

# カニクイザルの胸腺から繰り返し採材する手技検討及びこれらの操作が生体に及ぼす影響

Study on Repeated Biopsy Method of the Thymus in Cynomolgus Monkeys and Effects of These Procedures on the Animal Conditions

○浜島敏之<sup>1</sup>, 須山由美<sup>1</sup>, 林良太<sup>1</sup>, 葛西義明<sup>2</sup>, 入口翔一<sup>3</sup>, 大塚博比古<sup>1</sup>, 福井英夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Axcelead Drug Discovery Partners株式会社 研究本部 非臨床安全性研究,

<sup>2</sup> 武田薬品工業株式会社 再生医療ユニット, T-CiRA, <sup>3</sup>京都大学 iPS細胞研究所, T-CiRA



## 背景及び目的

サル免疫系はヒトに近いと考えられているため、サルのデータは再生医療におけるヒトへの外挿性を予測する上で非常に有用である。胸腺機能を末梢血中でモニターする手法として、胸腺から新たに移出されたT細胞 (recent thymic emigrants; RTE) をモニターする方法があるが、ヒトのRTEのイムノフェノタイプ型がサルと同等でないことから(Comp Med 2016; 66: 308-23)、サルへの応用が困難である。そのため、胸腺生検によるリンパ球の解析や病理評価が求められる場合がある。本検討では、サルでの胸腺機能の経時的変化を同一個体で評価する為に、胸腺から繰り返し採材する手法及びそれが生体に与える影響について検討した。

## 材料

### 使用動物

- カニクイザル(フィリピンあるいは中国産)
- 予備検討: 雌雄各1例 計2例(開始時: 4年9ヵ月及び6年)
- 検討①: 雄2例(開始時: 5年1及び8ヵ月)
- 検討②: 雌雄各1例 計2例(開始時: 6年及び6年4ヵ月)

### 飼育条件

飼餌: 固型飼料 [Certificate diet PS-A, オリエンタル酵母, 100g/日 (摂餌量測定日) あるいは約100g/日], 補助飼料あり, 手術前日は16~24時間絶食

給水: 水道水の自由摂取

照明: 7:00-19:00点灯 (12時間周期)

環境エンリッチメント: 動物用玩具あり

## 方法(手術の手順のみ)

### 手術の操作手順(胸腺採取以外)

#### 【前処置】

- ペニシリンiv(約10万単位/頭)\*、硫酸アトロピンim(0.05 mg/kg)、塩酸メドミジンim(20 µg/kg)、ブトルファンールim(0.2 mg/kg)、アルファキサロンiv(1 mg/kg)
- 気管内にチューブを挿管、術部の剃毛、術部の消毒\*

#### 【術中】

- 人工呼吸 (換気量10-20 mL/kg/回、換気回数10-12回/分)
- イソフルラン(1.0-2.5%濃度[酸素で気化])で麻酔維持

#### 【術後(当日)】\*

- ペニシリン滴下(約2万単位/mL)、縫合、胸腔内陰圧操作、閉胸
- 覚醒後に気管チューブを抜管、ポビドンヨード及びゲンタマイシンの術部塗布、メロキシカムim(0.2 mg/kg)、アチパメゾールim(150 µg/kg)

#### 【術後(翌日以降)】\*

- 手術翌日: イソジン及びゲンタマイシンの術部塗布
- 手術翌日から3日間: ペニシリンim(約10万単位/頭)、メロキシカム im(0.2 mg/kg)
- 手後約10日後: 抜糸

\*: 予備検討実験では実施せず、検討終了後に、動物は麻酔下で放血・安楽死

## 予備検討. 胸腔鏡法と開胸法の比較

### <実験目的>

胸腔鏡法と開胸法の操作を雌雄各1例の動物で順に行い、採材の可否を含め比較検討した。

### <実験方法>

#### 胸腔鏡法

第6肋間の皮膚をメスで切開し、鉗子で肋間を小さく開胸した後に胸腔鏡\*を挿入しモニター画面で胸腺を確認。他に2箇所を切開し剪刀と鉗子を挿入し、胸腺の一部を採材

\*胸腔鏡は内科腹腔鏡(A5213、光学視管45° 10 mmφ、オリンパス)で代用

#### 開胸法

右あるいは左の第3あるいは第4肋間を切開し、開胸器を使用し、肋間から胸腔内の胸腺を視認。鉗子で胸腺を掴みながら、剪刀で胸腺の一部を採材

### <結果>

胸腔鏡法: 胸腺の描出が困難で採材できなかった。  
開胸法: 胸腺を直視しながら(第6肋間とは違い第3肋間では開胸部の真下に)、著しい出血もなく採材できた。

### <考察>

胸腔鏡法: 熟練した技術と適切な手術器具の整備が必要と判断された。  
開胸法:

- 直視下で胸腺が採取可能で摘出ミスが起こりにくい。
- 1箇所2 cm程度の切開で済み、他に2箇所穴を開ける必要がある「胸腔鏡法」と比べて動物の負担が小さいと思われる。
- 胸腺を真下に直視できる、左右の第3及び4肋間を切開箇所を使い、複数回採材できる可能性がある。

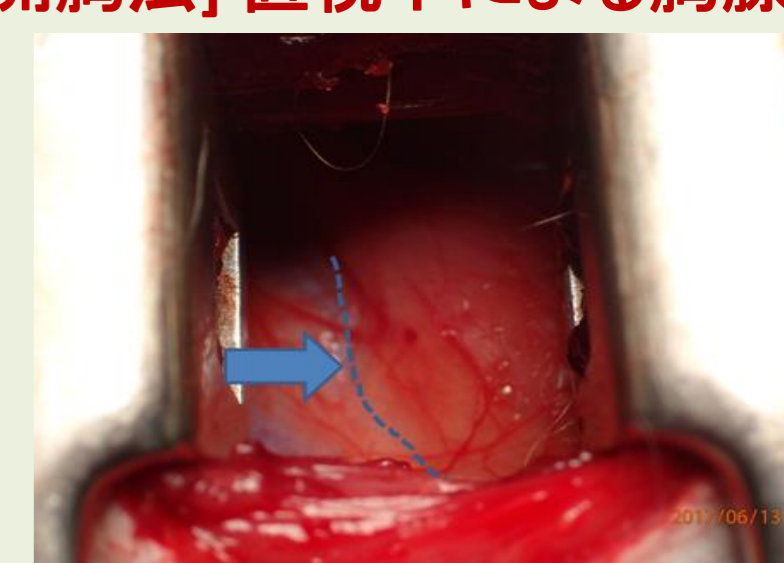
### <小括>

胸腺を繰り返し採材する手法として、胸腔鏡法より開胸法が妥当と考えられた。

### [胸腔鏡法] 胸腔鏡による胸腺像



### [開胸法] 直視下による胸腺像



※矢印の点線箇所は胸腺を示す。

## 検討①. 胸腺の繰り返し採材の影響(2週間間隔で3回)

### <実験目的>

雄2例に開胸法で2週間間隔で計3回の胸腺採材を行い、採材の可否と繰り返し採材の生体に及ぼす影響を検討した。

【別目的で1及び2回目の間に生理食塩水を5日間iv】

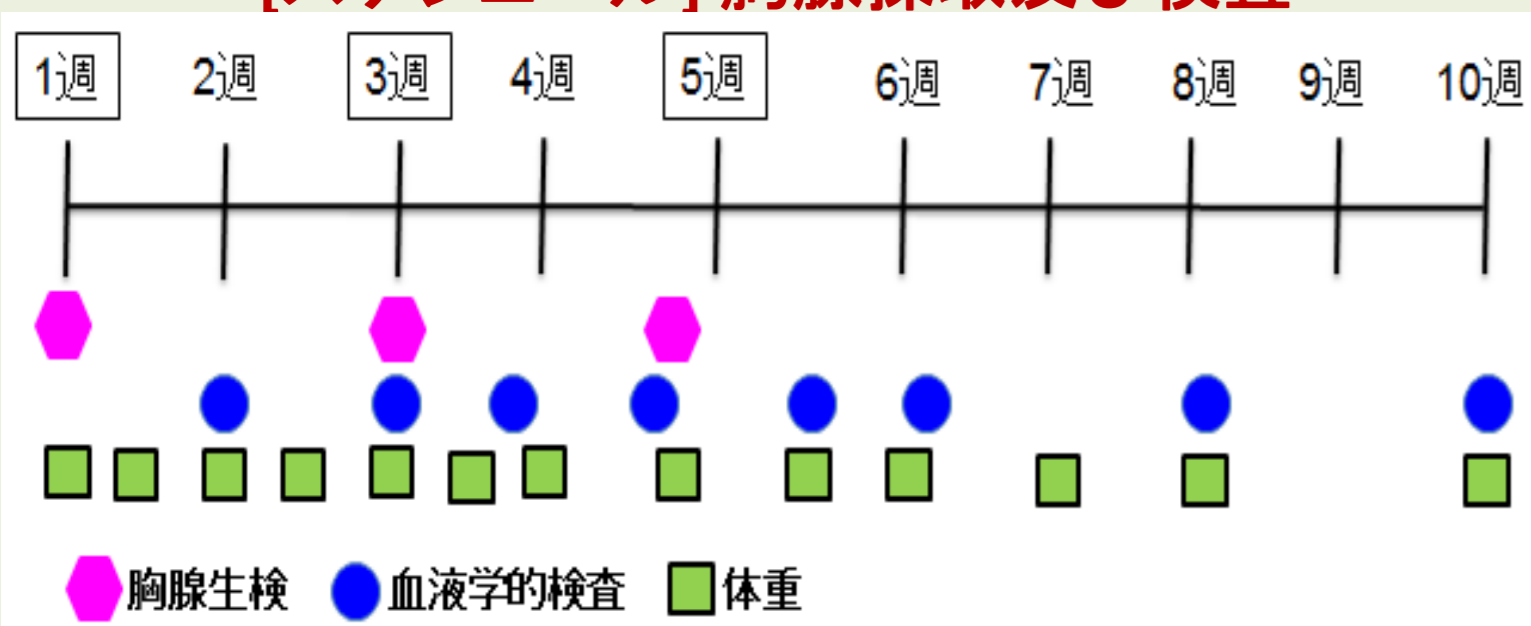
### <胸腺採取>

左側(1及び3回目)又は右側(2回目)の第3又は4肋間から開胸法(上述)で胸腺の一部を採材

### <実施検査>

一般状態観察(1回/日以上)、体重(2回/週~1回/2週)、摂取量(毎日)、血液学的検査(2回/週~1回/2週)、採取胸腺の重量確認及び病理組織学的検査

#### [スケジュール] 胸腺採取及び検査

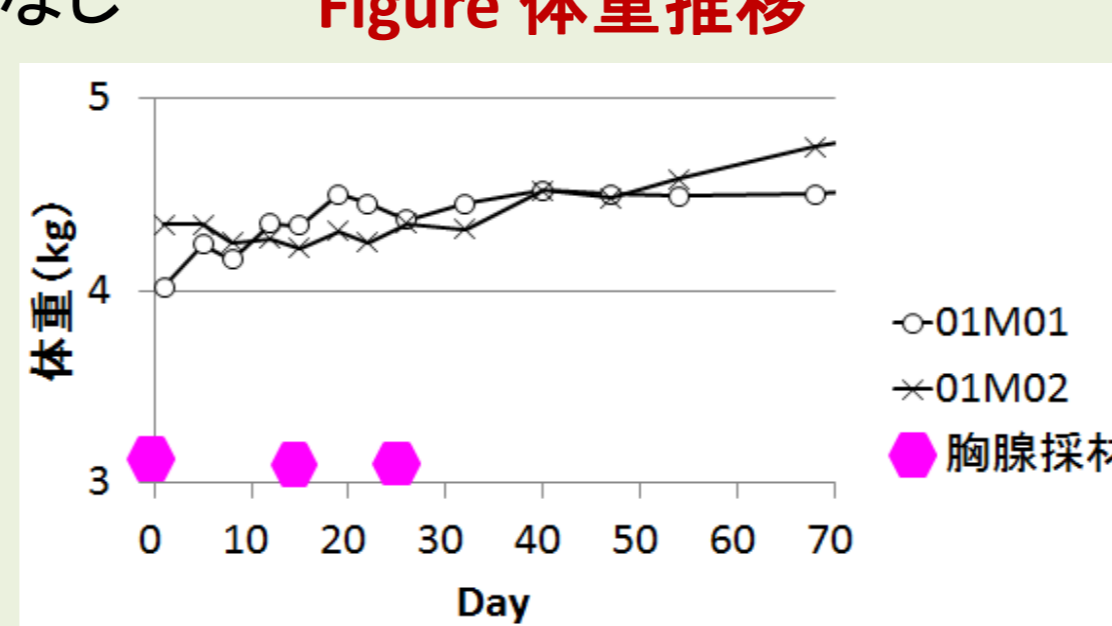


### <結果>

一般状態観察: 糞量減少が2例に各1回、赤色便が1例に1回(初回胸腺採材前から下痢あり試験期間継続)

体重: 影響なし

#### Figure 体重推移



摂餌量: 影響なし(手術前後などの一過性低下はあり)

血液学的検査: 変動はみられたが、顕著な変化はなかった(初期値は未測定により不明)。

#### Table 血液学的検査の推移

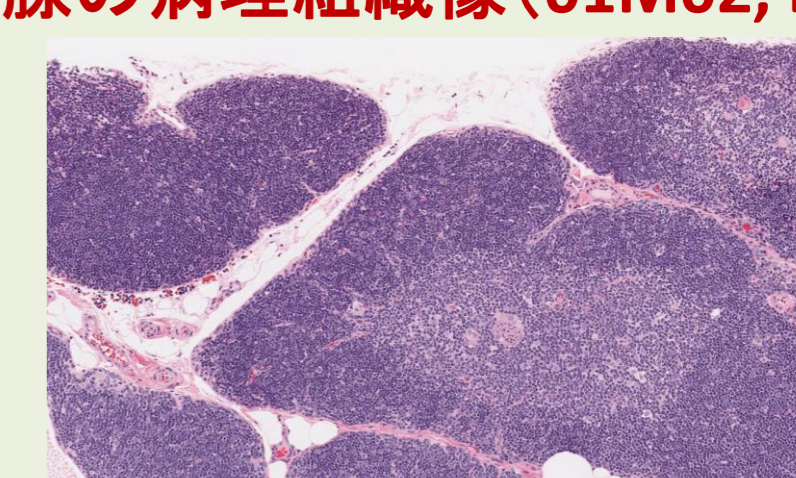
Animal number	Day	Erythrocytes	Reticulocytes	Platelets	Leukocytes	Leukocytes, differential	
		(x10 <sup>9</sup> /µL)	(x10 <sup>9</sup> /µL)	(x10 <sup>9</sup> /µL)	(x10 <sup>9</sup> /µL)	Neutrophils (x10 <sup>9</sup> /µL)	Lymphocytes (x10 <sup>9</sup> /µL)
01M01	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	8	540	10.2	51.0	129	92.2	31.8
	15	526	15.2	68.0	105	62.2	38.6
	19	516	13.0	54.4	114	59.4	48.4
	26	527	19.9	50.2	120	78.5	37.6
	32	512	19.5	57.0	84	19.6	58.1
	40	551	12.1	63.1	111	35.4	68.8
	54	623	5.2	40.5	98	29.5	62.3
	68	660	5.5	43.8	111	32.2	71.8
	01M02	1	ND	ND	ND	ND	ND
7		528	6.2	37.9	105	63.2	38.2
14		522	6.3	39.8	100	53.5	42.2
18		503	5.6	37.0	97	52.9	38.9
25		500	6.8	36.0	96	55.6	36.5
31		503	7.1	34.5	95	59.6	31.0
39		518	6.7	34.5	92	51.4	36.2
53		537	6.2	32.1	107	62.0	40.4
67		535	5.1	31.3	95	44.1	44.1

胸腺の重量及び病理組織学的検査: 2例とも毎回約50 mg以上の組織が採材できた。2回目に病理評価は可能であったが、3回目は採取組織で胸腺を病理組織学的に確認できなかった。

#### Table 胸腺の病理組織所見の推移

Animal No.	Day 1	Day 15	Day 26 or 28
01M01	Not sampled	Normal	No thymus in sampled specimen
01M02	Not sampled	Normal	No thymus in sampled specimen

#### 胸腺の病理組織像(01M02, Day 15)



### <考察>

3回目の胸腺採材の結果は、短期間に実施した過度な手術侵襲ストレスにより胸腺が萎縮したためと考えられた。

### <小括>

胸腺の繰り返し採材ができ、一般状態、体重、摂餌量及び血液学的検査では懸念される変化もなかった。しかし、繰り返し採材で胸腺に影響がみられた。

## 検討②. 胸腺の繰り返し採材の影響(4~5週間間隔で3回)

### <実験目的>

雌雄各1例に開胸法で間隔を4~5週間に延ばし計3回の胸腺採材を行い、繰り返し採材の生体に及ぼす影響を検討した。

【別目的で腋窩リンパ節[2~3週間間隔で5回]及び骨髄液(脛骨吸引)[4~5週間間隔で3回]も採取】

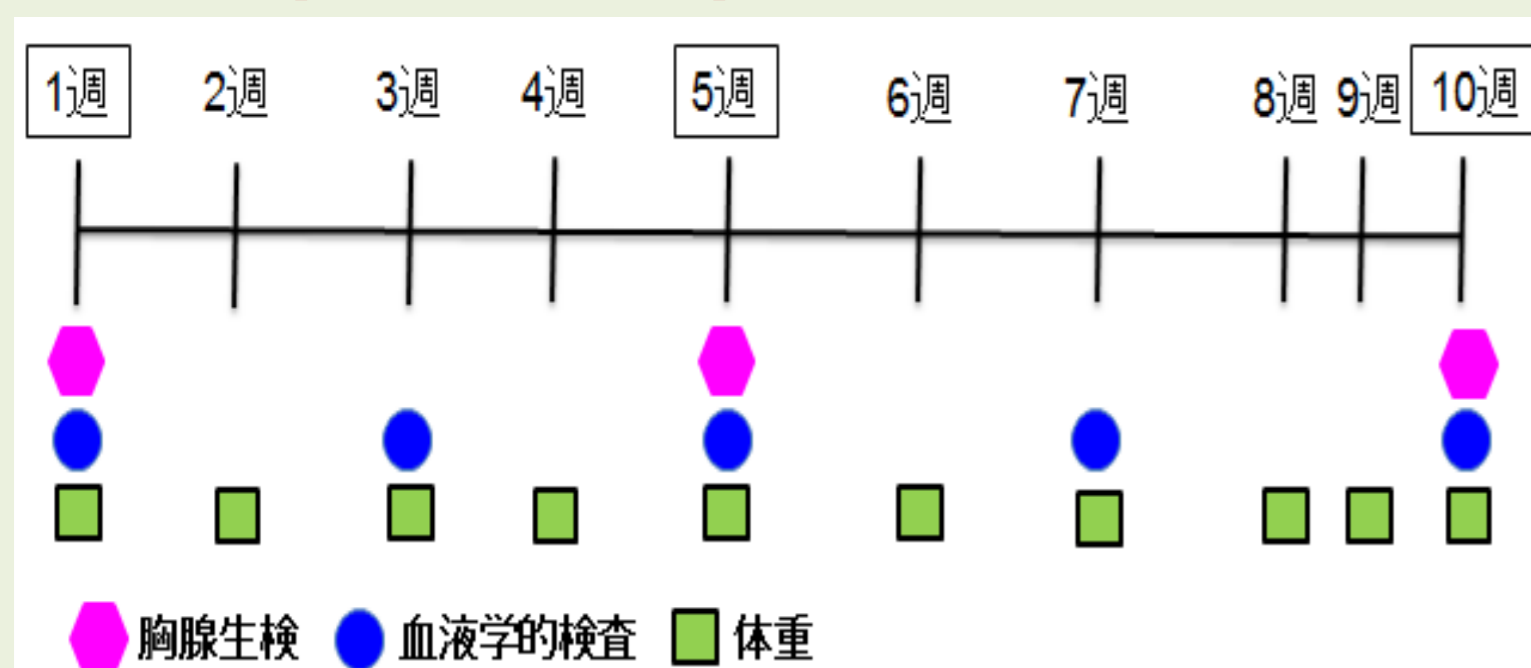
### <胸腺採取>

左側(1及び3回目)及び右側(2回目)の第3又は4肋間から開胸法(上述)で胸腺の一部を採材

### <実施検査>

一般状態観察(1回/日)、体重(1回/週)、血液学的検査(2あるいは3週間間隔)、採取胸腺の重量確認及び病理組織学的検査

#### [スケジュール] 胸腺採取及び検査

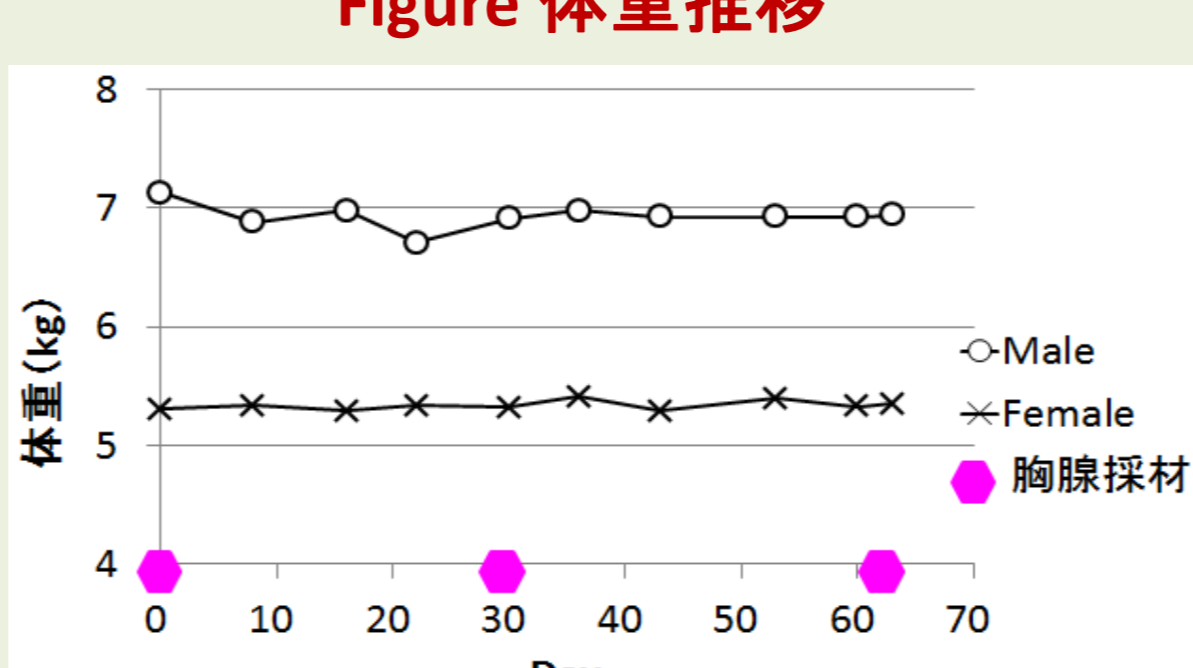


### <結果>

一般状態観察: 術部の一過性の紫斑があったが出血や感染を示す変化なし[リンパ節生検の影響によると思われる腹部の腫脹が一過性にみられた]

体重: 雄で一過性のわずかな低下

#### Figure 体重推移



血液学的検査: 赤血球数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度が2例ともわずかに低下、白血球数及び好中球が1例でわずかに増加

#### Table 血液学的検査の推移

Animal	Day	Erythrocytes	Reticulocytes	Platelets	Leukocytes	Leukocytes, differential	
		(x10 <sup>9</sup> /µL)	(x10 <sup>9</sup> /µL)	(x10 <sup>9</sup> /µL)	(x10 <sup>9</sup> /µL)	Neutrophils (x10 <sup>9</sup> /µL)	Lymphocytes (x10 <sup>9</sup> /µL)
Male	1	633	1.7	44.8	106	43.5	44.5
	16	592	2.2	49.5	131	69.1	51.1
	30	593	2.2	49.1	113	48.2	54.3
	43	594	1.8	44.5	80	22.8	45.0
	63	601	1.7	40.2	110	40.8	58.7
Female	1	609	9.6	36.8	141	60.5	74.1
	16	533	10.9	39.5	189	136.8	44.7
	30	555	8.3	41.4	187	136.0	43.8
	43	549	5.9	36.0	112	38.9	64.1
	63	558	7.0	35.2	163	108.5	47.9

胸腺の重量及び病理組織学的検査: 2例とも毎回約200 mg以上の組織が採材でき、病理組織学的検査で胸腺が確認。初回採取時から加齢性変化と思われる萎縮があり、3回目まで繰り返し採材による変化なし

#### Table 胸腺の病理組織所見の推移

Animal	Day 1	Day 30	Day 63
Male	Atrophy (Moderate)	Atrophy (Moderate)	Atrophy (Moderate)
Female	Atrophy (Mild)	Atrophy (Mild)	Atrophy (Mild)

### <小括>

胸腺の採取間隔を延ばした場合、胸腺に影響はみられなかった。その他、懸念される変化もみられなかった。

## 結論

サルの胸腺から繰り返し採材するために簡便な開胸法が適していること、及び採材の間隔は4週間程度であれば手術侵襲ストレスに起因した変化などは認められないことが明らかとなった。

無断転載禁止

演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業・組織および団体等はありません。