

23 . 筑波医学実験用霊長類センター

センター長 寺尾 恵 治

概 要

今年度で創設から 25 年を経過した霊長類センターは、年産 250 頭の生産能力を有する繁殖コロニーに感染実験施設と共同利用施設の二つの特殊実験施設を併設する我が国有数の霊長類医科学研究施設となった。ケージサイズの拡大を目的とした飼育棟および P3 施設の改修工事と新棟建設が現在進行中であり、平成 16 年度末には動物福祉に配慮した施設・設備の整備がほぼ完了する。感染研支所としてワクチン国家検定と感染症研究への育成ザル供給を目的として設立されたセンターは、平成 8 年の共同利用施設の開設にともない、サル類を用いた遺伝子治療、再生医療、移植医療、脳科学、長寿科学などの先端医療研究を支援する業務を拡大付加してきた。整備された霊長類センターを広く国内の研究者に開放し、感染症研究のみならず創薬研究や医療技術の開発研究に資するため、平成 17 年 4 月に発足する独立行政法人・医薬基盤研究所に移行させることとなった。医薬基盤研究所においては、引き続き国の支援を受けて、従来進めてきた実験用霊長類のリソース整備、モデル開発、基盤技術開発などのセンターが独自に取り組む基礎研究を進展させるとともに、所内外の研究者と共同で新規医薬品、医療技術の開発および実用化に関わる研究体制が整備される予定である。

今年度も実験用霊長類の繁殖・供給、品質管理、疾患モデル開発に関わる業務が順調に進展した。繁殖・供給業務では 232 頭のカニクイザル新生仔を得るとともに、ワクチン検定を含め感染研に 137 頭、共同利用施設に 75 頭、所外 14 頭の計 226 頭の育成カニクイザルを供給した。検査健康管理室においては、感染症および免疫研究において重要な情報となるカニクイザルの MHC クラス I のタイピング法が確立された。ウイルスを中心とした繁殖育成コロニーの SPF 化に関わる定期的調査が実施され、早期隔離により確立した。SRV/D 陰性コロニーでは、SRV/D 以外のウイルスの感染率も低いことが明らかになった。繁殖育成室においては、ここ数年問題となっている育成ザルの保育率を改善するための要因分析をおこなうとともに、交配の効率化を目的とした早期妊娠診断法が検討された。モデル開発では、感染研研究部と共同で、SIV、BSE、らい菌などの感染症モデルの開発を継続するとともに、あらたに C 型肝炎のモデルとして HCV に近縁な GBV-B を用いたタマリンでの感染・発症モデルの開発が開始された。繁殖コロニーで

見いだされた若年性家族性黄斑変性症家系の維持に対して、今年度から厚生労働科研費の支援が得られることになりサル類では貴重な遺伝性疾患モデルの維持が可能となった。自然発症モデルとしてカニクイザルとミドリザルで循環器疾患の総合的スクリーニングを開始し、心筋症に類似した疾患を抽出した。これらはいずれも付加価値の高い疾患モデルとなり得る。免疫学的特性解析および胚・配偶子レベルでの遺伝子保存や遺伝子改変ザル作出を目的とした発生工学技術の開発研究が継続された。これらの研究は基盤的研究費の他に、厚生労働科学研究費補助金、ヒューマンサイエンス財団、文部科学省科学研究費等の支援を受けて実施された。共同利用施設では、遺伝子治療、再生医療、長寿科学、脳科学研究、移植医療、新規医療技術開発など運営委員会で承認された計 27 件の実験が予防衛生協会の技術支援を受けて展開された。

人事面では、平成 15 年 4 月 1 日付けで下澤律浩が繁殖育成室研究員として採用され就任した。平成 16 年 3 月 31 日に榊原一兵主任研究官が定年退官された。センター創設以来四半世紀にわたり千例を超える斃死例の病理診断により繁殖コロニーの健康管理に貢献された努力に敬意を表し、今後のご活躍をお祈りする。

研 究 業 績

・ 実験用サル類の病原学的研究

1 . サル EBV、CMV、SFV の感染状況に関する調査

TPC 繁殖コロニー内の、サル EBV、CMV、SFV (フォーミーウイルス) の感染状況を調査し、SPF 化の検討を行った。調査の結果、コロニー内では、CMV の感染は低率であるが、EBV、SFV については高率に感染していることが確認された。一方、従来から進めてきた SRV/D SPF 群内の人工哺育由来サルでは、EBV、CMV、SFV のいずれも感染率が著しく低い事が明らかとなった。今後、人工哺育サルを活用して、当該 3 ウイルスについても SPF 群を維持し、特殊実験にこれを供することが可能となった。

[成田豊子*、高野淳一朗*、藤本浩二*、寺尾恵治 (*社

・予防衛生協会)]

2. レトロウイルスに関する研究

(1) サルレトロウイルス(SRV/D)感染の検出法に関する研究

筑波霊長類センターで飼育されているサルより SRV/D つくば株を分離し、その全遺伝子配列を決定し、既知の SRV/D とは異なる新しい SRV/D (SRV/D-T と仮称)であることを明らかにした。本ウイルス感染のない SPF サルコロニー作成のため、全血からの直接 SRV/D プロウイルス DNA の検出系、および 血漿、唾液から RT-PCR 法を用いた SRV/D の RNA ゲノム 検出系を確立した。全血からの SRV/D プロウイルス DNA の検出系の開発により 1 日で確定診断が可能となり、SPF サルコロニー作成と維持のためのモニタリングシステムを構築した。〔原 正幸、菊池俊彦、小野文子*、佐多徹太郎**、成田豊子*、高野淳一郎*、藤本浩二*、寺尾恵治、向井鎌三郎 (*社・予防衛生協会、**感染研・感染病理)〕

(2) サルエイズ脳炎発症モデルの確立に関する研究

エイズ脳炎で死亡したサル 2 頭の脳組織の培養により、SIV を産生するモノサイト系 SIV 産生細胞株 (CM1,CM5) を樹立し、2 株の産生する SIVcm1 と SIVcm5 を用い CM 細胞の由来を検討した。SIVcm を血液由来分化モノサイト、肺胞マクロファージおよび骨髄細胞に moi0.1 で感染させ、CM 様細胞の出現をみた。サル骨髄細胞のみに、CM 様細胞のコロニーが形成され、分裂増殖した。培養上清中には SIVcm の産生が確認されたので、脳炎発症脳血管周囲に形成される CM 様細胞の集簇の由来は骨髄細胞である可能性が示唆された。

〔向井鎌三郎、佐多徹太郎**、菊池俊彦、原 正幸、小野文子*、中山満 (*社・予防衛生協会、**感染研・感染病理)〕

(3) HIV-1 coreceptor, CXCR4・CCR5, -based vaccine の開発

抗 CCR5-CXCR4 キメラ環状抗体が単クローン抗体 7 種によるエイズウイルスの感染防止作用を MAGIC-5 細胞を用いて調べた結果、そのうち 4 種の単クローン抗体は non-clade B HIV-1 や SIV の感染をほぼ完全に抑制した。本キメラ環状抗体で免疫したサル抗血清を 4 倍希釈し宿主細胞 (MAGIC-5 細胞) を前処理することにより、その抗 HIV-1 感染防止効果を検討した。その結果、X4,clade A と X4,clade E および R5,clade A と R5,cladeE の HIV-1 臨床分離株の感染を濃度依存的に阻害した。

〔向井鎌三郎、原 正幸、菊池俊彦、庄司省三* (*熊本大薬)〕

(4) HIV-1 Vif の分子機構に関する研究

HIV-1 Vif は抗 apobec-3G 作用と独立して、ウイルス

粒子内においてウイルスプロテアーゼによる GagP2/NC 切断のみを特異的に阻害する。本年度は上記 Vif 作用に係る機序についてより詳細な解析を行った結果、P2/NC processing 阻害活性は Vif N 末端側 40 アミノ残基を含む領域により規定されており、一方 Vif のウイルス取り込みは中央領域により規定されていた。さらに Vif のウイルス取り込みは、processing 阻害活性に必要であるが十分ではなかった。以上より、Vif はその Gag 結合領域と processing 阻害に関わる機能領域が独立して存在していると考えられた。

〔李永仲、明里宏文〕

(5) 糖鎖欠失 SIVmac239 変異株のアカゲザル感染における感染防御免疫の解析

(内容はエイズ研究センターを参照)

〔杉本智恵、森 一泰〕

(6) 糖鎖欠失 Env と中和抗体感受性、細胞指向性および CD4 非依存性との関連

(内容はエイズ研究センターを参照)

〔杉本智恵、森 一泰〕

(7) Env エイズワクチンデザインにおける糖鎖修飾の重要性

(内容はエイズ研究センターを参照)

〔杉本智恵、森 一泰〕

(8) 感染後早期治療ザルに誘導された gag 特異的 CD4+T 細胞のエピトープと MHCIIallele の決定

(内容はエイズ研究センターを参照)

〔杉本智恵、森 一泰〕

3. C 型肝炎のサル病態モデル開発

HCV はヒト及びチンパンジー以外の動物では感染・発症しない。このことが個体レベルでの抗ウイルス薬やワクチンの有効性試験を行なう上での障害となっている。この点を克服すべく、HCV に最も近縁なウイルスである GBV-B を用いた C 型肝炎のサロゲート (代用) モデルの開発を試みた。GBV-B の感染性分子クローンより作成したウイルス RNA を、タマリンの肝臓に直接接種したところ、血中ウイルス RNA 量が接種 2 週後以降有意に上昇し、接種 4 週にピーク値を示した。また接種後約 2 週 ~ 4 週で GPT 等肝炎を示す血清生化学値が顕著に上昇した。以上よりタマリン/GBV-B 感染系は C 型肝炎のサロゲートモデルとして有用である可能性が示された。

〔李永仲、柳澤真紀、明里宏文〕

4. サル由来赤痢アメーバのヒト由来株との比較

2000 年 ~ 2003 年で、2,211 件のサルの糞便を検査し、1 検体で赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 319 検体で *E. dispar* を検出した。1 検体から分離した *E. histolytica*

について、DNA 配列を決定し、既知のヒト由来 *E. histolytica* 株との比較を行った。SREHP 領域ではアミノ酸レベルでは相同性が認められたが、DNA レベルで大きな差があった。16S-like ribosomal RNA 領域で系統樹を作成し、他の 12 種の *Entamoeba* 属との比較をした結果、ヒト由来の *E. histolytica* と *E. dispar* との中間に位置することが確認された。

〔高野淳一郎*、成田豊子*、藤本浩二*、寺尾恵治（*社・予防衛生協会）〕

5. カニクイザルを用いたハンセン病モデルの開発

幼若カニクイザルにらい菌を接種し、らい菌由来ペプチド (MMP-II、LpK、FAP) に対する末梢リンパ球の幼若化反応と主要リンパ球サブセットレベルの継時的変化を調査した。静脈内接種 2 頭と鼻腔内接種 1 頭で LpK、FAP に対する幼若化反応が誘導された。接種した 6 頭すべてで CD4⁺/T 細胞の増加と CD16⁺/NK 減少が認められた。鼻尖端に接種した 2 頭で接種部位の腫脹と活性化リンパ球の有意な増加が認められた。

〔柴田宏昭、向井 徹*、寺尾恵治（*ハンセン病センター）〕

6. カニクイザルを用いた BSE プリオン感染モデルの開発

BSE 発症ウシ脳乳剤を経口および脳内接種したカニクイザルについて継時的に行動解析、記憶能解析、脳波測定を実施した。アップルテストによる両腕の運動機能と指迷路試験による記憶能には経口投与群、脳内接種群のいずれも BSE-P 接種後 5 ヶ月では顕著な変化は見られなかった。一方、経口投与した 1 頭において投与後 3 および 5 ヶ月目に突発性律動波 (PSD 様脳波) が観察されたが、BSE-P 感染との関係については不明である

〔小野文子*、寺尾直美、寺尾恵治（*社・予防衛生協会）〕

7. カニクイザルにおける循環器疾患

カニクイザル繁殖コロニーにおける循環器疾患のスクリーニング調査として、超音波診断、レントゲン撮影、心電図検査、心房性ナトリウム利尿ペプチドを含む血液検査を行ったところ筋性部心室中隔欠損症、三尖弁閉鎖不全、右心拡大、右室二腔症などの疾患が疑われる個体が存在することが確認された。それら疾患の詳細な解析を行うと同時に、異常の認められなかった個体のデータを用いて各種検査の正常値の検索を試みている。

〔揚山直英*、鯉江 洋、小野文子*、山海 直（*社・予防衛生協会）〕

8. アフリカミドリザルにおける循環器疾患

アフリカミドリザルにおける循環器検査として超音波による画像解析、レントゲン撮影、心電図検査、心房性ナトリウム利尿ペプチドを含む血液検査を行い、各種検査値の解析を行った。当センターのアフリカミドリザル

コロニーにおいて高率に心筋症の疑い症例を確認したがその詳細な原因については不明である。現在、病理学的検索、MRI・造影検査を含めた多角的な病態の解析を実施している。

〔揚山直英*、鯉江 洋、小野文子*、山海 直（*社・予防衛生協会）〕

9. サル類の高磁場 MRI 検査

サル類における高磁場 MRI 検査方法の樹立を試みた。脳固定装置開発、麻酔法、バイタルサインモニタリング法を樹立する事によって撮像を可能とした。サル種、年齢、体重別に各種撮像を行い、撮像条件の適正化を行うと共に、各種疾患の診断も行った。今後繁殖コロニーの特性を生かし、多様な撮像例数を重ねることにより、年齢別、種別、雌雄別、疾患別の画像データベース構築、サル類の brainmap 樹立を試みる。また、サル類のトレーニング法も含めた機能的 MRI の構築も目指す。

〔揚山直英*、成田勇人*、小野文子*、寺尾恵治（*社・予防衛生協会）〕

10. 若年性家族性黄斑変性カニクイザル家系の確立と維持

網膜黄斑変性カニクイザル家系の子孫について黄斑部の眼底検査を実施した結果、第二世代の 14 頭と第三世代の 10 頭に軽度から重度の黄斑変性が認められ、新たに 24 頭 (雄 10 頭、雌 14 頭) の発症個体が確認された。第二世代の雌ザルはすべて繁殖能力を有しており、年齢も 10 歳から 13 歳と繁殖適齢期にある。一方で、第三世代の雄ザルは 5 歳未満の個体が大半であり、今後繁殖能力を確認してコロニー維持の核となる雄個体を選抜する予定である。

〔鈴木通弘*、岩田 岳**、寺尾恵治（*社・予防衛生協会、**国立病院東京医療センター）〕

. 実験用サル類の臨床病理学的研究

1. 顔面、四肢に水疱、痂皮が認められたカニクイザルへの対応

離乳後 1 ヶ月 (6 ヶ月齢) のカニクイザルの体重測定時に顔面、四肢に水疱、痂皮が認められ、体重減少、下痢を伴った個体を認めた。白血球減少、CRP 上昇がみられ、水疱の直接塗沫で球菌を認めたので、本個体の隔離と繁殖棟サルの移動禁止を指示した。当該サルの全身状態悪化を認め、伝染性の強いウイルス性疾患の可能性を疑い、本個体の安楽殺を行った。感染病理部による脾臓、肝臓、心臓、肺、腸、腎、皮膚の検査の結果、皮膚の潰瘍性病変に球菌を認めたが、ウイルス性封入体様所見は認められず、常在細菌による日和見感染症と考えられ、サルの移動禁止解除を行った。

〔小野文子*、佐多徹太郎**、冷岡昭雄*、向井鎌三郎、寺尾恵治（*社・予防衛生協会、**感染研・感染病理）〕

・実験用サル類の免疫学的特性に関する研究

1. カニクイザル MHC クラス I 遺伝子の解析

カニクイザルのクラス I 主要組織適合抗原 (MHC クラス I) のタイピング法の確立を目的とし、29 頭の個体から 34 個の独立したクラス IA (Mafa-A) 遺伝子座の対立遺伝子塩基配列を決定した。その結果、14 種の対立遺伝子が明らかになった。また、1 ~ 3 個の対立遺伝子配列が 1 個体から得られたので、カニクイザルクラス IA 主要組織適合抗原 Mafa-A 遺伝子座は、アカゲザルと同様に 2 個あることが推測された。

〔宇田晶彦、棚林 清*、山田靖子**、明里宏文、向井鎌三郎、山田章雄*、寺尾恵治 (*感染研・獣医科学、**動物管理)〕

2. カニクイザル ES 細胞から血液系細胞への分化誘導

OP9 細胞をフィーダーとしてカニクイザル ES 細胞を種々のサイトカイン存在下で 6 日間培養した結果、約半数に造血前駆細胞マーカーである CD34 の発現が認められた。一方、正常カニクイザル末梢単核球を反応細胞とした MLR では、未分化 ES 細胞に対する反応は見られなかったが、分化誘導した細胞に対しては幼若化反応が認められた。未分化マーカー SSEA4 を指標とした FACS ソーティングにより 95 % の純度で分化細胞が回収された。

〔柴田宏昭、寺尾恵治〕

3. カニクイザルの末梢 CD4+/CD8+(DP) T 細胞と腸管上皮 DP T 細胞との性状比較

老化に伴い末梢中に出現する DP T 細胞 (pDP) の由来を検討するために、代表的な胸腺外分化 DP T 細胞である腸管上皮 T 細胞 (IEL/DP) と表現型および TCR レパトリーを比較した。IEL/DP が粘膜組織特異的のホーミングレセプターを発現しているのに対し、pDP は非粘膜特異的のホーミングレセプターを発現していた。さらに、両者の TCR レパトリーが異なっていることから、pDP 細胞が IEL/DP 細胞に由来する可能性は低いと判断した。

〔李 元雨、柴田宏昭、寺尾恵治〕

・生殖生理および発生工学的研究

1. 室内繁殖コロニーで育成されたカニクイザルの哺育態度に関する統計学的解析

繁殖育成ザルの哺育態度の実際とこれに影響する因子を明らかにするために、メスカニクイザルの哺育データを解析した。その結果、一度良好な哺育態度を示した個体はその後安定して子を哺育すること、各個体の哺育態度は 2 産目までに概ね決定することが明らかとなった。また、初産年齢、子の性別、その母ザルの哺育態度がある個体の哺育態度に影響しているという統計学的根拠は見出せなかった。すなわち当センターの個体の哺育

態度に最も影響する要因は自身の出産経験であることが示唆された。

〔土田順子、吉田高志、小野孝浩*、山海 直 (*社・予防衛生協会)〕

2. カニクイザルの早期妊娠診断

当センターのカニクイザルの妊娠診断は交配初日を第 1 日として第 35 日に超音波診断法で実施している。今回、交配の効率化を目的として早期妊娠診断について解析した。第 21 日で 16 妊娠例のうち 12 例 (75 %) において胎嚢が確認され妊娠と判定した。第 28 日では 23 妊娠例中 11 例で胎嚢のみ、11 例で胎嚢と胎心心拍を共に確認し計 22 例 (96 %) を妊娠と判定した。確定妊娠診断は第 35 日に実施した。第 28 日で妊娠診断を実施することにより、非妊娠ザルについては 2 月連続で交配することが可能となった。

〔前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、羽成光二*、山海直、吉田高志 (*社・予防衛生協会)〕

3. アフリカミドリザル精子の凍結保存

アフリカミドリザルにおける発生工学的な基礎研究はほとんどなされていない。サル類精子凍結保存法において TTE を用いた方法がマカク属サル類の定法となっているが、属の異なるアフリカミドリザルでは本法を適用しても融解後に良好な運動性を示す精子が得られない。今回、凍結前処理について検討したところ短時間で実施することにより融解直後に良好な運動性を示す精子を認めた。また、前処理を氷上で行うことで融解後の精子の運動性をより長く維持できることが明らかとなった。

〔岡田浩典、山海 直〕

4. アフリカミドリザルの ES 細胞樹立の試み

アフリカミドリザル ES 細胞株は、新たな付加価値を持つ貴重なリソースとなり得るものと考えられる。3 個の拡張胚盤胞から物理的に単離した内部細胞塊部分を FBS あるいは KSR を添加した DMEM を用いて STO 細胞との共培養して ES 細胞株の樹立を試みた。培養 3 日目に伸張したコロニー 1 個が出現した。培養 7 日目に継代して他のサル類 ES 細胞に類似した扁平なコロニーが確認できた。しかし、その後の継代で ES 様細胞は消失した。今回、ES 様細胞を確認できたことにより、ES 細胞の樹立が可能であることが示唆された。

〔下澤律浩、岡田浩典、山海 直〕

5. アフリカミドリザルおよびカニクイザルにおけるグリセリン溶媒を用いた FSH による卵胞発育誘起

サル類の卵胞発育誘起の新規な方法を検討した。オナガザル属アフリカミドリザルおよびマカク属カニクイザルのメスに FSH を投与した。FSH は徐放性に作用させるために 50 % グリセリンを溶媒に用いた。その後 hCG 投与を経て卵を採取した。カニクイザルにおいてはグリセリンを溶媒に用いることで良好な成熟卵の採取成績を

得た。しかし、アフリカミドリザルでは通常の方法を用いた場合と顕著な差は認められなかった。投与するホルモンに対する反応性が二つの属間で異なることが示唆された。

〔下澤律浩・岡田浩典・吉田高志・山海 直〕

6. アフリカミドリザルにおける顕微授精

医学研究や野生サル類の維持増殖にも期待ができることからアフリカミドリザルにおける顕微授精について検討した。ピエソパルスを利用して、直腸電気刺激法により採取した精子あるいは尾部を切断した精子頭部のみを成熟卵の細胞質に注入した。精子あるいは精子頭部みの注入で受精成績に差はなく高率に受精が確認され精子頭部が卵活性化能を有していることが示された。また、作出した33個の受精卵は、6個(18.2%)の拡張胚盤胞に発生した。アフリカミドリザルにおける顕微授精による受精卵の作出および体外培養に初めて成功した。

〔下澤律浩・岡田浩典・吉田高志・山海 直〕

7. Percoll を用いた多数のマウス受精卵の収集法

研究を遂行する過程で卵以外の細胞をすべて除去しつつ多数の卵を同時期に準備する必要があった。従来の手作業で卵のみを多数収集することは操作に長時間を要してしまい、卵の性状が変わることが懸念される。そこで、迅速かつ簡便に多数の卵を収集する方法を検討した。卵細胞、透明帯、他の体細胞等の比重を考慮して検討した結果、透明帯の比重が小さいことが明らかとなり、この性質を利用して卵を他の細胞と明確に分離することができ、同時に速やかに多数の卵を回収することが可能になった。

〔岡田浩典・山海 直〕

8. 交流磁場環境が精子の運動性および先体反応に及ぼす影響

サル類を含む哺乳動物の生殖細胞に及ぼす強磁場の影響について継続して検討している。今年度は20分間の交流磁場暴露が精子に及ぼす影響について検討した。実験にはモルモット精子を用い、磁場暴露は交流磁場発生装置内で実施した。その結果、通常の培養のみでは先体反応が誘起されない条件下の精子を交流磁場に暴露することで先体反応が誘起された精子を確認することができた。交流磁場という刺激が精子内のカルシウムの動きに影響をあたえ先体反応が誘起された可能性が考えられた。

〔山海 直・下澤律浩・岡田浩典・羽鳥真功・岡田詔子* (*東邦大)〕

発表業績一覧

誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Tanabayashi K, Mukai R, Yamada A, Takasaki T, Kurane I, Yamaoka M, Terazawa A, Konishi E, : Immunogenicity of a Japanese Encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. *accine*, 21:2338-4, 2003.
- 2) Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A, : Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol*, 32(2): 105-10, 2003.
- 3) Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A, : Detection of CD3epsilon polymorphism in cynomolgus monkeys by a method based on RFLP. *J Med Primatol*, 33: 34-7, 2004.
- 4) Fujita M, Yoshida A, Sakurai A, Tatsuki J, Ueno F, Akari H, Adachi A: Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV. *Int J Mol Med* 11: 641-644, 2003.
- 5) Bour SP, Akari H, Miyagi E, Strebel K: Naturally-occurring amino acid substitutions in the HIV-2 ROD envelope glycoprotein regulate its ability to augment viral particle release. *Virology* 309: 85-98, 2003.
- 6) Ueno F, Shiota H, Miyaura M, Yoshida A, Sakurai A, Tatsuki J, Koyama AH, Akari H, Adachi A, Fujita M: Vpx and Vpr proteins of human immunodeficiency virus type 2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microb. and Inf.* 5: 387-395, 2003.
- 7) Villinger, F., Mayne A. F., Bostik P., Mori K., Jensen P. E., Ahmed R. and Ansari, A: Evidence for antibody mediated enhancement of SIV gag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques. *J Virol*. 77: 10-24. 2003.
- 8) Xing H. Q, Moritoyo. T, Mori. K, Tadakuma. K, Sugimoto. C, Ono. F, Hayakawa. H, Izumo. S: Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus-infected monkey. *J. Neurovirol.* 9: 508-518. 2003.
- 9) Sugimoto. C, Tadakuma. K, Otani. I, Moritoyo T, Akari. H, Ono. F, Yoshikawa. Y, Sata. T, Izumo. S, and Mori. K : *Nef* gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus In T-cell-rich paracortex in lymph nodes. *J Virol*. 77: 4169-4180. 2003.
- 10) Ansari. AA, Mayne. AE, Onlamoon. N, Pattanapanyasat. K, Mori. K, and Villinger. F : Use of recombinant cytokines for optimized induction of antiviral immunity against SIV in the nonhuman primate model of human AIDS. *Immunol.*

- Res.29:1-18.2004.
- 11) Lun.W-H, Takeda.A,Nakamura.H,Kano.M,Mori.K, Sata.T,Nagai.Y andMatano.T:Loss ofvirus-specific CD4+Tcellswithincreases in viral loads in the chronic phase after vaccine-basedpartial control of primary simian immunodeficiency virus replication in macaques. *J Gen Virol.*85:1955-1963.2004.
- 12) Matano.T,Kobayashi.M,garashi.H,Takeda.A, Nakamura.H,Kano.M,Sugimoto.C,Mori.K,Iida.A, Hirata.T, Hasegawa.M,Yuasa.T,Miyazawa.M, Takahashi.Y,Yasunami.M,Kimura.A,O'Connor.D.H, Watkins.D.I, and Nagai.Y : Cytotoxic T Lymphocyte based Control of Simian Immunodeficiency Virus Replication in a Preclinical AIDS Vaccine Trial. *J.Exp.Med.*199: 1709-1718.2004.
- 13) Shimizu Y,Suzuki J,Terao K,Ishida T. In vitro aging of macaque adherent cells: similar pattern of cellular aging between human and macaque. *Mech Ageing Dev.* 124(2):237-44.2003.
- 14) Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M: New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion. *Biochem Biophys Res Commun.*28;303(1):170-176.2003.
- 15) Ageyama N, Kimikawa M, Eguchi K, Ono F, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K: Modification of the leukapheresis procedure for use in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Clin Apheresis.*18(1):26-31.2003.
- 16) Lee WW, Nam KH., Terao K. and Yoshikawa Y.: Age-related increase of peripheral CD4+/CD8+ double positive (DP) T lymphocytes in the cynomolgus monkey: longitudinal study in relation to thymic involution. *Immunology*,109(2):217-225.2003
- 17) Suzuki MT, Terao K, and Yoshikawa Y: Familial early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primates.*44(3):291-294.2003.
- 18) Kirii Y, Inoue T, Yoshino K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K.: Molecular cloning, functional characterization, and enzyme-linked immunosorbent assay of cynomolgus monkey Fas ligand. *J Immunol Methods.*1;278(1-2):201-209.2003.
- 19) Lee WW, Nam KH, Terao K. and Yoshikawa Y: Possible role of genetic factor(s) on age-related increase of peripheral CD4+CD8+ double positive T cells in cynomolgus monkeys. *Exp Anim.*,52(4): 309-316.2003.
- 20) Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, Terao K: Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am J Primatol.*61(1):3-12.2003.
- 21) Watanabe K, Watanabe R, Shioda A, Mizoguchi K, Sugimoto T and Terao K: Investigation of the mechanism of drug-induced autoimmune hemolytic anemia in cynomolgus monkeys elicited by a repeated-dose of a humanized monoclonal antibody drug. *J Toxicological Sci.*,28:123-138,2003.
- 22) Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y: Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation.*15;76(7):1061-1067.2003.
- 23) Omatsu T, Ishi Y, Kyuwa S, Milanda EG, Terao K. and Yoshikawa Y: Molecular evolution inferred from immunological cross-reactivity of immunoglobulin G among chiroptera and closely related species. *Exp Anim.*,52(5): 425-428.2003.
- 24) Ogonuki N, Tsuchiya H, Hirose Y, Okada H, Ogura A, Sankai T: Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) *Human Reproduction*18,1273-1280,2003.
- 25) Okada H, Hirose Y, Ito Masao, Sankai T: Aspiration method to collect epithelial cells from mouse, rat, and monkey oviducts. *Comparative Topics in Laboratory Animal Science*42,46-51,2003.
- 26) Tutida J, Kawasaki K, Sankai T, Kubo N, Terao K, Koyama T, Makino J. and Yoshikawa Y: New type of puzzle-task finger maze learning in *Macaca fascicularis*. *Int Primatol.*,24:261-270.2003.
- 27) Shimozawa N, Tajima S, Azuma N, Hioki K, Kono T, Ito M: Histological study of the hypertrophic placentas and open eyelids observed in cloned fetuses. *J. Reprod. Dev.*, 49:221-226.2003.
- 28) Ogawa H, Ono Y, Shimozawa N, Sotomaru Y, Katsuzawa Y, Hiura H, Ito M, Kono T: Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction.*126:549-557.2003.
- 29) Okada H, Hirose Y, Periyasamy M, Masao Ito M, Sankai T: Zona-froast method for separating mouse eggs from other cells. *Exp. Anim.*, in press
- 30) Miyamoto S, Chen Y, Nakamura S, Sankai T, Machida T, Yoshida T: Synthesis and release of steroids in intestines revealed by detection of androstenedione, testosterone, 5 α -dihydrotestosterone, and an unidentified substance in intestinal tissues and contents from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *ological Science*, in press

2 . 和文発表

なし

. 学会発表

1 . 国際学会

- 1) Fujita M, Sakurai A, Yoshida A, Akari H, Adachi A: Proteasome-degradation of HIV-1 Vif: Mutational analysis. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 20-25, 2003.
- 2) Sugimoto C, Shioda T, Yasutomi Y, Yamamoto N, Nagai Y, and Mori K: Properties of a quintuple deglycosylated SIVmac239 mutant as a novel attenuated SIV. 21st annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 2003, Seattle, USA.
- 3) Sugimoto C, Ohgimoto S, Kusakawa S, Takebe Y, Shioda T, Nagai Y, and Mori K: Influence of Deglycosylation on efficacy of Env based vaccine. 21st annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 2003, Seattle, USA.
- 4) Sankai T: Reproductive physiology of female monkeys Workshop II 「Genitals」 8th International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba) December, 2003.
- 5) Tsuchida J, Kawasaki K, Sankai T, Kubo N, Terao K, Koyama T, Makino J, Yoshikawa Y: Inger maze learning in long-tailed macaques 8th International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba) December, 2003.
- 6) Hanazono Y, Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano K, Suzuki Y, Torii R, Terao K, and Ozawa K: Engraftment and teratoma formation after allogeneic in utero transplantation of nonhuman primate embryonic stem cells. The 1st International Society for Stem Cell Research (ISSCR). June 8 to 11, 2003, Washington DC.

2 . 国内学会

- 1) 李永仲、吉川泰弘、明里宏文: HIV-1 Vif 蛋白の機能ドメイン解析. 第51回日本ウイルス学会(京都)2003年10月
- 2) 原 正幸、明里宏文、棚林 清、山田章雄、佐多徹太郎、向井鎌三郎: 新型 SRV/D の分離同定とウイルス検出法の確立 第51回日本ウイルス学会(京都)2003年10月
- 3) 中山大介、三隅将吾、高宗暢暁、向井鎌三郎、橘園臣、梅田衛、本田徹朗、庄司省三: CCR5-CXCR4 キメラ環状抗原免疫カニクイザルより得られた抗血清の clade の異なる種々ウイルス感染に対する効果 第51回

日本ウイルス学会(京都)2003年10月

- 4) 杉本智恵、保富康宏、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森 一泰: 糖鎖欠損変異 SIV の新規 attenuated virus としての性質 第17回日本エイズ学会(神戸)2003年11月
- 5) 森 一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、草川茂、武部豊、保富康宏、永井美之: Env エイズワクチンにおける糖鎖の重要性 第17回日本エイズ学会(神戸)2003年11月
- 6) 吉岡徹、揚山直英、柴田宏昭、安隆則、上田享司、竹内公一、松井圭司、山本啓二、田畑寿晃、上田泰次、長谷川護、大河原重雄、寺尾恵治、島田和幸、池田宇一、小澤敬也、花園豊: 自己 CD34⁺細胞移植による血管新生療法: 霊長類心筋梗塞モデルを用いた遺伝子標識研究 第65回日本血液学会(大阪)8月25日~31日 2003年.
- 7) 上田享司、花園 豊、柴田宏昭、揚山直英、長島建之、田畑寿晃、上田泰次、久米晃啓、池原 進、長谷川護、寺尾恵治、小澤敬也、霊長類を用いた造血幹細胞遺伝子治療の開発: 選択的増幅遺伝子と骨髓内移植法による移植前処置の回避. 第65回日本血液学会(大阪)8月25日~31日 2003年.
- 8) Yoshioka T, Matsui K, Yasu T, Yamamoto K, Ageyama N, Shibata H, Suzuki C, Murakami Y, Takahashi M, Misawa Y, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y, Shimada K, Ikeda U. Few Transplanted Bone Marrow CD34⁺ Cells Become Endothelial and Myocardial Cells in Ischemic Myocardium in Nonhuman Primates 第68回日本循環器学会総会 2004年3月
- 9) Hanazono Y, Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Ookawara S, Hasegawa M, Terao K, and Ozawa K. Engraftment and teratoma formation after allogeneic in utero transplantation of gene-modified primate embryonic stem cells. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18-20, 2003, Tokyo
- 10) Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Ueda K, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Tabata T, Ueda Y, Hasegawa M, Ookawara S, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, and Hanazono Y: Transplantation and in vivo follow up of lentivirally transduced CD34⁺ cells in a nonhuman primate myocardial infarction model. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18-20, 2003, Tokyo
- 11) Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Nagashima N, Tabata T, Ueda Y, Kume A, Ikehara S, Hasegawa M, Terao K, and Ozawa K. A novel method of hematopoietic stem cell gene therapy without conditioning: the intra-bone marrow transplantation with the selective amplifier gene in primates. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18-20, 2003, Tokyo
- 12) Yonemitsu Y, Terao K, Ono F, Kuwahara T, Iida A, Hara H, Iwasaki H, Hasegawa M and Sueishi I K. Preclinical safety study (acute toxicity and biodistribution)

for intramuscular administration of F-defective, non-transmissible recombinant Sendai virus vector expressing human FGF-2 using non-human Primate. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18-20, 2003, Tokyo

13) Ueda Y, Nagashima T, Hanazono Y, Ageyama N, Kume A, Terao K, Ozawa K and Hasegawa M. Expansion of gene-modified hematopoietic cells by second generation selective amplification genes (SAGs) in the Secondary Transplanted Mice. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18-20, 2003, Tokyo

14) Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Ono F, Kobayashi E, Muramatsu S, Madoiwa S, Matsushita T, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Terao K, Sakata Y and Ozawa K., Serotypes of AAV vectors: muscle-directed expression of human coagulation factor IX in cynomolgus monkeys. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18-20, 2003, Tokyo

15) 山海 直：サル類における発生工学的基盤技術の開発とその展望 発生工学用マニピュレーション技術研究会（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所）2003年4月

16) 鯉江 洋、揚山直英、酒井健夫、金山喜一、山海直：カニクイザルにおける筋性部心室中隔欠損症が疑われた1例 第135回日本獣医学会（東京）2003年4月

17) 広瀬良宏、岡田浩典、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、小倉淳郎、山海 直：マウスおよびウサギの体細胞核移植由来胚からのES様細胞の樹立 シンポジウムフィールドトピックス II 「ES細胞の樹立と利用」第50回日本実験動物学会（大宮）2003年5月

18) 岡田浩典、広瀬良宏、宇田晶彦、伊藤雅夫、山海直：カニクイザル卵管上皮細胞の不死化細胞株の樹立とその特性 シンポジウムフィールドトピックス IX 「サル類の繁殖と発生工学」第50回日本実験動物学会（大宮）2003年5月

19) 山海 直：サル類における発生工学の展開 シンポジウム発生工学の進歩と生殖医療の今後 第44回哺乳動物卵子学会（東京）2003年5月

20) 岡田浩典、広瀬良宏、伊藤雅夫、山海 直：Percoll を用いた多数のマウス受精卵の収集法 第44回日本哺乳動物卵子学会（東京）2003年5月

21) 広瀬良宏、岡田浩典、山海 直：生殖細胞との共培養を目的としたカニクイザル各種体細胞株の樹立とその有用性 第44回日本哺乳動物卵子学会（東京）2003年5月

22) 川崎勝義、神谷 誠、山海 直、小山高正、寺尾恵治、吉川泰弘、黒田洋一郎：画像差分を応用したオープンフィールド行動の自動解析法 第9回画像センシングシンポジウム（横浜）2003年6月

23) 越後貫成美、井上貴美子、三木洋美、広瀬良宏、岡田浩典、竹入修二、山海 直、小倉淳郎：ウサギ精子および精子細胞の卵子活性化能についての再検討 第96回日本繁殖生物学会（帯広）2003年9月

24) Yoshioka T, Matsui K, Yasu T, Yamamoto K, Ageyama N, Shibata H, Suzuki C, Murakami Y, Takahashi M, Misawa Y, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y, Shimada K, Ikeda U. Few Transplanted Bone Marrow CD34+ Cells Become Endothelial and Myocardial Cells in Ischemic Myocardium in Nonhuman Primates 第68回日本循環器学会総会 2004年3月