

C. 結果

表3に示したクロスコンタミネーションを起こした細胞の一覧は、表2のSTRプロファイルデータベースによって明らかにしたものでそのプログラムは既にWEB上に公開している。調査はデータベースから一つの細胞を特定して他の全ての細胞と比較するという手法で実施した。これを全ての細胞を対象に繰返すことによってクロスコンタミネーションを起こした細胞を特定した(表3)。

この方法は細胞バンクが収集した細胞のクロスコンタミネーションを特定するには有効だが、利用者の手元にあるSTRプロファイルデータを細胞バンクのデータと比較することは出来ない。そこで今年度は、この点を改善して利用者が自らのデータを細胞バンクのデータと比較できるよう新しいプログラムを開発することにした。プログラム

の運用は、これまでの細胞バンクの管理システムを利用することを前提に分担研究者である水澤が全体のデザインを行い、遺伝子バンクの技術職員である平田に実際のプログラムの作成についての協力を得て行った。プログラムはWEB上で運用できるようにCGIプログラムとして運用するようPerl言語を利用して作成した。データは外部からの比較に提供することを目的としているので倫理問題が発生しないよう株化された細胞のみに限定するよう注意した。プログラムは以下に示した。このプログラムはJCRB細胞バンクのホームページから実行できるようにした。URLは

<http://cellbank.nibio.go.jp/str2/str006.html> である。

表4 STRプロファイルデータベースによる細胞の比較を実施するためのPerlプログラム
(プログラムファイル名はstr006.cgi)

```
#!/usr/bin/perl
# Analysis of cell identity by user profile data against the STR
# profile database created by the JCRB Cell Bank
# Program designed by Mizusawa,H.,(Cell Bank) and coded by Hirata,M.,(Gene Bank)

use CGI;
#####
@lineS=();
@lineN=();
@lineM=();
@lineA=();
@histData=();
$tblVersion=;
@keyList=();
@datList=();
```

```

$myName=str007.cgi;
#$gSpot=/******/green.gif;
#$rSpot=/******/red.gif;

```

```

#####
$htmlCGI=new CGI;
print $htmlCGI->header;
&histD(-1.0);
&setQueryList();
&setSTRtable(str_profile_data.txt);
&sortLine();
&htmlPage();

```

```

#####
sub htmlPage()
{
my      $s=join("",<DATA>);
print $htmlCGI->start_html(-title => 'cgi proc',-head=> $s);
print <BR><TABLE BORDER='2' CELLPADDING='2' width='90%' align='center'>;
print <tr><td align='center' bgcolor='#ccffcc'>;
print  <b><font color='maroon' size='+3'>STR matching analysis by entering your
data.</font><br>;
print <div align='right'><font size='+1'><b>- JCRB Profile Database -</b></font></div></b>;
print </td></tr></table><BR>;
&testPRN($htmlCGI->param('EV'));
&reRecalc($htmlCGI->param('EV'));
&testPRNhist($htmlCGI->param('EV'));
print $htmlCGI->end_html;
}

```

```

#####
sub setQueryList()
{
my      @li,$ss,$cc;
        @li=$htmlCGI->param;
        for(my $i=0;$i<@li;$i++){
            $ss=$li[$i];
            if(substr($ss,0,1) eq @){
                push(@keyList,substr($ss,1));
                push(@datList,$htmlCGI->param($li[$i]));
            }
        }
}

```

```

#####
sub searchLine()
{
my      $qu=shift;
my      $im=@keyList;
my      $mm=0,$nn=0,$sj;
        for(my $i=0;$keyList[$i];$i++){
            $mm+= &hitPo($datList[$i]);
            $sj= &getData($keyList[$i],$qu);
            $mm+= &hitPo($sj);
            $nn+= &andPo($datList[$i],$sj);
        }
        $nn*=2;
        return  $nn,$mm;
}

```

```

#####
sub setSTRtable()
{
        open(FH,$_[0]);
        $tblVersion=<FH>;
        while(<FH>){
            my      $t;

```

```

        if(/^[0-9]+\#t){
            $t= $';
            $t=~ s/^\d+/\d+/\d+/\d+/\d+/\d+/\d+/\d+//;
            ($nn,$mm)=&searchLine($t);
            if($mm>0){
                push(@lineS,$t);
                push(@lineN, $nn);
                push(@lineM, $mm);
                push(@lineA, ($nn/$mm));
                histD(($nn/$mm));
            }
        }
    }
close(FH);
}
#####
sub histD()
{
    my $sev=shift;
    if($sev lt 0.0){
        for(my $i=0;$i<20;$i++){
            $histData[$i]=0;
        }
    }else{
        my $evN=int(20*($sev+0.005));
        $evN=19 if($evN > 19);
        $histData[$evN]++;
    }
}
#####
sub hitPo()
{
    my @lst=split(/[,#\s]/,$_[0]);
    my $nn=0,$tmp;
    foreach $tmp (@lst){
        $tmp=~ s/^\s//g;
        $nn++ if($tmp gt );
    }
    return $nn;
}
#####
sub andPo()
{
    my @lt1=split(/[,#\s]/,$_[0]);# $obj1;
    my @lt2=split(/[,#\s]/,$_[1]);# $obj2;
    my $nn=0,$st1,$st2;
    for(my $i=0;$i<@lt1;$i++){
        $st1=uc($lt1[$i]);
        $st1=~ s/^\s//g;
        for(my $j=0;$j<@lt2 && ($st1 gt );$j++){
            $st2=uc($lt2[$j]);
            $st2=~ s/^\s//g;
            $nn++ if(($st2 gt ) && ($st1 eq $st2));
        }
    }
    return $nn;
}
#####
sub getData()
{
    my ($nm,$obj)=@_;
    my @li=split(/^\s/, $obj);
    my $leng,$s;
    $nm=<$nm>;

```

```

    $leng=length($nm);
    for(my $i=0;$i<@li;$i++){
        $s=substr($li[$i],0,$leng);
        if($nm eq $s){
            return substr($li[$i],$leng);
        }
    }
    return ;
}
#####
sub sortLine()
{
my    $im=@lineS;
    for(my $j=1;$j<$im;$j++){
        for(my $i=0;$i<$im-$j;$i++){
            if($lineA[$i]< $lineA[$i+1]){
                @lineS[$i, $i+1]=@lineS[$i+1, $i];
                @lineN[$i, $i+1]=@lineN[$i+1, $i];
                @lineM[$i, $i+1]=@lineM[$i+1, $i];
                @lineA[$i, $i+1]=@lineA[$i+1, $i];
            }
        }
    }
}
#####
sub queryPRN()
{
    print <TR BGCOLOR='#ccfff'>;
    print <TH rowspan='3'          bgcolor='#ffccc'>EV</TH>;
    print <TH rowspan='2'>Cell No.</TH><TH rowspan='2'>Cell name</TH>;
    print <TH colspan='9'>Locus names by PowerPlex1.2</th>;
    print <TH rowspan='3'>Figures from ABI PRISM 310</TH></TR>;
    for(my $i=0;$i<@keyList;$i++){
        print <TH>$keyList[$i]</TH>;
    }
    print </TR>¥n;

    print <TR align='middle' bgcolor='#ccffcc'>;
    print <TH colspan='2'><i>Query (Your Cell)</i></TH>;
    for(my $i=0;$i<@keyList;$i++){
        print <TH><i>$datList[$i]</i></TH>;
    }
    print </TR>¥n;
}
#####
sub subjectPRN()
{
my    $i=shift;
my    @li=split(/#/,$lineS[$i]);
my    $nn;
    print <TR align=middle><TD bgcolor=ffdddd>;
    printf(%4.2f(%2.0d/%2.0d),$lineA[$i],$lineN[$i],$lineM[$i]);
    print </TD><TD>$li[0]</TD><TD>$li[1]</TD>;
    for(my $j=0;$j<@keyList;$j++){
        print <TD>;
        my $ss=&getData($keyList[$j],$lineS[$i]);
        &andPoPRN($datList[$j],$ss);
        print </TD>;
    }
    print <TH> ;
    $nn=0;
    for(my $j=2;$j<@li;$j++){
        if($li[$j]=~/\.gif\.jpg/){
            my $sss,$ssw;

```

```

        $ssw=$li[$j];
        $ssw=~ s/[%.jpg|.gif|/g;
        $sss=http://cellbank.nibio.go.jp/pictures/$li[$j];
        print <a href=http://cellbank.nibio.go.jp/pictures/$li[$j];
        print onmousedown=gifOpen(¥$sss¥,¥$ssw¥) ;
        print TARGET=¥$li[$j]¥ >$ssw</a><BR>;
        $nn++;
    }
}
print - if($nn == 0);
print </TH></TR>¥n;
}
#####
sub clearVector()
{
    my $fg=shift;
    for(my $i=0;$i<@$fg;$i++){
        $$fg[$i]='';
    }
}
#####
sub andPoPRN()
{
    my @lt1=split(/[\s]/,$_[0]);
    my @lt2=split(/[\s]/,$_[1]);
    my @fg=@lt2;
    my $st1,$st2,$nn;
    &clearVector(¥@fg);
    for(my $i=0;$i<@lt1;$i++){
        $st1=uc($lt1[$i]);
        $st1=~ s/¥s//g;
        for(my $j=0;($j<@lt2) && ($st1 gt );$j++){
            $st2=uc($lt2[$j]);
            $st2=~ s/¥s//g;
            $fg[$j]='+' if(($st2 gt ) && ($st1 eq $st2));
        }
    }
    &andPoPRNsub(¥@lt2,¥@fg);
}
#####
sub andPoPRNsub()
{
    my ($lt2,$fg)=@_;
    my $nn=0,$st2;
    for(my $j=0;$j<@$lt2;$j++){
        $st2=uc($lt2[$j]);
        $st2=~ s/¥s//g;
        if($st2 gt ){
            print , if($nn>0);
            &andPoBPRN($st2,$fg[$j]);
            $nn++;
        }
    }
}
#####
sub andPoBPRN()
{
    my($st2,$fg)=@_;
    if($fg eq '+'){
        print <B>$st2</B>;
    }else{
        print $st2;
    }
}

```

```

#####
sub testPRN()
{
my      $min=shift;
my      $hSum=0;
print <div align='center'><b>LOOK! graphical analysis shown at the bottom of this
page.</b></div>;
print <TABLE BORDER=1 width='90%' CELLPADDING=3 CELLSPACING=1 align='center'>¥n;
&queryPRN(1);
for(my $i=0;$i<@lineS && $lineA[$i]>=$min;$i++){
    &subjctPRN($i);
    $hSum++;
}
print </TABLE><BR>¥n;
return if($hSum eq 0);
}
#####
sub testPRNhist()
{
my      $min=shift;
my      $hSum=0;
print   <TABLE          BORDER=1          WIDTH='90%'          align='center'><TR><TH
bgcolor='ffcccc'>EV</TH><TH          bgcolor='ccffff'>Cell          No.          Scored</TH><TH
bgcolor='ccffff'>Graph</TH></TR>¥n;
for(my $i=19;$i>=0 ;$i--){
    my $aDa;
    my $histA=$histData[$i]*4;
    $hSum+=$histData[$i];
    $histA=700 if($histA > 700);
    $aDa=$i*0.05;
    if($aDa < $min){
        printf          <TR><TD          bgcolor='ffdddd'          align='center'
WIDTH='70'>%.2f~%.2f</TD>,$aDa,$aDa+0.05 ;
        printf <TD ALIGN='center' WIDTH='70'>%4d</TD><TD>,$histData[$i];
        if($gSpot ne ){
            print <IMG SRC='$gSpot' alt='$histData[$i]' width='$histA'
height='10'>;
        }else{
            print <FONT COLOR='#00FF00'>;
            for(my $j=0;$j<$histData[$i];$j++){
                print |;
            }
            print </FONT>;
        }
    }else{
        printf          <TR><TD          bgcolor='ffdddd'          align='center'
WIDTH='70'><B>%.2f</B>~%.2f</TD>,$aDa,$aDa+0.05 ;
        printf <TD ALIGN='center' WIDTH='70'>%4d</TD><TD>,$histData[$i];
        if($rSpot ne ){
            print <IMG SRC='$rSpot' alt='$histData[$i]' width='$histA'
height='10'>;
        }else{
            print <FONT COLOR='#FF0000'>;
            for(my $j=0;$j<$histData[$i];$j++){
                print |;
            }
            print </FONT>;
        }
    }
}
print </TD></TR>¥n;
}
printf <TR><TD COLSPAN='3' ALIGN='center'>Total No. of cells = %4d (JCRB Cell
Bank)</TD></TR></TABLE><br><hr><br>,$hSum;

```

```

}
#####
sub reRecalc(){
my $min=shift;

print <<EOF_LINE;
<BR><br>
<hr>
<FORM METHOD=POST ACTION=/cgi-bin2/str2/$myName>
<b><INPUT TYPE=submit VALUE=Analyze again> after changing the EV
<SELECT NAME=EV>
EOF_LINE

    for(my $i=1.0;$i>0.0;$i-=0.1){
        print <OPTION VALUE=¥$i¥ ;
        print SELECTED if($min eq $i);
        print >;
        printf %.2f¥n,$i;
    }
    print <OPTION VALUE=0>0.00¥n</SELECT>¥n;
    for(my $i=0;$i<@keyList;$i++){
        my $iKey0='@'.$keyList[$i];
        my $iData=$datList[$i];
        print <INPUT TYPE=¥hidden¥ NAME=¥$iKey0¥ VALUE=¥$iData¥>¥n;
    }
    print </FORM>¥n
}
#####
__DATA__
<STYLE TYEP=text/css>
<!-- B {color:#ff0000} -->
</STYLE>
<SCRIPT LANGUAGE=JavaScript>
<!--
function gifOpen(fPath,fName)
{
    window.open(fPath,fName,
toolbar=no,location=no,directories=no,status=no,menubar=no,scrollbars=no,resizable=yes,width=300,height=250)
}
//-->
</SCRIPT>

```

表4に示した CGI プログラムは、細胞バンクのホームページの中の STR 分析によってヒト細胞の相互比較を行うメニューに新たに『3. Matching analysis between your data and JCRB cells』という項目を設けてそこにリンクさせた(図1)。このメニューの1と2は既に構築したプログラムでいずれも細胞バンクで作成した細胞のプロファイルデ

ータ間で相互比較を行うものであるが、新たに3としてユーザーデータと細胞バンクで作成したデータとを比較することが出来るようにしたものである。この画面(図1)の3を実行すると図2の画面が表示され、利用者は各自が実験を通じて得た STR 分析結果の値を入力する欄が表示される。

図1 STR 分析を実行するメニュー画面 (<http://cellbank.nibio.go.jp/str2/top.html>)

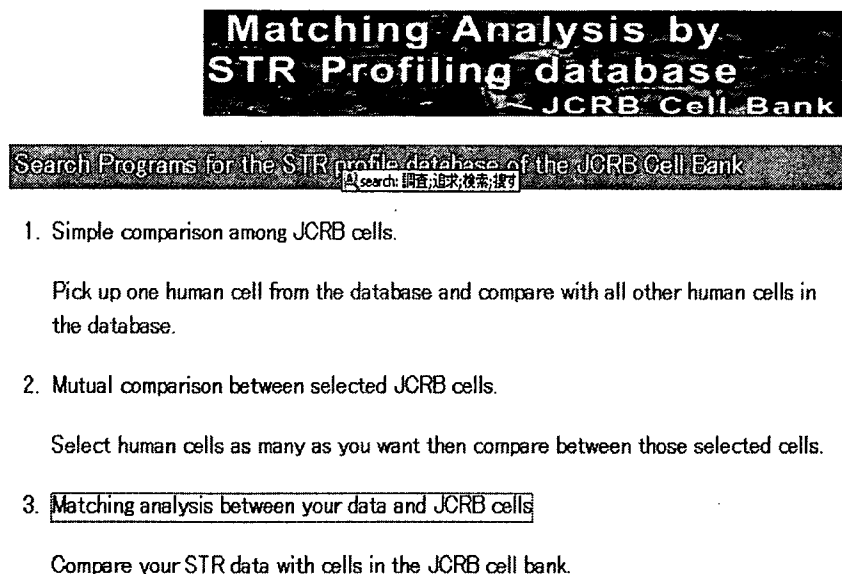


図2の画面で『Enter your STR data』と示された入力ダイアログに各ローカスに対応するデータを自由記述で入力する。入力データである各ローカスの反復回数はカンマで区切っていくつでも入力することができるようにした(例、10,12,13)。染色体の構造を考えれば1個又は2個が適切な数であるが、培養細胞という特殊な条件で生存している細胞であることから、3個あるいは4個というケースが観察される場合もあるので、そうしたケー

スのデータを受入れられるようにした。

データ入力後その上に配置されている「Go STR analysis」というボタン(図2)をクリックすると、入力したデータとデータベースに登録されている全てのデータが比較されてEVが算出されて大きな順に一覧表として表示される(図3)。ユーザーが入力したデータと比較してEVが0.8以上の細胞が見つかった場合は、ユーザの細胞が誤りである可能性が高いことになる。

図2 STR マッチング(<http://cellbank.nibio.go.jp/str2/str006.html>)

STR matching analysis by entering your data.

- JCRB cell bank -

Hirata, M. coded programs.
 Ozawa, Y., and Kohara, A. produced STR data and database.
 Masui, T. reviewed ethical issues.
 Mizusawa, H. organized whole system and designed the STR profile database.

• The EV means an "evaluation value" to show how much two cell lines resemble each other based on the genetic analysis.

| | | | | | | | | | |
|------------------------|---|---------|--------|---------|-------|------|----|------|--------|
| Hit the go button -> | Go STR analysis with EV over 0.60 after entering your data below. | | | | | | | | |
| Locus name: | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S538 | VWA | TH01 | AM | TPOX | CSF1PO |
| Enter your STR data:-> | 11,12 | 12,13,3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 |
| Sample data (HeLa): | 11,12 | 12,13,3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 |

- The human STR profile database includes about 800 cell lines mainly from JCRB and IFO(Inst. Fermentation Osaka).
- A method for the EV calculation.
- STR loci used by the PowerPlex1.2 system. Map on the chromosome.
- Refer the STR profile database of the ATCC : (ATCC top page).

図3 比較計算結果の一覧表 (EV 値の大きなものから順に並べられている)。

| STR matching analysis by entering your data. | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------|-------------|-----------------------------|---------|--------|---------|----------|------|----|------|--------|----------------------------|
| JCRB Profile Database | | | | | | | | | | | | |
| LOOK! graphical analysis shown at the bottom of this page. | | | | | | | | | | | | |
| EV | Cell No. | Cell name | Locus names by PowerPlex1.2 | | | | | | | | | Figures from ABI PRISM 310 |
| | | | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | VWA | TH01 | AM | TPOX | CSF1PO | |
| | Query (Your Cell) | | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | |
| 1.00 (32/32) | CCL-23 | HEp-2 | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | - |
| 1.00 (32/32) | IFO50005 | J-111 | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | c07526 c07527 c07528 |
| 1.00 (32/32) | IFO50016 | Chang Liver | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | c07982 c07983 c07984 |
| 1.00 (32/32) | JCRB0073 | J-111 | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | c02528 c02529 c02530 |
| 1.00 (32/32) | JCRB0649 | HeLa P3 | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | c02729 c02730 |
| 1.00 (32/32) | JCRB9004 | HeLa | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | c02406 c02407 |
| 1.00 (32/32) | JCRB9004 | HeLa | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | c110510 c110511 |
| 1.00 (32/32) | JCRB9027 | KB | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | c02505 c02506 c02507 |
| 1.00 (32/32) | JCRB9086 | HeLa229 | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | c04999 c05000 |
| 1.00 (32/32) | RCB0454 | OST | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | - |
| 0.97 (32/32) | JCRB9066 | Chang Liver | 11,12 | 12,13.3 | 8,12 | 9,10 | 16,17,18 | 7 | X | 8,12 | 9,10 | c05123 c05124 |

図3はユーザーのSTR データを入力した後細胞バンクの細胞と比較した結果である。ユーザーデータは Query の欄に示されており、それと比較した細胞バンクの細胞がその下に表示される。EV のコラムに 1.00 と示されたものは、ユーザ入力したSTRのパターンと完全に一致したことを示し、その細胞から入力したデータは HeLa 細胞であったことがこのリストから読み取れる。しかし、EV の値がどこまで低下した場合に異なる細胞であると判断できるかという点は細胞によって異なることも考えられるので、EV の範囲ごとに細胞数のヒストグラムを作成して、一覧表の下に表示されるよう

にした(図4)。ヒストグラムは 1.0 と 0.05 を中心に二つの山が出来てその間に谷が出来ることから、同一細胞の範囲がどこまでかということ判定しやすくなる。谷より大きい側に出た山が同一細胞の群となり、ここに異なる名称の細胞が含まれる場合はクロスコンタミネーションの結果であると結論することができる。図3で、細胞の名称を確認すると、HeLa 細胞に混ざって J-111 や KB という細胞名が見えるが、これらは 1960 年代に明らかになった HeLa コンタミの細胞の事例である。また、この時の入力データも HeLa であったことがわかる。

図4 EVの範囲に依存したヒストグラム

Analyze again after changing the EV [0.60]

| EV | Cell No. Scored | Graph |
|---|-----------------|-------|
| 0.95-1.00 | 15 | |
| 0.90-0.95 | 14 | |
| 0.85-0.90 | 0 | |
| 0.80-0.85 | 0 | |
| 0.75-0.80 | 0 | |
| 0.70-0.75 | 0 | |
| 0.65-0.70 | 5 | |
| 0.60-0.65 | 1 | |
| 0.55-0.60 | 20 | |
| 0.50-0.55 | 67 | |
| 0.45-0.50 | 113 | |
| 0.40-0.45 | 171 | |
| 0.35-0.40 | 114 | |
| 0.30-0.35 | 161 | |
| 0.25-0.30 | 83 | |
| 0.20-0.25 | 31 | |
| 0.15-0.20 | 34 | |
| 0.10-0.15 | 10 | |
| 0.05-0.10 | 2 | |
| 0.00-0.05 | 0 | |
| Total No. of cells = 841 (JCRB Cell Bank) | | |

以上、今年度は米国の Nardone らの呼びかけに答
 えて、クロスコンタミネーション発生の危険性を
 国内の研究者に訴え、注意を促すための基盤を構
 築することが重要であると考え、本コンピュータ
 プログラムを作成してホームページ上に公開した。
 培養細胞を研究資源化するにあたっては、細胞に
 間違いが無いことを十分に確認する必要があるこ
 とから、STR プロファイルデータベースを過去数
 年に亘って蓄積してきたがその有効活用ともなる。
 この試みについては、ドイツの細胞バンク
 (DSMZ)とも意見交換をし、その重要性について
 同意を得たので、今後各国の細胞バンクに呼びか
 けて類似のシステムを作成するよう促そうと考え
 ている。さらに、データの統合化が図ればさら
 に利便性が高まるので、将来の課題として検討を
 加えている。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

生物資源の遺伝発現プロファイル

分担研究者：鈴木 治（独）医薬基盤研究所生物資源研究部 主任研究員

研究要旨

生物資源の品質管理法の一手段、特に種・系統識別法として miRNA プロファイリングの応用を検討するため、モルモット下垂体より miRNA の分離とその分子群のシーケンスを求めたところ、275 種類の 20-24 塩基の RNA が得られ、そのうち 3 種は既報との一致が見られたが (let-7, miR-7, miR-21)、他はモルモット独自の配列と考えられた。このことは、miRNA の分子集団構成の差異により動物種を判別しうることを示唆し、miRNA プロファイリングが動物種識別法として活用しうることを示している。

A. 研究目的

生物資源を活用した生命科学研究の推進には、ゲノム解析・遺伝子発現解析・機能解析を基にした生物資源の品質管理法の完備が必須である。

近年 20~24 塩基の microRNA (miRNA) による様々な生命現象への関与が指摘されている。既に 500 種以上の配列が報告されている miRNA の配列自体は種間でよく保存されているが、ターゲットとなる mRNA の 3'-非翻訳部位の種間の保存性は一般に翻訳部位に比べてそれほど高くはないことから、生物種により miRNA の集団構成が異なることが推測される。このことは、miRNA 集団構成の種差・系統差の情報を、生物資源の生物種・系統を識別する品質管理法として利用しうる可能性を示唆している。

そこで本研究では、生物資源のプロファイル法として miRNA の集団構成分析による種・系統の識別法を開発する。今年度は特に種差を考慮するため実験用齧歯類の中でマウス、ラットとは比較的遠縁のモルモットを使用し、下垂体を対象臓器として miRNA の単離と種類の検索を行った。

B. 研究方法

1) モルモット下垂体：

RNA Later (Qiagen) で保存されたハートレー

成熟雄の下垂体組織をフナコシより購入した。

2) RNA 抽出：

miRNAeasy Mini kit (Qiagen) と FlashPAGE (Ambion) により 40nt 以下の RNA を抽出した。

3) サブクローニング：

Small RNA Cloning Kit (Takara Bio) により miRNA 由来 cDNA を増幅した。得られた 20-40nt 程度の cDNA でコンカテマー (3-5 個連結したもの) を作成し、pUC118 ベクターに結合した。大腸菌 DH10B 株へベクターを導入後、得られたコロニーをピックアップし、インサートの配列をシーケンスした。

4) シーケンス解析：

得られたシーケンス群について miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) に登録されている miRNA 配列データと照合、比較した。

C. 研究結果

モルモット下垂体 3 個 (29 mg) より small RNA 分画を抽出し、Small RNA Cloning Kit のマニュアルに従い miRNA 由来 DNA を PCR により増幅し、ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) にて産物のサイズを確認した (図 1)。60-80 nt 付近のバンドを切り出して抽出したのち、制限酵素 Sse8387I 処理によりアダプター配列中の

PstI/Sse8387I 部位で切断した。PAGE 後 (図 2), 40-60 nt 付近のバンドを回収し, T4 DNA ligase によりお互いを結合させ (コンカテマー形成), 2% アガロースゲル電気泳動を行い (図 3), 100~700bp の部分から DNA を抽出した。

回収した DNA をベクターに挿入し, 大腸菌に Transfect して得られたコロニー192 個からコロニーダイレクトシーケンスによりインサートのシーケンスを求めたところ, 167 個で配列が決定でき, コンカテマー構造を考慮して各 small RNA 配列を決めたところ, 646 個のシーケンスが求められた (長さの範囲: 13-33nt)。そのうち, 20-24 nt のものは 285 個で重複を除くと 275 種の miRNA 分子種が得られた。既報に一致するものは 3 個 (let-7, miR-7, miR-21) であり (表 1), 他はモルモット独自のものと思われた。

D. 考察

モルモット独自の miRNA 群が得られたことから, miRNA の配列や集団構成には種差があり, このことは種を判別する方法として miRNA プロファイリングが活用できることを示唆している。

E. 結論

モルモット下垂体の miRNA をサブクローニングしたところ, モルモット独自の配列を有する miRNA が見られ, 種差を示すマーカーとしての miRNA の有用性が示唆された。さらに他の動物種の miRNA 集団との比較により種差マーカーとしての可能性を検討したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Aberrant turnover of collagen type VI in the hearts of transgenic mice harboring Gal β 1,3 GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3GalII) transgenes. Experimental Biology 2007, Washington, DC., USA, 2007 年 4 月。
2. **鈴木治**, 小浦美奈子, 高野薫, 野口洋子, 内

尾-山田こずえ, 松田潤一郎. 心拡張を呈するシアル酸転移酵素多発現マウスの心臓 6 型コラーゲンの減少. 第 54 回日本実験動物学会総会, 東京, 2007 年 5 月。

3. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Sequence Analysis of the FSH Receptor in the Mongolian Gerbil. 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, ON, Canada. 2007 年 6 月。
4. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Protein profiling of mouse oocytes matured in vitro during the first wave of folliculogenesis. 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, San Antonio, TX, USA, 2007 年 7 月。
5. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Strain difference of 2410146L05Rik, an oocyte/embryo specific gene in mice. 58th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Charlotte, NC, USA, 2007 年 10 月。
6. **Suzuki O**. Sequence comparison of FSH-receptors among 12 mouse strains. 21st International Mammalian Genome Conference, 京都, 2007 年 10 月。
7. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Microarray Analysis of Gene Expression in Mouse Oocytes Matured in vitro during the First Wave of Folliculogenesis. 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Washington, DC, USA, 2007 年 12 月
8. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Production of Pups by Ovarian Transfer in the Syrian Hamster. 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, CO. USA, 2008 年 1 月。
9. Mizumachi R, **Suzuki O**, Murata Y, Matsumoto T, Nasu M, Atai H, Nishi K. Evaluation of 4C30 mice as a dilated cardiomyopathy model. 横浜, 2008 年 3 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

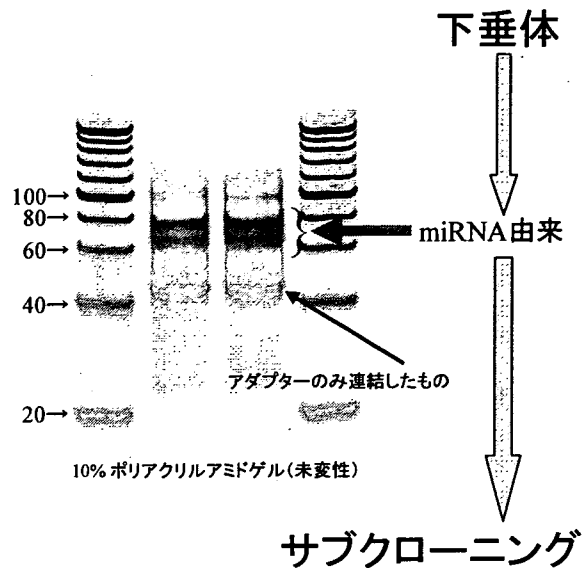


図1 モルモット下垂体 small RNA 由来 cDNA 増幅産物の泳動像。

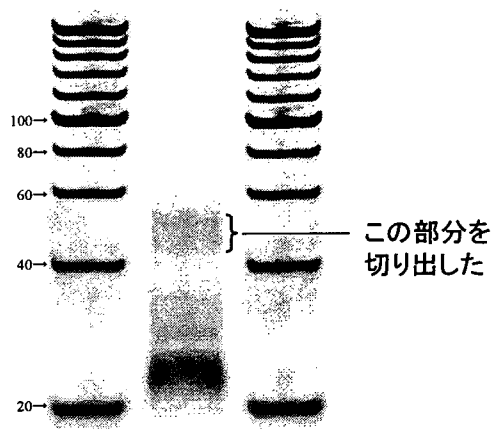


図2 酵素処理後の電気泳動像

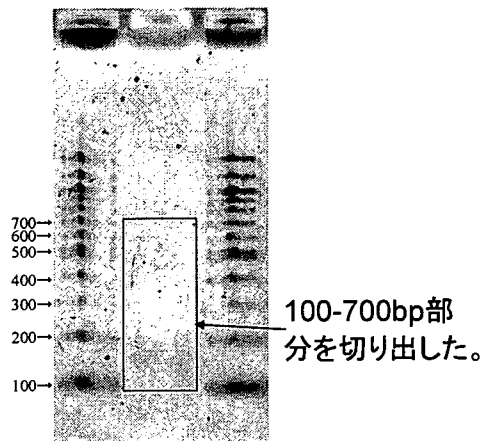


図3 コンカテマー形成後の電気泳動像

表 1 得られた miRNA の中で既報と一致したもののリスト

miRBase Release 9.0 にリストアップされている miRNA と本実験で得られた 275 種の small RNA を比較して一致したものを示す。以下のように let-7, miR-21, miR-7 がモルモット下垂体には存在することがわかる (他はモルモット独自の miRNA と見られる)。

| モルモットより得た配列 | 一致したエントリ |
|------------------------|--|
| UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU | dme-let-7 MIMAT0000396 <i>Drosophila melanogaster</i> let-7 dps-let-7 MIMAT0001198 <i>Drosophila pseudoobscura</i> let-7 bmo-let-7 MIMAT0004190 <i>Bombyx mori</i> let-7 ame-let-7 MIMAT0004418 <i>Apis mellifera</i> let-7 |
| UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA | hsa-miR-21 MIMAT0000076 <i>Homo sapiens</i> miR-21 mmu-miR-21 MIMAT0000530 <i>Mus musculus</i> miR-21 rno-miR-21 MIMAT0000790 <i>Rattus norvegicus</i> miR-21 ssc-miR-21 MIMAT0002165 <i>Sus scrofa</i> miR-21 mml-miR-21 MIMAT0002320 <i>Macaca mulatta</i> miR-21 ptr-miR-21 MIMAT0002321 <i>Pan troglodytes</i> miR-21 ggo-miR-21 MIMAT0002322 <i>Gorilla gorilla</i> miR-21 ppy-miR-21 MIMAT0002323 <i>Pongo pygmaeus</i> miR-21 mne-miR-21 MIMAT0002324 <i>Macaca nemestrina</i> miR-21 age-miR-21 MIMAT0002325 <i>Ateles geoffroyi</i> miR-21 ppa-miR-21 MIMAT0002326 <i>Pan paniscus</i> miR-21 gga-miR-21 MIMAT0003774 <i>Gallus gallus</i> miR-21 mdo-miR-21 MIMAT0004091 <i>Monodelphis domestica</i> miR-21 cgr-miR-21 MIMAT0004417 <i>Cricetulus griseus</i> miR-21 |
| UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUG | gga-miR-7 MIMAT0001157 <i>Gallus gallus</i> miR-7 xtr-miR-7 MIMAT0003552 <i>Xenopus tropicalis</i> miR-7 mdo-miR-7 MIMAT0004086 <i>Monodelphis domestica</i> miR-7 |

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告書

細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究

| | | | |
|-------|--------|---------------------|-------|
| 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 |
| 協力研究員 | 小澤 裕 | (独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部 | 技術補助員 |
| 協力研究員 | 大谷 梓 | (独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部 | 技術補助員 |
| 協力研究員 | 小松 みどり | (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 3400 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、わずか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実施し、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、ヒト由来細胞を中心に 446 検体を検査し、48 検体でウイルス検査陽性の結果を得ることが出来、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、細胞のマイコプラズマ汚染検査に関する全国調査を実施し、1500 検体におよぶ検査を実施した結果、26%程度の細胞においてマイコプラズマ汚染が認められる結果が得られた。さらに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の実施>

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。てはじめとして、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 14 種類 (CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, BKV, JCV, ADV, HBV, ParvoB19, HTLV-1, HTLV-2, HIV1, HIV2, HPV18) 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立し、今年度は検査を 446 検体実施した。

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)
14. ヒトパピローマウイルス 18 型 (HPV18)

<培養細胞のマイコプラズマ汚染全国調査>

マイコプラズマは自己増殖能を持つ、細菌の 1/10 ぐらいの大きさの微生物であり、培養細胞と共存して増殖するが、汚染しても培地が濁ったりしないので混入に気付きに微生物である。マイコプラズマの汚染が細胞に与える影響は様々であり、細胞の遺伝子発現やシグナル伝達に与える影響は少なくない。また、汚染された細胞から抽出された DNA や RNA の 20% 程度はマイコプラズマ由来になってしまうとの報告もあり、マイコプラズマ汚染が研究に及ぼす影響は非常に大きいものである。しかし、これまで細胞バンクに寄託された細胞のマイコプラズマ汚染検査を実施していると、その約 20% は汚染していることが明らかになっており、マイコプラズマ汚染の現状を把握し、その実状を広く研究者に知らせることにより、質の高い研究の遂行を普及し、信頼性・再現性の高い研究による国際競争力強化を目指すため、培養細胞のマイコプラズマ汚染全国調査を実施した。本調査に使用し

たのは、Lonza社製 マイコアラート という迅速検査キットであり、マイコプラズマの汚染／感染を化学発光により検出する新しい測定キットである。その特徴として操作が簡単で高感度に短時間でマイコプラズマの検出ができることがあげられ、全国調査に際して迅速簡易検査が非常に効果を発揮したと考えられる。

<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 14 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。用いたプライマーの種類は表 1 にまとめた。

ウイルスゲノムの増幅

10xbuffer、dNTP、ROX、25mMMg、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。

<培養細胞のマイコプラズマ汚染全国調査>

検査試料となる培養上清を用意し、MycoAlert Reagent、MycoAlert Substrate を溶解させた。室温で 15 分間静置し、検査試料 (100 μL) に MycoAlert Reagent (100 μL) を加えて、室温で 5 分間静置した。ルミノメーターで測定 (測定値 A) 後、MycoAlert Substrate (100 μL) を加え室温で 10 分間静置し、ルミノメーターで測定 (測定値 B) した。判定は測定値 B と A の比率を求め (B/A)、比率が 1 以上の時をマイコプラズマ陽性と判定した。

<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 3) による染色体の染色を行い、細胞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 4 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 5）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 と判定され、検査に用いるプレートに問題がないことを確認した。

ヒト由来細胞株を中心に 446 検体の解析を実施し、39 細胞株においてウイルス検査陽性の判定を得た（検査結果 表 2）。

細胞番号 細胞名 ロットナンバー

- ・ JCRB0135 MT-4 031699
- ・ JCRB0138 KMH-3S 081799

上記の 2 細胞株は HTLV-1 陽性であることがすでに明らかになっている細胞株であり、細胞の登録情報どおり HTLV-1 陽性の結果が得られた。この 2 細胞株はその他のウイルスは陰性だった。

細胞番号 細胞名 ロットナンバー

- ・ JCRB9012 RAJI 042095
- ・ JCRB9123 B95-8 072795
- ・ JCRB9071 Daudi 120694
- ・ JCRB9062 HS-Sultan 032395
- ・ JCRB9071 P39/TSU 031395
- ・ JCRB0106 SCCH-26 101795
- ・ JCRB0035 RPMI1788 121198
- ・ JCRB0042 HEC-1 110586
- ・ JCRB0024 IM-9 100690
- ・ JCRB0032 CCRF-SB 090889

- ・ NIHS0247 SLVL 11102000
- ・ NIHS0313 OUS-11 08122002
- ・ JCRB0332 AT(L)6KY 07212006
- ・ NIHS0217 YGHS-5 020499
- ・ JCRB0041 HLCL-1 051688
- ・ JCRB1042 BSL2KA 10022007

上記の 16 細胞株はすでに EBV 陽性であること明らかになった。

また、parvoB19 および HBV に関しては、下記の 3 株が陽性を示した。

細胞番号 細胞名 ロットナンバー

- ・ JCRB0406 PLC/PRF/5 122095
- ・ JCRB1031 JHH-7 12202002
- ・ JCRB0199 HuH-1 01222002

HPV18 に関しては下記 17 株が陽性を示した。

細胞番号 細胞名 ロットナンバー

- ・ JCRB0213 HeLa AG 08152000
- ・ JCRB0214 HeLa TG 071499
- ・ NIHS0331 HSGC-C5 10062003
- ・ JCRB0649 HeLa. P3 120597
- ・ NIHS0231 HuL-1 03232000
- ・ JCRB9066 Chang liver 08242001
- ・ JCRB9086 HeLa 229 08232001
- ・ JCRB9004 HeLa 051299
- ・ JCRB9010 HeLa S3 120292
- ・ FDSC0026 SKG-IIIb 052890
- ・ FDSC0029 SNG-II 032190
- ・ JCRB0178.1 KP-3L 11152001
- ・ IF050004 WISH #10
- ・ JCRB0073 J-111 100698
- ・ JCRB9027 KB 120398
- ・ JCRB1203 HCS-2 08062007
- ・ JCRB1205 HCSC-1 08112007

HHV6 に関しては下記 1 株が陽性を示した。

細胞番号 細胞名 ロットナンバー

・ IF050271 HUV-EC-C #1121

<培養細胞のマイコプラズマ汚染全国調査>

8 大学、3 国公立研究所、2 企業およびその他の研究機関より検査試料の提供を受け、1575 検体の検査を実施したところ、410 検体 (26.0%) においてマイコプラズマ汚染陽性の判定となった (表 3)。

<核型解析による細胞キャラクタライズ>

JCRB0810 : ME-180 (子宮頸がん細胞)

ギムザ染色による、自然発生染色体構造異常を分析した結果、染色分体型の異常 (ギャップ、ブレイク等) は $0.06 \pm 0.035 / \text{cell}$ であるのに対して、動原体を二つ持つ等の染色体型の異常が $0.50 \pm 0.106 / \text{cell}$ と非常に多く観察された興味深い細胞であった (図 1)。

D. 考察

<細胞のウイルス検査の実施>

JCRB 細胞バンクで保有するヒト由来細胞株 638 株を中心にウイルス検査の実施を開始し、既に 446 細胞株の検査を行った。その検査の中で、ウイルス陽性と判定されたのは 39 株であり、そのほとんどが文献報告されているウイルス汚染であった。しかし、一部は文献報告のないウイルス汚染であり、非常に興味深い知見が得られたと考えられる。今回のウイルス検査実施において、検査の途中より HPV18 の検査を追加したが、世界で始めて樹立された細胞株として有名な HeLa 細胞

において陽性判定されるウイルスであり、本検査の導入により、培養細胞にしばしば見られる HeLa 細胞とのクロスコンタミネーションをも示唆するデータとなりえる。また、パピローマウイルスは非常に多くの種類が存在するため、この汚染種類の特定は非常に複雑である。現在 2 段階の PCR 反応を応用した検出法を開発しており、今後パピローマウイルスの特定を目指した検査法の開発を行う予定である。

<培養細胞のマイコプラズマ汚染全国調査>

今回全国調査を行って、非常に高率にマイコプラズマ汚染が検出されたことは、大きな問題であると捉えるべきである。現在の研究における培養細胞は培養細胞そのものが研究対象ということではなく、培養細胞を用いて、生理活性物質や遺伝子の研究をするものが多く、培養細胞は非常に多くの研究者が用いる 1 つの研究ツールとなっている。そのため、誰もが培養技術を学ぶこともなく、気軽に培養細胞を扱い、研究を遂行しているのが現状である。そのため、培養細胞に関する知識は浅く、マイコプラズマ汚染に注意を払う研究者は少ない。我々細胞バンクとしてはこれらの全国調査を通じて、マイコプラズマ汚染の現状を把握するとともに、研究者への培養に対する意識の向上を図ることを目的としている。今後も継続して活動を行い、より多くの研究者が、研究の信頼性・再現性確保のために、これらの問題に正面から取り組めるような環境を整備していくことが必要であると考えられる。