

平成10年度 厚生科学研究費補助金

厚生科学特別研究事業

新しい日米科学技術に関する研究（実験動物(霊長類)科学)

研究報告書

班長 山田章雄

国立感染症研究所  
筑波医学実験用霊長類センター

# 厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業） 総括研究報告書

新しい日米科学技術に関する研究（実験動物(霊長類) 科学)

主任研究者 山田章雄 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター センター長

**研究要旨** 本研究では、最新の霊長類を用いた医学研究のニーズに対応するために、第一に、筑波霊長類センターで繁殖育成されているカニクイザルの微生物学的浄化、特に、SRV/D、レトロウイルスの除去を行うことを目的として、昨年度に当センター繁殖・育成コロニーから分離された、SRV/Dつくば分離株（2株）の遺伝子解析、血清学的解析をカリフォルニア霊長類研究センターとの共同研究を行った。第二には、サル類を用いた遺伝子治療評価系の確立を目的として、日米共同でカニクイザルの骨髓幹細胞の精製と濃縮技術の開発、骨髓幹細胞移植技術の開発、カニクイザルのゲノム解析と遺伝子治療研究基盤の高度化に関わる共同研究を行ったのでその結果を報告する。

## 分担研究者

向井隼三郎・国立感染症研究所・筑波医学実験用  
霊長類センター主任研究官  
寺尾恵治・国立感染症研究所・筑波医学実験用  
霊長類センター、繁殖育成室長

## A. 研究目的

### 1) カニクイザルの微生物学的浄化

アジア産マカク属サル類には、バイオセーフティレベル4に分類されるBウイルスのほか、ヒトT細胞白血病ウイルスに近縁のSTLV-Iやサル類特有のSRV/Dなどのレトロウイルスに自然感染している。Bウイルスに関しては、昭和53年の筑波霊長類センター開所以来、早期母仔分離と抗Bウイルス抗体の定期的検査により、育成されたワクチン国家検定用のサルからBウイルスを除去することに成功し、平成8年には、繁殖用親サルのうちのB抗体陽性個体を除外した結果、Bウイルスに関しSPF化に成功した。昨年度からは、アジア産マカク属サル類に自然感染しているレトロウイルスのうち、特に、SRV/D (Simian retrovirus/D)に注目し、本ウイルスの感染に対する診断法を検討し、本ウイルスを育成サルから、除去することを最終目的に研究を開始した。昨年度は本ウイルス抗体検査法を開発し、当センターサルコロニーの本ウイルスによる浸淫度を把握したところ、約6割のサルが本ウイルスの感染を受けていることが明らかになり、その過程でSRV/Dつくば株（2株）を分離した。本年度はSRV/Dつくば株のウイルス遺伝子の解析と血清学的解析をカリフォルニア霊長類研究センターとの

共同で行い、つくばウイルス株の型同定を行い、ウイルスの除去に役立てる、B) オクラホマ州立大学獣医学部感染症部門で作成されつつあるSPFサルコロニーの診断法に関する検討と情報交換を行う、C) 南テキサス医療センターウイルスリファレンス研究所において、最新のサル血清診断法の検討と情報交換を行うことを目的とした。

### 2) サル類を用いた遺伝子治療評価系の確立

次世代の新規治療法として遺伝子治療の有用性が期待されているが、治療に用いる遺伝子がヒト由来であることから、生体内での安定性、安全性、有効性については霊長類を用いた前臨床試験が不可欠である。そのため、本年度は、米国と共同研究をおこない、Seattle市、Fred Hutchinson Cancer Research CenterのBernstein教授と共同でCD34陽性骨髓幹細胞を精製・濃縮するヒトのモノクローナル抗体を選別、米国NIH、国立心肺・血液研究所と共同でカニクイザルを用いた骨髓移植実験技術を確認し、アトランタ市ヤーキス地区霊長類研究センターと共同で、カニクイザルの主要脳部位のcDNAライブラリーを作製することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) カニクイザルの微生物学的浄化

#### ウエスタンブロット法による抗SRV/Dつくば株抗体の検出

昨年度はSRV-1株を用い、ウエスタンブロット法を行ったが、本年度は、カリフォルニア霊長類研究センターLerche博士との共同実験を行い、SRV-1、SRV-2、SRV-5の標準株3株の蔗糖段階密度勾配ウイルス粒子画分抗原および、10～2

0%アクリルアミドゲルを用い、H. Towbin の原著に従って行った。また、被検血清は、100倍希釈して用いた。判定はSRV特異的タンパクバンドが1本では疑陽性とし、2本検出された場合に陽性とした。

#### PCR法によるSRV/Dつくば株遺伝子の検出

2x10<sup>5</sup>個の末梢血単核球由来のDNAを用い、SRV-1、SRV-2、SRV-3のgag領域の274bpを1回目のPCRで増幅し、2回目のnested PCRで234bpのgagDNA断片を増幅する、細胞培養をしない直接PCR法(Lab. Anim. Sci. 47: 263, 1977)をカリフォルニア霊長類研究センターLerche博士と共同で行った。

#### SPFコロニーサルの診断法

オクラホマ州立大学獣医学部感染症部門で作成されつつあるSPFサルコロニーの診断法に関する検討と情報交換、南テキサス医療センターウイルスリファレンス研究所では、最新のサル血清診断法の検討と情報交換を行った結果を基に、筑波霊長類センターにおけるSPF診断法を再検討した。

#### SRV/Dフリーコロニーの構築案

今年度のSPFコロニーサルの診断法に関する日米科学技術検討と情報交換に基づいて、筑波霊長類センターでのSRV/Dフリーコロニーの構築案を改定した。

#### 2) サル類を用いた遺伝子治療評価系の確立

カニクイザルのCD34陽性骨髄幹細胞を識別するヒトモノクローナル抗体の選別：現在判明しているカニクイザルのCD34と交叉反応性を示すヒトモノクローナル抗体はワシントン大のBernstein教授が開発したClone 12.8抗体、オスロ大のGaudernack教授が開発したClone 563抗体、米国Systemix社が開発したK6.1抗体の3種類のモノクローナル抗体が知られている。しかしながら、これら3種類の抗体のいずれも米国における特許裁判の影響を受けて現在では入手が不可能となっている。そこで今回、入手可能なヒトCD34抗体をスクリーニングして、カニクイザルのCD34と交叉する抗体の選別を行った。骨髄穿刺およびアフレーシスのそれぞれの方法で採取した細胞を溶血処理して得た単核細胞を、ヒトCD34抗体結合磁気ビーズと反応させ、磁気分離装置によりCD34陽性細胞を単離した。単離したCD34陽性細胞を定法によりメチルセルロースを用いたコロニーアッセイ培養に供し、培養14日目に出現したコロニー数を計測した。

#### カニクイザルを用いた骨髄移植法の開発

3~5歳齢の育成カニクイザルを用いて2種類の骨髄採取法を検討した。一つは骨髄穿刺法で他の一つはサイトカインで末梢に幹細胞を動員するアフレーシス法である。骨髄穿刺法は麻酔下のサルの寛骨から直接穿刺法で50mlの骨髄を採取した。アフレーシス法は100mg/KgのヒトリコンビナントG-CSFを5日間連続で投与した後に、アフレーシス装置で末梢血単核細胞を回収した。致死量のX線を照射したカニクイザルへの骨髄移植実験は、全骨髄細胞移植、CD34陽性骨髄幹細胞移植に分けて方法の確立を行った。3歳齢の育成カニクイザルから50mlの骨髄を採取した後、致死量のX線(500Rx2回)を照射した。X線照射後直ちに全骨髄細胞またはCD34陽性細胞を静脈内に移植し、移植後の骨髄抑制状態とその回復過程を血球数および血小板数の変化でモニターした。なお、移植後3週間にわたる集中治療管理技術の確立もあわせておこなった。

#### カニクイザル脳のcDNAライブラリーの作製

ヒトでは完全長RNAの抽出が不可能な臓器として中枢神経系をとりあげ、カニクイザル脳の主要13部位(前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、扁桃核、海馬、海馬傍回、視床、中脳(黒質)、小脳、視床下部、下垂体、延髄)の新鮮材料からのcDNAライブラリーの構築を試みた。深麻酔により安楽殺した成熟雌カニクイザルから速やかに脳を摘出し、安楽殺後20分以内に13部位を液体窒素で凍結した。凍結組織から定法に従ってRNAを抽出し、cDNA化した。これを発現プラスミッドに組み込み、コロニー数を計測した。

#### C. 研究成果

##### 1) カニクイザルの微生物学的浄化

#### ウエスタンプロット法による抗SRV/Dつくば株抗体の検出

SRV 1、SRV 2、SRV 5株の合計3株のウイルス粒子抗原に当センターの本ウイルス陽性サル血清(4例)を反応させたとこ、興味ある結果が得られた。同一希釈の血清で比較した場合、本抗原(SRV 5)と最も強く反応した。血清サンプル6は他の血清サンプルとは異なった反応性を示し、SRV 1、SRV 5株抗原のgp20(TM)との反応性は全くなく、ヌクレオキャプシッド抗原であるp14と反応した。

SRV 2抗原に対しては、血清サンプル1, 3, 4はp27、p24などのcapsid抗原とgp20(TM)とに反応したが、gp70とは全く反応せず、その反応は他

の株（タイプ1 およびタイプ5）に比べて弱かった。血清サンプル6はp24capsid抗原と僅かに反応したのみで、SRV 2 抗原のみを用いて判定した場合陰性であった。

#### PCR法によるSRV/Dつくば株遺伝子の検出

昨年度は Liskaらの方法に従い、SRV/Dのenv領域の検出に成功した。今回、カリフォルニア地区霊長類研究センターLerche 博士のgag 遺伝子検出系を用いた。gag 遺伝子検出系を用いても、SRV/Dつくば株 2株についてnested PCRで234bpのgagDNA断片の検出が可能であったので、現在その遺伝子塩基配列を決定を試みているところである

#### SPFコロニーサルの診断法

オクラホマ州立大学獣医学部感染症部門で作成されつつあるSPFサルコロニーの診断法に関する検討と情報交換を行い、以下の結論を得た。

SPFサルコロニーのヘルペスウイルス感染に関し、当大学ではα亜科ヘルペスウイルス7種類の血清診断を行っているが、ELISA 抗原は、感染Vero細胞をTris-HCl (pH7.4, 50mM), Triton X-100 (0.5%), SDS(0.1%)溶液0.15mlに溶解したものであるが、この抗原で感度、特異性も高く検査できているとのことであった。また、43例の抗ヘルペスELISA抗体価が低い(OD<sub>BV</sub> ≤ 0.6)サル血清をウエスタンブロット法で解析した結果、gD (糖タンパクD) より低分子量のキャプシッドタンパクが12例の血清に検出されたが、その検出とELISA抗体価には相関がなかったようである。。従って、オクラホマ州立大学Eberle教授研究室では、ウエスタンブロット法よりもELISA法のほうが、検出感度がよいと考えている。

南テキサス医療センターウイルスリファレンス研究所では、精製ウイルス粒子抗原を用いたドットELISA法をサルの血清診断に用いている。最近、ヘルペスウイルスの感染診断で非特異的反応の高いサル血清に関してウエスタンブロット法を試みたところ、反応したバンドの数が多くて、判定が非常に困難であったので、ドットELISA法を用いている。レトロウイルスの感染の血清診断においても、ドットELISA法を用いているが、判定が困難な場合はウエスタンブロット法を併用している。

以上、米国3カ所のサル血清診断を行っている研究所における共同研究と情報交換の結果、レトロウイルスに関しては、定期的に採血し、血漿はウイルス粒子を抗原としたウエスタンブロット法で、PBMCはLerche博士のPCR法で検出するこ

とにより、抗体陰性ウイルス分離培養陰性サルにおいても、確実にサル体内に潜伏感染しているSRV/DのプロウイルスDNAが検出できることが、明らかになった。

また、ヘルペスウイルスの診断法に関しては、現時点で、ELISA法がウエスタンブロット法よりも特異性と感度においてより優れているとの結論に達した。

#### SRV/Dフリーコロニーの構築案

昨年度は、米国テキサス州サウスウエスト医学生物学研究所ウイルス・免疫部門J. K. Hilliard博士とテキサス霊長類センターのS. L. Pearson博士によるアカゲザルのSPF化の失敗例を参考に、筑波霊長類センターでのSRV/Dフリーコロニーの構築案を作製したが、その構築案は、早期母子分離と分離後の仔ザルの個別飼育を行い、SPF ELISA法で定期的に検査するというものであった。

今回の米国での共同研究と情報交換の結果を踏まえ、筑波霊長類センターでのSRV/Dフリーコロニーの構築案を改定した。すなわち、サルの定期的血清診断はウエスタンブロット法によるが、抗原はSRV 1、SRV 2、SRV 5株を用いる。また、ウイルスの検出には分離培養法ではなく、gag 遺伝子検出PCR法を用い、定期的に検査することとした。

#### 2) サル類を用いた遺伝子治療評価系の確立 カニクイザルのCD34陽性骨髄幹細胞を識別するヒトモノクローナル抗体の選別

、市販されている各種CD34抗体を用いてカニクイザルの骨髄細胞との交叉反応性を調査した結果、Dynal社から市販されているClone 561抗体が反応することを明らかにした。次に、DynalのヒトCD34磁気ソートキットを用いてカニクイザルのCD34の純化を試みた結果、骨髄穿刺法およびアフレーシス法のいずれの方法で得た細胞からも妥当な細胞数(3~5x10<sup>6</sup>)のCD34陽性細胞が回収された。そこで次に、この抗体で精製されたカニクイザルCD34陽性細胞に自己複製能と多分化能を有する幹細胞が存在しているか否かを確認する目的で、非分画細胞と純化したCD34細胞を用いて定法に従いメチルセルロースを用いたコロニーアッセイを行った。その結果、図2に示すように、培養に供した10万細胞中のコロニー出現率は、いずれのコロニーにおいてもCD34陽性細胞で非分画細胞の約100倍の数のコロニーが出現した。特に未分化な幹細胞の指標とされるGMEmixコロニーは、非分画

細胞では全く検出されないのに対して、CD34細胞では500前後のコロニーの出現が認められた。この結果から、DynaI社の抗体によりカニクイザルの骨髓肝細胞を含むCD34陽性細胞が純化できることが明らかになった。

#### カニクイザルの骨髓移植法の確立

50mlの骨髓からは $8.3 \times 10^9$ の細胞が回収され、溶血処理後の単核細胞数が $6.8 \times 10^8$ 、最終的に回収されたCD34細胞は $3.3 \times 10^6$ であった。一方、アフレーシスでは $3.1 \times 10^9$ の細胞が回収され、溶血処理後の単核細胞数が $1.9 \times 10^9$ 、最終的に回収されたCD34細胞は $6.4 \times 10^6$ であった。ことから、カニクイザルでの骨髓移植法の開発に関し、骨髓穿刺法およびアフレーシス法の2種類の方法を確立した。

次に、致死量のX線を照射した個体への骨髓移植実験を試みた。X線照射ザルへの骨髓移植では移植後の骨髓抑制に対応する集中治療方法をマニュアル化する必要がある。そこで今回は、全骨髓移植、CD34細胞移植、ベクター導入CD34細胞移植と段階的に難易度を上げて、移植後の管理マニュアルの確立をめざした。X線照射後骨髓抑制によりWBCおよびHCTのいずれも著しく減少するが、G-CSF投与を含む集中治療と適切な抗生剤の投与と輸血管理により、移植後21日目には移植した骨髓細胞由来の白血球の増加が認められた。これらの過程で、移植後の集中治療法がマニュアル化できたと同時に、 $1.2 \times 10^6/\text{Kg}$ のCD34細胞の移植で血液細胞の再構成が可能であることが判明した。以上の結果から、カニクイザルでの骨髓移植法の開発に関し、骨髓穿刺法およびアフレーシス法の2種類の方法を確立した。

#### カニクイザル脳のかDNAライブラリーの作製

カニクイザル脳的主要部位のうち前頭葉、側頭葉、小脳の完全長cDNAライブラリーが作製できた。

### D. 考 察

#### 1) カニクイザルの微生物学的浄化

##### エスタンプロット法による抗SRV/Dつくば株抗体の検出

今回、SRV 1、SRV 2、SRV 5株の合計3株のウイルス粒子抗原に当センターの本ウイルス陽性サル血清(4例)を反応させたところ、同一稀釈の血清で比較した場合、SRV 5と最も強く反応した。

SRV 2抗原には、p27、p24などのcapsid蛋白とgp20と反応したが、gp70とは全く反応せず、その反応は他の株(タイプ1およびタイプ5)に比べて弱かった。今回、SRV 1、SRV 2、SRV 5

株の合計3株のウイルス粒子抗原に当センターの本ウイルス陽性サル血清(4例)を反応させたところ、同一稀釈の血清で比較した場合、SRV 5と最も強く反応した。

SRV 2抗原には、p27、p24などのcapsid蛋白とgp20と反応したが、gp70とは全く反応せず、その反応は他の株(タイプ1およびタイプ5)に比べて弱かった。

現在までに、SRV 1、3株はアカゲザルから分離されており、SRV 5株は一部の中国産のアカゲザルからのみ分離されている。SRV 4株は過去に1頭のカニクイザルから分離されたのみであり、通常、カニクイザルからの分離SRV株は例外なくタイプ2株ということになっている。

しかしながら、今回の日米共同実験により、SRV/Dつくば株に対するサル抗体の反応性に関し、タイプ2株SRVに最も弱く反応したことから、SRV/Dつくば株はSRV 4株である可能性と、全く新しいタイプの株であることが予想された。

##### PCR法によるSRV/Dつくば株遺伝子の検出

昨年度はLiskaらの方法に従い、SRV/Dのenv領域の検出に成功したが、今回、カリフォルニア地区霊長類研究センターLerche博士のgag遺伝子検出系を用いても、SRV/D筑波株2株について検出が可能であったので、現在その遺伝子塩基配列を決定を試みているところである。

遺伝子配列が決定できれば、つくば株が既知の米国においてサル繁殖コロニーを壊滅的に汚染させた株と同一か否かを確定できると考えられ、これらの結果は、今後の筑波霊長類センターにおけるSPF化プロジェクトに大いに役立つものと期待される。

昨年度はLiskaらの方法に従い、SRV/Dのenv領域の検出を試みたが、標準陽性サルリンパ球を用いても、10例中5例しか検出できなかった。Lerche博士のgag遺伝子検出系では、Liskaらの方法よりもはるかに感度が良く、ウイルスをリンパ球の培養により増殖させなくてもよいなど感度操作性に優れていることが明らかになった。

#### 2) サル類を用いた遺伝子治療評価系の確立

##### カニクイザルの骨髓移植法の確立

骨髓穿刺法とG-CSFで動員したアフレーシス法で回収した細胞数を比較したところ、50mlの骨髓から最終的に回収されたCD34細胞は、 $3.3 \times 10^6$ と $6.4 \times 10^6$ 個であったので、今回カニクイザルからの

骨髄採取法として、骨髄穿刺法およびアフレーション法の2種類の方法を確立することができたと判断できる。

カニクイザルの骨髄採取法、純化法、培養法が確立できたので、致死量のX線を照射した個体への骨髄移植実験を試み、 $1.2 \times 10^6/\text{Kg}$ のCD34細胞の移植で血液細胞の再構成が可能であったので遺伝子導入した骨髄幹細胞の移植を目的とした遺伝子治療法の評価系が確立できたと判断できる。

#### カニクイザル脳のcDNAライブラリーの作製

カニクイザル脳の主要13部位からの完全長RNA回収率から、前頭葉、側頭葉、小脳のcDNAライブラリーは確立できたと判断されるが、他の部位での完全長RNA回収率が低かった理由として、1頭の個体の脳組織を細分化したためにRNA抽出に必要な十分な組織量が得られなかったことと、予想以上にサル脳のRNA量が少なかったことが考えられる。今後は部位別の細分化を避け、十分量のRNAが回収できる部位の仕分けを行い、完全長の割合が70%を越えるRNAでのcDNAライブラリーの構築を再度試みる必要がある。

以上、分担研究者である向井と寺尾が渡米し、米国側共同研究者共同実験を行った。2課題ともに、当初予定した内容を上回る成果が得られたと評価する。特に、カリフォルニア地区霊長類研究センターLerche博士との共同研究を開始できたことは、Lerche博士が米国でもSRV/D研究の第一人者であることも含めて、今後の研究の親展が期待できる。また、将来遺伝子治療におけるドラッグデリバリーの重要な標的となる骨髄幹細胞の、採取、純化、移植法を確立したことは、日米間でサル類を用いた遺伝子治療評価技術がほぼ同一レベルに達したことを示している。

#### E. 結論

##### 1) カニクイザルの微生物学的浄化 ウエスタンブロット法による抗SRV/D つくば株抗体の検出

今回の日米科学技術協力により、SRV 1、SRV 2、SRV 5株のウイルス粒子抗原に当センターの本ウイルス陽性サル血清(4例)を反応させたところ、SRV/Dつくば株はまれなSRV/D第4株か、または全く新しいタイプの株である可能性が示唆された。

##### PCR法によるSRV/Dつくば株遺伝子の検出

昨年度は、SRV/Dつくば株のenv領域の検出はできていたが、今回、カリフォルニア地区霊長類

研究センターLerche博士のgag遺伝子検出系を用いても、SRV/D筑波株2株について検出が可能であったので、当筑波霊長類センターが間違いなくSRV/Dで汚染されていることが判明し、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療の評価を行う上でも、本ウイルスの除去を是非とも行わねばならない。

#### S P Fコロニーサルの診断法

現時点で、ヘルペス系のウイルスは、ELISA法が検出法として、感度・特異性において最適であるが、レトロウイルスにおいては、ウイルス粒子を抗原として用いたウエスタンブロット法が確実であることが明らかになった。

#### SRV/Dフリーコロニーの構築案

昨年度作製したSRV/Dフリーコロニーの構築案を早期母子分離と共に、ウエスタンブロット法による血清抗体検査及び、末梢血リンパ球からのウイルスゲノムDNA検出を直接PCR法で定期的に行うことで、より簡単な方法に改訂できた。

#### 2) サル類を用いた遺伝子治療評価系の確立

##### カニクイザルの骨髄移植法の確立

Washington大学のBernstein教授と共同で、カニクイザルのCD34陽性細胞を純化するヒトモノクローナル抗体を選別し、NIHのDonahue博士と共同で、カニクイザルの骨髄採取法、CD34陽性幹細胞純化法、幹細胞培養法および骨髄移植法に関わる基礎的技術を確立した。

2) Washington大学のBernstein教授と共同で、カニクイザルのCD34陽性細胞を純化するヒトモノクローナル抗体を選別し、陽性細胞の機能を明らかにした。

##### 3) カニクイザル脳のcDNAライブラリーの作製

Yerkes霊長類センターのde Waal教授と共同で、カニクイザルの脳主要部位のcDNAライブラリーを構築し、高次脳機能傷害の霊長類モデル開発のための基礎研究が行われた。

#### F. 研究発表

(分担研究報告書参照)

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（厚生科学特別事業）  
「新しい日米科学技術に関する研究（霊長類）；H10-特別-071」研究報告書

分担研究課題：サル類を用いた遺伝子治療評価系開発に関わる日米協力

分担研究者：寺尾恵治

（国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター、繁殖育成室長）

研究要旨：サル類を用いた遺伝子治療評価系の確立を目的として、日米共同で以下の研究を行った。

1) 米国 NIH、National Heart, Lung and Blood Institute、Hematology Branch の Donahue 博士と共同でカニクイザルを用いた骨髓幹細胞移植技術を確立した。カニクイザルから骨髓穿刺法およびアフェレーシス法の両法で骨髓細胞を採取し、ヒト CD34 抗体を用いて CD34 陽性細胞を分離した。致死量の X 線（500Rx2 回）を照射したサルに自己の骨髓細胞および CD34 陽性細胞を移植した結果、それぞれ 14 日、21 日目に末梢血中の白血球数および血小板数が回復し、CD34 陽性細胞に自己複製能および多分化能のある幹細胞が濃縮されることが判明した。これにより、骨髓幹細胞を標的とした遺伝子治療評価技術が確立された。

2) 米国 Seattle 市、Fred Hutchinson Cancer Research Center の Bernstein 教授と共同で、サルの骨髓幹細胞のマーカーである CD34 と交叉するヒトのモノクローナル抗体の選別実験を行った。その結果、オスロ大学の Gaudernack 教授が作成した Clone 561 抗体がカニクイザルの CD34 と交叉反応を示すとともに、この抗体で精製したカニクイザル CD34 陽性細胞は *in vitro* のコロニーアッセイおよび *in vivo* での骨髓移植において、多分化能をしめしたことから、Clone 561 抗体がカニクイザルの骨髓幹細胞を識別することが判明した。これにより、カニクイザルの骨髓幹細胞の濃縮技術が確立された。

3) 米国 Atlanta 市、Yerkes Regional Primate Research Center の de Waal 教授と共同で、チンパンジーおよびカニクイザルのゲノム解析と遺伝子治療研究基盤の高度化に関わる共同研究を行った。今年度はヒトでの整備が遅れている脳的主要部位の cDNA ライブラリーの整備を行い、完全長 RNA の割合が 40%以上でクローン数が 1 万以上の良質なライブラリーをカニクイザルの前頭葉、側頭葉および小脳で確立した。

キーワード：カニクイザル、遺伝子治療、  
骨髓幹細胞、CD34、cDNA ライブラリー

A. 目的

次世代の新規治療法として遺伝子治療の有用性が期待されている。一方で、遺伝

子治療に使用される医薬品は開発途上のものが多い。また治療に用いる遺伝子がヒト由来であることから、生体内での安定性、安全性、有効性については霊長類を用いた前臨床試験が不可欠である。霊長類を用い

た遺伝子治療法の評価システムを開発するためには、技術先進国である米国における現状を把握し、必要な技術および試薬の共同開発をはかる必要がある。

平成10年度より筑波に新設された「霊長類共同利用施設」で遺伝子治療評価実験が本格化した。一方、骨髄幹細胞を標的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療法は究極の治療法として期待されているが、その評価には霊長類モデルの開発が不可欠である。

今回は米国の3施設と共同で以下の研究を行った。

1) Washington DC、NIH、National Herat, Lung and Blood Institute, Hematology BranchのDonahue博士と共同でカニクイザルを用いた骨髄移植実験技術を確認する。

2) Seattle市、Fred Hutchinson Cancer Research CenterのBernstein教授と共同で、カニクイザルのCD34陽性骨髄幹細胞を識別するヒトのモノクローナル抗体を選別する。

3) Atlanta市、Yerkes Regional Primate Reserach Centerのde Waal教授と共同で、カニクイザルを用いた遺伝子治療研究における研究基盤の高度化に関する研究を行う。今年度は特に、カニクイザルの主要脳部位のcDNAライブラリーの整備を行った。

## B. 材料と方法

1) カニクイザルを用いた骨髄移植法の開発：3～5歳齢の育成カニクイザルを用いて2種類の骨髄採取法を検討した。一つ

は骨髄穿刺法で他の一つはサイトカインで末梢に幹細胞を動員するアフエレーシス法である。骨髄穿刺法は麻酔下のサルの寛骨から直接穿刺法で50mlの骨髄を採取した。アフエレーシス法は100 $\mu$ g/KgのヒトリコンビナントG-CSFを5日間連続で投与した後に、アフエレーシス装置で末梢血単核細胞を回収した。致死量のX線を照射したカニクイザルへの骨髄移植実験は、全骨髄細胞移植、CD34陽性骨髄幹細胞移植に分けて方法の確立を行った。3歳齢の育成カニクイザルから50mlの骨髄を採取した後、致死量のX線(500Rx2回)を照射した。X線照射後直ちに全骨髄細胞またはCD34陽性細胞を静脈内に移植し、移植後の骨髄抑制状態とその回復過程を血球数および血小板数の変化でモニターした。なお、移植後3週間にわたる集中治療管理技術の確立もあわせておこなった。

2) カニクイザルのCD34陽性骨髄幹細胞を識別するヒトモノクローナル抗体の選別：現在判明しているカニクイザルのCD34と交叉反応性を示すヒトモノクローナル抗体はワシントン大のBernstein教授が開発したClone 12.8抗体、オスロ大のGaudernack教授が開発したClone 563抗体、米国Systemix社が開発したK6.1抗体の3種類のモノクローナル抗体が知られている。しかしながら、これら3種類の抗体のいずれも米国における特許裁判の影響を受けて現在では入手が不可能となっている。そこで今回、入手可能なヒトCD34抗体をスクリーニングして、カニクイザルのCD34と交叉する抗体の選別を行った。骨髄穿刺およびアフエレーシスのそ



れぞれの方法で採取した細胞を溶血処理して得た単核細胞を、ヒト CD34 抗体結合磁気ビーズと反応させ、磁気分離装置により CD34 陽性細胞を単離した。単離した CD34 陽性細胞を定法によりメチルセルロースを用いたコロニーアッセイ培養に供し、培養 14 日目に出現したコロニー数を計測した。

3) カニクイザル脳主要部位の cDNA ライブラリーの確立：ヒトでは完全長 RNA の抽出が不可能な臓器として中枢神経系をとりあげ、カニクイザル脳の主要 13 部位（前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、扁桃核、海馬、海馬傍回、視床、中脳（黒質）、小脳、視床下部、下垂体、延髄）の新鮮材料からの cDNA ライブラリーの構築を試みた。深麻酔により安楽殺した成熟雌カニクイザルから速やかに脳を摘出し、安楽殺後 20 分以内に 13 部位を液体窒素で凍結した。凍結組織から定法に従って RNA を抽出し、cDNA 化した。これを発現プラスミッドに組み込み、コロニー数を計測した。

4) 日米共同研究成果の評価：3 月 14 日から 24 日にわたって分担研究者の寺尾が渡米し、Donahue 博士（3 月 15、16 日）、de Waal 教授（3 月 19 日）および Bernstein 教授（3 月 22 日）と面会し、今年度の研究成果に関する打ち合わせを行った。

### C. 結果および考察

1) カニクイザルの骨髄移植法の確立：図 1 は骨髄穿刺法と G-CSF で動員したアフエレーシス法で回収した細胞数を比較したものである。50ml の骨髄からは  $8.3 \times 10^9$  の細胞が回収され、溶血処理後の

単核細胞数が  $6.8 \times 10^8$ 、最終的に回収された CD34 細胞は  $3.3 \times 10^6$  であった。一方、アフエレーシスでは  $3.1 \times 10^9$  の細胞が回収され、溶血処理後の単核細胞数が  $1.9 \times 10^9$ 、最終的に回収された CD34 細胞は  $6.4 \times 10^6$  であった。これらの結果から、今回カニクイザルからの骨髄採取法として、骨髄穿刺法およびアフエレーシス法の 2 種類の方法を確立することができたと判断できる。

カニクイザルの骨髄採取法、純化法、培養法が確立できたので、致死量の X 線を照射した個体への骨髄移植実験を試みた。X 線照射ザルへの骨髄移植では移植後の骨髄抑制に対応する集中治療方法をマニュアル化する必要がある。そこで今回は、全骨髄移植、CD34 細胞移植、ベクター導入 CD34 細胞移植と段階的に難易度を上げて、移植後の管理マニュアルの確立をめざした。図 3 は X 線照射したカニクイザルに CD34 陽性骨髄細胞を移植した実験の経緯を示したものである。X 線照射後骨髄抑制により WBC および HCT のいずれも著しく減少するが、G-CSF 投与を含む集中治療と適切な抗生剤の投与と輸血管理により、移植後 21 日目には移植した骨髄細胞由来の白血球の増加が認められた。これらの過程で、移植後の集中治療法がマニュアル化できたと同時に、 $1.2 \times 10^6/\text{Kg}$  の CD34 細胞の移植で血液細胞の再構成が可能であることが判明した。これらの結果は、サルを用いた骨髄移植の先進研究施設である米国 NIH と遜色のない結果であった。これにより、遺伝子導入した骨髄幹細胞の移植を目的とした遺伝子治療法の評価系が確立できたと判断できる。

2) カニクイザルの CD34 陽性骨髄幹細胞を識別するヒトモノクローナル抗体の選別：まず、市販されている各種 CD34 抗体を用いてカニクイザルの骨髄細胞との交叉反応性を調査した結果、Dynal 社から市販されている Clone 561 抗体が反応することを明らかにした。次に、Dynal のヒト CD34 磁気ソートキットを用いてカニクイザルの CD34 の純化を試みた結果、骨髄穿刺法およびアフエレーシス法のいずれの方法で得た細胞からも妥当な細胞数 ( $3 \sim 5 \times 10^6$ ) の CD34 陽性細胞が回収された。そこで次に、この抗体で精製されたカニクイザル CD34 陽性細胞に自己複製能と多分化能を有する幹細胞が存在しているか否かを確認する目的で、非分画細胞と純化した CD34 細胞を用いて定法に従いメチルセルロースを用いたコロニーアッセイを行った。その結果、図 2 に示すように、培養に供した 10 万細胞中のコロニー出現率は、いずれのコロニーにおいても CD34 陽性細胞で非分画細胞の約 100 倍の数のコロニーが出現した。特に未分化な幹細胞の指標とされる GMEmix コロニーは、非分画細胞では全く検出されないのに対して、CD34 細胞では 500 前後のコロニーの出現が認められた。この結果から、Dynal 社の抗体によりカニクイザルの骨髄肝細胞を含む CD34 陽性細胞が純化できることが明らかになった。さらに、図 3 に示すように、Clone 561 で精製した幹細胞を  $1.2 \times 10^6 / \text{Kg}$  移植したサルで血液細胞の再構成が認められた結果は、Clone 561 陽性カニクイ細胞中に骨髄幹細胞がエンリッチされていることを明確に示している。こ

れらの結果から、今後 Clone 561 抗体を用いたカニクイザルの骨髄幹細胞移植実験が遅滞無く遂行できると判断した。

3) カニクイザル脳主要部位の cDNA ライブラリーの確立：カニクイザル脳の主要 13 部位からの完全長 RNA 回収率を表 1 に示す

今回の結果から、前頭葉、側頭葉、小脳の cDNA ライブラリーは確立できたと判断される。その他の部位での完全長 RNA 回収率が低かった理由として、1 頭の個体の脳組織を細分化したために RNA 抽出に必要な十分な組織量が得られなかったことと、予想以上にサル脳の RNA 量が少なかったことが考えられる。今後は部位別の細分化を避け、十分量の RNA が回収できる部位の仕分けを行い、完全長の割合が 70% を越える RNA での cDNA ライブラリーの構築を再度試みる必要がある。

4) 研究成果の評価：平成 11 年 3 月 14 日から 24 日まで、分担研究者である寺尾が渡米し、3 名の米国側共同研究者と今年度の研究成果の評価を行った。3 課題ともに、当初予定した内容を上回る成果が得られたと評価された。特に、将来遺伝子治療におけるドラッグデリバリーの重要な標的となる骨髄幹細胞の、採取、純化、移植法を確立したことは、日米間でサル類を用いた遺伝子治療評価技術がほぼ同一レベルに達したことを示している。今後はサル類を用いた遺伝子治療法の評価に関わるその他の実験技術および研究基盤整備を日米共同でおこなってゆく必要がある。

## E. 結論

米国側3施設と共同研究を行い以下の結果を得た。

1) NIHのDonahue博士と共同で、カニクイザルの骨髄採取法、CD34陽性幹細胞純化法、幹細胞培養法および骨髄移植法に関わる基礎的技術を確立した。

2) Washington大学のBernstein教授と共同で、カニクイザルのCD34陽性細胞を純化するヒトモノクローナル抗体を選別し、陽性細胞の機能を明らかにした。

3) Yerkes霊長類センターのde Waal教授と共同で、カニクイザルの脳主要部位のcDNAライブラリーを構築した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hanazono, Y., Dunbar, C.E.,  
Donahue, R.E., Kato, I., Ueda, Y.,  
Hasegawa, M., Urabe, M., Kume, A.,  
Terao, K. and Ozawa, K.: Basic studies  
toward hematopoietic stem cell gene

therapy. The Keio Journal of Medicine,  
48: -in press- (1999)

### 2. 学会発表

藤井敦子、鈴木通弘、小野文子、寺尾恵治、吉川泰弘、国枝哲夫：ヒトマイクロサテライト用プライマーを用いたカニクイザルの染色体連鎖地図の構築、第45回日本実験動物学会、1998年、松本

長田直樹、平井百樹、寺尾恵治、森 祐介、早坂郁夫：染色体DNA複製タイミングのヒトと近縁霊長類における比較—FISH法による解析—、第52回日本人類学会、1998年9月、札幌

坂手龍一、平井百樹、寺尾恵治、森 祐介、早坂郁夫、染色体複製バンドパターンによるヒトと近縁霊長類との比較研究、第52回日本人類学会、1998年9月、札幌

肥田宗友、鈴木 穰、寺尾恵治、菅野純夫：マカク脳の部位特異的cDNAライブラリーの作製と解析、第21回日本分子生物学会、1998年12月、横浜

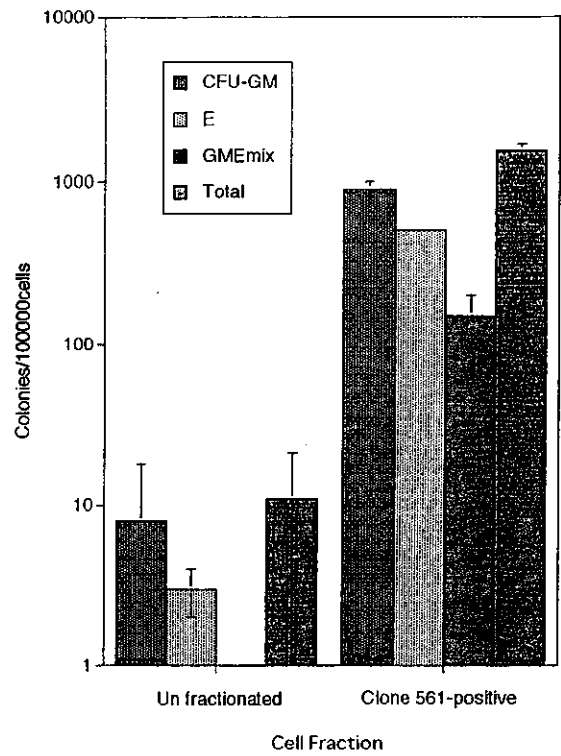
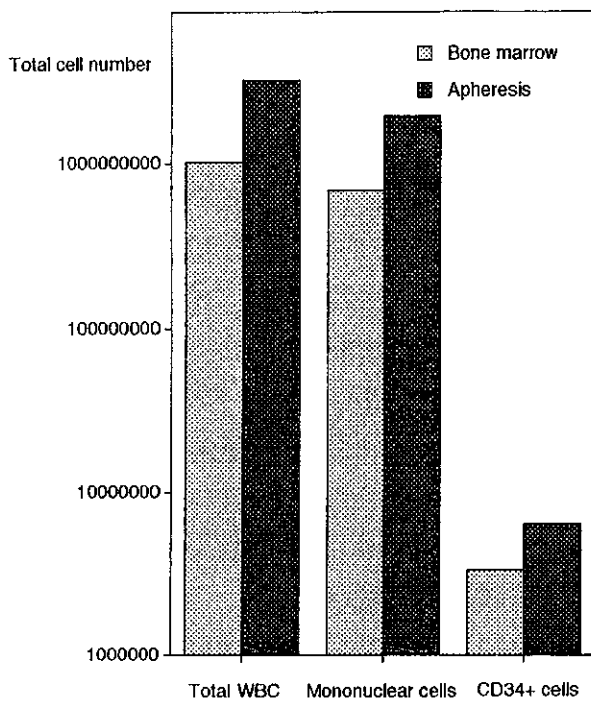


Figure 1: Recovery of CD34+ cells from bone marrow and leucoapheresis

Figure 2: Colony assay with clone 561-positive bone marrow cells

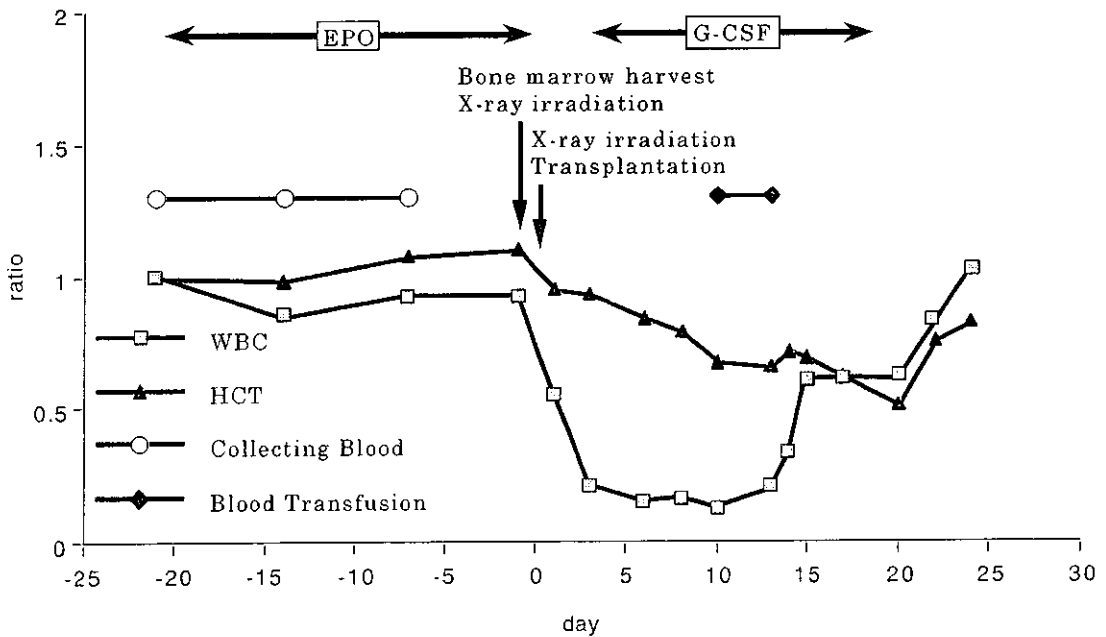


Figure 3: Changes of WBC and HCT after CD34+ bone marrow transplantation

Table 1: Characteristics of RNA extracted from major brain reagions of cynomolgus monkey

Region	Full length RNA(%)	No. of Clone	Note
Frontal lobe	40%	>10000	OK
Temporal lobe	50%	>10000	OK
Parietal lobe	20-30%	>5000	Contamination*
Occipital lobe	Under evaluation		
Amygdala	Under evaluation		
Hippocampus	Few	1500	
Parahippocampal gyrus	Under evaluation		Contamination
Thalamus	Few	1500	
Hypothalamus	Few	1500	
Mesencephalon	Few		
Cerebellum	40%	>10000	OK
Pituitary gland	not many		Contamination
Medulla oblongata	Few		

\*: Contamination of genomic DNA

# 厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

## 分担研究報告書

### サルレトロウイルスに関するサルコロニーのSPF化に関する研究

分担研究者 向井 謙三郎 国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター主任研究官  
協力研究者 山田 章雄 国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター・センター長  
宇田 晶彦 国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター協力研究員

研究要旨 アジア産マカク属サル類には、バイオセーフティレベル4に分類されるBウイルスのほか、ヒトT細胞白血病ウイルスに近縁のSTLV-Iやサル類特有のSRV/Dなどのレトロウイルスが自然感染している。本研究では、最新の霊長類を用いた医学研究のニーズに対応するために、筑波霊長類センターで繁殖育成されているカニクイザルの微生物学的浄化、特に、SRV/D、レトロウイルスの除去を行うことを最終目的として、昨年度に当センター繁殖・育成コロニーから分離された、SRV/Dつくば分離株（2株）の遺伝子解析、血清学的解析をカリフォルニア霊長類研究センターとの共同研究を行った。また、オクラホマ州立大学獣医学部感染症部門では作成されつつあるSPFサルコロニーの診断法に関する検討と情報交換を、南テキサス医療センターウイルスリファレンス研究所では、最新のサル血清診断法の検討と情報交換を行ったので報告する。

#### A. 研究目的

アジア産マカク属サル類には、バイオセーフティレベル4に分類されるBウイルスのほか、ヒトT細胞白血病ウイルスに近縁のSTLV-Iやサル類特有のSRV/Dなどのレトロウイルスに自然感染している。Bウイルスに関しては、昭和53年の筑波霊長類センター開所以来、早期母仔分離と抗Bウイルス抗体の定期的検査により、育成されたワクチン国家検定用のサルからBウイルスを除去することに成功し、平成8年には、繁殖用親サルのうちのB抗体陽性個体を除外した結果、Bウイルスに関しSPF化に成功した。昨年度からは、アジア産マカク属サル類に自然感染しているレトロウイルスのうち、特に、SRV/D (Simian retrovirus/D)に注目し、本ウイルスの感染に対する診断法を検討し、本ウイルスを育成サルから、除去することを最終目的に研究を開始した。昨年度は本ウイルス抗体検査法を確立し、当センターサルコロニーの本ウイルスによる浸淫度を把握したところ、8～11ヶ月齢離乳時の仔ザルで29%陽性 (n=27) であり、1～5歳の育成ザルでは、59%が陽性 (n=99) であり、当センターで育成中に水平感染を受け、本ウイルスによる汚染が進んでいることを報告した。本年度は、A) 昨年度分離に成功したSRV/Dつくば株のウイルス遺伝子の解析と血清学的解析をカリフォルニア霊長類研

究センターとの共同で行い、つくばウイルス株の型同定を行い、ウイルスの除去に役立てる、B) オクラホマ州立大学獣医学部感染症部門で作成されつつあるSPFサルコロニーの診断法に関する検討と情報交換を行う、C) 南テキサス医療センターウイルスリファレンス研究所において、最新のサル血清診断法の検討と情報交換を行うことを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1) ウエスタンブロット法による抗SRV/Dつくば株抗体の検出

昨年度はSRV-1株を用い、ウエスタンブロット法を行ったが、本年度は、カリフォルニア霊長類研究センターLerche 博士との共同実験を行い、SRV-1、SRV-2、SRV-5の標準株3株の蔗糖段階密度勾配ウイルス粒子画分抗原および、10～20%アクリルアミドゲルを用い、H. Towbinの原著に従って行った。また、被検血清は、100倍希釈して用いた。判定はSRV特異的タンパクバンドが1本では疑陽性とし、2本検出された場合に陽性とした。

##### 2) PCR法によるSRV/Dつくば株遺伝子の検出

2x10<sup>5</sup> 個の末梢血単核球由来のDNAを用い、SRV-1、SRV-2、SRV-3のgag領域の274bpを1

回目のPCRで増幅し、2回目のnested PCRで234bpのgagDNA断片を増幅する、細胞培養をしない直接PCR法 (Lab. Anim. Sci. 47: 263, 1977) をカリフォルニア霊長類研究センターLerche 博士と共同で行った。

### 3) SPFコロニーサルの診断法

オクラホマ州立大学獣医学部感染症部門で作成されつつあるSPFサルコロニーの診断法に関する検討と情報交換、南テキサス医療センターウイルスリファレンス研究所では、最新のサル血清診断法の検討と情報交換を行った結果を基に、筑波霊長類センターにおけるSPF診断法を再検討した。

### 4) SRV/Dフリーコロニーの構築案

今年度のSPFコロニーサルの診断法に関する日米科学技術検討と情報交換に基づいて、筑波霊長類センターでのSRV/Dフリーコロニーの構築案を改定した。

## C. 研究成果

### 1) ウエスタンプロット法による抗SRV/Dつくば株抗体の検出

SRV 1、SRV 2、SRV 5株の合計3株のウイルス粒子抗原に当センターの本ウイルス陽性サル血清(4例)を反応させたところ、興味ある結果が得られた(図1, 2, 3)。即ち、血清サンプル1, 3, 4はほぼ同様の反応パターンを示し、SRV 1抗原には、主に、gp70やgp20などのenv遺伝子産物と反応し(図1)、SRV 5抗原(図2)には、gp70(env)やgp20 TM (Trans Membrane) のほかにp27およびp24などのcapsid蛋白と反応し、同一希釈の血清で比較した場合、本抗原(SRV 5)と最も強く反応した。血清サンプル6は他の血清サンプルとは異なった反応性を示し、SRV 1、SRV 5株抗原のgp20(TM)との反応性は全くなく、ヌクレオキャプシッド抗原であるp14と反応した。

SRV 2抗原に対しては、血清サンプル1, 3, 4はp27、p24などのcapsid抗原とgp20(TM)とに反応したが、gp70とは全く反応せず、その反応は他の株(タイプ1およびタイプ5)に比べて弱かった。血清サンプル6はp24capsid抗原と僅かに反応したのみで、SRV 2抗原のみを用いて判定した場合陰性である(図3)。

### 2) PCR法によるSRV/Dつくば株遺伝子の検出

昨年度はLiskaらの方法に従い、SRV/Dのenv領域の検出を試みたが、今回、カリフォルニア地区霊長類研究センターLerche 博士のgag 遺伝

図 1

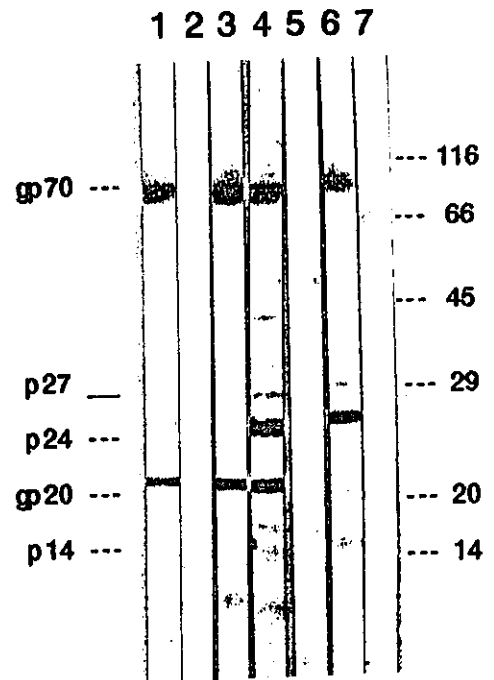
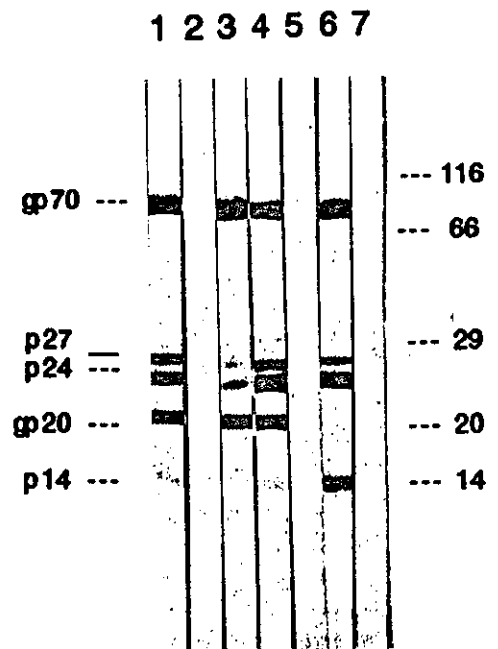


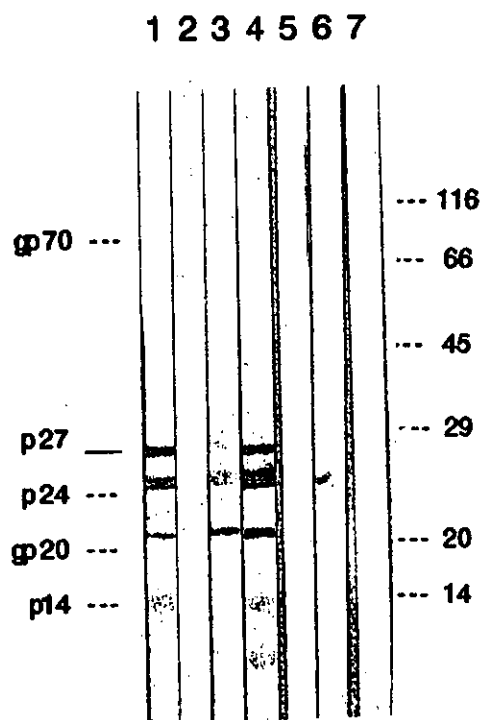
図 2



レーン1, 3, 4, 6 : つくばSRV/D陽性サル血清  
レーン2, 5, 7 : SRV/D陰性サル血清

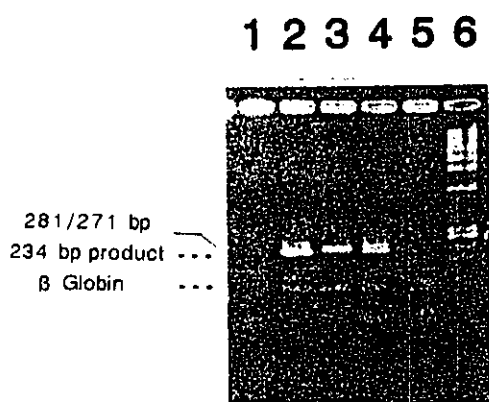
子検出系を用いた。Nested PCRを行った後、3%アガロースゲル電気泳動で解析した結果を図4に示す。レーン1は鋳型DNAを加えない、レーン5はSRV/D非感染細胞DNAを加えた陰性対照である。レーン2, 3は2頭のSRV/D感染つくばカニクイザルのリンパ球DNAを加えて

図 3



PCRを行ったもので、レーン4は陽性対照としてSRV 1株ウイルスDNAを用いた。また、レーン6はφX174/Hae IIIサイズマーカーである。gag 遺伝子検出系を用いても、SRV/Dつくば株2株についてnested PCRで234bpのgagDNA断片の検出が可能であったので、現在その遺伝子塩基配列を決定を試みているところである。

図 4



### 3) SPFコロニーサルスの診断法

オクラホマ州立大学獣医学部感染症部門で作成されつつあるSPFサルコロニーの診断法に関する検討と情報交換を行い、以下の結論を得た。

SPFサルコロニーのヘルペスウイルス感染に関

し、当大学ではα亜科ヘルペスウイルス7種類の血清診断を行っているが、ELISA 抗原は、感染Vero細胞をTris-HCl (pH7.4, 50mM), Triton X-100 (0.5%), SDS(0.1%)溶液0.15mlに溶解したものであるが、この抗原で感度、特異性も高く検査できているとのことであった。また、43例の抗ヘルペスELISA抗体価が低い(OD<sub>BV</sub> ≤ 0.6)サル血清をウエスタンブロット法で解析した結果、gD (糖タンパクD) より低分子量のキャプシッドタンパクが12例の血清に検出されたが、その検出とELISA抗体価には相関がなかったようである。従って、オクラホマ州立大学Eberle教授研究室では、ウエスタンブロット法よりもELISA法のほうが、検出感度がよいと考えている。

南テキサス医療センターウイルスリファレンス研究所では、精製ウイルス粒子抗原を用いたドットELISA法をサルの血清診断に用いている。最近、ヘルペスウイルスの感染診断で非特異的反応の高いサル血清に関してウエスタンブロット法を試みたところ、反応したバンドの数多くて、判定が非常に困難であったので、ドットELISA法を用いている。レトロウイルスの感染の血清診断においても、ドットELISA法を用いているが、判定が困難な場合はウエスタンブロット法を併用している。

以上、米国3カ所のサル血清診断を行っている研究所における共同研究と情報交換の結果、レトロウイルスに関しては、定期的に採血し、血漿はウイルス粒子を抗原としたウエスタンブロット法で、PBMCはLerche博士のPCR法で検出することにより、抗体陰性ウイルス分離培養陰性サルにおいても、確実にサル体内に潜伏感染しているSRV/DのプロウイルスDNAが検出できることが、明らかになった。

また、ヘルペスウイルスの診断法に関しては、現時点で、ELISA法がウエスタンブロット法よりも特異性と感度においてより優れているとの結論に達した。

### 4) SRV/Dフリーコロニーの構築案

昨年度は、米国テキサス州サウスウエスト医学生物学研究所ウイルス・免疫部門 J. K. Hiliard博士とテキサス霊長類センターの S. L. Pearson博士によるアカゲザルのSPF化の失敗例を参考に、筑波霊長類センターでのSRV/Dフリーコロニーの構築案を作製したが、その構築案は、早期母子分離と分離後の仔ザルの個別飼育を行い、SPF ELISA法で定期的に検査するというものであった。

今回の米国での共同研究と情報交換の結果を踏



まえ、筑波霊長類センターでのSRV/Dフリーコロニーの構築案を改定した。すなわち、サルの上記の定期的血清診断はウエスタンブロット法によるが、抗原はSRV 1、SRV 2、SRV 5株を用いる。また、ウイルスの検出には分離培養法ではなく、gag 遺伝子検出PCR法を用い、定期的に検査することとした。

#### D. 考 察

##### 1) ウエスタンブロット法による抗SRV/Dつくば株抗体の検出

昨年度はSRV 1株を抗原として用い、ウエスタンブロット法で抗体を検出するのに成功し、本法が最も確実な方法であることを報告した。今回、SRV 1、SRV 2、SRV 5株の合計3株のウイルス粒子抗原に当センターの本ウイルス陽性サル血清(4例)を反応させたところ、同一稀釈の血清と比較した場合、SRV 5と最も強く反応した。

SRV 2抗原には、p27、p24などのcapsid蛋白とgp20と反応したが、gp70とは全く反応せず、その反応は他の株(タイプ1およびタイプ5)に比べて弱かった。

現在までに、SRV 1、3株はアカゲザルから分離されており、SRV 5株は一部の中国産のアカゲザルからのみ分離されている。SRV 4株は過去に1頭のカニクイザルから分離されたのみであり、通常、カニクイザルからの分離SRV株は例外なくタイプ2株ということになっている。

しかしながら、今回の日米共同実験により、SRV/Dつくば株に対するサル抗体の反応性に関し、タイプ2株SRVに最も弱く反応したことから、SRV/Dつくば株はSRV 4株である可能性と、全く新しいタイプの株であることが予想された。

##### 2) PCR法によるSRV/Dつくば株遺伝子の検出

昨年度はLiskaらの方法に従い、SRV/Dのenv領域の検出に成功したが、今回、カリフォルニア地区霊長類研究センターLerche博士のgag 遺伝子検出系を用いても、SRV/D筑波株2株について検出が可能であったので、現在その遺伝子塩基配列を決定を試みているところである。遺伝子配列が決定できれば、つくば株が既知の米国においてサル繁殖コロニーを壊滅的に汚染させた株と同一か否かを確定できると考えられ、これらの結果は、今後の筑波霊長類センターにおけるSPF化プロジェクトに大いに役立つものと期待

される。

昨年度はLiskaらの方法に従い、SRV/Dのenv領域の検出を試みたが、標準陽性サルリンパ球を用いても、10例中5例しか検出できなかった。Lerche博士のgag 遺伝子検出系では、Liskaらの方法よりもはるかに感度が良く、ウイルスをリンパ球の培養により増殖させなくてもよいなど感度操作性に優れていることが明らかになった。

##### 3) SPFコロニーサルの診断法

定期的に採血し、血漿は精製ウイルス粒子を抗原としたウエスタンブロット法で、PBMCはLerche博士のPCR法で検出することにより、抗体陰性、ウイルス分離培養陰性サルにおいても、確実にサル体内に潜伏感染しているSRV/DのプロウイルスDNAが検出できることが、本年度の日米科学技術協力特別研究事業により明らかになった。

しかしながら、1回限りの検査では本ウイルスを見逃す可能性があり、定期的に検査することが必須であることはいままでのない。このことは、潜伏・持続感染しているウイルスは、一般的には、宿主の免疫状態によりその増殖が抑制されているが、体内のサイトカインレベルの量的・質的変動により、レトロウイルス遺伝子の発現が増加し結果的にウイルス感染リンパ球が増加する場合があるからである。

##### 4) SRV/Dフリーコロニーの構築案

昨年度のSRV/Dフリーコロニーの構築案では、早期母子分離と分離後の仔ザルの個別飼育の原則と、5倍希釈血清を用いるより感度のよいSPFELISA法で継続して検査するというものであった。昨年度は、末梢血リンパ球のゲノムDNAを用いた直接PCR法では、14例のSRV/D陽性サルすべての検出はできなかった。そこで、末梢血リンパ球をRaji細胞と混合培養を行い、検体DNA中のSRV遺伝子コピー数を増加させLiskaらのPCR法で検出を試みても、10中5例からしか、ウイルス遺伝子が検出できなかった。今回のカリフォルニア霊長類研究センターとの共同研究で明らかになったことは、末梢血リンパ球のゲノムDNA調製し、 $2 \times 10^5$ 個の白血球由来のDNAを用いた直接PCR法で、ほぼ、100%検出できることがわかり、SRV/Dフリーコロニーの作業の煩雑さが著しく改善された。診断法は前項の3) SPFコロニーサルの診断法に述べたとおりで、筑波においてもSRV/Dフリーコロニーの構築が可能になると思われる。

## E. 結論

### 1) ウエスタンブロット法による抗SRV/Dつくば株抗体の検出

今回の日米科学技術協力により、SRV 1、SRV 2、SRV 5株のウイルス粒子抗原に当センターの本ウイルス陽性サル血清(4例)を反応させたところ、SRV/Dつくば株はまれなSRV/D第4株か、または全く新しいタイプの株である可能性が示唆された。

### 2) PCR法によるSRV/Dつくば株遺伝子の検出

昨年度は、SRV/Dつくば株のenv領域の検出はできていたが、今回、カリフォルニア地区霊長類研究センターLerche博士のgag遺伝子検出系を用いても、SRV/D筑波株2株について検出が可能であったので、現在その遺伝子塩基配列を決定を試みているところである。

### 3) SPFコロニーサルの診断法

現時点で、ヘルペス系のウイルスは、ELISA法が検出法として、感度・特異性において最適であるが、レトロウイルスにおいては、ウイルス粒子を抗原として用いたウエスタンブロット法が確実であることが明らかになった。

### 4) SRV/Dフリーコロニーの構築案

昨年度作製したSRV/Dフリーコロニーの構築案を早期母子分離と共に、ウエスタンブロット法による血清抗体検査及び、末梢血リンパ球からのウイルスゲノムDNA検出を直接PCR法で定期的に行うことで、より簡単な方法に改訂できた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Mukai R., Narita, T, Kobayashi, R, Fujimoto, M, Takasaka, M., Honjyo, S.: Survey of viral infections in nonhuman primates at Tsukuba Primate Center for Medical Science.

Topics in Primatology Vol 3: 399-408, 1992.

2) Fujii Y, Mukai R, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Kojima E, Murakami K, Yoshikawa Y.: Antiviral effects of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine in rhesus monkey acutely infected with simian immunodeficiency virus.

Antivir. Chem. Chemother. 9, 85-92, (1998)

3) Akari H, Ono F, Sakakibara I, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A,

Yoshikawa Y.: Simian T cell leukemia virus type I-induced malignant adult T cell leukemia like disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8+ T cell leukemia.

AIDS. Res. Hum. Retroviruses, 14, 367-371, (1998)

4) Shoji S, Furuishi K, Ogata A, Yamataka K, Tachibana K, Mukai R, Uda A, Harano K, Matsushita S, Misumi S.: An allosteric drug, o,o'-bismyristoyl thiamine disulfide suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 Tat and NF-kappa B.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 249, 745-53 (1998)

## 2. 学会発表

1) 向井 隼三郎、佐多徹太郎、宇田晶彦、小松原博文、毒島孝治、村山裕一、倉田 毅、山田章雄：サルエイズ脳炎発症におけるモノサイト様細胞株 (BM1, BM2) の役割。

第12回日本エイズ学会総会 東京、1998年12月