

<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。染色体型の異常は DNA 複製前に固定される染色体異常であり、異常の起こる単位は染色体全体である。また、不安定型の異常と安定型の異常に大別され、Dicentric 等が不安定型、Translocation 等が安定型異常にある。不安定型は細胞分裂時に DNA の均等な分配が妨げられるため分裂死の原因となりますが、この細胞では不安定型の染色体構造異常が高率に観察される特徴が認められた。これらのキャラクタライズ情報が染色体異常誘発メカニズムを解析する研究者に有効に利用されることを期待する。

F. 研究発表

学会発表

- (1) Masui, T., Kohara, A., Mizusawa, H. Revist informed consent: how we can support blanket consent. 66 th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct., 2007.
- (2) 増井徹、小原有弘、水澤博 包括同意を支える施策について。第18回日本疫学会学術総会 Jan., 2008.
- (3) 増井徹、小原有弘、水澤博 ヒト研究資源の規制状況: 包括同意の問題。第80回日本組織培養学会大会 May. 2007.
- (4) 小原有弘 マイコプラズマ迅速検査法の紹介と

その実践 第80回日本組織培養学会大会 May. 2007.

- (5) Arihiro Kohara High-Resolution Genomic Analysis of Immortalized Human Cells and Human Tumor Cells Using Array-Based Comparative Genomic Hybridization. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations. Oct. 2007.
- (6) 水澤博 厚生労働省 創薬医学研究用研究資源 第30回 日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 Dec. 2007.
- (7) 小原有弘 培養細胞におけるゲノム・染色体解析の重要性 第29回日本バイオマテリアル学会大会 Nov. 2007.
- (8) Arihiro Kohara High-resolution genomic analysis of immortalized human cells and human tumor cells using array-based comparative genomic hybridization. 47th ASCB Annual Meeting Dec. 2007.

誌上発表

- (1) 小原有弘、水澤博、JCRB細胞バンク: 厚生労働省、細胞工学 2007;26(10):1177-8.
- (2) 水澤博、小原有弘、増井徹、 我国におけるヒト研究資源の現状と将来、医学のあゆみ 2007;222(2):113.
- (3) Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2007 May 21;.
- (4) Ono K., Satoh M., Yoshida T., Ozawa Y., Kohara A., Takeuchi M., Mizusawa H., Sawada H., Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA, In Vitro Cell.Dev.Biol. Anim. 2007 43:168-175 (2007)
- (5) 小原有弘、大谷梓、小澤裕、塩田節子、増井徹、水澤博 培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査、Tiss.Cult.Res.Comm.26: 159-163(2007)

- (6) 水澤博、増井徹、竹内昌男、小原有弘
-190C 気相式液体窒素保存システム、
Tiss.Cult.Res.Comm.26: 155-170(2007)
- (7) 水澤博、小原有弘、増井徹
単行本: バイオ研究の舞台裏ー細胞バンクと研究倫理ー (ポピュラーサイエンス 282) 裳華房
(2007)
- (8) 水澤博、小澤裕、小原有弘、増井徹、佐藤元
信、岩瀬秀、深海薫、西條薫、中村幸夫
培養細胞で頻発するクロスコンタミネーション
への警戒、実験医学、印刷中 (2008)

知的所有権の取得状況 なし

表1 ウイルス検査に用いたプライマー・プローブ一覧

Virus name	Type (DNA or RNA)	Target region	Primer sequence (F)	Primer sequence (R)	Probe sequence	product size
GAPDH	PCR control		tgctcctccctcctgattc	octagctccagccttgatt	FAM-aaasagctagagcagcaaatcttgc- IowaBlack	76 bp
CMV	DNA virus	Major immediate-early region	catgagctcttccgagtac	ggcacaagctggctcacaatag	FAM-tgttaccgcgcagcaantggc- IowaBlack	130 bp
EBV	DNA virus	BALF5 gene	cggaagcccttgcaoitc	ccctctttatccgatggatg	FAM-rgcagctgcgcaaatgcttc- IowaBlack	220 bp
HHV8	DNA virus	U66/65 gene	gcaatccactgcctggatgatg	tgaagcttggatgatgactaa	FAM-rtcagatgcttffccatg- TAMRA	176 bp
HHV7	DNA virus	U37 gene	cggaagcttggatgatgatg	ccaatctccagcaacgctg	FAM-rtcagatgcttffccatg- TAMRA	128 bp
BKV	DNA virus	Large T antigen	ggaagctttggctctctaacatt	gatgagatatttggcattgRg	FAM-rtcagatgcttffccatg- TAMRA	119 bp
JOV	DNA virus	Large T antigen	ggaagctttggctctctaacatt	gatgagatatttggcattgRg	FAM-rtcagatgcttffccatg- TAMRA	113 bp
ADV	DNA virus	Hexon gene	ggcagcttttgagcagc	tcgatgagccgcagcctg	FAM-ccatggaYgacacaccc- TAMRA	105 bp
ParvovB19	DNA virus	VP1 protein gene	ggctttccagcaagYgtaaaaga	cggtYaaactcttgcasaatg	FAM-ccagctccctctg- MGB	84 bp
HBV	DNA virus	S gene	gctgctcctctcctcattctctag	ggcaMacgggcaacataact	FAM-tgctcgcctgttt- MGB	222 bp
HTLV1,2	RNA virus	Env gene	SHTF : ggcacactgcagacac	R1 : ctgagcagataagcctca	FAM-Mtccactggcaccacatgagz- TAMRA	62 bp
HIV1	RNA virus	gag gene	F1 : ggcactcaagcgcYatgcaatg F2 : ggcaccccaRcagctagcaatg	R1 : tgcataRtccacttccctctggtttctct R2 : tctatactccttccctcaggtttctct R3 : tctatactccttccctcaggtttctct	FAM-actatcaatgagagctgcagaa- MGB	60 bp 135 bp
HIV2	RNA virus	LTR	gcagtagagcctgagcttctc	ctgcttctcaYtgccagctttatt	FAM-tggcagcagYgctcaccg- TAMRA	119 bp
HPV 18, 45	DNA virus	Reading frame E1 gene	caattttcagccagcagagc	acttgcacacttgagccc	JOE-agaagcagcaagcttctcct- TAMRA	76 bp

Reference CMV : 株式会社 BML、試験検査部 試験検査一課、野山智子、田所健一、山口敏和、リアルタイムPCR法によるEBV/HCMV-DNA測定について

EBV : Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Matsuyama, T., Morishima, T. 1999. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus Load by Using a Real-Time PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 37:132-136.

HHV8 : Gautheret-Dejean, A., Manichanh, C., Thien-Ah-Koon, F., Fillet, A.M., Mengesha, N., Vidaud, M., Dhedin, N., Vernant, J. P., Agut, H. 2002. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-8 infection and application to bone marrow transplant patients. *J. Virol. Meth.* 100: 27-35.

HHV7 : Hara, S., Kimura, H., Hoshino, Y., Tanaka, N., Nishikawa, K., Ihira, M., Yoshikawa, T., Morishima, T., 2002 Detection of Herpesvirus DNA in the Serum of Immunocompetent Children. *Microbiol. Immunol.* 46(3), 177-180.

BKV,JOV: Herman, J., Van Ranst, M., Snoeck, R., Beuselink, K., Lerut, E., Van Damme-Lombaerts, R. 2004. Polyomavirus infection in pediatric renal transplant recipients: Evaluation using a quantitative real-time PCR technique. *Pediatr. Transplantation.* 8: 485-492

ADV : Shimizu, N. Original

ParvovB19 : Shimizu, N. Original

HBV : Shimizu, N. Original

HTLV1,2 : Shimizu, N. Original. Only use Reverse primer. Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Cell-Associated HTLV Type I DNA Viral Load. *AIDS Research and Human Retroviruses*, May 2000, Vol.16, No.7 : 665-675.

HIV1 : Shimizu, N. Original.

HIV2 : Ferns, R.B., Garson, J.A. 2006. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for quantification of cell-free human immunodeficiency virus type 2 using a Brome Mosaic Virus Internal control. *J. Virol. Meth.* 135: 102-108.

HPV18,45 : Moberg, M., Gustavsson, J., Gyllenstein, U. 2003. Real-Time PCR-Based System for Simultaneous Quantification of Human Papillomavirus Types Associated with High Risk of Cervical Cancer. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3221-3228.

表2 細胞のウイルス検査結果 (表中の数字は検査陽性、△印は未確定)

Cell No.	Cell Name	Lot No.	GAPDH CMV	EBV	HHV6	HHV7	BKV ADV	parvoB19	HTLV1	HTLV2	HIV1	HIV2
JCRB1179	KMS-11	11242006	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0403	HuH-7	040396	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB5004	HeLa	05232001	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0156	KHYG-1	01092001	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1185	KMS-21BM	02072007	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1187	KMS-26	02232007	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1180	KMM-1	11212006	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1187	NCR-G2	10112006	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1184	KMS-24	02192007	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0166	NCR-G1	08172006	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0180	LI90	10262001	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB5010	HeLa S3	120292	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB9068	293	122299	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0142	NCC16	080999	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIHS0205	NCE16	122993	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB9017	WI-38	031699	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0135	MT-4	063098	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0128	TK-1	062298	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0208	CCK-81	050698	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0612	GOTO	01232003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1034	OVS-11	01312003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1027	SAT	03282003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1029	JHH-5	042095	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB9012	RAJI	082995	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0611	KATOIII	100995	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB9048	MOLT3	1011795	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0234	MKN45	102595	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB9083	LoVo	071498	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0621	NB-1	120595	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0226	COLO201	072795	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB8123	B95-8	020190	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0019	K-562	081799	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0138	KHM-3S	07192006	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIHS0426	PL507	08012006	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1155	Yub625	12202002	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1031	JHH-7	03072003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1042	BSL2KA	09102003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1066	KMH-2	02072003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSR0024	KMRC-20	12062002	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIHS0325	MKN28	09242002	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIHS0314	Kasumi-6	110794	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0077	PC-3	120498	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0076	A549	#1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FCB999	MKN7	072396	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0112.1	THP-1	122090	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0114	LC4-1	09202001	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIHS0270	IHH-4	12022002	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSR0032	PH61-N	08192003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1088	IRC-2	12062002	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIHS0325	MKN28	10262006	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1165	HSP-239	12012006	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1177	HSP-250	06292000	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0222	NTI-5	041499	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0134	MC7-7	110796	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0604	PSV811	12242002	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1030	JHH-6	01162002	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIHS0291.6	OJMS-36T-6	10062003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIHS0331	HSGC-C5	03282003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1029	JHH-5	050194	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0006	HL60RG	012194	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIHS0175	MLMA	062294	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0057	LU98B	08192003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB1068	IRC-2	120694	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB9071	Dauid	062994	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0086	TALL-1	031695	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB9081	PA-1	032395	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB9082	HS-Sultan	031395	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0032	P39/TSU	032192	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB0116.1	U937, 1-14	061395	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JCRB9060	MRC-9		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

JCRB0995	HEPM	072695				embryo palatal mesenchyme
JCRB9042	Wt26 VAA	100595				lung, SV40 virus transformed
JCRB0074	VMRC-MELG	100895	1.34E+02			melanoma
JCRB0106	SCCH-26	101795				neuroblastoma
JCRB0104.2	KU1812F	081194				leukemia
JCRB0415	HLF	122895				hepatoma
JCRB0408	HiO-3NI	122895				osteosarcoma
JCRB0628	PLC/PRP/5	122095				liver cancer, HBsAg positive
JCRB0818	MRK-nu-1	031596			1.70E+05	mammary carcinoma
JCRB0816	SBC-3	032996				lung carcinoma
JCRB0816	SBC-1	041796				lung carcinoma
JCRB0622	HSC-2	070196				squamous carcinoma, mouth
JCRB0710	EJ-1	082796				bladder carcinoma (=T24)
JCRB0044	LU89A	090698				lung cancer
JCRB0711	T24	101596				urinary bladder carcinoma
JCRB0625	Ca9-22	101896				gingival carcinoma
JCRB0404	HLE	022396				hepatoma
JCRB0191	OCUG-1	01222002				galbladder carcinoma
JCRB0810	ME-180	100196				uterus, cervical cancer
JCRB0830	PEER	110496				acute lymphocytic leukemia, EBNA (-)
JCRB0821	NUGC-2	100496				stomach, gastric cancer
JCRB0077	PC-3	110794				lung adenocarcinoma
JCRB0623	HSC-3	121296				squamous carcinoma, mouth
JCRB0822	NUGC-3	112596				gastric cancer, stomach
JCRB0070	MIA PaCa-2	102596				pancreatic cancer
JCRB0624	HSC-4	112796				squamous carcinoma, tongue
JCRB0031	MOLT-4	022795				peripheral blood, T-cell
JCRB0103	VMRC-LCP	082994				lung squamous cell carcinoma
JCRB0969	SW-13	071895				adenocarcinoma, adrenal cortex
JCRB0061	AZ-621	063095				gastric cancer, stomach
JCRB0225	COLO320DM	112996				carcinoma of the sigmoid colon
JCRB0430	KMS-12-PE	022897				myeloma, B-cell, EBV Ag negative
JCRB0827	VMRC-RCZ	030497				renal cancer
JCRB0819	SBC-5	021297				renal cancer
JCRB0801	CaK1-1	011097				small cell carcinoma
JCRB0834	NUGC-4	031097				renal cancer
JCRB0034	RPMI8228	030397				signet ring cell carcinoma
JCRB0824	8305C	041197				multiple myeloma
JCRB0713	HeLa S3(ec)	063097				undifferentiated thyroid carcinoma
JCRB0812	REF-LC-MA	042397				HeLa subclone
JCRB0614	NY	070197				small cell carcinoma, lung
JCRB0823	YMB-1	120996				osteosarcoma
JCRB0833	NIH-12	041097				breast cancer
JCRB0122	KO51	062497				neuroblastoma
JCRB0435	JHH-4	061797				acute myeloblastic leukemia
JCRB0831	HO-1-N-1	110797				hepatocellular carcinoma, HBV(-)
JCRB0813	VMRC-RCW	050697				squamous cell carcinoma
JCRB0627	KYM-1	103197				renal cell carcinoma
JCRB0124	Takigawa	070397				rhabdomyosarcoma
JCRB0004	A-431	071696				epidermoid carcinoma
JCRB0075	SF-TY	033198				advanced gastric carcinoma
JCRB0432	KMS-6	042198				normal skin fibroblast
JCRB0058	LU99C	091697				embryo, normal fibroblast
JCRB0950	IMR-32	102594				lung carcinoma
JCRB0251	SCH	060198				neuroblastoma, brain
JCRB0127	KOSC-3	062398				stomach, choriocarcinoma
JCRB0207	CaR-1	061298				oral cancer
JCRB0240	MCAS	070798				adenocarcinoma, rectum
JCRB0250	NEC8	082798				ovary
JCRB0832	NIH-8	070798				testicular germ cell tumor
JCRB0098	KURAMOCHI	090298				neuroblastoma
JCRB0055	LU65B	109898				ovarian cancer
JCRB0234.0	TYK-nu	102198				lung cancer
JCRB0257	CoCM-1	111798				ovary, undifferentiated carcinoma
JCRB0256	RCM-1	110698				descending colon, adenocarcinoma
JCRB0235	Lu-134-A-H	121898				rectum, adenocarcinoma
JCRB0744	ECV304	011499				lung, small cell carcinoma
JCRB0258	LC-1sq	012999				EJ-1, T24(cross contamination)
JCRB0133	KHM-1B	020199				lung, squamous carcinoma
JCRB9058	RPMI2650	121996				myeloma
JCRB0260	SAS	120798				quasi-diploid squamous carcinoma
JCRB0035	RPMI1788	121198				tongue squamous carcinoma
NIH50202	TASK1	041599				normal peripheral blood
NIH50194	REF-LC-KJ	053199				neuroectodermal tumor(Askin's tumor)
NIH50195	KHM-5M	062899	6.14E+07			undifferentiated human thyroid cell line
	KHM-10B	060399				Burkitt's lymphoma

NIH/NCI Cell Line	YGH5-4	Accession Number	+	-	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Description
NIHS0216	YGH5-4	020399	+	-	-	-	-	-	-	healthy human male blood, EBV transformed
JCRB0239	TCO-1	081999	+	-	-	-	-	-	-	thyroid gland, non differentiated cancer
JCRB0054	LU65A	101285	+	-	-	-	-	-	-	lung cancer
JCRB0042	HEC-1	100586	+	-	38.85	-	-	-	-	endometrial adenocarcinoma
JCRB0024	IM-9	100690	+	-	3.33E+05	-	-	-	-	B lymphoblasts
JCRB0033	CCRF-CEM	091790	+	-	-	-	-	-	-	T lymphoblastoid leukemia
JCRB0021	MOLT-4F	052695	+	-	-	-	-	-	-	T-cell lymphoblastic leukemia
JCRB0094	P30/OHK	011789	+	-	-	-	-	-	-	differenciated hepatoma
JCRB0141	PHK-180b	092499	+	-	-	-	-	-	-	foreskin, immortalized with HPV16 E6 E7, telomerase
NIHS0221	BE(2)-M17	071399	+	-	-	-	-	-	-	neuroblastoma
JCRB0105	KY821	031287	+	-	-	-	-	-	-	leukemia
JCRB0042	HEC-1	110586	+	-	2.14E+06	-	-	-	42.89	endometrial adenocarcinoma
JCRB0032	CCRF-SB	090889	+	-	-	-	-	-	-	B lymphoblastoid leukemia
JCRB9072	RD	041289	+	-	-	-	-	-	-	rhabdomyosarcoma, embryonal
JCRB0056	LU65C	111185	+	-	-	-	-	-	-	lung carcinoma
JCRB0426	HuH28	100996	+	-	-	-	-	-	-	bile duct carcinoma
JCRB0227	C32TG	122999	+	-	-	-	-	-	-	amelanotic melanoma
JCRB0147	JKT-beta-del	04052000	+	-	-	-	-	-	-	T-cell leukemia
JCRB0141	PHK16-ob	02142000	+	-	-	-	-	-	-	foreskin, immortalized with HPV16 E6 E7, telomerase
NIHS0231	HuL-1	03232000	+	-	-	-	-	-	-	no information
NIHS0179	NB(TU)1-10	10242000	+	-	-	-	-	-	40	neuroblastoma
NIHS0246.0	MY	11062000	+	-	-	-	-	-	38.45	acute biphenotypic leukemia
NIHS0246.2	MY-M13	11082000	+	-	-	-	-	-	-	subclone of MY
NIHS0246.1	MY-M12	11102000	+	-	-	-	-	-	-	subclone of MY
JCRB0247	SLVL	11102000	+	-	2.30E+07	-	-	-	-	splenic lymphoma, B cell line, EBV transformed
JCRB0401	HuH-6 clone5	083098	+	-	-	-	-	-	-	hepatoblastoma, HBsAg negative
JCRB9051	KG-1	063095	+	-	-	-	-	-	-	bone marrow, acuto myogenous leukemia
JCRB9079	Ran Nor	030687	+	-	-	-	-	-	-	skin, osteoporosis
JCRB9043	Detroit 529	121286	+	-	-	-	-	-	-	Down's syndrome, skin
NIHS0245	TK	11282000	+	-	-	-	-	-	-	B-cell malignant lymphoma
JCRB0232	SKG-IIIa	030498	+	-	-	-	-	-	-	cervix tumor
JCRB0262	T.T	021492	+	-	-	-	-	-	-	esophagus, squamous carcinoma
JCRB0126.1	KOSC-2 cl3-43	030899	+	-	-	-	-	-	-	oral floor, crosscontaminated with mouse cell
JCRB0429	KMS-12-BM	151086	+	-	-	-	-	-	-	myeloma, bone marrow
JCRB0104.1	Hu812E	030387	+	-	-	-	-	-	-	chronic myeloid leukemia(CML), peripheral blood
JCRB0425	HuCC1	022196	+	-	-	-	-	-	-	bile duct carcinoma
JCRB0072	MiTen	121885	+	-	-	-	-	-	-	normal skin fibroblast
JCRB0079	LU65	031586	+	-	-	-	-	-	-	lung giant cell carcinoma

NIHS0256	HNOS	02202002	40,75		squamous cell carcinoma
JCRB0181	KP-2	01162002	+		pancreatic tumor cell line
NIHS0251	HKA-1	01232002	+		keratoacanthoma(角化棘細胞腫)
JCRB0182	KP-4	11062001	+		pancreatic ductal cell carcinoma, PTHP secreting cell line
JCRB0183	GGP-1	11062001	+		pancreatic carcinoma of islet cell, CAE
JCRB0188	KYSE-30	11202001	+		esophageal cancer
FDSC0034	GAK	10122001	+		malignant melanoma
JCRB0192	OCUM-1	01222002	+		stomach, gastric cancer
JCRB0433	KMST-6	deposit	+		normal fibroblast immortalized by 60Co irradiation
JCRB0189	KYSE-50	11232001	+		esophageal cancer
NIHS0058	JHH-2	060688	+		hepatoma
NIHS0291.5S	OUMS-36T-5F	01252002	+		normal embryo cell transformed with hTERT
NIHS0291.4	OUMS-36T-4	07032002	+		normal embryo cell transformed with hTERT
NIHS0291.3	OUMS-36T-3	07172002	+		normal embryo cell transformed with hTERT
JCRB1005	NCC-TT-A3	07192002	+		tetracarzinoma
NIHS0282	OZ	deposit	+		bile duct cell line established from sections of the tumor patient
OJCRB0185	HCC48	#1	+		cross-contamination with HCC50(?)
JCRB1015	HSC-1	09062002	+		skin squamous carcinoma cell line
NIHS0283	NOZ-W	08222002	+	1.70E+02	gall bladder carcinoma
NIHS0313	OUS-11	08122002	+		normal embryo cell transformed with hTERT
NIHS0291.8S	OUMS-36T-8F	08062002	+		lung normal tissue of lung cancer patient
NIHS0315	HSC-1	10022002	+		normal embryo cell transformed with hTERT
NIHS0291.8	OUMS-36T-8	10022002	+		skin squamous carcinoma cell line
JCRB1006.0	OUMS-36	08022002	+		normal embryo cell transformed with hTERT
JCRB1042	BSL2KA	03072003	+	Δ	primary cells from normal human lung tissue
NIHS0324	MKN28 niigata	12032002	+		normal embryo cell transformed with hTERT
FDSC0011	MKN28	12042002	+		normal embryo fibroblast
JCRB1018	HMY-1	12052002	+		Bloom's syndrome, B-cell transformed with EBV
NIHS0325	MKN28 unknown	12062002	+		gastric cancer
JCRB1027	SAT	01312003	+		gastric cancer
NIHS0296	OVI5E	02072003	+		melanoma
JCRB1041	SEKI	02212003	+		squamous cell carcinoma
NIHS0297	OVKATE	deposit	+		ovarian tumor
JCRB1006.7F	OUMS-36T-7	02182003	+		malignant melanoma
NIHS0328	PA-1/6TG-γ	deposit	+		ovarian tumor
JCRB1029	JHH-5	12192002	+		ovarian tumor
NIHS0301	OVTOKO	deposit	+		teratocarcinoma
NIHS0291.4	OUMS-36T-4	07192002	+		hepatocellular carcinoma
NIHS0302	OUMIU	deposit	+		ovarian tumor
NIHS0289	OVSABO	deposit	+		normal embryo cell transformed with hTERT
NIHS0303	OVMIU-II	deposit	+		ovarian tumor
NIHS0300	OVSAYO	deposit	+		ovarian tumor
JCRB1006.7F	OUMS-36T-7F	04272003	+		ovarian tumor
JCRB1053	STC1	05262003	+		ovarian adenocarcinoma
JCRB1006.6F	OUMS-36T-6F	06042003	+		ovarian tumor
JCRB1006.2	OUMS-36T-2	06102003	+		normal embryo cell transformed with hTERT
JCRB1035	HSC-41	11212002	+		lung cancer
NIHS0298	OVMANA	03312003	+		normal embryo cell transformed with hTERT
HSRB0024	KMRC-20	02072003	+		normal embryo cell transformed with hTERT
HSRB0034	TCC-PAN2	01032003	+		gastric cancer
HSRB0036	KYSE140	01272003	+		ovarian tumor
HSRB0037	KYSE150	01272003	+		renal cancer
HSRB0038	KYSE-110	01272003	+		pancreatic cancer
HSRB0044	OCUM-6	02072003	+		esophageal cancer
HSRB0043	CPT-K5	05202003	+		esophageal cancer
HSRB0031	HCC-58	10312002	+		esophageal cancer
HSRB0032	PH61-N	12022002	+		(leukemia)
NIHS0305	GS20S(SVT)	deposit	+		colon cancer
NIHS0310	FAGJTOTERT	deposit	+		cross contamination with MIA PaCa-2
NIHS0307	XP39OSTERT	deposit	+		SV40 transformed human fibroblast from Cookslyne syndrome
JCRB1068	IRC-2	08192003	+		hTERT transformed fibroblast cell line from Farnsworth's syndrome (Group O)
JCRB1059	CSZAWTERT	08212003	+		hTERT transformed B-cell from Bloom's syndrome
JCRB1058	XP40OSTERT	08192003	+		normal cell line (placenta)
JCRB1061	BS2CHTERT	08192003	+		hTERT transformed fibroblast cell line from Bloom's syndrome
JCRB0332	AT(L)8KY	07212006	+		hTERT transformed fibroblast cell line from Cookslyne syndrome
JCRB1006.3F	OUMS-36T-3F	03142003	+		hTERT transformed fibroblast cell line from Kuroki's syndrome (Group O)
JCRB1055	XP30S(SVT)	deposit	+		hTERT transformed fibroblast cell line from Bloom's syndrome
JCRB0817	G-361	022895	+		EBV transformed B cell lymphoblastoid cell line
JCRB1006.4F	SBC-2	070896	+		normal embryo cell transformed with hTERT
JCRB1006.2F	OUMS-36T-2F	05082003	+		normal embryo cell transformed with hTERT
NIHS0426	PL507	06102003	+		placenta-derived mesenchymal stem cell
JCRB0613	ITO-II	032596	+		testicular tumor(embryonal tumor)

JCRB9118	SCC-4	032287	34.99					tongue, squamous cell carcinoma
JCRB0820	EBC-1	031496	31.35					lung, squamous carcinoma
HSRB0035	SUIT-2	01102003	+					pancreatic cancer
JCRB0178.1	KP-3L	11152001	+					pancreatic tumor
JCRB9111	BaWo	062687	34.59					human placenta derived cell line
JCRB9115	SW837	020188	38.24					rectum
JCRB0108	SCCH-196	040387	+					small round cell carcinoma
JCRB9054	IMR-90	121186	+					normal fibroblast
NIHS0461	Yub625	p7	+					polydactylous finger
NIHS0462	LK-2	040196	32.84	44.73				polydactylous finger
JCRB0829	A4/Fuk	120186	31.75					lung, squamous cell carcinoma
JCRB0097	ABC-1	120996	30.06					malignant melanoma at ileocecal
JCRB0815	HuO9	081996	+					lung, adenocarcinoma
JCRB0427	HuO9N2	122596	+					osteosarcoma,
JCRB0428	A-172	030796	35.11					osteosarcoma,
JCRB0228	YKG-1	062496	+	41.01				brain, glioblastoma
JCRB0746	FLow3000	122485	+					malignant brain tumor
JCRB0068	COD-14Br	060487	+					normal fibroblast
JCRB9101	ECV304	030196	+					bronchiolo
JCRB0118	SKM-1	042099	34.81	45.45				肺帯の内皮細胞
NIHS0217	YGH5-5	020489	39.52					myelo dysplastic syndrome
JCRB9063	WIL2-NS	103095	+					healthy human, EBV transformed cell line
JCRB0220	NTI-4	081899	+					B lymphocyte
JCRB9078	De Gin	030687	+					fetus body, fibroblast-like
JCRB0091	P31/FUJ	101186	+					skin, osteoporosis
JCRB0071	BALL-1	121085	+					acute monocytic leukemia
JCRB0095	P32/ISH	072986	+					acute lymphoblastoid leukemia(ALL)
JCRB0115	SCC-3	052191	+					Burkitt lymphoma, EBNA(-), B cell
JCRB9103	KD	060887	32.94					<small>from Heigley's lymphoma, metastasis cell line, ATLAC-3, ERYOAO3, EBNA(-), lip, fibroblast</small>
JCRB0065	KG-1	111688	+	41.73				acute myeloblastic leukemia
JCRB0041	HLCL-1	051688	+					peripheral lymphocyte, transformed
NIHS0263	KG-1-C	030390	+		3.83E+05			brain, mixed glioma
JCRB1188	NCE SVI6	02072002	+					cervix, SV40 transformed keratinocyte cell
JCRB1054	KMS-27	03152007	+					myeloma cell line
JCRB9068	HepG2	11132005	+					hepatoma
JCRB0254	MKN45	11172006	+					transformed embryonal kidney by adenovirus(types)
JCRB1182	NCC-RbC-51	12122006	+					stomach, adenocarcinoma
JCRB9068	NCR-G2	09072006	+					retinoblastoma
JCRB1167	NCR-G3	09122006	+					complex type germ cell tumor of human embryonic testis origin
JCRB1183	NCC-RbC-54	03222007	+					complex type germ cell tumor of human embryonic testis origin
JCRB1206	TK	08282007	+					primary retinoblastoma
JCRB3002	Doh1	06132007	+					brain, malignant lymphoma, EBNA(-)
JCRB1186	NCC-RbC-59	05302007	+					skin, dischromatosis
JCRB0173	SKN	07202007	+					retinoblastoma, orbital recurrence
JCRB3006	FaBJTO hTERT-1	07302007	+					uterus leiomyoma
JCRB1200	NCC-RbC-53	08102007	+					skin, Fanconi anemia
JCRB0118	SKM-1	042099	+					primary retinoblastoma
JCRB0080	LU99	101896	+					myelo dysplastic syndrome, peripheral blood
JCRB1140	UE8E7T-3	01202008	+					lung, giant cell carcinoma
JCRB1107	UCB TERT-21	#10	+					bone marrow derived mesenchymal stem cell
JCRB1110	UCB 408E6E7TERT-33	01252002	+					bone marrow derived mesenchymal stem cell
NIHS0291.1S	OUMS-36T-1F	100698	+					unilobular cord derived mesenchymal stem cell
JCRB0073	J-111	120398	+					unilobular cord derived mesenchymal stem cell
JCRB9027	KB	020996	+					normal embryo cell transformed with hTERT
JCRB0254	HKN45	09132006	+					monocytic leukemia のはずが HeLa
NCTR0005	HMSC-MSCBM	#1121	+					HeLa subline
IFO50271	HUV-EG-C	05302007	+					stomach adenocarcinoma
JCRB3001	Dch2	06052007	+					human mesenchymal stem cell
JCRB3003	Dch3	07122007	+					normal endothelial cell, umbilical cord
JCRB1193	HEC-1-B	07062007	+					skin, dischromatosis
JCRB1201	GCH-nu-Y5	08062007	+					skin, dischromatosis
JCRB1209	HCS-2	09102007	+					endometrial adenocarcinoma from human uterus body
JCRB3007	MT-1	08062007	+					gestational choriocarcinoma
JCRB1205	FA18JTO hTERT	07282007	+					squamous cell carcinoma from uterine cervix
JCRB3004	HCS-1	08112007	+					Lymphoid cell line from Aden T cell Leukemia, low level HTLV-1 producer
JCRB3004	Dch4F	06122007	+					squamous cell carcinoma from uterine cervix
JCRB1196	KMS-20	06192007	+					small round cell carcinoma, uterin cervix
JCRB1195	KMS-34	05292007	+					skin, Fanconi anemia
JCRB1192	KMS-28BM	04022007	+					myeloma cell line
JCRB1191	KMS-28PE	03262007	+					myeloma, pleural effusion infiltration
JCRB1210	MT-2	09072007	+					myeloma, pleural effusion infiltration
JCRB1190	NCC-RbC-57	08092007	+					retinoblastoma

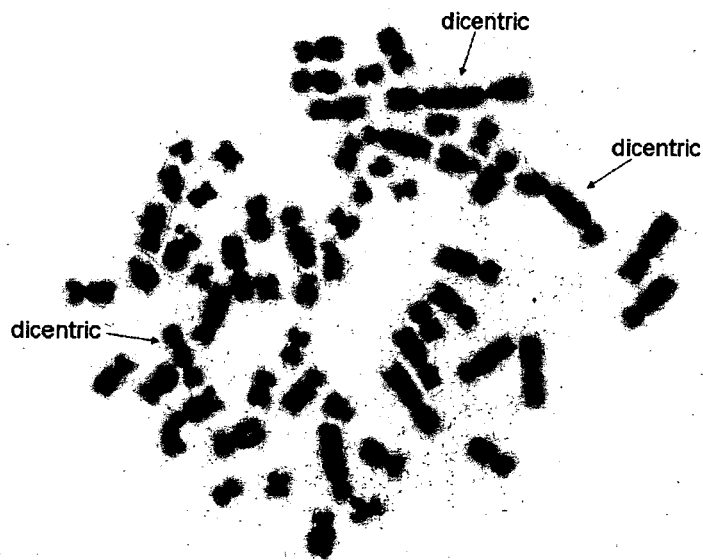
Cell Line	Accession	Source	Characteristics	Notes
JCRB1214	10182007	NCC-RbC-67	retinoblastoma	
NIHS0259.0	deposit	NCC16-PT1	Normal human epithelium cells immortalized with HPV18 virus genome	
JCRB0215	012999	HeLa TG Cap	modified HeLa cell	
JCRB0140	113099	HeLa	normal keratinocyte cells immortalized with HPV18 virus genome	
JCRB0713	063097	NCE16	HeLa, can grow in suspension culture	
JCRB9051	063095	HeLa S3 (SC)	bone marrow, acute myelogenous leukemia	
JCRB1042	10022007	KG-1	Bloom's syndrome B-cell transformed with EBV	
JCRB0316	1012007	BSL2KA	Ataxia telangiectasia, skin fibroblast	
JCRB1216	10092007	AT2KY	Human leukemia cell line established by co-culturing with human ATL cells	
JCRB0540	11012007	MT-4	retinoblastoma	
JCRB1212	10262007	TIG-119	Human placenta-derived mesenchymal stem cell	
JCRB1219	10292007	NCC-RbC-58	Human primary umbilical cord-derived cells	
JCRB1218	10282007	PL532	fetal lung	
JCRB9060	061395	UC701	uterine body, endometrial adenocarcinoma	
JCRB1118	11272007	MFC-9	Lung cancer	
JCRB0054	102885	HEC-6	uterine body, endometrial adenocarcinoma	
JCRB1141	12222005	LU65A	embryonal lung, diploid	
JCRB1117	08182005	HEC-251	primary umbilical cord-derived cells	
JCRB9008	120893	HEC-T-A	primary umbilical cord-derived cells	
JCRB1224	12072007	MFC-5	diffuse histiocytic lymphoma	
JCRB1220	11132007	UC704	normal endothelial cell, umbilical cord(ATCC)	
JCRB9021	121487	UC702	lung small cell carcinoma	
NCTR1730	4304684	U937	acute monocytic leukemia (09122007 004b)	
JCRB1081	07122004	HUV-EC-C	Bilateral retinoblastoma	
JCRB0112	08182007	MS-1-C	bone marrow -derived mesenchymal stem cell	
JCRB1223	01172008	THP-1	premyeloblastic cell line	
JCRB1154	05022006	NCC-RbC-T1	Human Umbilical Vein Endothelial Cells(CAL); Toyobo	
JCRB0085	031395	UE7T-13	bone marrow-derived mesenchymal stem cell	
NCTR0012	2311	HL60	placenta-derived mesenchymal stem cell	
JCRB1133	12012006	HUVEC(CAL)	primary umbilical cord derived mesenchymal stem cell	
NIHS0564	02142008	UE6E7T-2	umbilical cord derived mesenchymal stem cell	
NIHS0552	02152008	PL511		
JCRB1108	07252005	UC705		
		UCB408E6E7-31		

表3 細胞のマイコプラズマ汚染全国調査結果

総合計	Total	総検査数	総陽性数	総疑陽性数	総陰性数
		1575	410	29	1136
			26.03%	1.84%	72.13%

8大学3国公立研究所2企業

図1 JCRB0810 : ME-180 G-バンド染色像



プロトコール1 DAPI 染色法

1. 染色体標本に DAPI 蛍光色素を適量載せて染色する。
2. カバーグラスをかけ、カバーグラスの全周囲をシールする。

プロトコール2 染色体標本作製プロトコール1

I 標本作製に必要な試薬類

- ・ コルセミド溶液
- ・ トリプシン溶液
- ・ メタノール
- ・ 酢酸
- ・ 低張液 0.075M KCl (略してK)
- ・ 低張液 1%(W/V) クエン酸-3-ナトリウム (略してC)

II 標本作製

1. 60m/m dish または 100m/m dish に細胞を播種し、継代培養する。その際、培養液量をチェックしておく。
2. 細胞の対数増殖期を見計らって、コルセミド溶液を添加する (最終濃度約 0.04~0.08mg/ml ; 細胞のロットごとに最適条件を決めておく)。
3. 培養を継続し、増殖速度に応じて、コルセミド処理の時間を決める。通常 2 時間程度 (30 分~6 時間)。
4. 細胞を 15ml チューブに回収する。接着性細胞の場合は、トリプシン処理の時間を短めにする。また、最適低張液の組成が未知の場合は、細胞懸濁液を数本に分けておく。
5. 1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清をデカントで捨てる。
6. 低張処理を行う。最初 1ml の 0.075M KCl のみで各チューブのサンプルを懸濁させ、次に予め設定しておいた C:K の比率になるように総量 5ml の低張液を加える。
7. 37°C インキュベーター内にチューブを寝かせて、22 分間静置。
8. カルノア固定液 (メタノール:酢酸=3:1) を調整し (用時調整、1 時間以上経ったものは使用しない)、各チューブに 1ml ずつ加え、静かに混和させる。
9. 1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清をデカントで捨てる。
10. カルノア固定液を各チューブに 5ml ずつ加え、混和させる。
11. 1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清をデカントで捨てる。
12. カルノア固定液を各チューブに 5ml ずつ加え、混和させる。

13. 1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清をデカントで捨てる。
14. カルノア固定液を各チューブに 0.5ml ずつ程度加え、混和させる。
15. スライドガラス上にカルノア固定液の細胞懸濁液を染色体メタフェーズ展開装置 HANABI (株式会社アドサイエンス・テクノロジー) により展開させる。
16. 各スライドガラスの右端に、日付、細胞名、細胞番号、ロット番号、C:K の比率、スライド番号を表記し、2 枚ずつペアでセロテープで留め、ポリエチレンの袋に封入する (ポリシーラー)。
17. 使用時までフリーザー内 (-20°C または -80°C) で保存する。

プロトコール 3 ギムザ染色法

1. 染色体標本を 80%エタノールに数秒つける。
2. 3%Gimsa 溶液*で 20 分間染色する。
3. 軽く水洗いをしてから、自然乾燥させる。

*市販のギムザ原液を 1/15M Sorensen のリン酸緩衝液 (PH6.4) で希釈する。

プロトコール 4 染色体標本作製プロトコール II

1. 培養最終継代後、対数増殖期 (通常 48 時間後) に コルセミド (最終濃度 0.05~0.08 mg/mL) を添加する。
2. コルセミド添加後、1 時間から 3 時間培養を継続する。
3. 上清を遠心管 2 本に回収する。
4. Dish を PBS (-) 4mL で洗浄し、遠心管本に回収する (*).
5. Dish に 0.25% Trypsin 3mL を加えて 37°C で 5 分間処理し、細胞の剥れを確認する (*).
6. 4 を Dish に戻し、ピペッティングして遠心管 2 本に回収する (*).
7. 1200 rpm、室温、5 分間の遠心後、上清を除去する。
8. タッピングでペレットを解す。
9. 解したペレットに 0.075M KCl 3.0 mL を加えて Pipetting し、25 分~30 分間の低張処理を行なう。
10. 2 倍量のカルノア固定液 (メタノール:酢酸=3:1、用時調整) を加え、ピペッティングする。

11. 1000 rpm~1200 rpm、室温、5分間の遠心後、上清を除去する。
12. タッピングでペレットを解す。
13. 5 mL のカルノア固定を加えてピペッティングする。
14. 1000 rpm~1200 rpm、室温、5分間の遠心後、上清を除去する。
15. タッピングでペレットを解し、総量 5ml のカルノア固定液を加えて1本の遠心管にまとめる。
16. 11~13 を 2 回繰り返す。
17. 1000 rpm~1200 rpm、室温、5分間の遠心後、上清を除去する。
18. 細胞数にあわせて適量のカルノア固定液を加えて、細胞浮遊液を調整する。
19. 4℃の 50%エタノール中で保存しておいたスライドガラスの水分をふき取り、18. のカルノア固定液の細胞浮遊液を滴下して展開を行なう。スライドガラスは湿らせた JK ワイパー上で乾燥させる。

*) 浮遊系細胞の場合は上記手順 4~6 は省く

プロトコール5 G-染色法

GTG 法 (トリプシン処理法) : 原法は Seabright (1971)

1. 作成後 1 週間前後のスライドを 0.025% のトリプシン液 (*1 に 10~20 秒浸す。
(作製直後のスライドは温風乾燥機で 95℃40 分の前処理することで良好な結果が得られる)
2. 直ちに 10% 血清を含むハンクス液、次いで 5% 血清を含むハンクス液でスライドを洗いトリプシンの作用を止める。
3. 3% ギムザ液 (*2 で洗い、血清を落とす。
4. 新しい 3% ギムザ液 (*2 で 7 分間染色する。
5. 軽く水洗して乾燥させる。

*1) 組織培養に使う 0.25% トリプシン溶液を原液とし使用時に蒸留水で 10 倍希釈して作製する。

*2) 市販のギムザ原液を 1/15M Sorensen のリン酸緩衝液 (PH6.8) で希釈して作製する。

生物種の遺伝的プロファイル法の開発

分担研究者: 内尾こずえ (独) 医薬基盤研究所生物資源研究部 研究員

研究要旨

ヒト疾患モデル動物として、遺伝子改変が容易であることからマウスが多用されている。疾患モデルマウス作製の際、ヒトの多様な遺伝的背景に対応することを目的として様々なマウス系統が利用されることから、人為的ミスにより複数系統の交雑した状態で研究に供されることが増加している。一方でノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウス利用の増加にともない、スピードコンジェニック技術の普及が求められている。そこでマウスの遺伝的背景を把握し、病態解析を的確に行うためには遺伝的モニタリング技術が必須である。現在、マイクロサテライトマーカーを用いた検出方法が用いられているが、より簡便で確実な技術を開発することが望まれる。本研究ではマルチプレックス PCR およびキャピラリー電気泳動を用いた方法を開発し、研究資源バンクのホームページにて情報を公開、さらに検索システムを整備する。多くの創薬・疾患研究者が遺伝的背景の正しいマウス系統を用いて研究を行えるようにサポートしたい。

研究目的

ヒト疾患モデル動物として遺伝子改変マウスが利用されることが増加し、その作製に C57BL/6、BALB/c、DBA/2、C3H など多種多様な近交系マウスが利用されている。ヒトの多様性に対応するために各種系統の遺伝的背景・表現型の差異を利用することは非常に有意義である。しかしながら、人為的ミスによる複数マウスの交雑に起因する遺伝的背景のばらつきは、個体差を生み、研究精度の低下をもたらす。さらに遺伝的背景が不均一なマウスを用いて治療法開発、

薬効評価を行うことは大きなリスクをとまなう。また研究の再現性を保証するためにもマウスの遺伝的背景を把握する必要性は高い。

複数マウス系統の交雑が判明した場合、近交系マウスとの交配を重ねることによって遺伝的背景を統一することが可能である(コンジェニック化)。この方法はノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスを系統化する際にも利用されている。例えばノックアウト作製に多く用いられている ES 細胞は空間学習に障害のある 129 系統由来で

あり、病態モデルマウスとして解析を行うためには C57BL/6 等の近交系マウスに遺伝子置換を行うことが多い。通常のコンジェニック化には約 3 年を要するが、マイクロサテライトマーカを利用すると（スピードコンジェニック法）、1 年半に短縮可能であり、非常に効率的である。このスピードコンジェニック法を利用することで、複数系統が交雑した場合でも、効率的に遺伝的背景を均一にすることができる。

そこで各種マウス系統を判別する「遺伝的モニタリング技術」を開発し、その普及に努めることで、コンジェニック法の効率化を図るとともに間違ったマウス系統の利用を防ぎ、再現性の保証できる研究推進に貢献したい。

研究方法

＜マイクロサテライトマーカ選択＞
ゲノム上には、1 から複数塩基対の反復配列（マイクロサテライト）が広範囲に多数散在し、マウス系統によりその反復回数に多型が存在する。この反復配列をはさんだプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動パターンが多型として検出可能である。各染色体 20 箇所のローカスを選択した（表 1 に 1 番染色体のプライマーを示した）。

＜マルチプレックス PCR およびキャピラリー電気泳動＞

約 5 ミリメートルのマウス尾より QIAGEN EZ1 DNA extraction kit を用いて DNA を抽出した。PCR 法により、産物

の分子長が異なる 4 種類のプライマーセット（各染色体 5 セット）を同時に増幅し、通常の電気泳動による解析を行った（3.5% アガロースゲルを使用）。また同様に蛍光ラベルを行ったプライマーセットを用いた PCR 産物をキャピラリー電気泳動にて解析を行った。キャピラリー電気泳動は、Beckman 社 CEQ8800 Fragment Analysis を利用し、マルチプレックス PCR 産物の分子長の差を検出した。

結果および考察

産物の分子長が異なる 4 種類のプライマーセットを用い、マルチプレックス PCR を行った結果の一つを示す。D1Mit200, D1Mit253, D1Mit206, D1Mit217 の PCR 産物を 3.5% アガロースゲルに電気泳動し、解析した。4 つの産物の分子長の差が確認できる（図 1）。また Beckman 社 CEQ8800 を用いてキャピラリー電気泳動を行うと、図 2 のように数 bp の分子長も判別が容易で、正確であることがわかる（図 2）。しかしながらキャピラリー電気泳動装置を保持しない研究室においてもマイクロサテライトマーカを利用したマウス系統判別の必要性もあるため、通常のアガロースゲルを用いた電気泳動でも解析可能で且つマルチプレックス PCR 可能なプライマーセット情報を提供することが望ましい。そこで、図 1 で示したように、汎用性の高いプライマーセットを引き続き設定していく。

遺伝子改変マウス作製法が広く普及した

ことで、分子生物学者、細胞生物学者も積極的にマウスを扱うようになり、マウス利用がより一層増加している。しかしながらマウス系統の遺伝的背景を意識しながら研究を遂行している研究者は少ないように見受けられる。このことは実験動物を専門とする研究者が積極的に情報提供を行わなければ改善することはないであろう。遺伝的背景を意識してマウスを利用すべきであると強調するには理由がある。マウス系統はそれぞれ表現型に特徴があり、研究目的にあった使い分けが可能である。例えば一般的に遺伝子改変マウス作製に用いられている C57BL/6 系統は肥満やアテローム性動脈硬化症になりやすいが、糖尿病性腎症には抵抗性である。一方で免疫研究に用いられることが多い BALB/c 系統は肥満抵抗性、ストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病抵抗性などの特徴を持つ。このように遺伝的背景に起因する表現型の違いは明確に存在する。そのため、数種類の系統が交雑することにより、表現型に大きく影響をおよぼすことは容易に想像できる。そこで研究精度を高めるためにも均一な遺伝的背景を持つ個体を利用するよう説いていく必要がある。その役割を担うべきは実験動物を専門とする研究者であり、また生物資源バンクである。

(独) 医薬基盤研究所 疾患モデルマウスバンクへ寄託あるいは保護預かりしたマウスについて、培養細胞でのクロスコンタミネーションに相当するような例をあげてみたい。依頼者にバンクへ導入するマウス系統の由来を記載していただいているが、記

載情報にある系統とは異なるマウス毛色を呈すこともあり、コンジェニック化が完了していない、あるいは交雑してしまっていることが判明することもある。しかしながら、毛色は数種の遺伝子で制御されているものであり、偶然視覚的に系統の誤りに気が付くことは稀である。遺伝的背景に広範囲に交雑があつたとしてもマウス外観から視覚的に気が付くことはほとんど皆無であろう。ゲノムの大部分についてはサテライトマーカーを用いた解析によりはじめて系統の判別が可能となる。また実験動物利用初心者が陥り易い誤りではあるが、コンジェニック化の過程において毛色の変化によって系統や遺伝子置換レベルを判断することは問題外である。遺伝的背景が曖昧な状態でマウス系統を用いることは、実験の再現性が保証されず、高質の研究推進の障害となる。

特に生物資源バンクから分譲を行うマウスについては、高い品質を保証すべきである。しかし先述したようにマウス寄託者からの情報は必ずしも正確ではなく、現時点ではマウス系統のチェックシステムも構築されていない。本研究で行っているような遺伝的モニタリングシステムを利用することで、迅速なマウス系統の判別も可能となる。生物資源バンクにおいては、寄託されたマウス系統の遺伝的モニタリング結果を公開すべきであろう。さらに誤りが見つかった場合は、近交系マウスとの交配を重ねることによって浄化できるため、バンクが積極的にマウス利用法を説くべきである。

(独) 医薬基盤研究所 疾患モデルマウスバンクは維持マウス系統を疾患・創薬研究に利用していただくことを目指している。だからこそ高品質な資源の提供が最重要課題といえる。高品質といっても、微生物学的汚染がないことは言うまでもなく、遺伝学的にも均一な資源を指す。複数のマウス系統のゲノムがランダムに混じり、表現型が統一されていないマウス資源を用いての疾患・創薬研究(薬効・副作用の評価)を避けるためにも、バンクから高品質なマウスの提供を目指すべきである。本研究は引き続き遺伝的モニタリング法を改良し、ホームページ上での情報公開を目指し、マウス資源の高品質化に貢献していきたい。

関与する、第 145 回獣医学会、2008 年 3 月 28-30 日、相模原

研究発表

<論文発表>

なし

<学会発表>

1. 山田-内尾こずえ・澤田京子・國枝孝典：ネフローゼマウス(ICGN マウス)の病態進行パラメーターについて、第 144 回日本獣医学会、2007 年 9 月 2-4 日、江別
2. 國枝孝典・澤田京子・内尾こずえ：マウス卵胞発育過程における TNF α および TNF 受容体の発現解析、第 100 回日本繁殖生物学会、2007 年 10 月 18-22 日、東京
3. 山田-内尾こずえ・澤田京子・眞鍋昇：Matrix Metalloproteinase-12 はネフローゼマウス(ICGN マウス)の病態進行に

表 1. 1 番染色体マイクロサテライトマーカー

		プライマー1	プライマー2
D1-1	D1Mit415	TTGGCACATGCCTACAACCTC	AGAACACCATATATTGTGCCCC
D1-2	D1Mit446	TGAGTATATCATGAAGACAGCAACC	ACGTATTTACCTTGTCTGAATTTG
D1-3	D1Mit291	TGCCCGTGATAACCCTATGT	TTGTGACAAGCAGGAGC
D1-4	D1Mit155	ATGCATGCATGCACACGT	ACCGTGAAATGTTCACCCAT
D1-5	D1Mit318	TTTTTTAAGAATTACATTGTGTGTG	CCAGTAGGTAATGTTCTTGGTACC
D1-6	D1Mit98	CACAAGAAAACCAACTTATTCCC	ACCACACACATACACATATGCC
D1-7	D1Mit302	CCCCATGTTGATGTCATTG	TCTGTGGACTTGTGGTGGAG
D1-8	D1Mit498	GTCTGACTTGACTATGTGTGTCAGG	GTAAGTTCCTGCAATCAAAGGC
D1-9	D1Mit414	TTCCCTTTACTGAATTCATTATTG	TCCCAGAGGTCCTGGTACAC
D1-10	D1Mit65	CTAACCCCTATACATACTGCC	CCGTTCAGACTGAATACAGACC
D1-11	D1Mit217	TAAGTCTTCGCTCATGCC	CGGTCGCCGATTTAGTTTAT
D1-12	D1Mit30	TGAACCATCACCATGCTGTT	TGGGCTGCGTTTCTAAGG
D1-13	D1Mit200	GCCATGTTTATGTACATAGGTAGG	ATGGATGGATGGTTTTCTG
D1-14	D1Mit16	AGAGTTAGCTGCCTAGCTTGTAGTG	TGGAAAGATCTAGGGTTGTCAAAA
D1-15	D1Mit214	GACTGGGTCAAGAATTTGTATATATCA	AGGGCCCCAGATTAGGAATA
D1-16	D1Mit373	AGATAGCCACTCAGTTGAATACCC	CTTTACAGGTCTTGAAGCATGG
D1-17	D1Mit213	TTCTTAGAAGTGATAAAAAGTTTCAGCA	AAAATTCCAGAATTCTCACTACGG
D1-18	D1Mit253	TCAAATAGCAGAGATTTATGGGG	GGTCTGCCCTTGTACATGGT
D1-19	D1Mit463	TTGTTATTGTTGTTACTGTTGGTGG	ATGACCTCAAATGTATACTATGGTG
D1-20	D1Mit206	TGAGGCACCTTTGTATTACAGC	CCAGATGTCTTTGAACATTCTCC

図 1

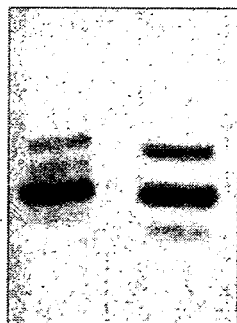
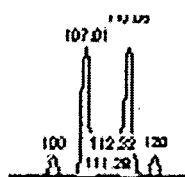


図 2



分担研究報告書

マルチプレックスPCR法を用いたウイルス検査に関する研究

分担研究者：清水 則夫（東京医科歯科大学准教授）

研究要旨

iPS細胞の登場により再生医療研究が加速されているのに伴い、ヒト培養細胞研究資源の重要性が増している。研究の質を高めるため、細胞株の品質管理法の確立が緊急且つ重要な課題である。特にヒト培養細胞研究資源へのウイルス汚染に関する検討は十分になされていない。培養細胞研究資源を使用した研究の質を高めるため、簡便・安価に多種類のウイルスを測定する手法を開発し、ヒト培養細胞研究資源のウイルス汚染の実態を把握し、適切に対処することが必要である。本研究では、多くのウイルスを同時に検出できる新しいウイルス検査系を構築し、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することを目的に昨年確立したDNAウイルスの検査系に加えて、RNAウイルスを10コピー/wellの感度で同時・半定量測定系の開発を行い、8種類のウイルスRNA(HIV-1, -2, HTLV-1, -2, HAV, HCV, HEV, GBV)の検出系を作成した。

A. : 研究目的

ヒトゲノムの研究や再生医療研究に用いるヒト培養細胞研究資源の重要性が著しく増している。実際、再生医療の研究にはヒト由来の多分化能を持った培養細胞の使用が欠かせないが、そのような培養細胞の細胞バンクへの寄託も増加傾向にある。今後、研究の質を高めるためには、ヒト培養細胞研究資源の品質管理法を確立し、研究に使用する培養細胞の品質管理を徹底することが求められる。細菌やマイコプラズマ汚染の検出は勿論必要であるが、加えてウイルス汚染状況に関する情報も重要である。実際、外国に細胞を

出荷する際には、ウイルス汚染状況に関する情報の添付を求められる事が多く、今後その必要性は増していくものと考えられる。

ウイルスは、細菌・真菌・マイコプラズマなどと違いその増殖には生きた細胞が必須であり、しかも細胞特異性が高いため、培養法により多種類のウイルスの有無を検査することは極めて難しい。したがって、PCR法などの核酸増幅法によりウイルスゲノムを直接検出することが必要となるが、その実用化には多くのウイルスを同時・高感度・安価に検出する新しい方法の確立が求められる。本