

つとも重要な課題として実験材料となる良質な卵を確保するか、というところにいきついた。カニクイザルから少しでも多くの卵を同時に採取するために卵胞発育誘起を行っているが、そのとき使用するホルモン製剤によって成績が異なってくる。また、サル種によっても外因性のホルモンに対する卵巣の反応性が異なってくる。そのみならず個体間でその反応性が異なってくる。本プロジェクトにおける発生工学的研究を遂行する上で、如何にして良質な卵を多数確保することは大きな課題である。研究材料である卵の質はその後の研究成果に大きく影響する。ここでは如何にして良質な卵を確保するかというテーマにしぼり、カニクイザルの卵胞発育誘起に関する研究成果を報告する。

1) カニクイザルとアフリカミドリザルにおける卵胞発育誘起、ここでは属が異なる2種のサルに適したホルモン製剤を、またその投与方法を見出すことを目的とした。2) 年齢と卵胞発育誘起成績の解析では、少しでも個体差が少なく安定した成果を得るための方法を見出すことを目的とし、年齢ごとの成績を比較した。

B. 研究方法

1) カニクイザルとアフリカミドリザルにおける卵胞発育誘起

動物には当センターで飼育されているカニクイザルおよびアフリカミドリザルを用いた。卵胞発育誘起の方法をFig. 1に示した。月経を確認した個体についてGnRH α を投与し、その後FSHあるいはeCGを連続投与した。これらのホルモンの最終投

与から36あるいは60時間後にhCGを投与した。その後、36から38時間目に卵を採取した。卵の採取は、個体を全身麻酔下で開腹し、発育した卵胞に針を刺して吸引して行った。採取した卵は直ちに培地にて洗浄し、発育ステージについて検索した。また、成熟した卵の細胞質内に精子を顕微注入し(ICSI)、その後の前核形成について観察した。前核形成を認めた卵を受精能を有している卵と判定した。

2) カニクイザルにおける年齢と卵胞発育誘起成績の解析

卵胞発育誘起にはFSHの連日投与の方法を用いた。その他のホルモン投与、卵採取は1)の実験と同様の方法で実施した。動物には3、4歳の個体と8から12歳の個体を用いた。なお、3、4歳の月経周期を認めていない未性成熟個体はGnRH α の投与は行っていない。

倫理面への配慮: 動物に対しては動物福祉上の配慮を十分に行い、研究内容およびその方法については独立行政法人医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査を経ている。また、本研究を実施した研究者はバイオハザード委員会および動物委員会が主催する講習会を受講した。

C. 研究結果

1) カニクイザルとアフリカミドリザルにおける卵胞発育誘起

卵胞発育誘起の結果をTable 1に示した。カニクイザルではFSHを連日投与したもの、3日毎に投与したものの採取卵数はそれぞれ30.6および20.8個であった。また、成熟卵

すなわちMII期の卵はそれぞれ12.3および10.0個であった。一方、eCGを2日おきに投与した個体では採取卵数18.1個、成熟卵数6.8個であった。

アフリカミドリザルではFSH投与の場合、採取卵数19.0個、成熟卵数6.8個であり、eCGを投与した場合、それぞれ18.0個と12.0個であった。

ICSIを行った結果をTable 2に示した。カニクイザルではFSHおよびeCGを用いて得られた卵の50.0および100%で前核形成を認めた。アフリカミドリザルのそれはそれぞれ58.6および77.8%であった。

2) カニクイザルにおける年齢と卵胞発育誘起成績の解析

本研究の結果をTable 3に示した。卵胞発育数、採取卵数の平均は、3、4歳の個体では81.0および52.2個であり、8から12歳の個体では62.3および37.2個であった。成熟卵数の平均はそれぞれ27.5および6.8個であった。いずれもきわめて大きな標準偏差の値となった。

D. 考察

1) カニクイザルとアフリカミドリザルにおける卵胞発育誘起

カニクイザルを用いた実験においてFSHの投与方法を検討した。FSHは半減期が短いことが知られており、通常、卵胞発育を誘起するためには1日2回、連日投与が必要と考えられている。当センターではFSHの溶媒にグリセリンを使用することで1日1回の投与が可能であることが確認されており、今回も溶媒にはグリセリンを使用している。そこで連日投与と3日毎の投与でそ

の成績を比較した。個体に投与される総FSHの量は同じである。この結果、採取される卵数は連日投与の方が多いことが確認されたが、実験に使用できる成熟卵の数はほとんど差がないことが明らかとなった。すなわち、グリセリンを溶媒に用いることで体内への吸収速度が遅くなり良好な成績が得られたものと考えられる。一方、eCGをもちいた場合、採取卵数、成熟卵数ともにFSHのそれよりも劣っていた。ところが、アフリカミドリザルでは採取卵数はeCG投与とFSH投与の場合で大きな差はなかったが成熟卵の数は明らかにeCG投与の方が優れていた。すなわち、卵胞発育を誘起するためにはカニクイザルではFSHを、またアフリカミドリザルではeCGを用いた方が良いことが明らかになり、このことはサル種により卵巣のホルモンに対する感受性が異なっていることを示している。

得られた成熟卵の受精能を調べるためにICSIを行い、すべての実験区の卵で前核形成を認めることができた。しかし、前核形成率はカニクイザル、アフリカミドリザルともにeCG投与により得られた卵の方が良好であった。

より多くの良質な卵を採取する方法の確立を目指しているが、サル種によって数と質のバランスを考えながらホルモン製剤を選択しなければならぬことが示唆された。

2) カニクイザルにおける年齢と卵胞発育誘起成績の解析

本実験では性成熟していない個体に対してGnRHaは投与していない。GnRHaは内因性のホルモン分泌を抑

えて性周期を停止することを目的としているため投与している。すなわち、未性成熟個体はサルの性周期を考慮することなく実験に使用できるという利点があることを意味している。

外部からのホルモンによる卵胞発育誘起は明らかに若い個体を使用した方が効率が良いことが今回の解析で明らかになった。しかし、標準偏差がきわめて大きいこと、すなわち個体差がかなり大きいことは残された課題である。

E. 結論

良質な卵を多く採取するための方法を検討した。カニクイザルではFSHを、アフリカミドリザルではeCGを卵胞発育誘起のために用いることが良いという結果を得た。また、若い個体を用いる方が良好な成績が得られた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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

3) 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

4) Koie, H., Ageyama, N., Ono, F., Kanayama, K., Sakai, T., Sankai, T. Echocardiographic diagnosis of muscular ventricular septal defect in a cynomolgus monkey. Contemporary topics, 44, 26-27, 2005

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

2. 学会発表 (含：シンポジウム)

- 1) 下澤律浩、石橋英俊、岡田浩典、羽鳥真功、吉田高志、山海直。カニクイザル卵巣から採取した未成熟卵子の体外成熟培養。第52回日本実験動物学会（東京）2005年5月
- 2) 羽鳥真功、岡田浩典、石橋英俊、下澤律浩、蝦澤隆、山海直。顕微鏡下細胞培養システムで培養した細胞の長期間デジタル連続撮影装置を用いた動画による解析。第52回日本実験動物学会（東京）2005年5月
- 3) 岡田浩典、羽鳥真功、石橋英俊、下澤律浩、山海直。アフリカミドリザル精子の凍結保存。第52回日本実験動物学会（東京）2005年5月

4) 山海 直. サル類を用いた医科学研究における動物福祉. シンポジウム:飼育現場での動物福祉への取り組み. オーガナイザー:池田卓也、猪股智夫. 第31回日本実験動物技術者協会関東支部総会(つくば) 2006年2月

4) 大藤浩美、羽成光二、小林秀範、山海 直、吉田高志. 交配の為の使用を兼ねたカニクイザル用個別ケージの作成. 第31回日本実験動物技術者協会関東支部総会(つくば) 2006年2月

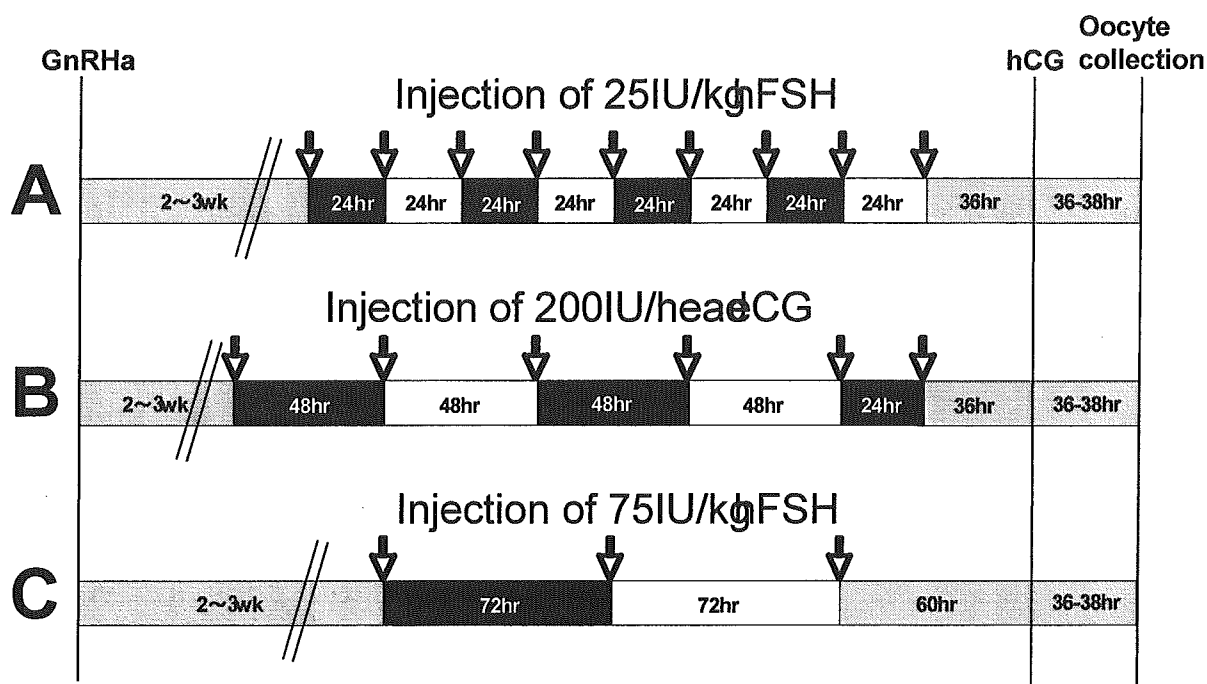


Fig. 1.

A, B and C show administration methods by s-hFSH, eCG and i-hFSH, respectively. Arrow shows each administration. The detail is shown for Materials & Methods.

Table 1. Oocytes collected from follicles in cynomolgus and African green monkeys with follicular growth stimulation.

Monkeys	Treatments*	No. of monkey	The average of month ages	The average of oocytes collected	The average of each stage of normal oocytes (%)		
					M II	GVBD	GV
Cynomolgus	s-hFSH	7	96.1±11.0	30.6±12.1	12.3±5.5 (40.2)	7.6±3.7 (24.8)	9.3±2.9 (30.4)
	eCG	8	98.0±9.7	18.1±3.7	6.8±2.1 (37.6)	3.6±2.7 (19.9)	6.9±1.6 (38.1)
	i-hFSH	5	88.2±12.2	20.8±3.6	10.0±2.9 (48.1)	3.4±1.9 (16.3)	7.0±1.5 (33.7)
African green	s-hFSH	6	138.0±10.2	19.0±5.9	6.8±2.0 (35.8)	2.0±1.1 (10.5)	3.3±1.1 (17.4)
	eCG	5	121.0±3.1	18.0±3.8	12.0±3.6 (66.7)	1.4±1.0 (7.8)	1.2±0.8 (6.7)

*; s-hFSH, hFSH administration for serial 9 days. i-hFSH, hFSH administration for 3 times at an interval of every three days.

Table 2. Fertilized ability of in vivo mature oocytes in cynomolgus and African green monkeys.

Monkeys	Treatments	No. of monkey	No. of oocytes examined	No. of oocytes activated (%)	No. of oocytes with (%)*		
					2PN2PB	3PN1PB	mPN2PB
Cynomolgus	serial hFSH	4	62	31 (50.0)	28 (45.2)	2 (3.2)	1 (1.6)
	eCG	1	8	8 (100)	8 (100)		
African green	serial hFSH	4	29	17 (58.6)	17 (58.6)		
	eCG	4	36	28 (77.8)	28 (77.8)		

*; 2PN2PB, two pronucleus and two polar bodies. 3PN1PB, three pronucleus and one polar body. mPN2PB, multiple pronucleus and two polar bodies

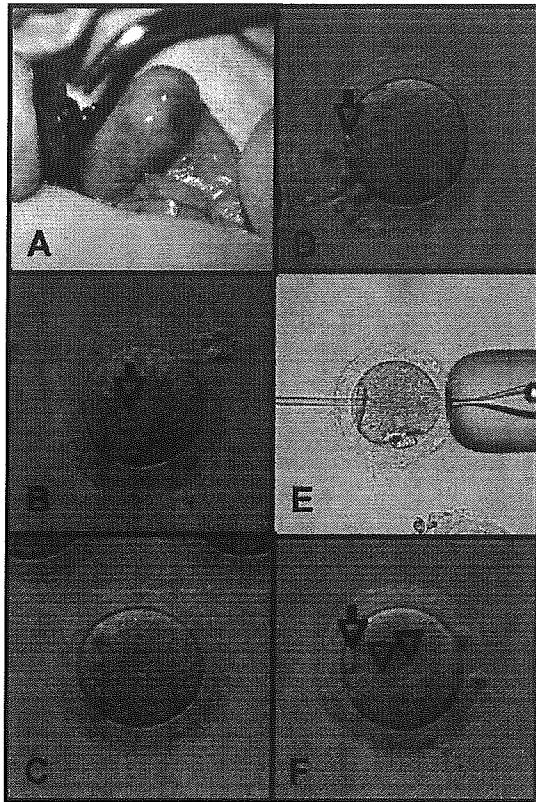


Fig. 2.

A, Ovary in African green monkey treated with follicular growth stimulation, showing developed follicles. B-D, Oocytes recovered from follicles. Germinal vesicle (GV) stage (B, arrow: GV), GV breakdown stage (C) and mature (D, arrow: 1st polar body) oocytes. E, Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). F, Zygote with second polar body (arrow) and two pronuclei (arrowheads) produced by ICSI.

Table3. 採卵成績

年齢 (歳)	頭数 (頭)	吸引卵胞数 (個)	採卵数				
			total	GV	GⅡ (M-I)	M- II	abnorma I
3, 4	10	81.0±1.7	52.2±23.6	16.8±8.5	9.2±8.3	27.5±21.7	2.6±1.9
8-12	6	62.3±29.6	37.2±31.1	22.0±29.2	9.0±10.7	6.8±4.8	5.0±0
15	1	17	16	6	1	9	0

Ave.±S.D.

細胞レベルのリソース整備 -発生工学的検討-

分担研究者

下澤律浩 (医薬基盤研究所・霊長類センター研究員)

研究要旨

発生工学的研究を行う上で、卵は必要な研究材料であるが、ホルモン投与による多数の成熟卵の採取は確立されていない。そこで、卵巣から直接採取された未成熟卵の体外成熟に関する検討を行った。また、相同なゲノムを持つカニクイザルを複数作出することが可能になるだけでなく、遺伝子操作個体の作出や体細胞に由来した胚性幹細胞の樹立に貢献する体細胞核移植技術の検討を行った。まず、体外成熟に関する検討では、未成熟卵の成熟に24時間以上を必要とすることが明らかになった。さらに、48時間目に成熟を確認した卵への単為発生誘起後の発生では、採取時に卵丘細胞で包埋されている卵でその後の発生が確認された。このことは、体外成熟における卵丘細胞の存在が重要であることを示すものである。また、体細胞核移植に関する検討では、ドナーとして分裂中期に同調した体細胞を用いたときに、その構築卵への活性化処理として、カルシウムイオノフォアおよびDimethylaminopurine処理による方法よりも、ストロンチウムイオンを含む溶液中でのカルシウムイオノフォア処理による方法で活性化後の正常な核相およびその後の発生において良好な成績が得られた。本法による体細胞核移植卵の作出の有効性を示す結果であった。これらの検討は、カニクイザルのリソース整備上、重要な発生工学の一技術である。

A. 研究目的

発生工学的研究を行う上で、卵子は無くてはならない重要な研究材料である。しかしながら、サル類へのホルモン投与による多数の成熟卵の採取は必ずしも効果的とは言えない。成熟卵を効率良く確保することが可能になれば、サル類の発生工学研究の大きな躍進が期待できる。また、カニクイザルにおける新たな発生工学技術の展開を計るために、体細胞核移植の検討を行っ

た。この技術は相同なゲノムを持つカニクイザルを複数作出することが可能になるだけでなく、遺伝子操作個体の作出や体細胞に由来した胚性幹細胞の樹立へ通じる技術である。このため、カニクイザルのリソース整備において今後より一層重要な発生工学分野の一技術になり得る。そこで今回成熟卵を確保するために、カニクイザル卵巣から採取した未成熟卵の体外培養による成熟卵の作出、および体内成熟卵を

利用した体細胞核移植について検討を行った。

B. 研究方法

1) サル未成熟卵の体外成熟培養の検討

当霊長類センターで維持しているカニクイザル実験殺個体の卵巣を細切して回収した卵子は、20%FBSのみを添加したTCM-199培地にて体外成熟培養を行った。またそれらの卵は、卵丘細胞で厚く覆われているもの(A群、図1A)、卵丘細胞の層が薄いあるいは一部欠落しているもの(B群、図1B)、卵丘細胞で覆われていないもの(C群、図1C)の3群に分けた。成熟培養開始から24時間目に卵子は、ヒアルロニダーゼ処理で卵丘細胞を除去し、卵核胞期卵(図2A)、卵核胞崩壊期卵(図2B)、成熟卵(図2C)に分類した。この際、成熟卵以外は継続して体外成熟培養を行い、48時間さらに72時間目に観察を行った。また、体外成熟卵の発生能を検討するためにカルシウムイオノフォア(IA)およびDimethylaminopurine(DMAP)溶液中に浸漬することで活性化誘起を行って単為発生卵を作成し、その体外発生培養を行い、発生能を検討した。

2) サル体細胞核移植の検討

成体サルの皮膚に由来する繊維芽細胞をノコダゾール処理して分裂中期に同調したものをドナーとした。レシピエント卵については、hFSHおよびhCGの投与によって採取された成熟卵子から倒立顕微鏡下にて染色体を除去したものを使

用した。両者の融合は、不活化センダイウイルスにより行った。融合後の活性化処理には、次の二つの方法を行った。方法1) IA処理(5分間)、続けてDMAP処理(4時間)、方法2) ストロニウムイオンを含む溶液中でのIA処理(Sr+IA; 5分間)。このようにして作出した核移植卵については、体外発生培養を行った。

(倫理面への配慮)

独立行政法人医薬基盤研究所・動物実験委員会の承認を受けて実施した。サル卵の発生に関する検討においては、サルから卵を回収する以外に検討する方法は無い。

C. 研究結果

1) サル未成熟卵の体外成熟培養の検討

A群、B群およびC群の体外成熟培養後24時間での成熟卵の割合は、それぞれ15.0%、23.1%および0%であり、A群およびB群の間に成熟率に差は見られなかったが、C群において成熟卵は認められなかった。48時間ならびに72時間目での積算した成熟率はそれぞれ、40.0%、53.8%および38.5%、ならびに45.0%、61.5%および46.2%であり、B群において成熟率が高い傾向にあった。

また、A群、B群およびC群で48時間目に卵丘細胞を除去して、極体の放出が確認された卵(それぞれ25.0%、80.0%および41.7%)をIAおよびDMAPによる活性化を誘起した。その結果、それぞれ、正常な形態を示した卵は、100%、0%および40.0%であった。

さらにそれらを体外培養したところ、A群においてのみ卵割が見られ、2細胞期に100%が、さらに3細胞期には50%が発生した。

2) サル体細胞核移植の検討

方法 1) における核移植では、16構築卵をIAおよびDMAP処理による活性化後に極体を放出して核を形成した正常な形態(図3A)と考えられるものは25%であった。56.3%で極体の放出は見られず(図3B)、18.8%で変性か、あるいは核の形成は見られなかった。正常な形態を示した核移植卵を体外培養したところ、全てで4細胞期へ、さらにその内の25.0%で8細胞期への発生(図3C)が確認できた。

方法 2) における核移植では、構築卵をSr+IA処理による活性化後に極体を放出して核を形成した正常な形態と考えられるものは66.7%であった。残りは前核の形成および極体の放出ともに認められなかった。正常な形態を示した核移植卵を体外培養したところ、75.0%で4細胞期へ、さらに50.0%で8細胞期への発生が確認された。

D. 考察

未成熟卵の成熟培養について検討した結果、その体外成熟には24時間以上を必要とすることが認められた。また、体外成熟率に関しては卵丘細胞の有無の明確な効果は確認できなかった。しかし、活性化能および発生能に関しては、卵丘細胞に厚く包まれていた卵においてのみ、前核の形成および卵

割が認められた。このことは卵丘細胞の重要性を示すものである。より一層の体外成熟を誘導するために、培養条件の改善が必要であることと共に体外成熟した卵の活性化能および発生能の検討も重要であると考えられた。また、採取時に卵丘細胞の付着が悪い卵の体外成熟においては、卵丘細胞あるいはその他の細胞との共培養が効果的であるかもしれない。

体細胞核移植について検討した結果、IAおよびDMAP処理により活性化された核移植卵では、そのほとんどが異常な形態を示したことから、この活性化方法を利用した分裂中期体細胞に由来する体細胞核移植卵の作出は困難であることが示された。このため、Sr+IA処理による活性化を行った核移植では、そのほとんどで正常な活性化型(図1)であった。加えて、その後の発生においても、綺麗な卵割が進行し、8細胞期(図2)までの発生が確認できたことは、この方法による体細胞核移植卵の作出における有効性を示すものである。

E. 結論

本検討により、未成熟卵の体外成熟は可能であることを示したが、極体の放出のみでの卵の質、つまり発生能を評価することは難しいことが明らかとなった。また、分裂中期にある体細胞の核移植においては、DMAP処理による活性化方法は適しておらず、Sr+IA処理による活性化方法の有効性が明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

1) 下澤律造、石橋英俊、岡田浩典、羽鳥真功、吉田高志、山海直、妊娠カニクイザル卵巣から採取した未成熟卵子の体外成熟培養、第52回日本実験動物学会(東京都)、2005年5月

2) 岡田浩典、羽鳥真功、石橋英俊、下澤律造、山海直、アフリカミドリザル精子の凍結保存、第52回日本実験動物学会(東京都)、2005年5月

3) 羽鳥真功、岡田浩典、石橋英俊、下澤律造、蛸澤隆、山海直、新規顕微鏡下細胞培養システム下における長期間デジタル連続撮影装置を用いた動画での培養細胞の観察、第52回日本実験動物学会(東京都)、2005年5月

4) Nobuhiro Shimozawa, Hironori Okada, Masanori Hatori, Takashi Yoshida, Tadashi Sankai, *In vitro* maturation and developmental ability of oocytes collected from ovaries of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), 12th International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba), December 2004.

5) Hironori Okada, Masanori Hatori, Nobuhiro Shimozawa, Tadashi Sankai, Cryopreservation of spermatozoa from African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*), 12th International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba), December 2004.

6) Masanori Hatori, Hironori Okada, Nobuhiro Shimozawa, Takashi Ebisawa, Tadashi Sankai, Serial digital images analysis of developmental states of the rabbit preimplantation stage embryos, 12th International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba), December 2004.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

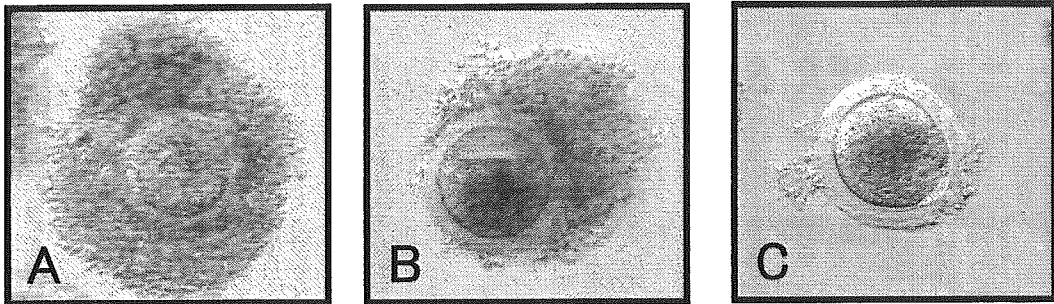


図1. 卵巣から採取直後の卵

A: 卵丘細胞に厚く覆われている卵、B: 卵丘細胞が一部欠落している卵、
C: 卵丘細胞に覆われていない卵

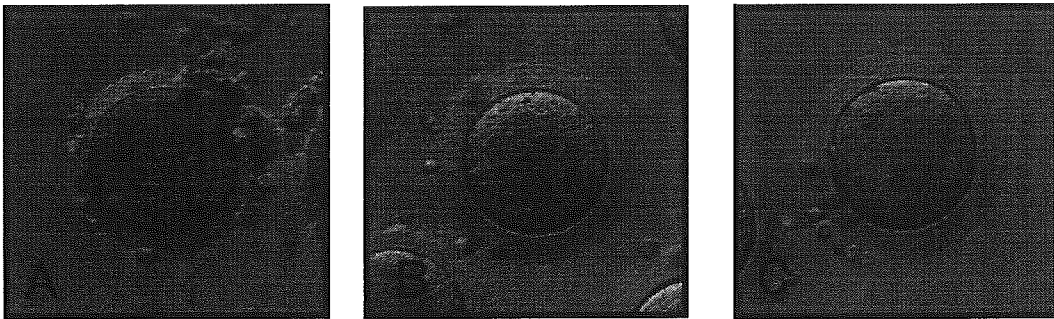


図2. 体外成熟後24時間目の卵

A: 卵核胞期卵、B: 卵核胞崩壊期卵、C: 成熟卵

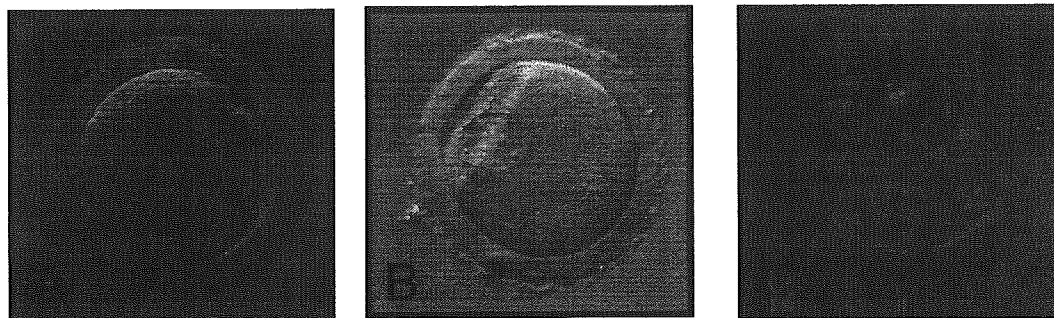


図3. 核移植卵の活性化および体外発生

A: 1前核1極体を形成した正常活性化型、B: 1前核の形成のみを示した
異常活性化型、C: 8細胞期へ発生した核移植卵

カニクイザル BAC クローンの染色体マッピング

分担研究者

数藤由美子（日本赤十字社 中央血液研究所）

研究協力者

菊池俊彦（医薬基盤研 霊長類医科学研究センター）

高野淳一郎（社団法人 予防衛生研究所）

研究要旨

カニクイザルの遺伝子レベルでのリソース整備として、これまで、繁殖コロニーを構成する血縁の明らかな個体から核 DNA のコレクション作りを進め、併せて Bacterial Artificial Chromosome (BAC) ライブラリーを整備してきた。本研究ではそれら遺伝子レベルのリソースの付加価値を高めることを目的とし、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・マーカーのいっそうの整備を進め、少なくとも 66 個のマーカーを得た。これらの情報と、既に我々が構築したカニクイザル完全長 cDNA クローン約 7 万個から抽出した遺伝子データベースに基づいて BAC クローンを選び、46 個についてカニクイザル染色体への直接的マッピングを試みた。リソースの情報の高度化は、今後、疾患モデルのゲノム解析を支援する土台ともなる。

キーワード：カニクイザル、マイクロサテライト、BAC ライブラリー、ゲノムマッピング

A. 研究目的

本研究では、これまでに蓄積してきた遺伝子リソース、即ち核 DNA および SNP 解析などのシミュレーションで必須となるカニクイザルの Bacterial Artificial Chromosome (BAC) ライブラリーの、情報の高度化を目的とした。具体的には、BAC クローンの末端塩基配列を決定し、既存公開データを用いた

ヒト・チンパンジー・アカゲザルとの比較ゲノムマッピングをおこなうとともに、既にデータベース化したカニクイザル完全長 cDNA クローン約 7 万個から抽出した遺伝子情報やマイクロサテライト・マーカー情報を用いてクロンのスクリーニングをおこなう。こうしてスクリーニングした BAC クローンについて、カニクイザル染色体マッピングをおこなう。遺伝子およびマイクロサテライトの詳細な染色体地図を作製することで、リソースの高度化を図って付加価値を高めるとともに、疾患

モデルのゲノム解析を支援するのである。

B. 研究方法

1. マイクロサテライト・マーカーの整備

マイクロサテライトは広く高等生物のゲノムに存在する 2~5 塩基の単純繰り返し配列であり、その反復回数は個体ごとに変異に富み、多型性を持つ。そのため連鎖解析、家系分析などに大変有力なツールである。ヒトではおよそ 3 万個のマーカーが設定され、疾患遺伝子のマッピングなどに利用されている。しかし、カニクイザルのゲノム情報はまだ解明されていない。そこでまず、ヒトのマイクロサテライト・マーカーを準用して、カニクイザルのマーカーの作製を試みた。

ヒトのデータに基づいてまず 148 組のプライマー・セットを設定し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅をおこなった。増幅が確認できたマーカーについては、20 頭の血縁関係の無いカニクイザルで PCR をおこない、ジェネティックアナライザ ABI3100 およびソフトウェア GeneScan (アプライドバイオシステムズ社) を用いて多型を解析し、分布比較をすることとした。

2. BAC クローンの末端塩基配列決定

既に作成済みの BAC ライブラリーから DNA を抽出し、ベクター内に設定したプライマーを用いてクローンの 5' - および 3' - の末端塩基配列を決定した。これらの配列を公開データベースのヒト・シーケンス・データとチンパンジー、アカゲザルのドラフト・シーケンス・データを用いてアラインメントし、ヒトの遺伝子やマイクロサテライト、ヒト BAC コンティグ・クローンとの関連を調べた。また、カニクイザル完全

長 cDNA クローン約 7 万個から抽出した遺伝子情報とも比較した。

3. カニクイザル染色体マッピング

カニクイザル染色体マッピングは蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法による直接的な位置づけをおこなう。

FISH 法の準備として、まず、カニクイザル雄 2 個体の末梢血を得て、フィトヘマグルチニン刺激によりリンパ球培養をする。細胞分裂後期複製時にブロデオキシウリジン (BrdU) を加え、適当な時期に紡錘糸の形成を疎外するコルセミドを加え、培養開始から 72 時間後にハーベスティング、固定し、スライドグラスに展開する。UV 照射により BrdU を光崩壊させ、ダイレクト R-バンド標本作製する。これらの反応条件はヒトと異なるので、実験条件の設定から始め、作製できた標本を用いて、まずヒト 23 本の各染色体を染め分けるプローブを用いた FISH (M-FISH) を行い、ヒト染色体との対応づけをした。また、従来の G-バンド標準核型を作成するほか、直接的にマッピングができるよう、カニクイザルの R-バンドの標準核型を作成することとした。以上の準備をふまえて、遺伝子やマイクロサテライト・マーカーの領域を含む BAC クローンについて染色体マッピングを開始した。

C. 研究結果および考察

1. マイクロサテライト・マーカー

ヒト・マイクロサテライト・マーカーから組んだ 148 組のプライマー・セットのうち、106 組で PCR による増幅が確認できた。これらのマーカーを血縁関係の無い 20 頭のカニクイザルで多型の分布を比較した結果、少なくとも 66

個のマイクロサテライト・マーカーは多型性を持っており、その数は 2~10 であることがわかった (Table 1)。家系内での遺伝性が保たれているかどうか調べるため、4 家系 20 頭を用いて多型を検出し、マーカーはメンデルの遺伝法則に準拠しているのを確認した。

今後、ヒトのマイクロサテライト・マーカーだけでなく、最近 Genomics 誌上で報告された近縁種 (アカゲザル) のマイクロサテライト・マーカー解析を参考に、ヒトで市販されている 400 個、10 cM 間隔と同程度のマイクロサテライト・マーカーのセットを整備し、疾患関連遺伝子解析の連鎖解析に用いることを予定している。

Table 1. カニクイザルゲノムにおいて多型性の見られたマイクロサテライト・マーカー (ヒトのマーカーと対応させた)

マーカー	アレル数	マーカー	アレル数
D1S206	4	D7S640	3
D1S207	7	D8S272	7
D1S213	6	D8S505	5
D1S255	5	D8S1106	10
D1S2797	4	D9S290	6
D1S2868	8	D10S1412	5
D1S468	3	D10S1432	7
G09705	3	D10S192	7
D2S364	7	D10S1652	6
D2S391	5	D10S611	6
D3S1279	5	D11S2002	5
D3S1292	7	D11S902	4
D3S1569	6	D11S925	7
D3S1614	5	D11S968	6
D3S1768	8	D12S1617	6
D3S2401	4	D12S364	4
D4S2430	2	D12S85	4
D4S3090	2	D13S765	7
D4S403	3	D13S894	4
D4S415	5	D15S644	6
D4S423	5	D16S403	5
D6S1691	7	D16S404	5
D6S2741	8	D16S415	6
D6S276	4	D16S515	5
D6S2876	7	D17S804	5
D6S2883	9	D17S1290	5
D6S289	5	D17S1852	3
D6S291	4	D17S831	5
D6S434	5	D17S921	4
C2-4-4	4	D18S536	7
MICA	4	D18S72	4
MOG-CA	5	D22S274	4
D7S1826	6	D22S280	4

2. BAC クローンの末端塩基配列決定

既に作成済みの BAC ライブラリー、384 ウェルのプレート 288 枚から 1 枚分 (384 個) の DNA 抽出をおこない、ベクター内に設定したプライマーを用いて、5' - および 3' - の末端塩基配列決定をおこなった。

384 個中、306 個のクローンで、両末端それぞれ 700~800 bp の塩基配列を得ることができた。ほかに 45 個については片側末端のみ決定できた。これらすべてについて、既存の公開データを利用した *in silico* の比較マッピングをおこなった。カニクイザル BAC クローン末端配列と公開データベースのヒトのシーケンス・データとチンパンジー、アカゲザルのドラフト・シーケンス・データを用いてアラインメントをし、関連するヒト遺伝子やマイクロサテライトを得、さらに対応するヒトの BAC コンティグ・クローンを同定した (Table 2)。また、ヒトゲノム・データとの対応からインサートサイズが予測されたので、これらの情報をすべてリスト化した。

今後は、前述のカニクイザル・マイクロサテライト・マーカー、および、我々のグループにおいて既に作成しデータベース化したカニクイザル完全長 cDNA クローン約 7 万個から抽出した遺伝子を利用して、BAC クローンをスクリーニングする。

Table 2. カニクイザル BAC-end 配列にもとづくホモロジ-検索 (抜粋)

Clone name	Human position	Human sequence
#1-3	9q34.3	Ch19:136824766
#1-5	10q23.3-q24	chl10:98852396 98928098
#1-6	1p32.2-p32.1	chl1:52093196 52170227
#1-7	3p24.3	chl3:19999859-20070031
#1-14	17q25.3	chl17:74190312 74259847
#1-21	3p26-p25	chl3:2195778-2229403
#1-22	14p31	chl14: 83389706 83446157
#1-23	2q36	chl2:228389151 228468171
#1-24	11q22.3	chl11:102289898-102351322
#1-30	10q23-10q24	chl10:97539854
#1-34	8q11.2	chl8:54439884
#1-35	15q21.3	chl15:56552094-56615969
#1-37	9p21	chl9:27677309-27800459
#1-38	2p21	chl2:44734067-44804564
#1-48	19p13.3	chl19:5036501-5217993
#1-51	8q21.2-21.3	chl8:86243478 86302208
#1-52	Xp22.12	chlX:21409540-21460205

3. カニクイザル染色体マッピング

M-FISH 法により染色体対応関係を調べた。ヒト 1, 3-6, 8-13, 16-19 番染色体・性染色体はカニクイザル染色体と 1 対 1 対応、ヒト 2 番染色体は 2 対に対応し、カニクイザル染色体では、ヒト 7&21, 14&15, 20&22 番が融合しそれぞれ 1 本の染色体となることを確認した。

R-バンド標本作製ではヒトと細胞周期が異なるため、条件の工夫が必要となった。試みに、ヒト各染色体に対応するクローンを各数個ずつ、合計 46 個選んでマッピングをおこなったが、今のところ 350 バンド・レベルの分染のため、高精度とはいえない。そこで、より高精度で安定したバンド染色法の改良を図るとともに、先に同定しやすい X 染色体由来の BAC クローンからマッピングを始めることとした。現在、351 クローンのコレクションのヒト、チンパンジー、アカゲザルへの *in silico*

マッピングの結果から、保存性の高い X 染色体由来と思われるクローンを選別し、マッピング・プローブ用 DNA の大量調整を進めている。また、比較マッピングが必要と考えられるので、並行してヒト染色体への直接的マッピングをおこなう準備を進めている。

E. 結論

本研究では、これまでに蓄積してきた遺伝子リソース (核 DNA および BAC ライブラリー) の情報の高度化と、来年度以降おこなう疾患関連遺伝子解析支援の土台作りのため、マイクロサテライト・マーカのさらなる整備をおこない、少なくとも 66 個のマーカを得た。また、BAC ライブラリーのうち 306 個のクローンについて両側の、45 個については片側のみの末端配列 (各 700-800 bp) を決定し、ヒトゲノム・データおよびチンパンジー、アカゲザルのドラフト・シーケンス・データを用いてアラインメントをおこない、各クローンに含まれる遺伝子やマイクロサテライトを予測した。うち 46 クローンについてはカニクイザル染色体マッピングを試みた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

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

分担研究者

吉田高志(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)

研究要旨

カニクイザルの個体レベルでのコロニーの維持のためには効率の良いかつ省力化された繁殖方式を確立する必要がある。今年度は、月経初発後11日目に雌雄同居を開始するという基準化された交配方式での妊娠率等の解析を行なった。さらに繁殖群から退役した老齢カニクイザルを対象として閉経後骨粗鬆症実験モデルの確立を試みた。骨量減少の過程を詳細に調査するために二波長X線密度測定装置（DXA）による骨量の測定のみならず血液・血清生化学的測定ならびにサイトカイン等の測定を行なった。データ解析には、多変量解析法の一つである正準相関分析法を採用した。

A. 研究目的

繁殖効率の改善と作業の省力化

現行の交配方式では前回の月経周期の長さが正常範囲の中にあることを確認して、その長さによって次回の月経周期の長さを推定し、推定排卵時期に雌雄の同居を行うものである。この方法では月経周期の長さの不安定な個体では交配が出来ず非効率的である。また前回の月経周期の長さで次回の月経周期の長さ、すなわち排卵時期を推定するための科学的根拠は無い。そこで、月経出血後11日目に交配を開始し、交配ごとに同居日を変更するという煩雑な作業の省力化を計り、かつ、妊娠効率の高い集団（年齢等）につ

いての解析を加えることを目的とする。

閉経後骨粗鬆症モデルの確立

霊長類センターのAging farmに保持されているカニクイザルを対象として骨量測定のみならず血液・血清生化学的測定ならびに代謝関連サイトカイン（レプチン・アディポネクチン等）の測定を半年間隔で同一個体で繰り返しての縦断的調査を実施している。本年度もこれを継続し閉経後骨粗鬆症のモデルを確立することを目的とする。

B. 研究方法

繁殖効率の改善と作業の省力化

メスカニクイザルの月経出血発

現状況を毎日観察し、月経出血初発日を第1日目とし第11日目からオスザルと3日間同居させる1対1交配を行った。その後、5週目に超音波画像診断装置によって妊娠診断を行った。調査対象期間は2年間とした。また一部の個体では、排卵が期待される前後の時期に採血を行い、血中エストラジオール (E2) 濃度の変化から排卵日の推定を行い妊娠との関係を解析した。

閉経後骨粗鬆症モデルの確立

霊長類センターのAging farmに保持されているカニクイザルを対象として骨量測定のみならず血液・血清生化学的測定ならびに代謝関連サイトカイン (レプチン・アディポネクチン等) の測定を半年間隔で同一個体で繰り返しての縦断的調査を実施している。本年度もこれを継続し閉経後骨粗鬆症のモデルを確立する。

(倫理面への配慮)

動物は「倫理委員会」の承認の元、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守するとともに、独立行政法人医薬基盤研究所「動物実験委員会」でのプロトコル承認を前提とし倫理上の問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

繁殖効率の改善と作業の省力化

過去にオスとの交配が行なわれた397頭のメスの妊娠状態 (重複例有り) について解析を加えた結果、

3回以内の交配で妊娠した個体は154頭 (40.3%)、交配回数当たりの妊娠率は46.3%であった。残りの228頭 (59.7%) のうちその後の交配で妊娠したサルは100頭 (59.7%) でありこれらの妊娠率は12.7%であった。

血中E2の測定によって排卵日を推定したところ6-10歳齢の若齢群では 13.3 ± 1.7 日目 (平均値 \pm 標準偏差) であり、交配期間中に排卵した割合は53.3%であった。他方、15-23歳齢の高齢群では 12.8 ± 2.3 日目であり、交配期間中に排卵した割合は41.3%であった。

閉経後骨粗鬆症モデルの確立

23歳齢以上、36歳齢に至るメスカニクイザルで血液・血清生化学的測定 (17変数) 及びサイトカイン (レプチン・アディポネクチン) の測定を行い、腰椎骨量・骨密度と比較した。方法としては、腰椎骨量・骨密度を目的変数とし、その他の測定値を説明変数とする正準相関分析法を採用した。その結果、第一正準変数が両者の間で有意に相関した (正準相関係数 $r=0.719$ 、 $p < 0.01$)。

腰椎骨密度と血液・血清生化学的測定値及び血清サイトカイン濃度と密接な関係があることがわかった。

D. 考察

交配日を月経出血初日から数えて第11日目から3日間と固定する方法で妊娠例を求めるようにした。このことにより、従来の前回の月経周期の長さに合わせて交配日を微妙

にシフトさせるやり方より、作業はより簡略化された。このことによって従来に比べて妊娠率が低下したという証拠は無い。

他方、コロニーの繁殖効率を改善する目的で、妊娠しにくい個体というような個体がいるのか否かを検討した。妊娠例を3回以内で妊娠したものと、それ以上の回数 of 交配を必要としたもの（最大9回）とに分けた。3回以内で妊娠したものはコロニーの約40%の個体であり、これらの妊娠率は約46%であった。そして、4回目以降の交配で妊娠した個体は、残りの約60%の個体の約半数（43.9%）であったが、妊娠率は12.7%にすぎなかった。このような妊娠のしにくい個体は、繁殖コロニーから排除し、コロニーの健全化を図る必要がある。

他方、排卵日をホルモン測定で推定した例では、若齢群（6-10歳齢）と高齢群（15-23歳齢）では排卵日の平均値には差がなかったものの、そのバラツキには大きな違いがあった。最短日と最長日との差は若齢群で6日間、高齢群で10日間であった。この差が11日目からの3日間交配で、高齢群では排卵日と交配日とうまく合致しない確率を高くして妊娠率を下げる原因になっていると判断される。ただし月経周期の長さの分布には若齢群にも高齢群にも差が認められない。

今後、繁殖コロニーの年齢構成を若い方にシフトさせる必要があるのかもしれない。さらに詳細な検討を行いたい。

閉経後骨粗鬆症モデルの確立

性周期にともなう性器出血、すな

わち月経出血が確認される動物は、ヒトを含めた類人猿と高等なサル類（旧世界サル・狭鼻猿類）に限られている。その中でも霊長類センターのカニクイザルは、閉経現象が確認された数少ない実験動物である。我々は以前にカニクイザルの閉経年齢は23~25歳齢頃であると報告したが、最近の調査ではもう少し年齢を上の方に設定されるのではないかと、とのデータも得られ始めている。そのようなカニクイザルを対象とする閉経後骨粗鬆症の実験モデル化にはもう少し時間が必要である。今回は中間報告的に、腰椎骨密度と血液・血清生化学的測定値及び血清サイトカイン濃度との密接な関係について解析を加えたが、さらに観察を継続し閉経後骨粗鬆症のモデルとして確立したい。

E. 結論

本研究によりリソースとしての実験用カニクイザルの簡便かつ効率的な交配方法の開発が計られ、併せてカニクイザルの繁殖コロニーの質的改善のための基礎的検討が行なわれた。さらに、閉経後骨粗鬆症の実験モデルを得るための基礎的検討が行なわれた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

○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 cynomologus 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.

2. 学会発表

○Yoshida T. Using long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) as a model for osteoporosis study. International Symposium on Southeast Asian Primate Research. October 2005, Bangkok, Thailand.

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

分担研究者

吉川 泰弘（東京大学大学院農学生命科学・教授）

研究協力者

木村 展之（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・研究員）

研究要旨

アルツハイマー病（AD）原因因子であるアミロイド β （A β ）は、神経細胞に様々な障害を引き起こすことが報告されている。本研究グループは過去の検索において、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ことから、同細胞の機能の改善・増強が認知症治療のターゲットとなる可能性に着目した。AG の対 A β 反応は過去に多くの研究者によって明らかにされているが、その多くは免疫反応や食食機能に関与する物である。しかしながら、AG は脳内において免疫反応のみならず脳内ホメオスタシスの維持等に関する様々な機能を有している。そこで本研究においては、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。

A. 研究目的

アストログリア細胞（AG）は、脳の発生期から既に様々な脳内環境の構築・維持に関する重要な機能を果たしている。アルツハイマー病（AD）主病変構成因子であるアミロイド β （A β ）は、AG に対して様々な反応を誘起することが知られており、中でも A β 食食機能を有することから、同疾患を制御するターゲットとしての可能性が示唆されている。その一方で、これら免疫反応以外の対 A β 反応については未だ不明な部分が多い。そこで

本研究においては、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 によってどのような影響がもたらされるのかを *in vitro* 系を用いて検索した。

B. 研究対象および方法

1) ラット胎仔大脳皮質初代培養系ならびに AG 単独培養系を用いて、以下の実験を行った。A β 1-40 および A β 1-42 を 5 μ M にて培養液中に添加し、3・24 時間後に培養上清ならびに細胞を回収した。分子生物学