

201208014B

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22年度～24年度 総合研究報告書

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：072-641-9859
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>

平成25年(2013年)3月

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22年度～24年度 総合研究報告書

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：072-641-9859
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>

平成25年(2013年)3月

目 次

I. 総合研究報告

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	-----	8
--------------------------------	-------	---

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	-----	3 5
----------------------------	-------	-----

清水 則夫

3. マイコプラズマ検査法に関する研究	-----	4 3
---------------------	-------	-----

原澤 亮

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	5 0
---------------------	-------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	5 4
-----------------	-------	-----

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

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方法である反面、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。

本研究においては、疾患研究のための細胞コレクション（高発がん性遺伝病患者由来細胞）の整備を実施するとともに、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。本研究の成果は、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

A. 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3,600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。

B. 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

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、主なものとして、色素性乾皮症、ファンコニー貧血症、網膜芽種、コカイン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、ガードナー症候群、レックリングハウゼン症候群など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、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、高発がん性遺伝病患者由来細胞等のゲノム詳細解析を実施した。

C. 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

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、主なものとして、色素性乾皮症、ファンコニー貧血症、網膜芽種、コカイン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、ガードナー症候群、レックリングハウゼン症候群など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。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、758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758検体を検査

し、66検体（65細胞株）でウイルス検査陽性の結果（確定検査未実施を含む）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。

D. 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1,400種以上の細胞株を登録しており、毎年3,600アンプル程度に分譲を国内外の研究者に対して実施している。本研究においては、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資源化を実施し、研究者に分譲できる体制を構築した。当該細胞コレクションに関してデータベースの作成、細胞リストの公開などを実施し、その中でも研究者よりリクエストの多かった細胞を優先して資源化し、研究者に分譲できるよう体制整備を実施した。これにより、主なものとして、色素性乾皮症、ファンコニー貧血症、網膜芽種、コカイン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、ガードナー症候群、レックリングハウゼン症候群などに関する細胞株の提供が可能となった。

また、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。本研究では細胞のクロスコンタミネーションを調べるためのデータベースならびに解析システムを構築するとともに、細胞認証試験に関するガイドラインを世界の細胞バンクと協力して作成した。また、クロスコンタミ細胞のリスト公開を実施し、研究社会への貢献を果たした。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細胞バンクが分譲する細胞数は年間3,600アンプル程度であり、国内外

の研究者に有用な細胞資源の供給を実施している。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を目標としたい。

E. 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	小澤 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	樫山 明日香	(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
協力研究者	小堀 眞季	(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 1400 株にもおよぶ細胞資源を保有しており、年間 3,600 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。本研究においては 3 年間で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 758 検体を検査し、66 検体（65 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については国際共同研究によるガイドライン策定、クロスコンタミネーション細胞リストの公開などを行い、研究に使用する細胞における問題の排除に努めた。今後、更なる検査項目の追加を継続し、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、細胞クロスコンタミネーションに関する研究を実施した。

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性疾患患者由来細胞株のうち、主なものとして、色素性乾皮症、ファンコニー貧血症、網膜芽種、コカイン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、ガードナー症候群、レックリングハウゼン症候群など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。

・ 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リストの公表>

クロスコンタミネーション細胞のリストを

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性疾患患者由来細胞株のうち、色素性乾皮症、ファンコニー貧血症、網膜芽種、コカイン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、ガードナー症候群、レックリングハウゼン症候群（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、758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758検体を検査し、66検体（65細胞）でウイルス検査陽性の結果（確定検査未実施を含む）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73種のうち、16細胞種（陽性率21.9%）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。

< 細胞クロスコンタミネーションに関するデータベース作成、ガイドライン策定、細胞リスト作成 >

細胞のクロスコンタミネーションを検索するために必須なSTR解析結果のデータベースを整備拡充した。特にATCC、DSMZ、理研セルバンクとともにデータを共有化し、世界の細胞バンクに登録されているデータを検索可能なデータベースとして構築するとともにそれらを比較解析できるシステム

（図1）を整備した。また、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（参考1）はANSI（American National Standards Institute）において承認され、頒布されている。詳細はwebページ参照：
<http://webstore.ansi.org/RecordDetail.aspx?sku=ANSI%2FATCC+ASN-0002-2011>

さらに、The International Cell Line Authentication Committee (ICLAC)を立ち上げ、ガイドライン、SOP、クロスコンタミ細胞リストの公表等を行いながら、科学的根拠に基づくクロスコンタミ細胞のレビュー及び認定を実施した。その成果としてクロスコンタミネーション細胞リスト公表した。（参考2）

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。本研究においては1999株の細胞情報を公開するとともに、細胞の一部に関して資源化を実施し（色素性乾皮症、ファンコニー貧血症、網膜芽種、コカイン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、ガードナー症候群、レックリングハウゼン症候群など）、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、研究が有用活用できるよう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、本研究において最終的にDNA試料を用いたウイルス検査を758細胞株の細胞株で実施した。その検査の中で、ウイルス陽性と判定されたのは66検体（65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。

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・研究労力が無駄にな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。本研究において資源化した細胞208種のうち、46細胞種（陽性率22.1%）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、本年度より日本薬局方改正のためのマイコプラ

ズマ否定試験に関する共同研究に参画し、
確実かつ有用なマイコプラズマ否定試験を
日本薬局方に収載するべく研究活動を開始
している。

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。

＜細胞クロスコンタミネーションに関する
データベース作成、ガイドライン策定、細
胞リスト作成＞

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。本研究
で行ったクロスコンタミネーション検索の
ためのデータ整備は、細胞品質チェックす
る際には絶対必要なデータベースであり、
このような研究は細胞バンクでしか行うこ
との出来ない重要な使命であると考えられ
る。また、国際ガイドライン策定に参画し、
世界の細胞バンク（ATCC、DSMZ、理研セル
バンク）と連携してのデータベース構築な
らびに比較解析システムを整備したことは
国際的にも評価されている。また、クロス
コンタミネーション細胞リストの公表は、
この問題に対して研究者へ直接警鐘を鳴ら
すものであり、リストに上がっている細胞
の研究使用を根絶する狙いがある。これに
より、間違った細胞の使用がなくなり、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、これ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クロス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) Cell line cross-contamination initiative: An interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. Dirks WG, Macleod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H. *Int J Cancer*. 126:303-4 (2010)
- (2) Cell line misidentification: the beginning of the end. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. *Nat Rev Cancer*. 10(6):441-8(2010)
- (3) Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. *Int J Cancer*. 127(1):1-8(2010).
- (4) Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and

tissues. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, Macleod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C, Kerrigan L. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 46(9):727-32(2010).

- (5) 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)
- (6) 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)
- (7) 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)
- (8) Match criteria for human cell line authentication: Where do we draw the line? Capes-Davis A, Reid YA, Kline MC, Storts DR, Strauss E, Dirks WG, Drexler HG, Macleod RA, Sykes G, Kohara A, Nakamura Y, Elmore E, Nims RW, Alston-Roberts C, Barallon R, Los GV, Nardone RM, Price PJ, Steuer A, Thomson J, Masters JR, Kerrigan L. *Int J Cancer*. (2013) 印刷中
- (8) Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal Kinehara M, Kawamura S, Tateyama D, Suga M, Matsumura H, Mimura S, Hirayama N, Hirata M, Uchio-Yamada K, Kohara A, Yanagihara K, Furue MK. *PLoS One*. 2013;8(1) e54122

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と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)
- (2) マイコプラズマ汚染の現状と論文投稿における国際動向、小原有弘、古江楠田美保、第 83 回日本組織培養学会 5 月(岡山)
- (3) ヒト多能性幹細胞の緩慢凍結法による細胞凍結・解凍における改善の検討 林田みどり、小澤裕、家村将士、柳原加奈、小原有弘、古江一楠田美保、日本組織培養学会第 85 回大会 5 月(京都)
- (4) 培養細胞におけるマイコプラズマ汚染の現状について大谷梓、松永典子、家村将士、川口英子、平山知子、林田みどり、小澤裕、塩田節子、古江一楠田美保、原澤亮、小原有弘、第 39 回日本マイコプラズマ学会学術集会 5 月(岩手)
- (5) ジメチルアニリン異性体のマウスでの変異原性 鈴木孝昌、小原有弘、松本真

理子、広瀬明彦、林 真、本間正充 日本環境変異原学会 第 41 回大会 11 月(静岡)

国際学会

Profiles of genomic instability in high-carcinogenicity genetic disease cell lines collection by high-resolution array-based comparative genomic hybridization (aCGH). A. Kohara, N. Hirayama, Y. Ozawa, M. Ozawa, A. Ohtani, N. Matsunaga, M. Iemura, S. Shioda ASCB San Francisco (2012)

表1 本研究において資源化した主な高発がん性遺伝病患者由来細胞株

	細胞番号	細胞名	疾患名	タイプ
1	JCRB0301	XP2OS(SV)	色素性乾皮症	A
2	JCRB0302	XP2YO(SV)	色素性乾皮症	F
3	JCRB0303	XP3OS	色素性乾皮症	A
4	JCRB0304	XP35OS	色素性乾皮症	A
5	JCRB0305	XP2SA	色素性乾皮症	V
6	JCRB0306	XPL3KA	色素性乾皮症	C
7	JCRB0307	XPK15OS	色素性乾皮症	A
8	JCRB0325	XPEMB-1	色素性乾皮症	A
9	JCRB0326	XP39OS	色素性乾皮症	A
10	JCRB0327	XP40OS	色素性乾皮症	C
11	JCRB3012	XP24KO	色素性乾皮症	E
12	JCRB1055	XP3OS(SVT)	色素性乾皮症	A
13	JCRB1057	XP39OSTERT	色素性乾皮症	A
14	JCRB1058	XP40OSTERT	色素性乾皮症	C
1	JCRB0315	FA18JTO	ファンコニ貧血症	
2	JCRB3006	FA9JTO hTERT-1	ファンコニ貧血症	G
3	JCRB3007	FA18JTO hTERT	ファンコニ貧血症	A
4	JCRB3010	FA20P	ファンコニ貧血症	A
5	JCRB0314	FA9JTO	ファンコニ貧血症	G
6	JCRB1090	FA9JTOTERT	ファンコニ貧血症	G
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	
1	JCRB0322	GS33JTO	ガードナー症候群	
2	JCRB0323	RB24KY	ガードナー症候群	
1	JCRB3015	NF1	レックリングハウゼン症候群	

表2 ウイルス検査総数ならびに検出ウイルス種

検査細胞 758細胞株 陽性細胞 66細胞株		
検出ウイルス	細胞株数	
EBV	27	
HHV6	1	
HHV7	1	
HBV	3	
HTLV1	6	
parvoB19	2	
HIV1	5	ベクター由来と考えられる (重複感染例有)
HPV18	19	

STR matching analysis by your data. — JCRE cell bank —

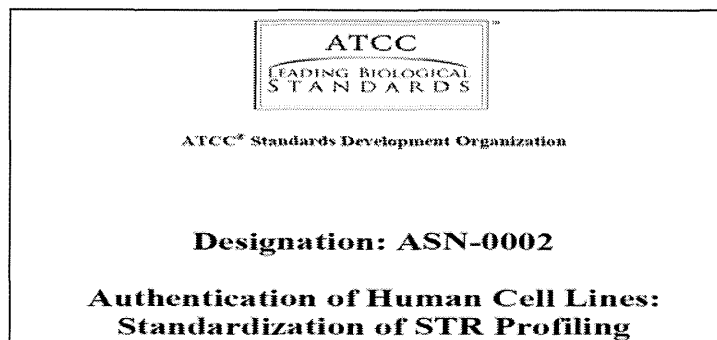
Hirata, M. coded programs.
 Ozawa, Y., and Kohara, A. produced STR data and database.
 Masui, T. reviewed ethical issues.
 Mizusawa, H. organized whole system and designed the STR profile database.

Go STR analysis with EV over 0.60 after entering your data below.									
Locus name	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
Enter your STR data->	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Sample data (HeLa):	11,12	12,13.3	8,12	9,10	16,18	7	X	8,12	9,10
Caution:	Use comma (,) to separate the STR values in the single locus. The period (.) is used to show decimal point like 13.3 in the locus D13S317 of the HeLa.								

• EV = evaluation value

図1 世界の細胞バンクに登録されたデータとの比較解析システム

参考1 細胞認証試験に関するガイドライン



参考2 クロスコンタミネーション細胞リスト

Attributions in the last two columns indicate where these misidentifications were reported and in no way imply responsibility for the cause by the authors or institutions.

This table is meant as a preliminary guide to avoiding suspect cell lines, but all recently acquired cell lines should be tested (e.g. by STR profiling for human cell lines) and compared to reference stock before use.

The "Contaminating Cell Line", in most cases, will have overgrown the claimed original, or will have replaced it by a technical error, and the original cells will no longer exist. Genuine examples of some cell lines, such as RT-4 human bladder carcinoma, may still exist (see Table 2); their identity would be confirmed by profiling.

We would be grateful for evidence of other misidentified lines not listed here or any other relevant information.

We would also be grateful to anyone who can confirm the existence of authentic stocks of any of the lines listed; please contact Amanda Capes-Davis [acapdav@gmail.com] and copy to Ian Freshney [i.freshney@ntworld.com].

Confusion may also arise from two different cell lines having the same name; information on these would also be welcome.

Observations made in these lists are based on published reports and details obtained from cell banks, their websites, and Wikipedia. "Reference PubMed ID" refers to the unique ID number assigned by the PubMed database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

The authors take no credit nor responsibility for any of the primary observations and have merely attempted to collate data previously available on other sites.

Table 1. Cross-contaminated or Misidentified Cell Lines

Misidentified Cell Line	Claimed Species	Claimed Cell Type	Contaminating Cell Line	Actual Species	Actual Cell Type	Misidentification Reported By	Reference PubMed ID
2474/90	Human	Gastric carcinoma	HT-29	Human	Colon carcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
2563 (MAC-21)	Human	Lung carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Nelson-Rees et al, 1981	6451928
2957/90	Human	Gastric carcinoma	HT-29	Human	Colon carcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
3051/80	Human	Gastric carcinoma	HT-29	Human	Colon carcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
41M	Human	Ovarian carcinoma	OAW 28	Human	Ovarian carcinoma	Wilson et al, 1996	8795574
ACC2	Human	Salivary gland, adenoid cystic carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Phuchareon et al, 2009; Zhao et al, 2011	19557180, 21868764
ACC3	Human	Salivary gland, adenoid cystic carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Phuchareon et al, 2009; Zhao et al, 2011	19557180, 21868764
ACCM	Human	Salivary gland, adenoid cystic carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Phuchareon et al, 2009; Zhao et al, 2011	19557180, 21868764
ACCNS	Human	Salivary gland, adenoid cystic carcinoma	Unknown	Mouse	Unknown	Phuchareon et al, 2009	19557180
ACCS	Human	Salivary gland, adenoid cystic carcinoma	T-24	Human	Bladder carcinoma	Phuchareon et al, 2009	19557180
ADLC-5M2	Human	Lung carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
<i>Aedes aegypti</i> , Suitor's clone	Mosquito	Not specified	Unknown	Moth, <i>Antheraea eucalypti</i>	Not specified	Greene et al, 1972; Nelson-Rees et al, 1981	4402510, 6451928
<i>Aedes vexans</i> culture	Mosquito	Not specified	Unknown	Moth, <i>Antheraea eucalypti</i>	Not specified	Greene et al, 1972; Nelson-Rees et al, 1981	4402510, 6451928
AG-F	Human	Lymphoma, Hodgkin	CCRF-CEM	Human	Leukemia, acute lymphoblastic, T cell	Drexler et al, 2003	12592342
AKI	Human	Melanoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Yoshino et al, 2006	16643607
ALVA-31	Human	Prostate carcinoma	PC-3	Human	Prostate carcinoma	van Bokhoven et al, 2001; Varella-Garcia et al, 2001	11304728, 11433521
ALVA-41	Human	Prostate carcinoma	PC-3	Human	Prostate carcinoma	van Bokhoven et al, 2001; Pan et al, 2001; Varella-Garcia et al, 2001	11304728, 11135436, 11433521
ALVA-55	Human	Prostate carcinoma	PC-3	Human	Prostate carcinoma	van Bokhoven et al, 2003	14518029
ALVA-101	Human	Prostate carcinoma	PC-3	Human	Prostate carcinoma	van Bokhoven et al, 2003	14518029
AMDURII	Human	Skin	LLC-PK1	Pig, <i>Sus scrofa</i>	Kidney, normal renal cells	Milanesi et al, 2003	14505435
AO	Human	Amnion	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Nelson-Rees et al, 1981	6451928
ARO	Human	Thyroid, anaplastic carcinoma	HT-29	Human	Colon carcinoma	Zhao et al, 2011	21868764
ARO81-1	Human	Thyroid, anaplastic carcinoma	HT-29	Human	Colon carcinoma	Schweppe et al, 2008	18713817
AV3	Human	Amnion	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Lavappa et al, 1976; Nelson-Rees et al, 1981	1250349, 6451928
AZ521	Human	Gastric carcinoma	HuTu 80	Human	Duodenal carcinoma	JCRB website	No PMID
B2-17	Human	Astrocytoma	U-251 MG	Human	Glioblastoma	JCRB website	No PMID
BCC1/KMC	Human	Basal cell carcinoma	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	MacLeod et al, 1999	10508494
BE-13	Human	Leukemia, acute lymphoblastic, T cell	PEER	Human	Leukemia, acute lymphoblastic, T cell	Drexler et al, 2003	12592342
BHP 10-3	Human	Thyroid, papillary carcinoma	TPC-1	Human	Thyroid, papillary carcinoma	Schweppe et al, 2008	18713817