



Title	Safety Evaluation of HVJ-AVE Liposomes in Nonhuman Primates
Author(s)	坪庭, 直樹
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42635
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	坪 庭 直 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 1 0 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Safety Evaluation of HVJ-AVE Liposomes in Nonhuman Primates (HVJ-AVE リポソームの霊長類における安全性の評価)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 奥 山 明 彦 (副査) 教 授 金 田 安 史 教 授 西 宗 義 武

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

HVJ-リポソーム法は、HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan, Sendai Virus) のエンベロープを持つリポソームにより核酸をはじめとする高分子物質を培養細胞あるいは生体内の臓器細胞へ導入する方法である。この方法によりこれまで培養細胞をはじめ、血管、腎臓、移植心臓、肺、筋肉などへプラスミド DNA やオリゴヌクレオチドの導入が確認され、また組織障害や、炎症、明らかな毒性は認められなかった。さらに HVJ-リポソーム法の最適化を行い HVJ-AVE (Artificial Viral Envelope) リポソーム法が開発された。実験動物モデルにおいては閉塞性動脈硬化症や、肝硬変の動物実験モデルに対する連続投与法、あるいはメラノーマに対する遺伝子ワクチン療法が HVJ-AVE リポソーム法を用いて施行され治療効果をあげている。

今回施行した HVJ-AVE リポソームの霊長類における安全性の評価は、まず実際の臨床応用が検討されている局所連続投与時の安全性の検討を行い、さらに局所投与した HVJ-AVE リポソーム法が血管内に入る可能性を考慮し単回静脈投与時の安全性の検討を行った。

【方法ならびに成績】

第一に HVJ-AVE リポソームを用いて局所連続投与時の安全性の検討を行った。カニクイザル 4 頭を 2 群に分けた。Vehicle control 群は 2 頭のカニクイザル (オス 1 頭、メス 1 頭) に対して、 $30 \mu M$ の脂質と 40,000 hemagglutinating units (以下 HAU) の HVJ より調整された 2 mL の HVJ-AVE リポソーム液を day 0 に大腎筋に注射し、注射前と day 7、21、28 に血算値と生化学的検査値の検討を行った。血算値に変化は見られなかった。LDH、ALT、CK の上昇が一部のサルに認められたが、day 28 には正常化する傾向がみられた。HVJ-AVE liposome with HGF 群では 2 頭のカニクイザル (オス 1 頭、メス 1 頭) に対して、hepatocyte growth factor の cDNA を含んだ発現ベクターである pUC-SR α /HGF を $400 \mu g$ 封入した 2 mL の HVJ-AVE リポソーム液を day 0 と day 7 に大腎筋に注射し、注射前と day 7、21、28、29 に血算値と生化学的検査値の検討を行った。さらに、HGF 値を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。血算値に変化は見られなかった。LDH の上昇が認められたが、day 28 には正常化する傾向がみられた。HGF 値は day 21 ならびに day 28 に上昇を示した。また各組織への pUC-SR α /HGF の移行は PCR 法で調べた。投与部位のみでなく、肝臓、脾臓より pUC-SR α /HGF が検出された。免疫反応を調べるため、antibody capture assay にて抗 HVJ 抗体の titer を測定したところほぼ検出

限界以下であった。さらに、死体解剖、病理組織検査でも特記すべき変化は認められなかった。PCR法で投与部位のみでなく肝臓、脾臓よりプラスミドDNAが検出されたためHVJ-AVEリポソーム法が血管内に入る可能性を考慮し次に単回静脈投与時の安全性の検討を行うこととなった。

第二にHVJ-AVEリポソームを用いて単回静脈投与時の安全性の検討を行った。カンクイザル16頭を3群に分けた。Control群は、4頭のオスカニクイザルに対して10mLの生理的食塩水を静脈内投与した。Vehicle control群は5頭のオスカニクイザルに対して、50 μ Mの脂質と66,666HAUのHVJより調整された10mLのHVJ-AVEリポソーム液を静脈内投与した。HVJ-AVE liposome with DNA群では7頭のオスカニクイザルに対して、pcDNA3.1(+)を666 μ g封入した10mLのHVJ-AVEリポソーム液を静脈内投与した。各群の動物に対し注射前とday 7、14、21、28に血算値と生化学的検査値の検討を行った。血算値に変化は見られなかった。LDH、AST、ALT、CKの上昇が一部のサルに認められたが、day14あるいはday28には正常化する傾向がみられた。各群1頭の動物に対し、遅延型皮膚反応を調べた。HVJ-AVE liposome with DNA群では、皮内注射の注射後24時間あるいは48時間後に軽度の紅斑を認めた。Control群やVehicle control群では変化を認めなかった。各群数頭ずつ各臓器へのプラスミドDNAの移行がPCR法により調べられた。Day 1では、すべての動物の肺、肝臓、脾臓よりプラスミドDNAが検出され、一部の動物では、心臓、腎臓からも検出された。Day14、21、28では、どの臓器からもプラスミドDNAは検出されなかった。さらに、血清、血球細胞、尿へプラスミドDNAが移行しているかどうかPCR法で調べられたが、いずれよりも検出されなかった。さらに、安全性確認のため不活性化を行っているHVJのゲノムRNAが各臓器に移行しているか、RT-PCR法で調べたがいずれよりも検出されなかった。死体解剖では特記すべき変化は認められなかった。病理組織学的検査では、Vehicle control群とHVJ-AVE liposome with DNA群の投与部位において、若干の炎症細胞の浸潤が認められた。また、腎臓におけるリポフスチンの蓄積や、肝臓のグリソン鞘への細胞浸潤や、精巣の萎縮はControl群を含めた動物で散見された。しかし、プラスミドDNAが検出された肺、肝臓、脾臓の組織像は正常と診断された。

【総括】

HVJ-AVEリポソームを用いて局所連続投与を行ったところ、投与直後は一部の生化学検査で若干の変動はあるもののすぐに正常化する傾向にあり、また死体解剖や病理検査で特記すべき変化は認められなかった。また、抗HVJ抗体のtiterはほぼ検出限界以下であった。以上より、この投与方法は安全と考えられ、さらにHGFの上昇が認められ、有効な遺伝子導入法であることが再確認された。なお、封入したプラスミドDNAは、投与部位にもっとも強く、ついで肝臓と脾臓より検出された。

次に、局所連続投与時に投与物質が血管内に入る可能性があるため単回静脈投与を施行したところ、投与直後は一部の生化学検査で若干の変動はあるもののすぐに正常化する傾向にあり、また死体解剖や病理検査で特記すべき変化は認められなかった。プラスミドDNAは、投与後1日で肺、肝臓、脾臓、また一部の動物で心臓、腎臓よりも検出された。また、各臓器よりHVJのゲノムRNAは検出されなかった。

以上より、HVJ-AVEリポソーム法の霊長類における安全性が確認された。

論文審査の結果の要旨

HVJ-AVEリポソーム法は、実験動物モデルにおいては閉塞性動脈硬化症や肝硬変に対するHGF発現遺伝子の導入や、メラノーマに対する遺伝子ワクチン投与に用いられ安全でしかも治療効果をあげている。しかしヒトを含めた霊長類に対する安全性は確認されていなかった。当該論文において、HVJ-AVEリポソーム法の安全性の評価が行われた。このなかで、生化学的検査値に一過性の上昇が認められるものの時間の経過とともに正常化が確認され、組織学的所見に異常は認められなかった。さらにHVJのゲノムが組織より検出されないことも明らかにし、導入したDNAは網内系に取り込まれることを示唆した。本研究はHVJ-AVEリポソーム法の臨床安全性試験の開始の可能性を高めるものであり、学位の授与に値すると考えられる。