

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)

生命科学研究資源基盤としての培養細胞株の収集・保存・供給
システムの整備に関する研究

平成15年度～17年度 総合研究報告書

平成17年度 総括・分担研究報告書

課題番号：H15-ゲノム-002

主任研究者 水澤 博

独立行政法人医薬基盤研究所
生物資源研究部 細胞資源研究室
〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8
電話：072-641-9819
FAX：072-641-9851
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>

平成18年4月10日

目 次

A：平成15年度～17年度 総合研究報告書

- I. 生命科学研究資源基盤としての培養細胞株の収集・保存・供給システムの整備に関する研究----- A-1
水澤 博

B：平成17年度 総括・分担研究報告

I. 総括研究報告書

- 生命科学研究資源基盤としての培養細胞株の収集・保存・供給システムの整備に関する研究----- B-1
水澤 博

II. 分担研究報告

1. ヒト細胞の研究資源化と研究倫理に関する研究 ----- B-44
増井 徹
2. 培養細胞における遺伝子発現データベースの作成 ----- B-53
小原 有弘
3. 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 ----- B-62
許 南浩
4. 培養細胞に出現する汚染微生物のモニタリングに関する研究 ----- B-73
原澤 亮
5. 遺伝性疾患日本人患者細胞の研究資源化と分譲に関する研究 ----- B-83
立花 章
6. 正常2倍体ヒト線維芽細胞の研究資源化と分譲に関する研究 ----- B-87
木村 成道
7. 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 ----- B-97
安本 茂
8. ヒトの疾患モデル細胞の研究資源化に関する研究 ----- B-100
田中 憲穂
9. ヒト尿路上皮腫瘍(腎臓癌, 膀胱癌等)及び後腹膜の肉腫の樹立に関する研究 ----- B-105
執印 太郎
10. ヒト食道癌由来細胞株・膵臓癌由来細胞株の樹立に関する研究 ----- B-109
嶋田 裕
11. ヒト膵臓由来細胞株、肺癌由来細胞株の樹立に関する研究 ----- B-113
井口 東郎
12. 実験腫瘍及びヒト消化器がん由来細胞株の樹立に関する研究 ----- B-118
柳原 五吉
13. ヒト肝・胆系組織由来細胞の研究資源化に関する研究 ----- B-121
永森 静志
14. ヒト組織の研究資源化に関する研究 ----- B-127
小林 真一

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)

生命科学研究資源基盤としての培養細胞株の収集・保存・供給
システムの整備に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

課題番号：H15-ゲノム-002

主任研究者 水澤 博

独立行政法人医薬基盤研究所
生物資源研究部 細胞資源研究室
〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8
電話：072-641-9819
FAX：072-641-9851
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>

平成18年4月10日

課題番号：H15-ゲノム-002

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）
総括研究報告書

生命科学研究資源基盤としての培養細胞株の
収集・保存・供給システムの整備に関する研究

主任研究者：水澤 博 医薬基盤研究所生物資源研究部 部長

研究要旨

当該研究は、総合科学技術会議諮問第5号に対する答申に沿って生命科学研究の基盤を強化(p34)する目的をもって実施するものである。本研究では知的基盤整備(p36)の一環として生物遺伝資源研究材料(p36)である『ヒト由来培養細胞株』の収集、標準化(p38、高度化=誤謬・汚染の排除)、並びに関連する情報基盤の構築(p38、IT化)を持続的に実施し、本研究を通じて確立された培養細胞研究資源をHS研究資源バンクを通じて国内外の多数の研究者に提供し、生命科学研究の推進に貢献している。本研究においては近年国民から要望の強い倫理的課題もクリアし、ヒト資源を流通させる基盤の構築も重視し、国民的理解の元で生命科学研究を推進できるよう研究倫理も研究課題として掲げて取り組んできた。従って、本研究は生命科学研究資源バンクを実際に推進する業務全般とその業務を発展させるための研究課題を一体化させて取り組んでいるものである。

厚生労働省細胞バンク(JCRB細胞バンク)は1985年に我国に初めて設置された公的細胞バンクであり、マイコプラズマ混入等の細胞汚染への対策や、最新のDNA分析法に基づいた細胞のクロスコンタミネーションを迅速に発見して排除するシステムを、情報システムの積極的導入を図って確立してきた。その結果、当細胞バンクから提供した細胞は汚染や誤りが無い国際的に通用する高品質な細胞として評価を頂き、現在では年間3000アンプルの細胞を有償で分譲するまでに成長した。本年度、当細胞バンクは東京(国立医薬品食品衛生研究所)から大阪(医薬基盤研究所)に移転して、施設を大幅に整備して再構築を図ることになりその作業に大幅に手を取られた。にもかかわらず、一般研究者からの細胞の寄託は過去の実績を大幅に上回る105種という数となった。このように当細胞バンクは着実に発展している。(要旨中のpは、H17.12.27,総合科学技術会議諮問第5号答申のページ番号)

分担研究者

増井 徹	医薬基盤研究所生物資源研究部 主任研究員
小原有弘	医薬基盤研究所生物資源研究部 研究員
許 南浩	岡山大学大学院医歯学総合研究科 教授
原澤 亮	岩手大学農学部 教授
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	東京都老人総合研究所 名誉所員
安本 茂	神奈川県立がんセンター 専門研究員
田中憲徳	食品薬品安全センター-秦野研究所 遺伝毒性部長
執印太郎	高知大学医学部腎泌尿器制御学教室 教授
嶋田 裕	京都大学腫瘍外科 講師
井口東郎	国立病院四国がんセンター臨床研究部 部長
柳原五吉	国立がんセンター研究所 実験動物管理室 省令室長
永森静志	杏林大学医学部,総合医療学 教授
小林真一	聖マリアンナ医科大学 薬理学教室 教授

A. 研究目的

当該研究は、1985年対ガン10ヵ年総合戦略の一環として設置された厚生労働省研究資源バンク事業を長期にわたって持続的に発展させることを目的とする。生命科学研究に培養細胞(主にヒト由来)が不可欠であるという状況は今後も続くと予想されることから、これを研究資源として積極的に収集して品質の高度化をはかって『ヒトゲノム研究』を始めとする生命科学研究の現場に迅速に提供するシステムを維持発展させることは、ゲノム研究を含む我国の厚生科学研究を今後とも継続して発展させるには不可欠である。本研究班はこの細胞バンクシステムを継続的に発展させることを目的に厚生労働省より委託されて実施している。この目的を達成するために、当研究班では今年度は次の諸研究課題を設定して解決を図ってきた。

① 年間40から50種類を目標に培養細胞を収集し、品質の高度化を図る。

細胞バンクは培養細胞を収集して提供(分譲)することを使命としている。発祥はアメリカであるが最初のヒト培養細胞であるHeLa細胞が樹立された1951年以後すぐに細胞バンクの構想がアメリカで生まれ実現してきた。将来の生命科学の発展を見越した卓越した見識によるものであるが、その後米国ではクロスコンタミネーションの問題やマイコプラズマによる細胞汚染の問題の発生に際して既に確立していたATCC(American Type Culture Collection)が収集した細胞を中心に調査検討し、汚染の排除とクロスコンタミネーションの排除に大きく貢献することとなり、米国では1970年代には細胞バンクによる細胞の品質の高度化が常識化する

こととなった。当時まだ公的細胞バンクを確立していなかった我国に対しては欧米先進国の研究者の目は冷ややかで日本は高度な科学技術を持つといいながら汚染した細胞や謝った細胞を使って生命科学研究を行っているという暗黙の批判があったと当時の培養技術に携わる研究者は語っていた。こういう問題は記録が残る論文にはなりにくい。そこで、バンクの運営に携わる我々は、多くの細胞を収集して高度化する作業を実施することが重要であると考えているが、そのためには、細胞の収集に伴い、細胞に関連する出来るだけ多くの学術情報を入手して整備しなければならない。細胞入手の初期には、入手した細胞をバンク内で迅速に培養するための技術情報が重要であるし、細胞を公開する段階になったときは該当する細胞をWEBを通じて検索できるよう情報を公開しなければならない。そのため、入手した情報はデータベース化して内部管理に利用できるようにアレンジすると同時に、いつでもWEB上に公開できるよう準備をしておかなければならないのである。細胞の入手にあたっては、こうした作業とともに実施することになり、そのプロセスに不都合があればいつでも改良のための研究を実施しなければならないのである。

② 収集した培養細胞について汚染状況を調査し、クリーンな細胞のコレクションを確立する。また、細胞の誤謬を排除するために遺伝子と染色体の分析を実施する。

細胞バンクでは収集した細胞を職員が手分けして順番に培養する。その過程で、必ず細菌、真菌、マイコプラズマ、による汚染があるか否かを検査する。我々は汚染が無いこ

とを期待しているが、そのためには出来るだけ高感度に汚染を検出する努力を行わなければならないし、以後紹介する各種検査についてもいえることであるが、新しい方法を一つ開発して検査を実施するシステムを作る場合、以前から実施していた検査を中止して新しい検査を追加する場合もあるが、古い検査を停止することが出来ないという場合もある。結果、職員の作業量は徐々に増加してゆくことになる。そのため、検査手法の開発も新しい検査手法の開発も重要であるが、従来の複数の検査をまとめて一つにするような方法の開発研究も重要である。さらに、分子生物学の発達の結果、遺伝子を検査することによって大幅な労力の改善も期待できるようになってきたので、今後はそうした方向に研究が向かうことも予想される。また、我国の研究者から収集した細胞の汚染率などのデータを集計することも重要な研究課題である。

- ③ マイコプラズマ検査は、蛍光染色法と Nested PCR 法の 2 種類の方法で確認してきたが結果を得るまでの時間が長い(1 週間)という弱点があった。そこで、新たに迅速検出法の導入を図って作業の効率化を検討する。

マイコプラズマは細胞壁を持たない最小の微生物である。そのため、生存に必要な遺伝子のセットも最小限しか持たず培養を通じて検出しにくい微生物である。そのため、確実な検出を期待して蛍光色素染色による検出法と PCR 法によって DNA を検出する方法の 2 つの方法でマイコプラズマの汚染を確認してきた。いずれの方法も培養や PCR 実験を含むために、結果を得るには、実験開始後二

日から一週間を必要としていた。そのため、マイコプラズマ汚染が陽性と出た場合に除染の作業に入るタイミングが大きくずれ、既に長期保存用のアンプルが出来上がってしまってから汚染しているという結果が出て、相当するのアンプルを廃棄せざるを得ない場合というケースも生じていた。そのため、短時間で汚染の有無を確認する方法を探していたが、最近マイコアラート法という試薬が紹介されたことからこれを試したところ望ましい結果が出たので結果を報告する。

- ④ 昨年度確認したカルシウムを主成分とする微粒子の実態解明を実施する。

培養細胞を汚染する微生物としては細菌、真菌、マイコプラズマ、原虫にウイルスを加えた 5 種類が問題となっており、我々は、細菌と真菌の汚染は既に毎回チェックして汚染フリーとしているしマイコプラズマも重視して時々開発される新しい方法を使って検出感度の向上を図ってきた。今後ウイルスの検査体制を次年度以降確立するための研究を開始する予定であるが、これまで汚染か汚染で無いか良くわからないが細胞培養を汚す微粒子の存在が時々話題になっていた。細胞バンクでもそうした微粒子の存在を培養で観察することがあったが、多くの場合専門家達によって議論されても生物では無いだろうという結論となるのが普通であった。しかし、数年前からこのような微粒子を複数回観察したことがあったため、分担研究者の原澤の協力を得て培養を試みることにした。その結果、これまで単なる無機質な郷雑物ではないかと思われていた微粒子がゆっくりではあるが増殖しているという結果を得ることとなり、この微粒子の成分分

析を実施することとした。欧米の研究者によってもこのような汚染微生物の存在がささやかれていることから、ある程度の分析を進めることは細胞バンクの義務では無いかと考えた。

- ⑤ 細胞の保存管理データベース(JDACSII)をコンピュータ技術の発達に合わせて改善する。

細胞バンクが設立された1985年はIBM社が16ビットの小型コンピュータの市販を開始してから5年目に当たり、小型コンピュータが本格的なビジネスに利用できるかどうかを多くの人々が探っている時期であった。ATCCでは当時IBM社のシステム360(オフコン)を導入して培養細胞の情報のデータベース化を開始したばかりであった。我々は効率的な運営を目的に、廉価だった16ビット型のパーソナルコンピュータを導入してdBASEIIにより細胞管理システム(JDACS:JCRB Data Control System)を構築してバンク事業の効率化を図ってきた。当時データベース化した情報は、(a)論文に基づく細胞の学術データ、(b)入手後培養により発生する培養データ、(c)保存場所や保存数を管理する在庫管理データベースに加えて、(d)文献情報や(e)細胞の利用者情報、さらに(f)画像やグラフデータをデジタル化した画像情報や動画情報もデータベース化して今日に至っている。このシステムはバンク事業の開始にともなって構築し、運用してきたがその後20年間コンピュータ環境も大きく変化して現在に引き継がれている。それに伴い、大きな改良を何度か実施しているが、Windowsが導入された時期に、DOS画面で運用していたシステムをWindowsのグラフィ

ックな画面で運用できるようプログラムを更新して言語をDelphiに変更して全面的にプログラムを書き換えた。その後運用上の問題は改善したので、今年度はデータベースファイルの構造をdBASEからMySQLに変更する作業を実施した。もともと、dBASEはパーソナルユースのデータベースファイルであるため、ネットワーク上でマルチユーザーで利用するには速度等において不十分であった。とは言え急いで改変した場合に発生するかもしれない大きなトラブルを避けるために、まずはプログラム本体をdBASE言語からデルファイに修正し、後にデータベースファイルをMySQL化するという戦略で本年度実施したところである。

- ⑥ ヒト細胞を取扱う中心的機関として、ヒト材料の研究利用に関する問題点について持続的に検討を加える。

当細胞バンクが設立された1985年頃は我国においては研究倫理という課題はあまり問題とはなっていなかった。しかし、社会の発達と共に公害問題などを経験した我国では、ヒトに由来する試料を扱う際に倫理的な面からの批判がいずれ出るようになるのではないかということが想像された。そのため、細胞の培養に密接に関連する日本組織培養学会などではヒト由来組織の商業的な利用がいずれ問題になるかもしれないということから、倫理問題検討委員会を設置して議論を重ねて報告書などを作成していた。細胞バンクは、そうしたヒト由来試料を配布する機関として倫理問題への対処を考えていた2000年頃に究極の個人情報と位置付けられた遺伝子情報の解析研究が大きく進展することになり、その必要性から倫理問題につい

ての国としての指針の作成等の作業が開始された。案の定バンクはヒト細胞を扱っているため、指針の作成に加わるよう要請を受けて参加させていただいたが、その中で倫理問題に関する国際的な情報の収集や人文系・法律系の研究者の方々との交流を通じての研究を直接実施する必要があることを感じ、細胞バンクの中で研究を開始することにして数年を経過した。近年、倫理指針等で唄われていることはヒト組織の提供者に使用目的を明らかにして入手することが望ましいとされているが、バンクという性格はヒト組織を不特定多数の研究者に積極的に配布して研究を活性化することが目的である。この矛盾を私どもはどう乗り越えるべきかが当面大きな課題としてのしかかっているので検討しているところである。

B. 研究方法

① 細胞の樹立や資源化については個々の細胞に依存するので、分担研究報告を参照されたい。

② 無菌テスト

培養細胞の一定量を血液寒天培地、NB、TB等の培地に接種して 30℃又は 37℃で培養して観察。マイコプラズマの検出にはPCR法(プライマーは分担研究者の原澤が当細胞バンクと協力して開発し、国際的にも利用されている)と蛍光色素(Hoechst33158)染色法を併用した。マイコプラズマの除菌は MC210 を 0.5ug/ml の濃度で添加後長期間培養により実施した。

STR 分析法

Promega 社の STR 分析用プライマーセット(9 ローカス)を使って実施した。STR 分析結果は

独自開発した STR データベース(STRbase)に記録した。

染色体の測定

増殖期の培養細胞にコルセミド(最終濃度、0.06 μ g/ml)を 2.5~4 時間加え、回収した細胞を低張液で処理後、メタノール・酢酸混合液で固定した。固定した細胞は HANABI を用いてスライドガラスの上に染色体を分散させた。DAPI で染色して Zeiss の蛍光顕微鏡で染色体を観察した。その像をソフトウエア Leica Qfish を用いて染色体数を測定した。細胞分化能(脂肪細胞、神経細胞)の測定各細胞を 14mm ϕ カバースリップ(CS)の入った 3.5cm シャーレの中で培養した。Cambrex の脂肪細胞誘導培地で約 2 週間培養した。CS 4%グルタルアルデヒド溶液で固定して、Oil red-o 染色を行った。透過型正立顕微鏡で細胞内の脂肪顆粒を観察した。

神経細胞への分化誘導には約 1,000 個の細胞を 10mm ϕ のカバースリップ(ポリリジン、ラミニン処理済み)に播き、3~4 日ごとに神経細胞分化誘導培地(NPDM、Cambrex 製)と神経細胞維持培地(NPMM、Cambrex 製)を交換する。約 3 週間後、4%グルタルアルデヒド溶液で固定して、神経特異的 β -チューブリン III 抗体、または抗 nurr-1 抗体で蛍光染色した。染色像を落射型蛍光顕微鏡で観察した。

動画観察

直径 35mm の Falcon シャーレに細胞を播種し、Zeiss の倒立顕微鏡で観察した。ソフトウエア MetaMorph を用いて 3 分に 3 コマの撮影をした。約 24 時間撮影した 481 フレームから STK ファイルを作成した。STK ファイルを AVI ファイルに変換した。その際、2 分の 1 にフレーム数を減少させた。AVI ファイルをソフトウエア VideoStudio を用いて WMV ファイル

(320x240, 30fps)に変換した。各画像ファイルは、JCRB のウェブサイトに掲載した。

- ③ マイコプラズマの迅速検出法にはマイコアラート (Cambrex 社) を導入して既存方法と比較した。

マイコアラートは、マイコプラズマ特異的酵素により生成された ATP をルシフェラーゼの発光反応によって高感度に検出する方法で、10CFU/ml 程度のマイコプラズマを検出することが可能であるという。試薬はキット化されているので、細胞培養試料にマイコアラート基質溶液を添加して5分反応させた後で一度ルミノメーターで光度を測定してから発光試薬を添加して発光させて再度ルミノメーターで光度を測定する。2回の測定の差を発光強度として、マイコプラズマ汚染があった細胞試料と汚染の無い細胞試料との間で測定値を比較する。細胞バンクには汚染された試料も一部保存しているので、そうしたサンプルの発光強度を比較することによってマイコアラート法の正確さについて検討することが可能になる。

- ④ Kasumi-6細胞で検出された微粒子の分離培養から微粒子の成分分析をおこなった(分担研究者、原澤)。

本研究は主に分担研究者である原澤によって実施された研究である。本研究を実施するきっかけとなったのは細胞バンクに広島大学から寄託された Kasumi と名付けられた骨髄系細胞にマイコプラズマや細菌とは異なる汚れを見出したことに端を発する。多くの研究者が類似の汚れを観察していたと聞くが、多くの場合生物なのか単なる結晶なのかわかないまま放置されてきた経緯があっ

たという。そこで、その実体を明らかにしておいたほうが良いと考えた細胞バンクのスタッフが、サンプルを分担研究者である原澤に送り調査を依頼したところ自律増殖性があるという鑑定結果が返ってきたため、その実体を明らかにする必要があると判断し、今年度から共同研究を開始することとした。培養細胞にとっては汚染物質というものになるので、実験はほぼ全て原澤の研究室で実施していただくこととした。

当該汚染が見出されたサンプルは凍結融解を繰り返して細胞を破碎してから 200 μ メートルのメンブランフィルターを通して濾液を得、これを血清入りの RPMI1640 培地に接種して培養した。その結果、自律的に増加することが観察されたので遠心によって集めた後、白い沈殿の表面を赤外線分光で測定して成分分析を実施するとともに、蛋白を抽出して N 末端のアミノ酸配列を決定した。

- ⑤ dBASEII で構築した細胞管理データを MySQL に変換した。変換作業に必要なプログラム作成には、Borland 社の Delphi を使用し、実行ファイル(exe)を作成した。

細胞管理データは細胞バンク内に設置した Windows2000 によって構築されたデータベースサーバ上におき、バンクの職員全員がこのサーバにアクセスしてデータの閲覧、修正等にかかわる。データは主に論文に基づく学術データが中心に記載されているが、一部のヒト細胞については、性別、年齢、由来組織、病名、などのデータが記載されている。しかし、細胞を提供した人物の個人情報、即ち氏名や住所などは一切記載していないので個人情報保護法に抵触することは無いと思われる。

データは、学術データ、培養データ、在庫管理データの主に3つのファイルで構成されているがバンクの管理運営のためには、さらに細胞利用者管理ファイル、細胞寄託管理ファイルなどが必要となり、それらの全てをMySQLで作成しなおした。その際、ファイルのフィールド構造を若干見直して修正を加えた。またdBASEからMySQLへは変換フィルターを作成して、それによって自動変換を行い誤りが無いようにした。

- ⑥ 倫理面の研究は文献調査並びに現場研究者へのインタビューを中心に実施した。

(倫理面への配慮)

研究資源バンクはヒト由来細胞が収集されて多くの研究者に分譲する組織である。そのため、研究者が個別の研究目的でヒト由来試料を使うのとは大きく異なり、不特定多数の研究者の様々な研究目的に利用する事に関する倫理的妥当性について検討することが求められているということが私ども細胞バンクを運営する担当者の理解である。解決策の有無はともかくとして、私ども細胞バンクの担当者がこのような意識を持ってバンクの運営に望んでヒト由来の細胞材料を扱っているという点に社会の支持を頂ける基礎があると考えている。ヒト由来材料を使った研究活動が社会に受け入れられるには市民からの信頼を得ることが必須であり、難しい問題があるなら、どこに問題があるのかということ率直に公開して市民と共に考えるという姿勢が重要であろう。そのため、私どもはこれをバンク内における研究活動の一つと位置付けて取り組んでいるところである。

ヒト組織の研究利用は微妙な問題を多く含

み既存のルールの遵守だけでは説明責任を果せない。従って、自らルールの策定に関与すると共に、ルールの妥当性に関する調査研究を実施して深い考察を行いながら市民と共に考える姿勢を明示する必要がある。そのため研究倫理に関する問題を専門家の育成を含めて、重要な研究の一つと位置付けて人材を配置し重要課題の一つとしている。ここでの研究手法は、ほとんどの場合文献調査、市民との会合による意見聴取、海外の専門家からの意見聴取などとなる。得た情報は可能な限り速やかにWEBを經由して公開する。

C. 研究結果

- ①本年度は下記に示す105株(種類)の細胞について寄託依頼があった。

2005年における寄託依頼細胞一覧

細胞番号	細胞名	由来動物名
NIHS0378	hs-103-3	Ch. hamster
NIHS0379	hs-164-2	Ch. hamster
NIHS0380	hs-171-1	Ch. hamster
NIHS0381	hs-172-3	Ch. hamster
NIHS0382	hs-211	Ch. hamster
NIHS0383	hs-222-3	Ch. hamster
NIHS0384	cs-17-25	Ch. hamster
NIHS0385	cs-19-36	Ch. hamster
NIHS0386	cs-20-5	Ch. hamster
NIHS0387	AIG	Ch. hamster
NIHS0388	HEC-1-A	Human
NIHS0388.1	HEC-1AOZA1*注	Human
NIHS0388.2	HEC-1AOZA2*注	Human
NIHS0388.3	HEC-1AOZA3*注	Human
NIHS0388.4	HEC-1AOZA4*注	Human
NIHS0388.5	HEC-1AOZA5*注	Human
NIHS0388.6	HEC-1AOZA6*注	Human

NIHS0389	HEC-1B	human	NIHS0427	KUSA-A1	mouse
NIHS0390	HEC-6	human	NIHS0429	PL508	human
NIHS0391	HEC-50B	human	NIHS0430	PL509	human
NIHS0392	HEC-59	human	NIHS0431	PL510	human
NIHS0393	HEC-88nu	human	NIHS0432	KUSA-H1	mouse
NIHS0394	HEC-108	human	NIHS0433	KUSA-0	mouse
NIHS0395	HEC-116	human	NIHS0434	KUM3	mouse
NIHS0396	HEC-151	human	NIHS0435	KUM4	mouse
NIHS0397	HEC-155	human	NIHS0436	KUM6	mouse
NIHS0398	HEC-180	human	NIHS0437	KUM7	mouse
NIHS0399	HEC-251	human	NIHS0438	KUM9	mouse
NIHS0400	HEC-265	human	NIHS0439	NRG	mouse
NIHS0401	Atsuchi	human	NIHS0440	KMBC-2	human
NIHS0402	Hirakawa	human	NIHS0441	KMPC-3	human
NIHS0403	OVAS	human	NIHS0442	NCR-G1	human
NIHS0404	Chikamatsu	human	NIHS0443	NCR-G2	human
NIHS0405	HCS-2	human	NIHS0444	NCR-G3	human
NIHS0406	HCA	human	NIHS0445	NCR-G4	human
NIHS0407	HCSC	human	NIHS0446	UE6E7T-1	human
NIHS0408	Sugizaki	human	NIHS0447	UE6E7T-2	human
NIHS0409	YS	human	NIHS0448	UE6E7T-3	human
NIHS0410	UCB302MSCs	human	NIHS0449	UE6E7TC-4	human
NIHS0411	UCBTERT-21	human	NIHS0450	UBE6T-6	human
NIHS0412	UCB408E6E7-31	human	NIHS0451	UBE6T-7	human
NIHS0413	UCB408E7-32	human	NIHS0452	UE7T-9	human
NIHS0414	UCB408E6E7TERT33	human	NIHS0453	UE6E7T-11	human
NIHS0415	Yub621c	human	NIHS0454	UE6E7T-12	human
NIHS0416	Yub621b	human	NIHS0455	UE7T-13	human
NIHS0417	Yub621BMC	human	NIHS0456	UBE6T-15	human
NIHS0418	Yub622	human	NIHS0457	UE6E7-16	human
NIHS0419	Yub623	human	NIHS0458	HSC-59	human
NIHS0420	Yub 10F	human	NIHS0459	HSC-60	human
NIHS0421	PL502	human	NIHS0460	HSC-64	human
NIHS0423	PL504	human	NIHS0461	Yub625	human
NIHS0424	PL505	human	NIHS0462	Yub631	human
NIHS0426	PL507	human	NIHS0463	Yub632	human

NIHS0464	Yub633	human
NIHS0465	Yub634	human
NIHS0466	SV	mouse
NIHS0467	GP8	mouse
NIHS0468	R201C	mouse
NIHS0469	I51T	mouse
NIHS0470	HSC-F	monkey
NIHS0471	HSP-239	monkey
NIHS0472	HSP-250	monkey
NIHS0473	Yub635	human
NIHS0474	Yub636	human
NIHS0475	Yub637b	human
NIHS0476	Yub637s	human
NIHS0477	Yub642	human
NIHS0478	Yub642p	human
NIHS0479	Yub642b	human

注(*) : HEC-1A0ZA は細胞バンク内で作成した HEC-1 のサブラインである。HEC-1 の染色体に高頻度な不安定性が認められたので複数のクローンを分離してその変化を観察し、安定性について検討するため複数のクローンを得て培養している。それぞれを HEC-1-A 由来サブラインとして維持し染色体情報を明確にしてから公開し要望があれば分譲も行う。しかし主な目的はクローン化した HEC-1A 細胞の染色体が培養の経過に依存して変動する様子を明らかにして染色体の安定性についての情報を得ることにある。

寄託依頼があった細胞種の内訳は、ヒト由来細胞が 79 種、マウス由来細胞が 13 種、チャイニーズハムスター由来細胞が 10 種、モンキー由来細胞が 3 種であり、ヒト由来細胞が圧倒的に多かった。細胞の受入にあたっては「NIHS」で始まる番号を発行して整理し、その番号下で受入書類作成、細胞の送付受領処理を行った後、

各細胞についての品質管理実験を実施し、マイコプラズマ検査や STR 分析によるヒト細胞の個別識別実験を実施した。この 2 つの方法に加えてアイソザイムによる検査で細胞が由来する動物種を確認して問題が無いと判定された細胞から優先して当該細胞バンクとしての正規登録を実施した。正規登録とは、当細胞バンクとして改めて JCRB で始まる番号を割り振ってデータ登録を行うことにより実施した。この過程で、細胞を培養することによって得られるデータについては品質管理情報を含めて全てデータベースの『培養記録データベースファイル』に記録した。ここには発生する画像データも記録した。

2005 年 4 月～2006 年 2 月 24 日までにマイコプラズマ検査を実施した全細胞種類数は 190 種

(委託検査 4 検体を含み、同一細胞の再検査も含む) であった。このうちマイコプラズマを検出した細胞は、NIHS0396:HEC-151、NIHS0393:HEC-88nu、NIHS0395:HEC-116、NIHS0394:HEC-108、NIHS0392:HEC-59、NIHS0421:PL502、NIHS0446:UE6E7T-1、NIHS0449:UE6E7TC-4、NIHS0361:RI-T、の 9 種の細胞であった、これらはその後除染を実施し、現在までに NIHS0392:HEC-59、NIHS0393:HEC-88nu、NIHS0394:HEC-108、NIHS0395:HEC-116、NIHS0396:HEC-151 の 5 件の細胞については除染されたことを確認した。残りの細胞は間葉系幹細胞に属すもので除染処理による細胞の性状変化の可能性が危惧されたので寄託を取り下げる措置が取られた。また、マイコプラズマ検査に加えて、クロスコンタミネーションの有無については STR 分析によって調査検討された。1999 年に開始した STR 分析法に関する実験としての評価はほぼ固まり現在は本方法を細胞の重要な品質管理手

法として採用し、細胞バンクに寄託依頼がある全てのヒト由来細胞について分析を実施し、STR実験の結果はデータベースに登録している。このデータベースは国内の培養系ヒト細胞の個別識別データベースとして当細胞バンクのみに存在する貴重なデータベースであり、国内外の個々の研究者が使用している細胞についてクロスコンタミネーションの疑問が生じた場合は、本データベースと比較すれば直ちにその可否について調査をすることが出来、有効な研究支援として利用できる。この利点を生かして、バンクに登録される細胞だけでなく、一般の研究室からの調査依頼にも答えることを目的に将来は受託検査を実施したいと考えている。

今年度新規登録した 52 件の細胞のうち、NIHS0397:HEC-155 と NIHS0398:HEC-180 の2つのヒト癌細胞がまったく同じ細胞であるという結果が STR 分析法により得られた (Ev=1.000)。この2種については、寄託者と相談しながら現在、古いストックを起こして正しい細胞があるかどうか調査を進めている。その他、他研究室からの依頼検査として 11 件の細胞を調査し、LVV0008:HSG と JCRB9004:HeLa (Ev=0.903)、LVV0009: HSY と JCRB9004: HeLa (Ev=0.903)、 YKN0003: HEp-2C-niid-n と JCRB9004: HeLa (EV=0.968)、 YKN0004: HEp-2C-niid-p と JCRB9004:HeLa (EV=0.968) の4件でクロスコンタミネーションを発見した。細胞バンクから分譲する細胞の誤謬を排除することは当然のことであるが、国内の研究機関を概観しても誤謬を排除することを目的とした調査研究を実施している研究室は極めて少なく、それが我国から誤った細胞を利用した研究が数多く発表されてしまうという弊害を生んでいるようである。従って、我々を含めて多

数の細胞を積極的に集積する細胞バンクがバンク特有の研究課題として積極的に調査研究を実施しなければならないし、多くの研究者から期待されているところであると言える。そのため、我々は研究者の要望に答えて低料金 (実費) でクロスコンタミネーションの受託検査を実施することが出来れば、誤った細胞の利用が減少し、結果として国単位での研究費の有効利用を果せるようになる、こうした業務は細胞バンクが本来あるべき姿として今後積極的に実施してゆきたいと計画している。そのため、次年度から本調査を受託する体制を確立するために受託検査規定等を整備していると共に、こうした事業の拡大を通じて細胞バンク自らの道も探る計画である。

さらに細胞の由来動物種を確認するためにアイソザイム分析検査を実施しているが、54 件を分析して同定が不能だった 1 件を除いて全て記載どおりの動物種と判定された。同定不能であったのはマウス由来の間葉系間細胞で染色体構造の複雑な変化が予想されるのでかかる細胞について今後さらに検討を行い利用者に情報提供を行う必要がある。

以上の検査を経て今年度細胞バンクへの正式登録細胞としたのは次の 52 種の細胞で、ヒト細胞 35 種、チャイニーズハムスター細胞 10 種、マウス細胞 7 種、ウシ細胞 2 種であった。

正規登録完了細胞一覧

細胞番号	細胞名	由来動物名
JCRB0155.1	NM-1/E	bovine
JCRB0155.2	NM-1/F	bovine
JCRB1096	hs-103-3	Ch. hamster
JCRB1097	hs-164-2	Ch. hamster
JCRB1098	hs-171-1	Ch. hamster
JCRB1099	hs-172-3	Ch. hamster

JCRB1100	hs-211	Ch. hamster	JCRB1136	UE6E7T-3	human
JCRB1101	hs-222-3	Ch. hamster	JCRB1137	UE6E7TC-4	human
JCRB1102	cs-17-25	Ch. hamster	JCRB1138	NRG	mouse
JCRB1103	cs-19-36	Ch. hamster	JCRB1139	KUM9	mouse
JCRB1104	cs-20-5	Ch. hamster	JCRB1140	UBE6T-6	human
JCRB1105	AIG	Ch. hamster	JCRB1141	HEC-251	human
JCRB1106	UCB302MSCs	human	JCRB1142	HEC-265	human
JCRB1107	UCBTERT-21	human	JCRB1143	UBE6T-7	human
JCRB1108	UCB408E6E7-31	human	JCRB1144	HEC-180	human
JCRB1109	UCB408E7-32	human	JCRB1145	HEC-50B	human
JCRB1110	UCB408E6E7TERT	human	JCRB1147	UE7T-9	human
JCRB1111	Yub621c	human	JCRB1148	KMBC-2	human
JCRB1112	Yub621b	human			
JCRB1113	Yub621BMC	human			
JCRB1114	Yub622	human			
JCRB1115	Yub623	human			
JCRB1116	Yub10F	human			
JCRB1117	HEC-1-A	Human			
JCRB1118	HEC-6	human			
JCRB1119	KUSA-A1	mouse			
JCRB1120	HEC-59	human			
JCRB1121	HEC-88nu	human			
JCRB1122	HEC-151	human			
JCRB1123	HEC-108	human			
JCRB1124	HEC-116	human			
JCRB1125	PL502	human			
JCRB1126	PL504	human			
JCRB1127	HEC-155	human			
JCRB1128	PL505	human			
JCRB1129	KUSA-H1	mouse			
JCRB1130	PL507	human			
JCRB1131	UE6E7T-1	human			
JCRB1132	KUSA-0	mouse			
JCRB1133	UE6E7T-2	human			
JCRB1134	KUM3	mouse			
JCRB1135	KUM4	mouse			

この 52 種について本年度は細胞バンクへの正式登録を完了した（3 年間では通算約 130 種の登録を実施）。この 52 種を加えて細胞バンク発足以来の累積収集細胞数（登録細胞数）は 964 種（うちヒト由来細胞株 576 種，60%）となった。これらの細胞は HS 研究資源バンクを通じて公開・分譲している。

分担研究者の多くは新規細胞の開発を目的として参加した。各研究者とも毎年 2-3 種の新規細胞を資源化して細胞バンクの整備に貢献した。今年度は 26 種の細胞が分担研究者より寄託された。細胞の一覧は以下のとおりであるが、自発的寄託に比べると、バンクとして必要となりそうな細胞を選択して分担研究者に依頼したため細胞の種類が多様である。

分担研究者による寄託細胞一覧(2005 年度)

KYSE-200	ヒト	食道扁平上皮ガン
KYSE-220	ヒト	食道扁平上皮ガン
KYSE-270	ヒト	食道扁平上皮ガン
SH-SY5Y	ヒト	神経芽腫細胞
SaM-1	ヒト	大腿骨骨膜

InM1.2	ヒト	大腿骨骨膜
NS	ヒト	膀胱癌
KMUM-1.1	ヒト	尿管癌
KMUC-3	ヒト	尿管癌
DT40-47	ニトリ	ヒト染色体断片保持
DT40-98	ニトリ	ヒト染色体断片保持
DT40-76	ニトリ	ヒト染色体断片保持
DT40-377	ニトリ	ヒト染色体断片保持
DT40-408	ニトリ	ヒト染色体断片保持
DT40-417	ニトリ	ヒト染色体断片保持
K05B18	ニトリ	ヒト染色体断片保持
HSC-59	ヒト	胃がん
HSC-60	ヒト	胃がん
HSC-64	ヒト	胃がん
YUMOTO	ヒト	子宮頸がん
SEKI	ヒト	メラノーマ
CS20STERT	ヒト	コケイン症候群
RB24KYTERT	ヒト	初代繊維芽細胞
FA9JTOTERT	ヒト	初代繊維芽細胞
NOZ	ヒト	胆嚢癌
OZ	ヒト	胆管癌

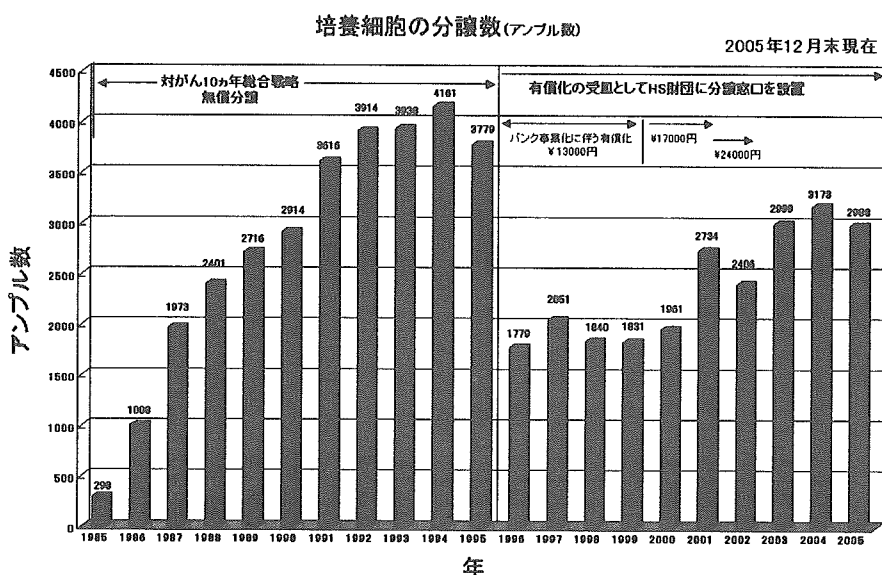
各細胞に関する学術情報、文献情報などが十分に公開されていなければいくら培養細胞が公開されていると言っても利用することが困難である。そのため、我々は収集した細胞の利用環境を向上させることを目的に、各培養細胞に関する、学術情報(文献を含む)、培養情報、各種画像データをホームページ上に公開して利用者である研究者に積極的に提供している。また、情報も日常的に実施している培養情報を迅速に公開して、最新の情報を提供するシステムを構築している。約950種にのぼる公開中の細胞のいずれかのデータは毎日更新されていて、公開中のホーム

ページのデータもほぼ毎日更新して最新のデータを公開している(<http://cellbank.nibio.go.jp/>)。本情報は細胞分譲機関であるHS研究資源バンクにも提供し活用されている。

細胞分譲に関する分析

これまでに登録が完了した細胞に関して平成17年度の分譲数は平成17年1月から12月までの12ヶ月で2988アンプルであった。平成15年が2999アンプル、H16年度が3173アンプルだったので分譲数はわずかながら低下した(図1)。しかし、1995年対ガン10ヵ年総合戦略終了時に有償化した時点で年間分譲アンプル数は1780アンプルにまで低下して以後、徐々に増加に転じて現在に至っている。今年度の分譲数は一時的に低下傾向となったが、平成13年度以降の増加傾向を維持しているのかどうかについては来年度以降の分譲数を確認しないと結論付けるのは難しい。今年度は既に紹介したようにヒト由来間葉系幹細胞の寄託が多数あり、次年度以降も継続して寄託される計画となっている。近年の研究動向を考えると、こうした細胞の需要は増加すると予測されるので、来年度以降の分譲数は増加するものと考えられる。分譲数のみがバンクの存在意義とは考えてはいないが、実際に利用される細胞を提供することはバンク事業の責務である。また依然として生命科学研究に培養細胞は不可欠な研究資源と考えられ、必要とされる細胞を積極的に収集することが今後さらに望まれていると思われるので積極的な収集に努める所存である。

図 1



細胞バンクの存在意義を検討しつつ長期的なバンク事業の業務内容を立案する参考データを得る目的で、分譲細胞の動向について HS 研究資源バンクの支援を得て毎年調査分析している。その一貫として分譲数が多い細胞について上位 30 種を集計した結果が図 2 である。図 2 には平成 16 年度と平成 17 年度に当細胞バンクから分譲した上位 30 種の細胞を示した。最も多く利用される細胞でも月あたり 6.5 アンプルで、年間にするると 78 アンプルである。過去においては長らく HL60 という分化誘導を起こす細胞が上位を占めており(2004 年)我国では分化に関連する研究に多くの研究者の興味が集まっていることが理解できた。2005 年にはこの HL60 に変わって 3T3 L1 細胞が分譲数の上位を占めて HL60 と入れ替わったが、この 3T3 L1 細胞もやはり分化誘導がかかる細胞として利用されていることから、細胞の種類が変わっても依然として分化に関する研究に興味が集まっていることが読

み取れる。細胞の分化は発生を経て細胞の性質が変わり生命のダイナミズムを理解するうえで大変興味深い研究分野であることからそれに興味が集まることは妥当である。

しかも、近年注目が集まっているのはやはり細胞分化を重要な研究課題とする再生医療分野の研究であり、HL60 や 3T3L1 細胞に代わって多分化能を有するヒト細胞への興味が高まっているように見える。そうした時代を反映して、本年度は成育医療センター研究所から多数の間葉系幹細胞の寄託があった。これらの細胞はがん細胞に比べると増殖速度が遅かったり、丁寧な培養を要求されるため、作業に時間がかかり処理が滞る傾向にある。そのため今年度末に向けて品質管理実験が完了に向かい現在ようやく正規登録と公開の作業が進行しつつあるので、平成 18 年度初頭から公開される見込みである。今後こうした細胞の利用が増加すると予想される。間葉系幹細胞は多分化能を維持した細胞として再生医療研究の

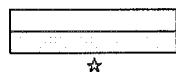
一環として社会からの要請も強い分野で利用される細胞である。

しかしながら、こうした細胞はヒトに由来することと同時に分化能を維持したまま培養できるようにしておかなければならないという難しさがある。また、倫理問題にも十分に配慮しながら利用環境を整備することが極めて重要である。特に、研究者の

希望だけで研究を進めるのではなく、一般の市民（納税者）の意見を十分に取り入れて、市民の納得を得られるよう議論を尽くしながら研究に利用するという環境を整備することも重要視されていることを痛感している。そうした環境も整えながら分譲体制の整備を進める計画である。

図 2

2004年 (1~12月)			2005年 (1~12月)			
順位	資源番号	資源名	分譲数/月	資源番号	資源名	分譲数/月
1	JCRB9068	293	6.3	JCRB9014	3T3 L1	6.5
2	JCRB0085	HL60	5.1	JCRB1054	Hep G2	5.8
3	JCRB9014	3T3 L1	5.0	JCRB9068	293	5.0
4	JCRB0160	LI90	4.8	JCRB0023	RBL-2H3	4.8
5	JCRB0403	HuH-7	4.8	JCRB0403	HuH-7	4.5
6	JCRB1054	Hep G2	4.5	☆ IF050271	HUY-EC-C	3.9
7	JCRB0023	RBL-2H3	4.3	☆ JCRB0160	LI90	3.8
8	JCRB0134	MCF-7	4.0	JCRB0134	MCF-7	3.6
9	JCRB9004	HeLa	3.5	JCRB0254	MKN45	3.2
10	IF050271	HUY-EC-C	3.2	JCRB9004	HeLa	3.2
11	JCRB0202	B16 melanoma	3.1	JCRB0603	V79	2.9
12	JCRB9021	U937	2.8	JCRB0733	PC-12	2.8
13	JCRB0112	THP-1	2.7	JCRB0085	HL60	2.5
14	JCRB0603	V79	2.7	JCRB0202	B16 melanoma	2.4
15	JCRB0733	PC-12	2.7	JCRB9005	BALB/3T3 clone A31	2.1
16	JCRB0255	MKN74	2.4	JCRB9021	U937	2.1
17	IF050416	3T3-L1	2.3	IF050081	Neuro-2a	2.0
18	JCRB0254	MKN45	2.3	JCRB0076	A549	2.0
19	JCRB9127	COS-7	2.2	JCRB0145	MEB 5	2.0
20	IF050081	Neuro-2a	2.0	JCRB9127	COS-7	2.0
21	JCRB0104	KU812	2.0	IF050288	U-251 MG	1.8
22	JCRB0615	5611	1.9	JCRB0615	NIH/3T3 clone 5611	1.8
23	JCRB9018	CHO-K1	1.9	JCRB0611	KATOIII	1.6
24	JCRB0076	A549	1.8	JCRB0621	NB-1	1.6
25	JCRB0252	MKN1	1.8	JCRB1025	MKN7	1.6
26	JCRB0099	HH	1.8	IF050416	3T3-L1	1.5
27	JCRB0019	K562	1.7	☆ JCRB0501	TIG-1-20	1.5
28	JCRB9054	IMR-90	1.7	☆ IF050075	WI-38	1.4
29	JCRB9094	DLD-1	1.7	JCRB0019	K562	1.4
30	JCRB9110	PC-3	1.6	JCRB0156	KHYG-1	1.4
合計			90.1	合計		82.4



☆ ATCCに登録されていない株
左表でもベストセラーである株
ヒト正常細胞（プライマリー）

このように分化誘導にかかわる細胞は多くの研究者に利用されるのではないかと考えているが、図 2 の分譲実績を見ると、以前から良く知られている汎用的な細胞株、たとえばHeLaやV79等の細胞への需要も一

貫して大きい。恐らく、その理由は、食品添加物や薬品などの安全性を確認するための培養細胞を利用した検討のための指標細胞として、染色体異常試験などに利用されたりする機会が多いのではないかと想像さ

れる。こうした目的は、薬品や食品の安全性を確保するために実施される業務で、細胞の性質等が十分に明らかにされた標準細胞を使用して実施することが求められていて、そうした細胞の配布機関が実質的に当細胞バンクであることを考えると十分に納得できる場所である。

また、対照実験として利用されるケースも多いのではないかと考えている。対照実験には性質が明確になっている著名な細胞であることが重要で、マイコプラズマ汚染の無いことなどが確認されていたり、他の細胞と入れ替わったりしていない等の確認が十分になされている、いわゆる標準細胞株であることが重要である。この上位 30 種の細胞の多くは、そうした標準細胞として性状が確認されているものである。こうした細胞については、今後もバンクの主要な細胞として今後も継続的に分譲できる体制を維持する必要がある。

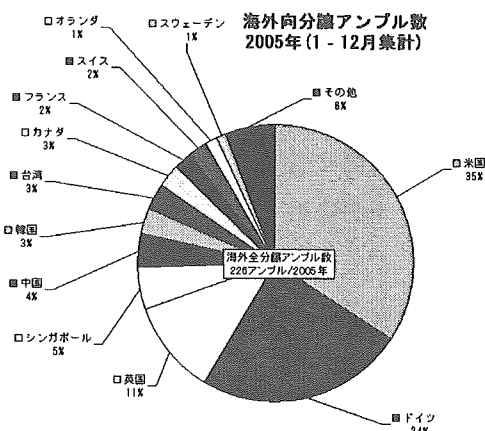
さらに、分譲において特徴的だったのは ATCC などに登録されていない、我国ならびに当細胞バンクに独特な細胞であった。図 2 に示したように、2005 年のデータでは上位 30 種のうち 8 種が JCRB 細胞バンクにしか無い細胞であったことは興味深かった。

本年度の海外への分譲は、図 3 に示したように 226 アンブルで、米国 (35%)、ドイツ (24%)、英国 (11%) が多かった。その他、シンガポール、中国、韓国などからの分譲依頼があった。

生命科学研究において培養細胞は重要な研究資源として利用されている。そのため、培養細胞は国際的な規模で互恵的に多くの国と交換されて利用しあうことは重要であろう。我国の多くの生命科学研究に従事する研究者は伝統的に米国の ATCC から細胞を購入して利用してきた。一方、その逆に日本からの研究資源が海外でも利用できるようにすることは意義が深いと考えられるが、まだ提供した総数は 250 アンブルで多いとは言えない。今後とも、継続して海外の研究者へのサービスを促したいと考えている。

その一方で、所謂研究資源ナショナリズムと呼ばれる現象が台頭してきており、各国の間での研究資源の流通がしにくくなってきているという状況もある。こうした状況について、我々担当者は若干戸惑っている面もあるが、基礎的な研究分野においては国際協力を進めるという立場から現在の体制を維持したいと考えているが、国際的な動向を見ながら時々において適切に対処したいと考えている。

図 3



② 登録が完了した 52 株の細胞についての細菌・真菌検査を実施し全て無菌的であることを確認した。また、マイコプラズマ検査により 9 件の汚染を確認した（今年度の汚染率 17.3%）。マイコプラズマ汚染を確認した 9 件については MC210 による除菌を試み、5 件の除菌に成功した。残りの 4 件は全て間葉系幹細胞であり除染作業を通じて性質の変化があるかもしれないという危惧から一旦登録を取り下げることとした。当該細胞はまだ新しく樹立されるようになった細胞であるため、注意深く寄託作業等を進めたいと考えている。

STR 分析では新規寄託細胞に加え、他研究室から依頼を受けて 9 件の細胞について試験的に受託試験として実施した。当細胞バンクで構築した約 700 種の樹立細胞株に関するヒト細胞識別データベース (STRbase) で比較した結果、バンクへの寄託希望があった細胞 55 種を検査した結果 1 種類のクロスコンタミを発見し、寄託から除外し、樹立者に連絡して善後策を検討している。また、受託検査として実施した 9 件のうち 4 件にクロスコンタミを認めたので、依頼者に対して該当細胞の廃棄を勧告

した。

こうした試験を通じて細胞識別を行う STRbase のデータ整備も進みその利用価値は益々増大している。

STR 分析はクロスコンタミを効率良く発見する大変良い方法であるが、実験を重ねるにつれて、STR のパターンが予想以上に大きく変化する細胞種のあるらしいことに気づきつつある。こうした結果は、癌細胞に散見されるようなので、将来この問題に検討を加える必要がある。

この問題について検討する場合、STR 分析が微小遺伝子領域を検出していることにより発生する問題であると考えられるので、マクロな染色体構造の分析の併用が必須であると考え、FISH 法、ギムザ染色法などによる分析を再開した（専門家が転出したため中断していた）。

今年度から不死化した間葉系幹細胞の寄託が増えているので、それを例に染色体分析の手法を確立して分析を開始し、不死化の方法に依存して 4 倍体の出現率に顕著な差を生じることを確認した。染色体分析結果は画像データとしてデータベースに登録して Web で公開すると共に、細胞増殖の様

子に関する動画の撮影も実施して Web に公開した。

染色体の測定

本年度新規寄託された HEC シリーズの細胞株は我国で樹立されて数多くのがん研究に利用されてきた著名な細胞であり、細胞バンクで保存する価値が極めて高い一連の細胞である。これらの細胞の染色体数は 46 ~ 88 (2 倍体から 4 倍体) の範囲にあった。継代数が 100 代から 200 代に進んでいるにも関わらず、個々の細胞株の染色体数分布はかなり小さい幅に入っていた。一方、間葉系幹細胞として近年樹立された Yub シリーズ、PL シリーズの細胞は、新しい分化研究に利用される重要な細胞と考えられるが、これらの細胞株の染色体数は二倍体 ($2n=46$) が中心で、ほぼ正常な数に保持されていた。マウスの正常細胞は二倍体 ($2n=40$) であるが、マウス由来の KUM シリーズ細胞株の染色体数は四倍体 (63~80) と個々の細胞によりばらつきが見られた。不死化遺伝子を導入していないが、染色体数は弱四倍体になっていた。AIG シリーズの細胞は 3 種類ともに二倍体 ($2n=20$) を示し、長期継代された細胞株であるにもかかわらず染色体数が安定していた。UCB シリーズ及び U シリーズの細胞の染色体数は 46 本を示した。培養の継代数と培地の種類によって染色体数の変化が見られ、その結果を次の表 1 に纏めた。

UCB408E6E7TERT-33 細胞を D-MEM-10%FBS で培養すると、入手後短期間(6 日間)では二倍体 ($2n=46$) 染色体の細胞が 28% 観察されるものの、その後急激に減少した。55 日では 0% になった。間葉系細胞用培地 (Camblex 製) や α MEM-20%FBS の培地でもこの減少をくい止めることは出来なかった。しかし、Plusoid M 培地を使用すると、二倍体 ($2n=46$) の細胞の減少速度が抑えられる傾向にあった。

UE6E7T-3 や UBE6T-6 細胞についても、長期に培養すると二倍体 ($2n=46$) 染色体をもつ細胞の構成比率が低下し四倍体染色体の細胞が増加する傾向にあった。

ヒト間葉系細胞にヒトパピローマウイルスに由来する E6, E7 遺伝子を導入すると染色体が不安定になり、二倍体が減少して四倍体細胞の比率が増加する傾向を示した。以上の染色体分析結果は、寄託者による結果とほぼ一致していることが明らかになった。結果は画像データとして Web で公開する。

今年度染色体について測定した細胞は表 1 に示した 48 種である。