

日本財団補助金による 2000年度日中医学学术交流促進事業

④. 日本人研究者派遣助成

(3) ほ乳類の培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験の技術指導とその応用

日本財団助成金による
2000年度日中医学学術交流推進事業報告書

－日本人研究者派遣－

平成 12 年 8 月 28 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 中 島 章 殿

1. 訪 中 者 氏 名 本 間 正 充



所属機関名 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 職名 室長

所在地 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-81-1 電話 03-3700-9847

受 入 機 関 名 華西医科大学公衆衛生学院

所在地 中国四川省成都市人民南路三段 17 号

受入責任者名・役職 張朝武(Zhang Cauowu)・華西医科大学公衆衛生学院学部長

2. 中国滞在日程

月	日	訪問地・機関	活動内容等
7 月	7 日 (金)	成都	中国成都到着
	8, 9 日 (土、日)	成都	資料整理、観光
	10 日 (月)	成都・華西医科大学	大学案内、学部長表敬訪問、講義準備
	11 日 (火)	成都・華西医科大学	講義
	12～14 日 (水～金)	成都・華西医科大学	実技指導
	15, 16 日 (土、日)	成都	資料整理、観光
	17, 18 日 (月、火)	成都・華西医科大学	実技指導
	19 日 (水)	北京	乗り継ぎ
	20 日 (木)	帰国	

3. 交流報告

交流テーマ

「ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験の技術指導とその応用」

訪中研究者氏名：本間正充

所属：国立医薬品食品衛生研究所

役職：室長

報告

<概要>

平成 12 年 7 月 7 日から 7 月 20 日までの 14 日間、華西医科大学衛生学部・学部長張朝武(Zhang Chaowu)教授の招聘を受け、同大学・同学部張立実(Zhang Li-Shi)教授の研究室を訪問した。張教授は現在、衛生学部の副学部長であると同時に、栄養学、食品衛生学、遺伝毒性学の 3 つの研究室の責任者でもある。張教授は平成 6 年から 7 年までの 2 年間、国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部に客員研究員として在籍し、主としてほ乳類培養細胞を用いた染色体異常、遺伝子突然変異の研究に従事し、多くの研究業績を残し帰国した。帰国後は日本での研究経験を生かし、中国国内での遺伝子突然変異試験の普及や、それを用いた漢方薬成分の遺伝的影響などの研究を行っている。中国における遺伝毒性の研究はエームス試験や染色体異常試験が定着し始めたばかりで、ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験に関してはほとんど行われておらず、張教授は中国におけるこの分野のパイオニア的存在である。ほ乳類培養細胞による遺伝子突然変異試験は最近 ICH(international Conference of Harmonization)において医薬品の遺伝毒性試験法の 1 つとして認知され、その国際的普及が計られている。今回の滞在の第一の目的は張教授の研究を助け、遺伝子突然変異の研究を中国国内に普及させることである。この目的のため滞在中、以下の活動を行なった。

- (1) 遺伝子突然変異試験法、特に MLA 試験の原理、役割に関する講義
- (2) 遺伝子突然変異発生のメカニズムに関する講義
- (3) 遺伝子突然変異試験法の技術指導、および遺伝子突然変異体の分子生物学的、細胞遺伝学的解析技術の指導
- (4) 毒性・遺伝毒性に従事する中国人研究者とのインタビュー

なお、上記(3)の目的を達成するため、日本からマウス細胞株 1 種、ヒト細胞株 2 種と細胞培養のための培地、血清、実験器具等を携行した。また、今回の滞在には北京の中国薬品生物製品検定所の王雪(Wang Xue)博士も同行した。王博士もまた平成 9 年～10 年まで国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部に在籍した研究者である。日本語が堪能であることから、私の講義の一部について通訳を努めていただき、また同時に本人も日本で行っ

た遺伝子突然変異に関する研究について講演を行った。

滞在中のこの時期の大学は夏期休暇に入ったばかりで学生はまばらであった。ただし、日本と同様、研究室に属する大学院生や教官の多くは残っているため上記活動を行うには何ら問題はなかった。むしろ、教官の多くは卒業式や、学位授与式を終えたばかりであるため、比較的時間的余裕があり、多くの中国人研究者と話し合う機会を得ることができた。

<活動内容>

(1) 遺伝子突然変異試験法、特に MLA 試験の原理、役割に関する講義

MLA 試験はマウス L5178Y 細胞を用いたチミジンキナーゼ遺伝子をターゲットした遺伝子突然変異試験である。我が国においてもこれまでなじみのない試験であったが、ICH において医薬品の遺伝毒性に関する安全性試験の 1 つとして採用されて以来、急速に広まりつつある。張教授は、日本滞在中に、我が国における MLA 試験導入に貢献し、その経験から現在、中国国内で本試験法の啓蒙、普及を行っている。講義では、まず最初に、医薬品、化学物質、農薬等における遺伝毒性試験のガイドラインについて、我が国と、米国、EC を比較し、また OECD や ICH の国際的ガイドラインを紹介した。その後、MLA 試験の原理、MLA 試験導入によるこれらガイドラインへのインパクトを解説した。特に、1994 年から 1996 年まで行った国際共同研究の成果について触れ、遺伝毒性試験としての MLA 試験の優位性を強調した。さらには、突然変異体を遺伝子レベル、染色体レベルで解析した最新のデータを紹介した。突然変異体には染色体の構造的変化だけでなく、染色体の数的変化を有する物も含まれていることから、MLA の Aneugen 検出系としての有効性にも言及した。

中国は医薬品資源が豊富で、特に漢方生薬を利用した薬物治療に関しては歴史的に大きな経験の蓄積がある。しかしながら、中国医薬品の需要のほとんどは中国国内に限定され、国外向けの医薬品の割合はきわめて少ない。その理由の 1 つとして、中国で生産される医薬品の品質および安全性に関する保証が国際レベルに達していないことがあげられる。中国の医薬品産業をより活性化するためには、今後国際市場をターゲットとした展開が重要と考えられるが、そのためには国際水準の GLP (Good Laboratory Practice) の確立が不可欠である。この講義によって、医薬品開発における国際的ガイドラインの現状とその重要性を少しでも多くの聴衆が理解してくれることを期待した。

(2) 遺伝子突然変異発生のメカニズムに関する講義

MLA 試験を含む常染色体劣性型遺伝子突然変異検出系は、点突然変異だけでなく染色体レベルの欠失、組換え、染色体不分離等をも検出できるきわめて変異スペクトルが広い遺伝子突然変異検出系である。また、ここで検出される突然変異は、がん抑制遺伝子の体細胞での突然変異スペクトルと一致するため、細胞がん化における遺伝子変異のモデルとしても有用である。我々は最近この系を用いて、がん抑制遺伝子のひとつである p53 が相同

組換えを介して、染色体上で生じた DNA の二本鎖切断を修復することをを解明したが、本講義では主にこの内容を中心た p53 の遺伝的安定化機構について解説した。また、その応用として、p53 正常細胞、変異細胞、欠損細胞を用いて各種遺伝毒性物質の性質を検討することにより、突然変異のメカニズムや、それら遺伝毒性物質の性質を詳細に解析できることなどを紹介した。

華西医科大学の遺伝毒性学研究室においては最近日本においても問題となっている内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の毒性に関する研究が行われている。これまで内分泌攪乱化学物質の毒性に関してはホルモンレセプターを介した生理学的影響が中心であり、遺伝的影響はほとんどないものと理解されてきた。しかしながら、最近の我々のこの検出系を用いた研究からダイオキシン、ビスフェノール A 等の内分泌攪乱化学物質の一部は、相同組換え反応を亢進させる作用があることが示唆されている。このことから、講義終了後、多くの研究者から相同組換えの機構、相同組換えの検出法についての質問を受けた。また、一部の研究者とは、情報提供または共同研究ということで内分泌攪乱化学物質の遺伝的影響について一緒に研究する約束をした。

(3) 遺伝子突然変異試験法の技術指導、および遺伝子突然変異体の分子生物学的、細胞遺伝学的解析技術の指導

遺伝子突然変異試験の基本的な方法に関しては張教授が日本で学んでいたため、基本的な技術に関しては特別な指導は必要ないと判断された。しかしながら、試験に必要な細胞の状態が悪く、今回新たな細胞を日本から持ち込んだことからわかるように、細胞の維持管理に関する環境は必ずしもいいとは言えなかった。具体的には、(1)細胞を保存する超低温フリーザー（-80℃以下）または液体窒素容器がないこと、(2)培養に必要な超純水の確保が困難であること、(3)細胞培養に必要なプラスチック容器が不足していることなどが挙げられる。今後、中国側に何らかの研究援助が可能な場合、これら機器、器具の提供が重要であると考えられた。また、MLA 等の突然変異試験では 96 穴のマイクロプレートを用いるのが通常であるが、これは使い捨てで、比較的高価であることが、中国での本試験の普及を妨げていることも痛感した。安価なマイクロプレートの開発や、マイクロプレートを用いない試験法の改良も重要と考えられる。

遺伝子突然変異体の解析には分子生物学的解析（サザンブロット、ノーザンブロット、ウェスタンブロット、PCR 法、DNA シークエンス法等）および細胞遺伝学的解析（ギムザ染色による染色体分析、FISH 法、SKY 法等）などがあるが、現状ではサザンブロット、ウェスタンブロット、ギムザ染色のみが行われていた。これら技術に関しては問題ないと判断された。しかしながら、詳細な変異体の解析に関しては PCR 法、シーケンス法が必須であるが、高額な機械を必要とするため、いまだ実現していない。また、FISH 法に必要とされる蛍光顕微鏡の設備は十分であったが、試薬としての蛍光プローブの作成や入手は困難なようであった。研究援助が可能な場合、これら機器、試薬も考慮すべきと思われる。

る。

張教授の研究室では、日本から持ち帰った培養細胞を用いて、遺伝子突然変異だけでなく DNA 損傷試験（コメット試験）やアポトーシス誘導試験も行っていたことには驚いた。DNA 損傷やアポトーシスは突然変異の発生と密接に関連しており、p53 もその制御に大きく関与していることが明らかとなっている。我々の研究室でも最近、導入し始めたばかりであるが、張教授の方がデータの蓄積が多く、改めて彼の先見の目の高さを認識した。張教授とはこれら研究に関して共同研究を行うことを約束した。

(5) 毒性・遺伝毒性に従事する中国人研究者とのインタビュー

滞在中以下の研究者とインタビューする機会を得た。その内容も簡単に記載する。

(a) 張立実(Zhang Li-Shi)：華西医科大学教授・公共衛生学院副学部長

私の親友であり、今回招聘してくれた人物。滞在中、公私に関わらずすべてを面談見ていただいた。専門は栄養学、食品衛生学、遺伝毒性学で遺伝子突然変異、遺伝毒性のガイドライン、GLP を含むすべてのことに関して意見交換を行った。

(b) 王雪(Wang Xue)：中国薬品生物製品検定所毒理室副教授

私の友人であり、今回の訪問に際して、北京から同行していただき、日本語と中国語の通訳も務めていただいた。専門は遺伝毒性。遺伝子突然変異、中国における GLP の現状などについて情報交換を行った。

(c) 張朝武(Zhang Chaowu)：華西医科大学教授・公共衛生学院学部長

今回の招聘責任者。中国における医薬品、医薬品試験の現状。ダイオキシンや重金属汚染等の中国の環境問題。大学教育等について主に話をした。ダイオキシン等の内分泌攪乱化学物質の生体影響について、張立実教授の仕事通じ華西医科大学の研究を支援することを約束した。

(d) 黄承玉(Hang Cheng-yu)：華西医科大学教授

専門は食品衛生学。生薬成分、栄養補助食品について話をした。米国に留学経験があり。

(e) 張健新(Zhang Jianxin)：華西医科大学副教授

専門は腫瘍学。中国におけるがん研究の現状を話していただいた。また、研究室も案内していただいた。日本への留学経験有り。

(f) 来宋生(Rongsheng Luan)：華西医科大学副教授

専門は予防医学、疫学。中国におけるエイズ問題。特に雲南省少数民族での麻薬汚染が、エイズの罹患率を高めており、極めて深刻な現状であることなどを話していただいた。日本への留学経験有り。

(g) 何涛：華西医科大学講師

張立実教授の研究室で実際に遺伝子突然変異試験を行う試験責任者。細胞の培養、維持、突然変異試験、変異体の同定など、具体的な実験について指導等を行った。

(h) 張健静(Zhang Jiangjing)：華西医科大学博士研究員

張立実教授の研究室で実際に遺伝子突然変異試験や遺伝子解析を行う研究者。突然変異試験のみならず、アポトーシス、コメット試験についても議論した。

(i) 呂曉英(Lu Xiao)：華西医科大学大学院生

張立実教授の研究室で実際に遺伝子解析等を行う学生。がん遺伝子や p53 などのがん抑制遺伝子の役割に興味をもっており。おもに講義内容に関して更に説明等を行った。

(j) 越春(Zhao Chun)：昆明医学院栄養食品研究所副教授

専門は栄養学、食品学。アロエ、靈芝、余甘子等に含まれる薬用成分を研究しており、栄養補助食品としての可能性について話していただいた。

他に多くの研究者、学生とも話をする機会を得たが、代表的なもののみを記載した。

<今後の交流計画>

張立実教授の研究室を中心に今後、いくつかの研究テーマに関して共同研究を行い、研究交流を計るとともに、我々の研究室への中国人研究者を受け入れ、人的交流を進めていきたいと考える。具体的な計画を以下の示す。

- 1.「ヒト培養細胞を用いた新しい遺伝毒性評価システムの構築」：本共同研究には現在、日本において製薬企業を中心とする約 25 の研究機関が参画している。ヒト培養細胞を用いた遺伝子突然変異、コメット試験について研究経験豊富な張教授に参加していただくことは共同研究の大きな発展になると考えられる。
- 2.「内分泌攪乱化学物質の遺伝毒性に関する研究」：ダイオキシン、PCB 等の内分泌攪乱化学物質によって誘発される遺伝子突然変異、特に組み換え型遺伝子突然変異の発現機構を解明することにより、それら化学物質の発がんリスクを評価する。中国側で主に突然変異体の分離、日本側で変異体の解析を担当する。
- 3.「中国薬草中に含まれる抗変異作用をもつ薬物のスクリーニングに関する研究」：遺伝子突然変異検出系を用い、突然変異を抑制する化学物質を中国薬草中から検索する。中国側で主に抗変異作用のスクリーニング、日本側でその作用メカニズムの検討を行う。
- 4.人的交流として、来年度から張教授の研究室出身者で、現在、成都衛生防疫所の Zhan Li 氏を留学生として受け入れる予定である（現在、日中医学協会に申請中）。

<最後に>

今回の訪問では何よりも私を招聘してくれた張立実教授に何より感謝したい。彼は、副学部長という忙しい立場であるにも関わらず、滞在中公私にわたり私をもてなしてくれた。あまりの接待ぶりを私が心配すると、彼は「日本から来た一番の親友をこのように接待するのは当然のことだ」と言ってくれた。彼が日本に滞在した 2 年間、私が彼にどれだけのことをしてあげたのかはわからないが、彼が私のことを一番の親友と思ってしてくれている

ことを聞いて感激した。彼もまた、私にとって一番の親友である。また、彼の家族、友人、大学・研究室の方々にも感謝したい。彼らはいつも友好的に私に接してくれ、彼らのおかげですべてをいい思い出で過ごすことができた。多くの中国人の暖かさに触れ、私はいつまで中国と中国人が好きになった。また、いつかこの地に来ようと思う。

最後に、今回の訪中を援助していただき、私を中国好きにしてくれた日中医学協会に感謝いたします。