

200711015A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

課題番号 (H19-生物資源-指定-004)

**動物資源の安定供給に向けた繁殖および
品質管理技術の高度化に関する研究**

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 保 富 康 宏

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20(2008)年3月

目 次

I. 総括研究報告

動物資源の安定供給に向けた繁殖および品質管理技術の高度化に関する研究

保富 康宏 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 染色体情報を伴うカニクイザルのマイクロサテライト・マーカ (MSM) の開発

寺尾 恵治 ----- 10

2. 動物資源の安定供給にかかわる研究

吉田 高志 ----- 15

3. 新規霊長類医科学研究用資源の開発・安定供給に関する研究

明里 宏文 ----- 19

4. 胚・配偶子の凍結保存技術に関する研究

山海 直 ----- 23

5. 疾患モデルマウスの環境要因と繁殖学的パラメーターに関する研究

松田 潤一郎 ----- 29

6. 胚・配偶子の凍結保存技術に関する研究

鈴木 治 ----- 32

7. マウス標準系統のプロファイリング

内尾 こずえ ----- 40

8. カニクイザルcDNAクローンの収集解析とゲノムマーカの開発整備

高橋 一郎, 亀岡 洋祐, 長田 直樹 ----- 45

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 50

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 53

動物資源の安定供給に向けた繁殖および 品質管理技術の高度化に関する研究

主任研究者 保富 康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター長

研究要旨 生物系研究資源は高品質な資源の安定的供給に加え多様な研究ツールと関連情報の集積・提供によりその価値が評価される。本研究では異なった生物資源グループの有機的連携により、小動物と霊長類の二種類の動物資源の安定的な供給システムの整備を行った。動物資源の安定供給では(1)カニクイザルの排卵を的確に把握し、交配計画を決定した。(2)新世界ザル3系統のコロニーの樹立を始めた。(3)マウスにおける飼料、環境要因等と疾病発症および繁殖に対する影響を解明した。配偶子の対外操作技術の開発では(1)カニクイザルの卵巣の凍結技術を開発した。(2)マウスの系統差における卵胞刺激ホルモンの受容体アミノ酸配列を調べ、各系統における受容体構造には差がないことを確認した。遺伝子情報による管理技術の高度化においては(1)カニクイザルマイクロサテライトマーカーの整備を試み人遺伝子との関連を調べ、100の多型性を確認した。(2)カニクイザルのcDNAライブラリーを骨髄および胸腺から作製し、未知遺伝子の同定を開始した。以上のことにより我が国における実験動物としての生物資源整備を行い、医科学研究の発展に寄与できる生物資源の整備計画を遂行した。

分担研究者

寺尾恵治

医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・特別研究員

吉田高志

医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・室長

明里宏文

医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・室長

山海 直

医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・主任研究員

松田潤一郎

医薬基盤研究所 生物資源研究部・研究リーダー

鈴木 治

医薬基盤研究所 生物資源研究部・主任研究員

内尾こずえ

医薬基盤研究所 生物資源研究部・研究員

高橋一朗

医薬基盤研究所 生物資源研究部・主任研究員

亀岡洋祐

医薬基盤研究所 生物資源研究部・主任研究員

長田直樹

医薬基盤研究所 生物資源研究部・研究員

A. 研究目的

医薬基盤研究所は創薬・医学研究に必須な生物研究資源として、遺伝子、細胞、小動物、霊長類、薬用植物の5種類の研究資源を総合的に整備、維持、供給する我が国唯一の研究機関である。生物系研究資源は、高品質な資源の安定的供給に加え、多様な研究ツールと関連情報の集積・提供によりその価値が評価される。本研究では、異なった生物資源グループの有機的連携により、小動物と霊長類の二種類の動物資源の安定的な供給システムを整備する。分担する生物資源グループはいずれも生産・供給の基盤体制を確立しているが、現状で未解決の問題に焦点を絞り、相互連携により下記の個別課題の効率的な達成を目的とした。

B. 研究方法

1. 動物資源の安定供給にかかわる研究：

①繁殖効率が著しく劣る疾患モデルマウスを対象として、病態の進行と繁殖学的パラメーター（繁殖成績、各種血中性ホルモン濃度など）との関連についての基礎データの収集を行い、給与飼料の違いなどによる繁殖能を検討し、系統ごとの効率的繁殖方

式を確立し、実験動物資源バンクからの安定供給体制を整備した（松田）。②各種マウス標準系統について、生活習慣および雌雄差に着目し、研究を進めるために疾患に大きな影響を与える食餌の与える影響を精査するために低カロリー食、通常食、高カロリー食を与えた雌および雄マウスについて、血清生化学（一般的な項目および主要サイトカイン）・各臓器（肝、腎、脂肪、筋、脾）の病理データ、疾患関連遺伝子の発現レベルを調べた。また性ホルモンが疾患に与える影響を検討する。これらの集積したデータを本研究終了時に疾患モデルマウスバンクのホームページにて公開した（内尾）。③カニクイザルで繁殖適正個体の選抜、適切な交配、早期妊娠診断、妊娠ザル管理、繁殖不適ザルの摘発に関わるパラメータと標準化手順を整備した。リスザル、マーモセット、タマリン等新世界ザルの安定供給に向けパイロットコロニーを作出し、飼育繁殖技術を確立した（吉田、明里、保富）。

2. 胚・配偶子の体外操作技術に関する開発研究：①マウスを用いて各種ホルモンの卵子体外成熟培養系への影響と LH 受容体の系統差・年齢差を調べることにより効率

的な卵子体外成熟法と排卵誘起法を検討した(鈴木)。②カニクイザル配偶子の安定的な体外操作技術と胚および配偶子の凍結保存法を検討した(山海)。

3. 遺伝子情報を基にした動物資源の品質管理技術の高度化：カニクイザル脾臓および胸腺より Total RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製し、cDNA クローンをそれぞれのライブラリーより分離し塩基配列を解読、クラスタリングの後、カニクイザルデータベースに加え、カニクイザル cDNA データベースを更新した(寺尾、高橋、亀岡、長田)。

(倫理面への配慮)

本研究では動物への外科処置、安楽殺を含む実験が必要なことから、動物福祉または動物実験倫理の問題に対する十分な配慮が必要である。この点に関しては

1) 医薬基盤研究所・動物実験委員会でのプロトコルの承認を前提とした。

2) 個体レベルでの実験プロトコルの作成にあたっては、法律第 105 号「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守するとともに、サル類の使用にあたっては「医薬基盤研究所・サル類を用いる実験指針」の精神に則り、使用動物数の根拠及び苦痛軽減の具体策を詳細に記述した。

C. 研究成果

1. 動物資源の安定供給：①マウスにおける飼料、環境要因等と疾病発症および繁殖に対する影響を解明した(松田、内尾)。②カニクイザルの排卵を的確に把握し、交配計画を決定した(吉田、保富)。③新世界ザル 3 系統のコロニーの樹立を始めた(明里、保富)。

2. 配偶子の対外操作技術の開発：①マウスの系統差における卵胞刺激ホルモンの受容体アミノ酸配列を調べ、各系統における受容体構造には差がないことを確認した(鈴木)。②カニクイザルの卵巣の凍結技術

を開発した(山海)。

3. 遺伝子情報による管理技術の高度化：①カニクイザルマイクロサテライトマーカーの整備を試み人遺伝子との関連を調べ、100 の多型性を確認した(寺尾、高橋、亀岡、長田)。②カニクイザルの cDNA ライブラリーを骨髄および胸腺から作製し、未知遺伝子の同定を開始した(寺尾、高橋、亀岡、長田)。

D. 考察

本研究では現在までに行われていなかった安定的なマウスおよび霊長類資源の供給体制の確立、それをを用いた疾患研究を遺伝子レベルから検討を行った。得られた成果はマウスから霊長類までのヒトにいたる医科学研究のモデル動物の研究の基盤体制の樹立に貢献できる結果を導きだしていると考えられる。このことは病態の把握、原因の追求、さらにはテーラーメイドも視野に入れた治療法・治療薬の開発とつながり、我が国の厚生労働行政に対し莫大な貢献をもたらすことが期待される。また、短期的な競争的研究開発を行う民間企業等では広く情報や治験を与える研究開発を行うことは困難であり、その意味においても生物資源を広く網羅しそれを集約していくことは重要であり、本研究で得られる結果は医科学の発展に非常に重要な位置づけ、結果をもたらすと考えられる。現在、新薬開発や新興感染症、難病指定疾患等の研究には実験動物の必要性は敢えて語る必要はないが総括的に生物資源として医科学研究に貢献する実験動物の整備を行う研究は少なく、その意味においても本研究は医科学研究において価値は高い。

E. 結論

医科学研究に必要な実験動物を生物資源という視点でとらえ動物個体からその遺伝子にいたる広範囲な研究を行い、安定的な

供給および詳細な情報の付加価値が実験動物に付与された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka Takahashi, Y., Yasunami, M., Naruse, T., Hinohara, K., Matano T., Mori, K., Miyazawa, M., Honda, M., Yasutomi, Y., Nagai, Y. and Kimura, A. Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA)-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis* 2007;28:918-924.
- 2) Nishikubo, K., Imanaka-Yoshida, K., Tamaki, S., Hiroe, M., Yoshida, T., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. Establishment of a novel animal model of myocarditis by utilizing different immune responses to Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in mice. *J. Autoimmun.* 2007 ; 29:146-153.
- 3) Yasuhiro Yasutomi. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. Holland, CR. and Miyamura, T Eds. Structure-based viral replication. World Scientific Publishing. 2007. p 539-552.
- 4) Okabayashi, S., Ohno, C., Kato, M., Nakayama H., Yasutomi, Y. Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Vet. Path.* in press.
- 5) Nomiyama H, Otsuka-Ono K, Miura R, Osada N, Terao K, Yoshie O and Kusuda J. Identification of a novel CXCL1-Like chemokine gene in macaques and its inactivation in hominids. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2007, 27:32-37.
- 6) Kikuchi T, Hara M, Terao K. Development of a microsatellite marker set applicable to genome-wide screening of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primates*. 2007, 48: 140-146.
- 7) Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tanuma R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of the genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *Genome Biology*, in press.
- 8) Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee Y-J, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H: GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection* 9, 515-521, 2007.
- 9) Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K, Mukai R. Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. *Virus Genes* 35, 281-288, 2007.
- 10) Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen Y, Lee Y-J, Unno N, Nishina K, Iwasaki Y, Maki N, Mizusawa H, Akari H: Efficient regulation of viral replication by systemically administered siRNA with cationic liposome in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361, 294-300, 2007.

- 11) 明里宏文：医学実験用霊長類を用いた病原体感染実験施設の管理運営におけるコンプライアンスとバイオセーフティ。JVM (獣医畜産新報) 60, 641-645, 2007
- 12) Sato H, Leo N, Katakai Y, Takano J, Akari H, Nakamura S, Une Y: Prevalence and molecular phylogenetic characterization of *Trypanosoma (Megatrypanum) minasense* in the peripheral blood of amsll neotropical primates (*Saimiri sciureus* and *Saguinus midas*) after a quarantine period. Journal of Parasitology, in press.
- 13) Shinichi Hayasaka, Yukihiro Terada, Kichiya Suzuki, Haruo Murakawa, Ikuo Tachibana, Tadashi Sankai, Takashi Murakami, Nobuo Yaegashi, Kunihiro Okamura Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin Va, MyRIP, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis Asian Journal of Andrology (in press)
- 14) Shinichiro Nakamura, Sachi Okabayashi, Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Tadashi Sankai, Fumiko Ono, Koji Fujimoto, Keiji Terao
Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey
Veterinary Pathology, 45: 67-72, 2008
- 15) Hironori Okada, Masanori Hatori, Nobuhiro Shimozawa, Hideaki Tsuchiya, Takashi Kuwana, Tadashi Sankai
Collection and culture of primordial germ cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)
Reproductive Medicine and Biology, 6, 203-210, 2007
- 16) Nobuhiro Shimozawa, Hironori Okada, Masanori Hatori, Takashi Yoshida, Tadashi Sankai
Comparison of follicular growth stimulation methods for collecting mature oocytes from cynomolgus and African green monkeys
Theriogenology, 67, 1143-1149, 2007
- 17) Hisayuki Nomiyama, Kaori Otsuka-Ono, Retsu Miura, Naoki Osada, Keiji Terao, Osamu Yoshie, Jun Kusuda.
Identification of a Novel CXCL1-Like Chemokine Gene in Macaques and its Inactivation in Hominids. J Interferon Cytokine Res. 27: 32-37 (2007).
- 18) Yasuhiro Uno, Yutaka Suzuki, Hiroyuki Wakaguri, Yoshiko Sakamoto, Hitomi Sano, Naoki Osada, Katsuyuki Hashimoto, Sumio Sugano, Itsuro Inoue.
Analysis of expressed sequence tags from liver in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): A systematic identification of drug-metabolizing genes. Febs lett. 582: 351-358 (2008).
- 19) Naoki Osada, Sumio Sugano, Yutaka Suzuki. Evolution of Gene Expression in Human and Chimpanzee Brains. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd: Chichester (2008).
- 20) 長田直樹, 高橋一朗. JCRB 遺伝子バンク: 疾患研究と創薬にむけた遺伝子バンク. 細胞工学 26: 1307-1308 (2007).

2. 学会発表

- 1) 唐松克夫、清水佑也、松原明弘、石川豊数、保富康宏：
抗酸菌分泌抗原 Ag85B の新規アジュバントとしての可能性. 第 11 回日本ワクチン学会(横浜)
- 2) 松原明弘、唐松克夫、保富康宏: IL-4 変異体を用いたヘルパー T 細胞(Th)反応調節によるインフルエンザウイルス感染の制御. 第 11 回日本ワクチン学会(横浜)
- 3) 岡林佐知、中山裕之、保富康宏: 実験用カニクイザルに認められた新生仔奇形の一例・・・第 114 回日本獣医学会
- 4) 保富康宏: 特別講演「粘膜に対する遺伝子免疫療法による疾患制御」日本臨床化学学会
- 5) 明里宏文: サルを用いた病原体感染実験実施におけるコンプライアンスとバイオセーフティ. 第 143 回日本獣医学会学術集会シンポジウム、平成 19 年 4 月
- 6) 岩崎優紀、明里宏文: C 型肝炎霊長類サロゲートモデルの開発. 日本レトロウイルス研究会学術集会、平成 19 年 7 月
- 7) 川合覚、斉藤直之、片貝祐子、小野文子、中村紳一郎、揚山直英、明里宏文、寺尾恵治: 磁気共鳴画像 (MRI) 検査による実験的脳マラリアの病態解析. 第 143 回日本獣医学会学術集会、平成 19 年 9 月
- 8) 岩崎優紀、飯島沙幸、木村展之、片貝祐子、揚山直英、明里宏文: 霊長類サロゲート C 型肝炎モデル: マーモセットにおけるくすぶり型慢性 GBV-B 感染. 第 143 回日本獣医学会学術集会、平成 19 年 9 月
- 9) Akari H, Ishii K, Iwasaki Y, Iijima S, Maki N, Mori K-i, Katakai Y, Kimura N, Yoshizaki S, Ageyama N, Yokota T, Suzuki T, Miyamura T: Development of chronic GBV-B infection in marmosets with smoldering plasma viremia. 14th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. September, 2007.
- 10) 岩崎優紀、石井孝司、飯島沙幸、榎昇、森健一、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、

- 揚山直英、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文: C 型肝炎サロゲート霊長類モデル: GBV-B は新世界ザルに潜伏感染する. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、平成 19 年 11 月
- 11) 冷岡昭雄、大山篤、手塚行雄、片貝祐子、小野文子、揚山直英、明里宏文: ABSL3 施設でのサル類飼育管理. 第 7 回日本バイオセーフティ学会学術集会、平成 19 年 11 月
 - 12) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Aberrant turnover of collagen type VI in the hearts of transgenic mice harboring Gal β 1,3 GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3GalII) transgenes. *Experimental Biology* 2007, Washington, DC., USA, 2007 年 4 月.
 - 13) 鈴木治、小浦美奈子、高野薫、野口洋子、内尾-山田こずえ、松田潤一郎. 心拡張を呈するシアル酸転移酵素多発現マウスの心臓 6 型コラーゲンの減少. 第 54 回日本実験動物学会総会、東京、2007 年 5 月.
 - 14) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Sequence Analysis of the FSH Receptor in the Mongolian Gerbil. 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, ON, Canada. 2007 年 6 月.
 - 15) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Protein profiling of mouse oocytes matured in vitro during the first wave of folliculogenesis. 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, San Antonio, TX, USA, 2007 年 7 月.
 - 16) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Strain difference of 2410146L05Rik, an oocyte/embryo specific gene in mice. 58th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Charlotte, NC, USA, 2007 年 10 月.

- 17) Suzuki O. Sequence comparison of FSH-receptors among 12 mouse strains. 21st International Mammalian Genome Conference, 京都, 2007年10月。
- 18) Suzuki O., Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K., Matsuda J. Microarray Analysis of Gene Expression in Mouse Oocytes Matured in vitro during the First Wave of Folliculogenesis. 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Washington, DC, USA, 2007年12月
- 19) Suzuki O., Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K., Matsuda J. Production of Pups by Ovarian Transfer in the Syrian Hamster. 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, CO. USA, 2008年1月。
- 20) 水町涼治、鈴木 治、村田勇二、松本貴博、那須昌弘、直弘、西勝英。4C30 マウスを用いた拡張型心筋症モデルとしての有用性の検討。第81回日本薬理学会年会, 横浜, 2008年3月。
- 21) Masanori Hatori, Hironori Okada, Nobuhiro Shimozawa, Fowzia Sultana, Ken-ichi Yagami, Tadashi Sankai
Comparison of the proliferation of embryonic stem (ES) cells, embryonic fibroblast of cynomolgus monkeys and the EScells of mouse
16th International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2007
- 21) Nobuhiro Shimozawa, Masanori Hatori, Tadashi Sankai
Characterization and in vitro differentiation ability of an embryonic stem like cell line in the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*)
16th International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2007
- 22) Shinichiro Nakamura, Sachi Okabayashi, Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Tadashi Sankai, Fumiko Ono, Koji Fujimoto, Keiji Terao
Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey
16th International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2007
- 23) Yoshitaka Ikeda, Hiroshi Koie, Kiichi Kanayama, Takeo Sakai, Mikiko Kobayashi, Miyako Kato, Keiji Terao, Tadashi Sankai, Naohide Ageyama
Establishment of echocardiographic reference values and effect of age on heart in cynomolgus monkey
16th International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2007
- 24) Koichi Kyono, Norio Owada, Tadashi Sankai
Cryopreservation of the entire ovary of cynomolgus monkey in a magnetic field environment
第34回日本低温医学会シンポジウム (札幌) 2007年11月
- 25) Hiroshi Koie, Naohide Ageyama, Shinichiro Nakamura, Kiichi Kanayama, Takeo Sakai, Keiji Terao, Tadashi Sankai
Antemortem echocardiographic diagnosis of double chambered right ventricle (DCRV) in two cynomolgus monkeys
58th AALAS national meeting (Charlotte, NC, USA) October, 2007
(AALAS: American Association for Laboratory Animal Science)
- 26) Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Shinichiro Nakamura, Kiichi Kanayama, Takeo Sakai, Keiji Terao, Tadashi Sankai
Nonhuman primate model of severe heart

failure associated with dilated cardiomyopathy

58th AALAS national meeting (Charlotte, NC, USA) October, 2007

(AALAS: American Association for Laboratory Animal Science)

27)石山昭彦、原田香奈子、三輪光春、福与恒雄、山下紘正、中山智里、宮本義孝、千葉敏雄、草野満夫、絵野沢伸、渡辺慎介、前田英樹、鹿山貴弘、山海直

TITS 治療における胎盤血管観察のための蛍光内視鏡

第 5 回日本胎児治療学会 (大阪) 2007 年 10 月

28)本多 新、廣瀬美智子、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、脇阪紀子、下澤律浩、羽鳥真功、山海直、小倉淳郎

ウサギ ES 様細胞の樹立・培養の効率化と解析

第 100 回日本繁殖生物学会 (東京) 2007 年 10 月

29)谷口遼馬、本橋秀之、山海直、佐藤嘉兵、加田日出美

成長途上卵母細胞の体外培養における組織の形態変化と成熟能について

第 52 回日本生殖医学会 (秋田) 2007 年 10 月

30)廣瀬美智子、本多 新、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、脇阪紀子、下澤律浩、羽鳥真功、山海直、小倉淳郎

ウサギ ES 様細胞の樹立と解析

第 24 回日本疾患モデル学会 (つくば) 2007 年 8 月

31)Tadashi Sankai A novel method for cryopreservation of ovarian tissue in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)

Organon sponsored special symposium, The 25th annual meeting of Japan society of fertilization and implantation (Sendai, Japan) August, 2007

32)Hideyuki H. Motohashi, Tadashi Sankai, Kahei Sato, Hidemi Kada

Development of Mouse Fetal Germ Cells in vitro and in vivo: Organ Culture of Female Genital Ridges, Graft under the Kidney Capsule of SCID Mouse and Maturation in vitro of the Grown Oocytes
25th Annual Meeting of Japan Hum Cell Society (Tokyo) August 2007.

33)Hideyuki H. Motohashi, Tadashi Sankai, Kahei Sato, Hidemi Kada

Factors Affecting Morphological Changes and Oocyte Maturation in Preantral Follicles and Oocyte-Granulosa Cell Complexes during Culture in vitro
25th Annual Meeting of Japan Hum Cell Society (Tokyo), August 2007.

34)遠藤圭介、持田慶司、大川美佳、三木洋美、羽鳥真功、山海直、柏崎直巳、小倉淳郎

マウスおよびウサギ未受精卵のガラス化保存法の検討

第 54 回日本実験動物学会 (東京) 2007 年 5 月

35)下澤律浩、岡田浩典、羽鳥真功、山海直 カニクイザルにおける簡略化した卵胞発育誘起法の検討

第 54 回日本実験動物学会 (東京) 2007 年 5 月

36)羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、八神健一、山海直

カニクイザルおよびマウス胚性幹細胞の増殖様式の比較

第 54 回日本実験動物学会 (東京) 2007 年 5 月

37)岡田浩典、下澤律浩、羽鳥真功、山海直 二種類のカニクイザル ES 細胞株へのリポフェクションによる遺伝子導入条件の検討
第 54 回日本実験動物学会 (東京) 2007 年 5 月

38) 揚山直英、鯉江 洋、中村紳一朗、金山喜一、酒井健夫、小野文子、寺尾恵治、山海直

霊長類拡張型心筋症モデルにおける基礎および臨床学的解析

第 143 回日本獣医学会 (つくば) 2007 年 4 月

39) Kanako Harada, Mitsuharu Miwa, Tsuneo Fukuyo, Toshiro Chiba, Mitsuo Kusano, Shin Enosawa, Shinsuke Watanabe, Hideki Maeda, Takahiro Shikuyama, Tadashi Sankai

ICG fluoroscopy for the visualization of the placental vascular network feasibility study

26th Annual IFMSS conference (IFMSS: International Fetal Medicine and Surgery Society) (Dutch Aruba) April, 2007,

40) 山田-内尾こずえ・澤田京子・國枝孝典：ネフローゼマウス (ICGN マウス) の病態進行パラメーターについて、第 144 回日本獣医学会、2007 年 9 月 2-4 日、江別

41) 國枝孝典・澤田京子・内尾こずえ：マウス卵胞発育過程における TNF α および TNF 受容体の発現解析、第 100 回日本繁殖生物学会、2007 年 10 月 18-22 日、東京

42) 山田-内尾こずえ・澤田京子・眞鍋昇：Matrix Metalloproteinase-12 はネフローゼマウス (ICGN マウス) の病態進行に関与する、第 145 回獣医学会、2008 年 3 月 28-30 日、相模原

43) カニクイザル cDNA ライブラリーコレクションの拡充とその解析 長田直樹、橋本雄之、楠田潤、亀岡洋祐、田沼玲子、平田誠、高橋一朗 第 30 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2007 年 12 月

44) ヒトゲノム中での遺伝子発現パターンと淘汰圧との関係 長田直樹 第 79 回日本遺伝学会 岡山大学 2007 年 9 月

カニクイザル由来 cDNA データベースの構築、

45) アカゲザルとの比較解析 長田直樹、橋本雄之、平田誠、田沼玲子、亀岡洋祐、楠田潤 第 23 回日本霊長類学会 滋賀県立大学 2007 年 7 月

H. 知的財産の出願・登録状況

1) 明里宏文、高崎智彦、倉根一朗：デングウイルス検査方法及びモデル動物 (2008 年、特許出願中)

染色体情報を伴うカニクイザルのマイクロサテライト・マーカー（MSM）の開発

分担研究者 寺尾 恵治（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）

研究協力者 東濃 篤徳（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）

数藤由美子（日本赤十字社・中央血液研究所）

研究要旨

カニクイザルの染色体地図作成および遺伝子マッピングに資するマイクロサテライト・マーカー（MSM）の整備を目的として、染色体情報を伴う122のMSMを確立した。

これまでに整備を終えているカニクイザルのBacterial Artificial Chromosome (BAC) ライブラリーの384クローンについて両末端の塩基配列を解析し、配列決定できた306クローンについて配列情報から対応するヒト染色体を特定した。近傍に位置するMSM候補配列を含むヒトゲノム配列から、アカゲザルのゲノム情報を参照して243のプライマーを設計し、カニクイザルで増幅しかつ多型性を示す122のMSMプライマーを確立した。これらのMSMは86-375bpのサイズ、平均対立遺伝子数は7.06 (2-14)、平均ヘテロ接合率は0.72 (0.18-0.92) で、75のMSMが0.72以上のヘテロ接合率を示した。ヒト染色体とアカゲザルの染色体との対応から、これらのMSMが存在するアカゲザル（マカクザル）染色体を同定した結果、すべてのマカク染色体をカバーしていることが明らかとなった。

A. 研究目的

アカゲザルを中心としてマカクザルのマイクロサテライト・マーカー（MSM）の整備が進められているが、染色体情報（染色体および周辺配列情報）が明らかなマーカーの整備が遅れており、遺伝性疾患家系を対象とした疾患遺伝子探索などの解析に支障が生じていた。我々はこれまでにカニクイザルの66のMSMを整備しているが、今年度は既に整備を終えているBACライブラリーを活用して、染色体が既知のMSMの整備を試みた。

B. 研究方法

1. DNA サンプルの調整：

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで飼育されている非血縁のカニクイザル10頭から10 mlのヘパリン加末梢血を得た。QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)によって末梢血よりゲノミックDNAを調整した。

2. プライマーの設計：

両末端の塩基配列が決定できた306のカニクイザルのBACクローンについて、両端配列をヒトゲノム情報と対応させ176クローンの

ヒト染色体位置を決定した。UCSC ゲノムブラウザ (<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Human&db=hg17&hgside=102947824>) および DNASIS ソフトウェアを使用し、マイクロサテライトマーカ候補配列を含むヒトゲノム配列に対応するアカゲザルゲノム配列を参照して、243 ペアのプライマーを設計した。設計したプライマーは UCSC ゲノムブラウザ内の BLAT 検索によってアカゲザルゲノムデータベースから唯一無二の配列であることを確認した。

3. 増幅、多型解析：

DNA 増幅のために一般的な PCR 条件 (変性 94°C・アニーリング 55°C・伸長 72°C) で増幅反応を行った結果、243 のプライマーの内 162 (66.7%) のプライマーで増幅が確認された (図 1)。増幅が確認された 162 のプライマーについては FAM, HEX, NED の 3 種類の蛍光色素を標識した GeneScan™ 用カスタム蛍光プライマーを作成し、GeneScan (ABI・ジェネティックアナライザ) によってカニクイザル 10 頭の非血縁個体で多型解析を行った。

C. 研究結果および考察

1. プライマー設計と歩留まり：

表 1 に配列決定、プライマー設計、カニクイザルでの増幅、多型解析の各段階での歩留まりを示す。384 クローンのうち 306 クローン (79.7%) で両端配列が決定できた。片側のみ配列決定できたクローン数は 45 であった。両末端配列決定クローンの内、ヒト染色体位置が決定できたクローンは 176 であった。176 クローンのヒト染色体情報からアカゲザルゲノム情報を参照して、243 の MSM 候補プライマーを設計した。その内、162 (66.7%) のプライマーによりカニクイザルで PCR 産物が得られた。増幅可能プライマーの内、最終的にカニクイザルで多型性が確認できたプライマーは 122 (75.3%) であった

(表 1)。これらのプライマーで検出される MSM は 76 個の BAC クローン近傍に位置していた。

2. ヘテロ接合率の分布：

図 1 に多型性が見られた 122 個のプライマーで判定される MSM の概略を示す。プライマーセットで検出される対立遺伝子 (アリル) 数は 2~14 で、平均は 7.06 アレルであった。ヘテロ接合率は 0.18~0.92 であり、平均ヘテロ接合率は 0.72 であった。平均以上のヘテロ接合率を示す比較的高い多型性を示すマイクロサテライトマーカ (ヘテロ接合率 > 0.72) の割合は 75 個 (61.5%) であった。

3. 染色体上の分布

表 2 に今回開発した MSM が存在する可能性のあるヒト及びアカゲザルの染色体番号と MSM の分布数を示す。ヒトとアカゲザルの染色体の対応は、Rogers et al., Genomics 87 (2006) 30-38 に基づいている。ヒト染色体との対応では、21 番染色体以外の常染色体および X 染色体に存在することが確認された。一方、ヒト染色体と対応するアカゲザル染色体では、すべての常染色体上に存在する MSM を確立することができた。特に、3、6、11、10 番染色体に関して比較的多くの MSM を整備することができた。

今後は今回開発できた MSM が存在する BAC クローンから DNA を抽出し、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) によって MSM のカニクイザル染色体上の位置を確認する予定である。カニクイザルで染色体情報と周辺配列情報が明らかな MSM が整備されると、網膜黄斑変性症や高脂血症などの、現在までに確認されているカニクイザルの遺伝性疾患の原因遺伝子の探索や、染色体地図の整備に有用となることが期待される。

D. 結論

カニクイザルで染色体情報を伴う 122 の

マイクロサテライトマーカーを新たに整備した。検出される対立遺伝子（アレル）数は2-14で、平均は7.06アレルであった。ヘテロ接合率は0.18-0.92であり、平均ヘテロ接合率は0.72であった。平均以上のヘテロ接合率を示す比較的高い多型性を示すマイクロサテライトマーカー（ヘテロ接合率>0.72）の割合は75個（61.5%）であった。またアカゲザルの染色体情報から今回整備した122のMSMにより、マカク属サルのすべての常染色体がカバーできることが判明した。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表（論文発表）

Nomiyama H, Otsuka-Ono K, Miura R, Osada N, Terao K, Yoshie O and Kusuda J. Identification of a novel CXCL1-Like chemokine gene in macaques and its inactivation in hominids. *Journal of*

Interferon & Cytokine Research, 2007, 27:32-37.

Kikuchi T, Hara M, Terao K.

Development of a microsatellite marker set applicable to genome-wide screening of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primates*. 2007, 48: 140-146.

Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tanuma R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of the genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *Genome Biology*, -in press-.

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

項目	個数	歩留(%)
両端塩基配列決定に供試したBACクローン数	384	—
両端塩基配列が決定できたBACクローン数	306	79.70%
ヒト染色体位置が決定できたBACクローン数	176	57.50%
アカゲザルゲノム情報を参照して設計したプライマー数	243	—
カニクイザルで増幅が認められたプライマー数	162	66.70%
カニクイザルで多型性が認められたプライマー数	122	50.20%

表 1. MSM プライマー設計に関わる各段階での歩留まり

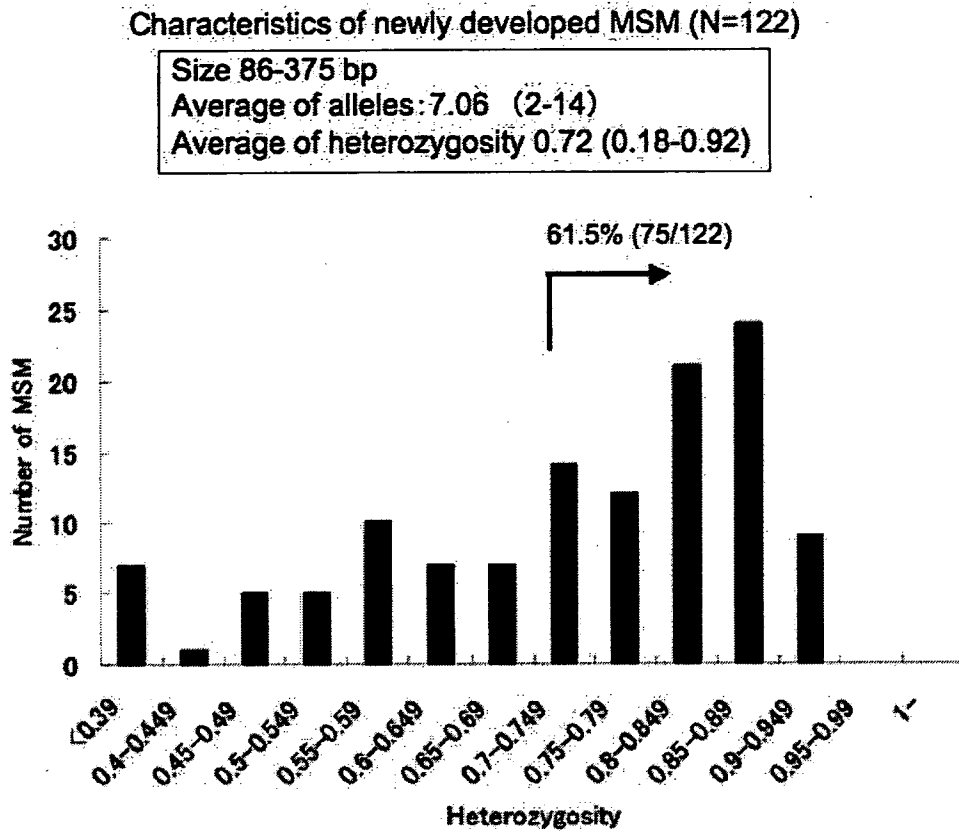


図 1. 新規に確立した 122 の MSM の概要と検出されるヘテロ接合率の分布

Number of cyno-MSM	Human chromosome#	Rhesus chromosome#
3	1	1
13	2	13, 12
7	3	2
4	4	5
10	5	6
4	6	4
12	7	3
5	8	8
2	9	15
2	10	9
6	11	14
11	12	11
7	13	17
3	14	7
5	15	7
5	16	20
1	17	16
4	18	18
1	19	19
1	20	10
0	21	3
10	22	10
6	X	

染色体が決定した MSM 数 染色体番号 染色体番号

表 2. 新規に確立した MSM のヒトおよびアカゲザル染色体での分布

動物資源の安定供給に向けた繁殖および 品質管理技術の高度化に関する研究

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資源開発研究室長

研究要旨

繁殖群の個体の適正化を計る為、①繁殖候補群から繁殖群への昇格の条件として、1産仔を得ること、②6回交配して妊娠しない個体は繁殖群から省くこと、とした。また、母体血中 mCG- β の検出が早期妊娠診断を行うのに適当であることがわかった。以上の検討によって、繁殖群のスリム化を計り、繁殖効率の改善が計られることが期待された。

A. 研究目的

現状のカニクイザル繁殖群は、個体ごとの繁殖能力が不均質であることから、繁殖効率の低下が生じている。繁殖集団の均質化を行い、繁殖効率の改善を目的として、最適な繁殖年齢の把握、繁殖不適ザルの摘発、雌雄同居を行う為の交配適期の推定、早期妊娠診断法の改良にかかわる生殖生理学的マーカーの開発等について検討を加え、効率的な繁殖群の維持システムの確立を試みる。

B. 研究方法

霊長類センターの繁殖候補群 86 頭（4.5 歳齢以上で未経産個体）および繁殖群 371 頭（出産経験のある個体）、計 457 頭（4.5～24 歳齢）を対象として 2006 年 3 月から翌年の 3 月までの 1 年間で、総計 1172 回の雌雄同居による交配を行った。交配は、月経出血初日を第 1 日目

とし、第 11 日目から 3 日間雌雄同居させる方法（3 日間交配）と第 9 日目から 7 日間同居させる方法（7 日間交配）の二種類を採用した。いずれの方法であれ、月経出血初日から 32 日目に大腿静脈から 2ml の採血を行い妊娠診断のためのホルモンの測定に供した。

ホルモンの測定値にかかわらず、交配後 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。

妊娠診断の為のホルモンの測定は、マカク属サル胎盤絨毛性生殖腺刺激ホルモン β 鎖（mCG- β ）を対象とし、測定はヒト用キット（ β -HCG キット、ABBOTT JAPAN CO., LTD）によった。ヒト用キットのカニクイザルのホルモン測定への適用の妥当性並びに測定値の信頼性については別途検討し確認を取った。

データの比較は、 χ^2 乗検定法によった。

C. 研究結果

3日間交配での妊娠率(妊娠数/交配数)は、13.1%(78/597)、7日間交配のそれは、17.0%(98/575)であり、7日間交配のほうが妊娠率はわずかに大きいものの統計学的に有意な差はなかった(図1)。

年齢別の妊孕性を見る為に各年齢で妊娠率を比較したところ4・5歳齢での3日間交配でそれぞれ7.0%・4.7%であり7日間交配でも9.3%・2.1%といずれも極端に低かった。またいずれの交配方式であれ20~24歳齢で妊娠したものはなかった。6~19歳齢ではいずれの方式であれ15~20%程度の妊娠率を示し、特に妊娠率が高いと言うような年齢層は認められなかった。

二つの交配方式の間で妊娠率に差がなかったため、以下の解析はふたつのデータをまとめて算出した。またこの調査期間中に妊娠した176頭の個体のみを検討の対象とした。

妊娠を作出するのに必要な交配回数は、1回の交配で妊娠するものは98例(55%)、2回のもの38例(21%、累積76%)、3回のもの23例(13%、累積89%)であり6回までの交配で総ての個体は妊娠していた。これらの妊娠例を得る為に要した交配数は319回であった。さらに6回以上10回まで交配した15例の中にはこの間に妊娠した例はなかった。また妊娠を得る為に必要な交配回数を年齢ごとに算出したが年齢による違いはなく、おおむね1.9回であった。

血中mCG- β 濃度の測定による妊娠診断で妊娠しているのを見逃していた例(いわゆるfalse negative)は、3日間交配で1例(1.3%)、7日間交配で8例(8.1%)であった。

D. 考察

カニクイザル等の狭鼻猿類(旧世界ザル)で人工繁殖を行おうとする場合、1頭のオスと複数頭のメスを長期間同居飼育させる、いわゆるハーレム方式と、交配適期いわゆる排卵時期に比較的短期間の雌雄の同居行う方式とがある。我々は、ハーレム形成時に闘争が発生しやすく動物の損傷が多い前者の方法ではなく、雌雄の関係も管理が容易であり受胎日ならびに胎子の胎齢が特定しやすく催奇形性実験等にも適用可能であり産仔の実験動物としての有用性の高い後者の方法を採用している。

個別飼育をしているオスとメスを同居させて妊娠させる場合は、交配の適期を推定する必要がある。交配適期の推定には、性皮の腫脹や頸管粘液の性状を見る方法が良く用いられている。また、尿中や血中のホルモン濃度をしようとする方法もある。しかし、狭鼻猿類や類人猿ではヒトと同じように性周期に伴う性器出血すなわち月経出血が認められる。この月経出血の間隔すなわち月経周期の長さを指標としては交配適期を推定する方法も推奨されている。

交配時の周期の長さを推定する方法として、個体ごとに前回の周期の長さを基準とする方法や、個体ごとの過去数回の周期の長さの平均値を基準とする方法が提案されており、我々もこれまでこれらの方法に準じて、次回周期の長さを推定し、その推定周期の長さに応じて交配時期を微妙に調節してきた。しかし、60頭の動物から得られた240の月経周期の長さの統計学的解析から、前回の周期の長さは次回の周期の長さの指標にはならないことを明らかにした。前回の周期の長さは如何であれ次回の周期

の長さは、28日の長さに回帰する傾向にあるわけである。そこで前回周期の長さなどにこだわることなく28日の周期のときに最も排卵が期待される12日目ごろに交配を設定すればいいことになる。

そこで同居期間は従来と同一にして、11日目に雌雄の同居を開始し14日目に分離すると言う3日間同居方式を標準とした。他方、血中ホルモン濃度の測定によって排卵日を推定したところ6~10歳齢の若齢群と15~23歳齢の老齢群とでは、老齢群のほうが排卵日のばらつきが大きくなる傾向が有ることも明らかになった。そこで、老齢個体を観点に入れて12日目をはさんだ9日目から同居を行い16日目に分離を行う7日間同居方式との比較も行った。

検討の結果、3日間交配でも7日間交配でも、全体の妊娠率、年齢ごとの妊娠率等の間には顕著な差を認めることが出来なかった。すなわち7日間交配が、排卵日がばらつく傾向にある老齢個体においても必ずしも有効でなかったわけである。換言すれば、3日間交配でも、老齢個体に対して一定の有効性を有していることになる。妊娠を作出する効果が同じであるならば、オスの拘束期間が3日間交配の2.3倍である7日間交配のほうが非効率的であることになる。

早期妊娠診断法の開発として、妊娠特有の蛋白ホルモンである血中のmCG-βの検出を試みた。母体血中のmCG-βは、妊娠後3~4週目に一過性の増加を呈する。3日間交配の場合の交配3週後は月経周期の32日目でありmCG-βの検出による妊娠診断での妊娠の見逃しが1.3%にとどまったのはこの方法による妊娠診断の的確性を証明

しているものと判断される。また前回の月経出血から32日目での妊娠診断であるから、もしこのときに妊娠していなければこのときの周期で交配が可能であり、繁殖の効率化も計れることになる。カニクイザルの場合、妊娠中も月経出血と区別のつかない性器出血（偽月経）が複数回にわたって観察されることも多く、性器出血が見られたからといって妊娠していないと断言することは出来ない。従来の超音波画像診断方式による妊娠診断では、交配以後5週目、すなわち月経初日から約46日目であり交配のチャンスを少なくとも1回は逃してしまう。

他方、7日間交配では交配の初日近くに妊娠した場合、採血日は交配の4週目あたりになりmCG-βの検出の有効性が発揮されることが期待されるが、末日近くの妊娠では妊娠の2週目ごろとなりまだmCG-βの増加時期の前であり、mCG-βがまだ検出できず、そのために妊娠の見逃し率が8.1%に達したものと判断される。別の観点からこの結果を見ると、個別飼育下での雌雄同居交配方式ではカニクイザルは同居後すぐに交尾し妊娠することが多いものと考えられる。そのために7日間交配方式では、mCG-βの検出の有効が発揮されなかったものと判断される。

また、この観察期間中に妊娠した個体の妊娠の様子を見ると、176個体の妊娠例が得られ、そのうちの55%の妊娠は初回の交配で得られた。2回目の交配の成績を加えれば76%に達し、3回目を加えると89%であった。6回目までの累積は100%であり、6回以上10回まで交配を行っても妊娠例は得られなかった。要するに、妊孕性ある個

体は 6 回程度まで交配すれば妊娠し、6 回まで交配して妊娠しない個体は妊孕性が無い個体であると判断して繁殖群から排除することが妥当であろうと判断される。176 頭の個体の妊娠に要した交配回数は 319 回であり妊娠率は 55.2%になる。この数字は、野生由来動物で繁殖群を構成していた当時のものとほぼ同じであった。

繁殖集団の質の向上のためには、5 歳齢未満である未経産のメスは、あくまでも繁殖候補メスとし、繁殖群は 1 産目を経験した個体で構成することが重要である。そして、繁殖群の個体であっても 6 回までの交配で妊娠しない個体を排除することによって群を構成することが肝要である。

E. 結論

カニクイザルの大規模繁殖システムの効率化を計るため 1 年間をかけてカニクイザルの交配実験を行った。交配時期を月経出血第 1 日目から数えて 12 日目を中心にして雌雄の同居を 3 日間行う (3 日間交配) と 7 日間行う (7 日間交配) とで妊娠率を比較したがいずれの方法であれ 15%程度の成績しかえられなかった。そこで、この期間に妊娠した 176 頭の個体の条件について検討を加えたところ①繁殖候補群から繁殖群への昇格の条件として、1 産仔を得ること、②6 回交配して妊娠しない個体は繁殖群から省くこと、という原則を提唱した。また、3 日間交配方式を採用することによって、母体血中 mCG- β の検出が早期妊娠診断を行うのに適当であることがわかった。以上の検討によって、繁殖群のスリム化をはかり、繁殖効率の改善が計れるようになった。

G. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
無し

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し