

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)

ヒトゲノム研究に必要な
培養細胞研究資源の品質の高度化に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

課題番号：H18-ゲノム-指定-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19年 4月10日

目 次

I. 総括研究報告	
1. ヒトゲノム研究に必要な培養細胞研究資源の品質の高度化に関する研究 水澤 博	1
II. 分担研究報告	
1. ヒト細胞資源のゲノム研究利用における「包括的同意」のあり方に関する研究 増井 徹	7
2. 培養細胞に含まれるヒトゲノムを攪乱する混入ウイルスの検出系の確立に関する研究 小原 有弘	15
3. ヒトゲノムのマクロ構造を指標としたヒト培養細胞の品質の高度化に関する研究 竹内 昌男	34
4. ヒトゲノム研究の障害となると予想される新たに発見した汚染因子、ナノバクテリアに関する研究 原澤 亮	44
5. マルチプレックスPCR法を用いたヒトウイルスゲノム検出に関する研究 清水 則夫	56
6. ヒトゲノム解析研究に資するヒト遺伝性疾患細胞の不死化と品質管理に関する研究 藤堂 剛	62
7. ヒトゲノム研究に提供する幹細胞の迅速同定に利用するモノクローナル抗体の開発に関する研究 梅澤 明弘	65
8. ヒトゲノム研究に用いるヒト幹細胞・体細胞用成分既知培地の開発に関する研究 星 宏良	68
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	75
IV. 研究成果の刊行物・別刷	78

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

ヒトゲノム研究に必要な培養細胞研究資源の品質の高度化に関する研究

主任研究者：水澤 博
(独) 医薬基盤研究所 生物資源研究部 部長

研究要旨

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、常に筆頭細胞バンクとしての自覚を持って他の細胞バンクをリードしてきた。細胞バンクの必要性は、有用な細胞の収集や分譲に加えて、利用する際に問題となる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排除するシステムの確立、コンピュータを活用した積極的な情報提供システムの確立などが含まれる。このように広い視野に立った細胞バンク整備の結果、当細胞バンクから提供する細胞は汚染や誤りが無く、国際的に通用する高品質な細胞として評価され、現在では年間 3200 アンプルの細胞を有償で分譲できるまでに発展した（ヒューマンサイエンス研究資源バンク経由）。本研究事業ではヒトゲノム研究には欠かすことのできない培養細胞研究資源の品質を高度化するために必要な研究を行い、細胞バンクの事業に活用し、研究者のニーズにあった高品質な細胞資源の確立を目的としている。実際には細胞誤謬の検査法改良開発、ゲノムの詳細解析法による品質管理法の開発、細胞のウイルス検査法の開発、分化能を持つ細胞の識別方法ならびに安定培養用培地開発、未知なる汚染源による細胞汚染の調査研究を実施、細胞資源の品質を世界最高水準に到達べく研究を行った。また、細胞資源バンク活動に必要なヒト資源利用時の研究倫理に関する問題点の調査研究にも取り組み、ホームページを通じて広く情報公開を行った。

(独)医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室：JCRB 細胞バンク
(<http://cellbank.nibio.go.jp/>)

分担研究者

増井 徹	(独)医薬基盤研究所生物資源研究部 主任研究員
小原 有弘	(独)医薬基盤研究所生物資源研究部 研究員
竹内 昌男	(独)医薬基盤研究所生物資源研究部 客員研究員
原澤 亮	岩手大学農学部 教授
清水 則夫	東京医科歯科大学難治性疾患研究所 助教授
藤堂 剛	京都大学放射線生物研究センター 教授
梅澤 明弘	国立成育医療センター研究所生殖医療部 部長
星 宏良	株式会社機能性ペプチド研究所 取締役所長

研究目的

生命科学研究はヒトゲノムプロジェクトの完了を受けて大きく転換しつつあり、疾病治療へ応用することを視野に入れた研究が活発化している。細胞治療研究や疾患遺伝子研究などの研究はそうした応用研究の先端であり、その推進には、多分化能を持ったヒト培養細胞などの利用が重要である。当研究は、ヒトゲノム研究に必須なヒト由来培養細胞研究資源の品質を高度化して、汚染や誤謬の無い研究材料を提供して研究社会へ貢献することを最終的な目的とした。近年ヒト由来の間葉系幹細胞や遺伝性疾患プライマリ細胞に注目が集まっていることから、そうした細胞の収集を強化してそれらにゲノム研究の手法を取り入れた各種解析の実施、品質管理手法の開発を行い、もって新しい医学研究に対応する基盤の構築を目的としたこうした研究により多くの研究者が品質の安定した高品質な細胞を利用できる環境が構築されれば、我国における生命科学研究全体の質の向上を期待でき、海外からの我国の生命科学研究への信頼度が向上するものと思われた。また、これにより、研究手法に多くのゲノム研究手法が取り入れられると同時に、誤った材料を使ったゲノム研究を抑止することを通じて研究費の効率的利用の支援にも資するものと考えられた。

研究方法

<マイクロ・マクロのゲノム解析等を活用した品質の高度化に関する研究>

- ・ ヒト色素性乾皮症やヒト早老症などのヒト遺伝性疾患患者より集められる細胞に関して情報を収集・データベース化

京都大学放射線生物研究センターにて収集保存していた、約70種類に及ぶヒト遺伝性疾患や腫瘍の患者、およびその両親や兄弟姉妹などから得た線維芽細胞やリンパ球、及びそれらから樹立した細胞株など、合計約2000種の細胞、約1万本の凍結チューブをJCRB細胞バンクに移管し、研究者への提供を行うべく情報登録、データベース化を行った。

- ・ ヒトゲノムのマクロ構造解析技術による、染色体レベルでの品質管理技術開発

細胞は直径100mmのプラスチックディッシュで培養し、継代後約2日目にコルセミドを加え、37°Cで2時間インキュベートした後、トリプシンで剥離し、ディッシュから回収した。次に0.075M・KC1低張処理後、カルノア液で固定した。染色体数の測定にはmetaphase spread chromosome をDAPI染色し、Axioplan II imaging microscope (Carl Zeiss, GmbH) で観察し、プログラムソフトLeicaQFISHを用いて画像の取得と解析をした。pFISH解析には13番染色体、17番染色体に特異的なプローブ(XCP13 -kit・FITC、XCP17 - kit - Texas Red) (MetaSystems, GmbH)を、mFISHの解析にはマルチカラープローブ(24XCyte-MetaSystems' 24color kit)を用いた。方法はMetaSystems社のプロトコールに従った。FISH像はZeiss Axio imaging microscope (Carl Zeiss Microimaging, GmbH)で観察し、プログラムソフトmBAND/mFISH (MetaSystems, GmbH) で解析した。

- ・ ヒトゲノム研究に用いるヒト幹細胞・体細胞用成分既知培地(無血清培地)の開発
本研究ではインフォームドコンセントの

もとで採取され、製品化された hMSC (Cambrex社) を使用した。hMSCの増殖アッセイは、 α MEM培地にポリビニルピロリドン、インスリン、既知脂肪酸混合物を添加した増殖検定用無血清基本培地に種々の細胞増殖因子や血清代替物質等の検定物を添加した培地で行った。実験は、24ウェル、96ウェル培養プレートまたは35mm直径の培養ディッシュにhMSCを5000細胞/cm²で播種後、37°C、5%CO₂/airのインキュベーター内で培養し、培養開始後4-11日目に細胞数を計測、または、Cell counting kit (同仁化学) を用いた吸光度法で検定物のhMSCに対する増殖促進作用について計測した。計測は1検定物あたり3ウェルで行い、平均値および標準誤差を示した。検定対象細胞成長因子は、いずれもヒト型組換え体のepidermal growth factor (EGF)、platelet derived growth factor-bb (PDGF)、fibroblast growth factor-1(FGF1)、fibroblast growth factor-2 (FGF2)、fibroblast growth factor-4 (FGF4)、fibroblast growth factor-7 (FGF7)を使用した。

また、血清機能成分代替検定物質として、デキサメサゾン、クエン酸鉄、鉄-EDTA錯体、アスコルビン酸リン酸エステル塩を使用した。

・リアルタイムマルチプレックスPCR法による培養細胞のウイルス検査法を確立

アプライドバイオシステムズ社製7300リアルタイムPCRシステムを用い、13種類のウイルス検出用プライマーを付着乾燥させた検査プレートにより7種の細胞を同時検査できるマルチプレックスPCR法を確立し、50種の細胞のウイルス検査を行った。

<ゲノム攪乱要因の汚染微生物等の解析・除去に関する研究>

・細胞資源中に検出された未知なる増殖性粒子「ナノバクテリア」の生物学的、理化学的性状の詳細解析

培養液中のブラウン運動のような動きを示す微粒子異物を孔径800 nmのメンブランフィルターにより濾過して培養細胞成分を除去してから新鮮培地 (RPMI 1640 / 10% FCS) を添加して37°Cで培養することで分離した。培養液中の粒子形態を位相差倒立顕微鏡U-2000 (ニコン) により観察し、さらに微粒デジタル顕微鏡VHX-100 (キーエンス) および走査電子顕微鏡VE-8800 (キーエンス) により観察した。

<ゲノム研究者への情報提供システムの構築に関する研究>

・ヒトゲノム研究におけるヒト細胞資源の入手に必要な「包括的同意」のあり方に関する情報収集

生物研究資源部での活動、また、国内・国外で発表された報告書や論文及び国内・海外での聞き取り調査、研究会や研究班での活動を元に、現在の日本での問題点とその解決の方向性について調査研究を行った。

結果

3. 研究結果及び考察

①ミクロ・マクロのゲノム解析等を活用した品質の高度化に関する研究

ヒト色素性乾皮症やヒト早老症などの高発がん性遺伝病患者由来細胞コレクションに関して情報を収集・データベース化を行った。それに伴い、2000株にもおよぶ細胞コレクションを(独)医薬基盤研究所より分譲する体制を確立し、ホームページ上にて

情報公開を開始した。本細胞コレクションに関しては非常に貴重なコレクションであり、今後遺伝病の発症メカニズムあるいは遺伝子治療などへの利用が考えられる。

CGHアレイ、mBAND法などを用いて染色体レベルでの安定性評価法開発を行った結果。これらの詳細ゲノム解析が細胞機能解析とともに細胞品質管理に非常に重要であることが示された。今後、細胞治療・再生医療研究が盛んに行われるが、ES細胞だけではなく、組織幹細胞でも移植に必要な細胞量の確保にはin vitro 増幅が不可欠であり、そのためには他細胞のコンタミネーションやマイコプラズマ汚染、ウイルス汚染チェックと同じように、移植された組織の悪性変異を防ぐためにもカリオタイプの検査は品質管理の重要な項目に加えなければならないことを本研究では警告している。

培養細胞のウイルス検査法確立では、マルチプレックスPCR法を応用した実用的ウイルス検査法を確立し、バンクが保有している培養細胞に対するウイルス検査体制を確立した。その結果、13種類のウイルス

(CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, BKV, JCV, ADV, HBV, ParvoB19, HTLV-1, -2, HIV1, HIV-2) を10コピー/wellの感度で同時・半定量測定系を開発に成功した。本方法を用いて50株のウイルス検査を実施し、細胞資源のウイルス汚染現状を把握することができた。研究に用いる細胞のウイルス汚染検査に関しては、非常にニーズが高いが、世界で入手可能な細胞のほとんどが検査されていないのが現状であった。世界に先駆けてウイルス検査を全細胞に実施し、情報提供することで高品質な細胞バンクとしての認知度をあげることができ、他の細

胞バンクとの差別化つなぐと考えられる。

②ゲノム攪乱要因の汚染微生物等の解析・除去に関する研究

細胞資源中に検出された未知なる増殖性粒子「ナノバクテリア」の生物学的、理化学的性状を詳細解析し、ナノ粒子は球形もしくは卵型を呈し、培養ステージでは十字型もしくは垂鈴型を呈するものが存在した。これらの粒子は「ナノバクテリア」と呼ばれるものに類似しており、細胞培養中に比較的頻繁に見られた。このナノバクテリアに関する研究はいろいろと報告があり、ヒト結石症との因果関係が示唆されており、新たな細胞資源の汚染微生物として注目する必要があると考えられる。

③ゲノム研究者への情報提供システムの構築に関する研究

細胞バンクにおける分譲動向を調べると、本年度は3200アンプルの分譲を行い、再生医療研究を志向するような分化能を有する細胞の分譲依頼が増加した。また海外特にアジア諸国への分譲数が増加しており、細胞バンクの認知度ならびに保有資源の重要性が評価を受けている証拠であると考えている。

ヒトゲノム研究におけるヒト細胞資源の入手に必要な「包括的同意」のあり方に関して国内外の情報収集を行い、今後のヒト試料を扱う資源バンクにおける問題点について整理された。

4. 評価

1) 達成度について

(独)医薬基盤研究所・細胞資源研究室はJCRB細胞バンクとして50種の新規細胞の収集、3200アンプルの分譲を行い、本研究

を通じて新たな品質管理法開発による、細胞資源の品質高度化に取り組んだ。その結果ウイルス汚染検査体制の確立は世界の細胞バンクに先駆けて我々の細胞バンクで確立することができた。今後、創薬・再生医療研究など多岐にわたる研究に供される細胞資源は、ますます高品質であることが要求される。その際にウイルス検査体制を確立できた意義は非常に大きい。また、あわせて未知なる汚染原因となりうる課題への取り組み、「ナノバクテリア」に類似した汚染微生物に関して知見を得られたことは今後非常に大きな問題をはらんでいると考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々は、本研究を通じて多くの研究者によって樹立された培養細胞の品質を高度化し、誤った細胞や汚染された細胞を排除するシステムを確立し運用している。さらに、誤謬や汚染を含む細胞を研究に利用することの問題点をホームページに掲載し、正しい細胞を利用するよう積極的な啓蒙活動も行っている。これにより多くの研究者が誤謬や汚染を避ける必要性を強く認識するようになってきている。誤謬や汚染を含む研究材料を使った研究がどれほど研究費を浪費するかを考えれば、こうした細胞バンクの活動やそれを整備するための研究には極めて大きな社会的また学術的意味が強くある。

3) 今後の展望について

JCRB細胞バンクが分譲した細胞数は本年度3200アンプルにも登り、年々増加傾向にある。これは培養細胞を用いた研究が広く普及したことと、保有する細胞資源の数が

が増加しているのに比例していると考えるのが妥当である。しかし、細胞を用いた研究にはトレンドのようなものがあり、現在は再生医療・細胞治療の実現に向けた研究への応用技術開発に力が注がれており、細胞バンクからも分化能を有する細胞の分譲が増加した。これにあわせて品質管理に注目する研究者が増え、将来ヒトへの適用を視野に入れ、細胞の汚染特にウイルス汚染に非常に関心がもたれているのが現状である。世界に先駆けて全保有細胞のウイルス検査情報提供を確立することにより、より品質の高い細胞を提供する細胞バンクとの認知度を上げ、他の細胞バンクとの差別化につながることを期待している。また、研究者のニーズに合わせた細胞の供給を実現するため、不死化細胞の樹立開発、ヒトES細胞をはじめとする分化能を有する細胞の供給体制を確立し、厚生労働省の細胞資源バンクとして確固たる地位を築きあげることが目標としたい。

5. 結論

細胞資源のウイルス検査体制の確立ならびに新たなる品質評価法の開発を実施し、細胞資源の高度化を行った。これにより細胞資源の品質に関して確固たる地位を築き、生命科学研究の基盤を構築することができた。また、未知なる汚染微生物に注意を払い、細胞資源バンクが果たすべき役割を担うことで、研究者が安心して利用できる細胞資源の確立に努めた。

今後、日本の厚生労働省の細胞資源バンクとして国家の生命科学研究の推進に貢献する研究基盤の構築を目指すものである。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 30

論文発表 2

それ以外の発表 3

そのうち主なもの

論文発表

小原有弘, 水澤 博 JCRB細胞バンク事業の概要 分子細胞治療(2006) 5:46-50.

増井徹 包括同意、何が問題か：医学・生物学研究をめぐる内外の状況から メディカルバイオエシックス2007 ; 34 : 74-81.

2) 海外

口頭発表 3

論文発表 23

そのうち主なもの

論文発表

Umezawa A, Toyoda M., Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stemcells. Inflammation and Regeneration, 27(1):28-36. 2007

Takeuchi M., Takeuchi K., Kohara A., Satoh M., Shioda S., Ozawa Y., Ohtani A., Mizusawa H., et.al.

Chromosomal Instability in Human Mesenchymal Stem Cells Immortalized with Human Papilloma Virus E6, E7 and hTERT Genes.

In Vitro. 43, 2007 (in press)

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし

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）

「ヒトゲノム研究に必要な培養細胞研究資源の品質の高度化に関する研究」 班長：水澤博
分担研究報告書（平成 18 年度）

ヒト細胞資源のゲノム研究利用における「包括的同意」のあり方に関する研究

分担研究者 増井 徹

独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部（JCRB 細胞バンク）主任研究員

研究要旨

日本における人体由来研究資源の医学・生物学研究利用はゲノム解析倫理指針、疫学研究指針、臨床研究指針によってその枠組みが整えられた。しかし、個人情報保護法の施行とそれに伴う議論の中で、バンク活動にとって重要な「包括同意」の考え方への批判が高まっている。この問題に焦点を当て現状を分析し、論考を加え、細胞バンクが果たすべき役割について考察した。

A. 研究目的

生物研究資源の適切な流通は、実験科学研究の検証性を支える基礎である。ところが、人体に由来する生物研究資源（人研究資源）の研究利用を規制する現行の研究倫理指針群は、個人情報保護法への適応にともない、インフォームド・コンセントへの依存を強め、特定の研究への説明とそれに限定した研究利用を推奨する考え方を強めている。本報告においてはその制限の持つ問題点について検討し、その解決策を提案する。

て検討をされたものである。それらを以下に示す。

1. 収集制限の原則 ?
2. データの完全性の原則
3. 目的明確化原則 ?
4. 利用制限の原則 ?
5. 安全管理の原則
6. 公開の原則
7. 本人参加の原則
8. 責任の原則

B. 研究方法

生物研究資源部での活動、また、国内・国外で発表された報告書や論文及び国内・海外での聞き取り調査、研究会や研究班での活動を元に、現在の日本での問題点とその解決の方向性について調査研究を行った。

現行の諸研究指針（ゲノム解析研究倫理指針、疫学研究指針（現在見直し中）、臨床研究指針）はこの原則に従い、また個人情報保護法の枠組みにしたがって改正がなされた（2004年12月改正、2005年4月施行）。先に示した原則の中で、特に人体研究資源の流通に関わるものは、「1. 収集制限の原則」、「3. 目的明確化の原則」、「4. 利用制限の原則」の3つである。それらの遵守を目指し、インフォームド・コンセントの原則に従うと、以下のような状態が個人情報原則に従った理想的な倫理的研究実施と考えることができる。

C. 研究結果と考察

1. 背景

2003年5月に成立した個人情報保護法は2005年の4月に施行された。個人情報保護法の基本は1980年のOECD個人情報保護8原則に由来する。この原則は特に金融情報の国際的流通を想定し

- ① 研究計画において、明確な使用目的、方法。
- ② 目的達成後の速やかな廃棄。

③ 目的外利用の禁止。

④ 第三者提供の禁止。

これらの条件が個人情報保護の原則から導きだされることを踏まえると、人研究資源に関する包括同意の枠組みに対する批判の高まりは、個人情報保護法の基本精神によると考えることが妥当といえる。そして、本報告で論考する問題点への配慮なく、個人情報コントロール権を強調した個人情報保護の原則から、人研究資源の研究利用の問題が議論されることはバランスを欠くのみならず、日本の医学・生物学研究への理解を阻害し、その発展を抑えるものとなると考えられる。

先示した①から④の考え方の対極にあるのが、われわれ細胞バンクの活動である。目的を特定しない長期保存、目的外使用、第三者提供なしに、細胞バンクの活動は成り立たない。そして、本報告書の最後に論じる検証性の確保の問題を取り上げただけでも、従来の科学研究の枠組みの中に人研究資源が入ったことで、医学・生物学研究の首尾一貫性 (integrity) を保つ体制に、個人情報保護が立ちはだかっているという構図が生まれていることがわかる。研究のこの側面—科学性が要請する人権の抑制—を強調することは、個人の利益と社会の利益の対立というかたちでこの問題を捕らえることになる。しかし、問題をそのように捉えることは、一般社会・市民と研究者社会の溝を大きくしても、その和解への道を阻むと考えられる。医学・生物学研究のぎりぎりのところで顔を出す「人権の抑制」という問題を、人の尊厳を高めることにより解決を図ること、そしてその背後に法的基礎を作る試みも必要であると考えている。

そして、そのような解決の基礎は研究という場の検討だけでは解決される可能性はない。医療も巻き込んだ大きな問題である。しかし、本報告では、そこまでの射程を論考することはできない。本年度は、分担研究者増井が関わっている研究、検討活動の最近の動きを取りまとめ、人研究資源バンクの活動を支える動きの方向を考察する。

2. 人体研究資源の利用に関する新しい動き

ここでは、3つの例を紹介したい。一つはHAB学術機構の動き、もう一つは日本学術会議の検討会、最後に厚生労働科学研究費宇都木伸班の動きである。後ろの2つの検討には分担者が加わっている。HAB学術機構の検討には、3回の傍聴を行い、外部へ公開可能な配布試料の提供を受けた。

a. HAB学術機構の検討

日本における研究倫理の枠組みが形成されたのは、1998年の黒川委員会が端緒であった。この会は日本製薬工業協会とHAB協議会からの要請もあったのだと思うのだが、日本における人体研究資源の流通を促進するために、社会的な受容を得ることを目的として、製薬企業、研究者が守るべき枠組みに関して検討を始めたのがきっかけであるという。その際、日本における人体研究資源の利用の可能性を探る中で、手術摘出組織の利用を取り上げた。ただし、この時点ですら、手術摘出組織で問題が解決するとは考えられておらず、答申の中では、1997年の臓器移植法、その施行規則の見直しの際に、移植不適合臓器の研究利用を可能にする道を開くようにと明記されている。

現在、HAB学術機構は「移植用臓器提供の際の研究用組織の提供・分配システムの構想に関する準備委員」(町野朔座長)を組織して、心臓停止時の腎臓の臓器提供に際し、他の利用可能な臓器・組織の研究用の提供に関して検討をしている。今年度中に検討成果は公表されるという。この枠組みは、脳死判定とは関係がないが、臓器移植法の規制範囲である心臓停止時の腎臓提供での人研究資源の提供に関わる枠組みを考える点で注目に値する。

日本における死後(心臓死と脳死)の腎臓提供者は年間50-100例の間である。昨年は始めて100人を超え、110人から死後の提供があった。(一方生体からの移植はその10倍ほどある。)心

臓器停止後の腎臓提供においては、心臓停止前にカテーテルを挿入して臓器の冷却と保存を図る。このようにして還流された臓器は、心臓停止後も良い状態で利用可能である。そこで、臓器移植のための腎臓の提供、組織移植のための組織（臓器以外の組織、例えば皮膚、骨、血管、心臓弁など）の提供が済んだ後、肝臓は研究利用可能であるという。そこで、この肝臓の提供・分配の法的な問題を検討し、可能性を探るのが当該委員会の目的である。

これまでの手術摘出組織の問題点は、その提供量の少なさである。数グラムの試料からできる研究では、いくら実験方法をマイクロ化したとしても限度がある。また、数検体をプールした試料の作成も試されているが、問題の解決には程遠い。それに引き換えて、HABが構想する提供枠組みは、一提供で数百グラムを想定できる。これなら、一つのバッチで多くの医薬品の比較研究が可能となり、日本における試みとして画期的といえる。

法的には問題ないというが、実務の面ではかなりの困難が予想される。特に移植用の臓器・組織の提供をそれぞれのコーディネーターが関わり、脳死・心臓死移植臓器提供、心臓死後の移植用組織提供を分けて行うという2重の枠組みが日本では行われていること（関西ではこの枠組みの一本化が計られているという）。それら2つの移植への提供枠組みは、「病人の救済」に直接つながるということをアピールできるが、それにも拘わらず提供件数が増えないという日本の現実がある。その中で、医学・生物学研究、それも製薬企業の利用に関する理解が、死を控えた家族の混乱の間で、説明と提供に関する承諾を得られるのか。この活動を支援する資金面での裏づけはどこから得られるのか。など多くの問題を抱えていることは確かである。しかし、この方向での検討は、大きな意味を持つ。

b. 日本学術会議の検討

日本学術会議は「ヒト由来試料・情報を用いる

研究に関する生命倫理検討委員会」（位田隆一委員長）を組織して、今年度検討を行った。日本学術会議の提言書は、政府への提言として、医学・生物学研究分野におけるヒト由来試料・情報を用いる研究に関して生命倫理的観点から検討を行った。これは、2005年度からの検討を引き継いだ検討であり、生命倫理的側面、規制的な側面を中心にした検討である。その提言書は公的バンクの活動に関する国の関与について提言を行う性格をもつ。

特徴は、包括同意の可能性には難色をしめすが、公的バンクを通じての人研究資源の分譲に関しては、目的外利用、第三者提供の枠組みを認めた点である。これは、ゲノム解析研究倫理指針を追認したものである。また、公的バンクと私的バンクの連携関係の強化を謳っている。これまでの異なるのは、これまでのバンクの枠組みは、ゲノム解析研究倫理指針が示す「連結不可能匿名化」をされた人研究資源の分譲であったが、連結可能での分譲枠組みを作ることについての提言は述べている。

この提言書は、現在日本学術会議内での検討を受けている。

c. 厚生労働科学研究補助金宇都木班の検討活動

分担研究者は本研究班に第1期「遺伝子解析研究、再生医療等分野において用いられるヒト由来資料に関する法的倫理的研究」第2期「個人情報に関する医学・生物学研究利用を支える法的・倫理的・社会的基盤について」2期6年間関わり、英国におけるバイオバンクの動きと、それを支える基本的社会基盤政策について検討を続けた。第1期は人由来細胞・組織を中心とした検討を行い、バンク活動で用いる用語についての検討などを行ったのだが、2期目は人体由来の情報の流通を課題として検討活動を行った。というのは、人体由来の細胞と組織あるいはゲノム試料の利用が、病歴や生活習慣という個人に由来する情報と結びつい

たときに意味を持つため、今後の医療情報の利用に関して検討が必要であることが、1期目の検討でしめされたからである。

現在の人研究資源についての国際的、国内的な大きな動きは、細胞や組織のような「もの」と、病歴や生活習慣などの「情報」を一つのセットとして収集することである。そして、それらのセットが体系的に、例えば同じ症状の患者、同じ地区の住民という具合に集団として集められ、且つ検証したい仮説にふさわしい対照群の存在があって初めて研究資源としての価値が生まれる。このような事情の中で、情報と組織・細胞の関係ということが重要性を持つ。そこで、第一期3年の「もの」にまつわる検討の後に、丁度2003年に個人情報保護法の成立の問題もある中で、第二期人由来の情報についての検討をした。ところが、ものと情報の流通の問題は、ともに個人情報保護に関わる問題であり、現在の規制の方向性は規制強化の方向に振れすぎていると考えられる。この点に関しては、背景のところで述べた。

本研究班において英国における人研究資源政策の動向を追跡調査した。その中で、1999年から検討が行われていたUKバイオバンクの活動が2007年から本格始動する。また、2004年の末に成立した人組織法を基礎として、人組織庁が新設され、その活動が準備期を経て2007年度から本格化すると考えられる。さらに、患者の承諾なしに患者の個人情報を研究に利用する枠組みである患者情報助言グループの活動が、2006年の国立保健サービス法の中で、従来どおりに維持されたことなど大きな動きがある。そのような動きは、現在英国でも日本同様に大きく規制方向に振れているものを、緩和する動きでもある。

このような緩和の動きとは反対に、英国の伝統あるがん登録の活動の中で、患者情報助言グループ（保健大臣が設置する機関で、患者の個人情報をその個人の承諾なく利用できる許可を与えるかを審査し、保健大臣に答申する）が、がん患者ががん登録の記録を抹消できるという方針を打ち出した。英国でのこの議論は、個人情報の本人の利益以外の利用において、本人

の拒絶をどのように扱うかという問題として興味深い。

ドイツにおいては、80年代に個人情報保護の動きの中でがん登録にインフォームド・コンセントの考えが導入され、そのことによって登録の精度が落ち、インフォームド・コンセントを得ない、悉皆的な登録へと法律を用いて改正したという歴史がある。英国では、がん登録法はなく、法的な背景としては先の患者情報助言グループの審査と保健大臣の承認により行われている。初期の議論とドイツの経緯から、がん登録へのインフォームド・コンセントに対しては、これを使わないという枠組みを決定した。ところが、本人の拒否に対応して登録情報の抹消を行おうとするのである。この動きがどの程度の実質的なインパクトを持つものかは興味深い。英国国会の下院でのがん登録などを含む疾病登録へ利用する制度の議論においては、がん登録の存在が当然のこととして国会議員の議論の前提となっているさまは興味深いことであった。そこで議論されていたのは、患者の承諾なく当該患者の医療情報をごん登録に利用するための患者情報助言グループの設置法についてである。

承諾なしでの個人情報の研究利用の話は、既存組織の研究利用や目的外の利用、第三者提供にも理論的なつながりがある。実際に、英国の医学研究アカデミーが2006年の1月に公表した報告文書「個人情報を社会善のために」は大きなインパクトを持っているようである。ただ、その姿勢については、当該検討委員会の委員であった英国バイオバンクCEOのロリー・コリンズ教授も、また作成に深く関わったキャシー・レデル法学博士も、慎重な姿勢を示している。方向性として検討すべきものであるが、それが社会の支持を今の時点でとられていると考えることは困難であるという点で、先の2人の意見は一致している。また、英国医師会の医学倫理部門でのインタビューにおいても、市民が個人情報は社会善のためなら使用されても良いとする意見を持っているという証拠がない点を強調し、その証拠がない限り英国医師会とし

て、医学研究アカデミーの報告書の意見を支持できないとしている。

英国での人組織法では、医療の場で医療のために採取された人体試料の残余物については、患者の再同意なしに利用できる枠組みがある。診療の場は人組織法による規制は受けず、コモンローによる承諾原則が適応されるが、その規制と研究利用の枠の隙間を埋めて利用する形式を採っていると考えられる。ただ、英国での聞き取りにおいては、治療の残余物であれ、それが直ぐに研究利用される予定がある場合には、倫理審査委員会は残余物の研究利用に関する承諾を得ることを要請するだろうという意見が多かった。

このように日本での人研究資源の利用枠組みと、英国における利用枠組みではそんなに違いはないように思われる。ただ、英国では人組織を保存する施設は、免許を取得しなければならないとされる点が大きく異なる。使用に関する免許は必要がないが、保存については免許が必要である。ただ、取得のための費用が100万円もするために、かなりの負担であり、どのような機関が免許を取得するのか、また、小規模の人研究資源保存施設が統合される動きを加速する目的もあるとする見方もある。末端の研究者は使用者として必ずしも免許を必要としないが、保存が全くない使用者というのは考えられない。など、実務としてこの免許システムがどのように動くかは興味深いものがある。免許制度は、人組織庁の資金源であり、その点でもこの免許制度が動くかどうかは大きな鍵となる。英国のこの試みの成功は、日本における包括同意の導入と研究資源保管機関の備えるべき性質の問題などを検討する場合に参考となると考えられる。

英国の人組織法の場合は、バンク活動の中には、治療用も研究用も一緒に含めて免許制度が適応される。治療用と研究用のバンクの性質の差をどのように規定し、評価し、免許の発行へとつなげるのかも重要な点である。

3.研究という活動が要請する2次利用、第3者

提供

a. 国際的研究誌が要請する研究資源の共有ポリシー

医学・生物学研究においては、国際的研究誌は研究資源の共有ポリシーを、その投稿規程の中に含めている。すなわち、当該発表論文で使用した研究試料については、請求をした研究者に供与しなければならないとする。この規程は、科学研究における検証性を考えれば当然のことである。

研究論文において、結果はすべて過去形が用いられる、「これをこのように調べたらこの結果を得た」という、過去の事実を示すためである。考察や結論を書くときに、現在形を用いて真実の記述として書けることはごく少ない。

「これをこのように調べたらこの結果を得た」ということが再現できなければ、そもそも研究成果の検証はありえない。この実験の再現のために研究誌は「材料と方法」を詳しく書き、研究材料を他の研究者の要請があったら分け与えることを義務付けることによって、実験の再現と検証を可能にする体制を保護してきた。この最たるものが、19世紀に良く見られたという公開実験である。公衆の面前で研究の成果を見せ、観衆を納得させることは、検証の持つ基礎的性質も満足させるものである。もちろん、種も仕掛けもあるトリックを駆使して観衆を化かすことだってあったことは、当然であろう。とはいえ、実験の再現や検証を可能にするシステムに異議を唱える人はいない。

ところが、これが人研究資源であつたらどうであろうか。インフォームド・コンセントを得て研究に利用していた人研究資源について、外部の研究者（第三者）にどのように使われるかをコントロールできないかたち（目的外使用）で提供することを、或いはそもそも外部の研究者へ提供することについてインフォームド・コンセントが得られていなければ、そのような未知の第三者提供を禁止することが個人情報保護の体制にかなっていない、となる。すると、人研究資源を用いた研究は検証されることがないということになる。現在の研究評価の中では、

一つの人研究資源を用いた研究成果には、独立の人研究資源のセットを用いた検証が、一つの研究論文の中で要求される。それは、一つには人研究資源の流通の悪さに起因するのかもしれない。

いずれにしても、人研究資源の研究利用は、二次利用、第三者提供の問題において大きな問題をもち、これらの問題が科学研究としての検証性を阻害する可能性がある。

b. 包括同意の行方と解決に向けて一人を対象とした研究の検証性の確保のために—UKバイオバンクの計画思想

先の項で述べたような、二次利用や第三者提供の問題を解決するために、研究者が自分の研究のためだけに人研究資源を取り扱わないようにするというシステムが考案されている。その典型が、英国のUKバイオバンクである。この事業は研究を実際には行わず、人研究資源の体系的収集と保護管理者（Custodian）として機能することが目的とされていた。そして、そのような人研究資源の保護管理機関が生まれることで、これまでの研究資源の共有で問題となった研究者間、研究組織間の利益相反の問題を緩和し、より公正な、迅速且つ効率的に研究者による人研究資源の利用が可能となり、医学・生物学研究が推進されるという考え方が議論されていた。

これは、これまで論じてきた多くの問題を解決する鍵となると考えられる。しかし、大きな問題は実施に際しての動機付けと、科学を支えるために必要な研究資源の集め方の問題である。これを解決するために、バイオバンクは科学委員会を持ち、その小委員会が多くの問題について検討を重ねていた。例えば、参加者の募集に関して、質問紙の項目の検討、集めた情報の利用に関して、集めた情報のセキュリティーに関してというように検討をして報告書を公開した。

しかし、1999年から検討をはじめ、2004年の段階でのパイロット研究がスタートしないことに対して、まず2003年の英国議会下院の委員

会が医学研究評議会の事業評価文書の中で批判を行った。これを受けて、また、UKバイオバンク内でも議論されたようである。そして、2003年に就任したジョン・ニュートンCEOが辞任し、2005年に新しくロリー・コリンズCEOが就任した。そのあたりで、本事業は方向転換を行ったようである。ロリー・コリンズ氏は心臓血管系の疫学研究者としてカリスマ的力を持ち、研究の実施に強い意欲をもっており、この事業の成功にとってなくてはならない存在であるといえる。と同時に、この新体制は、UKバイオバンクが初期に構想した人研究資源基盤整備構想とは異なる性質のものになったようである。

聞き取り調査したUKバイオバンクの初期計画を指導した医学研究評議会のフランシス・ロール旧研究計画官は、「この変化（新CEOの元での体制）は初期のバイオバンク構想と異なったものに、現在のUKバイオバンクが向かっているということを憂慮させるものだ」と述べていたのは、印象的であった。

D. 結論

現在の医学・生物学の研究体制を考えると以下の基礎的条件が問題を複雑にしている。

- ① 一動物種としてのヒトを研究するための技術と知識が整備された。ヒトゲノムプロジェクトの進展の中で進んだ変化は大きい。
- ② 医療と健康産業を市場として、ヒトの病気を研究することに対する企業のインセンティブが生まれている。
- ③ 医学・生物学研究の成果は、企業活動があってはじめて多くの人たちに恩恵をもたらす。
- ④ ヒトを研究する際に、これまで患者を研究対象としてきた医師に限らず多くの非医師である研究者の参入が重要になった。
- ⑤ 医療の分野、医師の領域で行われる医学研究と、純粋科学の研究者が考える実験的研究と、企業が計画する応用研究や治療の間に、同じ研究といわれるものでも

大きな開きがある。

これらの問題を反映して、人研究資源は価値を増している。また、患者などに直接接しない研究者の医学・生物学研究における貢献も大きくなっている。このような状況は、はじめに医師が中心になって考えた研究計画で収集された人研究資源について、新たな研究利用方法やそれに多様な研究者が参入するという予測できない状況を生んでいる。

そこで、2つの方向性が必要になる。

1. 初期の研究で収集された人研究資源の活用を促進する施策。

これを可能にする枠組みとして、日本学術会議の提案書案に見られる。すなわち、公的研究費で研究用に収集された人研究資源に公的品格を持たせて、公的バンクの管理或いはそれに相当する公開の体制を作ることである。ところが、ここでは、バイドール法を精神を引きついた研究成果物の研究者及び研究機関の権利の問題があるといわれている。日本では2004年の国立大学の独立行政法人化にともなり、バイドール法的な方向性がさらに強化されたように思われる。

実際に、研究助成機関である各省においても、研究に際して収集された人研究資源の「公的性質」を主張することは、研究者、研究機関の動機付けを「そぐ」という考え方もあり、微妙な問題でもある。

そこで、施策としてはUKバイオバンクを論じたところで示したような公的研究資源基盤という構想がありうる。しかし、そこではデッドストックを抱え込む覚悟、それを支える資金基盤、そこから何が出てくるかわからないという状況の中での助成金の支出、収集主体の動機付けなど多くの問題を含むということを、人研究資源の収集に関して伝統のある英国においてさえ難しいということは、私たちが日本で考える際の教訓にする必要がある。

活性化案として、これまで収集された人研究資源についてカタログリストを作り、その利用

状況を把握することは、人研究資源政策を検討すると同時に、研究資源の利用を活性化することを可能にすると期待される。

2. 人研究資源の二次利用第三者提供を可能にする枠組み。

本報告書で論じたように、研究資源は科学研究を支えるためにも、研究が公正に行われ、研究の検証による健全な発展が起こるために、人研究資源の二次利用、第三者提供は欠くことができない。

それを可能にする枠組みについて日本国内の具体的事例に沿って検討すると同時に、本報告書の中では詳しく論じなかった、原則的な理論的な溝を埋め、二次利用や第三者提供を可能にする制度の提案をすることが重要となる。本報告書で論じた日本学術会議の提案は、公的バンクへの寄託・提供のためのインフォームド・コンセントを可能にすることによって、この二次利用、第三者提供を可能にするものである。しかし、公的バンクの処理能力や、専門的な小規模の私的バンクとの共存を考えると、以下の2つの点について、より詳しい検討を加えて、社会と研究者が納得のいく形での人研究資源の利用体制を考えることが重要となる。

- ① 一般的な研究計画で用いる包括同意についての理論的背景の整理。
- ② 包括同意を可能にする、収集・研究実施主体の要件を提案。例えば説明文書やインフォームド・コンセントの書式。

これらの問題について、具体的に検討し、一定の理解を得ることが必要である。一定の理解を得るのは、研究者も、研究倫理指針の策定母体も、また、市民も共にそれぞれの役割の応じた理解が必要と考えるべきである。研究者にとって都合のよい包括同意の話であるだけに、研究者側だけが主張をしても、市民の側の理解が得られなければ、うまくいく可能性がないことは、英国における状況の分析から理解いただけることと考える。

今後の人研究資源バンクの発展にとって、これら2つの問題の解決策として、来年度からメディカルバイオリソースプロジェクトを構想している。

E. 研究発表

1. 論文発表

Masui, T. "Trust and Creation of Biobanks: biobanking in Japan and the UK." M. Sleeboom-Falker, ed. *Biobanking*. 2007. in press.

増井徹. 包括同意、何が問題か：医学・生物学研究をめぐる内外の状況から. *メディカルバイオエシックス*2007 ; 34 : 74-81.

Masui, T., Liu SY., Tamaoki, E., Tsutani, K. *Ethics in pharmacogenetics: Harms caused by genetic exceptionalism. Pharmacogenetics* 2007, in revision.

増井徹 ほか. 医療・医薬品バイオ技術に関する国民理解促進施策研究会提言；医療・医薬品に関わるバイオ技術の円滑な産業化を目指す情報発信について、関西経済連合会、産業・科学技術委員会、2006 : 1-20.

2. 学会発表等

増井徹 「創薬と研究倫理を支える：市民参加の基礎」日本製薬工業協会、第5回企業の研究倫理審査連絡会、2006年4月7日

Nukaga Y. and Masui, T. "Pharmacogenetics Challenge and Future of Individual Medicine: Genetic Exceptionalism." *Drug Information Association, Second Multitruck Workshop in Japan*. 2006, April 13.

Masui, T. "Public Acceptance of Innovative R&D is Not Enough in Japan: Suggested Approaches for New Regulatory Guidelines to Support Biomedical Research" *International Business Conferance: Advances in Drug Discovery and Development, Japan*. 2006, April 24.

増井徹. 「臨床研究を支えるために」第二部：がんTRが国民理解・協力を得る為の諸課題. 第5回がんトランスレーショナルリサーチワークシ

ョップ、がん治療関連5学会、文部科学研究費補助金特定領域研究「がん研究の総合的推進に関する研究班」共催 2006年6月1日

増井徹. 「人体由来組織・細胞及び情報の利用についての倫理とルール」第一回生命倫理講習会、京都大学再生医学研究所「21世紀COEプログラム「融合的移植再生治療を目指す国際拠点形成」共催、2006年6月13日

増井徹. 「人のことはヒトで、を支える研究基盤ーゲノム情報が支える医学・生物学研究」科学技術応用倫理研究所 平成18年度第2回応用倫理研究所セミナー金沢工業大学、2006年6月22日

増井徹. 「医療・医薬品バイオ技術の国民理解」医療/医薬品バイオ技術に関するPA向上施策. *BioJapan2006 in Osaka*. 2006年9月15日

増井徹. 「検体の研究利用における同意の問題」生命倫理コロキウム「科学という営みが要請する人資料の研究利用に関わる「同意」」日本医学哲学・倫理学会 国内学術交流委員会主催、2006年10月27日

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

培養細胞に含まれるヒトゲノムを攪乱する混入ウイルスの検出系の確立に関する研究

分担研究者 小原 有弘（独）医薬基盤研究所・生物資源研究部 研究員

協力研究員 塩田 節子（独）医薬基盤研究所・生物資源研究部 技術補助員

研究要旨

我々厚生労働省の細胞バンクである JCRB 細胞バンクでは 1000 株にもおよぶ細胞資源を保有しており、年間 3200 アンプルを提供している。近年、細胞を扱う研究者の安全を確保する目的と将来ヒトへの応用も視野に入れた研究の目的のため、細胞分譲に際して細胞のウイルス汚染状況に関する問い合わせが多くなっていた。現在、世界的に見ても細胞資源を提供する細胞バンクにおいてウイルス検査体制を確立しているバンクは無く、ほんの一部の細胞においてのみ情報が提供されているのが現状である。本研究では細胞資源のウイルス検査法を確立し、細胞資源の登録情報として研究者へ提供することにより研究者の安全を確保するとともに、細胞資源のウイルス汚染状況の確認を行った。その結果、安定した結果を得られる高感度なウイルス検査系が確立でき、細胞資源のウイルス汚染の現状を把握することができた。また、細胞の動物種推定に用いるマルチプレックス PCR 検査法の確立、核型解析による細胞キャラクタライズ研究も実施、細胞付加情報とした。今後、研究者への情報提供を行うとともに、更なる検査項目の追加を行い、世界最高水準の細胞資源を保有する細胞バンクを目指す。

A. 研究目的

<細胞のウイルス検査法の開発>

細胞バンクでは、動物種、健康状態の異なる個体由来の、種々の臓器から採取された正常組織や腫瘍組織から樹立され、寄託された細胞株を国内外の企業、大学等の研究機関に提供している。細胞自体には微生物汚染に対する防御能力は無く、その品質管理は重要である。とりわけ、細菌、真菌による汚染と異なり、培地の濁り等で判定できないマイコプラズマや

ウイルスによる汚染検査は重要である。

我々はすでにマイコプラズマ汚染検査は確立し委託業務を行っているが、細胞株のウイルス検査は我々のバンクを含め公的バンクではまだ行われておらず、すでに多方面で使われている細胞株でも、ウイルス汚染の有無に関しては何の情報も無いのが現状である。

しかし、近年の再生医療の技術的な発展に伴い、細胞を使った薬品の開発、治療法の開発研究の進展に伴い、ウイルス検

査の必要性は高まっている。汚染された細胞を通しての持続感染は、ウイルスに本来の宿主以外の、自然環境では起こりえない環境を与え、ウイルスの変異を促進し、人類に多大な不利益をもたらしかねない。このような事態をさけるためにも、ウイルス検査の確立と分譲用培養細胞の全細胞株の検査実施は重要な課題であり、多数の細胞株を安全かつ効率よく、安価に検査できる方法の確立が急務であった。

東京医科歯科大 清水らは実際に細胞治療の現場で、治療用細胞の品質検査として、マルチプレックス PCR を用いたウイルス検査法を確立した。我々は、同研究室に検査用プレートの作成を委託した。ではじめとして、検査対象をヒト由来細胞に絞り、ヒト細胞で持続感染を起こす、または、ゲノムに潜むウイルス 13 種類 (CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, BKV, JCV, ADV, HBV, ParvoB19, HTLV-1, HTLV-2, HIV1, HIV2) を同一プレート上でリアルタイム PCR によって検査できる方法を確認し、今年度は検査法確立のため 50 細胞株の検査を行った。

1. ヒトサイトメガロウイルス(CMV)
2. エプスタイン・バーウイルス(EBV)
3. ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)
4. ヒトヘルペスウイルス7型(HHV-7)
5. BKウイルス(BKV)
6. JCウイルス(JCV)
7. アデノウイルス(ADV)
8. B型肝炎ウイルス(HBV)

9. ヒトパルボウイルス19型(parvoB19)
10. ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)
11. ヒトT細胞白血病ウイルス2型(HTLV-2)
12. ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)
13. ヒト免疫不全ウイルス2型(HIV-2)

<ネステッド PCR を用いた培養細胞の由来動物種検査法>

細胞培養において他種の細胞によるクロスコンタミネーション (混入や置き換わり) は重大な問題である。このため、細胞バンクでは細胞の品質管理の一環として、由来種に関する検査が必要である。現在当細胞バンクでは、アイソザイム分析法を用いて細胞の由来種の同定を行っている。しかしこの方法には、酵素を扱うので実験や判定が難しい、多量のサンプルを必要とするなどの問題がある。そこで近年考案された PCR による動物種決定法を用いて、よく培養に使用されているヒト、マウス、ラット、チャイニーズハムスター、シリアンハムスター、アフリカミドリザル、カニクイザル、モルモット、ウサギ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、ニワトリの 14 の動物種において、判定が容易で且つ検出感度の高い方法を検討することを目的とした。今回検討したのはヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、アフリカミドリザル、チャイニーズハムスター、シリアンハムスターの 8 種である。

<核型解析による細胞キャラクタライズ>

核型分析は細胞のキャラクターを捉える非常に有用な方法であり、核型分析情報を付加することにより、細胞の研究利用に際する有益情報となる。また、JCRB細胞バンクで保存している細胞の標準化にもつながる。そこでヒト由来間葉系幹細胞4種及び、ヒト由来血球・リンパ系細胞を用いて経時変化解析を行い、染色体安定性の基礎知見を得るとともに、当細胞バンクが保有する細胞の染色体情報のデータベース化を利用数の多い細胞より開始し、研究者への情報提供を行うことを目的とした。

B. 研究方法

<細胞のウイルス検査法の開発>

細胞株からのゲノムDNAの抽出

培養細胞から Amersham 社製 GenomicPrep もしくは、QIAGEN 社製 AllPrep を用いてゲノムDNAを抽出した。

検査プレートの作成

東京医科歯科大学 清水らの方法で13種類のウイルス検出用プライマーを付着乾燥させた検査用プレートを宅配便にて受け取り、検査に使用した。

ウイルスゲノムの増幅

10xbuffer、dNTP、ROX、25mMg、taq、H₂O からなる Master Mix に細胞のゲノムDNAを0.5 ng/well となるように加え、Prism7300 (アプライドバイオシステムズ ジャパン) で 95°C10 分処理後、95°C15 秒、60°C 60 秒の反応を50 サイクル行った。Negative control として H₂O を

Positive control として、スタンダードを50 copy/well 加えた。

<ネステッド PCR を用いた培養細胞の由来動物種検査法>

培養細胞から抽出した DNA を用いてネステッド PCR を行った。プライマーはミトコンドリア DNA のチトクロム b より D-ループを経由して 16S リボゾーム RNA 遺伝子までの領域を対象として、1st プライマーは相同性の高い配列をもとに、2nd プライマーは種特異的な配列をもとにデザインされたものである。得られた増幅産物を電気泳動にて確認した。

1st PCR

1st プライマーを用いて PCR を行った。

(DNA polymerase ; Ex Taq [TaKaRa]、サーマルサイクラー; [Applied Biosystems] 使用)

反応液組成

Template DNA	100ng
TaKaRa Ex Taq (5Units/ μ l)	0.25 μ l
10X Ex Taq buffer	5 μ l
dNTP Mixture (2.5mM each)	4 μ l
Universal F	200nM
Universal R	200nM
DW	up to 50 μ l

反応条件

94°C 5min	} 30cycles
59°C 5min	
72°C 2min 30sec	
94°C 45sec	
59°C 45sec	

72°C 10min

1st プライマー

universal F 5' -THGTHSAATGAATCTGAGGVGGVT-3'

universal R 5' -THGTHSAATGAATCTGAGGVGGVT-3'

2nd PCR

1st PCR 産物を template として 2nd プライマーを用いて PCR を行った。

2nd プライマーは、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、ウシ、ブタの 7 種を検出する Mix1、アフリカミドリザル、カニクイザル、チャイニーズハムスター、シリアンハムスター、モルモット、イヌ、ニワトリの 7 種を検出する Mix2 をそれぞれ用いた。

(DNA polymerase ; Ex Taq [TaKaRa]、サーマルサイクラー ; [Applied Biosystems] 使用)

反応組成液

1st PCR 産物	2 μ l
TaKaRa Ex Taq (5Units/ μ l)	0.25 μ l
10X Ex Taq baffle	5 μ l
dNTP Mixture (2.5mM each)	4 μ l
2nd プライマー-Mix1 or Mix2	200nM
DW	up to 50 μ l

反応条件

94°C 5min

60°C 5min

72°C 1min 30sec

94°C 45sec

60°C 30sec

72°C 10min

} 30cycles

2nd プライマー

表 1 参照

電気泳動

2% アガロースゲル (SeaChem 社、GTG アガロース) を支持体として、電気泳動装置 (i-Mupid) により各 2nd PCR 産物 (5 μ l) を電気泳動し、エチジウムブロマイド (0.1 μ g/ml) でゲルを染色後、UV 照射下でバンドを確認した。

<核型解析による細胞キャラクタライズ>

細胞は染色体標本を作製後、DAPI 染色法 (プロトコール 1) による染色体の染色を行い、染色体数のカウントを行った。染色体標本作製手順はプロトコール 2 に示した。また JCRB1130; PL507 と NCTR0005;hMSC (H-494)、NCTR0005;hMSC (H-495) に関しては mFISH (プロトコール 3) による解析を行った。

また当細胞バンクに保存してある細胞の染色体情報の収集には、染色体標本作製後ギムザ染色法 (プロトコール 4) による染色体の染色を行い、細胞数のカウントを行なった。染色体標本作製手順はプロトコール 5 に示した。また JCRB1165;HSP-239 と JCRB1177;HSP-250 に関しては、G 染色法 (プロトコール 6) による解析を行った。

C. 研究結果

<細胞のウイルス検査法の開発>

今回用いた検査用プレートの感度検定を行ったところ、Negative control はすべての well で negative であり、スタンダードを加えた well はすべて positive