

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期にのみ交配するよりも、過去に調べた排卵期や月経履歴から推測した排卵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認する必要がある。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)およびプロゲステロン(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行うが、連日採血を麻酔下あるいは無麻酔下で行っている。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行うが、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 pathology in brain accompanied by enhanced GA 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

