

厚生科学研究費

ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

霊長類を用いた遺伝子治療法の
評価システム開発研究

平成 10 年度 研究成果報告書

平成 11 年 3 月

班 長 吉 川 泰 弘

東京大学大学院農学生命科学研究科

4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
Keio J. Med. ,48. Basic studies toward hematopoietic stem cell gene therapy.	1999		Hanazono Y, Dunbar CE, Donahue RE, Kato I, Ueda Y, Hasegawa M, Urabe M, Kume A, Terao K, Ozzawa K
Exp. Anim. 47. Comparative analysis of human and macaque monkey CD4: differences in formaldehyde lability and conformation.	1998		Akari H, Terao K, Nam KH, Adachi A, Yoshikawa Y
AIDS Res Human Retroviruses. 14. Simian T-cell leukemia virus type 1-induced malignant adult T cell leukemia-like disease in a naturally infected African green monkey; implication of CD8+ T cell leukemia.	1998		Akari H, Ono F, Sakakibara I, Takahashi H, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A, Yoshikawa Y
AIDS Res Human Retroviruses. 14. Induction of MHC-II DR expression on circulating CD8+ lymphocytes in cacaques infected with SIVmac 239 nef-open but not with its nef-deletion mutant.	1998		Akari H, Mori K, Otani I, Terao K, Ono F, Adachi A, Yoshikawa Y
Dev Comp Immun. 22. Age-dependent remodeling of peripheral blood CD4+ CD8+ double-positive T lymphocytes in cynomolgus monkeys.	1998		Nam KH, Akari H, Terao K, Ohto H, Itagaki S, Yoshikawa Y
Proc 12th World AIDS Conf. Early depletion of peripheral blood CD4+CD8+ T lymphocytes in cynomolgus macaques by SIVmac infection: implication of Nef.	1998		Akari H, Adachi A, Nam KH, Mori K, Otani I, Terao K, Yoshikawa Y
Exp Anim. 47. Age-related alterations of major lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys.	1998		Nam KH, Akari H, Terao K, Itagaki S, Yoshikawa Y
Clin Immun. in press. Effects of SIVmac infection on peripheral blood CD4+CD8+ T lymphocytes in cynomolgus monkeys.	1999		Akari H, Nam KH, Mori K, Shibata H, Otani I, Adachi A, Terao K, Yoshikawa Y
J Exp Zool. 281. Microtubule and microfilament dynamics in rat embryos during the two-cell block in vitro.	1998		Matsumoto H, Shoji N, Umezu M, Sato E

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
J. Fertil Implant. (Tokyo), 15, 177-179 Comparison of results from IVF-related studies for cynomolgus monkeys, Japanese monkeys, African green monkeys, and red-bellied tamarins.	1998		T. Sankai, N. Ogonuki, H. Tsuchiya, K. Shimizu, F. Cho and Y. Yoshikawa
J. Med. Primatol., 27, 10-14 Localization of testosterone and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerase in cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) testis.	1998		J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, F. Cho and Y. Yoshikawa
Lab. Anim. Sci., 48(3), 270-274 Effects of single and multiple injections of ketamine hydrochloride on serum hormone levels in male cynomolgus monkeys.	1998		S. Malaivijitnond, O. Takenaka, T. Sankai, T. Yoshida, F. Cho and Y. Yoshikawa
Hum. Reprod., 13(9), 2555-2560 Comparison of two methods of assisted fertilization in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>): Intracytoplasmic sperm injection and partial zona dissection followed by insemination.	1998		N. Ogonuki, T. Sankai, F. Cho, K. Sato and Y. Yoshikawa.
Lab. Anim. Sci., 48(5), 535-537 Changes in the electrical impedance level of vaginal mucus during the menstrual cycle in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>).	1998		H. Tsuchiya, N. Ogonuki, T. Yoshida, F. Cho, Y. Yoshikawa, M. Ito and T. Sankai.
J. Reprod. Dev., 44(4) Suppl., 33 Acrosome vesiculation in unincubated frozen-thawed cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) spermatozoa.	1998		A. Okada, H. Igarashi, M. Kuroda, Y. Yoshikawa, H. Tsuchiya and T. Sankai.

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
<p>Proceedings of the Japan Society for Comparative Endocrinology, 13, 52 A simple non-invasive method to measure fecal steroid hormones for monitoring the reproductive status of female great apes.</p> <p>J. Mamm. Ova Res. 16 (in press) Rabbit fetuses implanted and developed in the greater omentum.</p> <p>J. Med. Primatol. (in press) Localization of immunoreactive testosterone and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ5-Δ4 isomerase in cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) testes during postnatal development.</p> <p>Am. J. Primatol. (in press) A two-step extraction method to measure fecal steroid hormones in female cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>).</p>	1998		<p>S. Miyamoto, T. Sankai and T. Yoshida.</p> <p>T. Endo, K. Kanayama and T. Sankai.</p> <p>J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, F. Cho, and Y. Yoshikawa.</p> <p>M. Matsumuro, T. Sankai, F. Cho, Y. Yoshikawa and T. Yoshida.</p>

平成10年度 研究報告概要

霊長類を用いた遺伝子治療法の評価システム開発研究

吉川泰弘（東京大学）

山田章雄（国立感染症研），寺尾恵治（国立感染症研），早坂郁夫（三和科学研究所），山海直（国立感染症研），加藤賢三（国立感染症研），河村晴次（東京大学），黒田洋一郎（東京都神経研），明里宏文（徳島大），岡田詔子（東邦大学），佐藤英明（東北大学），橋本光一郎（明治乳業）

研究目的

わが国に於いても既にいくつかの大学病院でヒトに対する遺伝子治療が開始されるようになった。しかし、多くは海外で開発されたベクターと海外のデータに依存した治療法である。他方わが国独自に開発されたウイルスベクターも実験用小動物から霊長類を用いた評価系にそのレベルを上げつつある。多くの遺伝子疾患や癌、エイズ・ウイルス性肝炎等の慢性感染症、あるいは21世紀に著しい増加が懸念される老人病に対する新技術治療法として遺伝子治療の適用が期待され基礎検討が進められている。しかし、これらの疾患の治療に使用される遺伝子治療用ベクターはまだ開発途上のものが多い。

我が国独自で開発されてくるベクターがヒトへの導入を考えたデザインであること、また導入される遺伝子がヒト由来の遺伝子である事を考えると、生体内での安定性、安全性および有効性については、ヒトに最も近縁な霊長類をもちいて評価する必要がある。このためには動物実験倫理をふまえた上で、霊長類をもちいた検査の効率的な評価基準の作成と基準に基づく評価システムの確立が緊急の課題である。本研究班では異なる機能を持つ研究グループを置き、霊長類を用いた *ex vivo*、器官培養、個体での遺伝子治療法の評価システムを確立することを目的としている。

研究方法

1) 諸外国における遺伝子治療法の評価に関する情報の収集と国内でのベクター開発の現状を調査し、評価研究対象とする遺伝子導入法を検討する。平成10年度はわが国で独自に開発されたセンダイウイルスベクターを中心に、霊長類を用いた個体での評価系について調査を進めた。2) マカカ属サル類をもちいて評価を行うグループはカニクイザルで新規開発ベクターとして、センダイウイルスベクターおよびマウスレトロウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターを対象に以下の研究を進めた。*in vitro* での有効性の評価に供する主要臓器の初代培養細胞系の確立を目的とした組織分配、骨髄幹細胞の同定、純化、培養法を確立しマウスレトロウイルスの骨髄幹細胞を標的とした遺伝子導入効率の検討、ドラッグデリバリーシステム評価として、骨髄幹細胞の採取法、*in vivo* への移植法および GFP 遺伝子を組み込んだマウスレトロウイルスを導入した幹細胞の移植方法の確立、サルでのパーキンソン病モデルおよび多発性硬化症モデルの開発と、治療に用いる

アデノ随伴ウイルスに GFP 遺伝子を導入しサル脳内への接種実験。3) チンパンジーを用いるグループは安楽殺を避けて遺伝子治療評価を行うため、バイオプシー技術の開発を主体に研究を進めた。MRI による体内臓器の画像解析と脳の3次元マップの作成。バイオプシー技術の確立をめざし胃内視鏡、消化管(大腸)内視鏡のチンパンジーへの応用とバイオプシー材料の光学顕微鏡、及び電子顕微鏡検索を行った。4) サル類疾患モデルの胚や配偶子の保存方法の開発、さらに遺伝子治療法の生殖細胞への影響の評価システム開発を目指素グループは、霊長類の凍結生殖細胞特性解析、未熟卵細胞の成熟培養、体外受精などについて基盤技術の確立を試みた。5) 各種霊長類由来細胞の初代培養技術開発グループは、不死化技術、凍結技術の開発を進めている。本年度はサル胎児由来大脳皮質ニューロンの凍結初代培養系でもシナプス結合が形成されること、またヘルペスウイルス・サイミリを用いてチンパンジーのT及びBリンパ球の不死化、サル類胎児由来腎、肝、消化管、脾、皮膚、肺等の細胞培養等を試みた。

結果と考察

1) 評価基準調査グループは遺伝子治療の対象とされている疾患、開発されつつあるベクター等について調査を進め、感染症を対象としたDNAワクチン開発と実験用小動物を用いた免疫応答の誘導実験が精力的に行われつつあることを明らかにした。今年度は特にわが国で独自に開発されたセンダイウイルスベクターを中心に、霊長類を用いた個体での評価系について調査を進めた。

2) カニクイザルの骨髓幹細胞の採取、純化、培養及び移植法の確立ではエリスロポエチンと G-CSF 投与により末梢血中の白血球数を増加させアフレーシスを行った。実施後には白血球数、HCT とともに低下したが、2 週間で術前値に復帰した。アフレーシスでは単核細胞が特異的に回収され、回収された単核細胞から磁気ビーズソーティングにより純度の高い CD34 陽性細胞が回収できた。また骨髓穿刺法による CD34 陽性細胞回収も成功し、Dynal 社の抗体によりカニクイザルの骨髓幹細胞を含む CD34 陽性細胞が純化できることが明らかになった。移植後の集中管理では輸血時期、頻度、抗生剤投与、検査間隔等についてマニュアル化することができた。脳疾患を標的とした遺伝子治療の有効性評価を目的とした疾患モデルの開発ではパーキンソン病と EAE モデルの作出を試みた。パーキンソンモデルの作出は MPTP の静脈内連続投与での誘発を試みている。

パーキンソンモデルの作出実験と平行して、治療に用いるアデノ随伴ウイルスベクターに GFP 遺伝子を組み込みサル黒質内に投与し、投与部位での遺伝子発現効率を検討する実験を実施中である。

3) サル類の疾患モデル動物の開発：疾患モデル動物の胚や配偶子の保存方法の開発、さらに遺伝子治療法の生殖細胞への評価システムの開発を目指し、発生工学的基盤技術の確立を目的とした研究を進めている。本年度は妊娠カニクイザルにおける膣インピーダンス値の変化について検討し、妊娠早期には高値を 妊娠末期には低値を示すことが明らかになった。またエストロジェンの即日測定による排卵日の推定を基盤データとして膣内腔への人工授精を試みた、これまで霊長類センターでは人工受精に成功しなかったが今回は妊娠例を得ることに成功した。eCG 投与回数、hCG 投与時期が未性成熟カニクイザルの卵胞発育および回収卵の質に及ぼす影響について検討し、eCG、hCG 投与スケジュールを考

慮することで卵の質的向上を認めた。雄性生殖細胞に由来する卵子活性化因子について解析し、卵子活性化因子の発現能はマウスとカニクイザルで異なること、受精後その因子は前核に存在すること、精子核周辺活性化物質のみでも卵を活性化する能力を有していることが示された。またカニクイザル精子の凍結保存は生存精子に先体反応様の変化を起こすこと、先体と極体形成領域にスフィンゴミエリンが豊富に認められることを見出した。

4) チンパンジーを用いて評価するグループはMR Iにより、2例のチンパンジーの全身映像を撮影した、この情報に基づいて、脳の3次元マップを完成した。今後神経系のバイオプシーを試みる場合の貴重なデータとなるであろう。動物福祉の観点からバイオプシー前のチンパンジーの鎮痛・麻酔法を確立し、バイオプシー技術の確立をめざし胃内視鏡、消化管（大腸）内視鏡のチンパンジーへの応用とバイオプシー材料の光学顕微鏡、及び電子顕微鏡検索を行った。検索材料の形態は非常によく保存されており、評価に耐えうるものであった。

5) 霊長類由来細胞（神経系、腎、リンパ系、肝、骨髄等）の初代細胞培養技術について検討し、サル胎児由来新鮮大脳皮質ニューロンの初代培養系については、in vitro の神経回路であるシナプス結合が形成されることが明らかになった。さらに凍結保存も可能になった。またヘルペスウイルスサイミリを用いてチンパンジーのT及びBリンパ球不死化に成功し、数個の細胞株を得ることが出来た。これらの細胞株についてCD分類とMHCの解析を始めた。

結論

霊長類を用いて遺伝子治療法の評価を行う場合、以下の3点について評価法を確立する必要がある。1) 新規開発ベクターの有効性、安全性、安定性の評価 (in vitro、in vivo)、2) ドラッグデリバリーシステムの有効性評価、3) 特定の疾患を標的とし疾患モデルを用いた遺伝子治療の有効性評価である。

新規開発ベクターの in vitro での有効性を評価するための初代培養細胞系の開発と凍結保存に関してはほぼ終了し、センダイウイルスベクターを中心に有効性の検討を始める。カニクイザルを用いた骨髄幹細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムの評価系の開発、脳疾患を標的とした遺伝子治療法の評価に用いる疾患モデルの開発について研究は急速な進展を見せた。骨髄移植と骨髄幹細胞への遺伝子導入のハードとソフトのためのマニュアルが出来たので、今後の実験を通して SOP の評価が必要である。また骨髄幹細胞へのベクター導入効率、in vivo での遺伝子導入効率、遺伝子発現効率、遺伝子発現継続時間等の評価が可能となると考えられる。チンパンジーではバイオプシー技術の展開（呼吸器系）、バイオプシー技術を用いた器官培養系、in vivo での遺伝子治療評価系の技術開発が必要となる。

霊長類を用いた遺伝子治療法の評価システム開発研究

吉川泰弘（東京大学大学院 農学生命科学研究科 教授）

研究要旨：

カニクイザルの in vivo でウイルスベクターの評価を行うグループは、センダイウイルスベクター、マウスレトロウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターを対象に研究を進めた。すなわち骨髄幹細胞の同定、純化、培養法を確立しマウスレトロウイルスの骨髄幹細胞を標的とした遺伝子導入効率の検討、ドラッグデリバリーシステム評価として、骨髄幹細胞の採取法、in vivo への移植法および GFP 遺伝子を組み込んだマウスレトロウイルスを導入した幹細胞の移植方法の確立を試みた。またサルでのパーキンソン病モデルおよび多発性硬化症モデルの開発と、治療に用いるアデノ随伴ウイルスに GFP 遺伝子を導入しサル脳内への接種実験を始めた。チンパンジーで評価するグループは安楽殺を避けて遺伝子治療評価を行うため、バイオプシー技術の開発を主体に研究を進めた。MRI による体内臓器の画像解析と脳の 3 次元マップの作成。バイオプシー技術の確立をめざし胃内視鏡、消化管（大腸）内視鏡のチンパンジーへの応用とバイオプシー材料の光学顕微鏡、及び電子顕微鏡検索に成功した。サル類疾患モデルの胚や配偶子の保存方法の開発、さらに遺伝子治療法の生殖細胞への影響の評価システム開発をめざすグループは、霊長類の凍結生殖細胞特性解析、未熟卵細胞の成熟培養、体外受精などについて基盤技術の確立を試みた。各種霊長類由来細胞の初代培養技術開発グループは、チンパンジーの T 及び B リンパ球の不死化、サル類胎児由来腎、肝、消化管、脾、皮膚、肺等の細胞培養等に成功した。さらにサル胎児由来大脳皮質ニューロンの凍結初代培養系でもシナプス結合が形成されることが明らかになり、神経系での発現ベクターの安全性評価が可能になり、センダイウイルスベクターの導入高率の評価を始めた。

○ 吉川泰弘（東大大学院
農学生命科学研究科 教授）

山田章雄（国立感染研
筑波霊長類センター長）

寺尾恵治（同上、室長）

早坂郁夫（三和科学研究所長）

山海直（国立感染研 主任研究官）

加藤賢三（同上 主任研究官）

河村清次（東大大学院

農学生命科学研究科 助教授）

黒田洋一郎（東京都神経研
参事研究員）

明里宏文（徳島大医学部 助手）

岡田詔子（東邦大医学部 助教授）

佐藤英明（東北大農学部 教授）

橋本光一郎（明治乳業 主任研究員）

A. 研究目的：

わが国に於いても既にいくつかの大学病院でヒトに対する遺伝子治療が開始されるようになった。しかし、多くは海外で開発されたベクターと海外のデータに依存した治療法である。他方わが国独自に開発されたウイルスベクターも実験用小動物から霊長類を用いた評価系にそのレベルを上げつつある。多くの遺伝子疾患や癌、エイズ・ウイルス性肝炎等の慢性感染症、あるいは21世紀に著しい増加が懸念される老人病に対する新技術治療法として遺伝子治療の適用が期待され基礎検討が進められている。しかし、これらの疾患の治療に使用される遺伝子治療用ベクターはまだ開発途上のものが多い。

我が国独自で開発されてくるベクターがヒトへの導入を考えたデザインであること、また導入される遺伝子がヒト由来の遺伝子である事を考えると、生体内での安定性、安全性および有効性については、ヒトに最も近縁な霊長類をもちいて評価する必要がある。このためには動物実験倫理をふまえた上で、霊長類をもちいた検査の効率的な評価基準の作成と基準に基づく評価システムの確立が緊急の課題である。本研究班では異なる機能を持つ研究グループを置き、霊長類を用いた *ex vivo*、器官培養、個体での遺伝子治療法の評価システムを確立することを目的としている。

B. 研究方法：

1) 諸外国における遺伝子治療法の評価に関する情報の収集と国内でのベクター開発の現状を調査し、評価研究対象とする遺伝子導

入法を検討する。平成10年度はわが国で独自に開発されたセンダイウイルスベクターを中心に、霊長類を用いた個体での評価系について調査を進めた。2) マカカ属サル類をもちいて評価を行うグループはカニクイザルで新規開発ベクターとして、センダイウイルスベクターおよびマウスレトロウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターを対象に以下の研究を進めた。 *in vitro* での有効性の評価に供する主要臓器の初代培養細胞系の確立を目的とした組織分配、骨髄幹細胞の同定、純化、培養法を確立しマウスレトロウイルスの骨髄幹細胞を標的とした遺伝子導入効率の検討、ドラッグデリバリーシステム評価として、骨髄幹細胞の採取法、 *in vivo* への移植法および GFP 遺伝子を組み込んだマウスレトロウイルスを導入した幹細胞の移植方法の確立、サルでのパーキンソン病モデルおよび多発性硬化症モデルの開発と、治療に用いるアデノ随伴ウイルスに GFP 遺伝子を導入しサル脳内への接種実験。3) チンパンジーを用いるグループは安楽殺を避けて遺伝子治療評価を行うため、バイオプシー技術の開発を主体に研究を進めた。MRI による体内臓器の画像解析と脳の3次元マップの作成。バイオプシー技術の確立をめざし胃内視鏡、消化管(大腸)内視鏡のチンパンジーへの応用とバイオプシー材料の光学顕微鏡、及び電子顕微鏡検索を行った。4) サル類疾患モデルの胚や配偶子の保存方法の開発、さらに遺伝子治療法の生殖細胞への影響の評価システム開発を目指素グループは、霊長類の凍結生殖細胞特性解析、未熟卵細胞の成熟培養、体外受精などについて基盤技術の確立を試みた。5) 各種霊長類由来細胞の初代培養技術開発グループは、不死化

技術、凍結技術の開発を進めている。本年度はサル胎児由来大脳皮質ニューロンの凍結初代培養系でもシナプス結合が形成されること、またヘルペスウイルス・サイミリを用いてチンパンジーのT及びBリンパ球の不死化、サル類胎児由来腎、肝、消化管、脾、皮膚、肺等の細胞培養等を試みた。

C.D 結果と考察：

1) 評価基準調査グループは遺伝子治療の対象とされている疾患、開発されつつあるベクター等について調査を進め、感染症を対象としたDNAワクチン開発と実験用小動物を用いた免疫応答の誘導実験が精力的に行われつつあることを明らかにした。今年度は特にわが国で独自に開発されたセンダイウイルスベクターを中心に、霊長類を用いた個体での評価系について調査を進めた。

2) カニクイザルの骨髄幹細胞の採取、純化、培養及び移植法の確立ではエリスロポエチンとG-CSF投与により末梢血中の白血球数を増加させアフエレーシスを行った。実施後には白血球数、HCTともに低下したが、2週間で術前値に復帰した。アフエレーシスでは単核細胞が特異的に回収され、回収された単核細胞から磁気ビーズソーティングにより純度の高いCD34陽性細胞が回収できた。また骨髄穿刺法によるCD34陽性細胞回収も成功し、DynaL社の抗体によりカニクイザルの骨髄幹細胞を含むCD34陽性細胞が純化できることが明らかになった。移植後の集中管理では輸血時期、頻度、抗生剤投与、検査間隔等についてマニュアル化することができた。脳疾患を標的とした遺伝子治療の有効性評価のための

疾患モデル開発ではパーキンソン病とEAEモデルの作出を試みた。パーキンソンモデルの作出はMPTPの静脈内連続投与での誘発を試みている。

パーキンソンモデルの作出実験と平行して、治療に用いるアデノ随伴ウイルスベクターにGFP遺伝子を組み込みサル黒質内に投与し、投与部位での遺伝子発現効率を検討する実験を実施中である。

3) サル類の疾患モデル動物の開発：疾患モデル動物の胚や配偶子の保存方法の開発、さらに遺伝子治療法の生殖細胞への評価システムの開発を目指し、発生工学的基盤技術の確立を目的とした研究を進めている。本年度は妊娠カニクイザルにおける膣インピーダンス値の変化について検討し、妊娠早期には高値を、妊娠末期には低値を示すことが明らかになった。またエストロジェンの即日測定による排卵日の推定を基盤データとして膣内腔への人工授精を試みた、これまで霊長類センターでは人工受精に成功しなかったが今回は妊娠例を得ることに成功した。eCG投与回数、hCG投与時期が未性成熟カニクイザルの卵胞発育および回収卵の質に及ぼす影響について検討し、eCG、hCG投与スケジュールを考慮することで卵の質的向上を認めた。雄性生殖細胞に由来する卵子活性化因子について解析し、卵子活性化因子の発現能はマウスとカニクイザルで異なること、受精後その因子は前核に存在すること、精子核周辺活性化物質のみでも卵を活性化する能力を有していることが示された。またカニクイザル精子の凍結保存は生存精子に先体反応様の変化を起こすこと、先体と極体形成領域にスフィンゴミエリンが豊富に認められることを見

出した。

4) チンパンジーを用いて評価するグループはMRIにより、2例のチンパンジーの全身映像を撮影した、この情報に基づいて、脳の3次元マップを完成した。今後神経系のバイオプシーを試みる場合の貴重なデータとなるであろう。動物福祉の観点からバイオプシー前のチンパンジーの鎮痛・麻酔法を確立し、バイオプシー技術の確立をめざし胃内視鏡、消化管(大腸)内視鏡のチンパンジーへの応用とバイオプシー材料の光学顕微鏡、及び電子顕微鏡検索を行った。検索材料の形態は非常によく保存されており、評価に耐えうるものであった。

5) 霊長類由来細胞(神経系、腎、リンパ系、肝、骨髄等)の初代細胞培養技術について検討し、サル胎児由来新鮮大脳皮質ニューロンの初代培養系については、*in vitro*の神経回路であるシナプス結合が形成されることが明らかになった。さらに凍結保存も可能になった。またヘルペスウイルスサイミリを用いてチンパンジーのT及びBリンパ球不死化に成功し、数個の細胞株を得ることが出来た。これらの細胞株についてCD分類とMHCの解析を始めた。

E. 結論:

霊長類を用いて遺伝子治療法の評価を行う場合、以下の3点について評価法を確立する必要がある。1) 新規開発ベクターの有効性、安全性、安定性の評価(*in vitro*、*in vivo*)、2) ドラッグデリバリーシステムの有効性評価、3) 特定の疾患を標的とし疾患モデルを用いた遺伝子治療の有効性評価である。

新規開発ベクターの*in vitro*での有効性

を評価するための初代培養細胞系の開発と凍結保存に関してはほぼ終了し、センダイウイルスベクターを中心に有効性の検討を始める。カニクイザルを用いた骨髄幹細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムの評価系の開発、脳疾患を標的とした遺伝子治療法の評価に用いる疾患モデルの開発について研究は急速な進展を見せた。骨髄移植と骨髄幹細胞への遺伝子導入のハードとソフトのためのマニュアルが出来たので、今後の実験を通してSOPの評価が必要である。また骨髄幹細胞へのベクター導入効率、*in vivo*での遺伝子導入効率、遺伝子発現効率、遺伝子発現継続時間等の評価が可能となると考えられる。チンパンジーではバイオプシー技術の展開(呼吸器系)、バイオプシー技術を用いた器官培養系、*in vivo*での遺伝子治療評価系の技術開発が必要となろう。

分担研究報告書

遺伝子治療ベクターの評価基準作成に関する研究

分担研究者 山田章雄（国立感染症研究所 筑波霊長類センター センター長）

研究要旨

わが国でも大学病院などでヒトに対する遺伝子治療が開始され、また新しい遺伝子治療法による申請数が増加傾向にある。しかしこれらの多くは海外で開発されたベクターを用いる治療法である。他方、わが国で独自に開発されたウイルスベクターも実験用小動物から霊長類を用いた評価系にそのレベルを上げるところまできている。これらのベクターはヒトに最も近縁な霊長類をもちいて評価する必要がある。このためには動物実験倫理をふまえた上で、霊長類をもちいた検査の効率的な評価基準の作成と基準に基づく評価システムの確立が必要である。本年度はわが国で独自に開発されたセンダイウイルスベクターなどを中心に、霊長類を用いた個体での評価系及び動物実験の倫理について調査を進めた。

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床適用に先だって、霊長類を用いて遺伝子治療法の評価を行う場合、以下の3点について評価法を確立する必要がある。新規開発ベクターの有効性、安全性、安定性の評価（in vitro、in vivo）、ドラッグデリバリーシステムの有効性評価、特定の疾患を標的とし疾患モデルを用いた遺伝子治療の有効性評価である。すなわちウイルスベクターおよび導入遺伝子の霊長類初代培養細胞での発現効率および安定性を評価し、生体内での安定性・安全性・有効性を評価し、適切な霊長類疾患モデルを用いて有効な遺伝子治療法を評価する方法を確立しておく必要がある。

本調査研究では、遺伝子治療の諸外国における動向、わが国の遺伝子治療に関する傾向、及び対象となるサル類及びチンパンジーの研究に使用される実態等に関して調査し、現実

的で適切なベクターの評価を進めるための基準を作成することを目的としている。本年度はわが国で独自に開発されたセンダイウイルスベクターなどを中心に、霊長類の細胞及び個体を用いた評価系及び動物実験の倫理について調査を進めた。

B.C. 研究方法と結果

1) 引き続きわが国と外国における遺伝子治療法に関する情報の収集と国内でのベクター開発の現状を調査し、評価研究対象とする遺伝子導入法の検索をしている。

わが国では1995年北海道大学で行われたADA欠損症の例に続いて東大医科研の腎癌、岡山大学の例、及び名古屋大学のリポソームをベクターとした治療法など、遺伝子治療の臨床適用が急速な展開を見せている。しかし遺伝子治療の対象とされている疾患、及び開発されつつあるベクターでは、米国のデ

ータが最も豊富である。臨床的には1989年に遺伝子マーキングから始まり、先天性遺伝子疾患であるADA欠損症等への治療が試みられ、現在までに約3000例が実施されている。内訳は、マーキング(30)と遺伝子治療(200)が主流である。遺伝子治療では癌が138例で免疫療法、HSV-TKとガンシクロビル、癌抑制遺伝子の導入の症例が多い。遺伝子病(33例)では、単一遺伝病である嚢胞性肺線維症、ゴウチェ病、慢性肉芽腫症、カナバン病等がある。感染症はエイズで(23例)、その他に冠状動脈疾患などがある。

2) ベクターとしては米国で開発されたマウスレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等が実績があるが、何れもウイルスの力価、遺伝子導入効率、デリバリー等の点で問題が多い。わが国ではウイルスを用いないリポソームや、リポソームにウイルス糖蛋白等を添加したベクターが開発されている。また最近センダイウイルスをベクターとする方法が開発された。このベクターは力価が高い点、遺伝子導入効率が高い点では有効である。

センダイウイルスは本来マウス等の小型げっ歯類を宿主とするパラミキソウイルスであり硬化性肺炎等を起こすが、本来の宿主では無い霊長類にたいする感染性、病原性は明らかにされていない。安全性、安定性、有効性、デリバリー等について霊長類を用いて評価する必要がある。このほかにレンチウイルスやシンドビスウイルス等がベクター候補として研究されつつある。

3) チンパンジーやマカカ属サル類を用いた

遺伝子治療法の *in vivo* 評価に関しては、まだシステムとして組み立てられていない。遺伝子デリバリーの基礎として霊長類骨髄幹細胞の同定と単離・培養、遺伝子導入、生体への移入が米国で研究され、当研究班でも基盤技術が確立されつつある。

肝炎、エイズ等の感染症に関しては、霊長類のこれらのウイルスに関する感受性の点から、DNAワクチンやレトロウイルスベクターの有効性等に関してチンパンジーが利用されている。特にチンパンジーに関しては、米国ではニューメキシコ、LEMSIP、テキサス大学、ヤーキース霊長類研究所、サウスウエスト財団などの施設で数100頭のコロニーを維持し医学研究用に利用されている。わが国では、本研究班に属している三和科学でチンパンジー(110頭)を繁殖、飼育しており、当研究班では、バイオプシーを基本に器官培養による3次元構築上でのベクターの発現、及びバイオプシー技術による *in vivo* 評価法の確立を考えている。

4) 動物実験の倫理に関しては、ヨーロッパ、米国・カナダとわが国では大きな違いがある。この点に関してはヨーロッパが最も厳しく、動物実験の政府による規制(実験、実験者の登録許可制、第三者を加えた動物実験審査委員会による評価、情報の公開などを義務づけている)が行われている。米国・カナダは各大学、研究機関に動物実験審査委員会(第三者を加えた委員会、IACUC)を置きこの委員会が動物実験の倫理的審査等を行っている。

わが国では動物の飼育管理と保護に関する法(動管法)に基づき実験動物の飼育管理に関する基準がつけられ、また文部省や学会で出された通知や指針により自主規制的に動物

実験を遂行している。

特に霊長類や類人猿などヒトに近縁な動物を使用する動物実験に関しては、動物福祉の点から世界的に関心が高い。これらの動物を医学実験に使用する際は、十分な議論に基づく動物実験倫理とその評価が必要であろう。

D. 考察

わが国でも、遺伝子治療法が次第に臨床適用されるようになってきた。これまで遺伝子治療はマーキングとしてスタートしたため、動物実験をバイパスして進んできたきらいがある。しかし今後は霊長類のようなヒトに近縁な動物や疾患モデル動物を用いてその安全性、有効性、安定性などを評価する必要がある。

しかし、サル類や類人猿を用いる動物実験は動物福祉や倫理の上から、世界的に関心が高い。チンパンジーを用いて遺伝子治療の評価系を確立するにはMRIによる体内臓器の画像解析とバイオプシー技術の確立をめざす必要がある。動物倫理の世界的コンセンサからするとチンパンジーではバイオプシーによる評価が限界であろう。また他のマカカ属サル類においても出来る限り生存した状態で同一個体を用いて多くの情報が得られるよう努力する必要がある。

マカク属サルを用いた遺伝子治療法の評価システムの開発に関する研究

分担研究者 寺尾恵治（国立感染研・筑波霊長類センター）

カニクイザルを用いて遺伝子治療法の評価システムの開発を目的として、以下の実験を行った。

1) 新規開発ベクターとして、センダイウイルスベクターおよびマウスレトロウイルスベクターを対象として、*in vitro*での有効性の評価に供する主要臓器の初代培養細胞系の確立を目的として安楽殺による組織の分配を行った。

2) 骨髄幹細胞の同定、純化、培養法を確立するとともに、マウスレトロウイルスの骨髄幹細胞を標的とした遺伝子導入効率を検討した。

3) ドラッグデリバリーシステムの評価として、骨髄幹細胞の採取法、*in vivo*への移植法およびGFP遺伝子を組み込んだマウスレトロウイルスを導入した幹細胞の移植方法を確立した。

4) 特定の疾患を標的として前臨床の段階にある遺伝子治療法の有効性を評価するために、サルでのパーキンソン病モデルおよび多発性硬化症モデルの開発を行うとともに、治療に用いるアデノ随伴ウイルス（AAV）にGFP遺伝子を導入してサルの脳内への接種実験を行い、接種部位での遺伝子発現効率を調査した。

キーワード：カニクイザル、ウイルスベクター、骨髄幹細胞、パーキンソン病、多発性硬化症

A. 目的

遺伝病、癌、慢性感染症および老人病に対する新技術治療法として遺伝子治療の適用が検討されている。しかしながら、治療に使用される遺伝子治療医薬品は開発途上のものが多く、生体内での安定性、安全性および有効性については、前臨床試験としてヒトに最も近縁な霊長類を用いて評価する必要がある。さらに、遺伝子治療医薬品として開発の進んだ製剤については、霊長類を用いて検査を行うための効率的な評価基準の作成と基準に基づく評価システムの確立が緊急の課題である。

本研究では、マカク属サルを用いて1)ベ

クター等の標的細胞での*in vitro*での発現効率および安定性を評価し、2)生体内での安定性、安全性、有効性を評価し、3)ドラッグデリバリーシステムを含む最も有効な遺伝子治療法を確立し、4)特定の疾患を標的とした遺伝子治療法の有効性を評価することを目的としている。今年度は1)*in vitro*評価に必要なサル由来初代培養細胞系の確立、2)ドラッグデリバリーシステムとしての骨髄幹細胞の同定、純化、培養法の開発と、遺伝子導入幹細胞の移植法の確立、3)脳疾患を標的とした遺伝子治療法の評価を目的として疾患モデルの開発を試みた。

B. 材料と方法

1) カニクイザル由来初代培養細胞系の確立：帝王切開により胎齢80日齢のカニクイ

ザル胎児 2 頭を得た。安楽殺後、主要臓器（脳、心臓、肝、肺、腸、腎、腸、皮膚）を摘出し初代培養細胞系の確立を試みた。

2) CD34 陽性骨髄幹細胞の同定、純化、培養法の確立と骨髄幹細胞を標的としたマウスレトロウイルスの遺伝子導入効率の評価：ヘルペス B ウイルスおよびサルレトロウイルス陰性の 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 μ 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。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。9 \times 10⁶ の CD34 細胞に GFP 遺伝子を組み込んだマウスレトロウイルスを感染させ、ファイブロネクチンをフィーダーとして IL3、IL6、SCF、G-CSF、Flt-3 を添加した培養液で 4 日間培養し、GFP を発現しているベクター導入細胞の割合を FACS で計測した。

3) 骨髄幹細胞移植法の確立：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および GFP 組み込みマウスレトロウイルスベクターを導入した CD34 細胞移植の 3 段階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。

4) 脳疾患を標的とした遺伝子治療評価に供する疾患モデルザルの開発：特定の疾患を標的として、マウスおよびラットで有効性が確認され、前臨床の段階にある遺伝子治療法を評価するためには、疾患モデルの開発が必須となる。今年度は脳疾患モデルザルの開発を目的として、パーキンソンモデルと多発性硬化症モデル（実験的アレルギー性脳炎；EAE）の開発を行った。パーキンソンモデルの開発は、MPTP の静脈内連続投与を実施したが、MPTP がケミカルハザードであることを考慮し、実験開始に先立って陰圧アイソレータを試作するとともに実験中の安全対策マニュアルを作成した。3 歳齢の育成カニクイザルに 0.5mg/Kg の MPTP を 1 回/週の割合で静脈内投与した。投与後継続的に行動観察を行いパーキンソン病の発症をモニターした。EAE モデルは、結核菌死菌とアジュバントの混合液に 10mg/頭となるよう調整したサル脳白質のホモジネートを混合し、10 歳齢の育成カニクイザル 12 頭の皮内に投与した。発症効率をあげるために、一部のサルでは 7.5 または 2.5 μ g/頭の百日咳菌の毒素を免疫当日と 2 日後に静脈内投与した。

C. 結果及び考察

1) 初代培養細胞系の確立：胎齢 80 日齢の胎児 2 頭からの初代培養細胞系の開発結果に関しては、他の分担研究者の報告書で

詳述する。

2) カニクイザルの骨髄幹細胞の採取、純化、培養法の確立 : 図1にG-CSFで動員したアフレーシス実験の経過を、白血球数とヘマトクリット値(HCT)の変化と実験処置の手順とで示す。図に示すように3週間のエリスロポエチン投与と5日間のG-CSF投与により末梢血中の白血球数は投与前の7.8倍(8万/ml)に増加した。アフレーシス実施後には白血球数、HCTともに低下したが、2週間で術前の値に復帰した。

図2はアフレーシスで回収した白血球の回収率と単核細胞の比率を示したものである。G-CFSで末梢に動員される白血球の大半(84%)が顆粒球であり、単核細胞の比率は16%前後となる。一方、アフレーシスにより生体内に循環している白血球の18.6%が回収されたが、アフレーシスでは単核細胞が特異的に回収される(右図)ことから、単核細胞の回収率は68.8%に達した。回収された単核細胞から磁気ビーズソーティングにより純度の高い(>90%)CD34陽性細胞が回収できた。回収されたCD34細胞の単核細胞に対する割合は0.2%であった。

図3は骨髄穿刺法と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ものである。50mlの骨髄からは 8.3×10^9 の細胞が回収され、溶血処理後の単核細胞数が 6.8×10^8 、最終的に回収されたCD34細胞は 3.3×10^6 であった。一方、アフレーシスでは 3.1×10^9 の細胞が回収され、溶血処理後の単核細胞数が 1.9×10^9 、最終的に回収されたCD34細胞は 6.4×10^6 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。これにより、今後実験目的によりいずれかの骨髄採取法を選択することが可能となった。

現在カニクイザルのCD34と交叉反応を示すヒトCD34モノクローナル抗体が3種類存在することが判明しているが、いずれも米国での特許裁判の影響を受けて入手が困難になっている。そこで今回はDynal社から市販されているヒト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、前述したように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のCD34陽性細胞が回収された。しかしながら、今後このキットを用いた骨髄移植実験を継続して行くためには、回収した細胞にカニクイザルの骨髄幹細胞が含まれているか否かを検証しておく必要がある。そこで、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4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。

4) 骨髄移植法の確立 : 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

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 5 は骨髄穿刺により採取した 50ml の全骨髄を X 線照射したカニクイザルに移植した実験での白血球数と HCT の変化を示したものである。図に示すように全骨髄細胞を移植した場合には、HCT はほとんど変化せず、WBC も移植後 2 週間で回復した。X 線照射後の G-CSF の投与も 2 週間で終了できた。この過程で、移植後の集中管理中での、輸血時期、頻度、抗生剤投与、検査間隔、等についてマニュアル化することができた。この経験を基にして、致死量の X 線照射したサルに骨髄細胞から得た CD34 細胞を $1.2 \times 10^6 / \text{Kg}$ 移植した。図 6 はその経過を示したものであるが、図 5 に比べ WBC および HCT のいずれも移植後の減少が著しく、G-CSF の投与も 3 週間を必要とし、血球数の回復が確認されたのは移植後 25 日目であった。これにより、先に *in vitro* で確認された純化 CD34 に幹細胞が含まれているという事実が *vivo* のレベルで確認できたと同時に、移植実験には $1.2 \times 10^6 / \text{Kg}$ 以上の CD34 細胞の移植が必要であることが判明した。現在 GFP 遺伝子を組み込んだマウスレトロウイルスを導入した CD34 細胞を移植した実験を継続中である。図 7 は今回移植した CD34 陽性細胞での GFP 発現細胞の比率を FACS で調べた結果を示したものである。図に示すように、今回行ったマウスレトロウイルスの導入培養法では約 10% の細胞に GFP 遺伝子が導入されていた。この導入効率是他のグループから報告されている数値と遜色ないことから、今後細胞を移植されたサルでの遺伝子

導入効率、遺伝子発現効率、遺伝子発現持続期間、等のデータが得られれば、骨髄幹細胞を標的としたドラッグデリバリーの評価に必要な知見となることが期待される。

5) 脳疾患を標的とした遺伝子治療の有効性評価を目的とした疾患モデルの開発：今年度は脳疾患の内、パーキンソン病と EAE モデルの作出を試みた。パーキンソンモデルの作出は MPTP の静脈内連続投与での誘発を試みたが、投与開始後 2 カ月を経過した時点では、著明な変化は見られていない。実験開始に先立ち、MPTP によるケミカルハザード防止対策として、陰圧アイソレータを試作するとともに、汚物処理を含めた飼育管理方法および静脈内投与方法のマニュアルを作成し、これに基づいた管理を行っている。また、パーキンソンモデルの作出実験と平行して、治療に用いるアデノ随伴ウイルスベクターに GFP 遺伝子を組み込んで、サル黒質内に投与し、投与部位での遺伝子発現効率を検討する実験を実施中である。

一方、EAE モデルの作出では、12 頭のサルを 3 群に分けて、1 群にはサルの脳白質のホモジネートとアジュバントだけを免疫し（2 頭）、他の群にはホモジネートとアジュバントの免疫に加え、異なった濃度（ $2.5 \mu\text{g} \times 2$ 回（4 頭）、 $7.5 \mu\text{g} \times 2$ 回（6 頭））の百日咳菌毒素を静脈内接種した。その結果、アレルギー性脳炎の発症が見られたのは $7.5 \mu\text{g}$ の毒素を投与した 6 頭のうち 3 頭だけで（発症率 50%）、他の群では発症はみられなかった。EAE を発症した 3 頭のサルの発症時期は免疫後、8、22、24 日目であった。これらの結果から、サル脳白質のホモジネートを抗原としてカニクイザルの EAE モデルが作成できると判断した。

サルを用いて遺伝子治療法の評価を行う場合、以下の3点について評価法を確立する必要がある。1) 新規開発ベクターの有効性、安全性、安定性の評価 (in vitro, in vivo)、2) ドラッグデリバリーシステムの有効性評価、3) 特定の疾患を標的とした前臨床試験としての遺伝子治療の有効性評価、の3つである。今年度は、新規開発ベクターの in vitro での有効性を評価するための初代培養細胞系の開発、骨髄幹細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムの評価系の開発、脳疾患を標的とした遺伝子治療法の評価に用いる疾患モデルの開発について研究を行った。特に骨髄幹細胞について重点的な解析を行ったが、それは造血幹細胞が各種の血液細胞に分化、増殖する多分化能と、分化せずに自己を複製する自己複製能の2つの能力を有し、遺伝子導入の最適な標的細胞と考えられているからである。今年度の最大の成果は、カニクイザルの骨髄幹細胞の採取、純化、培養法と骨髄移植法を確立したことである。これにより今後ベクター開発研究者と共同で、骨髄幹細胞へのベクター導入効率、in vivo での遺伝子導入効率、遺伝子発現効率、遺伝子発現継続時間、等の評価が可能となると考えられる。

一方、マウスおよびラットでの基礎検討が終了している特定の疾患を標的とした遺伝子治療法の評価に関しては、疾患モデルを用いた前臨床試験が必須となる。今年度は脳疾患を中心にしたモデル開発を行ったが、将来的には移植治療や癌等の重要疾患のモデルを作出する試みを展開して行く必要がある。

D. 結論

マカク属サルを用いた遺伝子治療法の評価系の開発を目的として実験を行い以下の結果を得た。

1) 新規開発ベクターの in vitro での有効性評価に供するサル由来初代培養細胞系の確立を目的として、カニクイザル胎児の主要組織 (脳、肺、心臓、肝、腎、腸、皮膚) を摘出供給した。

2) カニクイザルの骨髄採取法、幹細胞純化法、幹細胞培養法、骨髄移植法を確立し、移植後の集中治療のマニュアルを作成した。

3) GFP 遺伝子を組み込んだマウスレトロウイルスのカニクイザル骨髄幹細胞への ex vivo での導入効率を評価するとともに、GFP/レトロウイルス導入幹細胞の移植実験をおこない、in vivo での遺伝子発現効率を評価した。

4) 前臨床の段階にある遺伝子治療法の評価に用いる疾患モデルザルの作出を試み、パーキンソン病モデルおよび多発性硬化症モデルとしてのアレルギー性脳炎の作出方法を開発した。

D. 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

なし

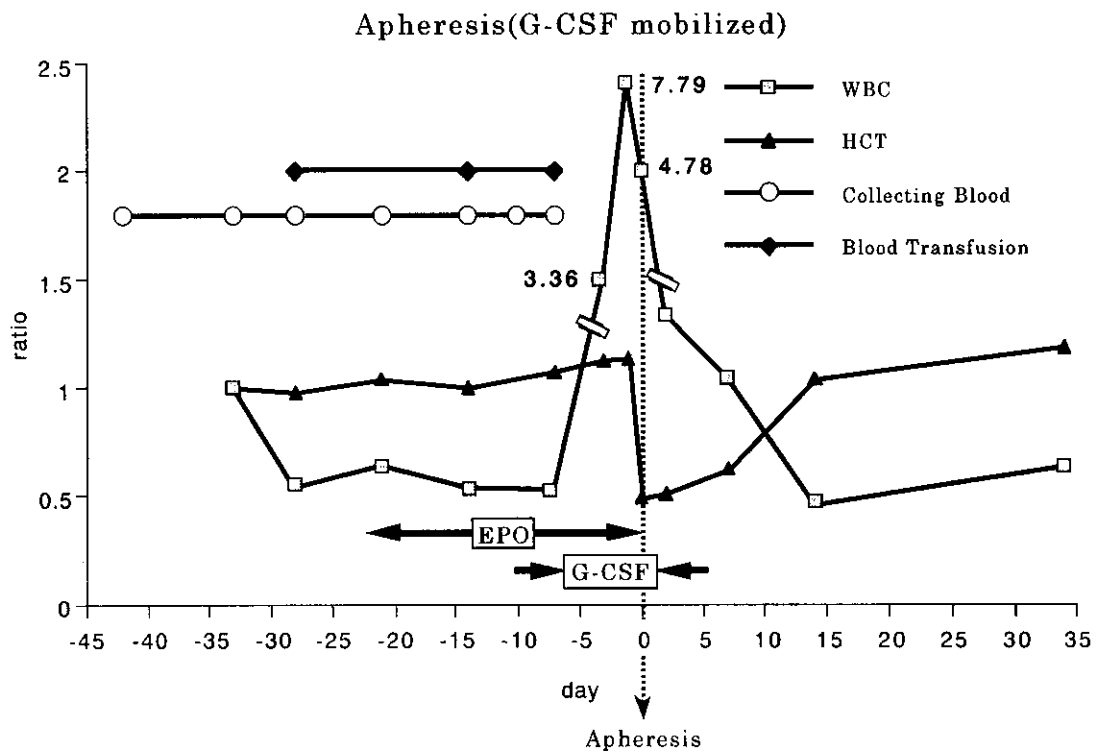


Figure 1: Changes of WBC and HCT during leukapheresis in G-CSF-mobilized monkey.

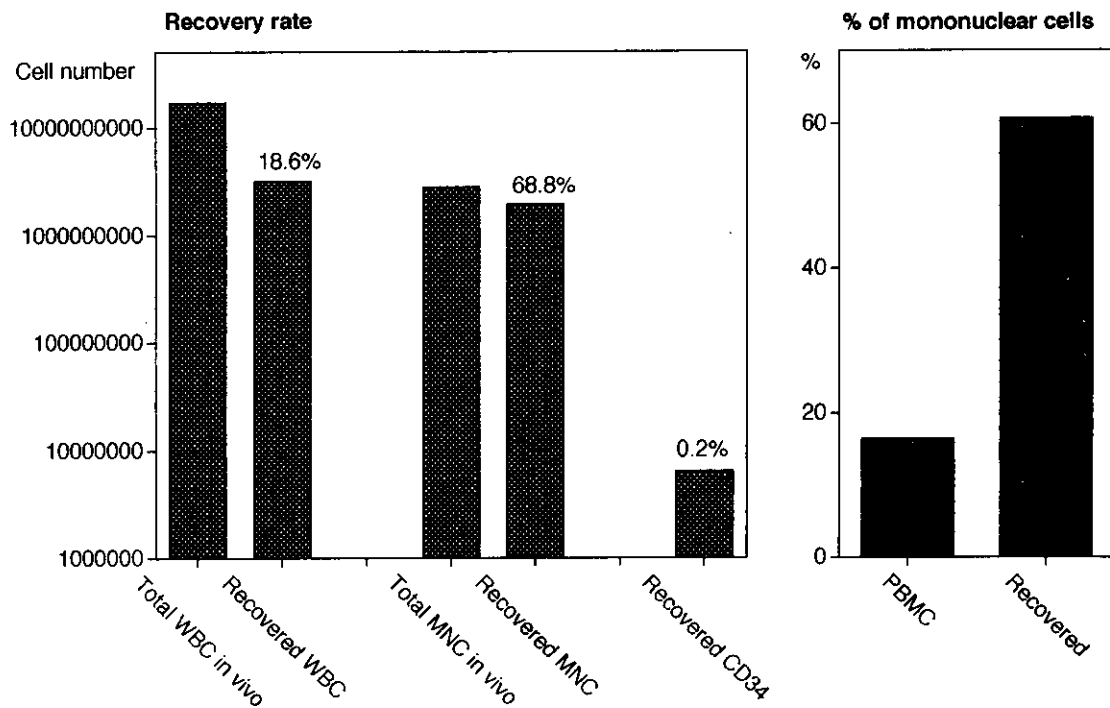


Figure 2: Recovery of WBC, mononuclear cells and CD34+ cells after leukoapheresis.