

201208017A

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24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25年(2013)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24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25年（2013）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. 高度 SPF カニクイザルコロニーの確立

保富 康宏 ----- 4

2. 霊長類における発生工学的技術の高度化

山海 直 ----- 8

3. 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 ----- 13

4. 霊長類を用いた感染症モデルに関する研究

岡村 智崇 ----- 16

5. 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 ----- 21

6. 不妊の機序解明と治療法の開発に関する研究

鈴木 治 ----- 24

7. 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 ----- 32

8. 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

高橋 一朗 ----- 40

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 43

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 50

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:周産期疾患研究は人類にとって非常に重要な課題であるが、それを推進するためには人に近い霊長類を用いた研究は必須である。また、そこに至る過程において用いられる霊長類の遺伝的な背景や感染病原体の除去等の高品質な動物を用いなければ真の知見を与える研究とはならない。さらにこの知見を直接霊長類から取得するには生物学的な解析に基づく基礎的情報が十分知られており、繁殖効率の良いマウスを主とする小動物での研究も必要となる。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、実験動物における周産期疾患の病態解明を行い、ヒト周産期疾患研究につなげることで、また、この研究の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った。

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**

周産期疾患研究は人類にとって非常に重要な課題であるが、それを推進するためには人に近い霊長類を用いた研究は必須である。また、そこに至る過程において用いられる霊長類の遺伝的な背景や感染病原体の除去等の高品質な動物を用いなければ真の知見を与える研究とはならない。さらにこの知見を直接霊長類から取得するには生物学的な解析に基づく基礎的情報が十分知られており、繁殖効率の良いマウスを主とする小動物での研究も必要となる。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、実験動物における周産期疾患の病態解明を行い、ヒト周産期疾患研究につなげることで、また、この研究の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ことを目的とした。

**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研究成果を得ることが可能である。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

樹立される。また、現在の少子化対策の一助にもなり、病態の把握、原因の追求、さらにはテーラーメイドも視野に入れた治療法・治療薬の開発となることから、我が国の厚生労働行政に対し莫大な貢献をもたらす。加えて短期的な競争的研究開発を行う民間企業等では広く情報や治験を与える研究開発を行うことは困難であり、その意味においても本研究で得られる結果は医科学の発展に非常に重要な位置づけ、結果をもたらすと考えられる。

## **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**

分担研究報告書参照

## **G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**

特許出願

1) 「新規な組換え BCG ワクチン」

PCT/JP2012/073213 国際特許申請中

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

高度 SPF カニクイザルコロニーの確立

研究分担者：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  
研究協力者：下澤律浩 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

霊長類医科学研究センターで維持されているカニクイザルにおける SPF レベルの高度化を目的に、D型サルレトロウイルス (SRV/D) 排除に関して検討した。SRV/D は経胎盤感染するため、帝王切開-里仔法による清浄化は難しい。そこで、①血中 SRV/D ゲノム陰性および SRV/D 抗体陽性 (抗体陽性)、②血中 SRV/D ゲノム陰性および SRV/D 抗体陰性 (SPF)、③血中 SRV/D ゲノム陽性および SRV/D 抗体陰性 (バイレミア) の3群の母ザルから出生した仔ザルの SRV/D 感染状況を調べた。その結果、抗体陽性個体の母ザルからはゲノム陰性および抗体陰性の SPF 仔ザルが出生することが明らかとなった。しかし、原因不明のバイレミア個体も検出された。完全に SPF コロニーが確立できていないことから、事故的な要因による感染の可能性を排除できない。この原因の特定・対策を講じるとともに、SPF 両親による繁殖を推進することは当センターにおけるカニクイザルの SPF 化にとって重要である。

A. 研究目的

特定の微生物に感染している実験動物を医科学研究や感染症研究などに使用することで、研究結果に大きな悪影響を与えることは周知のことである。実験用カニクイザルにおいても、当然該当することであり、そのような微生物を排除することは必須である。現在までに霊長類医科学研究センターで維持されているカニクイザルではBウイルス、サル水痘ウイルスなどの排除に成功している。さらに SPF レベルの高度化を目的に本研究では、下痢や貧血などの日和見感染症を引き起こすD型サルレトロウイルス (SRV/D) 排除に関して検討した。

B. 研究方法

SRV/D は経胎盤感染するため、帝王切開-里仔法による清浄化は難しい。そこで、どのような母ザルによって、産仔における SPF 化が可能かを明らかにするために、次のような3つの微生物レベルの母ザル

を繁殖に使用し、離乳時の仔の SRV/D 感染状況を調べた。

①血中 SRV/D ゲノム陰性および SRV/D 抗体陽性 (抗体陽性)、②血中 SRV/D ゲノム陰性および SRV/D 抗体陰性 (SPF)、③血中 SRV/D ゲノム陽性および SRV/D 抗体陰性 (バイレミア)

(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

離乳した仔ザル 97 頭の全ては SRV/D が排除された SPF であった。SPF 仔ザルの内、91 頭は抗体陽性の母ザルから出生した。残りの SPF 仔ザル 6 頭の母ザルは SPF であった。つまり両親が SPF に由来する。

それ以外に離乳した8頭でSRV/Dバイレミアであることが判明した。これらの母親はSRV/D抗体のみ陽性であり、SRV/Dバイレミアではない。現在その原因を調査しているが、妊娠中にバイレミアになったか、あるいは生後に何らかの理由で感染したことが原因として考えられる。

#### D. 考 察

SRV/Dは経胎盤感染することから、帝王切開-里仔法による排除は難しい。SRV/Dを血中に排しておらず、その抗体のみを保持している抗体陽性個体の次世代への影響を明らかにするため、本研究を行った。その結果、抗体陽性個体の母ザルからはゲノム陰性および抗体陰性のSPF仔ザルが出生することが明らかとなった。このことは抗体を持つ母ザルは体内でのSRV/D増殖を抑制していることを顕している。さらに、SRV/Dが既に排除されているSPF母ザルにおいても、SPF仔ザルが出生することも確認された。より一層、SPF個体の同士の繁殖を推進することで、SPF化が加速されるものと期待できる。

抗体陽性個体はSRV/Dに感染している個体であるが、抗体を産生することでSRV/Dを抑制し、血中へ排出していないと考えられる。しかし、今回バイレミアである離乳仔が存在することが明らかとなった。これは妊娠中のストレスにより、一次的に免疫能が低下したことで、抗体陽性個体の血中へのウィルス排出が亢進することで、経胎盤感染が生じた可能性を排除できない。また、哺育中のストレスあるいは人工保育による事故的な感染などの可能性も排除できない。今回の感染原因を特定することは、現状でSPFコロニーを確立できていないことから、今後の維持管理にとって非常に重要である。

現在、SPF個体数は順調に増加し、全

個体数(飼育室数は20室)における割合はおよそ5割(飼育室数は12室)に達している。6年前のおよそ1割であったSPF個体は順調に数字を伸ばしている。

#### E. 結 論

SRV/Dを排除したカニクイザルSPF化を図るためには、SRV/D抗体のみ陽性個体を繁殖から排除する理由はなく、このような個体はSPF個体同士の繁殖とともに、推進する必要がある。SPFザルの繁殖の促進は、SPF化にとって重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 1. 論文発表

- 1)Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Kurosawa, T., Hamano, M., Higashimo, A., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kurane, I. and Akari, H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archiv. Virol.* in press
- 2) Tougan, T., Aoshi, T., Coban, C., Katakai, Y., Kai, C., Yasutomi, Y., Ishii, K. J. and Horii, T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum. Vac. Immunother.* 2012 in press
- 3) Karamatsu, K., Matsuo, K., Inada, H., Tsujimura, Y., Shiogama, Y., Matsubara, A., Kawano, M. and Yasutomi, Y. Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Asthma Allergy* 2012;5:71-79.
- 4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H. and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1 mt



replication in macaque cells. *Microve. Infect. in press*

5) Yoshida,T., Omatsu,T., Saito,A., Katakai,Y., Iwasaki,Y., Iijima,S., Kurosawa,T., Hamano,M., Nakamura,S., Takasaki,T., Yasutomi,Y., Kurane,I Akari,H. CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins *Archives Virol* 2012;15.;363-368.

6) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Matsubara,A., Tsujimura,Y., Hiroe,M., Naka,T.,Shimojo,N., Sakai,S., Aonuma,K. and Yasutomi,Y. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. *J.Immunol* 2012;189;2043-2053.

7) Uchdida,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., Kuboddera,T., Tomori,M., Sakaki,K., Enomoto,M., Hirai,Y., Kumagai,J., Yasutomi,Y., Mochizuki,H., Kuwabara,S., Uchihara,T., Mizusawa,H. and Yokakota,T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* 2012;135;833-846.

8) Saito,A., Kono,K., Nomaguchi,M., Yasutomi,Y., Adachi,A., Shioda,T., Akari,H. and Nakayama,E. E. Geographical genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J.Gen.Virol.* 2012;93:594-602.

9) Higashino,A., Sakate,R., Kameoka,Y., Takahashi,I., Hirata,M., Tanuma,R., Masui,T., Yasutomi,Y. and Osada,N. Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. *Genome Biol.* 2012 Epub

10) Tachibana,S., Sullivan,SA., Kawai,S., Nakamura,S., Goto,N., Arisue,N.,

Palacpac,NMQ., Honma,H., Yagi,M., Tougan,T., Katakai,Y., Kaneko,O., Mita,T., Kita,K., Yasutomi,Y., Kim,HR., Sutton,PL., Shakhbatyan,R., Horii,T., Yasunaga,T., Bamwell,JW., Escalante,AA., Carlton,JM. And Tanabe,K. Plasmodium cynomolgi genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. *Nature Genetics* 2012; 44:1051-105

## 2.学会発表

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粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17-18日

2) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏：C型肝炎モデルマウスを用いた治療用DNAワクチンの検討 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17-18日

3) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏：HCV-DNAワクチンの細胞性免疫誘導能とC型肝炎モデルマウスを用いた治療効果についての検討 第60回日本ウイルス学会 大阪 2012年11月13-15日

4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏：強力な細胞性免疫を誘導するAg85B発現弱毒エイズウイルスの防御免疫機構の解析 第60回日本ウイルス学会 大阪 2012年11月13-15日

5) Okamura,T., Matsuo,K., Yasutomi,Y. : Induction of protective immune responses against pathogenic AIDS virus infection in monkeys infected with non-pathogenic AIDS virus carrying an adjuvant molecule.

第41回日本免疫学会 神戸 2012年12月5日-7日

6) TSUJIMURA,Y., YASUTOMI,Y. : Suppressive effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to inflammatory responses in human bronchial epithelial cells. 第41回日本免疫学会 神戸 2012年12月5日-7日

7) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Hiroe,M., Shimojo,N., Sakai,S., Aonuma,K., Yasutomi,Y.: Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Dendritic Cells Inhibits Myocardial Inflammation in Experimental Autoimmune Myocarditis. Basic Cardiovascular Sciences 2012 scientific sessions, 2012.7.23-26, New Orleans, USA

8) 田尻和子、下條信威、町野智子、酒井俊、今中一吉、吉田恭子、廣江道昭、保富康宏、青沼和隆：スタチンは CD4 陽性 T 細胞の Th1/Th17 細胞への分化を抑制し心臓の炎症を制御する。第 16 回心血管内分泌代謝学会、2012. 11. 23-24、東京

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

周産期疾患の病態解明および新規治療薬、治療法の開発は極めて重要な課題であり、これらの研究を遂行するうえで必須である研究資源としての動物の高品質化、繁殖・育成技術の高度化を併行して進めなければならない。分担研究者は霊長類の発生工学的技術の高度化を担当し、医科学研究に有用な霊長類遺伝子資源の保存に関する研究を実施してきた。本年度は、卵巣のまるごと保存の技術として用いてきた磁場環境下での保存法に関する基礎データの蓄積を目指した。これまでにカニクイザル卵巣のまるごと保存を行い比較的良好な成果を得てきたが、技術の改良、理論の解明を行うための基礎データが不足していた。今回得られた成果をもとに凍結理論の仮説をたて証明していく作業が必要となる。さらに、機器の改良に取り組み、技術の高度化を実現する必要があると考えている。また、個体レベルでの保存をより効率よく実施することを目的とし、母体血中を循環する胎児由来 DNA の解析手法を用いた雌雄判定の可能性を検討した。現段階では妊娠 5 週胎児 DNA の検出が可能であり、精度をあげることでさらに妊娠早期胎児の正確な雌雄判定が可能になると考えられた。

## A. 研究目的

### 1) 微弱エネルギー負荷環境下での凍結に関する基礎データの収集

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、次世代を残すための重要な臓器である。その卵巣の保存技術の開発はメス生物資源の長期保存が可能となるだけではなく、ヒトへの臨床応用が考えられる。これまでにカニクイザル等の実験動物を用いて、卵巣まるごとの保存、融解後の卵巣の解析、融解した卵巣の移植実験などを行い、本技術が研究資源の保存に応用できる可能性を見出してきた。研究を飛躍的に展開するためには、本研究で使用している機器の特性を把握し、その凍結理論を解明することが必要であると考えた。本年度は、これまで使用してきた微弱エネルギー負荷装置による凍結に関する基礎データの収集を行った。

### 2) カニクイザル胎児由来DNA解析による雌雄判定技術の開発

サル類は、発生様式がヒトに類似しているため、周産期疾患の解析研究に適した実験動物である。中でもカニクイザルは周年繁殖動物であり、1年を通して繁殖関連や胎児を用いた研究が可能である。近年、ヒトを含む数種類の動物で、妊娠母体血清中の胎児由来 DNA を利用した、出生前胎児 DNA の解析が行われるようになってきた。しかし、カニクイザルではこれらの情報が極めて少ない。本プロジェクトでは、カニクイザル妊娠母体血清中の胎児由来 DNA の効率的な検出方法を確立し、胎児由来 DNA の検出系を用いて妊娠早期の胎児の雌雄判定を行うことを目的として研究を実施してきた。その一環として、胎児由来 DNA 断片サイズの分布パターンについて解析することで、母体を循環する DNA についての情報を得ることを目指してきた。

## B. 研究方法

### 1) 微弱エネルギー負荷環境下での凍結に関する基礎データの収集

凍結環境の設定に使用する微弱エネルギーとして磁場を用いた。磁場暴露が可能なプログラムフリーザーを用いて、15mlのチューブに入れた水および生理食塩水10mlを凍結した。凍結過程の温度変化をK熱電対を利用してモニタリングした。氷の結晶が大きくなれば凍結後の体積が増加することになるため、磁場を暴露しながら凍結した場合と磁場暴露なしで凍結した場合で凍結後の体積を比較した。また、低下した温度が凝固点に達したときに水分は凝固するが、その凝固の過程で液体中の粒子が濃縮されムラができる。そこで水に食紅を浮遊させて、磁場暴露環境下および非暴露環境下で凍結し食紅の状態を比較観察した。

### 2) カニクイザル胎児由来DNA解析による雌雄判定技術の開発

妊娠カニクイザル母体血清中のセルフリーDNAを用いて、Taqman法による定量的リアルタイムPCRを行った。オス特異的なSRY遺伝子およびDYS-14領域配列のスクリーニングは45頭の妊娠カニクイザルの妊娠5週、12週および22週時での血清サンプルで行った。また、妊娠22週時の血清および臍帯血上清を材料として、サザンブロット法により母体血清中のセルフリー胎児由来DNAの検出を行い、DNA断片サイズの分布パターンを予想した。コントロールには、オスカニクイザルのゲノムDNAとSRY遺伝子とDYS-14配列を組み込んだプラスミドDNAを用いた。オス特異的なSRY遺伝子あるいはDYS-14領域配列は母親個体からは検出できないため、母体血中からこれらが検出できたときは、胎児が雄であると仮定できる。そのことを利用して雌雄判定を実施した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は医薬基盤研究所の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) 微弱エネルギー負荷環境下での凍結に関する基礎データの収集

凍結過程の温度変動を調べたところ、微弱エネルギー、すなわち磁場暴露環境下と非暴露環境下での顕著な違いは認められなかった。過冷却状態から氷になるときにいずれも凝固熱が発生していることが確認された。また、磁場暴露環境とは関係なく、水よりも生理食塩水のほうが凝固するときの温度が低かった。このことは磁場暴露環境が凝固点を変えるものではないことを示している。水に食紅を浮遊させて凍結したところ、磁場を暴露しない状態で凍結したものには明らかなムラを認めた。一方、磁場暴露環境下でのそれは非暴露のものとは比べて極めて軽微なものであった。凍結後の体積を比較したところ、10mlの水は、氷になると11mlを示すチューブのライン近くまで増加していた。磁場暴露環境で凍結すると、その増加は僅かであった。

### 2) カニクイザル胎児由来DNA解析による雌雄判定技術の開発

リアルタイムPCR法によりSRY遺伝子およびDYS-14配列の定量的な検出が可能となった。妊娠22週の血清サンプルと帝王切開時の臍帯血上清サンプルを用いて、サザンブロット法によって、母体血清中のオス胎児由来のDNAサイズの分布パターンの同定を試みているが、目的DNAの検出には至っていない。なお、コントロールプラスミドの希釈系列を検出する条件は確立した。また、リアルタイムPCR法による判定では、100%の感度と特異性で、5、12、22週の妊娠カニクイザル母体血清サンプルからY染色体特異的な配列を確認できた。

## D. 考察

### 1) 微弱エネルギー負荷環境下での凍結に関する基礎データの収集

これまでの研究により、磁場暴露環境下で凍結すると、凍結時の細胞へのダメ

ージを軽減できる可能性が示されていた。そこでその原理を明らかにすることを目的として凍結過程の温度変化を調べてみたが、磁場暴露の影響は認められなかった。しかし、磁場暴露環境下で凍結することで、食紅粒子のムラが少なくなるという結果を得た。通常、水分が凍結する過程で粒子は濃縮されていく。しかし、磁場暴露によりその濃縮が軽減されたということは、過冷却状態から凝固するときのスピードに差があった可能性が考えられる。これを細胞に置き換えて考えると、細胞内の様々な成分が濃縮されることなく凍結できると言えるかもしれない。また、水は凝固すると結晶となるため体積が増加する。しかし、磁場暴露下で凍結するとその体積の増加がほとんど見られなかった。このことは結晶のサイズが小さい状態で凍結している可能性が示唆される。温度変化の調査で凝固熱が発生していることとあわせて考えると、ガラス化状態にはなっていないと思われる。しかし、体積の増加が抑えられたことの意義は大きい。細胞を凍結した場合、細胞内水分の体積の増加は致命的なダメージとなるが、それが軽減される可能性がある。今後もこの凍結手法の基礎データを蓄積し、さらに改良を加えながら細胞へのダメージが少ない方法を確立させなければならない。この方法が活気的なところの一つとして、磁場を使用しているため大きな塊であってもその外側と内側を同じ環境にできるということが挙げられる。すなわち、臓器をまるごと凍結できる可能性がある。卵巣まるごとの保存が可能になれば、臨床的には女性のガン患者への応用が考えられる。すでに卵巣をスライスして凍結する技術がこのような症例に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可能性があるため、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。本技術はスライスして凍結しなければならない現状を改善できる可能性を秘めている。さらに、卵巣のように複数の機能を有する細胞が含まれてい

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かもしれない。卵巣の凍結保存技術は多くの分野への応用が考えられ、ここで開発する意義は大きい。

2) カニクイザル胎児由来DNA解析による雌雄判定技術の開発

母体血清中の胎児由来 DNA は、リアルタイム PCR では非常に高い感度と特異性を認め、100%の確立で雌雄判定が可能であった。母体を循環するセルフリーの胎児由来 DNA を解析する目的でサザンブロットティングを試みたが、現在のところ検出できていない。この結果は、母体血清中での濃度が低いためと考えられるが、コピー数が多い Y 染色体特異的配列である DYS-14 であっても検出することができなかった。胎児由来 DNA の断片サイズの分布パターンを検証するためは、さらなる検討が必要である。

## E. 結論

1) これまでに比較的良好な成果を上げてきた磁場暴露環境下での凍結に関する基礎データを収集した。凍結過程の温度変化に磁場は影響しなかったが、浮遊粒子のムラを少なくし、凝固による体積の増加を抑制していることが示された。

2) カニクイザルの母体血中を循環する胎児由来 DNA をリアルタイム PCR で検出することに成功している。母体での胎児由来 DNA の存在形態を検索する目的でサザンブロットティングを試みたが、現在のところ再現性ある成果を得るに至っていない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

J. Otsuki, Y. Nagai, A. Lopata, K. Chiba, Y. Lubna, T. 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. 27: 380-7, 2012

J. Morichika, C. Iwatani, H. Tsuchiya, S. Nakamura, T. Sankai, R. Torii  
Triplet Pregnancy in a Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) after Double Embryo Transfer  
Comp. Med. 62: 1-4, 2012

2. 学会発表  
(国際学会)

T. Sankai  
Present and future research direction regarding cryopreservation of the entire ovary  
Inter National Symposium of Japan Society Assisted Reproduction (Osaka, Japan)  
September 29-30, 2012

M. Iwamoto, M. Hashimoto, S. Yazaki, T. Oishi, K. Inoue, A. Ogura, T. Sankai  
*In vitro* development of interspecies cloned embryos reconstructed with porcine oocytes and cynomolgus monkey fibroblast cell nuclei  
9<sup>th</sup> annual meeting of Asian Reproductive Biotechnology Society, Manila, Philippines, October 23-26, 2012

(国内学会)  
山海 直  
The application to medical science of a new freezing technology developed for food  
食品のために開発された最新凍結技術の医科学への応用  
日本低温医学会 (東京) 2012年 11月 21日

吉田麻衣子、小山高正、山海 直  
Characterization of choosing mating partner of laboratory-bred cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)  
室内環境下での交尾相手選択に関するカニクイザルの特性の解析

日本繁殖生物学会 (つくば) 2012年 9月 6、7、8日

Lubna Yasmin、高野淳一郎、永井 泰、大月純子、山海 直  
Male fetal DNA detection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) serum at early pregnancy stage

カニクイザルにおける妊娠初期の胎児由来 DNA の母体血清からの検出  
日本繁殖生物学会 (つくば) 2012年 9月 6、7、8日

Lubna Yasmin, Jun-ichiro Takano, Tadashi Sankai

Determining and quantifying male-specific fetal DNA in pregnant cynomolgus monkeys  
第21回サル類疾病ワークショップ (神奈川) 2012年7月14日

Lubna Yasmin、高野淳一郎、永井 泰、大月純子、山海 直  
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  
Detection of fetal DNA in maternal serum from pregnant cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)

第 59 回日本実験動物学会 (別府) 2012年 5月 24、25、26日

Lubna Yasmin、高野淳一郎、永井 泰、大月純子、山海 直  
妊娠初期カニクイザルの母体からの胎児由来DNAの検出の試み  
第7回日本生殖再生医学会 (東京) 2012年 3月25日

3. その他  
(著書等)

山海 直

分担翻訳

犬と猫の重篤症例における臓器不全  
サンダース ベテリナリー クリにクス  
シリーズ Vol. 7 No. 3

Saunders Veterinary Clinics Small Animal  
Practice

原著者：Frederic P. Gaschen、監訳者：金  
山喜一、鯉江 洋

インダース/エルゼビア・ジャパン、印刷  
中

山海 直

分担翻訳

犬と猫の慢性腸疾患 —病態生理・診断・  
治療の最新情報—

サンダース ベテリナリー クリにクス  
シリーズ Vol. 7 No. 1

Saunders Veterinary Clinics Small Animal  
Practice

原著者：Frederic P. Gaschen、監訳者：金  
山喜一、鯉江 洋  
インダース/エルゼビア・ジャパン, 2012

山海 直

巻頭総説

早期妊娠診断と胎児の雌雄判定技術の開  
発研究に携わって

Letters of Society of Primate Diseases and  
Pathology (第3号) 2-3, 2012

(報道)

山海 直

日本テレビ「未来シアター」

2012年12月7日

内容：食品のために開発された凍結技術  
の医科学への応用

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  
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・医療につなげる目的で、粘膜免疫を利用した経口ワクチン開発を行った。経口感染を示す E 型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子に 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し、カニクイザルを用いて昨年度に引き続き、ワクチンの有効性と安全性の検証を行った。その結果、経口によるワクチン投与により、有害事象を生じず、特異的免疫の誘導が確認された。

### A. 研究目的

性交渉を通じての感染症を防ぐ場合は、特に粘膜免疫が重要であると考えられている。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と考えられているが、粘膜への投与方法で最も簡便な経口投与では、消化器官の数多くの酵素等の存在により、目的とする抗原を安定的に消化器粘膜に発現させることは極めて難しいので、粘膜免疫を誘導することは困難とされている。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、昨年度の報告では、HEV-VLP を用いることで消化器粘膜に VLP 抗原を発現させ、特異的な免疫誘導に成功したが、本年度は封入した DNA ワクチンによる免疫誘導に関して報告する。

### 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、繁殖したカニクイザルを用いた。

#### 2. 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。HEV-VLP を EDTA でキレートし DNA ワクチンの封入を行った。

健常なカニクイザルへ経口ゾンデを用いて C52 のみ (3 頭) 又は HIV-1 gag DNA ワクチンを封入した C52 (3 頭) を胃内投与した。C52 単独投与の VLP タンパク量は質量換算で 28.6 mg、DNA ワクチン封入 C52 投与の VLP タンパク量は質量換算で 9.5 mg、DNA 量は約 3.0 mg となるように調整したものを 2 週間隔で合計 3 回免疫を行い、経時的に採血した (図 1)。

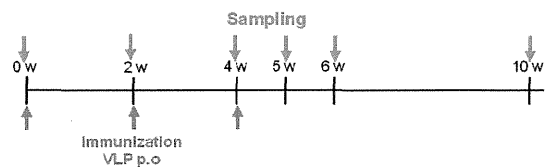


図 1. 実験スケジュール

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  $\mu\text{g/mL}$  に調製した溶液を 96 穴 ELISA plate に 100  $\mu\text{l/well}$  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  $\mu\text{l/well}$  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  $\mu\text{l/well}$  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  $\mu\text{l/well}$  で蒔き、5~15min 反応させ、



2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 20 μl/well 加え反応を止め、plate reader で 450nm の OD 値を測定した。OD<sub>450</sub> ≥ 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。

#### 5. 特異的細胞性免疫能の測定

C52 又は Gag に対する免疫応答として、C52 又は A9ICTL ペプチドを用いて 24 時間 抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN-γ 産生 PBMC 数を測定し、抗原特異的な PBMC の免疫応答を検討した。細胞濃度は 1x10<sup>5</sup> cells/100ul、ペプチド量を 100ug 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

##### 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 週目には検出された (図 2)

また、DNA ワクチンを封入した C52 を経口投与し、HEV-VLP 及び DNA 得的な免疫応答の誘導も試みた。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 INF-g 産生細胞が誘導され、封入された DNA 特異的な INF-g 産生細胞も投与 4 週目に僅かながら誘導された (図 3)

#### D. 考察

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。DNA ワクチンを封入した HEV-VLP 経口投与実験を行い、特異的な細胞性免疫能を評価した。HEV-VLP 及び DNA 特異的な INF-γ 産生細胞の誘導が検出された。しかしながら、HEV-VLP 特異的な INF-γ 産生細胞の誘導時期は個体差があり、DNA 特異的な INF-γ 産生細胞の誘導は HEV-VLP に比べて弱かった。これは、投与した DNA 量が少なかった可能性が考えられる。今後、投与回数又は投与量を増やした検討を行い、十分な特異的な免疫能の誘導を試み、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

粘膜免疫を誘導する DNA ワクチンとして、HEV-VLP に封入して、サルに経口投与した。その結果、特に有害事象を生じず、特異的な液性及び細胞性免疫応答が確認され、経口投与による粘膜免疫の誘導が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y. Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. Differentiation. *In press*.

##### 2. 学会発表

Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y, Mineno J. Pre-clinical study for HIV-1 gene therapy; In vivo safety and efficacy of endoribonuclease MazF transduced CD4+ T cells in the presence of SHIV 89.6P infection using primate models. 第 18 回日本遺伝子治療学会、熊本・熊本 2012.6.28-30

Mizukami Y, Fujishiro S, Ishino R, Shibata H, Kobayashi E, Hanazono Y. Failure of teratoma formation after porcine syngenic transplant of induced pluripotent stem cells. 第 10 回幹細胞シンポジウム、兵庫・淡路、2012.5.31-6.2

Ono F, Shibata H, Kurosawa A, Yamakawa Y, Tobiume M, Yuko Sato Y, Katano H, Hagiwara K, Saito N, Komatuzaki K, Nakamura K, Emoto Y, Hamano M, Yasutomi Y, Sata T. Assessment of memory disorder by using retrieval task test in classical and atypical (L-type) bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions transmitted

cynomolgus macaques. Asian. Pacific Prion Symposium 神奈川・横浜. 2012.7.29-30

Katakai Y, Ono F, Narita H, Ogawa H, Ohno C, Otho K, Okabayashi S, Itakagaki I, Ageyama N, Kimura N, Shibata H, Terao K, Nakamura S, Yoshikawa Y, Yasutomi Y. Aging farm of cynomolgus monkey for biomedical study. The 5th Annual meeting of the Asian society of Zoo and Wildlife Medicine. タイ・バンコク、チェンマイ 2012.10.10-14

G. 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。

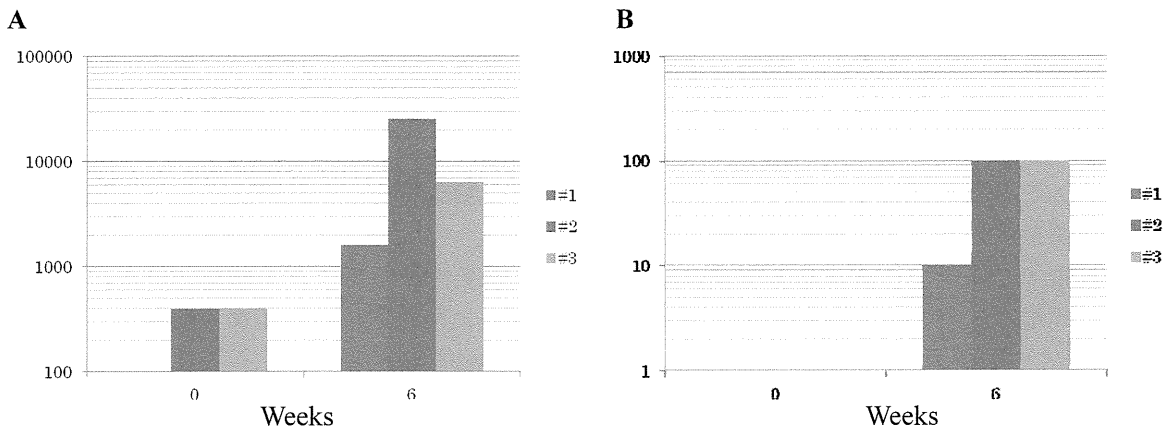


図2. 血中の抗 HEV-VLP 特異抗体価の推移  
初回免疫時と初回免疫 6 週間後の抗 HEV-VLP-IgG 抗体価 (A)、抗 HEV-VLP-IgA 抗体価 (B)

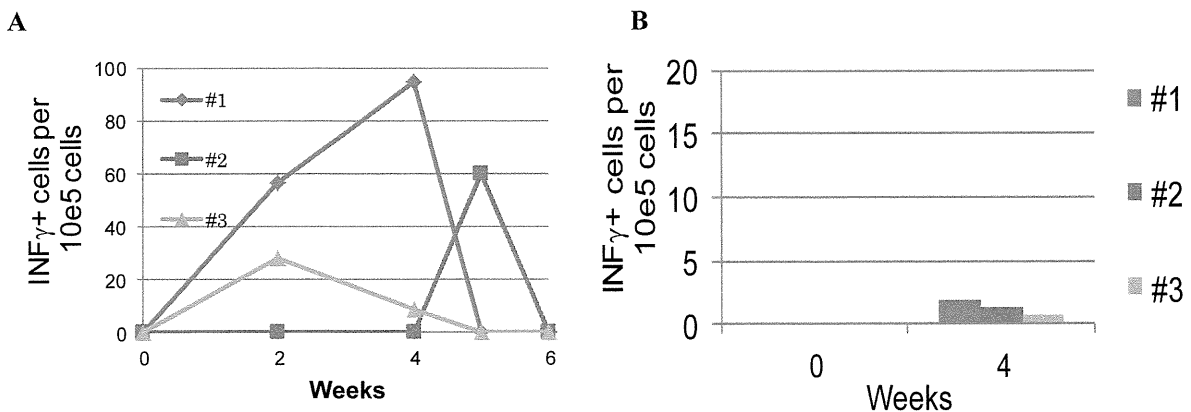


図3. 血中の特異的細胞性免疫能の推移  
HEV-VLP 特異的な INF-γ 産生細胞 (A)、Gag 特異的な INF-γ 産生細胞 (B)

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

風疹はヒトが唯一の自然宿主であり、風疹免疫のない妊婦が妊娠初期に風疹に罹患すると風疹ウイルスが胎盤を介して胎児に感染し、先天性風疹症候群（CRS 症候群）を起こすと考えられている。しかし、障害の形成機構は未だ不明である。これまで、風疹の動物モデルにはマウス、フェレット等の報告があるが、小動物モデルを用いた研究では解剖学的にヒトの胎盤構造の隔たりが極めて大きく、ヒトの動物モデルとして機能しているとはいえない。このため妊婦の動物モデルには、免疫機構や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、昨年度に引き続き妊娠陽性 3 週のカニクイザルに弱毒風疹ウイルスを接種し、接種後 3 週にて解剖を行い、ウイルスの胎児感染および免疫誘導能を検討した。次に弱毒風疹ウイルス接種妊娠カニクイザルより出生したサル新生児を用いて、CRS 症候群用の障害の判定を行った。

A. 研究目的

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 症候群）の危険性が高まることである。CRS 症候群は治療法が無く、対策として幼児期からの定期予防接種が最も重要である。しかし、近年の報告では、風疹免疫の誘導が不十分な妊婦が報告されており、数件の CRS 症候群が報告された。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が出来ない。

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、周産期における風疹の影響を明らかにするため、妊娠初期（妊娠陽性 3 週）のカニクイザルに弱毒風疹ウイルスを接種し、母体および胎児への

影響を検討する。

B. 研究方法

1. 弱毒風疹ウイルスの胎児感染および生体内分布の検討

妊娠陽性 3 週齢のカニクイザル 17 頭に弱毒風疹ウイルスを接種し、採血および Swab を採取する。ウイルス接種後 3 週で解剖し、胎盤感染や母体内のウイルス分布を解析する。

2. 風疹ウイルス遺伝子検出

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 IgM 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. CRS 症候群用の障害の検討

妊娠陽性 3 週齢のカニクイザル 4 頭に弱毒風疹ウイルスを接種し、妊娠末期に帝王切開を行い、サル新生児を用いて CRS 症候群用の障害を検討する。

#### 5. 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 からの弱毒風疹ウイルス遺伝子の検出

弱毒風疹ウイルスを接種した 17 頭の妊娠カニクイザルから PBMC、鼻汁 Swab を経時的に採取し、弱毒風疹ウイルスの感染を確認したところ PBMC から 3 頭 (#001、#012、#020)、鼻汁 Swab から 6 頭 (#001、#005、#012、#015、#018、#027) ウイルス遺伝子が検出された (図 1)。

#### 2. 胎児感染の検討

弱毒風疹ウイルスを接種した 17 頭のうち、2 頭のサル胎児 (#001、#012) から弱毒風疹ウイルス遺伝子が検出された (図 2)。

#### 3. 弱毒風疹ウイルスの生体内分布

弱毒風疹ウイルスを接種した 17 頭の妊娠カニクイザルを解剖し、弱毒風疹ウイルスの検出を試みたところ、9 頭の妊娠サル (#001、#004、#005、#007、#008、#012、#013、#015、#020) 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 3)。

#### 4. 抗風疹 IgM 抗体の解析

17 頭のサルから分離・採取した血漿 (ウイルス接種前および接種後 3 週) を用いて抗風疹 IgM 抗体の検出を行ったところ、11 頭 (#001、#004、#005、#007、#008、#012、#013、#015、#018、#020、#027) で抗体の上昇が確認された (図 5)。

#### 5. CRS 症候群用の障害の検討

弱毒風疹ウイルス接種妊娠カニクイザルより出生した 4 頭のサル新生児は、目視での障害は確認されなかった。現在、詳細な解析を行うため、病理学的解析を行っている。

### D. 考察

本研究では、周産期における新規評価系動物モデルの確立を目的に、弱毒風疹ウイルスを接種した妊娠カニクイザルを用いて研究を行った。弱毒風疹ウイルスを接種した妊娠カニクイザルを接種後 3 週で解剖したところ、サル胎児 17 頭のうち、2 頭のサル胎児からウイルスが検出された。この結果から胎盤を介した胎児感染が疑われたが、詳細は不明である。次に弱毒風疹ウイルス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。さらに CRS 症候群用の障害を判定するため、弱毒風疹ウイルス接種妊娠カニクイザルより出生したサル新生児を用いて検討を行った。結果、目視では障害を確認することは出来なかった。しかし、これまでの報告で、弱毒化された風疹ワクチンによる胎児への障害形成の報告は無いことから、今後は風疹ウイルス野生株を使用した評価系を確立し、胎児の障害形成機構の解明を行いたいと考えている。

### E. 結論

妊娠カニクイザルは、風疹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」