

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

脂溶性化学物質の日和見感染に対する抵抗性に及ぼす影響

分担研究者 鈴木 嘉彦 麻布大学獣医学部獣医学科

協力研究者 志村 純子 麻布大学獣医学部獣医学科

研究要旨

体内での蓄積性が懸念される脂溶性有害化学物質が、強い病原性を持たない細菌に対する感染抵抗性にどのような影響を及ぼすかを調べるために、マウスを用いた非病原性細菌感染のモデル系の確立を試みた。非病原性細菌として病原性のない大腸菌を使用し、感染は腹腔投与により行い、腹腔からの菌のクリアランス機能、感染部位への細胞のケモタクシス機能およびサイトカインの産生能を非病原性細菌に対する感染抵抗性へ及ぼす影響の指標に適していることがわかった。さらに脂溶性有害化学物質として、食器や包装ラップ乳児用品などに使用されているフタル酸エステルおよびビスフェノールを用い、この系を用いて宿主抵抗性へ及ぼす影響を検討した。その結果フタル酸エステルおよびビスフェノールの投与は菌のクリアランス機能や感染部位への細胞のケモタクシス機能を亢進させる傾向があることが分かった。

A. 研究目的

ダイオキシンなどの蓄積性の高い脂溶性有害化学物質の摂取が免疫系に損傷をあたえ、生体の宿主抵抗性を低下させることがいくつか報告されている。本研究ではダイオキシン類の摂取が、日和見感染を代表する非病原性細菌の感染に対する宿主抵抗性に及ぼす影響を検討するための予備実験として、日和見感染のモデル系の検討を行った。

さらにこの実験系を用いて食品を包むラップや、食器などに含まれているフタル酸エステルおよびビスフェノールなどの脂溶性有害物質の非病原性細菌に対する宿主抵抗性を検討した。

B. 研究方法

試薬：フタル酸エステル (DOP)、ビスフェノール(BIS)およびジエチルスチルベストロール(DES)、コーン油は、和光純薬(株)より購入した。

細菌：非病原性細菌としては大腸菌 k-12 株の標準品を用いた。細菌の培養には LB 培地 (Gifco)

を用いた。生菌数の測定にはトリプソイドソイビーン寒天培地 (日水) を用いた。マウス：Balb/c SPF マウス メス 4 週令を日本 SLC(株) より購入した。実験期間中飲水、食餌は自由摂取とした。大腸菌感染実験には 5 週令のマウスを用いた。

大腸菌の感染：大腸菌は LB 培地を用いて 18 時間前培養したのち、濁度 (OD550nm) 0.05 になるように阪口フラ

スコに接種し 105 分から 120 分 37℃ で浸透培養を行った。遠心により菌を回収後、 $2.0 \times 10^8$ — $3.0 \times 10^8$ /マウスの濃度に生理食塩水を用いて調整し腹腔に摂取した。経時的に腹水、脾臓を採取し、生菌数を測定した。血液は採血後血清を分離し、サイトカインの測定に供した。

脂溶性化学物質の投与：DOP, NON, BIS および DES はそれぞれ 340 mg/kg/day, 20 mg/kg/day, 5.0 mg/kg/day および 2.0 mg/kg/day を少量のエタノールで溶解した後、コーン油で希釈し、0.2 ml/マウスを背部に投与した。投与期間は5日間とし、最終投与から2—3日後、大腸菌 K-12 を感染させ、0、24、98 時間後の腹水、血液、脾臓、胸腺を採取した。

腹水中の細胞数の測定：採取した腹水は800回転5分間遠心したのち、上清は段階希釈し、生菌数を測定した。沈澱した細胞はチュルク液で染色後、血球計算盤で細胞数を測定した。

脾臓中の生菌数の測定：採取した脾臓はゲンタマイシン溶液 (100 ug/ml) で1時間インキュベートしたあと、生理食塩水で洗浄後、ホモゲナイズし、段階希釈して生菌数を測定した。

サイトカインの測定：血液中及び腹水中のサイトカインの定量は OPT EIA KIT (Pharmingen) を用いて行い ELISA リーダーで測定した。検量線を作成し、濃度を換算した。

血清脂質の分析：和光純薬製キット (コレステロール C-テストワコー、NEFA C-テストワコー、トリグリセライド G-テストワコー) を用いて行った。

### C. 研究結果

#### (1) 非病原性細菌に対する宿主抵抗性への影響を調べるための実験モデル系の確立

化学物質を投与していない対照群に  $2.0 \times 10^8$  の大腸菌 K-12 を腹腔に感染させた場合、感染後 24 時間目までに腹腔からの菌の排除が行われた。脾臓への移行は投与後 6 時間目から観察され、96 時間目までの間に徐々に排除された。腹腔内への免疫細胞のリクルートは投与後 24 時間後から顕著になり、48 時間目がピークとなった。陽性対照として免疫抑制作用のある DES を投与した群では腹腔からの菌の排除が対照群に比べ遅延しかつ腹腔内への免疫細胞のリクルートも対照群に比べ減少していた。

血清のサイトカインは、IL-6, TNF- $\alpha$  および MCP-1 を測定した結果、MCP-1、IL-6 および TNF- $\alpha$  は感染後 6 時間後をピークに 24 時間後までには急速に減少した (Fig 1)。DES 投与群との差はなかった。血清中の脂質はコレステロール (T-CHOL)、NEFA、トリグリセライド (TG) を測定した。大腸菌の感染によって T-CHOL の上昇が 12 時間目から認められたが DES 投与群と対照群とでは差が見られなかった。TG 値は感染によっての変化は見られなかった。NEFA 値も感染による変化は認められなかったが対照群の値は、投与後 6 時間目より 48 時間目まで DES 群より高値を示した (Fig 2)。このことから感染によって、脂質代謝の亢進がおきていることが示唆された。

以上のことから、大腸菌 K-12 を腹腔に摂取し、腹腔内の生菌数、脾臓中の生菌数、血清中 (腹水) のサイトカイ

ンを指標にすることによって非病原性細菌に対する宿主抵抗性への影響を調べる事が可能であることがわかった。

(2) フタル酸エステルおよびビスフェノールの非病原性細菌に対する宿主抵抗性

上記で述べた実験系を用いて、フタル酸エステルおよびビスフェノールを投与したマウスでの大腸菌 k-12 の感染に対する抵抗性を腹腔内の生菌数、細胞数、脾臓中の生菌数、血清中（腹水）のサイトカインを測定することによって検討した。

感染20時間後の腹腔内の生菌数は、BIS および DOP 投与群とも対照群より速やかに減少していた (Fig.3-A)。また、脾臓中の生菌数も対照群に比べて多く、42時間後においても BIS 群では菌数の減少が見られなかった。DOP 投与群では42時間までに投与した5匹のマウスがすべて死亡したため、菌の検出はできなかった (Fig.3-B)。腹腔内にリクルートしてきた細胞数は BIS および DOP 投与群では対照群に比べ有意に多かった (Fig.3-C)。これらのことから BIS および DOP の投与により感染局所に免疫担当細胞があつまりやすくなる傾向が見られたことから腹腔からの菌の排除は速やかに行われるがその反面脾臓中の菌の排除に関する機能が低下していることが示唆された。脾臓での菌の残留が死亡の原因の一つであるとも考えられた。

次に血清中および腹水中のサイトカインの濃度を測定した結果、血清中の IL-6 では BIS および DOP 投与群とも高い値を示していた (Fig.4)。MCP-では DOP 投与群が対照群より高い値を示す

傾向にあった (Fig.5)。TNF- $\alpha$  は、対照群に比べ DOP 投与群、BIS 投与群とも低い値を示していた (Fig.6)。また、各試験群でのサイトカインの値は血清の方が腹水よりも有意差が検出されたことから、感染抵抗性に関する指標としてサイトカインを用いる場合には血清のサイトカイン濃度を測定する方が、のぞましいことが分かった。

#### D. 考察

生体は外界の微生物に常にさらされており、皮膚や口腔、鼻腔および腸管には多くの細菌が棲息している。正常な状態では、正常な棲息部位以外に細菌が生体に侵入した場合には種々の防御機構によって速やかに排除される。この機構にはマクロファージや好中球を中心とする貪食細胞の機能やその活性化をつかさどるサイトカインの産生が関与している。しかし術後や老化、その他の原因で免疫機能が低下した場合にこれらの菌に感染すると体内で内毒素などを産生し重篤な症状に陥ったり、死に至ることもある。このような感染は一般に日和見感染と呼ばれる。

本研究では非病原性細菌を用い、日和見感染の動物実験モデル系の確立を目的として、盲腸炎モデルとしてよく用いられる非病原性大腸菌を腹腔感染させる系を用いた。この系においては正常な生体防御機構が備わっている状態では感染後24時間で腹腔から菌の排除が起こり、96時間で脾臓からの菌の排除が起こっていた。また、腹腔に集まる細胞の数は感染後24時間から増加して72時間まで持続していた。好中球などを呼び寄せるはたらきのあるプロ炎症性サイトカインである IL-6

および MCP-1 の産生は、感染後 6 時間—12 時間がピークであり、血清中より腹水中のサイトカイン濃度を測定した方が感度がよいことがわかった。これらの結果から、腹腔内、脾臓内の生菌数、腹腔の細胞数および腹水のサイトカイン産生を指標にすることにより、この系を用いた感染系で非病原性細菌に対する宿主抵抗性を調べることができると考えられた。

さらにこの系を用いて、近年食品を包むラップや、食器などに多く含まれており、健康被害が懸念されている脂溶性化学物質であるフタル酸エステルおよびビスフェノールの宿主抵抗性を検討した。これらの脂溶性化学物質は今までの知見から、体内代謝が早く、体内蓄積性が比較的低いと考えられている。そこで我々は皮下に連続的に一週間投与した後、2—3 日の休止期間をおいて感染させる方法を行った。この方法はエストロゲン様ホルモンの生体影響を検討する時によく用いられる。ビスフェノールおよびフタル酸エステルは、腹腔内に投与された大腸菌に対して細胞を局所に遊走させるサイトカインの産生を亢進する作用がある。この結果腹腔内細胞数の増加が見られ、腹腔からの菌の排除が対照群に比べて速やかに起こることが認められた。しかしその後脾臓に移行した菌の排除に関する機能が低下しており、対照群に比べ脾臓に菌が長く残存している。フタル酸エステル投与群においては死亡率が高かった。このことは、フタル酸エステルおよびビスフェノールの持続的投与が免疫系に影響し、炎症反応を亢進する可能性を示唆している。しか

し、どのような機序で免疫系が亢進されているのかに関しては、さらなる検討が必要である。

我々は来年度、ダイオキシンを投与した動物を用いて感染抵抗性を検討する予定であるが、病原体を用いた感染実験を行うにはケミカルハザードだけでなくさらにバイオハザード施設が必要となってくる。しかし現実的に両方の施設を備えた研究施設は日本にはほとんどない。そこで本研究で確立した実験系はバイオハザード施設がない環境でも行えるという利点があることから、今後のダイオキシン類を用いた感染動物実験を行うためにも重要な意義を持っている。

#### E. 結論

日和見感染の動物モデルの確立のため、非病原性大腸菌を用いた感染モデルを構築し、宿主抵抗性の指標になる測定項目を検討した。その結果、大腸菌 K-12 を  $2 \times 10^8$ /マウスの濃度で腹腔感染し、腹腔内生菌数、脾臓内生菌数、腹水のサイトカイン産生を測定することにより、感染抵抗性への影響を予測できることが分かった。さらにこの系を用い、ビスフェノールおよびフタル酸エステルの影響を調べたところ、免疫反応を亢進することによって宿主抵抗性に影響を及ぼす可能性が認められた。

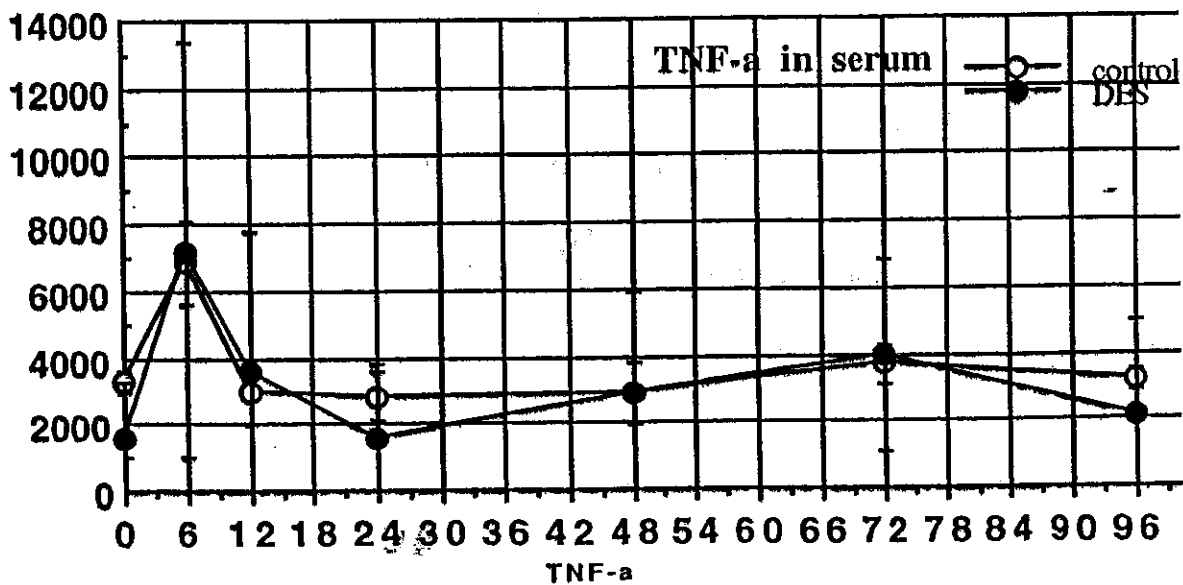
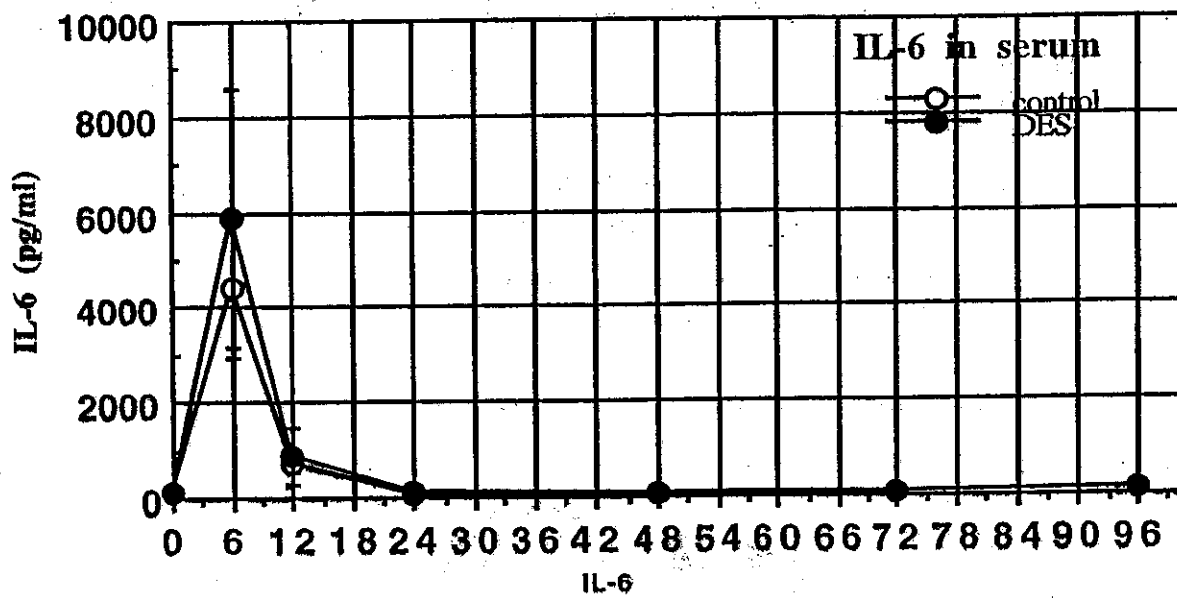
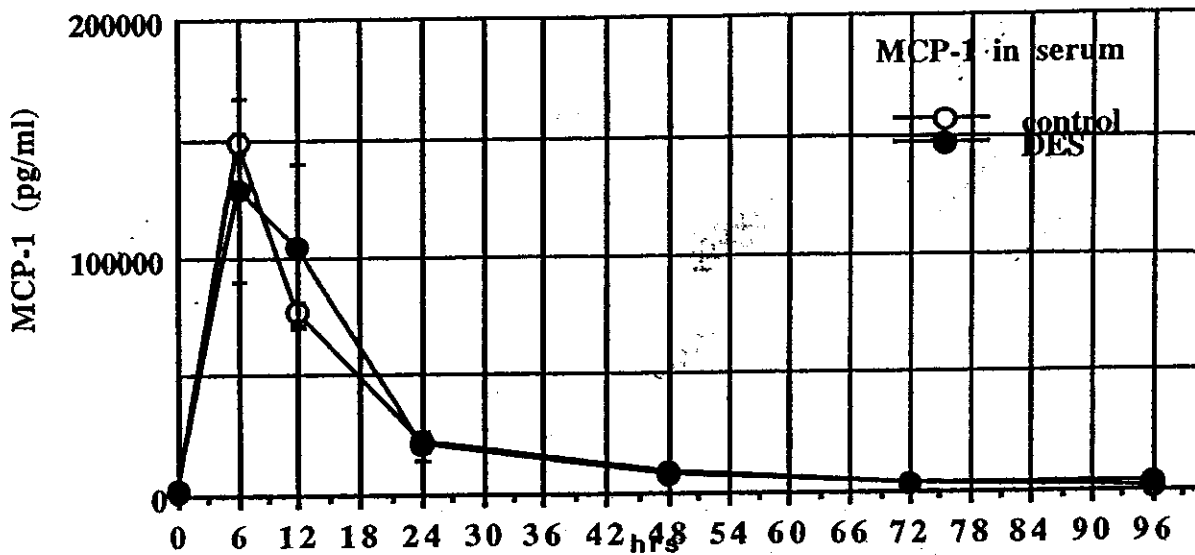


Fig.1 非病原性細菌感染におけるサイトカインの変化

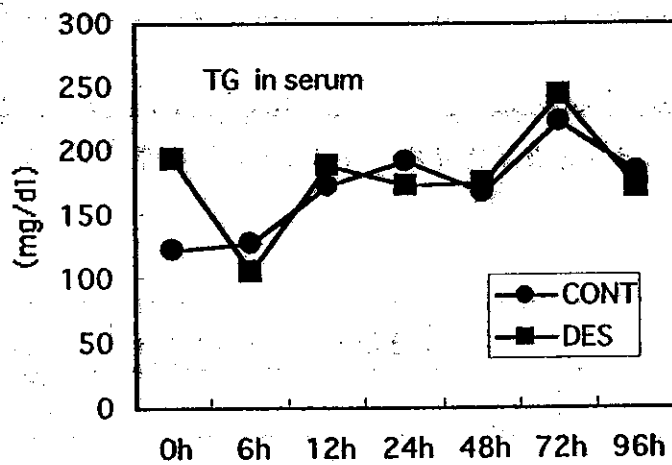
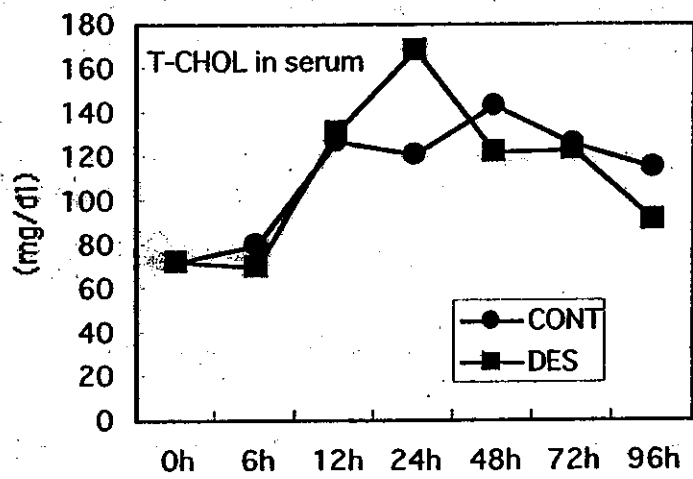
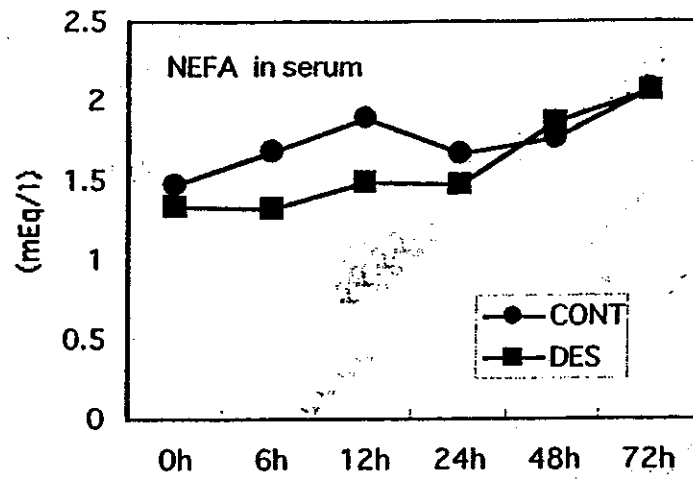


Fig.2 非病原性細菌感染での血清脂質の変化

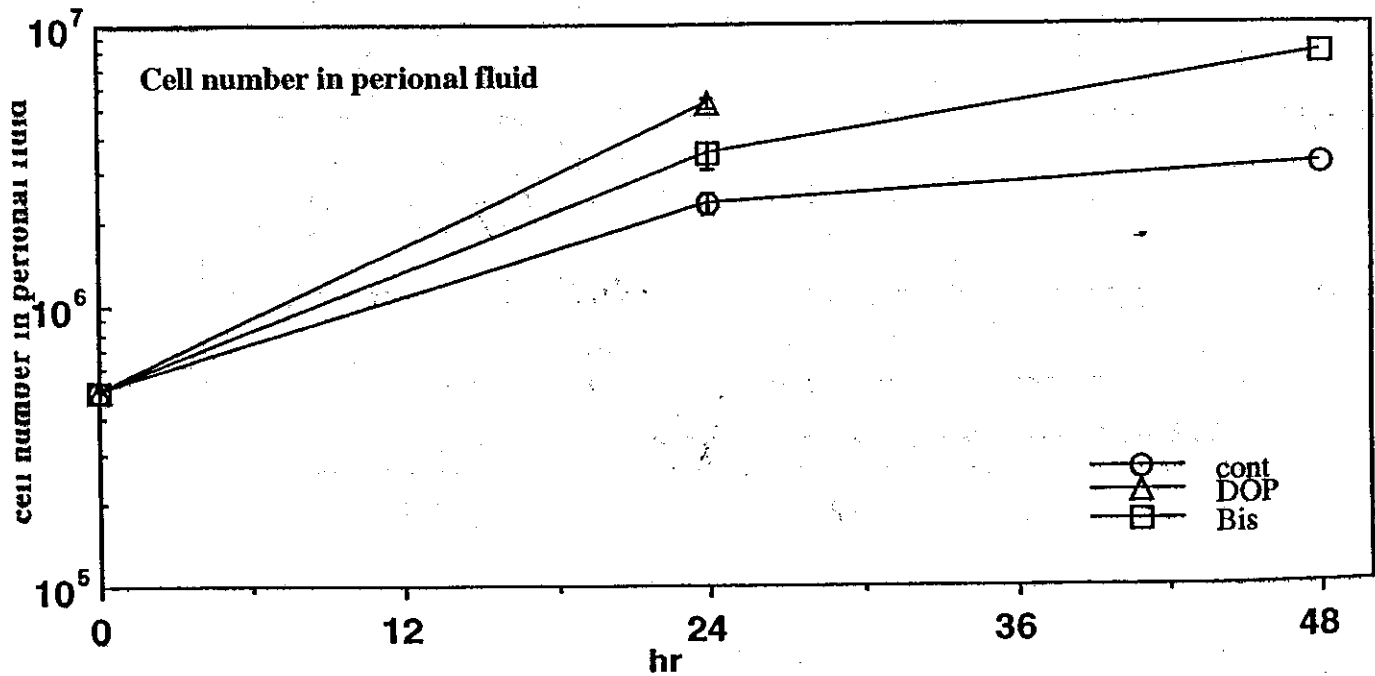
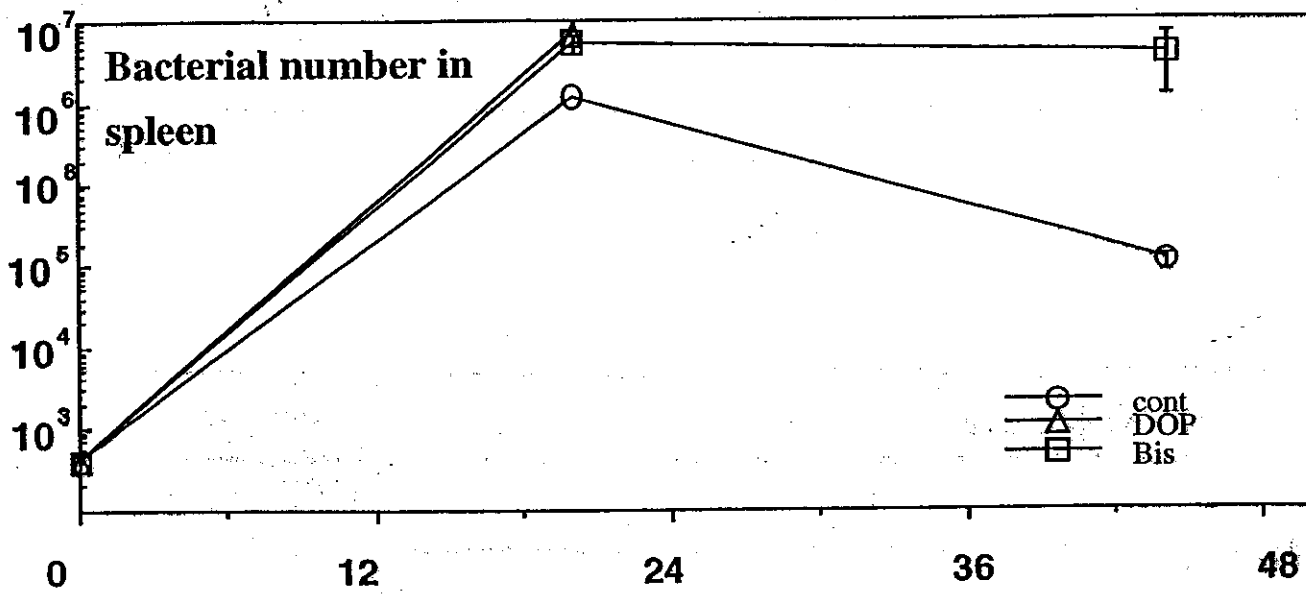
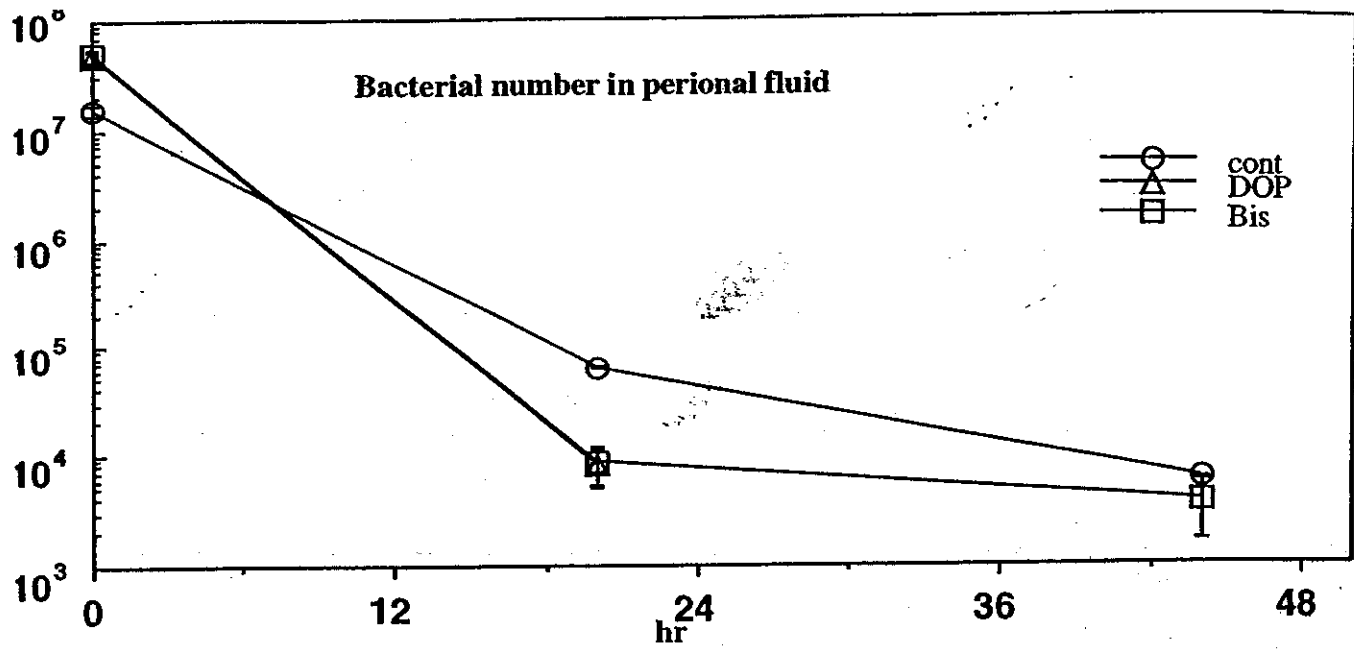


Fig.3 腹腔内、脾臓内の生菌数および腹腔内細胞数におけるビスフェノールおよびフタル酸エス

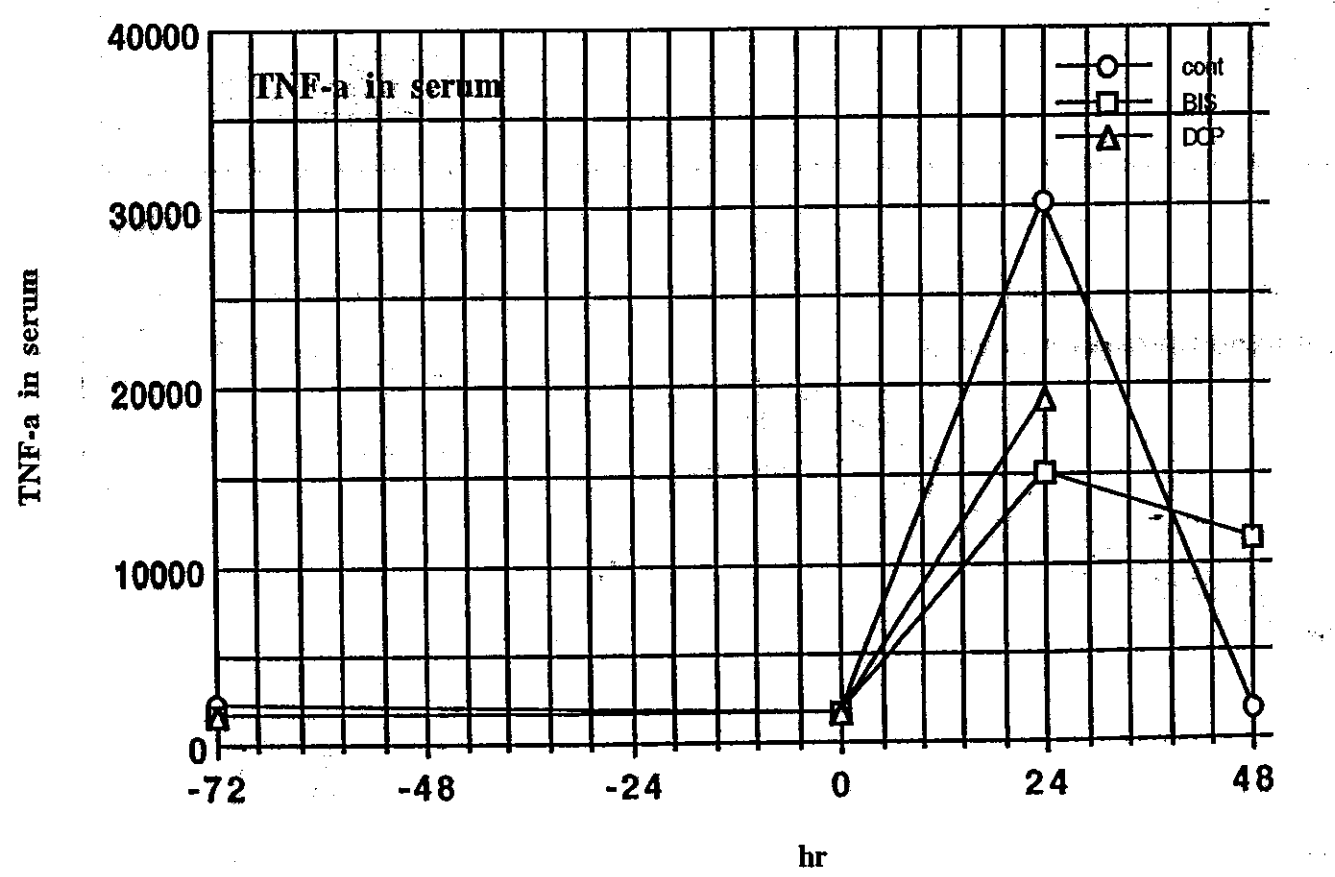
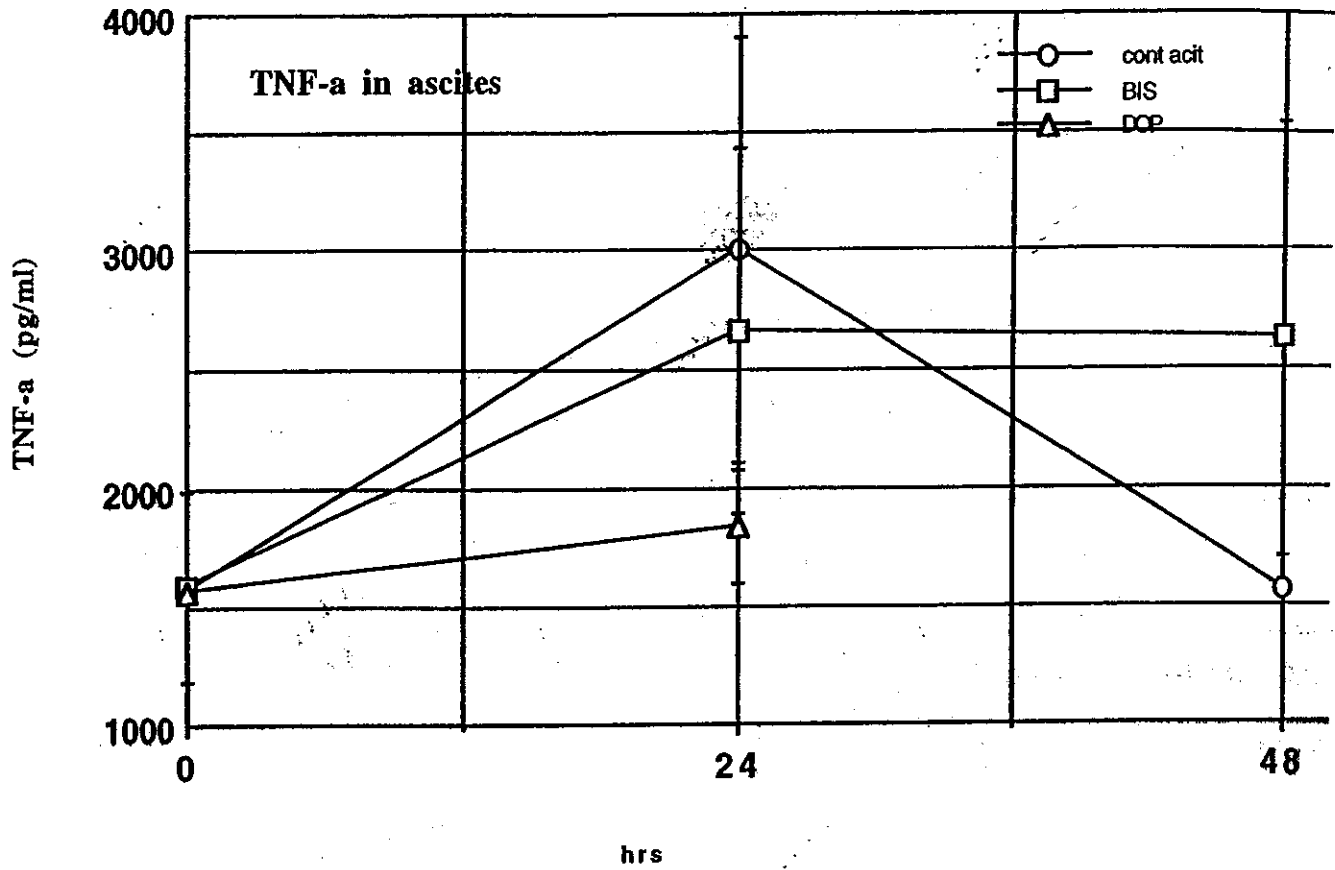


Fig.5 血清中、腹水中でのTNF-a産生におけるビスフェノールおよびフタル酸エステルの影響



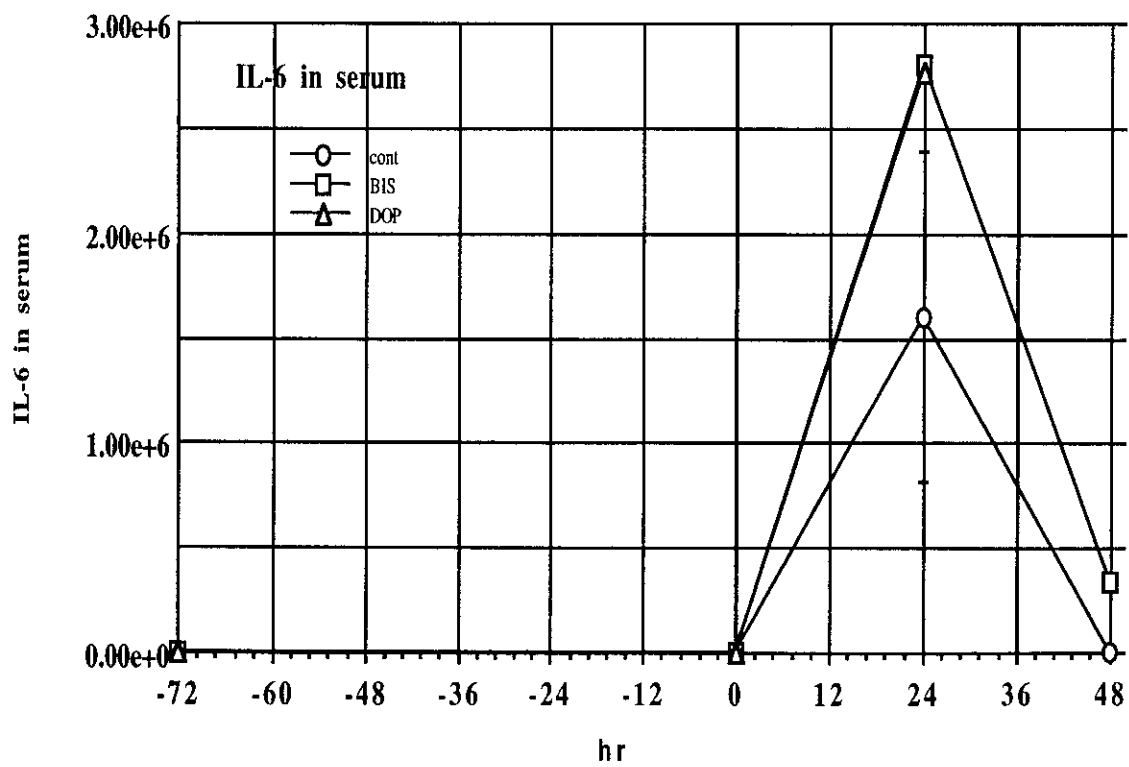
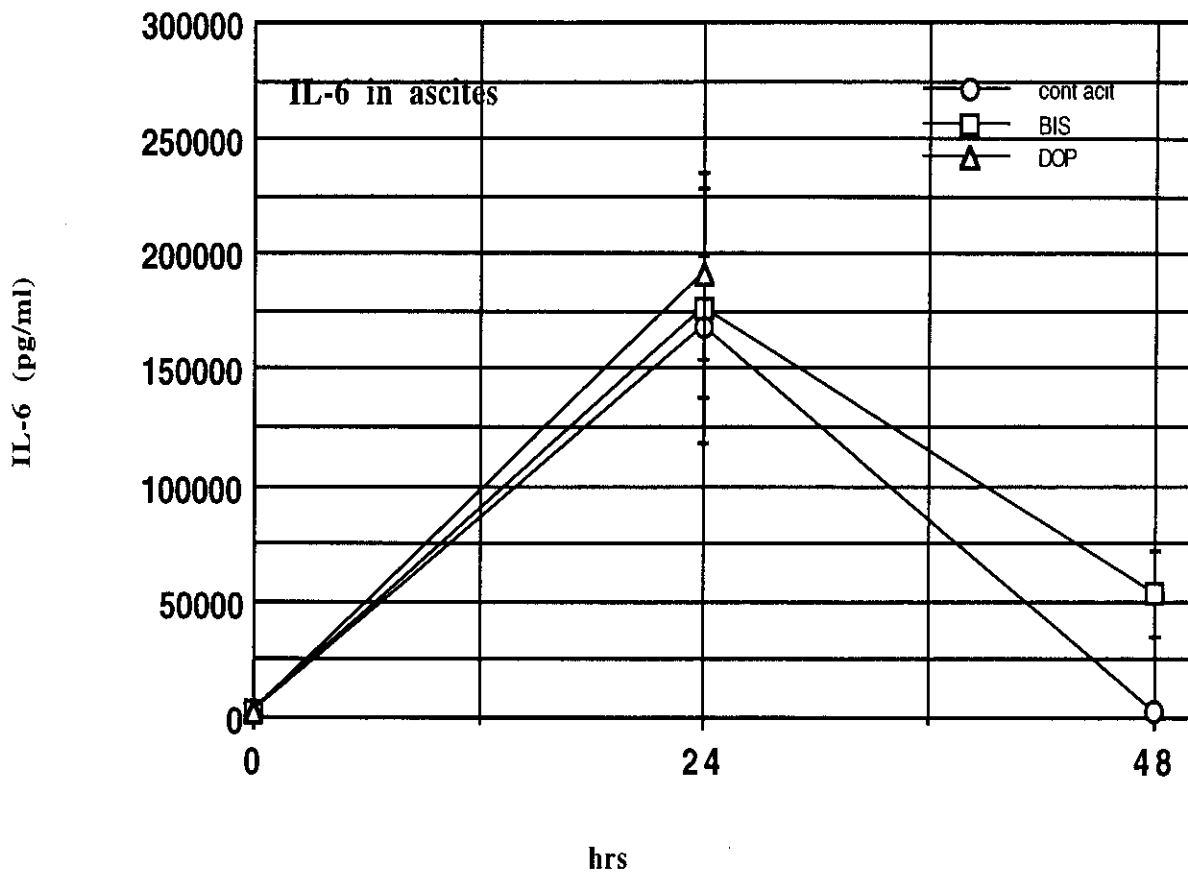


Fig.4 血清中および腹水中のIL-6産生におけるビスフェノールおよびフタル酸エステルの影響

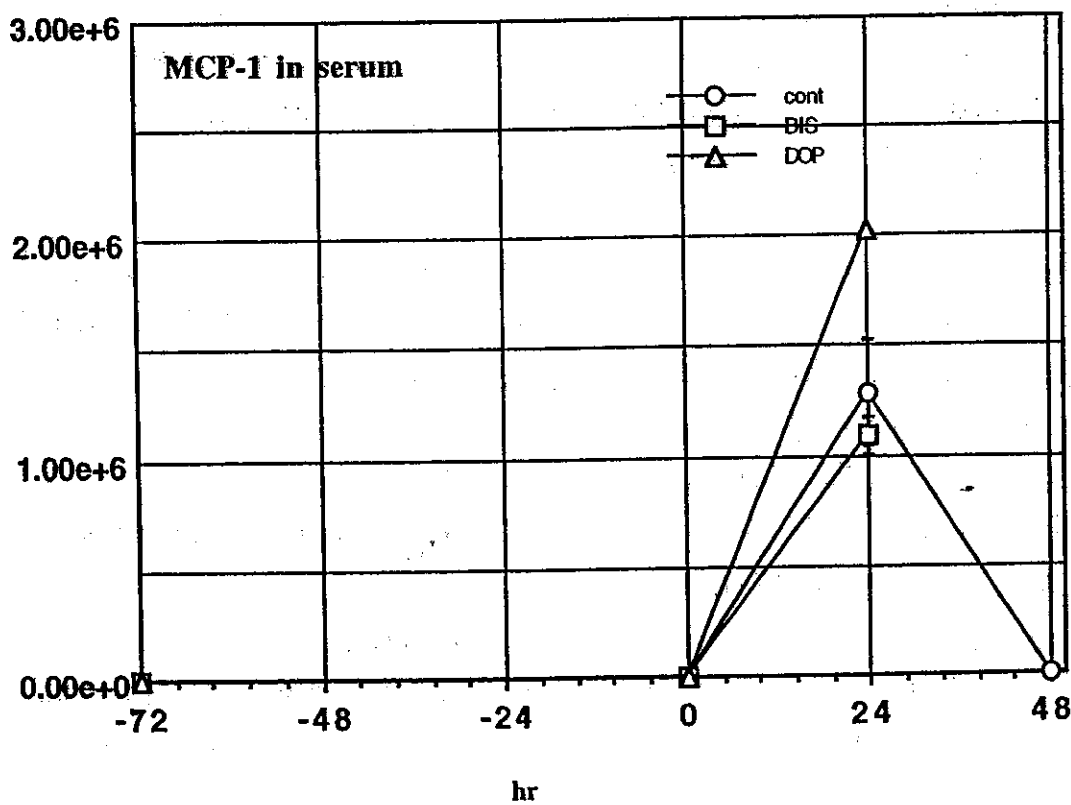
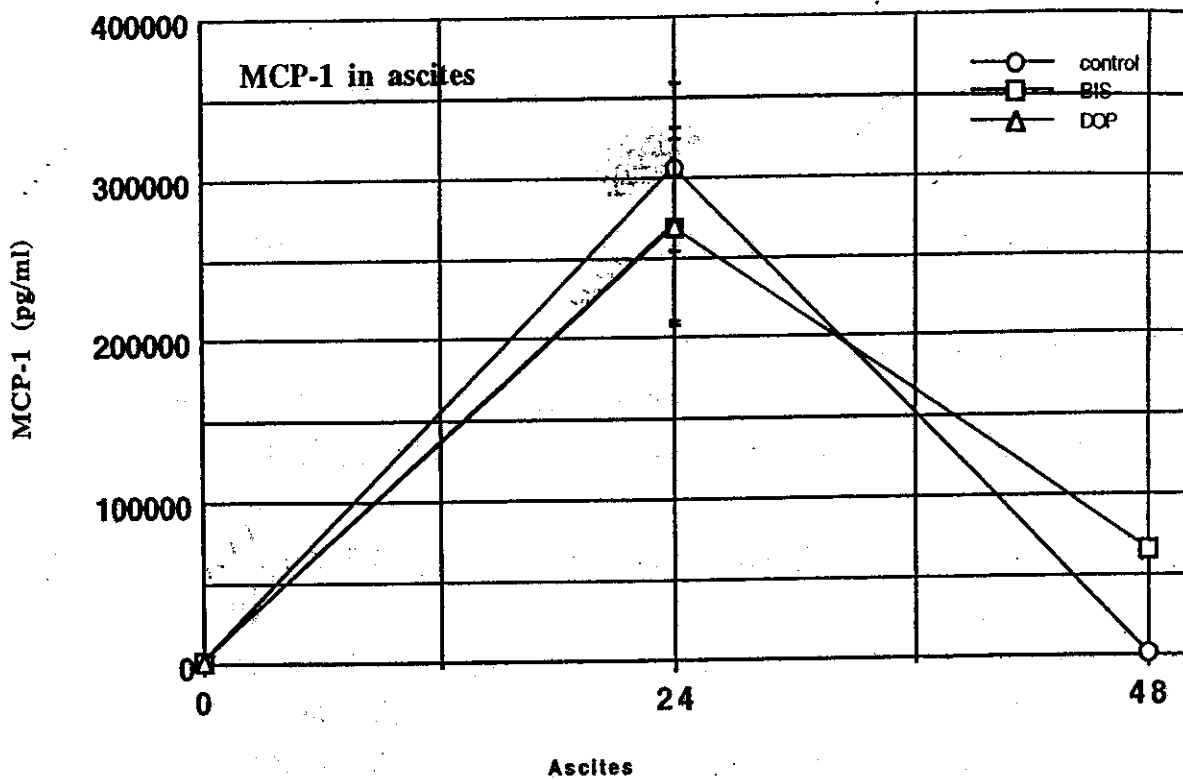


Fig. 6 血清中および腹水中のMCP-1 産生におけるビスフェノールおよびフタル酸エステルの影響

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

潜伏感染ウイルスの再活性化の検出、評価法の検討に関する研究

分担研究者 山田章雄 国立感染症研究所

筑波医学実験用霊長類センター、センター長

協力研究者 向井鎌三郎 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター

**研究要旨** 生活環境中の脂溶性有害物質が食品や水などを介して生体に暴露した時の宿主の感染症に対する抵抗性に及ぼす影響を調べるにあたり、本研究では、ウイルス感染サル類を用いてその評価を行うことを目的とした。本年度は、国立感染症研究所筑波霊長類センターで飼育されているサルにおけるウイルス感染の状況を抗体検査により調査し、抗体陽性サルからのウイルスの検出法の確立を試みた。その結果、レトロウイルスの分離培養系を確立し、またPCR法により、SRV、SIV、EBウイルスの測定系を確立できたので、今後、有害物質をサルに経口投与した際の潜伏感染ウイルスの再活性化や易感染性の検討を行うことが可能となった。

A. 研究目的

TBT(Tri Butyl Tin)をはじめとする生活環境中の脂溶性化学物質は体内に蓄積され、慢性毒性として免疫毒性があることが報告されている。本研究では、ヒトと同じ霊長類に属するサル類を用いて、脂溶性有害物質が、潜伏感染しているウイルスにどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的としている。このため、サルレトロウイルス (SRV、

SIV) やサルヘルペスウイルス (EBウイルス、CMV) 等のウイルス感染の測定法の確立を行った。

B. 研究方法

1. サルレトロウイルス感染の検出

抗SRV/D抗体の検出

抗SRV/D抗体の検出と確定診断はウエスタンブロット(WB)法により行った。即ち、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、被検サル血清は、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 遺伝子の検出

$2 \times 10^5$  個の末梢血単核球由来の DNA を用い、SRV-1、SRV-2 感染 Raji 細胞染色体 DNA を用い、SRV/D env 領域の 422, 398bp DNA 断片 DNA 断片を Nested PCR で検出する (Liska, V., et. al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 13: 433-437, 1997) 方法と、SRV/D gag 領域の 274bp を 1 回目の PCR で増幅し、2 回目の nested PCR で 222bp の gagDNA 断片を増幅する方法 (Lerche, N.W., et al. Lab. Anim. Sci. 47: 263, 1977) を検討した。

#### 抗 SIV 抗体の検出

抗 SIV 抗体は EIA、IFA、WB 法等で検出できるが、アジア産マカク属サル類では通常は検出されない。

アフリカ産のサル類では多くのサル類からそれぞれのサル種に固有の SIV が分離されている。アフリカミ

ドリザルでは、20 倍希釈したサル血清を用い、SIV 感染、非感染 Hut78 細胞のスミア標本を用いて作製したスライドによる間接蛍光抗体 (IFA) 法により測定した。

#### PCR 法による SIV 遺伝子の検出

結果の図 3, 4 に詳しく述べた。

#### 2. サルヘルペスウイルス感染の検出

抗 EB ウイルス抗体の検出は当センターで分離された EB ウイルス産生細胞株 (Ts-B9) 株のスミア標本かまたは、(株) 科薬社製ヒト用抗 EB ウイルスカプシッド抗原 (VCA) IgG 抗体価測定用スライドを購入し、IFA 法により測定した。但し、2 次抗体は FITC 標識抗サル IgG 抗体を 100 倍希釈して用いた。

サルサイトメガロウイルス (CMV) の感染の検出には、CMV 感染、非感染 OMK 細胞のスミア標本を用いて作製したスライドによる間接蛍光抗体 (IFA) 法により測定した。

PCR 法による EB ウイルス遺伝子の検出は、Hayashi ら (Lab. Invest. 79, 823, 1999) のプライマーセットと当センターで分離されたカニクイザル由来 EB ウイルス産生細胞株 (Ts-B9) 株のゲノム DNA を用いて行った。

### (倫理面への配慮)

本研究のうち、ウイルス感染実験に関しては、国立感染症研究所動物実験委員会による審査の結果承認を受けた。また、サル抗体検査の一部の血清は、筑波霊長類センターサルコロニーにおいて定期健康診断のために麻酔下で採血されたものを被験検体として用いた。また、動物の取り扱いにあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って繁殖育成サルを用い、動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

## C. 研究成果

### 1. サルレトロウイルス感染の検出

#### SRV/D抗体の検出

WB法を用いて、SRV/D抗SRV/D抗体の検出を行うことにより、筑波霊長類センターで繁殖されたカニクイザルへの本ウイルスによる浸淫度を調査したところ、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)であった。

#### PCR法によるSRV/D遺伝子の検出

SRV1、SRV2の鋳型DNAとして、組換えプラスミッドpSRV1、D2C/Oregon、を用い、Liskaらの方

法でSRV/Dウイルスのenv領域の422, 398bp DNA断片をNested PCRで検出を試みだところ、検出系の感度は数1000コピーであった。一方、Lercheら方法でSRV/Dgag領域の検出を行ったところ、感度はかなり高く、SRV1、SRV2いずれのプラスミッドを鋳型に用いても、数千コピーのウイルス遺伝子が検出できた。同様のバンドはSRV-1、SRV-2感染Raji細胞染色体DNAを用いた場合にも検出可能であった。

図1には用いたプライマーの配列およびPCR産物のサイズを示す。

筑波霊長類センターで繁殖されたカニクイザルのうち抗SRV/D抗体陽性個体より分離された2株(N27, T150)のSRV/Dに関し遺伝子配列を決定したところ、env領域の410bp、gag領域の232bpに関し、既知のSRV/D-1、-2、-3と比較したところ、核酸塩基配列で67.0~77.6%、アミノ酸に変換した後比較しても62.6~75.3%の相同性しか認められず、SRV/D筑波株間の差がないことから、SRV/D筑波株は新型ウイルスであることが推測された(図2)。

#### アフリカミドリザルのSIV感染

アフリカミドリザルには野生でSIV感染個体が多く、36~42%が陽性であるといわれている。筑波

霊長類センターで繁殖に用いられていた野生由来アフリカミドリザルに関して IFA 法にて検査したところ、47 頭中 41 頭 (87%) が SIV 抗体陽性であった。

#### PCR 法による SIV 遺伝子の検出

我々は最近、サルエイズ脳炎組織由来の SIVBM5 株の全塩基配列を決定したが、そのため、独自にデザインした PCR 用のプライマーおよびその反応条件を図 3、4 に示す。このうちの 2 セット (S.pol 2 - A.pol 1 と S.pol 3 - A.pol 2) は アフリカミドリザルの SIVagm の PCR 検出にも用いることができ、検出感度は数 100 コピーであった。

## 2. サルヘルペスウイルス感染の検出

#### カニクイザルの EB ウイルス感染

筑波霊長類センターではコロニーのサルの定期健康診断のためにサルの採血を行っているが、平成 12 年度に採血された血清 126 検体を用い、EB ウイルス VCA 抗原を用いた IFA 法により、抗 EB ウイルス抗体の有無を調査したところそのうちの 76% が陽性であった。

つぎに、当センターで分離された EB ウイルス産生細胞株 (Ts-B9) 株のゲノム DNA を用い、Hayashi ら

(Lab. Invest. 79, 823, 1999) のプライマーセット (S. BRRF1; 11a - A. BRRF1; 11b) および (S. BGRF1; 13a - A. BGRF1; 13b) を用いて PCR を行ったところ、それぞれ 678bp と 1078bp のバンドが検出されたので、検出感度を上げるため、nested PCR を開発中である。

#### カニクイザルの CMV 感染の検出

SA6 感染 OMK 細胞を用い、IFA 法にてカニクイザルのサイトメガロウイルス (CMV) による感染の検出を行った。

1 才から 2 才までの保存サル血清 69 検体を調査したところ、陽性率は 84% であり、ほとんどのサルで本ウイルスによる感染があるものと思われる。CMV は尿や唾液中に排出されると言われており、現在 PCR 法による検出法の開発を行っている。

## D. 考察

生活環境中の脂溶性有害物質が食品や水などを介して生体に暴露した時の宿主の感染症に対する抵抗性及ばず影響を調べるにあたり、サル類を用いることは、サル類がヒトと同じ霊長類に属するため、ヒトにおける脂溶性有害物質の及ぼす影響をより直接的に推測することができる可能性が高い。実際に、サル EB ウ

イルス、サルCMVなどやサルエイズウイルスにおいては、その抗原性においても、ウイルス遺伝子塩基配列においてもヒトウイルスと相同性が高く、ヒトの検査用のプローブがそのまま使えることが多い。

今回、サルレトロウイルス2種類、サルヘルペスウイルス2種類の検査検出系を開発したが、当センターのカニクイザルには4種類のウイルスに感染している個体が多いことがあきらかになった。

今後、脂溶性有害物質が潜伏感染しているウイルスにどのような影響を及ぼすのかを明らかにするためには、コルチゾール等のストレスマーカーの測定を行い、環境要因による血中ウイルス量の変動を把握しておく必要がある。次年度の前半はこのような観点で、今年度確立できたウイルス感染の測定法を用いて、サルレトロウイルス (SRV、SIV) やサルヘルペスウイルス (EB ウイルス、CMV) のバックグラウンドレベルの血中ウイルス量を測定し、安定した値を示すサルの選別が必要であると考えられる。

一方、小動物において脂溶性有害物質が病原体の感染 dose を著しく低下させるようなウイルス等が明らかになった場合には、サルを用いて同等の病原体の感染 dose を調べる

ことも計画の一部として考慮する必要があると思われる。

## E. 結論

1. レトロウイルスの分離培養系を確立し、その遺伝子、抗体検出系を確立した (SRV, SIV)。

2. ヘルペスウイルス感染の検出系をEBウイルスに関して確立した。CMVに関してはPCR系を引き続き開発する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) J. Takano, T. Narita, K. Fujimoto, R. Mukai, and A. Yamada: Detection of B virus infection in cynomolgus monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen. *Exp. Anim.*, In press.

2) Shimizu N., Soda Y., Kanbe K., Liu H.Y., Mukai R., Kitamura T., Hoshino H : A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 74 : 619-626 (2000)

3) Matunaga, S, Mukai, R, Murayama. M. I Yoshikawa, Y, Murayama, Y: Sequence and functional properties of African green monkey CD4 silencer. *Immunol. Lett.* (Accepted)

### 2. 学会発表

1) 小松原博文、菊池俊彦、佐多徹太郎、松田基夫、宇田晶彦、山田章雄、向井鏝三郎：中枢神経指向性 SIV の解析

第 14 回日本エイズ学会（京都）2000 年

2) 棚林 清、向井鏝三郎、山田章雄：B ウイルス糖タンパクの発現と血清診断用抗原としての可能性、第 129 回日本獣医学会 2000

3) 棚林 清、向井鏝三郎、山田章雄：人獣共通伝染病としての B ウイルス

感染症、サル類における B ウイルス抗体検査、第 15 回ヘルペスウイルス研究会 2000 年 6 月

棚林 清、向井鏝三郎、山田章雄：組換え発現蛋白を用いた B ウイルスサル血清抗体検出法の開発、第 48 回日本ウイルス学会 2000 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



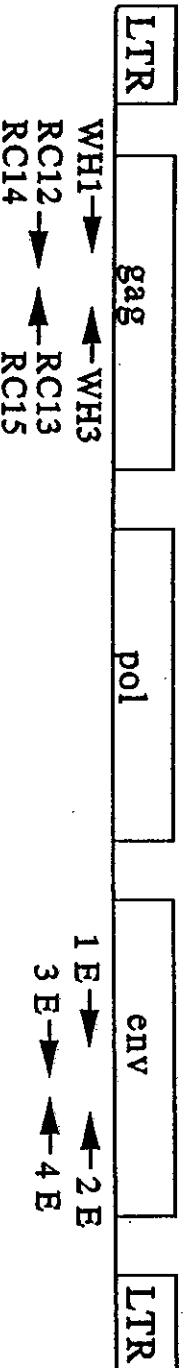
1

## Simian retrovirus typed env and gag specific primers for PCR

Primers * 1	sequence ( 5' - 3' )	Predicted env product size (bp)			
		SRV/D-1	SRV/D-2	SRV/D-3	N27 T150
<b>Standard PCR</b>					
SRVenV 1E	GCCCCGTGGTAAAGAAAATTG	728	701	725	(713) (713)
SRVenV 2E	ACTTCTACTAGAGAGTCTAC				
<b>Nested PCR</b>					
SRVenV 3E	GAAGATTGCTGGCTGTGCTT	422	398	422	(410) (410)
SRVenV 4E	ATAGCTGGAATGGGACACAGG				
<b>* 2</b>					
Primers	sequence ( 5' - 3' )	Predicted gag product size (bp)			
<b>Standard PCR</b>					
WH1/M	CCACTGTAATGGCGGTTGTTAATCC	266		266	
WH3/M	CTGGGAAAATATCTTTGGGATTTGTTT				
WH1/2	CCGCTGTGATGGCGGTAGTCAATCC				
WH3/2	CTGGGAAAATATCTTTGGGAGGATATTTC	266			
<b>Nested PCR</b>					
RC12	TAATCCAAAAGAGGAGCTCAAGA	222		222	(232) (232)
RC13	TGTCTCTCTTCTGACTGGC				
RC14	CAATCCTAAGAAGAACTCAAGA				
RC15	TATCTCTCTGTGTTTATTAATAAGG	222			

\* 1 AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSE, Vol 13, No 5, Number, 1997 : 433 - 437

\* 2 Laboratory Animal Science, Vol 47, No 3, June, 1997 : 263 - 268



Homology in Nucleic Acid \ Amino Acid in env and gag of SRVs TPC

( env )

	SRV-1	SRV-2	SRV-3	N27	T150
SRV-1		60.8	81.9	72.1	72.1
SRV-2	65.6		62.9	62.6	62.6
SRV-3	84.7	64.9		70.4	70.4
N27	70.5	67.7	69.2		100
T150	70.5	67.7	69.2	100	

( gag )

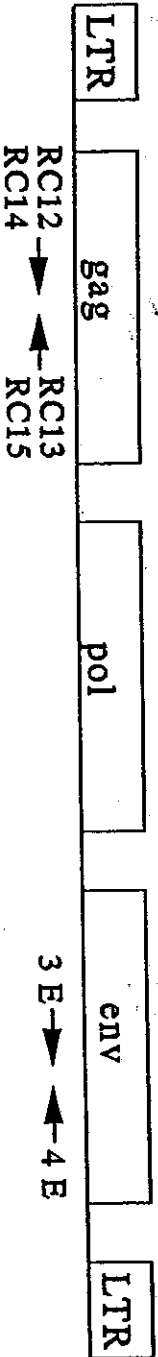
	SRV-1	SRV-2	SRV-3	N27	T150
SRV-1		69.9	95.9	75.3	75.3
SRV-2	70.1		68.5	65.8	65.8
SRV-3	90.6	71.5		74.0	74.0
N27	75.9	67.0	77.6		100
T150	75.9	67.0	77.6	100	

Nucleic acid : 410bp

Amino acid : 136 residue

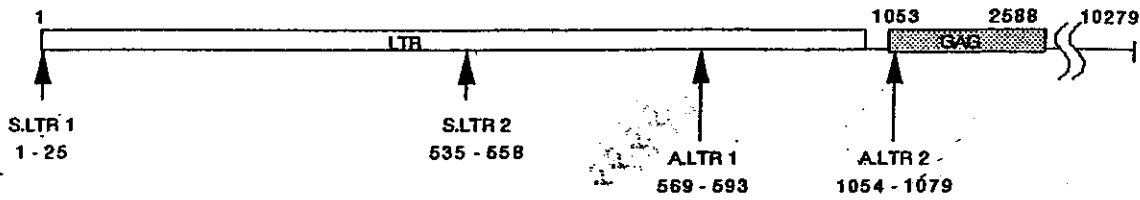
Nucleic acid : 232bp

Amino acid : 77 residue

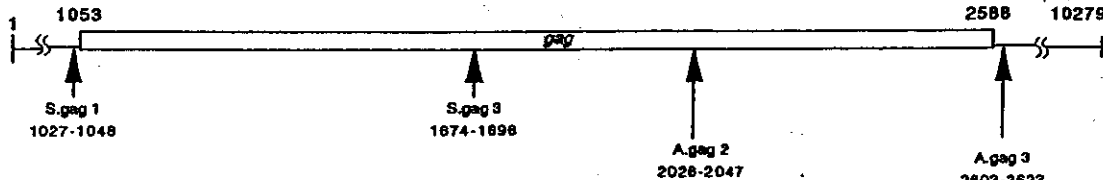


3

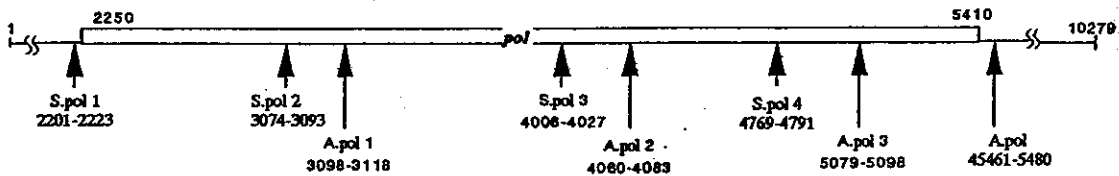
### SIV Sequencing Strategy



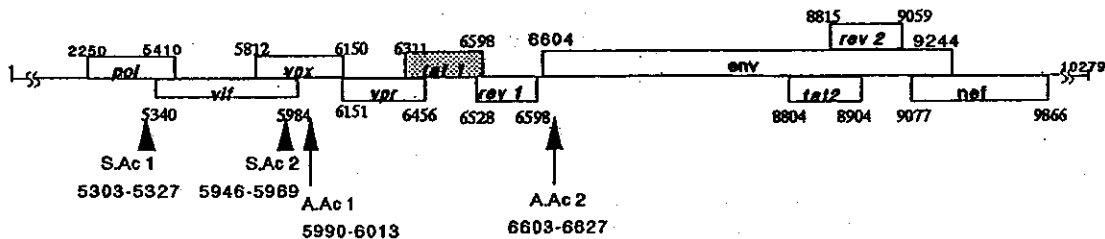
S.LTR 1 : TGGAAGGGATTATTACAGTGC AAG / A.LTR 1 : ACACCCAGGCTCTACCTGCTAGTGC → 593 bp  
 S.LTR 2 : AGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGGAG / S.LTR 2 : TGACAAGACGGAGTTTCTCACGCCCA → 545 bp



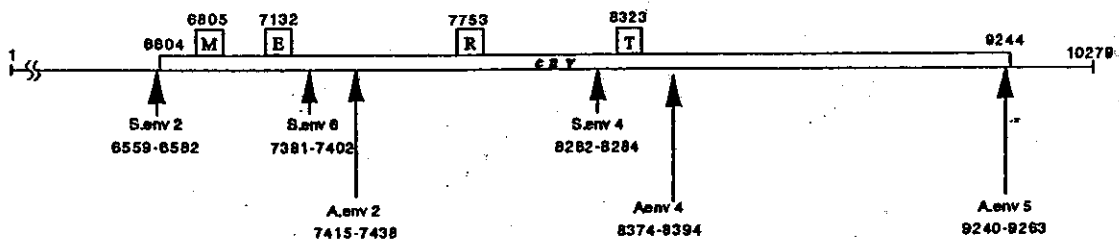
S.gag 1 : GAAGGGGTAATAAGATAGAGTG / A.gag 2 : TTACATCTGGGTTAGCATTTT → 1021 bp  
 S.gag 3 : AATGAGGAAGCAGCAGAATGGGA / A.gag 3 : TAATACTTCTACAGGCTGTCC → 950 bp



S.pol 1 : ACAGAGGGGACCAAGAAAGCCAA / A.pol 1 : TTCCGTAAGTCCCTGAGTGAC → 918 bp  
 S.pol 2 : ATAGATTTTAGGGAAGCTAAA / A.pol 2 : GGTATCCAGGTTACCTGCCAATAG → 1010 bp  
 S.pol 3 : CCCAAAATTCACCTTACCAGTT / A.pol 3 : TCCTCCCTTTCTTTAAAAT → 1093 bp  
 S.pol 4 : AGTGGATTATAGAAAGCAGAGGT / A.pol 4 : GACCTTAAATGGGGCACAT → 712 bp



S.Ac 1 : GTAGTACCCAGAAGAAAGGCTAAAA / A.Ac 1 : TTACATAGCTTGGTGACATCCCTT → 711 bp  
 S.Ac 2 : TTCCAGGTTTGCAAAGGTCTTG / A.Ac 2 : CAGCTGATTCCCAAGACATCCATA → 682 bp



S.env 2 : GAAAAAGGCTAAGGCTAATACATC / A.env 2 : CATTAAGCCAAACCAAGTAGAAG → 880 bp  
 S.env 6 : GTCTCTTCATGCACAAGGATGA / A.env 4 : CTCGATGGCAGTGACCCTAGT → 1014 bp  
 S.env 4 : GTCCGAACTTATTGGCTGGGA / A.env 5 : CCTGATTGTATTCTGTCCCTCAC → 1002 bp



S.nef1 : GGACTGAACTGACCTACCTACAAT / A.nef1 : TTATACATCAAGAAAGTGGGCGTTT → 901 bp

☒ 4

PCR Reaction conditions

DNA Template	10-100ng
10 x buffer	5 $\mu$ l
25 mM dNTP	1 $\mu$ l
Primer ( ~200 ng each )	1 $\mu$ M each
Sterile water	add to a final volume of 49 $\mu$ l
Ex Taq Polymerase ( 1 unit/ $\mu$ l )	1 unit
<b>Total Volume</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

95°C	3 min	} 30 cycle
95°C	30 sec	
49 or 56°C	30 sec	
72°C	1 min	

Annealing Temperature	Primer
56°C	S.LTR 1/ A.LTR 1, S.LTR 2/ A.LTR 2, S.gag 1/ A.gag 2, S.gag 3/ A.gag 3, S.pol 1/ A.pol 1, S.Ac 2/ A.Ac 2, S.env 2/ A.env 2, S.env 6/ A.env 4
49°C	S.pol 2/ A.pol 2, S.pol 3/ A.pol 3, S.Ac 1/ A.Ac 1, S.nef 1/ A.nef 1