

共同利用研究で貸与を受けたフクロテナガザル、ニシローランドゴリラ、ニシチンパンジーの固定標本を用いて浅指屈筋とヒラメ筋の筋束構成と支配神経パターンを調査した。その結果、ニシローランドゴリラとニシチンパンジーの浅指屈筋の筋束構成は互いに似ているが、ヒトでの報告とは異なることが明らかとなった。また、支配神経の筋内分布パターンは、筋束構成の違いにかかわらず一定の共通性がみられた。フクロテナガザルのヒラメ筋の筋束構成と支配神経は、ニシローランドゴリラ、ニシチンパンジーに比べて単純化していた。これらの成果は第 36 回・37 回日本霊長類学会大会、第 127 回日本解剖学会全国学術集会で発表した。また成果をまとめた論文を執筆中である。

#### 2021-B-70 一卵性多子ニホンザルの作製試験

信清麻子、外丸祐介（広島大・自然センター）、畠山照彦（広島大・技術センター）所内対応者：岡本宗裕

本課題は、動物実験に有用な一卵性多子ニホンザルの作製を目指すものであり、これまでに生殖工学基盤技術の検討に取り組むことで、「卵巢刺激→体外受精→受精卵移植」により産子を得るための再現性の高い技術を確認し、多子ではないものの受精卵分離胚移植による産子獲得、また別種であるカニクイザルへの受精卵移植により、正常なニホンザル産子を得ることに成功しレシピエントしての有用性を確認し、一卵性多子ニホンザルの獲得に向けた基盤が十分に築かれた状況にあるが、現在までに双子以上の多子を得ることはできていない。

過去の産子獲得をした条件を検討したところ、新鮮な胚よりも状態が悪いとされている凍結した分割胚でも、産子を獲得していた例があり、産子獲得においては、胚だけでなく移植個体の状態も大きな要因となると考えた。

そこで、2021 年度は、移植個体をより良い状態に保つため、個体に可能なかぎりストレスをかけないよう、移植個体は血中ホルモン測定などは行わず、メンス情報のみで性周期を把握することとした。候補であるの 24 頭のメンス状況を 10 月から確認し、4 頭の移植個体を選抜した。実験日程についても、繁殖期が短い屋内飼育動物の状態に合わせて、2 月末から 3 月初旬に絞って実験を計画した。

しかしながら、実験を予定していた期間（2 月 24 日～3 月 2 日、3 月 2 日～3 月 8 日）は、広島大学の新型コロナウイルス感染拡大防止に係る対策により、県外への移動制限や移動後の自宅待機（移動日含めて 2 日間）等が求められたことから、実験を実施することが不可能であった。

#### 2021-B-71 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・獣医生理学/病態生理）、揚山直英（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・獣医生理学/病態生理）、澤田悠斗（予防衛生協会）、中村紳一郎、塚本篤士（麻布大学・実験動物学研究室）所内対応者：宮部貴子

申請者はこれまでにカニクイザルやニホンザルなどサル類の循環器疾患を中心に研究を行ってきた。サル類は人と解剖学的構造及び生理学的機能が近いこと、特に循環器疾患領域で人医学への貢献が期待されている。今年度は従来の研究を継続し、「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。今回の研究では、これまでに獣医臨床学的手法を用いた評価により各種循環器疾患を診断し、それら個体の組織材料を対象に病理組織学的検索を行った（図参照）。その結果、拡張型心筋症および肥大型心筋症を発症した個体が存在する事が明らかとなり、その一部が家系性を有する事も示唆された。本研究の結果は人とサル類を含めた霊長類全般の循環器疾患研究に大変有用であると考えられる。

申請者らはそれらの解析結果やデータをまとめ、第 29 回サル類疾病ワークショップおよび第 164 回日本獣医学会にてオンライン発表を行った。その発表に際し、データ解析や予演会等の打ち合わせをオンラインで共同研究者らと行った。発表内容はこれら貴重な心筋症発症個体の詳細な病態解析を中心に行った。本研究で得られた基礎及び臨床データは、獣医循環器分野や霊長類研究のみならず、人医学においても、大変重要な成果だと思われる。引き続き、これらニホンザルに認められた貴重な家系性循環器疾患の研究を継続したいと考えている。

### 7.2.3 随時募集研究

#### 2021-C-1 COVID-19 の性感染症可能性の組織学的検討

森山隆太郎（近畿大・理工）所内対応者：鈴木樹理

マカク雄生殖系組織を用いて ACE2 受容体免疫陽性な生殖関連細胞が存在するか観察した結果、精巣のライディッヒ細胞、精母細胞周囲および精細胞周囲が ACE2 受容体免疫陽性であった。TMPRSS2 免疫陽性細胞を観察した結果、精巣のセルトリ細胞、精巣上体頭部・体部・尾部にある精巣上体管周囲の上皮細胞、精囊、前立腺および尿道球腺の腺腔を囲む上皮細胞が TMPRSS2 免疫陽性であった。NPR1 免疫陽性細胞を観察した結果、精巣では精細胞が強い免疫陽性で、精母細胞が弱い免疫陽性であった。精巣上体では頭部・

体部・尾部にある精巣上体管周囲の上皮細胞、精嚢、前立腺、尿道球腺の腺腔を囲む上皮細胞、さらに陰茎を含む全ての部位の血管内皮細胞が免疫陽性であった。また、FURIN 免疫陽性細胞を観察した結果、精巣の精細胞、精巣上体頭部・体部・尾部にある精巣上体管周囲の上皮細胞、精嚢、前立腺および尿道球腺の腺腔を囲む上皮細胞が免疫陽性であった。次に雌の組織で ACE2 受容体免疫陽性な生殖関連細胞が存在するか観察した結果、どの組織においても免疫陽性細胞は観察できなかった。同様に TMPRSS2 免疫陽性細胞を観察した結果、卵巣の間質細胞が TMPRSS2 免疫陽性であった。さらに、NRP1 受容体免疫陽性細胞を観察した結果、卵巣の間質細胞と子宮、膣、クリトリスの分泌上皮細胞であった。

RT-PCR 法により雄生殖系組織における mRNA 発現を同定した結果、ACE2 受容体 mRNA 発現組織は精巣のみであり、TMPRSS2、NRP1 および FURIN mRNA 発現組織は精巣、精巣上体頭部・体部・尾部、精嚢腺、前立腺、尿道球腺、陰茎であった。さらに、雌生殖系組織における mRNA 発現組織を同定した結果、ACE2 受容体 mRNA 発現組織は観察できず、TMPRSS2 と NRP1 mRNA 発現組織は卵巣、子宮、膣、クリトリスであった。

これらの結果は、SARS-CoV2 が霊長類の生殖組織に直接感染しないことを示唆するものである。

## 2021-C-2 チンパンジーにおける位取り記数法の学習と作業記憶における加齢効果

村松明穂、山本真也（京都大・高等研）所内対応者：足立幾磨

本研究の目的は、①ヒトにおける数の概念的進化的基盤を探ること、②発達・加齢がチンパンジーの作業記憶に与える影響を明らかにすることである。飼育チンパンジーを対象に、タッチモニタを用いたコンピュータ課題による実験的研究を行った。

数の概念に関する研究では、アラビア数字の系列 1 から 9 について学習済みのチンパンジーを対象に、前方・後方に系列を延長し、数系列 0 から 19 の学習と定着を試みた。すべての個体で数系列 0 から 19 を学習できたが、10 以降への延長前に「基数」「0」を学習する必要があることが示唆された。今後は、20 から 99 までの般化テストによって、十進法の表記規則の学習について確認することが望まれる。

作業記憶に関する研究では、過去 17 年間の作業記憶に関する課題のデータを各記憶媒体などから回収した。また、各作業記憶課題について、現時点でのデータを取った。年齢ごとに個体内・個体間で比較した結果、チンパンジーの作業記憶能力は、課題によっては 10 代半ばで低下し始めることが分かった。今後、20 代でのデータを収集・分析することが望まれる。さらに、作業記憶の新規課題では、最も成績の良い個体でも、10 個以上の刺激の情報の一瞬での記憶・利用は難しいことが分かった。

## 2021-C-3 サルレトロウイルスと Syncytin 遺伝子による ASCT 分子の共進化

宮沢孝幸（京都大学医生物学研究所附属感染症モデルセンターウイルス共進化分野）、北尾晃一、庄司日和（京都大・院・医）所内対応者：岡本宗裕

令和 3 年度では①霊長類研究所所蔵資料から受容体と syncytin 遺伝子のクローニング、②受容体と Syncytin タンパク質の細胞融合活性の測定を行った。

①資料からの受容体と syncytin 遺伝子のクローニング

分与された霊長類の血液サンプル（フサオマキザル全血、ヨザル全血）から RNA を抽出後、今年度はフサオマキザル、ヨザルの cDNA 合成を行い、ASCT1/2 及び MFSD2 の遺伝子を PCR で増幅した。また、ゲノム DNA から Syncytin 遺伝子のクローニングも行った。

②クローニングした受容体と Syncytin タンパク質の細胞融合活性の測定

ASCT1/2、MFSD2 受容体発現プラスミドをヒト胎児腎細胞(HEK293T)に導入し、同時に Syncytin 発現プラスミドも導入した。細胞融合依存的ルシフェラーゼアッセイで細胞融合レベルを定量し、異種間での受容体-syncytin 相互作用の度合いを定量した結果、種ごとに融合活性に差があることが明らかになった。また、受容体のアミノ酸配列を解析したところ、syncytin と相互作用する部位において変異が蓄積していることが明らかになった。

## 2021-C-4 オランウータンの遺伝性白質ジストロフィーの病態解明

内田和幸、チェンバーズ・ジェームズ、高市雄太（東京大学農学生命科学研究科・獣医病理学研究室）所内対応者：宮部貴子

千葉市内の動物公演にて飼育されていた 33 歳のオランウータンにみられた大脳白質ジストロフィーについて、臨床・病理所見および原因遺伝子を検討した。

症例はボルネオオランウータン、雄。1988 年に国内で生まれ、人工保育で飼育。2019 年に慢性的な鼻炎症状を示し、抗生剤を投与。嘔吐することもあった。2020 年 5 月頃から左後肢の跛行、第 2・3 指の伸展を認めた。9 月に測定過小を認め、徐々に悪化。12 月に前肢の震え、2021 年 1 月に転倒を認めた。2021 年 2 月に頭部および右前肢の不随意運動を繰り返し、翌日死亡。解剖時に上顎切歯における重度の齲蝕。喉頭嚢に食渣および混濁した液体が貯留。肺は退縮不良、水腫性。腹腔内臓器が一部で線維性に癒着。大脳は、脳溝が軽度拡大し、固定後の断面にて両側性、多巣状に白質の退色を認めた。病理組織学的には

大脳の LFB-HE 染色標本にて、白質における広範なミエリン脱落を認めた。同領域には、スフェロイドおよび肥厚星状膠細胞が多見され、それぞれ免疫染色で Neurofilament および GFAP に陽性であった。また、肥厚星状膠細胞の細胞質に褐色顆粒を認めたが、同色素は自家蛍光を示し、PAS 反応および LFB に陽性、トルイジンブルー染色で異染性なし、免疫染色では Ubiquitin 陰性であった。この顆粒は超微形態学的に高電子密度の凝集物から成り、ミエリン様の物質も混在して観察された。また心筋の多巣状壊死および線維化、誤嚥性肺炎も認めた。

以上の所見から本症例を大脳白質ジストロフィーと診断した。本症例では、感染症を示唆する所見は認められず、病変の分布および給餌内容から代謝性疾患の可能性も否定的であった。スフェロイドおよび肥厚星状膠細胞に色素沈着が観察されたことから、ヒトの Adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSPP) に相当する遺伝性疾患であると考えられた。霊長研にて保管されたサンプルも利用し、原因遺伝子の検討を行い、複数の候補遺伝子が確認されたが、サンプル数が少なく決定には至らなかった。

#### 2021-C-5 マカクサル網膜を用いた網膜組織培養系の確立

西口康二、川野健一、藤田幸輔、小柳俊人（名古屋大・院・医）所内対応者：高田昌彦

京都大学霊長類研究所にてドナーとなる霊長類の眼球を、実験殺の後にすみやかに摘出し、採取した眼球を低温にて名古屋大学に輸送した。神経網膜を分離し、3mm のバイオプシーパンチを用いて両眼の神経網膜全体からパンチを採取した。

予備実験としてマウス網膜を用いて網膜組織培養系の確立のため、1.2%B27 添加、1%N2 添加、0.8mM l-グルタミン添加 Neurobasal®-A 培地、2.DMEM/F12、3.DMEM/F12+10%ウシ胎児血清の3種類の培地構成で検討した。網膜パンチは、トランスウェルの上に、膜を湿らせるのに十分な培地を用いて静置し、網膜外側（光受容体側）を上にしたものと下にしたもので検討した。膜に組織が接着させるために組織を一旦インキュベート（37℃、5%CO<sub>2</sub>）した後、膜の下に培地を注意深く加え、組織をインキュベートした。培地は2日に一度交換した。2週間・4週間で組織を回収し、組織学に検討した。その結果、1.2%B27 添加、1%N2 添加、0.8mM l-グルタミン添加 Neurobasal®-A 培地が最も適していることが分かった。

同様にサル網膜にて 1.2%B27 添加、1%N2 添加、0.8mM l-グルタミン添加 Neurobasal®-A 培地を用いて、1週間・2週間・4週間で組織を回収し、組織学に解析した。その結果、マウスと同様に長期間の網膜組織培養が可能となった。今後さらに検討していく予定である。

#### 2021-C-6 法科学的試料における定量PCRを用いた人獣鑑別

中川俊史（愛媛県警察本部・科学捜査研究所）所内対応者：今井啓雄

霊長類のサンプルを用いて、人獣鑑別法を開発した（詳細については論文準備中のためここでは非公表）。

#### 2021-C-7 下北半島ニホンザルの外来種交雑に関する研究

川本芳、羽山伸一、近江俊徳（日本獣医生命科学大学）所内対応者：田中洋之

下北には 1952 年頃に輸入され半島基部で放し飼いされるタイワンザルがいた。交雑が危惧され、母群は 2004 年に全頭捕獲され消滅している。一方、下北半島では農作物被害等の軋轢が深刻化し、2012 年以降は個体数調整が行われている。本研究では有害捕獲個体を分析し、外来種交雑の影響が残るかを検討した。タイワンザル母群（69 個体）、下北半島のニホンザル（305 個体）を分析した結果、mtDNA の分子系統解析から出自は台湾南部の寿山（Shoushan）と推定できた。Y 染色体のマイクロサテライト DNA の分析からは、5 種類の Y 染色体タイプが区別でき、この分類により外来種母群へのニホンザル移入は確認できたが、ニホンザル側への遺伝子浸透の証拠は認められていない。房総のアカゲザル交雑調査で開発した常染色体一塩基多型（SNP）による交雑分析法を改良し（交雑度検出感度 2.6%）タイワンザルに応用したところ、母群内では一部（3/69=4.3%）が強く交雑（交雑度 30~50%）していた。ニホンザル側の調査は継続中で、これまで分析した 62 個体では常染色体標識でも交雑の証拠は認められていない。

#### 2021-C-8 大型類人猿の肩関節、特に烏口突起を中心とした軟部組織の線維走行に関する研究

磯貝純夫（岩手医科大学・解剖学講座・人体発生学分野）、田頭一志（岩手医科大学・研修生）、荒川高光（神戸大学大学院・保健学研究科）、江村健児（姫路獨協大学）、櫻屋透真（神戸大学大学院）所内対応者：平崎鋭矢

共同利用研究で貸与を受けた、フクロテナガザル、ニシチンパンジーの固定標本を用いて、肩関節特に烏口突起に付着する小胸筋、烏口腕筋、上腕二頭筋短頭、烏口上腕靭帯、烏口鎖骨靭帯、烏口肩峰靭帯、またその周囲の鎖骨下筋、大胸筋などの付着形態、繊維の走行をピンセットとメスによる一般的な肉眼解剖学的手法で剖出し、スケッチとデジタル画像で記録する。

## 2021-C-10 FUS 抑制マーモセットモデルにおける高次脳機能解析

石垣診祐、遠藤邦幸、岩出展行、金侑璃、瀧澤雅恵(名古屋大学大学院医学系研究科) 所内対応者: 中村克樹  
確率逆転学習課題を基盤とした新規高次脳機能評価指標開発

作出した尾状核特異的 FUS KD マーモセットおよび control マーモセットの、injection 後 1 年および 2 年の確率逆転学習課題を継続し、時系列的な変化の解析を進めた。その結果、 $\beta$  (逆温度) の時系列変化を FUS KD マーモセットと control マーモセットと比較した場合、AAV injection 後 6 ヶ月、1 年の時点で FUS KD マーモセットでは有意に  $\beta$  が上昇することが明らかになった。野生型マーモセットの確率逆転学習課題のための訓練を開始した。課題のプロトコルが学習成立に与える影響を評価するために、施設間で異なるタスクの成功率評価をそれぞれの手法(10 回単位、30 回単位)で再解析し、評価結果に差異がないことを確認した。尾状核特異的 FUS KD マーモセットを追加作出するため、AAV injection 前の確率逆転学習課題訓練を開始した。

### 摂食行動指標開発

野生型マーモセットを用いて、摂食行動様式の定量法を作出するために、ガムを給餌瓶に充填しケージの前面 4 箇所を設置し、ガムを摂取する様子を動画撮像して摂食様式の定量化をはかる実験に着手した。動画から給餌瓶へアプローチする行動を、DeepLabCut によって定量化するパイプラインを preliminary に作成した。

## 2021-C-12 霊長類の着床機構の解明

依馬正次、岡村永一、武藤真長、松本翔馬(滋賀医科大学) 所内対応者: 今井啓雄

胎盤の正常発生は胎仔の成長を保証し、出生児の体重にも直接的に影響することから、ゴリラなどの大型類人猿から小型の霊長類まで胎盤の構造が一つの体重決定因子であると推測されている。しかし、胎盤発生を個体レベルで研究するのは侵襲性の高い実験が求められるため、実施が困難である。そこで申請者は、子宮と胎盤をそれぞれ模倣するオルガノイドを作成し、人工着床系を構築することを試みてきた。具体的には、ヒトおよびカニクイザルの子宮から子宮内膜の特性を忠実に反映する子宮内膜オルガノイドを作成することに成功している。さらに、胚盤胞由来の胎盤幹 (Trophoblast Stem) 細胞を子宮内膜オルガノイドと反応させることで両者間で低頻度ながら接着反応が起こることを見出し、着床の初期反応を模倣していることが期待されている。本申請では、代表的な類人猿であるチンパンジーとゴリラ、マカク属のアカゲザルの子宮から子宮内膜オルガノイドを樹立、胎盤からは TS 細胞を樹立し、各霊長類の着床過程を模倣する人工着床系を構築することを目的とする。

本年度はインド産のアカゲザル 2 頭から子宮と繊維芽細胞の供給を受け、これまでに子宮オルガノイドの作製を行った。

## 7.3 令和 3 年度で終了した計画研究

### 霊長類の先進的遺伝子改変モデルを用いた神経ネットワークの構造と機能の解明

実施期間: 令和 2~3 年度

課題推進者: 高田昌彦、大石高生、宮地重弘、井上謙一

共同利用・共同研究の計画研究のひとつとして、令和 2 年度より 2 年間の予定で、研究会題目と同じ「霊長類の先進的遺伝子改変モデルを用いた神経ネットワークの構造と機能の解明」と題した研究課題を立ち上げた。当該計画研究では、多様なウイルスベクターシステムや光遺伝学・化学遺伝学的技術により作出した先進的遺伝子改変モデルを用いて、マカクザルやマーモセットなどの霊長類動物における神経ネットワークの構造と機能の解明に迫ることを目的とした、先進的かつ独創的な多数の共同利用研究を推進した。2 年間の採択課題は以下のとおりで、令和 2 年度末と 3 年度末の 2 回にわたり、本計画研究に関わる共同利用研究会を開催した。研究会では、高次脳機能や精神・神経疾患に関する多様な研究を意欲的に展開している研究所内外の研究者(特に中堅・若手研究者)から最新の研究成果を紹介していただき、活発な情報・意見交換を行うことができた。

### 研究実施者

<令和 2 年度(2020)>

- A-3 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)
- A-4 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)
- A-6 脳活動制御とイメージングの融合技術開発(南本 敬史)
- A-7 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)
- A-8 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)
- A-9 霊長類脳の全細胞イメージングと神経回路の全脳解析(橋本 均)