

## 肝腫瘍

MRI を用いた SPIO 造影により、霊長類で初となる腫瘍病変部の抽出に成功し、局在診断が可能であることを示した。また、造影効果による正常組織と腫瘍病巣のコントラストからは腫瘍が低分化の肝臓原発悪性腫瘍である事が示唆され、病理組織学的所見より得られた肝細胞の異型性と浸潤性所見との一致が認められた。これらのことから肝腫瘍個体も有用な霊長類生物資源としての可能性が示唆された。

これら MRI を用いた心電図および呼吸同期撮像による Cine-MRI、また SPIO 投与による造影 MRI が霊長類において樹立されたことで、画像診断を用いた評価系が霊長類疾患モデルを用いた安全性・有効性評価等の各種研究に有用なツールであることが示唆された。

## E. 結論

本研究により、カニクイザル繁殖コロニー内に存在する拡張型心筋症モデルの詳細な解析から、本モデルがヒト病態を忠実に反映し、医科学研究に重要な資源である事が明らかとなった。さらに、肝腫瘍個体の解析を行う事で、新たなモデルとしても可能性が示唆された。さらに、これらの詳細な解析を通して樹立された MRI を用いた画像診断評価系は霊長類資源を用いた研究推進のための重要なツールであると言える。今後はさらなる霊長類循環器疾患モデル等の詳細な解析を通し、霊長類資源の新たな可能性や各種病態と加齢性変化との関連性等を模索したい。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(雑誌)

- 1) 揚山直英、霊長類における循環器疾患モデルの紹介、心電図、33号、S-2-87～S-2-94、2013

(書籍)

- 1) 揚山直英 (分担翻訳)、16章：不整脈と伝導障害の治療、監訳者：金山喜一、鯉江洋、臨床家のための犬猫の心臓病マニュアル、interzoo、2013、336-355

### 2. 学会発表

- 1) 揚山直英、鯉江洋、川嶋晴子、岡林佐知、金山喜一、山海直、保富康宏：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、第60回日本実験動物学会総会、茨城、2013年5月15日-17日
- 2) 伊藤 康世、鯉江洋、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、大野智恵子、金山喜一、保富康宏、揚山直英：再生医療評価系としての霊長類を用いたセルトラッキングシステムの開発、第60回日本実験動物学会総会、茨城、2013年5月15日-17日
- 3) Naoki Saito, Hideto Chono, Hiroaki Shibata, Naohide Ageyama, Yasuhiro Yasutomi, Junichi Mineno, NONHUMAN PRIMATE MODEL FOR HIV-1 GENE THERAPY USING ENDORIBONUCLEASE MazF TRANSDUCED CD4+ T CELLS IN THE PRESENCE OF SHIV 89.6P INFECTION、第19回日本遺伝子治療学会学術集会、岡山、2013年7月4日-6日
- 4) Miyako Igarashi, Naohide Ageyama, Yuko Katakai, Nobuyuki Murakoshi, Yoshiaki Yui, Kenji Kuroki, DonZhu

Xu, Yukio Sekiguchi, Hiroshi Tada, Yasuhiro Yasutomi, Kazutaka Aonuma, A Non-human Primate Model of Atrial Fibrillation with Atrial Electrical and Structural Remodeling using Atrial Tachypacing、第28回日本不整脈学会学術大会、東京、2013年7月4日-6日

特になし  
3. その他  
特になし

- 5) 齊藤尚紀、蝶野英人、柴田宏昭、揚山直英、保富康宏、峰野純一、RNA分解酵素MazFを用いたHIV感染症遺伝子治療法開発－SHIV89.6P感染霊長類モデル－、第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013年11月20日-22日
- 6) Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Haruko Kawashima, Sachi Okabayashi, Yasuyo Ito, Kiichi Kanayama, Tadashi Sankai, Yasuhiro Yasutomi, Age-related Changes in Heart Rate Variability in Nonhuman Primate, 64th AALAS National Meeting, MD, USA, 2013/10/27-31
- 7) Yasuyo Ito, Hiroshi Koie, Hiroaki Shibata, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Chieko Ohno, Kiichi Kanayama, Yasuhiro Yasutomi, Naohide Ageyama, Cell tracking in non-human primates using magnetic resonance imaging, 64th AALAS National Meeting, MD, USA, 2013/10/27-31

#### 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

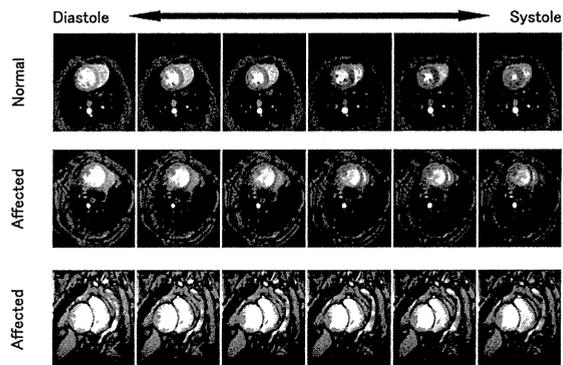


図1

心電図および呼吸同期にて撮像したCine-MRIの画像。

上段の正常個体に較べ中・下段の発症個体はいずれも収縮期にかけての収縮が不全である。

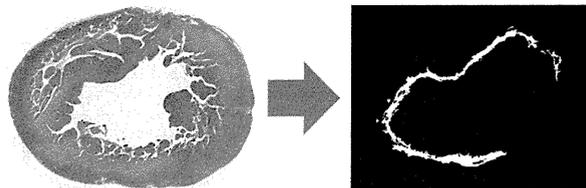


図2

MRI撮像にてびまん性の壁運動低下が認められた個体の病理組織切片。

マッソントリクロム染色にて青色に染色される線維化部分が左心室全周に認められた（左図）。その染色部位を蛍光顕微鏡により線維化領域として抽出し、面積を算出する事に成功した（右図）。



図3

SPIOの造影効果により肝臓短軸のT2強調画像。

腫瘍組織と正常組織のコントラスト増強効果が認められた（白矢印）。肝臓はSPIOを取り込んだクッパー細胞により低信号となるがクッパー細胞を有さない腫瘍組織は高信号となり病巣が抽出される。

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

カニクイザルモデルを用いたウイルス感染症に関する研究

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

エイズワクチン研究においてサルエイズモデルは極めて重要であり、SIV 感染マカク属サルを用いた研究が多数行われている。霊長類医科学研究センターでは、インドネシア、フィリピン、マレーシア産地を把握したカニクイザルの SPF 繁殖コロニーを確立し、良質なカニクイザルの供給体制を整えている。しかし、これまでの報告で原産地別カニクイザルを用いたサル免疫不全ウイルス感染実験の報告は少ない。本研究では産地および系統が明らかな SPF カニクイザルを用いて SIV とカニクイザルの感染系の確立を試みる。SPF カニクイザルに SIVmac239 および SHIV89.6P をそれぞれ静脈内より接種を行ったところ、SIVmac239 に感染したカニクイザルのウイルス量は、Set Point で平均  $1.8 \times 10^6$ /ml であった。CD4+T 細胞は感染初期に大きな変化はなく、接種後 50 週を超えて、減少傾向が認められた。SHIV89.6P に感染したカニクイザルでは、Set Point で平均  $9.4 \times 10^5$ /ml であり、CD4+T 細胞は、接種直後から急激な減少が認められた。組織中の CD4+T 細胞の保存状況を検討するため、接種後 34 週において鼠径リンパ節を解析したところ、SIVmac239 接種群では CD4+T 細胞のわずかな減少が確認されたが、SHIV89.6P 接種群では CD4+T 細胞は喪失していた。これらの結果から、カニクイザルの SIV および SHIV の病態の一部が明らかとなった。

A. 研究目的

エイズワクチンの研究にはインド産アカゲザルを用いた動物実験が行われているが、アカゲザルの系統や産地によって、エイズウイルスに対する反応性が異なることが報告されているため、新たなサルエイズ動物モデルが求められる。

霊長類医科学研究センターでは、SPF 化されたカニクイザルを繁殖し、実験に供給することが可能である。カニクイザルはアカゲザルよりも小型で取り扱い易く、世界中で様々な動物実験に用いられている。しかしながら、エイズウイルスに対する感受性・病原性といった詳細な研究は行われていない。

本研究では、当センターで繁殖育成された産地や系統が明らかになっている SPF カニクイザルを用いて、サル免疫不全ウイル

ス (SIVmac239) およびサルヒト免疫不全ウイルス (SHIV89.6P) の病態を明らかにする。これまでの研究で、カニクイザルに接種する SIVmac239 分子クローンの *in vitro* の解析を終えている。本年度はウイルス接種後のウイルス量や CD4+T 細胞の動態について検討した。

B. 研究方法

1. 接種スケジュール

エイズ病態を明らかにするため、各産地 SPF カニクイザル 10 頭に SIVmac239、5 頭に SHIV89.6P の静脈内接種を行った。ウイルス接種後、ウイルスコピー数、CD4+T 細胞数および免疫学的解析を行った。

2. ウイルスコピー数および CD4+T 細胞数  
ウイルスコピー数は、血漿からウイルス RNA を抽出し、SIVgag 特異的 Primer およ

び probe を用いて Real time PCR を行った。また CD4+T 細胞数の算定には、フローサイトメーターを用いて検討した。

### 3. 組織中における CD4+T 細胞の保存

ウイルス接種後 34 週において鼠径リンパ節を採取し、CD4+T 細胞の保存状況をフローサイトメーターおよび免疫組織学的染色を行い検討した。

### 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. ウイルスコピー数および CD4+T 細胞の動態

SIVmac239 に感染したカニクイザルのウイルス量は、Viral Peak で平均  $6.5 \times 10^7$ /ml、Set Point で平均  $1.8 \times 10^6$ /ml であった。CD4+T 細胞は感染初期に大きな変化はなく、接種後 40 週を超えて、減少傾向が認められた。SHIV89.6P に感染したカニクイザルでは、Viral Peak で平均  $1.8 \times 10^8$ /ml、Set Point で平均  $9.4 \times 10^5$ /ml であり、CD4+T 細胞は、接種直後から急激な減少が認められ、慢性期においてもほぼ喪失していた (図 1A, B)。

### 2. 組織中における CD4+T 細胞の保存

ウイルス接種後、34 週における鼠径リンパ節について Anti-CD4 抗体を用いて免疫組織学的染色を行った。SIV 感染サルでは、やや CD4+T 細胞の減少が認められ、SHIV 感染サルでは、CD4+T 細胞の喪失が確認された (図 2A)。またフローサイトメーターを用いて詳細に解析したところ、非感染サルの CD4+T 細胞 (%) は平均 66.7%、SIV 感染サルの CD4+T 細胞 (%) は平均 42.9%とやや減少が確認された。SHIV 感染サルの CD4+T 細胞 (%) は、平均 1.9%とほぼ喪失していた (図 2B)。

## D. 考察

エイズワクチン研究で用いられるアカゲザルのエイズ動物実験は、世界中で行われている。しかしながらアカゲザルの産地・系統によりウイルスの感受性が異なることが報告されており、アカゲザルに代わるエイズ動物モデルが必要であると考えられる。

カニクイザルは、世界中であらゆる感染症の研究に用いられており、実際にカニクイザルを用いたエイズワクチン研究も行われている。しかし、カニクイザルと SIV の病態に関する詳細な研究は行われてはいない。そのためエイズ動物モデルとして、カニクイザルを用いるならば、SIV の病態ならびにカニクイザルの産地・系統によるウイルス感受性の差異や免疫応答を明らかにするのは極めて重要である。

本研究において、免疫不全ウイルス感染後のカニクイザルの病態が一部明らかとなった。SIVmac239 および SHIV89.6P 感染後のウイルス量は、産地に関係なく高いウイルス血漿を呈した。このウイルス量は、過去に報告されているインド産アカゲザルのウイルス量とほぼ同程度であることが確認された。また SHIV89.6P 接種後、CD4+T 細胞が急激に減少し、血中および組織中において CD4+T 細胞が喪失しているが、現在のところエイズ発症はみられない。経過観察を行い、エイズ発症が確認されれば病態について詳細な解析を行いたいと考えている。さらに今後、ウイルス感染後の免疫応答と病態との関連性について検討していく予定である。

## E. 結論

カニクイザルの SIV 病態が一部、明らかになり、今後エイズワクチン研究の動物モデルとしての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、松尾 和浩、保富 康宏  
：抗酸菌分泌抗原を組み込んだ弱毒エイズ  
ウイルスの霊長類カニクイザルにおける細  
胞性免疫反応の解析 第 61 回日本ウイル  
ス学会 神戸 2013 年 11 月 10 日-12 日

(2) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏  
産地別 SPF カニクイザルを用いたサル免疫  
不全ウイルスのエイズ病態に関する研究  
第 27 回日本エイズ学会 熊本 2013 年 11 月  
20-22 日

「国際」

特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含 む)

特許出願

なし

PTEN 抑制物質投与による霊長類誘起排卵数増加法の基礎的検討

分担研究者：鈴木 治（独）医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 主任研究員

### 研究要旨

動物資源の計画的な増産・系統保存には効率的な誘起排卵法が必須である。私は、これまでにマウスをモデルとして PTEN 阻害剤投与による誘起排卵数増加の可能性を検討してきた。そこで本研究では、投与時期や PTEN 阻害剤の選択、および系統差を検討した。誘起排卵数増加には PMSG と同時に PTEN 阻害剤を投与するのが最も効果的で、前日では作用が弱く、PMSG 投与の翌日など後の時期ではむしろ抑制的であった。一方、PTEN 阻害剤による排卵数増加傾向は系統により異なり、卵巣内 PTEN 蛋白質含量の系統差と関係があると思われた。PTEN 阻害剤は bpV(pic)以外に 4 つの製剤の卵巣への影響を調べたが、bpV(pic)が最も作用が強かった。このように PTEN 阻害剤によるマウスの誘起排卵数の増加は有望だが、投与時期や卵巣内 PTEN 量を配慮する必要があると思われた。霊長類への応用には霊長類卵巣での PTEN 量の調査が必要であろう。

### A. 研究目的

動物資源の計画的な増産・系統保存には排卵誘起（通常、自然排卵数より多い卵子が排卵されるため過剰排卵処理、もしくは過排卵処理と呼ばれる）が汎用されるが、例えばマウスの排卵誘起で得られる卵子数には大きな系統差があり（Suzuki et al. *Reprod. Fert. Dev.* 1996, 8(6):975-980）、低反応マウス系統からの採卵は深刻な問題となっている。

低誘起排卵数の克服法として、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前に排除できれば、誘起排卵効率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個体に対し採卵前にいわゆる「排卵障害治療」を検討した研究は稀である。

そこで私は、ヒト不妊治療を参考に各種薬剤を卵子採取前に雌個体に投与することにより、排卵誘起効率を向上させる方法を検討してきた。近年、原始卵胞の活性化機構が注目され（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ことが明らかとなった。以前、私は PTEN の

阻害剤の一種 Dipotassium bisperoxo (picolinate) oxovanadate (V)（略称：bpV(pic)）の投与後、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可能性をマウスモデルで見いだした。

そこで本研究では、さらに PTEN 阻害剤の至適投与時期や作用の系統差、および卵巣内 PTEN 蛋白質含量との関係についてマウスをモデルとして調べ、PTEN 阻害剤併用による誘起排卵の向上効果とその機序についてさらに詳しく検討した。bpV(pic)以外の PTEN 阻害剤の効果についても調べた。

### B. 研究方法

#### 1) PTEN 阻害剤を併用した過排卵誘起

PTEN 阻害剤として Dipotassium bisperoxo (picolinate) oxovanadate (V)（略称：bpV(pic)）を用いた。bpV(pic)（Enzo）をリンゲル液に溶解した。これまでの研究から 1 匹当たりの bpV(pic)の腹腔内投与量を 30  $\mu$ g に設定した。

投与時期について 3 条件を設定し（図 1）、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、設定した日付に bpV(pic)を腹腔内投与した。PMSG 投与後、その 48 時

間後に hCG を投与し、更に約 16 時間後、パラフィンオイル (Zenith Biotech.) で覆った TYH 培地 (三菱化学メディエンス) 小滴内へ卵管膨大部より卵子卵丘細胞複合体を採取し、ヒアルロニダーゼ処理 (300 iu/mL, Sigma) により卵丘細胞を分散させ、卵子数を記録した。

#### 2) 誘起排卵に対する bpV(pic)作用の系統比較

A/J マウスと同様に、C57BL/6N, ICR, DBA/2, C3H/HeJ について、PMSG と同時に 30  $\mu$ g の bpV(pic)を腹腔内投与する群と対照群としてリンゲル液のみを腹腔内投与する群を設定し、誘起排卵数への bpV(pic)投与の影響を調べた (図 2)。

#### 3) 蛋白質の定量 Western blot 解析

卵巣を測定時まで Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) 内で冷蔵保存した。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 (約 0.3  $\mu$ g)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 PTEN 抗体 (1 : 10,000, CST, ウサギ抗体) または抗 Müllerian Inhibiting substance (MIS, anti-Müllerian hormone, AMH と呼ばれる) 抗体 (1:10,000, Santa Cruz, ヤギ抗体) と抗 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (1:50,000, Millipore, マウス抗体) を、二次抗体 (Jackson Immunoresearch) として Peroxidase ラベル抗ウサギ IgG 抗体もしくは抗ヤギ抗体 (1:20,000) および Peroxidase ラベル抗マウス IgG 軽鎖特異的抗体 (1:50,000) を用いて免疫染色を行った。視覚化には化学発光 (ECL plus, GE もしくは 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 段階の量でアブライ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 (検量線作成法については Exp Anim 60(2): 193-196, 2011 を参照)。

#### 4) 卵巣 PTEN 蛋白質含量の系統間比較

4 系統の 4 週齢の雌マウスより得た卵巣の PTEN 蛋白質含量の系統間比較を行った (図 3A)。さらに PTEN 阻害剤の作用との相関について検討した (図 3B)。

#### 5) PTEN 阻害剤の検討

bpV(pic)以外の PTEN 阻害剤 4 種について卵巣への効果の有無を検討した (Hydroxy(oxo)vanadium 3-hydroxypyridine-2-carboxylic acid trihydrate, **VO-HOpic**, Sigma; Potassium bisperoxo(bipyridine)oxovanadate (V), **bpV(bipy)**, Merck; Potassium bisperoxo(1,10-phenanthroline)oxovanadate (V), **bpV(phen)**, Merck; Dipotassium bisperoxo(5-hydroxypyridine-2-carboxyl)oxovanadate (V), **bpV(HOpic)**, Merck)。各 PTEN 阻害剤について 2 用量の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。すなわち、28 日齢の A/J マウス 10~11 匹に各種 PTEN 阻害剤を腹腔内投与し、毎日 2 匹ずつ (一部 3 匹)、1~4 日目に卵巣を採取し、卵巣体重比 (図 4) および卵巣 MIS 蛋白質含量 (図 5) を比較した。

#### 6) 統計処理

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。正規性、もしくは等分散性が保証されない場合は Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks にて検定した。相関については線形回帰分散分析を行った。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: DS25-44)。

### C. 研究結果

#### 1) bpV(pic)の投与時期と排卵数

bpV(pic)は、A/J マウスにおいて PMSG 投与と同時に打つと排卵数が増加する傾向が見られた ( $p=0.075$ , 図 1A)。一方、PMSG 投与の翌日、もしくは 2 日後(hCG 投与日)に bpV(pic)を投与すると排卵数を抑える傾向が見られた(図 1B)。

#### 2) bpV(pic)投与による排卵数増加の系統差

A/J, C57BL/6N, ICR では bpV(pic)投与群のほうが対照群に比べ排卵数が多い傾向があったが、DBA/2 では変化せず、C3H/HeJ ではむしろ排卵数が抑制される傾向があった(図 2)。

#### 3) 卵巣 PTEN 含量と bpV(pic)の作用との関係

4 系統の卵巣内 PTEN 蛋白質含量には系統差が有り(特に A/J と C3H/HeJ 間で有意, 図 3A), PTEN 含量と bpV(pic)による排卵数増加率 ([bpV(pic)群の平均排卵数]/[対照群の平均排卵数]) とには正の相関の傾向 ( $p=0.052$ , 図 3B)が見られた。

#### 4) 他の PTEN 阻害剤の効果

bpV(pic)以外に購入可能な 4 つの PTEN 阻害剤について、卵巣体重比(図 4)や卵巣内 MIS 含量(図 5)への影響を調べたが、bpV(pic)と同様の影響がある薬剤はなかった(bpV(pic)の結果は省略)。

### D. 考察

本研究では、PTEN 阻害剤 bpV(pic)による誘起排卵数増加効果の時期特異性、および系統差、さらに他の PTEN 阻害剤の効果について検討した。

雌個体への PTEN 阻害剤 bpV(pic)投与には時期特異性が見られた(図 1)。特に PMSG 投

与と同日に打つと排卵数の上昇を来す有望な方法だと考えられた。しかし、PTEN が抑制されていればよいという訳ではなく、PMSG 投与後ではむしろ PTEN の抑制は排卵数低下を招いた。このことは、排卵数増加には PI3K 経路の活性化の後、再び PTEN などにより抑制されることが重要であると思われた。

PTEN の排卵数決定への関与はマウス一般に当てはまるはず、すなわち、A/J で見られた排卵数増加効果は他の系統でも見られるはずと考えていたが、実は系統により異なっていた。このことは排卵数決定機構には、今までに知られていない複雑な制御機構が存在することを示唆している。今後の研究課題となる。

本研究では bpV(pic)より良い PTEN 阻害剤は見つからなかったが、A/J でしか調べていないので、系統差があることを鑑みると系統との組み合わせで判断すべきものと思われる。この点については本研究では十分な検討は出来なかった。

このように PTEN 阻害剤は系統依存的ではあるが、有望なマウス過排卵の促進剤たり得ることがわかった。特に排卵数の決定に PTEN が時期特異的に、かつ、様々な程度に関わるという新たな知見が得られたことから、PTEN 阻害剤の活用には、こうした PTEN の関与の違いがどのように排卵数の決定に関わるのか、これを支配する分子は何かを探求する必要があると思われる。また、マウス以外でも卵巣 PTEN 含量の高い個体であれば PTEN 阻害剤の効果期待できると考えられる。PTEN 阻害剤による誘起排卵数増加を霊長類に応用するには、霊長類の卵巣における PTEN 含量の調査が必要と思われた。

### E. 結論

本研究の結果から雌マウス個体への PTEN 阻害剤は性腺刺激ホルモンによる誘起排卵数を増加させる有望な方法であるが、系統差があり、卵巣 PTEN 含量に依存することがわかった。PTEN 阻害剤による霊長類での誘起排卵

数増加が期待できるかを推定するには、霊長類卵巣の PTEN 含量の調査が必要であろう。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Iwata, Y., Ohtake, H., **Suzuki, O.**, Matsuda, J., Komamura, K., and Wakabayashi, S. (2013) Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 99(4): 760-768.
2. **Suzuki, O.**, Koura, M., Noguchi, Y., Uchio-Yamada, K., and Matsuda, J. (2013) Zygosity determination in hairless mice by PCR based on *Hr<sup>hr</sup>* gene analysis. *Exp Anim* 62(3): 267-273.

### 2) 学会発表

1. **Suzuki, O.** Search for plasma biomarkers for dilated cardiomyopathy using a mouse model with sialyltransferase transgenes. *Experimental Biology* 2013. 平成 25 年 4 月 20 日～24 日. Boston, MA, USA
2. **鈴木治**. 遺伝子導入による心筋症疾患モデルマウスの解析手技. *BIOtech* 2013. 平成 25 年 5 月 8 日～10 日. 東京
3. **鈴木治**, 小浦美奈子, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎. マウス精巣上体精の受精能に及ぼす resveratrol の効果. 第 60 回日本実験動物学会総会. 平成 25 年 5 月 15 日～17 日. つくば
4. 小浦美奈子, 河相晶子, 中野正文, 小川純輝, 野口洋子, **鈴木治**, 松田潤一郎. 創薬支援をめざす医薬基盤研究所「実験動物研究資源バンク」の活動状況. 第 60 回日本実験動物学会総会. 平成 25 年 5 月 15 日～17 日. つくば
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. PTEN 阻害剤によ

- るマウス誘起排卵効率化の試み. 第 64 回日本卵子学会. 平成 25 年 5 月 25 日～26 日. 東京
6. **Suzuki, O.** Attempt to Enhance Superovulation Efficiency in Mice with a PTEN Inhibitor. *ENDO* 2013. 平成 25 年 6 月 15 日～18 日. San Francisco, CA, USA
  7. **鈴木治**. PTEN 抑制剤投与によるマウス卵巣の組織学的変化. 第 106 回日本繁殖生物学会大会. 平成 25 年 9 月 12 日～14 日. 府中
  8. **Suzuki, O.** Effect of Resveratrol Treatment on in vitro Fertilizability of Mouse Epididymal Sperm. 64th AALAS National Meeting. 平成 25 年 10 月 27 日～31 日. Baltimore, MD, USA
  9. 錦織充広, 八木寛陽, 望月明和, 佐々木一樹, 岩田裕子, 若林繁夫, **鈴木治**, 松田潤一郎, 南野直人. 拡張型心筋症モデルマウスのプロテオーム解析に基づく疾患発症メカニズムの解明. 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会総会. 平成 25 年 11 月 22 日～23 日. 豊中
  10. **鈴木治**. 拡張型心筋症の血中バイオマーカー候補としての 3 型エノラーゼ. 第 36 回日本分子生物学会年会. 平成 25 年 12 月 3 日～6 日. 神戸
  11. **Suzuki, O.** Enhanced superovulation in A/J mice by the PTEN inhibitor bpV(pic) and gonadotropins. 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 平成 25 年 12 月 14 日～18 日. New Orleans, LA, USA
  12. **Suzuki, O.** Superovulation in A/J mice using a combination of gonadotropins and the PTEN inhibitor bpV(pic). 2014 IETS Annual Conference. 平成 26 年 1 月 11 日～14 日. Reno, NV, USA
  13. **Suzuki, O.** The PTEN Inhibitor, bpV(pic), may Enhance Superovulation in Mice. AAAS 2014 Annual Meeting. 平成 26 年 2 月 13 日～17 日. Chicago, IL, USA

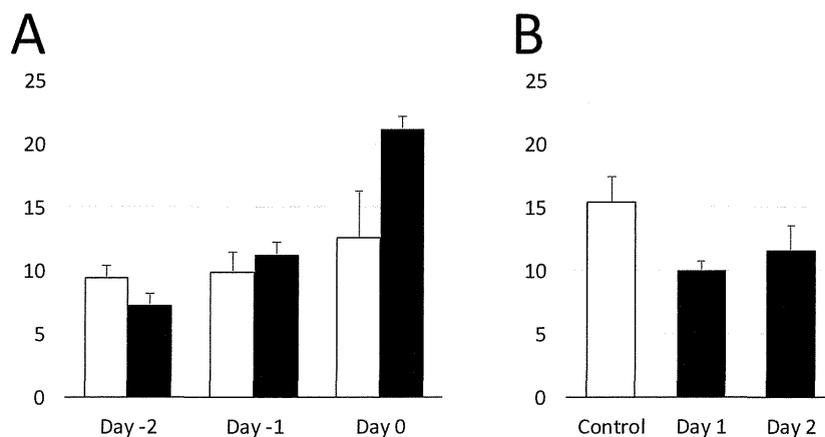


図 1. bpV(pic)を併用した過排卵誘起。各実験群の排卵数の平均±標準誤差 (n=5)を示す。A) bpV(pic)もしくはリンゲル液のみをPMSG投与2日前 (Day -2), 前日 (Day -1) および当日 (Day 0) に投与した場合, 対照群 (□) に比べ bpV(pic)投与群 (■) で排卵数が多い傾向, すなわち, 排卵数の増加傾向が見られた (Day -2, Day -1 は過去データ)。B) PMSG 投与後, 翌日 (Day 1) と2日目 (hCG 投与日と同じ, Day 2) に bpV(pic)を投与すると (■) 未投与群 (□) に比べ排卵数が少ない傾向が見られた。すなわち, PMSG 投与後の PTEN 阻害剤投与は排卵数を抑制する傾向があることがわかった。

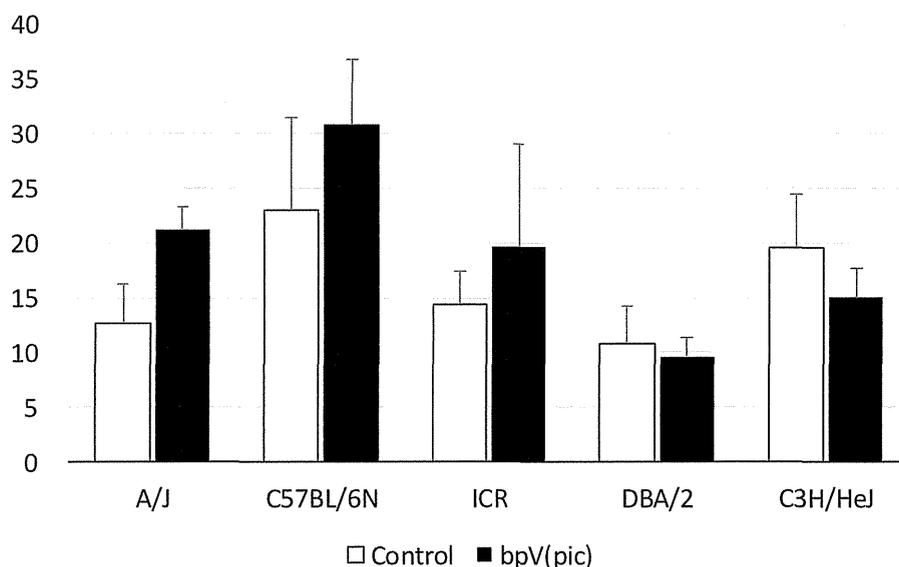


図 2. マウス 5 系統における bpV(pic)を併用した誘起排卵数 (平均±標準誤差, n=5)。A/J は図 1 の Day 0 の結果を転記したものである。対照群 (□) に比べ bpV(pic)投与群 (■) に比べ, A/J, C57BL/6N, ICR については上昇傾向, DBA/2 では変わらず, C3H/HeJ ではむしろ抑制されることがわかった。このように bpV(pic)の誘起排卵数への影響には系統差があることがわかった。

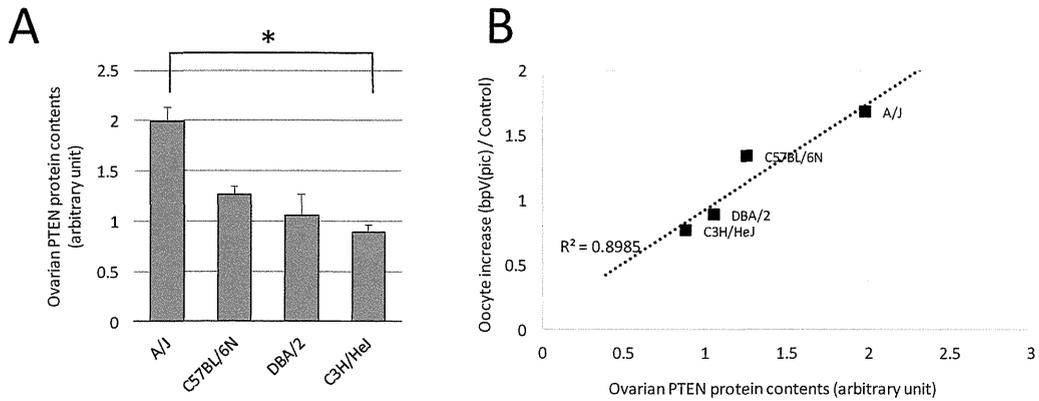


図3. 卵巣内 PTEN 蛋白質含量と PTEN 阻害剤の誘起排卵効率向上効果の関係。A) 4 系統の卵巣内 PTEN 蛋白質含量には系統差が見られた (A/J と C3H/HeJ の間で有意差有り)。B) PTEN 含量と bpV(pic)による排卵数増加率 ([bpV(pic)群の平均排卵数]/[対照群の平均排卵数]) とには正の相関の傾向 (線形回帰,  $p=0.052$ ) が見られた。PTEN の排卵数決定機構への寄与には系統差があることがわかった。

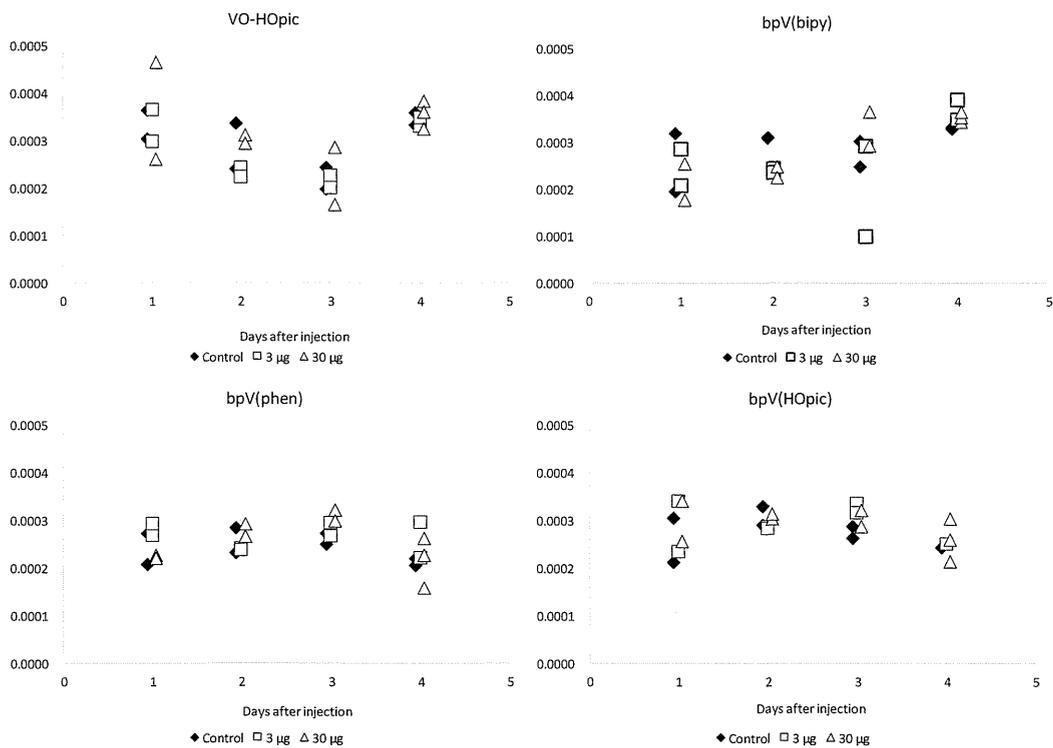


図4. PTEN 阻害剤4種投与後の卵巣重量体重比 (n=2, 一部 n=3, 個々のデータを表示)。各種 PTEN 阻害剤またはリンゲル液 (対照) を 28 日齢 A/J 系雌マウスに投与後 (Day 0), Day 1 から Day 4 まで毎日 2 匹毎 (一部 3 匹) に卵巣を採取して秤量し, 体重を測定した。対照群 (◆, リンゲル液のみ) に比べ, どの PTEN 阻害剤投与群 (□ : 3 µg/head ; △ : 30 µg/head)でも差はあまり無かった。

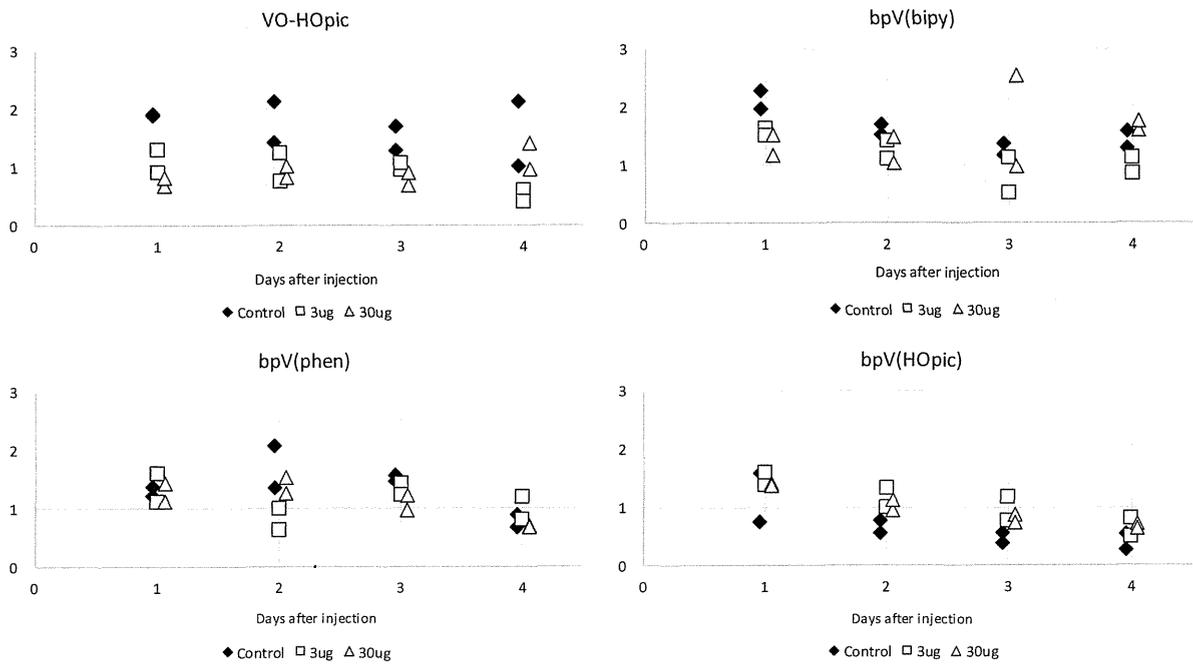


図 5. PTEN 阻害剤 4 種の投与後の卵巣 Müllerian inhibiting substance (MIS) 蛋白質量の変化 (GAPDH を内部標準とした arbitrary unit ; n=2, 個々のデータを表示)。MIS の量は発育卵胞数の尺度と言われており, 原始卵胞の活性化の指標と見ることが出来る。しかし, 対照群 (◆, リンゲル液のみ) に比べ, どの PTEN 阻害剤投与群 (□ : 3  $\mu$ g/head ; △ : 30  $\mu$ g/head) でも差はあまり無かった。

## 医科学研究に重要な霊長類資源の繁殖・育成と疾患モデルの作製・解析 カニクイザル MHC class-Iのタイピング解析

分担研究者 高橋一朗 (医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部)

### 研究要旨

感染症を引き起こすウイルス感染に対して感受性があるか或いは抵抗性かは、MHC の class I が重要な働きを持っていると考えられている。そこで基盤研霊長類センターで飼育管理されているカニクイザル個体より作成された株化 B 細胞株で MHC class I A ローカス、B ローカスからの発現しているタイプを調べウイルス感染との相関を調べた。

カニクイザル 8 個体より作成された B 細胞株で発現している MHC class I について A ローカスおよび B ローカス特異的なプライマーで増幅しクローニングしてシーケンス法で同定した。それぞれ 20 クローン以上クローニングしたクローンをとりシーケンスし、カニクイザル MHC データベースと比較し発現しているクローンを同定した。

### A. 研究目的

霊長類センターで飼育管理しているカニクイザルコロニーの遺伝学的解析を行うことにより、コロニーの特色を把握し実験用カニクイザルの高度化を図り資源としての価値を高める。またヒトの疾病モデルとしてカニクイザルを使用するための基礎データとして、MHC 遺伝子の発現情報を蓄積する。

アカゲザルでの MHC class-I のタイピングおよびゲノム解析した結果の整備がすすんでいるが、カニクイザルについては、体系的に進んでいない。そこで感染症に対する防御を担っている MHC class I を調べることで、実験動物のカニクイザルの資源の高度化を図ることを目的とする。

### B. 研究方法

カニクイザル個体より採血された血液より B 細胞を株化した細胞を作製した。

カニクイザル B 細胞株については SIV 感染前に作成され、作製後に SIV 感染実験を行い感染の成立、感染の非成立が行われた。これら B 細胞株 8 株より遺伝子発現している RNA を抽出し MHC type I 特異的なプライマーで PCR 増幅後クローニングし約 20 クローンをシーケンスして塩基配列を MHC データベースで検索し比較した。

### C. 研究結果

カニクイザル 8 頭より作製された不死化 B 細胞株より発現している MHC class I 遺伝子をクローニングしてクローンをとり、それ

ぞれ塩基配列を決定した。各個体の B 細胞株からそれぞれ A ローカス、B ローカス 20 数個のクローンをシーケンスしたが、解析できたのが、表の数字である。それをそれぞれカニクイザル MHC のデータベースと比較して対応するクローンを同定した。取れてくるクローンと発現しているクローンが同じ(クローニング効率がどれも同じ)と仮定すると単一なものしか発現していないもの、2クローンが発現しているもの主要なものが 1 個でマイナーなものが発現しているものなど、個体によりまちまちであった。B 細胞株より発現している MHC class I A ローカス、B ローカスは、複数発現しており、これらの塩基配列を決定し、クラスタ解析を行った。SIV ウィルス感染抵抗性個体と感染感受性個体との MHC クラス I の特異的なタイプは特定できなかった。ただし近縁のアカゲザルの報告から抵抗性を付与すると考えられる分子の発現がみられる個体があった。

#### D. 考察

霊長類の実験動物として最もポピュラーであるカニクイザルについて、MHC のタイピングは非常に重要な情報であるが個体で発現している MHC の情報はクローンの塩基配列情報の登録は多くなされているが、その MHC 分子の発現により知られている感染症ウィルス感染に対して感受性かあるいは抵抗性かは報告がない。これについては多く

の個体で発現している MHC を解析し感染抵抗性の固体の数を増やして解析する必要がある。

それとともに複数のアレルの関与も考えられ 2 個体からの結果からは判定できないが、少なくとも 2 個体では違うアレルが働いていると思われる。

またアカゲザルで感染抵抗性を付与すると報告のある Mamu-B\*07:04 と相同性のある、Mafa-B\*017:01 の発現が確認されたが、個体では感染が成立していた。

#### E. 結論

MHC class I 抗原は感染症の抵抗性を付与することが知られており、あらかじめ抵抗性を付与する MHC class I 分子の発現を調べることができたとしたら実験動物としてのカニクイザル資源の高度化に役立つと考えられる。ただし MHC 分子の発現のデータの蓄積と解析が必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし。

個体	A locus		B locus	
#051	Mafa-A1*087:01	6	Mafa-B*137:01	5
	Mafa-A1*054:01	1	Mafa-B*010:01	4
	Mafa-A1*001:03	1	Mafa-B*109:03	1
			Mafa-B*019:03	1
#054	Mafa-A1*003:01	4	Mafa-B*140:01	7
	Mafa-A1*010:02:01	3	Mafa-B*004:03	3
	Mafa-A1*001:03	1	Mafa-B*141:01	1
			Mafa-B*143:01	1
#017	Mafa-A1*008:02	4	Mafa-B*095:01	7
	Mafa-A1*052:02	4	Mafa-B*033:02	3
			Mafa-B*116:01	2
			Mafa-B*050:02	1
			Mafa-B*017:01	1
			Mafa-B*157:01	1
#002	Mafa-A1*100:01	4	Mafa-B*007:01:01	6
	Mafa-A1*007:02	2	Mafa-B*118:01	3
	Mafa-A1*003:02	2	Mafa-B*098:02	1
	Mafa-A1*001:03	2	Mafa-B*030:03:02	1
	Mafa-A1*002:01:02	1	Mafa-B11L*01:04	1
#014	Mafa-A1*052:02	6	Mafa-B*068:02	9
	Mafa-A1*008:02	6	Mafa-B*157:01	4
			Mafa-B*116:01	1
			Mafa-B*144:02	1
#023	Mafa-A1*076:01	12	Mafa-B*018:01:02	7
	Mafa-A1*066:02	3	Mafa-B*068:02	5
	Mafa-A1*070:01	1	Mafa-B*015:01	4
			Mafa-B*019:01	2
			Mafa-B*050:02	2
#024	Mafa-A1*009:01	12	Mafa-B*090:01	5
	Mafa-A1*040:02	1	Mafa-B*144:02	3
			Mafa-B*069:02	3
			Mafa-B*011:01	2
			Mafa-B*098:06	2
			Mafa-B*137:01	1
#28	Mafa-A1*087:01	14	Mafa-B*010:01	8
			Mafa-B*045:02	2

図: MHC class I 遺伝子 A ローカス、B ローカスの発現パターン

# 研究成果の刊行に関する一覧表

(平成25年度)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
揚山直英	16章：不整脈と 伝導障害の治療	金山喜一	臨床家のための 犬猫の心臓病マ ニュアル	interzoo	日本	2013	336-355

# 16章：不整脈と伝導障害の治療

## 不整脈治療について

不整脈は正常な洞調律からの心拍リズムの変化と定義される。良性で臨床的に重要ではなく特別な治療は不要である不整脈もあれば、逆に失神や心不全や突然死につながる悪性の不整脈（心室細動等）のような重度な臨床症状を引き起こす不整脈もある。本章では、不整脈管理のための治療方法について論じる。

### 総論

抗不整脈薬は、通常、その特異的な電気生理学的性質により心臓の2つの領域を標的としている。

●洞房結節および房室（AV）結節：脱分極はカルシウムチャンネルによって稼働している。洞房結節、房室結節が起源となる不整脈治療には、カルシウムチャンネル拮抗薬（CCBs）と $\beta$ 遮断薬（BBs）が優先して使用される。不整脈の治療薬として通常最も処方されるカルシウムチャンネル拮抗薬はジルチアゼム（経口投与と静脈内投与が可能）である。 $\beta$ 1選択性 $\beta$ 遮断薬であるテノロールとエスモロール（静脈内投与のみ）は、最も頻繁に抗不整脈薬 $\beta$ 遮断薬として使用されている。ジゴキシンは迷走神経作用効果があり、その結果、間接的に房室結節の伝導時間を延長する。それら抗不整脈薬の適応は心房細動（AF）の治療に限定される。薬剤の投与量はTable16-1とTable16-2を参照さ

りたい。

●心房または心室の心筋：脱分極はナトリウムチャンネル依存性で再分極はカリウムチャンネルに支配されている。心房や心室の心筋が起源である不整脈治療にはナトリウムチャンネル遮断薬（NCB）、カリウムチャンネル遮断薬（KCB）、またはそれらを組合せたものが通常 $\beta$ 遮断薬とともに使用される。犬における不整脈治療のナトリウムチャンネル遮断薬としては、リドカイン（静脈内投与のみ）、メキシレチン、まれにプロカインアミドが使用される。最も重要なカリウムチャンネル遮断薬はソタロールで、 $\beta$ 遮断薬作用ももち合わせている。また、著者らは優れたカリウムチャンネル遮断薬であるアミオダロンを主に使用するが、こちらは強力なナトリウムチャンネル遮断薬や若干のカルシウムチャンネル拮抗薬、 $\beta$ 遮断薬活性も併せもっている。薬剤の投与量はTable16-1とTable16-2を参照されたい。

主な不整脈の適切な長期間管理のためには、心電図（ECG）に加えて24時間ホルター記録が必要となる。不整脈の正しい診断は院内の短期ECG記録で得られることがあるかもしれないが、断続的な不整脈動物の場合、24時間ホルター記録が確定診断を行うために必要とされる。

どのようにまたはいつ不整脈の治療をするかについての確定は、臨床症状と処置の緊急性にもとづく。24時間ホルター記録が得られる前に静脈内投与の

Table16-1 心拍数のコントロール/犬の上室性不整脈で使用する薬剤

薬 剤	経口投与	静脈内投与	適応症
ジルチアゼムXR (Dilacor)	3.0~4.0mg/kg、BID	—	AF、AFL、 AT、OAVRT
ジルチアゼム (Cardizem)	0.5mg/kg、TID、増量可能（上 限1.5~2.0mg/kg、TID）	0.1~0.2mg/kg、急速投与、そ の後CRI、2.0~6.0 $\mu$ g/kg/分	急性AF、AFL、 OAVRT
アテノロール (Tenormin)	0.25~1.0mg/kg、SIDあるいは BID	—	AFL、AT、 OAVRT
エスモロール (Brevibloc)	—	50~100 $\mu$ g/kg、急速投与（反 復投与、総量500 $\mu$ g/kgまで）、 50~200 $\mu$ g/kg/分	急性AF、AFL、 ATまたはOAVRT
ソタロール (Betapace)	1.0~2.5mg/kg、BID	—	AF、AFL、AT
ジゴキシン (Lanoxin)	0.003~0.005mg/kg、BID、小さ い犬には混濁液が利用可能。 ドーベルマンには最大投与 量：0.25mg、BID	—	AF
プロカインアミド (Procain)	—	10~15mg/kg、2分以上かけて 緩徐にIV、必要に応じてCRI、 25~50 $\mu$ g/kg/分で開始	AT
アミオダロン (Cordarone)	10mg/kg、BIDを1週間（負荷 投与量）*、5.0mg/kg、SID（維 持量）*	—	AF、AT
リドカイン	—	2.0mg/kg、急速投与、必要に応 じて反復投与	麻薬が原因のAF

\*獣医学領域での推奨投与量は確立されておらず可変的。

AF：心房細動、AFL：心房粗動、AT：心房頻拍、BID：1日2回投与、CRI：持続定量点滴、OAVRT：順方向性房室回帰性頻拍、SID：1日1回投与、TID：1日3回投与

薬剤を使用する緊急管理が必要となるかもしれない。過急性な上室性不整脈の緊急治療にはジルチアゼムとエスモロールのいずれも静脈内投与用薬物として処方が可能である。リドカインは致死的な心室性不整脈に使われる最も重要な静脈内投与用薬物である。

- 24時間ホルター記録の有利な点は、不整脈の量や質の徹底した評価も可能なことである。次のパラメータが検査すべきものである。(1) 全体的な脈拍と比較して異常な脈拍（上室性か心室性あるいはその両方）の間隔と異常な脈拍が起こる率。(2) 中断の長さや存在だけでなく、毎日1時間

毎の心拍数の平均値が120回より多いか50回より少ないときの総計時間。(3) 飼い主または病院スタッフによって睡眠および覚醒時に記録された失神や極度の不安状態、息切れのような状態は、ホルター上の心電図変化と臨床症状を関連づけるのに役立つ。これらのパラメータは動物の不整脈の基礎的評価として極めて重要であり、抗不整脈治療に必須である。

- 治療を始めるなら、薬剤が異常な調律を抑制する効果があるか、あるいは、催不整脈作用によって有害なリズムを引き起こし、心室性不整脈や過休