

201208017B

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22～24年度 総合研究報告書

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22～24年度 総合研究報告書

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. 総括研究年度終了報告

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. 分担研究年度終了報告

1. 高度 SPF カニクイザルコロニーの確立

保富 康宏 ----- 3

2. 霊長類における発生工学的技術の高度化

山海 直 ----- 7

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 ----- 18

4. 霊長類を用いた感染症モデルに関する研究

岡村 智崇 ----- 24

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 ----- 30

6. 不妊の機序解明と治療法の開発に関する研究

鈴木 治 ----- 35

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 ----- 47

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 のタイピング解析とゲノムシーケンシング

高橋 一朗 ----- 61

III. 研究成果の刊行に関する一覧表(平成 22~24 年度) ----- 65

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 80

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。実験動物霊長類であるカニクイザルはヒトと同様の性周期、胎盤構造を持つ唯一の実験動物である。また、周産期疾患に関する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

分担報告書参照

C. 研究結果

以下の如く結果を得た。

1. 配偶子および生殖器の凍結保存による効率的な遺伝子保存技術の確立を目指し、研究者らが開発した精子凍結保存方法の汎用性の調査研究、カニクイザル受精卵および卵巣の保存技術の新規開発研究を開始した。
2. SRV/D 感染カニクイザルの妊娠期間中の血中ウイルス量と新生児のウイルス感染との関連を調べる為に SRV/D 感染ザルの妊娠 6 週の胎仔、臍帯血、羊水を採取した

結果、少なくとも羊水は SRV/D 陽性であった。

3. 周産期における風疹ワクチンの影響を検討するため、4 頭の妊娠陽性カニクイザルに風疹ワクチンを接種した。結果、4 頭中 1 頭のサル胎児から風疹ワクチンが検出され、胎児感染が確認された。

4. カニクイザルの実験動物としての品質向上に寄与するため SOLiD 3 plus システムを用いカニクイザルの腎臓および大腸の遺伝子発現解析を行った。

5. 繁殖能力が低く系統維持が困難な SCG マウス (急速進行性糸球体腎炎モデル) の繁殖学的特性を解析し、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、産仔の病態発現を確認した。

6. 体外受精成績の向上を目指して 129 系雄マウスに徐放性薬剤を与えたところ、プラセボ群に比べ 5mg Dehydroepiandrosterone Acetate 群で胚盤胞形成率に若干の向上傾向が見られた。

7. 難治性ネフローゼマウス胚をネフローゼおよび正常雌性マウスに移植し、産仔の表現型を比較した結果、遺伝子型が同一であるにも関わらず、表現型が大きく異なっており、母体環境の重要性が明らかとなった。

D. 考 察

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。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。

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) 保富康宏 (他 3 名) : 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 PCT/JP2010/069435

2) 保富康宏 (他 3 名) : 遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方法 特願 2011-025234

3) 保富康宏 (他 5 名) : 新規な組換え BCG ワクチン PCT/JP2012/073213

平成 22 年度～24 年度 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 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。これらを基に SRV/D の清浄化を進めたところ、研究期間内 (H22,4 月～H24,12 月末) で 401 頭の SPF カニクイザルが 611 頭と 50%以上に増加した。これらのことはわが国の医科学研究用霊長類資源が世界で唯一であり、最高レベルに正常化されていることを示すものである。

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

H22,4 月～H24,12 月末での年度ごとの SPF カニクイザルの頭数を表 1 に示した。H22 年度開始時には 401 頭であったカニクイザルが H24 年度 12 月末時点で 611 頭となり、コロニーの清浄化が進んだ。

D. 考察

実験動物の清浄化 (SPF 化) はげっ歯類を中心とした小動物では古くからおこなわれており、医科学研究に大きく寄与してきた。霊長類を医科学実験に用いることの有用性は古く知られており、100 年の歴史を

持つ霊長類センターも存在するが、SPF コロニーを確立しているところはない。本研究では医科学研究に最も重要な霊長類であるカニクイザルを用いて SPF 化を行い、611 頭の大型コロニーの作製に成功した。このことは創薬や病態解明につながる医科学研究に大きく貢献すると考えられる。

E. 結 論

SRV/D を排除した SPF カニクイザルコロニーが著しく拡大した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

- 1) Yasuhiro Yasutomi. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies In Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2010;B75-B77.
- 2) 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.* 2010; 1:1-9.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 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.* 2011;144:204-211.

7) 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.

8) 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 SIVsequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Micorbes and Infection* 2011;13:58-64.

9) Xing,L., Wang,J.C., Li,T-C., Yasutomi,Y., Lara,J., Khudyakov,Y., Schofield,D., Emerson,S., Purcell,R., Takeda,N., Miyamura,T. and R.Holland Cheng. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domein. *J.Virol.* 2011;85:1117-1124.

10) Chono,H., Saito,N., Tsuda, H., Shibata, H., Ageyama,N., Terao,K., 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:

11) Matsuo,K. and Yasutomi,Y. *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Res. Treat.* 2011

- 12) 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 fuscata fuscata*). *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2011;85:653-658.
- 13) Iwasaki,Y., Mori,K., Ishii,K., Maki,N., Iijima,S., Yoshida,T., Okabayashi,S., Katakai,Y., Lee,YJ., Saito,A., Fukai,H., Kimura,N., Yoshizaki,S., Suzuki,T., Yasutomi,Y., Miyamura,T., Kumagai,M and Akari,H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive Hepatitis C-like disease in Marmosets. *Front.Microbiol.* 2011;2:240.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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., 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.
- 17) 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.
- 18) 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
- 19) 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; 44:1051-1055.
- 20) 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.
- 21) 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-1mt replication in macaque cells. *Microve. Infect. in press*

22) Yoshhida, 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*

23) 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. in press*

表1 SPFカニクイザルの頭数の変化

22年3月末	22年度	23年度	24年度*
401頭	508頭	537頭	611頭

*12月末時点

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、唯一ヒトと同じ単一子宮を有し内分泌動態等も類似しているサル類を対象に研究を進める意義は大きい。また、カニクイザルは周年繁殖が可能であり本研究に適したサル種と言える。

これらの研究を遂行するうえで必須となる医科学研究資源としてのサルの高品質化、繁殖・育成および保存技術の高度化が本プロジェクトの目的の一つとなっている。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た。カニクイザルを実験対象とし「精子および卵子の凍結保存」「卵巣の新規手法による凍結保存」「母体血中を循環する胎児由来 DNA の検出と本検出系による胎児の雌雄判定」の研究を並行して進めてきた。精子の凍結は TTE 溶液という凍結希釈液を用いることで融解後も良好な運動活性を保持できることを確認している。しかし、精子先体のアクロゾームにダメージがあり、この手法はマカカ属サルの精子にのみ有用でありサル類共通の手法ではない。卵の凍結保存は様々な方法が試されており、ヒトの卵で有用な簡便な手法をカニクイザルに応用したところ、Morula ステージまでの卵に応用できたが、Blastocyst ステージの卵は凍結融解後、移植を試みたが産児は得られていない。卵巣は、微弱エネルギーを負荷した環境で凍結することで、組織学的検索において良好と判断される所見を得ている。また、母体に胎児由来 DNA が循環していることをカニクイザルで初めて確認し、この検出系を用いて妊娠 5 週目以降の胎児の雌雄判定が可能となった。

A. 研究目的

1) カニクイザルの精子および卵子の凍結保存

精子、卵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プロジェクトの成果に与える影響は大きい。とくに、精子、卵子の安定した凍結保存技術が確立されれば、研究資源の保存、供給、これらを使った発生工学的研究に貢献することができる。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。また、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。サル類においては疾患モデルなどの貴重な遺伝資源の保存、繁殖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。現在、種々のサル種に共通の精子、卵子凍結保存技術はなく、簡便かつ高率に生存性が保持される技術の開発が望まれている。

2) カニクイザル卵巣の新規手法による凍結保存

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、卵巣のように多くの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実現できる可能性がでてくる。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。本プロジェクトでは、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について検討した。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り、微弱エネルギーを負荷する磁場暴露装置による凍結に関する基礎データの収集をも目的とし、将来を見越した研究を行った。

3) 母体血中を循環する胎児由来 DNA の検出と本検出系による胎児の雌雄判定

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 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、母体中を循環する 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) カニクイザルの精子および卵子の凍結保存

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。精液が固まるのを防ぐために採取後ただちに培養液で希釈した。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、液体窒素の液面から 5 cm 上に 5 分間静置して凍結しその後液体窒素内に保存した。融解は 37℃のお湯に入れる急速融解を行った。この方法は以前に分担研究者が開発したものである。

カニクイザルで顕微授精を実施し受精卵 (胚) を作成した。発生した胚をポリプロピレンのシート上に微量の培地とともにのせてただちに液体窒素中に浸漬するというガラス化凍結を実施した。具体的には胚を第 1 ガラス化凍結用培地に入れる。高浸透圧のため胚は収縮するが培地が浸透することで細胞質体積が回復する。次に胚を第 2 ガラス化凍結用培地に胚を移してポリプロピレンのシートに培地と共にのせ液体窒素中に浸漬した。融解は、第 1 融解用培地、続いて第 2 融解用培地に入れることで行った。次に洗浄用培地で胚を洗浄し、形態的に正常な胚を 20% FBS 添加の CMRL-1066 に移して培養した。4-8 cell ステージの凍結融解胚は 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卵管に移植した。Blastocyst ステージで凍結融解した胚は拡張胚盤胞になることを確認して移植した。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。この卵子の凍結は、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ある。

2) カニクイザル卵巣の新規手法による凍結保存

まるごとの卵巣を微弱エネルギー負荷環境下で凍結した。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、凍結環境の確認実験を行った。15ml のチューブに入れた水および生理食塩水 10ml を用いて、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、温度を下げていき凝固点になったときに水分は凝固するが、通常、液体中の粒子は濃縮されムラが生じる。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観察した。

カニクイザルの卵巣を磁場暴露環境下で凍結し、融解後の卵巣をもとの個体に移植して卵巣機能が維持できているかを継続観察している。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°C 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たのち、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。

凍結融解後の卵巣の組織学的解析を行うにあたり、カニクイザル卵巣の情報が少ないため、組織学、組織免疫学的基礎データの集積をあわせて実施している。卵巣を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) 母体血中を循環する胎児由来 DNA の検出と本検出系による胎児の雌雄判定

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。SRY 遺伝子および DYS-14 領域配列のスクリーニングは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 週時の妊娠カニクイザル血清および臍帯血上清を材料として、サブプロット法により母体血清中のセルフリー胎児由来 DNA の検出を試みた。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。SRY 遺伝子、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、胎児がオスであると推定できる。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) カニクイザルの精子および卵子の凍結保存

本手法開発時と同様、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。また、分担研究者はニホンザルでも同様の成果を得ているが、アフリカミドリザル精子には応用が困難であった。

ICSI により受精させた 4-8 cell および Blastocyst まで発育した卵子を凍結した。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た 4-8 cell と Blastocyst 凍結由来胚を移植した結果、4-8 cell で妊娠が確認された。妊娠率は 29.2% 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 で凍結した胚の移植による妊娠例は得られていない。

2) カニクイザル卵巣の新規手法による凍結保存

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 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。

カニクイザル卵巣を凍結し、融解して移植したところ 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

動態を示す個体が確認され、また、月経も認めた。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個体、すなわち、定着しなかったことを示す個体もいた。移植後も長期（約 5 年）にわたり月経周期が継続している個体がいることを確認した。

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。

カニクイザル卵巣の基礎データ収集を目的として組織学的検索を行った結果、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) 母体血中を循環する胎児由来 DNA の検出と本検出系による胎児の雌雄判定

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。このとき、SRY 遺伝子のコピー数は 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。

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、サザンブロッティング法によって、母体血清中のオス胎児由来の DNA サイズの分布パターンと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。

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され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性状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。

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移植による妊娠は確認されなかった。4-8 cellで凍結した胚を、融解後培養して発生したBlastocystを移植した場合、妊娠することを確認している。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。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。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。

カニクイザル卵巣の凍結保存の実験で凍結融解した卵巣を移植したカニクイザルは、現在も生存しており、継続的に内分泌機能の解析を行っている。約5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。ヒトにおいても卵巣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。ヒトでは卵巣をスライスして凍結しているのに対し、本実験では卵巣まるごとを使用している。卵巣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。本プロジェクト研究の成果は新規凍結法として適用できる可能性を示すものである。カニクイザルでは卵巣の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く。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、排卵した卵子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巣の細胞が脂肪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巣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巣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す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、本実験でその生存も確認された。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可能性も考えられ、卵子の生存についてはさらに詳細な検討が必要である。

このように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、水分が徐々に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の濃縮を抑制して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なかった。結晶のサイズが小さい状況を作り上げ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。

さらに、胎児由来のDNAを母体の末梢血からの検出系の技術開発をカニクイザルで試みてきた。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フリーの胎児由来DNAを解析する目的でサザンブロッティングを試みたが、現在のところ検出できていない。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。この結果は、母体血清中での濃度が極めて低いためと考えられる。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、さらなる研究が必要である。本技術を進展させることで、遺伝子関連疾患を早期に検出でき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) カニクイザルの精子および卵子の凍結保存

カニクイザル精子、卵子の凍結保存は実用可能である。ただし、精子の場合、先体のアクロゾームにダメージがあること、胚盤胞ステージの胚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。これらの問題は早急に解決すべきであり、研究の継続が必要である。

2) カニクイザル卵巣の新規手法による凍結保存

カニクイザルの卵巣を磁気による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することを内分泌学的に確認した。また、使用している機器により構築される凍結環境の基礎データを収集した。今後、これらのデータを基にし、理

論的理解のうえで本技術を高度化する必要がある。

3) 母体血中を循環する胎児由来 DNA の検出と本検出系による胎児の雌雄判定
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。しかし、サザンブロットイングでは、現在のところ再現性ある成果を得ていない。今後、検出精度をあげるとともに検出可能な DNA を増やしていき汎用性ある技術へと進展させる必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. Fujiomto, 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

H. H. Motohashi, T. Sankai, H. 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

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 76: 33-38, 2011

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)

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

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

H. Koie, T. Ikegawa, . Okabayashi, K.
Kanayama, T. Sankai, Y. Yasutomi, N.
Ageyama
Rare cardiac disease cases in four cynomolgus
monkeys (*Macaca fascicularis*)
62th AALAS national meeting (San Diego,
CA, USA) October 2–6, 2011

L. Yasmin, J. Takano, Y. Nagai, J. Otuki, T.
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

J. Otsuki, L. Yasmin, A. Lopata, T. 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

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
9th annual meeting of Asian Reproductive
Biotechnology Society, Manila, Philippines,
October 23-26, 2012

(国内学会)

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
outotransplantation
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

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)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)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

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（神奈川県）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
卵巣凍結保存の現状と今後の課題
IVF J NEWS 49, 2010

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

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 クリニックシリーズ 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 クリニックシリーズ 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

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

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

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学への応用

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし