

《巻頭言》

「ホット・ゾーンがらみで」

In relation to “Hot Zone”

吉川泰弘

TPC ニュースの巻頭言ではこれまで特別のケースを除いて、その折り折りに感じたこと、考えたことを書いてきた。今回編集部から「ホット・ゾーンがらみで」書いてほしいという依頼があった。時期的に見てタイムリーであるし、数年前には実現しなかった輸入感染症とくにサル類とヒトの人獣共通感染症に関する研究調査費の申請も行ったことがあるので、サル類のことを念頭に置きながら「エマージングウイルス」「危機管理」「検疫」「ペット」などをキーワードとして、ホットゾーンがらみで考えていることを以下に述べる。

「ホット・ゾーン」とは、R.プレストンのノンフィクション小説で有名になり、小説と映画化になったフィクションの「アウトブレイク」でも登場する名詞で、今では流行語の1つになってしまった感がする。危険病原体、特にレベル4の病原体を取り扱う封じ込め区域をこう呼ぶ。米国ではアトランタのCDCとフォートデトリックのUSAMRIIDにある。これに相当する日本でのP4レベルの研究施設は、東京の西に位置する国立予防衛生研究所村山分室にある。しかし米国のCDCやUSAMRIIDと違って、実際の活動は行っていない。

突如として出現したウイルス感染症(英語ではemerging virus diseasesと言っている)は、皮肉なことにWHOが天然痘の撲滅を宣言し、

人類がウイルス病に打ち勝てる自信を持ち、感染症が人類のコントロール下に置かれるのではないかという楽観的な見方が広がった後に、次ぎ次ぎに登場して来た。ヒトT細胞白血病ウイルス、エイズウイルス、肝炎ウイルスなどである。また動物の世界では北海のアザラシの大量死を起こしたり、オーストラリアで馬と人の急性致死性肺炎の原因となった新しいモービリウイルスが分離されている。北米・カナダでは肺炎型のハンタウイルスが出現して問題となっている。こうしたウイルス群の他に、今回話題になったようなエボラ出血熱に代表される、人間界に時折り迷入して来て被害を与えるウイルス病も広い意味で突如として出現した感染症に含められている。こうした病気が注目される理由は、第1にウイルス感染症が予想以上に多様で未知の感染症がまだまだ沢山あるという見方になったこと、第2に熱帯雨林の伐採や国土開発に伴い生態系が変化してしまい、本来森の中に留っていた病原体がサル等を介してヒトの社会に侵入してくる可能性が高くなったこと、第3に交通網の発達や人の移動が激しくなり、風土病・地域病的であったと考えられる疾病が比較的短期間に世界中に蔓延する可能性が大きくなってしまったことであろう。第2・第3のエボラ型ウイルスやエイズ型ウイルスが出現する危険性を考えておかなければならない。

今年に入って関西の大震災、地下鉄のサリン殺人事件、ザイルでのエボラ出血熱流行と立て続けに問題が起き、我々の日常生活がそれ程安定したものではないという事実を実感させられることになった。それと共に危機

管理という言葉が非常に多く使われるようになってきた。危機を管理するという事は、非日常的状态に対応して管理するという事であり、日常的管理を行っている地方自治体や警察より強力な組織がある種の強制力を持って管理に当たるという事である。実際に阪神大震災の時も、地下鉄サリン事件関連の時も自衛隊が動いている。エボラ出血熱のような急性の致死性感染症が入って来た際に、研究者と行政官のみで対応が可能であるとは考えにくい。レベル4の病原体に対しては素早い科学的対応と社会的対応の両方が必要であろう。パニックに陥らない為にも平時にシミュレーションを行ない、誰れがどうするかを具体的に広く議論し、国民のコンセンサスを得てマニュアル化しておくべきであろう。

サル類の検疫問題は古くて新しい問題である。危機管理の前提に平時の安全管理体制の確立がある。「備えあれば憂いなし」なのである。この件に関しては新聞や週刊誌にも最近は何度も書かれているので繰り返す気はない。サル類の検疫は必要である。問題は誰れが、何処でやり、その情報の公開と責任体制をどうするかをはっきりさせなければならない。年間4000頭前後のサル類が我が国に入っているのであるから、全てを検疫するとすれば、月平均330頭の入荷に対しアフリカ産であれば10週間の(2ヵ月強)、アジア産であれば9週間(約2ヵ月)の検疫期間が必要であるから、毎月660頭のサルを検疫し続ける事になる。50頭ずつ隔離するとしても13室、動物の世話と観察等に1室平均3人を当てると考えても39人が必要である。この他に検査、事

務処理関係の人員も加えると、相当の経常予算がいる。公衆衛生の観点からみれば所轄は厚生省になるであろう。

サル類の検疫のもう一つの問題はペットである。4000頭入って来るサル類のうち、正確な数は把握出来ないが、25%はペットであると言われている。野生動物の保護、絶滅の危機にある種の保存が世界的に承認され、ワシントン条約(CITES)を批准している我が国では、第I種に属する霊長類の輸入は当然、第II種に属するサル類のペットとしての輸入も不当である。個人的趣味で飼う場合は論外として、コンパニオンアニマルとして生活する場合にも、利益とリスクを冷静に判断する必要がある。検疫システムが完備されれば違法なペットの輸入にも歯止めがかかることが期待できる。

日本人の悪い所は喉元を過ぎるとすぐ忘れてしまうことである。「転ばぬ先の杖」を実践する時が来ている。

追記 R.プレストンの「ホット・ゾーン」の一つの主題であった。フィリピン産のサルが感染したサルエボラウイルス(レストン株)とヒトで出血熱を起こしているエボラウイルス(ザイール、スーダン株)に関する混乱があり、その為に輸入サル類の取り扱い停止という事態が生じてしまった。正確な情報の提供が必要であることを感じて、以下のような手紙を関係者に送ることにしたので、ここに掲載する。

関係各位殿

平成7年7月

先般のザイルにおけるエボラ出血熱の流行及び昨年のコートジボワールにおけるチンパンジーからヒトへのエボラウイルス感染が、輸入霊長類取扱いに強い危惧の念を与えた事は十分に理解出来ます。

しかし、ヒトとサル類のエボラウイルス感染に関して、多少の混乱があるように思われますので、以下にこれまでに得られた情報をお知らせし、冷静な判断をして下さるよう、関係各位にお願いする次第です。

- 1) 現在まで、ヒトとサル類のエボラウイルスは4株が知られております。このうちスーダンとザイル株は、ヒトのエボラ出血熱の病原体で、ヒト及びサル類に対して重篤な出血熱を起こします。第3は、コートジボワール株で、チンパンジーからヒトに感染したものです。感染者は一命は取り止めましたが発病しております。以上の3株は、いずれもアフリカ中央部に由来する病原性ウイルス株です。
- 2) 他方、1989年に米国でフィリピン由来のカニクイザルから分離されたレストン株は、フィリピン、インドネシア、中国産等のマカク属サル(例えばアカゲザル、カニクイザル)が感染しております。この株はヒトにも稀に感染しますが(米国でのサル類接触者を対象にした検査では4名が感染しました。)、発病することはありません。アジア産のサル類が感染していること、ヒトに病原性が認められないことから、上記のアフリカ由来のエボラウイルスとは性状は明らかに違います。

- 3) 当センターにかつて輸入された野生由来カニクイザルについて小規模ではありますが追跡調査を行ったところ、a)インドネシア由来のカニクイザルがエボラウイルスに対する抗体を有していましたが、検疫中・検疫後も発病したものの、新たに抗体陽性になった例はありませんでした。b)抗体陽性のサルも、その後3~11年間の追跡調査では、抗体は全て陰性になり、ウイルスが体内に残るような持続感染は考えられません。c)抗体陽性のサルから生まれた仔ザルは抗体陰性で、母から子への垂直感染(母子感染)は起こらないと考えられます。このように育成ザルではサルエボラウイルスの汚染は避けられると思われます。
- 4) 近年、アジアの霊長類輸出を行っている諸国では、野生ザルの輸出を禁止し、研究用であっても育成ザルの輸出に限定するように法律を徹底させています。

以上の点を考慮すると、アフリカ産の野生ザルとアジア産の育成ザルを一緒に考えて取扱いを停止することは科学的であるとは思えません。アジア産の育成ザルに関しては、ヒトのエボラウイルス感染を危惧する理由は特に無いと思います。関係各位の冷静な判断を重ねてお願いする次第です。

《繁殖育成情報》

幼若カニクイザルの管理

Management of preweaned cynomolgus monkeys

小野孝浩, 長 文昭

成熟雌雄カニクイザルの長期にわたる観察、交配後、妊娠した雌ザルはおよそ5ヵ月半の妊娠期間を経て分娩を迎える。今回は出生した新生仔の管理取り扱いについて実務的な解説をしたい。

出生登録

新生仔の出生登録は飼育技術者二人で行う。まず保定者が母ザルを保定し補助者が母ザルの両足を押さえ母ザルの腹部にしがみついている新生仔ザルの胴体部を持って引き離す。この時に仔ザルを取られまいとして母ザルが飼育技術者や自らの仔ザルを攻撃することがあるので注意を要する。母子とも体重を測定し、新生仔については性別、被毛の状態、歯の萌出、外傷、奇形、排便の有無などをチェックし、臍帯の処理をする。新生仔と胎盤がつながっている場合は臍帯を新生仔の臍から2~3cmの位置で切除する。臍帯が乾燥していればそのまま切り、湿っていれば縫合糸で結紮してから切る。既に母ザルが臍帯を切っている場合も臍から2~3cmの長さに切りそろえる。いずれの場合も感染を防止するため臍帯の断端および臍の周囲にヨードチンキを塗布する。

母ザルについては、哺育状態、分娩に伴う出血の量、乳分泌の有無、胎仔娩出後の子宮の大きさをチェックする。出生登録後は洗浄済みのケージに移し衛生的に管理する。哺育技術(哺育能)の未熟な母ザルは一度仔ザルを引き離すとそれ以後哺育しなくなることもある。それ故多くの場合、分娩の翌朝に取り扱

いをする前に、特に初産の母ザルの場合は哺育行動を十分に観察し、正常に哺育していることを確認してから出生登録を行う。また、これまでの分娩哺育経歴を調べ不安があり、哺育能が不完全であったり、哺育技術の未熟な母ザルには、哺育の介助をして、なるべく母ザルによる哺育をさせるようにしている。例えば、母ザルが立つと新生仔は母ザルの下腹部から足の甲の部分へずり落ちてしまう、或いは床に座ると新生仔は母ザルの尻や足の下に敷かれてしまうような場合、母ザルに僅かな量の麻酔薬あるいは鎮静剤を投与し、新生仔を抱き支えるように母ザルの両手を繰り返し新生仔の背・尻部に添えるように訓練する。また、母ザルが哺育をしない例では、生まれたまま放置された新生仔は体温が低下し衰弱している状態で午前9時~9時半の個別観察時に発見されるのが普通である。このような場合、まず全身を40℃くらいの湯に浸け体を温めマッサージをするようにして沐浴、その後タオルで拭いて、保温した哺育箱に入れる。正常な体温への復帰と元気が回復し次第ぶどう糖液などを口にふくませその後は里仔哺育あるいは人工哺育にする。

里仔哺育

実施に当たっては、まず里親の選択から始まる。哺育経験のある雌ザルで死産直後の個体がいれば最も里仔受入の成功率は高い。次に分娩後間もない時期の仔を哺育している母ザルに里仔を受け入れさせ、実仔と里仔の2仔哺育をさせるか、実仔と里仔を入れ替えて哺育させるケースもある。第3の里仔

ケースとして、実仔を4~5月齢で離乳して間もない母ザルに生まれて間もない里仔をつけることも可能である。

いづれのケースにおいても次の注意はせねばならない。過去の哺育歴や現在の乳分泌の状態を調べる。実際に仔ザルを抱かせて行動を観察する。里親が自分の仔でないと認識し、加えて里仔哺育を拒否する場合には、仔ザルを咬んだり振り払ったりすることがあるので、体をよく洗浄して臭いをとり、さらに里親の臭いをつける。仔ザルが衰弱した状態あるいは外傷を負っている場合は無理に里仔をしない。外観上はよく哺育しているようでも母乳を飲めないこともあるので1日おきに体重を測定する。体重の増加が確認できたら測定間隔を徐々にあける。

人工哺育

出生直後は簡易哺育箱で飼育する。哺育箱の床に市販の愛玩動物用のパネルヒーターを置いて保温しタオルをいれる。タオルの端の織り糸の解れがないよう注意している。出生時は1頭で飼育するが、立ち上がって行動し始める4週齢頃からは、同じ週齢の人工哺育仔がいれば、積極的に同居させる。両者の体重差があまり大きくないことが必要である。8週齢を過ぎる頃に哺育箱から通常のサル用ケージに移して飼育する。授乳には市販のヒト乳児用粉ミルクを用いている。授乳時刻と回数は、飼育技術員の就業時間内の9:00、11:00、14:00と16:30の1日4回与え、1回の授乳量は0週齢で5ml、1週齢で10ml、2週齢で20ml、4週齢で40mlを目安として徐々に増やしてい

き、8週齢以降は50mlと一定量にしている。出生直後は飼育技術員が仔ザルを手に持ち哺乳瓶でミルクを飲ませるが、立ち上がって行動する4週齢ころから哺乳瓶をセットしておくだけで自ら飲むように躑ける。また1~2週齢で門歯がはえはじめ4週齢頃には固形物の摂食が可能になるので細切したリンゴとミカンを与える。6週齢頃からはサル用固型飼料も与える。これ以外の特別な離乳食は与えていない。固形物の摂食量の増加にあわせ授乳の回数を減らしていく。出生時の体重の2倍を離乳の目安としているので、体重が700gを越えたところで授乳を一時的に中止して青果、固型飼料の摂取だけで体重の増加が確認できれば授乳を再開することなく人工哺育を終了する。母親哺育の仔ザルは約20週齢頃に離乳するが人工哺育仔の場合はやや遅れて離乳となる。

育成仔の体重変化

これまでの出生時の平均体重および標準偏差は雄 $351 \pm 59\text{g}$ 、雌 $325 \pm 53\text{g}$ でやや雄が大きい。体重測定は1週間に1回行う。出生直後は生理的な要因で体重が減少するが2週齢頃に増加に転じ、以降ほぼ安定した体重増加がみられる。3週齢までは毎週1回測定し体重が増加していれば測定間隔をあけ3週間に1回の測定としている。もし増加しなければ4週齢以後も毎週1回づつ体重測定を続け保定検診などにより母ザルの乳分泌状態や仔ザルの異常の有無を調べる。(図1)

乳歯の萌出時期

1～2週齢で第1門歯がはえはじめ、つづいて第2門歯、犬歯、第1臼歯の順にはえ、約30週齢頃に第2臼歯がはえて全20本の乳歯がはえそろう。(表1)

健康観察

母ザルに抱かれている仔ザルは顔の様子が観察しにくいことがあるので、母親に力強くしがみついているか、それともぶら下がりぎみか、などが健康を判断する目安になる。また食欲の有無については定期的な体重測定やその時の腹部触診により推定する。便性状を観察する場合、乳仔の便は乳白色であるが固形物の摂食をするようになり乳の飲量が少なくなると排泄物の色調は黄色にかわる。成体の便とは大きさが異なるので容易に見分けがつくが、特に新生仔期は母ザルが仔ザルの肛門周囲をなめてしまうことが多く、便を観察できないこともある。

保定

4～5ヶ月齢の離乳時期の仔ザルは大変活発に動き回る。これらの仔ザルは捕獲の際に抵抗して咬みつくことさえある。それ故、この時期の仔ザルの保定は成体と同じように実施せねばならない。

離乳

離乳は摂食、歯の萌出、体重、行動、日齢などが所定の条件を満たしてから行う。以前は下痢などをおこす個体が多くみられたので、原因を調査するべく便の検査やストレスを定量的に測定する実験を行った結果母仔分離に

よるストレスが原因であることが判明した。ストレスを軽減すべく離乳の時期を遅らせたところ、離乳後に下痢をするサルは少なくなかった。しかし離乳時期を遅らせることは繁殖効率の低下や、免疫学的な立場から母仔移行抗体が消失し幾つかの感染症に罹りやすいなどの弊害がある。以上の条件をみたし離乳した後に日齢や体重の似かよった仔ザルを2頭同居させる。日齢差、体重差が大きいと優劣が著明になるので体重差が50g以内になるようにしている。同居後10週まで1週間に1回体重測定をしている。体重差が著しく拡大している場合には分離し、体重差の小さい他の個体との組み合わせを図るようにする。(表2)

個体識別

個体識別は離乳時に顔面の定点に入れ墨を行う。滅菌した墨汁を注射筒にとり26Gの注射針を用い皮内に注入している。模式図に示すように点状に入れ墨をし、その入れ墨部位を組み合わせることで最大99番まで表示可能である。3桁の識別、すなわち100番台が必要な時は耳に入れ墨をする。センターでは、実際上100番台を必要としない。カニクイザルは成長すると顔色が黒色になり顔面に入れ墨は識別が困難になるので1歳齢頃に電気入れ墨器で大腿部の内側に個体番号を算用数字で入れ墨している。(図2)

外傷

個別ケージでは一対の親仔が飼育されているので負傷することはないように思われるが、

隣ケージのサルに尾や手足を引っ張られて咬まれたりすることがある。そのような時はケージを移動し隣ケージの個体を換える。またケージ床網や餌箱に手足を入れて遊んでいるうちに、挟み込まれた手足が腫脹したり、裂傷を負うことがある。何度も繰り返すような悪癖の個体にはケージの改良が必要である。希に親に咬まれる事故もあるが、これは親の哺育行動が未熟であったり、歯のはえ始めた仔ザルが乳を吸う時に母ザルの乳首を強く咬むので母ザルが嫌がって仔ザルを咬むようである。

下痢

下痢症状を継続的あるいは断続的に見せる仔ザルに対しては乳酸菌製剤や整腸剤を投与し、それと同時に採便をして細菌検査や寄生虫卵検査を行い、その結果から抗生物質や駆虫剤を投与する。脱水症状が著しい個体では必要に応じ輸液も行う。仔ザルの場合は抵抗力が弱く急激に衰弱することがあるので早期に適切な処置を行うことが必要である。

麻酔

麻酔薬は塩酸ケタミンを使用し 10mg/kg を筋肉内に投与し 15～30 分の麻酔が得られる。麻酔後は気道を狭窄することのないように覚醒するまで注意して観察する。

採血

採血作業は麻酔下で実施している。採血量は、全血量の 5% を目安としている。たとえば体重が 500g ほどの仔ザルなら 2ml 程度とする。

注射針は 23G か 25G のものを使用し、大腿静脈から採血し採血後はしっかりと止血をする。

以上、幼若カニクイザルについて述べたが、この時期の動物は形態的にも機能的にも未発達であるため、取り扱いや管理には細心の注意が必要であることを付記する。

《検査情報》

HHV - 6 様ウイルス感染が疑われたカニクイザルのウイルス学的検討

Virological survey on a cynomolgus monkey suspected HHV-6 like virys infection

成田豊子, 向井録三郎

1910 年に Zahorsky¹⁾が突発性発疹を独立した疾病として記載したが、長い間その原因はわからなかった。しかし、1988 年に山西らにより、HHV - 6 (human herpesvirus-6)が本疾患の原因ウイルスとして同定された²⁾。

サル類における本ウイルスに対する抗体の保有状況は、多くのサル種で報告されている³⁾。当センターのカニクイザル及びアフリカミドリザルでの HHV - 6 に対する抗体保有状況は、1990 年に間接蛍光抗体法を用いて測定した結果、カニクイザルでは 31 頭中 17 頭(55%)、アフリカミドリザルでは 35 頭中 27 頭(77%)が抗体を保有していた。

ここでは、25 ページの「臨床ノート」で紹介した当センターカニクイザルコロニーの約 10 ヶ月齢の仔ザルにみられた HHV - 6 様ウイルス感染症について行った若干のウイルス学的検査結果を紹介する。表 1 は、本症例の血清を用い、カニクイザルに発疹を起す可能性

のある数種のウイルスに対する抗体の有無を、発疹発見時より経時的に検査したものである。麻疹ウイルス、サル水痘ウイルス、B ウイルス、麻疹ウイルスに対する抗体は、どの時点でも検出されなかった。しかし HHV - 6 に対する抗体は、発疹発見時及び 2 週目には、陰性であったが、発疹発見後 3 週目に陽転した。EBV に対する抗体はどの時点でも陽性であり、抗体価の変動はほとんど見られなかった。

図 1 は本症例の HHV - 6 に対する抗体価の経時的推移を示した。抗体価は発疹発見後 3 週目に 1:40 倍を示し、6 週目まで上昇が認められた。この、HHV - 6 に対する抗体価の推移は、図 2⁴⁾に示したように、ヒトの突発性発疹患者の場合と非常に類似していた。また、症状(発疹)に類似性がみられたことや、発疹症と関連する他のウイルスに対する抗体が陰性であったことから、本症例はおそらく HHV - 6 様ウイルス感染による突発性発疹と推測された。

大阪大学微生物研究所の山西弘一教授らの協力を得て、本症例の仔ザルについて更に検査を進めた。発疹発見時、1 ヶ月後、半年後、また、その後 1 ヶ月毎に、末梢血凍結保存リンパ球および新鮮リンパ球を用い、PCR 法にて HHV - 6 の DNA の検出を試みたが、現在までのところまだその検出には成功していない。HHV - 6 は臍帯血リンパ球ではよく増殖するが、成人の末梢血リンパ球での増殖はあまりよくないことが報告されている⁵⁾。そこで我々は、カニクイザルの臍帯血リンパ球を宿主細胞として本ウイルスの分離を試みた。ヒトの場合、発疹が出る以前の発熱期にウイ

ルスの回収が容易であると言われているが、残念なことに本症例では、発疹発見後約 2 ヶ月後に採取したリンパ節と末梢血からのリンパ球を材料として、宿主細胞と混合培養を行った。その間、抗原の有無の確認のため適時抗原スライドを作成した。1 ヶ月間の培養期間中、細胞変性効果はみられなかったし、ウイルスの分離も陰性であった。

最近、当センターのカニクイザルでの血清疫学調査において、非常に興味ある結果が得られた。HHV - 6 には 2 つのタイプがあり、タイプ A と呼ばれるものは AIDS 患者から分離され⁶⁾、タイプ B と呼ばれるものは突発性発疹患者から分離されている²⁾。本症例を含む 1 オ～2 オ令でのカニクイザル血清では、HHV - 6 タイプ A に対する抗体保有率が 17%(5 頭/29 頭)で、HHV - 6 タイプ B に対する抗体保有率 7%(2/29)より高く、ヒトの場合とは異なった成績を示した。

さらに、健常人より分離され、その抗原性が HHV - 6 と類似している新しいヘルペスウイルス - 7 (human herpesvirus-7)⁷⁾ に対する抗体の有無を離乳直後から 1 歳未満のカニクイザルの血清で調査したところ、その抗体保有率は 19%(3/16)で、HHV - 6 に対する抗体保有率より高率であった。また、HHV - 7 に対する抗体価も非常に高いものもみられた。今回の症例からは、HHV - 6 様ウイルスの分離は出来なかったが、カニクイザルは、ヒトとは異なった HHV - 6、HHV - 7 類似のウイルスを保有する可能性が示唆されたので、これらのウイルスを分離することが今後の課題である。また、カニクイザルが、HHV - 6 及び HHV

- 7 感染症の，病態解析のための動物モデルとして利用できる可能性も検討していきたい。

文献

1) Zahorsky J: Roseola infantum. Pediatrics 22: 60-64, 1910.

2) yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. and Kurata, T.: Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. Lancet: 1065-1067. 1988.

3) Higashi, K., Asada, H., Kurata, T., Ishikawa, K., Hayami M., Spriatna, Y., Sutarman, and Yamanishi, K. 1989. Presence of antibody to human herpesvirus 6 in monkeys. J Gen. Virol. 70, 3171-3176.

4) T. Okuno, H. Sao & K. Yamanishi Human herpesvirus 6(HHV-6) Virus vol.41. No.2 65-76. December 1991.

5) Lopez, C., Pellett, P., Stewart, J., Goldsmith, C., Sanderlin, K., Black, J., Warfield D., Feorino, P. 1988. Characteristics of human herpesvirus-6. J. Infect. Dis. 157, 1271-1273.

6) Salahuddin, S. Z., Ablashi, D. V., Markham, P.D., Josephs, S. F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B. and Gallo, R.C. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. Science 234, 596-600.

7) Wyatt L and Frenkel N: Human

herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. J. Virol., 66: 3206-3209, 1992.

《時代を支える TPC の研究》

—厚生省長寿科学総合研究紹介—

霊長類を用いた老人病モデルの開発に関する研究

Nonhuman primate models for senile diseases

I 総括

Summary of the 1st stage of longevity science at the TPC

吉川泰弘

ここでは厚生省長寿科学研究，霊長類班として活動して来た研究の総括を述べる。各研究については，順次紹介して行く予定である。

1. 要旨

本研究班は霊長類を用いた老人病モデルの開発，並びに同モデルを用いた発症機序の解明，診断・予防・治療法の開発を目的として研究を進めて来た。第1期の3年間にわたって，老人病として特に重要なものであり，霊長類でなければ適当なモデルになり得ない疾患を標的として選択を行った。その結果，老人斑，網膜黄斑変性症，高脂血症，骨粗鬆症モデル等が選ばれた。老齡ザルの老人斑形成はヒトと同様であると考えられる。老人斑の好発系及び嫌発系の家系解析，老人斑形成のリスクファクターである 蛋白とアポリポ蛋白 E の遺伝子の多型を解析しつつある。網膜

黄斑変性には、遺伝性と加齢性のものがある事が明らかになり、視覚機能測定と共に病理学的・生化学的解析を進めつつある。高脂血症と関連するリポ(a)蛋白に関しては遺伝的多型の検索及び初代肝細胞培養系を用いた蛋白の発現調節機構を調べた。骨代謝に関しては、アフリカミドリザル雌群に骨減少症が認められ、血清因子群と骨量の相関を検索した。

2. 研究の目的

ヒトに最も近縁なサル類を用いて、ヒトの老人病の中で特に重要と考えられる疾患のモデル開発研究を行う。また疾患モデル動物等に関する情報ネットワークの確立、および老齡ザルのデータベース化と取扱い技術のビデオ作成等により、わが国の長寿科学基礎研究の支援体制を確立することを目的とする。

このため以下のことを行う。

I) 霊長類を用いた老人斑、糖尿病、高脂血症、網膜変性症、骨粗鬆症等の成人病、代謝病の疾患モデルの開発研究を行う。

II) 長寿科学研究における動物モデル開発研究、老齡動物の維持・管理・相互利用等に関する情報を収集し、長寿科学研究領域における国内外の情報ネットワークを確立する。また、老齡ザルの飼育管理に関するビデオを作成する。

3. 研究方法と結果

疾患モデルの開発:

最初に筑波霊長類センターで飼育されている20才以上の育成カニクイザル20数頭を含め、約1500頭のカニクイザル、150頭のアフ

リカミドリザル、120頭のリスザルを対象に研究を始めた。これら老齡ザルを含めた年齡の異なる全飼育サルの血液生化学性状の分析を行い、サル類における生理、代謝機能の加齢変化を調査した。また老齡ザルでは糖尿病、白内障、網膜変性、難聴、骨異常などの加齢性疾患の多発傾向がみられるので、これらのサルの疾患がヒトの老年性疾患に質的に類似するか否かをヒトで開発された測定方法を適用して検査し、疾患モデルとしての有用性を検討した。

その結果、20才以上の老齡ザルの半数に糖尿病が認められた。急激な体重減少の後に斃死した例では、ラ氏島の変性・消失のみられる例が多かった。

老人斑に関する研究では、若齡から老齡におよぶカニクイザル37頭の脳について病理組織学的検索を行った。老人斑は20才から29才の14例に関しては、11例が陽性であった。老人斑はPAM染色で形態学的にclassical, primitive および diffuse の3種のサブタイプに分類された。この中でも mature 型に属する classical および primitive 型の老人斑が多く認められ、diffuse 型の老人斑は少数であった。

老人斑の脳内分布を明らかにする目的で、前額断で左右半球を前から後端にかけて切り出し、老人斑の総数および型について26才、24才、20才の3例を対象に検索した。その結果すべての症例で側頭葉前端部を含む部分に一致して多くの老人斑を認めた。老人斑の出現には左右・前後差のあることが明らかになった。また老人斑への他の蛋白の沈着状況をモノクローナル抗体を用いてABC法で検索

した所、アポリポ E 蛋白は、全ての型の老人斑に沈着していたが、ユビキチン、アルファ - 1 アンチトリプシン、タウ蛋白などは、成熟型老人斑には沈着しているが、diffuse 型老人斑への沈着は認められなかった。

アポ E 蛋白の遺伝子については、ヒトのアポ E 多型であるアミノ酸残基 112 番の変異に関して検討した。フィリピン、インドネシア、マレーシア産、その他で得られたカニクイザルそれぞれ 3 匹計 12 匹の抹梢血から DNA を抽出し、Hixon らの PCR—制限酵素消化法により分析した。その結果カニクイザルすべてにおいて 112 番目のアミノ酸は Arg でありヒトの 4 型であることが明らかになった。現在、アポ E 遺伝子の全領域に関して、多型性を検索している。蛋白遺伝子に関しては、第 16、17 エクソン及び第 1 イントロン、プロモーター領域の多型の検索を進めている。

サル類のリポ蛋白(a)の代謝に関する研究では、ヒトとサルにしか存在しないこの蛋白のヒトとサルの類似性及び、in vitro でのリポ蛋白(a)(Lp(a))の発現調節因子について検討した。カニクイザルの平均 Lp(a)血清濃度は 55.3 ± 22.7 mg/dl であり、蛋白分画である apo(a)は少なくとも 10 種類の分子量多型を有すること、apo(a)分子量と Lp(a)濃度はヒトと同様に負の相関関係を有すること、家系の明らかなカニクイザルについて血清 Lp(a)濃度と apo(a)表現形の間をみると、apo(a)は codominant に遺伝していることが明らかとなった。

また Lp(a)の合成調節を検討する目的で初代肝細胞の培養を試みた。肝細胞からは高濃度の Lp(a)の分泌が観察された。培養系を用い

てリンフォカインの Lp(a)の発現に関する影響を検索したところ、IL - 1、IL - 6、TNF の添加により Lp(a)の分泌は増加する傾向が、TGF の添加により減少する傾向がそれぞれ認められた。

骨代謝疾患モデル開発研究では、二波長 X 線骨密度測定装置(DEXA)によりミドリザルおよびカニクイザルの腰椎骨密度の加齢変化を明らかにし、これらのサル類が、ヒトの老人性骨粗鬆症の動物モデルになり得るか否かについて検討を加えた。

興味ある知見としては、性成熟後のメス・ミドリザルで、著しく骨密度の低値を呈する個体群が認められた。さらに 10 歳前後の育成個体もしくは推定年齢 17 歳以上の野生由来個体のなかには、1 歳齢の動物に担当する骨密度値しか呈しない個体も認められた。その結果、骨密度の最大値と最小値との差が 2.5 倍にもなるような大きな個体差となった。これらの動物は、ヒトの若齢性の骨軟化症や、また老齢性の骨粗鬆症の疾患モデルになり得る可能性が示唆された。

ミドリザルについては、さらに加齢に伴う半年間の骨量変動を調べるとともに骨量減少と血清生化学値との関連を調べた。その結果成長・老化に伴い半年間で統計的に有意に骨量の増加、減少がそれぞれ起こっていることが明らかになった。またメス・ミドリザルの BMD 値と有意に相関した血清生化学値は、PTH、GOT、ALP および Na であった。各項目と BMD との相関係数の絶対値は、最大で 0.39 でしかなかったが、重回帰係数は、0.73 に達した。従って、いくつかの血清生化学値

で総合的に判断することにより、BMD値をかなりの程度に予測し得る可能性が示唆された。

サル類を用いた老年性眼科疾患モデルの開発研究を行うために、サル類に認められる眼科疾患のデータベースの作成を試みた。その結果、育成カニクイザルにみられる異常眼底所見は16種、その発現率は19%、野生由来カニクイザルにみられる異常眼底所見は16種、21%であることが明らかになった。年齢の明らかな育成ザルの眼科疾患のデータベースでは、育成ザル1,162頭のうち実数225頭延べ244例の異常所見を認めた。眼科領域疾患で、霊長類の眼底異常所見のデータベースが出来た事は、この領域の研究にとって、エポックメイキングな事である。今後の疾患モデル開発研究に大いに役立つことが期待される。

また、網膜黄斑変性症についてサルのモデルとしての有用性を検討した。その結果霊長類センターのカニクイザルには、老齢性の網膜黄斑変性症と遺伝的な若年性黄斑変性症の2種類があることが明らかになりつつある。

網膜黄斑変性症に関しては病態把握を目的として、サル類を対象としたFAG—ICG検査等の技術開発に着手した。

情報ネットワークの確立:

米国霊長類センターとの情報交換、霊長類に関する国際情報ネットワークの利用および国内におけるオンラインネットワーク(プライベートフォーラム)を通じて活動した。また老齢ザルのデータベース化と、老齢ザル取扱い及び検査技術等のビデオ化を始めた。

4. 考察

これまで3年間にわたり、ヒトの老人病のモデルとなるサル類の疾患について基礎的検討を行って来た。本プロジェクトのスタート地点では難聴、子宮内膜症、脳ミネラル沈着、スローウイルス脳炎等可能性のある多くの加齢性異常について研究を始めたが、ヒトの老人病の中で特に重要と考えられ、ブレイクスルーが求められている疾患。マウス・ラットなどではヒトのモデルとなりにくい疾患で霊長類特有のものという基本的スタンスで選択を行って来た。その結果脳神経系では老人斑の形成モデル、循環器・代謝系では糖尿病、脂質代謝特にサルとヒトのみに発現しているリポ(a)蛋白・骨格系として骨量減少、骨粗鬆症、および感覚器系として加齢性眼疾患特に霊長類特有の黄斑部の機能異常である網膜黄斑変性症の5つの疾患モデルに標的をしぼることになった。今後その病理発生、遺伝的背景・遺伝子解析及び環境因子等について掘り下げて研究を進めて行く必要がある。

またオンライン国際情報交換、国内フォーラムは、情報ハイウェイ構想として我が国でも積極的に取り組まれ始めている。霊長類を含む長寿研究動物モデル開発分野でも一層の活性化が必要であると考えられる。

5. 結論

長寿科学基礎研究領域で霊長類を有効利用するために、疾患モデル動物の開発研究を推進している。老齢ザル脳の老人斑形成はヒトと同様であると考えてよく、形成機序を解析する為に非常に有用なモデルと考えられる。

リポ(a)蛋白の代謝に関しては、ヒトと同様の多型性が明らかになり、初代肝細胞での発現調節機構の解明が進みつつある。骨量減少症では骨量が短期的に予想以上に変動すること、特に成長、妊娠・出産・哺育、老化等と関連して動くことが明らかになりつつある。さらに血清因子の寄与と同因子群の総合判断により骨量を予測することが可能となった。また網膜黄斑変性症モデルでは加齢性と遺伝性若年型の2型があることが明らかになりつつある。これらの霊長類に特有の疾患モデルについて基礎及び臨床系の研究者と共同して研究を更に進める必要がある。

DXA によるサル類の腰椎骨と全身の軟部組織量の測定—骨密度と肥満・るい瘦の研究—

Measurement of lumbar vertebrae and whole body mass in primate species: Bone mineral density regarding obesity and emaciation

吉田高志

「不老不死」は、秦の始皇帝以来の我々の願望である。しかし、徐福を派遣しようにも、蓬莱山は何処にもない。厚生省の長寿プロジェクトは、不老不死の研究をおこなうものではない。いかにして、上手に歳をとるか (Successful aging) という研究をおこなうプロジェクトである。高齢化社会を迎えるにあたって、なるべく多くの方々に「元気なお年寄り」になっていただく研究である。「元気なお年寄り」を悩ます一つが、老人性骨粗シヨ

ウ症とそれにともなう骨折・寝たきりという問題である。また、他の一つに高脂血症・肥満等にともなう糖尿病等の代謝性疾患がある。さらに、「上手に歳をとる」ためには、中年から考え始めても片手落ちであるに違いない。上手に中年まで至っていなければならない。すなわち上手に育っていなければならない。本稿では、サル類をモデルとして、「上手な育ち方」から「上手な歳のとり方」について考えてみたい。ちなみに、長寿プロジェクトのなかでの我々の研究課題は「霊長類を用いた長寿研究領域での実験モデルの開発に関する研究」である。

ところで、二波長 X 線密度測定装置(DXA)が、サル類での腰椎の骨密度を測定するのに有効な方法であることを、すでに TPC ニュースで報告した (Vol.12, No.1, 1993, 「サルの骨を測る」)。出生直後の体重がわずかに 300g でしかない仔ザルから、4Kg 以上にのぼる 10 歳以上の成熟獣での腰椎骨の測定が可能である。ところで、DEXA は一般に、「骨」密度測定装置と訳されている。しかし、我々はあえて、「骨」を省いて訳している。これは、本装置を全身モードで用いることにより、全身の骨量、軟部組織量を正確に測ることができるからである。骨しか測れない訳ではない。

DXA を武器に長寿の世界に入ってみよう。

サルの骨代謝

カニクイザルの腰椎の形態的成長変化: DXA による腰椎骨正面からの骨測定をおこなうと、平面に投影したときの各腰椎骨の

平均骨幅を計測することができる。また、二波長 X 線の走査線に対して腰椎の長軸が垂直に位置しているという条件付きで、各腰椎骨あたりの走査線の数 \times 0.6mm(走査線の幅)で長さを測ることができる。このようにして、カニクイザルの第2腰椎(L2)から第6腰椎(L6)までの各腰椎の長さと同幅、そして、骨量と骨密度とを若齢獣と成獣とで比較したのが図1である。ちなみに、カニクイザルの腰椎骨の数は、ヒトの5椎と異なって7椎である。そして、推定にあたり L1 は肋骨の、L7 は腸骨の影響を受けるため、L2—L6 の計測をおこなった。若齢時には雌雄とも、上位腰椎に比べて下位腰椎の方がやや幅が狭くなる傾向があるものの、面積的にはほとんど差がない。しかし、骨密度(BMD)は明らかに下位腰椎ほど低くなる。このことは BMD の絶対値に差があるものの、雌の方が、雄よりも顕著である。しかし、成熟後では面積のみ限り最も大きいのは L5 であり、BMD も最も高いという傾向を呈した。大勢としては、上位腰椎の成長変化に対し、下位腰椎のそれの方が大きい(優成長)。出生後の重力負荷に対し、サル類でも負荷が大きいと考えられる下位腰椎の成長変化が大きいといえよう。

雌ミドリザルの低 BMD 個体:ところで、図2を見ていただきたい。これは、当センターで繁殖・飼育された10歳齢以上を含む個体の L3—L5 の平均 BMD を年齢に従ってプロットしたものである。併せて推定年齢5歳以上でセンターに入荷し、15年近く飼育された野生由来の個体の BMD も示されている。図中の縦の破線は性成熟が完了する時期を示してい

る。上段の雄の場合、出生後の成長期を通じ、BMD は増加し、性成熟の完了とともに $0.674 \pm 0.068 \text{ g/cm}^2$ (M \pm S.D.)に達する。10歳齢以上と野生由来の群とで、BMD のやや小さい個体が含まれているようにも見える。ところが、下段に示した雌の場合、実線は雄で引かれているものと同じものを引いてみたが、成長期ではその線上に各個体が並んでいる。ところが、性成熟を完了した時期から、明らかに実線から離れ低 BMD 個体と思われるものが現れてくる。それらを白丸で示した。雌の場合、白丸と黒丸とを併せて計算すると BMD は、 $0.611 \pm 0.105 \text{ g/cm}^2$ となり個体差を表す変動係数(C.V.= $100 \times \text{S.D.}/\text{M}$)は17%にもなる。雄の場合のそれ(10%)の約2倍にものぼった。ちなみに日本人婦人の場合のそれは8.8%、白人婦人では13%と報告されている。当センターの雌ミドリザルで低 BMD 個体の存在が疑われた訳である。低 BMD 個体と判断されたものの中には、成熟個体でありながら BMD が1歳齢相当しかない個体も含まれる。これらの個体では、血清の低蛋白・低カルシウムおよび高リン、高アルカリフォスファターゼ活性を併発するものも含まれている。それではなぜにこのような個体が出現したのだろうか。現在のところ確証はないが、ある種の栄養障害を想定し、固形飼料の改善を図り、BMD の増加をもたらすかどうか、長期的な調査を始めている。

ところで、雌の場合、2歳から4歳のところで例数が不足していることが問題ではあるが、白丸個体は性成熟に達した後で現れてくるような気がする。そして、歳をとった個体

の中に極端な BMD の低値を呈する個体が認められるようである。現在、これらの個体の妊娠歴などについても検討中であるが、結論的なものはまだ得られていない。

妊娠・分娩・哺育と BMD:多くの女性にとって、中年を迎える前の人生の最大のイベントとして妊娠をあげることができよう。常識的に妊娠中、そして哺乳中は、胎児に、そして乳汁中に母体からカルシウムが移行するために母体の BMD が低下すると信じられている。しかし、話はそれほど簡単ではない。妊娠中の母体の X 線撮影はできない。そこで、ミドリザルでおこなってみた。これまでの腰椎の測定は正面からであったが、これでは胎子の骨の影響を受けてしまう。そこで母体側面からの測定が出来るように工夫した。そのようにして得られた典型例を図に示す(図 3)。母体の BMD は、妊娠とともに 30%近くも減少する。このころの胎子は小指の先の大きさにもおよばない。母体の骨のカルシウムが胎子に移行した結果とは考えられない。そして、不思議なことに妊娠中期に BMD は一度回復する。そして、もう一度減少するものの、分娩時には、非妊娠時と同じ値を呈する。このような変動は、もう 10 を越す妊娠例で確認された。この W 字型の変動の機序は不明である。ここでは、この現象のみを挙げておくことにする。

データは示さないが、哺育中の母体 BMD は、常識どおり、明らかに減少し、この減少は離乳の時期である分娩後約 20 週まで続く。そして離乳後、回復し始めるが分娩後 40 週たってももとには戻らない。

妊娠中の BMD のドラスチックな変動は予想外のことであったが、分娩時にはもとに戻る。母体にとってより問題となるのは、哺育中の BMD の減少である。哺育を二度、三度と繰り返した場合、BMD はどのように変動するか、は不明である。しかし、「上手に中年を迎える」ことはなかなか難しそう。中年に達した時点での BMD が低いことが、将来の骨粗しょう症の発症、骨折の原因となるとされている。

肥満の発生:DEXA を全身モードで用いることにより、全身の骨量、軟部組織量(赤身肉量、脂肪量)を測ることができることを最初に述べた。両者の和が、画像より得られた体重となる。例えば、体重計で得られた 4.31Kg という数字と上二桁は一致する。出生直後の 300g の仔ザルから 肥満しきった 7Kg の動物まで、実体重と画像からの体重とはほぼ一致する ($r=0.999$)。軟部組織量に占める脂肪の割合(%脂肪)も算出することができる。%脂肪は、カニクイザルの肥満・るい瘦度指数とも考えられる。そこで、雌カニクイザルを対象として、%脂肪を横軸に、血液・血清の各測定値を縦軸にして、回帰分析をおこなった。血清脂質関連の項目で、%脂肪とわずかに関連したのは総コレステロール量($r=0.203$, $p<0.05$)ぐらいであり、中性脂肪量などには有意な相関は認められなかった。最も強く関連したのはヘマトクリット値($r=0.454$, $p<0.001$)等の赤血球関連の項目である。雌カニクイザルの%脂肪と血液・血清測定値との関係を解析する目的で多変量解析法(正準判別分析法)の適用をおこなった。肥満と赤血球増加の傾向とが

確認された。その傾向は、40%脂肪以上の個体で顕著になる。35%～40%脂肪の個体は肥満への移行状態にあるものと判断された。他方、25%以下の個体では、貧血および低蛋白傾向が検出された。これらのものは、るい瘦個体と判断される。血液・血清測定値の多変量解析の結果から、雌カニクイザルの正常像を少しずつ浮かび上がらせることができた。

ところで、図4を見ていただきたい。これは、横軸に年齢をとって、雌カニクイザルの%脂肪値をプロットしたものである。7歳まで、ほとんどの個体は30%脂肪前後の値を呈している。しかし、8歳を過ぎる頃から35%脂肪以上の値を呈する個体が現れてくる。カニクイザルの8歳とは、ヒトに換算すると中年の始まりあたりに相当する。中年肥満の始まりである。5歳頃から、当センターの繁殖システムに導入され、妊娠・出産を繰り返してきた雌ザル達の肥満が始まる。そして、高脂血症になる訳ではないが、運動不足も加わって、40%脂肪以上の肥満個体が現れてくる。この状態で数年が経過すると、糖尿病を発症するものも現れる。糖尿病を発症すると、急激な体重減少を呈し、25%以下のるい瘦個体となり、天寿をまっとうすることのできないものもある。「上手に中年でいる」ことはここでも難しい。

しかし、サルを対象とする長寿科学のプロジェクトは始まったばかりである。これからどうやって「上手に歳をとるか」について研究していきたい。しかし、上手に歳をとるだけでなく、上手に中年でいつづけて、そしてその前に、上手に中年になるために、上手に

成長することの重要性はご理解いただけたものと思う。将来の研究についてご期待いただきたい。

平成の子供達は!!

ところで、長寿研究のプロジェクトの紹介文で、成長期や成熟期の重要性について指摘してきた。これは、もちろん「長寿」をそれまでの人生の総括として評価するためである。ところが、いま、平成の子供達が、「長寿」にいたる遙か以前のところで、リスクな状況に置かれていることが分かった。

比較のために昭和の子供達にも登場してもらおう。図5の左側を見ていただきたい。これは、昭和35年の統計データに基づく体重の横断的調査の結果である。下段に平均値の推移を示す。男子()も女子()も、15歳齢くらいまでの体重は単調に増加し、それ以降では増加率が減少しプラトーに達するようだ。ただし、10歳から14歳にかけてわずかではあるが、女子の平均体重が男子のそれを上回り、この期間だけは、男女の関係が逆転している。ところが上段の個体差を示す変動係数を見ていただきたい。男女ともそれまで10%程度であった個体差が、10歳齢ごろになると女子の個体差が大きくなってくる。女子ではこのころ、性成熟にともなう体重成長の加速が見られるからである。当時の平均初潮年齢は13歳5ヵ月齢(S36年)であった。性成熟年齢の個体差と、それにともなう成長の加速時期の個体差とが、この時期の女子の変動係数を大きくしている訳である。そして、女子の方が男子

よりも性成熟が早いと、わずかとはいえこの時期に、平均体重の男女の逆転がおこる。しかし、男子でも性成熟に達し、成長の加速が始まると、平均体重は再逆転する。高度経済成長以前のまだ貧しかった時代の子供達である。

前頁の図は、飽食の時代といわれる平成3年のデータである。一見してわかるのは上段での年齢層を問わない個体差の増加である。昭和の子供達では個体差の大きい時代で18%、そうでない時期では10%程度である。平成の子供では10%から20%以上の範囲を不規則に変動しているように見える。女子の場合、平均体重が40Kgに達する年齢は、11歳であり、昭和の子の12.5歳よりも1.5歳も早くなっている。14歳時での比較でも3.4Kgの増加が認められる。性成熟期(平均初潮年齢12歳3~8ヵ月齢, S46.47年)での体重の増加が認められ、個体差が大きくなる。これは極端に肥満した子供が含まれているからに違いない。ところが、18歳齢で比べると差がない。

男子の場合も、14歳齢では9.3Kgの増加が、そして18歳齢でも6.6Kgの増加が認められ、これも極端に肥満した子供が含まれるからに違いない。これが個体差を大きくしていると推測される。18歳齢で60Kgを切っていた昭和の子どもの平均体重も、平成の子供では明らかに60Kgを上回っている。それでは、女子の場合の14歳から18歳にかけての体重増加率の減少は、何に起因しているのであろうか。14歳で、自分自身を太目であると思った(誤解した?)子供が18歳齢にかけて過激なダイエットに走っていることの反映であろうか。

もしそうなら、この年齢は将来の妊娠・哺育に備えて身体を、そして骨を作らなければならない重要な年齢である。

カニクイザルでも、低Ca食(過激なダイエットに相当?)を給餌することによってBMDの低下が報告されている。それに卵巣摘出が加わると(生理の不順・停止に相当)、BMDの顕著な低下が認められる。厚生省の調査でも神経性食欲不振症(拒食症)の年次別総患者推定数は、1970年代から'80年代にかけて倍増している。そして、この患者さん達、あるいはその予備群と見られる方々に、生理の不順・停止をとまなうことがよく知られている。

このような女性が母となり、妊娠・哺育を繰り返し、中年に達したとき、そして「長寿」を迎えようとするとき、これまでサル類でみてきたことと無縁であるとの保証はない。将来の骨粗シヨウ症患者を、現在の日本社会が無意識に大量生産しているのではないことを祈り、サル類をモデルに長寿の研究を推進することを誓い筆を置く。本研究は文末に示した参考文献の著者らとの共同研究の成果である。記して感謝する。

参考文献

冷岡昭雄, 吉田高志, 長文昭, 吉川泰弘(1994). オス・ミドリザルの腰椎骨(骨密度, 骨幅, 投影面積)の測定とその加齢変化. 実験動物. 43:235-241.

成田勇人, 大久保文雄, 吉田高志, 長文昭, 吉川泰弘(1994). カニクイザルの骨量・軟部組織量の生体計測, 実験動物 43:

261-265.

吉田高志, 冷岡昭雄, 長 文昭, 吉川泰弘(1994). ミドリザルの血清生化学的測定値と腰椎骨密度との関係, 実験動物. 43: 369-374.

冷岡昭雄, 吉田高志, 長 文昭, 吉川泰弘(1994). ミドリザルでの腰椎骨密度の半年間の変化. 実験動物. 43 573-576.

宇佐美芳和, 冷岡昭雄, 大藤圭子, 吉田高志, 長 文昭, 吉川泰弘(1995). メス・ミドリザルの骨密度と血清測定値との関係: 重回帰分析による解析. 成長. 34 15-19.

田中佐絵子, 成田勇人, 大藤圭子, 吉田高志, 長 文昭, 吉川泰弘(1995). カニクイザルの血液・血清生化学的測定値と脂肪との関係. 成長. (印刷中)

《時代を支える TPC の研究》

—科学技術庁省際基礎研究紹介—

ニューロコンピュータによる行動解析システムの開発

Development of a system of behavior analysis using neuro-computer

川崎勝義

この記事は, センター長の吉川泰弘がリーダーとなって進めている, 科学技術庁省際基礎研究「霊長類行動のマルチメディア情報処理とニューロコンピュータによる解析システムの開発(略称: 行動解析プロジェクト)」の中で行われた研究を紹介したものである。音声解析はアズテックリサーチの渡辺彰氏, スネ

ークによる唇の解析は岡山県立大の渡辺富夫氏, モード画像を用いた背景処理の研究は環境研究所の清水明氏によってそれぞれ行われたものである。その他の研究については, TPCを中心として行われたものである。

(1)要約

脳機能の異常によって生ずる行動異常を自動解析するためのコンピュータシステムを開発する目的で, 研究を進めてきた。まず, 長期間の観察によって抽出できる行動異常を解析するための昼夜連続撮影記録装置の開発を行い, 1 週間にわたる屋内繁殖カニクイザル行動を高画質の S-VHS・VTR に連続撮影することに成功した。また, これらのデータを処理するための画像処理用コンピュータプログラムの開発に成功した。これらのうち主なプログラムは, DVI(digital video interactive)システム用差分処理プログラム, 同システム用ブレンドプログラム, ワークステーション用オプティカルフロープログラム, ワークステーション用スネークプログラム, モード画像による背景処理プログラムであった。これらを用いて, VTR 画像から解析対象となるサルを抽出し, 回転行動, 2 足行動, 4 足行動, 座位の 4 つの行動を分類することに成功した。また, 並行して行った音声解析においては, 雌雄のカニクイザルを被験体として解析し, 2~3 歳の雄ザルに雌ザルよりも基本周波数の高いボーイソプラノがあること, その後の 3~4 歳には成熟雄の周波数に変調する声変わりがあることを明らかにした。

(2)研究目的

感染症、毒性因子に限らず、その他の環境的要因やあるいは遺伝的要因によって脳機能に異常が生じた場合、その多くは、運動障害、あるいは行動異常をとまなう。その範囲は、麻痺、振戦、運動失調のような明かな神経症状とされる単純な運動障害から、比較的長期にわたる機能的観察の結果明らかとなる記憶障害や、感情障害などによる行動異常まで多岐にわたっている。また、行動の異常はその表出が複雑で、解析に客観性を持たせることは困難であることが多く、したがって解析にあたって、専門科の能力に依存する点が多い。さらに、その分析には膨大な時間と労力を要する。

こうしたことから、脳の機能的異常を客観的かつ簡便に分析する手法の開発が望まれ、コンピュータの導入が考えられてきた。しかし、近年急速に発達したコンピュータによる画像処理を応用した手法においても、マーキングされた特定点の追跡など、複雑な動物行動の解析に用いるにはきわめて単純で不十分な方法しかこれまで用いられてこなかった。そこで我々は、最新のコンピュータ画像処理技術を用いて、脳の機能的異常のモデルとなるような霊長類の比較的複雑な行動を解析するための簡便な自動行動分類・解析システムの開発を目的として研究を行ってきた。

(3)研究方法

長期にわたる動物行動をリアルタイムで、高画質情報のまま記録するために、昼夜連続撮影記録装置ならびに昼夜連続撮影用照明装

置を開発した。

高画質情報の VTR 画像を劣化させずに高速でデジタル化し、また多量のデジタル情報を圧縮、保存するために、DVI システムを導入した。

多量のデジタル画像情報を高速で演算処理するために、DVI システムを利用するコンピュータプログラムを開発した。

多量のデジタル画像を高速で処理するため、ワークステーションを導入し、このワークステーションで実行させる画像処理用コンピュータプログラムを開発した。

簡便で容易に画像処理が行えるよう工夫するため、パーソナルコンピュータ用に背景処理等の画像処理プログラムを開発した。

(4)研究成果

開発システム構成の概要

1) 昼夜連続撮影記録装置(図 1)

撮影画像の入力には、浜松フォトニクス社製の昼間撮影用 CCD カメラ、及び夜間撮影用 ICCD カメラを導入し、この 2 台をタイマーによって切り替えて使用した。ICCD カメラの光量調節には自動光量制御装置(浜松フォトニクス社製)を用いた。この入力画像に時間記録用のビデオタイマー(朋栄社製)による時間情報を挿入して S-VHS/VTR 記録を行えるようにした。これらの入力情報は CRT モニターによって確認できた。S-VHS/VTR 記録は日本ビクター社製の S-VHS/VTR 装置(BR-S747)に改良を加えたもので行った。この装置(BR-S747)は、もともと 3 台の S-VHS/VTR をつなぎ、1 台のデッキに仕上げたものであるが、我々は

この内部の3台を時系列で順に、連続して録画できるよう改良して使用した。また、この装置にオートマチックカセットローダー(SA-LA30)を3台とりつけることによって、合計で6巻のカセットテープをセット可能とし、連続して6巻分の録画、録音が自動的に行えるようにした。音声の入力には浜松フォニクス社製のミニマイクを導入した。

2) 昼夜連続撮影用照明装置(図2)

昼夜連続で撮影を行うための照明装置を開発した。この照明装置は天井用1台と前面用2台の計3台からなるもので、天井用照明には昼間照明用のインバータ蛍光灯2本と夜間照明用の赤色ランプ12個を、2台の前面用照明にはそれぞれ夜間照明用の赤色ランプ3個のみを内蔵したものである。昼間用照明と夜間用照明は昼夜連続撮影記録装置と連動してタイマーによって切り替わるようにした。

3) VTR 編集システム

撮影したサルの行動を専門家によって観察、解析、行動分類するため、またコンピュータ入力用のデータを編集するために、VTR編集システムを導入した。このシステムは2台のS-VHS/VTR(ソニー社製 SLV-RS7)、ビデオ・オーディオセレクター(ソニー社製 SB-V550)、ビデオコントローラ(ソニー社製 RM-E500)、CRT モニタ(ソニー社製 KV-14PS1)から構成した。

4) DVI システム

撮影した VTR 画像をコンピュータで扱え

るデジタル画像に変換し、また、一部の画像処理を行うため、IBM 社製のパーソナルコンピュータ(PC/AT)に ActionMedia ボード(インテル社製)を装着した DVI システムを構成した。このシステムとこのシステムを利用するために開発されたアプリケーションプログラム D/VISION(タッチビジョンシステム社製)を用いることによって、VTR 画像をリアルタイムでデジタル変換し、さらに圧縮してハードディスクに書き込むことが可能となった。また、DVI システムに装備された関数を一部用いることによって、差分画像、ブレンド画像、エッジ画像を作成することが可能となった。

5) 動画処理用ワークステーション indy

DVI システムによってデジタル化した画像データを高速で演算し、画像処理を行うため、シリコングラフィクス社製のワークステーション indy R4000 に 4GB、及び 9GB の記憶容量を持つ2台のハードディスクと 2GB の記憶媒体を利用することのできる MO ドライブを SCSI 接続して用いた。このワークステーションは DVI システム搭載のパーソナルコンピュータとイーサネットで接続し、9GB のハードディスクはパーソナルコンピュータの仮想ディスクとして利用することを可能にした。

6) 音声解析ならびにデータ処理用パーソナルコンピュータ

DVI システムならびにワークステーションで解析し、画像データから得られた運動量な

どのテキストデータをグラフなどで可視化するためにアップル社製パーソナルコンピュータ、パワーマック 8100/80AV を用いた。このコンピュータにはスライド作製機、カラープリンタを SCSI 接続し、解析の結果得られた行動項目などを時系列上にカラーバーコード表示し、プレゼンテーション用に出力することを可能にした。

また音声の周波数解析も同コンピュータを用いて行った。

開発した画像解析用コンピュータプログラムの概要

1) 差分処理プログラム

DVI システム用とワークステーション用の 2 つの差分処理プログラムを開発した。いずれも、時系列上にある 2 枚の画像の輝度値差分を計算するプログラムであるが、排他的論理和を用いて計算するものと、DVI 用にはその独自の関数を用いて差分の絶対値を取るプログラムも開発した。これらのプログラムは 2 枚の画像間に存在する不一致部分を検出ことを可能にするもので、解析対象となったサルの運動量を近似するデータ算出のために用いることが可能であった。

2) ブレンド処理プログラム

DVI システム用にブレンド処理プログラムを開発した。時系列上の複数枚の画像を平均化するプログラムである。同じ枚数の画像をブレンド処理した場合、画像間で動きのあったものは平均化されその輝度値が薄くなっていき、動きの無かった部分の輝度値はそのまま

に残る。したがって、静止したターゲットを強調することが可能となった。

3) エッジ処理プログラム

DVI システム用にエッジ処理プログラムを開発した。このプログラムは走査線上の輝度値を微分し、その傾きがある閾値を越えたものを表示するプログラムである。解析ターゲットと背景の境界を明らかにするために用いることが可能であった。また、一部ワークステーション用にも開発し、オプティカルフロープログラムと組み合わせて用いた。

4) オプティカルフロープログラム

ワークステーション用にオプティカルフロープログラムを開発した。このプログラムは、輝度値情報を基に、2 枚の画像間に起こったピクセルの移動をベクトルで追跡していくプログラムである。本来、膨大な演算量を必要とするアルゴリズムからなっており、従来、高速の大型コンピュータによって計算されてきたものであるが、このプログラムは本研究のためにスタジオ・ゲン社と共同開発し、ワークステーションでも十分高速に解析できるよう工夫した。このプログラムによって解析ターゲットを時系列で連続的に追跡することが可能となった。

5) スネークプログラム

ワークステーション用にスネークプログラムを開発した。このプログラムは、マウスによって選択したポイントを輝度値情報を基にその濃度勾配にしたがって移動させていくプ

プログラムで、これとオプティカルフロープログラムとを組み合わせることによって、解析対象を発散させずに追跡することが可能となった。また、スネークで追跡した解析ターゲットの重心位置を求められるようなプログラムも同時に開発した。

6) モード画像を利用した背景処理プログラム

パーソナルコンピュータ用背景処理プログラムを開発した。このプログラムは、解析ターゲットと背景とを分離するために開発されたもので、次のようなアルゴリズムから構成されている。すなわち、時系列上の複数枚の画像をそれぞれブロックに分割し、ブロック毎の平均輝度値を計算する。それぞれのブロックにおける平均輝度値を時間軸上で解析してヒストグラムをつくり、頻度が最大の輝度値をそのブロックのモード輝度値としてモード画像を作成する。このモード画像と処理対象となる原画像との差分を取り、2値化する。すなわち、背景部分の輝度値はモード画像との輝度値の差が小さいので、黒く表示され、解析ターゲットの存在した部分は動きがあるためモード画像との輝度値の差が大きくなり、白く表示される。つぎに、この差分画像をマスクにしてもう一度原画像を重ね、マスク部分を白く表示し、抜けた部分に原画像を表示すると、解析ターゲットのみがもとの輝度値で表示されることになる。また、このプログラムには、背景処理を行った後の解析ターゲットの重心位置、面積、X軸写像長、Y軸写像長を求めるプログラムも同時に開発した。

開発システムの試運転

1) 昼夜連続撮影

国立予防衛生研究所筑波医学実験用霊長類センターで繁殖育成されたメスのカニクイザル1頭を撮影対象として、同センター動物舎内において1週間の昼夜連続撮影を行った。撮影対象は、通常用いられている飼育用ケージと同様のケージではあるが、前面の撮影が行いやすいよう強化ガラスに交換した撮影用ケージに入れられ、そのケージ内で1週間飼育された。撮影対象のサルを撮影用ケージに投入した直後から撮影を開始し、昼夜を通して1週間連続で撮影を行った。撮影用に用いたテープは、S-VHS用の160分テープであった。本システムにおいてはこれを6本装備することが可能であり、したがって、16時間は無人での撮影が可能であった。1日2回、撮影者が動物舎へ入り、撮影用テープの交換とケージ前面のガラス及びケージ周辺の清掃を行った。

全てのシステムが順調に作動し、長期にわたる撮影も比較的容易に行うことが可能であった。また、S-VHS/VTRによる撮影を標準時間モードで行うことが可能となったために、コンピュータで画像処理を行うために必要な高画質の画像を得ることができた。

2) 編集機を用いた専門家による行動のファイルサイズの測定と行動データベースの作成

撮影したVTRから160分を抽出し、サルの行動について、回転行動、4足行動、座位の3つの行動を専門家の判断によって抽出、

ファイル化して、それぞれの行動のファイルサイズを特定し、グラフ化した。その結果回転行動の持続時間では5~15秒、また4足行動では0~5秒をピークにポアソン分布するのに対して、座位の持続時間にはばらつきが大きく、10~15秒で一度ピークとなるものの、それより長いファイルサイズのものもかなり多く存在することが明かとなった。

さらに、このシステムを用いて、撮影映像から、14の行動項目を抽出し、それぞれの行動項目について10ファイルずつの行動データベースを作成した。これらのデータベースをもとに、以下に述べるような特徴抽出を行っている。

3) DVI システムによる画像のデジタル化、運動量計算

撮影を行ったVTR映像の一部をDVIシステムによってデジタル化し、ハードディスクに保存した。1時間20分のVTR映像をこのシステムによってデジタル化した場合、およそ1.5GBの記憶容量を必要とした。デジタル化はリアルタイムで行うことができた。

デジタル化された画像情報をDVIシステムを用いる差分処理プログラムによって処理し、解析ターゲットの運動量を抽出した。図3に示したのは差分処理を行った結果の例である。図4に示したのは、6枚後の画像との差分処理を行うことによって求めた運動量の変化である。左から2足行動、回転行動、4足行動、座位の4つの行動パターンの運動量であるが、それぞれの行動が比較的特徴的な運動量変化パターンをもっている。この図で

示した運動量は絶対値差分によって求めたものであるが、排他的論理和を使って計算した場合も、ノイズが大きくなるものの、ほぼ同様の変化を示した。また、差分を取る2枚の画像について、時系列上の関係を1枚(隣り合わせの2枚)から6枚までを変化させてみると、時系列上で離れている2枚による差分の方が、S/N比が高く、行動に特徴的な運動量変化パターンを抽出できる傾向にあった。

4) ブレンド処理プログラムによる静止画強調

DVIシステムを用いてサル行動の画像にたいし、ブレンド処理を行った。1秒間30フレームのデジタル画像を10枚ずつブレンドし、この処理を1フレームずつ時系列上ですらしながら行った。この処理によって、大きな動きを示したときのサルは次第に薄くなり、背景にとけ込んでしまったが、動きの少なかったサルはそのまま残すことが可能であった。図5にブレンド処理を行ったサルの画像を示した。早い動きを示していた右ケージのサルは画面の中でほぼ消えてしまっているが、とまっていた左ケージのサルは残っている。

5) ワークステーションを用いたオプティカルフロー・スネーク処理による重心位置計測

「あいうえお」と発音する唇の画像をオプティカルフロー・スネークによって処理し、この唇の重心位置を求める計算を行った。図6は唇の回りにプロットしたポイントが、変化する唇の形を追跡した軌跡を示している。図中唇の回りの白い部分はその軌跡である。

間違いなく唇の形を追いかけることことができた。また、図7左パネルはオプティカルフローが追跡した部分の重心位置変化を示したものである。右パネルはこのうち、変化の大きかったy成分についてフレームごとの変化を表したものであるが、唇の形の変化をよくとらえることができた。

6) モード画像を用いた背景処理，ならびに重心位置，面積，X軸写像長，Y軸写像長の測定

撮影を行ったサルのVTR画像をDVIシステムでデジタル化したデータについて，モード画像を用いた背景処理をほどこした。図8は原画像246枚を用いて作成したモード画像である。図9はこのモード画像と原画像にブロック処理を施したモザイク画像との差分処理を行うことによって作成したマスク画像である。明確にサルの形が切り取られている。これに原画像を重ね，背景を白抜きにしたものが図10である。背景をきれいに消去し，解析対象のサルのみを浮かび上がらせることができた。抽出された重心位置の変化については，現在のところ行動に対応したものを抽出できていない。面積，X軸写像長，Y軸写像長についても抽出を終了し，行動パターンとの関係を検討中である。

7) 音声の基本周波数特性の解析

雌雄のカニクイザルを被験体として声の基本周波数特性を解析した。その結果2~3歳の雄ザルに雌ザルよりも基本周波数の高いボーイソプラノがあること，その後の3~4歳には

成熟雄の周波数に変調する声変わりがあることを明らかにした。

(5)考察

昼夜連続撮影記録の可能性

本研究によって開発した昼夜連続撮影記録装置は十分使用に耐えるものであり，動物行動の長期間にわたる観察，解析に威力を発揮するものであることが明らかになった。

DVIシステム

様々なデジタル画像用ボードを検討したが，比較的高画質で，秒間30枚の画像をリアルタイムで圧縮処理できるボードはDVIボードしか存在しなかった。今後類似したボードが開発されるであろうと考えられるが，DVIシステムは我々のニーズに十分応え得るシステムであった。

行動のデータベース作成とパラメータの抽出

行動のデータベース作成と，各行動ファイルについてのファイルサイズ，運動量，姿勢(重心，面積，X軸写像長，Y軸写像長)及びオプティカルフロー・スネークによる体の動きなどについてパラメータ化を進めてきた。すでに抽出したファイルサイズ，運動量によって，数種の行動を分類することは可能であったが，さらに多くの行動を抽出，分類するためには，多くのパラメータを抽出し，どういったパラメータが最もよく行動の変化を反映するのか，その組み合わせはどのようなものが適当であるのか検討を重ねていく必要があ

る。

行動分析のための抽出パラメータの組み合わせに関する基本戦略

上で述べたように、パラメータの抽出に関して、更なる研究を進めていく必要があるが、以下、現在考えられるパラメータを用いた行動分類法を述べる。

まず、基本となる第1のパラメータは差分処理によって得られた運動量である。研究成果のところでも述べたように、運動量のパラメータによって4つの行動进行分类することは可能であった。これらの行動分類は体全体の動きの大きさによって分類されたもので、細かい動きを知ることは困難である。また、第2のパラメータはファイルサイズである。同じ運動量を持つ行動でも、その種類によって、持続時間が異なると考えられる。したがって、この運動量とファイルサイズのデータのみで大きな動きによる分類には十分対応できると考えている。

次に重要となるパラメータは位置情報、ならびに姿勢の情報である。これらのパラメータは、立ち上がりなどの姿勢移動や、体全体の動きは小さいが四肢の運動に特徴のある行動の抽出に有効である。これらの情報を得るためには、背景を消去し、解析対象のみを抜き出すことが重要であるが、モード画像を用いる背景処理と重心等抽出のプログラム、ならびにオプティカルフロー・スネークを用いた重心抽出法はこれに有効であると考えられる。また、ブレンド処理は、抽出の対象となる行動の平均的な姿勢を抽出するため、ある

いは、早い動きを伴う行動を除外する目的で有効に用いることができる。

最後に、グルーミングや摂食など部分的な運動、小さいが早い動きを伴う行動には、オプティカルフロー・スネークが有効である。スネークの導入によってオプティカルフローを正確に追跡できるようになり、オプティカルフロー・スネーク画像をブレンドすることによって身体のパーツの運動を取らえることが可能となった。

今後の展望

今後、これまでの研究成果をふまえて、行動の抽出、分類に有効と思われるパラメータをニューロコンピュータへ移植してゆく。ニューロコンピュータの基本プログラムはすでに開発を終えているが、これに、行動データベースから抽出したパラメータを入力し、バックプロパゲーション、及びフィードフォワードによってニューロコンピュータを教育し、行動自動分類システムの最終段階を構成する。学習を完了したニューロコンピュータによって、サル行動の分類を行い、行動異常を抽出、評価するシステムの作製を考えている。

《症例報告》

カニクイザルにみられた硫黄顆粒を伴うブドウ球菌性皮膚肉芽腫・膿瘍の一例

Staphylococcal dermal granuloma with sulfur granule in a cynomolgus monkey

榊原一兵

カニクイザルがブドウ球菌(*Staphylococcus*

aureus)に感染した場合、急性経過をとることが多く、感染部位における膿瘍の形成、もしくは敗血症になりやすい。今回報告する症例は皮膚に肉芽腫、膿瘍が約10年間にわたり継続してみられた症例である。

硫黄顆粒(Sulfer granule, Druse)は真菌感染症の病巣に良く形成され、組織診断に有用な所見とされている。しかし、この症例のように、ある種の細菌が慢性的に感染し、膿瘍・肉芽腫を形成した場合にも硫黄顆粒が形成されるため、それとの鑑別が必要である。

症例:カニクイザル、雄、当センター産12才(1981年12月14日生まれ)。

発生状況および臨床所見:生後約1年で、皮下織に硬結した病巣があることに気付いた。その後約10年間で、この病巣は背部や胸部皮膚に多数認められるようになった。その間、抗生物質(アミノベンジルペニシリンやセファゾリン等)で治療したが、死亡した。

病原検索:皮下織結節部より *Staphylococcus aureus* および *Streptococcus sp.* が分離された。真菌の検査結果は陰性であった。

解剖所見:皮膚は広範に脱毛し、胸部と背部の皮下には小豆大の硬い結節が散発ないし密発し、触知された。この結節は皮膚表面に隆起し、痂皮が付着していた。またその一部は黒褐色で出血し、潰瘍も認められた(図1)。結節の断面からは淡黄色の膿汁が流出した。結節は胸部筋肉内にもあり、その周囲は充血し、

断面からは淡黄色の膿が流出した。

組織所見:皮下織には不整形で大きさの異なる硫黄顆粒(Druse)がありそれを中心に小膿瘍・肉芽組織が見られた。(図2)。硫黄顆粒の中心部はヘマトキシリンで紫色、周囲はエオジン赤く染色される。また硫黄顆粒周辺部には棍棒状の突起(Club)が見られた。この病原体をとり囲んで、リンパ球、好中球、ランゲハンス型多核巨細胞がみられ、いわゆる Tuberculoid granulomatous reaction が観察された。また、空胞細胞(Foam cell)やプラズマ細胞等も見られた。さらにその外側には繊維の増殖と毛細血管の新生がみられた。中枢神経系組織には本病原体による播種性の病変、髄膜炎や神経繊維の崩壊像が観察された。そしてこれら病変の起原菌は *Staphylococcus aureus* であることが細菌検査および免疫組織染色(ABC法)によって明らかになった。

《臨床ノート》

発疹

Rash

小野文子

繁殖コロニーを管理していくうえで、ウイルス感染症の発生は最大の脅威です。特に、TPCのようにSPF(Specific pathogen free)化にむけてクリーンなサルコロニーを作出していく過程で、ある種のウイルス感染症がそのウイルスに対する抗体フリーのコロニーの中で発生した場合、一気にその感染が蔓延する可能性があります。突然死、天然孔からの出血

等激しい症状を呈した場合はもちろん緊急な対応が必要ですが、発疹が観察された場合もまずウイルス性疾患の可能性を疑って対応していく必要があります、その鑑別診断が重要となります。霊長類で報告のある発疹の認められるウイルス性疾患には、麻疹、サル水痘様ヘルペスウイルス感染症、モンキーポックス等があります。今回は、当センターで認められた、HHV-6(Human herpesvirus-6)様ウイルス感染症と考えられる症例について紹介します。

当センターのカニクイザルは3つの棟で飼育されており、その中に繁殖棟と育成棟があります。1989年のTSVH(Tukuba Simian Varicella-like Herpesvirus)感染症の発生以来、繁殖棟で出生したサルを離乳後育成棟に移動する際、隔離室で1ヵ月間健康状態を観察するとともにTSVH抗体価の有無のチェックを行っていました。その隔離観察中に10ヵ月齢の個体が発疹が発見されました。その報告を受けた後、同居個体を含めこの隔離室で飼育された29頭について入念な検査をおこなった結果、発疹の認められたものはその一頭のみでした。その個体の血清について発疹関連ウイルスに対する抗体検査を実施するとともに、同一室内で隔離して飼育すると同時に、飼育管理体制を強化しました。すなわち、この隔離室の飼育管理作業は入棟時の最後に行い、入室の際は防護衣類の交換と消毒を徹底して行いました。ウイルス学的検査の結果HHV-6様ウイルス感染症による発疹の可能性が強く示唆されました(ウイルス学的検査成績についての詳細は8ページに記載されていますので参照してください)。発見時、口腔

周囲を中心に側頭部、前頸部、四肢内側にピンク色の斑状丘疹が観察され、発熱は認められませんでした。5日後に、口角部の紅斑が観察されましたが、口腔内に糜爛や潰瘍は認められませんでした。10日後では、発疹はまだ顔面に認められ、口角部は赤色痂皮となり、体表リンパ節の腫脹が観察されました。しかし、これらの観察期間中の血液生化学検査成績や元気、食欲等の健康状態に異常は認められませんでした。顔面の発疹は1ヵ月後より徐々に消失しましたが、リンパ節の腫脹は発疹発見後、3ヵ月目まで観察されました。この個体は生後7ヵ月目で離乳しましたが、その母ザルのHHV-6抗体は陽性でした。しかしこの仔ザルと離乳後同居していた1頭の仔ザルの本ウイルスに対する抗体は約3ヵ月間の同居でも陰性でした。おそらく本症例は母ザルより哺育中に感染したものと思われます。また、同居していた仔ザルに感染していないことから水平感染は弱いと考えられました。そこで、発症した個体のみを個別飼育とし、この隔離室にいたその他の仔ザルは、抗体価の変動や発症がないことを確認したうえで育成棟へ移動しました。

ヒトにけるHHV-6感染による突発性発疹は主として6~24ヵ月齢の乳幼児を中心に見いだされる疾患で数日の高熱の後、分利状に解熱し、ほぼ同時に斑状丘疹が体幹部に始まって末梢に広がり2~3日で消失します。抗体保有率はほぼ70~80%で生後6ヵ月から1歳までに感染していると考えられています。

今回のカニクイザルの症例では発疹が認められる以前に発熱したかどうかは不明です。

また発疹が終息するまでに約 1 ヶ月要している事からその臨床症状はヒトとはやや異なっています。

今回の症例は、現在のカニクイザルコロニーにも潜在しているウイルスで感染力が弱かったこと、また群の隔離が容易であったことによりその感染状況を早期に把握することが可能でしたが、今後も未知、既知のウイルス感染を防御するには、日々の感染力と初動対応が重要と考えられます。

《シンポジウム報告》

第 12 回霊長類エイズ動物モデルシンポジウムに参加して

12th Annual Symposium on Nonhuman Primate Model for AIDS Oct. 12—15, 1994, Boston.

森 一泰

10/12(水) 昼、ボストン・ローガン空港に着く、レンタカーを借り、約 30 マイル西のサウスポートにあるニューイングランド霊長類センターへ、半年ぶりに見る研究所はほとんど変わらないのだが、以前とは違った印象を感じた。おそらく今回はじめて訪問者として研究所を見たためか、おかれた立場により世界は違って見えるのだろう。Dr. Desrosiers と挨拶をした後、オレゴン霊長類センターの児玉さんと彼の上司を乗せ会場のマリオットホテルへ、今回は例年と異なり、registration、reception 後、早速、招待講演が始まった。

NIH の Dr. Fauci はエイズの pathogenesis についてリンパ節の構造変化、特に FDC ネット

ワークの崩壊が免疫抑制の原因となり血中ウイルス量の増加につながるという仮説を報告した。次に、1 年半程前から議論されていたヘルパー T 細胞のサブクラス Th1/Th2 のバランスが HIV 感染により Th2 に傾き、細胞性免疫の抑制が起こり AIDS が発病するという仮説について、実際の感染者からの成績からその仮説を否定する結果を示した。すなわち、サイトカインの産生について、IL1, IL6, TNF は感染者で高値を示すが、Th1, Th2, を代表するそれぞれのサイトカイン IFN- γ , IL10 は、非感染、感染者の両方で高値を示す、逆に、Th1, Th2, を代表する別のサイトカイン IL2, IL4 は両方で低いことから単純に HIV 感染により Th1 が低下し Th2 が上昇するわけではない。さらに話題の長期無発症感染者について、1) HIV 感染者の約 5% が長期無発症感染者に該当する。2) 無発症期に見られるリンパ節の構造変化が見られない(germinal center の形成も顕著でない)、3) ウイルス量は発症するケースに比べ 1/10 ~ 1/100 と低い、4) HIV に対する抗体産生に差は見られない、5) CD8⁺T 細胞が HIV の増殖を抑えている、6) 発症するケースに見られる CD8⁺T 細胞における V の clonal expansion が見られないと報告した。

10/13(木) 2 日目午前は引き続き pathogenesis の発表があった。

Aaron Diamond AIDS research Institute の Dr. Ho は AIDS 発病のメカニズムについて Dr. Fauci の仮説(AIDS の pathogenesis に FDC が重要であるという)に否定的な考え方を述べた Dr. Fauci は、感染後発病前までウイルス量が

低く抑えられていること、発病の原因について、それぞれ、FDC ネットワークによるウイルスの濾過によりウイルス量がコントロールされているため、発症は FDC 構造の崩壊によると考えていた。それに対して、Dr. Ho は CD4⁺ T 細胞の減少は単に CD4⁺ T 細胞の生産が HIV による減少に追いつかなくなることに よると結論した。彼の根拠は感染から発病し 死に至るまでを 1) 感染後 4 週までの初期感染、 2) 4 週から 5 年までの無発症期、3) 5~8 年の ARC 期、4) 8~10 年の AIDS 期、と分け、それぞれの期間に産生されるウイルス量を算出した。結果は 1) 3×10^{10} 2) 4×10^{10} 3) 2×10^{11} 4) 2×10^{12} となる。さらに血中の CD4⁺ T 細胞数とその 1 日当たりの増減についても期間別に算出した。それらの結果から 1 日当たり total CD4 に対して 1~9% の turnover が感染者に見られた。血中ウイルス量と CD4 の turnover には相関関係があった。つまり、細胞性免疫による感染 CD4 の減少とそれに対応する CD4 細胞の産生に平衡関係が成り立っている。AIDS 発病の原因: CD4 減少は、血中ウイルス量が高すぎるため、多量の CD4⁺ T 細胞の破壊が産生量を越えるために起こると考えている。実際に、CD4 の減少を優れた抗ウイルス剤 (proteinase inhibitor) により改善することができたことを報告した。

次に Johns Hopkins 大の Dr. Mankowski が SIVmac239 から *in vivo* passage により分離された neuro-virulent SIV の neuro-virulence は、SIV が脳内の内皮細胞で感染増殖する性質によるためだと報告した。エイズ脳炎では白質内にマクロファージ系細胞の浸潤とその周囲

に内皮細胞が集まる現象が見られるが *in vivo*, *in vitro* (macaque brain endothelial cells/ MBEC) の実験から neurovirulent 株 SIV/17E-Br の脳内皮細胞におけるウイルス増殖が確認された。さらに、SIVmac239 と SIV/17E-Br (env に 16 個、LTR に 4 個のアミノ酸変異) の組み替え SIV について調べたところ、SU(外膜蛋白) のみの置換では脳炎を起こさなかった。*in vitro* の MBEC では PCR positive だが *in situ* RT-PCR hybridization negative だった。env(SU+TM) の置換ウイルスでは 1 年後に脳炎を起こし *in vitro* でも感染 15 日後に増殖感染が見られた。つまり、transmembrane 蛋白、nef、LTR も neuro-virulence に必要なことを暗示している。この場合ウイルスの細胞内への侵入は CD4 を介さない可能性が高いようだ。

Pasteur 研究所の Dr. Chakrabarti は前回に引き続き、初期感染におけるリンパ節内のウイルスの感染増殖とその影響について報告した。今回は pathogenic SIVmac251 と nonpathogenic SIVmac251 BK28 nef deletion と SIVmac239 (nef stop) を用い、感染 7 日後、2 ヶ月後にリンパ節を取り、調べている。まず血中ウイルス量について、SIVmac251 BK28 nef deletion では 1~2 週のピークのみ、SIVmac239 ではピークのあと低下するが再び上昇し、その後高いウイルス産生が続く、SIVmac251 では初めの高いウイルス産生が続くという違いが見られた。SIVmac239 の nef 遺伝子 stop codon は 15 日後に open に変わった。ウイルスに対する免疫反応については、SIV 抗体、germinal center (GC) に形成、CD8 T 細胞の浸潤を調べている。SIV 抗体はどれも同じように作られている。GC の

大きさはBK28 nef deletion, SIVmac239ではSIVmac251と比べ早く大きくなるがその後小さくなる。SIVmac251ではGCの形成は遅れるがその後の縮小は見られず lymphadenopathyに進行する。CD8T細胞の浸潤についてはSIVmac251において顕著にみられGCの過形成,強い病原性との関連が考えられる。3種のウイルスの病原性の違いはウイルスの増殖能力の違いではなく抗ウイルス免疫の誘導に違いがあるのではないかと述べた。この発表に対して New England Regional Primate Research CenterのDr. Desrosiersは1) SIVmac239の病原性が彼らの結果と異なる。2) SIVmac251 BK28 クロームは既にnonpathogenicであるので得られた結果が nef deletionのためかSIVmac251 BK28の性質によるためか分からないとコメントした。

今回のシンポジウムでは endothelial cellの話が3題あった。UC DavisのDr. Dandekarは初期感染時の消化管リンパにおけるSIV感染について述べた。SIV感染3日後に感染細胞が主に消化管リンパのリンパ小胞,パイエル板に見られることからSIV感染細胞がリンパ節の高内皮細静脈を通して運ばれてくると思われる。1週間後には固有層,小腸リンパ周囲に感染細胞が拡がる。pathogenicなSIVmac251,239ではxyloseの吸収異常が感染後2,8,13日に見られるが,nonpathogenicなSIVmac1A11では2,8日に弱い吸収異常が見られるが13日には正常になった。さらにpathogenic SIV感染によるintestine villiの形状の変化,crypt epithelial cellsの中にapoptotic cellsを含む上皮の過形成が見られた。リンパ

球の細胞接着因子の解析からは,non-pathogenic SIV感染に比べ高いVLA-4,LFA-1の発現がpathogenic SIV感染において見られた。対応する内皮細胞の細胞接着因子:VCAM-1,ICAM-1の発現については2群に差は見られなかった。VLA-4に競合的に結合するペプチドCS1をSIV感染ザルに投与したところ小腸,末梢リンパのウイルス量が顕著に低下した。小腸リンパの細胞のサイトカインmRNAをRT-PCRを用いて調べたところSIV感染後,病原性に関係なくIL10は2週間まで増加し,その後低下した。IFNは感染直後のみ高い値を示した。IL4は測定期間中高値を示した。

New England Regional Primate Research centerのDr. Sassevilleは脳炎と内皮細胞について報告した。彼らは既にSIV脳炎を起こしたサルにおいて特異的に脳内皮細胞のVCAM-1の発現が顕著に高いことを報告しているが,今回は1)初期感染においてSIVmac239(10^4 TCID₅₀)は2週間後に脳内へのSIV感染細胞の浸潤,急性の髄膜脳炎が見られたが,脳内皮細胞における高いVCAM-1の発現は見られなかった。また1例で脳炎を発症し顕著なVCAM-1の発現を伴った。SIVmac1A11感染では脳における感染,炎症いずれも検出されなかった。

午後はMicrobiology session。NIHのDr. Hirschはアフリカミドリザル(Vervet)から分離されたSIVagmの感染実験について述べた。これまでの研究から,SIVagmはアフリカミドリザルに自然感染し,宿主に対し病原性を持たないことから,ウイルス側にその原因があ

る可能性も考慮されている。Dr. Hirsch は彼らの分離株がブタオザル(pig tail macaque)に対し病原性を持つことを報告した。SIVagm を接種されたサル8頭中3頭でエイズを発症した。(20カ月の時点で、1頭は10カ月後に、2頭は13カ月後に、2頭ではCD4が低下した)。ところが、ミドリザル、アカゲザルに対しては病原性を示さなかった。ウイルス分離を末梢リンパ球、リンパ節、髄液から試みたところ、ブタオザルからはウイルス分離は容易にできたのに比べ、ミドリザルでは可能だが低い virus load であり、アカゲザルからはウイルス分離が困難であった。彼らはすでに JM109 derivative 3226/RecD を用い、molecular clones の分離に成功している。今後、分離された molecular clones を用いブタオザル特異的に病原性を決めているウイルスの遺伝子の解明、サル種の違いにより SIVagm のウイルス増殖が異なることから、宿主側のファクターの解明と今後の仕事が注目される。

Oregon Regional Primate Research Center の児玉さんは脳における SIV の宿主である microglia での SIV の感染増殖を決めるウイルス遺伝子の研究を続けているが、まず、env 遺伝子については macrophage-tropism に必要なアミノ酸変異が必要であること、さらに nef 遺伝子については SIVmac239 と比較して N 末端から 76 と 105 の間の 5 個のアミノ酸置換が重要であることを報告した。私の未発表の結果から nef が macrophage における SIV の感染増殖に影響することが判明しているが、彼らの結果はこのことを裏付けている。Johns Hopkins の neurovirulent SIV の結果との関連に

興味を惹かれる。

UC Davis の Dr. Luciw は S/HIV について述べた。S/HIV は、SIVmac239 の tat, rev, env の部分を HIV-1 SF162(macrophagetropic)または HIV-1 SF33(T cell tropic)の遺伝子と置換することにより作成された。サルの PBL では S/HIV-1SF33 は SIVmac239 と同程度、S/HIV-1SF162 は 1/10 の増殖を示した。ヒトのマクロファージでは S/HIV-1 SF162 は高い増殖、S/HIV-1 SF33 はほとんど増殖を示さなかった。*in vivo* 実験では、それぞれ 300TCID₅₀ を 4 頭のアカゲザルに接種した。血中ウイルス量を PBL10⁷ 当たりのウイルス感染細胞を coculture 法より算定すると S/HIV-1SF33 では 2 週後、2000~10000、4 週後、50~5000、8 週後、5~100、16 週後、検出可と減少した。S/HIV-1SF162 では 2 週後、10~1000、4 週後、0~30、8 週後、検出不可となった。感染 2 週後のリンパ節中のウイルス量は血中ウイルス量と相関関係を示した。このように S/HIV の性質は用いた HIV-1 の env 遺伝子により支配された。残念ながら AIDS 発症は見られなかった。

Aaron Diamond AIDS Research Center の Dr. Chen は SIV に自然感染している Sooty mangabey(Sm)から SIVsmSL162 を分離し、その遺伝子解析の結果について述べた。gag 遺伝子配列、系統樹分析からこのウイルスは SIVmac、HIV-2 と等距離にある。また、すでに分離されている SIVmac、SIVmne、SIVsmm は、おそらく 1 種の SIV に由来している。SIVsm は SIVagm 場合と同様に AIDS が見つかる遠い昔から Sooty mangabey に感染していた

のではないかと報告した。

10/14(金) 3日目 午前は治療, 感染, 疫学のセッション。Massachusetts General Hospital の Dr. Hirsch はこれまでの抗 HIV-1 薬の臨床研究のレビューをおこなった。CD4<500/mm³ の感染者に対する AZT500mg/day 投与は, 4年生存率では効果は見られなかった。CD4 の増加(40~100/mm³)が発病の早い時期の投与の場合, 長くて1年間見られた。顕著な効果としては HIV 感染した母親(妊娠 14~34 週)から子供への感染率を約 4 倍低下させた。他の薬, ddI, ddC, d4T 等を用いた併用療法がより優れた治療効果を示した。surrogate markers については現在 CD4, 2 microglobulin, neopterin, ウイルス量(DNA, RNA)が用いられているが, ウイルス量の測定が一番優れていることを報告した。

University of Alabama, Birmingham の Dr. Fultz は SIVsmm pbj14 の mucosal infection の話と SIV 感染サルへの放射線照射について述べた。ブタオサルに SIVsmm pbj14 を rectal または vaginal に 10³TCID₅₀ ,または iv で 10⁴TCID₅₀ 接種した。結果は, iv 接種 8 頭は 7~8 日後死亡, rectal では 2 頭は生存, 2 頭死亡(9, 14 日後) ,vaginal では 2 頭生存 2 頭死亡(159 日後, 23 週後)。死亡したサルでは, 高い viremia 急激な CD4 の減少, 急激な CD8 の増加とその後の減少が見られた。vaginal 感染で明らかな発症の遅れが見られた。次に SIV 感染サルの放射線照射による治療の試みが述べられた。放射線治療は以下の理由による。1)免疫の活性化が AIDS の発症に関係している。2)リンパ

がウイルスの reservoir になっている。3)リンパにウイルス増殖に必要な activated cells が多く存在する。4)免疫抑制剤, cyclosporin A が AIDS に効果を示した。SIV 感染サル 2 頭に 5 日連続照射した。結果は, リンパ節の肥大は消失した。リンパ球の FACS 分析では, 照射後血中の CD4, CD8, B cells は検出不可となるが, その後正常近くまで回復した。ウイルス分離は 1 例で見られた。末梢リンパ球は PHA, PWM に対して低い反応性を示した。副作用は見られなかった。

German Primate Center の Dr. Stahl-Hennig は逆転写酵素の S/HIV chimera について発表した。SIVmac239 をもとに pol 遺伝子は HIV-1(HxB-2) の遺伝子を用いている。CEMX174 におけるウイルス増殖のピークは chimera では SIVmac239 に比べ 10 日遅れるが, サルの PBL ではほとんど同程度のウイルス増殖を示した。アカゲザルの感染実験では SIVmac239 と同程度の血中感染細胞数(300~5000 infected cells/10⁶ PBMC)を 20 週(観察期間)示し, AIDS の症状(lymphadenopathy, splenomegaly)を起こした。

California Regional Primate Research Center の Dr. Miller はウイルスの macrophage tropism が SIV の粘膜を介する感染に必要な性質なのかという問題について報告した。SIVmac251 (uncloned, containing both T cell and Macrophage tropic viruses) 10³ TCID₅₀ を vaginal に 5 頭の雌サルに, iv 5 頭の雄サルに接種し, 3, 7, 14, 35, 49, 63 日後に採血し plasma 分離後, PBMC から CD14⁺(monocyte/macrophage), CD14⁺(T, B cell)細胞を分離し,

CEMx174, macrophage を用いて co-culture でウイルス分離をした。iv 接種では 3 日後, vaginal では 14 日以後すべてのサンプルに macrophage tropic のウイルスが検出された。T cell-tropic ウイルス(macrophage では増殖しない)の分離は, iv では 7 日以後, vaginal では 35 日まで稀にしか分離されなかった。以上の結果から macrophage における感染性をもつウイルスが粘膜を介する感染, また初期のウイルス増殖を行っているのではないかと報告した。

California Regional Primate Research Center の Dr. Marthas は newborn rhesus monkeys への SIV 感染実験について述べた。まず adult の成績について, AIDS による死亡率は SIVmac251 感染では:50% が 1 年以内に, SIVmac239 では :25—40% が 1 年以内に死亡する。SIVmac1A11 感染では 100%のサルにおいて 5 年の観察期間中病変は見られなかった。newborn における AIDS による死亡率は, SIVmac251 感染で 6 頭中 5 頭が 12 週までに, 残りの 1 頭は 26 週後に死亡した。SIVmac239 では全頭のサルが 12 週までは異常がみられなかったが,その後 adult と同様の経過を示した。SIVmac1A11 では全頭のサルが感染後 1 年間の観察期間異常が見られなかった。血中の感染細胞数は, SIVmac239 は SIVmac251 に比べ若干低い, SIVmac1A11 では検出できなかった。抗 SIV 抗体は, SIVmac239, SIVmac1A11 で低い検出され, SIVmac251 では検出されなかった。SIVmac251 の強い病原性は SIVmac239 と比べ免疫の誘導の差に違いがあるためではないかと推測される。

午後は Immunology session。New England Regional Primate Research Center の Dr. Johnson は nef deletion SIVmac239 により誘導される免疫の解析の結果について, 1) gag, env に対する高い CTL 活性が検出された。2) 末梢血の CD8⁺の分画からウイルスの増殖を抑制する factors が出ている。3) HIV 感染長期無発症の例と共通する現象が見られたと報告した。HIVgagCTL のエピトープの解析から CTL の認識から回避するエピトープをもつ 2 個のアミノ酸変異を持つウイルスの出現を確認した。

Harvard Medical School, Beth Israel Hospital の Dr. Voss は S/HIV chimera 感染サルから HIV-1 env specific な CTL を同定した。そのエピトープは QQQNNLLKAIEA で env 蛋白 N 末端から 553 ~ 562 の conserved regions に含まれている。MHC の解析からは 25%以上のサルがこの MHC を持つ。

CDC, Yerkes Regional Primate Research Center の Dr. Folks は Hyper-immune activation により AIDS の発症を早める事ができることを示した。以前から SIV 感染実験では約 30% のサルが 6 ヶ月以内に AIDS により死亡し, その際, SIV に対する液性免疫が誘導されない事が知られていた。彼らはアカゲザルを 4 群に分け, 次の処置(感染時と 1 ヶ月後)を SIVmac251 感染実験に組み入れた。1) 感染のみ, 2) allogenic cells の接種, 3) allogenic cells, KLH/Freund' adjuvant, tetanus toxoid/ Freund's adjuvant, 4) 3)の処置のみ。結果は 3) 群で 2 頭は 4 ヶ月後, 1 頭は 7 ヶ月後に死亡。1)と 2) では 1 頭のみ 7 ヶ月までに死亡した。CD4 の減少は 3)2)1)の順で早く起こった。KLH,

tetanus toxoid に対する抗体は 4) では増加したが 3) では最初に見られたが、その後消失した。hyper-immune 処置によるリンパ節中の細胞の活性化は見られなかった。plasm 中の TNFRI, TNFRII が 1)2) で検出されたが 3) では検出されなかった。また、3) では感染初期に特徴的な CD8⁺ 細胞の増加が見られた。これが immunone paralysis を起こし SIV による CD4 減少 AIDS の発症を招いたのではと推測している。

10/15(土) Vaccine session。New England Regional Primate Research Center の Dr. Desrosiers は HIV-1 NL4-3 より作成した vaccine candidates, 3(nef, vpr NRE: LTR の U3 の 5' 部分を欠失させたウイルス), 4(vpu の欠失を加えたウイルス)の結果を報告した。vaccine の効果を調べるためにチンパンジーを用いている。2 つの attenuated viruses はチンパンジーの PBL では同程度のウイルス増殖を示した。チンパンジーでは HIV-1 NL4-3(wt)は 2, 4 週後に明らかな初期感染を示す感染細胞, または HIV-1 RNA を検出したが, attenuated viruses 感染では Virus Load のピークは 1/10 以下であった。感染 1 年後(現在)も wt では co-culture でウイルスを検出している。attenuated viruses では頻度は低いウイルスを検出。抗体産生は attenuated viruses 感染では wt に比べ低いが見出している。さらに 6 日前に 25TCID₅₀ の HIV-1 IIIb をチャレンジしたばかりであることを報告した。つぎに HIV 感染長期未発症者(血友病患者)から分離されたウイルスの塩基配列解析について。5 例について nef 遺伝子を PCR で増幅し塩基配列を

決定した。1 例に欠失が 1983 年から 1993 年の調べられた全部(81 回)の PCR に見られた。この患者には 1983—1986 の期間 HIV で汚染した製剤が投与されており nef 欠失 HIV が vaccine として働いた可能性が高いと述べた。

National Institute Biological Standards and Control, UK の Dr. Stott は種々の vaccine の効果について述べた。最も印象深い発表は attenuated virus についてであった。彼らは SIVmac251 32H からの molecular clone, PJ5 と nef 遺伝子に 12bp の欠失をもつ PC8 を用いた。アカゲザル感染実験では、1 ヶ月後の血中の感染細胞数は PJ5 感染では 10⁶PBMC 中 10³個, PC8 感染では 10⁶PBMC 中 10 個で SIVmac239 とその nef 欠損ウイルスの場合と同様だ。PC8 感染ザル 4 頭に 39 週後に PJ5 のチャレンジをしたところウイルスの検出はできなかった。PCR で検出されたのは PC8 の DNA のみであった。PC8 未感染ザル 4 頭ではすべてのザルからウイルス(PJ5)を検出した。さらに PC8 感染ザルでは S/HIV にたいしても感染を阻止した。2 種の S/HIV (速水研と Dr. Sodroski から)を vaccine として用い SIVmac239 をチャレンジしたところ、それぞれの S/HIV 感染ザルにおいて 4 頭中 4 頭, 4 頭中 3 頭で SIVmac239 が検出された。PC8 感染ザル(30 週後)に対しては感染細胞の接種, 粘膜を通しての接種 (intra rectal), 多量のウイルス接種を試みたが、いずれの場合に対しても感染を阻止した。他の vaccine については、不活化ワクチン, ウイルス蛋白ワクチン, passive immunization は、いずれも弱い効果または効果が見られなかった。

TSI Mason Laboratories の Dr. Wyand は attenuated virus vaccine として nef (SIVmac239nef deletion), 3(さらに NRE と vpr の欠失を加えたウイルス)の効果を vaccine 接種後 8, 20, 79 週後に SIVmac251(10AID₅₀) を接種して調べた。protection の判定として次の基準を用いている。1) AIDS の症状がない, 2)検出されるウイルス量が非常に低いまたは未検出, 3)CD4⁺, CD29W⁺数が安定している, 4)感染初期の plasma 中にウイルスが検出されない。結果は protect された割合を示す。8 週後: nef, 0/4; 3, 2/4, 20 週後: nef, 1/2; 3, 2/3, 79 週後: nef, 1/2; 3, 4/4。Dr. Stott の結果も参考にすると, protection には vaccine 接種後 30 週は必要と思われる。

Beth Israel Hospital の安富さんは, 組み替え BCG vaccine について報告した。SIVmac の gag の CTL エピトープ(9 個のアミノ酸から成る)を BCG に組み込んだ recombinant BCG による primary immunization と peptide/ liposome による booster により SIV 感染と同程度の CTL を誘導した。SIVmne(20 AID₅₀)をチャレンジしたが protection できなかった。ウイルスを調べたところ escape mutant は検出されなかった。protection には多数のエピトープに対する CTL が必要なのではないかと推測していた。

《学会報告》

第 16 回全米骨・ミネラル学会に参加して

Report on “The 16th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)”

吉田高志

霊長類による骨粗鬆症モデルの確立を計るために, 米国での骨および骨代謝の研究の現状を把握する目的で, 米国でも最大の ASBMR(American Society for Bone and Mineral Research)の第 16 回大会に参加するとともに, 米国内のいくつかの研究施設を訪問した。以下はその折りの顛末記である。

9 月 9 日(金曜日)

ミシシッピ沿岸の街カンザスシティーで催された本大会の初日である。5 日間にわたっておこなわれる大会で, 約 160 演題の口頭発表が一部をのぞき, ほとんどが一会場でおこなわれ, 1500 演題にもものぼるポスター展示が 3 日間に分けておこなわれた。かなりハードなスケジュールである。初日は, レジストレーションをすませて, 早々会場から退散した。

9 月 10 日(土曜日)

午前中, 「ホルモン」と「骨芽細胞」のふたつのセッションに参加する。副甲状腺ホルモン(PTH)等の骨代謝に関連するとされているホルモンやその受容体の遺伝子発現の話が主体であった。骨代謝関係の日本の国内学会にすら全く参加したことが無く, これまで骨とは無関係の生殖内分泌学の研究に従事してきており, 米国でこの学会が, 骨にからむ学会として, 初めての参加経験である。講演内容を聞き取るのに, もっと苦勞するのでは, と危惧していた。しかし思ったより大変では無い。これは, 10 分間しかない口頭発表では

あるが、すべての発表者が、その研究をおこなう目的や背景についてしっかりと説明してくれることと、必ずスライドで要約と結論とを示してくれたからである。多少、聴き落としたところがあったとしても、その発表の時間内で取り返すことが十分に可能であった。そして、5 分間の討議時間には、広い会場内の 4 つのマイクロホンに質問者の長蛇の列ができる。しかし、座長は時間を見計らって、しっかりと質問を打ち切る。

昼休みを挟んで午後 2 時間 15 分は、ポスター発表にあてられている。ポスター展示場の片隅の出店で、ハンバーガーを買い込み、頬張りながらポスターを見ても、これだけの時間で 534 ものポスターを見終る訳が無い。まずは表題を見ながら歩きまわる。

カラフルなポスターのひとつに、フランスのグループによって、DEXA(二波長 X 線密度測定装置)によるカニクイザルの腰椎の骨密度(BMD)の測定についての報告があった。米国のホロジック社の装置(QDR-1500)を用いるものである。ヒト成人用の解析プログラムによってカニクイザルの腰椎骨の測定をおこなうより、新たに開発された小児用のプログラムによる方が、測定誤差も小さく、測定値の再現性も良い、というものである。

TPC でも米国ルナー社の装置(DPX—)を用い小児用解析プログラムによってカニクイザルの測定をおこなっている。そのデータも、日本から持参している。発表者と話がしたいと思い、ポスターの前で待った。しかし現れない。その後も、他のポスターを見ながら、横目で注意していたが、とうとう現れる気配

も無く、展示の時間は終了してしまった。

夕方には、米国ルナー社の招待によるミシシッピー川の舟遊びが用意されていた。500 人以上が乗れそうな大きな外輪船で川を遊んでいく。夕闇の迫るなか、ワイングラスを片手に船縁からぼんやりと岸辺を見ていると、英国人の Dr. Nick に話しかけられた。問われるままに、TPC でのカニクイザルの腰椎骨の計測について話すと、大きな関心を示し帰国後、関係資料を送ることを約束した。

9 月 11 日(日曜日)

「骨粗鬆症—その治療」では、卵巣を除去したラットを実験モデルとして、エストロジェンやその競合阻害剤、抗乳癌剤等あるいは PTH を投与し、その影響を見るような発表がいくつか続いた。「骨芽細胞と骨基質」のセッションにも参加した。このセッションでは、骨形成の分子機序、PTH 受容体や成長因子の mRNA の発現等、どちらかと言うとミクロな研究が中心であった。

例の如く、昼食はハンバーガーである。相変わらずそれを頬張りながら、ポスターを見まわる。ウィスコンシン大学のグループが、仔豚を制限食(50%)と無制限食(100%)とで飼育した場合の骨成長の比較を DEXA を使っておこなっていた。14 日間育てられたところで制限食群では無制限食群にくらべて全身骨量(BMC)で 59%、BMD でも 89%という成長の抑制が認められた、という。成長期の栄養条件の重要性が指摘される。また、屠殺後の実際の骨無機塩量の測定値と BMC との相関性(r)は 0.88 と高度な相関が認められ、DEXA での

測定値の信頼性が確認された。

ウェイク・ホーレスト大学ポーマン・グレイ医学部の Dr. Jerome は、骨密度の最高値 (PeakBone Mass) に達する前の雌カニクイザル (9 歳齢未満) の卵巣を除去し、低 Ca 食を与えるという実験を展示していた。卵巣を除去していない対照群でも、低 Ca 食を与えると腰椎 (L2—L4) の BMC は 4 ヶ月で 2.5% 減少するのに対し、卵巣を除去したものでは 6.8% も減少した。日本人の場合、10 代後半から 20 代にかけての女性で、過激なダイエットの結果と推測される体重成長の抑制が認められる。このような女性の場合、月経周期が正常に回復している場合でも BMD の減少がおこっている可能性が、カニクイザルで示された訳である。そして、そのような女性で、月経周期の不順、停止がともなっている場合、さらに顕著な BMC の減少がおこっていることが考えられる。非常に示唆に富む研究である。

サンアントニオの SFBR のグループが DEXA でヒヒの BMD を測定し、BMD に及ぼす遺伝的影響についてのポスターを展示していた。彼らは 4 歳齢から 29 歳齢のヒヒの腰椎を測定し、BMD 値の加齢変化を調べている。TPC のカニクイザルやミドリザルでの加齢変化のデータを見せると、これらのサルでは測定値の絶対値が小さくて、測るのが大変だろう、ヒヒでは測定値がヒトとほぼ同じだから比較的容易だよ、と同情される。しかし、家系調査がしっかりしている TPC の、出生直後からのデータは、遺伝様式の解析には格好のモデルだ、と非常にうらやましそうにしていた。

9 月 12 日 (月曜日)

今日の午前中は、別に聴きたいものも無いが、とりあえず会場に行こう、とのんびりとホテルを出た。新型の DEXA を展示しているルナー社のブースにでも寄ってみようか、とエスカレータで登る。

ルナー社のブースには、日本での総代理店である日本電子輸入販売の社員の方々も詰めている。副社長の Dr. Hanson に紹介された。日本から持参したカニクイザルでの全身の計測をおこなっているところの写真を取り出し、腰椎 BMD のみならず、全身の計測もおこなっていることを説明する。カニクイザルの全身の計測を始めるにあたって、ブタの肋骨、ラードおよびウシの赤身肉を手に入れて、それらを適当に混ぜて測定した事を伝えると大いに関心を示した。我々の工夫した測定法でおこなうと、実重量と画像解析による推定重量との間にはほとんど差がないこと、混ぜたもののなかに含まれる肋骨の量と測定される骨量とが良く相関すること、さらに、このように測定値の信頼性を確認した上で、実際にカニクイザルを測定したところ、実体重と推定体重とがみごとに一致すること、等々が彼を非常に驚かせたようである。人間の測定でも 60kg の実体重の場合、推定体重との差は 1~2kg 程度もあるそうだ。それが、4kg の実体重のカニクイザルで推定体重との差は数十 g にとどまっている。ルナー社の DEXA で、このような使い方をする日本人がいる、という事に Dr. Hanson はいたく感動したようである。

イタリアのミラノ大学のグループは、子宮

筋腫等が原因で、治療のため人工的に閉経が誘発された婦人の全身の骨量、脂肪量等の測定をおこなっていた。このような研究は、将来、サル類を対象として緻密におこなうべきであろう。また、ブラジルのリオデジャネイロのグループも、糖尿病の患者を対象とし、糖尿病性骨減少症の報告をおこなっていた。まさに、TPC の糖尿病のカニクイザルでおこなうべき研究である。これらの発表の真似をする訳ではないが、人間を対象としてはおこなうことができないような手法を用いて、サル類を動物モデルとして研究を推進する必要がある。

午後は「骨粗鬆症—病理生理学」という訳のわからないテーマのセッションに参加した。このセッションの目玉は、オーストラリアの聖ビンセント病院のグループの骨粗鬆症の原因となる遺伝子、ビタミン D 受容体遺伝子の話題のようである。Nature の今年の号(vol.367, p.284, p.216, 1994)に掲載されているので詳細はそちらに譲るとして、一応話は聴いてみた。

おわりに

カンザスシティーでの大会を終えた後、ウィスコンシン州の州都でマジソンに、ルナー社本社研究所兼工場を訪れた。

ひととりの見学と説明をうけたあと、技術担当副社長の Dr. Barden は小会議室に案内した。ここで、我々の DEXA の使い方を説明する訳である。カニクイザルの測定中の写真のファイルがまた役に立った。腰椎骨の測定よりも、むしろ全身の骨量、軟部組織量およ

び軟部組織に占める脂肪の割合(%脂肪)の測定法と測定結果について重点的に説明した。

Dr. Barden も、我々の工夫によるカニクイザルの実体重と推定体重との高度な相関性に対して感嘆の声をもらした。口の中でしきりに相関係数 $r=0.9999$ とつぶやいていた。

今回のルナー社訪問の目的は、測定値の正確さの報告に行くことではない。せっかくの正確な測定でありながら、ソフトの問題から、この装置をカニクイザルで有効に生かせないことについての苦情を呈することである。現在のソフトでも、全身の測定をおこなった時、画像を見ながら、頭部、左右の手足、体幹部と切り分けてゆき、各部の測定値を知ることができるようになってきている。しかし、このソフトが有効に機能しない。ヒトとサルとの体型の違いが問題点である。特に腰部の解析では、ヒトには無い尻尾が致命的なイタズラをする。尻尾を独立の部位とするようにソフトを改める必要がある。そうっていない為に、我々も、全身の測定値を、単に全身の値としてしか使えない。各部位の切り分けがサルにおいても可能となれば、たとえば内臓での脂肪の蓄積、いわゆるヤセ型の肥満等の解析も可能となるだろう。今後、実験動物の分野への展開を図るつもりであるならば、尻尾の独立は必須のことである。このことをデータを基に Dr. Barden に力説した。Dr. Barden も説得力のある我々のデータを見ながらこのことを納得してくれたようである。これでルナー社を訪れた目的を達した。何時になるかはわからないが、きっと新しいソフトを開発してくれるであろう。

紙面の都合で、訪問先のいくつかは割愛することにした。

17日間にわたってアメリカ中を駆け回った気がする。もっとも、最初の一週間ほどはカンザスシティに滞在し、ASBMRに参加し話を聞くことが主であったので比較的には楽をすることができた。そして、発表を聴いている限り、我々のこれからのサル類を用いての骨と骨代謝の研究は、やりようによっては研究の第一線に互してゆけるという感触を得た。TPCで始めてまだ日の浅い骨に関する研究ではあるが、さらに発展させる必要がある。

〈セミナー報告〉

「予防衛生協会セミナー'95」を終わって

“Seminar '95” by the Corporation for Production and Research of Laboratory Primates (CPRLP)

小林理恵子

去る2月23日(木)、24日(金)の両日「予防衛生協会セミナー'95」を開催いたしました。

予防衛生協会の賛助会員をはじめ筑波霊長類センターでサルの飼育及び取り扱い技術研修を受けた実習生、関係諸機関でサル類を取り扱う技術者の皆さんを対象に、「実験用サル類の理解と現状」をテーマとして企画されたものです。今回は特に、サル類を取り扱ううえでの基礎的な事柄についての講習を中心にいたしました。

定員の50名を越えた申込をいただき、参加いただけなかった方々には心からおわびいた

します。

参加は、技術者52%、獣医師32%、臨床検査技師その他16%でした。また、つくば市あるいは茨城県内からの参加者は14%で、東京の20%を先頭に神奈川県、群馬県、山梨県、静岡県、岐阜県、大阪府、京都府、兵庫県、山口県、熊本県と全国各地からご参加頂きました。

東京からの高速バス到着場所のセンタービルから会場のカシミつくばセンターまでは、予防衛生協会のバスをご利用頂き、定刻通りに開会することができました。

筑波霊長類センター長の吉川泰弘先生から普段では聞けない実験分野にもふれながら、実験用動物としてサルが用いられている現状を具体例をしめして講演していただきました。予防衛生協会理事でもあり、東大名誉教授の山内一也先生の講演は、Bウイルスの感染様式やヒトでの感染事故の実態について、また今話題の「ホットゾーン」やいくつかの本を紹介しながらマールブルグウイルスなど人、サル共通感染ウイルスのうち人に対して危険なウイルスの紹介をしていただきました。

ついで、協会職員の獣医師、小野文子と実験動物1級技術師の成田勇人による「サル類の検疫について」これまでの経験をふまえて報告いたしました。予定の講習を終了して、懇親会を催し、短い時間でしたが交流を深めることができました。

2日目は、国立予防衛生研究所、高阪精夫先生が、「サル類の感染性下痢症」と題して下痢症と関連のあるウイルス、細菌、寄生虫などについて、筑波霊長類センターの経験を

紹介されました。また同研究所の長先生は、外国のサル輸出の歴史と現状について、施設の紹介を兼ねながら、検疫にもふれた講演をされました。そして、午後からは、予防衛生協会が今回はじめて編集制作したビデオ「実験用サル類の取扱い手技—基礎編—」を観て、参加者との意見交換がされました。総合討論は、時間が不足でしたが予防衛生協会への要望、ご批判とも考えられる含蓄ある貴重なご意見を伺う事ができました。

セミナー開催中に参加者にアンケートの協力をお願いしたところ 100%の回収率となりました。ありがとうございました。皆様からの貴重なご意見を次回のセミナー開催に生かすよう努力いたします。別表に集計結果をご報告いたします。

予防衛生協会職員は、初めてのセミナーを主催して予防衛生協会セミナーにたいする関心が予想以上に大きかった事、技術者のなかまが知識を深めたいという要求が大きい事を感じとる事ができたことは次回セミナー準備に一層のはげみとなるものでした。社団法人として自らの社会的責任を自覚し、セミナーを通して皆様と共に学び共に向上できることをめざしてゆきたいと希望をあらたにいたしました。

《実習生メモ》

実習生として得たこと

What I learned at the TPC

藤井裕二

わたくしは、新規抗 HIV 剤 SK034(6-C1-ddG)

の生体レベルでの抗レトロウイルス効果を AIDS 動物実験モデルである SIV 感染アカゲザルを用いて検討することを目的に日本製紙(株)から派遣されました。

SK034 は化学合成と微生物による代謝を利用して、Dideoxyguanosine (ddG)に C1 を導入することにより ddG に脂溶性を付与した物質です。そのため、血液脳関門の透過性が向上し、エイズ患者で高率に発生する脳症への効果が期待される薬剤です。本物質の *in vitro* での抗 HIV 作用は確認されていますが、実験動物レベルでその効果が確認されるかどうかは、今後の薬剤開発の上で重要な問題でした。

まさか、入社間もない私が、このような重大な仕事を任されて、霊長類センターに派遣されることになるとは考えてもみませんでした。思えば、学生時代に実験動物学のサルに関する講義を受けたわけですが、その時には、サルを用いて実験を行う事など一生ないだろうとたかをくくっていたのが嘘のようです。

一昨年(2007)の12月、筑波おろしの吹く当センターにやってきた頃は、国内で唯一大規模な感染動物実験を行える施設で実験できるという期待と、ウイルス、それも HIV に非常に類似した SIV に感染したサルを扱うという不安が入り交じっていました。はたして、サルのような大型動物を使いこなせるか心配でもありました。

しかし、派遣期間がスタートすると、ウイルス実験に対するバイオセーフティーの講義、RI の取扱のための講習、各種ウイルス実験、そしてサルの扱い方、採材のしかた、また、その処理法と多くの事を学び、習得しなけれ

ばなりませんでした。何とか、実験を進めていく基礎的な知識と技術を身につける事ができ、SK034のSIV感染ザルでの効果の検討に入ることができました。皆さんがよくご存じのように、サルのような大型動物を使用する実験は一人でおこなうことはできません。私の場合もグループの皆さんの協力なくしては実験する事はできませんでした。幸い、SK034はエイズ様症状を呈したSIV感染アカゲザルに対して顕著な治療効果を示すことが確認できました。下痢がひどく、急激に体重が減少し、横になりかけていたサルが、元気をとりもどし体重増加する程回復するとは思っていませんでした。

今回の実験を通じて強く感じたことは、グループでの実験を進める上で、グループ内での綿密な打ち合わせ、つまり、何時、何処で、誰が、何を、どのように行うのかはっきりさせておくことがいかに重要であるか、ということです。動物を使うような実験では、一度始めてしまったら途中でやめることはできないわけですし、その機会を逃がすと、それまで積み重ねてきたことがすべて無駄になりかねないからです。私の場合、優れた人達とグループを組むことができ、そのおかげで良い結果も得られたと感じています。

最初はみな同じに見えたサルの顔も、一年二ヵ月を過ごす間に区別がつくようになりました。それと同様に、私も多くの知識と技術を身につけることができました。会社に戻った現在、予研での経験を今後の研究活動に生かしていきたいと考えております。

最後に、本実験を進めるのに大変お世話に

なりました向井先生、国立予防衛生研究所、予防衛生協会の皆様にお礼申し上げます。