

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、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、血中の抗体価及びウイルス量の関係並びに垂直感染率の調査を行った。妊娠初期の段階から、羊水や臍帯血を通じて胎仔への感染が広がっていたことが示唆された。そこで、帝王切開により新生仔への SRV/D 感染の低減を検討したが、その効果はあまり見られなかった。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特異的な液性、細胞性免疫能の誘導が確認された。

### 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、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胎仔を取り出し、胎仔への感染を調べた。

また、感染対策も重要であり、安全で簡便な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 ワクチンが感染防御ワクチンとして魅力的なツールと考えられるが、経口投与では粘膜免疫を誘導するのが難しいと考えられている。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、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、妊娠をさせた。エコー下での妊娠確認後、妊娠 6 週目 (満期 23.5 週) に帝王切開により、胎仔を取り出し、胎仔はネンブタール投与により安楽殺を行った。帝王切開時に、羊水、臍帯血及び胎仔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。

霊長類医科学研究センターで自然交配した出産前後の母カニクイザルと仔ザルからも採血しウイルス感染の疫学調査を行った。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。

#### 2. RT-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遠心による濃縮後、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。

健全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)。

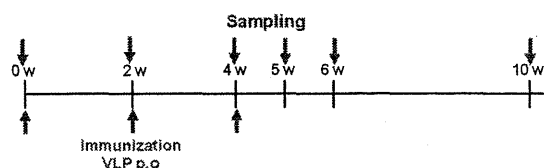


図 1. 実験スケジュール

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製した溶液を 96 穴 ELISA plate に 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  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  $\mu\text{l}/\text{well}$  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  $\mu\text{l}/\text{well}$  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  $\mu\text{l}/\text{well}$  で蒔き、5~15min 反応させ、2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を 20  $\mu\text{l}/\text{well}$  加え反応を止め、plate reader で 450nm の OD 値を測定した。OD<sub>450</sub>  $\geq$  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- $\gamma$  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  $1 \times 10^5$  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

SRV/D 血症の妊娠ザルとその胎子の SRV/D 感染の有無を PCR を用いて調査した。調べた 3 頭の妊娠ザルの血液から全て SRV/D 陽性であることが確認できた (図 2 A、図 2 C、図 2 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 2 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 2 E、#2 の臍帯血: data not show)。しかしながら、胎子中では、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 2 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 2 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 2 E)。

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 RT-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。

#### 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

検出された (図 3)

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 4)

#### 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。特に霊長類医学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、コロンビア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、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、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。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。

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 結果からも分かる通り、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。

粘膜免疫を誘導するためには抗原を直接、適切な形態で伝達しなければならず、それに加えて細胞性免疫を誘導するためには細胞質内での抗原発現が必要となる。そこで、呼吸器粘膜にウイルスベクターを用いてワクチンとする方法が多く報告されている。経口投与ワクチンは、呼吸器粘膜を標的と

した経鼻ワクチンに比べ、安全性や簡便性、に優れるが、経口投与は消化器官の数多くの酵素等の存在により、安定的に抗原を消化器粘膜に発現させることが極めて困難であると考えられている。そこで、カニクイザルを用いた DNA ワクチン封入 HEV-VLP の経口投与実験を試みた。経口投与後、血中の HEV-VLP に対する特異的な抗体の産生が認められた。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、HEV-VLP 及び DNA 特異的な INF- $\gamma$  産生細胞の誘導が検出された。従って、経口感染を示すウイルスである HEV-VLP を用いることにより、消化器粘膜に特異抗原を発現させることに成功した。しかしながら、HEV-VLP 特異的な INF- $\gamma$  産生細胞の誘導時期は個体差があり、封入した DNA 特異的な INF- $\gamma$  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

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。

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両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

Yuki Y, Nochi T, Harada N, Katakai Y, Shibata H, Mejima M, Kohda T, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Ono F, Kozaki S, Terao K, Tsukada H, Kiyono H. In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates. *J. Immunol.* 185(9):5436-5443. 2010.

Chono H, Matsumoto K, Tsuda H, Saito N, Lee K, Kim S, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Yasutomi Y, Mineno J, Kim S, Inouye M, Kato I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific *E. coli* mRNA interferase. *Hum Gene Ther.* 22(1):35-43. 2011.

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.

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

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. 2010.5.12-14.

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. 2010.7.1-7.3.

Ono F, Yamakawa Y, Tobiume M, Sato Y, Katano H, Hagiwara K, Itagaki I, Hiyaoko A, Komatuzaki K, Emoto Y, Shibata H, Murayama Y, Terao K, Yasutomi Y, Sata T. Transmission of classical and atypical (L-type) bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to cynomolgus macaques. PRION2010. オーストリア・ザルツブルグ. 2010. 9. 8-11.

H Shibata. Research into regenerative medicine in a non-human primate stem cell-based allogeneic transplantation model. 2011 Korea Association for Laboratory Animal Science, Winter Symposium. 韓国・龍坪. 2011.2.18-19.

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.

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, Aageyama 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

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.

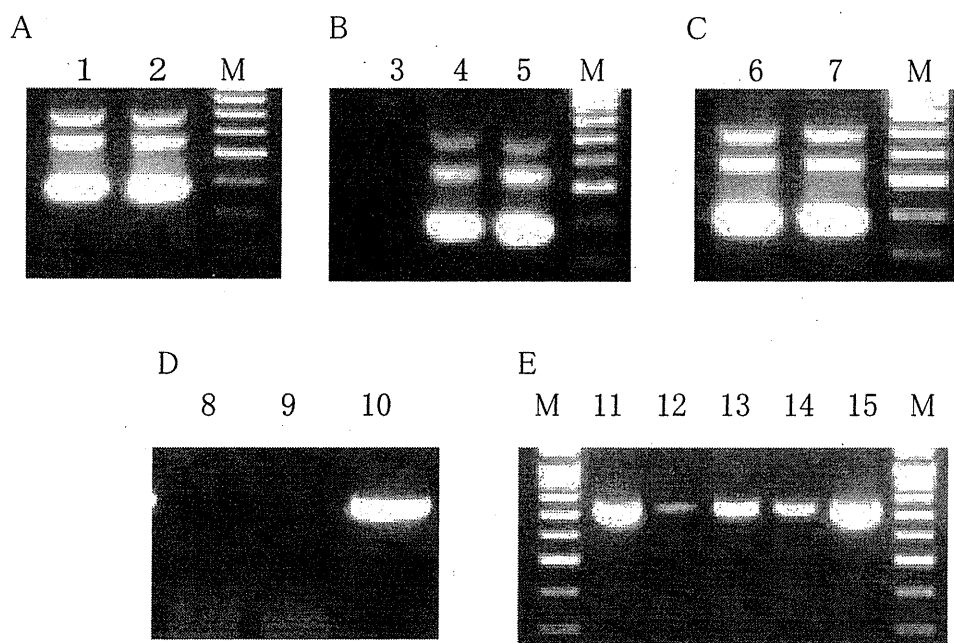


図 2. カニクイザルサンプル中の特異的 SRV/D プロウイルス又は RNA の検出

(A)env1234 を用いた RT-PCR, 1 ; #1 母ザル血, 2 ; positive control. (B) gag4 を用いた PCR, 3 ; #1 胎児, 4; #2 胎児, 5; positive control. (C)gag4 を用いた PCR, 6; #2 母ザル血液, 7; positive control. (D)env1234 用いた RT-PCR, 8; #3 臍帯血, 9; #3 羊水, 10; #3 母ザル血液. (E)gag4 を用いた PCR, 11; #2 羊水, 12; #3 臍帯血, 13; #3 羊水, 14; #3 母ザル血液, 15; positive control. M; marker.

表 2. 分娩時 SRV/D 陽性母ザルの仔ザルへの垂直感染率

	SRV/D	仔ザル	
		+	-
母ザル	+	4	7
	-	1	71

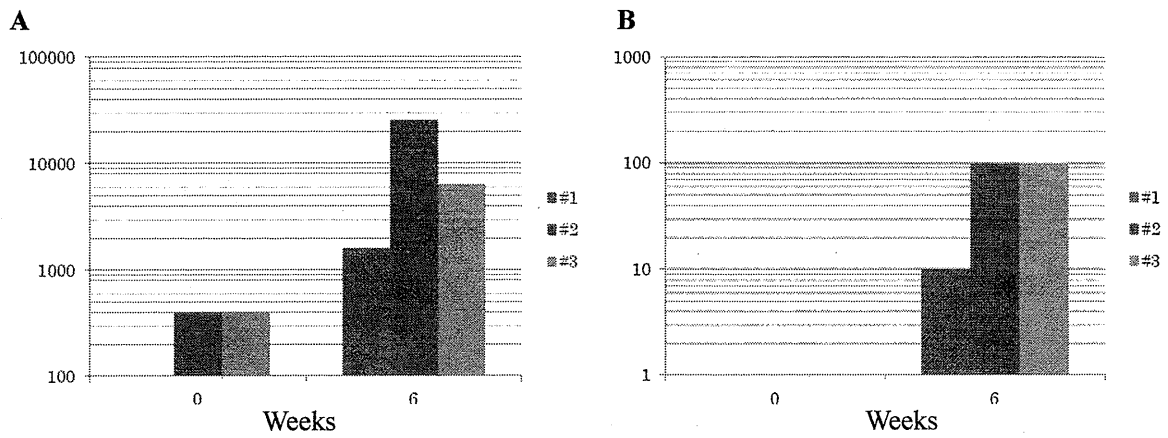


図 3. 血中の抗 HEV-VLP 特異抗体価の推移  
初回免疫時と初回免疫 6 週間後の抗 HEV-VLP-IgG 抗体価 (A)、抗 HEV-VLP-IgA 抗体価 (B)

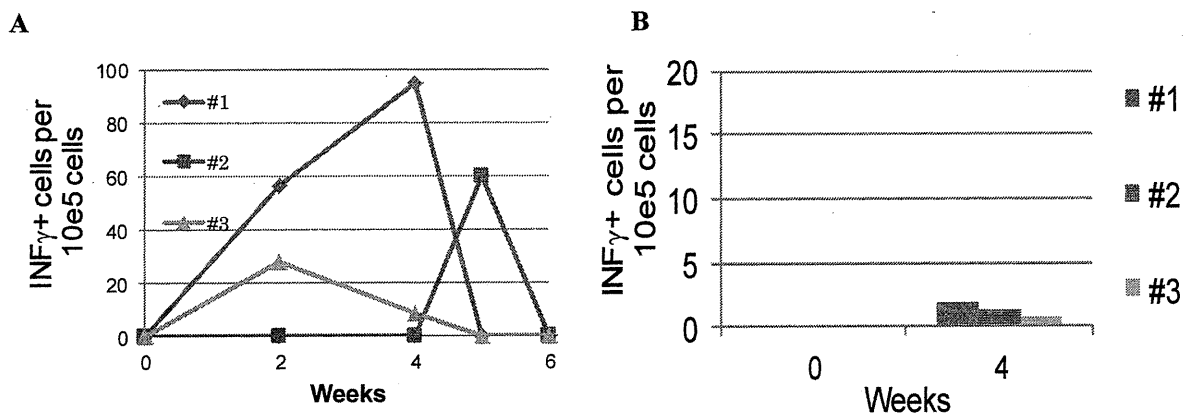


図 4. 血中の特異的細胞性免疫能の推移  
HEV-VLP 特異的な INF- $\gamma$  産生細胞 (A)、Gag 特異的な INF- $\gamma$  産生細胞 (B)

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

先天性風疹症候群（CRS 症候群）は、風疹ウイルスの胎盤を介した胎児感染により発生するが、その詳細な障害形成機構は未だ不明である。風疹の胎児感染を評価する動物モデルにはマウス、フェレット等の報告があるが、解剖学的にヒトの胎盤構造との隔たりが大きく、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極めて重要である。

本研究は周産期における風疹の影響を検討できる感染症評価モデルを確立するため、妊娠カニクイザルを用いた動物モデルの確立を目的とする。まずカニクイザルの風疹に対する感受性について明らかにする。次に妊娠 3 週のカニクイザルに弱毒風疹ウイルスを接種し、ウイルスの胎児感染および免疫誘導能を検討する。さら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

風疹は、古くから知られている全身性のウイルス感染症の一つである。風疹に伴う最大の問題は、風疹免疫が不十分な妊娠初期の妊婦が風疹ウイルスに感染すると、新生児に先天性風疹症候群（CRS）を起こすことである。CRS 症候群は、新生児に白内障、先天性心疾患、難聴を主症状とする、風疹ウイルス感染症の最大の問題点である。CRS 症候群は、妊娠初期の妊婦に風疹ウイルスが感染することで、危険性が高まるとされているが、その発症機構は未だ不明である。

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の確立を目指す。まず動物モデルとなるカニクイザルの風疹に対する感受性について調べ、次に妊娠初期（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. カニクイザルを用いた風疹感受性の検討  
当センターで繁殖育成しているカニクイザルを用いて、風疹の感受性を検討する。3 頭のカニクイザルに弱毒風疹ウイルスを接種し、ウイルス感染および免疫誘導能を解析した。

2. 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。

3. 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。

4. 抗風疹 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。

#### 5. 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。また詳細な解析を行うため病理学的解析を行った。

#### 6. 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. カニクイザルを用いた風疹感受性試験

カニクイザルの風疹に対する感受性について検討したところ、弱毒風疹ウイルスを接種された 3 頭のカニクイザルは、抗風疹 IgG 抗体を誘導した (図 1)。また #003 のカニクイザルでは、接種後 2 週において PBMC や鼻汁 Swab よりウイルス遺伝子が検出された (図 1)。

#### 2. 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 2)。

#### 3. 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 3)。

#### 4. 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、弱毒風疹ウイルス遺伝子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ウイルス遺伝子が検出された (図 4)。

#### 5. 抗風疹 IgM 抗体誘導の解析

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)。

#### 6. CRS 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

風疹ウイルスの胎児感染は、胎盤を介して起こる。このため妊婦の動物モデルには、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。

本研究では、まずカニクイザルの風疹感受性を明らかにするため、風疹抗体およびウイルスの感染を鼻汁 swab や PBMC を用いて確認した。胎児への影響を検討するため、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たところ、17 頭のうち、2 頭よりサル胎児からウイルスが検出された。うち 1 頭は死流産であった。血漿中にはウイルスが不検出のため、感染した PBMC 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。今後も引き続き、調査を継続したい。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、採取した鼻汁 Swab からウイルス遺伝子が検出され、また解剖後、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 IgM 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障害の検討を行ったところ、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、今後は風疹の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

カニクイザルは風疹に対し感受性を持ち、さらに妊娠カニクイザルは、周産期における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

1. Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Intradermal delivery of recombinant vaccinia virus vector DIs induces gut-mucosal immunity. *Scand. J. Immunol.* 72(2):98-105. 2010.

##### 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

2. 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 日－15 日

3. Tomotaka Okamura, Kazuhiro Matsuo, and Yasuhiro, Yasutomi. 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

「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, Sapporo.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願

なし

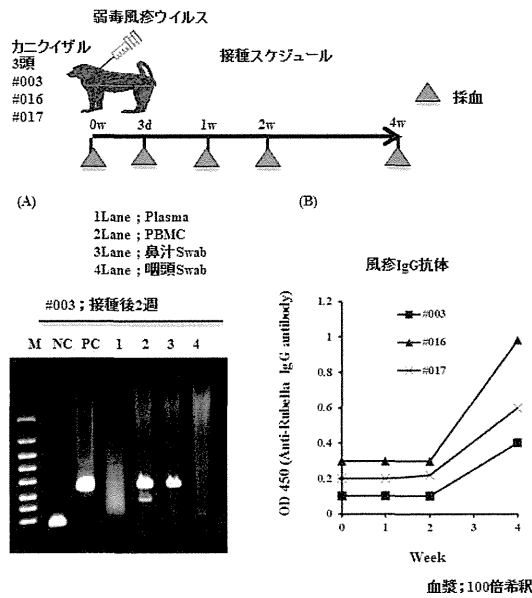


図 1. 弱毒風疹ウイルス接種後のカニクイザルを用いたウイルス遺伝子の検出(A)および免疫応答(B)

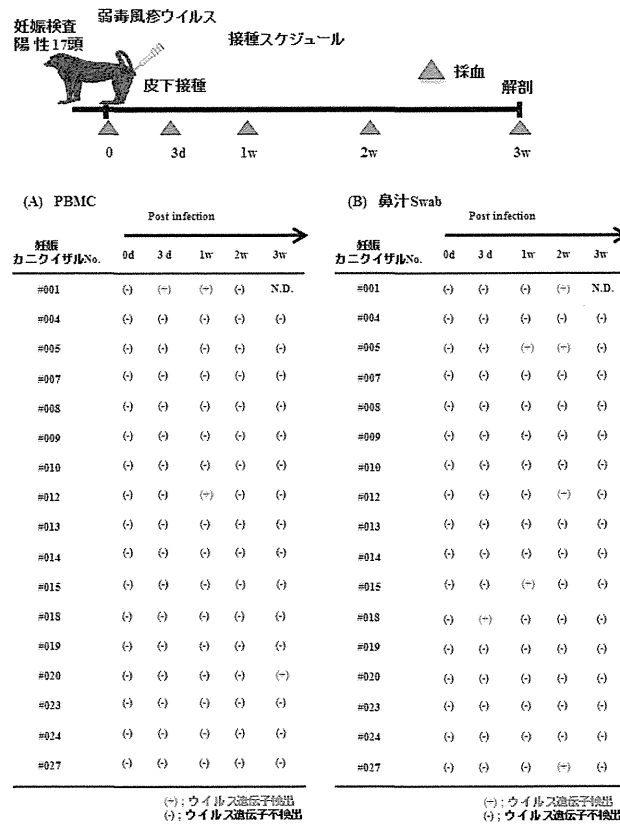


図 2 弱毒風疹ウイルス接種後の妊娠カニクイザル PBMC(A)および鼻汁 Swab(B)を用いたウイルス遺伝子の検出

妊娠 カニクイザルNo.	胎盤	羊水	胎児
#001	(-)	(-)	(-)
#004	(-)	(-)	(-)
#005	(-)	(-)	(-)
#007	(-)	(-)	(-)
#008	(-)	(-)	(-)
#009	(-)	(-)	(-)
#010	(-)	(-)	(-)
#012	(-)	(-)	(-)
#013	(-)	(-)	(-)
#014	(-)	(-)	(-)
#015	(-)	(-)	(-)
#018	(-)	(-)	(-)
#019	(-)	(-)	(-)
#020	(-)	(-)	(-)
#023	(-)	(-)	(-)
#024	(-)	(-)	(-)
#027	(-)	(-)	(-)

(-) : ウイルス遺伝子検出  
(-) : ウイルス遺伝子不検出

図 3. 妊娠カニクイザルにおける弱毒風疹ウイルスの胎児感染の検討

	妊娠カニクイザルNo.																
	#001	#004	#005	#007	#008	#009	#010	#012	#013	#014	#015	#018	#019	#020	#023	#024	#027
肺	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
肝臓	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
脾臓	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
腎臓	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
皮膚	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
下顎リンパ節	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
縦隔リンパ節	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
腋窩リンパ節	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
腸間膜リンパ節	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
鼠径リンパ節	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-) : ウイルス遺伝子検出      (-) : ウイルス遺伝子不検出

図 4. 弱毒風疹ウイルス接種妊娠カニクイザルのウイルス生体内分布

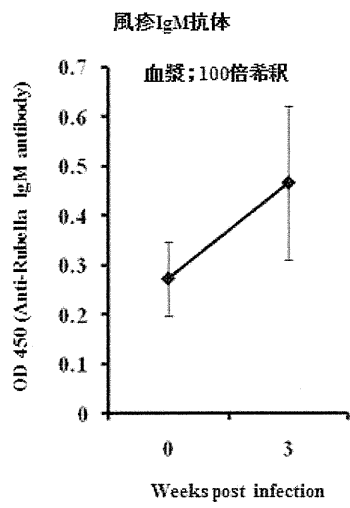


図 5. 弱毒風疹ウイルス接種後の抗風疹免疫誘導

## 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

分担研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 研究リーダー

### 研究要旨

難病研究や創薬に役立つことを目指し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクの整備を進め、繁殖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）の供給体制の確立を始めとして、151 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、生殖工学関連の膨大な技術とデータの蓄積が進み、多くの系統で安定した技術を確立し、実験動物研究資源バンクから長期的安定的に保存・供給できるシステムを開発した。一方、BALB/c など一部の系統では凍結精子の利用が困難で、今後の開発研究が期待される。

### A. 研究目的

医薬基盤研究所疾患モデル小動物研究室では、難病を始めとした疾患研究や創薬への支援を目的に、実験動物研究資源バンクを設立し、疾患モデルマウスを中心に資源の収集・保存・提供・情報発信などを行っている。これらの疾患モデルマウスの中には繁殖が困難なマウスも多く、貴重な研究資源を安定的に供給する体制を整備するためには、病態や繁殖特性に応じた繁殖法の改良が必要である。とくに、本研究では、繁殖が困難な疾患モデルマウスにおいて系統保存法として常用されている体外受精、胚・精子凍結、胚移植による産仔作出という一連の生殖工学技術の開発を行い、良質のマウスの供給体制の整備を行うことを目的とする。本研究によって、実験動物研究資源バンクから各種疾患モデル動物が安定的に供給されることで、創薬研究や難病の治療法開発が推進されるとともに、周産期疾患の解明や不妊治療への応用にも繋がりが、ひいては国民の健康に貢献することが期待される。

初年度は、難病指定の急速進行性糸球体腎炎の唯一のモデルマウスである SCG/ThpNkc マウス（通称 SCG/Kj, SCG）を研究対象とした。その結果、繁殖能力が低い本系統を、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。

次年度と本年度は、引き続き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として、実験動物研究資源バンクで保存・供給を行っている合計 151 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目指した。

### B. 研究方法

#### （1）急速進行性糸球体腎炎モデル SCG マウスの保存・供給体制整備

SCG マウスは、早期に糸球体腎炎及び血管炎を発症する個体がいるために、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。早期に死亡する個体についても状態の良いものは採材した。常法により、各臓器をホルマリン固定、切り出し、パラフィン包埋、薄切の後、H. E. 染色を行い、病理標本作製・病理組織検査を行った。腎臓における半月体形成と血管炎の有無に注目して病理判定を行った。また、常法に従って体外受精や自然交配によって採取した胚を凍結または移植し、産仔の発症状況及び繁殖成績を比較した。

#### （2）各種疾患モデルマウスの体外受精法確立

マウスは、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクに寄託もしくは保護預かりを依頼されたマウス合計 151 系統（次年度 60 系統、本年度 91 系統）を用いた。

体外受精は昨年度同様に次のように行った。同系統の雌マウスに PMSG および hCG により過排卵を誘起し、卵管膨大部より卵子を採取し、HTF 培養液中に導入した。培養はすべて 5% CO<sub>2</sub>、37℃で行った。新鮮精子を用いる場合は、成熟雄 2 匹から精巢上体尾部精子を採取し、HTF 培養液中に別々に加え、1-1.5 時間前培養し、濃度、活力の高い方を体外受精に用いた。前培養した精子懸濁液 3-5 μl を採取した卵子に加えて媒精し、5 時間培養後、KSOM 培養液で 3 回洗浄し、

KSOM 培養液中で翌日まで培養し、2細胞期胚への発生率を体外受精率と見なした。なお、受精率向上のための工夫として、媒精用の HTF ドロップをなるべく平たい形状にすることで、精子が卵子に接近しやすくした。精子凍結保存と融解は、R18S3 による常法により、FERTIUP 精子凍結保存液および FERTIUP 精子前培養培地を用いて行った。融解精子は、1時間前培養後、精子懸濁液 10  $\mu$ l を上記と同様に卵子に加えて媒精し、培養後、2細胞期への発生を観察した。なお、新鮮精子、凍結融解精子の媒精にあたっては、精子の死亡（不動）が多い場合や活力が弱く、濃度が低い場合は、媒精する精子量を適宜増やした。また、媒精後も受精状況を適宜観察し、卵丘細胞が十分に分散せず透明帯に強固に付着していたり、運動精子数が少ないと判断した場合は、その時点でさらに精子懸濁液を追加するなど、各系統マウスに最適化された媒精方法を適応した。

マウス卵管への胚移植は、ソムノペンチル麻酔下に背部の皮膚、筋層を切開し、卵管を露出し、実体顕微鏡下で卵巣嚢を切開し卵管采からマウス胚を移植した。筋層を縫合糸にて縫合し、皮膚切開部を小動物用スキングリップにて閉じた。手術後、麻酔から覚醒するまで、37℃のホットプレート上で保温した。移植胚数が少ない場合は、適宜ダミー胚（毛色で区別できる ICR マウス胚など）を加えて移植した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

## C. 研究結果

### （1）急速進行性糸球体腎炎モデル SCG マウスの保存・供給体制整備

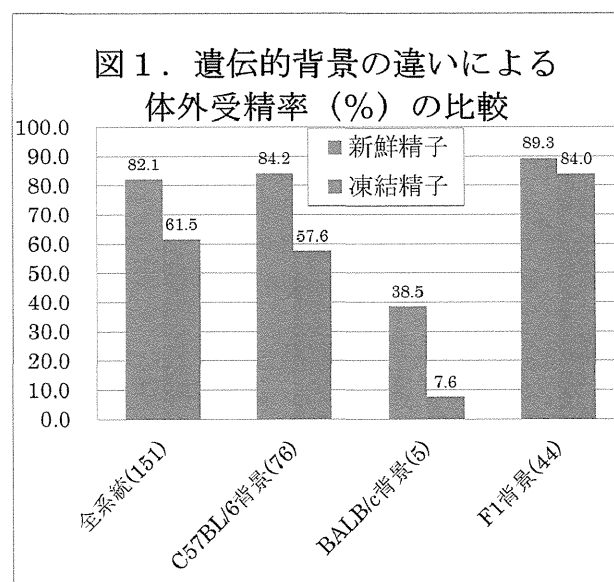
実験動物研究資源バンクへの寄託を受けた SCG 第1世代については、半月体形成率 41.7%（雌雄合計、以下同じ）、血管炎の発症率 66.7%であった。第2世代以降では半月体形成率 45.7%、血管炎発症率 80.0%であり、当研究室の飼育条件においても既報と同様の発症率が維持されていることが確認できた。血管炎については、雌雄差が大きく、雄よりも雌の方が 1.5~2 倍も発症していた。繁殖成績は、第1世代の平均産子数 8.3 匹、離乳率 57.6%、第2世代以降の平均産子数 6.2 匹、離乳率 63.6%で、産子数がやや低下傾向を示した。体外受精によって作出した2細胞期胚の胚凍結-融解-移植については2回行ったが、産子が得られなかった。そこで、自然交配で得られた胚を新鮮なまま、あるいは凍結融解後に移植することを試みたところ、産子が得られた。得られたマウスを交配し、産子を得た後に親の病理診断を行ったが、凍結前と同程度の発症率を得た。上記の結果から、当バンクに

おける SCG マウスの継代維持方法を確立することができ、胚凍結やレシピエント（ICR 等）への移植によっても急速進行性糸球体腎炎モデルとしての特性が保持されていることが分かった。

### （2）各種疾患モデルマウスの体外受精法確立

実験動物研究資源バンクへの寄託もしくは保護預かりを依頼された合計 151 系統の遺伝的背景系統は C57BL/6 が 76 系統 (50.3%) で最も多く、次に F1 関連系統が 44 系統 (29.1%) と多く、BALB/c は 5 系統 (3.3%) であった。全 151 系統において、新鮮精子を用いた場合の体外受精率は平均 82.1%であった。凍結-融解精子を用いた場合は平均 61.5%であり、約 21 ポイントの低下が見られた。C57BL/6 を遺伝的背景に持つ 76 系統においては、新鮮精子を用いた場合の体外受精率は平均 84.2%であり、凍結-融解精子を用いた場合は平均 57.6%であった。これは全体の平均と類似した値であった。一方、BALB/c を遺伝的背景に持つ 2 系統においては、新鮮精子を用いた場合の体外受精率は平均 38.5%であり、凍結-融解精子を用いた場合は平均 7.6%であり、非常に低い値を示した。一方、F1 交雑系を遺伝的背景に持つ 44 系統においては、新鮮精子を用いた場合の体外受精率は平均 89.3%であり、凍結-融解精子を用いた場合は平均 84.0%であり、C57BL/6 系よりも良い成績を示した。（図1. 参照）

胚移植を行った 74 系統のうち、産子を得ることが出来たのは 69 系統 (93.2%) であった。



## D. 考察

SCG マウスの発症は、早い個体では6週齢頃と比較的早期であることから、交配を6週齢という若齢から開始することが系統維持には効果的であった。世代が進むに従い産子数がやや減少傾向を示したが、発症率は維持されており、当バンクにおいて疾患モデルとしての特性を保持しつつ生体で繁殖維持することができた。一方、

体外受精由来胚を用いた場合、胚凍結-融解-移植による産仔作出は、現時点ではこの系統マウスでは困難であり、このマウスに応用可能な最適化された体外受精技術の開発が今後の課題である。また、自然交配由来胚については、とくに胚凍結を行った場合、産仔数が減少し、出産後、里子に付けるなどの工夫が必要なことが多かった。今後、胚凍結法についても更なる改良が必要であろう。実際に実験動物研究資源バンクから分譲する場合は、凍結胚を融解し、胚移植によって得られたマウスを交配させ、この親マウスの発症を確認してから仔マウスを提供することが必要である。従って、他の系統に比べてかなり多くの凍結胚由来の産仔を得て、交配ペアを準備する必要がある。以上のように、今後改良すべき点もあるが、SCG マウスの継代維持方法を確立し、実験動物研究資源バンクからの供給を可能とすることができた。

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクに寄託もしくは保護預かりを依頼されたマウス合計151系統マウスの遺伝的背景系統として特徴的であったのは、C57BL/6 が約半数と多く、さらに、F1 交雑系を遺伝的背景として持つ系統が 29%と比較的多くを占めていた。今回の結果から、F1 交雑系由来の精子は、凍結精子においても新鮮精子の場合とほぼ同等の 9 割近い高い受精率を示した。これは雑種強勢現象が精子の耐凍性に好影響をもたらした可能性が考えられた。

一方、BALB/c を背景とするマウス系統は、例数は少ないものの、特に凍結精子の体外受精率が約 8%と非常に悪かった。今後の改良が待たれる。ただし、実験動物研究資源バンクとして、BALB/c 背景のマウス資源を扱う場合は、新鮮精子を用いた体外受精で 2 細胞期胚を作製し、胚凍結を中心とした資源化を行うことで、効率良く安全に当該マウスの保存を行うことが可能であり、実際にわれわれ基盤研実験動物研究資源バンクでは実践しており成果を挙げている。

体外受精由来の産仔獲得について、胚移植成績は約 93%と非常に高い。これは、体外受精で得られた胚が正常な発生能を持つことを示しており、胚数が少ない場合にはダミー胚を同時移植したり、帝王切開のタイミングに工夫を払うなど多くの技術が各系統に適切に応用されている結果と考えられる。

さまざまな疾患モデルマウスを効率良く資源化し、研究者の要求に応じて迅速に高品質のマウスを分譲することで、難病研究や創薬に役立つことを目指し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクの整備を進めており、今回の結果は、多くの系統では十分に安定した高レベルのマウス保存・供給体制が整備されていることを示している。今後、体外受精率の低い系統については、精子側のみならず、卵子側の要因について

も検討を加え、受精率の改善に向けた技術開発を行う必要がある。以上、体外受精法を応用し、実際に寄託や保護預かりを受けたマウス 151 系統について、各系統に最適化され、安定した技術の確立をめざすとともに、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した。

## E. 結論

難病研究や創薬に役立つことを目指し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクの整備を進め、繁殖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) の供給体制の確立を始めとして、151 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、生殖工学関連の膨大な技術とデータの蓄積が進み、多くの系統で安定した技術を確立し、実験動物研究資源バンクから長期的安定的に保存・供給できるシステムを開発した。一方、BALB/c など一部の系統では凍結精子の利用が困難で、今後の開発研究が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Naka T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. *PLoS One*. 2012;7(5):e37803. Epub 2012 May 25.
- 2) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K. Therapeutic Chaperone Effect of N-Octyl 4-Epi- $\beta$ -Valienamine on Murine GM1-Gangliosidosis. *Mol Genet Metab*. 106:92-98, 2012.
- 3) Akiyama T, Suzuki O, Matsuda J, Aoki F. Dynamic replacement of histone h3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet*. Oct;7(10):e1002279, 2011.
- 4) Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Tsuji S, Matsuda J. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with

- Gal $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 87(8):550-62, 2011.
- 5) Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. J Neurochem. 118(3):399-406, 2011.
  - 6) Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in  $\beta$ -galactosidase deficiency. Hum Mutat. 32(7):843-52, 2011.
  - 7) Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative Western blots. Exp Anim. 60(2):193-6, 2011.
  - 8) Shiozuka C, Taguchi A, Matsuda J, Noguchi Y, Kunieda T, Uchio-Yamada K, Yoshioka H, Hamanaka R, Yano S, Yokoyama S, Mannen K, Kulkarni AB, Furukawa K, Ishii S. Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human  $\{\alpha\}$ 1,4-galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease. J Biochem. 2011 Feb;149(2):161-170.
2. 学会発表
- 1) 坂手龍一、高橋一朗、古江-楠田美保、松田潤一郎、小原有弘、川原信夫、保富康弘、増井徹「厚生労働省：創薬・医学研究用研究資源 - 薬用植物、医学実験用霊長類、遺伝子、培養細胞、実験動物、幹細胞、難病資源 -」第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡
  - 2) 鈴木治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎。「卵巣内 PTEN 関連蛋白質量のマウス系統間比較」第 105 回日本繁殖生物学会、2012 年 9 月 5 日～8 日、つくば
  - 3) 小浦美奈子、斉藤賢一、河合晶子、中野正文、野口洋子、鈴木 治、松田潤一郎「クローズドコロニー ddY マウスの中から発見されたてんかん様の症状を現すマウスについて」第 59 回日本実験動物学会総会、2012 年 5 月 24 日～26 日、別府
  - 4) 小浦美奈子、河相晶子、中野正文、野口洋子、鈴木治、松田潤一郎「創薬・難病研究を支える医薬基盤研究所「実験動物研究資源バンク」」第 59 回日本実験動物学会総会、2012 年 5 月 24 日～26 日、別府
  - 5) 鈴木治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎。PCR によるヘアレスマウスの遺伝子型判定法。第 59 回日本実験動物学会総会、2012 年 5 月 24 日～26 日、別府
  - 6) 増井 徹、保富 康弘、川原 信夫、古江-楠田 美保、松田潤一郎、小原 有弘、高橋 一朗、亀岡 洋祐。厚生労働省：創薬・医学研究用研究資源 - 薬用植物、医学実験用霊長類、遺伝子、培養細胞、実験動物 - 第 34 回日本分子生物学会年会横浜、2011 年 12 月
  - 7) 鈴木 治、小浦 美奈子、野口 洋子、山田-内尾 こずえ、松田潤一郎、拡張型心筋症の動物モデル 2 種 (マウスとハムスター) における心臓カルシニューリンの発現比較、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月
  - 8) 鈴木 治、小浦 美奈子、野口 洋子、山田-内尾 こずえ、松田潤一郎、雄への dehydroepiandrosterone 徐放剤投与がマウス体外受精へ及ぼす影響、第 104 回日本繁殖生物学会大会、盛岡、2011 年 9 月
  - 9) 鈴木 治、小浦 美奈子、野口 洋子、山田-内尾 こずえ、松田潤一郎、シアル酸転移酵素過剰発現マウスの心筋症様心臓における Calreticulin の増加、第 58 回日本実験動物学会総会、東京、2011 年 5 月
  - 10) 増井 徹、保富 康弘、川原 信夫、古江-楠田 美保、松田潤一郎、小原 有弘、高橋 一朗、亀岡 洋祐、厚生労働省：創薬・医学研究用研究資源 - 薬用植物、医学実験用霊長類、遺伝子、培養細胞、実験動物 -。BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) 2010 年 12 月 7～10 日、神戸。
  - 11) 松田潤一郎、疾患モデル動物の現状と問題点。第 8 回医療機器フォーラムー動物実験の最前線ー疾患動物治療を用いる医療機器の有効性、安全性評価。2010 年 10 月 15 日、東京。
  - 12) 小浦美奈子、島かおる、中村和臣、野口洋子、鈴木 治、鈴木和男、亀岡洋祐、松田潤一郎。急速進行性糸球体腎炎モデル SCG/ThpNkc マウスの繁殖及び腎炎の



発症状況について. 第44回日本実験動物技術者協会総会 2010年9月3,4日、旭川.

- 13) 中村和臣, 小浦美奈子, 野口洋子, 鈴木治, 松田潤一郎. BALB/c凍結胚における個体復元率の改善. 第44回日本実験動物技術者協会総会 2010年9月3,4日、旭川.
- 14) 鈴木 治, 小浦美奈子, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎. シリアンハムスター卵巣凍結保存における卵巣サイズの影響. 第103回日本繁殖生物学会総会. 2010年9月2日~4日、十和田.
- 15) Matsuda J. Animal Models of Lysosomal Diseases. Yonago International Symposium: Chaperone Therapy Update. (シャペロン療法国際シンポジウム) July 29, 2010. Yonago.
- 16) 鈴木 治, 小浦美奈子, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎. マウス排卵誘起におけるhCGの血中動態. 第57回日本実験動物学会総会. 2010年5月12日~14日、京都.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

## 研究要旨

体外受精効率の低いマウス系統の存在はマウス増産の深刻な問題である。本研究では各種薬剤を事前に個体に投与することにより体外受精効率を向上させる方法を検討してきた。本研究では、初年度と次年度で徐放性ステロイド剤（Dehydroepiandrosterone、DHEA）の効果を雄、雌双方で検討した。得られた胚の発生効率に向上傾向が見られ、特に低用量で良好であった。3年度目の雄への適用として、精子形成へのサーチェインの効果を期待して Resveratrol 徐放剤を投与してみたところ、低用量で向上傾向が見られた。DHEA や Resveratrol は低用量での適用が期待できる。一方、3年度目の雌への適用として PTEN 阻害剤の一種、bpV(pic)による原始卵胞活性化誘導によって誘起排卵数が増えるかを調べたところ、排卵数に増加傾向が見られたことから、原始卵胞の人為的活性化は誘起排卵数の上昇をもたらす有望な方法だと推察された。このように「採卵・採精前にいわゆる不妊治療をマウスに施す」方法は有効な手段たり得ることが分かった。

## A. 研究目的

動物資源の増産・系統保存には体外受精が汎用されるが、マウスの体外受精による受精率には大きな系統差があり（卵子：Suzuki et al. *Reprod. Fert. Dev.* 1996, 8(6):975-980；精子：Kawai et al., 2006, *J Reprod Dev* 52(4):561-568），低率系統の繁殖は深刻な問題となっている。

低受精率の克服法として、配偶子形成過程および成熟過程で何らかの手を加え、系統差が生じる原因を採卵・採精前に排除できれば、体外受精成績のさらなる向上が期待できると考えられる。しかし、現在のところ低繁殖系統のマウス個体に対し採卵・採精前にいわゆる不妊治療を検討した研究は稀である。

そこで本研究では、ヒト不妊治療を参考に各種薬剤を配偶子採取前に個体に投与することにより、体外受精効率を向上させる方法を検討した。具体的には、ステロイド剤、Sirt1 賦活化剤、そして PTEN 阻害剤の3つの薬物の効果を調べた。

まず繁殖に関わる性ホルモンの増強によってマウスの繁殖効率が高まるかを調べた。具体的には、男性ホルモン testosterone の前駆体として、雌ではさらに女性ホルモン（estrogen,

マウスでは estradiol）に代謝される Dehydroepiandrosterone（DHEA）の徐放性製剤の投与による体外受精効率の向上効果について雄・雌双方で検討した。DHEA は男性用サプリメントとして、また女性の不妊治療薬として用いられる物質であり、効果があるものと思われた。ただし、女性不妊治療に対する効果には賛否両論がある。特に testosterone の卵胞発育への影響には促進／必須であるという意見と閉鎖を促すという意見があるため、この点の解明も目的の一つであった。

次に、近年、精巣におけるサーチェインの重要性が指摘されていることから（McBurney ら *Mol Cell Biol* 23:38-54, 2003; Coussens ら, *PLoS One* 3:e1571, 2008），Sirt1 活性化剤の一種、Resveratrol を雄マウスに事前に投与して精巣内の Sirt1 発現を促すことにより精巣上体精子の体外受精効率の向上が望めるかを検討した。

さらに、雌マウスにおいて性腺刺激ホルモンに低反応の系統の問題に対する解決法を検討した。卵胞発育とホルモン要求の関係から排卵誘起を考えると、卵胞は前胞状卵胞（Preantral follicle)への発育に性腺刺激ホルモンは必要とせず、発育するに従い FSHR が発現して

FSH(PMSG など) に反応する能力を徐々に獲得し、しかるのち卵胞刺激ホルモン (FSH や PMSG など) の投与によって胞状卵胞への発達が促され、黄体化ホルモン (LH や hCG) により排卵が誘起される。すなわち「性腺刺激ホルモンに反応しうる卵胞の数 (= 前胞状卵胞数)」が「排卵誘起で得られる卵子の数」の上限となる。もし前胞状卵胞が全く形成されていなければ、いくら性腺刺激ホルモンを投与しても誘起排卵は生じないということになる。よって、いかにして前胞状卵胞数を確保するかが、効率の良い排卵誘起には必須である。しかし、今までこの視点は全く考慮されてこなかった。近年、原始卵胞の活性化機構が注目されており (Li ら, Proc Natl Acad Sci USA 107: 10280-10284, 2010), Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) が原始卵胞の活性化を抑制的に制御している。本研究では PTEN の阻害剤の一種 Dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate (V) (略称: bpV(pic)) の投与により原始卵胞の活性化を促して前胞状卵胞の増加を促し、その後性腺刺激ホルモンを併用するという新規の排卵誘起法によって誘起排卵数が増加するかを調べた。

## B. 研究方法

### 1) 徐放性ステロイド剤の投与

9 週齢の C57BL/6NCrSlc (B6 系) および 129X1/SvJmsSlc (129X1 系) の雄マウスに DHEA の徐放性製剤 (21 日用, 総量 5 mg, Innovative Research of America), または, プラセボ (Placebo) を頸部皮下にイソ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, Slc:ICR 卵子を用いて体外受精に用いた。

また, 9 週齢の 129X1/SvJmsSlc (129X1 系) の雌マウスに DHEA の徐放性製剤 (21 日用, 総量 0.25, 1.5, および 5 mg), または, 薬物量に対応したプラセボ (Placebo) を頸部皮下にイソフルラン麻酔下で専用の挿入用針にて挿入した。21 日後, これら雌と Slc:ICR 成熟雄を体外受精に用いた。

### 2) Resveratrol 徐放剤の投与

9 週齢の 129X1/SvJmsSlc (129X1 系) の雄マウスに Resveratrol の徐放性製剤 (21 日用, 総量 0.1, 0.5, および 1 mg, Innovative Research of America), または, 薬物量に対応したプラセボ (Placebo) を頸部皮下にイソフルラン麻酔下で専用の挿入用針にて挿入した。21 日後, これら雄マウスを Slc:ICR 雌と共に体外受精に用いた。

### 3) PTEN 抑制剤を併用した過排卵誘起の試み

PTEN 阻害剤として Dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate (V) (略称: bpV(pic)) を用いた。bpV(pic) (Enzo) をリンゲル液に溶解して 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3  $\text{mg}/\text{mL}$  の 3 種の濃度のリンゲル溶解液を調製した。これらを 1 匹当たり 0.1 mL 投与することにより, 1 匹当たり bpV(pic) をそれぞれ 3  $\mu\text{g}$ , 30  $\mu\text{g}$ , 300  $\mu\text{g}$  の 3 種の投与量を設定した。

誘起排卵に低反応な系統として A/J を用い, 3 用量の bpV(pic) 投与群および対照群 (リンゲル液のみ) で注射後の卵巣の変化を経時的に観察した。

予備実験 (詳細は省略) で得られた結果から, 4 つの条件を設定し (図 8), bpV(pic) と性腺刺激ホルモンの併用による誘起排卵への効果を調べた。PMSG を投与する日を 28 日齢の日とし, その前に設定した日付に bpV(pic) を所定の用量投与後, PMSG を投与し, その 48 時間後に hCG を投与後, 得られた卵子の数や Slc:ICR 雄を用いた体外受精での受精率・発生率を体外受精にて確認した (図 9)。

### 4) 体外受精および胚培養

体外受精用精子は採卵約 2 時間前に精巣上体尾部より採取し, TYH 培地 (三菱化学メディアエンス) にて 1~2 時間培養後, パラフィンオイル (Zenith Biotech.) で覆った TYH 培地小滴内へ 150 sperm/ $\mu\text{L}$  の濃度となるように添加した。採卵用雌には PMSG (5 iu) を投与し, 48 時間後に hCG (5 iu) を投与して排卵を誘起した。あらかじめ精子を投入した小滴内へ hCG

投与後約 16 時間に卵管膨大部より卵子を採取した（この時点を経験時刻とした）。約 5 時間後、発生用培地（DHEA の実験では mWM（三菱化学メディアエンス）；Resveratrol および PTEN 阻害剤の実験では KSOM/aa（Zenith Biotech.）+1 mg/mL BSA（Sigma））の小滴に胚を 3 回移すことによって洗浄し、パラフィンオイルを覆った発生用培地の小滴にて媒精後 96 時間まで培養した。

全ての培養は、37°C のインキュベーター内に静置した密閉容器（Modular incubator chamber, Billups-Rothenberg）内にて、5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> の気相下で行った。

媒精後 24 時間の 2 細胞期への発生率を受精率、媒精後 96 時間の胚盤胞期への到達率を体外発生率とした。

#### 5) 血中ステロイド濃度の測定

DHEA 処理後の雌からの採卵時に得た血液から血漿を分離し、各群 6 匹の DHEA, progesterone, testosterone, estradiol の血漿中の濃度を EIA キット（Cayman Chemical）にて測定した。

#### 6) 蛋白質の定量 Western blot 解析

採精時に得た精巣、または採卵時に得た卵巣を使用時まで Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) 内で冷蔵保存した。各実験群当たり 4 匹の精巣または卵巣から個体毎に ReadyPrep™ protein extraction kit (Total Protein 用, Bio-Rad) を用いて蛋白質を抽出し、各種蛋白質の定量 Western blot 解析を行った。抽出した蛋白質 (0.5~1 µg) を 4-12% NuPAGE® Bis-Tris ゲルと NuPAGE® MES SDS ランニングバッファー (Invitrogen) による SDS-PAGE の後、PVDF 膜 (Pall) へ転写し、一次抗体として抗 Sirt1 抗体 (1:10,000, Millipore, ウサギ抗体)、抗 Androgen Receptor (AR) 抗体 (1:10,000, Epitomics, ウサギ抗体) と抗 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (1:50,000, Millipore, マウス抗体) を、二次抗体として Peroxidase ラベル抗ウサギ IgG 抗体 (1:20,000, Vector Laboratories)

および Peroxidase ラベル抗マウス IgG 軽鎖特異的抗体 (1:50,000, Jackson Immunoresearch) を用いて免疫染色を行った。視覚化には化学発光 (ECL plus, GE または Pierce) を用い、CCD カメラ (LAS3000-Multi, Fujifilm) にて発光像を記録し、各バンドの発光強度を測定した (Multigauge ソフトウェア, Fujifilm)。全サンプルを等量混合した液を 4 段階の量でアプラインして検量線を毎回作成し、目的蛋白質と GAPDH のバンドの発光強度から GAPDH を内部標準として目的蛋白質発現量を「目的蛋白質 / GAPDH 比」として求めた（方法については論文発表 (4) を参照）。

#### 7) 統計処理

受精率、体外発生率への効果については角度変換後、供試卵子数で重み付けをした分散分析により検討した。それら以外の数値の有意差については正規性を Shapiro-Wilk 検定で、等分散性を Levene 検定で確認した後、各用量で薬物投与の有無の間の差を分散分析により判定した。p < 0.05 を有意とした。

（倫理面への配慮）

動物を用いた実験は、(独) 医薬基盤研究所の動物実験規定に従い、実験計画の承認を得て実施した (承認番号: DS24-37 および DS24-39)。

### C. 研究結果

#### 1) DHEA の精巣上体精子への影響

DHEA 処理した雄マウスの精巣上体精子を用いた体外受精および胚培養では、B6 系では受精率に、129X1 系では胚盤胞形成率に若干の上昇傾向が見られたが、受精率、体外発生率は両系統とも DHEA 投与の有無の間で有意差はなかった (図 1)。

#### 2) DHEA 処理後の AR 蛋白質の発現比較

精巣における AR 蛋白質量は、DHEA 投与の有無では有意差がなかったが、B6 系マウスの方が 129 系より有意に高かった (図 2)。

#### 3) 雌への DHEA による体外受精と胚発生への