

## 7. 細胞の評価

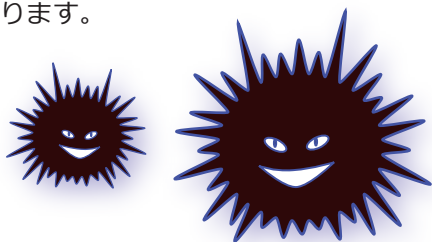
医薬品や環境物質などの様々な化合物の機能や毒性の評価において、より生体内の反応に近い結果を得るために培養細胞を用いる試験が実施されています。実施する試験の目的に適合した細胞を安定して供給できることは大きなメリットですが、その細胞の求められる機能を維持し続けることは意外に難しいことでもあります。適切な培養方法の選択と継続には（例えば休日の培地交換作業など）研究者に大きな負担をかけることとなります。また、苦勞して培養した細胞が本当に本来の機能を有しているのかどうかを適時確認する必要もあります。本章では、コンタミネーションの問題に加えて、今まではあまり触れられていなかった不可侵領域とも言える、細胞の評価、品質管理について述べていきます。

### 7.1 コンタミネーション

細胞培養実験において最も注意しなければいけないことにコンタミネーションがあり、大きく分けると2つの意味があります。一つは雑菌の混入で、環境中（主に作業者に起因する汚染）の微生物の混入があります。

もう一つはクロスコンタミネーションと呼ばれる実験対象（細胞）間での混入です。培養過程で、元々使用していた細胞と異なる細胞とが入れ替わっていた事例が稀ながらも実際に起こっています。

微生物によるコンタミネーションを起こした場合は、貴重なサンプルを破棄しなければいけなくなり大きな損害となります。また、クロスコンタミネーションを起こした場合は本来の結果とは異なる結果が得られ、実験の正確性が失われます。いずれにしても多大なる損害となりますので、防止策が必要となります。基本的に無菌作業の徹底と、複数サンプルを同時に扱うことを禁止するなどの対策を講じることとなり、基本的な仕組みの構築と、作業員への適切な教育が必須となります。



### 7.2 マイコプラズマ汚染の対策

細胞培養において、マイコプラズマ汚染は研究者にとって大きな頭痛の種です。マイコプラズマは細胞壁を持たない微生物で、目に見えないことが汚染の拡大を余儀なくしています。また、通常培地の濁度やpHに大きな変化は認められないことなども、汚染の確認が困難な要因の一つとなっています。主な感染源としては、以前に感染して持ち込まれた培養細胞や、研究者自身と考えられています。

マイコプラズマに汚染すると、細胞に変化をもたらし可能性があり、免疫反応や遺伝子発現の変化を誘導する可能性があります。問題は、この変化が新しい細胞株あるいは、新しい機能獲得と勘違いされてしまう危険性もあることです。実際に新たな細胞の機能だと思われたものが、実はマイコプラズマ汚染が原因だったとの例がありますので、十分な注意が必要です。

防止対策としては、新たな細胞を導入する時はマイコプラズマ汚染のないことがわかるまで区分保管しておくことや、培地や試薬類は必要な分量に無菌的に小分けしておき、常に使い切るようにして、残ったものは破棄するなどの措置を実施する必要があります。また、重要な細胞は、一定の期間毎にサンプリングし、マイコプラズマ汚染の検査を実施することもお勧めします。

### 【コラム 3】 その細胞は目的の細胞？ (STR、BAC Array、Proteome)

使用している培養細胞が、本当に目的とする機能を持った細胞なのか？と疑ったことはないでしょうか？つい最近までこの「細胞の品質」について語ることはタブー視されていたように思いますが、培養中の形態変化や、アッセイの結果がバラつくため、ストックを解凍して再実験した経験を持つ研究者は意外に多いのです。一体、この細胞の変化は何に起因して起こるのでしょうか？

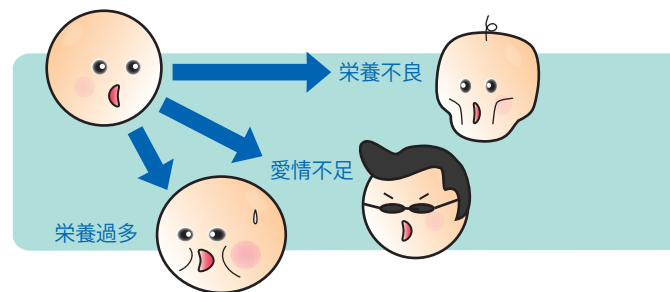
様々な意見があるのですが、基本的に生物は自分に一番都合の良い環境に能動的に向かうものあり、培養細胞も同様だと考えられます。外的刺激（ストレス）が細胞の変化を誘発しており、温度、pH、ガス環境、圧力、培地の組成、水、または周囲の細胞からの情報など、様々な影響を受けていると言われ、トリプシン処理や凍結保護剤のDMSOの影響も危惧されています。本当に細胞の性質は簡単に変わるのでしょうか？ますます細胞を利用した研究の重要性が高まるこの時代にこそ、この問題は真剣に考えなければいけません。

研究に用いる細胞の品質管理を考える上で重要な事項としては同一性（均一性）が挙げられます。さらに、医療に関与する細胞においては、安全性が重要視され、感染性、造腫瘍性、免疫反応などの評価が必要となります。実験に使用する細胞においては機能に変化していないことが前提ですので当然です。

しかし、細胞は化合物と異なり「生き物」であるため、一定のばらつきが必ずあります。同一の細胞を同一の条件で培養することが基本ですが、それでも環境の変化や作業精度のばらつき、あるいは、偶然に異なる機能に変化する可能性もあります。更に、知らないうちに異なる細胞と入れ替わっていることもあります。この細胞の同一性・均一性を維持するためには、何が同じでなければならないのか？逆に何が異なっても構わないのか？など、現場の状況を鑑み、現実的な作業ルールや、指標（標準化）の構築が必要なのは明らかです。

そして、この培養技術向上において日本組織培養学会は「細胞培養士認定制度」を設け、培養技術の標準化に取り組み、研究者の意識改革を図っています。日本再生医療学会でも「臨床培養士認定制度」を設け、安全な再生医療の実践へと方向性を定めています。もちろん標準化の作業はそう簡単ではないと思いますが、それでもなお、大いなる成果を期待して止まないものであります。

細胞は常に「周囲の環境に適合した状態へ変化しようとしている」ことを前提にして実験を進めることは、とても重要なことなのです。



参考：評価方法の例

- ・ STR (Short Tandem Repeat) 解析：  
ヒト細胞における誤認細胞排除の標準的な手法です。ゲノム上の様々な部位に存在する繰り返し回数の多型性を利用した遺伝子多型解析法で、9領域の組み合わせを統計学的に検定し、精度を高めています。階層的クラスタリングの最短距離法などを用いて、同一細胞であるかどうかの判断の一つとされています。
- ・ BAC Array 解析：  
目的の細胞と、比較対照となる細胞を異なる蛍光色素で標識を行ってハイブリダイズして目的の細胞のDNAコピー数の変化（増減:不均衡型変化）を解析する技術で、現在はPCRとの併用など、飛躍的に解像度が向上しています。
- ・ Proteome解析：  
細胞抽出液から、二次元電気泳動法にてたんぱく質の分離を行い、そのパターン解析に加え、その他手法（MALDI、HPLC、X線解析、NMR等）とも併用して、精度の高いプロファイリングを細胞品質評価に応用します。手法としては古典的ですが、解析技術の進歩が飛躍的に向上したことで、新たな知見が得られています。