

を算出した。IPC 株の動物は接種 15 日後、ICH 株の動物は 28 日後に安楽殺を実施し、血液学的・血清生化学検査及び病理学的検査を行った。

デングウイルスは臨床分離株である DHF0663 株(デングウイルス 2 型)  $10^7$  PFU/ml を、コモンマーモセットにケタミン麻酔下で皮下接種した。接種後 1、3、5、7 日にそれぞれ採血、7 日に安楽殺を実施し組織検体を採取した。また尿および糞便を採取し、血液と共にウイルス定量や生化学検査等を行なった。血漿、尿、糞便および上記組織検体についてリアルタイム PCR 法によりウイルス定量を行なった。血中抗デング抗体は、IgM および IgG について ELISA 法により測定した。また、デングウイルス抗原 NS1 蛋白を ELISA 法にて測定した。

#### (倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得て当センター感染症実験施設にて実施した。

### C. 研究結果

コモンリスザルへ熱帯熱マラリア原虫感染サル血液を接種した結果、感染赤血球率は ICH 株では接種 22 日目に 2%、IPC 株では接種 15 日目に 50%にまで上昇した。臨床症状ならびに血液性状の変化は、赤血球感染率の程度に応じて認められた。IPC 株の動物では、末期に食欲不振や活動性低下・血色素尿排出がみられた。血液学的には赤血球数ならびに血小板数の重度減少・白血球数増加があり、また血清生化学的には尿素窒素・肝逸脱酵素・ビリルビン値等

が顕著に上昇した。一方 ICH 株の動物では明らかな臨床症状は見られず、血液性状の変化も IPC に比べ軽度であった。

コモンマーモセットへのデングウイルス攻撃接種後、血中ウイルス RNA 値を経時的に測定したところ、これまで報告のあるマカク属サルでの結果と比較し、数百〜数千倍高いレベルのウイルス RNA が感染 3-7 日をピークに検出された。また血中におけるウイルス抗原である NS1 蛋白もウイルス RNA と相関して増加していることが確認された。抗デング抗体価については day5 から IgM 抗体の、day10 より IgG 抗体の有為な上昇がそれぞれ認められ、day14 までどちらの抗体価も上昇した。上記の経過観察の過程で、デングウイルス接種ザルの 1 頭において肉眼的に明らかな血尿を呈した。そこで day5 より採尿を行ない尿中ウイルスの有無について検討を行なった。その結果、尿中に約 2 週間にわたって持続的なウイルス排出を確認した。以上の結果より、コモンマーモセットはデングウイルスに高い感受性を有していることが明らかとなった。

### D. 考察

これまで熱帯熱マラリア原虫感染モデルとしてはポリピアリスザルが適切とされてきた。しかしポリピアリスザルは国内での入手がほぼ不可能であり、海外からの輸入の見込みもないことから、事実上熱帯熱マラリア感染モデル研究は実施が困難であった。本研究では、ポリピアリスザルに代わりコモンリスザルを接種動物として用いたところ、遜色のない安定した高いマラリア原虫感受性を有することが明らかとなった。本成果は、新規抗マラリア薬あるいは

ワクチン開発において不可欠な評価実験系が本国で実施可能であることを示すものであり、今後の開発研究への応用が期待される。

本研究で新世界ザルであるコモンマーモセットにおけるデングウイルス感受性について検討を行なったところ、これまで多く用いられてきたマカク属サルと比較して遙かにデングウイルスに対して高い感受性を有することが明らかとなった。我々の予備的実験結果では、マーモセットに近縁で同じマーモセット科に分類される新世界ザルであるタマリンでもほぼ同程度の血中ウイルス RNA 値を示したことから、マーモセット科サルは高い感受性を有することが強く示唆された。本成果は、デングウイルス予防ワクチンや治療薬開発における前臨床試験のための評価系モデルとしてのみならず、個体レベルでのデングウイルス感染病態機序の解明において画期的なブレイクスルーとなるものと期待される。

## E. 結論

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。

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

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

岩崎優紀、森健一、横昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、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 長期持続感染サルの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

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

大松勉、平山隆則、小滝徹、伊藤美佳子、片貝祐子、中村紳一郎、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

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

## 2. 論文発表

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.

Sato H, Leo N, Katakai Y, Takano J, Akari H, Nakamura S, Uney 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.

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.

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)

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)

Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io 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.

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.

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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（特願 2008-35178）

## 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

研究分担者 山海 直 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 主任研究員

### 研究要旨

昨年度、カンクイザル5頭を用いて卵巣の凍結保存および移植実験の成果を報告した。本年度はその5頭の生殖機能を確認する目的で継続して末梢血中性ホルモン動態を検索した。個体ごとにホルモン動態は異なっていたが、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。また、今回用いた凍結法の特性を解析したところ、 $-10^{\circ}\text{C}$ においても氷ができず過冷却状態にあることが明らかとなった。この成果は組織や臓器をそのままの状態での保存できる可能性を有しており、動物資源の新規な保存技術になるかも知れない。

### A.研究目的

現在、臓器や組織をまるごと、長期間にわたって保存する技術は存在しない。本研究ではカンクイザル卵巣を用いて新規保存技術の開発を試みている。卵巣には原始卵胞、卵母細胞、胞状卵胞など様々な状態の細胞が含まれており、卵巣はきわめて複雑な機能を有した臓器といえる。よって、卵巣での成果を明確にすることで他の臓器への応用の可能性が明らかになる。

これまでにマウスを用いた研究やヒトでの応用研究の成果が報告されているが、いずれの方法も卵巣を細かく切り刻む必要がある。すなわち大きな組織や臓器の外側と内側を同じ条件で凍結することができないのが現状である。

本研究で採用した方法には二つのポイントがある。ひとつは組織内部まで浸透が期待できない凍結保護剤は使用しないこと。二つ目は、

組織、臓器全体に同じ条件で影響を与えると考えられる磁場を用いることである。

本研究は、組織や臓器を保存する技術を開発することを目的としており、その成果は医学研究に資する動物資源を有効に利用するための新しい手法となる。既存の動物資源の供給体制を大きく変える可能性を有しているだけでなく、臓器移植医療などへの応用も可能になるかも知れない。

### B.研究方法

#### 1) 卵巣摘出と凍結保存

実験には月経周期を認めるカンクイザル5頭を用いた。月経時に全身麻酔下で開腹手術を施し、左右両側の卵巣を摘出した。卵巣の血液、水分をできるだけ除去し、ビニール袋に入れてシールした。その状態で磁場が暴露でき

るプログラムフリーザに設置し、1分間に $-6^{\circ}\text{C}$ の速度で $-30^{\circ}\text{C}$ まで温度を低下させて凍結した。最終的には液体窒素に浸漬して保存した。

#### 2) 卵巣の融解と移植

液体窒素から取り出した卵巣を $37^{\circ}\text{C}$ のお湯に浸漬して融解した。融解した卵巣を摘出した個体の筋肉内あるいは腎被膜下に移植(自己への移植)した。

#### 3) 移植した卵巣機能の検索

卵巣を移植した個体の月経周期の回帰について検索した。なお、実験期間を通して供試個体から経時的に末梢血を採取し、主要性ホルモンであるLH、FSH、E2およびプロジェステロンの濃度を測定した。

#### 4) 凍結機器の機能の検索

磁場を暴露しながら凍結できる機器の特製を明らかにする一貫として、様々な容器にPBS溶液をいれて凍結機器を作動させ、その状態を観察した。

#### (倫理面への配慮)

カニクイザルを使用するにあたり独立行政法人医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を受けている。実験実施時の動物への苦痛の軽減を原則とし飼育環境の整備にも十分に配慮した。

### C. 研究結果

使用した5頭のカニクイザルはE2およびプロジェステロン濃度の動態から卵巣摘出前に正常な月経周期を示していたことが確認された。

いずれの個体も卵巣摘出後、この二つのホルモン濃度は低値を示し、FSHおよびLHが高濃度となった。これらのホルモン動態は卵巣が完全に摘出されたことを示している。

摘出された卵巣は凍結された状態で1か月保存したが、その後融解したときにはしっかりとした形状を保っていた。この卵巣をもとの5頭のカニクイザルに移植した結果、個体ごとに月経回復までの期間は異なっていたが、すべての個体で陰部からの出血を確認した。また、移植後約1年が経過しても月経周期を維持した個体が存在することが、月経の出現とE2、プロジェステロン、LH、FSHの動態から明らかになった。

ファルコンのチューブ(15ml, 50ml)にPBSを入れて磁場暴露環境下で温度を低下させた結果、 $-10^{\circ}\text{C}$ においても凍結しない、すなわち過冷却状態にあることが明らかになった。しかし、容器にペットボトルを用いると $-10^{\circ}\text{C}$ でPBSは凍結した。また、磁場の強度を上げることで過冷却状態を保つ温度が低下することが示された。

### D. 考察

今回用いた磁場環境下での凍結法は、食品業界では、凍結前の状態に近い旨味、食感を維持するものとして実用化されつつある。旨味や食感を保持できるこの方法は細胞へのダメージがきわめて少ないものと予測される。本研究では機能を保持することを期待その方法を応用したものである。

カニクイザル5頭を用いて研究を遂行してお

り、凍結融解後、予測よりはるかに早く月経が回帰したことを見出している(昨年度報告)。その5頭の約1年の経過を臨床所見ともに内分泌学的に解析したところ、いずれの個体も特記すべき臨床所見はなく健康を維持していた。E2、プロゲステロン、LH、FSHの動態を解析したところ、数回の月経周期を示したあと周期を停止し数か月後に再度周期を回復した個体、長期にわたり月経周期を認めなくても単発的に周期を示すもの、また、観察期間中、定期的な周期を示す個体などが確認されている。これらの所見は移植した卵巣が生存していることを示すものであるが、個体ごとに状況が異なることから、その機能回復には何らかの影響を及ぼしていることは明らかである。問題が凍結、融解にあるのか、移植技術にあるのかは現段階では不明である。カニクイザルを用いた研究では個体差が生じることは承知していなければならない。しかし、今回用いた個体は実験前には定期的な月経周期を示していたことを考えると、さらに詳細な検討を加えるべきであると考え。

今回、使用した機器の特製を明らかにする目的でPBSを用いて凍結実験を試みた。実験回数が少なく、現状では明確な結論を出すに至っていないが、通常ではありえない温度での過冷却状態をつくりだすことができること、磁気強度を変えることでその温度が変化することは確かである。この過冷却状態を保持することが本法の特徴といえるが、それがどのように凍結に影響しているかは今後、明らかにしていくべき課題である。また、安定した状態を維持できるよう機器を改変していくことも必要かもしれない。

い。

現在、卵巣以外の様々な臓器の凍結にも挑戦しており、そこで明らかになった事象がある。サンプルのサイズが大きくなればなるほど、融解に多くの時間を有するということである。すなわち、サンプルの外側と内側を同じ条件で凍結できたとしても、融解時には全くことなる状態になってしまうとことを意味しており、融解方法の開発は今後の大きな課題となりそうである。

本研究により新規技術が確立されたときには、本プロジェクトの最大の課題である動物資源の安定供給に対して様々な可能性を示すことになるだろう。また、この技術は凍結保護剤を使わずに大きな組織や臓器を凍結するというものであり、臓器凍結バンクの構築をも可能にする夢の手法といえる。

## E. 結論

カニクイザルの卵巣を磁場環境下でまるごと保存し、融解した卵巣を個体にもどすことで卵巣機能が回復したことを内分泌学的に確認した。また、その機能は1年を経過しても維持されることを示す結果を得た。本法は臓器のまるごと保存を可能にする新規な方法となり得る可能性を有している。

## 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

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

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

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

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

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

### 2. 学会発表

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

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

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 64<sup>th</sup> Annual Meeting (ASRM) (San Francisco, CA,*

*USA) November 8-12, 2008*

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. *24<sup>th</sup> edition of the Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology: ESHRE (Barcelona, Spain) July 6-9, 2008*

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. *24<sup>th</sup> edition of the Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology: ESHRE (Barcelona, Spain) July 6-9, 2008*

N. Shimozawa, S. Nakamura, M. Hatori, T. Sankai. Characterization of a novel primate embryonic stem cell line in African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). *41<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for the study of Reproduction:SSR (Hawaii, USA) May 27-30, 2008*

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

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

羽鳥真功、Fowzia Sultana、下澤律浩、八神健一、山海 直. カン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

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

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. カン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

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

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

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

### 3. その他公表

京野廣一、山海 直。卵子・胚・卵巣組織の低温医学「卵子学」鈴木哲也編集、京都大学学術出版会(印刷中)

京野廣一、西中千佳子、京谷利彦、中條友紀子、石川孝之、藤井和博、大和田哲夫、羽鳥真功、山海 直。生殖細胞：卵巣保存。特集「産婦人科領域における細胞・組織の凍結保存」。産婦人科の実際(金原出版), 57: 1543-1548, 2008

山海 直。内容：新規技術での卵巣丸ごと保存、臓器凍結バンク構想。フジテレビ, 2008年1月30日

山海 直。内容：卵巣丸ごと保存、臓器凍結バンク構想。World Business, NIGHTLY BUSINESS REPORT (EU、中東で放映), 2008年12月18日取材

山海 直。内容：新規技術で卵巣まるごと保存に成功。TBS ラジオ, 2008年11月17日

山海 直。内容：食品のために開発された凍結技術で臓器凍結を目指す。NHK, 2008年10月19日

山海 直。内容：ABIの大和田社長が開発した食品凍結技術を医学に応用する。テレビ東京, 2008年10月17日(金)

山海 直。内容：臓器のまるごと保存が将来、可能になるかも知れない。朝日放送, 2008年7月13日

### H.知的財産権の出願・登録状況

なし



## 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

研究分担者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所  
生物資源研究部 研究リーダー

### 研究要旨

実験動物研究資源バンクにおける疾患モデルマウスの安定的な供給体制を整備するため、疾患モデルマウスの病態に応じた繁殖法の改良を目指し、環境要因が疾患発症と繁殖機能に及ぼす影響について引き続き検討を行った。本年度は、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。低蛋白飼料投与による EL マウスの繁殖効率の改善について、実験動物研究資源バンクのホームページに系統情報として掲載し、利用法の普及を図った。

### A. 研究目的

医薬基盤研究所実験動物開発研究室では、創薬・疾患研究への支援を目的に、実験動物研究資源バンクを設立し、疾患モデルマウスを中心に資源の収集・保存・提供・情報発信などを行っている。これらの疾患モデルマウスの中には繁殖が困難なマウスも多く、貴重な研究資源を安定的に供給する体制を整備するためには、病態や繁殖特性に応じた繁殖法の改良が必要である。そこで、本研究では、低繁殖性を示す疾患モデルマウスにおいて、環境要因が疾患発症と繁殖機能に及ぼす影響についてのデータを集積し、疾患モデルマウスの効率的な生産、維持指標を提供することを目指す。本研究によって、実験動物研究資源バンクから各種疾患モデル動物が安定的に供給されることで、創薬研究や治療法開発が推進され、ひいては国民の健康に貢献することが期待される。

本年度は、昨年度に引き続き、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクで維持、

供給しているモデルマウスのうち、低繁殖性を示す EL マウス(てんかんモデル)について、環境要因としての食餌が繁殖能力に及ぼす影響について検討した。EL マウスは、基盤研実験動物研究資源バンク独自の疾患モデルマウスであり、ヒトの側頭葉てんかんの貴重な自然発症モデルマウスとして世界的にも広く利用され、分譲の要望も多い系統である。しかし、EL マウスは過肥と雄に尿閉が認められ繁殖能力が低い。昨年度、EL マウスについて高蛋白飼料より低蛋白飼料を与えた方が、個体当たりの出産回数、合計産仔数が増え繁殖効率が向上することを報告した。今年度は、低蛋白飼料の投与が、EL マウスの体重、臓器重量(脂肪組織を含む)及び血液生化学値に与える影響を検索し、繁殖効率向上の要因を検討した。

## B. 研究方法

EL マウス雌雄をそれぞれ高蛋白飼料 (CMF、特殊系繁殖用、オリエンタル酵母工業) 投与群と、低蛋白飼料 (CE-7、長期飼育用、日本クレア) 投与群に分け、約7か月齢まで飼育し、体重、主要臓器重量 (脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体、卵巣、子宮)、白色脂肪 (腸間膜、腎周囲、生殖器周囲、大腿部周辺皮下) 及び褐色脂肪重量を計測した。また、15 項目の血液生化学検査 (非絶食、心血液から血漿を分離、富士ドライケム 7000V 使用) を行った。(倫理面への配慮)

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

## C. 研究結果

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 (雌: 18.4%減、雄: 10.7%減) が認められ (図1)、白色脂肪と褐色脂肪ともに重量の明かな低下傾向を示し (図2、3)、臓器重量は肝臓などでやや低下傾向を示した。血液生化学値については、低蛋白飼料群で総コレステロール値の減少傾向が認められた。また、250 日齢までの両飼料での飼育成績から、EL マウスにおいて、高タンパク飼料より低タンパク飼料を与えた方が、雄で寿命が延長 ( $146.3 \pm 40.2$  日,  $n=30$  vs  $177.5 \pm 39.8$  日,  $n=13$ ) した。なお、この期間中、雌では死亡はみられなかった。

低蛋白飼料投与による EL マウスの繁殖効率の改善については、実験動物研究資源バンクのホームページに系統情報として記載し、利用者の便を図った。

## D. 考察

疾患モデル動物の利用は、疾患研究・創薬研究に不可欠である。しかし、一般的に疾患モデル動物は病態を発現するために繁殖能力が劣ることが多く、そのために十分に利用が進まず、研究の進展を妨げていることがある。本研究では、実験動物研究資源バンクからの疾患モデルマウスの安定供給を目指して、繁殖困難な EL てんかんモデルマウスの繁殖成績向上を目指し、食餌の影響を検討している。昨年度は、EL マウスにおいて高蛋白飼料より低蛋白飼料を与えた方が、個体当たりの出産回数、合計産仔数が増え繁殖効率が向上することを報告した。

今年度は、低蛋白飼料の投与が、なぜ EL マウスの繁殖効率を向上させるのかその要因を検討するため EL マウスの体重、臓器重量 (脂肪組織を含む) 及び血液生化学値を検索した。その結果、低蛋白飼料により体重の低下がみられ、とくに脂肪組織重量の低下が顕著であった。また、血液生化学検査では低蛋白飼料により血中コレステロール値の低下傾向が認められた。これらのことから、EL マウスがもともと肥満傾向を示すので、低蛋白飼料が EL マウスの肥満傾向を抑制し、肥満に伴う繁殖成績の低下を抑制する可能性が示唆された。また、雄で寿命が延長する傾向が示された。

EL マウスが低繁殖性を示す原因としては、①てんかん発作を起こしやすいこと、②雄で尿閉を早期に起こすため、③肥満傾向を示すため等が考えられる。例えばケトン食療法が EL マウスのてんかん発作を抑制することが知られているが、繁殖能力を向上させるかどうかは不明である。今回の低蛋白飼料投与は、基本的にてんかん発作の発症日齢や頻度には影響しないので、てんかんモデルとしての有用性を維持しながら、繁殖効率を良くするた

め的手段として有用と考えられる。尿閉の発症抑制に低蛋白飼料が有効か否かは、まだ解明されておらず、今後の検討事項ではあるが、少なくとも低蛋白飼料が肥満に伴う繁殖効率低下を抑制する可能性が今回示された。

EL マウスの利用者は多く、分譲依頼も多いが、分譲を受けた研究者がEL マウスの繁殖に失敗して研究に十分利用できないことが多くある。今回の低蛋白飼料による繁殖効率の改善法は、繁殖の専門家ではない一般研究者にとって、貴重な情報であり、基盤実験動物研究資源バンクのホームページで系統情報として提供することで普及を図った。

今後、繁殖効率の著しく劣る多くの疾患モデルマウスの病態進行と繁殖学的パラメーターとの関連について基礎データを集積することで、系統ごとの効率的繁殖方式を開発するなど、実験動物研究資源バンクからの安定供給体制の整備を進める予定である。

## E. 結論

実験動物研究資源バンクにおける疾患モデルマウスの安定的な供給体制を整備するため、疾患モデルマウスの病態に応じた繁殖法の改良を目指し、環境要因が疾患発症と繁殖機能に及ぼす影響について引き続き検討を行った。本年度は、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。低蛋白飼料投与によるEL マウスの繁殖効率の改善について、実験動物研究資源バンクのホームページに系統情報として掲載し、利用法の普及を図った。

## F. 健康危険情報

該当無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

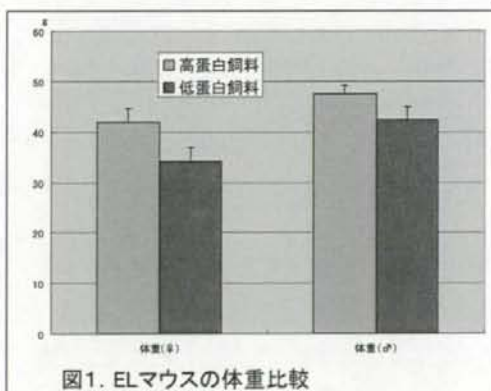
該当無し

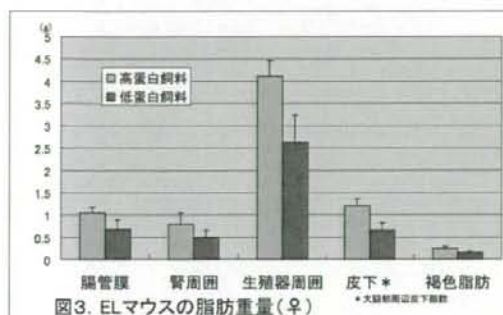
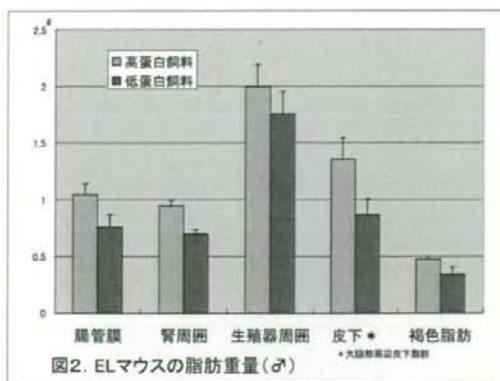
### 2. 学会発表

- 1) 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）
- 2) 野口洋子、高野薫、小浦美奈子、中村和臣、鈴木治、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(II)－臓器重量、血液生化学値の検討。第56回日本実験動物学会総会、大宮（2009年5月予定）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し





## 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

研究分担者:鈴木 治 (独)医薬基盤研究所生物資源研究部 主任研究員

### 研究要旨

ホルモン投与による誘起排卵で得られる排卵数のマウス系統差は、多様な系統を扱う系統保存を実施する上で深刻な問題である。そこで、本研究ではマウス卵巣内卵胞数と性腺刺激ホルモン受容体の系統差を調べることにより効率的な卵胞刺激法を検討する。昨年度の研究で卵胞刺激ホルモン受容体(FSHR)の系統差がないことが判明したので、本年度は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を調べたところ、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。これらの結果は、排卵誘起への LHR の系統差は無視できない可能性を示唆している。

### A. 研究目的

動物資源の増産・系統保存は配偶子の使用を前提とし、配偶子、特に卵子・胚の安定供給が必須である。現在、実験動物では性腺刺激ホルモン投与による過剰排卵誘起技術が汎用されている。しかし、この方法は系統差が非常に大きく、多様な系統を扱う系統保存の高度化には深刻な問題である。

卵胞発育およびその後の排卵は卵胞刺激ホルモン(FSH)と黄体化ホルモン(LH)によって制御されており、排卵誘起ではFSH作用を持つ製剤PMSGとLH作用を持つ製剤hCGを用いて人為的に卵胞発育・排卵を誘起している。マウスにおける誘起排卵卵子数の系統差の原因として、これら2つのホルモンに対する反応性の違い、具体的にはホルモン受容体の系統差が考えられる。特にPMSGは馬由来、hCG

は人由来の製剤であり、マウス以外の動物種から得られた性腺刺激ホルモンに対する反応性がマウスの系統によって異なる可能性がある。

そこで本研究ではFSH受容体(FSHR)およびLH受容体(LHR)の系統差を調べることにより誘起排卵のマウス系統間差の原因解明と解決法開発を目指す。昨年度の研究により、FSHRのアミノ酸配列や発現量に系統差はないことが判明した。なお、昨年度の報告には間に合わなかったが、FSHRの蛋白質発現量にも系統差が無いことをFSHRに対するペプチド抗血清による定量Western blotで確かめた(学会発表の5で報告)。そこで本年度は、LHRに注目し、LHRのアミノ酸配列と発現量の系統差を調べた。

## B. 研究方法

### 1) 使用した系統

LHR の発現解析には 6 系統の 4 週齢雌と成熟 ddY 系マウスを、LHR のアミノ酸配列の決定には 12 系統の成熟雄精巣を用いた。

### 2) LHR のアミノ酸配列解析:

12 系統の成熟雄マウス精巣から Total RNA を抽出し (RNeasy Mini Kit, Qiagen), 逆転写酵素により cDNA を合成した (Superscript III, Invitrogen)。GenBank より得た C57BL/6J マウス LHR の配列 (Accession #: NM\_013582) を基に Primer 3

([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) で、まずコーディング領域のほぼ全体をカバーするようなプライマーを設計後

(First PCR), 4 区間の PCR 用プライマーを設計した (Nested PCR)。Nested PCR の産物についてシーケンスし、オーバーラップ部分を基に連結してコーディング領域全体を求め、アミノ酸配列に翻訳し、GENETYX ソフトウェア V8 (ゼネティックス社) によりアミノ酸配列を整理・比較した (図 1)。

### 3) 卵巣 mRNA と蛋白質の抽出

6 系統の 4 週齢雌マウス (各系統ごとに 5 匹) に PMSG (5 iu) を投与し、48 時間後に卵巣を回収し、使用時まで Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) 内で保存した。また、成熟マウスの卵巣も同様に採取・保存した。個体毎にそれぞれ AllPrep DNA/RNA/Protein Min Kit (Qiagen) を用いて Total RNA と蛋白質を抽出した。

### 4) 卵巣 LHR mRNA の定量

6 系統の 4 週齢雌マウス卵巣より抽出した Total RNA を用いて逆転写酵素により cDNA を合成した (QuantiTect Reverse Transcription キット; Qiagen)。さらに昨年度採取・合成した PMSG 未投与個体由来の卵巣 cDNA も併せて用い、LHR mRNA 用 (Mm00442931\_m1; ABI 社) と GAPDH 用の TaqMan Probe (ABI 社) を用いて Realtime-PCR (QuantiFast Probe PCR キット; Qiagen および ABI Prism 7900HT; ABI を使用) により両者の発現量を測定した (図 2)。

### 5) 抗マウス LHR 抗血清の作成

マウス LHR のアミノ酸部分配列 (C+EENELSGWDYDYDF) を有するペプチドにキャリアとしてスカシ貝から抽出したヘモシアニン (KLH) を結合したものを抗原に用いて、抗 LHR 血清をウサギで作成した (スクラム社に外注)。

### 6) 卵巣 LHR の Western blot 解析

抽出した卵巣蛋白質を 4-12% BisTris ゲルと MES バッファ (Invitrogen) による SDS-PAGE の後、PVDF 膜 (Pall 社) へ転写し、転写総蛋白質の存在を SyproRuby blot Stain (Invitrogen) による蛍光染色で確認した (FX-pro にて撮影, Bio-rad)。その後、一次抗体として抗 LHR 血清を、二次抗体として Peroxidase ラベル抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories 社) を用いて免疫染色を行った。視覚化には化学発光 (ECL plus, GE 社) を用い、CCD カメラ (LAS3000, FujiFilm) にて発光像を記録した。LHR 検出の陽性対照としてマウス卵巣蛋白質抽出液 (Santa Cruz Biotechnology, sc-2404) を用いた (図 3)。

### 7) 蛋白質抽出条件の検討

PMSG と hCG による排卵処理を施した 4 週齢の C57BL/6 雌から、hCG 投与後約 18 時間に卵巣を摘出し、使用時まで Allprotect Tissue Reagent 内で保存した。ReadyPrep™ sequential extraction kit (Bio-Rad) を用いて蛋白質を 3 分画に抽出した (図 4)。Fraction 1 と Fraction 2 を用いて 6) と同様に LHR の Western blot 解析を行った。さらに成熟 ddY の精巣・卵巣から得た Fraction 2 分画を用いて FSHR (昨年度作成した抗血清を使用) と LHR の Western blot を行った。

### 8) 統計処理

LHR mRNA 発現量の系統差の有意差検定には分散分析の後、Tukey-Kramer 法により各系統間の比較を行った (StatView for Windows Version 5, SAS Institute, Inc.)。棄却率を 5% とした。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、(独)医薬基盤研究所の動物実験規定に従って行った。

### C. 研究結果

#### 1) LHR アミノ酸配列の系統差

C57BL/6JのLHRのcDNA配列(NM\_013582)を元に12系統のLHRのcDNA配列を決定し、その配列からアミノ酸配列を求めた。図1に示すように、cDNA配列に一箇所系統差が見られたが、調べた系統では成熟LHRタンパク質のアミノ配列に系統差はなかった。

#### 2) mRNA発現量の系統差

図2に卵巣におけるLHR mRNA発現量をGAPDH mRNAを内部標準とした相対値で示した。PMSGを投与する前のDBA/1とDBA/2の間にのみ有意差が見られたが、PMSG投与後48時間(hCGを投与する時刻)では系統間に有意差はなかった。

#### 3) LHR蛋白質発現の検出

LHRの断片ペプチド配列を抗原にして作成した抗LHR抗血清を用いて卵巣蛋白質のWestern blotによりLHR蛋白質の系統差の検出を試みた。しかし、PMSG投与後48時間後の卵巣では用いた6系統で全てLHRが検出できなかった(図3A)。そこで、成熟雌の卵巣(妊娠、および非妊娠)から同様にAllPrep DNA/RNA/Protein Min Kitを用いて蛋白質を抽出してLHRのWestern blot解析を行ったが、この場合もLHRは検出されなかった(図3B)。

そこで蛋白質抽出パuffアの種類と抽出する卵巣の時期を比較検討した結果、過排卵処理を施して排卵から約6時間後の卵巣から溶解度による蛋白質分画抽出を行い、膜蛋白質を濃縮した分画(Fraction 2)を用いるとLHRが検出できることがわかった(図4)。しかし、LHRと同様に細胞膜7回貫通型のGPCRであるFSHRは卵巣・精巣とも良好に検出可能であるにもかかわらず、LHRは成熟精巣で検出可能だが、非妊娠成熟雌では検出されないことから、LHRは卵巣において時期特異的発現をしていることがわかった(図5)。

### D. 考察

本研究では、マウスにおける誘起排卵数の系統差がLHRの量的・質的差異によるものかを検討した。アミノ酸配列には系統差はなかった。しかし、mRNA発現についてはPMSG処理前で系統差が見られた。PMSG投与によるmRNA発現の上昇に系統差はないもののmRNA量の上昇と蛋白質発現との時期にタイムラグが見られたことからLHR蛋白質の動態はmRNA量に依存しない複雑な制御を受けているものと思われる。特に4週齢のDBA/1やC3Hの卵巣でLHR mRNA量に大きな個体差が見られたことは、卵胞発育そのものの進行や、進行に伴うLHR転写制御に系統差があることを示唆している。hCGを投与する時期であるPMSG投与後48時間にはLHR mRNA量の系統差は見られないが、蛋白質発現はまだ開始していないことから、系統差という観点を含めて排卵数制御に及ぼすLHR発現機序、特に蛋白質合成の影響をさらに精査する必要があると考えられる。

### E. 結論

LHRのアミノ酸配列に系統差はないが、PMSG処理前のLHR mRNA発現量には系統差があった。一方、PMSG処理によるLHR mRNA発現上昇に系統差は無いものの、蛋白質発現にタイムラグがあることから、マウスにおける誘起排卵数の系統差はLHRの蛋白質発現機構の系統差による可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

該当なし。

### G. 研究発表

- 1) 論文発表  
なし。

2) 学会発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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

6. 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
7. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

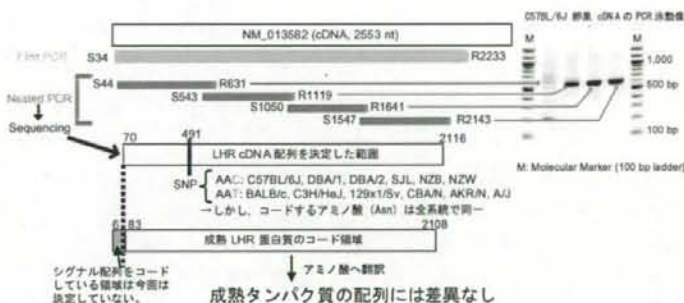


図1. マウス LHR cDNA 配列の比較。コーディング領域のほぼ全体を First PCR により増幅した後、LHR の部分配列を増幅するプライマーセット4組を用い、シグナル配列を除くコーディング領域を PCR で増幅し、得られた増幅産物(右上の泳動像参照)をシーケンスした。491番目の塩基にのみ系統差が見られたが(SNPと表示)、コードするアミノ酸に差異はなかった。



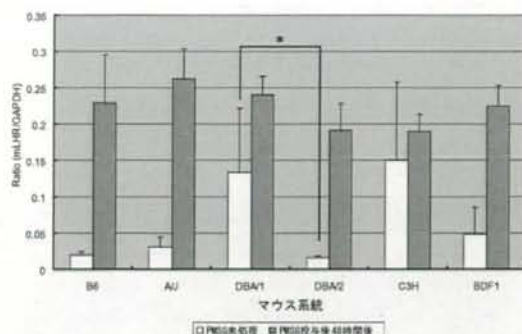


図2. マウス6系統4週齢の卵巣におけるLHR mRNAの発現量 ( $n=5$ , 平均値+標準偏差)。GAPDHを内部標準としてLHR量をTaqMan Probeを用いたqRT-PCRにて測定し、GAPDH mRNA量に対するLHR mRNA量の相対値として表示した。系統は左から誘起排卵数が少ない順に並べた (B6=C57BL/6Cr)。PMSG処理の前後と系統差による2元分散分析によると、系統間、PMSG投与前後、およびその相互作用に全て有意差があった ( $p < 0.05$ )。PMSG未処理群のみの系統間の分散分析で有意差が見られ ( $p = 0.0027$ )、DBA/1とDBA/2間にのみ有意差があると判定された (Tukey-Kramer法;  $p < 0.05$ )。標準偏差が示すようにDBA/1とC3HのPMSG未処理群のLHR mRNA量には大きな個体差が見られ、両系統で幼若個体に見られる卵胞発育のFirst waveの進行パターンに個体差がある可能性が考えられるが、本研究では調べられなかった。一方、PMSG投与48時間後の系統間比較では有意差がなかった ( $p = 0.0530$ )。これらのことから、4週齢卵巣においてPMSG刺激前におけるLHR mRNA発現量に系統差があるものの、PMSG投与により全系統でほぼ同レベルにまでLHR mRNA発現が活性化されることがわかった。

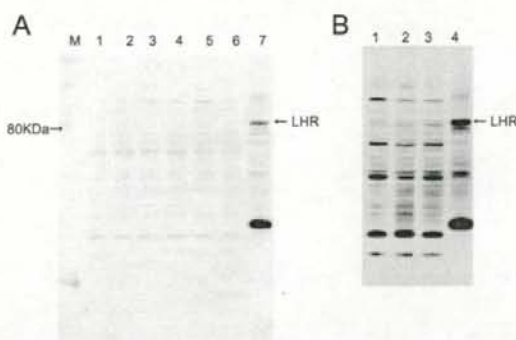


図3. AllPrep DNA/RNA/Protein Min Kitで抽出した卵巣蛋白質のWestern blot解析。A) 抗LHR血清を用いてPMSG投与後48時間後の6系統の4週齢卵巣から抽出した蛋白質内のLHRの検出を試みたが、陽性対照 (レーン7) に陽性バンドが見られるのみで、調べた6系統全てにおいてLHRのバンドは検出されなかった。M:分子量マーカー (Novex sharp protein standard; Invitrogen), 1: C57BL/6Cr, 2: A/J, 3: DBA/1, 4: DBA/2, 5: C3H, 6: BDF1, 7: マウス卵巣蛋白質抽出液 (Santa Cruz Biotechnology)。B) 異なる年齢のマウス卵巣から抽出した蛋白質を用いてLHRのWestern blot解析を行った。この場合も、陽性対照 (レーン

4)に陽性バンドが見られるのみで、調べた3種類の卵巣のいずれにおいてもLHRは検出されなかった。  
 1: PMSG投与後48時間後の4週齢C57BL/6Cr, 2: C57BL/6Jの妊娠雌, 3: C57BL/6Jの非妊娠成熟雌, 4: Ovary Extract (Santa Cruz Biotechnology)。

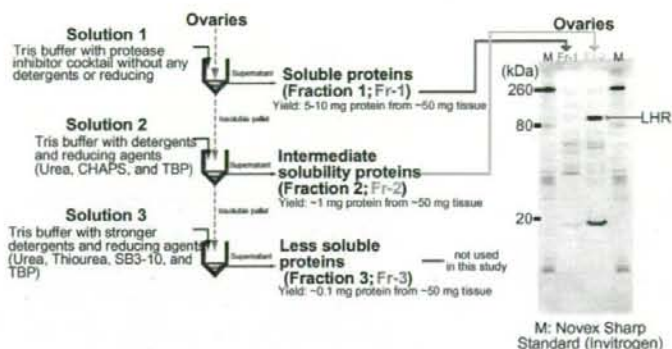


図4. 溶解度による卵巣蛋白質の分画抽出。膜蛋白質を濃縮するため、溶解度による蛋白質の分画抽出を試みた。PMSGとhCGによる排卵処理を施したC57BL/6雌からhCG投与後約18時間で卵巣を摘出し、蛋白質を溶解度により3分画に抽出した。Fraction 1とFraction 2を用いて、抗LHR血清によるLHR蛋白質の検出を試みたところ、Fraction 2で明瞭な陽性バンドが検出できた。

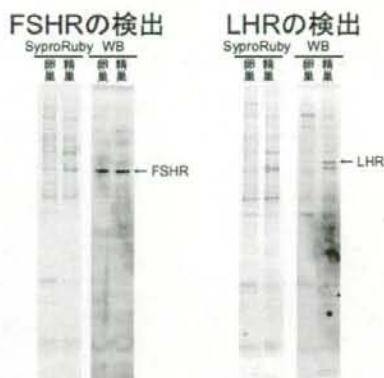


図5. 成熟ddYマウスの卵巣および精巣のFraction 2分画を用いたWestern blot解析。成熟個体の卵巣及び精巣からFraction 2分画を得てLHRのWestern blot解析を行ったところ、精巣でのみLHRのバンドが確認された。そこで卵巣のFraction 2で確かに7回膜貫通型の膜蛋白質が抽出されていることを確認するため、同一サンプルについてFSHRのWestern blot解析を行ったところ、卵巣・精巣とも明瞭なバンドが検出された。図4の結果と併せて考えると、卵巣内LHRは時期特異的な発現をしていることがわかる。写真でSyproRubyはPVDF膜に転写された総蛋白質を染色したもの、WBは同一PVDF膜でFSHR抗血清またはLHR抗血清を用いたWestern blot解析の結果である。

## マウス標準系統のプロファイリング

研究分担者：内尾こずえ（独）医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究員

### 研究要旨

遺伝子改変マウス作成においては、対象とする系統マウスの遺伝的背景と発現型との関連が不明であり、作成した系統の表現型を予測することは非常に困難である。遺伝子改変マウスにおける改変遺伝子の発現型に関わる遺伝的要因と環境要因との関連を明らかにするため、遺伝的背景の異なる標準系統の遺伝的、生理的特性を融合したデータベースを整備することで遺伝子改変マウスの効率的な作成指標を提供し、効率化を目指す。本年度は生理的特性、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、マウス系統差・雌雄差を明らかにした。

### A. 研究目的

遺伝子改変マウス作成技術が広く普及し、多様な系統が作成されているが、期待された表現型が得られないことも多い。遺伝子改変マウス作成にはC57BL/6、BALB/c、DBA/2、C3H、FVB、129 など様々な近交系マウスが利用されているが、マウスの遺伝的背景と発現型との関連が不明であり、作成した系統の表現型を予測することは非常に困難である。効率的にモデルマウスを作成するためには、改変遺伝子の発現型に関わる遺伝的要因と環境要因との関連を明らかにする必要がある。さらに食餌、飼育方法など環境要因が表現型に大きく影響することも知られている。そこで遺伝的背景と環境要因との相互作用に関わる遺伝的・生理的情報をデータベース化し、モデルマウス作出法の効率化を目指す。

### B. 研究方法

#### < 供試動物 >

日本クレアより8週齢のC57BL/6J、BALB/cA およびDBA/2Jを購入した。マウス用飼料として通常食（CE2）、低タンパク食（CE7）および高脂肪食（Quick Fat: QF）を用いた（日本クレアより購入）。実験スケジュールは図1、実験群は表1に示した。一晚絶食後、血液、臓器（肝・腎・脾・筋・白色脂肪・褐色脂肪）を採取した。

#### < 生化学検査 >

血清中のインスリン、adiponectin、leptin をELISA法にて測定した。さらに各種サイトカイン（IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12、MCP-1、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ 、GM-CSF、RANTES）をサイトカインアレイ法にて測定した。

### C. 研究結果

今年度は生活習慣病のパラメーター、免疫機能を制御するサイトカインの測定を行った。

#### <生活習慣病に関与する因子>

8週齢の C57BL/6J、BALB/cA および DBA/2J に4週間食餌負荷 (CE-7, CE-2 および QF) し、一晩絶食後に採血を行った (実験のタイムスケジュール、実験群は図1、表1参照)。血清中のインスリン、adiponectin および leptin を ELISA 法にて測定したところ、系統差・雌雄差が顕著であった。以下、項目別に結果を記載する。

#### インスリン

インスリンは膵島β細胞から分泌されるペプチドホルモンであり、血糖値をコントロールしている。生活習慣病の原因の一つにインスリン抵抗性がある (十分量のインスリンが存在しても、インスリン作用不足により、糖の取り込みができない状態となり、血糖値が上昇する。さらにインスリンの産生量が増加し、高インスリン血症となる)。

(実験結果: 図2参照) 空腹時 insulin はどの系統においてもオスの方が高い傾向にあった。さらに QF を負荷した実験群が高く、高脂肪食により血中インスリン量が増加していた。特に DBA/2 は高脂肪食を負荷することにより顕著に増加していることから、インスリン抵抗性になりやすい系統といえる。

#### Adiponectin

Adiponectin は脂肪細胞から分泌されるホルモンである。Adiponectin はインスリン感受性を増強する善玉アディポカインとも言われており、肥満などにより Adiponectin が減少するとインスリン抵抗性の原因ともなる。

(実験結果: 図3参照) どの系統においてもメスの方が高い傾向にあった。また高脂肪食負荷により adiponectin 量は低下する傾向にあった。特に DBA/2 は、adiponectin 量が低い傾向にあることに加え、高脂肪食を負荷することにより顕著に分泌量が減少していることから、インスリン抵抗性になりやすい系統といえる。

#### Leptin

Leptin は脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、摂食、代謝を制御している。Leptin を欠損したマウスが食欲過剰で肥満を呈することから leptin が摂食を抑制するシグナルを担っていることが明らかとなった。一方、血中レプチン濃度は肥満者において高い傾向にあり、レプチン抵抗性による作用不足の状態であると考えられている。

(実験結果: 図4参照) 空腹時 leptin はオスの方が高い傾向にあった。特に DBA/2 のオスは分泌量が多く、高脂肪食を負荷するとさらに増加した。

#### <サイトカインアレイ>

各種サイトカイン (IL-1α, IL-1β, IL-2、