

20030376

厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの  
基盤高度化に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 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

平成16年(2004)3月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

- 医科学研究用リソースとしてのカキザルの基盤高度化に関する研究 ……1  
筑波霊長類センター 寺尾恵治

## II. 分担研究報告書

1. ウイルス学的モニタリングシステム開発、SPFコロニーの確立に関する研究 ……7  
筑波霊長類センター 向井鏖三郎
2. 筑波霊長類センターカキザル繁殖コロニーにおけるサルEBV, CMV, Foamy virusの  
感染状況調査とSPF化に関する研究 ……19  
(社)予防衛生協会 藤本浩二
3. 医科学研究用リソースとしてのカキザルの基盤高度化に関する研究 ……23  
(独)理化学研究所 小倉淳郎
4. 医科学研究用リソースとしてのカキザルの基盤高度化に関する研究 ……26  
筑波霊長類センター 山海 直
5. 霊長類細胞不死化技術開発と網羅的霊長類細胞株ライブラリーの構築 ……30  
筑波霊長類センター 明里宏文
6. 生理学的特性解析、基盤技術開発研究 ……35  
筑波霊長類センター 吉田高志
7. 領域選択的脳虚血誘導法を用いたカキザルにおける高次脳機能障害モデルの開発 ……37  
東京大学農学部 吉川泰弘

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……43

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……45

# I . 総括研究報告書

## 医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの基盤高度化に関する研究

主任研究者 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）センター長

研究要旨：医科学研究用のサル類リソースを個体レベルから遺伝子レベルまで総合的に整備、維持するシステムを構築し、汎用性の高いサル類研究資源の高度化をはかるため、今年度は以下の研究を行った。

個体レベルのリソース整備では、SPF (Specific Pathogen Free) ザルの供給体制を確立するため、すでに繁殖育成コロニーから排除に成功しつつある HBV、SVV、SIV、STLV の 4 種のウイルスについて、繁殖育成コロニーの血清学的モニタリングを実施し、当該ウイルスについて SPF 状態が維持されていることを確認した。また、当面の排除対象ウイルスである SRV については、遺伝子診断によるウイルス検出系の開発に成功し、従来の血清学的診断を併用して選抜した SRV 陰性カニクイザルを隔離して 60 頭規模の SPF パイロットコロニーを確立した。

胚・配偶子レベルでのリソース整備では、次世代の遺伝子改変ザルの開発を視野に入れて、雌ザルからの効率的な成熟卵採取法を開発するとともに、サル類に応用可能な顕微授精技術と核移植クローンの効率的な安定化技術をマウスを用いて検討した。細胞レベルでの遺伝子保存を目的として、Herpesvirus Simiri (HVS) を用いて広範な霊長類不死化細胞ライブラリーの整備に着手し、カニクイザル、アカゲザル、チンパンジー、タマリン由来の末梢T細胞株を樹立した。

遺伝子レベルでのリソース整備では、将来的に SNP 解析および DNA チップを用いた シュミレーション実験に対応する tool として、繁殖コロニーを構成する家系の明らかな 100 頭の核 DNA を新たに保存し、遺伝疾患解析用に 3 件 40 個体の核 DNA を供給した。サル類を用いた医科学実験を支援するための汎用性の高い研究基盤技術として、肥満度を定量的に評価するための 2 波長 X 線密度測定装置による全身の軟部組織に占める脂肪割合の測定法を確立した。また、光感受性色素を利用して大脳新皮質の任意の領域に虚血を作成する技術を開発した。

### 分担研究者名：

向井鎌三郎（筑波霊長類センター・室長）

明里宏文（筑波霊長類センター・主任研究官）

藤本浩二（(社)予防衛生協会・部長）

吉田高志（筑波霊長類センター・室長）

小倉淳郎（(独)理化学研究所・室長）

吉川泰弘（東京大学農学部・教授）

山海 直（筑波霊長類センター・主任研究官）

## A. 研究目的

21 世紀の重要な厚生労働科学研究として、脳・神経科学、長寿科学、新興再興感染症制圧、遺伝子治療、再生医療、ゲノム創薬などが注目されているが、これらの先端技術の開発研究および有用性・安全性評価では優れた動物モデルの開発が不可欠である。なかでも、サル類は解剖、生理、代謝、免疫などのシステムがヒトと類似していることから、最も有用なモデル動物とみなされている。一方、分子生物学の進展により複雑な生体反応を細胞レベル、タンパクレベル、遺伝子レベルで解析することが可能になりつつある。特にポストゲノムプロジェクトとされる研究領域では、これら分子レベルの情報を基にした新しいアプローチが必要であるが、サル類では分子レベルでの解析基盤技術並びにリソースの整備が遅れている。本研究では、21 世紀の医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの基盤高度化を目的として、個体レベル、細胞レベル、遺伝子レベルでの汎用性の高いリソースの整備と質的向上を目的とする。本研究により、個体レベルから遺伝子レベルまでの異なったこれらの階層のリソースと基盤技術を集中的に整備することにより、SPF カニクイザルを用いた分子レベルでの医科学実験を支援することが可能となる。また本研究で開発されたリソース、基盤技術および個体情報などをデータベース化し、公開することにより我が国におけるサル類を用いたトランスレーショナル・リサーチの効率的推進に貢献することを最終目的とする。

## B. 研究方法

主として国立感染症研究所・筑波霊長類センターで繁殖育成されたカニクイザルとアフリカミドリザルを対象として研究を行った。血清疫学調査では、年齢の異なる 170 頭の個体から採

血した血清を用いて蛍光抗体法および ELISA 法により抗体の検出を試みた。貧血、下痢、体重減少を呈した 2 頭のカニクイザルの末梢単核球から SRV/D を分離するとともに、gag 遺伝子の配列を決定した。

効率的な核移植クローン作成を目的として、マウスを用いて異なったドナー細胞による核移植を行った。アフリカミドリザルの顕微受精技術を検討するとともに、得られた受精卵の内部細胞塊から ES 細胞の樹立を試みた。効率的な卵子採取法として、グリセリン溶液に溶解した FSH 処理による採卵を試みた。Herpesvirus saimiri を各種霊長類の末梢リンパ球に感染させ、各種霊長類の末梢リンパ球の不死化を試みた遺伝子レベルでのリソースとして、家系の明らかな第二世代の個体の末梢血白血球から定法に従って核 DNA を抽出し、ライブラリーとして凍結保存した。

汎用性の高い基盤技術として、二波長 X 線骨密度測定装置による全身の軟部組織に占める脂肪の割合から、カニクイザルの肥満度を客観的に評価する測定法を検討した。光感受性色素(ローズベンガル)を静脈内投与した後、光ファイバーで照射することにより、大脳新皮質内の任意の領域に虚血を作成する条件を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の内、サルの個体レベルでの動物実験は国立感染症研究所・動物実験委員会により審査・承認された後実施した。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、作業方式に従って動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

## C. 結果

### 1. 個体レベルのリソース整備：

筑波霊長類センターの繁殖育成コロニーの微生物学的清浄度を血清学的にモニタリングした。コ

ロニーから排除に成功しつつある HBV、SVV、SIV、STLV の4種のウイルスについては、すべての個体が抗体陰性であり、当該ウイルスについて SPF 状態が維持されていることが確認できた。一方、離乳時に 25%であった EBV 感染率は年齢に伴い増加し、10歳以上では全頭が抗体陽性であった。同様に SFV の抗体陽性率は3歳齢までは10%以下であったが、4-9歳で30%、10歳以上で80%と増加した。これに対し、CMV の陽性率はいずれの年齢群でもきわめて低かった。SRV/D 陰性個体を隔離して確立した SRV-SPF パイロットコロニーにおける EBV、SFV、CMV の抗体陽性率には人工保育群と実母保育群で著しい差が認められ、SPF 化における早期離乳と隔離飼育の有効性が実証された(藤本)。

繁殖コロニーで下痢、貧血、体重減少を示す2頭のカニクイザルから SRV/D を分離した。分離した SRV 株の gag 領域の塩基配列は既知の SRV/D 株と 79.3-81.2%程度の相同性を示すことから、既知の SRV/D とは異なる新しい SRV であることが判明した。そこで次に SRV/D 筑波株の gag 領域を特異的に検出するプライマーを開発し、血漿、唾液からの SRV/D ゲノムの検出を試みた結果、Nested PCR により2コピーまで高感度に検出できることが明らかとなった。一方、11頭の唾液から分離した SRV/D の gag 領域を比較したところすべて同一の配列であることから、コロニー内で同一の SRV/D が広範に感染を広げていることが推測された。今年度確立した高感度検出系と血清診断法とを併用して、SRV/D 陰性ザルをスクリーニングし、2歳半の陰性個体56頭で構成される SRV/D 陰性パイロットコロニーを確立した(向井)。

## 2. 胚・配偶子・細胞レベルでのリソース整備:

マウスを用いてサルでの核移植クローン技術開発に資する基盤的技術を検討した。今年度は特に、核移植ドナー細胞の細胞学的特性把握を目的として、成体幹細胞および生殖細胞をドナー細胞とし

て体細胞移植を行った。G0細胞である造血系細胞は高率に2-cellに発生したが、その後の発生低下が顕著であった。一方、胎齢10.5日のマウス始原生殖細胞をドナー細胞とした核移植クローンで産児を得ることに初めて成功した(小倉)。

4頭のアフリカミドリザル雌から採取した75個の卵子のうち35個(47%)が成熟卵であった。その一部について顕微受精を行い3個が拡張胚盤胞に発生した。胚盤胞から内部細胞塊を単離し、フィーダー細胞上で継代培養したところ、霊長類のES細胞に類似した扁平なコロニーが形成された。グリセリンに溶解したFSHによる卵胞発育誘起により、ミドリザルおよびカニクイザルから回収された平均卵数はそれぞれ、20個/頭、50個/頭であり、そのうち成熟卵の割合はそれぞれ30%と40%と本法により比較的高率に良好な卵が回収されることが判明した(山海)。

カニクイザルの末梢血では mitogen で活性化した末梢単核球に Herpesvirus saimiri (HVS) を感染させることにより、1ヶ月程度で不死化細胞が樹立でき、培養一年後も安定した増殖を示した。HVS で不死化した細胞株の表面マーカーを解析したところ、細胞株はいずれも CD3 陽性 T リンパ球であり、活性化マーカーや共刺激分子を強く発現していた。また MHC class-I ハプロタイプの解析で複数の異なった MafaA を発現していることが判明した。カニクイザルと同様な方法でアカゲザル、タマリン、チンパンジー由来の細胞株の樹立に成功した(明里)。

## 3. 遺伝子レベルでのリソース整備:

霊長類センターの繁殖育成コロニーのカニクイザルで家系の明らかな第二世代約100頭から核DNAを抽出し、DNAバンクとして凍結保存した。今年度2件、40頭の保存DNAを供給希望者に提供した(寺尾)。

## 4. 基盤技術の開発:

繁殖育成コロニーの生理学的モニタリング技術

として、肥満度測定法を開発した。体重を指標とした場合には 64.5%が正常、12.3%が境界型、23.2%が肥満と判断された。5-10 歳、11-15 歳、16-20 歳のそれぞれの年齢群で肥満個体の占める割合は、8.3%、31.9%、47.6%と年齢の増加に伴って急激に増加した。一方、境界型の占める割合には年齢群でほとんど差がなかった（吉田）。

ローズベンガルを静脈内注射し、光ファイバーで照射した部位に梗塞巣が生じた。梗塞巣中心部にはニューロンは存在せず、TUNEL 陽性のアポトーシスを生じている細胞が多数検出された。アポトーシスを起こしている細胞は梗塞巣周辺部にも存在した。また、脳障害の生体応答の一つであるミクログリアの活性化も顕著で、特に BrdU 陽性の活性化型ミクログリアの出現が特徴的であった（吉川）。

#### D. 考 察

筑波霊長類センターでは、研究用リソースとしてのカニクイザルから排除すべき感染微生物として、サルからヒトへの危険性から HBV を、サルからサルへの危険性から SVV をとりあげ、両ウイルスについては繁殖育成コロニーからの摘発排除に成功しつつある。本研究では上記に加え、実験結果に影響を与える可能性の高い SRV/D 陰性コロニーの確立を当面の目標とする。今年度の最も大きな成果は、筑波コロニーのカニクイザルから SRV/D を分離し、遺伝子診断による高感度・特異的ウイルス検出系を確立したことである。これにより、血漿、唾液からの SRV/D ゲノムの検出が可能となり、感染経路の特定や、非感染個体の抽出が可能となった。今年度は本法を血清診断法と併用して 56 頭の SRV/D 陰性育成ザルを選抜・隔離し、SRV/D-SPF パイロットコロニーを確立した。収容した 56 頭について、EBV に対する抗体調査を行ったところ、出生直後から人工保育されたサルでは、抗体陽性率が実母保育群に比べて著しく低く、人

工保育（早期分離）が SPF コロニー作出に有効であることが判明した。EBV は SRV/D の次に摘発排除の対象としているウイルスであり、今後は SPF ザルの選抜時期、飼育形態、定期的モニタリングシステムを含めて効率的な SPF コロニー作出・維持法を検討する必要がある。

実験用サル類を対象とした発生工学技術の開発は、遺伝子改変ザル作出に関わる基盤技術の開発だけでなく、胚・配偶子レベルでの遺伝子保存も可能とする。新規技術の開発では小型実験動物を用いたモデル研究が有効であり、核移植クローンに用いるドナー細胞の選択に関わるマウスの知見はサルへの応用が可能である。効率的にサル類の成熟卵を回収する技術が確立されたことにより、今後はこれらの技術を融合して、効率的で安定した体外受精、体外培養技術の確立をめざす。また、配偶子採取法と体外授精技術を応用し、網膜黄斑変性症などの遺伝性疾患家系について胚・配偶子レベルの遺伝子保存を試みる予定である。

細胞レベル、遺伝子レベルのリソースは、代替法実験や使用するサル種の最適化のために必須であり、遺伝的特性が明らかなカニクイザルについては細胞レベルでの遺伝子保存の意味も持つ。代替法においては正常な表現型と機能を有する細胞株の整備が必要となるが、HVS で不死化したカニクイザル T 細胞株は少なくとも表面マーカーに関しては有用なリソースと評価できる。また異なったサル種で細胞レベルのリソース整備が行われれば、研究用途に応じたサル種の最適化が可能となり、実験に使用する個体数を最小とすべきという国際的合意と合致する。来年度以降も網羅的霊長類細胞株の整備を継続する必要がある。

研究用リソースとしてのサル類で最も整備が遅れているのが汎用性の高い基盤技術の開発であることから、本研究では、様々な階層のリソース整備に加え、基盤技術の開発を目的の一つとした。肥満度を客観的に評価する技術の確立は、繁殖・

育成ザルを正常に維持してゆくための生理的モニタリングの指標となるだけでなく、肥満個体を抽出し代謝疾患モデルとして活用することも可能とする。今後は、定期的なモニターにより、適正な飼育管理が維持されているか否かを長期にわたり検証してゆく必要がある。

血管性痴呆症は高齢化社会にとって重要な疾患であることから、優れた虚血モデルの開発が望まれていた。光感受性色素と局所照射が可能な光ファイバーを用いて、脳内の任意の部位に安定した虚血を作成する技術の開発は今年度の特筆すべき成果である。この技術を応用することにより、脳梗塞の治療・予防法の開発のみならず、サルを用いて小動物では不可能な脳の高次機能に関する研究を推進することが可能となる。虚血モデルの開発と平行して記憶などの高次脳機能および行動異常を評価するシステムも開発中であり、カニクイザルの虚血モデルをヒトの脳血管性痴呆の病態解析、予防、治療法開発に応用するために、虚血に伴う高次脳機能の変化を詳細に検討してゆく必要がある。

#### E. 結論

筑波霊長類センターの繁殖育成コロニーではHBV、SVV、SIV、STLVの4種のウイルスについてはSPF状態が適正に維持されていた。SRV/Dウイルスの分離に成功し、遺伝子診断による高感度・特異的ウイルス検出系を開発するとともに、SRV陰性カニクイザルをスクリーニングして60頭規模のSPFパイロットコロニーを確立した。

雌ザルからの効率的な成熟卵回収法を確立し、アフリカミドリザルの顕微受精に初めて成功した。HVSを用いて広範な霊長類不死化細胞ライブラリーの整備に着手し、カニクイザル、アカゲザル、チンパンジー、タマリン由来の末梢T細胞株を樹立した。

サル類を用いた医科学実験を支援するための汎用性の高い研究基盤技術として、肥満度測定法と大脳新皮質の任意の領域に虚

血を作成する技術を開発した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Shimizu Y, Suzuki J, Terao K, Ishida T. In vitro aging of macaque adherent cells: similar pattern of cellular aging between human and macaque. *Mech Ageing Dev.* 2003 Feb;124(2):237-44.

2) Ageyama N, Kimikawa M, Eguchi K, Ono F, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K. Modification of the leukapheresis procedure for use in rhesus monkeys (*Macaca mulata*). *J Clin Apheresis.* 2003;18(1):26-31.

3) Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A. Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol.* 2003 Apr;32(2):105-10.

4) Tutida J., Kawasaki K., Sankai T., Kubo N., Terao K., Koyama T., Makino J. and Yoshikawa Y. (2003). New type of puzzle-task finger maze learning in *Macaca fascicularis*.

*INTERNATIONAL PRIMATOLOGY*, 24: 261-270.

5) Suzuki MT, Terao K, and Yoshikawa Y. Familial early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primates.* 2003 Jul;44(3):291-294. 2003 Mar 14.

6) Kirii Y, Inoue T, Yoshino K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K. Molecular cloning, functional characterization, and enzyme-linked immunosorbent assay of cynomolgus monkey Fas ligand. *J Immunol Methods.* 2003 Jul 1;278(1-2):201-209.

7) Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y,



Terao K. Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. Am J Primatol. 2003 Sep;61(1):3-12.

8) Watanabe K, Watanabe R, Shioda A, Mizoguchi K, Sugimoto T and Terao K. Investigation of the mechanism of drug-induced autoimmune hemolytic anemia in cynomolgus monkeys elicited by a repeated-dose of a humanized monoclonal antibody drug. J Toxicological Sci., 28: 123-138, 2003.

9) Mimuro J, Mizukami H, Ono F, Madoiwa S, Terao K, Yoshioka A, Ozawa K and Sakata Y., Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. in press

## 2. 学会発表

なし

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告書

## ウイルス学的モニタリングシステム開発、SPF コロニーの確立に関する研究

分担研究者 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） 室長  
協力研究者 原 正幸、菊池俊彦、寺尾恵治（筑波医学実験用霊長類センター）  
成田豊子、高野淳一郎、小野文子（(社)予防衛生協会）  
佐多徹太郎（国立感染症研究所）

研究要旨： 医科学研究用リソースとしてのカニクイザルを用いた研究基盤の高度化をはかるためには、微生物学的観点からみて、研究結果を攪乱する可能性のあるウイルスを除外しなければならない。筑波霊長類センターでは、ヒトに危険性のあるBウイルスとサル類に危険なサル水痘様ウイルス（SVV）をカニクイザルコロニーより排除してきた。本研究では、抗体陰性で且つ不顕性感染し、研究結果を攪乱する可能性があり、希に致死的という厄介な、D型サルレトロウイルス（SRV/D）の遺伝子診断による高感度・特異的ウイルス検出・診断法の開発を目的とした。本年度は、筑波霊長類センターの抗体陽性サルで、SRV/D感染症発症を疑わせる症状を呈した2個体より分離されたSRV/Dを形態学的、分子生物学的に解析した。その結果を応用し、高感度・特異的ウイルス検出PCR法、全血からの直接SRV/DプロウイルスDNAの検出系および血漿、唾液からRT-PCR法を用いたSRV/DのRNAゲノム検出系を確立した。従って、潜伏感染ウイルスの再活性化の検出や感染経路の推測が可能となり、SPFコロニー作成と維持のためのモニタリングシステムを構築することが可能となった。

### 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、マカク属サルはAIDS研究や種々のワクチン開発、移植実験等の研究として数多く用いられている。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）が自然感染していることが知られている。

従って、このSRV/Dに感染しているサルをAIDS研究やワクチンなどの免疫学関連研究や免疫抑制剤を用いる遺伝子治療モデル実験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に感染していないサルを用いることが望まれる。実際、6か月に亘る薬物安全性試験の途中で、SRV/Dの感染症による重

度の貧血が見られたため、実験を再度繰り返したという報告がある（N.W.Lerche and K.G.Osborn *Tox. Path.* 31, 103-110 2003）。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。従って、本研究ではSPFサルコロニーの作出を目指し、高感度・特異的SRV/Dの検出・診断法の開発を目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. SRV/Dの分離

貧血、下痢、体重減少等のSRV/Dに特徴的な症状を示した2頭のカニクイザル（No. 27, No. 150）の末梢血単核球とRaji細胞とを混合培養し、顕微鏡下でCPEを確認した。常法に従い、抗原スライドを作成し、標準抗SRV/D抗体

を用いて間接蛍光抗体法を行った。また、感染細胞の一部は、2.5% グルタルアルデヒド固定液を加え 4 °C で 1 時間インキュベートした後、洗浄液 (0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液、0.1M 蔗糖) で洗浄し電子顕微鏡撮影を行った。

## 2. ゲノム DNA 及びウイルス RNA の調製

SRV/D 感染 Raji 細胞にプロテイナーゼ K 溶液 (10 mM Tris, cl pH 8.5、150 mM EDTA、0.4 % SDS、10 mg/ml proteinase K) を等量加え、65 °C で 15 分間保温後、37°C で一晩インキュベートした。

次に、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、TE (10 mM Tris、1 mM EDTA) 0.4 ml に溶解した。その後 20 mg/ml RNase を 40  $\mu$ l 加え、37 °C で 30 分間保温後、フェノール抽出法により調製した。また、100 頭以上の SPF 個体を対象として定期的にモニタリングを行うためには作業の簡便化をはかる必要がある。そのために、NucleoSpin Blood (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany) を採用し、サル全血から 2 時間でゲノム DNA を抽出し PCR を行った。

## 3. PCR 法および塩基配列決定

全ゲノムの遺伝子配列が報告されている SRV/D-1、-2、-3 の gag 領域を増幅するためのプライマーが設計され報告されているのでこれらのプライマーを用いた (図 1)。PCR 反応液は、TaKaRa Ex Taq TM (5u/ $\mu$ l) タカラ) を 0.5  $\mu$ l、10  $\times$  Ex Taq Buffer を 2.5  $\mu$ l、10 mM dNTP (各 2.5 mM) を 2.0  $\mu$ l、各プライマーを 25 pmol、Template DNA 1.0  $\mu$ l (50 ng) をそれぞれ加え、全量を 25  $\mu$ l とした。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 産物は 0.5x TBE を用い、アガロースゲル電気泳動を行い、分画した。PCR 反応物はゲルより切り出し、ABI PRISM 3100-Avant を用い、BigDye Terminator 法にて塩基配列を決定した。また、RT-PCR は ThermoScript RT-PCR システム (Invitrogen) を用いて SRV/D ゲノムの cDNA を合成し、その反応液の一部を次の PCR 反応液に加えて行った。

(倫理面への配慮)

本研究のうち、サルに関わる実験に関しては、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、サルの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努めた。

## C. 研究結果

### 1. SRV/D の分離

TPC で飼育されている抗 SRV/D 抗体陽性カニクイザルで下痢、貧血、体重減少等の SRV/D 感染に特徴的な症状を示した個体 2 頭から採血を行い、末梢血リンパ球と Raji 細胞を混合培養した結果、ウイルスの感染後に見られる細胞変性効果 (CPE) が認められ (図 2A)、RT assay によっても逆転写酵素活性が確認されたため Raji 細胞へのウイルス感染が確認された。この感染 Raji 細胞を用い、間接蛍光抗体法 (図 2B)、と電子顕微鏡による解析 ((図 2C) を行った。

電子顕微鏡写真より、細胞質内に直径 90nm の A 型ウイルス粒子と細胞外に直径 120nm の D 型ウイルス粒子が確認されたので、これら 2 頭のサルから SRV/D を分離できたことが示唆された。

### 2. SRV/D 筑波株の全 gag 遺伝子配列決定と既知の SRV/Dgag との比較検討

N27 株を基に、SRV/D 筑波株感染 Raji 細胞より得たゲノム DNA を鋳型に、gast4 と RR111 プライマーセットを用い、2189bp の断片を得た。この断片の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推測することにより SRV/D 筑波株の gag 領域はそれぞれ 1977bp、659aa であることが明らかになった。表 1 には、遺伝子配列が明らかになっている SRV/D-1、-2、-3 とのホモロジー解析結果を示す。ヌクレオチドレベルのホモロジーに関し、筑波株と既知 SRV/D との相同性は 79.3

〜81.2%であり、SRV/D-1, -3 間の相同性は 92.8%で、SRV/D-1, -2 間は 79.3%、SRV/D -2, -3 間は 78.9%であった。即ち、筑波株は、既知の SRV/D 株間の差異と同じくらい、既知の SRV/D 株と異なることが明らかになった。また、アミノ酸配列の比較による相同性解析によっても同様の結果が得られた (表 1)。

### 3. 系統樹の作成による解析

上記の相同性をさらに別の方法で確認するため、gag の塩基配列に基づいて SRV/D 筑波株、SRV/D-1, -2, -3 及び GenBank データベースより入手可能な関連するレトロウイルス間の系統樹の作成を試みた。SRV/D の株間で並べた時のギャップは解析には含まれないようにし、NJ 法を用いて系統樹を作成した (図 3)。側枝上の数字はサイトあたりの塩基置換数を現し、進化的距離に正比例する。全 Gag 塩基配列の系統樹解析によっても SRV/D 筑波株は進化的に既知の SRV のグループに属するが、新しい SRV であることが明らかになった。

### 4. SRV/D 筑波株 gag 領域特異的検出プライマーの作成と nested PCR 系の確立とその検出感度

SRV/D 筑波株特異的プライマーの作製は SRV/D-1 (GenBank M11841), SRV/D-2 (GenBank M16605), SRV/D-3 (GenBank M12349) と SRV/D 筑波株の塩基配列を基に行った

SRV/D 筑波株の全長 8127bp の塩基配列を基に gag、env 領域に SRV/D 筑波株特異的プライマーを設計し PCR を行った。その結果、gag 領域で SRV/D 筑波株を特異的に増幅する Tga1、Tga2 プライマー対を用いた 1st PCR では SRV/D 筑波株のみで 722 bp の増幅断片が認められ、SRV/D-1, -2 では増幅断片が認められなかった (図 4A)。Tga1、Tga2 プライマー対の内側に位置する Tga3、Tga4 プライマー対を用いて Nested PCR を行った結果、SRV/D 筑波株のみで 381bp の増幅断片が認められ、SRV/D-1, -2 では増幅断片が認められなかった (図 4B)。

この gag 領域の PCR 検出系の感度を検討したところ、Tga1、Tga2 プライマー対を用いた 1st

PCR では 2000 コピーまで検出され、Tga3、Tga4 プライマー対を用いた Nested PCR では、2 コピーまで検出することができた。同様に env 領域で SRV/D 筑波株を特異的に増幅する Ten1、Ten2 及びその内側に位置する Ten3、Ten4 プライマー対を用いた Nested PCR では、20 コピーまでしか検出できなかった。

一方、既に報告されている pol 領域で全ての SRV/D を増幅する SRVPOLF1、SRVPOLR1 及び POLF2、POLR2 プライマー対を用いた 1st PCR では、SRV/D-1, -2、SRV/D 筑波株と全てのウイルス株で 446bp の増幅断片が認められ、nested PCR では 118bp の断片が認められた (図 4C, 4D)。

### 5. 全血から SRV/D プロウイルス DNA の迅速な検出法の確立

SPF コロニー作成と維持のためのモニタリングシステムを構築するにあたり、迅速性と作業効率の問題となる。通常の方法で、サルリンパ球からゲノム DNA を調製すると、約 3 日間必要である。効率化のために、NucleoSpin Blood (MACHEREY -NAGEL, Duren, Germany) を採用し、サル全血から 2 時間でゲノム DNA を抽出し PCR を行った。通常の方法で調整したゲノム DNA と比較してその検出感度には大差がないことは確認済みである。本法を用いると、サルのクエン酸血液があれば、2 時間でゲノム DNA を調製し、nested-PCR とゲル電気泳動で 6 時間位必要であり、1 日で十分検査が可能となった (図 5)。

### 6. RT-nested PCR による血漿、唾液からの SRV/D ゲノムの検出

既知の SRV/D は唾液等の体液中に排出されることが報告されている。筑波霊長類センターのカニクイザルコロニーにおける水平感染様式を明らかにするためにも、また、採血以外の非侵襲的検体採取法として、本年度は、唾液中の SRV/D 筑波株の検出を、RT-nested PCR 法と培養によるウイルス分離法を行い、その結果を比較した。SRV/D 感染症に特徴的な貧血と下痢を示したサルより、血漿と唾液を採取し、解析した結果を図 6 に示す。発症個体では、血漿と唾液共に RT-nested PCR 法と培養によりウイル

スが検出されたが、SPF コロニーのサルからの検体からはウイルスは検出されなかった。このことは、Raji 細胞を用いた培養によるウイルス分離法でも確認された。

#### 7. 筑波霊長類センターカニクイザルコロニーの SRV/D のサブタイプ

SRV/D 筑波株の全 gag 遺伝子配列に基づき開発した SRV/D 筑波株特異的検出 PCR 系を用い、当センターのカニクイザルより分離された 11 株の SRV/D を調査したところ、そのすべてが SRV/D 筑波株であったことから、当センターのカニクイザルコロニーにおいて、本ウイルスの感染の広がり予測された。

#### D. 考察

抗体陰性で且つ不顕性感染し、研究結果を攪乱する可能性があり、希に致死的という厄介な、D 型サルレトロウイルス (SRV/D) は、サル繁殖コロニーから排除されねばならない。先に述べたように、6 か月に亘る薬物安全性試験の途中で、SRV/D の感染症の発症による重度の貧血が見られたため、実験を再度繰り返したという報告があり、その経済的・時間的損失には計り知れないものがある。

アジア産のマカク属サル類に SRV/D が感染した場合の症状は 3 種類のカテゴリーに分類される。a. 無症候で、高抗体価の場合。b. 低血中ウイルス量であり、無症候かまたは軽度の貧血・下痢が時々認められるケース。c. 高血中ウイルス量で病態が突然進行するが、抗体が全く認められないケース (このカテゴリーの中には、母子感染・垂直感染により仔ザルが SRV/D の感染を受けウイルスに対して免疫学的寛容状態になり、高血中ウイルス量で、無症候であるケースも含む)。

このカテゴリー b. c. が認められることが SRV/D 感染の最大の特徴であり、他のウイルス感染では通常みられない。ここに、SRV/D 感染における診断の中に超高感度特異的遺伝子検出系が必要である所以がある。

今年度の研究成果として、我々は、筑波霊長類センターのカニクイザルより SRV/D 筑波株

の分離に成功し、その遺伝子配列を既知の SRV/D と比較することにより、SRV/D 筑波株 gag 領域特異的検出プライマーの作成と nested PCR 系の作成を行った。その検出感度は、2 コピーまで検出できるもので、超高感度、特異的なウイルスゲノム検出系の確立に成功した。また、日常の検査効率を上げるため、1 日で可能な、全血から SRV/D プロウイルス DNA の迅速な検出法の確立にも成功した。

また、開発した SRV/D 筑波株特異的検出 PCR 系を用い、当センターのカニクイザルより分離された 11 株の SRV/D を調査したところ、そのすべてが SRV/D 筑波株であったことから、当センターのカニクイザルコロニーにおいて、本ウイルスの感染の広がり予測された。このため、カニクイザルコロニーにおける SRV/D の水平感染による伝播経路を明らかにすることにより、その防圧の戦略をたてるために、唾液中の SRV/D を組織培養法と RT-nested PCR による検出を試みた。その結果、血漿中のウイルスと同様に、唾液中の SRV/D 検出にも成功した。また、37°C24 時間放置したウイルスにも感染性が残存していたことと合わせて考察すると、唾液等の体液中の SRV/D が水平感染を引き起こす原因である可能性が強く示唆された。従って、汚物処理法はウェット方式ではなく、すべて、ドライ方式にすることと、個別ケージで飼育することにより、SPF を選別する母集団サルのウイルス学的清浄度をより良く保つことが出来ると考えられる。

次年度は糞尿中のウイルス検出結果を報告できる予定である。

#### E. 結論

1. 当センターのカニクイザル SRV/D 筑波株を分離し、そのゲノム解析により超高感度・特異的ウイルス遺伝子検出系を確立した。

2. 当センターのカニクイザルより分離された 11 株の SRV/D を調査したところ、そのすべてが SRV/D 筑波株であったことから、当センターのカニクイザルコロニーにおいて、本ウイルス

株の感染の広がりが予測された。

3. その他                   なし

3. サル分泌液（唾液）からの SRV/D のウイルス分離培養法と RT-PCR 法による検出系を確立した。

#### F. 健康危険情報

SRV/D のヒトへの感染例の報告が 1 例あるが、その病原性に関しては明らかではない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Misumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S. :  
A novel cyclic peptide vaccine for defense against HIV/AIDS progression. J. Biol. Chem. 2003; 278: 32335- 43

##### 2. 学会発表

1) 中山大介、三隅将吾、向井鏖三郎、橘 園臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、庄司省三：CCR5 及び CXCR4 を mimic した 環状キメラ抗原を免疫したカニクイザルの抗血清による Cross-clade R5 及び X4 HIV-1 感染阻害効果  
第 17 回日本エイズ学会（神戸）2003 年

日本エイズ学会誌 Vol.5 No.4. 372, 2003

2) 遠藤昌史、稲津麻子、三隅将吾、向井鏖三郎、橘 園臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、庄司省三：CXCR4 を基礎にした新規ペプチド免疫戦略とその HIV-1 感染防御効果

第 17 回日本エイズ学会（神戸）2003 年

日本エイズ学会誌 Vol.5 No.4. 372, 2003

3) 草場正司、三隅将吾、向井鏖三郎、橘 園臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、庄司省三：Chimeric receptor CCR5 の細胞外第 2 ループ (ECL-2) 特異的認識自己抗体による種々の HIV-1 に対する感染防止効果

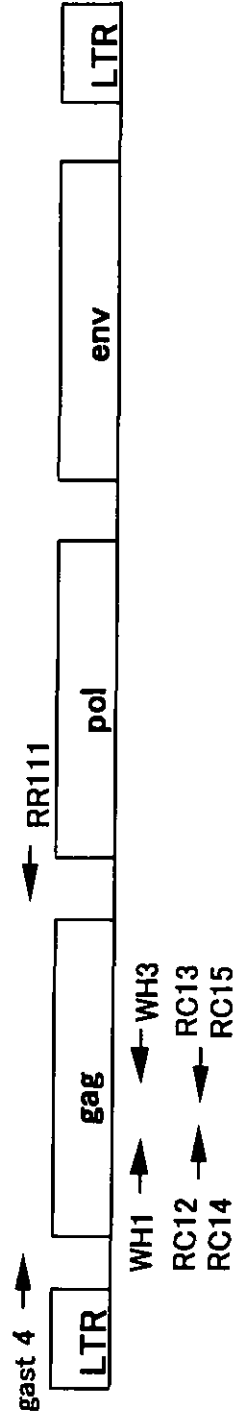
第 17 回日本エイズ学会（神戸）2003 年

日本エイズ学会誌 Vol.5 No.4. 373, 2003

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得     取得準備中
2. 実用新案登録   なし

### Simian Retrovirus type D gag specific primers for PCR



Primers *	sequence ( 5 - 3 )	Predicted gag product size (bp )			
		SRV/D-1	SRV/D-2	SRV/D-3	N 27 T 150
<b>Standard PCR</b>					
WH1/M	CCACTGTAATGCCGGTTGTTAATCC	266			266
WH3/M	CTGGGAAAATATCTTTGGGATTTGTTTC				
WH1/2	CCGCTGTGATGCCGGTAGTCAATCC				
WH3/2	CTGGGAAAATATCCTTGGGAGGATATTC			266	
<b>Nested PCR</b>					
RC12	TAATCCAAAAGAGGAGCTCAAAGA		222		(232)
RC13	TTGTTCTTCCTTTTCTCGACTGGC				(232)
RC14	CAATCCTAAAGAGGAACTCAAAGA				222
RC15	TATTCCTCTGTGTTTTTAAATAAGG				

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



図2

SRV/D陽性サルN27からのウイルス分離

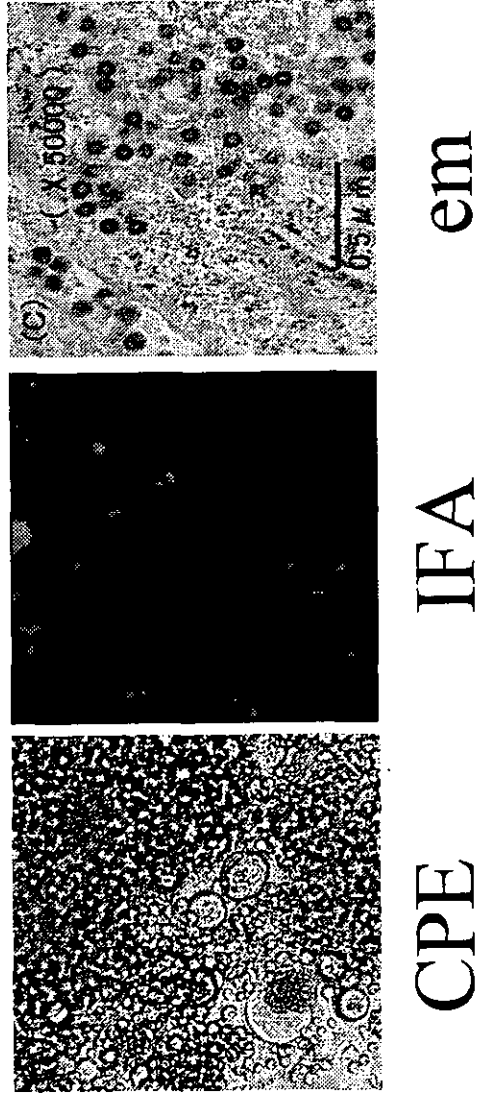


表1

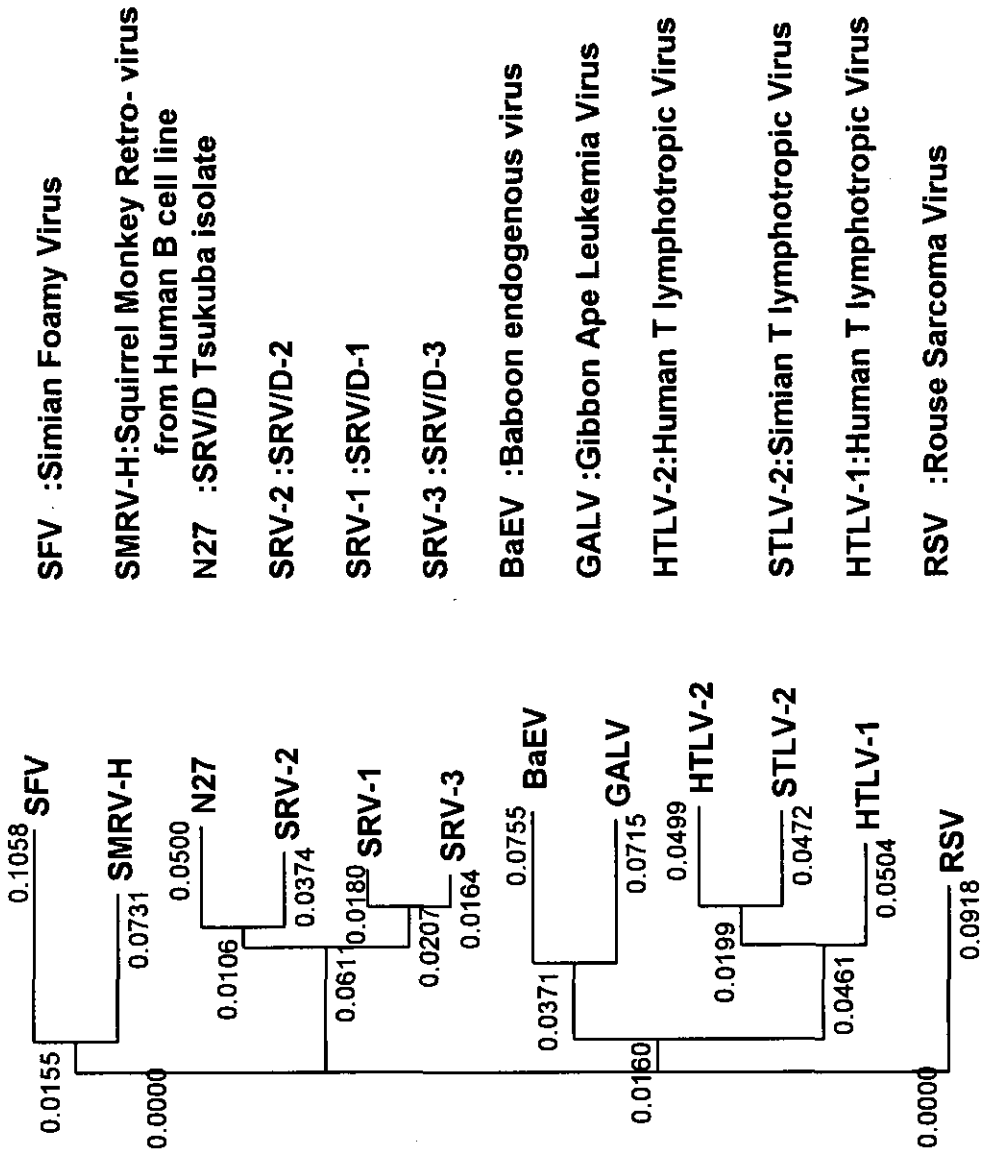
gene	a.a	SRV-1	SRV-2	SRV-3	No.27
SRV-1			84.0	96.2	86.2
SRV-2		79.3		84.3	82.9
SRV-3		92.8	78.9		85.9
No.27		81.2	79.3	80.6	

**gag**                      **Nucleic acid : 1977 bp**  
**Amino acid : 659 residue**

Table 1. Nucleotide \ Amino Acid Homology of SRV/D-1, -2, -3, and SRV/D Tsukuba in gag. The ID numbers is as follows: SRV-1 (M11841), SRV-2 (M16605), SRV-3 (M12349)

3

Phylogenetic analysis of entire gag region among Retroviruses



## PCR specific to SRV/D-Tsukuba

図4

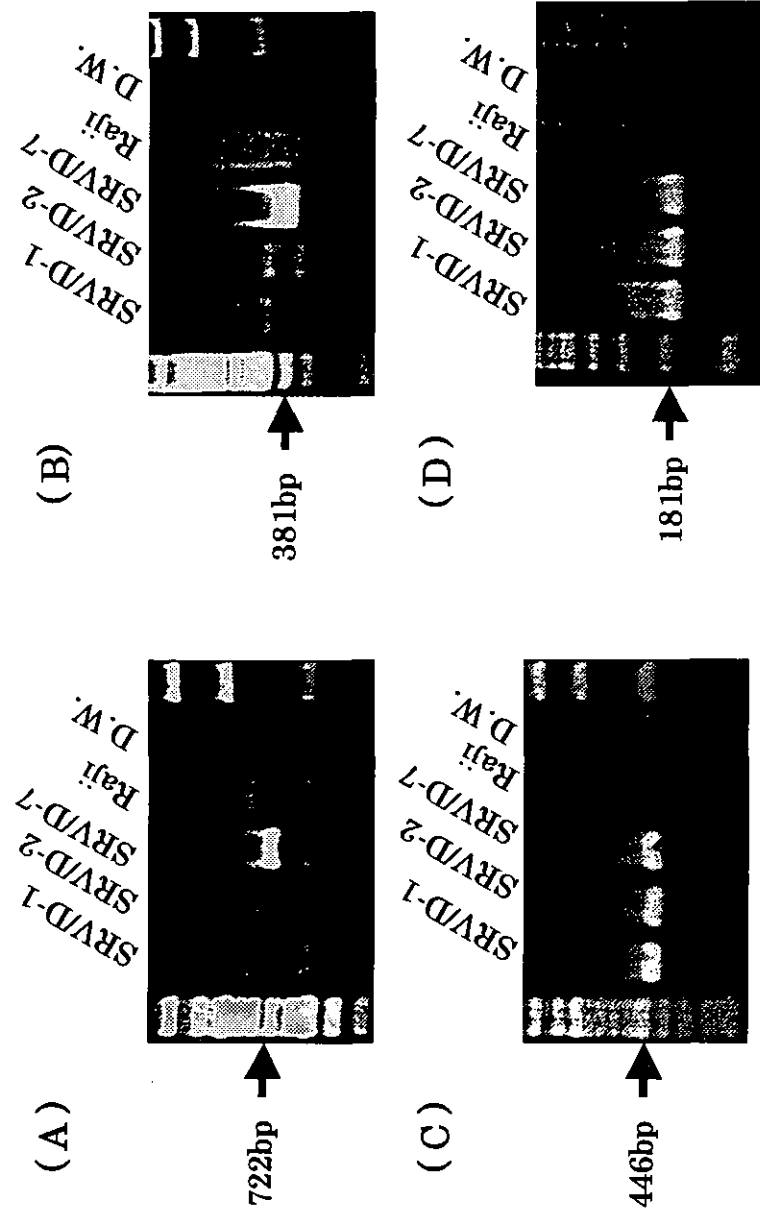


Fig.4 1st PCR using SRV/D-Tsukuba specific primer set. (A) Agarose gel electrophoresis of 1st PCR products with SRV/D-Tsukuba specific primer set Tga1-Tga2. (B) Agarose gel electrophoresis of nested PCR products with SRV/D-7 specific primer set Tga3-Tga4. (C) Agarose gel electrophoresis of 1st PCR products with SRV/D specific primer set SRVPOLF1-SRVPOLR1 (15). (D) Agarose gel electrophoresis of nested PCR products with SRV/D specific primer set POLF2-SRVPOLR2 (15).