

200811015A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 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21 (2009) 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・マーカー (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に関する研究

明里 宏文 18

4. 胚・配偶子の凍結保存技術に関する研究

山海 直 22

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 27

6. 胚・配偶子の凍結保存技術に関する研究

鈴木 治 31

7. マウス標準系統のプロファイリング

内尾 こずえ 37

8. カニクイザルcDNAクローンの収集解析とゲノムマーカーの開発整備

高橋 一朗, 亀岡 洋祐, 長田 直樹 43

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 47

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

研究代表者 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

本研究では基盤研の利点である複数の生物資源維持体制を生かし、動物系研究資源に共通なコンセプトに基づき、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。(1)カニクイザルの品質の向上を目的にDタイプレトロウイルス(SRV/D)のカニクイザルコロニーでの感染状況を調査し、SRV/D 費感染コロニーの拡大を行った。(2)新世界ザルを用いてデング熱および熱帯熱マラリアにおける新たな感染系を樹立した。(3)カニクイザルの卵巣の凍結技術を開発した。(4)カニクイザルマイクロサテライトマーカー(MSM)の整備を試み新たに377の新規MSMを確立した。(5)繁殖効率が悪い癩癩モデルマウスにおいて低タンパク飼料を用いると繁殖率の改善が認められることが確認された。(5)カニクイザルのcDNAライブラリーを骨髄および胸腺から各10,000クローン作製した。(6)マウスの系統差における黄体化ホルモン受容体(LHR)のアミノ酸配列をしらべ排卵誘起へのLHRの系統差は無視出来ないことが確認された。遺伝子情報による管理技術の高度化においては(7)マウス系統差における食餌と生活習慣病因子との関係を検討したところ、系統差により大きな違いがあることが認められた。(8)低繁殖性を示すEL てんかんマウスについて、低蛋白飼料が脂肪蓄積の減少をもたらすことで、肥満傾向に伴う繁殖効率の低下を抑制する可能性を示した。以上のこと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う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・医学研究に必要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) SRV/D 非感染ザルによるコロニーの構築を目指している。本研究では SRV/D 抗体検査および PCR 検査を行った。(2) 新世界ザルであるコモンマーモセット及びコモナリスザルを用いたデング熱及び熱帯熱マラリアにおいて有用な霊長類感染モデルの作製を試みた。(3) 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。(4) 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

行った。(5) カニクイザルの脾臓、胸腺の各組織からオリゴキャッピング法により完全長 cDNA ライブラリーを作成した。(6) マウスの系統差における黄体化ホルモン受容体(LHR)のアミノ酸配列を解析した。(7) マウス系統差における食餌と生活習慣病因子との関係を検討した。(8) 低繁殖性を示す EL てんかんマウスの飼料と繁殖率の関係を検討した。

(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) SRV/D 検査の結果、サルの糞尿の接触がない環境で飼育すれば感染はほとんど拡大しないこと、SRV/D 陽性個体から生まれた

子どもの 67%が感染していることが明らかとなった(保富、吉田)。(2)新世界ザルであるコモンマーモセット及びコモンリスザルを用いたデング熱及び熱帯熱マラリアにおいて有用な霊長類感染モデルが得られた(明里)。(3) カニクイザルを用いて卵巣の凍結保存および移植実験を試みたところ、E2、プロジェステロン、FSH、LH の関連が明らかになり、移植した凍結融解卵巣が1年以上にわたり機能していることが確認された(山海)。(4)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)の整備を行い、今年度新たに染色体情報を伴う377のMSMを確立した。この結果二年間で499の新規MSMが整備できた(寺尾)。(5)カニクイザルとアカゲザルのゲノム情報を比較し、アカゲザルゲノム情報をベースにしたカニクイザルゲノムブラウザを作成した。このデータベースはカニクイザルのcDNA位置情報だけでなく、ゲノム資源であるBACクローンの位置情報やカニクイザルの疾患原因遺伝子にも有用なマイクロサテライト座位の多型情報も統合されており、今後のカニクイザルを用いた遺伝研究の重要な基盤になると考えられた(長田、亀岡、高橋)。(6)黄体化ホルモン受容体(LHR)のアミノ酸配列やmRNAの発現量と誘起排卵数との相関では、排卵数との明確な相関は見られなかったが、ホルモン刺激前の幼若個体のLHR mRNAには系統差が見られ、さらにmRNA量の上昇とLHR蛋白質発現にタイムラグがあることがわかった(鈴木)。(7)生理的特性、特に生活習慣病に深く関与するホルモンおよび免疫機能を制御するサイトカインについて精査したところ、マウス系統差・雌雄差に明らかに差違が認められた(内尾)。(8)高蛋白飼料群と低蛋白飼料群を比較した結果、低蛋白飼料群で雌雄とも体重の有意な減少が認められ、臓器重量は肝臓などでやや低下傾向を示した(松田)。

D. 考察

医科学研究における実験動物等の生物資源の必要性は周知である。研究に使用される生物資源は質、供給量ともに非常に重要となる。さらに、研究に応じて小動物から霊長類までの広い範囲で使用できることが理想である。国内外においてこの様に広い範囲で高品質の実験動物を使用できる環境は決して多くは無い。その大きな要因として各種実験動物において情報や研究の交流が無いことが考えられる。本研究では小動物から霊長類までの実験動物が同一研究所内に存在するという環境、ならびにその遺伝子から生理学的な特質までを研究するというグループにより、今までにない実験動物という生物資源の充実が図られた。遺伝的なバックグラウンドが均一であるマウス等の小動物とヒトに近い霊長類を遺伝子レベルから研究するという事は医科学研究の本質に迫るものである。本研究の充実を図ることが我が国の医科学研究の発展に大きく寄与すると考えられた

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) Okabayashi, S., Ohno, C., Kato, M., Nakayama H., Yasutomi, Y. Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*).

Vet. Path. 45:232-235, 2008.

2) Tsuchida, J., Yoshida, Y., Sankai, T. and

Yasutomi, Y. Maternal behavior of laboratory-born, individually reared long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*).

J. Am. Assoc. Lab. Anim. 47:29-34, 2008.

3) Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol. Res.* July Epub ahead, 2008.

4) Yasui, F., Kai, C., Kitabatake, M., Inoue, S., Yoneda M., Yokochi, S., Kase, R., Sekiguchi, S., Morita, K., Hishima, T., Suzuki, H., Karamatasu, K., Yasutomi, Y., Shida, H., Kidokoro, M., Mizuno, K., Matsushima K. and Kohara, M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunol.*:47;1-6, 2008.

5) Morioka, T., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura, A., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* in press

6) Okabayashi, S., Ohno, C. and Yasutomi, Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* in press

7) 清水裕也, 唐松克夫, 松原明弘, 保富康宏 : ワクチンアジュバントの開発 日本臨床 66 : 1915-1921, 2008.

8) 松原明弘, 清水裕也, 唐松克夫, 保富康宏 : 経口ワクチンの開発 日本臨床 66 : 1873-1878, 2008.

9) 辻村祐佑, 加藤翔太, 保富康宏 : アレルギー性疾患に対するワクチン開発 PHARMASTAGE 8 : 14-21, 2009.

10) Blancher A., Bonhomme M., Crouau-Roy B., Terao K., Kitano T., Saitou N. Mitochondrial DNA Sequence Phylogeny of 4 Populations of the Widely Distributed *Cynomolgus* Macaque (*Macaca fascicularis fascicularis*). *J Hered.* 2008 99(3): 254-264.

11) Terao K. Dynamic changes in early development of immune system in macaque monkeys -The significance from standpoint of the preclinical toxicity test using nonhuman primates- *Journal of Toxicological Science*, 2009, -in press-

12) Hiyoshi M., Suzu S., Yoshidomi Y., Hassan R., Harada H., Sakashita N., Akari H., Motoyoshi K., Okada S. Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111, 243-250, 2008.

13) 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* 94, 1128-1138, 2008.

14) Kawada M., Tsukamoto T., Iwamoto N., Kurihara K., Takeda A., Moriya C., Takeuchi H., Akari H., Matano T. Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based viral containment in a macaque AIDS model. *Journal of Virology* 82, 10199-10206, 2008.

15) Nakajima T., Ohtani H., Satta Y., Uno Y., Akari H., Ishida T., Kimura A. Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics* 60, 727-735, 2008. (Sep 23, 2008; Epub ahead of print)

16) Hohjoh H., Akari H., Fujiwara Y., Hirai H.

Wada K: Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. **Gene** 432, 60-66, 2009. (Nov 24, 2008; Epub ahead of print)

17) Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Ito K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T: Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. **Retrovirology**, 6, 1, 2009.

17) Akari H, Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S: Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. **Microbiology and Immunology** 53, 53-57, 2009.

18) Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. **Cancer Science**, in press.

19) N. Shimozawa, T. Sankai, A. Ogura. Reproductive technologies and related studies in the cynomolgus monkey. **J. Mamm. Ova Res.** 25: 133-142, 2008

20) A. Honda, M. Hirose, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, N. Shimozawa, M. Hatori, N. Shimizu, T. Murata, M. Hirose, K. Katayama, N. Wakisaka, H. Miyoshi, K. Yokoyama, T. Sankai, A. Ogura. Stable ES cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. **Reprod. Biomed. Online.** 17: 706-715, 2008

21) J. Tsuchida, T. Yoshida, T. Sankai, Y. Yasutomi. Maternal behavior of laboratory-born, individually reared long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.** 47: 1-6, 2008

22) S. Hayasaka, Y. Terada, K. Suzuki, H. Murakawa, I. Tachibana, T. Sankai, T. Murakami, N. Yaegashi, K. Okamura. Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin

Va, MyRIP, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis. **Asian J. Androl.** 10:1-8, 2008

23) S. Nakamura, S. Okabayashi, N. Ageyama, H. Koie, T. Sankai, F. Ono, K. Fujimoto, K. Terao. Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey. **Vet. Pathol.** 45: 67-72, 2008

24) Uchio K, Sawada K, Manabe N. The expression of macrophage metalloelastase (MMP-12) in podocytes of hereditary nephrotic mice (ICGN strain). **The Journal of Veterinary Medical Science** 2009 (in press)

25) Yamamoto Y, Ishino F, Kaneko-Ishino T, Shiura H, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O, Sato K. Type 2 diabetes mellitus in a non-obese mouse model induced by megl/grb10 overexpression. **Exp. Anim.** 2008 57(4): 385-395

2. 学会発表

1) 松原明弘、清水裕也、加藤翔太、河岡義裕、保富康宏: IL-4 アンタゴニストを用いた 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 56 回日本ウイルス学会 岡山 10 月 26 日-28 日

2) 松原明弘、高村史記、清水裕也、保富康宏: SIVmac239 の Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖欠損株を用いた SIV DNA ワクチンの開発 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

3) 千代智子、関口敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆宇、村井深、小原道法: HCV 遺伝子組み換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

4) 関口敏、千代智子、飛田良美、松原明弘、保富康宏、村井深、小原道法: HCV 遺伝子組み換えワクチニアウイルスの治療ワクチ

ン効果第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

5) Marni Cueno, 唐松克夫, 保富康宏, Antonio Laurena, 岡本尚 : Immunogenicity of HIV-1 Tat protein expressed in tomato. 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 10 月 26 日-28 日

6) 岩崎優紀, 飯島沙幸, 吉田友教, 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 第 146 回日本獣医学会学術集会 (宮崎) 平成 20 年 9 月 24 日

7) 岩崎優紀, 森健一, 横昇, 石井孝司, 飯島沙幸, 吉田友教, 吉崎佐佐香, 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 長期持続感染サル of ウイルスゲノム解析 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (岡山) 平成 20 年 10 月 26 日

8) 齊藤暁, 飯島沙幸, 岩崎優紀, 海津雅彦, 足立昭夫, 野間口雅子, 俣野哲朗, 明里宏文 サル PBMC およびサル個体内における新規サル細胞指向性 HIV-1 クローンの増殖 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (岡山) 平成 20 年 10 月 26 日

9) 大松勉, 平山隆則, 小滝徹, 伊藤美佳子, 片貝祐子, 中村紳一朗, 明里宏文, 高崎智彦, 倉根一郎 マーモセットを用いたデングウイルス感染モデルの構築 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (岡山) 平成 20 年 10 月 26 日

10) 海津雅彦, 齊藤暁, 飯島沙幸, 岩崎優紀, 足立昭夫, 野間口雅子, 俣野哲朗, 明里宏文 サル PBMC およびサル個体内における新規サル細胞指向性 HIV-1 クローンの増殖 第 22 回日本エイズ学会学術集会 (大阪) 平成 20 年 11 月 26 日

11) N. Shimozawa, M. Hatori, T. Sankai. Fertility of older female cynomolgus monkeys. International Primatological Society: IPS, XXII Congress (Edinburgh, UK) August 3-8, 2008

12) F. Sultana, M. Hatori, N. Shimozawa, T. Sankai. Continuous observation of microscopic development of mouse and rabbit pre-implantation embryos in vitro. 15th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction (Bangladesh) August 6-7, 2008

13) K. Kyono, M. Hatori, C. Nishinaka, K. Fujii, N. Owada, T. Sankai. Cryopreservation of the entire ovary of cynomolgus monkey in a magnetic field environment without using cryoprotectants. American Society for Reproductive Medicine's 64th Annual Meeting (ASRM) (San Francisco, CA, USA) November 8-12, 2008

14) Y. Mochimaru, N. Kuji, M. Yamada, T. Hamatani, Y. Yoshimura, T. Sankai, K. Kyono, M. Mihara, C. Suzukamo, N. Kashiwazaki. Effect of magnetic field supplementation during the freezing process for porcine ovarian tissue Cryopreservation. 24th edition of the Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology: ESHRE (Barcelona, Spain) July 6-9, 2008

15) K. Kyono, M. Hatori, F. Sultana, C. Nishinaka, T. Kyoya, H. Uto, S. Kanto, M. Kuchiki, Y. Nakajyo, K. Fujii, N. Owada, T. Sankai. Cryopreservation of the entire ovary of cynomolgus monkey in a magnetic field environment without Cryoprotectants. 24th edition of the Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology: ESHRE (Barcelona, Spain) July 6-9, 2008

16) N. Shimozawa, S. Nakamura, M. Hatori, T. Sankai. Characterization of a novel primate embryonic stem cell line in African green

monkey (*Cercopithecus aethiops*). 41st Annual Meeting of the Society for the study of Reproduction:SSR (Hawaii, USA) May 27-30, 2008

17) 山海 直. サル類の ES 細胞と始原生殖細胞 (PGC). 筑波実験動物研究会平成 20 年度講演会 (つくば) 2008 年 6 月 6 日

18) 山海 直、羽鳥真功、Fowzia Sultana、大和田哲男、藤井和博、京谷利彦、西中千佳子、京野廣一. 磁場環境下における Whole Ovary の凍結(見るアートセミナー). 第 26 回日本受精着床学会 (福岡) 2008 年 8 月

19) 羽鳥真功、Fowzia Sultana、下澤律浩、八神健一、山海 直. カニクイザル胚性幹細胞株における神経細胞への分化誘導. 第 55 回日本実験動物学会 (仙台) 2008 年 5 月 15-17 日

20) 下澤律浩、中村紳一郎、羽鳥真功、山海 直. アフリカミドリザルにおける新規な非ヒト霊長類 ES 細胞の樹立. 第 55 回日本実験動物学会 (仙台) 2008 年 5 月 15-17 日

21) 池田嘉孝、鯉江 洋、金山喜一、酒井健夫、加藤美代子、寺尾恵治、山海 直、揚山直英. カニクイザルにおける心エコー図評価基準の樹立. 第 55 回日本実験動物学会 (仙台) 2008 年 5 月 15-17 日

22) 本多 新、廣瀬 美智子、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、下澤律浩、羽鳥真功、清水なつみ、村田武英、広瀬めぐみ、形山和史、脇阪紀子、三好浩之、横山和尚、山海 直、小倉淳郎. ウサギ ES 細胞の効率的な樹立とその維持. 第 3 回ウサギフォーラム-医療に貢献する実験用ウサギ- (神戸) 2008 年 7 月 26 日

23) 本橋秀之、山海 直、佐藤嘉兵、加田日出美. 未成熟マウス卵巣から分離した卵母細胞-顆粒膜細胞複合体の体外成長培養により成熟した卵母細胞からの産子作出. 第 53 回日本生殖医学会 (神戸) 2008 年 10 月 23 日

24) 岩瀬 愛、佐藤舞子、本橋秀之、山海 直、佐藤嘉兵、加田日出美. ガラス化保存・融解未成熟マウス卵巣の免疫不全マウス腎被膜下移植後の卵母細胞体外成熟能について. 第 53 回日本生殖医学会 (神戸) 2008 年 10 月 23 日

25) 高野薫、小浦美奈子、野口洋子、鈴木治、梶本健吾、松田潤一郎. 低蛋白飼料投与による EL てんかんモデルマウスの繁殖効率の改善. 日本実験動物科学技術 2008、仙台 (2008 年 5 月)

26) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Differential solubility analysis of fractionated heart proteins in laboratory animals. Experimental Biology 2008, San Diego, CA, USA, 2008 年 4 月

27) 鈴木 治、揚山直英、寺尾 恵治、「心筋症サルの心臓における 6 型コラーゲンの量的変化」、第 55 回日本実験動物学会総会、仙台、2008 年 5 月

28) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Cloning of Pituitary microRNAs in the Guinea Pig. 90th Annual Meeting of The Endocrine Society, San Francisco, CA, USA, 2008 年 6 月

29) 鈴木 治、小浦美奈子「卵巣移植による凍結保存卵巣由来シリアンハムスター産仔の作出」第 101 回日本繁殖生物学会総会、福岡、2008 年 10 月

30) Suzuki O. Quantitative comparison of ovarian FSH-receptors among six mouse strains. 59th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Indianapolis, IN, USA, 2007 年 11 月

31) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Comparison of ovarian luteinizing hormone receptors among mouse strains. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, CA, USA, 2008 年 12 月

32) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y,

Uchio-Yamada K, Matsuda J. Successful cryopreservation of Syrian hamster ovaries by vitrification. 35th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, San Diego, CA, USA, 2009年1月

33) 山田-内尾こずえ・澤田京子・國枝孝典・眞鍋昇: 母胎環境が遺伝性ネフローゼマウス (ICGN 系統) 腎病変に与える影響、第 146 回獣医学会、2008年9月25日、宮崎

34) 山田-内尾こずえ・澤田京子・國枝孝典・眞鍋昇: 胚移植由来ネフローゼマウス (ICGN マウス) 産仔の病態解析、第 100 回関西実験動物研究会、2008年12月5日、京都

35) 長田直樹 ヒト疾患とはぼ中立説 中立進化論の現在 国立遺伝学研究所、三島 2008年7月

36) 長田直樹、亀岡洋祐、高橋一朗、寺尾恵治 実験用マカク間における遺伝的分化と交雑についてのゲノム解析 第 24 回日本霊長類学会 明治学院大学 東京 2008年7月

37) 長田直樹 Deleterious Mutations and Human Diseases: Genomic Perspective. 第 10 回日本進化学会 東京 2008年8月

38) 長田直樹 ヒトゲノム中の塩基置換多型と疾患関連遺伝子について 第 62 回日本人類学会 愛知学院大学 名古屋 2008年11月

39) 亀岡洋祐、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男 MPO リーダーペプチドは活性制御に関与するか II MPO 研究会 東京 2008年10月

40) 長田直樹、亀岡洋祐、平田 誠、田沼 玲子、鈴木 穰、菅野 純夫、高橋 一朗 カニクイザル骨髄、脾臓、膵臓由来 cDNA ライブラリーの解析 日本分子生物学会・日本生化学会年会、神戸、2008年12月

41) 亀岡洋祐、古谷昌弘、大島正道、平田 誠、田沼玲子、長田直樹、高橋一朗、鈴木和男 人工ガンマグロブリンの多様性の検討、第

31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008年12月 神戸

42) Naoki Osada, Yosuke Kameoka, Ichiro Takahashi, Keiji Terao. Pattern of genetic admixture and differentiation between *Macaca fascicularis* and *M. mulatta* genome. SBE 2008, Barcelona, Spain, 2008年6月

43) Naoki Osada Analysis of recent gene duplication and conversion in the *Drosophila melanogaster* genome. JSPS International Colloquium (Evolutionary Genomics), Bonn, Germany 2009年3月

H. 知的財産の出願・登録状況

明里宏文、高崎智彦、倉根一朗: デングウウイルス検査方法及びモデル動物 (特願 2008-35178)

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 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21年(2009)年3月

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

研究分担者 寺尾 恵治 (医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター)
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、今年度新たに染色体情報を伴う377のMSMを確立した。この結果二年間で499の新規MSMが整備できた。カニクイザルの Bacterial Artificial Chromosome (BAC) ライブラリーのうち、新たに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296クローンについて配列情報から対応するアカゲザル染色体のゲノム情報を参照して、428のプライマーを設計した。このうち、カニクイザルで増幅しかつ多型性を示すプライマーは377であった。これらのMSMは63-647bpのサイズ、平均対立遺伝子数は8.20(2-17)、平均ヘテロ接合率は0.75(0.10-0.94)で、249のMSMが0.75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、499のMSMをデータベース上に整理させたところ、マカク常染色体およびX染色体上に平均10Mbp間隔でカバーしている事がわかった。12のBACクローンを任意に選抜し、蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH)解析によってカニクイザルの染色体を確認したところ、すべてのBACクローンがアカゲザル染色体情報と一致することが確認され、アカゲザルの染色体情報を基にカニクイザルの染色体を推定する方法の妥当性が実証された。

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MSM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。我々はこれまでに合計188のカニクイザル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、カニクイザルの全染色体をカバーするMSMの整備を目的として、新たなMSMの検索を進めた。

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 49 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 296 のカニクイザルの BAC クローンについて、両端配列をアカゲザルゲノム情報と対応させ 248 クローンのカニクイザル染色体位置を決定した。UCSC ゲノムブラウザ (<http://genome.ucsc.edu/>) 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ー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、428 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、428 のプライマーの内 401 (93.7%) のプライマーで増幅が確認された。増幅が確認された 401 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、GeneMapper (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。

4. 産地別三群間 (インドネシア・フィリピン・マレーシア) における遺伝的多様性の比較:

開発した MSM の内、352 個の MSM を用いて霊長類医学科学研究センターで維持管理されているインドネシア、フィリピン、マレーシア由来の各 4 頭を用いて遺伝的多様性をヘテロ接合率で比較した。

5. 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 解析:

アカゲザルのゲノム情報を参照してカニクイザルの染色体を同定する方法の妥当性を検証するため、任意に抽出した 12 の BAC クローンについて、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) によりカニクイザル染色体上の位置を確認した。アカゲザルゲノム情報を参照して推定した 12 クローンの存在する染色体番号は 13, 2, 5, 6, 3, 8, 15, 14, 11, 17, 7, 19 番である。

C/D. 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 248 クローン (64.6%) 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は 88 であった。両末端配列決定クローンの内、染色体位置が決定できたクローンは 183 (73.8%) であった。183 クローンのアカゲザルゲノム情報を参照して、428 の MSM 候補プライマーを設計した。その内、401 (93.7%) のプライマーでカニクイザルで 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 377 (88.1%) であった。これらのプライマーで検出される MSM はすべてカニクイザル BAC クローン中に位置していた。

2. ヘテロ接合率の分布:

図 1 に多型性が見られた 377 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 2-17 で、平均は 8.54 アレルであった。ヘテロ接合率は 0.10-0.94 であり、平均ヘテロ接合率は 0.75 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 > 0.75) の割合は 261 個 (69.2%) 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 らの報告 (Genomics 87:30-38, 2006) によった。その結果、ヒトおよびアカゲザル染色体において、全ての常染色体および X 染色体上に存在する MSM を確立することができた。特に、ヒト染色体 1, 2 番に関して比較的多くの MSM を整備することができた。

4. 三群間 (インドネシア・フィリピン・マレーシア) における遺伝的多様性の比較:

図 2 にインドネシア、フィリピン、マレーシア由来集団における 352 の MSM の平均ヘテロ接合率を示す。各群における平均ヘテロ接合率はそれぞれ 0.80, 0.65, 0.86 であった。三群間で t 検定 (Paired t-test) を行った結果、フィリピン群におけるヘテロ接合率が他の 2 群に比べて有意に低い (危険率 0.1% 未満) ことがわかった。一方、インドネシア群とマレーシア群の間には有意差は認められなかった。

5. 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 解析:

図 3 に FISH 解析をした 12 の BAC クローンの内、4 クローンの蛍光写真を示す (各クローンにおけるマカク染色体およびヒト染色体の対応は以下の通り (A): 11, 12, (B): 17, 13, (C): 7, 15, (D): 19, 19)。12 の BAC クローン DNA のすべてがアカゲザルゲノム情報を基に推定した染色体上に位置していた。このことから、アカゲザル染色体情報を参照してカニクイザルの染色体が推定できると判断した。昨年度と今年度の研究により、周辺配列情報を含む染色体情報を伴うカニクイザルの MSM が整備された事で、網膜黄斑変性症や高脂血症など、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なツールが整備できた。

E. 結論

カニクイザルで染色体情報を伴う 377 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 (アリル) 数は 2-17 で、平均は

8.54 アレルであった。ヘテロ接合率は 0.10-0.94 であり、平均ヘテロ接合率は 0.75 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>0.75）の割合は 261 個（69.2%）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 377 の MSM により、マカク属サルの全ての常染色体およびX染色体がカバーできることが判明した。なお、アカゲザルの染色体情報を参照したカニクイザルでの染色体推定法の妥当性は FISH により検証できた。

352 個の MSM を用いて霊長類医学研究センターで維持管理されている由来の異なる三集団（インドネシア、フィリピン、マレーシア）について遺伝的多様性を比較した結果、フィリピン群のヘテロ接合率が他の二群に比べて有意に低いことがわかった。この結果から、MSM は繁殖育成集団の遺伝的モニタリングに応用可能であることを示唆している。

昨年度と今年度の研究により整備したカニクイザルの新規 MSM は 565 に及び、マカク常染色体

およびX染色体を平均 10Mbp 間隔でカバーできる。カニクイザルを用いたゲノム研究に有用なツールを整備することができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(論文発表)

Blancher A, Bonhomme M, Crouau-Roy B, Terao K, Kitano T, Saitou N. Mitochondrial DNA Sequence Phylogeny of 4 Populations of the Widely Distributed *Cynomolgus* Macaque (*Macaca fascicularis fascicularis*). J Hered. 2008 99(3): 254-264.

Terao K, Dynamic changes in early development of immune system in macaque monkeys -The significance from standpoint of the preclinical toxicity test using nonhuman primates- Journal of Toxicological Science, 2009, -in press-

H. 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	248	64.6%
アカゲザル染色体位置が決定できたBACクローン数	183	73.8%
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	428	-
カニクイザルで多型性が認められたプライマー数	377	88.1%

表 1. MSM プライマー設計に関わる各段階での歩留まり。

新規に開発したMSMの特徴(N=377)

平均サイズ:256(63-647)
平均アレル数:8.54(2-17)
平均ヘテロ接合率:0.75(0.10-0.94)

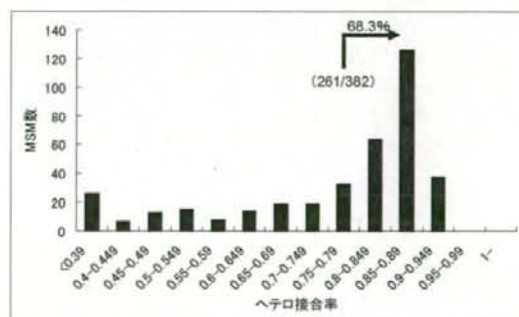


図1. 新規に確立した 377 の MSM の概要と検出されるヘテロ接合率の分布。
アカゲザル染色体番号 ヒト染色体番号 開発したマイクロサテライト数

1	1	34
13、12	2	35
2	3	28
5	4	22
6	5	18
4	6	21
3	7	24
8	8	13
15	9	8
9	10	20
14	11	16
11	12	22
17	13	20
7	14	9
7	15	10
20	16	10
16	17	9
18	18	14
19	19	7
10	20	6
3	21	7
10	22	4
X	X	20

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。

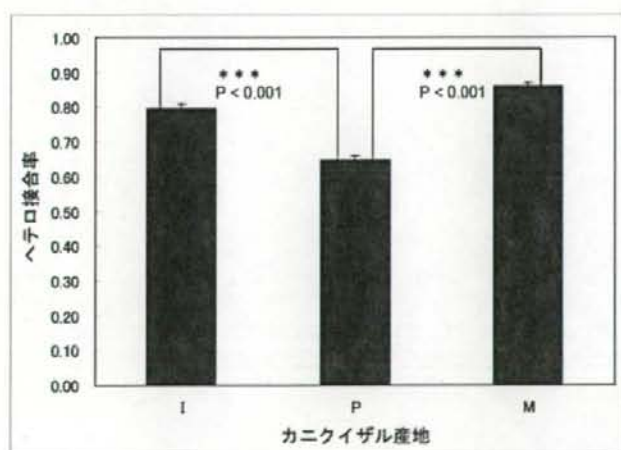


図2. インドネシア・フィリピン・マレーシア(I・P・M)における平均ヘテロ接合率の比較。バーは標準誤差を、アスタリスクは有意差(危険率0.1%未満)を示す。

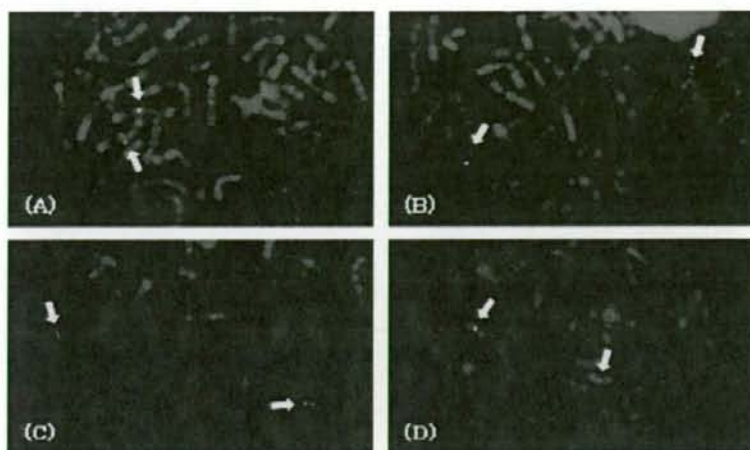


図3. FISH解析によるカニクイザル BAC クローン DNA の染色体位置の特定。マカク染色体およびヒト染色体番号の対応は(A): 11, 12, (B): 17, 13, (C): 7, 15, (D): 19, 19。

動物資源の安定供給に関わる研究

研究分担者 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 室長

研究要旨

医科学研究に資するカンクイザルの質の向上を目的として SRV/D 非感染ザルによるコロニーの構築を目指している。本研究では SRV/D 抗体検査および PCR 検査を実施し感染防止について検索し、さらに繁殖手法について提案した。

SRV/D 検査の結果、サル糞尿の接触がない環境で飼育すれば感染はほとんど拡大しないこと、SRV/D 陽性個体から生まれた子どもの 67%が感染していることが明らかとなった。よって、平行感染しない飼育環境を整備し、繁殖を行う個体の組み合わせに配慮することで SRV/D に感染していない個体数を加速度的に増加させることができると考えられた。その結果として SRV/D に感染していないカンクイザルコロニーの構築が可能になる。

A. 研究目的

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は、医科学研究に資するカンクイザルを飼育している。また、世界最大級の繁殖システムを有している。しかし、当センターのカंकイザルコロニーにサルレトロウイルス・タイプ D (SRV/D) が蔓延していることがわかっている。本研究では SRV/D を除去するための繁殖シミュレーションを作成することを目的とし、SRV/D に関する情報を収集した。

B. 研究方法

対象個体: 当センターで生まれた0歳から繁殖が可能になるまでの育成ザル、さらに実際に繁殖に使用している性成熟個体、合計約1,600頭をウイルス検査対象とした。

SRV/D 検査: 抗体価の測定および PCR によるウイルス検査を実施した。

1) 雌雄、年齢への影響

カンクイザルの雌雄および年齢と感染との関連を調査した。

2) 繁殖能力への影響

SRV/D の繁殖能力への影響について調査した。

3) 母子同居の影響

母子同居と感染の関連について調査した。

4) 平行感染の調査

SRV/D が平行感染する可能性について調査した。

5) 隔離飼育

SRV/D に感染していないことが明らかない個体を SRV/D に感染している個体(抗体検査陽性あるいは PCR 検査陽性)がいない部屋で飼育した。

(倫理面への配慮)

カンクイザル飼育、繁殖・育成を実施するにあ

たり、動物への苦痛の軽減を原則として日常の作業を行っている。また、環境の整備にも十分配慮している。

C. 研究結果

1) 雌雄、年齢への影響

今回の調査対象カニクイザルの数はメスに偏っていたが特に雌雄に関係なく SRV/D 感染は成立することを示す結果をえた。また、年齢にもとくに関係は認めなかった。

2) 繁殖能力への影響

当センターで実施しているカニクイザルの繁殖率は 56%、流産、死産で胎児が分娩まで発育できない可能性は 11%であるが、SRV/D 抗体陽性個体あるいは PCR 検査陽性個体の繁殖成績が劣ることはなかった。

3) 母子同居の影響

PCR 検査陽性個体 21 頭とその個体から生まれた個体(分娩直後)の SRV/D について検査したところ、14 頭(66.7%)が PCR 検査陽性だった。PCR 検査陰性個体 77 頭で同様の検査をおこなったところ、1 頭の子どもが陽性だったが 76 頭が陰性だった。

4) 平行感染の調査

個別ケージでの飼育環境下では、ほとんど平行感染しないことを示す結果を得た。

5) 隔離飼育

人為的要素が大きく影響する数字であるが、約 1,600 頭のカニクイザルコロニーにおいて昨年 199 頭だった隔離飼育数が本年度は 318

頭と約 100 頭増やすことができた。

D. 考察

カニクイザルの SRV/D は、サルに致命的な症状はでないため、ほとんどの医科学研究への影響はないと思われる。しかし、エイズウイルスを用いた研究のようにレトロウイルス関連の実験に使用した場合、実験結果の判断に混乱を招きかねずそのことは決して無視できない欠点である。また、長期下痢や食欲不振などの原因として SRV/D が関係している可能性がある。このような観点から、コロニーから SRV/D を排除し医科学研究に資するサルの質の向上を図る意義は大きい。また、世界有数の規模をもつ当センターから SRV/D を除去することができれば、多くの施設でその手法は応用できるものとなるだろう。

これまでに SRV の感染経路はおおよそ明らかになっているが、今回の調査はそれをうらづけるものであった。すなわち、糞尿がふれる状況を改善することで感染拡大はかなりの効率で防ぐことが可能であると考えられた。具体的には 1 段(糞尿がとどかないようにする)のケージで個別飼育することが大きな要素となる。ただし、清掃時などにも糞尿がとびちらないような配慮が必要かもしれない。

また、PCR 陽性個体から生まれたサルの 67% が分娩直後の検査で陽性だったことからこれらの個体は繁殖には適しないものと思われる。

今後、これらの点に注意し、PCR 陰性個体を用いた繁殖をつづけることで SRV/D 陰性個体数は加速度的に増加させることができるものと予測される。ただし、サル類のコロニーを維持

することは決して容易なことではない。サルの質の向上を目指すためには飼育環境の整備と飼育しているサルの状況を関係者が理解して作業を行うことがきわめて重要と考える。飼育環境、作業者の意識、そして科学的知見をもとにした繁殖方法が SRV/D 感染に大きく影響するため、これらを配慮したシステムを稼働することによって SRV/D 陰性個体のコロニー構築が可能になるだろう。

E. 結論

SRV/D はサルの糞尿の接触がない環境で飼育すれば感染はほとんど拡大しない。しかし、SRV/D 陽性個体から生まれた子どもの 67% が感染していることが明らかとなった。これらのことを知ったうえで繁殖作業を進めることで

SRV/D に感染していない個体数を加速度的に増加させることができると考えられた。その結果として SRV/D に感染していないカニクイザルコロニーの構築が可能になる。

F. 健康危険情報

特記すべき事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新規霊長類医科学研究用資源の開発に関する研究

研究分担者 明里宏文 医業基盤研究所霊長類医科学研究センター室長
協力研究者 片貝祐子、岩崎優紀、吉田友教、濱野正敬

研究要旨

近年、新世界ザルは脳神経科学研究や新興再興感染症研究におけるモデル動物としての重要性が高まりつつある。本研究ではこれまで研究のあまり進んでいない感染症動物モデル研究の基盤整備を目指し、新規霊長類モデル開発を行なった。その結果、新世界ザルであるコモンマーモセット及びコモンリスザルを用いたデング熱及び熱帯熱マラリアにおいて有用な霊長類感染モデルが得られた。本成果は今後のワクチン開発や新規治療薬の有効性評価等における研究基盤として活用可能と考えられた。

A. 研究目的

近年、鳥インフルエンザや SARS といった様々な新興再興感染症が出現し人類を脅かしている。こうした脅威に対抗していく上で、その感染発症機序の解明やワクチン・新規治療薬の開発並びに有効性評価等は不可欠であり、このためには霊長類を用いた感染症モデルが必要である。しかしながら、まだ多くの感染症において霊長類感染モデルは開発が進んでおらず、もしくは実用レベルに至っていない。以上のことを鑑み本研究では世界的規模で感染拡大が懸念されており、また国内での旅行感染症が危惧される新興再興感染症であるデング熱及び熱帯熱マラリアについて、実用的な霊長類感染モデル開発を行なった。

B. 研究方法

1. 実験用サル類：対象動物としてコモンリスザルおよびコモンマーモセットを用いた。コモンリスザルはスリナムより輸入、コモンマーモセットは国内繁殖施設由来の個体を用いた。

2. 各種病原体感染実験：サル類は当センター感染症施設・ABSL2 区域にて感染実験および飼育管理を行なった。熱帯熱マラリア原虫については *Inochina I* /CDC 株 (ICH) 及び *IPC* /Ray 株 (IPC) を用いた。熱帯熱マラリア原虫は、いずれの株についても感染赤血球約 10^6 個を含む感染サル血液を、コモンリスザルに塩酸ケタミン麻酔下で静脈内接種した。接種後毎日、臨床症状の観察とともに、末梢血を採血して塗沫ギムザ染色標本を作製し、鏡検にて感染赤血球率