

ユーザーインストラクション: アデノ随伴ウイルス (AAV) in vivo用

製品内容

カスタム超純粋アデノ随伴ウイルス (AAV) に関する製品情報を以下の表に示します。AAVウイルスタイター(力価)は品質検査証明書 (COA) に記載されています。

スケール	納入品	仕様
超純粋パイロット	カスタムウイルス	濃縮ウイルス (>10 ¹⁸ GC/ml, 4x25 ul)
	コントロールウイルス(オプション)	濃縮ウイルス (>10 ¹⁸ GC/ml, 4x25 ul)
超純粋中容量	カスタムウイルス	濃縮ウイルス (>10 ¹⁸ GC/ml, 10x50 ul)
	コントロールウイルス(オプション)	濃縮ウイルス (>10 ¹⁸ GC/ml, 10x50 ul)
超純粋大容量	カスタムウイルス	濃縮ウイルス (>10 ¹⁸ GC/ml, 10x100 ul)
	コントロールウイルス(オプション)	濃縮ウイルス (>10 ¹⁸ GC/ml, 10x100 ul)

注意: ウイルスをin vitro細胞培養に使用する場合、超純粋ウイルス精製は必要ありません。in vivo試験(すなわち動物実験)では、欠陥粒子や細胞破片および少量の培地成分を除去するために超純粋精製が不可欠です。これらの混入物は非常に大きな免疫応答を誘発します。超純粋精製は、さらにウイルスを生体内注入に適したレベルまで濃縮しています。

保存および取り扱い

- ベクタービルダーの超純粋AAVはin vivo実験への使用を推奨しています。当社の超純粋AAVはPBS組成バッファーに保存されています。
- お受け取り後は、長期保存の場合は-80 °C(少なくとも1年間は安定)、短期保存の場合(例: 2~3 週間)は-20 °Cで保存してください。
- AAVのバイアルは使用前に氷上で解凍し、実験中も氷上で取り扱ってください。解凍したAAVは生物学的活性を大きく低下させることなく、4°Cで 1-2 週間保存が可能です。
- AAVは解凍後、実験に使用する量に応じて少量ずつ分注し、再凍結できます。ウイルスを希釈する必要がある際はPBSによって行い、必ず**使用直前**に希釈するようにして下さい。

注意: 凍結融解を繰り返すことは避けてください。AAVは活性損失を最小限に数回は凍結融解が可能ですが、可能な限り避けることで最良の結果が得られます。

安全上の注意事項

VectorBuilderから提供される全てのAAV製品は、AAV末端逆位配列(ITR)によって挟まれた組換え導入遺伝子配列で構成されています。AAV ITRsは、野生型AAVゲノムのわずか6%から成り、ウイルス粒子にパッケージされた唯一のAAV特異的配列です。ウイルス構造遺伝子の大部分の除去はウイルスの複製能を欠損させ、ウイルス複製はトランスで提供するアデノウイルスヘルパーに依存します。組換えAAVウイルスは、ヘルパーウイルスではなくヘルパープラスミドの存在下で生合成されます。組換えウイルスは3つのプラスミド(cis ITR含有プラスミド、AAVレプリカーゼおよびカプシド遺伝子をコードするtrans プラスミド、アデノウイルスヘルパープラスミド)を用いた293T細胞の一過性トランスフェクションによって生合成されます。そして、異なるセロタイプ(血清型)カプシドタンパク質を有するベクターゲノムの偽型(シュードタイプ)化をもたらします。組換えAAVウイルスは、ヒトに病原性のない野生型AAVウイルスをベースにしています。野生型AAVウイルスの複製はアデノウイルスやヘルペスウイルスの存在に依存し、ヘルパーウイルスが存在しない場合は安定して宿主細胞のゲノムに組込まれますが、組換えAAVウイルスのゲノムは宿主細胞内に主にエピソームとして存在し、組込み頻度はあるとしても低いとされています。AAVウイルスはバイオセーフティレベル2 (BSL-2) 基準に従って取り扱うことを推奨します。バイオハザード物の取り扱い、保管および廃棄はすべて公的基準および所属機関の基準に従ってください。

推奨されるAAV血清型(セロタイプ)の組織指向性

組織	推奨 AAV セロタイプ
 平滑筋	AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10
 中枢神経系 (CNS)	AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV-PHP.eB
 末梢神経系 (PNS)	AAV-PHP.S
 脳	AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV8, AAV-DJ/8
 網膜	AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV2.7m8
 内耳	AAV1, AAV2, AAV6.2, AAV8, AAV9, AAV2.7m8
 心臓	AAV1, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV-DJ
 肺	AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV9, AAVrh10
 肝臓	AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV-DJ, AAV-DJ/8
 脾臓	AAV1, AAV2, AAV6, AAV8, AAV9, AAVrh10
 腎臓	AAV2, AAV4, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV-DJ, AAV-DJ/8
 脂肪	AAV6, AAV8, AAV9
 精巣	AAV2, AAV9
 脾臓	AAV-DJ, AAV-DJ/8
 脊髄神経	AAV2-retro
 内皮細胞	AAV2-QuadYF

注意: 目的遺伝子 (GOI) を運ぶITRsはAAV2ゲノム由来です。セロタイプの違いはカプシドタンパク質の違いで区別します。

尾静脈注射によるマウスへの投与プロトコール

尾側静脈を介した静脈内注射は、AAVをマウス組織に導入するための効率的な手段です。尾静脈注射は手術や麻酔を必要とせず、簡便であることから多用されています。他の注入部位として門脈と頸静脈等がありますが、これらは手術を必要とします。門脈注射と比較して、組織へのAAV導入においては尾静脈注射がより効率的です。

研究の目的に適した注入方法を検討するために、EGFP発現AAVなどのレポーターAAVを使用してパイロットテストを実施することができます。

準備するもの

- 成体マウス、20~25g、6週齢以上
- 超純粋AAV (>10¹³ GC/ml)
- 70% エタノール
- 熱源
- マウス保定器
- コットンガーゼパッド
- 27ゲージ1/2インチの針付き0.5 ml注射器

手順

1. 保定

マウスは市販の保定器を使用して身体的に固定することができます。尾が次の処置ために露出していることを確認して、保定器にマウスを穏やかに入れます。

2. 血管拡張

末梢血管を拡張させるために、注射の前に尾を温水(43°C)に浸すか、5~10分間ヒートランプの近くに動物を置いてマウスを温めてください。

Note: ヒートランプを使用する場合は、ケージの上約15~25cmにランプを配置し、5分間マウスを観察します。マウスがケージの隅に集まってきたら加熱を止めます。

3. 注射

- マウスが軸位置で保定器に入っていることを確認します。尾側静脈が見えるようにするために、尾を少し回転させます。70%エタノールで注射部位を消毒し、ガーゼパッドで拭き取ります。
- 27ゲージの針付き0.5 mlシリンジを使用して、少なくとも0.1 mlの超精製AAV粒子(総量を吸引します。針から空気を注意深く取り除きます。
- 尾の先端部分をつかみ、片側に少しひねって外側の静脈を確認します(図1)。針を浅い角度で挿入し(尾静脈が表面に比較的近い)、0.1mlの希釈した組換えAAVを静脈に注入します。針が正しく挿入されていれば、注射は抵抗なくスムーズに進行し、静脈は一時的に透明な色に変わります。局所的な腫れが観察された場合はウイルスは静脈ではなく尾の組織に注入されているため、注入を停止します。

Note: 尾静脈注射は尾の先端から約 1/3 の位置から注射を開始します。注入を失敗した場合、注入場所を失敗した箇所より尾静脈に沿って、さらに上に移動して行うことができます。

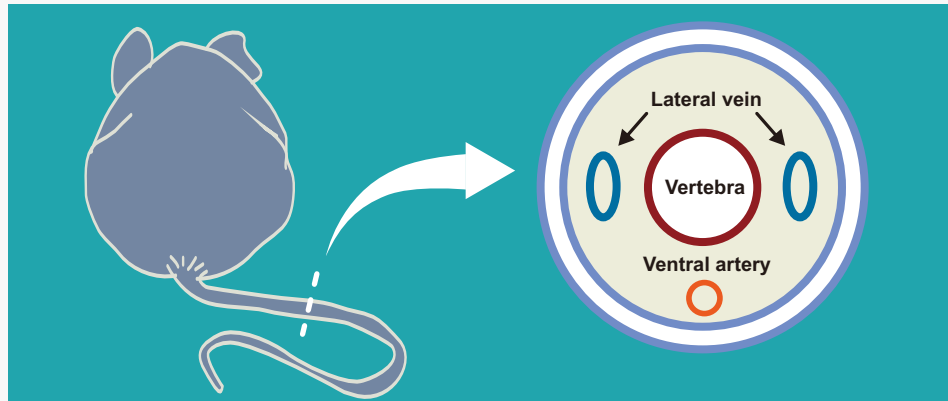


図 1. マウス尾側静脈および尾腹動脈の横断面図

- 注入し終わったら針を抜き、出血が止まるまで清潔なガーゼで押さえます。
- マウスをケージに戻します。

4. 検証

AAV粒子は静脈内注射後、組織に留まります。In vivo 形質導入の効率を検証するために、ウイルス注入後7日目に目的組織を摘出し、解析を行います。

結果例

in vivo 形質導入の成功例を図2に示します。

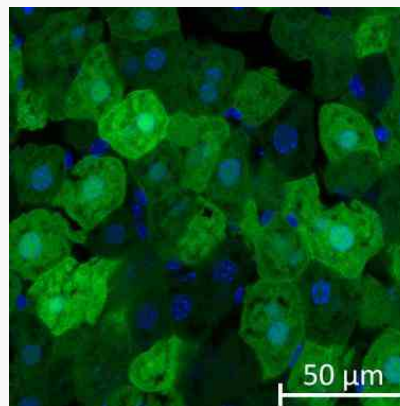


図 2. このユーザーインストラクションのプロトコールに従って、超純粋EGFP発現AAV9 2×10^{13} GC/kgをマウスに尾静脈注射して10日後、解析のために肝臓を摘出しました。画像は共焦点レーザー顕微鏡にて撮影。緑:EGFP、青:DAPI

マウス脳室内注入プロトコール

脳室内 (intra-cerebroventricular: ICV) 注射は左右の側脳室内に超純粋AAVを注入し、その後中枢神経系 (CNS) 内に拡散させる方法です。

脳室とCNSには二つの側脳室で作られる脳脊髄液 (CSF) が含まれています。CSFは側脳室から循環し始め、最終的にくも膜下腔に流れ込みます (図3)。くも膜下腔は脳、脊髄と仙骨の全体をカバーするため、ICV注射によってウイルスや他の治療薬を血液脳関門で遮断されずに中枢神経系に行き渡らせることが可能です。

研究の目的に適した注入条件を検討するために、EGFP発現AAVなどのレポーターAAVを使用してパイロットテストを実施することができます。

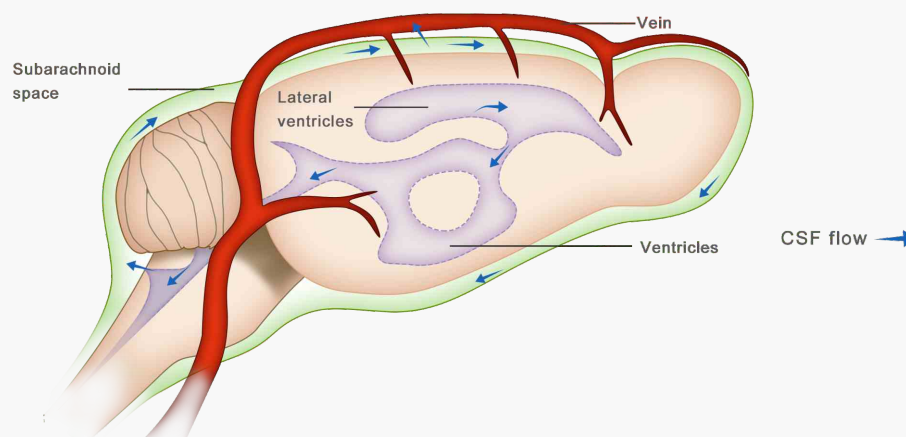


図 3. マウス脳脊髄液の循環経路

準備するもの

- 新生児マウス, 1~3 日齢
- 超純粋AAV (>10¹⁹ GC/ml 推奨)
- 70% エタノール
- 純エタノール
- 氷
- ドライアイス
- コットンガーゼパッド
- ヒーティングパッド または 容器
- 脳定位置固定装置
- 33~34 ゲージ 1/2 インチ針
- 10 ul シリンジ
- 15 cm pressure equalization (PE) tube

手順

1. 手術前準備

- 手術台を70%エタノールで拭きます。
- 脳定位置固定装置の溝に5 ml純エタノールを加え、冷やします。定期的にドライアイスを入れたエタノールを加え、手術台の温度を約0°Cに保ちます。同時にヒーティングパッドを温めておきます。

注意: マウスを死亡させないために、手術環境は0°C以下に保つようにして下さい。

2. 注入シリンジの準備

- 33~34 ゲージ針をPEチューブの端にしっかりとはめ込み、チューブのもう片方の端を10 ul シリンジを取り付けます。
- 5 ul の 超純粋AAV を針の中に吸い込み、注意深く空気を抜きます。
- シリンジと針を脳定位置固定装置に固定します。

3. 麻酔

マウスの意識を失わせるためにマウスを氷の上にやさしく置き、4分間待ちます。

4. 保定

意識を失ったマウスを脳定位置固定装置に保定します。

5. 注入

5.1 左側脳室

- マウスの頭部を 70% エタノールで拭き、ガーゼで余分なエタノールをふき取ります。
- 針をマウスのラムダ構造の真上に移動します (図 4)。スケールのxとy軸の値を記録します。
- 針を左側脳室の真上に移動します ($x + 1.2 \text{ mm}$, $y + 1.6 \text{ mm}$)。そしてz軸方向に調整して、頭蓋骨に針で穴を開けます。
- 頭蓋骨に穴を開けたらすぐにゆっくりと針をマウスから抜きます。

注意: 穴を開ける際は針の圧がかかっているため、z軸方向にほんの少しだけ動かします。穴を開けた後にすぐに針を除去すると頭蓋骨が元の位置に戻ります。

- 注意深く、再度針を穴の中にちょうど脳に触れるまで下げます。z軸方向のスケールの値を記録します。
- 左側脳室の中心に針先が来るように針をゆっくりとさらに2.5~3 mm 下げます。スケールの値は $x + 1.2 \text{ mm}$, $y + 1.6 \text{ mm}$, $z - 2.5 \sim 3 \text{ mm}$ となります。
- シリンジをゆっくりと押し、2.5 ul のウィルス溶液を左側脳室に注入します。AAVが脳から漏れないように、ウィルス注入後は一分以上待ちます。
- ゆっくりとz軸方向に針を引き上げ、マウスから針を抜きます。この工程は2分ほどかけて行います。早く抜きすぎるとAAVの漏れにつながります。

5.2 右側脳室

- 針を右側脳室の真上に移動します ($x - 1.2 \text{ mm}$, $y + 1.6 \text{ mm}$)。そしてz軸方向に調整して、頭蓋骨に針で穴を開けます。
- 頭蓋骨に穴を開けたらすぐにゆっくりと針をマウスから抜きます。

注意: 穴を開ける際は針の圧がかかっているため、z軸方向にほんの少しだけ動かします。穴を開けた後にすぐに針を除去すると頭蓋骨が元の位置に戻ります。

- 注意深く、再度針を穴の中にちょうど脳に触れるまで下げます。z軸方向のスケールの値を記録します。
- 右側脳室の中心に針先が来るように針をゆっくりとさらに2.5~3 mm 下げます。スケールの値は $x - 1.2 \text{ mm}$, $y + 1.6 \text{ mm}$, $z - 2.5 \sim 3 \text{ mm}$ となります。
- シリンジをゆっくりと押し、2.5 ul のウィルス溶液を左側脳室に注入します。AAVが脳から漏れないように、ウィルス注入後は一分以上待ちます。
- ゆっくりとz軸方向に針を引き上げ、マウスから針を抜きます。この工程は2分ほどかけて行います。早く抜きすぎるとAAVの漏れにつながります。

注意: マウスを死亡させないために、30分以上マウスを低温にさせないようにして下さい。

6. 回復

注入後すぐにマウスを温めておいたヒーティングパッドの上に載せ、体温と動きが回復するまで待ちます。

7. 観察

母マウスのいるケージに戻します。さらに実験を進めるまで体調を観察します。

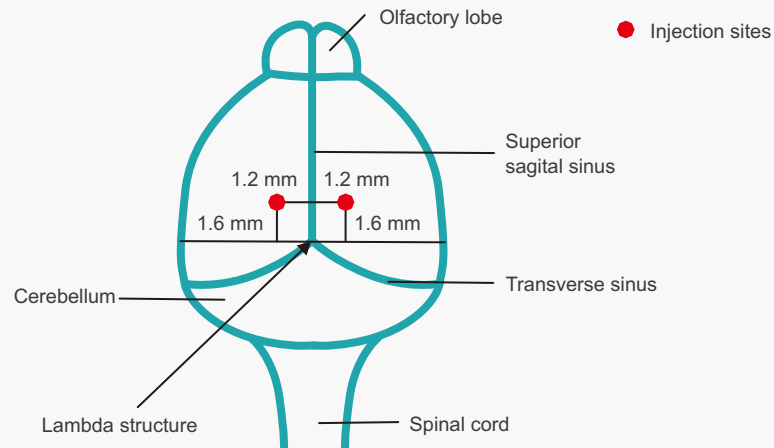


図 4. マウスラムダ構造と注入箇所を真上から見た図

結果例

図5にin vivo 形質導入の成功例を示します。

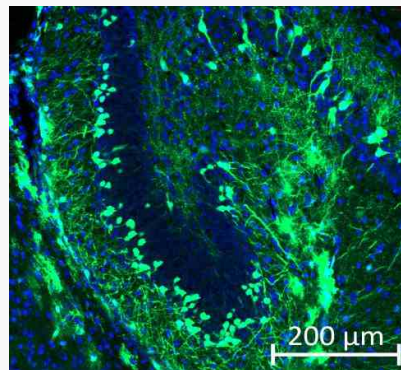


図 5. このユーザーインストラクションのプロトコールに従って、超純粋EGFP発現AAV9、 2×10^{13} GC/kgをICVIにて注入して10日後、解析のために脳を摘出し、解析しました。海馬の画像を共焦点レーザー顕微鏡にて撮影。緑：EGFP、青：DAPI

マウス In Vivo 注入における推奨使用量

マウス組織に超純粋AAVを形質導入する際の推奨注入容量を以下の表に示します。(注入方法は異なります)

注入部位	推奨容量
側脳室	5 ul
側坐核	0.05~0.1 ul
腹側被蓋野	
海馬	
頸静脈	≥100~250 ul
尾静脈	100~250 ul
肺	10 ul/site, 全部で5か所
腹腔	200~250 ul
硝子体液	1~2 ul
心臓	1.5~3 ul/site, 全部で5か所
筋	10 ul/site, 全部で4か所

注意: 全ての組織において、AAVIによって導入された遺伝子の発現は2~6か月続きます。通常、発現のピークは注入後2~4週間後に観察されます。