

発生工学的手法によるニホンザルの計画的
繁殖と実験動物化に関する研究

(課題番号 11558097)

平成11年度～平成14年度科学研究費補助金

(基盤研究 (B) (1))

研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 鳥居 隆三

(滋賀医科大学動物生命科学研究センター教授)

目 次

はしがき	1
研究組織	3
研究発表	5
研究成果	9
Efficacy of intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) on artificial reproduction of Japanese monkey (<i>Macaca fuscata</i>)	10
ニホンザル繁殖システムへの顕微授精の応用	11
Birth of the Japanese Monkey (<i>Macaca fuscata</i>) Infant Following In-vitro Fertilization and Embryo Transfer	18
ニホンザルの室内人工繁殖法 (2) - 顕微授精 - 胚移植法の検討 -	27
ESTABLISHMENT OF THE PRIMATE EMBRYONIC STEM CELL LINES FROM BLASTOCYSTS PRODUCED BY INTRA CYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI) OR IN VITRO FERTILIZATION (IVF) USING THE JAPANESE MONKEY AND THE CYNOMOLGUS MONKEY	28
DEVELOPMENT OF THE CYNOMOLOGUS MONKEY OOCYTES FOLLOWING INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION	29
The UL27 Sequence of Herpes B Virus in Japanese Macaque	30
First successful birth of the Cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) by intra-cytoplasmic sperm injection and embryo-transfer(ICSI-ET)	31
サル ES 細胞株の樹立	32
Establishment of Embryonic Stem Cell Lines From Cynomolgus Monkey Blastocysts Produced by IVF or ICSI	39
カニクイザルの顕微授精胚の移植による出産と胚性細胞の樹立	46
サル (ニホンザル、カニクイザル) ES 細胞株の樹立とこれからの展開	47
サル ES 細胞研究の最前線	56
Establishment of a pluripotent cynomolgus monkey ES cell line expressing GFP	64
Detection of a Unique Genotype of Monkey B Virus (<i>Cercopithecine herpesvirus1</i>) Indigenous to Native Japanese Macaques (<i>Macaca fuscata</i>)	65
Monkey Embryonic Stem Cell Lines Expressing Green Fluorescent Protein	70

滋賀医科大学附属図書館



2002018270

(はしがき)

世界に約200種生息するとされる霊長類の中で、アカゲザルやカニクイザルと同じマカカ属に属するニホンザルは我が国に唯一生息するサルであり、世界最北端に生息する貴重なサルでもある。このニホンザルは、最近のバブル期経済に代表される日本経済の急速な発展に伴い計画性に乏しい山里の宅地化やゴルフ場等の乱開発などにより生息する場を追われ、さらに休耕田の増加とそこでの根菜類の栽培等により山里の田畑や住宅地に餌を求め出現することが多くなり、農作物やヒトに被害を及ぼすとして有害鳥獣駆除の対象動物として殺処分あるいは捕獲されてきた。一方、地方行政は捕獲された個体は医学・生物学研究用の実験材料にということで大学や研究機関等に譲渡しその処分を任せ、また大学等は無償で材料が手に入ることから、ニホンザルの野生捕獲個体の直接利用という道筋が出来てしまった。

本学が位置する滋賀県も有数のニホンザルの生息地域であると同時に、人口増加率は今や我が国トップを争い、山里の宅地化、ゴルフ場の乱立が見られた結果、ニホンザルは有害鳥獣として多数捕獲と殺処分が行われ、捕獲された個体の一部は本学に譲渡されてきた経緯がある。

本学に譲渡されたニホンザルについて搬入時の検収と検疫、さらに、内分泌学的な生理機能に関して分析を進めてきた結果、滋賀県に生息するニホンザルは、外部および内部寄生虫は散見されるものの、結核、サルモネラ、赤痢等の罹患は全くないこと、生殖生理学的数値として月経周期は約28～30日、妊娠期間は160～180日であり、交尾期は10月～3月に限られ、出産時期は4月から6月に集中すること、この季節繁殖性の原因は視床下部からの Gn-RH の分泌に依存していること等の成績を得ることができた。また本学では、基礎医学から臨床医学研究の実験用個体として用いられた結果、多大の成果をもたらしてくれた。とくに、ニホンザルの持つ特性ともいえる温順な性格とそれに伴うトレーニング効果が大であること、体躯が大きく体力もあることなど、医学研究なかでも脳神経系の研究にはなくてはならない種ともいわれている。しかしながら、最近の本学に譲渡される有害鳥獣捕獲個体は、妊娠中のメス個体や若い個体（授乳を受けている1年未満の幼弱個体）、摩耗の激しい歯をもつ、あるいはほとんどの歯が脱落した状態にある老齢個体等、ヒトにとって捕獲しやすい、サルにとって捕獲されやすい個体が増加してきた。しかも人獣共通感染症の一つであるヘルペスBウイルス抗体が、滋賀県内で捕獲された成熟個体の約半数（加齢と共に増加）が陽性個体であること等も分かった。

この様な状況をふまえ、本研究では、医学研究に有用なニホンザルを、野生捕獲個体に依存するのではなく、かつ人獣共通感染症の危険性のない、しかも遺伝的にも統御されたいわゆる実験動物を作出することによって、医学研究における実験成績の精度、再現性を改善し、その結果使用される個体数も削減できると考え、ニホンザルの室内人工繁殖による実験動物化について検討した。人工繁殖法では、従来の自然交配法に比べて微生物学的、遺伝学的統御をより精度のあるものとすべく、発生工学的手法を活用した室内での人工繁殖法を検討し、その可能

性を探り、将来室内人工繁殖法を実用段階に移行出来るか否かの検討を行うことも目的とした。

その結果、発生工学的手法を活用した体外受精一胚移植法、顕微授精一胚移植法を確立し、遺伝学的に統御されたSPFの個体の作出の見通しがついた。さらに、受精胚の体外培養法の確立と胚性幹(ES)細胞の分離と樹立にも成功した。

このようにSPFのニホンザルの作出が可能となり、ニホンザルの実験動物化という当初の目的を達成することが出来た。今後さらに室内での計画的な繁殖を、実験段階から生産段階に移行させることに努力すると共に、本研究成果が医学研究のさらなる進展に生かされることを期待したい。

平成15年3月

鳥居 隆三

研究組織

平成11年度～平成13年度

研究代表者：鳥居隆三（滋賀医科大学動物生命科学研究センター、教授）

研究分担者：和 秀雄（大阪大学人間科学部、教授）

研究分担者：細井美彦（近畿大学生物理工学部、教授）

研究分担者：入谷 明（近畿大学生物理工学部、教授）

平成14年度

研究代表者：鳥居隆三（滋賀医科大学動物生命科学研究センター、教授）

研究分担者：和 秀雄（広島国際大学社会環境科学部、教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成11年度	4,600	0	4,600
平成12年度	2,600	0	2,600
平成13年度	2,700	0	2,700
平成14年度	2,200	0	2,200
総計	12,100	0	12,100

研 究 発 表

研究発表

(1) 学会誌等

1. Kusaka N, Torii R, Hosoi Y, Masuda Y, Mori F, Yamashita M, Nigi H & Iritani A, Efficiency of intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) on artificial reproduction of Japanese monkey (*Macaca fuscata*), *Exp. Anim.*, 48(5), 325, 1999.
2. 細井美彦、鳥居隆三、増田善行、佐伯和弘、松本和也、加藤博巳、入谷明、ニホンザル繁殖システムへの顕微授精の応用、*近畿大学生物理工学部紀要*、2、19-25、1999.
3. Torii R, Hosoi Y, Masuda Y, Iritani A & Nigi H, Birth of the Japanese monkey (*Macaca fuscata*) infant following in-vitro fertilization and embryo transfer, *Primates*, 41(1), 39-47, 2000.
4. 藤波菜穂子、鳥居隆三、細井美彦、和秀雄、入谷明、ニホンザルの室内繁殖法(2) -顕微授精-胚移植法の検討-、*霊長類研究*、16、3、291、2000.
5. Torii R, Hosoi Y, Fujinami N, Tada T, Suemori H, Kondo Y, Imahie H, Kobayashi K, Nakatsuji N & Iritani A, Establishment of the primate embryonic stem cell lines from blastocysts produced by intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) or in vitro fertilization (IVF) using the Japanese monkey and the Cynomolgus monkey, *Theriogenology*, 55(1), 374, 2001.
6. Fujinami N, Hosoi Y, Torii R, Takenoshita Y, Saeki K, Matsumoto K, Nigi H & Iritani A, Development of the Cynomolgus monkey oocytes following intracytoplasmic sperm injection, *Theriogenology*, 55(1), 503, 2001.
7. Ohsawa K, Torii R, Watanabe Y & Sato H, The UL27 sequence of Herpes B virus in Japanese macaque, *Exp. Anim.*, 50(3), S36, 2001.
8. Torii R, Fujinami N, Hosoi Y, Takenoshita Y & Iritani A, First successful birth of the Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) by intra-cytoplasmic sperm injection and embryo-transfer(ICSI-ET), *Exp. Anim.*, 50(3), S63, 2001.
9. 末盛博文、鳥居隆三、細井美彦、サルES細胞の樹立、*実験医学*、19、1938-1944、2001.
10. Suemori H, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kobayashi K, Imahie H, Kondo Y, Iritani A & Nakatsuji N, Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI, *Developmental Dynamics*, 222 : 273-279, 2001.
11. 鳥居隆三、細井美彦、藤波菜穂子、和秀雄、入谷明、カニクイザルの顕微授精胚の移植による出産と胚性幹細胞の樹立、*霊長類研究*、17、2、164、2001.
12. 鳥居隆三、サル(ニホンザル、カニクイザル)ES細胞株の樹立とこれからの展開、

関西実験動物研究会報、22, 55-62, 2001.

13. 鳥居隆三、末盛博文、サルES細胞研究の最前線、分子細胞治療、1 (1)、15-22, 2002.
14. Torii R, Takada T, Suzuki Y, Kadota N, Kobayashi K, Kondo Y, Nito S, Kimura H, Hosoi, Y & Iritani A, Establishment of pluripotent cynomolgus monkey ES Cell line expressing GFP, Exp. Anim., 51(3), S80, 2002.
15. Ohsawa K, Black DH, Torii R, Sato H & Eberle R, Detection of a unique genotype of monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) indigenous to native Japanese macaque (*Macaca fuscata*), Comparative Medicine, 52, 555-559, 2002.
16. Takada T, Suzuki Y, Kondo Y, Kadota N, Kobayashi, K, Nito S, Kimura H & Torii R, Monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein, Cell Transplantation, 11(7), 631-635, 2002.
17. Hosoi Y, Torii R, Fujinami N, Matsumoto K, Saeki K, & Iritani A, Fertilization by intracytoplasmic sperm injection and subsequent embryo development in vitro to blastocysts in Japanese monkey (*Macaca fuscata*), J. Mamalian Ova Research, 20, 2003(in press)

(2) 口頭発表等

1. 日下尚子、鳥居隆三、細井美彦、増田善行、森布紀子、山下正紀、和秀雄、入谷明、ニホンザルの人工繁殖における顕微授精の有用性、第46回日本実験動物学会、千葉(5/20-5/22/1999)。
2. 藤波菜穂子、鳥居隆三、細井美彦、和秀雄、入谷明、ニホンザルの室内繁殖法(2) -顕微授精-胚移植法の検討-、第16回日本霊長類学会大会、名古屋(7/7-7/9/2000)。
3. Hosoi Y, Torii R., Kusaka N, Matsumoto, K, Saeki K, Nigi H & Iritani A, Establishment of routine artificial reproductive methodology in the Japanese monkey (*Macaca Fuscata*), 14th International Congress of Animal Reproduction, Stockholm (7/2-7/6/2000).
4. Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kondo Y, Imahie H, Kobayashi K, Iritani A & Nakatsuji N, Embryonic stem cell lines established from primates species and mouse strains derived from asian wild mice, International Congress on Differentiation and Cell Biology, Australia (9/24-9/28/2000).
5. 大沢一貴、鳥居隆三、松林清明、佐藤浩、日本産ニホンザル三叉神経節からのBVゲノム検出の試み、第48回日本ウイルス学会、三重(10/12-10/14/2000)。
6. 鳥居隆三、サル(カニクイザル、ニホンザル)のES細胞株樹立と今後の展開、関西実験

- 動物研究会、第67回研究会、京都(12/1/2000)。
7. Torii R., Hosoi Y, Fujinami N, Kondo Y, Imahie H, Kobayashi K, Iritani A & Nakatsuji N, Establishment of the primate embryonic stem cell lines from blastocysts produced by intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) or in vitro fertilization (IVF) using the Japanese monkey and the Cynomolgus monkey, The 27th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Omaha, USA(1/13-1/16/2001).
 8. Fujinami N, Hosoi Y, Torii R, Takenoshita Y, Saeki K, Matsumoto K, Nigi H & Iritani A, Development of the Cynomolgus monkey oocytes following intracytoplasmic sperm injection, The 27th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Omaha, USA(1/13-1/16/2001).
 9. 鳥居隆三、サル類を用いた体外受精及び顕微授精とその有用性、予防衛生協会セミナー2001、実験用霊長類を用いた最新医科学研究、筑波(2/9/2001)。
 10. 鳥居隆三、サルのES細胞株の樹立と医学、実験動物学への応用、大阪府立大学農学部新士会、大阪(3/13/2001)。
 11. 鳥居隆三、細井美彦、藤浪菜穂子、入谷明、カニクイザルにおける顕微授精一胚移植法による初の出産、日本実験動物科学技術大会2001、横浜(5/8-5/12/2001)。
 12. 大沢一貴、鳥居隆三、渡邊洋二、佐藤浩、日本産ニホンザル由来BウイルスのUL27(gB)領域のゲノム特性、日本実験動物科学技術大会2001、横浜(5/8-5/12/2001)。
 13. Suemori H, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kondo Y, Imahie K, Kobayashi K, Suzuki Y, Iritani A & Nakatsuji N, Establishment of embryo stem cell lines from blastocysts of the Cynomolgus monkey. The 14th International Congress of Developmental Biology, Kyoto, Japan (7/8-7/12/2001).
 14. 鳥居隆三、実験動物としての野生ニホンザル、霊長類の研究利用：野生ニホンザルを中心に、第17回日本霊長類学会大会、自由集会、京都(7/12/01)。
 15. 鳥居隆三、細井美彦、藤浪菜穂子、和秀雄、入谷明、カニクイザルの顕微授精胚の移植による初の出産と胚性幹細胞の樹立、第55回日本人類学会・第17回日本霊長類学会大会連合大会、京都(7/12-7/15/2001)。
 16. 鳥居隆三、サルES細胞の樹立と再生医学研究—発生工学的手法の活用—、滋賀バイオ技術フォーラム平成13年度第2回例会、滋賀県工業技術総合センター(10/12/2001)
 17. 鳥居隆三、医学研究用霊長類の現状と将来—発生工学的手法の活用—、日本実験動物技術者協会関西支部、滋賀地方大会、滋賀(10/20/2001)。
 18. 中川孝博、鳥居隆三、サルの検疫とBウイルスの抗体検査結果、日本実験動物技術者協会関西支部、滋賀地方大会、滋賀(10/20/2001)。
 19. 鳥居隆三、サルES細胞の樹立と再生医学研究—発生工学的手法の活用—、第54回国際

CARDシンポジウム、熊本(1/11/2002)。

20. Suemori H, Yasuchika K, Tada T, Torii R., Hosoi Y, Kondo Y, Imahie H, Kobayashi K, Suzuki Y, Iritani A & Nakatsuji N, Establishment of embryonic stem cell lines from blastocysts of the cynomolgus monkey, Keystone Symposium, USA, Colorado(3/17-3/23/2002).
21. Suzuki Y, Kondo Y, Kadota N, Kobayashi K, Nito S, Kimura H, Takada T & Torii R, Establishment of cynomolgus monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein, Keystone Symposium, USA, Colorado(3/17-3/23/2002).
22. 成田純子、鳥居隆三、櫻川宣男、サル羊膜細胞由来のサルES細胞株樹立への試み、第1回日本再生医療学会、京都(4/18-4/19/2002)。
23. 門田奈依、高田達之、鈴木豊、近藤靖、仁藤新二、木村博、鳥居隆三、GFP発現カニクイザルES細胞株の樹立、第1回日本再生医療学会、京都(4/18-19/2002)。
24. 鳥居隆三、高田達之、鈴木豊、門田奈依、小林欣治、近藤靖、仁藤新二、木村博、細井美彦、入谷明、GFP発現サルES細胞株の樹立とその多能性、第49回日本実験動物学会、名古屋(5/23-5/25/02)。
25. 鳥居隆三、サルES細胞と再生医療、安全性評価研究会セミナー、大阪(6/1/2002)。
26. 鳥居隆三、サルES細胞の役割と展望、第127回科学技術セミナー、滋賀(6/13/02)。
27. 成田純子、鳥居隆三、寺尾恵治、櫻川宣男、サル羊膜細胞の核移植による胚の発生、第18回日本霊長類学会大会、東京(7/19-7/21/2002)。
28. 鳥居隆三、サルES細胞のこれからの展開、ケーエーシー第7回技術発表会、大阪(9/28/2002)。
29. 鳥居隆三、再生医学研究におけるサルES細胞の有用性、第5回移植遺伝子工学研究会、シンポジウム、東京(10/17/2002)。
30. Narita J, Takada T, Kimura H, Terao K, Sakuragawa N & Torii R, Cynomolgus monkey blastocysts produced by nuclear transfer using amniotic epithelial cells, 29th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Auckland, New Zealand, Auckland(1/12-1/15/2003).

研 究 成 果

研究成果

平成11年度から平成14年度の4年間において、ニホンザルを室内で人工的に繁殖し、同時に実験動物化することを目的として、人工授精法、体外受精法、顕微授精法、体外培養法、等の発生工学的手法および胚移植法の導入と確立を試みてきた。その結果、

1. eCG(PMSG)、hMG、FSH を用いた卵巣刺激法と腹腔鏡観察法による成熟卵子の採取方法を確立した。
2. さらに体外受精法を確立し、腹腔鏡観察下で2～4細胞期胚を卵管采に移植する胚移植法を確立することが出来た。
3. その結果、ニホンザルでは世界で最初の妊娠と自然出産により産仔を得ることができた。
4. また、電気刺激法によって採取、あるいは安楽死個体の精巣上体から採取した精液を液体窒素中で凍結保存する方法も確立した。
5. 凍結精液を用いて行う顕微授精-胚移植法も確立することが出来、サルにおいて世界で2例目の産仔を得ると共にカニクイザルでは世界で最初の例となった。
6. また受精胚を体外培養する方法を確立できた結果、ニホンザルとカニクイザルから胚性幹細胞(ES細胞)の樹立に世界で初めて成功した。
7. 受精胚を液体窒素中で凍結保存する方法についても見通しがついた。
8. 今までに9頭の出産と離乳を行うことが出来、また最終年度の平成14年度の3月までに28頭の妊娠を確認することが出来た。
9. 出産した個体は微生物学的検査により、サルモネラ、赤痢、結核、外部、内部寄生虫、さらに、Bウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV-1)、サルエイズウイルス(SIV)、サルD型レトロウイルス(SRV)、サル水痘ウイルス(SVV)、フィロウイルス、サルT細胞白血球ウイルス(STLV)、麻疹ウイルスのウイルス抗体検査において、すべて陰性を確認し、当初予定していた微生物学的統御個体としてのSPF(Specific Pathogen Free)個体の作成が可能になった。
10. ただ、顕微授精-胚移植法においてニホンザルにおいてははまだ妊娠と出産に成功しておらず、今後さらにこの原因を追及せねばならない。

以上のように、4年間の研究を通じて、ニホンザルにおける卵巣刺激法、腹腔鏡観察下での採卵法、体外受精法、顕微授精法、腹腔鏡観察下での卵管采移植法、また精子と受精胚の凍結保存法をいずれも確立することが出来、これらの手法を用いて室内での計画的な繁殖を行うための準備を整えることが出来た。ただ、顕微授精-胚移植法においてニホンザルの妊娠を確認することが出来なかった。少なくともカニクイザルでは成功を収めていることから、この原因は、胚移植のためのレシピエント個体の不足にあると考えている。そのためにも、レシピエント個体の排卵周期の同期化は今後解決しなければならない最も大きな課題であり、これによって生産化に向けた飛躍的向上が可能となると考える。