

a significant difference between the CD34⁺ cell-treated and saline-treated groups. The peri-infarct region was the injection site, and thus the highest degree of change would be expected there.

All monkeys except one CD34⁺ cell-treated monkey (BM97080) were examined for cardiac function and blood flow at 2 weeks after transplantation, and their tissue sections were finally prepared at this time point (see below). BM97080 was examined at 12 weeks, at which time the cardiac function was still improved compared with immediately after infarction (data not shown) and the blood flow data were in a position similar to the cell-treated group at 2 weeks (Fig. 3C).

In Vivo Tracking of Transplanted Cells

Two weeks after the transplantation, tissue sections were prepared from the infarct, peri-infarct, and nonischemic regions. Immunostaining of an endothelial marker CD31 demonstrated more vessels in the peri-infarct region of the CD34⁺ cell-treated than saline-treated myocardium (Fig. 4A). In fact, the capillary density of the peri-infarct region was significantly better preserved in the cell-treated than

saline-treated group, although there was no significant difference in the capillary density of the nonischemic control regions between the two groups (Fig. 4B).

Double immunostaining with anti-CD31 and anti-GFP showed that some cells in vessels were positive for both CD31 and GFP in the peri-infarct region (Fig. 5A). The result clearly indicates that at least some transplanted CD34⁺ cells gave rise to endothelial cells. However, we found that the transplanted cell progeny accounted for only a small fraction of endothelial cells after examining more than 100 sections of the peri-infarct region. In situ PCR for proviral GFP sequences also showed that few CD31-positive endothelial cells contained the GFP-provirus (Fig. 5B). There were no GFP-positive cardiomyocytes in more than 100 sections. Most of the transplanted cell progeny were found not incorporated in vessels (Fig. 5C). Hematoxylin-eosin staining did not show any noncardiac tissue regeneration in the myocardium.

On the other hand, we found that in vitro conditioned medium of CD34⁺ cell culture for endothelial differentiation contained high levels of VEGF, whereas unconditioned medium did not contain detectable VEGF, as assessed

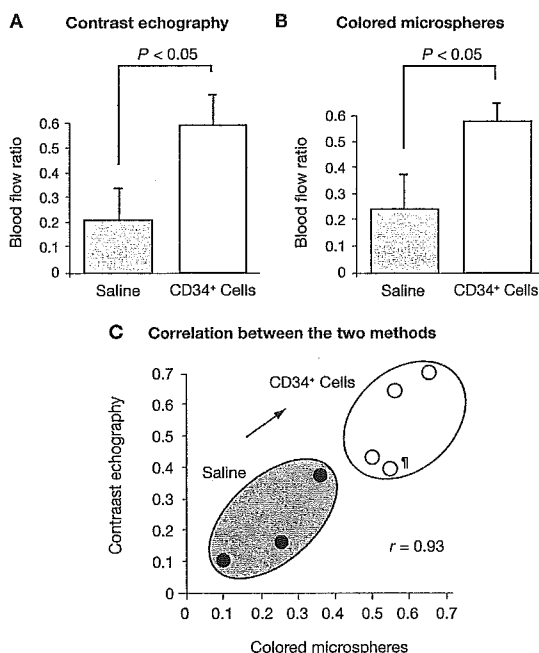


Figure 3. Improved regional blood flow after CD34⁺ cell transplantation. Myocardial contrast echocardiography (A) and colored microspheres (B) showed a significantly ameliorated blood flow ratio (the peri-infarct to nonischemic control region) in the CD34⁺ cell-treated monkeys ($n = 3$) compared with the saline-treated monkeys ($n = 3$) at 2 weeks after treatment. (C): An excellent correlation was found between the two methods. A CD34⁺ cell-treated monkey (♂, BM97080) that was examined at 12 weeks after transplant is included in the panel (C) but excluded from the statistical analysis in (A) and (B).

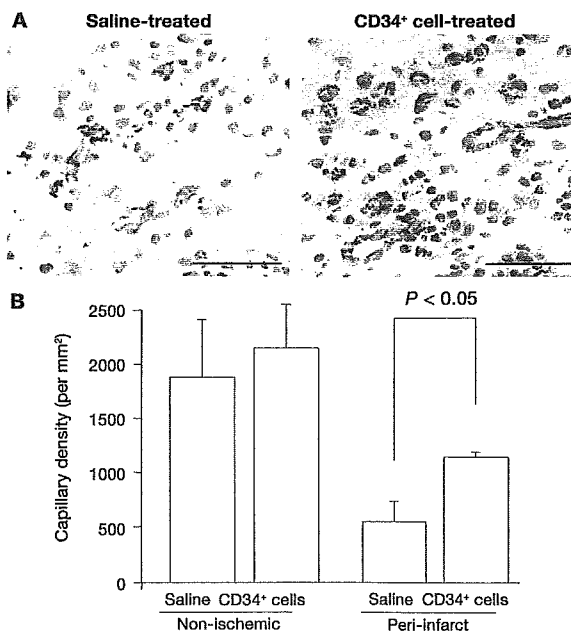


Figure 4. Neovascularization in the ischemic myocardium. Tissue sections were prepared at 2 weeks after the treatment. (A): Representative results of immunostaining with anti-CD31 (stained in brown) in the peri-infarct region of the saline-treated and CD34⁺ cell-treated myocardium. Bar = 50 μm . (B): The density of CD31-positive capillaries in the peri-infarct and control nonischemic regions in the saline-treated and CD34⁺ cell-treated groups. Five fields for each section were randomly selected ($n = 3$ for the saline injection, $n = 3$ for the CD34⁺ cell injection), and the number of CD31-positive capillaries was counted (average \pm standard deviation).

by ELISA (Fig. 6A). In addition, in vivo VEGF levels in the peri-infarct tissue were significantly higher in the CD34⁺ cell-treated than saline-treated group (Fig. 6B, left), although in vivo levels of bFGF differed little between the two groups (Fig. 6B, right).

DISCUSSION

Although gained with small numbers of cynomolgus monkeys, our data suggest that the direct transplantation of bone marrow CD34⁺ cells, even without coronary bypass grafts or percutaneous coronary intervention, results in improved regional blood flow and cardiac function after myocardial infarction in nonhuman primates. Furthermore, we have tried to see the contribution of transplanted CD34⁺ cells to the

repair of ischemic myocardium. To this end, we genetically marked CD34⁺ cells with GFP using an SIV-based lentiviral vector before transplantation. Lentiviral vectors can transduce nondividing cells unlike oncoretroviral vectors, and thus the ex vivo culture period with multiple cytokines to allow cell cycling can be reduced to 1 day or less [20, 22, 23]. This is the great advantage of using lentiviral vectors over oncoretroviral vectors for transduction of multipotent stem cells, given that extended ex vivo culture of stem cells may result in loss of multilineage differentiation and engraftment abilities [24]. Human immunodeficiency virus (HIV)-1-based lentiviral vectors can efficiently transduce human cells, but not Old World monkey cells [25]. According to a recent report, a species-specific cytoplasmic component confers the innate

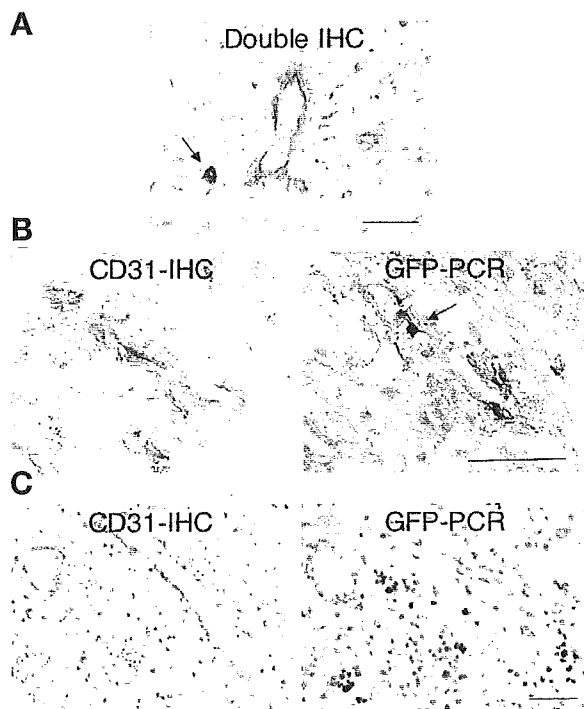


Figure 5. In vivo fate of transplanted cells. Cardiac sections were prepared at 2 weeks after transplantation. (A): Double immunohistochemistry (IHC) with anti-CD31 and anti-green fluorescent protein (GFP) in the peri-infarct region of the CD34⁺ cell-treated myocardium. Some cells (arrow) were positive for both CD31 (stained in brown) and GFP (stained in black), but such cells were rare. (B, C): Serial sections from the peri-infarct region of the CD34⁺ cell-treated myocardium. One section (left) was stained with anti-CD31 (stained in brown), and the other (right) was assessed by in situ polymerase chain reaction (PCR) for proviral GFP sequences (stained in black). (B): Some CD31-positive endothelial cells contained the GFP-provirus (arrow, right panel), but such cells were rare. (C): Transplanted cell progeny (cells positive for GFP-provirus in the right panel) were not incorporated in vessels (cells positive for CD31 in the left panel). Bar = 50 μ m.

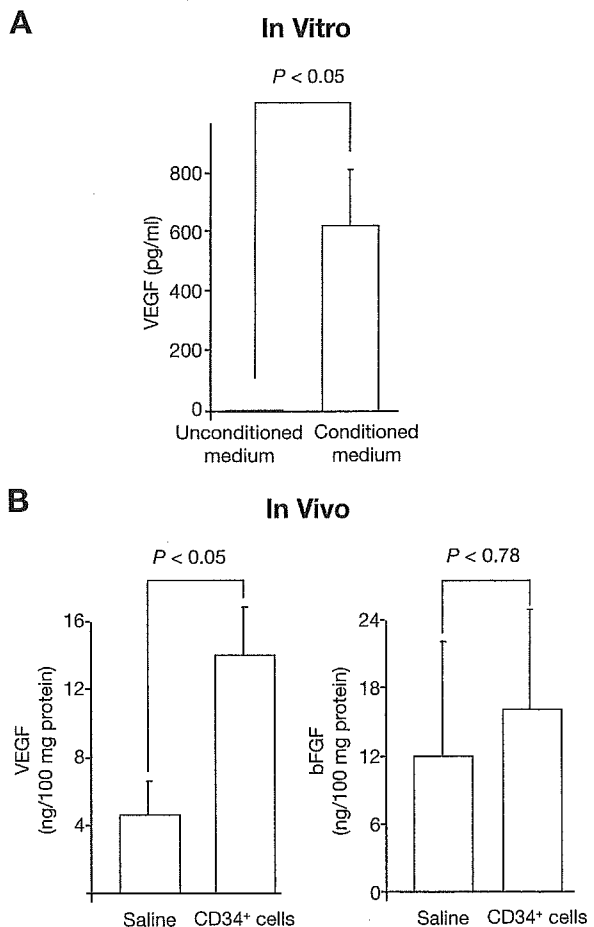


Figure 6. VEGF is implicated in the neoangiogenesis. (A): Unconditioned and conditioned media of in vitro CD34⁺ cell cultures for endothelial differentiation were examined for VEGF by ELISA. The average \pm standard error of six culture dishes is shown. (B): Lysates (three samples per monkey) from the peri-infarct region of the CD34⁺ cell-treated (monkey, $n = 3$) and saline-treated (monkey, $n = 3$) myocardium were prepared and examined for VEGF and basic fibroblast growth factor (bFGF) by ELISA. Data are shown as the average \pm standard error. Abbreviation: VEGF, vascular endothelial growth factor.

postentry restriction to HIV-1 infection in simian cells [26]. Unlike HIV-1-based lentiviral vectors, SIV-based ones can efficiently transduce simian hematopoietic stem/progenitor cells [21]. In this study, we also used an SIV-based lentiviral vector and achieved the efficient gene transfer into simian CD34⁺ cells.

As a result of this marking study, we found only a few GFP-positive cells incorporated into the vascular structure in the ischemic myocardium at 2 weeks after transplantation. GFP-positive cardiomyocytes were not detectable. The existence of GFP-positive endothelial cells can be explained by fusion events [27, 28]. However, if that is the case, GFP-positive cardiomyocytes should have also been detected, given that cardiomyocytes are even easier targets of fusion than endothelial cells [11, 29]. Whether fusion occurred or not, only a few transplanted cells gave rise to nonhematopoietic cells in our primate model.

There are several possible explanations for the very low prevalence of transplanted cell-derived endothelial cells or cardiomyocytes in the ischemic myocardium. First, 2 weeks was too short or the number of transplanted cells was too small to see the nonhematopoietic differentiation. However, the cardiac function and regional blood flow were ameliorated by this time point and with this number of transplanted cells. Thus, if transplanted cell-derived, nonhematopoietic differentiation was a reason for the improvement, transplanted cells at this number should have given rise to such cells by this time point. In fact, Orlic et al. [8] observed transplanted cell-derived endothelial cells and cardiomyocytes within 11 days after transplant in mice. In addition, we observed the endothelial differentiation from CD34⁺ cells within 7 days *in vitro* (Fig. 1). However, we cannot formally rule out a possibility that inflammatory responses after generation of infarction might have negative effects on engraftment of transplanted cells. Second, the SIV vector failed to transduce stem or progenitor cells that might be responsible for nonhematopoietic differentiation. Even if the transduction was successful, the cytokine treatment during the transduction or GFP expression in the cells spoiled the differentiation abilities. However, we have shown that the SIV vector successfully transduced cells that were capable of differentiating into GFP-expressing endothelial cells (Fig. 1). We have not examined the differentiation ability to cardiomyocytes, because the method to differentiate CD34⁺ cells to cardiomyocytes *in vitro* has not been well established. Thus, we cannot formally rule out the possibility that the *ex vivo* culture spoiled the ability to differentiate to cardiomyocytes or reduced the ability to differentiate to endothelial cells. Third, cells expressing xenogeneic GFP were rejected via immune responses.

However, 2 weeks is too short to allow immune elimination of GFP-expressing cells in monkeys [30, 31]. Fourth, the GFP expression was shut down because of transcriptional silencing *in vivo*, resulting in negative immunostaining with anti-GFP. To examine this possibility, we tried to detect the provirus (vector integrated into genome) in the cardiac tissue by *in situ* PCR and found again that only a few CD31-positive endothelial cells contained the GFP-provirus (Fig. 5B), thus arguing against transcriptional silencing-based negative immunostaining with anti-GFP. Taken together, we concluded that most transplanted cell progeny were not incorporated into the repaired, nonhematopoietic tissues.

Our results are in agreement with recent reports that transplanted hematopoietic cells are unable to transdifferentiate into nonhematopoietic cells in ischemic myocardium in mice [9–11]. Our studies confirm and extend these findings in a couple of ways. First, we show that the cardiac function can be indeed significantly improved after injection of hematopoietic cells in a nonhuman primate model, although the above studies used murine myocardial infarction models and did not address the potential beneficial effects of hematopoietic cell injection. Second, the improvement is unlikely to be the result of generation of transplanted cell-derived endothelial cells or cardiomyocytes. Finally, we have found that cultured CD34⁺ cells secrete VEGF and that the CD34⁺ cell-treated myocardium contains a significantly higher level of VEGF than the saline-treated myocardium. This observation raises a possibility that some angiogenic cytokines secreted from transplanted cells (paracrine effects) potentiate angiogenic activity of endogenous cells. VEGF would be a candidate. Despite this, the delivery of a single agent (VEGF) failed in clinical trials for cardiac ischemia [32]. *In situ* multiple cytokine production and coordinated action may be essential for clinical benefits [33, 34]. It will be important to explore and identify cytokines responsible for the paracrine effect. If transplanted cells serve as cytokine factories rather than stem cells in ischemic tissues, it is not surprising that not only stem cells but other types of cells may also work [35]. The concept of stem cell therapeutics for ischemic diseases needs additional consideration.

ACKNOWLEDGMENTS

The SIV vector was supplied by DNAVEC Corporation (Ibaraki, Japan), and thrombopoietin was supplied by Kirin Brewery Co. Ltd. (Tokyo). We thank Masahiro Shakudo (Sumiyoshi Hospital, Osaka) for analyzing the contrast echocardiography and Yasuhiro Ochiai (Jichi Medical School) for preparing tissue sections.

REFERENCES

- 1 Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009–3017.
- 2 Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913–1918.
- 3 Tse HF, Kwong YL, Chan JK et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47–49.
- 4 Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;107:2294–2302.
- 5 Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45–46.
- 6 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141–148.
- 7 Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–967.
- 8 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701–705.
- 9 Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664–668.
- 10 Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668–673.
- 11 Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;10:494–501.
- 12 Hanazono Y, Terao K, Ozawa K. Gene transfer into non-human primate hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *STEM CELLS* 2001;19:12–23.
- 13 Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N et al. Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am J Primatol* 2003;61:3–12.
- 14 Nakajima T, Nakamaru K, Ido E et al. Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. *Hum Gene Ther* 2000;11:1863–1874.
- 15 VandenDriessche T, Thorrez L, Naldini L et al. Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-I central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo. *Blood* 2002;100:813–822.
- 16 Kobayashi N, Yasu T, Yamada S et al. Influence of contrast ultrasonography with perflutren lipid microspheres on microvessel injury. *Circ J* 2003;67:630–636.
- 17 Wei K, Jayaweera AR, Firoozan S et al. Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion. *Circulation* 1998;97:473–483.
- 18 Hale SL, Alker KJ, Kloner RA. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 1988;78:428–434.
- 19 Haase AT, Retzel EF, Staskus KA. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4971–4975.
- 20 Hanazono Y, Asano T, Ueda Y et al. Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:106–110.
- 21 Hanawa H, Hematti P, Keyvanfar K et al. Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood* 2004;103:4062–4069.
- 22 Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE et al. Transduction of human CD34⁺ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 1999;283:682–686.
- 23 Horn PA, Keyser KA, Peterson LJ et al. Efficient lentiviral gene transfer to canine repopulating cells using an overnight transduction protocol. *Blood* 2004;103:3710–3716.
- 24 Dunbar CE, Takatoku M, Donahue RE. The impact of ex vivo cytokine stimulation on engraftment of primitive hematopoietic cells in a non-human primate model. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:236–245.
- 25 Owens CM, Yang PC, Gottlinger H et al. Human and simian immunodeficiency virus capsid proteins are major viral determinants of early, postentry replication blocks in simian cells. *J Virol* 2003;77:726–731.
- 26 Stremlau M, Owens CM, Perron MJ et al. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 2004;427:848–853.
- 27 Terada N, Hamazaki T, Oka M et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542–545.
- 28 Ying QL, Nichols J, Evans EP et al. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002;416:545–548.
- 29 Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968–973.
- 30 Rosenzweig M, Connole M, Glickman R et al. Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to

- enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells. *Blood* 2001;97:1951–1959.
- 31 Heim DA, Hanazono Y, Giri N et al. Introduction of a xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model. *Mol Ther* 2000;1:533–544.
- 32 Henry TD, Annex BH, McKendall GR et al. The VIVA trial: vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation* 2003;107:1359–1365.
- 33 Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 2003;9:604–613.
- 34 Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004;94:230–238.
- 35 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109:1543–1549.

XIII. 動物血の正常値

はじめに

医学の発展にとって実験動物の果たしてきた役割は大きく、その重要性は今も変わらない。ノーベル医学生理学賞の受賞対象研究の90%以上に動物実験が含まれているといわれる。高等哺乳類の霊長類から無脊椎動物に至るまで多種多様な実験動物が医学に貢献してきた。実験動物の多様な生物学的特性から、適応される手技はそれぞれまったく異なる。実験動物を用いてさまざまな研究を行うには、使用する動物の特性をよく理解し、その研究に適合した動物および手技を選択しなければならない。さらにそのうえで研究の質の向上を図るには、その動物に関する明確なバックグラウンドデータが欠かせない。本章では、これら各種実験動物の血液学的な特徴を紹介したい。

1. 各種実験動物の血液学的特徴

1) 哺乳類

a) マウス

マウスは、医学実験の各分野でもっとも多用される実験動物である。哺乳綱・齧歯目のハツカネズミ種に属する動物であり、数多くの系統が開発されてきた。血液学的には、リンパ性白血病を好発するAKR、先天的に胸腺の欠損したヌードマウス、重症複合型免疫不全症のNOD/SCIDマウスなどの系統が存在する。

実験動物としての長い歴史に育まれ、その入手や扱いは容易である。SPFや免疫不全マウスでは、飼育施設の厳密な環境管理が必要であるが、一般的には飼育ケージ、餌、水、床敷きがあれば飼育できる。

採血方法は、尾静脈または眼窩静脈叢から行うのが一般的であるが、最近では大腿静脈から採取することも可能との報告もある。片手で保定し1人で行え、1回に0.2~0.3 mLほどの採血が可能である。ある程度の日数をおけば反復採血が可能である。全採血の場合は、麻酔下での心臓採血が一般的である。体重30 gのマウスから約1 mLの血液が採取できる。

表 XIII-1¹⁾ に正常値を示す。赤血球では多染性が認められることが多く、これはマウスの赤血球寿命が20~45日と他の動物に比べ短いからである。赤血球のサイズは他の動物に比べ小さいが、数は800~900万/ μ Lと多い。血小板数も80~100万/ μ Lと他の動物に比べ高値を示す。

b) ラット

ラットは実験動物化されたドブネズミのことである。マウスと

同様、各種実験に幅広く用いられる動物である。マウスよりも大型で、オスで体重800 gに達するが、マウスに比して温順で、ヒトにも馴れるため、実験に比較的使いやすい。飼育もマウスに準じて容易であるが、費用はマウスの10倍近くかかり、その系統もマウスほど確立されていない。しかし昨今、多くの近交系が作出され、SPF化も進み、遺伝的モニタリングの手法も確立されてきていることから、応用範囲が広がっている。

採血方法はやや熟練を要するが、マウス同様1人で保定し採血することができる。採取量も尾静脈や眼窩静脈叢などの部分採血で1 mL、心臓採血による全採血で10 mL以上が可能である。また、マウスと異なり、生体からの腸骨穿刺による骨髓採取も可能である。血液学的特徴は、ほぼマウスと一致するが(表 XIII-1)¹⁾、赤血球内に血色素結晶を認めるなどの特異的な特徴を有する²⁾。

c) ウサギ

重歯目・ウサギ科に属する飼うサギの日本白色種、ニュージーランドホワイト種などが実験動物として有名であるが、その他肉食、毛皮用など多数の品種が存在する。比較的大型で、おとなしく、扱いやすいため、実験動物としてもよく用いられる。採血方法は、耳介中央の耳介動・静脈が太く明瞭であり、ここから採取するのが普通である。ウサギを保定箱に入れるか、もしくは助手が保定し、採血者が耳翼をもち中央の血管を圧迫し怒張させることで3~5 mLの量が採取できる。体重に比べ採取できる血液量が多く、抗体の産生も良いことから、免疫血清の作製によく用いられる。

白血球のうち、他の動物で好中球に相当するものがエオジン好性の顆粒を持っており、偽好酸球と呼ばれる。赤血球数はやや高めで(表 XIII-1)¹⁾、白血球数の日内変動が大きいこと、血小板数の個体差が大きいことも特徴の1つである。

d) イヌ

食肉目に分類されるイヌは、血液学的性状もヒトに近く(表 XIII-2)¹⁾、ヒトによく順応し、取り扱いも容易であり、大型実験動物として有用性は大きい。伴侶動物としてもっともヒトに身近であり、米国などではすでに、抗イヌCD 34モノクローン抗体が開発され、イヌの骨髓移植がペット医療として行われている。実験動物や伴侶動物としての長い歴史から、用いる医学的手法や試薬の多様性はヒトのそれに通じるものがあり、実験を行ううえで有利である。譲渡犬の実験利用は禁止される傾向にあり、コロニー化されたビーグル犬が今後の実験利用の中心になる。

採血は2人で行う。無麻酔下で、1人が外頸静脈または前肢橈腕皮静脈を露出させ、もう1人が採血する。イヌは採血時のストレスや刺激により、脾臓からの赤血球動員がおき、容易にヘマトク

表 XIII-1 齧歯目および重歯目の血液学的数値(文献²⁾より)

	マウス(ICR, 1歳未満)		マウス(ICR, 1歳以上)		ラット		ウサギ (ニュージージーランドホワイト)	
	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス
WBC ($\times 10^9/L$)	8.0 \pm 3.2	6.0 \pm 2.5	9.3 \pm 5.0	6.7 \pm 4.3	10.6 \pm 2.8	8.6 \pm 2.7	9.5 \pm 2.1	8.4 \pm 2.2
RBC ($\times 10^{12}/L$)	9.11 \pm 0.70	8.74 \pm 0.69	8.27 \pm 0.88	7.46 \pm 0.93	7.82 \pm 0.83	7.27 \pm 0.51	6.75 \pm 0.53	6.22 \pm 0.48
Hb (g/L)	154 \pm 11	150 \pm 9	135 \pm 14	124 \pm 14	147 \pm 12	143 \pm 8	137 \pm 10	128 \pm 8
Ht (L/L)	0.426 \pm 0.32	0.410 \pm 0.32	0.375 \pm 0.41	0.345 \pm 0.39	0.399 \pm 0.35	0.381 \pm 0.24	0.404 \pm 0.31	0.378 \pm 0.23
MCV (fL)	46.8 \pm 1.8	46.9 \pm 1.9	45.3 \pm 2.7	46.3 \pm 2.8	51.3 \pm 3.0	52.6 \pm 2.3	59.9 \pm 2.8	60.9 \pm 2.4
MCHC (%)	36.3 \pm 1.3	36.7 \pm 1.6	36.2 \pm 0.7	36.0 \pm 1.0	37.0 \pm 1.0	37.6 \pm 1.0	34.0 \pm 0.5	34.1 \pm 0.6
PLT ($\times 10^9/L$)	1,199 \pm 200	1,071 \pm 178	1,300 \pm 225	912 \pm 182	1,016 \pm 186	1,018 \pm 196	499 \pm 130	470 \pm 86
分節核好中球 (%)	19 \pm 8.9	16 \pm 9.2	32 \pm 11.1	32 \pm 12.4	12 \pm 6.0	12 \pm 7.0	32 \pm 11.0	34 \pm 10.7
リンパ球 (%)	77 \pm 11.0	80 \pm 9.6	63 \pm 13.8	62 \pm 13.4	83 \pm 7.0	83 \pm 8.0	62 \pm 13.2	61 \pm 11.3
単球 (%)	2 \pm 1.9	2 \pm 2.0	5 \pm 4.2	4 \pm 2.3	4 \pm 2.0	3 \pm 2.0	1 \pm 1.4	1 \pm 1.1
好塩基球 (%)	0	0	0	0	0	0	2 \pm 1.7	3 \pm 1.3
好酸球 (%)	1 \pm 1.0	1 \pm 1.1	0 \pm 0.8	0 \pm 0.5	1 \pm 1.0	1 \pm 1.0	1 \pm 0.8	1 \pm 1.8

数値の表記は平均値 \pm SD

表 XIII-2 イヌおよびネコの血液学的数値

	イヌ ³⁾ (ビーグル)		ネコ ³⁾	
	オス	メス	オス	メス
WBC ($\times 10^9/L$)	10.4 \pm 3.2	10.2 \pm 2.7	17.4 \pm 1.2	16.6 \pm 1.4
RBC ($\times 10^{12}/L$)	6.60 \pm 0.56	6.99 \pm 0.49	7.40 \pm 0.2	7.10 \pm 0.9
Hb (g/L)	152 \pm 13	158 \pm 11	107 \pm 4	103 \pm 4
Ht (L/L)	0.437 \pm 0.37	0.459 \pm 0.32	0.414 \pm 0.12	0.396 \pm 0.12
MCV (fL)	66.2 \pm 2.4	65.7 \pm 1.5	56.6 \pm 1.1	56.6 \pm 1.2
MCHC (%)	34.9 \pm 0.8	34.4 \pm 0.7	25.8 \pm 0.8	26.0 \pm 0.8
PLT ($\times 10^9/L$)	323 \pm 69	320 \pm 70	235 \pm 65	220 \pm 72
桿状核好中球 (%)	1 \pm 1.1	1 \pm 1.1	—	—
分節核好中球 (%)	56 \pm 7.9	55 \pm 9.7	58.3 \pm 7.8	57.1 \pm 8.1
リンパ球 (%)	30 \pm 6.5	31 \pm 8.2	32.0 \pm 5.8	32.5 \pm 4.6
単球 (%)	6 \pm 2.5	6 \pm 2.1	2.8 \pm 0.8	4.90 \pm 1.8
好塩基球 (%)	0 \pm 0.4	0 \pm 0.4	0 \pm 0.02	0.10 \pm 0.02
好酸球 (%)	6 \pm 3.6	6 \pm 4.4	6.90 \pm 1.75	5.90 \pm 1.90

数値の表記は平均値 \pm SD

リット値や赤血球数などが変化するので注意が必要である。

e) ネコ

ネコもイヌ同様食肉目に分類される動物であり、伴侶動物としての歴史は古い。ただし、実験動物としての歴史はイヌより浅く、特に脳神経生理の研究に対して好んで用いられてきた。近年、急速に実験動物としての価値を高めたのは、イヌにはみられないネコ白血病ウイルス(FeLV)やネコ免疫不全ウイルス(FIV)が存在し、ヒトの AIDS 研究に対して、霊長類を用いる研究に匹敵する新しい知見が得られることがわかったからである。

実験動物としての扱いも大型の動物の中では比較的楽であるが、イヌに比べるとストレスを感じやすく、採血時には興奮しやすいことに注意を要する。採血はイヌと同様の方法で行う。適切な繁殖施設が少なく、動物管理センター由来や、いまだに野生由来のものが実験に供試されていることが問題である。血液正常値は、白血球がヒトの倍近い数値を示す以外は、概してヒトに近い値を示す(表 XIII-2)³⁾。

f) 霊長類

180種余りのサル類のうち、医学実験に使われるサルは30種余りにのぼる。昨今の実験に用いられるサル類では、旧世界ザルのマカカ属であるアカゲザルおよびカニクイザル、新世界ザルのコモンマーモセットが多い。霊長類は、遺伝学的にヒトに近く、ヒトをもっとも反映する実験動物として大変に有用である。そのため近年、霊長類の実験への使用頭数や海外からの輸入頭数が増加傾向をたどっている。一方その反面、実験動物としての管理は特

表 XIII-3 霊長類の血液学的数値

	コモンマーモセット ⁴⁾		カンクイザル ¹⁾		アカゲザル ⁵⁾		ヒト ⁶⁾	
	オス	メス	オス	メス	オス	メス	男	女
WBC ($\times 10^9/L$)	9.8 \pm 2.8	9.7 \pm 3.2	15.1 \pm 4.7	12.3 \pm 3.5	12.39 \pm 1.65	11.60 \pm 1.62	5.1 \pm 1.0	5.1 \pm 1.2
RBC ($\times 10^{12}/L$)	6.56 \pm 0.69	6.23 \pm 0.74	6.64 \pm 0.57	6.29 \pm 0.552	5.15 \pm 0.91	5.19 \pm 0.78	4.31 \sim 5.65	3.78 \sim 4.97
Hb (g/L)	153 \pm 14	146 \pm 13	123 \pm 8	114 \pm 10	128.3 \pm 13.5	126.8 \pm 11.5	137 \sim 174	113 \sim 149
Ht (L/L)	0.479 \pm 0.45	0.459 \pm 0.42	0.406 \pm 0.29	0.379 \pm 0.30	0.415 \pm 0.42	0.415 \pm 0.15	0.402 \sim 0.515	0.336 \sim 0.446
MCV (fL)	73.3 \pm 4.5	74.0 \pm 4.5	61.3 \pm 3.5	60.4 \pm 3.6	89.6 \pm 9.9	93.5 \pm 12.7	83 \sim 101	79 \sim 99
MCHC (%)	31.9 \pm 1.0	31.9 \pm 1.2	30.3 \pm 1.1	30.2 \pm 1.0	30.7 \pm 2.0	31.4 \pm 3.2	31.8 \sim 36.4	31.1 \sim 36.2
PLT ($\times 10^9/L$)	610 \pm 141	650 \pm 170	395 \pm 105	437 \pm 109	144 \pm 15	130 \pm 53	131 \sim 365	125 \sim 375
桿状核好中球 (%)	2.7 \pm 3.4	2.4 \pm 3.1	0 \pm 0.2	0 \pm 0.2	—	—	5.0 \pm 3.9	3.7 \pm 2.8
分節核好中球 (%)	29.2 \pm 16.0	29.0 \pm 14.1	38 \pm 14.0	37 \pm 13.1	36.5 \pm 16.3	39.4 \pm 16.4	52.0 \pm 7.9	57.5 \pm 8.7
リンパ球 (%)	64.5 \pm 16.5	63.2 \pm 14.0	55 \pm 13.4	57 \pm 12.8	60.9 \pm 16.2	57.6 \pm 16.2	35.3 \pm 8.5	31.7 \pm 7.2
単球 (%)	3.1 \pm 2.2	2.9 \pm 2.1	3 \pm 2.0	3 \pm 2.1	0.6 \pm 1.2	0.6 \pm 1.2	5.3 \pm 2.6	5.2 \pm 3.5
好塩基球 (%)	0.4	0.6	0 \pm 0.4	0 \pm 0.5	0.2 \pm 0.8	0.2 \pm 0.6	0 \sim 5	0 \sim 3
好酸球 (%)	1.0 \pm 1.3	1.9 \pm 2.4	3 \pm 2.6	3 \pm 2.7	1.8 \pm 2.5	1.9 \pm 2.9	0 \sim 10	0 \sim 5

数値の表記は平均値 \pm SD

殊であり、他の動物に比べコストもかかり、倫理面の制約、ヒトに対する危険な病原体を持つといった面も存在することを承知しておかなければならない。霊長類では、野生由来のもの利用は禁止されていて、すべてコロニーで繁殖させた実験用の動物を使用している。

採血は、いずれのサルの場合も麻酔下で行うことが望ましく、2人1組で行う。保定者がサルを仰臥位に両大腿部が直角をなすように保定し、採血者が鼠経部の大腿動脈を触診し、ややその内側を走行する大腿静脈に針を刺入することにより採取する。血管を視認せずに行うが、保定者と協調し訓練を積み重ねることでない。むしろ多量の採血が可能だし、小型のサルにも適した方法である。

サルの血液性状はヒトと酷似している。表 XIII-3^{1,4-6)}には代表的な血液学的数値を載せたが、報告者によって多少数値は異なる。サル類は、遺伝的にも環境的にも統御された実験動物とは違い、また、寿命も長く、その血液学的数値が個体ごとにある程度ばらつくのはやむをえない⁷⁾。

2) 哺乳類以外の脊椎動物

a) 鳥類

鳥類の中ではニワトリが実験動物としての歴史が長い。もともとは養鶏産業に関連して、遺伝学、栄養学、生理学、形態学などさまざまな研究が行われた。それらの研究からウイルス発癌、癌遺伝子、筋ジストロフィーモデルなどが生まれることになり、結

果的に医学領域に多大な影響を与え、実験動物としての価値を高めた。また、発育鶏卵であるニワトリ杯は、ウイルス病のワクチン製造に多く用いられる。

鳥類に特徴的なのは、総排泄孔にあるファブリキウス嚢がBリンパ球の分化を制御していることである。免疫学におけるB細胞に関する研究は、このニワトリのファブリキウス嚢が重要な知見を提供した。

採血方法は、保定者が片手で脚を、片手で翼を広げ仰向けにし、翼の裏の尺骨に沿った静脈から採取する。赤血球は扁平の楕円球形で有核であり、哺乳類に比べその数は少ない(表 XIII-4)⁸⁾。赤血球の寿命が12 \sim 40日と短いため、末梢血中に未熟な赤血球が現われやすい。血小板は、哺乳類の場合とは大分異なり、栓球といって骨髓芽細胞から単核栓芽球が生成され成熟したもので、有核で、赤血球に似た形の未熟な形態をとる。哺乳類の好中球に相当する、好酸性の偽好酸球が存在する。

b) 魚類

魚類の中では、ゼブラフィッシュが変異体の研究や遺伝子解析が進んだ実験動物として有名である⁹⁾。ゼブラフィッシュ変異体の胚を用いて造血の分子機構など血液学の研究が盛んに行われている¹⁰⁾。コイやアユでも造血幹細胞培養法が樹立され、免疫学的な研究が行われており¹¹⁾、また、ギンブナは脊椎動物では唯一、自然界でクローン発生するといわれ、実験動物として生物学研究への貢献が期待されている。メダカは、そのES細胞の樹立や、脊椎動物では初めて宇宙で世代交代実験が行われるなど、最新の研究で

表 XIII-4 哺乳類以外の脊椎動物の血液学的数値

	鳥類		魚類		両生類	
	ニワトリ ⁸⁾		ゼブラフィッシュ ¹²⁾	コイ ¹³⁾	ウシガエル ⁹⁾	ヒキガエル ⁹⁾
	オス	メス	—	—	—	—
WBC ($\times 10^9/L$)	3.78	3	—	40.2	14.7~21.9*	7.7~18.0*
RBC ($\times 10^{12}/L$)	16.615	29.397	2.89~3.25	0.60 \pm 0.02	0.43~0.45	0.23~0.81
Hb (g/L)	135	97	—	41.8 \pm 0.2	74.0~82.0	73~168
Ht (L/L)	0.40	0.308	—	0.203 \pm 0.060	0.266~0.320	—
MCV (fL)	—	—	—	3,337.63 \pm 3.32	625~716	—
MCHC (%)	—	—	—	20.53 \pm 0.41	26.0~28.0	—
栓球 ($\times 10^9/L$)	27.586	30.856	—	77	—	—
分節核好中球 (%)	25.8	13.3	7.10 \pm 4.75	60.4	5.60~8.40	19.6~72.1
リンパ球 (%)	64	76.1	82.95 \pm 5.47	31.9	47.0~71.0	14.9~75.5
単球 (%)	6.4	5.7	9.68 \pm 2.44	6.5	1.0~5.0	1.3~8.0
好塩基球 (%)	2.4	2.4	0.13 \pm 0.40	0.1	5.60~8.40	0~12.5
好酸球 (%)	1.4	2.5	0.15 \pm 0.53	0.7	21.6~32.4	0~6.2

* : 栓球数を含む

も知られるが、そもそも突然変異系や近郊系の確立などにより日本から世界に紹介された実験動物である。しかしながら最近の生息環境の悪化により、野生では絶滅が危惧されている種でもある。

採血法としてもっとも一般的な方法は、尾柄部を切断し、尾動脈の切断面から血液を採取する方法である。しかし、この方法は魚を殺すことを前提として行わなければならない。尾動脈に直接針を刺入する方法や、静脈洞または心臓から直接採血する方法では、反復した採血が可能となるが、これらは熟練を要する。

魚類で特徴的なのは、造血が主に腎臓で行われていることである(一部脾臓が担っている種もある)。すなわち泌尿器と同居している。元来、造血が AGM(aorta-gonad-mesonephros, 大動脈-生殖隆起-中腎)領域から発生することを考えれば、これは不思議なことではない。

赤血球は、有核で楕円形であり、その数も哺乳類に比べ著しく少ない。血小板に相当するものが栓球である。一般的な正常値を表 XIII-4^{12,13)} に載せたが、魚は変温動物であり各血球数に大きな季節差があるうえ、種差も存在する。

c) 両生類

両生綱の無尾目または有尾目に属するカエルやイモリも実験動物として広く用いられている。カエルの種としては、アフリカツメガエルがもっともよく用いられる。ウシガエルは別名食用カエルと呼ばれるが、食用ばかりでなく実験に供されることがある。

アフリカツメガエルは、水中で生活し続け、餌も養魚用ペレットなどを与えるだけでよく、多くの個体を容易に管理できる。さ

らに、卵がホルモン処理で簡単にいつでも入手できる点、受精卵の蛋白合成活性が高く、その大きさからも実験操作が容易である点、そして変態といった生物学的特徴などから、発生学を中心に、生理学、細胞生物学、分子生物学といったさまざまな研究に用いられてきた。

採血方法は心臓採血が一般的であるが、やや熟練が必要である。しかしながら取り扱いや管理が容易で、成長も早いことから、熟練を積むことは容易である。両生類の造血は主に脾臓で行われるが、無尾類からは一部造血に骨髄が参加する。赤血球は大型で(直径平均 12~25 μ m)、有核であり、その数は少ないが、無尾目は有尾目に比べ 1 桁多い(表 XIII-4)⁹⁾。特に両生類は冬眠という特性を有し、血球数の季節変動が著しい。

3) 無脊椎動物

マーカーとして生物学実験に欠かせない GFP(green fluorescent protein) は、発光オワンクラゲ *Aequorea victoria* から遺伝子がクローンされた蛍光蛋白である¹⁴⁾。腔腸動物であるクラゲにも血球細胞は存在する。透明な無顆粒細胞、顆粒細胞、アメーバ状細胞などがそれである。造血は白体と呼ばれる脂肪組織が担っている。

ショウジョウバエやカイコといった昆虫も、実験動物としてよく用いられる。最近では、カイコにヒト M-CSF などのサイトカインをつくらせたり¹⁵⁾、その血液から抗菌性蛋白の分離に成功するなど、医学研究でもその有用性が高まっている。血球に相当す

表 XIII-5 ヒトとマウスの造血需要

	1 μ lあたりの赤血球数	体重	血液容積 (mL)	赤血球の寿命 (日)	1日あたりの赤血球産生	個体寿命 (年)	生涯の赤血球産生
マウス	9.0×10^9	25 g	1.8	50	3.2×10^6	2	2.4×10^{11}
ヒト	6.0×10^9	70 kg	4,900	120	2.5×10^{11}	80	7.3×10^{15}

るものや、免疫を担う細胞があることも証明されており、原白血球、プラズマ細胞(アメーバ状細胞)、顆粒細胞、小球細胞、エノシトイドなどの血球が存在する。造血組織は、前胸部にある翅芽に隣接する部位に確認されている。

Darwin の晩年の研究で有名なミミズは環形動物であり、ヤマトヒメミミズが再生の研究に利用されるなど、実験に使用されている。ミミズには肺のような呼吸器官がなく、肺なしに空気呼吸をする最大の生物といわれている。酸素は皮膚を通して血液に入り、ヒトのヘモグロビンより 50 倍も酸素親和力が強い特別なヘモグロビンを使って組織に酸素を運びこんでいる。細胞は体腔細胞 coelomocyte、リンパ球、単球、顆粒球、黄細胞がみられ、黄細胞以外は免疫応答に関与しているといわれる¹⁶⁾。造血部位は消化管の中腸領域を流れる背血管や腎管に分布する血管にあり、細胞は背部の体節状の組織内で分化する。

古くから再生研究に用いられてきたプラナリアは扁形動物に属し、三胚葉からなる動物の中でもっとも単純な構造をしている。偽体腔と血管をもち、その中に血液細胞が認められる。血液細胞には顆粒細胞や血液芽球と呼ばれる大型細胞が存在する。

無脊椎動物は脊椎動物と違い、開放血管形となっており、体表を切れば血液が流れ出る。血小板は存在せず、色素も直接血漿中に溶解しているため赤血球を持たない。無脊椎動物の血液学的数値については、標準的な血液の採取法が確立されていないことからさまざまなデータが報告されており、統一された見解はまだできていないのが実情である。

2. 各種実験動物における造血

1) 造血の場

脊椎動物の中で、ヒトを含めた哺乳類の造血は骨髄で行われている。鳥類でも造血のほとんどを骨髄が担っており、大腿骨の骨幹部はほとんどが赤色髄である。しかし鳥類で、哺乳類の胸腺に相当するのはファブリキウス嚢である。その他の脊椎動物では、造血の場は必ずしも骨髄ではなく、進化による造血巣の変遷をみるようで興味深い。

魚類では、造血の場は主に腎臓であるが、一部の種では脾臓が造血の主役を担う。魚類の中でメクラウナギはもっとも下等な脊椎動物であり、造血は腸管の粘膜下にある厚い脂肪組織で行われている。

両生類では、脾臓が造血の主役を担う。ただし有尾類の顆粒球は、肝臓の被膜直下で産生され、リンパ組織は脾臓や腸管粘膜に認められる。リンパ管系も発達しているが、腎臓や骨髄は造血に

参加していない。無尾類からは一部骨髄が造血に参加するようになるが、冬季は骨髄がほとんど脂肪髄になるなど、造血に季節変動が認められる。

爬虫類の造血は、両生類と鳥類、哺乳類の中間に位置するような特徴を持つ。骨髄と脾臓が造血の主役を担うが、種属によってその主座は大きく異なる。

2) 造血の発生

個体発生の過程によっても、造血の場は連続的に移動することが知られている。マウスでは脾臓が個体発生の中期から後期に肝臓以上に重要となり、ネコでは脾臓造血はほとんど認められないなど、動物種によっても著しく異なっている。

アフリカツメガエルのキメラを用いた解析により、腹部血島由来の血球細胞の大部分は赤血球として分化するが、少数の細胞は予定中腎領域に移動してから由来の異なる背側部の中胚葉細胞と混ざり、変態期になってから分化してくることが示された¹⁷⁾。

鳥類では、大動脈領域の血管内皮細胞から細胞塊が生じ、ここから胚体内造血が始まる。この大動脈領域が、血液前駆細胞の産生に重要な役割を果たしており、哺乳類の AGM 領域にあたるものであることが示唆されている¹⁸⁾。ちなみに、鳥類胚および哺乳類胚性幹細胞(ES 細胞)を中心とした研究により、造血幹細胞は造血細胞と内皮細胞の共通の祖先であるヘマンジオブラストから誘導されることがわかってきた。

従来、哺乳類における成体型造血系の起源は卵黄嚢にさかのぼると考えられてきた。しかし、卵黄嚢では成体型の造血幹細胞は出現せず、その出現は 10 日齢マウス胎子の AGM 領域で初めて認められることがわかった。結局、すべての脊椎動物において、成体型造血は AGM を起点として発生するらしい¹⁹⁾。

3) 造血の動態

表 XIII-5 は、ヒトとマウスの造血需要をまとめたものである²⁰⁾。下線部は、マウスが一生につくる赤血球を、ヒトは 1 日でつくっていることを示す。この表からヒトとマウスでは造血系の動態や制御に大きな違いがあることは容易に想像できる。マウスの造血が必ずしも忠実にヒトを反映するモデルになるとは限らない。

マウスの場合、レトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞の遺伝子標識研究から、移植後の造血系は、きわめて少数の造血幹細胞から由来することが報告されている²¹⁾。しかし、ヒトでは、造血幹細胞の動態、例えば、一体何個の幹細胞が造血系再構築に必要なのか、幹細胞は骨髄有核細胞中にどのくらいの頻度で含まれているのか、幹細胞はどのくらいの頻度で自己複製しているのか、等のデータがほとんど得られていないのが現状である。

3. 各種実験動物における血液細胞の比較

1) 赤血球

無脊椎動物の一部を除けば、動物の血液は着色している。色素としてヘモグロビンを持つ血液は赤い。ただし、ヘモグロビンが赤血球内に取り込まれるのは、ほぼ脊椎動物に限られる。先に述べた通り、ほとんどの無脊椎動物は赤血球を持たず、ヘモグロビンやヘモシアニンが直接血漿内に溶けている。軟体動物や節足動物は、血液中にヘモグロビンの代りにヘモシアニンが溶けている。これは銅を活性中心に持ち、二価銅を含む酸化ヘモシアニンは青色をしているため、血液は青くみえる。

ラット、ウサギ、ネコでは赤血球の大小不同性が強く、正常状態でもハウエル・ジョリー小体が認められる。これらの動物は同時に網赤血球も多くみられることから赤血球生成・消滅の回転が早いことを示唆している。マウスでは比較的大きさは揃っているが、やはりハウエル・ジョリー小体が認められ、これもマウスの赤血球寿命が短いことと関連している。

赤血球の大きさも種により異なり、その直径がマウスでは5.2~6.0 μm 、ラットで5.0~6.2 μm と他の動物に比べやや小さい。両生類の赤血球は大型で、特に有尾目では時に70 μm (平均24~38 μm)に達するものもある。鳥類、爬虫類、両生類の赤血球は有核であり、楕円形をなす。

赤血球の寿命は、イヌで90~120日、サルで86~105日とヒトの140日に近いが、マウスの赤血球寿命は20~45日、ラットで45~65日、鳥類では12日程度のものがあるなど短い。一方、カエルなどでは700日という報告もあり、種によりまるで異なってくる。

2) 白血球

哺乳類、鳥類では、免疫系を担う細胞はマクロファージ、好中球、リンパ球、単球など各種の細胞が存在するが、その比率は動物種によって大きく異なる。一般的に齧歯類、鳥類ではリンパ球の比率が高く、イヌやネコでは好中球の比率が高い。好中球の染色性も種によって異なり、ネコやマウスでは非常に染色されにくい。ウサギ、モルモット、ニワトリでは非常によく染まり、好中球がエオジン好性の顆粒を持った形態で、一見好酸球にみえるが、好酸球は別に存在するため、偽好酸球と呼ばれる。また、マウスの好中球はラットと違い、アルカリホスファターゼ染色で染まらない。顆粒球の核も種によって異なり、マウスやラットではリング状の独特な核を持った細胞がみられる²⁾。イヌやネコでは好中球の核が分節傾向に乏しく、サルでは過分節傾向が強い。

無脊椎動物も、免疫細胞に相当する食細胞を持っている。アメーバ状細胞は特に貪食活性が強く、捕食した異物をライソゾーム酵素で処理している。無脊椎動物にはBリンパ球やTリンパ球は存在しない。しかしながら、ミズなどの環形動物やヒトデなどの棘皮動物ではリンパ球様の細胞も存在し、異種あるいは同種他個体から移植された皮膚に対して拒絶反応を起こすといわれている。

節足動物の昆虫は、免疫学的に独自の進化を遂げている。原白血球、プラズマ細胞(アメーバ状細胞)、顆粒細胞、小球細胞、エノシトイドなどの多数の細胞が免疫を担っている。エノシトイドとは崩壊することで生体防御に関連しているとみられる、昆虫特有の免疫細胞である。

3) 血小板

哺乳類において血小板は、ほぼヒトと同様の機能を有するが、その数は齧歯類では全般的に高値の傾向がある(表 XIII-1)¹⁾。なお、ウサギではその数的個体差が大きいことも知られている。形態的にはマウスやラットでは、他の哺乳類に比べその容積が小さく、ウサギの血小板は大小不同で楕円形、円形、卵円形などさまざまな形をとる。

鳥類、魚類では栓球といって骨髄芽細胞から単核栓芽球が生成され成熟したもので、有核である。哺乳類にみられる巨核球は現われない。

無脊椎動物に血小板は存在しない。進化の過程で動物の血液循環系が閉鎖系になってから、血小板が出現したと考えられる。下等な動物が持つアメーバ状細胞などの大型の細胞には貪食能と粘着能があり、粘着能が凝固機能の原型と考えられている。

4. 各種実験動物における血液型の比較

1900年 Landsteiner によって、ヒトの血液に ABO 式血液型があることが発見されたことは有名である。Rh はアカゲザル Rhesus monkey の頭文字の Rh からつけられた名前前で、アカゲザルの血球とヒトの血球との間の共通抗原を Rh 因子と呼び、この両者の血球を合わせたとき凝集するものが Rh+、凝集しないものが Rh-となる。

サルの血液型は、ヒトと同じ ABO 型で判別できる。カニクイザルのように A, B, AB, O のすべての型があるものから、アカゲザルのように B 型しかいないもの、チンパンジーのように B 型がなかったり、キイロヒヒのように O 型がなかったり、ブタオザルのように A 型がなかったりするものもある。その他サル独自の血液型判定も存在し、カニクイザルやアフリカミドリザルの同種免疫抗体によって分離される G システムなども報告されている²²⁾。

イヌの血液型は、古来より伴侶動物であったことから、研究の進み具合はヒトの場合に劣らない。昨今のペットブームから、輸血や移植の適合標識としていっそう発展しつつあり、血液型判定技術は商業的に成り立っている。その血液型分類法も、日本で発見されたものだけで J, D, B 方式などがあり、多種多様であったが、それらを国際的にまとめた DEA 方式が分類の標準として用いられることが多い。この分類法では、イヌ独自の赤血球表面抗原として 16 種類が知られているが、そのうち 10 種はまれであるため、現在 6 種類のを主に使用している。

ウサギの血液型は、他の齧歯類同様、医学実験の歴史が長いこ

とから、その研究も古く、多数の血液型分類が報告されている。分類法としては H1・H2, K, G・g, K1・K2, Hg 等が知られ、いずれも 3~6 種類に分類される。しかしながら同一型でも研究者によって報告が異なり、見解としてまだ統一はされていない。

マウスでは 200 系統に及ぶ近郊系が作出され、その遺伝的モニタリングシステムが確立している。そのため、染色体地図が哺乳類の中でもっとも詳細に解析され、免疫学的遺伝子座が組織適合抗原や同種アロ抗原などのマーカーとして利用されている。赤血球の抗原としては、Ea-1 から 8 までの 8 遺伝子座によって支配される抗原が報告されている。それぞれの分布は各系統によって異なり、遺伝的モニタリングの指標の 1 つとして用いられる。有名な H-2 抗原系は、主要組織適合性抗原の 1 つであり、マウスで初めて発見された。

ニワトリでは 16 種の血液型分類法が確立されている。そのうちの 1 つ B システムは、マウスの H-2 やヒトの HLA と相同的な性質を示し、組織適合性に関与している。

5. モデル動物

ヒトの疾患を理解し、その治療法を解明するうえで、モデル動物はきわめて重要である。マウスではさまざまな系統の血液病モデルがつくられてきた。先に紹介したような系統の他、W/W^v マウスは先天的に赤血球の生産量が少ない貧血モデルであり、NZB マウスは自己免疫性溶血性貧血を発症するマウスである。

イヌでは、血友病モデル動物が存在し、米国には IX 因子欠損のイヌをコロニー化している²³⁾。また、ヒトの骨髄移植でノーベル賞を受賞した Donnell Thomas らのグループは、もともとイヌを用いたモデル実験から骨髄移植の基礎を築いた²⁴⁾。

ネコは、リンパ腫の自然発生頻度が高く (0.2%)、有用な疾患モデルとなりうる。ネコ白血病ウイルス (FeLV) やネコ免疫不全ウイルス (FIV) は、ネコ特有のウイルス疾患として、すでにウイルスも同定され、実験室内での感染も引き起こすことができることから、ヒトのウイルス性白血病や AIDS のモデルとしての応用が期待される。

疾患を実験的に誘発したものも、モデル実験動物としてよく用いられる。マウスでは、胚を遺伝子操作することによって、非常に多くの系統のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスが作製され、医学研究に多大な貢献をしてきたことは周知の通りである。鳥類では B 細胞の分化にファブリキウス嚢が必須であるため、幼若期にファブリキウス嚢を切除すると B 細胞欠損モデルをつくることができる。

霊長類は、遺伝的な制御が困難であることから、先天的な疾患モデルの系統は存在しない。しかし、ヒトへの外挿がもっとも容易な実験動物として、人為的なモデル動物 (パーキンソン病や心筋梗塞など) の作出はわれわれも試みている。また、GFP 遺伝子が組み込まれたトランスジェニック・アカゲザルも作製された²⁵⁾。ちなみにこのサルに名づけられた ANDI という名前は inserted DNA

の頭文字を逆に並べたものである。

日本では、実験動物中央研究所で繁殖育成された、小型の新世界ザルであるコモンマーモセットを用いた骨髄移植のモデル実験が東京大学医科学研究所において行われた²⁶⁾。国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センターでは、中型の旧世界ザルであるカニクイザルを自家繁殖させることにより SPF 化し実験動物としての樹立を行い、骨髄移植のモデル実験に利用している^{27,28)}。

おわりに

実験動物の扱いに際しては、生命に対する畏敬の念を常に抱きながら、動物福祉や倫理に十分な注意を払わなければならない。特にサルなどの高等動物では、米国研究審議会 (NCR) や国際実験動物管理協会 (AAALAC) が中心となり、飼育設備やケージのサイズにまで厳密な国際規格が定められている²⁹⁾。いたずらに動物の命を奪う医学実験は避けなければならない。対象となる動物の生物学的特性を知り、真に有用で必要最小限の動物実験を計画、遂行することが肝腎である。

(揚山 直英・花園 豊)

文 献

- 1) Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX et al: Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. J Toxicol Environ Health 18: 161-188, 1986
- 2) Hasegawa A: Atlas of the Hematology of the Laboratory Rat, Elsevier, Amsterdam, 1998
- 3) Mitraka BM, Rawnsley HM: Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals, Masson Pub, New York, 1977
- 4) 谷岡功邦: 実験動物の生物学的特性データ。堀内茂友編: ソフトサイエンス社, 1989, pp 481-490
- 5) Vogin EE, Oser F: Comparative blood values in several species of nonhuman primates. Lab Anim Sci 21: 937-941, 1971
- 6) 日本臨床衛生検査技師会: 血液正常値設定事業報告。衛生検査 31: 1185-1187, 1982
- 7) 吉田高志, 大藤圭子, 長文 昭ほか: カニクイザル (*Macaca fascicularis*) の血液学的測定値の成長にともなう変化。成長 33: 21-25, 1994
- 8) 山本春弥: 実験動物の血液学。関 正利, 平嶋邦猛, 小林好作編: ソフトサイエンス社, 1981, pp 402-409
- 9) Paw BH, Zon LI: Zebrafish. A genetic approach in studying hematopoiesis. Curr Opin Hematol 7: 79-84, 2000
- 10) Davidson AJ, Ernst P, Wang Y et al: *cdx4* mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple *hox* genes. Nature 425: 300-306, 2003
- 11) Moritomo T, Serata K, Teshirogi K et al: Flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst of ayu, *Plecoglossus altivelis*. Comparison with other fresh water fish. Fish Shellfish Immunol 15: 29-38, 2003
- 12) Murtha JM, Qi W, Keller ET: Hematologic and serum biochemical values for zebrafish (*Danio rerio*). Comp Med 53: 37-41, 2003
- 13) Smith GL, Hattingh J, Burger AP: Haematological assessment of effects of the anesthetic MS 222 in natural and neutralized from in three freshwater fish species, interspecies

- difference. *J Fish Biol* 15 : 633-643, 1979
- 14) Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G et al : Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 : 802-805, 1994
 - 15) Ji XH, Sun LH, Qin JC et al : Effects of rhM-CSF expressed in silkworm on cytokine productions and membrane molecule expressions of human monocytes. *Acta Pharmacol Sin* 21 : 797-801, 2000
 - 16) Stein E, Avtalion RR, Cooper EL : The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Morphology and phagocytic properties. *J Morphol* 153 : 467-477, 1977
 - 17) 前野 貢 : 両生類胚における造血発生. *細胞工学* 17 : 1716-1721, 1998
 - 18) Cormier F : Avian pluripotent haemopoietic progenitor cells. Detection and enrichment from the para-aortic region of the early embryo. *J Cell Sci* 105 : 661-666, 1993
 - 19) Robin C, Ottersbach K, de Bruijn M et al : Developmental origins of hematopoietic stem cells. *Oncol Res* 13 : 315-321, 2003
 - 20) Abkowitz JL, Persik MT, Shelton GH et al : Behavior of hematopoietic stem cells in a large animal. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 2031-2035, 1995
 - 21) Nolte JA, Dao MA, Wells S et al : Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 2414-2419, 1996
 - 22) 寺尾恵治, 本庄重男 : サル類の血液型をめぐる諸問題. *日獣会誌* 34 : 409-415, 1981
 - 23) Lozier JN, Dutra A, Pak E et al : The Chapel Hill hemophilia. A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 12991-12996, 2002
 - 24) Thomas ED, Storb R, Clift RA et al : Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med* 292 : 832-843, 1975
 - 25) Chan AW, Chong KY, Martinovich C et al : Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 291 : 309-312, 2001
 - 26) Hibino H, Tani K, Ikebuchi K et al : The common marmoset as a target preclinical primate model for cytokine and gene therapy studies. *Blood* 93 : 2839-2848, 1999
 - 27) Hanazono Y, Nagashima T, Takatoku M et al : In vivo selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. *Gene Ther* 9 : 1055-1064, 2002
 - 28) Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H et al : Safe and efficient methods of autologous hematopoietic stem cell transplantation for biomedical research in cynomolgus monkeys. *Comp Med* 52 : 445-451, 2002
 - 29) National Research Council : Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington DC, 1996

Age-related changes of intracellular A β in cynomolgus monkey brains

N. Kimura*‡, K. Yanagisawa†, K. Terao‡, F. Ono‡, I. Sakakibara‡, Y. Ishii*, S. Kyuwa* and Y. Yoshikawa*

*Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, †Department of Alzheimer's Disease Research, National Institute for Longevity Sciences National Center for Geriatrics and Gerontology, 36-3 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8522, and ‡The Tsukuba Primate Center, National Institute of Infectious Diseases, 1 Hachimandai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0843, Japan

N. Kimura, K. Yanagisawa, K. Terao, F. Ono, I. Sakakibara, Y. Ishii, S. Kyuwa and Y. Yoshikawa (2005) *Neuropathology and Applied Neurobiology* 31, 170–180

Age-related changes of intracellular A β in cynomolgus monkey brains

To confirm the intracellular accumulation of amyloid β -protein (A β), we carefully performed immunohistochemistry using brains of cynomolgus monkeys of various ages. Cortical neurones and their large neurites were immunostained with antibodies against A β in young monkey brains. In aged monkey brains, intracellular A β localized within cortical neurones; no clear association was found between the presence of intracellular A β and senile plaques (SPs). Interestingly, we did not observe A β -immunoreactive cortical neurones in brains fixed with neutral buffered formalin. Western blot analyses of microsomal and nerve ending fractions derived from the brains of young to aged monkeys revealed that intracellular A β generation changed with age. In the microsomal fraction, the amount of A β 42 significantly increased in brains from older monkeys (> 30 years of age), and the amount of

A β 43 significantly decreased with age in the microsomal fraction. The amount of A β 40 remained the same regardless of age. Biochemical analyses also showed that intracellular levels of each of these A β molecules significantly increased with age in nerve ending fractions. As we previously observed that a similar accumulation of presenilin 1, β -amyloid precursor protein (APP) and APP C-terminal fragment cleaved by β -secretase in the nerve ending fractions obtained from brains with SPs, the accumulation of intracellular A β in this fraction may be closely related to formation of spontaneous SPs with age. Taken together, these results suggest that intensive investigation of age-related changes in the nerve ending will contribute to a better understanding of the pathogenesis of age-related neurodegenerative disorders such as sporadic Alzheimer's disease.

Keywords: ageing, cynomolgus monkeys, intracellular A β , nerve ending fraction, paraformaldehyde, proteinase-K pretreatment

Introduction

Amyloid beta (A β) peptide consists of 40–43 amino acids and is derived from β -amyloid precursor protein (APP) [1]. A β is the major protein component of senile plaques (SPs), a characteristic feature of Alzheimer's disease (AD) [2]. Mutation of the APP gene is one causative factor under-

lying early onset familial AD; such mutations cause increased accumulation of A β in the brain [3–5]. APP is sensitive to proteolysis by α -, β - and γ -secretases, and cleavage of APP by β - and γ -secretases leads to the generation of A β [6–8].

Recent studies show that intracellular accumulation of A β in neuronal cells, rather than extracellular accumulation of A β aggregates (e.g. SPs), plays a very important role in promoting A β pathogenesis [9–17]. In brains from aged cynomolgus monkeys, particularly in those from monkeys over 20 years old, SPs spontaneously form in the

Correspondence: Nobuyuki Kimura, The Tsukuba Primate Center, National Institute of Infectious Diseases, 1 Hachimandai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0843, Japan. Tel: +81 0298 37 2121; Fax: +81 0298 37 0218; E-mail: kimura@nih.go.jp

neocortex; thus, the cynomolgus monkey is a useful animal model to investigate A β pathology [18]. We previously described in detail the age-related changes of the subcellular distribution of AD-related proteins, including presenilin1 (PS1), APP and APP C-terminal fragment (β CTF), a cleavage by-product of APP and β -secretase, in the brains of cynomolgus monkeys [19,20]. These AD-related proteins mainly accumulate in the nerve ending fraction. In the present study, we investigated the localization of intracellular A β in brains from young (4–8 years of age), adult (11–21 years of age) and aged (24–36 years of age) cynomolgus monkeys. Age-related changes in the subcellular distribution of intracellular A β were also biochemically assessed.

Materials and Methods

Animals

Twenty-seven cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) brains were used in this study. Of these, 8 brains were from young monkeys (age: 4–8 years), 13 were from adult monkeys (age: 11–21 years), and 6 were from aged monkeys (age: 24–36 years). With the exception of two cases (cases 19, 20), the frontal, temporal and occipital lobes were used for immunohistochemical studies of intracellular A β in the neocortex. Occipital lobes of 10 cases (cases 1–4, 17–20, 25, 27) were used for Western blot analyses.

All brains were obtained from The Tsukuba Primate Center, National Institute of Infectious Diseases, Japan. All animals were housed in individual cages and maintained according to the National Institute of Infectious Disease rules and guidelines for experimental animal welfare. Only one monkey (case 27) died naturally. The remaining animals were deeply anaesthetized with pentobarbital. Tissue blocks were fixed (see below) and embedded in paraffin for sectioning. Table 1 summarizes the age and sex of the animals and indicates which cases were used for immunohistochemical or biochemical analyses.

Antibodies

For immunohistochemical investigations, a mouse monoclonal antibody against A β (4G8; Signet, Dedham, MA, USA) was used for detecting total A β . For double immunohistochemistry, a rabbit polyclonal antibody against A β 40 (Ab40; IBL, Gunma, Japan) was used for detecting A β 40; a rabbit polyclonal anti-

Table 1. Cynomolgus monkeys used in the present study

Case	Age (years)	Sex	SP	NFT	Experimental purpose
1	4	M	ND	ND	IH and WB
2	4	M	ND	ND	IH and WB
3	4	M	ND	ND	IH and WB
4	4	F	ND	ND	IH and WB
5	7	M	ND	ND	IH
6	7	M	ND	ND	IH
7	8	F	ND	ND	IH
8	8	M	ND	ND	IH
9	11	F	ND	ND	IH
10	11	M	ND	ND	IH
11	17	F	ND	ND	IH
12	17	F	ND	ND	IH
13	17	M	ND	ND	IH
14	17	M	ND	ND	IH
15	20	F	ND	ND	IH
16	20	F	+	ND	IH
17	20	F	+	ND	IH and WB
18	21	M	+	ND	IH and WB
19	21	M	NT	NT	WB
20	21	M	NT	NT	WB
21	21	F	+	ND	IH
22	24	M	+	ND	IH
23	29	M	+	ND	IH
24	30	M	+	ND	IH
25	30	F	+	ND	IH and WB
26	35	F	+	ND	IH
27	36	M	+	ND	IH and WB

SP, senile plaques; NFT, neurofibrillary tangles; IH, immunohistochemistry; WB, Western blotting; M, male; F, female; +, detected; ND, not detected; NT, not tested.

body against A β 42 (Ab42; IBL, Gunma, Japan) was used for detecting A β 42; and a rabbit polyclonal antibody against A β 43 (Ab43; IBL, Gunma, Japan) was used for detecting A β 43. As Ab40, Ab42 and Ab43 specifically react with the C-terminal amino acids of A β 40, A β 42 and A β 43, respectively, we concluded that these three antibodies would be appropriate for detecting complete A β 40, A β 42 and A β 43. A mouse monoclonal antibody against NeuN (Chemicon, Temecula, CA, USA) was used for specifically staining neurones. For Western blotting, 4G8, Ab40, Ab42 and Ab43 were used to assess age-related changes in the subcellular localization of total A β , A β 40, A β 42 and A β 43, respectively.

Immunohistochemistry

Brain samples were fixed with 10% neutral buffered formalin or 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin.

Sections were deparaffinized by pretreating with 0.5% periodic acid, followed by autoclaving for 5 min at 121°C. Sections were then incubated free floating in primary antibody solution overnight at 4°C. Primary antibody dilutions were: 4G8 (1:150). It is noteworthy to emphasize that we did not pretreat these sections with 99% formic acid. This point will be elaborated later in the Results section. After brief washes with buffer, the sections were sequentially incubated with either biotinylated goat antimouse, followed by streptavidin–biotin–horseradish peroxidase complex (sABC kit; DAKO, Denmark). Immunoreactive elements were visualized by treating the sections with 3-3' diaminobenzidine tetroxide (Dojin Kagaku, Japan). The sections were then counterstained with haematoxylin.

For double immunohistochemistry, sections were deparaffinized by using the autoclaving method for 5 min at 121°C, then incubated free floating in primary antibody solutions containing NeuN (1:300) and Ab40 (1:200), Ab42 (1:200) or Ab43 (1:150) overnight at 4°C. Sections were then incubated with Alexa 488-conjugated goat antimouse IgG (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) or Alexa 568-conjugated goat antirabbit IgG (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 2 h at room temperature.

Subcellular fractionation of monkey brains

Subcellular fractions were prepared at 0–4°C from occipital lobes of 10 monkeys (cases 1–4, 17–20, 25, 27), as described by Tamai *et al.* [21]. Sucrose solutions were prepared in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.25 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM endoplasmic reticulum (EDTA). Brain tissue (~1.0 g) was homogenized in a glass homogenizer with 10 ml of 0.32 M sucrose solution and then centrifuged at 1000 g for 10 min. The pellet (P1) was resuspended in 0.32 M sucrose, and this solution was layered over a discontinuous density gradient consisting of 1.2 M and 0.85 M sucrose solutions. The suspension was centrifuged at 75 000 g for 30 min in a Hitachi RPS-27 swing rotor (Hitachi, Tokyo, Japan) to separate out P1 myelin and nuclei fractions. The supernatant (S1) from the P1 fraction was centrifuged at 13 000 g for 15 min to yield the P2 fraction. The supernatant (S2) from the P2 fraction was centrifuged at 10 5000 g for 60 min to obtain the microsomal (pellet) and cytosol (supernatant) fractions. P2 was resuspended in 0.32 M sucrose, layered over a

sucrose density gradient consisting of 1.2 M and 0.85 M sucrose solutions, and then centrifuged at 10 5000 g for 60 min to isolate the mitochondrial fraction. P2 myelin and synaptosome fractions separated as interface bands between the 0.32 M and 0.85 M sucrose layers and the 0.85 M and 1.2 M sucrose layers, respectively. The P1 and P2 myelin fractions were combined, diluted with ice-cold water, homogenized, and then centrifuged at 13 000 g for 15 min to sediment the myelin fraction. The P2 synaptosomal fraction was diluted in sucrose solution (final concentration: 0.85 M), layered over a solution of 1.2 M sucrose, and centrifuged at 75 000 g for 30 min. The purified nerve ending (synaptosome and synaptic plasma membrane) fraction separated as the interface between these two sucrose solutions.

Proteinase-K treatment

As the nerve ending fraction contained both synaptosomes and synaptic plasma membranes, some peptides or proteins associated with the exterior synaptic plasma membrane were included in this fraction. To rigorously investigate intracellular A β , each nerve ending fraction was pretreated with 20 μ l/ml Proteinase-K (Pro-K, tritirachium alkaline proteinase; Wako, Osaka, Japan) to obtain pure synaptosomes. This treatment was aimed at excluding from our analysis contamination of extracellular peptides and proteins.

Immunoblotting

To normalize the loading variance and confirm the purity of the three subcellular fractions, we immunoblotted the fractions as described previously [19]. Immunoblots for calnexin and synaptophysin served as controls. Endoplasmic reticulum (ER) and vesicles in the microsomal fraction were examined with a rat monoclonal antibody against calnexin (Transformation Research Inc., Framingham, MA, USA). The nerve ending fraction pretreated with Pro-K was examined with a mouse monoclonal antibody against synaptophysin (DAKO, Denmark).

Western blot analyses

Western blot analyses were performed to assess age-related changes in the subcellular distribution of each A β

molecule. In cases 1–4, 17–20, 25 and 27, brain homogenates from the occipital lobes were fractionated by sucrose gradient centrifugation into microsomal and nerve ending fractions. The nerve ending fraction was pre-treated with Pro-K as described above (see Proteinase-K Treatment). The proteins in each fraction were adjusted to 30 μ g, and then each fraction was analysed by using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE using 12.5% acrylamide gels). Separated proteins were blotted onto polyvinylidene fluoride membranes (Immobilon P; Millipore, Bedford, MA, USA).

The membranes were blocked with 5% nonfat dried milk in 20 mM PBS (pH 7.0) and 0.1% Tween-20 (Wako, Japan) overnight at 4°C, and then incubated with primary antibodies (4G8, 1:1000; Ab40, 1:1000; Ab42, 1:1000; Ab43, 1:1000) for 1 h at room temperature. They were then incubated with either horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse IgG or mouse antirabbit IgG (1:6000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) for 1 h at room temperature. Immunoreactive elements were visualized by using enhanced chemiluminescence (ECLplus, Amersham, UK).

Data analyses

To confirm the reproducibility of age-related changes in intracellular A β , immunoreactive bands obtained from the Western blots were quantified by using commercially available software (Quantity One; PDI, Inc., Upper Saddle River, NJ, USA). Data are shown as means \pm SD. For statistical analyses, one-way ANOVAs were performed, followed by the Bonferroni/Dunn *post hoc* test.

Results

Immunohistochemistry

In brain sections fixed with paraformaldehyde, 4G8 immunostained intracellular A β in a granular pattern in the neocortex of cynomolgus monkeys (Figure 1a–d). 4G8 immunoreactivity was observed in neurones, regardless of the age of the animal (Figure 1a–d). In addition, there were no regional differences in the pattern of 4G8 immunostaining (i.e. intracellular A β). Moreover, besides staining cell bodies, 4G8 also immunostained large neurites of large pyramidal neurones, even in brains from young monkeys (Figure 1a,b).

Although 4G8 immunoreactivity was observed in some cortical neurones of aged monkeys (Figure 1c,d), this immunoreactivity apparently was not associated with the formation of SPs.

In contrast to brain sections fixed with paraformaldehyde, those fixed with neutral buffered formalin failed to show 4G8 immunoreactivity in cortical neurones of a young monkey. In a brain from an aged monkey, although 4G8 immunostained several cortical neurones, immunoreactivity was much weaker than that observed in sections from a brain fixed with paraformaldehyde (data not shown).

Preabsorption of 4G8 with a specific antigen peptide completely abolished 4G8 immunoreactivity (Figure 1e), thereby confirming the high specificity of 4G8 for A β . These preabsorption experiments also served as controls.

To confirm whether A β specifically localizes only within neurones (not glial cells), brain sections from young and aged monkeys were double-immunostained with the neurone-specific antibody, anti-NeuN, and with one of the anti-A β antibodies Ab40, Ab42, or Ab43. Sections used for double immunohistochemistry were from brain samples fixed with paraformaldehyde. Ab40, Ab42 and Ab43 immunostained NeuN-immunoreactive cells, even in sections from the brains of young monkeys (Figure 2a–i). Ab40 immunostained cortical neurones and large neurites of large pyramidal neurones, regardless of age (Figure 2a–c). Similarly, both Ab42 and Ab43 also immunostained cortical neurones and large neurites of monkeys regardless of age (Figure 2d–i).

Immunoblotting

In immunoblots of proteins from microsomal fractions, anticalnexin labelled a 95 kDa band representing ER and vesicles; immunostaining intensity was unchanged with age of the animal (data not shown). In immunoblots of proteins from nerve ending fractions treated with Pro-K (Pro-NE fraction), antisynaptophysin labelled a 38 kDa band likely to represent synaptic vesicles. The intensity of antisynaptophysin immunostaining remained constant across all age groups (data not shown).

Western blotting and data analysis

As 4G8 reacts with all forms of A β , we concluded that 4G8-immunoreactive bands represent the total amount of A β present in any given sample. We investigated age-

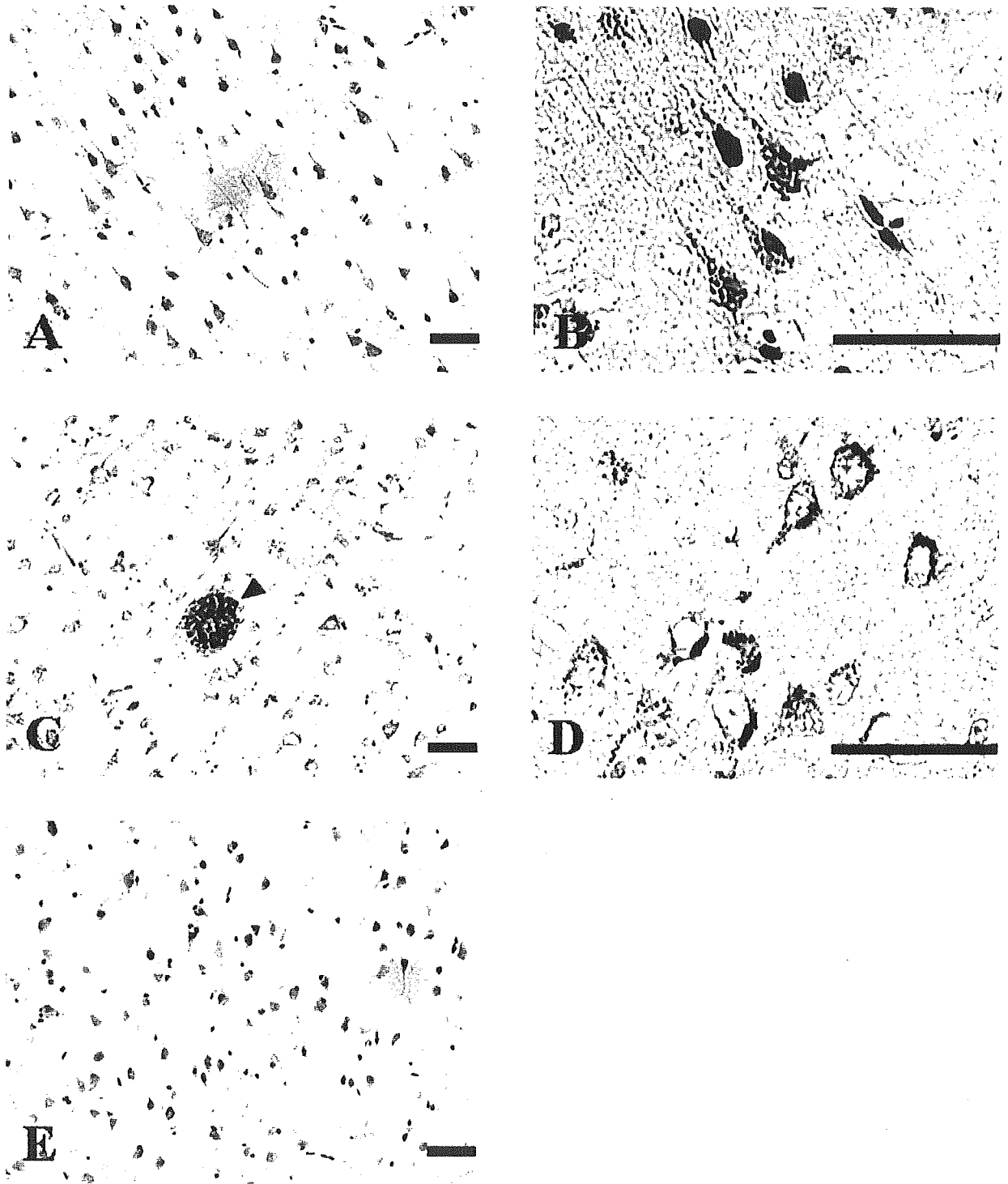


Figure 1. Photomicrographs of temporal lobe sections from a 4-year-old cynomolgus monkey (case 1; a, b, e) and a 36-year-old cynomolgus monkey (case 27; c, d). Sections were immunostained with the $A\beta$ -specific antibody 4G8 and counterstained with haematoxylin. (a) In sections from the young monkey, 4G8 immunostained cortical neurones in a granular fashion. (b) Higher magnification view of section shown in Figure 1a. In the neocortex, 4G8 also immunostained large neurites of pyramidal neurones. (c) In sections from the aged monkey, 4G8 immunostained cortical neurones. Arrowhead: senile plaque. (d) Higher magnification view of the section shown in Figure 1c. Immunoreactive granules primarily localized to cortical neurones. (e) Preabsorption control. The section adjacent to the one shown in Figure 1a was incubated in primary antibody solution preabsorbed with $A\beta$. Scale bars = 50 μ m.

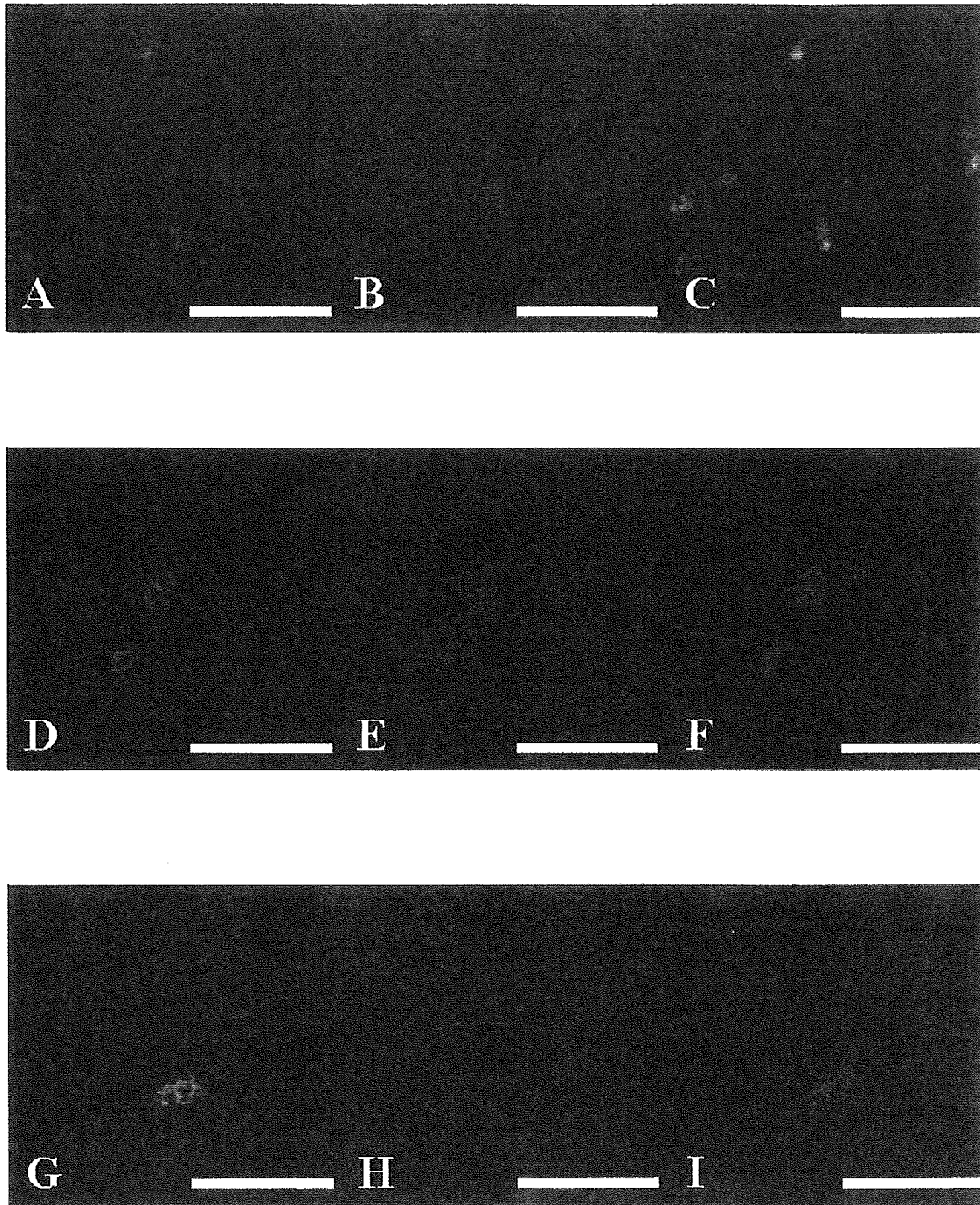


Figure 2. Photomicrographs of occipital lobe sections from a different 4-year-old monkey (case 4). Sections were double immunostained with NeuN and Ab40, Ab42 or Ab43. (a–c) Double immunostaining with NeuN (a) and Ab40 (b) reveal that A β 40 localizes to neurones in the neocortex. (cf. panel c, merged image of a and b). (d–f) Double immunostaining with NeuN (d) and Ab42 (e) indicates that A β 42 also localizes to neurones in the neocortex. (cf. panel f, merged image of d and e). (g–i) Double immunostaining with NeuN (g) and Ab43 (h) shows that A β 43 similarly localizes to neurones in the neocortex. (cf. panel i, merged image of g and h). Scale bars = 50 μ m.

related changes in the subcellular distribution of monomeric A β in the brain, because A β is produced as a monomer during APP cleavage, not as an aggregate [1,6–8]. This prompted us to evaluate the amount of monomeric A β in cynomolgus monkey brains.

In microsomal fractions, 4G8 immunostained a 4 kDa band representing total A β (Figure 3). The amount of total A β in the microsomal fraction increased with age, although not significantly (Figure 4a). Ab40, Ab42 and Ab43 also immunostained a 4 kDa band, representing A β 40, A β 42 and A β 43, respectively (Figure 3). The amount of A β 40 did not change much with age (Figure 4a). On the other hand, we found age-related changes of A β 42 and A β 43 in this fraction. The amount of A β 42 in the microsomal fraction significantly increased

with age; in contrast, the amount of A β 43 significantly decreased with age (Figure 4a).

In Pro-NE fractions, all anti-A β antibodies also immunostained a 4 kDa band (Figure 3). In this fraction, the amount of total intracellular A β significantly increased with age (Figure 4b), and the magnitude of this increase tended to be greater than that observed in microsomal fractions (Figure 4). Intracellular A β 40, A β 42 and A β 43 levels significantly increased with age, although the magnitude of the increase of intracellular A β 43 tended to be smaller than that observed for A β 40 and A β 42 (Figure 4b). Intracellular A β 40 levels increased about 3.7 times across age groups; intracellular A β 42 increased about 5.0 times; and intracellular A β 43 increased about 2.3 times (Figure 4b).

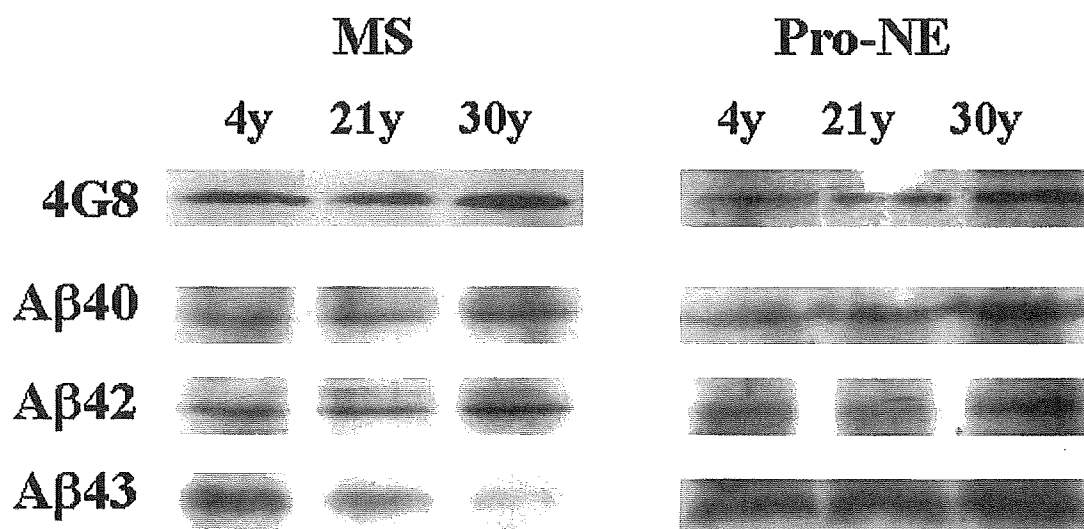


Figure 3. Western blots showing the expression of intracellular A β in microsomal and Pro-NE fractions from brains of various aged cynomolgus monkeys. The A β -specific antibody 4G8 immunostained a 4 kDa band representing total intracellular A β . Ab40, Ab42 and Ab43 immunostained 4 kDa bands representing intracellular A β 40, A β 42 and A β 43, respectively. Lanes contained fractions derived from the brains of young, adult and aged monkeys, as follows: 4y, 4-year-old monkeys (case 1); 21y, 21-year-old (case 20); and 30y, 30-year-old (case 25). MS, microsome fraction; Pro-NE, nerve ending fraction pretreated with Pro-K.

Figure 4. Age-related changes in the amount of intracellular A β in microsomal and Pro-NE fractions from the brains of various aged cynomolgus monkeys. Proteins from each fraction were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with appropriate antibodies. Immunoreactivity of the resulting bands was quantified, and data from the various fractions from old monkeys were compared to those from 4-year-old monkeys. * $P < 0.02$. Y axes show the mean values of the quantified data, and those from 4-year-old monkeys were set as standards, respectively. (a) Analysis of intracellular A β in the microsomal fraction. The amount of total intracellular A β (4G8) in the microsomal fraction increased with advancing age. Although the amount of intracellular A β 40 (A β 40) in the microsomal fraction remained stable with age, the amount of intracellular A β 42 (A β 42) significantly increased and the amount of intracellular A β 43 (A β 43) significantly decreased with age. (b) Analysis of intracellular A β in the Pro-NE fraction. The amount of total intracellular A β (4G8) in the Pro-NE fraction significantly increased with age. The amounts of intracellular A β 40, A β 42 and A β 43 (A β 40, A β 42 and A β 43) also significantly increased with age. In the Pro-NE fraction, intracellular A β 40 increased about 3.7 times with age, intracellular A β 42 increased about 5 times, and intracellular A β 43 increased about 2.3 times. Key: 4, 4-year-old monkey (cases 1–4, $n = 4$); 20+, 20- to 21-year-old (cases 17–20, $n = 4$); and 30+, 30- and 36-year-old monkeys (cases 25 and 27, $n = 2$).