

本学の教育研究環境に適した食品栄養健康分野での 動物培養細胞の利用に関する研究

Novel Approaches to Nutritional Research by means of Cell Culture Techniques

有田政信, 木元幸一, 島村宗夫

Masanobu ARITA, Kouichi KIMOTO and Muneo SHIMAMURA

I. 神経細胞の培養と成長促進物質

島村宗夫

はじめに

食品, 栄養学, 健康における研究は, 試験管レベルの実験から動物をつかった実験まで広範にわたっている。いずれの実験も最終的には人が健康で幸福な生活を営む事につながっている。研究方法をどの方向のものを選ぶかはその目的によって選ばれるべきである。近年バイオテクノロジーの発達と共に動物細胞の培養技術が発達し, かなり手軽に行えるようになった。食品, 栄養, 健康分野でも同様に各所で動物細胞を使った研究報告が増えつつある。

本学でもより多くの人々がこのような培養細胞が使えるような準備をしようと本プロジェクトをスタートさせた。培養細胞の主なものはガン細胞である。増殖が速く培養が容易であるからである。つくば市には cell bank と呼ばれる施設があり, いろいろの細胞が用意されリストも出されているので必要に応じて申し込む事ができる。多くの場合, 細胞は冷凍保存されていて必要に応じて解凍し, 培養し直して送ってもらえる。また, もし新しい培養細胞が見つかった際には登録も可能である。

1. 動物細胞の培養技術の概要

動物細胞を生体から切り出し, それを人工培地で増殖させる訳である。そのためには生きの良い状態で動物細胞を取り出さなければなら

い。人工培地は細胞にとって必要な栄養分を含んでいる訳である。これらの操作は全て無菌環境で行われなければならない。そのためには一般にP2の施設でクリーンベンチの中で取り扱われる。それだけでは細菌の増殖などが止められない場合が多いので2, 3の抗生物質, ペニシリン, ストレプトマイシンなどが加えられる。これらの培地はCO₂インキュベーターのなかで37°Cで培養される。滅菌のためには, オートクレーブは必要な装置である。最近は便利な, 培養器具, 滅菌済みキット, デスポーザブルペットなどが販売されているのでそれを利用すると便利である。

2. 動物細胞の性質

動物の体は細胞からできている。細胞一つ一つは多少の違いはあるが, 基本的には, 似かよっていて細胞膜に囲まれ中心には核がある構造をもっている。細胞は実に精巧に作られており, 1つの都市国家にも比べられる。細胞膜という城壁に囲まれ, 中には小胞体という運河が張り巡らされている。この運河はところどころ城外につながっている。この都市国家の中心には核と言う宮殿があり, その周囲は掘り割りの様に運河(核膜)に取り囲まれている。宮殿にはDNAという貴族たちが住んでいる。それも古代共和制ローマの施政官のように同じ役職をするものが二人ずついる。奇妙な事に貴族たちのもつ知識は, A (アデニン), T (チミン), C

(シトシン), G (グアニン) と言ったたった4つの文字で書かれている。この知識を小出しにすれば、国家の経営のためにはたいの用が足りる。小出しにされた情報にもとづいて、アミノ酸が配列され、国家の主な働き手であるタンパク質というロボットがつくられる。タンパク質は運河のほとりに住むリポゾームという職人たちによって作られるが、貴族からの命令をここにはこんできたり、アミノ酸を集めてくるのもRNAとよばれるDNAの家来たちである。

また、ミトコンドリアという、やはり運河に囲まれた器官も有る。これは、酸素を使って炭水化物を水と炭酸ガスに分解し、生命エネルギーの通貨とも言うべきATPを生産する工場であり、現代社会の発電所に相当する。葉緑体も堀割で囲まれ、ミトコンドリアと同様、内側に複雑なヒダ状運河をもつが、これは逆に、水と炭酸ガスを素材に太陽のエネルギーを吸収し炭水化物を合成する。さらに、ベルトコンベアーのように細胞内の運動を司るフィラメントや微小管も、タンパク質が鎖状に並んで作られたものである。筋収縮の立役者であるアクチンやミオシンもこうしてできたフィラメントにほかならない。膜につながる線維のお蔭で、運河は絶えず形を変えている。運河の中でも輸出のために特別に発達した装置はゴルジ体と呼ばれ、ゴミ処理のために発達したところはリソゾームと呼ばれている。

3. 細胞の分裂

受精卵は活発に細胞分裂を繰り返す。その結果それぞれの原基となる細胞ができる。それらの細胞は分裂を繰り返しそれぞれの組織、臓器ができる。細胞の中にはさらに分裂を繰り返すもの、そのまま止まってしまうなどいろいろである。分裂を繰り返す細胞としては性細胞、腺細胞、皮膚細胞、等があり、一度できあがってしまうと、一生分裂をしない神経細胞のようなものもある。これらの中間方は筋細胞や肝細胞などである。これらの細胞は通常は細胞分裂は繰り返さないが、傷害などがあると分裂を繰り返

返し修復する。

正常な細胞ではないが癌細胞は突然変異によって細胞分裂を盛んに繰り返される様になったものである。現在最もよく使われている培養細胞は癌細胞である。

4. 培養細胞バンク（銀行）

全国的組織として細胞バンクがつくば市にある。新しい培養細胞の登録、培養細胞の保管、供給などを行っている。細胞リストを一覧にして公開しているので、自分の希望にあった細胞株を有料で分けてくれる。

5. 動物細胞の人工培養

人、或いは動物の生きた細胞を取り出し人工的に細胞分裂を繰り返させ増殖させることを培養とよんでいる。生体の条件に似せた環境をつくり増殖させるわけである。温度（37℃）、栄養素：炭水化物、タンパク質、脂肪、浸透圧の調節、酸塩基平衡の調節、それに加えて成長促進物質の添加（血清、およびそのなかに含まれる未知物質）目的とする細胞によって組成は違う。また雑菌の増殖なども押さえる為に抗生物質を加える。

6. 神経細胞の培養

神経系はニューロンと呼ばれる神経細胞と二つの突起から成り立っている。樹状突起と軸索突起つまり神経線維とである。ニューロンは先にも触れたが特殊な性質をもっていて一度できたものは二度と細胞分裂をしない。言い換えればニューロンは固体と寿命が同じである。しかし、未熟なニューロンは突起も未分化で枝も伸び、また、枝分かれもし、他のニューロンなどターゲットの組織にシナプス結合をする能力をもっている。脳の悪性腫瘍であるメニンギオマ、やメニンゴブラストマの神経細胞は分裂もする。

従って神経細胞を培養するときには幼若な神経細胞を用いて突起の発達の状態を見るか、メニンゴブラストマ等の神経細胞を用いての細胞培養によるしかない。

大脳のニューロンの発達の様子の一例を図一に示す。これは生体内での発達の状態を示したも

ので、神経細胞と僅かの突起とから成り立っているニューロンが、成長するに従って多数の突起に増えている事が解る。人の場合十数年かかってこのような発達を遂げるのである。

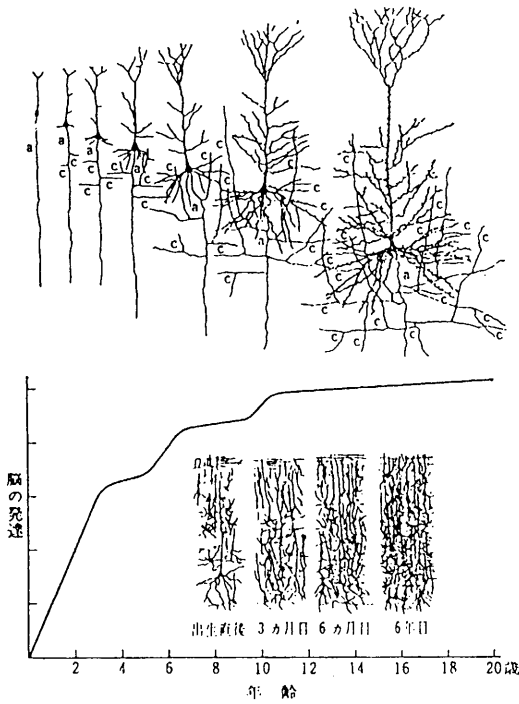


図1 上図は神経細胞の突起の伸びてゆく状況を示す。(aは軸索、cは軸索の側枝、ほかの突起は樹状突起)
下図は脳の発達段階と配線ができてゆく状況を示す。

1) 脊髄神経節からの神経細胞の取り出し方
受胎数週間のラットの胎児を麻酔下で、また無菌的に取り出し、脊髄後根神経節をさがし摘出する。小さな塊であるのでピノキュラーなどを使って取り出すとよい。取り出された神経節をメスなど鋭利な刃物でできるだけ細かに切り刻む。それにトリプシン、パパイニンなどタンパク質分解酵素を加え神経細胞をばらばらにする。勿論、肉眼では見えないから適当な時期に顕微鏡で調べるしかない。ばらばらになった細胞は培養液で充分洗い、希釈して培養皿にまく。

2) 神経細胞の培養

ばらばらになった神経細胞を集めて培養器に入れて培養する訳である。培養基には色々の栄養素、炭水化物、タンパク質、脂肪、ミネラル、

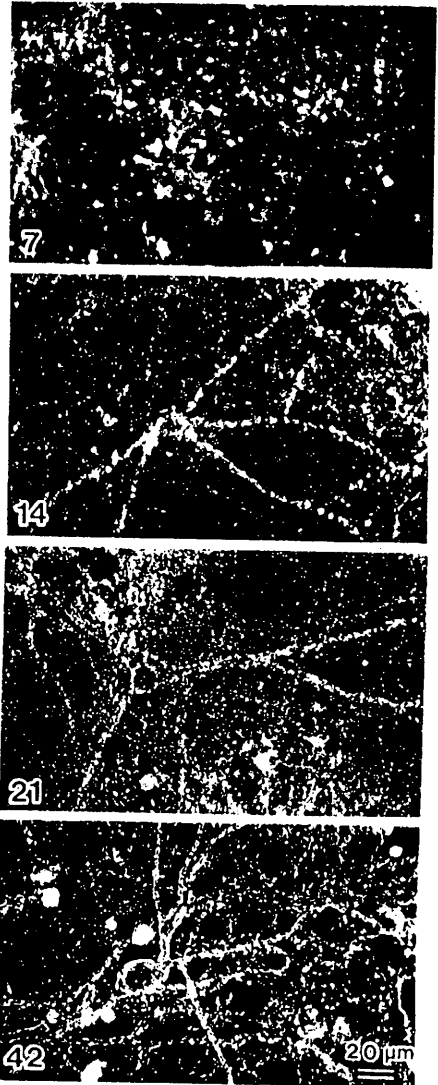


図2 培養ニューロン上のシナプスの免疫組織学

シナプス小胞膜の構造蛋白質であるシナプトフィジンの抗体(SY-38)を用いて、免疫組織学的に各培養期間のニューロンを染色した。数字は培養日数を示す。14日目以降、ニューロンの細胞体および突起上に免疫陽性のスポット(シナプス)が点在し、その量は培養とともに増加する。

水等が含まれている。更に、ペニシリン等の抗生物質も加え、後で述べるがそれに成長を促進させる物質（血清）を加える。一般にDMEMと呼ばれ、Dulbecco's modified Eagle's Gibco社の培養液が使われている。

3) 成長促進物質 (NGF)

培養した細胞の一例を図2に示す。この例はラットの大脳皮質の錐体細胞の培養であるが、血清を加えてあり、神経細胞の成長している状態が良く分かる。血清を加えない場合はこのような成長は見られないので、血清の中に何か成長を促進させる物質が含まれている事が分かる。それがNGFである。既に、神経線維の成長を促進させる物質が幾つか見つかっていて、いずれもタンパク質、ポリペプチドであり、アミノ酸順列も判っている物もある。

これらは動物細胞の栄養学への応用の一例と言える。

参考文献

- 市川真澄, 中枢シナプスの形成と分化 Brain Medical, 4;61-68,1992.
 杉本悦郎, 細胞, 培養細胞の利用 日本農芸化学, 68;1199-1205,1994.
 東田陽博 他, 神経系, 株化培養細胞, 神経生化学マニュアル, 実験医学, 別冊, 98-1105, 1990.

II. 培養動物細胞を利用した食品成分の生理活性の測定

有田政信

緒言

動物細胞培養技術は、生命現象の解明、生理活性物質の機能検定や生理活性物質の生産の手段等として近年多用されている。この中で食品化学分野で最も関連深いものとして、食品成分の機能検定・評価が考えられる。

従来、食品成分のこのような評価は、主としてマウス、ラット等の実験動物が用いられているが、この実験動物を用いた評価法は試料を大量に必要とし、多大の時間、経費、労力を要し、動物による固体差による変動があって再現性や定量性に乏しいという欠点があった。しかしながら、動物培養細胞の利用は、動物実験よりも経費や労力、時間も短時間で更に多数の試料をしかも微量で再現性、定量性ある結果を得ることができる。

培養動物細胞の機能は、増殖、分化、生理活性物質の生産等に大きく分けることができる。したがって、これらに対して食品成分の生理的な機能性を検定することができる。そこで本報告では、食品成分の一つである糖質の生理活性の検定について述べる。

I. 糖鎖の生理機能について

糖鎖、特に生体膜上の糖鎖（糖蛋白質、糖脂質等）の機能に注目が集まっている。これらの糖鎖は、細胞・細胞間の相互作用、細胞・基質接着、ウイルス・宿主相互作用、更には細胞増殖や分化の制御という多細胞社会の基本的な現象に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている¹⁻³⁾。また、多くの形態として存在する構造の多様性と細胞の種類や各組織、

器官に特徴的な糖鎖構造を有し、組織発生や細胞分化、癌化などによって劇的に変化することが明らかとなっている。そして糖鎖の生理機能、生物学的意義として、ウイルス、バクテリア、細胞毒素などのレセプター機能をはじめ細胞の分化、接着、成長、増殖、癌化、免疫などの生命現象に深く関与しているものとして、糖鎖の末端によく結合しているシアル酸の役割が注目されている³⁻⁹⁾。

そこでヒトにとって生命誕生後最初に口にする乳に含まれ、乳でも初乳（出産後約1週間）に特に多く含有され、常乳になると急激に減少するため新生児にとって重要な働きをしているものと考えられるシアル酸結合オリゴ糖の役割について神経芽腫瘍細胞（Neuro2a）を用いて検討を行った¹⁰⁻¹²⁾。

II. 乳中のオリゴ糖の分画・精製方法

ウシの初乳及び常乳を37℃に加温し、Folchの分配法に基づいて実施した。即ち、試料乳0.5lに対しchloroform-methanol(2:1,v/v)2.5lを加え、20,000rpm、15minホモジナイザーを用い常温で均質化して抽出した。この懸濁液を4℃、6,000rpm、20min遠心分離を行った。上層は淡黄色の水層（methanolを含む）、中間層はタンパク質の固形沈殿物、下層はchloroform層となった。粗糖質画分を含む上層（水溶性画分）を集めて減圧下でロータリエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥を行って粗糖質画分とした。この画分をゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって分画を行った。すなわち、粗糖質画分を、Cellulofine GCL-25-mカラム（100×2.6cm I.D.,チッソ(株)製）によって分画した。各溶出画分は、レゾルシノール-塩酸試薬によってシアル酸を、フェノール-硫酸試薬によって全糖を検出した。検出されたオリゴ糖画分は、凍結乾燥を行い、イオン交換カラムクロマトグラフィーの試料とした。

次に、酸性オリゴ糖を分取するため、イオン

交換カラムクロマトグラフィーによる分画をおこなった。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって得た糖質画分をDEAE-Sepharose CL-6Bカラム（40×2.6cm I.D.,Pharmacia Biotech）によって分画した。溶出は、酢酸ピリジン緩衝液（pH5.0）によるグラジエント溶出を行った。各フラクションはシアル酸検出をして分画した。検出された酸性オリゴ糖画分は、凍結乾燥を行い、TLCによってチェックして試料とした（図1）。

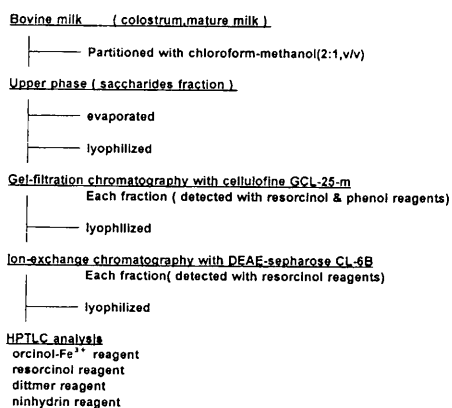


図1 Extraction and purification of oligosaccharides from bovine milk

III. マウス由来神経芽腫瘍細胞（Neuro2a）の培養方法

1) 細胞培養培地

ダルベッコ変法 イーグル培地（DMEM培地、日水製薬(株)製）粉末9.5gをRQ水1000mlに溶解し、その後120℃、20分間高圧滅菌を行い、放冷後、別に濾過滅菌した、グルタミン溶液10ml、10%炭酸水素ナトリウム水溶液15ml、ストレプトマイシン・ペニシリンGカリウム溶液20mlを添加して基本培地とした。この基本培地450mlにFetal Calf Serum（FCS）50mlを添加して神経芽腫瘍細胞（Neuro2a）の培養培地とした。

2) 継代培養方法

神経芽腫瘍細胞 (Neuro2a) は, 60mm ポリスチレン滅菌シャーレを用いて DMEM+10% FCS 培地で, 37°C, 5% 炭酸ガス濃度, 湿度 100% に保たれた炭酸ガスインキュベーター (HITACHI) 内で培養を行った。シャーレ中の細胞が増殖し, コンフルエントになったら, 培地を除去し, トリプシン溶液を 3 ml 添加し, 37°C インキュベーター内で 5~10 分間加温し, 更に Cell Scraper (BECTON DICKINSON) で細胞を傷つけない様に剥がした。これに FCS 1 ml を加え遠沈管に移して, 遠心分離 (1500rpm, 5min, 5°C) を行った。上澄液を除去し培地 (DMEM+10% FCS) を 5 ml 添加し, 再度遠心分離 (1500rpm, 5min, 5°C) を行った。上澄液を除去し, 培地 (DMEM+10% FCS) 5 ml 添加しピペットでパイペティングをし, 細胞を培地中に均一に浮遊させ, 培地 (DMEM+10% FCS) 7.5ml の入った 60mm シャーレに 0.5ml ずつ分注し, 炭酸ガスインキュベーター内で培養する。この操作を繰り返して細胞を継代培養した。

3) 神経芽腫瘍細胞 (Neuro2a) 細胞に対する生理活性の測定方法

前培養を行った 60mm シャーレ中の培地を吸引, 除去し, PBS で洗浄後, トリプシン溶液 3 ml を添加して 5% 炭酸ガスインキュベーター内で 5~10 分間加温後, セルリフターで剥がし FCS 2 ml の入った遠沈管に移し, 5°C, 1500rpm で 7 分間遠心分離した。上澄液を除去し 10% FCS+DMEM 培地を 10ml 加え, 5°C, 1500rpm で 5 分間遠心分離後, 上澄液を除去し, 10% FCS+DMEM 培地 20ml を添加しパイペティングを行い, 10% FCS+DMEM 培地 15ml の入った 90mm シャーレ 10 枚に 1 ml ずつ分注後, 炭酸ガスインキュベーター内 (37°C, 炭酸ガス濃度 5%) で培養を行い, 継代培養時と同様にし

て細胞を得, 一部を採取して血球計算板で細胞数をカウントした。そして 60mm シャーレ 1 枚につき細胞数が 1.4×10^6 cells になるように分注したのちインキュベーター (37°C, 炭酸ガス濃度 5%) 内で培養を行った。細胞がシャーレに定着後, 培地を除去して, PBS で洗浄し, 検定試料を一定濃度添加した培地を 8 ml 静かに加え, インキュベーター (37°C, 炭酸ガス濃度 5%) 内で 24 時間培養を行った。培養後, 各試料毎に顕微鏡写真撮影を行い, 画像解析装置 (MOP-Videoplan) で 1 細胞あたりの神経突起の数及び神経突起の長さを測定した。同時に, 1 シャーレ中の細胞数も測定した (図 2)。

Neuro2a cells(DMEM+10%FCS)

— incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂ , -95% air

Neuro2a cells 1.2×10^6 cells/60mm polystyren dish

— cultured for 48hr with DMEM containing 10%FCS
— removed medium
— added DMEM without FCS containing sample

Sample; β -Lactose	0.1 μ M, 1.0 μ M, 10.0 μ M
3'-SL	0.1 μ M, 1.0 μ M, 10.0 μ M
6'-SL	0.1 μ M, 1.0 μ M, 10.0 μ M

— cultured for 24hr

Measurement (cell number, neurite number and length)

図 2 Measurement of effects on Neuro2a cells treated with milk oligosaccharides

4) 神経芽腫瘍細胞 (Neuro2a) 細胞に対する生理活性の測定結果

マウス由来神経芽腫瘍細胞 (Neuro2a) を 48 時間上記の方法によって培養を行い, ミルクオリゴ糖の主要成分である β -ラクトース, 3'-シアリルラクトースおよび 6'-シアリルラクトースを所定濃度になるように培地に添加し, 分注して 24 時間培養した。培養後, 顕微鏡撮影

を行って、MOP-Videoplanで画像解析を行った。その結果、各試料群のplate当たりの細胞数は、コントロール群とすべての供試試料群の間に差異が認められなかった。このことより供試したミルクオリゴ糖は細胞増殖活性を有しないものと考えられた。一方、細胞当たりの神経突起の数を比較すると、コントロール群より0.1 μ M 6' -シアリルラクトース及び0.1 μ M 3' -シアリルラクトースを添加した画分で、約1.2-1.3倍の神経突起を有し、 β -ラクトースを添加した画分はコントロール群とほぼ同じ値であった。細胞当たりの神経突起の長さを比較すると、1.0 μ M濃度で β -ラクトース添加群は、コントロール群の1.2倍伸展し、3' -シアリルラクトース添加群で試験濃度全般でわずかな伸展を示した。6' -シアリルラクトースを添加した画分は、1.0及び10.0 μ M濃度で約1.7倍の神経突起の伸展が認められた。以上の結果から6' -シアリルラクトースは、3' -シアリルラクトースや β -ラクトースと比較して高い神経成長促進因子様活性 (NGF活性) が存在することが判明した。本活性の詳細な検討については今後生化学的手法によって実施する必要性が認められた (表1)。

Table1. Effects of 3' -sialyllactose and 6' -sialyllactose from bovine milk on Neuro2a cell line

Sample reagents	conc. (μ M)	cell number ($\times 10^4$ /dish)	neurite number (number/cell)	neurite length (μ m)
Control	—	2.50 \pm 0.89	2.30 \pm 0.94	1.94 \pm 1.05
β -lactose	0.1	2.94 \pm 1.05	2.28 \pm 1.18	1.80 \pm 0.95
	1.0	2.64 \pm 0.91	2.49 \pm 1.14	2.30 \pm 1.44
	10.0	3.16 \pm 1.27	2.19 \pm 1.01	2.16 \pm 1.47
3'-SL	0.1	2.66 \pm 0.95	2.73 \pm 1.22	2.22 \pm 1.48
	1.0	2.88 \pm 1.03	2.65 \pm 0.97	2.09 \pm 1.16
	10.0	2.40 \pm 0.86	2.50 \pm 1.00	2.25 \pm 1.20
6'-SL	0.1	1.57 \pm 0.56	2.98 \pm 1.33	2.64 \pm 1.42
	1.0	3.08 \pm 1.10	2.68 \pm 1.54	3.31 \pm 2.65
	10.0	2.16 \pm 0.77	2.42 \pm 1.04	3.41 \pm 1.95

参考文献

- 1) 入村達郎：日経サイエンス，“糖鎖と細胞”別冊111(1994)
- 2) 鈴木明身：タンパク質・核酸・酵素，“複合糖質”(1992)
- 3) H.Wiegandt: New comprehensive biochemistry vol.10, “Glycolipids” 199-205(1985)
- 4) S.Dosako: 日本食品工業学会誌, 41, 523-528(1994)
- 5) 山内邦男：牛乳の特性と健康, 光生館, 139-170(1993)
- 6) Y.Matsuoka and T.Idota: J.Nutr.Sci.Vitaminol., 41, 241-251(1995)
- 7) J.B.Miller, P.M.Veagh, Y.McNeil and B.Gillard: Acta Paediatr., 83, 1051(1994)
- 8) G.Harzer and F.Hascheke: Micronutrients in Milk and Milk-based Food Products (Elsevier applied science), 193-197(1989)
- 9) G.Gronberg, P.Lipniunas, T.Lundgren, F.Lindh and B.Nilsson: Arch.Biochem.Biophys., 278, 297-311(1990)
- 10) M.Messer: 化学と生物, 133, 816-824(1995)
- 11) T.Urashima, T.saito, Y.Tsuji, Y.Taneda, T.Takasawa and M.Messer: Biochim.Biophys.Acta., 1200, 64-72(1994)
- 12) T.Urashima and T.Saito: 化学と生物, 31, 80-82(1993)

Ⅲ. 遺伝子組換え技術による培養細胞系の確立

木元幸一

はじめに

科学技術が極めて高度になり、細分化していく中で多くの実験研究はますます精密で高度な分析手段を要するようになった。生体成分および生理機能の微量解析では①その材料の確保と物質の単離に膨大な費用と多くの手間がかかること、そして②測定手段としてラジオアイソトープの使用が常識となってきた。この2つの操作は、本学での実験遂行に際して大きな障害となって立ちはだかっていた。しかし近年の分子生物学の急速な進歩は、ある種の恩恵を我々にもたらしてくれた。それは、①材料の確保と物質の単離において培養細胞の利用が手軽になったこと。そして、②測定手段としてアイソトープに代わる検出技術が芽生えてきたことである。そこでこの章では、生体の臓器から極微量の成

分を苦労して取り出すことをせず、遺伝子工学的技術で作成し、培養細胞により恒久的に確保する方法とそのことにより測定系においても放射性同位元素を使わない新しい方法が可能になっていることについて報告する。

1. 遺伝子組換え技術について

遺伝子は、核のなかに存在し染色体という大きな単位を構成し、細胞が分裂していく場合も同じ遺伝子が複製されていく。この遺伝子の本体がいわゆるDNAでありgenomic DNAといわれる。このgenomic DNAからタンパク質が作られるまでには数段階のステップが存在する。まず、染色体のDNAは、細胞分裂が繰り返されても新しい細胞に大事に保存されなければならない、核から持ち出されたりせず、転写（コピー）と言う段階を経てDNAの情報がRNAに移されるのである。そしてこのRNA（mRNA）がタンパク質合成の場所（リボゾーム）へ移動し、そこでこのDNAからRNAに移さ

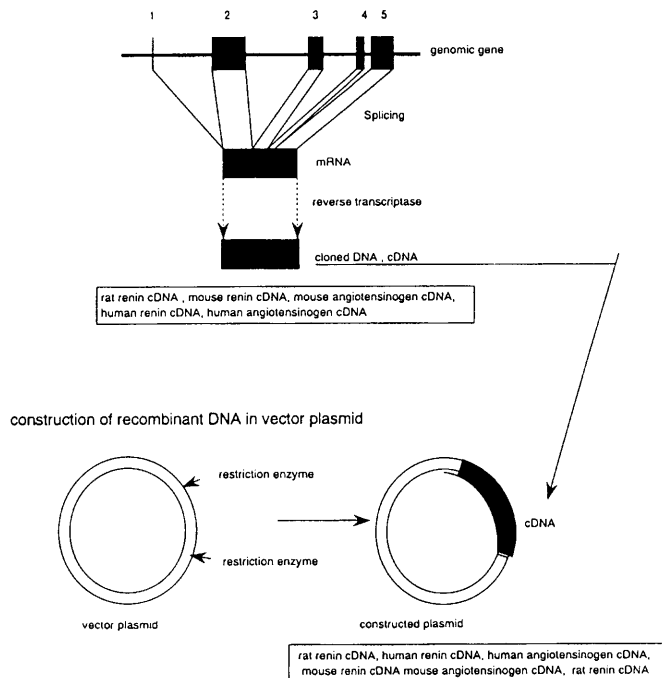


Fig.1 Recombinant DNA technology
genomic DNA and cDNA

れた遺伝子情報に基き合成が行われる。コピーだからDNAとRNAはまったく同じものかというところが同じものではなく異なっている。genomic DNAにはexonとintronという部分があり成熟したmRNAにはこのintronという部分が欠けている。intronというのはタンパク質が合成される時には(塩基配列-アミノ酸配列, 翻訳過程), 翻訳されない部分で必要がないのである。そこでmRNAはsplicingという過程で余計なものを落として必要な部分だけから構成されるものになる。いわゆるタンパク質のアミノ酸をコードするものだけから成ることになる。染色体のDNAよりも、この身軽になったmRNAの方がタンパク質をつくるには便利な状態になっている。そこで、このmRNAから逆転写酵素というものでDNAを作るのであるが今度のDNAにはgenomic DNAとは異なりintronの部分がなく、翻訳されるexonだけから成り大変好都合で利用しやすい。このDNAを染色体のgenomic DNAに対してcloned DNA通称cDNAと呼んでいる。このcDNAを大腸菌などの微生物のプラスミドというサークル型のDNAに組み込むのである。大腸菌は、シャーレで培養できるので目的物質のcDNAの入ったプラスミドがたくさん得られる。こうして得られたものがいわゆる発現ベクターである。こ

こまでの段階をFig. 1に示した。この段階でもcDNAが働きタンパク質がつくられるが、哺乳類と大腸菌ではシステムが同じではなく最終段階はやはり動物細胞で行うことが必要である。哺乳類の動物細胞としてはtransientな発現系としてはCos-7が使われ、permanentな発現系としてはCHO-cellsがよくつかわれる。CHO-cellsによる遺伝子導入と導入細胞の培養方法例をFig. 2に示した。¹⁾ dhfr-からdhfr+への形質転換をプラスミド導入の目安として培養し、この場合angiotensinogenの生産を培養液のAI generation assayにより求め、angiotensinogen産生細胞株を得る。次にMTXによる

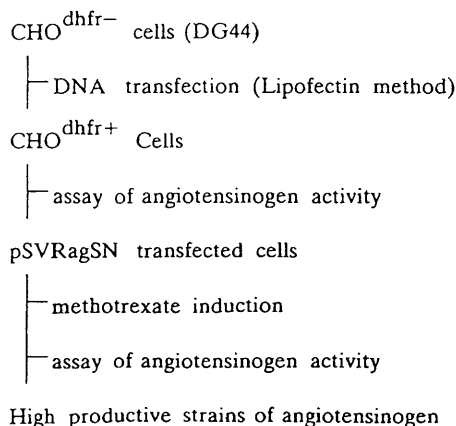


Fig.2 Expression of Recombinant Rat Angiotensinogen

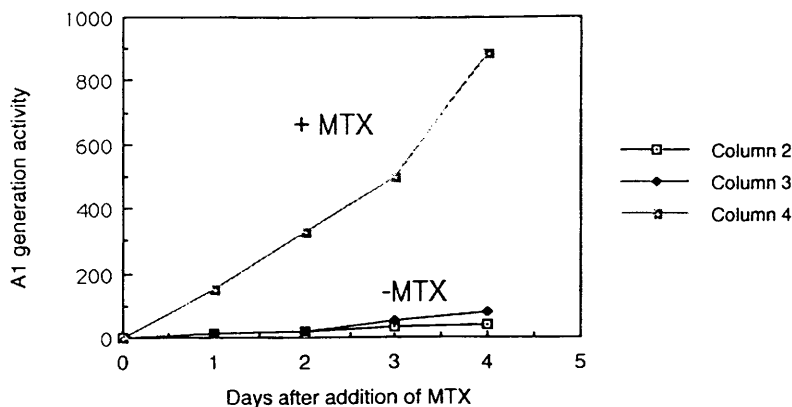


Fig.3 Effect of MTX in culture medium on the production of angiotensinogen

inductionをかけさらに高angiotensinogen産成株を確立している。¹⁾ AI generation activityの変化をFig. 3に示す。

2. 遺伝子組換え技術を利用する理由

生体中のプレホルモン-酵素系は非常に微量であるためその生化学的追跡はもっぱらラジオアイソトープを使う場合が多い。Fig. 4では、その代表ともいえるべき血圧調節システムrenin-angiotensin系を示している。高血圧症の90%は本態性高血圧でありその2/3にはrenin-angiotensinシステム(RA系)が関与している。reninは腎臓でつくられ血中へ分泌されるが本酵素はこのRA系の律速酵素であり種々の血圧変動における寄与は大きく血中での活性測定は不可欠である。しかし測定系は微量で高感度が要求される。村上らは²⁾人間のrenin遺伝子を発現ベクターに組み込み、さらにCHO-cellsに導入後細胞培養により産成させることに成功した。そのことにより例えば豚数百頭分の腎臓24kgに相当するものがrenin遺伝子導入CHO-cells培養細胞から実験室内で得られたことになり画期的なことである。続いて彼等と我々は、各種のreninとangiotensinogen産成株を作成した^{3) 4)}。

このようにして得られたrecombinant reninやrecombinant angiotensinogenを用いてAI gen-

eration activityを測定することを試みた。本学ではラジオアイソトープの施設がないのでそれに代わる測定系を利用しなければならない。そこで鈴木⁵⁾の開発したELISA法を用いることとした。簡単な手順をFig. 5に示す。図から明らかのように96穴のマイクロプレートに抗体を固定化し、AI generationにより生じたAIと標識AIとの競合反応をenzyme linked immunoabsorbant assay法で求める。Table 1に示すように遺伝子組換え技術により各酵素(renin)または基質(angiotensinogen)のcDNAが導入されたCHO-cellsの培養細胞から得られた各酵素(rh,rR-renin)-基質(rh-,

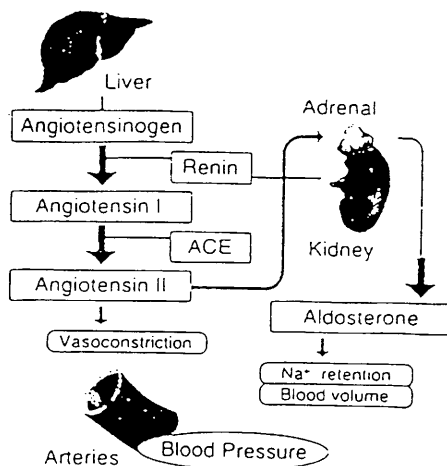


Fig.4 Renin-angiotensin sistem²⁾

Table 1 Comparative study of AI generation assay on ELISA methods.

Enzyme	Substrate	results	
		sample	blank
rh-Rn	rh-ang	171 pgAI	44 pgAI
rh-Rn	tridecapeptide	293	172
h-plasma	tridecapeptide	799	774
h-plasma	rh-ang	344	172
rh-Rn	hog substrate	---	---
R-plasma	rR-ang	256	73

rR-angiotensinogen) 反応系は良い結果が得られた。次に基質のほうを合成基質のtridecapeptideにした場合ブランクの上昇があったが測定は可能であった。しかし酵素を実際の測定で重要な血漿とした場合、両方によりブランク値が上がって測定が不可能となった。しかし酵素を血漿としたままで基質を遺伝子組換え技術によりCHO-cellsから得られたangiotensinogenを用いると表より明らかなように血漿中のrenin concentrationが求められた。その他ラジオアイソトープ法で使用されるhog substrateなども測定不可能であり、本方法で得られたrecombinant reninまたはangiotensinogenを用いることによりアイソトープ施設なしでは不可能と見られていた微量測定の困難を克服できる事になる。このことより、高血圧症における重要因子である食品・栄養・運動などのrenin-angiotensinシステムへの影響や役割の追跡と解明ができると予測される。

3. 実験室の設備に関して

以上の様に遺伝子組換えを利用した動物細胞の培養は非常に大きな利点をもたらすどころか今まで本学では不可能であったような実験系が可能になり、食品・栄養・健康の分野における研究の大きな発展が期待できる。しかしよく知られているように遺伝子組換え実験については、文部省学術国際局による、『大学等における組み換えDNA実験指針』に基づく基準によって行わなければならない。この指針の内容は「大学などにおいて組み換えDNA実験を計画し、実施する際に遵守すべき安全確保に関する基準を示し、もって組み換えDNA実験の安全かつ適切な実施を図る」ことを目的としている。本項で述べた実験内容では組み換え体の作成から行うのが本来であると思われるが目的のcDNAが導入され、目的物質が産生されることが確認された産生細胞樹立株を譲り受けるところからでも十分実用には間に合う。むしろそのほうが、既存の細胞培養施設で培養し、得ら

れた培養液より目的物質を抽出すれば済む。またすでに樹立細胞株なので危険性が極めて少ない。しかし定義されている組み換えDNA実験実験とは、「ある生細胞内で増殖可能なDNA（ベクター）と異種のDNAとの組み換え分子を試験管内で作成し、それを当該生細胞に移入し、異種のDNAを増殖させる実験および実験の結果得られた組み換え体を用いる実験」をいう。つまり、樹立した組み換え体を導入された細胞からスタートする場合もこの基準を指針としなければならない。實際上、専門の細胞培養従事者のいない場合の安全確保や手軽さにおいては、遺伝子組換えおよび導入終了後確立した産生安定株からのスタートがより簡便である。遺伝子組換えそのものを研究目的とするのではなく、実験材料を得るための手段として使うだけにすることであろう。いずれにしろ肝心の施設であるが、物理的封じ込めとしてはP2、生物的封じ込めとしてはB1またはB2ということになろう。資料1にその内容を示した。

まとめ

近年の生物学での分子レベル、細胞レベルでの研究の進歩は著しい。その一端を確実に担っているのは細胞培養技術の発展と操作の簡略化である。器具の多くがdisposableになったこと。マニュアルが揃ってきたことなどである。食品・栄養・健康の分野においても、今迄述べてきたような事が既に行われている。動物培養細胞を生理活性物質のスクリーニングに利用したり、栄養学上興味ある細胞の性質を調べたり（骨芽細胞、脂肪細胞、神経細胞など...）或いは、最も安全な動物細胞を宿主とした動物の遺伝子導入細胞で目的は充分達成される。今後は、多くの人達がそれぞれの目的で、各々が種々培養細胞の導入を行う事が予想される。現在hepaフィルターを備えた培養室があるので、P1、P2レベルでの実験が可能である。よって学内の教育研究の発展と活性化を計るためには、早急に安全委員会の設置をし、円滑な利用と運営が望まれる。

資料 大学などにおける組換えDNA実験指針(表4-1)

表 微生物及び培養細胞を宿主に用いる実験における封じ込めのレベル(20/以下の規模で行う場合)(指針表4-1)

DNA 供与体 宿主-ベクター系		動物 (P2)	植物 (P1)	別表1-(1) (P3)	別表1-(2) (P2)	別表1-(3) (P1)
EK2系		P1	機関届出実験 (P1)	P2	P1	機関届出実験 (P1)
EK1系, SC1系, BS1系		P2	機関届出実験 (P1)	P3	P2	機関届出実験 (P1)
表3の左欄に掲げる宿主-ベクター系		P2	P1	P3	P2	P1
培養細胞〔宿主〕 (分化を目的としないものに 限る。)	別表1-(1)〔ベクター〕	基準外実験	基準外実験	基準外実験	基準外実験	基準外実験
	別表1-(2)〔ベクター〕	P2	P2	P3	P2	P2
	別表1-(3)〔ベクター〕	P2	P1	P3	P2	P1
別表1-(1)を宿主・ベクターのいずれかに用いるもの		基準外実験	基準外実験	基準外実験	基準外実験	基準外実験
別表1-(2)を宿主・ベクターのいずれかに用いるもの (ただし別表1-(1)を用いるものを除く。)		P2	P2	P3	P2	P2
別表1-(3)のみで構成される宿主-ベクター系		P2	P1	P3	P2	P1

- ・種名まで同定されていない微生物のうち、病原性の無いことが明らかでないものを用いる実験については基準外実験
- ・封じ込めのレベルのみ記載のものについては機関承認実験
- ・用いられるすべてのウイルス等に由来するDNAが、プロモーター、ターミネーター等発現調節の機能のみを持ちかつ、感染性ウイルス粒子を出さないものについては、別表1を別表2又は別表3に読み替えるものとする。

文 献

- 1)K.Kimoto, T.Inagami et al, Biomed. Res., 13,41-46(1992)
- 2)K.Tamura, K.Murakamin et al., Hypertens. Res. 18,7-18(1995)
- 3)村上和雄 生化学 65,260-276(1992)
- 4)村上和雄 日本臨床 50,39-45(1992)
- 5)F.Suzuki, S.Yamashita et al., Clin. Exp. Hypertens., A12,83-95(1990)