

しかし、このプログラムは、凍結操作に 5-7 時間を要し、時間と人手が大変なので、短時間の凍結保存を難移植性のがん組織で試みたところ、図 3 に示すようにプログラムフリーザーで凍結保存したものは生着、増殖し、きれいな組織像を示したのに対し、瞬間凍結保存した組織は移植後消失した。注意深い凍結が必要である。図 1 に示す 4 つのプログラムで凍結保存を行ったところ、旧来のプログラム A, B が最適で、次に C, D では再移植しても消失した (図 4)。

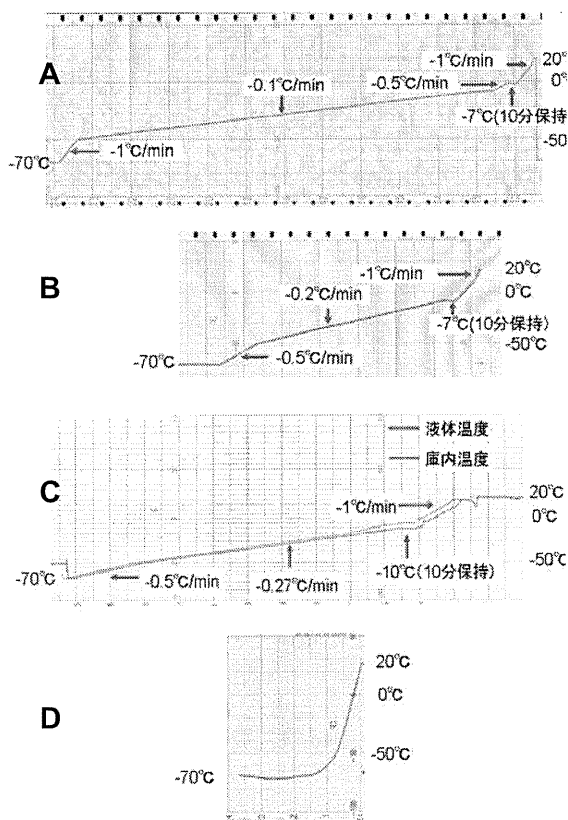
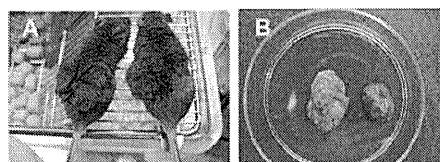
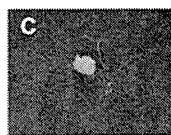


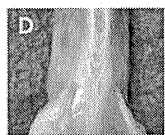
図 3. 凍結保存プログラム。



A, B; 電動プログラムフリーザー



C; N2プログラムフリーザー



D; 故障; 急速冷凍

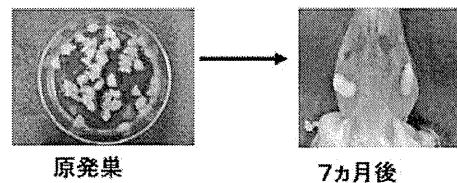
消失

図 4. 凍結保存プログラムによるヒト腫瘍の生着、増殖の違い。

2. 非増殖性ヒト疾患組織の移植

非増殖性ヒト疾患組織および正常組織に関しては、Super-SCID で継代維持は可能であるが、数代で縮小消失する。30 例近くの皮膚疾患患者 (色素性乾皮症、乾癬等) の皮膚組織や正常皮膚、多くの肺、甲状腺等の組織移植実験を行ったが、同じ傾向であった。本研究班では、難治性疾患組織 (がんを除く) の入手が困難であったため、1 つのモデルとして、成年男子が 60 才をすぎるとその多くが発症し治療薬も存在しなく、QOL を低下させる疾患として前立腺肥大症組織の継代移植をおこなってきた。図 5 に示した如く、切除前立腺肥大組織は、電気メスで細片に削られているので、こげている部分が多く、こげを除去した後、雄 C3H/HeJ-*scid*; LPS および C57BL/6J-*scid* マウスに移植した。一部テストステロンデポ

(1.5mg) を皮下に注入した。移植 7 ヶ月例では、移植片はきれいに残存している。図 6 に示す如く、原発巣組織では、間質の増生を伴うきれいな一層円柱上皮よりなる腺腔を形成しているのに対し、C57BL/6J-*scid* マウスへの移植例では、7 ヶ月後では一部扁平上皮像がみられ、14 ヶ月後安楽死例でも同様に扁平上皮化がみられた。しかし、一部組織 (11 ヶ月安楽死) では、きれいな一層円柱上皮の腺腔を形成しているものがみられた。しかし、一部組織、きれいな一層円柱上皮の腺腔を形成しているものがみられ、マウス血中に PSA も検出されている (図 7)。



(患者血清中PSA: 5.48 ng/ml)

図 5. 前立腺肥大摘出組織と移植 7 ヶ月後。

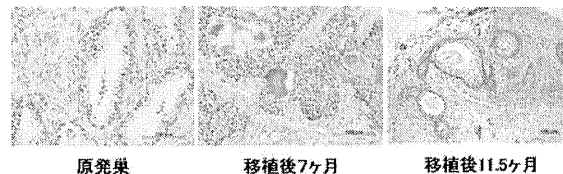


図 6. 前立腺肥大症組織像。原発巣、移植 7 ヶ月後、14.5 ヶ月後。

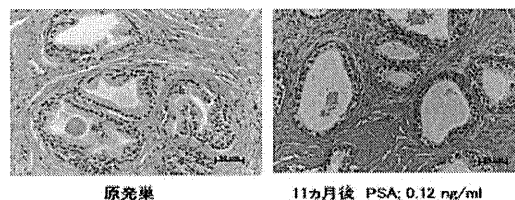
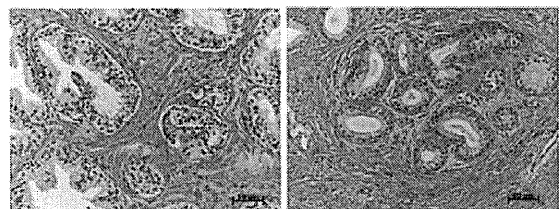


図 7. 前立腺肥大症組織像。原発巣と移植 11 ヶ月後。

C3H/HeJ-*scid*; *LPS* 雄マウスへの移植例ではテストステロン投与と関係なく、きれいな一層円柱上皮でおおわれた腺構造がみられた、組織像は原発巣組織と大差なく維持されており、ほぼヒト前立腺肥大組織の長期維持に成功したものと思われる(図8)。PSAも当該患者血中濃度(5.45ng/ml)とほぼ同じ値(5.25ng/ml)を移植2ヶ月後には示している。

これら継代、移植組織に対し、AR染色、PSA染色、Ki67染色、cox2染色を行ったところ、移植組織はきれいに染色されており、よく維持されていることを示している(図9)。さらに長期維持、移植を継続中である。



原発巣 移植2ヵ月後
(患者血清中PSA: 5.48 ng/ml) マウス血清中PSA: 5.48 ng/ml)

図8. 前立腺肥大症組織像と血中PSA値。原発巣と移植2ヵ月後。

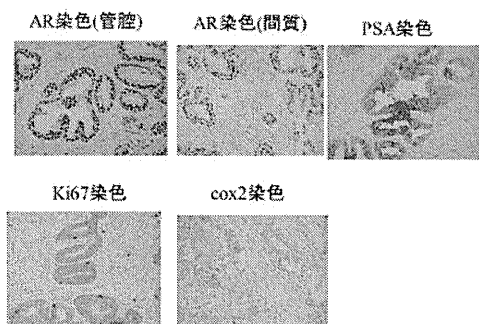


図9. 移植ヒト前立腺肥大症の特殊染色像。

3. 難病自然発症モデル動物研究

難病・疾患資源研究部疾患モデル小動物研究室では、いくつかの難病モデルマウスについて研究を行っている(研究協力者; 松田潤一郎: 難治性ネフローゼマウス、ライソゾーム病マウス、拡張性心筋症マウス、難治性てんかんマウス)。また研究協力者、竹森 洋は、最近、脊髄小脳変性マウスの自然発症モデルマウスを樹立し、病態解析を行った。本症は、男女差なく発症し、約10万人3人の希な難病である。脚の痙攣(こむら返り)に始まり序々に歩行困難になるが、対症療法しかない。約40の責任遺伝子が報告されており、優性、劣性遺伝する。KOマウスが作成されているがヒト病態を正確には反映していない。図10に示す如く、本モデルマウスはヒトとよく似た症状を示している。形態学的にも、小脳神経層の萎縮が

あり、マイクロアレイを用い遺伝子発現の変化を認めている。

脊髄小脳変性症(特定疾患)の自然発症モデルマウスの樹立と病態解析

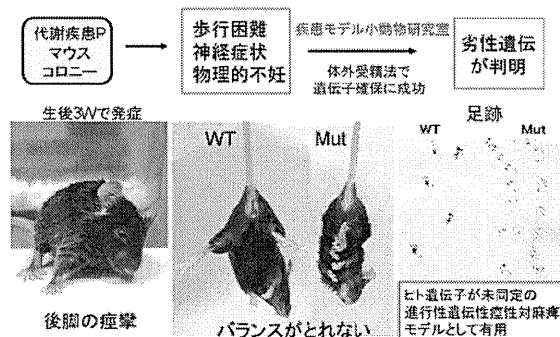


図10. 脊髄小脳変性マウスの自然発症モデルマウス。

脊髄小脳変性症モデルマウス(TS3)は生殖能力があるものの、後肢麻痺で自然交配ができない。そこで、体外受精法で他系統の正常マウスへの交配を行い、多数のマウスを確保した。全染色体から80種のマイクロサテライトマーカーを選び、リンケージ解析を行うことで、最終的に5cM(約100個の遺伝子)に絞り込んだ。次に、マイクロサテライト解析と照らし合わせることで、当該5cM領域には遺伝子発現変動を伴う遺伝子が存在しないことが判明した。このことは、遺伝子変異は発現調節領域には無く、タンパクコード領域(ORF)にあることを示唆する。そこで、当該5cM領域内の神経関連遺伝子のmRNAをcDNA化後に直接塩基配列決定を行うことで責任遺伝子の変異の確認を行った。その結果、膜チャンネルをコードするタンパクのORFに1kbの欠損があることでタンパクができていないことが判明した。TS3マウスの解析は、脊髄小脳変性症の分子機構理解・治療法開発のみならず、認知症治療薬探索への応用も期待される。既に薬用植物資源研究センターとの共同により、TS3マウスの病態を利用することで新たな脊髄小脳変性症の病態制御物質の探索に成功している。

また、難治性疾患に指定されていないが、日本でも100万人もの患者がおり治療薬もなく対症療法しかなく、QOLを著しく低下させる疾患として変形性骨関節症(OA)がある。OA自然発症モデルマウスは野村が1979年に発見している。男女比(3:7)、レントゲン像は本症患者に極似しており、1年でほぼ100%発症する。OA発症は、単一劣性遺伝子に支配されており、第2染色体上にあることも証明している。本OAマウスは、第2染色体bp(*Gdf5*)遺伝子変異による骨形成異常、亜脱臼を伴うため、発症すると思われたが、bp近傍の全く異なる劣性遺伝子によることを証明し、

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、幼少期より欠損あるいは発現低下している劣性遺伝子を見つけている（未発表）。詳細な解析にはマウス用 MRI による生体での早期診断が必要である。

D. 考案

増殖性ヒト組織（がん等）については、特定のプログラムで凍結保存すれば、20 年後に再移植すれば蘇り、形態、機能も非常によく保存されているのに対し、難病組織等非増殖性の組織は本質的に継代維持、再生可能な凍結保存は困難と考えられたが、Super-SCID マウスでは正常組織に加え、前立腺肥大症組織の移植をおこなったところ、1 年以上にわたり、移植組織は維持され、組織学的にもなんとか原発巣に近いものが維持され、PSA 分泌、特殊染色でも確認できた。

脊髄小脳変性症モデルマウス（TS3）の責任遺伝子を同定することを試み、TS3 の遺伝子産物は、膜チャンネルをコードするタンパクの ORF に 1kb の欠損があり、産生されていないことが判明した。TS3 マウスの病態を薬理的に修飾可能か否かを検討する目的で、約 30 種の市販薬等の投与を行った。その結果、TS3 マウスの病態は抗鬱薬（フェノバル・バルプロン酸）で改善し歩けるようになった。反対に認知症薬（メマンチン）で悪化した。よって、脊髄小脳変性症の一部は、抗鬱薬や統合失調症薬などの記憶を忘れる方向性の薬剤で治療可能であると期待される。

変形性膝関節症の責任遺伝子を第 2 染色体上 *bp(Gdf5)* 近傍の新たな劣性遺伝子によることを証明しにマップしたが、詳細な解析にはマウス用 MRI による生体での早期診断が必要である。

E. 結論

難病の基礎研究、治療研究、創薬研究に結びつくヒト疾患組織の長期継代維持と形態・機能を生かしたままの永久保存法を確立するため、難病研究バンク開発研究における総括的ヒト難治性疾患組織維持システムの基盤研究を行った。増殖性ヒト組織（がん等）については、継代維持、凍結保存し、再移植で、形態、機能が非常によく保存されている。難病組織等非増殖性の組織は本質的に継代維持、再生可能な凍結保存は困難と考えられたが、Super-SCID マウスでは正常組織に加え、前立腺肥大症組織や成人脂肪組織の移植が、特殊染色による組織学的検査でも原発巣に近い状態でも 1 年以上にわたりよく維持され、PSA も分泌されていることから機能もよく維持されているものと結論した。

難病疾患自然発症モデルマウスに関しては、新たな脊髄小脳変性症自然発症モデルマウスの樹立

と病態解析が画期的であり、責任遺伝子を竹森が決定した。変形性膝関節症の責任遺伝子を第 2 染色体上にマップした。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文 (10)

Dillip Kumar Parida¹, Koji Wakame, Taisei Nomura. Integrating Complimentary and Alternative Medicine in Form of Active Hexose Co-Related Compound (AHCC) in the Managemem of Head & Neck Cancer Patient. *Int. J. Clin. Med.* 2: 588-592, 2012.

Masao Iwamori, Akihiro Sakai, Norihito Minamimoto, Yuriko Iwamori, Kyoko Tanaka, Daisuke Aoki, Shigeki Adachi and Taisei Nomura. Characterization of novel glycolipid antigens with an α -galactose epitope in lactobacilli detected with rabbit anti-Lactobacillus antisera and occurrence of antibodies against them in human sera. *J. Biochem.* 150: 515-523, 2011.

Miyake T, Ueda Y, Matsuzaki S, Miyatake T, Yoshino K, Fujita M, Nomura T, Enomoto T, Kimura T. CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 137(4): 715-22, 2011.

A. Yogo, T. Maeda, T. Hori, H. Sakaki, K. Ogura, M. Nishiuchi, A. Sagisaka, H. Kiriyama, H. Okada, S. Kanazawa, T. Shimomura, Y. Nakai, M. Tanoue F. Sasao, P. R. Bolton, M. Murakami, T. Nomura, S. Kawanishi, and K. Kondo, Measurement of relative biological effectiveness of protons in human cancer cells using a laser-driven quasimonoenergetic proton beamline, *APPLIED PHYSICS LETTERS* 98, 053701, 2011

Nomura T. Transgenerational health concerns from radiation in mice and humans. In: Bersimbay RI, Au W, eds. *Genome-environment interactions and genetic toxicology*. 15th Alexander Hollaender Course, Astana: Eurasian National University Press; 2010; 19-23.

Taisei Nomura. Biological Consequence and Health Concern from Low Dose and Low Dose Rate Radiations in Mice and Humans. *Health Physics.*, 100: 266-268, 2011.

Iwamori M, Iwamori Y, Adachi S, Nomura T. Excretion into feces of asialo GM1 in the murine digestive tract and Lactobacillus johnsonii exhibiting binding ability toward asialo GM1. A possible role of epithelial glycolipids in the discharge of intestinal bacteria. *Glycoconj. J.* 28 : 21-31, 2011.

Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Rie Tsuboi-Kikuya, Yoriko Tokita, Fumio Matsuzuka, Keizo Hiramatsu, Kazuo

Fujikawa, Tetsuo Itoh, Taisei Nomura Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice. *Mutat Res.*, 696, 107-113 2010

M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura and N. Nakamura No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. *Radiat. Res.* 173, 205–213, 2010.

Iwamori M, Shibagaki T, Nakata Y, Adachi S, Nomura T. Distribution of receptor glycolipids for Lactobacilli in murine digestive tract and production of antibodies cross-reactive with them by immunization of rabbits with Lactobacilli. *J Biochem.* 146(2):185-91, 2009.

和文(4)

野村大成、足立成基、梁 治子、畑中英子、菊谷理絵、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二、D. K. Parida、R. I. Bersimbay 宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究；放射線晩発影響の防護。Space Util. Res., 28, 2012年3月 (in press).

野村大成 まだ生まれ来ぬ子孫を守れるのは今生きている我々自身、公共的良識人、10月号、2011年。

野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二。宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究。Space Util. Res., 27: 107-110, 2011。

野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介。宇宙環境の人体影響評価 (2009年度ワーキンググループ活動報告)。Space Utiliz Res. 26: 249-251, 2010。

2. 学会等発表

国際会議(8)(招待講演)

Taisei Nomura, Hiroo Nakajima, Tadashi Hongyo, Rie Kikuya, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Yoriko Tokita, Eiko Hatanaka, Nanao Yoshida, D. K. Parida, Koji Wakame. Inhibition of Radiation Induced Late Effects (Congenital Malformations and Leukemia) by Active Hexose Correlated Compound, AHCC in Mice. 19th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, Sapporo, Oct. 15-16, 2011.

Taisei Nomura. Fukushima Nuclear Plants Accident: Radiation Effects on Human Health, “Philosophy

on Safety and Conscience” in Japan. 19th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, Sapporo, Oct. 15-16, 2011.

Taisei Nomura. Biological Consequences and Health Concern from Low Dose and Low Dose Rate Radiations in Mice and Human Tissues.

International workshop “Biological consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation” Richland, USA, May 3-5, 2010.

Taisei Nomura. Biological Consequences and Health Risk from Low and Low Dose Rate Radiation Exposures in Mice and Humans. LOWRAD 2010, Dec. 13-15, 2010.

Taisei Nomura. Carcinogenicity Of Urethane (Ethyl Carbamate) In Mice And Humans. 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens. Dec. 15-18, 2010.

Taisei Nomura. Dietary Modulation to Prevent Cancer and Malformation in Mice. In: Dietary Modulation of Xenobiotics Transport and Metabolism. 3rd Asian Pacific Regional Meeting of The International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), Bangkok, Thailand, May 10-12, 2009.

Taisei Nomura. Transgenerational health concerns from radiation in mice and humans. In: The 15th Alexander Hollaender Course; Genome-Environment Interactions and Genetic Toxicology, September 23 – 26/27, 2009, Astana, Kazakhstan.

Taisei Nomura. Differential Sensitivity of Mice and Human Tissues to Radiation Sources. In: HIBMC/PMRC Joint Meeting, Tatsuno, Hyogo, Dec. 15, 2009,.

国内会議等(3)(招待講演)

野村大成 内閣委員会基調講演「福島原発事故による環境汚染と住民の安全性」衆院議員会館、6月2日、2011年。

野村大成 微量放射線の人体に与える影響<問われる安全の哲学；良心> 第104回公共哲学京都フォーラム「東日本大震災を公共哲学する」、神戸ポートピアホテル、神戸、8月22-24日、2011年。

野村大成 微量放射線の人体に与える影響<問われる安全の哲学；良心、良識>、日本学術振興会主任研究員会議；東日本大震災原子力関係の勉強会。学術システム研究センター、東京、2011年9月2日。

他。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

疾患関連細胞の品質評価ならびにキャラクタライズ研究

分担研究者 小原 有弘（独）医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部 主任研究員

研究要旨：（独）医薬基盤研究所・培養資源研究室は国内初の公的細胞バンクとして事業を開始し、厚生労働省の細胞バンクとして創薬研究・疾患研究に供するヒト細胞資源の収集、品質管理、保管、供給を行ってきた。中でも細胞の品質管理に重点を置き、細胞のマイコプラズマ・ウイルス汚染、細胞のクロスコンタミネーションの問題に取り組んで来た。本研究班においてはこれらの品質管理技術の応用・発展により、資源を利用するために必要な情報を付加するための技術開発を行い、疾患関連細胞の品質評価を実施する。

本研究班では、遺伝性疾患患者由来細胞を対象として G-band 法を中心とした、染色体の詳細解析を実施した。細胞におけるゲノム情報は病因・病態を解明するために非常に重要な情報であり、これらの詳細解析による情報は研究者にとって有用な情報となる。今後更なる詳細解析を実施し、難治性疾患患者由来の資源に適用することで、研究者にとって有用な情報の付加に勤めるよう技術開発を行う予定である。また、難治性疾患患者からの細胞株樹立についても共同研究実施し、それらの詳細解析による病因・病態解析ならびに創薬研究への応用を期待して研究を進めた。

A. 研究目的

細胞資源は多岐にわたる基礎・応用・開発研究において必須の研究資源として利用されており、難治性疾患の克服に関してもこれら有用な研究資源の供給が必要である。（独）医薬基盤研究所・培養資源研究室（JCRB 細胞バンク）は国内初の公的細胞バンクとして研究者への研究資源の供給に勤めてきた（年間分譲3500アンプル、保有資源数3000株）。中でも細胞の品質管理に重点を置き、細胞のマイコプラズマ・ウイルス汚染、細胞のクロスコンタミネーションの問題に取り組んで来た。これまでの実績を踏まえ、難治性疾患克服のための細胞資源を整備するとともに、これらの品質管理技術の応用・発展により、資源を利用するために必要な情報を付加するための技術

開発を行い、疾患関連細胞の品質評価を実施する。

B. 研究方法

1) 細胞資源化

（独）医薬基盤研究所・培養資源研究室においては、遺伝性疾患患者由来細胞約2700種を情報登録しており、これらの細胞を増殖させ、様々な品質管理検査を実施した（表1）。

2) 染色体詳細解析

低張固定処理した細胞の染色体標本を作製し G-band 解析、マルチカラー-FISH (mFISH) など染色体の詳細解析を実施した。

3) CGH アレイ解析 (アジレント社、Affymetrix 社)

CGH マイクロアレイスライド (Human Genome CGH 244A Oligo Microarray kit, Agilent Co., Japan)、Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を用いて、ゲノム詳細解析を実施した。

C. 研究結果

1) 細胞資源化

情報登録されている色素性乾皮症、ファンコニ貧血症、網膜芽腫、コカイン症候群の患者由来細胞株について、細胞増殖ならびに品質管理検査を実施し、研究者に分譲できる体制を整備した。

2) 難治性疾患患者由来細胞資源の染色体詳細解析

色素性乾皮症、ファンコニ貧血症、網膜芽腫、コカイン症候群の患者由来細胞株について、染色体詳細解析を実施、病態に特徴的な染色体異常や、非常に微細な異常を検出し、細胞の特性解析として有意義な解析データを得た。

3) 難治性疾患患者由来細胞資源の mFISH 法による染色体解析

次に、G-band 法によって異常が認められた細胞について mFISH 法による染色体解析を行った。

例として、JCRB3006:FA9JTO hTERT-1 については G-band 解析で認められた 4 番染色体への付加が詳細に解析でき、20 番染色体と X 染色体由来の染色体断片が付加していると推測された。G-band 解析だけでは詳細な情報を得ることが出来ず、また見逃す可能性が高い染色体異常も、mFISH 解析を行うことで詳細な

解析が可能であることがわかった。

また、JCRB3007:FA18JTO hTERT についても mFISH で解析を行ったところ、X 染色体に見られた付加は 7 番染色体、16 番染色体に由来することが判明した。さらに G-band 法で正常核型とされたものにおいても 14 番染色体に 13 番染色体由来の付加が起こっていることがわかり、mFISH 解析による詳細解析が、染色体異常を起こしやすい細胞の解析に非常に有効であることがわかった。

4) 難治性疾患患者由来細胞資源のアレイ CGH によるゲノム詳細解析

JCRB3006:FA9JTO hTERT-1 につてアレイ CGH によるゲノム詳細解析を行った。mFISH で認められた 4 番染色体の異常は 4 番染色体長腕末端部の増幅、X 染色体の一部の転座 (X 染色体増加が認められない)、20 番染色体短腕部の増幅転座を伴う異常であることが推測された。

D. 考察

本研究では、培養細胞、特に難治性疾患患者由来細胞資源の染色体解析による細胞特性解析の可能性について研究を行った。G-band 法は職人的技術を要するが比較的安価に解析が可能である。しかし、構造異常や大きな染色体の変化を捉える事は可能であるが、mFISH 法やアレイ CGH 法と比べると染色体の異常を見逃す可能性が高いといえる。今回の研究においても G-band 解析において正常核型と判定された細胞において mFISH 法によって異常が見出された。しかし、mFISH 法、アレイ CGH 法は設備や試薬コストが非常に効果であり、すべての細胞に対して解析を実施すると非常に大きなコストがかかり、研究者

への負担も増加する。これら技術を組み合わせることで、より多くの情報を細胞に付加した形で研究者に細胞供給することが我々細胞バンクにとって重要な意味を持ち、今後の研究の基盤になると考えられる。

E. 結論

細胞のゲノム詳細解析技術を用いて、難治性疾患患者由来細胞資源の特性解析を実施したが、細胞プロファイル情報として非常に有用なデータを取得することが出来、細胞評価法として重要な意味を持つことが明らかとなった。今後、本研究班で資源化した細胞が細胞ツールとして難治性疾患研究に貢献し、研究が進展・発展する可能性があり、そのために必要な情報を付加する技術を開発することが出来た。今後細胞細胞のコンタミネーションやマイコプラズマ汚染、ウイルス汚染チェックなどの品質管理技術とともに細胞を供給する立場として研究者に必要な資源、情報を提供していく必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

適用なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Cell line cross-contamination initiative: An interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. Dirks WG, Macleod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H. *Int J Cancer*. 126:303-4 (2010)
- (2) Cell line misidentification: the beginning of the end. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. *Nat Rev Cancer*. 10(6):441-8(2010)
- (3) Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. *Int J Cancer*. 127(1):1-8(2010).
- (4) Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, Macleod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C, Kerrigan L. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 46(9):727-32(2010).
- (5) Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines. Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, Ohgushi H, Hirano T. *Hum Cell*. 24(1):2-8(2011)
- (6) Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. *Int J Dev Biol*.

55(2):181-7(2011)

- (7) ヒト多能性幹細胞の命名法の国際統一規格案について. 菅三佳, 高田圭, 小原有弘, 末盛博文, 青井貴之, 中村幸夫, 古江・楠田美保 再生医療 (日本再生医療学会雑誌) vol.11(1)2-8 (2011)

2. 学会発表

国内会議

- ①マイコプラズマ汚染の現状と論文投稿における国際動向、小原有弘, 古江楠田美保、第 83 回日本組織培養学会 5 月(岡山)
- ②細胞認証試験によるリスク管理の必要性と論文投稿における国際動向、小原有弘, 古江楠田美保、第 29 回日本ヒト細胞学会学術集会 8 月(富山)

表 1 資源化した難治性疾患患者由来細胞資源

	細胞番号	細胞名	疾患名	タイプ
1	JCRB0301	XP2OS(SV)	色素性乾皮症	A
2	JCRB0302	XP2YO(SV)	色素性乾皮症	F
3	JCRB0303	XP3OS	色素性乾皮症	A
4	JCRB0304	XP35OS	色素性乾皮症	A
5	JCRB0305	XP2SA	色素性乾皮症	V
6	JCRB0306	XPL3KA	色素性乾皮症	C
7	JCRB0307	XPK15OS	色素性乾皮症	A
8	JCRB0325	XPEMB-1	色素性乾皮症	A
9	JCRB0326	XP39OS	色素性乾皮症	A
10	JCRB0327	XP40OS	色素性乾皮症	C
11	JCRB3012	XP24KO	色素性乾皮症	E
12	JCRB1055	XP3OS(SVT)	色素性乾皮症	A
13	JCRB1057	XP39OSTERT	色素性乾皮症	A
14	JCRB1058	XP40OSTERT	色素性乾皮症	C
1	JCRB0315	FA18JTO	ファンconi貧血症	
2	JCRB3006	FA9JTO hTERT-1	ファンconi貧血症	G
3	JCRB3007	FA18JTO hTERT	ファンconi貧血症	A
4	JCRB3010	FA20P	ファンconi貧血症	A
5	JCRB0314	FA9JTO	ファンconi貧血症	G
6	JCRB1090	FA9JTOTERT	ファンconi貧血症	G
1	JCRB0311	RB16KY	網膜芽種	両側性
2	JCRB0312	RB24KY	網膜芽種	両側性
3	JCRB0313	RB28KY	網膜芽種	片側性
4	JCRB1182	NCC-RbC-51	網膜芽種	両側性
5	JCRB1183	NCC-RbC-54	網膜芽種	両側性
6	JCRB1186	NCC_RbC-59	網膜芽種	両側性
7	JCRB1190	NCC-RbC-57	網膜芽種	片側性
8	JCRB1200	NCC-RbC-53	網膜芽種	片側性
9	JCRB1212	NCC-RbC-56	網膜芽種	両側性
10	JCRB1214	NCC-RbC-67	網膜芽種	片側性
11	JCRB1221	NCC-RbC-92	網膜芽種	片側性
12	JCRB1223	NCC-RbC-T1	網膜芽種	両側性
13	JCRB1303	NCC-RbC-83	網膜芽種	片側性
14	JCRB1305	NCC-RbC-39	網膜芽種	片側性
15	JCRB1326	NCC-RbC-60	網膜芽種	両側性
16	JCRB0328	RBL162T	網膜芽種	-
17	JCRB0329	RBL221T	網膜芽種	-
18	JCRB0330	RBL182T	網膜芽種	-
19	JCRB3005	R59	網膜芽種	両側性
1	JCRB0309	CS2OS	コカイン症候群	
2	JCRB0310	CS2AW	コカイン症候群	
3	JCRB1056	CS2OS(SVT)	コカイン症候群	
4	JCRB1059	CS2AWTERT	コカイン症候群	

Ⅲ 平成 21 年度～23 年度の研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（3年）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Osada N, Hirata M, Tanuma R, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Kameoka Y, Hashimoto K, Takahashi I.	Collection of <i>Macaca fascicularis</i> cDNAs derived from bone marrow, kidney, liver, pancreas, spleen, and thymus.	BMC Res Notes.	29	2:199	2009 Sep
Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N.	IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice.	J Immunol.	183(5)	3417-24	2009 Sep Epub 2009 Aug 12.
Higashino A, Osada N, Suto Y, Hirata M, Kameoka Y, Takahashi I, Terao K.	Development of an integrative database with 499 novel microsatellite markers for <i>Macaca fascicularis</i> .	BMC Genet.	5	10:24	2009 Jun
Osada N, Uno Y, Mineta K, <u>Kameoka Y</u> , Takahashi I, Terao K.	Ancient genome-wide admixture extends beyond the current hybrid zone between <i>Macaca fascicularis</i> and <i>M. mulatta</i> .	Mol Ecol.	19(14)	2884-95	2010 Jul Epub 2010 Jun 23.
Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A.	DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time.	PLoS Genet	7	e1002085	2011
Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A.	β -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion.	Scientific Reports	1	68	2011

Nakamura A, Miyado K, Takezawa Y, Ohnami N, Sato M, Ono C, Harada Y, Yoshida K, Kawano N, Kanai S, Miyado M, Umezawa A.	Innate immune system still works at diapause, a physiological state of dormancy in insects.	Biochem Biophys Res Commun	410	351-357	2011
Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A.	Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells.	Genes Cells	16	1-11	2011
Cui CH, Miyoshi S, Tsuji H, Makino H, Kanzaki S, Kami D, Terai M, Suzuki H, Umezawa A.	Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy.	Hum Mol Genet	20	235-244	2011
Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y, Umezawa A.	Biomaterials for the Feeder-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells.	Chem Rev	111	3021-3035	2011
Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H.	Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX.	Mol Ther	19	400-407	2011
Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A.	Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts.	PLoS One	5	E13017	2010

Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A.	Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling.	Curr Med Chem	17	3245-3252	2010
Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T	Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells.	Genes Cells	14	1395-1404	2009
Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A.	Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS.	Exp Cell Res	315	2727-2740	2009
Sugimoto M, Arai H, Tamura Y, Murayama T, Khaengkhan P, Nishio T, Ono K, Ariyasu H, Akamizu T, Ueda Y, Kita T, Harada S, Kamei K, <u>Yokode M.</u>	Mulberry leaf ameliorates the expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in db/db mice.	Atherosclerosis.	204(2)	388-94	2009
Shimada K, Murayama T, <u>Yokode M.</u> , Kita T, Uzii H, Ueda T, Lee JD, Kishimoto C.	N-acetylcysteine reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by reducing superoxide production.	Circ.J.	73(7)	1337-41	2009
Sumi E, Murayama T, <u>Yokode M.</u>	A survey of attitudes toward clinical research among physicians at Kyoto University Hospital.	BMC Med Edu	9	75	2009
Tamara Y, Sugimoto M, Murayama T, Minami M, Nishikaze Y, Ariyasu H, Akamizu T, Kita T, <u>Yokode M.</u> , Arai H.	C-C Chemokine Receptor 2 Inhibitor Improves Diet-Induced Development of Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Mice.	J Atheroscler Thromb.	17(3)	219-28	2010

Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Marusawa H, Iwanaga Y, Hasegawa K, <u>Yokode M</u> , Kimura T, Kita T.	MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo.	Proc Natl Acad Sci U S A.	107	17321-17326	2010
Hatta T, Murayama T, Narita K, Sumi E, <u>Yokode M</u>	Trend Analysis of Informed Consent Research in Clinical Trials: Comprehensive Retrieval via Electronic Databases.	Jpn J Clin Pharmacol Therapeutics	42	21-25	2011
Shimada K, Mikami Y, Murayama T, <u>Yokode M</u> , Fujita M, Kita T, Kishimoto C.	Atherosclerotic plaques induced by marble-burying behavior are stabilized by exercise training in experimental atherosclerosis.	Int J Cardiol.	151(3)	284-289	2011
Shimada K, Murayama T, <u>Yokode M</u> , Kita T, Fujita M, Kishimoto C.	Olmesartan, a novel angiotensin II type 1 receptor antagonist, reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice associated with reducing superoxide production.	Nutr Metab Cardiovasc Dis.	21(9)	672-678	2011
Tamura Y, Murayama T, Minami M, <u>Yokode M</u> , Arai H.	Differential effect of statins on diabetic nephropathy in db/db mice.	Int J Mol Med.	28(5)	683-7	2011
Ido A, Moriuchi A, Numata M, Murayama T, Teramukai S, Marusawa H, Yamaji N, Setoyama H, Kim ID, Chiba T, Higuchi S, <u>Yokode M</u> , Fukushima M, Shimizu A, Tsubouchi H.	Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety.	J Transl Med.	9	55	2011

Noda H, Iso H, Yamashita S, Ueno H, <u>Yokode M</u> , Yamada N, Ouchi Y; Defining Vascular Disease (DVD) Research Group.	Risk stratification based on metabolic syndrome as well as non- metabolic risk factors in the assessment of carotid atherosclerosis.	J Atheroscler Thromb.	8(6)	504-12	2011
Wada H, Ura S, Kitaoka S, Satoh-Asahara N, Horie T, Ono K, Takaya T, Takanabe-Mori R, Akao M, Abe M, Morimoto T, Murayama T, <u>Yokode M</u> , Fujita M, Shimatsu A, Hasegawa K.	Distinct characteristics of circulating vascular endothelial growth factor-a and C levels in human subjects.	PLoS One.	6(12)	e29351	2011
Arai H, Ouchi Y, <u>Yokode M</u> , Ito H, Uematsu H, Eto F, Oshima S, Ota K, Saito Y, Sasaki H, Tsubota K, Fukuyama H, Honda Y, Iguchi A, Toba K, Hosoi T, Kita T; Members of Subcommittee for Aging.	Toward the realization of a better aged society: messages from gerontology and geriatrics.	Geriatr Gerontol Int.	12(1)	16-22	2012
Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, <u>Yokode M</u> , Kita T, Horie M, Kimura T.	A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents.	Cardiovasc Res.	Jan 20	[Epub ahead of print]	2012
Azakami K., Sato T., Araya N., Utsunomiya A., Kubota R., Suzuki K., Hasegawa D., Izumi T., Fujita H., Aratani S., Fujii R., Yagishita N., Kamijyuku H., Kanekura T., Seino K., Nishioka K., Nakajima T., Yamano Y.	Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders.	Blood	114 (15)	3208- 3215	2009
Yamano Y., Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Azakami K., Hasegawa D., Izumi T., Fujita H., Aratani S., Yagishita N., Fujii R., Nishioka K., Jacobson S., Nakajima T.	Abnormally high levels of virus-infected IFN- γ +CCR4+CD4+CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder.	PLoS One	4(8)	e6517: 1-14	2009

Shimizu Y., Takamori A., Utsunomiya A., Kurimura M., Yamano Y., Hishizawa M., Hasegawa A., Kondo F., Kurihara K., Harashima N., Watanabe T., Okamura J., Masuda T.,	Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages.	Cancer Sci	100(3)	481-489	2009
新谷奈津美、佐藤知雄、加藤智啓、山野嘉久	T細胞の分化・成熟機構	血液・腫瘍科	58(6)	631-639	2009
Yamano Y. and Nishioka K.	The contribution of Asian researchers to the field of rheumatology.	Nat Rev Rheumatol	6(2)	106-111	2010
Kamihira S., Yamano Y., Iwanaga M., Sasaki D., Satake M., Okayama A., Umeki K., Kubota R., Izumo S., Yamaguchi K., Watanabe T.	Inter-and intra-laboratory Variability in HTLV-1 Proviral Load Quantification Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays: A Multi-Center Study.	Cancer Sci	101(11)	2361-2367	2010
Araya N., Sato T., Yagishita N., Ando H., Utsunomiya A., Jacobson S., Yamano Y.	Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease.	Viruses	3	1532-1548	2011
Sato T., Azakami K., Ando H., Araya N., Yamano Y.	Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and innate immunity.	Inflammation and Regeneration	31(1)	110-115	2011
Araya N., Takahashi K., Sato T., Nakamura T., Sawa C., Hasegawa D., Ando H., Aratani S., Yagishita N., Fujii R., Oka H., Nishioka K., Nakajima T., Mori N., Yamano Y.	Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type1-associated neurological disease.	Antivir Ther	16(1)	89-98	2011

Kitazono T., Araya N., Yamano Y., Yamada Y., Nakamura T., Tanaka Y., Inoue M., Ozaki S.	Corresponding Author: Okazaki T. Advantage of higher-avidity CTL specific for Tax against human T-lymphotropic virus-1 infected cells and tumors.	Cell Immunol	272(1)	11-17	2011
Takamori A., Hasegawa A., Utsunomiya A., Maeda Y., Yamano Y., Masuda M., Shimizu Y., Tamai Y., Sasada A., Zeng N., Choi I., Uike N., Okamura J., Watanabe T., Masuda T., Kannagi M.	Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers.	Retrovirology	7(8)	100(1-15)	2011
山野嘉久	HTLV-1キャリアー、HTLV-1-associated myelopathy(HAM)患者診療の現状と問題点	血液内科	63(1)	81-86	2011
安藤仁、八木下尚子、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久	HTLV-1関連脊髄症(HAM)の病態と治療	医療と検査機器・試薬 別冊 機器・試薬	34(4)	472-477	2011
山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、八木下尚子	HAM専門外来の取り組み	神経内科	75(4)	387-392	2011
山野嘉久、佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、八木下尚子	HTLV-1関連脊髄症(HAM)の治療法を確立していくために—その現状と展望—	日本臨牀			2011 in press
Iwamori M, Shibagaki T, Nakata Y, Adachi S, Nomura T.	Distribution of receptor glycolipids for Lactobacilli in murine digestive tract and production of antibodies cross-reactive with them by immunization of rabbits with Lactobacilli.	J. Biochem.	146 (2)	185-191	2009

M. Kodaira, H. Ryo, N. Kamada, K. Furukawa, N. Takahashi, H. Nakajima, T. Nomura, N. Nakamura	No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors.	Radiat. Res.	173	205-213	2010
S. Adachi, Haruko Ryo, T. Hongyo, H. Nakajima, R. Tsuboi-Kikuya, Y. Tokita, F. Matsuzuka, K. Hiramatsu, K. Fujikawa, T. Itoh, T. Nomura	Effects of Fission Neutrons on Human Thyroid Tissues Maintained in SCID Mice.	Mutat. Res.	696	107-113	2010
野村大成、梁治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介	宇宙環境の人体影響評価（2009年度ワーキンググループ活動報告）	Space Utiliz Res.	26	249-251	2010
Miyake T, Ueda Y, Matsuzaki S, Miyatake T, Yoshino K, Fujita M, <u>Nomura T</u> , Enomoto T, Kimura T.	CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma.	J Cancer Res Clin Oncol.	137(4)	715-22	2011
Taisei Nomura	Biological Consequence and Health Concern from Low Dose and Low Dose Rate Radiations in Mice and Humans.	Health Physics.	100	266-268	2011
Iwamori M, Iwamori Y, Adachi S, Nomura T.	Excretion into feces of asialo GM1 in the murine digestive tract and Lactobacillus johnsonii exhibiting binding ability toward asialo GM1. A possible role of epithelial glycolipids in the discharge of intestinal bacteria.	Glycoconj. J.	28	21-30	2011

野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、畑中英子、菊谷理絵、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二	宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究	Space Util. Res.	27	107-110	2011
Yogo A., Maeda T., Hori T., Sakaki H., Ogura K., Nishiuchi M., Sagisaka A., Kiriyama H., Okada H., Kanazawa S., Shimomura T., Nakai Y., Tanoue M., Sasao F., P. R. Bolton., Murakami M., Nomura T., Kawanishi S., Kondo K.	Measurement of relative biological effectiveness of protons in human cancer cells using a laser-driven quasimonoeenergetic proton beamline.	APPLIED PHYSICS LETTERS	98 053701		2011
Masao Iwamori, Akihiro Sakai, Norihito Minamimoto, Yuriko Iwamori, Kyoko Tanaka, Daisuke Aoki, Shigeki Adachi and Taisei Nomura	Characterization of novel glycolipid antigens with an a-galactose epitope in lactobacilli detected with rabbit anti-Lactobacillus antisera and occurrence of antibodies against them in human sera.	J. Biochem.	150(5)	515-523	2011
Dillip Kumar Parida ¹ , Koji Wakame, Taisei Nomura	Integrating Complimentary and Alternative Medicine in Form of Active Hexose Co-Related Compound (AHCC) in the Management of Head & Neck Cancer Patients.	International Journal of Clinical Medicine	2	588-592	2011
野村 大成、足立 成基、梁 治子、畑中 英子、菊谷理絵、時田 偉子、堀家なな緒、中島 裕夫、本行忠志、藤川 和男、伊藤哲夫、落合 俊昌、行徳淳一郎、若命 浩二、D. K. Parida、R. I.	宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究；放射線晩発影響の防護	Space Util. Res.	28	印刷中	2012

Dirks WG, MacLeod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H.	Cell line cross-contamination initiative: an interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines.	Int J Cancer	126(1)	303-304	2010
Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, Macleod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI	Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines.	Int J Cancer	127(1)	1-8	2010
American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002.	Cell line misidentification: the beginning of the end.	Nat Rev Cancer.	10(6)	441-448	2010
Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, Macleod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C, Kerrigan L.	Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues.	In Vitro Cell Dev Biol Anim.	46(9)	727-732	2010
Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, Ohgushi H, Hirano T.	Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines.	Hum Cell. :(2011)	24(1)	2-8	2011
Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK.	Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells.	Int J Dev Biol.	55(2)	181-187	2011