

表 1

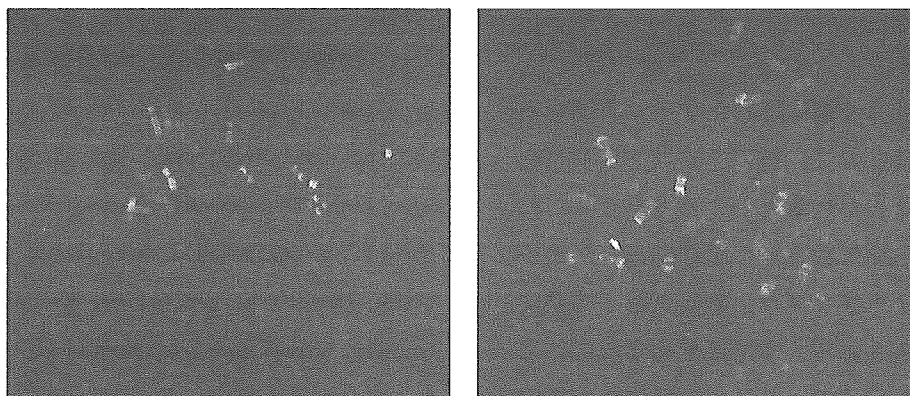
各培養細胞の動的形態(動画像)の観察と染色体数の測定

No.	細胞名	登録番号	来 源			増殖能	動画撮影 (対物レンズ の倍率)	特性(分化能)		染色体数 (2n +*)
			動物種	臓器	細胞			脂肪細胞*	神経細胞*	
1	cs-19-36	JCR61103	ハムスター	精巣	精巣芽核細胞	無限増殖	10x			(20)
2	hf-103-3	JCR61096	ハムスター	同上	同上	同上	5x			(20)
3	AG	JCR61105	ハムスター	同上	同上	同上	10x			(20)
4	UCB309MS0s	JCR61106	ヒト	臍帯血	間葉系細胞	有限増殖	5x			(46)
5	UCBTERT-21	JCR61107	ヒト	同上	同上	無限増殖	5x			(46)
6	UCB408E6E7-31	JCR61108	ヒト	同上	同上	有限増殖	5x	(+)		(46)
7	UCB408E7-32	JCR61109	ヒト	同上	同上	同上	5x	(+)		(46)
8	UCB408E6E7TERT-33	JCR61110	ヒト	同上	同上	無限増殖	20x10x	(+)		(46,92)
9	UCB408E6E7TERT-33		ヒト	同上	同上	同上	ND	(+)		(88)
10	UCB408E6E7TERT-33		ヒト	同上	同上	同上	ND	(+)		(88)
11	UCB408E6E7TERT-33		ヒト	同上	同上	同上	ND	(+)		(88)
12	UCB408E6E7TERT-33		ヒト	同上	同上	同上	ND	(+)	(-)	(88)
13	UCB408E6E7TERT-33		ヒト	同上	同上	同上	ND	(+)		(88)
14	UCB408E6E7TERT-33	NIHS0414	ヒト	同上	同上	同上	ND			(46,88)
15	UCB408E6E7TERT-33	NIHS0414	ヒト	同上	同上	同上	ND			(46,90)
16	UCB408E6E7TERT-33	NIHS0414	ヒト	同上	同上	同上	ND			(46,90)
17	Yub621b	JCR61112	ヒト	予備	精巣芽核細胞	有限増殖	5x			(46)
18	Yub621c	JCR61111	ヒト	同上	同上	同上	5x			(46)
19	Yub621BMC	JCR61113	ヒト	同上	同上	同上	5x			(46)
20	Yub623	JCR61115	ヒト	同上	同上	同上	5x			(46)
21	Yub10F	JCR61116	ヒト	同上	同上	同上	5x			(46)
22	Yub622	JCR61114	ヒト	同上	同上	同上	5x			(46)
23	HEC-1-A	JCR61117	ヒト	女性生殖器	上皮性細胞	無限増殖	5x			(51)
24	HEC-1-ADZA1		ヒト	同上	同上	同上	ND			(51)
25	HEC-1-ADZA2		ヒト	同上	同上	同上	ND			(51)
26	HEC-1-ADZA3		ヒト	同上	同上	同上	ND			(51)
27	HEC-155	JCR61127	ヒト	同上	同上	同上	20x			(74)
28	HEC-6	JCR61118	ヒト	同上	同上	同上	20x10x			(80)
29	HEC-59	JCR61120	ヒト	同上	同上	同上	20x			(88)
30	HEC-108	JCR61123	ヒト	同上	同上	同上	20x			(82)
31	HEC-151	JCR61122	ヒト	同上	同上	同上	20x			(45)
32	HEC-251	JCR61141	ヒト	同上	同上	同上	20x			(48,90)
33	FL502	JCR61125	ヒト	精髄	間葉系細胞	有限増殖	20x10x5x	(-)	(-)	(46)
34	FL505	JCR61128	ヒト	同上	同上	同上	20x10x5x	(-)	(-)	(46)
35	FL507	JCR61130	ヒト	同上	同上	同上	20x10x5x	(+/-)	(-)	(46)
36	KUS A-HI	JCR61129	マウス	骨髓	骨芽細胞	有限増殖	20x10x5x			(80)
37	KUS A-A1	JCR61119	マウス	同上	同上	同上	5x			(76)
38	KUS A-O	JCR61132	マウス	同上	同上	同上	20x			(78)
39	KUM-4	JCR61135	マウス	同上	同上	同上	20x			(72)
40	KUM-3	JCR61134	マウス	同上	同上	同上	20x	(+)		(peak?)
41	KUM-9	JCR61139	マウス	同上	同上	同上	20x	(+)		(63)
42	NRG	JCR61138	マウス	同上	同上	同上	20x	(+)		(88)
43	UE6E7T-2	JCR61133	ヒト	骨髓	間葉系細胞	無限増殖	20x	(+)		(46)
44	UE6E7T-3	JCR61136	ヒト	同上	同上	同上	20x	(+)		(46)
45	UE6E7T-3	JCR61135	ヒト	同上	同上	同上	ND			(45,87)
46	UE6E7-6	JCR61140	ヒト	同上	同上	同上	20x	(-)	(+)	(44)
47	LI-90	JCR60160	ヒト	肝臓	上皮性細胞	有限増殖	5x			ND
48	MEG-01	IFO 50151	ヒト	末梢血	巨核球細胞	無限増殖	20x			ND

(*) 脂肪細胞への分化能有り。(-)分化能なし。
 **No.8~16, 44~46; この枠内のデータについては、次の図を参照して下さい。

また、このうちいくつかについては Fish 法による詳細な分析も進めているので途中経過として写真データを紹介しておく(図 4)。

図 4.



報告書はモノクロなのでわかりづらいが、FISH 法は染色体ごとに色分けして染める技術である。これにより 23 対 46 本の染色体をそれぞれ特異的な色で染め分けることが出来るので、構造解析が極めて容易になる。今後、細胞バンクにおいてこのような技術を使って、詳細な情報を利用者に提供できるようになれば、個々の研究者にとって大変便利になると予想されるので、本技術や測定機器の導入を積極的に進めたいと考えている。以前、細胞バンク職員であった田辺が既にかかる作業を進めていたが、総合研究大学院大学(葉山)に転出したので再度セットアップを実施しているところである。かかる方法は担当者の技術に強く依存しているので、一度セットアップした経験があっても、担当者が変わると変更が大きく再度やり直す必要がある。

細胞特性

臍帯血、胎盤および骨髄由来の間葉系細胞について脂肪細胞への分化能を有するかを測定した。測定した UCB シリーズ、KUM シリーズの細胞はその分化能を保持していた。しかし、PL シリーズと U シリーズの一部の細胞 (PL502、PL505、UBE6T-6) にはその分化能が見られなかった。神経細

胞への分化能を測定した PL シリーズ、UCB408E6E7TERT-33 などにはその能力を持っていなかった。UBE6T-6 細胞は脂肪細胞への分化能もたないで神経細胞へ分化する能力を有していた。

動画データの作成

静止画像での観察よりも詳細で、動的な細胞の形態像が観察された。細胞表面の突起の伸張と退縮が個々の細胞によって異なることと細胞の二次元移動の特徴的な動画が観察された。1 個の細胞の動的形態は 200 倍の位相差顕微鏡により細胞の構造とともに観察された。細胞分裂が一度は観察されるように、3 分ごとに一回の撮影を 24 時間継続した。

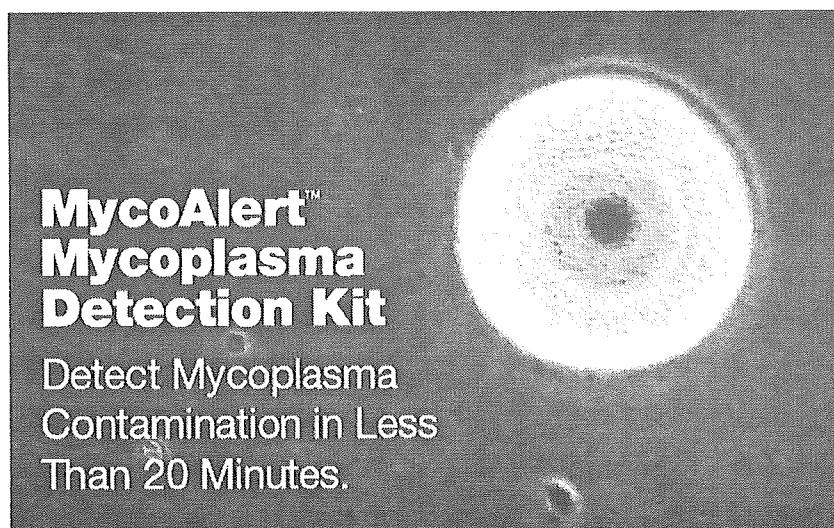
- ③ マイコプラズマの迅速検出についてはマイコプラズマ特異的酵素活性を ATP に変換して検出するマイコアラート法 (Camblex) を試みた。本法は 2 時間ほどで結果が出るため、これまでに比べてはるかに迅速に結果が得られるので除染作業に入るタイミングを大幅に短縮することが可能になった。そのため、マイコプラズマ汚染の有無に関する初期スクリーニング法として適切であると判断し、今後の細胞バンク運営に採用することにした。但し、本法はマイコプラ

ズマを間接的に定量するので、確実性を確保するために、従来法も継続して実施するものとする。

Cambrex 社より市販されたマイコアラートシステムは次の 37 種のマイコプラズマを検出することが可能とのことであり、これまでの手法では数日から 1 週間ほどかかっていたマイコプラズマ汚染検査を 2 時間に短縮できるという。本法は生化学反応による間接的検出法であるため、従来法を併用して誤検出の防止に努めるが結果が迅速に出るため、汚染細胞の振り分けが迅速になり除染処理を開始するタイミングを一週間以上早めることが出来、バンクの効率的な運営に大きく貢献すると考えられた。

Acholeplasma laidlawii, Acholeplasma modicum, Acholeplasma morum, Mesoplasma entomophilum, Mesoplasma florum, Mycoplasma alkalescens, Mycoplasma arginini, Mycoplasma arthnditis, Mycoplasma

bovirhinis, Mycoplasma bovis, Mycoplasma bovoculi, Mycoplasma buccale, Mycoplasma californicum, Mycoplasma canadense, Mycoplasma cloacale, Mycoplasma conjunctivae, Mycoplasma equirhinis, Mycoplasma faucium, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma gallinaceum, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Mycoplasma hyopneumoniae, Mycoplasma hyorhinis, Mycoplasma hyosynoviae, Mycoplasma lipophilum, Mycoplasma muris, Mycoplasma neurolyticum, Mycoplasma opalescens, Mycoplasma orale, Mycoplasma pirum, Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma primatum, Mycoplasma pulmonis, Mycoplasma salivarium, Mycoplasma spermatophilum, Mycoplasma synoviae, Spiroplasma citri,



Cambrex 社のカタログから。短時間での検出がセールスポイント。

MycoAlert は、マイコプラズマ特異的酵素の活性を測定するものである。この系では、MycoAlert Substrate の反応によって ATP を生成させて定量するものである。ATP の定量はルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応によって行い、MycoAlert Substrate 添加前後を比較して判定する。最初の事例として今期寄託された細胞を検査したところ、U6E7TC-4 細胞と Hec-108 の 2 系統の細胞で B/A 比が大きくマイコプラズマ陽性であるとの結果を得た(表 2)。この結果を確認するために、これらの細胞を旧来の方法 (RT-PCR 法) によってマイコプラズマ DNA を確認した (図 5)。図には示さないが蛍光染色法によっても確認した。

表 2 ルミノメーター測定値

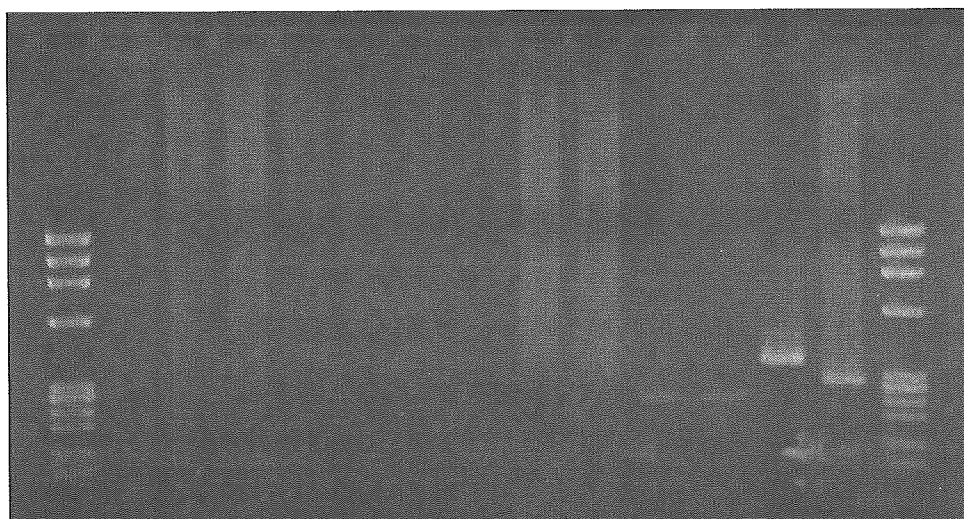
	ベルトール社			プロメガ社			判定
	A	B	B/A 比	A	B	B/A 比	
UE6E7T-3	98	80	0.8	668	310	0.5	-
UE6E7TC-4	103	508	4.9	623	2096	3.4	+
Kasumi-6	116	86	0.7	736	365	0.5	-
HEC-508	102	60	0.6	574	245	0.4	-
HEC-180	115	70	0.6	797	287	0.4	-
HEC-108	126	735	5.8	781	3289	4.2	+

UE6E7T-3 (p21 medium change なしで 10d 培養)

UE6E7TC-4 (p2* medium change なしで 2d 培養)

念のため 2 社のルミノメーターで測定したが、大きな差は無かった。

図5 UE6E7TC-4 (cell sup , p2* medium change なしで 6d 培養)



さらに 5 系統の細胞を MycoAlert 法で調べ、UE6E7T-1 でマイコプラズマを検出した (表 3 :

表 3

	A	B	B/A	判定
UE6E7T-1	143	6267	43.8	+
UE6E7T-2	442	198	0.4	-
UE6E7T-2 p	329	192	0.6	-
HEC-116	133	101	0.8	-
HEC-88nu	117	91	0.8	-

図 6

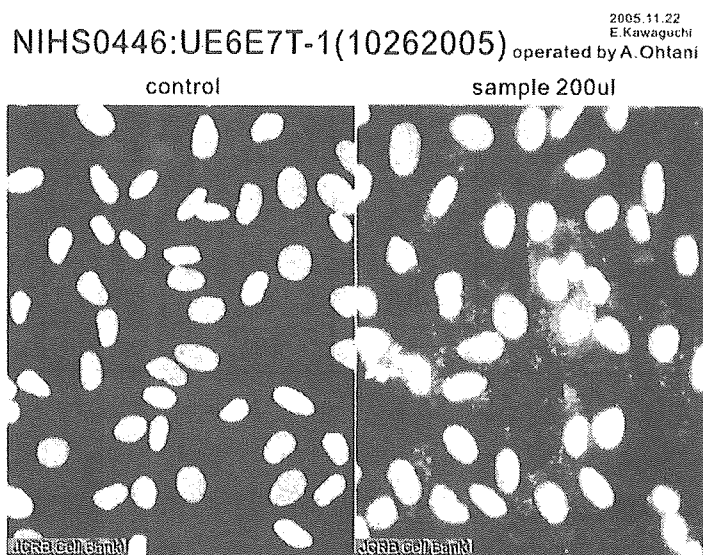
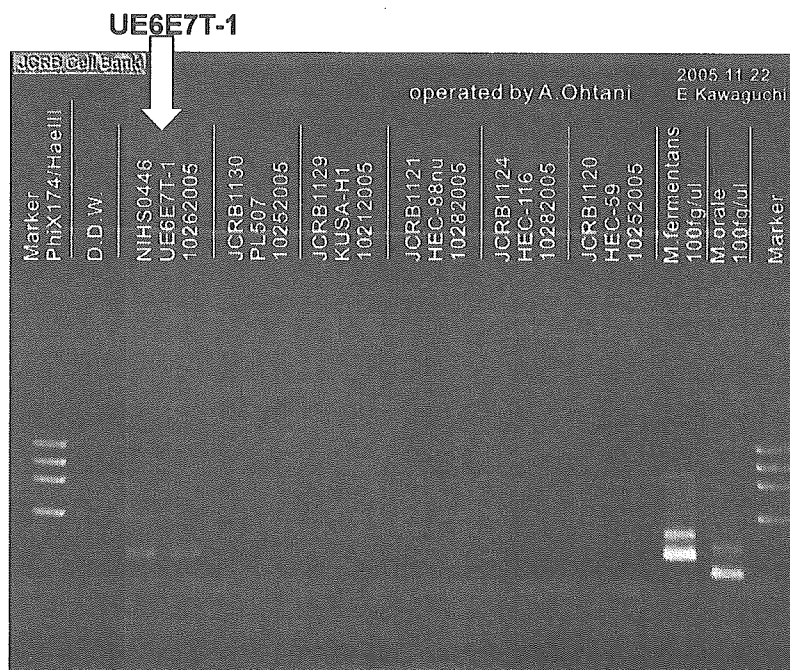


図 7



B/A 比 43.8)。確認のためこの細胞を蛍光染色法 (図 6) と RT-PCR 法 (図 7) で調べたところいずれの方法によってもマイコプラズマ陽性であり、MycoAlert 法の結果と一致した。

表 4

	A	B	B/A	判定
negative cont.	195	33	0.2	-
positive cont.	119	4227	35.5	+
PL502 p5 on Vero	87	44	0.5	-
PL502 p5 cell sup	88	47	0.5	-
PL502 p8 on Vero	79	160	2.0	+
PL502 p8 cell sup	104	592	5.7	+
HEC-116 on Vero	87	169	1.9	+
HEC-116 cell sup	102	1428	14.0	+
HEC-155 on Vero	110	61	0.6	-
HEC-155 cell sup	122	62	0.5	-

図 8

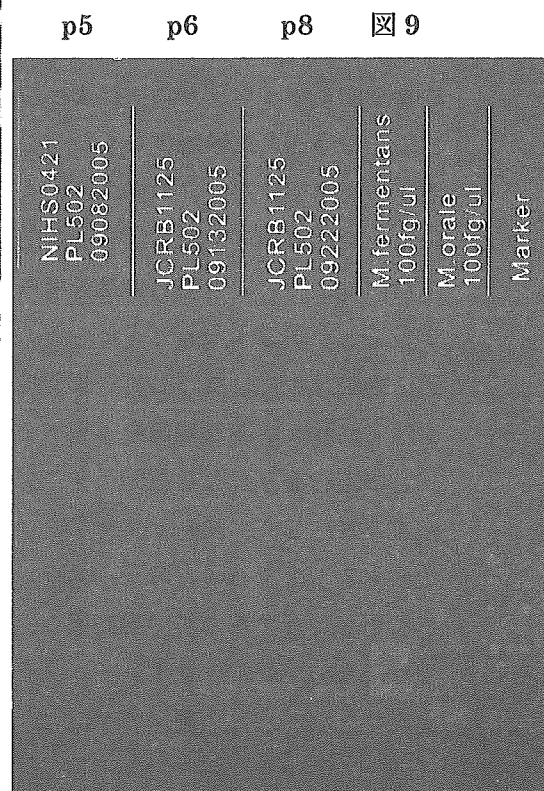
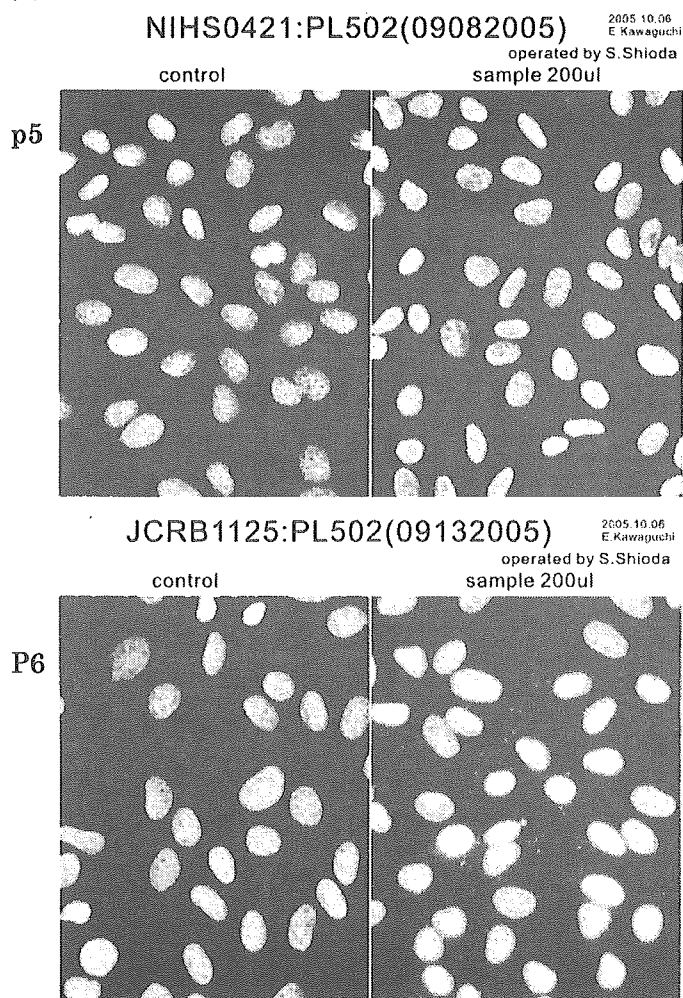
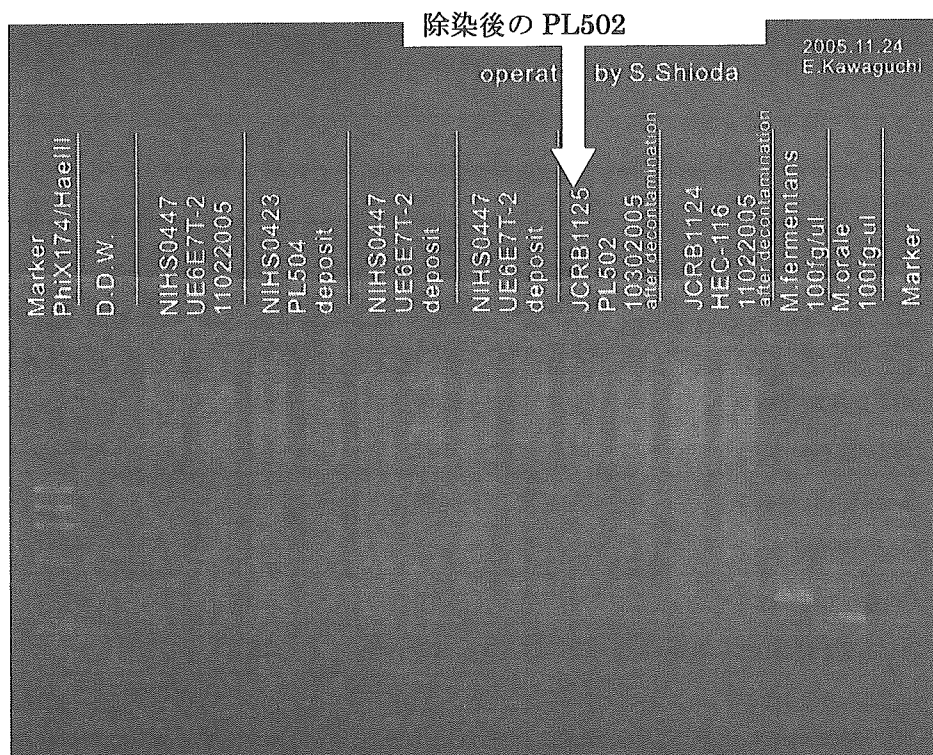


図 10



以上のように MycoAlert によるマイコプラズマ検出結果は良好だったが、近年我々の啓蒙活動の効果もあり新規に寄託される培養細胞がマイコプラズマによって汚染されている事例が比較的少なくなってきた。これ事態はバンクの効用という点で良いことであるが、今回のような事例を実地に検討しようという場合の検査事例を確保することが困難になってきた。そこで、今回汚染が認められた PL502 細胞株を取り上げて、我々が寄託処理を実施する過程で同じ細胞を繰り返し複数回マイコプラズマ検査を実施して、MycoAlert 法と従来法を比較することを行ってみた。結果は表 4 に示したとおりであるが、寄託後 5 継代めまでは MycoAlert 法ではマイコプラズマを検出できなかった (表 4 の PL502 p5、p5

は継代数 5 を示す)。Vero 細胞に感染させて検出する増感検出法によっても上澄から直接検出する方法でも陰性であった。しかし、培養を 8 継代まで進めた場合は、値は異なるものの Vero への感染系でも直接上澄を検査した事例でもマイコプラズマ陽性であった。同じ継代数の細胞を Vero 感染後検査した事例 (図 8) でも、RT-PCR 法 (培養上澄、図 9) でも同じ結果となり並行した結果となった。

このような事例は多々発生する。つまり、バンクでは細胞のマイコプラズマ汚染を正しく排除することを目的に、まず存在しているものは全て出すための培養法を徹底して採用している。そのため、培地には抗生物質等の抗菌剤を一切使用しない。しかし、一般研究者は抗生物質等を培地に加えて培

養することがほとんどである。従って、バンクに寄託後抗生物質非含有培地で培養を開始するとごくわずかなマイコプラズマでも継代を重ねるうちに出現することとなるので、今回の事例のように継代5日目には検出できなかったものが継代8日目には検出、という事例が生じることとなる。残念ながら、このような事例の場合は陰性として処理されるので、MycoAlert法によっても検出は不可能で、除染処理に入る時期は遅れることとなる。この事例においても除染後は、図10のようにRT-PCR法によってもマイコプラズマのバンドは検出されなかった。

なお、マイコプラズマの除染に現在我々が標準で使用している除去試薬はDNAジャイレースと呼ばれる酵素の機能を阻害するとされるキノロン系の試薬MC210を0.5ug/mlの濃度で数継代作用させて除去する。大半が除去された段階ではどんな実験系を使っても陰性となったように見えるが、除去が完全で無いと再出現するものである、そのため、我々はMC210で除染処理を実施した後、MC210や他の抗生物質は一切添加せず、約3ヶ月間30継代の連続継代培養を実施し、その後マイコプラズマが再度出現しないことを確認して除去が完了したとしている。勿論、細胞によってはそれほど長い時間継代培養できない場合などもあるので、その場合は別のやり方にはするが、基本は可能な限りマイコプラズマを上手に除去して研究者に提供する手法を追及するものである。

以上の研究結果からMycoAlert法は従来法に比べて遜色なくマイコプラズマの検出が可能でありながら迅速に実施できること

が示されたので、本方法を採用して、特に細胞入手初期の検査に利用して、除染の必要性の有無の判断を迅速に行うことにした。細胞バンク業務実施上大変効果的に利用できることを確信した。

しかし、本方法だけでマイコプラズマ検査を完了したとすることについてはまだ若干の不安があるので、さらに検討をしたい。MycoAlert法は、マイコプラズマ特異的酵素によって生成するATP量を定量するという大変賢明な方法であることは間違いないし、信頼性もかなり高いことは確認した。しかし、本方法はマイコプラズマによって生成したATPの量を定量するという間接的な方法で検出しており、マイコプラズマそのものを直接観察しているわけではない。問題が単純でATP生成活性が高いマイコプラズマの汚染はこれで検出できるはずだが、問題は自然界は我々が予測したものだけが汚染物質として存在しているわけでは無いと想像される点である。想定外のものとして、マイコプラズマ以外にATP生成をする汚染微生物は皆無なのか？既知の生物の場合はそれが真実であったとしても未知の微生物の出現は無いのであろうか？あるいは、ATP生成をしないマイコプラズマは無いのか？ATP生成酵素が変異を起こしたマイコプラズマは絶対に出現することはありえないのか？等々多くの疑問は沸き起こってくる。細胞バンクという性格上、出来るだけ確実に汚染を補足して高品質化して利用者たる研究者に提供するには、十分過ぎるほどの注意を持って検査を実施して分譲することは必要なことであろう。そこで、マイコプラズマのDNAを観察するRT-PCR法と、蛍光染色でマイコプラズマ

の存在を確認する蛍光染色法の従来法も併用してマイコプラズマ対策は継続することとする。

その際のマイコプラズマ検出手順を若干変更して、最終的にはホームページに掲載している細胞バンクの品質管理手順を修正する。この手順修正のポイントは、寄託細胞を最初に培養する時点でのマイコプラズマ検査を MycoAlert 法を導入する点である。これで、寄託細胞の培養がスタートした場合、その日のうちに汚染の有無に関する情報を得ることが可能になるので、マイコプラズマ除去実験に入る必要があるかどうかを極めて早い時期に知ることが可能になった。これまでの方法ではマイコプラズマ汚染の有無は最低でも1週間後でないとも結果を知ることが出来なかったため、それ以後でなければ除染作業に入ることが無

④ Kasumi-6 細胞から分離した自律増殖性微粒子について

細胞培養技術は1950年代にヒト由来の細胞の培養に成功して以来多くの研究者によって採用され近代生命科学研究における重要な研究手法として定着した汎用技術である。我国でも1960年代より取り入れられて培養技術や周辺技術の開発が成され、倒立顕微鏡やクリーンベンチなどの開発を成就した。こうした技術であることから、培養はほぼ完成した技術として理解されることが多く、その中で奇妙な現象を観察したとしても、それを未だ解決されていない新しい疑問であることに気が付く研究者が少なくなっている。言わば、技術革新という環境の中で新しい疑問はほぼ無くなっているはずだ、培養技術という誰もが毎日使って

かったことを考えると作業を大きく効率化することが可能になる。しかし、MycoAlert 法を併用すると、最初の培養から除去操作を加えることが可能になるので、バンク事業の迅速化に大きく貢献するものである。また、それに引き続いて従来法を利用することによって MycoAlert 法で検出した結果の確認ができ、さらに種の同定も実施することができる。これによりバンク事業としてみた場合の迅速性と確実性の両者を現実に確保できるようになることは大変有利である。

以上、マイコプラズマ検出作業手順の改善は、マイコプラズマ汚染への対処に要する時間の迅速化を可能として細胞そのものの品質を高めることに貢献する、そうした視点から今後積極的にバンク事業に組み込むことに決定した。

いる技術なのだから一点の曇りも無いはずだ、という神話の中に埋没しているのが現状ではないだろうか。

JCRB 細胞バンクでは10年ほど前、1995年ごろ広島大学から Kasumi と名付けられた一連の培養細胞が寄託された。通常のルーチン作業の中でマイコプラズマを検査し、細胞の個別識別を実施し、勿論微生物の汚染が無いことも検査し、検査結果は全てきれいでまったく問題がなく正規登録をし、JCRB 番号を発行してデータベースに記載した。しかし、細胞バンクであるからこそこういう人材があるともいべき細胞培養の詳細を知り尽くした培養担当者が、検査データはどれも問題は無いのだが、何故か細胞が汚れて見えるということを出したのである。敢えて表現すれば顕微鏡下で

細胞と細胞の間はきれいであればならぬのだが、何か黒い粒子状のものが観察されるというのである。勿論、このような汚れとしての微粒子という話しは比較的良く聞く話しであり驚くこともないのだが、今回は特にひどいような気がするので、どう思うかという話しが細胞バンクの中で話題となってしまった。他の担当者達も確かに指摘された粒状のものは見えるが「細菌」ほどは大きくないし、細胞の破砕物のようにも見えるので単なる汚れではないかというのが一般的な感想であった。細胞バンクで仕事をしている職員は、微生物を専門にしているわけでは無いので生き物ならいくら小さくても動くであろうからという単純な理由を持ち出して、この汚れのような微粒子はやはり生物では無いという結論であった。しかし、これは暫定的な結論であってきちんとして結果を出しているわけではないのでいささか気持ちが悪く、どうしたらよいかということになった。一般の研究室なら本来やるべき仕事は別にあるので、こういう疑問に深入りすることは無いのであるが、万一ということを考えれば、細胞バンクという職場においては、このような問題を無視するわけにはいかないと考えたのである。

そこで、あえて長期にわたって分担研究者として細胞バンク事業を手伝って頂いてきた微生物学者の原澤教授のもとに、この汚れのようなものが見える細胞を送って、調査の依頼をしたのだった。実はこの依頼を出すまでに既に数年は放置していたのであるから、場合によってはその責任が問われることになるかもしれないが、それはともかくとしてとんでもない回答が返ってきた。

私は、生物では無いという回答を期待していたが、細胞を取り除いても増えるというのである。今のところ培地は血清を含んだRPMI1640倍地であるが、この条件下で微粒子は増えるという。そこで、成分分析等をおこなったところ、主成分はヒドロキシアパタイトとフェチインという蛋白質であるという。今のところまだDNA成分が検出はされていないので確定的なことは言えないが、単なる微粒子というものでは無いのではないかということになってきた。

この件については分担研究者の原澤による分担研究報告に詳細を書いていたが、もし微生物であると確定すると、現在ストックしてきた全ての細胞について、この微粒子の混入があるかどうかについて検査を実施する必要がある。しかも、この微粒子に関する迅速検査法はまだ無いのでその実験系の確立も課題となろう。

実は、アメリカの培養学会においてだいぶ前にアメリカではナノバクテリアとかスローバクテリアというものが問題になっているとATCCの担当者Hay博士から聞いたことがあった。当時はまだこうした微生物について日本では問題になっておらず私自身もまだ気がついていなかったのが、Hayの話聞き流していただけたが、実はこのような問題だった可能性がある。興味深かったのは、この件を原澤博士と共著で米国の培養学会雑誌に投稿したところ、レフリーから大変好意的な反応が返ってきて、ほとんどフリーパスで掲載が決まったことであつた。論文自体はまだ荒削りなところがあつたが多くの研究者が気にしている話題であることが想像できた。しかし、日本ではこうした問題を指摘してもまだまだ反応

少なく、理解されないことが多い点で両国の差として面白い現象である。

今後さらに検討を進めて、細胞培養から取り除く必要があるものかどうかについて決着をつけたいとおもっているが、一つはこうした微粒子が細胞に毒性があるのかが一つのかぎになると考えられる。勿論、自立増殖性があるなら、それが増殖しないような培養条件を確立することも重要である。有害な汚染物質であるか否かという視点で、この件については、もう少し検討を進めてゆきたい。敢えて踏み込んで検討をしておきたい理由は、この物質がハイドロキシアパタイトというカルシウムを主成分としているという点にあり、ある報告ではいわゆる『結石』の原因になっているのではないかという指摘があるからである。研究用の培養細胞が人体に投与されるわけではないが、再生医療の進展によっては、培養細胞が医療用に利用されるようになるかもしれない。その際、もし、我々が検出した微粒子が通常の培養系だけの問題ではなく、培養一般に広がっているものなら再生医療でも問題となるであろうし、細胞治療を受けた患者に結石が出やすいということにならないとも限らない。そうしたこともあって、一定程度のところまでは突き止めておきたいと考えている次第である。

- ⑤ 細胞バンク事業が開始された 1985 年は IBM 社によって最初の 16 ビットマイクロコンピュータ (現在のパソコンの原型) が市販されて 5 年経過した時期で、米国ではこの小型コンピュータがどこまで業務に利用できるかを確認する様々な試みが行われていた。当時、その能力に気が付いた我々は、

この IBM-PC/AT を導入して培養細胞に関するデータベースを構築することにした。当時 ATCC では IBM のシステム 360 と呼ばれる高価なオフィスコンピュータを導入してデータベース化作業を進めていたが資金の少ない当細胞バンクでも、小型の IBM-PC/AT の導入でそれに匹敵するデータベースを構築できると評価した。そこで、当時はまだ日本語システムは搭載されてはいなかったが、この IBM-PC/AT を採用して dBASEII による培養細胞データベースとその管理プログラム (JDACS) を作成して細胞バンク事業を開始した。このシステムは有効に活用され、後に日本語システムが導入され、さらに DOS から Windows へと変貌を遂げて現在に至っている。さらに、孤立コンピュータシステムからネットワークコンピュータへと技術が大変貌を遂げる中、我々が構築したデータベースシステムも効率良く機能させるには時代に合わせてシステムを発展させることが必須である。

そこで、数年前から継続的にシステムを改良する研究に取り組みはじめ、管理プログラムの大幅な改善を 2 から 3 年ごとに実施することとした。毎年大掛かりな改修を実施すると、システムに大きな障害が現れた際にバンク事業そのものが中断される可能性があるため、大きな改修を実施した後は 1-2 年じっくりとシステムが問題なく動くことの動作確認を実施してから次のステップに進むという注意を払っているためである。こうした改修をほどこしながら、必要に応じて新しい時代のデータである画像データや動画データなどをデータベースに取り込んで多くの研究者の利便性を高めることも実施している。画像データも、既に

10年近く入力し続けており、今年で1万枚の画像をデータベースに登録して公開した。

細胞バンクデータベースは厚生労働省の支援を受けて20年間維持管理してきたわけであるが、バンク事業が始まって数年した頃からネットワーク技術の普及が始まり世界は急速にネットワーク化された。その技術はまたたく間に世界を席卷しWorldWideWeb(WWW)によって情報化が実現した。ここに来て多くの識者はWWWに掲載するコンテンツの重要性を説き始めたが、我々は、細胞バンク事業開始時に既にコンピュータで培養細胞の情報を文献情報まで含めて記録することを開始していたので、非常に簡単な変換プログラムを作成することによって、培養細胞情報をインターネットに公開することが出来た。恐らく、国際的に見ても非常に早い時期にWEBの活用を開始した細胞バンクの一つである。さらに、その後、細胞バンクで生み出したあらゆる情報を電子化して、利用者に提供するというコンセプトでデータを見直し、日常的に画像データや動画データを決まった書式で取扱うようシステムを構築しているため、これらのデータの有効利用が実現している。我々が世界に先駆けて培養細胞の画像データの提供を開始した後、ATCCがほぼ同様な画像データの提供を始めている。

その後、さらにシステムの発展を考え、細胞の個別識別を行っているSTR分析用データベースを構築したうえで、細胞バンク利用者自身が直接バンクに登録されているヒト培養細胞を指定して他の細胞とのクロスコンタミネーションがあるかどうかを直接調べることが出来るシステムを公開した。ここでは、特定の細胞を他の全ての細胞と

比較するシステムと、任意の2つの細胞間がどの程度一致していてどの程度異なっているかという情報を得ることが出来る。データベースへのデータ登録から全てを公開することを一時考えて作業を進めていたが、クロスコンタミネーションを見つけるというJCRB STRデータベースシステムはヒトの個人識別を行う遺伝子解析技術でもあるため、倫理上問題があるのでは無いかとの内部研究からの指摘があり(分担研究者、増井)検討した結果、一般公開は中止することとした。細胞バンクだけでデータ登録をしている場合は、十分に管理が行き届くので培養細胞のデータのみが入力が可能だが、一般公開してデータ登録を可能にすると、生存している個人のデータが入力されているかどうかを管理できないことが最大の理由である。これに関連して、HS研究資源バンクがヒトB細胞のDNAの提供を開始したことに伴って、そのクロスコンタミネーションが同様に心配されたが、このシリーズの細胞はやはり生存個人のデータとして1000名ぶんのデータとなっており、現時点ではやはり個別識別データベースに登録することは問題がある旨指摘されており、データ登録はしていない。そのため現時点ではクロスコンタミネーションについて正確な意味で排除されていないので、利用者たる研究者におかれては、そのことを念頭に研究に利用されたい。

こうしてデータベースの利用は年を経るにしたがって着実に有効利用が図られるように発展しているので、今年度は20年利用してきた古いデータベースファイルやデータ構造の修正に着手し、dBASEIIファイル(dbf)をMySQLデータベースに移行する作

業を開始することにした。プログラムが大変大きくなって、とても個人でプログラムの改修を行うことが難しくなってきたので、プログラムの作成(コーディング)は業者委託として実施しているが、ソースプログラムを含めて作成したものは全て納品することとして、小さな障害ならば我々が自ら修正できるようにしてある。またプログラムの詳細コーディングは委託しているが、プログラム言語は基本的には Pascal による

記述で比較的分かりやすい言語を採用しているため、業者が作成したプログラムの中味を理解することは十分にできるため、適正な価格で作業が進められていると考えて良いであろう。本年度は、この作業を行いながら、新規データ登録 200 レコード、培養記録 1145 レコード、保存管理記録 1412 レコードのデータ入力を実施し、WEB 上へも公開した。以下、今年度実施したデータベース変更手順を参考例として紹介する。

細胞バンクホームページで公開されている細胞データ。左フレームから、個別の重要情報(クロスコンタミ細胞一覧表、p53 遺伝子サーベイ結果、染色体パネル一覧)にアクセスし、右フレームに細胞の個別情報が表示される。該当細胞の写真データはポップアップして表示される。

(データベースが変わっても表示形式は同一である)

MySQL テーブルの作成手順

はじめに

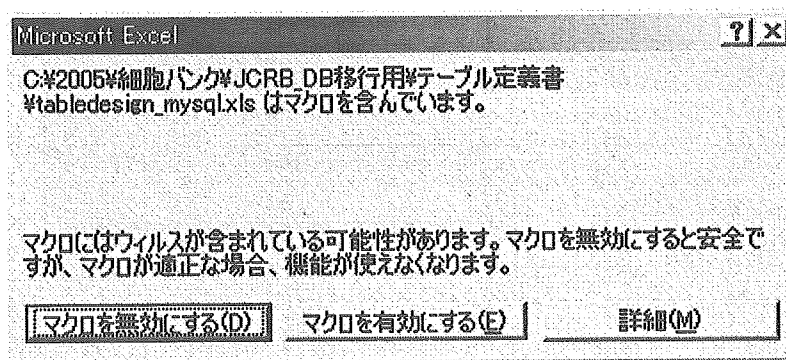
ここでは、テーブル定義書「tabledesign_mysql.xls」から Create 文を抽出して、その Create 文に基づいて、MySQL Control Center 又は DOS コマンドから実行することにより、テーブルを自動的に作成する方法を紹介する。細胞バンクでは、①MySQL データベースを既に導入しており、② strdata データベースの作成、penguin ユーザの権限設定が、既に行われていることを前提とする。細胞バンクにおいては Win2000 データベースサーバで実行されている。

1. テーブル定義書の準備

(1) テーブル定義書「tabledesign_mysql.xls」をバックアップしておく(事故復帰のため)。

(2) テーブル定義書「tabledesign_mysql.xls」を開く。

(※ここでは「マクロを有効にする」とする)



- ・ テーブル定義書は以下のように表示される。
- ・ 1シート、1テーブルの内容を表示する。

項目名	カラム名	キー	属性	バイト	NOTNULL	Default	備考
1 アクセス日付	DDATE		date				dBaseではサイ
2 アクセス時間	DTIME		varchar	5			
3 アクセス者名	NAME		varchar	30			

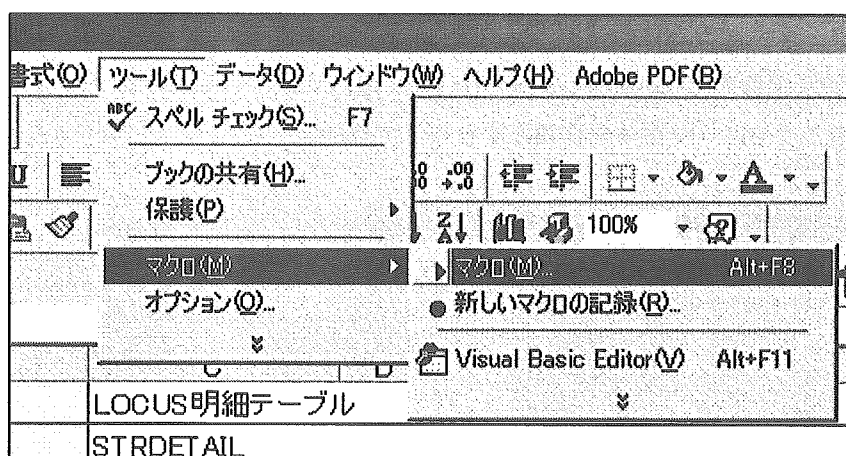
(3) 不要なテーブルのシートを削除する。

例えば、既にテーブルが作成されている

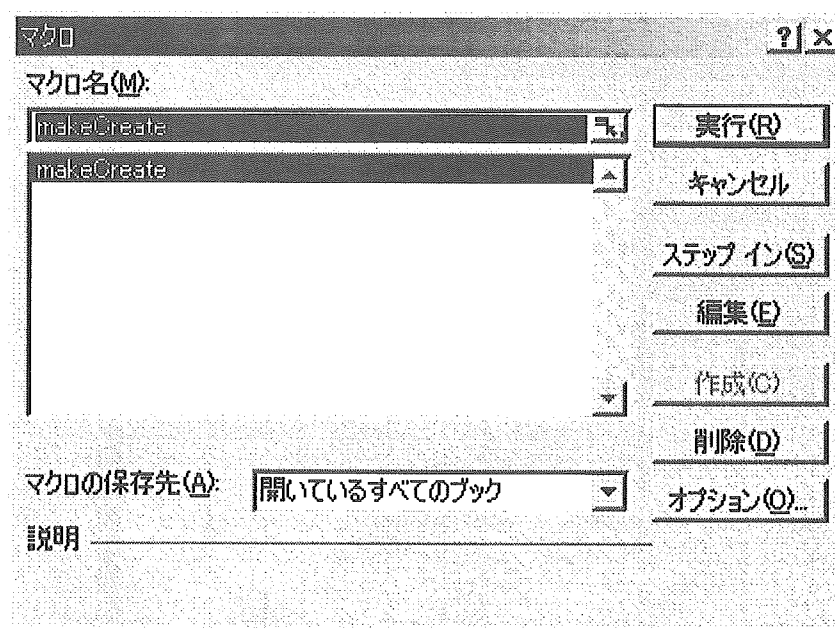
LOCUS マスタ、培養細胞識別テーブル、LOCUS 明細テーブルのシートを削除する。

2. Create Table スクリプトの作成

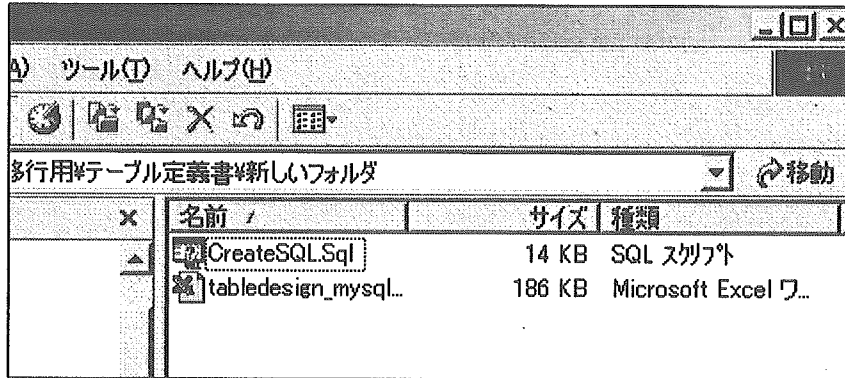
(1) メニューから「ツール」→「マクロ」→「マクロ」としてマクロダイアログを表示する。



(2) マクロダイアログで、「makeCreate」を選択して、実行する。

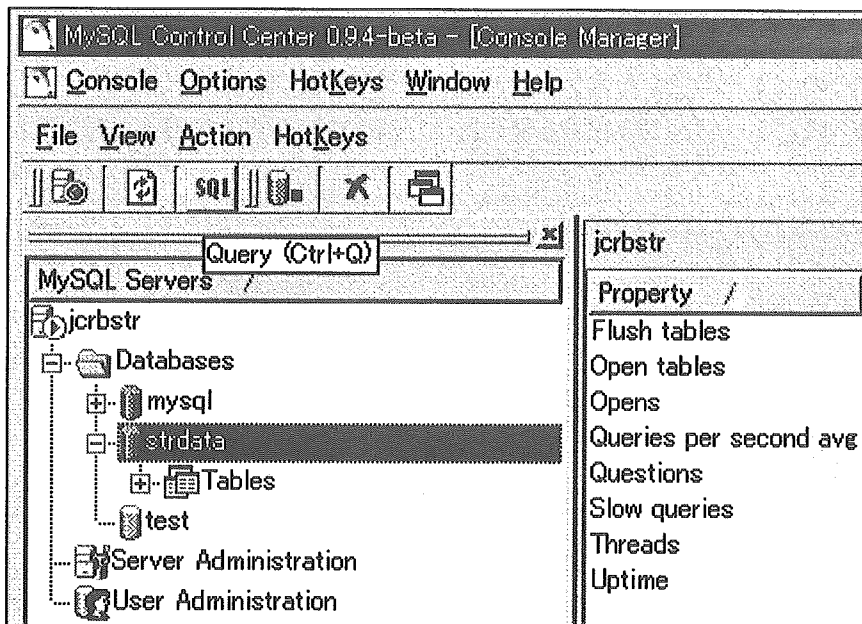


- (3) 実行終了後、テーブル定義書「tabledesign_mysql.xls」と同じフォルダに、「CreateSQL.Sql」が作成される。

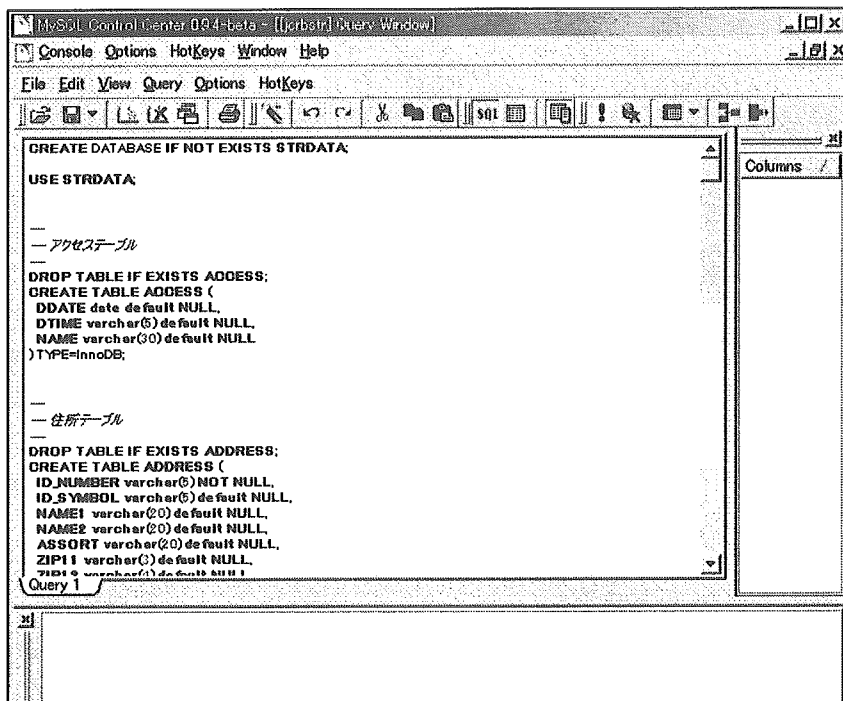


3. MySQL Control Center によるテーブル作成 (これを使用する場合は4は実行しなくてよい)

- (1) MySQL Control Center を起動する。
- (2) データベース「strdata」を選択して、Tool bar の「SQL」ボタンをクリックする。

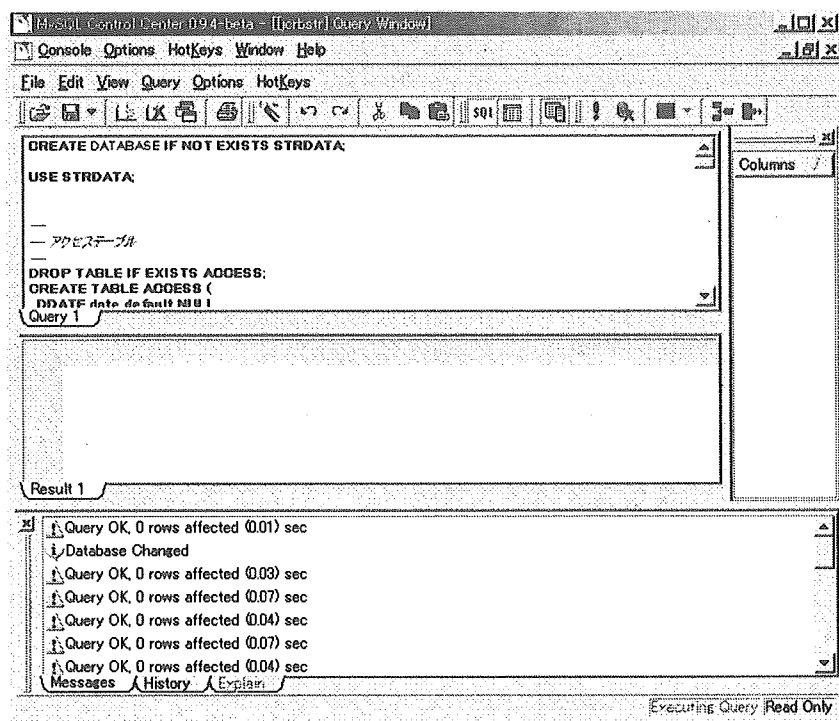


(3) 表示された画面の、左上パネルに、先の「CreateSQL.sql」の全文を貼り付ける。

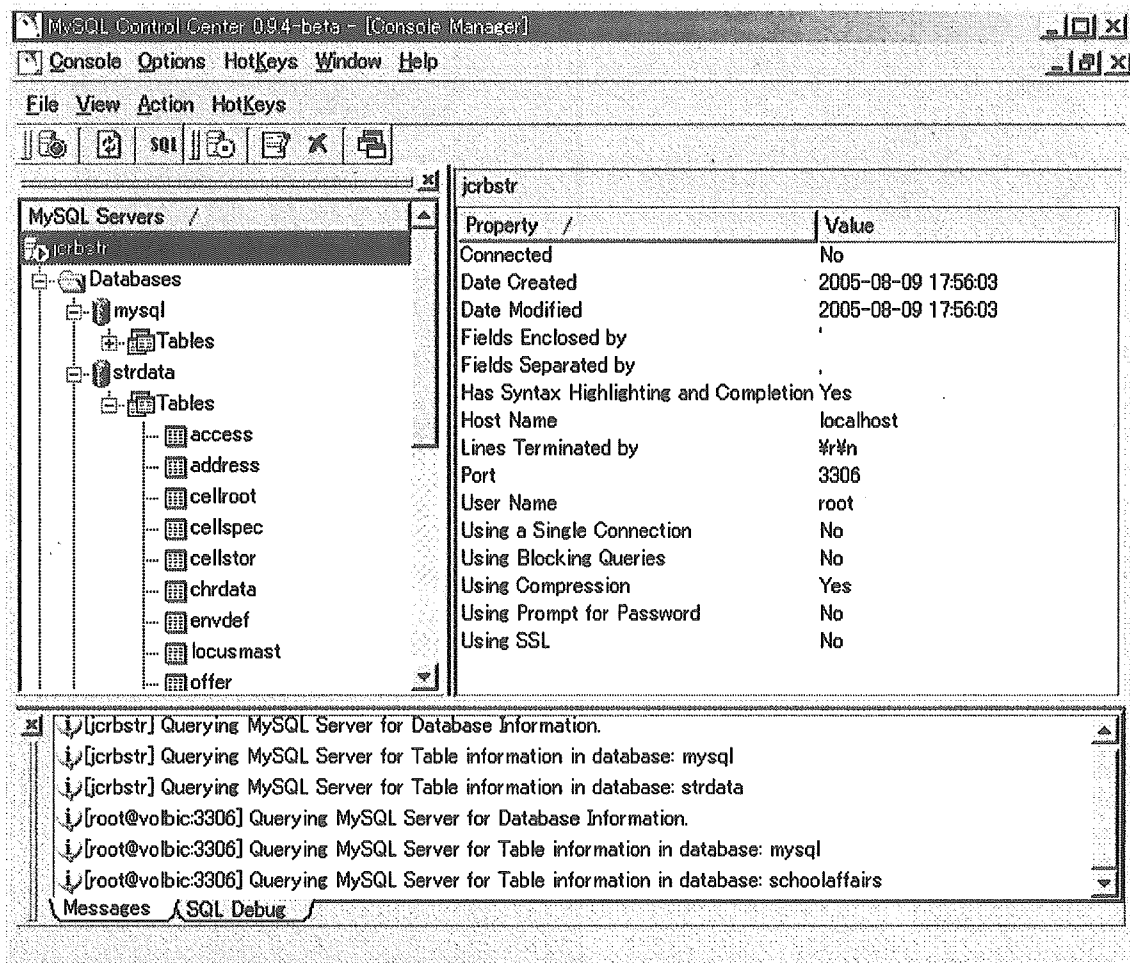


(4) ツールバーの「！」ボタンをクリックして、貼り付けたSQL文を実行します。

※注意：この際、既にテーブルが存在する場合には、同名のテーブルは削除されて新たに作り直されます。



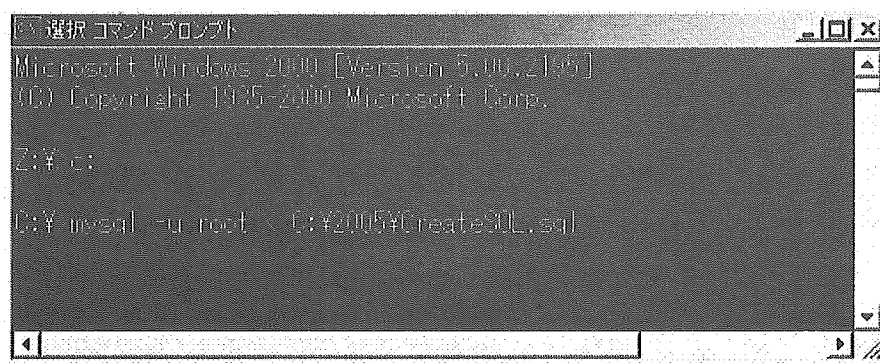
- (5) ここで、一旦 MySQL Control Center を終了し、再び起動させるとデータベース「strdata」下にテーブルが作成されていることを確認できる。



4. DOS 窓からのテーブル作成の場合。この場合は、3のテーブル生成は不要。

- (1) DOS 窓を開いて、以下のコマンドを実行する。

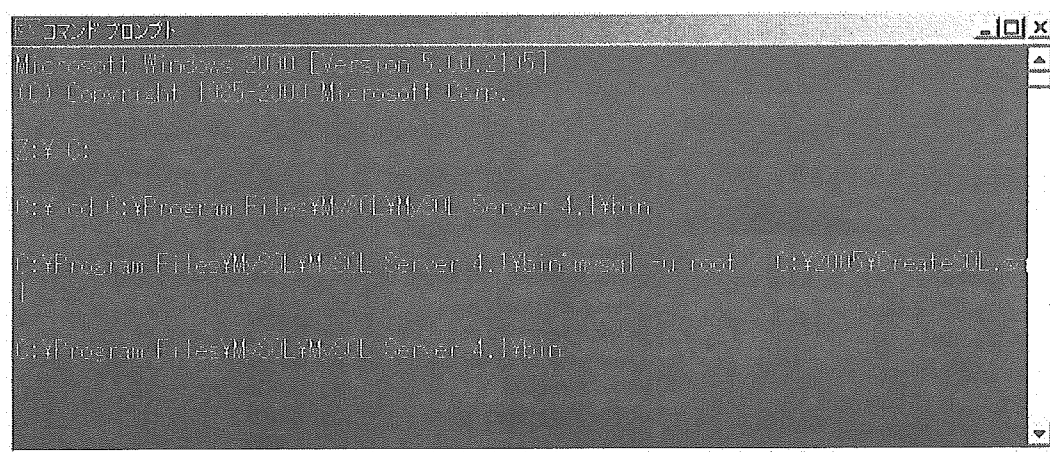
※C:¥2005¥に、CreateSQL.sql が存在する場合



(2) mysql コマンドのパスが通っていない場合、以下のように、

mysql の bin ディレクトリまで移動してからコマンドを実行してください。

※C:\Program Files\MySQL\MySQL Server 4.1\ に、MySQL がインストールされている場合。



```
コマンドプロンプト
Microsoft Windows [バージョン 5.00.2139]
(c) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.

C:\>
C:\> cd C:\Program Files\MySQL\MySQL Server 4.1\bin
C:\Program Files\MySQL\MySQL Server 4.1\bin> mysql -u root -p C:\2005\create\01.sql
|
C:\Program Files\MySQL\MySQL Server 4.1\bin
```

⑥ 研究倫理に関する課題。

人体に由来する試料を利用した研究は現代社会に必須なものとなってきたが、これは未来への投資と考える必要はないだろうか。そのため、生命科学研究を推進するためには、それにふさわしい研究の枠組みが必要になってきたように見える。特に、2000年にミレニアム研究としてヒト遺伝子解析研究がスタートした時期に倫理問題に関して広く議論されて研究の枠組みが作られたが、この枠組みは遺伝子情報という『究極の個人情報』をどう守るかという視点で実施されたもので、ヒトに由来する様々な試料の取り扱いに関するものとはちょっと異なっていた。しかもその後ヒトES細胞の樹立などもあり、もう少し幅を広げ、広くヒト由来材料を利用して人類に役立つ知識を得るための枠組みを新たに考える必要があるのではないだろうか。細胞バンクは『培養可能組織』という限定された試料ではあるが、ヒトの体に由来する組織を収集し、不特定多数の研究者に提供するという使命を持つものである。そのため、現在の枠組みを維持しつつ、多くの国民の納得を得られるように新しい枠組みを自ら構築する努力をしたいと考えている。

いずれ、現在の遺伝子解析を目的とした倫理規定の枠組みでは細胞バンクの活動を支えることは難しく、十分な説明責任を果

せないと思われる。特に、不特定多数の研究者に配布することに関連する『包括同意』という問題は公的研究資源バンクを維持するには重要だが、あまり深く議論された形跡が無く、人体試料を利用した研究を実施するための社会的合意形成が不十分であると感じる。当バンクはこの点を重視して諸外国の情報を収集するとともに、そうした情報を研究者、行政担当者、一般市民に積極的に提供し、社会への説明責任を果たす努力を行う目的をもって研究課題として設定している。

この件については、医薬基盤研究所、生物資源研究部、細胞資源研究室の主任研究員である増井が分担研究者として研究を実施している。増井自身長い期間ヒト細胞の樹立研究を実施し無血清、完全合成培地の開発などの研究経験を持ち、その研究の評価も高い。ヒト細胞を扱いながら考えていた倫理問題についての問題意識を基礎に、近代社会におけるヒトをターゲットにした生命科学研究のあり方について様々な角度から検討を加えている。主に英国のバイオバンクの指導者のインタビューなどを通じて、ヒト試料の扱い方について考察している。