

表3 わが国の細胞バンクが確認したクロスコンタミネーションを起こしていた培養細胞一覧

登録番号 <sup>※1</sup>	細胞名 <sup>※2</sup>	細胞の由来	実在細胞名 <sup>※3</sup>	細胞の由来	文献	入手可否
JCRB/HSRRB細胞バンクにおける調査結果						
1	IFO50004	WISH 羊膜	HeLa	子宮頸癌	3) 4) 5)	可
2	IFO50039	NC-37 リンパ芽球 (男)	Raji	パーキットリンフォーマ (男)	5)	可
3	IFO50079	Flow7000 正常皮膚上皮 (男)	HeLa	微量HeLa混入, 問題解決済み		可
4	IFO50290	Marcus アストロサイトーマ (女)	RERF-LC-OK	肺癌		不可 <sup>※4</sup>
5	IFO50315	RMG-II 卵巣中腎腫	RMG-I	卵巣中腎腫		JCRB株を分譲 <sup>※5</sup>
6	IFO50318	RTSG 卵巣未分化腺癌	SNG-II	子宮内膜腫瘍		不可
7	IFO50319	RMUG-L 卵巣嚢胞腺癌	SNG-II	子宮内膜腫瘍		不可
8	IFO50344	SK-MG-1 星状細胞腫	RERF-LC-OK	肺癌 (女)		不可 <sup>※4</sup>
9	IFO50360	KNS-89 グリオブラストーマ (男)	U-251MG	アストロサイトーマ		不可
10	JCRB0067	Flow2000 正常皮膚上皮 (男)	不明	他所のFlow2000と一致せず		IFO株を分譲 <sup>※6</sup>
11	JCRB0073	J-111 単球性白血病細胞 (男)	HeLa	子宮頸癌	5) 11) 12)	可
(IFO50005)						
12	JCRB0092	P39/TSU 骨髄芽球性白血病 (男)	HL-60	単核球性白血病 (女)		不可
13	JCRB0122	KO51 骨髄芽球性白血病 (男)	K562	骨髄性白血病		不可
14	JCRB0127	KOSC-3 歯肉扁平上皮癌 (女)	Ca9-22	歯肉癌 (女)		不可
15	JCRB0128	TK-1 グリオブラストーマ (女)	U-251 MG	星状細胞腫 (男)		不可
16	JCRB0171	SKG-II 子宮頸癌	SNG-II	子宮内膜腫瘍		IFO株を分譲
17	JCRB175	SNG-II 子宮内膜腫瘍	SKG-II	子宮頸癌		IFO株を分譲
18	JCRB0224	WiDr 直腸癌 (女)	HT-29	直腸癌	12)	可
(IFO50043)						
19	JCRB0253	MKN28 胃癌 (女)	MKN-74	胃癌 (男)		可
20	JCRB0604	PSV811 ウェルナー, 上皮線維芽	WI-38	胎児肺正常細胞 (女)		不可
21	JCRB0710	EJ-1 膀胱癌 (男)	T24	膀胱癌 (女)	13) 14)	可
22	JCRB0744	ECV304 臍帯血上皮 (女)	T24	膀胱癌 (女)	13) 15)	不可
23	JCRB0811	RERF-LC-OK 肺癌 (女)	Marcus	星状細胞腫		不可
24	JCRB0823	YMB-1 乳癌	ZR-75-1	乳癌		可
25	JCRB0825	YMB-1-E 乳癌	ZR-75-1	乳癌		可
26	JCRB1013	KA-S1 腎盂癌	mouse	マウス		不可
27	JCRB1047	OVSAO 卵巣癌	OVMIU	相互取違えの可能性 <sup>※7</sup>		可
28	JCRB1049	OVMIU 卵巣癌	OVSAO	相互取違えの可能性 <sup>※7</sup>		可
29	JCRB1050	OVMIU-II 卵巣癌	なし	相互取違えの可能性 <sup>※7</sup>		可
30	JCRB1064	KYSE110 食道癌	KYSE200	食道癌		不可
31	JCRB1070	HSG c-C5 唾液腺 (男)	HeLa	子宮頸癌		可
32	JCRB1078	TMH-1 甲状腺癌 (女)	IHH-1	甲状腺癌 (男)		可
33	JCRB1127	HEC-155 子宮内膜漿液性腺癌	HEC-180	子宮内膜漿液性腺癌		可
34	JCRB9016	FL 羊膜由来正常細胞	HeLa	子宮頸癌	3) 4) 5) 11)	不可
35	JCRB9027	KB 口腔上皮癌	HeLa	子宮頸癌		可
36	JCRB9062	HS-sultan 形質細胞腫 (男)	Jiyoye	男性, パーキットリンフォーマ	5) 16)	可
37	JCRB9066	Chang Liver 肝臓癌	HeLa	子宮頸癌	3) 4) 5) 11)	可
(IFO50016)						
38	JCRB9094	DLD-1 大腸癌	HCT-15	大腸癌	17)	可 <sup>※8</sup>

(次ページに続く)

- ※1 細胞番号を示す記号。IFOは発酵研究所, JCRBは厚生労働省細胞バンク, RCBは理研細胞バンク。
- ※2 STR-PCR実験により(2)の細胞と同一細胞であると識別された細胞。樹立年や該当研究室への聞き取り調査を行い、実在していないと推定した細胞をこの欄に記載した。推定にあたっては両細胞の樹立年を重視し、(1)欄に記載した細胞を樹立する際に(2)欄に示した細胞が該当研究室に存在していたか否かを重視した。
- ※3 (1)の推定の結果、実在していると思われる細胞をこちらの欄に記載した。
- ※4 どちらかが正しい細胞が判明していない。SK-MG-1がMarcusの別名で、RERF-LC-OKが誤って同定された細胞である可能性も否定できない。
- ※5 JCRB0172.1 RMG-IIはユニークなのでJCRB株を分譲している。
- ※6 IFO50089: Flow2000はユニークなのでこの株を分譲している。
- ※7 OVMIUとOVMIU-IIは同一人から採取したと記載されているにもかかわらずSTR分析の結果、別人由来であることが確認されたが、同じ寄託者によって寄託されたOVSAOがOVMIUと一致した。細胞を維持する過程で取り違えが起こったものと考えられるが、このような場合は事情を理解して利用すればよいので分譲は継続している。
- ※8 現時点ではどちらが正しい株か推定できない。DLD-1が正しい細胞ということもありうる。

登録番号 <sup>#1</sup>	細胞名 <sup>#2</sup>	細胞の由来	実在細胞名 <sup>#3</sup>	細胞の由来	文献	入手可否
理研細胞バンクにおける調査結果						
39	RCB0004 RCB2276	HMV-1 メラノーマ	HeLa	子宮頸癌	<sup>#10</sup>	不可
40	RCB0077 RCB1457	HuL-1 胎児肝細胞	HeLa	子宮頸癌	<sup>#9</sup>	不可
41	RCB0100	HL111783 肺癌	HeLa	子宮頸癌	18)	不可
42	RCB0110	SQ-5 肺癌	HeLa	子宮頸癌	18)	不可
43	RCB0223	PSV811 ウェルナー症候群患者 上皮線維芽細胞	WI-38	胎児肺正常細胞	<sup>#9</sup>	不可
44	RCB0392	NCU-F5 Ectodermal dysplasia患者 皮膚細胞(女)	不明	Y染色体あり	18)	不可
45	RCB0408	AKI メラノーマ(男)	HeLa	子宮頸癌	18)	不可
46	RCB0442	SCCTF 舌癌	SCCKN	舌癌	18)	不可
47	RCB0445	Namalwa パーキエトリンパ腫	不明	他所のNamalwaと一致せず		不可
48	RCB0454	OST 骨肉腫	HeLa	子宮頸癌	<sup>#9</sup>	不可
49	RCB0458 RCB0491	Chang Liver 肝臓癌	HeLa	子宮頸癌	3) 4) 5) 11)	不可
50	RCB0460	HBL-100 乳癌(女)	不明	Y染色体あり	18)	不可
51	RCB0461	U251 グリオブラストーマ	U373-MG	グリオブラストーマ	<sup>#9</sup>	不可
52	RCB0465	Lu-130 肺癌	Lu-134	肺癌	18)	不可
53	RCB0553	Intestine 407 小腸上皮細胞	HeLa	子宮頸癌	<sup>#9</sup>	不可
54	RCB0640	TCO-1 子宮頸癌	TCS	子宮頸癌	18)	不可
55	RCB0656	HKMUS 子宮頸癌	SKG-II	子宮頸癌	18)	不可
56	RCB0686	HKMUS-SF 子宮頸癌	SKG-II	子宮頸癌	18)	不可
57	RCB0712	KMT-2 臍帯血由来単球系細胞	KG-1	急性骨髄性白血病	18)	不可
58	RCB0726	IMC-2 上顎癌(男)	HeLa	子宮頸癌	<sup>#10</sup>	不可
59	RCB0727	IMC-3 上顎癌(男)	HeLa	子宮頸癌	<sup>#10</sup>	不可
60	RCB0728	IMC-4 上顎癌(男)	HeLa	子宮頸癌	<sup>#10</sup>	不可
61	RCB0885	GT3TKB 胃癌	RERF-LC-AI	肺癌	18)	不可
62	RCB1000	MKN28 胃癌(女)	MKN74	胃癌(男)	<sup>#9</sup>	不可
63	RCB1019	T3M-12 肺癌	T3M-1	口腔癌		不可
64	RCB1201	Mashwa-1 シュワン細胞腫	MMAc	メラノーマ	18)	不可
65	RCB1202	BSCC-93 有棘細胞癌	DJM-1	毛包癌	18)	不可
66	RCB1288	MEK 肝臓癌(女)	不明	Y染色体あり		不可
67	RCB1289	ETK-1 胆管癌	SSP-25	胆管癌	18)	不可
68	RCB1318	KU-YS 神経芽細胞腫(男)	KU-SN	外胚葉性腫瘍(女)		不可
69	RCB1386	Mash-1 シュワン細胞腫	MMAc	メラノーマ	18)	不可
70	RCB1427	ABS-9 急性骨髄性白血病(女)	不明	Y染色体あり		不可
71	RCB1496	FU-RPNT-2 腎癌	FU-RPNT-1	腎癌		不可
72	RCB1711	HuL-1・P3 胎児肝細胞	HeLa	子宮頸癌	<sup>#9</sup>	不可
73	RCB1888	KB 口腔上皮癌	HeLa	子宮頸癌		不可
74	RCB1889	HEp-2 喉頭癌(男)	HeLa	子宮頸癌		不可
75	RCB1893	TE-7 食道癌	TE-2	食道癌		不可
76	RCB1908	WiDr-TC 直腸癌	不明	他所のWiDrと一致せず		不可
77	RCB1937	HPB-MLT T細胞白血病	HPB-ALL	急性リンパ性白血病		不可
78	RCB1944	KG-1 急性骨髄性白血病	mouse	マウス		不可
79	RCB1948	TE-2 食道癌	TE-7	食道癌		不可
80	RCB1957	DLD-1 大腸癌	HCT-15	大腸癌	17) <sup>#9</sup>	不可
81	RCB1958	HCT-15 大腸癌	DLD-1	大腸癌	17) <sup>#9</sup>	不可
82	RCB1961	LS174T 直腸癌	不明	他所のLS174Tと一致せず		不可
83	RCB1964	YMB-1-E 乳癌	ZR-75-1 (CRL1500)	乳癌		不可
84	RCB1984	CoLo-TC 大腸癌	COLO205	大腸癌		不可
85	RCB2096	PK-8 肺癌	不明	RCB1961 直腸癌と一致		不可
86	RCB2137	EJ-1 膀胱癌(男)	T24	膀胱癌(女)	13) 14) <sup>#9</sup>	不可
87	RCB2215	NCC-RbC-70 レチノブラストーマ	NCC-RbC-54	レチノブラストーマ		不可
88	RCB2236	HE15 胎児由来線維芽細胞	HE13	胎児由来線維芽細胞		不可
89	RCB2274	H-1H 口腔癌	HeLa	子宮頸癌		不可
90	RCB2275	HSGc-C5 唾液腺(男)	HeLa	子宮頸癌	<sup>#9</sup>	不可
91	RCB2349	USAC 骨肉腫	mouse	マウス		不可

※9 JCRBの調査と理研の調査で同じ結果となったもの。

※10 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) の結果と一致。

## おわりに

以上、クロスコンタミネーションが発生する原因と対応策についてのヒントを示したがぜひ参考にしていただきたい。それを前提に既存細胞を使う場合は細胞バンクなどの専門機関を上手に活用すべきである。9カ条にも「細胞は十分な検査体制が整っている細胞バンクから入手すべきである」とある。とはいえ、バンクから入手した後は各自の責任となるので先に述べたヒントを参考にクロスコンタミを発生させないように十分注意して培養していただきたい。

研究の進歩は急で、新しい細胞の樹立も日々進んでいる。そのため、公的バンクには寄託されていない細胞も多数存在するが、そのような細胞は樹立した研究者の責任において十分に確認しておくことが重要である。9カ条には「検査をせずに細胞のやりとりをすることは止めるように」と述べられている。もちろん、研究者同士の材料のやりとりを禁止するのは研究の発展を妨げるので好ましくない。しかし、クロスコンタミネーションの頻繁な発生が明らかになった以上、細胞を提供する側も受け取る側も熟慮した対策をとる必要がある。日本組織培養学会の細胞バンク委員会や教育システム委員会ではこうした問題について検討しているので、そうしたところから寄せられる情報にも目を配っていただき、クロスコンタミネーションが発生する原理をよく理解してその防止に努め、実り多い研究に邁進していただきたい。

## 文献

- 1) Gey, G. O. et al. : *Cancer Res.* 12 : 264-265, 1952
- 2) Gartler, S. M. : *Nature*, 217 : 750-751, 1968
- 3) Lavappa, K. S. : *In Vitro Cell Dev. Biol.* 14 : 469-475, 1978
- 4) Lavappa, K. S. et al. : *Nature*, 259 : 211-213, 1976
- 5) Hay, R. J. et al. : *Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, 6 : 1988
- 6) Jeffreys, A. J. et al. : *Nature*, 316 : 76-79, 1985
- 7) Hammond, H. A. et al. : *Am. J. Hum. Genet.* 55 : 175-189, 1994
- 8) Kimpton, C. P. et al. : *PCR Methods Appl.* 3 : 13-22, 1993
- 9) Masters, J. R. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 8012-8017, 2001
- 10) Chatterjee, R. : *Science*, 315 : 928-931, 2007
- 11) Honma, M. et al. : *In Vitro Cell Dev. Biol.* 28A : 24-28, 1992
- 12) Lavappa, K. S. et al. : *Am. J. Hum. Genet.* 29 : 67A-67A, 1977
- 13) Tanabe, H. et al. : *Tiss. Cult. Res. Commun.* 18 : 329-338, 1999
- 14) O'Toole, C. M. et al. : *Nature*, 301 : 429-439, 1983
- 15) Dirks, W. G. et al. : *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 35 : 558-559, 1999
- 16) Drexler, H. G. et al. : *Blood*, 98 : 3495-3496, 2001
- 17) Chen, T. R. et al. : *Cancer Genet. Cytogenet.* 81 : 103-108, 1995
- 18) Yoshino, K. et al. : *Hum. Cell.* 19 : 43-48, 2006

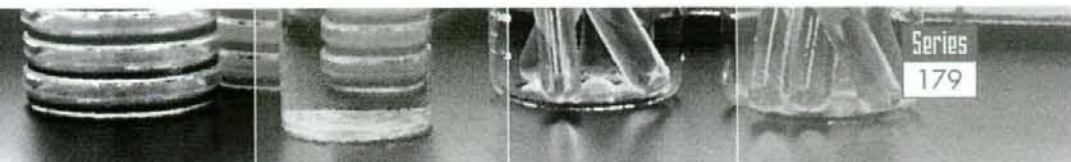
## Profile

著者プロフィール

わが国では生命科学の基盤整備の一環として1985年頃から細胞バンクの設置がはじまり、JCRB細胞バンクや理研細胞バンクなどの公的バンクが設立された。公的バンクの使命は、研究資源の収集に加えて収集資源の正当性を確認してから提供する体制を確立することにある。こうした体制を確立するには、多くの担当者が相互に協力し合う有機的な体制を整備することが必要で、本小論の著者は細胞のクロスコンタミネーションの解決に直接かかわっているメンバーである。

## STR 分析によるヒト培養細胞の迅速同定法 —培養細胞のクロスコンタミネーション防止のために—

水澤 博, 小澤 裕, 増井 徹, 平田 誠, 小原有弘



### はじめに

生物は、ゲノム (n) によって性質が特徴付けられており、高等動物のゲノムは n が対になったセット (2n) として存在している。このゲノムに乗っている遺伝子の様子 (遺伝子型) は交配実験を通じて知ることができるが、手間暇のかかる作業を必要とする。これに対し、1960年代に台頭した微生物研究材料ではゲノムを1セット (n) しかもたないという特徴と当時発見された生化学的マーカーによって遺伝子型を迅速に同定できるようになり、それを確認してから実験をはじめるといった実験手順が確立した。これは分子生物学を精密科学とすることに貢献したが、その後高等生物に由来する培養細胞に研究の主役が移ると、再び2nというゲノム構成に戻ったうえに交配実験ができない材料であったことから、遺伝子型を確認することが再度困難になった。そのため、遺伝子型を確認してから実験を開始するという手順は消えてしまうことになり、培養細胞の管理は実験実施者の技量にのみ頼ることになった。そのためクロスコンタミネーションの多発が懸念されたがしばらくその解決策は見出されなかった。

ところで、1980年代に入ると分子生物学研究の実用化が進み、PCR法の開発や制限酵素切断断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) の発見などによって遺伝子型を迅速かつ精密に分析する技術が確立し (STR-PCRはこうした技術の一つ) ヒト培養細胞の迅速同定が可能になった<sup>1)~4)</sup>。各国の細胞バンクでは2000年頃からこの方法を導入してヒト培養細胞の調査を開始した結果、かなりの細胞に誤りがあることが明らかになった (misidentified cell lines)。わが国でもJCRB細胞バンクや理研細胞バンクが合わせて100種近くの培養細胞が誤って同定されていたことを明らかにした<sup>5)</sup>。欧米はこの事態に危機感を強めており<sup>6)</sup>、論文の投稿やグラントの申請の際に細胞を確認するデータ (authentication) の添付を求める声も出はじめている。2007年末に山中らがiPS細胞を発表して大いに話題をよんだが、この論文では樹立したiPS細胞が出発材料と同一であることをSTR分析によって確認している<sup>7)</sup>。今後重要な研究とみなされればみなされるほどこうした点が重視されるようになることは必至であり、ここに細胞を確認する実験法 (STR-PCR) の概要を紹介する。

### Quick identification of cultured human cells by the PCR based STR analysis method — Prevention of the cross culture contaminations —

Hiroshi Mizusawa/Yutaka Ozawa/Tohru Masui/Makoto Hirata/Arihiro Kohara: JCRB Cell Bank Laboratory of Cell Resources, Division of Biological Research Resources, National Institute of Biomedical Innovation [JCRB細胞バンク (<http://cellbank.nibio.go.jp/>) 医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室<sup>1)</sup>/遺伝子資源研究室<sup>2)</sup>] E-mail: cell@nibio.go.jp, Phone: 072-641-9851, Fax: 072-641-9851 (小原有弘)

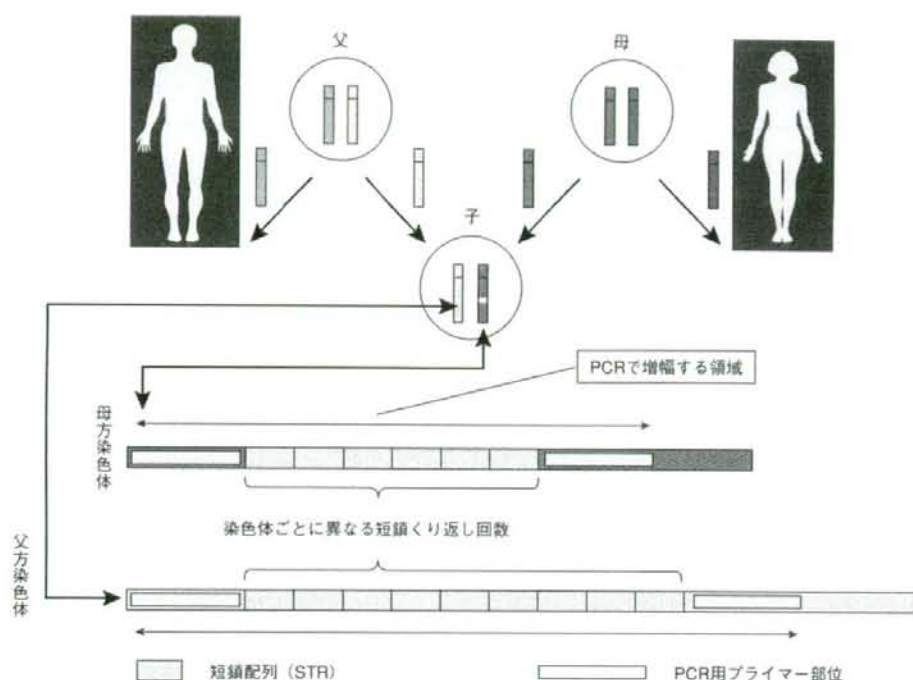


図1 短鎖反復回数の検出原理 (STR-PCR法)

細胞のなかには母方と父方から1本ずつ受け継いだ染色体が対になって存在し、それぞれに短鎖反復配列が存在し対になっている。短鎖反復配列は、反復回数多型性を示し父方と母方の染色体で異なることが多い。図では母方で6回、父方で9回となっている。反復配列の外側にPCR反応のプライマー部位が設定されていて、そこからPCR反応で増幅するので、増幅産物の長さを正確に測定できれば正確な反復回数を知ることができる

## ヒト培養細胞の識別同定実験

### 1) PCR法を利用したSTR分析によるヒト細胞の個別識別

STRはshort tandem repeatの略で、2から7塩基長程度の短いDNA配列がくり返し(10から20回程度)出現する染色体領域を指す(図1)。この特徴をもつ配列はヒトゲノム上に広く分布し1万カ所以上存在するともいわれており、反復回数において多型性を示す(図1)ことからこれを応用した個人識別技術が開発され(DNAフィンガープリント)、法医学分野での活用がはじまった。

この方法は、その原理からヒト培養細胞の識別同定に利用できることは明らかで、1999年ごろから世界

各地の細胞バンクが次々と採用し、クロスコンタミネーションを調査するツールとして定着した。これに使える領域はDNA上に多数存在するが、研究用ヒト培養細胞の識別においてはプロメテック社のPowerPlex<sup>®</sup> 1.2 Systemが世界各国の細胞バンクで採用されて事実上の標準となった。このシステムではD5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX, CSF1POの8カ所のSTRローカスと性別を判定する1つのマーカー遺伝子、Amelogenin, を標的にしている(表1)。

PowerPlex<sup>®</sup> 1.2 Systemは9カ所のローカスを2グループに分けて異なる蛍光色素(FL: fluorescein, TMR: carboxy-tetramethylrhodamine)を含む標識プライマーで増幅し、各ローカスの増幅フラグメント

表1 ヒト培養細胞の個別識別に利用する8カ所のSTR領域と性別判定用の標的遺伝子

STR領域	蛍光標識の種類	染色体上の位置	遺伝子の定義	反復配列単位
D5S818	FL	5q21-q31	非遺伝子領域	AGAT
D13S317	FL	13q22-q31	非遺伝子領域	AGAT
D7S820	FL	7q11.21-q11.22	非遺伝子領域	AGAT
D16S539	FL	16q24-qter	非遺伝子領域	AGAT
vWA	TMR	12p12-pter	HUMVWFA31	AGAT
TH01	TMR	11p15.5	HUMTH01	AATG
Amelogenin X	TMR	Xp22.1-22.3	HUMAMEL (X)	非反復配列
Y	TMR	Yp11.2	Amelogenin-like-protein (Y)	非反復配列
TPOX	TMR	2p23-2pter	HUMTPOX	AATG
CSF1PO	TMR	5q33.3-q34	c-fms proto-oncogene	AGAT

Power Plex® 1.2 (プロメガ社)

が他の増幅フラグメントと区別できる長さに調整されており、9カ所の遺伝子型を1回の実験で分析できるようにデザインされている。最近、これに7カ所の遺伝子座をさらに追加して精度を高めたPowerPlex® 16 Systemやマイコプラズマの有無も同時に検査できるようにしたキットが開発されたが、原理は共通なので本稿ではPowerPlex® 1.2 Systemを使った例を紹介する。

増幅したPCR産物の検出にはアガロースゲル電気泳動を利用することも不可能ではないが、キャピラリーシステムによるジェネティックアナライザーの利用が便利である。JCRB細胞バンクではABI PRISM®310 Genetic Analyzerを使用している。実験はキット化されているので容易に扱えるが、一つひとつの実験行程を十分理解してから実験に取りかかるよう心がけ、キットに同梱されている説明書を十分に読んでいただきたい。実験手順の概略は以下のとおりである。詳細はプロトコルを参照されたい。

この実験では各研究者が使っているヒト培養細胞のトータルDNAを調査対象とする。このDNAにPowerPlex® 1.2 System実験キットのプライマーを加えてSTR領域をPCRで増幅し、増幅したDNA断片のサイズをジェネティックアナライザーで分析する。これにより増幅産物の長さを精密に測定し、その長さから各ローカスの短鎖の反復回数を正確に求める。ABI PRISM®310 Genetic Analyzerを使用する場合はGene MapperでSTRを分析し、図2のチャートを出力する。図2はHL60 (JCRB0085)を解析した例で、

D5S818ローカスの12回反復をはじめとして各ローカスの反復回数が計算されてチャートに表示される。このチャートから得られた各ローカスの反復回数を表にしたのが図3の1行目である(2行目以降は他の細胞のデータ)。

## 2) 実験結果のデータベース化と比較分析

図3は、さまざまなヒト培養細胞のSTR分析データを表にしたものである。ローカスごとの短鎖反復回数を各ローカスに対応させて「12」や「11,14」のように反復回数を記述している。1つのローカスに複数のピークが観察される場合はカンマで区切って全部記載する(表2)。

この結果はデータベース化しやすく(図3)、比較的簡単な計算式で細胞相互の遺伝的類似度を計算するのに利用できる。比較の結果一致する細胞がなければその細胞はユニークな細胞であることを示し<sup>8) 9)</sup>、一致した細胞が出現すればクロスコンタミネーションの可能性が高いということとなる。理論的考察によればこの方法は1億人から2億人に1人を識別することが可能であり<sup>10) 11)</sup>、数千種ほどのヒト培養細胞を区別するには十分であると考えられている。

クロスコンタミネーションの有無はSTR実験もとに図3に示したデータベースを利用して2種の細胞間の比較をくり返すという方法で行う。比較元となる細胞を1つ選び、これを他のすべてのヒト細胞と比較する。図3では1行目が比較元の細胞で、2行目以降が比較先となる。比較は

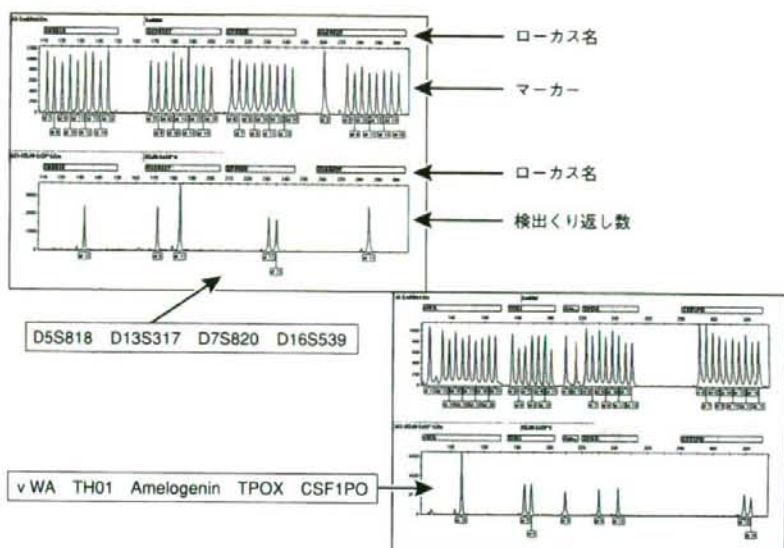


図2 シークエンスアナライザーによるフラグメント解析結果

この図は、ABI PRISM® 310 Genetic AnalyzerによってDNAフラグメントを分離した後、各フラグメントをGeneMapperによって解析しチャートとして出力したものである。実験は1回であるが使用した蛍光色素によって2群に分けて解析されるために2枚のチャートが出力される。それぞれのチャートには、マーカーのラダーと調査対象の細胞のピークが出力されており、マーカーの位置から反復回数が正確に算出される。短鎖の反復回数は各ピークの下に囲み文字で表示される(見やすい画像とするために異なるロット番号のデータをはめ込んだ。結果に差はない)

$$\text{評価値 (EV)} = \frac{\text{2種の細胞間でピークの出現位置(反復回数)が一致した場合の数} \times 2}{\text{2種の細胞で観察されたピークの総数}}$$

という式によってEV(評価値, evaluation value)を求めて判定する。図3は求めたEVを大きい順に並べて細胞番号や細胞名をともに示している。この式で2種の細胞が完全に一致していればEVは1.0となり、まったく一致していなければ0.0となる。通常EVが0.9以上の場合は同一細胞で、0.7付近まで下っていれば異なる細胞であると判定する。EVがその間となる場合はヒストグラムなどを作成して判定するが、必要に応じて再実験や他の解析方法も考慮する。そこで図3をみると7行目のJCRB0092:P39/TSUのEVは0.933でHL60と同一細胞であると判定できる。P39/TSUは

新規細胞として当初発表されており、クロスコンタミネーションの事例と判定した。なお、次の8行目のJCRB0140:NCE16はHL60との間のEVは0.714で、この値からNCE16はHL60ではないと判定した。このように、基準にした1つの細胞と他のすべての細胞をコンピュータの助けを借りて比較することによってクロスコンタミネーションの有無を迅速に確認して誤って同定された細胞を排除することができる。

### 3) 培養細胞のSTRデータベースと比較プログラムの利用

本稿では培養細胞のSTRデータを得るプロトコルについては以下に紹介するが、データが得られても比較対象となるデータや比較プログラムが無ければ実験の意味は半減するし、かといって個々の研究者に多数の比較対象のSTRデータを作成することまで要求するのは現実的ではない。したがって、データベースやそれを検索するプログラムが利用できる体制を整え

比較元細胞													
CellNo.	CellName	CellNo.	EV	STR1	STR2	STR3	STR4	STR5	STR6	STR7	STR8	STR9	STR10
1	JCRB000	HL60	1000	12	8,11	11,12	11	16	8,8	X	8,11	13,14	
2	JCRB001	HL60-1	1001	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
3	JCRB002	HL60-2	1002	12	8,11	11,12	11	16	8	Y	8,11	13,14	
4	JCRB003	HL60-3	1003	12	8,11	11,12	11	16	8	X	8,11	13,14	
5	JCRB004	HL60-4	1004	12	8,11	11,12	11	16	9	Y	8,11	13,14	
6	JCRB005	HL60-5	1005	12	8,11	11,12	11	16	8	X	8,11	13,14	
7	JCRB006	HL60-6	1006	12	8,11	11,12	11	16,16	7,8	X	8,11	13,14	
8	JCRB007	HL60-7	1007	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
9	JCRB008	HL60-8	1008	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
10	JCRB009	HL60-9	1009	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
11	JCRB010	HL60-10	1010	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
12	JCRB011	HL60-11	1011	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
13	JCRB012	HL60-12	1012	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
14	JCRB013	HL60-13	1013	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
15	JCRB014	HL60-14	1014	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
16	JCRB015	HL60-15	1015	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
17	JCRB016	HL60-16	1016	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
18	JCRB017	HL60-17	1017	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
19	JCRB018	HL60-18	1018	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
20	JCRB019	HL60-19	1019	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	
21	JCRB020	HL60-20	1020	12	8,11	11,12	11	16	7,8	X	8,11	13,14	

図3 STR分析データベースを利用した細胞間の遺伝子型比較例(約700種の比較)  
 図の1行目の細胞(基準細胞)を元に2行目以下の細胞と比較した結果を一覧表で示した(比較は本文で説明)。左から5番目のカラムのEVが比較計算の結果で評価値(evaluation value)とよぶ、この数字を大きい順にソートして並べたのがこの図で、細胞バンクで収集した700種の細胞の結果のうち上位9種のみを示した。EVO.9以上なら間違いなく同じ細胞、0.7以下なら間違いなく異なる細胞であると判定できるが、その間の結果の場合はヒストグラムを作成したり別の実験を組み合わせたりしながら判定する

ることは重要であり、それを研究基盤として整備することは公的な細胞バンクの責務であるだろう。そこでわれわれは、JCRB細胞バンクに登録している600種類ほどのヒト培養細胞に関するSTRデータを公開して(<http://cellbank.nibio.go.jp/str2/top.html>)一般研究者が利用できるようにした。比較プログラムのコアは共通であるが比較方法に次の3つのパターンを準備したので目的に応じて利用されたい。①、②は細胞バンクで作成したSTRデータを相互に比較するもので、③は利用者データと細胞バンクのデータを比較するものである。

#### ①単純比較

細胞バンクのSTRデータを収録したデータベースから1つの細胞を選択して他のすべての細胞と比較する単純比較である。ここでは細胞バンクで収集した細胞のSTRデータを公開して一般利用者に直接確認してもらおうことを目的としている。

#### ②相互指定比較

特定の細胞の間だけで類似度を比較するのが目的である。ここでは①と違い、比較したい複数の細胞のみをピックアップしてその間だけで比較を行う。

#### ③ユーザーデータの検証

上記①と②は、比較元も比較先もデータベースに記

表2 論文等への記述例 HL60 (JCRB0085)

ローカス名	検出ピーク
D5S818	: 12
D13S317	: 8, 11
D7S820	: 11, 12
D16S539	: 11
vWA	: 16
TH01	: 7, 8
Amelogenin	: X
TPOX	: 8, 11
CSFIPO	: 13, 14

録されたデータだけを使用するもので、ユーザーデータは利用できない。そこでユーザーデータを入力してバンクのデータと比較するのがこの検証プログラムである。著名な細胞についてはATCC, DSMZ, RCBなどのデータも比較のために含めている。

これらのシステムで利用しているデータベースは個人情報保護等の倫理的課題を避けるために株化された細胞のみを収録している<sup>12)</sup>。ATCCも類似したSTR検索システムを公開しており、ドイツのDSMZでも似たような考え方を持っているとのことである。今後STRデータを確認してクロスコンタミネーションを防止する環境はより整備されることになるであろう。



## 準備

### 1 実験材料

培養細胞（細胞懸濁液  $1 \times 10^6$  cells/mL）

### 2 試薬およびキット

- FTA® Elute（ろ紙，ワットマンジャパン社）
- PowerPlex® 1.2 System（プロメガ社）
- ヌクレアーゼフリー蒸留水
- EDTA 含有 10× Genetic Analyzer 用緩衝液（アプライドバイオシステムズ社）
- 脱イオン化ホルムアミド（アムレスコ社，Ultra Pure Grade，カタログ番号 0606）
- Performance Optimized Polymer 4（POP-4，アプライドバイオシステムズ社）
- AmpliTaq Gold® DNA polymerase（アプライドバイオシステムズ社）

### 3 器具

- ABI PRISM®310 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ社）
- 310 Genetic Analysis Capillary, 47 cm × 50 μm（アプライドバイオシステムズ社）\*1
- 310 Glass Syringe（1.0mL）
- サンプルチューブとセプタム（中ブタ）（アプライドバイオシステムズ社）
- GeneAmp® PCR System 9700（アプライドバイオシステムズ社）
- 微量高速遠心機
- 0.2mL（薄壁）微量遠心チューブ（アプライドバイオシステムズ社）
- 1.5mL 褐色微量遠心チューブ（フィッシャー社，カタログ番号 05-402-26）
- エアロゾールバリアーピペットチップ
- その他，ヒートブロック，恒温槽など

\*1 PowerPlex® 1.2 System を使用する前に PowerPlex® Matrix Standards, 310（カタログ番号 DG4640）を使用してマトリックスの標準化を行っておく。

## プロトコール

### 1 DNAの抽出と精製 (FTA® Eluteを使用) ※2

- ① 細胞懸濁液 ( $1 \times 10^6$  cells/mL) を, FTAろ紙上に記された直径10 mmほどの円の中心に滴下する (約40  $\mu$ L) ※3.
- ② 室温で3時間ほど放置して乾燥させる (乾燥したフィルターは長期保存可能) ※4.
- ③ 細胞懸濁液が吸着している中心部分を直径3 mmの専用切り取り器で打ち抜き, 滅菌した1.5 mLのエッペンドルフチューブに入れる.
- ④ ここに500  $\mu$ Lの滅菌水を加えてすぐに3回, 合計5秒ほどボルテックスミキサーで強く攪拌してろ紙を洗う.
- ⑤ 滅菌したピペットでろ紙を30  $\mu$ Lの滅菌水が入った0.2 mLのチューブに移し, 10秒間遠心してろ紙を完全に水中に沈める.
- ⑥ ⑤のろ紙を沈めたチューブを95°Cで, 30分加熱する.
- ⑦ 加熱後, ボルテックスミキサーにより約60回強く攪拌する.
- ⑧ 遠心によりろ紙を溶出液と分離する ※5.
- ⑨ 滅菌ピペットでろ紙を取り出して廃棄する.
- ⑩ 溶出したDNAが検査対象の鋳型DNAとなる, これを-20°Cで使用するまで保管する.

※2 STRタイピングでは増幅産物の大きさが500bp未満であり, 分解を受けたDNAテンプレートの利用に関しては柔軟に対応できる. また, 本方法ではPCRを行うことはできてもザンプロット法に使うほど多量のDNAは得られない. 他にもDNA迅速精製法はあるがその多くはSTRタイピングに利用することが可能である.

※3 ろ紙上にはDNA抽出用の試薬が塗布されているので, 滴下するサンプルが試薬とよく馴染むよう小面積に集中させずに分散させるのがコツである.

※4 細胞を吸着させた乾燥FTAろ紙は郵送可能なので細胞DNAの分析を他所に依頼するのは容易である. JCRB細胞バンクに分析を依頼するとFTAろ紙が送付されるので細胞を吸着させて返送する. 複数の細胞の分析を依頼する場合は細胞滴下面が接触しないよう1枚ずつ袋に入れて送付する.

※5 DNAは溶出液に含まれる.

### 2 PCR法によるSTR領域の増幅

#### 【1. PowerPlex® 1.2 SystemによるDNAの増幅】

- ① 凍結保存されているGold ST★R 10×BufferとPowerPlex® 1.2 10×Primer Pair Mixを氷水上で解凍する.
- ② PCR実験の反応液は1本あたり25  $\mu$ Lで表3の組成である. この反応液は①-④で作製した鋳型DNAを2.5  $\mu$ L (0.5~1 ngDNA) 含む ※6.

表3 Power Plex® 1.2 System用のPCR増幅反応液の組成

反応液の名称	添加量
1) ヌクレアーゼフリー蒸留水	16.7 $\mu$ L
2) Gold ST★R 10×Buffer	2.5 $\mu$ L
3) PowerPlex® 1.2 10×Primer Pair Mix	2.5 $\mu$ L
4) AmpliTaq Gold® DNA polymerase	0.8 $\mu$ L (4u)
1)から4)までがマスターミックス	全量 22.5 $\mu$ L
5) 反応直前に添加する鋳型DNA (0.5~1.0 ng)	2.5 $\mu$ L
	全反応液量 25 $\mu$ L

AmpliTaq Gold® DNA Polymeraseが5u/ $\mu$ Lの時の液量. 酵素濃度が異なる場合はヌクレアーゼフリー蒸留水で量を調整して常に反応液量が25  $\mu$ Lとなるようにする.

※6 これより多いテンプレート量を必要とする場合は水の添加量を減らして調節する.

- ③ 実験ごとに必要な反応液の本数を確認して表3のPCRマスターミックスの必要量を計算して調整する<sup>※7</sup>。
- ④ 1.5 mLの滅菌褐色チューブでマスターミックスを作製して穏やかに混和する。マスターミックスには蛍光試薬が含まれるのであるべく光にさらさないよう注意する。
- ⑤ PCR反応を行うエッペンドルフチューブに、マスターミックスを22.5  $\mu$ Lずつ分注する。
- ⑥ マスターミックスを分注したチューブに、鋳型DNAを2.5  $\mu$ L (0.5 ~ 1 ngのDNAを含む) ずつ加える。
- ⑦ 陽性増幅対照にはJCRB9004 HeLaの鋳型DNA2.5  $\mu$ Lを使用し、陰性増幅対照にはスクレアーズフリー蒸留水を使用する。
- ⑧ サーマルサイクラーにより表4のスケジュールでPCR反応を行う(われわれはGeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700を使用)。

表4 PCR反応の条件

GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 9700 Thermal によるPCR反応
反応液(表3)を95℃で11分間静置した後、温度を96℃に上げて1分間置いてから次の温度サイクルを指定回数だけくり返す
$\left\{ \begin{array}{l} 94℃に温度を下げて30秒間置く \\ \text{その後68秒間で60℃まで温度を下げて30秒間維持した後} \\ 50秒間で70℃まで温度を上げて45秒間維持する \end{array} \right.$ これを10サイクルくり返した後、
$\left\{ \begin{array}{l} 90℃に温度を下げて30秒間置く \\ \text{その後60秒間で60℃まで温度を下げて30秒間維持した後} \\ 50秒間で70℃まで温度を上げて45秒間維持する \end{array} \right.$ これを20サイクルくり返した後、 60℃で30分間維持してから、4℃に温度を下げて次の実験に使用する

- ⑨ PCR反応が完了したらサンプルを暗箱で遮光して-20℃で保存する。

## 【II. ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer<sup>®</sup>による増幅断片の検出と分析】

- ① 1本の分析に蛍光ラダー溶液<sup>※9</sup>(CXR) 1.0  $\mu$ Lと脱イオン化ホルムアミド<sup>※10</sup> 24.0  $\mu$ Lを混合(25  $\mu$ L)してローディングカクテルとするので、分析する全本数に必要な容量を計算してあらかじめ混合しておく。
- ② 調製したローディングカクテル25.0  $\mu$ Lと増幅したDNAサンプル(② I-⑤)の1.0  $\mu$ Lを混合する。
- ③ ①で調製したローディングカクテル25.0  $\mu$ Lにキット(PowerPlex<sup>®</sup> 1.2)に含まれるアレリックラダーミックスを1.0  $\mu$ L加える。

※7 1サンプル当たりのマスターミックス量(22.5  $\mu$ L)に総反応数を乗じてマスターミックスの全量( $\mu$ L)とする。

※8 ABI PRISM 310 Genetic Analyzerは気温の影響を強く受けるので空調設備がしっかりした部屋に設置するのが望ましい(20 ~ 22℃くらいで安定した結果が得られる)。

※9 PowerPlex<sup>®</sup> 1.2 Systemには、増幅サンプルの位置を補正するために泳動キャピラリの内部標準(ILS: internal lane standard)として使う60から400塩基対の間に出現する蛍光ラダー(CXR: carboxy-X-Rhodamine)がキットに含まれている。

※10 ホルムアミドの品質は検出結果に大きな影響を及ぼすので、伝導率が100  $\mu$ S/cm未満の脱イオン化ホルムアミドを使用する。伝導率が100  $\mu$ S/cmを上回るホルムアミドは検出感度を著しく低下させる。

- ④ サンプル②とアレリックラダー③とも95℃で3分間加熱して変性させた後直ちに氷水上に移して3分間冷却する。
- ⑤ ABI PRISM® 310 Genetic Analyzerにて泳動を開始する。
- ⑥ GeneMapper®を用いてデータを解析する。解析結果は図2のようなチャートとして出力される<sup>※1)</sup>。

※1) GeneMapperは、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzerでフラグメント解析を行うための専用ソフトウェアだが標準では添付されないため別途購入する。このソフトウェアを通して図2のデータが出力される。初期のABI PRISM® 310 Genetic Analyzerではマッキントッシュが制御用コンピュータとして使われGenoTyperがSTRの解析に使われていた。後に制御用コンピュータがWindowsに変更されてから提供されたのがGeneMapperである。図2はGenoTyperにより得られたものである。

## ● クロスコンタミネーション防止の姿勢

最後に、クロスコンタミネーションを防止する方法について提言をする。まずは培養細胞が他の細胞に混入してゆく経路を考察することが重要である。培養の専門家は2種類の細胞の人為的なニアミスこそが問題であり、ごく普通に行っている操作のなかに潜んでいると考えている。ピペットの往復と培地の使い回しがそれにあたる。詳細はすでに紹介した<sup>3)</sup>が、一度使ったピペットの先端はいかなる言い訳があろうとも汚染されたということを新しい常識にするべきことを強調しておきたい。そのため、培地、添加物、トリプシンなど細胞培養に使用するあらゆる試薬は個々の細胞に専用とし、十分に量があることを確認してから日々の実験に望む姿勢を確立する必要がある（これは実験前に必要量を分注してから使うことで専用ができる）。ちなみに、この注意はマイコプラズマ汚染の防止とも共通していることも、あわせて指摘しておきたい。

## 文献

- 1) Jeffreys, A. J. et al.: Nature, 314: 67-73, 1985
- 2) Edwards, A. et al.: Am. J. Hum. Genet., 49: 746-756, 1991

- 3) Alford, R. L. et al.: Am. J. Hum. Genet., 55: 190-195, 1994
- 4) Hammond, H. A. et al.: Am. J. Hum. Genet., 55: 175-189, 1994
- 5) 水澤 博 他: 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, 26: 561-567, 2008
- 6) Chatterjee, R.: Science, 315: 928-931, 2007
- 7) Takahashi, K. et al.: Cell, 131: 861-872, 2007
- 8) Masters, J. R. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 8012-8017, 2001
- 9) Tanabe, H. et al.: Tiss. Cult. Res. Commun., 18: 329-338, 1999
- 10) Jones, D. A.: J. Forensic Sci. Soc., 12: 355-359, 1972
- 11) Lins, A. M. et al.: J. Forensic Sci., 43: 1168-1180, 1998
- 12) 水澤 博 他: ヒト培養細胞: 科学と倫理のジレンマ。科学, 71: 1601-1607, 2001

## ■ 著者プロフィール ■

この記事の著者は、細胞バンクにおいてヒト由来培養細胞の同定識別を担当しているチームのメンバーである。当細胞バンクではそれぞれの得意分野と経験を活かして細胞の同定識別システムを総合的に整備している。各著者の担当課題は次の通りである。水澤: 統括管理と企画。小沢・小原: 実験の実施と技術改良。平田: コンピュータによるデータ解析とWEB公開方法の開発。増井: 倫理問題（患者個人情報保護等）の監視と解決策提案。

Vol.26 No.7 (2008年4月発行)

生命研究への応用と開発が進む

## バイオデータベースとソフトウェア最前線

DNA解析からRNA・タンパク質の機能解明, エピジェネティクス研究, システム生物学と誰もが使う文献検索の新機能

編集/森下真一, 阿久津達也 226頁 ISBN978-4-7581-0290-2

目次 1章 DNA / 2章 RNA / 3章 タンパク質 / 4章 エピジェネティクス / 5章 システム生物学 / 6章 文献検索とゲノム言語

活用成果から新機能紹介  
まで最新情報が満載です!



詳しくは本誌 巻付ページへ

近刊 Vol.26 No.10 (2008年6月発行予定)

## RNAの機能解明と医療応用

最新の解析戦略と機能性RNAの知見から, RNA異常と疾患の関わり, RNA医薬・診断への応用まで

編集/林崎良英, 安田 純 約230頁 ISBN978-4-7581-0291-9

目次 1章 哺乳類トランスクリプトーム解析とRNA新大陸  
2章 機能性RNAの生理学  
3章 RNAからみた疾病  
4章 医療応用をめざすRNA研究

既刊 定価(本体5,400円+税) [B5判]



Vol.26 No.5 (2008年3月発行)

## 再生医療へ進む 最先端の幹細胞研究

注目のiPS・ES・間葉系幹細胞などの分化・誘導の基礎と, 各種疾患への臨床応用

編集/山中伸弥, 中内啓光  
235頁 ISBN978-4-7581-0289-6



Vol.26 No.2 (2008年1月発行)

## 細胞内の輪廻転生 タンパク質の分解機構

ユビキチン, プロテアソーム, オートファジー, プロテオリスなど分解装置の作動機構と病態生理作用

編集/田中啓二  
234頁 ISBN978-4-7581-0288-9



Vol.25 No.20 (2007年11月発行)

## 粘膜免疫からの 感染と免疫応答機構

体の入口から呼吸器・消化器, 生殖器, 皮膚までの制御システム

編集/清野 宏  
217頁 ISBN978-4-7581-0287-2



Vol.25 No.17 (2007年10月発行)

## 分子レベルから迫る 癌診断研究~臨床応用への挑戦~

遺伝子多型・発現解析やエピジェネティクス・プロテオミクス・糖鎖・イメージングを駆使した前駆的診断研究を構築

監修/中村祐輔  
編集/牛島俊和, 片桐豊穂, 山田哲司, 近藤科江  
232頁 ISBN978-4-7581-0286-5



Vol.25 No.15 (2007年9月発行)

## 解明が進む メタボリックシンドローム

脂肪細胞の機能からエネルギー代謝・摂食・心血管系の制御機構, 予防と治療まで

編集/春日雅人, 伊藤 裕, 尾越靖彦  
240頁 ISBN978-4-7581-0285-8



Vol.25 No.13 (2007年7月発行)

## 脳神経疾患の 分子病態と治療への展開

アルツハイマー病, パーキンソン病, 発達障害, 精神疾患などの発症メカニズムを分子から解く

編集/貫名信行, 西川 徹  
218頁 ISBN978-4-7581-0284-1

発行 羊土社

〒101-0052  
東京都千代田区神田小川町2-6-1  
TEL 03(5282)1211  
E-mail: eigo@yodosh.co.jp

ご注文は最寄りの書店, または小社営業部まで

FAX 03(5282)1212  
URL: http://www.yodosh.co.jp/

## Type 2 Diabetes Mellitus in a Non-Obese Mouse Model Induced by Meg1/Grb10 Overexpression

Yoshie YAMAMOTO<sup>1,2)</sup>, Fumitoshi ISHINO<sup>3)</sup>, Tomoko KANEKO-ISHINO<sup>4)</sup>, Hirotsuke SHIURA<sup>3)</sup>, Kozue UCHIO-YAMADA<sup>5)</sup>, Junichiro MATSUDA<sup>5)</sup>, Osamu SUZUKI<sup>5)</sup>, and Katsunori SATO<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 1–23–1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, <sup>2)</sup>Okayama University Graduate School of Natural Science and Technology, 3–1–1 Tsushima-naka, Okayamashi, Okayama 700-8530, <sup>3)</sup>Department of Epigenetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1–5–45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, <sup>4)</sup>Tokai University School of Health Sciences, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, and <sup>5)</sup>Division of Biomedical Research Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 7–6–8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

**Abstract:** We assessed the possibility of C57BL/6-Tg (Meg1/Grb10)*isn*(Meg1 Tg) mice as a non-obese type 2 diabetes (2DM) animal model. Meg1 Tg mice were born normal, but their weight did not increase as much as normal after weaning and showed about 85% of normal size at 20 weeks of age. Body mass index of Meg1 Tg mice was also smaller than that of control mice. The glucose tolerance test and insulin tolerance test showed that Meg1 Tg mice had reduced ability to normalize the blood glucose level. Blood urea nitrogen (BUN) in Meg1 Tg mice ( $19.6 \pm 1.2$  mg/dl) was significantly lower than in controls ( $22.0 \pm 0.8$  mg/dl), while plasma triglyceride, insulin, adiponectin, and resistin levels were significantly higher ( $202.0 \pm 23.4$  mg/dl vs  $146.3 \pm 23.4$  mg/dl,  $152.4 \pm 16.3$  pg/ml vs  $88.1 \pm 16.9$  pg/ml,  $74.4 \pm 10.9$   $\mu$ g/ml vs  $48.3 \pm 7.0$   $\mu$ g/ml, and  $4.0 \pm 0.2$  ng/ml vs  $3.6 \pm 0.2$  ng/ml, respectively). Body, visceral fat weight and liver weights were significantly lower ( $19.6 \pm 0.4$  g vs  $24.3 \pm 0.3$  g,  $376.7 \pm 29.6$  mg to  $507.5 \pm 23.0$  mg, and  $906.0 \pm 41.8$  mg to  $1,001.0 \pm 15.1$  mg, respectively). Thus, hyperinsulinemia observed in Meg1 Tg mice indicates that their insulin signaling pathway is somehow inhibited. With high fat diet, the diabetes onset rate of Meg1 Tg mice increased up to 60%. These results suggest that Meg1 Tg mice resemble human 2DM.

**Key words:** biochemical characterization, Meg1/Grb10 transgenic mouse, non-obese mouse model, type 2 diabetes mellitus

---

### Introduction

---

Type 2 diabetes mellitus (2DM) is a life-threatening endocrine disorder that affects as many as 6% to 10% of the population of the world. This type of diabetes is

classified as non-insulin dependent diabetes and accounts for higher than 95% of all cases of diabetes [12, 39]. Moreover, recent studies have revealed that the prevalence of 2DM has doubled in the United States over the last 30 years [1].

---

(Received 2 November 2007 / Accepted 24 March 2008)

Address corresponding: Y. Yamamoto, Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 1–23–1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Many experimental 2DM model animals have been established from spontaneous mutants and are currently in use in human 2DM research [11, 22, 24, 33, 35]. In spite of much effort, which has focused on using such model animals, some aspects of 2DM remain unclear. To elucidate the pathological character of 2DM, it is necessary to identify which metabolic pathways are responsible for the onset of 2DM. However, in many cases, the relationship between original mutations and their affected metabolic pathways is difficult to explain. Recent progress in molecular biology has enabled us to take another approach to develop novel diabetes model animals through the manipulation of genes that are closely related to glucose metabolism and insulin resistance [6]. Using gene-targeting technology, a number of useful mouse models have recently been developed for the study of the progression of diabetes [4, 17].

Recently, genomic imprinting has been discovered as an important factor in the etiology of 2DM. A number of studies have reported a relationship between genomic imprinting and 2DM in the mouse [13, 21, 30]. Overexpression of some imprinted genes might explain the mechanism of human transient neonatal diabetes [21], and deletion of some imprinted genes has been suggested as the cause of pancreatic  $\beta$  cell dysfunction [13]. Another candidate imprinted gene for 2DM is maternally expressed 1(Meg1)/growth factor receptor-binding protein (Grb) 10 [23]. Recently, it has been reported that *Meg1/Grb10* knockout mice show the embryonic overgrowth phenotype [3]. *Meg/Grb10* transgenic mice Meg1 Tg mice were produced to elucidate Meg1/Grb10 function *in vivo* [31]. Grb10 interacts with both insulin receptors (IR) and insulin-like growth factor I receptors (IGF-1R) *in vitro* [8, 9, 27]. Since the IGF-1 signaling pathway is reportedly involved in embryonic growth, Meg1/Grb10 may have a negative effect both on the embryonic growth and postnatal growth phenotypes associated with uniparental duplication of chromosome 11 [7, 23]. Alternatively, Meg1/Grb10 may function in glucose homeostasis, which is regulated by the IR signaling pathway. Insulin binds to IR and activates a signal transduction pathway through its receptor kinase activity. It has been demonstrated that IGF1 functions via IGF1R, while IGF2 functions via both IGF1R and IR, and that each of these signaling pathways contributes to

some extent to late embryonic growth [20]. Moreover, mutation studies of human 2DM patients indicate the existence of additional factors in the pathogenesis of this disease [25].

Overall, Meg1 Tg mice have similar character to human 2DM in overexpression of the imprinted Meg1/Grb10 gene that functions negatively for both insulin signaling via IR and IGF-1 signaling via IGF-1R. Therefore, it seems likely that, in the late embryonic stage, when endogenous Meg1/Grb10 expression is very high, Meg1/Grb10 negatively regulates growth via modulation of both the IR and IGF1R cascades [31]. There are few data about biochemical changes in the Meg1 Tg mouse. To be useful in therapeutic research the model mouse has to show a similar phenotype to human 2DM. Furthermore, the incidence rate of the onset of 2DM in Meg1 Tg mice fed on basal diet was reportedly small [30].

In this study, we examined several basic biochemical characters of Meg1 Tg mice as a 2DM model, and the effects of diet on the onset of 2DM. The results indicate that the Meg1 Tg mouse is a useful non-obese 2DM mouse model.

---

## Materials and Methods

---

### Animals

The production and maintenance of *Meg1/Grb10* transgenic mice were reported in detail at elsewhere [31]. Transgenic (C57BL X C3H) F<sub>2</sub> mice were screened by PCR amplification of tail DNA samples using transgene-specific and endogenous Peg1 primer sets. Transgenic-positive founder mice (Meg1 Tg mouse) were backcrossed to C57BL/6Njcl (C57BL/6) mice, and the litters that were used in subsequent studies contained animals that were maintained within the C57BL/6 hybrid background. The Meg1 Tg mouse consists of 4 lines, with names of T10L, T18L, T20L, and T27L. We used these 4 lines for each experiment. Transgenic-negative mice were used as control mice. C57BL/6, NOD/ShiJcl (NOD), KK-A<sup>y</sup>/TaJcl (KK-A<sup>y</sup>), and BKS.Cg-*+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>*/Jcl (BKS) mice were also used in the RT-PCR experiment. Only male mice were used in our experiment.

This study was performed in accordance with the *Guidelines for Animal Experimentation of the National*

### *Institute of Infectious Diseases.*

#### *Body weight and body mass index (BMI)*

Body weights of all mice used in our experiments were measured weekly from 4 weeks of age to 20 weeks. At 15 weeks of age, mouse length from nose to anus was recorded. Body mass index (BMI) was calculated as body weight (g) / body length<sup>2</sup> (cm).

#### *Food and water intake*

The mice were allowed free access to food pellets and water. We used either CMF (Oriental yeast Co., Ltd., Tokyo) or Quick Fat (CLEA Japan, Inc., Tokyo) for normal fat diet (NFD) and high fat diet (HFD), respectively. HFD contains high crude fat and glucose, which gives it a higher calorie count than NFD. Food intake per mouse was calculated as the average of 3 days intake at 11 weeks of age.

#### *Organ weight*

At 30 weeks of age 5 Meg1 Tg mice and control mice were sacrificed under deep ether anesthesia and necropsied. Visceral fat and livers were separated and weighed.

#### *Glucose tolerance test and insulin tolerance test*

Glucose tolerance tests and insulin tolerance test were performed on 11-week-old Meg1 Tg mice that had been fed on HFD. Glucose tolerance tests and insulin tolerance tests were performed after overnight fasting by administering glucose orally (2.0 g/kg body weight) and 0.3  $\mu$ l of blood was collected from the tail vein after 0, 30, 60, and 120 min. The blood glucose level was measured by FreeStyle Meter (NIPRO, Osaka). Insulin tolerance tests were performed by an intraperitoneal injection of 1.0 U/kg of human insulin (Eli Lilly Japan, Tokyo) to Meg1 Tg mice and control mice; then 0.3  $\mu$ l of blood was collected from the tail vein after 0, 30, 60, and 90 min. The blood glucose level was measured by FreeStyle Meter (NIPRO).

#### *Plasma chemistry*

Meg1 Tg and control mice were maintained on a normal light/dark cycle. Blood was collected from the mice with heparin at necropsy and inspection. The samples

were centrifuged at 13,000 rpm centrifugation, and plasma was collected and stored at -30°C until assay. Plasma leptin, adiponectin, insulin and resistin were assayed by ELISA. Plasma total glucose, total cholesterol (TCHO), ammonia, triglyceride (TG), blood urea nitrogen (BUN), GOT, GPT, ALP, CPK, and LDH were measured using Fuji dry-chem 3000 (FUJIFILM Medical Co., Ltd., Tokyo). Livers and visceral adipose tissues were also recorded.

#### *Histology*

For histopathology, pancreas tissue samples were taken from Meg1 Tg and control mice at 20 weeks of age. The tissue samples were fixed in 10% buffer-neutralized formalin solution and embedded in paraffin. Sections were cut at 2  $\mu$ m thickness and stained with hematoxylin and eosin.

#### *Urinalysis and confirmation of the onset of 2DM*

Urine collection was executed by compulsive urination at each weighing time, and urinary glucose was determined by Urolabostick (Biel-Sankyo Co., Ltd., Tokyo). When urinary glucose was detected, blood was collected from the tail vein. Confirmation of the onset of 2DM was decided by the detection of over 300 mg/ml of glucose in blood.

#### *RT-PCR*

Total RNA was extracted from livers, pancreata, skeletal muscles, and white and brown adipose tissues from 5 mice each of the Meg1 Tg, NOD, KK-A<sup>y</sup>, BKS, and C57BL/6 strains of mice at 11 weeks of age, using the RNeasy system (QIAGEN K. K., Tokyo) according to the manufacturer's instructions. For the RT-PCR analysis, cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of the total RNA using the SuperScript III First-Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen Japan K. K., Tokyo) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was PCR-amplified in 50  $\mu$ l of reaction mixture containing 25  $\mu$ l of TaqMan master mix (Applied Biosystems Japan Ltd., Tokyo) and 500 nM of the gene-specific (*Meg1/Grb10*, uncoupling protein 1 (*Ucp1*), glucose transporter 4 (*Glut4*), and *G3PDH* for normalization) TaqManProbe. The assays were performed in triplicate and the copy number of the *Meg1/Grb10*, *Ucp1*, and *Glut4* RNA were



calculated with an ABI Prism 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems Japan). The data for each tissue were normalized to an internal standard (*G3PDH*).

#### Statistical analysis

Measurement data are shown as the mean value  $\pm$  standard error (Mean  $\pm$  SE). Statistical analysis of the data was performed using a one-factor ANOVA followed by Student's *t*-test. Comparison of the mean was calculated by Bonferroni's method. Covariance analysis was performed by Levene's method. Calculation of confidence limits and significance testing were made at a level of  $P=0.05$ .

## Results

#### Postnatal growth curve

Fig. 1 shows the body weights of Meg1 Tg mice and controls that were fed either normal fat diet (NFD) or high fat diet (HFD). The weight of Meg1 Tg mice was normal until 4 weeks of age under both NFD and HFD diet conditions. However, their body weights did not increase as much as control mice after weaning and were 12 to 15% smaller than these of control mice at 20 weeks of age. These differences were statistically significant ( $P<0.05$ ).

#### Food intake and BMI

For average food intake, no differences were observed between Meg1 Tg mice and controls under both diet conditions at 11 weeks of age (Fig. 2A: fed with HFD,  $1.74 \pm 0.02$  g/day/10 g of body weight vs  $1.65 \pm 0.03$  g/day/10 g of body weight; and with NFD,  $1.65 \pm 0.02$  g/day/10 g of body weight vs  $1.51 \pm 0.07$  g/day/10 g of body weight). However, BMI of Meg1 Tg mice were significantly lower than these of control mouse fed with HFD ( $P<0.05$ ) both at 15 and 30 weeks of age (Fig. 2B: BMI at 15 weeks of age,  $0.27 \pm 0.01$  g/cm<sup>2</sup> vs  $0.32 \pm 0.03$  g/cm<sup>2</sup>; and at 30 weeks of age,  $0.29 \pm 0.05$  g/cm<sup>2</sup> vs  $0.36 \pm 0.07$  g/cm<sup>2</sup>).

#### Glucose tolerance test and insulin tolerance test

The plasma glucose level of Meg1 Tg mice fed with HFD at 11 weeks of age was significantly higher than those in both Meg1 Tg mice and controls fed with NFD

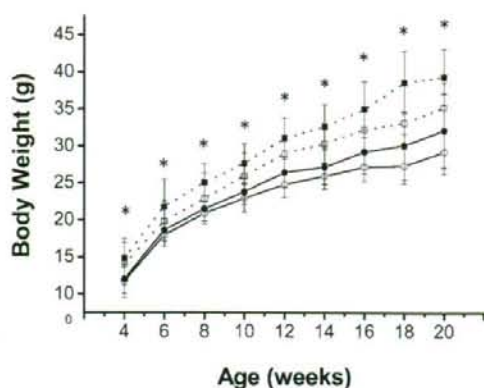


Fig. 1. Growth curve of control and Meg1 Tg mice from 4 to 20 weeks of age. Plotted values are means  $\pm$  SE for 20 mice per group. Open square ( $\square$ ), control mice fed NFD; filled square ( $\blacksquare$ ), control mice fed HFD; open circle ( $\circ$ ), Meg1 Tg mice fed NFD; filled circle ( $\bullet$ ), Meg1 Tg mice fed HFD. \* $P<0.05$  (Student's *t*-test).

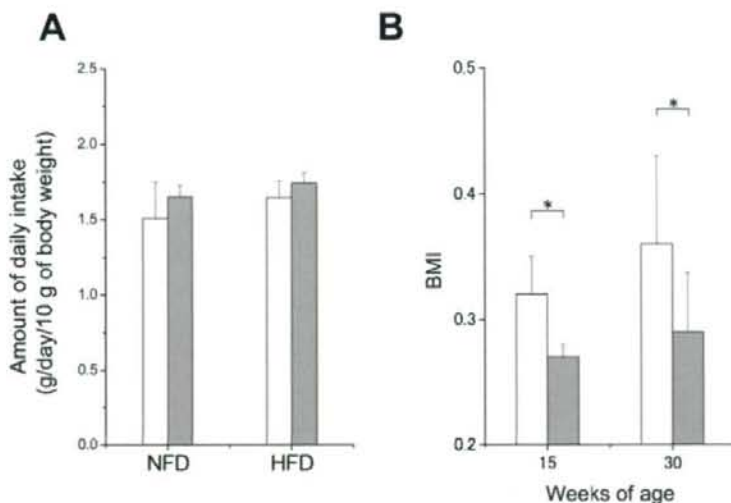
( $P<0.05$ ), indicating that their glucose tolerance was reduced (Fig. 3A). The reduction in blood glucose concentration after intraperitoneal administration of insulin was significantly delayed in Meg1 Tg mice compared to control mice fed with either HFD or NFD ( $P<0.05$ ), indicating that Meg1 Tg mice had insulin resistance (Fig. 3B).

#### Organ weight

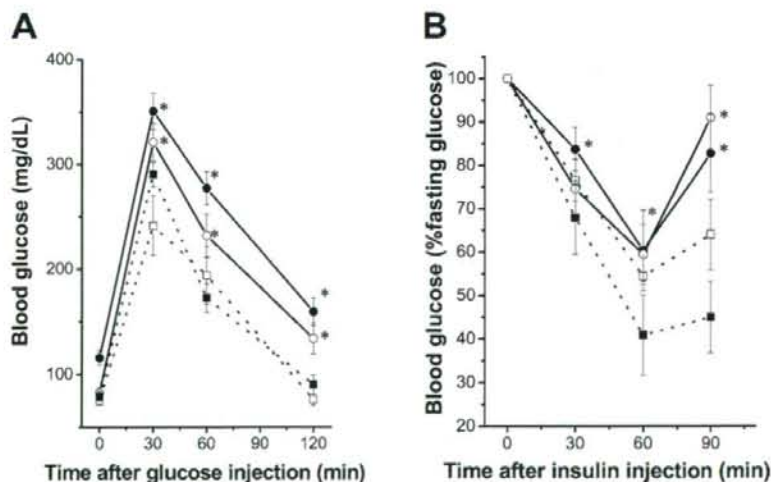
The weights of body, visceral fat, and liver, and the visceral fat/body weight ratios and liver/body weight ratios of Meg1 Tg and control mice at 10 to 12 weeks of age are shown in Table 1. The effect on organ weight by HFD feeding in Meg1 Tg mice was examined. When mice were fed HFD, weights of body, visceral fat and livers of Meg1 Tg mice were significantly lower than the controls ( $P<0.05$ ), while liver/body weight ratio of Meg1 Tg mice was significantly higher than that of control mice ( $P<0.05$ ). When Meg1 Tg mice were fed NFD, their body weight was significantly lower than the controls ( $P<0.05$ ). There were no differences in visceral fat/body weight and liver/body weight ratios between Meg1 Tg and control mice irrespective of diet.

#### Plasma chemistry

The data on BUN, TG, insulin, adiponectin, resistin,



**Fig. 2.** Daily intake and BMI change in control and Meg1 Tg mice. (A) Daily intake of Meg1 Tg (■) and control (□) mice at 11 weeks of age that were fed with NFD or HFD. There were no significant differences between the diet groups. (B) BMI of Meg1 Tg and control mice fed with HFD were calculated at 15 and 30 weeks of age. BMI of Meg1 Tg mice (■) at both ages were significantly lower than those of control mice (□) ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Glucose and insulin tolerance level of Meg1 Tg and control mice. (A) Glucose tolerance in mice at 11 weeks of age that had been fasted overnight ( $n=10$ ). (B) Insulin tolerance in mice at 11 weeks of age that had been fasted overnight ( $n=10$ ). Plotted values are means  $\pm$  SE for 10 mice per group. Open square (□), control mice fed NFD; filled square (■), control mice fed HFD; open circle (○), Meg1 Tg mice fed NFD; filled circle (●), Meg1 Tg mice fed HFD. \* $P < 0.05$  (Student's *t*-test). Glucose levels and their reduction rate in Meg1 Tg mice were significantly higher than in control mice.

**Table 1.** Liver, fat, and body weights of Meg1Tg and control mice at 10 to 12 weeks of age

	Control (NFD)	Meg1 Tg (NFD)	Control (HFD)	Meg1 Tg (HFD)
Body weight (g)	20.8 ± 0.6	18.4 ± 0.3 <sup>a)</sup>	24.3 ± 0.3	19.6 ± 0.4 <sup>a)</sup>
Visceral fat weight (mg)	197.6 ± 46.0	187.0 ± 68.6	507.5 ± 23.0	376.7 ± 29.6 <sup>a),b)</sup>
Visceral fat/body weight ratio (mg/g)	9.0 ± 0.9	8.9 ± 1.6	18.8 ± 2.6	20.0 ± 1.1
Liver weight (mg)	900.2 ± 30	977.4 ± 38.5	1,001.0 ± 15.1	906.0 ± 41.8 <sup>a)</sup>
Liver/body weight ratio (mg/g)	44.5 ± 3.7	51.6 ± 4.9	41.2 ± 1.3	44.9 ± 2.1 <sup>a)</sup>

Values are the means ± SE for 10 mice per control and 10 mice per Meg1Tg. Meg1Tg (HFD) and control (HFD) mice were fed HFD. Meg1Tg (NFD) and control (NFD) mice were fed NFD. <sup>a)</sup> $P < 0.05$  vs control, <sup>b)</sup> $P < 0.05$  vs Meg1 Tg (NFD).

**Table 2.** Plasma chemistry in Meg1 Tg and control mice at 10 to 12 weeks of age

	Control (NFD)	Meg1 Tg (NFD)	Control (HFD)	Meg1 Tg (HFD)
BUN (mg/dl)	26.7 ± 1.9	20.6 ± 0.7	22.0 ± 0.8	19.3 ± 1.2 <sup>a)</sup>
Triglyceride (mg/dl)	69.3 ± 23.2	90.6 ± 21.9	146.3 ± 11.4	202.0 ± 23.4 <sup>a),b)</sup>
Insulin (pg/ml)	92.5 ± 13.4	153.3 ± 14.3	88.1 ± 16.9	152.4 ± 16.3 <sup>a)</sup>
Adiponectin (ng/ml)	23 ± 4.01	46.8 ± 3.2	48.3 ± 7.0	74.4 ± 10.9 <sup>a),b)</sup>
Resistin (ng/ml)	2.28 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.6 ± 0.2	4.0 ± 0.2
IGF-1 (ng/ml)	395.8 ± 43.1	232.5 ± 28.3	358 ± 49.5	272.1 ± 24.4
Leptin (pg/ml)	548 ± 171	1,136.0 ± 267.0	1,036.0 ± 161.0	1,008.0 ± 146.0
NH3 (μg/dl)	143.1 ± 24.2	162.0 ± 12.2	223.1 ± 32.6	280.7 ± 50.9 <sup>b)</sup>
Glucose (mg/dl)	161 ± 16.9	163.0 ± 12.6	172.8 ± 9.4	199.7 ± 58.4

Values are the means ± SE for 10 mice per control and 10 mice per Meg1Tg. Meg1Tg (HFD) and control (HFD) mice were fed bHFD. Meg1Tg (NFD) and control (NFD) mice were fed NFD. <sup>a)</sup> $P < 0.05$  vs control, <sup>b)</sup> $P < 0.05$  vs Meg1Tg(NFD).

IGF-1, leptin, ammonium, and glucose, measured at 10 to 12 weeks of age, are shown in Table 2. Irrespective of diet, plasma BUN in Meg1 Tg mice was significantly lower than in control mice ( $P < 0.05$ ). Plasma TG, insulin, adiponectin and resistin in Meg1 Tg mice were significantly higher than in control mice ( $P < 0.05$ ), whereas plasma IGF-1 of Meg1 Tg mice tended to be lower than in controls. When mice were fed NFD, the plasma leptin concentration of Meg1 Tg mice was significantly higher than that of control mice. For mice fed HFD, the plasma leptin level of Meg1 Tg mice was almost the same as the value of control mice (Table 2). Plasma glucose and ammonia in both NFD- and HFD-fed Meg1 Tg mice tended to be higher than those of control mice.

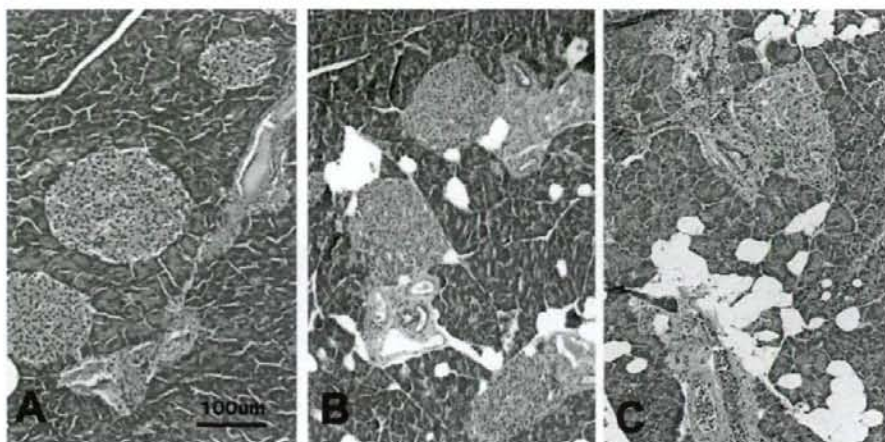
Other measured biochemical markers such as TCHO, GOT, GPT, ALP, CPK, and LDH plasma concentrations measured in Meg1 Tg and control mice of the same age were almost similar (data not shown).

#### Histological analysis

We found two histological abnormalities in the pancreatic tissues of Meg1 Tg mice fed NFD: atrophy of the pancreatic acinus cells and an increase in adipocytes at 20 weeks of age; and enlargement of islet of Langerhans (Fig. 4B). When Meg1 Tg mice were fed HFD, the above-noted pathological abnormalities were more severe than these of NFD feeding (Fig. 4C). Pathological abnormalities did not develop in control mice fed NFD or HFD (Fig. 4A).

#### The onset rate of type 2 diabetes

The onset rates of 2DM between Meg1 Tg mouse fed NFD and HFD at 25 weeks were 11.3% and 60.0%, respectively (Fig. 5A). This clearly demonstrates that feeding with HFD induces 2DM in Meg1 Tg mice. There were no symptoms of 2DM in control mice up to 30 weeks of age.



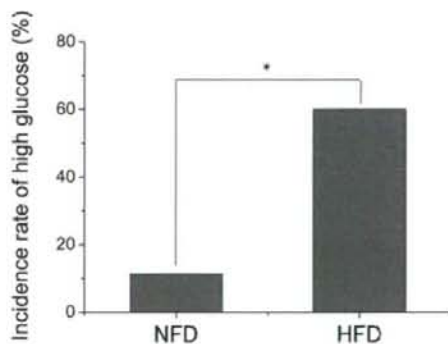
**Fig. 4.** Light microscopic features of pancreata from control and Meg1 Tg mice around 20 weeks of age. Heamatoxylin and eosin stain,  $\times 100$ . (A) Control mouse. (B) Meg1 Tg mouse fed NFD. (C) Meg1 Tg mouse fed HFD. Vacuolation and denaturation at exocrine pancreas in the Meg1 Tg mouse was found. Furthermore, enlargement of an islet of Langerhans was observed. The pathological abnormality of Meg1 Tg mice fed HFD was more severe than that of NFD-fed Meg1 Tg mice.

#### Meg1/Grb10, Ucp1, and Glut4 expression in Meg1 Tg and 3 diabetes model mice

For further analytical research, we examined diabetes related gene expressions of Meg1 Tg mice in comparison with NOD, KK-A<sup>y</sup>, BKS, and C57BL/6 mice. *Meg1/Grb10*, *Ucp1*, and *Glut4* expression ratios against control gene are shown in Fig. 6. *Meg1/Grb10* gene expression of skeletal muscle of Meg1 Tg mice was 100 times higher than those of the other 3 diabetes model mice and the C57BL/6 mouse (Fig. 6A:  $P < 0.05$ ). In contrast, *Glut4* expression of skeletal muscle of Meg1 Tg mice was significantly lower than these of the 3 diabetes model mice and the C57BL/6 mouse (Fig. 6C:  $P < 0.05$ ). There were no differences of *Ucp1* gene expression in brown adipose tissue between Meg1 Tg and the 3 diabetes model mice and the C57BL/6 mouse. Meg1 Tg mice fed HFD showed suppression of *Ucp1* gene expression in brown adipose tissue (Fig. 6).

#### Discussion

We evaluated the Meg1 Tg mouse as a non-obese 2DM animal model in this study. Two of the major defects seen in 2DM are insulin resistance of targets, such as



**Fig. 5.** Increased incidence rate of high blood glucose in Meg1 Tg mice fed HFD. Meg1 Tg mice were fed NFD and HFD for 25 weeks. The onset rates (■) of type 2 diabetes, the decided by the detection of over 300 mg/ml of glucose in the blood, in the Meg1 Tg mouse were compared by diet. HFD feeding-induced diabetes was significantly higher than NFD feeding. \* $P < 0.05$  (Student's *t*-test).

liver, muscle and adipose tissues, and impaired insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells [26, 37, 38]. Histological analysis revealed the pancreatic abnormality in Meg1 Tg mice (Fig. 4). Moreover, Meg1 Tg mice showed both the insulin resistance and glucose intoler-