

厚生労働科学研究費補助金
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

平成14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
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1
03-3700-1141(460)
e-mail:mizusawa@nihs.go.jp
URL:http://cellbank.nihs.go.jp/

平成15年4月10日

課題番号：H12-ゲノム-012

目 次

I 総括研究報告書

細胞培養と保存管理、品質管理作業・システム構築、細胞バンク情報管理システム 水澤 博 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	3
--	---

II 分担研究報告書

ヒト遺伝性疾患細胞 立花 章 京都大学放射線生物研究センター 助教授	24
ヒト正常2倍体細胞 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	29
体性幹細胞作成 安本 茂 神奈川県立がんセンター臨床研究所 研究課長	36
ヒト正常細胞・不死化細胞 難波正義 岡山大学医学部 客員研究員	40
血清由来ペステイウイルス検出系 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	44
ヒト株化細胞・がん細胞 竹内昌男 ヒューマンサイエンス研究資源バンク 所長	47
各種動物細胞 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	53

H12-ゲノム-012

2002年度厚生労働省科学研究費補助金（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

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

研究要旨

本研究班は、研究基盤の整備を目的に、培養細胞の収集、保存、培養、品質管理、分譲に関連する様々な研究を総合的に実施している。1984年の設立以来これまでに、培養細胞の品質管理体制を確立してきたが、さらに新しい手法を導入してより精緻な実験手法の確立をめざして研究を進めている。さらに、近年は情報環境が整備されてきたことに伴って細胞バンクで生み出された様々な情報を公開するためのシステムの整備も実施している。さらに、ヒト培養細胞を扱うことから倫理問題についても独自の検討を加えている。なお、今期の研究班では、細胞の収集を積極的に進め、年間約50種の培養細胞の収集を目標として、ヒトに由来する細胞の収集を重点的に進めた。

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
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	東京大学医学部動物実験施設	助教授
難波正義	岡山大学医学部	客員研究員
安本 茂	神奈川県立がんセンター	研究第二科長
田中憲穂	食品薬品安全センター-秦野研究所	副部長

組織の創薬研究資源化に関する研究班(HS財団)で重点的に取り組んでいる。

B. 研究方法

本研究班では上記4課題に整理して研究を実施している。研究方法はそれぞれの課題で異なるので、ここでは研究方法の概略を示すに留める。詳細は、各研究結果の中に述べる。

A. 研究目的

本研究班は、我が国の医学・創薬などに関する研究を積極的に支援するための培養細胞研究資源基盤の総合的な整備を目的としており、我々が重点的に取り組んだ課題は次のとおりである。

- ① 研究用培養細胞の収集と樹立に関する研究
- ② 細胞の品質を高度に維持するための各種品質管理手法の開発研究とその成果を活用した細胞バンクの品質管理体制の確立に関する研究
- ③ 細胞バンクを長期間安定に維持するための各種情報システムの継続的開発と維持のための研究
- ④ ヒト細胞を研究資源として収集することに伴う倫理問題に関する研究

なお、④の課題については、本研究班においても取り組んでいるが、主には林真国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部部長を主任研究者とするヒト

①細胞の樹立と収集に関する研究は、細胞の培養を主な研究方法として用いている。新たな細胞の樹立に関しては、遺伝子の組換えや導入・選択手法が近年主要な研究方法として用いられている。特に、分裂寿命により無限増殖不可能な細胞について、それを無限増殖するように操作することは重要な課題となった。そのためには遺伝子導入等の実験手法が積極的に利用された。これらの研究は分担研究者を中心に進められた。

②品質管理に関連する研究においては、細胞培養に加えて混入ウイルスを検出するためのPCR実験手法や、細胞の識別を行うためのSTR-PCR法による遺伝子DNAの分析、核型分析法による染色体構造の分析に加えて2DFISH法や3DFISH法などの新しい染色体分析手法を取り入れた研究を開始している。

③情報システムの継続的開発に関しては、各種プログ

ラム言語を用いたコンピュータプログラムの開発が主な研究手法である。また、ここでは細胞バンク内での各作業担当者間の情報のやりとりをスムーズに行い作業効率を上げることを目的とした業務支援プログラムシステムの改良と、細胞株情報や品質管理情報を広く研究者や一般社会に対して公開するためのWEBサーバの構築に関する開発研究の2つに大きく分類できる。前者は主にDelphiを開発言語としたが、後者はPerl、PHP、HTML等を開発言語として用いた。

- ④研究倫理に関する調査研究については、文献調査ならびに聞き取りなどインタビュー調査を主に使用している。収集した資料の整理保存し、必要に応じてHTML書式に変換してホームページへの掲載を実施した。

(倫理面への配慮)

倫理面については、ヒト細胞を扱うことを前提にした当バンクの活動として重要課題に位置付けている。2000年に公布された3省合同ガイドラインを遵守し、収集ヒト培養細胞に関する情報を当所倫理委員会に提出し、その審査を受けた。また、海外の事情に関する独自の調査研究を実施するとともに法律関係、倫理関係、社会学関係の有識者らと交流を持ち多方面からの検討を実施している。また、収集した資料や検討した内容については、ホームページへの掲載を通じて国民の理解を得られるよう努力を行なっている。

C. 研究結果

① 研究用培養細胞の収集と樹立に関する研究

a) 細胞の収集

本研究班では、国立医薬品衛生研究所と分担研究者により、2000年度から2002年度の3年間で約150種の細胞を収集して公開することを目標とした(年間50種)が、2002年度2月20日現在、約170種の細胞を収集した。このうち、138種類の細胞については品質管理を完了して分譲用細胞としての公開を完了した。これらについては種アンプル(各30本づつ)を保存すると共に、分譲用アンプル(各40本づつ)をヒューマンサイエンス研究資源バンク(大阪)に送付して分譲体制を確立した(JCRB株)。この138種の細胞の内訳は、ヒト細胞株99種類、

マウス細胞株10種類、ラット細胞株25種類、チャイニーズハムスター細胞株2種類、ウサギ細胞株1種類、ウシ細胞株1種類である(竹内、難波、田中、安本、立花、木村)(表1)。

これら138種類の細胞株とは別に、平成2002年度よりスタートしたファーマコシューティカルコンソーシアム(PSC)のプロジェクトとして樹立されたヒトDNA解析に用いるリファレンス用EBVトランスフォーム正常ヒト血液細胞株についての寄託依頼があり、これを受入れることにした(竹内)。全部で約1000種類の細胞の寄託が予定されているが、2002年度末までに500種類(500名ぶん)の受入を完了した。この受入にあたっては、当該研究所の倫理委員会、ヒューマンサイエンス研究資源バンク倫理委員会、樹立者である東京女子医大の倫理委員会のそれぞれが独立して審査を行い、全ての倫理委員会の承認を受けた後に寄託作業を開始した。これらの細胞については、ガイドラインの規定により、匿名・非連結化を実施した後に寄託され、平成15年2月末までに500株の受入が完了した(PSC株)。また、これらの細胞に関する情報については年齢と性別のみを当細胞バンクが保持することとし、これ以外の情報については樹立した東京女子医大にて管理することとした。また、個々の細胞を同定識別するためのSTR-PCR実験は、当面行なわないこととした。ただし、これについては問題が残るので、今後の検討課題としたい。

さらに、2001年には財団法人発酵研究所がヒト培養細胞保存事業を停止したのに伴い、発酵研究所で保存管理していた細胞のうち当バンクと重複していない細胞株195種類を受入れた(IFO株、竹内)。この細胞株については、先に述べた当研究班における収集の目標数値には含まない。

当研究班としての細胞株の収集についてはヒト細胞株を重点的に収集したが、その主なものはガン細胞が中心であった。2000年にはヒトゲノムプロジェクトが一段落し、ほぼ解読が完了したことによって、各種難病に関する遺伝子の所在や機能を研究する基盤が構築された。そうした状況にもなって、各種疾病の原因になる遺伝子の探索研究や、正常遺伝子の同定に関する研究に興味を向いており、今後正常ヒト細胞ならびに遺伝性疾患を伴うヒト細胞の需要が増加するものと思われる。そうした状況に鑑み、正常ヒト細胞の樹立と収集

に力を入れた(木村、立花、難波、安本)。しかし、ヒトの正常組織由来の細胞は分裂能力に限界があり、一定回数分裂を経るとそれ以上の分裂能力を急速に失う。そこで、hTERTやSV40遺伝子を持つレトロウイルスベクターを利用した形質転換を起こさせて無限分裂能を獲得した細胞も10種類ほど樹立した(木村、立花)。これらの細胞については来年度品質管理を実施して公開する予定である。

なお、ヒト正常細胞、遺伝性疾患患者由来細胞に関するプライマリ細胞の維持管理については、維持管理条件並びに送付条件が他の株化細胞と異なるため独自の管理を実施し、研究者への送付も独自に行っている。各年度年においてそれぞれ20数件ずつの送付を実施した(木村、立花)。

当該年度の細胞の収集を含め、ここ数年来問題になってきたことだが、ヒトに由来する培養細胞の研究資源としての役割は極めて大きくなりつつある。それに伴い、社会的関心も高まると同時に、個人の細胞が研究に利用されていることへの懸念も拡大しつつある。特に、ヒトゲノムの全塩基配列が明らかになるとともに、究極の情報とも言えるヒトの健康にかかわる個人情報と本人と関係無いところで明らかにされて生活上の不利益を蒙る可能性についての懸念が急速に拡大している。こうした懸念をなくし、多くの国民の利益となるような形での研究の推進が現在求められているところである。そのため、2000年には生命科学研究に関する国の機関が合同して遺伝子解析を念頭に置いた倫理ガイドライン(3省合同)が作成された。我々は、そのガイドラインを遵守しての細胞バンクの運営について、独自の調査研究を進めている。特に、この分野では最も進んでいると考えられている英国の例についての調査を進めている。また、そうした実績に基づいて現在国立医薬品食品衛生研究所における倫理委員会事務局の機能を担当して活動している。

表1. 2000年-2002年に収集した細胞の数と内訳

収集細胞株	種類数
ヒト細胞株	99種類
マウス細胞株	10種類
ラット細胞株	25種類
チャイニーズハムスター細胞株	2種類
ウサギ細胞株	1種類
ウシ細胞株	1種類
合計	138種類

内訳

(2003/03/19作成)

(細胞登録管理テーブル出力 Sorted by JCRB Number)

細胞番号	細胞名	動物名	登録状況
JCRB0129.1	RCR-1	rat	登録完了
JCRB0132.1	AH601	rat	登録完了
JCRB0145	MEB 5	mouse	登録完了
JCRB0146	MLMA	human	登録完了
JCRB0149	Bhas 42	mouse	登録完了
JCRB0152.1	M	rat	登録完了
JCRB0152.2	M. P3	rat	登録完了
JCRB0153.1	tsJT663	rat	登録完了
JCRB0153.2	tsJT16	rat	登録完了
JCRB0153.3	tsJT60	rat	登録完了
JCRB0155	NM-1	bovine	登録完了
JCRB0156	KHYG-1	human	登録完了
JCRB0157	TK	human	登録完了
JCRB0158.0	MY	human	登録完了
JCRB0158.1	MY-M12	human	登録完了
JCRB0158.2	MY-M13	human	登録完了
JCRB0159	SLVL	human	登録完了
JCRB0160	LI90	human	登録完了
JCRB0163	HL60(S)	human	登録完了
JCRB0164	HTC/C3	human	登録完了
JCRB0165	KHM-10B	human	登録完了
JCRB0166	HMC-1-8	human	登録完了
JCRB0167	RCN-9	rat	登録完了
JCRB0168	c-WRT-7-LR	rat	登録完了
JCRB0169	Lu-134-B	human	登録完了
JCRB0170	Lu-135	human	登録完了
JCRB0171	SKG-II	human	登録完了
JCRB0172	RMG-I	human	登録完了
JCRB0172.1	RMG-II	human	登録完了
JCRB0173	SKN	human	登録完了
JCRB0174.0	NCC16-P11	human	登録完了
JCRB0175	SNG-II	human	登録完了
JCRB0176	RKN	human	登録完了
JCRB0177.0	KP-1N	human	登録完了
JCRB0177.1	KP-1NL	human	登録完了
JCRB0178.0	KP-3	human	登録完了
JCRB0178.1	KP-3L	human	登録完了
JCRB0179	SNG-M	human	登録完了
JCRB0180	GAK	human	登録完了
JCRB0181	KP-2	human	登録完了
JCRB0182	KP-4	human	登録完了
JCRB0183	QGP-1	human	登録完了
JCRB0186	OV3121ras4	mouse	登録完了
JCRB0187	OV3121ras7	mouse	登録完了
JCRB0188	KYSE-30	human	登録完了
JCRB0189	KYSE-50	human	登録完了
JCRB0190	KYSE-70	human	登録完了
JCRB0191	OCUG-1	human	登録完了

JCRB0192	OCUM-1	human	登録完了	JCRB1019	RERF-LC-Sq1	human	登録完了
JCRB0193	WB-F344	rat	登録完了	JCRB1020	RERF-LC-Ad1	human	登録完了
JCRB0194	KON	human	登録完了	JCRB1021	RERF-LC-Ad2	human	登録完了
JCRB0195	RP-1	mouse	登録完了	JCRB1022	OUMS-23	human	登録完了
JCRB0196	RP-3	mouse	登録完了	JCRB1024	Kasumi-6	human	作成中
JCRB0197	OSC-20	human	登録完了	JCRB1026	OV3121	mouse	登録完了
JCRB0198	OSC-19	human	登録完了	JCRB1027	SAT	human	登録完了
JCRB0199	huH-1	human	登録完了	JCRB1029	JHH-5	human	登録完了
JCRB0200	KMLS-1	human	登録完了	JCRB1030	JHH-6	human	登録完了
JCRB0232	SKG-IIIa	human	登録完了	JCRB1031	JHH-7	human	登録完了
JCRB0232. 1	SKG-IIIb	human	登録完了	JCRB1032	OZ	human	作成中
JCRB0506. 1	SVts-8	human	登録完了	JCRB1033	NOZ	human	登録完了
JCRB0533	TIG-112	human	登録完了	JCRB1034	OUS-11	human	登録完了
JCRB0534	TIG-114	human	登録完了	JCRB1035	HSC-41	human	作成中
JCRB0535	TIG-118	human	登録完了	JCRB1036	HSC-42	human	作成中
JCRB0536	TIG-121	human	登録完了	JCRB1037	HCC-56	human	作成中
JCRB0537	TIG-108	human	登録完了	JCRB1038	PH61-N	human	作成中
JCRB0538	TIG-109	human	登録完了	JCRB1039	SKN-3	human	作成中
JCRB0648	L. P3	mouse	登録完了	JCRB1040	FF101	rat	作成中
JCRB0649	HeLa. P3	human	登録完了	JCRB9126	BS-C-1	AGM	登録完了
JCRB0709. 1	L5178Y TK	mouse	登録完了	JCRB9127	COS-7	AGM	登録完了
JCRB1001. 1	MS-653-A	rat	登録完了	JCRB9128	Mv 1 Lu	mink	登録完了
JCRB1001. 2	MS-653-G	rat	登録完了	JCRB9129	BCE C/D-1b	bovine	登録完了
JCRB1002	K562/ADM	human	登録完了	JCRB9130	DT40	chicken	登録完了
JCRB1003	Kasumi-1	human	作成中				
JCRB1004	Kasumi-3	human	作成中				
JCRB1005	NCC-IT-A3	human	登録完了				
JCRB1006. 0	OUMS-36	human	登録完了				
JCRB1006. 1	OUMS-36T-1	human	登録完了				
JCRB1006. 1F	OUMS-36T-1F	human	作成中				
JCRB1006. 2	OUMS-36T-2	human	作成中				
JCRB1006. 2F	OUMS-36T-2F	human	作成中				
JCRB1006. 3	OUMS-36T-3	human	作成中				
JCRB1006. 3F	OUMS-36T-3F	human	作成中				
JCRB1006. 4	OUMS-36T-4	human	作成中				
JCRB1006. 4F	OUMS-36T-4F	human	作成中				
JCRB1006. 5	OUMS-36T-5	human	作成中				
JCRB1006. 5F	OUMS-36T-5F	human	作成中				
JCRB1006. 6	OUMS-36T-6	human	作成中				
JCRB1006. 6F	OUMS-36T-6F	human	作成中				
JCRB1006. 7	OUMS-36T-7	human	作成中				
JCRB1006. 7F	OUMS-36T-7F	human	作成中				
JCRB1006. 8	OUMS-36T-8	human	作成中				
JCRB1006. 8F	OUMS-36T-8F	human	作成中				
JCRB1007	KMRC-5	human	作成中				
JCRB1008	HFb16d	human	登録完了				
JCRB1009	RERF-GC-1B	human	登録完了				
JCRB1010	KMRC-1	human	登録完了				
JCRB1011	KMRC-2	human	登録完了				
JCRB1012	KMRC-3	human	登録完了				
JCRB1013	KA-S1	human	登録完了				
JCRB1014	KMRM-M1	human	登録完了				
JCRB1015	HSC-1	human	登録完了				
JCRB1016	HSC-5	human	登録完了				
JCRB1017	HKA-1	human	登録完了				
JCRB1018	HMV-1	human	登録完了				

- 注1: 本リストは、細胞バンク管理データベースより今期入手細胞の一覧表として一括出力した。
- 注2: 一番右のカラムの登録状況の欄は、この表を出力した日付けにおける細胞の状態を示している。登録完了は、全ての品質管理実験を完了して既に分譲用アンプルを作成して分譲を開始していることを示している。作成中は、現在品質管理実験もしくは分譲用アンプルの作成を行っていることを示している。
- 注3: 収集した細胞のうち、まだ作業に入っていない細胞は、JCRBの記号は付けず、NIHSあるいはHSRB記号で管理して、この一覧表には掲載していない。今期におけるこのような細胞は当該報告書作成の時点で約30種類となっている。

収集した細胞については、別項に詳細な方法や実験結果を示したとおり、全ての細胞を対象に品質管理を実施した。細胞バンクは、収集した細胞を多くの研究者に提供し、それらの研究者によって成される先端的研究等を支援することを目的としているので、誤った細胞株や汚染のある細胞を排除して提供する責任がある。そのため、収集した細胞については全てを対象に実験的に基づいた検証を通じて、汚染や誤謬が無いことを確認してから細胞バンクに登録して研究者に公開した。なお、マイコプラズマ汚染については、必ずMC210によって完全に除去して、除去処理後3ヶ月間は連続培養を実施しても再び陽性に転じることが無いことを確認し、これを陰性と記載して細胞の分譲体制を確立した。

b) 細胞の管理における品質管理の現状

今期の品質管理は、次の2つを重点とした。

1番目の課題は培養細胞へのマイコプラズマ汚染並びにウイルス汚染を排除する課題である。我が国では、培養細胞を使った研究が比較的多いにもかかわらずマイコプラズマによる汚染が多いとかねてより諸外国から指摘されていた。そのため、当該細胞バンクにおいては、収集した細胞の全てについて、VERO細胞を指標とした蛍光染色法とPCR法の2つの方法によってマイコプラズマ汚染の有無を検査し、汚染が無いことを確認すると共に、汚染があった場合にはキノロン系試薬であるMC210を使用して除去した後再び汚染が出現しないことを確認してから分譲体制を確立している。新規細胞を入手した場合の汚染率については現在では以前に比べると減少してきており、およそ10%強となってきた。

汚染の問題については、マイコプラズマの問題と同時に、ウイルスによる汚染の問題もあるが、特殊な実験技法等が要求されることもあって、現在のところ人材が不足しているためにこの対策は取っていない。この点は海外の細胞バンクに比べて著しく劣っている部分であり、今後改善が望まれるが、研究者レベルの人材を確保せずに実施することは現実には不可能である。このような中でも、マイコプラズマ汚染検出系の開発の延長線上で実施可能であった血清に由来するペスティウイ

ルスについては分担研究者の原澤らがその検出系の開発を実施してきた。民間の検査会社がこの実験系を利用した検査業務を実施しているため外部委託で、一部の細胞と新規に購入する培養用ウシ血清については検査を実施している。

培養に使用する血清に由来して汚染が広がるのが懸念されているウシ嘔吐病ウイルス(BVDV)の混入の有無についての検査を実施している。

品質管理の2番目の課題は、ヒト細胞相互間で発生するクロスコンタミネーションの課題である。かつて1960年代にアメリカにおいて新規に樹立された数多くのヒト細胞が実はHeLa細胞のクロスコンタミネーションであるという指摘が発表され学会が騒然とした経験を我々は知っている。当初は細胞を樹立した研究者によって大いに反発された研究発表であったが事態を重視したアメリカの細胞バンクであるATCC(American Type Culture Collection)では、染色体とアイソエンザイムについての詳細な検討を実施した。その結果、HeLa細胞には特徴的な4つのマーカー染色体があることを確認して、これとアイソエンザイムG6PD(グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ)の移動速度を詳細に分析した結果を総合して、確かに新しく樹立された多くのヒト細胞がHeLa細胞であることを確認した。現在では、この経験を踏まえて、新規に樹立された細胞についてはG6PDと染色体を確認することが新規樹立細胞へのHeLa細胞の混入を防止するために最低限実施する検査項目であることが世界各国の細胞バンクの共通認識となっており、我々も、収集した全ての細胞についてこの検査を実施している。

しかし、この方法はHeLa細胞がクロスコンタミした場合のみ検出することが出来るのであり、他のヒト細胞相互間のクロスコンタミネーションを検出するわけではない。そのため、HeLa以外の細胞におけるクロスコンタミネーションに対する疑問は依然として残っていた。しかし、1985年に英国のJeffreysらがDNAフィンガープリント法を開発して以後、この問題への解決に道が開かれることとなった。これに端を発したその後の研究を通じて、現在ではSTR-PCR法が確立され、これによってヒト細胞に関する相互のクロスコンタミネーションの有無を確認する手段が確立した。

我々は、先のG6PDと染色体検査に加えて、このSTR-PCR法を利用したクロスコンタミネーション検

査を実施する体制を2000年までに確立した。この実験体制を確立すると同時に、実験データをデータベース化して、クロスコンタミネーションの有無を迅速に同定するためのコンピュータプログラムシステムも開発し、細胞バンクのホームページを通じて広く公開した。これにより利用者は当バンクから提供されているヒト細胞のクロスコンタミネーションの状況を直接確認することが出来るようになった。現在までに収集した500種類ほどのヒト培養細胞のうち約400種に関する検査を終了し、この時点で16種の細胞についてクロスコンタミネーションがあることを発見した。我々が確認したクロスコンタミネーションを起こしていた細胞の一覧表を次に示す(表2)。

表 2

誤っていた細胞	正しい細胞	評価値	コメント
		(a)	
JCRB0092: P39 TSU	JCRB0085: HL60	0.933	注意喚起(b)
JCRB0127: KOSC-3	JCRB0625: Ca9-22	1.000	注意喚起
JCRB0128: TK-1	IF050288: U-251 MG	1.000	注意喚起
JCRB0128: TK-1	RCB0461: U251(c)	0.966	U373-MG, SNB-19
JCRB0142: NCC16	JCRB0141: PHK16-0b	1.000	登録削除
JCRB0253: MKN28	JCRB0255: MKN74	1.000	登録抹消
JCRB0604: PSV811	JCRB9017: WI38	0.923	注意喚起
JCRB0744: ECV304	JCRB0711: T24	0.917	注意喚起
NIHS0231: HuL-1	JCRB9004: HeLa	0.933	登録中止
NIHS0244: K051	JCRB0019: K-562	1.000	登録中止
NIHS0056: JHH-1	—	—	誤謬防止
NIHS0267: TMH-1	NIHS0270: IHH-4	0.966	登録中止
JCRB0073: J-111	JCRB9004: HeLa	1.000	歴史的に既知
JCRB9027: KB	JCRB9004: HeLa	1.000	歴史的に既知
JCRB9066: Chang	JCRB9004: HeLa	0.968	歴史的に既知
	Liver		
JCRB0710: EJ-1	JCRB0711: T24	1.000	歴史的に既知

(a) 評価値(EV)はSTR-PCR実験のデータを使って2種の細胞を比較した計算結果。EV=1.000は完全に一致したことを示し、EV=0.000はまったく一致しなかったことを示す。経験的にEV=0.850以上の場合にクロスコンタミネーションの危険性が高いことが400種類のヒト細胞の分析から得られている。

(b) 表において『注意喚起』とは、現時点ではクロスコンタミネーションがあると明記して分譲することである。将来登録を抹消する予定である。

(c) U251については、U373-MG, SNB-19等広範なく

ロスコンタミがある旨ATCCにより報告された。

細胞の情報を公開する際には、これらの検査結果を踏まえて、問題があることを明記すると共に、必要に応じて登録を抹消する手続きも行うものとする。現在既に公開している全ての細胞に関する調査が完了した後は、今後入手する全てのヒト細胞を対象に事前検査を実施し、登録前に確認する体制を確立することを目指している。

② 品質管理手法の開発と品質管理体制の確立に関する研究

a. マイコプラズマ汚染除去手法の検討

1999年度までの当該研究班に比べて、今期の研究班による細胞の収集量は大幅に拡大したが、それに伴い細胞の汚染や相互混入(クロスコンタミネーション)の問題の多発が懸念された。細胞の汚染の問題とクロスコンタミネーションの問題は、細胞バンクの運営上極めて重要な問題であると位置付け、当該研究班にはその専門家が加わり継続した研究を実施している。これまでにマイコプラズマ汚染の高感度検出の開発などいくつか見るべき成果をあげてきたが、今期は動物系ウイルスの混入、及びそれ以外の汚染微生物を検出した(原澤)。さらに、マイコプラズマ汚染が認められた場合の除染の効率について検討した。

日常的に実施される細胞を登録する作業としての培養作業の中でマイコプラズマ汚染の実態調査を実施しているが、新たに寄託された細胞におけるマイコプラズマ汚染率は細胞バンク開始初期に比べると減少しており、最近ではおよそ10%程度であった。細胞バンクでは、ホームページや論文を通じてマイコプラズマ汚染は無くすべきであるし、無くすることが可能であるということを啓蒙的に述べてきたが、その効果が徐々に浸透しつつあると考えられる。

今期の研究班発足以前に収集したものも含めて、今期約30種類の細胞についてマイコプラズマによる汚染を認めたが、そのほとんどはキノロン系薬剤であるMC210処理によって除去することが出来た。2種についてはMC210で除去できなかったものがあつたので、これについてはBMcycline1とBMcycline2を試用した。その結果、今期に検出した全てのマイコプラズマ汚染についてその除去に

成功した。

この際、マイコプラズマを除去するためのMC210処理について若干の工夫を行った。

以前より指摘されていた問題であったが、MC210処理は、メーカーである大日本製薬からの指示として0.5ug/mlの終濃度で1継代処理が適切であるとされていた。しかし、この濃度と期間の組み合わせでは、マイコプラズマが十分に除去できていないという問題が度々指摘されていたし、我々もそれを確認していた。特に問題は、処理後マイコプラズマが確かに検出されなくなるということについては十分に確認出来るのであるが、その後継代培養を続けると数週間の培養のうちいつの間にか出現してきてしまうということが時々報告されていた点である。恐らく、この処方ではほとんどのマイコプラズマは除去できるのであるが、ごくわずかに生き残るものがあり、培養の継続を通じてそれが広がるという点に問題があるのだろうと推定した。したがって、最初に十分に除去することが重要であろうと考えたのである。恐らく、0.5ug/ml、1継代処理が不十分な処理であると思われた。

そこで、MC210による処理時間を延長することによって除去を確実にすることを試み、除去処理後3ヶ月間の連続培養によって再出現の有無を確認することとした。

方法としては、通常の培養時に使用する培地にMC210を添加するというだけという簡単な方法であるが、MC210の濃度を上げずに、処理期間を延長することによって、細胞への影響を極力抑制しようと考えた。

結果は、表2に示したように、極めて効果的で

あった。MC210処理によって一度マイコプラズマが陰性となった細胞については、その後の3ヶ月にわたる継続培養によっても、再出現したものは皆無であった。この結果から今回試みたように、0.5ug/mlのMC210処理を3継代続ける処理は極めて有効であることを確認した。但し、2例においてはMC210のみでは不完全な除去しか出来なかったために、BMサイクリンを併用した。この2例については、マイコプラズマ種の同定を試みたがまだ確認していない。

なお、この表には1継代期間のMC210処理による結果を示していないので厳密な意味での対象実験は示されていないことになるが、これまでの細胞バンクのマイコプラズマ除去作業の中で1継代期間のMC210処理を実施した場合には、何度も十分な除去が出来なかったという経験を持っているので、今回はあえて表に示すことはしなかった。

なお、マイコプラズマの検査については、VERO細胞を指標細胞としたHoechst33258による蛍光染色法(国際的な標準手法)と、原澤によって開発されたネスティッドPCR法によるマイコプラズマ遺伝子の増幅法による2法を併用して実施することを当細胞バンクとしての標準的な検査法として採用し、両法による結果が異なった場合には、再検査あるいは再除去を実施しているため、汚染の有無については確実に捕捉できていると考えている。なお、表2に示した除去実験においては、MC210処理後BMサイクリンと記載されているもの以外は両方共に陰性となり、結果に齟齬が生じたものは無かった。

表2. マイコプラズマ除染・再検出実験結果

細胞番号	細胞名	ロット番号	汚染	処理	処理後の時間(月*4)				>3
					処理直後	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	
JCRB0127	KOSC-3	042198	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0132.2	AH-601.P3	031799	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0133	KHM-1B	020199	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0139	TASK-1	090399	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0152.2	M.P3	09212000	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0177.0	KP-1N	08072002	+	MC210+BM-cycline1(*2)	-	-	-	-	NT
JCRB0178.1	KP-3L	07132001	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0401	HuH-6 Clone5	11202000	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0418	d-RLN-4	111398	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0432	KMS-6	032398	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0622	HSC-2	122198	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0623	HSC-3	102198	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB0625	Ca9-22	090798	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB1005	NCC-1T-A3	07122002	+	MC210(*1)	-	-	-	-	-

JCRB1006.0	OUMS-36	04092002	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCRB1015	HSC-1	09062002	+	MC210(*1)	-	-	-	-	-
JCRB1016	HSC-5	08302002	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
JCR81022	OUMS-23	09102002	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
NIHS0056	JHH-1(4*)	071888	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
NIHS0181	RL-33	100598	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
NIHS0189	L-alpha	021098	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
NIHS0189	L-alpha	032698	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
NIHS0194	KHM-5M	111899	+	MC210(*1)	-	NT	NT	-	NT
NHS0195	KHM-10B	08252000	+	MC210(*1)	-	NT	-	-	NT
NIHS0251	HKA-1	02152002	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
NIHS0252	HMY-1	03222002	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
NIHS0274.0	KP-1N	03202002	+	BM-cycline(*3)	-	-	-	-	NT
NIHS0274.1	KP-1NL	10192001	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
NIHS0291.4	OUMS-36T-4	07192002	+	MC210(*1)	-	-	-	NT	NT
NIHS0291.4S	OUMS-36T-4F	07032002	+	MC210(*1)	-	-	-	-	NT
NIHS0291.8S	OUMS-36T-8F	08062002	+	MC210(*1)	-	-	-	NT	NT

*1 MC210 処理は、試薬の使用説明には0.5ug/mlで1週間と指示されているが、これで除去されないことが多いので、終濃度0.5ug/mlで3週間行なった。ほとんどの細胞は1週間で継代するので、その都度新鮮なMC210を添加することになる。

*2 MC210のみでは除染が出来なかったので、BM-cycline1と併用して3週間処理した。

*3 MC210のみでは所線が出来なかったので、BM-cycline1とBM-cycline2を併用して3週間処理した。

*4 薬剤処理後マイコプラズマが検出されなくなったことを確認し、その後さらに3ヶ月以上継代培養を連続3ヶ月以上実施し、1ヶ月おきにマイコプラズマが再検出されるかどうか検討した。マイコプラズマの検査はHoechst33258による蛍光染色とPCR法を併用し、いずれも陰性であった場合に「-」とした。

*5 NTは検査省略

これらの検査は、細胞バンクとしての細胞の登録作業の際に実施しているものであって、除去の効率を目的とした独立した実験として実施しているものではない。そのため、厳密に言えば、MC210処理を1継代期間にとったコントロール実験は実施していない。しかし、細胞バンクとしてこれまで何度も除去を試みた結果から、30例全てにおいて3ヶ月継代培養後にもマイコプラズマが一例も検出されないということは明らかに注目すべき結果である。

ただ、一つ問題が指摘される点は、メーカ指定の処理期間より長くしたことが細胞の性質を変えることにはならないかという問題である。かつて、MC210と類似の試薬としてMC110という試薬が同社より提供され、除去の試みを実施したことがあった。その際、比較的低濃度においても4倍体等の染色体居所が比較的容易に得られてしまったことがあり、このMC210はそのような遺伝毒性を改良した試薬である。今回は、まだ全ての細胞を確認してはいないが、簡単な染色体の観察では、染色体異常は検出されていないが、今後さらに注意して染色体の観察を継続する必要があるが、今のところこの

処理法が重大な影響をもたらすとは考えられないと思われる。

b) 細胞間のクロスコンタミネーションの検出

1999年より当JCRB細胞バンクではヒト細胞相互のクロスカルチャーコンタミネーションを検査する目的でSTR-PCR実験系を導入して検査を開始した。細胞の収集の項で紹介したように、かつてHeLa細胞のクロスコンタミネーションが大いに話題となった経緯を心配してのことであった。

分子生物学研究において多用される大腸菌、サルモネラ菌、枯草菌などは、菌株に様々な栄養要求性を導入して個々の菌株を個別に識別できることが常識とされている。これは、いかなる実験においても誤謬というものは必ず発生するという前提があるため、誤謬を避けるためには、実験の前後において必ず菌株の遺伝的性質を確認して、誤りが無かったことを確認できなければならないという考えに基づいている。実際、自らの実験においても身近なところで実験をしていた研究者においても、実験に利用した菌株を間違えてしまったという経験は一度や二度は誰でも持っているものであろう。

ところが、培養細胞においては、遺伝的には2倍体であるということもあって、人工的な栄養要求性マーカーやそれに匹敵して簡単にチェックできる遺伝マーカーは存在せず、多くの場合個々の細胞を個別に識別することはほぼ不可能であった。そのため、培養細胞を使用する研究者はこの点に格段の注意を払って、細胞の取り違えなどをしないよう注意を凝らして利用することが言わば常識であったのである。

ところが、いくら注意を払っていたとしても、クロスコンタミネーションは起こることがあるものであるということを知りしめたのが、HeLa細胞のクロスコンタミネーションの事件であった。特に、ヒトに由来する細胞は多くの研究者に興味を持たれているにもかかわらず、樹立することが大変困難であることが知られているが、逆に新しい細胞を樹立した場合には、その真偽を調査するより新規の細胞を樹立した喜びに負けてしまうという点が大いに問題であったように感じられるところである。

HeLa細胞のケースについては、最終的にはATCCが染色体の構造に関する膨大な研究を実施し、HeLa細胞のマーカー染色体の存在を突き止め、それによりクロスコンタミネーションがありうることを確認して、多くの研究者はクロスコンタミネーションの問題を明確に意識することとなったのであった。

しかし、問題はここで解決したわけではなかった。ATCCの膨大な研究はHeLa細胞にのみ通用する結果であって、それ以外にも大量に樹立されてきたヒト培養細胞相互の間でクロスコンタミネーションがあるかどうかについては一切わからなかったのである。

HeLa細胞の事例を見ればあきらかなように、そうしたクロスコンタミネーションが発生していないと断定することのほうがむしろ無謀であるように思われた。

そこで、そうした問題を防止するために、何を調査検討したらよいかということは多くの細胞バンク担当者らによって検討されていたが、良い解決策が無いままであった。

ところが、高等動物の分子生物学がかなり発展した1985年に、英国のJeffreysらによって一つの回答が得られることとなった。

彼らによれば制限酵素によって切断した断片に

はその長さが個人間で差がある部分があり、それを調べることによってあたかも指紋のように個人を識別できるようになるというものであった。

この方法は後にSTR-PCR法へと発展し、数塩基対の短いDNA配列が繰り返される回数が個人間で異なることが明らかになったのである。そして、こうした性質を持つ遺伝子配列を10ヶ所程度を調べることによって理論的には何千万人という個人を同定識別することが可能であるという見通しが得られることになったのであった。ここにいたるまでに、原理的には類似の様々な方法が各所の細胞バンクによって検討され、我々もDNAプロファイリング法を確立していた。しかし、DNA-DNAハイブリダイゼーション法を利用することから³²Pなどの放射性同位体の利用など細胞バンクの日常的な実験手法にはなじみにくい方法であったために、一通りのヒト細胞の検査を実施した後は日常的な検査手法として採用することを躊躇していた。

しかし、今回採用したSTR-PCR法は、PCRによってターゲットの配列を増幅して検出するために放射性同位体を使わずに済むことや、蛍光色素を利用したDNAシーケンサーによって迅速に解析することが可能になるなど多くの利点を有したために、我々はこの方法を採用することに踏み切った。ほぼ同時期に、英国のMastersやATCCのRaidらもこの方法が広範なヒト細胞の識別に利用できるとして、同じ方法の採用を独自に決めることとなった。

この手法を採用して以後、我々は、ヒトに由来する細胞については、旧来のアイソザイムの検査とSTR-PCR法を併用することとして現在に至っているが、2002年度末までに当バンクで収集した550種類のヒト細胞のうち約400種類の細胞についての検査を終了した。その結果、細胞の収集の項に示したように16種の細胞についてクロスコンタミネーションがあることを新たに明らかにした(図2)(本報告書を書いている最中に新たに1種のクロスコンタミが検出された)。

この16種のうち、KB、J111など4種は既にHeLa細胞であることが世界的に確認されている細胞であるが、K051や、ECV304など数種類は、我が国あるいは我が国の研究者が樹立した細胞で比較的多くの研究者に利用されていた細胞であったため、その影響は大きいものがあつた模様である。また、U251は、U373-MG、SNB-19などと同一であることを

確認した。この3種は既にATCCが同一細胞であることを直前に同じ方法で確認していたため、我々の結果はそれを確認することとなった。異なる細胞であるとの前提で行なわれた研究にとっては新たな問題に直面することになるが、いずれ誤りは訂正されなければならないことを考えれば、こうした事実を迅速に広く知らせることは重要である。

この問題に関しては、多くの研究者にとって重要な知見となるので、その情報は論文に記載することを待たずに細胞バンクのホームページで公開することにした(<http://cellbank.nihs.go.jp/>)、また、これらのデータの妥当性を個々の研究者に直接評価してもらえよう、WEBプログラムを開発して、ホームページを参照した人々が最新データを使用して直接比較することが出来るようにしてある。また、個々の細胞に関する情報のページには、クロスコンタミネーションがある旨記載した。

クロスコンタミネーションが明らかになった細胞については、カタログから削除して分譲体制を解除する必要があるとの考えも当然のことであるが、長期間に渡って利用されてきた細胞であるために、すぐに削除して分譲体制を解除することには困難があろう。そこで、今後2-3年程度はその旨記載したうえで分譲を継続して、それからカタログから削除する予定である。一方、新たに樹立された細胞については、出来るだけ早期にこの検査を実施し、遺伝的にユニークな細胞であることを確認することが望まれる。そこで、クロスコンタミが発見された細胞は研究に利用すべきでは無い。我々が作成しているデータベースはこうした個々の研究者に提供することによって迅速にクロスコンタミネーションの有無を確認する手段として大変広い利用価値があるものと考えられる。

4. マルチカラーFISH法による株染色体の2次元・3次元解析

細胞分裂期にDNAは凝集して細胞ごとに特徴的な染色体を形成する。株化された培養細胞においては、この染色体構造が正常細胞の構造から大きく逸脱して細胞ごとに異なった特徴を示すようになるので、細胞の特徴を把握するのに良い指標となる。染色体構造を観察するためには、過去において様々な染色法が開発されて、各国の細胞バンクにおいて利用されてきたが、区別を形態のみに依存していたので、微妙な差異を読み取ることが困

難であった。

ところが、近年分子生物学の発展と共に様々な染色体構造を解析する手法が確立されつつあり、染色体ごとに異なった色彩で染色することが可能になり、容易に染色体を区別することができるようになった。細胞バンクにおいてもこの手法を積極的に取り入れ、個々の細胞に関する特徴を記載する試みを開始した。これはマルチカラーFISH法と呼ばれ2次元解析に加えて、3次元解析法も可能になりつつある。

a) 2D-FISH法によるmetaphase染色体の解析

厚生労働省・細胞バンク(JCRB)には現在約800種類を超える各種ヒト培養細胞株が収集保存されており、品質管理の一環として染色体分析を実施している。その内容は染色体数の計数(分布とモード数)および分染法(Q/Gバンド法)による核型分析を基本としている。多くのヒト腫瘍細胞株において、転座、逆位などによる複雑な再配列を伴う染色体が多数見出され、それらの大多数はバンド分析だけでは正確な由来を明らかにできず、ペインティングプローブを用いたFISH(Fluorescence In Situ Hybridization)法による解析が必須である。本研究の目的は、マルチカラーFISH法により種々のヒト培養細胞株における染色体再配列を解析(カリオタイピング)し、生物遺伝資源としてのゲノム構造の性状情報を明らかにすることである。理想的には細胞バンクに登録されているすべての細胞株を解析対象とするべきであるが、ポストゲノム時代、特に創薬研究で汎用されると思われる、肝臓、腎臓、胃、大腸、白血病、脳神経由来などの細胞株(できれば日本人由来)を中心に解析する予定である。FISH法に用いるプローブは、ヒトの24種類の全染色体を異なる蛍光色で識別できるM-FISHプローブ(ASI社SKY Paint)と各染色体ごとに開発されつつあるMetaSystems社のmBANDプローブ(領域特異的マルチカラープローブ)を使用する。また、染色体特定領域のコピー数の変化と複雑な構造異常を伴う場合が想定されるため、ゲノムコピー数の変化の検出にCGH(Comparative Genomic Hybridization)法を行い、M-FISH法、mBANDプローブによるデータを補強し、従来から蓄積してきたQ/Gバンド法による基礎データと統合させることにより、総合的なカリオタイピングを進め、生物遺伝資源としての細胞株ゲノムの基礎



図1: ヒトリンパ球のFISH像。18番染色体=赤; 19番染色体=緑; DAPI 対比染色=青。



図2: ヒトoral squamous carcinoma腫瘍細胞株(JCRB0622; HSC-2)のM-FISH像。

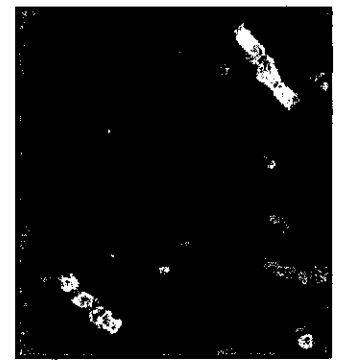


図3: ヒトリンパ球の5番染色体mBANDプローブによるFISH像。

情報の充実を目指す。最終的にはFISH画像データをwebを通じてインターネット上に公開することを想定しており、これらの細胞株を使用する多くの研究者にとって貴重な生物遺伝資源情報を提供する予定である(図1、図2、図3)。

b) 3D-FISH法による interphase 染色体の解析

動植物細胞における染色体研究は、従来、細胞分裂中期“metaphase”の細胞を研究対象とし、細胞周期の間期“interphase”の細胞核の染色体を解析することは技術的に困難であった。しかし、ここ数年で開発された3D-FISH法(Three Dimensional-Fluorescence In Situ Hybridization 法)により染色体研究は新たな展開を迎え、2次元レベルの“metaphase”のみならず、3次元レベルの“interphase”における解析が可能となった。3D-FISH法により様々な生物種の間期核における染色

体の存在様式が調べられ、一般に、動植物細胞の間期核における染色体は、クロマチンファイバーが核内でほどけたスパゲッティのような構造を呈しているのではなく、高度に区画化された「テリトリー」構造を持つことが明らかにされた。最近の哺乳類や鳥類細胞の研究から、染色体テリトリーの核内配置はランダムではなく、規則性を持つことが報告されている。すなわち、核の中心付近から核膜周辺部にかけての放射状(Radial)核内配置については、染色体のサイズ、複製のタイミング、染色体の遺伝子密度、遺伝子発現の状態と密接に関連していることが示唆されている。例えば、ヒトリンパ球細胞において、ほぼ同サイズのヒト18番および19番染色体に着目すると、遺伝子密度の低い18番染色体は核の周辺部(periphery)に、遺伝子密度の高い19番染色体は核の中心付近(interior)に局在することが知られている。

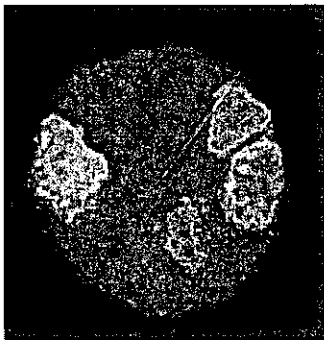


図4: ヒト間期核リンパ球の3D-FISH像。共焦点レーザー蛍光顕微鏡によるスキャン画像のほぼ中央のセクション。8番染色体=赤; X染色体=緑; DAPI 対比染色=青。



図5: マーモセット間期核リンパ球の3次元再構築像。AmiraソフトウェアV2.3を使用。18番染色体=赤; 19番染色体=緑。



図6: ヒト間期核リンパ球の3次元再構築像。AmiraソフトウェアV2.3を使用。2番染色体=緑; 8番染色体=青; 14番染色体=赤。

本研究では、種々の異なるタイプのヒト培養細胞株（血球細胞、上皮細胞、および繊維芽細胞）を材料とし、それぞれのタイプに対応した3D-FISH法（3次元構造を保持した細胞固定法、FISH、共焦点レーザー蛍光顕微鏡による画像スキャン、3次元画像再構築）を確立し、本プロトコルの有効性を検討した。今後はヒト18番および19番染色体の数的異常および転座などの構造異常を伴う種々のヒト培養細胞株を対象として、M-FISH法による染色体再配列のカリオタイプングデータに基づき、18番→periphery、19番→interiorというトポロジーが乱されているかどうかを検討し、染色体テリトリーの核内配置を規定する因子の探索を行うとともに、生物遺伝資源としての各種細胞株の画像情報の充実を目指す（図4、図5、図6）。

③ 細胞情報管理システムの継続的開発と維持

細胞バンクでは多数の細胞に関する膨大な資料を保存し管理している。それらの資料については、ハードコピーとして記録することは安全な保存を確立するうえで必須であるが、一度ファイルに収めてしまったハードコピーは利用者たる研究者への情報提供に利用することは面倒である。そこで、こうした資料を可能な限りデジタル化してコンピュータ上に記録して迅速な情報提供体制を確立することを目指している。

この実現には、細胞バンク内部のコンピュータシステムの整備と情報のデータベース化が必須であり、それを追求してきた。細胞バンクの設立（1985年）とほぼ同時に出現したマイクロコンピュータ（パーソナルコンピュータ、PC）をいち早く採用して、文字情報のデータベース化を実現した。その後、PCは発展を続け、現在では記憶装置の容量が大幅に増加し、価格も低下した。これによって大量の情報を記録する環境が整ったと言えるであろう。こうした環境を生かして、我々は数年前から画像データのデータベース化を試み、細胞の形態写真など様々な画像データを電子ファイル化して利用者に提供する体制を確立する試みを行ってきたが、このシステムの構築は本年でほぼ完了した。そこで、今後はこれをさらに発展させて、細胞の増殖の様子などをさらに直感的に見ることが出来る動画情報システムの構築を開始することとした。

a) 細胞バンク情報管理システム基盤の整備

個々の細胞には寄託時に提供される学術的な情報に加えて、培養ごとに観察される様々な情報が付加される。さらに、培養が完了して保存する際には保存場所や在庫数を正確に記録しておかなければならないので、これらの情報も細胞ごとに正確に記録して管理しなければならない。こうした基礎情報は基本的に文字で記載できる情報であるが、細胞の形態や各種品質管理実験の結果は、データを直接見たほうが研究者には良く理解できる。コンピュータが高価で、記録装置の価格も高価だった時代には情報を圧縮せざるを得ず、実験の一次データを要約して簡潔な文字列として記録せざるを得なかったが、現在では記録装置の価格も低下し、大容量のデータの保存が可能になったために、一次データを直接記録するように修正した。

1985年当時、パーソナルコンピュータの外部記憶装置として入手可能だった容量は40Mbyte程度であったが、2002年においては40Gbyteと、1000倍に容量が拡大した。これを複数設置することにより100Gbyte程度の情報の保存が可能になった。

こうしたコンピュータ環境の進歩を生かすために、数年前から培養細胞情報管理システムの改良を試みてきた。それまで、DOS環境下で動かしていた培養細胞管理システム(JCRB Data Control System)をWindows環境下で動作させることが出来るように新しいプログラム言語であるDelphiを採用してシステムの全面改良を実施した。その際、データベース自身は当初構築したdBASEファイルを継続して採用することにした。Delphiは、複数種類のデータベースファイルを同時に扱うことが出来るマルチデータベースエンジンを持っているので、今後の情勢を見ながらデータベースファイルの更新の必要性を見極めたいと考えている。通常、データベースは記録しているデータのレコード数と、そのデータベースへのアクセス件数が動作の安定性を規定している。

現在細胞バンク管理のためのデータベースは内部の職員のみアクセスを許可していることと、記録の最大レコード数は数千件以下であることから、データベースへの直接的な負荷はそれほど大きくはならないので、データベースそのものを更新する必要は今のところ無いと考えている。

問題は、画像データや、ムービーデータをこの

データベースの中でどのように管理するかという点である。検討した結果、比較的緩い結合によるデータ管理が望ましいと考え、個々のデータは、それぞれ単独の画像又はムービーファイルとして作成することにし、データベースにはファイル名のみを記録することとした。データベースを管理するプログラムについては、これに合わせて再構築することとした。特に、画像データやムービーデータについては、データ入力作業中にそのデータを直接観察しながら作業できることが望ましいことを考慮して、入力画面から直接呼び出して確認出来るようにした点はプログラムの操作性を高めることとなった。

データ入力には、3つの画面を作成して、3つ

の独立したデータベースに対応させた。一つは、細胞の基礎情報となる学術的情報を主に記録するデータベース (cellroot.dbf) と画面(図7、8)であり、2つめが培養記録を保存するデータベース (cellspec.dbf) と画面(図9)、3番目が在庫と保存場所を記録するデータベース (cellstor.dbf) と対応する画面 (図10) である。

さらに、このプログラムでは、各種の細胞バンク業務に対応する作業や出力のルーチンを作成してきたが、今後の細胞バンク事業の展開に応じて、その都度業務に対応するルーチンを追加出来るように考慮している。これまでに作成してきたのは、細胞の分譲業務の支援、各種報告書作成の際の支援、細胞バンクのホームページに提供するHTML

図7. 細胞基本情報・学術情報入力画面
データベースファイル cellroot.dbf

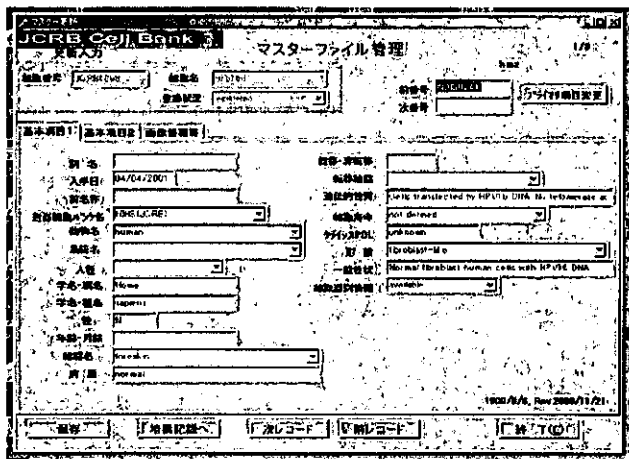


図8. 動画ファイル入力画面 (3面) と動画の確認

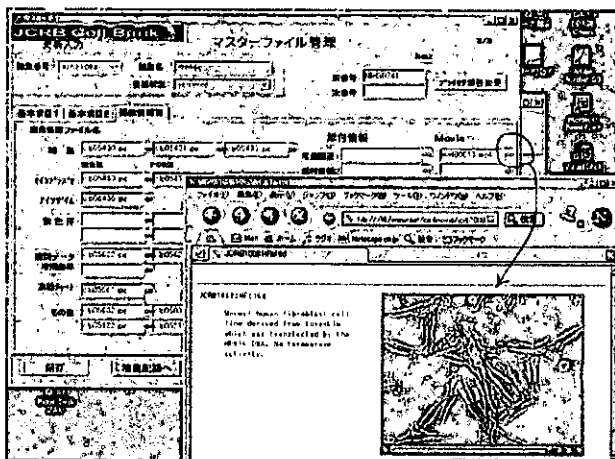


図9. 培養情報入力画面
データベースファイル cellspec.dbf

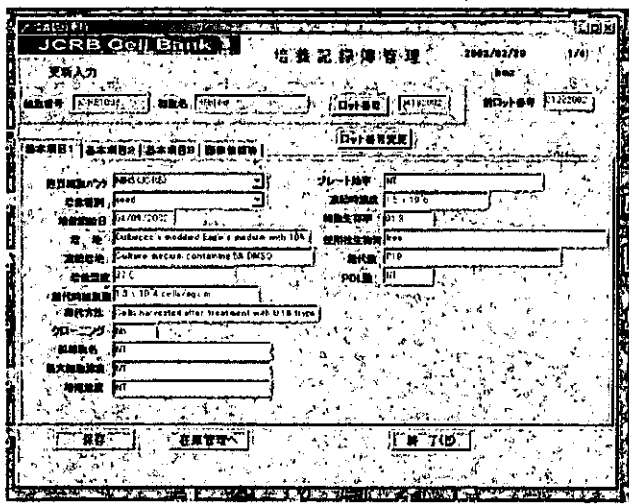
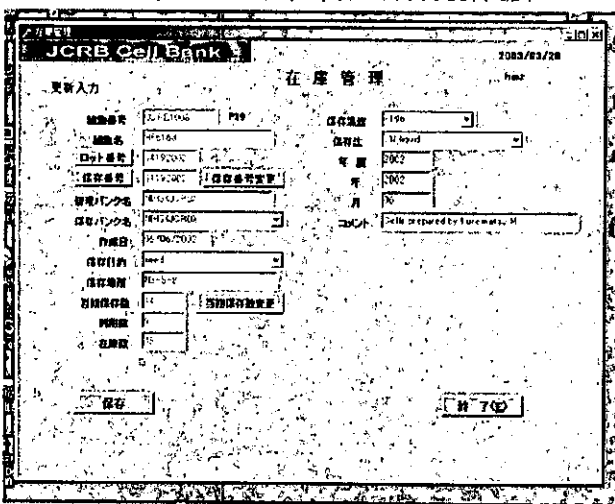


図10. 保存管理情報入力画面
データベースファイル cellstor.dbf



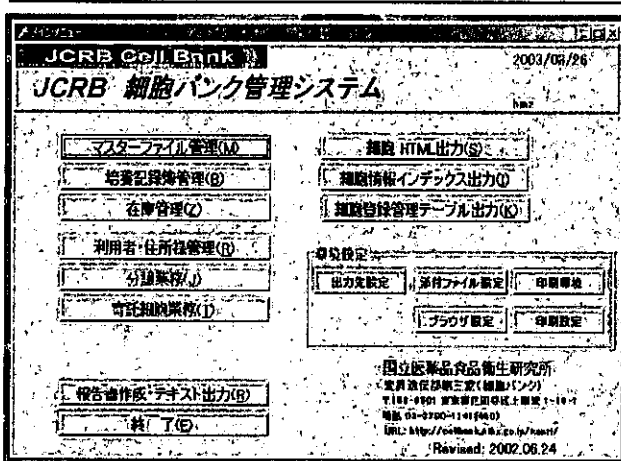


図 11. 細胞バンク管理システムマスターメニュー
細胞に関するデータ入力、分譲業務、各種WEB
情報の出力作成などに加えて、各種初期設定が
出来るようになっている。

ファイルの作成、カタログ作成、利用者住所録の作成、などである(図 11)。

利用者への情報提供に関しては、データベースへの直接のアクセスは許可しないこととし、dBASEファイルの記録をHTMLファイルに変換した後にアクセスさせるようにした。これにより、データの安全性は十分に確保することが出来ると同時に、記録した全ての情報を利用者へ提供することが出来るようになった。そのために、細胞バンクの情報提供する専用サーバを設置している。情報提供サーバは、万一の不正侵入に備えて2台準備し、同じ内容で常時稼働させることとした(ミラーリング)。これにより不正侵入によるサーバのクラッシュが発見された場合には、すぐに復旧させることが可能になる。サーバは、LinuxをOSとして採用し、データの修正や追加がしやすいようにSAMBAによりWindowsシステムと連携を取り、WEBはAPACHEにより構築している。

この情報サーバを設置して依頼、不正侵入はまだ一度も発生していないが、経年劣化によるコンピュータの不調が発生するという事故を2回ほど経験した。その都度、情報提供は長時間停止することなく迅速に切り替えることができた。

b) 細胞バンク WEBサーバの維持と管理

当細胞バンクでは、WEBサーバにより情報の提供を実施している。上に述べたようにLinuxをOSとしてSAMBA、APACHEを使用して2重のシステムを構

築して管理している。このWEBサーバは、第一義的には培養細胞を利用する研究者を対象に情報の提供を実施しているが、研究者では無い一般の人々も対象に様々な情報の提供を実施することにした。

これは、次に述べる倫理問題への取組みとも関連するが、研究資源としてヒト細胞を利用することから、出来るだけ多くの情報を提供する必要があると考えたからである。特に、昨年ヒト細胞が競売にかけられるという事件が発生して以後、培養細胞や細胞株というものがあるかという問合せがマスコミ各社から多く寄せられたことを通じて、一般の人々にそうした内容が十分に理解されていないということを痛感した。そこで、これを契機に、細胞株や細胞バンクについて一般向けに説明する必要性を実感したのである。そこで、このWEBサーバ上に、Visitor Centerというページを作成し、細胞株や細胞バンクに関する情報に加えて、倫理問題にも言及する情報提供を開始した。これについては今後さらにコンテンツの整備を計る計画である。

研究者向けには、まずは個々の細胞に関する最新の情報を提供できるようにした。これは、細胞バンク内で使用している管理プログラムから自動的にHTMLファイルを出力できるようにしたので、元の情報を修正した場合にはすぐにHTMLファイルも修正される。特に、品質管理データについては、様々な実験を通じて出てくるため、一度に作成することは不可能である。細胞の保存が確立した後に時間を置いて次々と発生してくる品質管理データについては、そのデータベースに都度記録することになるが、その都度最新情報をHTML化してWEB上に出力して公開することが可能である。そのため、公開する情報については、最新情報を常に公開できるようになっている。

また、品質管理の項目で紹介したように細胞識別データについても、WEB上で該当する細胞の情報にリンクして提供出来るようにしたので、個々の研究者は、細胞の一般的情報と同時にその細胞がユニークであるか否かについて、直接確認することも出来るようにした。さらに、検出したクロソコタミネーションのケースについては、その一覧表も設けてあるために、利用者は迅速に細胞の正当性についての情報を得ることが出来るようになっている。

c) 動画データファイルの作成とデータベース化

コンピュータ技術の進歩とともにビデオ映像技術についてもデジタル化の方向に発展してきている。この方向は既に1990年代から始まっていたが、複数の画像データの集合であるビデオデータはさらに容量が大きくなってしまふことが普及できない主な要因となっていた。特に、ビデオデータをインターネットとWEBを使用して配信しようとするとデータ容量の大きさは通信速度との関係から大変大きな負荷がかかることとなり、クライアントがスムーズに動画を見ることはほぼ不可能であった。

しかし、その後ADSLなどの通信システムの速度を大幅に改善する技術が開発され、現在ではその普及が始まっている。それと時を同じくして動画データの圧縮技術の開発も進展し、現在ではこれまで最も圧縮率が高いとされていたMPEGフォーマットを発展させたMPEG-4というフォーマット(.mp4)が利用できるようになった。この通信技術の高速化とMPEG-4技術の導入によって、これまでかなり無理があると考えられていたインターネットとWEBブラウザを通じての動画の配信がにわかに現実的な課題となってきた。

こうした環境の変化を取り入れて、我々は、改めて5年ほど前に試験的に撮影した細胞培養時に撮影した動画ファイル(MPEGフォーマット)を、MPEG-4フォーマットに変換してWEBを通じて観察することを試みた。動画の画面サイズは、340ドットx280ドットとした。クライアント側にはパーソナルコンピュータで一般的に使用される動画鑑賞用ソフトウェアであるQuickTimeを予め導入しておいた。

この試みの結果、画像圧縮技術の影響で多少の画像品質は低下するものの、個々の細胞の分裂の様子などは比較的きれいに映し出されることや、ADSLの通信環境があれば、一般家庭からでもストレス無く鑑賞することが出来ることが確認された。そこで、細胞バンクとしてシードアンプルや分譲用アンプルを作成する作業の中で、動画撮影装置をセットしてルーチン作業として細胞培養時の動画を撮影するシステムを構築することを試みた。

実は、最初の動画を撮影した数年前に既に装置は組み立ててあったので、この間の技術の進歩を考慮して、動画を撮影するデジタルカメラのみを交換することにした。これにより、最初に撮影す

る動画は、画面解像度640x480ドットの非常に大きな画像が撮影できるが、現在の技術ではこの解像度ではその後の処理や動画の配信に支障が出るので、360x240ドットの解像度に縮小することとした。縮小効果により映像の品質は上昇するようである。

撮影は、ツアイス顕微鏡Axiovert135に位相差装置を付けてモノクロ撮影することとした。対物レンズは10倍および30倍の2種類を使用した。細胞は、直径3cmのシャーレを使って培養することにしたが、顕微鏡のステージ上で一晚培養しなければならないので、ステージ全体を覆ったうえで温度を37℃に保ったうえでCO₂を供給できるチャンバーを取り付けることにした(図6)。カメラはPhotometrics社のCoolsnapHQを利用し、5分に一回の間欠撮影を行なうこととした。撮影の際の光も間欠的に投光して培養中に温度が上昇しないようにした。

撮影は、5分に1枚の間欠撮影で、約10時間の連続撮影を行い約120枚の画像を得た。これをUniversal Imaging Corp.社のMetaMorphV4.6r8を使用してMOVフォーマットの動画ファイルをまず作成した。対物レンズの倍率を交換したり、撮影領域を変えて、このような動画ファイルを一つの細胞について複数作成した。これらをUlead Systems社のVideo Editorを使用して編集しながら1本に結合してタイトルを付加しMOVフォーマットの動画ファイルとした。これをさらに、Apple社のQuickTimeオーサーエディションを使用してmp4フォーマットに変更して公開用の動画ファイルとした。現在、動画ファイルは複数のフォーマットが流通していることやmp4フォーマットが新しいフォーマットであるため、一つの動画編集用ソフトウェアで全ての作業を完了することができないのが若干面倒ではあるが、1回手順を定めてしまえば、流れ作業で実施できるので、それほどの負担となることは無かった。

ここで作成した動画ファイルは、ファイル名をmvfxxxxx.mp4として4桁のシリアル番号を含んだファイル名とし、これを細胞バンク管理データベース中に記録することとした。そのため、これまで使用してきた細胞バンク管理用データベースには新たに画像ファイル名を登録できるフィールド(文字長12桁)を5個追加して、一つの細胞について5本の動画まで記録できるようにした。

mp4 フォーマットのデータは、現在の段階では、HTML ファイルの単純なリンク書式では見ることができない（理由は不明）ので、他のサイトの事例を参考に、画像ファイルを表示するための特別なタグを挿入したHTMLドキュメントを別途作成して細胞のデータを表示するHTMLファイルからリンクを貼って呼び出すことにした。画像データをクライアントに表示するための書式は次のとおりであり、“embed src=”タグがその機能を持っている。

動画表示のためのHTMLファイル。細胞バンク管理プログラムからHTMLファイルを作成する際に画像ファイル名の有無を判別し、存在する場合には自動出力される。

```
<!DOCTYPE HTML PUBLIC "-//W3C//DTD HTML 3.2//EN">
<html>
<head>
<title>JCRB1008:HFb16d</title>
<meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=Shift_JIS">
</head>
<br>
<hr>
<table width="100%" bgcolor="eefcec" align="center">
<tr><td valign="top">
JCRB1008:HFb16d<p>
<ul>
Normal human fibroblast cell line derived from foreskin which
was transfected by the HPV16 DNA. No teromerase activity.
```

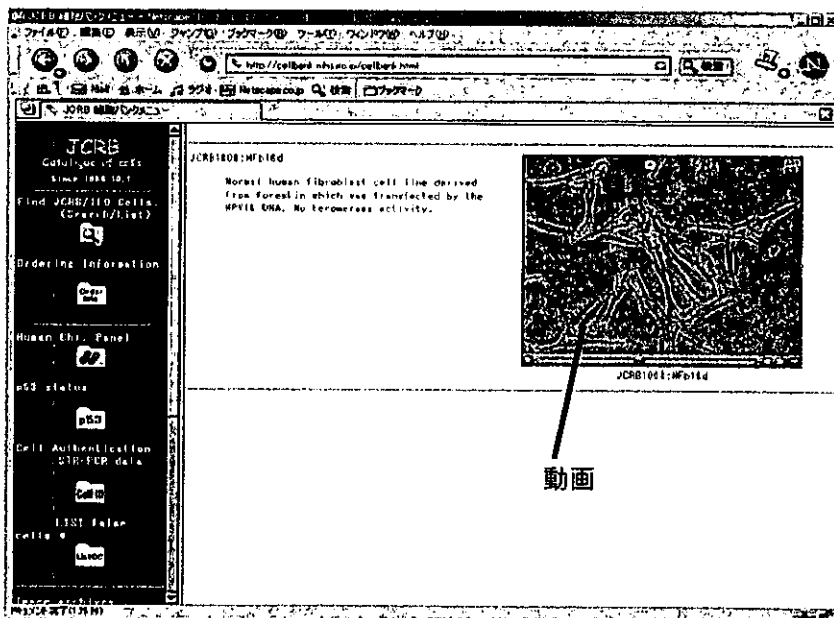
```
</ul>
</td>
<td align="center">
<embed src="/movies/mvf00013.mp4" width="360"
height="260"> JCRB1008:HFb16d </embed></td>
</tr>
</table>
<hr>
<br>
</div>
```

このファイルは細胞の詳細データを表示するHTMLファイルと同時に作成され、自動的にリンクが貼られるよう、細胞バンク管理プログラムの出力ルーチンを修正した。そのため、作成した動画ファイルを所定のディレクトリに収録した後、細胞バンク管理プログラムで該当する細胞のデータを呼び出して、動画データの項目にファイル名を記録しておけば、後は動画を見る仕様のHTMLファイルが全て自動的に作成されることとなる(図12)。

このようにして構築したシステムを活用して動画ファイルの記録を開始したが、今年度は28本の動画ファイルを作成した。これにより、研究者は始めて使う細胞でも、増殖の様子が事前にわかるようになり、培養の不安が取り除けることとなる。また、一般の人々に対しても、このような情報の提供を通じて研究への理解を深めてもらうことが期待される。

現在、表示速度を重視して画像の品質を落と

図12. 上記HTMLファイルによって表示された動画



JCRB細胞バンクホームページアクセス状況 2000年4月以降、月間延べアクセス数集計

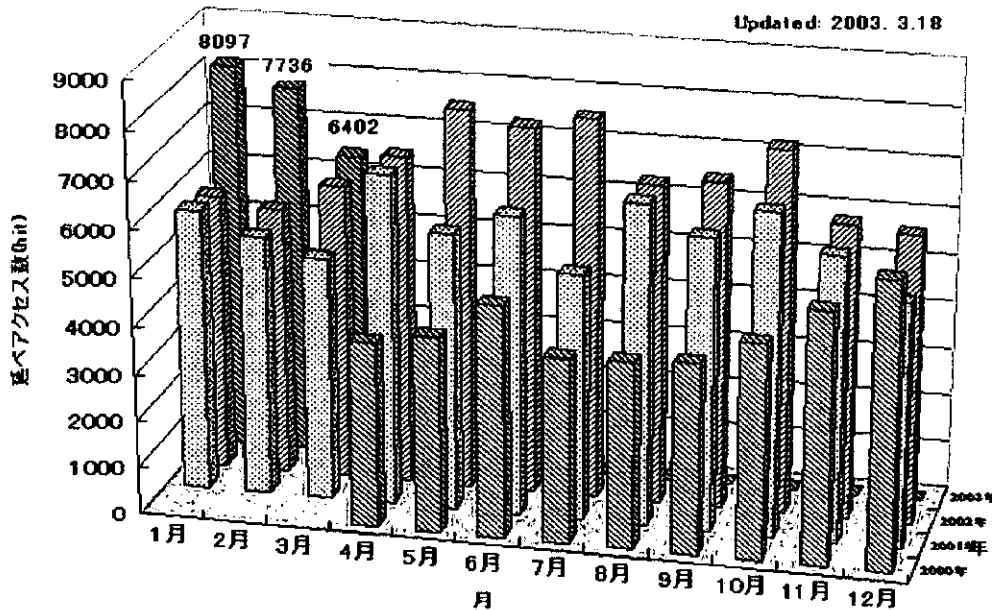


図13、JCRB細胞バンクへのアクセス数の変化（2000年から2002年3月まで）

すことで妥協したが、今後さらなるコンピュータ環境の発展により、将来は高品位の画像データを提供できるようになるものと期待している。

d) WEB ページへのアクセス数の変化

Computer, Internet, Internet browser の普及によって、現在ではほとんどの研究者はWebを通じて研究情報を入手するようになった。細胞バンクで1985年頃に開始したWEB情報へのアクセスは1995年当時は月間100件程度であったが、利用者は驚くほどのスピードで増大してきた。現在のWEBサイトの形式に落ち着いたのが2000年であったが、その当時は月間のアクセス数は4000件程度であった。それが現在では、月間8000件程度に増大しているのは驚きである。興味深いのは春新学期を向かえる頃に大きく増大して、一旦低下するが夏休みに入るころになって再び上昇するという傾向が毎年見られる点である(図13)。

④ ヒト細胞を研究資源として収集することに伴う倫理問題に関する検討

公的細胞バンク(JCRB)における倫理問題に対する対応。公的ヒト試料バンクは人体由来の研究資源の収集・品質管理、保存、分譲、及びそれを支える基礎的問題である倫理・法・社会的問題に対処する活動をしている。特に日本においては、研究基盤としての基礎問題の検討が不十分であるので、JCRBの活動とその情報のHP上での積極的発信は重要である。

現在日本では、多様な研究倫理指針が策定され、状況の整備が図られようとしており、インフォームド・コンセント、倫理審査、個人情報保護が重要な課題であるといわれている。しかし、ヒト試料の利用枠組みは、当座の問題に対処する形で策定されてきた経緯があり、根本的な問題の多くを積み残しており、民間からの厳しい意見に対応できないケースの発生が懸念される。

そこで、JCRB細胞バンクとしてはヒト資料を扱う研究資源バンクの主体として、政府、学会、市民等それぞれのドメインの活動を追跡調査しつつ、それらの中から、将来的に重要と思われる問題に

JCRB細胞バンクホームページアクセス状況 2000年4月以降、月間延べアクセス数集計

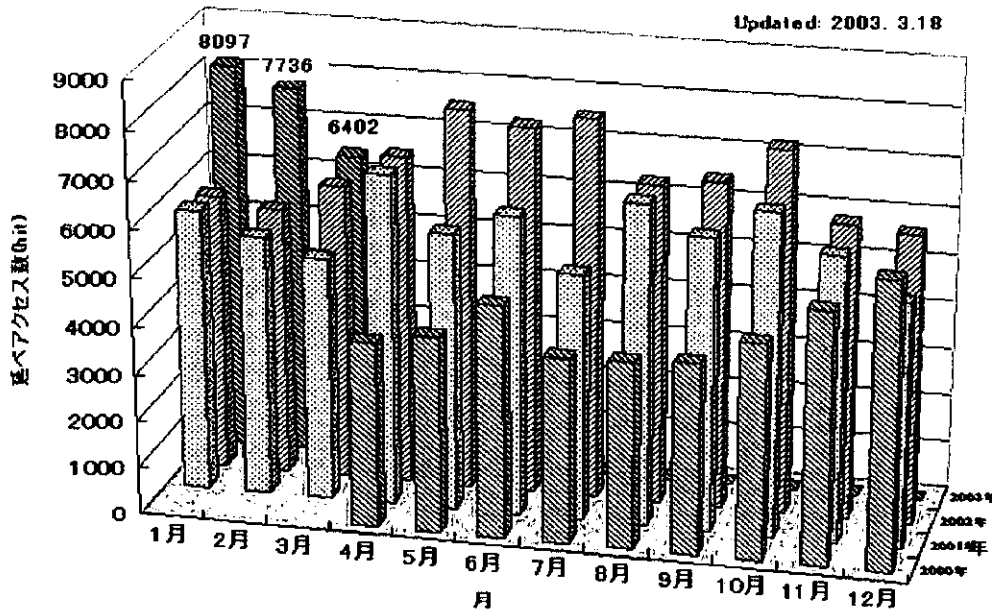


図13、JCRB細胞バンクへのアクセス数の変化（2000年から2002年3月まで）

すことで妥協したが、今後さらなるコンピュータ環境の発展により、将来は高品位の画像データを提供できるようになるものと期待している。

d) WEB ページへのアクセス数の変化

Computer, Internet, Internet browser の普及によって、現在ではほとんどの研究者はWebを通じて研究情報を入手するようになった。細胞バンクで1985年頃に開始したWEB情報へのアクセスは1995年当時は月間100件程度であったが、利用者は驚くほどのスピードで増大してきた。現在のWEBサイトの形式に落ち着いたのが2000年であったが、その当時は月間のアクセス数は4000件程度であった。それが現在では、月間8000件程度に増大しているのは驚きである。興味深いのは春新学期を向かえる頃に大きく増大して、一旦低下するが夏休みに入るころになって再び上昇するという傾向が毎年見られる点である(図13)。

④ ヒト細胞を研究資源として収集することに伴う倫理問題に関する検討

公的細胞バンク(JCRB)における倫理問題に対する対応。公的ヒト試料バンクは人体由来の研究資源の収集・品質管理、保存、分譲、及びそれを支える基礎的問題である倫理・法・社会的問題に対処する活動をしている。特に日本においては、研究基盤としての基礎問題の検討が不十分であるので、JCRBの活動とその情報のHP上での積極的発信は重要である。

現在日本では、多様な研究倫理指針が策定され、状況の整備が図られようとしており、インフォームド・コンセント、倫理審査、個人情報保護が重要な課題であるといわれている。しかし、ヒト試料の利用枠組みは、当座の問題に対処する形で策定されてきた経緯があり、根本的な問題の多くを積み残しており、民間からの厳しい意見に対応できないケースの発生が懸念される。

そこで、JCRB細胞バンクとしてはヒト資料を扱う研究資源バンクの主体として、政府、学会、市民等それぞれのドメインの活動を追跡調査しつつ、それらの中から、将来的に重要と思われる問題に