

201008034A

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 (H22-創薬総合-指定-017)

**実験動物を用いた周産期疾患の
解析と繁殖技術の開発**

平成22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23年(2011)3月

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 (H22-創薬総合-指定-017)

実験動物を用いた周産期疾患の
解析と繁殖技術の開発

平成22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23年(2011)3月

目 次

I. 総括研究報告

実験動物を用いた周産期疾患の解析と繁殖技術の開発

保富 康宏 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 霊長類における発生工学的技術の高度化

山海 直 ----- 9

2. カニクイザルにおける垂直感染の解析と繁殖技術の開発に関する研究

柴田 宏昭 ----- 16

3. 霊長類を用いた感染症モデルに関する研究

岡村 智崇 ----- 19

4. 疾患モデルマウスの生殖工学手法の最適化に関する研究

松田 潤一郎 ----- 25

5. 不妊の機序解明と治療法の開発に関する研究

鈴木 治 ----- 27

6. 疾患モデルマウスの妊娠母体の病態解析と産仔の表現型への影響に関する研究

内尾 こずえ ----- 33

7. 周産期疾患の解析と繁殖技術の開発のためのカニクイザル
MHC class-Iのタイピング解析とゲノムシーケンシング

高橋 一郎, 亀岡 洋祐 ----- 41

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

実験動物を用いた周産期疾患の解析と繁殖技術の開発

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 センター長

研究要旨:周産期における疾患は我が国はもとより人類にとっても大きな問題である。加えて、不妊等を引き起こす疾患は少子高齢化を考えた場合、解決しなければならない課題である。本研究ではマウスを主体とした実験小動物と、我が国で唯一の医科学研究に特化し、遺伝学的解析とSPF化を達成したカニクイザルコロニーの自家繁殖・育成を行っている霊長類医科学研究センターの霊長類を用い、繁殖障害ならびに周産期疾患の解明を行い、それに伴う医科学研究に有用な胚・配偶子の凍結保存による遺伝子保存技術の確立および遺伝学的解析を行う。また、周産期に使用可能なワクチンや垂直感染を示す感染症の解析やそれに関する遺伝学的な解析を行った。本研究で用いた長期間自家繁殖による遺伝学的な情報が明確な霊長類資源は世界的にも極めて貴重である。そのために系統の明らかなマウス等の小動物の情報が、高度化された均質な霊長類資源であるために反映可能となり、さらなる霊長類資源高度化およびヒト疾患解明に貢献できる。さらに実験動物における周産期の解明は生物資源としての安定的な供給にも繋がっていくと考えられた。

研究分担者

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
柴田 宏昭	医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター	プロジェクト研究員
岡村 智崇	医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター	研究員
松田 潤一郎	医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部	研究リーダー
鈴木 治	医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部	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 一郎	医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部	主任研究員
亀岡 洋祐	医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部	主任研究員

A. 研究目的

周産期における疾患は我が国はもとより人類にとって歴史的にも大きな問題してとらえられてきた。加えて、不妊等を引き起こす疾患は少子高齢化を考えた場合、解決しなければならぬ課題である。これには基礎的な動物実験が必要であり、ヒトと生理学的な周期や胎盤構造が同一のカニクイザル等の霊長類を用いた研究が必要となる。現在までにこれら研究が諸外国でも殆ど行われていないのは野生動物に近い雑多な霊長類を用いてきたためであり、用いられる霊長類はSPF化や遺伝学的な解析等により、高度化した動物で行われていなければ詳細なヒトへの応用に繋がらない。しかしながら、不妊に対するホルモン療法やそれに伴う生理学的な解析はヒトではもちろん困難であるが、霊長類で直接行うことも、霊長類由来の生物製剤の希少さや霊長類を扱うことの特異性の問題等により、小動物のように簡便に行えない。一方、マウスを主とした実験小動物は遺伝学的な均一性に加え、基礎的な生物学的解析が充実しており、それは希少疾患モデル動物でさらに顕著となる。繁殖等の周産期に関する解析も、繁殖周期の長さや、産仔数の多さから、薬物投与等による効果を研究することに有用であり、ホルモン療法や各種薬剤による、投与実験およびその判定等も容易である。これらのことから、周産期における生理学的な解析や疾患等の研究には汎用性の高い実験小動物の基礎的な情報ならびにその情報を元にして、さらにヒトに近い霊長類への展開が必要となる。本研究では汎用性が高いマウスと人に非常に近い霊長類を用いて繁殖障害ならびに周産期疾患の解明を行い、それに伴う医科学研究に有用な胚・配偶子の凍結保存による遺伝子保

存技術の確立および遺伝学的解析を行う。また、周産期に使用可能なワクチンや垂直感染を示す感染症の解析やそれに関する遺伝学的な解析を行った。

B. 研究方法

(1) カニクイザル繁殖法の確立

2日間で血中E2濃度が急激な減少をにより排卵を確認しサル性の周期を調べた。排卵前後の3日間および7日間雄と同居させ受胎率を調べた。

(2) カニクイザル卵巣の凍結保存と移植

磁気パルス微弱エネルギーを発生するプログラムフリーザーにて凍結し、最終的には液体窒素に浸漬して保存した。拒絶反応が起きないように摘出したものの個体に移植した。

(3) カニクイザル受精卵の凍結保存

受精卵(胚)はICSIにより作成した。凍結は、ポリプロピレンのシートに微量の培地とともに胚をのせて液体窒素中に浸漬するという簡便なガラス化法を用いた。

(4) サルDタイプレトロウイルス(SRV/D)の検出

P血液、羊水中のRNAをターゲットとしたRT-PCRを行った。PCRの条件は、既報に準拠した。

(5) 妊娠カニクイザルにおける風疹ウイルスワクチンの接種

風疹ワクチンの胎児への影響を解析するため、妊娠陽性3週齢のカニクイザルに風疹ワクチンを接種し、採血およびSwabを採取する。その後3週で解剖し、胎児感染の有無や母体内ワクチン分布を解析した。

(6) カニクイザルMHCタイピング

カニクイザル末梢血からDNAサンプル、

RNAサンプルを抽出し、Random hexamer をプライマーとして1本鎖cDNAを合成し、MHC class Iタイピングプライマー MAS (MHC type I Locus A), MBS (MHC type I Locus B) (Boyson et.al) を用いPCR反応を行った。PCR 産物は塩基配列をシーケンサー(ABI・ジェネティックアナライザ)で決定した。

(7)速進行性糸球体腎炎(SCG)マウスにおける受胎率の検討

生後6週齢で交配を開始し、出産後に尿検査(潜血と蛋白)を行い、おおむね100日前後で解剖・採材した。

(8)マウスにおけるホルモン処置と受胎率の検討

9週齢のC57BL/6NCrSlc(B6系)および129X1/SvJmsSlc(129系)の雄マウスにDHEAの徐放性製剤(21日用、総量5mg, Innovative Research of America), または、プラセボ(Placebo)を頸部皮下にインフルラン麻酔下で専用の挿入用針(trochar)にて挿入した。21日後、雄が12週齢に達した時点で体外受精に用いた。

(9)自然発症ネフローゼマウス表現型検索

母体および産仔の血清生化学検査およびRNA抽出およびReal Time PCRによる発現タンパクの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

(1)カニクイザル繁殖法の確立

カニクイザルにおける排卵を検討したところ、繁殖周期の中期を中心に高齢の個体で

は排卵日にばらつきがあることが分かった(図1)。このことから雄の同居を性周期中期を中心に3日間と7日間に分けて受胎率を検討したが、両者には優位さがなかった。(図2)。また、SPF個体を作製する目的でサルDタイプレトロウイルス(SRV/D)の感染状況を検討するために、SRV/D感染母体からの新生児の感染状況を調べたところ、102頭の新生カニクイザルのうち11頭にSRV/D感染が認められた。これらの母体は全て血漿中からウイルスゲノムが検出され、SRV/D抗体陽性で血漿中からウイルスゲノムが認められない個体からの新生児においてはSRV/Dの感染は認められなかった(図3)。

(2)カニクイザル卵巣の凍結保存と移植

カニクイザルの卵巣を磁気パルス微弱エネルギー曝露下でまるごと保存し、融解した卵巣を個体に移植することで卵巣機能が回復したことを内分泌学的に確認され、その機能は少なくとも3年は維持されていた。

(3)カニクイザル受精卵の凍結保存

カニクイザル胚の凍結をヒトで用いられている方法で実施したところ、4-8 cellは産児が得られるがBlastocystでは産児が得られなかった。

(4)サルDタイプレトロウイルス(SRV/D)の検出

ウイルス血症の3頭の妊娠ザル6週齢の胎仔のウイルス感染を調べたところ、既にこの時期、羊水や臍帯血中にウイルスが存在することが分かった。

(5)妊娠カニクイザルにおける風疹ウイルスワクチンの接種

妊娠カニクイザルにおける風疹ワクチンの接種では1頭に死流産が認められ、その胎児か

らはウイルスも検出された。その他の個体においても母体の感染は認められた。

(6) カニクイザル MHC タイピング

MHC class-I タイピング解析によって描かれたカニクイザル個体 A の系統樹が確立された。

(7) 速進行性糸球体腎炎 (SCG) マウスにおける受胎率の検討

繁殖能力が低く系統維持が困難な、難病指定の急速進行性糸球体腎炎モデルマウス (SCG マウス) を繁殖学的特性に基づいて系統維持し、体外受精は困難であったが自然交配由来の胚を凍結-融解-胚移植して産仔を得ることに成功した。

(8) マウスにおけるホルモン処置と受胎率の検討

DHEA による雄マウスの体外受精能の向上は有効であった。

(9) 自然発症ネフローゼマウス表現型検索

ネフローゼマウスを用いた本研究により母体疾患が産仔の表現型に大きく影響することが明らかになった。

D. 考察

不妊等を含む周産期疾患に対する病態解明および新規治療薬・治療法は医学研究において重要課題である。これらの解決には高度な実験・研究が必要であり、特に動物実験は重要である。また、ヒト遺伝子の解析は世界的に行われ、そのために医学研究に用いる実験動物においても分子からの解明が無ければ有用性が低い。本研究では科学的な問題はもとより、倫理的にも困難な問題が山積する周産期疾患を、実験動物として高度化を推進したマウスから霊長類までの広範囲

な動物を用いて行った。さらに不妊や周産期疾患でのマウスおよび霊長類資源の遺伝子レベルからのヒト疾患に有用な知見が得られ、ヒトでは困難な生理学的、遺伝学的な解析や実験的治療等を行える。これにより周産期に影響を及ぼす遺伝学的、生理学的情報、および不妊等に繋がる疾患に対し、マウスから霊長類までの、ヒトにおける周産期研究のモデル動物の基盤体制が樹立することを目的としている。本研究で得られた結果は医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た。

E. 結論

マウスから霊長類の広い範囲の実験動物を用いて、遺伝子から個体までの研究により、周産期疾患研究の基礎的知見を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida, T., Saito, A., Iwasaki, Y., Iijima, S., Kurosawa, T., Katakai, Y., Yasutomi, Y., Reimann, K.A., Hayakawa, T. and Akari, H. Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. *Frontiers Microbiol.* 2011 in press
- 2) Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi, Y., Lara, J., Khurdyakov, Y., Schofield D., Emerson, S., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T. and Holland, R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.* 2011;85:1117-1124.

- 3) Chono,H., Matsumoto,K., Tsuda,H., Saito,N., Lee,K., Kim,S., Shibata,H., Ageyama,N., Terao,K., Yasutomi,Y., Mineno J., Kim,S., Inoue,M. and Kato,I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase. *Human Gene Ther.* 2011;22:35-43.
- 4) Saito,A., Nomaguchi,M., Iijima,S., Lee,Y-J., Kono,K., Nakayama,E.E., Shioda,T., Yasutomi,Y., Adachi,A., Matano,T., Akari,H. A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Micorbes Infect.* 2011;13:58-64.
- 5) Naruse,T.K., Zhiyong,C., Yanagida,R., Yamashita,T., Saito,Y., Mori,K., Akari,H., Yasutomi,Y., Matano,T. and Kimura,A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origine rhesus macaques. *Immunogenetics* 2010;62:601-611.
- 6) Okabayashi,S., Uchida,K., Nakayama,H., Ohno,C., Hanari,K., Goto,I. and Yasutomi,Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *J.Comp.Pathol.* 2010 Epub
- 7) Yasuhiro Yasutomi. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2010;B75-B77.
- 8) Fujimoto,K., Takano,J., Narita,T., Hanari,K., Shimozawa,N., Sankai,T., Yoshida T., Terao,K., Kurata,T. and Yasutomi,Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp.Med.* 2010;60:51-53.
- 9) Cueno,M.E., Karamatsu,K., Yasutomi, Y., Laurena,A.C. and Okamoto.T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 2010;19:889-895.
- 2.学会発表
- 「国内」
- 1) 塩釜ゆみ子、松原明弘、河岡義裕、保富康宏：ヘルパーT細胞(Th)制御によるインフルエンザ感染病態とワクチン効果の検討第13回日本ワクチン学会 東京2010年12月11日-12日
- 2) 保富康宏：アジュバント分子組み込みエイズウイルスの開発(シンポジウム)第24回日本エイズ学会、東京、2010年11月24日~26日
- 3) 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザルTRIM5 alleleがサル指向性HIV-1の増殖に与えるインパクト第24回日本エイズ学会、東京、2010年11月24日~26日
- 4) 下澤律浩、高橋一郎、柴田宏昭、伊奈田宏康、野阪哲哉、保富康宏：カニクイザル体細胞に由来する人工多能性幹細胞の作製第57回日本実験動物学会、京都、2010年5月12日~14日
- 5) 塩釜ゆみ子、松原明弘、河岡義裕、保富康宏：IL-4とそのアンタゴニストを用いたヘルパーT細胞反応調節によるインフルエンザ感染病態とアレルギー反応 第58回日本ウイルス学会 徳島2010年11月7日-9日

「国際」

Vancouver, Canada, February 26 -
March 3, 2011.

- 1) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro
YASUTOMI: Therapeutic effects of Ag85B
in allergic asthma by inducing not only Th1
response but also Interleukin-17, -22
production. 14th International Congress of
Immunology. Kobe Japan, August 22-
27, 2010.
- 2) Akihiro Matsubara, Kenta Watanabe,
Mitsuo Kawano, Satoru Mizuno, Yusuke
Tsuji-mura, Hiroyasu Inada, Masayuki
Fukumura, Isamu Sugawara, Tetsuya
Nosaka, Kazuhiro Matsuo, Yasuhiro
Yasutomi:
- 3) Intranasal immunization with replication-
deficient recombinant human
parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed
protective effects against Mycobacterium
tuberculosis infection. TB Vaccines. A
Second Global Forum, Tallinn, Estonia
September 21-24, 2010.
- 4) Yasuhiro Yasutomi: Gene delivery of
suppressor of cytokine signaling 1
(SOCS1) showed therapeutic effects to
autoimmune myocarditis in mice. 2nd
Annual International Congress of
Cardiology, Shanghai, China, December
7-9, 2010.
- 5) Y. Tsujimura and Y. Yasutomi.
Therapeutic effects of Ag85B in allergic
asthma by inducing not only Th1
response but also Interleukin-17, -22
production. Immunity in the Respiratory
Tract : Challenges of the Lung
Environment. Keystone Symposia,

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

(1) パラミクソウイルスベクターを用いた経鼻
噴霧型結核ワクチン

2010年11月1日 (PCT/JP2010/069435)

(2) 遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方
法

2011年2月8日 (特願 2011-025234)

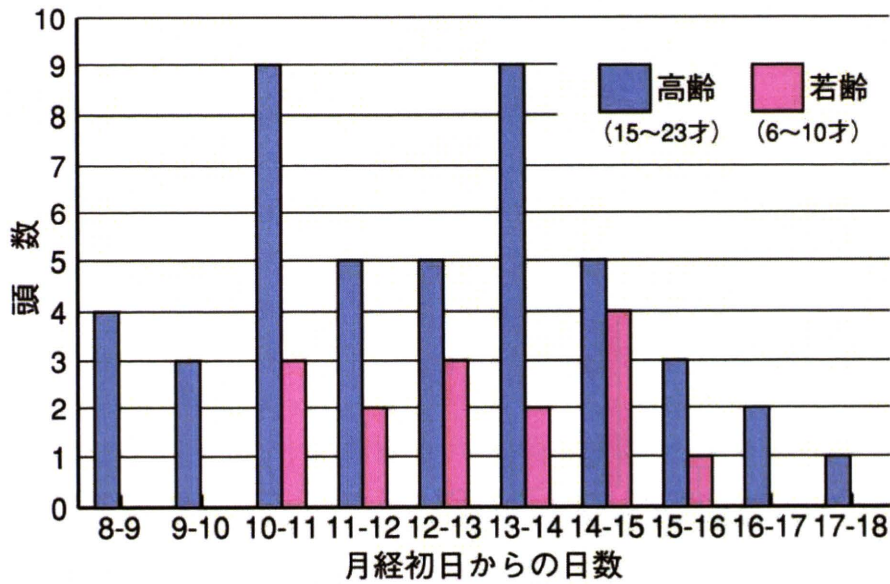


図1. 血清中E2濃度の測定による排卵日の推定

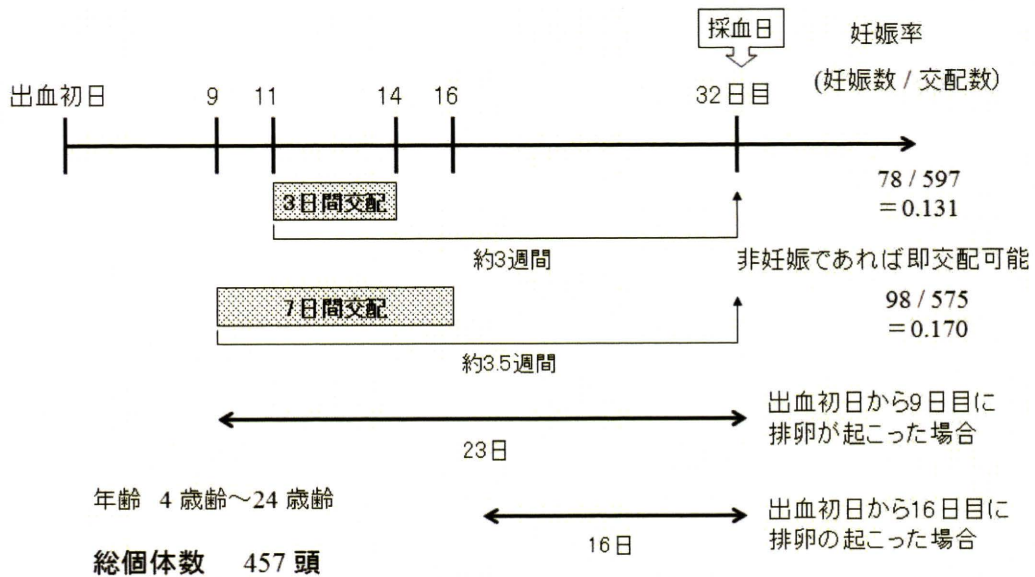


図2. カニクイザル雄同居日数による受胎率の変化

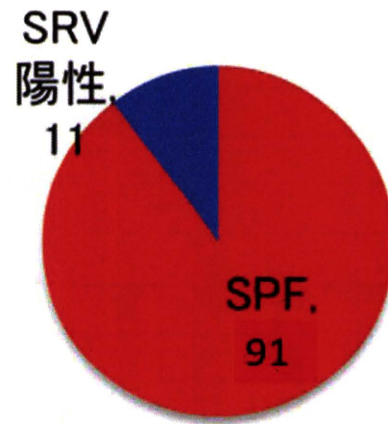


図 3. 新生児における SRV/D 感染

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

霊長類における発生工学的技術の高度化

分担研究者 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

周産期疾患研究は極めて重要な課題であり、ヒトに近縁のサル類を用いた研究を推進する意義は大きい。本研究を効率的に遂行するためには、生物資源としての動物の高品質化、繁殖・育成技術の高度化を行わなければならない。分担研究者は、とくにサル類の発生工学的基盤技術の高度化を目的として研究を実施してきた。本年度は凍結保存に関わる二つの課題「カニクイザル卵巢の凍結保存」と「カニクイザル受精卵の凍結保存」に取り組んできた。カニクイザル凍結卵巢を移植することで5頭中4頭に月経周期の回帰を認め、約3年が経過してもその内分泌機能を維持する個体が存在していることを見出した。また、ICSIにより作成したカニクイザル胚をヒトの胚で応用されている方法で凍結したところ、4-8 cell ステージで凍結した胚由来の産児が得られた。これは ICSI 由来カニクイザル凍結胚のはじめての産児である。しかし、Blastocyst で凍結した試験区からは産児が得られなかった。カニクイザルとヒトの胚は耐凍性が異なる可能性を示唆する結果であり、カニクイザルの Blastocyst を凍結するためには手法の改良が必要であると考えられた。

A. 研究目的

1) カニクイザル卵巢の凍結保存

卵巢はメスの生殖細胞である卵細胞を保有し受精可能な状態に成熟させる臓器である。また、性ホルモン分泌という内分泌機能をも有しており、次世代を残すためかつ、生殖生理学に関わる健康保持のための重要な臓器である。その卵巢の保存技術の開発はメス特有の生物資源の長期保存を可能にするものとなる。臨床的には女性のガン患者に卵巢保存技術が適用されようとしてい

る。がん治療により生殖能力を失うケースが多くあるため、治療前に卵巢を摘出、保存し、がんが完治したところで卵巢を移植するというものである。さらに、卵巢のように多機能を有する細胞が複数含まれている臓器の凍結保存が可能になれば、その技術は卵巢以外の様々な臓器の保存を可能にするものと考えられる。そこでカニクイザル卵巢の凍結技術の確立を目指して研究を進めることとした。

2) カニクイザル受精卵の凍結保存

卵の凍結保存は、次世代を残すための技術として様々な実験動物、家畜、ヒト不妊治療の手法として開発されている。カニクイザルにおいても貴重な遺伝資源の保存、コロニーの有効な利用システムを構築する上で意義ある技術である。しかし、種々のサル種の卵に共通の凍結保存技術はなく、また簡便かつ高率に生存性が担保された技術は未だ存在しない。近年、ヒトの受精卵のためにシートを用いたガラス化凍結技術が開発された。この技術はヒトにおいて、かなり有用である。そこで同じ手法でカニクイザル受精卵のガラス化凍結保存を試み、汎用性について検討することとした。

B. 研究方法

1) カニクイザル卵巣の凍結保存

カニクイザル 5 頭を用いて卵巣摘出、凍結保存、同一個体への移植実験を行い、移植後のカニクイザルの生殖生理学的解析を継続解析している。本年度は、移植後約 3 年が経過した個体の状態を解析した。

実験には月経周期を認めるカニクイザル 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密封した。その状態で磁気パルス微弱エネルギーを発生するプログラムフリーザーに設置し、1 分間に -6°C の速度で -30°C まで温度を低下させて凍結し、最終的には液体窒素に浸漬して保存した。卵巣摘出後（卵巣保存後）、1 カ月間、個体の健康状態および性ホルモン動体につい

て解析し卵巣が完全に摘出できていることを確認した。液体窒素から取り出した卵巣を 37°C のお湯に浸漬して融解し、拒絶反応が起きないように摘出したもとの個体の筋肉内あるいは腎被膜下に移植した。卵巣を移植した個体の月経周期について検索した。移植後約 3 年間にわたり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。

カニクイザル以外にウサギおよびマウスの卵巣を用いて同様の手法による凍結を行い、融解卵巣の腹壁、卵管采への移植実験、融解卵巣から採取した卵胞の生存性について検索した。移植実験はウサギで実施し、卵胞の生存性についての実験はマウスを用いて行った。卵胞の生存性は酸素の取り込み量を測定し細胞の呼吸を検出することで行った。

2) カニクイザル受精卵の凍結保存

受精卵（胚）は ICSI により作成した。凍結は、ポリプロピレンのシートに微量の培地とともに胚をのせて液体窒素中に浸漬するという簡便なガラス化法を用いた。胚をピペット先端に保持して持ち込むメディアムの量を極力少なくし、第 1 ガラス化凍結用培地（VM1）表面に静かにのせ、胚が沈降しながら収縮することを観察した。その後、細胞質体積が完全に回復することを確認した。次に胚を第 2 ガラス化凍結用培地（VM2）表面に移動した。そして、ガラス化凍結用培地（VS）中で胚を 2、3 度ピペッティングしたのちポリプロピレンのシートに VS と

共にのせ液体窒素中に浸漬して保存した。

胚の融解のために、操作の1時間以上前から培地と4-well dishを37℃に温めておいた。凍結された胚が着いたシートを液体窒素から取り出し、ただちに第1融解用培地(TM1)に浸漬して実体顕微鏡にて融解した胚を探し出して第2融解用培地(TM2)に移した。次に洗浄用培地(WM)で胚を洗浄し、形態的に正常な胚のみを20%BS添加のCMRL-1066に移して培養した。4-8 cell凍結融解胚は16 cell、MorulaあるいはBlastocystに発生し形態的に正常と判断したものを移植した。Blastocystでの凍結融解胚は拡張胚盤胞になることを確認したものを移植した。

排卵日あるいは排卵後1-6日目のメスを胚移植のレシピエントに用いた。胚移植は腹腔鏡下にてレシピエントの卵管采からカテーテルを卵管内に挿入して実施した。胚移植実施日より約30日後に超音波画像診断装置により妊娠診断を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験委員会の承認を受けて実施している。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

1) カニクイザル卵巣の凍結保存

カニクイザル卵巣を凍結し、融解後腎皮膜下あるいは骨格筋内に移植したところ5頭中4頭でLH、FSH、E2およびプロジェス

テロンの濃度が正常個体と同様の動態を示すことが確認され、また、月経も認められた。他の1頭はLH、FSH濃度が高値となり、E2、プロジェステロン濃度の上昇は認められなかった。すなわち、定着しなかったことを示す結果を得た。移植後約3年が経過したが、月経周期を認めていた4頭中3頭はその周期が継続して示されていることが確認された。

ウサギ凍結卵巣を腹壁あるいは卵管采に移植したが、炎症性の膜に覆われてしまい移植した卵巣の細胞の多くは脂肪細胞に置き換わっていくことが確認された。また、凍結融解したマウス卵巣から採取した卵胞を用いてその酸素消費について検索したところ、いくつかの卵胞で酸素消費が確認された。比較的大きな卵胞においても酸素消費を認めている。

2) カニクイザル受精卵の凍結保存

ICSIにより受精させた4-8 cellの胚63個とBlastocystまで発育した胚56個を凍結することができた。融解直後の形態観察による生存率は4-8 cellとBlastocystで、それぞれ95と86%であり、数時間~5日間培養し形態的に正常と判断して移植した胚の数は、4-8 cell凍結由来胚37個、Blastocyst凍結由来胚21個であった。凍結した4-8 cell由来胚の移植により7頭の妊娠が確認された。妊娠率は29.2% (7/24)であった。移植した時の胚のステージ、16 cell、Morula、Blastocystのいずれの試験区からも妊娠例を得ることができた。一方、Blastocystで凍結した胚を16頭のレシピ

エントに移植したが妊娠には至らなかった。

妊娠が確認された 7 頭のうち 3 頭は出生に至ったが、他の 4 頭中 1 頭は妊娠 161 日目で前置胎盤により死産が確認された。さらに、3 頭はそれぞれ妊娠 81 日目、100 日目、120 日目に流産した。

D. 考察

カニクイザル卵巢の凍結保存の実験で凍結融解した卵巢を移植したカニクイザルは、現在も生存している。移植後約 3 年が経過したが現在も主要性ホルモン動態が正常に動いていることが確認された意義は大きい。ヒトにおいても卵巢移植成功例が報告されているが、数年でその機能が消失するといわれており、そのことが課題となっている。今回の手法とヒトで実施されている手法には大きな違いがある。ヒトでは卵巢をスライスして凍結しているのに対し、本実験では卵巢まるごとを使用している。卵巢まるごとを凍結する技術はこれまでの常識を超えたものと言える。卵巢まるごとで凍結融解したのち移植することで少なくとも 3 年間機能が保持されたということは、新規凍結法として適用できる可能性を示すとともにヒトでの課題解決につながる可能性を示唆するものである。

カニクイザルでは移植場所として毛細血管が豊富な場所である腎皮膜と骨格筋内を選んでいいる。しかし、本研究には交配により産児を得るという目標があるため、排卵した卵が卵管に取り込まれる場所を模索する必要がある。そこでウサギを用いて移植

場所の検討を行った。今回は腹壁と卵管の開口部である卵管采への移植を試みが、いずれも完全な定着は確認できず、組織学的検索により卵巢の細胞が脂肪細胞に置き換わるという組織像を得ている。移植を成功させるポイントとして、いかに迅速に血液を卵巢内に送りこむかということがあるだろう。血管縫合という移植手法を用いることが可能になれば定着する可能性が上がるかもしれない。

さらにマウス凍結融解卵巢から採取した卵胞の酸素消費を検索して生存性を確認した。生きた細胞は酸素を消費していることを利用した判定法である。これまで凍結融解により大きな卵胞は死滅する可能性が高いと考えられていたが、今回の実験でその生存をも確認された。ただし、これは卵胞を構成している細胞やその卵胞内に存在する顆粒膜細胞の生死を示していると考えられ、卵の生存についてはさらに詳細な検討が必要である。しかし、少なくとも大きな卵胞そのものは凍結融解後も生存細胞で構成されていることを示唆する結果が得られており、これは一つの大きな成果と考えている。

ポリプロピレンのシートを用いたカニクイザル胚のガラス化凍結実験では、4-8 cell での凍結胚を移植し 3 頭の産児を得ることに成功した。このことは、4-8 cell の凍結保存に本法が有用であることを示している。ICSI で作成したカニクイザル胚の凍結融解、胚移植により産児を得たはじめての成功例である。しかし、同じように ICSI

で作成した Blastocyst 21 個を 16 頭のレシピエントに移植したが 1 例の妊娠も確認されなかった。4-8 cell で凍結した胚を、融解後培養して発生した 5 個の Blastocyst を 4 頭のレシピエントに移植し 1 例が妊娠している。すなわち、Blastocyst までの培養系、胚移植の手法には問題なかったと言える。このことから、Blastocyst は 4-8 cell と異なり凍結融解時に何らかのダメージを受けているということになる。ただし、Blastocyst での凍結胚は融解後に拡張胚盤胞にまで発生することが確認されており、細胞そのものは生存しているが、着床に関わる部分あるいは因子にダメージがあったと推察される。アカゲザルでは ICSI 由来 Blastocyst の凍結により産児を得たという報告がある。このときは、ナイロンループに張った培地の膜上で胚を凍結させる方法を用いている。胚の凍結融解において、培地量をできるだけ少なくするということは理論的には大きな意義があり、培地の膜上で凍結する方法は理想に近いのかもしれない。ただし、培地の膜上での凍結方法に比べ、今回の方法は極めて簡便であるという大きな利点がある。

従来、カニクイザル発生初期胚の凍結保存では、ガラス化法よりも緩慢凍結法が良いと言われており、緩慢凍結法による融解胚から妊娠個体を得たとの報告もある。緩慢凍結法は凍結操作に時間がかかりプログラムフリーザーが必要となり、また、カニクイザル ICSI 胚の緩慢凍結に関する報告はない。ヒトでは、今回と同じ方法で

Blastocyst の凍結、胚移植により産児が得られている。カニクイザル胚とヒト胚の違いがあるとすれば、サル類に適した手法を新規開発しなければならない。

今回の検討において凍結精子を用いた ICSI により作成した胚からも妊娠例を得ている。凍結保存されていたオスの遺伝性疾患モデル個体の精子を用いて個体にするための手法を示したことを意味する。精子の凍結保存技術と胚の凍結保存技術を組み合わせることで、カニクイザル遺伝子の保存と個体作出において様々な操作手順を選択することが可能となり、遺伝子バンク構築への貢献が期待できる。

E. 結論

カニクイザルの卵巣を磁気パルス微弱エネルギー曝露下でまるごと保存し、融解した卵巣を個体に移植することで卵巣機能が回復したことを内分泌学的に確認され、その機能は少なくとも 3 年は維持されることを示す結果を得た。移植場所、方法についてはさらに検討が必要である。また、大きな卵胞を形成する細胞が生存していることが確認された。

カニクイザル胚の凍結をヒトで用いられている方法で実施したところ、4-8 cell は産児が得られえが Blastocyst では産児が得られなかった。ヒト胚との耐凍性の違いがあることを示唆するものであり、サル Blastocyst を凍結するための技術開発が求められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

J. Yamasaki, C. Iwatani, H. Tsuchiya, J. Okahara, T. Sankai, R. Torii
Vitrification and transfer of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection
Theriogenology (in press)

T. Sankai, N. Owada, K. Kyono
Cryopreservation of the ovary (Review)
J. Mamm. Ova Res. 27: 101-105, 2010

T. Yoshida, K. Hanari, K. Fujimoto, T. Sankai
Female reproduction characteristics in a large-scale breeding colony of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)
Exp. Anim. 59: 251-254, 2010

N. Shimozawa, S. Nakamura, I. Takahashi, M. Hatori, T. Sankai
Characterization of a novel embryonic stem cell line in the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*)
Reproduction 139: 565-573, 2010

K. Fujimoto, J. Takano, T. Narita, K. Hanari, N. Shimozawa, T. Sankai, T. Yosida, K. Terao, T. Kurata, Y. Yasutomi
Simian Retrovirus Type D Infection in a Colony of Cynomolgus Monkeys
Comp. Med. 60: 51-53, 2010

2. 学会発表

T. Sankai, N. Owada, K. Kyono
Cryopreservation of the entire ovary of cynomolgus monkey, rabbit, and mouse in an electric field induced by pulsed magnetic stimulation
International Symposium on Cell Freezing (Tokyo) March 6, 2011

K. Kyono, T. Ishikawa, K. Usui, M. Hatori, L. Yasmin, E. Sato, M. Iwasaka, K. Fujii, N. Owada, T. Sankai
Autotransplantation of the entire ovary of monkeys and rabbits after cryopreservation in an electric field induced by pulsed magnetic stimulation
26th edition of the Annual Meeting of the European

Society for Human Reproduction and Embryology: ESHRE (Roma, Italy) July 27-30, 2010

山海 直、石川孝之、薄井加奈、佐藤英明、大和田哲男、京野廣一
卵巣 (entire ovary) の凍結保存を目指したカニクイザル、ウサギおよびマウスを用いた解析
第 55 回日本生殖医学会 (徳島) 2010 年 11 月 10-12 日

山海 直、羽鳥真功、Lubna Yasmin、石川孝之、薄井加奈、佐藤英明、岩坂正和、藤井和博、大和田哲男、京野廣一
カニクイザルおよびウサギ卵巣の磁気パルス刺激下での凍結と融解卵巣移植後 2 年間の内分泌学的解析
T. Sankai, M. Hatori, L. Yasmin, T. Ishikawa, K. Usui, E. Sato, M. Iwasaka, K. Fujii, N. Owada, K. Kyono
Cryopreservation of the entire ovary from monkey and rabbit in an electric field and two years endocrinological observation after autotransplantation
第 57 回日本実験動物学会 (京都) 2010 年 5 月 12-14 日

山海 直
生殖細胞および生殖器の凍結保存
第 6 回霊長類医科学フォーラム「先端医科学研究の現状」(つくば) 2010 年 11 月 18 日

山海 直
自然発症疾患モデルサルとその保存
サルシンポジウム(公開)「サル類の医科学研究への貢献-疾患モデルと再生医療研究-」(大津) 2010年12月3日

3. その他

山海 直
卵巣凍結保存の現状と今後の課題
IVF J NEWS 49, 2010

山海 直
NHK 「Biz スポ」 2011 年 2 月 2 日
内容：卵巣凍結保存

山海 直
NHK WORLD ENGLISH 2011 年 1 月 15 日
内容：卵巣凍結保存

山海 直
NHK「首都圏ニュース」2011年1月11日
内容：卵巣凍結保存

山海 直
毎日新聞（朝刊）「なるほドリ」2010年9月
10日
内容：サルの習性

山海 直
テレビ朝日「サンデースクランブル」2010年
7月29日
内容：サルの習性

山海 直
テレビ朝日「ワイドスクランブル」2010年7
月26日
内容：サルの習性

山海 直
テレビ朝日「ワイドスクランブル」2010年7
月15日
内容：卵巣凍結保存、臓器凍結バンク構想

山海 直
テレビ東京、テレビ大阪「カンブリア宮殿」
2010年5月24日
内容：卵巣凍結保存、臓器凍結バンク構想

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

カニクイザルにおける垂直感染の解析と繁殖技術の開発

分担研究者 柴田宏昭 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
プロジェクト研究員

研究要旨

周産期関連疾患の研究は非常に重要な研究であるが、この研究分野における動物モデルを用いた基礎研究は多くは行われてはいない。そこで、胎盤構造などがヒトに近い霊長類を用いた研究は必要不可欠である。霊長類における周産期関連疾患の病態解明を行い、ヒト周産期疾患研究や医療につなげ、且つ、本研究推進のために生物資源としての動物の高品質化、繁殖・育成技術の高度化を行う目的で、本研究では、カニクイザルにおけるサルDタイプレトロウイルス（SRV/D）感染ザルの妊娠初期の血中ウイルス量と胎子のウイルス感染との関連を調べた。ウイルス血症の3頭の妊娠ザル6週齢の胎子のウイルス感染を調べたところ、羊水や臍帯血中にウイルスが検出された。また、この時期の胎子にもウイルス感染が認められた個体もあり、妊娠初期の段階から、羊水や臍帯血を通じて胎子への感染が広がっていたことが示唆された。

A. 研究目的

SRV/Dは、咬傷による血液や唾液を通じての感染が主な感染ルートと考えられるが、出生以前の垂直感染も疑われている。また、SRV/Dに感染したサルは、臨床症状として、免疫不全に伴う日和見感染、貧血、持続性下痢、体重減少、リンパ腫症、脾腫、白血球減少などが報告されており、多くの霊長類センターでは、実験用サル繁殖コロニーからのSRV/Dキャリアーサルを根絶する事が非常に重要な課題となっている。そこで、本研究では、カニクイザルにおけるSRV/Dの垂直感染の実態を解明し、且つSRV/Dフリーの繁殖コロニーを目指す目的で、ウイルス血症の妊娠ザルから妊娠初期：胎齢6週齢（満期23.5週）の胎子を取り出し、ウイルス感染を調べた。

B. 研究方法

1. サル

霊長類医科学研究センターで繁殖育成されたカニクイザルの内、SRV/D血症のメスザルを自然交配させ、3頭を妊娠をさせた。エコー下での妊娠確認後、妊娠6週目に帝王切開により、胎子を取り出し、胎子はネブタール投与により安楽殺を行った。帝王切開時に、羊水、臍帯血及び胎子の一部の組織を採取した。また、母ザルの採血も同時に行った。

2. PCR

SRV/Dはウイルス抗体陰性でもウイルス血症を起こしている場合があるため、プロウイルスをターゲットとしたPCR又は、血液、羊

水中のRNAをターゲットとしたRT-PCRを行った。PCRの条件は、既に報告されている論文（AIDS Research and Human Retroviruses.1997, Comparative Medicine. 2005）に準拠した。プライマーは、SRV/D-1、-2、-3、-4に対するenv領域(env1234)、SRV/D-4に対するenv領域(env4)、SRV/D-4に対するgag領域(gag4)を特異的に認識するものを用いた。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験を実施するにあたり、動物福祉および動物実験倫理をとして、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、日本霊長類学会「サル類を用いた実験遂行のための基本原則」および霊長類医科学研究センター「サル類での実験遂行指針」を遵守した。

また、本実験をおこなう上で、医薬基盤研究所の動物実験委員会、組換えDNA実験安全委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

3頭のSRV/D血症の妊娠ザルと6週齢の胎子のSRV/D感染をPCRを用いて調査した。3頭の母子サンプルの結果は表1に示した。今回調べた3頭の妊娠ザルの血液中から全て

SRV/D 陽性であることが確認できた(図 1 A、図 1 C、図 1 E)。また、羊水に関しても 3 頭全てに SRV/D 陽性であることが確認できた(図 1 E、#1 の羊水: data not shown)。臍帯血を調べた 2 頭は全て SRV/D 陽性であった(図 1 E、#2 の臍帯血: data not show)。しかしながら、胎仔中では、2 頭中 1 頭しかプロウイルスの存在を確認できなかった(図 1 B)。なお、#3 の臍帯血、羊水サンプルを env1234 のプライマーを用いた RT-PCR したところ、ポジティブなバンドは検出されなかったが(図 1 D)、gag4 のプライマーを用いた PCR では、陽性反応が検出された(図 1 E)。

D. 考察

SRV/D のサブタイプは、1~6 型が確認されているが、実質的には、1~5 型に分類される。カニクイザルは、そのサブタイプのうち、1、2、4 型の感染が確認されている。特に霊長類医科学研究センターのカニクイザルは、サブタイプ 4 に感染している。海外の霊長類センターでも、あるサブタイプがドミナントに感染しているとの報告があり、コロー内における水平感染が、この点からも強く疑われている。SRV/D の出生前の垂直感染の報告もあり、今回、妊娠初期の胎仔への感染について調査した。母ザルがウイルス血症であれば、既に胎齢 6 週目には、羊水、臍帯血中にウイルスの存在が確認され、母ザルのウイルスが羊水や臍帯血を通じて胎仔へ感染していることが示唆された。しかしながら、今回調べた SRV/D 陰性胎仔は、胎齢が進むにつれ、すなわちウイルスに暴露される時間が長くなるにつれ、胎仔への感染が拡がるのか、それとも羊水、臍帯血中のウイルス量が、ある一定量に達したときに胎仔への感染が拡がるのか、場合によっては、このままウイルス陰性が続くのか今後も検討が必要である。また、妊娠期間中に羊水や臍帯血中のウイルス量が変動するのもも調査する必要がある。

今回用いたプライマーは、SRV/D のサブタイプ 1、2、3、4 の env を共通に認識する env1234、タイプ 4 の env のみを認識する env4 及びタイプ 4 の gag のみを認識する gag4 を用いたが、図 1 D と図 1 E 結果からも分かるとおり、汎用性の高い env1234 は、霊長類センターのサルが感染しているタイプ 4 に対しては検出感度が劣り、gag4 を用いた方が検出感度が良かった。今回、データは示さなかったが、SRV/D-4 の検出感度は、env1234 < env4 < gag4 の順である事が推察された。

E. 結論

ウイルス血症の 3 頭の妊娠ザル 6 週齢の胎仔のウイルス感染を調べたところ、既にこの時期、羊水や臍帯血中にウイルスが存在することが分かった。調べた胎仔 2 頭の内、1 頭はウイルス感染が認められ、胎齢の早い段階から胎仔への垂直感染が認められた。従って、ウイルスに感染していた羊水、臍帯血を通じて胎仔へ感染するものと示唆された。今後、羊水、臍帯血中のウイルス量と胎仔へのウイルス感染との関連性について調べていく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし。
2. 学会発表
特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

表 1. SRV/D の母子間の感染

Exp. No.	母ザル	臍帯血	胎仔	羊水
#1	+	NA	-	+
#2	+	+	+	+
#3	+	+	NA	+

NA; not assay.