

ノムの検出:

2×10^6 の CMK-6 細胞から定法により DNA を抽出した。PCR に用いたプライマーは、SHBV については B ウイルスゲノムの Us 領域内の A 領域 (HB2A:HB1B, 295bp)、C 領域 (HB2A:HB2B, 641bp)、E 領域 (HB3A:HB2B, 421bp)、HSV については DNA ポリメラーゼをコードする領域の 330bp を増幅領域とする 2 種のプライマー (KM-1、KM-2)、SCMV と HCMV については Vp25 をコードする領域の 610bp を増幅領域とする 2 種のプライマー (CM-2、CM-3) を用いた (表 1)。陽性コントロールとして、SHBV はプラスミド DNA、他の 3 種のウイルスではウイルス感染細胞株から抽出した DNA を用いた。PCR は 100ul の反応液量で、predenaturation ; 94C、3 分 1 サイクルの後、denaturation ; 94C、2 分、annealing ; 55C または 65C、3 分、extention ; 72C、4 分を 30 サイクル、final extention ; 72C、10 分、1 サイクルの条件でおこなった。PCR-Microplate Hybridization は HSV-1/HF、CMV、HSBV/E、E のビオチン標識 DNA プローブを用いておこなった。

2) RT-PCR による SRV/D env 遺伝子の増幅:

2×10^6 の CMK-6 細胞から定法に従って total RNA を抽出し、cDNA を調整した。SRV/D env 遺伝子の増幅には、表 1 に示すプライマーを用い、50ul の反応液量で predenaturation ; 94C、4 分 1 サイクルの後、denaturation ; 94C、15 分、annealing ; 53C、15 秒、3 分、extention ; 72C、4 分で 40 サイクル、final extention ; 72C、10 分、1 サイクルの条件でおこなった。10ul の PCR 産物を 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、Ethidium bromide で染色し、増幅された DNA を検出した。

C. 結果及び考察

図 1 に CMK-6 細胞から抽出した DNA を用いて、PCR で増幅した 4 種のヘルペスウイルス DNA 断片の電気泳動図と PCR-Microplate hybridization 法による DNA 検出結果を示す。図に示すように、CMK-6 細胞から調整した DNA では、いずれのヘルペスウイルスにおいても陽性コントロールに見られる特異バンドが検出されなかった。さらに、PCR-Microplate hybridization 法での hybridization signal も検出限界以下であった。

図 2 は RT-PCR により SRV/D env 遺伝子を増幅した結果を示した物である。SRV/Tsukuba 株を感染させた Raji 細胞から抽出した RNA では PCR サイクル数に依存した特異バンドが検出されたが、CMK-6 から抽出した RNA では SRV/D に特異的なバンドは検出されなかった。

以上の結果から、現在研究用に供給されているカニクイザル由来の ES 細胞株、CMK-6 には実験者に Zoonosis の危険性があるサルヘルペス B ウイルス、サルサイトメガロウイルス、サルタイプ D レトロウイルスの潜伏または持続感染が無いと判断した。

D. 結論

カニクイザルで樹立された ES 細胞株、CMK-6 について、実験者に Zoonosis の危険性がある、サルヘルペス B ウイルス、サルサイトメガロウイルス、サルタイプ D レトロウイルスの感染の有無を調査した。その結果、いずれのウイルスについても潜伏または持続感染が無いことが実証された。

E. 研究発表

1. 論文発表

このテーマについては発表無し

表1 カニクイザル ES 細胞株のウイルス感染調査に用いたプライマーセット

	Primer	Primer sequence (5'→3')	Fragment size (bp)	Gene region
SRV/D	SRVenvF1:	GCCCGTGGTAAAGAAAAAATTG	SRV-1(728)	env
	SRVenvR1	ACTTCTGCTAGAGAGTCTAC	SRV-2(701)	
SHBV	HB2A:	CCGCGCTCGCCACGGACACCA	295	Us
	HB1B:	TCGCGGGGTCACGCGTAGACG		
	HB2A:	CCGCGCTCGCCACGGACACCA	641	Us
	HB2B:	ATCGCGCGCCGGACCGATCGT		
	HB3A:	CCTGCACCGGTGCTGTAGACG	421	Us
	HB2B:	ATCGCGCGCCGGACCGATCGT		
HSV	KM-1:	CCGCGCTCGCCACGGACACCA	330	DNA
	KM-2:	TCGCGGGGTCACGCGTAGACG		polymerase
HCMV & SCMV	CM3:	CCGCGCTCGCCACGGACACCA	610	VP25
	CM2:	ATCGCGCGCCGGACCGATCGT		

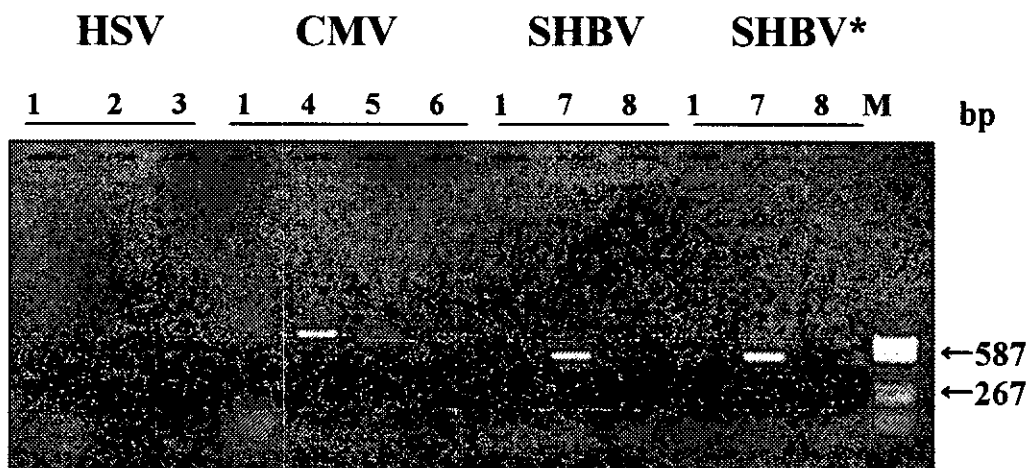


Figure 1 (a)

1 : CMK-6、2 : HSV-1 感染細胞、4 : HCMC 感染細胞、5 : SCMV 感染細胞
 7 : SHBV プラスミド DNA、3、6、8 : PCR コントロール

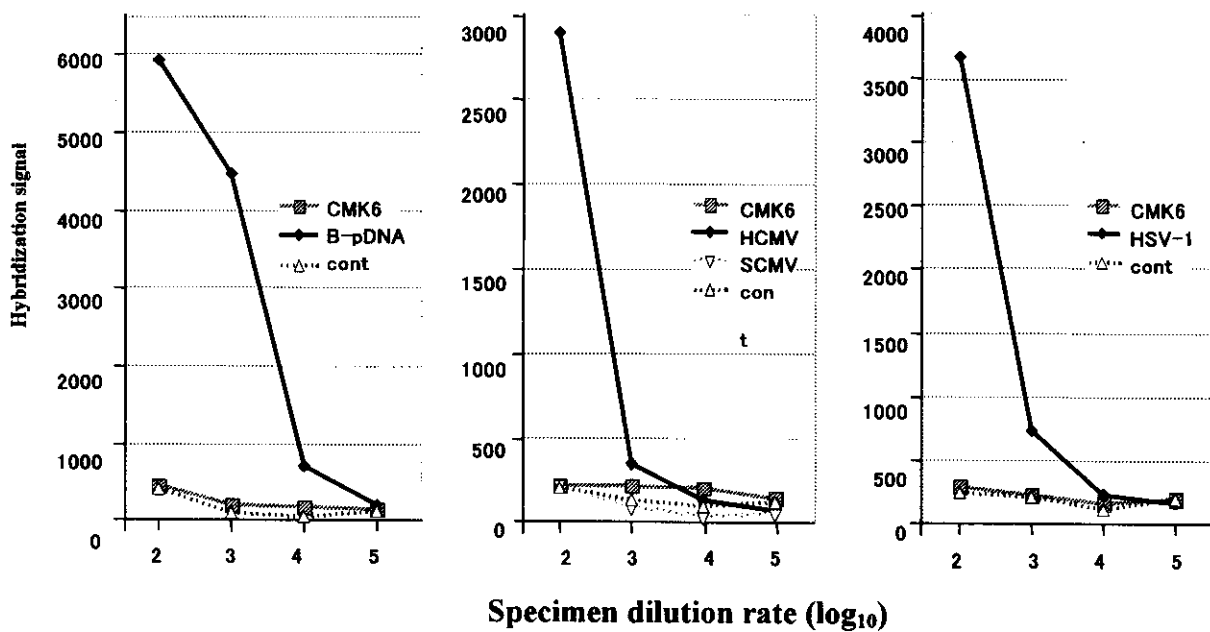
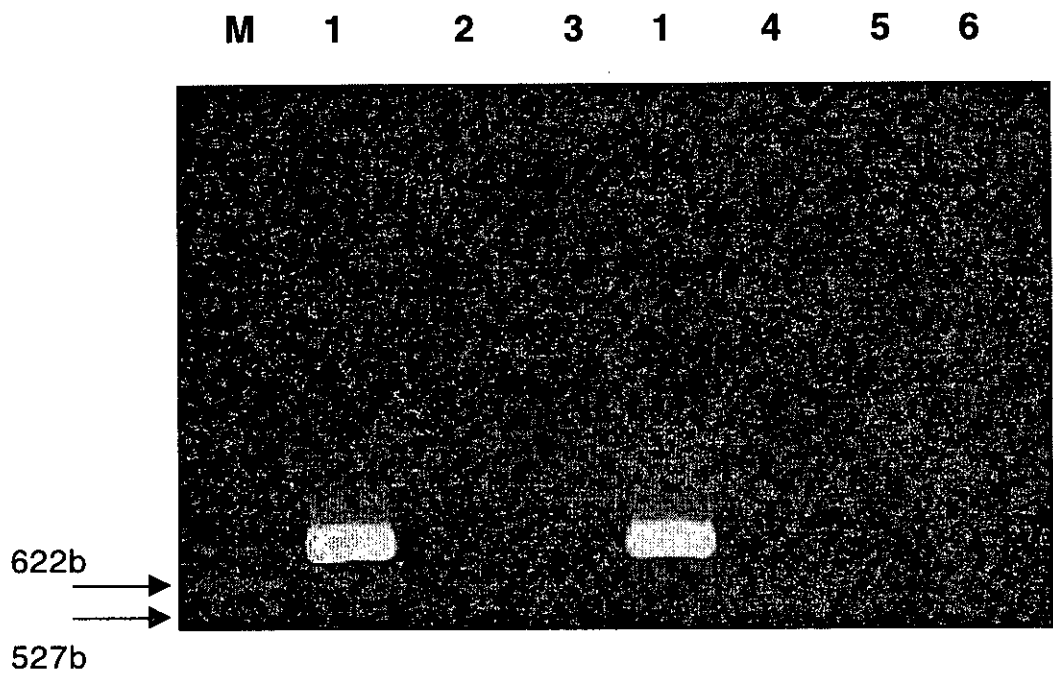


Figure 1 (b)

図 1 4 種のヘルペスウイルス遺伝子断片の増幅
 a : 電気泳動 b : PCR-Microplate Hybridization



M : 分子量マーカー、 1 : SRV/D 感染 Raji 細胞 2 : 休止期 CMK-6
 3 : 休止期 CMK-10、 4 : 活性化 CMK-6、 5 : 活性化 CMK-10
 6 : 非感染 Raji 細胞

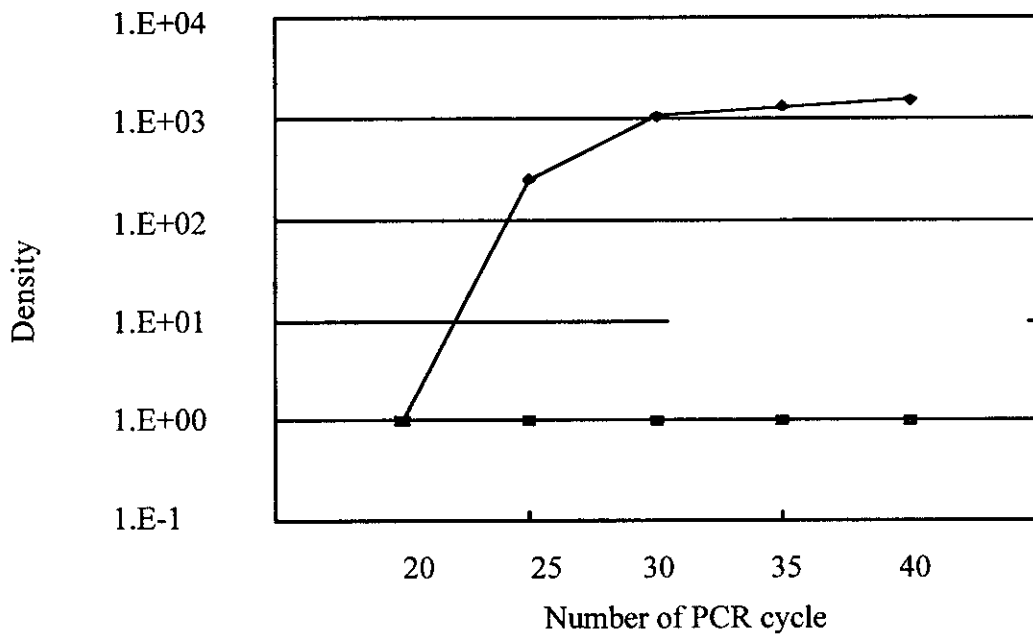


図 2 : RT-PCR による SRV/D ゲノムの検出

高感度ゲノム検出法を用いた SRV/D SPF サルコロニーの確認に関する研究

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)

協力研究者 高野淳一郎** 成田豊子** 原 正幸* 向井鏖三郎*

藤本浩二** 小野文子**

(*国立感染症研究所筑波霊長類センター、

**社団法人予防衛生協会)

研究要旨

サル類を用いた遺伝子治療研究はウイルスベクターの開発及び導入遺伝子の長期発現ならびに安全性を検討するためには必須である。我々は遺伝子治療研究に用いる SPF サルの作出を目的として、B ウイルス、SVV 抗体陰性の筑波霊長類センターのカニクイザルコロニーから、免疫不全を引き起こす simian retrovirus type D (SRV/D) 陰性群作出を試みた。離乳時48%の陰性サルを隔離し、定期検査を実施することにより、4 回の検査で92%の陰性サルを確保することができた。また、SRV/D の感染の特徴として、抗体産生を伴わない無症候キャリアになることがあるため、感度の高いゲノム検出法を確立するために、霊長類センターで飼育されているカニクイザルから SRV/D を分離し、この塩基配列を基に gag 領域の PCR 用のプライマー対を設計した。本プライマー対を用いることにより血清中のウイルス及び血液中の SRV/D ゲノム DNA を高感度に検出することが可能となった。

キーワード：カニクイザル、SRV/D、SPF コロニー、PCR

A. 研究目的

サル類はヒトと同じ霊長類に属することから、医生物学領域の研究や安全性試験のための実験用動物として重要であり、特にマカク属サルは AIDS 研究や種々のワクチン開発の研究にも数多く用いられている。さらに、遺伝子治療のためのウイルスベクターの開発及び導入遺伝子の長期発現ならびに安全性を検討するためにはサル類を用いた研究は必須である。しかし、マカク属サルには simian

immunodeficiency virus (SIV) と同様に免疫不全を引き起こす simian retrovirus type D (SRV/D) が存在している。この SRV/D に感染しているサルを遺伝子治療研究に使用した場合、免疫抑制等の負荷による潜在ウイルス惹起による病態発現や、レトロウイルスベクターの評価系における関与等により、実験結果に影響を及ぼす可能性があり、SRV/D に感染していないサルを用いることが望まれる。そこで、我々は筑波霊長類センターに

における個別飼育カニクイザルコロニーから SRV/D 陰性の SPF コロニーの作出を試みた。また、SRV/D の感染の特徴として、抗体産生を伴わない無症候キャリアになることがあるため、感度の高いゲノム検出法による SRV/D 感染サルの確認が必要となる。そこで、高感度のゲノム検出法の確立を行うとともに、霊長類センターにおいて飼育されているカニクイザルの SRV/D 感染率を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) SPF コロニーの作出

SPF コロニーは、当センターのカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 繁殖コロニーにおいて離乳による母仔分離時にウエスタンブロットリング (WB) 法で抗 SRV/D 抗体陰性の仔ザルのみを別室に移動し、SRV/D type 2 のプライマーを用いた PCR 法を併用して、陰性確定個体を SPF サル室に維持管理した。飼育方法はセミドライ方式として管理した。動物は定期的に検査し陽転個体を排除しながら維持した。

2) 高感度ゲノム検出法の確立

Sample : 上記の方法により、3 回ないし 4 階の検査で陰性を確認し、SPF 管理室で飼育されているカニクイザル 60 頭および共同利用施設で飼育されている長寿研究用 (コントロール) カニクイザル 49 頭の血液を用いた。

PCR : 霊長類センターで飼育され、貧血、

薬剤不応答性の下痢等の症状を呈したカニクイザルから分離された SRV/D の塩基配列を基に gag 領域に 1st PCR 用、Nestlet PCR 用のプライマー対を設計した。

PCR 反応液は、TaKaRa Ex Taq TM ((5unit/ μ l) TaKaRa) を 0.5 μ l、10 × Ex TaqTM Buffer を 2.5 μ l、10 mM dNTP mixture (各 2.5 mM) を 2.0 μ l、各プライマーを 25 pmol、Template DNA を 1.0 μ l (50 ng) をそれぞれ加え、全量が 25.0 μ l になるように滅菌蒸留水で調製した。蒸発を防ぐために反応液の上にミネラルオイルを重層した。PCR 反応には、ペルティエ・サーマル・サイクラー (MJ RESEARCH) を使用した。PCR 産物の電気泳動には 0.5 × TBE (90 mM Tris、90 mM Boric acid、2 mM EDTA) を緩衝液として用い、1.2% アガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色を行い写真撮影を行った。

検出感度 : SRV/D の遺伝子をプラスミドに導入したものを TE に 1 ng/ μ l (2 × 10⁵ コピー/ μ l) になるように調製し、非感染 Raji 細胞のゲノム DNA をキャリアとし 10 倍希釈を行った。0.2 コピー/ μ l から 2 × 10⁵ コピー/ μ l になるように、それぞれ調製されたものを鋳型 DNA として用いた。また、Negative control とし非感染 Raji 細胞のゲノム DNA を、Positive control とし SRV/D 感染 Raji 細胞のゲノム DNA を使用し PCR 反応を行った。

C. 研究成果

1) SPF コロニーの作出

生後6から10ヶ月齢のカニクイザル287頭について離乳時にSRV/D抗体検査を実施した。なお、これらのサルは随時離乳されるため、1群20~40頭ずつ不定期に検査、隔離を行ってきた。第1回目の検査では37%で抗体陽性であった。そのうちの24頭についてSRV/D type 2のプライマーを用いたPCRを実施したところ1頭でゲノムDNAが検出された。ウエスタンブロッティング法で明らかなバンドが2本以上確認されたものを陽性と判定し、バンドが1本または非常に判定しにくいほど薄いものについては不定判定としており、15%が不定判定であった。明らかな陰性サルのみをSPF群として隔離することとしたが、1次検査では48%で抗体陰性が確認された。抗体陰性のサル138頭中21頭においてPCRを実施したところ4頭においてゲノムDNAが検出された。抗体および、PCRで陰性を確認したサルのうち同居サルが陽性であるサルを除いた108頭について隔離飼育を開始した。隔離飼育を行うサルは随時導入のため、1次隔離室、2次隔離室をもうけ1次隔離はロットごとに行い2次隔離以降は同室管理とした。飼育管理は全管理の最初の作業とし、洗浄作業については他の管理より、簡易方式にして室内の湿度上昇を制御した。1次隔離後の検査では全頭について抗体検査およびPCR検査を実施し、抗体またはPCR陽性サルを排除しながら、

SPF管理を行った。2回目の検査では抗体は79%、PCRでは100%陰性が、3回目では抗体40%、PCR97%、4回目の検査で抗体92%、PCR98%の陰性が確認された。(Fig. 1、Table 1)

2) 高感度ゲノム検出法の確立

PCR:

霊長類センターから分離されたSRV/Dの塩基配列を基にgag領域に1st PCR用、Nested PCR用のプライマーを設計し、SRV/D感染サルと非感染サルから採血を行い血清よりウイルスRNA、血球よりゲノムDNAを調製し、RT-PCRおよびNested PCRを行った。その結果、SRV/D感染サルからは、ウイルスRNA、ゲノムDNAともにSRV/D gag領域特異的増幅断片(381bp)が認められ、非感染サルからは増幅断片が認められなかった(Fig. 2)。

検出感度:

1st PCRでは2000コピーまで検出され(Fig. 3A)、Nested PCRでは2コピーまで検出することが可能であった(Fig. 3B)。

検出率:

筑波霊長類センターのSPFサルコロニーで飼育されているカニクイザル60頭(SPF化において最終検査で陽性サルを排除した後のサルを用いた。これらのサルは3回または4回の検査が実施された個体である)、コントロールカニクイザル49頭か

ら採血を行い、ゲノム DNA を調製し本検出法を用いて検査を行った。その結果、SPFサルコロニーで飼育されているカニクイザル 60 頭全てが SRV/D 陰性であった (Table 2)。一方、コントロールカニクイザル 49 頭中 11 頭 (22.5%) が陽性であった。

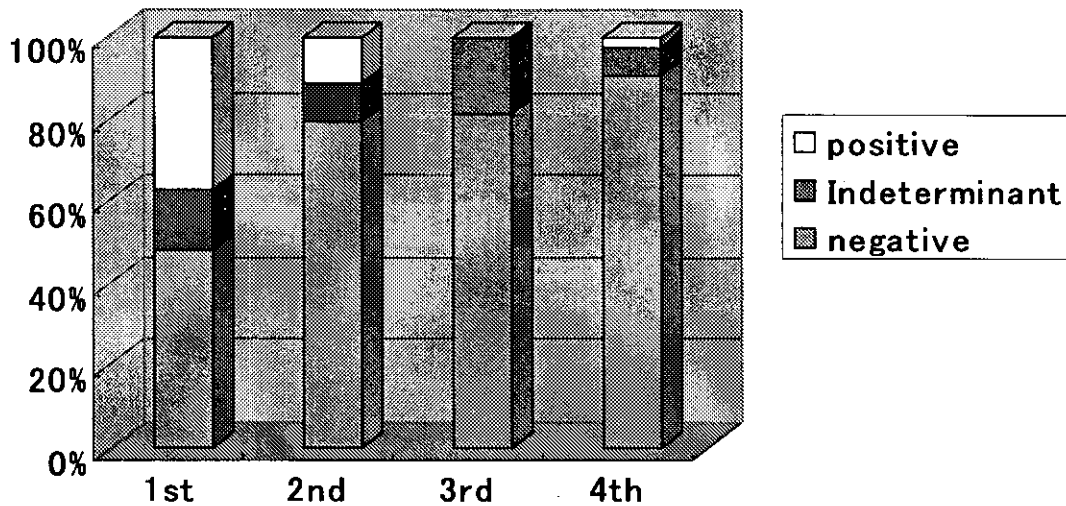
D. 考察

マカク属サルは 遺伝子治療研究において重要な実験動物である。しかし、マカク属サルには SIV と同様に免疫不全を引き起こす SRV/D が存在している。従って、この SRV/D に感染しているサルを 遺伝子治療研究に使用することは実験結果に影響を及ぼす可能性があり、SRV/D 非感染サルを用いることが望まれる。そこで陽性コロニーから出生したサルを早期から検査隔離をする方法で SPF コロニーの作出を試みた。隔離後平均 2 年の間に 3~4 回の検査を行って陽性サルを排除しながら維持していく方法を用いて約 92% の陰性コロニーを維持できた。完全陰性群作出にはさらに、定期検査を進めることが必要であると考えられた。さらに、SRV/D 陰性サルを研究に供給する体制を整えるためには、飼育管理における隔離体制および、飼育環境について、さらに検討を行うとともに、これら陰性サルを用いて繁殖コロニーを組むことが重要であると考えられた。また、SRV/D の感染の特徴として、抗体産生を伴わない無症候キャリアになることがあるため、感度の高いゲノム検出法による SRV/D 感染サルの確認が必

要となる。

そこで、高感度のゲノム検出系を確立するため、霊長類センターで飼育されているカニクイザルから SRV/D を分離し、この塩基配列を基に gag 領域に 1st PCR 用、Nestet PCR 用のプライマー対を設計した。本プライマー対を用いることにより血清中のウイルス RNA 及び 血液中の SRV/D ゲノム DNA が直接検出できるかを調べるため、SRV/D 感染サルと非感染サルから採血を行い Nestet PCR を行った。その結果、SRV/D 感染サルからは、ウイルス RNA、ゲノム DNA とともに目的とする増幅断片が認められ、非感染サルからは増幅断片が認められず (Fig 2)、本検出法を用いることにより、SRV/D のウイルスの高感度検出が容易にできるようになった。

次に、本検出法を用いて筑波霊長類センターにおける本 SRV/D の検出率を明らかにするため、SPF サルコロニーで飼育されているカニクイザル 60 頭、共同利用棟施設で飼育されているカニクイザル 49 頭を用いて、血液中のゲノム DNA からウイルスの検出を試みた。その結果、コントロールカニクイザル 49 頭中 11 頭 (22.5%) が陽性であった。その一方で、SPF サルコロニーで飼育されているカニクイザルからは検出されず (Table 2)、本コロニーは、SRV/D に関し SPF 化されていることが明らかとなった。



Fig, 1 Change in western blotting reactivity after serial screening and selection of SRV sero-negative monkeys

WB	PCR	1st	2nd	3rd	4th
Negative	Negative	17	86	56	38
	Positive	4		1	
	NT*	117			
	total	138	86	57	38
Indeterminant	Negative	15	10	12	3
	Positive	1		1	
	NT*	26			
	total	42	10	13	3
Positive	Negative	23	12		
	Positive	1			1
	NT*	83			
	total	107	12	0	1
Sample Number		287	108	70	42
Avrage of test Interval (days)		-	317	141	175

NT* non tested

Table 1 Comparison in sensitivity between W B and PCR Detection during serial screening and selection for SRV/D Negative monkeys

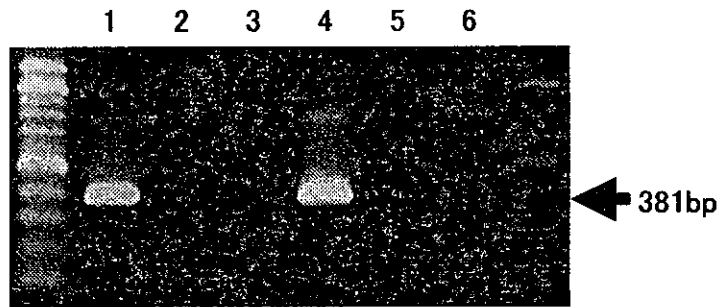


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product. Lane 1 and Lane2; Detection of SRV/D from PBMC by nested PCR. Lane 4 and Lane5; Detection of SRV/D from plasma by RT- PCR. Lane 1 and Lane4; SRV/D Infected monkey. Lane 2 and Lane5; uninfected monkey. Lane 3 and Lane 6; Water control .

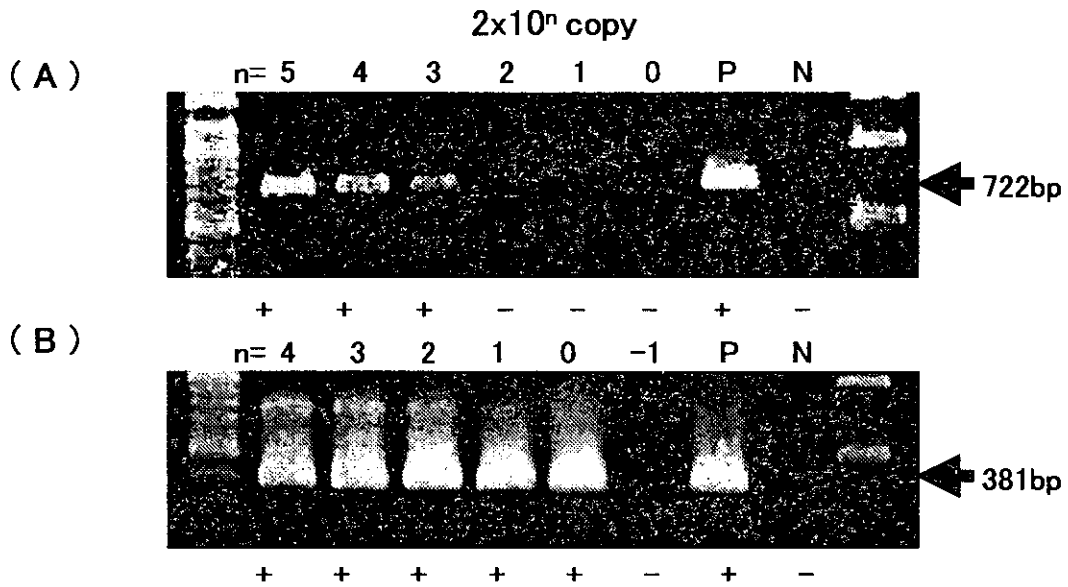


Fig.3 PCR Titration of SRV/D genome using gag primers. (A) Agarose gel electrophoresis of First PCR products. (B)Agarose gel electrophoresis of nested PCR products

	Positive	Negative
SPF	0	60
Control	11	28

Table. 2 Incidence of SRV/D infection estimated from nested PCR for SRV/D gag region

カニクイザルを用いた SeV/FGF2 ベクター接種実験

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)

協力研究者 米満 吉和¹⁾、羽成光二²⁾、鴻野あや子²⁾、小川浩美²⁾、
揚山直英²⁾、大藤圭子²⁾、寺尾直美³⁾、寺尾恵治³⁾、小野文子²⁾、中山 裕之⁴⁾

1) 九州大学大学院医学研究院病態医学専攻病理学講座

2) 社団法人予防衛生協会

3) 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター

4) 東京大学農学生命科学研究科

研究要旨

カニクイザルにおいて SeV/FGF2 を筋肉内投与した際の急性変化について検討した。

SeV/FGF2 をカニクイザルの上腕及び大腿部筋肉内に、 5×10^9 cfu/ml/kg と 5×10^8 cfu/ml/kg を分割投与し、その後 14 日間観察を行った。観察期間を通じて、死亡例は認められず、一般状態観察において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。また、症状の発現は投与濃度には依存していなかった。

キーワード：カニクイザル、遺伝子治療、SeV/FGF2 vector

A. 研究目的

カニクイザルにおいて SeV/FGF2 vector を接種した際の急性変化を検討した。

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 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。採血および投与は塩酸ケタミン (5 ~ 20 mg/kg、ケタラール 50; 塩酸ケタミン 50mg/mL (三共株式会社)) の筋肉内投与による麻酔を行った。投与後 2 週目にケタラール麻酔下で、ペントバルビタールナトリウム (25mg/kg; ネンプタール (大日本製薬株式会社)) を静脈内投与し深麻酔状態で心臓採血による放血後、過剰量のペントバルビタールナ

B. 研究方法

1) 動物および方法

1999 年 10 月及び 2001 年 9 月に中国より輸入した育生カニクイザル (*Macaca fascicularis*) 雄 9 頭 (体重 3.5kg ~ 5.7kg) を用いた。飼育環境は室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、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

トリウム(100mg/kg) 静脈内投与による安楽死を行った。試験群構成は、対照群(PBS)3 頭と被験物質投与群(SeV/FGF2)3 頭とした。

対照群:PBS

#G9 (♂、2才 8ヶ月)

#G17 (♂、0才 9ヶ月)

#G19 (♂、0才 9ヶ月)

投与群:SeV/ FGF2 5e9ciu/ml /kg

#G3 (♂、2才 8ヶ月)

#G15 (♂、0才 9ヶ月)

#G16 (♂、0才 9ヶ月)

SeV/ FGF2 5e8ciu/ml /kg

#G4 (♂、2才 8ヶ月)

#G18 (♂、0才 9ヶ月)

#G20 (♂、0才 9ヶ月)

ベクター投与は麻酔下で、PBS 1ml/kg 又は SeV/FGF2 1ml/kg を右大腿部 4 箇所、右上腕部 2 箇所に分割投与した。

2) 観察、測定および検査項目

一般状態の観察、体重測定、血圧脈拍測定を実施した。

尿検査は新鮮尿を採取し尿検査用試験紙を用いて検査した。

血液学的および血液生化学的検査

麻酔下で投与7日前、投与 6 時間後、投与後1、2、5、9および13~15日目に大腿静脈から 7.8ml の静脈血を採取し血液および生化学検査を実施した。

投与後 2 週間目に安楽死を行い肉眼的および組織学的検索を実施した。

C. 研究結果

一般状態観察において、活動性、食欲、便性

状等において観察期間を通して異常は認められなかった。

体重および体温測定において、全例とも著しい変動は認められなかった。

尿検査において新鮮尿による半定量分析において、投与群の 4 例(G3、G16、G18、G20)において投与 6 時間後に尿蛋白が検出され G16では 14 日目まで痕跡反応が認められた。投与群の 1 例(G18)および、対照群の 1 例(G17)においては投与後6時間目より潜血反応が認められた。尿比重、pH、尿糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンにおいては全例とも特記すべき変化は認められなかった。

血圧測定において、全例とも著しい変動は認められなかった。脈拍数は投与群の 1 例(G15)において投与日および、対照群の 1 例(G17)において 14 日目に上昇が認められたが、麻酔の覚醒状態に影響するものと思われる。

血液学的検査において全例で実験期間中、赤血球数、hemoglobin 濃度、hematocrit 値が漸減し、コントロール群に比べ接種群において減少傾向が明らかであった。また投与群の 1 例(G4)では MCV においても軽度低下傾向が認められた。白血球数は 1 例を除き実験期間を通じて著しい変動は認められなかった。投与群の 1 例(G18)において投与後 14 日目に顆粒球分画の増加が認められた。fibrinogen 濃度は投与群の 1 例(G16)において増加傾向、1 例(G4)において減少傾向が認められた。p rothrombin 時間、血小板数及び activated partial thromboplastin 時間においては著しい

変動は認められなかった。

血液生化学的検査において GOT 値は投与群の全例およびコントロール群の 1 例 (G19) において投与後 6 時間目から 9 日目まで上昇が認められたが 2 週目ではほぼ投与前の値に回復した。CPK は全例において投与後 6 時間目から上昇し、その後回復傾向が認められた。LDH は投与群の 1 例 (G4) を除き投与後 1 日目より上昇し、その後回復傾向が認められた。血糖値は投与群の 1 例 (G16) および対照群の 1 例 (G9) において投与後 6 時間目に、対照群の 1 例 (G17) において投与後 2 日目に一過性に上昇が認められ、投与群の 1 例 (G4) において投与後 13 日目に低下が認められた。BUN, Cre 値は投与群の 1 例 (G4) において投与後 13 日目上昇が認められた。その他、血清蛋白、CRP、血清脂質、電解質、GPT、ALP、 γ -GTP、LAP および ChE 値に軽度な増減は認められたが、いずれも正常範囲を大きく逸脱した値ではなかった。

投与群 6 例において行った剖検の肉眼所見においては、6 例中 2 例 (G15、G4) に腸管および肝臓に、2 例 (G16、G20) に肺に結節を認められたが、慢性の所見であることから、ベクター投与に起因する病変ではないと思われた。脾臓は 6 例中 4 例 (G3、G15、G16、G18) において濾胞が明瞭であった。G20 では一部腎臓に変性部が認められた。

D. 研究考察

カニクイザルにおいて SeV/dF-lacZ を筋肉内投与した際の急性毒性を検討した。

観察期間を通じて、死亡例は認められず、一般状態観察でも異常は認められなかった。

体重、体温、血圧および脈拍測定において観察期間を通じてベクター投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

尿検査では投与後 6 時間目にベクター投与群 6 例中 4 例に尿蛋白が検出されたが、その後痕跡程度であり、血液生化学値の腎機能マーカーである、BUN, Cre においても著しい変動がなかったことから、急性の腎機能障害を誘発したものではなかった。その他の検査項目では観察期間を通じて特記すべき変化は認められなかった。

血液学的検査では全例で投与後に赤血球数、hemoglobin 濃度、hematocrit 値の減少が認められたことから、頻回採血に影響するものと考えられ明らかな貧血症状を呈するものではなかった。しかし、ベクター投与群においてややその傾向が強かったため、長期経過を追うことにより、骨髄抑制、造血抑制の有無について検討する必要があると思われた。白血球数では 1 例を除いて著しい変動は認められなかった。投与後 13 日目に顆粒球分画の上昇が認められた G4 においても、炎症マーカーである CRP の上昇も認められず、ベクター投与の影響ではないと考えられた。血液凝固系検査ではベクター投与に留意すると考えられる変動は認められなかった。

血液生化学的検査では全例で投与後 6 時間目より GOT と CPK、1 日目より LDH の上昇が認められたが、いずれも投与後 14 日目には回復傾向を示した。これらの変化は対照群にも共通して認められ、また回復傾向を示したこ

とから、筋肉内大量投与に関連した一過性の変化であり、ベクター投与に起因する変化ではないと考えられた。血糖値の変動は一過性のものであり、ベクター投与に起因するものではないと考えられた。投与群の 1 例 (G4) で腎機能の指標であるBUNのわずかな上昇が認められたが、この個体のクレアチニン値は実験開始前よりやや高値を示していたことから、ベクター投与に起因するものではないと考えられた。その他の血液生化学値では軽度な増減が認められたが、いずれも正常範囲を大きく逸脱した値ではなく、ベクター投与に起因するものではないと考えられた。

剖検はベクター接種群のみ実施し、6 例中 4 例に肺、肝臓および、腸管に結節が観察されたが、今回使用したカニクイザルは中国より輸入したサルであり、輸入検疫検査では検出されない既往症としての寄生虫疾患の痕跡であると考えられ、ベクター投与に起因すると思われる病変ではないと考えられた。また、6 例中 4 例においてやや脾臓の濾胞が明瞭であったが、生理的な範囲の変化であると考えられた。

以上のことから本試験条件下において SeV/dF-lacZ はカニクイザルに対して重篤な急性毒性を発現しなかったことから、この被験物質の筋肉内投与における毒性は低いものと判断した。また、症状の発現は投与濃度には依存していなかった。以上のことより、SeV/dF-lacZ の急性毒性は低いものと考えられた。

Table 1 Urinalysis in monkeys after intramuscular administration of Sev/FGF2 Vector

Group	Animal No.	Specific gravity										pH					
		day -7	day 0	day 1	day 3	day 5	day 9	day 13~15	day -7	day 0	day 1	day 3	day 5				
Sev /FGF2; 5e9ci u/k g	G3	1.000	1.010	1.005	1.000	1.005	1.005	1.000	1.005	1.005	1.000	8.5	7.0	7.5	8.0	7.5	
	G15	1.005	1.010	1.005	1.000	1.005	1.005	1.000	1.005	1.005	1.000	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	
	G16	1.000	1.000	1.005	1.000	1.005	1.000	1.005	1.000	1.005	1.005	8.5	8.5	8.0	8.5	8.5	
	G4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.005	1.005	1.005	1.005	1.005	1.005	8.0	8.5	7.5	8.0	8.0	
Sev /FGF2; 5e8ci u/k g	G18	1.005	1.000	1.010	1.000	1.005	1.000	1.005	1.000	1.005	1.005	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	
	G20	1.005	1.000	1.005	1.000	1.005	1.000	1.005	1.000	1.005	1.005	8.5	8.5	8.0	8.5	8.5	
	G9	1.005	1.000	1.005	1.000	1.000	1.005	1.005	1.000	1.005	1.005	7.5	8.5	8.0	8.5	8.5	
	G17	1.005	1.000	1.015	1.000	1.010	1.005	1.005	1.005	1.005	1.005	8.0	8.5	7.0	8.5	8.0	
Control	G19	1.005	1.010	1.005	1.000	1.010	1.005	1.005	1.005	1.005	1.005	8.0	8.0	7.5	6.5	8.0	
	Glucose																
	Group	Animal No.	day -7	day 0	day 1	day 3	day 5	day 9	day 13~15	day -7	day 0	day 1	day 3	day 5			
	Sev /FGF2; 5e9ci u/k g	G3	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G15		±	±	-	-	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	
G16		±	+	±	±	±	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	
G4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sev /FGF2; 5e8ci u/k g	G18	-	+	±	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G20	±	++	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G17	-	±	±	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	
Control	G19	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ketone bodies																
	Group	Animal No.	day -7	day 0	day 1	day 3	day 5	day 9	day 13~15	day -7	day 0	day 1	day 3	day 5			
	Sev /FGF2; 5e9ci u/k g	G3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G15		-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bilirubin																	
Group	Animal No.	day -7	day 0	day 1	day 3	day 5	day 9	day 13~15	day -7	day 0	day 1	day 3	day 5				
Sev /FGF2; 5e9ci u/k g	G3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G15	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fig. 1 Hematological findings in monkeys after intramuscular administration of SeV/FGF2 Vector

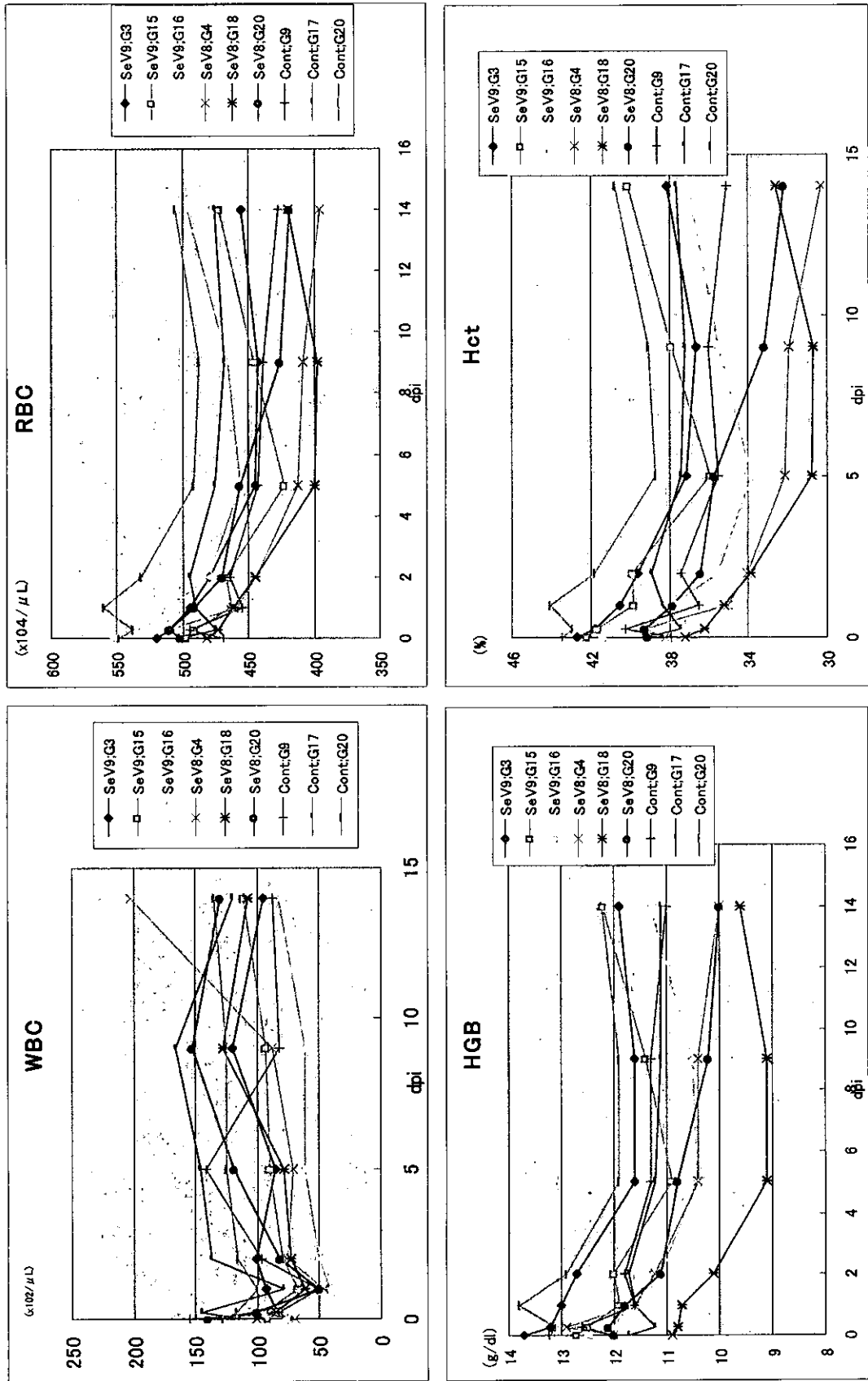


Fig. 2 Blood chemical findings in monkeys after intramuscular administration of SeV/FGF2 Vector

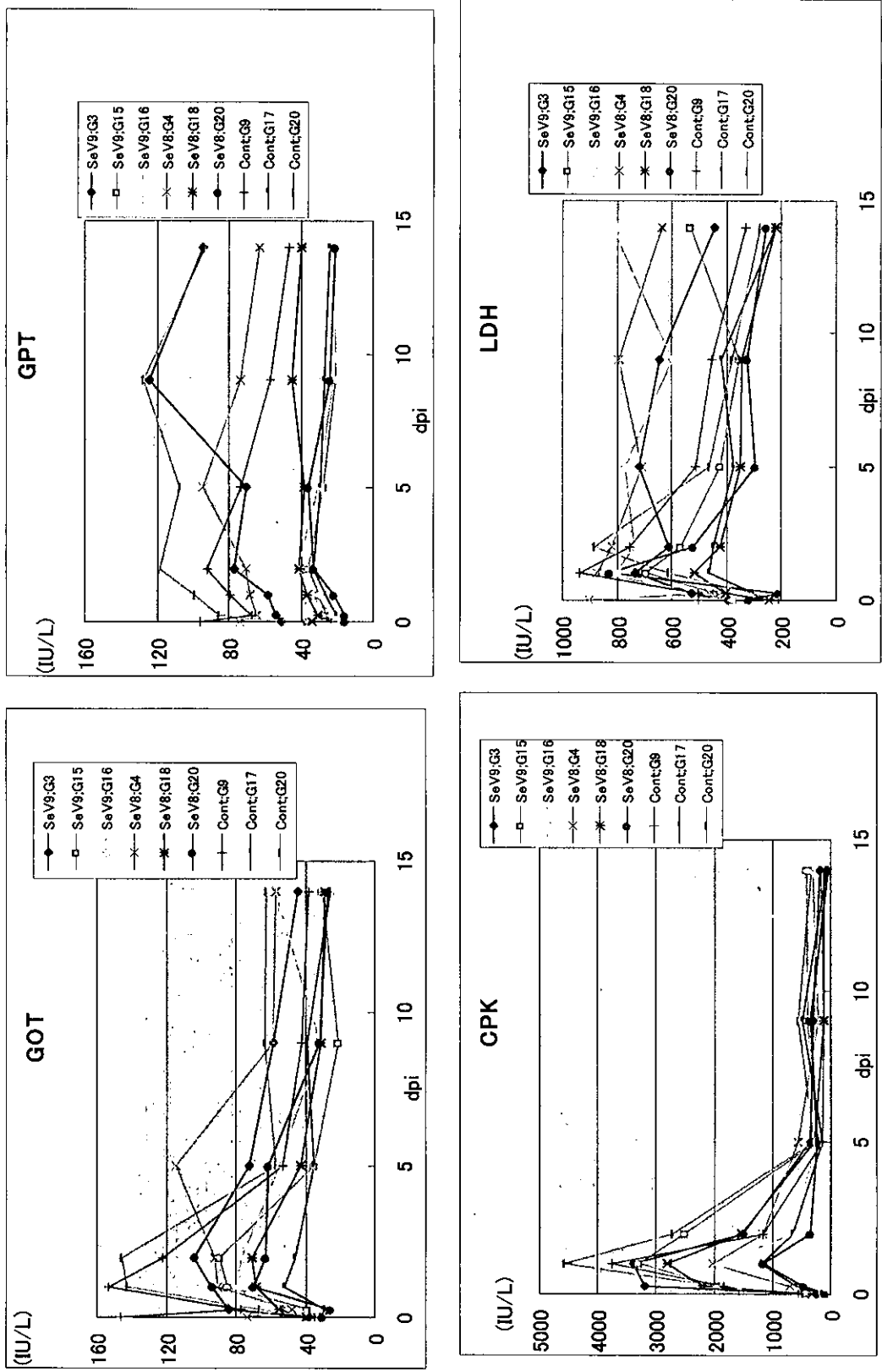


Table2 SeV/FGF2 接種サルの組織病理所見

	肺	胸腺	脾臓	腸管	筋接種部位	備考
#G3	中度～重度の水腫				筋線維間に炎症細胞浸潤	
#G15				大腸粘膜：中度の炎症細胞浸潤（リンパ球、プラズマ細胞）	筋線維間に炎症細胞浸潤	
#G16	結節部：好酸球、リンパ球、類上皮細胞を主とする炎症細胞浸潤巣、中央部に虫体（肺ダニ）	大型	リンパ細胞増大・数	大腸粘膜：中度の炎症細胞浸潤（リンパ球、プラズマ細胞） 結節部：結合織性または肉芽腫性結節（寄生虫の通過痕と思われる）	筋線維間に炎症細胞浸潤	若齢個体と思われる
#G4		萎縮			筋線維間に炎症細胞浸潤	
#G18					筋線維間に炎症細胞浸潤	
#G20	結節部：好酸球、リンパ球、類上皮細胞を主とする炎症細胞浸潤巣（肺ダニ結節）、虫体はみられない 上記病巣の周囲気管支内・粘膜に好酸球浸潤	大型			筋線維間に炎症細胞浸潤	若齢個体と思われる

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）：その3

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 F 遺伝子欠損弱毒化センダイウイルスを接種したところ、接種部の筋肉で限局性炎症がみとめられた以外、ウイルスの増殖によると思われる病変はみられなかった。センダイウイルスの遺伝子ベクターとしての安全性が確認された。

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 F 遺伝子欠損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 F 遺伝子欠損株を接種し、感染性および形成される病変をしらべた。一昨年度は予備的検討のためサル1頭のみ、昨年度は4頭にウイルスを接種し病理組織学的検索を行った。今年度は接種ウイルスとして F 遺伝子欠損に加えて FGF2 遺伝子搭載したウイルスを用い、接種ウイルス量も増やしたが、接種場所は筋肉内に限定した。

B. 材料・方法

健康カニクイザル (*Macaca fascicularis*) 6頭にセンダイウイルス F 遺伝子欠損/FGF2 遺伝子導入株を 1×10^8 または 1×10^9 大腿および下腿の筋肉内に接種した (表1)。接種後13日、14日、15日にサルを安楽殺し、剖検、主要臓器を採取、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 染色標本作製し、光学顕微鏡で観察した。

C. 結果

1) 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)。

肺： 安楽殺によると思われる中度～重度の水腫 (1例、図1)、肺ダニ寄生による肉芽腫結節 (2例、図2)。

腸： 大腸粘膜に中度の炎症細胞 (リンパ球、プラズマ細胞) 集簇 (2例)。寄生虫性と思われる肉芽腫結節 (1例、図3)。

筋の接種部位： 筋線維間に炎症細胞浸潤 (6例 (全例)、図4)。

D. 考察

カニクイザルにセンダイウイルス F 遺伝子欠損/FGF2 遺伝子導入株を接種したところ、ウイルスを接種部の筋肉で限局性炎症が観察された。他の病変 (肺の肉芽腫結節、腸炎など) はウイルス接種とは無関係と考えられた。昨年度はウイルスを様々な部位に接種し、その結果主に接種部位で炎症病変が認められた。今回の結果もほぼ同様で、接種部以外でウイルス接種に関連した病変はみとめられなかった。この結果から、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さらに強く示された。

E. 結論

カニクイザルに F 遺伝子欠損センダイウイルスを接種すると接種部位に軽度の炎症

病変が形成されたが、ウイルスによる他の病変はみとめられなかった。これにより弱毒化センダイウイルスの安全性が示された。

F. 研究発表
なし