

外へ取り出し、細胞を増殖させた後に自分の体内に戻す自家移植と他人の細胞を用いた他家移植があるが、どちらの場合においても移植に適した機能を細胞が持っているが絶対不可欠であるが、がん化などの異常な状態ではない正常細胞を利用しなければならない。また、細胞を増殖させる条件もできるだけ生体内を模倣した状況下で培養しなければならないが、現在はウシ胎児血清などを用いた培養環境での細胞増殖をおこなっているのが現状である。こうした条件下での細胞増殖では細胞の機能維持にばかり目を向けているために、増殖速度の速くなった、がん化した細胞が治療に用いられる場合も十分に想定される。そうした細胞治療に使用する細胞の品質管理ならびに培養細胞の品質管理として染色体の変化を詳細に解析することは非常に有効であると考えられる。本研究ではヒト由来の組織より樹立された不死化ヒト間葉系幹細胞を中心に染色体解析を行った。その結果、樹立された不死化ヒト間葉系幹細胞の染色体は不安定で培養を続けることによって染色体の数的増加が見られることが明らかになった。研究で用いた細胞は有限である間葉系幹細胞に対してレトロウイルスベクターを用いてヒトパピローマウイルスの E6 遺伝子、E7 遺伝子ならびにヒトテロメラーゼ遺伝子を導入して無限増殖にした細胞である。無限増殖にしたことで、40 継代程度で増殖を止めていた細胞が 200 継代程度まで分裂増殖することが明らかになっている。このようにがん細胞を模倣した状態の細胞を作成することで、寿命を無限にすることができるが、染色体の解析でその数的異常（増加）が認められた事実から考えると如何に

染色体を安定に、がん化しない条件で保持するかが今後の再生医療に向けた細胞培養技術の開発課題として捉えられる。今後は増殖あるいは欠失した染色体領域を詳細に解析するとともに、厳密な培養管理による培養技術開発ならびに培養環境（特に培地）開発を継続して行う計画を立てている。

CGH アレイ

当研究室においては細胞の個別識別のために STR-PCR 法を利用している。この方法は細胞の染色体上の微小特定領域における繰り返し配列の繰り返し配列を解析することにより、個別識別を行うものである。培養細胞はがん細胞より樹立された細胞が多く、染色体が不安定であることがわかっており、細胞の核型解析を行うと染色体の本数ならびに構成は多くの場合、ばらつきを持った不均一状態で存在していることが明らかである。我々の研究において HeLaAG という培養細胞株を STR 解析したところ繰り返し配列のプロファイルが細胞の培養日数（継代数）によって変化する現象を捉えた。これは染色体上の特定微小領域におけるゲノムの不安定性を実証するものであり、品質管理として STR 法を使用する際の深刻な問題となるものであった。そこで今回 CGH (Comparative Genomic Hybridization) アレイを用いて染色体上の 4000 にもおよぶ微小領域のプロファイルを行った。解析には HeLa ならびに HeLa 由来の亜株と歴史的にも有名な HeLa のクロスコンタミネーション株 (KB, ChangLiver) を使用した。その結果 HeLa を 122 継代目の細胞と 150 継代目の細胞に染色体プロファイルに差があることが明ら

かとなった(図1)。また、他の HeLa 由来の亜株に関しても同様に継代数による染色体プロファイル変化が認められた(図2)。この変化は HeLa よりも HeLa 由来細胞の方が大きく、この差は HeLa 細胞から樹立されたこれらの亜株が遺伝的に不安定な状況であることを示すものである。また、このプロファイルの変化は細胞の性質・機能に大きく寄与するであろうと容易に推察できることから、普段研究者が使用している培養細胞が非常に大きなバラエティーを持って存在し、研究の再現性確認を不可能なものにするかもしれないという危険性を示していることになる。今まで我々が行ってきた STR-PCR 法による個別識別検査は由来個人を特定するため染色体上の微小特定領域のみを解析していたが、今回 CGH アレイによる染色体プロファイル解析で大きなプロファイルの違いを認めたことは、由来個人を特定するだけでは細胞の機能保持、性質保持を保証するものではなく、今後の培養細胞研究に大きな問題を提起することになるだろう。

新しい細胞品質管理としての細胞プロファイルに関する研究

これまで JCRB 細胞バンクでは研究者へ高品質な細胞を提供するため、様々な検査を実施してきた。マイコプラズマ汚染に関しては、国内培養資源の約 20%がマイコプラズマ汚染されており、汚染された細胞を使用した研究が非常に多く行われているのが現状であることを突き止めている。また、STR-PCR 法を利用した細胞の個別識別検査においては国内で樹立された細胞が HeLa 細胞に置き換わっている事例など深

刻な問題を提起してきた。そのような中でヒトゲノムの解読終了に伴い、遺伝子発現を網羅的に解析する技術が広く普及した。本方法を培養細胞に適用することにより、樹立された培養細胞の性質・性状ならびに機能をも網羅的にプロファイルすることが可能となった。培養細胞を利用する研究者は研究者個々の興味によって細胞を選び使用するが、我々細胞バンクが遺伝子発現の網羅的情報を提供することにより、研究者が目的とする機能を有した細胞を選択することが容易となる。本研究では医薬品開発の現場で多く使用されている肝がん細胞 Hep G2 を用いた網羅的遺伝子発現解析を Affymetrix 社の GeneChip を用いておこなった(図)。遺伝子毎に HepG2 細胞において発現しているかなど網羅的な情報を得ることができた。また、組織特異的な遺伝子発現を解析するため、組織別に代表的な細胞を選択し、遺伝子発現解析のデータベース化に着手した。今後更なる研究を進めてこれらのプロファイル情報をデータベース化し、情報提供できる体制の確立を目指す。

学会発表

小原有弘, 水澤博・国内培養細胞研究資源の現状と JCRB 細胞バンクにおける品質管理・日本組織培養学会 (2005. 5. 26)

Arihiro Kohara, Tohru Masui, Hiroshi Mizusawa・Training Procedures in Cell Culture・Society for In Vitro Biology (2005. 6. 6)

Arihiro Kohara, Yutaka Ozawa, Setusko Shioda, Tohru Masui, Masao Takeuchi, Hiroshi Mizusawa · Developing an In Vitro Gene Expression Assay for Predicting Hepatotoxicity. · 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics (2005.9.1)

小原有弘 · ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の研究成果発表展示 · 日本分子生物学会 (2005. 12. 7-9)

論文

Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K. · Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene. · Mutat Res. 2005 586(1):1-17

図1 (HeLa 細胞の 122 継代目と 150 継代目の染色体プロファイル比較)

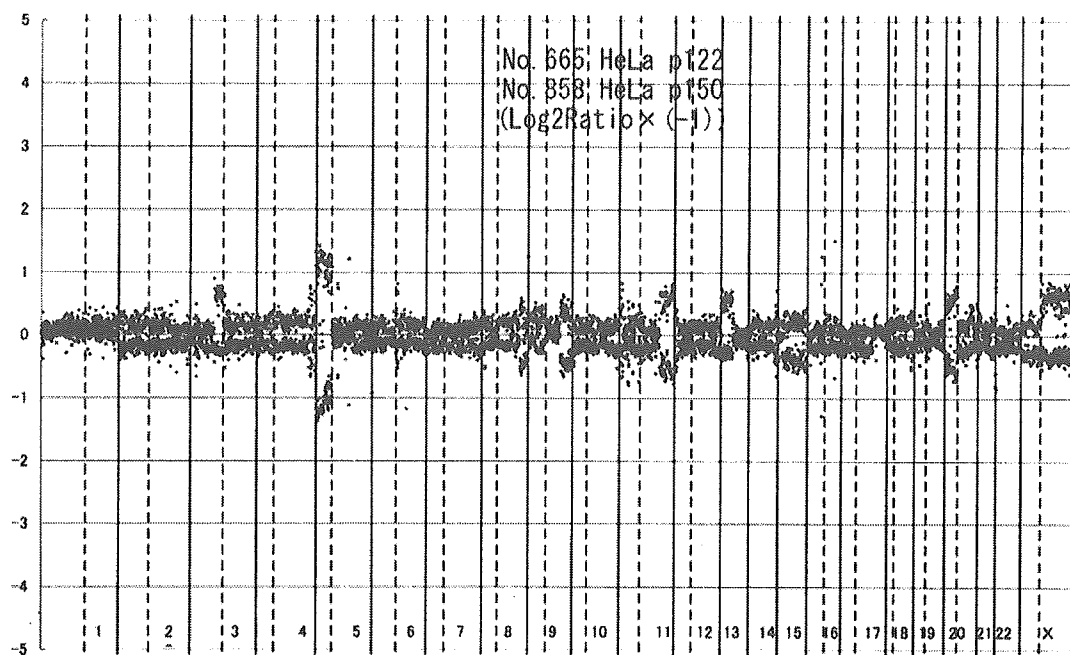
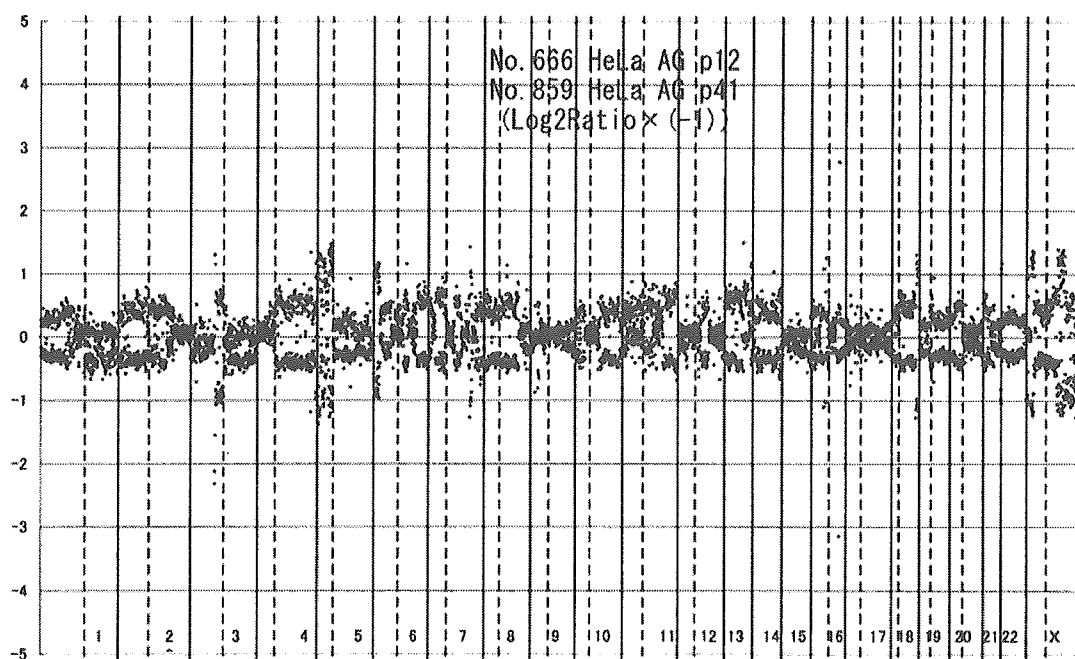


図2 (HeLaAG 細胞の 12 継代目と 41 継代目の染色体プロファイル比較)



厚生省労働科学研究費補助金
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業(ヒトゲノム分野))
平成17年度 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

分担研究者 許 南浩 岡山大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

[平成15年度]

細胞バンクの長期的な運営方針を決定するために、その本来あるべき姿を検討した。基本的には、資料の収集、保存、活用を任務とする幅広い活動(図書館、博物館、文書館を含む)をカバーする総合資料学(仮称)を「学」として構築し、その中に細胞バンク活動を位置づける必要性を提案するに至った。それを実体化するため、総合資料学とその概要(総合資料学とその存立基盤、総合資料学の現状、総合資料学の要素)と細胞バンクの存立・活動に必要な要素(細胞を資料とすることの意味、細胞の収集、細胞の同定、細胞の分類、細胞の品質管理、細胞の保存、細胞の解析、資料情報の構築・管理、資料の活用)を解析し、総合資料学領域の先行分野に比して、細胞バンク(学)のもつ特徴を考察した。

[平成16年度]

細胞バンクのあるべき姿を明らかにし、それに基づいて長期的な運営方針を決定するための検討を継続した。報告書には、その一部として収集細胞の分類法を提案した。同時に、今後ますます重要性を増すと予想されるヒト各組織からの正常初代培養細胞を研究に使用するための基盤技術として、増殖を維持、制御するための新しい方法の開発を試みた。その結果、高い効率で初代培養細胞に適用できる可能性が示唆された。

[平成17年度]

細胞バンクの存立基盤と社会的責務を改めて検討した。科学は、情報、材料、技術が共有されて初めて成立し発展するものであって、その共有を効率的かつ信頼性を担保しつつ推進するシステムとして細胞バンクが必須という結論に達した。次に、そのような存在である細胞バンクが果たすべき機能のうち特に重要な細胞の品質管理(マイコプラズマ、ウイルス等の不顕性感染、細胞と細胞のコンタミネーション、細胞属性の標準化・確認)と細胞バンクの教育機能、細胞培養のトレーニングコース(細胞バンクが教育機能をもつ必然性、細胞培養トレーニングコースのあり方)について詳細に論じた。

実験的活動としては、細胞バンクの運営・機能拡充に役立つ細胞培養の基盤技術に関する系統的な検討結果を記述した。具体的には、多様な培養法の比較(単層培養、スフェロイド培養、三次元培養、器官培養、生体内培養)、遺伝子改変のための遺伝子導入法の比較(プラスミドベクターの精製法、ほ乳類細胞への遺伝子導入法)、体性幹細胞の単離と解析(ラット骨髄細胞由来血液幹細胞の肝細胞への分化、高度の増殖能をもつラット及びマウス骨髄由来間葉系幹細胞の単離、温度感受性ゲルを用いたマウス胎児真皮からの幹細胞単離)を行った。

以上、細胞バンク活動についての理論的考察とその活動を支える技術基盤の開発に努めた。

A. 研究目的

細胞バンクのあるべき姿を体系的に検討し、長期的な運営方針について具体的な提言をすることを目的とする。平成15年度はそ

の第一歩として、資料の収集、保存、活用という類似の特徴を持つものとして、図書館、博物館、文書館、生物資源バンクなどを総合的に研究する総合資料学およびその一分野

としての細胞バンク学の構築を提言し、要素を検討した。平成 16 年度は、収集細胞の新たな系統的分類法とどのような細胞を優先的に収集すべきかについての提言を行った。本年度はその活動を継続し、細胞バンクが単に細胞を受動的に収集して配布するという機能を超えて、社会において今後果たすべき役割を検討する。

本分担研究では、上記のような細胞バンクについての理論的な考察の他に、細胞バンクの持つべき技術・情報、すなわち細胞培養の基盤の技術の開発・発展をも試みる。具体的には、各種培養法の試みと特徴の比較、細胞の遺伝子改変を行う効率的な方法などである。

B. 細胞バンクの社会的責務とその達成の方策

1. 細胞バンクの存立基盤と社会的責務

細胞バンクは人類とその知的活動にとって有用な細胞を収集し、保存・管理して配布すると共に、その活用に必要な事柄を体系的に研究し実践するものである。その細胞バンクの位置づけとあるべき姿については平成 15 年度に包括的な検討を行った。本年度は、その中で幾つかの要点を取り上げ、より詳細に検討する。

科学とは、「客観的で検証可能な知の体系」とであると定義づけることができる。検証可能ということが意味を持つには、情報、材料、方法の共有が前提となる。このような共有が保証されなければ、特定の事象や結果に再現性がなくとも、誤っているとは結論できず、検証ができないからである。情報、材料、方法の共有はこれまで専門誌への論文掲載、学会活動、大学などの教育活動によって行われ

てきた。しかし、それらの大部分は個別的・自発的活動を基盤とするものであって、効率が非常に悪かったのは否めない。科学が急速に進歩し、膨大な情報が既存の体系に流れ込み、同時に科学が直接人々の生活に大きな影響を持つに至った現代にあっては、このような非効率的な共有システムがその役割を十分に果たしきれないのは明らかである。効率的な「共有システム」が、細胞バンクの使命を考えるキーワードである。

生命科学研究の過半は、細胞を使って行われている。従って、細胞と細胞培養に関する情報、材料、方法の共有は、生命科学研究にとって死活的に重要な事項である。この役割を担うのが、細胞バンクの存立意義であり、社会的責務である。

例えば、HeLa 細胞は恐らく全世界で数千の研究室が保有し、様々な研究に用いていることであろう。それらの細胞は同じく HeLa 細胞と呼ばれながら、実際には少しずつ性質を異にする。さらに、その一部はコンタミネーションを起こして他の細胞と入れ替わっている可能性が高い。このような細胞を用いた研究結果が発表されて、生命科学の大系に新たな情報として入ってくるが、不適切な細胞を使った研究結果は科学にとってはノイズであり、検証して取り除かなければならない。このことは膨大なエネルギーを要する。我々は、想像以上のエネルギーが単にノイズを取り除くためか、ノイズによって示唆された不必要な研究に費やされているかを、改めて認識しなければならない。世界で数カ所の細胞バンクが細胞を標準化し品質管理をして提供すると共に、科学者が研究を始める際は必ず細胞バンクから細胞を取り寄せることを徹底すれば、このような状況は根本的に変化

する。細胞バンク活動への投資は、ノイズを取り除くのに必要な人的・物的資源に比べれば、比較にならないほど小さいのである。

このように、細胞の収集、品質管理、供給という細胞バンクの機能は、材料としての細胞の共有を保証するシステムとして、生命科学のより効率的な進展にとって必須のものである。

近年、知的活動の3つの側面として、「知の創生」、「知の継承」、「知の活用」が盛んに言われるようになった。この3つの要素はそれぞれに重要で、相互に支え合ってはじめて知的活動が可能となるが、日本では従来、少なくとも意識の上では「知の創生」が偏重される傾向にあり、「知の継承」、「知の活用」は軽視されてきた。大学が研究重視で、学生の教育や社会への還元への努力が不十分であると批判を受けたのも、その一つの表れである。人類全体としてみれば、あらゆる知的活動はそもそも「知の継承」が出発点であり、そうでなければ人々の活動は賽の河原の石積みになるであろう。「知の継承」とは、同時代の個人間という横の情報・技術の共有と世代間を貫く縦の情報・技術の共有である。このような情報、技術の共有という面でもまた細胞バンクの貢献が望ましい。個人や小さな研究室単位で個別的、恣意的に行われるのではなく、体系的に共有を保証するシステムが遙かに効率的であるからである。「知の継承」とは畢竟教育である。従って、細胞バンクは広い意味での情報発信と教育機能を持つ必要がある。

以上の議論は、細胞バンクの研究支援という側面にのみ焦点を当てたものである。この他に、細胞バンクは生物資源の長期保存という機能があるが、その点はここでは立ち入ら

ないこととする。

以下、細胞バンクの役割のうち、特に重要な項目についてより詳細な検討を行う。

2. 品質管理、特に細胞コンタミの検定
細胞の品質管理で問題になるのは主に次の3点である。

- 1) マイコプラズマ、ウイルス等の不顕性感染
- 2) 細胞と細胞のコンタミネーション
- 3) 細胞属性の標準化、確認

- 1) マイコプラズマ、ウイルス等の不顕性感染

マイコプラズマが感染しても細胞はにわかには死滅するわけではないが、部分的な変性を起こしたり、細胞の属性が変化しする。このような細胞を用いて得られた結果は、上記で議論した情報のノイズにあたるわけで、科学の体系を攪乱し、最終的にその情報を取り除くのに多大なエネルギーを要するという意味で、情報が無いこと（細胞が死滅して実験ができなかった場合）よりも罪が重い。日本は細胞培養研究、特にヒトがん細胞の培養においては先導的な役割を果たしてきたが、どういう訳かマイコプラズマの感染に対する注意や対策が遅れ、非常に深刻な状況であった。この問題の克服に大きな役割を果たしたのは細胞バンクである。細胞を細胞バンクに寄託すると即座に検査が行われて明白な結果を突きつけられることとなった。また、研究者は細胞バンクから細胞を取り寄せればマイコプラズマ感染のないことが保証され、安心して研究を行えるようになった。現在では、ごく一部の古い時代に樹立されたまま保存されているヒト由来細胞株を除いて、

状況は大幅に改善したと思われる。バンクのような集中システムではなく、個別の研究者や研究室に頼っていたのでは、未だにマイコプラズマ感染の問題を克服できず、培養細胞を使った日本発の研究の信頼性にまで影響したことであろう。

ウイルスの感染も、ある意味ではマイコプラズマと同様の問題を抱えているが、ウイルスは宿主細胞の選択性が厳密で比較的感染が起こりにくいこと、状況によっては疾患モデルになり得るといった肯定的な面があること等のため、問題の所在が多少異なる。ウイルスは多様であってその検出法も完備している訳ではないが、近年、細胞治療に用いる細胞の品質管理に関連して広範な検出技術が開発されつつあるので、いずれは細胞バンクもそのような検索を標準的に取り入れなければならないであろう。

2) 細胞間のコンタミネーション

細胞間のコンタミネーションも不顕性であって、結果に影響する程度の大きさからすれば最も深刻な問題であると言えよう。実際、以前には超一流学術誌に掲載された研究に疑義がもたれ、確証することができないまやうやむやになった事例もあった。昔は、動物種が違っている場合は別として、細胞の同定には染色体解析やアイソザイム解析ぐらいしか手段がなく、それらは培養経過中に変化するので、確定的なことが言えなかったのである。このような状況は、STR-PCR法の開発によって根本的な改善をみた。STR-PCR法は、理論上ほぼ全てのヒト個体を識別できることになっている。勿論、これは確率的な問題であり、我々は長期培養経過中に細胞に何が起こるか、完全に知っているわけではなく、

実際にSTR-PCR法によって得られるパターンが培養経過中にある程度の変動をするという事実も受け止める必要がある。しかし、現在のところ、その信頼性の高さからして、STR-PCR法で細胞のコンタミネーションが示唆されれば、他の方法でそのことが明確に否定されない限り、コンタミネーションと考えて対処するのが妥当であろう。

STR-PCR法による細胞の同定にも、日本では細胞バンク（特にJCRB）が中心的な役割を果たした。この方法自体は特に難しい技術を要するわけではないが、それにしても様々な技術的・条件的最適化が必要であり、何よりも多数の細胞株を解析して比較しなければ意味をなさない。特定の研究室が、自らの使用する限られた数の細胞を同定するためにこのような解析を行うことは困難で、実際、それは殆ど実行されてこなかった。細胞の品質管理を細胞バンクに集中化することによって得られた成果の好例である。

このような解析の結果、深刻な現実が明らかされようとしている。ヒト細胞株を使用した日本発の過去の研究の少なくとも数%が、コンタミネーションを起こした細胞株を使用して行われた可能性が示唆されたのである。仮に、前立腺がん細胞株の制がん剤感受性の研究が実際には子宮がん由来細胞を用いて行われていたとすれば（しかも、研究者自身も意識していない）、どのような意味を持ちうるであろうか？ このような状況を防止することは、科学に携わる人（行政も含めて）全ての責務であり、技術的に可能であるにもかかわらず事態を放置すれば、その責任は免れないと思われる。

細胞バンクの品質管理能力を高め、研究者は可能な限り細胞バンクから購入した細胞

を使って研究を行い、独自に開発した株細胞を用いる場合はコンタミネーションの検定を行った上で研究に使用するよう努めなければならない。その意味では、細胞バンクが自ら収集した細胞の品質管理を行うだけでなく、必要なら付属の外部組織という形にするにせよ、受注によって細胞の品質管理を請け負う体制を整備することが望ましい。

3) 細胞属性の標準化、確認

研究者が細胞株を使用するのは、その特定の属性に着目してのことである。従って、使用される細胞は、標準的な条件下では必ず期待された応答を示すことが求められる。しかし、細胞株は継代中に変化するものであって、培地や培養条件、偶発的な事象など、多様な要因に影響され、どのような変化が起こるかを予測することはできない。同じ細胞名がついていても、各研究室が保有している細胞は、同一とは言えないのである。このことが、科学的ノイズを生む大きな原因の一つである。

例えば、制がん剤に抵抗性の細胞と感受性の細胞を個人の研究者から入手した場合、必ずしも再現性が得られないことがある。ある条件下で分化が誘導されると言われているのに、分化しないことがある。細胞バンクが、収集した細胞について、可能な限りのcharacterizationを行い、標準的な条件下では必ず期待された応答を示すことを確認して細胞を供給することができれば、このような細胞の変異・多様化に由来する科学的ノイズは大幅に軽減されることであろう。

このようなことを実現するには、個々の細胞株について相当な解析を行う必要があり、限られた物的・人的資源の中で、細胞バンク

がこれに取り組むのは容易ではない。微生物の感染や細胞相互のコンタミネーションと比較すれば、この問題は研究者サイドに任せることが比較的容易でもある。その意味で、この活動は細胞バンク外の一般的研究と共通であり、外部との接点となると同時に、細胞バンク特有の研究の理論的・技術的基盤を充実させるのにも役立つ。同時にこのような解析も、個々の研究室単位ではなく細胞バンクに集中化して行うことが能率のよいことは明らかで、研究の基盤を支えるという意味と、物的・人的資源の節約のためにも、積極的な取組が望まれる。細胞バンクとしては、将来の重要な課題と言えよう。

3. 細胞バンクの教育機能： 細胞培養のトレーニングコース

1) 細胞バンクが教育機能を持つ必然性

細胞バンクという言葉を皮相にとらえれば、細胞株を収集し配布すれば事足りるという解釈も可能であろう。そういう立場からは、何故細胞バンクが教育機能を持たなければならないのかという疑問が生じるのは当然である。

我々は、有限の物的・人的資源をもって如何に科学を推進し、人類の福祉に貢献するかを考えなければならない。冒頭で議論したように、科学が成り立つためには情報、材料、技術の共有が前提となる。従って、どのような体制をとれば、より効率的で信頼のおける共有システムを構築し維持できるかが問題である。

情報、材料、技術のうち、細胞バンクがまず材料としての細胞の共有システムを保証する方向で活動を始めたのは自然なことである。個別の研究者間で行われる細胞の授受、

品質管理よりも、細胞バンクに集中して行った方が遙かに効率的で信頼のおけるものであったからである。このことは前項で、特に品質管理を例に検討した。

次は技術の共有である。有限の寿命を持つ人間に担われる科学が時空を超えて存在し発展するためには、「知の継承」がその大前提である。知の継承は、勿論技術を含む。

知の継承は、これまで個別の研究室単位、研究者間で行われてきた。細胞培養に関しては、それが当然であると考えられてきたのである。しかし、それは本当に機能しているのだろうか？ 同時に、それが最も効率的で信頼のおける方法なのだろうか？

細胞バンクや日本組織培養学会が設置した細胞培養に関する質問箱に寄せられる質問をみると、現実はずしもそうではないことが分かる。多くの若い研究者が、十分な基本指導や適切なアドバイスを受けることができないまま、悩み苦しんでいるのである。培養技術がこれだけ普及しているのに何故という疑問も生ずるが、考えてみるとそれは当然のことで、培養技術を使う研究者が増えるほど、培養を熟知している集団と培養の経験を全く持たない集団の境界領域は拡大するのである。このような領域にいる若い研究者を放置することは、人的にも物的にも大きな損失である。その解決のために、細胞バンクと日本組織培養学会は協力してインターネット上に質問箱を設けたり、出版活動を行ってきているが、技術に関することは、やはり実際に細胞を取扱ながらの指導が必要なのはいうまでもない。この技術の共有者の拡大という作業もやはり集中化して行う方がより効率的で信頼のおけるものとなる。このことが、細胞バンクが教育機能、すなわち細胞

培養のトレーニングコースを持つべき必然性である。その必然性は、生命科学を推進するための社会的要請に由来するものであって、細胞バンク内部からくるものではない。

2) 細胞培養トレーニングコースのあり方

細胞培養のトレーニングが必要な若い研究者数は膨大である。また、研究の目的、使用予定の細胞も多様であろう。従って、細胞バンクが培養のトレーニングコースを設けるに当たっては、以下の点を考慮する必要がある。

(1) 基盤的・普遍的に重要な事項に集中する

細胞培養に関して、基盤的・普遍的に重要な事項を集中的のトレーニングし、個別の課題に関してはその応用として独自に対応することを促す。技術のみを伝授するのではなく、その背景となる情報、考え方も同時に教育する。

(2) 受講者が技術・情報の発信源となるよう努める

細胞培養のトレーニングを要する若い研究者は膨大であり、日々新たに生まれている。トレーニングコースを如何に拡大しても、その全てを受け入れるのは不可能である。従って、受講者には、自らがコースで身につけた細胞培養にとって基盤的・普遍的な事項について、個々の研究機関に帰った後に周辺に対して指導的な役割を発揮できるように努めるべきである。

(3) 外部組織と協力する

細胞バンク自体は、ネット上の質問箱の設置とそれに対する積極的な回答をはじめ、既に様々な形で教育的活動を行ってきた。その努力は高く評価されるべきであり、同時に培

養のトレーニングコースを独自に運営できる力量も持っていると思われる。しかし、より広範な人的資源を活用し、教育内容を高度化すると同時に、客観的な立場から教育内容を改善するためにも、外部組織、例えば日本組織培養学会との密接な協力の下に、コースを運営することが望ましい。

3) 情報の共有に向けて

材料、すなわち細胞の共有、技術の共有への貢献の先には、情報の共有への貢献がある。細胞に直接関わる情報は既にかなり整備され提供されているが、将来的な課題としては、細胞に関わる研究に関する情報全般を収集し、整理して、研究者に使いやすい形で提供することも大きな意義をもつ。科学研究に関わる情報量は飛躍的に増大しつつあり、早晩、個々の研究者が関連する情報を全て検索し整理して把握することは不可能になるであろう。情報が過剰なために逆に行き渡らないという矛盾を防ぐには、少なくとも基本的な事項に関しては集中的・系統的に情報を収集して提供し、情報の共有に貢献することが望ましい。

C. 細胞培養の基盤的技術の検討と新開発

1. 研究の必要性

我々は、上記のような細胞バンクのあり方に関する理論的な検討の他に、細胞培養の基盤的技術の検討と新たな開発を行ってきた。このことは細胞培養技術の領域を広げ、新たに有用な細胞を開発する基盤になるものであり、その結果、細胞バンクの活動にも貢献すると考えるからである。

2. 多様な培養法の比較： 皮膚由来細胞・

組織を用いた各種細胞培養法の特性解析

我々は皮膚由来細胞・組織を中心に、多様な培養法を系統的に試みて、その特性を整理した。その要点を以下に記す。

1) 単層培養： 最も標準的な培養。培地（特に増殖因子）、基質を操作することによって、多様な組織からの幹細胞の単離、正常性を維持したままの実質的な無限増殖、三胚葉の境界を越えた分化誘導等、以前には想定も困難であったことが可能であることを示した。

2) スフェロイド培養： スフェロイド培養を行えば一般的に細胞の分化機能が単層培養に比較して向上すること、正常表皮角化細胞、培養内株化角化細胞、扁平上皮がん細胞がスフェロイド中では特徴的な増殖動態をとることが明らかになった。また、合成ポリマーを用いた温度感受性ゲルを利用して皮膚幹細胞を単離する新しい方法を確立した。

3) 三次元培養： ヒト線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル上にヒト正常表皮角化細胞を播種して皮膚類似の三次元構造を形成させる培養法を試み、創傷治癒過程等、細胞の増殖・分化動態の解析を厳密な条件下で行えることを示した。また、新規に開発した合成担体を充填したバイオリクターで肝がん細胞株を培養し、大量の細胞を高機能状態で培養できることを示した。

4) 器官培養： マウス胎児皮膚を浮遊膜上で器官培養し、少なくとも3日間は形態形成が進む条件を決定した。この間に毛のう形成がおり、その過程に対する増殖因子の影響を検討した。

5) 生体内細胞培養： 生体内培養というのは、やや矛盾した言葉であるが、ヌードマウスの背部皮膚全層欠損部にシリコンチャンバーを装着し、そこに表皮細胞と真皮細胞の

混合細胞浮遊液を播種することによって皮膚組織を再構築させることが可能であることを示した。さらに、この系に骨髄細胞を添加すると、骨髄細胞が微小環境の影響を受けて皮膚細胞に分化することを明らかにした。このように多様な培養法を系統的に試みた結果、培養技術の豊かな可能性を改めて認識するに至った。細胞バンクもこのような情報を積極的に発信すると同時に、トレーニングコースの実施あたっては、単層培養だけではなく、少なくとも上記培養法の一部を取り込むべきだと考える。

3. 遺伝子改変のための遺伝子導入法の比較
細胞バンクの立場からは、同一クローンに由来する細胞に様々な遺伝子を導入して改変し、その特性を比較解析することが可能な細胞パネルを供給することも、将来の重要な課題であろう。その基礎的な検討として、いろいろな細胞に対する遺伝子導入の条件を、導入効率、発現レベル等を指標に検討している。

1) プラスミドベクターの精製 :
Transfection 用のプラスミドは高純度のもを使用しなければ良い結果が得られない。ポリエチレングリコール沈殿法によるプラスミド精製は簡便であるが、純度が不十分であった。セシウムクロライド密度勾配遠心法により得られたプラスミドは高純度ではあるが、手技が煩雑で時間がかかり、回収率も低い。現在のところ、我々が試みた中では、JETSTAR 2.0 plasmid Maxi kit 20 (GENOMED 社) が最良であった。このキットを用いれば、セシウムクロライド密度勾配遠心法よりも純度の高いプラスミド標品を簡単に調製することができる。

2) ほ乳類細胞への遺伝子導入法 : 遺伝子

導入法としては、初期にはリン酸カルシウム沈殿法が主に用いられたが、より簡便で効率の良いリポフェクション法が開発されて、これが主流となった。基質接着性のがん細胞株に対するリポフェクション用の試薬としては、Invitrogen 社の Lipofectamine 2000 や OZ Biosciences 社の DreamFect が有用であった。いずれもカチオン系の試薬で、細胞への接着-取り込み-エンドソームからの遊離に優れた効果を持つ。最近、カチオン化マグネットナノ粒子に DNA を付着させ、磁力によって細胞内に物理的に取り込ませるマグネットフェクション法が開発されたが、実際にこの方法を使用したところ確かに導入効率が高かった。しかし、正常上皮細胞の初代培養系ではいずれの方法も満足のいく導入効率 (50%以上) が得られず、ウイルスベクターを使用する必要があった。

4. 体性幹細胞の単離と解析

近年の細胞生物学の進展の中で、細胞培養の常識に最も根本的な変革を迫ったのは様々な体組織に多分化能をもつ幹細胞が含まれているという発見であろう。我々も、細胞培養の新たな展開という観点から、この課題に取り組んでいる。

1) ラット骨髄細胞由来血液幹細胞の肝細胞への分化 :
ラットの骨髄から血液幹細胞のマーカをもつ細胞集団を単離した。この細胞に高濃度の Hepatocyte Growth Factor (HGF) を添加することにより、アルブミン産生、肝特異的酵素遺伝子の発現を示す肝細胞を誘導することができた。この研究は生体内分化誘導と異なり、肝細胞との細胞融合なしに、肝細胞としての形質をもつ細胞が誘導できることを示した点に意義がある。但し、こ

の幹細胞集団は増殖能力に限界があり、治療モデルに使用するような大量の細胞を調製することは困難であった。

2) 高度の増殖能をもつラット及びマウス骨髄由来間葉系幹細胞の単離： 培養条件を工夫して、新たにラット及びマウス骨髄から 200 PDL 以上も安定して増殖する幹細胞株の単離に成功した。すなわち、細胞の供給源としては無限に近い。この細胞は間葉系幹細胞としてのマーカータンパク質を発現しているが、その一部はこれまで報告されたものと異なる。ラット骨髄由来幹細胞は、300 PDL の間、正常 2 倍体の核型を保ち、その細胞学的性質、分化能に変化が見られなかった。HGF と FGF4 により高率に肝細胞に分化し、その細胞を経脾的に移植すると、90%肝切除による致死性肝不全（放置すると 48 時間以内に全てのラットが死亡する）に対して救命効果を示すことが明らかになった。また、マウス骨髄から単離した幹細胞も、骨、軟骨、脂肪など多分化能を示した。

3) 温度感受性ゲルを用いたマウス胎児真皮からの幹細胞単離： 近年、皮膚をはじめ様々な臓器から多分化能を有する幹細胞が分離されてきたが、その方法の多くは高度の機器や熟練した技術を要する。我々は、温度感受性ゲルによる三次元培養法によって、マウス皮膚から幹細胞を簡便かつ効率よく分離する方法を開発し、分離された細胞（DEEP-1）を解析した。DEEP-1 細胞は上皮様形態をとり、当初の形質を保ったまま 200PDL（250 日）を越えて安定的に増殖した。サイトケラチン 8、18、19 や E-カドヘリン等の上皮細胞マーカーの他、p63、integrin b1、S100A6 等の幹細胞マーカーも発現した。さらに、培養内で TGFb 処理により Epithelial

mesenchymal transition が観察され、単個細胞クローンを成体マウス臓器に移植すると、一部の細胞が神経細胞、肝細胞、腎臓細胞の形質を獲得した。DEEP-1 細胞は培養内で容易にスフェロイドを形成し、特徴的な形態変化を示した。皮膚が比較的採取しやすい臓器であることを考えると、本研究結果は、幹細胞生物学の基礎研究や将来の再生医学的応用に向けて、大きな意義を有すると考える。

F. 健康危険情報
該当しない。

G. 研究発表（平成 17 年度）

[英語論文]

1. Sakaguchi M, Sonogawa H, Nukui T, Sakaguchi Y, Miyazaki M, Namba M, Huh NH: Bifurcated converging pathways for high Ca²⁺ and TGFbeta-induced inhibition of growth of normal human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 13921-13926, 2005
2. Takaishi M, Makino T, Morohashi M, Huh NH: Identification of human hornerin and its expression in regenerating and psoriatic skin. J Biol Chem 280: 4696-4703, 2005
3. Kashiwagi M, Huh NH: Organ culture of developing mouse skin and its application for molecular mechanistic studies of morphogenesis. Methods Mol Biol 289: 39-46, 2005
4. Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kurose K, Ebara S, Miyazaki M, Namba M, Kumon H, Huh NH: Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer

- cells through activation of c-Jun-NH2-kinase. *Cancer Res* 65: 9617-9622, 2005
5. Sakaguchi M, Nukui T, Sonogawa H, Murata H, Futami J, Yamada H, Huh NH: Targeted disruption of transcriptional regulatory function of p53 by a novel efficient method for introducing a decoy oligonucleotide into nuclei. *Nucleic Acids Res* 33: e88, 2005
 6. Kataoka K, Nagao Y, Nukui T, Akiyama I, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A, HuhNH: An organic-inorganic hybrid scaffold for the culture of HepG2 cells in a bioreactor. *Biomaterials* 26: 2509-2516, 2005
 7. Deguchi K, Takaishi M, Hayashi T, Oohira A, Nagotani S, Li F, Jin G, Nagano I, Shoji M, Miyazaki M, Abe K, Huh NH: Expression of neurocan after transient middle cerebral artery occlusion in adult rat brain. *Brain Res* 1037: 194-199, 2005
 8. Futami J, Kitazoe M, Maeda T, Nukui E, Sakaguchi M, Kosaka J, Miyazaki M, Kosaka M, Tada H, Seno M, Sasaki J, Huh NH, Namba M, Yamada H: Intracellular delivery of proteins into mammalian living cells by polyethylenimine-cationization. *J Biosci Bioeng* 99: 95-103, 2005
 9. Kitazoe M, Murata H, Futami J, Maeda T, Sakaguchi M, Miyazaki M, Kosaka M, Tada H, Seno M, Huh NH, Namba M, Nishikawa M, Maeda Y, Yamada H: Protein transduction assisted by polyethylenimine-cationized carrier proteins. *J Biochem (Tokyo)* 137: 693-701, 2005
 10. Aoki M, Kanamori M, Ohmori K, Takaishi M, Huh NH, Nogami S, Kimura T: Expression of developmentally regulated endothelial cell locus 1 was induced by tumor-derived factors including VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 990-995, 2005
 11. Medina RJ, Kataoka K, Takaishi M, Miyazaki M, Huh NH: Isolation of epithelial stem cells from dermis by a three-dimensional culture system. *J Cell Biochem* 2006 Jan 11; [Epub ahead of print]
 12. Deguchi K, Tsuru K, Hayashi T, Takaishi M, Nagahara M, Nagotani S, Sehara Y, Jin G, Zhang H, Hayakawa S, Shoji M, Miyazaki M, Osaka A, Huh NH, Abe K: Implantation of a new porous gelatin-siloxane hybrid into a brain lesion as a potential scaffold for tissue regeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006 Jan 11; [Epub ahead of print]
 13. Medina RJ, Kataoka K, Miyazaki M, Huh NH: Efficient differentiation into skin cells of bone marrow cells recovered in a pellet after density gradient fractionation. *Int J Mol Med* (in press)
- [日本語論文]
なし
- [学会発表]
1. Sakaguchi M, Sonogawa H, Miyazaki M, Namba M, Huh N: Bifurcated converging pathways for high Ca⁺⁺- and TGF β -induced inhibition of growth of normal human keratinocytes, The American Society for Cell Biology (ASCB) annual meeting (45th), San Francisco, USA, December 12, 2005.
 2. Huh N, Makino E, Sakaguchi M: S100C/A11, an essential element of the

signal transduction of TGFb-induced growth suppression and a potential target for therapy against hyper-proliferative human diseases. Cell Signaling World 2006, Singnal Transduction Pathways as Therapeutic Targets, Luxembourg, Luxembourg, January 26, 2006.

3. Sakaguchi M, Abarzua F, Takaishi M, Nasu Y, Kumon H, Huh N: Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of JNK, The 11th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research,

Phitsanulok, Thailand, January 26, 2006.

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

「前立腺癌細胞のアポトーシス誘発剤」 出願番号 2005-073807

2. 実用新案登録

○なし

3. その他

○なし

培養細胞に出現する汚染微生物のモニタリングに関する研究

分担研究者 原澤 亮 岩手大学農学部 教授

研究要旨

細胞培養におけるマイコプラズマ汚染の検査を中心にこれまで調査研究を進めてきた。その過程で遭遇したヒトの急性骨髄性白血病由来の培養細胞である Kasumi-6 細胞系に見出された微粒子は、ブラウン運動のような動きを呈し、当初、マイコプラズマによる汚染を疑わせたが、一連のマイコプラズマ検査試験によりそれが否定された。Kasumi-6 細胞系から分離した微粒子は胎児ウシ血清を含む細胞培養用液体培地中で自己増殖することが判明した。そこで、この自己増殖性微粒子を液体培地中で大量培養し、その微細形態ならびに理化学的性状を調べた。その結果、この自己増殖性微粒子は厚い殻で覆われた球形もしくは卵形を呈し、ヒドロキシアパタイトを成分とし、「ナノバクテリア」と呼ばれるものに類似していることが判明した。

平成15年度の概要：細胞バンクに保存されている73株の細胞系についてマイコプラズマによる汚染状況をPCR法により検査し、KATO111 (JCRB0611), MKN45 (JCRB0254), HuH-6 Clone 5 (JCRB0401), AH601.P3 JTC27 (NIH0211), HSC-2 (JCRB0622), HSC-3 (JCRB0623) の6株に汚染を認めた。[現在はすべてが除染されている]

平成16年度の概要：JCRB 細胞バンクへ寄託されたヒトの急性骨髄性白血病由来の培養細胞である Kasumi-6 細胞系に見出された微粒子が無細胞系液体培地において自己増殖することを明らかにした。しかし、この粒子からは通常の方法によって核酸や特異的なタンパク質を証明することができず、生物であるのか無生物であるのかの判断を下せなかった。

A. 研究目的

細胞培養は個体と異なり感染防御機構を備えていないためさまざまな微生物等により汚染することが知られている。最も頻繁にみられる汚染はマイコプラズマによるもので、多くが不顕性の持続感染状態となり、細胞培養に対して外見上さ

したる変化を示さないため看過されやすい。細胞培養におけるマイコプラズマ汚染が最初に報告されたのは1956年であるから、すでに半世紀を経ているが、未だにその汚染は尾を引いており、再生医療や遺伝子治療などの高度先端医療において、由々しい問題をもたらすことが危惧

されている。そのため JCRB 細胞バンクでは細胞培養におけるマイコプラズマ汚染の検査を定期的実施している。ところが、JCRB 細胞バンクへ寄託されたヒト由来培養細胞のひとつである Kasumi-6 細胞系についての受け入れ時の検査では、マイコプラズマとは異なると考えられる汚染事例が指摘された。そこで本研究では、Kasumi-6 細胞系におけるその汚染物の性状を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

Kasumi-6 細胞系はヒトの急性骨髄性白血病由来の培養細胞として、2002 年に JCRB 細胞バンクへ寄託されたもので、受け入れ当初から培養中にブラウン運動のような動きを示す微粒子異物が存在することが細胞バンクの職員により確認されていた。そこでこの微粒子を Kasumi-6 細胞と分別するため、同培養細胞を -80°C に一晩保存後、孔径 800 nm のメンブランフィルターにより濾過し、培養細胞成分を除去してから新鮮培地 (RPMI 1640 / 10% FCS) を添加して 37°C で 1 週間培養した。細胞培養から分離した微粒子をさらに 2 リットルの液体培地を用いて 37°C で 1 週間培養した。培養液から遠心 (10,000xg, 10 分) により自己増殖性微粒子を回収し、ダルベッコのリン酸緩衝液 (マグネシウム、カルシウム不含) で 3 回洗浄した。遠心により得た白色ペレットの一部をグルタルアルデヒド固定して透過型電子顕微鏡により観察した。さらにその物性を、

東京大学環境安全研究センターの鈴木良實助教授の協力を得て、蛍光 X 線分析装置 (Energy Dispersive X-ray spectrometer, EDV-700HS, SHIMADZU), X 線回折装置 (X-ray Diffractometer, RINT2200, RIGAKU), およびフーリエ変換赤外分光分析装置 (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, FTIR 8600PCC, SHIMADZU) 等により解析した。

C. 研究結果

(1) 透過型電子顕微鏡による観察

グルタルアルデヒド固定したサンプルを樹脂に包埋し、超薄切片標本を作製し、5 万倍で観察した。その結果、ヒドロキシアパタイトを思わせる無機的な所見とともに、厚い壁に包まれた球形もしくは卵形の大きさ 400 nm 程度の物質が認められた (図 1)。

(2) 蛍光 X 線分析による解析

Kasumi-6 細胞系由来自己増殖性微粒子を構成する元素組成はカルシウム 62.6%、リン 35.6% を主成分としており、その他イオウ 0.7%、亜鉛 0.5%、カリウム 0.4% が痕跡程度に検出された。

(3) X 線回折による解析

自己増殖性微粒子の回折パターンには結晶に依存する鋭いピークは認められなかったものの、一部半値幅の広い小さなピークが現れた。その結晶性を高めるために試料を 500°C で 2 時間加熱して分析したところ、わずかに結晶性が上昇した。対照としてヒドロキシアパタイト (和光

純薬) とリン酸カルシウム (和光純薬) の標準試薬を並行して分析した。ヒドロキシアパタイトとリン酸カルシウムのスペクトルは酷似しており、明確に判別できなかった。また、両者のスペクトルは自己増殖性微粒子のそれとよく一致していた (図2)。

(4) フーリエ変換赤外分光分析による解析

自己増殖性微粒子を 500°C で 2 時間加熱して分析した。対照としてヒドロキシアパタイトとリン酸カルシウムを分析したところ、リン酸カルシウムでは 1640 cm^{-1} 付近にピークを示したが、ヒドロキシアパタイトと自己増殖性微粒子ではそれが認められなかった (図3)。

D. 考察

Kasumi-6 細胞系由来の微粒子は、核酸や特異的なタンパク質が検出されないものの、新鮮液体培地を加えて 37°C で培養するとその個数が次第に増加する。そこで、この自己増殖性微粒子の物性を器機分析により明らかにすることを試みた。電子顕微鏡観察では厚い殻に覆われた球形もしくは卵形の粒子が観察された。蛍光 X 線分析から、この自己増殖性微粒子の主成分は、ナトリウム以下の軽元素を除けば、カルシウムとリンであることが明らかになった。これまでに、この微粒子のタンパク質分析から牛血清由来のフェチュインが検出されているが、それが蛍光 X 線分析において有機物の痕跡と

して現れたものと考えられた。また、自己増殖性微粒子の結晶に依存する X 線回折スペクトルから、この微粒子がヒドロキシアパタイトあるいはリン酸カルシウムである可能性が示唆された。さらに、フーリエ変換赤外分光分析により検出された 1640 cm^{-1} 付近のピークの有無により、自己増殖性微粒子がヒドロキシアパタイトの可能性が強く示唆された。このようなヒドロキシアパタイトを成分とする自己増殖性微粒子に類似のものが細胞培養中に存在することはすでに報告されており、「ナノバクテリア」と呼ばれている。

「ナノバクテリア」については、オレゴン州立大学海洋学部の元教授 Richard Y. Morita 博士が低栄養条件下での細菌について 1988 年に「nano-bacteria」と記載したのが嚆矢とされている。その後、テキサス大学名誉教授で地質学者の Robert L. Folk 博士が、1990 年代初めにイタリアの温泉で石灰岩中に大きさ 50~200 nm の球状もしくは卵状の微粒子を走査電子顕微鏡で発見し、これを“nannobacteria” (two “n”s) と呼び、広く知られるようになった。培養という手続きを執らずに「バクテリア」と断言して憚らない地質学者というのは、随分度胸があるものだと感心したものだが、VBNC (viable but non-culturable) 状態の微生物がかなり多く存在することが明らかになりつつある現在では、「培養という手続き」の重要性はかつてほど大きくはないのかもしれない。

一方、約1万3千年前に南極アレン・ヒルズ氷原へ落下したとされる火星からの隕石(AHL84001)が1984年に採取され、これに「ナノバクテリア」と同じ大きさの微生物らしき痕跡をNASAの研究者David S. McKay博士らが発見し、1996年にサイエンス誌に発表したところ、科学界は騒然となり激しい論争が起きた。この微生物らしき痕跡にはバクテリアにより生成されたと考えられる磁鉄鉱 Fe_3O_4 (磁石化石)が検出されたため、当初火星の生命の証拠として注目された。しかし、後にその磁鉄鉱は必ずしもバクテリアによらなくても生成されることが判明したので、現在ではこの隕石にまつわる「火星の生命」説は否定的とされ、NASAもこの発表を一旦取り下げた。ところが、隕石中の「ナノバクテリア」に関してはその後パリ大学理学部のKarim Benzerara博士らにより類似の報告がなされている。これらの微粒子が生物であるという確証を得ないまま、「ナノバクテリア」を巡る状況はさらに渾沌となり始めている。それは上述のものとは別の、以下に述べるもう一つの「ナノバクテリア」の出現に大きな理由がある。

フィンランド、クオピオ大学の生化学者E. Olavi Kajander博士とNeva Giftoçlu博士は、長期間培養した細胞培養が死滅する原因を究明する過程で、死にかけた培養細胞内に自己増殖する大きさ50~200 nmの微小粒子が存在することを発見し、これを“nanobacteria”と

名付けて1998年に発表した。その後、この「ナノバクテリア」は他の多くの細胞培養や細胞培養に用いられる仔牛血清中にも存在すると報告され、培養細胞を扱う研究者たちに少なからぬ不安を抱かせている。さらにKajander博士のグループは「ナノバクテリア」の16S rRNA遺伝子の塩基配列が $\alpha 2$ *Proteobacterium*に近縁であるとし、これを独自に“Nanobacterium sanguineum”と命名した。また、彼らは「ナノバクテリア」の表層がアパタイトで覆われているので、異所性石灰化に起因する尿路結石や動脈硬化、乳がんの原因になる微生物であると主張し、それら疾病の診断治療を目的とするベンチャー企業(Nanobac Life Sciences社)まで設立している。

「ナノバクテリア」に関するこれら一連の研究は専らKajander博士のグループによるものであり、その信憑性には少なからぬ疑いがもたれていたところ、米国NIHの微生物学者John O. Cisar博士らは、「ナノバクテリア」が生物ではなく、自己増殖する無機物であるとの実験成績を2000年に提示した。しかも、Kajander博士らにより報告された16S rRNA遺伝子の塩基配列はPCRの際に環境中からコンタミする*Phyllobacterium myrsinacearum*による可能性が高いことを指摘し、「ナノバクテリア」が微生物であるという根拠は失われてしまった。さらに、フランス、マルセイユ医科大学臨床微生物学教室のDidier A. Raoult教授らはヒトの上

部尿道結石からの、また米国コーネル大学獣医学部の Stephen C. Barr 教授らはウシ、ヤギ、イヌ、ネコなどからの「ナノバクテリア」の検出を試みたものの、いずれも成功しなかったと報告した。ところがこのような状況の中で、Kajander 博士らと共同研究し始めたドイツ、ウルム大学工学部の Andrei P. Sommer 博士は「ナノバクテリア」の増殖には至適な光の波長があると報じ、さらに奇妙なことに、「火星の隕石」で登場した NASA の McKay 博士らとも共同研究を始め、「ナノバクテリア」が地球の原始状態でも生存できるとする論文を 2003 年に発表した。Sommer 博士はその後も、星間物質の権威で英国カージフ大学の天文学者 Nalin Chandra Wickramasinghe 教授の参画を得て「ナノバクテリア」を生命の起源と結び付けようと試みており、さらに最近では「ナノバクテリア」が雲に乗って移動するという奇妙な説まで唱え始めている。しかも、メイヨークリニック医科大学腎臓学分野の John C. Lieske 教授らが動脈硬化症の患者さんの病変部に「ナノバクテリア」様構造を認めたと 2004 年に報告した。訝しいことに「ナノバクテリアの父」と呼ばれる Folk 博士と彼の研究室員がこの論文の共著者になっている。2005 年春に、Lieske 教授らは、隕石中の「ナノバクテリア」を調査した、前述の Benzerara 博士を講演のためメイヨークリニックへ招聘している。

Kajander 博士のグループのほかに、

「ナノバクテリア」を検出したとするのは、①卵巣がんから特異抗原を検出したウィーン大学付属病院の Roland Sedivy 教授と Walter B. Battistutti 博士、②卵巣がんから特異抗原と mRNA を検出したウィーン医科大学婦人科学の Gernot Hudelist 博士ら、③牛血清中に特異抗原を検出したノースカロライナ大学獣医学部の Edward B. Breitschwerdt 教授ら、④腎臓結石から特異抗原を検出したインドの卒後研修研究所の Madhu Khullar 教授ら、および、⑤健康人の血清中に特異抗原を検出した中国の中南大学医学部の Wang XueJun 博士らの少なくとも 5 つのグループである。最後に挙げた中国の Wang 博士らは現在では Kajander 博士らと共同研究しているようである。「ナノバクテリア」の特異抗原を検出するためのキットは Nanobac Life Sciences 社から発売されている。「ナノバクテリア」はさまざまな疾病に関連すると報じられているが、それらの治療法に関する報告も現れ始め、しかも、「ナノバクテリア」を除去することにより前立腺結石症が快方に向かったという報告まで登場した。ところで、Kajander 博士の当初からの共同研究者である Ciftcioglu 博士は NASA の McKay 博士らと共に「ナノバクテリア」が微小重力状態で増殖しやすくなるとして、宇宙飛行士にとって腎臓結石形成が潜在的な脅威となると警告している。地質学や天文学までを巻き込んで、「ナノバクテリア」を巡る謎はますます深まってい