

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）研究成果発表抄録
研究課題：培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究
研究番号：H10 - ゲノム 039
主任研究者：所属施設 国立医薬品食品衛生研究所、変異遺伝部、第三室（細胞バンク）
氏名 水沢 博

1. 研究目的

本研究班は、わが国におけるヒトを対象とした生命科学研究を推進することを目的に設立された厚生省細胞バンク（JCRB 細胞バンク）事業を推進し、有意義な研究基盤となるよう整備し、わが国の生命科学研究の推進を支援することを目的に関連の研究を実施するものである。

2. 概要

細胞バンク事業基盤の整備に必須な研究課題として次の3項目を設定している。

細胞の培養・保存に関する基礎技術と細胞の性状確認と品質を高度化に関する研究
細胞及び培養に関する情報の整理・保存と情報の提供システムの構築に関する研究
生命科学研究に必須なヒトプライマリ細胞の樹立と研究資源化の促進に関する研究

この3つの研究課題を研究主任者が所属する国立医薬品食品衛生研究所、細胞バンク（JCRB細胞バンク）と分担研究者が分担して実施している。

3. 研究の分担体制と成果

細胞の培養・保存に関する基礎技術と細胞の性状確認と品質を高度化に関する研究

- A. 細胞バンクにおける品質管理システムの確立に関する研究として、汚染検査手法の開発研究は継続的に実施する必要があると位置付けている。この研究には、分担研究者の原沢（マイコプラズマ検出法開発、ウイルス検出法開発：東大実験動物）と阿部（BVDV非汚染ウシ培養細胞系の確立：三菱化学・中標津血清）が主にあたり、その結果を利用して細胞バンクにおける汚染検査の実施体制を確立してきた。特に、マイコプラズマ検査については、RT-PCR法を導入して精度を高めることに成功し、BVDV汚染が予想以上に広範に広がっていること、ならびに市販血清にその原因があることをつきとめた。現在は、BVDV汚染を除くためにBVDVフリー血清の安定的導入をはかり、汚染状況の詳細な検討を実施するためにBVDVに汚染していないウシ細胞株の樹立を試みている。
- B. 細胞同定法の開発研究はクロスコンタミネーションを排除するために必須な研究課題であり、主任研究者が主にこの研究を実施してきた。

1985年以降、DNAフィンガープリント法が導入されて道が開かれた。この方法の弱点を克服するために我々は独自にサザンブロッティング法を用いたDNAプロファイリング法を開発し、高い識別能力があり細胞の管理に有効であることを確認した（1992年ごろ）。しかし、この方法はルーチン化する部分に問題が多かった（RIの使用、複雑なプロトコル）。そこで、新たな手法としてSTR-PCR法の導入を新たに試みることとした（一部を <http://cellbank.nihs.go.jp/>で CellID システムとして暫定公開中）。暫定的ながら、この研究を通じて、ECV304がT24/EJ1と同一細胞、PSV811がWI38と同一細胞の可能性が高いという結果を新たに得た、さらに2-3新たな疑いを見出している。

また、将来、遺伝子産物であるたんぱく質レベルでの多様性も細胞の同定に有効な手段となる可能性があると考え、分担研究者の木村（たんぱく質多型データベースの開発：老人研）と共に検討を実施している。

細胞の同定については、過去において核型分析やアイソザイム分析などが確立され利用されてきたが、多数のヒト細胞が利用されるようになった現在、ヒト細胞相互のクロスカルチャーコンタミを防止する同定手法の確立は必須である。主な視点としては、遺伝子レベルでの同定と、遺伝子発現レベルでの同定が必要では無いかと考えている。

情報管理と公開

品質管理結果の記録の整理と情報の提供は細胞バンクの重要な課題と位置付け、関連する研究開発を主任研究者が実施している。これには2つの課題を含む。第一は日常的なバンク運営における情報の整理をするためのデータベースシステムの開発と構築であり、日進月歩に進歩

するコンピュータシステムを有効活用するために継続的改良が必須である。

第2は、整理したデータベースの内容を研究者に公開するための手法を開発することであるが、インターネットと World Wide Web (WWW) の普及により、その有効活用を図ることとした。そのため、研究の重点をデータベースに蓄積したデータを効率良く WWW 情報に変換する手法の開発に置いてきた。その結果、データの変換システムならびに、変換データの WWW 上での検索システムを確立した。また、細胞の同定を WWW 上で実施するための CellID システムの開発も進行している。現在、この結果を利用して <http://cellbank.nihs.go.jp/> に細胞検索システムや CellID システムを公開し、迅速なアップデート情報を提供している。

今後、コンピュータやネットワークシステムの進歩に沿って継続した改良が必要である。

なお、当細胞バンクサーバへのアクセス件数は、毎日 100 から 150 件程度である。これは現在のシステムに移行する前のおよそ 5 倍から 10 倍に増加した。

ヒトプライマリ細胞の研究資源化（樹立を含む）と分譲

新規ヒト細胞の研究資源化は重要な研究課題として位置付け、主に分担研究者によって実施されている。現在進めているプライマリ細胞の研究資源化は、上皮系細胞（分担研究者、安本：神奈川がんセンター研究所、増井：国立医薬品食品衛生研究所）線維芽細胞（分担研究者、木村：老人研究所、加治：静岡大学、佐々木：京都大学）神経芽細胞（分担研究者、竹内：発酵研究所）で実施している。これらの研究においては株化まで目指した研究ならびに初代培養に特化した細胞系の確立を含んでいる。さらに、過去において確立した細胞のうち、HSRRB からの分譲が困難な細胞については、分譲も一部負担している（佐々木、木村）。特に、ヒト遺伝性疾患に由来するプライマリ細胞は倫理課題など未解決も問題もあったため、採取あるいは樹立した研究機関から直接分譲することとしてきた。現在、厚生省で研究倫理に関する検討が進んでいるので、その結果によっては HSRRB から分譲することが可能になると考えている。

（倫理面への配慮）

我々は、2 年ほど前から倫理問題に関する試料の収集を進め、倫理面からの検討を進めてきた。収集した資料については、ホームページを通じて公開すると共に、国立医薬品食品衛生研究所に倫理審査委員会を設置することを当局に働きかけてきた。その結果、平成 11 年度より正式に設置されることとなった。その中で細胞バンクが新規に収集する細胞培養のためのヒト組織については、組織の提供機関となる病院内の倫理審査委員会の承認を前提として当該機関における倫理審査委員会の承認を得て受け入れるシステムを確立しつつある。ヒト組織については、培養後バンクに登録することを含めて患者に説明して同意を得た上で個人識別情報を消した Coded Unlinked Sample（匿名化、非結合サンプル）として受け入れるという基準を作りつつある。

4. 評価

1) 達成度について

本研究班は細胞バンクの基盤を整備を目的とした研究を実施してきた。そのため、課題名は年毎に大きく変わることは無いが内容は着実に進歩しており、日常的な品質管理業務の改善に大きく貢献してきた。細胞バンク事業開始当初（1985 年）は古典的な品質管理手法しかなかったものを、PCR 法を軸にした遺伝子をターゲットとした検出法に切り替える努力が実りつつある。こうした新しい手法の導入には米国の ATCC とほぼ対等に実施する体制を整えてきた。また、情報の提供システムについても、他に先駆けて WWW の積極的な利用を実施し、バンク専用サーバの構築を確立した。これにおいて、ATCC ではまだ実施していない写真データの公開なども既に実施するなど高い評価を受けている部分もある。さらに品質管理については国内の他細胞バンクに先駆けて新しい手法を導入してきた。本研究班の果たしている役割は大変大きい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

細胞バンクが徹底した品質管理を実施することは、個々の研究者に安心して利用できる研究材料を提供する基盤が整備されることを意味し、学術的にも重要であることは間違いない。国際的にも、汚染の排除とクロスコンタミの排除は細胞バンクに課せられた責任であるという認

識は定着し、本研究はそれに沿った内容で進めている。

さらに、細胞バンクがこのような研究にまじめに取り組むことによって、多くの研究者が個々のテーマに集中できる環境が整備され、研究の進展速度を押し上げる効果も期待できる。

3) 今後の展望について

ヒトゲノムプロジェクトの進行によりヒトの遺伝子塩基配列が全て明らかになる日も近く、ヒト遺伝子の多型性に着目したオーダーメイド医療などの開発研究が急務であるとされている。

多型性研究においては、大量のヒト由来の細胞試料を利用する必要があるため、その提供ならびに保存において細胞バンクの役割が期待されている。

臓器移植の発展にともない、人工臓器の開発研究、再生医療の推進も期待されている。ここでも細胞研究資源の活用は不可欠で、より多くの細胞、特に再生能を獲得した細胞の保存と供給などは非常に重要な分野となることが予測される。そうした中で細胞バンクがどの程度機能を果たせるかは不確定な要素が多いが重要な課題となることが予想される。

医療の将来を考えると、民族間の生物学的差異が問題となると予測され、安易に海外のバンクに依存する体質を改めることが求められるようになる。日本人の細胞を使わなければならないことを意味しており、わが国の国民の協力を得て多くの研究資源を収集して研究レベルで利用できるよう体制を整える必要があるものと思われる。細胞バンク事業はこうした諸点を念頭に置いて基盤整備を推進する必要がある。

5. 結論

本研究班は、研究基盤としての細胞バンクの維持、管理、運営に大きく貢献する研究を実施してきた。かかる研究は継続性を持って長い視点で推進することが重要であり、今後も継続して研究を進めることはわが国における研究基盤の構築と維持に必須である。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	13 件
原著論文による発表	4 件
それ以外の発表	1 件

そのうち主なもの

論文発表

1. 田辺秀之、祖父尼俊雄、水沢 博：Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法による細胞ゲノム解析 (Comparative genomic hybridization for genomic analyses of cells), 組織培養, 22, 194-198 (1996)
2. 増井 徹：上皮細胞特有の増殖と増殖停止の切替え機構 (Epithelial specific Mechanisms for switching growth and growth arrest), 蛋白質核酸酵素, 41(12) 1913-1919 (1996).
4. 水沢 博 JCRB/HSRRB 細胞バンク培養細胞研究資源データベース, 蛋白質核酸酵素 43(13), 2015-2019 (1998).
5. 水沢博、田辺秀之、増井徹、高田容子、樽松美治、峰岸大輔、吉田東歩、佐藤元信、竹内昌男、阿部武丸、原沢亮, 培養細胞系に混入するウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) の RT-PCR 法による検出, Tissue Culture Research Communication 18:131-138 (1999)

学会発表

1. 増井 徹、高田容子、岩下新太郎、田辺秀之、祖父尼俊雄、水沢 博, 増殖停止関連遺伝子 eti-1 のアポトーシス誘導活性, 第 57 回日本癌学会総会, 横浜国際平和会議場 (パシフィコ横浜), 1998.9.30-1998.10.2
2. 田辺秀之、中川ゆずき、峰岸大輔、橋本雄之、田中憲穂、押村光雄、祖父尼俊雄、水沢博, 染色体ペインティング法および Reverse FISH 法によるヒト単一染色体保持雑種細胞株パネルの解析, 日本人類遺伝学会第 43 回大会, 10 月 14 日 - 16 日, 山梨県甲府市・山梨県立県民文化ホール.

(分担研究者)

3. 血管内皮細胞の老化に及ぼす酸素分圧の影響、伊倉宏一、太田敏郎、加治和彦 , 第 7 1 回
日本生化学会大会 (名古屋) 1998 年 10 月

2) 海外

口頭発表	3 件
原著論文による発表	6 件
それ以外の発表	1 件

そのうち主なもの

論文発表

1. Honma, M., Mizusawa, H., Hayashi, M., Kaoru, S., Ohno, Y., and Sofuni, T. Heterogeneity of the Y chromosome following long-term culture of the human lung cancer cell line A549. *In Vitro Cell Dev. Biol. Animal* 32:262-264, 1996.

(分担研究者)

2. Tachibana, A., Kato, T., Ejima, Y., Yamada, T., Shimizu, T., Yang, L., Tsunematsu, Y. and Sasaki, M. S.: The FANCA gene in Japanese Fanconi anemia: reports of eight novel mutations and analysis of sequence variability. *Human Mutation*, 13:237-244, 1999.
3. Toda, T., Satoh, M., Sugimoto, M., Goto, M., Furuichi, Y. and Kimura, N. : A comparative analysis of the proteins between the fibroblasts from Werner's syndrome patients and age-matched normal individuals using two-dimensional gel electrophoresis. *Mech. Ageing Dev.*, 100(2), 133-143, 1998
4. Kikuchi, K. and Yasumoto, S. Retention of cell adhesion and growth capability in human cervical cancer cells deprived of cell anchorage. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 867-873, 1999
5. Y. Nakagaito, M. Satoh, H. Kuno, T. Iwama, M. Takeuchi, A. Hakura, & T. Yoshida, Establishment of an epidermal growth factor-dependent, multipotent neural precursor cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 34:585-592(1998)
6. Harasawa, R., and Giangaspero, M. (1999) Genetic variations in the 5' end and NS5B regions of classical swine fever virus genome among Japanese isolates. *Microbiol. Immunol.* 43(4): 373-379.
7. Inhibition of phospholipase promote apoptosis of human endothelial cells., Miao, J., Kaji, K., Araki, S., *J. Biochem.*, 121: 612-618 (1997).

学会発表

1. Tanabe, H., Ishida, T.*, Ueda, S.*, Sofuni, T. and Mizusawa, H.: Evolutionary consideration for the origin of human chromosome 9 by FISH analyses of comparative gene mapping of IGHEP2 in higher primates, *Human Genome Mapping Workshop 96, Heidelberg, Germany* (1996.3)
2. Mizusawa, H., Slow but steady movement of cell banking in Japan., In the session of "Management and Function of National Cell Line Repositories" Congress on in vitro biology, Las Vegas, (1998.5.30-6.3).

(分担研究者)

3. Sasaki, M. S.: The role of Rad51/Rad54/Ku in radiation-induced chromosome aberrations in vertebrate cells. *The 11th Int. Cong. Rad. Res.*, July 18-23, 1999, Dublin.
4. Toda, T., Sugimoto, M., Omori, A., Matsuzaki, T., Furuichi, Y., and Kimura, N.: Proteomic analysis of immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *IPPC '99, International Proteome & Proteomics Conference 1st Pacific Rim 2-DE Meeting, 1999*
5. Harasawa, R., and Giangaspero, M.: Classical swine fever virus genovars among Japanese isolates. *4th Pestivirus Meeting by the European Society for Veterinary Virology, (Giessen, Germany) March, 1999.*

7 . 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

増井 : E t i 1 遺伝子に関する国際特許申請中。

安本 : 予定 (準備中) : 二件