

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4652139号
(P4652139)

(45) 発行日 平成23年3月16日(2011.3.16)

(24) 登録日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/09 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 U
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A

請求項の数 7 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2005-178385 (P2005-178385)	(73) 特許権者	598041566
(22) 出願日	平成17年6月17日(2005.6.17)		学校法人北里研究所
(65) 公開番号	特開2006-345811 (P2006-345811A)		東京都港区白金5丁目9番1号
(43) 公開日	平成18年12月28日(2006.12.28)	(74) 代理人	100081086
審査請求日	平成20年3月28日(2008.3.28)		弁理士 大冢 邦久
特許法第30条第1項適用 平成16年12月18日		(74) 代理人	100121050
社団法人日本皮膚科学会主催の「日本皮膚科学会 第7			弁理士 林 篤史
96回東京地方会(研究地方会)」において文書をもって発表		(72) 発明者	増澤 幹男
特許法第30条第1項適用 平成17年3月18日 社			神奈川県相模原市北里1丁目15番1号
団法人日本皮膚科学会事務所発行の「日本皮膚科学会雑			学校法人北里学園内
誌 第115巻 第3号 臨時増刊号」に発表		審査官	上條 肇
微生物の受託番号 FERM BP-10349			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超低増殖性細胞株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

S C I D (重症複合型免疫不全症) マウス皮下可植性ヒト血管肉腫より得た腫瘍細胞をマウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有培地で培養し、トリプシン- E D T A 処理によって剥離しない細胞株を選択し、得られた細胞株を剥離継代培養することを特徴とする低増殖性細胞株の樹立方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法において、マウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有培地におけるマウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有濃度を50%以下とする請求項1に記載の低増殖性細胞株の樹立方法。

【請求項3】

マウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有濃度を20%以下とする請求項2に記載の超低増殖性細胞株の樹立方法。

【請求項4】

S C I D マウス皮下可植性ヒト血管肉腫に由来し、請求項3に記載の方法により樹立された超低増殖性細胞株。

【請求項5】

倍化時間が1000時間以上である請求項4に記載の超低増殖性細胞株。

【請求項6】

S C I D マウス皮下可植性ヒト血管肉腫 W B - S C I D に由来する超低増殖性細胞株 S

L G / W B - S C I D (平成17年6月8日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受領番号 F E R M - A B P - 1 0 3 4 9 号として寄託)。

【請求項7】

請求項4～6のいずれかに記載の超低増殖性細胞株を宿主とすることを特徴とするライ菌の培養方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、低増殖性細胞株の樹立方法、特に超低増殖性細胞株の樹立方法、その方法により樹立された超低増殖性細胞株及びこれを用いたライ菌の培養方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ハンセン病はWHO指定特定伝染病であり、全世界で約1200万人の患者がいると推定されている。また、年間50万人以上の患者が新たに発生しているとされる。この感染症の原因菌であるライ菌 (*Mycobacterium leprae*) は細胞内寄生菌であり、マクロファージ、シュワン細胞、血管内皮細胞等の内部で増殖する。

ライ菌は試験管内で培養することはできず、抗ライ薬の効果を調べるためにはマウス足底部でのライ菌培養が用いられている。また、ライ菌はアルマジロに感染することが発見されており、ライ腫型ライ (LL型：ライ菌が最も増殖する臨床病型) の疾患モデルとしてライ研究に利用され、これを用いてライワクチンをつくることが試みられている。

20

【0003】

しかし、動物を用いた培養は取扱いが不便である。マクロファージ、神経細胞などを感染細胞として用いることも検討されてきたが、培養には成功していない。このように、*in vitro* 培養が不可能であるという事情がハンセン病研究の遅れの大きな原因となっている。また、上述の通り、ハンセン病は現在でも多数の患者を有する感染症である。ハンセン病治療薬としてはサルファ剤や各種抗生物質が用いられており、耐性菌に対しては2～3剤併用の多剤療法が行なわれているが、これらに対しては耐性菌が発生しており、有用な抗ライ薬のスクリーニング系が望まれている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0004】

本発明は、動物を利用することなく、ライ菌の長期的な *in vitro* 培養を可能とする培養系の確立を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

ライ菌は倍化時間が14日以上とされる。このため、ライ菌を細胞に感染させる場合、細胞の倍化時間がライ菌の倍化時間よりさらに長くないと細胞内でライ菌が増殖できない。また、感染する細胞はライ菌が増殖しやすい種類の細胞でなければならない。

本発明者はこれらの点に着目し、生体内においてライ球形成 (ライ腫型ライの良好な増殖形態とされる) が認められる血管内皮細胞から、増殖速度が低く、ライ菌の感染増殖に適した細胞株を樹立することを試みた。その結果、特定の方法を採ることにより低増殖性細胞株、特に超低増殖性細胞株が樹立され得ること、及び、この方法により得られた細胞株がライ菌の感染増殖に適していることを見出し、本発明を完成するに至った。

40

【0006】

すなわち、本発明は以下の低増殖性細胞株の樹立方法、特に超低増殖性細胞株の樹立方法、その方法により樹立された超低増殖性細胞株及びこれを用いたライ菌の培養方法を提供する。

1. S C I D (重症複合型免疫不全症) マウス皮下可植性ヒト血管肉腫より得た腫瘍細胞をマウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有培地で培養し、トリプシン-E D T A 処理によって剥離しない細胞株を選択し、得られた細胞株を剥離継代培養することを特徴

50

とする低増殖性細胞株の樹立方法。

2. 前記1に記載の方法において、マウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有培地におけるマウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有濃度を 5 0 % 以下とする前記1に記載の低増殖性細胞株の樹立方法。

3. マウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有濃度を 2 0 % 以下とする前記2に記載の超低増殖性細胞株の樹立方法。

4. S C I D マウス皮下可植性ヒト血管肉腫に由来し、前記3に記載の方法により樹立された超低増殖性細胞株。

5. 倍化時間が 1 0 0 0 時間以上である前記4に記載の超低増殖性細胞株。

6. S C I D マウス皮下可植性ヒト血管肉腫 W B - S C I D に由来する超低増殖性細胞株 S L G / W B - S C I D (平成 1 7 年 6 月 8 日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受領番号 F E R M - A B P - 1 0 3 4 9 号として寄託)。

7. 前記4～6のいずれかに記載の超低増殖性細胞株を宿主とすることを特徴とするライ菌の培養方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、ライ菌の感染増殖に適した超低増殖性細胞株が得られる。このため、ライ菌の長期的な *i n v i t r o* 培養が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

(A) 低増殖性細胞株の樹立方法

はじめに、本発明による低増殖性細胞株の樹立方法について説明する。

本発明による低増殖性細胞株の樹立方法は、S C I D (重症複合型免疫不全症) マウス皮下可植性ヒト血管肉腫より得た腫瘍細胞をマウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有培地で培養し、トリプシン - E D T A 処理によって剥離しない細胞株を選択し、得られた細胞株を剥離継代培養することを特徴とする。

S C I D (severe combined immunodeficiency disease; 重症複合型免疫不全症) マウスは、遺伝子再構成能に異常があるために成熟した B および T 細胞が先天的に欠損したマウスであり、ヒト新生児でみられる遺伝性の重症複合型免疫不全症のモデル動物である。レシピエントとしての S C I D マウスは、種々の系統が知られているが、本発明ではいずれも用いることができる。一方、ヒト血管肉腫は稀ではあるが致死性の高い腫瘍である。S C I D マウス皮下可植性ヒト血管肉腫は、ヒト血管肉腫を S C I D マウスに移植して細胞樹立したものである。このような S C I D マウス皮下可植性ヒト血管肉腫は、本発明者らにより樹立されており (Masuzawa M. et al., 摘valuation of recombinant interleukin-2 immunotherapy for human hemangiosarcoma in a SCID mice model (WB-SCID) J. Dermatol. Sci. 27(2):88-94, 2001)、本発明でもこの腫瘍 (W B - S C I D) またはこれに準じて作製した S C I D マウス皮下可植性ヒト血管肉腫を用いることができる。以下の説明では、便宜上、このようにして得られる S C I D マウス皮下可植性ヒト血管肉腫を W B - S C I D 腫瘍細胞と呼ぶ。

【0009】

本発明では、W B - S C I D 腫瘍細胞を腫瘍から得た後、マウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清含有培地で培養する。マウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清を含まない培地では W B - S C I D 腫瘍細胞は数日間で死滅するため、マウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清は培養に必須である。マウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 も本発明者らにより樹立されている (Masuzawa M. et al., 摘stablishment of a new murine-phenotypic angiosarcoma cell line (ISOS-1) J. Dermatol. Sci., 16(2): 91-98, 1998)。

【0010】

マウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清は、上記 I S O S - 1 を培養することにより得られるが、典型的には、F B S (ウシ胎児血清) を添加した D M E M (ダルベッコ改変イーグル培地) を用いることができる。具体的には (a) 培地として D M E M + 1 0 % F

10

20

30

40

50

B S + 2 m M L - グルタミン + 1 0 m M H e p e s + 5 0 μ g / m l ゲンタマイシンを用い、I S O S - 1 細胞を 1×10^6 程度フラスコで培養し、コンフルエントになり細胞数約 1×10^8 となった状態で培地を回収し、遠心 (3 0 0 0 r p m) 後、上清を凍結保存し、使用時に 3 7 $^{\circ}$ C で解凍後、濾過して使用する。I S O S - 1 培養上清の添加濃度は好ましくは 5 0 % 以下である。

【 0 0 1 1 】

W B - S C I D 腫瘍細胞を培養するための培地は、上記 I S O S - 1 培養上清の添加を除けば通常と同様でよく、例えば、F B S (ウシ胎児血清) を添加した D M E M (ダルベッコ改変イーグル培地) を用いることができる (Masuzawa M. et al., 摘stablishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO - HAS) Int. J. Cancer, 81 (2) : 305 - 308, 1999 参照) 。培養条件は後述の超低増殖性培養株を得る場合以外は通常の温度条件及び湿度条件を採用し得る。培養は接着培養にて行なう。

10

【 0 0 1 2 】

次いで、トリプシン - E D T A 処理を行ない、剥離した細胞を除く処理を行なう。これにより、酵素抵抗性細胞以外の細胞が除去できる。トリプシン - E D T A 処理は通常 5 回以上、好ましくは 1 0 回以上行なう。

もっとも、このようにして得られた W B - S C I D 腫瘍細胞は、それ自体低増殖性で、本発明では、かくして得られた W B - S C I D 腫瘍細胞についてトリプシン - E D T A 処理を行なった後、これを機械的に剥離して培養する手法を繰り返して継代培養を行なう (本願において「剥離継代培養」と呼ぶ。) 。これにより、より低増殖性の細胞株を得ることができる。剥離継代培養における機械的剥離操作としては接着細胞を穏やかかつ効果的に剥離するために慣用される剥離方法が利用できるが、典型的にはピペティング操作が用いられる。剥離継代培養は通常 1 0 代以上、好ましくは 1 0 0 代以上行なう。

20

得られた細胞は密度依存性であり、密度が高いほど増殖が活発化する。

【 0 0 1 3 】

(B) 超低増殖性細胞株の樹立方法

本発明による超低増殖性細胞株の樹立方法は、基本的には上記の低増殖性細胞株の樹立方法と同様であるが、初代培養時のマウス血管肉腫細胞株 I S O S - 1 培養上清の添加濃度は好ましくは 5 ~ 2 0 % 程度とする。 5 % 以下では成育せず死滅する。 2 0 % が最適である。また、インキュベータの設定温度を低くすることでより増殖性の低い細胞株が得られる。通常は 3 7 $^{\circ}$ C 以下、好ましくは 3 4 $^{\circ}$ C 以下とする。

30

【 0 0 1 4 】

(C) (超) 低増殖性細胞株

このようにして得られる (超) 低増殖性細胞株は、マウス C D 3 1 、 G S A - 1 陽性であり、マウス内皮系細胞である。また、染色体はすべてマウス型で、最頻数は 7 7 である。しかし、ヒト / マウス両クラス I 抗原を同時発現している。

また、低増殖性細胞株で倍化時間が 5 0 ~ 1 0 0 時間程度、超低増殖性細胞株では、5 0 0 時間を超え、1 0 0 0 時間以上、さらに 1 5 0 0 時間以上の細胞株が得られる。このような細胞株として S L G / W B - S C I D が得られ、平成 1 7 年 6 月 8 日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受領番号 F E R M - A B P - 1 0 3 4 9 号として寄託した。

40

【 0 0 1 5 】

(D) ライ菌の培養

上述のように、本発明による、低増殖性細胞株、特に超低増殖性細胞株は培養時間が 1 5 0 0 時間以上であり、しかも、至適温度が 3 4 $^{\circ}$ C である。このため、倍化時間が約 2 週間 (3 3 0 時間) 、至適温度が 3 1 ~ 3 4 $^{\circ}$ C であるライ菌の培養に適している。

本発明による超低増殖性細胞株を用いてライ菌の培養を行なうには、S L G / W B - S C I D を 3 4 $^{\circ}$ C インキュベータで I S O S - 1 培養上清 2 0 % 添加の培地にて、7 5 c m ² 培養フラスコでコンフルエントになるまで培養した時点で、ライ菌 $2 \sim 5 \times 10^7$ を添加して培養を続ける。

50

【実施例】

【0016】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明を制限するものではない。なお、下記の手技はすべて無菌操作で行なった。

【0017】

実施例1：低増殖性細胞株の樹立

(1) マウス血管肉腫細胞株 ISOS-1 培養上清の作成

培地として DMEM + 10% FBS + 2 mM L-グルタミン + 10 mM HEPES + 50 μ g/ml ゲンタマイシンを用い、ISOS-1 (Masuzawa M. et al., *Establishment of a new murine-phenotypic angiosarcoma cell line (ISOS-1)* J. Dermatol. Sci. 16(2): 91-98, 1998) を 1×10^6 を 175 cm² フラスコで上記培地 50 ml 中 1 週間培養した。フラスコがコンフルエントになり細胞数約 1×10^8 となった状態で培地を回収し、遠心 (3000 rpm で 10 分間) 後、上清を -20℃ 凍結保存した。これを使用時 37℃ で解凍後、0.45 μ m フィルターで濾過して用いる。

【0018】

(2) WB-SCID 細胞

SCID マウス皮下可植性ヒト血管肉腫 WB-SCID (Masuzawa M, et al., *Assessment of recombinant interleukin-2 immunotherapy for human hemangiosarcoma in a SCID mice model (WB-SCID)* J. Dermatol. Sci. 27(2):88-94, 2001) の腫瘍を摘出した。

摘出腫瘍をシャーレに移し、生理食塩水内にて半割し、腫瘍中心半壊死組織より円刃を用いて擦過するようにして非酵素処理にて細胞遊出させた。遊出した細胞を遠心チューブに移し、遠心器にて 4℃、1000 rpm で遠心し、細胞を沈下させ上清を除去し、沈下した細胞層を分離した。

【0019】

細胞層を上記 (1) のマウス血管肉腫細胞株 ISOS-1 培養上清 50% 添加し、ヒト血管肉腫細胞用培地 (DMEM + 10% FBS + マウス血管肉腫細胞株 ISOS-1 培養上清 50% 添加) (以後培地と略す) にて再浮遊させて通常の培養皿に移し、CO₂ インキュベーター内にて 37℃、5% CO₂ の通常の培養環境で培養を開始した (初代培養)。

以後週に 2 回培地を交換し、培養開始 1 週間後、培地を除去し、生理食塩水で 1 回培養皿底を洗い、0.25% トリプシン-EDTA (GIBCO 製) (以後、トリプシン-EDTA と略す) を適量加え 10 分間放置した。放置後、剥離した細胞を除去し、培養皿底に残存した細胞のみを生理食塩水で 1 回洗い、新たに新鮮な培地を加え継続培養した。上記の操作を週 2 回、計 10 回繰り返し、トリプシン-EDTA 処理にて剥離する細胞がないことを確認し、トリプシン-EDTA で剥離しなかった細胞のみ培養を続けた。

【0020】

(3) 低増殖細胞株の選択

1 カ月後、培養皿底に観察される細胞コロニーをトリプシン-EDTA で 1 時間処理し、その後トランスファーピペットで約 10 分間ピペッティングして機械的に細胞を剥離した。剥離細胞を新たな培養皿に移し、培養を継続した。

培養皿内で増殖した細胞について上記の同様にピペッティングして機械的に細胞を剥離、剥離継代培養を繰り返した。

2 ケ月後、紐状に長い細胞群が単層敷石状に安定して培養された。この細胞は密度依存性 (細胞密度が高いほど増殖は活発化) に増殖した。

径 35 mm 培養皿 (9.6 cm²) で培地 2 ml、培地交換週 2 回の培養条件で、 10^5 個の細胞を培養すると最も増殖する 7 日目から 10 日目でも、倍化時間は約 70 時間であり、低増殖性であった。

上記の培養条件で 10 日目以降に細胞は培養皿をほぼ覆い、唐草模様状に単層に増殖した。コンフルエントの状態に近づくと、細胞の剥離が起こった。

細胞数を減らして培養を繰り返すことで細胞は性状を変化せず、ゆっくり増殖を続けた

10

20

30

40

50

。

得られた細胞は紐状で長い形態（長さ：約100～250 μm）である。また、得られた細胞を自動細胞分析装置（FACSscan：Becton Dickinson社製）を用いCELLQuest解析ソフトでFACS解析したところ、マウスCD31、GSA-1陽性でマウス内皮系細胞であることが確認された。染色体はすべてマウス型で、71～79に及び、最頻数は77であった。また、ヒト／マウス両クラスI抗原を同時発現しており、電顕的には高密度顆粒が多く、きわめて細胞小器官に富んでいた。この細胞はDMSO10%添加培地で凍結保存が可絶であった。

【0021】

実施例2：超低増殖性細胞株の樹立

10

実施例1と同様にしてWB-SCID細胞を得た。（1）培地に添加するISOS-1培養上清の添加比率を50%から20%に低下させ、（2）CO₂インキュベーターの温度設定を37℃から34℃に低下させた他は実施例1と同様の培養条件でこれを培養した。

。

この結果、変更前の条件でコンフルエントに達した細胞密度の約50%まで増殖した時点で細胞は超低増殖性となり、この時点での倍化時間は1500時間以上であった。

細胞の形状等は実施例1と同様であった。単一株をSLG/WB-SCIDとして、平成17年6月8日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託した（受領番号FERM-ABP-10349号）。

【0022】

20

実施例3：ライ菌の培養

上記のSLG/WB-SCID細胞株を75 cm²培養フラスコを用いて34℃インキュベーターでISOS-1培養上清20%添加の培地にて培養し、コンフルエントになった時点（細胞数約1.5 × 10⁶）で、Thai53株ライ菌（国立感染症研究所ハンセン病研究センター）2～5 × 10⁷個を培地に混入させ、上記と同様の培養条件で培養を継続した。

チール・ネルセン染色、ヒトライ菌DNA特異的プライマーによるPCRで得られた細胞中のライ菌を確認し、さらにATP測定とヌードマウスの足蹠接種での腫瘍形成で生菌の確認を行なった。培養フラスコあたりの回収細胞を0.5% Triton-X100処理し、Shepard法により菌数を算定した。これによりライ菌の長期培養が可能であることが確認された。

30

【産業上の利用可能性】

【0023】

本発明によれば、SCIDマウス皮下可植性ヒト血管肉腫から、増殖速度が低い（倍化時間で300時間以上、特に1000時間以上）細胞株が得られる。これは、ライ菌の増殖速度よりも低増殖性であり、至適温度もライ菌に類以しており、ライ菌の感染する血管内皮細胞由来であることからライ菌の感染増殖に適していると考えられ、実際にその有効性が確認された。この結果、ライ菌の*in vitro*での培養が可能になり、ライ菌の研究及び抗ライ薬のスクリーニング等に有用である。また、本発明による細胞株はヒト／マウス両クラスI抗原を同時発現しておりヒト血管肉腫の特性解明の上でも有用性が期待される。

40

フロントページの続き

(56)参考文献 Journal of Dermatol. Sci., 1998年, Vol.16, p.91-98
日本癌学会総会記事, 2004年, Vol.63, p.522

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/09

C12N 1/20

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

PubMed