

**厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
研究報告書**

研究課題

**生命科学研究に必須な培養細胞研究資
源管理基盤の整備に関する総合的研究**

課題番号：H12-ゲノム-012

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部第三室（細胞バンク）
水沢博

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）研究報告書

研究課題：生命科学研究に必須な培養細胞研究資源管理基盤の整備に関する総合的研究

課題番号：H12-ゲノム-012

主任研究者：所属施設 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第三室（細胞バンク）

氏名 水沢博

報告書目次

総括研究報告書

細胞バンクシステムの構築に関する研究

水沢 博 細胞バンクシステムの構築と維持に関する総合的研究・・・・・・・・・・・・・2

分担研究報告書

細胞バンクにおける品質管理に関する研究

原澤 亮 PCR法を用いた混入ウイルス検出法の活用に関する研究・・・・・・・・・・・・・21

竹内 昌男 細胞株管理における品質管理技術の改良に関する研究・・・・・・・・・・・・・25

細胞の収集、樹立に関する研究

立花 章 ヒト遺伝性疾患細胞の研究資源化と分譲に関する研究・・・・・・・・・・・・・27

木村 成道 正常2倍体ヒト線維芽細胞の研究資源化と分譲及び品質管理に関する研究・・・・・・・・30

安本 茂 組織臓器再生機能を保有する幹細胞の研究資源化に関する研究・・・・・・・・・・・・・33

難波 正義 多分化能を持つヒト骨髄性細胞の研究資源化に関する研究・・・・・・・・・・・・・36

黒木 登志夫 国内樹立ヒト細胞系の状況調査と収集に関する研究・・・・・・・・・・・・・39

田中 憲徳 ヒトの疾患モデル細胞の研究資源化と細胞バンクの危機管理システムの構築・・・・・・・・42
に関する研究

参考資料 総括研究報告書添付論文・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・付

研究課題：生命科学研究に必須な培養細胞研究資源管理基盤の整備に関する総合的研究

課題番号：H12-ゲノム-012

主任研究者：所属施設 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第三室（細胞バンク）

氏 名 水沢博

1. 研究目的

我国は、平成7年11月15日に施行された科学技術基本法において、国が先導して『研究材料の円滑な供給等の支援機能の充実に必要な施策を講ずる（第十二条、2）』とし、『研究開発の効率的な推進のために、情報処理の高度化、データベースの充実、ネットワーク化の促進を図る（第十三条）』ことを宣言した。本研究プロジェクトは、この施策の実現を目指して欧米依存型研究体質から脱却することを目標に、生命科学研究基盤のうち培養細胞研究資源基盤を整備することを目的に研究を実施するものである。従って、培養細胞研究資源基盤の整備に必須である次の4項目を重点課題とした。

- a) 日本人由来のヒト培養細胞を多数収集する。
- b) 誤謬や汚染を排除した高度な培養細胞研究資源として長期保存体制を確立する。
- c) 急速に進歩している情報技術を活用して研究資源情報提供システムを整備する。
- d) 研究者に迅速に細胞資源を提供するシステムを整備する。

当研究班は上記4課題を持って、培養細胞研究資源の数量的充実整備、品質管理手法（汚染微生物の高感度検出法、クロスコンタミネーション検出技術）の向上による品質の高度化、データベースシステムの開発と維持を通じて業務の効率化を図る、インターネットの効果的利用による培養細胞情報の迅速な公開を実施し、細胞バンクを研究資源基盤システムとして総合的に整備充実することを目指す。

2. 研究方法

概要

培養細胞の収集は、培養細胞研究資源基盤の整備に不可欠であるが、たいへん幅が広い課題である。そこで、当該主任研究者と分担研究者により分業体制を確立してこれらの課題を分担した。分担は次ぎのような基準でおこなった。

細胞バンク（国立医薬品食品衛生研究所、変異遺

伝部、第三室）は、培養細胞研究資源基盤の中核組織として、①細胞の収集、②細胞の性状確認（品質管理）、③長期保存、④分譲、の各業務を実施する。

公的バンクから提供される研究資源は、その品質において国際的な基準を満たした高度なものを提供することが求められている。したがって、上記②の細胞の性状確認の作業は、公的細胞バンクの中心的な業務課題として最も重視する必要がある、先端的研究による成果を迅速に取り入れて、細胞の品質を高度に維持する体制を維持発展させなければならない。

さらに、多数の細胞を収集するというのも、多方面の研究者からの要望に答えるには不可欠な課題である。しかし、細胞の樹立という作業は、2-3年の長期間にわたることも多く、困難な細胞であればあるほど時間を要するものである。

そこで、当該研究班においては、細胞の樹立を分担研究者の主要な課題として、樹立した細胞を厚生労働省細胞バンクに寄託することを前提として参画をお願いした。寄託にあたっては、事前にマイコプラズマ検査、アインザイム検査等の簡単な品質管理検査は実施することを義務付けることとしたが、ヒト細胞の個別識別等、より高度な技術や過去に蓄積されたデータを必要とするような品質管理検査については、国立医薬品食品衛生研究所細胞バンクの重要な課題として実施することとした。

このような趣旨に基づいて、細胞の収集については分担研究者、黒木、田中、立花、木村、安本、難波が担当することとした。細胞の樹立には時間と相当程度の研究経験を必要とし、時間的にも長期間を必要とする。したがって、単年度で樹立することはほぼ不可能であるため、それぞれの研究者の研究経験と研究テーマに基づいて、論文発表（欧文誌が好ましい）まで完了した培養細胞を中心に寄託を進めることとし、現在、樹立中の細胞については将来、

条件が整った段階で寄託を考慮することとした。

品質管理については、細胞バンク設立以来15年余り経過し、多くの品質管理実験が定着することになった。しかし、特に職員数の補充が大変厳しいことから、必ずしも国際的な基準に照らして十分な品質管理体制が確立しているとはいえない。特に、ウイルス検査の体制は未だ十分ではなく、このことが、国内の企業ユーザーの利用をためらわせていることは明らかである。

そのため、今年度からは、ウイルス検査を実施できる体制を確立することを目標に、分担研究者、原沢、竹内の協力を仰ぐこととした。原沢は、長期間にわたって細胞バンクでの品質管理体制の確立に携わっており、既にPCR法を応用したマイコプラズマの高感度検出法を確立し、品質管理実験の一部として実用化することとなったが、さらにその発展として、家畜に由来する各種ウイルスの混入を検出する実験系の確立を試みている。

国内外の細胞バンクには、家畜に由来している細胞が複数寄託されていて、それらの培養にはウシ由来の血清が利用されることなどを考えると、ウシや他の家畜に由来するウイルスの混入の危険は常に存在しているため、その検出法を確立することは重要である。また、その結果ウイルスの混入が認められることとなった場合は、除去するシステムの構築についても真剣に考えなければならなくなる場所である。

一方、ヒトに由来する各種ウイルスの混入を明らかにすることも重要である。その重要性については認識はありながら、人的労力の不足や施設の不備からこれまでほとんど手がつけられてきていなかった。これは、由々しき問題であることは認識しているものの、公的研究機関における職員の採用に限界があるため、実際に実験を実施することが不可能であったことに起因している。このような問題は、国内で活動している全ての細胞バンクに共通している問題で、今後政策的な解決策が必要であると思われる。われわれは、そうした整備が将来実施されることを期待しつつ、本年度から竹内の協力を仰いで、ウイルス検査手法の確立を目指して、今後実施できる時期が到来したときに対応できる体制を確立する準備をはじめめるものである。

以上の課題については、分担研究者の協力を得る

こととし、主任研究者は以下の課題に関する研究を実施することとした。

A. ヒト細胞の個別識別

ヒト由来の細胞を中心に、相互に混入していたという事故が現在世界各国の有力な細胞バンクで次々と発見されつつある。この問題は、研究者の不注意というより、培養細胞の樹立の難しさを反映していると考えられるが、これまで、ヒト細胞を相互に区別して識別する実験的手法が確立されていなかったことに原因があった。

しかし、1985年に英国のJeffreys, A. J. らによってDNAフィンガープリント法が発表されて以来ヒト細胞の個別識別への道が開け、様々な方法が世界的に開発されるようになってきた。

当該細胞バンクにおいても1990年頃から独自のプローブを調整して、DNAフィンガープリント法を改変したDNAプロファイリング法を開発し実用化を試みたが、放射性アイソトープを使用しなければならないなどの弱点があったことから、日常的な培養細胞の品質管理技術とするにはいたらなかった。しかし、最近になってDNAシーケンサーを利用したSTR-PCR法が開発、商品化されるに至り、実用的な利用に道が開かれることとなった。そこで、これを取り入れてヒト細胞の個別識別データを蓄積し、ヒト由来培養細胞の相互混入の状況についての調査研究を本格的に実施することとした。

B. 情報技術 (IT) を活用した細胞バンクの効率化

1984年に当該細胞バンクが設立されて以来、効率的な細胞バンク運営を目指して、小型コンピュータ (PC) の活用を進めてきた。実質的には、あらゆるデータの電子ファイル化とハードコピー (マスターデータ) の管理を徹底することに加えて、品質管理実験、在庫管理情報等のデータをデータベース化することであった。

1995年以降、インターネットの国際的な普及が始まったことにより、World Wide Web (WWW) と呼ばれる情報提供システムを構築することが容易になり、24時間体制で細胞バンク情報を提供できる通信基盤が整備された。そこで、当該細胞バンクでは、それまでに電子ファイル化して蓄積してきた培養細胞情報をWWWに供用することとし、当該細胞バ

ンクが所属する国立医薬品食品衛生研究所でインターネットサーバの運用を開始した直後から、細胞バンクの独自サーバを設置して、WWWサイトの運営を開始した。

現在は、大変に早い速度で進展する情報技術を迅速に取り入れて、細胞バンクWWWサーバの改善維持に努めるほか、新たに導入する品質管理実験から得られる情報の公開方法等の検討ならびに開発を進めている。特に、本年度は、STR-PCR法により得られた培養細胞の個別識別データのデータベース化や識別システムの改良を実施した。

C. 一般品質管理

マイコプラズマ検査とアイソザイム検査は、基本的な汚染の防止と細胞が由来する動物種を確認するために不可欠な一般的な品質管理実験であるが、これらの検査を日常的に実施する体制を維持する。

研究方法

a. 細胞の樹立ならびに収集

細胞の収集は以上述べたように、分担研究者によって実施されているので、分担研究報告書を参照されたい。

b. 品質管理手法の開発と実施

i) ウイルス汚染の検査

ウイルス検査手法は、マイコプラズマ検査手法の改変等が主な実験方法となる。検査対象のウイルスを特徴付けることが出来るユニークな塩基配列を探し出して、PCRプライマーの塩基配列を決定することをまず行う。次に陽性対象となる材料を入手して、実際に系が動いてバンドが検出できることを確認した後、疑わしい細胞を細胞バンクの保存株から拾い出して検出可能か否かについて検討した。

昨年度までに確立したBVDV検査では、多数の細胞がBVDVで汚染されているという結果を得たため、BVDVフリーの血清を三菱化学中標津血清製造所より入手し、ほとんどの細胞培養をこの血清に切り替えた。その結果、BVDV汚染が減少したか否かについての検討を実施している。

BVDV（ウシ下痢症ウイルス）をはじめとして、複数の家畜由来のウイルス検出については、原沢の分担研究報告を参照されたい。

主任研究者は、原沢により確立された手法を利用して、細胞バンクに保存されているすべての細胞についての検査体制を確立するものである。しかし、現状では人的に十分では無いために、検査は外部の検査会社（SRL）に委託して実施することとした。

本年度からは、ヒト由来のレトロウイルス等の検出に関する研究も分担研究者によって実施することとした。詳細は竹内の分担研究報告書を参照されたい。

ii) 培養細胞のクロスコンタミネーション（相互混入）について

細胞のクロスコンタミネーションの有無については、STR-PCR法を利用し、DNAシーケンサーによるフラグメントの解析を通じておこなった。細胞識別に使用したプライマーはD5S818(5q21-q31), D13S317(13q22-q31), D7S820(7q), D16S539(16q24-pter), vWA(12p12-pter), TH01(11p15.5), Amelogenin(Xp22.1-22.3 and Y), TPOX(2p23-2pter), CSF1PO(5q33.3-34)の各染色体部位に対応した、9ローカスを選択した。AmelogeninはX/Y染色体上にあることから、性別も特定することが可能である。

PCR法により増幅したフラグメントはABI社のDNAシーケンサー(Model 310)によりピークを検出した後同社Genotyperソフトウェアによってピーク部位を分析して、増幅フラグメントの位置を正確に決定した。

プローブごとに得られたピークは、ピークの出現位置を特定して、ピークが検出された場合に1、検出されなかった場合に0とし、0と1で現される数列で表現して細胞ごとの固有データとして下の例の形式で記録することとした。このデータに細胞番号、細胞名、培養ロット番号、画像ファイル名などを付加してデータベース化することにした。

例：HL60の場合、上段が遺伝子座をあらわし、下段が各遺伝子座で検出されたピークの場所(1)を示す。

STR-PCR 実験により得られた細胞識別基礎データ (HL60 細胞の例)

D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
000001000	010010000	000001100	00000010000	00000100000	0001000	10	00100100	0000000110

新たなデータを得たときには、この形式でデータベースに記録し、その後既存の蓄積データと比較して、同一のパターンが存在するか否かの確認を行うこととした。この作業を通じて新たなデータが順次データベースに追加し、基礎情報の整備を行った。データ数が増えるにしたがって識別精度の向上が期待できる。

データベースに蓄積したデータの比較を迅速に行うために、データ間の比較処理プログラムを開発することとした。細胞バンク内部のみに限定せず多くの研究者が確認できるようにすることを目指して、WWWのCGIプログラムとして開発することにした。開発言語にはPerlを採用した。

比較には、次の式を用いてEvaluation Value (EV) を求めてその数値 (評価値) により判別した。

れ以下の場合を不一致としたが、しかし、個々の実験において、EVの値は微妙にずれる可能性があるので、得られた全てのEV値と各EV値を示す細胞数の相関をグラフ化して表示し、総合的な評価によって識別ポイントを定めることとした (図1、図2)。

c. 細胞バンク運営システムの改善

細胞バンクの運営に必要なコンピュータシステムの改善、改良を実施した。

1984年に細胞バンクが設立されて以来、15年を経て基本システムの老朽化が進んできた。あまり頻繁なシステムの変更は利用する細胞バンク職員らの負担増を招くため、出来るだけ変更しない方針であったが、設立当初の80286CPUは既に過去のものとなり、現在はペンティアム(80586)800MHz等の高速CPUが主流となった。この変化によって、当時DOS

Evaluation value (評価値, EV) =

(二種類の細胞の座において "1" の出現位置が一致した数) x 2

片方の細胞で出現した "1" の数 + もう一方の細胞で出現した "1" の数

これを評価値として、2細胞間の値が0.75以上となった場合を2種の細胞が同一であると判別して、そ

図1

Kawahara, Y. & Mizusawa, H. P
JCRB Cellb

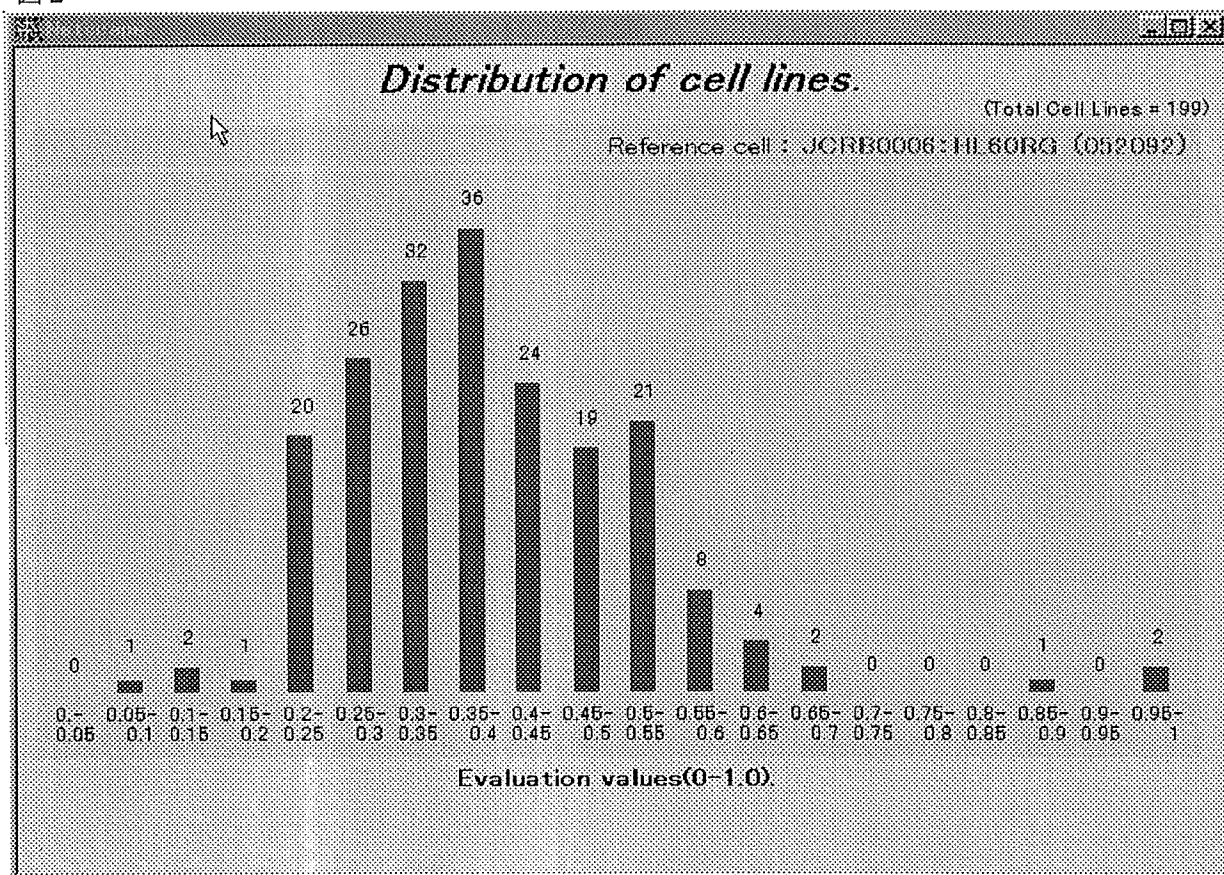
Evaluation of cell individuality by STR-PCR methods

Next page Graph Back to Search

* On clicking the button, original data displayed

Cell No.	Cell Name	Lot No.	EV	D7S817 7-15	D13S325 7-15	D7S820 6-14	D16S23 8-15	vWA 11-12	TPO1 6-11	GM	TPO2 6-13	D2S133 6-15
JCRB0006	HL60RG	052092	1.000	000001000	010010000	000001100	00000010000	00000100000	0001000	10	00100100	0000000110
JCRB0085	HL-60	031395	0.963	000001000	010010000	000001100	00000010000	00000100000	0011000	10	00100100	0000000110
JCRB0092	P39 TSU	031395	0.997	000011000	010010000	000001100	00000010000	00001100000	0011000	10	00100100	0000000110
JCRB0140	NCE16	091799	0.667	000011000	000010100	000001100	00000010000	00000100000	00100a0	10	00000100	0000010100
JCRB0140	NCE16	113099	0.667	000011000	000010100	000001100	00000010000	00000100000	0010010	10	00000100	0000010100
JCRB0054	LU65A	101285	0.640	000001000	000100000	000001100	00001010000	00000001000	0100000	10	00100100	0000000100
JCRB0055	LU65B	100898	0.640	000001000	000100000	000001100	00001010000	00000001000	0100000	10	00100100	0000000100
JCRB0056	LU65C	111185	0.640	000001000	000100000	000001100	00001010000	00000001000	0100000	10	00100100	0000000100

図 2



だった基本的なソフトウェア環境はWindows98ならびに、WindowsNTへとグラフィックインターフェースを伴ったオブジェクト指向型に発展し、古いシステムはもはや大変使いづらいこととなってきた。

そのため、古いデータベースを新しいシステムに適合させるため、ネットワーク環境の再構築を図ることとして、新しいOSの導入と細胞バンクネットワークの再構築、データベース開発言語の再検討とプログラム開発、データベース構造の修正など、コンピュータシステムの大幅な見直しをおこない、新たなプログラム開発も行った。細胞バンクの内部管理プログラムは、Windows98上で動作するDelphi(日本ボーランド社)を新たに導入して開発したが、データベースは過去との連続性を確保するためにdBASE形式を使用することとした。プログラムはコンパイルし実行型プログラムを作成した。

細胞の管理は、発表論文に基づいたデータの主データファイル、培養ごとに発生するデータを記録する培養記録ファイル、在庫管理のための保存管理ファイルの3種のデータをもとに、さらに、寄託時の事務処理や有料領布を管理するためのプログラムなども作成した。

また、外部の研究者が参照するための様々な検索システムは、LinuxをOSとして、Perl言語を使用してCGIプログラムとして開発し、WWW上で動作させることとした。このデータベースは、テキスト型ファイルで構築した。

(倫理面への配慮)

ヒト培養細胞を扱うことから、倫理問題については重視して取り組んでいる。対外的には、日本組織培養学会の倫理問題検討会に委員を送り、ヒト培養細胞を医療分野以外で利用する際の問題点や倫理的取り扱いのあり方などについての検討に参加している。また、国によって検討されてきた、ガイドラインや倫理原則の策定に関する作業委員会に参加し、問題点の検討を実施している。

実際のヒト組織の入手については、どのような方法が可能かについて、実際の研究と連動しつつ、関東中央病院産婦人科ならびに国立小児病院等の担当者との意見交換を行い、インフォームドコンセントを得るための書式の検討などを実施してきた。

国立医薬品食品衛生研究所内部においては、数年前より国立医薬品食品衛生研究所当局に働きかけて倫理委員会の設置をお願いし、平成11年より倫理委員会が始動することとなった。

また、ヒト培養細胞を利用する際の研究倫理に関連する各種資料の整備も実施し電子ファイル化したうえで、細

胞バンクのWWWサーバを利用して公開する作業も実施している。

3. 研究結果および考察

a. 細胞の樹立ならびに収集

- 1, 不死化したヒト遺伝性疾患患者由来培養細胞4株 (XP30S(SVT), FA9JT0(SVT)など)。常染色体劣性遺伝様式を示す高発癌性遺伝病の日本人患者に由来する細胞。遺伝子の複製や修復に欠損を持つ細胞を不死化したもの。(立花)。
2. HPVならびにSV40ウイルスの導入により不死化させたヒト子宮頸部由来正常細胞4株。(安本)。
3. 正常ヒト胎児由来線維芽細胞OUMS-36にhTRT遺伝子を導入してテロメラーゼ活性を制御する細胞6株。(難波)。
4. 正常性を維持した分裂回数が有限である日本人成人皮膚由来線維芽細胞TIG108及びTIG109細胞ならびにTIG-3(既に寄託済み)をSV40ウイルス遺伝子により不死化した細胞株3株。(木村)。
5. ヒト21番染色体を分離導入したマウスES細胞5株を含む、ヒト疾患モデル動物細胞株など10株。(田中)。
6. 日本人に由来する食道癌、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、腎がん、膵がん、胃がん、口腔がんを中心に、癌抑制遺伝子に変異が見出されている細胞株など28細胞株。(黒木)。

以上日本人に由来するヒト培養細胞ならびに正常細胞を中心に約50種の細胞を樹立ならびに収集した。

分担研究者によって今年度収集された細胞は以上72種となり、順次JCRB細胞バンクに寄託される。また、JCRB細胞バンクに直接寄託のあった細胞が約20種程度あった。樹立者自身の研究室において無菌検査等簡単な品質管理は実施するが、詳細な品質管理は、主任研究者(国立医薬品食品衛生研究所細胞バンク)に寄託された後に実施することとなる。現在実施できる品質管理実験は、①細菌・真菌検査、②マイコプラズマ検査(蛍光染色法およびPCR法)、③アイソザイム検査による由来動物種の同定(LDH, NP, G6PD)、④STR-PCR法によるヒト細胞の個別識別検査、⑤RT-PCR法によるBVDV検査、である。このうち、BVDV検査は、外部検査機関(SRL株式会社)に委託する。

寄託された細胞は暫定番号(NIHS)を付けて、10か

ら20本程度の少量のアンプルを作成して暫定的ストックを作成する。このストックを利用してマイコプラズマ汚染の有無、アイソザイムによる由来動物種の確認を実施した。また、この段階でマイコプラズマ汚染が認められたものについては、マイコプラズマ除去用のキノロン系試薬MC210を利用して除去培養を実施した。この培養には、約3ヶ月を要す。今年度は、3種類ほどに汚染が認められた。こうした操作の結果、平成12年度中に登録することができた細胞は、約20種であった。

b. 品質管理手法の開発と実施

i) ウイルス汚染の検査

マイコプラズマ汚染に関する検査体制は、当該細胞バンクの最重要課題として設立以後継続して取り組み、現在までに古典的染色法ならびにネステッドPCR法を導入ならびに確立して、日常的なバンク運営に利用している。その後、ネステッドPCR法をさらに応用して、細胞バンクに登録されている家畜由来細胞株に混入している可能性のある各種ペステイウイルスならびに細胞培養に汎用されるウシ血清に由来するペステイウイルスの代表的なものとしてBVDV(ウシ下痢症ウイルス)の検出系を確立した。これを利用して、細胞バンクに保存されている細胞株ならびにウシ血清の汚染について調査を実施した。

その結果、市販されているウシ血清の大部分にBVDVの遺伝子断片が検出されることが明らかになったが、ウイルスとしての生物活性を維持しているか否かについて明らかにすることが出来なかった。これを明らかにするには生物活性の有無を見る必要があるが、そのためには、BVDVに汚染されていないウシ由来細胞が必要であるが、当該細胞バンクでこれまでに収集したウシ由来細胞株は全てBVDVに感染しており、このような目的に利用することはできなかった。

そこで、BVDVに汚染されていないウシ細胞を独自に樹立することを試み、BVDVフリー血清を市販している三菱中標津血清製造所に協力を依頼して、樹立する試みを行ってきた。その結果、本年7月頃にプライマリ細胞として培養することに成功したとの連絡を受けたので、すぐに入手して培養することとした。細胞は、当初の目論見とは異なり、血管内皮細胞ではなく、血管壁内の平滑筋に由来する細胞の形態を示した。とりあえず、この細胞を登録(JCRB0155, NM-1)、BVDV検査を実施することとし

た。現在、まだ結果は出ていないが、今年度末までには得られる予定である。マイコプラズマ検査、細菌・真菌検査はいずれも陰性、アイズイムで確認した動物種については、ウシ由来であることを確認した。この細胞がプライマリ細胞であることから、現在、最大分裂回数を確認するための継続培養を実施している。

さらに、上記家畜由来ウイルスに加えてヒト由来の、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、およびパピローマウイルスの検出系の開発にも取り組み、バンクの運営に利用する努力を継続して実施している（分担研究報告参照）。

ii) 培養細胞のクロスコンタミネーション（相互混入）について

細胞の由来が誤ってはいは正確な研究が出来ないことは誰の目にも明らかであるが、1970年以後世界各国の研究室で細胞の誤謬の事例が多数報告されるようになってきている。異種動物由来細胞の場合は、染色体構造やアイズイム分析で比較的確認しやすいが、ヒト細胞相互間では区別することが困難だったからである。確実な方法として染色体構造の詳細な分析法（核型分析）があったが、この方法は大変時間がかかる方法で、多数の細胞を扱う細胞バンクでの日常的な検査方法とすることには向かなかった。

1985年に英国でDNAフィンガープリント法が開発されて以後、ヒト細胞相互間での識別が可能となり、これを細胞バンクの運営に取り入れる試みを何度か実施してきた。その結果、平成11年DNAシーケンサーを使用して解析するSTR-PCR法が実用的な点で優れていることを確認し、それ以後細胞バンクにおいて実用化する試みを続けてきた。その結果、今年度より、基本的な品質管理のルーチン検査として品質管理実験の一環とすることにした。

実験は、各細胞からDNAを抽出した後ABI社のシークエンスアナライザーにより分析して個々の細胞に特徴的なピークデータを得るが、このピーク的位置を他のヒト細胞のデータと比較することにより、相互混入の有無を確認することとした。

これを実施するため、細胞バンクとしてヒト細胞を培養する際には必ず試料の一、 10^6 個の細胞からDNAを抽出して、これを実験方法の項で述べた各プローブセットによってターゲット部位（STR）のDNAを増幅した。それをABI社のシークエンスアナライザーにより検出して、ピーク的位置を特定したデータを得ることとした。データは、実験方法の項に示した形式で得られるので、これをデータベース化して相互に比較し、同一パターンが得られるか否かの確認を行った。

この過程で、多数の細胞とパターンの比較をしなければならぬことから、データが多くなるほど比較作業に時間を要することになるので、コンピュータを利用することにした。データの収集とピーク位置の分析については、ABI社の分析システムを利用することとしたが、得られたデータをデータベース化して、他の細胞とピーク位置を比較するためのプログラムについては、WWWのCGIプログラムとしてPerl言語を使用して独自に開発した。プログラムは、①ピークデータと画像データの入力、②入力データと画像データの表示、③比較作業、④比較結果の表示（テキスト表示とグラフ表示）の4つの部分から構成されている。

このうち、最も重要なプログラムを下に示すこととする。このルーチンは、データ表示ルーチンから呼び出して動作するようになっていて、EV値を計算した結果を表示する（図1）。また、EV値に対する細胞数の分布を示すグラフも表示する（図2）。

プログラム：クロスコンタミ細胞検出用 CGI プログラム
(STR-PCR データの比較により EV 値を求める)

```
#!/usr/bin/perl
#####
# STR-PCR データのパターンを比較し、結果を表示する。
# EV 値の結果を得る
#####
##### 関連ファイル定義 #####
$search_cgi = './str_search.cgi'; # 検索エンジン CGI プログラム
```

```

$data_file      = './str_data.txt';          # STR-PCR データファイル
$compare_cgi   = './str_compare.cgi';      # STR-PCR データの比較 CGI プログラム
$viewlist_cgi  = './str_viewlist.cgi';     # 現在利用できる細胞の全リスト
$graph_cgi     = './str_graph.cgi';        # EV 値の分布をグラフで表示
$searchform_html = './str2/str_searchform.html'; # 検索をするためのフォーム (HTML ファイル)
$pic_dir       = 'http://cellbank.nihs.go.jp/pictures/'; # 画像データファイルを保存してあるディレクトリ (必ず/まで含める)
$html_dir      = './str2/';                # HTML ファイルを格納しているディレクトリ (必ず/まで含める)
$celldata_dir  = 'http://cellbank.nihs.go.jp/celldata/'; # 細胞情報 HTML ファイルの格納してあるディレクトリ
$jcrb_data_dir = 'http://cellbank.nihs.go.jp/celldata/';
$nihs_data_dir = 'http://cellbank.nihs.go.jp/celldata2/';
$error_html    = './str2/error.html';

##### パラメータ設定 #####
$title = "<A HREF=%Y%" . "$html_dir" . "ev_info.html%Y">Evaluation of cell individuality</A> by STR-PCR methods";
# リストのタイトル
$title_color = '#AA0000';                  # タイトルの文字色
$bgcolor     = '#EFEFFC';                  # 背景色
$p_max       = '20';                       # 1 ページに表示する最大データ数
$table_bgcolor = '#F0F8FF';                # データ出力テーブルの背景色
$item_bgcolor = '#C4DFE4';                 # テーブルの項目名部分の背景色
$javawindow_width = '710';                 # JavaScript で画像を開くときのウィンドウの横のサイズ
$javawindow_height = '535';                # JavaScript で画像を開くときのウィンドウの縦のサイズ

#### セッティングファイルの読み込み ####
require './str_setting.pl';

#### 文字コード変換サブルーチンの呼び出し ####
require '../jcode.pl';

##### 受け取ったデータを処理する #####
if ($ENV{'REQUEST_METHOD'} eq 'POST') {

    read (STDIN, $all_formdata, $ENV{'CONTENT_LENGTH'});

}
else {

    $all_formdata = $ENV{'QUERY_STRING'};

}
@formdata_pair = split(/&/, $all_formdata);
foreach $formdata_pair (@formdata_pair) {

    ($key, $value) = split(/=/, $formdata_pair);
    $value =~ tr/+//;
    &jcode'convert(*value, 'euc');
    $value =~ s/%([a-fA-F0-9][a-fA-F0-9])/pack("C", hex($1))/eg;
    $value =~ s/&/&amp;/g;
    $value =~ s/%"/&quot;/g;
    $value =~ s/,//g;
    $value =~ s/%t//g;
    $value =~ s/</&lt;/g;
    $value =~ s/>/&gt;/g;
    $value =~ s/%r%r/<BR>/g;
    $value =~ s/%r/<BR>/g;
    $value =~ s/%n/<BR>/g;
    $FORMDATA{$key} = $value;
}

```

```

##### 表示するページを変数 $page に格納 #####
$page = $FORMDATA{'page'};

##### 基準となる細胞の Data No. を取得 #####
$STD_datano = $FORMDATA{'query_datano'};

##### 全データを配列に格納 #####
open(DATA, "$data_file");
@DATA = <DATA>;
close(DATA);

##### 基準となる細胞のデータを取得 #####
$STD_data = $DATA[$STD_datano];

##### 基準となる細胞の STR タイプを取得 #####
($STD_datano, $STD_cellno, $STD_cellname, $STD_lotno, $STD_D5S818, $STD_D13S317, $STD_D7S820, $STD_D16S539,
$STD_vWA, $STD_TH01, $STD_AM, $STD_TPOX, $STD_CSF1PO, $STD_pic1, $STD_pic2, $STD_pic3) = split(/\t/, $STD_data);
$STD_strtype = $STD_D5S818 . $STD_D13S317 . $STD_D7S820 . $STD_D16S539 . $STD_vWA . $STD_TH01 . $STD_AM . $STD_TPOX .
$STD_CSF1PO;

##### STR タイプの長さの取得 #####
$STD_strtype_length = length($STD_strtype);

##### 基準となる細胞の STR タイプ中に含まれる "l" と "a" と "b" の数をカウント #####
$_ = $STD_strtype;
$STD_count_l = tr/l/l/;
$STD_count_a = tr/a/a/;
$STD_count_b = tr/b/b/;
$STD_count = $STD_count_l + $STD_count_a + $STD_count_b;

##### 全データの配列 @DATA から先頭行(全データ数、更新日)を抜き出す #####
$top_data = shift(@DATA);
($last_datano, $data_count, $update) = split(/\t/, $top_data);

##### 全データ数から基準となる細胞の分をひく #####
$data_count = $data_count - 1;

##### 全データ数と 1 ページに表示する最大データ数から全ページ数を取得 #####
$page = int($data_count / $p_max) + 1;

##### 1 ページに表示する最大データ数 $p_max、表示するページ $page から表示するデータの始まりと終わりを計算。 #####
$data_start = $p_max * $page - ($p_max - 1);
$data_end = $p_max * $page;
if($data_end > $data_count) {
    $data_end = $data_count;
}

##### 全データの配列から一つずつデータを取り出し、基準のデータと比較 #####

foreach (@DATA) {
    ($OBJ_datano, $OBJ_cellno, $OBJ_cellname, $OBJ_lotno, $OBJ_D5S818, $OBJ_D13S317, $OBJ_D7S820, $OBJ_D16S539, $
OBJ_vWA, $OBJ_TH01, $OBJ_AM, $OBJ_TPOX, $OBJ_CSF1PO, $OBJ_pic1, $OBJ_pic2, $OBJ_pic3) = split(/\t/, $_);
    ##### 対象となる細胞の STR タイプを取得 #####
    $OBJ_strtype = $OBJ_D5S818 . $OBJ_D13S317 . $OBJ_D7S820 . $OBJ_D16S539 . $OBJ_vWA . $OBJ_TH01 . $OBJ_AM .
$OBJ_TPOX . $OBJ_CSF1PO;

    ##### 対象となる細胞の STR タイプ中に含まれる "l" と "a" と "b" の数をカウント #####
    $_ = $OBJ_strtype;
    $OBJ_count_l = tr/l/l/;
    $OBJ_count_a = tr/a/a/;

```

```

$OBJ_count_b = tr/b/b/;
$OBJ_count = $OBJ_count_l + $OBJ_count_a + $OBJ_count_b;
##### 基準と対象のSTRタイピングデータを比較し、“l”、“a”、“b”で一致した数をカウント #####

$match_count = 0;
for ($i = 0; $i < $STD_strtype_length; $i++){
    $STD_type = substr($STD_strtype, $i, 1);
    $OBJ_type = substr($OBJ_strtype, $i, 1);
    if ($STD_type eq 'l' and $OBJ_type eq 'l'){
        $match_count++;
    }
    elseif ($STD_type eq 'a' and $OBJ_type eq 'a'){
        $match_count++;
    }
    elseif ($STD_type eq 'b' and $OBJ_type eq 'b'){
        $match_count++;
    }
}
##### 比較結果からEV値を計算 #####

$EV = $match_count * 2 / ($STD_count + $OBJ_count);
$EV = sprintf("%.3f", $EV);
##### 比較対象の細胞のデータとEV値を結合し、結果データとする #####
$OBJ_result_data = "$OBJ_datano\t$OBJ_cellno\t$OBJ_cellname\t$OBJ_lotno\t$EV\t$OBJ_D5S818\t$OBJ_D13S317
\t$OBJ_D7S820\t$OBJ_D16S539\t$OBJ_vWA\t$OBJ_TH01\t$OBJ_AMY\t$OBJ_TPOX\t$OBJ_CSF1PO";

##### 結果データと基準データとの比較 #####
# if ($STD_cellno eq $OBJ_cellno and $STD_cellname eq $OBJ_cellname and $STD_lotno eq $OBJ_lotno){
#     $STD_result_data = $OBJ_result_data;
# }
# else {
#     push(@RESULT_DATA, $OBJ_result_data);
# }

##### 結果データと基準データとの比較 (2) #####
if ($STD_datano eq $OBJ_datano){
    $STD_result_data = $OBJ_result_data;
}
else {
    push(@RESULT_DATA, $OBJ_result_data);
}
}

##### @RESULT_DATAをCellNoでソート #####
foreach(@RESULT_DATA){
    push(@CellNo, (split(/#/))[1]);
}
@RESULT_DATA = @RESULT_DATA[sort {$CellNo[$a] cmp $CellNo[$b];} $[..]#RESULT_DATA];

##### @RESULT_DATAをEV値で降順にソート #####
foreach(@RESULT_DATA){
    push(@EV, (split(/#/))[4]);
}
@RESULT_DATA = @RESULT_DATA[sort {$EV[$b] <=> $EV[$a];} $[..]#RESULT_DATA];

##### DataNo. と配列の添え字の番号が一致するように、ソートしたリストの先頭に基準データを追加 #####
unshift(@RESULT_DATA, $STD_result_data);

##### EV値を0.05ずつの区間に分け、それぞれの区間の頻度を求める。 #####
$class1 = 0;

```

```

$class2 = 0;
$class3 = 0;
$class4 = 0;
$class5 = 0;
$class6 = 0;
$class7 = 0;
$class8 = 0;
$class9 = 0;
$class10 = 0;
$class11 = 0;
$class12 = 0;
$class13 = 0;
$class14 = 0;
$class15 = 0;
$class16 = 0;
$class17 = 0;
$class18 = 0;
$class19 = 0;
$class20 = 0;
foreach (@EV) {
    if ($_ <= 1 && $_ > 0.95) { $class1++; }
    if ($_ <= 0.95 && $_ > 0.9) { $class2++; }
    if ($_ <= 0.9 && $_ > 0.85) { $class3++; }
    if ($_ <= 0.85 && $_ > 0.8) { $class4++; }
    if ($_ <= 0.8 && $_ > 0.75) { $class5++; }
    if ($_ <= 0.75 && $_ > 0.7) { $class6++; }
    if ($_ <= 0.7 && $_ > 0.65) { $class7++; }
    if ($_ <= 0.65 && $_ > 0.6) { $class8++; }
    if ($_ <= 0.6 && $_ > 0.55) { $class9++; }
    if ($_ <= 0.55 && $_ > 0.5) { $class10++; }
    if ($_ <= 0.5 && $_ > 0.45) { $class11++; }
    if ($_ <= 0.45 && $_ > 0.4) { $class12++; }
    if ($_ <= 0.4 && $_ > 0.35) { $class13++; }
    if ($_ <= 0.35 && $_ > 0.3) { $class14++; }
    if ($_ <= 0.3 && $_ > 0.25) { $class15++; }
    if ($_ <= 0.25 && $_ > 0.2) { $class16++; }
    if ($_ <= 0.2 && $_ > 0.15) { $class17++; }
    if ($_ <= 0.15 && $_ > 0.1) { $class18++; }
    if ($_ <= 0.1 && $_ > 0.05) { $class19++; }
    if ($_ <= 0.05 && $_ > 0) { $class20++; }
}

##### ログをとる #####
&get_log;

#####
####          HTML形式で比較結果を表示          ####
#####
&HTML_header;
print "<FONT SIZE=%"+2%" COLOR=%"$title_color%"><B>$title</B></FONT>%n";
print "<HR>%n";
print "<BR>%n";
print "<TABLE>%n";
print "<TR>%n";
if ($page != 1){
    $previous = $page - 1;
    print "<TD>%n";
    print "<FORM METHOD=%"POST%" ACTION=%"$compare_cgi%">%n";
    print "<INPUT TYPE=%"hidden%" NAME=%"page%" VALUE=%"$previous%">%n";
    print "<INPUT TYPE=%"hidden%" NAME=%"query_datano%" VALUE=%"$STD_datano%">%n";
}

```

```

print "<INPUT TYPE=%submit% VALUE=% Previous page %">%n";
print "</FORM>%n";
print "</TD>%n";
}
elseif ($page == 1){
print "<TD>%n";
print "<FORM>%n";
print "<INPUT TYPE=%button% VALUE=%------%">%n";
print "</FORM>%n";
print "</TD>%n";
}
if ($page < $allpage){
$nextpage = $page + 1;
print "<TD>%n";
print "<FORM METHOD=%POST% ACTION=%$compare_cgi%>%n";
print "<INPUT TYPE=%hidden% NAME=%page% VALUE=%$nextpage%>%n";
print "<INPUT TYPE=%hidden% NAME=%query_datano% VALUE=%$STD_datano%>%n";
print "<INPUT TYPE=%submit% VALUE=% Next page %">%n";
print "</FORM>%n";
print "</TD>%n";
}
elseif ($page == $allpage){
print "<TD>%n";
print "<FORM>%n";
print "<INPUT TYPE=%button% VALUE=%------%">%n";
print "</FORM>%n";
print "</TD>%n";
}
$STD_cellname = ~ s/ %SP%/g;
print "<TD>%n";
print "<FORM METHOD=%POST% ACTION=%JavaScript:open_window(% $graph_cgi?
D_cellno=$STD_cellno&STD_cellname=$STD_cellname&STD_lotno=$STD_lotno&class1=$class1&class2=$class2&class3=$class3&class4=$class4&class5=$class5&
class6=$class6&class7=$class7&class8=$class8&class9=$class9&class10=$class10&class11=$class11&class12=$class12&class13=$class13&class14=$class14&class15=
$class15&class16=$class16&class17=$class17&class18=$class18&class19=$class19&class20=$class20% )%;>%n";
print "<INPUT TYPE=%submit% VALUE=% Graph %">%n";
print "</FORM>%n";
print "</TD>%n";
print "<TD>%n";
print "<FORM ACTION=%$searchform_html%>%n";
print "<INPUT TYPE=%submit% VALUE=%Back to Search%>%n";
print "</FORM>%n";
print "</TD>%n";
print "</TR>%n";
print "</TABLE>%n";
print "<FONT COLOR=%$title_color%>%* :On clicking the button, original data displayed.%n";
print "<TABLE BGCOLOR=%$table_bgcolor% BORDER CELLPADDING=%5%>%n";
print "<TR BGCOLOR=%$item_bgcolor%>%n";
print "<TD></TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%>Cell No. </TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%>Cell Name</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%>Lot No. </TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%>EV</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%><A HREF=%$html_dir%.d5s818.html%>D5S818</A><BR><FONT SIZE=%-1%>7-15</FONT></TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%><A HREF=%$html_dir%.d13s317.html%>D13S317</A><BR><FONT SIZE=%-1%>7-15</FONT></TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%><A HREF=%$html_dir%.d7s820.html%>D7S820</A><BR><FONT SIZE=%-1%>6-14</FONT></TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%><A HREF=%$html_dir%.d16s539.html%>D16S539</A><BR><FONT SIZE=%1%>5, 815</FONT></TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%><A HREF=%$html_dir%.vwa.html%>vWA</A><BR><FONT SIZE=%-1%>11, 13-21</FONT></TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%><A HREF=%$html_dir%.th01.html%>TH01</A><BR><FONT SIZE=%-1%>5-11</FONT></TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%><A HREF=%$html_dir%.am.html%>AM</A></TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%><A HREF=%$html_dir%.tpox.html%>TPOX</A><BR><FONT SIZE=%-1%>6-13</FONT></TD>%n";
print "<TD ALIGN=%center%><A HREF=%$html_dir%.csf1po.html%>CSF1PO</A><BR><FONT SIZE=%-1%>6-15</FONT></

```

```

TD>¥n";
print "</TR>¥n";

##### 基準となるデータをテーブルの一番上と一番下の行に加える #####
($SID_datano, $STD_cellno, $STD_cellname, $STD_lotno, $STD_EV, $STD_D5S818, $STD_D13S317, $STD_D7S820, $STD_D16S539, $STD_vWA, $STD_TH01, $STD_AM, $STD_TPOX, $STD_CSF1PO)
= split(/¥t/, $STD_result_data);
($STD_cellno_l = $STD_cellno) =~ tr/A-Z/a-z/;
print "<TR BGCOLOR=¥"$STD_line_bgcolor¥">¥n";
print "<TD><FORM METHOD=¥"POST¥" ACTION=¥"$search.cgi¥"><INPUT TYPE=¥"hidden¥" NAME=¥"cellno¥"
VALUE=¥"$STD_cellno¥"><INPUT TYPE=¥"hidden¥" NAME=¥"lotno¥" VALUE=¥"$STD_lotno¥"><INPUT TYPE=¥"submit¥" VALUE=¥"
¥*¥"></FORM></TD>¥n";
$_ = $STD_cellno_l;
if(/jcrb/){
    print "<TD ALIGN=¥"left¥"><A HREF=¥"$jcrb_data_dir$STD_cellno_l.htm¥">$STD_cellno</A></TD>¥n";
}
else{
    print "<TD ALIGN=¥"left¥"><A HREF=¥"$error_html¥">$STD_cellno</A></TD>¥n";
}
print "<TD ALIGN=¥"left¥">$STD_cellname</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"left¥">$STD_lotno</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"left¥" BGCOLOR=¥"$EV_line_bgcolor¥">$STD_EV</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"center¥">$STD_D5S818</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"center¥">$STD_D13S317</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"center¥">$STD_D7S820</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"center¥">$STD_D16S539</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"center¥">$STD_vWA</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"center¥">$STD_TH01</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"center¥">$STD_AM</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"center¥">$STD_TPOX</TD>¥n";
print "<TD ALIGN=¥"center¥">$STD_CSF1PO</TD>¥n";
print "</TR>¥n";
for($i = $data_start; $i <= $data_end; $i++){
    chomp($RESULT_DATA[$i]);
    ($data_no, $cellno, $cellname, $lotno, $EV, $D5S818, $D13S317, $D7S820, $D16S539, $vWA, $TH01, $AM, $TPOX, $CSF1PO) = split(/
¥t/, $RESULT_DATA[$i]);
    ($cellno_l = $cellno) =~ tr/A-Z/a-z/;
    print "<TR>¥n";
    print "<TD><FORM METHOD=¥"POST¥" ACTION=¥"$search.cgi¥"><INPUT TYPE=¥"hidden¥" NAME=¥"cellno¥"
VALUE=¥"$cellno¥"><INPUT TYPE=¥"hidden¥" NAME=¥"lotno¥" VALUE=¥"$lotno¥"><INPUT TYPE=¥"submit¥" VALUE=¥"
¥*¥"></
FORM></TD>¥n";
    $_ = $cellno_l;
    if(/jcrb/){
        print "<TD ALIGN=¥"left¥"><A HREF=¥"$jcrb_data_dir$cellno_l.htm¥">$cellno</A></TD>¥n";
    }
    else{
        print "<TD ALIGN=¥"left¥"><A HREF=¥"$error_html¥">$cellno</A></TD>¥n";
    }
    print "<TD ALIGN=¥"left¥">$cellname</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"left¥">$lotno</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"left¥" BGCOLOR=¥"$EV_line_bgcolor¥">$EV</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"center¥">$D5S818</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"center¥">$D13S317</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"center¥">$D7S820</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"center¥">$D16S539</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"center¥">$vWA</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"center¥">$TH01</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"center¥">$AM</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"center¥">$TPOX</TD>¥n";
    print "<TD ALIGN=¥"center¥">$CSF1PO</TD>¥n";
    print "</TR>¥n";
}

```

```

)
print "<TR BGCOLOR=%"$STD_line_bgcolor%">%n";
print "<TD><FORM METHOD=%"POST%" ACTION=%"$search.cgi%"><INPUT TYPE=%"hidden%" NAME=%"cellno%"
VALUE=%"$STD_cellno%"><INPUT TYPE=%"hidden%" NAME=%"lotno%" VALUE=%"$STD_lotno%"><INPUT TYPE=%"submit%" VALUE=%"
%*%"></FORM></TD>%n";
$_ = $STD_cellno_1;
if(/jcrb/){
    print "<TD ALIGN=%"left%"><A HREF=%"$jcrb_data_dir$STD_cellno_1.htm%">$STD_cellno</A></TD>%n";
}
else{
    print "<TD ALIGN=%"left%"><A HREF=%"$error_html%">$STD_cellno</A></TD>%n";;
}
print "<TD ALIGN=%"left%">$STD_cellname</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"left%">$STD_lotno</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"left%" BGCOLOR=%"$EV_line_bgcolor%">$STD_EV</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"center%">$STD_D5S818</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"center%">$STD_D13S317</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"center%">$STD_D7S820</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"center%">$STD_D16S539</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"center%">$STD_vWA</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"center%">$STD_TH01</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"center%">$STD_AM</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"center%">$STD_TPOX</TD>%n";
print "<TD ALIGN=%"center%">$STD_CSF1PO</TD>%n";
print "</TR>%n";
print "</TABLE>%n";
&HTML_footer;
sub get_log {
    $accesstime = localtime(time);
    $client_ip = $ENV{'REMOTE_ADDR'};
    $logdata = "$accesstime%t$client_ip%t$STD_cellno%t$STD_cellname%t$STD_lotno%t%t";
    open(logfile, ">>$log_file");
    print logfile $logdata;
    close(logfile);
}
##### プログラム終了 #####

```

各細胞ごとに得られたSTR-PCR実験によるピークのパターンをデータベースとして登録する。その後、WWWサーバ上で動作する上記の識別プログラムを起動して細胞相互のパターンを比較してEV値を算出する。算出した結果は、図のようにWWW上で表示される。この操作は、当該細胞バンクのWWWサイトである <http://cellbank.nihs.go.jp/> において、CellIDと表示されたメニューから実行できる（図1）。

ここで計算の結果示されたEV値が0.75以上の場合は、クロスコンタミが大変強く疑われるが、0.7から0.9のどこを閾値とするかの判定が困難である。そこで、EV値に依存した細胞数の分布をグラフで表示させることにより、その値を確定することとした。このグラフを得るには、この表示画面上の

“Graph” と書かれたボタンをクリックすれば良い（図2）。

その結果表示されるのがこのグラフである。このグラフではHL60RG細胞を199種のヒト細胞と比較した結果を示したが、EV=0.35-0.4にピークを持つ大きな山がひとつあり、右の0.85以上の部分に大きな山からはずれた3種の細胞の小さなピークが現れている。この主ピークから外れたところに出た小さな3種の細胞によるピークのEV値は図1から、1.000, 0.963, 0.897であることがわかる。相互に関連の無い細胞の場合が図2の大きな山に相当するとなると考えると、0.65以下の値が相互に独立している場合のEV値と考えてよいので、この場合はEV=0.897以上の細胞を同じ細胞であると判別することにした。

図1からその細胞は3種で、HL60RGは自分と自分を比較しているので除外すると、図1からHL60、P39TSUであることが読み取れる。HL60はHL60RG細胞の親株であることから、一致すると出たこの結果が正しいことがわかるが、P39TSUは、HL60とは独立に樹立された別のヒト由来細胞であったはずであり、これがクロスコンタミであることが疑われた。実は、この細胞は既に1990年にDNAプロファイリング法で確認していた時に既にHL60であることが疑われていたので、この方法でもそれがさらに確認されたこととなった。

この結果から、このシステムが、比較的確度高くクロスコンタミネーションを解明する系として適切であることが示された。

そこで、このシステムを利用して、現在までに、199種のヒト細胞を調査した。その結果、新たに数種類の培養細胞株がクロスコンタミネーションを起こしているという事例を今年度確認することとなった。わが国で樹立された比較的良く利用されてきた早老症患者由来とされた細胞株PSV811がWI38と、血管内皮系細胞株ECV304がEJ1/T52と、ひと末梢血由来細胞株K051がK562とそれぞれ同じ細胞株であることが判明した。いずれも、国内で日本人より樹立されたものであったが、それぞれクロスコンタミネーションを起こしていることが明らかとなった。これらのデータが明らかになった後に、樹立者と連絡をとり、細胞バンクへ寄託した時期より若い細胞についてさらに調べてみたが、いずれも同じパターンであり、クロスコンタミネーションを起こした細胞しか現存していないことが明らかとなった。

このような結果を得た場合の、判明後の取り扱いであるが、該当細胞株が長期間にわたって多くの研究者に利用されてきた経過を考えると、直ちに廃棄することは好ましく無いと判断した。むしろ、事実を明らかにしたうえで、クロスコンタミネーションを示す実験データを公開して分譲は継続するほうが良いと判断した。

なお、本研究班の分担研究者により樹立されて寄託予定であった細胞のうち、HPV16ゲノムを組み込んだプライマリ細胞PHK16でも、本識別システムによってクロスコンタミという結果を得たので、この場合は登録を取り消すこととした。

こうしたクロスコンタミの発見は、迅速に検出す

る実験系が開発されたことによって容易に発見できることとなった。わが国に限らず、アメリカのATCC、ドイツのDSMなどでもクロスコンタミネーションが数多く発見されるようになってきており、国際的に再整理が進んでいるところである。

なお、国内の他の細胞バンクにおいては、東北大学、がん細胞保存施設が類似のシステムによって細胞のクロスコンタミのチェックを開始した。また、理化学研究所細胞バンクの細胞についても共同で1部調査した結果、複数の細胞にクロスコンタミネーションがあることが明らかとなり、そこでもこの検査法をルーチンで取り入れる準備をはじめているところである。

c. 細胞バンクシステムの改善

細胞バンクの効率的な運営には、細胞株に関する詳細データが職員に公開されていることが必須であり、情報の入手が迅速にできなければならない。それには、全ての情報がデータベース化されている必要がある。そのため、我々は細胞バンク設立当初からデータベースシステムの開発と維持に力を入れてきたが、本年度は古いシステムの全面的更新を実施した。そのため、データベースの利用にあつたての様々な不備を拾い出して検討を加え、グラフィックユーザインターフェースを全面的に導入することを目指して、プログラム開発システムにDelphi, V5.0 (Borland)を導入した。プログラムのコーディングにあたっては、アウトソーシングにより開発会社(株・セイラシステム、東京)に委託したが、細胞バンク事業の性質上、品質管理項目の追加修正が頻繁に発生することを考慮し、最初のコーディング納品以降は、細胞バンクの担当者自らがプログラムの手直しを実施できるよう読みやすいコーディングとすることを特別留意事項とし、ソースコードの納品も条件とした。

また、細胞情報をWWWに公開して利用者の便宜を図る作業を迅速に実施できるシステムとするために、HTMLファイル出力ルーチンを作成した。この結果、これまで特定のコンピュータで作業を実施していたデータの参照がネットワークに接続されているマシンであればどこからでも作業が実施できるようになったので、運営の効率化に寄与することとなった。また、WWW情報の頻繁な書き換えがより迅速にできるようになったため、新鮮な情報を提供できるようになった。

図 3

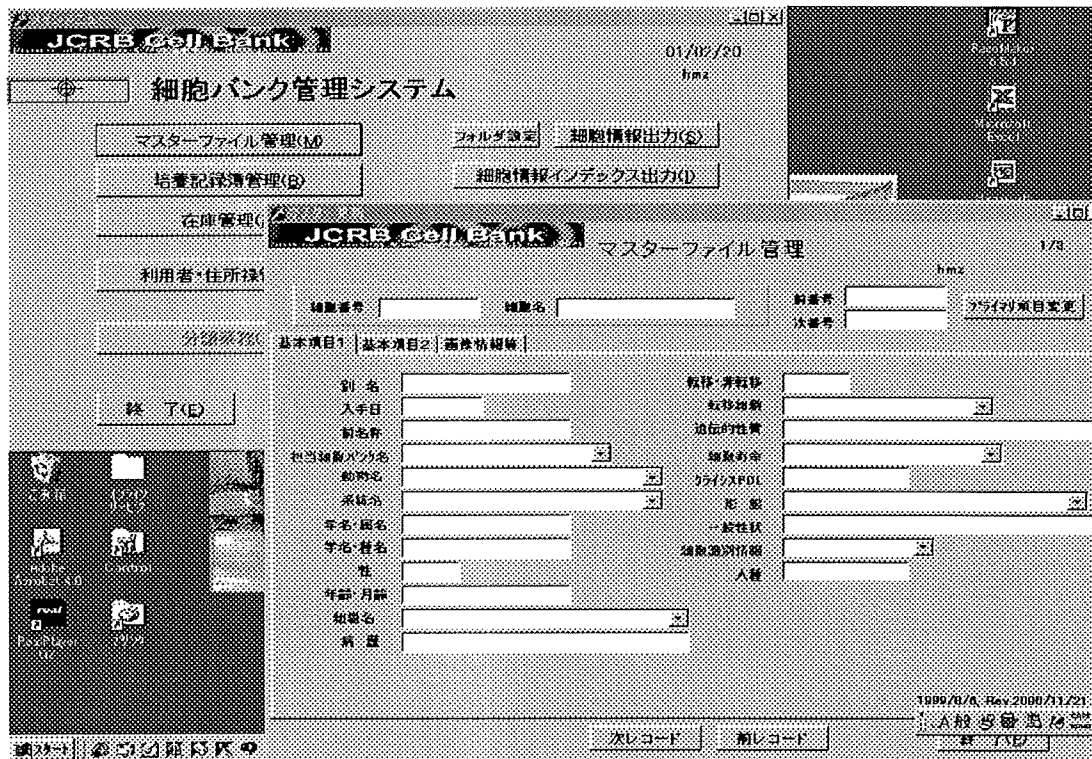


図 3 は、細胞バンクにおいて細胞の管理を行うプログラムの画面である。細胞のマスターデータ、培養記録、在庫管理データの入力作業に加えて、HTML ファイルの作成をこのメニューから実施することができる。

図 3 の主メニューから HTML 変換を実行すると、マスターファイル管理で入力したデータと、培養記録簿管理で入力したデータが全て HTML ファイルに変換される。文献情報は、ReferenceManager (ISI) で処理することによってアブストラクトまでが、変換した HTML ファイルに自動的に添付される。

細胞の検索は、CGI 検索システムを準備すると同時にリスト表示から選択できるようにした。この検索システムは、平成 13 年 1 月に述べにして約 2000 名に利用された。

細胞バンク WWW サーバへのアクセス件数は急速に増加することとなり、平成 12 年 12 月には月間アクセス数が 6000 件にまで増加し、民間の検索サイトである Lycos のバイオテクノロジー部門のベストサイトとしても登録されることとなった。

考察

平成 12 年度 1 月までに JCRB 細胞バンクで分譲用に公開した細胞は昨年度末から 17 種増加して 554 種となった (ヒト細胞については 7 種の増加)。今年度は細胞収集のスピードアップを図ることが可能になり、72 種の細胞が新たに収集されることとなった。今年度収集した細胞は、所定の品質管理実験を通じて高度な品質を維持しているものだけを登録して公開することとなるが、人的に少ない人数で作業を行っているため、なかなか進まないのが悩みの種である。

細胞バンク設立当初は、染色法によるマイコプラズマ汚染検査とアイソザイム検査を利用した由来動物種の確認しか品質管理項目として実施することができなかったが、その後の研究により、現在ではマイコプラズマ検査に PCR 法を加えて精度を高めると同時に、ウイルス検査の体制も徐々に出来つつある。また、細胞の同定については、STR-PCR 法の導入によりヒト細胞の相互混入を発見する手法を確立し、日常的なバンク運営に取り入れてきた。そのため、国内に設立されている複数の公的細胞バンクの中でも当バンクが最も充実した品質管理体制を確立するに至っていると思われる。

本研究班は、細胞バンクの実質的運営を母体にして構成されている。細胞バンクは、多くの研究者が利用して価値が確定する組織であるため、より多く

の細胞の収集、品質の向上、分譲の迅速化など運営上の不可欠な要素があり、それをコンピュータという情報機器を効果的に活用して効率化に取り組んできた。

しかし、細胞バンクの「かなめ」となる細胞の培養と品質管理については、作業の自動化を進めることは不可能であり、多くの人材を必要とする部分である。当該研究班では、品質管理体制を強化するために新しい検査手法の開発に取り組みかつ新しい細胞の寄託を推進しているが、仕事が進むにしたがって、細胞バンクの運営現場で実施しなければならない作業が増え職員の増加を進めなければ対応しきれないという状況が生まれてきている。

今年度の新規細胞の収集が72種に及んだにもかかわらず、新規登録が出来たのは17種に過ぎなかった。今後、秦野研究所やHS財団研究資源分譲バンクにも応援を依頼しないと、迅速な細胞の登録が進まなくなると考えられるので、平成13年度においては、細胞の調整に関する体制の見直しを行うこととしたい。

なお、本研究班は、いわゆる先端的科学研究とは異なり、上記各研究課題で得られた成果を、実際に稼働している細胞バンク業務に取り入れて実施に移さなければならないという課題をさらに持って遂行していることに留意されたい。

4. 評価

1) 達成度について

培養細胞研究資源基盤整備については、コンスタントに実施する意外にない地味な仕事である。その中でも、問題が発生した時点で解決する努力を研究として実施することが需要であると考えられるが、利用者とのコミュニケーションを密に図ることによって問題点の指摘を受ける必要がある。

今年度大変印象的であったのは、PSV811細胞のクロスコンタミネーション発見のいきさつであった。PSV811細胞は、早老症患者に由来する細胞として有名な細胞で多くの研究者に利用されてきた細胞であった。このことから最近の遺伝子解析研究において、この細胞から早老症の原因遺伝子を同定しようとする研究者がでたが、結果的に原因遺伝子を特定する試みは失敗に終わった。後に海外で原因遺伝子を特定した研究者から遺伝子情報を入手して調べた結果、PSV811は、早老症細胞では無いので

は無いかという疑いを得ることとなり、この細胞の正しさが疑われることとなった。

この時点で、かかる細胞を保存し分譲している当該細胞バンクに調査検討の依頼が来ることとなったが、ちょうどその頃にSTR-PCR法を確立してヒト培養細胞の同定作業をはじめていたので、依頼のあったPSV811細胞を直ちに調査することにした。その結果、明らかになったことが、先に結果で述べたようにPSV811細胞はWI38細胞（著名なヒト正常細胞）と同じものであるという結果であった。

このように、利用者から指摘さえあれば優先的な調査も可能なので、利用者とのコミュニケーションは重要である。

このSTR-PCR法を利用した細胞識別システムの開発については、本年度で基礎的なシステムは確立した。ただ、当該細胞バンク研究室の室温が不安定であるため、冬季の室温が低下傾向にあり、これが理由で分析できないという結果が出てきたため、現在、さらに温度の影響を調査中である。

また、平成12年度末までに200種の細胞に関する識別データを得てデータベース化した。今後、実験をスピードアップして、データの蓄積を図ることが重要であり、これを重視して研究をさらに進めてゆく。

なお、国際的には、当該細胞バンクと米国のATCCは、ほぼ同一の手法で細胞の同定を実施していることが昨年春の米国インビトロ学会に出席して明らかになった。英国のグループは細胞バンクのメンバーでは無いが類似の方法で細胞同定を実施している。また、ドイツの細胞バンク(DSM)では、依然としてサザンブリッジ法で識別をしているが、近い将来同じ方法で検査をはじめることが予想される。

なお、国内的には、本方法で細胞識別データを確認しているのは、当該細胞バンクと、東北大学加齢医学研究所内のがん細胞保存施設(工藤)である。他の細胞バンクの状況を調査する目的で、担当者の協力を得て理化学研究所細胞バンクで保管されている細胞を取り寄せて調査した結果、10種の細胞のうち数種に混入の恐れがあることを認めるに至り、理研細胞バンクにおいても、該当する検査方法を導入する重要性を認識することとなった。

以上のように、このSTR-PCR法による細胞の同定は、わが国内外に今後広がってゆくものと思われるし、その中で当該細胞バンクの試みは、先導的な役割を担ってきたと言えよう。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

培養細胞研究資源を整理して品質の高度化を図る動きは国際的な流れとなっている。特に経済大国と称されている国々では、それぞれに積極的な取り組みを行っている。とはいえ、十分な整備を実施しているのは、日本を除けば米国、ドイツ、英国の3ヶ国である。また、最近では韓国や台湾などにおいても細胞バンクの整備を進めている。

各国細胞バンクの当面の課題は、細胞の誤謬を取り除く点に絞られており、今回報告したヒト細胞の個別識別法を利用してクロスコンタミの発見に全力をあげている。これによって、培養細胞研究資源が一層意義のあるものとして価値を高めることができるであろう。

培養細胞は、体から取り出して培養できるようにした生体試料であるため、その識別は困難であった。STR-PCR法の開発により誰でも容易に扱えるようにはなったが、その実験にはかなりの時間を要することは明らかである。しかし、一方で十分に確認した細胞で実験をおこなうことが要求されるようになることから、個々の研究者の負担は自動的に増えることとなる。研究環境の整備は、意外にもこのような形で個々の研究者の負担を増加させることとなるため、研究の分業化を考慮しなければならない時代となってきたように思える。

そこで、細胞に共通した作業を実施するのが公的な細胞バンクであると考え、研究の分業化の一端を担うのが細胞バンクであると位置付けることができる。同じような実験を複数の研究室で繰り返して実施することを避けて、十分な品質を確保した細胞を提供できるようになれば、結果的に研究費の効率的運用に貢献することとなるであろう。

3) 今後の展望について

培養細胞研究資源基盤の整備のポイントは、①収集する細胞の数を増やすことと②細胞の品質の向上を図ることの2点につきる。平成12年度の結果を

見れば明らかに、細胞の数を増やすことについては、意外に多くの細胞を1年間で収集することが可能であることが明らかになった。また、品質管理手法の開発もコンスタントに進めれば、それなりに整備が見込めることも明らかである。

問題は、収集した細胞と確立した品質管理の実務と職員数とのバランスをどのようにして確立するかという点に今後絞られてくるものと思われる。細胞バンクの規模、収集細胞数、品質管理のレベルなどの点で先進欧米諸国の細胞バンクと同じレベルのものを構築する必要があるとするのか、低レベルのもので良しとするのか等、国の戦略として決定してゆく必要があるものと思われる。

5. 結論

厚生省細胞バンク事業は、細胞の収集、細胞の品質の向上という2つの面で、着実に発展している。特に、品質の向上という点では、他に先駆けてSTR-PCR法を導入し、複数の細胞のクロスコンタミネーションを発見することが出来、研究社会への貢献を果たした。また、マイコプラズマ汚染も確実に補足して、除去作業にも取り組んでいる。こうした地道な細胞バンクの運営については多くの研究者から感謝されている。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	2件
原著論文にほる発表	2件
それ以外（レビュー等）の発表	0件

そのうち主なもの

論文発表

1. 増井徹、水沢博 細胞と組織の凍結保存と解凍操作、*蛋核酵*、45、2195-2201 (2000).
2. 増井徹、祖父尼敏雄、石井美智子、今西由紀夫、安井英明、高田容子、林真、水沢博、厚生省細胞バンクにおけるヒト組織・細胞取り扱い倫理問題への取り組み、*Tiss. cult. Res. Commun.* 19、1-15 (2000).
3. 高田容子、増井徹、田辺秀之、原沢亮、水沢博、培養細胞系でのマイコプラズマのPCR検出法、*Tiss. cult. Res. Commun.* 19、131-138 (2000).

学会発表

1.

2) 海外

口頭発表	2件
原著論文による発表	2件