

**厚生科学研究費補助金総括研究報告書**

厚生科学研究費（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）

**培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究**

主任研究者 水沢 博（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究者

木村成道（財 東京都老人総合研究所），安本 茂（神奈川県立がんセンター臨床研究所），佐々木 正夫（京都大学 放射線生物研究センター），阿部 武丸（株，三菱化学㈱医薬カンパニー 中標津製造所），原沢 亮（東京大学医学部附属動物実験施設），加治 和彦（静岡県立大学 生活科学科）

厚生科学研究費補助金総括及び分担研究報告書

厚生科学研究費(ヒトゲノム遺伝子治療研究事業)

培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究  
(H10-ゲノム-039)

主任研究者 水沢 博(国立医薬品食品衛生研究所)  
厚生省細胞バンク(JCRB細胞バンク)

## 培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究

主任研究者 水沢 博 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第三室 室長

研究要旨：本研究班は、培養細胞研究資源を収集してその品質の高度化を図り、研究者に分譲するためのシステムの整備を図るために必要な研究活動を実施する総合的な研究班である。個別の研究課題は、ヒト細胞の研究資源化、品質管理手法の開発研究、研究資源情報のサーバー構築に必要な研究など多岐に渡っている。本年度は、あらたに数種のヒト細胞を資源化したことに加えて、ウシに由来するBVDVによる汚染が予想以上に広がっている実体を明らかにし、その除去の検討を始めた。また、これらの情報を細胞バンクサーバーを通じて迅速に研究者に公開するシステムも確立した。また、本サーバーは研究者のみならず一般国民を対象に細胞バンク業務を理解してもらえよう配慮した情報の整備も図りつつある。

### 分担研究者

木村成道： (財)東京都老人総合研究所遺伝子情報部門 部長  
安本 茂： 神奈川県立がんセンター臨床研究所 部長  
佐々木 正夫： 京都大学放射線生物研究センター 教授  
阿部 武丸： 三菱化学㈱医薬カンパニー中標津製造所 所長  
原沢 亮： 東京大学医学部 附属動物実験施設 助教授  
加治 和彦： 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科  
老化制御研究室 教授

### A. 研究目的

本研究は、科学技術基本法（平成7年11月15日制定）第12条第2項及び第13条に基づいて我国における培養細胞研究資源基盤を整備することを目的に実施するものである。厚生省細胞バンク（JCRB細胞バンク：Japanese Collection of Research Bioresources）事業は、医学・薬学系研究の支援を目的として設立され、かかる研究に不可欠である「ヒト」に由来する組織及び培養細胞研究資源を広く収集し、品質の高度化を図ることを責務としている。さらに、かかる事業が円滑かつ迅速に実施できるような最適化された運営システムの確立を図ることも本研究の主要な目的の一つである。

医学研究及び薬学研究は、ヒトを対象にした各種疾病の原因究明、高度先端医療技術の開発、最新の知見に基づいた各種疾病の診断薬や治療薬の開発などを包含し様々な研究成果を生み出している。当該細胞バンク事業は、こうした研究を研究材料の安定的かつ迅速な提供を通じて積極的に支援することによって我国の医学薬学研究の環境を整備することを目的としている。現代においても我国では未だ多くの研究者がマイコプラズマやウイルス等の微生物に汚染された細胞ならびに誤謬のある細胞を多数使用している現状があり、欧米先進国にはるかに遅れた側面がある。そのた

め、このような事実を積極的に公開し、汚染の無い細胞を迅速に供給する体制を確立し、その利用を促すことは極めて重要な課題である。

このような基本理念に基づいて本研究班では次の各項目についての研究を実施し、我国の医学薬学研究基盤の整備を積極的に推進するものである。

1. ヒトに由来する培養細胞研究資源ならびにヒト組織の収集を通じて、研究資源の確保を図る（資源収集）。
2. 収集した研究資源を有効に利用できるよう、品質の高度化を図ることを目的として様々な品質管理手法の開発研究を実施する（品質管理技術の開発研究）。さらに、開発した手法を日常的な細胞バンク運営の中に取り込むための実用化研究ならびに、実用化された手法を利用して細胞バンクで保存管理されている細胞について総合的な調査研究を実施する。
3. 収集した培養細胞の学術情報ならびに品質管理実験の結果得られた様々な情報を迅速に研究者に伝達することを目的に、インターネットを利用した情報サーバーの整備を図り、情報を公開するために必要なハードウェア及びソフトウェアの開発と維持を実施する。
4. 情報サーバーを利用して、当該細胞バンクにおける資源情報に加えて、世界的な規模での研究資源の状況を広く研究者に公開すると同時に、研究資源を効率良く利用できるようなするための様々な附加情報の整備を図り研究環境の整備を目指す。同時に研究基盤の整備状況等を研究者以外、広く国民に紹介するための基盤の整備も試みる。

以上の目的を遂行するために本研究班を組織し、各分担研究者に対して参画を要請した。分担研究者のうち、加治、木村、佐々木および主任研究者の研究室における増井主任研究員らは、主にヒトに由来する培養細胞ならびにヒト組織の研究資源化に関する研究を実施し、ヒトに由来する研究材料の収集と利用に資する研究を実施する。また、原沢、阿部、主任研究者及び主任研究者の研究室における室員は、細胞の品質管理のうち、今回重視しているウシウイルス性下痢症ウイルスの検出手法の開発と、実際の細胞ならびに培養に利用する血清からのウイルスの検出を実施、該当ウイルスによる汚染の広がり状況について調査を実施した。

さらに、主任研究者（水沢）は、品質管理により確定した情報のインターネットへの公開手法についての開発研究を実施し、ホームページの維持管理にもあたっている。

## B. 研究方法

本研究班は、培養細胞研究資源を利用するための基盤整備を目的としている総合的な研究班である。そのため、上記「目的」の項に紹介したように多岐に渡る研究課題について取り組んでいる。それぞれに特徴的な実験方法を利用しているので、研究方法の詳細については各分担研究報告を参照されたい。

主任研究者は、今年度はBVDV汚染の拡散状況の調査研究と、情報システムの再構築を実施した。BVDVの検出については原沢ならびに阿部が昨年度までに実施した研究結果を利用し、細胞バンクで保存している培養細胞ならびに、多数の市販ウシ胎児血清についての汚染状況についての調査研究を実施した。保存培養細胞ならびに市販血清からのBVDVウイルスの検出については分担研究報告として研究報告を別に添付したのでそちらを参照されたい。以上を前提に、ここでは、総括的な結果と情報の公開手法についての研究成果について総括的に記載することとする。

情報システムの改良ならびに新規作成の方法については、プログラム作成とデバッグが中心的な方法となる。細胞バンクの管理についての主要な部分については市販プログラムも採用して、効率的な運用を試みている。データを一つのプログラムから別のプログラムにデータを受け渡す際に若干のデータフォーマットの修正や、特定データの附加等が必要になる。その場合は、dBASE言語、Delphi、HTML等の書式を利用して簡単なプログラムコードを作成し、バッチプログラム等により実行した。同時に、サーバシステムの構築には、WindowsNT、Linuxによるサーバの構築を試み

ている。また、World wide Webサーバの構築には、WindowsNTの場合はInternet Information SystemならびにApacheを比較検討している。また、Samba等のサーバに付随するシステムの導入についても検討を試みた。特に、Microsoft社の製品が概してプログラムが大掛かりで、安定性に欠ける側面があるために、Unix系のサーバシステムの導入を検討することは将来に向けて意味のあることである。

## C. 研究結果

### 1. ヒトに由来する細胞ならびに組織の研究資源化について

本研究は主に分担研究者および国立医薬品食品衛生研究所・細胞バンクの増井（主任研究者）によって実施され、複数の新規細胞が樹立された。さらに、各細胞の性状の確認等を通じて、多くの研究者に利用できる基礎的な体制も確立された。当該年度において、JCRB細胞バンクで登録の依頼を受けた細胞は表1に示したとおりである。

表1.

寄託番号	登録番号	細胞名
NIHS0144	JCRB0177	B104
NIHS0144.1	JCRB0117.1	B104-R3
NIHS0147	JCRB0118	SKM-1
NIHS0165	JCRB0126.1	KOSC-2 c13-43
NIHS0165	~JCRB0126	KOSC-2
NIHS0166	JCRB0127	KOSC-3
NIHS0160	JCRB0119	YG10003
NIHS0161	JCRB0120	YG10007
NIHS0162	JCRB0121	YG10008
NIHS0163	JCRB0122	K051
NIHS0164	JCRB0123	K052
NIHS0180	JCRB0131	RL-33
NIHS0181	JCRB0128	TK-1
NIHS0182	JCRB0124	Takigawa
NIHS0189	JCRB0125	L alpha
NIHS0190	JCRB0133	KHM-1B
NIHS0191	未	KHM-2B
NIHS0192	未	KHM-3S
NIHS0193	未	KHM-4
NIHS0194	未	KHM-5M
NIHS0195	未	KHM-10B
NIHS0202	未	TASK1
NIHS0203	未	PHK16-0b
NIHS0204	未	NCC16
NIHS0205	未	NCE16
NIHS0206	JCRB0533	TIG-112
NIHS0207	JCRB0534	TIG-114
NIHS0208	未	ASF-2
NIHS0209	未	ASF-4
NIHS0210	未	RERF-LC-KJ
NIHS0211	JCRB0132.2	AHA601.P3 (JTC27)
NIHS0212.1	未	CHO (pMAM-1uc)
NIHS0212.2	未	CHO (pMAM-HS1uc)

NIHS0213	未	P53LMAC01
NIHS0215	未	p53-def-MOSE
NIHS0216	未	YGHS-4
NIHS0217	未	YGHS-5
	合計	37細胞株

ここで、細胞番号に付けられているNIHSは、寄託時の管理番号であり、品質の確認ならびに高度化に関する評価が完了していない段階に添付される番号である。バンクにおいて汚染検査、細胞の確認が完了し分譲可能であると判断された場合にはJCRBで始まる番号が新たに添付されて、カタログに掲載されて研究者に公開されることになる。本表では、全37株のうち、19株についてこの1年間で品質管理実験が完了しJCRB番号がを付して公開したことを意味している。

登録予定細胞を37種としたのは、国立医薬品食品衛生研究所・細胞バンクにおいて細胞の寄託ならびに培養に直接関与している職員数からこのぐらいの数を新たに登録できるであろうことを予測して割り出した細胞数である。しかし、実際にはこの1年間で登録できたのは、19株に止まってしまった。

この理由は、主に細胞の多くがマイコプラズマに汚染されていたことが原因である。即ち、職員が無理なく培養を実施して登録作業が出来る細胞数は一人当たり年間に12から15種類と試算し、3名が培養の専任として仕事をしているので、36から45種類が可能であると判断した。しかし、実際登録のための品質管理実験を実施すると、ほとんどの細胞からマイコプラズマが検出されることとなってしまったため、その除染作業をせざるを得ない状況となってしまったのである。マイコプラズマ汚染を排除することは細胞バンクとして最も重要な責務の一つであり、汚染を発見した場合はすぐに除染作業を開始することとしている。実際、数年前にMC210というマイコプラズマ除染用の試薬が大日本製薬から市販されるに及んで、比較的効率よく除染することが可能になったものの、除染に要する時間が短縮されたわけではない。実際、マイコプラズマを排除するには、MC210を添加して培養した後、時間経過を追って検査を実施し、検出されなくなったことを確認した後、一度少数の保存アンプルを作成してから、再度培養を開始し、連続30継代にわたる抗生物質を添加しない培養を実施し、最後にマイコプラズマが検出されなくなったことを確認して初めてマイコプラズマフリーであるとしている。

細胞の混乱や汚染の拡散を排除するには、除染作業と他の細胞を同時に扱うことを禁じる必要があり、そのために、除染作業が開始されると、新たな細胞の登録作業が遅れることとなってしまふ。そのため、当初予定した細胞の登録作業のうち半数程度しか登録する

ことができなかった。

今後、他の研究室などへの応援の要請等を含めて、登録作業の分担などを考える必要もあるかもしれない。また、年度末にかかって新たな寄託希望も現れているため、効率良く品質管理を実施し登録作業を迅速に実施する体制の確立を図ることは急務である。しかし、ことを急ぐあまり、細胞の誤謬を見過ごしたり、汚染が十分に排除できない事態となることは見過ごすことが出来ない問題であり、この矛盾をどのように解決するかを継続して検討する必要がある。

## 2. BVDVウイルスによる汚染の広がりとその対処について

細胞バンクにおける品質管理については、①マイコプラズマ汚染の排除、②相互混入の2点を最重点課題として設立以来取り組んできた。しかし、この10年間で研究の方向は医療や創薬などの実用的な課題を目的とした研究が広く推進されるようになってきたことに特徴がある。特に、ヒトを対象にした治療薬の開発や治療用に培養細胞を利用する事態を考えた場合、細胞中に混入しているかもしれないウイルスの存在が大変大きな問題としてクローズアップされることとなる。かかる問題については、細胞バンク設立当初より問題点として指摘され続けてきたが、実際のバンクの職員の配置ならびに設備等が必ずしも十分で無い状況下で、ウイルス検査までを実施できる体制を確立することはほぼ不可能であると考えられ、実施できない状況が続いていた。

しかし、1990年代に入り、遺伝子を増幅して検出するPCR法が紹介され、品質管理の手法として有効であることが明らかになるにつれて、現状の体制下にあってもウイルスの検査を実施できる可能性が出てきた。そこで、本研究班においては3年ほど前から効率良く迅速にウイルスを検査する手法を開発する研究を分担研究者である原沢が実施してきた。この方法がほぼ確立したことから、本年度は、別添付研究報告に示したようにBVDVの検出を試みることにした。

BVDVはウシに由来するウイルスであり、これまで何度もその混入が疑われてきたが、検出感度が低かったことから、極めて曖昧な結果しか得ることが出来なかったものである。しかし、本研究班を通じて開発されたRT-PCR法は大変高感度に検出できるものであったことから、細胞培養に使用する市販の血清から大変高い頻度でBVDVが検出されるという結果を得るに至った。勿論、バンクで保存している細胞株の大部分からもBVDVが検出されるに至った。

そこで、血清メーカーに依頼をし、BVDVによって汚染していない血清の作成を試み、この血清を安定的に

供給できる体制を確立することを試みた。但し、現在の段階では、血清の調整方法が必ずしも十分でないため一部の細胞については、増殖率に難点があり、旧来の汚染されている可能性のある血清を利用せざるを得ない側面がある。次年度以降は、こうした難点を取り除いた血清の安定的な供給体制を確立するようメーカーに対して強く働き掛ける必要があると思われる。

今回、BVDVを取り上げた理由は、極めて基礎的な問題として検出系の確認などを実施する目的が主要な課題であり、ほぼ目的を達成できたと考えられる。

実際、ヒトを対象にした細胞の利用ということを考えると、ヒトに感染して感染症を引き起こすウイルス等の検査体制を早期に確立する必要があると思われるので、そうした努力が次年度以降必要になる。現在、日本組織培養学会細胞バンク委員会では、この点についての検討を国内の細胞バンクと共同して検討しているため、今後順次体制を確立してゆくことが期待される。また、当該研究班もその中で重要な役割を演じることとなると思われる。

### 3. 細胞バンク情報管理システムの改良に関する研究について

細胞の保存管理、ならびに細胞の送付は極めて事務的な手続である。我国の細胞バンクは、先進欧米諸国の場合とは異なり、秘書や事務員等の採用は極端に少なく、手続を簡素化しなければバンク運営に支障をきたす。そのため、培養細胞研究資源に関する様々な情報の維持管理や在庫管理情報等については、コンピュータを最大限に利用することが不可欠である。それを目的にデータベース化された情報の利用を前提にして、細胞バンク管理プログラムを作成して、運用に供してきた。しかし、利用しているプログラムは、当バンクが設立された1985年に作成したものでありその後10年以上を経過して大変古くなってしまった。

パーソナルコンピュータの利用環境は現在ではWindowsに代表されるGUI (Graphic User Interface) を基本としたオブジェクト志向型のシステムへと劇的に変化したため、旧来のプログラムシステムでは運用上様々な問題が発生することとなってしまっている。特に、1985年当時はDOS環境で運用していたため、高度なCGI画面に対応していないので、利用するたびにDOSシステムを呼び出す等の、複雑で面倒な処理を余儀なくされるようになってきた。そこで、このプログラムをWindowsをプラットフォームとしたシステムに移植する必要が急務となるに至った。

プログラムのコードの作成については専門の業者に委託することにしたが、細胞バンクの基本的概念や業務の流れは、主任研究者が把握し整合性がとれた管

理システムとなることを目指した。特に、これまで利用してきたデータベースファイルの構造を変えることについては慎重に対処し、今回はデータベースの構造については一部のフィールド名(項目名)のみの調整による最小限の変更に止めることとした。そのため、新しい運営システムに問題が発生した場合は、すぐに旧プログラムに戻ることができ、業務に支障をきたさないよう配慮した。

新規システムの開発には、高速な実行方ファイルを生成し、プログラム言語としても評価の高いDelphi (インプライズ社、旧ボーランド社)を採用することとした。データベースはBDE (ボーランドデータベースエンジン)を介して直接dBASEファイルにアクセスすることとした。

さらに、World Wide Webへの情報提供についてはこれまでどおり大きな変更をすること無く、dBASEに蓄積した細胞株情報と別途管理している文献情報ならびに画像情報を結合してHTMLファイル化することを踏襲した。但し、外部の研究資源保存管理機関との連携がよりスムーズに取れるようにすることを目的に、昨年までに確立してきたFolio Views (Folio Co.)を取りやめ、通常のHTMLファイルを採用することとした(細胞バンクサーバの現状については画面を別途添付)。

### D. 考察

本研究班では、我国における医学・薬学研究に資する研究資源を収集しその品質を高めるための研究を総合的に実施している。本年度も分担研究に見られるように、ヒト由来の細胞資源ならびに新しい品質管理の結果等が示され、着実にバンク基盤の整備に役立つ結果が得られている。しかし、本研究班の特徴は、研究結果を論文として発表するだけでは十分では無いという点である。実施した研究結果が実際の細胞バンクの運営に反映されなければならない点に大きな特徴がある。

ところが、実際の厚生省細胞バンクの実務をおこなう研究室(国立医薬品食品衛生研究所、変異遺伝部第三室)はその設備ならびに職員数において必ずしも十分なものとはなっていないため、研究結果を細胞バンクの実務に反映することが大変難しい場合が多々ある。特に、新しい品質管理法を開発した場合、その方法を日々の細胞バンクのために培養している細胞の品質管理実験として取り入れてゆくことが最終目標であるが、一つの実験を取り入れるごとに、それに要する時間と実験設備の整備が同時に進行しないと必ずしも十分な体制を確立することが出来ないことになる。そのため、DNAプロファイリング法という精度の高い

細胞識別法を開発しながら、日々のルーチン作業として実施するまでに至らなかったケースも過去にあった。面白いことに、ATCCはこの方法を品質管理に取り入れ、細胞の識別精度を上げて現在に至っている。

しかし、今回のBVDV検出法は大変ラッキーなケースである。PCR実験については、新たな設備としてDNAの増幅を実施するサーマルサイクラーを1台導入するだけで、実験の拡張を図ることが可能であることが明らかになった。そのため、BVDVの検査、マイコプラズマ検査などを含めて、いくつかの品質管理実験を同時に実施することが可能になると思われるので、次年度は、こうした点を総合して、品質管理実験のシステムを組み立てることを検討する。また、細胞の識別についても、PCR実験が利用でき、DNAプロファイリング法に置き換える可能性を確認しつつある。こうしてみると、PCR法を新たな中心的な品質管理技法として、効率良い細胞バンク運営の基盤を確立できるかもしれない。

また、こうした実験により得られた結果は、WWWのホームページを利用して迅速に研究者に提供することが可能になった(<http://cellbank.nihs.go.jp/>)。そこで、これを利用して汚染などの問題が発見された場合は、緊急レポートとして結果を迅速に公開するシステムも確立することが出来てきた。そのためか、JCRB細胞バンクを参照する研究者の数は、設置以後増加し続け、現在では月間述べ1200名ほどの研究者が参照するようになってきている。今後、迅速な情報提供を維持し続けることは益々重要な意味を持つてくるであろう。

#### E. 結論

1. 本研究班における研究は、報告に止まらず、適宜細胞バンク運営の実務に利用し、細胞バンク基盤整備に役立てることが最大の目的である。
2. 本年度の研究の結果、いくつかの新たなヒト細胞が資源として作出された。しかし、細胞を実際に登録する作業はマイコプラズマ除去などの問題もあり必ずしもスムーズに行っているわけでは無いが、実際に担当している職員は、相当の努力をして登録作業を急いでいる。
3. 新たなウイルス検査法を実用化してバンク運営に役立てる目処がついた。我国の他の細胞バンクでも日本組織培養学会を中心に相互の研究交流を図る中で、複数種のウイルス検査方法を確立する努力が為されている。こうした協力体制も活用して、今後数年以内に細胞バンクにおけるウイルス確認試験が可能になるものと思われる。

4. 細胞バンク情報システムは有効に機能し、多くの研究者が参照して実際の研究に役立てていると思われる。1998年度のアクセス件数はコンスタントに月間1200件を越えるまでになった。今後、培養上の詳細な情報、非研究への情報公開などを含めて一層内容の整備・充実を図る予定である。
5. ヒト由来の組織や培養細胞を扱うための倫理問題については、創薬研究班と協力しながら制度上の整備を図っているところである。平成10年度中に国立医薬品食品衛生研究所に所内倫理委員会を設けて、細胞バンクでヒト細胞を扱う際の問題点についての議論をお願いすると同時に手続を明確化した。また、手術により切除された組織を病院から入手する際の病院側の倫理委員会とも接触し、協力関係を築くための基本合意も出来た。また、倫理問題への取り組みについても、WWWのホームページを通じて公開する作業も始めた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 日本組織培養学会編、細胞バンク・遺伝子バンク、共立出版
2. 水沢 博 JCRB/HSRRB細胞バンク培養細胞研究資源データベース、蛋白質核酸酵素 43(13), 2015-2019 (1998)。

##### 2. 学会発表

1. Mizusawa, H., Slow but steady movement of cell banking in Japan, Congress on in vitro biology, 1998 May 30-June 3, LasVegas,
2. 水沢 博, Quality Control of Cell Lines at Japanese Collection of Research Bioresources. The 1st Korean Cell Line Research Workshop, 1998.6.18, Seoul National University,
3. 水沢 博, Japanese Cell Lines in JCRB Cellbank, The 1st Korean Cell Line Reserach Workshop, 1998.6.18, Seoul National University,
4. 田辺秀之、中川ゆづき、峰岸大輔、橋本雄之、田中憲穂、押村光雄、祖父尼俊雄、水沢博, Fish 法によるヒト単一染色体保持雑種細胞株パネルの性状解析, 日本組織培養学会第70回大会、1998、5月、21日-5月22日、仙台市復興記念会館,
5. 増井 徹、高田容子、岩下新太郎、樽松美治、田辺秀之、祖父尼俊雄、水沢 博, 増殖停止関連遺伝子 *eti-1* のアポトーシス誘導活性, 日本組織培養学会第70回大会、1998、5月、21日-5月22日、仙台市復興記念会館,
6. 増井 徹、高田容子、岩下新太郎、田辺秀之、祖

父尼俊雄、水沢 博，増殖停止関連遺伝子 *eti-1* のアポトーシス誘導活性，第57回日本癌学会総会，横浜国際平和会議場（パシフィコ横浜），1998.9.30-1998.10.2

7. 田辺秀之、中川ゆずき、峰岸大輔、橋本雄之、田中憲徳、押村光雄、祖父尼俊雄、水沢博，染色体ペインティング法および ReverseFISH 法によるヒト単一染色体保持雑種細胞株パネルの解析，日本人類遺伝学会第43回大会，10月14日-16日、山梨県甲府市。山梨県立県民文化ホール。
8. 田辺秀之、峰岸大輔、増井 徹、祖父尼俊雄、水沢博，FISH法によるテロメアおよびセントロメアDNAを指標とした各種培養細胞株の染色体分析，日本染色体学会、11月29・30日，広島国際会議場
9. 田辺秀之、峰岸大輔、増井 徹、祖父尼俊雄、水沢博，ヒト腫瘍細胞株におけるテロメア癒合 (telomeric association; tas) について，第16回染色体ワークショップ，1999.1.30-2.1，葉山

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
該当無し。



# 厚生科学研究費によるJCRB細胞バンク情報 サーベイ整備状況とその利用状況

1. 細胞株カタログ情報
2. 細胞株関連情報
3. 細胞分譲情報
4. 利用状況

**[Http://cellbank.nih.go.jp/](http://cellbank.nih.go.jp/)**

# JCRB細胞バンク情報サーバーページ画面

(左フレーム: 細胞株カタログ情報, 右フレーム: 関連情報)

Folio siteDirector - Netscape  
ツバ化(日) 編集(日) 表示(N) ツバツバ(G) Communicator(日) ツバツバ(日)  
場所: http://cellbank.nih.go.jp/

戻る 次 再読み込み ホーム 検索 印刷 セキツチ 停止

JCRB Infobase  
BioResources  
Cells  
1999. 3. 3  
NEW Cells  
1998. 9. 17  
Chromosome Panel  
p53 gene status  
p53  
Tables Revised

English Japanese

Welcome to JCRB/HSRRB Cell Bank  
Japanese Collection of Research Bioresources  
(used to be Japanese Cancer Research Resources Bank)  
and  
Human Science Research Resources Bank

This page has been accessed 14229 times.  
(Counter start at July. 21 1998)

スタート 秀 Distiller Assist... APACHE HiJaak PRO Folio siteDi... 15:10

# 1. 細胞株カタログ情報

Doc Frame Page - Netscape

URL: http://cellbank.nih.go.jp/cgi-bin/folio/text/cellsfor/query?w/doc/@1?&doc=@1?&doc=@1?

ホーム
 戻る
 進む
 再読み込み
 印刷
 停止
 検索
 ヘルプ

---

Contents  
 Next page  
 Previous page  
 Query  
 Next Hit  
 Previous Hit

---

JCRB0001 : F9-41

Date accepted: 02/15/85

Other name: F9

Animal: mouse, 129 Sex: M

Scientific Name: Mus musculus

Tissue: testis; transplanted with embryo

Suggested medium: Dulbecco's modified Eagle's medium with 15% fetal calf serum

Suggested method for passage: Treat cells with 0.01% EDTA and 0.125% trypsin. Subculture every two days and disperse cells completely.

Cell no. of passage: 154026 cells/100mm dish

---

**JCRB Cell Bank**  
 Ministry of Health and Welfare Japan 1997

Updated on March 3, 1999  
 JCRB Cell Bank, NIIHS, Kami-Yoza, Setagaya Tokyo, 1588501, Japan  
 Phone +81-8700-1141/e-mail: cellbank@niihs.go.jp

National Institute of Health Sciences  
 1-18-1 Kami-Yoza, Setagaya  
 Tokyo 158, Japan  
 Last update: 03/02/99

---

Distiller Assist...
 APACHE
 Hitack PRO
 Folio site Direc...
 DOC Frame...

15:11

# 1. 細胞株カタログ情報

## 細胞検索画面

Simple Query Request Page - Netscape

戻る 次 再読み込み ホーム 検索 印刷 設定 停止

Folio Controls  
INFO INFOBASE  
How to query

C:\V\I\EMS31\T\I\LENEM.NFO

Search Text: \_\_\_\_\_ Search

Display Options:  
 Records w/Hits Only  
 Headings w/Hits  
 Words Around Hits  
Words: [ 4 ]

APACHE Folio site Direc... Simple Quer... 15:11

# 1. 細胞株カタログ情報

## 細胞情報検索結果

DOC Frame Page - Netscape

ツルビ 編集 表示 ツルビ Communicator (C) 4/7/95

場所 <http://cellbank.nihhs.go.jp/cgi-bin/folio.cgi/exe/cellsinfo/query=hela/doc/1@136?>

戻る 次 再読み込み ホーム 検索 印刷 セキュリティ 停止

JCRB0073: J-111

Date accepted: 10/12/85  
 Animal: human Sex: F Age: 25 year-old  
 Scientific Name: Homo sapiens  
 Tissue: peripheral blood  
 Suggested medium: Eagle's minimal essential medium with non-essential amino acids and 10% fetal bovine serum.  
 Suggested method for passage: Cells are harvested after treatment with 0.02 % EDTA and 0.25 % trypsin.  
 Cell no. at passage: split ratio=1/3  
 Case history: acute monocytic leukemia  
 Genetics: **hela** marker chromosome observed ID:371 Lavappa KS. In Vitro Cell Dev. Biol. 14:469-475(1978).

Life span: infinite  
 Morphology: epithelial-like  
 Characteristics: acute monocytic leukemia  
 Classification: tumor  
 Established by: Osmond, E. E.  
 Deposited by: Akiyama, M.  
 Comments: **hela** markers. In Vitro. 14, 469, 1978.

[ Reference(s) by Ref ID ]  
 ID:69 Lavappa KS, Verma RS, and Dosik H. Am. J. Hum. Genet. 29:67A(1977).  
 ID:371 Lavappa KS. In Vitro Cell Dev. Biol. 14:469-475(1978).  
 ID:653 The Cell Culture Collection Committee. Science. 146:241-243(1964).  
 ID:1182 Osmond FF and Rronke JH. In Vitro. 10:1010-1022(1975).

ツルビ 完了。

Distiller Assist... APACHE H:back PRO Folio siteDirec... DOC Frame... 15:11

## 2. 細胞株関連情報

Folio site Director - Netscape

ファイル 編集 表示 場所 <http://cellbank.nhs.go.jp/> Communicator 印刷 停止

戻る 次 再読み込み ホーム 検索 カギ 印刷 セキクリ 停止

JCRB Infobase

BioResources

Cells  
1999. 3. 3

New Cells  
1998. 9. 17

Chromosome Panel


p53 gene status

Tables Revised

JCRB Cell Bank  
The Japanese Collection of Research Bioresources

English Gene Bank

Last update: 1999. 3. 16



1. JCRBスターバンク業務案内
2. HSRRB細胞分譲案内
3. ヒト組織利用にあたっての研究倫理
4. 細胞バンク活用情報
5. 細胞・細胞培養の基礎と歴史  
(非専門家向け解説も準備しています。)
6. 掲示板：利用者フォーラム
7. 関連サイトへのリンク
8. 掲示板：管理者からのお知らせ

本サイトに掲載する写真は600×450ピクセルを標準に作成しています。15インチモニターを使用している方が多いと思いますが、800×600ピクセルに設定するのが良いでしょう。

本事業は 第2条第2項及び第3条に基づき事業です。

トキヤク 完了。

Distiller Assist... APACHE HiLack PRO Folio siteDi...

15:10

## 2. 細胞株関連情報

### マスターバンク品質管理情報

Folio siteDirector - Netscape  
Folio 編集 表示 場所 <http://cellbank.nhs.go.jp/>  
戻る 次 再読み込み ホーム 検索 信 印 印刷 停止

JCRB Infobase  
BioResources  
Cells  
1999. 3. 3  
NEW Cells  
1998. 9. 17  
Chromosome Panel  
p53 gene status  
p53  
Tables Revised

トキス外完了。  
APACHE Huack PRO Folio site Di... 15:12

### JCRB細胞バンク・細胞管理手順

培養管理, 品質管理, 情報管理

#### 寄託細胞の受入と長期保存

1. 細胞受入培養  
トークン作成 (NIHS) = 品質管理用  
一般汚染検査, マイコプラズマ検査・除染, 細胞種確認検査
2. 細胞保存管理培養  
シート作成 (JCRB) = 長期保存用  
一般汚染検査, マイコプラズマ検査, 細胞種確認検査, 細胞識別

#### 品質管理

1. 一般微生物汚染検査 (細菌および真菌)  
培養法 (グラブドナー, チオグリコロト培地, LBプレート)

### 3. 細胞分譲情報

### ヒューマンサイエンス振興財団へのリンク

Folio siteDirector - Netscape  
Folio 編集 表示 サイト 場所 [http://www.jstfor.jp/index.html]  
Folio 編集 表示 サイト 場所 [http://www.jstfor.jp/index.html]  
Folio 編集 表示 サイト 場所 [http://www.jstfor.jp/index.html]  
Folio 編集 表示 サイト 場所 [http://www.jstfor.jp/index.html]

JCRB InfoBase

BioResources

- Cells 1999. 3. 8
- New Cells 1998. 9. 17
- Chromosome Panel
- p53 gene status

Tables Revised

APACHE Httback PRO Folio siteDirector... 15:12

- 財団の紹介
- 入会のご案内
- 財団の事業
- 財団の刊行物
- ヒューマンサイエンス研究資源バンク
- 財団主催セミナーのご案内
- What's New
- 賛助会員のページ
- 関係機関のホームページ
- HOME
- INFORMATION [ENGLISH]

**ヒューマンサイエンス研究資源バンク**

Human Science Research Resources Bank (1999年1月 修正)

ヒューマンサイエンス研究資源バンクについてご案内致します。  
必要項目をクリックして財団情報や他機関の情報を共に What's New に掲載されるので、クリックしてご覧下さい。

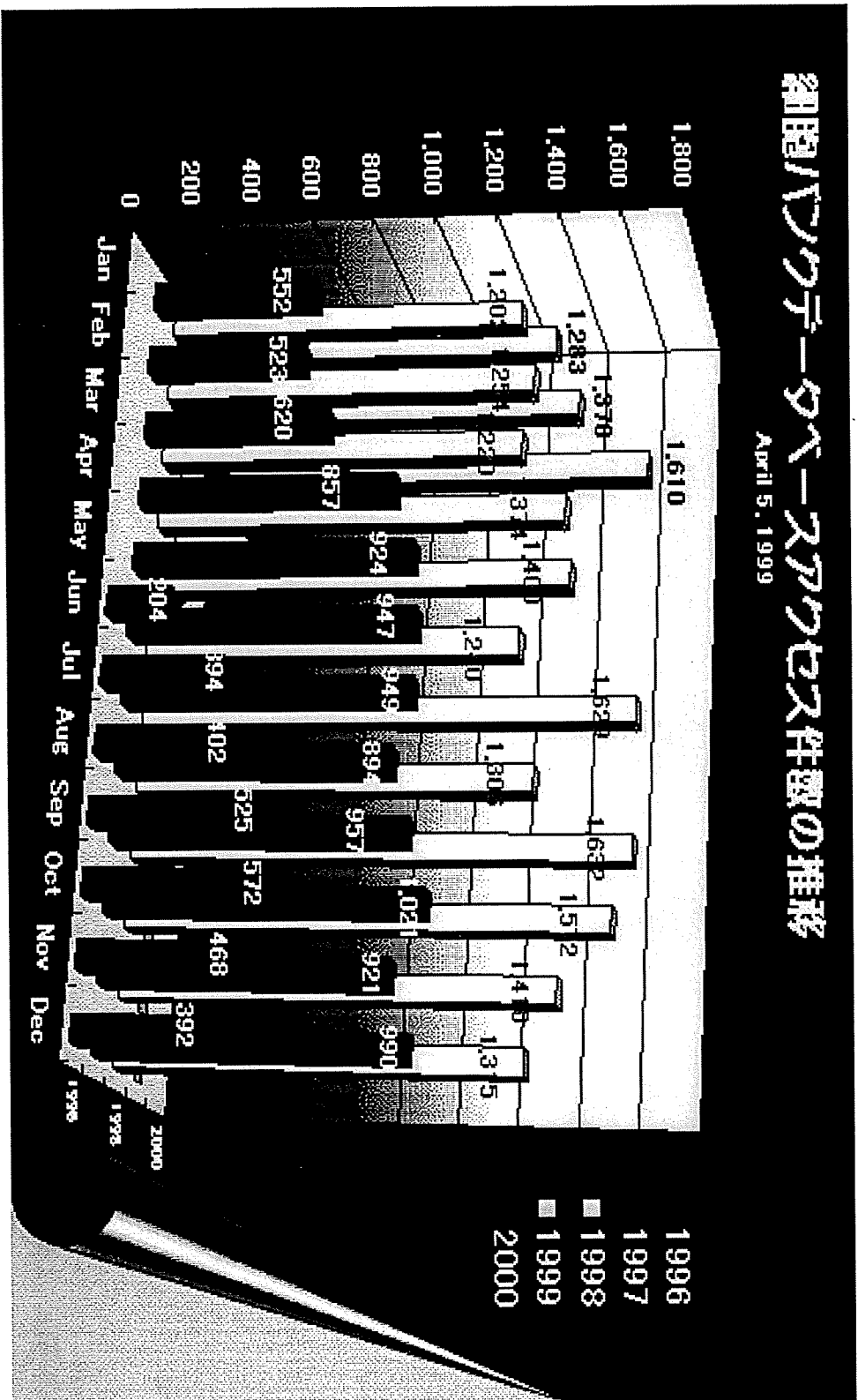
**HSRRBの紹介**  
HSRRBのご紹介をいたします。

**運営規程**  
運営規程のご案内をいたします。

**利用の手引 [細胞]**

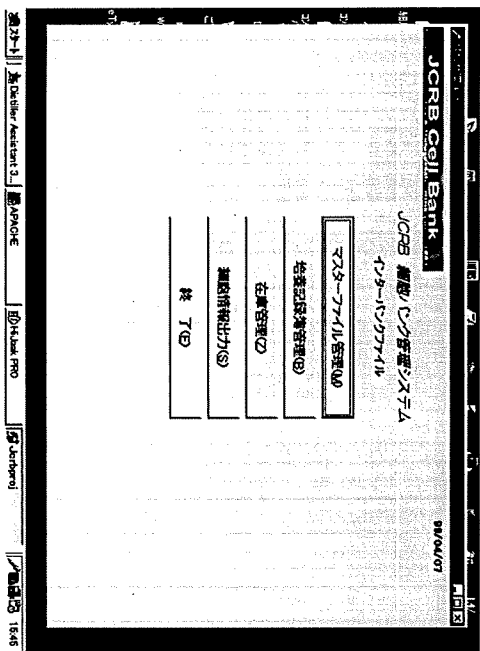


# 1996年6月から1998年度末(1999年3月)までの 細胞バンク情報サーバの利用状況

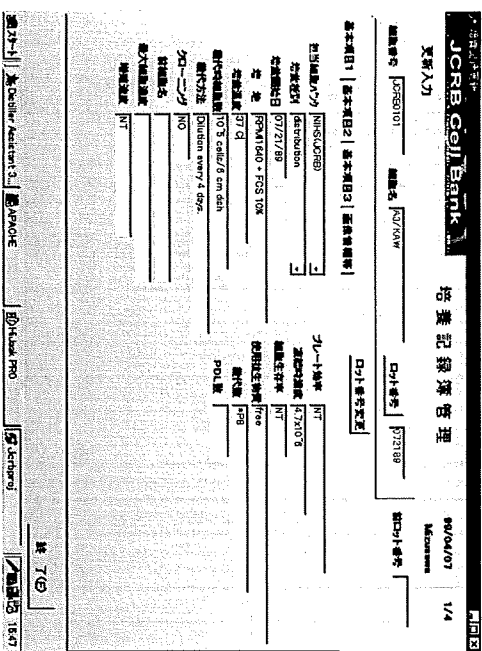


# Windows対応細胞株管理システム

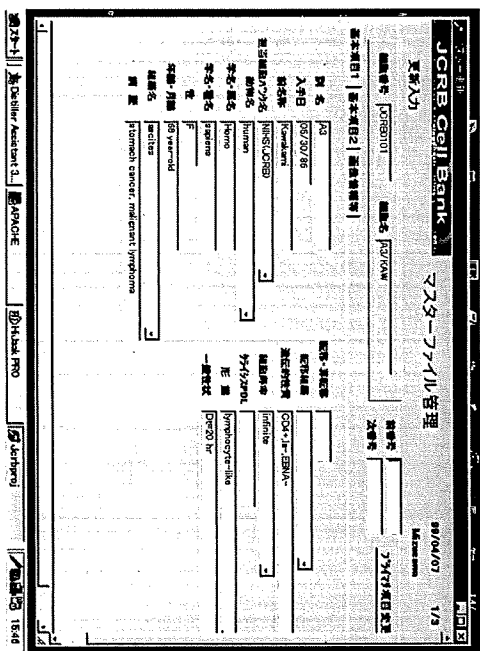
## 主メニュー画面



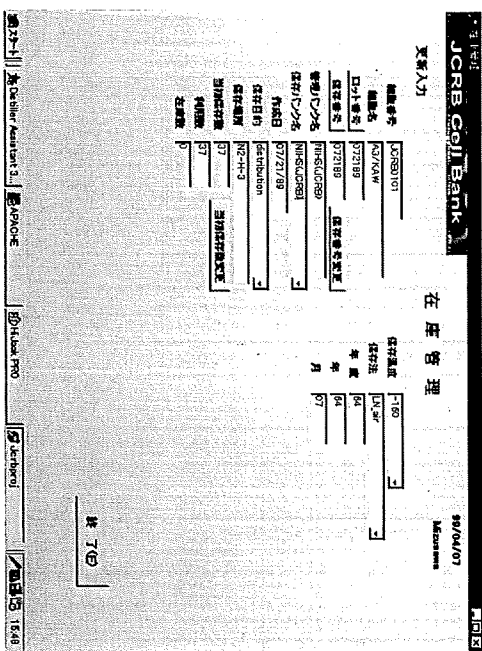
## 培養管理情報入力画面



## マスターデータ入力画面



## 保存管理データ入力画面



## ウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV)による培養細胞 及び市販ウシ血清の汚染状況に関する調査研究

主任研究者: 水沢 博, 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 第三室 室長  
(分担研究ぶん報告書)

**研究要旨:** JCRB細胞バンクでは、研究資源として培養細胞を配布する立場での品質管理の一環として、ペスティウイルスの1種であるウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV, Bovine Viral Diarrhea Virus)のネステッドPCR法による検出法を確立した。これを用いて、8社22ロットのウシ胎児血清を調査したところ1ロットを除いた全ての血清からBVDVのゲノム断片が検出された。この結果は必ずしも感染性ウイルスが混入していることを意味するものではないが、少なくともBVDVゲノム断片が検出されるウシ血清はかなり広範囲に及んでいるものと思われる。また、ATCCならびにJCRB細胞バンクで品質管理を受けている細胞について調査した結果では20株中15株からBVDVが検出された。

### A. 研究目的

1984年に厚生省がわが国初めての細胞バンク (JCRB細胞バンク) を設置して以後、複数の細胞バンクが設置されて現在に至っている。

細胞バンク設置の意義については、1950年代に米国で計画された段階で様々な議論がなされ、①十分な性状確認が成された細胞をいつでも研究者が利用できる状態で保存することと、②細胞に関する様々な情報を整理保存することの2点が第一義的な任務であることが確認されて現在に至っている。

原則論を言えば、十分な性状確認が成された細胞という表現の中に「何者にも汚染されていない純粋な培養細胞を確立すること」が含まれているのであるが、マイコプラズマや細菌などはこれに則してほぼ完全に排除することが可能になっているものの、ウイルスについてはその存在を確実に否定することは大変難しい課題であった。米国の代表的な細胞バンクである ATCC (American Type Culture Collection) では、この点をクリアにするためにウイルスの検出法に関する研究を様々に検討すると同時に多数の職員を擁して業務に取り組んできている。

ところが、わが国の場合、個々の細胞バンクの職員数はATCCに比べて遥かに少なく、十分なウイルス検査の体制を確立することが出来ないで現在に至っているのが実状である。どのバンクも、実験ならびに業務に従事する職員数はアルバイト職員を含めても概ね数名程度であり、あらゆる検査はこの範囲で実施せざるを得ない。従って、1998年度までにわが国で確立された汚染検査体制は、マイコプラズマ・一般細菌・真菌によるものまでであり、ウイルス検査の体制の確立には至っていないのが実状である。

ウイルス検査と一言で言ってしまうと大変簡単なこ

とのように聞こえるが、ウイルスには、DNAウイルスからRNAウイルスまで様々なものが存在して豊富なバラエティーがある他、個々のウイルスの増殖様式も様々に異なるため、ウイルスごとに多種多様な実験手法を導入しなければならず、一人の従事者が出来る実験の量と質には明らかに限界が存在しており、少数の職員で出来る課題ではなかった。同時に、ヒトに感染するウイルスを分離増殖させてしまえば危険性が増すこともあって、増殖系を利用することがはばかれるという事情も存在していた。

しかし、1990年代の半ばになって事情が一変することになった。即ち、PCR法という高感度DNA/RNA検出法が確立されたことによって、汚染ウイルスを大幅に増殖させなくてもウイルスの混入があるかどうかを検出できる実験的基盤が確立されることになった。この方法はウイルスの検出に利用するより先、JCRB細胞バンクではマイコプラズマの高感度検出法として採用するに至り、古典的な方法と組み合わせることでマイコプラズマによる汚染をほぼ100%捕捉できるようになった。その原理を考えれば、当然ウイルスの検出に応用することが可能になると思われたのである。

1995年、原沢は、国際的な遺伝子研究の結果整備されてきたDNAのデータベースを分析し、ウシに由来する Pestivirus の一つである BVDV の検出に利用できる PCR プライマーを作成することに成功し、極めて高感度で安定な検出方法を確立するに至った。細胞バンクではこの方法を採用して培養細胞に混入しているのではないかと想像されていた BVDV の調査を試みることにしたのである。

BVDVは、細胞の培養に利用するウシ血清に混入していることが予想されていたが、PCR法の確立まではいずれの方法も感度が低く、極めて不安定な検出しが行

えなかった.そのため,混入の疑いが提示されながら,混入についての確実な結論を得ることができない状況が続いていた.

本稿では,原沢らによって確立されたPCR法を利用して,JCRB細胞バンクで保存されている種細胞へのBVDVの混入の状況や通常のルートで購入した仔ウシ血清やウシ胎児血清中のBVDVの検出について,これまでに得られた調査結果を紹介することにしたい.

## B. 実験方法

### 1. BVDVの検出

BVDVの検出は,原沢らの方法に準じて行った.BVDVはRNAウイルスであるため,血清および細胞培養上清からRNAを抽出した後,逆転写酵素でcDNAを合成し,これをネステッドプライマー法を用いてBVDVを検出した.使用したプライマーの塩基配列と検出に利用したBVDV上の領域については図1に示した.BVDVの検出に利用した該当領域はBVDVの各ウイルス株間でのホモロジーが高く他のウイルスでは見られないユニークな配列である.

### RNAサンプルの調整

細胞培養上清又は血清サンプルの0.25mlに0.75mlのISOGEN-LS(ニッポンジーン)と0.2mlクロロフォルムを添加し30秒攪拌した後4°Cで5分間静置した.その後12,000gで15分間4°Cで遠心し,水層を取って0.5mlの2ug/mlのグリコーゲンを含むイソプロパノールを添加し攪拌の後さらに12,000gで15分間4°Cで遠心し沈殿を得た.沈殿に1mlの75%エタノールを添加して洗浄したのち再度12,000gで15分間4°Cで遠心し沈殿を簡単に乾燥し蒸留水に溶解してこれをRNAサンプルとした.

### 逆転写酵素反応

逆転写酵素の反応は上記RNAサンプルの10 $\mu$ lに5倍濃度逆転写酵素 buffer 4 $\mu$ l, 0.1M DTT 2 $\mu$ l, M-MLV 逆転写酵素 (GIBCO-BRL) 0.1 $\mu$ l, 5mM dNTP 2.0 $\mu$ l, RNase inhibitor(宝酒造,京都) 0.1 $\mu$ l, 40 $\mu$ M プライマー R1 0.25 $\mu$ l, DEPC 処理水 1.55 $\mu$ l を加え37°Cで60分間反応させた後95°Cで5分間加温して反応を停止した.

### ネステッドPCR反応

PCR反応は2組のプライマーセット(図1)を利用してネステッドPCRを実施した.最初のPCR反応は,逆転写酵素反応により作られたcDNAサンプルに10倍濃度のPCR反応バッファー 5 $\mu$ l, 2.5mM dNTP 4 $\mu$ l, 40 $\mu$ M プライマー F1 0.25 $\mu$ l, 40 $\mu$ M プライ

マー R1 0.25 $\mu$ l, Taq DNA ポリメラーゼ (PerkinElmer, Cetus, Norwalk, Conn.) 0.25 $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 35.25 $\mu$ l を加えて反応を行った.PCR反応は,94°C 30秒,55°C 100秒,72°C 100秒を30回繰り返した.

2回目のPCR反応は,1回目のPCR産物1 $\mu$ lに10倍濃度のPCR反応バッファー 5 $\mu$ l, 2.5mM dNTP 4 $\mu$ l, 40 $\mu$ M プライマー F2 0.25 $\mu$ l, 40 $\mu$ M プライマー R2 0.25 $\mu$ l, Taq DNA ポリメラーゼ 0.25 $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 39.25 $\mu$ l を加えて反応を行った.反応は1回目のPCR反応と同じ手順で実施した.この1連の反応は大変鋭敏なので,反応産物相互の混入が生じないように十分な注意を払わなければならない.

### アガロースゲル電気泳動

PCR産物は反応後3%アガロースゲルにて電気泳動を行って検出した.電気泳動後0.2 $\mu$ g/mlのエチジウムブロマイドでアガロースを染色した後UVを照射してポラロイドフィルムで写真撮影を行い検出した.

### 2. 血清

細胞バンクでは,主に海外の血清メーカーよりサンプルの提供を受けて,細胞バンクで保存している細胞を指標にして増殖能をテストする.特に増殖しにくい細胞をいくつか選択して,これを良く増殖させることが出来るウシ胎児血清を複数選択して各メーカーよりある程度の規模で購入している.これまでは,購入時にBVDVの検査を実施することは無かった.

陰性対照には三菱化学PFCS血清を使用し,陽性対照にはIBR/BVD/PI混合生ワクチン(日生研,東京青梅市)を使用した.混合生ワクチンには弱毒化したBVDV No.12株からNo.43株までが104.0 TCID<sub>50</sub>以上含まれていることが仕様書に明記されている.この混合生ワクチンを10倍ずつ連続希釈し,三菱化学PFCS血清に混入させて陽性対照とした.

### 3. 培養細胞

実験には,主にJCRB細胞バンクでシードカルチャーとして保存している培養細胞を利用した.特に,ヒトに由来する細胞,ウシに由来する細胞およびマイコプラズマの検出の際の指標細胞として用いるVero細胞を比較することとした.また,海外の事情を把握するために,ATCCから入手した細胞も使用した.ATCCから入手した細胞については,培養せずアンプルを開封したものを直接検査した.

## C. 実験結果

実験は各サンプルをPCR処理した後アガロースゲルで電気泳動し,泳動後エチジウムブロマイドで染色し