

理事長に就任するにあたって

Message from the chief director of the
Corporation for Production and Research of
Laboratory Primates (CPRLP)

(社)予防衛生協会理事長 松浦十四郎

昭和 49 年度の予算要求に当たって、当時厚生省の科学技術担当審議官であった私は会計課長にいわれました。「あなたはサルが輸入されなくなったら、ワクチンの検定が出来なくなるから、日本の衛生対策上の大問題だと主張しているけれど、何時から輸入がとまるのですか。それに輸入すれば一頭 10 万円なのに、飼育すれば、100 万円もかかるのは経済的には全く成り立たない話ですね」。この議論から始まったサルの繁殖システムは昭和 53 年から TPC として陽の目を見ることになり、それから 14 年がすぎました。しかし発足当時のこの議論はそのまま生きており、行政管理庁の指摘もそれに近いもののように聞いております。

たしかに、TPC の役割が単にワクチン検定のサルの育成に限られているのならば、その議論はそのまま生きているに違いありません。一行政当局はそうに今でも理解していると思います。

ところが 14 年間の歴史の中でサルの飼育技術の確立、向上のみならず、その周辺の感染、老化等の問題も研究され、内部的にその需要が拡大したように思われます。

予防衛生協会は国の施設で、国の仕事を丸ごと請け負うという今まで厚生省(国)には無かった特殊な性格をもった法人として出発し

ました。この法人も TPC と一体になって、予研の方々の指導を受け技術的にも進歩してきたと思われます。

また、外部では高品質のサルに対する需要が増している、他方サルを使う実験は出来るだけ少なくすべきであるという見解があるとも聞いています。

この度私がこの協会にきて短期間ですが聞いて感じたことは、発足当時に考えていたことと現在の実状との人間のギャップでした。TPC と協会をとりまく環境について十分に理解し、TPC と協会との関係、協会のあり方について改めて見なおす時が来ているようです。予研、TPC のご指導、ご援助を受けながら協会の発展の道を求めていきたいと思っております。

理事長職の退任にあたり協会の発展を祈念して

Farewell message from the former chief
director of CPLP

(社)予防衛生協会顧問 金光克己

この度新年度の事業計画を諮る平成 4 年度通常総会の開会を機とし健康上の理由から理事長の役職を辞任することになりました。

思えば当時世界のすう勢として、資源衰退により危機が指摘されているところの野生動植物の保護の声が高まり、これを規制する国際条約であるいわゆるワシントン条約が発効され日本においてもこれを批准したことにより、霊長類の輸入規制といった問題が背景にあったため、昭和 53 年筑波医学実験用霊長類

センターが建設され、これにより全体支援のための社団法人予防衛生協会が設立されました。爾来今日まで公衆衛生の向上として国民の健康を守るため国立予防衛生研究所が必要とする新薬開発としての国家検定のためのサルの繁殖・育成及び供給業務に貢献できた事を責任者として誇りとしているところでございます。これも偏に職員の皆さまの平素のご協力とご努力に負うところであり誠に深く感謝しているところでございます。霊長類の育成・繁殖といった事業も当初は全くの未知の分野で、そのうえ国の機関で行うといった希有な事業の委託となると全てにかけて不安の連続でありました。幸いにも予研の諸技術陣に支えられ今日を迎えることができたと振り返っておるところでございます。

と申しましても、発足以来 14 年間を目の前にして霊長類の委託事業と併行した予防衛生協会独自事業の開発につきましては、総会等で幾度となく検討してまいりましたが隘路が多く、その間に実験用動物を囲む社会背景の変化にも対応しながら試行錯誤の連続でございましたが、この程予研と協議を重ね漸く協会が実施でき得る事業から着手することを心よりご理解頂くことができました。

今後も種々ございましょうが早速に来年の事業計画として総会に諮ったところ承認を得ることとなりましたことを、ここに報告させて頂くとともに関係者のご協力に対し深謝しているところでございます。さいわい新役員が選任され各界に造詣のある進取気鋭の方々を迎えることが出来、新しい感覚で協会を育ててくれるものと心より期待しているもので

あります。

どうぞ協会の発展のため私も今後は顧問として寄与させて頂くことになりましたが、職員の皆さんにおかれましても習得された霊長類の繁殖・育成技能や検定・研究技術を十二分に活用され、わが国唯一の霊長類指導協会を形成すべく益々のご精進の程をお願いするとともに、役員の積極的な企画及び関係機関のご協力と平素からご支援を賜っております賛助会員の皆様のご指導を併せてお願いし挨拶いたします。

《巻頭随想》

学習，ヒラメキ，カオス

Study, inspiration and chaos

吉川泰弘

2・3 年前、科学技術庁の「脳機能解明のための基盤技術開発研究班」の合同班会議のシンポジウムで、とても印象に残った発表があった。

それは NHK で放送されたビデオで、工学部の先生が学生の卒論に与えたテーマで、いかに速く歩くかを学習するロボットであった。ロボットといってもいかめしいものではなく、丁度製図の時に使うコンパスを少し複雑にしたようなもので、足首、膝、腰の関節に相当する所で 360 度自由に曲れる代物であった。

さて画面に横たわった一直線に伸びたコンパスは、足首や膝などを時々ピクピクさせながら、横にコロコロころがる運動を始める。ビデオのコマは早送りで適当につないであるので、見ていると、ころがりからやがて、赤

ちゃんのハイハイのような運動になり、次いで各関節を一杯に使った尺取り虫運動になり、尺取り虫運動が次第にハデになり極限にまで伸びると、反対側に折れ曲がって、反動を利用したウサギ跳びスタイルとなり、最後には100m 競争のような走る運動も出て来た。会場は爆笑のウズであった。画面に出てくるコンパスは、いかにも人間的に振舞ったからである。工学部の先生の説明では、このロボットのプログラムはたった数行ですむもので、前の動きよりも後の動きの方が少しでもゲインがあれば、それを採用せよというコマンド 1 つであるということであった。たった1つのコマンドで、これ程の自由度とパターンの進歩を生むということを知り、改めて感動した。

脳の神経回路は複雑で、情報処理、記憶、学習メカニズムといったテーマは、21 世紀に残された神経科学の主要な課題である。並列処理型ニューロコンピュータの開発にも力がそそがれているが、行動パターンからみた学習の動機づけが上に述べたように非常に簡単なものでよいという事は面白いことである。

話は変わるが、水平思考の重要性を説く仮説の中で、神経回路の特徴として、インプリティグ(刷り込み)に代表されるように 1 度出来た神経回路は、保守的で、そこから脱却することは、非常に難しいと云われている。従ってヒラメキを生むには垂直思考をやめて水平思考に切り換えなさいというわけである。もっともな気もする。これは右脳と左脳の使い分けでも似たような例が引かれている。

さて最初に述べたコンパスの動きをみてい

ると、尺取り虫運動から、ウサギ跳び運動に移る過程は、尺取り虫の歩幅がどんどん大きくなり、180 度まで広がった所で遂に反対側に折れて、突然ウサギ跳び運動の原型が出現する。重要なポイントは尺取り虫運動からウサギ跳び運動への転換はウサギ跳び運動が尺取り虫運動の延長線上にあるようでありながら、全く不連続に出現する点である。一つの運動の局限が、次の段階で全く異質のタイプの運動に転換してしまうのは、ヒラメキと共通しているように見える。学習なしではヒラメキは生まれませんが、他方ヒラメキが学習の単純な延長上とは、異質に見えるので、ヒラメキとか発想法のノウハウについて書いた本がよく売れるのであろう。

最近物理学や数学の世界では、カオス理論が話題になっている。人によれば 20 世紀最大の発見であるとも云っている。細かい点をはぶいて云えば、この発見は数学的にカオス状態、すなわち、ゆらぎ、乱れ、不規則性などが、非線形性という観点からどのように生ずるかということをはっきりと示した事である。この結果我々の身の回りで起こる、不規則性は、従来その現象に係わる因子が多過ぎるために、予測不可能という不可知性で説明されていたが、カオス理論では 1 つの系に 3 個以上の因子が働けば、その運動は、決定論に従いつつカオスになってしまうというもので、非常に単純なものから、容易にカオス状態が導かれることを明らかにしたものである。

さて、カオスの世界の中の乱れでは、1 つの運動(数式の解の軌跡)が、突然、別の運動に移ったかのようにふるまう。これは例えば、

振り子の振幅が次第に大きくなると突然円運動に変換したり、蛇口から出る水の紋様が流速が減るにつれて、縄目から、突然水滴になったり、川の中のウズが流速の増加により全く形を換えてしまうことなどに見られる。カオス理論の中では不連続性、不規則性、予測不可能性が連続変移上の正統な位置に置かれており、連続性との対立概念にはなっていないのである。

話を元に戻すと、学習による進歩には、ある種の不連続性がみられ、それはヒラメキというような表現でいわれる一種の不可知なもののようにみえる。この不連続性、不可知性もカオス理論からみれば、最低 3 要素からなる決定論に従う不規則運動(カオス)の結果生ずる連続変移上の不連続性なのかもしれない。その意味では、振り子運動から円運動に転換するには、ただ 1 つ、振幅を拡大する必要があり、その意味ではヒラメキを生むには、そのテーマに関して、絶えず考えつづけること(振り子を振り続けること)が必須なのである。果報は寝て待つわけにはいかない。

厚生省長寿科学研究・霊長類研究班発足する

The Ministry of Health and Welfare starts the program “Use of primates in biomedical research for longevity”

厚生省厚生科学課及び保健医療局のお骨折りにより、平成 4 年 4 月より、厚生省長寿科学研究に、霊長類を用いた疾患モデル開発研究班が発足することとなった。今期（3 年間）

のテーマは以下の 3 題である。

・長寿科学研究領域における霊長類を用いた疾患モデルの開発：

医学実験用霊長類における糖尿病、高脂血症、網膜変性症、骨粗しょう症等の代謝疾患、老年性疾患の年齢別発症頻度を調査し、これらの疾患の発症に及ぼす加齢の影響を明らかにする。スローウイルスを用いた霊長類の痴呆モデルの開発を行う。疾患を多発する特定の家系を調査し代謝疾患および老年性疾患の高リスクグループを特定し、これらに属する個体で長期的視野にたって経時変化を調査し、老年性疾患の発症におよぼすリスクファクターを明らかにする。疾患多発家系を確率するとともに、成人病関連遺伝子の解析を行う。

・長寿科学研究における実験動物の情報ネットワークの整備：

長寿科学研究における各種実験動物の特性、利用、モデル開発、老齢動物の確保・相互利用等に関する情報を収集し、データベースを開発する。これらの情報は公開とし、主として既存のパソコン通信ネットワークを利用してオンラインで検索できるシステムを開発する。さらに、霊長類に関する最新情報を収集するため、内外のデータベースと直結したシステムを確立する。ヒトゲノムプロジェクトに対応した、実験動物の老年性疾患関連遺伝子に関する情報ネットワークを整備する。

・老齢ザルの飼育管理、取扱い技術の確立と技術者の育成：

これまでに蓄積された管理技術を集大成す

るとともにトレーニングマニュアルを作成する。

TPC のメンバーの他に、大学の各分野の先生方、企業の研究者方にも、協力研究員となっていたが、7 月中に、第 1 回の分野別班会議を開催した。

《検査情報》

カニクイザルコロニーにおけるサル水痘様ヘルペスウイルス抗体保有状況

Survey on antibody against Tsukuba Simian Varicella-Like Herpesvirus (TSVH) in the colony of cynomolgus monkeys

成田豊子・向井謙三郎・高阪精夫

1989 年から 1990 年にかけて、当センターのカニクイザル繁殖コロニーで発生したサル水痘様ヘルペスウイルス(TSVH: Tsukuba Simian Varicellalike Herpesvirus) 感染症の流行については、1 昨年の本ニュース(1990, Vol.9 No.2) で特集として報告した。今回は、流行時感染を受けたサル(TSVH 抗体陽性ザル)の流行終息後 1 年目における、抗体保有状況の変化とその後の新たな感染ザル発生の有無を知る目的で、カニクイザルコロニーの全頭のサルを対象に、TSVH に対する抗体保有状況を前回と同様に蛍光抗体法(IFA)で調査したので報告する。なお、一部のサルについては、IFA に加え、我々の確立した特異性の高い中和試験(NT)やドットウェスタンブロッティングを用いた酵素抗体法(DIA)も用いて調査した。また、IFA 抗体 10 倍陽性血清については DIA も併用し、両測定法で 10 倍以上のものを

陽性と判定した。

1. 流行終息後 1 年目のカニクイザルコロニーにおける TSVH 抗体保有状況

本症の流行が発生した第 1 棟(繁殖棟)の全頭について、調査した TSVH 抗体保有状況を表 1 に示す。最初に本症が発生した 2 室(フィリピン産系)では、'90 年 6 月の流行終息後の TSVH 抗体陽性ザルは 35 頭であった。その後、16 頭が払い出し及び死亡等で搬出され、残り 19 頭の抗体陽性ザルが 継続飼育されていた。流行終息 1 年後の'90 年 10 月の調査では、この 19 頭のうち 18 頭は抗体が維持されており、陽性と確認されたが、1 頭は抗体価が 10 倍以下に陰転していた。また、新たな陽性ザルが 3 頭(いずれも発疹症状はみられなかった)増え、今回の調査では合計 21 頭が陽性であった。しかし、新たな陽性ザル 3 頭中 1 頭は、陽性個体の母ザルから出生した仔ザルで、移行抗体によるものであった事が、その後の調査で明らかになった。他の 2 頭の新たな陽性ザルは、野生由来及び育成ザルの各 1 頭であった。そして、このうち育成の 1 頭は、TSVH の流行が終息した 6 ヶ月後の'90 年 10 月の検査で抗体価 20 倍であったことから、その間に感染が起こったものと推測された。他の 1 頭は'90 年 6 月の流行終息時は陰性で、'91 年 10 月の検査時で陽性であった。続いて 2 室同様に流行のみられた 3 室(マレーシア産系)についてみると、'90 年 6 月の流行終息後の調査で 61 頭が抗体陽性であったが、そのうち 6 頭が払い出し及び死亡等で搬出され、残り 55 頭が飼育

されていた。'91 年 10 月の調査で抗体が維持されていたサルは、55 頭中 52 頭で 3 頭は陰転していた。しかし、この 3 頭のうち 2 頭は、移行抗体消失のための陰転であった。一方、新たに移行抗体によるものと思われる仔ザル 3 頭が加わり、191 頭中合計 55 頭が抗体陽性であった。この抗体陽性仔ザル 3 頭に関しては、6 ヶ月後の検査で抗体の消失が確認された。2、3 室における抗体を維持した陽性ザルのほとんどの抗体価は、1 年前の流行終息後の抗体価と同程度であった。つぎに、群繁殖を行っている 5 室についてみると、'90 年 6 月に行った流行終息後の調査では、12 頭が、抗体価 10 倍の陽性であった。そのうち 5 頭が払出し及び死亡等で搬出され、残りの 7 頭の '91 年 12 月の調査では、すべて抗体価 10 倍以下の陰性であった。そこで我々は、この 12 頭の '90 年 6 月の調査時採取した血清と '91 年 12 月の陰転した 7 頭の血清について DIA での調査を試みた。その結果、'90 年 6 月、IFA で陽性と判定された 12 頭すべてが DIA では、10 倍以下の陰性と判定された。もちろん 7 頭も同様であった。

表 2 に 1990 年と 1991 年に調査した第 2 棟(育成棟)と第 3 棟(保持棟)における TSVH 抗体保有状況を示す。第 2 棟は、'90 年、'92 年ともに TSVH 汚染のないコロニーであった。しかし、第 3 棟では、'90 年の調査で 1 頭が 20 倍の抗体価を保有していた。このサルは、予研・村山産で TPC に移動してきた 1979 年の採取血清で、抗体価 160 倍という高い抗体価を示した。'92 年の調査では、'90 年同様 20 倍でこの間の抗体価の変動はなかった。

2. TSVH 感染症流行源の究明

今回と前回(TPC NEWS 特集号)の調査で、本症の集団発生以前既に本ウイルスに、感染していた個体がカニクイザルコロニーに存在していたことが明らかになった。それらのサルのうち、1 頭は最初に流行が見られた第 1 棟 2 室で飼育されていた。このサルは、第 3 棟で流行前に抗体を保存していたサルと同様、予研・村山産で、'89 年 12 月に発症した。その時の年齢は 26 才であった。そしてこのサルの発症 4 ヶ月前('89 年 8 月採取)の血清は、その一年前('88 年 7 月)に比べて抗体価の有意な上昇(IFA 価 10 倍から 40 倍)が起こっていた。しかし中和抗体は、両時点とも検出されなかった。つまりこの個体に、村山で飼育されていた 15 年の間のどこかで感染していた本ウイルスが流行発生時まで潜伏感染していたものと考えられる。そして、何らかの原因で再活性化し、そのウイルスが向い側ケージのサル(野性由来繁殖用雄・本症例 No.1)に伝播し、その後の集団発生という結果につながったものと考えられる。その上、流行源となったと思われるこのサル自身は、流行発生後 1 ヶ月目に局所的に発疹が観察され、一見被害ザルの様に思われ、発症後本ウイルスに対する中和抗体も認められた。この事はすでに IFA 抗体を産生していても、かなりの高齢であることから、免疫能の低下等で同じウイルスの再感染を免れ得なかったものと考えられる。また症例 No.1 の流行前の血清('82 年、'87 年)について、NT 及び IFA を試みたが陰性であった事等からも今回の流行源となったサルは、村

山産の高齢ザルで、本ウイルスの再活性化により流行が起こった可能性が濃厚である。今後 TPC において、二度と大流行を起こさぬ様、本ウイルスを完全に排除する事が、コロニーを維持して行くうえで大切である事を痛感させられた。その 1 つの対策として現在は、離乳仔ザル及び移動する時期には本ウイルスに対する抗体検査を、必ず行うことにしている。同様に、その他のヘルペスウイルス属(B ウイルス, CMV, EBV 等)についても、今後できる限り排除していきたい。

《検査技術》

酵素免疫吸着法(ELISA)によるウイルス抗体検査

- B ウイルス関連抗体のモニタリング -

Detection of B virus related antibodies by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) used HSV-1 antigen

藤本浩二

酵素免疫吸着法(ELISA)は抗原あるいは抗体を免疫吸着体に固相化した後、酵素標識した抗体あるいは抗原を加え、その結果起こった抗原・抗体反応を酵素活性を利用して増幅検出する方法である。吸着体にはマイクロプレート、ビーズ、膜など選択できるが、マイクロプレートを使用する場合が多いようである。理由としては、反応の途中で行う数回づつのプレートの洗浄と最終の比色定量が自動化されている点、さらに二抗体法によるウイルス抗原の検出など補捉 ELISA の際にプレート法がより適しているためである。標識する

酵素としてはアルカリフォスファターゼあるいはペルオキシダーゼが一般的である。

ここでは TPC のカニクイザルコロニー内で B ウイルス(*Herpesvirus simiae*)感染をモニタリングするために行う単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)に対する抗体の検出について、ELISA と従来から行なってきた補体結合試験(CF 法)の結果を比較する。

B ウイルスは東南アジア産のマカカ属サルに自然感染しているヘルペスウイルスの 1 つであり、サル類に対しては普通は不顕性感染で全身症状はみられないが、口唇、舌、口腔粘膜に水疱や潰瘍を起こすことがある。一方、ヒトに感染した場合は致死的な脳・脊髄炎を起こすバイオセーフティーレベル 4 に分類されるヒトにとって最も危険なウイルスの 1 つである。これまでに約 30 人の感染例が報告されており、最近では 1991 年 10 月米国テキサスにあるヘイゼルトン社の霊長類センターで獣医師 1 人が本ウイルスに感染して死亡した。また、カニクイザルを用いた長期の免疫抑制剤投与と実験の途中で潜伏感染していた B ウイルスが再活性化し、実験者の安全が問題になった報告も最近なされている(1)。同様に米国では今後のエイズ研究にサルを利用する場合の B ウイルスによる危険を除くため、B ウイルスフリーコロニーの確立を目指し、米国内の 6 つの霊長類研究所で同時に国家的プロジェクトをスタートさせた。

サルコロニー内での B ウイルス感染のモニタリングはウイルス抗体の検出が主要となるが、B ウイルスの取扱いには最高度封じ

込め実験室(P4)が必要であるため、B ウイルスと共通抗原を有する HSV-1 に対する抗体を測定することにより B ウイルス感染を推測することができる。マカカ属サル血清中の抗 HSV-1 抗体と B ウイルス感染の関係については、参考文献を参照いただきたい(2,3,4,5,6)。

カニクイザル血清中の抗 HSV-1-IgG 抗体の測定法を図 1 に示す。ウイルス抗原は HSV-1 感染 Vero 細胞の超音波破砕物から、超遠心法で精製したウイルス粒子分画である。正常細胞抗原はウイルス非感染 Vero 細胞を同様に処理したものである。プレートにそれぞれの抗原を 1 μ g/ml で固相化し、これに希釈したサル血清を反応させた。次にアルカリフォスファターゼを標識した抗カニクイザル IgG 抗体を反応させ、最後に基質である PNP を加え、生成物を 405nm で比色した。方法は他の技術書に詳しいので参考にしていきたい(7)。ELISA で重要な点は、プレートに固相化できる蛋白量がごく少量であるため抗原をある程度精製しておくこと、また第 2 抗体はアフィニティ精製したものに酵素を標識する点であり、これが十分な感度と低いバックグラウンドを生む条件となる。たとえば、市販の CF 用の HSV-1 抗原をプレートに固相化した場合は、抗原蛋白の中に安定化剤として多量に含まれる BSA などがプレートをブロックしてしまい有効に抗体が測定できない。

ELISA でカニクイザル血清中の抗 HSV-1 抗体を定量した結果を図 2 に示す。ウイルス抗原を固相化した場合(・—・)血清の希釈に従い

吸光度(E^{405})が低下してくる。血清中のウイルス抗体価はウイルス抗原と正常細胞抗原のウェルでの吸光度の差が 0.2 以上を示す最大希釈倍数で表わすこととし(矢印) 図 2 の例では抗体価 1,600 倍と判定される。

図 3 に HSV-1 抗原と B ウイルス感染 Vero 細胞培養液を不活化後凍結融解した粗精製 B ウイルス液(HBV)を抗原とした ELISA でカニクイザル血清中の抗体を測定した結果を示す。両抗原に対する抗体価はよく相関した。一方、本来 B ウイルスに対する抗体を HSV-1 の共通抗原部分で検出しているため、各検体間の B ウイルス抗体価の差が HSV-1 を抗原とした ELISA では小さく判定される問題もある。しかし、結果として、HSV-1 を抗原とした ELISA でカニクイザル血清の抗 B ウイルスのある程度定量的に測定できると判断した。

野生カニクイザル血清中の抗 HSV-1 抗体を CF 法と ELISA で測定した結果の比較を図 4 に示す。CF 法で抗体陽性と判定された血清は全て ELISA で抗体陽性となったが、CF 法で抗体陰性と判定された 42 例中 27 例では ELISA で抗体陽性と判定された。この陽性 27 検体のうち 26 検体は B ウイルス抗原を用いた ELISA で抗体陽性であり、残りの 1 検体は正常細胞抗原に対する反応が強く判定不能となった。また ELISA で HSV-1 抗体陰性と判定された 18 検体は B ウイルスに対しても抗体陰性であった。篠川ら(4)も同様に、野生由来カニクイザルの調査から、抗 HSV-1-CF 抗体陰性のサルの中に約 40%の抗 B ウイルス中和抗体陽性のサルが存在することを明らかにしている。

以上の結果はサルコロニー内の B ウイルス感染のモニタリングには ELISA による HSV-1 抗体の検査が CF 法のそれより精度の高い方法であることを示している。

次に TPC の F1 育成カニクイザルで抗 HSV-1 抗体の有無を調査した結果を示す(図 5)。

右端のカラムは野生由来のカニクイザルの結果であり、抗体陽性率は 90%以上であった。0 日齢から 1 ヶ月齢の新生仔は母ザルからの移行抗体の影響で全て抗体陽性、2~3 ヶ月齢で陽性率は 80%に低下し、4 才齢以後 5 才齢まで抗体陽性の個体は検出されない。6 才齢以後わずかに陽性例がみられるが、これはすべて TPC の通常の繁殖・飼育方式とは異なり、例外的に群繁殖・育成方法で育成されたサルであった。以上の結果から、TPC での通常の繁殖・育成方式により得られた育成カニクイザルでは、HSV-1 に対する抗体調査結果から判断する限り、B ウイルス感染フリーであるといえる。

IgM 抗体は感染の初期に産生される免疫抗体クラスの一つであり、IgM 抗体の検出は感染が最近起きたものであるか否かを知るよい指標となる。しかし、IgM 抗体は量的に少なく特に、IgG 抗体の中に IgM 抗体が混在する場合は図 1 に示したような抗原をプレートに固相化する ELISA ではその検出が難しい。さらに、血清中に自分の IgG と反応する IgM 抗体(IgM 型リウマチ因子)が存在する場合、抗原と結合した IgG に付着しているリウマチ因子に抗 IgM 抗体が反応してしまい、見かけ上ウイルス IgM 抗体陽性と判定されることがある。

このような望ましくない反応を抑え、かつ少ない量の IgM 抗体を検出する方法として捕捉—ELISA 法が開発され、この方法はマイクロプレートを用いた ELISA の 1 つの特技となっている。

図 6 に捕捉 - ELISA による抗 HSV-1-IgM 抗体の測定法を示した。プレートにアフィニティー精製した抗カニクイザル IgM 抗体を固相化しこれで血清中の IgM を捕捉後ウイルス抗原を加えると、左の場合のように抗体陽性例ではウイルス抗原が捕捉され、これを酵素標識した抗ウイルス特異抗体で検出するという仕組みである。

図 7 は、TPC で野性由来雄サルと育成雌サルの長期同居交配の際 B ウイルスの伝播が起こり、雌ザル血清中に抗 HSV-1-IgG 抗体が検出されたと考えられる例である。雌ザルは交配開始 1 年前の保存血清では抗体陰性であったが、3 ヶ月間の野性雄ザルとの交配直後の血清では、IgG 抗体価が 6,400 倍、IgM 抗体価が 100 倍であり、交配期間中に雄ザルから B ウイルスの感染があったと推察された。

以上、カニクイザルコロニー内での B ウイルス感染のモニタリングに HSV-1 を抗原とした ELISA が有効であることを報告した。結果としては、従来の CF 法に比べ ELISA の感度が数十倍高く、これまで抗体陰性であると判定されていた野性カニクイザルの中にもかなり抗体陽性のものがあることが明らかとなった。また TPC で繁殖育成されたカニクイザルは例外的なものを除き、ほとんどすべてが B ウイルス感染フリーであることが再確認された。

なお、TPC では現在、P4 施設利用可能な米国と共同研究の上で、B ウイルス DNA の断片を組換え DNA としてクローン化した後、*in vitro* で有効なウイルス抗原蛋白を発現する系を開発し、合成ペプチドを利用した B ウイルス抗体検査法の確立をめざしています。

さらに、B ウイルスに特異的なモノクローナル抗体など診断薬開発も計画しています。近い将来、安全で高感度の B ウイルス抗体測定キットを TPC から全国のサル検疫・実験施設に供給できるよう努力したいと考えています。

参考文献

- (1) Lab. Anim. Sci., 42, 146-151, 1992.
- (2) Develop. Biol. Standard, 45, 61-66(S. Kager, Basel), 1980.
- (3) The Herpesvirus 2, 385-428 (Plenum Press) 1983.
- (4) Exp. Anim., 35, 59-63, 1986.
- (5) J. Virol. Meth, 14, 99-109, 1986.
- (6) Lab. Anim. Sci., 237, 304-308, 1987.
- (7) ウイルス・クラミジア・リケッチア検査, 第 1 分冊 46-61 (財・日本公衆衛生協会), 1987.

《症例報告》

高齢カニクイザルに見られた化膿性脊髄炎の一例

Purulent myelitis in an aged cynomolgus monkey

榊原一兵

サルにみられる細菌性の化膿性炎は咬傷に起因することが多く、また二次的に内部臓器へ転移性の病変をつくることが多い。しかしながらそれが中枢神経系に波及する例は非常にまれである。

ここに報告する症例は個別ケージ内で飼育されていたため臨床的に運動の異常に気づかれるのが遅れ、発見時全身の衰弱が著しいため予後不良と判断して安楽殺された。臨床的に下肢の運動麻痺、知覚障害が見られたため中枢神経系の異常を疑い MRI(磁気共鳴映像法)により検索した。MRI 検査では、腰部骨格筋肉内に限局性に強い水分子のシグナルが認められた。解剖時にこの部位に一致して深部膿瘍が確認され、さらに病理組織検査によって細菌が脊髄神経から脊髄へ伝播したことが明らかとなった。

症例: カニクイザル、メス、22 オ、当センター産、個別ケージ内で飼育・食欲不振に気づきその 3 日後に横臥、意識低下、下肢の運動、感覚麻痺、上肢も感覚麻痺が観察された。背側を強く圧迫することによりやや痛みを感じるようであった。

臨床検査成績: MRI にて背側(右側)に限局性的水反応あり。解剖時、この部位に膿瘍を認める。膿はやや粘稠、半透明、淡赤、血液の混入は認められなかった。膿瘍、脾臓、および副腎より *Staphylococcus aureus* が純粹に分離された。

病理所見: 皮膚外傷は全く認められなかった。右第 4 から第 6 腰椎付近に約 1cm × 4cm の膿瘍が確認された。これは 2 個の膿瘍が瘻管で融合したものであった(図 1 MRI 写真)。

胸および腰椎には異常を認めなかった(ソフト X 線写真より)。

組織学的には図 2 に示すように腰部骨格筋から脊柱管にかけて膿瘍があり、さらに髄膜腔内にもリンパ球、好中球などの浸潤および、線維素の沈着が認められた。髄膜腔内の炎症性の細胞浸潤は腰髄から胸髄にかけて観察された。図 3 は腰髄の髄鞘染色標本である。側索白質に顕著な髄鞘および髄索の崩壊が認められる。別部位では、髄鞘の変性、即ち淡染した部位や、髄索の著しい腫大が認められ、好中球の浸潤も観察された。またこの病変部近辺の脊髄神経線維には Gram 染色で陽性に染まる球菌と神経線維の変性が認められた。

以上の所見から本症例はなんらかの外傷をうけ、そしてそれによって生じた骨格筋の膿瘍から細菌が末梢神経にそって髄腔さらに腰髄側索まで伝播したものと考察される。

《臨床ノート》

臨床ノート: プロローグ

Clinography : prologue

落久保文子

予防衛生協会に獣医として就職して 4 箇月、まだまだその獣医という肩書きをどこかに隠しておきたいほどの現状です。こちらに来る以前、東京大学医科学研究所ではリスザルにおけるイヌジステンパーウイルス(CDV)誘発脳炎に関する研究に従事してまいりました。

小児神経疾患の中でウイルス性脳炎は最も重要な疾患の 1 つと考えられています。近年、有効な抗ウイルス剤が開発され、早期診断、

早期治療が要求されるようになってきており、それにともない脳内におけるウイルスと神経細胞との関係また、それによって引き起こされる様々な神経症状の病因解析をおこなうための実験系の確立が望まれています。

リスザルの脳内への CDV 接種により脳炎を惹起した結果、麻痺、ミオクローヌ様発作、痙攣発作などの神経症状が高率に発現しました。特徴的な脳波所見としては、てんかん型波形と周期性同期性放電が認められ、亜急性期には、背景脳波の平坦化が見られ、聴覚脳幹部誘発電位では激しいニューロンの発作活動が脳幹部の機能異常を誘発する可能性が、また、視覚誘発電位では急性期では機能異常が上位脳幹部から大脳皮質の視覚野にまで及んでいることが示唆されました。病理組織学的には、神経細胞の変性、壊死、囲管性細胞浸潤などの病変が広範囲にみいだされ、亜急性期にはヒトの代表的神経難病である亜急性硬化性全脳炎に大変よく似た所見が認められました。

急性期の 2 例からはウイルス抗原分布とほぼ一致した部位からウイルスが分離され、これらの分離ウイルスの性状はマウスでの神経病原性、抗原エピトープの面で脳の部位により差異が見られ、中枢神経系における組織依存性のウイルス修飾がおこっている可能性が考えられました。

リスザルにおける CDV 誘発脳炎はウイルス性脳炎のモデルとして高い感受性とその脳炎発現における再現性により今後、病態の解析や治療試験に非常に有用と思われます。

今年度より長寿科学の研究班がスタートし

痴呆症をテーマとして研究を進めていくにあたり霊長類モデルの開発が必須となっており。この Para-medical な仕事とともに、いえ、それ以上にケージの中で暮らしている彼らから学んで実感することは、本来の veterinary medicine として彼らに帰すことのできる仕事ができればと強く思うようになりました。サルは、たとえ生まれた時からケージの中にいようと、ぎりぎりまで決して人間に自分達の弱みを見せようとしません。その野性は崇高ささえ感じますが、それが何も手を施せないまま死へと導いてしまう場合があります。与えられた空間のみで生きていく彼らに対して、できることがあるとすれば、その苦しみを隠さねばならない状況を取り除いていくことではないかと。研究と現場の獣医との一見両極が一つの幹と信じて。

《研究会報告》

医学実験用霊長類安定供給のための対策

A plan for a stable supply of nonhuman primates for biomedical research

1. 安定供給のための動的平衡状態の解析

吉川泰弘・長 文昭・鈴木通弘・大藤浩美

【目的】: TPC は自己完結型あるいは自給自足の繁殖方式により、室内繁殖を行っている。設立以来 14 年を経て、野性ザル(F_0)が繁殖群の 1 割以下となり、繁殖コロニーの主体は育成ザル(F_1 以上)となった。育成ザルの繁殖データの量がシミュレーションするのに満足できる量に達した現在、本プロジェクトでは、これらのデータをもとにして自己完結型の安

定供給を行うために必要なコロニーサイズを明らかにすることを目的とした。

【方法】: シミュレーションに必要な各因子を育成群のデータをもとにして求めた。野生ザルのデータは採用しなかった。自己完結型大規模室内繁殖方式は世界でも類例がなかったので、その方法論は試行錯誤的にならざるを得なかった。従って各因子の算出は、必ずしも育成ザルの全データを機械的に採用するのではなく、将来も行われる方式に従ったデータで、例数が十分量あるものを採用した。自己完結型安定供給のためのサルコロニーサイズを割り出すには、年数の経過によって母集団が変異しては困るので、動的平衡状態を仮定し、そのサイズを決める必要がある。図 1 に動的平衡状態の概念を図示した。

【結果】

A) 因子群:

1) 初産年齢: 育成群から繁殖群に移した個体について種々の交配様式を試み、初産年齢に関するそれらの結果を表 1 にまとめた。初産年齢でみる限り、1:1 交配、短期・長期同居あるいは群交配を含めて考えてみても、それらの様式の違いには大差はなく、現状では 5 オ 7 ヶ月を平均初産年齢と考えてよい。これは通常 4 オで繁殖群に導入し、新しい環境への順化と月経の観察(2~3 ヶ月)を経て交配を始めた場合、初産に要する平均交配回数が 5.2 回(約 6 ヶ月)、妊娠期間が 5.5 ヶ月と考えれば、妥当な数字である。

一方 1980 年以後に出生した全育成ザルに

について初産年齢の分布を調べてみると、図 2 から明らかなように、4, 5, 6 才で全体の 70% を占めているので、以後は 4, 5, 6 才を初産群、7 才以上の繁殖個体を経産群と考えて処理することにする。これは後で述べるように、初産群と経産群では、種々のパラメータが異なるからである。

2) 正産仔出生率: 妊娠した個体が死・流産を起こさずに正産する割合は、妊娠母体が初産であるか、経産であるかによって異なる。表 2a, 2b から明らかなように、初産での正産仔出生率は 83.3%、経産での正産仔出生率は 89.9%であった。

3) 年間出生数: 繁殖集団が年間何頭の仔を出産するかを明らかにすることは、それ程容易でない。現場では繁殖コロニーの全雌頭数と 1 年間に産まれる仔の数を知れば、一応コロニーサイズからどの位の仔が得られるか推測できる。しかし、実際には繁殖コロニーは数学的均一性をもっているわけではなく、ダンゴ状態であったり、ピラミッド型であったりして、得られるデータは母集団の年齢や構成により大きくゆらいでしまう。他方、交配回数から割り出した妊娠率や 1 回の交配で得られる妊娠個体率から直接年間出生数を算出することは困難である。

ここでは、任意の時点で動的平衡状態が成立していると想定して、年間出生数を出すことにした。すなわち繁殖群が任意の時点で、各年齢でどのような繁殖ステージの構成要素からなっているのか調べた。表 3a は 1987 年～1991 年の各 5 月末での個体数を合計したものである。要素は妊娠中(E_1)、哺育中(E_2)、哺

育後の休止期(E_3)、および交配中(D)である。TPC での繁殖・育成システムから考えると、妊娠期間 5.5 ヶ月(E_1 に対応)、哺乳期間 5 ヶ月(E_2 に対応)、哺育後の母体休止期 2～3 ヶ月(E_3)、交配中あるいは交配待ち(D: 期間はシステムおよび妊娠率などにより支配される)になる。

集計月によるデータのブレを補正するために、3 ヶ月ごとの年齢別妊娠個体率の変動を調べた。表 3b から明らかなように、5 月末を含む 3 ヶ月ごとのデータの平均は、初産群で 10.1%、経産群では 16.2% であり、信頼区間は、それぞれ初産群で 7.5%～12.7%、経産群で 15.4%～17.0%であった。後述する全推計値はこの値がもとになっているので、全ての値は初産群で 25%(2.6/10.1)、経産群で 5%(0.8/16.2)の上下幅があると考えなければならない。

前に述べたように 4～6 才は初産群と考えてよい。4 才の構成要素に関しては十分量のデータがないので、5, 6 才について考えると E_1 の平均は 0.101 である。7 才以上を経産群と考え、 E_1 の平均値を求めると、0.162 になる。さて、年間産仔数は、1 年間に総数何頭の雌が $E_1 \rightarrow E_2$ の状態に移行したかを求めればよい。超音波診断により妊娠が確定されるのは妊娠後平均 35 日である。カニクイザルの平均妊娠期間は 165 日であるから E_1 のグループの雌は、130 日後には全て E_2 に移行して、新たに E_1 に入ったグループは更に 130 日後までに全て E_2 に移行することになる。こうした動的平衡状態を考えると 1 年間には、繁殖雌母集団を A とすると、年間産仔数は、

$$A \times E_1 \times 365 \text{ 日} / 130 \text{ 日} \text{ となる。}$$

図 3 は、動的平衡状態に達した繁殖群(4 - 15 才で均等になっている)を想定した場合の雌個体総数を A として、総正産仔数を求めるための概念を図示したものである。初産群には 4, 5, 6 才の雌が含まれるのでこれは全繁殖群の 3/12 である。初産群による年間産仔数は

$A \times 3/12 \times \text{初産群 } E_1 \times 365/130$ である。正産仔数は表 2a から明らかなように産仔数 $\times 0.833$ となる。同様にして経産群は繁殖雌の 9/12 であるので、経産群の年間産仔数は

$A \times 9/12 \times \text{経産群 } E_1 \times 365/130 \times 0.899$ である。従って年間の総正産仔数は $A \times 0.059 + A \times 0.307 = 0.366A$ となる。

4) 繁殖母集団実数: 年間の総正産仔数が求まったので、つぎに母集団実数(B)を求める。前述したように繁殖雌母集団を A とした場合、TPC では基本的に繁殖コロニーの構成は雄 1 に対して雌 10 としているので、繁殖母集団の総数は $A \times 11/10$ になる。一方表 4 は、繁殖コロニーでの負傷、事故などによる年間死亡率(T)を求めたものである。繁殖コロニーを維持するには年間死亡数に対応する数だけの余分の個体を毎年繁殖群にいれなければならないので、結局母集団の総数は

$B = A \times 11/10 \times (1+T)$ となり、その値は $A \times 1.110$ である。また毎年繁殖群に導入される育成ザルの総数(Y)は繁殖母集団実数を 12 で割って(4~15 才令が均一であるため)これに年間死亡数を加えたものになる。従って

$Y = A \times 1.11/12 + A \times 1.11 \times T = 0.102A$ である。

5) 離乳率: 正産した仔ザルは約 5 ヶ月間哺

乳されるが、育成ザルでは野生ザルに比較して、哺育に問題がある。特に初産の育成雌ザルではその哺育率は低く、67%であり、経産ザルでは 91%である。そのため、TPC では里仔に出したり、人工哺育を行ない、離乳率を上げる方式を取っている。表 5a, 5b に初産・経産での総離乳率を示した。初産では離乳率は 84.7%であり、正産仔数が $A \times 0.059$ なので、初産の離乳仔数は $A \times 0.059 \times 0.847 = 0.050A$ となる。一方経産では総離乳率は 92%であり、正産仔数は $A \times 0.307$ なので、経産の離乳仔数は $A \times 0.307 \times 0.92 = 0.282A$ となる。従って年間離乳仔数は $0.050A + 0.282A = 0.332A$ である。

6) 育成率: 離乳後 3 才令までの育成群の生存率を表 6 にまとめた。途中で国家検定用に供給した個体はデータから除いてある。育成率は初産仔・経産仔では差がなく、表から明らかなように 91.7%であった。離乳時期は生後 5~6 ヶ月令であるから、2.5 年で 8.3%減少すると考えると、年間の減少率は 3.32%と考えてよい。年間総離乳仔数が 0.332A であるから、2 才令の総育成仔数は $A \times 0.332 \times 0.950 = 0.315A$ である。

B)コロニーサイズ:

以上でシミュレーションに必要な全因子群が求まったので、図 1 の動的平衡状態を想定してコロニーサイズを求めたのが図 4 である。理論値から供給数は $a = 0.315A - 0.102A = 0.213A$ となる。また 2 才令から 4 才令までの間に供給されるとすると、

0 才から 1 才令までの数は、平均 0.332A

1 才から 2 才令までの数は 平均 0.321A

2 才から 3 才令までの数は 平均 0.255A

3才から4才令までの数は 平均 0.153A
繁殖母集団実数は 1.110A
となるのでコロニーサイズは $S=2.171A$ である。

【考察】

図4で示された内容を具体的に考えてみると、例えば繁殖群に雌1000頭をあてると、交配用の雄および繁殖群の年間死亡数の補填を含めて、実際の繁殖群の個体数は1110頭になる必要があるということである。この母集団から年間366頭の正産仔が出産し、332頭が離乳し、2才までに生存する数は315頭ということになる。また繁殖群を維持するには毎年102頭(雌92+雄10頭)を繁殖群に導入する必要がある。この時コロニーサイズは2171頭で、年間供給出来る仔ザルは213頭になる。2才令の生存仔数が315頭ということは、雄・雌各157頭前後と考えればよいから、実際の供給は雄147頭、雌66頭ということになり、自己完結型の安定供給が理論的に可能であるということを示している。

ついでコロニーサイズ S と供給数 a について考えてみると、 $S=2.171A$ であり $a=0.213A$ である。従って $S=10.19a$ となる。これは供給可能頭数とコロニーサイズは単純な一次式の関係であり供給頭数を決めれば、コロニーサイズはそれに規定されるということである。例えば100頭供給するには1019頭のコロニーサイズを必要とすることを意味している。現在予研でワクチンの国家検定に必要な育成ザルの数は年間150頭であり、この時のコロニーサイズは $150 \times 10.19=1529$ となる。この他

に検定用ウイルスの力価測定・分離などに使われる初代腎細胞のドナーとして最低30頭が必要である(アフリカミドリザルでもよい)。この時のコロニーサイズは $180 \times 10.19=1834$ 頭である。

今回求めた各要素のデータは、これまでのTPC育成ザル繁殖システムをもとにして得たものである。将来にわたっても、これまでと同様試行錯誤的方法を取る機会が多いと考えられる。従って各因子の値はこれからも変化するものであり、毎年のデータを編入して、バージョンアップしていかなければならない。システムを固定化しないためにも繁殖計画に対するフィードバックの姿勢が重要である。例えば、ラインローテーション方式を緩和し、交配待ちの雌を出来るだけ少くする。また雌に関しては、3.5才から繁殖群に入れ(この場合、雌は3才では原則として供給しない)、6才までに繁殖資質による選抜を確立して、野性ザルの時と同様出来るだけ早期に不妊雌や繁殖資質の劣っているサルを繁殖群から除いた場合、理想的には表7に示したように初産群では観察・交配待ち群(C群)が残るが経産群に関しては交配待ち群がゼロになる。この場合経産群での年間正産仔数は

$A \times 9/12 \times 0.23 \times 365/130 \times 0.899=0.435A$ となる。初産群の正産仔数は変わらないので年間の正産仔出生数は $0.059+0.435A=0.494A$ となる。これに基づいて動的平衡状態を想定すると図5のようになる。

この時の供給個体数は $a=a_1+a_2=0.329A$ であり、コロニーサイズは $S=2.869A$ となるので、供給数とコロニーサイズの関係は $S=8.72a$ と

なる。こういう状態が確立できれば毎年検定および腎摘に 180 頭，研究用に予研 30 頭，TPC30 頭，他の研究機関等に 30 頭の合計 270 頭づつ供給する場合でも，2354 頭のコロニーサイズとなる。この場合，具体的には正産仔数は年間 403 頭，離乳仔数は 368 頭，2 才までの育成仔数は 350 頭となる。2 才から 4 才までの間に，検定研究用に雄 153 頭，雌 20 頭を供給し，雌 156 頭，雄 21 頭は繁殖候補群に入れる。この群については 7 才までに繁殖資質による選抜を行い，7 才の時点で雌 84 頭，雄 13 頭を供給，新繁殖集団には選抜された雌 73 頭，雄 8 頭を組み込むこととなる(図 6)。

なお，年間 30 頭の供給は，少ないように見えるが，サル類を用いた実験は急性感染実験を除けば一個体を縦断的に追うケースが多く，通常 3～5 年間にわたって行われる。1 実験が平均 4 年間であるとすれば，総計 $30 \times 4 = 120$ 頭が供給できるわけであるから 20 頭単位の実験を組む研究施設であっても，6 機関が安定してサルの供給を受けられることになる。

最後に，今回試算した安定供給体制は，現在の TPC の実状とは大きくかけはなれている。現在の繁殖母体は 9 - 11 才の集団を中心とするダンゴ状態であり，この状態からいかにして動的平衡状態に移行させるかが，大きな課題である。また繁殖資質の評価基準になる一般式も必要である。これらについては次のプロジェクトで論じる予定である。

2. 現状から動的平衡状態までのプログラム

吉川泰弘・寺尾恵治

前プロジェクトで動的平衡状態の解析が行われたので，ここでは，TPC の現状から検定のためのサルを毎年 150 頭づつ供給しながら動的平衡状態へ移行するためのプログラムについて考えてみたい。TPC の現状を示したのが図 7a である。繁殖群の母体は 8 才～10 才の育成ザルで，ほとんどの個体が経産であるため，この群が引退するまでもう 5 年～7 年間は，安定した数の正産仔を得ることが出来る。この間すみやかに長期計画のための基盤を作り上げる必要がある。次期繁殖群の候補となる 3～7 才令が落ち込んでいるのは，当時，現在の繁殖母体となっている群が初産時であったので正産仔出生率や離乳率が低かったにも拘らず，繁殖候補群を検定用に供給しなければならなかったためである。さらに 1989 年からのサル水痘様ウイルスの流行は繁殖停止と繁殖母集団のサルの死亡をもたらし，この影響が 1 才令の生産仔数の減少として表われている。

現在から，検定用供給以外の，全ての雌ザルを繁殖群に入れていくとすると，図 7b，7c に示すように推移し，1999 年に現在の繁殖群が引退し，谷の部分が繁殖母体の中心となるため供給上ギリギリの生産仔数になる危険性がある。その後少しずつ安定し，2006 年には検定用に 150 頭のサルを安定供給できるための動的平衡状態に達すると考えられる(図 7d)。ほぼ 15 年先の話である。

この過程の繁殖群総数，候補群数，育成数，供給数，繁殖群への導入数の推移をみてみると，1991 年から 1995 年までは総育成数と供給数は何回か上昇と下降を繰り返し，1997 年

から 150 頭の供給用サルを安定して確保できるようになる。1999 年に繁殖群が最後の落ち込みを示し、この結果として 2002 年に供給数が一時的に低下した後(図 8a, 8b), 安定供給に入ることになる。

他方、野生ザルの経験をもとにしてたてた 1200 頭体制では(図 9a), 毎年 150 頭の供給を続けようとする、図 9b に示したように現在から 3 年後に新しい繁殖群への組み込みが不可能になり、再生産が出来なくなる。

無理に検定用のサルを供給しつづけると 7 年後には新しい繁殖群への導入数は 20 頭を割ってしまい、10 年後には一頭も繁殖群に導入出来なくなる。これは事実上繁殖群の崩壊を意味している。図 9c に示したように 12 年後には、繁殖母体は老齢ザルのみとなり、年間 150 頭のサルを供給することは物理的に不可能となる。この時点で繁殖群にテコ入れをしても、もはや繁殖群の崩壊を止めることは不可能である。

検定用 150 頭の供給だけを考えた時、動的平衡状態の総数 $150 \times 10.19 = 1529$ 頭を維持するか、1200 頭を維持するかという、わずか 300 頭強の違いである。しかし長期的にみると、コロニーが崩壊するか、安定供給として平衡状態になるかは、実にこの 300 頭の差にかかっているのである。

《研究手帳》

老齢ザルの心理・行動学的特徴

Psycho-ethological characteristics in aged monkeys

協力研究員(川村学園女子大学) 小山高正

1. はじめに

われわれは老齢カニクイザルがヒトの老化モデルとして有用であるかを調べるため、2 つの心理・行動・免疫学的調査を行っている。

脳・神経系の機能低下を総合的に判断する手段として、老齢ザルの好奇心の有り様を調査する。老齢ザルにおける神経・免疫機能を反映するものとして、ストレス負荷に対する反応性をとりあげ、種々のストレス負荷場面での行動学的、免疫学的変化を調査する。それぞれについて今までに得られた成果を手短に報告する。

2. 老齢ザルの新奇刺激に対する反応

ヒトは加齢とともに新しいものへの興味がなくなり、関心の範囲が狭くなるといわれる。そこで、われわれは好奇心の加齢にともなう変化を調べるため、新奇刺激を呈示するコンピュータを組み込んだ WGTA 様の装置を用い、オペラント条件づけを行った。また、その習得過程の行動を観察し、老齢ザルに特徴的な行動を検討した。

(1)調査方法

対象個体: 老齢メス(20~22 歳)8 頭, 若齢メス 8 頭(4 歳)

手続き: タッチ・スクリーンを取り付けたコンピュータ・ディスプレイに反応のための視覚刺激(赤い四角形)を呈示し、それに触ると報酬が出されるような装置(Fig.1)を準備し、対象個体に課題を行わせた。課題を学習する手順は 2 つに分かれている。

餌による強化を用いて反応刺激(赤い四

角形)に触ることを学習する原学習(training sessions)(タッチ・スクリーンに直接触れることができる第1段階と、ケージの金網越しに触る第2段階がある)を行う。

餌ではなく、ディスプレイ上に呈示される新奇刺激(動・静止画とリズム音)を報酬とする本実験(novel stimulus sessions)(本実験は3段階あり、画面上の赤い反応刺激の面積が1ステップで1/4ずつ小さくなり第3段階では1/16となる)。

同時に、原学習開始時の装置内での行動がビデオで記録され分析された。ビデオに記録された原学習開始時3試行における対象個体の行動を、3分間づつ7つの行動項目についてその頻度と持続時間を分析する。

ここで分析する行動項目は以下の3つである。

(i) 常同行動(stereotyped behavior): 同じ行動様式を型にはまったように繰り返し行う。毛を引っ張る、足を噛むなど動きのうち自己指向的な行動も含まれる。

(ii) 探索行動(exploration): 床、金網、天井、餌箱、ディスプレイ以外の実験装置を触る、なめるなどする。

(iii) ディスプレイ(display): ディスプレイに触る、なめるなどする。

各行動の測度は、対象個体の全観察時間(約9分)に対するその行動が生じた合計時間(秒)の割合(%)で示されている。

(2)調査結果の要約

学習ならびに新奇刺激に対する反応における老齢ザルの特徴(Table.1)。

原学習1が完成した若齢4頭の中2頭が本

実験(新奇刺激強化による課題場面)に進み、いずれも最終段階まで到達した。老齢の1頭も本実験に進んだが第1段階で急速に反応が落ちてしまった。

学習装置内での行動の比較(Fig.2-a, b, c)。

原学習が完成した個体としなかった個体とで、装置内での行動を比較したのが Fig.2 である。若齢の未完成個体は常同行動(stereo)が著しく多いことがわかる。さらに若齢の未完成個体は探索行動(exploration)とくにディスプレイへの探索(display)が相対的に少ない。一方、老齢の原学習完成個体は全般的探索行動は多いが、ディスプレイへの探索に関しては未完成個体との差はほとんどない。

(3)何がわかったか

学習課題の遂行能力に関しては老若の違いは歴然であるが、即これが新奇刺激全般への興味の差であるとはならない。若齢の原学習未完成個体はステレオ行動が多いために十分な探索行動がなされていないといえるが、老齢ザルでは未完成個体も探索を行っているし、ディスプレイ画面への関心も高く、触ることも多いからである。しかし、装置の構造上正反対となるためには、タッチ・スクリーンを触っただけでは駄目で、わずかだが押さなくてはならない。おそらく、若齢では「触る」の次に「押す」という反応型が現れて学習が完成して行くのに、老齢では触ってもそれが押すという行動パターンへつながって行かないのではないだろうか。この仮説を検証するためには行動連鎖を含めたより詳細な分析が必要である。

3. 老齢ザルの社会的ストレスに対する反応

老化とともに代謝や免疫能が低下すると考えられる高齢者が心理的ストレスを受けた場合の生体防衛反応全般を調査することは時代的要請である。それには高齢者の面接や疫学的調査に合わせて実験的研究が必要であり、ここでも老齡ザルがヒトのモデルとして有用である。水没などの強い物理的ストレスで心理的ストレスを体験させることはわれわれの日常からかけ離れてしまうので、ここでは異年齡の未知個体との同居という日常的な社会的ストレスへの反応を老齡・若齡で比較検討した。

(1)調査方法

対象個体: 老齡メス(20 から 22 歳)4 頭, 若齡メス(4 歳)4 頭

手続き: 表 2 にまとめられているように、各個体をホーム・ケージで採血後観察室へ移動し、7 日間の馴化期間を経て老齡 1 頭と若齡 1 頭を同居させる。同居後 2 週間の行動、血中コーチゾル濃度、リンパ球の変化を観察する。

ビデオで撮影された行動は、9 項目(常道行動、抑鬱、恐れ・回避、社会的接触、威嚇、社会的毛づくろい、探索、移動、無活動・摂餌)について頻度と持続時間が測定された。

(2)調査結果の要約

内分泌の変化: 同居の前後で血中コーチゾル濃度の変化は見られなかった。同居後、老齡では下降後上昇、若齡では上昇後下降のパターンをとったが、いずれも有意な差はなかった。

行動の変化(図 3-a-b): (i)抑鬱(depression)は全体として同居後、減少する傾向がみられ

たが、同居後は若齡の方に多く観察された。同居事態では、若齡の方が緊張しているようにみえる。

(ii)同居後の社会的接触(social contact)は、若齡の方がより多く観察され、同居の緊張を若齡の方から解消しようと努力する姿がうかがえる。

リンパ球の変化: 老齡個体では血中コーチゾル濃度の変化とリンパ球サブセットの量的変化に有意な高い相関は見られなかったが、若齡では 4 頭中 3 頭でヘルパーT 細胞、ナチュラルキラー細胞、 $U5^+$ 細胞、B 細胞との間で有意な高い相関が見られた。

(3)今の段階でわかったこと

まだ観察数が少ないが、以上から次のことがいえるだろう。老齡ザルにとって、たとえ未知でも、若い同性の 1 個体との同居は明確な生理的变化を起こさない。むしろ、1 頭で隔離された場合に血中コーチゾルは上昇することが別の実験からわかっている。一方、同居は若齡個体に緊張を生じさせ、若齡個体はそれを緩和しようとする活動をより多く行う。また、その緊張は免疫系にも影響を及ぼしていることがわかった。

4. おわりに

老齡ザルは新しい環境に大いに興味を持っているようであるが、与えられた課題を器用にこなすというところで若者に大きく水をあけられてしまうようだ。ところが、一緒に暮らすような場面ではその強さを発揮して優位を保っている。社会的知能に長けているのかも知れない。老齡ザルの行動を見てきてこんな姿が浮かびあがり、あまりに人間的で思わ

ず笑ってしまう。その姿を予測に終わらせないためにももう少しこの研究を継続していく必要があるだろう。幸い、当筑波霊長類センターで繁殖・育成され老齢期に達したカニクイザルは、その質、数、飼育環境の良さからみて世界で類を見ない貴重な研究資源である。高齢化時代となった今日、彼らを様々な科学研究に役立てることが多方面から期待されている。

なお、本研究は長文昭，寺尾恵治(霊長類センター)，東海林美恵子(ほくさん)，野口惇夫(筑波大学)氏との共同研究として行われている。

《繁殖育成情報》

新生仔カニクイザルの体温調査

Body temperature in infant cynomolgus monkeys

小野孝浩

以前にこの欄で、繁殖活動をするカニクイザルが野生由来ザルから育成ザルに世代交代しつつあることを報告しました。育成ザルの中には分娩後の哺育が不良なサルが多く、里仔哺育や人工哺育で育てられる新生仔が増加傾向にあります。ところで、ヒトでの新生児管理において保温が栄養補給、感染防止とならんで新生児医療 3 原則の 1 つにあげられているように、里仔哺育や人工哺育される新生仔カニクイザルを健康管理する上で体温調節機能を把握することは重要であると考えます。

生まれたばかりの新生仔カニクイザルは自ら体温を維持できず、母親に抱かれることに

より一定の体温を維持することは既に報告しました。それでは新生仔はいつ頃から体温を一定に維持できるようになるのでしょうか。そこで以下のような調査をしました。

生後 0～7 日齢の新生仔を母親より分離し、分離時、15 分、30 分、60 分、120 分の 5 ポイントについて体温測定しました。図 1 は各日齢ごとの体温変化を示したものです。0 日齢と 1 日齢が最も下降します。次いで、若干交差している箇所がみられますが、2 日齢、3 日齢と日齢が増すにつれ下降する幅が小さくなります。7 日齢になると下降も僅かで、120 分後はほぼ分離時の体温と同じくらいまで上昇しました。さらに、各日齢において分離時(0 分)の体温と時間経過した時点(15 分、30 分、60 分、120 分)の体温に有意な差が生ずるか比較してみました(表 1)。0 日齢では、いずれの値にも有意差がありました。1～4 日齢では、15 分値には有意差が認められず、30 分、60 分、120 分値に有意差がありました。5～7 日齢では、いずれの値にも有意差は認められませんでした。

このような成績から、出生直後の新生仔カニクイザルは母ザルから分離すると体温を維持することができず有意に下降しますが、日齢が経過するにつれて下降の度合いが小さくなり、若干の個体差はあるものの約 5 日齢で有意差がなくなります。つまり体温が維持できるようになると言えます。今後もさらに調査検討を重ね、人工哺育時の保温方法など新生仔管理の一指標として活用していきたいと考えています。

《学会報告》

「*In vitro Fertilization and Embryo Transfer in Primates*」Serono Symposia, USA
に参加して

Report on a symposium

協力研究員(エイズ予防財団)山海 直

1992年5月28日から31日までの4日間にわたって、霊長類の発生工学に携わる研究者があつまり「霊長類における体外受精・胚移植」と題するシンポジウムがオレゴンにおいて開催された。

本シンポジウムは、Scientific committee としてオレゴン霊長類センターのBrenner所長、Drs. Wolf, Stoufferの3氏が担当し、会場は霊長類センターの所在するBeavertonの隣町であるTigardのホテルに設けられた。この季節のオレゴンは陽が長く5時頃に夜が明け21時近くになってやっと陽が沈む状態である。そのためかシンポジウムは、早朝から夜遅くまでという日本では考えられないプログラムが組まれていた。その内容はきわめて充実したものであり、参加者全員はホテルに缶詰状態となり有意義な時間を過ごした。

大会の参加者は126名(事前登録者)で、その大半はアメリカからの参加であった。その他ブラジル、アイルランド、イギリス、フランス、ドイツ、イラン、オーストラリア、日本からの参加があった。しかし、残念ながら日本からの参加は私一人であり少し寂しい思いがした。

シンポジウムは「IVF in Primates」「Gamete Biology/ Ovarian Physiology」「Preimplantation /

Implantation Biology」「Gamete/ Embryo Manipulation」「Gamete/ Embryo Applications」の5つのセッションから成り、22名の演者から発表があった。内容の詳細については、ここでは紹介は避けるが、とくに、Drs. Bavister, Gould, Overstreetの精子の受精能獲得、先体反応、運動変化についての報告、Drs. Dukelow, Wolf, Boatman, Deyの卵子の成熟、体外受精、胚培養、Growth factorに関する報告、Dr. Stoufferの卵胞発育誘起、Dr. Rallの凍結保存についての報告など当センターの研究に参考となる多くのデータが紹介された。また、Drs. Enders, Hearn, Faziebasの着床後胚の詳細な研究、Drs. Cohen, Menezoの細胞レベルの研究など興味ある知見が報告され和やかな雰囲気の中かで討論された。当センターでは、サル類生殖細胞の特殊性、体外受精、胚移植などの研究に取り組んでいる。今回のシンポジウムに参加できたことは、今後の研究発展のために大きな意義をもつことは言うまでもない。また、ポスターセッションにおいて、23演題の発表があり、私も「Ovarian Superstimulation and *In Vitro Fertilization in the African Green Monkey (Cercopithecus aethiops)*」という演題で、ミドリザルにおける卵胞発育誘起と体外受精のはじめての成功例を報告した(写真)。

本分野におけるサル類を用いた研究は、ヒト不妊症治療モデルの開発、疾患モデルの確立、実験用サル類の繁殖システム、絶滅に頻している野性サル類の繁殖への応用、特殊な遺伝形質を有しているサル類の遺伝子保存など、その利用されうる範囲はきわめて広い。にもかかわらず、サル類を用いた発生工学的

研究の歴史は浅く、マウス、ラット、ウサギなどの実験動物、ウシ、ブタなどの産業動物での研究レベルと比べても遅れている。また、ヒトで行われている技術レベルにも達していないのが現状である。しかし、今回のシンポジウムによるとサル類を用いた発生工学的研究は、確実かつ急速に発展している。研究内容は、体外受精、胚移植というすべての発生工学技術の基礎となる研究段階から、ヒトでは試みることのできないような卵子、精子に関する詳細な研究へと移行している。アメリカにおいては、サル類はすでに実験動物としてかなりの部分で確立されているものと思われる、サル類を対象として本分野の研究に取り組んでいる研究者も多い。マウス、ラットと異なってサル類にはヒトにも通じる特殊性がある。この特殊性を理解した上で他の実験動物レベルと同等の最先端の研究がなされている。

わが国においても、少しでも多くの研究者がサル類を用いた発生工学的研究に目を向け、その重要性を理解していただけることを筆者は期待している。

私が本シンポジウムに参加するにあたり、「Medical Research Foundation of Oregon」から援助をいただきました。また、心よく協力くださいました長文昭、吉田高志両先生に対し感謝いたします。

Q and A(読者の質問にお答えして)

TPC ニュースに目を通してくださった読者の方々から、これまでにいくつかの質問が、編集委員あてに寄せられて来ました。これま

では、個人的にお答えしてきましたが、今号から、新たに「Q and A」のコーナーをもうけることにしました。TPC ニュースを読んで不思議に思った事、あるいはサルについて疑問に思った事、なんでも結構です。お寄せ下さい。一緒に考えてみませんか。

Q: 小生は、街で動物病院を経営する臨床獣医です。当院へも、時々、ペットのサルが患者として持ち込まれます。診療にあたって血液・血清性状の検査をおこないます。しかし、検査項目によってはとんでもない値が報告されて来て、病気のためなのか、それともサルの特性なのか判断にこまることがあります。サルの正常値とはどのようなものなのか、御教示ください(K.O)

A: このようなご質問は、けっこう寄せられます。この方のような開業獣医さん、動物園の飼育担当の方、大学の実験動物施設、等々から、しばしば緊急の問い合わせとして電話されることも多く、あわただしく対応したことも何度もありました。「当方のサル種はニホンザルですが、参考データが見当たらないのでカニクイザルの値でいいから教えてください。」という依頼さえも受けたことがあります。しかし、サルといっても季節繁殖特性のあるニホンザルやアカゲザルと、通年繁殖のカニクイザルの血液・血清性状とを同一に論じることは無理でしょう。当センターのリスザルの血液・血清性状値は明らかに1年の周期性を示しています。また、ミドリザルもカニクイザルと異なった特性を呈しています。このようなサル種のちがいによる差がありま

すが、ここでは野生由来ザルで TPC に搬入後 4~5 年目のリス・カニクイザルの血液・血清性状値をヒトの成人値と比較してみます²。タンパク関係ではグロブリン量が相対的に大きいため、アルブミン・グロブリン比が 0.97 前後の小さい値を呈しています。尿酸もヒトの 1/10 程度の低値です。他方、乳酸脱水素酵素 (LDH) やアミラーゼ、レニン活性は、ヒトの数倍の高値を示し、ナトリウム、カリウム濃度も高目の値を呈しています。当然のことですが、これらの測定値は、動物の飼育条件³、摂餌内容⁴、年齢⁵、あるいは妊娠⁶などの影響を受けるとともに採血の条件、たとえば麻酔の影響⁷等も考慮する必要があります。

このようなことから、御質問のように、サルの正常値はコレダ!! と簡単に答えることは困難です。文末の文献を御参照下さい。また、これらの数値を掲載した資料も出版されています^{8,9}。明確な御答えができず申し訳ありません。

(吉田高志)

文献

- 1) 吉田ら, (1988), 成長 27: 166-169.
- 2) Yoshida et al., (1989), Exp. Anim. 38: 259-262.
- 3) 吉田ら, (1990), 実験動物 39: 21-26.
- 4) 吉田ら, (1988), 実験動物 37: 39-44.
- 5) 吉田ら, (1986), 実験動物 35: 329-338.
- 6) 吉田ら, (1988), 実験動物 37: 257-262.
- 7) 吉田ら, (1986), 実験動物 35: 455-461.
- 8) 実験動物の生物学的特性データ. 田嶋嘉

雄 監修 ソフトサイエンス社, 東京(1989).

9) 実験動物学. 田嶋嘉雄 監修 朝倉書店. 東京(1991).

Q: 私は製薬会社の研究所に勤務しています。最近では実験にカニクイザルやアカゲザルを使用することも多くなりました。一方、毒性試験や代謝実験のために血中ホルモン濃度を測定する必要性を感じています。サル類の血中ホルモン濃度を、比較的簡単に測定することは可能でしょうか? (T.S.)

A: 血中ホルモン濃度を測定するとなると RIA 等になるでしょう。そして、比較的簡単に、という希望に従うならば、ヒト用の RIA キットが適用できればそれで測定するのがもっとも簡単です。精度管理等もうまくできます。化学的に定義されているステロイド系のホルモンや甲状腺ホルモン(T_3 , T_4)等は、ヒト用もサル用ありませんから、問題になるのはタンパク系のホルモンの測定です。カニクイザルの血中ホルモン測定にヒト用のキットが適用できるかどうか、TPC で検討した結果を表に示しました。しかし、たとえば PRL がヒト用 RIA キットで測定できる、といってもどのメーカーのどのロットのキットでも適用できる、というものではありません。キットに用いられている抗体のサル類のホルモンへの交叉反応性に違いがある可能性があります。キットを入手したら、サル由来材料を用いて平行性検定等をおこない、適用できることを確認しておく必要があります。LH について国内でもいくつかの研究室で RIA 系を独自に組

み立てて測定を実施していますし，
RRA(Radio Receptor Assay)による測定も報告
されています。

サルはヒトに近いはずだからヒト用のキットが……という発想もあると思いますが，
ヒト用キットを適用するにあたっては，充分
に慎重におこなってください。

(吉田高志)

文献

- 1) Yoshida et al., (1989) Endocrinology
124: 1287-1293.
- 2) 吉田ら，(1992)，成長 31: 35-40.
- 3) 吉田ら，(1985)，実験動物 34:
165-171.
- 4) 田中ら，(1986)，実験動物 35: 11-19.
- 5) 櫻井ら，(1988)，実験動物 37:
53-58.
- 6) Watanabe et al., (1990), Biol. Reprod.
43.
- 7) Yoshida et al., (1984), Endocrinol.
Japan. 31: 665-673.
- 8) Yosida et al., (1987), Am. J. Primatol.
12: 101-106.