

て写真撮影を行って観察した。

PCR 反応の検出感度を確認するために BVDV を 104.0TCID<sub>50</sub>以上含む混合生ワクチンを連続希釈して RT-PCR実験に供して電気泳動により確認した(図2)。図には希釈率10<sup>-4</sup>より高い希釈率の部分を示したが、図から明らかなように10<sup>-5</sup>より高い希釈率ではBVDVのバンドは一切検出されなかった。この結果から実験系は正確に機能していることがわかる。希釈率10<sup>-4</sup>までは全ての希釈率で検出されたことから、当該生ワクチンの仕様書に記載された力価を参考にすると(104.0TCID<sub>50</sub>以上)、1 TCID<sub>50</sub>相当まで検出できたと概算できる。

この実験条件下で各血清サンプルを分析し、結果を図3及び表1に示した。図3の中のレーンの説明にA, A', aと記述されたアルファベットはそれぞれ販売元、製造元、製品ロット番号を示しており、表1に示した記号に一致させている。販売元、製造元の会社名は伏せることとする。

この実験結果から明らかなように、ほぼ全ての血清からBVDVのシグナルが検出され、僅かにC'社が製造したロットbのみが陰性であった。実験の精度は高く、繰り返し行った実験で同じ結果を得た。

市販されている培養用の血清からBVDVのシグナルが高頻度に観察されたことは、当然のことながらこれらを利用して細胞培養の上清からも検出されるであろうことが容易に想像できたので、ATCCならびにJCRB細胞バンクで保存されている細胞についての調査も実施することとした。この結果については、表2に示した。

表2は、ATCCならびにJCRBから入手した細胞で十分に品質管理されている細胞である。それらを培養せずにアンプルの封を切って直接PCR実験に使用した。結果は明らかなようにほとんどの細胞上清からBVDVのシグナルが検出され、高頻度に汚染されているという結果を得ることとなった。僅かに、JCRB0111 VERO, CRL1587 VERO76, CCL33 PK-15, CCL 10 BHK21, CCL92 3T3-Swiss の5種からは検出されなかった。各細胞は長期間液体窒素下で保存されていた細胞であるため、これらの細胞を培養した当時の血清を入手することはできない。そのため、当時使用した血清が汚染されていたか否かの確認はできない。そのため類推するほか無いのであるが、表1の結果を考慮すると、各細胞を培養した血清中にBVDVが混入していたと考えるのが妥当であろう。なお、CCL33, CCL10, CCL92の3種については、それぞれ該当する動物種について一種類の細胞についてのみ実験を行っているもので、この結果をもってこれらの動物種由来の細胞はBVDVの汚染を受け難いというような結論を下すことはできない。今後の検討課題である。

もし、検出されたBVDVが血清のみに由来するものであれば、BVDVフリー血清で培養すれば、自然に消滅してゆくことが予測される。そこで、現在この点を確認するために三菱化学PFCS血清を使用して培養することを現在試みている。現時点では予備的な実験結果であるが、ヒト由来の細胞については確かに速やかにBVDVのシグナルが消滅することを確認している。しかし、ウシ由来の細胞の場合は10継代ほど培養してもシグナルが消失することは無かった。

#### D. 考察

これまで、細胞培養に使用する血清を通じてBVDVが混入してくる可能性が度々指摘されてきたが、検出感度などの問題からそのたびに曖昧なまま放置されてきた。今回この曖昧さを解消する目的でPCR法による検出システムを確立し、血清と細胞の両者についてBVDVによる汚染実態を把握するための調査研究を実施した。実験結果を見れば明らかなように、BVDVゲノム断片が検出される血清と細胞は想像以上に蔓延しているように思われた。

わが国ではそれほど話題になることも少ないが、米国での畜産業は国の基幹産業として最重要課題と位置づけられており、それに打撃を与えるかもしれないBVDVのようなウイルスの海外からの侵入にはことの他神経質であり、その防疫体制は大変厳しいものである。わが国で使用されている研究用のウシ血清はそのような国から輸入されるので、まさかそれからこれほど高頻度にBVDVのシグナルが検出された点についてはあらためて驚きを禁じ得ない。

しかし、ここで、注意しておかなければならないのは、今回の実験結果からは①感染性BVDVが混入している場合、②非感染性(不活化)BVDVが混入している場合、③BVDVのゲノム断片が混入している場合の3つの可能性が考えられるということである。

感染性、非感染性に限らずウイルス粒子が混入していれば、ウイルスキャプシド抗原(Virus Capsid Antigen, VCA)を認識する抗体を用いてウイルス粒子として確認できることになるが、感度と迅速さを考慮すると、細胞バンクとしてのスクリーニング検査を目的とした場合にはPCR法を用いるのが現実的であろう。

PCR法で検出出来るのは、実験に供したプライマーDNAに挟まれたごく一部のゲノム領域のみであるため、断片化されたBVDVゲノムが混入していても検出される。そのためこの結果からすぐにあらゆる細胞が生きた感染性BVDVに汚染されていると結論を出すことは尚早であろう。そして、この点がPCR法の技術的限界でもある。

予備的な実験によればヒト細胞からBVDVが検出されたとしても、BVDVフリーの血清に置き換えることに

よって速やかに消失して、以後継続してBVDVが検出されることは無いようである(予備的な実験結果)。そのため、ヒト細胞の培養上清から検出されたBVDVはヒト細胞中で持続的にウイルスを産生しているものではないと思われる。従って、この結果を考えれば、ヒト細胞を使用する限りBVDVによる汚染が実験結果を乱すような事態についてはそれほど心配する必要は無いと思われる。とはいえ、火の無いところに煙りは立たないわけで、BVDVがどこかに居たからこそ断片であったとしても今回検出されるに至ったという点については考慮する必要があると思われ、細胞バンクとしては疑わしきは用いずの原則を遵守するべきであろう。

一方、ヒト細胞の場合とは異なり、ウシ由来の培養細胞については十分な配慮をする必要があると思われる。ウシに由来する細胞の例としてMDBK細胞を取り上げBVDVフリー血清を使用した場合にウイルス遺伝子が消滅するか否かをヒト細胞の場合と同様調べてみた。しかし、この場合には、いつまでも培地中からBVDVが検出され続け、ヒト細胞の場合のように消滅してしまうということはないようである(予備的な調査)。そのため、BVDVはウシ細胞中で持続感染していることが強く示唆されたのである。詳細な実験を実施していないので断定的な結論を出すのは時期尚早かと思うが、その可能性は十分に大きいことが予想される。この点についてさらに検討するためには、BVDVに汚染されていないウシ由来の培養細胞を手に入れなければならないのであるが、少なくともバンク等で保管している既存のウシ由来細胞については全てBVDVが検出されてしまっている。そのため、新たにBVDVの感染の無い細胞系をBVDVフリー血清を用いて樹立する必要があり、現在この試みを開始しているところである。

## E. 結論

本研究の結果、我国で使用されているウシ由来の血清がBVDVによって広範に汚染されていることが明らかになった。その影響と思われるが、細胞の上澄も広くBVDVに汚染されている実体が明らかになった。しかし、ヒト由来の細胞の場合、BVDVフリー血清で培養することによってすみやかに汚染が排除されることが示されたが、ウシ由来細胞の場合はBVDVフリー血清で培養しても持続的なBVDVの検出があり、持続感染していることが示唆された。

今後、細胞バンクでは、可能な限りBVDVフリー血清を採用してBVDVフリー細胞を保存することを心がける必要のあることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 日本組織培養学会編、細胞バンク・遺伝子バンク、共

立出版

2. 水沢 博 JCRB/HSRRB 細胞バンク培養細胞研究資源データベース、蛋白質核酸酵素 43(13), 2015-2019 (1998).

### 2. 学会発表

1. Mizusawa, H., Slow but steady movement of cell banking in Japan, Congress on in vitro biology, 1998 May 30-June 3, Las Vegas,
2. 水沢 博, Quality Control of Cell Lines at Japanese Collection of Research Bioresources The 1st Korean Cell Line Research Workshop, 1998. 6. 18, Seoul National University,
3. 水沢 博, Japanese Cell Lines in JCRB Cellbank, The 1st Korean Cell Line Reserach Workshop, 1998. 6. 18, Seoul National University,
4. 田辺秀之、中川ゆづき、峰岸大輔、橋本雄之、田中憲徳、押村光雄、祖父尼俊雄、水沢博, Fish 法によるヒト単一染色体保持雑種細胞株パネルの性状解析, 日本組織培養学会第70回大会、1998、5月、21日-5月22日、仙台市復興記念会館,
5. 増井 徹、高田容子、岩下新太郎、樽松美治、田辺秀之、祖父尼俊雄、水沢 博, 増殖停止関連遺伝子 eti-1 のアポトーシス誘導活性, 日本組織培養学会第70回大会、1998、5月、21日-5月22日、仙台市復興記念会館,
6. 増井 徹、高田容子、岩下新太郎、田辺秀之、祖父尼俊雄、水沢 博, 増殖停止関連遺伝子 eti-1 のアポトーシス誘導活性, 第57回日本癌学会総会, 横浜国際平和会議場(パシフィコ横浜), 1998. 9. 30-1998. 10. 2
7. 田辺秀之、中川ゆづき、峰岸大輔、橋本雄之、田中憲徳、押村光雄、祖父尼俊雄、水沢博, 染色体ペインティング法および ReverseFISH 法によるヒト単一染色体保持雑種細胞株パネルの解析, 日本人類遺伝学会第43回大会, 10月14日-16日、山梨県甲府市. 山梨県立県民文化ホール.
8. 田辺秀之、峰岸大輔、増井 徹、祖父尼俊雄、水沢博, FISH法によるテロメアおよびセントロメアDNAを指標とした各種培養細胞株の染色体分析, 日本染色体学会、11月29・30日、広島国際会議場
9. 田辺秀之、峰岸大輔、増井 徹、祖父尼俊雄、水沢博, ヒト腫瘍細胞株におけるテロメア癒合(telomeric associateion; tas)について, 第16回染色体ワークショップ, 1999. 1. 30-2. 1, 葉山

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特に無し。

## 図及び表の説明

### 図1

ウイルスの検出に利用したBVDVウイルスの領域とPCR

### プライマーの塩基配列

Pestivirus の polyprotein 遺伝子の 5' 側 non-coding 領域を使用した. この領域について R1 プライマーで cDNA を合成したのち, この cDNA を鋳型として F1-R1 プライマーで 1 回目の PCR を行い, 引き続いて F2-R2 プライマーで 2 回目の PCR を実施した.

### 図 2

連続希釈生ワクチンからの BVDV の PCR 法による検出

生ワクチンを 10 倍ずつ連続希釈を行ない, ネステッド PCR 法を実施した. 生ワクチンの希釈率は図中の各レーンに明記した. レーン 8 は陽性対照, レーン 9 は陰性対照である.

### 図 3

各種血清からの BVDV ゲノム断片の PCR 法による検出

各レーンのサンプルは図に示したとおりである. レーン番号に記載したアルファベットで記述した血清のコードは, 表 1 に使用したコードに一致している. 陽性対照と陰性対照はそれぞれレーン 23, 24.

### 表 1

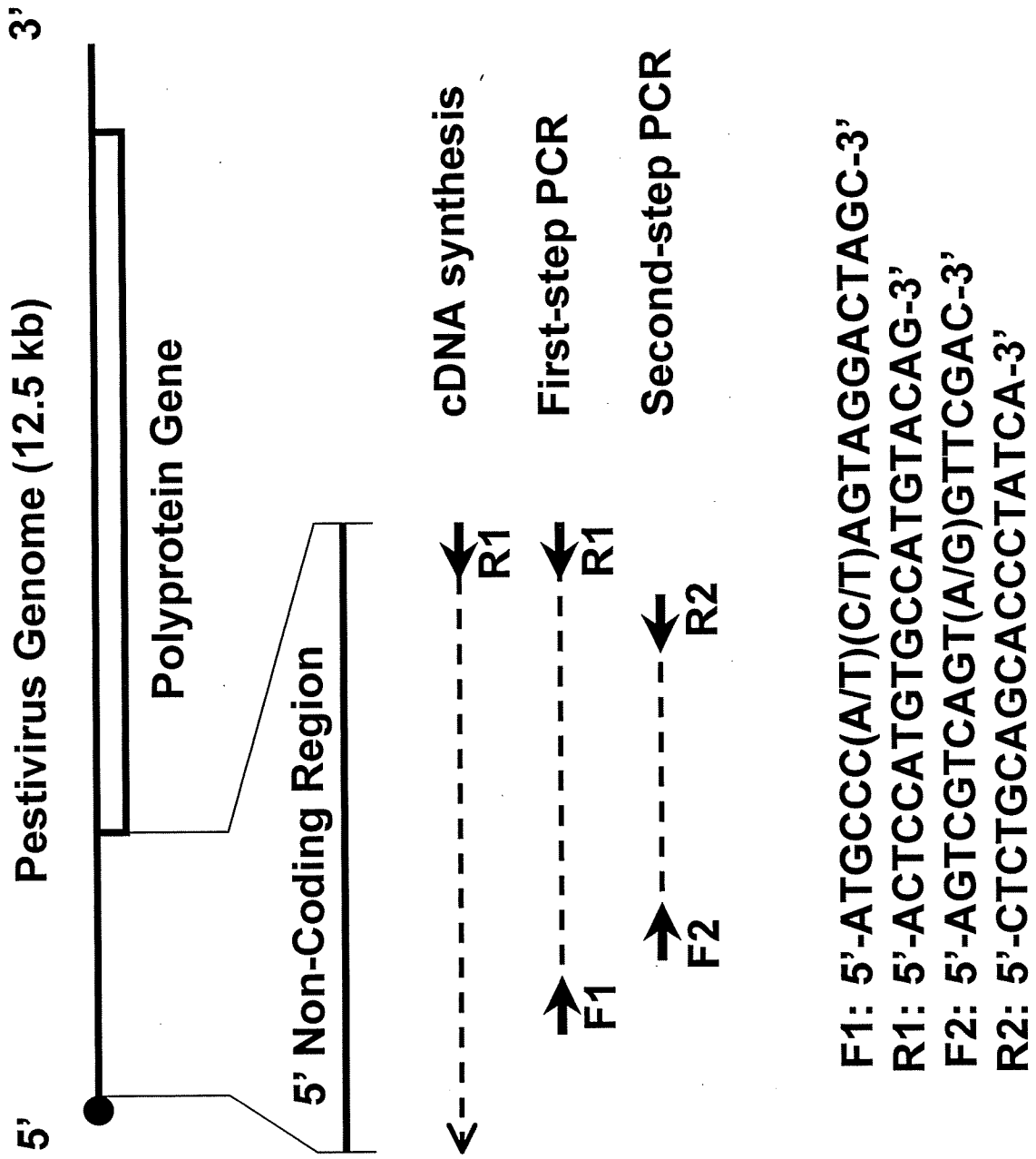
各種血清からの BVDV ゲノム断片の PCR 法による検出

実験は 2 回繰り返して実施した. 販売元と製造元については名称を伏せ, コード化した.

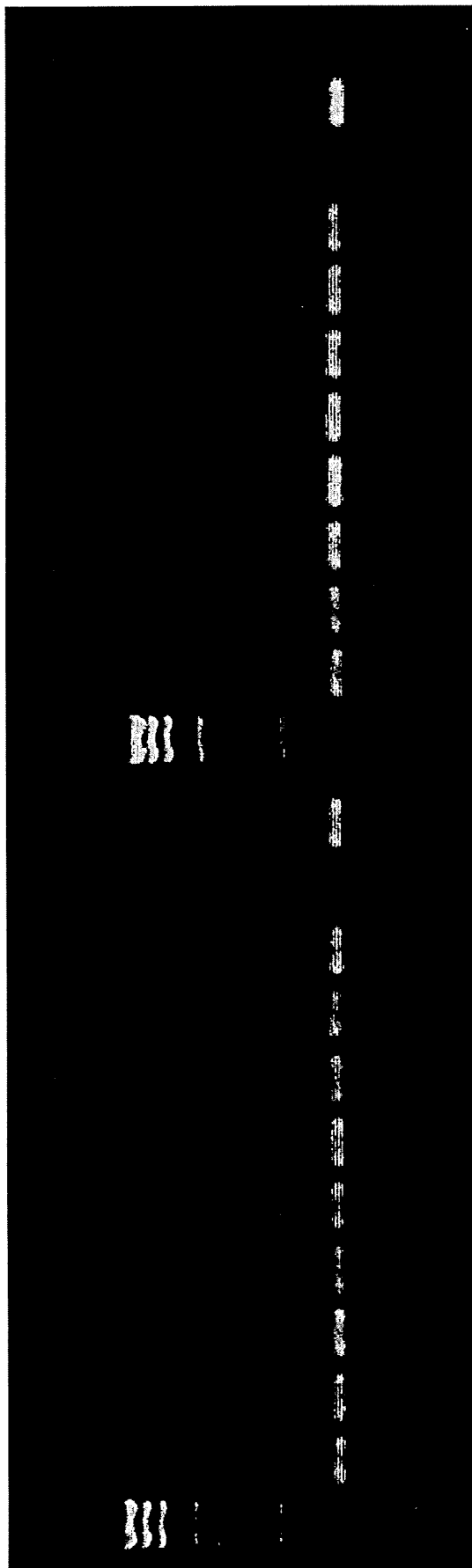
### 表 2

細胞培養上清からの BVDV ゲノム断片の PCR 法による検出

使用した細胞は, ATCC と JCRB から入手した細胞を使用した. 培養をせず開封したアンプルを直接検査した. データは, 動物種ごとに整理した. 本実験結果は原沢らによる結果を引用したものである.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Lane No.	サンプル	Lane No.	サンプル
1	マーカ-φX174	13	マーカ-φX174
2	A A' a	14	D D' a
3	A A' b	15	D D' b
4	A A' c	16	D D' c
5	B B' a	17	E E' a
6	B B' b	18	E E' b
7	B B' c	19	F F' a
8	C C' a	20	F F' b
9	C C' b	21	F F' c
10	C C'' a	22	三菱化学 PVF01
11	C C'' b	23	陽性対照
12	C C'' c	24	陰性対照

1 2 3 4 5 6 7 8 9

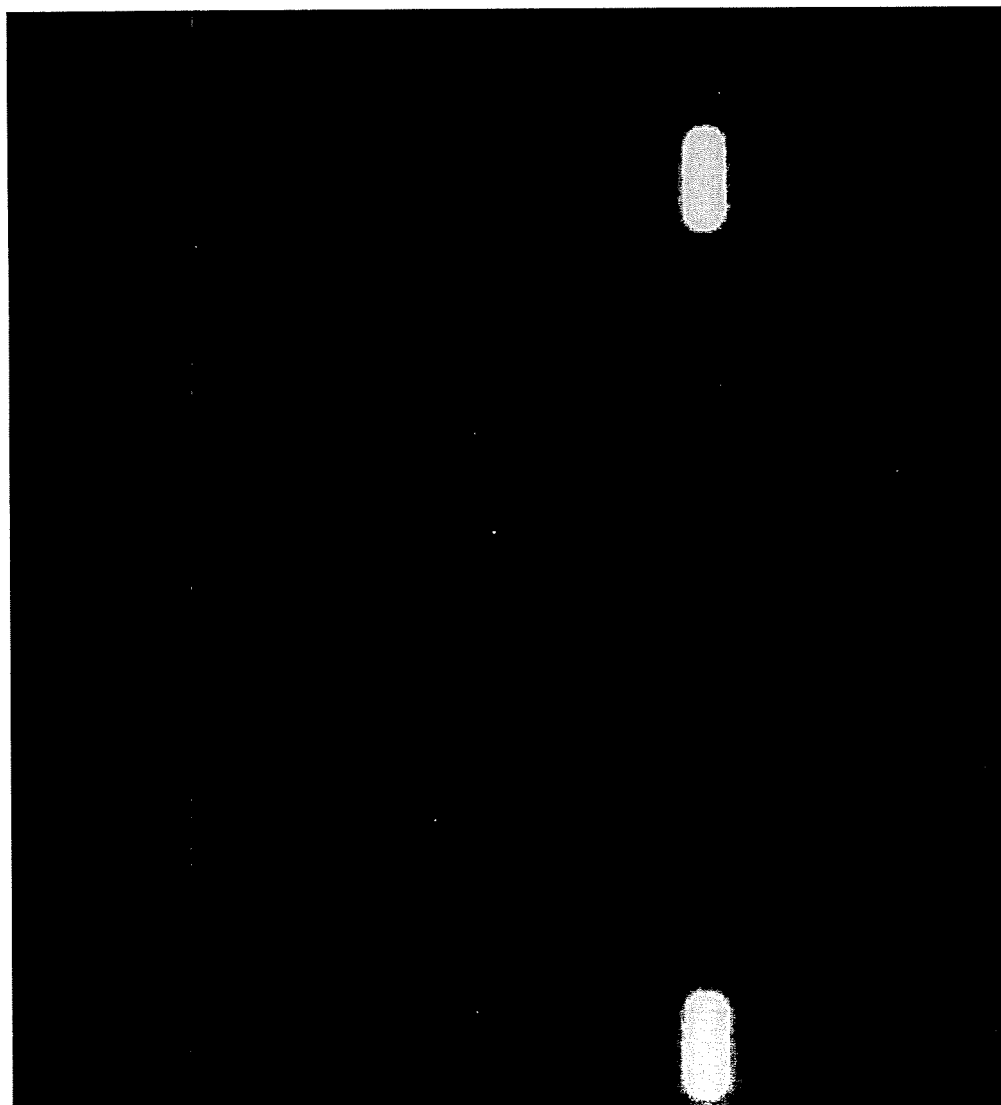


表1

販売元	製造元	ロット	1回目	2回目
A	A'	a	+	+
		b	+	+
		c	+	+
B	B'	a	+	+
		b	+	+
		c	+	+
C	C'	a	+	+
		b	+	+
	C''	a	+	+
		b	-	-
		c	+	+
D	D'	a	+	+
		b	+	+
		c	+	+
E	E'	a	+	+
		b	+	+
F	F'	a	+	+
		b	+	+
		c	+	+
G	G'	a	nt	+
		b	nt	+
		c	nt	+
三菱化学	三菱化学	PVF01	-	-
		PVF02	nt	-
		PVF03	nt	-

表2

Cell Line	動物種	細胞名	PCR結果
CCL 2	Human	HeLa	+
CRL1582	Human	Molt 4	+
CRL1593	Human	U937	+
CCL 75	Human	WI 38	+
JCRB0224	Human	WiDr	+
CCL 70	Simian	CV-1	+
CCL 81	Simian	Vero	+
JCRB0111	Simian	Vero	-
CRL 1587	Simian	Vero76	-
JCRB0099	Bovine	HH	+
CCL 22	Bovine	MDBK	+
CCL207	Bovine	CPA	+
CCL209	Bovine	CPAE	+
CCL 44	Bovine	EBTr	+
CCL 73	Caprine	Ch1Es	+
CCL 33	Swine	PK(15)	-
CCL 34	Canine	MDCK	+
CCL 94	Feline	CRFK	+
CCL 10	Hamster	BHK21	-
CCL 92	Mouse	3T3-Swiss	-



## 細胞培養を汚染する牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝学的型別の同定に関する研究

分担研究者 原沢 亮 東京大学医学部 附属動物実験施設 助教授

### 研究要旨

細胞培養を汚染する牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV: bovine viral diarrhea virus)には複数の種あるいは型が知られており、それらを厳密に同定するために、ウイルスゲノムの5'非翻訳領域における回文様塩基置換に依拠する遺伝学的指標を定めた。

### A. 研究目的

細胞培養を汚染するウイルスとして最も高頻度に検出されるBVDVは分類学的にはフラビウイルス科ペステイウイルス属に所属する。本属ウイルスには、このほか家畜法定伝染病の原因となる豚コレラウイルス(CSFV)およびわが国には発生がないとされている羊や山羊のボーダー病の原因となるボーダー病ウイルス(BDV)などが含まれる。これまでBVDVと呼ばれていたものの中に遺伝学的に異なる2種類のウイルスが含まれることが最近明らかにされ、国際ウイルス分類命名委員会の下部組織であるフラビウイルス作業部会ではBVDVをBVDV-1およびBVDV-2の2種に分けることを決定した。したがって、ペステイウイルス属を構成するウイルス種はBVDV-1、BVDV-2、BDV、CSFVの4種となった。しかし、これらのウイルスの宿主域は固定しておらず、偶蹄類内の動物種に相互に伝播することが知られているため、検出されたウイルス種の同定に支障をきたすことがある。とくにBVDV-1およびBVDV-2はいずれも牛ウイルス性下痢ウイルスと呼ばれるが、牛に対する病原性が若干異なり、新たに種として認定されたBVDV-2は血小板減少症を伴う全身症状を呈するといわれる。いずれのウイルスも牛の血液中出现するため、細胞培養用として採取される血清中にも混入することになる。そこで、本年度の研究ではBVDV-1とBVDV-2を確実に区別するための遺伝学的指標を確立することを目的とした。

### B. 研究方法

ペステイウイルスはいずれもプラスセンスの1本鎖

RNAをゲノムとし、その5'端に非翻訳領域を備えている。この領域には回文様塩基配列からなる3箇所の可変領域があり、自由エネルギーの低いステム・ループ構造を想定することが理論的に可能である。本研究では、細胞培養に汚染しているBVDV-1およびBVDV-2の5'端非翻訳領域をRT-PCR法により増幅させ、その塩基配列を決定し、同時に二次構造を想定した。これらの5'端非翻訳領域に想定される3個のステム・ループ構造をDNAデータベースに登録されている既知のBVDV-1株およびBVDV-2株を含めて比較し、それぞれの種もしくは型に固有の構造を抽出した。

### C. 研究結果

ウイルスゲノム上の5'端非翻訳領域の3箇所(V1, V2, V3)の回文様塩基配列を比較検討し、BVDV-1およびBVDV-2に固有の構造を特定することができた(図1)。V1領域はBVDV-1では26塩基から、またBVDV-2では29塩基からなり、V3領域は、BVDV-1では19塩基から、BVDV-2では18塩基から構成されていた。また、BVDV-1はさらにBVDV-1aとBVDV-1bに型別することが可能であった。これら3種類のBVDVの鑑別は二次構造上のステム領域の塩基置換として認識することができた。この塩基置換は二次構造を安定に保つために相補的变化しているので、これを回文様塩基置換(PNS: palindromic nucleotide substitution)と呼ぶことにする。5'端の3箇所の可変領域にみられるそれぞれのPNSはBVDV-1およびBVDV-2に特徴的あり、相互に入れ替わることはなかった。したがって、PNSはBVDVを種および型として鑑別するための遺伝学

的マーカーとして有用であると考えられた。

#### D. 考察

BVDVの分類・型別は遺伝子間の相同性を定量的に測定して得た分子系統樹に基づいてこれまでは行われていた。本研究により開発した5'端非翻訳領域におけるPNSに依拠した構造論的手法は、transitionあるいはtransversionとして観察される塩基対の変化様式に基づき、変異の程度を質的に把握することができるため、種間あるいは型間の違いをより明晰に説明することが可能となった。

#### E. 結論

BVDVは分類学的にBVDV-1とBVDV-2に分けられることになったため、それに対応できるような分類同定のための型別法を開発した。この方法はペスティウイルスゲノムの5'端非翻訳領域におけるPNSに依拠しており、変異の程度を質的に把握できるため、曖昧さの入り込む余地がなく正確な分類を可能にした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

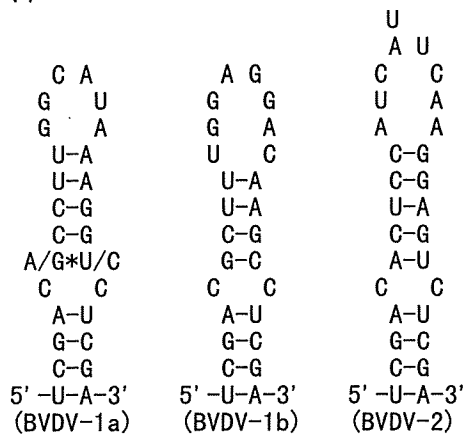
Harasawa, R., and Giangaspero, M. (1998) A novel method for pestivirus genotyping based on palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods* 70: 225-230.

##### 2. 学会発表

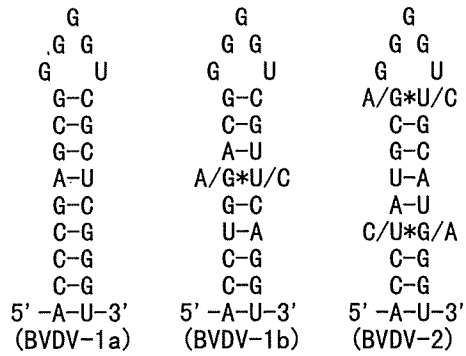
Giangaspero, M., and Harasawa, R.: Ovine pestiviruses - their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. 4th Pestivirus Meeting, European Society for Veterinary Virology, Giessen, Germany, 15-19 March 1999.

(图 1)

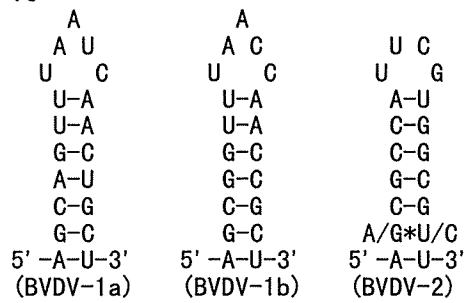
V1



V2



V3



## BVDVフリー血清によるペスティウイルス除去に関する研究

分担研究者 阿部 武丸 三菱化学(株)医薬カンパニー中標津製造所 所長

**研究要旨:** BVDV汚染細胞株を、BVDVフリー血清で洗淨的培養継代した。その結果、ヒト由来2株(HeLa、U937)およびサル由来1株(CV-1)については容易に(1継代で)浄化できた。一方、ウシ由来2株(HH、EBTr)については通算18代洗淨的継代しても浄化できなかった。このことから、(1)ウシ由来の汚染細胞株はBVDVの持続的感染をしている。(2)ウシ以外由来の汚染細胞株では、PCR的汚染は必ずしもBVDVの持続感染を意味せず、むしろBVDV遺伝子残査の汚染の可能性が疑われた。(3)BVDV汚染細胞株を、BVDVフリー血清で洗淨的培養継代することにより、汚染浄化を図れる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

ウイルスやマイコプラズマなどに汚染した培養細胞株から、それらを除去すること(汚染細胞の浄化)は極めて難しい。単純な洗淨的な継代培養だけで持続感染している寄生体の除去する事は困難であり、また抗生物質あるいは抗血清を添加して継代する方法も考えられるが、ウイルスに効果的な抗生物質は少なく、細胞毒性あるいは形質転換の恐れなどがある。

ところで、培養細胞の増殖速度は培養液への血清添加濃度を高めることで速められることが多い。もし、血清添加濃度を高めて細胞増殖を促進し、寄生体の増殖速度を上回る状態を作り出すことができれば、その状態の継代を繰り返すことで(継代的洗淨)、寄生体感染を免れた細胞の救出が図れる可能性がある。

こうした洗淨的継代培養実施するためには、非汚染で、かつ細胞毒性を発現しない良質血清の使用が前提となる。

今回、BVDVフリーの培養用子牛血清の作出に成功したことを機に、BVDV汚染が判明している細胞株を洗淨的継代培養することによって、汚染細胞株の浄化を図れるか否かを検討することとした。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

##### 1) 使用した培養細胞

本実験で使用した培養細胞は、表1に示した。これらの細胞はいずれも、PCR検査によって、BVDV汚染と判明している細胞株である(表1)。

##### 2) 使用血清

##### (1) 洗淨用陰性血清; PFCS (Lot. PVF-02; 三菱化学)

この血清は、初乳を飲んでいない生後20時間以内の新生子牛(準胎児)から無菌的に採取された。採取後、個体別に、PCR法によりBVDV陰性であることを確認し、プールし、濾過滅菌(最終0.1 $\mu$ m)し、-20 $^{\circ}$ C保存した。

##### (2) 陽性対照血清

PCR法によりBVDV陽性であることが確認された市販外国製ウシ胎児血清。-20 $^{\circ}$ C保存した。

##### 3) 使用培地等

###### (1) 培養液

各細胞に使用した培地は表2に示した。いずれも、基本的な合成培地に、血清を添加したものをを用いた。予備試験によって種々の濃度で血清を添加し、細胞増殖に最適と考えられる濃度を決定して実験に使用した(表2)。

###### (2) 洗淨・希釈液

細胞の洗淨ならびに希釈には、ダルベッコPBS(ニッスイ)を使用した。

###### (3) 細胞剥離・分散剤

細胞の培養皿からの剥離には、PBSにトリプシン(DIFCO)を0.25%または0.05%、ならびにEDTA(同仁化学)を0.02%添加して使用した。

###### 4) その他の使用器具等

- (1) 25 cm<sup>2</sup> Tフラスコ (IWAKI)
- (2) 175 cm<sup>2</sup> Tフラスコ (Becton Dickinson)
- (3) 15 ml 遠心チューブ (IWAKI)
- (4) パスツールピペット
- (5) メスピペット (1、2、5、10、30 ml)
- (6) 試験管
- (7) 細胞計測用具一式
- (8) 100 ml メジューム瓶

## 5) 使用した主な実験機器

- (1) クリーンベンチ
- (2) 遠心機
- (3) 顕微鏡
- (4) CO<sub>2</sub> インキュベータ

## 2. 方法

### 1) 検討方法の概要

#### (1) 実験1、2、3

HeLa、CV-1およびEBTr細胞について、①立ち上げ、②予備試験、③本試験(10継代)を行い、継代培養を実施し、各段階でサンプリングし、BVDVの残存汚染の状況を調べた。

#### (2) 実験4、5、6

HH、U937およびEBTr細胞について、立ち上げ、本試験(陰性および陽性血清を用いた比較継代試験; 3継代)を行い、各段階でサンプリングし、汚染の変化を調べた。

### 2) サンプリング方法

培養した細胞がコンフルエントになった段階で(浮遊系は予定細胞数段階で)培養液を採取した。検索まで-20℃凍結保存した。

### 3) 培養の概要

#### (1) 細胞立ち上げ

凍結保存されている細胞を溶解した。10%血清の培養液を加えて遠心し、上清をすてた。培養液(血清10%)を加え、細胞を浮遊させ、Tフラスコ(5ml培養液)内で培養した。培養2~5日目に培地交換した。

#### (2) 予備試験

細胞立ち上げ後、培地交換し、コンフルエントになった段階で(浮遊系は細胞数計測にて判断)継代した。その際、血清濃度が、5、10、20、40、80%の培養系を作り、細胞毒性・増殖の濃度差による状況を観察し、細胞増殖の最も良い血清濃度を決め、

本試験に用いた。

### (3) 本試験：継代法の概要

#### a) 付着系の場合

- ①コンフルエントになった段階で、培養液を除去。
- ②PBS(-) 5ml 添加し洗浄後、PBS(-)を除去。
- ③分散液3ml 添加。
- ④37℃、3~10分
- ⑤培養液3ml 添加。
- ⑥15ml 遠心チューブ、遠心、上清除去。
- ⑦培養液5ml 添加、細胞分散。
- ⑧細胞数計測、1~3×10<sup>6</sup> 個/5ml/Tフラスコで播種。

#### b) 浮遊系の場合

- ①コンフルエント(約7×10<sup>5</sup> cell/ml)になった段階で、15ml 遠心チューブに移し遠心、上清除去。
- ②培養液5ml 添加、細胞分散。
- ③細胞数計測、1~3×10<sup>6</sup> 個/5ml/Tフラスコで播種。

## C. 研究結果

### 1. HeLa株(実験1)

ヒト由来株であるHeLa株について、通算18代に渡る洗浄的培養を行って、汚染の推移を検討し、結果を表3に示した(表3)。

結果から明らかのように、BVDV陰性血清を使って培養することにより、最初の段階から速やかに陰性となった。以後、通算18代に渡る洗浄培養期間中に、陽性となることはなかった。このことは、想像していた細胞自体の持続感染の汚染とは異なる汚染形態(簡単に洗浄できる細胞外汚染)を示唆している。

### 2. CV-1株(実験2)

サル由来株であるCV-1株については、通算18代に渡る洗浄的培養を行って、汚染の推移を検討し、結果を表4に示した(表4)。

CV-1細胞の場合もHeLa細胞と同じ様に、陰性血清で培養することにより、BVDV陰性培地に変更した最初の段階から陰性であった。その後通算18代に渡る洗浄培養期間中に、陽性となることはなかった。

### 3. EBTr株(実験3)

ウシ由来株であるEBTr株について、通算18代に渡る洗浄的培養を行って、汚染の推移を検討し、結果を表5に示した(表5)。

ウシ由来株であるEBTr株の場合は、表から明らかなように、HeLaやCV-1細胞のヒトやサル由来株とは異なり、BVDV陰性血清で洗浄培養しても、18代の継代培養を通じて陰性化することが無かった。各継代毎には、少なくとも5倍以上の希釈がなされているから、立ち上げ時の汚染は、18継代後には恐らく5の18乗倍以上に希釈されているはずである。こうしたレベルの希釈にも関わらず18継代後でも陽性であったことは当初汚染の残存とは考えにくい。むしろ、細胞そのものにBVDVが持続感染しており、培養液中に持続的にウイルスを放出していることを示している。

#### 4. HH株 (実験4)

EBTr株と同じく、ウシ由来株であるHH株について、立ち上げ培養をBVDVフリー血清および汚染血清をそれぞれに含む培養液で行い、以後どのように汚染が変化するかを調べ、結果を表6に示した(表6)。

ウシ由来株であるHH株では、陰性血清で立ち上げた場合から陽性となり、3代の洗浄培養においてBVDVが陰性化することは無かった。

#### 5. U937株 (実験5)

ヒト由来の浮遊系株であるU937株について、立ち上げ培養をBVDVフリー血清および汚染血清をそれぞれに含む培養液で行い、以後どのように汚染が変化するかをしらべ、結果を表7に示した(表7)。

ヒト由来株であるU937株については、立ち上げ培養をBVDVフリー血清で立ち上げた場合には陰性となり、BVDVフリー血清で3代洗浄培養しても陽性化しなかった。一方、立ち上げ培養をBVDV汚染血清で立ち上げた場合には陽性となり、これを、BVDVフリー血清で3代洗浄培養した場合には1代目から陰性となったが、汚染血清で3代洗浄培養した場合には1代目から陽性となった。こうした結果は、簡単に洗浄できる細胞外汚染を示唆している。

#### 4. EBTr株 (実験6)

ウシ由来株であるEBTr株について、立ち上げ培養をBVDVフリー血清および汚染血清をそれぞれに含む培養液で行い、以後どのように汚染が変化するかをしらべ、結果を表8に示した(表8)。

ウシ由来株であるEBTr株では、実験3の場合と同様、で立ち上げて時から陽性となり、3代洗浄培養しても、陰性化しなかった。

#### D. 考察

洗浄的継代による効果の上で、ウシ由来細胞株とウシ以外由来細胞株のBVDV汚染は、明らかに異なっていた。すなわち前者は18代にわたる洗浄的継代にも関わらず、その汚染は除去できなかった。18代にわたる洗浄的継代は、恐らく5の18乗倍以上の希釈を意味している。にも関わらず汚染が除去できなかったことは、細胞そのものの持続的ウイルス放出、すなわち持続感染を示している。

これに対して後者は、BVDVフリー血清で培養すると、立ち上げ培養時から陰性となり、以後陽性化する事はなかった。立ち上げ培養時の陰性は希釈効果による一過性の陰性の可能性もあるが、継代中の誘導による汚染の顕在化も認められず、たしかに洗浄されたことを示している。すなわち、後者の汚染は、立ち上げ時に簡単に洗浄除去されるような汚染であったと考えられる。感染体そのものによる汚染の場合、こうしたことは考えにくい。

では、ウシ以外由来の細胞株で認められたこうした汚染はいかなる汚染であったのか。持続感染によるものではない新しい範疇の汚染が示唆された。

被験細胞株の汚染はPCR試験によってBVDV汚染と判定されている。PCR法はBVDVの遺伝子断片がありさえすれば、高感度にBVDV陽性と判定する試験法である。言い換えれば感染粒子そのものがなくともBVDV陽性と判定される可能性のある試験法である。

したがって最も考えられることは、被験細胞株の培養に使用された培養用血清の中に、BVDVの遺伝子断片あるいは失活したウイルスがあったため、細胞株そのものがBVDVに汚染されていると判定されてしまったことである。

そうした場合、細胞液中に含まれていたBVDVの遺伝子断片あるいは失活したウイルスが、培養の際の希釈効果によって除去され、立ち上げ段階から陰性となったことは大いに考えられる。

ところで、ウシ由来の細胞株がBVDVに感受性を有することは想像に難しくなく、このため汚染血清の使用によって持続感染的汚染が生じたことはおおいにうなずけるところであるが、もし、ウシ以外の動物由来の細胞株がBVDVに感受性を有しないため、今回の様なことが生じたとするならば、活性ウイルス粒子の存在があった場合でも同様に希釈除去される。言い換えれば、BVDVに対する細胞自体の感受性問題である可能性も考え得る。

細胞株のBVDV汚染は培養用のウシ血清に起因していると考えられており、また市販培養用血清の広範なBVDV汚染が知られている。したがって、汚染の

機会は常に存在している。

今回調べたウシ以外由来細胞株3種が、確かに洗淨的に浄化できたが、その汚染の実態がいかなるものであったのか、については不明であり、その他のウシ以外由来細胞種にも適用できるか否かは不明である。

#### E. 結論

1. PCR法でBVDVの汚染が判明している細胞株を、BVDVフリー血清で洗淨的培養する事により
  - 1)ウシ由来の汚染細胞2株についてBVDVの持続感染が確認された。この汚染は18代にわたる洗淨的継代でも浄化できなかった。

- 2)ウシ以外由来細胞3株について、BVDVフリー血清で洗淨的培養することにより、汚染浄化できる可能性が示唆された。

2. PCR法によるBVDV汚染判定は、必ずしもBVDV持続感染を示さないことについて、改めて注意する必要があるが示された。

#### F. 研究発表

該当無し

#### G. 知的所有権の取得状況

該当無し

---

表1. 本実験で使用した細胞一覧

	培養系	株名	JCRB No.	由 来	形 態
1	付着系	HeLa	JCRB9004	ヒト子宮頸部癌	上皮様
2	付着系	CV-1	JCRB9049	アフリカトリサル腎	線維芽様
3	浮遊系	U937	JCRB9021	ヒト胸水	リンパ芽球様
4	付着系	EBTr	JCRB9038	ウシ気管支	線維芽様

表2. 本実験で使用した培地一覧

	株名	培地		
1	HeLa	イーグルMEM培地「ニッスイ」	+	NEAA*
2	CV-1	イーグルMEM培地「ニッスイ」	+	NEAA*
5	U937	RPM1640培地「ニッスイ」		
3	HH	イーグルMEM培地「ニッスイ」		
4	EBTr	イーグルMEM培地「ニッスイ」	+	NEAA*

表3. BVDV 陰性血清による HeLa 細胞 (ヒト) の洗浄培養

サンプル 記号	内 容	通算洗浄 継代数	P C R 成績
PVP-A	陽性対照血清①		+
PVP-B	陽性対照血清②		+
PVP-C	陽性対照血清③		+
PVF-2	陰性血清		-
TA	立ち上げ培養	1	NT
a 1	予備試験 継代 1 代目	2	-
b 1	" " 2 "	3	-
c 1	" " 3 "	4	-
d 1	" " 4 "	5	-
e 1	" " 5 "	6	-
f 1	" " 6 "	7	-
g 1	" " 7 "	8	-
A 1	本試験 継代 1 代目	9	-
B 1	" " 2 "	10	-
C 1	" " 3 "	11	-
D 1	" " 4 "	12	-
E 1	" " 5 "	13	-
F 1	" " 6 "	14	-
G 1	" " 7 "	15	-
H 8	" " 8 "	16	-
I 1	" " 9 "	17	-
J 1	" " 10 "	18	-



表 4. BVDV 陰性血清による CV-1 細胞 (サル) の洗浄培養

サンプル 記号	内 容	通算洗浄 継代数	P C R 成績
PVP-A	陽性対照血清①		+
PVP-B	陽性対照血清②		+
PVP-C	陽性対照血清③		+
PVF-2	陰性血清		-
T A	立ち上げ培養	1	N T
a 1	予備試験 継代 1 代目	2	-
b 1	" " 2 "	3	-
c 1	" " 3 "	4	-
d 1	" " 4 "	5	-
e 1	" " 5 "	6	-
f 1	" " 6 "	7	-
g 1	" " 7 "	8	-
A 1	本試験 継代 1 代目	9	-
B 1	" " 2 "	10	-
C 1	" " 3 "	11	-
D 1	" " 4 "	12	-
E 1	" " 5 "	13	-
F 1	" " 6 "	14	-
G 1	" " 7 "	15	-
H 8	" " 8 "	16	-
I 1	" " 9 "	17	-
J 1	" " 10 "	18	-

表 5. BVDV 陰性血清による EBTr 細胞 (ウシ) の洗浄培養

サンプル 記号	内 容	通算洗浄 継代数	P C R 成績
	陽性対照		+
a 1	予備試験 継代 1 代目	2	+
b 1	" " 2 "	3	+
c 1	" " 3 "	4	+
d 1	" " 4 "	5	+
e 1	" " 5 "	6	+
f 1	" " 6 "	7	+
g 1	" " 7 "	8	+
A 1	本試験 継代 1 代目	9	+
B 1	" " 2 "	10	+
C 1	" " 3 "	11	+
D 1	" " 4 "	12	+
E 1	" " 5 "	13	+
F 1	" " 6 "	14	+
G 1	" " 7 "	15	+
H 8	" " 8 "	16	+
I 1	" " 9 "	17	+
J 1	" " 10 "	18	+

表6. BVDV 陰性血清による HH 細胞 (ウシ) の洗浄培養

サンプル 記号	内 容	通算洗浄 継代数	P C R 成績
F 0	-血清で立ち上げ	1	+
F 1	F 0 を -血清で継代 1 代目	2	+
F 2	F 0 を -血清で継代 2 代目	3	+
F 3	F 0 を -血清で継代 3 代目	4	+
P O	+血清で立ち上げ	1	+
P F 1	P O を -血清で継代 1 代目	2	+
P F 2	P O を -血清で継代 2 代目	3	+
P F 3	P O を -血清で継代 3 代目	4	+
P F 1	P O を +血清で継代 1 代目	2	+
P F 2	P O を +血清で継代 2 代目	3	+
P F 3	P O を +血清で継代 3 代目	4	+

-血清 : BVDV フリー血清を含む培養液にて培養  
 +血清 : BVDV 汚染血清を含む培養液にて培養

表7. BVDV 陰性血清および陽性血清で培養を立ち上げた場合の洗浄培養の効果  
(U937 細胞の場合)

サンプル 記号	内 容	通算洗浄 継代数	P C R 成績
F 0	-血清で立ち上げ	1	-
F 1	F 0 を -血清で継代 1 代目	2	-
F 2	F 0 を -血清で継代 2 代目	3	-
F 3	F 0 を -血清で継代 3 代目	4	-
P O	+血清で立ち上げ	1	+
P F 1	P O を -血清で継代 1 代目	2	-
P F 2	P O を -血清で継代 2 代目	3	-
P F 3	P O を -血清で継代 3 代目	4	-
P F 1	P O を +血清で継代 1 代目	2	+
P F 2	P O を +血清で継代 2 代目	3	+
P F 3	P O を +血清で継代 3 代目	4	+

-血清 : BVDV フリー血清を含む培養液にて培養  
 +血清 : BVDV 汚染血清を含む培養液にて培養

表8. BVDV 陰性血清および陽性血清で培養を立ち上げた場合の洗浄培養の効果  
(EBTr 細胞の場合)

サンプル 記号	内 容	通算洗浄 継代数	P C R 成績
F 0	-血清で立ち上げ	1	+
F 1	F 0 を -血清で継代 1 代目	2	+
F 2	F 0 を -血清で継代 2 代目	3	+
F 3	F 0 を -血清で継代 3 代目	4	+
P O	+血清で立ち上げ	1	+
P F 1	P O を -血清で継代 1 代目	2	+
P F 2	P O を -血清で継代 2 代目	3	+
P F 3	P O を -血清で継代 3 代目	4	+
P F 1	P O を +血清で継代 1 代目	2	+
P F 2	P O を +血清で継代 2 代目	3	+
P F 3	P O を +血清で継代 3 代目	4	+

-血清 : BVDV フリー血清を含む培養液にて培養  
 +血清 : BVDV 汚染血清を含む培養液にて培養

## ヒト上皮基底層細胞及び不死化細胞の研究資源化に関する研究

分担研究者 安本 茂 神奈川県立がんセンター臨床研究所部長

**研究要旨:**本研究ではヒト表皮細胞に関して二つの課題を設定した。一つはヒト上皮細胞の不死化細胞株の作成に関するもので、いま一つは上皮基底層細胞の研究資源化と上皮幹細胞の分離同定に関するものである。ヒト上皮細胞の不死化と不死化細胞の研究は細胞増殖の制御機構やテロメア、テロメラーゼ、あるいは細胞の生存や死の問題を通してヒト細胞での発がん、特に発がん初期の分子機構を知る上で貴重な情報を与えることができる。一方、上皮幹細胞はその存在が信じられているにもかかわらず表皮をはじめ他の多くの再生上皮系組織においていまだその実体が解明されていない。悪性新生物の発生や老化に伴う各種疾病の発生には上皮細胞のホメオスタシスの機構が深くかかわっていると考えられるが、上皮組織の再生の元となる幹細胞の研究が必ずしも進んでいるとは思われない。その実体の解明と分離培養法の確立は幹細胞の生物学的基礎のみならず細胞移植による組織、臓器の再生や遺伝子治療の標的となる細胞を供給するなど臨床応用へ向けての潜在的な重要性を持った研究資源を提供するものとする。

### A. 研究目的

#### I) ヒト上皮不死化細胞株の分離

表皮細胞は皮膚を形成している重層扁平上皮組織の構成細胞である。上皮組織層では個体の一生を通じて表皮細胞の再生と死が繰り返され、結果として組織の機能を保持する構造となっている。体表を包む表皮のみならず内腔を形成する例えば、口腔内膜、食道、気道上皮、子宮外頸部なども重層扁平上皮組織としてその構造や構成細胞の種類などに類似する点が多く、これらの上皮系組織での細胞の増殖と分化の調節機構を明かにすることは、生物個体の成りたちや機能(生存及び老化など)に関する純粋に生物学的な命題としての興味ばかりでなく、臨床医学的にも益するところは大きい。例えばがんの発生起源は扁平上皮、腺上皮を含めその80%以上が上皮系組織である。また、上皮組織の再生や移植が細胞レベルで実現すれば、熱傷創傷の治療や遺伝子治療などの技術にも大きく貢献することは目に見えている。更に、概念として明瞭ではあるが今だその存在と素顔がベールの中である幹細胞の実体解明にも大きく近づくことも期待される。いずれの上皮についても言えることであるが、全ての上皮構成細胞が個体の一生を通じて増殖能力を持ち続ける訳ではないので、細胞増殖から分化までの細胞動態の階層構造の中で再生機能を維持する細胞サブセットの存在を考えなければならない。しかしながら上皮組織内での細胞動態は十分解明されている訳でない。特に細胞の再生(Regeneration)と長期生存(Longevity)に関する調節機構は不明な点が多い。ヒトの正常上

皮細胞は実験的に操作するには系自体が複雑な要素を持ちまた扱い方もやや面倒であり、実験材料として量的にも制限されるため、概して培養細胞株が使用されることが多い。しかし、多くの樹立されたヒト由来細胞株はその殆ど全てのものががん細胞由来であるため、そこから得られる情報は必ずしも正常上皮細胞の動態を正しく反映していないと思われる。

我々は腫瘍ウイルスの発がん遺伝子の機能を利用し、皮膚及び子宮頸部などの扁平上皮細胞を培養条件下で不死化し、それらの細胞株の特性を解析してきた。正常細胞由来の不死化細胞系は癌細胞由来の細胞株と違い色々な点で上皮組織を構成する細胞の動態を解析する上で有用なモデルに成りえると考えられた。

#### II) 正常ヒト上皮培養細胞の研究資源化と幹細胞

一方、正常ヒト上皮培養細胞は技術的な側面や倫理的なコンセンサスの上からも幾つかの制約があるものの、医学創薬学的にその研究資源化の重要性はさらに大きい。しかしながら、それらの特性の多くに関して正確に理解されている訳でなく、特に欧米の現状に較べその研究と利用に関し大きく立ち後れている。我々は上皮組織のホメオスタシスを研究する目的で上皮構成細胞の動態を解析すると同時に幹細胞の分離同定などを進めその研究資源化のための基盤作りを進めてきた。

個体や特定の臓器の再生維持に関わる特別な細胞を一般に幹細胞と考えてよいが、生殖幹細胞、胎児性幹細胞、それに造血幹細胞などは個体の一生を通じて長い寿命を持ちそして多分化能を示しながら極めて強い

再生能力を備えている点からその代表例として比較的抵抗なく受け入れられる性格を備えている。しかし、上記三種類の幹細胞以外にも、再生能力を持った、例えば、皮膚をはじめ再生を繰り返す多くの扁平上皮組織、毛ノウ、小腸上皮、肝臓、乳腺、血管内皮、角膜、さらにある種の神経組織や臭覚上皮組織、筋肉、などにおいても直接あるいは間接的にその存在が確信されている。これらの組織の多くは臨床的に生体移植可能な組織である。このような多様な組織に一定の個体寿命を通して組織維持（ホメオスタシス）に関与する特別な再生細胞が存在すると考えるのは理にかなっているが、それを幹細胞と呼ぶことに異をとる向きが多いのは、当該細胞に対して幹細胞に期待される特性をどの程度適用するかが人によって少しずつ違うからある。例えば通常幹細胞といえれば直ちに思い浮かべる多分化能という特性にかなりの比重を置くと、表皮や粘膜上皮の幹細胞の場合その定義要項を満たす材料が揃っていない。従って表皮には幹細胞は存在しないと結論されスッキリするが、依然として様々の生体組織の恒常性（ホメオスタシス）の機構は解かれないまま存在する。我々は幹細胞に関連する事項としてとりあえずMillerらが考える次のようなA-Iの要件を考慮に入れてその分離同定を試みた。

- A. 幹細胞は組織の特別な場所に位置している。
- B. 幹細胞は数が少ない。
- C. 幹細胞は細胞内微細構造が単純で核の占める割合が大きい。
- D. 幹細胞は巾広い再生能力を持つ。
- E. 幹細胞の増殖は不活発であるが、刺激を受けると活発な増殖が誘導される。
- F. 幹細胞はその個体の寿命以上の分裂寿命を持つ。
- G. 幹細胞は組織構成細胞の再生に必要な活発に増殖する移行期細胞を生みだす。
- H. 幹細胞の場は子孫細胞の運命決定に重要な微小環境である。
- I. がんの発生源は幹細胞自身か移行期に入ったばかりの娘細胞である。

## B. 研究方法

### a) ヒト上皮細胞の分離培養法

ヒト上皮組織から組織構成細胞を回収する方法は二通りある。一つは組織片培養（explant culture）である。外科手術に伴って提供される余剰表皮組織を細かく切り刻んだものを培養皿表面に固定して培養し、組織から遊走してくる表皮ケラチノサイトを回収するもので、この方法は表皮構成細胞を比較的損失が少なく回収できるのが利点である。組織片から細胞を効率よく遊走させる条件は培養液の選択にかかっている。遊走してきた細胞は活発な増殖を伴って培養皿表面にシート状に広がっていくが、血清（2-5%）を含む

培養液のCa<sup>2+</sup>濃度が高い（> 2 mM）場合は細胞シートは次第に2-3層の重層構造をとる。重層した細胞はインボリュクリンなどの分化マーカーが発現し細胞間の接着が強固になり一部重層扁平上皮の構造を再現している。この重層した細胞層は血清を除きCa<sup>2+</sup>濃度を下げて（< 0.1 mM）培養すると数日で培養皿に直接接着している増殖層の細胞と分離できる。

一方、低Ca<sup>2+</sup>条件で組織片培養を続けると細胞の重層化は起らず細胞間の強固な接着もなく増殖サイクルにある細胞を選択的に培養できる。しかしこの条件は分化を抑制している訳でなくインボリュクリンなどを発現する細胞は生成しそれらの細胞は培養皿表面との接着を失って培養液中に浮遊するため培地更新時に除かれている。

もう一つの方法はコラゲナーゼやディスパーゼなどの酵素を用いて真皮から表皮部分を剥離後表皮ケラチノサイトをトリプシンで分散して培養するもので、培養法として広く普及し、より馴染み深いものである。分散された細胞は培養皿表面に接着し増殖を開始するが増殖はクローナルであって、通常コロニー形成率は回収された細胞の数%以下である。この過程で多くの細胞が失われるため構成細胞が人為的な操作で選別される可能性がある。表皮構成細胞のいくつかのサブセット特に想定される幹細胞を失うこともありえるという点ではよりリスクがある。この場合も増殖相（基底細胞、傍基底細胞）の細胞を選択的に培養するためには0.03mMのCa<sup>2+</sup>培地を用い、より分化段階が進んだケラチノサイトまで含めて培養する場合はCa<sup>2+</sup>濃度を高くした培地を用いる。しかし、これはそれぞれについて最低限の培地条件であって、培養上皮という観点からは更に培養方法や培地成分の工夫が必要である。細胞接着の基質の分子種や幹細胞を含む表皮構成細胞サブセットの増殖サイクル、分化、アポトーシスなどの誘発因子類やそれらの制御因子類などが明らかにされなければならないが多くは不明である。

### b) 不死化細胞の分離

ヒト及びマウスの表皮からケラチン細胞を調製し2-3回1:5又は1:3でスプリットした細胞にpMHPV16d(HPV16DNAをpMMTneoに2量体くみこんだプラスミドDNA)、pDE7、pDE6、pSV40ori-DNAを持つプラスミドDNAをBaekon5000TMを用いたエレクトロポレーション法で導入した。4-6週後成長型コロニーを多数クローニングしそれぞれの増殖の特性を調べた。

### c) ヒト上皮構成細胞の分離

上記培養法で調製した上皮細胞初代培養細胞を