

2011/0021A

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業)

疾患研究のための細胞コレクションの資源化ならびに
品質評価法・特性解析法開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

課題番号： H22-創薬総合-指定-014

研究代表者 小原 有弘

独立行政法人医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部 培養資源研究室
〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8
電話：072-641-9851
FAX：072-641-9851
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>

平成24年 5月31日

目 次

I. 総括研究報告

- 疾患研究のための細胞コレクションの資源化ならびに
品質評価法・特性解析法開発に関する研究 ----- 1

小原 有弘

II. 分担研究報告

1. 細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究 ----- 7

小原 有弘

2. 細胞資源におけるウイルス検出法開発に関する研究 ----- 14

清水 則夫

3. マイコプラズマ検査法に関する研究 ----- 19

原澤 亮

4. 疾患研究の為の細胞コレクションの資源化ならびに
品質評価法・特性解析法開発に関する研究 ---- 24

平田 みつひ

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 28

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 30

平成23年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

疾患研究のための細胞コレクションの資源化ならびに 品質評価法・特性解析法開発に関する研究

研究代表者：小原 有弘 医薬基盤研究所難病・疾患資源研究部

研究要旨

本研究を実施している『医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・培養資源研究室』は、「生物研究資源基盤の整備」の実施を目的に研究を進めている。我々が取り組んでいる研究資源基盤とは①培養細胞（研究資源・材料）の収集、②収集した培養細胞の増殖（複製）、③増殖した培養細胞の評価（品質管理）、④評価した研究資源の適切な保存管理（資産管理）、⑤保存している研究資源の研究者への提供システム（分譲）の構築であり、我々は収集した研究資源を国家資産として適切に保管し国内外の生命科学研究の支援に有効に活用する責務を負っている。一方、培養細胞は典型的培養生物で様々な問題が起こりうる研究材料であり、厳密な監視を必須とする研究材料である。従って本研究の目的はこのような培養細胞について、質的・量的な改善開発研究を行うとともに、適切な監視体制を確立し国の生命科学研究のレベルを向上させることにある。

細胞培養技術は、無菌技術の開発により確立された便利な道具である反面、未だに様々な誤りが生じやすい。培養細胞と共存する微生物や同種細胞は汚染物とは認識し難い（マイコプラズマ、ウイルス、異動物種細胞、同動物種細胞）。誤認された細胞や汚染された細胞を使った研究は、捏造と誤解されかねない危険を含んでいると同時に、創薬研究においては正しい細胞の利用やウイルスが混入していないことを証明した材料の提供が必須である。さらに、税金の適正執行が以前にも増して強く求められるようになってきている現在、正しい細胞の提供がより重視されることは当然である。

しかし、細胞を監視し調査研究を推進するには細胞の集積を必要とするうえに多くの労力や研究費が必要となる地道な作業であるにも拘わらず、学問的には「細胞の正誤」という単純な結果しか得られないと理解する研究者が多く、敬遠されがちな課題である。従って、多数の細胞を収集する細胞バンクこそ、このような課題への積極的な関与が求められているのである。

そこで我々は、こうした課題に積極的に取り組み、培養細胞へのウイルス混入に関する精密な調査研究の持続的実施や、培養細胞の遺伝的な背景に関する調査研究を通じて培養細胞の品質評価法の開発を実施した。また、結論が得られたものについては速やかに細胞バンクの運営（分譲業務の実務）に取り入れて、ホームページを通じた利用者への情報公開を積極的に推進している。

分担研究者

清水則夫：東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス学 准教授

原澤 亮：岩手大学農学部 教授

研究の目的

『医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・培養資源研究室』は、総合科学技術会議答申(第5号)に基づいて厚生労働省として創薬研究(医学研究を含む)の研究基盤を整備する目的で、ヒトを中心とした生物系研究資源の収集と品質の高度化を目指した研究を実施するものである。医薬基盤研究所細胞バンクは、かかる目的で各種疾病に由来するヒト培養細胞ならびに正常ヒト培養細胞を積極的に収集し、国の研究資産として保存管理している。その業務はおよそ次の5点に集約される。①培養細胞(研究資源・材料)の収集、②収集した培養細胞の増殖(複製)、③増殖した培養細胞の評価(品質管理)と培養細胞の標準化、④評価した研究資源の適切な保存管理(資産管理)、⑤保存している研究資源の研究者への提供(分譲)である。

当該業務を通じて収集した培養細胞は年間約3500アンプルが研究者に提供され、数多くの生命科学研究に利用されている。医薬基盤研究所・培養資源研究室は、このように国内外の生命科学研究を支援しており、研究の活性化に貢献している。それ故誤りのある細胞を分譲することは許されないことである。ところが培養細胞とは本来ヒトの体の中に存在している組織や細胞を体外に取り出して人工的に培養しているため、利用しやすい反面様々な誤謬を生じ易い研究材料であることがはっきりしてきた。過去の研究を洗い出してみると、数多くの

研究が誤った細胞を利用して進められてしまっていたという事実が明らかになると共に、汚染微生物の混入に気が付かないまま研究を進めていたという事実も明らかになってきた。現在でも間違った細胞を使用した研究報告は後を絶たず、研究の成果に疑問が投げかけられているのが現状である。こうした中、研究成果の公表時に細胞の品質チェックをしなければならないという、論文投稿規程の改訂が主要な科学雑誌において進んでおり、これらのチェックに対応した細胞の使用が求められるようになった。

実際に細胞を汚染する微生物としてはマイコプラズマや一部のウイルスが細胞と共存してしまうことが考えられるが、汚染が発生しても通常の培養によっては存在が認識されずに汚染した細胞を研究に利用している例も多発している。これもPCR法が開発されて以来分析技術の改良が進められて、微量混入微生物の高精度な検出が可能になったことによって明らかにされてきた。

本研究班は、こうした新しい遺伝子解析技術を積極的に導入して収集した培養細胞を継続的に調査することによって細胞の相互混入(クロスコンタミネーション)の有無を確認してきた。また、PCR法をさらに改良したリアルタイムPCR法によって培養細胞を汚染する可能性のあるウイルスの検出を試みてきた。特に、企業研究者が国内の細胞バンクから提供されている細胞を利用できないと考えていた大きな理由がウイルス検査を実施していないという理由であっ

たことから、この検査法の導入が急がれていた。幸い、近年の技術開発によりリアルタイム PCR 法が確立し、そのプライマーセットが分担研究者の清水らによって開発されたことから、その技術を積極的に導入してウイルス検査体制を確立することとした。検査結果の詳細は分担研究者の報告にゆだねるが、概観すると想定外のウイルスが検出されたケースはごく一部に限られ、各細胞について原報どおりの結果であった。この結果により、細胞バンクとして、ウイルスが検出されなかった旨証明書を発行することが可能になったことから、多くの研究者への貢献を果たすことが可能になった。

HeLa 細胞が樹立されてヒト培養細胞の長期継代技術が確立したが、これは同時に HeLa コンタミネーションと呼ばれる細胞誤認をもたらし、初代培養細胞だと信じられて樹立された多数のヒト細胞が実は HeLa 細胞であったという結末をもたらした(1978年)。しかし、この当時はアイソザイムと核型分析による方法しかなかったため一応の結論を得たとしても、当時は確定的な結論とするにはまだ不安が残ったために HeLa 細胞の兆候が見られるという注意書きを細胞に添付するにとどまっていた(ATCC のカタログによる)。そして、その後英国の Jeffreys の研究により始まった DNA フィンガープリント法はヒト細胞の識別を遺伝的に可能にすることから注目を浴びたが、実験として再現性に難点があったためその後さらに改良が進められた。その結果、

PCR 法を利用した STR 分析法へとより汎用性が高い方法に発展することになり、我々を含めて世界の細胞バンク関係者によって注目されてヒト細胞の識別に積極的に取り入れられることになった。この結果、HeLa 細胞の混入について確定診断をすることが可能になり、現在では ATCC も明確に HeLa コンタミであると記述するようになった。

我々もこの方法を 1999 年から導入してヒト細胞のクロスコンタミネーション調査を開始し JCRB 細胞バンクが収集したヒト細胞の約 6% に誤りがあったことを明らかにし、ホームページを通じてその情報を公開した。しかし、重要な点はこの問題の深刻さを研究者自信に十分に認識してもらわなければならない点で、細胞バンクにおける研究はそこまで責任を持たなければならない。そのため、クロスコンタミネーションを起こしている細胞の一覧表を雑誌に投稿して注意を促し、ホームページを通じてクロスコンタミネーションを実際に検出できるよう確認してもらうようにすることなどが重要であると考えている。

その一環としてクロスコンタミネーションの分析を受託する検査を開始したが、同時に利用者が解析した結果を細胞バンクの STR データと比較して自らの細胞がユニークであるか否かを確認することが出来るホームページを作成して公開した。これにより各自が使っている細胞を細胞バンクのデータと比較してクロスコンタミが無いことを確認してから研究に取り掛かれるよう

になるので、今後積極的に利用を促したいと考えている。

以上、紹介したように、当研究班は数多くの培養細胞を研究資源化する過程で不可欠な培養細胞の品質を評価する方法を検討すると同時に、目途がついた方法については収集した細胞を評価するために日常的な業務の中に組み込んでいく作業も実施している。それにより利用者である研究者に対して高度な品質を持った細胞を提供する基盤を確立することが可能になるものである。実際、細胞バンクが大阪に移転後品質管理体制を強化してきており、それと呼応するように分譲数も増加しつつある。品質管理体制の強化と分譲数の増加は無関係では無いものと信じている。

研究方法

<疾患研究のための細胞コレクションの資源化>

・ 高発がん性遺伝病患者由来細胞の資源化に関する研究

網膜芽細胞腫、コカイン症候群などの遺伝性疾患患者由来細胞を資源化し、研究者への分譲体制整備を行った。

<細胞資源の品質評価ならびに特性解析法開発に関する研究>

・ 染色体詳細解析による品質評価方法に関する研究

染色体の基本的な分析手法であるDAPI染色法、G-バンド法、FISH法、アレイCGH法などを用いてH23年度は細胞バンクに新

たに受け入れた細胞株と再測定した細胞株について染色体数を測定し、それらの分布を調べた。

・ 細胞資源同士の混入・入れ替わりの排除

プロメガ社製PowerPlex 16HS systemを用いてSTR-PCR解析による細胞個別識別検査を行った。

・ 微生物汚染の排除

①ウイルス検査

培養細胞からAmersham社製 GenomicPrepもしくは、QIAGEN社製 AllPrepを用いてゲノムDNAを抽出し、東京医科歯科大学清水らの方法でウイルス検出用プライマーを付着乾燥させた検査用プレートを検査に使用した

②マイコプラズマ汚染検査

検査試料となる培養上清を用意し、MycoAlert Reagent, MycoAlert Substrateを溶解させた。室温で15分間静置し、検査試料(100 μ L)にMycoAlert Reagent(100 μ L)を加えて、室温で5分間静置した。ルミノメーターで測定(測定値A)後、MycoAlert Substrate(100 μ L)を加え室温で10分間静置し、ルミノメーターで測定(測定値B)した。判定は測定値BとAの比率を求め(B/A)、比率が1以上の時をマイコプラズマ陽性と判定した。

・ ゲノム解析・遺伝子発現解析・機能解析による標準化された細胞の構築

アレイCGHを用いて、ヒトiPS細胞等の幹細胞におけるゲノム詳細解析を実施した。

結果及び考察

＜疾患研究のための細胞コレクションの資源化＞

・ 高発がん性遺伝病患者由来細胞の資源化に関する研究

色素性乾皮症19種、ファンコニー貧血症4種などの遺伝性疾患患者由来細胞の資源化を実施した。疾患メカニズムの解明や治療薬・治療法開発に有用な資源として、また疾患iPS細胞樹立のための材料として利用されている。

＜細胞資源の品質評価ならびに特性解析法開発に関する研究＞

DNA試料を用いたウイルス検査法によるウイルス検査を細胞バンクに登録されているヒト由来細胞で継続実施し、679細胞種の検査を終了した。細胞資源のウイルス検査法を実施し、細胞資源の登録情報として研究者へ提供することにより研究者の安全を確保するとともに、細胞資源のウイルス汚染状況の確認を行った。その結果、ヒト由来細胞を中心に679検体を検査し、56検体（53細胞株）でウイルス検査陽性の結果（確定済み）を得ることが出来、細胞資源のウイルス汚染の現状を把握することができた。今後、研究者への情報提供を行うとともに、更なる検査項目の追加を行い、世界最高水準の細胞資源を保有する細胞バンクを目指す。

4. 評価

1) 達成度について

(独)医薬基盤研究所・培養資源研究室はJCRB細胞バンクとして65種の新規細胞の収集、3539アンプルの分譲を行い、本研究を通じて新たな品質管理法開発による、細胞資源の品質高度化に取り組んだ。その結果ウイルス汚染検査実施は世界の細胞バンクに先駆けて我々の細胞バンクで確立することができた。今後、創薬・再生医療研究など多岐にわたる研究に供される細胞資源は、ますます高品質であることが要求されると考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々は、本研究を通じて多くの研究者によって樹立された培養細胞の品質を高度化し、誤った細胞や汚染された細胞を排除するシステムを確立し運用している。さらに、誤謬や汚染を含む細胞を研究に利用することの問題点をホームページに掲載し、正しい細胞を利用するよう積極的な啓蒙活動も行っている。これにより多くの研究者が誤謬や汚染を避ける必要性を強く認識するようになってきている。誤謬や汚染を含む研究材料を使った研究がどれほど研究費を浪費するかを考えれば、こうした細胞バンクの活動やそれを整備するための研究には極めて大きな社会的また学術的意味が強くある。

3) 今後の展望について

JCRB細胞バンクが分譲した細胞数は本年度3,539アンプルとなり、国内外の研究者に有用な細胞資源の供給を実施す

ることが出来た。これは培養細胞を用いた研究が広く普及したことと、保有する細胞資源の数が増加しているのに比例していると考えるのが妥当である。しかし、細胞を用いた研究にはトレンドのようなものがあり、現在は再生医療・細胞治療の実現に向けた研究への応用技術開発に力が注がれており、細胞バンクからも分化能を有する細胞の分譲が増加した。これにあわせて品質管理に注目する研究者が増え、将来ヒトへの適用を視野に入れ、細胞の汚染、特にウイルス汚染に非常に関心がもたれているのが現状である。世界に先駆けて全保有細胞のウイルス検査情報提供を確立することにより、より品質の高い細胞を提供する細胞バンクとの認知度を上げ、他の細胞バンクとの差別化につながることを期待している。また、研究者のニーズに合わせた細胞の供給を実現するため、遺伝病患者由来細胞株をはじめとする疾患関連細胞株の供給体制を確立し、厚生労働省の細胞資源バンクとして確固たる地位を築きあげることが目標としたい。

5. 結論

細胞資源のウイルス検査の実施ならびに新たな品質評価法の開発を実施し、細胞資源の高度化を行った。細胞資源バンクが果たすべき役割を担うことで、研究者が安心して利用できる細胞資源の確立に努めた。

今後、日本の厚生労働省の細胞資源バン

クとして国家の生命科学研究の推進に貢献する研究基盤の構築を目指すものである。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告書

細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究

研究代表者	小原 有弘	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	研究員
協力研究者	塩田 節子	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	林田 みどり	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	大谷 梓	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	家村 将士	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	松永 典子	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	平山 知子	(独) 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員

研究要旨

我々厚生労働省の細胞バンクである JCRB 細胞バンクでは 1300 株にもおよぶ細胞資源を保有しており、年間 3500 アンプルを提供している。また、疾患関連細胞として高発がん性遺伝子疾患患者由来細胞株の資源化を進めており、これら有用細胞資源の品質管理ならびに品質評価法開発を通じて、生命科学研究の研究基盤の構築を目指している。本研究では遺伝性疾患患者由来細胞の資源化を行うとともに、細胞を扱う研究者の安全を確保する目的と将来ヒトへの応用も視野に入れた研究の目的のため、細胞品質管理としてのウイルススクリーニング検査を継続実施し、細胞資源の登録情報として研究者へ提供することにより研究者の安全を確保し、細胞資源のウイルス汚染状況の調査研究を行った。その結果、ヒト由来細胞を中心に 679 検体を検査し、56 検体（53 細胞）でウイルス検査陽性の結果を得ることが出来、細胞資源のウイルス汚染の現状を把握することができた。さらに、細胞品質管理の一環として細胞のクロスコンタミネーションの有無を確認する目的で STR 分析を実施してデータベース (STR profile database) を構築してきた (1999 年以来継続)。その結果多くのヒト細胞にクロスコンタミネーションのあることを明らかにしてきたが国際的にも大きな問題になりつつある。本年度、国際ガイドラインの策定が実施され、論文投稿規程の厳格化で細胞の品質チェックは細胞を使用した研究には必須となり、STR 解析ならびにそのデータベースは非常に重要なものとなっている。これらのデータベース整備と細胞比較確認を行うシステム整備が急務であり、本研究において整備を行った。今後、更なる検査項目の追加を行い、世界最高水準の細胞資源を保有する細胞バンクを目指す。

A. 研究目的

研究に用いる培養細胞の品質管理は非常に重要であり、研究によって得られた成果に非常に大きく寄与するが、研究者が研究に用いる培養細胞の品質に無関心であるのが現状である。細胞バンクとしてこれら細胞品質の保証を責務と考え、新たな品質管理法の開発ならびに品質評価法の開発を通じて、提供する細胞の高品質化を図り、これらの情報を、細胞バンクとして分譲する細胞の付加情報として整備することを目的とした。

本研究では高発がん性遺伝病患者由来細胞資源化を行うとともに、細胞のウイルススクリーニング検査による細胞品質の高度化、クロスコンタミネーション検索のデータベース整備を行った。

B. 研究方法

<遺伝性疾患患者由来細胞株の資源化>

京都大学放射線生物研究センターより寄託された遺伝子疾患患者由来細胞株のうち、網膜芽種、コカイン症候群、毛細血管拡張性運動失調症に関する細胞株の培養、増殖、品質管理を行い分譲可能資源として整備した。

<細胞の品質管理法の開発ならびに品質評価>

①細胞のウイルススクリーニング検査

・細胞株からのゲノム DNA の抽出
培養細胞から Amersham 社製 GenomicPrep もしくは、QIAGEN 社製 AllPrep を用いてゲノム DNA を抽出した。

・検査プレートの作成

東京医科歯科大学 清水らの方法でウイルス検出用プライマーを付着乾燥させた検査用プレートを宅配便にて受け取り、検査に使用した。用いたプライマーの種類は表 2 にまとめた。

・ウイルスゲノムの増幅

2xbuffer, RT-taq, RNase-Free H2O からなる Master Mix に細胞の totalRNA を 100 ng/well となるように加え、Prism7300 (アプライドバイオシステムズジャパン) で 50°C30 分処理後、PCR 反応: 95°C15 分処理後、94°C15 秒, 60°C60 秒の反応を 45 サイクルで行った。

②マイコプラズマ汚染検査

検査試料となる培養上清を用意し、MycoAlert Reagent, MycoAlert Substrate を溶解させた。室温で15分間静置し、検査試料 (100 μ L) に MycoAlert Reagent (100 μ L) を加えて、室温で5分間静置した。ルミノメーターで測定 (測定値A) 後、MycoAlert Substrate (100 μ L) を加え室温で10分間静置し、ルミノメーターで測定 (測定値B) した。判定は測定値BとAの比率を求め (B/A)、比率が1以上の時をマイコプラズマ陽性と判定した。

③ゲノム解析・遺伝子発現解析・機能解析

アレイ CGH を用いて、遺伝性疾患患者由来細胞株等のゲノム詳細解析を実施した。

<クロスコンタミネーション (細胞認証試験) に関する国際ガイドラインの策定>

細胞のクロスコンタミネーション (細胞認証試験) に関する国際ガイドラインを ATCC、DSMZ、など世界の細胞バンクならびに細胞

生物学研究者とともに作成した。

C. 研究結果

<遺伝性疾患患者由来細胞株の資源化>

京都大学放射線生物研究センターより寄託された遺伝子疾患患者由来細胞株のうち、網膜芽細胞腫 19 種、コカイン症候群 4 種、毛細血管拡張性運動失調症 5 種（表 1）などの遺伝性疾患患者由来細胞の資源化を実施した。疾患メカニズムの解明や治療薬・治療法開発に有用な資源として、また疾患 iPS 細胞樹立のための材料として利用されている。

<細胞の品質管理法の開発ならびに品質評価>

①細胞のウイルススクリーニング検査

DNA 試料を用いたウイルス検査法によるウイルス検査を細胞バンクに登録されているヒト由来細胞で継続実施し、679 細胞種の検査を終了した。細胞資源のウイルス検査法を実施し、細胞資源の登録情報として研究者へ提供することにより研究者の安全を確保するとともに、細胞資源のウイルス汚染状況の確認を行った。その結果、ヒト由来細胞を中心に 679 検体を検査し、56 検体（53 細胞）でウイルス検査陽性の結果（確定済み）を得ることが出来（表 2）、細胞資源のウイルス汚染の現状を把握することができた。

②マイコプラズマ汚染検査

本年度資源化した細胞 65 種のうち、12 細胞種（陽性率 18.5%）においてマイコプラズマ汚染が認められた。

③ゲノム解析・遺伝子発現解析・機能解析

遺伝性疾患患者由来細胞株のゲノム詳細解析を実施し、細胞のキャラクタライズ情報として情報登録した。

<クロスコンタミネーション（細胞認証試験）に関する国際ガイドライン策定>

細胞のクロスコンタミネーション（細胞認証試験）に関する国際ガイドラインを、ATCC、DSMZ、など世界の細胞バンクならびに細胞生物学研究者とともに策定した。作成したガイドラインは ANSI (American National Standards Institute) において承認され、頒布されている（参考 1）。詳細は web ページ参照：

<http://webstore.ansi.org/RecordDetail.aspx?sku=ANSI%2FATCC+ASN-0002-2011>

D. 考察

<遺伝性疾患患者由来細胞株の資源化>

高発がん性遺伝病患者由来細胞は京都大学放射線生物研究センターで長年にわたってコレクションされた細胞であり、JCRB 細胞バンクに一括寄託された。本細胞のコレクションは非常に貴重なコレクションであるが、これまで分譲に関する品質管理を実施していなかった。今後これらの細胞を用いた研究を発展させ、遺伝病に関する新たな知見が得られるよう早急に分譲体制の整備を進める予定である。本年度はその細胞の一部に関して資源化を実施し（網膜芽細胞腫 19 種、コカイン症候群 4 種、毛細血管拡張性運動失調症 5 種など）、細胞キャラクタライズ情報を付加のために染色体解析を実施し非常に有益な情報を得た。得られた情報は全て細胞の付加情報としてホームペ

ージ上で公開し、研究に有用活用できるようなシステムを構築した。

<細胞の品質管理法の開発ならびに品質評価>

①細胞のウイルススクリーニング検査

JCRB 細胞バンクで保有するヒト由来細胞株を中心にウイルススクリーニング検査を継続実施し、DNA 試料を用いたウイルス検査は既に679細胞株の検査を行った。その検査の中で、ウイルス陽性と判定されたのは56検体(53細胞株)であり、そのほとんどが文献報告されているウイルス汚染であった。しかし、一部は文献報告のないウイルス汚染であり、非常に興味深い知見が得られたと考えられる。また、本年度は共同研究者の清水がウイルス検査とともにマイコプラズマを同時検出できる検査法の開発を行ったので、今後細胞バンクの細胞資源に関する品質管理検査としての有用性を検討したい。今後検査対象ウイルスの情報を細胞情報として登録し、研究者へ提供するシステム整備を行う予定である。

②マイコプラズマ汚染検査

研究に用いる細胞のマイコプラズマ汚染の状況は高い汚染率を示しており、我々が過去に行った調査研究においては約25%の細胞がマイコプラズマに汚染されていると考えられる。これらの汚染細胞を用いて行った研究の信頼性・再現性にはその研究の信憑性を疑われるケースが多く、膨大な研究費・研究労力が無駄にあることが考えられる。その意味では細胞バンクが提供する細胞の品質保証は絶対的であり、そこに

こそ細胞バンクの存在意義があると考えられる。本年度資源化した細胞65種のうち、12細胞種(陽性率18.5%)においてマイコプラズマ汚染が認められた。検出された汚染は1つの研究室内で多くの細胞に汚染が広がった例であり、細胞培養培地、試薬、培養器具の共有などにより水平に汚染拡大したと考えられる。この事象は他の多くの研究室でも日常的に起こっていることと考えられ、これらの汚染排除には1. マイコプラズマに関する知識の普及、2. 簡単に検査できる方法の普及などにより研究者への啓発活動が重要になると考えられる。これらの責務も細胞バンクとして果たしていくよう、折に触れてマイコプラズマ汚染の影響、細胞の微生物汚染の影響に関する情報発信に勤めたい。また、本年度認められたマイコプラズマ汚染の中には、通常のマコプラズマ除去方法によってマイコプラズマを除去することができないものが散見され、その詳細に関して更なる研究を実施している。ヒトに対して病原性を有するマイコプラズマの耐性菌出現も非常に問題視されていることから、関連性にも注目したい。

③ゲノム解析・遺伝子発現解析・機能解析

本研究では遺伝性疾患患者由来細胞資源の染色体解析による細胞特性解析の可能性について研究を行った。G-band法は職人的技術を要するが比較的安価に解析が可能である。しかし、構造異常や大きな染色体の変化を捉える事は可能であるが、mFISH法やアレイCGH法と比べると染色体の異常を

見逃す可能性が高いといえる。今回の研究においても G-band 解析において正常核型と判定された細胞において mFISH 法によって異常が見出された。しかし、mFISH 法、アレイ CGH 法は設備や試薬コストが非常に効果であり、すべての細胞に対して解析を実施するとなると非常に大きなコストがかかり、研究者への負担も増加する。これら技術を組み合わせることで、より多くの情報を細胞に付加した形で研究者に細胞供給することが我々細胞バンクにとって重要な意味を持ち、今後の研究の基盤になると考えられる。

＜クロスコンタミネーション検索のためのデータベース整備＞

細胞のクロスコンタミネーションは世界的にも重要な事項として問題視されている。このクロスコンタミネーションによって多くの研究報告の信憑性が疑われ、多くの研究費・研究労力の浪費に繋がっているのは間違いのない事実である。既に報告されている間違った細胞を利用した研究も後を絶たず、これらが及ぼす研究社会への影響は計り知れないものだと考えられる。本年度実施した、国際ガイドラインの策定は、この問題に対して適した基準を作り、試験方法、検出感度、判定方法などについて研究者への普及を目指したものである。現在、論文投稿規程の厳格化によって、研究者が研究報告する際には細胞の品質チェックが義務付けられるようになってきた。本研究で行った国際ガイドライン策定により、研究者が研究の発表前に研究の信憑性・再現

性を確保し、間違った研究が排除されることを期待するものである。

E. 結論

培養細胞研究資源を使用した研究の質を高めるために、細胞バンクの果たす役割は大きく、研究者が必要とする細胞資源をラインナップするとともに研究に使用する細胞の出来る限りの保証を代行することが大きな役割であると考えられる。細胞の品質評価法開発ならびに特性解析技術の開発は研究者により良い細胞資源を提供するために必須であり、こららの継続的な研究実施が不可欠なものである。研究社会において日本人研究者が良い成果を出すため、その基盤整備を怠ることは出来ない。今後、本研究班で資源化した細胞が細胞ツールとして創薬基盤研究に貢献し、研究が進展・発展する可能性があり、そのために必要な情報を付加する技術を開発することが出来た。また、細胞バンクが永続的に細胞のコンタミネーションやマイコプラズマ汚染、ウイルス汚染チェックなどの品質管理技術の情報と研究者に必要な細胞資源の情報を提供して責務を遂行してゆくため、本研究班の継続実施が重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

適用なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal

stem cells and of cancer cell lines.

Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, Ohgushi H, Hirano T. Hum Cell. 24(1):2-8(2011)

- (2) Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. Int J Dev Biol. 55(2):181-7(2011)

- (3) ヒト多能性幹細胞の命名法の国際統一規格案について. 菅三佳, 高田圭, 小原有弘, 末盛博文, 青井貴之, 中村幸夫, 古江-楠田美保 再生医療(日本再生医

療学会雑誌) vol.11(1)2-8 (2011)

2. 学会発表


国内会議

- ①細胞認証試験によるリスク管理の必要性和論文投稿における国際動向、小原有弘、古江楠田美保、第29回日本ヒト細胞学会学術集会8月(富山)

	細胞番号	細胞名	疾患名	タイプ
1	JCRB0311	RB16KY	網膜芽種	両側性
2	JCRB0312	RB24KY	網膜芽種	両側性
3	JCRB0313	RB28KY	網膜芽種	片側性
4	JCRB1182	NCC-RbC-51	網膜芽種	両側性
5	JCRB1183	NCC-RbC-54	網膜芽種	両側性
6	JCRB1186	NCC_RbC-59	網膜芽種	両側性
7	JCRB1190	NCC-RbC-57	網膜芽種	片側性
8	JCRB1200	NCC-RbC-53	網膜芽種	片側性
9	JCRB1212	NCC-RbC-56	網膜芽種	両側性
10	JCRB1214	NCC-RbC-67	網膜芽種	片側性
11	JCRB1221	NCC-RbC-92	網膜芽種	片側性
12	JCRB1223	NCC-RbC-T1	網膜芽種	両側性
13	JCRB1303	NCC-RbC-83	網膜芽種	片側性
14	JCRB1305	NCC-RbC-39	網膜芽種	片側性
15	JCRB1326	NCC-RbC-60	網膜芽種	両側性
16	JCRB0328	RBL162T	網膜芽種	-
17	JCRB0329	RBL221T	網膜芽種	-
18	JCRB0330	RBL182T	網膜芽種	-
19	JCRB3005	R59	網膜芽種	両側性
1	JCRB0309	CS2OS	コカイン症候群	
2	JCRB0310	CS2AW	コカイン症候群	
3	JCRB1056	CS2OS(SVT)	コカイン症候群	
4	JCRB1059	CS2AWTERT	コカイン症候群	
1	JCRB0308	AT1OS	毛細血管拡張性運動失調症	
2	JCRB0316	AT2KY	毛細血管拡張性運動失調症	
3	JCRB0331	AT(L)5KY	毛細血管拡張性運動失調症	
4	JCRB0332	AT(L)6KY	毛細血管拡張性運動失調症	
5	JCRB0333	AT(L)7KY	毛細血管拡張性運動失調症	

表 1 資源化した網膜芽細胞腫、コカイン症候群、毛細血管拡張性運動失調症患者由来細胞株

参考 1



ATCC® Standards Development Organization

Designation: ASN-0002

**Authentication of Human Cell Lines:
Standardization of STR Profiling**

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

細胞資源におけるウイルス検出法開発に関する研究

研究分担者：清水 則夫 東京医科歯科大学 准教授

研究要旨

医薬品開発や iPS 細胞を含めた再生医療研究が加速されていることに伴い、ヒト培養細胞研究資源の重要性が著しく増している。培養細胞を使用した研究の質を確保するためには細胞株の品質管理を徹底することが重要であるが、研究用培養細胞資源へのウイルス汚染に関する検討は十分には行われていない。培養細胞研究資源を使用した研究の質を高めるためには、簡便・安価に多種類のウイルスを測定する手法を開発し、ヒト培養細胞研究資源のウイルス汚染の実態を把握することが必要である。本研究では、DNA ウイルスと RNA ウイルスの両方を 1 ステップ・同時・迅速・高感度に測定するため、同一バッファー・同一酵素・同一条件下で効率よく RT-PCR と PCR の両方を行うことが可能な実験系の開発を行い、感度・ダイナミックレンジともに使用に耐える試薬系の開発に成功した。

A. : 研究目的

体性幹細胞や iPS 細胞を用いた再生医療研究や医薬品開発が加速されていることに伴い、ヒト培養細胞研究資源の重要性が著しく増している。実際、再生医療の研究に用いる分化能を持ったヒト由来培養細胞のバンクへの寄託は増加傾向にある。今後、再生医療の研究の質を高めるためには、ヒト培養細胞研究資源の品質管理法を確立し、研究に使用する培養細胞の品質管理を徹底することが求められる。培養細胞に微生物が持続感染すると、細胞の性質・増殖性、遺伝子発現パターン、動物に接種した際の細胞の挙動や動物の反応などに大きく影響する可能性があるため、細菌・マイコプラズマ・ウイルスの汚染状況に関する情報は非常に重要である。実際、外国に細胞を出荷する際に

は、ウイルス汚染状況に関する情報の添付を求められる事が多く、今後その必要性は増していくものと考えられる。

細菌・真菌・マイコプラズマなどと違い、ウイルスの増殖には生きた細胞が必須であり、しかもウイルスは組織・細胞特異性が高いため、培養法により多種類のウイルス感染の有無を同時に検査することは極めて難しい。したがって、PCR 法などの核酸増幅法によりウイルスゲノムを直接検出することが必要となるが、その実用化には多くのウイルスを同時・高感度・安価に検出することが可能な新しい検査法の確立が望まれる。本研究では、細胞バンクが保有する細胞株や今後新たに寄託される培養細胞株の全数検査に使用する出来る実用的な新規ウイ

ルス検査系を確立することを目的として研究を行なっている。従来はDNAウイルスとRNAウイルスを別々に測定する場合、市販のRT-PCRキットを使用したPCRは感度が不十分のため、DNAウイルスとRNAウイルスを別々の実験系で測定していたため、煩雑な操作が必要であった。本研究では、DNAウイルスとRNAウイルスの両方を1チューブ内で、迅速・高感度・簡便に測定するため、同一バッファ・同一酵素・同一条件下で効率よくRT-PCRとPCRの両方を行う実験系の開発を目的に研究を行った。

B: 研究方法

1. RT-PCRとPCRの対象

1 Step RT-PCRのモデル実験系としてヒトのハウスキーピング遺伝子GAPDH(Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)を、PCRもでる実験系としてHHV6を選択した。

2. 増幅領域とプライマー・プローブ配列

○ GAPDH: 標的領域は下記146bp

```
601 aactttgata tcgtggaagg actcatgacc acagtcatg ccatcactgc caccagaagaag
661 actgtggatg gccctccgg gaaactgtgg cgtgatggcc gcggssctct ccagaacatc
721 atccctgct ctactggcgc tgcca
```

F-primer: 5' -aactttggtatcgtggaaggactca-3'

R-primer: 5' -tggcagcgccagtagaggcaggat-3'

Probe:

FAM-actgtggatggcccctccgggaaactgtgg-TAMRA

○ HHV6: 標的領域はDNA polymerase gene

F-primer: 5' - gaagcagcaacgcaacaca-3'

R-primer: 5' -acaacatgtaactcggtgtacggt-3'

Probe: FAM-aaccctgctgcccgtccc-iowaBlack

3. 試薬と反応条件

○ 5X RT-PCR Buffer

50mM Tris-HCL

250mM KCL

7.5 mM MgCL₂

2.7M Betain

0.025% Gelatin

○ 酵素

逆転写酵素: ReverseScribe(GW社)

PCR用酵素: HiTaq (抗Taq抗体含有: GW社)

○ 反応液組成

2xPremix (20μl反応系に10μl使用)

a. Buffer (5xRT-PCR)

b. dNTP Mix (final 0.5mM)

c. ReverseScribe 1μl (100U)

d. HiTaq 0.2μl (0.4U)

e. Primer 各 5 pmol Probe 7.5 pmol

f. RT-primerはPCR用のspecific primerを使用し、GAPDH RT-PCR法により増幅した。

○ウイルス遺伝子の増幅・検出にはアプライドバイオシステム社のABI-Prism 7300およびロッシュ社のLyghtCycler 480を使用。

○ RT-PCR, PCR反応条件

・逆転写反応: 42°C5分

・PCR反応: 95°C15秒, 60°C60秒 45サイクル

○ RT-PCRおよびPCRの同時測定の比較実験に使用した市販の1 Step RT-PCRキット

a. RT-PCR Quick Master Mix (東洋紡)

b. EXPRESS One-Step Super Script qRT-PCR Kit (Life technologies)

c. Titan one tube RT-PCR system (Roche)

d. PrimeScript One Step RT-PCR Ki: Perfect Real Time (Takara)

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要な研究は行なっていない。

C: 結果

1. 市販のOne Step RT-PCR Kitを使用したmRNA(RT-PCR)およびDNA(PCR)の検出

研究方法に記載した市販のOne Step RT-PCR KitのRT-PCRの性能を検証したところ、Takara社のPerfect Real Timeが最もより性能を持つとの結果が得られた(図1)。他のキットを使用した実験では、20pgのTotal RNAからの検

出は不能あるいは安定性の面で劣っているとの結果だった。

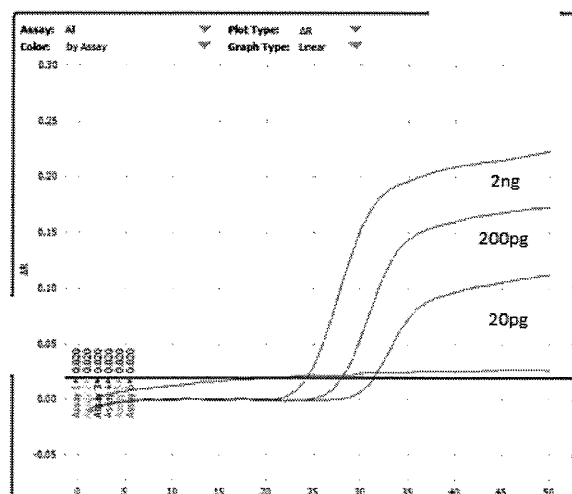


図 1 : Takara 社の Perfect Real Time による GAPDH 遺伝子 mRNA の検出 : 20pg の Total RNA からでも良好に検出可能

これらの試薬キットを使用した HHV6 ゲノム DNA の検出では、いずれの試薬キットでも良好な増幅結果を得られなかった。この結果は今回使用した試薬キットを使用した RNA ウイルスと DNA ウイルスの同時検出は不可能なことを示しており、新しい検査系の開発が必要な事が改めて示された。

2. 本研究により開発した、One Step RT-PCR 試薬を使用した mRNA およびウイルス DNA の検出

一方、我々が開発した One step RT-PCR 系は Perfect Real Time と同等の RNA 検出能を持つことが示された (図 2)。

さらに、本試薬を使用した DNA (HHV6) の検出では実験に用いた HHV6 スタンダード ($10^7 \sim 10^1$ copies/reaction) すべてが良好に増幅し、検査の用いるのに十分な感度とダイナミックレンジを持つことが示された (図 3)。

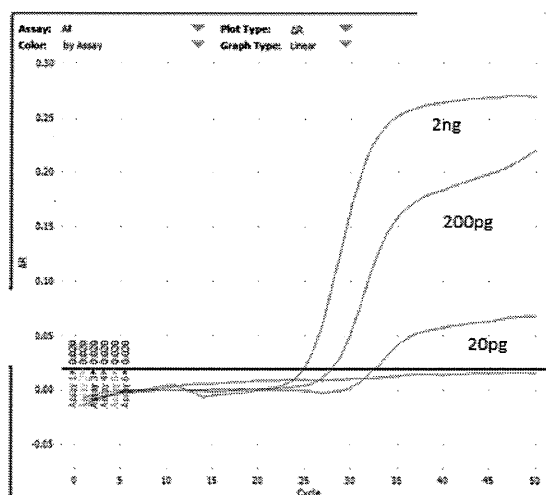


図 2 : 開発した実験系による One step RT-PCR : 20pg の Total RNA からでも GAPDH 遺伝子 mRNA 良好に検出可能だった。

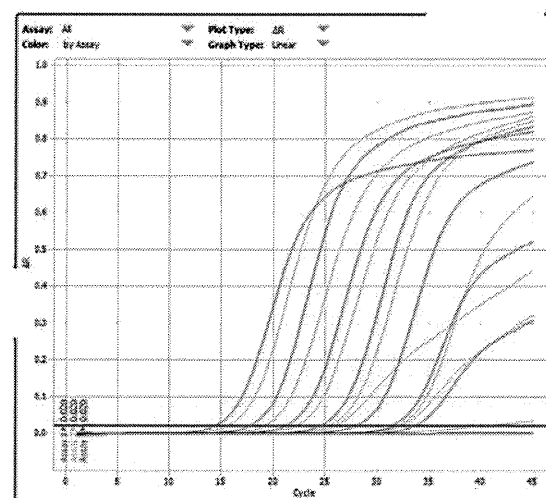


図 3 : 開発した実験系による DNA-PCR 結果 : HHV6 スタンダード ($10^7 \sim 10^1$ copies/reaction) すべてが良好に増幅した。

D: 考察

1. 市販の One step RT-PCR 試薬キットは多数販売されているが、少なくとも我々の開発した RNA ウイルス検査系に適用できるものは非常に限られており、Takara 社の Perfect Real Time が今回試した試薬キットを使用して最も良好な結果が得られた。今後新しいウイルス検査項目を増やす際には、試薬キットとの相性を確認することが極めて重要である。

2. 市販の One step RT-PCR 試薬キットを使用した DNA ウイルス HHV 6 の検出では、いずれの試薬キットともに検出感度が不十分であり、実際の DNA ウイルス検査に使用することは難しい。今回開発した試薬は RT-PCR の検出感度は Perfect Real Time と同等であったが、PCR の感度・ダイナミックレンジが Perfect Real Time より優れていた。RT-PCR、PCR の感度・ダイナミックレンジはプライマー・プローブ配列の違いにより影響を受けることがあり、これまでに我々が開発したすべてのウイルス検査系に今回開発した試薬が使用可能かどうか今後検証していく必要がある。

E: 結論

DNA ウイルスと RNA ウイルスの両方を 1 ステップ・同時・迅速・高感度に測定することを目的に、同一バッファー・同一酵素・同一条件下で効率よく RT-PCR と PCR の両方を行うことが可能な実験系の開発を行った。市販の One step RT-PCR 試薬キットでは Takara 社の Perfect Real Time を使用した場合に最も良い結果が得られたが、同時に DNA ウイルスに用いるには性能が不十分であった。今回開発した試薬を使用した RT-PCR、PCR の同時検査系は Perfect Real Time と同等以上の感度・ダイナミックレンジを持つことが示され、今後実用化を目指したデータ蓄積を行っていく予定である。

F: 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol.* 2011; 95:345-349.
2. Ng SB, Selvarajan V, Huang G, Zhou J, Feldman AL, Law M, Kwong YS, Shimizu N, Nagami Y, Aozasa K, Salto-Tellez M and Chng WJ. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling. *J Pathol.* 2011; 223:496-510.
3. Abe T, Segawa Y, Watanabe H, Yotoriyama T, Kai Y, Yasuda A, Shimizu N and Tojo N. Point-of-Care Testing System Enabling 30-min Detection of Influenza Genes. *LAB CHIP.* 2011; 11:1166-1167.
4. Yagasaki H, Kato M, Shimizu N, Shichino H, Chin M and Mugishima H. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV6). *Ann Hematol.* 2011; 90(7):851-852.
5. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N and Sawada K. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia.* 2011; 25(8):1324-1334.
6. Sugita S, Ogawa M, Inoue S, Shimizu N and Mochizuki M. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiples and quantitative real-time. *Jpn J Ophthalmol.* 2011; Jul 13. 55(5):495-501.
7. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefe Arch Clin Exp.* in press.

8. Ng SB, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay J, Lin B, Bi C, Tan J, Kwong YL, **Shimizu N**, Aozasa K, Chng W. Dysregulated MicroRNAs Affect Pathways and Targets of Biological Relevance in Nasal-type Natural Killer / T-cell Lymphoma. *Blood*. **118(18):4919-4929**. 2011 Nov 3.
9. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, **Shimizu N**, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, and Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *PLoS Pathogens*, 2011;7(10):e1002326. Epub 2011 Oct 20.
10. Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Inomata H, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, **Shimizu N**, Ito M and Fujiwara S Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PloS ONE* 2011;6(10):e26630. Epub 2011 Oct 19.
11. Ramakrishnan R, Donahue H, Garcia D, Tan J, **Shimizu N**, Rice AP and Ling P. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas. *PLoS ONE*, 2011;6(11):e27271 **2011 Nov 11**.

国内学会発表

1. 伊藤仁也、橋本尚子、永井謙一、清水則夫、永野誠司、有馬浩史、田端淑恵、松下章子、柳田宗之、渡邊 健、丸山京子、初山麻子、高橋隆幸
網羅的ウイルス・真菌PCR 法を用いた造血細胞移植後肺障害の迅速診断
Use of multiplex PCR to detect universal virus or fungus in bronchoalveolar lavage of patients with lung disease after

hematopoietic stem cell transplantation

第33回日本造血細胞移植学会 2011年3月10

日 松山市

2. 谷ヶ崎博、加藤麻衣子、清水則夫、七野浩之、陳基明、麦島秀雄

非血縁骨髄ドナー由来の Chromosomal

integrate HHV-6 (CIHHV-6) の1女児例

第33回日本造血細胞移植学会 2011年3月

10日 松山市

国際学会発表

1. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Ito M, Komano J and Fujiwara S. Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV0HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. XV International Congress of Virology, Sept 2011, Sapporo, JAPAN.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし