

20010439

厚生科学研究費

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

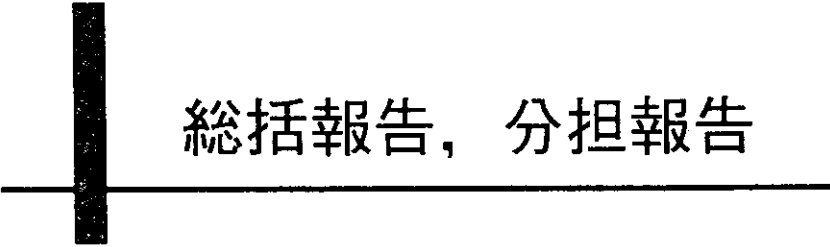
宿主応答を指標とした類人猿などを用いた
遺伝子治療法の評価系の確立

平成 13 年度 研究成果報告書

平成 14 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



総括報告，分担報告

厚生科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

総括研究報告書

宿主応答を指標とした類人猿などを用いた遺伝子治療法の評価系の確立

主任研究者 吉川泰弘

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

研究要旨

F 蛋白遺伝子欠損型のセンダイウイルスベクターの安全性について、多臓器同時接種法により検索した。臨床的には急性の障害はみられなかった。病理変化は神経系、感覚器系、腎臓でベクターに由来すると思われる炎症反応がみられたが軽度なもので、接種後 10 日では回復傾向がみられた。齧歯類に対する病原性に比較すれば霊長類では比較的安全であると思われる。ウイルスベクターに対するサル類の宿主応答として液性・細胞性免疫反応、リンフォカイン等が測定可能になったことは非常な前進である。サル類の発生工学基盤研究では条件検討のデータが蓄積されるにつれ体外受精、胚移植技術の安定性が増加した。また新しく ES 様細胞が得られたことは再生医療モデル研究を進めるにあたり、重要なツールになる。チンパンジーではバイオブシーと器官培養法を駆使した *ex vivo* での評価系が確立されつつある。動物福祉上、不可逆的侵襲実験が出来ないチンパンジーでこの様な評価系を確立することは、ヒトへの外挿を考える上で強力なツールである。本年度から伴侶動物を対象とした遺伝子治療研究をスタートした、臨床例を増やすことによりヒトへの応用のブレークスルーが得られることが期待される。本年度はマカカ属サル類、チンパンジー、伴侶動物を用いて遺伝子治療法の有効性、安全性に関する基盤研究を進めることが出来た。また発生工学的手法を応用してカニクイザルで新たに ES 様細胞の確立に成功し、チンパンジーでも ES 細胞作成の基盤研究が開始された。今後は遺伝子治療及び再生医療の有効性、安全性に関して動物モデルを用いて基盤研究を進めて行く予定である。

| | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| 分担研究者：所属氏名 | 中山 裕之 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授 |
| 寺尾恵治 国立感染症研究所筑波霊長類 センター長 | 久和 茂 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授 |
| 早坂郁夫 三和化学研究所熊本霊長類パーク 所長 | 辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授 |
| 山海 直 国立感染症研究所筑波霊長類センター 主任研究官 | |

A. 研究目的

遺伝子治療の先進国である米国では、しばしば非臨床試験なしにヒトで臨床応用がなされ、遺伝子治療の有効性に関する疑義や、あるいは高用量使用による死亡例のような問題が生じている。本研究は非臨床試験のためのサル類及び類人猿を用いた *ex vivo*, *in vivo* の遺伝子治療法の安全性、有効性、安定性等に関する評価システムを確立すること、サル類の ES 細胞を用いた再生医療の安全性、有効性評価のための実験手技の開発、伴侶動物モデルを用いた遺伝子治療法の有効性評価の検討を目的としている。

非臨床試験による安全性、有効性評価はヒトに近縁な霊長類が最も適している。しかし動物福祉や生命倫理から齧歯類に比べ制約が多い。他方、伴侶動物は寿命の延長からヒトと同様に老人病や癌の発生が高くなり、従来の治療法以外に遺伝子治療のような先端医療の試みが開始されつつある。本研究班は *ex vivo* 評価のためのツール開発、評価マニュアルの作成、*in vivo* での遺伝子デリバリー系開発と評価基準の作成を試みてきた。またサル類 ES 細胞の作成、バイオハザード観点からの評価や伴侶動物を用いた遺伝子治療の有効性評価を進めている。これらの成果は、わが国で開発されるウイルスベクターのヒトへの適用に対する安全性等の非臨床試験に有用だけでなく、治療法の有効評価や安全評価の材料提供に役立つ。本研究班で対象とするモデルが齧歯類でなくヒトに外挿可能な伴侶動物や霊長類であるため、その成果は遺伝子治療・再生医療法が社会に受け入れられるコンセンサスを得るために極めて有用である。

B. C. 方法と結果

①欠損型センダイウイルスベクターの安全性評価の基礎研究として、若齢カニクイザルの雄6頭を用い、対照群2頭、非増殖性ウイルスベクター (dF/SeV vector) をイソフルン吸入麻酔下で4頭に接種した。接

種部位は左右前頭葉・眼球内・鼻腔内である。また開腹し、肝臓・脾臓・腎臓にも接種した。一般状態の観察・体重測定・体温測定・尿検査、血液学および血液生化学的検査をおこなった。行動観察では全頭において投与後一過性に旋回運動と過敏反応が観察された。体重の変動、尿検査の異常は認められなかった。血液学的検査では接種後5日目より赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少が認められた。白血球数は著しい変動は認められなかった。また血液生化学検査所見では1例を除き顕著な変動はなかった。

②欠損型センダイウイルスベクター接種個体の病変を検索した。大脳髄膜、延髄、眼、鼻粘膜、腎臓で、ウイルスの増殖によると思われる炎症病変が観察された。この病変はウイルスの増殖を示唆するものであるが、病変はいずれも軽度で、接種後10日には回復傾向がみとめられた。

③ウイルスベクター接種にともなう宿主応答の解析を目的として1) レトロベクターにより骨髓造血幹細胞と末梢リンパ球に GFP 遺伝子を導入したカニクイザルについて、GFP 特異的免疫応答を比較した。末梢リンパ球に GFP 遺伝子導入した場合は抗原特異的幼若化反応と細胞障害性 T 細胞 (CTL) 活性が認められたが、造血幹細胞に導入した場合は両反応とも陰性であった。このことから、造血幹細胞への遺伝子導入では宿主に免疫寛容が成立することが確認された。2) ベクター接種量と宿主反応との関連を明らかにするため、F タンパク欠損センダイウイルスベクターを筋肉内に接種し、カニクイザルで炎症性サイトカインの上昇を検討した。IL6 と INF γ の軽度の上昇が認められるが、TNF α は検出されなかった。一方、血中抗体のレベルはウイルス接種量に対応して上昇した。3) ベクター構造と宿主免疫応答との関連を、野生型センダイウイルスベクター (wtSeV) と dFSeV を接種したマウスで比較した。dFSeV を接種したマウスでは Direct CTL および CTL Precursor 活性のいずれも wtSeV 接種マウスより有意に低く、宿主

の細胞性免疫応答回避という点で dFSeV は wtSeV より優れていると判断した。さらに、wtSeV と dFSeV をそれぞれ感染させた標的細胞では dFSeV 感染標的の方が細胞障害を受けにくいことから、標的細胞上への抗原提示に関しても dFSeV は wtSeV より優っていると推測された。4) カニクイザルでウイルスベクターに対する CTL 活性を測定する方法として、自己骨髄ストローマ細胞を標的とするアッセイ法を開発した。この方法を用いて①のケースで dFSeV を多臓器に接種した例では接種後 5 日目に比較的高い Direct CTL 活性が検出されることが明らかになった。④サル類の胚・配偶子の保存法開発、再生医療評価システムの開発を目的として発生工学的基盤技術の開発研究を進めた。1) カニクイザルにおける体外受精-胚移植による双児と思われる妊娠例を得た。霊長類センター 2 例目の成功例であったが、妊娠途中で発育を停止したものと思われ産児を得ることはできなかった。2) カニクイザルの月経初日に GnRH アゴニストを投与した場合、10 から 14 日目で下垂体の LH 分泌がなくなることが明らかとなった。本法を応用することで内因性のホルモンの影響を受けずに卵巣機能をコントロールできる可能性が示唆された。3) 2 細胞期の分離割球の超急速凍結保存が可能であることがマウス卵を用いて示された。凍結融解後の生存率および発生率をさらに向上させることでサル類の卵への応用も可能であると考えられた。4) hFSH と IGF-I の培地への添加、フィーダー細胞との共培養がカニクイザル円形精子細胞の体外成熟に有効であることが示された。5) カニクイザルの受精卵から ES 様細胞の樹立に成功した。⑤チンパンジーを用いた遺伝子治療用ベクターの評価技術開発の一環として、*in vitro* による評価方法を進めている。本年度は、器官培養したチンパンジー気管支上皮にアデノウイルスベクターが発現するか否かを検討した。また、ES 細胞の利用による評価法開発を目指し、チンパンジーの卵採取方法を検討した。バイオプシーにて採取したチンパンジー気

管支上皮を 3 日間器官培養した後、Ad5-CMV-lacZ を 1 時間暴露し、2 4 時間後に LacZ 遺伝子の発現を観察した。同様な方法により、1 8 日間培養した気管支上皮における Ad5-CMV-lacZ の導入効果を検討した。培養 3 日目の気管上皮では、LacZ 遺伝子の発現は観察されなかった。一方、培養 1 8 日の再分化した上皮では LacZ 遺伝子の発現が認められた。ES 細胞の樹立においては、チンパンジーの月経周期と性ホルモン動向の基礎データを取り、採卵技術の検討を行った。チンパンジーにとって侵襲性の少ない超音波診断装置による経膈採卵の技術に目処が立ち、過排卵処理に見通しがついた。今後、受精、ES 細胞の樹立を行う予定である。

⑥伴侶動物を用いたモデル研究では、イヌ *p53* 遺伝子発現アデノウイルスベクターの *in vitro* における抗腫瘍効果の検討を行うとともに、その腫瘍症例に対する試験的臨床応用を試みた。1) AxCA-cp53 がイヌの腫瘍細胞株に対して増殖抑制効果を持つことが示され、その腫瘍症例に対する遺伝子治療への臨床応用が期待された。また *p53* 遺伝子の変異を持たない腫瘍細胞株に対しても AxCA-cp53 が増殖抑制効果を示したことから、AxCA-cp53 が *p53* 遺伝子に変異を持たない腫瘍症例に対して有効性を示す可能性があるものと考えられた。2) 肺癌症例においては、超音波検査下で AxCA-cp53 10^{10} PFU/5 ml を注射した。本症例は投与時点で DIC を併発しており、投与 2 週後に斃死した。剖検では、腫瘍の中心に組織の溶解がみられたが、ウイルスの投与によるものかどうかは不明であった。また斃死 1 日後にしか剖検を行えなかったため、*p53*mRNA の発現を検討することはできなかった。乳腺腫瘍症例では、AxCA-cp53 10^{11} PFU/2.5 ml を乳腺腫瘍内に 1 回投与した。投与による副反応は認められなかった。血中には AxCA-cp53 が PCR 法によって、少なくとも 3 日目までは陽性を示した。6 日後には検出限界以下であった。尿中への AxCA-cp53 の排出は検出されなかった。腫瘍は投与 3 日後の時点でやや縮小し色調も改善したが、

7 日後には投与時点と同程度の大きさであった。投与 7 日後に右側乳腺の全摘出を行い、AxCA-cp53 ゲノムの検出、ウイルス由来 p53 mRNA の検出、および P53 蛋白の免疫染色を行った。AxCA-cp53 ゲノムは投与部位とともに他の乳腺腫瘍からも検出された。

D. 考察

本年度は欠損型センダイウイルスベクターの安全性について、多臓器同時接種法により検索した。臨床的には急性の障害はみられなかった。病理変化は神経系、感覚器系、腎臓でベクターに由来すると思われる炎症反応がみられたが軽度なものであり、接種後 10 日では回復傾向がみられた。ヒトでの応用にはまだ改変の余地があるが、齧歯類に対する病原性に比較すればサル類では比較的安全であると思われる。臨床研究までには高容量試験等が必要である。ウイルスベクターに対する宿主応答として液性・細胞性免疫反応、リンフォカイン等が測定可能になったことは非常な前進である。サル類の発生工学基盤研究では条件検討のデータが蓄積されるにつれ体外受精、胚移植技術の安定性がました。また新しく ES 様細胞が得られたことは再生医療モデル研究を進めるにあたり、重要なツールになる。チンパンジーではバイオプシーと器官培養法を駆使した *ex vivo* の評価系が確立されつつある。動物福祉上、不可逆的侵襲実験が出来ないチンパンジーでこの様なアッセイ系を確立することは、ヒトへの外挿を考える上で強力なツールである。本年度から伴侶動物を対象とした遺伝子治療研究をスタートした、臨床例を増やすことによりヒトへの応用のブレークスルーが得られることが期待される。

E. 結論

マカカ属サル類、チンパンジー、伴侶動物を用いて遺伝子治療法の有効性、安全性に関する基盤研究を進めた。また発生工学的手法を応用してカニクイザルで新たに ES 様細胞の確立に成功し、チンパンジ

ーでも ES 細胞作成の基盤研究が開始された。今後は遺伝子治療及び再生医療の有効性、安全性に関して動物モデルを用いて基盤研究を進めて行く予定である。

F. 研究発表

Kimura, N., Nakamura, S., Goto, N., Narushima, E., Hara, I., Scichiri, S., Saitou, K., Nose, M., Hayashi, T., Kawamura, S., Yoshikawa, Y. Senile plaques in an aged western lowland gorilla, *Exp. Anim.* 50, 77-81, 2001.

Nakayama, H., Nakamura, S., Miyawaki, K., Kikuta, F., Uchida, K., Kuroki, K., Makifuchi, T., Yoshikawa, Y., Doi, K. Fractal analysis of senile plaque observed in various animal species. *Neurosci. Letter.* 297, 195-198, 2001.

Takahashi, K., Kamiya, K., Uruse, K., Suga, M., Takizawa, T., Mori, H., Yoshikawa, Y., Ichimura, K., Kuida, K., Momoi, T. Caspase-3-deficiency induces hyperplasia of supporting cells and degeneration of sensory cells resulting in the hearing loss. *Brain Res.* 894, 359-367, 2001.

Setoguchi, A., Okuda, M., Nishida, E., Yazawa, M., Ishizaka, T., Hisasue, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Yoshikawa, Y., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H. Results of heperamplification of centromeres in naturally developing tumors of dogs. *American J. Vet. Rec.* 62, 1134-1141, 2001.

Okada, A., Igarashi, H., Kuroda, M., Terao, K., Yoshikawa, Y., Sankai, T. Cryopreservation induced acrosomal vesiculation in live spermatozoa from cynomolgus monkeys. *Hum. Reproduct.* 16, 2139-

2147, 2001.

Kamiya, K., Takahashi, K., Kitamura, K., Momoi, T., Yoshikawa, Y. Mitosis and apoptosis in postnatal auditory system of the C3H/He strain. Brain Res. 901, 296-302, 2001.

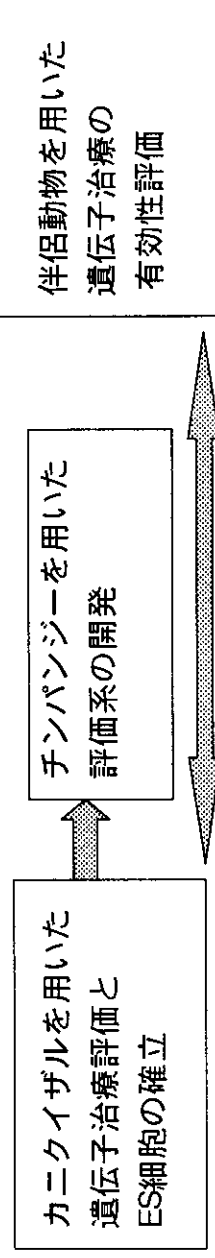
Kimura, N., Nakamura, S., Honda, T., Takashima, A., Nakayama, H., Ono, F., Sakakibara, I., Doi, K., Kawamura, S., Yoshikawa, Y. Age-related changes in the localization of presenilin-1 in cynomolgus monkey brain. Brain Res. 922, 30-41, 2001.

宿主応答を指標とした類人猿などをを用いた遺伝子治療法の評価系の確立

主任研究者：東京大学大学院農学生命科学研究科 吉川泰弘

目的：非臨床試験のための霊長類を用いた遺伝子治療の安全性、有効性評価システムの確立およびサル類等のES細胞を用いた再生医療の実験手技の開発を目的とする。

体制：



平成13年度の主な成果

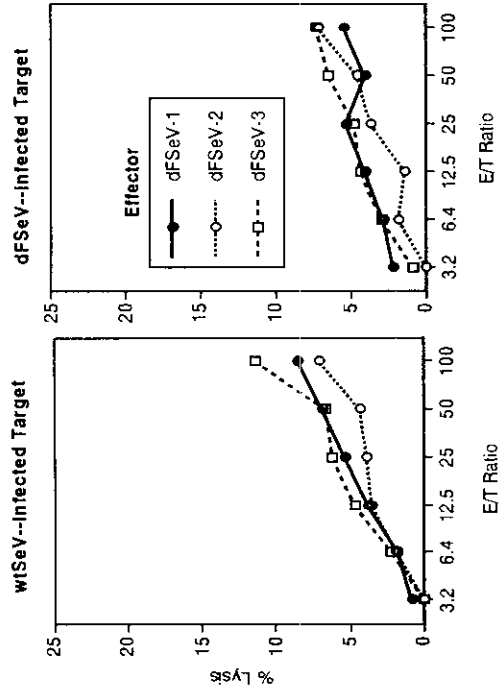
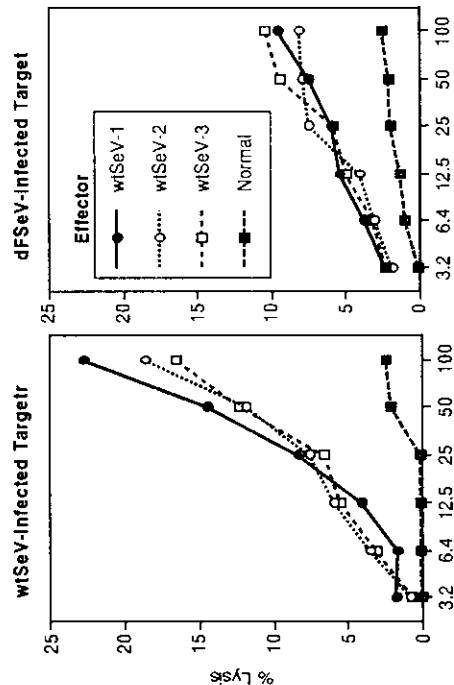
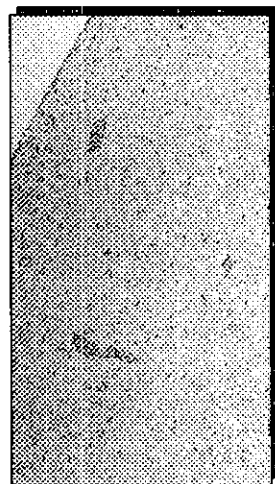
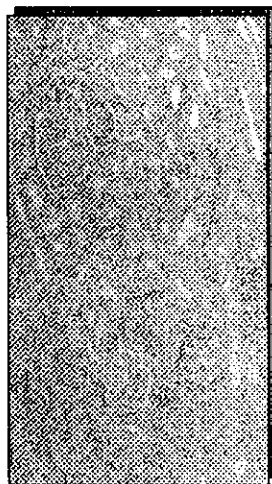
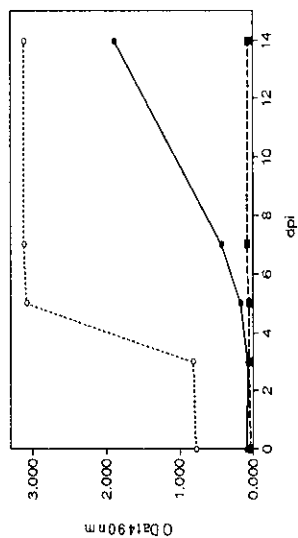
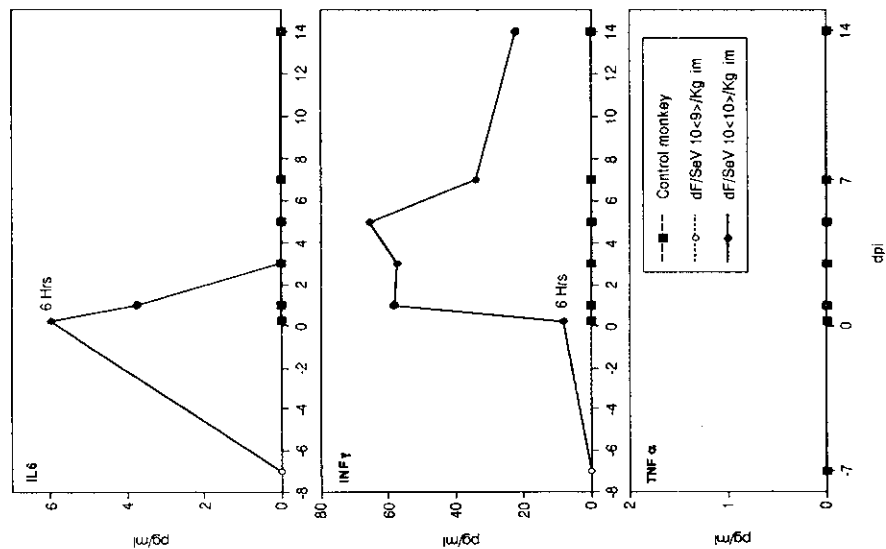
- 1) カニクイザルでのF欠損センダイウイルスベクターの安全性評価法の確立
- 2) カニクイザルのES様細胞株作成、既に作成されたES細胞のバイオハザード評価
- 3) チンパンジーでの遺伝子治療評価系の作成、配偶子保存と胚培養
- 4) 伴侶動物での遺伝子治療有効性評価

カニクイザルを用いた研究

- 1) F 欠損センダイウイルスベクターの安全性評価 (ベクター接種群、コントロール群)
臨床検査、サイトカイン、抗体、細胞性免疫、病理組織検査
- 2) 再生医療手技開発
- 3) 再生医療モデル開発 (脳虚血、腎虚血)
ES細胞の作成、既存サル由来ES細胞のウイルス検査 (Bvirus, SCMV, HuHSV, HuCMV, の何れも陰性)

接種部位：左右前頭葉、眼球、鼻腔内、肝臓、脾臓、腎臓

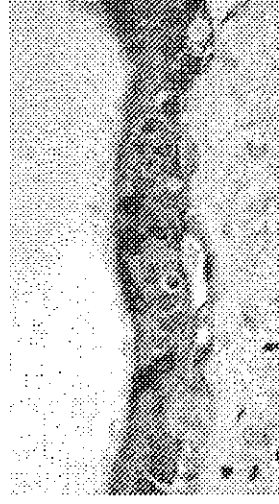
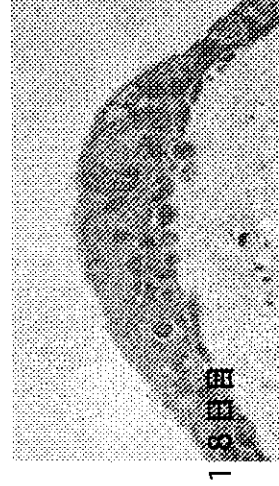
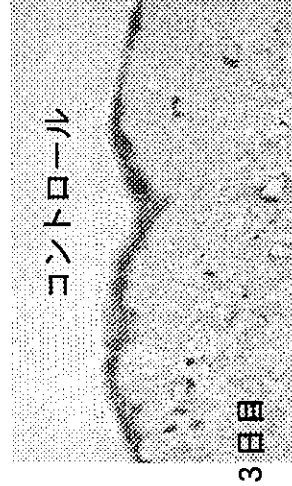
観察期間：接種後5、10日間、急性の毒性反応は認められない。多臓器接種で評価可能



チンパンジーを用いた研究

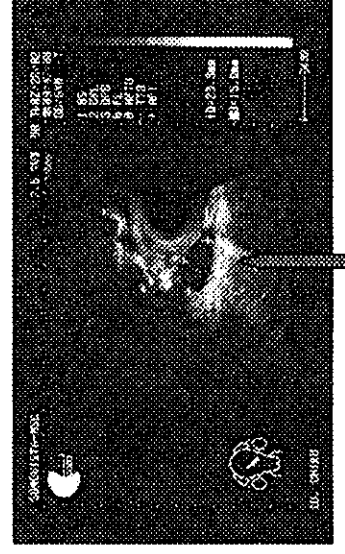
- 1) 気管支内視鏡によるバイオプシー材料を用いた器官培養と遺伝子発現
- 2) チンパンジーES細胞作成のための基盤技術開発

培養気管支上皮へのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入 (Ad5-CMV-LacZ)



器官培養3日目、18日目に遺伝子導入、24hr後に染色
MOI=16

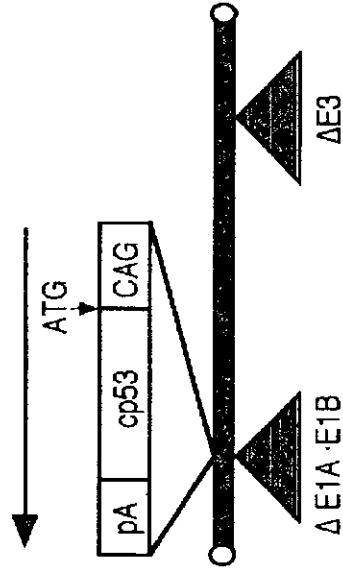
- 1, チンパンジーの月経とホルモン周期の検討
- 2, 排卵のための卵巣刺激法の開発
- 3, 超音波による成熟卵胞 (矢印) の確認
- 4, 体外受精のための配偶子保存



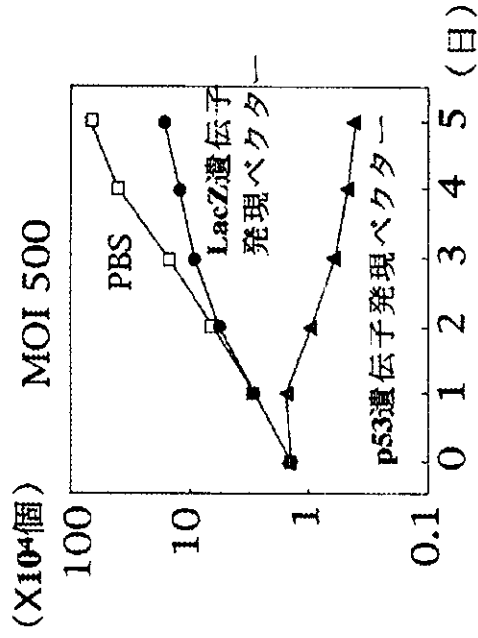
伴侶動物を用いた遺伝子治療

イヌの自然発生腫瘍の遺伝子治療（アデノウイルスベクターを用いた p53 遺伝子導入）

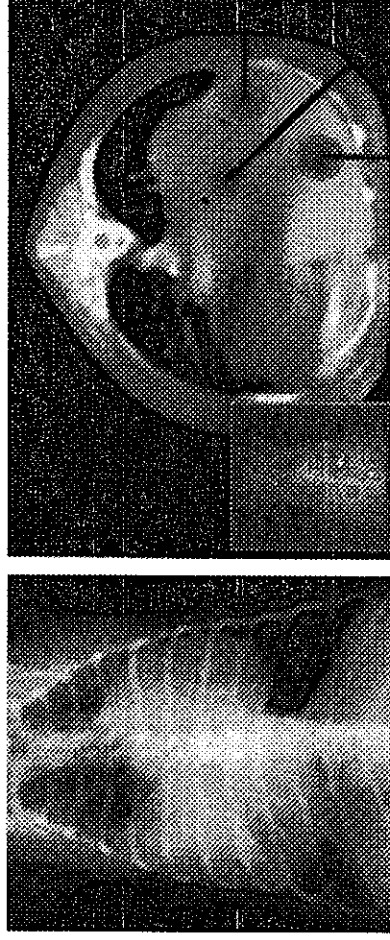
イヌ p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター



骨肉腫細胞に対する細胞増殖抑制効果

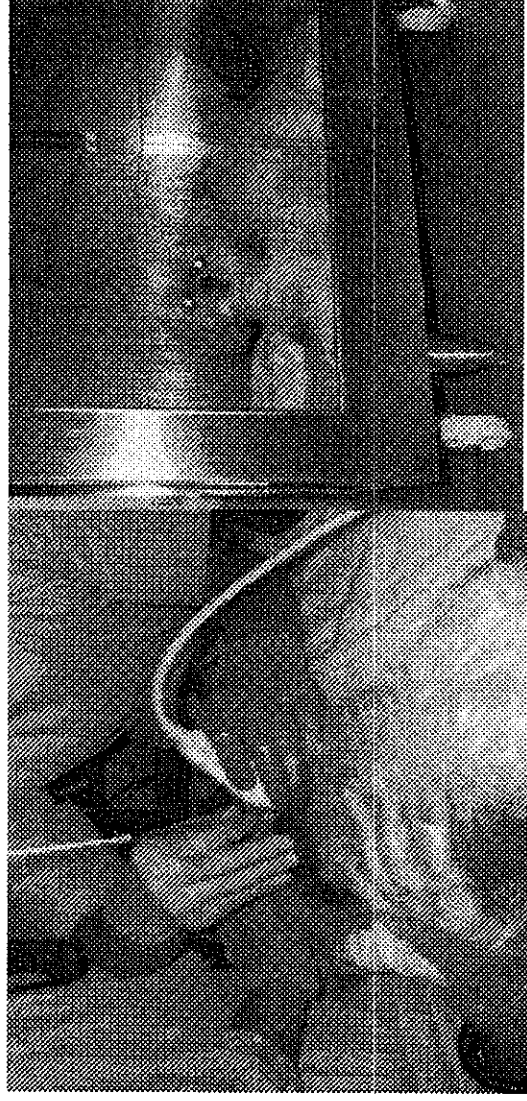


腫瘍症例への投与



レントゲン所見

CTによる投与部位決定



エコー下でのウイルスベクター投与

アイソレーターでの隔離

欠損型 dF/SeV ベクターのカニクイザルへの接種実験（臨床経過）

分担研究者 久和 茂 （東京大学大学院農学生命科学研究科）

協力研究者 小野文子 （予防衛生協会）

研究要旨

カニクイザルにおいて dF/SeV vector を接種した際の変化を検討した。

試験は、dF/SeV vector をカニクイザルの左右前頭葉、眼球、鼻腔、肝臓、脾臓、腎臓に接種し、その後観察及び検査を実施した。

観察期間を通じて、死亡例は認められなかった。行動観察においては dF/SeV vector 接種群およびコントロール群とも接種後一過性に過敏反応と旋回運動が見られた。

体重、体温、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査の結果 dF/SeV vector 接種群において軽度の一過性の血清蛋白低下と赤血球減少が認められ、1 例において接種後 14 日目に肝機能マーカーの上昇が認められたが、白血球数、血液凝固系、尿およびその他の生化学検査で顕著な異常は認められなかった。

キーワード：カニクイザル、遺伝子治療、dF/SeV vector

A. 研究目的

カニクイザルにおいて dF/SeV vector を接種した際の急性変化を検討する。

AS; Oriental Yeast Co. Ltd.) 約 70g と補食としてリンゴ 100g を 1 日 1 回与えた。なお、採血日の前日は午後 3 時頃に残餌を除去し、採血終了時まで絶食とした。

B. 研究方法

1) 動物および方法

3-5 歳のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 雄 6 頭 (体重 2.94kg ~ 3.98kg) を用いた。

飼育室環境は室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 12 回/時間、14 時間照明/日 (5 時~19 時) に設定し、ステンレス製個別ケージ [サイズ; 800mm (W) × 500mm (L) × 800mm (H)] に個別に収容し飼育した。飼料は、市販固型飼料 (Type

試験群構成は、対照群 2 頭と被験物質投与群 (dF/SeV vector) 4 頭とした。

投与方法は、1%フルン吸入麻酔下で、生理食塩水又は dF/SeV vector を頭皮を切開し頭骸骨を穿孔し、左右前頭葉に接種した。眼球内には左右強膜部より注入した。鼻腔内は伏臥位で注入した。また、開腹し、肝臓、脾臓、腎臓に接種した。

2) 観察、測定および検査項目

(1) 一般状態の観察

投与 2 日前から投与後 3 日目より解剖日まで午前中に 1 回の観察を行った。

(2) 体重測定

麻酔下で投与前 2 回、投与時、投与後 3、5、7 および 10 日目に測定を行った。

(3) 体温測定

麻酔下で投与前 2 回、投与時、投与後 3、5、7 および 10 日目に直腸温を測定した。

(4) 尿検査

投与前 2 回、投与時、投与後 3、5、7 および 10 日目に新鮮尿を用いて、pH、蛋白、ブドウ糖、ketone 体、bilirubin、潜血、urobilinogen を尿検査用試験紙（マルティスティックス SG^R、バイエル三共株式会社）で検査をおこなった。

(5) 血液学および血液生化学的検査

麻酔下で投与前 2 回、投与時、投与後 3、5、7 および 10 日目に大腿静脈から 5.1ml の静脈血の採取をおこなった。なお、採血の前日は午後 3 時から絶食とした。採取した血液はプレイン採血管（テルモ；VP-P052）へ 3ml、EDTA-2Na 採血管（テルモ；VP-NA052）へ 0.3ml、3.13%クエン酸 Na 採血管（VP-CW052）へ 1.8ml 分注した。

血液学的検査は EDTA-2Na 採血管に採取した血液を用い Sysmex 自動血球計数装置 K-4500（シスメック

株式会社）により赤血球数（RBC）、hemoglobin 濃度（Hb）、hematocrit 値（Ht）、白血球数（WBC）、血小板数（platelet）を測定し、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）および平均赤血球血色素濃度（MCHC）を測定した。白血球百分率は同血液を用いて血液塗抹標本を作製し、May-Giemsa 染色後、顕微鏡下の視算法で計測した。また、クエン酸 Na 採血管に採取した血液は採取後すみやかに遠心分離（25℃、5000 r.p.m、10 分間）して得られた血漿を用いて prothrombin time(PT)、activated partial thromboplastin time(APTT) および fibrinogen(FIB)を自動血液凝固測定装置 KC-4A micro(株式会社 MC MEDICAL)で測定した。

血液生化学的検査はプレイン採血管に採取した血液を遠心分離（4℃、2500r.p.m.、15 分間）して得た血清を凍結保存（-80℃）し、測定時に溶解して行った。

t ransaminase（GOT、GPT）、 γ -glutamyl transpeptidase（ γ -GTP）、alkaline phosphatase（ALP）、leusine aminopeptidase（LAP）、creatine phosphokinase（CPK）、cholinesterase（ChE）、total protein、albumin、尿素窒素（BUN）、creatinine、total cholesterol、free cholesterol、triglyceride、乳酸脱水素酵素（LDH）glucose、無機リン（IP）、C-reactive protein（CRP）、Ca、Na⁺、K⁺および Cl⁻は血清を用いて、自動分析装

置 AU400 (オリンパス光学工業株式会社) で測定した。

C. 研究成果

1) 一般状態

一般状態観察では、全頭において投与後一過性に旋回運動と過敏反応が観察された。

2) 体重

全例とも著しい体重の変動は認められなかった(Table 1)。

3) 尿検査

新鮮尿による半定量分析において、投与後著しい異常は認められなかった(Table 2)。

5) 血液学的検査

ベクター接種群において接種後 5 日目より赤血球数、hemoglobin 濃度、hematocrit 値の減少が認められ、10 日目まで減少傾向は継続して認められたが、MCV および RDW-SD の変動は認められなかった。白血球数は接種前より高値を示した 1 例を除き著しい変動は認められなかった (Fig.1)。

血液凝固系検査では fibrinogen 濃度が接種 3 日にベクター接種群の 2 例においてわずかに上昇したが、5 日目には投与前に回復し、PT および PTT においても明らかな変動は認められなかった (Fig. 2)。

血液生化学検査ではベクター接種群で接種後一過性に減少傾向が認められたが 7 日

目には回復した。炎症マーカーである CRP はベクター接種群の 1 例および対照群において接種後 3 日目一過性に上昇が認められた。肝機能マーカーである GOT,GPT,ALP はベクター接種群の 1 例でにおいて投与後 10 日目に上昇が認められたが、10 日目まで経過を観察した他の 1 頭および対照群の 1 頭においては著しい変動は認められなかった。その他の血液生化学検査所見では顕著な変動は認められなかった(Fig. 2)。

E. 結論

カニクイザルにおいて dF/SeV を左右前頭葉、眼球、鼻腔、肝臓、脾臓、腎臓に接種した際の急性毒性を検討した。観察期間を通じて、死亡例は認められなかった。一般状態観察では全頭において投与後一過性に過敏反応や旋回行動が観察されたが、その後異常行動は消失したことから、脳内および眼球内接種の物理的刺激による反応であると考えられた。血液検査においては白血球数の変動は認められず、CRP においても⑥頭中 3 頭において手術後一過性の軽度上昇が認められたのみであったことから、ベクター接種による急性変化および、手術処置を用いた投与方法による炎症反応は誘導されなかったものと考えられた。ベクター投与群の 1 例において肝機能マーカーの上昇および血清蛋白の軽度の減少が認められたことから、病理組織学的検索および、慢性経過の観察によるベクターの影響について検討する必要があるものと考えられた。

採血： EDTA0.3ml ⇒ 血算、塗抹
 プレイン3ml ⇒ 血清保存 (0.1ml x 1, 0.5ml x 2) ⇒ 生化学検査
 クエン酸 ⇒ 血液凝固系測定、血漿保存

尿： ウロステイック：ウロ、蛋白、pH、潜血、比重、ケトン、ビリ、ブドウ糖

生化学検査： CRP,TP,ALB,BUN,GLU,T-CHO,F-CHO,TG,P,Ca,GOT,GPT,ALP,CPK,LDH,Cre,Na,K,CL,r-GTP,LAP,ChE
 血液凝固系： PT,APTT,Fib

接種手術： 左右前頭葉、眼球、鼻腔、肝臓、脾臓、腎臓

解剖： 東大、中山先生

| | 第1群 | | | | 第2群 | | | |
|---------|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | #G5 | #G6 | #G10 | #G7 | #G8 | #G14 | #G14 | #G14 |
| 通番 | 1029910046 | 1029910048 | 1029910042 | 1029910049 | 1029910050 | 1029910060 | 1029910060 | 1029910060 |
| 動物番号 | 60717 | 60718 | 60724 | 60719 | 60720 | 60727 | 60727 | 60727 |
| アドレス | 5.28 | 5.28 | 3.22 | 5.28 | 5.28 | 4.25 | 4.25 | 4.25 |
| 前回体側日 | 3,370g | 4,040g | 3,430g | 3,000g | 4,690g | 3,260g | 3,260g | 3,260g |
| 前回体重 | dF/SeV ; 6/1 dF/SeV ; 6/1 生食 ; 6/11 dF/SeV ; 6/1 dF/SeV ; 6/1 生食 ; 6/13 | | | | | | | |
| 5月28日 月 | 絶食 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 5月29日 火 | 採血 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6月4日 月 | 絶食 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6月5日 火 | 採血 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6月10日 日 | 絶食 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6月11日 月 | 接種手術● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 6月12日 火 | 絶食 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6月13日 水 | 接種手術● | (絶食) | (絶食) | ● | ● | ● | ● | ● |
| 6月14日 木 | 採血 | ○3dpi | ○3dpi | ○3dpi | ○3dpi | ○3dpi | ○3dpi | ○3dpi |
| 6月15日 金 | 絶食 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6月16日 土 | 採血 | ○5dpi | ○5dpi | ○5dpi | ○3dpi | ○3dpi | ○3dpi | ○3dpi |
| 6月17日 日 | 絶食 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6月18日 月 | 採血/解剖● | ○7dpi | ○7dpi | ○7dpi | ●5dpi | ●5dpi | ●5dpi | ●5dpi |
| 6月19日 火 | 絶食 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6月20日 水 | 採血/解剖 | ●10dpi | ●10dpi | ●10dpi | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 6月21日 木 | 採血/解剖 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

Table2 Urinalysis in monkeys after inoculation of d F/SeV Vector

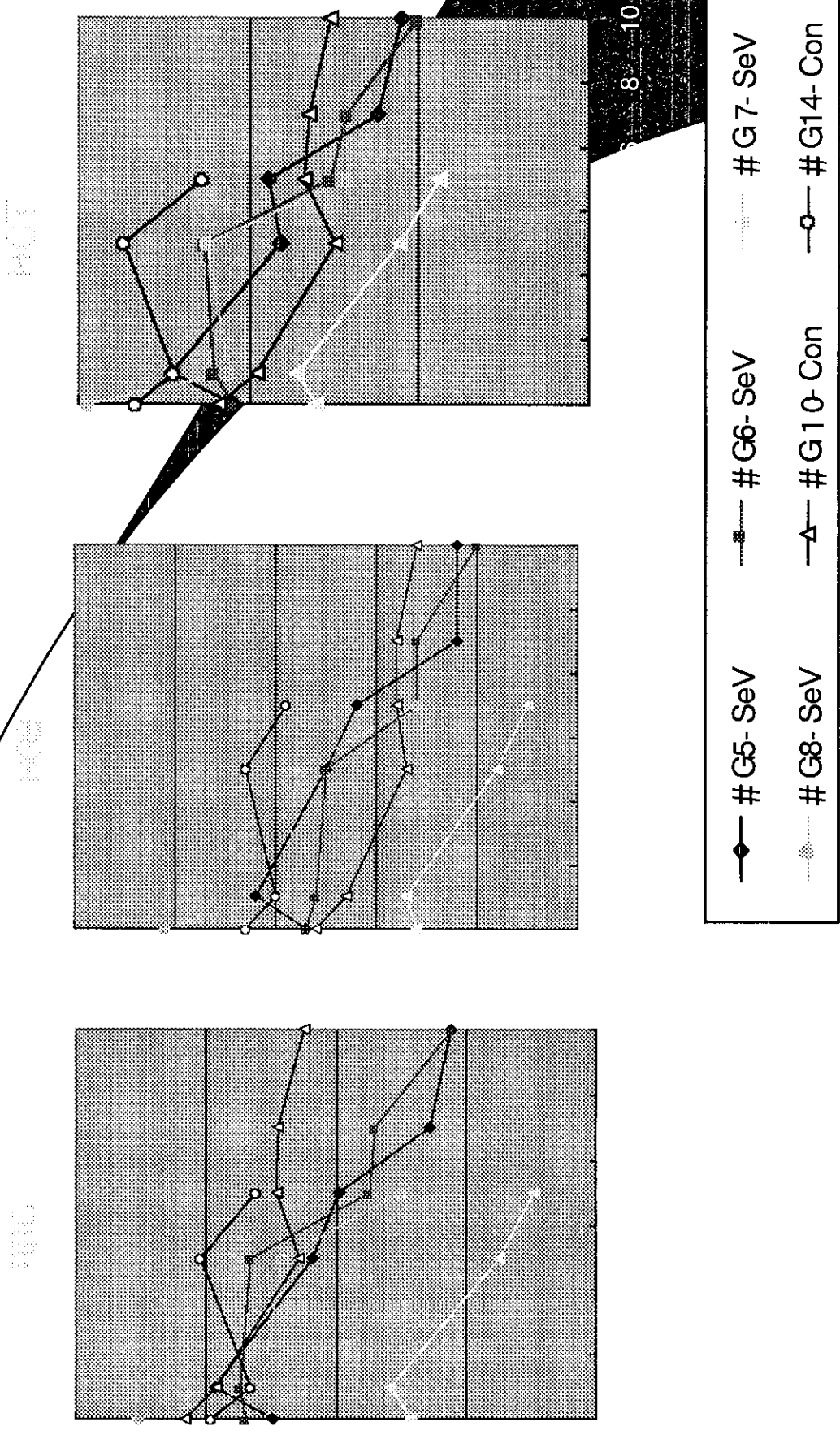
| Group | Animal No. | | | Specific gravity | pH | Protein | Glucose | Ketone bodies | Bilirubin | Occult blood | Urobilinogen |
|---------|------------|-------|-------|------------------|-----|---------|---------|---------------|-----------|--------------|--------------|
| d F/SeV | #G5 | pre 1 | 5.29 | 1.020 | 8.5 | - | - | - | - | - | 0.1 |
| | | pre 2 | 6.5 | 1.030 | 8.5 | ± | - | - | - | - | 0.1 |
| | | day 3 | 6.14 | | 5.0 | ± | ++ | - | - | - | 0.1 |
| | | day 5 | 6.16 | | 8.5 | + | - | - | ±(非溶血) | - | 0.1 |
| | | day 7 | 6.18 | 1.008 | 8.5 | - | - | - | - | - | 0.1 |
| | day 10 | 6.21 | 1.023 | 8.5 | ± | - | - | - | - | 0.1 | |
| | #G6 | pre 1 | 5.29 | 1.030 | 8.5 | ± | - | - | - | - | 0.1 |
| | | pre 2 | 6.5 | 1.035 | 7.5 | ± | ++++ | - | - | - | 0.1 |
| | | day 3 | 6.14 | | 6.5 | + | +++ | - | - | - | 0.1 |
| | | day 5 | 6.16 | | 8.5 | ± | - | - | - | - | 0.1 |
| day 7 | | 6.18 | 1.006 | 8.0 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| #G7 | day 10 | 6.21 | 1.020 | 8.0 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| | pre 1 | 5.29 | 1.017 | 8.5 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| | pre 2 | 6.5 | 1.022 | 8.0 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| | day 3 | 6.16 | | 8.0 | + | - | - | - | - | 0.1 | |
| | day 5 | 6.18 | 1.018 | 8.0 | ± | - | - | - | - | 0.1 | |
| #G8 | pre 1 | 5.29 | 1.008 | 7.5 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| | pre 2 | 6.5 | 1.023 | 8.0 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| | day 3 | 6.16 | | 7.0 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| | day 5 | 6.18 | 1.012 | 8.0 | ± | - | - | - | - | 0.1 | |
| | pre 1 | 5.29 | 1.023 | 8.5 | ± | - | - | - | - | 0.1 | |
| #G10 | pre 2 | 6.5 | 1.038 | 5.0 | - | ++ | - | - | - | 0.1 | |
| | day 3 | 6.14 | | 7.5 | + | +++ | - | - | - | 0.1 | |
| | day 5 | 6.16 | | 8.5 | ± | - | - | - | - | 0.1 | |
| | day 7 | 6.18 | 1.003 | 8.5 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| | day 10 | 6.21 | 1.025 | 8.5 | ± | - | - | - | - | 0.1 | |
| Control | pre 1 | 5.29 | 1.024 | 8.0 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| | pre 2 | 6.5 | 1.012 | 8.5 | ± | - | - | - | - | 0.1 | |
| | day 3 | 6.16 | | 8.0 | - | - | - | - | - | 0.1 | |
| | day 5 | 6.18 | 1.008 | 8.5 | ± | - | - | - | ±(非溶血) | 0.1 | |

Protein: -, negative; ±, trace; +, 30mg/dL; ++, 100mg/dL

Glucose: -, negative

Ketone body: -, negative; ±, 5mg/dL; +, 15mg/dL; ++, 40mg/dL; +++, 80mg/dL; ++++, 160mg/dL

Hematological change of dF/SeV Vector inoculation



カニクイザルのセンダイウイルスに対する感受性（病理学的変化）

分担研究者 中山裕之（東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究要旨：

カニクイザルに弱毒化センダイウイルスを接種したところ、大脳髄膜、延髄、眼、鼻粘膜、腎臓で、ウイルスの増殖によると思われる炎症病変が観察された。この病変はウイルスの増殖を示唆するものであるが、病変はいずれも軽度で、接種後10日には回復傾向がみとめられた。

A. 研究目的

遺伝子治療法においては、遺伝子ベクターとしてセンダイウイルスを用いる系が考案されている。この系の有効性・安全性を確認するため、カニクイザルにセンダイウイルスを接種し、感染性および形成される病変をしらべた。昨年度は予備的検討のため、サル1頭のみでウイルスを接種し病理組織学的検索を行ったが、今年度はウイルス接種に4頭、対照に2頭のサルをそれぞれ用いて、経時的に組織変化を検索した。

B. 材料・方法

健康若齢カニクイザル（*Macaca fascicularis*）6頭を用いた。4頭にセンダイウイルスF遺伝子欠損株を 1×10^8 接種した。接種箇所は脳（左側前頭葉）、眼球（左眼）、鼻腔（左鼻腔に滴下）、上腕筋（左側）、大腿筋（左側）、肝、脾、膵、腎である。残りの2頭は対照とし、培地のみを同一の部位に注射した。接種後5日と10日にサルを安楽殺し（それぞれウイルス接種2頭、対照1頭ずつ）、剖検、上記の臓器を採取、ホルマリンで固定した。それぞれの組織から常法に従ってHE染色標本を作製し、光学顕微鏡で観察した。

C. 結果

- 1) ウイルス接種した1頭の脳で接種部位に変色病変を認めた以外、肉眼的にはウイルス接種に起因すると考えられる変化は認められなかった。
- 2) 組織学的変化：以下のような変化が

観察された（表1）。

大脳：接種後5日：

接種部位の炎症（図1）。

接種部周囲の髄膜炎（リンパ球・プラズマ細胞主体）（図2）。一部に囲管性細胞浸潤（リンパ球主体）。

接種後10日：著変なし。

延髄：接種後5日：一部に囲管性細胞浸潤（リンパ球主体）（図3）。

接種後10日：一部に囲管性細胞浸潤（リンパ球主体）。

眼：接種後5日：角膜と虹彩が炎症性に癒着（図4）。視神経乳頭に軽度炎症細胞浸潤。

接種後10日：角膜と虹彩が炎症性に癒着。軽度結膜炎。

鼻粘膜：接種後5日：粘膜下に炎症（図5）。

肺：接種後5日：軽度水腫。

接種後10日：充血水腫。

腎：接種後5日：間質に炎症細胞（リンパ球、プラズマ細胞）集簇巣（図6）。糸球体腫大。

接種後10日：間質に炎症巣。

D. 考察

カニクイザルにセンダイウイルスF遺伝子欠損株を接種したところ、大脳髄膜、延髄、眼、鼻粘膜、腎臓で、ウイルスの増殖によると思われる非化膿性の炎症が

観察された。この結果は昨年の結果と同様であった。これらの病変はウイルスの増殖を示唆するものである。病変の程度はいずれも比較的軽度であり、接種後10日で回復傾向がみとめられた。センダイウイルス F 遺伝子欠損株の遺伝子ベクターとしての安全性が示唆されたが、さらなる改良は必要であろう。

今後は病変部におけるウイルス核酸および抗原の発現をしらべ、ウイルスの増殖を確認したい。

E. 結論

カニクイザルに弱毒化センダイウイルスを接種すると軽度の病変が形成され、ウイルスの増殖が示唆された。このことからセンダイウイルスが遺伝子ベクターとして機能する可能性が示された。

F. 研究発表

なし

表1. センダイウイルス接種カニクイザルの病理組織所見

| 接種後 | 個体 | 大脳 | 延髄 | 眼 | 鼻粘膜 | 肺 | 腎臓 | その他 |
|--------|----------|------------------------------------|----------------|---------------------------|-------|-------|-----------------|-------|
| 接種後5日 | #7 SV | 接種部位炎症、 周囲髄膜炎、 一部囲管性細胞 浸潤 | - | 角膜と虹彩が 炎症性に癒着 | - | - | リンパ球小集 簇巣数カ所 | - |
| | #8 SV | 広範な髄膜炎 | 一部に囲管性 細胞浸潤 | 視神経乳頭軽 度炎症細胞浸 潤 | 粘膜下炎症 | 軽度水腫 | 糸球体腫大し 細胞数増加 | 肝脂肪変性 |
| | #14 Cont | 接種部位炎症 | - | - | - | - | - | - |
| 接種後10日 | #5 SV | - | - | - | N.E. | 充血・水腫 | 比較的広範な 間質炎症巣 | - |
| | #6 SV | - | 一部に囲管性 細胞浸潤 | 角膜と虹彩が 炎症性に癒着 軽度結膜炎 | N.E. | 充血・水腫 | - | - |
| | #10 Cont | - | - | - | - | 充血・水腫 | - | - |

SV：センダイウイルス接種、Cont：生理食塩水接種、N.E.：検査せず、(-)：著変なし

上記の炎症はいずれも非化膿性の炎症（リンパ球とプラズマ細胞を主体とする）

#8の腎、肝の変化はウイルス接種とは無関係と考えられる。#8、5、6、10の肺の変化は安楽殺のためと考えられる。