

と判定され、検査に用いるプレートに問題がないことを確認した。

我々厚生労働省の細胞バンクである JCRB 細胞バンクにおいて年間分譲数の多い細胞株中心にヒト由来の 49 細胞株、新世界サル由来の 1 細胞株のゲノム DNA を検査試料としてウイルス検査を実施した。

JCRB 細胞バンクにて、冷蔵保存されていた DNA を検査した結果、濃度が薄く保存期間の長い (1994 年調整) 1 サンプルを除いてすべてのサンプルで PCR 反応の陽性コントロールであるハウスキーピング遺伝子 GAPDH の増幅が行われていた。

50 細胞株の検査結果は表 2 のとおりである。

| 細胞番号 | 細胞名 | ロットナンバー |
|------------|--------|---------|
| • JCRB0135 | MT-4 | 031699 |
| • JCRB0138 | KMH-3S | 081799 |

上記の 2 細胞株は HTLV-1 陽性であることがすでに明らかになっている細胞株であり、細胞の登録情報どおり HTLV-1 陽性の結果が得られた。この 2 細胞株はその他のウイルスは陰性だった。

| 細胞番号 | 細胞名 | ロットナンバー |
|----------------------------------|--------|----------|
| • JCRB9012 | RAJI | 042095 |
| (バーキットリンパ腫由来細胞株) | | |
| • JCRB9123 | B95-8 | 072795 |
| (EBV 産生新世界サル (タマリン) 由来リンパ系細胞株) | | |
| • JCRB1042 | BSL2KA | 03072003 |
| (ブルーム症候群患者由来 EBV 形質転換 B リンパ芽球様株) | | |

上記の 3 細胞株はすでに EBV 陽性であ

ることが細胞登録情報で明らかになっており、情報どおりの結果が得られた。そのほかのウイルスは陰性だった。BKV に関しては、さらに、次の 2 細胞株も陽性であったが、この 2 細胞株に関しては、BKV 陽性であるという情報はなかった。

| 細胞番号 | 細胞名 | ロットナンバー |
|---------------------------------------|-------|----------|
| • JCRB0077 | PC-3 | 110794 |
| (肺腺癌由来細胞株 (ATCC CRL1435 とは異なる細胞株である)) | | |
| • JCRB1068 | IRC-2 | 08192003 |
| (正常な胎盤のプライマリー培養細胞) | | |

また、parvoB19 および HBV に関しては、肝細胞癌由来の細胞株シリーズのうち細胞登録情報において HBs-Ag(-) の細胞株は陰性で HBs-Ag(+) の細胞株では陽性であり、登録情報との相違は無かった。

| 細胞番号 | 細胞名 | ロットナンバー |
|-------------------------|-------|----------|
| • JCRB1029 | JHH-5 | 03282003 |
| (HBs-Ag(-) の肝細胞癌由来細胞株) | | |
| • JCRB1031 | JHH-7 | 12202002 |
| (HBs-Ag(+)) の肝細胞癌由来細胞株) | | |
| その他のウイルスは陰性であった。 | | |

<ネステッド PCR を用いた培養細胞の由来動物種検査法>

ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、アフリカミドリザル、チャイニーズハムスター、シリアンハムスターの 8 種について検討した結果、ヒト、マウス、ラット、ウシ、アフリカミドリザル、チャイニーズハムスター、シリアンハムスター

の7種において、2nd PCRに Mix プライマーを用いた動物種の判定が可能であることが確認された(図1)。しかし、これらには多数の non specific band が含まれており、今後最適な PCR 条件を検討する必要があった。ウサギについては、目的のバンドがうまく得られなかったので、再度検討する予定とした。また、残りの6種についても PCR を行い、確認する必要があった。

電気泳動については、核酸キャピラリー電気泳動装置 HAD-GT12 System(eGene Inc.)を導入することにした(図2)。この機械を使うことで PCR 産物をより簡単に早く高感度に検出することができるため作業効率が上がり、また DNA 分子量マーカーの泳動結果から得られた検量線を用いることにより検出されたサンプルのバンドの分子量を即座に得ることが可能であり、判定がより容易になった。

<核型解析による細胞キャラクタライズ>

細胞の染色体数を DAPI 染色法(図3)で経時的に調べた結果、どの細胞においても培養初期も後期も染色体の Mode は46本であり、染色体数に変化はみられなかった(表3)。このうち NCTR0005:hMSC (H-494)、NCTR0005:hMSC (H-495)、NIHS0426:PL507 の mFISH を行った結果、それぞれの染色体の大きな変異は見られなかった。また NCTR0005:hMSC は指定培地である MSCBM と一般的な DMEM で培養したところ、培地による染色体への影響は

見られなかった(図4)。

当バンクで保存している細胞の染色体情報をギムザ染色法での解析結果を表4に示した。大部分の細胞の染色体数 (Mode) は、2n よりも多くなっていた。このうち、チンパンジー由来細胞で雌雄のペアで寄託された JCRB1165:HSP-239 と JCRB1177:HSP-250 は G 染色法による解析を行った。その結果、JCRB1165:HSP-239 には染色体の6番と20番に転座が見られた(図5)が JCRB1177:HSP-250 には転座などの変異は見られなかった(図6)。

D. 考察

スタンダード(ウイルスゲノムの一部)を添加した陽性対照は常に陽性を示し、サンプルの検査結果も複数回行ったものに関して検査結果は安定していた。この結果から考えると本検査系の信頼性は高く、安定した検査結果を出すことができる検査方法であると言える。また、今回調べた50細胞株に関しては、検査した13種類のウイルスについて、複数のウイルスに汚染されている細胞株はなかった。細胞の登録情報どおりの検査結果が得られ検査の感度も安定していると言える。また、情報に無いウイルス汚染も少数であるが(4%)見付き、ヒトに持続感染するウイルスが多数存在するヒト由来の細胞株にウイルスが潜んでいる可能性は否定できない。さらに、実験室内感染の可能性も否定できないので、実験室内で一般的に使われる、SV40も検査項目

に加えるべきであり、今後の検討課題であるといえる。さらに、今回は項目に加えられていないが、ヒトパピローマウイルス (HPV) は、癌ウイルスとして知られており、ヒトの癌細胞株から検出される可能性はきわめて高い。今後検査項目として加えるべく検査系の確立を継続する予定である。

また、細胞培養に牛血清が使われている現状では、牛由来のウイルスによる汚染についても調べていく必要がある。現在、牛下痢症ウイルス (BVDV) については RT-PCR 法が確立されているが、牛のレトロウイルス等まだあまり調べられていないウイルスについても今後調べていく必要がある。

<ネステッド PCR を用いた培養細胞の由来動物種検査法>

PCR による動物種の判定法は、アイソザイム法よりも簡便で判定も容易であると考えられたが、マルチプレックスによる検査には今後最適化を行う必要があると考えられた。

<核型解析による細胞キャラクタライズ>

今回、経時的に染色体数の変化を調べたヒト由来間葉系幹細胞 4 種及び、ヒト由来血球・リンパ系細胞では、長期培養による染色体数の Mode への影響はみられなかった。この結果と、今回使用した細胞の DNA を用いて行う CGH アレイの結果と照らし合わせる必要があると考えられる。

また当細胞バンクで保存している細胞のうち、これまでに 10 細胞の染色体情報の収集を終えることができた。今後も当バンクで保存している細胞の染色体情報を継続的に収集することが、細胞の標準化に向けて重要であると考えられる。

F. 研究発表

学会発表

Arihiro Kohara, Yutaka Ozawa, Setusko Shioda, Tohru Masui, Kikuko Takeuchi, Masao Takeuchi, Hiroshi Mizusawa・High Resolution Genomic Analysis of Immortalized human Cells and Tumor Cells Using Array-Based Comparative Genomic Hybridization. EMS Annual Meeting (Vancouver, 2006. 9. 16-21)

小原有弘・ヒト由来培養細胞系で多発する

クロスコンタミネーションの検出. 第 7 回アデノウイルス研究会 (2006. 11. 19)

小原有弘・hTERT により不死化したヒト間葉系幹細胞の染色体安定性と形質. 日本再生医療学会 (2007. 3. 13-14)

誌上発表

小原有弘, 水澤博

JCRB 細胞バンクの事業の概要

分子細胞治療 vol. 5 no. 2 (2006)

Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh

M, Shioda S, Ozawa Y, Ohtani A, Morita
K, Hirano T, Terai M, Umezawa A,
Mizusawa M. Chromosomal Instability in
Human Mesenchymal Stem Cells
Immortalized with Human Papilloma
Virus E6, E7 and hTERT Genes. • In Vitro.
2007 in press

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

表1 2ndプライマー一覧

| | 2nd プライマー | プライマー塩基配列 (5' -3') | 増幅予測サイズ (bp) |
|-------|------------------------|------------------------------|--------------|
| Mix 1 | Human F | TATTGCAGCCCTAGCAGCACTCCA | 441 |
| | Human R | AGAATGAGGAGGTCTGCGGC | |
| | Mouse F | GCACTGAAAATGCTTAGATGGATAATTG | 948 |
| | Mouse R | CCTCTCATAAACGGATGTCTAG | |
| | Rat F | CAATCCACCAAGCACAAGTG | 493 |
| | Rat R | CCCCAACCGAAATTTGGTAGTTC | |
| | Rabbit F | CATGCAAGACTCCTCACGCCA | 704 |
| | Rabbit R | GGGCTTTCGTATATTCTGAAG | |
| | Feline F | TAGAACACCCACGAAGATCC | 1391 |
| | Feline R | CATATGGTCTCTTTGGGTCG | |
| | Bovine F | CCTAGATGAGTCTCCCAACTC | 1090 |
| | Bovine R | GTTGTTTAGTCGAGAGGGTATC | |
| | Swine F | CCTATATTCAATTACACAACCATGC | 819 |
| | Swine R | GCGTGTGCGAGGAGAAAGGC | |
| Mix2 | African green monkey F | CCAGAAGACCCACGATAACTCTCA | 301 |
| | African green monkey R | TGTTAGCTCAAGGTAATCGAGTTGTAC | |
| | Cynomolgus F | AGTGAGCGCAAACGCCACTGC | 1132 |
| | Cynomolgus R | GTTAACAGTGAAGGTGGCATG | |
| | Chinese hamster F | CCGGCGTAAAACGTGTTATAGACT | 601 |
| | Chinese hamster R | GTATTAGGTATAATATCGGCAGTC | |
| | Syrian hamster F | GACCTCTTAGGTGATTCCCTAC | 245 |
| | Syrian hamster R | GTATGAAGAAGGGGTAGAGCA | |
| | Guinea pig F | GCCCTATGTACCACACTCAG | 339 |
| | Guinea pig R | CCTTAGCTTTCGTGTGTCGGACTTA | |
| | Canine F | GCCCAACTAACCCAAACTTA | 755 |
| | Canine R | GGTTAACAATGGGGTGGATAAG | |
| | Avian F | GTATTCCCGTGCAAAAACGAG | 197 |
| | Avian R | CTTAGTGAAGAGTTGTGGTCTG | |

表 2 培養細胞のウイルス検査結果一覧

| Cell No. | Cell Name | Lot No. | GAPDH | CMV | EBV | HHV6 | HHV7 | BKV | ADVI | parvoB19 | HTLV1 | HIV1 | HIV2 |
|------------|-----------|----------|---------------------|-----|-----|------|------|-----|------|----------|-------|------|------|
| | | | JCV HBV HTLV2 | | | | | | | | | | |
| JCRB1179 | KMS-11 | 11242006 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0403 | HuH-7 | 040396 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB9004 | HeLa | 05232001 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0156 | KHYG-1 | 01092001 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1185 | KMS-21BM | 02072007 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1187 | KMS-26 | 02232007 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1180 | KMM-1 | 11212006 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1167 | NCR-G2 | 10112006 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1184 | KMS-24 | 02192007 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1166 | NCR-G1 | 08172006 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0160 | LI90 | 10262001 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB9010 | HeLa S3 | 120292 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB9068 | 293 | | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0142 | NCG16 | 122299 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| NIHS0205 | NCE16 | 080999 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB9017 | WI-38 | 122993 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0135 | MT-4 | 031699 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| JCRB0128 | TK-1 | 063098 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0208 | CCK-81 | 062298 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0612 | GO TO | 050698 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1034 | OVS-11 | 01232003 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1027 | SAT | 01312003 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1029 | JHH-5 | 03282003 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB9012 | RAJI | 042095 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0611 | KATOIII | 082995 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB9048 | MOLT3 | 100995 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0254 | MKN45 | 111795 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB9083 | LoVo | 102595 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0621 | NB-1 | 120595 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0226 | COLO201 | 071498 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB9123 | B95-8 | 072795 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0019 | K-562 | 020190 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0138 | KHM-3S | 081799 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| NIHS0426 | PL507 | 07192006 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1155 | Yub625 | 08012006 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1031 | JHH-7 | 12202002 | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| JCRB1042 | BSL2KA | 03072003 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1066 | KMM-2 | 09102003 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| HSRB0024 | KMRC-20 | 02072003 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| NIHS0325 | MKN28 | 12062002 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| NIHS0314 | Kasumi-6 | 09242002 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0077 | PG-3 | 110794 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0076 | A549 | 120498 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| RCB999 | MKN7 | #1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0112.1 | THP-1 | 072396 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB0114 | LC4-1 | 122090 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| NIHS0270 | IHH-4 | 09202001 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| HSRB0032 | PH61-N | 12022002 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JCRB1068 | IRC-2 | 08192003 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| NIHS0325 | MKN28 | 12062002 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

表 3 DAPI 染色法による染色体解析の結果一覧

| Cell No. | Cell Name | Slide No. | Lot# | PDL | Mode |
|------------|-------------|-----------|------|-----|------|
| JCRB1155 | Yub625 | H-456 | p5 | 10 | 46 |
| JCRB1155 | Yub625 | H-465 | p8 | 20 | 46 |
| JCRB1156 | Yub631 | H-455 | p5 | 8 | 46 |
| JCRB1156 | Yub631 | H-464 | p8 | 18 | 46 |
| JCRB1156 | Yub631 | H-476 | p13 | 30 | 46 |
| JCRB1130 | PL507 | H-457 | p5 | 16 | 46 |
| JCRB1130 | PL507 | H-461 | p6 | 20 | 46 |
| JCRB1130 | PL507 | H-466 | p8 | 26 | 46 |
| * JCRB1130 | PL507 | H-473 | p11 | 36 | 46 |
| NCTR0005 | hMSC(MSCBM) | H-487 | p5 | +4 | 46 |
| * NCTR0005 | hMSC(MSCBM) | H-494 | p11 | +18 | 46 |
| * NCTR0005 | hMSC(DMEM) | H-495 | p11 | +15 | 46 |
| JCRB0332 | AT(L)6KY | H-478 | p4* | +8 | 46 |
| JCRB0332 | AT(L)6KY | H-493 | p21* | +40 | 46 |

*mFISHを行なった染色体標本

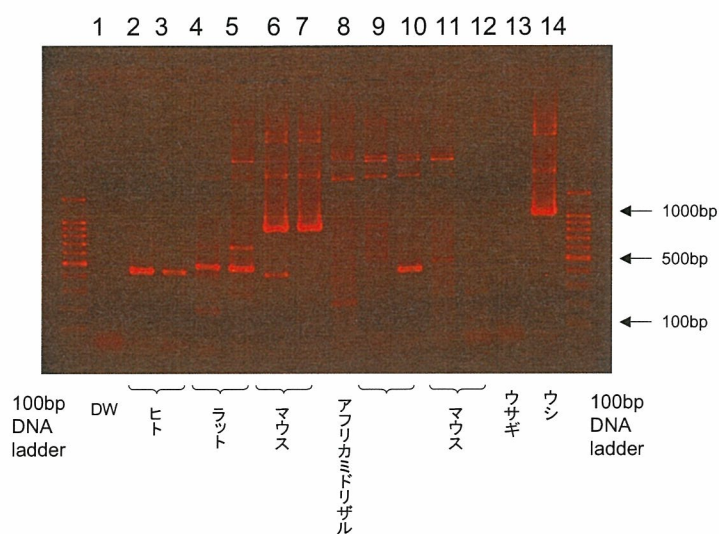
表 4 ギムザ染色法による染色体解析の結果一覧

| Cell No. | Cell Name | Animal | Tissue | Mode | 2n |
|------------|-----------|-----------------|------------------------------|------|----|
| JCRB9014 | 3T3 L1 | mouse | embryo | 71 | 40 |
| JCRB1054 | Hep G2 | human | liver, gallbladder | 51 | 46 |
| JCRB9068 | 293 | human | kidney | 71 | 46 |
| JCRB0023 | RBL-2H3 | rat | hemo-lymphocytic | 71 | 46 |
| JCRB0403 | HuH-7 | human | liver, gallbladder | 60 | 46 |
| * JCRB0160 | LI90 | human | liver, gallbladder | 46 | 46 |
| * JCRB0254 | MKN45 | human | stomach | 43 | 46 |
| JCRB0603 | V79 | chinese hamster | lung | 22 | 22 |
| JCRB1165 | HSP-239 | chimpanzee | peripheral blood lymphocytes | 48 | 48 |
| JCRB1177 | HSP-250 | chimpanzee | peripheral blood lymphocytes | 48 | 48 |

*ATCCに登録されていない株

図 1 Universal プライマーを用いた 1st PCR と、種検出プライマー Mix を用いた 2nd PCR からなるネストド PCR による各動物種の PCR 産物の、電気泳動装置 (Mupid-2) を用いた電気泳動像

(a) Mix 1



(b) Mix 2

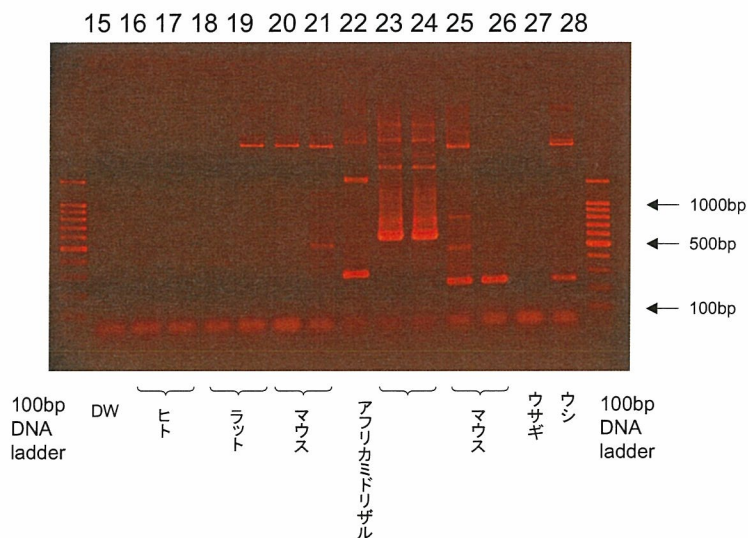
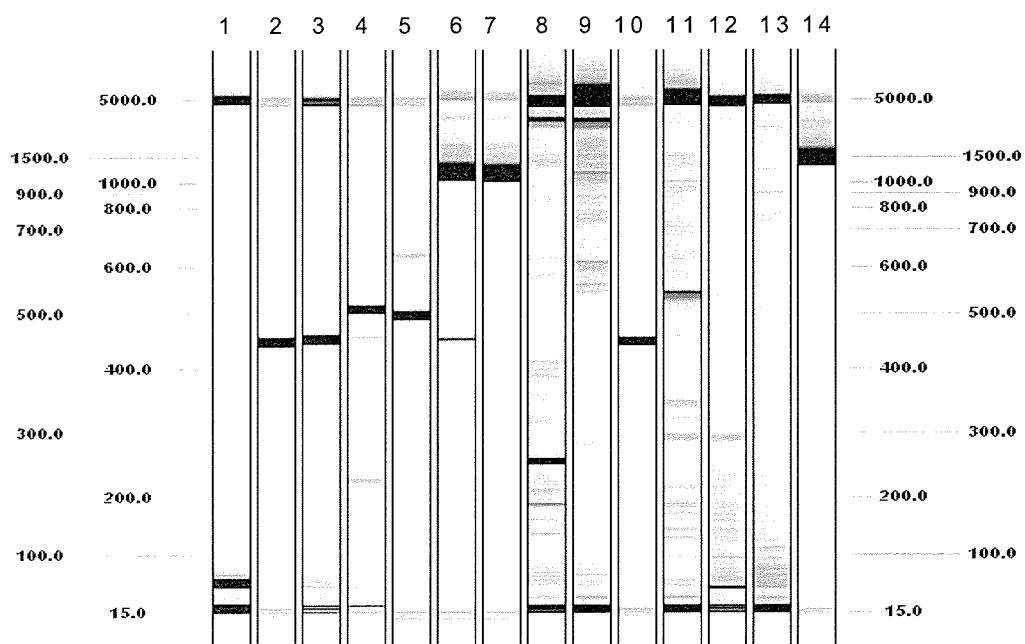


図2 Universal プライマーを用いた 1st PCR と、種検出プライマーMix を用いた 2nd PCR からなるネステッド PCR による各動物種の PCR 産物の、核酸キャピラリー電気泳動装置 HAD-GT12 System (Gene Inc.) を用いた電気泳動像

(a) Mix 1



(a) Mix 2

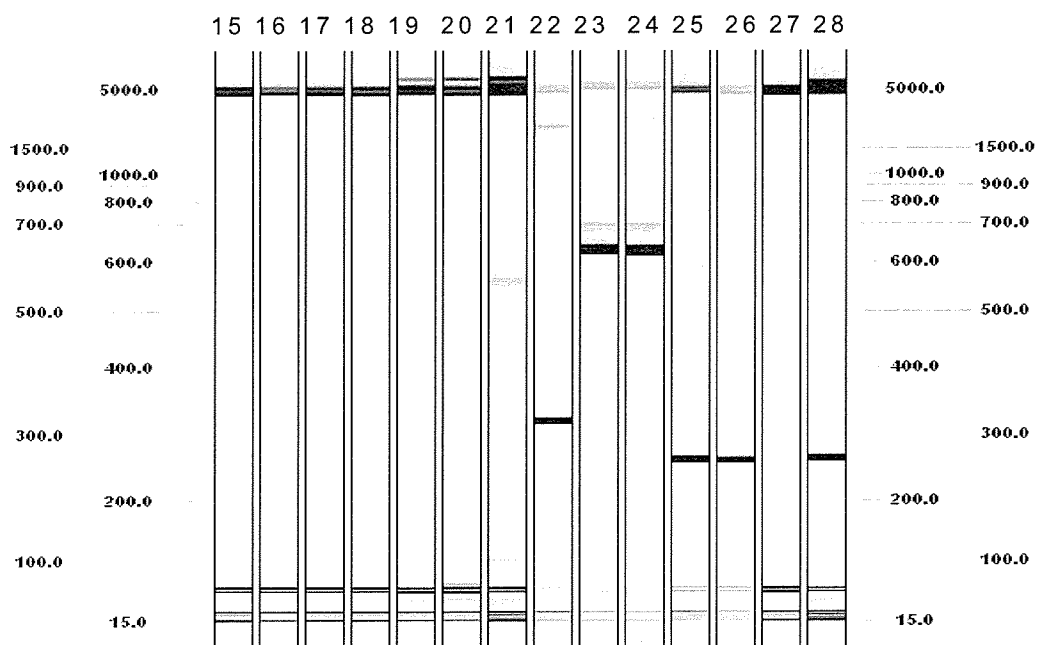


図3 DAPI 染色像 (JCRB1156;Yub631 (H-0464))

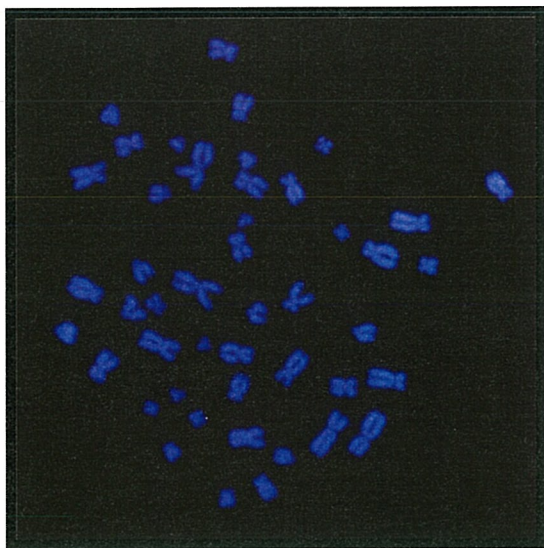
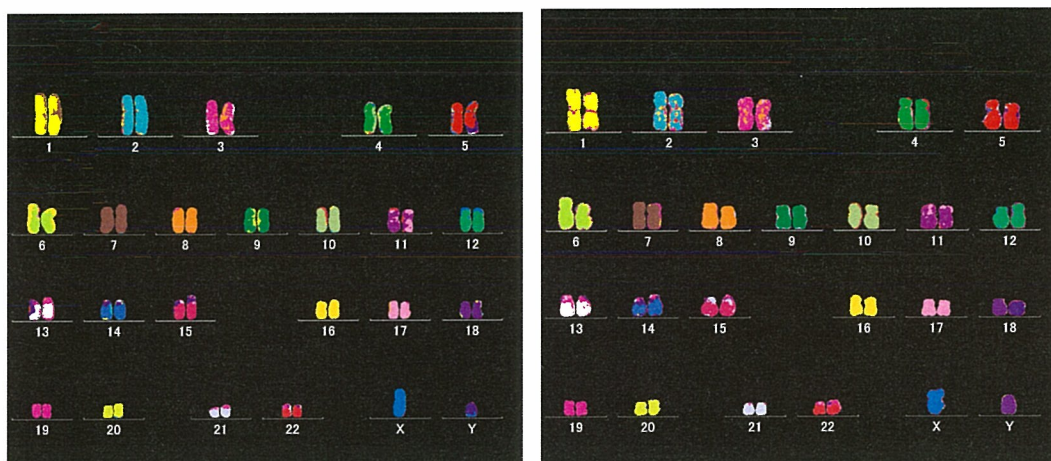


図4 Carl Zeiss イメージングシステム Isis を使用した NCTR0005;hMSc の mFISH 染色像



H-494、使用培地；MSCBM（指定培地）

H-495、使用培地；DMEM

図5 JCRB1165;HSP-239 のカリオグラム

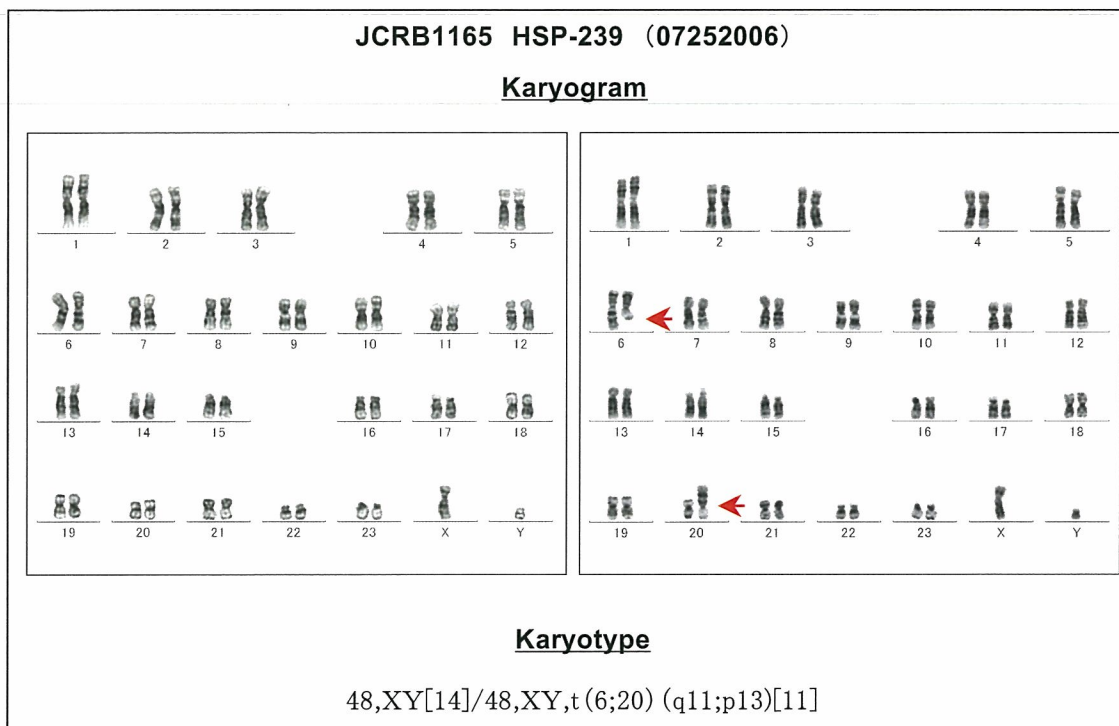
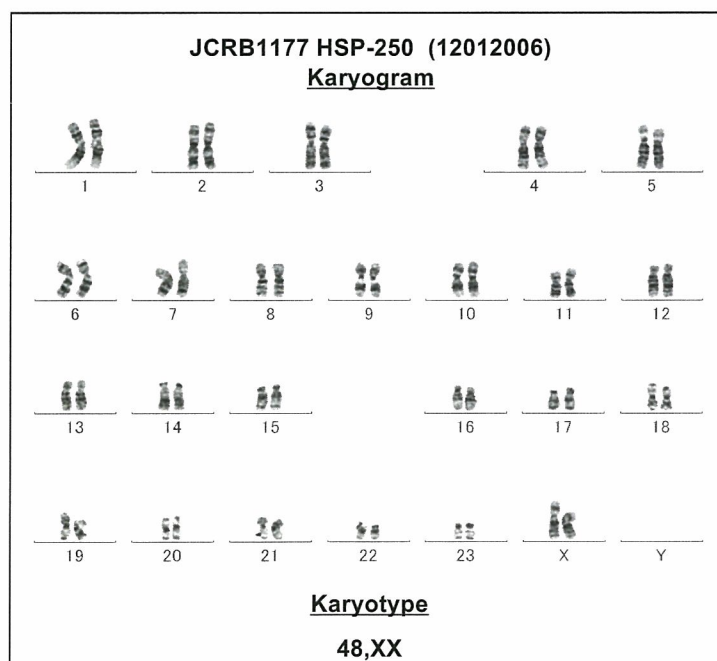


図6 JCRB1177;HSP-250 のカリオグラム



プロトコール1 DAPI 染色法

1. 染色体標本に DAPI 蛍光色素を適量載せて染色する。
2. カバーグラスをかけ、カバーグラスの全周囲をシールする。

プロトコール2 染色体標本作製プロトコール1

I 標本作製に必要な試薬類

- ・ コルセミド溶液
- ・ トリプシン溶液
- ・ メタノール
- ・ 酢酸
- ・ 低張液 0.075M KCl (略してK)
- ・ 低張液 1%(W/V) クエン酸-3-ナトリウム (略してC)

II 標本作製

1. 60m/m dish または 100m/m dish に細胞を播種し、継代培養する。その際、培養液量をチェックしておく。
2. 細胞の対数増殖期を見計らって、コルセミド溶液を添加する（最終濃度約 0.04~0.08mg/ml ; 細胞のロットごとに最適条件を決めておく）。
3. 培養を継続し、増殖速度に応じて、コルセミド処理の時間を決める。通常 2 時間程度 (30 分~6 時間)。
4. 細胞を 15ml チューブに回収する。接着性細胞の場合は、トリプシン処理の時間を短めにする。また、最適低張液の組成が未知の場合は、細胞懸濁液を数本に分けておく。
5. 1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清をデカントで捨てる。
6. 低張処理を行う。最初 1ml の 0.075M KCl のみで各チューブのサンプルを懸濁させ、次に予め設定しておいた C:K の比率になるように総量 5ml の低張液を加える。
7. 37°C インキュベーター内にチューブを寝かせて、22 分間静置。
8. カルノア固定液 (メタノール:酢酸=3:1) を調整し (用時調整、1 時間以上経ったものは使用しない)、各チューブに 1ml ずつ加え、静かに混和させる。
9. 1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清をデカントで捨てる。
10. カルノア固定液を各チューブに 5ml ずつ加え、混和させる。
11. 1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清をデカントで捨てる。
12. カルノア固定液を各チューブに 5ml ずつ加え、混和させる。

13. 1200 rpm、室温、5分間の遠心後、上清をデカントで捨てる。
14. カルノア固定液を各チューブに0.5ml ずつ程度加え、混和させる。
15. スライドグラス上にカルノア固定液の細胞懸濁液を染色体メタフェーズ展開装置 HANABI（株式会社 アドサイエンス・テクノロジー）により展開させる。
16. 各スライドグラスの右端に、日付、細胞名、細胞番号、ロット番号、G:Kの比率、スライド番号を表記し、2枚ずつペアでセロテープで留め、ポリエチレンの袋に封入する（ポリシーラー）。
17. 使用時までフリーザー内（ -20°C または -80°C ）で保存する。

プロトコール3 mFISH プロトコール

I 必要な試薬と器具

- ・ ヒト用 mFISH プローブ
- ・ コプリンジャー
- ・ $0.1\times\text{SSC}$
- ・ $1\times\text{SSC}$
- ・ $2\times\text{SSC}$
- ・ 0.07N NaOH
- ・ $30\% \text{EtOH}$
- ・ $50\% \text{EtOH}$
- ・ $70\% \text{EtOH}$
- ・ $100\% \text{EtOH}$
- ・ $4\times\text{SSCT}$
- ・ $1\times\text{PBS}$
- ・ ペーパーボンド（コクヨ）
- ・ カバーグラス
- ・ コプリンジャー
- ・ ウォーターバス

II 実際の手順

* あらかじめコプリンジャーに必要な試薬類をいれ、指定された温度で保温しておく。

1. ハイブリダイゼーション

1) プローブ液の調整

- i. ヒト用 mFISH プローブを必要量エッペンに取り分ける。

ii. 75°Cで分間インキュベートし、プローブ DNA を変性させる。

iii. 氷上で急冷する。

2) スライドガラスの処理

iv. スライドガラスの染色体展開領域をダイヤモンドペンでマークする。

v. コプリンジャーを用いて 0.1×SSC 中（室温）にスライドガラスを洗めて、室温で1分間インキュベートする。

vi. コプリンジャーを用いて 2×SSC（70°C）にスライドガラスを洗めて、70°Cのウォーターバス中で30分間インキュベートする。

vii. ウォーターバスからコプリンジャーごと取り出し、37°Cまで冷却する（約20分）。

viii. コプリンジャーを用いて 0.1×SSC 中（室温）にスライドガラスを洗めて、室温で1分間インキュベートする。

ix. コプリンジャーを用いて 0.07N NaOH 中（室温）にスライドガラスを洗めて、室温で1分間インキュベートし、染色体 DNA を変性させる。

x. コプリンジャーを用いて 0.1×SSC 中（4°C）にスライドガラスを洗めて、4°Cで1分間インキュベートする。

xi. コプリンジャーを用いて 2×SS 中（4°C）にスライドガラスを洗めて、4°Cで1分間インキュベートする。

xii. 30% EtOH、50% EtOH、70% EtOH、100% EtOH へとスライドガラスを移し、段階的に標本を脱水する（室温）。

xiii. スライドガラスをコプリンジャーに立てかけて風乾させる。

xiv. 1)で調整したプローブをスライドガラスのマークした領域に載せる。

xv. カバーガラスを載せ、気泡を追い出してからペーパーボンドで全周囲をシールする。

xvi. 密閉湿箱に納め、37°Cで一晩以上かけてハイブリダイゼーションさせる。

2. スライドガラスの洗浄と対比染色

i. ペーパーボンドのシールを剥がし、カバーガラスをはずす。

ii. コプリンジャーを用いて 1×SSC（75°C）にスライドガラスを洗めて、75°Cのウォーターバス中で5分間洗浄する。

iii. コプリンジャーを用いて 4×SSC（室温）にスライドガラスを洗めて、室温で5分間インキュベートする。

iv. Blocking reagent 50 mL を載せてから、カバーガラスを載せて 37°Cで10分間インキュベートする。

v. コプリンジャーを用いて 4×SSC（室温）にカバーガラスを外したスライドガラスを洗めて、室温で洗浄する。

- vi. Blocking reagent 50 mL と detection reagent 1 mL を載せてから、カバーグラスを載せて 37°C で 15 分間インキュベートする。
- vii. コプリンジャーを用いて 4×SSCT (室温) にスライドグラスを沈めて、室温で 3 分間洗浄する。この操作を 2 回行う。
- viii. コプリンジャーを用いて 1×PBS (室温) にスライドグラスを沈めて、室温で 3 分間洗浄する。
- ix. コプリンジャーを用いて MQ 水 (室温) にスライドグラスを沈めて、洗浄する。
- x. スライドグラスをコプリンジャーに立てかけて風乾させる。
- xi. DAPI/antifade を展開領域に 20 mL 載せ、カバーグラスを被せる。
- xii. 蛍光顕微鏡で観察する。

プロトコール4 ギムザ染色法

1. 染色体標本を 80%エタノールに数秒つける。
2. 3%Gimsa 溶液* で 20 分間染色する。
3. 軽く水洗いをしてから、自然乾燥させる。

*市販のギムザ原液を 1/15M Sorensen のリン酸緩衝液 (PH6.4) で希釈する。

プロトコール5 染色体標本作製プロトコールII

1. 培養最終継代後、対数増殖期 (通常 48 時間後) に コルセミド (最終濃度 0.05~0.08 mg/mL) を添加する。
2. コルセミド添加後、1 時間から 3 時間培養を継続する。
3. 上清を遠心管 2 本に回収する。
4. Dish を PBS(-) 4mL で洗浄し、遠心管本に回収する(*).
5. Dish に 0.25%Trypsin 3mL を加えて 37°C で 5 分間処理し、細胞の剥れを確認する(*).
6. 4 を Dish に戻し、ピペッティングして遠心管 2 本に回収する(*).
7. 1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清を除去する。
8. タッピングでペレットを解す。
9. 解したペレットに 0.075M KCl 3.0 mL を加えて Pipetting し、25 分~30 分間の低張処理を行なう。
10. 2 倍量のカルノア固定液 (メタノール:酢酸=3:1、用時調整) を加え、ピペッティングする。
11. 1000 rpm~1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清を除去する。

12. タッピングでペレットを解す。
13. 5 mL のカルノア固定を加えてピペティングする。
14. 1000 rpm~1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清を除去する。
15. タッピングでペレットを解し、総量 5ml のカルノア固定液を加えて 1 本の遠心管にまとめる。
16. 11~13 を 2 回繰り返す。
17. 1000 rpm~1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清を除去する。
18. 細胞数にあわせて適量のカルノア固定液を加えて、細胞浮遊液を調整する。
19. 4°C の 50% エタノール中で保存しておいたスライドガラスの水分をふき取り、18. のカルノア固定液の細胞浮遊液を滴下して展開を行なう。スライドガラスは湿らせた JK ワイパー上で乾燥させる。

*) 浮遊系細胞の場合は上記手順 4~6 は省く

プロトコール 6 G-染色法

GTG 法 (トリプシン処理法) : 原法は Seabright (1971)

1. 作成後 1 週間前後のスライドを 0.025% のトリプシン液 (*1 に 10~20 秒浸す。
(作製直後のスライドは温風乾燥機で 95°C 40 分の前処理することで良好な結果が得られる)
2. 直ちに 10% 血清を含むハンクス液、次いで 5% 血清を含むハンクス液でスライドを洗いトリプシンの作用を止める。
3. 3% ギムザ液 (*2 で洗い、血清を落とす。
4. 新しい 3% ギムザ液 (*2 で 7 分間染色する。
5. 軽く水洗して乾燥させる。

*1) 組織培養に使う 0.25% トリプシン溶液を原液とし使用時に蒸留水で 10 倍希釈して作製する。

*2) 市販のギムザ原液を 1/15M Sorensen のリン酸緩衝液 (PH6.8) で希釈して作製する。

ヒトゲノムのマクロ構造を指標としたヒト培養細胞の品質の高度化に関する研究

分担研究者 竹内昌男

独立行政法人 医薬基盤研究所・生物資源研究部・細胞資源研究室

客員研究員

研究要旨： 再生医療に用いる幹細胞は、増殖能だけでなく、細胞固有の分化能の維持とともに悪性変異が起らないことが要求される。そのモデルとして、hTERT, HPVE6/E7 遺伝子、がん遺伝子 Bmi-1 などの導入により長期増殖能をもつヒト骨髄、臍帯血由来間葉系幹細胞を用い、それらの長期継代培養による染色体の安定性を DAPI 染色法、FISH 法、CGH アレイ法により経時的に調べ、同時に細胞の脂肪細胞、骨芽細胞、神経様細胞への分化能も調べた。HPVE6/E7, Bmi-1 遺伝子を導入した3種類の細胞株は長期培養後、染色体数にかなりの変動があり、特に、13 番染色体の欠失が各細胞株に共通して観察された。hTERT 遺伝子のみを導入した細胞株は長期培養下でも染色体は安定であった。細胞分化能はいずれの細胞株も保持されていた。それ故、本研究から、再生医療に用いる細胞は基礎研究を十分実施し、細胞の性質を詳細に精査する品質管理の必要性を確認した。

A. 研究目的

細胞資源バンクで保存されている細胞の重要な役割の1つは、それぞれが生体内で果たしている機能を出来るだけ反映することである。

生体組織幹細胞（Tissue-specific stem cells）は損傷組織の再生や組織の恒常性（homeostasis）維持には無くてはならない細胞である。特に、間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell）は自己複製能だけでなく、親細胞と異なる表原型をもつ細胞になりうる多分化能の細胞であるので、再生医療では大きな期待が寄せられている。しかし、これらの細胞を移植して疾患の治療に利用するには、まだまだかなり高いハードルを越えなければならない。

その一つは、幹細胞の増幅である。生体から単離した幹細胞の治療に必要な量を確保するためには細胞を増やさなければならない。細胞には寿命があるので、当然増幅にも限界が伴う。そこを越える1つのモデルとして、本研究ではヒト臍帯血、骨髄由来の間葉系幹細胞にヒト telomerase reverse transcriptase (hTERT) やヒトがん遺伝子 HPV16E6/E7 や Bmi-1 遺伝子を導入することにより無限増殖を獲得した細胞株を用いて増幅によるゲノムのマクロ構造、すなわち染色体カリオタイプと間葉系幹細胞本来の分化能にどんな変化が見られか、再生医療への適用の可能性と問題点を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞 2 種類、UCBTERT-21 (JCRB1107) と UCB408E6E7 TERT-33 (JCRB1110)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 2 種類、UE6E7T-3 (JCRB1136) と UBE6T-6 (JCRB1140) は当 JCRB 細胞バンク(Osaka, Japan)で seed stock として保存された標品を使用した。臍帯血由来間葉系幹細胞株、UCBTERT-21 は hTERT 遺伝子のみで、UCB408E6E7TERT-33 は hTERT と HPV16E6/E7 の組み合わせ遺伝子により不死化したものであり、Plusoid M (Med-Shirotori Co. Japan) 培地で培養した。また骨髄由来間葉系幹細胞株、UE6E7T-3 は hTERT と HPV16E6E7 遺伝子で、UBE6T-6 は hTERT, HPV16E6 そして Bm-1 遺伝子の組み合わせ導入により不死化したものであり、Poweredby 10 培地 (Med-Shirotori Co. Japan) で培養した。培養開始の細胞密度は 2000 cells/cm² で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。PDLs の計算は次の式に従った: $PDLs = \log(\text{cell output}/\text{cell input})/\log 2$ 。本実験で培養を開始したときの PDLs は、UCBTERT-21, UCB408E6E7TERT-33, UE6E7-3 と UBE6T-6 それぞれ 42, 67, 40 と 56 であった。これらの細胞の取扱いについては、すべて当研究所の倫理委員会の承認を得ている。

2) 染色体解析

細胞は直径 100mm のプラスチックディッシュで培養し、継代後約 2 日目にコルセミドを加え、37°C で 2 時間インキュベートした後、トリプシンで剥離し、ディッシュから回収した。次に 0.075M・KC1 低張処理後、カルノア液で固定した。染色体数の測定には

metaphase spread chromosome を DAPI 染色し、Axioplan II imaging microscope (Carl Zeiss, GmbH) で観察し、プログラムソフト LeicaQFISH を用いて画像の取得と解析をした。pFISH 解析には 13 番染色体、17 番染色体に特異的なプローブ(XCP13 -kit - FITC、XCP17 - kit - Texas Red) (MetaSystems, GmbH)を、mFISH の解析にはマルチカラープローブ (24XCyte-MetaSystems'24color kit) を用いた。方法は MetaSystems 社のプロトコールに従った。FISH 像は Zeiss Axio imaging microscope (Carl Zeiss Microimaging, GmbH)で観察し、プログラムソフト mBAND/mFISH (MetaSystems, GmbH)で解析した。

3) CGH アレイ解析

サンプル DNAs は約 10⁶ の細胞から isolation kit (Amersham BioSciences, UK) と Spin Column (QIAGEN Co., Japan)を用いて抽出・精製した。標準 DNAs (Promega Co. USA) と試験 DNA は それぞれ Cy3 または Cy5 (BioPrimer DNA Labeling System, Invitrogen Co., Japan)で標識し、Cot-1 DNA とエタノールで共沈殿し、ハイブリダイゼーションキット(50% formamide, 10% dextran sulfate, 2xSSC, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH7)に溶かした。75°C 10 分処理で DNA を変性したのち、BAC Array (MAC Array™ Karyo 4000 Component, Macrogen Co., USA) で 42 °C、48-72 時間ハイブリダイゼーションした。50% formamide - 2x SSC (pH 7.0) で 50°C、15 分間、2x SSC - 0.1% SDS で 50 °C、15 分間洗浄し、100 mM sodium phosphate buffer (0.1% Nonidet P-40 (pH 8)を含む) で洗浄したのち各スポットの蛍光量を GenePix4000A (Axon

Instruments, USA) で測定し、MacViewer (Macrogen Instruments, USA) を用いてデータを解析した。

4) 分化能の測定

脂肪細胞への分化能を測定するため、カバースリップの上に培養した各細胞を誘導培地 (hMSC Differentiation BulletKit -Adipogenic ; PT-3004, Camblex BioScience Walterville, Inc. USA)、神経細胞への誘導には NPMM Bullet kit (NPMM™ BulletKit (B3209, Camblex BioScience Walterville, Inc. USA) を用いた。骨芽脂肪への分化誘導には 0.1 μM dexamethasone (Sigma Chemical Co., USA), 50 μg/ml L-ascorbic acid (Sigma Chemical Co., USA) と 10 mM β-glycerophosphate (Sigma Chemical Co., USA) を Plusoid-M 培地 (Med-Shirotori Co., Tokyo, Japan) 培地または Poweredby10 培地 (Med-Shirotori Co., Tokyo, Japan) に入れ、2-4 週間培養した。phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、4% paraformaldehyde で固定した。

脂肪細胞は Oil Red-O (Sigma Chemical Co., USA) 染色し、骨芽細胞には 0.25 mg/ml naphthol AS-BI phosphate および 0.25 mg/ml Fast violet LB salt で alkaline phosphatase 染色した。神経細胞の観察には、パラフォルムアルデヒドとメタノール固定したのち、anti-IIIβ tubulin 抗体 (Sigma Chemical Co. USA) または anti-neurofilament antibody NF-200 (Sigma Chemical Co., USA) と Texas Red-anti-mouse IgG 抗体 (Southern Biotechnology Associates, Inc., USA) で免疫染色した。

C. 研究結果

1) ヒト間葉系幹細胞の長期培養過程での染色体数の変化

がん細胞ではよく見られるように、今回研究に用いた不死化間葉系幹細胞でも染色体の異常が観察され、特に長期培養するとその頻度が高くなった。図 1 は hTERT 遺伝子のみと Bmi-1, E6, E7 and/or hTERT の組み合わせ遺伝子を導入して不死化したヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の染色体数の分裂回数 (PDL) による変動を示したものである。樹立直後は全ての細胞株の染色体数モードは 46 本(2n)であった。UCBTERT-21 細胞は PDL 133 にも及ぶ長期培養後でも安定であった (Fig. 1A and B)。一方、UBE6T-6 および UE6E7T-3 細胞には変化がみられた。PDL 62 の UE6E7T-3 は 90 %の細胞が 46 本の染色体をもっていたが、PDL 147 では染色体欠失により 44 本になった細胞が 43% もあった(Fig. 1E and F)。UBE6T-6 細胞でも同様な傾向であった(Fig. 1C and D)。UCB408E6E7 TERT-33 細胞もまた PDL 68 で near-diploid (24%) と near-tetraploid (53%)の二相性の細胞集団分布を示した (Fig.1G)。しかし、この near-diploid は不安定で、PDL 81 では細胞の 80% が near-tetraploid の 85-92 本の染色体をもっていた(Fig. 1K)。これらの結果から、UE6E7T-3, UBE6T-6 および UCB408E6E7TERT-33 細胞の染色体数は長期培養でかなり変動するが、UCBTERT-21 にはその傾向が見られないことが示された。

次に、染色体の不安定性を調べるために、FISH 法、CGH 法による解析を行った。PDL 52 の UCBTERT-21 細胞の mFISH 分析の結果は正常なカリオタイプを示した(Fig. 2A and 2B)。UBE6T-6 細胞は 43-45 本の染色

体数を示し、13, 16 and 19 番染色体の欠失が検出された (Fig. 2D and E)。UCB408E6E7TERT-33 細胞も不均一な染色体構成を示した。mFISH 分析の結果から UCBTERT-21 細胞以外は共通して 13 番染色体の欠失が示されたが、この結果は 13 と 17 番染色体のプロンプを用いた pFISH 分析によっても確かめられた (Fig. 2C and F)。UCBTERT-21 細胞では約 97% の細胞が 2 コピーの 13 番染色体をもっていることから、染色体構成が安定であることを示した (Fig. 2G)。UE6E7T-3 と UBE6T-6 細胞の染色体数は 43-45 本であり、UE6E7T-3 の 76% が、UBE6T-6 の 86% が 13 番染色体を一本だけ持っていた (Fig. 2I and J)。同様に、UCB408E6E7TERT-33 細胞は 70% が三本の 13 番染色体を持った near-tetraploid であった (Fig. 2H)。

さらに FISH 法により観察された染色体 13 番の欠失が CGH アレイ法によって確かめられた。長期培養の初期ステージ (青色スポット) と後期ステージ (赤色スポット) のデータを図 3 に示した。UCBTERT-21 細胞では培養の初期および後期において共に変化が認められなかった (Fig. 3A)。UBE6T-6 と UCB408E6E7TERT-33 細胞の培養初期に 13 番染色体が欠失していたことを FISH 法で認めたが、CGH 法からはさらに 4 番、9 番、16 番染色体も欠失していることを認めた (Fig. 3B and D)。UE6E7T-3 については、PDL 78 から PDL 101 の間で 16 番染色体の欠失も観察されたが、特に特徴的なことはこれら 3 種類の細胞株に共通して 13 番染色体の欠失が観察されたことである。これらのデータは FISH 分析の結果と一致した。

2) 不死化間葉系幹細胞の分化能

間葉系幹細胞は骨芽細胞、軟骨細胞や脂肪細胞に分化することができるし、ときには神経様細胞に分化したりすることが可能であり、すなわち多分化能を持っていると報告されている。今回用いた 4 種類の細胞株を適切な誘導培地で 2 ~ 4 週間培養した。特に、UE6E7T-3 細胞は他の細胞よりも脂肪細胞へ分化する能力が強い (Fig. 4Ab)。骨芽細胞への分化能の一番強いのは UCB408E6E7TERT-33 細胞であった (Fig. 4Ad)。UBE6T-6 細胞は形態学的、マーカー遺伝子発現において神経様細胞への分化を示した。誘導培地で 28 日間培養後、III- β -tubulin 抗体、または neurofilament NF-200 抗体による蛍光染色すると神経突起様構造が観察された (Fig. 4Af and Ah)。一方、誘導培地で処理する前の UBE6T-6 細胞ではこのような構造は見られなかった (Fig. 4Ae and Ag)。これらの結果を図 4B にまとめて記載した。

D. 考察

遺伝子治療に代わる細胞治療では、移植する細胞の量的、質的安全性とその効果が約束されなければならない。本研究では、遺伝子を導入したヒト臍帯血、骨髄間葉系幹細胞が *in vitro* 培養で遺伝子型、表現型にどんな変化を示すかを明らかにした。細胞治療の問題の 1 つに、移植する細胞が十分量でなければいけない。組織から分離された幹細胞は極めて少量であるので、それを *in vitro* で増幅する必要があり、それには細胞寿命の限界を解決しなければならない。細胞が限りなく増殖したり、細胞が生存し続けるための不可欠な遺伝子はがん細胞の不死化機構解明のための研究から得られたことが多い。梅沢らはこれらの遺伝子を間葉系幹細胞に導入し、多くの不

死化間葉系細胞株を樹立した。本研究で使用した4細胞株（UCBTERT-21, UCB408E6E7TERT-33, UE6E7T-3, UBE6T-6）のうち、hTERTのみで不死化した細胞株UCBTERT-21は細胞周期の制御に深く関わるp53/p21やpRB/p16^{INKA}経路の変異なしに寿命を相当のばすことができた。しかしながら、同じ遺伝子hTERTで不死化したヒトケラチノサイトは延命はしたが、pRB/p16^{INKA}経路の不活性化やp16発現のdownregulationが見られることが報告されている。これらのことから細胞のタイプによって不死化にはテロメア以外のバリエーションが存在する可能性が示された。

一方、ヒトパピローマウイルス16E6E7やBmi-1のがん遺伝子とhTERTを用いて不死化した細胞株UCB408E6E7TERT-33（臍帯血由来）、UE6E7T-3やUBE6T-6（骨髄由来）は不死化したものの長期培養を続けると、染色体数に大きな変化を示した。UCB408E6E7TERT-33細胞は培養初期にはdiploid (2n)であるが、培養期間が長くなるにつれて、tetraploid (4n)とtetraploidより少し少ない異数体aneuploid(4n-1~5)になる。同じようなパターンがUE6E7T-3やUBE6T-6でも観察された。最近、ヒトN/TERT-1ケラチノサイトやHeLa細胞のin vitro実験で、異数体aneuploidが形成される前にtetraploidの形成があり、それは分裂期に2つの娘細胞の不分離によるというnondisjunction説が報告されたが、古くからヒトがん細胞でも高頻度でtetraploidが観察されている。AneuploidのUCB408E6E7TERT-33細胞の染色体構成をCGH解析や13番染色体と17番染色体プローブを用いたpFISHで調べた結果は見事に細胞あたり17

番染色体は4本、13番染色体が3本であることが明らかになった。さらに驚いたことは、17番染色体は正常であるのに13番染色体の1本の欠失がdiploid UE6E7T-3やUBE6T-6両細胞の70~80%で観察されたことである。これらの3細胞株に共通してみられるこの現象から、この培養条件でこれらの細胞株が増殖していくためには13番染色体の欠失が重要であったことが示されている。特定染色体の欠失によるカリオタイプ変異は培養ヒトdiploid ES細胞でも報告されている。これまで染色体異数体はtetraploidから形成されるという主張が強かったが、本研究からtetraploidを経由せず、diploidからでも形成されるという異数体形成機構の新たな事実が示された。

tetraploid形成なしに起こる異数体形成機構は不明であるが、中心体が重要な役割をしている可能性が高い。正常細胞やUCBTERT-21細胞では、中心体が細胞あたり1~2個しかないものが、この3細胞株では3~10個も存在するものが細胞の12~35%にも及ぶ。この問題は次の機会に明らかにしたいと思っている。

細胞治療で最も重要な問題は移植する細胞の質的要素である。間葉系幹細胞が今日再生医療面で大きな期待を受けているのは、他の組織幹細胞ではみられないいろいろな他組織への分化能を持っているからである。この研究で用いた細胞株は臍帯血と骨髄由来の幹細胞であるが、in vitroに限られた条件下でも骨細胞、脂肪細胞、神経細胞への分化能を保持していた。遺伝子を導入してもそれはなんら変わらなかった。しかし、この研究では分化したかどうかの指標は細胞の特異的発現物質の検出によったもので、当然生理活性も伴わ