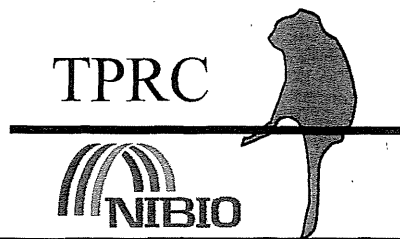


17. 研究支援希望の有無: 有・無

(どちらかに○をつけてください。また、「有」の場合、研究支援内容を具体的に記入してください。なお、希望に沿えない研究支援もあり得ます。)

脳内接種、採血、脳脊髄液採取、行動観察、MRI 撮像、解剖



Tsukuba Primate Research Center
National Institute of Biomedical Innovation

Hachimandai1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-0843 JAPAN

Phone:+81-29-837-2121, Fax:+81-29-837-2121

平成25年6月7日

岐阜大学
大学院連合創薬医療情報研究科・人獣感染防御研究室
桑田 一夫 先生

霊長類医科学研究センター・動物実験計画承認書送付

平素より大変お世話になっております。
標記の件につきまして、下記の課題の動物実験計画承認書を同封いたしますので、ご査収のほど、
よろしくお願い申し上げます。

研究課題名： 低分子シャペロンによるプリオン感染霊長類の治療研究

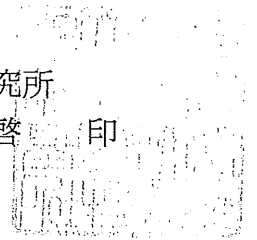
以上

筑波総務課・共同利用施設担当
独立行政法人医薬基盤研究所
霊長類医科学研究センター
〒305-0843
茨城県つくば市八幡台1-1
TEL: 029-837-2121(代)
FAX: 029-837-0218

平成25年 4月 24日

岐阜大学大学院
連合創薬医療情報研究科
人獣感染防御研究
桑田 一夫 殿

独立行政法人医薬基盤研究所
理事長 米田悦啓 印



動物実験計画承認書

平成25年3月28日付けをもって申請のあった動物実験計画書については、
下記のとおり承認します。

記

承認課題名：低分子シャペロンによるプリオン感染霊長類の治療研究

承認番号：DS25-30

条 件：本実験は、基盤研のバイオセーフティ委員会および所属の研究
機関における動物実験計画書の承認後実施すること。

送付ご案内

送付日 2013年6月24日

岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科
大学院医学系研究科 遺伝発生学分野 (併)
応用生物学部野生動物管理学研究センター人獣感染防御研究室 (併)
学術院 生命科学研究部門 教授
桑田 一夫 先生

株式会社新日本科学 安全性研究所
〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438
TEL : 099-294-2600 FAX : 099-294-3619
安全性研究所 実験研究部

佐藤 万里



拝啓

時下ますますご清栄のこととお慶び申し上げます。
平素は格別のご高配を賜り、厚く御礼申し上げます。

変更販売動物1例の「細菌検査証明書」を2部送付致します。
ご査収の程宜しくお願い申し上げます。

敬具

本送付状は御社にて保管してください。

細菌検査証明書

株式会社新日本科学にてツベルクリン検査を実施し、以下の結果を得た。

No	動物種	性別	個体番号	検査実施日	判定日	検査結果
6	カニクイザル	雄	110760C	2013年06月21日	2013年06月24日	陰性

獣医師： 船戸 護



日付： 2013年06月24日

細菌検査証明書

株式会社新日本科学にて赤痢菌およびサルモネラ検査を実施し、以下の結果を得た。

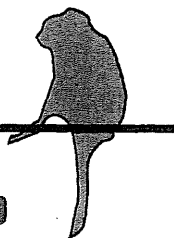
No.	動物種	性別	個体番号	検査実施日	判定日	検査結果
6	カニクイザル	雄	110760C	2013年06月21日	2013年06月22日	陰性

獣医師： 船戸 護



日付： 2013年06月24日

TPRC



Tsukuba Primate Research Center

National Institute of Biomedical Innovation

Hachimandai1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-0843 JAPAN

Phone:+81-29-837-2121, Fax:+81-29-837-0218

平成 25 年 7 月 18 日

岐阜大学大学院
連合創薬医療情報研究科
桑田一夫先生

平素より大変お世話になっております。
病原体等取扱申請承認書をお送りいたしますので、ご査収くださいますよう、よろしくお願
い申し上げます。本書の送付が遅くなりまして大変申しわけございませんでした。

独立行政法人医薬基盤研究所
霊長類医科学研究センター
岡村智崇（代理：藤田）
〒305-0843
茨城県つくば市八幡台 1-1
Tel : 029-837-2125
Fax : 029-837-0218

病原体等取扱使用承認書

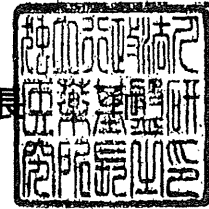
保富 康宏 殿

承認番号: BSL3-R-13.02

病原体 BSE 感染牛プリオン又はカニクイザル馴化プリオン (BSL1/BSL2/BSL3) について、

平成 25 年 5 月 / 日 から 平成 26 年 3 月 3 / 日 までの使用を承認します。

医薬基盤研究所 研究所長



様式 2

平成 25 年 7 月 16 日

国立大学法人岐阜大学大学院

連合創薬医療情報研究科

桑田 一夫 様

一般社団法人予防衛生協会

代表理事 吉川 泰弘



検疫結果通知書

平成 25 年 6 月 13 日に依頼のありました検疫につきましては、
別添検疫結果報告書のとおりとなりましたので通知いたします。

なお、検疫結果報告書についてのお問い合わせは検疫責任者（冷
岡 昭雄）まで連絡を下さるようお願い申し上げます。

別 添

検疫結果報告書

平成 25 年 6 月 25 日に入荷したカニクイザル 6 頭の検疫は、平成 25 年 7 月 16 日に終了した。

総括コメント

- 1) 栄養状態は 6 頭いずれも良好と判断された。
- 2) 検疫期間中、異常出血、食欲不振等著しい異常は全頭について認められなかった。
- 3) 赤痢菌検査は全頭陰性であった。
- 4) ツベルクリン反応試験は全頭陰性であった。
- 5) サルモネラ検査は全頭陰性であった。
- 6) 蠕虫卵検査は 6 月 26 日の 1 頭（通番 6）の落下便から鞭虫卵が検出されたため、2 週おきに 2 回という投薬スケジュールに従い、6 月 28 日と 7 月 12 日に駆虫薬（ドロントールプラス錠：各 1/4 錠）を計 2 回経口投与した。
なお、7 月 9 日の蠕虫卵再検査では陰性と判断された。
- 7) 血液・血清生化学検査では全頭について異常は認められなかった。
- 8) Bウイルス抗体、サル水痘ウイルス（SVV）抗体は全頭陰性であった。
- 9) サルレトロウイルス（SRV）の抗体および DNA-PCR 検査は全頭陰性であった。

なお、個々の検疫結果については、別添検疫結果報告表に記載した。


一般社団法人 予防衛生協会

検疫責任者 冷岡 昭雄



獣医師 岡林 佐知

検疫結果報告表

一般社団法人  予防衛生協会

通番 1 個体番号 1021306010
 サル種 カニクイザル 産地 日本
 入荷日 2013/6/25 検疫終了日 2013/7/16

現地個体番号 111590C 収容ケージ 53110
 性別 ♂ 生年月日 2011/10/9

		検取時	第1回	第2回	第3回	終了前検査	備考
年月日		2013/6/25	2013/6/26			2013/7/9	
体重 (Kg)		1.87				1.97	
栄養状態		+				+	
細菌検査	ツベルクリン反応	-				-	
	赤痢菌	-					
	サルモネラ	-					
ウイルス検査	Bウイルス	-				-	
	サル水痘様ウイルス	-				-	
	SIV						
	STLV						
	SRV(抗体/DNA-PCR)	-/-				-/-	
	麻疹ウイルス						
寄生虫	蠕虫卵		-				
血液・血清生化学検査	WBC	×10 ² /μl	97			123	
	RBC	×10 ⁴ /μl	599			538	
	HGB	g/dl	14			13	
	HCT	%	43.5			39.0	
	MCV	fl	72.6			72.5	
	PLT	×10 ⁴ /μl	32.3			24.7	
	W-SCC	×10 ² /μl	55			88	
	W-LCC	×10 ² /μl	42			35	
	TP	g/dl	7.5			7.3	
	BUN	mg/dl	9.1			20.9	
	GLU	mg/dl	60			43	
	GPT	IU/l	36			28	
	CRP	mg/dl	0.08			0.07	

検取時検査所見

特記事項なし。体温(直腸温): 38.5°C

終了前検査所見

特記事項なし。体温(直腸温): 38.5°C


検疫終了判定所見

検疫終了判定基準を満たした。

検疫終了 : **可**

担当獣医 岡林 佐知

検疫結果報告表

一般社団法人  予防衛生協会

通番 2 個体番号 1021306011
 サル種 カニクイザル 産地 日本
 入荷日 2013/6/25 検疫終了日 2013/7/16

現地個体番号 111660C 収容ケージ 53111
 性別 ♂ 生年月日 2011/12/7

		検収時	第1回	第2回	第3回	終了前検査	備考
年月日		2013/6/25	2013/6/26			2013/7/9	
体重 (Kg)		1.90				2.11	
栄養状態		+				+	
細菌検査	ツベルクリン反応	-				-	
	赤痢菌	-					
	サルモネラ	-					
ウイルス検査	Bウイルス	-				-	
	サル水痘様ウイルス	-				-	
	SIV						
	STLV						
	SRV(抗体/DNA-PCR)	-/-				-/-	
	麻疹ウイルス						
寄生虫	蠕虫卵		-				
血液・血清生化学検査	WBC	× 10 ² /μl	65			107	
	RBC	× 10 ⁴ /μl	555			535	
	HGB	g/dl	14			13	
	HCT	%	42.2			40.9	
	MCV	fl	76.0			76.4	
	PLT	× 10 ⁴ /μl	45.5			37.1	
	W-SCC	× 10 ² /μl	34			64	
	W-LCC	× 10 ² /μl	31			43	
	TP	g/dl	6.9			7.0	
	BUN	mg/dl	11.8			17.7	
	GLU	mg/dl	65			60	
	GPT	IU/l	32			31	
	CRP	mg/dl	0.07			0.08	

検収時検査所見

特記事項なし。体温(直腸温): 38.8°C

終了前検査所見

特記事項なし。体温(直腸温): 39.4°C


検疫終了判定所見

検疫終了判定基準を満たした。

検疫終了 : **可**

担当獣医 岡林 佐知

検疫結果報告表

一般社団法人  予防衛生協会

通番 3 個体番号 1021306012
 サル種 カニクイザル 産地 日本
 入荷日 2013/6/25 検疫終了日 2013/7/16

現地個体番号 111600C 収容ケージ 53112
 性別 ♂ 生年月日 2011/10/23

		検取時	第1回	第2回	第3回	終了前検査	備考
年月日		2013/6/25	2013/6/26			2013/7/9	
体重 (Kg)		1.88				1.93	
栄養状態		+				+	
細菌検査	ツベルクリン反応	-				-	
	赤痢菌	-					
	サルモネラ	-					
ウイルス検査	Bウイルス	-				-	
	サル水痘様ウイルス	-				-	
	SIV						
	STLV						
	SRV(抗体/DNA-PCR)	-/-				-/-	
	麻疹ウイルス						
寄生虫	蠕虫卵		-				
血液・血清生化学検査	WBC	× 10 ² /μl	93			133	
	RBC	× 10 ⁴ /μl	513			522	
	HGB	g/dl	13			13	
	HCT	%	39.3			39.7	
	MCV	fl	76.6			76.1	
	PLT	× 10 ⁴ /μl	44.3			36.7	
	W-SCC	× 10 ² /μl	65			105	
	W-LCC	× 10 ² /μl	28			28	
	TP	g/dl	6.4			7.1	
	BUN	mg/dl	13.7			18.0	
	GLU	mg/dl	89			73	
	GPT	IU/l	41			32	
	CRP	mg/dl	0.07			0.04	

検取時検査所見

特記事項なし。体温(直腸温): 38.7°C

終了前検査所見

特記事項なし。体温(直腸温): 39.6°C

検疫終了判定所見

検疫終了判定基準を満たした。

検疫終了 : **可**

担当獣医 岡林 佐知

検疫結果報告表

一般社団法人 予防衛生協会

通番 4 個体番号 1021306013
 サル種 カニクイザル 産地 日本
 入荷日 2013/6/25 検疫終了日 2013/7/16

現地個体番号 120090C 収容ケージ 53124
 性別 ♂ 生年月日 2012/4/25

		検収時	第1回	第2回	第3回	終了前検査	備考
年月日		2013/6/25	2013/6/26			2013/7/9	
体重 (Kg)		1.68				1.68	
栄養状態		+				+	
細菌検査	ツベルクリン反応	-				-	
	赤痢菌	-					
	サルモネラ	-					
ウイルス検査	Bウイルス	-				-	
	サル水痘様ウイルス	-				-	
	SIV						
	STLV						
	SRV(抗体/DNA-PCR)	-/-				-/-	
	麻疹ウイルス						
寄生虫	蠕虫卵		-				
血液・血清生化学検査	WBC	$\times 10^2/\mu\text{l}$	74			115	
	RBC	$\times 10^4/\mu\text{l}$	570			559	
	HGB	g/dl	14			13	
	HCT	%	42.6			41.2	
	MCV	fl	74.7			73.7	
	PLT	$\times 10^4/\mu\text{l}$	38.3			39.6	
	W-SCC	$\times 10^2/\mu\text{l}$	49			71	
	W-LCC	$\times 10^2/\mu\text{l}$	25			44	
	TP	g/dl	6.6			6.8	
	BUN	mg/dl	12.2			20.5	
	GLU	mg/dl	52			58	
	GPT	IU/l	37			21	
	CRP	mg/dl	0.12			0.04	

検収時検査所見

鼠径部皮膚汚濁。体格やや小、やや大腿部短い。体温(直腸温):38.6°C

終了前検査所見

鼠径部皮膚汚濁。体格やや小、やや大腿部短い。体温(直腸温):39.2°C

検疫終了判定所見

検疫終了判定基準を満たした。

検疫終了 : 可

担当獣医 岡林 佐知

検疫結果報告表

一般社団法人  予防衛生協会

通番 5 個体番号 1021306014
 サル種 カニクイザル 産地 日本
 入荷日 2013/6/25 検疫終了日 2013/7/16

現地個体番号 111060C 収容ケージ 53125
 性別 ♂ 生年月日 2011/6/10

		検取時	第1回	第2回	第3回	終了前検査	備考
年月日		2013/6/25	2013/6/26			2013/7/9	
体重 (Kg)		1.73				1.80	
栄養状態		+				+	
細菌検査	ツベルクリン反応	—				—	
	赤痢菌	—					
	サルモネラ	—					
ウイルス検査	Bウイルス	—				—	
	サル水痘様ウイルス	—				—	
	SIV						
	STLV						
	SRV(抗体/DNA-PCR)	—/—				—/—	
	麻疹ウイルス						
寄生虫	蠕虫卵		—				
血液・血清生化学検査	WBC	× 10 ² /μl	69			90	
	RBC	× 10 ⁴ /μl	633			611	
	HGB	g/dl	15			14	
	HCT	%	47.3			45.2	
	MCV	fl	74.7			74.0	
	PLT	× 10 ⁴ /μl	30.2			27.4	
	W-SCC	× 10 ² /μl	44			69	
	W-LCC	× 10 ² /μl	25			21	
	TP	g/dl	6.0			6.3	
	BUN	mg/dl	10.0			15.5	
	GLU	mg/dl	78			74	
	GPT	IU/l	42			22	
	CRP	mg/dl	0.09			0.08	

検取時検査所見

特記事項なし。体温(直腸温):38.0°C

終了前検査所見

特記事項なし。体温(直腸温):38.5°C


検疫終了判定所見

検疫終了判定基準を満たした。

検疫終了 : **可**

担当獣医 岡林 佐知

検疫結果報告表

一般社団法人  予防衛生協会

通番 6 個体番号 1021306015
 サル種 カニクイザル 産地 日本
 入荷日 2013/6/25 検疫終了日 2013/7/16

現地個体番号 110760C 収容ケージ 53126
 性別 ♂ 生年月日 2011/5/15

		検収時	第1回	第2回	第3回	終了前検査	備考
年月日		2013/6/25	2013/6/26			2013/7/9	
体重 (Kg)		2.24				2.36	
栄養状態		+				+	
細菌検査	ツベルクリン反応	-				-	
	赤痢菌	-					
	サルモネラ	-					
ウイルス検査	Bウイルス	-				-	
	サル水痘様ウイルス	-				-	
	SIV						
	STLV						
	SRV(抗体/DNA-PCR)	-/-				-/-	
	麻疹ウイルス						
寄生虫	蠕虫卵		+			-	鞭虫卵
血液・血清生化学検査	WBC	$\times 10^2/\mu\text{l}$	107			146	
	RBC	$\times 10^4/\mu\text{l}$	536			508	
	HGB	g/dl	13			12	
	HCT	%	40.8			38.1	
	MCV	fL	76.1			75.0	
	PLT	$\times 10^4/\mu\text{l}$	37.5			27.7	
	W-SCC	$\times 10^2/\mu\text{l}$	68			93	
	W-LCC	$\times 10^2/\mu\text{l}$	39			53	
	TP	g/dl	6.9			6.7	
	BUN	mg/dl	7.4			15.5	
	GLU	mg/dl	77			77	
	GPT	IU/l	38			30	
	CRP	mg/dl	0.99			0.15	

検収時検査所見

特記事項なし。体温(直腸温): 39.2°C

終了前検査所見

特記事項なし。体温(直腸温): 39.2°C

検疫終了判定所見

検疫終了判定基準を満たした。

検疫終了 : **可**

担当獣医 岡林 佐知

カニクイザルを用いたBSEプリオン感染実験

脳内接種

脳内接種は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下において頭部を剃毛後イソジンで消毒し、頭皮膚切開、側頭部頭蓋骨に直径 2mm の穿孔部を作成し、視床に脳乳剤 0.2ml を注入した。注入後、皮膚を縫合し、手術日より 3 日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

検査方法

1、行動解析

① 自由行動観察（ビデオ）

5 分間自由行動を撮影した後、餌（リンゴ、固形飼料）をケージ前面におき 10 分間ビデオ撮影を行う。

A)精神症状

抑うつ
自傷
食欲不振
飲水量低下
あくび
驚愕反応
搔痒感
多動

B)神経症状

運動失調
○ 振戦
ミオクローヌス
運動麻痺
姿勢反射生涯
動作緩慢
動作停止
歩行困難
筋力低下
起立不能

C) 律動性運動

律動性運動はさらに a,平衡移動運動 b,旋回運動 c,振り子運動に分類される。旋回運動には b-1,水平面での一方向性、b-2,途中で方向を変える旋回、b-3 垂直方向の旋回運動に分かれる。振り子運動には c-1,正立、c-2,倒立（後肢でケージの上をつかんで）の2種類が観察された。これらすべての律動的運動自体は BSE の脳組織の投与の有無に関わらず観察される。留意すべき点は I 頻度 II 速度、III 運動時の頭部と体幹の位置関係（姿勢反応）である。

感染・疾病の進行を示唆する運動の異常（神経制御異常）

一般に中枢神経の異常の初期、疾病に進行時には

I, 頻度を増大（運動休止期の短縮）、II、運動速度の大きくなる III、体幹と頭部の位置関係の異常：頭部の安定、両眼の水平維持が保たれない傾向（頭を上下に大きく動かす、下あごを先行させて旋回運動を行なう、頭部を下げて旋回を行なう）が見られる。

D) 非律動性運動および姿勢

a) 姿勢：駐立姿勢、座位、ケージの上にとぶら下がるなどの姿勢、また 尾などに見られる筋緊張、これらを基準にサルの状態を判断するのは困難である。

b) 眼球運動：体位と眼球の位置、定位にあるときの眼球の位置変動の大きさ、その頻度、視線、これらはサルの精神状態を評価するにはいい指標となるように思われる。

c) 口：口をあけて、歯をむき出して威嚇する、ケージの前面（透明）をなめる、もぐもぐとものを食べているように口をしきりに動かす、腕、後肢の指をくわえる、上腕、大腿部をかじる

d) 頭部、頭の震顫、足でかく。

これらは、サルの中枢神経の異常状態を評価する情報になりうる。

一般に症状が進行（接種からの時間経過とともに）、①頭が固定されているときの眼球の特に水平方向への眼球振動が多くなる、頭部の運動と眼球の運動の分離が著しくなる。②口を大きく開けて、ケージの錠前の部分をかじる（正常な場合、指でいじることが多い）、前面の透明な部分をなめるなど、手で行なっていた行動を口で行なうようになったと考えられる行動が多くなる、体の一部を口にくわえる行動が時間経過とともにかじるような運動になり、後肢、臀部をかじろうとして旋回運動を行なうのが観察される。③個体によっては頭部の震顫が見られる固体があった。

以上をまとめると異常な行動としては

1、律動性の頻度が増し、同じ姿勢を維持する時間が短縮する。

2、頭と体幹の位置関係が変化する。下顎の運動が旋回運動に先行する、頭が下がる・

3、垂直な旋回運動が多く見られるようになる。

4、駐立、座位時に視線（眼球運動）の目的のない運動が顕著になる、

5、体の一部を強くかむ（自傷行動）が出現する。

があげられる。これらが行動観察による評価基準となるうる可能性がある。

② アップルテスト・食物回収試験（運動能力と記憶力のテスト）

行動観察・ビデオ撮影

アップルテスト（運動機能評価）

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し前肢運動機能の評価を行う。

左右トレーに奥行4段階にリンゴをおいて回収する過程を観察

4個づつ 3回（24試行）

回収時の指先の症状、利き手について観察。

回収時間のタイム解析

③ 食物回収試験

食物回収試験は9つの報酬穴の開いたパネルに報酬のリンゴ片を入れて、動物が指先で回転させて開けることができる不透明な蓋で穴を塞ぎ、9つの穴からリンゴ片を回収する行動により、短期記憶能の評価を行う。9つの穴全てにリンゴ片を入れ、全てのリンゴを取り終わるまでの行動を1試行とし、5試行実施した。サルの報酬穴とそれを覆うフタへの反応は、正ストロークと誤ストロークに分類した。正ストロークとは、報酬の入っている報酬穴あるいはその上のフタへ触れ、報酬を回収することである。誤ストロークとは、報酬の入っていない穴に指を入れる、あるいはその上のフタを動かして報酬穴を露出させる行動である。連続して行う正ストローク数と誤ストローク数により、評価を行う。

2、定期サンプリング

接種後、定期的に血液および脳脊髄液の採取を行った。動物は塩酸ケタミン麻酔下で血液は大腿静脈より採取した。脳脊髄液は背部剃毛後イソジンで消毒し、第3～第5腰椎椎間より採取した。

採血量 クエン酸 4.5ml（WBC および血漿を分注し-80℃保存）

CSF ①0.5〜1ml 採取