

第1章 動物細胞工学とは？

1.1 細胞培養(Cell culture)の歴史

○組織培養の始まり

- ・1907年、ハリソンがオタマジャクシの脊索から取った[]をカエルの凝固リンパ液中で培養し、神経細胞から神経線維が形成されたことを数週間にわたって観察したことに始まる。
- ・1912年、カレル(外科医)がニワトリの胚の線維芽細胞の長期培養に成功。このとき、胚の抽出物中に細胞増殖を促進する物質が含まれることを発見。
- ・1920年代には、培養液にニワトリの血漿を添加することで長期継代培養が可能になった。
- ・[]年、ヒト子宮頸ガン由来の上皮細胞株、[]細胞の樹立。

○初期の組織培養の問題点

- ・[]の入手が困難。
- ・[]細胞の有限増殖。(ガン細胞は無限増殖)

○培地の開発

- ・Ham や Eagle などがアミノ酸、ビタミン、無機塩類などからなる[]の[]の開発に成功。1950~60年代にかけて動物細胞を用いた研究が大きく進展した。
- ・血清添加を前提とした培地。

○無血清培地(Serum-free culture)の開発

- ・1970年代、血清の変わりに必要な[]だけを添加する無血清培地が開発された。
- ・血清の役割は、[]の供給よりもむしろ[]の供給にある。

1.2 細胞培養の目的・展望

○新規生理活性物質の発見

- ・新規生理活性物質が細胞機能の制御、培養法の改良によって見いだされる。
- ・既知物質の新規生理機能も見いだされる可能性がある。従来から知られている機能よりも重要である可能性もある。

○生理活性物質の生産技術の開発

- ・培養システムの開発。
- ・大量凍結技術による大量培養の効率化。

○天然生理活性高分子からの誘導体の製造

- ・生体の恒常性維持物質としての天然生理活性高分子が必ずしも高分子医薬として最適であるとは限らない。遺伝子組換え作業によって天然には存在しない生理活性物質を作る。(例：[]抗体、[]抗体)

- 自動制御細胞培養システムの開発
 - ・生理活性物質を細胞を用いて効率的にしかも大量に生産するためには自動化された高密度大量培養システムの開発が不可欠。
- 治療用細胞の生産
 - ・移植に於ける拒絶反応の観点から、自分の細胞を治療用細胞として使用することが望ましい。
 - ・皮膚移植用の上皮細胞。
- 人工臓器
 - ・人工肝臓。
 - ・肝臓は、その生理機能を発現するためには3次元的構造を必要とするため、細胞の支持体の構造も重要。
- バイオセンサー
 - ・味覚、臭覚等の官能試験に頼らざるをえない対象に対して、細胞を用いたバイオセンサーの開発が望まれる。
- 食品の生物機能の解析
 - ・食品の栄養的特性および生物機能調節能を細胞を用いて解析する。
 - ・食品添加物の安全性試験。(試験、 試験)
- 生命現象の解明
 - ・免疫、老化、発生、ガン化のメカニズムを解明する。
- 遺伝子機能の解明
 - ・培養細胞は高等生物の 機構を解明する最も単純化された生命単位である。
 - ・遺伝子改変、調節操作は遺伝子機能の解明に重要な情報を与える。
- 産業用動物の育種
 - ・クローン動物の作出。家畜、魚類等の食用資源の効率的生産。
 - ・動物体内での医薬品の生産。動物工場。
- 医薬品等の機能評価
 - ・毒性試験等。
 - ・動物実験の代替。例：シャンプーの開発に当たっての 試験。
- 微生物代謝物による細胞機能の調節

1.3 細胞培養について

- 生体内で起こっている生命現象を生体外により簡略化された形で再現する。
- 通常細胞は、単一種、クローンで培養されている。しかし、生体は様々な細胞から成り立つ複合系であるため、生体外での培養も複合培養系で考慮する必要がある。

1.4 動物細胞による組換えタンパク質の生産

微生物には複合タンパク質を作る機能が無い。糖タンパク質やリポタンパク質等の [] は真核細胞しか作れない。

○糖タンパク質

●エリスロポエチン (Erythropoietin: EPO)

- ・赤血球の形成に関与する糖タンパク質。
- ・ [] で生合成される。
- ・赤血球による組織への酸素供給量は [] で感知される。酸素供給量が低下するとEPOの [] が促進され、血中EPO濃度が上昇し、赤血球形成が促進される。
- ・標的細胞上の特異的レセプターに結合して細胞の生存を支持し、分化と増殖を促進する。
- ・組換え型ヒトEPOは腎疾患に伴う貧血の治療薬として使われている。
- ・電気泳動上では、 [] kDaの分子量を示すが、ペプチド鎖は [] 個のアミノ酸からなり、その分子サイズは [] kDaである。残りは、糖鎖に由来する。
- ・糖鎖構造は動物種によって微妙に異なる。ヒトのEPOをチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、幼若ハムスター腎臓細胞(BHK細胞)、昆虫細胞、植物細胞などで発現させたが、生体内で抗貧血活性を示すのは [] 由来の生産物だけ。
- ・ヒトEPOは24、38、83番目の [] 残基にN結合型糖鎖を、126番目の [] 残基にO結合型糖鎖を持つ。

第2章 動物細胞

2.1 いろいろな細胞

2.1.1 原核細胞と真核細胞

○原核細胞(Prokaryote)

- ・明確な□がなく、□が直接細胞膜接して存在している。
- ・染色体 DNA は環状の□として存在。
- ・細菌、微生物。

○真核細胞(Eukaryote)

- ・□がある。核膜は、□を物理的な衝撃から守るために進化の過程で獲得した。
- ・□、高等生物の細胞。

2.1.2 種々の細胞

- ・動物細胞にもいろいろな形、働きがある。
赤血球、神経細胞(Nerve cell)、色素胞細胞、白血球(Leucocyte)、筋芽細胞(Myoblast)、精子(Androcyte)
- ・ヒトの体は、およそ□個の細胞から成り立っている。
- ・接着性の細胞(接着細胞)と□細胞がある。接着細胞は体細胞由来で、浮遊細胞は血球由来の細胞。
- ・体の構成:細胞 → 組織 → 器官 → 器官系(□の器官系)

2.2 細胞の内部構造

2.2.1 オルガネラ(Organelle)

○核(Nucleus)

- ・□(Chromosome)を持つ。DNA の他に多くのタンパク質を含んでいる。□、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ、遺伝子調節タンパク質など。□は、DNA と複合体をなし、クロマチン(染色質; Chromatin)を形成している。
- ・遺伝情報や細胞分化(Cell differentiation)、物質代謝(Metabolism)など、様々な細胞機能の中核。
- ・普通、核は一つの細胞に一個だが、肝臓細胞、軟骨細胞、交感神経節細胞では2個の核を持つ。また、□などのように多数の核を持つ細胞もある。
- ・核膜には□(Nuclear pore)と呼ばれる 50~100 nm の小さな孔が所々に開いていて、そこで核内成分と細胞質が連絡している。(mRNA やリボゾーム)
- ・□(Nuclear Localization Signal)を持った物質のみが核膜孔を通過して核内に入ることができる。
- ・核内には核小体(仁ともいう)があり、RNA とタンパク質からなる構造体で、リボソーム RNA の供給源。タンパク合成が盛んな細胞では核小体がよく発達している。
- ・アポトーシス(Apoptosis)は、□の断片化によって引き起こされる。

細胞の[]死。オタマジャクシの[]の消失、胎児の水かきの消失。

- ・テロメア(Telomere):染色体の末端にあり、細胞分裂ごとに切断され、細胞の[]を決める。

○ミトコンドリア(Mitochondrion; (複) Mitochondria)

- ・2枚の膜からなる糸状もしくは粒状の小器官。外観は桿菌に似ている。マトリクス、内膜のヒダ状構造:クリステ(Cristae)、内膜の内側:マトリクス(Matrix)。TCA回路(クレブス回路・クエン酸回路)や β 酸化などミトコンドリアの代謝機能に関わる酵素群が存在。
- ・肝細胞には[]個ほどある。
- ・外膜は分子量[]程度までの分子は無差別に透過させるが、内膜は選択的に特定の物質のみを透過させる。
- ・呼吸酸化のクエン酸回路と電子伝達系の働きがある。
- ・DNAやRNAを持つことから、元々は[]ではないかと考えられている。

○細胞膜(Cell membrane)

- ・親水性の頭と疎水性の足を持つ[](Phospholipid)で構成される二重膜。
- ・脂質二重膜中にタンパク質や糖質が[]状に埋め込まれている。一部が埋め込まれていたり、貫通していたり、存在形態は様々。
- ・細胞膜上には様々な分子が埋め込まれており、細胞間の情報伝達や、細胞内情報伝達に関与している。

○小胞体(Endoplasmic reticulum)

- ・細胞質中に縦横に発達して見える小器官。網状の不規則な構造。
- ・おもに、細胞から分泌されるタンパク質や膜脂質などの生体物質を合成する場。
- ・膜表面に[]が付着しているものを粗面小胞体(Rough-surfaced endoplasmic reticulum)、付着していないものを滑面小胞体(Smooth-surfaced endoplasmic reticulum)という。

【粗面小胞体】

- ・すい臓、唾液腺などの分泌を営む細胞でよく発達している。
- ・膜の表面に付着したリボゾームで作られたタンパク質は小胞体の膜を通過して小胞体内腔に入って、滑面小胞体を通してゴルジ体へと運ばれる。
- ・小胞体内腔では[]型糖鎖の修飾が行われる。
- ・核の外膜と連絡しており、粗面小胞体は[]由来とも考えられている。

【滑面小胞体】

- ・粗面小胞体の膜と連絡している。
- ・脂質代謝が主な機能。従って、[]を合成する細胞(肝細胞など)などでよく発達している。

○リボゾーム(Ribosome)

- ・RNAとタンパク質からなる直径 nm の顆粒状構造体。粗面小胞体の表面に付着した 型リボゾームと細胞質に散在した リボゾームとして存在するが、両者の構造的な違いはない。遊離型になるか、付着型になるかは、小サブユニットに結合し、これから翻訳しようとする mRNA がコードするタンパク質に依存する。
- ・細胞質内で働くタンパク質は、浮遊したまま、遊離型リボゾームで翻訳される。
- ・細胞膜、リソソーム、あるいは分泌されるタンパク質は、 小胞体上で 型リボゾームで翻訳される。
- ・分泌タンパク質をコードする mRNA は、その最初の部分にシグナル配列と呼ばれる特殊なアミノ酸配列をコードしており、その情報に基づいて合成された 15~30 残基の 性アミノ酸配列の鎖が小胞体へと結合するシグナルとなる(シグナル配列)。
- ・大小二つのサブユニットからなる。小さい方に が結合し、大きいサブユニットに を結合した が結びついてタンパク質合成を行う。
- ・分泌タンパク質をコードする mRNA は、その最初の部分にシグナル配列と呼ばれる特殊なアミノ酸配列をコードしており、その情報に基づいて合成された ~ 残基の疎水性アミノ酸配列の鎖が小胞体へと結合するシグナルとなる。
- ・真核生物のリボゾームは沈降係数 80S で、大サブユニットが 60S、小サブユニットが 40S である。一方、原核生物は、70S で、それぞれ 50S、30S である。

○ゴルジ体(Golgi body)

- ・Camillo Golgi が発見したので、Golgi 体と名付けられた。
- ・ の近傍にある。平坦な円盤状のゴルジ偏平囊。ゴルジ偏平囊は直径 0.5 μm 程度の扁平な袋状の膜構造で、20~30 nm 程度の一定の間隔で層をなす。
- ・、 ()、 の三つに別れる。
- ・分泌に関与する細胞では、著しく発達している。
- ・ の形成も行われる。リソソームの内容物の種々の加水分解酵素は粗面小胞体で作られて、ゴルジ体へと運ばれる。そして一次リソソームとなる。
- ・糖タンパク質の に関与している。糖鎖を合成するための種々の が多く含まれる。

○リソソーム (Lysosome)

- ・エンドサイトーシスなどで細胞外から入ってきた物質や細胞内の不要となった物質、さらに細胞内に侵入してきた細菌等を する小胞。すべての真核細胞にみられる。
- ・約 9 nm の厚さを持つ膜で囲まれている。直径 0.05~0.5 μm 。
- ・リソソーム内は酸性 (pH 3~5) に保たれており、酸性条件下で働く多種の 酵素 (約 40 種) が含まれている。
- ・酸性 pH の維持は、 H^+ を送り込む ATP 依存性の により達成されている。
- ・分解酵素は細胞自身に分解作用が及ばないように膜内に閉じこめられている。

○細胞骨格 (Cytoskeleton)

- ・細胞質内に存在し、細胞の形態を維持し、細胞内外の運動に必要な物理的力を発生させる細胞内の 構造。
- ・アクチンフィラメント (Actin filament) : 直径は 5~9 nm。2 つのアクチン鎖で構成されている。アクチンフィラメントのほとんどは の直下に集中しており、張力への抵抗、 の保持、細胞質突起の形成、細胞間や細胞-基質間の接合に関わる。
- ・微小管 (Microtubule) : 直径約 nm の管状の構造であり、主にチューブリン (Tubulin) と呼ばれるタンパク質からなる。細胞分裂の際に形成される分裂装置 (星状体・紡錘体・染色体) の主体。
- ・中間径フィラメント (Intermediate filament) : 直径 8~12nm、アクチンフィラメントよりも丈夫な、細胞質中の複数種の構成要素。アクチンフィラメントと同様に、張力に抵抗することによって細胞の を保つ働きがある。

第3章 動物細胞培養

3.1 動物細胞培養に必要な機器と器具

○クリーンベンチ

- ・ フィルターで除菌した無菌空気を排出。
- ・ 紫外線殺菌灯で庫内を殺菌。

○炭酸ガスインキュベーター (CO₂ incubator)

- ・ 炭酸ガス濃度 %。
- ・ 炭酸ガス緩衝系による pH 制御。
$$\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$$
- ・ pH7.0~7.2 程度。
- ・ 培地中の水が蒸発しないように湿度が 100%に保たれている。

○小型卓上遠心機

- ・ 細胞の回収に用いる。
- ・ rpm、 分間で細胞は沈殿。

○倒立顕微鏡 (Inverted microscope)

- ・ シャーレなどで培養したままの状態で見極鏡観察するために がステージの下にある。ゆえに倒立と呼ばれる。ステージ上に大きな空間があるため、シャーレや培養プレートで細胞を培養したままで観察できる。

○細胞計数装置 (Cell counter)

- ・ 電気的変化を検知することで、細胞数を計数する。

○オートピペッター

- ・ 基本的に液体培養なので、ピペット操作で行う。口では吸えないので、オートピペッターを用いる。電動ポンプ式で、吸ったり吐いたりする。

○アスピレーター

- ・ 廃液を吸い出すための吸引ポンプ。

○エアコン

- ・ 湿度調節する。湿度を下げれば、雑菌汚染の危険性が下がるので、湿度を 50~60%程度まで下げる。
- ・ 雑菌汚染は細胞培養の大敵。

3.2 各種滅菌装置

○微生物コントロールに関する用語

- ・ : 病原菌、非病原菌を問わず、すべての微生物を完全に死滅除去すること。
- ・ : 微生物の生命を奪い、不活性化すること。
- ・ : 病原性微生物の不活性化を意味し、非病原性微生物の残存・混入は問題としない。
- ・ : 対象物から菌を除いて減らすこと。
- ・ : 菌は殺さないが、その増殖を止めること。

○滅菌法の種類

●加熱滅菌法

・乾熱滅菌

- ・160°C以上の高温で器具を処理する。
- ・ガラス、陶器、金属など。
- ・滅菌の時間は温度に依存する。
 - 135~145°C 3~5 時間
 - 160~170°C 2~4 時間
 - 180~200°C 0.5~1 時間
- ・ガラスピペットはピペット缶に入れて滅菌する。

・湿熱滅菌(加圧蒸気滅菌(オートクレーブ滅菌))

- ・最も一般的で、確実かつ経済的な滅菌法。
- ・高温の[]を充満させる。
- ・液体の滅菌も可能。
- ・滅菌条件:
 - 115°C 30 分
 - 121°C []分
 - 126°C 15 分

●ろ過滅菌法

- ・[] μm 、あるいは [] μm のメンブレンフィルターでろ過。
- ・加熱によって変性する材料(タンパク質、ビタミンなど)の滅菌に用いる。
- ・空気中の菌の除菌にも用いる。
- ・細菌は除去できるが、[]やウイルスは除去できない。
- ・ホローファイバー型フィルターでは、ウイルス除去可能(50 nm)なものもある。

●物理滅菌法

・紫外線滅菌

- ・殺菌作用が強い波長領域は []~[] nm。
- ・線源と被照射物との []が短いほど効果的([]の二乗に反比例)。
- ・照射時間は長い方がよい。
- ・紫外線は直線的に進むので、陰になる部分には効果がない。
- ・紫外線の殺菌効果は []の照射により弱められるので、暗所で行う必要がある。

・放射線滅菌

- ・X線、 α ・ β ・ γ 線、電子線、陽子線、中性子線が用いられる。
- ・プラスチックやゴムなど、熱に弱い器具の滅菌に有効。
- ・物質への []が強い。
- ・大がかりな特別な装置が必要。

・高周波滅菌

●化学滅菌法

・ガス滅菌

- ・プラスチックやゴムなど、熱に弱い器具の滅菌に有効。

◎エチレンオキシドガス

長所:

- ・あらゆる微生物に有効。
- ・加熱の必要がない。
- ・拡散浸透しやすく、プラスチックや紙、繊維などでつつんだ状態で滅菌できる。

短所:

- ・滅菌に時間を要する。
- ・の問題がある。
- ・引火・爆発性がある。
- ・ヒトへの毒性が強い。

◎ホルムアルデヒドガス

- ・ホルマリン液を加熱することでホルムアルデヒドガスを発生させて殺菌する。
- ・一般細菌やウイルスなど、広い範囲に効果的で、室内の消毒に有効な消毒法。

・薬剤による滅菌

◎アルコール滅菌

- ・60～90%、通常は %エタノールを用いる。これよりも薄くても濃くても効果が薄まる。
- ・は 15 秒ぐらいで殺菌される。しかし、孢子や糸状菌には効果なし。
- ・蒸発するので、の危険性がない。

◎次亜塩素酸ナトリウム

- ・B型肝炎ウイルスにも有効。かなり殺菌効果が強い。

3.3 動物細胞の凍結保存に必要な器機

○凍結保存装置

●ディープフリーザー

- ・°C。
- ・1～2年の短期間の保存に適している。
- ・装置の故障の不安がある。

●液体窒素保存槽

- ・°C。
- ・半永久的な保存が可能。
- ・液体窒素の補充さえ忘れなければ、安定して保存可能。
- ・で予備凍結した後、液体窒素に移す。

○凍結保存の必要性

- ・培養中、動物細胞は常に突然変異をしている。確率は 個に1個の割合。
- ・凍結保存中は変化しない。
- ・変化させずに長期間細胞株を維持するには凍結保存が必要。
- ・凍結傷害を抑制するため、を添加した凍結培地で凍結保存する。しかし、は有機溶媒であるので、極力低温かつ短時間に凍結・融解作業を行う。

第4章 無血清培養法

4.1 基本合成培地

- ・アミノ酸、無機塩類、ビタミン、微量元素などで構成される。
- ・浸透圧調整のため、が入る。
- ・pH 指示薬としてを含む。
- ・1950 年代に活発に開発され、動物細胞培養の発展に大きく寄与した。
- ・MEM (Minimum Essential Medium)、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、RPMI 1640、Ham' F-12、ERDF 等

4.2 血清添加培地 (Serum-supplemented medium)

○血清

- ・血清は非常に多くの生物学的分子 (、糖質、脂質、、無機塩類) の複雑な成分の混合物。
- ・細胞の増殖を生理的にバランスよく促進したり、抑制したりする活性を持つ。
- ・基本合成培地に ~ % 添加する。

○血清の供給源

・ウシ

ウシ胎仔血清: 心臓穿刺(せんし)により採血

ウシ新生児血清: 生後 10 日以内仔ウシより採血

仔ウシ血清: 生後 1 年以内の仔ウシより採血

成牛血清

- ・ウマ
- ・ニワトリ
- ・ヤギ
- ・ブタ

○血清の主な機能

①細胞の増殖や機能発現を導くホルモンの供給

- ・血清中には 1 mL あたり、数ミリグラムから数ナノグラム存在。
- ・特定の細胞だけに作用する特異的なものがある。上皮性増殖因子 (EGF: Epidermal Growth Factor)、線維芽細胞増殖因子 (FGF: Fibroblast Growth Factor)。
- ・ホルモンの中で、 はほとんどの培養細胞の増殖に不可欠。半減期が短く、システインによる不活性化を受けやすいので、比較的高濃度に必要。
- ・ステロイドホルモンを必要とする細胞もある。

②細胞の接着や伸展のための因子(接着因子: Cell adhesion factor)の供給

- ・細胞外基質に必須の成分である接着因子の供給。
- ・多くのほ乳類細胞は適切な基質に接着し、分裂を始めたり、単層になつたりする前にまず伸展しなければならない。その伸展・接着に必要な因子が□。

例)コラーゲン(Collagen)、フィブロネクチン(Fibronectin)。

③ホルモンや無機質、脂質などを輸送する輸送タンパク質の供給

- ・血清は、細胞に必須な数種の低分子因子を運ぶための輸送タンパク質を含む。
- ・アルブミン(Albumin)は、ビタミンや脂質(脂肪酸、コレステロール)や、とくに□を輸送する。
- ・□であるトランスフェリン(Transferrin)はほとんどすべての培養細胞に必要。細胞膜表面上にトランスフェリンレセプターがある。

④細胞の生存と増殖とに必須な脂質の供給源

- ・脂肪酸、リン脂質、レシチン、コレステロールの供給。

⑤無機微量元素の供給源

- ・微量元素(銅、亜鉛、コバルト、マンガン、モリブデン、セレン)は多くの酵素の補助因子として働いている。□は、代謝による解毒作用に不可欠な酵素を活性化し、遊離ラジカルの不活性化にも関与。

○血清の問題点

- ①多くの細胞にとって、血清はその細胞が由来する元の組織で接していた生理学的体液ではない。
- ②血清にも細胞毒性がある。
細菌毒や脂質のような選択的な阻害因子の他に、ポリアミンオキシダーゼを含んでいることがある。これは、ポリアミン(スペルミン、スペルミジン)と反応して毒性を有するポリアミノアルデヒドを生成する。ウシ胎仔血清は、比較的この酵素レベルが高い。
- ③ロットによる性質の違いが大きい。
生まれ、□、環境、□、遺伝的性質、年齢、性別による成分の違いが大きい。
- ④細胞に特異的な増殖因子を必ずしも十分に含んでいるとは限らない。
- ⑤高価である。500 mL 3~4万円。
- ⑥成分が複雑なため、培養液から細胞が生産した物質の分離精製が困難。

4.3 無血清培地 (Serum-free medium)

○無血清培養の目的

- ・不明確な血清成分の [] の違いによる培養条件の不確定性をなくす。
- ・動物細胞による物質生産において、目的物質以外をできる限り含まない方が有利。
- ・血清によるコスト高の解消。

○無血清培地の利点

- ・血清のロットによる培養状態の変化がなく、培養の [] が上昇する。
- ・ウイルス、細菌、マイコプラズマなどの血清由来の [] の危険度が減る。
- ・経済性が高い。
- ・培養産物の精製が容易。
- ・バイオアッセイにおいて、 [] による阻害が減少する。
- ・血清の毒性の影響がなくなる。
- ・初代培養における線維芽細胞の増殖過多が防止できる。

○無血清培養の問題点

- ・多くの細胞株に対しては血清が不要となることで経済的であるが、特殊なホルモンや増殖因子の添加が必要な場合、血清以上に高価になりうる。
- ・ホルモン、成長因子の組み合わせは細胞種特異的であるので、細胞種ごとに異なる成分の無血清培地が必要になる。たとえば、神経細胞を増殖させる因子の組み合わせは、他の細胞種には無効である。

○無血清培養の添加因子

●インスリン (Insulin)

- ・分子量約 [] の増殖因子。20 個のアミノ酸からなる A 鎖と 30 個のアミノ酸からなる B 鎖からなる。
- ・細胞によるグルコース、アミノ酸、カリウムイオンの取り込み促進、RNA、タンパク質、脂質、グリコーゲンの生合成を促進。

●トランスフェリン (Transferrin)

- ・遊離の鉄イオンの利用は効率が悪く、鉄イオン輸送タンパク質が必要。
- ・分子量 8 万の []。1 分子に 2 個の鉄イオンを結合する。
- ・トランスフェリンレセプターを介して 3 価の鉄イオンを移送する。細胞内に取り込まれた後、トランスフェリンは鉄イオンを遊離し、トランスフェリン自身は細胞外に再分泌される。

●エタノールアミン (Ethanolamine)

- ・分子量 61.08。 [] の一種。細胞膜の構成要素。
- ・脂質合成に関与。

●亜セレン酸ナトリウム (Sodium Selenite)

- ・分子量 172.94。
- ・グルタチオンペプチダーゼの構成元素であり、組織や膜脂質において非特異的な [] 作用を示し、生体膜機能の維持に効果がある。

- アルブミン (Albumin)
 - ・脂肪酸や微量元素、ある種の[]の運搬体として働く。
 - ・過酸化水素や過剰の微量元素に対する[]作用。
 - ・細胞を物理的な作用から守る。
 - ・アルブミンの添加は、ハイブリドーマやリンパ球の細胞増殖や物質生産能を促進する。
- メルカプトエタノール (2-mercaptethanol)
 - ・システインの取り込み促進に関与。
 - ・過酸化物の還元。
 - ・細胞周期の G1 期から S 期への移行を促進。
- プロスタグランジン (Prostaglandin)
 - ・脂肪酸。
 - ・幾つか種類があり、F2 α , E1 が用いられる。
- ヒドロコルチゾン (Hydrocortisone)
 - ・分子量 362.47。
 - ・各種アミノトランスフェラーゼを活性化して糖新生を促進する。
- プロゲステロン (Progestogen)
 - ・分子量 314.47。
 - ・[]の一種。
 - ・胎盤から分泌される。妊娠中の女性は通常の 300 倍の血中濃度。
- 無血清培養の注意点
 - ・pH 緩衝能に関する注意事項
 - 血清添加培地ほどの pH 緩衝能がない。
 - pH 上昇には注意が必要。

第5章 免疫学

5.1 免疫とは

5.1.1 免疫学の始まり

- ・免疫 (Immune) とは、「免れる」を意味するラテン語「Immunis」からきた英語。
- ・18 世紀終わり、イギリスの医師 Edward Jenner が に対するワクチン (Vaccine) を作ったのが免疫学の始まり。
- ・ヨーロッパで天然痘による被害が起こった。牛にも天然痘とよく似た病気、牛痘がある。牛痘に感染した乳搾り婦が天然痘にかからないことを Jenner が発見した。1796 年に牛痘の膿 (うみ) を少年の皮膚に接種すると、天然痘に対する強い予防効果があることを発見した。これが の開発につながった。しかし、100 年ぐらいの間、なぜそうなるのかはわからなかった。
- ・ワクチンとは、特定の病原体に対する獲得免疫を活性化し、病原体による侵入の前に、病原体に対する免疫を確立する製剤である。
- ・免疫とは、自己と非自己の認識が非常に重要である。自己認識ができないと、自分自身が免疫の攻撃対象となる。 がその例。

5.1.2 血液 (Blood)

○血液の一般性質

- ・体重の 8% が血液。
- ・pH: 7.3~7.5。
- ・緩衝系: 炭酸-重炭酸系 $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
血漿タンパク質 (弱酸)
ヘモグロビン
- ・細胞内はタンパク質とリン酸系による pH 緩衝作用。
 $\text{H}_2\text{PO}_4 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-}$
- ・血漿の浸透圧は 290 ミリオスモル (mOsm) で、0.9% の食塩水の浸透圧に等しい。
- ・アイソトニックとは、浸透圧が等しい等張性のこと。

○液性成分

血漿 (Blood plasma)

- ・血漿タンパク質: アルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン。
- ・50% 飽和硫酸で沈殿するのがグロブリン。それ以上の飽和濃度で沈殿するのがアルブミン。
- ・アルブミンは、アミノ酸、脂肪酸、カルシウムなどと結合して運搬する働きがある。
- ・グロブリンは、広義には可溶性の球状タンパク質。免疫グロブリンも含まれる。

○固形成分

血球(Blood corpuscle)

●血小板 (Blood platelet)

- ・の細胞質の一部が血中に遊離した物で、核を持たない。
- ・直径 1~2 μm で、球形ないしは楕円形の細胞片である。
- ・血中の血小板数は 15 万~45 万個/ mm^3 。寿命は 日。
- ・血液の凝固に関与する。
- ・露出されたコラーゲンや血液凝固系カスケードの産物に反応して、凝集反応を起こし、止血・血栓に関与する。PDGF、VEGF などの成長因子を放出し、破損箇所の血管新生を促す役割も担っている。

●赤血球 (Erythrocyte)

- ・直径 8 μm 、厚さ 2.0 μm の円盤形。
- ・がないため、中央部がへこんでいる。
- ・血液 1 mm^3 あたり、女性で約 450 万個、男性で約 500 万個。
- ・酸素との接触効率をよくするため、表面積が大きい。
- ・寿命は ~日。骨髓(Bone marrow)で生まれて、脾臓(Spleen)で破壊される。
- ・65%が水分で、35%がヘモグロビン(Hemoglobin:分子量 65,000 の 4 量体)。

~ヘモグロビン~

ヘモグロビンのサブユニット1つが1つのヘムを持つ。1分子あたり、1分子の酸素分子を結合。末梢組織など、の高い場所では酸素を放出し、二酸化炭素と結合しやすく、肺などのが低い組織では酸素と結合しやすい。

- ・骨髓幹細胞から赤芽球へ分化し、最終的に除核され、骨髓から末梢に出る。放出された核は、が貪食する。

●白血球 (Leukocyte)

- ・血小板、赤血球以外の血球細胞の総称である。
- ・ヒト成人で 5,000~9,000 個/ mm^3 。

①顆粒球 (Granulocyte)

- ・顆粒球は、染色すると顆粒がみえる。
- ・ライト・ギムザ染色での染色のされかたにより、好中球、好塩基球、好酸球に分類される。
- ・末梢白血球のうち、好中球 50~60%、好酸球 2~4%、好塩基球が 1%。

【好中球 (Neutrophil)】

- ・食細胞であり、 (ファゴサイトーシス) が強い。血中や末梢中において細菌を捕食して分解する。特に炎症の初期段階で炎症部位に遊走してきて貪食し、死骸が蓄積したものが膿。
- ・非特異的生体防御に関与している。
- ・毛細管から組織に入る。 活性が高く、微生物、特に細菌に対して働く。
- ・末梢血中での寿命は 日。半減期は 時間。毎日 10^{11} 個以上生産

される。

- ・直径 12～14 μm 。核は桿状、もしくは分葉。アズール顆粒と好中性顆粒を持つ。

【好酸球 (Eosinophil)】

- ・の表面に付着して、活性因子(ペルオキシダーゼ)を介して寄生虫に傷害を与える。
- ・アレルギー性疾患における炎症に関与している。
- ・核が二つにくびれている。抗原抗体複合体に強い親和性を持つ。
- ・直径 13～15 μm 。ほぼ均質な好酸性顆粒を持つ。
- ・細胞表面に 受容体を持つ。

【好塩基球 (Basophil)】

- ・ヒスタミン、セロトニンを含み、受容体を持つ。
- ・は血管の浸透性を高め、生体防御に関わる高分子タンパク質や細胞が血管外に出て、異物の周囲に集合しやすくする。いわゆる 症状を引き起こす。
- ・細胞表面に、IgE を結合した IgE 受容体($\text{Fc}\epsilon\text{R}$)を持ち、抗原刺激を受けると、ヒスタミン等を含む を放出する。
- ・顆粒中の成分は、血管を拡張させ、その透過性を増大し、液性成分を組織中にもらす働きをする。また、皮膚に蕁麻疹を生じさせたり、気管支の平滑筋を収縮させて喘息を起こしたりして、過敏反応を引き起こす。

②単球 (Monocyte)

- ・直径 15～20 μm 。血中に、数百個/ mm^3 くらい存在する。核が分葉して、クローバー状に見える。
- ・マクロファージの前駆細胞で、骨髄幹細胞から分化し、炎症部位においてケモカイン(MCP-1 など)の刺激を受けると、末梢組織中に出てマクロファージに分化する。また、肺や肝臓などにおいて、恒常的に組織中に出てマクロファージを供給している。アズール顆粒という、細胞傷害性の小胞を持つ。

③マクロファージ (Macrophage)

- ・食細胞であり、消化した断片を細胞表面に提示し、として獲得免疫系の活性化に働く。
- ・食作用の対象は、、老廃した自己成分。
- ・直径 15～20 μm 。
- ・寿命は 1 日～数カ月。

④リンパ球 (Lymphocyte)

- ・骨髄幹細胞が胸腺(Thymus)で成熟したのが リンパ球。骨髄、肝臓や脾臓で成熟したのが リンパ球。
- ・Bリンパ球のBは Bone marrow(骨髄)。
- ・直径 10～15 μm 。
- ・全白血球の 20～30%を占める。

【Tリンパ球 (T lymphocyte, T cell)】

- ・細胞性免疫応答 (Cell-mediated immune response) に関与している。
- ・表面の分子マーカーによって、 T細胞、 T細胞、キラー () T細胞に分類される
- ・ヘルパーTは、末梢血リンパ球の 60~85%。キラー、サブレッサーが 20~30%。
- ・寿命は数カ月。
- ・直径6~15 μm 。未感作細胞は、細胞原形質が殆どなく、分葉していない が細胞の殆どの体積を占める。未感作状態では、B細胞と見た目では区別できない。
- ・リンパ系幹細胞から分化し、骨髄を出て に移行して教育を受ける。自己に過剰に反応せず、適度に自己細胞を認識できるようなT細胞だけが、 における選別をくぐりぬけて、血液中に出てくる。未感作細胞は、主にリンパ節、脾臓、肝臓、骨髄などに存在し、抗原刺激を受けて末梢の血液やリンパ液の循環を始める。一部のT細胞は、胸腺における教育を受けずに腸管に移行して、パイエル板などで粘膜の免疫に携わる。

【Bリンパ球 (B lymphocyte, B cell)】

- ・体液性免疫応答 (Humoral immune response) に関与している。
- ・Bリンパ球が抗原刺激を受けて成熟した、 (Plasma cell) が抗体を産生する。
- ・免疫記憶に関与するメモリーBリンパ球の寿命は 10 年くらい。
- ・直径6~15 μm 。未感作細胞は、細胞原形質が殆どなく、分葉していない が細胞の殆どの体積を占める。未感作状態では、T細胞と見た目では区別できない。
- ・末梢血中やリンパ節、脾臓、骨髄に存在し、抗原刺激とヘルパーT細胞からの IL-4、IL-5、IL-6 などの刺激を受けて活性化する。いったん活性化されると、一部はメモリーBリンパ球となってリンパ節にとどまり、大部分は骨髄に移行して形質細胞に分化する。プラズマ細胞は、小胞体が異常に発達し、抗体産生に特化して、7~10 日ほど抗体を作り続け、抗原刺激がなくなると (Apoptosis) によって死ぬ。
- ・リンパ系幹細胞から分化し、骨髄において骨髄ストローマ細胞によって哺育され、成熟して末梢血に出る。

⑤ ナチュラルキラー細胞 (Natural killer cell)

- ・Tリンパ球とは異なり、抗原感作なしにウイルス感染細胞や腫瘍細胞を傷害する。
- ・MHC (主要組織適合性抗原複合体) を発現していない細胞 (ウイルス感染細胞や腫瘍細胞) に対して細胞傷害性を持ち、 (Perforin) やグランザイムBなどによって細胞をアポトーシスに導く。ウイルス感染の初期に、感染細胞によって産生される炎症性サイトカイン、IFN- α/β によって活性化され、傷害性を増す。

- ・リンパ系幹細胞から分化する。
- ⑥NKT 細胞 (Natural killer T cell)
 - ・Tリンパ球とNK 細胞と同一の祖先から分化してきた。
 - ・Tリンパ球と同様にT細胞レセプター(TCR)を発現している。
- ⑦樹状細胞 (Dendrocyte)
 - ・不定形の細胞で、抗原を貪食して、MHC クラス II 上に発現し、CD4⁺のT細胞に対して [] を行う。CD8⁺のT細胞に対しても、傷害すべき抗原を提示する仕組みがあるはずであるが、解明されていない。
 - ・リンパ球系樹状細胞はリンパ球系幹細胞から、骨髄球系樹状細胞は骨髄球幹細胞から分化する
- ⑧肥満細胞 (Mast cell)
 - ・マスト細胞とも呼ばれる。血液中を流れる好塩基球と性質の殆ど同じ細胞。IgE を結合した [] 受容体を発現し、そこに抗原が結合することで刺激を受け、 [] を放出する。アレルギーに関与する。好塩基球から分化すると云われるが、詳細は不明。腹腔水に大量に存在する。

5.1.3 生体防御系

- 非特異的生体防御(自然免疫)
 - 体液性因子による生体防御
 - ・ラクトフェリン(Lactoferrin) : [] イオンを結合することにより、鉄欠乏を引き起こし、菌の生育を妨げる。
 - ・リゾチーム(Lysozyme) : 細菌の [] を溶解する。
 - 細胞性因子による生体防御
 - ・ナチュラルキラー細胞(NK 細胞)による抗原非特異的な細胞傷害。特に、腫瘍に対して効果を示す。
- 抗原特異的生体防御(獲得免疫)
 - ・特定の [] (侵入異物) に対して特異的に攻撃をしかける。
 - ・免疫とは、自己と非自己の認識から始まり、非自己物質を排除する。その判断の元になるのが抗原である。
 - ・抗原となりうる物は、分子量数千以上の物質であるが、実際に抗体自体が結合する部分である [] (Epitope) は糖 6 個程度の大きさの部分。
 - ・Bリンパ球とTリンパ球が中心的な役割を果たす。Bリンパ球は、抗体 (Immunoglobulin) と呼ばれる抗原 (Antigen) と結合するタンパク質を分泌する。
 - ・T細胞のうち、キラーT細胞は、細胞膜上に抗原認識レセプター(TCR)を持ち、それを介して抗原と結合し、ウイルス感染した細胞や変異自己細胞を殺傷する。
 - ・Bリンパ球は、細胞表面上の抗体で抗原認識し、T細胞も膜表面上のT細胞レセプター(TCR)で認識する。TCR の構造は、抗体によく似ている。

【抗体 (Immunoglobulin, antibody)】

- ・ヒトの抗体には []、[]、[]、[]、[] の 5 種類ある。
- ・基本構造はY型の分子で、IgM は、[] 量体の分子量 90 万、IgG は 16 万、分泌型 IgA は 2 量体の 45 万、IgE、IgD は 20 万。

- ・IgMとIgAには□鎖がある。
- ・IgEはアレルギーに関与している。□や□上のIgEレセプターに結合して、そこに抗原となる物質が結合するとヒスタミン(Histamine)などが分泌されて、症状が出る。たとえば、花粉、ダニ、ハウスダスト。

【免疫系の破綻】

- ・自己と非自己の認識を誤ると、自分自身を攻撃する。(自己免疫疾患: Autoimmune disease)
- ・自己免疫疾患の一つである□になると、抗IgG抗体や抗核酸抗体が産生される。抗原-抗体複合体の沈殿が関節に集まって、関節炎を発症する。
- ・I型糖尿病は、インスリンを産生するすい臓の□細胞を免疫系が攻撃し、細胞を殺してしまい、インスリンを合成できなくなることによる。

5.1.4 免疫反応

●非特異的異物処理

- ①粘膜中に存在するトランスフェリン(Transferrin)やリゾチームなどが菌の侵入を阻害する。リゾチーム(Lysozyme)は菌の細胞壁を溶解することで抗菌作用を示す。
- ②異物粒子表面の補体活性化物質、たとえばグラム陰性菌のリポ多糖などによって補体が活性化される。補体成分のC5aが好中球の集合を促す。
- ③好中球が異物の侵入した局所に集中する。炎症はそのためにおこる。
- ④同時に、マクロファージ(Macrophage)が集合する。マクロファージは、貪食後の抗原提示により抗原特異的生体防御(□)を活性化する。マクロファージが異物を貪食作用により細胞内に取り込み、□内で消化し、その断片化した異物をMHC(Major histocompatibility (antigen) complex 主要組織適合性抗原複合体)クラスIIとともに□に提示する(抗原提示)。

●抗原特異的異物処理

- ①マクロファージの細胞膜表面に提示された抗原に特異的に結合するリンパ球が活性化され、そのリンパ球が分裂や分化を繰り返し、抗原と特異的に反応するリンパ球が大量に増殖する。
- ②最終的に分化したT細胞やB細胞が異物処理をおこなう。キラーT細胞は細胞性免疫で、直接殺傷する。B細胞は、形質細胞まで分化して抗体を分泌し、補体系を活性化する。また、毒素などに対しては、毒性を中和する抗体も産生されることがある。

5.2 体液性免疫応答

- ・体液性免疫応答(Humoral immune response)の中心はBリンパ球である。
- ・体液性免疫応答の主役をになうのはBリンパ球が産生する抗体。
- ・Bリンパ球が抗原刺激を受けて抗原特異的抗体を産生する形質細胞(Plasma cell)へ分化(Differentiation)する。
- ・B細胞は、CD4⁺T細胞(ヘルパーT細胞)によって抗原を提示されることで活性化される。抗原提示(Antigen presentation)は、CD4⁺T細胞のMHCクラスIIによって行われ、B細胞は、膜に結合したIgM、即ち膜結合型IgMによってMHC上に提示された抗原ペプチ

ドやその抗原ペプチドに結合した小分子などを認識する。

- ・膜結合型 IgM は、未熟で未感作な時期から B 細胞上に発現していて、抗原によって B 細胞が感作されると、遺伝子を組替えることにより、IgD、IgA、IgG、IgE にクラススイッチ (Class switch) する。
- ・特異抗体の多様性は $10^9 \sim 10^{10}$ 種くらい。
- ・一つの B リンパ球クローンは、(抗原認識部位のアミノ酸は配列が同一である一種類の分子の抗体しか作らない。B 細胞クローンは、特定の抗原とのみ結合する抗体クローンを産生する。
- ・免疫系が活性化されると特異抗体を産生する B リンパ球の活性化、増殖が起こり、大量の形質細胞クローンが体内で増殖し、大量の特異抗体を産生する。このとき、一部のリンパ球は記憶細胞となり、次の抗原刺激に備える。

【抗体により引き起こされる免疫反応】

- ・侵入微生物を例にすると、微生物の表面抗原に抗体が結合する。この抗体を認識する形で、いくつかの免疫反応が起こる。
- ・貪食細胞の貪食活性が表面に結合した抗体により促進される。
- ・補体系の活性化。補体系の古典経路と呼ばれる経路が抗体タンパク質の定常領域によって活性化される。
- ・微生物に結合した抗体を認識してキラー細胞が微生物を殺傷する。

【抗体】

- ・ 処理で、二つの Fab と Fc に別れる。 処理では、ヒンジ部位の後ろで切断するので、 $F(ab)_2$ と Fc に別れる。
- ・先端部分を といい、抗原と結合する部分である。可変領域のアミノ酸配列は抗体分子により大きく異なる。その他の部分は と呼ばれ、個々の抗体分子間でアミノ酸配列がほとんど変わらない。
- ・IgG の場合、 鎖 (Light chain) の可変領域はアミノ酸 108 個、定常領域は 106 個。ドメインは 2 つ。 鎖 (Heavy chain) の可変領域はアミノ酸 108 個、定常領域は 338 個。ドメインは 4 つ。
- ・IgG、IgD、IgE は基本の Y 字構造の単量体。IgM の場合、重鎖のドメインは つで、Y 字構造が、J 鎖によって 5 つくつした五量体構造をとる。IgE の重鎖ドメインも 5 つであるが、単量体。
- ・IgA の重鎖ドメインは つで、分泌型は 量体。IgA は、消化管内などの粘液中で働くため、消化液による消化を免れるために Fc 部分を J 鎖と分泌片という分子量 5.8 万のタンパク質でおおわれた形を取っている。分泌片は、粘膜上皮細胞を通過する過程で結合する。
- ・IgD の働きはまだはっきりしていないが、B リンパ球の分化の過程で細胞膜表面上に発現される。
- ・血中濃度高い抗体は であり、次に IgA、IgM、IgD、IgE の順番である。
- ・一般的には、全く新しい抗原が体内に侵入した場合、最初に が分泌され、7 ~ 10 日して大量の の分泌が起こる。

- ・未熟 B 細胞内において、抗原結合部位(可変領域)のアミノ酸配列をコードする遺伝子に変異が生じることによって、さまざまな結合特異性を持つ抗体を産生する未熟 B 細胞が生じる。この遺伝子の変異を体細胞突然変異(Somatic hypermutation)という。遺伝子改変が行われた未熟 B 細胞の中で、外来抗原(非自己物質)に対して結合能の高い抗体を産生できる未熟 B 細胞が生き残る。

【クローン選択説】

- ・鑄型説(教育説)(Instructive theory)
 - ・ポーリングとハロヴィッツという2大化学者によって提唱された説。
 - ・抗体分子の折り畳みの過程で抗原分子と出会い、抗原分子を鑄型として、抗原決定基と相補的な構造へと分子が折り畳まれることによって抗体の抗原認識の多様性が生まれるという説。
 - ・現在では、否定されている。
- ・クローン選択説(Clonal selective theory)
 - ・1957年に Burnet により提唱された免疫理論。
 - ・抗原に出会う以前に、あらゆる抗原(外来物質)に対応できるように、様々な抗原特異性を持つ抗体をつくる無数の未熟 B リンパ球が生前に個体内に用意されている($10^9 \sim 10^{10}$ 種類)。この多様性は、抗原結合部位のアミノ酸配列をコードする遺伝子の によって生み出される。また、未熟 B 細胞の 1 クローンは、1 つの抗原特異性を持つ抗体を発現する。すなわち、 $10^9 \sim 10^{10}$ 種類の未熟 B 細胞クローンが、出生前に体内に備わっている。出生後に外来から侵入した抗原と遭遇することにより、抗原と結合性を示す受容体(膜結合型 IgM)を持つ未熟 B 細胞クローンが選択され(クローン選択)、抗原刺激を受けた未熟 B 細胞クローンは増殖、分化して (抗体産生細胞)へ分化することによって抗原特異的抗体が産生される。

5.3 細胞性免疫応答

- ・中心的役割は T リンパ球。T リンパ球はその性質から、大きく3つの亜集団に区別できる。 (キラー) T 細胞、 細胞、 細胞。
- ・リンパ系幹細胞から分化し、殆どの未熟 T リンパ球(Pre-T lymphocyte)は へ移行し、非自己細胞を正しく認識できるよう教育を受ける。胸腺へ移行した T リンパ球のうち、90%以上は負の選択を受け、 を起こして死滅する。
- ・胸腺は、幼児期に最大で、30代で半分になる。年を取るにしたがって委縮する。従って、高齢になると、免疫系が弱くなる。
- ・T リンパ球の抗原認識分子は、T 細胞レセプター(TCR)。抗体とよく似た構造をしている。
- ・主要組織適合抗原複合体(MHC; Major Histocompatibility Complex)には、クラス I とクラス II があり、クラス I はすべての細胞に発現しているが、クラス II は、マクロファージ、単球、B リンパ球などの限られた細胞に発現している。MHC は自己であることを表現している分子であり、個人で MHC の型が違う。骨髄移植や臓器移植では、この MHC の型の適合が問題となる。MHC が合っていない組織が体内にはいると、免疫系の

攻撃の対象となる。MHC は第6染色体上にある。

【ヘルパーTリンパ球:Helper T lymphocyte】

- ・ヘルパーTリンパ球はインターロイキン(Interleukin)と呼ばれる免疫ホルモンを分泌して、Bリンパ球を誘導して抗体産生細胞である形質細胞へ分化誘導したり、細胞傷害性Tリンパ球を活性化する。
- ・抗原提示している[]との結合で活性化される。
- ・細胞膜表面上に TCR の他に CD4 という分子を持っている。
- ・抗原の提示に特化した、貪食細胞(主に樹状細胞)によって MHC クラス II を介して提示されているペプチドを監視。非自己ペプチドを認識すると、活性化されて末梢に移行し、周囲の細胞傷害性Tリンパ球を活性化したり、リンパ節においてBリンパ球と相互作用して抗体産生を促したりする。
- ・活性の違いによって、Th1(主に細胞傷害性Tリンパ球、マクロファージやNK細胞の活性化、Bリンパ球に対する IgG 産生促進)と Th2(主に、Bリンパ球の活性化、クラススイッチの促進)の2種類に分類される。
- ・エイズウイルス HIV(Human Immunodeficiency Virus)は[]Tリンパ球の CD4 を認識して感染する。AIDS(Acquired immunodeficiency syndrome)はヘルパーTリンパ球が破壊されたために起こる免疫不全症候群。

【細胞傷害性(キラー)Tリンパ球 (Cytotoxic T lymphocyte)】

- ・MHC クラス I 抗原、あるいは MHC クラス II 抗原に拘束された特異的細胞傷害活性を示す。細胞表面上に CD8 分子を持つ。
- ・標的細胞を認識すると、パーフォリン(Perforin)、グランザイムBといったタンパクを放出し、その細胞を[]に導く。
- ・パーフォリンは分子量約[]万の糖タンパク質であり、標的細胞に穴をあけて殺傷する。
- ・パーフォリンは、補体の C9 関連タンパク質で、カルシウムイオン存在下で標的細胞に結合し、内径約 16 nm の穴をあけて標的細胞を殺す。
- ・パーフォリンは、Tリンパ球内には膜に包まれた顆粒状で存在している。

【サプレッサーTリンパ球 (Suppressor T lymphocyte)】

- ・免疫作用を抑制する働きがある。
- ・Bリンパ球やTリンパ球、さらにはマクロファージに働きかけ、過剰な免疫反応を阻止する。

●臓器移植における拒絶反応

- ・ヒトの MHC 遺伝子の産物をヒト白血球抗原(HLA:Human Leukocyte Antigen)といい、いわゆる白血球の型。
- ・A、B、Cは MHC クラス I を、DR、DQ、DPは MHC クラス II を規定。
- ・臓器の受け側(レシピエント)と提供側(ドナー)の HLA が合っていないと、臓器移植は体細胞免疫系による拒絶反応のため、うまく行かない。
- ・兄弟で HLA が合う確率は4分の1。

5.4 アレルギー (Allergy)

- ・肥満 (マスト) 細胞 (Mast cell)、および好塩基球 (Basophil) が症状を引き起こす原因細胞である。
- ・肥満細胞や好塩基球の細胞膜表面上の IgE レセプターに IgE が結合して、その IgE が認識する抗原 () が結合するとヒスタミン、ロイコトリエン、プロスタグランジンといった、ケミカルメディエーターを放出する。
- ・ヒスタミンは分子量 111.15 で、血管膜の透過性を高めたり、粘膜を刺激する。
- ・IgE はもともと、寄生虫に対して効果を持つ抗体。
- ・アレルギーを引き起こす抗原をアレルゲン (Allergen)。
- ・乳幼児期の環境が清潔すぎるとアレルギー疾患の罹患率が高くなるという衛生仮説がある。

第6章 細胞融合とハイブリドーマ

6.1 細胞融合法

6.1.1 ポリエチレングリコール(PEG)法

- ・PEGは細胞膜の[]構造を緩やかにし、細胞膜同士の接着を誘起し、膜構造の回復時に細胞融合する。
- ・簡便で、細胞の[]は高いが、融合効率が悪い。

6.1.2 電気融合法

○電気融合の緩衝液

- ・マンニトール緩衝液

電解質を多く含む緩衝液では、抵抗が低いためにジュール熱による対流が起こり、[]が形成されない。

- ・融合条件

交流印加時に[]が形成される。そして、直流のパルス電圧をかけると一過的な[]が起こり、膜修復の際に細胞膜の融合が起こる。

- ・融合効率はよいが、特別な装置を必要とし、生存率が低い。

6.2 ハイブリドーマ(Hybridoma)

○ハイブリドーマ作製の歴史

1975年にケーラー(Köhler)とミルシュタイン(Milstein)が特定の抗体を産生するBリンパ球ハイブリドーマを作製したのが最初。特定の抗原と反応する抗体を産生するマウス[]と長期培養可能なマウス[]とを融合し、特定の抗体を生産し、しかも長期培養可能なハイブリドーマを作った。

○ハイブリドーマ作製の目的

- ・リンパ球は抗体を産生するが、[]ができない。
- ・リンパ腫もしくは骨髄腫細胞(ガン細胞)は、抗体は作らないが、[]可能。

↓

両方の良い性質を持った融合細胞を作製する
(抗体を生産し、長期継代可能な細胞の作製)

○HAT 培地

- ・ハイブリドーマだけを選択的に増殖させる培地

H: ヒポキサンチン(Hypoxanthine)

[]回路によるプリン、ピリミジン塩基合成の原料。

A: アミノプテリン(Aminopterin)

葉酸のアナログで、葉酸リダクターゼを阻害することで[]
(de novo 経路)を阻害。

T: チミジン(Thymidine)

[]回路によるプリン、ピリミジン塩基合成の原料。

○親細胞(ガン細胞)

サルベージ回路に必要なヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase: HGPRT)活性を欠如したリンパ腫、骨髄腫細胞株を用いる。親細胞株は HGPRT を欠損しているため、サルベージ回路が動かない。また、de novo 経路もアミノプテリンで阻害されているため、HAT 培地中では増殖できない。

○融合細胞の選択

- ・親細胞: HGPRT 欠損、および *de novo* 経路阻害で増殖不可。
- ・リンパ球: 長期継代培養不可。
- ・親細胞同士、リンパ球同士の融合体も同理由で増殖不可。
- ・親細胞とリンパ球の融合体、すなわちハイブリドーマのみが HAT 培地で増殖可能。

○ハイブリドーマのクローニング

- ・HAT 培地で増殖してきたハイブリドーマの集団を1個ずつ培養する。
- ・限界希釈法。
- ・特異抗体の検出は酵素抗体法で行う。

6.3 モノクローナル抗体の活用法

抗体の持つ高い抗原特異性、すなわち特定の物質とだけ結合する性質を利用し、特定の成分だけを選択的、かつ高感度で検出する。

- ・酵素抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)
- ・ウエスタンブロットティング法 (Western-blot analysis)
- ・免疫組織染色 (Immunohistostaining)
- ・アフィニティークロマトグラフィ (Affinity chromatography)

第7章 動物細胞による物質生産

7.1 微生物と動物細胞の違い

- ・微生物は、生産性は高いものの、糖タンパク質などの[]を生産できない。
- ・動物細胞は、生産性は微生物に劣るが、複雑な分子を生産できる。

7.2 動物細胞による物質生産の効率化

- ・生産性を高めるための方策
 - 大容量での培養
8,000 リットルの培養タンクでの培養
 - 高密度での培養
静置培養の細胞密度 (10^6 cells/mL) を 10~100 倍に上げる
 - 細胞の生産性の向上
細胞自身の生産性を高める

7.3 高密度培養装置

- ・高密度培養を達成するためには、[]の供給(培地交換)、[]の供給など、培養系の制御化が必要である。常に培養条件を細胞の生育、もしくは物質生産にとって至適な状態に維持するため、高密度培養装置はコンピューター制御された培養管理システムを必要とする。
- ・一般に高密度培養装置に必要とされる制御項目には以下の四つがあげられる。

- ① []の制御
- ② []の制御
- ③ [] (Dissolved oxygen; DO) 濃度の制御
- ④ []のシステム

- ・高密度培養装置には様々な形式の培養装置がある。

用いる細胞が接着性の細胞であるのか浮遊性の細胞であるのか、また、細胞を生産の目的にのみ用いるのか、もしくは細胞自体も回収したいのか、など、培養の形態、目的に適した培養システムを選択しなければならない。

○浮遊細胞用高密度培養装置

モノクローナル抗体を産生する[]などの細胞を培養するには、培養槽内に細胞を懸濁状態で培養する。

○接着細胞用高密度培養装置

接着性の細胞の大量培養には、細胞を[]と呼ばれる直径 100 μm 程度のビーズ上に接着させ、浮遊細胞と同じようにビーズを懸濁状態で培養するシステムや、多孔質の担体や[]上に細胞を固定化して培地のみを循環させるシステムがある。

第8章 動物細胞の遺伝子操作

8.1 遺伝子操作

- ・機能性タンパク質の大量生産
- ・既存タンパク質の機能改変
- ・自然界には存在しない機能性タンパク質(人工タンパク質)の創製(キメラ抗体)

【キメラ抗体(Chimera antibody)】

- ・キメラとは、本来ギリシャ神話に出てくる架空の怪獣。
- ・キメラ＝遺伝的に異なった細胞よりなる固体
- ・異種の動物の抗体遺伝子断片をつなげて作製した抗体。
- ・抗原結合部位をマウス型、定常部位をヒト型として作製。

【ヒト化抗体(Humanized antibody)】

- ・ヒトの抗体を改変して、抗原結合性に重要な、重鎖(H鎖)と軽鎖(L鎖)の [] (CDR) 部分の一次構造のみをマウスなどの他の生物由来の抗体に由来する一次構造で置き換えた抗体。
- ・ヒトの疾患の体内診断薬、治療薬としての利用可能。
- ・動物細胞への機能付与

8.2 遺伝子治療

- ・現在は、生体外 (*ex vivo*) 遺伝子治療 (Gene therapy)。
- ・生体内遺伝子治療を目指した研究も行われている。
- ・ [] (Virus vector)、もしくは [] (Liposome) による遺伝子導入。
- ・ [] にはレトロウイルス (Retrovirus)、アデノウイルス (Adenovirus)、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus) がある。
- ・ [] による遺伝子導入をリポフェクション (Lipofection) といい、カチオニックリポソーム (Cationic liposome) を用いる。
- ・遺伝子治療はいくつかの症例については成功もあるが、 [] を用いる問題として、異常免疫反応や発ガンなどの重篤な副作用を引き起こす可能性がある。

8.3 クローン

- ・クローンとはもともとギリシャ語で小枝の意で、1個の細胞または生物から無性生殖 ([]) で増殖した生物の一群を指す。また、遺伝子組成が完全に等しい遺伝子・細胞または生物の集団。
- ・受精卵クローンと体細胞クローンがある。
- ・英国 Roslin 研究所、Wilmut らのグループは、成体の乳腺細胞から取り出した核を、除核した未受精卵に移植し、ヒツジの子宮へ移し産子、すなわち体細胞クローン羊 ([]) を得ることに成功した。この成果は Nature 誌 1997 年 2 月 27 日号で発表された。Wilmut らは、96 年にヒツジの [] (ES 細胞) 様細胞を 6~13 世代継代し、産子を得ることに成功するなど、クローンヒツジの作製技術では世界をリードしている。

- ・クローンウシなど、様々なクローン動物が製作されている。
- ・クローン技術は、有用種の育成、実験動物の作製に応用可能である。稀少動物の保護や育種、医薬品の生産、移植用臓器の作製など、様々な領域で利用可能である。
- ・クローン技術のヒトへの応用については倫理的問題、安全面での問題など、解決すべき課題が多い。

8.4 再生医療

- ・現在、他人からの臓器移植に頼っている移植治療は提供臓器の数量不足や、移植の際の[]が問題となっている。
- ・十分に機能しなくなった器官を取り戻す方法として、あらゆる組織へと変化する事が可能な胚性幹細胞(ES細胞)とクローン技術によって、患者自身の細胞をから細胞や臓器、組織などを育てて、それを治療に用いることが考えられている。
- ・現在、シャーレ上で培養した皮膚組織を患者へ移すといった手法が実用化されている。将来的には遺伝子操作をした豚などの体内でヒトの臓器を生産するという手法も考えられている
- ・皮膚や軟骨の再生はすでに実用化されており、今後、神経、気管、角膜、血管、筋肉、心筋なども実用化へ向けて研究が進められている。

【ES細胞】

- ・幹細胞(Stem cell)とは、組織や臓器に成長する元となる細胞である。幹細胞はほとんどの臓器や組織中に存在している。
- ・造血幹細胞や神経幹細胞など、様々な幹細胞の中で、ほとんどの種類の組織にでも分化することができ、増殖能力も高いことから、万能細胞と呼ばれるのがES細胞(Embryonic Stem Cell:胚性幹細胞)である。
- ・ES細胞は、ヒトでは受精後5~7日程度、マウスでは3~4日程度経過した初期胚(受精卵)から作られる細胞で、1998年にアメリカの研究者がヒトのES細胞の培養に成功した。

【iPS細胞】

- ・[](Induced pluripotent stem cell; iPS cell)。
- ・体細胞へ数種類の遺伝子を導入することにより、ES細胞同様、非常に多くの細胞に分化できる[](Pluripotency)と、[]を持たせた細胞のこと。
- ・ヒトの患者自身からiPS細胞を樹立する技術が確立されれば、拒絶反応のない移植用組織や臓器の作製が可能になると期待されている。
- ・同一個体においては、分化万能細胞も体細胞も核内にもつ遺伝子の塩基配列は全く同一であり、分化能の違いは、様々な遺伝子の発現量と、それを制御するクロマチン修飾、及びDNAメチル化などのエピジェネティックな情報の違いに由来すると考えられている。