

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの
基盤高度化に関する研究

平成15～17年度 総合研究報告書
平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 寺 尾 恵 治
独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

平成18年(2006)3月

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総合研究報告書（平成15～17年度）

医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの 基盤高度化に関する研究班

区分	氏名	所 属	職名
班長	寺尾 恵治	国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター	センター長
		医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	センター長
班員	向井 鏑三郎 平成15、16年度	国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター	室長
	藤本 浩二	社団法人・予防衛生協会	主席研究員
	吉田 高志	国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター	室長
		医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究リーダー
	明里 宏文	国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター	主任研
		医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究リーダー
	山海 直	国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター	主任研
		医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	主任研
	下澤 律浩	国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター	研究員
		医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究員
揚山 直英 平成17年度	医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究員	
小倉 淳郎 平成15、16年度	理化学研究所・バイオリソースセンター	室長	
数藤 由美子 平成17年度	日本赤十字社・中央血液研究所	研究員	
吉川 泰弘	東京大学農学生命科学研究科	教授	

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの
基盤高度化に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 寺尾 恵 治

独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

平成18(2006)年3月

目 次

I. 総括研究報告書（平成17年度）

医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの基盤高度化に関する研究

班長 寺尾 恵治・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15

II. 分担研究報告書

カニクイザル繁殖コロニーにおけるサルタイプDレトロウイルス（SRV/D）

感染様式に係わる研究 藤本 浩二（社団法人予防衛生協会・主席研究員）・・・・ 20

霊長類の細胞株リソース整備 明里 宏文（医薬基盤研究所・研究リーダー）・・・・ 26

発生工学的基盤技術の開発 山海 直（医薬基盤研究所・主任研究員）・・・・ 30

細胞レベルのリソース整備 ー発生工学的検討ー

下澤 律浩（医薬基盤研究所・研究員）・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

カニクイザルBACクローンの染色体マッピング

数藤 由美子（日本赤十字社 中央血液研究所）・・・・・・・・・・・・・・・・ 42

実験用カニクイザルの繁殖学的特性解析と老齢ザルを用いての閉経後骨粗鬆症

モデルの確立

吉田 高志（医薬基盤研究所・研究リーダー）・・・・・・・・・・・・・・・・ 46

アストログリア細胞におけるA β 反応性BDNF発現上昇並びにシナプス変性の回復

吉川 泰弘（東京大学大学院農学生命科学・教授）・・・・・・・・・・・・・・・・ 50

画像データベースを用いた基盤技術開発～カニクイザルにおける循環器疾患

モデル研究への応用～

揚山 直英（医薬基盤研究所・研究員）・・・・・・・・・・・・・・・・ 54

III. 研究成果の刊行物・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの 基盤高度化に関する研究

主任研究者 寺尾恵治 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター長

研究要旨

次世代の医科学研究に資する実験用霊長類リソースを個体レベルから遺伝子レベルまで総合的に整備、維持、供給するシステムを構築することを目的として、効率的に研究を行い今年度以下の結果を得た。

- 1) 個体レベルのリソース整備では、主として SRV/D の感染疫学を実施した。SRV/D 感染（抗体陰性/ウイルス陽性）が確認された離乳仔 5 頭では 1 歳齢時においても全てウイルス陽性を維持し、内 1 頭は抗体が陽転した。離乳時抗体陽性であった 3 頭は 1 歳齢で 3 頭ともウイルス陰性となった。2 歳齢～9 歳齢でウイルス陽性のカニクイザル 11 頭は全て半年後もウイルス陽性であり、内 2 頭は抗体が陰転、2 頭は陽転した。
- 2) 胚、配偶子レベルのリソース整備では、精子の凍結保存法を確立するとともに、胚の体外操作に必須の過排卵処置、卵回収、体外受精、受精卵培養の条件検討を行い、ホルモン処理の指摘条件を確立した。
- 3) 細胞レベルのリソース整備では、Herpesvirus saimiri を用いた不死化技術を応用して、医科学研究に汎用されている多様な霊長類由来不死化細胞株ライブラリーの構築に成功した。また新たに霊長類研究のためのリソース拡充を目的として、これまで解析が困難であった新世界ザル CD 抗原を検出するシステム作成を試み、21 種類の主要なリンパ球 CD マーカーが初めて定量的に検出可能となった。
- 4) 遺伝子レベルのリソース整備では、新たに BAC クローン 306 個の両末端塩基配列と 45 個の片側末端塩基配列を決定し、公開ゲノムデータベースを用いてヒト、チンパンジー、アカゲザルのゲノムとの対応づけ（マッピング）をおこない、存在する遺伝子やマイクロサテライト・マーカーを予測した。さらに、カニクイザルのマイクロサテライト・マーカーの整備を進め、66 個のマーカーを得た。
- 5) 疾患モデル・基盤技術開発では、サル類における MRI、超音波検査、X 線検査などによる画像診断技術を確立し、画像データベースの構築を進め、サル類の研究基盤技術整備を行った心室中隔欠損症、右室二腔症、弁膜症などの心疾患モデルの抽出にも一部成功した。痴呆症モデルに関しては、アストログリア細胞（AG）による対 A β 反応が、神経細胞の障害に先立って生じていることを明らかにした。また、AG の持つ免疫反応以外の生理的機能、特に神経栄養因子放出機能に注目して、A β による影響を検索した。

分担研究者

藤本 浩二

予防衛生協会・主席研究員

吉田 高志

医薬基盤研究所

霊長類センター・研究リーダー

山海 直

医薬基盤研究所

霊長類センター・主任研究員

下澤 律浩

医薬基盤研究所

霊長類センター・研究員

明里 宏文

医薬基盤研究所

霊長類センター・研究リーダー

数藤 由美子

日赤中央血液研究所・研究員

揚山 直英

医薬基盤研究所・研究員

吉川 泰弘

東京大学農学生命科学研究科・教授

研究協力者

木村 展之

医薬基盤研究所・研究員

土田 順子

医薬基盤研究所・協力研究員

岡田 浩典

医薬基盤研究所・協力研究員

菊池 俊彦

医薬基盤研究所・協力研究員

羽鳥 真功

医薬基盤研究所・協力研究員

A. 研究目的

21世紀の重要な厚生労働科学研究として、脳・神経科学、長寿科学、新興再興感染症制圧、遺伝子治療、再生医療、ゲノム創薬などが注目されているが、これらの先端技術の開発研究および有用性・安全性評価では優れた動物モデルの開発が不可欠である。なかでも、サル類は解剖、生理、代謝、免疫などのシステムがヒトと類似していることから、最も有用なモデル動物とみなされている。一方、分子生物学の進展により複雑な生体反応を細胞レベル、タンパクレベ

ル、遺伝子レベルで解析することが可能になりつつある。特にポストゲノムプロジェクトとされる研究領域では、これら分子レベルの情報を基にした新しいアプローチが必要であるが、サル類では分子レベルでの解析基盤技術並びにリソースの整備が遅れている。本研究では、21世紀の医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの基盤高度化を目的として、個体レベル、細胞レベル、遺伝子レベルでの汎用性の高いリソースの整備と質的向上を目的とする。

B. 研究方法

主として独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで維持されている繁殖育成群のカニクイザルを用いて実験を行った。一部の実験については、京都大学霊長類研究所で維持されている霊長類からの抹消血を用いた。また、痴呆症モデル開発などではマウスを用いた基盤技術開発をおこなった。画像診断技術の開発は、筑波霊長類センターで定期的実施している定期健康診断時に集中的に行った。

上記実験のうち個体レベルでの動物実験および個体からの材料採取については、独立行政法人医薬基盤研究所・動物実験委員会により審査・承認された後実施した。また、動物の取り扱いにあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。実験の具体的方法については分担研究者の報告書に詳述する。

C. 研究結果および考察

本年度は一期3年の最終年度であり、研究成果については分担研究報告書に詳述されていることから、本項では当初の目的にそった成果の評価と今後の課題について記載する。

1) 個体レベルのリソース整備：

微生物学的に清浄な実験用カニクイザルの供給を目的とした品質管理技術とSPFコロニーの確立を第一の目的とした。ヒトに危険なHBVとサル集団に危険なSVVについては繁殖育成コロニーからの排除に成功していることから、実験ストレスにより顕在化するSRV/Dの摘発排除を目的として

高感度検出技術を開発し、抗体/ウイルス陰性個体を隔離することにより、100頭規模のSRV/D陰性パイロットコロニーの整備を終了した。SRV/D陰性ザル確保手段として人工保育ザルに着目した結果、EBVおよびCMVについても陰性のコロニー(Super SPF)が整備出来る可能性を示唆した。一方、SRVの疫学調査の結果、胎内での垂直感染が疑われる事例を見だし、これらの大半がウイルス陽性/抗体陰性の状態を維持していることから、SRV/Dにより発症する免疫不全症や白血病等のモデルとしての有用性が期待されている。

2) 胚、配偶子、細胞レベルでのリソース整備：

マウス等では胚、配偶子レベルでの遺伝子保存が可能となっていることから、実験用霊長類の配偶子の凍結保存法を検討し、精子についてはほぼ凍結技術を確立した。卵子および胚レベルの遺伝子保存に関しては、配偶子の体外操作技術の開発が前提となる。卵の採取法、体外操作法、培養法などの基盤技術は、次世代の個体レベルのリソースとして遺伝子改変ザルを作出するために必須の技術であり、今後も継続して技術開発に取り組む必要がある。

細胞レベルのリソース開発ではHVS(Herpesvirus saimiri)を用いた独自の霊長類機能細胞の不活化技術を応用して、医科学研究に汎用されているチンパンジーからオマキザルまで10種の霊長類由来不活化細胞株ライブラリーの構築に成功した。またこれまで解析技術のなかった新世界ザルのCD抗原の検出法を確立し、21種類の主要リンパ球CDマーカーの定量的検出を可能とした。今後は確立した不活化細胞株と技術を細胞バンク等を通じて公開する予定である。

3) 遺伝子レベルでのリソース整備：

ヒトゲノムの成果に基づいた新規の診断、治療技術やゲノム創薬研究では、サル類を用いた有効性と安全性の評価が必須となる。SNPsなどの戦略では、ヒトと同様に多様な遺伝子構成を示す集団についてその有効性を実証する必要がある。これら新しい医科学研究領域における実験用霊長類の有用

性を保証するためには、集団の遺伝的解析に必須のリソースを整備しておく必要がある。この観点から、主として霊長類センターのカニクイザル集団を対象として、遺伝子レベル研究リソースの集中整備をおこなった。その結果、脳の主要部位、肝臓、精巣の完全長cDNAライブラリー(他の研究班と共同開発)、500家系、延べ1500頭の血縁関係の明らかなカニクイザルの核DNAライブラリー、バクテリアル人口染色体(BAC)ライブラリーを整備するとともに、遺伝子マッピングに必須の染色体地図とマイクロサテライトマーカーの開発に着手している。これら研究用霊長類の遺伝子レベルでのリソースが整備されれば、家系の明らかなカニクイザル集団を対象とした遺伝性疾患の原因遺伝子同定やSNPsなどの有効性評価が可能となる。

4) 基盤技術開発：

痴呆症、循環器疾患、骨粗鬆症はいずれも今後10年間に患者数が急増することが危惧されている重要な疾患である。これら厚生労働行政上重要な疾患の治療法、予防法の開発では優れた動物モデルの開発が不可欠であることから、本研究班では基盤的霊長類リソース開発と平行して、疾患モデルを中心とした戦略的リソース開発を行ってきた。その結果、以下の成果を得ている。

1) カニクイザル脳組織では加齢とともにRetrograde(負方向の軸索輸送)機能が低下していることから、AD関連タンパク群のシナプス蓄積が軸索輸送機能低下により生じる可能性を考え、細胞レベルでのin vitro実験で証明した。マウスでの仮説実証を経て霊長類のモデル開発に挑戦する。

2) サル類の心機能検査に関わる画像診断技術を確立し、評価基準を樹立した。カニクイザルの繁殖育成個体を対象として大規模スクリーニングに着手し、いくつかの先天性心疾患を抽出した。

3) サル類を対象として全身の骨量を非侵襲的に測定する技術を開発し、閉経後の高齢雌ザルで骨量が減少することを確認している。

これらサル類の疾患モデルが確立されれば、新規な治療・予防戦略や医薬品の有効

性、安全性を霊長類を用いて検証することが可能となり、国際競争力のある治療法のトランスレーショナルに貢献することが可能となる。

E. 結論（成果の活用、提供）

個体レベルでのリソース整備に係わる研究は、実験用霊長類の微生物学的清浄度の向上をめざしたものであり、本研究班の成果は今後サル類を用いた遺伝子治療、再生医療、移植医療などの前臨床試験において必須となるレトロウイルスフリーの SPF ザルの供給体制の確立に向けて有用な知見である。

胚、配偶子、細胞レベルのリソース整備における発生工学技術の開発は、遺伝子改変ザル作出に関わる基盤的技術の開発だけでなく、胚・配偶子レベルでの遺伝子保存も可能とする。効率的にサル類の成熟卵を回収する技術が確立されたことにより、今後はこれらの技術を融合して、効率的で安定した体外受精、体外培養技術の確立をめざす。

各種サル類由来細胞株の樹立は細胞バンクとして、供給体制の整備をすすめてゆく。

遺伝子レベルの基盤的リソースとして、cDNA、gDNA、BAC、マイクロサテライトマーカーについてはほぼ整備を完了した。今後は家系解析に必須の核 DNA の整備を引き続き継続し、家系性疾患ザルの遺伝解析や SNIPs を利用した疾患感受性の解析などのモデル研究に活用する。

汎用性の高い基盤技術として、心疾患解析用画像診断技術と肥満度測定技術の開発と痴呆症モデル開発戦略の検証をおこなった。これらと平行して記憶などの高次脳機能および行動異常を評価するシステムも開発中であり、付加価値の高い疾患モデルを総合的に開発してゆく必要がある。

F. 研究発表

Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K. Safe And Efficient Collection of Cytokine-Mobilized Peripheral Blood Cells From

Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) with Human Newborn-Equivalent Body Weights. *Exp Anim.* 2005 Oct;54(5):421-428.

Umeda S, Suzuki MT, Okamoto H, Ono F, Mizota A, Terao K, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Iwata T. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J.* 2005 Aug 12; [Epub ahead of print]

Takano JI, Narita T, Tachibana H, Shimizu T, Komatsubara H, Terao K, Fujimoto K. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in cynomolgus monkeys imported into Japan for research. *Parasitol Res.* 2005 Jul 1; [Epub ahead of print]

Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. *Immunogenetics.* 2005 May;57(3-4):189-197.

Hara M, Kikuchi T, Ono F, Takano J, Ageyama N, Fujimoto K, Terao K, Baba T, Mukai R. Survey of Captive Cynomolgus Macaque Colonies for SRV/D Infection Using Polymerase Chain Reaction Assays. *Comp Med.* 2005 Apr;55(2):145-149.

Kimura N, Yanagisawa K, Terao K, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Age-related changes of intracellular Abeta in cynomolgus monkey brains. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005 Apr;31(2):170-80.

Okada H, Ito M, Hirose Y, Uda A, Terao K, Yoshida T, Sankai T. Buffalo Rat Liver Cells Produce Factors that Support Preimplantation Development of Mouse Embryos Cultured In Vitro. *Comp Med.* 2005 Feb;55(1):61-66.

Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono Y. Related Articles, Links

Repair of Infarcted Myocardium Mediated by Transplanted Bone Marrow-Derived CD34+ Stem Cells in a Nonhuman Primate Model. *Stem Cells.* 2005;23(3):355-64.

Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. *Immunogenetics.* 2005 Mar 3; [Epub ahead of print]

Umeda S, Ayyagari R, Allikmets R, Suzuki MT, Karoukis AJ, Ambasadhan R, Zernant J, Okamoto H, Ono F, Terao K, Mizota A, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Iwata T. Early-Onset Macular Degeneration with Drusen in a Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Pedigree: Exclusion of 13 Candidate Genes and Loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Feb;46(2):683-91.

Koie H, Ageyama N, Ono F, Kanayama k, Sakai T, Sankai T. Echocardiographic diagnosis of

muscular ventricular septal defect in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Contemporary Topics In laboratory animal science. 2005; 44: 26-28.

Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K. Prevention of Immune Responses to Human Erythropoietin in Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). Journal of Veterinary Medical Science. In Press.

Kimura N, Yanagisawa K, Terao K, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Age-related changes of intracellular Abeta in cynomolgus monkey brains." Neuropathol Appl Neurobiol. 2005;1(2):170-80.

Nonaka K, Fukuda S, Aoki K, Yoshida T, Iida H, Ohya K, Regional distribution in cortical bone mineral density measured by pQCT can predict the alteration in mineral property at the tibial diaphysis of cynomolgus monkey. Bone 2006;38:265-272.

Yoshida T. Using long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) as a model for osteoporosis study. Nat. Hist. J. Chulalongkorn Univ. 2005, Suppl. 1:79-83.

Okada, H., Hirose, H., Periyasamy, M., Ito, M., Sankai, T. Characterization of an immortalized oviduct cell established from the cynomolgus (*Macaca fascicularis*). J. Med. Primatol. 34, 67-72, 2005

Okada, H., Ito, M., Hirose, Y., Yoshida, T., Sankai, T. Buffalo rat liver cells produce proteins that support the preimplantation development of mouse embryos cultured *in vitro*. Comp. Med., 55, 61-66, 2005

Kwon, J., Mochida, K., Wang, W. L., Sekiguchi, S., Sankai, T., Aoki, S., Ogura, A., Yoshikawa, Y., Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. Biol. Reprod., 73, 29-35, 2005

Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Okada, H., Takeiri, S., Shimozawa, N., Nagashima, H., Sankai, T., Ogura, A. development of rabbit embryos following microinsemination with sperm and spermatids. Mol. Reprod. Dev., 72, 411-417, 2005

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

H. 健康危険情報

特になし

カニクイザル繁殖コロニーにおけるサルタイプD レトロウイルス（SRV/D）感染様式に係わる研究

分担研究者

藤本浩二（社団法人予防衛生協会主席研究員）

協力研究者

成田豊子（社団法人予防衛生協会試験検査室長）

羽成光二（社団法人予防衛生協会繁殖育成室長）

高野淳一郎（社団法人予防衛生協会繁殖育成室研究員）

研究要旨

① 昨年度の研究でサルタイプDレトロウイルス（SRV/D）感染が確認された離乳仔（6ヶ月齢時）10頭について、半年後（1歳齢時）のSRV/D抗体とRT-PCRによる血液中ウイルス遺伝子検査を実施し、感染状態の変化を観察した。離乳時に抗体陰性/ウイルス（遺伝子）陽性であった5頭は1歳齢時においても全てウイルス陽性を維持し、内1頭は抗体が陽転した。離乳時抗体陽性であった3頭は1歳齢で3頭ともウイルス陰性となった。

② ウイルス（遺伝子）陽性の2歳齢～9歳齢のカニクイザル11頭について、半年後の、抗体およびウイルス陽性状態を調査した。その結果、ウイルス陽性であった11頭は全て半年後もウイルス陽性状態を維持していた。この内2頭は抗体が陰転、2頭は陽転した。

③ SRV/DのSPF化に当たっては0日齢からの人工哺育が有効でなかったことから、SRV/Dの垂直感染を予測して、分娩時ウイルス（遺伝子）陽性の母ザルから生まれた0日齢仔について、ウイルスゲノム検査を実施した。その結果、5頭のウイルス陽性の母ザルから産まれた新生仔の内2頭がウイルス陽性であることが確認された。2頭の内1頭は0日齢から人工哺育し、1頭は母ザル哺育としたが、いずれも、1ヶ月齢、2ヶ月齢においてもウイルス陽性が確認された。一方、残りの3頭では、出生時、1ヶ月齢、2ヶ月齢時いずれの時期においてもウイルスは検出されず、母子感染は確認されなかった。

A. 研究目的

筑波霊長類医科学研究センター（以下、霊長類センター）の全カニクイザル繁殖コロニーにおいては、すでに、Bウイルス、サル水痘ウイルス、SIV、STLV、麻疹ウイルスについて SPF 化を完了し、定期検査により SPF 状態をモニタリングしている。一方、最近の臓器移植研究、AIDS 研究等重度免疫抑制処置を伴う実験においては、潜伏あるいは持続感染性を持つその他のレトロウイルスやヘルペスウイルスについて SPF サルが求められている。また、その他の実験においても、これら潜伏・持続感染ウイルスに対する宿主免疫反応が、試験結果に影響を与える場合がある。

昨年度までの当該研究事業において、0 日齢からの人工哺育と 1 段ケージ個別飼育方式を組み合わせることにより、帝王切開をせずに EBV、SFV、CMV に未感染なサルが得られることが明らかとなった。一方、SRV/D については、生後 0 日齢からの人工哺育仔ザルと母ザル哺育仔ザル間の感染率に差が認められず、経胎盤もしくは経産道による母子感染が予測された。

本年度の研究では、SRV/D-SPF コロニーの作成の基礎情報として、SRV/D の潜伏・持続感染様式と母子感染の有無について調査した。

B. 研究方法

(1) 動物

昨年度の研究で SRV/D 陽性と判定した、離乳仔 10 頭と 2 歳～9 歳齢の 11 頭について抗体検査とウイ

ルスゲノムの検出を行った。また、霊長類センターカニクイザル繁殖コロニーで、自然分娩もしくは帝王切開した 46 組の母仔について、出産後 24 時間以内の血液からウイルスゲノムの検出を行った。

(2) 材料

ウイルス抗体検査と RT-PCR のための RNA 抽出には血清を用いた。また、帝王切開の場合は仔ザルの血清ではなく、臍帯血清を仔ザル由来材料とした。

(3) 方法

抗体検査は霊長類医センターで分離した SRV/D 株の精製ウイルス抗原を用い、WB 法で行った。ウイルスゲノムの検出には *env* 領域を増幅するプライマーセットを用いて Nested RT-PCR を行った。

C. 研究結果

(1) SRV/D 感染離乳仔ザルの半年後の感染状態（表 1）

前年度の当該研究において SRV/D 感染が確認された離乳ザル 10 頭について、半年を経て SRV/D 抗体検査と RT-PCR によるウイルスゲノムの検出を行った。その結果、離乳時に抗体陰性/ウイルス（遺伝子）陽性であった 5 頭は 1 歳齢時においても全てウイルス陽性を維持し、内 1 頭は抗体が陽転した。離乳時抗体、ウイルスともに陽性であった 1 頭は一歳齢でウイルス陰性となった。離乳時ウイルス陰性であった 4 頭は一歳齢でいずれもウイルス陰性であった。

(2) 若齢および成獣サルウイルス陽性状態の変化 (表 2)

ウイルス (遺伝子) 陽性の 2 歳齢～9 歳齢のカニクイザル 11 頭について、半年後の、抗体およびウイルス陽性状態を調査した。その結果、ウイルス陽性であった 11 頭は全て半年後もウイルス陽性状態を維持していた。この内 1 頭は抗体が陰転、2 頭は陽転していた。

(3) 出産時ウイルス陽性の母ザルから生まれた仔ザルの SRV/D の感染調査 (表 3)

5 頭のウイルス陽性の母ザルから産まれた新生仔の内 2 頭がウイルス陽性であることが確認された。2 頭の内 1 頭は 0 日齢から人工哺育し、1 頭は母ザル哺育としたが、いずれも、1 ヶ月齢、2 ヶ月齢においてもウイルス陽性が確認された。一方、残りの 3 頭では、出生時、1 ヶ月齢、2 ヶ月齢時いずれの時期においてもウイルスは検出されず、母子感染は確認されなかった。3 頭の母ザルの内出生 1 ヶ月後、2 ヶ月後においても調査できた母ザル 2 頭では、1 頭が出産 1 ヶ月後でもウイルス遺伝子は検出されたが、2 ヶ月後には検出されなかった。残りの 1 頭については 1 ヶ月後、2 ヶ月後ともにウイルス遺伝子は検出されなかった。

D. 考 察

昨年度までの当該研究事業で霊長類センターのカニクザル繁殖コロニーでは、全年齢群を通して、20%～40%の SRV/D (遺伝子) 陽性のサルが存在することが明らかと

なり、これらのサルがウイルス陽性を持続して、コロニー内の感染源となっているか問題であった。ウイルス陽性ザルについては、同一個体で感染が持続しているか、また、抗体レベルの変動等によりウイルスの活性化が occuri、ウイルス陽性個体に変化しているのが注目された。今年度の研究では、これらの点を明らかにするために、同一個体について SRV/D の感染状況を抗体とウイルス遺伝子の検査を実施した。

離乳時 (6 ヶ月齢) から半年間の変化を見ると (表 1)、離乳時にウイルス陽性であった仔ザルは 1 歳齢時においてもウイルス陽性であり、その後もウイルス血症状態を維持することが示唆された。抗体陽性/ウイルス陽性の 1 頭が抗体陽性/ウイルス陰性となったが、この個体は母ザルに哺育されていたため、離乳の少し前に母ザルから感染し、抗体産生が起こり、ウイルス血症が抑えられたことが予想される。

SRV/D の感染状況を、若年から成獣についての SRV/D の感染状況調査では (表 2)、半年間では、抗体陰転が 2 頭と陽転が 2 頭確認されたが、ウイルス血症状態に変化は無かった。離乳ザル、若年ザル、成獣ザルの結果から、ウイルス血症状態を維持している成獣は、少なくとも離乳時からウイルス血症となっている可能性が高い。しかし、表 1 の離乳ザルの結果で、ウイルスが検出されなくなった 1 頭が確認されたことから、ウイルス血症状態を維持する成獣は、出生

後まもなくウイルスに感染した可能性が高い。

さらにこれらウイルス血症状態の母ザルから仔ザルへの感染経路を明らかにするため、ウイルス陽性ザルから仔ザルへの感染の有無を調査した(表3)。その結果、ウイルス陽性の母ザルからの仔ザルが全て出生時にSRV/Dに感染していることは無く、0日齢の検査で未感染ザルを確保できることが明らかとなった。しかし、0日齢の仔ザルからの材料の採取には、大きなリスクや仔ザルへのストレスが予想される。今回の研究では例数が少なく不確定ではあるが、仔ザルへの垂直感染が認められた2頭の内1頭の母ザルでは出産1ヶ月後、2ヶ月後にもウイルス血症を維持していた。一方で、垂直感染の認められなかった3頭の内2頭の母ザルは、出産2ヶ月後にはウイルス血症が認められなくなっている。このことから垂直感染の認められなかった母ザルについては、出産に係わるストレス等によるSRV/Dの活性化により、一時的にウイルス血症となった可能性がある。妊娠中の母ザルで血中ウイルス量も含めたウイルス血症の状態を把握できれば、出産前に生まれてくる仔ザルのスクリーニングが可能になると予想される。

E. 結論

離乳時にSRV/Dウイルス遺伝子陽性のサルは終生陽性を維持し、コロニー内での感染源となっていることが示唆された。母仔感染については、出産時にウイルス遺伝

子陽性である母ザルから生まれた仔ザルが、全てSRV/Dに感染することは無く、0日齢の仔ザルの検査で陰性ザルを確保できることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Takano J, Narita T, Tachibana H, Shimizu T, Komatsubara H, Terao K, Fujimoto K: *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in cynomolgus monkeys imported into Japan for research. *Parasitol Res*, 2005, 97: 255-257

Hara M, Kikuchi T, Ono F, Takano J, Ageyama N, Fujimoto K, Terao K, Baba T, Mukai R.: Survey of captive cynomolgus macaque colonies for SRV/D infection using polymerase chain reaction assays. *Comp Med*, 2005, 55: 145-149.

Hara M, Sata T, Kikuchi T, Nakajima N, Uda A, Fujimoto K, Baba T, Mukai R.: Isolation and characterization of a new simian retrovirus type D subtype from monkeys at the Tsukuba Primate Center, Japan. *Microbes Infect.* 2005, 7: 126-131

学会発表

羽成光二、新井千尋、高野淳一朗、成田豊子、藤本浩二、寺尾恵治：カニクイザルの人工哺育 第21回

日本霊長類学会、2005年、7月、岡山

一の作出 第52回実験動物学会、2005年、5月、東京

高野淳一朗、成田豊子、羽成光二、藤本浩二、寺尾恵治：人工哺育を利用した SPF カニクイザルコロニ

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. SRV/D 感染離乳仔ザルの半年後の感染状態

	6ヶ月齢		1歳齢	
	WB	PCR	WB	PCR
1310401014	+	-	+	-
1320401004	-	+	+	+
1420403006	-	+	-	+
1320403039	-	+	-	+
1310401010	-	+	-	+
1310401019	+	-	+	-
1310401013	-	+	-	+
1320404052	-	-	-	-
1320404054	-	-	-	-
1320404056	+	+	+	-

表 2. 若齢および成獣サルのウイルス遺伝子陽性状態の変化

	2004年12月調査時		2005年6月調査時	
	WB	PCR	WB	PCR
1319803005	+	+	+	+
1329812064	+	+	-	+
1229906027	+	+	+	+
1219908039	-	+	-	+
1229908046	+	+	-	+
1210008049	+	+	+	+
1310303027	-	+	+	+
1210304022	-	+	+	+
1229308113	-	+	-	+
1219504050	+	+	+	+
1219901004	-	+	-	+

表 3. 出産時ウイルス遺伝子陽性の母ザルから生まれた仔ザルの SRV/D 感染調査

母ザル番号	出産時		生後1ヶ月		生後2ヶ月		備考
	母	仔	母	仔	母	仔	
1319711082	+	+	+	+	+	+	母ザル哺育
1319710076	+	+	nd*	+	nd*	+	人工哺育
1219307101	+	-	nd*	-	nd*	-	帝王/人工哺育
1118904029	+	-	+	-	-	-	母ザル哺育
1218903014	+	-	-	-	-	-	母ザル哺育

*nd:データ無し

霊長類の細胞株リソース整備

分担研究者

明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

研究協力者

李永仲、飯島沙幸

研究要旨

本研究は、Herpesvirus saimiri を用いた独自の霊長類機能細胞の不活化技術を応用して、医学研究に汎用されている多様な霊長類由来不活化細胞株ライブラリーの構築に成功した。また新たに霊長類研究のためのリソース拡充を目的として、これまで解析が困難であった新世紀サル CD 抗原を検出するシステム作成を試み、21種類の主要なリンパ球 CD マーカーが初めて定量的に検出可能となった。本成果はサル類を用いたトランスレーショナルリサーチを行う上で非常に有用であると考えられた。

A. 研究目的

今日、サル類を用いた様々なトランスレーショナル・リサーチの重要性が高まっているが、動物倫理の観点から可能な限りサル個体による動物実験を避ける、もしくはなるべく配慮しなければならない。他方、研究目的やその用途に応じて最適なサル類は異なることから、本来は研究ごとにサル類の最適化が必要となる。しかし、こういった最適化のための評価研究に必要とされる各種サル培養細胞株ライブラリーは現在のところ国内外を問わず作成されておらず、Vero, Cosなど、ごく一部のサル種の細胞株が散見されるのが実情である。

こうした状況を踏まえて、本研究ではこれまでに、種々の霊長類由来細胞を画一的方法で不活化する方法を確立し、網羅的霊長類細胞株ライブラリーの構築へ向けてさまざまなサル種の細胞株樹立を試みてきた。そこで今年度は、これらの成果を総括し霊長類細胞株ライブラリーを完成させる事を目的と

した。さらに昨年度に引き続き、新世界ザルリンパ球CD抗原を検出するシステム作成も試みた。

B. 研究方法

多様な霊長類培養細胞株を網羅的に樹立するため、比較的入手可能である血液細胞に着目した。霊長類末梢血は、当センター及び京都大学霊長類研究所で現在保有している、広範なサル類より採取した。末梢血リンパ球の不活化には Herpesvirus saimiri (HVS) を用いた。新世界ザル CD 抗原の検出には、タマリン HVS 不活化細胞株を抗原として用いた。抗ヒト CD 抗体としては主要なリンパ球分化抗原を認識する蛍光標識抗体を使用した。これらの組み合わせによる細胞への抗体処理後、蛍光強度を Flowcytometry にて解析した。

C. 研究結果

1) 昨年度に樹立した細胞株については、一定期間（1-2ヶ月程度）経代した後細胞変性等異常が認められない事を確認した上で液体窒素への複数バイアル保存を実施した。

また今年度新たにシロクチタマリン、ヨザル、フサオマキザル由来細胞株樹立に成功した。本研究にて最終的に樹立された細胞株は、10種霊長類、31細胞株となった。

2) 新世界ザル CD 抗原を検出可能な抗体の同定

今年度は、昨年度に引き続きこれまで困難であった新世界ザルの免疫学的解析を可能とすることを目的として、新世界ザルリンパ球 CD 抗原を検出可能な抗ヒト CD 抗体のスクリーニングを行った。入手が可能であった約200種類の抗体について、不死化タマリン T 細胞を用いて交差反応性を検討した結果、最終的に 21 種の CD 抗原 (CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8 α , CD11a, CD16, CD20, CD25, CD29, CD30, CD38, CD44, CD47, CD49c, CD49d, CD80, CD81, CD95, MHC-II DR) が検出可能であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究では、自ら確立した HVS 不死化法に基づく霊長類機能細胞の不死化技術を応用して、カニクイザルを初めとする多様な霊長類由来不死化 T 細胞株の樹立に成功した。昨年度までに樹立した分と合わせて、10種霊長類、31細胞株が樹立され、医学研究に使用されているほぼ全ての霊長類をカバーする霊長類ライブラリーを構築することが出来た。本研究は、動物倫理上の問題に取り組む上で貴重なリソースであるものと考えられる。事実、まだ未発表の細胞株を含めすでに国内研究者より多数の

問い合わせが来ている状況は、その霊長類リソースとしての高い希少性・有用性を現すものである。

昨年度および今年度は、上記細胞株を利用して、これまで解析が困難であった新世界ザル CD 抗原を検出するシステム作成も試みた。その結果、最終的に 21 種の CD 抗原が初めて定量的に検出可能となった。本成果はここ数年で急激に実験動物としてのニーズの高まっている新世界ザルについて、その付加価値を高める事に繋がると共に、新世界ザルを用いたさまざまな疾患モデルにおける免疫学的解析を行なう上で非常に有意義であると考えられた。

なお本研究により樹立された各種霊長類細胞株は（独）医薬基盤研究所・細胞バンクに一括して寄託する予定となっており、研究者が利用可能な「ライブラリー」として公開される運びである。

E. 結論

本研究により、自ら確立した霊長類機能細胞の不死化技術を応用して、医学研究に汎用されている多様な霊長類由来不死化細胞株の樹立に成功した。また新たに霊長類研究のためのリソース拡充を目的として、これまで解析が困難であった新世界ザル CD 抗原を検出するシステム作成を試み、21種類の主要なリンパ球 CD マーカーが初めて定量的に検出可能となった。本成果はサル類を用いたトランスレーショナルリサーチを行なう上で非常に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

霊長類医科学研究基盤高度化のための研究資源開発：霊長類細胞株ライブラリーの構築

遺伝子治療や臓器移植等トランスレーショナル・リサーチ及び新興再興感染症の治療薬・ワクチン開発研究等におけるサル類を用いた動物実験

- ① in vitroにおけるfeasibility study
- ② 研究目的に応じたサル種の最適化

無駄な動物実験の回避
経済的・時間的な効率化

一般にavailableなサル由来細胞は？

Vero, Cos, CV-1

全てアフリカミドリザル由来

- Herpesvirus saimiriによる末梢血Tリンパ球の不活化
- ・血液細胞は非侵襲的な入手が可能
 - ・同一方法で多様な霊長類の同一細胞種を不活化可能
 - ・不活化後も通常と比較して生理的機能を良く維持

一元的な霊長類細胞株ライブラリー構築

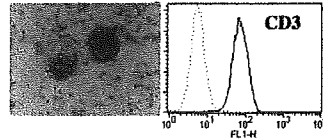
樹立細胞株一覧 (10種31株)

Ape & Old World Monkey

チンパンジー	2
カニクイザル	6
アカゲザル	6
ブタオザル	3

New World Monkey

コモンマーモセット	3
アカテタマリン	1
シロクチタマリン	4
コモンリスザル	1
ヨザル	2
フサオマキザル	3



主な表面発現
CDマーカー

- CD3+
- CD25+
- CD28+
- CD69+
- ...

医学生物学研究に汎用性の高い実験用霊長類

の細胞株ライブラリー樹立に成功した

発生工学的基盤技術の開発

分担研究者

山海 直 医薬基盤研究所 主任研究員

研究協力者

下沢律浩（医薬基盤研究所 研究員）

岡田浩典（医薬基盤研究所 協力研究員）

羽鳥真功（医薬基盤研究所 協力研究員）

研究要旨

医科学研究用リソースとしてのカニクイザルを開発、維持し、さらに新規な研究に対応していくためには発生工学的基盤技術は必須である。これまでに様々な試みを行ってきたが発生工学的研究を行ううえで、もっとも基本である良質な卵を採取することの重要性を感じている。実験に使用する卵の質はその実験の結果に大きく影響するということである。そこで本年度は卵胞発育誘起について二つの検討を行った。まず、カニクイザルとアフリカミドリザルを用いて卵胞発育誘起の結果を比較したところ、カニクイザルではeCGよりもFSHをもちいることで良好な成果が得られることが明らかになった。一方、アフリカミドリザルではeCGを用いたほうが良いという結果を得た。このことはサル種によってホルモンに対する卵巣の反応性が異なることを示している。また、使用する個体の年齢と卵胞発育誘起の結果の関係を解析したところ、明らかに若い個体を用いた方が良好な結果を得ることができた。繁殖年齢である10歳前後の個体よりも未性成熟個体、あるいは性成熟直後と考えられる3、4歳の方が卵胞発育の状況は良好であった。その要因は明らかではないが、内因性のホルモンとの関連が強いことが予測される。

A. 研究目的

次世代の医科学研究用サル類のリソースとしてカニクイザルの個体レベルおよび細胞レベルでの質的向上とリソース整備を目的として発生工学的基盤技術を確立する。種々の形態でのリソースが研究対象となるがそれらのもっとも基本となる形が個体レベルでのリソー

スである。発生工学的研究において産児を得るためには、卵を用いた操作の後胚移植により操作した卵を母体に戻さなければならない。また、その卵操作を伴う研究としてトランスジェニック、クローン個体作出などを目指した研究がリソースという意味で期待される場所である。そこでもっとも基本であり、も