

ルートも報告されている^{8,9)}。これらの感染経路を遮断して、標的細胞特異的に結合するリガンド等をウイルス表面タンパク質のファイバーやヘキソン、protein IX 領域（ヘキソンとヘキシソンの間に存在するタンパク質）に付与すれば、ターゲティング能をもったアデノウイルスベクターが開発できる（著者らはこれらの領域に簡便に外来リガンドを挿入する技術も開発済みである¹⁰⁾）。著者らはファイバーノブ、シャフト、ペントンベースの3領域を同時に改変したトリプル改変ベクターを開発し（図3）、このベクターが肝臓をはじめとする *in vivo* での遺伝子発現能をほとんど消失していることを明らかにしている^{11,12)}。現在このトリプル改変ベクターに、標的細胞特異的に高親和性を示

すりガンドを付与することでターゲティング能をもったアデノウイルスベクターの開発を進めている。

3. マイクロ RNA による遺伝子発現制御システムを搭載したアデノウイルスベクターの開発

近年、タンパク質をコードしない non-coding RNA であるマイクロ RNA (miRNA) とよばれる 21-23 塩基の小さな RNA が発生・分化等の過程に多大な影響を及ぼすことが報告され注目されている。miRNA は細胞特異的に発現し、標的遺伝子のメッセンジャー RNA の 3' 非翻訳領域に結合することにより、複数 (10 ~ 100 程度の遺伝子) の標的遺伝子の翻訳を厳密に抑制する。最近著者らは、miRNA による遺伝子発現制御システムを利用して、特定の細胞で目的遺伝子の発

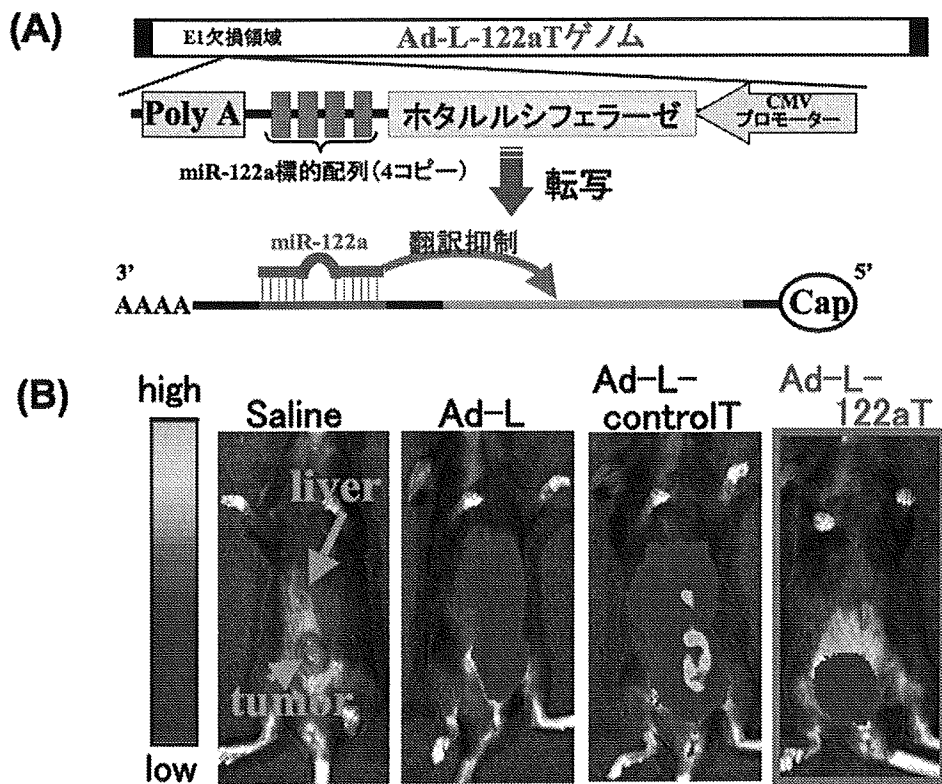


図4 マイクロ RNA による遺伝子発現制御システムを搭載したアデノウイルスベクター

ルシフェラーゼ遺伝子の下流に肝臓特異的な miRNA である miR-199a の標的配列を 4 コピー挿入したアデノウイルスベクター (Ad-L-199aT) (A) は、担癌マウスの腫瘍内に投与した場合、腫瘍特異的な遺伝子発現が認められるが (B) (*in vivo* イメージング装置で遺伝子発現を検討)、コントロール配列を付与したベクター (Ad-L-controlT) や miRNA の標的配列を付与していない従来のベクター (Ad-L) は、腫瘍のみならず、(腫瘍から漏れ出たベクターが肝臓に移行して) 肝臓での遺伝子発現も認められる。(p8 カラー図参照)

現をオフにするアデノウイルスベクター発現制御系を開発した¹³⁾。

アデノウイルスベクターを全身投与した場合、前述したように肝臓で主に遺伝子発現が認められるが、肝臓特異的な miRNA である miR-199a の認識配列を目的遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入することにより、肝臓での遺伝子発現を 100 分の 1 程度に抑えられることを見いだした¹³⁾ (図 4)。herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を用いた自殺遺伝子治療においては、ベクターを腫瘍内に投与した場合においても、腫瘍部位から漏れ出たベクターが肝臓をはじめとする正常組織に移行し、組織障害を起こすことが問題となっているが、HSVtk 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-199a の認識配列を付与した場合、高い抗腫瘍効果を維持したまま肝障害を劇的に軽減させることが可能であった¹³⁾。目的組織での選択的な遺伝子発現を得るためには、組織特異的プロモーターが汎用されるが (一般的に組織特異的プロモーターは転写活性が低いことが課題となっている)、miRNA による遺伝子発現制御システムは特定の組織・細胞でのみ遺伝子発現をオフにする新しい遺伝子発現制御法であり、遺伝子治療への応用だけでなく、基礎研究分野においても強力な技術になると期待される。

III V. 免疫反応の抑制が可能なアデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスベクターを生体に投与した場合、①数時間以内に生じる自然免疫、②7～10 日以内に生じるベクターにより産生されたウイルスタンパク質 (および外来遺伝子産物) に対する細胞性免疫、そして、③ウイルスタンパク質に対する液性免疫の 3 種類の免疫反応が起こる。これらの免疫反応を克服できるベクターや投与方法 (投与戦略) の開発は、安全性や有効性の高い遺伝子治療の実現にとって必要不可欠である。

ウイルスを始めとする異物を生体に投与すると、生体は即座にインターフェロンやサイトカイン、ケモカイン等を産生し、それらの異物を排除しようとする自然免疫が発動する。アデノウイルスベクターを生体に投与した場合にも自然免疫の活性化は生じ、1999

年に米国で起こったオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対するアデノウイルスベクターを用いた死亡事故では、自然免疫の過剰な活性化が原因と考えられている。アデノウイルスベクターをマウスに全身投与した場合には、IL-6、IL-12 等の産生が投与 3 時間以内に生じる。全身投与されたベクターの 90% 以上は肝臓 (実質細胞とクッパー細胞をはじめとする非実質細胞) に移行するが、多くの炎症性サイトカインは肝臓 (のクッパー細胞) ではなく、主に脾臓で分泌される^{14,15)}。興味深いことに、前述したポリリジンでファイバーを修飾したアデノウイルスベクターでは、脾臓への移行性が減少する結果、血中へ分泌される IL-6 は約 1/4 にまで減少し (肝臓をはじめとする各臓器での遺伝子発現は従来型ベクターと同等以上に起こる)¹⁴⁾、安全性が高いことが明らかとなった。アデノウイルスベクター投与に伴う自然免疫に関与する生体側因子やウイルス側因子、シグナル伝達機構の解明は、自然免疫応答の克服に向けて重要な研究課題であり、著者らのグループでは、各種改変アデノウイルスベクターやノックアウトマウス、RNAi 技術、マイクロアレイ解析を通して、これらの研究を進めている。

一方、アデノウイルスベクター投与後の細胞性免疫の活性化については、従来のアデノウイルスベクターは E1 領域を除去することで、ウイルスタンパク質の産生が生じないように設計されているが、E1 非依存的に他のウイルスタンパク質の合成がわずかながら起こり、これが免疫系のターゲットとなることが原因と考えられている。この問題を克服するために、ウイルスコード遺伝子を全て除去した gutted アデノウイルスベクターが開発されており、本ベクターを用いた場合は、通常のマウスにおいても長期間の遺伝子発現が認められる¹⁶⁾。従来は、高タイターの gutted アデノウイルスベクターの産生が技術的に難しいのが課題点であったが、最近ヘルパーウイルスとパッケージング細胞の改良により、その問題点は一部克服されつつある¹⁷⁾。

液性免疫の制御に関しては、主要カプシドタンパク質のヘキソンに対する抗体が液性免疫の主体であることから、ヘキソン改変ベクターが、この問題を克服するために開発されている¹⁸⁾。また、異なった血清型

(11型や35型)^{19,20}や異なった種(チンパンジー, イヌ, ヒツジ, トリ, ウシ, マウス等)に属するアデノウイルスベクターが開発されており, これらのベクターでは, 抗ヒト5型アデノウイルス抗体存在下でも遺伝子導入活性を示す. これらのベクターの中には, CAR以外の受容体を認識して感染するものもあり, 感染域を変えることも同時に可能になる.

VI. その他のアプローチによるアデノウイルスベクターの高機能化

従来のアデノウイルスベクターではE1欠損領域の1カ所にしか外来遺伝子を挿入できなかったが, 著者らはE1欠損領域に加え, E3(欠損)領域, 並びにE4遺伝子と3'ITR(inverted terminal repeat)の間の領域にも同時に外来遺伝子を挿入することが可能なダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルス

ベクターを開発した^{21,22}(図5). これにより, 複数の外来遺伝子を単一のアデノウイルスベクターに搭載することが可能となり, 複数のベクターの共投与の場合と異なり, 作用させるベクター量も最小限で済ませることができるようになった. これらのベクターの応用例として, テトラサイクリン耐性オペロンを利用した遺伝子発現制御系を単一のベクターに搭載させたシステムを開発し, 目的遺伝子の発現を, 正あるいは負に自在に制御することが可能となった^{21,22}(図5A). さらに, E3欠損領域にGFP(green fluorescence protein)発現単位を挿入し, E1欠損領域に目的遺伝子発現単位を挿入することで, 遺伝子導入された細胞をGFPで視覚的に同定しながら目的遺伝子の機能を検討する実験系への利用等が可能となった²³(図5B).

一方, 短鎖の二本鎖RNA(small interfering RNA: siRNA)発現カセットをアデノウイルスベクターに搭

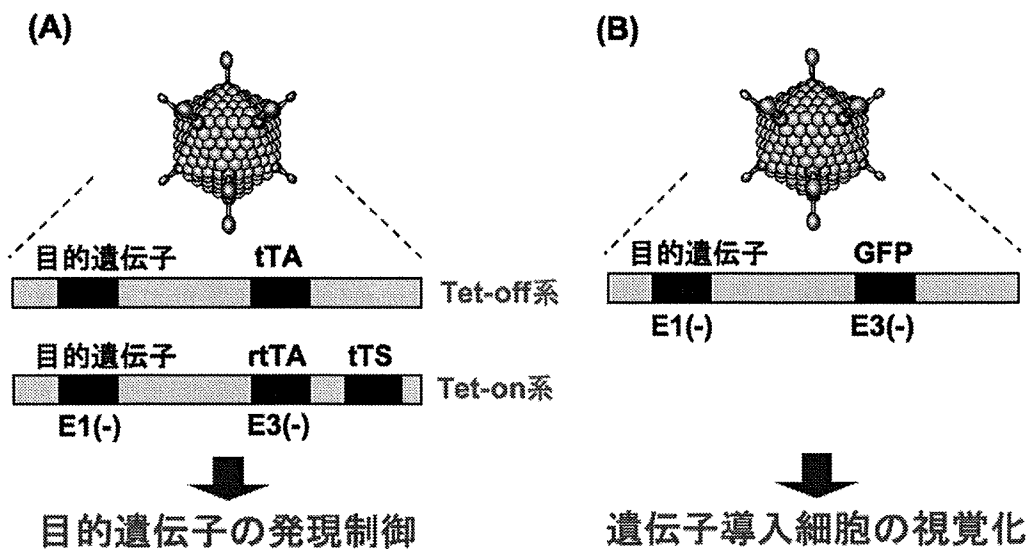


図5 複数の外来遺伝子の搭載が可能なアデノウイルスベクター

- (A) E3欠損領域にtet-off系の転写活性化因子tTAを発現するカセットを有し, E1欠損領域にテトラサイクリン誘導性プロモーター下に目的遺伝子を発現するカセットを有したアデノウイルスベクター, あるいはE3欠損領域にtet-on系の転写活性化因子rtTAを発現するカセットを, E4領域と3'ITR領域の間にテトラサイクリン制御性サイレンサーのtTSを発現するカセットを挿入し, E1欠損領域にテトラサイクリン誘導性プロモーター下に目的遺伝子を発現するカセットを挿入したアデノウイルスベクターでは, ドキソサイクリン(テトラサイクリンの誘導体)濃度に依存した目的遺伝子の発現制御が可能になる.
- (B) E3欠損領域にGFPを発現するカセットを有し, E1欠損領域に目的遺伝子を発現するカセットを有したアデノウイルスベクターでは, 遺伝子導入された細胞を視覚化することが可能になる. いずれのベクターにおいても, ユーザーはE1欠損領域に挿入する遺伝子だけを入れ替えれば使用できる.

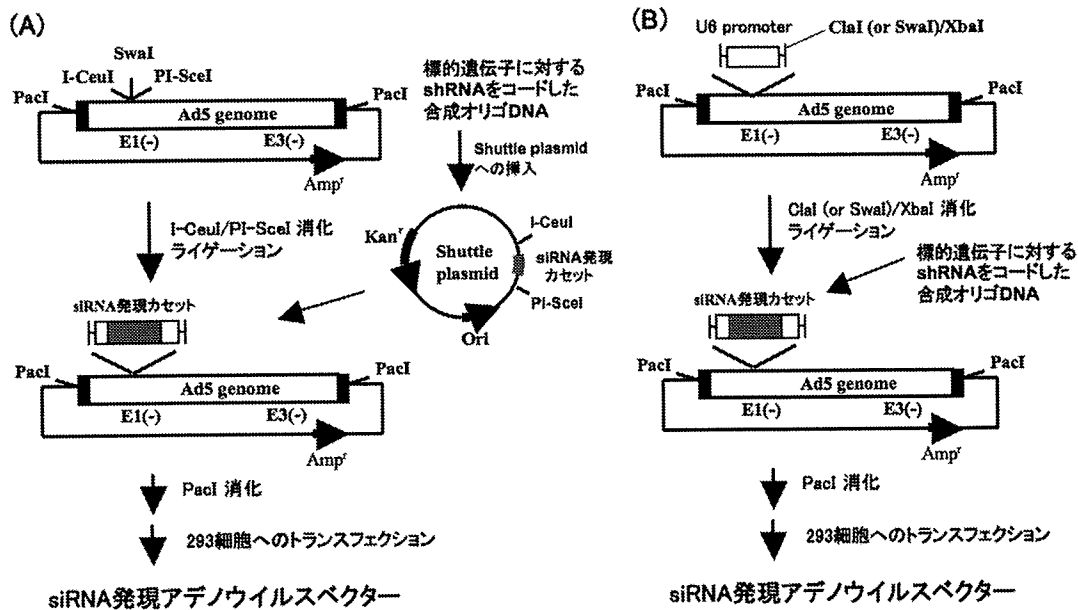


図6 ベクタープラスミドへの直接クローニングによる迅速な siRNA 発現アデノウイルスベクター作製法
従来の *in vitro* ライゲーションに基づくベクター作製法 (A) では、目的遺伝子の siRNA 配列に相当する合成オリゴ DNA をまずシャトルプラスミドに挿入し、次にベクタープラスミドに組み換える必要があるが、直接クローニングによるベクター作製法 (B) では、目的遺伝子の siRNA 配列に相当する合成オリゴ DNA を直接ベクタープラスミドに挿入でき、極めて簡便である。

載させれば、目的遺伝子の発現を特異的にノックダウン可能になるが、著者らは siRNA 発現アデノウイルスベクターの作製法を飛躍的に簡便化することにも成功した²⁴⁾(詳細は図6を参照)。新しい方法では、siRNA 配列に相当する合成オリゴ DNA をアデノウイルスベクタープラスミドにライゲーションし、これを 293 細胞にトランスフェクションするだけで目的のベクター作製が可能となり、極めて有用である。

III おわりに

本稿で紹介したように、遺伝子治療への応用を通して発展してきたアデノウイルスベクターの改良研究は、ベクター作製の簡便化や高機能化により生命科学を進めていく上での必須の基盤技術になっている。著者らが開発した新しい遺伝子導入技術が、広く生命科学に利用されることを期待している。

参考文献

- 1) Fallaux FJ, et al : New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9 : 1909-1917, 1998.
- 2) Okegawa T, et al : The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res* 61 : 6592-6600, 2001.
- 3) Mizuguchi H, et al : A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther* 8 : 730-735, 2001.
- 4) Koizumi N, et al : Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 5 : 267-276, 2003.
- 5) Kurachi S, et al : Fiber-modified adenovirus vectors containing the TAT peptide derived from human immunodeficiency virus in the fiber knob have efficient gene transfer activity. *Gene Ther* 14 : 1160-1165, 2007.
- 6) Mizuguchi H, Hayakawa T : Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes.

- Gene 285 : 69-77, 2002.
- 7) Mizuguchi H, Hayakawa T : Targeted adenovirus vectors. Hum. Gene Ther 15 : 1022-1033, 2004.
 - 8) Shayakhmetov DM, et al : Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. J Virol 79 : 7478-7491, 2005.
 - 9) Waddington SN, et al : Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. Cell 132 : 397-409, 2008.
 - 10) Kurachi S, et al : Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. Gene Ther 14 : 266-274, 2007.
 - 11) Koizumi N, et al : Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and α_v integrin-binding ablation. J Virol 77 : 13062-13072, 2003.
 - 12) Koizumi N, et al : Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, α_v integrin, and heparan sulfate binding reduce in vivo tissue transduction and toxicity. Hum Gene Ther 17 : 264-279, 2006.
 - 13) Suzuki T, et al : miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without disturbing the antitumor effects in suicide gene therapy. Mol Ther 16 : 1719-1726, 2008.
 - 14) Koizumi N, et al : Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production. J Immunol 178 : 1767-1773, 2007.
 - 15) Sakurai H, et al : Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune response. J Immunol 180 : 4931-4938, 2008.
 - 16) Palmer DJ, Ng P : Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. Hum Gene Ther 1 : 1-16, 2005.
 - 17) Palmer D, Ng P : Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. Mol Ther 8 : 846-852, 2003.
 - 18) Roberts DM, et al : Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. Nature 441 : 239-243, 2006.
 - 19) Sakurai F, et al : Efficient gene transfer into human CD 34+ cells by an adenovirus type 35 vector. Gene Ther 10 : 1041-1048, 2003.
 - 20) Stone D, et al : Development and assessment of human adenovirus type 11 as a gene transfer vector. J Virol 79 : 5090-5104, 2005.
 - 21) Mizuguchi H, Hayakawa T : The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. J Gene Med 4 : 240-247, 2002.
 - 22) Mizuguchi H, et al : Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rTA and tTS expression cassettes in separate genome regions. Hum Gene Ther 14 : 1265-1277, 2003.
 - 23) Kishimoto H, et al : A novel *in vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-competent adenovirus containing green fluorescent protein gene. Nature Med 12 : 1213-1219, 2006.
 - 24) Mizuguchi H, et al : Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs. Hum Gene Ther 18 : 74-80, 2007.

臨床英文の正しい書き方

改訂4版

羽白 清 著

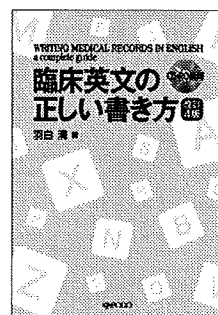
英語で診療録を書くための参考書として定評のある臨床英文表現集。基本語句、例文、疾患名、略語を中心に全編に検討を加え、英米の新知見を加えた。

主要目次

1章 英文診療録 2章 診察の英語表現 3章 病歴の書き方 4章 身体的所見の書き方 5章 要約・診断の書き方 6章 指示の書き方 7章 経過記録の書き方 8章 検査結果の書き方 9章 手術記録の書き方 10章 退院時抄録の書き方

●全文掲載のCD-ROM付

A5判・上製・548頁 定価5,880円(本体5,600円+税5%)



金芳堂

☎606-8425 京都市左京区鹿ヶ谷西寺ノ前町34番地 TEL(075)751-1111・FAX(075)751-6858
http://www.kinpodo-pub.co.jp/

アデノウイルスベクターの 作製・増幅・精製法

みずぐちひろゆき
水口裕之^{1,2)}

1) 大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘1-6)

2) 独立行政法人 医薬基盤研究所 基盤的研究部 遺伝子導入制御プロジェクト (〒567-0085 茨木市彩都あさぎ7-6-8)
E-mail: mizuguch@phs.osaka-u.ac.jp

実験のコツと注意点

従来はアデノウイルスベクターの作製は煩雑であり一部の研究室でのみ使用できる特殊な技術であったが、現在では、種々の簡便なアデノウイルスベクター作製法が開発され、基本的な分子生物学の知識・技術を習得していれば、アデノウイルスベクターの取り扱いと比較的容易になった。アデノウイルスベクターは、用いるベクターのバックボーン(構造)によりE1やE3領域の欠損サイズが異なり、それによりベクターを増幅する際のコツも微妙に異なることに注意していただきたい。本稿では、著者らが開発し、現在クロンテック社より市販されている*in vitro*ライゲーションによるプラスミド構築に基づいたアデノウイルスベクター作製法について述べるが、紙面の都合上、ベクターの増殖・精製法(のコツ)に絞って解説する。なお、アデノウイルスベクターの諸性質や、機能面で優れた改良型アデノウイルスベクターの開発研究については、本誌1月号の著者の総説を参照していただきたい。

III 原理

従来、アデノウイルスベクターはE1遺伝子を発現するパッケージング細胞である293細胞内での相同組換えを利用して作製されていた(種々のアデノウイルスベクター作製法については、著者らの総説¹⁾を参照して頂きたい)。即ち、目的遺伝子の発現単位をE1

領域の上流と下流のゲノムDNAの一部の間に組み込んだプラスミド(あるいはコスミド)と、E1領域を除くウイルスゲノム全長(あるいはE1領域を除くウイルスゲノム全長を有するプラスミド)を293細胞にコ・トランスフェクションし、E1領域前後の相同な遺伝子配列領域間での相同組換えを期待し、E1領域を外来遺伝子に置き換えるというものである。しかしながら、動物細胞内での相同組換えの効率が良くないことや、煩雑な作業を必要とすること、293細胞の染色体に組み込まれているE1遺伝子とも相同組換えを起こし、高頻度に野生型ウイルスからなるクローンも生成するといった問題点があり、アデノウイルスベクターの作製はそれほど容易なものではなかった。これはアデノウイルスのゲノムサイズが約36 kbと巨大なため単一の制限酵素切断部位を得ることが困難であり、プラスミド構築に基づいて簡単にE1領域を外来遺伝子に置き換えるような方法が開発されていなかったことに起因している。

著者らは、これまであまり用いられることのなかったI-CeuIとPI-SceI(これらの酵素はアデノウイルスゲノムを切断しない)という少なくともそれぞれ9~10, 11 bpを認識する制限酵素に着目し、これらの酵素の認識配列をE1欠損領域に組み込むことによって、簡便な1ステップの*in vitro*ライゲーションに基づいたプラスミド構築で外来遺伝子をE1欠損領域に挿入する方法を開発した^{2,3)}(図1)。作製した組換えプラスミ

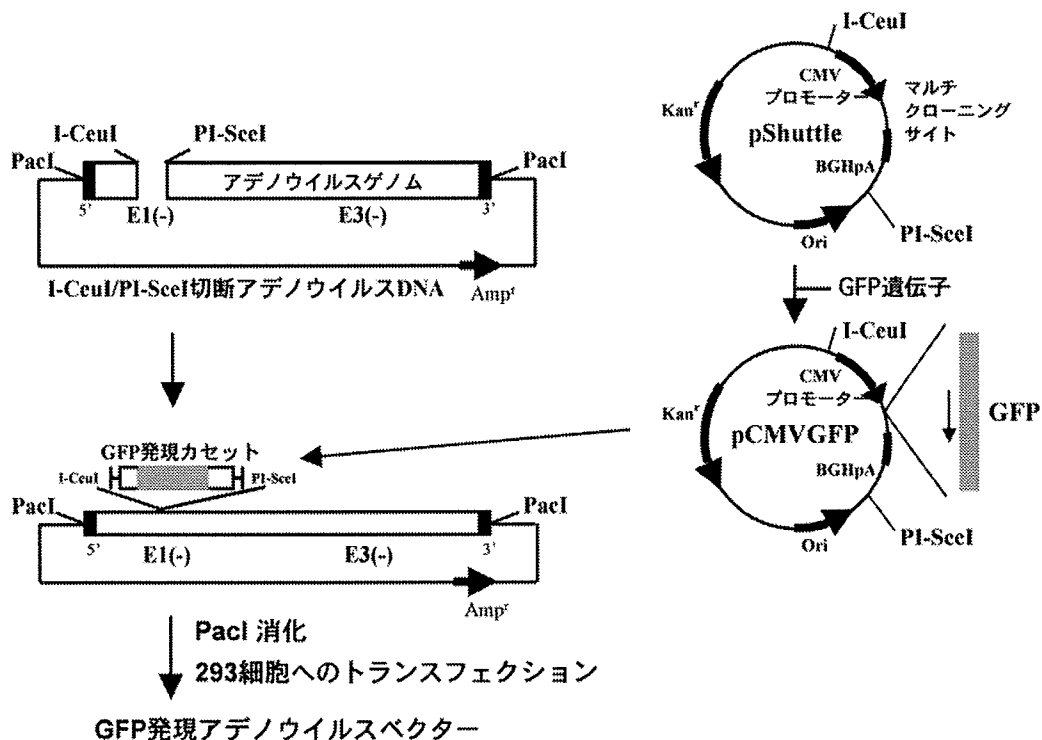


図1 *in vitro* ライゲーションによるプラスミド構築を利用したアデノウイルスベクター作製法の概略
 シャトルプラスミドに目的遺伝子〔ここではGFP (Green Fluorescent Protein) を用いた〕を組み込み、I-CeuIとPstIで切断する。これをI-CeuIとPstIで切断したアデノウイルスDNAとライゲーションする。作製した組換えプラスミドをアデノウイルスゲノム両末端に存在する制限酵素部位PstIで切断し、293細胞にトランスフェクションとするとアデノウイルスベクターができる。

ドをゲノム両末端に存在する制限酵素PstIで処理することにより線状にし、293細胞にトランスフェクションすると、組換えアデノウイルスが生じる。本法は、1) 簡便なプラスミド構築に基づいているため、特別な試薬・テクニックを必要とせず、だれでも簡単にウイルスDNAに相当するプラスミドの作製が可能であり、2) 相同組換えを必要としないため効率が良い、3) 均一なウイルスDNA (に相当するプラスミド) を293細胞へ導入することにより組換えアデノウイルスを作製するので、野生型ウイルスからなるクローンを生成する可能性は極めて低く (ベクター増殖中に野生型ウイルスが生成する可能性はある)、ブランク精製などを通した目的の組換えアデノウイルスのスクリーニング・精製を必ずしも必要としない、といった長所を有しており、アデノウイルスベクターの作製は格段に簡略化された。本システムはクロンテック社

よりAdeno-X expression systemとしてキット化され、広く普及している。

III 準備

- ・ 超遠心機 (ベックマン超遠心機, SW41 ローター, あるいは日立超遠心機, P40ST ローター)
- ・ 塩化セシウム溶液 (0.22 μm のフィルターで滅菌する。オートクレーブ滅菌は比重が変わるので禁句)
 1.25 g/cm³ (塩化セシウム 26.99 g を PBS 73.01 ml に溶かす)
 1.35 g/cm³ (塩化セシウム 35.18 g を PBS 64.82 ml に溶かす)
 1.50 g/cm³ (塩化セシウム 45.41 g を PBS 54.59 ml に溶かす)
- ・ 透析膜 (Spectrum laborator 社, Spectra/Por Membrane)

MWCO:50,000 など)

- ・ 透析バッファー (10 mM Tris (pH7.5), 1 mM MgCl₂, 10 % glycerol : オートクレーブ滅菌)
- ・ -70 度以下にセットしたエタノールバス, あるいはエタノールドライアイス, 液体窒素など.

III プロトコール

目的遺伝子をまずシャトルプラスミド (マルチクローニングサイトの両端に I-CeuI と PI-SceI 部位を有している) に挿入し, その後 I-CeuI と PI-SceI 部位を利用して目的遺伝子をベクタープラスミドに組み換える (図 1). 作製したプラスミドをアデノウイルスゲノム両末端に存在する制限酵素 PacI で切断し, 293 細胞にトランスフェクションするとアデノウイルスベクターが生じる. なお, PacI 切断プラスミドの 293 細胞へのトランスフェクションの際には, 目的遺伝子を挿入したベクタープラスミドの大量調製は必ずしも必要ではなく, 制限酵素解析に用いたミニプレップ DNA を直接 PacI 処理, およびトランスフェクションに用いることができ, 非常に簡便である. 以上の遺伝子組換えのステップはクロンテック社のキットのプロトコール⁴⁾を参照していただきたい. ここでは高タイターのアデノウイルスベクターを得るための増幅法と精製法の“コツ”を中心に述べる.

(注意) 現在種々のアデノウイルスベクターが市販されているが, 個々のベクター間で E1 領域や E3 領域の欠損サイズには微妙な違いがみられる (ベクターバックボーンが異なれば欠損サイズは微妙に異なっていることが多い). このわずかな欠損サイズの違いにより, 個々のアデノウイルスベクター間で, 高タイターのベクターを得るための“コツ”は異なると考えた方がよい. 本稿で述べるコツは, 比較的大きなサイズの E3 領域の欠損 (2.6 kb や 3.1 kb の E3 欠損) をもつアデノウイルスベクターにあてはまると考えて頂きたい.

1. アデノウイルスベクターの増幅

- 1) 目的遺伝子を組み込んだアデノウイルスプラスミドを PacI 消化し, カチオン化リボソーム試薬などで 293 細胞 (60mm dish あるいは 12well dish に 70 ~ 90 % コンフルエント状態のもの) に

トランスフェクションする.

- 2) 通常の液体培養をする.
- 3) 約 10 日後, CPE (cytopathic effect : ウイルス増幅のため, 細胞が死滅する現象) が現れるので (293 細胞の性質やトランスフェクション効率, アデノウイルスベクターの構造等により CPE が生じる時期は異なる), 細胞をピペッティング等で集める. 遠心 (1,500 ~ 2,000 rpm, 5 分) にて細胞を集め, 上清を 1 ml 程度だけ残して他は捨てる (あるいは上清を全て捨てて, 新鮮な培地を 1 ml 加える).
- 4) 凍結融解 (-70 度以下 → 37 度) を 3 ~ 5 回行い, 遠心後 (2,000 ~ 3,000 rpm, 5 分), 上清を回収する. 一部を -70 度で保存する (後のウイルス増幅過程でトラブルがあった際に, この時点から再開できるように).
- 5) 5×10^5 個/60 mm dish あるいは $2 \sim 5 \times 10^4$ 個/12 well 程度の 293 細胞に, 4 で回収した上清 (ウイルス液) を含む新鮮培地を加えて培養する. なお, 3 で生じた CPE の程度により 1 次ウイルス液を作用させる 293 細胞数は異なる. 慣れれば, どの程度の細胞数に作用させれば最適かが習得できる. はじめは上記のように 2 種類の細胞数を用意し, 両者に作用させればよい.
- 6) 48 時間以内に CPE が起こっている細胞を回収, 遠心し (2,000 ~ 3,000 rpm, 5 分), 上清を 1ml 程度だけ残して他は捨てる (あるいは上清を全て捨てて, 新鮮な培地を 1 ml 加える). 凍結融解 (-70 度以下 → 37 度) を 3 ~ 5 回行い, 遠心後 (2,000 ~ 3,000 rpm, 5 分), 上清を回収する.
- 7) 回収したウイルス液を含む新鮮培地を 5 で作用させた細胞数の 10 ~ 20 倍の細胞数の 293 細胞 (70 ~ 90 % コンフルエントの状態にする) に作用させ培養する. 回収したウイルス液を 10 ~ 20 倍の細胞数の 293 細胞に作用させると 48 時間以内に確実に CPE が起こる.
- 8) 48 時間以内に細胞を回収し, 6 ~ 7 を繰り返す (1 ~ 2 度). この時点で 150 mm dish 3 ~ 5 枚以上の 293 細胞からウイルスを回収できているはずであり, 10^{10-11} PFU (plaque forming Unit) 以上の

ウイルス液が得られる。

(注意) アデノウイルスベクターの増幅の各ステップで、293細胞にアデノウイルスベクターを作用させてから48時間以内に完全CPEが生じる条件下でウイルスを増幅させることが、高タイターのウイルス液を得るためには極めて重要である。完全CPEが生じるまでに72時間以上を要した場合には、次の増幅のステップではもう一度、同じ細胞数の293細胞に作用させ、48時間以内に完全CPEが生じたウイルス液を増幅させていくようにする。

2. アデノウイルスベクターの精製

アデノウイルスベクターを精製せずに実験に供している場合も散見されるが、未精製のウイルス液は、細胞由来のプロテアーゼ等を含んでいることから、細胞毒性の原因になるばかりでなく、発現させたい目的遺伝子産物も含みシュード・トランスダクションの原因にもなる。特に、アデノウイルスベクターを *in vivo* の

個体に用いる場合には、ベクター精製は必須である。アデノウイルスベクターの精製には、塩化セシウム/超遠心を用いた標準的な精製法とカラムを用いた方法(クロンテック社等で発売)がある。アデノウイルスベクターの取り扱いに不慣れであったり、超遠心機を有していない研究者はカラムを用いた方法が簡便である(コストは塩化セシウム/超遠心法に比べ高価である)。塩化セシウム/超遠心法は、ベクター精製に2~3日を要するが(透析を含めて)、カラムを用いた方法は1日で精製が完了するという特徴も有する。ここでは、塩化セシウム/超遠心を用いた精製法を紹介する(図2)。

- 1) 150 mm dish 1~5枚から回収したCPEが起こっている細胞を遠心し(1,500~2,000 rpm, 5分)、上清を捨ててPBS 5 mlを加える。凍結融解(-70度以下→37度)を3~5回行い、遠心後(2,000~3,000 rpm, 5分)、上清を回収する。

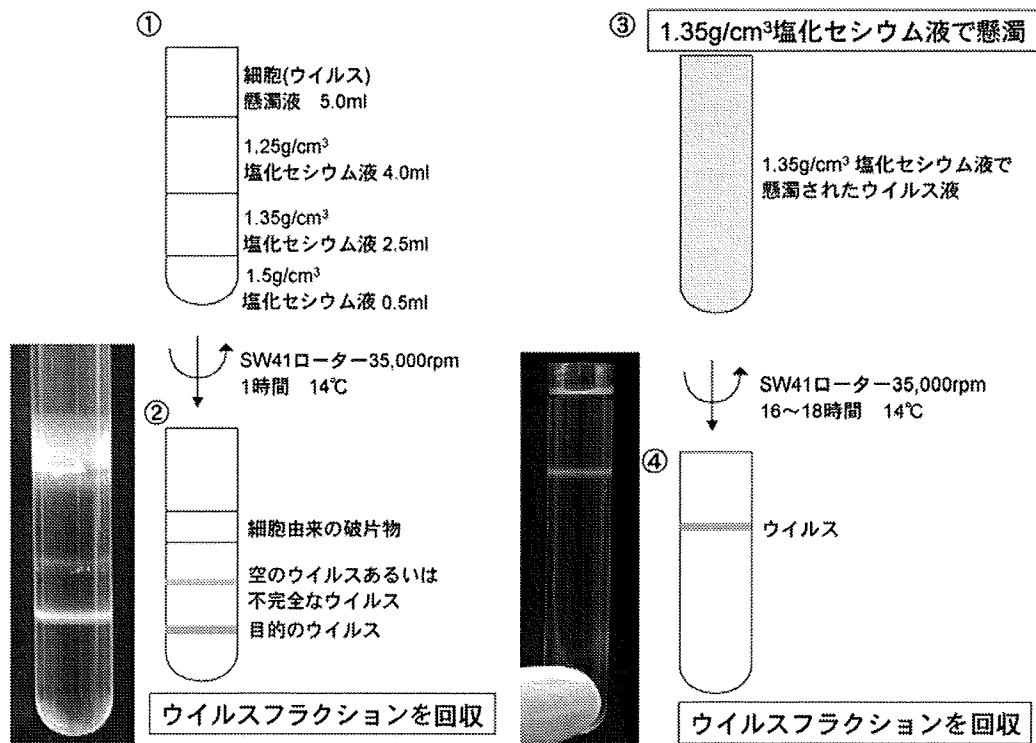


図2 アデノウイルスベクターの塩化セシウム密度勾配遠心法による精製

(p.7 カラー図参照)

- 2) MgCl₂ (1 M) 50 μl, RNaseA (10 mg/ml) 100 μl, DNaseI (10 mg/ml) 100 μlを加え, 37℃で30分間 incubate する. 本ステップは必ずしも必要ではないが, 特に回収した細胞数が多い場合や初心者の場合には本ステップで細胞由来の核酸を断片化しておく, 後の塩化セシウムの密度勾配遠心後のウイルスバンドがきれいにでき, 精製が容易になる.
- 3) 超遠心機のスウィング・ローターのチューブに 1.50 g/cm³ の塩化セシウム液 0.5 ml を入れ, その上に 1.35 g/cm³ の塩化セシウム液 2.5 ml, 1.25 g/cm³ の塩化セシウム液 4.0 ml, そして最後にウイルス液 5.0 ml を注意深く重層する.
- 4) 35,000 rpm, 14℃, 1時間遠心して, ウイルス分画を回収する.
- 5) ウイルス液を 1.35 g/cm³ の塩化セシウム液で懸濁し (最終用量 12 ml), 35,000 rpm, 14℃, 16~18時間遠心してウイルス分画を回収する.
- 6) 透析バッファーで一昼夜, 4℃で透析する (バッファー交換を1度行う).
- 7) ウイルス液を小分注して-70℃で保存する.
- 8) タイターを測定し, 増殖型アデノウイルス (replication competent adenovirus: RCA) の混入がないことを確認した後, 実験に供する.

III コメント

RCA 混入の確認法は理研 DNA バンクが開発した方法が簡便である⁹⁾. 本方法は, 感度は低いが簡便であり, 実験室レベルでの RCA 混入の確認としては十分である. より高感度に RCA 混入を検出したい場合には, 我々が開発した infectivity PCR を用いた方法が便利である⁶⁾. 著者らは, アデノウイルスのパッケージングリミットを利用することで, RCA が生じにくい新規アデノウイルスベクター系を開発済みであり, 詳細は本誌1月号⁷⁾を参照していただきたい.

アデノウイルスベクターのタイター表記法としては, 生物学的タイターと物理化学的タイターがある. 生物学的タイター測定法としてはプラーク法や End-point dilution 法, アデノウイルスのヘキソンに対する抗体を用いた免疫染色に基づく方法 (Adeno-X Rapid Titer Kit: クロンテック社) が (図3), 物理化学的タイター測定法としては OD₂₆₀ 法が用いられる (図4). 一般的には生物学的タイターが用いられるが, カプシドタンパク質を改変することで感染域を制御した改良型アデノウイルスベクター⁷⁾の場合には, 293細胞への感染性も変わってくるため, 物理化学的タイターを用いるのが一般的である.

1) プラークアッセイ

タイターは plaque forming unit (PFU)/ml と表記される.

2) TCID₅₀ 法

96穴プレートを用いて段階希釈したウイルス液を作用させ, 50%細胞変性終末点 (TCID₅₀) を調べることによる算出法. タイターは TCID₅₀/ml と表記される.

3) その他

Adeno-X rapid titer kit (ヘキソン抗体を用いた免疫染色に基づく). タイターは infectious unit/ml 等と表記される.

図3 生物学的タイターの測定法

0.1% SDS (final) を含む TE でウイルス液を懸濁。

5 分, ポルテックス。

→ 15,000 rpm で 5 分遠心。

→ 上清の OD₂₆₀ を測定。

→ 下記の計算式で particle titer を算出。

$$\text{OD}_{260} \ 0.1 = 1.1 \times 10^{11} \text{ particle titer/ml}$$

図4 物理化学的タイターの測定法

通常, 150 mm dish 5 枚から回収・精製したアデノウイルスベクターのタイターは約 2×10^{10} PFU/ml ~ 2×10^{11} PFU/ml (約 1 ml) 程度である。

III おわりに

アデノウイルスベクターは作製法が簡便化されたこともあり, 最先端の生命科学研究を行う上での必須の基盤技術として多くの研究室で恒常的に使用されるようになってきている。しかしながら, 個々の研究者は必ずしもアデノウイルスベクターの取り扱いを熟知しているとは言い難い。本稿および改良型アデノウイルスベクターの開発状況をまとめた著者らの総説⁷⁾が, アデノウイルスベクターの理解に役立ち, 正しい技術を習得して本ベクターを使用することに役立てれば幸いである。

参考文献

- 1) Mizuguchi H, et al : Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv Drug Deli Rev* **52** : 165-176, 2001.
- 2) Mizuguchi H, Kay MA : Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved *in vitro* ligation method. *Hum Gene Ther* **9** : 2577-2583, 1998.
- 3) Mizuguchi H, Kay MA : A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector. *Hum Gene Ther* **10** : 2013-2017, 1999.
- 4) Adeno-X Expression System User Manual: <http://www.clontech.com/images/pt/PT3414-1.pdf>
- 5) Suzuki E, et al : A simple method for the simultaneous detection of E1A and E1B in adenovirus stocks. *Oncol Rep* **11** : 173-178, 2004.
- 6) Ishi-Watabe A, et al : Detection of replication-competent adenoviruses spiked into recombinant adenovirus vector products by infectivity-PCR. *Mol Ther* **8** : 1009-1016, 2003.
- 7) 水口裕之 : 改良型アデノウイルスベクター開発の最前線. *脳* **21** **12** : 123-131, 2009.

統計に無理なくなじめる入門書 /

統計なんてこわくない

著 柳 修平 川崎医療福祉大学教授

統計は基本的には現象をまとめるための道具といえる。この現象を何とか人にわかりやすく説明できないか, という点が本書の出発点となっている。統計を学ばなければ困るが, なじみにくいという人に恰好の入門書。また, データ処理に困惑している人にとっても, 問題解決のヒントがつかめるガイドブックとして好適。

●A5判/160頁 定価1,995円(本体1,900円+税5%) ISBN4-7653-0974-6



金芳堂

〒606-8425 京都市左京区鹿ヶ谷西寺ノ前町34番地 TEL(075)751-1111・FAX(075)751-6858 <http://www.kinpodu-pub.co.jp/>

