

5. Harasawa, R., Asada, K., and Kato, I. (1995) A novel repetitive sequence from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.* 57(3): 557-558.
  6. Harasawa, R., and Mizusawa, H. (1995) Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines. *Microbiol. Immunol.* 39(12):979-985.
  7. Harasawa, R., Lefkowitz, E.J., Glass, J.I., and Cassell, G.H. (1996) Phylogenetic analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of the genus *Ureaplasma*. *J. Vet. Med. Sci.* 58(3):191-195.
  8. Sasaki, T., Harasawa, R., Shintani, M., Fujiwara, H., Sasaki, Y., Horino, A., Kenri, T., Ishii, K., and Chino, F. (1996) Evaluation of current sterility tests for human live viral vaccines. *Biologicals* 24:51-55.
  9. Harasawa, R. (1996) Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5' untranslated region. *Acta Virol.* 40:49-54.
  10. Harasawa, R., and Cassell, G.H. (1996) Phylogenetic analysis of genes coding for 16S rRNA in mammalian ureaplasmas. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(3):827-829.
  11. Kojima A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Tamura, Y., and Harasawa, R. (1996) Detection of mycoplasma DNA in veterinary live virus vaccines by the polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 58(10):1045-1048.
  12. Sasaki, T., Harasawa, R., Shintani, M., Fujiwara, H., Sasaki, Y., Horino, A., Kenri, T., Asada, K., Kato, I., and Chino, F. (1996) Application of PCR for detection of mycoplasma DNA and pestivirus RNA in human live viral vaccines. *Biologicals* 24:371-375.
  13. Yoshida, M., Nakagaki, K., Nogami, S., Harasawa, R., Maeda, R., Katae, H., and Hayashi, Y. (1997) Immunologic protection against canine heartworm infection. *J. Vet. Med. Sci.* 59(12): 1115-1121.
  14. Harasawa, R., Maeda, R., Nogami, S., Nakagaki, K., Yoshida, M., Kataoka, Y., Kobayashi, H., Katae, H., and Hayashi, Y. (1997) Characteristics of nucleotide sequences flanking the trans-spliced leader SL1 exon in *Dirofilaria immitis*, *Brugia malayi*, and *Brugia pahangi*. *J. Vet. Med. Sci.* 59(12): 1149-1152.
  15. Giangaspero, M., Harasawa, R., and Verhulst, A. (1997) Genotypic analysis of the 5'-untranslated region of a pestivirus strain isolated from human leucocytes. *Microbiol. Immunol.* 41(10): 829-834.
  16. Matsuda, K., Li, J.-L., Harasawa, R., Taki, T., Handa, S., and Yamamoto, N. (1997) Phosphocholine-containing glycolipids (GGPL-I and GGPL-III) are species-specific major lipid antigens of *Mycoplasma fermentans*. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 233:644-649.
  17. Kojima A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Nishimura, M., Nishimura, S., Harasawa, R., and Tamura, Y. (1997) Detection of *Mycoplasma* in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. *Biologicals* 25:365-371.
  18. 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.
  19. Harasawa, R. (1999) Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S rRNA spacer sequence. *Microbiol. Immunol.* 43: 127-132.
  20. Harasawa, R., and Giangaspero, M. (1999) Genetic variations in the 5' end and NS5B regions of classical swine fever virus genome among Japanese isolates. *Microbiol. Immunol.* 43(4): 373-379.
  21. Yamakawa, H., Nagai, T., Harasawa, R., Yamagami, T., Takahashi, J., Ishikawa, K., Nomura, N., and Nagashima, H. (1999) Production of transgenic pig carrying MMTV/v-Ha-ras. *J. Reprod. Dev.* 45: 111-118.
  22. Giangaspero, M., and Harasawa, R. (1999) Ovine pestiviruses: their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. *Vet. Microbiol.* 70:33-39.
  23. Harasawa, R., and Kanamoto, Y. (1999) Differentiation of two biovars of *Ureaplasma urealyticum* based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *J. Clin. Microbiol.* 37(12): 4135-4138.
- 2 学会発表
1. Giangaspero, M., Harasawa, R., and Verhulst, A.: Primary and secondary structures in the 5'-untranslated genomic region of a pestivirus strain isolated from human leucocytes. 4th International Congress of Veterinary Virology, (Edinburgh, Scotland) August, 1997
  2. Harasawa, R., and Giangaspero, M.: A simple and practical approach for genotyping based on the palindromic structures in the 5'-untranslated region of pestivirus RNA. 4th International Congress of Veterinary Virology, (Edinburgh, Scotland) August, 1997
  3. Giangaspero, M., Vacirca, G., Harasawa, R., Buttner, M., Vanopdenbosch, E., Letellier, C., Panuccio, A., Belloli, A., and Verhulst, A.: Pestiviral RNA detected in modified live virus vaccines for human use. International Conference on Emerging Infectious Diseases, (Atlanta, Georgia)

March, 1998.

4. Harasawa, R.: Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S rRNA spacer sequence. 12th Conference of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM), (Sydney, Austraria) July, 1998.
5. Giangaspero, M., and Harasawa, R.: Ovine pestiviruses - Their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. 4th Pestivirus Meeting by the European Society for Veterinary Virology, (Giessen, Germany) March, 1999.
6. Harasawa, R., and Giangaspero, M.: Classical swine fever virus genovars among Japanese isolates. 4th Pestivirus Meeting by the European Society for Veterinary Virology, (Giessen, Germany) March, 1999.
7. 原澤 亮、水澤 博:動物細胞培養にみられる Pestivirus RNA の5' 非コード領域。第 120 回日本獣医学会 (鳥取市) 1995 年 11 月
8. 原澤 亮、G.H. カッセル:16S rRNA 遺伝子とその下流のスペーサー領域からみた哺乳類ウレアプラズマの系統分類。第 121 回日本獣医学会 (相模原市) 1996 年 4 月
9. 高田容子、増井 徹、田辺秀之、水沢 博、西村和子、原沢 亮:培養細胞を汚染するマイコプラズマの PCR 法による微量検出について。第 3 回日本微生物資源学会 (大阪市) 1996 年 6 月
10. 原澤 亮:5' 端非コード領域からみた Pestivirus の系統分類。第 3 回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会 (熱海市) 1996 年 10 月
11. 原澤 亮:5' 端非翻訳領域からみた Pestivirus の分類と同定。第 123 回日本獣医学会 (藤沢市) 1997 年 4 月
12. M. ジャンガスペロ、原澤 亮:ヒト由来 Pestivirus の5' 端非翻訳ゲノム領域。第 124 回日本獣医学会 (鹿児島市) 1997 年 10 月
13. 吉田元信、中垣和英、野上貞雄、前田龍一郎、原澤 亮、小松忠人、小林 光、片江 宏巳、林 良博:犬系状虫免疫犬に移植された diffusion chamber 内遊走細胞の解析。第 126 回日本獣医学会 (江別市) 1998 年 8 月
14. 原澤 亮、M. ジャンガスペロ:ゲノム両端の構造からみたブタコレラウイルス。第 127 回日本獣医学会 (相模原市) 1999 年 4 月

G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし。

## 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 三菱東京製薬（株）中標津製造所

研究要旨：BVDVフリー血清の作出に成功したことを機に、ペスティウイルス汚染が判明している細胞株からのウイルス浄化を図れるか否かを検討し、合わせてBVDVフリーのウシ細胞株の樹立を試みた。その結果、ヒト、サル由来細胞株からはペスティウイルス汚染は容易に除去されたが、ウシ由来細胞株からは除去できなかった。持続感染が確立されているものと思われるが、これを検討するために、BVDVフリーのウシ血管内皮細胞から培養系を確立した（NM-1）。

### A. 研究目的

- ① BVDVフリー血清の作出に成功したことを機に、ペスティウイルス汚染が判明している細胞株を、この血清を用いた洗淨的継代培養によって、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。
- ② BVDVフリーのウシ細胞株を確立しペスティウイルス汚染ウシ細胞株との比較において洗淨的継代の効果・限界について検討する。

### B. 研究方法

- ① PCR検査によって、ペスティウイルス汚染が判明しているヒト、サル、ウシ由来の細胞株5株についてBVDVフリー血清を用いて洗淨的継代培養した。
- ② BVDVフリーのウシ細胞株、NM-1、の確立を図り、細胞バンクに登録した。

### (倫理面への配慮)

牛の細胞を利用しているので現在は特に必要はない。

### C. 研究結果

- ① ヒト、サル由来細胞株のペスティウイルス汚染は、容易に除去されたが、ウシ由来細胞株は除去できなかった。培養用ウシ血清に由来する「極微量（PCR的）汚染」という新たな問題がクローズアップされた。
- ② BVDVフリーのウシ血管内皮細胞の細胞プールを作製できた（NM-1）。

### D. 考察

- 1) 達成度について  
① BVDVフリー血清による洗淨的継代培養による汚染細胞株の浄化の可能性についてはほぼ達成できた。培養用ウシ血清に由来する「PCR的汚染」という新たな問題については、さらに別の視点から検討を要する。
- ② BVDVフリーウシ細胞株の確立は、ほぼ50%の達成状態。ペスティウイルス汚染ウシ細胞株との比較を検討しなければならない。
- 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について  
保存細胞株におけるBVDV汚染に関し培養用ウシ血清に由来する「PCR的汚染」という新たな問題がクローズアップされたこと、並びに、フリー血清による洗淨的継代という方法の可能性が示されたことは、学術的にも興味深いことであり、国際的にも、社会的にも大いに意義あることである。
- 3) 今後の展望について  
① 保存細胞株におけるBVDV汚染の実態の解明  
② BVDV以外の「PCR的汚染」の可能性についての検討  
③ フリー血清による洗淨的継代という方法の可能性の追求。  
④ BVDVフリーウシ細胞株と汚染細胞株との比較

### E. 結論

単純なフリー血清による洗淨的継代培養による、汚染細胞株の浄化の検討は、「PCR的汚染」という新たな問題をクローズアップした。この新しい汚染概念の観点での細胞汚染問題の見直しは「培

「養細胞研究資源の高度化」の上で、極めて重要な課題と考えられる。

F. 研究発表

論文発表

水沢博、田辺秀之、増井徹、高田容子、樽松美治、峰岸大輔、吉田東歩、佐藤元信、竹内昌男、阿部武丸、原沢亮, 培養細胞系に混入するウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) のRT-PCR法による検出, Tissue Culture Research Communication 18: 131-138 (1999)

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定も含む)

なし

## 正常2倍体細胞の研究資源化過程における酸素依存性機能発現変化 分担研究者 加治和彦 静岡県立大学大学院・生活健康科学研究科

研究要旨：ヒト血管内皮細胞を材料として普遍的な培養法の確立を試みた。一方で個体の維持や老化に酸素や活性酸素が影響を及ぼしていることが明らかにされつつあることから、培養系正常2倍体細胞に活性酸素が如何なる影響を及ぼすかについて検討を加えた。そのために、若いPDLの細胞にレトロウイルスをベクターにしてSOD遺伝子をヒト由来のフェニックス細胞に導入しパッケージ化し、これを正常内皮細胞に感染させた。現在、SOD遺伝子が導入されたヒト内皮細胞を確立した。

### A. 研究目的

ヒトを対象とする生物学および医学において、ヒトの細胞の培養法の確立は極めて重要である。特に正常2倍体細胞はその正常性を維持しつつ培養、増殖させることにより、その性質の研究を可能にするのみならず、遺伝子治療や移植等の材料として求められている。血管内皮細胞は、心臓や血管およびリンパ系の内壁を一層で覆う細胞である。内皮細胞は、組織へ酸素や各種栄養素、ホルモンや成長因子を供給すると同時に、組織からの代謝産物を血管内に移動する。特に脳では脳血管関門系が発達している。このように血管内皮細胞は、個体を維持するうえで極めて重要な役割を担っている。実際老化に伴い血管系が関与する疾病が増加する。

このようなことから、我々は第一にヒト血管内皮細胞の培養法の確立を計った。また個体の維持や老化に酸素や活性酸素が大きな影響を及ぼしていることが、明らかにされつつある。正常2倍体細胞に活性酸素が如何なる影響を及ぼすかを検討した。

### B. 研究方法

ヒト内皮細胞の血管材料としてヒトの臍帯を用いた。新鮮なヒト臍帯を最寄りの産院の協力を得て入手した。基礎培養液、培養皿は市販品を使用し、内皮細胞成長因子 (ECGF) は仔ウシ脳から調製した。

#### (倫理面への配慮)

産院の協力によった。今回は特に供与者との個々の了解は取り付けていない。現在までのところ、所属大学では倫理委員会が機能しておらず、早急に設置する予定である。

### C. 研究結果

(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞の初代培養： トリプシン-EDTA溶液を臍帯静脈に注ぎ込み、両端を注射筒に接続する。静脈の内壁の内皮細胞は、この消化酵素の働きで剥がれてくる。この細胞を回収して培養する。約2時間の操作で簡単にヒトの臍帯静脈内皮細胞を単離し培養することができる。ヒトの内皮細胞はウシやラットのそれとは異なり、典型的な敷石状の集合模様を呈さない。しかし血液凝固第8関連因子で間接蛍光染色すると、染色された分泌顆粒がたくさん細胞中に見られるので内皮細胞であると確認できる。このようにしてほぼ100%が内皮細胞からなる細胞集団を得る。

(2) ヒト内皮細胞の培養条件： ヒト以外の動物の内皮細胞は比較的簡単に増殖させることができる。ウシやブタの内皮細胞は、MEMに10%の胎児ウシ血清 (FBS) を加えた培養液で簡単に増える。ヒトの内皮細胞は、この条件では全く増殖しない。細胞の培養条件を決めるために、基礎培養液、増殖因子、それに培養基の検討を試みた。種々の培養条件で細胞を培養皿に蒔き、コロニーの形成を観察した。基礎培養液にMCDB-104を選び、10%FBSを加えさらに、増殖因子としてECGFを含むカクテルを添加した。培養皿をゼラチンでコートする。この条件でHUVECは約20時間ごとに分裂し、継代培養も容易で、55から125の細胞集団倍加 (PDL) を行なった。培養の鍵はECGFで、これは我々が新生ウシ脳から部分精製した。酸性FGF (aFGF) と塩基性FGF (bFGF) の混合物である。

(3) 細胞の継代培養と細胞寿命： コンフルエン

トに増殖した細胞集団派直ちに継代培養する必要  
がある。ヒト内皮細胞はコンフルエントのまま維持  
すると、細胞は数日以内に培養液中に浮き上がり、  
新たな細胞分裂による補給も不十分で培養系全  
体が一見不健康になる。これはECGF飢餓による  
プログラム細胞死(アポトーシス;後述)による。  
ヒトの線維芽細胞や平滑筋細胞と同様に、内皮細  
胞も細胞集団倍加数が有限である。すなわち細胞  
集団は有限回の分裂の後、分裂能力を失う。その  
最終細胞集団倍加数(PDL)は、50から120PDLで  
あった。この値はヒト線維芽細胞のそれと同様の  
レベルであった。内皮細胞は老化するにつれて大  
きくなり、細胞同士の配向性が崩れてくる。

(4) ヒト内皮細胞のプログラム死(アポトーシス):

ヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖にはECGFが必須で  
あった。ECGFの存在のもとで増殖している内皮細  
胞の培養系からECGFを除くと、細胞は数時間後  
には培養皿の底面から浮かび上がり始め、次第に  
小さな破片に分かれて死んでしまう。2~4日たつ  
と、細胞の90%以上は培養系から消失する。しか  
しECGFを除くと同時にシクロヘキシミドを加え  
ると、この細胞死が著しく阻止された。これは、  
ECGF(-)による細胞死には、蛋白合成が必要であ  
ることを示している。ECGF除去によって浮かび上  
がった直後の細胞の核のDNAは、ヌクレオソーム  
単位の断片化が確認され、細胞にアポトーシスが  
誘導されたことが分かった。したがって、内皮細  
胞にアポトーシスを誘導させることなく、最終寿  
命まで培養するか為には、ECGF飢餓を如何に防  
ぐかが重要である。

(5) SODの遺伝子導入: ヒト正常細胞はその正  
常性の特質として、細胞寿命を持っている。また  
ヒトを対象とする研究である制約から、トランス  
ジェニックの技術を導入することが不可能である。  
それに代わるものとして、若いPDLの細胞に遺  
伝子を導入することを試みた。レトロウイルスを  
ベクターにSOD遺伝子をのせ、ヒト由来のフェ  
ニックス細胞によりパッケージングした。このウ  
イルスを内皮細胞に感染させた。

この結果内皮細胞は染色体に新規の遺伝子が  
DNAとして導入された。この形質転換細胞も細胞  
寿命を持つが、標的遺伝子の発現のコントロール  
が可能である。今後この形質転換内皮細胞の解析  
を行う予定である。

E. 結論

ヒト臍帯血管内皮細胞は、ゼラチンをコートした  
培養皿に、MCDB-104を基礎培養液に10%胎児ウシ

血清、ECGF(50~100ng/ml)、EGF(10ng/ml)さら  
にヘパリン(10~100ug/ml)を添加した培養液で  
培養すると、著しい細胞増殖が得られる。この細  
胞はECGF飢餓でアポトーシスが誘導される。ECGF  
飢餓が起こらないようにECGFを十分供給し、細胞  
集団がコンフルエントになる前に継代培養を続け  
ると、この細胞の最長寿命と思われる55~125PDL  
(細胞集団倍加数)を引き出すことができる。この  
培養条件は、ヒトの臍帯以外の組織の大血管の内  
皮細胞にも適用できる。TNFやIL-1がヒト内皮細  
胞の細胞寿命に影響を及ぼす。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. TMIG-2DPAGE: A new concept of two-dimensional  
gel protein database for research on aging.  
Toda, T., Kaji, K. and Kimura, N. (1998)  
Electrophoresis, 19: 344-348.

2. Purification of a vascular apoptosis-inducing  
factor from hemorrhagic snake venom., Masuda,  
S., Araki, T., Kaji, K. et al., Biochem.  
Biophysl. Res. Commun., 235: 59-63 (1997).

3. Integrin  $\beta 4$  is involved in apoptotic signal  
transduction in endothelial cells., Miao,  
J., Araki, S. and Kaji, K., Biochem. Biophys.  
Res. Commun., 233: 182-186 (1997).

4. Enhancement of apoptosis in developing chick  
neural retina cells by basic fibroblast growth  
factor., Yokoyama, Y., Ozawa, S., Kaji, K.  
et al., J. Neurochem., 68: 2212-2215 (1997)

5. Inhibition of phospholipase promote apoptosis  
of human endothelial cells., Miao, J., Kaji,  
K., Araki, S., J. Biochem., 121: 612-618  
(1997).

2. 学会発表

血管内皮細胞の老化に及ぼす酸素分圧の影響、  
伊倉宏一、太田敏郎、加治和彦、第71回日本  
生化学会大会(名古屋)1998年10月

G. 知的所有権の取得状況

なし。