

細胞培養のノーベル賞への貢献

難波正義

新見公立大学, 財団法人岡山医学振興会

キーワード: 細胞, 培養, ノーベル賞

Contribution of cell cultures to the Nobel Prize

Masayoshi Namba
Niimi College

要 旨

約1世紀前に、生きた組織や細胞を動物の体外に取り出した研究—組織培養あるいは細胞培養—が始まった。その後の研究の流れの中で、1) 組織・細胞培養の特性を生かして行われた研究でノーベル賞に輝いた研究、2) 組織・細胞培養の経験をもつノーベル賞受賞者、3) ノーベル賞にはならなかったけれども特記できると私が考える細胞培養の研究、などについて取り上げてみたい。

表1に本稿の記述の流れを示している。現在のような細胞の増殖を主体とする培養、すなわち「細胞培養」は、Rous and Jones¹⁾の仕事をも最初としてもよさそうである。彼らは、ニワトリの胎児や腫瘍組織、あるいは、若いラットの組織などをトリプシンで処理して、遊離細胞を作成して、培養し、増殖させることに成功している。培養の仕事とは離れるが、1911年にRousはニワトリに生じた腫瘍をすりつぶし、濾過した細胞フリ

ーの抽出液を、ニワトリに注射することにより、腫瘍を発生させることに成功した。この実験から、当時、濾過性病原体によって腫瘍が発生すると結論したが、この結論は多くの腫瘍研究者からは長らく認められなかった。しかし、濾過性病原体はRous Sacroma Virus (RSV) であることが分かり、Rousは1966年にノーベル賞を受賞した。その後、このウイルスから癌遺伝子としてsrc遺伝子が発見され、この癌遺伝子はもともとは動物細胞由来であることが証明された²⁾。この発見によって、VarmaとBishopが1989年のノーベル賞に輝いている。

1912年、血管縫合術で米国からの最初の医学生理部門のノーベル賞に輝いたCarrelが、細胞の培養を報告している³⁾。彼は培養した細胞は培養の条件さえよければ永遠の生命を得て、増殖し続けてゆく性質があると述べている。事実、「人間この未知なるもの」と題する彼の著書の中で、「1912年1月に鶏の胎児の心臓断片から取った細胞集団は、今日なお23年前と同じように活発に成長している。本当にそれは永久に死なないのである」と述べている⁴⁾。そして、彼は人工的環境が細胞を生理的にどのように変化させるのかということに興味をもち研究を続け、細胞の寿命などについても考

平成21年11月受理

〒718-8585 新見市西方1263-2

電話: 0867-72-0634 FAX: 0867-72-1492

E-mail: mnamba@niimi-c.ac.jp

— ◆ プロフィール ◆ —



1961年 岡山大学医学部卒業
1971年 岡山大学医学部助教授 (癌源研究施設病理部門)
1990年 岡山大学医学部教授 (細胞生物部門)
1996年 日本組織培養学会会長
1999年 岡山大学医学部長
2002年 新見公立短期大学学長
2005年 財団法人岡山医学振興会理事長
2010年 新見公立大学学長

表1 組織・細胞培養を利用したエポックメイキングな研究の代表例 — ノーベル賞を受賞した研究を中心に —

Rous	1911年 Rous sarcoma Virus の発見で、1966年にノーベル賞 1912年 トリプシンで組織を処理して分離した細胞の培養を開始（細胞培養）
Carrel	1912年 ノーベル賞（血管縫合術）。その後、リンドバークと人工心臓の開発も行った 1912年 心筋組織片培養の開始。長期維持 培養容器としてカレルのフラスコを開発
Earle	1943年 マウスL細胞株樹立
Enders, Robbins, Weller	1954年 ノーベル賞（組織培養によるポリオウイルスの増殖）
Tjio, Levan	1956年 ヒト染色体数と核型の決定
Issacs	1957年 インターフェロンの発見：最初の発見されたサイトカイン
Okada	1962年 細胞融合法
Yasumura	1963年 Vero 細胞の樹立。現在、世界でウイルスワクチンの製造に使用されている。
Dulbecco, Temin, Baltimore	1975年 ノーベル賞（DNA and RNA 腫瘍ウイルスの研究） Dulbecco 培地の開発 逆転写酵素の発見
Köhler, Milstein	1984年 ノーベル賞（細胞融合によるモノクローナル抗体作成）
Brown, Goldstein	1985年 ノーベル賞（コレステロール代謝）
Levi-Montalcini, Cohen	1986年 ノーベル賞（神経細胞成長因子、上皮細胞増殖因子の発見）
Evans	2007年 ノーベル賞（マウス胚性幹細胞の培養化とノックアウトマウスの作製）
Zur Hausen	2008年 ノーベル賞（パピローマウイルスと子宮頸癌）

察した。当時、完全な合成培地も抗生物質もない時代に上記の細胞の培養を続け、最終的には34年間にわたって培養を維持した、この彼の卓越した培養の無菌操作技術と馬力には感心せざるを得ない。

1943年、Earle によってマウス由来L細胞株が第2次世界大戦中に米国で樹立されたことは驚きである⁵⁾。このL細胞はメチルコラントレンで処理したC3H マウスの腫瘍から培養化された。世界諸国は戦争で培養などの悠長な研究をやっておれなかった時代である。このL細胞株は現在にいたるまでも培養維持され、世界最長の培養歴をもつ培養細胞である。

以上、第2次世界大戦の終るまでの細胞培養は、合成培地や抗生物質などなかったので、無菌的に長期にわたって細胞を維持することは非常に困難であった。しかし、終戦後、抗生物質や合成培地が登場したことにより、培養細胞を用いた研究が飛躍的に発展する。

戦後の細胞培養の技術を大きく発展させたものは、ポリオウイルスワクチンを培養細胞で作ろうとしたこと

であろう。Enders は組織培養を使用して、1937年ヘルペスウイルスの研究を始め、1941年には、馬脳脊髄炎ウイルス、ヘルペス、インフルエンザ、水痘ウイルスの増殖に組織培養が有用なことを証明していたが、第2次世界大戦で研究の中断を余儀なくされていた。戦後、1947年に彼らはポリオウイルスを組織培養で増殖させる研究を開始し、ポリオワクチン産生への道を拓いた。戦前にはサルの子体の脳組織でワクチンの製造が試みられたが、免疫力が上がらなかったり、アレルギー反応などでワクチン製造は不成功に終わっていた。当時、ポリオウイルスは神経組織で増殖すると考えられていたが、Enders らは組織培養法で、神経組織以外のヒトの結合組織、腸、肝、腎、副腎、脳、心臓、脾臓、肺、脳下垂体などに由来する細胞でポリオウイルスが増殖できることを証明した⁶⁾。そして、彼等は1954年の医学生理部門のノーベル賞に輝いた。

Enders らの培養法は、組織片培養であった。すなわち、上の Rous のところで述べたトリプシンで組織を処理し分離した細胞培養する方法ではなくて、生体から取り出した組織を細切して培養する方法である。細

切した組織片から細胞が増殖してくる。培地も塩類溶液と牛血清透析外液を 3 : 1 に混ぜたものであった。しかし、その後、ワクチン製造のために培養技術は改良・工夫され著しく進歩した。すなわち、継代して増殖させることのできる細胞系の樹立（細胞培養法）と合成培地の開発とである。まず、Morgan によって合成培地 199 培地が 1950 年に開発され⁷⁾、その後、1955 年に開発されたの Eagle 培地などに発展した。さらに、Dulbecco の培地はウイルス研究のために Eagle の培地から改変されたものである。

この Dulbecco は 1975 年ノーベル賞を受賞した。彼は細胞培養を利用した DNA 腫瘍ウイルスによる細胞のトランスフォーメーションの研究を行い、プラークアッセイ法を確立した。この時の共同研究者の Temin は、RSV でのニワトリ細胞のプラークアッセイ法を確立している。これらのすべての研究は細胞培養を用いてなされたものである。興味深いことに Dulbecco は培養の基礎をすでに第 2 次世界大戦前に Levi-Montalcini の主人からイタリアで学んでいる。

ウイルスワクチンについて、培養細胞の見地から特記されることは、安村らによるアフリカミドリザルの腎臓に由来する Vero 細胞の樹立であろう⁸⁾。現在、日本を含め世界の多くの研究所でこの Vero 細胞がワクチンの製造に非常に役立っている。

話が少し前後するが、1954 年、東京大学伝染病研究所（伝研）の長野と小島は、紫外線照射で不活化した痘瘡ウイルスを投与したウサギの皮膚に、生きた同ウイルスを感染させると、その感染が抑制される蛋白質を見出し、ウイルス干渉因子とした。この研究は、大いに評価されるべきであると思うが、残念ながらそうはならなかった。その理由は、実験が動物実験であったためにウイルスに対する抗体の問題が否定されなかったことと、論文がフランス語で書かれたせいでもあった。その後、1957 年、Isaacs & Linenmann はニワトリの漿尿膜を培養し、インフルエンザウイルスを使用してインターフェロンを証明した⁹⁾。彼らの論文には長野らの論文の引用はなく、現在、インターフェロンの発見者は Isaacs とされている。とにかく、インターフェロンは最初に見出されたサイトカインであり、大いに評価されるべきものであろう。Isaacs が長生きを

していればノーベル賞を受賞したかもしれない。残念ながら彼は 46 歳で死亡した。

1956 年に Tjio and Levan によって、ヒト染色体数が 46 本であることと核型とが決定されたことは、培養化されたヒト胎児肺線維芽細胞を使用した結果であった¹⁰⁾。このヒト染色体の決定は、その後のヒト細胞遺伝学の発展に大きく貢献した。

1962 年、岡田は細胞融合を観察した¹¹⁾。すなわち、培養した Ehrlich 腹水腫瘍細胞を HVJ ウイルスで処理して、融合細胞を作成した。この細胞融合法は、モノクローナル抗体作製に必須の技術であったし、また、細胞遺伝学を著しく進展させた。ノーベル賞にふさわしい研究であろう。

この細胞融合を利用して 1984 年のノーベル賞に輝いたのは、モノクローナル抗体の作成である。1975 年、Köhler と Milstein は、培養化されたマウス骨髓種細胞と羊赤血球で免疫したマウスの脾臓から採集したリンパ球とを細胞融合し、羊赤血球に対する抗体を産生する増殖する細胞系を得て、モノクローナル抗体作成法を開発した¹²⁾。

先に述べた Temin は RSV に感染させた培養ニワトリ線維芽細胞を DNA 合成阻害剤で処理すると、RSV の増殖が低下することを観察し、RNA 腫瘍ウイルスの増殖には DNA の介在が必要であることを推論した¹³⁾。この現象から、やがて彼は RSV が逆転写酵素を持つことを証明し¹⁴⁾、1975 年に Dulbecco と共にノーベル賞を受賞した。上記の RSV の定量的増殖実験に培養細胞が用いられたことは当然のことであるが、逆転写酵素を証明するために大量の RSV を集めるためにも、RSV を産生する培養細胞が使われている。ちなみに、この年、Temin と同じ逆転写酵素を RSV で証明して同時にノーベル賞を受賞した Baltimore も、かつて Dulbecco の研究室で働いていた。

1972 年、Brown と Goldstein は、家族性高コレステロール症の遺伝的原因を追究するために患者の線維芽細胞の培養を開始し、その細胞の LDL 受容体に遺伝子欠損があることを見出した¹⁸⁾。当時、コレステロールの代謝は、腸や肝組織で行われると考えられていたの

で、実験が難しいと考えられていた。しかし、彼らは培養した患者の皮膚線維芽細胞にコレステロールの代謝異常があることを見出すことができ、研究は順調に進み、1985年のノーベル賞に輝いた。

最初の発見されたサイトカインであるインターフェロンはノーベル賞を逃したが、次に発見されたサイトカイン、神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) と上皮細胞成長因子 (Epidermal Growth Factor, EGF) は1986年のノーベル賞に輝いた。

NGF の発見は、Levi-Montalcini らが、マウス肉腫180の組織片をニワトリ胚知覚神経節と併置培養し、神経節から肉腫組織片に向かって無数の神経繊維が伸張することを観察したことによる¹⁵⁾。Levi-Montalcini の下で働いていた Cohen は、マウス顎下腺にこの神経成長因子 (Nerve growth factor) が多く含まれることを見出したが、この顎下腺抽出液を新生児マウス注射すると、早期眼瞼開裂と早期切歯出現が起こることを見出した¹⁶⁾。この実験は、動物実験であったので、その作用機序をさらに明らかにするために、ニワトリ胎児の皮膚組織の培養を行い、この顎下腺抽出液がニワトリ胎児皮膚上皮細胞を増殖させることを見出し、上皮細胞増殖因子 (Epidermal growth factor, EGF) と命名した¹⁷⁾。ただ、これだけの仕事ではノーベル賞につながらなかったであろう。しかし、彼は EGF が動物体内で何か重要な生理的作用をもつと信じて研究を続け、EGF のアミノ酸配列を決定し、EGF 受容体を見出し、受容体は EGF が結合するとリン酸化されることを証明した。これらの一連の EGF の作用機構を解析した研究は、培養ヒト線維芽細胞と A-431 (EGF 受容体高発現細胞株、ヒト外陰部上皮性細胞癌由来) でなされている。その後、ある種の癌細胞ではその受容体に変異 (癌遺伝子として erbB が同定された) して、EGF が結合しなくても受容体のリン酸化がおり、細胞の増殖をきたす場合や、受容体数の増加がおり細胞の異常増殖が起こることが分かってきた。そして、細胞の増殖因子の研究から癌細胞の異常増殖のメカニズムが明らかにされた EGF の研究はノーベル賞に十分値するものになった。最近、この異常な受容体の働きを封じる分子標的癌治療薬が開発されている。

1981年、マウス胚性幹細胞の培養化の論文¹⁹⁾を私は読

んだとき、大変興奮した。私の技術でもヒトの胚性幹細胞を樹立できるのではないかと考え、人口受精で残ったヒトの受精卵を入手しようと、周りの数人の産婦人科医師に依頼したが、産婦人科学会の倫理規程があるとかで入手できなかった。人口受精で使い残った多くの受精卵を顕微鏡下で眺めて残念であった。また、日本での先端的研究の難しさを感じた。Evans らは、1981年のマウス胚性幹細胞樹立の報告の約10年前から、テラトカルチノーマ細胞の培養で、多分化能をもつ細胞を研究していた。そして、1978年処女生殖のマウス胎児からハプロイド細胞株を樹立する試みを始めている。非常に挑戦的研究である。この研究の対照実験で、2倍体性の胚性幹細胞の培養化に成功し、その後、この幹細胞の遺伝子改変、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスの作成などで、Smithies、Capecchi らと2007年のノーベル賞を受賞した。これらの一連の研究は、細胞培養の技術がなければ為し遂げられなかったであろう。

2008年、Zur Hausen は、パピローマウイルスの子宮頸がんの関係で、ノーベル賞を受賞した。彼らは、1983年に、パピローマウイルス16型が子宮頸癌と関係することを、DNA hybridization法で証明し²⁰⁾、続けて18型を見出し、その後、ウイルスのE6、E7遺伝子が子宮頸癌に関係することを、子宮頸癌細胞株 (HeLa, C4-1, 756) で証明した²¹⁾。Zur Hausen は以前から癌とウイルスとの関係に強い関心をもっていた。そのために、1965年米国ペンシルバニア大学医学部 Henle 教授の下で、バーキットリンパ腫とEBウイルスとの関係の研究を開始し、バーキットリンパ腫培養株 Raji 細胞のDNAにEBウイルス遺伝子が組み込まれていることを見出した²²⁾。この彼の経験が、子宮頸癌の中にウイルスを見出そうとしたのではないかと予想される。彼は米国に3年間滞した後、ドイツに帰り、Herpes simplex virus が子宮癌をおこすと考えて研究を始め、その後、1972年にパピローマウイルスの研究を始めた。話しは脱線するが、パピローマウイルスを現在も培養細胞で増殖させることが出来ない。パピローマウイルスの増殖に適する培養細胞系がないということである。また、なぜ、パピローマウイルスが子宮頸癌なのであろうか。

おわりに

以上、培養細胞が大いにかかわってノーベル賞を受賞した研究、あるいは、ノーベル賞につながる可能性のあった研究、そのほか、私が細胞の培養でインパクトを感じた研究などについて思いつくままに述べた。

ノーベル賞受賞までには、研究の成果が発表されてから、時間的経過が必要なので、取り上げられた話題が古すぎると批判されるかもしれない。しかし、ノーベル賞は研究の結果が報告されて、その結果が時間的に評価されなければならないので、話しが古くならざるを得なかった。それに、現在、流行のESやiPS細胞のことなどについては、読者は私より良く知っていることと思う。

将来、分子細胞生物学での分子レベルの研究から、より高度の細胞レベルへの研究に培養細胞が利用され、新しい発見がなされてくるのではないかと予想される。例えば、細胞の分化とか器官形成とかの問題が残されている。これらの問題の解決は、現在活発に研究されている幹細胞を利用した再生医療にも繋がるであろう。また、現在ヒトの細胞が培養されているといっても、その種類はきわめて限られている。多くのヒトの臓器からの分化機能をもつ細胞の培養化には成功していない。細胞培養に関わっている研究者は、今後、エキサイティングな大きな可能性のあることを信じて努力されることを私は期待している。

最後に、これらのノーベル賞に繋がった研究を概観するとき、各研究者は科学的事項の原理的なことをよく習得していて、その基礎の上に、新しい事実を見出そうと集中的に強力に研究を進めている印象を受ける。一方、我が国の場合、基礎的原理的なことがしっかりと大学時代の学生に教えられていないのではないかと、そして、我が国の多くの研究は外国で見出された原理的ものを利用した応用的な研究に傾いているのではないかと、という感想をもった。基礎的な科学の原理を徹底的に教え込まれた若い研究者が、未知の現象の解明のために集中的に取り組める環境で研究を進めることができることが、ノーベル賞級の研究を生むであろう。このためには、現在の日本の大学の教育の在り方、国の科学政策のあり方が問われる。

文 献

- 1) Rous P, Jones FS : A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *J Exp Med* (1916) 23, 549-555.
- 2) Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK : DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* (1976) 260, 170-173.
- 3) Carrel A : On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med* (1912) 15, 516-528.
- 4) Carrel A : 人間この未知なるもの. 渡部陽一訳, 三笠書房, 東京 (1980).
- 5) Earle WR : Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J Natl Cancer Inst* (1943) 4, 165-212.
- 6) Enders JF, Weller TH, Robbins RC : Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* (1949) 109, 85-87.
- 7) Morgan JF, Morton HJ, Parker RC : Nutrition of animal cells in tissue culture. : I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med* (1950) 73, 1-8.
- 8) 安村美博, 川喜田愛郎 : 組織培養によるSV₄₀の研究. *日本臨床* (1963) 21, 1201-1215.
- 9) Isaacs A, Lindenmann J : Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* (1957) 147, 258-267.
- 10) Tjio JH, Levan A : The chromosome number of man. *Hereditas* (1956) 42, 1-6.
- 11) Okada Y : Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp Cell Res* (1962) 26, 98-107.
- 12) Köhler G, Milstein C : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* (1975) 256, 495-497.
- 13) Temin H : The effects of actinomycin D on growth of Rous sarcoma virus in vitro. *Virology* (1963) 20, 577-582.
- 14) Temin HM, Mizutani S : RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* (1970) 226, 1211-1213.
- 15) Levi-Montalcini R, Meyer H, Hamburger V : In Vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res* (1954) 14, 49-57.
- 16) Cohen S : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* (1962) 237, 1555-1562.
- 17) Cohen S : The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* (1965) 12, 394-407.
- 18) Brown MS, Goldstein JL : Familial hypercholesterolemia : defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* (1974) 71, 788-792.

- 19) Evans MJ, Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* (1981) 292, 154-156.
- 20) Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen H : A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) 80, 3812-3815.
- 21) Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer, W, Roggenbuck B, Stremlau A, Zur Hausen H : Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* (1985) 314, 111-114.
- 22) Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H : Presence of EB virus nucleic acid homology in a "virus-free" line Burkitt tumour cells. *Nature* (1970) 227, 245-248.