

ヒト皮膚移植 SCID マウスを用いた新しいコスメトロジー研究

大阪大学 医学部

野村 大成

Normal human organs and tissues (skin, thyroid gland, lung, liver, stomach and intestinal mucosa, endometrium, bone marrow cells, etc.) were well maintained for long periods (> 2 years) over several mouse generations in the T and B cell function deficient SCID (severe combined immunodeficient) mice improved by the selective inbreeding of homozygous (*scid/scid*) male and female mice which showed undetectable serum IgG and IgM ($< 1 \mu\text{g}/\text{ml}$), while it was difficult to maintain these human tissues in nude mice and also in leaky SCID mice.

Transplanted human organs and tissues were stably maintained morphologically and functionally, providing an invaluable experimental system for the *in vivo* study of human organs and tissues. For example, daily exposure to large dose ($> 7.5 \times 10^5 \text{ J}/\text{m}^2$) of ultraviolet light B (UVB) for long periods (~ 2 years) induced actinic keratosis in normal human skin. Consequently, the use of SCID technology maintaining human skin enables us to study on the *in vivo* influence of cosmetics and allergic agents, protection from environmental toxic agents, and experimental therapy of human skin diseases.

1 緒言

正常ヒト臓器の発生、分化、機能、およびその異常に関する研究は人体実験が不可能なため、極めて制限されたなかでの臨床研究、あるいは正常個体とかけはなれた生理条件下（培養細胞等）でしかすすべがなかった。1983年、Bosma博士によりT細胞、B細胞機能の欠損した重度複合免疫不全（severe combined immunodeficiency: SCID）マウスC.B17-*scid*が発見された⁽¹⁾。1988年McCuneらにより、ヒト白血球がこのSCIDマウス体内で短期間内ながら生存し、機能を発することが報告され⁽²⁾、ヒト組織の機能をマウス個体を借りて研究を行うことができる可能性が示された。しかし、現在米国で使われているC.B17-*scid*マウスは、若年で白血病を多発し（約30%）、また、T、B両細胞ともに一部正常に戻ってしまうため（約30%）、マウス皮膚のallograftすら生着しにくいこ

とがわかっている^(3-5 参照)。これらSCIDマウスの血中IgG、IgMを測定し、検出限界以下のものを20代以上選択的兄妹交配（Selective Inbreeding）を繰り返すことにより、T、B両細胞のleakのない、白血病も発生しない改良型SCIDマウスC.B17/N-*scid/scid*の完成を試みている⁽³⁻⁶⁾。これら改良SCIDマウスには、ヒト良性腫瘍、ヒト異形成組織の継代・維持も可能であることを世界で初めて証明した⁽⁷⁻¹⁰⁾。しかも、我々の改良したSCIDマウスでは、ヒト正常組織（皮膚、肺、肝臓、胃腸、甲状腺、子宮内膜、骨髄他）が全て生着し、2年以上にわたりマウスの世代を越えて継代・維持が可能となった。即ち、ヒト皮膚組織で一部置換したマウスを完成させた⁽¹²⁾。

本研究は、改良型C.B17/N-*scid/scid*マウスの量産、T細胞、B細胞、NK、マクロファージ機能欠損マウスの系統化と量産システムを完成させ、ヒト皮膚組織移植マウスを用い、ヒト皮膚の形態および機能に関する基礎的研究に始まり、薬物、環境有害物質等への反応と治療実験への応用、特に医薬品や日常品（化粧品、洗剤）のヒト皮膚への安全性と皮膚アレルギー等研究への応用を試み、広くコスメトロジー研究のために供するのを目的とする。



A New Approach to Cosmetology with Human Skin Maintained in SCID Mice

Taisei Nomura

Faculty of Medicine, Osaka University

2 実験

2.1 SCID マウスの改良

Bosma より供与された C.B17- *scid* マウスは、幼若および成熟した T、B 両細胞が約半数のマウスに出現し (leaky)、またこれらのマウスでは若年での白血病の発生が多い。同種皮膚移植の生着率をみても、non-leaky SCID マウスでは 94.1 % の生着率を示すのに対し、leaky SCID マウス (血清中 IgG が $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のも) ではわずか 28.6 % であり、同種皮膚移植でさえ困難である。また、リンパ性白血病は、leaky SCID マウスにおいて 3 から 5 ケ月齢で 31.7%、5 から 9 ケ月齢になると半数以上の 58.8% に発生し、長期観察が困難であった。従って、ELISA 法により全ての SCID マウスを生後 4-6 週齢の間に血中 IgG、IgM を測定し、IgG、IgM ともに検出限界以下のホモ (C.B17-*scid/scid*) 同士の選択的兄妹交配を繰り返し、leak と白血病発生の減少を試みた。また、C.B17-*scid* マウスの改良に加え、*bg^l* 遺伝子等を C57BL/6J、C3H/HeJ マウスへ導入し、T、B 両細胞機能のみならず NK 活性およびマクロファージ活性も欠如したマウス C57BL/6^J/N-*scid/scid*、C3H/HeJ/N-*scid/scid*、C57BL/6^J/N-*scid/scid*; *bg^l*/ *bg^l* の作製を試みた。

2.2 ヒト正常組織の SCID マウスへの移植

血中 IgG、IgM が $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の SCID マウスにヒト正常皮膚の移植を行った。ヒト皮膚は乳癌患者で乳房全摘術を施行したものおよび包茎手術を施行した後の切除皮膚を了解を得て用いた。いずれも通常焼却廃棄されるものである。SCID マウス

をアベルチンで全身麻酔し、約 1 cm 平方のヒト正常皮膚をマウス背部皮膚を同寸大切除した部分に移植した。表面を乾燥を防ぐため、抗生物質を含んだクリームを塗り弾力包帯でカバーした。2 週間後に包帯およびクリップの除去を行った。SCID マウスが弱った時、または、死亡した時は、他の SCID マウスにヒト皮膚を再移植し、ヒト正常皮膚の長期維持を試みた。

2.3 毒性テスト

応用の第一段階として、ヒト正常皮膚の長期維持と太陽紫外線による日焼けおよび日光角化症の誘発を試みた。B 領域紫外線 (UVB) を得るのに健康ランプ 4 本 (東芝 FL20S-E、波長 280-360 nm、ピーク 313 nm) を用いた。コダック社製のコダセル・セルロースシート (K6808) を用い、288 nm 以下の紫外線を完全に除去し、地上に到達する太陽紫外線により近似させた。照射線量率は $2.8 \text{ J}/\text{m}^2/\text{sec}$ である。月、水、土曜日に $8000 \text{ J}/\text{m}^2$ 、火、木、金、日曜日に $2000 \text{ J}/\text{m}^2$ の照射を行った。

3 結果と考察

3.1 SCID マウスの改良

正常ヒト組織の移植による機能と分化の研究を行う場合、長期間の観察が必要となる。従って、前述のような leaky SCID マウスの出現と若年での白血病死は研究の大きな妨げとなる。我々は、1986 年より SCID マウスへの beige, nude, *Lps*⁻ 等免疫不全遺伝子の導入を行うとともに、全ての C.B17-*scid* マウスの選択的兄妹交配を繰り返すことにより、SCID マウスの改良を行っている。この地味な努力が大きな成果に結びついた (表 1)。

表 1 SCID mice maintained in the Department of Radiation Biology, Faculty of Medicine, Osaka University, Japan

Strains	Genotype	Generation	Immunodeficiency
C.B17/N- <i>scid</i>	<i>scid/scid</i>	F28	T, B cell
C57BL/6J- <i>scid</i>	<i>scid/scid</i>	N9F5	T, B cell
C3H/HeJ- <i>scid</i>	<i>Lps</i> ⁻ / <i>Lps</i> ⁻ , <i>scid/scid</i>	N8F7+1	T, B cell, Macrophage
C57BL/6J- <i>bg^l</i> ; <i>scid</i>	<i>scid/scid</i> , <i>bg^l</i> / <i>bg^l</i>	N7F4	T, B cell, NK
C3H/HeJ- <i>bg^l</i> ; <i>scid</i>	<i>Lps</i> ⁻ / <i>Lps</i> ⁻ , <i>scid/scid</i> , <i>bg^l</i> / <i>bg^l</i>	N3F1	T, B cell, NK, Macrophage

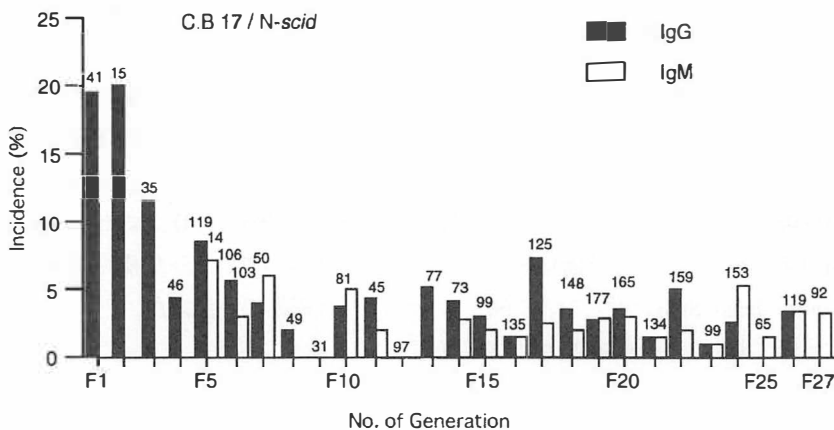


図1 Leaky SCID マウスの選択的兄妹交配による減少。ヒストグラム上の数字は測定したSCID マウスの匹数を示す。IgG、IgM いずれかが $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ を超えるものを leaky SCID とした。

選択的兄妹交配を行った C.B17-*scid/scid* マウス 2,588 匹の血清免疫グロブリン値を測定したところ、大多数のマウスにおける血清 IgG、IgM 値は検出限界以下あるいは $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であった。従って、我々は血清 IgG、IgM 値が $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ を超えるマウスを leaky SCID とした。

図1は、それら leaky SCID マウスの出現率を示したものである。F₁-F₂においてはIgGがleakする頻度が、18.2%とBosmaらの報告と同様に高率であったのに対して、F₃以降は4.0%と有意に著しく減少している。このように選択兄妹交配することにより leaky SCID マウスの頻度は有意に減少した。また、*scid* 遺伝子を C57BL/6J、C57BL/6J-bg^l、C3H/HeJ マウスに導入することにより、congenic マウスを作成している。N₈以後兄妹交配することにより、leakyの出現は全く見られなくなった。

図2は各世代における白血病の発生率を示している。F₄からF₆では平均20%発生しているが、F₁₅以降では1~4%と有意に減少している。

以上のごとく血清IgG、IgM

が検出限界以下の C.B17-*scid/scid* マウスを選択的兄妹交配することにより白血病の発生とT、B両細胞機能の出現を抑えることができた。このように選択的兄妹交配を行い、血清IgG、IgMが検出限界以下の SCID マウスにヒト正常皮膚の移植を行っている。

3.2 ヒト正常組織の SCID マウスでの維持

表2に、甲状腺、副甲状腺、肺、肝、胃、大小腸粘膜、子宮内膜、骨髓細胞、皮膚等ヒト正常組織の SCID マウスでの維持状態をまとめた。SCID

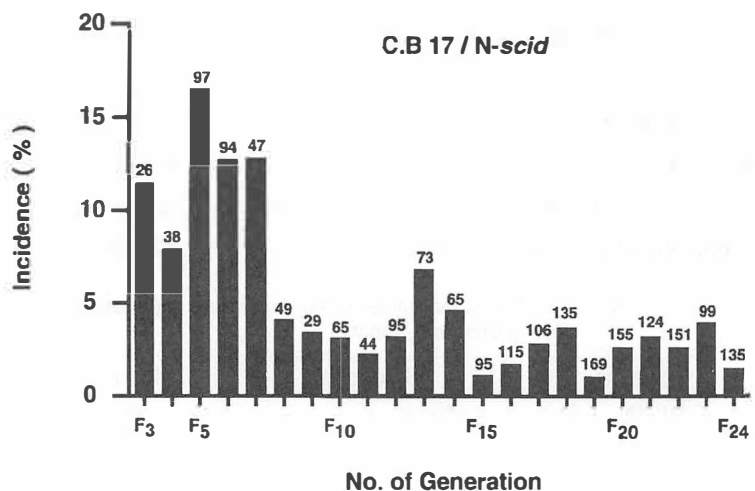


図2 SCID マウスにおけるリンパ性白血病発生率の選択的兄妹交配による減少。

表2 Survival and maintenance periods of normal and precancerous human tissues in SCID mice

	No.	Survival (%)	Max. period ^a (Month)	No. of transfer
Skin	42	100	28	7
Thyroid gland	49	100	34	10
Lung	13	100	22	8
Liver	7	100	14	4
Gastric mucosa	18	100	21	6
Colorectal mucosa	10	100	13	5
Endometrium	7	71.4	22	6
Bone marrow cell	19	84.2	< 6 ^b	1

^a Some continue.^b Identified by human IgG in the serum of SCID mice. Usual C.B17-*scid* mice were used.

マウスの世代を越えて長期間維持されている。特にヒト皮膚は100%2年以上にわたる長期維持に成功している。図3 aは、移植後247日目の肉眼像であるが、アルビノのSCIDマウス皮膚の中に淡黄色をしているのがヒト皮膚である。顕微鏡組織像(図3 b)でも連続性を示しているが、表皮層の厚さと色素細胞の存在からヒトとマウス皮膚の境界(矢印)が区別できる。

日光角化症、psoriasis等ヒト皮膚疾患のSCIDマウスでの維持にも成功している。その一部を表3にまとめた。

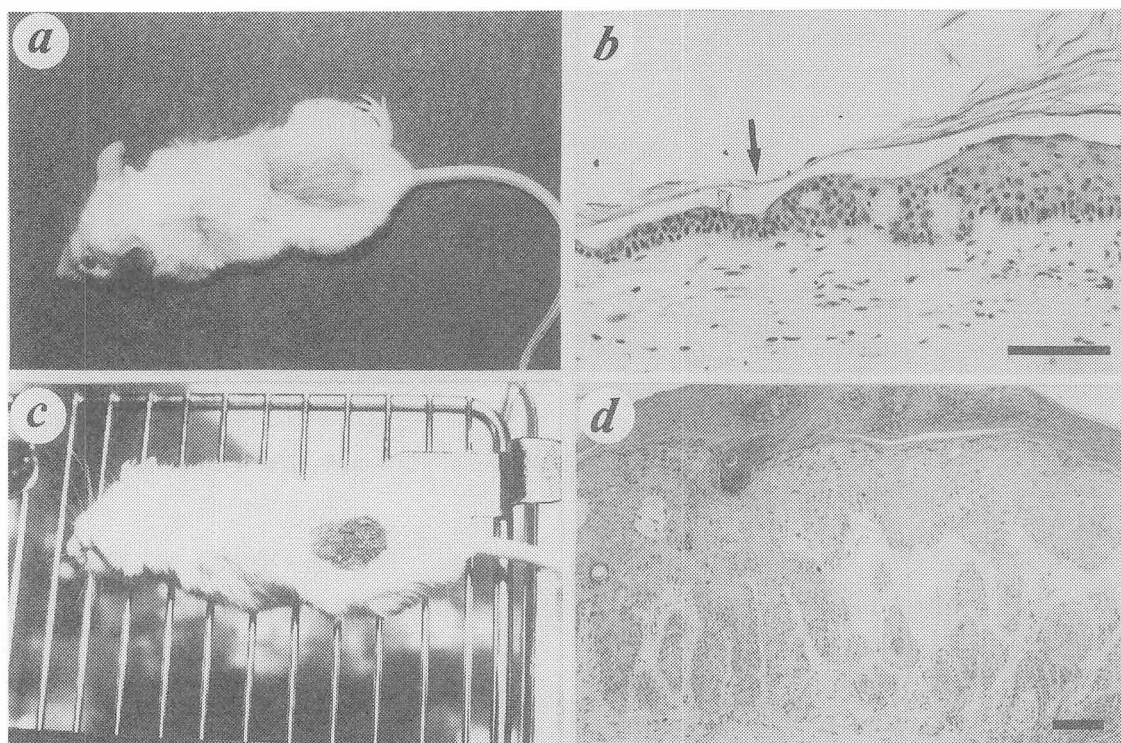
3.3 UVB照射によるヒト皮膚疾患と遺伝子変異の誘発

真夏の正午頃の砂浜で1-2時間寝ころんでいた場合とほぼ同じ量を週4日、他の3日はその4倍量のUVB(8,000⁵/m²)を照射した。表4に示す如く、非照射群では全く何の変化もないのに対し、UVB長期連続照射により高率にヒト皮膚に日光角化症が発生した(図3 c、d)。マウス皮膚は毛で被われているため、耳の先端と尾を除いて何の変化も見られなかった。図4は、日光角化症の診断時期を照射量に対して表したものである。丸印は包茎患者より切除した正常皮膚、三角印は乳房部の正常皮膚、四角印は顔面日光角化症患者的鎖骨部正常皮膚を示しているが、個人差が非常

に大きい、即ち、日光感受性に個人差が大きいのがよくわかる。また、1例だが、日光角化症患者の正常皮膚は高感受性を示している。また、UVB照射により、高率に*p53*遺伝子の変異が誘発されている。しかし、*K-ras*遺伝子の変異は今のところ誘発されていない。

現在、2年にわたる連続UVB照射により皮膚癌の誘発にも成功しており、ヒト皮膚置換SCIDマウスは、日焼け防護クリームの開発、治験には今すぐにでも応用可能である。

本研究で、改良SCIDマウスの量産システムを完成させた。ヒト皮膚組織置換マウスを用いることにより、ヒト皮膚組織の形態、機能の基礎研究に加え、アレルギー、がん化、毒性、安全性のテストなど、これまでヒト臓器ではなし得なかった研究がマウスの個体を借りて可能となった。また、他の医学分野においても、ヒト臓器組織を用いて実験的、臨床的研究を行うことがいかに大切か述べる必要もない。これまで理論的には考えられても、実用化されるとは思ひもしなかった独創的、かつ先駆的な研究、および治療実験が可能となる。ヒト臓器組織置換マウスを用いた研究システムの完成は、人間のバイオサイエンスに関する基礎的および臨床的研究に革命的な進歩をもたらすものと確信する。特に、ヒト皮膚の継代維持は100%成功しており⁽¹²⁾、コスメトロジーの進歩に



- a. 移植後247日目のヒト包皮。かすかに黄色を示している部分がヒト皮膚。見やすくするため周辺のマウスの毛を一部除去してある。
- b. 組織像。ヒト皮膚とマウス皮膚の境界を矢印で示してある。H.E 染色。—；100 μm 。
- c. UVB 614,000 J/m² 照射後に見られる日光角化症。茶褐色、肥厚、表面凹凸を示す。
- d. UVB 1,754,000 J/m² 照射後に見られた日光角化症の組織像。early invasion を示す。H.E 染色。—；100 μm 。

図3 SCID マウスへのヒト皮膚の移植と太陽紫外線による影響。

表3 Transplantation of Human Skin

Case	Survival (%)	Max. No. of Generation	Period (months)
1 (breast ca)	2/2 (100)	4	25
2 (breast ca)	4/4 (100)	5	20
3 (phimosi)	4/4 (100)	7	28
4 (breast ca)	2/2 (100)	4	25
5 (breast ca)	1/1 (100)	1	6
6 (breast ca)	3/3 (100)	3	6
7 (breast ca)	4/4 (100)	3	9
8 (solar keratosis)	4/4 (100)	4	20
9 (solar keratosis)	1/1 (100)	3	14
10 (phimosi)	3/3 (100)	3	13*
11 (breast ca)	4/4 (100)	4	20
12 (phimosi)	4/4 (100)	5	18
13 (phimosi)	6/6 (100)	6	21*

Total 42/42 (100)

*Experiments continue at present.

表4 Actinic keratosis induced by ultraviolet light B in the human skin maintained in SCID mice

Human skin	Period (days)	UVB dose (J/m ²)	Keratosis Incidence (%)
A. Normal skin from breast cancer patients			
Unirradiated	~ 745	0	0/8 (0.0)
Irradiated	~ 620	~ 1,890,000	7/9 (77.8)
B. Normal skin from phimosis patients			
Unirradiated	~ 831	0	0/6 (0.0)
Irradiated	~ 592	~ 1,754,000	6/8 (75.0)
C. Normal skin from actinic keratosis patient			
Unirradiated	366	0	0/1 (0.0)
Irradiated	278	730,000	1/1 (100)

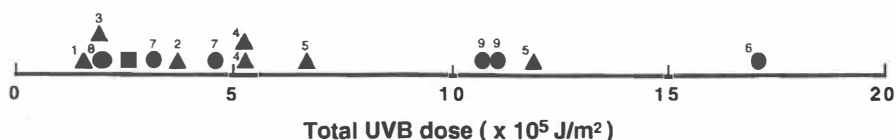


図4 日光角化症の発生とUVB照射量。正常包皮(●)、正常乳房部皮膚(▲)および顔面日光角化症患者の正常皮膚(■)にUVBを照射し、経時的にバイオプシーを行い、病理組織学的に日光角化症と診断された時の線量を示した。

大きな影響を及ぼすものと思われる。また、環境有害物質の人体への影響に関するヒト組織での直接の実験研究が可能となるとともに、これまで、患者を用いてなされてきた薬剤の安全性テスト(臨床治療研究)もヒト臓器組織置換マウスシステムを用いて行うことができるなら、最近のソリブジン事件に代表される人身事故も防げる。

引用文献

1. Bosma, G.C., Custer, R. P., Bosma, M.J.: A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301 527-530 1983.
2. McCune, J.M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M., Weissman, I. L.: The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*, 241 1632-1639 1988.
3. 野村大成: 重度免疫不全マウスの有用性—ヒト免疫機能、ヒト癌転移機構への応用. 医学のあゆみ, 157 635 1991.
4. 野村大成: がん研究におけるSCIDマウスの重要性. *Oncologia*, 26 321-328 1993.
5. 野村大成、杉山治夫、他: SCIDマウスへのヒト臓器の移植. 血液・腫瘍科, 26 461-467 1993.
6. Inohara H., Nomura T., et al.: Reduction of leaky lymphocytes clones producing immunoglobulins and thymic lymphocytic leukemia by selective inbreeding of scid (severe combined immunodeficient) mice. *Acta Otolaryngol.*, 501 107-110 1993.
7. Nomura T., Hamaoka T., et al.: SCID (Severe Combined Immunodeficient) mice as a new system to investigate metastasis of human tumor. *J. Radiat. Res.*, 31 287-291 1990.
8. Nomura T., Takahama Y., et al.: Rapid growth and spontaneous metastasis of human germinal tumors ectopically transplanted into scid (severe combined immunodeficient) and scid-nu^{streaker} mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82 701-709 1991.
9. Inohara H., Nomura T., et al.: Growth and me-

- tastasis of fresh human benign and malignant tumors in the head and neck regions transplanted into scid mice. *Carcinogenesis*, 13 845-849 1992
- 10 . Takatera H., Nomura T., Itatani H.: Differential expression of a human sperm-specific isozyme in seminoma cells transplanted into scid-nu^{str} mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84 215-218 1993.
 - 11 . Kawaguchi T., Nomura T., et al.: Consecutive maintenance of human solitary and hereditary colorectal polyps in SCID mice. *Cancer Detection and Prevention*, 21 148-157 1997
 - 12 . Nomura T., Nakajima H., et al.: Maintenance of normal human tissues and benign tumors in the improved SCID mice and in vivo carcinogenesis of human tissues by radiation and chemicals. *XVI Intl. Cancer Cong. Abst. Book I*, 412 1994.