

23 . 筑波医学実験用霊長類センター

センター長 寺尾 恵 治

概 要

本年度から文部科学省のナショナル・バイオリソースプロジェクトがスタートしたことを契機として、我が国における霊長類リソースの開発、保存、利用のありかが検討され始めている。大型で知能の発達している実験用サル類は生物系研究資源の中でも特殊な動物であり、その飼育管理には特殊な施設、設備、管理技術に加えて、動物福祉の立場から心理的幸福や環境エンリッチメントへの配慮が要求される。近年、欧米を中心にして動物実験における動物福祉、動物の権利に関する社会的関心が高まり、実験動物の飼育環境の適正化への対応が必要になってきた。米国および EU においては、飼育環境を改善する具体的方法の一つとして飼育スペース（ケージサイズ）の拡大が検討され、それぞれの動物種や実験内容に応じたケージサイズが動物実験指針に盛り込まれた。現在ではこれらの基準が国際標準となりつつある。昭和53年に開設した霊長類センターでは、日常的な健康管理と飼育管理業務に配慮した機能的な飼育ラックおよび飼育ケージを設置したが、カニクイザルの飼育ケージとしては国際標準を下回っていた。数年前から、国際標準に適合するケージの更新を求めて予算要求を繰り返してきたが、今年度の補正予算で繁殖・育成施設およびP3実験施設の飼育ケージの大型化が認められた。現在、新棟建設を含めケージサイズの大型化を目的とした設計が始まっており、平成17年度からは国際標準サイズのケージによる繁殖育成および実験飼育が開始される予定である。ケージの設計に当たっては、カニクイザルの社会性に配慮して集団飼育を可能とする機能を付加した。加えて、補正予算により共同利用施設への functional MRI の設置要求も認められ、平成16年から非侵襲的方法による高次脳機能解析が開始される。

今年度は1：1交配、隔日交配により227頭のカニクイザル新生児を得た。ワクチン検定を含め感染研へ152頭、共同利用施設に49頭の計201頭のカニクイザルを供給した。なお、昨年度から手続きを開始していた韓国・国立霊長類センターへのミドリザルの譲渡契約が最終的に締結され、3月に繁殖育成された30頭の繁殖用ミドリザルが韓国に移送され、韓国・国立霊長類センターでミドリザルの繁殖コロニーが再編成されることとなった。

これまで継続して行ってきた実験用サルの品質管理

(各種モニタリング)およびモデル開発に関する研究は、前者は主として基盤的研究費により、後者は厚生労働科学研究費、文部科学省科学研究費、HS財団などからの競争的研究費の支援を受けて順調に進展した。品質管理においては霊長類センターのコロニーから分離されたサルタイプDレトロウイルス(SRV/D)の全塩基配列が決定され、既知のSRV/Dとは異なるウイルスであることが判明し、筑波SRV/Dの高感度検出法の確立が期待されている。モデル開発ではAIDSを中心とする感染症モデル、肥満・糖尿病などの代謝疾患モデル、老化モデルに加え、共同利用施設利用研究グループと共同で新しい支援技術が確立された。個体レベルから遺伝子レベルまで、階層の異なるサル由来リソースの整備と基盤技術開発を両輪とした総合的な霊長類リソース整備の体制が整いつつある。

人事面では、7月1日付で徳島大学から明里宏文が主任研究官として着任した。10月1日付けで棚林清主任研究官が獣医科学部・第三室長に転出した。

研究業績

・実験用サル類の病原学的研究

1. サルBウイルスに関する研究

(1) 免疫組織染色によるBウイルス(BV)特異的抗原検出法の検討

BVに対するモノクローナル抗体(#19B6および#3E8)を用い、間接蛍光抗体法および免疫組織化学染色でヒト単純ヘルペスウイルス(HSV)と区別して検出できるかBVgB蛋白発現細胞及びHSV感染細胞をモデルにして免疫染色を試みた。両抗体ともいずれの方法でもBVgB発現細胞で明瞭に抗原を検出できたが、HSV感染細胞ではほとんどシグナルは観察されず、病変組織におけるBV特異的抗原検出に利用できる可能性が示唆された。

[棚林清、宇田晶彦、向井録三郎、山田章雄(獣医科学部)]

2. レトロウイルスに関する研究

(1) サルレトロウイルス(SRV/D)感染の検出法に関する研究

筑波霊長類センターで飼育されているサルより SRV/D つくば株を分離し、その全遺伝子配列を決定し、既知の SRV/D とは異なる新しい SRV/D (SRV/D-7 と仮称)であることを明らかにし、特異的検出 PCR 系を開発した。当センターにおける SRV/D -7 の感染経路、陽性率を明らかにするため、SRV/D-7 に特異的プライマーを設計し、SRV/D 臨床分離株 (n=11) の遺伝子解析を行った。その結果、11 分離株全てが SRV/D-7 であったことから、本ウイルスは TPC 内で水平感染により広がっていることが示唆された。

[原 正幸、高野淳一朗*、成田豊子*、菊池俊彦、石川智美、藤本浩二*、寺尾恵治、向井録三郎 (* (社) 予防衛生協会)]

(2) サルエイズ脳炎発症モデルの確立に関する研究

エイズ脳炎で死亡したサル 2 頭の脳組織の培養により、SIV を産生するモノサイト系 S I V 産生細胞株 (BM1, BM5) を樹立し、2 株の産生する S I V bm1 と S I V bm5 の遺伝子と Host range の解析を行った。その結果、SIV bm5 には M 指向性 S I V に特徴的な点突然変異の一部があるが、SIV bm1 にはこの変異が全く無かった。クローン化 SIV bm1 および bm5 は肺胞 M 、アストロサイトに感染増殖したが、SIVmac239 は感染できなかった。現在、M ・神経細胞指向性を担う遺伝子領域を特定しつつある。

[向井録三郎、佐多徹太郎*、菊池俊彦、石川智美、原正幸、小野文子**、中山満 (* 感染病理部, ** (社) 予防衛生協会)]

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

抗 CCR5-CXCR4 キメラ環状ドペカ°プド°単クローン抗体によるエイズウイルスの感染防止作用を MAGIC-5 細胞を用いて調べた結果、本抗体は HIV, SIV, SHIV の細胞への感染をほぼ完全に抑制した。本キメラ環状ド°プド°でサルに免疫および Booster を行った結果、3 頭中抗体の上昇が顕著でなかった 1 頭を含めて全頭の血清が SIV, SHIV の感染をほぼ完全に抑制した。また、1 クール 3 回の免疫で約 6 ヶ月間は抗ウイルス活性が保持されることが明らかとなった。

[向井録三郎、原 正幸、菊池俊彦、石川智美、庄司省三* (* 熊本大薬)]

(4) エイズウイルス Vif タンパク質機能に関する研究

Vif タンパク質は、エイズウイルス複製効率を左右する重要な調節タンパク質である。最近の研究で我々は、Vif が viral genomic RNA 依存性に nucleoprotein complex としてウイルス粒子にパッケージされること、さらにウ

イルスプロテアーゼによりその一部が特異的領域で切断されることを示した。これらのことから Vif はウイルス粒子内で、ウイルス感染性に関わる何らかの機能を有することが推察された。そこで Vif のウイルス粒子内における役割を検討した。その結果、Vif はウイルスプロテアーゼによる Gag 前駆体の第一切断部位を特異的に阻害し、それによって capsid-p2-nucleocapsid からなる Gag 中間体が生成されること、さらにこの中間体は、Vif と共に nucleoprotein complex に局在することが明らかとなった。本研究成果は、Vif によるウイルス感染性制御機構の解明に重要な知見となるとともに、ウイルス成熟過程を阻害する新規抗 HIV 薬の開発に資すると考えられた。

[明里宏文]

(5) 感染における Nef 遺伝子の役割

(内容はエイズ研究センターを参照)

[杉本智恵、森 一泰]

(6) Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果

(内容はエイズ研究センターを参照)

[杉本智恵、森 一泰]

(7) 糖鎖欠失 SIV の新規 attenuated virus としての性質

(内容はエイズ研究センターを参照)

[杉本智恵、森 一泰]

(8) マイクロサテライト多型によるアカゲザル MHC ハプロタイプ解析

(内容はエイズ研究センターを参照)

[杉本智恵、森 一泰]

(9) 共通 MHC ハプロタイプを持つ SIV 感染アカゲザルに誘導されたウイルス特異的 T 細胞 エピトープと感染病態との関係

(内容はエイズ研究センターを参照)

[杉本智恵、森 一泰]

3. 輸入カニクイサルからの赤痢アメーバ (Entamoeba histolytica) の分離

中国から輸入したカニクイザル 1 頭から赤痢アメーバを分離した。昨年度までの糞便塗抹検査で中国、フィリピン、ベトナムから輸入されたカニクイザル 1,968 頭中 283 頭において E. histolytica/ E. dispar のシストを確認した。本年度は塗抹検査でシストが確認された 33 頭について培養と PCR 検査を組み合わせて E. histolytica と E. dispar の判別を行い、1 頭に E. histolytica、30 頭に E. dispar を確認した。サル類の糞便内シストを介した飼育管理者の赤痢アメーバ感染に注意が必要である。

[高野淳一朗*、成田豊子*、藤本浩二*、寺尾恵治 (* (社) 予防衛生協会)]

4. サルタイプ D レトロウイルス (SRV/D) の精製とウエスタンブロット (WB) 用抗原の調整

筑波霊長類センター内のカニクイザルから分離した SRV/D ウイルスを精製して、ELISA および WB 用抗原を調整し検査系を作成した。SRV/D は Raji 細胞で分離後、A549 細胞に感染させ限界希釈法によりクローン化した。感染 A549 細胞の培養上清から超遠心法によりウイルス粒子を精製し、これを ELISA および WB 抗原として調整した。

[高野淳一郎*、成田豊子*、藤本浩二*、寺尾恵治 (* (社) 予防衛生協会)]

5. 抗ブタ膵臓細胞抗体と B ウイルス抗原との交差反応性について

ブタ膵臓細胞を移植したカニクイザルにおいて、移植細胞抗原に対する抗体産生に伴い B ウイルス抗原に対する抗体反応が認められた。この反応は共通抗原性を有する SA8、HSV-1 および宿主細胞の vero 細胞に対しては認められなかった。WB 検査で当該血清は 50kD ~ 60kD にのみ強いバンドを示し、B ウイルス抗体による反応ではないと判断した。ブタ細胞抗原と B ウイルス抗原の交差性については、二次元 WB によりさらに解析を進める。

[成田豊子*、高野淳一郎*、小野文子*、藤本浩二*、寺尾恵治 (* (社) 予防衛生協会)]

・実験用サル類の臨床病理学的研究

1. 2002年度のカニクイザルのへい死例について

今年度の自然へい死例の剖検総数は44頭であった。その死因と頭数は次のとおりである。死産8、肺炎3、敗血症(心臓、腎臓に膿瘍)5、咬傷7(母サルによる1、肺炎を併発1)、肺膿瘍2、哺育不良による餓死衰弱2、事故(ケージにはさまる)による餓死1、糖尿病2、膈壁穿孔による腹膜炎2、子宮内膜症に起因する腹膜炎1、開腹手術後の腹膜炎1、鼓腸症(腸捻転)1、リンパ腫1、黄疸1、出生直後死(生活力薄弱)1、骨軟化症1、不明(腐敗を含む)5。

[榊原一兵、浜野政章*、寺尾恵治 (* (社) 予防衛生協会)]

・実験用サル類の臨床学的研究

1. サル類を用いた末梢血動員幹細胞移植

カニクイザルとアカゲザルを用いて、サイトカイン処理により末梢に動員した造血幹細胞を、1100cGy の放射線全身照射後に自家移植した。移植後、細胞の定着は確認されたが、その後二ヶ月過ぎに6頭中5頭のサルの容態が急激に悪化し、死亡した。細菌、寄生虫感染は確認されず、SVV、SRV、B-virus の抗体は陰性、抗ウイルス剤などの投薬も著効を示さなかった。現在その原因を

解明すべく病理組織学的検索等を検討している。

[揚山直英*、羽成光二*、鴻野あや子*、小川浩美*、小野文子*、寺尾恵治 (* (社) 予防衛生協会)]

2. カニクイザルを用いた SeV/FGF2 ベクター接種実験

FGF2 遺伝子を組み込んだセンダイウイルスベクター (SeV/FGF2) を筋肉内投与したカニクイザルで急性変化を検討した。観察期間を通じて、死亡例は認められず、一般健康状態にも著しい異常は認められなかった。体重、体温、血圧、脈拍、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検の結果、SeV/FGF2 接種に起因すると考えられる重篤な急性毒性を発現しなかったことから、SeV/FGF2 の筋肉内投与における毒性は低いものと判断した。

[小野文子*、羽成光二*、鴻野あや子*、大藤圭子*、小川浩美*、揚山直英*、米満吉和**、吉川泰弘***、寺尾恵治 (* (社) 予防衛生協会、**九大、***東大)]

3. カニクイザルにおける糖尿病治療研究

糖尿病カニクイザルにブタ膵内分泌細胞を内包した人工膵島を腹腔内に移植し、血糖値、インシュリン値を指標として有効性を評価した。一方、ブタ膵内分泌細胞に対する抗体を測定したところ移植した人工膵島の破損が確認された8例中7例で抗体が検出されたが、PERV 感染は認められなかった。抗体が陰性で維持された1例において約半年間血糖値の低下とインシュリン値の上昇が認められ人工膵島が有効に機能したことが確認された。

[小野文子*、羽成光二*、成田勇人*、鴻野あや子*、大藤圭子*、小川浩美*、揚山直英*、大河原久子**、吉川泰弘***、寺尾恵治 (* (社) 予防衛生協会、**東京女子医大、***東大)]

4. カニクイザルを用いたパーキンソン病モデルの作成

カニクイザルを用いて、ドパミンニューロンに対し選択的毒性を示す MPTP の静脈内連続投与によるパーキンソン病モデルの開発を行った。神経症状発現は個体差が著しく、投与閾値を越えた場合には起立不能を呈し死亡する例が見られた。死亡例では肝機能障害が疑われたため、血清中の GOT、GPT 値をモニターし、MPTP の投与量、投与間隔を微調整した。この方法により、安定したパーキンソン症状が持続するモデルの作出が可能となった。

[小野文子*、羽成光二*、成田勇人*、鴻野あや子*、大藤圭子*、小川浩美*、揚山直英*、吉川泰弘**、寺尾恵治 (* (社) 予防衛生協会、**東大)]

・実験用サル類の免疫学的特性に関する研究

1. マルチプレックス PCR-SSP 法によるカニクイザル MHC タイピング

カニクイザルのクラス I 主要組織適合抗原、MHC の

タイピング法の確立を目的とし、塩基配列を決定した。その解析結果をもとに、allele 特異的 primer set を設計した。これら primer set を混合することにより同時に数種類の allele を特異的に検出するマルチプレックス PCR-SSP 系を確立できたので、カニクイザルの MHC タイピングに有効な手段であると考えられる。

[宇田晶彦、棚林 清、向井鎌三郎、山田章雄、寺尾恵治（獣医科学部）]

2. カニクイザル CD34 陽性細胞の長期培養と体外増幅サル骨髄造血幹・前駆細胞の Ex vivo での増幅を目的として 長期培養法の検討をおこなった。カニクイザル骨髄から単離した CD34 陽性細胞をマイトマイシン処理を施したカニクイザル骨髄由来ストローマ細胞をフィーダーとして、hIL3、hFlt-3 存在下で培養した結果、培養 70 日目に CD34 陽性細胞数は約 250 倍に、コロニー形成細胞（造血前駆細胞）は約 230 倍に増加した。この結果より、サル CD34 陽性細胞の体外増幅が可能と判断した。

[柴田宏昭、河野陽子、寺尾恵治]

3. カニクイザル CD34 陽性細胞からリンパ系細胞への分化誘導

カニクイザル造血幹細胞からリンパ系細胞への分化誘導系を検討した。骨髄細胞由来の CD34 陽性細胞を、マイトマイシン処理のカニクイザル骨髄由来ストローマ細胞をフィーダーにし、hIL3、hFlt-3 存在下で培養した結果、培養 7 日目より CD20dull 細胞が発現した。その後、培養 40 日目前後より、CD20dull / IgD 陽性細胞が増加し、成熟 B 細胞と考えられる細胞への分化が示唆された。CD3 陽性細胞（T 細胞）、CD16 陽性細胞（NK 細胞）は検出されなかった。

[柴田宏昭、河野陽子、寺尾恵治]

4. カニクイザルの末梢 CD4/CD8 共陽性（DP）T 細胞レベルに及ぼす遺伝的影響

カニクイザルの DP T 細胞レベルには個体差が存在することから遺伝的要因の関与が考えられた。両親の DP レベルを高レベル群と低レベル群に分けて家系調査を行った結果、両親が高×高、高×低、低×低の組み合わせからそれぞれ 69.2%、33.3%、0%の高レベルの子供が生まれた。また DP T レベルの両親と子供との相関（遺伝率）は 0.54 ± 0.19 であり、カニクイザルでは末梢 DP T 細胞レベルに遺伝的要因が関与する可能性が示唆された。

[李 元雨、柴田宏昭、*吉川泰弘、寺尾恵治（*東大）]

5. カニクイザル末梢 CD4/CD8 共陽性（DP）T 細胞レベル増加時の解析（縦断的調査）

6 歳齢のカニクイザルを DP T 細胞レベルで高中低の 3 群に分け、5 年間縦断的調査を実施した。DP T 細胞が急増した個体では 6 歳齢の時点で休止期成熟記憶 T 細胞の割合が高いことから、免疫系の成熟度が DP T 細胞

レベルに影響することが示唆された。胸腺起源細胞マーカーである TREC のレベルを調べた結果、DP T 細胞が増加したサルで TREC のレベルが低く、胸腺退縮が加齢に伴う DP T 細胞増加要因の一つと考えられた。

[李 元雨、柴田宏昭、*吉川泰弘、寺尾恵治（*東大）]

実験用サル類の内分泌学的研究

1. カニクイザルの消化管組織中のテストステロン様物質の同定

雄カニクイザルの消化管組織中には少なくとも 4 種類のテストステロン様物質が存在することを明らかにしてきた。これらのステロイドを同定すべく、盲腸組織をホモジェナイズし、有機溶媒による抽出、ゲル濾過および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分離・精製をおこなった。それらを試料とし、標準品と比較検討したところ、それらはテストステロン、5 α -ディヒドロテストステロン、アンドロステネダイオンと同定された。最後の一つは未だ同定されていない。

[宮本幸子、山海 直、吉田高志]

2. カニクイザルの消化管組織中のテストステロン変換酵素

雄カニクイザルの組織をホモジェナイズして、マイクロゾーム分画を得た。この分画とテストステロンとをインキュベートし、培養液を高速液体クロマトグラフィ（HPLC）によって分析したところ、テストステロン以外に、少量のアンドロステネダイオンと大量の 5 α -ディヒドロテストステロンとが検出された。このことは消化管もステロイドホルモンの生合成をおこなう場であることを意味している。消化管の未知の機能が考えられる。

[宮本幸子、山海 直、吉田高志]

3. カニクイザルでの肥満指数としてのレプチン/アディポネクチン比の有用性

カニクイザルの健康状態を把握する目的で各種血清生化学値の測定を行っているものの、肥満を的確に把握できる指標は乏しい。また、二波長 X 線密度測定装置（DXA）によって全身の脂肪量の測定はできるものの煩雑である。そこで、肥満指数としてのレプチン/アディポネクチン比（L/A 比）の有用性について検討を加えた。DXA によって全身の軟部組織量に占める脂肪の割合（%Fat）を測定し L/A 比と比較したところ、%Fat が 40% を超える明らかに肥満の個体で L/A 比の顕著な増加を認めた。

[陳 楊、吉川泰弘*、吉田高志（*東大）]

4. 長期人工環境飼育下のカニクイザルでの閉経後の骨量減少

霊長類共同利用施設のエイジングファームの動物を閉経後骨粗鬆症の実験モデルとするために腰椎骨ならびに

全身骨の測定を行なった。2000年5月より約半年の間隔で反復測定を行なった。23歳以上の個体で全身骨量の減少傾向が認められた。しかし腰椎骨では未だそのような傾向は得られていない。今後も観察を継続し自然発症性の閉経後骨粗鬆症の実験モデルとしたい。

[陳 楊、小川浩美*、吉川泰弘**、吉田高志 (* (社) 予防衛生協会、** 東大)]

実験用サル類の生殖生理および発生工学的研究

1. 生殖細胞との共培養を目的としたカニクイザル各種体細胞の株化とその有用性

体細胞は雌雄の成熟カニクイザルおよび胎児より採取し、複数代継代後一部の株において不死化を行った。これまでに卵管、精巣、子宮、卵巣、脳、腎、心、肝、肺、腸管および胎児由来の細胞を分離し株化することに成功した。卵管上皮細胞をフィーダーとしてマウス卵を培養したところ卵の発生に良好な影響を及ぼしていることが確認された。またセルトリ細胞をフィーダーとしてカニクイザルの円形精子細胞を培養したところ、長期の培養が可能となり一部の円形精子細胞で形態変化を示すものを認めた。

[広瀬良宏、岡田浩典、山海 直]

2. 不死化カニクイザル卵管上皮細胞株の樹立およびその特性の解析

卵の発育培養において卵管上皮細胞との共培養が良好な影響を与えることが知られている。しかしながらカニクイザルの場合採取できる細胞の量に限界がある。そこでカニクイザル卵管上皮細胞の不死化を試みた。不死化した卵管上皮細胞株について卵に影響を及ぼすことが知られている数種のグロースファクター遺伝子の発現を検索した。またマウス卵を用いて実際に卵の共培養をおこない、その有効性について検索した。その結果、複数のグロースファクターの発現が認められ、実際に卵を培養した場合にも有効な作用が認められた。

[岡田浩典、広瀬良宏、山海 直]

3. Buffalo Rat Liver (BRL) 細胞培養上清中に認められるタンパクの LC-MS/MS 分析

BRL 細胞の培養上清中にカニクイザルおよびマウス卵の生存性を改善する因子が 35-50kDa の範囲に含まれていることを明らかにした。そこで LC-MS/MS 分析を試み 7 種のタンパクを同定した。そのうち follistatin-related protein と pigment epithelium-derived factor について、卵発生に対して作用することが知られている。この 2 種を含む 7 種のタンパクのいずれかが卵発生に影響を及ぼしているものと考えられた。

[岡田浩典、広瀬良宏、吉田高志、山海 直]

4. カニクイザルの体細胞核の異種動物卵の除核卵細胞質内への注入

我々はカニクイザルの胚盤胞を少しでも多く得るための方法を模索している。今回、除核した異種動物の卵細胞質にカニクイザルの体細胞核を注入しその発生について観察した。その結果、低率ではあるが胚盤胞を得ることができた。今後、ミトコンドリア DNA の動態などを検索する予定。また、得られた胚盤胞から ES 細胞の樹立を試み、ES 様細胞をえることに成功したがその株は分化してしまった。

[山海 直、広瀬良宏、岡田浩典、越後貫成美*、井上貴美子*、三木洋美*、小倉淳郎* (* 理研)]

5. ウサギ胚性幹細胞 (ES 細胞) の樹立および分化能の検討

サル類の ES 細胞樹立技術の確立を目指し、まずはウサギ卵を用いて技術確立を試みた。自然交配により得られたウサギ卵から ES 様細胞を分離した。ES 様細胞を分離するにあたり、透明体を除去した卵をフィーダー細胞上で培養し ES 様細胞の分離を試みた。得られたコロニーの形態は扁平であり、アルカリフォスファターゼ活性は陽性であった。また分化用培地で培養したところ細胞塊の形態が球状に変化するものが観察された。この球状の細胞塊は複数の層からなり三胚葉に分化している可能性が示唆された。さらに培養を続けることで嚢胞状に変化して胚様体を形成した。

[広瀬良宏、岡田浩典、越後貫成美*、井上貴美子*、三木洋美*、小倉淳郎*、山海 直 (* 理研)]

6. ウサギ体細胞核由来胚性幹細胞の樹立

サル類への応用を将来的な目的とし、ウサギ体細胞核由来胚性幹細胞の樹立を試みた。ウサギ卵丘細胞の体細胞核移植により得られた卵を用いて ES 様細胞を分離することができた。これらの株は形態上では自然交配により得られたウサギ ES 様細胞と差異はなかった。また 9 代継代後も 71% の細胞でウサギの正常染色体数である $2n=44$ を維持していた。さらに ES 細胞の未分化性を示すマーカーである SSEA 染色においては SSEA-1 と 3 において陽性であることが確認された。今後、これらの細胞株を用いてウサギの体細胞核由来の ES 様細胞の特性について明らかにしたい。

[広瀬良宏、岡田浩典、越後貫成美*、井上貴美子*、三木洋美*、小倉淳郎*、山海 直 (* 理研)]

7. 強磁場環境が精子の運動性および先体反応に及ぼす影響

サル類を含む哺乳動物の生殖細胞に及ぼす強磁場の影響について継続して検討して

いる。Lysophosphatidyl-choline (LC) を培養液に添加して先体反応時間を短縮することで昨年度実施した実験条件の改善を試みた。また、精子は急激な温度変化により運動能が著しく障害され不動化精子が多く観察されるこ

とが知られている。そのことを応用して低温障害処理した精子に強磁場を暴露した場合に致死的な効果が増大されるか否かについても検討を加えた。実験にはモルモット精子を用いた。その結果、10Tesla の磁場環境への15分間の暴露では顕著な影響は認められなかった。

[山海 直、岡田浩典、広瀬良宏、岡田詔子*(*東邦大)]

8. 多数の卵を収集するための Zona-float 法の開発

近年、数百個の卵をサンプルとして分子生物学的解析を行うことが増えきた。しかしながら手作業による卵の単離・収集では、数千単位の卵を収集することは困難である。また、作業にかかる時間が長くなることにより卵細胞自体に多大なダメージを与えてしまうという問題が生じる。そこで、卵特有の物理的な性質について検索し、透明帯の比重が他の細胞成分に比べて非常に小さいことを明らかにした。この性質を利用し、Percoll を用いて卵を他の細胞からの単離・収集を試み、同時に多数の卵の収集することに成功した。今回はマウス卵を用いて検討したが、今後サル類の卵でも応用できる技術であると考えている。

[岡田浩典、広瀬良宏、山海 直]

. 実験用サル類の飼育・繁殖・育成技術の開発と改良

1. カニクイザルの繁殖成績

(1) 3日間1対1同居交配による繁殖成績

繁殖用雄23頭と雌299頭を用いて延べ728回の3日間1対1同居交配を実施した。妊娠診断は前年度に交配を行ったものも含め、延べ721頭についておこない、128頭の妊娠例(17.7%)を得た。出生仔の内訳はF2が44頭、F3が66頭、F4が2頭、F5が2頭、F6が1頭の合計115頭であった。そのうち死産は4例、流産は7例であった。

[前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、小川浩美*、高野一郎、吉田高志(*社)予防衛生協会]

(2) 隔日1対1交配方式による繁殖成績

繁殖用雄61頭と雌289頭で延べ374回の交配を実施した。妊娠診断は前年度から引き続き交配を行っていたものも含め、延べ388頭についておこない128頭の妊娠例(32.9%)を得た。出生仔の内訳はF2が20頭、F3が96頭、F4が5頭、F5が1頭の合計122頭であった。そのうち死産は13例、流産は7例であった。

[前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、小川浩美*、高野一郎、吉田高志(*社)予防衛生協会]

(3) 長期同居交配方式による繁殖成績

繁殖候補雄1頭雌1頭で長期間同居により妊娠1例を得たが死産であった。

[前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、小川浩美*、高野

一郎、吉田高志(*社)予防衛生協会]

(4) カニクイザルの人工哺育

本年度中に正常出産した227頭のうち72頭(31.7%)は母ザルが哺育不良のため人工哺育を実施した。人工哺育した72頭のうち10頭が死亡した。死因別頭数は、肺炎3頭、衰弱3頭、肺血症1頭、肺膿症1頭、肺疾患1頭、咬傷1頭であった。

[前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、小川浩美*、高野一郎、吉田高志(*社)予防衛生協会]

. 実験用サル類の自然発症疾患

1. カニクイザルにおける心機能疾患の調査

カニクイザル繁殖コロニーの個体の心機能疾患に関する調査を実施した。約700頭のカニクイザルの中で、雑音の聴取された26頭を超音波診断、レントゲン撮影、心電図検査により確定診断を試みた。その結果、9頭の個体で心室中隔欠損、三尖弁閉鎖不全などの心機能異常が認められた。いずれの個体も血算値、心房性ナトリウム利尿ペプチドなどの生化学値などに異常は認められなかった。今後、遺伝的調査、縦断的調査を継続して行いカニクイザル繁殖コロニーにおける心機能疾患の現状を明らかにしたい。

[揚山直英*、鯉江 洋**、小野文子*、山海 直(*社)予防衛生協会、**日大]

2. アフリカミドリザルにおける心機能疾患の調査

アフリカミドリザルにおいて超音波診断、レントゲン撮影、心電図検査を実施して心機能疾患の調査を行った。現在まで22頭の調査を行い、レントゲン所見、超音波診断で心室の拡大が認められた拡張型心筋症の疑い症例が4例、肥大型心筋症が一例確認された。また、心電図検査により不整脈個体が2例認められた。不整脈個体については、ホルター心電計による鑑別診断を行うことを現在検討している。また、その他の疾患に関しては家系調査、遺伝的解析や心臓カテーテル造影などによる精査を実施していきたい。

[揚山直英*、鯉江 洋**、小野文子*、山海 直(*社)予防衛生協会、**日大]

発表業績一覧

. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Mumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S, : A novel cyclic peptide vaccine for defense against HIV/AIDS progression. J. Biol.

Chem. In press.

- 2) Khan MA, Akari H, Kao S, Aberham C, Davis D, Buckler-White A, Strebel K : Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease and its possible correlation with Vif function. J Virol. 76, 9112-9123, 2002.
- 3) Kao S, Akari H, Khan MA, Dettenhofer M, Yu X-F, Strebel K : Human immunodeficiency virus type 1 Vif is efficiently packaged into virions during productive but not chronic infection. J Virol. 77. 1131-1140, 2003.
- 4) Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K. nef gene is required for robust productive infection by simian immunodeficiency virus of T-cell-rich paracortex in lymph nodes. J Virol. 77:4169-80, 2003.
- 5) Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Hirata M, Hirai M, Terao K, Suzuki Y, Sugano S and Hashimoto K. : Prediction of unidentified human genes on the basis of sequence similarity to novel cDNAs from cynomolgus monkey brain. Genome Biology, 2002;3(1): RESEARCH 0006.1-0006.5.
- 6) Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F., Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume A., Matsumura M., Nagatsu I, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I and Ozawa K. : Behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associate viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. Human Gene Therapy, 13: 345-354.
- 7) Shimada MK, Terao K and Shotake T. : Mitochondrial sequence diversity within a subspecies of savanna monkeys (*Cercopithecus aethiops*) is similar to that between subspecies. Journal of Heredity, 93: 9-18.
- 8) Lee WW, Nam KH, Terao K, and Yoshikawa Y. : Age related telomere length dynamics in healthy cynomolgus monkey's PBMC measured by Flow FISH. Immunology, 105: 458-465.
- 9) Kano M, Matano T, Kato A, Nakamura H, Takeda A, Suzuki Y, Ami T, Terao K, and Nagai Y. : Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques. Journal of General Virology, 83: 1377-1386.
- 10) Hanazono Y, Nagashima T, Asano T, Shibata H, Ageyama N, Ueda Y, Dunbar CE, Kume A, Terao K, Hasegawa M. and Ozawa K. : In vitro selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. Gene Therapy, 9:1055-1064.
- 11) Hanazono Y, Terao K, Shibata H, Nagashima T, Ageyama N, Asano T, Ueda Y, Kato I, Kume A, Hasegawa M. and Ozawa K. : Introduction of the GFP gene into hematopoietic stem cells in primate results in prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow progenitors and peripheral blood cells. Journal of Gene Medicine, 4: 470-477.
- 12) Terao K, Suzuki J and Ohkura S. : Circadian rhythm in circulating CD16-positive natural killer (NK) cells in macaque monkeys. Implication of plasma cortisol levels. Primates, 43(4): 329-338.
- 13) Asada Y, Kawamoto Y, Shotake S and Terao K. : Molecular evolution of IgG subclass is different from that of IgG in non-human primates, implication of antigenic determinant among apes-. Primates, 43(4): 343-349. 14) Inoue-Murayama M, Adachi S, Mishima N, Mitani H, Takenaka O, Terao K, Hayasaka I and Murayama Y. : Variation of variable number of tandem repeat sequences in the 3'-untranslated region of primate dopamine transporter genes that affects reporter gene expression. Neuroscience Letter, 334(3):206-210.
- 15) Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Hirai M, Terao K, Sugano S and Hashimoto K. : Cynomolgus monkey testicular cDNA library for discovery of novel human cDNAs in the human genome sequence. BMC Genomics, 2002 3: 36-47.
- 16) Suzuki J, Ohkura K and Terao K. Baseline and stress levels of cortisol in conscious and unrestrained Japanese macaques (*Macacca fuscata*). J Med Primatol., 2002 31: 340-344.
- 17) Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ohto K, Ono F, Nagashima T, Ueda Y, Donahue R.E, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y and Terao K. : Safe and Efficient Methods of Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Biomedical Research in Cynomolgus Monkeys. Comp Med. 2002 Oct;52(5):445-51.
- 18) Ageyama N, Kimikawa M, Eguchi K, Ono F, Shibata H, Yoshikawa Y and Terao K. : Modification of the Leukapheresis Procedure for Use in Rhesus Monkeys (*Macaca mulata*) J. Clin. Apheresis, 18(1):26-31, 2003.
- 19) Chen, Y., Ogawa, H. Narita, H., Ohtoh, K., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y.: Ratio of leptin to adiponectin as an obesity index of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Exp. Anim. (in press)
- 20) Kawasaki K, Mitsui Y, Ono T, Ogawa H, Takano I, Sankai T, Terao K. : Simple method for assaying serum oxytocin and changes of serum oxytocin level during parturition in cynomolgus monkeys. Exp. Anim. 51, 181-185, 2002
- 21) Ogonuki N, Tsuchiya H, Hirose Y, Okada H, Ogura A, Sankai T. : Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) Human Reproduction (in press)
- 22) Okada H, Hirose Y, Ito M, Sankai T. : Aspiration method to collect epithelial cells from mouse, rat, and monkey oviducts Comparative Topics in Laboratory Animal Science (in press)

23) Tsuchida J, Kawasaki K, Sankai T, Kubo N, Terao K, Koyama T, Makino J, Yoshikawa Y. : Newtype of puzzle-task finger maze learning in *Macaca fascicularis* Int. J. Primatol. (in press)

2 . 和文発表

なし

. 学会発表

1 . 国際学会

- 1) Akari H, Bour S, Kao S, Strebel K: The HIV-1 Vpu induces apoptosis by suppressing the NF-kB-dependent expression of anti-apoptotic factors. Keystone Symposia, Colorado, USA. April 5-11, 2002.
- 2) Khan MA, Kao S, Akari H, Davis D, Buckler-White A, Strebel K: Intravirion processing of the HIV-1 Vif protein by the viral protease. Keystone Symposia. Colorado, USA. April 5-11, 2002.
- 3) Akari H, Kao S, Khan MA, Strebel K: Regulation of viral infectivity by HIV-1 Vif: more is not always better. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 21-26, 2002.
- 4) Kao S, Akari H, Khan MA, Strebel K: HIV-1 Vif is efficiently packaged into virions during acute but not chronic infection of H9 cells. ColdSpring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 21-26, 2002.
- 5) Khan MA, Akari H, Kao S, Davis D, Strebel K: Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease: implications for viral infectivity. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 21-26, 2002.
- 6) Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Komatsu N, Terao K, Ozawa K. and Hasegawa M : . In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells with a novel selective amplifier gene consisting of the erythropoietin receptor and MPL genes The 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, USA June 5-9, 2002,
- 7) Yonemitsu Y, Terao K, Ono F, Kuwahara T, Iida A, Hara H, Iwasaki H, Hasegawa M and Sueishi K. : Preclinical safety study for intramuscular administration of F-defective, non-transmissible recombinant sendai virus vector using non-human primate: Toward a clinical study for 'integrated' therapeutic angiogenesis to treat subjects with critical limb ischemia. The 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, USA June 5-9, 2002,
- 8) Fujimoto K, Takano J, Narita T and Mukai R. : Detection of B virus infection in macaque monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen. The 19th

Congress of the International Primatological Society, August, 2002, Beijing, China.

- 9) Ozawa K, Hanazono Y, Kume A, Nagashima T, Ueda Y, Terao K and Hasegawa M. : SAGs (Selective Amplifier Genes) for in vivo expansion of transduced cells in hematopoietic stem cell gene therapy. 3rd Stem cell gene therapy conference, Rockville MD, USA, March 21-23, 2002
- 10) Hida M, Sakate R, Hashimoto K, Suzuki Y, Hirai M, Terao K, Gojyobori T and Sugano S. : Comparative analysis of 5'-regions of human and cynomolgus monkey mRNA using oligo-capped cDNA libraries. HGM 2002:HUGO Seventh International Human Genome Meeting, Shanghai, China, April 14-17, 2002

2 . 国内学会

- 1) 原 正幸、菊池俊彦、高野淳一朗、成田豊子、藤本浩二、棚林 清、馬場 忠、向井録三郎 カニクイザルコロナー SRV / D の同定とその検出系の確立 第 49 回日本実験動物学会 (名古屋) 2002 年 5 月
- 2) 棚林 清、宇田晶彦、向井録三郎、山田章雄 免疫組織染色による B ウイルス特異的抗原検出法の検討 第 134 回日本獣医学会 (岐阜) 2002 年 9 月
- 3) 宇田晶彦、棚林 清、向井録三郎、南 基煥、山田章雄 カニクイザルにおける CD3 分子のポリモルフィズムの解析 第 131 回日本獣医学会 (岐阜) 2002 年 9 月
- 4) 明里宏文、足立昭夫 HIV-1 Vif 蛋白はウイルス粒子内においてプロテアーゼによる Gag 前駆体の p2-NC プロセッシングを特異的に阻害する 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (札幌) 2002 年 10 月
- 5) 明里宏文、足立昭夫、Klaus Strebel: HIV-1 Vif 蛋白質に関する機能解析. 第 16 回日本エイズ学会学術集会・シンポジウム 5 「HIV 形態形成に関する基礎研究の進歩」(名古屋) 2002 年 11 月
- 6) 中山大介、向井録三郎、石川智美、橋 囃臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、三隅将吾、庄司省三 : Chemokine receptor CCR5-CXCR4 chimera 抗原に基づいた conformation specific 単クローン抗体の免疫学的諸性質の検討 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会 (名古屋) 2002 年 11 月
- 7) 遠藤昌史、三隅将吾、向井録三郎、石川智美、橋 囄臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、庄司省三 CXCR4 の特異的構造を基礎にした HIV-1 X4 ウイルスの感染防御法の検討 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会 (名古屋) 2002 年 11 月
- 8) 飯干高明、三隅将吾、高宗暢暁、向井録三郎、石川智美、橋 囄臣、梅田 衛、本田徹朗、庄司省三 HIV-1 coreceptor 由来環状 dodecapeptide(cDDR5)のウイルス感染防止免疫抗原としての検討 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会 (名古屋) 2002 年 11 月
- 9) 菊池俊彦、石川智美、宮崎 均、佐多徹太郎、向井

鎌三郎：Cloning and Analysis of Neurotropic SIV。第25回日本分子生物学会（横浜）2002年

10)小澤敬也、村松慎一、王立軍、池口邦彦、藤本健一、岡田尚巳、水上浩明、寺尾恵治、中野今治 AAV ベクターを用いたパーキンソン病の遺伝子治療、シンポジウム「中枢神経系再生のストラテジー」第45回日本神経化学学会大会、7月17日・19日、2002、札幌学（内208）

11) Nagashima,T., Ueda,Y., Hanazono,Y., Shibata,H., Ageyama,N., Komatsu,N., Terao,K., Ozawa,K and Hasegawa,M. : Second generation selective amplification genes for efficient in vivo expansion of gene modified hematopoietic cells. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18 - 20, 2002, Tokyo.

12) Takatoku,M., Hanazono,Y., Nagashima,T., Shibata,H., Ageyama,N., Ueda,Y., Kume,A., Dunbar,CE., Terao,K., Hasegawa,M. and Ozawa,K. : Clonal Insertion analysis of gene-modified hematopoietic cells after hematopoietic reconstitution with retrovirally-transduced CD34+ cells in nonhuman primates. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18 - 20, 2002, Tokyo.

13) Yonemitsu,Y., Terao,K., Ono,F., Kawahara,T., Iida,A., Hara,H., Iwasaki,H., Hasegawa,M. and Sueishi,K. : A preclinical safety study for intramuscular administration of F-defective, non-transmissible recombinant Sendai virus vector using non-human primates. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18 - 20, 2002, Tokyo.

14) 柴田宏昭、棚林 清、揚山直英、吉川泰弘、寺尾恵治 カニクイザル骨髄中の造血幹・前駆細胞の同定 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月19-21日

15) 川崎勝義、小山高正、山海 直、寺尾恵治、吉川泰弘 老齢ザルの非修正法による迷路学習 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月19-21日

16) 李 元雨、寺尾恵治、吉川泰弘 カニクイザルの末梢 CD4/CD8 共陽性（DP）T 細胞と腸管上皮 DPT 細胞との性状比較 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月19-21日

17) 寺尾恵治、李 元雨、柴田宏昭、南 基煥 老齢カニクイザル NK 細胞の表現型と機能 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月19-21日

18) 成田純子、鳥居隆三、寺尾恵治、櫻川宣男 カニクイザル羊膜細胞の核移植による胚の発生 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月19-21日

19) 成田勇人、小野文子、鴻野あや子、羽成光二、揚山直英、大藤圭子、村松慎一、池口邦彦、藤本健一、中野今治、寺尾恵治 カニクイザルを用いたパーキンソン病モデルの作出 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月19-21日

20) 揚山直英、花園 豊、小野文子、柴田宏昭、長島建之、上田泰次、長谷川護、小澤敬也、吉川泰弘、寺尾恵

治 カニクイザル造血幹細胞の自家移植法の確立 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月19-21日

21) 揚山直英、花園 豊、上田享司、柴田宏昭、上田泰次、長谷川護、小野文子、小澤敬也、寺尾恵治；カニクイザルにおいてヒトタンパク質に対する抗体産生を抑制する方法。2003/5/29-31 第50回日本実験動物学会総会（埼玉）

22) 川崎勝義、中島宙美、関田清司、小山高正、寺尾恵治、山海 直、吉川泰弘 コカイン自己投与カニクイザルの線条体ドーパミン・マイクログリアリシス 日本神経精神薬理学会（前橋）2002年10月17日-18日

23) 陳 楊、小野文子、吉田高志、吉川泰弘 カニクイザルにおける血中レプチン濃度と年齢、体重および性別の関係 第49回日本実験動物学会総会（名古屋）2002年5月

24) 陳 楊、成田勇人、小野文子、吉田高志、吉川泰弘 カニクイザルでの脂肪細胞由来サイトカインと肥満との関係 第18回日本霊長類学会大会（東京）2002年7月

25) 宮本幸子、山海 直、町田武生、吉田高志 雌雄ニクイザルの糞便中テストステロン様物質の検出 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月19-21日

26) 吉田高志 糞便中の性ステロイドホルモンの簡易測定法とその応用 第18回日本霊長類学会大会シンポジウム（霊長類の生殖生物学：ラボからフィールドまで）（東京）2002年7月19-21日

27) 吉田高志 サル類の骨代謝と生理 第6回サル類の疾病ワークショップ（骨疾患を中心として（筑波）2003年2月

28) 山海 直 サル類の発生工学？基盤技術の開発を目指して シンポジウム「霊長類の生殖生物学：ラボからフィールドまで」 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月19-21日

29) 広瀬良宏、岡田浩典、井上貴美子、越後貴成美、三木洋美、小倉淳郎、山海 直 ウサギの受精卵および体細胞の核移植由来胚からの ES 細胞樹立の試み フォーラム「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」（佐賀）2003年3月

30) 山海 直、広瀬良宏、岡田浩典、土屋英明、越後貴成美、岡田詔子 サル類精子の特性と凍結保存 第5回 SSRE (The Society for the Study of Reproduction Engineering) シンポジウム（東京）2003年3月

31) 岡田浩典、広瀬良宏、喜多 清、吉田高志、伊藤雅夫、山海 直 Buffalo Rat Liver 細胞との共培養がマウス卵の発育に及ぼす影響 第49回日本実験動物学会（名古屋）2002年5月

32) 広瀬良宏、岡田浩典、喜多 清、伊藤雅夫、山海 直 カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養におけるアポトーシスインヒビターの影響 第49回日本実験動物学会（名古屋）2002年5月

33) 岡田浩典、広瀬良宏、吉田高志、伊藤雅夫、山海 直 Buffalo Rat Liver 細胞の培養上清がマウス卵の発育に及ぼす影響 第43回日本哺乳動物卵子学会（和歌山）

筑波医学実験用霊長類センター

2002年5月

34) 広瀬良宏、李元雨、吉川泰弘、岡田浩典、山海直 カニクイザル精細胞のアポトーシスの検索および体外成熟培養におけるアポトーシスインヒビター添加の影響 第18回日本霊長類学会(東京)2002年7月19-21日

35) 岡田浩典、広瀬良宏、Manonmani Periyasamy、吉田高志、伊藤雅夫、山海直 受精卵の発育培養における各種フィーダー細胞の影響 第18回日本霊長類学会(東京)2002年7月19-21日

36) 土屋英明、松田佳子、喜多清、岡田浩典、広瀬良宏、桑名貴、山海直 サル類始原生殖細胞に関する体外操作基盤技術 第18回日本霊長類学会(東京)2002

年7月19-21日

37) 松田佳子、土屋英明、山海直、桑名貴 カニクイザル始原生殖細胞の検出と培養の試み 第18回日本霊長類学会(東京)2002年7月19-21日

38) 越後貫成美、小倉淳郎、広瀬良宏、岡田浩典、山海直 カニクイザル円形精子細胞が有する卵子活性化能の個体差の解析 第18回日本霊長類学会(東京)2002年7月19-21日

39) 鯉江洋、揚山直英、酒井健夫、金山喜一、山海直 カニクイザルにおける筋性部心室中隔欠損症が疑われた1例 第135回日本獣医学会(東京)2003年3月