

## (2) 共同利用研究への応募並びに採択状況

平成 31 年度は計 144 件 (延べ 361 名) の応募があり、共同利用実行委員会(濱田穰、半谷吾郎、今井啓雄、足立幾磨、脇田真清、宮部貴子) において採択原案を作成し、共同利用専門委員会 (平成 31 年 2 月 27 日) の審議・決定を経て、拠点運営協議会 (平成 31 年 3 月 20 日) で承認された。その結果、114 件 (307 名) が採択された。

各課題についての応募・採択状況は以下のとおりである。

課題	応募	採択
計画研究	31 件 (102 名)	31 件 (102 名)
一般研究	87 件 (209 名)	83 件 (205 名)
随時募集研究	21 件 (45 名)	21 件 (45 名)
研究会	5 件 (5 名)	5 件 (5 名)
合計	144 件 (361 名)	140 件 (357 名)

※上記は拠点運営協議会 (平成 31 年 3 月 20 日) 以降に採択された随時募集研究の件数も含む。

## 7.2 研究成果

### 7.2.1 計画研究

#### 2019-A-1 アイ・トラッキングによるチンパンジーの社会認知研究

佐藤侑太郎 (京都大学野生動物研究センター)、狩野文浩 (京都大学高等研究院) 所内対応者: 友永雅己

今年度は、霊長類研究所のチンパンジー7~10 個体を対象に一連の視線計測実験によるデータ収集をおこなった。第一に、感覚間選好注視実験 (cross-modal preferential looking) によってチンパンジー音声の参照的機能を調べた。モニターに果物とヘビの動画を横に並べて提示し、チンパンジー警戒声、採餌声、悲鳴などの音声を再生した。実験の結果、警戒声を聞かせた時にチンパンジーがヘビの動画をより長く見ることがわかった。この結果は、チンパンジーが警戒声とヘビの視覚情報とを関連付けることができることを示唆する。第二に、視線追従 (gaze-following) における集団間バイアスを調べた。実験では、1 個体のチンパンジーが左右いずれかを向く動画が提示された。動画中のチンパンジーが同施設で飼育される個体か別施設 (熊本サンクチュアリ) で飼育される個体かで、視線追従の生じやすさに違いがあるかを調べた。第三に、他者身体運動の理解に関する実験をおこなった。この実験はヒト乳幼児を対象におこなわれた過去の実験がもとになっている。CG アニメーションを用いて、生理学的に不可能な動作 (上腕の肘関節が逆に曲がる) をみせるキャラクターの動画を提示した。これを見ているときのチンパンジーの視線と瞳孔径を測定した。現在データの分析を進めている。

#### 2019-A-2 マカクザル前頭極の多シナプス性ネットワークの解明

石田裕昭、西村幸男 (都医学研) 所内対応者: 高田昌彦

申請者らは、マカクザルをモデルに狂犬病ウイルスを用いた逆行性越シナプストレーシング法を用いて、前頭極における多シナプス性神経ネットワークの解析を進めてきた。前頭極における大脳間ネットワークについて、これまでに 1 次および 2 次シナプスまでのネットワークについて解析を終えており、論文の執筆を進めている。

本年度は、前頭極—大脳基底核ネットワークを調べる目的で、2 次シナプスまでのネットワークの解析を終えた。さらに 1 頭のサルを用いて、3 次シナプスまでの神経ネットワークを調べる実験を実施した。今後、前頭極—大脳基底核ネットワークについて 3 次シナプスまでの神経ネットワークを観察するため、もう 1 頭のサルを用いた実験を追加し、データの解析を進める。

#### 2019-A-3 霊長類の皮質—基底核—視床ループの形態学的解析

藤山文乃、荻部冬紀、平井康治、緒方久実子、東山哲也、角野風子 (同志社大学) 所内対応者: 高田昌彦

最近霊長類で線条体の tail と呼ばれる部位が報酬系などで特殊な役割を果たしていることが報告されている。私たちは、げっ歯類においても同様の機能分担がある領域があるのかを調べるために、齧歯類とマーモセットの尾側線条体の比較解剖学を行なっている。一部の領域において、D1R および tyrosine hydroxylase の染色性が弱く、D2R の染色性が強い領域 (D1R-poor zone) を発見し、現在論文執筆中である。この研究は所内対応者の高田昌彦教授にご提供いただいたマーモセットを用いた実験を進めている。

#### 2019-A-4 視覚の充填知覚を司る情報処理機構の探索

小松英彦 (玉川大学脳科学研究所)、斎藤治美 (玉川大学脳科学研究所) 所内対応者: 高田昌彦  
盲点の視野上での位置を 2 頭のニホンザルで計測した。まず、サルが注視点を見ている時に視野のさまざまな位置に小光点を呈示し、それに向かってサッケードを行うように視覚サッケード課題を訓練した。一部の試行では、小光点を呈示せず、その場合には注視点に対する注視を続けたら報酬を与えた。このような訓練を行ったのち、サルの片目をマスクで遮蔽し、タスクを行わせた。盲点内部に小光点が呈示された場合、サルは注視を続けるので、これにより盲点の位置を同定することができた。盲点は耳側視野の水平子午線上で網膜中心から 15 度くらいの偏心度のところに同定された。次に注視課題を行っているサルの第一次視覚野 (V1) に金属微小電極を刺入し、受容野のマッピングを行い、盲点に対応する視野位置を表現している場所を探索した。鳥距溝後壁皮質にそのような領域が同定された。盲点において生じる充填知覚に V1 がどのように関わっているかを調べるため、V1 の各層から同時にニューロン活動を記録して、層毎の活動の違いを調べる予定である。そのための準備として、V1 に多チャンネルリニアアレイ電極を刺入し、ニューロン活動を記録するための予備実験を行った。

#### 2019-A-5 行動制御における皮質下領域の機能解析

田中真樹 (北大・医・神経生理)、鈴木智貴 (北大・医・神経生理、Rockefeller 大)、竹谷隆司 (北大・医・神経生理)、亀田将史 (北大・医・神経生理) 所内対応者: 高田昌彦  
これまで、視床や小脳をターゲットにして分子ツールを用いた複数の研究を進めてきた。令和元年度は運動性視床で行った実験について対照動物からのデータ収集を終え、夏ごろから定量解析を行い、論文作成に着手した。本実験では、補足眼野に AAV ベクターを接種し、運動性視床から単一ニューロンを記録しながら終末に発現させたハロロドプシンを光刺激して大脳視床経路の役割を探った。ベクターを接種した個体では光刺激によって課題関連活動の変化とともに、非特異的な活動の変化も認めた。課題関連活動の変化は興奮性、抑制性の両方があり、運動方向やイベントに特異的に光刺激の効果を認めた。一方、ベクターを接種しない対照個体でも同様の実験を行ったところ、非特異的な活動変化のみを認め、これらの多くは興奮性の効果を示した。これらのことから、運動性視床の課題関連活動の少なくとも一部は、大脳からの直接入力によって調整されていることが明らかとなった。光刺激の効果にはオプシンを介したものと、局所の温度変化によるものの 2 種類があると考えられる。これらの研究成果は現在、投稿に向けて準備中である。

#### 2019-A-6 意欲が運動を制御する神経基盤の解明

西村幸男、鈴木迪諒 (東京都医学総合研究所 脳機能再建プロジェクト) 所内対応者: 高田昌彦  
越シナプス神経トレーサー (狂犬病ウイルス) により、意欲の中枢である腹側中脳から 2 シナプス性の脊髄への投射の存在を見出した、また本成果に関して論文執筆を開始した。これらの成果の一部を下記に示す学会にて発表した。

1. Suzuki M, Inoue K-I, Nakagawa H, Takada M, Isa T and Nishimura Y. Macaque ventral midbrain facilitates the output to forelimb muscles via the primary motor cortex. The 2019 Annual Meeting of the Society for the Neural Control of Movement (NCM) (2019.4.26-27 Toyama, Japan)
2. 鈴木迪諒: 意欲を司る中脳辺縁系が運動と機能回復を制御する神経基盤、第 27 回日本運動生理学会大会シンポジウム IV 「運動技能向上・再獲得を担う脳内神経基盤の包括的理解」(2019.8.24 広島)

#### 2019-A-7 脳機能におよぼす腸内細菌叢の影響

福田真嗣、村上慎之介、谷川直紀、楊佳約 (慶應義塾大・先端生命科学研) 所内対応者: 中村克樹

本研究では小型霊長類であるコモンマーモセットに着目し、高次脳機能、特に情動反応や記憶力と腸内細菌叢との関係について解析を行った。高次脳機能評価を行うため、凶形弁別課題およびその逆転学習課題を訓練した。さらに、記憶機能を検討するため空間位置記憶課題も訓練した。これらのマーモセットの便を採取し、次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢解析を行った。得られた腸内細菌叢情報と認知機能情報について、相関解析や多変量解析手法を用いてアプローチし、認知機能に関連する腸内細菌叢の探索を行っている。これまでに、学習成績の比較的良好なマーモセットと悪いマーモセットの腸内細菌叢に一部差があることを見出すことができた。今後はより詳細な解析を実施する。

## 2019-A-8 チンパンジーを対象としたアイ・トラッキングによる記憶・心の理論・視線認知についての比較認知研究

狩野文浩（京都大・野生動物・熊本サクチュアリ） 所内対応者：友永雅己

類人猿の意図理解に関して、成果を上げた。これまでの研究から、類人猿が、予期的な注視を指標にした課題において、動画の中で、他者（動画の中の役者）が現実とは異なる誤った知識を抱えている（誤信念をもつ）状況においても、他者の行動の向かう先を予測的に注視することが示されている。本研究では、その心的メカニズムに関してさらに調査を進めた。先行研究では、類人猿が他者の意図理解にもとづいて課題を解決したのか（心の理論）、他者が最後に見た場所を再訪する、というような、特定の「行動ルール」にもとづいて課題を解決したのか、明らかではなかった。この「行動ルール」仮説を検証するために、本研究では、類人猿が、他者が同一の行動をしている状況においても、自己の経験に照らし合わせて、他者の行動の予測のやり方を変化させるか調べた。課題では、まず類人猿は近くで見ると透けて見えるトリック衝立と、近くで見ても透けて見えない普通の衝立のどちらかを経験した。2つの衝立は遠目から見ると同じに見える。その後、類人猿は動画を見た。動画では、類人猿が経験した衝立と同じ見た目の衝立の後ろに役者が隠れる様子が映され、その目の前では、隠されたオブジェクトが移動した。動画を見た類人猿は、トリック衝立を経験した場合は、役者がそのイベントを見たかのように役者の行動を予測し、普通の衝立を経験した場合は、役者がそのイベントをみなかったかのように役者の行動を予測した。したがって、予期的な注視を指標にした課題において「行動ルール」仮説は成立しないことが示された。Kano F, Krupenye C, Hirata S, Tomonaga M, & Call J (2019) Great apes use self-experience to anticipate an agent's action in a false-belief test. Proc. Nat. Acad. Sci. 116(42):20904-20909.

## 2019-A-9 判断を可能にする神経ネットワークの解明

宇賀貴紀、三枝岳志、熊野弘紀、須田悠紀（山梨大・医） 所内対応者：高田昌彦

運動方向を判断する際、大脳皮質中側頭（MT）野が動きの知覚に必要な感覚情報を提供していることは明らかであるが、MT野の情報がどこに伝達され、判断が作られているのかは未解明である。本研究では、化学遺伝学的手法を用い、MT野からのどの出力経路が判断に必須であるかを調べることで、判断を可能にする神経ネットワークを明らかにすることを目指す。今年度はサル1頭のMT野にhM4Di遺伝子を搭載したウイルスベクターを打ち、マルチユニットと局所電場電位（LFP）の反応変化を解析した。

## 2019-A-11 遺伝子導入法による大脳基底核疾患の病態に関する研究

南部篤、畑中伸彦、知見聡美、佐野裕美、長谷川拓、瀨瀬大輔、Woranan Wongmassang、Zlata Polyakova（自然科学研究機構・生理学研究所・生体システム） 所内対応者：高田昌彦

パーキンソン病（PD）の病態を明らかにするため、ドーパミン選択的神経毒MPTP（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine）をニホンザルに投与し、PDモデルを作製した。大脳基底核出力部である淡蒼球内節の神経活動を覚醒下で記録したところ、発火頻度に変化はなく、オシレーションもみられなかった。大脳皮質運動野の電気刺激に対する応答様式について調べてみると、正常サルでは早い興奮-抑制-遅い興奮からなる3相性の応答が観察できるが、PDサルでは3相性応答のうちの抑制が消失していた。記録を行いながらドーパミン補充療法を施し、症状が改善された時に記録を行ってみると、抑制が回復して3相性の応答様式に戻っていた。これらの結果は、大脳皮質-大脳基底核経路を介した淡蒼球内節における一過性の伝達様式の異常が、PD症状の発現に寄与していることを示唆する。淡蒼球内節はGABA作動性の抑制性ニューロンで構成され、常時連続発火することによって投射先である視床と大脳皮質を抑制している。正常状態では、直接路を介した入力によって淡蒼球内節が一時的に抑制されると、脱抑制によって視床と大脳皮質の活動が増大し運動を起こすが、PDでは大脳皮質からの入力によって淡蒼球内節が十分に抑制されず、視床と大脳皮質に対する抑制を解除出来ないため、無動や寡動を来すと考えられる。

## 2019-A-12 霊長類脳的全細胞イメージングと神経回路の全脳解析

橋本均（大阪大・薬）、中澤敬信（大阪大・歯）、笠井淳司、勢力薫（大阪大・薬） 所内対応者：高田昌彦

本年度は高田研で作成された複数の蛍光標識アデノ随伴ウイルスベクターを隣接する微小脳領域に感染させた脳を得た。高速高精細な全脳イメージングシステムFASTを用いて、単一細胞レベルで観察し、霊長類脳の詳細な全脳神経回路の情報を得るための画像データ処理法の開発等を実施している。その結果について、以下の学会発表を行った。

1. 勢力薫、笠井淳司、中澤敬信、橋本均.(2019年7月25日)「脳内のシンギュラリティ検出のための全脳高解像度イメージング」Neuro2019（朱鷺メッセ）
2. 勢力薫、笠井淳司、丹生光咲、田沼将人、五十嵐久人、中澤敬信、山口瞬、井上謙一、高田昌彦、橋本均 高精細全脳イメージング技術FASTの開発と精神疾患モデルマウスの病態解析—脳全体を対象とした

#### 2019-A-13 神経路選択的トレーシング法による社会脳ネットワークの解析

二宮太平、則武厚、磯田昌岐 (生理研・認知行動) 所内対応者: 高田昌彦

本共同研究は、社会的認知機能に重要とされる、いわゆる社会脳ネットワークの詳細を解剖学的アプローチにより明らかにすることを目的とする。具体的には、内側前頭皮質 (MFC) と腹側運動前野 (PMv) を対象とした、越シナプス能をもたない G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターおよびテトラサイクリン遺伝子発現調節システム (Tet-on システム) を利用した、神経路特異的トレーシングをおこなう。そのため、まず昨年度は実験目的に適したウイルスベクターの詳細な検討および作製をおこなった。現在、同様のベクターを用いた検証実験が計画されており、その際ベクターの有効性を確認する予定である。また、注入実験の際に電気生理学的手法を用いた対象領野の同定が必要であるため、細胞外電位記録実験および電気刺激実験に向けたセットアップをおこなった。今後は、ベクターの有効性を確認し、必要があれば更なるベクターの調整をおこなった後、当初計画していた、MFC と PMv への注入実験および神経ラベルの解析を進めていく予定である。

#### 2019-A-14 複数骨格筋への単シナプス性発散投射構造の解剖学的同定

関和彦、大屋知徹、梅田達也、工藤もゑこ、窪田慎治 (国立精神神経医療研究センター) 所内対応者: 高田昌彦

脊髄運動ニューロンに投射する Premotor neuron は大脳皮質、脳幹、脊髄にそれぞれ偏在し、最近の申請者らの電気生理学の実験によって Premotor neuron の複数筋への機能的結合様式が筋活動の機能的モジュール (筋シナジー) を構成することが明らかになってきた。この神経解剖学的実体については全く明らかにされておらず、ヒトの運動制御の理解の発展と、運動失調に関わる筋、神経疾患の病態理解や新しい治療法の開発のためには喫緊の研究課題である。そこで本研究では上肢筋の脊髄運動ニューロンへ投射する細胞 (Premotor neuron) の起始核である脊髄、赤核、大脳皮質からの発散性支配様式を解剖学的に明らかにすることによって、霊長類における巧緻性に関わる皮質脊髄路の脊髄運動ニューロンへの直接投射の機能的意義を解剖学的観点から検討する。

本年度は新たなウイルスベクターの開発を継続して行なった。また、国立精神・神経医療研究センターにおいて、霊長類研究所から供給を受けた AAV ベクターの機能評価をマーマセットを対象に行う研究を終了し、原著論文を発表した。

#### 2019-A-15 Conservation genetics of Myanmar's macaques: a phylogeographical approach

Aye Mi San (University of Yangon) 所内対応者: 田中洋之

In Myanmar, rhesus macaque (*Macaca mulatta*) distributed through Central to Northern Myanmar (>15°N). For the phylogeographic study, the target region of D-loop (1.2 kbp) was amplified and sequenced. The results showed that at least two clusters of rhesus macaque (*M. mulatta*) were observed in Myanmar. The Northern cluster has large genetic distance (0.072 to 0.085) from Central and North-western cluster. These two clusters may have different histories, i.e., they have been isolated by ancient geographic or ecological barriers such as Chindwin River, Ayeyarwady River, mountain ranges, valleys (22°N-24°N) and different climate. To characterize their phylogeographic positions within rhesus macaques, D-loop were sequenced of eight rhesus macaques from Primate Research Institute whose provenances were either India or China, and aligned with Myanmar rhesus. These results suggested that Myanmar Northern clade clustered in the Indian 1 haplogroup and Central and North-western clade clustered in Indian 2 haplogroup. Based on our findings we suggested that Myanmar origin rhesus macaques might be genetically suited for biomedical research similar as Indian origin rhesus macaque. As for the Conservation of Myanmar rhesus macaques, such information are necessary as population sizes and the way of distribution (whether local population ranges are fragmented from each other?), or the genetic variability within local populations; and information on the condition of habitat environment in Central-Northern Myanmar, such as industrial, agricultural or logging activities or great migration of people.

These results were presented at the 7th Asian Primate Symposium and the 1st International Conference Human-Primate Interface (8th-10th February, 2020, Gauhati University, India).

#### 2019-A-16 イメージングと脳活動制御の融合技術開発

南本敬史、永井裕司・小山佳・堀由紀子 (量子科学技術研究開発機構) 所内対応者: 高田昌彦  
本研究課題において、独自の技術である DREADD 受容体の生体 PET イメージング法と所内対応者である高田らが有する霊長類のウイルスベクター開発技術を組み合わせることで、マカクサルノ特定神経回路をターゲットとした化学遺伝学的操作の実現可能性を飛躍的に高めること目指した。R1 年度は脳移行性が高

くかつDREADDに親和性の高い化合物として独自に見出したDCZの有効性についてさらなる検証を進め、抑制性DREADD(hM4Di)を両側DLPFCに発現させたサルに微量のDCZを投与することで、空間作業記憶の障害を引き起こすことを示すなど、サルDREADD操作性の高精度化・安全性・利便性を高めることに成功し、論文として報告した(NagaiらNat Neurosci, in press). さらにDCZを放射性ラベルした $[^{11}\text{C}]\text{DCZ}$ はDREADDの脳内発現を画像化するPETリガンドとしても有用で、高感度にhM4Di/hM3Dqの発現を定量するとともに、陽性神経細胞の軸索終末に発現したDREADDsも鋭敏に捉えることに成功。この終末部にDCZを投与することで経路選択的な抑制制御ができることを明らかにした。この成果は複数の論文に発表するとともに、化合物DCZの情報とともに共有するにより、DREADDによるサル脳回路操作を広く展開する。

#### 2019-A-17 マカクザル外側手綱核の神経連絡

松本正幸、山田洋、國松淳(筑波大学・医学医療系) 所内対応者：高田昌彦

嫌悪的な事象(報酬の消失や罰刺激の出現)を避けることは、動物の生存にとって必須である。研究代表者と所内対応者、協力研究者らの研究グループは、マカクザルを用いた電気生理実験により、外側手綱核と呼ばれる神経核がこのような回避行動の制御に関わる神経シグナルを伝達していることを明らかにしてきた(Kawai et al., Neuron, 2015; Kawai et al., Cerebral Cortex, 2019)。このような外側手綱核の回避行動に対する役割をさらに神経回路レベルで理解するためには、外側手綱核が他の脳領域とどのような神経連絡を持ち、そのシグナルがどの領域に伝達されているのか、またどの領域を起源とするのか知る必要がある。しかし、外側手綱核の神経連絡を調べた解剖学的な研究の多くはげっ歯類を対象にしたものであり、霊長類を対象とした研究はほとんどおこなわれていない。

これまでに、フサオマキザルの外側手綱核に神経トレーサーを注入し、霊長類の外側手綱核が他の脳領域とどのような神経連絡を持つのかを明らかにしようと試みた。ただ、外側手綱核は非常に小さな神経核(2mmほど)であり、組織学的な解析をおこなった結果、神経トレーサーが外側手綱核から外れた位置に注入されていたことが明らかになった。2020年度以降、より高い精度で神経トレーサーを注入できる方法を工夫し(電気生理マッピングを事前におこなうなど)、また、外側手綱核と関連が深くトレーサーが注入しやすい他の領域(中脳ドーパミン領域など)をターゲットにして手綱核周辺の神経回路を明らかにするなど、複数のアプローチを組み合わせて実験を進める予定である。

#### 2019-A-19 Analysis of mitochondrial sequences for species identification and evolutionary study of slow loris (genus Nycticebus)

Wiradateti (Research Center for Biology-LIPI) 所内対応者：田中洋之

The Cooperative Research Program 2019, following the 2018 program activity, focused on genetic variation of the mtDNA markers in each species or between populations of slow loris. This study aims to understand the degree of genetic variation between species and among populations within the species to aid future conservation efforts. Last year, we analyzed using the 16S r-RNA of mtDNA. This year we analyzed the COI gene of mtDNA as a marker. These results will be valuable as supportive data in the release and reintroduction of these species to the wild without disturbing the gene pool of existing populations. This study can also be used for further studies of slow loris evolution in Asia. The analysis was conducted using a whole length of COI, which is about 1600 bp from 43 samples consisting of *N. coucang* (n= 20), *N. javanicus* (n= 19), and *N. menagensis* (n=4). Most of the samples came from confiscated, and some were collected from the wild.

The data analysis was conducted using the DNA pars and the MEGA 6.0 program. The results of DNA polymorphism from all samples of this study showed that 310 sites were found to be variable (polymorphic) with parsimony-informative 171 sites, and Nucleotide diversity;  $\pi$ : 0.03800; the haplotypes as many as 36 with Haplotype Diversity (Hd):  $0.986 \pm 0.011$ . DNA polymorphism between species was estimated by genetic distance (d) and nucleotide diversity ( $\pi$ ); these indices between *N. menagensis* and *N. Javanicus* were higher ( $d = 0.065 \pm 0.006$ ;  $\pi = 0.019 \pm 0.006$ ) than those of *N. menagensis* with *N. coucang* ( $d = 0.046 \pm 0.005$ ;  $\pi = 0.013 \pm 0.002$ ). While between *N. javanicus* and *N. coucang*,  $d = 0.055 \pm 0.005$ ;  $\pi = 0.020 \pm 0.002$ . Contrary, on the morphological character, the head fork (strip pattern on the head) and the back strip (lines on the back) were almost similar between *N. coucang* with *N. menagensis*, but have a clear difference with *N. javanicus*. The result of morphological observation suggests that molecular identification of the confiscated slow loris is necessary.

Each species has a different haplotype; *N. javanicus* h = 16; *N. coucang* h = 16, and *N. menagensis* h = 4. The haplotype diversity (Hd) of the *N. coucang* population (Hd = 0.996) was higher than Javan slow loris (Hd = 0.942) and Kalimantan slow loris (Hd = 0.966). This result indicated that the population of Javan slow loris had a low genetic diversity. Based on the phylogenetic analysis using ancestor trees between *N. menagensis* and *N. coucang*, it was showed that *N. menagensis* was ancestral or the oldest, then the analysis between three species in this study showed that *N. javanicus* was the ancestral species of the slow loris Indonesia.

From this study, we conclude that the COI gene of mtDNA could be used as a genetic marker for the identification of species in the genus *Nycticebus*, especially for the three species of Indonesia. These results support the results of the previous studies using 16S rRNA.

#### 2019-A-20 Ecological and phylogeographical study on Assamese macaques in Bhutan

Tshewang Norbu (Department of Forest and Park services, Ministry of Agriculture and Forest, Royal Government of Bhutan) 所内対応者：田中洋之

In the 2000s, new macaque species were found in Arunachal Pradesh and eastern Tibet. Therefore, it is recognized that the evolutionary study of Assamese macaques (*Macaca assamensis*) in Bhutan is important for clarifying the phylogenetic relationships of Asian macaques. In 2019, I focused on the Assamese macaques living in Sakteing Wildlife Sanctuary, which is located southernmost part of Bhutan and borders Arunachal Pradesh. First, I conducted interview-survey to assess the distribution of macaques, and then, visited the macaques inhabiting sites to observe macaque populations, collect DNA samples (fecal samples or other materials), and take photographs for morphology study. I carried out such a field-survey in several different places, considering altitudinal gradient that would enable us to better understand the behavioral patterns of the macaque at varying altitudes and different forest types. The coordinates of the sampling sites were also noted using GPS for future mapping and references. One of the purposes in this project was to compare the genetic and morphological features of the eastern populations of Assamese macaques with that of western populations.

I collected a total of 25 fecal samples from different sites in eastern Bhutan. Under the Materials Transfer Agreement between our institute and PRI, I brought these samples to PRI for molecular phylogenetic analysis. After DNA extraction, I did the long-PCR which amplify approximately 9 kb in mitochondrial DNA (mtDNA), including full length of 16S r-RNA, D-loop and cytochrome b gene. This was to avoid mis-amplifying NUMT (mtDNA-like sequence in nuclear genome). Next, the D-loop region was amplified with the primers of LqqF (5'-TCCTAGGGCAATCAGAAAGAAAG-3') and SARU5 (5'-GCCAGGACCAAGCCTATTT-3'), using the long-PCR product as template DNA. I sequenced the PCR product using DNA sequencing service of the company as well as by ourselves at the laboratory of Dr. Tanaka. DNA sequencing was successful for 25 samples. I continue the phylogenetic analysis of the DNA sequence data obtained in 2019 along with that of Assamese macaque from western part of Bhutan.

#### 2019-A-21 ウイルスベクターを利用した経路選択的操作技術による霊長類皮質—基底核—視床連関回路の機能解明

小林和人、菅原正晃、加藤成樹 (福島県立医科大学)、渡辺雅彦、山崎美和子、内ヶ島基政、今野幸太郎 (北海道大学) 所内対応者：高田昌彦

マーモセット束傍核—尾状核経路の認知機能における役割を評価するために、視覚弁別学習課題を用いて、行動学的な解析を行った。イムノトキシン細胞標的のための遺伝子として、インターロイキン-2 受容体  $\alpha$  サブユニット(IL-2R $\alpha$  と GFP 変異体 mVenus の融合遺伝子をコードし、融合糖タンパク質 E 型 (FuG-E) を用いてシュードタイプ化した NeuRet ベクターを作成し、これをマーモセットの線条体内に注入した。その後、束傍核にイムノトキシンあるいはコントロールとして PBS を注入することにより、視床線条体路の除去を誘導した。視床線条体路を欠損する動物の行動学的評価として、中村教授・高田教授の開発した、視覚弁別課題を用いて認知機能の解析を行った。視覚弁別課題では、第一に、1つの単純な画像の提示を用いて画像に触れること、およびそれにより報酬を得られることを学習させた。次に、報酬が得られる正画像と得られない誤画像の2種類の弁別用画像を同時に提示して、正画像を選択した正答率や一定の正答率に達する所要期間を評価した。一定の正答率に達した後、画像の正誤を逆転させて同様に正答率と一定の正答率に達する所要期間等を評価した。コントロール群に比較して除去群は視覚弁別学習の獲得に変化はなかったが、逆転学習の実行が低下する傾向を示した(t 検定、 $P=0.063$ )。本実験は、コントロール群m実験群のそれぞれを2頭の動物を用いて行ったため、動物数を追加して確認する必要がある。行動テストの後、視床線条体路を構成する細胞数の減少を抗 GFP 抗体を用いて免疫組織学的に検出した。コントロール群に比較して、実験群の束傍核細胞数は40%程度に減少することから経路の除去を確認した。

#### 2019-A-22 動物園のチンパンジーにおける口腔内状態の調査

生江信孝 (日立市かみね動物園)、桃井保子、齋藤渉 (鶴見大学)、木村加奈子、大栗靖代、正藤陽久、飯田伸弥 (日立市かみね動物園) 齋藤高 (たかいそ海岸歯科) 所内対応者：宮部貴子

かみね動物園で飼育しているチンパンジーの雌1個体 (愛称マツコ、推定41歳)において、腫脹、排膿、薬剤投与を繰り返す内歯瘻および外歯瘻がみられた。食欲に大きな変化はみられなかったが、外歯瘻があらわれると同時に左半身の脱毛が始まり大きなストレスになっていると推測された。ハズバンダリートレーニングにて日々歯のブラッシング、口腔内の確認をし、給餌内容を糖分の多い果物、根菜類を減ら

し葉物などの野菜類、枝葉の量を増やすなど見直しを行ったが症状が治まることはなかった。2019年8月に、日立市かみね動物園において、全身麻酔下で歯科治療をおこなった。口腔内X線検査をおこない、優先度の高い3歯を抜歯した。約3時間に及ぶ全身麻酔下での治療は初めてだったが、覚醒後からすぐに餌を欲しがらるなど大きなダメージはみられなかった。治療後には5日間、消炎鎮痛薬を経口投与した。経過は良好で、日々口腔内を確認したが患部の腫脹はみられず、抜歯窩は約3週間で回復した。その後現在に至るまで内歯瘻および外歯瘻はみられていない。この治療経過は2019年11月16日にSAGA22、2019年12月17日に第67回動物園技術者研究会にて「内歯瘻および外歯瘻を繰り返したチンパンジーの歯科治療：1症例報告」として発表した。

#### 2019-A-23 チンパンジーの口腔内状態の調査と歯科治療法の検討

齋藤渉(鶴見大・歯・保存修復)、桃井保子(鶴見大・名誉教授)、花田信弘、今井奨、岡本公彰、宮之原真由(鶴見大・歯・探索歯学) 所内対応者：宮部 貴子

霊長類研究所チンパンジー歯科研究チームは、2019-A-22に参画し、茨城県日立市立かみね動物園において、重篤な歯科疾患を有するチンパンジー1個体の歯科的対応をおこなった。現地の歯科医師、獣医師、飼育員、また企業よりボランティアとして派遣された放射線技師らと協働した。当該個体は2008年入園時にすでに多数のう蝕歯を有しており、それがおよそ10年を経て口腔内は憂慮すべき不健全状態にあった。2019年8月に、全身麻酔下で歯と歯周組織の視診・触診検査および全歯のX線検査を行い、その結果に基づきただちに診断後治療方針を決定した。優先すべき処置として、左上中切歯、右上犬歯、右下第3大臼歯を抜歯し、処置後5日間消炎鎮痛薬を経口投与した。その後、患部の腫脹や食欲低下はみられず、抜歯窩は約3週間で回復した。

抜去した左上中切歯を、ホルマリン固定し、実体顕微鏡観察後に写真撮影、次いで、X線マイクロCT(Shimadzu inspeXio SMX-225CT, Kyoto, Japan)で115 kv、70  $\mu$  A、スライス厚さ0.218 mm条件下で撮像した。その後、抜去歯から切片を作製し、象牙質面を走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、象牙細管の大きさや、象牙細管と管間象牙質が占める面積の割合すなわち象牙細管の密度、また成長線の間隔などはヒトの象牙質構造と近似していることがわかった。しかし、ヒトよりセメント質が厚く、管周象牙質形成がみられないことが特徴的であった。

#### 2019-A-24 触覚情報を用いたチンパンジーの個体識別および課題反応との関係解析

田中由浩、秋田駿(名古屋工業大学・工) 所内対応者：友永雅己

個体識別や感情推定について、カメラやマイクを用いた視聴覚情報を用いた研究開発が多く、触覚情報(力や振動)について検討が十分進んでいない。触覚情報は外から見えにくい性質も持ち、新たな情報源として基礎と応用の両側面で活用が期待される。そこで本研究では、チンパンジーのタップ動作を対象に、深層学習を用いた個体識別、提示課題における各種反応との関係を分析した。5個体に対し顔に見える画像の選択課題をタッチパネルで与え、タップによる振動データと反応時間、課題難易度、正解の有無を記録した。実験は6ヶ月間行われ、1個体に対し約90日、約3000タップのデータが集められた。個体識別ではタップによる振動を短く切り出し(0.04s)、2つの振動センサ情報を用いることで、1タップで85%程度の識別率が得られた。また、課題難易度、1枚提示の単純課題、課題の正誤に対して、振動強度と反応時間による2次元分布を求めて比較した。その結果、個体差はあるが、単純課題では反応時間が短く、データ数を増やした検証が必要ではあるが、正解時と不正解時で分布全体の傾向がやや異なるように見られた。難易度による差は見られなかった。分布結果は、1タップで反応推定が可能というより、複数課題を通したデータ群による反応割合の推定可能性を示唆する。今後、課題の改良、ヒトに対する実験を通して、解析と考察を深めたい。

#### 2019-A-25 サル内側前頭葉を起点とする領域間回路の解析とうつ病モデルの創出

筒井健一郎、中村晋也、大原慎也、吉野倫太郎、森谷叡生(東北大・生命) 所内対応者：高田昌彦

内側前頭葉、特に前部帯状皮質と扁桃体および側坐核との線維連絡の構成を明らかにするために、マカクザル(2頭)の扁桃体と側坐核にそれぞれ異なる蛍光タンパク質を発現する逆行性ウイルスベクターを注入し、内側前頭葉において標識される神経細胞の数・分布を調べる実験を行った。その結果、扁桃体や側坐核に投射する神経細胞が前部帯状皮質の膝周囲部や眼窩前頭皮質に多く認められた一方で、その分布パターンには違いがあることが明らかとなった。また、これらの結果を受けて、化学遺伝学的手法による神経経路選択的機能阻害実験を行うための準備を行っている。今後は、結果のさらなる解析を進めるとともに、機能阻害実験に着手したい。

#### 2019-A-26 動物の画像からの個体識別のためのパターン認識手法の開発

森裕紀(早稲田大学・次世代ロボット機構)、内海力郎、佐藤琢(早稲田大学) 所内対応者：友永雅己

チンパンジーの個体認識と個体追跡について、画像処理・画像認識技術を用いた技術の検討を行った。昨年度の研究では、Single Shot Multibox Detector (SSD)を用いたチンパンジー検出モデルを検討したが、本年度はYOLOv3を用いた検出モデルを検討した。

YOROはDeep Learningを用いた物体検出モデルとそのプロジェクトで、現在活発に研究開発が進められている。現在の最新バージョンは3でYOLOv3となっている。YOLOは認識性能だけでなく計算速度も性能が高くCOCO datasetを用いた学習でSSDと認識性能は同程度以上を保ったままで3倍程度速く、動作させることができる。

今回は、前年度と同じデータセットを用いて検証を行い、良好な結果を得た。

#### 2019-A-27 The Bossou Archive Project

Daniel Schofield (University of Oxford) 所内対応者：林美里

The Bossou Archive Project aims to digitise and catalogue video footage of wild chimpanzees from Bossou, Guinea, from over 30 years of fieldwork, and implement a framework for researchers to access and analyse this data. A key part of the Bossou Archive project is to develop a system to identify individuals and analyse their behavior longitudinally over 30 years. The Cooperative Research Program for 2019 focused on developing software using Artificial Intelligence to automatically identify Bossou chimpanzees from raw video footage. We developed a deep convolutional neural network (CNN) framework, for the detection, tracking and recognition of chimpanzees from archival footage. We used 50 hours of footage spanning 14 years, to obtain 10 million face images from 23 individuals to train our CNN models, which obtained an overall accuracy of 92.5% for identity recognition and 96.2% for sex recognition. This system provides the tools for efficiently annotating video footage and automatically generating processing of large volumes of video data, which can be used to analyse behaviour, such as chimpanzee social networks (Figure 1). The output of this work was published in Science Advances (Schofield, Nagrani, Zisserman, Hayashi, Matsuzawa, Biro, Carvalho, 2019: <https://advances.sciencemag.org/content/5/9/eaaw0736>). Currently, a web-framework is being developed to enable remote collaboration and annotation of the Bossou archive, and promote the next phase of development for new automated methods such as full body tracking and action recognition.

#### 2019-A-28 ヒトとチンパンジーにおける質感知覚に関する比較認知研究

伊村知子 (日本女子大・人間社会・心理) 所内対応者：友永雅己

本年度は、チンパンジーの配偶者選択において重要な役割を果たす性皮の質感知覚として、チンパンジー7個体(オス3個体、メス4個体)を対象に、色情報やツヤやハリに対応する輝度情報の変化が性皮に対する選好に及ぼす影響について検討した。実験では、チンパンジーの性皮の最大腫脹時と最小腫脹時の画像を左右に並べて画面に4秒間提示し、チンパンジーのそれぞれの画像に対する注視時間をアイトラッカーを用いて測定した。性皮の画像は、林原類人猿研究センター生まれのチンパンジー2個体(撮影当時、歳11-12歳と8歳)を対象に毎日撮影されたものから、最小腫脹時と最大腫脹時のものを6枚ずつ選び、黒色背景上に配置した。カラー画像とモノクロ画像を作成した。1日につき12試行(2個体×6種類)を4セッション実施した。その結果、カラー画像、モノクロ画像にかかわらず、最小腫脹時よりも最大腫脹時の画像を有意に長く注視すること、モノクロ画像よりカラーの画像の方を有意に長く注視することが示された。このことから、チンパンジーは少なくとも性皮の腫脹に対する選好注視を示すこと、色だけでなく輝度の情報も手がかりとなる可能性が示唆された。

#### 2019-A-29 霊長類の循環器系加齢誘引疾患に関する研究

鯉江洋 (日本大学生物資源科学部 獣医生理学/病態生理学研究室)、揚山直英 (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター)、中山駿矢、白仲玉 (日本大学生物資源科学部 獣医生理学/病態生理学研究室) 所内対応者：宮部貴子

申請者はこれまでにカニクイザルならびにニホンザルの循環器疾患を中心に研究を行ってきた。サル類は生理解剖学的に人に近く、サル類を用いた循環器研究の結果が人医学に応用が可能である。また加齢に伴い発症する疾病も人と近い。今回も前年度からの研究を継続して「各種霊長類の発達と加齢に関する総合的研究」分野に申請を行った。今回の研究も昨年と同様に、獣医臨床学的手法を用い心臓の評価を行った。本研究結果は人とサル類を含めた霊長類全般に有意義な結果をもたらすものと思われる。

申請者らは、これまでの研究で、臨床上で貴重な老齢性心臓疾患個体を発見し、継続的に経過観察を行っている。これらの基礎ならびに臨床データは、今後の獣医循環器分野ならびに霊長類の研究において、大変重要な指標となる。次年度も引き続き、これらの貴重な個体の継続研究を行いたいと考えている

#### 2019-A-30 霊長類島皮質の神経ネットワークに関する解剖学的研究

上園志織 (東京医療学院大・保健医療・リハ) 所内対応者：高田昌彦



大脳基底核から島皮質への多シナプス的入力解析のために、越シナプス的逆行性トレーサーである狂犬病ウイルスベクターをマーモセットの島皮質に注入した。MRI を用いて脳画像を取得、脳アトラスを参考にして島皮質の亜領野（無顆粒性島皮質、不全顆粒性島皮質、顆粒性島皮質）を同定、それぞれ異なる蛍光タンパク（青、緑、赤）を発現する狂犬病ウイルスベクターを注入した。三次的ニューロンラベルを得るために3日間の生存期間を設けたのち、灌流固定を行い、脳を摘出した。蛍光実体顕微鏡で脳を観察し、3種類の蛍光ラベル（青、緑、赤）を確認した。脳の薄切を行い、組織標本を作製し、主に大脳基底核（線条体、視床下核、淡蒼球外節）の三次的ニューロンラベル着目してニューロンラベルを観察した。大脳基底核におけるニューロンラベルには類似性が見られたため、大脳基底核からの入力様式については島皮質全体で類似している可能性がある。当該研究の対象である島皮質は他の大脳皮質に比べ深部にあり、島皮質の亜領野への限局的な注入を成功させるためには、注入実験の方法をこれまで以上の精度でおこなう必要があることが分かったため、研究協力者とMRI画像の撮像プロトコル、注入実験の条件、麻酔方法の検討を進めた。2020年度は見直しをおこなったシステムでのトレーサー注入実験を行う予定である。

#### 2019-A-31 チンパンジーにおける健康な加齢にともなう認知的機能やモノとの相互作用の変化

原田悦子（筑波大学・人間系）、須藤智（静岡大学・大学教育センター） 所内対応者：友永雅己

今年度、チンパンジーの超高齢個体および高齢期個体における実験時の状況を観察しながら、ヒトの健康な加齢に伴う新奇なICT基盤人工物利用時に見られる特異的行動との共通性と相違性について、データの再分析などから明らかにしていく予定であったが、申請者の健康上の理由などから、具体的な研究を進めることは困難であった。ただし、議論のなかで、1) 知覚的、運動的な反応遅延、および2) 特にその影響が大きく出る「課題困難度」（課題事態に伴う負荷条件）によって課題への主体的な取り組みを放棄するなどの反応、については、おそらく共通に観察されるものと思われ、また3) 時間圧、社会的圧などの何らかの外的な認知的負荷が加算された場合にそれらの加齢の影響が大きく生じることも共通要素として存在することが強く期待されている。そうした影響とメタ認知の問題について、またその際に（活動を媒介する）「道具利用」の有無がどのような影響を与えるのか、それに関連して、方略変更が何を契機にどのように発生するかなどの問題を明らかにすべきであることが確認された。

#### 2019-A-32 脳性麻痺チンパンジーへの発達支援と養育環境整備

竹下秀子（追手門 gakuin 大学心理学部）、山田信宏（公益財団法人高知県のいち動物公園協会・飼育課）、高塩純一（社会福祉法人びわこ学園びわこ学園医療福祉センター草津・リハビリテーション課）、櫻庭陽子（京都市動物園生き物・学び・研究センター） 所内対応者：林美里

2019年度は引き続き左側機能の増強、右側機能の改善を得るとともに、全体として粗大運動から運動技巧へと運動発達の課題が拡大した。屋内飼育室の左右に張られた数本のロープをブラキエーションや「左右足底ロープ接着・左右手掌ロープ把握の二足立位移動」を駆使して移動し、高所壁際に配置された食物に到達するなど、3次元空間における全身粗大運動が、不安定な基盤からアフォードされつつ展開された。右下肢が支持機能に加えて推進機能を担う場面も見られるようになった。移動時における右半身の身体知覚の向上と、「両足底接地・やや右側に体幹を傾斜・後方への反り返りを含む座位で、左手把握のペットボトルの角度を左前腕回内などの調整によって効率的に果汁を飲む」、「塩ビ管のフィーダーを転がす試行錯誤を経て穴からペレットをとりだす」など、物とのかかわりにおける運動技巧の精緻性が向上した。姿勢運動の安定を基盤に手指の直接操作の経験が物とのかかわりにおいて蓄積され、物体の属性にそくした操作が随時発現した。次年度に向けては、引き続き3次元空間を多様な素材を利用してエンリッチメントしていくことを基本に、他者とのかかわりを絶やすことなく、身体運動的にも社会的にもプレイフルな時間を日常生活に確保する方途を探っていく。

#### 2019-A-33 芸術表現の霊長類的基盤に関する研究

齋藤亜矢（京都造形芸大・文明哲学研究所） 所内対応者：林美里

チンパンジーを対象とした対面場面における描画課題の実施が困難な状況となったため、パネルの開開口部を通して描画用の画材を受け渡すという新たな課題場面の構築をおこなった。その際、より正確に描線を記録するためにデジタルペンを導入する予定であり、共同研究者の幕内氏らとの連携により、その準備をおこなっている。

### 7.2.2. 一般研究

#### 2019-B-1 霊長類におけるエピゲノム進化の解明

一柳健司、平田真由、一柳朋子（名古屋大学大学院生命農学研究科） 所内対応者：今村公紀

これまでに今村助教が樹立されたキク、マリ、ケニー由来のiPS細胞と理化学研究所から入手したヒト