

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 (2 0 1 5) 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 -----

2. 霊長類由来研究資源の保存技術の高度化

山海 直 -----

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 -----

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 -----

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 -----

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 -----

7. カニクイザルの MHC class- の発現解析

高橋 一朗 -----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----

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、その霊長類ももちろん実験動物として高度化されていないといけない。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 カニ病態に差異はなかった。
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莢膜細胞であることが明らかとなった。

D. 考 察

医学研究、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）。

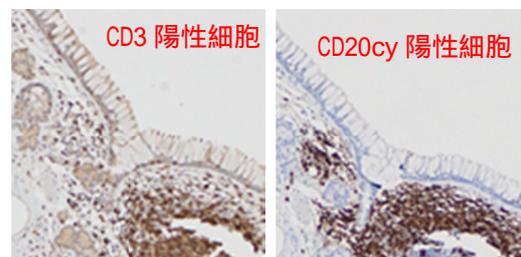
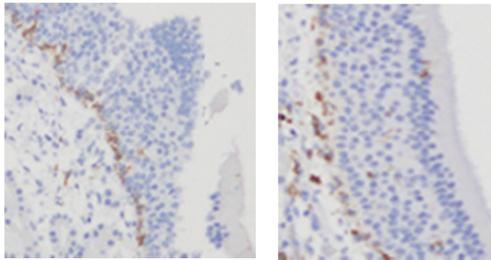


Fig. 1 粘膜下織におけるリンパ系組織の構築

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

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, Shimozaawa N, Yasutomi Y., Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain accompanied by enhanced GA 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 型肝炎の治療及びノ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負荷した環境で-30℃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℃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、卵巣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 fatal 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、榎谷内純恵、三好浩之、山海直、小倉淳郎、本多新
ナীব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 long-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
カニクイサル卵巣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、高野淳一郎、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) 下澤律造、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、すでに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、 pCO_2 、 pO_2 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{++} 、 HCO_3act 、 HCO_3std 、B.E. (vt)、B.E. (vv)、 $ctCO_2$ 、 $Ca^{++}(7.4)$ 、 O_2SAT 、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。 pCO_2 、Anion GAP では加齢と共に数値が上昇する傾向、B.E. (vt)、 $ctCO_2$ 、 $Ca^{++}(7.4)$ 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 HCO_3std 、B.E. (vt)、 $ctCO_2$ 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_3^- std、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 を示すという報告があり、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 と低い値を示すという報告があり、マカクザルでは

ヒトに比べ血球が小さい事が示唆された。また、MCH もヒトに比べ低い値を示し、アカゲザルと比較しても更に低い値を示していることから、カニクイザルではより低色素性の赤血球となっていることが示唆された。

年齢に関しては RBC count、HGB、HCT で正の相関、MCV、MCH で負の相関が認められ、有意差検定でも RBC count、HGB、HCT は年齢が増加するに従い増加し、MCV、MCH で有意に低下する加齢性の変化が認められた（図 3）。これらは他の霊長類でも同様の結果が報告されており、加齢に伴い体内水分含有量の低下が起こり、血液濃縮様の状態を呈している事が示唆された。

心疾患との関連：

最後に、今回データを得た個体より、心疾患の病歴の有無を基に比較を行ったところ、血液ガス項目では、 pCO_2 、 HCO_3std 、B.E. (vt)、 $ctCO_2$ 、全血球計算項目では W-MCR、W-MCC で差が認められた。特に、 pCO_2 では正常群の平均値が 35.72 ± 6.88 であるのに対し、心疾患群では 38.15 ± 4.62 で、有意な差が認められ、これらは、心機能低下と関連した pCO_2 の上昇が認められるヒトの心疾患例の報告とも一致しており、心機能低下の症状を良く反映している結果であると推察される。また、B.E. (vt)、 $ctCO_2$ 、 HCO_3std でも心疾患群が高値を示す傾向が認められた。これらは心疾患群がアルカローシスに傾いていることを示し、心臓の循環機能の低下により換気能力が低下する心疾患の特徴に一致している。これらのことからカニクイザルの血液ガス基準値は循環器疾患モデルの解析に有用である事が示唆された。

E . 結論

本研究の結果より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た。さらに加齢に伴う変化が認められる項目があり、加齢性モデルとしての可能性が示唆された。また、ヒトとの違いや相関性が明らかとなった。さらに心疾患モデルの病態が反映された結果であることも示唆された。すなわち、これらの基準値および結果はサルを用いた循環器疾患研究に有益であると共に、サル自体の健康管理にも役立つものである。今後は循環器疾患モデルとの関連性の詳細な解析等を通し、さらなる霊長類資源の可能性を模索したい。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto Y, Hiramatsu Y, Ageyama N, Sato S, Kanemoto S, Sato Y, Sakakibara Y. Cardiopulmonary Bypass Induces Recruitment of Bone Marrow-Derived Leukocytes to the Lungs in Monkeys. *Ann Thorac Surg.* 97: 617-622. 2014.
- 2) Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y, Mineno J. CD4(+) T Cells Modified by the Endoribonuclease MazF Are Safe and Can Persist in SHIV-infected Rhesus Macaques. *Mol Ther Nucleic Acids.* 3:e168.2014.

2. 学会発表

- 1) 藤城康世，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総会、北海道、2014 年 5 月 15-17 日。

- 2) 森谷忠生, 平松祐司, 古垣達也, 茂木芳賢, 縮共恭一, 山本純偉, 金本真也, 後藤行延, 揚山直英, 松下昌之助, 榊原謙: カニクイザルを用いた体外循環モデルの確立、第52回日本人工臓器学会大会、北海道、2014年10月17-19日。
- 3) 藤城康世, 岡林佐知, 鯉江洋, 金山喜一, 保富康宏, 揚山直英: カニクイザルに認められた肝細胞癌の生前MRI診断を実施した一例、第20回日本野生動物医学会つくば大会、茨城、2014年9月16-19日。
- 4) 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大会、茨城、2014年9月16-19日。
- 5) オスマン ボラン, 鯉江洋, 岡林佐知, 藤城康世, 金山喜一, 揚山直英: 霊長類における心拍変動およびアドレナリン受容体の加齢性変化、第20回日本野生動物医学会つくば大会、茨城、2014年9月16-19日。
- 6) Yasuyo Fujishiro, Hiroshi Koie, Hiroaki Shibata, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Kiiichi Kanayama, Yasuhiro Yasutomi, Naohide

Ageyama. Enhanced magnetic resonance imaging of Spontaneous Occurring Hepatocellular Neoplasia in Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*). 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation, Vietnam, 2014年10月14-17日。

- 7) Yuko Katakai, Syunya Nakayama, Hiromi Ogawa, Mayuko Tanaka, Akio Hiyaoka, Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Yasuhiro Yasutomi. Age-related changes on hematological, serum biochemistry and blood gas parameters in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation, Vietnam, 2014年10月14-17日。

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
特になし
3. その他
特になし

表 1. 雌雄における体重および年齢の平均値

	頭数	体重 (kg)	年齢
		平均値 (範囲)	平均値 (範囲)
雌	44	3.64±1.09 (1.10 - 6.18)	21.36±9.39 (2 - 35)
雄	20	5.74±1.02 (3.88 - 7.58)	17.05±8.94 (8 - 32)

表 2. 主要血液ガス項目の臨床学的意義

		項目名	臨床学的意義
ガス交換能力の指標	pCO ₂	二酸化炭素分圧	肺胞換気量の指標で、高値を示した場合は換気不十分、低値では過換気であることを示す。
	pO ₂	酸素分圧	血液の酸素化能力の指標であり、大気圧や外気酸素濃度などの環境要因、肺胞の換気量、拡散能、シャントなどの肺胞におけるガス交換能力により左右される。
	O ₂ SAT (SpO ₂)	酸素飽和度	血中 Hb と酸素の結合割合。PaO ₂ と相関する (酸素解離曲線)。
	ctCO ₂	血中 CO ₂ 濃度	血中の溶存二酸化炭素濃度を示す。ctCO ₂ の増加は換気不全を意味する。
酸塩基平衡の指標	pH	水素イオン濃度	水素イオン量を示す。アカゲザルの場合、7.45±0.04 以内が正常との報告がある。
	Anion GAP		Cl ⁻ 、HCO ₃ ⁻ 以外の陰イオンの総量。これらは通常測定されない陰イオンで、正常の場合はリン酸イオン・硫酸イオンなどが含まれる。特殊な病態では、乳酸・ケトン体なども含まれる。
	HCO ₃ std	標準重炭酸イオン	重炭酸イオンの指標で、腎臓における酸塩基平衡を示す。高値を示した場合は代謝性アルカローシス、低値では代謝性アシドーシスとなる。HCO ₃ に関しては呼吸性にも値が変化する。
B. E. (vt)	Base Excess in vitro	Base Excess は Buffer base の正常値からの偏移の度合いを示す。正の値は塩基の過剰 (代謝性アルカローシス) を、負の値は塩基の欠乏 (代謝性アシドーシス) を示す。	

「Hongo, T. , Hiroshige, T. and Toyota, J. 標準生理学. 第 6 版. 医学書院」参照



図 1. カニクイザルにおける動脈血採取

大腿動脈(A)および尾動脈(B)の何れの部位から採取した動脈血も全ての項目で同一の値を示す事が確認された。

表 3. 血液ガス検査項目および平均値

検査項目	平均	SD	MAX	MIN
pH	7.39	0.08	7.49	6.99
pCO ₂	36.67	6.00	50.90	9.70
pO ₂	89.91	12.69	122.20	57.20
Na ⁺	148.11	4.43	154.00	127.00
K ⁺	3.80	0.48	5.06	2.71
Ca ⁺⁺	1.21	0.07	1.40	1.04
HCO ₃ act	21.30	3.39	25.00	15.20
HCO ₃ std	22.80	4.00	28.80	6.60
B. E. (vv)	-4.04	4.16	1.20	-10.20
B. E. (vt)	-2.16	5.34	4.80	-27.20
ctCO ₂	23.38	4.90	30.80	2.60
Ca ⁺⁺ (7.4)	1.21	0.06	1.40	1.07
O ₂ SAT	96.49	1.58	98.60	91.00
Cl ⁻	107.13	3.42	115.00	89.00
Anion GAP	18.04	6.26	30.90	0.50

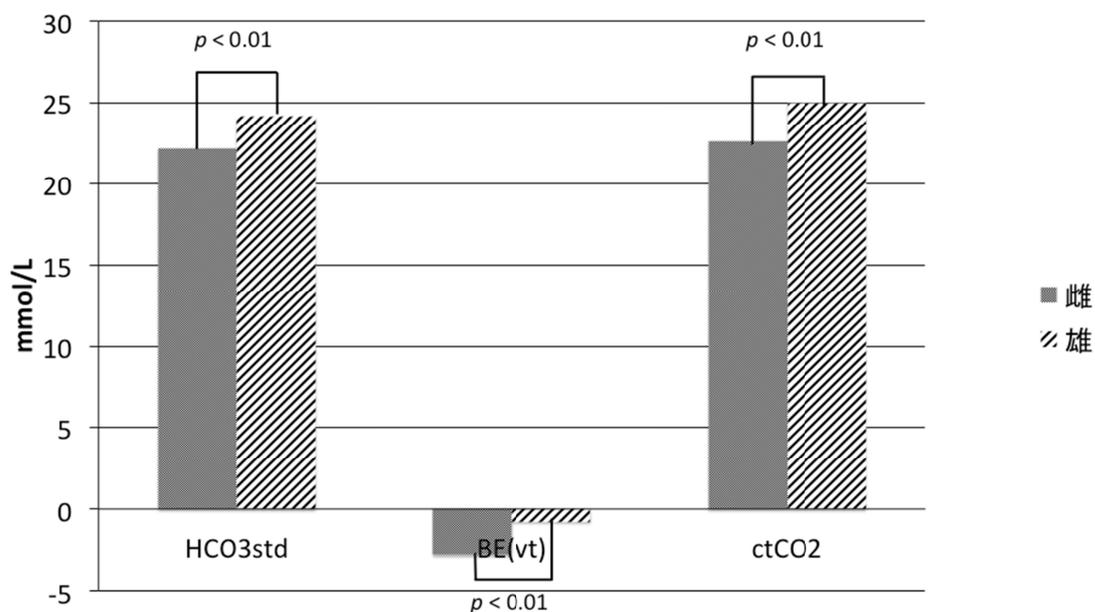


図 2. HCO₃、B.E.(vt)、ctCO₂の雌雄比較

血液ガス検査項目の雌雄に関する比較ではHCO₃std、B.E.(vt)、ctCO₂において有意な差が認められた。

表 4. 全血球計算検査項目および平均値

検査項目		平均	±SD	MAX	MIN
WBC	×10 ² /μl	82.86	26.40	146	29
RBC	×10 ⁴ /μl	649.64	100.15	880	380
HGB	g/dl	12.56	1.79	16.2	7.2
HCT	%	43.69	5.85	59.1	26.8
MCV	f1	67.64	4.59	79.1	59
MCH	pg	19.46	1.89	23.6	13
MCHC	g/dl	28.75	1.69	33.7	20.6
PLT	×10 ⁴ /μl	33.07	9.23	63.2	10.9
W-SCR	%	41.92	14.96	73.9	10.8
W-MCR	%	8.59	4.64	22.1	2.2
W-LCR	%	51.36	15.09	84.5	24.4
W-SCC	×10 ² /μl	34.30	16.26	81	9
W-MCC	×10 ² /μl	7.17	5.16	27	2
W-LCC	×10 ² /μl	43.79	21.18	118	15
RDW	f1	35.13	2.50	41.6	30.3
PDW	f1	11.87	2.23	18.6	8
MPV	f1	9.73	1.16	13	7.2
P-LCR	%	23.45	9.21	48.6	6.7

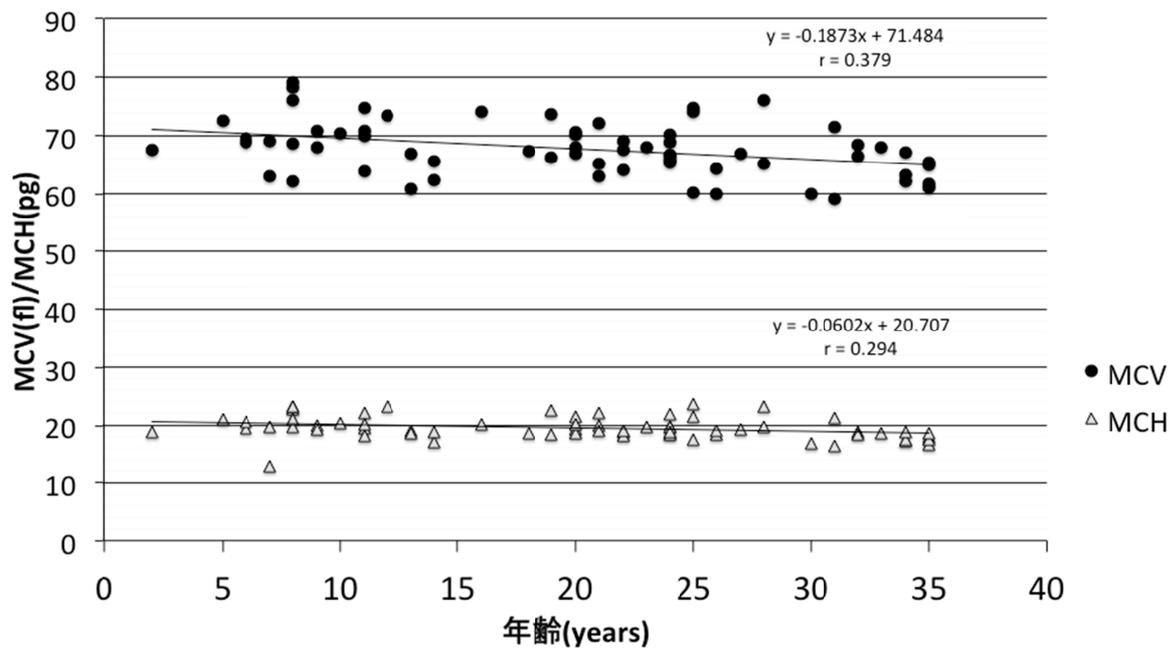


図3. 年齢とMCH、MCVの関連

加齢に伴い、RBC count、HGB、HCTが増加するのに対し、MCH、MCVは減少する傾向が認められた。

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

霊長類医科学研究センターでは、原産地（インドネシア、フィリピン、マレーシア）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。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。本年度は、SIV および SHIV 感染慢性期における病態および免疫反応について検討した。SIV_{mac239} 接種後 50 週を超えたカニクイザルのウイルス量は平均 1.6×10^6 /ml、ウイルス量の高い個体では CD4+T 細胞の減少が認められた。一方、SHIV89.6P 感染カニクイザルでは、接種後 50 週を超えて平均 1.1×10^4 /ml、CD4+T 細胞は接種直後から急激な減少が認められ、現在まで回復はみられなかった。これらのサル免疫反応について検討したところ、SIV 抗体価は SIV 接種カニクイザルで接種後、速やかに抗体の上昇が認められた。また IFN- γ 産生細胞数も時間経過と共に強い反応が認められた。SHIV 接種カニクイザルでは、抗体価および IFN- γ 産生細胞数は SIV 感染カニクイザルと比較して低値を示し、CD4+T 細胞（ヘルパー T 細胞）の喪失が関連していると考えられた。また接種後 1 年を経て、SIV 感染した 7 頭中 2 頭でエイズ病態（エイズ脳症 1 頭、多発性血管炎 1 頭）、SHIV89.6P 感染した 5 頭中 1 頭で間質性肺炎を呈し、それぞれ安楽殺を行った。これらの結果から、エイズ感染カニクイザルは、産地に関係なく高いウイルス量を検出し、またヒトのエイズ病態と類似の症状を呈することから、エイズ動物モデルとして有用であると考えられた。

A. 研究目的

感染症研究における実験動物としての霊長類は極めて重要であり、特にワクチン研究において霊長類を用いた検討は必須となっている。HIV は人以外ではチンパンジーにしか感染せず、そのチンパンジーもエイズを発症することがない。このためにエイズウイルス感染症では HIV と近縁ウイルスであり、エイズを発症する SIV とアカゲザルの実験系を用いて、病態やワクチン開発研究等が行われてきた。

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、SIV 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原産地（インドネシア、フィリピン、マレーシア）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（SIV_{mac239}）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、SIV_{mac239} および SHIV89.6P 感染カニクイザルの急性期における病態を明らかにした。本年度は慢性期における病態（ウイルス量および CD4+T 細胞）および免疫応答（細胞性免疫応答・液性免疫）について検討を行う。

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 7 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. SIV 特異的抗体価の測定

採血より採取した血漿を用いて、SIV 抗原特異的な ELISA 法を行い、抗体価を測定した。

4. 細胞性免疫反応の解析

経時的な採血より分離した PBMC (接種後 4, 16, 50 週)は、エフェクター細胞とし、抗原提示細胞には、各自己由来の B-LCL に SIVgag-pol 遺伝子および env 遺伝子を組み込んだワクシニアウイルスを感染させた感染細胞をそれぞれ用いた。エフェクター細胞および抗原提示細胞を共培養し、抗原特異的 IFN- γ 産生 ELISPOT assay を行った。

5. 病理組織学的解析

エイズ病態を呈したカニクイザルは安楽殺を行い、各臓器・リンパ節を回収し、病理組織学的解析を行った。

6. 倫理面への配慮

本研究では動物実験申請、バイオセーフティー、組換え DNA 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 接種後 50 週を超えた慢性期におけるカニクイザルのウイルス量は、平均 1.6×10^6 /ml であった。また比較的ウイルス量の高い個体では、CD4+T 細胞の強い減少が認められた。一方、SHIV89.6P に感染したカニクイザルでは、接種後 50 週を超えて

平均 1.1×10^4 /ml であり、また CD4+T 細胞は接種直後から急激な減少が認められ、CD4+T 細胞の枯渇状態は継続して確認された。(図 1A, B)。

2. SIV 特異的抗体価の測定

経時的に採取した血漿を希釈して、SIV 特異的抗体価を測定したところ、SIV 感染カニクイザルでは感染初期より高い抗体価を示し、時間経過と共に高値を示した(図 2A)。SHIV 感染カニクイザルでは、SIV 感染カニクイザルと比較して抗体価は低く、また、#5014 の個体では抗体の誘導は認められなかった(図 2B)。

3. 細胞性免疫反応の解析

SIV および SHIV 感染カニクイザルよりそれぞれ採取した PBMC (接種後 4, 16, 50 週)を用いて SIV 抗原特異的 IFN- γ 産生 ELISPOT 反応を行った。SIV 接種カニクイザルでは接種 4 週より反応は確認され、その反応は時間経過と共に強く認められた(図 3A)。SHIV 接種カニクイザルの IFN- γ 産生細胞数は、SIV 感染カニクイザルと比較して低い値を示し、また、#5002、#5014、#5024 の 3 頭の IFN- γ 産生細胞数は、時間経過と共に上昇はみられなかった(図 3B)。

4. 病理学的解析

SIV 感染サル 2 頭(#0060、#0062)、SHIV 感染サル 1 頭(#5014)は、エイズ症状を呈し安楽殺を行った。病理学的解析を行ったところ、#0060 はエイズ脳症、#0062 は多発性血管炎、#5014 は間質性肺炎と病理組織学的に診断された(Table 1)。

D. 考察

近年、モーリシャス産のカニクイザルと SIV 感染モデルは、低病原性であると報告されている。本研究ではフィリピン、インドネシア、マレーシアの各地域で産出されたカニクイザルを用いて、SIV、SHIV 感染

後の病態解析を試みた。SIVmac239 および SHIV89.6P 感染慢性期におけるウイルス量は産地に関係なく高い数値が検出された。これらのウイルス量は、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、SIV 感染カニクイザルにおける CD4+T 細胞は、感染初期において全頭で変化が無いが、慢性期になるとウイルス量の高い個体では減少傾向にある。一方で、SHIV 感染カニクイザルの CD4+T 細胞は、感染初期より喪失し、接種後 100 週を超えても回復の傾向はみられていない。これらの結果は免疫応答の結果に関連しており、CD4+T 細胞の保存されている SIV 感染カニクイザルでは、ヘルパ-T 細胞の機能により細胞性免疫および液性免疫が強く誘導される。一方で、CD4+T 細胞を喪失している SHIV 感染カニクイザルの免疫応答は、SIV 感染カニクイザルより低値を示すことが確認された。

さらに接種後、1~2 年で SIV 感染サル 2 頭、SHIV 感染サル 1 頭がエイズ症状を発症し、それぞれエイズ脳症、多発性血管炎、肺炎を呈することが確認された。これらの病態は、ヒトのエイズ症状と同じ病態を呈したことから、有力なエイズ動物モデルとして活用できると考えられた。

今後、引き続き経過観察を行いエイズ発症および非発症カニクイザルの違いを明らかにするため、免疫応答だけでなく Trim 遺伝子や MHC 遺伝子等の宿主因子についても解析を行う。

E. 結 論

カニクイザルの SIV 病態が明らかになり、エイズ動物モデルとしての有用性が示唆された。

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」

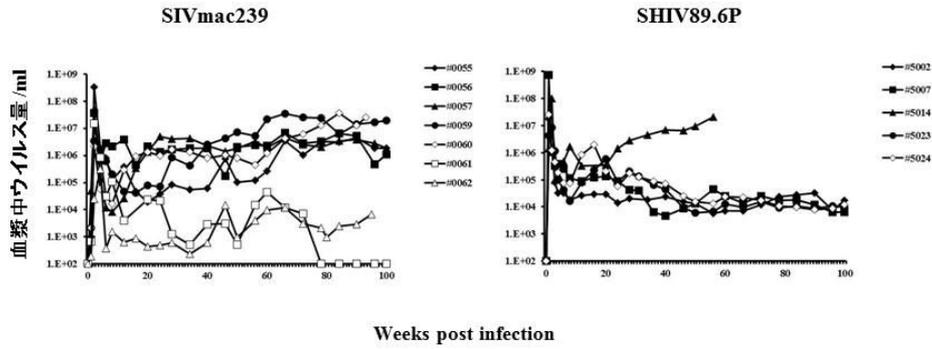
(1) 加藤 誠一、岡村 智崇、張 険峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏 BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価 第 62 回 日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014 年 11 月 10 日-12 日

「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

(A)



(B)

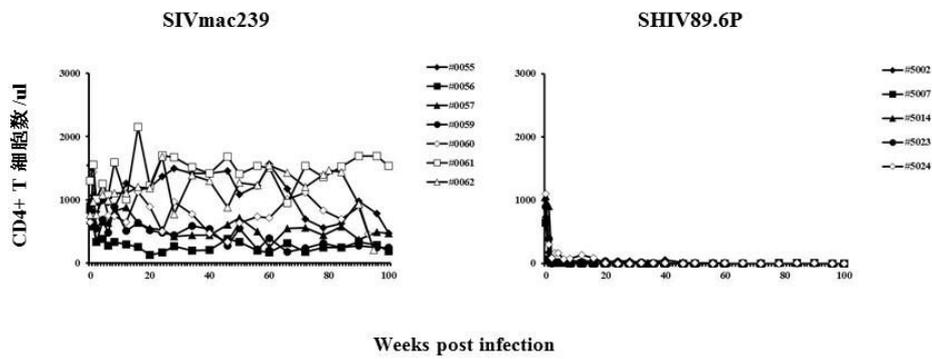
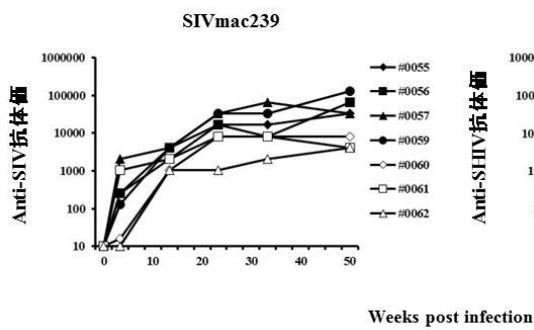


図1 SIVmac239 および SHIV89.6P 接種後のウイルス量 (A) および CD4+T 細胞 (B)。

(A)



(B)

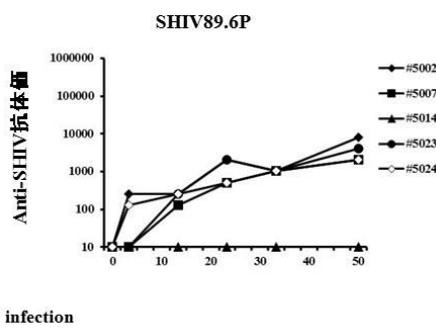


図2 SIVmac239(A)および SHIV89.6P(B)接種後の血漿中のウイルス抗体価。

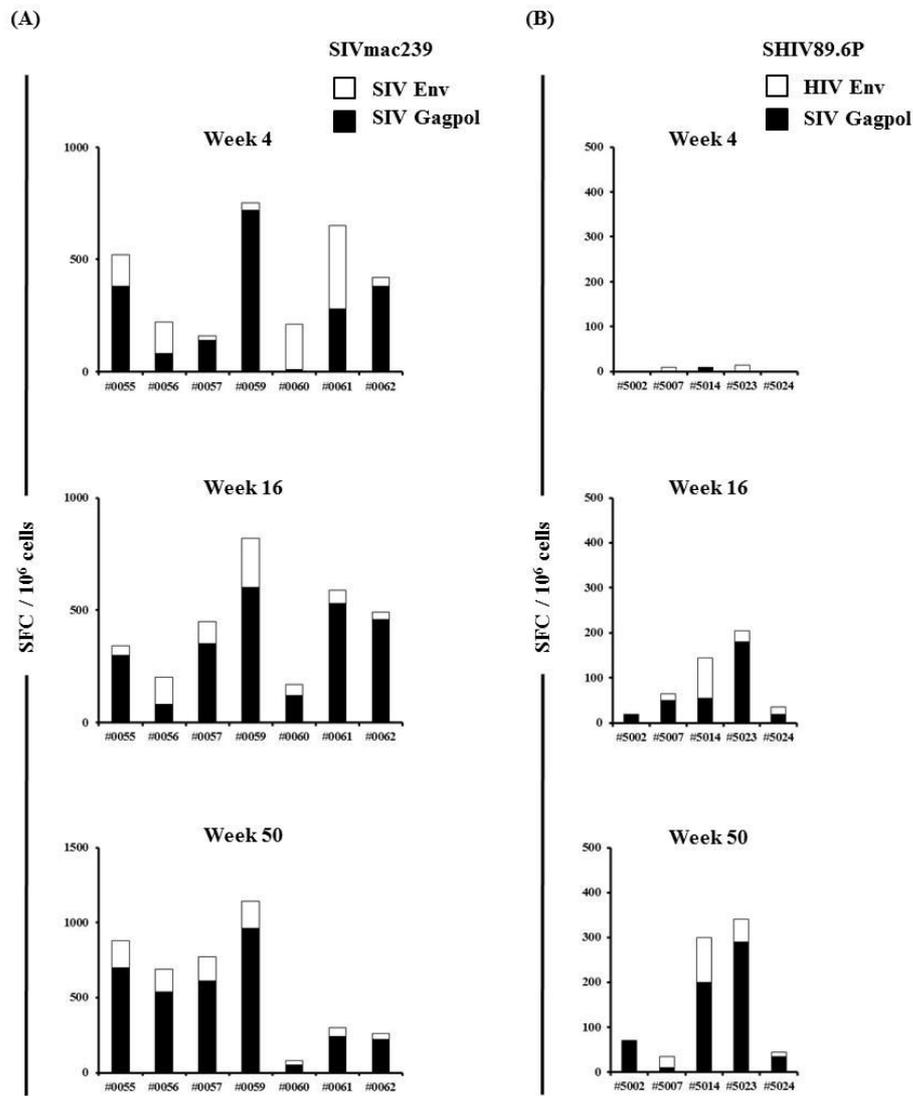


図3 SIVmac239(A)および SHIV89.6P(B)接種後の IFN- γ 産生細胞

Table 1 エイズを発症したカニクイザルの所見

Monkey	臨床症状	安楽殺	病理組織学的所見
#0060	食欲不振、体重減少、神経症状	658 日	エイズ脳症、脳脊髄炎
#0062	食欲不振、体重減少、白血球増多症	672 日	肺高血圧症、多発性血管炎
#5014	食欲不振、体重減少	391 日	間質性肺炎、リンパ組織リンパ球喪失

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

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。本研究で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。本年度は、PTEN 阻害時期の検討や卵巣内 PI3 キナーゼ（PI3K）や AKT アイソザイム蛋白質含量と排卵誘起効率との関係、さらに PTEN の卵巣内局在について調べたところ、雌マウス個体への PTEN 阻害剤は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莢膜細胞であると考えられた。また、PTEN 阻害剤の反応効率には PI3K 含量や AKT アイソザイム含量への依存性が示唆され、誘起排卵数決定機構における PI3K/Akt シグナル経路の重要性が再確認された。これまでは性周期の影響を避けるため、未成熟マウスで検討してきた。PTEN 阻害剤の効果は時期特異性が強いことから、PTEN 阻害剤による霊長類での誘起排卵数増加が成熟個体でも実践的に期待できるかを検討するには、成熟マウスを用いて性周期の影響を調査する必要がある。

A. 研究目的

霊長類や小型齧歯類等の研究用動物資源の計画的な増産・系統保存には排卵誘起技術が汎用されるが、例えばマウスにおいても誘起排卵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いまだに深刻な問題である。

本研究では研究用動物の低誘起排卵数の克服法として、卵子採取前に雌個体に各種薬剤を投与する方法を検討している。近年、卵胞発育には PI3K/Akt 経路の関与が注目され、特に Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) が原始卵胞活性化（Li ら、*Proc Natl Acad Sci USA* 107:10280-10284, 2010）や排卵（Fan ら、*Mol Endocrinol*, 22:2128-2140, 2008）に抑制的に関与することから、本研究では PTEN 阻害剤の一種 Dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate (V)（略称：bpV(pic)）と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 PTEN 阻害剤の投与時期依存的に誘起排卵数が増加することをマウスで見いだしてきた。

また、投与時期によっては PTEN 阻害剤で誘起排卵数が逆に減少する事例も見いだした。

そこで本年度は、PTEN 阻害時期のさらなる検討や、卵巣内 PI3 キナーゼ（PI3K）や AKT アイソザイム蛋白質含量と排卵誘起効率との関係、さらに PTEN の卵巣内局在についてマウスをモデルとして調べ、PTEN 阻害剤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。

B. 研究方法

1) PTEN 阻害剤と PI3K 阻害剤

PTEN 阻害剤として bpV(pic)（Enzo）をリンゲル液に溶解して用いた。投与量は 1 匹当たり 30 μ g（体重 1kg あたり 2 mg、すなわち 2 mg/kg BW）とした。

PI3K 阻害剤として LY294002（Cayman Chemicals）を DMSO に溶解した後、DMSO の最終濃度が 5%となるようにリンゲル液に加えて用いた。

2) 誘起排卵数に対する PI3K 阻害剤の影響

A/J マウスを用い、PMSG を投与する日を 28

日齢の日とし、24 時間後に LY294002 を腹腔内投与した。2 用量 (0.1 mg/kg BW と 1 mg/kg BW) を設定した。PMSG 投与 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。

3) 誘起排卵に対する bpV(pic) と LY294002 の併用効果

PMSG 投与日での PTEN 阻害剤 bpV(pic) の投与 (2 mg/kg BW) の有無と PMSG 投与の翌日での PI3K 阻害剤 LY294002 の投与 (0.1 mg/kg BW) の有無という 2 つの要因を組み合わせた合計 4 つの実験区を設定した (図 2)。採卵は上記 2) と同様に行った。

4) 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 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 PI3K の各サブユニットに対する抗体 (4 種類, 1:10,000, Cell Signaling Technology, ウサギ抗体) または AKT アイソザイムに対する抗体 (3 種類, 1:10,000, Cell Signaling Technology, ウサギもしくはマウス抗体) と抗 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (1:50,000, Millipore, マウス抗体, もしくは Cell Signaling Technology, ウサギ抗体) を、二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) として Peroxidase ラベル抗ウサギ IgG 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, 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 (Multiguage 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)。

5) PI3K サブユニットおよび AKT アイソフォームの卵巣内蛋白質含量の系統間比較

4 週齢の雌マウスより得た卵巣の PI3K サブユニット (2 系統) および AKT アイソフォーム (4 系統) の蛋白質含量の定量 Western blot 解析による系統間比較を行った。

6) 卵巣 PTEN の免疫組織染色

28 日齢の A/J マウスの卵巣を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、常法により組織切片を作成した。オートクレーブによる抗原賦活化処理の後、一次抗体として PTEN 抗体 (Cell Signaling Technology) を、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、さらに HRP 標識アビジンを反応させた。ジアミノベンジジンで発色させ、核染色 (マイヤーのヘマトキシリン) してから観察した。一次抗体処理を除いた標本を陰性対照とした。

7) 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、一要因、もしくは二要因分散分析により判定した。相関については線形回帰分散分析 (ピアソン相関検定) 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: DS25-44R1)。

C. 研究結果

1) PI3K 阻害剤 LY294002 の排卵数への影響

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から（図 1A, 昨年度実績の再掲）, PMSG 投与後, 翌日に PI3K 阻害剤である LY294002 を投与したところ, 高用量（1 mg/kg BW）では抑制傾向だが, 低用量（0.1 mg/kg BW）では排卵数が増加する傾向が見られた（図 1B）。PMSG 投与後では PI3K 活性が適度に抑制されると, つまり, PTEN 活性が適度に保たれていると排卵数が増える可能性が示唆された。

2) 誘起排卵数への PTEN 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用効果

阻害剤を全く投与しなかった対照群に比べ, bpV(pic)のみを投与した群は有意に誘起排卵数が多く, また, LY294002 のみを投与した群よりも有意に多かった。LY294002 のみを投与した群は対照群に比べ排卵数が若干多く, 両阻害剤併用群もさらに排卵数は上昇したものの, 両者とも対照群との間で有意差はなかった（図 2）。この結果は, PI3K 阻害剤の有効性は低く, PTEN 阻害剤こそが誘起排卵数の増加に有効であることを示している。

3) PI3K サブユニットの卵巣内含量の系統差

PI3K の各サブユニット蛋白質の卵巣内含量は, p85 と p110 α , Class III については C3H/HeJ に比べ A/J の方が有意に高かったが, p110 γ については 2 系統間に有意差はなかった（図 3）。本研究でこれまでに C3H/HeJ より A/J で PTEN 阻害剤による排卵数増加率が高いことが判明しているが, その理由が PI3 キナーゼによる PIP3 の産生能の高さである可能性を示している。

4) AKT アイソザイムの卵巣内含量の系統差

4 系統の卵巣内 AKT アイソザイムの各蛋白質含量には系統差が見られた（図 4）。各系統の卵巣内 AKT 含量と誘起排卵効率との間に関連はないが, bpV(pic)による排卵数増加効果と

の相関から, PTEN 阻害剤の効果と卵巣内 AKT1 含量との関連が示唆された（詳しくは図 4 の説明文を参照）。

5) 卵巣 PTEN の免疫組織染色

抗体との反応から PTEN は主に顆粒層細胞や莢膜細胞に存在し, PTEN 阻害剤はこれら顆粒層細胞や莢膜細胞に主に作用すると考えられた（図 5）。

D. 考察

PTEN 阻害剤による誘起排卵の向上効果とその機序を明らかにするため, 本年度は PTEN 阻害の時期の影響, 卵巣内 PI3K サブユニットや AKT アイソザイム蛋白質含量, さらに PTEN の卵巣内局在についてマウスをモデルとして調べた。

昨年度の結果から排卵数の上昇には PMSG 投与後の PTEN 阻害はむしろ抑制的であることが示唆され（図 1A）, 本年度の結果で PTEN 阻害剤の逆作用をもたらす PI3K 阻害剤が排卵数上昇傾向をもたらしたことから（図 1B）, 両阻害剤の併用効果が期待されたが, 相乗効果は見られず, PTEN 阻害剤単独投与こそが有効であることがわかった（図 2）。このことは, PTEN 阻害によって PI3K/Akt 経路の活性化が誘起された場合は, そのまま活性化状態を維持した方が排卵数上昇に有効であることを示唆している。

A/J は他系統に比べ PTEN 阻害剤による誘起排卵数上昇率が高いが（昨年度実績）, PI3K/Akt 経路を担うリン酸化酵素の PI3K（図 3）と AKT（図 4）の卵巣内含量と誘起排卵の相関性を調べたところ, A/J では PI3K 量や AKT 量が他系統に比べ多い傾向にあり, PTEN による PI3K/Akt 経路の抑制が PTEN 阻害剤により解除されると, 他系統に比べ効率良く PI3K/Akt 経路が活性化され, それが PTEN 抑制への反応性の良さをもたらすものと思われた。

卵巣内の PTEN は, 卵子自体よりも卵子発育を支持し, 排卵現象にも直接関与する顆粒層細胞や莢膜細胞に主に存在することから

(図5), PTEN 阻害剤により排卵数上昇が生じるのは妥当な現象だと言える。

成熟個体では生殖に関するホルモンの影響により周期的な卵胞発育が見られる(性周期; 齧歯類や家畜では発情周期, サル・ヒトでは月経周期と呼ばれる)。これまで本研究では, 性周期の影響を避け, 卵巣自体の反応を明確に見極めるために, 未成熟マウスを用いてきた。しかし, 霊長類やヒト, さらには家畜等への実践的な応用を考える場合は成熟個体での効果を検討する必要がある。PTEN 阻害剤の効果は時期特異性が高いことから, 次のステップとして PTEN 阻害剤の性周期での各段階での影響を検討し, 成熟個体への適用条件を決めることが重要だと思われる。

E. 結論

雌マウス個体への PTEN 阻害剤投与は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莢膜細胞であることが明らかとなった。PTEN 阻害剤投与の効果は時期特異性が強いことから, 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, 性周期(月経周期)の影響を調査する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Kumagai, A., Fujita, A., Yokoyama, T., Nonobe, Y., Hasaba, Y., Sasaki, T., Itoh, Y., Koura, M., Suzuki, O., Adachi, S., Ryo, H., Kohara, A., Tripathi, L., Sanosaka, M., Fukushima, T., Takahashi, H., Kitagawa, K., Nagaoka, Y., Kawahara, H., Mizuguchi, K., Nomura, T., Matsuda, J., Tabata, T., and Takemori, H. (2014) Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. *Genes*

5(4): 1095-1114.

2. 鈴木治, 松田潤一郎 (2015) 心筋症のマウスモデル: 拡張型心筋症マウスモデルの心機能解析と遺伝子解析, *医学のあゆみ* 252(10):1027-1031.

2) 学会発表

1. Suzuki, O. Chromosomal Mapping and Zygosity Check PCR of transgenes in a GFP Mouse Line (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM131-Osb) Determined by Genomic Walking. *Experimental Biology* 2014. 平成 26 年 4 月 26 日 ~ 30 日. San Diego, CA, USA.
2. 小浦美奈子, 河相晶子, 中野正文, 鈴木治, 松田潤一郎。医薬基盤研究所 実験動物研究資源バンクにおいて扱った, 凍結胚・凍結精子の復元率について。第 61 回日本実験動物学会総会。平成 26 年 5 月 15 日 ~ 17 日。札幌。
3. 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。医薬基盤研究所「実験動物研究資源バンク」創薬・難病研究への貢献。第 61 回日本実験動物学会総会。平成 26 年 5 月 15 日 ~ 17 日。札幌。
4. 鈴木治, 小浦美奈子, 内尾(山田)こずえ, 松田潤一郎。マウス 5 系統における bpV(pic)併用による誘起排卵向上効果。第 61 回日本実験動物学会総会。平成 26 年 5 月 15 日 ~ 17 日。札幌。
5. 鈴木治。マウス誘起排卵に対する PTEN 阻害剤の投与時期の影響。第 55 回日本卵子学会。平成 26 年 5 月 17 日 ~ 18 日。神戸。
6. Suzuki, O. Strain Difference in Superovulation with a PTEN Inhibitor in Mice. *ICE / ENDO* 2014. 平成 26 年 6 月 21 日 ~ 24 日. Chicago, IL, USA.
7. 鈴木治。卵巣内 PI3 キナーゼサブユニット蛋白質含量のマウス系統間比較。第 107 回日本繁殖生物学会大会。平成 26 年 8 月

- 20日～24日。帯広。
8. Suzuki, O. Effects of PTEN and PI3 Kinase Inhibitors on Superovulation in A/J Mice. 65th AALAS National Meeting. 平成 26 年 10 月 19 日～23 日. San Antonio, TX, USA.
 9. 塩田節子, 鈴木治, 小澤みどり, 平山知子, 湯華民, 森康子, 渡邊健, 清水則夫, 亀岡洋祐, 笠井文生, 小原有弘. 正常ヒト臍帯静脈内皮細胞株 HUV-EC-C のゲノムに組み込まれた HHV-6 の存在様式。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。平成 26 年 11 月 10 日～12 日。横浜。
 10. Matsuda, J., Koura, M., Kawai, A., Nakano, M., Moriishi, E., Noguchi, Y., Sasaki, M., and Suzuki, O. 2014. Aiming to promote innovative drug discovery: Laboratory Animal Resource Bank at the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Japan. AFLAS Congress 2014. 平成 26 年 11 月 11 日～12 日. Kuala Lumpur, Malaysia.
 11. 鈴木治。マウス卵巣内 AKT アイソフォーム蛋白質含量の系統差。第 37 回日本分子生物学会年会。平成 26 年 11 月 25 日～27 日。横浜。
 12. Suzuki, O. Effect of a combination of PTEN and PI3K inhibitors on superovulation in A/J mice. 2014 ascb/ifcb Meeting. 平成 26 年 12 月 6 日～10 日. Philadelphia, PA, USA.
 13. Suzuki, O. Comparison of ovarian contents of AKT isoforms among four strains of mice. 41st IETS Annual Conference. 平成 27 年 1 月 10 日～13 日. Versailles, France.
 14. Suzuki, O. Strain Difference in Protein Contents of Tachykinin Receptors in Mouse Ovaries. ENDO 2015. 平成 27 年 3 月 5 日～8 日. San Diego, CA, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

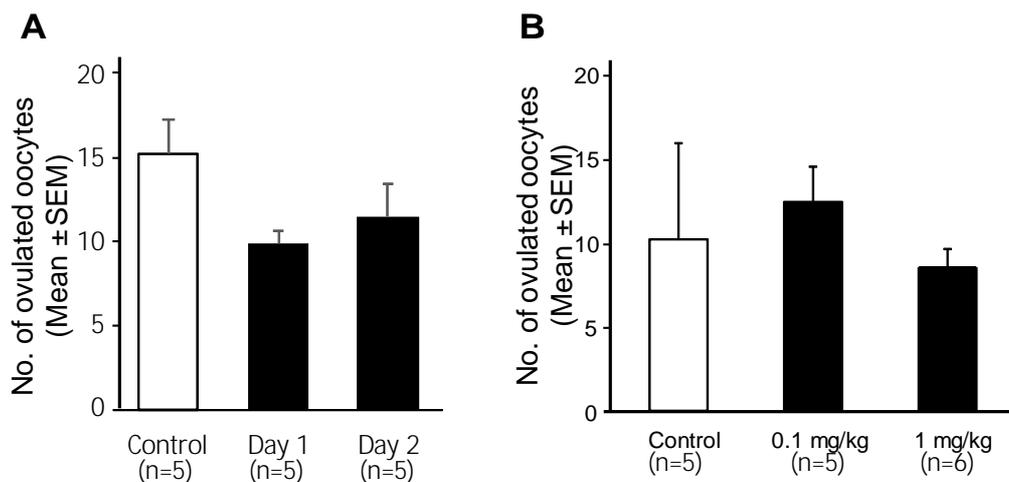
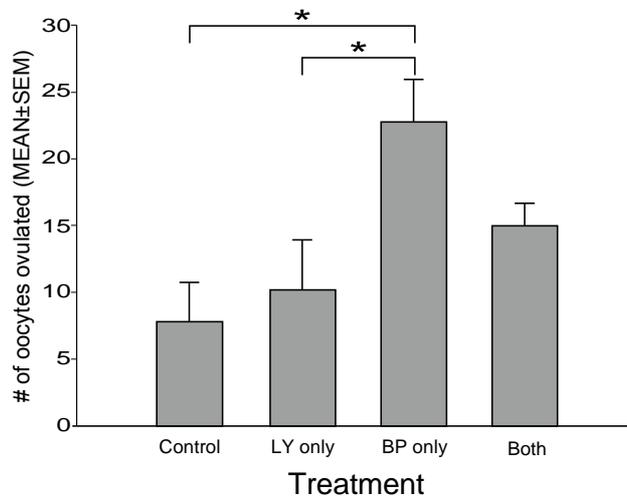


図 1. 誘起排卵数に対する PTEN 阻害剤 bpV(pic)と PI3K 阻害剤 LY294002 の効果。各実験群の雌 1 匹あたりの平均誘起排卵数 ± 標準誤差を示す。A) PMSG 投与後, 翌日 (Day 1) と 2 日目 (hCG 投与日と同じ, Day 2) に PTEN 阻害剤である bpV(pic)を 2 mg/kg BW 投与すると (), 未投与群 () に比べ排卵数が少ない傾向が見られた (昨年度実績の再掲)。すなわち, PMSG 投与後の PTEN 阻害剤投与は排卵数を抑制する傾向があることがわかった。B) PMSG 投与後, 翌日に PI3K 阻害剤である LY294002 を 0.1 mg/kg BW, もしくは 1 mg/kg BW 投与したところ (), 未投与群 () に比べ 0.1 mg/kg BW 投与群では排卵数が増加する傾向が見られた。1 mg/kg BW 投与群では減少傾向であった。PMSG 投与後では PI3K 活性が抑制されると, つまり, PTEN 活性が保たれていると排卵数が増える可能性が示唆された。



Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
PTEN-inhibitor	1	511.357	511.357	11.709	0.003 **
PI3K-inhibitor	1	38.035	38.035	0.871	0.364
PTEN-inhibitor x PI3K-inhibitor	1	135.704	135.704	3.107	0.096
Residual	17	742.400	43.671		
Total	20	1400.000	70.000		

図 2. 誘起排卵数に対する PTEN 阻害剤 bpV(pic)と PI3K 阻害剤 LY294002 の併用効果。PMSG 投与日での PTEN 阻害剤 bpV(pic)の投与の有無と PMSG 投与の翌日での PI3K 阻害剤 LY294002 の投与の有無という 2 つの要因を組み合わせ合わせた合計 4 つの実験区を設定し、誘起排卵数に対する PTEN 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用効果について調べた。上段に雌 1 匹あたりの平均誘起排卵数 (平均 ± 標準誤差; n=5, 併用群のみ n=6) を示すグラフを (*は $p < 0.05$ で有意差有り), 下段に 2 要因分散分析の結果を示す。全く阻害剤を投与しなかった対照群 (Control) に比べて, bpV(pic)のみを投与した群 (BP only) は有意に排卵数が多く, また, LY294002 のみを投与した群 (LY only) よりも有意に多かった。一方, 併用群 (Both) は対照群と有意差はなく, bpV(pic)の効果が LY294002 によって抑制されていた。2 要因分散分析では変動因として PTEN 阻害剤 (PTEN-inhibitor) の効果のみが有意で (**: $p < 0.01$), PI3K 阻害剤 (PI3K-inhibitor) や両阻害剤の相互作用 (PTEN-inhibitor x PI3K-inhibitor) は有意ではなかったことから, PTEN 阻害剤こそが誘起排卵数の増加に有効であることが確かめられた。

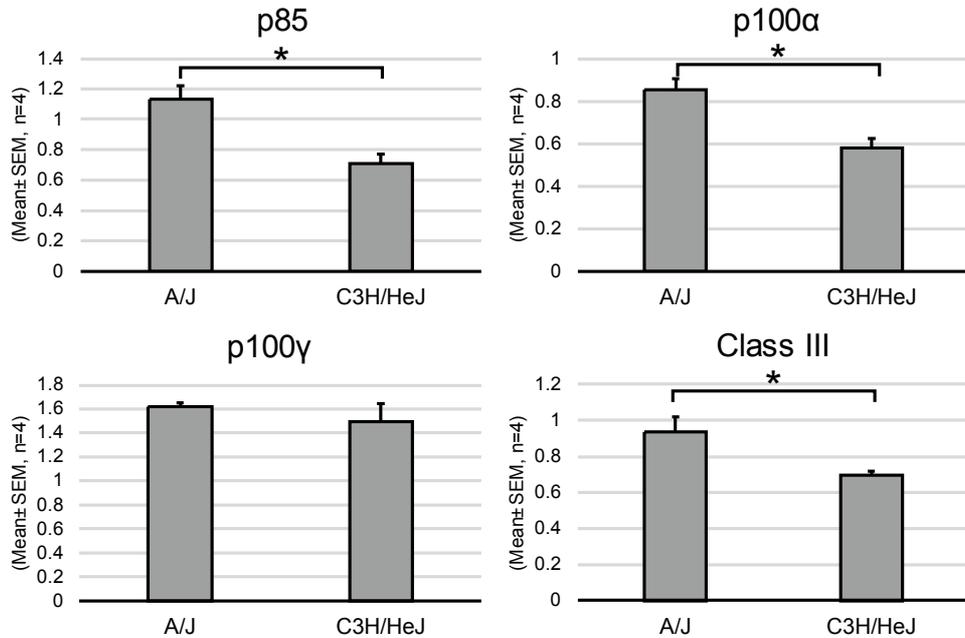


図3. 卵巣内 PI3K サブユニット蛋白質含量 (GAPDH 含量で標準化した含量, 卵巣 1 個あたりの平均 ± 標準誤差, n=4)。PI3 キナーゼの各サブユニット蛋白質の卵巣内含量は, p85 と p110α, Class III については C3H/HeJ に比べ A/J の方が有意に高かったが ($p < 0.05$), p110γ については 2 系統間に有意差はなかった ($p > 0.05$)。C3H/HeJ より A/J で PTEN 阻害剤による排卵数増加率が低いことを昨年度に確認しているが, その理由は PI3 キナーゼによる PIP3 の産生能が C3H/HeJ に比べ A/J で高いことによる可能性を示している。

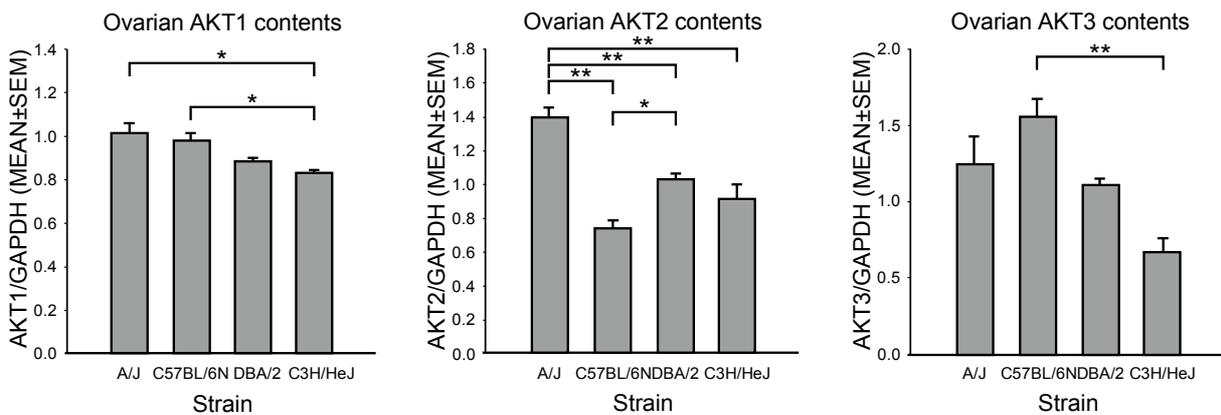


図4. 卵巣内 AKT アイソザイム蛋白質含量 (卵巣 1 個あたりの平均 ± 標準誤差, n=4)。4 系統の卵巣内 AKT アイソザイムの各蛋白質含量には系統差が見られた (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)。誘起排卵数 (昨年度に調査済み) と AKT アイソフォームの卵巣内含量の間には, どの AKT アイソフォームにおいても有意な相関は無かったことから ($p > 0.05$, ピアソン相関検定), 卵巣内 AKT 含量と誘起排卵効率との間には密接な関連はないと思われた。一方, PTEN 阻害剤 bpV(pic)による排卵数増加効果 ($[\text{bpV(pic)群の平均排卵数}]/[\text{対照群の平均排卵数}]$) と卵巣内 AKT 含量との相関をみると, AKT1 との間でのみ有意な相関が見られたことから ($p = 0.014$, ピアソン相関検定), PTEN 阻害の影響の出方には AKT1 の量が関係することが示唆された。

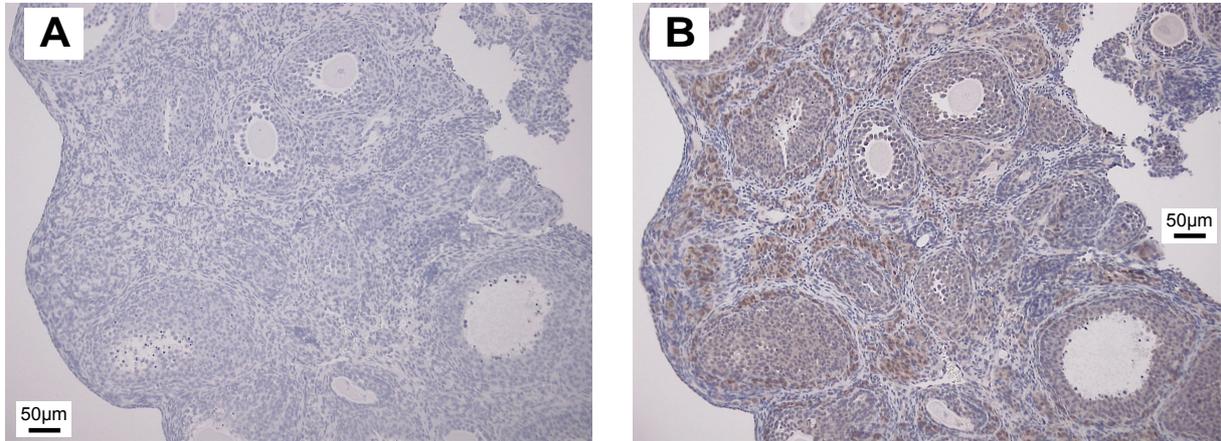


図 5.28 日齢の A/J マウスの卵巣を用いた PTEN の免疫組織染色 (A: 一次抗体未使用の陰性対照 ; B: PTEN 抗体使用)。顆粒層細胞および莢膜細胞に強い染色 (茶色) が見られる。卵子の染色は非常に弱いことから, PTEN は主に顆粒層細胞や莢膜細胞に存在し, PTEN 阻害剤はこれら顆粒層細胞や莢膜細胞に主に作用すると考えられた。

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の発現解析

分担研究者 高橋一郎 (医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター)

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 の発現が重要な働きを担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遺伝子を解析しデータベースより、タイプを同定した。

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 データベースを検索し発現しているクローンタイプを同定した。

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。またヒトの疾患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。今年度は昨年度に引き続き情報を収集した。

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 IPD (Immuno Polymorphism Database) MHC データベースを検索し発現している MHC のタイプを同定した。

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取り、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 数個のクローンを取りシーケンスしたが、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 のデータベースを検索して対応するクローンを同定した。取れてくる大腸菌の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、個体の n 数が少ないのでできなかった。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(#018)があった。また A ローカスがホモであると思われる個体が3頭 (#022, #053, #053) いた。B ローカスについて、ホモと思われる個体はいなかった。

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があるいは抵

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個体の数を増やして解析する必要がある。そしてデータを蓄積する必要がある。ヒトの MHC については、データベースが完備しルミネックス法で蛍光ビーズを使用し短時間で調べられる。ヒトとサルではニーズの要求も異なるので比較はできないが、できるだけ簡便で正確に同定できる方法の開発が待たれる。

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。このようなデータの蓄積がヒトの医療への貢献ができると考えられるので、地道にデータを積み重ねていく努力は必要である。

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	
#016	Mafa-A1*002:01:01	5	Mafa-B*121:01	3
	Mafa-A1*003:03	3	Mafa-B*136:02	2
			Mafa-B*007:01:01	2
			Mafa-B11L*01:04	2
			Mafa-B11L*01:01	1
			Mafa-B*050:01	1
			Mafa-B*050:04	1
#018	Mafa-A1*098:02	2	Mafa-B*017:01	4
	Mafa-A2*24:03	2	Mafa-B*007:01:02	3
	Mafa-A1*100:01	1		
#022	Mafa-A1*089:01	14	Mafa-B*104:01:02	3
			Mafa-B*073:01	2
			Mafa-B*064:01	1
			Mafa-B*144:02	1
#053	Mafa-A1*089:03	8	Mafa-B*099:01	3
			Mafa-B*114:01	1
#054	Mafa-A1*052:02	6	Mafa-B*068:02	3
	Mafa-A1*100:01	2	Mafa-B*037:02	2
			Mafa-B*033:02	2
			Mafa-B*068:03	1
#055	Mafa-A1*100:01	6	Mafa-B*108:01	3
			Mafa-B11L*01:04	2
			Mafa-B*007:01:02	1
			Mafa-B*033:03	1
#056	Mafa-A1*010:02:01	7	Mafa-B*058:01	5
	Mafa-A1*068:01	2	Mafa-B*153:01	3
	Mafa-A4*14:04	2	Mafa-B*043:01	2
#057	Mafa-A1*097:01	4	Mafa-B*007:01:01	4
	Mafa-A1*003:01	2	Mafa-B*121:01	3
			Mafa-B*011:01	1
			Mafa-B*004:03	1

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

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
<u>Shimozawa Nobuhiro</u>	Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells generated by using allogeneic genes.	Andras Nagy	iPS cells: Generation characterization and differentiation –Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology	Springer	Deutschland	2014	DOI 10.1007/7651_2014_137

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okabayashi S, <u>Shimozawa N</u> , Yasutomi Y, Yanagisawa K, Kimura N.	Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain accompanied by enhanced GA β generation in nonhuman primates.	PLoS ONE	10	e0117362	2015
Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, <u>Yasutomi Y</u> , Wijaya E, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenberg 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			印刷中
Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, <u>Okamura T</u> , Tsujimura Y, Inada H, Noshita T, Matsuo K. and <u>Yasutomi Y</u> .	Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization.	Vaccine	32	1727-1735	2014
Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., <u>Yasutomi Y.</u> , Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ.	A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	111	3086-3091	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and <u>Yasutomi Y.</u>	Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung.	Plos One	E-pub		2014
Saito N, Chono H, Shibata H, <u>Ageyama N.</u> , <u>Yasutomi Y.</u> , Mineno J.	CD4(+) T Cells Modified by the Endoribonuclease MazF Are Safe and Can Persist in SHIV-infected Rhesus Macaques.	Mol Ther Nucleic Acids.	3	e168	2014
Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, <u>Yasutomi Y.</u> , Aonuma K, Imanaka-Yoshida K.	Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation.	J.Am.Heart Assoc.	E-pub		2014
Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, <u>Yasutomi Y.</u> , 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.	E-pub		2014
Fukuyama Y., Yuki Y., Kataki Y., Harada N., Takahashi H., Takeda S., Mjima M., Joo S., Kurokawa S., Sawada S., Shibata H., Park EJ., Fujihashi K., Briles DE., <u>Yasutomi Y.</u> , 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	E-pub		2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
L. Yasmin, J. Takano, Y. Nagai, J. Otsuki, <u>T. Sankai</u>	Detecting and quantifying male-specific fetal DNA in the serum of pregnant cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>)	Com. Med.	65	70-76	2015
K. Honsho, M. Hirose, M. Hatori, L. Yasmin, H. Izu, S. Matoba, S. Togayachi, H. Miyoshi, <u>T. Sankai</u> , A. Ogura, A. Honda	Naïve-like conversion enhances the difference in innate <i>in vitro</i> differentiation capacity between rabbit ES cells and iPS cells	J. Reprod. Dev.	61	13-19	2015
A. Honda, M. Hirose, <u>T. Sankai</u> , L. Yasmin, K. Yuzawa, K. Honsho, H. Izu, A. Iguchi, M. Ikawa, A. Ogura	Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of <i>Tyrosinase</i> gene using CRISPR/Cas9	Exp.Anim.	64	31-37	2015
M. Hatori, <u>N. Shimosawa</u> , L. Yasmin, H. Suemori, N. Nakatsuji, A. Ogura, K. Yagami, <u>T. Sankai</u>	Role of retinoic acid and fibroblast growth factor 2 in neural differentiation from cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) embryonic stem cells	Comp. Med.	64	1-8	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kumagai, A., Fujita, A., Yokoyama, T., Nonobe, Y., Hasaba, Y., Sasaki, T., Itoh, Y., Koura, M., <u>Suzuki, O.</u> , Adachi, S., Ryo, H., Kohara, A., Tripathi, L., Sanosaka, M., Fukushima, T., Takahashi, H., Kitagawa, K., Nagaoka, Y., Kawahara, H., Mizuguchi, K., Nomura, T., <u>Matsuda, J.</u> , Tabata, T., and Takemori, H.	Altered Actions of Memantine and NMDA- Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line.	Genes	5(4)	1095-1114	2014
鈴木治， 松田潤一郎	心筋症のマウスモデル： 拡張型心筋症マウスモデ ルの心機能解析と遺伝子 解析	医学のあゆみ	252 (10)	1027-1031	2015