

201407033A

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 (H25-創薬-指定-009)

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

平成26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27年(2015)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 (H25-創薬-指定-009)

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

平成26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27年(2015)年3月

目 次

I. 総括研究報告

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

保富 康宏 ----- 1

II. 分担研究報告

1. ワクチン開発における霊長類を用いた基盤技術の開発

保富 康宏 ----- 3

2. 霊長類由来研究資源の保存技術の高度化

山海 直 ----- 7

3. カニクイザルのホルモン解析による繁殖技術の確立

下澤 律浩 ----- 12

4. 霊長類循環器疾患モデルの解析に関する研究

揚山 直英 ----- 16

5. 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

岡村 智崇 ----- 25

6. 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

鈴木 治 ----- 30

7. カニクイザルの MHC class-I の発現解析

高橋 一朗 ----- 38

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 43

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

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

研究代表者 保富康宏

独立行政法人 医薬基盤研究所 センター長

医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターは我が国で唯一の医科学研究を目的とした霊長類センターであり、さらに 1,500 頭以上のカニクイザル系統を維持し SPF 化している世界で唯一の機関である。本研究では霊長類医科学研究センターのカニクイザルコロニーに対して、実験動物として創薬につながる霊長類資源の繁殖技術の向上、動物資源の高度化、および疾患モデルを検討し、医科学研究の基盤の構築を行った。また、それに関わる繁殖技術の向上に向けマウスでの PTEN も試みた。カニクイザル資源に関わるものとしては受精卵の保存技術の開発と受精卵の質的評価法を樹立した。繁殖技術の開発においてはホルモン測定による排卵日の確定法を取り入れた。さらにカニクイザルの生物資源の高度化として MHC の測定も行った。これらに加え疾患モデルの作製と解析においては循環器疾患に対し重要な測定項目である血液ガスの標準値を作製した。また、感染症研究において呼吸器での感染における病態の変化およびサルエイズウイルス (SIV) のカニクイザルモデルを作製した。

以上の事から霊長類を用いた資源高度化およびヒト疾患モデルへの対応を試み、霊長類資源の創薬への有用性が示唆された。

研究分担者

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
下澤 律浩	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
揚山 直英	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
岡村 智崇	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 研究員
鈴木 治	独立行政法人医薬基盤研究所	難病・疾患資源研究部 主任研究員
高橋 一朗	独立行政法人医薬基盤研究所	難病・疾患資源研究部 主任研究員

A. 研究目的

創薬研究においては詳細な分子メカニズムの解析に続き、高度な動物実験により、効果や毒性の解析を行うことが必要である。さらに治験段階を迎えるには霊長類を用いた解析、検討は必須であり、その霊長類もちろん実験動物として高度化されていなければならない。さらに近年、治験段階を迎えるには霊長類を用いた解析、検討の必要性も要求されるようになった。医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターは

我が国で唯一の医科学研究を目的とした霊長類センターであり、さらに 1,500 頭以上のカニクイザル系統を維持し SPF 化している世界で唯一の機関である。本研究ではこれら高度な霊長類を用い、創薬につながる動物資源の繁殖技術の向上、動物資源の高度化および疾患モデルを検討し、医科学研究の基盤を構築することを目的とした。

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. 霊長類由来研究資源の保存技術の高度化：カニクイザル凍結保存受精卵の質的な評価法をメチレーション関連遺伝子および免疫染色法を用いた新規手法を樹立した。
2. カニクイザルのホルモン解析による繁殖技術の確立：カニクイザルホルモン測定による交配を行っているが、当該年度まで、従来の発情から計算したホルモン日測定法との受胎率の際は認められなかった。
3. カニクイザルのMHC 遺伝子発現解析: サルエイズウイルス (SIV) に感受性、抵抗性を付与するであろうMHCクラスIの解析を行った。
4. ワクチン開発における霊長類を用いた基盤的技術の開発: カニクイザルに感受性を持ち、新規ワクチンベクターとして期待されるヒトパラインフルエンザ2型ウイルスの経鼻投与における病変を検討したところ、病理学的な変化は認められなかったが、感受性のないマウスでは変化が認められた。
5. 循環器疾患モデルの作製とその解析: 循環器疾患の測定値となる血液ガスについて調べ、ヒトと相同性のある測定項目と無い測定項目に知見を得た。
6. 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: 産地の異なるSPFカニクイザルに差異はなかった。
7. 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: カニクイザルでの排卵の上昇を期待した PTEN 阻害剤投与はマウスにおいて時期特異的に性腺刺激ホルモンによる誘起排卵数を増加させ、その作用点は卵胞の顆粒層細胞および莖膜細胞であることが明らかとなった。

D. 考 察

医科学研究、創薬研究における実験動物の役割は極めて大きく、特にヒトに近い霊長類を用いた研究の重要性は近年世界中で認識されている。世界的にも新規

の霊長類センターの開設や既存の霊長類センターの拡大を行っている。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は我が国で唯一の医科学研究を目的とした霊長類センターであり、さらに1,500頭以上のカニクイザルの系統を維持し、SPF化している世界で唯一の機関である。これらカニクイザル資源に関しては世界的にも評価が高い。本研究ではこれらカニクイザルをさらに高度化し、創薬への利用の促進につなげることを試みている。

実験動物としての霊長類はそれ自体をSPF等で高度化していくこと、高度化に結びつく種々の情報、さらにはモデル動物の作製や解析により、具体的な疾患への対応に対し高度化して有用性を高める必要がある。本研究ではこれらを同時に行い、創薬への有用性を示したと考えられたが、さらなる疾患への対応が今後も継続されることが必要であると考えられた。

E. 結 論

カニクイザルを実験動物としての高度化を行い、創薬への有用性を示した。

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)

分担研究報告書参照

平成26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

ワクチン開発における霊長類を用いた基盤技術の開発

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

研究要旨

経鼻投与ワクチンにおける解析はヒトと抗原認識機構が異なるマウス等以外ではほとんど行われていない。本研究では現在新規粘膜ワクチンとして期待されているヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（HPIV2）をカニクイザルに経鼻投与し、そのリンパ球を免疫染色にて病理変化を解析した。鼻粘膜では投与後 CD3 陽性細胞、CD20cy 陽性細胞、CD163 細胞の浸潤が認められ、リンパ組織が粘膜局所に形成されていることが判明した。鼻粘膜投与における鼻粘膜局所での免疫組織学的検索はマウス等の小動物以外ではほとんど報告が無く、ヒトにおける毒性評価等には反映できるものと考えられた。

A. 研究目的

粘膜免疫を誘導する粘膜ワクチンでは抗原を粘膜に直接運ぶ必要があり、全身的な影響はもとより、粘膜局所における解析は重要である。しかしながらその局所反応や免疫系の認識機構の解明はヒトと構造や抗原認識機構が異なるマウス等で行われているのが大半である。カニクイザルはヒトに極めて近い鼻腔内の構造をもっており、ヒトと同様マウス等で抗原認識に重要な組織である NALT も保持していない。本研究では規粘膜ワクチンとして期待されているヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（HPIV2）を用いて、ヒトに類似の構造を持つカニクイザルにおいて粘膜ワクチン投与時における病理学的変化と抗原の認識について検討した。

B. 研究方法

カニクイザル（6～11歳、2.8～3.5kg）を麻酔投与下、仰臥位で固定後、鼻腔より HPIV2 を滴下し、10分間保持した。投与後0時間（コントロール）24時間後に解剖を行い、ホルマリン固定の後、HE染色にて鼻粘膜の病理的解析を行った。また、リンパ

球抗原に対するモノクローナル抗体による免疫組織化学染色を行った。

（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

鼻粘膜に HPIV2 滴下後24時間でT細胞（CD3 陽性）およびB細胞（CD20cy）がリンパ組織を軽視していることが認められた（Fig. 1）。

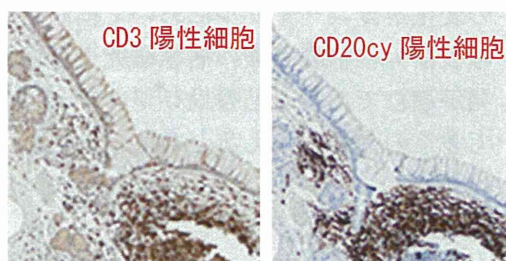
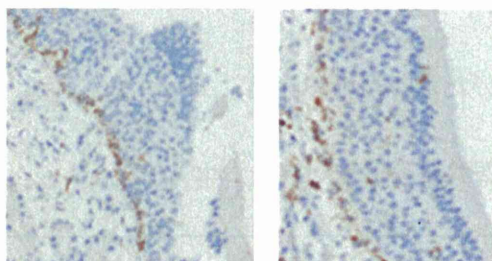


Fig. 1 粘膜下織におけるリンパ系組織の構築

単球（CD163 陽性細胞）浸潤は投与後6時間で粘膜基底層集約して認められたが、24時間ではこの様な集積は認められなか

った。(Fig. 2)。



投与後 6 時間 投与後 24 時間

Fig. 2HPIV2 投与後の粘膜における CD163 陽性細胞の浸潤

以上の事より HPIV2 経鼻投与において短時間で探究浸潤が認められ、その後 24 時間でリンパ系組織の形成が認められた。

D. 考 察

経鼻投与ワクチンは呼吸器等の粘膜免疫誘導に優れていることから研究、開発が急速に進歩している。実験動物を用いた解析も同様に急速に進歩し多くの報告がなされている。しかしながら、マウス等の実験動物は呼吸器粘膜における抗原の認識機構および組織構造が異なり、ヒトとの比較が困難である。全身的な反応はもとより粘膜局所における反応は極めて重要であるが、マウス等での検証は困難である。カニクイザルはヒトと類似の構造をもち、抗原認識機構および構造学的においても、極めて類似の機構であると考えられる。本研究ではヒトでは知見を得ることが出来ない粘膜局所の変化がカニクイザルにおいて検討され、呼吸器等の粘膜感染の病態研究や今後も開発が進むであろう粘膜投与ワクチンにおいて多くの治験を与えると考えられた。

E. 結 論

経鼻投与ワクチンの粘膜での病態解明は霊長類で多くの知見が得られると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuyama Y., Yuki Y., Katakai Y., Harada N., Takahashi H., Takeda S., Mjima M., Joo S., Kurokawa S., Sawada S., Shibata H., Park EJ., Fujihashi K., Briles DE., Yasutomi Y., Tsukada H., Akiyoshi K. and Kiyono H. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunology* 2015 E-pub
2. Okabayashi S, Shimosawa N, Yasutomi Y., Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain accompanied by enhanced GAB β generation in nonhuman primates *PLoS One in press*
3. Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y., Wijaya E|, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenbon A|, Standley DM|, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh responses to the coadministered antigen *J. Immunol.* 2015 *in press*
4. Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 2014;32:1727-1735.
5. Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014;111;3086-3091.

6. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. PLoS One 2014;9: E-pub

7. Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y. and Mineo J. CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques. Mol Ther. Nucleic Acids 2014:E-pub

8. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y. Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. J.Am.Heart Assoc. 2014 E-pub

9. Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y. Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, Plasmodium vivax and Plasmodium cynomolgi. Parasitol. Int. 2014 E-pub

2.学会発表

1.加藤 誠一、岡村 智崇、張 険峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏

BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価

第62回 日本ウイルス学会学術集会

2014年11月10日～12日パシフィコ横浜会議センター

2.Tsujimura Yusuke, Yasutomi Yasuhiro :

Suppressive effect of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to innate immune response is depending on the interaction with RIG-I.第43回日本免疫学会総会

2014年12月10日～12月12日、京都国際会議場

3.藤城(伊藤)康世、鯉江洋、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、Boran Osman、金山喜一、保富康宏、揚山直英：再生医療評価系としてのカニクイザルMSCを用いた細胞標識の解析。第61回日本実験動物学会学術総会。2014年5月15～17日。北海道、札幌市

4.塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：新規実験動物としての *Tupaia Belangeri* の飼育および繁殖について 第157回 日本獣医学会学術集会 平成26年9月9日～9月12日

北海道、札幌

5.塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：C型肝炎ウイルスに対するDNAワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いたPrime/Boost法による肝炎ウイルス特異的免疫賦活化効果の検討第18回 日本ワクチン学会学術集会 平成26年12月6日～12月7日 福岡国際会議場

G.知的所有権の出願・取得状況

1. 2014年11月6日

「NOVEL RECOMBINANT BCG VACCINE」

出願番号: 12832210.4

2. 2014年11月13日

特許出願 : 特願2014-229283

発明の名称：C型肝炎の治療及び／又は予防用医薬組成物

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

霊長類由来研究資源の保存技術の高度化

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

カニクイザルは様々な医科学研究に用いられている。その研究資源の確保のため、生殖関連細胞の凍結技術の高度化を図り繁殖・育成技術を向上させる意義は大きい。本研究では、凍結融解した卵の質を評価する技術開発を目的として一つの卵で遺伝子解析する技術開発を開始し、免疫染色により詳細に形態を観察するための基礎研究に取り組んだ。また、凍結融解卵巣を移植した個体の解析を昨年につづき実施した。さらに、繁殖効率向上のための基礎データを得るため、初潮の意義を考えるとともに妊娠しない個体に焦点をあて、妊娠しない原因について探求した。

A. 研究目的

1) 凍結融解した個々の卵の質を解析するための技術開発

卵の凍結保存はマウスでは遺伝子バンクとして、また、ヒトでは不妊治療技術のひとつとして応用されている。サル類においても卵の凍結保存の成功例が報告されている。実用化された技術ではあるが、融解卵の質については未だ議論されている。そこで、ひとつひとつの卵の質を評価する技術開発を開始した。メチレーションとアポトーシスに注目し、関連遺伝子の発現を卵で解析した。また、免疫染色により形態解析による評価システムの確立に取り組んだ。なお、本研究では、サル類への応用を視野に入れた手法の確立を目的とし、今回はマウス卵を用いて研究を行った。

2) 凍結保存された卵巣の移植後の状況解析

凍結保存された卵巣の移植後の状況を昨年度につづき継続して検索した。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の卵巣まるごとの保存、融解した卵巣の移植実験を行い、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。ここでは約7年前に移植した個体の卵巣の機能について月経を指標として検索し

た。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

霊長類資源を保持する上で、繁殖効率を向上させる意義は極めて大きい。大規模コロニーで効率よく繁殖するにあたり、初潮や月経などメスカニクイザルの生理的データやどのような個体が妊娠する傾向にあるかという妊娠傾向の解析を行った。また、生理的データや交配における妊娠傾向を加味した上で計画的に雌雄同居させ、なぜ妊娠しないのかに焦点を当てた解析を実施した。

B. 研究方法

1) 凍結融解した個々の卵の質を解析するための技術開発

マウス胚盤胞を材料とした。mRNA を抽出後、H19 遺伝子とハウスキープ遺伝子として GAPDH 遺伝子を増幅し、SYBR green を用いた相対定量法により H19 遺伝子発現を定量した。また、凍結前と融解後の拡張期胚盤胞を 1 % PFA で固定し、0.5 % TritonX-100 で処理したのち、1 % BSA バッファーで洗浄、Phalloidin および DAPI (4, 6, diamidino-2-phenylindole) で染色した。染色した卵をコンフォーカルマイクロスコープで観察した。マウス卵の凍結は、DAP213 を用いた手法で行った。

2) 凍結保存された卵巣の移植後の状況解析

約7年前に5頭のカニクイザルから卵巣を摘出し、まるごと凍結した。1ヶ月の間、

液体窒素中で保存し、その卵巣を融解して元の個体に移植した。凍結は微弱エネルギーを付与した環境で -30°C までプログラムフリーザーを用いて低下させ、その後、液体窒素に入れるという手法で実施した。融解は、 37°C のお湯に浸漬することで行い、その卵巣を大腿の骨格筋内あるいは腎皮膜下に移植した。移植した5頭のうち4頭で比較的早期に月経が出現することを確認しており、性ホルモンの動態からも凍結融解卵巣が機能していることを見出した。これらの個体は現在も外見上問題なく生存しており、今回、月経の状況を解析することで、移植した卵巣の内分泌機能の保持について推察した。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

カニクイザルのメス 43 頭を解析対象とし、初潮の日齢、月経が安定するまでに要する日齢を解析した。また、オス 1 頭が 2 頭のメスと 1 日おきに同居する交配方法（隔日同居交配）を設定し、2 頭のメスのうち一方だけが妊娠し、もう片方のメスが妊娠しなかったケースを解析対象 ($n=94$) として、2 頭のメスに年齢や、過去の妊娠歴にどのような差異があるか解析した。これらの一連の解析結果より、メスの安定を見計らい、過去の妊娠経験やメスの年齢に差をつけた隔日同居交配を設定し、交尾成立の確認実験を行った。具体的には雌雄同居の翌日にメスの膣スミアを顕微鏡で観察し、膣スミア中の精子の有無により交尾成立を判定した。この膣スミアによる行動観察実験には隔日交配 11 セット計 22 個体のメスカニクイザルを用いた。

（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得て実施した。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) 凍結融解した個々の卵の質を解析するための技術開発

マウス胚盤胞を用いた H19 遺伝子の定量 PCR では胚盤胞 5 個から抽出したサンプルにおいて遺伝子特異的な増幅が確認された。

Phalloidin および DAPI で染色したのち観察した結果、凍結融解した胚盤胞ではアクチンフィラメント（細胞骨格）が崩壊していることが確認され、凍結融解による形態的ダメージが観察された。

2) 凍結保存された卵巣の移植後の状況解析

まるごと凍結した卵巣を融解して移植した5頭のカニクイザルは、移植後、約7年が経過しているが、未だ月経が認められる個体が存在することが明らかとなった。直近3年間に確認された月経の回数はそれぞれ、5、0、2、8、3回であり、直近1年間に確認された月経の回数はそれぞれ3、0、0、2、2回であった。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

室内繁殖コロニーにおけるカニクイザルの初潮は 1149.1 ± 216.7 日齢（約3歳）で認め、月経が安定する（定期的に3回月経が認められる）のは 1505.9 ± 388.1 日齢（約4歳）であった。隔日同居交配での妊娠傾向を解析した結果、経産メスかつ高齢のメスがより多く妊娠していた。また、未経産メスにおいては、若齢にて妊娠していた。膣スミアによる精子確認では、経産メスでは12頭中10頭で精子が確認され、月経周期に関わらない交尾成立が確認された。一方で、未経産メスでは10頭中2頭のみで精子が確認された。

D. 考察

1) 凍結融解した個々の卵の質を解析するための技術開発

今回、H19 遺伝子の発現を捉えることに成功したが、検出には5個の胚盤胞を用いている。今後、よりの高い Taqman PCR 系を確立し、1 個の受精卵で解析することを目指す。また、Multi-color Taqman PCR 法を用いることで、H19 遺伝子の他に、Mest 遺伝子等複数のメチレーション関連遺伝子を同時に定量することで卵の質をより詳細に解析することが可能になると考えている。p53 遺伝子等のアポトーシス関連遺伝子についても Multi-color Taqman PCR 系を確立することで、多方面から卵の質の評価を可能にしたい。Phalloidin および DAPI の染色により、卵の形態評価がある程度可能で

あることが確認されたが、ミトコンドリアをはじめとする細胞小器官を染色することで、詳細な質評価が可能になると考えている。

2) 凍結保存された卵巣の移植後の状況解析

凍結融解卵巣の移植後、約7年経過しているにも関わらず、月経を認めた個体が存在することの意義は大きい。しかし、昨年（移植後約6年）の結果と比較すると明らかに劣っており、移植した卵巣が失活しつつあるのかもしれない。性ホルモンの動態とあわせて解析する必要があり、また、外部からのホルモン投与により卵巣を刺激し、卵胞が発育するか否かについて検討したい。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

室内繁殖コロニーにおけるカニクイザルの初潮は約3歳であり、月経の安定まで1年の期間を要する。月経の発現は若くして認められるが、月経の発現だけでなく生理学、社会学、行動学的な成熟は初潮だけを目安にはできないのかもしれない。もし、若すぎる妊娠による流産、死産の危険性などがあるとすれば、様々な観点から性成熟を判断することがメスの身体的な負担軽減、エンリッチメントや動物福祉を考えるうえで意義のある研究結果であると考えられる。隔日同居交配での妊娠傾向の分析では、経産メスで高齢のメスがより多く妊娠に至っており、未経産個体においては年齢要因が逆転し、より若いメスが妊娠していた。これらの結果をまとめると、若くして初妊娠を経験し、その後年齢を重ねる度に妊娠しやすくなるということになる。この情報は繁殖効率向上を検討する上で貴重な結果である。膣スミア中の精子確認実験により、多くの経産メスは最長3ヵ月間の雌雄同居期間中に複数回の交尾成立が確認された。一方で、未経産メスの多くは交尾すらしていないことが明らかとなり、交尾が見られた場合もごく少量の精子が確認されただけであり交尾回数も少なかった。これら結果は上述した隔日同居交配における妊娠傾向解析での事実を裏付けており、経産メスは同居期間中交尾行動が確認され、未経産メスでは交尾をしないため妊娠できないことが明らかとなった。交尾の行動障害は様々

な要因が考察されてきたが、今回明らかになった未経産メスで認められる交尾を行わない実態の要因については、心理、行動、成育歴等の詳細な解析が必要である。

E. 結論

今回、霊長類資源の凍結保存、繁殖技術の向上を目指した研究を実施し、以下の3つの結論を得た。

1) マウス胚盤胞5個から mRNA を抽出し、メチレーション関連遺伝子 H19 の定量に成功した。今後、1個の胚盤胞での遺伝子解析を試みる予定である。

2) 凍結融解卵巣を移植し約7年経過した個体の月経発現を見たところ、昨年よりもその回数が減少していた。すなわち、移植卵巣の内分泌機能が低下しつつある可能性が考えられた。

3) カニクイザルの初潮は約3歳、月経周期が安定するのは約4歳であった。また、妊娠しない個体は、交尾すら成立していないことが明らかとなった。さらに、はじめて妊娠する個体は5歳で多く認められることから、生理的性成熟と社会的性成熟には時間的ズレがある可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

L. Yasmin, J. Takano, Y. Nagai, J. Otsuki, T. Sankai
Detecting and quantifying male-specific fetal DNA in the serum of pregnant cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Com. Med.*, 65: 70-76, 2015

K. Honsho, M. Hirose, M. Hatori, L. Yasmin, H. Izu, S. Matoba, S. Togayachi, H. Miyoshi, T. Sankai, A. Ogura, A. Honda
Naïve-like conversion enhances the difference in innate *in vitro* differentiation capacity between rabbit ES cells and iPS cells
J. Reprod. Dev. 61: 13-19, 2015

A. Honda, M. Hirose, T. Sankai, L. Yasmin, K. Yuzawa, K. Honsho, H. Izu, A. Iguchi, M. Ikawa, A. Ogura
Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of *Tyrosinase* gene using CRISPR/Cas9
Exp. Anim. 64: 31-37, 2015

M. Hatori, N. Shimozawa, L. Yasmin, H. Suemori, N. Nakatsuji, A. Ogura, K. Yagami, T. Sankai
Role of retinoic acid and fibroblast growth factor 2 in neural differentiation from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryonic stem cells
Comp. Med. 64: 140-147, 2014

2. 学会発表
(国際学会)

M. Yoshida- Kobayashi, T. Koyama, Y. Yasutomi, T. Sankai
Psycho-behavioral approach to why male monkey prefers multiparous female to nulliparous one.
The 25th Congress of the International Primatological Society (Hanoi, Vietnam)
August 11-16, 2014

P. Pomchote, T. Sankai, Y. Hamada
Age-related bone changes in two macaque species which are difference in positional behavior
The 25th Congress of the International Primatological Society (Hanoi, Vietnam)
August 11-16, 2014

A. Honda, M. Hirose, T. Sankai, L. Yasmin, K. Yuzawa, K. Honsho, H. Izu, M. Ikawa, A. Ogura., Single-step generation of rabbits carrying at targeted allele using CRISPR/Cas9
World congress of reproductive biology 2014 (Edinburgh, Scotland) September 2-4, 2014

A. Nishimoto-Kakiuchi, S. Netsu, S. Okabayashi, O. Kondoh, R. Konno, T. Sankai
Analysis of spontaneous endometriosis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) by laparoscopy and MRI,
12th World Congress on Endometriosis (Sao Paulo, Brasil) April 30 – May 3, 2014

S. Netsu, A. Nishimoto-Kakiuchi, S. Hayashi, O. Kondoh, T. Sankai, R. Konno
Surgically induced endometriosis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)
12th World Congress on Endometriosis (Sao Paulo, Brasil) April 30 – May 3, 2014

A. Nishimoto-Kakiuchi, S. Netsu, S. Hayashi, A. Kato, R. Konno, T. Sankai
Nerve fiber and lymphoid nodule were observed in pathological and immunohistological analysis of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with spontaneous endometriosis,
12th World Congress on Endometriosis (Sao Paulo, Brasil) April 30 – May 3, 2014

(国内学会)

坂本淳平、谷口遼馬、加田日出美、山海直、堤治、本橋秀之
産仔への発生能からみたマウス卵母細胞体外成長培養における代替血清の可能性
第59回日本生殖医学会(東京)2014年12月4、5日

本多新、廣瀬美智子、山海直、ルブナ・ヤスミン、湯澤和明、本勝希実子、伊豆美奈、伊川正人、小倉淳郎
CRISPR/Cas9によるウサギチロシナーゼ遺伝子の破壊
第37回日本分子生物学会年会(横浜)2014年11月25 – 27日

本多新、廣瀬美智子、山海直、ヤスミン・ルブナ、湯澤和明、本勝希実子、伊豆美奈、伊川正人、小倉淳郎
CRISPR/Cas9によるウサギTyrosinase遺伝子の破壊
第4回ゲノム編集研究会(広島)2014年10月6、7日

山海直
最新生殖工学と幹細胞研究トピックス
岡山大学生殖補助医療技術教育センター公開講座(東京)2014年10月25日

中山駿矢、鯉江洋、金山喜一、片貝祐子、山海直、揚山直英
カニクイザル(*Macaca fascicularis*)における血液ガスおよび全血球計算基準値の確立に関する研究
第20回日本野生動物医学会(つくば)2014年9月16-19日

岩元正樹、矢崎智子、大石貴嗣、井上貴美子、小倉敦郎、山海直

EGFP遺伝子導入したカニクイサル細胞を用いた異種核移植胚の作出
第107回日本繁殖生物学会（帯広）2014年8月21-24日

L. Yasmin, J. Takano, T. Sankai
Frequencies of fetal cellular and cell-free DNA in maternal blood of pregnant cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)
第107回日本繁殖生物学会（帯広）2014年8月21-24日

本勝希実子、廣瀬美智子、羽鳥真功、ルブナ・ヤスミン、梅谷内純恵、三好浩之、山海直、小倉淳郎、本多新
ナイーブ様変換ウサギES細胞の質的向上とその解析
第3回ウサギバイオサイエンス研究会（甲府、山梨）2014年8月2日

M. Yoshida- Kobayashi, T. Koyama, Y. Yasutomi, T. Sankai
Were cynomolgus monkey females with more gravidas chosen by males?
第74回動物心理学会（犬山）2014年7月19-21日

P. Pomchote, T. Sankai, Y. Hamada
Bone mineral density, osteoarthritis, and menstrual status in ling-tailed macaques (*Macaca fascicularis*)
第30回日本霊長類学会（大阪）2014年7月4-6日

池田ゆうき、長谷川昭子、荻野舞、山海直、柴原浩章
カニクイサル卵巢におけるアンドロゲン受容体の免疫組織学的検討
第55回日本卵子学会（神戸）2014年5月17、18日

ルブナ・ヤスミン、高野淳一朗、山海直
妊娠カニクイサル血中に存在するオス胎児由来 SRY 遺伝子と DYS14 の検出量の比較
第61回日本実験動物学会総会（札幌）2014年5月15-17日

根津幸穂、西本（垣内）綾子、満下淳地、山海直、今野良
カニクイサルにおける子宮内膜症外科的誘因モデルの作成手法の確立
第66回日本産婦人科学会（東京）2014年4月18-20日

3. その他
山海直
医科学研究のためのカニクイサル—発生工学と先端技術開発の視点から—
Labio 21（日本実験動物協会情報誌）56: 20-23, 2014

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
(創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

カニクイザルのホルモン解析による繁殖技術の確立

分担研究者 下澤 律浩

独)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

創薬研究等に利用されるカニクイザルにおいて、SPF 化による動物資源の高度化、疾患モデルの開発や維持のために、繁殖技術の基盤を強化する意義は大きい。そこで、ホルモン測定により排卵期に併せた雄との同居方式(同居 A)と従来の同居期間の延長あるいは以前調べた排卵時期を考慮した雄との同居方式(同居 B)を比較した。同居 A は同居 B と比べ、妊娠率において有意差は認められなかった(0% vs 9.8%) が、精子が確認される割合は有意に低いことから(11.5% vs 37.7%)、交尾し難い交配方式であることが明らかとなった。次に、同居 B において未経産雌と経産雌で比較したところ、前者は精子確認で有意に低く(37.7% vs 75.0%)、妊娠率は低い傾向にあった(9.8% vs 33.3%)。ホルモン測定により排卵時期にのみ交配するよりも、過去に調べた排卵時期や月経履歴から推測した排卵時期に雌雄同居を設定した方が、妊娠を得やすいことが明らかとなった。また、未経産雌においては、交尾しないことが低い妊娠率の原因であることから、この対策が SPF 繁殖コロニー構築の早期実現に重要である。

A. 研究目的

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は我が国で唯一の医科学研究を目的としたカニクイザルのコロニーを1,500 頭以上の規模で維持している。このカニクイザルの中には、拡張型心筋症あるいは網膜黄斑変性症のようなヒト疾患モデルとして貴重な家系も存在する。現在、実験用カニクイザルの生産において、全頭 SPF 化を進めている。一方、当センターのサル

は設立以来、約 30 年以上外部からカニクイザルは導入されず、室内環境に馴化されて来た。SPF 化および繁殖の制御は、動物資源の高度化、疾患モデルの開発ならびに維持のために重要である。しかし、SPF コロニーの構築および拡大のために繁殖能力を持つ多くの雌を必要とするが、未経産雌の妊娠が非常に得難い現状にある。設立時から採用されている繁殖方法(雌の月経初発後 11-14 日の雌雄 1 対 1 同居法)の見直し

が必要と考えられるため、SPF サルコロニーの構築のために現状に即した繁殖技術を確立する必要がある。実際に、昨年度排卵時期を調べたところ、未経産雌においては、従来の雄との同居期間である月経後 11-14 日より長い期間の同居にした方がよいことを明らかにした。そこで、今年度は実際に雄との同居を実施し、交尾確認のために膣スメア中の精子の有無を観察し、SPF カニクイザルに適した繁殖方式を調べた。

B. 研究方法

本研究は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で飼育維持されているカニクイザルを用いて実施した。今後の SPF コロニーを担う比較的若い未経産雌を対象に効率的に妊娠を得る方法を確立するために、次の二つの同居方式を比較した。同居 A: ホルモン測定による排卵時期での雄との同居、同居 B: 従来の同居期間(月経後 11-14 日の 3 日間同居)の延長あるいは以前の排卵時期を考慮した雄との同居(およそ 7 日間の同居)。さらに、同居 B においては、経産雌についても、同様に調べた。

なお、同居 A においては非麻酔あるいは麻酔下で継続的な採血および膣スメア採取を行い、同居 B においては雄とセット時あるいは解除時の麻酔下の採血および同居期間中に隔日で膣スメア採取を行った。採血量は 1-2 ml で、採取後遠心分離して得た血清で蛍光酵素免疫装置(東ソー、AIA-360)を用いてエストラジオール(E2)およびプロジェステロン(P4)を測定した。一般的

に、排卵は E2 のピーク値の翌日および P4 の上昇時に生じる。また交配に用いた雄の繁殖能力は確認済である。膣スメアは顕微鏡下で精子の有無を観察した。

(倫理面への配慮)

カニクイザルを使用するにあたり独立行政法人医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を得ている。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

同居 A として、ホルモン測定により推定した排卵期に雄との同居を実施したところ、26 同居全てで妊娠は得られなかった(0%、0/26)。これらの内の 3 同居で精子が確認されたのみであった(11.5%、3/26)。一方、同居 B として、従来の同居期間(月経後 11-14 日の 3 日間同居)の延長あるいは以前調べた排卵時期を考慮した雄との同居(およそ 7 日間の同居)を実施したところ、9.8%(6/61)で妊娠が成立した。この 61 同居のうち、同居中の排卵確認、同居中の精子確認および排卵期での精子確認例はそれぞれ 38(62.3%)、23(37.7%)および 14(23.0%)であった。同居 A は同居 B と比べ、妊娠率において有意差は認められなかった(0%、0/26 vs 9.8%、6/61)が、精子が確認される割合は有意に低いことから(11.5%、3/26 vs 37.7%、23/61)、交尾が成立し難い交配方式であることが明らかとなった。なお、未経産雌との比較のため

に調べた経産雌においては、12 同居中 4 例で妊娠が確認され (33.3%)、同居中の排卵確認、精子確認および排卵期の精子確認例はそれぞれ 7 (58.3%)、9 (75.0%) および 6 (50.0%) であった。未経産雌と経産雌の間で、同居中に排卵が確認される割合に差は認められなかった (62.3%、38/61 vs 58.3%、7/12)。しかし、未経産雌は経産雌よりも、精子確認で有意に低く (37.7%、23/61 vs 75.0%、9/12)、妊娠率 (9.8%、6/61 vs 33.3%、4/12) および排卵期の精子確認は低い傾向にある (23.0%、14/61 vs 50.0%、6/12) ことが確認された。

D. 考察

カニクイザル SPF コロニーを確立するためには、妊娠経験のない未経産雌で多くの妊娠を得る必要がある。この未経産雌を対象に、効率的に妊娠を得る繁殖方法が重要となる。そこで、ホルモン測定による排卵間近での雄との同居方式 (同居 A) と従来の同居期間 (月経後 11-14 日の 3 日間同居) の延長あるいは以前の排卵時期を考慮した雄との同居方式 (同居 B、およそ 7 日間の同居) において、どちらの方式が SPF カニクイザルの繁殖方法として適しているかを調べた。

同居 A においては、妊娠が得られなかった。これはほとんどの例で排卵期にも関わらずに精子が確認されなかったことが、妊娠が成立しなかった大きな理由である。つまり、交尾が行われていないことが妊娠しない原因であることが明らかとなった。一方、同居 B においては、同居 A よりも有意

差はないものの精子が確認される割合は高い傾向にあった。同居 A では同居前や同居中に膣スミア採取を隔日で実施するが、連日採血を麻酔下あるいは無麻酔下で実施している。一方、同居 B では同居する際および同居解除時に麻酔下で雌を移動する際に採血を実施しているため、同居期間中に膣スミア採取を隔日で実施するが、採血は実施していない。この採血によるストレスが交尾行動に影響している可能性が考えられた。同居 A と同居 B を比較したとき、前者ではホルモン測定を継続する必要があること、採血のストレスが影響する可能性があること、必ずしも交尾するとは限らないことなどから、繁殖方式としては同居 B が適している。故に、E2 および P4 を測定して排卵時期にのみ交配する (同居 A) よりも、以前にホルモン測定で推定された排卵時期や月経履歴から推測した排卵時期を同居期間に含む雌雄同居 (同居 B) の方が、妊娠を得やすいことが明らかとなった。

次に繁殖方式としての同居 B において、未経産および経産の雌間での比較を行ったところ、精子の確認では前者は有意に低く、また妊娠の成立および排卵期の精子確認で前者は低い傾向にあった。一方、排卵の確認においては、両者で差は見られないことから、未経産雌の交尾行動に問題がある可能性が考えられた。交配 B の未経産雌においては、同居中に精子が確認された割合は 37.7% (23/61) と決して高い数値であるとはいえない状況にあることから、交尾をしない原因を追及し、それを解決することで

効率的な繁殖方式を構築できるものと考えられた。

また、本研究で実施した交尾を確認するための膣スミア採取による精子チェックの重要性を認識することができた。つまり、同居していれば、排卵期に交尾するものと考えていたが、本研究から必ずしもそうでは無いことが判明した。多くの未経産雌が交尾しないことは、自然交配による個体生産にとって大きな障害である。雌雄の同居翌朝等に雌膣内の精子の有無をチェックすることは交尾する個体を特定することに大いに役立ち、繁殖を優先する個体を選抜できる。また、交尾する未経産個体の選抜は、繁殖用個体として維持し、一方では交尾しない個体を繁殖候補から除外できることからコロニー維持用のサル数を削減することができる。未経産雌における低い交尾率の対策が SPF 繁殖コロニー構築の早期実現に重要である。

当センターには家族性の疾患を示す家系（黄斑変性や拡張型心筋症など）が存在する。これらの家系は貴重であることから、子孫を得る必要がある。しかし、これらの家系で交尾をしない個体が存在する場合、子孫を得られないことが想定される。その対策として、今後は人工授精あるいは胚移植などにより人為的な処置を行う個体作出技術の確立も必要である。

E. 結論

未経産雌においては、ホルモンを測定して排卵時期にのみ交配するよりも、過去調べた排

卵時期や月経履歴から推測した排卵時期に雌雄同居を設定した方が、妊娠を得やすいことが明らかとなった。また、妊娠の効率化には交尾のし難さを解決する必要性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y, Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates $A\beta$ pathology in brain accompanied by enhanced $GA\beta$ generation in nonhuman primates. PLoS ONE 10(2): e0117362. 2015.

2) Shimozawa N. Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells generated by using allogeneic genes. iPS cells: Generation characterization and differentiation -Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, Springer, DOI 10.1007/7651_2014_137.

2. 学会発表

1) 下澤律浩、東郷 睦、大津佳美、成田勇人、保富康宏. 血中エストロジオールの測定から推定されたカニクイザルの排卵時期. 第 61 回日本実験動物学会、2014 年 5 月 15-17 日、札幌市.

H. 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（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

霊長類循環器疾患モデルの解析に関する研究

研究分担者 揚山直英 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

再生医療・創薬研究等においてはヒトと近縁な霊長類を用いた有効性・安全性評価の需要が増え続けている。一方、それら霊長類における評価指標の中で特に循環器疾患の解析に重要な血液ガスに関する報告は少ない。そこで、今回はカニクイザル大規模繁殖コロニーにおいて、血液ガスおよび血液学データの測定を行い、その基準値の確立等を解析、検討した。その結果、血液ガス項目においては雄で HCO_3std 、B. E. (vt)、 ctCO_2 が高値を示し、ヒト同様の性差が認められた。また、全血球計算では加齢に伴って MCH と MCV が減少、RBC 数が増加し、ヒトと異なる傾向が認められた。血液ガス項目において pH、 pO_2 、 K^+ 、 O_2SAT 、 Cl^- はヒトと同様の値を示し、 Na^+ 、 Ca^{++} 、Anion GAP はヒトより高値を示すなど、カニクイザル独特の基準値が樹立された。すなわち、カニクイザルにおける血液ガスおよび全血球計算の基準値が樹立され、加齢に伴う変化、性差、ヒトとの違いや相同性が明らかとなった。さらに心疾患群との比較では循環機能の低下を示唆する結果が得られた。以上より得られた基準値、結果は霊長類を用いた循環器疾患モデルの解析に有用であると共に、霊長類自体の健康管理にも役立つことが示唆された。

A. 研究目的

循環器疾患は世界各国で大きな問題となっており、その病態解明、新規診断・治療法開発研究は極めて重要である。しかしながら、未だヒト病態を忠実に反映した霊長類の循環器疾患モデルの報告は少ない。そのため、霊長類において循環器疾患個体を構築し、その詳細な解析を行う事ができれば、心臓病態学、生物資源研究のみならず医科学研究や厚生労働行政への貢献が大いに期待される。さらに昨今、再生医療・創薬研究等においては霊長類を用いた有効性・安全性評価の需要も増加する傾向にある。それら霊長類モデルの解析や評価を円滑に施行するためには、評価指標の一つと

して重要な血液系のより詳細な検査手法や基準値を樹立する事が求められている。

霊長類における血液生化学検査、ホルモン等の基準値の報告は数多く存在する。しかしながら、その一方で血液ガスに関する報告はほとんどない。血液ガスは近年注目されている循環器系医療や再生医療等の先進医療、さらに薬物の有効性、毒性試験等の指標に用いられるほか、霊長類自身の健康状態を判別するための検査項目としても非常に重要である。そこで今回、カニクイザルにおける血液ガス等血液学の基準値を樹立するため、大規模繁殖コロニーにおいて、動脈血の採取および測定を行った。また、すでいくつかの血液学や生化学それ

ぞれ単独のデータの報告はあるが、今回のような大規模繁殖コロニーにおいて年齢や疾患等と多角的に比較した報告はないため、その解析も試みた。

B. 研究方法

本研究では、医薬基盤研究所霊長類医学研究センターにおいて繁殖・育成されている、カニクイザル 64 頭（雄 20 頭、雌 44 頭）を用い、動脈血採取と計測を行った。被検個体の体重、年齢の平均値を表 1 に示した。動脈血の採取は、塩酸ケタミン（ケタラル：第一三共，Tokyo：5～10mg/kg i. m.）麻酔下にて、大腿動脈もしくは尾動脈から行った（図 1）。採取した血液は即時検査を行った。

血液ガス測定はラピッドラボ 348EX（SIEMENS, Berlin）、全血球計算は KX-21（SYSMEX, Kobe）を用いて計測を行った。検査項目は血液ガス 15 項目 [pH、pCO₂、pO₂、Na⁺、K⁺、Cl⁻、Ca⁺⁺、HCO₃act、HCO₃std、B. E. (vt)、B. E. (vv)、ctCO₂、Ca⁺⁺(7.4)、O₂SAT、Anion GAP]、全血球計算 18 項目 [WBC count、RBC count、Hemoglobin (HGB)、Hematocrit (HCT)、MCV、MCH、MCHC、PLT、W-SCR、W-MCR、W-LCR、W-SCC、W-MCC、W-LCC、RDW、PDW、MPV、P-LCR] である。なお、主要な血液ガス項目の臨床的意義を表 2 に示した。それぞれの値についてはスチューデント T 検定により性別の有意差を確認し、体重、加齢性の変化に関してはピアソンの積率相関係数により有意性検定を行った。

（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、さらに法律第 105 号「動物の愛護および管理に関する法律」、文科省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行

のための基本原則」、霊長類医学研究センターの指針である「サル類を用いた実験の詳細」を遵守して遂行した。動物の取扱は全て麻酔下で行う等、苦痛の排除に努め、動物飼育管理にも万全の配慮を行い実験を実施した。

C. 研究結果

まず、測定・解析に際して、大腿動脈、尾動脈の何れの部位から採取した血液も各項目で同一の値を示すことを確認した。

血液ガス：

血液ガスにおける検査項目および平均値を表 3 に示した。pCO₂、Anion GAP では加齢と共に数値が上昇する傾向、B. E. (vt)、ctCO₂、Ca⁺⁺(7.4) は体重に相関する傾向が認められたが他は一定の値を示した。また、性別による比較では HCO₃std、B. E. (vt)、ctCO₂ で雄が高値を示す有意な差が認められた（図 2）。その他の血液ガス項目において年齢比較では有意な差は認められなかった。

全血球計算：

全血球計算における検査項目および平均値を表 4 に示した。性別における比較では RBC count が雄で $607.4 \times 10^3 \mu l$ であるのに対して雌で $668.8 \times 10^3 \mu l$ と多く、また HGB、HCT でも雌が多いという雌雄差が認められた。一方、年齢における比較では RBC count、HGB、HCT、W-MCR、W-MCC で正の相関が、MCV、MCH で負の相関が認められた（図 3）。体重との比較では、W-SCC、W-MCC、W-LCC で正の相関が、MCV で負の相関が見られた。他の項目では一定の値を示した。

D. 考察

本研究はカニクイザルの血液ガス基準値に関する初の研究である。また、全血球計算に関しては過去に報告があるものの、本研究のような大規模繁殖育成施設において実施されたものはない。以下に項目毎の考察を述べる。

血液ガス検査：

血液ガスにおいて、 HCO_3std 、B. E. (vt)、 ctCO_2 が雄で有意に高値を示し、アルカローシスの傾向が認められた(図2)。その一方で、雌ではB. E. (vt)が -2.82 とアシドーシスの傾向が見られている。これらはヒトでも同様の傾向が報告されており、さらに本コロニーにおいて雄の高齢個体や心疾患、腎疾患の罹患歴を持つものが多く換気能力に差が生じた事にも起因するものと考えられた。年齢による差は Na^+ で軽度に認められる程度で相関もほぼないことから、血液ガスは年齢に関係なく、一定の数値を示すことが示唆された。

また、pHはヒト同様 7.39 ± 0.08 と安定した数値を示した。一方、同じマカク属のアカゲザルではpHがヒトより高い 7.45 ± 0.04 を示すと言う報告があり、カニクイザルはアカゲザルよりもヒトに近い数字を示すことがわかった。 pCO_2 はヒトより低い 36.7 ± 6 を、 pO_2 はヒトとほぼ同じ 89.9 ± 12.7 を示した。この数字はアカゲザルでも 35.06 ± 4.25 と近い数値が見られており、マカク属で近い数値を示すことが推測された。 O_2SAT は雌雄ともに96前後の値を示しており、これはヒトや他のマカク属とも同様の値で一定している。 Na^+ は雄で 149.58 ± 2.85 、雌で 147.81 ± 4.34 とヒトやアカゲザルに対して高い値を示した。 K^+ は雄で 3.87 ± 0.33 、雌で 3.77 ± 0.54 とアカゲザルに対してわずかに高い数値を示した。 Cl^- は

107.13 ± 3.42 とヒトやアカゲザルと近い数値を示した。 Ca^{++} は 1.21 ± 0.06 とアカゲザルの 1.18 ± 0.05 と比べ高い値を示した。Anion GAPはアカゲザルの 17.21 ± 4.53 に比べ、 18.04 ± 6.26 とわずかに高い値を示した。ヒトのAnion GAPは 12 ± 2 mEq/Lとカニクイザルやアカゲザルに対して低い値を示している。Anion GAPは $\text{AG} = \text{Na}^+ - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-)$ で計算されたため、特にNaでヒトと異なった高い数値を示していることから、このような結果となったと推察された。

全血球計算：

全血球計算では体重との間でMCV、W-SCC、W-MCC、W-LCCで有意な相関がみられた。雌雄間でもW-SCR、W-LCR、W-SCCで有意差がみられていることから、体重における相関は雌雄に起因するものと推測される。また、W-SCRは小球性白血球を示すもので、リンパ球等がそれに当たる。アカゲザルに関して述べた論文でも、リンパ球は雄で高い数値を示しており、同様の理由が考えられた。他のカニクイザルでの結果と比較すると、RBC count、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC等多岐にわたる項目で同様の傾向が認められた。一方、PLTでは既報の値が 430 ± 110 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)であるのに対し、 331 ± 91.5 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)と低い値を示していた。

今回、RBC count、HGB、HCTで雄に比べ雌で高い数値が見られた。これらは一般的には性周期による出血に伴い、雌で低い値を示すと言われているが、今回雄で低い値がみられたのは、個別飼育管理方式で繁殖育成されると言うコロニー独特の特性によるものと推測された。MCV、MCHに関してはヒトに比べ低い値を示しているが、アカゲザルでもMCVは同様に 71.1 ± 5.44 と低い値を示すと言う報告があり、マカクザルでは