

正はプログラム部分のみを Delphi で実施することにした。データの入力や出力部分のプログラムの改変を主な修正点として、新しいWindowsコンピュータ環境下で実行できるようにすることを目的とした。結果として、プログラムはそれまでのインタープリター方式ではなく、コンパイルして独立したプログラム形式(exe)となったことも大きなメリットであった。独立したプログラムとして実行できるようになったため、システムの実行にあたってインタープリターの実行等の不必要な作業を行う必要も無くなり、実行速度も向上することとなった。

ボーランド社のDelphiは、BDEやODBCと呼ばれるデータ管理システムを経由して様々なデータベースファイルを結合して利用できるよう設計されているので、今後dBASEを他の形式に変更することも容易に出来る。従って、現時点で急いでデータベースファイルを変更することは無い。大規模な修正を実施することは不測の事態を発生させる場合が多いので、今年度は移転に際してネットワークが国立医薬品食品衛生研究所から医薬基盤研究所に移動した際に起こりうる問題について検討を加えることとした。ネットワークの基本構成は国立医薬品食品衛生研究所と医薬基盤研究所との間で類似した構成とすることに決定されたため、特に大きな問題の発生は予想されなかった。データファイルとプログラムとの結合はBDEシステムを通じて行うため、TCP/IPが正常に稼動する限りは大きな問題の発生は無いと予測された。実際、2月中旬の移転作業後すぐにシステムの再開を試みたが大きな問題が発生することは無かった。しかし、後に述べるようにドメイン名の変更に依存した問題が発生した。

STR データベース

既に一部紹介したように今年度はSTR分析用データベースの記録フォーマットを全面的に見直して変更を加えた。STR分析データベースの構築にあたっては慣れていたdBASEを利用して最もシンプルな形式(001010000など)でデータ入力を行いプログラムの動作確認や実験結果の評価を実施してきており、良好な結果が得られたことは既に毎年の報告書の中で述べてきた。200から300程度のレコード数のデータ入力完了した時点まで、データベースに大きな問題は起こっていなかったが、実験系と記録データの間での不整合が出るかもしれないという心配が指摘されていた。実際、その後500例ぐらいの実験データの入力が完了するころになると実際に心配していた問題が少数例ながら発生するようになってきた。そこで、当初採

用した暫定的なデータ記録方式を早急に改める必要が出てきたのである。

当初、データの記録方法については、STR分析でピークが出現した位置を1、ピークが出現しなかった位置を0としてローカスごとに『000101000』という形式で記載するようにしていた。この記述法は極めて単純であり、繰り返し回数の範囲がローカスごとに固定されているために、この範囲を逸脱した個体が出現した場合はデータを入力することが出来なくなってしまうと予想された。検査が300例を超えるまでそのような例に遭遇しなかったが、それを越えた時点で繰り返し回数が想定範囲から逸脱するケースが実際に出現してしまった。また、重複するDNA配列から1塩基脱落したような変異が生じる場合の記述法にも難点があったが、これも結果が300例を超えるころから実際に問題となるケースが多くなってきた。該当する細胞は、日本人由来の細胞株であるRTSG(IF050318)やSNG-II(IF050312)などにおけるD5S818ローカスにおけるピーク6である。このローカスでは過去の分析からピークは7から15までが観察されるとされていたが、今回ピーク6が始めて観察されることとなった。想定外の繰り返し回数となった点の生物学的意味づけについては不明であるが、細胞の個別識別という視点からは、想定外のピークの出現にも対応できるようにしておくことは重要であると思われた。

そこで、STRデータベースのデータ記録方式をこれまでの『000101000』から改めて、D5S818:6,12などと記述するにした。新しい方式では、データベース内にローカス名を含め、ピーク位置を直接記載することにより、範囲の設定は不要になり、繰り返し回数を自由に記載できるようになった。

上記のようなデータ記録方法の修正に合わせてデータベースシステムそのものもこれまでのdBASEからMySQLに変更することにした。また、データの入力・修正等のシステムの開発には他の細胞バンク管理プログラム同様 Delphi を利用することにした。今回MySQLを導入することによって、将来細胞バンクの管理プログラムで使用しているデータベース全体もMySQLに置き換えることを視野に入れる。本来dBASEは、小型コンピュータ用に作られたデータベースで原則として単一ユーザが独占的に利用することが前提となっているデータベースである。したがって、現在発達したネットワーク環境下では色々工夫はされているがネットワークを十分に生かすことは出来ない。ネットワーク上でデータベースを使用するには現在で

はSQLが標準仕様となっておりODBCを介してIPアドレスやデータベース名を基準に接続して利用するのが普通である。従ってデータ蓄積用のデータベースには、Windows や Unix 環境下で構築できるシステムとすべきであると考え『MySQL』をデータベースに採用することにした。

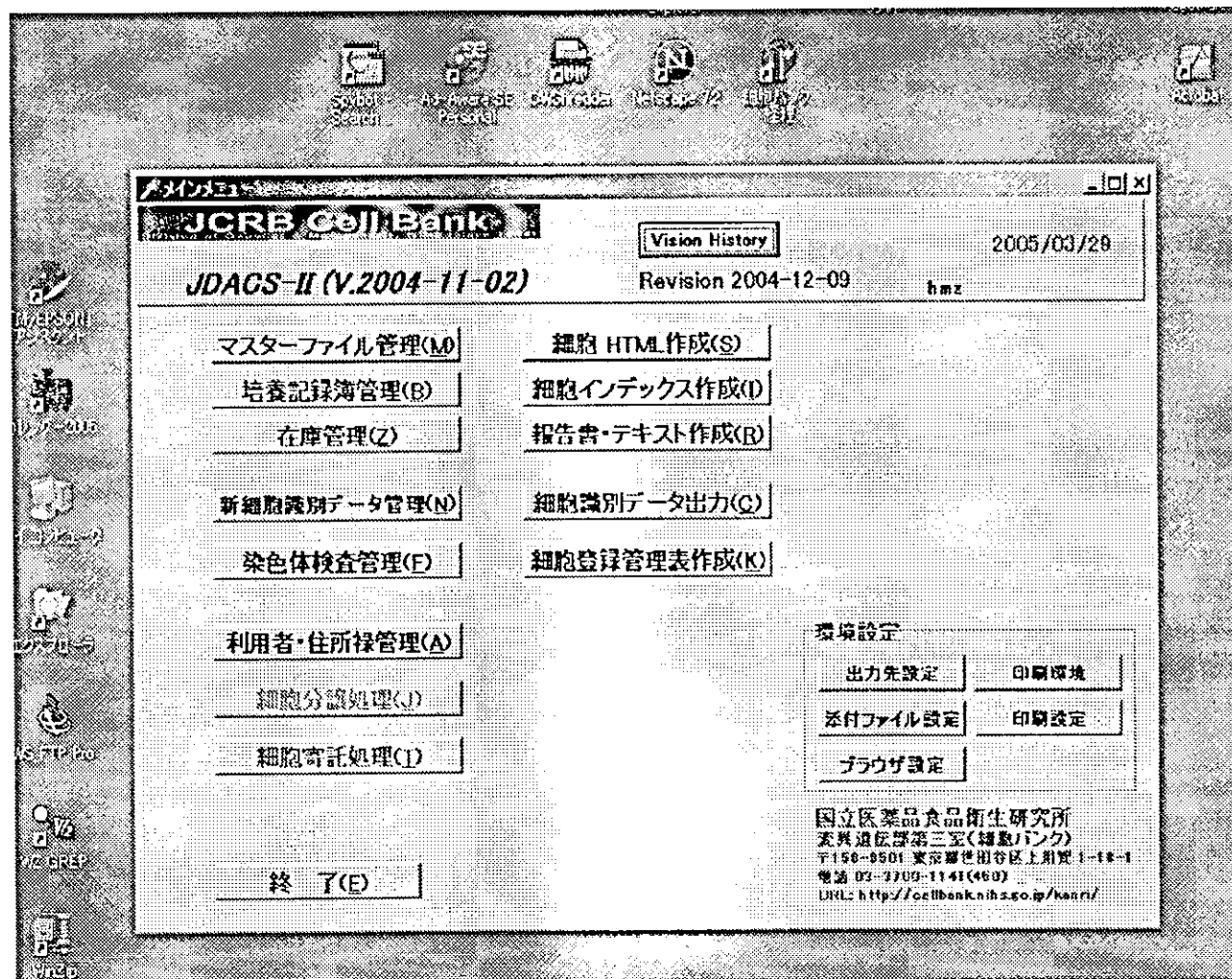
この結果、Delphiで構築した細胞バンク管理システムは、データベースファイルとして『dBASE』ファイルと『MySQL』ファイルの2種類のデータベースファイルを利用して稼動することになった(図2)。今年度は以上の点について最終的な改良を加えて、新たに発足する基盤研にシステムを移行する準備を整えて年度末の移転に備えた。新しいシステムはJDACS-II(JCRB Data Control System-II)と名づけた。

JDACS-IIは、細胞バンクを管理するためにコアシステムである。データベースは現在では既に古くなってしまったように見えるdBASEIIを利用しつつ、そのデータの入出力にはBDEによるソケットの利用で、近い将来のデータベースファイルの更新に備えている。

1985年英国のジェフリーによってDNAフィンガープリント法が報告されて依頼、細胞の個別識別が可能になり、当時問題となりはじめていた培養細胞のクロスコンタミネーションの実態を調査する基盤的手法が確立された。その後、この方法はSTR-PCR法として発展を遂げて現在では世界各国の細胞バンクがこの手法を利用して調査を開始している。我々JCRB細胞バンクでは1999年頃から本格的な調査を開始したが、大きな問題は結果をどのようにデータベース化するか

図3 新しい細胞バンク管理プログラム JDACS-II

図2で示した細胞バンク管理プログラムをDelphiによりWindowsのGUIを利用して動作するシステムに全面的に書き換えた。全体のコーディングは業者に委託したが、プログラムの基本構造はバンクの職員も理解しているので、業務の変更に伴いマイナーな修正は独自に実施することができる。また、このプログラムの開発にあたってはソースコードの納品を条件とした。



という課題であった。本手法による分析方法は現在のところヒト細胞のみが対象であるが、ヒトの全遺伝子配列の解読が完了した現在、ヒト細胞を利用する研究の機運が高まっており、そこに生じる誤りを取り除くことは重要である。そのため、ヒト細胞に限定したとしてもクロスコンタミネーションを排除するためのデータを確立することは重要である。

細胞バンクでは、1999年にSTR分析を開始すると同時に、このデータベース化を試みた。重要な点は、次々と明らかにされる個別のSTR分析結果を既に明らかにしたデータと迅速に比較し、同じ遺伝子プロファイルを見出してクロスコンタミの可能性の有無を明らかにすることであった。当時既に数百種のヒト培養細胞を保存していたことから、最低数百のデータセットを記録することを考えたがこれについては古いdBASEを利用するのではなく、新しく汎用的に利用されるようになっていたMySQLを採用することとした。このシステムはODBCによりWindows上でDelphiにリンクすることが出来たので、細胞を管理するプログラムとして既に構築していたJDACS-IIの中に埋め込んで構築することにした。当初は、記録するデータ形式を“0010100”という形式が直感的に理解しやすいので利用したが、データの記録に限界が生じたため、検出ピーク位置を直接データ化してローカス名と共に記述する形式に改め“<D5S818>11, 12”という記述方法にした(表2、表3)。その結果を表2に示したが現在までに809レコードを記録した。今年度の修正において変換プログラムを作成して旧来の“0010100”という記述方法を新しい記述方法、“<D5S818>11, 12”、に一括返還をした後、データを個別に点検して、変換仕切れなかった部分はマニュアルで修正した。

Delphiで利用するデータベースはあくまでも記録を目的とし、データの解析には使用しない。もちろんDelphiで解析プログラムを作成することも可能であるが、我々はあえて作成しないこととした。現在ヒトの遺伝子解析に伴う倫理問題が国内では広く議論されている最中である。細胞バンクではヒト細胞を扱っているため、原則として株化された細胞のため倫理問題に発展することは無いと信じているが、潜在能力として倫理問題に発展する可能性を秘めていることも確かである。従って、本来細胞のクロスコンタミネーションを防止するために構築しているSTRデータベースが、入力するデータによっては倫理問題に抵触していると指摘される可能性は皆無では無いであろう。

データ記録部と解析プログラムが同一システム上

に存在すると、どちらかいずれかで問題が指摘された場合、データの記録と解析の両者が同時にストップすることも想定される。従って、本システムではデータの記録部分とデータの解析部分を明確に分離することが望ましいと考え、Delphiにより構築する部分はデータの記録のみとした。このデータベースは医薬基盤研究所ネットワークシステムのファイアーウォールの内側に設置し、外部からはアクセス出来ない。蓄積したデータのうち公開可能なデータについては、データ管理者がファイアーウォールの外側に移動して公開し、WEBを通じてデータ解析が出来るようにした。STR解析プログラムはCGIプログラムとして主にPerlにより開発した。

STR データ解析

STR データ解析によるクロスコンタミネーションの有無の確認はWEBを通じて行うよう設計されている。このシステムにおける解析の考え方は次のとおりである。調査対象となるヒト細胞があった場合、実験を通じて該当細胞に関するSTRデータを得る。それをデータベースに記録した後比較を実行してEV値が1.000に近いものを探してクロスコンタミネーションの有無を知ることとなる。この場合、結果はEV値でソートするのでクロスコンタミの有無については容易に知ることが、任意の複数の細胞に関してどの程度のEV値を持つか知りたいという場合はそれらの細胞を選択してEV値を特定するわけではなかったので、探すことが困難となってきた。その理由の一つはデータ量が増大したことによるので、今後さらに困難になることが予想される。また、実験において特定の2つの細胞についての差がどの程度か知りたいというケースも増加してきており、任意の複数の細胞についての一致度がどの程度かを知るシステムが必要になってきた。そこで、今年度は、このシステムを構築することにした。

細胞バンクのホームページに入りCellIDを選択するとメニューが2つ現れるようになった(図4)。メニューの1番を選択すると旧来のシステムであり、細胞名を一つ指定してそれを元に他の細胞のEV値を求めてから値が大きい順にソートして表示される。図5ではHeLa細胞を選択して比較した結果を示した。上から順にEVが1.0に近いものから順に示され、EV=1.000の近くにHeLa以外の名称の細胞が多数表示されて、HeLa細胞のクロスコンタミネーションが多いことが読み取れるであろう。これに対してメニューの2(図4)を選択すると、任意に指定した複数の細

図5 既に運用しているヒト細胞相互比較システム

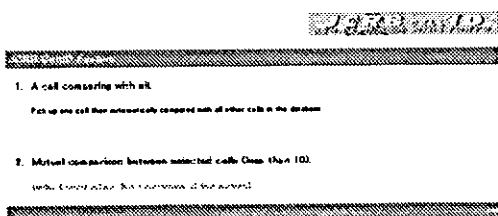
JCRB細胞バンクが開発したプログラムで、指定した細胞をデータベース上の他の全ての細胞と比較して類似性の高いものから順に一覧表で表示するプログラムである。クロスコンタミネーションがあればすぐに判定できる。しかし、比較する細胞数は時間と共に増加し見通しが悪くなってきた。そこで、特定した複数の細胞間での識別値(EV)を比較するソフトウェアの開発が必要になった。

* On clicking the button, original data displayed.

	Cell No.	Cell Name	Lot No.	EV	D10S818	D10S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPCX	CSF1PO
<input type="checkbox"/>	JCRB9004	HeLa	071994	1.000	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	IFO50005	J-111	12	1.000	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	IFO50016	Chang Liver	328	1.000	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	JCRB0073	J-111	100698	1.000	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	JCRB0649	HeLa.P3	120597	1.000	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	JCRB9027	KB	120398	1.000	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	JCRB9086	HeLa229	08232001	1.000	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	RCB0454	OST	xxxxxx	1.000	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	JCRB9066	Chang Liver	08242001	0.970	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16,17,18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	CCL 2.2	HeLa S3	atcc_web	0.968	11.12	13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	IFO50004	WISH	10	0.968	11.12	13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10
<input type="checkbox"/>	JCRB0649.1	HeLa.P3	08052004	0.968	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	12	9.10
<input type="checkbox"/>	NIHS0372	HeLa.P3	deposit	0.968	11.12	12.13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	12	9.10
<input type="checkbox"/>	YKNO003	HEp-2C-nid-n	04042005	0.968	11.12	13.3	8.12	9.10	16.18	7	X	8.12	9.10

図4 新しい比較方法に入るメニュー

メニュー1は旧来の比較を行うもので、図5のように結果が表示される。メニュー2が新しい比較方法を行うもので図6と図7の選択画面を経て図8の結果が得られる。



細胞のみの比較結果を知ることが出来る。メニュー2選択後示されるダイアログは旧来のものと良く似ているが、下のほうに選択した細胞の一覧が表示されるようになっている点異なる(図5)。ダイアログに細胞名を入力して検索ボタンを押すと登録されている細胞が一覧で表示される。そこで比較に使用したいロット番号の細胞のチェックボックスをチェックして「NEXT」ボタンをクリックするとそれが比較用に登録されてメニューの下部に表示される(図6)。表示された細胞についてはラジオボックスが付けられているので、最終的に比較元とする細胞をラジオボックスで指定することによって、その細胞との間の比較値(EV値)が表示されて大きいものから表示される(図8)。これにより、任意の知りたい細胞のみの一覧が示されることとなり、利便性が向上した。

図6 細胞指定ダイアログ

ダイアログに細胞名を入力して検索ボタンをクリックするとロット番号の選択画面に移行する。そこでロットを指定すると指定した細胞名をリストに加えてこの画面に戻る。その後ラジオボタンで比較元を指定して選択した細胞間でのE V値の比較を実行する。

Minimum comparison between selected cells

Find a STR data by the Cell Name

cell name :

1. Enter cell name and hit the search button.
2. Select any one of cells from the list and hit next.
3. The selected cell list will appear below the Selected cell list with radio button.
4. Hit compare after assigning one standard cell from the select.
5. The system will compare automatically between the selected cells.

Search example:

- "hela" matches HeLa, hela, HELA or etc. (Case insensitive exact match).
- "hela*" matches HeLa, HeLa S3, HeLa AG, or etc.
- "*ec*" matches ECV304, NEO14, Hec-1 or etc.
- "*" is a wild card for many characters.
- "?" is a wild card for a single character.

Selected Cell List
Select one cell as a standard and click the "compare" button.

HL60 -- JCRB0085 (Lot.031395) --
 HeLa -- JCRB9004 (Lot.071994) --
 K562 -- RCB0027 (Lot.D4232004) --
 P39/TSU -- JCRB0092 (Lot.031395) --
 TALL-1 -- JCRB0086 (Lot.062994) --

図7 ロット番号の指定

図6で細胞名を指定してSearchを実行するとこの画面が表示される。ここで、ロットを指定してNextボタンをクリックすると図6の画面下部に選択した細胞とロット番号が表示される。

HL60 -- JCRB0085(Lot.031395) --

Cell Information

D5S818	D13S317	D7S820	D16S639	VWA	TH01	AM	TPOX	GSF1PO
12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14

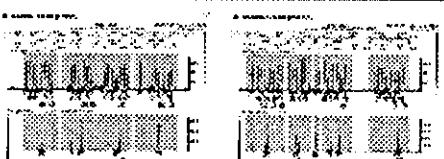


図8 指定細胞間での類似度比較

図6、図7のメニューを経て指定した細胞間で比較処理を実行した例。この場合は、指定した細胞に限定して相互にクロスコンタミネーションが発生しているか否かがわかる。この例では、P39/TSUはHL60と同一細胞であるがK-562やHeLaとは明らかに異なった細胞出ることが読み取れる。

Evaluation of cell individuality by Str-PCR methods

Graph Back to Search

* On clicking the button, original data displayed

Cell No.	Cell Name	Lot No.	EV	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPGX	CSF1PO
JCRB0085	HL60	031395	1.000	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14
JCRB0092	P39/TSU	031395	0.933	11,12	8,11	11,12	11	15,16	7,8	X	8,11	13,14
RCB0027	K562	04232004	0.500	11,12	8	9,11	11,12	16	9,3	X	8,9	9,10
JCRB0086	TALL-1	062994	0.500	9,12	8,9	10,11	9,10	17,19	7,9	XY	8,11	11,13
JCRB9004	HeLa	071994	0.400	11,12	12,13,3	8,12	9,10	16,18	7	X	8,12	9,10
JCRB0085	HL60	031395	1.000	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14

D. 情報提供システムの構築と維持

JCRB 細胞バンク事業では多数の培養細胞を収集して研究者に分譲するシステムをHS 研究資源バンク(ヒューマンサイエンス研究振興財団)と共同して実施しており、JCRB細胞バンクが主に収集を担当しHS研究資源バンクが分譲を担当している。研究資源バンク事業の重要な目的は過去の研究によって利用された研究材料を他の研究者に供することによって研究成果の有効活用を図ることにある。そのためには、優良な研究材料を収集することに加えて、収集した研究材料が先端科学研究に十分に利用できるだけの品質を持っていることを確認することもまた極めて重要な点であろう。特に、今年度の報告の中で注目しているSTR分析によってクロスコンタミネーションが無いことを確認して分譲に供することによって研究者は安心して研究に利用できるようになる。

数年前までは、このような確認手段は無かったので、多くの研究者はあまり疑うことをせず利用していたが、十分に確認できるようになった今日は確認情報を得てから利用することが極めて重要になってきた。

勿論、厳密さだけを議論すれば個々の研究者は各自が保有しているヒト細胞を細胞バンクと同じ方法で直接確認すべきであるという言い方も出来るが、全て

の研究者が細胞の確認に明け暮れているは国家として研究の発展は無い。そのために細胞バンクは存在していると理解すれば、我々が調査した結果は迅速に公開して、国内外の研究者に提供することが重要な意味を持つであろう。

以前は、実験結果を含む様々な情報は、紙などの印刷物としてから公開されることが普通であったが、現在では電子メディアが主流になってきたことから、これを上手に利用することによって迅速な情報公開が可能になった。勿論、印刷物とした情報の安全な保管や保存も電子メディアの脆弱性を考慮すれば必要なことになるので、両者を両立させなければならない点に面倒さは残るが、迅速な情報流通と地震等の災害による情報の遺失に対する備えを考えれば、いずれも必要なことであり、これを危機管理対策として重視するものである。

そこで、細胞バンクは既にSTRデータベースの構築のところで紹介したように、重要な情報はデータベース化して電子メディア上で管理することにしたが、ここには細胞バンク職員以外はアクセス出来ないようなクローズドのシステムとして構築した。そして、その中から公開可能なデータを抽出してネットワーク上の公開エリアに転送して、そこを外部に公開することにした。特にWorldWideWeb(WWW)が登場して以後、システムの構築が容易になったので、この考え方を発展さ

せてきている。非公開のデータベースは研究所の基幹ネットワークシステムにおいてファイアウォールで保護された内側に置くことによって外部から完全に遮断し、公開の必要がある情報だけを公開エリアに随時転送して公開し、細胞の検索や識別同定結果検索などに提供している。

『細胞バンク利用者』は細胞バンクから見るとネットワークの外側、即ちファイアウォールの外側のDMZエリア（非武装地帯）に置いた情報を利用してもらうことにした。そのため、DMZエリアに置いたデータについて、内部ネットワークからDMZエリア方向に一方通行にファイル更新が出来るようシステムの構築を実施しつつある。現時点ではまだ十分に自動化するに至っていないが、更新作業は頻繁に実施するよう努めている。各細胞の詳細情報を記したデータファイルは細胞情報を更新する都度自動的にHTMLファイルとして出力し、これをDMZに置いた公開エリアに転送する。また、STR分析などに利用するDNAプロファイルデータはテキストファイルとして出力して、これを

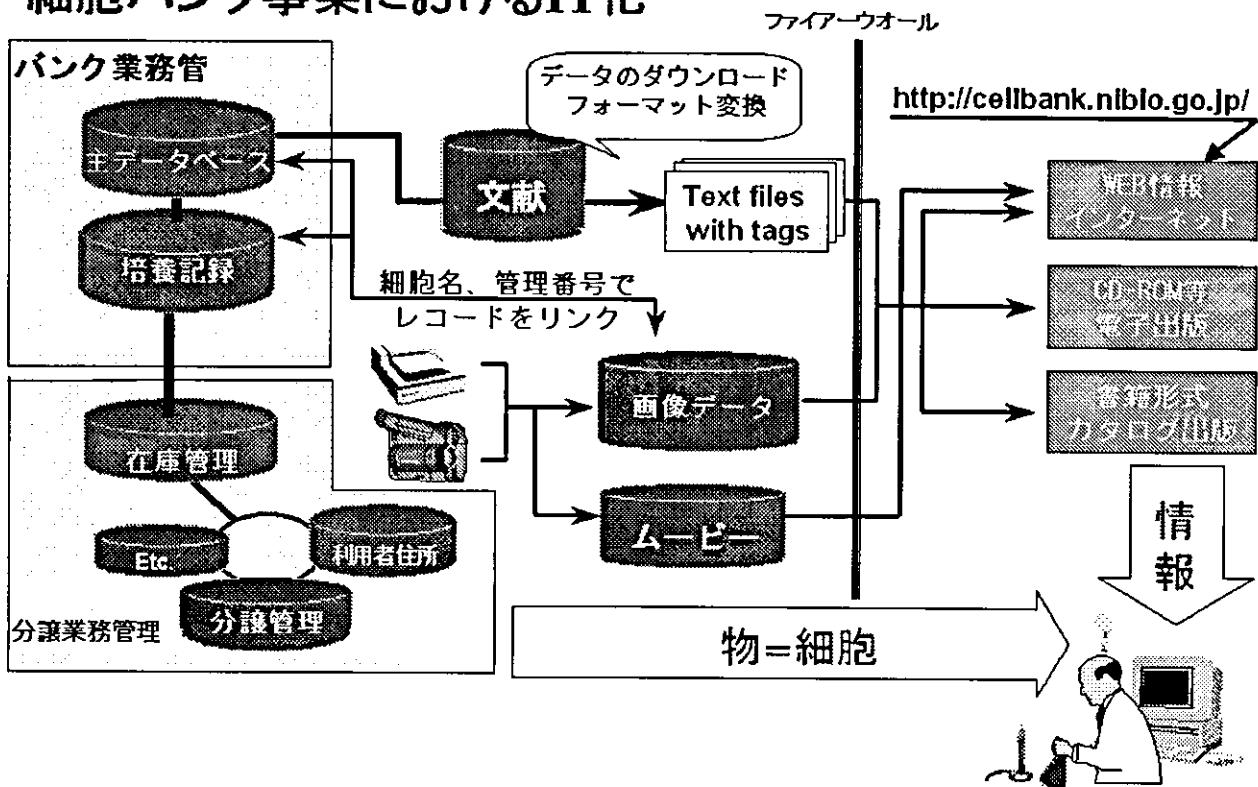
CGIプログラムからアクセスするデータファイルとして、Webを上で細胞にクロスコンタミの発生の有無を利用者自身が直接確認できるようにした。このシステムは多くの研究者に利用されているようで、細胞のクロスコンタミネーションを確認するページへは月間2000件ほどのアクセスがある。また、ホームページ全体へは月によって変動はあるが、多い月で8000件、少ない月で4000件程度のアクセスがある。

図9は、上記の細胞バンク情報システムを整理したものである。細胞バンク発足と同時に最も左側に示されている各種データベースファイルのフォーマットを決めて作成し、これにデータを入力してバンク事業が始まった。現在このデータベースには3356種の細胞が記録されているが、このうち分譲の対象となっている細胞は800種程度である。将来分譲対象となるものや、一度分譲対象として登録を目指したが品質管理の結果登録することが出来なかったもの、他の細胞バンクの記録をコピーしたものなど様々な情報が記録されているので、実際に分譲対象となっている細胞よりもはるかに多くの細胞に関する情報が記録されてい

図9 細胞バンクシステムの全体像

左側に細胞バンクで使用している主なデータベースを示し、右方向に利用の流れを示した。主データベースと培養記録を利用者に公開し、在庫記録以下の情報は公開していない。公開するデータは全てテキストファイルにダウンロードした後にWWWを経由して公開している。従って、ファイル化の際に自動的にHTML化して出力するシステムを構築した。

細胞バンク事業におけるIT化



る。

培養記録(cellspec. dbf)には、培養を実施した際の実際作業内容を記録しており、実際の培養の実数に近いが、それでも色々な培養関連情報があるので実際に細胞バンクで培養した記録は恐らく4000レコードぐらいでは無いと思われる。また在庫管理データファイル(cellstor. dbf)には保存している全ての細胞について、保存アンプル数、保存場所、アンプルの特徴などを記録している。ここに記録している情報はバンクが設立された当時(1985年)からの記録が全て保存されている。したがって、この記録が何らかの理由によって消滅してしまうと細胞を利用することが不可能になってしまうので、このデータベースを安全に維持管理することは極めて重要である。そのため、データベースへのデータ入力に利用した元になる培養記録はファイルとして安全な場所に保管し、万一の事態に備えると同時に、該当データベースについても毎日バックアップを作成している。

細胞の培養と保存に必要なこの3つのファイルに加えて、学術的な見地から個々の細胞に関連する文献データを管理することは重要である。JCRB細胞バンクでは、文献データベースを独立に作成して、全ての関連文献にID番号を発行することにし、このID番号を各細胞の該当欄に記録した。図中文献と記載したデータベースである。この構築にはReference Manager を利用している。データは可能な限りアブストラクトまで入力し、文献本体とのリンクも考慮中である。このReference Manager は面白い機能を持っており、主データベースからWEB用のデータを出力する際に、HTML書式で文献情報を追加できる機能を有している。操作上は多少面倒を強いられるが、これを利用すると公開する細胞情報に文献の一覧表をアブストラクトまで含めて公開する情報を添付することが出来るので、利用者の利便性は格段に向上するため必要な作業であると考えている。

こうして、データベース化された細胞情報は随時CellBankのホームページ上に出力されて、利用者が参照できるようになる。このシステムはもともと書籍形式のカタログの作成のために開発したものであったが、CD-ROMなどによる電子出版物の作成にも利用されるようになり。さらに、インターネット環境の整備の進行に従って、現在ではWEB用のHTMLファイルの作成に最も頻繁に利用されるようになった。その都度、出力用のプログラムを追加したり改修したりしながら現在に至っている。

さて、このシステムを今般の研究所移転に伴って医薬基盤研究所に移動するにあたって、一つ大きな問題が発生することとなってしまった。それは、このシステムがWebと連動して機能するようになってから既に数年を経過したが、出力ファイル作成用プログラムに問題のあることが判明した。つまり、HTMLファイルの特徴として、色々なWEB情報に自由にリンクできる記述が可能であるが、その記述を絶対ディレクトリ構造で記述している箇所が多々存在していることが明らかになったためである。システムも作り始めて数年経ているが初期の頃には移転を意識していなかったためドメイン名が将来変更になることを想定していなかった。そのため、ドメイン名を使った絶対リンクを作成したのである。そのため、医薬品食品衛生研究所から医薬基盤研究所にサーバを移動した後(nihs. go. jpからnibio. go. jpへ変更)、多数のリンク切れが発生することとなってしまった。勿論、予め想定されたものは探し出して相対アドレスに修正していたが事前にチェックすることが難しかった部分でリンク切れが複数発生した。

それでも、個々のファイルに独自に記録されたリンク名は面倒ではあるが一つ一つ拾い出して修正し、かなり問題を解消することができたので、修正し切れなかった部分は早急に対処する予定である。プログラムを利用して自動生成しているHTMLファイルにそのような絶対リンクがある場合はプログラムの修正やシステムの再構築が必要になる。いずれにせよ、HTMLを生成しているプログラムを丹念に探し出して、プログラムの記述を修正しなければならない。幸い当細胞バンクでは、プログラムの内容を全て把握しているので、その修正は独力で解決することが可能であるということである。年度終了時点で全文検索システム『ナマズ』を利用した細胞情報の検索システムにおけるリンク切れがまだ解消できていないが、新しい年度に入ったらすぐにナマズの再構築を実施し速やかに修正する予定である。

E. 倫理的課題の検討

近年、研究者に対して倫理性を求める社会の声が高まっている。当細胞バンクは厚生労働省管轄の細胞バンクとして、医学に関連する研究を支援することを重視しているために必然的にヒトに由来する培養細胞を多数収集する結果となっている。ヒト遺伝子DNAの全塩基配列が解明されて以後、ヒト由来材料は遺伝子情報という個人情報の宝庫であるという認識が確立

し、その取り扱いが個人情報の保護の視点に配慮することが求められるようになってきた。こうした事態は僅か数年前までは考えられなかった事態で多くの研究者には戸惑いが生じている。研究者は善意に基づいて研究という行為を職業として選択しており、生命の仕組みを解明することが医学の進歩に寄与し、それがヒトの命を救う行為であるという考えのもと、ヒトに由来する培養細胞を研究に利用することが倫理に抵触する問題であると考えたことは無かったと言って良いであろう。

しかし、ここ数年、研究費の不正使用や医療過誤等の問題が数多く報道される中で研究者の倫理性に対する疑問も数多く指摘されるようになってきているのが実情であり、そうした中で、ヒトに由来する研究材料を利用するというこの意味づけを研究者自らの手で捕らえなおすべきであるという認識が高まったかのように思う。細胞バンクではヒトに由来する研究材料(培養細胞)を多数取り扱う必要があることを踏まえて、『研究倫理』を敢えて研究テーマとして位置づけることを試みている。既に紹介したSTR分析結果のデータベース化はクロスコンタミネーションを排除するために純粋科学的に必須な当然のデータベース作りであるとも見られるが、一方で明らかに遺伝子多様性データベースとして個人識別に利用できるものであることから、個人管理のためのデータベースであるとも理解でき、そこに倫理性が問われる理由があることにもなっている。こうした問題を自ら洗い出して、その意義付けなどについての検討を加えることがこの課題の目標である。

OECDはグローバル化に伴う経済、社会、ガバナンスの課題に取り組む国際組織であるが、ここでも個人遺伝情報リサーチデータベース(Human Genetic Research Databases: HGRD)の検討に着手することとなった。この研究領域が経済活動の一環として重要な分野となることが国際的に認識されたことを意味するであろう。こうした会議への参加なども視野に入れて、ヒト細胞を配布することに関する検討を実施するものである。それに伴い、世界各国の事情を十分に理解するために、欧州や米国の積極的な情報収集を実施するものである。

F. 結論

平成16年度はかねてより計画されていた細胞バンクの移転が年度末に実施されることになった。1985年に細胞バンクが設置されて以後、培養細胞に関する

需要は年々増加してきた。そのため、1993年度には職員の増員等が認められ、バンクの事業体制が整備されてきたところであるが、施設が老朽化し、十分な品質管理を行い難いという状況もまた生まれていた。今回の大阪への移転にあたっては研究施設新設になり、設備も一新したのでバンク事業を進めやすくなった。また、理化学研究所細胞バンクは関東(つくば)に設置されており、厚生労働省細胞バンクが関西と地理的にも十分に隔離された土地に移転したことにより、地震が多い我が国にあつては安全確保にも貢献することになると考えられる。先の神戸大震災の際にも神戸大学の細胞保存施設が大きな被害を受けたこともあるので、地理的に離れた土地に2箇所のバンクを設置して相互に細胞を持ち合うという体制を構築することは今後の我が国の研究の体制を考えるうえで重要であろう。

本年は、年度末に実施された移転の準備を含めて、細胞を管理しているコンピュータシステムのメンテナンスやこれまでのプログラムの不備を調整することを重点にして研究を実施してきた。

また、1999年から実施してきたSTR分析によるヒト由来細胞の識別調査について既保存細胞に関する調査が一段落して、現時点での誤謬率が約6%と確定した。誤謬の多くはHeLa細胞の混入によるものであったが、それ以外のヒト細胞が混入するという事例も多々見られ、予想以上に細胞の誤謬が発生していることが明らかになった。これまで多用されてきた著名な細胞が実は誤った細胞であるという事例もあり、この点は培養細胞を利用している多くの研究に周知する必要があることは明らかである。そこで、今後、我々は、米国インビトロ学会、国内では日本組織培養学会などにおいて積極的にこの情報の詳細について発表して注意を促す活動を推進する計画である。

また、こうした情報は細胞バンクのホームページを通じて、実際のデータを紹介して実態を紹介する計画である。そのためにCGIプログラムを作成してホームページ上で細胞の比較計算を実施できるようなシステムを構築した。

G. 発表論文

1. Mizusawa, H., Kohara, A., Masui, T., Kurematsu, M., Takada, Y., Hojo, M., Ozawa, Y., Satoh, M., Yoshida, T., Takeuchi, M., Collection of cultured animal cells at the Japanese Collection

- of Research Bioresources (JCRB Cell Bank) in the National Institute of Health Sciences: An importance of the quality controls of human cultured cell lines. 10th International Congress of Cultur Collecitions (2004).
2. Kuroda, M., Tanabe, H., Yoshida, K. Oikawa, K. Saito, A. Kiyuna, T., Mizusawa, H. and Mukai, K., Ateration of chromosome positioning during adipocyte differentiation., J. Cell Sci., 117: 5897-5903(2004).
 3. Tanabe, H., Kupper, K., Ishida, T., Neusser, M., and Mizusawa, H., Inter- and intra-specific gene- density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. Cytogenet. Genome Res. 108:255-261 (2005)
 4. 増井 徹, 個人遺伝情報リサーチデータベース (Human Genetic Research Database)についてOECD 東京ワークショップに参加して. バイオサイエンスとインダストリー, 62:468-471(2004).
 5. 増井 徹, 人に由来する資料(組織・細胞及び情報)の医学・生物学研究利用における枠組み, Tiss. Cult. Res. Commun., 23:123-128(2004)

2004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）
研究報告書

培養細胞研究資源の収集・保存・供給システムの整備に関する研究
分担研究報告書

厚生省労働科学研究費補助金
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業 (ヒトゲノム分野))
平成 16 年度分担研究報告書

現在及び近未来の研究動向調査とそれに応じた細胞収集基本方針の
策定に関する研究

分担研究者 許 南浩 岡山大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨：

細胞バンクのあるべき姿を明らかにし、それに基づいて長期的な運営方針を決定するための検討を継続している。本報告書には、その一部として収集細胞の分類法を提案した。同時に、今後ますます重要性を増すと予想されるヒト各組織からの正常初代培養細胞を研究に使用するための基盤技術として、増殖を維持、制御するための新しい方法の開発を試みた。その結果、高い効率で初代培養細胞に適用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

細胞バンクのあるべき姿を体系的に検討し、具体的な提言をすることを目的とする。その第一歩として、昨年度は資料の収集、保存、活用という類似の特徴を持つものとして、図書館、博物館、文書館、生物資源バンクなどを総合的に研究する総合資料学およびその一分野としての細胞バンク学の構築を提言し、その概略を報告した。今年度は、より具体的な検討を行った。スペースの関係で、その一部を以下に述べる。同時に、生命科学研究の動向を調査すると共に自ら研究を推進する中で、有用な細胞を開発するための基盤的技術開発を行う。

B. 研究方法

総合資料学領域の先行分野である図書館(情報)学、博物館学関係の資料を解析し、参考にしながら、細胞バンクに特有の条件を考察した。同時に、新しい細胞を調製・樹立するため、初代培養細胞の増殖を維持・促進する新しい方法の開発を試みた。

C. 研究成果と考察

1. 資料(収集細胞)の分類

1) 資料分類規範としての図書十進分類法

資料分類法として規範的なものは図書を分類する十進分類法である。これは Melvil Dewey (1851~1931) が考案したものを基礎に世界中で少しずつ改変して使っている。その特徴は、10 項目、3 段階に分ける、すなわち全体として 1000 項目に分類するのが基本で、10 項目のうち 1 つは分類不能なものに充てていることである。日本では殆どの図書館は基本的にこの分類に依っているが、国立国会図書館だけは独自の分類体系を使用している。分類の基盤になるのは図書の内容である。

収集細胞(株)の分類

細胞(株)は図書と違って、その属性を容易に見て取ることができない。従って、バンクに収集した細胞(株)の分類は、細胞の由来に基盤をおくことが妥当であると

考えられる。

細胞（株）の由来に関して考慮すべき要素は、①動物種、②臓器、③組織、④正常か腫瘍か、ということである。この他に、発生過程に特徴的に表れる細胞（例えばES細胞）や培養内で人工的に作られる細胞（例えばハイブリドーマ）を考慮に入れる必要がある。これらの要素を考慮して、現実的で分かりやすいことを重視し、図-1に示すような分類法を提案する。実践的な立場からすると、細胞の特性を最も端的に表すのは由来組織なので、これを基本分類として、0～9の数値をあてる。発生期に特徴的に現れる組織と培養内で人工的に作られる細胞は独自の項目とする。ここでいう人工的とは融合細胞のように細胞の性質が劇的に変化するものを指し、遺伝子導入による改変細胞などは元の細胞の分類項目に入れる。次ぎに由来臓器による分類を行うが、これは多数になるので数値なら2桁必要である。アルファベットなら1文字で対応することも可能であるが、類推を可能かつ容易にするため、2文字とする。種の分類も同様である。正常性に関しては1文字とする。以下に、その項目に分類される個々の細胞（株）に4桁の番号をあてる。結局、10桁の文字・数値で個々の細胞を識別すること

になる。

細胞の分類体系は国内の各バンクが共通して使用すべきであり、将来は国際的に共通の規準を定めることが望ましい。長期にわたって影響があるので、その構築には慎重な議論が必要であり、図-1に示すものは議論の出発点である。但し、Deweyの図書十進分類法も、厳密には各国で異なっており、また数年おきに改訂されている。細胞の分類法も、ある程度、弾力的に考える方がよいであろう。

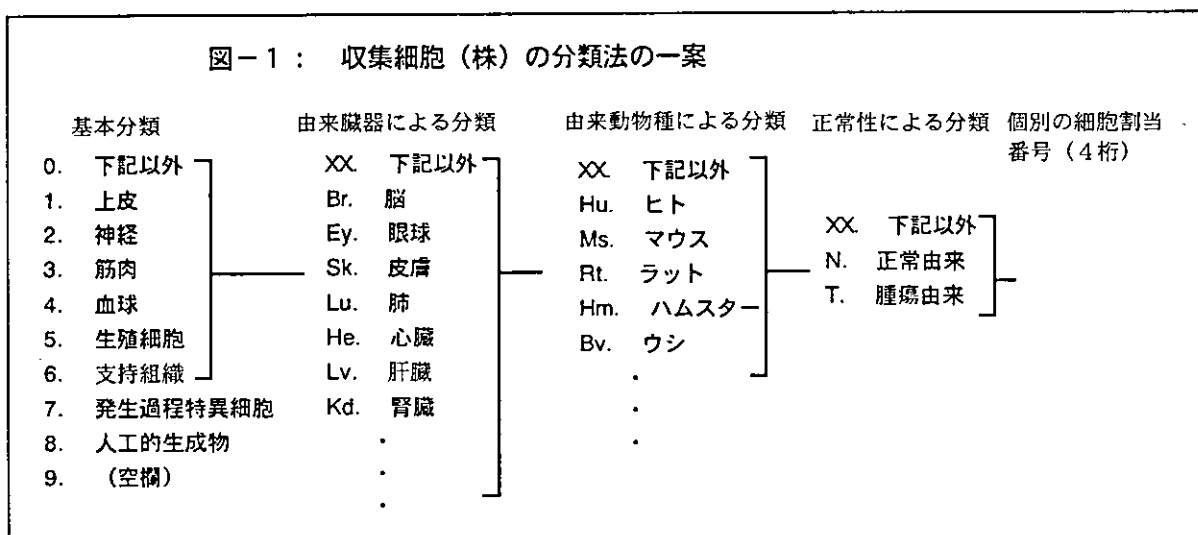
2. 細胞の収集

1) 細胞収集の基本方針

資料館活動の共通の特徴は、資料が汲めども尽きぬ情報を内包しており、保存しておけば未来の人類の知恵でそれを抽出できるということである。情報に変換してコンピュータに保存しておくものとは、根本的に異なる。その意味で、資料館活動一般に言えることであるが、細胞バンクにとっても、どのような細胞をどの範囲で収集するかが、基本的に重要な問題である。

昨年度の報告書で議論したように、細胞は生命の基本単位であり、より高次には生命体を再構築する元となり（つまり基本的には、あるいは近い将来、細胞があれば個体を生み

図-1： 収集細胞（株）の分類法の一案



出しうる)、より低次には遺伝子情報をいつでも取り出せる形で含む。従って、細胞は生物資源バンクの要であり、基本的には網羅的に細胞収集を進めることが望ましい。しかし、現実には収集・維持・管理にあてる資源は限られているので、優先順位を定める必要がある。

一般的に、総合資料学活動に見られる資料の収集規準を列挙すると以下ようになる。

- (1) 多くの人の利用需要がある。
- (2) 知的活動をより強く刺激する。
- (3) 歴史的意義がある。
- (4) 稀少である。
- (5) 網羅的観点から必要である。

細胞収集の基本方針に関しては、別途詳しく検討する。

現時点では、大部分の細胞バンクが必ずしも体系的な方針に基づいて収集を進めているとは言い難い。逆に供給している細胞、すなわち需要の側から見ると、ヒト腫瘍由来細胞株が圧倒的に多い。この一部は制がん剤の効果の研究等、がん細胞としての特性に着目した研究に用いられているが、大部分は腫瘍由来細胞が保持している正常細胞としての機能に着目した研究に使われている。しかし、言うまでもなく、腫瘍由来細胞は多かれ少なかれ正常細胞とは異なっているのであって、可能な限り正常細胞を研究に用いるに越したことはない。また、今後ますます盛んになると予想される再生医学領域の研究においては、幹細胞を含めた正常細胞の活用が必須であり、細胞バンクもそれに対応する必要がある。しかし、ヒト正常細胞を収集、供給する上で大きな問題は、その増殖性に限界があることである。

3. 正常細胞の増殖を制御する新しい技術の開発

1) 背景

ヒト正常細胞の増殖を促進し、細胞寿命を

克服するため、これまで主に遺伝子導入が行われてきたが、効率が悪く、不可逆的な変化が起こって細胞の正常性が損なわれるのが難点であった。そこで我々は、タンパク質の細胞内導入を利用した新しい細胞増殖制御技術の開発を試みた。

2) Decoy oligonucleotides の細胞内導入による転写因子活性制御

細胞増殖の制御や細胞寿命には様々な転写因子が関与している。従って、このような転写因子の機能を一時的・可逆的に操作できれば、細胞増殖の制御につながる。転写因子は特異的な塩基配列をもつ DNA に結合してその機能を発揮するので、外部からその結合配列を細胞内に導入すると、競合的に転写因子の機能を阻害される (decoy oligonucleotides)。問題は多様な細胞に高い効率で decoy oligonucleotides を導入する方法である。我々は、非常に効率よく細胞の核内に導入される運搬タンパク質を設計し、細胞増殖に抑制的に働く代表的な転写因子である p53 の機能を特異的に阻害できることを示した。この方法は、脳由来の初代培養細胞、ヒト血球細胞、マウス ES 細胞など、これまで遺伝子導入効率が低いことで知られている細胞にも、ほぼ 100% の効率で作用しうる。

3) Rb 遺伝子の直接的抑制による細胞増殖制御

我々は、高い効率で多様な細胞にタンパク質を導入する技術を用いて、細胞増殖を抑制する主要なタンパク質である Rb の機能を直接かつ特異的に抑制することによって、初代培養細胞の増殖を可逆的に維持することを試みている。予備的な実験では有望な結果が得られており、さらに検討を続けて、ヒト各組織の初代培養細胞を、簡便に研究に使用できるシステムの構築を目指したい。

E. 研究発表

[論文発表]

1. Kurose K, Sakaguchi M, Nasu Y, Ebara S, Kaku H, Kariyama R, Arao Y, Miyazaki M, Tsushima T, Namba M, Kumon H, Huh NH: Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J Urol* 171(3): 1314-1318, 2004
2. Miyazaki M, Masaka T, Akiyama I, Nakashima E, Sakaguchi M, and Huh N: Propagation of adult rat bone marrow-derived hepatocyte-like cells by serial passages in vitro. *Cell Transplantation* 13(4): 385-391, 2004
3. Sakaguchi M, Miyazaki M, Sonogawa H, Kashiwagi M, Ohba M, Kuroki T, Namba M, Huh NH: PKCalpha mediates TGFbeta-induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. *J Cell Biol* 164(7): 979-984, 2004.
4. Miyazaki M, Sakaguchi M, Akiyama I, Sakaguchi Y, Nagamori S, Huh NH: Involvement of interferon regulatory factor 1 and S100C/A11 in growth inhibition by transforming growth factor beta 1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 64(12): 4155-4161, 2004
5. Makino E, Sakaguchi M, Iwatsuki K, Huh NH: Introduction of an N-terminal peptide of S100C/A11 into human cells induces apoptotic cell death. *J Mol Med* 82(9): 612-620, 2004
6. Itoh M, Hiraoka Y, Kataoka K, Huh NH, Tabata Y, Okochi H: Novel collagen sponge reinforced with polyglycolic acid fiber produces robust, normal hair in murine hair reconstitution model. *Tissue Eng* 10(5-6): 818-824, 2004
7. Kanamori T, Takakura K, Mandai M, Kariya M, Fukuhara K, Sakaguchi M, Huh NH, Saito K, Sakurai T, Fujita J, Fujii S: Increased expression of calcium-binding protein S100 in human uterine smooth muscle tumours. *Mol Hum Reprod* 10(10): 735-742, 2004
8. Akiyama I, Tomiyama K, Sakaguchi M, Takaishi M, Mori M, Hosokawa M, Nagamori S, Shimizu N, Huh NH, Miyazaki M: Expression of CYP3A4 by an immortalized human hepatocyte line in a three-dimensional culture using a radial-flow bioreactor. *Int J Mol Med* 14(4): 663-668, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

細胞培養にしばしば観察される自己増殖様顆粒に関する研究

分担研究者 原澤 亮 岩手大学農学部 教授

研究要旨

細胞培養を汚染する微生物として、これまではマイコプラズマやペスティウイルスが主要なものとされてきたが、それ以外にいわゆる「培養できない微生物」による汚染が少なからず存在することが指摘されている。本年度は細胞バンクへ寄託された細胞培養の中にこの「培養できない微生物」に該当すると思われる事例が存在したので、その本態の解明について研究した。しかし、その結果、汚染微生物と思われた「培養できない微生物」は微生物ではなく、ウシ血清由来のフェチュイン(fetuin)を付着させた無機質の顆粒であることが判明した。しかし、無機質がなぜ自己増殖様の挙動を示すのかは解明できなかった。

A. 研究目的

細胞培養は個体と異なり感染防御機構をもたないため常に易感染状態にあるといえる。このためさまざまな微生物による感染を受けることになる。細胞培養を汚染する微生物としては、従来からマイコプラズマやペスティウイルスが知られているが、このほかいわゆる「培養できない微生物 (viable but non-culturable, VBNC)」による汚染が指摘されている。VBNCは通常の培地により培養不能な状態の微生物群を総称するものだが、近年にわかにその存在が注目されるようになり、わが国でも2004年10月には「培養できない微生物たち」(学会出版センター)という翻訳書が刊行されるに至っている。JCRB細胞バンクにおいて寄託された培養細胞のひとつ(Kasumi-6細胞)に運動性を示す自己増殖様顆粒が発見された(図1)。本顆粒は通常の寒天平板培地では集落の形成が認められないながら、この自己増殖様顆粒はウシ血清を添加した無細胞の液体培地で運動性を示しながら個数を増やすため微生物であろうと認識されたものの、固形培地では増殖が認められない点でVBNCの状態にあると思われた。本研究はKasumi-6細胞培養に検出されたこの自己増殖様顆粒の性状を明らかにすることを目的に実施した。

B. 研究方法

検査対象とする自己増殖様顆粒を Kasumi-6 細胞と分別するために、同培養細胞を -80°C に一晩保存後、孔径 800 nm のメンブランフィルターで濾過し、培養細胞の成分を除去し、濾液に新鮮培地 (RPMI 1640/10%FCS) を添加して 37°C で1週間培養した。培養液から遠心 ($10,000\text{ g}$ 10分) により粒子を集め、ダルベッコのリン酸緩衝液 (PBS) で3回洗浄した。遠心により得た白色ペレットからDNA抽出を試みた。また、同ペレットを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析するとともに、グルタルアルデヒド固定して透過型電子顕微鏡により観察した。さらに、同ペレットを PBS でさらに3回洗浄後、分光光度計により吸光度を観察した。

C. 研究結果

(1) 光学顕微鏡による観察：

Kasumi-6 細胞培養から細胞成分を除去して、残りの培養液を倒立型位相差顕微鏡により観察すると粒子は大きさ $1\text{ }\mu\text{m}$ 程度で、しきりに形態を変化させながら遊泳運動していた (図2)。

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Laemmli 法) による分析：

遠心により集めた顆粒を PBS で3回洗浄後、DTTによる還元処理したものと無処理のものをそれぞれ並行して10%ゲルにより電気泳動したところ、還元処理した場合には約 66 kDa 、また非還元の場合は 54 kDa 付近にそれぞれ単一のバンドを形成した (図3)。このバンドを PVDF 膜へブロッティングさせ、タンパク質のN末端の一次構造を調べたところ、「IPLDPVAGYKEPA」の13残基が決定でき、ウシのフェチュイン (α -2-HS-glycoprotein) と同定された。

(3) 透過型電子顕微鏡による観察：

グルタルアルデヒド固定したサンプルを樹脂に包埋し、超薄切片標本を作成し、4万倍で観察した。その結果、サンプルには生物学的特徴が見出せず、ハイドロキシアパタイトを思わせる無機的な所見が観察された (図4)。

(4) DNA抽出の試み：

一般的なDNA抽出法を試みたが白色のペレットはプロテナーゼ K によっても、また SDS によっても溶解することはなく、抽出操作を続けても最終的に核酸が得られなかった。

(5) 分光光度計による分析：

遠心後の白色ペレットを蒸留水に懸濁させ、200 nmから700 nmまでスキanningして吸収を調べたところ、無機質と考えられる曲線が得られた(図5)。

D. 考察

Kasumi-6 細胞培養の培養液をサンプルにして原核生物の16SリボソームRNA遺伝子領域を増幅させるためのプライマーセットを用いてPCRを行ったところ陽性バンドが形成されたので、その塩基配列を調べた。その結果、ベータプロテオバクテリウムに近縁な配列が検出されたため、これが汚染顆粒の本態であると当初考えたが、その後の検討により、誤りであることが判明した。今回の調査研究により、Kasumi-6 細胞培養に検出された自己増殖様顆粒から培地成分のウシのフェチュインが検出された。フェチュインはハイドロキシアパタイトに親和性を示し、複合体を形成することが知られている。しかし、培地対照からは該当するような顆粒の生成はみられず、培養液中でのハイドロキシアパタイト生成の機序は不明である。電子顕微鏡による観察所見もハイドロキシアパタイト様とするものであった。また、分光光度計による解析では無機質と考えられる成績が得られた。これらのことから、この顆粒はウシ血清由来フェチュインを吸着した無機質であるとの結論に至ったが、その化学組成、増殖性(顆粒数の増加)や運動性(形態変化)の機序の解明は今後の課題として残された。また、対照実験としてKYSE系の細胞培養について同様に-80℃に一晩保存後、孔径800 nmのメンブランフィルターで濾過し、培養細胞の成分を除去し、濾液に新鮮培地(ダルベッコMEM/10%FCS)を添加して37℃で1週間培養したところ、運動性を示す類似の顆粒が出現してきたことから、このような自己増殖様顆粒は多くの細胞培養に存在するものと考えられる(図6)。細胞培養に見い出されるこれら類似の顆粒がすべて同一のものとはにわかに断定できないが、無生物による汚染でありながら、見かけ上、生物のような挙動を示す汚染因子が存在することは細胞培養の品質管理において注意を要する問題となろう。また、フェチュインを含むことからそれによる生理活性が実験系を攪乱する場合があることに留意する必要もあろう。

E. 結論

Kasumi-6 細胞培養に検出された自己増殖様顆粒はウシ血清由来のフェチュインを吸着した無機質であることが判明したが、この無機質の理化学的性状は今後の研究課題として残された。この汚染物質は培養液中において個体数を増やすため継代希釈によっても除去ができなかった。

F. 研究発表

(6) 論文発表

- (1) Giangaspero, M. and Harasawa, R. (2004) Genetic variety of *Bovine viral diarrhoea virus 2* strains isolated from sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 323-326.
- (2) Harasawa, R., Pitcher, D.G., Ramirez, A.S. and Bradbury, J.M. (2004) A putative transposase gene in the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma imitans*. *Microbiology* 150: 1023-1029.
- (3) Giangaspero, M., Vacirca, G., Harasawa, R., Büttner, M., Panuccio, A., De Giuli Morghen, C., Zanetti, A., Belloli, A., and Verhulst, A. (2004) Genotypes of pestivirus RNA detected in anti influenza virus vaccines for human use. *Vet. Ital.* 40:7-21.

(7) 学会発表

- (1) Harasawa, R., Pitcher, D., and Bradbury, J.M. (2004) *Mycoplasma imitans* possesses a putative transposase gene in the 16S-23S rRNA intergenic spacer region. 15th Congress of the International Organization for Mycoplasmology, Athens, GA
- (2) Ramirez, A., Pitcher, D., Harasawa, R., Naylor, C.J., and Bradbury, J.M. (2004) Amplification of the 16S-23S intergenic spacer to distinguish *M. gallisepticum* from *M. imitans* and other avian *Mycoplasma* species. 15th Congress of the International Organization for Mycoplasmology, Athens, GA

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

图 1

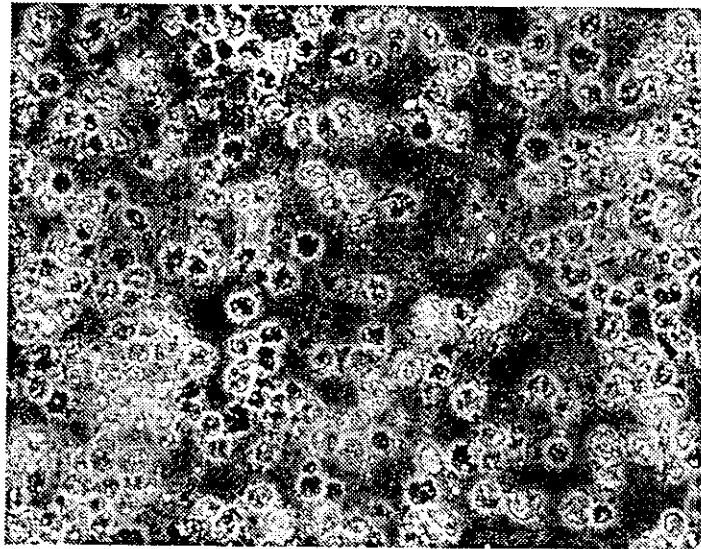


图 2

