

200/0438

厚生科学研究費補助金、ヒトゲノム再生医療等研究事業、課題番号：H12-ゲノム-012(水沢)

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム再生医療等研究事業

生命科学研究に必要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

平成13年度総括・分担研究報告書

課題番号：H12-ゲノム-012
主任研究者 水澤博
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 第三室 室長

平成14年4月10日

目 次

課題番号：H12-ゲノム-012

I. 総括研究報告書

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 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) 室長 水沢 博	3
--	---

II. 分担研究報告書

ヒト遺伝性疾患細胞の研究資源化と分譲に関する研究 分担研究者：立花 章 京都大学放射線生物研究センター 助教授	23
正常2倍体繊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 分担研究者 木村成道(財)東京都高齢者研究・福祉振興財団、東京都老人総合研究所	26
細胞バンクに保管されている細胞における牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)汚染状況に関する研究 分担研究者 原澤 亮 東京大学大学院医学系研究科附属動物実験施設 助教授	29
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 分担研究者 安本 茂 神奈川県立がんセンター臨床研究所 研究課長	32
多分化能をもつヒト骨髄性細胞の研究資源化に関する研究 分担研究者 難波正義 岡山大学医学部 客員研究員	36
国内樹立ヒト細胞系の状況調査と収集に関する研究 分担研究者 竹内昌男 ヒューマンサイエンス研究資源バンク 所長	41
ヒトの疾病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に関する研究 分担研究者 田中憲穂 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 細胞毒性学研究室長	44

2001年度 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）
総括研究報告書

生命科学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

主任研究者 水澤博 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

当研究班は、培養細胞を研究資源化して国内外の研究者に提供する業務を遂行するための細胞バンク基盤を整備することを目的に研究を実施している。そのため、①細胞の収集に関する課題、②細胞の保存管理に関する課題、③培養細胞に関する情報管理システムの構築と維持に関する課題、④ヒト培養細胞を利用するうえでの研究倫理に関する課題、の4つを主な研究課題として設定し、その成果を細胞バンクの運営に役立てることを目的としている。今期は、主にヒトに由来する細胞の個別識別を中心に研究を実施し、その結果がもたらす倫理的な課題についても検討を加えた。

分担研究者

立花章	京都大学放射線生物研究センター	助教授
木村成道	(財)東京都老人総合研究所	部長
原澤亮	東京大学大学院医学研究科	助教授
安本茂	神奈川県立がんセンター	研究第二課長
難波正義	岡山大学医学部	客員研究員
竹内昌男	ヒューマンゲノム研究資源バンク	所長
田中憲穂	食品薬品安全センター-秦野研究所	副部長

さらに、近年ヒト遺伝子の全塩基配列が明らかにされたことにより、個人情報保護に拘わる問題を通じて、ヒトに由来する培養細胞を扱う場合においても研究倫理について強く問われるようになってきた。そこで、ヒト細胞を扱う厚生労働省細胞バンクにおいては研究倫理に関する課題を重要なテーマとして位置付けることとした。

なお、上記細胞バンクの骨格の1つである『細胞の分譲』については、1995年にHS研究資源バンクを通じて分譲されることが決まったことから、必要な作業は現在そちらに移管された。そのため、当該細胞バンクにおいては、この点についての管理開発関連の仕事は手を離れているので、それを除いた次の4課題を主要な研究課題としている。

A. 研究目的

我々は培養細胞を研究資源として管理し、国内外の研究者に配布することを目的として運営している細胞バンク事業を実施している。本研究においては、この細胞バンク事業を維持し、研究基盤としての役割と責任を果たすために必要な各種研究を実施することが本研究班の目的である。このような目的のため、研究の課題は多岐にわたるものであり、見方によれば散漫な内容であるとのご批判を賜るかもしれない。しかし、わが国に細胞バンクが設立されてまだ十数年という浅い歴史で、また、職員の数も必ずしも十分では無い現状では、その機能のレベルを維持するためには必須なことである。

細胞バンク事業の骨格は、細胞の収集、保存管理、分譲の3つの機能が必須である。しかし、これらの細胞バンク機能を効率的に運営するには、収集する多数の細胞についての情報を効率良く管理し共有化を図ることが不可欠であるが、近年のコンピュータ科学の発達はそれを可能にすることとなった。そのため、そうした技術の積極的な取り込みによる情報管理システムの開発と維持は細胞バンク基盤整備において重要な研究課題として位置付ける必要がある。

- 1、細胞の収集に関する課題
- 2、細胞の保存管理に関する課題
- 3、培養細胞に関する情報管理システムの構築と維持に関する課題
- 4、ヒト培養細胞を利用するうえでの研究倫理に関する課題

当該細胞バンクから提供される培養細胞を利用して実施される多くの生命科学研究に対して責任を持つためには、上記4課題について日常的に意識して研究を実施することが必須である。また、時期によって各課題の中の具体的テーマは変わるものであるが、一定の結論を得ながら次のステップに進むこともまた重要である。特に、新しい研究技術が次々に開発されている現在、安定した細胞の性質を維持してそれを研究者に提供することが不可欠であり、細胞バンクで保有する数百以上の細胞を対象に様々な確認作業を実施することが求

められているのである。

このような点を考えると、細胞バンクにおける研究の内容は通常の研究とは大分様子が異なるものであるという点をあらかじめ理解していただきたい。

上記のように細胞バンクの特殊な事情を考慮し、本年度の研究目的は昨年度に引き続いて次の4点に設定した。

1、細胞の収集に関する課題

細胞バンクとして、その責任を果たすためには研究者が必要とする多種類の細胞を収集することが不可欠である。数多くの研究の中から研究資源としての細胞が作られることを考えると、重要な研究をピックアップして、共同研究として収集することが最も効率が良いと考えられてきた。そのため、当該細胞バンク事業においては協力研究者を募り共同して細胞の収集にあたっている。従って、この部分は、分担研究者が主に実施するものとする。詳細は、分担研究報告を参照されたい。特に、収集する細胞の意義とその細胞の正当性について評価することが出来る有能な研究者の存在が不可欠であるが、一人の研究者が全ての細胞を評価することも不可能である。そこで、それぞれの分野で秀でた実績を持つ研究者に分担研究として、研究資源として評価出来る細胞の収集を委託した。

2、細胞の保存管理に関する課題

培養細胞は、収集する段階でその意義についてきちんと評価したとしても、その評価は主に発表論文を元に行うものである。また、各分担研究者自身の研究から十分に評価できるものとして扱われてきているものである。しかし、培養細胞という性質を考えると、そこには多数の誤りが入る可能性を否定できず、様々な問題が発生しうる。そうした問題を解決することが細胞バンクとしての重要な役割の1つである。特に、マイコプラズマならびにウイルスによる汚染の問題への対応と、細胞そのものが誤っているかもしれないという疑問への回答を与えることである。この2点については、細胞バンク設立時より一貫して研究課題として持ちつづけ、検討を重ねてきている。本年度は昨年度に引き続いて次の2点について検討を行った。

A. 1960年代から細胞の誤りについて議論がなされて来たが、つい最近まで確定的なことを述べる事ができなかった。しかし、近年の分子生物学研究の発展の結果、1985年以降、DNAフィンガー

プリント法を原理とした実験手法が発達し、ここ3-4年ほどの間に驚くほどの進歩を遂げた。この方法をいち早く取り入れて我々は、培養細胞の中に発生する誤り、すなわちクロスコンタミネーションの存在について詳細な検討を加えることとした。また、細胞の性質を強く反映すると思われる、染色体の構造についてもデータを収集して新たな実験方法についての模索を始めることとした。

B. 細胞は、マイコプラズマ汚染が頻繁に発生することが知られている。細胞バンク設立以後この点は研究者に対して強く注意を促してきており、減る傾向にあるがまだ汚染された細胞が多く見られることは残念ながら事実である。少なくとも、我々は細胞バンクとしてこのような実態を容認することは出来ないので、収集した細胞について汚染実体を明らかにすると同時に、除去できるものについては除去を実施している。しかし、中には通常の方法で除去出来ないものが出現してくることがあるので、その理由について検討を加えることとしつつ、既存の方法を組み合わせた除去法についても検討を加えた。

3、培養細胞に関する情報管理システムの構築と維持に関する課題

細胞バンクにおいては、入手した細胞を培養し、それを保存管理することが重要な仕事である。また、保存した細胞を時々に取り出して再培養を実施してその品質について詳細な検討を加えることも重要な仕事である。こうした作業を通じて1つ1つの細胞から多数の情報が引き出されることになる。こうした情報は、細胞を研究に利用するうえで必要な基盤的情報となるので、その全てを利用者たる研究者に提供することが必須であると同時に、細胞バンク内部で細胞の管理を実施するのにも必要である。過去において、こうした情報は紙や印刷紙、グラフチャートなどの媒体（ハードコピー）に記録してファイルに保管されていたものであったが、そうした保存の方法ではその取扱いが煩雑で、有効に利用することが困難であった。また、その管理自体に多くの人手を必要とするものでもあった。しかし、1981年以後導入された小型コンピュータ技術はその後発達を遂げ、高性能の情報機器として利用可能となったため、こうした細胞から発生する各種情報を電子ファイル化して保存し、かつ有効に利用する試みを継続して実施している。そのため、データベースの構築とその運用プログラムの開発は必要不可欠である。しかし、コンピュータ技術の発達は驚くほど早いた

めに、一度構築したシステムを継続的に改良する努力を怠るとプログラムの運用が麻痺する可能性が高い。こうしたトラブルを避けるために、当バンクでは、細胞情報の管理運用システムを自力で設計して改善することを研究の一環として位置付けるものである。本年度の改良点について述べることにする。

4、ヒト培養細胞を利用するうえでの研究倫理に関する課題

ヒト培養細胞を扱ううえでの研究倫理の課題については、1995年頃から日本組織培養学会細胞バンク委員会（後に倫理問題検討委員会が発足し独立した）を通じて議論を行ってきた。その経過については当該学会倫理問題検討委員会より報告書が出された。しかし、2000年になって、ヒト全ゲノムの塩基配列が明らかにされるという時代を迎え、その研究成果を利用した新たな発展に際して個人のゲノム情報をどのように保護をするかという課題が浮上し、国においても倫理問題に関する委員会が次々と設置され、検討が開始されることとなった。

こうした時代において、パブリックドメインと位置付けられる細胞バンクにおいて、ヒト研究資料を扱う場合に発生する倫理問題については様々な角度から検討を加える責任があると痛感することとなってきた。そこで、様々な分野の研究者と連絡を取りつつ情報の収集を中心に倫理問題に関する考え方を整理する作業を行うこととした。現時点で、結論を急ぐことは考えていないが、情報を収集して問題点を明らかにする努力を開始したところである。

B. 研究方法

1、細胞の収集に関する課題

細胞の収集は主に分担研究者により実施されているので、分担研究報告を参照されたい。

2、細胞の保存管理に関する課題

A. 細胞のクロスコンタミネーションに関する実験

細胞のクロスコンタミネーションに関する実験は、STR-PCR法を使った。その実施にあたっては、ProMega社より提供されている9種類のプライマーセット（表1）を利用して、染色体上9箇所の微小領域における多型性を利用して細胞の同定を実施した。抽出したDNAをこれらのプライマーにより増幅した後、ABI社のDNAシーケンサーを利用して分離した後、フラグメント解析を行い個々の細胞についての基礎パタンを得た。その後、

このデータをデータベース化して、細胞間のパタンを比較検討するプログラムを作成して異なる細胞が異なるパタンを示すか否かについて迅速に検討するシステムを開発し、それによりクロスコンタミネーションの有無を検討した。

B. 細胞の汚染に関連する実験

細胞の汚染検査については、各種培地を用いて真菌、細菌汚染について継続的に実施している。マイコプラズマによる汚染は、1つの実験方法のみでは結果を読み誤る可能性が高いので、古典的な方法としての指標細胞を用いた蛍光染色法と新しい方法としてRT-PCR法を併用している。これにより汚染があると認められたものについては、キノロン系の試薬であるMC210を用いて除染作業を実施している。

3、培養細胞に関する情報管理システムの構築と維持に関する課題

ここでは、コンピュータを利用した細胞バンクにおける培養細胞情報を管理するためのデータベースシステムの維持と管理を目的としている。コンピュータは、PCサーバと呼ばれる、通常のPCを強化したものをサーバとして利用してそこにデータベースを構築している。また、細胞バンク設立以来16年間使用し続けている基幹データベースに、時々発生する問題を解決するために新たなデータベースを追加し修正しながら発展させている。

サーバを運用するシステムはLinuxを基幹として、補助的にWindows2000を使用している。クライアントとして使用するシステムには、Windows98を使用している。データベースの開発は、細胞バンク内部で管理するためのシステムとしてdBASEファイルを用いてその運用プログラムはDelphiを使用している。研究者に公開するためのデータベースは、Web上の公開エリアに置いたファイルをデータベース化したものをCGIを通じて管理して公開している。基幹データベースについてデータの修正が発生した場合は修正後直ちにWeb用のファイルを出力して古い情報を置き換えることとしている。こうした作業は、一貫してDelphiで作成したバンク管理用プログラムで実施している。

さらに、Web用のプログラムは、通常のHTMLファイルに加えて、Perl言語を使って作成した。

4、ヒト培養細胞を利用するうえでの研究倫理に関する課題

主に、情報の収集を中心に実施している。Webによる収集に加えて、時に応じて面接等の方法も取り入れている。今期はヒト細胞の個別識別システムを確立したことから、この実験がもたらす倫理的な問題についての検討も行った。

(倫理面への配慮)

研究倫理の問題は重要な研究課題として位置付けており、主に情報の収集を中心に実施している(研究成果参照)。

C. 研究結果

1. 細胞の収集に関する課題

細胞を収集することは、細胞バンクとして第一義的に重要な課題であり、公式には主に分担研究者によって実施されている。しかし、ホームページを通じて、独自の寄託も受け付けているので、希望する研究者があれば直接用賀へ寄託することも可能である。毎年、数件の寄託希望の研究者が現れている。

収集した細胞は、当バンクの標準的なプロセスに従って、処理され、公開用細胞として分譲出来るようにする。この際、細胞が正しいこと、ならびに、微生物によって汚染されていないことを確認することを原則としている。しかし、細胞が正しいという指標をどのようにするかは長年懸案事項であったが、ここ数年のSTR-PCR法の発展によりヒト培養細胞については遺伝的な確認が可能になってきたので、実施するうえで必要になる基礎データを収集するなどの研究を進めている(項目2参照)。マイコプラズマについては、汚染が見つかった場合は、MC210(大日本製薬)によって除去を行い、それでも除去できない細胞については細胞バンクとしては登録をせずに廃棄することを原則としている。これまで、除去できなかった細胞は無かったが、今年度始めて除去できない細胞に1例出現した。可能性としてMC210耐性マイコプラズマが出現した可能性を否定することが出来ないため、その耐性についての研究を別途スタートする準備を進めている。分担研究者である原澤がマイコプラズマ研究の第一人者として当研究班に参加していただいているので、次年度以降の課題としている。また、耐性機構の解明とは別に、実質的な部分では、MC210では除去できなかったマイコプラズマでも、BM-Cycline 1(Boheringer Mannheim Ymanouchi)によって除去できる可能性が既に示されているので、その方法を試み成功した。

なお、一度マイコプラズマで汚染された細胞については、除去が出来たとしても、増殖抑制されたまま長期間生存している可能性を否定することが出来ないため、除去後抗生物質を一切与えずに30継代の長期間培養を実施してからマイコプラズマが出現してこないことを確認してから、正規登録細胞として扱うこととしている。

ヒト由来の培養細胞については、特に注意してクロスコンタミネーションの有無についてSTR-PCR法によって確認をしている。確認できた細胞については正規細胞として登録することとした。しかし、クロスコンタミネーションの存在を確認した細胞については、直ちに分譲を停止することが難しい。

つまり、我々がクロスコンタミネーションを明らかにしても、それらは既に寄託以前に多くの研究者に利用されてしまっていて、多数の論文が出されていることが普通である。実験の再現性を確認するには、そうした細胞であっても、一定期間利用せざるを得ないことが多い。そのため、直ちに分譲をストップするわけにはいかない。そこで、分譲の際に提供される細胞の性状を記述したデータシートの中に『クロスコンタミが発生している事実を明記して』配布するのが現実的であらう。

こうした確認作業に加えて、寄託を受けた細胞は全て解凍培養を実施して、種となるアンプルをおよそ50アンプル作成した。こうした手続きを通じて、細胞に汚染が無く、誤った細胞ではないことを確認している。

2002年度において新たに登録した細胞は次のとおりである(表2)。

表2. 平成13年度に登録した細胞一覧(49種)

登録番号	細胞名	動物種	由来組織
JCRB0164	HTC/G3	human	thyroid
JCRB0165	KHM-10B	human	peripheral blood
JCRB0166	HMC-1-8	human	pleural effusion
JCRB0167	RCN-9	rat	colon
JCRB0168	c-WRT-7-LR	rat	
JCRB0169	Lu-134-B	human	lung
JCRB0170	Lu-135	human	lung
JCRB0171	SKG-11	human	uterine cervix
JCRB0172	RMG-1	human	ovary
JCRB0172.1	RMG-11	human	ovary
JCRB0173	SKN	human	uterus
JCRB0174.0	NCC16-P11	human	endocervix
JCRB0175	SNG-11	human	corpus uterus
JCRB0176	RKN	human	ovary
JCRB0177.0	KP-1N	human	pancreatic tumor
JCRB0177.1	KP-1NL	human	pancreas
JCRB0178.0	KP-3	human	pancreas

JCRB0178.1	KP-3L	human	pancreas
JCRB0179	SNG-M	human	uterus
JCRB0180	GAK	human	external genitalia
JCRB0181	KP-2	human	
JCRB0182	KP-4	human	
JCRB0183	QGP-1	human	
JCRB0184	HCC50	human	
JCRB0185	HCC48	human	
JCRB0186	OV312ras4	mouse	
JCRB0187	OV312ras7	mouse	
JCRB0188	KYSE30	human	
JCRB0189	KYSE50	human	
JCRB0190	KYSE70	human	
JCRB0191	OCUG-1	human	
JCRB0192	OCUM-1	human	
JCRB0193	WB-F344	human	
JCRB0194	KON	human	
JCRB0195	RP-1	mouse	ascites
JCRB0196	RP-3	mouse	ascites
JCRB0197	OSC-20	human	tongue
JCRB0198	OSC-19	human	tongue
JCRB0199	huH-1	human	
JCRB0200	KMLS-1	human	
JCRB1001.1	MS-653-A	rat	
JCRB1001.2	MS-653-G	rat	
JCRB1002	K562/ADM	human	pleural effusion
JCRB1003	Kasumi-1	human	blood
JCRB1004	Kasumi-3	human	Blood
JCRB1005	NCC-1T-A3	human	anterior mediast.
JCRB1006.0	OUMS-36	human	
JCRB1007	KMRC-5	human	
JCRB1008	Hfb16d	human	foreskin

(注：一部、性状等の確認が遅れている細胞もある。)

表2において登録した細胞は直ちに、当該年度中に収集した細胞とは限らない。収集した細胞については分担研究者竹内らの報告を参照されたい。収集した細胞は、既に述べたとおり、培養後各種品質管理実験を通じて確認できたものを分譲可能な細胞として登録する。これには、1ヶ月から3ヶ月程度の作業日数を必要とし、場合によっては汚染等の理由で登録が不適格であるとの結論が出る場合もある。そのため、収集した細胞が直ちに登録できるとは限らず、登録までに時間も必要となる。また、登録作業に要する時間は、概ね一人の作業員あたり年間で36種である。これは、汚染等が無くスムーズに仕事が進む場合の作業量であるが、マイコプラズマ汚染等が明らかになった場合には、その除去作業に時間を費やすこととなる。現在、細胞の培養と登録作業に専念できる職員数は延べ2名であることを考えると、妥当な数値である。昨年度の年間新規登録数の24種から大幅に増加しているが、新たに非常勤職員1名を増員した結果である。細胞の培養、品質管理に要する実験は機械等自動機器によって代替することが出来ない作業であるために、作業を実施する職員の数とその質に大きく依存することとなる。

さらに、公的バンクとして、細胞を扱う場合、これらを先端研究を実施している研究者に提供することが可能であるほど品質の高い細胞が要求され、かつ、品質管理実験によって生じた情報の全てを提供することが要求される。そのために、別項で紹介するようにコンピュータをフルに稼働させて情報の記録が随時実施できるような体制を整えているが、そうしたシステムの維持管理等も大変重要である。また、データの投入は1度実施すればその後各種報告書等の作成を効率良く支援することが出来るシステムにはなっているが、最初のデータ投入はどうしても逐次実施しなければならない手作業となってしまう。そうした仕事は、補助職員をさらに配置して実施しているが、細胞バンクとしてのQuality(質)を高度にしようとして試みれば試みるほど、入力すべき情報量は増加し、それにかかる作業量も増大する。そうした課題を成就させつつ細胞バンクの基盤を整備する作業を実施している。

2、細胞の保存管理に関する課題

A. 細胞のクロスコンタミネーションに関する実験

A-1 新たなクロスコンタミネーションの発見

昨年度までに、細胞のクロスコンタミネーションを確認するための基礎的な実験系であるSTR-PCR法を実施するシステムを確立した。その時点でおよそ200種類弱の細胞についての検査を実施した。本年度は、それをさらに推進して、合計約340種のヒト細胞についての検査を実施した。

実施に当たっては、新たに収集し登録する細胞を優先して実施して、登録作業の流れを明確に規定することとして作業手順も確立した。STR-PCR法は、細胞から抽出したDNAの濃度を正確に測定した後に、STR-PCR用プライマーを添加してPCR実験を実施した後に、その反応産物をDNAシーケンサーで解析する。解析した結果は、数値データとしてコンピュータに蓄積されてピークの位置が自動的に決定される。このコンピュータが確認したピークの位置が正しいか否かについての検討も現場に置いては重要な課題であり、同じ細胞を何度も繰り返してその繰り返しデータの同じ結果となるか否かの検討を要する。この検討にあたっては、HeLa細胞が有効に利用できることが判明した。

HeLa細胞は始めて培養に成功したヒト由来の細胞として現在でも世界各地で利用されており、その亜株もまた多数存在する。さらに、1960年代に問題となったように、HeLa細胞が多くの細胞に置き換わってしまっているというのでは無いかという

推定もかなりの確かさで懸念されていた。そこで、既に収集したこれらのHeLaならびに、その亜株、混入株を標的にどのような結果となるか検討を行った。同じHeLa細胞についても複数回培養し、この重複を含めて比較分析し、34のデータを分析した。その結果、細胞間の評価値(昨年度の報告書で報告、1.0が完全一致を示し、0.0が完全不一致を意味する)は、このグループ(全てHeLaであることは明らか)内では1.000から0.788まで広く分散した。

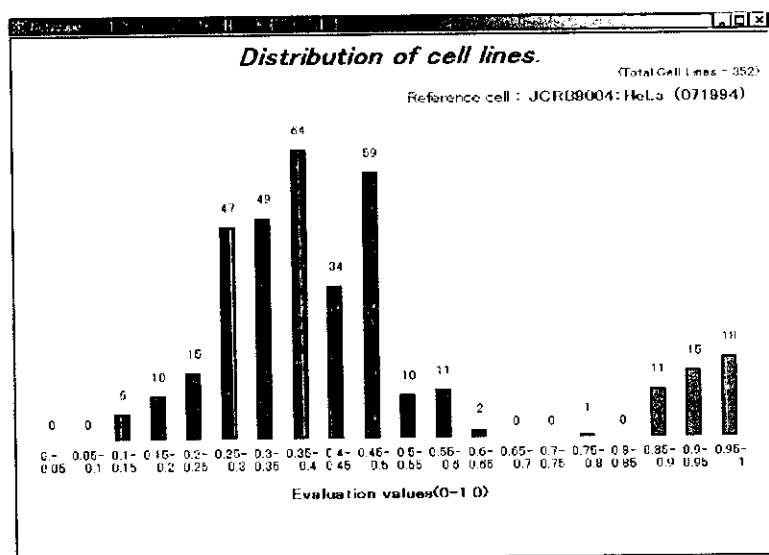
しかし、最も低い値を示した細胞と明らかにHeLa細胞では無い細胞の群の中で最も大きな値を示した細胞は、0.645(NCC16-P11)という値となり、この2つのグループ間には明らかにギャップが存在していた(図1)。

図1のグラフでは、EV = 0.85 以上に小さな山が見られた。また、EVの値が約0.3前後を中心と
図1. STR-PCR実験結果の分析。EV値による細胞の分布。

各細胞のSTR-PCR 実験結果得られるパターンを数値化してデータベースを構築した(平成12年度報告書)。その中から任意の1つ

するが、図1のEV=0.85以上のところに形成された山が比較の基準とした細胞と同一細胞であると判定することができる。基準にした細胞はHeLa細胞であり、ここに出現した細胞は全てHeLaの亜株かクロスコンタミが疑われていた細胞であった。但し、この図ではEV=0.75から0.8のところに1つの細胞が存在することがわかった。この細胞について確認したところ、これは、HeLaS3というHeLa細胞の亜株の1つであった。また、同じ細胞は複数の培養から複数のサンプルを調整してこの図の中に入っているが、全てEV=0.85以上のグループの中に入っていることは明らかであった。そこで、1つだけ外れたところに生じた細胞については、その理由について明らかにする必要が生じることとなる。ここでは、実験に用いたプライマーに問題があるという事実が実験中に明らかになっていたので、それに原因を求めることが出来ると、そのような場合は際実験を行い確認することが重要であろう。

実験においては、予測どおりの結果が出ないで、



の細胞を選択して、それを基準にして他の細胞との比較を行いEV値を算出した。基準にした細胞は、この図ではHeLa (JCRB9004, ATCC 由来) を用い、EV値はPerlによって作成したプログラムを使って自動的に算出した。得られたEVによって細胞をソートしてEV値順に並べた後、得られたEV値を0.5刻みに分割して、各分割値のところに出現する細胞の数を数えて頻度分布図とした。

して別大きな山が得られた。このようにピークは必ず2つの山に分離

このようにエラーとなることもある。そのような場合においては、その原因を明確にすることが出来るという点でも、この実験とデータの解析法は極めて有効であると考えられるのである。

さて、今年度においては、この方法を用いて、新たに100検体以上の細胞のデータを追加し、全体で

約300種類の細胞について結果を得た。その結果、全体で16種の細胞に誤りがあることが明らかになった(図2)。調査した細胞の種類が300種類であるから、収集した細胞の5.3%にクロスコンタミがあったということになる。

図2. 平成13年度までに収集した細胞のクロスコンタミネーションの状況

STR-PCR 法によって示されたクロスコンタミネーションの一覧。False Cell line が、誤っているとされた細胞で、そのような細胞は存在していないことになる。True Cell line が、実際の細胞である。ここで示したデータは、JTC-

False cell line (non-existing)	True cell line (original derivative)	EV	Confirmed cell bank	comments
JCRB0092: P39 TSU	JCRB0085: HL60	0.933	JCRB	Found by DNA finger printing first then confirmed by STR-PCR
JCRB0127: KOSC-3	JCRB0625: Ca9-22	1.000	JCRB	
JCRB0128: TK-1	IFO50288: U-251 MG	1.000	JCRB	U251 is a candidate of U373-MG or SNB-19. These two are also cross-contaminated found by ATCC.
JCRB0128: TK-1	RCB0461: U251	0.966	JCRB	U251 is a candidate of U373-MG or SNB-19. These two are also cross-contaminated found by ATCC.
JCRB0142: NCC16	JCRB0141: PHK16-0b	1.000	JCRB	NCC16 was replaced with NCC16-P11 which was confirmed to be unique.
JCRB0253: MKN28	JCRB0255: MKN74	1.000	JCRB	
JCRB0604: PSV811	JCRB9017: WI38	0.923	JCRB	
JCRB0744: ECV304	JCRB0711: T24	0.917	JCRB DSMZ	We checked earlier passage from Dr. Takahashi but it is still T24.
NIHS0009: JTC-17	JCRB9004: HeLa	ND		Dr. Yamakage (Hatano) indicated by cytogenetic analysis.
NIHS0231: HuL-1	JCRB9004: HeLa	0.933	JCRB	
NIHS0244: KO51	JCRB0019: K-562	1.000	JCRB DSMZ	
NIHS0267: TMH-1	NIHS0270: IHH-4	0.966	JCRB	Y chromosome is only different point.
JCRB0073: J-111	JCRB9004: HeLa	1.000	JCRB	Historically known.
JCRB9027: KB	JCRB9004: HeLa	1.000	JCRB	Historically known.
JCRB9066: Chang Liver	JCRB9004: HeLa	0.968	JCRB	Historically known.
JCRB0710: EJ-1	JCRB0711: T24	1.000	JCRB	Historically known.

17を除いて全て今回の研究で明らかにしたものであるが、一部は既に海外の細胞バンクとも情報を交換して確認した。J-111, KB, Chang Liver は既にHeLa細胞の混入が指摘されていたもので、この実験によって最終確認したと言っても良いと思われる。

図2に示したように、今回の研究において新たに、KOSC-3, TK-1, NCC16, MKN28, PSV811, ECV304, HuL-1, KO51, TMH-1の細胞がクロスコンタミであることが明らかとなった。慎重を期すために、結果を樹立者に連絡し、細胞バンクに寄託された細胞より古いロットの細胞の再送付をお願いして再検査を試みた。その結果、やはり同様にクロスコンタミを起こしている結果が得られたので、これらの細胞については、クロスコンタミと確定した。

なお、TK-1がクロスコンタミであることが判明したが、その相手はU251細胞であった。こ

れは著名なグリオーマ系培養細胞として広く利用されている細胞系であるが、最近この細胞とクロスコンタミを起こしている細胞としてU373MGとSNB-19が指摘された。当細胞バンクにはU373MGとSNB-19は保存されていないが、重要な問題であることを考慮し、現在ATCCからこの2つの細胞を特別に取り寄せて調査を開始したところである。また、ATCCもこの点には興味を持っており、情報の交換を行いながら検討を進めている。

A-2. STR-PCR法を個別識別実験系としての妥当

性の検討

図1に示したように、本実験においてHeLa細胞ならびにその関連群の細胞は他の無関係な細胞と区別することができることは明らかである。しかし、算出したEV値の分布は0.85から1.000と大変幅が広いことについては疑問が残る。このSTR-PCR法は、法医学領域においても個人の識別に利用されている方法で、人が残した生体の一部（毛髪や精液）に由来する遺留品を分析して個人を特定する手法として用いられる。法廷などにおいては、大変厳しい評価が為されると聞いており、我々が定義したEV値では1.000という値が得られなければ、同一人物由来とは評価されないようである。この基準から考えると、本実験で試みたHeLa細胞の場合は0.85以上の一致率しか得られないということは大変に甘い基準になっていると言える。勿論、実際にHeLa細胞の亜株であるということが知られている細胞で確認した事実であることを考えると、現実にその程度のEV値しか得られない場合があるということになる。そこで、我々は、このように同じ細胞であってもEV値が下がる場合がある点について検討を加えることにした。

細胞バンクにおいては、このSTR-PCR法を培養細胞の品質管理の一環として実施しているので、同じ細胞でも、培養するたびに実験を行ってデータを収集しているが、これまでに相当数のデータが蓄積してきた。そこで、同一細胞間のSTR-PCRのデータを比較から、同じ細胞にもかかわらず、ピークの高さが大きく異なる場合があることに気がついた。常識的に考えた場合には、培養細胞の不安定性という通説に従って、その程度の差はおかしくは無いだろうということになっていたが、この点を実験的に明確にしておく必要があると考えたのである。つまり、STR-PCR法の限界を明らかにすることによって、より正確なクロスコンタミネーションの事実を指摘することができるであろうと考えたのである。そこで、これまでに蓄積したHeLa細胞の亜株であるHeLaS3細胞のSTR-PCR実験データを集めて相互に比較することにした。

HeLaS3は、1955年にPuckらによってHeLa細胞から得られた単一クローン細胞であり、プレート効率が100%と大変高く、ウイルスのブランクアッセイが行いやすい細胞としてウイルス学の研究者に好んで使われてきた細胞である。

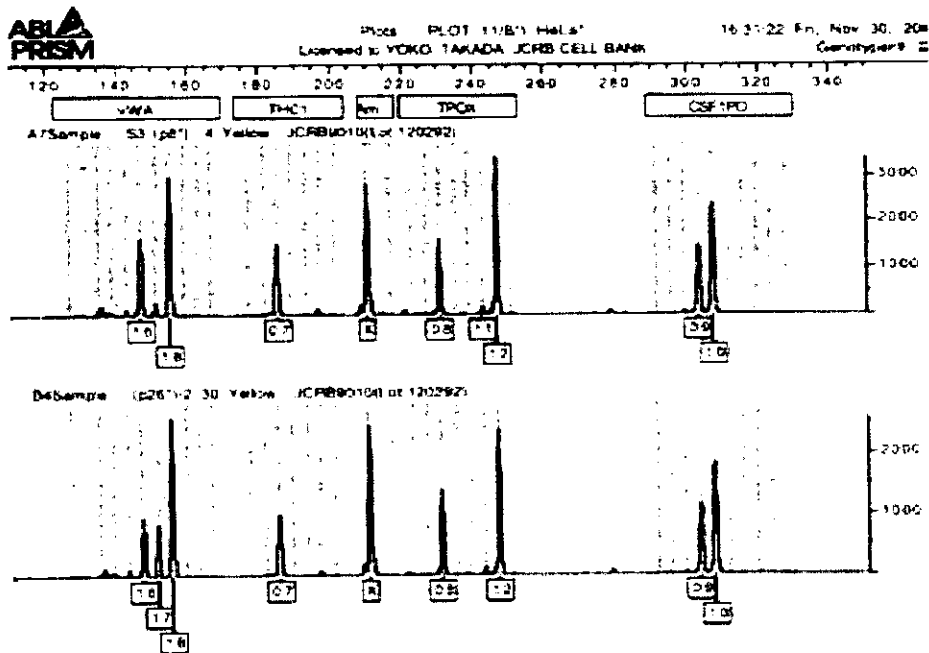


図3. HeLaS3細胞の継代培養の回数に依存したSTR-PCRパターンの変化

上段は細胞バンクで入手後8継代した細胞。下段は、入手後26継代した細胞。

図3ではvWA、TH01、Amrogenin、TPOX、GSF1POの5ローカスを

同時に調べているが、vWAローカスにのみ変化が生じている。図3には継代数8と26の2つの結果だけを示したが、継代8代目の細胞のvWAローカスにはピーク16とピーク18の2つのピークしか観察されていない。それが、継代数26代では新たにピーク17が観察され、その高さはピーク16とほぼ同じになっていた。PCR実験という性質から、検出されたピークが人工的なものであって実体を反映していないという可能性を完全には否定することが難しいので、継代数8から26代の間の複数の継代時に細胞をサンプリングしておいて、それらを全部調べることとした。その結果、継代の進行につれてこのピーク17が徐々に増加し、図3のようにピーク16とほぼ同じ高さになったところで停止していることが明らかになった。この結果は、図3のvWAで確認されたピーク17の出現が、アーティファクトでは無く、確かに継代に依存して増加したことは明らかである。同じ図3において他のローカスにおいてはこのような変化が見られないことから、vWAローカスに特異的な現象であることが明らかであろう。vWAローカスは12番染色体上にあるマーカであるが、図3で他の4種のマーカとして利用したローカスは全て12番とは別の染色体上に乗っていることが明らかであるが、それらにはこのような顕著なピークの出現や消失は観察されていない。また、これと対になって得られる別のチャートで示される、D16S539、D7S820、D13S317、D5S818の4ローカスもvWAとは異なる染色体上のマーカであるが、それらにおいてもこのような変動は観察されなかった。

以上の結果から、同じHeLaS3細胞であっても、vWAローカスにピークが3本出現するロットと、ピークが2本しか出現しないロットがあることが明らかになった。特に、今回の実験の結果から明らかなのは、継代数の進行により、そのような変化が現れることが示された点は重要である。培養細胞は、単一クローンとして樹立された場合でも、その後多くの研究者の手にわたり様々な研究室で相互に独立して研究に利用される。利用される場所によって継代のされ方は大きく代わり、ある研究室ではあまり培養されることなく長期間維持される一方、別の研究室では繰り返し培養される。その結果、長い年月を経て同じ細胞を別々の研究室から入手してSTR-PCR法によって調べれば図3で示されたように出現するピークの数が増減するという結果が得られることとなる。

以上の結果から、同一細胞を比較した場合においてもEV値が必ずしも一致しないということがあり

うることを示している。しかし、一方で図2の結果は、HeLa細胞に由来する全ての細胞はEV値が完全には一致しなくとも、一定の幅に収まっており他の細胞からは十分に識別できることを示している。従って、一定の幅に区切ったEV値の各チャンネルに出現する細胞の出現数を計数して、図2の頻度分布グラフを描けば、十分に細胞の由来を識別することが可能である。

なお、複数のピークのうち、何故vWAのみにこのような変化が生じたのかについては現時点では明らかでない。しかし一般に培養細胞の染色体が不安定であるという事実は知られており、今回の知見がそれに依存するものであるとする考察は妥当であると思われる。いずれにせよ、この点はさらに染色体の分析を通じて該当する染色体にどのような変化が現れているのか明らかにするつもりである。このような変動の原因については、ローカス内のピーク16に重複が発生する可能性、染色体そのものの欠失や重複が発生した可能性などいくつかの理由が考えられ、そうした理由を明らかにするには染色体の構造を調べなければならない。また、常識として語られている染色体の不安定性についても、その動態を明らかにしておくことは培養細胞の品質管理上重要な点だと思われる。

以上示したように、ヒト培養細胞の個別識別に利用されるSTR-PCR法が培養細胞の識別に有効であることが明らかとなり、培養細胞のクロスコンタミネーションの問題について解決する道が開けることとなった。今後、この実験方法は細胞バンクの運営の中でルーチンの実験として継続的に実施し個別識別データベースをさらに整備してゆくこととするものである。

しかし、ここで、研究倫理上の新しい問題が生じることとなった。すなわち、本方法がヒトの個別識別を行う方法であるということから、細胞バンクに寄託された細胞から個人情報削除され、非連結サンプルであったとしても、このSTR-PCR法の利用の仕方によっては、再度連結サンプルとすることが出来てしまうということが予想されるのである。

特に、今後疫学調査などによって大量のヒトサンプルが細胞バンクならびにヒト組織バンクに保存される可能性が高くなっているが、そうしたサンプルの全てについてこの個別識別データを得てデータベース化して公開すれば、個人の遺伝的識別情報が広く流出してしまう恐れが想定される。こうした事態をどのように評価するかはなかなか困難

が伴うが、現時点では疫学調査を目的として収集した多数のサンプルについては、ここで示したSTR-PCR法による個別識別情報は採取しないこと、また部分的にそうした実験をする必要があっても、そうしたデータは、公開するデータベース上には追加しないことによって問題を回避できるのではないかと考えている。しかし、この問題については外部の方の意見を聞きながら継続して検討してゆく必要があるため、次年度以降の検討課題とするものである。

なお、これまでに収集した株化された細胞の場合には、その多くが既に広く利用されている細胞であることや、数が少ないこと、ならびに提供者の多くは既に死亡されているケースがほとんどであることなどを考えると、データベース化して公開しても個人のプライバシーを侵害する事態は生じないものと考えている。

B. 細胞の汚染に関連する研究

マイコプラズマの汚染については当バンク設立以来継続的に検査を実施している。本年度に登録した細胞についての検査は継続的に実施すると共に、汚染が観察された場合は、キノロン系除染試薬であるMC210によってマイコプラズマを除染する手続きを踏んで、非汚染細胞として登録する作業を実施している。本年度は、数種類の細胞に汚染を認めたが、その大半はこの処理で除染できた。ただ、1種類のみはMC210によって除染することが出来なかったため、BMCyclineによって追加処理を実施し、最終的に除染に成功した。

ただ、バンクを運営する立場として、MC210で除染できなかった理由について明らかにする必要がありと考えている。本年度においては実施することができなかったが、この細胞を汚染していたマイコプラズマがMC210耐性となったものであるかどうかについて、今後検討を加えたいと考えている。メーカである大日本製薬からは、MC210耐性マイコプラズマの報告は為されていないので、今回除染できなかった理由が耐性マイコプラズマの出現にあれば、今後、この試薬の取扱いについて注意をする必要が出てくるため、重要な課題となると思われる。

3. 培養細胞に関する情報管理システムの構築と維持に関する課題

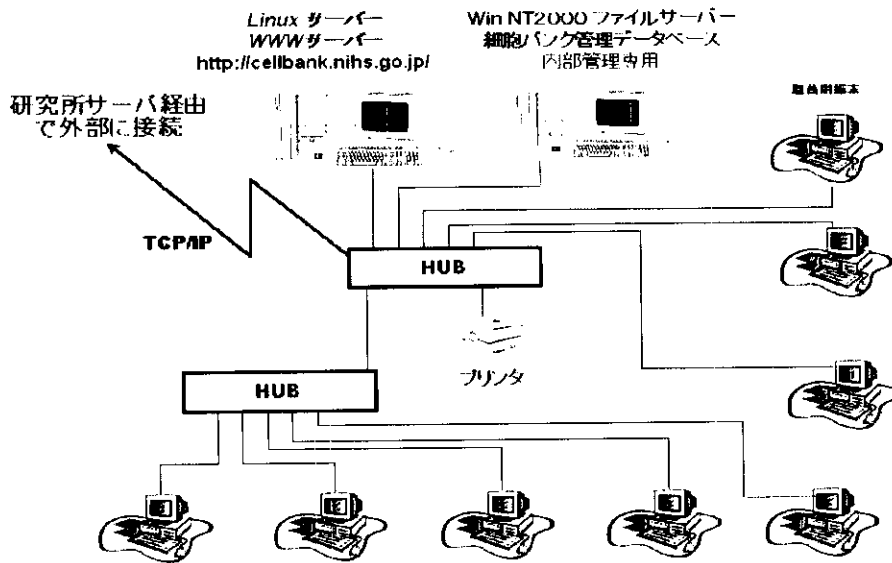
限られた職員数で細胞バンクを運営するには、様々な仕事の効率化を図ることが不可欠である。細胞バンクが発足した1984年、それより3年前に登場したビジネスに利用できるパーソナルコンピュータ、IBM・PC (AT) が利用できるようになっていた。これを導入して汎用的なビジネスソフトウェアであるdBASE IIを採用し培養細胞データベースを構築して業務遂行の効率化を目指してきた。その後、このPCシステムは発展を遂げ、現在では複数のコンピュータを端末機としてLANで接続し、外部ともTCP/IP接続によるインターネットを利用することができるようになった。これにより、細胞バンクの情報をリアルタイムで利用する研究者に提供する基盤が確立された。

そこで、こうしたインフラストラクチャー技術を十分に活かすために細胞バンク内部と外部の情報システムの構築を検討し、図4のようなアウトラインを持つシステムを構築してきた。基本設計は、国立医薬品食品衛生研究所の情報システムの下位に属する研究室内部のLANとして構築している。サーバには、研究室内部で共有する情報を管理するためのファイルサーバと外部に情報を提供するために利用するWWWサーバの2種類を設置した。それぞれの情報は重要な情報なのでトラブルの発生に備えるためにテープバックアップ装置とバックアップサーバを設置した(図4にはバックアップサーバは設置していない)。WWWサーバはApacheにより構築しOSにはLinuxを採用した。また、内部用のファイルサーバにはWindows2000を採用した。

情報の提供はWWWにより行っているが、そこに提供する情報は日常的に使用している細胞バンクデータベースからダウンロードしたデータをリアルタイムで公開している。そのシステムの構成は図5に示したとおりである。

図4. 細胞バンクにおけるLANの構築

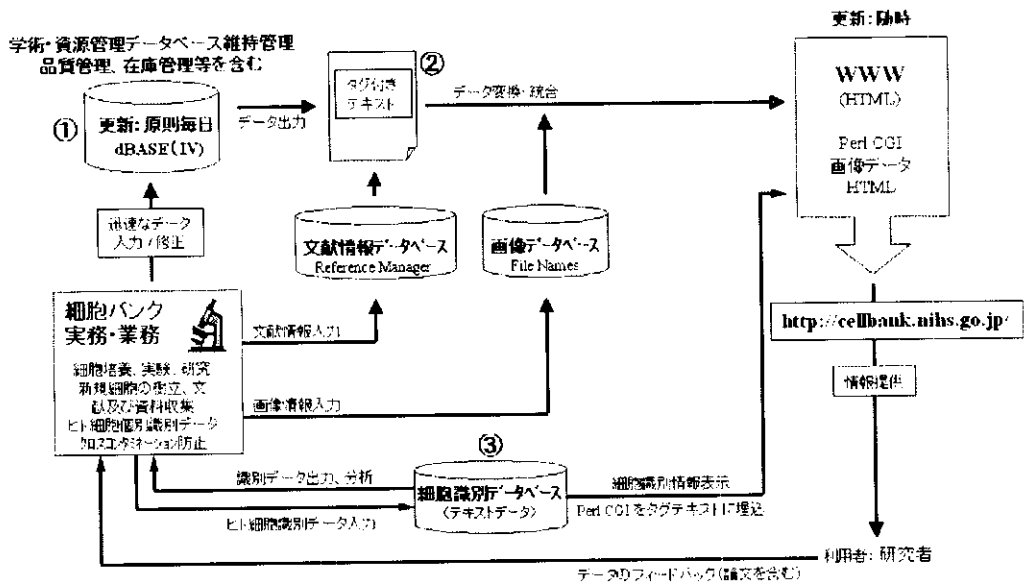
図5 培養細胞情報管理システムの構築と利用者のための提供システム
JCRB細胞バンクコンピュータシステムの整備(ハードウェア)



細胞バンク内のLANの構築。Ether Netで接続し、WWWサーバとファイルサーバを設置している。TCP/IPにより研究所全体を管理しているサーバ、ルータを経由して外部と接続されている。細胞バンク管理用の情報はファイルサーバに、外部に公開する情報はWWWサーバに分けて保存し、それぞれバックアップ用のコンピュータを準備している。

テム

培養細胞研究資源情報検索提供システムの開発
 培養細胞研究資源利用の効率化



内部管理情報を公開するためのWWWサーバへ転送する作業の流れを示した。内部データ(①)はdBASEフォーマットによりデータベース化し、Delphiにより開発している細胞バンク管理プログラムによってデータの入力・修正を行う。また、日常的に実施している細胞発送等の業務にも対応している。さらに管理プログラムは、修正したレコードがあると直ちにHTML化され(②)、その後で文献情報、画像情報を付加してWWWサーバに転送する。また、ヒト細胞個別識別データベース(③)は、CellIDシステムによって直接利用者が参照すること(図5中の左下に細胞バンク業務が位置している

が、そこから発生するデータを①のデータベースを使って管理している。新たな細胞を入手し、既に保存している細胞を新規に培養した場合など、新しく発生する細胞・培養情報に加えて、在庫管理情報などは全て、このデータベースに記録する。そして、その情報をリアルタイムで利用者に提供するために、記録した情報はHTMLファイルとして出力してWWWサーバに転送する(図5の②)。その際、文献情報ならびに画像情報も添付している。そのため、文献情報と画像情報については、独立したデータベースとして管理し、WWW情報の充実化を図っている。

また、昨年度においてヒト由来する培養細胞に生じる誤り(クロスコンタミネーション)を確認するシステムを、STR-PCR実験をベースに構築したが、この実験で発生するデータを迅速に処理してクロスコンタミネーションを確認するCellIDシステムを図5の③に組み込んで利用者が直接確認できるようにした。

こうしたシステムの中で、当該データベースに記録するデータの種類の重要性になるが、現時点では出来る限り多くの情報を記録できるようにすることを考えている(表3)。ただ、実際に実験をす

る力量が足りないために、期待した全ての情報を得ることが出来ないために空白のままになっている部分も多いが、今後充実させる努力が必要である。

表3には、現在使用しているデータベースの構造を示した。表3-1はマスターデータベースで、cellroot.dbfである。これには、該当する細胞に関する原著に基づいた情報が記録され、文献情報は別途管理している文献データベース(Reference Manager)のID番号を記録している。また、表3-2は、培養管理データベース(cellspec.dbf)で、培養ごとに発生するデータと培養時に気がついたコメントなどを記録している。また、培養の確認のために撮影した細胞の形態や染色体の構造などの写真や実験結果のグラフなどをデジタル化してそのファイル名を記録している。画像情報は利用者にとって大変有効なデータとなるため、こうした情報を効率的に提供するシステムの構築を模索してきたが、現在の方式でほぼ確定した。これによって、利用者は当細胞バンクのホームページから自由に個々の細胞の画像情報を参照できるようになった。

表3. 細胞バンク管理データベースの構造

表3-1 細胞マスター管理データベース

データベース構造: D:\CELLBANK\CELLROOT.DBF

データレコード数: 2076

最終更新日: 03/27/02

フィールド	フィールド名	型	幅	小数位	インデックス	
1	RNO	文字型	11		N	細胞番号
2	INDATE	文字型	10		N	入手日
3	CN1	文字型	20		N	細胞名
4	CN2	文字型	20		N	別細胞名
5	PREVNAME	文字型	20		N	前細胞名
6	PREV_NO	文字型	11		N	前細胞番号
7	BANKNAME	文字型	20		N	管理細胞バンク名
8	ANIMAL	文字型	30		N	由来動物名
9	STRAIN	文字型	30		N	由来動物種名
10	GENUS	文字型	20		N	学名(属名)
11	SPECIES	文字型	20		N	学名(種名)
12	SEX	文字型	3		N	性別
13	AGE	文字型	13		N	樹立時年齢・月齢等
14	IDENTITY	文字型	10		N	細胞識別実験
15	TISSUE	文字型	35		N	由来組織
16	CASEHISTOR	文字型	254		N	病歴情報
17	METASTASIS	文字型	3		N	転移の有無
18	METASTORGN	文字型	20		N	転移先の組織
19	GENETICS	文字型	254		N	遺伝学的性質
20	LIFESPAN	文字型	20		N	細胞寿命(選択)
21	CRISISPDL	文字型	10		N	クライシスに至るPDL数
22	MORPHOLOGY	文字型	40		N	細胞形態
23	CHARACT	文字型	254		N	一般性状
24	STARTDATE	文字型	10		N	培養開始時
25	CLASSIFY	文字型	12		N	細胞分類
26	HISTORY	文字型	254		N	樹立後の歴史
27	ORIGINATOR	文字型	50		N	細胞樹立者名

28	REGISTER	文字型	20	N	細胞登録者名
29	REGULATION	文字型	100	N	分譲に際しての制限事項
30	REF1	文字型	60	N	文献1D一覧
31	REF2	文字型	60	N	(文献) 不使用
32	REF3	文字型	100	N	(文献) 不使用
33	ROOTMEMO	メモ型	10	N	メモフィールド
34	COMMENT	文字型	254	N	コメントフィールド
35	DYEAR	文字型	4	N	入手年
36	NENND0	文字型	4	N	入手年度
37	DMONTH	文字型	2	N	入手月
38	MEDIUM	文字型	254	N	原著記載培地名
39	PASMETHOD	文字型	254	N	原著記載継代方法
40	PASCELLNO	文字型	30	N	原著記載継代時細胞数
41	SAFE_LEVEL	文字型	10	N	安全性レベル
42	REC_LEVEL	文字型	10	N	
43	IMAGE1	文字型	12	N	画像1
44	IMAGE2	文字型	12	N	画像2
45	IMAGE3	文字型	12	N	画像3
46	IMAGE4	文字型	12	N	画像4
47	IMAGE5	文字型	12	N	画像5
48	IMAGE6	文字型	12	N	画像6
49	IMAGE7	文字型	12	N	画像7
50	IMAGE8	文字型	12	N	画像8
51	IMAGE9	文字型	12	N	画像9
52	IMAGE10	文字型	12	N	画像10
53	IMAGE11	文字型	12	N	画像11
54	IMAGE12	文字型	12	N	画像12
55	IMAGE13	文字型	12	N	画像13
56	IMAGE14	文字型	12	N	画像14
57	IMAGE15	文字型	12	N	画像15
58	IMAGE16	文字型	12	N	画像16
59	IMAGE17	文字型	12	N	画像17
60	IMAGE18	文字型	12	N	画像18
61	IMAGE19	文字型	12	N	画像19
62	IMAGE20	文字型	12	N	画像20
63	IMAGE21	文字型	12	N	画像21
64	IMAGE22	文字型	12	N	画像22
65	IMAGE23	文字型	12	N	画像23
66	IMAGEMEMO	文字型	254	N	イメージメモ
67	SHEET1	文字型	14	N	添付情報有無
68	SHEET2	文字型	14	N	添付情報有無
69	SHEET3	文字型	14	N	添付情報有無
70	SHEET4	文字型	14	N	添付情報有無
71	SHEET5	文字型	14	N	添付情報有無
72	REFID	文字型	4	N	文献01
73	REFID02	文字型	4	N	文献02
74	REFID03	文字型	4	N	文献03
75	REFID04	文字型	4	N	文献04
76	REFID05	文字型	4	N	文献05
77	REFID06	文字型	4	N	文献06
78	REFID07	文字型	4	N	文献07
79	REFID08	文字型	4	N	文献08
80	REFID09	文字型	4	N	文献09
81	REFID10	文字型	4	N	文献10
82	REFID11	文字型	4	N	文献11
83	REFID12	文字型	4	N	文献12
84	REFID13	文字型	4	N	文献13
85	REFID14	文字型	4	N	文献14
86	REFID15	文字型	4	N	文献15
87	REFID16	文字型	4	N	文献16
88	REFID17	文字型	4	N	文献17
89	REFID18	文字型	4	N	文献18
90	REFID19	文字型	4	N	文献19
91	REFID20	文字型	4	N	文献20
92	MVFID01	文字型	8	N	動画1
93	MVFID02	文字型	8	N	動画2
94	MVFID03	文字型	8	N	動画3
95	MVFID04	文字型	8	N	動画4
96	MVFID05	文字型	8	N	動画5
97	RECORDLOG	文字型	2	N	
98	NEXT_NO	文字型	11	N	次細胞番号
99	FROM_NO	文字型	11	N	前細胞番号
100	RACE	文字型	30	N	人種

101	PROFILE	文字型	254	N	細胞プロフィール
102	ICNFORMAT	文字型	15	N	ICの有無
103	REDEPOSIT	文字型	15	N	再寄託可否
104	CO2CONC	文字型	5	N	培養時炭酸ガス濃度
**	合計	**	3690		

表3-2 細胞培養管理データベース

データベース構造: D:\CELLBANK\CELLSPEC.DBF

データレコード数: 3890

最終更新日: 03/27/02

フィールド	フィールド名	型	幅	小数位	インデックス	
1	RNO	文字型	11		N	細胞番号
2	CN1	文字型	20		N	細胞名
3	LOTNO	文字型	8		N	培養ロット番号
4	BANKNAME	文字型	20		N	担当細胞バンク名
5	LOTSPEC	文字型	20		N	ロット属性
6	STARTDATE	文字型	10		N	培養開始日
7	MEDIUM	文字型	254		N	培地名
8	GROWTEMP	文字型	12		N	培養温度
9	PASCELLNO	文字型	25		N	継代時細胞数(濃度)
10	PASMETHOD	文字型	254		N	継代方法
11	CLONE	文字型	3		N	クローニング操作の有無
12	PREVNAME	文字型	20		N	前細胞名称
13	SATUDENS	文字型	20		N	細胞飽和密度
14	GROWTHRATE	文字型	30		N	増殖速度
15	PLATEFFI	文字型	20		N	コロニー形成率
16	FREEZCONC	文字型	10		N	凍結時細胞濃度
17	VIABLFREEZ	文字型	4		N	凍結時生存率(染色法)
18	ANTIBIOTIC	文字型	50		N	使用抗生物質
19	PASSAGE	文字型	20		N	総継代数
20	PDL	文字型	5		N	PDL数(プライマリ)
21	MYCO	文字型	2		N	マイコプラズマ検出
22	MYCOSPEC	文字型	15		N	マイコプラズマ種名
23	BACT	文字型	2		N	細菌汚染検出
24	FUNGI	文字型	2		N	真菌汚染検出
25	PROTOZOA	文字型	2		N	原生生物汚染検出
26	VIRUS	文字型	2		N	ウイルス感染検出
27	VIRUSSPEC	文字型	30		N	ウイルス種名
28	VIRUSPROD	文字型	20		N	ウイルス生産の有無
29	VIRUSSENS	文字型	50		N	ウイルス感受性検査結果
30	ISOZYME	文字型	50		N	アイソザイム検査・動物名
31	CHRMODE	文字型	5		N	染色体モード
32	CHRDISTRB	文字型	50		N	染色体数分布
33	CHRMARKER	文字型	30		N	マーカー染色体記述
34	SURFACEAG	文字型	20		N	表面抗原
35	IDENTITY	文字型	10		N	細胞識別(ヒトSTR)
36	CONTACTSPC	文字型	50		N	接触阻止
37	ANCHORDEPD	文字型	3		N	付着性
38	TUMRGENSIS	文字型	50		N	造腫瘍性
39	EXOGENE	文字型	50		N	外来遺伝子有無・属性
40	OTHERS	文字型	254		N	その他
41	LOTMEMO	文字型	254		N	ロットメモ
42	DYEAR	文字型	4		N	培養年
43	DMONTH	文字型	2		N	培養月
44	NENNDO	文字型	4		N	培養年度
45	COMMENT	文字型	254		N	コメント
46	FMEDIUM	文字型	254		N	凍結培地
47	CO2	文字型	5		N	炭酸ガス濃度
48	SCFREQ	文字型	20		N	
49	ADHESION	文字型	6		N	接着性
50	RFLP	文字型	120		N	RFLP所見
51	IMAGE1	文字型	12		N	画像1
52	IMAGE2	文字型	12		N	画像2
53	IMAGE3	文字型	12		N	画像3
54	IMAGE4	文字型	12		N	画像4
55	IMAGE5	文字型	12		N	画像5
56	IMAGE6	文字型	12		N	画像6
57	IMAGE7	文字型	12		N	画像7
58	IMAGE8	文字型	12		N	画像8

59	IMAGE9	文字型	12	N	画像 9
60	IMAGE10	文字型	12	N	画像 1 0
61	IMAGE11	文字型	12	N	画像 1 1
62	IMAGE12	文字型	12	N	画像 1 2
63	IMAGE13	文字型	12	N	画像 1 3
64	IMAGE14	文字型	12	N	画像 1 4
65	IMAGE15	文字型	12	N	画像 1 5
66	IMAGE16	文字型	12	N	画像 1 6
67	IMAGE17	文字型	12	N	画像 1 7
68	IMAGE18	文字型	12	N	画像 1 8
69	IMAGE19	文字型	12	N	画像 1 9
70	IMAGE20	文字型	12	N	画像 2 0
71	IMAGE21	文字型	12	N	画像 2 1
72	IMAGE22	文字型	12	N	画像 2 2
73	IMAGE23	文字型	12	N	画像 2 3
74	SHEET1	文字型	14	N	添付文書
75	SHEET2	文字型	14	N	添付文書
76	SHEET3	文字型	14	N	添付文書
77	SHEET4	文字型	14	N	添付文書
78	SHEET5	文字型	14	N	添付文書
79	MVFD01	文字型	8	N	動画
80	MVFD02	文字型	8	N	動画
81	MVFD03	文字型	8	N	動画
82	MVFD04	文字型	8	N	動画
83	MVFD05	文字型	8	N	動画
84	HOME	文字型	5	N	
85	FROMLOT	文字型	8	N	前ロット番号
86	EVALUATION	文字型	12	N	評価
**	合計	**	2848		

注) この2つの細胞に関するデータベースに加えて、細胞の保存場所や在庫状況を管理する cellstor.dbf、利用者情報を管理する address.dbf、細胞の利用状況を管理する offer.dbf、などのデータベースを運用している。

細胞バンクの情報については以上のように、内部で管理するデータベースと、それを利用者に提供するWWW

情報の2つのシステムで運用している。研究社会にインターネットが普及し、WWWが使えるようになって6年が経過したが、この間利用率は上昇し、現在当細胞バンクのホームページ(<http://cellbank.nihs.go.jp/>)へのアクセス件数は月間6000件を超えるようになり、多くの研究者に利用されるようになった。

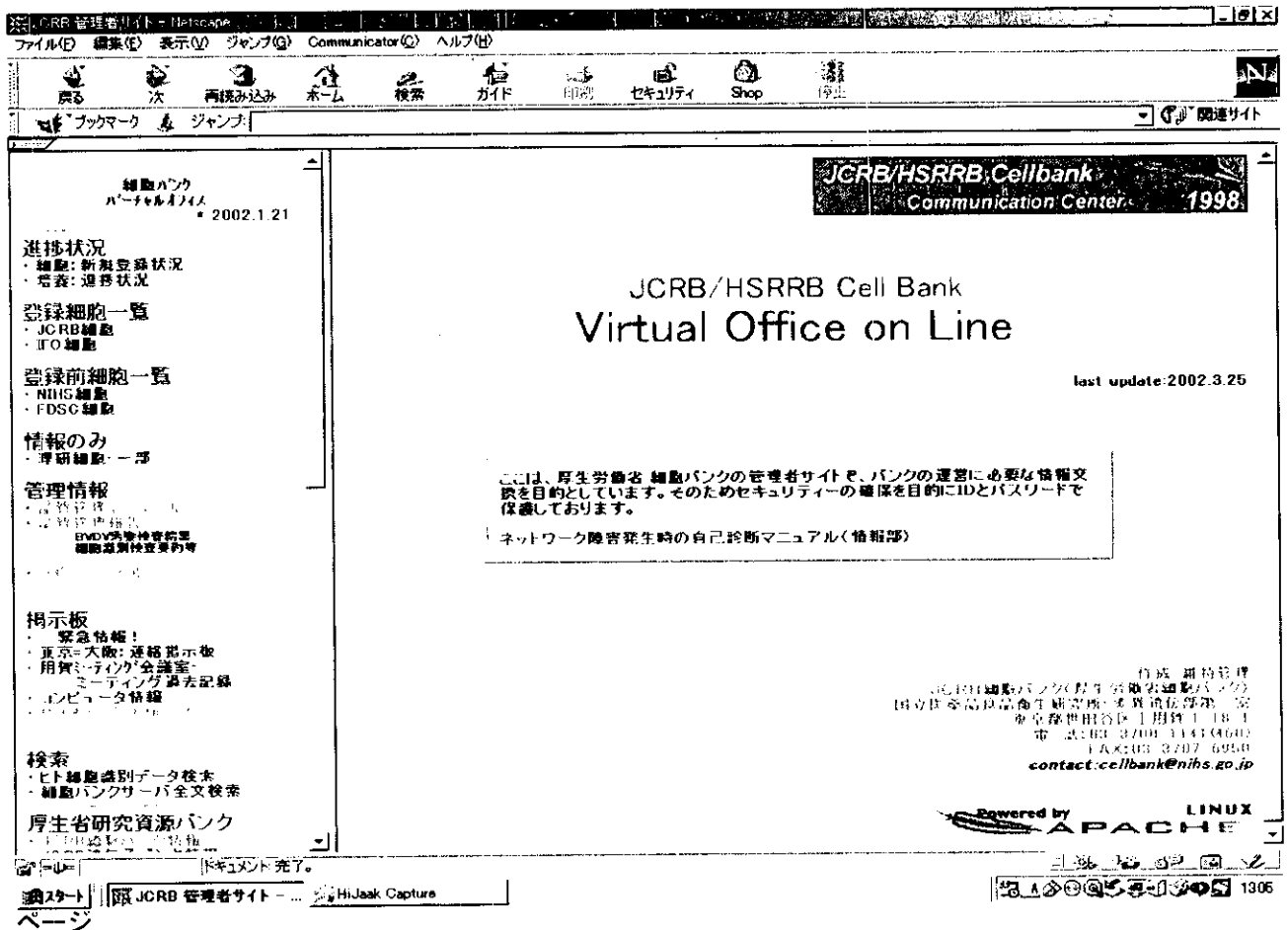
一方、近年生命科学の発展に基づいてヒトに由来する培養細胞が重要な研究資源として注目を集めるようになってきたが、同時にヒトの遺伝子配列が全て決定される事態となり、個人の遺伝的プライバシーの問題についての感心が高まり倫理的な課題が大きくクローズアップされることになってきた。倫理的な課題については別途検討しているところであるが、一般市民を対象にして、培養細胞に関する様々な情報を提供することも重要な課題として位置付けることが重要になってきたと言える。そこで、我々は、この細胞バンクサーバを通じて、培養細胞の情報を一般市民に対しても広く公開すると同時に、分かりやすく説明を加えるためのホームページを開設することにした。そのため、新たに Visiter Center というページを

作成し、情報を追加する作業を始めた。まだ開始したばかりなので、情報量は限られているが、今度整備をして行く計画である。

さらに、WWW上で利用できる様々なユーティリティソフトウェアがパブリックドメインとして安価に提供されるようになってきた。中でも掲示板ソフトウェアは、細胞バンクグループ内での情報の交換や作業連絡に大変利用価値が高いものであることが明らかになってきた。しかも、現在細胞バンク業務は、用賀の国立医薬品食品衛生研究所と大阪府泉南のヒューマンサイエンス研究資源バンクとに分かれて実施している。そのため相互の情報の交換と業務の連絡を迅速に実施することが大変重要な課題となってきた。そこで、今年度よりWWWサーバ上に細胞バンクバーチャルオフィス(図6)を開設して、相互の連絡がスムーズに実施できるようにした。ホームページのアドレスは秘匿し、パスワードで保護をかけているので一般利用者の侵入は許可していない。

ここでは、新規登録予定細胞に関する情報、連絡用掲示板などを設置し、日常的に情報の交換を行っている。

図6. 細胞バンク管理バーチャルオフィスのトップ



4. ヒト試料の研究利用に関する倫理的・法的・社会的枠組みについての研究

ヒトゲノムプロジェクトの進展に伴って、ヒトを研究する環境が整い、それに伴って、従来と異なった視点からヒト試料の研究利用が盛んになることが、欧米の事例から予想されたからである。そして、この動きは加速され、さらに病歴などの個人情報や、ヒト胎児やヒト胚の研究利用という新しい次元を加えつつ現在にいたっている。

当細胞バンクは旧厚生省におけるヒト由来研究資源バンクとして1985年に創設され、当初からパブリックドメインの確立を目指して活動をし、それを支えるシステムについて考え、出来る点については、提案し実行してきた。この実績を基に、21世紀的課題への準備を考えたときに、欧米やアジア諸国との競争を意識したときに、ヒト由来試料の研究資源化の枠組みについての検討が遅れていることが明らかとなり、1996年から検討を開始した。当初は日本組織培養学会の倫理問題検討委員会の活動へ協力することを主な活動とした。その後、その活動を核にして、法学、倫理学、社会学、マスコミ、企業など広い分野の人たちとの交流と意見交換、勉強会

を行ってきた。

この3年間の厚生労働省の努力によってヒト試料の研究利用に関する枠組みの一部は策定されてきた。しかし、これらの指針がヒト試料の研究利用に関する社会の認知を育成出来るかどうかについては、未だ未知数である。また、欧米の状況を見ると、政府だけでなく多くの団体がこの分野への意見を述べ、活発に議論されることによって、社会の中でのヒト由来研究資源の利用枠組みが出来あがっていくことが示されている。そして、厚生労働省細胞バンクはそのような活動を行える国内で少ない場所となっている。特に、日本における利用枠組みの検討が、法学、倫理学、社会学者という文科系の専門家たちを中心に行われてきたが、欧米に現状を見ると、研究経歴のある人材が文科系の専門家とともに協力しながら、全体の枠組みの制度設計とその位置付けについての議論にかかわっている。日本において、政府審議会等では医学生物学の専門家が参加しているが、枠組みの検討を主な課題としていない点で、対応が不十分で

ある。文科系の研究者が医学生物学研究の現状を理解すると同時に、理科系の研究者からも文科系の専門における議論を踏まえた意見の創出が不可欠となっている。倫理審査委員会において、科学と倫理の両面からと言われる状況を積極的に作り出す必要があるというのが、細胞バンクとしてヒト由来研究資源のフロントにかかわる実感であり、この問題に関して独自のスタンスでの研究活動を続けることは、不可欠であると考えている。

ヒト試料の研究利用に関する倫理的・法的・社会的枠組みについて研究することは、現在の新しい状況を記載する言葉を見つけて、それを表し、社会の理解を得て医学生物学研究の出来る環境を作るために不可欠な研究活動である。

このような研究の成果は見え難いものである。しかし、以下のような具体的成果が上がっている。

- 1) 厚生省初のこの種の指針となった1998年の黒川委員会報告作成の際して位置付けを整理した資料を提供したこと。
- 2) 日本組織培養学会倫理問題検討委員会の報告書の作成に協力。
- 3) 日本組織培養学会の大会等でのヒト由来研究資源利用に関するシンポジウムの企画と実行。平成14年度は胎児組織の研究利用に関するシンポジウムを企画実行。
- 4) 細胞バンク独自の勉強会の開催とその報告書の作成。
- 5) それらの活動で得られた資料をHPで提供。
- 6) 昨年末の細胞株競売事例では、マスコミへの適正な情報の提供と取材の受け入れによる対応によって、事例評価の適正化に寄与したと自負する。

D. 考察

細胞バンク事業は、多くの研究に対して質の良い研究材料を提供する公的な基盤組織として、わが国の研究基盤整備に不可欠な事業である。しかしながら、細胞を保存し提供するという点だけを近視眼的に眺めれば、特に難しい作業を伴うこともなく細胞を増やして発送するだけであると見られがちであるし、技術員が1-2名居れば運営できるであろうと語られることが多い。また、先端研究を目指す志の高い研究者が好んで参加を希望する研究組織でもない。

しかしながら、本研究報告書において、「結果」に

示したように、数多くの細胞がクロスコンタミネーションを起こしていた。この事実は、生命科学研究というものには多くの誤りもまた発生しうるものであることを示していると言えるであろう。そして、先端研究の現場に居る多くの研究者は、先端を突き進むことを強く強いられていることもあり、自らの誤りを検証しながら先を急ぐということが極めて困難な状況にある。

そのような中で、培養細胞を研究資源として扱うことが出来る細胞バンクは、収集した細胞を樹立者本人の利害から離れて客観的にその真偽等について検証することが出来る組織であると言える。そして、その判断は極めて注意深く行わなければならないということもまた極めて重要な視点であり、問題を発見した場合は1回の実験事実だけで判断することなく、樹立者に連絡を取って、再度同一サンプルでかつ誤りが無いはずだと信じる別の保存サンプルの提供を受けて、繰り返し実験を行う。その結果、同じ結果が出たものについて、始めてそのサンプルはクロスコンタミを起こしていたと結論するのである。

今回報告した16種の細胞のうち、15種まではこのようにしてクロスコンタミとして結論したわけであるが、NCC16の1種類については樹立者が、自らの保存細胞を調査しなおして最初のNCC16が誤りであるということを確認したものである。この細胞については、この後に再度寄託されNCC16-P11として登録しなおした。

さて、このような作業は確かに先端研究において新しいブレークスルーを目指すものには無いが、こうした誤りを放置したまま研究が進めば、必ずや先端研究の推進を脅かす存在にもなりうるものである。そして、先端研究によって生み出された最新の技術を取り入れることによって、より確実な結論を導き出せるものである。

今回報告したクロスコンタミネーションについては、1960年代から多く研究者によって疑問が提起され続けてきた問題である。しかし、最終的な決断については、どうしても下すことが出来なかった問題でもある。すなわち、異なる動物に由来する細胞については染色体の分析やアイソザイムの分析によって容易に区別が付きしたが、同一動物内の異なる個体に由来する細胞については、その指標となるマーカを得ることが不可能であったためである。グルコース6 磷酸脱水素酵素 (G6PD) のように人種によってごく稀に差のある酵素が発見された場合にはその区別が可能となり、それがHeLa細胞のクロスコンタミネーションの疑いと

なって問題が明らかになったわけであるが、同一人種に由来する細胞の場合には区別することは不可能であった。そのため、多くのクロスコンタミネーションという問題が発生しているであろうと予測する研究者は居たが、それを確認することは出来なかったのである。

しかし、1985年に英国のJeffreysらがDNAフィンガープリンティング法を報告して以来、DNA多型を調査すれば、そうした曖昧な疑問を解決できるであろうということが明らかになり、法医学分野での個人識別の要求も手伝って急速に進展したのである。我々も、1990年頃から、新たなプローブとなるDNA塩基配列を検索するなど、Jeffreysの方法を改良してDNAプロファイリングシステムを確立した。その時点でHeLaのクロスコンタミネーションでは無いかと疑われていた細胞がほぼ確実であることを確認すると共に、我々が収集した細胞の中に新たなクロスコンタミネーションが発生していた事実を明らかにした。しかし、残念ながら当時の技術は日常的な細胞の管理として採用することが困難であり検査出来なかった細胞も多かった。

しかし、ここ2-3年継続して実施しているSTR-PCR法は、その点で大変優れた方法であり、短時間で多くのサンプルをこなすことが出来ると同時に、得られるデータを標準化することが可能で、実験結果を容易にデータベース化することが可能であった。そのためチェックのためのプログラムをWWWのCGIとしてPerl言語により開発し迅速な判定を可能にした。これには2つの重要なポイントがある。1つは、新規に登録しようとしている細胞のクロスコンタミネーションを事前に確定できるようになったという点であるが、もう1つは、職員のミスも防止できるようになったという点である。このように誤りの無い細胞を確実に提供できる基盤が確立したということは極めて重要なことであると考えられる。

こうした点を踏まえて、新たな細胞の収集を継続しているが、これらの収集した細胞を登録する際にも、このSTR-PCR法により確認しながら作業を実施している。しかしながら、いかに迅速に確認できるとしても、実験が必要でありサンプルを得るための追加培養も必要である。さらに、マイコプラズマ汚染、染色体分析等のほかの品質管理実験も含めて多くの実験を伴うことから、新しい細胞の登録作業については一定の時間を必要とする。概ね、新規細胞を培養して登録するには、最短でも2ヶ月から3ヶ月程度の時間を必要とする。そ

のため、現在寝間50種程度の細胞を新規に登録する目標を立てているが、なかなか目標を達成することは難しいものである。今後とも、細胞バンクシステムをあらゆる点から点検し、迅速に仕事をこなすことが出来るシステムを構築してゆく必要があろう。

そうした点を考えると、コンピュータシステムを上手に利用することは大変重要であると思われる。厚生労働省細胞バンクが発足した1984年当時ATCCから様々な情報を得た。当時ATCCでは細胞に関する情報の記録を紙という媒体からコンピュータに移して間もない頃であった。また、現在のような小型コンピュータが普及していなかった時期であり、中型のいわゆるオフコンをUNIXで利用していた。しかし、当時はじめて本格的なビジネスに利用可能なIBM・PCが市販された直後で、我々はそれを利用することにした。当時はハードディスクの容量も40 Mbyteしかなく大変小さなものだったので、大容量のデータを扱うことは出来なかったが、文字情報のデータベース化は可能であった。その積極的な利用を心がけたかいてあって、現在の細胞バンク情報管理システムを構築することが出来るに至った。特に、この16年の間に画像データをデータベース化して利用者に容易に提供できるようにしたことは重要な点であったと思われる。また、基本的に事業開始当初のデータベース構造を維持していることから、能力の低いコンピュータシステムを暫時改善して能力を高めることが極めて容易に出来たことは重要である。無駄な経費を使わずに済んだということ、新たな機能を追加的に追加できたことなど、多くのメリットがあったように思われる。

そして、培養細胞情報を早期にデータベース化したことによって、データの再入力というような無駄な手間を省くことができたことも業務を効率良く推進することに役立った。

倫理問題については、多くのヒトに由来する試料を扱うこと、ならびにそれを多くの研究者に提供する立場から慎重に考える必要があると考えている。現在政府のガイドラインが示されているが、それを参考にしつつ、それだけで十分であるのか否かについて継続的に検討を加える必要がある。そのために、我々は倫理問題を細胞バンクにおける研究課題の一つとして位置付けることとした。現時点では、アメリカ、ヨーロッパにおける各国の資料の収集を中心に実施しているが、ヒト細胞の個別識別実験から、個人情報の問題が発生する可能性が出てきていることもあり、研究資料の取