

201110024A

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23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24年(2012)年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23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24年(2012)年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 ----- 6

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

柴田 宏昭 ----- 11

3. 霊長類を用いた感染症モデルに関する研究

岡村 智崇 ----- 14

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 ----- 19

5. 不妊の機序解明と治療法の開発に関する研究

鈴木 治 ----- 22

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 ----- 28

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 ----- 35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 45

厚生労働科学研究費 創薬基盤推進研究事業
総括研究報告書

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り、その研究は極めて重要である。また、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遺伝学的解析を行った。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 一朗	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としてとらえられてきた。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、繁殖周期の短さや、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った。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) 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：ネフローゼモデルマウス (ICGN 系統) および全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウスである *lpr/lpr* 系統を用いて、不妊治療が産仔に与える影響、母体疾患が産仔表現型に及ぼす影響および妊娠・出産による母体における疾患病態進行について精査した。
- 2) 不妊の機序解明と治療法の開発：Dehydroepiandrosterone (DHEA) の徐放性製剤の投与による卵子の体外受精能および体外発生能、血中ステロイド濃度、卵巣の各種ホルモン受容体発現量、および卵巣プロテオームへの影響について調べた。
- 3) 疾患モデルマウスの生殖工学手法の最適化：実験動物研究資源バンクで保存・供給を行っている、60 系統の疾患モデルマウスについて、新鮮精子または凍結精子を用いた体外受精法を応用し、安定した保存技術の確立を行った。
- 4) 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：カニクイザルの MHC class-I のタイピングによる解析を試みた。
- 5) 霊長類を用いた感染症モデル：妊娠初期（妊娠陽性 3 週）のカニクイザルに風疹ワクチンを接種し、母体および胎児への

影響を検討した。

- 6) カニクイザルにおける垂直感染の解析：サルにおける SRV/D ウイルスの垂直感染の実態を調べるために、分娩時 SRV/D 陽性母ザルから仔ザルへの垂直感染率を調査した。

（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) 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：ネフローゼマウスおよび SLE マウスを用いた本研究により不妊治療や母体疾患が産仔表現型に多大な影響を与える可能性が明らかとなった。
- 2) 不妊の機序解明と治療法の開発：マウス母体への DHEA 投与による卵子の体外受精能・胚発生能の向上は低用量で有望だが、高用量では抑制的であることがわかった。
- 3) 疾患モデルマウスの生殖工学手法の最適化：難病モデルを始めとする 60 系統の疾患モデルマウスについて、体外受精法を応用し、新鮮精子および凍結精子を用い、多くの系統で安定した技術を確立し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクから効率良く供給する体制を整備された。
- 4) 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：家系による免疫情報の遺伝解析が可能となることが予想できた。
- 5) 霊長類を用いた感染症モデル：妊娠カニクイザルは、風疹ワクチン研究の動物モデルとして利用できる可能性が示唆された。
- 6) カニクイザルにおける垂直感染の解析：. SRV/D の垂直感染率は約 1/3 であり、必ずしも母から仔へ感染するものでは無かった。帝王切開で新生仔を娩出しても新生仔への SRV/D 感染を防ぐことは難しかった。

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・治療法は医科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、そのために医科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) Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T., Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M., Yamamoto, M., Yokota, S., Kubodera, T., Tomori, M., Sakaki, K., Enomoto, M., Hirai, Y., Kumagai, J., Yasutomi, Y., Mochizuki, H., Kuwabara, S., Uchihara, T., Mizusawa, H. and Yokokota, T. Non-human primate model of

ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. Brain in press

- 2) Iwasaki, Y., Mori, K., Ishii, K., Maki, N., Iijima, S., Yoshida, T., Okabayashi, S., Katakai, Y., Lee, J., Saito, A., Fukai, H., Kimura, N., Ageyama, N., Yoshizaki, S., Suzuki, T., Yasutomi, Y., Miyamura, T., Kannagi, M. and Akari, H. Longe-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. Frontiers Microbiol. in press
- 3) Hirata, H., Kawai, S., Maeda, M., Jinnai, M., Fujisawa, K., Katakai, Y., Hikosaka, K., Tanabe, K., Yasutomi, Y. and Ishihara, C. Identification and Phylogenetic Analysis of Japanese Macaque Babesia-1 (JM-1) Detected from a Japanese Macaque (*Macaca fascicularis*). Am.J.Trop.Med.Hyg. in press
- 4) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H. and Nakayama, E.E. Geographic, Genetic, and Functional Diversity of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*) J.Gen.Virol. in press
- 5) Matsuo, K. and Yasutomi, Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. Tuberculosis Res. Treat. 2011 Epub
- 6) Chono, H., Saito, N., Yasutomi, Y., Mineno, J., and Kato, I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model. PLoS One 2011; 6: Epub

- 7) Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi, Y., Lara, J., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T. and Holland, R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.* 2011;85:1117-1124.
- 8) 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.
- 9) Okabayashi, S., Uchida, K., Ohno, C., Hanari, K., Goto, I. and Yasutomi, Y. Periventricular Leucomalacia(PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* 2011;144:204-211.
- 10) 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. *Micobes and Infection* 2011;13:58-64.
- 4) 和田剛、小原道法、保富康宏：C型慢性肝炎モデルマウスを用いた治療用DNAワクチンの評価 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 5) 辻村佑祐、保富康宏：好酸菌分泌抗原 Ag85Bは局所にインターロイキン-17、-22を誘導することでアレルギー喘息の治療効果を促す 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 6) 渡邊健太、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクターを用いた新規結核ワクチンの開発 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 7) 田尻和子、保富康宏：SOCS1遺伝子治療による自己免疫性心筋炎の制御効果の検討 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 8) 塩釜ゆみ子、河岡義裕、保富康宏：ヘルパーT細胞反応制御によるインフルエンザウイルス感染に対する免疫反応 第152回日本獣医学会 大阪 2011年9月19日-21日

2. 学会発表

「国内」

- 1) 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした新規結核ワクチンの開発 第15回日本ワクチン学会 東京 2011年12月10日-11日
- 2) 塩釜ゆみ子、保富康宏：Th制御とインフルエンザ感染の関係 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 3) 岡村智崇、保富康宏：カニクイザルを用いたアジュバント組み込みサルヒト免疫不全ウイルスの効果 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 「国際」
- 1) Akatsuki SAITO, Masako NOMAGUCHI, Ken KONO, Emi E. NAKAYAMA, Tatsuo SHIODA, Tomoyuki YOSHIDA, Yasuhiro YASUTOMI, Naofumi TAKAHASHI, Tetsuro MATANO, Akio ADACHI, Hirofumi Akari: Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5 α genotypes. Non-Human Primate model for AIDS Oct. 25-28, 2011, Seattle, WA.
- 2) Kenta WATANABE, Akihiro MATSUBARA, Mitsuo KAWANO, Satoru MIZUNO, Yusuke TSUJIMURA, Hiroyasu INADA, Masayuki FUKUMURA, Isamu SUGAWARA, Tetsuya NOSAKA, Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro YASUTOMI: Intranasal immunization with replication

-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. Interantional Union of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17, 2011, Sapporoo.

3) Tomotaka OKAMURA, Yuya SHIMIZU, Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro

YASUTOMI: Adjuvant molecule Ag85B cDNA insertion into live attenuated simian

-human immunodeficiency virus enhances the SHIV-specific immune responses in

Cynomologous monkeys. Interantional Union of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17, 2011, Sapporoo.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願

1) 遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方法(特願 2011-025234)

2) 新規な組換え BCG ワクチン(特願 2011-199422)

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

実験動物を用いた周産期疾患の解析と繁殖技術の開発

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

周産期疾患に対する病態解明および新規治療薬、治療法の開発を目的とした本プロジェクトにおいて、分担研究者は「霊長類の発生工学的技術の高度化」を実現し、医科学研究に有用な遺伝子の保存を可能にすることを目指している。これらの研究をヒトと同じ単胎妊娠動物であるサル類を用いて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、とくに生殖関連細胞、臓器の操作、保存技術の高度化、さらに特性解析を実施してきた。本年度は三つの課題「カニクイザル精子、卵および卵巣の凍結保存」「カニクイザルの卵巣における卵胞発育因子の免疫組織学的解析」「妊娠カニクイザルの血清中を循環する胎児由来 DNA の検出」について報告する。これまでの研究成果をもとにさらなる技術の高度化をはかること、課題解決を目指した新規研究をスタートさせることは重要である。

A. 研究目的

1) カニクイザル精子、卵および卵巣の凍結保存

配偶子の操作技術の向上、受精卵作出のための安定した技術開発が本研究班の成果に与える影響は大きいと思われる。さらに、精子、卵および卵巣の安定した凍結保存技術が確立されれば、これらを使った発生工学的研究に大きく貢献することができる。本研究は、安定した凍結、融解技術を確立することを目的として実施した。精子や卵の採取法はすでに確立されている。しかし、良質な卵を効率よく採取するためには、卵子の成熟培養、ホルモン処理方法などのさらなる工夫が必要である。良質な生殖細胞や受精卵が得られた時には、適時、必要な細胞を高品質のまま凍結融解することが求められている。精子や卵の凍結保存は、次世代を残すための技術として、またヒト不妊治療の手法として開発されている。サル類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必須の技術である。しかし、種々のサル種の精子や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。卵巣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。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、さらに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。その卵巣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巣保存技術が適用

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、治療前に卵巣を摘出、保存し、ガンが完治したところで卵巣を戻すというものである。さらに、卵巣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、その技術は卵巣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。様々な観点から卵巣の凍結保存技術を開発する意義は大きい。

2) カニクイザルの卵巣における卵胞発育因子の免疫組織学的解析

卵巣内に豊富に含まれる未発育卵胞を培養系で発育誘導し、受精可能な卵子に導くシステムを開発することは、強力ながん治療の影響で認められる卵巣機能不全や現在治療法の確立していない卵胞発育不全の治療法として重要である。しかしヒト組織を用いる研究には限界があり、これまではマウスを用いた研究がほとんどであった。臨床応用の点からは、サル類の卵胞発育を用いた実験が不可欠である。本研究では、その基礎としてカニクイザルの卵胞発育因子の発現を検討した。

3) 妊娠カニクイザルの血清中を循環する胎児由来DNAの検出

哺乳類において胎児由来のDNAが母体の血中に存在することを証明する報告が成されるようになってきた。我々はカニクイザルを用いた解析により、胎児がオスの場合、Y染色体に特異的な遺伝子を母体の血中から検出する技術を開発している。本研究は、胎児由来DNAが母体に移行する機序解明、さらに本法による胎児の雌雄判定、遺伝子診

断への応用の可能性を模索することを目的としている。

B. 研究方法

1) カニクイザル精子、卵および卵巣の凍結保存

直腸電気刺激装置を用いて成熟カニクイザルより精液を採取した。採取した精液はただちに精液用培養液 (TYH 溶液) で希釈した。この操作により精液が固まるのを防ぐことができる。遠心洗浄後、Tes、Tris、Egg yolk を基調とした凍結用希釈液 (TTE 溶液) で希釈し、室温から 4℃まで低下させ、上記溶液にグリセリンが入ったもの (TTE-G) でさらに希釈した。希釈した精液は凍結用ストローに入れ、液体窒素から 5 cm 上の気相で凍結した。しっかり凍結したところで液体窒素内に保存した。この方法は以前に分担研究者が開発したものである。

受精卵の凍結は、ヒトの受精卵のために開発されたポリプロピレンシートを用いたガラス化凍結法で実施した。

卵巣は、摘出、凍結保存、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して解析している。実験にはカニクイザル 5 頭を用いた。月経時に左右両側の卵巣を摘出し、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て -30℃まで温度を低下させて凍結し、その後、液体窒素に浸漬して保存した。卵巣摘出後、1 カ月間、性ホルモン動体の解析により卵巣が完全に摘出できていることを確認し、保存していた卵巣を移植した。移植後、個体の月経周期について内分泌学的に検索した。移植後約 4 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。

2) カニクイザルの卵巣における卵胞発育因子の免疫組織学的解析

カニクイザルの卵巣を組織学的検査のため、ホルマリン固定後パラフィン切片を作成し HE 染色に使用した。免疫組織染色には、抗ヒト透明帯 (ZP3) 抗体、抗ヒト GDF-9 抗体および抗ヒト BMP-15 抗体を用いた。調製した組織切片に抗原の賦活化処理をした後、定法に従って ABC 染色を施行した。

3) 妊娠カニクイザルの血清中を循環する胎児由来 DNA の検出

妊娠カニクイザルの初期 (5 週目)、中期 (12 週目)、後期 (22 週目) の母体血清から胎

児由来 DNA の検出を試みた。ターゲット DNA は、母体には存在しない Y 染色体上の単一遺伝子である SRY およびマルチコピー配列である DYS14 とした。解析は Taqman プローブを用いて 2 色のマルチプレックスリアルタイム PCR で行った。プライマーおよびプローブはアカゲザルの遺伝子情報をもとに設計した。さらにプラスミドを作成し高感度検出系を構築し、ターゲット DNA の絶対定量を行った。胎児の性別の確定診断は、超音波診断および分娩後の観察により実施した。

(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) カニクイザル精子、卵および卵巣の凍結保存

カニクイザル精子の凍結は、開発時と同様、活性良好な精子を回収することが可能であった。しかし、アクロゾームは先体反応が起きたかのようなダメージを受けている可能性はある。受精卵の凍結は、ポリエチレンシートを用いた急速法により可能であることが確認された。胚盤胞のステージの卵は、融解後も形態を維持していたが、移植による産児は得られていない。卵巣の凍結は、融解後の卵巣の移植試験により約 4 年経過後も機能を維持していることが確認された。

2) カニクイザルの卵巣における卵胞発育因子の免疫組織学的解析

カニクイザル卵巣組織において、抗ヒト透明帯抗体、抗ヒト GDF-9 抗体および抗ヒト BMP-15 抗体による免疫染色はすべて陽性であった。また、その局在もこれまでのヒトにおける報告と一致した。すなわち透明帯抗原は一次卵胞から卵母細胞周囲に発現していた。GDF-9 と BMP-15 は発育中の卵母細胞の細胞質内に存在した。

3) 妊娠カニクイザルの血清中を循環する胎児由来 DNA の検出

妊娠 5、12 および 22 週のカニクイザル母体の血清を用いて検討した結果、オス胎児由来の SRY および DYS14 遺伝子を検出することができた。検出できなかったときの胎児の性はいずれもメスであった。妊娠初期においては母体を循環する胎児由来 DNA 量は極めて少ないが、妊娠 5 週目においても検出することができた。妊娠 5、12 および

22週で、胎児がオスと判定されたのはそれぞれ検索した10例中6、4および6頭であり、SRY遺伝子の1mlあたりの平均コピー数は、それぞれ38、203および423であった。このとき、5週齢より12週齢、12週齢より22週齢で大きな個体差を認めた。DYS14のコピー数はSRYのそれよりも多かった。

D. 考察

カニクイザル精子の凍結保存は古くから検討されており、多くのグループで成功している。分担研究者が開発したTTE溶液を用いた方法はいくつかの施設で使用しているようであるが、詳細な研究により、先体にダメージを受けていることが判明している。この精子を用いてIVFやICSIに使用できることは実証されているが、非凍結時とは異なっている状態であることを承知の上で使用する必要がある。精子凍結については、先体にダメージのない方法を確立することを目指して、さらに検討をつづける必要がある。また、未だにサル類共通の精子凍結法が存在しないことも研究の進展を阻害している要因になっている。サル種ごとに精子の組成が微妙に異なっていることを示したものであり、精子そのものの構造学的解析も含め検討を進める必要があるかもしれない。

受精卵の凍結保存は、桑実期までのステージでは融解後の胚移植で産児が得られている。しかし、胚盤胞では融解後、光学顕微鏡下では正常な形態を示しているにもかかわらず、移植による産児が得られていない。凍結融解された胚盤胞の詳細な解析が必要である。解析方法としては、胚盤胞は拡張と収縮を繰り返すため、リアルタイム動画観察や細胞呼吸量の測定などが考えられる。

卵巣の凍結は、そのサイズによって生存性等が異なることを示唆する結果を得ている。分担研究者は微弱エネルギー環境下での凍結を試みているが、安定した成績を得るための手法開発を継続している。

今回、カニクイザル卵巣の組織を用いて免疫学的検索を実施した。用いた抗体に対する反応性はヒトでの報告に極めて類似していた。この手法を用いることで、卵巣内での卵母細胞の発生等の解析が可能になるものと期待している。

さらに、胎児由来のDNAを母体の末梢血から検出することを試みている。もっとも安易な方法として、胎児がオスの場合のY染色体上のDNA検出を試みた。胎児の

サイズが小さい妊娠初期においては検出が困難であったが、手法の工夫により妊娠5週目（調音版診断装置で心拍が検出できるようになる程度のサイズ）においても母体末梢血から胎児由来DNAの検出が可能となった。このことで、カニクイザルの早期雌雄判定が可能となった。本技術を進展させることで、遺伝子関連疾患の早期検出が可能になる可能性がでてきた。今後、様々な遺伝子検出を試みるとともに、胎児由来DNAが母体末梢血を循環するようになる機序解明も重要な課題と考えている。

E. 結論

1) カニクイザル精子、受精卵の凍結保存は実用可能である。ただし、精子の場合、先体反应用到にアクロゾームが変化している可能性があること、胚盤胞ステージの卵においては発生機能を失っている可能性があることを承知しておかなければならない。

2) カニクイザル卵巣におけるGDF9とBMP15の抗原性と、卵胞発育における発現はヒトと類似していることがわかった。これらの因子が実際にサルにおいても卵胞発育に関与しているかを否かを明らかにすることが今後の課題である。

3) カニクイザル母体の血中を循環するオス胎児由来のDNAを検出する手法を確立した。DNA量が少ない妊娠5週目胎児由来のDNAをも検出できることを確認した。今後、検出可能なDNAを増やしていき汎用性がある技術とする必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Junko Otsuki, Yasushi Nagai, Alex Lopata, Chiba, Kazuyoshi, Yasmin Lubna, Tadashi Sankai

Symmetrical division of mouse oocytes during meiotic maturation can lead to the development of twin embryos that amalgamate to form a chimeric hermaphrodite
Hum. Reprod. (in press; online publication)

Juri Morichika, Chizuru Iwatani, Hideaki Tsuchiya, Shinichiro Nakamura, Tadashi Sankai, Ryuzo Torii

Triplet Pregnancy in a Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) after Double Embryo Transfer
Comp. Med. 62: 1-4, 2012

Hideyuki H. Motohashi, Tadashi Sankai,
Hidemi Kada
Live offspring from cryopreserved
embryos following *in vitro* growth,
maturation and fertilization of oocytes
derived from preantral follicles in mice
J. Reprod. Dev. 57: 715-722, 2011

Juri Yamasaki, Chizuru Iwatani, Hideaki
Tsuchiya, Junko Okahara, Tadashi Sankai,
Ryuzo Torii
Vitrification and transfer of cynomolgus
monkey (*Macaca fascicularis*) embryos
fertilized by intracytoplasmic sperm
injection
Theriogenology 76: 33-38, 2011

2. 学会発表 (国際学会)

Hiroshi Koie, Takashi Ikegawa, Sachi
Okabayashi, Kiichi Kanayama, Tadashi
Sankai, Yasuhiro Yasutomi, Naohide
Ageyama
Rare cardiac disease cases in four
cynomolgus monkeys (*Macaca
fascicularis*)
62th AALAS national meeting (San Diego, CA,
USA) October 2-6, 2011

Lubna Yasmin, Jun-ichiro Takano, Yasushi
Nagai, Junko Otuki, Tadashi Sankai
Male fetal DNA detection in maternal
serum from pregnant cynomolgus monkeys
(*Macaca fascicularis*) in an established
breeding colony
16th World Congress on In Vitro
Fertilization (Tokyo) September 10-13,
2011

Junko Otsuki, Lubna Yasmin, Alex Lopata,
Tadashi Sankai
A novel origin of sex determination
disorders
24th edition of the Annual Meeting of the
European Society for Human Reproduction
and Embryology: ESHRE (Stockholm,
Sweden) July 3-6, 2011

(国内学会)

荻野 舞、持田菜穂子、長谷川昭子、和田
龍、細田容子、池田ゆうき、加藤 徹、脇
本 裕、坂 佳世、武信尚史、小森慎二、
山海 直
カニクイザルにおける卵巣組織の組織学

的・免疫組織学的検討
Histological and Immunohistological
Studies of Monkey Ovarian Tissues
第56回日本生殖医学会(横浜)2011年12
月8、9日

谷口遼馬、本橋秀之、山海 直、加田日出
美
代替血清培地を用いたマウス成長途上卵母
細胞培養における良好な受精・初期胚発生
能
The serum substitute media which showed
good development and fertilization
results in mouse growing oocytes culture
system
第56回日本生殖医学会(横浜)2011年12
月8、9日

持田菜穂子、長谷川昭子、山海 直、細田
容子、荻野 舞、小森慎二
Non-human primate 卵巣における卵胞発育
因子の免疫組織学的検討
第29回日本受精着床学会(東京)2011年9
月9、10日

小野寺舞、星野由美、大和田哲男、京野廣
一、山海 直、佐藤英明
ガラス化凍結保存卵子と磁場環境下での凍
結保存卵巣内卵子の健全性評価
第61回東北畜産学会(青森)2011年9月8、
9日

川嶋晴子、鯉江 洋、岡林佐知、金山喜一、
山海 直、保富康宏、揚山直英
心拍変動解析を用いたカニクイザルにおけ
る加齢性変化の検討
Age-related Changes of Heart Rate
Variability in Cynomolgus Monkey (*Macaca
fascicularis*)
第38回日本トキシコロジー学会(横浜)
2011年7月11-13日

西川智也、鯉江 洋、金山喜一、山海 直、
保富康宏、揚山直英
カニクイザルにおける椎骨心臓スケールと
心胸郭比の有用性
第58回日本実験動物学会(東京船堀)2011
年5月25-27日

池川 隆、鯉江 洋、岡林佐知、金山喜一、
山海 直、保富康宏、揚山直英
カニクイザルに認められた先天性心疾患4
例における臨床経過
第58回日本実験動物学会(東京船堀)2011

年 5 月 25－27 日

大月純子、Lubna Yasmin、永井 泰、Lopata Alex、山海 直

受精後形成される前核の大きさは卵の大きさと相関する

第 58 回日本実験動物学会（東京船堀）2011 年 5 月 25－27 日

大月純子、永井 泰、Lubna Yasmin、Alex Lopata、山海 直

一つの透明帯内に形成される二つの MII 期卵子からの XX/XY キメラ発生

第 52 回哺乳動物卵子学会（栃木県大田原市）2011 年 5 月 21、22 日

大月純子、Lubna Yasmin、永井 泰、Alex Lopata、山海 直

前核形成と卵細胞質体積との関連

第 52 回哺乳動物卵子学会（栃木県大田原市）2011 年 5 月 21、22 日

谷口遼馬、本橋秀之、山海 直、加田日出美

マウス成長途上卵母細胞培養における代替血清培地の検討

第 52 回哺乳動物卵子学会（栃木県大田原市）2011 年 5 月 21、22 日

持田菜穂子、長谷川昭子、山海 直、細田容子、荻野 舞、小森慎二

若齢から老齢までのカニクイザル卵巣組織の組織学的・免疫組織学的検討

第 52 回哺乳動物卵子学会（栃木県大田原市）2011 年 5 月 21、22 日

3. その他

（著書）

京野廣一、山海 直

卵子・卵巣組織の低温医学の現状と将来

「卵子学」森 崇英総編集、京都大学学術出版会 961-968, 2011

（報道）

山海 直

青森放送テレビ 「ニュートンのりんご」

2011 年 9 月 11 日、18 日（再放送）

内容：臓器、とくに卵巣の凍結保存

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金
(実験動物を用いた周産期疾患の解析と繁殖技術の開発)
分担研究報告書

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

我が国や先進国では、周産期関連疾患や不妊の問題が深刻化してきており、この分野における研究は非常に重要になってきている。そこで、動物モデルとして、齧歯類と違い胎盤構造などがヒトに近い霊長類を用いた基礎研究を通じて、周産期関連疾患の病態解明を行い、ヒト周産期疾患の予防・医療につなげ、且つ、本研究推進のための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 D 型サルレトロウイルス (SRV/D) 感染ザルを用い、血中の抗体価とウイルス量の関係並びに垂直感染率の調査を行った。帝王切開により新生仔への SRV/D 感染の低減は必ずしも見られなかった。あわせて、感染を防ぐための措置として、粘膜免疫を誘導する経口ワクチン開発にも着手し、ワクチンの有効性と安全性の検証を行った。ワクチン投与により血中に特異的抗体の誘導が確認された。

A. 研究目的

昨年度の報告で、母ザルがSRV/Dウイルス血症であれば、胎齢初期には羊水、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。そこで、本研究ではサルにおけるSRV/Dウイルスの垂直感染の実態を調べるために、分娩時SRV/D陽性母ザルから仔ザルへの垂直感染率を調査した。

また、垂直感染のみならず水平感染の対策も重要であり、経口投与可能なワクチン開発も行った。性交渉を通じての感染の場合は特に粘膜免疫が重要であると考えられる。そこで粘膜免疫を誘導するDNAワクチンは感染防御ワクチンとして魅力的なツールではあるが、粘膜への投与方法で最も簡便な経口投与では粘膜免疫を誘導しない。そこで、経口感染を示すE型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス様中空粒子(VLP)にDNAワクチンを封入させる事により、経口投与可能な粘膜免疫誘導型のワクチンを開発可能と考え、その基礎的研究もあわせて行った。

B. 研究方法

1. サル

霊長類医科学研究センターで自然交配し、出産前後の母カニクイザルと仔ザルから採血を行った。帝王切開の場合は臍帯血を採取し、仔ザルの血液の代わりとして用いた。採取した血液又は臍帯血から血漿を分離した。

2. RCR

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、血漿中の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。

3. ワクチン経口投与

HEV-VLP (C52)を発現するバキュロウイルスを用いた。常法に従い、同HEV-VLPを含む昆虫由来細胞培養上清を超速心による濃縮後、塩化セシウムによる密度勾配にて、精製HEV-VLPを得る。得られたHEV-VLPは蛋白濃度の測定を行うとともにSDS-PAGEによる泳動にて分子量を確認し実験に用いた。

健常なカニクイザル3頭へ経口ゾンデを用いてC52を胃内投与した。VLPタンパク質量換算で28.6 mgを2週間隔で合計3回免疫を行った。初回免疫から0、2、4、5、6、10週目に免疫サルから採血した(図1)。

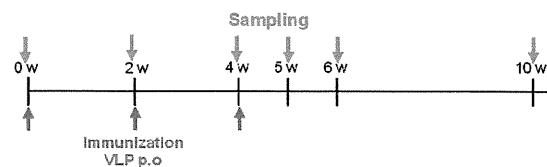


図1.実験スケジュール

採取したヘパリン血は 2,500 rpm、20min 遠心し、上清の血漿を分取し、沈殿した血球を PBS(-) で再懸濁後、比重遠心分離法にて末梢血リンパ球 (PBMC) を分離した。血漿、PBMC は各種測定までは -80 度で保存した。

4. 抗体価の測定

HEV-VLP(C52) を PBS(-) で蛋白質質量換算 5 µg/mL に調製した溶液を 96 穴 ELISA plate に 100 µl/well で蒔き、4 度で一晩置いた。0.05% Tween20-PBS(-) で洗浄後、Block Ace でブロッキングし、洗浄後、段階希釈した血漿を 100 µl/well 蒔き、37 度で 1.5hr 反応させた。洗浄後、10,000 倍希釈した horseradish peroxidase 標識の抗サル IgG 又は IgA 抗体を 100 µl/well で蒔き、37 度で 1hr 反応させた。洗浄後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine を含む基質発色剤を 100 µl/well で蒔き、5~15min 反応させ、2M H₂SO₄ を 20 µl/well 加え反応を止め、plate reader で 450nm の OD 値を測定した。OD₄₅₀ ≥ 0.15 を陽性と判断し、陽性となった一番高い希釈倍率を抗体価とした。

(倫理面への配慮)

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

1. SRV/D 垂直感染率

83 頭の妊娠ザルとそのサルから生まれてきた仔ザルの SRV/D 感染を PCR を用いて調査した (表 1)。出産時 SRV/D 陽性であった母ザルは 11 頭であった。そのうち生まれてきた仔ザル 4 頭が出生直後から SRV/D 陽性であった。4 頭の仔ザルの内訳は、自然分娩 2 頭 (内人工哺育 1 頭)、帝王切開 2 頭であった。出産前後 SRV/D 陰性であった母ザル 72 頭を検査したが、そのうち 1 頭から生まれた仔ザルが SRV/D 陽性であった。

なお、今回調査した妊娠ザルは全て 1 頭の仔ザルと出産し、双子以上の出産はなかった。

		仔ザル	
		+	-
母ザル	+	4	7
	-	1	71

表 1. 分娩時 SRV/D 陽性母ザルの仔ザルへの垂直感染率

2. 経口投与ワクチン開発

カニクイザルに HEV-VLP (C52) を経口投与し、HEV-VLP 特異的な免疫応答の誘導を試みた。免疫後のカニクイザルの日常観察や一般血液検査値に異常は無く、経口投与に伴う有害事象は生じなかった。血中に HEV-VLP 特異的な IgG、IgA 抗体が初回免疫 6 週目には検出され、特に IgG 抗体価が高かった。

D. 考察

母ザルが SRV/D ウイルス血症であれば、胎齢初期から羊水や臍帯血中にウイルスの存在が確認されていたが、SRV/D 陽性の母ザルから生まれてくる仔ザルは必ずしも SRV/D 陽性ではなく、今回の疫学調査では垂直感染率は 36% であった。出生直後から SRV/D 陽性仔ザルの内訳を見ると、自然分娩 2 頭、帝王切開 2 頭であったので、帝王切開によって、仔ザルへの SRV/D 感染を防ぐことは難しいことが示唆された。なお、母ザルが SRV/D 陽性ではなかったにもかかわらず、仔ザルが SRV/D 陽性であったケースがあった。この原因については明確に示せないが、母ザルが PCR 検出限界以下のウイルスを保持していた。垂直感染ではなく出生直後に感染したとも考えられた。今後、母胎のウイルス量と胎仔・乳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。

カニクイザルを用いた DNA ワクチン封入 HEV-VLP の経口投与実験に先立ち、HEV-VLP 単独の経口投与実験を行い、HEV-VLP に対する粘膜免疫の誘導能を評価した。3 回免疫後、血中の HEV-VLP に対する特異的な IgG、IgA 抗体の産生が認められた (図 2)。特に IgG 抗体価は非常に高く、液性免疫が強く誘導された。また IgA 抗体の誘導も確認され粘膜免疫の誘導が示唆された。最終的には DNA ワクチンを封入した HEV-VLP を投与するので、DNA ワクチンが封入されていた場合、DNA ワクチンがアジュバンド効果を示し、より特異抗体価の上昇が考えられる。また、DNA ワクチン自体による粘膜免疫の誘導が強く期待される。今後、液性免疫だけではなく、特異的細胞性免疫の誘導の確認を行い、更に誘導が困難な中和抗体の誘導の確認も行う必要がある。

E. 結 論

SRV/D の垂直感染率は約 1/3 であり、必ずしも母から仔へ感染するものでは無かった。帝王切開で新生仔を娩出しても新生仔への SRV/D 感染を防ぐことは難しかった。

水平感染を防ぐ目的で HEV-VLP ワクチンをカニクイザルに経口投与し、特に有害事象を生じず、HEV-VLP 特異的な液性免疫応答を誘導し、特異的 IgA 抗体の産生誘導もあったことから粘膜免疫の誘導が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Masuda S, Hayashi S, Ageyama N, Shibata H, Abe T, Nagao Y, Hanazono Y. Migration of cells from the yolk sac to hematopoietic tissues after in utero transplantation of early and mid gestation canine fetuses. *Transplantation*. 92(2):e5-6; author reply e6-7. 2011.

Chono H, Saito N, Tsuda H, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Yasutomi Y, Mineno J, Kato I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model. *PLoS One*. 6(8):e23585. Epub 2011 Aug 17. 2011.

2. 学会発表

下澤律浩、高橋一朗、柴田宏昭、小野良一、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. 2011.5.12-14.

Saito N, Tsuda H, Sakuraba T, Shibata H, Ageyama N, Chono H, Mineno J. Pre-clinical study for HIV-1 gene therapy using autologous

transplantation of gene modified CD4+ T cells in primate models. 第 16 回日本遺伝子治療学会. 栃木・宇都宮. 2011.7.1-7.3.

板垣伊織、小川浩美、成田勇人、田中麻祐子、柴田宏昭. MRI によるカニクイザル腹部脂肪の三次元的定量解析法. 第 20 回サル疾病ワークショップ. 神奈川・相模原. 2011.7.2.

Ono F, Kurosawa A, Yamakawa Y, Tobiume M, Yuko Sato Y, Katano H, Hagiwara K, Itagaki I, Komatuzaki K, Emoto Y, Hamano M, Shibata H, Yasutomi Y, Sata T. Quantitative analysis of histopathological changes and brain atrophy using volumetric MRI in transmission of classical and atypical (L-type) bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to cynomolgus macaques. *Asian Pacific Prion Symposium 2011*. 群馬・軽井沢. 2011.7.10-7.11.

伊藤康世、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、大野智恵子、鯉江洋、揚山直英. カニクイザルにおける MRI を用いた移植細胞の動態追跡に関する研究. 第 17 回日本野生動物医学会大会. 東京・府中. 2011.9.29-10.2.

Itakagaki I, Ogawa H, Narita H, Shibata H. 3D-quantification of abdominal fat using MRI in cynomolgus monkeys. *5th Asian Workshop on Zoo and Wildlife Medicine*. ネパール・カトマンズ. 2011.10.20-10.23.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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。

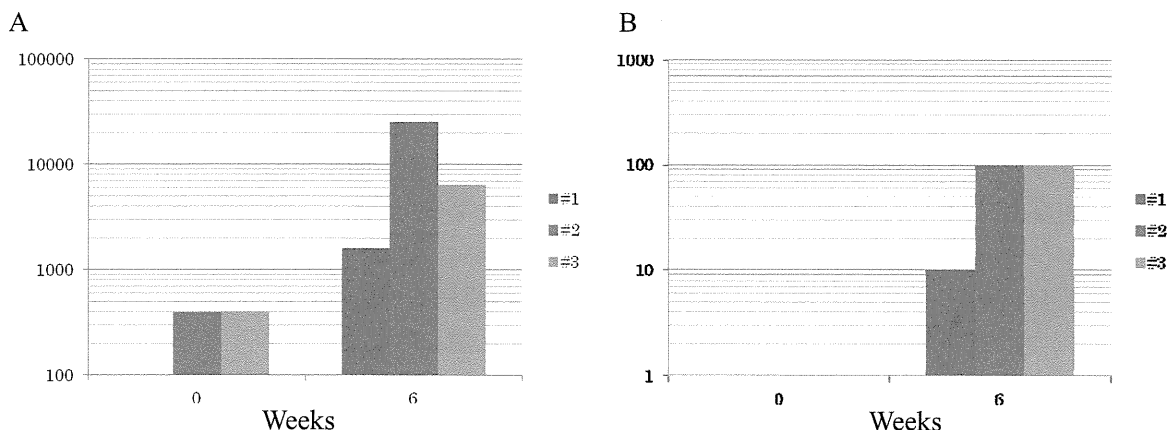


図 2. 血中の抗 HEV-VLP 特異抗体価の推移

初回免疫時と初回免疫 6 週間後の抗 HEV-VLP-IgG 抗体価 (A)、抗 HEV-VLP-IgA 抗体価 (B)

厚生労働科学研究費 創薬基盤推進研究事業
分担研究報告書

霊長類を用いた感染症モデルに関する研究

研究分担者：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

研究要旨

風疹の胎児感染を評価する動物にはマウス、フェレット等の報告がある。しかし小動物の胎盤構造は、解剖学的にヒトの胎盤構造との隔たりが極めて大きく、小動物モデルがヒトの動物モデルとして機能しているとはいえない。このため周産期における動物評価モデルには、解剖学的な胎盤構造がヒトと類似した霊長類を用いることは重要である。

これまでの研究で、カニクイザルは風疹ワクチンに対して感受性があることが確認された。今年度は、昨年度と引き続き妊娠陽性 3 週のカニクイザルに風疹ワクチンを接種し、接種後 3 週にて解剖を行い、ワクチンの胎児感染および母体の生体内分布および免疫誘導能を検討した。解剖後、子宮より摘出した 11 頭のサル胎児のうち 2 頭の胎児サルからウイルス遺伝子が検出され、胎児感染を確認した。次に母体ワクチンの分布について調べたところ、リンパ節を中心にウイルス遺伝子が検出された。またワクチンを検出された個体については、抗風疹 IgM 抗体の誘導も合わせて認められた。

これらの結果から、妊娠カニクイザルはワクチンの評価系動物モデルとして利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

風疹ウイルス感染症は、発熱、発疹、頸部リンパ節腫脹が主な症状であり、一般に予後良好である。風疹に伴う最大の問題は、妊娠初期の妊婦が風疹ウイルスに感染すると、新生児に白内障、先天性心疾患、難聴を主症状とする先天性風疹症候群（CRS）を発症する危険性が高まることである。CRS を治療する方法は無く、ワクチンによる予防が最も重要であるが、風疹ワクチンは弱毒生ワクチンであるため、妊婦への接種は推奨されておらず風疹免疫の不十分な妊婦は、現状のワクチンでは対策を取ることは出来ない。

本研究では妊婦に安全な新規風疹ワクチンの開発に向けて、周産期ワクチン評価モデルとして妊娠カニクイザルモデルを確立を目指す。今年度は昨年度に引き続き、妊娠初期（妊娠陽性 3 週）のカニクイザ

ルに風疹ワクチンを接種し、母体および胎児への影響を検討する。

B. 研究方法

1. 免疫スケジュール

妊娠陽性 3 週齢のカニクイザル 11 頭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、母体内ワクチン分布を解析する。

2. 風疹ワクチン遺伝子検出

採材したサンプル（PBMC、Swab、各種臓器）から RNA を抽出。風疹ウイルス遺伝子特異的な Primer を作製し、One-Step RT-PCR 法を行った。

3. 風疹ワクチン抗体誘導

血液から血漿を分離し、100 倍希釈した血漿を用いて抗風疹 IgM 抗体の ELISA 法を行った。

4. 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. 計時的に採取した血液および Swab からの風疹ウイルス遺伝子の検出

風疹ワクチンを接種した 11 頭の妊娠カニクイザルから PBMC、鼻汁 Swab を経時的に採取し、風疹ワクチンの感染を確認したところ PBMC から 2 頭 (#001、#012)、鼻汁 Swab から 4 頭 (#001、#005、#012、#015) ウイルス遺伝子が検出された (図 1、2)。

2. 胎児感染の検討

ワクチンを接種した 11 頭のうち、2 頭のサル胎児 (#001、#012) から風疹ウイルス遺伝子が検出された (図 3)。

3. 風疹ワクチンの生体内分布

風疹ワクチンを接種した 11 頭の妊娠カニクイザルを解剖し、風疹ワクチンの検出を試みたところ、8 頭の妊娠サル (#001、#004、#005、#007、#008、#012、#013、#015) よりリンパ節を中心に風疹ウイルス遺伝子が検出された (図 4)。

4. 抗風疹ワクチン抗体の解析

11 頭のサルから分離・採取した血漿 (ワクチン接種前および接種後 3 週) を用いて抗風疹ワクチン IgM 抗体の検出を行ったところ、8 頭 (#001、#004、#005、#007、#008、#012、#013、#015) で抗体の上昇が確認された (図 5)。

D. 考察

風疹の自然宿主はヒトのみであり、動物モデルには、これまでマウス、ラット、フェレット等の小動物が中心に扱われてきた。しかし、周産期における風疹の影響を検討する上で、胎盤構造がヒトと異なる小動物で評価するのは難しい。そのためヒトの胎盤構造と類似した霊長類を動物モデルとし

て評価することは、極めて重要である。

本研究では、風疹ワクチンの周産期における影響を妊娠カニクイザルを用いて評価した。胎児感染の有無について検討したところ、サル胎児 11 頭のうち、2 頭のサル胎児からウイルスが検出された。この 2 頭は PBMC からもウイルス遺伝子が検出されており、感染細胞から胎盤を介し胎児への感染が疑われるが、詳細は不明である。今後引き続き、調査を継続したい。次に風疹ワクチンの生体内分布について検討したところ、複数のリンパ節を中心にウイルス遺伝子が検出されたことから、リンパ系・マクロファージ系の細胞に強い感受性を持っていることが推測された。またウイルスが検出された個体については、風疹抗体の上昇が確認された。これらの結果から、妊娠カニクイザルは有用な動物モデルと考えられた。

今後は、風疹ワクチンを接種した妊娠カニクイザルから出生したサル新生児における先天性風疹症候群用の障害を判定する。また妊娠初期から後期にかけての母体免疫機構について抗風疹免疫を検討し、サル新生児の風疹移行抗体についても検討する。

E. 結論

妊娠カニクイザルは、風疹ワクチン研究の動物モデルとして利用できる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表

「国内」

(1) 岡村智崇、保富康宏：カニクイザルを用いたアジュバント組み込みサルヒト免疫

不全ウイルスの効果 第40回日本免疫学会
千葉 2011年11月27日－29日

「国際」

(1) Tomotaka OKAMURA, Yuya SHIMIZU,
Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro YASUTOMI:
Adjuvant molecule Ag85B cDNA insertion
into live attenuated simian
-human immunodeficiency virus enhances the
SHIV-specific immune responses in
Cynomologous monkeys. Interantional Union
of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17,
2011, Sapporoo.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含
む)

特許出願

なし

妊娠 カニクイザルNo.	Post vaccination →					
	0d	3 d	1w	2w	3w	
#001	(-)	(+)	(+)	(-)	N.D.	
#004	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#007	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#008	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#009	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#010	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#012	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	
#013	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#014	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+): ウイルス遺伝子検出
#015	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-): ウイルス遺伝子不検出

図1. 風疹ワクチン接種後の妊娠カニクイザルPBMCを用いたウイルス遺伝子検出

妊娠 カニクイザルNo.	Post vaccination →					
	0d	3 d	1w	2w	3w	
#001	(-)	(-)	(-)	(+)	N.D.	
#004	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#005	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	
#007	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#008	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#009	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#010	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#012	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
#013	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
#014	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+): ウイルス遺伝子検出
#015	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-): ウイルス遺伝子不検出

図2. 風疹ワクチン接種後の妊娠カニクイザル鼻汁Swabを用いたウイルス遺伝子検出

サンプル	妊娠カニクイザルNo.										
	#001	#004	#005	#007	#008	#009	#010	#012	#013	#014	#015
羊水	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
胎盤	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
胎児	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

(+): ウイルス遺伝子検出 (-): ウイルス遺伝子不検出

図3. 風疹ワクチンを接種した妊娠カニクイザル胎児感染の検討