

201108008B

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究推進事業

ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等の
有効性、安全性評価システムの構築

平成21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者
野村 大成

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総合研究報告

ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築	-----	1
野村大成 (資料) 年度別 (総括) 研究報告書		

(資料) 総合分担研究報告および年度別分担研究報告書

1. マイクロアレイを用いた継代維持ヒト組織の遺伝子発現の検索	-----	35
梁 治子		
2. ヒト腫瘍細胞等の SCID マウスでの腫瘍形成能、転移能の in vivo 検索系の確立	-----	55
小原 有弘		
3. 呼吸器疾患移植組織と免疫機能の解析	-----	75
立花 功		
4. 消化器等一般外科手術組織の移植系の確立	-----	81
本行忠志		
5. 前立腺腫瘍、前立腺肥大組織の移植維持系の確立	-----	91
野々村祝夫		
6. 婦人科腫瘍、胎児組織の移植維持系の確立	-----	101
榎本隆之		

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	113
--------------------	-------	-----

I. 総合研究報告

ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等の有効性、 安全性評価システムの構築

研究代表者 野村 大成（独）医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨：本研究では、ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築によるヒト臨床がん、疾患組織等の継代維持と再生可能な形での凍結保存基盤技術の確立を目的とし、（１）ヒト組織長期維持に最適のSCIDマウスを開発・使用、（２）20年間継代維持凍結保存してきたヒト腫瘍組織の再移植と再生可能な形での凍結保存を22年度までに完成、（３）未成功の前立腺がん、GIST等、新たなヒト臨床腫瘍組織の継代維持、再生可能な形での凍結保存、（４）ヒト培養がん細胞と臨床がん移植組織の創薬に向けた優位性、（５）ヒト正常組織、胎児由来組織の継代維持と褐色脂肪組織など新たなヒト資源の開発とその特性の究明を計り、ヒトがんと正常組織の総括的ヒト組織維持システムの基盤技術を23年度までに完成させる。20年以上にわたり世界をリードしてきた基盤研究の将来でのデータベース化等への発展を期するものであり、生きたヒト組織での医薬品等の有効性・安全性の研究、環境有害物質の人体影響評価に用いられ、国民の健康と医療・福祉に大きく貢献する。

研究分担者氏名・所属研究機関名及
び所属研究機関における職名

梁 治子・独立行政法人医薬基盤研究所・
プロジェクトサブリーダー

小原有弘・独立行政法人医薬基盤研究所・
研究員

立花 功・大阪大学・医学系研究科・
講師

本行忠志・大阪大学・医学系研究科・
准教授

野々村祝夫・大阪大学・医学系研究科・
教授

榎本隆之・大阪大学・医学系研究科・
准教授

A. 研究目的

1986年、Bosma博士よりT細胞、B細胞機能の欠如したSCIDマウスC.B17-*scid*⁺の供与を受けた。しかし、原種は、80%前後に正

常T、B細胞が出現し、約半数が8ヵ月以内に白血病死した。C.B17-*scid/scid*マウスのうち、IgM、IgGが検出限界以下のものを20代以上選択的兄妹交配することにより、Leaky、白血病死を激減させた。現在、世代数はF₅₃を超えている。これにより、初めてヌードマウス等に生着したことのないヒト悪性腫瘍が急激に増殖し、自然遠隔転移すること（J Rad Res, 1900, Jpn J Cancer Res, 1991, 93）、ヒト良性腫瘍もゆっくり増殖すること

（Carcinogenesis, 1992, Cancer Det, 1997, Cancer Lett, 1998, 2002）、最終的には、ヒト正常臓器・組織の長期間（～3年）の継代維持に成功した（Cancer Res, 1997, Cancer Lett, 1998；以後Super-SCIDと呼ばれる）。500回以上にわたり、ヒト脳組織を除く正常組織、前がん組織、がん組織の維持を行った。移植後の病理組織像やホルモン分泌能等はよく維持されている。また、移植ヒト皮膚に太陽紫外線類似光（UVB）を照射し、世界で初めて、人工的にヒトがんの誘発に成功した（Cancer Res, 1997）。ヒト骨髄、免疫細胞も

よく維持される (Mutat Res, 2008)。ヒト胎児組織も増殖分化し継代維持できた。ヒトヘルペスウイルスのようにヒト皮膚のみを宿主とするウイルスに関する感染症研究にも極めて重要な武器となっている。

本研究では、ヒト組織長期維持 SCID マウスを用いた医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築によるヒト臨床がん、疾患組織等の継代維持と再生可能な形での凍結保存基盤技術の確立を目的とし、

(1) ヒト組織長期維持に最適の SCID マウスを開発・使用、

(2) 20 年間継代維持凍結保存してきたヒト腫瘍組織の再移植と再生可能な形での凍結保存を 22 年度までに完成、

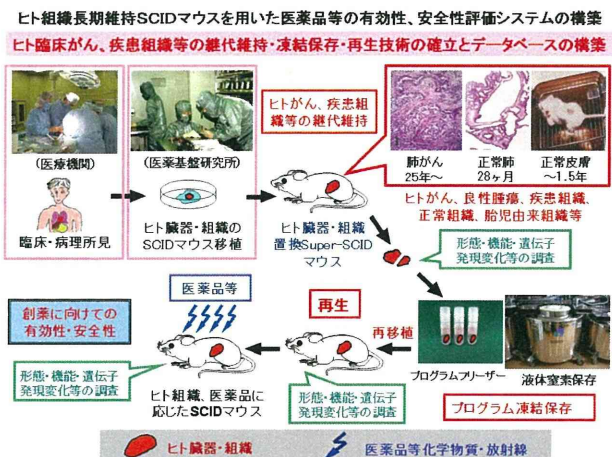
(3) 未成功の前立腺がん、GIST 等、新たなヒト臨床腫瘍組織の継代維持、再生可能な形での凍結保存、

(4) ヒト培養がん細胞と臨床がん移植組織の創薬に向けた優位性、

(5) ヒト正常組織、胎児由来組織の継代維持と褐色脂肪組織など新たなヒト資源の開発とその特性の究明を計り、

ヒトがんと正常組織の総括的ヒト組織維持システムの基盤技術を 23 年度までに完成させる。20 年以上にわたり世界をリードしてきた基盤研究の将来でのデータベース化等への発展を期するものであり、生きたヒト組織での医薬品等の有効性・安全性の研究、環境有害物質の人体影響評価に用いられ、国民の健康と医療・福祉に大きく貢献する (図 1)。

図 1



B. 研究方法

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持・増産; C. B17-*scid* [原種] に加え、C57BL/6J-*scid*, C3H/HeJ-*scid* 等マウスを常備する。bg^J, *H* 導入マウス (野村ら、1993) も用意する (野村)。

2. ノードマウス・通常の SCID マウスに生着したことの無いヒト悪性腫瘍、良性腫瘍、前がん病変 (主として頭頸部腫瘍、婦人科・生殖器腫瘍、消化器腫瘍、内分泌腫瘍等) を Super-SCID マウスで継代移植維持後凍結保存 (1988~1995) し、2005 年、大阪大学より医薬基盤研究所に移動、保管している。凍結保存組織を再移植することにより継代維持能力の確認を開始する (野村)。継代による組織変化は病理学的には認めていない (研究目的欄論文参考) が、形態学的観察に加え、機能変化を生化学的あるいはマイクロアレイを用い遺伝子発現レベルで解析する (梁、野村)。

3. 原発腫瘍、転移組織の新規移植; ホルモン非依存性前立腺癌、前立腺肥大組織、各種肺がん臨床組織の移植、継代維持から開始する。がんの進展をフォローするため、SCID マウス血中 PSA の微量測定法を完成させるとともに (野村、野々村)、自然遠隔転移を確認するため、マイクロサテライト解析法を開発する (梁、野村)。

4. 培養細胞移植; 資源部細胞バンクにおいて、遺伝子、微生物汚染のないことが確認できているルシフェラーゼ標識培養細胞 (腫瘍、骨髄細胞等) 株の確立 (小原) を行うと共に、皮下、腹腔、当該臓器内移植を行う。腹腔内移植系の成立は定量的制がん研究に重要である。中皮腫、前立腺がん細胞、大腸がん細胞等から開始する。(野村、小原)。

5. ヒト正常組織・細胞の長期維持; 成人脳以外の臓器組織の長期 (~2 年) 維持の大規模実験は終了している。確認リストを作成する。但し、ヒト甲状腺組織 (バセド一病由来)、肺組織、骨髄細胞、胎児由来組織 (皮膚、肺、脂肪等) 継代移植マウスは常備に努める。短時間宇宙飛行実験にも備える (野村、本行、立花、榎本)。

6. 移植ヒトがん組織中のウイルス検査；ヒト組織の医薬基盤研究所動物施設への導入に際しては、患者の手術前検査において、マイコプラズマ、肝炎 B, C 抗原、抗体、HIV, 成人 T 細胞白血病、Wasserman 反応陰性の場合のみ許可される。それに加え、ヒトがん組織中のウイルス検査も行う（野村、梁、小原）。検査するウイルスの種類は、DNA ウィルス；CMV, EBV, HH6, HH7, BKV JCV, ADV1, paboB19 HBV, HTLV1 HTLV2, HIV1 HIV2, HPV18, RNA ウィルス；HCV, RMRV である。ヒト移植（-80°凍結）より、DNA および RNA を同時に抽出する（AllPrep® DNA/RNA MiniKit, QIAGEN, Tokyo）し、TagMan Probe を用い、リアルタイム PCR 法（DNA ウィルス）またはリアルタイム RT-PCR 法（RNA ウィルス）により、各ウィルスの増幅を調べた。この時、GAPDH と β -actin を、DNA および RNA ウィルスそれぞれの、standard 遺伝子として用いた。Real time PCR は、GAPDH が 50 copies/500 ng genome DNA で、Real time RT-PCR は、 β -actin が 100 copies/100 ng Total RNA で増幅される条件下で行った。（小原、梁、野村）。

（倫理面への配慮）

手術等による成人ヒト組織に対しては、「ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等および先端医療評価システムの開発」（代表・野村）、12週未満退治組織に対しては、「ヒト胎児組織維持SCIDマウスを用いた医薬品等評価システムの開発」（代表・野村）の2課題で、医薬基盤研究所および医療機関の倫理委員会の承認をえている。厳重な管理の下、医薬基盤研究所において野村が移植・継代維持をおこなっている。譲渡されるヒト組織に対しては、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除やに関しては、文書・口頭で十分にインフォームド・コンセントをとり、同意を得、同意書にサインを頂いている。18歳未満の方に対しては、本人および親権者の同意を得ている。

動物実験に関しては、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研修、登録のうえ、十分に動物愛護

上の問題点に配慮し、研究をおこなっている。

その他の指針等（指針等の名称：厚生科学審議会「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」、日本産科婦人科学会会告「死亡した胎児・新生児の臓器等を研究に用いることの是非や許容範囲についての見解」、および、「同上」に対する解説。）

C. 研究結果

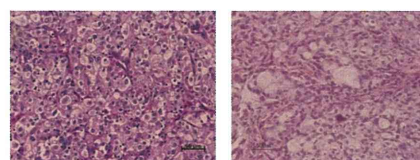
本研究課題について、当初研究計画・方法どおり実施し、計画以上の成果が得られた。

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持・増産；C. B17-*scid* [原種] に加え、C57BL/6J-*scid*, C3H/HeJ-*scid* 等マウスを常備した。bg^J, # 導入マウス（野村ら、1993）も用意した（野村）。

2. 長期継代維持後凍結保存ヒト組織・細胞の再移植・保存；

継代移植維持後凍結保存してきた（1988～1995）悪性腫瘍のうち、Yolk Sac 腫瘍、肺がん、結腸がん、頭頸部腫瘍等に加え、膵臓がん等について実施成功し、当所計画通りに 22 年度にほぼ終了した（野村）。ヒト悪性腫瘍も、正常臓器・組織、良性腫瘍移植前で見られたように肺がん、乳がん、大腸がん、下咽頭がんの移植後の組織の形態は移植前の組織形態と比べて変化はない（図 2～4）。

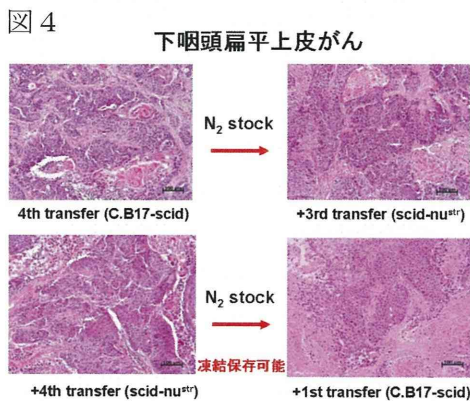
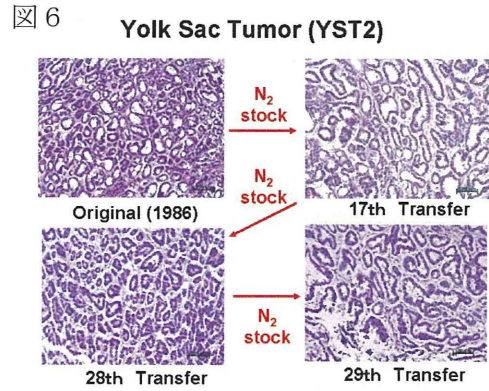
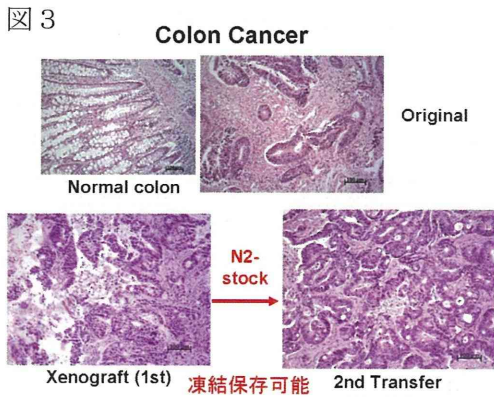
図 2 Lung Cancer in Peutz-Jeghers Syndrome Patient



Original 10.27.1993 9.12.2009 from N₂ stock

凍結保存可能

ヒト膵臓がんも 21 年度報告書に示した他のがん組織と同様に、移植後および凍結保存再生後もその組織形態は移植前、凍結保存前の組織形態と比べて変化はない（図 5）。



移植 10, 26, 31 代目組織をそれぞれ比較したところ変化はなかった (図7~9)。

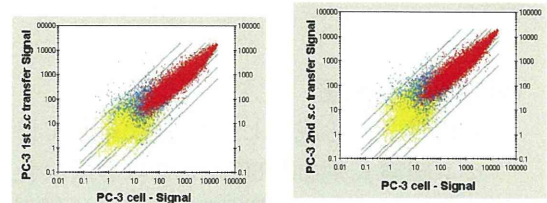
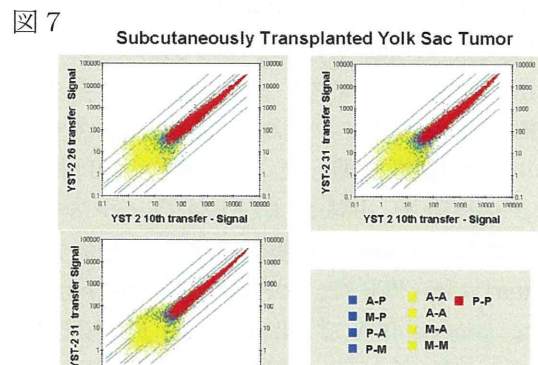
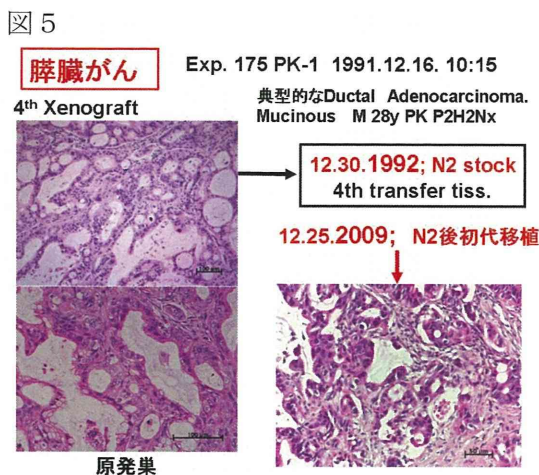


図8

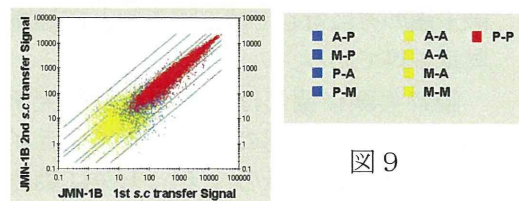
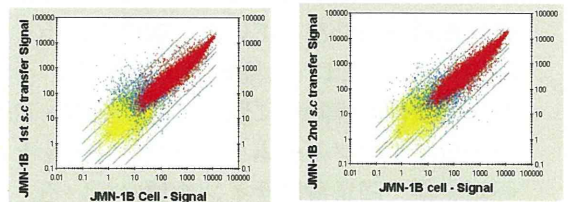
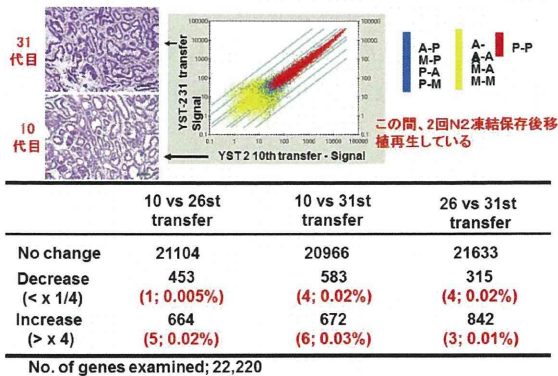


図9

以上のごとく、マウス移植悪性腫瘍組織片を N₂ 保存→再移植のサイクルを繰り返しても増殖し、組織像には変化がないことを見出した。ヒトの Yolk Sac Tumor をプログラムフリーザーで凍結し液体窒素中で保存したものを SCID マウスに再移植しても、生着し急速に増殖し移植前の組織の形態をよく保持していた (図6)。より詳細な検証のため、マイクロアレイを用い、遺伝子発現の変化について、

移植による形態および遺伝子発現の変化がほとんどみられない。卵のう膜腫瘍の継代、凍結、再移植の際にみられる遺伝子発現量の比較を移植代数により数値に示したのが表1である。変化は微々たるものである。従って、ヒト卵のう膜腫瘍については、継代維持、凍結保存、再生による形態学的、機能的変化なく、ほぼ完璧に永久保存されていると考えられる(野村)。

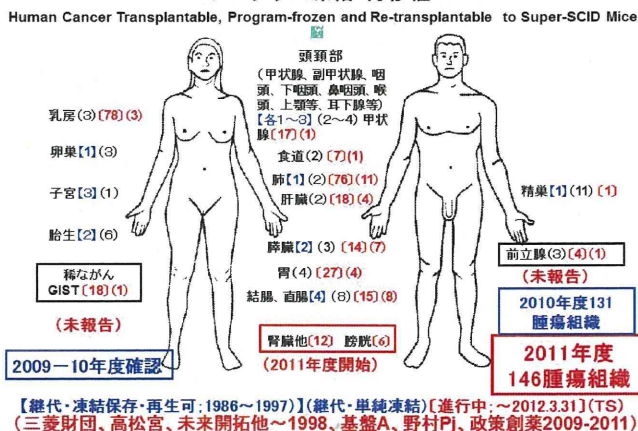
表1
継代維持による遺伝子発現の変化は殆どない(YST-2)



3. 原発腫瘍、転移組織の新規移植;

平成22年度に新規ヒト腫瘍131症例を、23年度には新規ヒト腫瘍146症例をSCIDマウスに移植した(野村、研究協力者;吉留、鳥、坂巻)。特に腎、尿管、膀胱腫瘍を主に行った。その成果は、図10に示した。移植したヒト組織の殆どは維持されるが、3-4カ月で消失する例が少数例でみられた。SCIDマウスへの継代移植を行い2-3代継代しても増殖の遅いもの(継代移植後6-8カ月たっても腫瘍が大きくなる)は中止し、6カ月以内に大きな腫瘍を形成するものを選び順

図10 Super-SCIDマウスへのヒトがん組織の移植、プログラム凍結・再移植



次プログラムフリーザーにて凍結保存した。

図11に示すように緩慢法(-0.1°C/min)では、20年前に凍結したヒトがん組織がもとのまま再生された。急速凍結法は、難移植性ヒト腫瘍には不向きであり消失した。

図11

ヒト組織のプログラム凍結保存



今まで移植が極めて困難であったヒト前立腺癌(睾丸転移巣)を適切なSCIDマウスに移植することによりSCIDマウス皮下で増殖するようになり、継代維持に成功している(野村、野々村)(22年度報告)。移植後腫瘍が大きくなるにつれマウス血中のヒトPSA濃度が増加している(図12)。また、これまで誰も移植継代維持に成功していないGISTは、倍加時間がヒト体内におけると同様に(遅いものは1年)極めてゆっくりであるが、転移症例では比較的早く増殖し、凍結保存にも成功している(図13)。

膵臓がん等をSCIDマウスに移植することにより、遠隔転移するものも見つかった(図13)。従って、前立腺がん、前立腺肥大組織の進展をフォローするために、SCIDマウス血中PSAの微量測定法の開発が必要となった。また、SCIDマウスでの遠隔転移を客観的に迅速に検出することが必要である。

Exp. 415 Prostate Cancer (Testicular Metastasis)



4th Xenograft; 11.4.2010, PSA; 72.7 ng/ml
C3H/HeJ-scid; b; LPS-2530, Testosterone (-)

手術前患者血清中
PSA; 5.6 ng/ml

図12

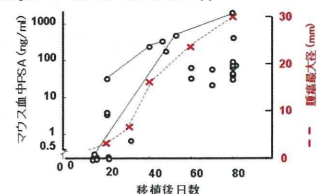


図 1 3

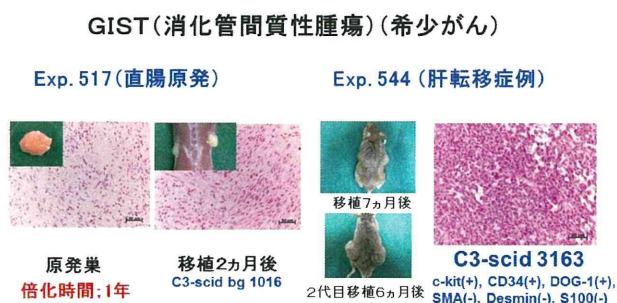


図 1 4



1) P S A 微量測定 (基礎編) ;

KAIWOOD CHR-110R Chromogenic Reader、PSA Test Cassette を用いヒトおよびマウス血清 100 μl 中のヒト PSA 測定を行った。

(1) 試料

- ・イノテック PSA 標準液 (0、4、10、22.5、45、95ng/ml)
- ・PBS
- ・阪大病院患者既知 PSA 血清 25 検体
- ・ヒト O 血清 (女性血清)
- ・マウス O 血清 (SCID マウス血清)

(2) 測定時間の設定

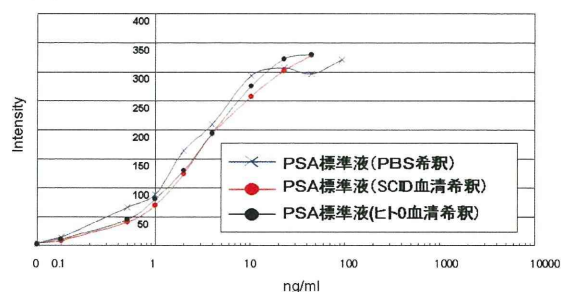
サンプル 100 μl チャージより測定までの時間 (1、2、3、4、5、6、7、10) を変え、各資料で Intensity を測定したところ、標準液、PBS を用いた場合、サンプル液が C ラインまで到達まで 5 分弱を要するため、それまでの測定値は無意味。5 分以降も経時的に Intensity は増加するし、時間を決めて測定してもデータは不安定であった。粘張なヒト血清では、5 分では C ラインまで到達しない。従って、ヒト O 血清 (女性) でも 5、6 分まで、高値を示す。10 分で確実に 0 を示す。標準 PSA 液をヒト血清で希釈した場合でも、10 分で安定した結果が得ら

れた。

(3) 検量曲線

PSA 標準液を PBS 希釈した場合、ヒト O 血清で希釈した場合、マウス血清で希釈した場合の量効果曲線を作成した。図 5 に示したとおり、PSA 量に比例して、Intensity は上昇し、きれいな検量曲線が得られた。PBS 希釈と粘張な血清とは少しずれがある。マウス血清、ヒト血清中の PSA 値は同一曲線を描いた。信頼性のある測定結果を示した。患者高 PSA 血清 2 検体のヒト O 血清希釈による検量曲線を作成し、その結果を図 5 に示した。PSA 量に比例して、Intensity は上昇し、きれいな検量曲線が得られた (図 1 5)。

図 1 5



以上の結果から、本装置を用いることにより、ヒト血中 PSA 値を正確に測定できることが判明した (0.1~100ng/ml)。0.5~20ng/ml の間は、ほぼ直線である。高値 PSA 血清に関しては、希釈法により測定が可能である。

2) P S A 微量測定 (応用編) ;

(1) 試料

- ・病院臨床検査部測定患者血清
- ・病院臨床検査部測定装置、BECKMAN COULER, Inc. UniCel DxI 800 immunoassay system 測定試薬が同じく BECKMAN COULER, Inc. Hybritech® ; PSA Test。
- ・P S A 標準液 (イノテック) ヒト O 血清希釈液

(2) 測定 ; KAIWOOD PSA Test Cassette を用い、P S A 標準液で確認したところ、同一値が得られたので、病院大型機器により測定済みの患者血清を本装置と本カセットにて測定した。分担研究者・野々村の報告書に示すように、P S A 標準血清を用い描

いた検量曲線では 100ng/ml 以下ではよく一致しているが、高値では検量曲線から大きく外れるものがあり、大型機器による測定を疑わざるを得ない結果となった（分担研究報告書・野々村、参照）。

3) 前立腺がん移植 SCID マウス血中 P S A 値の変動と腫瘍増殖

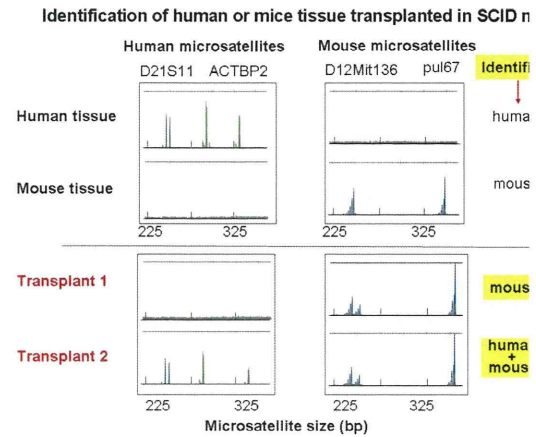
図 3 に示した如く、移植後 3-4 ヶ月で巨大な腫瘍を形成するようになった。血中 P S A 値も腫瘍の大きさに比例して高値を示した。手術前の患者血中 P S A 値は 5.6ng/ml であったが、数ヶ月で 1000 近い P S A 値を示すものもあった。

4) マイクロサテライトを用いたがんの浸潤、転移のフォロー；

SCID マウス体内でのヒトがんの進展をフォローするのに P S A など特異的なマーカーがあると大いに役立つことは、これまでの報告書に記載した（野村、野々村、小原）。しかし、ヒトがん組織を移植した際に、局所的にマウス腫瘍が誘発されることが極く稀にある。ヒトがん、マウスがんの識別また、ヒトがんのマウス体内への浸潤、遠隔転移識別には、病理組織学的、免疫学的手法に加え、より普遍的な手技が必要である。最近、マイクロサテライト解析法により迅速、客観的に識別することに成功した。マイクロサテライトはヒトゲノム上の 10,000 箇所位置しており、2~6 塩基対が約 100 コピーからなる短い配列である。短い遺伝子座であるため、PCR 法で増幅可能である。蛍光ラベルされたプライマーを用意し（Applied Biosystems）、SCID マウス移植がんの移植腫瘍そのものおよび転移組織 DNA を template として、4 種遺伝子座を PCR 法で、増殖する。得られた PCR 産物を、キャピラリー電気泳動にかけ（Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystems）Fragment analysis ソフト（GeneMapper, Applied Biosystems）で、それぞれの遺伝子座の長さや産物量を、PCR 産物を解析することで行った。マイクロサテライトは、普通はヒト、マウスに特異的である。用いたマイクロサテライト D21S11 と ACTBP2 は、ヒト組織に、D12Mit136 と pul67 は、マウス組織に特異性を示した。従って、移植が

ん組織について、移植 1 は、マウス組織であり、移植 2 は、ヒトとマウスの組織が混在していることが判別した（図 16）。

図 16



ヒトがん組織を継代、移植することにより巨大なヒト腫瘍を形成するが、がん種により周辺組織への浸潤に加えて、腋窩部、鼠蹊部、肺門部リンパ節、肺、肝等内臓に腫瘍を形成することがある。これがマウス由来かヒト由来か、病理組織診断に加え、客観的な証拠を得るのに用いた。病理学的にヒトがん組織の転移を疑っていた腫瘍は全てヒトマイクロサテライトパターンを示した。また、稀であるが、SCID マウスへのヒト腫瘍移植部位にマウス白血病が発生することもあるが、この場合も早急にヒト、マウス由来の診断を下すのに役立った。正常部位肺組織を移植した 2 例に巨大な腫瘍が発生し、解析の結果ヒト肺がんであった。臨床診断、治療に役立った。

4. 培養細胞移植

培養細胞移植；資源部細胞バンクにおいて、遺伝子、微生物汚染のない培養細胞（腫瘍、骨髄細胞等）を保存している。ヒト培養がん細胞については、ヒトの前立腺がん PC-3、中皮腫 JM1-1B、乳がん MCF-7 細胞株等を SCID マウスに移植した。予想通り、培養がん細胞は SCID マウス体内で急速に増殖し巨大な腫瘍を形成した。転移もした。移植された細胞は均質な細胞塊を形成し、継代移植しても形態は変わらない（図-17、18、19）。

また、培養がん細胞は SCID へ移植すると容易に増殖する。腹腔内注入すると、腹瘤を

形成し移植時の細胞数と移植・増殖した tumor nodule の数とにきれいな相関がみられた (図-20) ので、定量的制がん研究に用いられる。

図 - 17 Prostate Cancer Cell PC3

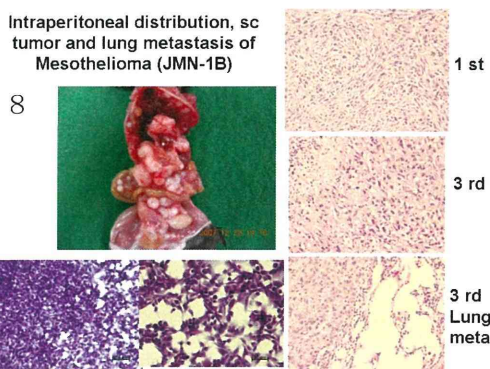
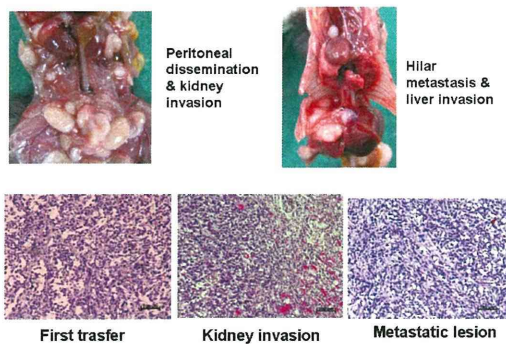


図 - 19

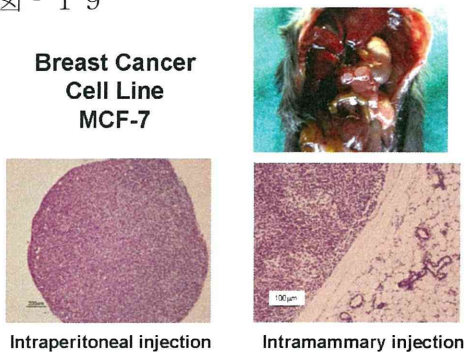


図 20 Distribution of Intraperitoneally Injected Mesothelioma Cell Line JMN-1B

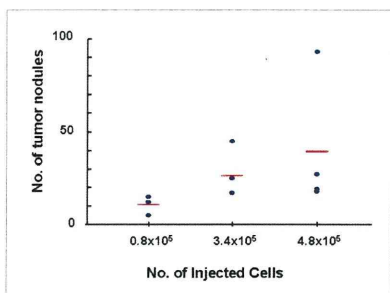
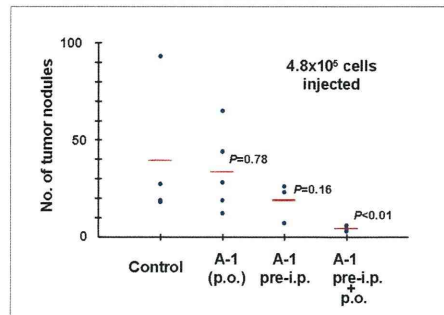


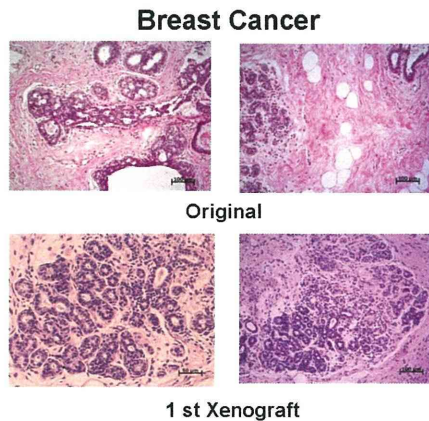
図 21 は、ヒト悪性腫瘍細胞 JMN-1B を SCID マウスに注入し、生理活性物質 (A) の効果を調べた実験で、tumor nodule 形成に抑制効果があることを示したモデル実験である (野村、立花、小原)。

図 21 Inhibitory Effects of Biomodifier on the Development of Intraperitoneally Injected Mesothelioma Cell Line JMN-1B in SCID Mice



しかしながら、乳がんの例 (図-19 と 22) をみてほしい。培養乳がん細胞を SCID マウスに移植してもがん細胞の塊があるだけで、臨床例にみるようながん特有の構造を形成するわけでない。致命的な差といえる。

図 22

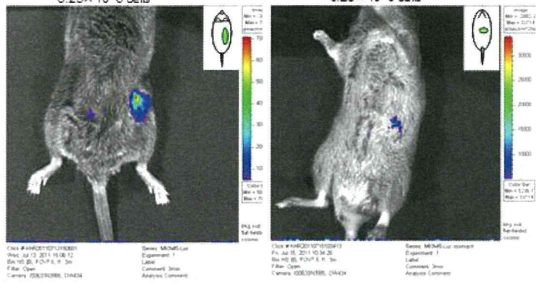


資源部細胞バンクにおいて、ルシフェラーゼ標識したヒト培養細胞の維持と遺伝子、微生物汚染のないヒトがん培養細胞 (腫瘍、骨髄細胞等) を選別保存した (詳細は、分担研究報告書・小原に記載)。ルシフェラーゼ安定発現がん細胞をスーパーSCID マウスに移植し、発光イメージング装置である IVIS (Caliper 社製) にて担癌マウスにおけるがん細胞の動態に関する観察を行った (小原)。担癌マウスの発光イメージングにおいては十分な感度を持って、皮下移植したがん細胞ならびに深部の標的臓器に移植したがん細胞のイメージングすることができた (図 23)。

図 2 3

MKN45-Luc (Exp. No. 621(G))

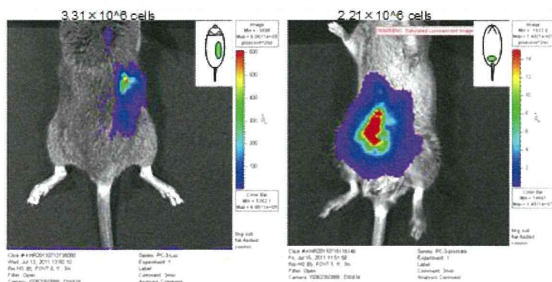
- ① 背中右皮下注入
- ② 膵胃壁内注入(開腹)



胃壁などのマウス体内深部の発光も観察可能である

PC-3-Luc (Exp.No. 620(PC))

- ① 背中右皮下注入
- ② 前立腺注入(開腹)



in vitroでの酵素活性結果を反映して
PC-3-LUCの方が発光強度が高い。

5. ヒト正常組織・細胞の長期維持；

ヒト正常組織、疾患組織は、手術時に治療上切除せねばならぬことがあり、20 数年にわたり、成人組織（甲状腺、肺、消化管、皮膚等）の譲渡を受け倫理委員会の承認を得て実施してきた。特に、ヒト正常組織の移植に関しては、甲状腺組織、肺組織および胎芽組織等を用いて行っている。ヒト正常肺組織は、がん組織切除時に切除せねばならぬことが多く重点的に行った。パセドー病患者甲状腺組織も同じである。これらヒト正常肺、甲状腺組織移植 SCID マウスに対し、放射線障害、宇宙環境（放射線と重力）の影響を調査した（本行、梁、野村）。また、ヒト脂肪組織（成人皮下脂肪、腹腔内脂肪、胎児由来脂肪）の長期継代維持を行った（野村、榎本、研究協力者；堀家-吉田）。

1) ヒト甲状腺組織移植 SCID マウスへの放射線等照射による形態、機能、遺伝子発現影響

頸部悪性腫瘍摘出手術等の際、やむを得ず切除されたヒト甲状腺組織を SCID マウスに

移植し、継時的変化を形態学的、機能（ホルモン分泌など）、遺伝子発現の変化で観察したところ、組織学的構造、ホルモン分泌能、下垂体ホルモンへの反応はよく維持されており、遺伝子発現の変化もほとんど無いことが分かった（図 2 4、表 2）。

図 2 4

Morphology and Function of Human Thyroid Gland Maintained in SCID Mice

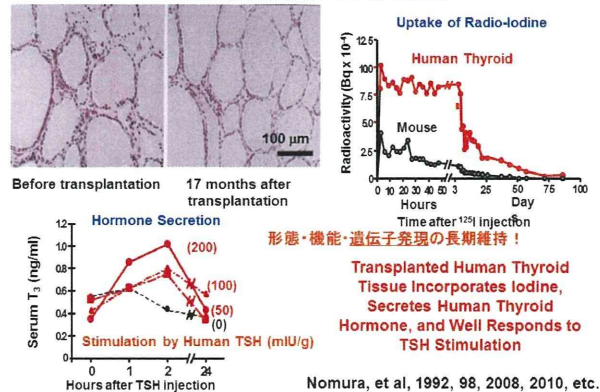


表 2

移植による遺伝子発現の変化－移植前甲状腺との比較－

Weeks after transplantation	No. of genes	Change in gene expression	
		Increase(>x4)	Decrease(>x1/4)
1	8500	92	195
2	8500	88	138
3	8500	95	129
4	8500	87	127

約3%の変化

Human thyroid tissues from a Graves' disease patient (20 y, female) were transplanted s. c. to SCID mice, and changes in gene expression (4 fold differences) were analyzed by GeneChip (Affymetrix HG-Focus Array; 8500 genes).

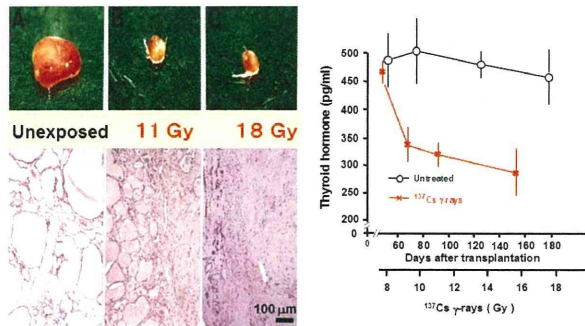
Mutation Res., 2008, 2010

しかし、放射線や環境有害物質ダイオキシンなどを作用させると、形態、機能、遺伝子発現は一変する。図 2 5 にガンマ線照射による微細構造の病変とホルモン分泌能の低下を示した。ヒト甲状腺組織は委縮し、組織学的には濾胞消失、変性線維化が見られた (Mutat. Res., 2008)。ダイオキシン経口投与した場合も全く同じであった。医薬品等化学物質の人体への直接影響評価に結び付くものと思う。

原子炉放射線の人体影響についても研究した。近畿大学原子力研究所小型研究用原子炉 UTR-KINKI にて照射実験を行った。UTR-KINKI からは、核分裂中性子線 1 Gy/時

図 2 5

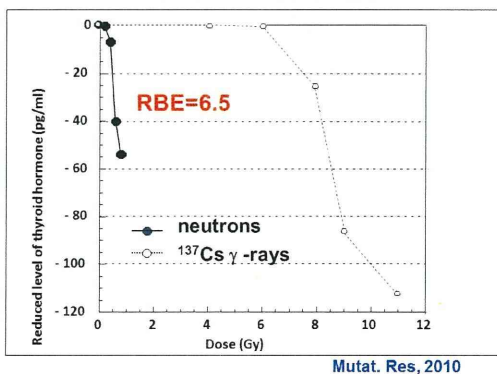
Macro- and Micro-scopic and Functional Changes of Transplanted Human Thyroid Gland by Radiation



間、ガンマ線 1 Gy/時間が出ています。これは、宇宙放射線の飛行体内の放射線分布とおなじである。また、ヒト甲状腺は放射線に高感受性であることより、この原子炉放射線をヒト甲状腺移植 SCID マウスに照射した。ヒト甲状腺の甲状腺ホルモン分泌能(マウス血中ヒト甲状腺ホルモンを測定)を、ガンマ線と比較したのが図 2 6 である。核分裂中性子線はガンマ線に較べ少量でもヒト甲状腺に強い障害を与えることが良くわかる。RBE 値は 6.5 である。

図 2 6

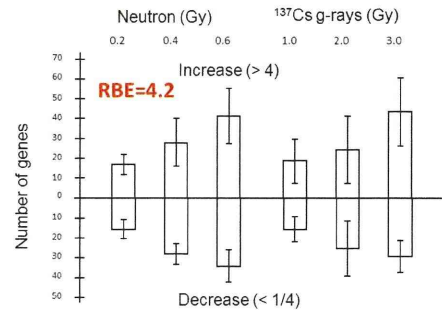
核分裂中性子線及び¹³⁷Cs ガンマ線による甲状腺ホルモンの減少



中性子線、ガンマ線照射ヒト甲状腺の遺伝子発現の変化をマイクロアレイを用い比較した。非照射甲状腺に対し、4 倍以上の発現変化を来した遺伝子数を図 2 7 に表示した。放射線被ばく量に比例して、4 倍以上の遺伝子発現を来した遺伝子数が増えている。この場合も核分裂中性子線はガンマ線に較べ障害度が高い。RBE 値は 4.2 であった。

図 2 7

Changes in Gene Expression by Neutrons and γ -rays

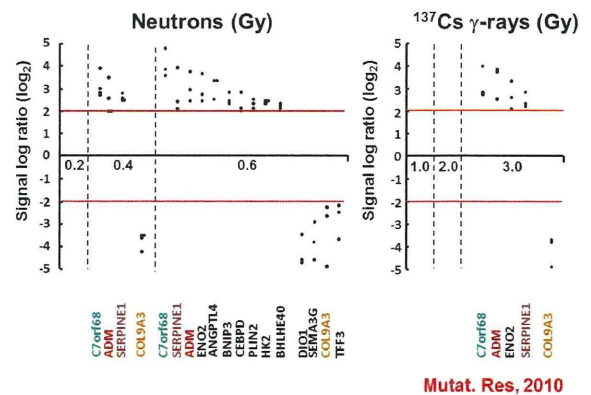


Mutat. Res., 2010

これら 4 倍以上の遺伝子発現の増減変化を示した遺伝子がどの程度放射線照射を受けたヒト甲状腺組織で見られたか解析したところ、放射線照射を受けた全ての甲状腺組織で 14 個の特定遺伝子が増減を受けていることが分かった(図 2 8)。中性子線の方がガンマ線に較べはるかに影響が大きい。

図 2 8

14 Genes specifically influenced by radiations



Mutat. Res, 2010

表 3

放射線照射により発現変化を示した14遺伝子の性質

C7orf68	chromosome 7 open reading frame 68
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin)
ADM	adrenomedullin
ENO2	enolase 2
ANGPTL4	angiopoietin-like 4
PLIN2	perilipin 2
DIO1	deiodinase, iodothyronine
COL9A3	collagen, type IX
TFF3	trefoil factor
HK2	hexokinase 2
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein
BHLHE40	basic helix-loop-helix family
CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)
SEMA3G	sema domain, immunoglobulin domain

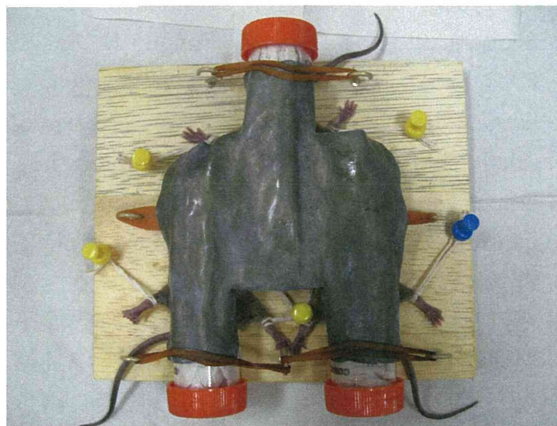
ストレス、損傷(8遺伝子)、アポトーシス(3遺伝子)、転写(2遺伝子)は放射線照射に高感受性 Mutat. Res, 2010

これら 14 個の遺伝子名を表 3 に示した。ストレス、放射線損傷反応関連遺伝子 8、アポトーシス関連遺伝子 3、転写関連遺伝子 2、その他 1 である。ダイオキシン、医薬品ウレタンについても解析中である。

2) ヒト肺組織移植 SCID マウスへの放射線等照射実験

がんの化学療法、放射線療法の最も深刻な副作用は周辺正常組織への損傷である。特に、肺繊維症は致命的な副作用であり、未だ、その発症メカニズムは不明で治療手段は防護以外にはない。肺がんの手術治療の際、治療上やむを得ず切除される周辺組織を倫理委員会の承認を得て SCID マウスに皮下移植し、確実に肺繊維症を誘発することが分かっている X 線を移植肺組織に照射（がん患者治療に用いるのと同じスケジュール; 2 Gy 週 2 回）した。この肺繊維症研究・治療モデルの詳細は、本行の分担報告書に記載した（野村、本行、立花）。X 線照射は、X 線発生装置 HITACHI MBR-1520R (150KeV, 20mA, 0.5A1+0.2Cu, 49cm) を用い、線量率 1.03 Gy/分で図 2 9 に示すように Isoflurane 麻酔科で移植部位（左右大腿部）以外を鉛板で被い照射した。

図 2 9



肺がん患者 2 症例から得られた周辺肺組織片 16 個のうち 12 片を SCID マウス 8 匹の左右下肢皮下に移植した。そのうち 6 匹に対し、X 線を週 2 回 2 Gy 5 週間計 20 Gy を照射した。非照射対照群はヒト肺組織 4 片を SCID マウス 2 匹の左右下肢皮下に移植したものをを用いた。Isoflurane 麻酔器を用い全てを無菌箱の中で麻酔下で行ったため、固定によるマウスへの苦

痛は最小限に抑えることができた。照射組織の解析は現在進行中である。露出した左右下肢と尾には照射群のみに皮膚の糜爛と潰瘍が認められたが、ヒト肺組織への影響が十分検査できることが分かった。今後、右に肺がん組織、左に正常肺組織を移植し、がん治療の有効性と安全性検出システムを完成させる。

6 . 移植ヒトがん組織中のウイルス検査 ;

ヒトがん組織からの病原性ウイルス検出に関しては、ヒトへの感染を危惧されているものは、手術前に検査されており、陰性患者由来の組織のみ SCID マウスへの移植を行っているためか、継代維持している腫瘍組織 38 例からは病原性ウイルスは検出されなかった。但し、EB ウイルスが調査した 38 症例の約 8 割に検出されている。日本人の 8 割が EB ウイルス感染があるのも事実であり、更なる検討を要する。

以上の如く、当初予定以上の成果が得られた。

D. 考察

ヒト悪性腫瘍に関しては、SCID マウス移植組織片をプログラムフリーザーにて凍結後、液体窒素保存 (N₂) することにより、移植・保存→再移植のサイクルを繰り返しても、増殖能、組織像に変化がないこと、さらに遺伝子発現の変化も限られていることを明確にした。従って、必要に応じて N₂ 保存からがん組織を SCID マウスに再移植する事により、ヒト悪性腫瘍組織を永久に生きたまま確保できる画期的方法である。しかも、マウス体内で、ヒト腫瘍の浸潤、遠隔転移もフォローすることができる。本研究を、全ての臓器腫瘍において確立するとともに、各ひと腫瘍の持つ病態（形態、分子レベル）を併せることにより、医薬品等の有効性、安全性を評価する基盤となる。一方、正常、疾患組織の継代維持が可能なことから、放射線、環境有害物質の人体影響評価の基盤ともなる。

E. 結論

本研究では、ヒト組織長期維持 SCID マウスを用いた医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築によるヒト臨床がん、疾患組

織等の継代維持と再生可能な形での凍結保存基盤技術の確立を目的とし、(1) ヒト組織長期維持に最適の SCID マウスの開発・使用、(2) 各種ヒト腫瘍組織の再生可能な形での凍結保存、(3) これまで未成功の前立腺がん、GIST 等、新たなヒト臨床腫瘍組織の継代維持の成功と再生可能な形での凍結保存、さらにヒトがんの浸潤、遠隔転移の同定と解析、(4) ヒト培養がん細胞の in vivo 進展の分析、(5) ヒト正常組織、胎児由来組織の継代維持による安全性研究等への応用、(6) 移植ヒトがん組織でのウィルス検査について研究し、生きたヒト組織での医薬品等の有効性・安全性の研究、環境有害物質の人体影響評価システムの構築基盤として、当初予定を大きく超える成果を得た。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamori M., Shibagaki, T., Nakata, Y., Adachi, S., Nomura, T. Distribution of receptor glycolipids for Lactobacilli in murine digestive tract and production of antibodies cross-reactive with them by immunization of rabbits with Lactobacilli. *J. Biochem.* 146(2), 185-191, 2009.
- 2) M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura and N. Nakamura No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. *Radiat. Res.* 173, 205-213, 2010.
- 3) Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. *Mutat Res.*, 696, 107-113 2010
- 4) 野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤 哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価 (2009 年度ワーキンググループ活動報告)。Space Utiliz Res. 26: 249-251, 2010.
- 5) Nomura T. Transgenerational health concerns from radiation in mice and humans. Astana: Eurasian National University Press. In: Bersimbay RI, Au W, eds. Genome-environment interactions and genetic toxicology. 15th Alexander Hollaender Course; 2010; 19-23.
- 6) Taisei Nomura. Biological Consequence and Health Concern from Low Dose and Low Dose Rate Radiations in Mice and Humans. *Health Physics.*, 100: 266-268, 2011.
- 7) Iwamori M, Iwamori Y, Adachi S, Nomura T. Excretion into feces of asialo GM1 in the murine digestive tract and Lactobacillus johnsonii exhibiting binding ability toward asialo GM1. A possible role of epithelial glycolipids in the discharge of intestinal bacteria. *Glycoconj. J.* 28: 21-30, 2011.
- 8) A. Yogo, T. Maeda, T. Hori, H. Sakaki, K. Ogura, M. Nishiuchi, A. Sagisaka, H. Kiriyama, H. Okada, S. Kanazawa, T. Shimomura, Y. Nakai, M. Tanoue F. Sasao, P. R. Bolton, M. Murakami, T. Nomura, S. Kawanishi, and K. Kondo. Measurement of relative biological effectiveness of protons in human cancer cells using a laser-driven quasimonoeenergetic proton beamline. *Applied Physics Letters*, 98 53701, 2011.
- 9) 野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二 宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究、Space Util. Res., 27: 107-110, 2011.
- 10) Masao Iwamori, Akihiro Sakai, Norihito Minamimoto, Yuriko Iwamori, Kyoko Tanaka, Daisuke Aoki, Shigeki Adachi and Taisei Nomura. Characterization of novel glycolipid antigens with an α -galactose

- epitope in lactobacilli detected with rabbit anti-Lactobacillus antisera and occurrence of antibodies against them in human sera. *J. Biochem.* 150:515-523, 2011.
- 11) Miyake T, Ueda Y, Matsuzaki S, Miyatake T, Yoshino K, Fujita M, Nomura T, Enomoto T, Kimura T. CRABP1-reduced Expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 13:715-722, 2011.
- 12) Dillip Kumar Paridal, Koji Wakame, Taisei Nomura. Integrating Complimentary and Alternative Medicine in Form of Active Hexose Co-Related Compound (AHCC) in the Management of Head & Neck Cancer Patient. *International Journal of Clinical Medicine.* 2: 588-592, 2012.
- 13) 野村大成、足立成基、梁 治子、畑中英子、菊谷 理絵、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二、D. K. Parida、R. I. Bersimbay. 宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究；放射線晩発影響の防護。 *Space Util. Res.*, 28, 2012 (3月、in press).
2. 学会発表
- 1) Taisei Nomura. Dietary Modulation to Prevent Cancer and Malformation in Mice. In: Dietary Modulation of Xenobiotics Transport and Metabolism. 3rd Asian Pacific Regional Meeting of The International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), Bangkok, Thailand, May 10-12, 2009.
- 2) Taisei Nomura. Transgenerational health concerns from radiation in mice and humans. In: The 15th Alexander Hollaender Course; Genome-Environment Interactions and Genetic Toxicology, September 23 - 26/27, 2009, Astana, Kazakhstan.
- 3) Taisei Nomura. Differential Sensitivity of Mice and Human Tissues to Radiation Sources. In: HIBMC/PMRC Joint Meeting, Tatsuno, Hyogo, Dec. 15, 2009, .
- 4) H Nakajima, T Saito, KG Yeliseeva, H Ryo, T Hongyo, Y, Yamaguchi, NA Kartel, EV Krupnova, V Trusova, AM, Voitovich, VS Piskunov, TP Smirnova, EI Anisimova, V. Afonin, T Todo, T Nomura. Ecological decrease, biological concentration and genome stress of radionuclides in plants and animals after Chernobyl catastrophe. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 2009. 8. 20-25, Firenze - Italy.
- 5) 野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）。相模原、2010. 1. 26。
- 6) Nomura T. Carcinogenicity of Urethane (Ethyl Carbamate) in Mice And Humans. 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Dec.15-18, 2010. Pattaya, Thailand.
- 7) Nomura T. Biological Consequences and Health Risk from Low and Low Dose Rate Radiation Exposures in Mice and Humans. LOWRAD 2010, Dec. 13-15, 2010, Barcelona, Spain.
- 8) Nomura T. The use of Active Hexose Co-related Compound in the Treatment of Head & Neck Cancer Patients. The 18th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine. July 24-25, 2010. Sapporo, Japan.
- 9) Nomura T. Biological Consequences and Health Concern from Low Dose and Low Dose Rate Radiations in Mice and Human Tissues. International workshop “Biological consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation” May 3-5, 2010. Richland, USA.
- 10) Taisei Nomura, Hiroo Nakajima, Tadashi Hongyo, Rie Kikuya, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Yoriko Tokita, Eiko Hatanaka,

Nanao Yoshida, D. K. Parida, Koji Wakame.
Inhibition of Radiation Induced Late
Effects (Congenital Malformations and
Leukemia) by Active Hexose Correlated
Compound, AHCC in Mice. 19th
International Congress on Nutrition and
Integrative Medicine, Sapporo, Oct.
15-16, 2011.

11) Taisei Nomura. Fukushima Nuclear
Plants Accident: Radiation Effects on
Human Health, “Philosophy on Safety and
Conscience” in Japan. 19th International
Congress on Nutrition and Integrative
Medicine, Sapporo, Oct. 15-16, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：特になし

ヒト組織長期維持 SCID マウスを用いた医薬品等の有効性、 安全性評価システムの構築

研究代表者 野村 大成（独）医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨：本研究では、20 年間継代維持凍結保存してきたヒト頭頸部、婦人科・生殖器腫瘍、消化器腫瘍、内分泌組織の再移植保存に加え、未調査のヒト原発腫瘍組織、本研究所資源部所有の培養細胞の移植維持凍結保存、ヒト正常組織、胎児由来組織の継代維持を計り、総括的ヒト組織維持システムを 3 年間で完成させる。いずれも我々が 20 年間実施してきた研究の発展を期するものであり、その成果はおのずから医薬品の有効性・安全性の研究のみならず環境有害物質の人体影響評価に用いられ、国民の健康に大きく貢献できる。

研究分担者氏名・所属研究機関名及
び所属研究機関における職名

梁 治子・独立行政法人医薬基盤研究所・
プロジェクトサブリーダー

小原有弘・独立行政法人医薬基盤研究所・
研究員

立花 功・大阪大学・医学系研究科・
講師

本行忠志・大阪大学・医学系研究科・
准教授

野々村祝夫・大阪大学・医学系研究科・
准教授

榎本隆之・大阪大学・医学系研究科・
准教授

A. 研究目的

1986 年、Bosma 博士より T 細胞、B 細胞機能の欠如した SCID マウス C.B17-*scid*⁺ の供与を受けた。しかし、原種は、80%前後に正常 T、B 細胞が出現し、約半数が 8 ヶ月以内に白血病死した。C.B17-*scid/scid* マウスのうち、IgM、IgG が検出限界以下のものを 20 代以上選択的兄妹交配することにより、Leaky、白血病死を激減させた。現在、世代数は F₅₃ を超えている。これにより、初めてヌードマウス等に生着したことの無いヒト悪性腫瘍が急激に増

殖し、自然遠隔転移すること (J Rad Res, 1900, Jpn J Cancer Res, 1991, 93)、ヒト良性腫瘍もゆっくり増殖すること

(Carcinogenesis, 1992, Cancer Det, 1997, Cancer Lett, 1998, 2002)、最終的には、ヒト正常臓器・組織の長期間（～3 年）の継代維持に成功した (Cancer Res, 1997, Cancer Lett, 1998 ; 以後 Super-SCID と呼ばれる)。350 回にわたり、ヒト脳組織を除く正常組織、前がん組織の維持を行った。大腸ポリープを除き、移植後の病理組織像やホルモン分泌能等はよく維持されている。また、移植ヒト皮膚に太陽紫外線類似光 (UVB) を照射し、世界で初めて、人工的にヒトがんの誘発に成功した (Cancer Res, 1997)。ヒト骨髄、免疫細胞もよく維持される (Mutat Res, 2008)。ヒト胎児組織も増殖分化し継代維持できた。ヒトヘルペスウイルスのようにヒト皮膚のみを宿主とするウイルスに関する感染症研究にも極めて重要な武器となっている。

本研究では、20 年間継代維持凍結保存してきたヒト頸部腫瘍、婦人科・生殖器腫瘍、消化器腫瘍、内分泌腫瘍等の再移植保存を 2 年間で、未調査のヒト前立腺、脳、肺他の原発腫瘍組織、本研究所資源部所有の培養細胞の移植維持を 3 年間で、また、良性腫瘍、正常組織、胎児由来組織の継代維持に努め、総括的ヒト組織維持システム構築の基盤を 3 年間で完成させる。いずれも我々が 20 年間実施してきた研究の発展を期するものであり、その成果は医薬品の有効

性・安全性の研究のみならず環境有害物質の人体影響評価に用いられ国民の保健・医療・福祉の向上に大きく貢献する。

B. 研究方法

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持・増産；C. B17-*scid* [原種] に加え、C57BL/6J-*scid*、C3H/HeJ-*scid* 等マウスを常備する。*bg^l*、*W* 導入マウス(野村ら、1993)も用意する(野村)。
2. ノードマウス・通常の SCID マウスに生着したことの無いヒト悪性腫瘍、良性腫瘍、前がん病変(主として頭頸部腫瘍、婦人科・生殖器腫瘍、消化器腫瘍、内分泌腫瘍等)を Super-SCID マウスで継代移植維持後凍結保存(1988~1995)し、2005年、大阪大学より医薬基盤研究所に移動、保管している。凍結保存組織を再移植することにより継代維持能力の確認を開始する(野村)。
3. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；ホルモン非依存性前立腺癌、前立腺肥大組織、各種肺癌臨床組織の移植、継代維持から開始する。自然遠隔転移を確認する(野村、野々村)。
4. 培養細胞移植；資源部細胞バンクにおいて、遺伝子、微生物汚染の無いことが確認できている培養細胞(腫瘍、骨髄細胞等)の皮下、腹腔、当該臓器内移植を行う。腹腔内移植系の成立は定量的制がん研究に重要である。中皮腫、前立腺がん細胞、大腸がん細胞等から開始する。(野村、小原)。
5. ヒト正常組織・細胞の長期維持；成人脳以外の臓器組織の長期(~2年)維持の大規模実験は終了している。確認しリストを作成する。但し、ヒト甲状腺組織(バセドー病由来)、骨髄細胞、胎児由来組織(皮膚、肺、脂肪等)継代移植マウスは常備に努める。短時間宇宙飛行実験にも備える(野村、本行、立花、榎本)。
6. 移植組織・細胞の継代維持による形態・機能の変化の調査；継代による組織変化は病理学的には認めていない(8. 研究目的欄論文参照)が、形態学的観察に加え、機能変化を生化学的あるいはマイクロアレイを用い遺伝子発現レベルで解析する(梁、野村)。

(倫理面への配慮)

手術等による成人ヒト組織に対しては、「ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等および先端医療評価システムの開発」(代表・野村)、12週未満退治組織に対しては、「ヒト胎児組織維持SCIDマウスを用いた医薬品等評価システムの開発」(代表・野村)の2課題で、倫理委員会の承認をえている。手術時等で採取されるヒト組織の譲渡に関しては、医療機関の倫理委員会の承認を得た上、担当医が医薬基盤研究所客員研究員等として参画する。厳重な管理の下、医薬基盤研究所において野村が移植・継代維持をおこなっている。譲渡されるヒト組織に対しては、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除やに関しては、文書・口頭で十分にインフォームド・コンセントをとり、同意を得、同意書にサインを頂いている。18歳未満の方に対しては、本人および親権者の同意を得ている。

動物実験に関しては、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研修、登録のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し、研究をおこなっている。

その他の指針等(指針等の名称：厚生科学審議会「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」、日本産科婦人科学会会告「死亡した胎児・新生児の臓器等を研究に用いることの是非や許容範囲についての見解」、および、「同上」に対する解説。)

C. 研究結果

本研究課題について、以下に示す当初研究計画・方法どおり実施し、予定通りの成果が得られた。また、8月より、流動研究員として、堀家なな緒が参加し、SCID マウスの飼育管理から実験解析まで、大きな実績を上げている。

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持・増産；C. B17-*scid* [原種]、C57BL/6J-*scid*、C3H/HeJ-*scid* 等マウスを常備し、*bg^l*、*W* 導入を開始した(野村)。GFP を導入し、近交化を開始した(野村)。
2. 長期継代維持後凍結保存ヒト組織・細胞の再移植・保存；継代移植維持後凍結保存(1988~1995)悪性腫瘍のうち、Yolk Sac

腫瘍、肺がん、結腸がん、頭頸部腫瘍等について実施成功した（野村）。ヒト悪性腫瘍も、正常臓器・組織、良性腫瘍移植前で見られたように肺がん、乳がん、大腸がん、下咽頭がんの移植後の組織の形態は移植前の組織形態と比べて変化はない（図-1、2、3）。

図-1 Lung Cancer in Peutz-Jeghers Syndrome Patient

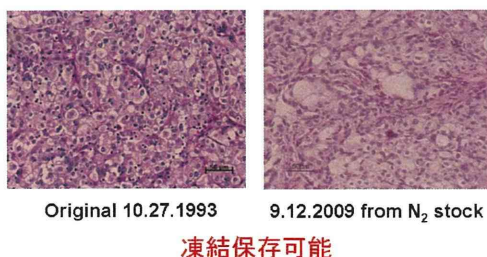


図-2 Colon Cancer

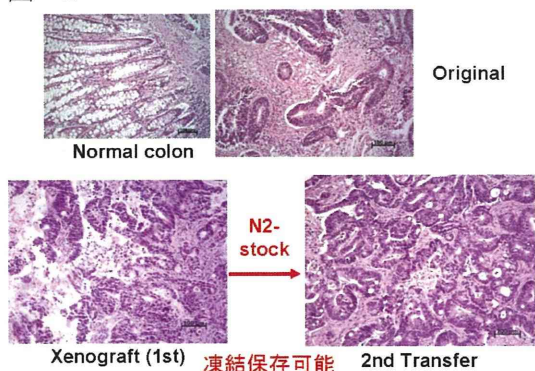
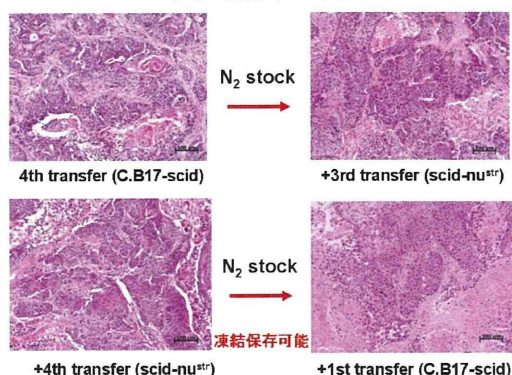


図-3 下咽頭扁平上皮がん

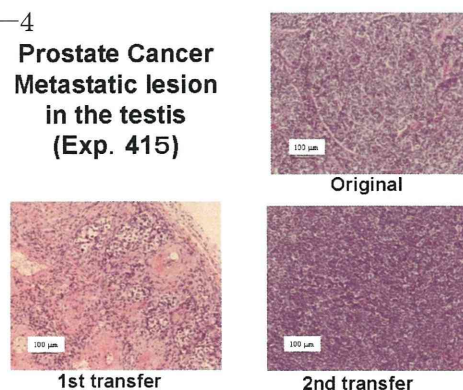


ヒトの York Sac Tumor をプログラムフリーザーで凍結し液体窒素中で保存したものを SCID マウスに再移植しても、生着し急速に

増殖し移植前の組織の形態をよく保持していた。このことは、ヒト York Sac Tumor のみでなく大腸がん、肺がん、頭頸部がん等の再移植のサイクルを繰り返しても、組織像に変化がないことを見出した。

3. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；今まで移植が極めて困難といわれているヒト前立腺癌（睾丸転移巣）の適切な SCID マウスへの移植を実施し成功している。すでに腫瘤形成しており、継代し組織形確認中である（野村、野々村）。（図-4）。

図-4 Prostate Cancer Metastatic lesion in the testis (Exp. 415)



4. 培養細胞移植；資源部細胞バンクにおいて、遺伝子、微生物汚染のない培養細胞（腫瘍、骨髄細胞等）を保存している。ヒト培養がん細胞については、ヒトの前立腺がん PC-3、中皮腫 JMN-1B、乳がん MCF-7 細胞株等を SCID マウスに移植した。予想どおり、培養がん細胞は SCID マウス体内で急速に増殖し巨大な腫瘍を形成した。転移もした。移植された細胞は均質な細胞塊を形成し、継代移植しても形態は変わらない（図-5、6、7）。

図-5 Prostate Cancer Cell PC3

