

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム再生医療等研究事業

生命科学研究資源基盤としての培養細胞の収集保存・供給
システムの整備に関する研究

平成15年度研究報告書
課題番号：H15-ゲノム-002

主任研究者 水澤 博

国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部 第三室 室長
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1
03-3700-1141 (460)
e-mail:mizusawa@nihs.go.jp
URL:http://cellbank.nihs.go.jp/

平成16年4月10日

課題番号 : H15-ゲノム-002

目 次

I 総括研究報告書

培養細胞研究資源の収集・保存・供給システムの整備に関する研究

水澤 博 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第三室(細胞バンク)室長 . . . 3

II 分担研究報告書

現在及び近未来の研究動向調査とそれに応じた細胞収集基本方針の策定に関する研究 . . . 31
許 南浩 岡山大学大学院医歯学総合研究科 教授(日本組織培養学会会長)

細胞バンク保存の細胞系におけるマイコプラズマ汚染に関する研究 38
原澤 亮 東京大学大学院医学系研究科 助教授

ヒト遺伝性疾患細胞の研究資源化と分譲システムに関する研究 43
立花 章 京都大学放射線生物研究センター 助教授

正常2倍体ヒト線維芽細胞の研究資源化と分譲に関する研究 49
木村成道 (財)東京都高齢者研究福祉振興財団 東京都老人総合研究所 参事研究員

組織臓器再生機能を保有する幹細胞の研究資源化に関する研究 53
安本 茂 神奈川県立がんセンター臨床研究所 研究課長

ヒトの疾病モデル細胞の研究資源化と細胞バンクの危機管理システムの構築に関する研究 . . . 56
田中憲穂 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 細胞毒性学研究室長

ヒト尿路上皮腫瘍(腎臓癌、膀胱癌等)及び後腹膜の肉腫の樹立に関する研究 60
執印太郎 高知大学医学部腎泌尿器制御学講座 教授

ヒト食道癌由来細胞株・膵癌由来細胞株の樹立に関する研究 63
嶋田 裕 京都大学医学研究科腫瘍外科学 講師

ヒト膵臓癌由来細胞株、肺癌由来細胞株の樹立に関する研究 66
井口 東郎 国立病院九州がんセンター 医長

実験腫瘍及びヒト消化器がん由来細胞株の樹立に関する研究 71
柳原 五吉 国立がんセンター研究所実験動物管理室長

ヒト肝・胆系組織由来細胞の研究資源に関する研究 75
永森静志 杏林大学医学部総合医療学

ヒト組織の研究資源化に関する研究 78
小林 真一 聖マリアンナ医科大学 薬理学 教授

H15-ゲノム-002

2003 年度厚生労働省科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

培養細胞研究資源の収集・保存・供給システムの整備に関する研究

主任研究者 水澤博 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 第三室

研究要旨

本研究班は、研究基盤の整備を目的に、培養細胞の収集、保存、培養、品質管理、分譲に関連する様々な研究を総合的に実施している。1984年の設立以来これまでに、培養細胞の品質管理体制を確立してきたが、さらに新しい手法を導入してより精緻な実験手法の確立をめざして研究を進めている。さらに、近年は情報環境が整備されてきたことに伴って細胞バンクで生み出された様々な情報を公開するためのシステムの整備も実施している。さらに、ヒト培養細胞を扱うことから倫理問題についても独自の検討を加えている。なお、今期の研究班では、細胞の収集を積極的に進め、年間約50種の培養細胞の収集を目標として、ヒトに由来する細胞の収集を重点的に進めた。

分担研究者

氏名・所属機関名及び所属機関における職名

増井 徹	国立医薬品食品衛生研究所	主任研究官
田辺秀之	国立医薬品食品衛生研究所	主任研究官
許 南浩	岡山大学大学院	教授
原澤 亮	東京大学大学院	助教授
立花 章	京都大学放射線生物研究センター	助教授
木村成道	(財)東京都老人総合研究所	部長
安本 茂	神奈川県立がんセンター	研究課長
田中憲徳	(財)食品薬品安全センター研究所	副部長
執印太郎	高知医科大学	教授
島田 裕	京都大学医学部	講師
井口東郎	国立病院九州がんセンター	内科医長
柳原五吉	国立がんセンター研究所	省令室長
永森静志	杏林大学医学部	教授
小林真一	聖マリアンヌ医科大学	教授

ヒト細胞の識別

動物細胞とヒト細胞の区別

3. 情報の提供
4. 細胞管理におけるコンピュータシステムの開発・維持・管理
5. 倫理的課題の検討

1. 細胞の収集

細胞の収集はヒト細胞を中心に収集する他、疾病モデル動物から樹立した細胞も収集する。ヒト細胞は、がん由来する細胞ならびに正常細胞を収集する。特にヒト細胞は病院関係者でないと入手が困難なため、主に分担研究者によって進められている。また年間2-3件の自発的な寄託がある。

2. 細胞の品質管理

培養細胞は、その特質から培養条件下では様々な誤謬の発生が避けられない場合がある。そのため、細胞バンクでは寄託を受けると、重要項目についての詳細な検査を実施するが、これを品質管理と呼んでいる。重要な検査項目は、①細胞が他の細胞と入れ替わっていないかどうか（クロスコンタミネーションの有無）、②マイコプラズマによって汚染されていないかどうか、の2点を重点項目とする他、必要に応じて寄託細胞の特徴の確認も実施する。本研究は上記品質管理の結果を整理し、問題点を明らかにすることを主な研究目的とする。

A. 研究目的

当該研究は、厚生労働省の補助金によって実施されている数多くの生命科学研究ならびに医学・薬学研究を支援するために、研究に不可欠な研究資源のうち特にヒト及び動物に由来する培養細胞研究資源の収集・保存・管理・供給システムの整備と発展を目的としている。そこで本研究班は次の課題を設定して総合的に研究を実施するものである。

1. 細胞の収集
2. 細胞の品質管理
マイコプラズマ汚染の排除

3. 情報の提供

研究者に細胞を提供するにあたっては、細胞に付随する様々な情報を同時に提供する。多数の細胞を保有する細胞バンクにあっては、そうした情報を日常的に管理するシステムを構築し業務の効率化を図ることが必須である。また、情報の内容は時代と共に変化するので、情報システム自身を時代と共に修正し構築しなおさなければならず、これも研究の一環と考えている。

4. 細胞管理のためのコンピュータシステムの開発・維持・管理

細胞バンクでは業務の円滑化を図るために、独自のサーバコンピュータを設置し、バンクで発生する文書、データベース、ならびに報告書などを厳密に管理している。このうち、培養細胞の情報については、細胞バンク設立当初(1985年)よりデータベース化しきており、大量の情報が蓄積されてきた。しかし、一方で時代と共にコンピュータも改良され大きく変化してきている。そのため、基本システム(OS)に合わせてハードウェアや培養細胞情報の管理プログラムも適宜改良する必要にさらされる。さらに、新しい品質管理を導入する場合には必要に応じて、新たなデータベースの構築と既存のシステムとの連携も求められる。こうした課題も情報管理関連の研究課題と位置付けている。

5. 倫理的課題の検討

ヒト培養細胞を取り扱うに際しては、細胞提供者の人権を侵さなく、有効に研究利用することが必要である。それには、国民の意識や疑問に対して絶えず耳を傾け、バンクにおける個人情報の取扱が適切であるか否か等様々な問題を常時検討しなければならない。そうした点については、研究倫理として細胞バンクにおける新しい研究課題として敢えて取り上げることにした。

B. 研究方法

1. 細胞の収集

細胞の樹立並びに収集は主に分担研究に依存している。細胞ごとに実験方法等が異なるので、分担研究報告を参照されたい。

個々の分担研究者から細胞の寄託を受ける場合は、細胞に付随する情報として文献情報等を重視

している。そのため、細胞の寄託に際しては、分担研究者からまず寄託予定細胞のリストと各細胞に関連する培養法、樹立経過、基本性質などに関する情報を文献のコピーと共に入手する。これらの情報を元に細胞の1つ1つに管理番号を発行し、その管理番号を基準にして細胞に関する情報をデータベースに記録し、必要情報が全て入手できたことを確認する。その後、データベースに入力したデータをWEB用にhtmlファイルに変換して出力し、これを管理用ホームページに公開する。これを細胞寄託者が確認して修正を施した後、細胞の送付(寄託)を依頼する。

送付された細胞は、バンクに到着後培養を開始し、次項で述べる品質管理実験を実施し、入手した情報と相違ないことを確認する。

2. 細胞の品質管理

培養した細胞については、原則として培養する度に、①マイコプラズマによる汚染、②ヒト細胞ではSTR-PCR法による個別識別、③動物細胞とヒト細胞の混同確認するアイソザイム分析の3点に関する実験を必ず実施する。

①マイコプラズマ検査、除染

マイコプラズマに対する汚染検査は、培養細胞の上澄1-200 μ lをVero細胞の培養に接種した後24時間培養してから固定し、蛍光色素であるヘキスト33258で染色して蛍光顕微鏡で観察する方法(染色法)とRT-PCR法を用いてマイコプラズマの16SRNA遺伝子を検出する方法(PCR法)の2つの方法で確認する。いずれの方法によっても陰性と判定された場合にマイコプラズマの汚染は無いものと認定する。どちらか一方又は両方で陽性と判定された場合は陽性として取扱い、再検査で再現性を確認した後、必要に応じて除染を行う。

2法の併用によりマイコプラズマ汚染が確認された場合には、該当細胞の汚染を除去する。マイコプラズマは通常の抗生物質では除去が困難であるため、その有効が確認されている薬剤、MC210(大日本製薬)を添加して1-2継代培養して除去を実施している。昨年の本報告で、除染の確認後、さらに30継代の継代培養を実施して、汚染マイコプラズマの再出現が無いことを確認してきたが、過去数十の事例において一度も再出現は無かったので、本

年度よりこの30継代の連続培養による確認作業は中止することとした。

② STR-PCR 実験

ヒト細胞の識別にはSTR-PCR法を用いた。STR-PCR法に使うプライマーはプロメガ社のパワープレックス1.2システムを使用した。このシステムが検出するローカスは2番染色体TPOX(2p23-2pter)、5番染色体CSF1PO(5q33.3-34)、5番染色体D5S818(5q21-q31)、13番染色体D13S317(13q22-q31)、7番染色体D7S820(7q)、16番染色体D16S539(16q24-qter)、12番染色体vWA(12p12-pter)、11番染色体TH01(11p15.5)、XY染色体Amelogenin(Xp22.1-22.3 and Y)である。これらのローカスに対応するプライマーにより増幅される塩基配列の長さを測定して細胞の多様性を測定した。DNAの抽出にはSchleicher & Schuell Biosciences社のIsoCode, DNA archive Matrixを採用し簡便化を図った。測定した結果は、ピーク出現位置にピークが検出された場合を“1”、検出されなかった場合を“0”として、細胞ごとにデータを整理してデータベース化した。2004年2月現在、JCRB細胞バンクで確認したヒト細胞はほぼ500種類に達し、保有しているヒト細胞のほぼ全ての検査を完了し、ヒト培養細胞識別データベースにデータを登録した。

③ アイソザイム分析

ヒト以外の動物細胞ではSTR-PCR法による識別が出来ないので、旧来より利用してきたアイソザイムを分析して由来動物種のみ判定をしている。

凡そ 10^6 の培養細胞をハーベストして1mlのバルビタール緩衝液に浮遊し、細胞を超音波破砕した後遠心上澄を粗抽出液としてその1ulを電気泳動する。泳動後LDH(Lactose Dehydrogenase)、NP(Nucleotide Phosphorylase)、G6PD(Glucose-6-phosphate Dehydrogenase)の基質を使用して各酵素を発色させて各酵素の移動度を測定し、動物種を判定する。

3. 情報の提供

細胞バンクでは、内部における情報の管理と外部に提供する情報の管理の2点についてコンピュータを積極的に利用した管理システムを細胞バンクの設立当初より導入してきた。主にPC系のコンピュータシステムを採用し、サーバにはLINUX

をOSとして利用している。内部管理用には細胞とそれに付随する情報をデータベース化して管理している。コンピュータの性能の更新、プログラムやシステムOSの更新等をタイムリーに実施しなければならない。また、新しい品質管理項目が発生した場合は積極的に対応するデータベースを作成することを試みている。本年度は、昨年末にほぼ完成した細胞識別用データベースの本格的運用が始まり、データの蓄積を積極的に推進した。さらに、染色体の構成を示す画像情報がコンスタントに得られるようになったので、その画像データを保存する運用システムを構築している。これらの内部管理用のデータベースは設立当初より使用しているdBASEIV(II)を使用してデータの蓄積を図っているが、データベースの運用にはGUIを導入し、Delphi 5.0を使用してプログラムを更新している。プログラムのコーディングには時間を要するので、プログラム開発メーカに外注依頼しているが、業務の変更等によって生じるマイナーな手直しは、主任研究者自ら実施している。

内部で蓄積している管理用のデータを元にして外部の利用者に向けた公開用データベースを独立させ安全性を確保している。特に、コンピュータネットワークの普及に伴い、業務に利用している管理用データベースは外部から保護することは必須である。そのため、外部に提供するデータは、Delphiによるhtmlファイル自動作成ルーチンにより、データの更新と同時に作成し、常に最新の情報を提供できるよう配慮している。

4. 細胞を管理するためのコンピュータシステムの開発・維持・管理

コンピュータシステムは時代と共に変遷してきたが、現在ではLINUXを使ってサーバを構築している。基本的に、コンピュータ管理のためのOSに関する情報を日常的に収集し必要に応じてサーバの再構築等を実施することは重要である。

5. 倫理的課題の検討

ヒトに由来する培養細胞に関連する倫理課題に関連する情報を国際的に収集し整理しなければならない。それらを参考にしつつ、わが国の細胞バンクとしてのヒト細胞の収集の方法、取り扱い方について当を検討を加える。主に資料の収集と管理

が倫理的課題に関連する研究方法となる。

(倫理面への配慮)

細胞バンクは、ヒト細胞を扱う中核研究機関として、その倫理面は研究対象の課題として位置付けている。遺伝解析等を目的としたヒト研究資源の利用には利用者が所属する各研究機関の倫理委員会の審査が必要である。細胞バンクにおいては、クロスコンタミネーションの防止策としてSTR-PCR法を導入して遺伝子解析を進めているが、培養細胞は匿名化されており提供者個人とのリンクは既に無い。また、既に多くの論文発表が成されており、公的資源として認められた材料である。このような公的研究資源に関する妥当性についてはガイドライン等では十分に定められているとは言えず、独自に検討を進める余地が残っている。そのため、これを重要な研究課題と位置付けることにした。

C. 研究結果

1. 細胞の収集

本研究班は厚生労働科学研究の将来の動向を見極めながら収集する細胞の種類に関するアウトラインを定め、それに沿った細胞の収集を推進する。過去50ほどの生命科学研究は遺伝子の構造と機能に関する研究を飛躍的に発展させ、今やヒト遺伝子の全塩基配列が決定された。その結果、様々な疾病が遺伝子上の塩基配列の差異によってもたらされることが明らかになってきた。そこで、現在ヒトの健康に関連する多くの研究は、ヒト遺伝子に生じる異常とその発現形式との相関を明らかにすることに主眼がおかれている。そして、遺伝子の発現はタンパク質を同定することやそれに起因する細胞の異常を追求する方向が中心となっている。ここ暫くは、明らかになった塩基配列と細胞の異常との相関を決定する研究が重要な研究課題となると思われる。このような中で、ヒトに由来する細胞に対する需要は今後暫くはさらに増加するものと思われる。そこで、当該研究班はヒトに由来する培養細胞を中心に収集し、多くの研究者に提供することに重点を置くものである。

しかし、ヒトに由来する細胞は、それが個人に由来する遺伝情報を含む実体であることから、ヒトの全塩基配列が確定したことを受けて、個人の遺伝情報の保護という課題が研究倫理の重要課題と

して浮上し、2000年頃より議論が活発になってきている。しかし、ヒト細胞は一般の生命科学研究者が入手することは困難で、病院の医師を通じて入手しなければならない。とは言え、個々の研究者が医師と直接交渉をして細胞を入手するのは、情報の秘匿等闇に隠れた部分が増え、好ましい入手方法とは言えない、しかし、一方でヒトの細胞を使用した研究は重要であり、今後とも多くの研究者にヒトを対象にした研究を進める必要もある。この間を結ぶのが細胞バンクであり、倫理問題や材料の透明性を維持してヒトを対象にした生命科学の推進を支援する組織として構築されなければならない。

従って、本研究班は、個人情報保護を含む倫理的課題を研究して具体的な手順を明確化すると共に、医師としての肩書きを持つ研究者の参加を得て、ヒト由来細胞の収集に努める。

一方、ヒト細胞においてはがん組織に由来する細胞は樹立が容易であるが正常な組織の樹立は困難である。そのため、正常細胞に由来する細胞の収集とがん細胞の収集とは異なる分担研究者に依頼している。また正常組織の場合は、分譲方法が通常の株化細胞と異なり手のかかるものが多いため、ユーザへは分担研究者からの直接送付システムを採用している。

平成15年度細胞登録状況

平成15年度に収集した細胞は下記の一覧表に示した50種類の細胞である。このうちの大部分はヒト由来の細胞であり、その大部分は日本人に由来する細胞株である。また、多くは癌患者に由来する株化細胞であるが、正常2倍体の性状を示す初代培養細胞系が次々と枯渇している状況を鑑み、新たにTIG系の正常2倍体細胞系4株が新規に登録された。

細胞番号	細胞名	動物名	登録状況
JCRB0541	TIG-111	human	登録完了
JCRB0542	TIG-120	human	登録完了
JCRB0543	TIG-110	human	作業中
JCRB0544	TIG-3S	human	作業中
JCRB0545	SH-SY5Y	human	作業中
JCRB1020	RERF-LC-Ad1	human	登録完了
JCRB1021	RERF-LC-Ad2	human	登録完了
JCRB1024	Kasumi-6	human	登録削除
JCRB1035	HSC-41	human	登録削除

JCRB1036	HSC-42	human	登録削除
JCRB1037	HCC-56	human	登録完了
JCRB1038	PH61-N	human	登録削除
JCRB1039	SKN-3	human	登録完了
JCRB1040	FF101	rat	作業中
JCRB1042	BSL2KA	human	作業中
JCRB1043	OVISE	human	登録完了
JCRB1044	OVKATE	human	登録完了
JCRB1045	OVMANA	human	登録完了
JCRB1046	OVSAGO	human	登録完了
JCRB1047	OVSAYO	human	作業中
JCRB1048	OVTOKO	human	登録完了
JCRB1049	OVMIU	human	作業中
JCRB1050	OVMIU-II	human	作業中
JCRB1054	Hep G2	human	登録完了
JCRB1055	XP30S(SVT)	human	登録完了
JCRB1056	CS20S(SVT)	human	登録完了
JCRB1057	XP39OSTERT	human	登録完了
JCRB1058	XP40OSTERT	human	登録完了
JCRB1059	CS2AWTERT	human	登録完了
JCRB1060	FA9JTOTERT	human	登録完了
JCRB1061	BS2CHTERT	human	登録完了
JCRB1062	JHH-1	human	登録完了
JCRB1063	KYSE140	human	登録完了
JCRB1064	KYSE110	human	登録完了
JCRB1065	Ki-JK	human	登録完了
JCRB1066	KMH-2	human	登録完了
JCRB1067	CPT-K5	human	登録完了
JCRB1068	IRC-2	human	作業中
JCRB1069	NOMO-1/ADM	human	登録完了
JCRB1070	HSG	human	登録完了
JCRB1071	KMRC-20	human	登録完了
JCRB1072	TCC-PAN2	human	作業中
JCRB1073	ASH-3	human	登録完了
JCRB1074	FU97	human	登録完了
JCRB1075.0	IM95	human	登録完了
JCRB1075.1	IM95m	human	登録完了
JCRB1076	NS-3	human	登録削除
JCRB1077	DD-762	mouse	登録完了
JCRB1078	TMH-1	human	登録完了
JCRB1079	IHH-4	human	登録完了

これらの細胞のうち、JCRB1024:Kasumi-6は、登録後細菌の汚染が明らかになり登録を抹消した。ここで発見された細菌は、通常の細菌汚染とは異なり増殖速度が極めて遅いシュエドモナス属の細菌であったことから発見が遅れたが未だ除去方法が確定していないので、現段階では登録を断念し削除した。当該細菌による汚染はバンクとしては初めての経験であったため分担研究者、原澤の協力を得て菌の特定等を行った。

また、JCRB1035:HSC-41, JCRB1036:HSC-42,

JCRB1038:PH61-N, JCRB1076:NS-3の各細胞は、クロスコンタミネーションが明らかになったことと、クロスコンタミネーションを生じている細胞の由来を明確に出来なかったため、登録を末梢した。この結果、今年度に新たに登録した細胞は、現在登録へ向けての作業中にあるものも含めて40種となった。

2. 細胞の品質管理

①細菌ならびにマイコプラズマ汚染

わが国の多くの研究者によって利用されている培養細胞に対して、諸外国の研究者からかねてよりマイコプラズマによる汚染が多いことが指摘されてきた。次のヒト細胞の識別の項目でも指摘されているようにクロスコンタミネーションが比較的多いという事実とも合わせて、わが国の研究者はこの問題を十分に自覚する必要がある。しかしながら、迅速な研究成果を求められる現在の研究体制においては、直接の成果にはならない細部にわたる細胞の品質管理を個々の研究者に背負わせることは大いに問題もあるように考えている。そこで、細胞バンクの役割が大変に重要になる。そうした汚染やクロスカルチャーコンタミネーションの無い細胞資源を提供し、さらに、そうした問題を細胞バンクが除去していることに注意を促して提供する体制を確立することが極めて重要であると我々は考えている。

こうした点を念頭において、JCRB細胞バンクでは、徹底したマイコプラズマ検査を実施し、汚染を認めれば迅速に除去を実施して公的資源としての培養細胞研究資源の管理を実施するものである。

こうした努力が功を奏しているようでもあり、近年収集した細胞がマイコプラズマに汚染されているというケースが徐々に少なくなりつつあるような印象を受ける。年間約30-40種の細胞を入手して培養しているが、マイコプラズマに汚染されている事例は数例に留まっている点は評価されて良いかもしれない。

ただ、マイコプラズマに対する多くの研究者の意識は必ずしも高いわけではなく、一般的な抗生物質、即ちペニシリンやテトラサイクリンを添加しておくだけで、マイコプラズマ汚染を防止できると信じている研究者が散見されるのは大変残念なことである。そもそも、マイコプラズマは通常の

細菌と異なり細胞壁を持たないため、そこをターゲットにしているペニシリンはマイコプラズマの除去に効果があるわけではない。また、安易に抗生物質を継続的に添加していれば耐性菌が出現して、結果的に一般細菌も含めて汚染細菌の除去ができていないという事態をももたらすのである。

今年度は、細菌による汚染にも目を配らなければならないことを痛感させる事例に遭遇した。通常、培養細胞に一般細菌が混入すればその増殖速度は速いのが通例で、あえて抗生物質を添加しないで培養している細胞バンクでは、一晩で細菌が増殖し細胞の培養を駄目にしてしまうのが普通である。年に1-2回細胞バンクにおいてもこうした汚染が発生することはあるが、その制御は完璧で、汚染された細胞の培養を滅菌して廃棄することによって発生した汚染をバンク内部に広げてしまう事態となることは無いのである。特に、細菌による汚染の場合、一般的には目視によって容易にその事実を見分けることが可能であるため、むしろ問題が後に引くことは無いという考えが支配的であった。

しかし、本年は細菌の汚染について新しい経験をしたのでそれについて紹介しておく。平成13年度に放射線影響研究所から寄託されたKasumi細胞については既に品質管理を実施し、マイコプラズマ汚染の除去を完了し、細胞の相互汚染も無いという結果を得ていた。

しかし、培養中に注意して顕微鏡観察をすると黒い微粒子状の点が観察されることが寄託時より指摘されていた。しかし、これは細胞の増殖と共に増殖しているように見えなくもないが、一般細菌が汚染した場合のように急激に増殖することはなく、培地の目視観察においては汚染があるという判断には至らなかった。勿論、マイコプラズマ検査では陰性の結果が得られており、そうした点からもこの黒い微粒子状のものが汚染微生物であるとも考えにくかった。しかし、培養担当者はこの黒い微粒子が気に入り、顕微鏡観察をいっそう丁寧に行い、その結果培養経過に従って、僅かずつではあるがやはり増加しているらしいという結論に至った。そこで、当研究班の分担研究者である原澤が微生物学の専門家なので、この細胞を送付し、電子顕微鏡観察や嫌気性菌培養法などを駆使して詳細な検査を依頼したのである。その結果明らかになっ

たことは原澤の研究報告書に述べられているが、微生物特有の培地を使って培養し、16SRNA等の塩基配列の分析や電子顕微鏡による形態学的分析などを実施した結果、明らかにシュードモナス属の細菌の混入であることが判明した。またこの細菌を純培養することに成功し、増殖の様子は動画に撮影した。インターネットならびに動画撮影技術や静止画像撮影技術等の発達にともなって、地理的に離れた施設との間で容易にこうした動画や画像情報を共有することが可能になったので、汚染微生物による予期せぬ汚染の拡大を抑止することが可能になったと言える。

当該細胞に観察された黒い微粒子が増殖して細胞を完全に覆ってしまうのであれば、直ちに汚染と判定されるのであるが、僅かにしか増殖しないことや培地を観察しても濁りが見えないことなどから、直ちに汚染と断定することは困難であったが、原澤の研究室において様々な方法を駆使して培養に成功したことから、汚染菌種の特定に成功したものである。

現在、この細菌については、通常研究室で使っている抗生物質では除去に成功していないため、現在該当細胞の登録は未梢した。

この汚染は、培養を担当している職員の丁寧な観察により発見されたものであるが、現在までのところ、Kasumi細胞以外の細胞では、観察された事例は無いので貴重な経験をしたことになる。今後は、除去方法についても検討を加える必要があると思われる。

なお、マイコプラズマの汚染が怖いのは、一般細菌による汚染とは異なり、マイコプラズマ自身の増殖力が極めて弱いため、培養細胞と共存してしまう点にあり、今回始めて観察したシュードモナス属の汚染細菌にも共通する問題である。

②ヒト細胞の識別・STR-PCR法による遺伝子分析

ヒト培養細胞の識別実験と結果のデータベース化

我々は、1984年に細胞バンク事業を開始して以来、多数のヒトに由来する培養細胞の中に誤りが発生しているのではないかと危惧を持っていた。微生物材料を用いる研究とは異なり、培養細胞の場合は実験に先立って確認する実験方法が当時は無かったからである。実際、遺伝子に関する知識

は蓄積していたとは言え、細胞バンク事業が開始された1985年ごろは塩基配列を決定する手法がようやく実用化されつつあった時期で、塩基配列情報を培養細胞の遺伝的背景を調査する目的に利用するほど実験は簡便ではなかった。多種類の細胞の遺伝学的背景を確認する目的にルーチン作業として塩基配列決定手法を使えるほど簡便な実験手法には至っていなかった。しかし、一方で、当時既にATCCは長い時間をかけて行ったアイソザイム分析や染色体の核型分析により、新たに樹立されたとされた多くのヒト培養細胞が実はHeLa細胞だったという事実を公表していた。これはアイソザイム、染色体、細胞形態など様々な指標を利用しながら時間をかけて明らかにしてきたことであり、培養ごとに細胞を確認することは当時まだ不可能であった。また、細胞の識別に使用する指標もHeLa細胞という特殊な細胞のみを対象として他と区別出来るだけで、HeLa以外の細胞間で発生していると推定されたクロスコンタミネーションを検出することは不可能であった。従って、HeLa細胞以外のクロスコンタミネーションがどれくらい発生しているのかという疑問は、多くの細胞バンク関係者にとっては解決手段が無い大きな疑問として持ち越されていたのであった。

しかし、我々が細胞バンク事業を開始してすぐ、1985年に英国のJeffreysらは、DNAフィンガープリント法を報告し、DNAの非転写領域にある塩基配列が指紋のようにヒトの一人一人を個別に識別する目的に利用できることを明らかにした。この報告を受けて、我々もいくつかの識別用プローブを開発し、クロスコンタミネーションを調査し、DNAプロファイリングを実施し、Molt4並びにHL60細胞の2種類の細胞とクロスコンタミネーションしていた事例を発見した。しかし、当時はまだ収集したヒト培養細胞の数は少なかったため実施が可能であったが、実験手法はサザンブロッティング法と放射性同位元素を使用したDNA-DNAハイブリダイゼーション法を使わざるを得なく、ルーチン作業として継続的に検査を実施するのは大変困難であった。従って、上記2種の細胞がクロスコンタミネーションをしている事例を発見した後、継続的な調査は中止したままであった。

その後、STR-PCR法が開発されてヒト細胞の迅速な識別が可能になり、現在のようにクロスコンタ

ミネーションの検査を継続的に実施する体制を確立することができた。我々は、この方法を1999年より取り入れて、細胞バンクとしてのシステムを確立してきたが、国際的に見ても極めて早い段階で調査を開始したことになる。その中核的な考え方は細胞を培養する都度STR-PCR実験を実施するという点である。この結果得られる多くのデータを他の細胞のパターンと比較して同じパターンが出現するか否かを確認する作業が重要になる。この作業を、実験の結果得られるグラフを直接見比べて行おうとするとその作業量は膨大なものとなる。また、データ数が増加するに従って確認に要する時間は増大し、結果として頻繁に実施できる検査とはなりえない。そこで、我々は、この検査を迅速に実施するためにSTR-PCR実験に使用するローカスを9種に限定し、実験結果を数値化してデータベースとする必要があると考えた。

これにより、データ入力を効率良く迅速に実施できれば、比較はプログラムが瞬時に実行するので短時間でクロスコンタミネーションの有無を判定できることが可能になると考え、実験のデザイン、結果のデータベース化、実験実施後の比較プログラムの作成を行い、培養細胞個別識別システムを構築した。

実験はで、約 10^6 の培養細胞からDNAを簡易抽出し、それを2種類の蛍光色素で標識した2種のプライマーセットを使ってPCR実験を実施する(PowerPlex™ 1.2 System, Promega Co. USA)。HeLa細胞を例にし、PCRで増幅したサンプルをシーケンサーで分析すると図1の結果が得られる(図1 a, b)。9種のプライマーは2群に分類されそれぞれ異なる蛍光色素と結合しているため、1回の分析によって2枚のグラフ(図1 a, b)が得られる。即ち、9種のローカスに関するデータが1回の実験で得られるのである。

図1 a, b各グラフの上段はサイズマーカーで、下段のピークの位置を特定するためのリファレンスとなる。ピークの位置はコンピュータで自動計算され、各ローカス中の検出ピーク位置としてこのグラフ(図1 a, b)に出力される(四角で囲まれた数値)。国際的な表記法としては”ローカス名:位置(例、D5S818:9, 13)”が用いられるが、データベースには後のプログラム開発に配慮して、ピークが検出された位置を1、ピークが検出されなかった

図 1

(a:左、b:右)

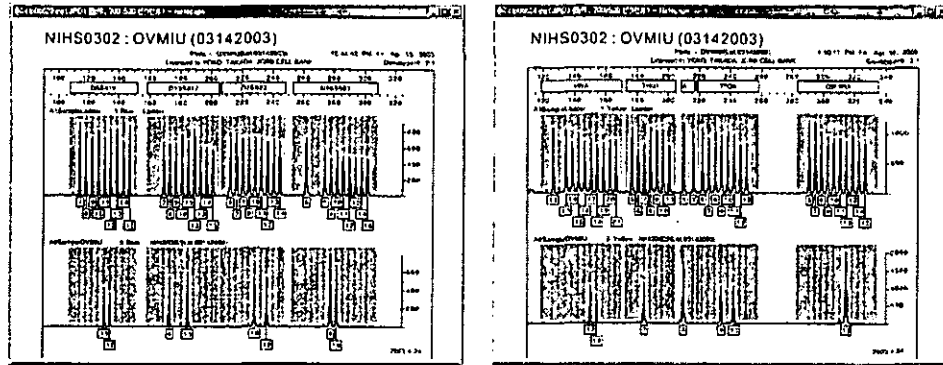
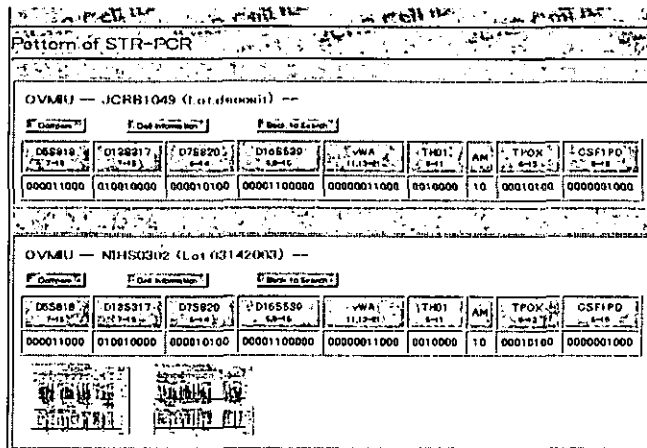


図 2



位置を0として、0と1に数値化して記録することにした(図2)。また、各ローカスで検出される可能性がある最初の位置をプロメガ社のデータを元に決定した。

データベースは図2のように1と0のパターンとして記録し、ピークの高さは考慮しない。データベースには1つの実験について1つのレコードを作成した。そこで、このデータベースから、任意のレコード(細胞)を1つ取り出し、その0と1のパターンを他のレコード全てと比較した。比較元のデータと同じパターンが得られるか否か、同じパターンとなった場合にはどの細胞と一致したかを特定することを目的に、プログラムの開発を実施した。元になるデータベースは、現在使用している細胞バンク管理システムの中で管理することを条件としてdBASEファイルを採用しDelphiで管理プログラムを作成した。このデータベースをstrdata.dbfと

し、これは細胞バンクの外には直接は公開しない。しかし、公開可能なデータは公開用フラグを付けて管理し、必要に応じて公開用にHTMLファイル化して出力可能にした。公開する場合は、テキスト形式で出力してから外部公開用サーバに移動し、WEBを通じて提供することにした。データのみ公開しても利用しにくいことを考慮し、このデータを使って細胞の相互比較を行うプログラムをPerl言語で開発し、これを公開用のホームページを通じて誰でも利用することができるようにした。そのため、細胞バンク外の研究者も元データには直接触れることなく、セキュリティーは十分に維持しながら細胞バンクで蓄積したSTR-PCRデータを多くの研究者が利用できるようになった。

任意に取り出した2種の細胞が一致するか否かは、識別データベースの0、1のパターンを次の式により計算してその値から判定した。計算結果は評

価値 (Evaluation value, EV) と名付けた。2種の細胞における”1”の出現位置が一致した場合の数を2倍したものをそれぞれの細胞で検出された1の総数で割ったものがEVである。

$$EV = \frac{2 \text{種の細胞間でのピークの一致数} \times 2}{\text{細胞Aのピーク数(1の数)} + \text{細胞Bのピーク数(1の数)}}$$

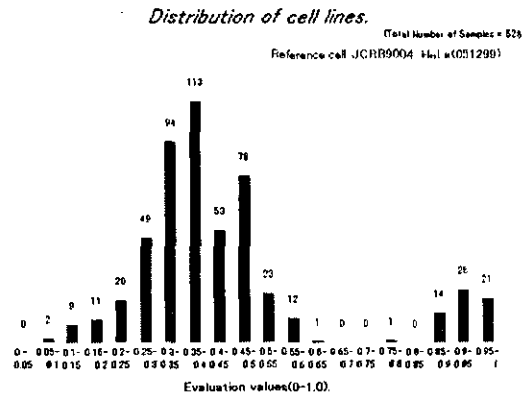
2つの細胞のパターンが完全に一致した場合にEVの値は1.000となる。また完全に不一致の場合(どの”1”も一致しなかった場合)は0.000となる。

確認した(論文作成中)。

また、互いに無関係である細胞(独立した細胞)の場合には、EV値の値は今までのところ最大で0.750を越えていない。この結果からこの実験系で細胞は十分に識別できることが明らかになったと考えている。さらに識別結果を確定するためにヒストグラムを作成して判定の助けとした(図3)。

図3はJCRB9004:HeLa細胞のSTR-PCRパターン元にして526種類のヒト細胞と比較した結果である。グラフの右端に出現したピークがEV値0.85以上のピークで、HeLa細胞に由来する細胞群である。

図3



実験結果は大変再現性が高く、異なる日に異なる研究室で行った実験結果を比較することも可能であり、例えばATCCで公開しているデータをそのままこのデータベースに入力した場合でも同一細胞ではEV=1.000という結果が得られた。

従って、データベースは極めて汎用性が高く、どこの研究室でもこれと同じプライマーセットを使っている限り利用可能である。

このデータベースの汎用性を確認するために、多くの異なる研究室で利用されてきたHeLa細胞とその亜株を多数収集して実験を繰り返し、結果をデータベース化して比較検討した。その結果、HeLaとその亜株間でのEVが最大で0.84程度に低下することがあることがわかった。ここから得られた疑問は、同じ細胞であるにもかかわらずEV値が低下するのは広範囲に観察されることなのかあるいは特定の細胞に限って観察されるのかという点と、その理由である。これについては詳細な検討を染色体の分析と組み合わせを行い、ある種のHeLa細胞の亜株では染色体の変動が極めて激しいことを

EV=0.65以下の領域に出現する大きなピークはHeLa細胞とは明らかに異なる細胞と判定される。しかし、EV=0.75からEV=0.8の領域に1つの細胞があることがわかり、グラフと数値からだけではこの細胞がHeLaと判定することが出来るか否かが不明である。しかし、実はこの細胞はJCRB9010:HeLaS3細胞であり、この実験を開始した当初初めて得られてデータであり、出現したピークの高さが低いピークについての判定の仕方が不明確であったため、現在とは異なる基準でパターンを作成したというデータであった。そのため、本来検出されなかったピークとして判定すべきものを検出と判定したり、1塩基のピークシフトを考慮に入れなかったりという問題が後に明らかになったものである。ここにこのようなデータを残しているのは、むしろ、そのような判定の未熟さが結果を狂わせる可能性がある点に注意を向けるために残しているデータである。このような事例は、少数ながら時々現れることがあるが、そのような場合はさらに染色体の分析や細胞の形態等、他の実験方法を取り入れて

表 1. 寄託された卵巣がん細胞の個別識別結果

細胞番号:細胞名	病期	採取部位	組織型	樹立年月日	個別識別結果(*)
NIHS0296:OVISE	IIb	骨盤転移巣	明細胞腺癌	1988.12.19	ユニーク
NIHS0297:OVKATE	IIIc	原発巣	腺癌	1991.12.24	ユニーク
NIHS0298:OVMANA	IV	原発巣	明細胞腺癌	1991.06.20	ユニーク
NIHS0299:OVSAHO	IIIc	腹腔内転移巣	腺癌	1991.06.25	ユニーク
NIHS0300:OVSAYO	Ic	原発巣	腺癌	1992.11.27	OVMIUと同一
NIHS0301:OVTOKO	IIIb	脾転移巣	明細胞腺癌	1990.08.17	ユニーク
NIHS0302:OVMIU	IIIc	原発巣	腺癌	1998.07.13	OVSAYOと同一
NIHS0303:OVMIU-II	IIIc	再発巣	腺癌	1998.10.14	ユニーク

(*) 個別識別は細胞バンクにおいて実施した。

最終的な判断を下すのが妥当であると考えている。こうした経緯を経て、STR-PCR法によりHeLa細胞とそれ以外の細胞を十分に区別できることや他の細胞にも適用できることを示していると結論した。

この中で、NIHS0302:OVMIUのケースと、IF050079:Flow7000のケースは、その経緯が興味深いので、以下に詳細について紹介することとする。

ヒト細胞のクロスコンタミネーション

以上、示したように確立したSTR-PCR法による細胞識別システムを利用して1999年より細胞識別実験を実施する体制を確立した。そして、収集した多数のヒト培養細胞についてクロスコンタミネーションの有無を調査してきた。その結果、本年度までに明らかになったクロスコンタミネーションと判定された細胞は表1に示した24種の細胞である。本年度は、NIHS0302:OVMIUとOVSAYO、JCRB1038:PH61-NとMTA PaCa-2、JCRB0135:HSC-41とHSC-42、JCRB1070:HSGc-C5とHeLa、JCRB1076:NS-3とCOLO201、IF050039:NC-37とRAJI、IF050079:Flow7000とChangLiverの7種類にクロスコンタミネーションのあることが新たに発見された。このうち、JCRB1038:PH61-Nは、寄託者の誤りで正しいPH61-Nが存在していたため、それと入れ替えて正しい細胞を登録することが出来た。また、HSGc-C5は、既に10年以上重粒子線の線量の測定に利用されてきている細胞で多くの研究室において標準的に利用されてきた細胞である。そのため、これはHeLa細胞である結果が出たことを明記して、該当する名称で分譲を継続することとした(細胞の名称を寄託者と相談してHSGと変更することとした)。それ以外の細胞については、現時点ではそれぞれクロスコンタミがあることを明記して分譲しているが、いずれ、時期を見てカタログから削除する予定である。

8種のヒト卵巣がん細胞(OVシリーズ)の場合

昨年の報告以後も我々はSTR-PCR法を使用して細胞バンクに寄託され登録するヒト細胞については、必ずユニークであるか否かを確認するシステムを構築し、これをルーチン化して日常的に細胞のクロスコンタミネーションを監視する体制を確立した。

従って、JCRB細胞バンクに寄託されたヒト由来培養細胞は例外なくこのシステムによって他のヒト細胞と混同されていないかどうかを確認することが出来るようになった。また、確認の過程で発生するSTR-PCR実験の結果はデータベースに記録し、それ以降に寄託される細胞との比較検討に利用できるようにしている。このデータベースに記録されるデータ数が増加すれば、それに応じて細胞の識別精度が高くなる。今年度も新たなヒト細胞に由来するデータを蓄積し現在までに、500種類以上のヒト細胞識別STR-PCRデータベースが確立している。

本年度寄託を受けた細胞の中に、同一研究者により樹立された8種類のヒト由来卵巣がん細胞(OVISE, OVKATE, OVMANA, OVSAHO, OVSAYO, OVTOKO, OVMIU, OVMIU-II)がある(表1)。

これらの細胞株はがん由来の細胞であるが、同一の研究者が複数の患者から樹立したものとして価値があると思われるほか、OVMIUとOVMIU-IIについては、治療前後の細胞を同一患者から樹立した点で比較研究に貴重な細胞であると思われる。

細胞の寄託後、正式登録に先んじて培養を実施する過程で、品質管理実験を実施し、その1つとしてそれぞれの細胞がユニークであること、ならびにOVMIUとOVMIU-IIが同一パターンとなることを確認するためSTR-PCR実験を実施した。

その結果を各細胞の特徴と共に表1に示した。一番右の端がSTR-PCR分析の結果でそれぞれがユニークであったか否かを示している。

表に示されたとおり、8種類中6種類までがユニークな細胞であるという結果を得たが、当初の期待とは異なり、この8種類のうちOVSAYOとOVMIUが同一細胞であり、OVMIU-IIがユニークな細胞であるという結果を得た(表2)。表2のを作成するのに利用したデータは図1のように得られた。

図1のように得られたSTR-PCR実験の結果を0と1のパターンに変換したものが表2である。

OVMIU-IIはOVMIUと同一患者から採取したはずであり、本実験において同一の細胞であるとの結果が期待されていたが、結果は表2に示されたとおり、OVMIU-IIはユニークな細胞として同定された。この結果は、OVSAYOとOVMIU-IIが細胞を維持してきた過程で入れ替わってしまった可能性のあ

ることを示唆している。そこで、現在樹立者の研究室で保存されている細胞を遡って調査し、最も初期、樹立直後の細胞を探し出して、その細胞について同様な実験を実施しSTR-PCRパターンを確認しているところである。それによって、いつ頃細胞が入れ替わったかについて明らかになるものと思われる。

Flow7000細胞へのHeLa細胞混入事例について

JCRB細胞バンクには、発酵研究所の業務閉鎖によって管理が移管された著名な正常ヒト細胞のFlow7000(IF050079)が保存されている。本細胞はそれほど多くは無いがコンスタントに需要がある細胞であり、プライマリ細胞に分類され、現在では細胞寿命が増加し世界的にも枯渇しつつある。しかし、IF050079:Flow7000は、まだ若干の余裕があるため、利用者からの分譲依頼に応じている。現在、マスターバンクにはこの細胞について、シード細胞として、ロット193、ロット335、ロット336の3つのロットが保存されていた。これらのシードカルチャーは発酵研究所によって作成され、細胞の移管は2000年に終了して現在分譲可能細胞としてカタログに掲載している。

表2 OVMIUとOVSAYOの比較

Evaluation of cell individuality by STR-PCR methods									
CellNo.	CellName	LotNo.	EV	D5S818 7.515	D13S317 7.15	D7S820 6.41	2D16S539 6.8-15	AWA 1113-21-2	
NIHS0302	OVMIU	03142003	1.000	000011000	010010000	000010100	00001100000	00000011000	
JCRB1047	OVSAYO	deposit	1.000	000011000	010010000	000010100	00001100000	00000011000	
JCRB1049	OVMIU	deposit	1.000	000011000	010010000	000010100	00001100000	00000011000	
NIHS0300	OVSAYO	03182003	1.000	000011000	010010000	000010100	00001100000	00000011000	
NIHS0300	OVSAYO	deposit	1.000	000011000	010010000	000010100	00001100000	00000011000	
NIHS0302	OVMIU	deposit	1.000	000011000	010010000	000010100	00001100000	00000011000	
NIHS0342	OVSAYO	deposit	1.000	000011000	010010000	000010100	00001100000	00000011000	
NIHS0344	OVMIU	deposit	1.000	000011000	010010000	000010100	00001100000	00000011000	
JCRB9095	HEPM	051887	0.774	000011000	010010000	000010100	00000101000	00000010000	
JCRB1057	XP39OSTERT	deposit	0.710	000011000	001010000	000001100	00000101000	00000011000	
JCRB1057	XP39OSTERT	deposit	0.710	000011000	001010000	000001100	00000101000	00000011000	
JCRB0178.0	KP-3	09262001	0.667	000000100	001010000	000010100	00001000100	00000011000	

今年度もこの細胞に対するリクエストがあり HSRRB より分譲されたが、利用者から当該細胞の形態に異常が観察されるため細胞のクロスコンタミネーションの疑いがあるのでは無いかとの指摘があった。

それを受けて分譲を担当している HSRRB から STR-PCRによる検査を実施するよう依頼があったので、クロスコンタミが指摘された直接のロットに加え、保存していた他のロットについても検査を実施することにした。これら3ロットの培養記録を調査したところ、数年前に培養された際にこの Flow7000 の培養の担当者が同じ時期に Chang Liver 細胞を培養しているという記録が見出されたことであった。Chang Liver 細胞は、著名な HeLa 細胞のクロスコンタミネーションが発生した細胞であることから、あるとすればこれが混入した可能性が高いということとなった。

そこで、依頼に基づき、ロット 335 の凍結保存アンプルから直接 DNA を抽出して検査した。しかし、これは明らかに Flow7000 細胞のパターンであり、クロスコンタミを起こしているという徴候は結果から読み取ることはできなかった。

そこで、このシードカルチャーを培養し、培養経過を追って STR-PCR の検査を実施してみることにした。その結果を図 4 に示した。

図 4 の Day0 は培養開始直前で、CellID で確認した結果このパターンは Flow7000 のそのものであった。

この後、この Flow7000 細胞の培養を開始し、7日目と 14日目に DNA を回収して同じように STR-PCR 実験を繰り返して実施した。その結果は図の Day7 と Day14 に示した。図から明らかなように、Day7 の結果を見ると、明らかに Day0 のパターンとは異なっていることがわかる。

Day7 では、大きなピークと小さなピークが検出されていることがわかるであろうか。背の高いピークは Day0 とは明らかに異なっているが、これは HeLa のパターンと一致している。そして、背の低いピークは Day14 には完全に消滅しているが、図を良くみると Flow7000 のピークであることがわかるであろう。この結果、Day7 には Flow7000 と HeLa とが混在していたと結論した。

この結果は、この 14 日間の培養の過程で細胞の集団が Flow7000 から HeLa 細胞に入れ替わったことが読み取れ、その原因はごく少量の HeLa 細胞が混入したためであると説明でき、それは恐らく数年前にこの Flow7000 のロットを作成した担当者が Chang Liver を同時に扱っていた記録から、それが意図せず混入したことをうかがわせるものであった。

なお、Flow7000 は繊維芽細胞で、HeLa の上皮系細胞とは形態が異なるのでこの過程における細胞の形態についても同時に観察した (図 7)。その結果、細胞の形態からも培養 7 日目には HeLa 細胞と思われる上皮様細胞が多数観察されることが分か

図 4 IFO50079:Flow7000 (lot 336)

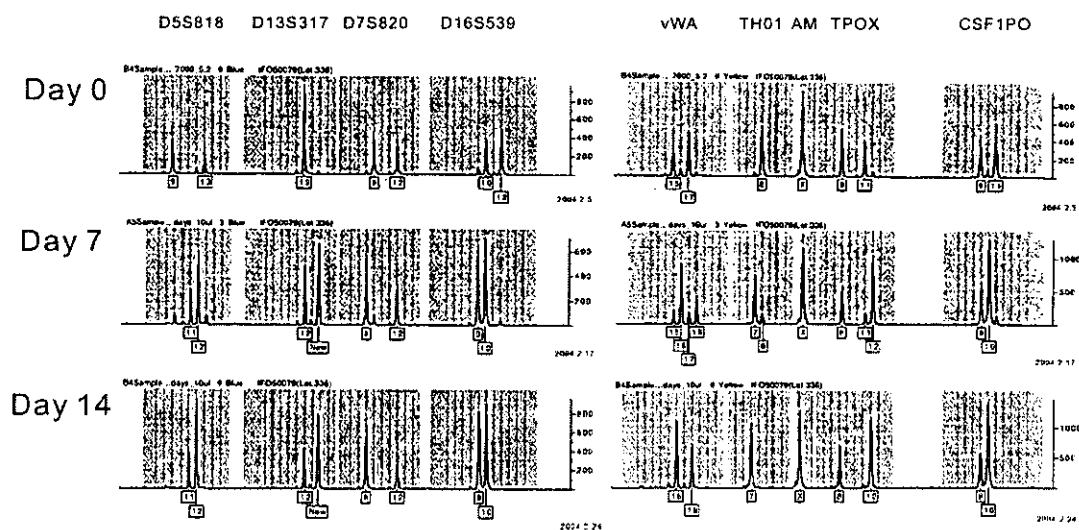
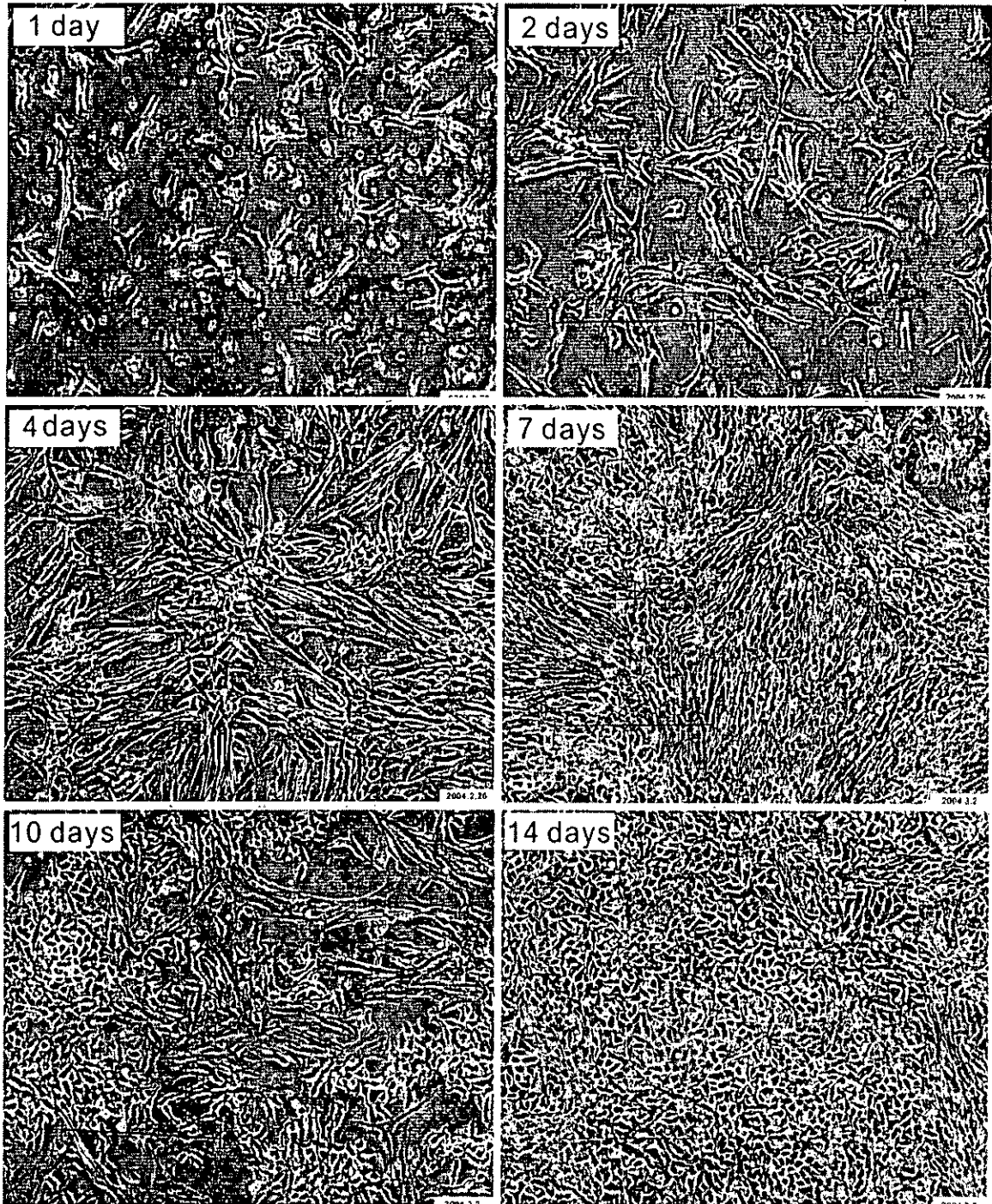


図5 IF050079:Flow7000、lot. 336 の培養



り、培養4日目から7日目にかけてFlow7000とHeLa様細胞が入れ替わったことを強くうかがわせる結果であった(図5)。

培養1日目から4日めまでは明らかに繊維芽状の細長い細胞が全体的に観察されるが、7日めには明らかに上皮様細胞が出現している。培養14日めにはほぼ全体が上皮様細胞で覆われている。図7のSTR-PCR実験の結果は、この培養で7日め14日めからサンプルを調整して分析した結果であり、上皮様細胞はHeLa細胞であるということが確認できた。

HeLa細胞の増殖速度はFlow7000の増殖速度と比べればはるかに早いことが既に知られていることと、このロット336を作成する以前にも一回以上継代培養しているため、ごくわずかの混入により入れ替わってしまったことは容易に理解できる。実は、このような事態はいつでもどこでも起こる可能性があるため、今回たまたま細胞バンクでこのような事故が発生したことについて敢えて報告するものである。

既に述べたように、IF050079:Flow7000は2000年以前に培養されて保存されていた細胞である。記録を調査した結果、この細胞を培養していた担当者(既に退職している)は、Flow7000を培養していた同じ時期に一方でChang Liver細胞を培養していたということが記録に残されていた。このChang Liver細胞は、現在ではHeLa細胞そのものであることが明らかになっており、今回検出したHeLa細胞はこれに由来するものであろう。

クロスコンタミネーションが発生する原因については色々指摘されているが、我々は基本的に次のような培地の取扱の中に原因があると考えている。今回の結果も、同時期同じ研究室内で培養されていた別の細胞が混入してきたという事実を考えると、この原因が最もありそうな原因であると考えられる。

現在、多くの研究室において培地は比較的大きな500mlの培地ビンで保管されていることが多い。また、培地の保管に冷蔵庫にカギをかけるという事はわが国ではあまり実行されていない。

一般的には、500mlの培地瓶に作成した培地は1回の培養で使い切ることは稀で、何回かに分けて使用する。そして、異なる種類の細胞であっても同じ組成の培地を使う場合は、保存している培地は他の細胞に使いまわされることが多い。また、多く

の研究室においては、培地を研究者間で融通して使いまわすということも比較的多く見受けられる光景である。

Flow7000細胞のロット335, 336を作成した時期は2000年以前であり、まだSTR-PCR法が導入されていなかった時期で、厳密なクロスコンタミネーションの管理は実施されていなかった。従って、当時細胞のクロスコンタミネーションに関する注意は現在ほど厳密なものではなかった。そこで、培地の使いまわしに対する注意は細胞バンクではかなり厳密に実施していたものの、実際に発生したという指摘が成されることが無かったために、培地の管理が若干甘くなっていたとしても不思議では無い。

この時期には、細胞バンクという業務を実施している研究室においてもこの点に対して強い懸念を抱いている者は少なかった。それでも、細胞バンクという業務の中での培養であることから、培養には相当の注意を払っていたことは確かであるにもかかわらず、こうしたクロスコンタミネーションが発生した。

相当注意を払いながら培養しているはずの細胞バンクですらこのような事故が発生したことを考えれば、細胞を利用するだけのごく普通の研究室では、かなり頻繁に発生する可能性が高いことは、一般の研究者の方々には是非理解しておいて欲しい点である。

現在では、STR-PCR法により、クロスコンタミネーションを確実に補足できる状況になったので、継続的に調査しているため、細胞バンクに細胞が寄託されれば確認できる。しかし、寄託しない細胞も多数存在すると思われるが、培地の管理等十分注意を払う必要がある。

JCRB細胞バンクでは、100ml単位で培地を作成し、他の細胞には絶対に使いまわさず、実験後残った場合は、廃棄するというルールを確立している。

一般的に、細胞培養を行う研究者は、細胞の混入(クロスコンタミネーション)やマイコプラズマなどの汚染の拡がりを避けるために注意を払ってピペット操作をおこなっている。最も厳しい注意としては、培養に接触させたピペットは絶対に培地ビンに戻さないというものであろう。全ての培養担当者はこの点は厳しく守っているはずである。

そして、これが守られていればクロスコンタミ

ネーションは発生しないと考えていた。しかし、ピペットから培養に培地を注ぎ込む際に、目には見えないほどの小さな水しぶきが上がるものであることは明らかで、ピペットを培養に接触させなかったとしても、ピペットの先端は細胞で汚染されていると考えるべきである。従って、ピペット操作ごとに必ずピペットを交換するか、1回使った培地は他の細胞に使いまわさないという原則を確立するのが重要である。恐らく、クロスコンタミネーションの原因はここにあるものと思われる。

JCRB細胞バンクでは、既に10年以上前から500mlの培地ビンの使用は取りやめている。必ず100mlの培地ビンに分注して保存し、使用後の残りは必ず廃棄して、別の細胞に使いまわすことは徹底的に避けている。今回クロスコンタミネーションが確認されたFlow7000を培養した当時の担当者は我々とは異なるやり方をしていたことが原因であろう。今回の事故を通じて、1本の培地は1細胞のみに限定するという方法は正しいものであると確信する。

一般の研究室に目を向けてみると、このような事例はかなり頻繁に発生しているであろうことは容易に予想できる。細胞バンク事業を開始してから今年で20年になるが、その間収集したヒト培養細胞は約500種である。そのうちSTR-PCR法を駆使して確認したクロスコンタミネーションは既に25例となり、収集した全ヒト由来細胞の約5%に相当する。さらに、細胞バンクで細胞のクロスコンタミネーションの検査を実施していることを知って、検査のみを依頼される場合も稀ながらあった(2例)。そして、この2例では確かにクロスコンタミネーションを起こしていた。勿論研究者自らが疑いを持ったことが理由で検査依頼となるので、クロスコンタミネーションであるという結果となることは驚くことでは無いが、多くの研究室でクロスコンタミネーションが発生している可能性が高いことを想像させる結果であるように思える。

また、我々がクロスコンタミネーションを確認した場合には、必ず原因に関する聴き取り調査を細胞の樹立者に対して行ってきたが、その全てで細胞の培養を本来の実験とは別に考え、材料を準備する手段として十分な技量を持たない職員にまかせっきりになっているという場合も多いようである。今回の事例のように、細胞バンクですら、ちょっとした油断がクロスコンタミネーションの

発生を招くことを考えれば、一般の研究室でも培養については十分注意してあたらなければならない。

特に、これまでの細胞培養の習慣として1つの培地を特定の細胞に特化して管理せず、複数の細胞に使いまわされている現状については、早急な改善を呼びかける必要があるように思うところである。これについては、日本組織培養学会とも相談のうえ、研究者に強い注意を促す書籍の出版を検討し実施したところである。今後も色々な雑誌を通じて、この問題を多くの研究者に対して強く働きかけてゆかねばならない。

なお、今回IF050079:Flow7000についてはHeLa(Chang Liver)によるクロスコンタミネーションが発生したロットは335と336の2ロットであり、それ以外のロットについては継続して調査中であるが、恐らく問題は無いものと思われる。そのため、これらのロットは一旦廃棄して、汚染の無いロットから新しいストックを作成する。また、そのうちのいくつかは長期継代を実施してHeLa細胞が出現しないことを細胞形態ならびにSTR-PCR法によって確認する予定である。

また、今回Flow7000を調査したことによって初めてFlow7000のSTR-PCRパターンを知ることとなったが、このパターンがFlow3000と同一であるという結果がこの実験の中で得られた。Flowと名付けられた細胞は他にもFlow1000、Flow2000等国内に9種類あることが知られており、かつてのFlow Laboratory(米国)で樹立されたヒト胎児由来のプライマリ細胞である。これらは樹立経過から判断して、ヒトの同一個体の異なる部位から樹立された可能性も考えられるため、Flow7000とFlow3000が同一個体から調整された細胞の可能性、クロスコンタミネーションが発生している可能性のいずれもありうることである。そこで、別のソースから細胞を入手してこの点を確認することにした。

JCRB細胞バンクには、Flow2000、Flow3000、Flow7000が保管されているが、大日本製薬はかつてFlow Laboratoryと業務提携を実施していたため、最もオリジナルに近いFlow細胞を保存していると信じられている。そのため、これを標準細胞と考え、大日本製薬に協力を依頼してそれらについてのSTR-PCRのパターンを確認することにした。また、同時にJCRB細胞バンクで保存されているい

くつかのFlow細胞がそれらと一致するかどうかも確認することとした。

なお、Flow細胞は初代培養系細胞であり樹立後の年数もかなり経っていることから、分裂能力が失われつつあり。現在では大日本製薬からの分譲も停止されている。しかし、これまで出版された幾多の論文を再評価するにも細胞の同定を実施しておくことは十分に意味があると思われるので確認をすることにした。

なお、現在ヒトの生命科学に感心が高まっている状況の中で、ヒトに由来するこのような正常2倍体細胞をバンクとして提供することは極めて重要な点であり、今後新たなヒト由来のプライマリ細胞を新しく入手し広く研究者に提供することは重要な点である。なお、そうした点を考慮して現在東京都老人研究所の協力を得てTIG系統のプライマリ細胞の登録を積極的に進めているところである。

Flow細胞のオリジナルSTR-PCRパターン

確認したFlow細胞は全部で9種、Flow1000、Flow2000、Flow3000、Flow4000、Flow6000、Flow7000、Flow8000、Flow11000、Flow13000の正常2倍体細胞で、全て大日本製薬の好意で入手した。実験は他の全ての細胞と同じ手法によりDNAを抽出して該当ローカスを増幅した後ABI310シークエンサーで分析し、実験結果はデータベースに追加し、ホームページ(<http://cellbank.nihs.go.jp/>)上に公開しているCellIDで比較検討を行った。細胞の入手先が大日本製薬であることを明らかにする目

的でこの9種についてはJPHの3文字を細胞番号に使った。細胞の一覧と、比較検討の結果を表3に示した。

以上の実験より、次の結論を得た。

- JPH0002:Flow2000は、JCRB0067:Flow2000とは異なる細胞であり、JPH0002:Flow2000が本物であるとするので、JCRBのカatalogにはその旨明記する必要がある。
- JCRB0067:Flow2000もユニークなので、如何なる細胞かを特定することが重要であるが、これまでJCRB細胞バンクで収集したものの中には無かった。現時点では特定できないので、将来明らかにする必要がある。
- JPH0006:Flow1000とJPH0005:Flow6000は同一ヒト個体から樹立した細胞であると判定した。
- JPH0004:Flow7000とJPH0007:Flow3000は同一ヒト個体から樹立した細胞であると判定した。
- JPH0009:Flow13000とJCRB9008:MRC-5、IF050073:MRC-5が同一個体から樹立した細胞であると判定されたがこれは驚きであった。この理由については、現時点では同一個体に由来するのか何れかが誤りを含んでいるのかは断定できない。
- 大日本製薬で保存しているFlow2000、Flow4000、Flow8000、Flow11000の4細胞はユニークである。

この結論を踏まえて、今後の課題はJCRBのFlow2000を特定すること、並びにFlow13000とMRC-

表3 検討したFlow細胞一覧と実験結果

Cell No. : Cell Name (Lot.No.)	結 果
JPH0006 : Flow1000 (F1-860903)	JPH0005:Flow6000 と完全一致 (Ev=1.000)
JPH0002 : Flow2000 (F2-911106)	ユニーク、JCRB0067:Flow2000 とは異なる (Ev=0.500)
JPH0007 : Flow3000 (F3-860409)	JCRB0068:Flow3000, JPH0004:Flow7000 IF050079:Flow7000 と完全一致
JPH0008 : Flow4000 (F4-940810)	完全ユニーク (526種、JCRB Cell ID database)
JPH0005 : Flow6000 (F6-900307)	JPH0006:Flow1000 と完全一致 (Ev=1.000)
JPH0004 : Flow7000 (F7-910813)	JPH0007:Flow3000 (Ev=1.000)
JPH0003 : Flow8000 (F8-790313)	完全ユニーク (526種、JCRB Cell ID database)
JPH0001 : Flow11000 (F11-870211)	完全ユニーク (526種、JCRB Cell ID database)
JPH0009 : Flow13000 (F17-870211)	IF050073:MRC-5, JCRB9008:MRC-5 と完全一致 (Ev=1.000)

5に関する問題は今後の検討課題として調査を続行する必要がある。

③由来動物種の同定・アイソザイム検査

現在細胞バンクに対する要求としてヒト培養細胞が重要な研究資源となりつつある。ヒト培養細胞を相互に区別できるDNAフィンガープリント法とも呼べるSTR-PCR法が確立するまでは培養細胞に誤りがあるかどうかは、HeLa細胞という限られた細胞しか区別できなかった。その際、主に用いられていた方法がアイソザイムを分析する手法であった。この方法は、異種動物細胞内で類似の酵素反応を行う言わば同じ酵素であるが由来する動物種が異なると分子量等が大きく異なるということを指標にして分析がなされていたものである。

原理として動物種が異なればアミノ酸組成が異なるために分子量ならびに等電点分析によって区別することが出来るとして細胞が由来する動物種を確認することが出来た。細胞バンク設立初期においては、ヒト由来細胞であるとされたものが実はマウス由来細胞であったというような事実を明らかにしたこともあった。最近でも1例であるが、やはりヒト細胞とマウス細胞を取り違えた例を発見した。

しかし、動物の種類が異なると染色体の形態や本数も同時に異なるために、さすがに動物種の間違いを起こしているままバンクに細胞が寄託された例は少ない。とは言え、そうした誤謬が生じる可能性が常につきまとう以上、この実験手法を使って細胞が由来動物種を確認することを止めるわけには行かないと考えている。そのため、毎年新たに収集する細胞に加えて、細胞バンク内で再培養する細胞についても、必ずこの検査を実施している。勿論、この可能性はヒト細胞同士のクロスコンタミネーションやマイコプラズマ汚染もバンク内で発生する可能性は常に秘めているため、STR-PCR法、マイコプラズマ検出実験、細菌・真菌による汚染の検出実験はバンク内で培養する際には原則として必ず実施し、その結果はデータベースに記録している。

現在では、実験データは機器分析などを通じて画像やグラフで得られるものが多いことから、画像データを直接記録する画像データベースを運用して管理しているものである。アイソザイムの実

験データはそうしたものとして位置付けている。

3. 情報の管理とSTR-PCRデータベースの構築

A. 細胞バンク管理データベース

細胞バンクでは収集した細胞を多数保存しなければならない。外見では区別できない細胞が封入されたアンプルを正確に管理するためには、個々の細胞に関する情報と共に細胞を保存している場所を特定する情報を正確に管理する必要がある。JCRB細胞バンクが設立された1985年当時、小型コンピュータはまだ十分に実用的なものとはなっておらず、重要な情報は書類として紙というハードコピーをファイル化して保存しておくのが普通の姿であった。しかし、ATCC等の資金力のある細胞バンクでは、IBM社のシステム360などを導入してコンピュータを利用した情報の管理を開始していた。その頃に細胞バンク事業を開始した我々は、細胞の管理手法を検討し、10年以上にわたる細胞バンク事業の継続を考えれば、小型コンピュータの低価格化ならびに実用化が促進されることを予測し、それを前提に情報管理をコンピュータ化することが必須であると考えた。そこで、当時、現在普及したIBM・PC及びその互換機を導入してMS-DOSを採用し、その上でdBASEIIという当時簡単ではあるが最も普及していたデータベースを採用して細胞の情報管理並びに在庫管理システムを作成することにした。

市販の統合型データベースソフトウェアと言われるものは、データベースファイルと、そのファイルを運用するアプリケーションソフトウェアとから構成されており、dBASEIIは、dbfファイルが使用され、アプリケーションはBASEC言語に類似した言語システムであった。そのため修得がしやすく、作成後のプログラムを解釈することも容易であった。実際の細胞バンク管理プログラムは極めて大きなシステムとなったので、プログラムの開発そのものは業者に委託して作成したが、細胞バンク業務の進展に伴って作成しなければならない追加プログラムは担当者自身で作成して利用することができた。従って、事務処理の事情よっての開発の遅れに左右されず、迅速な業務展開が可能であった。

当時、細胞バンクシステム全体を管理する本格的なコンピュータを導入するには1千万を超える金額が必要であったが、普及が始まったパーソナ

ルコンピュータを使用することで、そのコストを数十万円のハードウェアの価格とプログラム開発費300万円程度に抑制しつつ必要なシステムを構築することが可能であった。また、現在も、基本的には当時作成したプログラムの考え方を踏襲している。しかし、当時に比べパーソナルコンピュータを稼動するオペレーションシステム(OS)が大きく進歩し、Windows環境となったため、当時のシステムを新しい開発言語であるDelphi5.0(日本ボランド社)に移行して、Windows上で機能するGUIに対応した実行型プログラムとした。データベースファイルは、当時のファイルのフォーマットを現在でも踏襲し、事業の発展に応じてフィールド数を増やすなどして対応している。

また、当時と大きく変わった点は、研究室内のコンピュータが全てイーサネットに接続されているという環境が実現した点である。そのため、現在では細胞バンクの運営に必要なデータベースをサーバコンピュータ上に置き、バンクの職員はどこからでも情報を参照しながらバンクの業務に当ることが可能になり業務の効率化に貢献している。

細胞バンク設立当時、一人の利用者しか使えなかったコンピュータを複数の利用者が共同で利用できるようになった環境に合わせるために、現在でも毎年プログラムの見直しを実施し、使い難い点を改良し、新たな業務に対応したプログラムの開発を継続して実施している。当時同様プログラムの大きな修正や新しいサブルーチンの開発は業者に委託してコーディングを実施するが、小さな部分の修正は担当者が自ら行うこととしている。現在採用しているDelphi言語は、Pascalをベースにしたシステム開発型言語で、プログラムの見通しが良く比較的短時間での開発や修正が可能である。

このプログラムでは、①細胞に関する学術情報の管理、②培養記録の管理、③細胞の保存情報の管理(在庫管理)の重要な管理に加えて、細胞バンク利用者の管理や文献情報の管理も実施している。さらに、STR_PCR法などの新しい品質管理手法の導入にあたり、そのデータを管理するデータベースもこのシステムで一元的に管理することにした。さらに、コンピュータの能力が高まり、画像情報や

表4 STR-PCR 実験結果を記録するデータベースのフィールド構造

データベース名: STRDATA.DBF

データレコード数: 670

最終更新日: 03/19/04

フィールド	フィールド名	型	幅	小数位	インデックス	フィールド名の説明
1	RNO	文字型	11		N	細胞番号
2	CN1	文字型	20		N	細胞名
3	LOTNO	文字型	8		N	ロット番号
4	D5S818	文字型	9		N	データ部分
5	D13S317	文字型	9		N	データ部分
6	D7S820	文字型	9		N	データ部分
7	D16S539	文字型	11		N	データ部分
8	VWA	文字型	11		N	データ部分
9	TH01	文字型	7		N	データ部分
10	AM	文字型	2		N	データ部分
11	TPOX	文字型	8		N	データ部分
12	CSF1PO	文字型	10		N	データ部分
13	IMAGE21	文字型	12		N	画像データ 1
14	IMAGE22	文字型	12		N	画像データ 2
15	IMAGE23	文字型	12		N	画像データ 3
16	DDATE	文字型	10		N	実験日
17	EXPNO	文字型	8		N	実験番号
18	COMMENTS	文字型	254		N	コメント欄
19	TOHROKU	文字型	10		N	公開可能可否フラッグ
20	DNAPROFILE	文字型	254		N	国際的表記
**	合計	**	688			