

それ以外（レビュー等）の発表 0件

そのうち主なもの

論文発表

1. Masui, T., Sofuni, T., Ishii, M., Imanishi, Y., Yasui, H., Takada, Y., Hayashi, M., and Mizusawa, H. Ethical issues in use of human materials, a practical approach by JCRB Cell Bank. *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 19: 1-15, 2000.
2. Tanabe, H., Nakagawa, Y., Minegishi, D., Hshimoto, K., Tanaka, N., Oshimura, M., Sofuni, T., and Mizusawa, H. Human monochromosome hybrid cell panel characterized by FISH in the JCRB/HSRRB. *Chromosome Res.*, 8: 319-334, 2000.

学会発表

1. Mizusawa, H. Quality control of cell lines in Japan, Congress on In vitro Biology, 2000 San Diego.
2. Masui, T. and Mizusawa, H.

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

無し

研究課題：PCR法を用いた混入ウイルス検出法の活用に関する研究

課題番号：H12-ゲノム-012

分担研究者：所属施設 東京大学医学部附属動物実験施設

氏名 原澤 亮

分担研究課題：PCR法を用いた混入ウイルス検出法の活用に関する研究

—輸入細胞系とともに侵入する海外悪性伝染病ウイルス—

A. 研究目的

わが国で使われる動物起源の細胞系 (cell line) には海外から輸入されているものが少なくない。ウイルスのなかにはこのような培養細胞に細胞変性効果 (CPE) を起こさずに持続感染した状態のものがあり、それに気付かずに実験を行っている研究者が比較的多い。細胞培養におけるウイルス汚染は実験成績を攪乱するだけでなく、ときには実験者自身を危険に曝すことがある。1967年にアフリカミドリザルの腎臓培養細胞を処理していた実験者たちの間に発生したマールブルク出血熱では2次感染者を含めて患者31名を出して、うち7名が死亡した(アメリカ)。細胞培養を扱う場合には、このようなヒトに対して致命的な感染を引き起こすウイルスによる汚染はもとより、家畜等の動物に対する病原性ウイルスによる汚染にも充分注意する必要がある。とくにわが国に本来常在しないはずのウイルスについては、海外からの侵入を未然に防ぐ体勢を確立することも必要であろう。容易に野外に拡散しうる、一般の動植物や食肉等についてはそれぞれ厚生労働省と農林水産省によって検疫体勢がすでに確立しており、外来性の感染症のわが国への侵入防止に万全を期しているが、研究用の培養細胞には実験室内の環境でのみ扱うことが前提となっているが、必ずしも十分に管理されているとはいえない状況もあって、実情が十分に把握されていない。昨年度までの研究で明らかになったBVDVによる汚染の問題をさらに考え、海外からわが国に導入されてきている培養細胞の状況を把握する必要があると考え、家畜由来ウイルスの検査手法の開発をさらに継続して進めつつ、いくつかのウイルス種について、汚染状況を調査した。

そこで、家畜の病原性ウイルスとして知られているボーンダー病ウイルス (BDV)、豚コレラウイルス (CSFV)、牛ウイルス性下痢ウイルス1～2 (BVDV1～2) について細胞培養における汚染状況を調べ

た。ボーンダー病は羊や山羊の病気で、これまでにわが国での発生は一度も知られていない。つまり、わが国へはBDVがまだ侵入していないと考えられている。また、豚コレラは養豚家に最も恐れられている感染症であることから、農林水産省は目下その撲滅キャンペーンを強力に推進しており、わが国からの駆逐を目前にしている。牛ウイルス性下痢に対しては牛への生ワクチンの接種が功を奏しており、甚大な被害は出ていない。したがって、もし、BVDV以外のペスティウイルスが細胞培養から検出されれば、家畜の伝染病予防上注意を要する問題となる。今回は厚生労働省細胞バンクで保存されている未開封アンプルから核酸を抽出し、RT-PCR法を用いてこれらウイルスの検索を実施した。

B. 研究方法

検索した細胞系は我が国で樹立されたものと海外から輸入されたもの、合わせて20検体であった。ヒト起源が5種、サル起源が4種、牛起源が5種、そのほか山羊、豚、犬、猫、マムスター、マウス起源がそれぞれ1種ずつであった。検索に用いたRT-PCRはウイルスゲノムの5'端非翻訳領域(5'-UTR)を標的として特異的に増幅するもので、PCR産物はさらに塩基配列の決定に用いた。陽性を示した15サンプルについては、一次構造上にみられる3箇所の回文様配列に想定される二次構造のステム領域における塩基置換に基づいて、それぞれのウイルス種の同定およびgenovarの型別を行った。この領域に生じる点変異は回文を維持するように対称的に起きるので、これを回文様塩基置換(PNS)と命名し、ウイルス種およびgenovarの指標として用いた(Figure, 1. - Figure, 3.)。

C. 研究結果

RT-PCRの結果、サル起源のVeroとVERO76、豚起源のPK(15)、ハムスター起源のBHK21とマウス起源

V1			
(N)	D		
R D	A Y	U R	B D
D N	U R	A R	A A
R R	W A	Y N	C-G
Y H	C-G	R:U	G-C
U-A	C-G	G-C	R C
Y:R	U-A	A-U	R:Y
C-G	C-G	C-G	U:R
R:Y	A-U	G-C	G-C
C C	C C	C C	C C
A-U	A-U	A-U	A-U
G-C	G-C	A-U	G-C
C-G	C-G	C-G	C-G
U-AK	U-AG	U-AR	U-AG
	R	A	A
U*GU	U*GU	U*GU	U*GU
G-C	G-C	G-C	G-C
G-C	G-C	A-U	A-U
U-A	U-A	U-A	U-A
5'-G-C-3'	5'-A-U-3'	5'-G-C-3'	5'-G-C-3'
(BVDV-1)	(BVDV-2)	(BDV)	(CSFV)

V2			
G	G	G	G
G G	G G	G G	G G
G U	G U	G U	G U
G-C	G*U	G-C	R:C
C-G	C-G	C-G	C-G
R:Y	G-C	G-C	G:Y
R:Y	Y:R	G-C	R:Y
G-C	R:U	Y:R	U-A
Y:A	Y:R	Y:R	C-G
C-G	C-G	C-G	C-G
C-G	C-G	U:R	C-G
5'-A:Y-3'	5'-R:U-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'
(BVDV-1)	(BVDV-2)	(BDV)	(CSFV)

V3			
A			
D H	U C		
Y H	U G	A M	Y
U:R	A-U	U Y	Y A
U-A	Y:G	C-G	A:Y
G-C	C-G	C-G	C-G
R:Y	G:Y	A-U	A-U
C-G	C-G	C-G	C-G
R:Y	R:Y	A-U	U-A
5'-A-U-3'	5'-A:Y-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'
(BVDV-1)	(BVDV-2)	(BDV)	(CSFV)

Figure 1. Palindromic nucleotide substitutions of the four pestivirus species. 'R' represents for A or G, 'H' for A, T or C, 'M' for A or C, 'Y' for C or U, and 'W' for A or U.

の3T3-Swissを除く15種が陽性であった。二次構造でのPNSによる調査で、HH(牛起源)にBVDV-1a、MDBK(牛起源)、MDCK(犬起源)、Vero(CCL-81)(サル起源)、CV-1(サル起源)、WiDr(ヒト起源)、HeLa(ヒト起源)、MOLT-4(ヒト起源)、U937(ヒト起源)、WI-38(ヒト起源)、CRFK(猫起源)にはBVDV-1bが、また、CPA(牛起源)、CPAE(牛起源)、EBTr(牛起源)にはBVDV-2dがそれぞれ汚染していることが示された。さらに、Ch1Es(山羊起源)にBDVが汚染していることが判明した。

V1			
H A	R K	A A	A U
R Y	K G	R A	G G
R R	G A	R G	G G
Y A	Y Y	C A	A-U
U-A	U-A	U-A	U-A
C-G	U-A	C-G	C-G
C-G	C-G	C-G	C-G
G*U	G-C	R:U	A-U
C C	C C	C C	C C
A-U	A-U	A-U	A-U
G-C	G-C	G-C	G-C
C-G	C-G	C-G	C-G
U-AG	U-AG	U-AG	U-AG
	A	R	A
U*GU	U*GU	U*GU	U*GU
G-C	G-C	G-C	G-C
G-C	G-C	G-C	G-C
U-A	U-A	U-A	U-A
5'-G-C-3'	5'-G-C-3'	5'-G-C-3'	5'-G-C-3'
(BVDV-1a)	(BVDV-1b)	(BVDV-1c)	(BVDV-1d)

V2			
G	G	G	G
G G	G G	G G	G G
G U	G U	G U	G U
G-C	G-C	G-C	G-C
C-G	C-G	C-G	C-G
G-C	R:U	A C	G-C
R:Y	R:U	G-C	A C
G-C	G-C	G-C	G-C
Y:A	U-A	U-A	U-A
C-G	C-G	C-G	C-G
C-G	C-G	C-G	C-G
5'-A:Y-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'	5'-G*U-3'
(BVDV-1a)	(BVDV-1b)	(BVDV-1c)	(BVDV-1d)

V3			
A	A	A	G
D Y	R Y	D M	A A
Y M	U M	U H	A A
U:R	U-A	U-A	A G
W:W	U-A	U-A	U-A
G-C	G-C	G-C	G-C
A-U	G-C	A-U	G-C
C-G	C-G	C-G	C-G
R:Y	R:C	G*U	G-C
5'-A-U-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'
(BVDV-1a)	(BVDV-1b)	(BVDV-1c)	(BVDV-1d)

Figure 2. Subgenotypes in BVDV-1. 'R' represents for A or G, 'Y' for C or U, and 'W' for A or U.

D. 考察および結論

これら細胞培養における汚染原はBVDV-1およびBVDV-2の場合は、ほとんどが細胞培養に用いた牛血清由来であると考えられる。ただし、牛起源の細胞系の場合にはもともとなった牛に感染していたウイルスがそのまま培養細胞に持ち込まれた可能性も否定できない。動物細胞ではもとの動物に感染していたウイルスがそのまま細胞培養に持ち込まれる例はよく知られており、豚コレラウイルスが豚の初代細胞培養から検出されることがある。

V1			
R	G	G	U
A U	A U	A Y	A U
C Y	U Y	C Y	C C
Y:G	U*G	U*G	U-A
A A	W:A	A A	A:W
C-G	C-G	C-G	C-G
C-G	C-G	C-G	C-G
U-A	U-A	U-A	U-A
C-G	C-G	C-G	C-G
A-U	A-U	A-U	A-U
C C	C C	C C	C C
A-U	A-U	A-U	A-U
G-C	G-C	G-C	G:Y
C-G	C-G	C-G	C-G
U-AG	U-AG	U-AG	U-AG
A	A	A	A
U*GU	U*GU	U*GU	U*GU
G-C	G-C	G-C	G-C
G-C	G-C	G-C	G-C
U-A	U-A	U-A	U-A
5'-A-U-3'	5'-A-U-3'	5'-G*U-3'	5'-R:U-3'
(BVDV-2a)	(BVDV-2b)	(BVDV-2c)	(BVDV-2d)
V2			
G	G	G	G
G G	G G	G G	G G
G Y	G U	G U	G U
G*U	G*U	G*U	G*U
Y:G	C-G	C-G	C-G
G-C	G-C	G-C	G-C
U-A	Y:R	U-A	U-A
R:U	A-U	A-U	A-U
U:R	C-G	Y:G	U*G
C-G	C-G	C-G	C-G
C-G	C-G	C-G	C-G
5'-R:Y-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'	5'-R:U-3'
(BVDV-2a)	(BVDV-2b)	(BVDV-2c)	(BVDV-2d)
V3			
U Y	U C	U C	U C
Y R	U G	U G	U G
A:Y	A-U	A-U	A-U
C-G	Y:G	Y:G	C-G
C-G	C-G	C-G	C-G
R:Y	G-C	G:Y	G-C
C-G	C-G	C-G	C-G
G:Y	G*U	G:Y	G*U
5'-A-U-3'	5'-A:Y-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'
(BVDV-2a)	(BVDV-2b)	(BVDV-2c)	(BVDV-2d)

Figure 3. Subgenotypes in BVDV-2. 'R' represents for A or G, 'Y' for C or U, and 'W' for A or U.

BDVによる汚染が判明したChIEsは山羊の食道組織に由来する細胞系であり、検出されたBDVは食道組織を提供した山羊に感染していたものがそのまま細胞培養に持ち込まれたものであろうと考えられる。BDVは妊娠している羊や山羊に感染すると胎児の先天異常や流産を起こすことがある。この感染症はイングランドとウェールズとの境界地域で最初に発生したことにちなんで命名されたものであるが、これまでわが国での発生は知られていない。

このため海外からの本病の侵入を防ぐことが家畜の防疫上きわめて重要であることから、BDVは輸入禁止品とされている。ところが、不本意ながら細胞培養に汚染した状態で、本ウイルスは密かにこの国に侵入していたわけである。BDVは人獣共通感染病原体ではないが、羊や山羊のみならず牛にも感染するので、その取り扱いには注意が必要である。わが国の羊や山羊はボーダー病に対して清浄であるので、BDVに汚染しているChIEsを取り扱う場合には汚染ウイルスが外部に漏れることのないよう厳重な配慮が求められる。これは細胞培養が外来性ウイルスに汚染されている一例であって、今後、さらに広範に系統的な検索を重ねて、細胞培養におけるウイルス汚染の実情を把握し、品質管理の向上に努める必要がある。

当該研究においては、期せずして家畜への伝染の可能性のあるウイルスを検出することとなった。しかし、現在検出に利用しているPCR法はウイルスの生物活性を検出する実験法では無いので、検出されたものが感染性のあるウイルスであるか単にウイルスゲノムの断片が紛れ込んでいたものかについて即断することはできない。この点については今後さらに検討を要する点である。

また、材料として使用した培養細胞については、米国ATCCから入手して、日本で一度も培養せずに検出実験に使用した。これは、十分な品質管理を実施しているATCCにおいても、このウイルスの感染を見逃していたことを意味している。これが意味することは、汚染があったとしてもその量は過去の検出法では検出できなかったほどに微量であることもまた示している。

過去わが国において細胞バンクが確立していなかった時代には、培養細胞研究資源を海外、特にATCCに頼っていた。また、実験室という特殊な環境の中でのみ扱うことを前提に、比較的自由に培養細胞研究資源を海外から入手して、研究に使用してきたという経緯がある。

現在では、培養細胞等生物材料を廃棄する際には、オートクレーブなどの滅菌措置をとることが義務付けられており、これが直ちに野外に漏出して家畜に感染することとなるとは考えにくい。事実を公にして潜在的危険性があることを多くの研究者が認識しておく必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Harasawa, R., Giangaspero, M., Ibata, G., and Paton, D. J. (2000) Giraffe strain of

pestivirus: Its axonomic status based on the 5'-untranslated region. *Microbiol. Immunol.* 44: 915-921.

- (2) Harasawa, R., Hotzel, H., and Sachse, K. (2000) Comparison of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among strains of the *Mycoplasma mycoides* cluster and reassessment of the taxonomic position of *Mycoplasma* sp. bovine group 7. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1325-1329.
- (3) Matsuda, K., Li, J.-L., Ichinose, S., Harasawa, R., Saito, M., and Yamamoto, N. (2000) Monoclonal antibody against *Mycoplasma fermentans*-specific aminoglycoglycerolipid. *Microbiol. Immunol.* 44: 695-702.
- (4) Nogami, S., Murasugi, E., Shimazaki, K., Maeda, R., Harasawa, R., and Nakagaki, K. (2000) Quantitative analysis of microfilarial periodicity of *Dirofilaria immitis* in cats. *Vet. Parasitol.* 92: 227-232.

2. 学会発表

- (1) 原澤 亮、Hotzel Helmut, Sachse Konrad:

16S-23S rRNA遺伝子間スペーサー領域から見た *Mycoplasma* sp. bovine group 7 の分類学的位置。第129回日本獣医学会（つくば市）2000年4月

- (2) Giangaspero, M., Vacirca, G., Harasawa, R., Buttner, M., Panuccio, A., De Giuli Morghen, C., Zanetti, A., Belloli, A., and Verhulst, A.: Genotypes of pestiviral RNA detected in virus vaccines for human use. 5th International Congress of Veterinary Virology, (Brescia, Italy) August, 2000.
- (3) Harasawa, R., Giangaspero, M., Ibata, G., and Paton, D.J.: Taxonomic status of giraffe and deer isolates of pestivirus, estimated by palindromic nucleotide substitutions at the 5' untranslated region. 5th International Congress of Veterinary Virology, (Brescia, Italy) August, 2000.
- (4) Giangaspero, M., and Harasawa, R.: Nucleotide substitutions and virulence markers in the 5'-untranslated region of bovine viral diarrhea virus 2. 5th International Congress of Veterinary Virology, (Brescia, Italy) August, 2000.

研究課題：細胞株管理における品質管理技術の改良に関する研究

課題番号：H12-ゲノム-012

分担研究者：所属施設（財）発酵研究所

氏名 竹内昌男

1. 研究目的

近年、ヒト由来培養細胞が、ゲノム解析、再生医療などの研究資源としてますます重要視されてきた。多くの研究者が、このヒト由来培養細胞を利用できるようにするためには、細胞バンクにおけるバイオハザード対策が重要である。特に、癌などの重篤な疾患を引き起こすウイルスについて、培養細胞における感染の有無を明らかにし、研究者にその情報を提供することが大事である。

今回我々は、癌を引き起こすウイルスとして知られているB型肝炎ウイルス(hepatitis B virus; HBV)、C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus; HCV)およびヒトパピローマウイルス(human papilloma virus; HPV)の感染検査法について検討した。肝癌の多くがHBV及びHCV感染と関連し、子宮頸癌の多くがHPV感染と関連することが知られている。これらのウイルスは、国立感染症研究所のバイオセーフティレベル分類でレベル2に指定されており、取り扱い際の指針が示されている。

今回、我々が設定したウイルス感染検査法を用いて、(財)発酵研究所およびJCRB細胞バンクに保存されているヒト由来培養細胞をチェックし、その結果を品質管理情報として研究者に提供することにした。今後、国内では、手術で摘出されたヒト組織の研究資源化が重要なテーマとなる。今回のウイルス感染検査法を、手術で摘出されたヒト組織にも適用できるようにしたい。

2. 研究方法

2.1 細胞株：(財)発酵研究所(IFO)およびJCRB細胞バンクで保存している合計23細胞株について、ウイルスの感染検査を実施した。肝癌、胆管癌由来が8株、子宮癌、卵巣癌由来が14株、巨核芽球由来が1株で、細胞株名は以下のとおり(登録番号、由来を表示)。HuCCT1(JCRB0425; ヒト胆管癌)、HUH-6 Clone5(JCRB0401; ヒト肝癌)、HuH-7(JCRB0403; ヒト肝癌)、HuH28(JCRB0426; ヒト肝癌)、HLE(JCRB0404; ヒト肝癌)、HLF(JCRB0405;

ヒト肝癌)、PLC/PRF/5(IFO50069/JCRB0406; ヒト肝癌)、JHH-4(JCRB0435; ヒト肝癌)、CaSki(IFO50007; ヒト子宮頸癌)、SKG-III a(IFO50310/JCRB0232; ヒト子宮頸癌)、SKG-III b(IFO50311; ヒト子宮頸癌)、BOKU(IFO50323; ヒト子宮頸癌)、SKG-I(IFO50308; ヒト子宮頸癌)、SKG-II(IFO50309; ヒト子宮頸癌)、HeLaS3(IFO50011/JCRB9010; ヒト子宮頸癌)、SKN(IFO50314 ヒト子宮体癌)、NJG(IFO50322; ヒト子宮体癌)、RMG-I(IFO50315; 卵巣癌)、RMUG-S(IFO50320; ; 卵巣癌)、RMUG-L(IFO50319; 卵巣癌)、SNG-II(IFO50312; 子宮内膜癌)、SNG-M(IFO50313; 子宮内膜癌)、MEG-01(IFO50151; ヒト巨核芽球)。

2.2 細胞からDNA、RNAの調製：HBVとHPVはDNAウイルスであり、検査する培養細胞からDNAを調製した。DNA調製は常法により、培養細胞をプロテイナーゼKで反応後、フェノール/クロロホルム処理し、エタノールでDNAを沈殿させた。HCVはRNAウイルスであり、検査する培養細胞からRNAを調製した。RNA調製には東洋紡製のMagExtractor RNA精製キットを用い、RNAから相補DNAへの逆転写反応はGIBCO-BRL製のSuperScript Preamplification Systemを用いた。

2.3 PCR：HBV、HCVおよびHPVのそれぞれを検出する3種類のPCRを設定し、上記23細胞株について調べた。HBVは約3.2kbの環状DNAをもつ。PCRで増幅させる遺伝子部位として、配列の保存性が高いS抗原遺伝子領域(432bp)に設定した。sense primerとしては5'-GGACTTCTCTCAATTTCTAGGG-3'を用い、antisense primerとしては5'-CAAATGGCAATAGTAACTGAGA-3'を用いた。反応は、94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で3分間のサイクルを25回繰り返した。HCVは約9.5kbの1本鎖RNAウイルスであり、現在では9種の遺伝子型が知られている。プライマーは配列の保存性が高いとされる5'非翻訳領域に設定し、nested PCRを用いた。external sense primerとしては5'-TGTGAGGAAGTACTGTCTT-3'、external antisense

primerとしては、5'-AACACTACTCGGCTAGCAGT-3'を用いた。また、internal primerとしては5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3'、internal antisense primerとしては5'-GTTGATCCAAGAAAGGACCC-3'を用いた。反応は2段階とも、94°Cで30秒間、56°Cで30秒間、72°Cで1分間のサイクルを40回繰り返した。HPVは約8kbの2本鎖DNAをゲノムにもち、現在70種以上の型が知られている。これらのHPVの中でHPV-16、-18および-33の3型は悪性度が強く、今回はこれら3型を検出するPCRを検討した。増幅する部位は、E6癌遺伝子をコードする領域(約140bp)に設定した。HPV-16、-18および-33の3型に共通のsense primerとして5'-AAGGGCGTAACCGAAATCGGT-3'、HPV-16に特異的なantisense primerとして5'-GTTTGCAGCTCTGTGCATA-3'、HPV-18に特異的なantisense primerとして5'-GTGTTTCAGTTCCGTGCACA-3'、HPV-33に特異的なantisense primerとして5'-GTCTCCAATGCTTGGCACA-3'を用いた。これらのプライマーをセットで使用し、94°Cで30秒間、55°Cで2分間、72°Cで2分間のサイクルを30回繰り返した。

2.4 電気泳動: 電気泳動によりPCR産物を検出するため、色素を加えたPCR産物に対し、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によりDNAバンドを検出した。PCR産物については、DNAシーケンサー(ABIプリズム310)を用いて、DNA配列を確認した。PCRの陽性対照として、ヒトβグロブリン遺伝子の262塩基の増幅を確認した。

3. 研究結果及び考察

ウイルスを培養細胞から検出する高感度で簡便な方法として、現在のところPCRが有効と考えられている。しかし、このウイルス感染検査を細胞バンクで行うための、標準的な方法は確立されていない。今回我々は、HBV、HCVおよびHPVのそれぞれを検出する3種類のPCRを設定し、(財)発酵研究所およびJCRB細胞バンクで保存している23細胞株について調べた。

その結果、HBVのDNAが検出された株は、肝癌由来のPLC/PRF/5(IF050069/JCRB0406)のみであり、HCVのDNAが検出された例はなかった。HPVのDNAが検出されたのは子宮頸癌由来の7株であった。HPV-16のDNAが検出された株は、CaSki(IF050007)、SKG-III a(IF050310/JCRB0232)、SKG-III b(IF050311)、BOKU(IF050323)の4株、HPV-18のDNAが検出された株は、SKG-I(IF050308)、SKG-II(IF050309)、HeLaS3(IF050011/JCRB9010)の3株、HPV-33のDNAが検出された例はなかった。これらの結果は、細胞

株データベースの品質管理項目に入力し、カタログとインターネットを通じて研究者に情報提供できるよう整備した。

HBV、HCVおよびHPVは、生体において増殖可能な組織が限定されている。HBVとHCVは肝細胞、HPVは上皮細胞、特に子宮頸部で多く検出されている。今回の細胞株における結果は、生体でのウイルス分布と一致した。今後、細胞株における各ウイルスの感染検査を由来組織別に広く調べ、生体の分布と一致することが確認されれば、検査すべきウイルスの対象を絞ることが可能となる。

4. 結論

ウイルス感染の検出は、バイオハザード対策の面から、細胞バンクにおける重要な品質管理項目になりつつある。しかし、ヒトに病原性を示すウイルスの種類は多く、高感度で簡便なウイルス感染検出法の開発が求められている。今回我々は、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびヒトパピローマウイルスについて、培養細胞への感染の有無を検出するPCR法を設定した。本法を用いて、細胞バンクの培養細胞を検査し、感染が認められたものについては、カタログ等を通じ、研究者へ情報を提供した。

5. 研究発表

1. Kuno, H., Ikeda, H., Takeuchi, M., and Yoshida, T. A simple and rapid reverse transcriptase assay for the detection of retroviruses in cell cultures. *Cytotechnology* 29: 221-227, 1999

研究課題：ヒト遺伝性疾患細胞の研究資源化と分譲に関する研究

課題番号：H12-ゲノム-012

分担研究者：所属 京都大学放射線生物研究センター

氏名 立花 章

A 研究目的

ヒトゲノムの全塩基配列が決定され、21世紀における重要課題はヒト遺伝子の多様性とその機能の解明であると言われている。ヒト遺伝病の細胞はポスト・ゲノム研究戦略の重要な研究資源となる。ヒトの遺伝子の構造と機能は長い進化の上に成り立っているものであり、その遺伝的多様性と機能のダイナミズムは生物種固有であるのみならず、人種固有のものがある。従って、我が国におけるポスト・ゲノム研究戦略には日本人に基づく研究資源が要求される。本研究の目的は、日本人遺伝病患者細胞の遺伝的特性を明らかにし、新しいゲノム科学のニーズに応える研究資源として保存し、研究支援を行うことにある。特に、今後ヒト遺伝病細胞に対する研究者の要望はなお一層増加することが想定されるため、取扱が容易である不死化細胞株を樹立することにより、ゲノム研究の推進を支援することを目的としている。従来登録していた初代線維芽細胞株は増殖速度が遅いため培養が難しく、しかも継代数を重ねると細胞が増殖を停止する等、供給と利用の両面で困難があった。そこで、増殖能の良い細胞株を得るため、DNA複製開始点の配列を欠損したSV40 DNAを細胞に導入し不死化細胞を得ることを試みた。

2. 研究方法

SV40 DNA からDNA複製開始点領域を除去したDNAを、ヒト遺伝病患者由来初代培養線維芽細胞に導入することにより、細胞の不死化を行った。SV40 DNA導入後、3ヶ月以上培養を続け、初代培養細胞が増殖を停止する時期を過ぎても、増殖しつづける細胞を得た。これをもって不死化したものと判断した。平板効率を検討したうえで、色素性乾皮症及びコケイン症候群患者由来細胞については紫外線感受性を、ファンconi貧血症患者由来細胞についてはマイトマイシンC (MMC) 感受性を、コロニー形成法を用いて検討した。ブルーム症候群患者由来細胞については常法に従って姉妹染色分体交換 (SCE) の頻度を解析した。

(倫理面への配慮)

最近の患者については、診断とは別に細胞培養による疾患の解明と治療法の開発という合意事項で、

細胞をヒトゲノム研究に使用することと細胞バンクへの提供についての同意を得ている。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の策定が進行していることに伴い、現在京都大学においても「遺伝子解析研究ワーキンググループ」において検討されているところである。今後はこれら指針等に従って適切に対処することとしている。

3. 研究結果及び考察

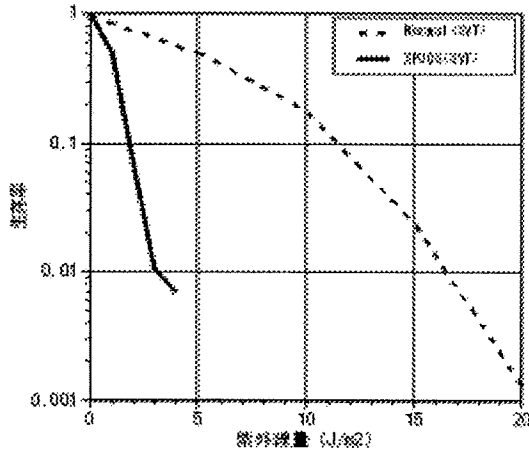
色素性乾皮症、コケイン症候群、ファンconi貧血症、ブルーム症候群の患者由来細胞から、不死化細胞株を樹立することを試みた。いずれの細胞も常染色体劣性の遺伝様式を示す高発癌性遺伝病の日本人患者に由来する細胞であり、DNA損傷の修復やDNA複製に欠損があることが知られている。

色素性乾皮症は、紫外線に高感受性を示し、皮膚癌を高発する。DNAにできた損傷の除去修復に欠損があることが知られている。既にJCRBバンクには数株を登録しているが、今回そのうちの一つである初代線維芽細胞XP30S (JCRB0303) にSV40 DNAを導入して不死化することを試みた。その結果、約4ヶ月にわたって継代された細胞XP30S (SVT) を得た。紫外線照射後の生存率を検討したところ、初代細胞株と同様非常に高い感受性を示した (図)。従って、色素性乾皮症細胞が持つDNA修復能の欠損という性質は保持していることが確認された。一方染色体数は細胞毎に59～216本のばらつきがあり、平均値は105、中央値は104であった。従って、多くの細胞では染色体は倍加、もしくはそれ以上に増加していることになる。染色体が倍加することはSV40 DNAによって不死化した細胞において一般的に見られることである。

コケイン症候群も紫外線に高い感受性を示す。JCRBバンクに登録している初代培養細胞CS20S (JCRB0309) をSV40 DNAを導入して不死化したと考えられるCS20S (SVT) 細胞を得た。紫外線感受性を調べたところ、元の細胞と同様高感受性を示した。染色体数は40～92本であり、平均値は73、中央値は82であり、やはりほとんどの細胞で倍加している。

ファンconi貧血症はMMCなどのDNA架橋剤に高い感受性を示し、また白血病の発生率が高い。既にJCRBバンクに登録している初代線維芽細胞FA9JT0

(JCRB0314) 細胞にSV40 DNAを導入して、不死化したと考えられる細胞株FA9JTO(SVT)を得た。FA9JTO



(SVT)細胞はMMCに非常に感受性であり、DNA架橋の損傷修復に欠損があることを示している。染色体数は42～88本、平均値は78、中央値は82であった。ブルーム症候群は、DNAヘリケースに異常があり、DNAの複製や組換えに欠損がある。SCE頻度が高く、本疾患の診断基準となっている。ブルーム症候群患者細胞にSV40 DNAを導入して不死化細胞を樹立することを2度試みたが、いずれも失敗に終わったため、他の細胞を探すこととした。BSL2KA細胞は、日本人ブルーム症候群患者由来リンパ球にEBウイルスを感染させ、無限増殖能を獲得した細胞である。放射線医学総合研究所 巽 絃一部長より分与された。SCE頻度(SCE/染色体)を調べたところ、 1.57 ± 0.32 (平均値 \pm SD)であった。これは正常細胞の平均値 0.20 ± 0.02 に比べてきわめて高く、ブルーム症候群細胞の特徴を保持していることを確認した。EBウイルス感染によって樹立された細胞株では、染色体数は大きな変化は見られないことが多いが、BSL2KA細胞では77～95本が観察され、平均値、中央値ともに83であり、ほぼ倍加していた。このことはブルーム症候群細胞の染色体不安定性を反映しているものと考えられる。

4. 評価

1) 達成度について

ヒト遺伝病の中でも特に高発がん性の遺伝病について細胞の収集を行ってきた。これらの細胞はDNAの複製や損傷の修復機構に欠損があることが知られており、これら欠損により発癌頻度が高いものと考えられる。ヒトにおける発癌機構解明などにはこれら遺伝病患者の細胞は極めて貴重な研究資源である。今年度は4種類の疾患について、それぞれ1株ずつの不死化細胞を得た。当初目標は5株の樹立であったが、ブルーム症候群細胞のSV40 DNAによる不死化に失敗したため、僅かに不足したが、ほぼ所期の目標を達成できたと考えている。得られた不死化細胞は、それぞれ元の疾患細胞に特有の性質を有していたことから、今後それぞれの疾患での欠損の解明や治療法開発の研究などに大きく寄与するものと思われる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今回樹立した不死化細胞株は、いずれもヒト高発癌性劣性遺伝病患者に由来するものである。これらの疾患の原因遺伝子はほぼ明らかにされつつあるが、遺伝子の機能の解明は今後の大きな課題である。特にこれらの遺伝子はDNAの複製や修復などの基本的な生命過程に直接関与する遺伝子群であり、その機能の解明の生物学的重要性は非常に高い。しかも遺伝的多様性は、遺伝子機能やひいては疾患特性にも影響を及ぼすことが考えられ、日本人の遺伝的特性を明らかにすることの意義は大きい。また、これら疾患に対する診断及び治療方法の進展がもたらす社会的貢献はきわめて大きい。

3) 今後の展望について

ヒトの遺伝病細胞は研究資源として極めて重要な位置を占める。特に、ヒトゲノムの塩基配列が明らかにされたことにより、今後のポストゲノム時代には、その重要性はますます増大する。しかし、一般にヒト細胞、ことに遺伝病細胞では培養が困難である。従って、わが国におけるポストゲノム研究を推進する上で、多くの研究者にとって利用しやすい形の細胞を樹立することは極めて重要な意義がある。今後このような細胞株の数を増加させることが必要である。一方、今回樹立した細胞では、細胞の性質そのものは保持しているものの、染色体数に大きな変化が生じている。今後は染色体数が安定した細胞株の樹立を目指す必要がある。

5. 結論

ヒト高発癌性遺伝病患者由来初代線維芽細胞からの不死化細胞株の樹立を試み、4株の細胞特性を明らかにした。いずれの細胞も、不死化後においてもそれぞれの疾患に特異的な性質を保持していた。これらの

細胞により、従来よりも幅広い研究者の研究に利用され、疾患の診断や治療の進展に寄与することが期待される。特に全ても日本人患者由来であるため、日本人集団での特色を明らかにする上で、大きな意義がある。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	2件
原著論文による発表	0件
それ以外（レビュー等）の発表	0件

そのうち主なもの

学会発表

仲 一仁・立花 章・石川冬木・池田恭治・本山昇：テロメララーゼによる末梢血管拡張性運動失調症 (Ataxia Telangiectasia) 患者由来不死化細胞の樹立。第23回日本分子生物学会年会、平成12年12月、神戸。

2) 海外

口頭発表	0件
原著論文による発表	2件
それ以外（レビュー等）の発表	0件

そのうち主なもの

論文発表

Yamada, T., Tachibana, A., Shimizu, T., Mugishima, H., Okubo, M., and Sasaki, M. S. (2000)、Novel mutations of the FANCG gene causing alternative splicing in Japanese Fanconi anemia. Journal of Human Genetics 45: 159-166.

7. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし。

研究課題：正常2倍体ヒト線維芽細胞の研究資源化と分譲及び品質管理に関する研究

課題番号：H12-ゲノム-012

分担研究者：所属（財）東京都老人総合研究所遺伝子情報部門

氏名 木村成道

A. 研究目的

正常2倍体ヒト線維芽細胞の研究資源化とその品質管理と分譲システムの構築

1) ヒト正常2倍体細胞の樹立と供給

1. 研究目的

老化研究および癌研究に資するため、ヒト正常2倍体の新規樹立と供給を目的とする。

2. 研究方法

供給用アンプルの作製＝供給用凍結細胞アンプルおよびバックアップ用凍結細胞アンプルを作製し、国立医薬品食品研究所マスターバンクにそれぞれ送付した。

細胞の樹立＝新生児および児童の皮膚片から這い出し法により細胞を採取し、細胞数測定を行いながら培養することで正確な細胞集団倍加数（PD）の記録を持つ初代培養細胞を樹立した。

3. 研究結果

- A. 供給細胞の凍結アンプル作製＝今年度は、今年度樹立・性格づけをして新規登録する成人皮膚線維芽細胞のTIG-108細胞（40Y、F）とTIG-109細胞（39Y、F）の供給のための凍結アンプル（それぞれ30アンプル）と、バックアップのための凍結アンプル（3アンプルずつ）を作製した。また、TIG-2M-30細胞（JCRB0525）の供給のための凍結アンプル（それぞれ30アンプル）と、バックアップのための凍結アンプル（3アンプルずつ）を作製した。30アンプルと3アンプルはそれぞれHS財団と国立医薬品食品研究所マスターバンクに送るための凍結アンプルである。
- B. 成人皮膚線維芽細胞の新規樹立＝皮膚片から這い出し法により細胞を採取し、細胞数測定を行いながら培養することで正確な細胞集団倍加数（PD）の記録を持つ初代培養細胞を樹立した。これらの細胞像は、線維芽細胞様である。マイコ

プラズマ・細菌の混入のないこと、正常な染色体構成（Gバンド法による）を持つことを確認した。さらに、長期間培養し、正常細胞の特徴である分裂寿命を持つことを調べた。成人由来皮膚線維芽細胞はTIG-108、TIG-109とし、以下の記載のとおりである。

(1) TIG-108（ヒト皮膚線維芽細胞）

由来動物、組織： ヒト、皮膚

性： F

年齢： 40歳

性状： 線維芽細胞様

分裂寿命： PD42

染色体： 正常2倍体（2N=46、XX）

マイコプラズマ： マイナス

細菌： マイナス

供給時のPD： PD15-20

(2) TIG-109（ヒト皮膚線維芽細胞）

由来動物、組織： ヒト、皮膚

性： F

年齢： 39歳

性状： 線維芽細胞様

分裂寿命： PD45

染色体： 正常2倍体（2N=46、XX）

マイコプラズマ： マイナス

細菌： マイナス

供給時のPD： PD15-20

C. 細胞の収集

SVtS-8（ヒト胎児肺線維芽細胞の不死化細胞）

SVtS-8細胞は、東京都老人総合研究所で樹立した正常細胞TIG-3細胞を、広島大学の井出利憲らがSV40 early geneで不死化させ樹立した細胞である。当細胞のバンクへの寄託の許可を受けている。SVtS-8細胞の性格：SV40 early geneをTIG-3細胞（ヒト胎児肺線維芽細胞、男性）に導入し不死化した細胞で、熱感受性が組み合わされているため、高温度で培養すると分裂寿命が引き起こされて、分裂を停止する。細胞老化研究、細胞の不死化・癌化研究に用いられる。HS

財団から供給されている正常細胞のTIG-3細胞と対で使うことができる。

4. 考察と評価

ヒト正常細胞は分裂寿命を持ち、かつ分裂寿命がつきる間に性格が変化する（これをインビトロ細胞老化という）ため、正確な分裂回数の記録を持つ細胞として樹立・維持するには特殊な培養技術と知識が要求される。当面、HS財団供給の老人研由来ヒト正常2倍体細胞の凍結アンプル作製および種細胞の維持・保管は、老人研で行わざるを得ない状況にある。なお、これらの細胞は、凍結アンプル解凍後の生存率が高いことや、醗酵研究所の協力のもとに、マイコプラズマ・細菌の混入がないことなどを確認し、供給に適した状態であることを確認してある。

5. 結論

ヒト正常2倍体の細胞を得るため、ヒト胎児肺線維芽細胞を出発点として、供与者年齢の異なる（老人、成人、幼児の）正常皮膚線維芽細胞を樹立し、HS財団細胞バンクに登録してきた。まだ、成人と幼児由来の細胞は2株ずつしか登録されていないので、今後更に充実化するための計画が進行中である。今年度、2種の成人由来由来の皮膚線維芽細胞を樹立し、性状確認を行ったことにより、新規登録が可能な段階に至った。

2) プロテオーム解析技術の細胞品質管理への応用

1. 研究目的

正常2倍体ヒト細胞は、培養条件下で加齢する有限の分裂寿命を持つ細胞である。このため老化の研究や癌化・不死化の研究に有用である反面、使用する際には細胞の老化度や不死性獲得の有無に十分注意を払う必要がある。本研究は、このような正常2倍体ヒト細胞の品質管理技術を確立することを目的とする。

2. 研究方法

細胞の老化や不死化の過程において、何らかの形でプロテオーム・プロファイルに変化が現れることが考えられる。この変化を2次元電気泳動で捕らえ、マイクロシーケンシングおよび質量分析によるペプチドマスプリンティングによって同定する。

（倫理面へ配慮）

個人情報に関わるデータは扱わないようにし

た。

3. 研究結果および考察

エイジーン研究所の杉本博士、古市博士との協同研究において、ヒト末梢血Bリンパ球をEpstein-Barrウイルスで形質転換した場合、多くのラインは芽球化はするものの、不死化を達成できるものは10%以下であることが、すでにわかっていた。我々は、ウイルスにより形質転換された芽球系細胞から自発的に発生する不死化細胞を捕らえ、不死化前後の発現蛋白質の違いをプロテオーム解析した結果、不死化に伴い下方修正を受ける蛋白質の一つが、微小管の解離再会合の調節に関与するリン酸化蛋白質の一種スタスミンと判明した。この物質は細胞の老化、不死化に伴う形態変化に関連することが推定される。

4. 評価

1) 達成度

有限の分裂寿命を有する正常2倍体ヒト細胞の品質管理の一方法論として、本研究は、二次元電気泳動と質量分析およびマイクロシーケンシング法を組み合わせたプロテオーム解析が有用であることを示し得た。この事実により、当初の目的を達成しつつあると考える。今後は、さらに幅広く、老化度判定指標、および芽球化/不死化判定指標を探索する必要があるものとする。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

本研究成果は、幹細胞を含めたヒト細胞を対象とする医療、基礎医学、生物学、創薬など多分野への応用が期待される。

5. 結論

プロテオーム解析技術は、細胞の品質管理に有用な手段として確立されつつある。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	5 件
原著論文による発表	3 件
それ以外（レビュー等）の発表	4 件

<そのうち主なもの>

論文発表

戸田年総：プロテオームデータベースの構築と活用：生物物理化学，44巻，3号，181-184，2000.

学会発表

戸田年総：細胞の老化に伴うヒストンの翻訳後修飾

の分析を目的とした二次元電気泳動の最適化。：日本生化学会第73回大会、横浜、2000。

近藤 昊、米沢由美子、ヒト胎児皮膚線維芽細胞の遊走の加齢変化と遊走調節因子：遊走メディエーターとしてのアラキドン酸。日本基礎老化学会第23回大会、2000年6月28-30日、大府。

戸田年総、野村晃司、盛政忠臣、木村成道：プロテオーム・プロファイリングによって見いだされたC57BL/6マウス脳に加齢変化。日本基礎老化学会第23回大会、2000年6月28-30日、大府。

ogy. : Spa, Belgium, May 6-10, 2000.

Toda T: Proteome and Proteomics for the Research on Protein Alterations in Aging. : 8th Congress on International Association of BioMedical Gerontology. : Kyongju, Korea, February 21-24, 2000.

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定も含む）
特になし

2) 海外

口頭発表	2 件
原著論文による発表	7 件
それ以外（レビュー等）の発表	2 件

<そのうち主なもの>

論文発表

Miyazaki, H., Fukuda, M., Ishijima, Y., Takagi, Y., Iimura, T., Negishi, A., Hirayama, R., Ishikawa, N., Amagasa, T. and Kimura, N.: Overexpression of nm23-H2/NDP kinase B in a human oral squamous cell carcinoma cell line results in reduced metastasis, differentiated phenotype in the metastatic site and growth factor-independent proliferative activity in culture. Clin. Cancer Res., 5, 4301-4307, 1999

Toda, T., Sugimoto, M., Omori, A., Matsuzaki, T., Furuichi, Y. and Kimura, N.: Proteomic analysis of immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. Electrophoresis, 21, 1814-1822, 2000

Kimura, N., Shimada, N., Fukuda, M., Ishijima, Y., Miyazaki, H., Ishii, A., Takagi, Y. and Ishikawa, N.: Regulation of cellular functions by nucleoside diphosphate kinases in mammals. J. Bioenerg. Biomemb., 32, 309-315, 2000

Kondo, H. and Y. Yonezawa, Human fetal skin fibroblast migration stimulated by an autocrine growth factor bFGF is mediated by phospholipase A2 via arachidonic acid without pertussis toxin-sensitive G-protein. Biophys. Biochem. Res. Commun. 272, 648-652, 2000.

学会発表

Toda, T.: Current status and perspectives of proteomics in ageing research. : EuroConference on Molecular, Cellular and Tissue Gerontol-

研究課題：組織臓器再生機能を保有する幹細胞の研究資源化に関する研究

課題番号：H12-ゲノム-012

分担研究者：所属 神奈川県立がんセンター臨床研究所

氏名 安本 茂

1. 研究目的

- I) 正常ヒト各種上皮培養細胞の研究資源化
- II) 研究資源としてのヒト上皮不死化細胞株の分離
- III) 上皮幹細胞の分離同定と潜在的分化能力の検証
- IV) 遺伝子発現プロファイルを基にした幹細胞、老化細胞及び不死化細胞の細胞特性の解析
- V) 臨床応用（細胞移植、遺伝子治療の標的細胞、再構成上皮組織の移植）に向けての幹細胞の再生能力の検証

2. 研究方法

- 1) ヒト上皮細胞の分離培養：A) Explant-Outgrowth 法による組織片からの均一な上皮細胞の培養と回収。B) デイスペーゼによる上皮層の選択的剥離法及びトリプシンによる部分消化、コラーゲンIVコート培養皿による基底層細胞集団の選別的培養。
- 2) 不死化法：SV40, HPV16-E6/E7, hTERT の導入による各種上皮細胞の不死化
- 3) 幹細胞の分離法：増殖因子受容体、接着因子、ケモカイン類受容体の特異抗体を用いた細胞選別（フローサイトメーター、Dynabeads 法、細胞間接着法）。レトロウイルス及びアデノウイルス発現ベクターによる細胞標識を用いた幹細胞の分裂様式及び再生能力の検証。
- 3) 幹細胞の培養条件の検討：液滴培養法（Droplet culture）の考案、適正培地の工夫による少数細胞（1-1000個）の培養法を用いた幹細胞（上皮構成細胞の1-5%）の再生能力の解析
- 4) DNA-array, Differential RNA display 法による幹細胞分子マーカーの検索。
- 5) マトリックス培養法による幹細胞の組織再構築

（倫理面への配慮）

ヒト手術検体（悪性新生物以外の疾患による）からの細胞の採取及び医学研究利用に関しては、外部識者二名を含めた神奈川県立がんセンター治験審査委員会及び生命倫理委員会において審査を受け、主治医及び手術担当医師による被検者（患者）への文書及び口頭によるインフォームドコンセントを得た上で被検者本人が特定され

ない検体資料として処理されている。

3. 研究結果及び考察

I 上皮細胞の分離と初代培養細胞の調製

現在のところ、明確な病変が伴わないヒト上皮組織は子宮筋腫等による子宮全摘出の場合の子宮頸部からのものが大半を占める。子宮頸部からは外頸部の扁平上皮細胞（ケラチノサイト）と内頸部から円柱上皮細胞（ムチン産生細胞）が回収される。共に回収率は良好で、外頸部一検体から未培養ケラチノサイトは 1.5×10^7 程度回収される。2週間の培養ではほぼ10倍程度の初代培養細胞が調製される。これらは 10^6 /ml/アンプル以上の細胞密度で凍結保存する。内頸部からの円柱上皮細胞は組織片培養から回収されるが、ほぼ同程度の初代培養細胞として回収される。凍結保存は一検体から各々、平均10アンプル程となる。継代培養2代目の細胞ではその10倍の凍結保存細胞が調製できる。したがって、供給本数を考慮すると培養2代目以降が適当と判断される。

その他、需要があれば臍帯からの血管内皮、筋原細胞（サテライト細胞）の回収も可能（検証済）で供給可能な正常細胞として検討項目としている。

II 不死化細胞株

子宮頸部上皮からの不死化細胞株は基礎的な研究目的で必要とする場合に依じて作製したものが20系列程凍結保存済である。これらは論文として未発表のものが含まれているが、細胞の特性が一部（主としてテロメア/テロメラーゼ）確認されたものは順次供給する予定である。

不死化細胞株の作製（SV40, HPVを用いる）は現在では労力と費用を別にすれば比較的容易になってきているため、供給できる新たな不死化細胞株に限度は無いが、需要次第だと考えている。

また現在、基礎研究目的で①胎児皮膚由来ケラチノサイト、②膵臓膵管上皮細胞の不死化細胞の作製に成功しており、その特性の論文等の発表（一部特許申請予定内容を含む）が済み次第、順次供給することを検討している。

これらの不死化細胞株は多くの場合、正常細胞から癌化予備細胞となった細胞系列と考えられるため、基礎的にはヒト細胞を用いた発がん研究、化学物質の毒性検定などには不可欠のものになると考えている。また変異抑制と組み合わせることによって、再生医学への応用が可能になると思われる。

III) 上皮幹細胞の分離培養

上皮構成細胞中1-5%の幹細胞の同定分離技術を確立し、幹細胞の増殖能力が極めて強いことを明らかにし、さらに分化能力も正常であることが明らかになっている。分離されたわずかの幹細胞を10マイクロリットル単位で高密度で培養することにより、極めて高い増殖活性を維持した培養シートを2-4週間程度で作製することができ、さらに長期にわたって(10週以上)増殖能力が低下せず培養を継続できることを明らかにした。このことからヒト上皮初代培養細胞を供給するためには幹細胞の分離培養が優れていると考えられた(特許申請公開中)。

IV) 上皮幹細胞系列の発現遺伝子変動プロファイル:

不死化細胞株及び幹細胞系列の検討すべき細胞特性の一つとして発現遺伝子群の変動プロファイルを得る目的でDNA-array法を実施し、以下のことが明らかになった。

- ① 上皮細胞は老化に伴って発現が昂進する遺伝子群が著しく増加した。
- ② 不死化細胞株の遺伝子発現プロファイルは老化幹細胞型であり、逆に活発な増殖期にある幼若ケラチノサイトのプロファイルを示さなかった。
このことは、多くの不死化細胞株は幹細胞系列上の老化細胞が不死化し、不死化細胞は老化幹細胞の形質を維持すると考えられる興味ある結果を示している。

V) 臨床応用: 幹細胞移植などの臨床応用に向けて上皮組織の再構築を実施し、ラット皮膚への移植実験によって検討を加えている。

4. 評価

1) 達成度

不死化細胞株の作製技術と供給体制はほぼ整ったと考える。一方、正常ヒト上皮初代培養細胞及び幹細胞の同定分離に関しても技術的にはほぼ確立され、臨床応用のための試験研究を実施する体

勢が整ったと考える。分離された幹細胞の研究資源としての供給は実際上の制約が残っているが原理的に可能となった。

2) 成果の学術的、国際的、社会的意義

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、本研究ではその一部が明らかにされたと考える。特に欧米の現状に較べ細胞の不死化研究と不死化細胞株の利用に関し大きく立ち後れている。再生上皮の幹細胞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

3) 今後の展望

人体組織の入手に関して倫理的な側面や実際上のシステムチックな調製体制は一研究部門の限られた人員によって対応できる問題でなくなっている。医学、医療用の再生可能な組織(筋肉、脳神経、肝臓、軟骨、骨など)の幹細胞の同定分離をさらに発展させることが懸案され、その幾つかは当研究分担者が取り扱うことが可能になっている。幹細胞の分離を含めた供給体制はコストと担当スタッフに関してのファイナンシャルサポートが不可欠であるため本研究班の存在意義は大きい。臨床応用に向けての幹細胞の特性に関する幾つかの細胞学および分子生物学的検討課題が残されているが、前年度までの課題であった、1) 自己再生能力を持っているか? については、ある程度の自己再生が可能であることが明らかになってきている。5) 幹細胞に寿命はあるか? に関しては、現在までの解析で、一般に信じられている以上の増殖及び生存能力を持つことが判明したが、細胞集団の再生能力が次第に低下することが避けられないため幹細胞事体の老化も進行すると考えられた。テロメア短縮がその一つの理由と考えられるがその詳細は検討中である。

幹細胞に関する残りの課題

- 2) 自己再生のための機構や分裂の様式。
 - 3) 組織構成細胞のクローナルな生成。
 - 4) 特異的分裂刺激因子類の検索。
- この3点に関してはさらに解析の継続が必要である。

5. 結論

- ① ヒト正常上皮細胞の不死化細胞株の分離法を確立し、不死化細胞株の研究資源化に向けた技術体制を整えた。未登録の昨年度分と合わせて早急に6?7株送付する予定でいる
- ② 不死化細胞株はがん細胞由来の細胞株と異なり多くの点で正常細胞の形質を保持する有用な細胞株と考えられる。しかし不死化細胞で発現変動遺伝子プロファイルの解析からは多くの不死化細胞株は老化幹細胞型であると考えられる興味ある結果が得られた。
- ③ 上皮細胞の長期増殖維持の培養条件を確立した。
- ④ 生化学的、分子生物学的解析が可能なレベルに達する正常上皮培養細胞の供給が一部可能となった。
- ⑤ 上皮幹細胞の分離法は確立したと考えるが、現在の所直ちに供給できる体勢ではない。

6. 研究発表

1) 国内

学会発表：なし

論文発表

1. 安本 茂、表皮幹細胞と培養皮膚。組織培養工学 25: 100-105, 1999
2. 安本 茂、正常上皮幹細胞のテロメラゼ活性と幹細胞。テロメア、テロメラゼ(山木戸道郎編)、pp. 59-73. 1999.
3. 安本 茂、国村忠司、木口一成、ヒト正常上皮幹細胞とテロメラーゼ活性の発現調節免疫と侵襲、1999
4. 安本茂、ヒト上皮幹細胞を操作する：分離培養による自己再生能力とその限界の解析、基礎老化研究 24(2) 83-86、2000
5. 安本 茂、ヒト再生上皮幹細胞の老化。別冊 医学のあゆみ(石川冬木編) pp. 41-47, 2001.

2) 海外

学会発表：なし

論文発表

1. Kunimura, C., Kikuchi, K., Ahmed, N., Shimizu, A. and Yasumoto, S., Telomerase activity in a specific cell subset co-expressing integrin b1/EGFR but not p75NGFR/bcl2/integrin b4 in normal human epithelial cells. Oncogene 17: 187-197, 1998
2. Harada, H., Mitsuyasu, T., Seta, Y., Maruoka, Y., Toyoshima, K. and Yasumoto, S., Overexpression of bcl-2 protein inhibits ter-

minal differentiation of oral keratinocytes in vitro. J. Oral. Pathol. Med. 27: 11-17, 1998

3. Kikuchi, K. and Yasumoto, S. Retention of cell adhesion and growth capability in human cervical cancer cells deprived of cell anchorage. Jpn. J. Cancer Res. 90: 867-873, 1999
4. Masunaga T, Shimizu H, Matsui C, Aozaki R, Morohashi M, Yasumoto S, Nishikawa T. LAMB gene transfection into SV40-transformed keratinocytes from patient with Herlitz junctional epidermolysis bullosa. Arch Dermatol Res 292: 195-197, 2000.

7. 知的所有権の出願、取得状況

2000年公開2件

- ① 整理番号 A3676、特開 2000-4900、国際特許分類 G01N 33/50
公開 平成12年2月29日
発明者：安本茂、国村忠司
発明の名称：長期生存細胞の同定方法およびその単離方法
- ② 整理番号 10-046、特開 2000-60542、国際特許分類 C12N 5/08
公開 平成12年2月29日
発明者：安本茂、国村忠司
発明の名称：高密度細胞培養法

研究課題：多分化能を持つヒト骨髄性細胞の研究資源化に関する研究

課題番号：H12-ゲノム-012

主任研究者：所属施設 岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設

氏名 難波正義

1. 研究目的

細胞の癌化は多段階的におこることが証明されてきた。すなわち、正常細胞は老化期を過ぎ、不死化し、その後、癌化する。ヒト正常細胞が癌化する場合は、老化、不死化の段階がきわめて特徴的で、ヒト細胞は不死化にきわめて抵抗性である。ヒト細胞は不死化すれば比較的容易に癌化するが、容易に不死化しない。この不死化の機構が分かれば、ヒト細胞の癌化の機構の解明につながる。

現在、テロメラーゼは細胞の不死化に密接に関与していることが知られてきたので、テロメラーゼ酵素活性をもたないヒト正常細胞に、テロメラーゼ遺伝子を導入したヒト細胞株を作成した。これらの細胞株は、ヒト細胞の不死化の機構の解明に役立つのみならず、ヒト正常細胞の不死化技術の確立は、今後の細胞治療、組織再生医療に役立つ。

2. 研究方法

正常ヒト胎児由来線維芽細胞(OUMS-36細胞, 34代)にhTERT遺伝子(pMXpuro)をElectrophorationにて導入した。遺伝子導入プロトコールはtrypsin処理した細胞をPBSで置換し、細胞浮遊液をつくり、Electrophoration(400V, 30 msec)にて形質転換した。Electrophoration翌日より0.5 mg/ml, puromycinにてselectionを開始し、翌週より1.0 mg/ml, puromycinに増量。2週間経過観察後、puromycin耐性を獲得した細胞をクローン選別した。細胞濃度, 電気刺激頻度, plasmid濃度の条件は結果の表1に示した通りである。培地は10%ウシ胎児血清を添加したDMEMを用いた。

3. 研究結果及び考察

テロメラーゼ遺伝子を導入した細胞の形態は、線維芽細胞様であり、表に示した8株はすべてテロメラーゼ活性を示した。それぞれの細胞株のテロメアの長さは、あるものは延長し、あるものは、短縮していた。また、現時点で(2001-2-19)、そ

れぞれの細胞株のpopulation doubling levelは、OUMS-36T-1: 64代, OUMS-36T-2: 62代, OUMS-36T-3: 68代, OUMS-36T-4: 65代, OUMS-36T-5: 59代, OUMS-36T-6: 71代, OUMS-36T-7: 59代, OUMS-36T-8: 68代に達しており、老化細胞の特徴はまだ現れていない。しかし、これらの細胞株がただ寿命が延長しているだけなのか、不死化しているのかは、今後の経過観測が必要である。

表1 テロメラーゼ遺伝子を導入されたヒト正常線維芽細胞

	cell density (/well*) plasmid	pulse frequency	DNA conc. (ng/ml)
OUMS-36T-1	10 ⁵	3 times	50
OUMS-36T-2	10 ⁷	twice	50
OUMS-36T-3	10 ⁶	twice	100
OUMS-36T-4	10 ⁶	twice	200
OUMS-36T-5	10 ⁶	4 times	50
OUMS-36T-6	10 ⁶	4 times	200
OUMS-36T-7	10 ⁶	3 times	200
OUMS-36T-8	10 ⁷	4 times	200

* 24 well plate を使用。

4. 評価

1) 達成度について

テロメラーゼの遺伝子をヒト線維芽細胞に導入し、遺伝子が導入された細胞を選別培養する技術は達成された。今後、線維芽細胞以外のいろいろの組織に由来する細胞に同遺伝子を導入することができるか、また、テロメラーゼ遺伝子導入だけでヒト細胞を不死化させることができるかどうか、検討を要する。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について
テロメラーゼ遺伝子のヒト正常細胞への導入法の確立は、今後ヒト細胞の不死化に貢献する。不死化した細胞系は、細胞の老化・不死化・癌化の機構の解明に役立つのみならず、今後の細胞治療・再生医療に役立つと考えられ、その社会的意義は大きい。

また、テロメラーゼ遺伝子導入ヒト正常細胞のバンクへの寄託は新規なものであり、多くの研究者に利用される可能性が期待される。

3) 今後の展望について

ヒトのいろいろの組織に由来する細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入し、それらの組織に由来する細胞の機能をもたせたまま、細胞寿命を延長あるいは不死化させることができれば、細胞治療、再生医療に役立つことが期待される。今後、種々の組織由来の細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入した細胞系を作成する予定である。

5. 結論

ヒト胎児由来の正常線維芽細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入した8系の細胞株を作成し、バンクに寄託した。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	11件
原著論文による発表	4件
それ以外の発表	2件

そのうち主なもの

論文発表

1. 難波正義:老化を示すヒト正常線維芽細胞と不死化ヒト線維芽細胞とに対する鉄イオンの影響に関する研究. 平成11年度厚生科学研究費補助金長寿科学総合研究事業研究報告書. 31-35, 2000
2. 小林直哉, 野口洋文, 田中紀章, 深谷憲一, 阪口政清, 井上裕介, 宮崎正博, 難波正義:急性肝不全に対する不死化ヒト肝細胞の移植. 今日の移植 13(3), 216-221, 2000
3. 河内祐輔, 難波正義:正常ヒト線維芽細胞hTERT導入株. *Tiss. Cult. Res. Commun.* 2000 (in press).

学会発表

1. 井上裕介, 宮崎正博, 辻 俊也, 難波正義: Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4)導入によるヒト不死化肝細胞株(OUMS-29)の肝特異的遺伝子の

発現. 第7回肝細胞研究会. 2000年6月

2. 野崎 功, 辻 俊也, 阪口政清, 宮崎正博, 清水信義, 難波正義: Human cytochrome P-450 2E1導入ヒト肝癌細胞株(HLE/2E1)の樹立と薬物毒性に対する特徴. 第7回肝細胞研究会. 2000年6月
3. 濮 紅, 阪口政清, 近藤 格, 近藤麻美, 姜海行, 川端晃幸, 難波正義: 培養環境中の酸素濃度の依存するヒト線維芽細胞に対する鉄毒性. 第73回日本組織培養学会. 2000年9月
4. 阪口政清, 宮崎正博, 河内祐輔, 近藤 格, 難波正義: S100Cタンパク質の細胞密度依存性増殖抑制シグナル. 第73回日本組織培養学会. 2000年9月
5. 呉 世薫, 尾山祐次郎, 難波正義: サイトカイン産生ヒト細胞の作製. 第73回日本組織培養学会, シンポジウム. 2000年9月
6. 近藤麻美, 岡田 茂, 宮崎正博, 難波正義: ヒト正常線維芽細胞と不死化線維芽細胞における鉄ニトリロ三酢酸による細胞障害とラジカル発生の違い. 第59回日本癌学会. 2000年10月
7. 近藤 格, 難波正義: ヒト細胞の不死化に伴い減少する細胞内タンパク質の二次元電機泳動による解析. 第59回日本癌学会. 2000年10月
8. 宮崎正博, 小林直哉, 阪口政清, 深谷憲一, 難波正義: 高分化型ヒト不死化肝細胞株(OUMS-29及びNRNT-3)の樹立と急性肝不全治療への応用. 第53回日本細胞生物学会, シンポジウム, 2000年10月
9. 友野靖子, 安藤香織, 内藤一郎, 佐渡義一, 坪井 壮, 渡辺綱一, 沖垣 達, 宮崎正博, 難波正義, 二宮善文: ヒト肝癌株細胞が分泌するXVIII型コラーゲン. 第53回日本細胞生物学会, シンポジウム, 2000年10月
10. 阪口政清, 宮崎正博, 河内祐輔, 近藤 格, 難波正義: S100Cタンパク質の増殖抑制シグナル. 第53回日本細胞生物学会, 2000年10月

2) 海外

口頭発表	2件
原著論文による発表	11件
それ以外(レビュー等)の発表	1件

そのうち主なもの

1. Li, J.W., Inoue, Y., Miyazaki, M., Pu, H., Kondo, A. and Namba, M.: Growth inhibitory effects of ATP and its derivatives on human fibroblasts immortalized with ⁶⁰Co- γ rays. *Int. J. Mol. Med.* 5, 59-62, 2000

2. Kobayashi, N., Miyazaki, M., Fukaya, K., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Uemura, T., Noguchi, H., Kondo, A., Tanaka, N. and Namba, M.: Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. *Transplantation* 69(2), 202-207, 2000
3. Tsuji, T., Miyazaki, M., Sakaguchi, M., Inoue, Y. and Namba, M.: A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 20-24, 2000
4. Kobayashi, N., Fujiwara, T., Westerman, K.A., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Noguchi, H., Miyazaki, M., Cai, J., Tanaka, N., Fox, I.J. and Leboulch, P.: Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 287, 1258-1262, 2000
5. Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Inoue, Y., Tsuji, T., Kouchi, H., Tanaka, T., Yamada, H. and Namba, M.: Relationship between contact inhibition and intranuclear S100C of normal human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 149(6), 1193-1206, 2000
6. Tsuji, T., Miyazaki, M., Sakaguchi, M. and Namba, M.: In vitro aging research in Japan. *Exp. Gerontol.* 35, 291-298, 2000
7. Kobayashi, N., Miyazaki, M., Fukaya, K., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Noguchi, H., Tanaka, N. and Namba, M.: Establishment of a highly differentiated immortalized human hepatocyte cell line as a source of hepatic function in the bioartificial liver. *Transplant. Proc.* 32, 237-241, 2000
8. Kano, Y., Nohno, T., Takahashi, R., Hiragami, F., Kawamura, K., Strebhardt, K., Namba, M., Sugiyama, T. and Little, J.B.: Morphological alteration of x-ray induced partially transformed human cells by transfection with a small c-myc DNA sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 887-894, 2000
9. Kobayashi, N., Miyazaki, M., Fukaya, K., Noguchi, H., Tanaka, N. and Namba, M.: Intrasplenic transplantation of immortalized human fetal hepatocytes prolongs the survival of 90% hepatectomized rats(1). *Transplant Proc.* 32(7), 2365-2367, 2000
10. Kobayashi, N., Miyazaki, M., Fukaya, K., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Noguchi, H., Matsumura, T., Watanabe, T., Totsugawa, T., Tanaka, N. and Namba, M.: Treatment of surgically induced acute liver failure with transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes. *Cell Transplant.* 9, 733-735, 2000

研究課題：国内樹立ヒト細胞系の状況調査と収集に関する研究

課題番号：H12-ゲノム-012

分担研究者： 所属施設 昭和大学腫瘍分子生物学研究所
氏名 黒木登志夫

1. 研究目的

わが国で樹立された細胞株の状況を調査し、生命科学に必須な細胞株を収集し、品質管理を行った上で、細胞バンクを通して研究者に分与する。

2. 研究方法

わが国において細胞株樹立および細胞株之遺伝子発現変異研究に関わっている次の研究者が共同研究者として本研究に参加した。それぞれの研究室において樹立された細胞株を細胞バンクに寄託する。

細胞株樹立共同研究者：

永森静志（杏林大・医・薬理；ヒト肝胆道系がん）
平川弘聖（大阪市大・医・外科；ヒト消化器がん、乳がん）
野沢志朗（慶応大・医・婦人科；ヒト子宮がん、卵巣がん）
井口東郎（九州がんセンター臨床研究部；ヒト膀胱がん）
柳原五吉（国立がんセンター・実験動物；ヒトがん、マウス腫瘍）
嶋田 裕（京大・医・外科；ヒト食道がん）
京泉誠之（放射線影響研究所・免疫；ヒトがん、マウスがん）
執印太郎（高知医大・泌尿器；ヒト腎がん）

品質管理共同研究者：

石岡千加史（東北大・加齢研；がん関連遺伝子変異検定）
稲澤 譲治（東京医歯大・難治研；染色体増幅、転座）

細胞収集法：

- 1) 上記細胞株樹立者から提供を受けた細胞は、次に示す品質管理を行い、検査に合格した細胞株を細胞バンクに寄託する。
- 2) 細胞バンクは寄託された細胞をマスターバンクとして、長期保存用のシードカルチャーの保存を行う。樹立者は細胞株の原株の保存の責任をもつ。
- 3) 寄託された細胞株はHS研究資源バンクを通して、公共研究資源として一般に有償で配布する。

品質管理法：

- 1) 細菌感染については培養法により、マイコプラ

ズマ感染については、染色およびPCRによって検出する。

- 2) 動物種についてはアイソザイム検査によって確認する。
- 3) 細胞株の混入については、DNAプロファイリング、染色体核型によって確認する。
- 4) さらに遺伝子増幅をCGH(Comparative genomic hybridization)によって検索する。
- 5) 遺伝子(ras)およびがん抑制遺伝子(p53, PTEN, APC, BRCA-1, 2)の変異をPCR法および酵母を用いたアッセイ法によって検索する。

(倫理面への配慮)

平成13年4月から施行される予定の『ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針』に従う。今回収集する細胞株は、この倫理指針前に樹立された細胞株であるので、患者から採取時に細胞バンク寄託についてのインフォームドコンセントを取得してあるかどうかを最初の問題となる。その内容にしたがってA群、B群、C群に分類し、倫理審査委員会で細胞バンクに寄託の是非を検討することになる。配布にあたっては、上記倫理指針に従い、連結不可能匿名化される。

3. 研究結果および考察：

本年度に収集した（あるいは収集予定の）ヒト細胞株28株、およびマウス由来細胞株4株を別表に示した。

ヒトがん由来細胞株は、食道がん由来細胞株が4株、膀胱がん由来細胞株4株、口腔内がん株2株、胃がん由来細胞株2株、肺がん由来1株、肝胆道系がん由来細胞株4株、乳がん由来1株、子宮頸部がん2株、子宮体部がん2株、卵巣がん1株、腎がん由来4株である。それぞれ転移形成能等で特性を有する。腎がん4株はいずれも腎がんのがん抑制遺伝子であるVHL遺伝子に変異あるいはmethylationの異常をもつ。VHL遺伝子に異常をもつ細胞は非常に少なく貴重な研究材料となるであろう。

マウス由来細胞株は4株を収集した。このうち