

★RT-PCR, PCR 反応条件

- ・逆転写反応：42°C5 分
- ・PCR 反応：95°C15 秒, 60°C60 秒 45 サイクル

★ RT-PCR および PCR の同時測定と比較実験に使用した市販の 1 Step RT-PCR キット

- a. RT-PCR Quick Master Mix (東洋紡)
- b. EXPRESS One-Step Super Script qRT-PCR Kit (Life technologies)
- c. Titan one tube RT-PCR system (Roche)
- d. PrimeScript One Step RT-PCR Kit: Perfect Real Time (Takara)
- e. One Step RT-PCR & PCR premix (Gene world: 本試薬は我々の研究室と共同で開発したものであるが、詳細な組成は GW 社より開示されていない)

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要な研究は行なっていない。

C: 結果

1. RNA ウイルス検出系の感度検定

検査系の感度を測定するため、披検ウイルス陰性を確認している細胞の RNA 1 μ g に各ウイルスのスタンダード RNA を 10⁶~10¹ コピー加えたサンプルをウイルスごとに作成した。検討の結果、スタンダードを加えなかった場合は全て陰性だったが、スタンダード RNA を加えたサンプルからはすべて陽性シグナルが検出され、測定系は全てのウイルスに対して 10 copies/reaction の測定感度を持つことを確認した。下記は代表的な実験結果。

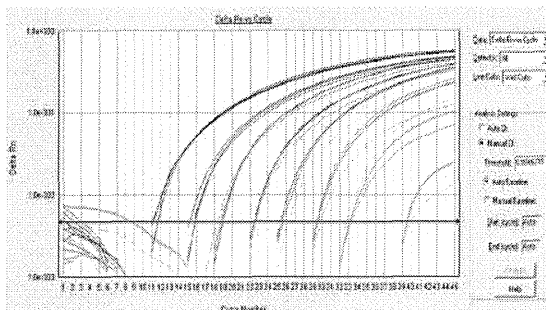


図 1 : パラインフルエンザウイルス (1, 2, 3

型) と RS ウイルスのスタンダードの測定結果
検定結果

2. 交差反応性の検討

検査系の交差反応の有無を検証するため、披検ウイルス陰性が確認されている細胞の RANA1 μ g に各ウイルスのスタンダード 100~10000 コピー分加えた測定用サンプルを各種ウイルスごとに作成した。各ウイルス検出系に作製した全ての測定用サンプルを個別に加え測定した結果、当該ウイルス検査系のスタンダードを加えた場合のみ陽性で、他のウイルススタンダードを加えた場合は陰性だった。さらに、ウイルス陽性が確定している臨床検体を用いた実験でも、交差反応性は認められなかった。したがって、今回作製したウイルス間相互の交差反応性は無いことが確認された。

3. 開発した One Step RT-PCR 試薬を使用した DNA・RNA ウイルス・マイコプラズマの検出

新しく開発した One step RT-PCR 系は PrimeScript と同等の RNA 検出能を持ち、さらに、HHV6 の検出 (PCR) では実験に用いた HHV6 スタンダード (10⁷~10¹ copies/reaction) すべてが良好に増幅し、検査に用いるのに十分な感度とダイナミックレンジを持つことが示された。しかし、マイコプラズマ (M. orale) の検出感度は 10³ 程度であり、PrimeScript より性能が優れているものの、なおマイコプラズマの検出感度は不十分だった。したがって、今回の実験目的である DNA ウイルス・RNA ウイルス・マイコプラズマを同時・同条件で検査するためには適さないことが示された。

4. Gene World (GW) 社と共同開発したプレミクスを使用した検討

GW 社との共同で、我々が開発したマルチプレ

ックス PCR を応用した DNA ウイルス・RNA ウイルス・マイコプラズマ検出系に使用可能な濃縮タイプのプレミックス (酵素、バッファーなどを含む) の開発を行った。具体的には、GW 社から提供された複数のプレミックス試作品の性能を当研究室で評価する方法により実験を実施した (試作品の詳細な試薬組成は GW 社から開示されていない)。以下に一番性能が良かったプレミックスを使用した実験結果を示す (図 1)。実験には、FluB、HHV6、マイコプラズマ (*M. orale*) の 3 種類の濃度のスタンダード (10^5 , 10^3 , 10^1 copies/reaction) を使用し、感度検定を行った。図 1 に示す通り、3 種類の病原体ともに 10 コピーの感度で検出することが可能だった。

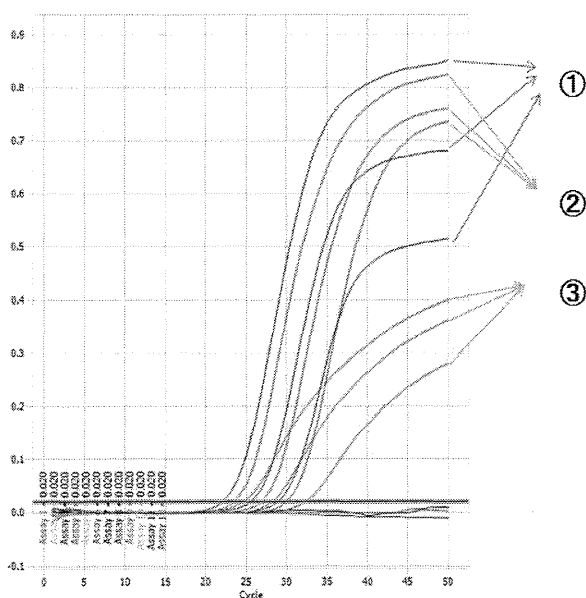


図 1 : ①FluB (RT-PCR) ②HHV6 (PCR) ③マイコプラズマ (PCR) の増幅結果

5. マイコプラズマの添加回収試験

GW 社のプレミックスを使用したマイコプラズマの添加回収試験を行った。細胞浮遊液に一定量のマイコプラズマ (*M. orale*, *M. pneumoniae*) を添加し、回収・DNA 抽出後に PCR 法によるマイコプラズマの検出を試みた。なお、実験に使用した温度・時間条件は One

Step RT-PCR を行う際と同様な条件により行った。結果により、両方の菌株ともに 10 copies/reaction の感度で検出可能なことが示された。

D: 考察

1. 作製した RNA ウイルス検査系は合成核酸を使用して感度、交差反応性の有無などに関し、十分な性能を持つ事が示されたが、実際のウイルスを用いた検証実験を行う必要がある。

2. 平成 22 年度の研究により開発した増幅試薬は DNA ウイルスと RNA ウイルスの同時検査に適用できたが、マイコプラズマの検出感度は 10^3 copies/reaction と満足すべきものではなかった。一方、GW 社と共同開発した One step RT-PCR 試薬は DNA ウイルス・RNA ウイルスに加えてマイコプラズマの検出の同時検出においても検出感度は 10^1 copies/reaction と十分な性能を持つことが示された。今回使用したウイルス・マイコプラズマ検査系はマルチプレックス PCR 法を使用するため条件が非常にタイトであり、使用できる酵素・バッファーが非常に限られている。GW 社のプレミックスは非常に良好な結果が得られたことから、DNA と RNA の同時増幅が必要となる様々な実験に使用できる汎用性を備えている可能性が高い。今後そのような観点でプレミックスの性能試験を継続していく予定である。

3. GW 社と共同開発したプレミックスを用いたマイコプラズマ (*M. orale*, *M. pneumoniae*) の添加回収試験により、本検査系は 10 copies/reaction の検出感度を持つことが示され、実用に十分な性能を持つことが明らかとなった。本検査法は、日本薬局方に記載のマイコプラズマ 3 種類 (*M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. hyohinis*) を良好に検出できることが実証

されているが、欧州薬局方には上記 3 種類を含む 9 種類のマイコプラズマが記載されている。我々はすでにその 9 種類を含む 17 種類のマイコプラズマ種を入手しており、今後 17 種類の菌種に関する添加回収試験を開発したプレミックスを用いて行っていく予定である。

4. 再生医療を実施する際に参考となる指針に記載されている具体的なウイルス種は HIV, HTLV, HBV, HCV であり、それらのゲノムを PCR 法により同時検出するためには、PCR と RT-PCR を同時に行う必要がある。また、「マイコプラズマ試験を実施すること」とあるが、現在はウイルス試験とマイコプラズマ試験を別々に実施している。今回我々が開発した実験系を使用すればウイルス試験とマイコプラズマ試験を同時・迅速・高感度に実施できるため、再生医療における安全性検査への応用が期待できる。今後、上記の各種ウイルスとマイコプラズマの同時検出実験を実施していく計画である。

E: 結論

1. これまでに作製したウイルス検査系の検査対象ウイルス数を増やす事を目的に研究を行い、パラインフルエンザウイルス (PIV) 1 型、2 型、3 型、RS ウイルス、コロナウイルス (OC43, NL63)、メタニューモウイルスの 7 種類のウイルス検出系を作製した。検査系は全てのウイルスに対して 10 copies/reaction の測定感度を持つこと、今回作製したウイルス間相互の交差反応性は無いことを確認した。

2. DNA ウイルス・RNA ウイルス・マイコプラズマを 1 ステップ・同時・迅速・高感度に測定することを目的に、RT-PCR、PCR 法による検出に使用する酵素・バッファー系の開発を行った。その結果、One step RT-PCR 法の温度・時間条

件で RT-PCR と PCR 反応を同時に行い、3 種類の微生物を高感度に検出することが可能なプレミックスの開発に成功した (Gene World 社との共同開発)。

F: 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ogawa M, et al. Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis. *Jpn J Ophthalmol.* 56(6):529-535, 2012.
2. Sugita S, et al. Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 12;53(8):4692-8. 2012.
3. Ogawa M, et al. Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250(12):1877-1883, 2012.
4. Sugita S, et al. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250:391-398, 2012.
5. Sugita S, et al. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol.* 95:345-349, 2011
6. Ng SB, et al. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling. *J Pathol.* 223:496-510, 2011
7. Abe T, et al. Point-of-Care Testing System Enabling 30-min Detection of Influenza Genes. *LAB CHIP.* 11:1166-1167, 2011

8. Yagasaki H, et al. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV6). *Ann Hematol.* 90(7):851-852, 2011
9. Watanabe A, et al. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia.* 25(8):1324-1334, 2011
10. Sugita S, et al. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiples and quantitative real-time. *Jpn J Ophthalmol.* 55(5):495-501, 2011 Jul 13.
11. Ng SB, et al. Dysregulated MicroRNAs Affect Pathways and Targets of Biological Relevance in Nasal-type Natural Killer / T -cell Lymphoma. *Blood.* 118(18):4919-4929, 2011 Nov 3.
12. Imadome K, et al. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *PLoS Pathogens*, 7(10):e1002326, Epub 2011 Oct 20.
13. Kuwana Y, et al. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PLoS ONE* 6(10):e26630, Epub 2011 Oct 19.
14. Ramakrishnan R, et al. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas. *PLoS ONE*, 6(11):e27271, 2011 Nov 11.
15. Nagasawa M., et al. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm. *Br J Haematol.* 148(5):812-814, 2010
16. Zhang Y, et al. Aberrant expression of NK cell receptors in Epstein-Barr virus-positive gammadelta T-cell lymphoproliferative disorders. *Hematology.* 15(1):43-47, 2010.
17. Kariya Y, et al. Dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci.* 101(4):876-881, 2010.
18. Iwata S, et al. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol.* 91(Pt1):42-50, 2010.
19. Yamanaka Y, et al. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood.* 114(15): 3265 – 3275, 2010.
20. Miyagawa Y, et al. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology.* 128(3):405-419, 2010.
21. Chan KK, et al. Interleukin-2 induces NF-kappaB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells. *J Pathol.* 221(2):164-74, 2010.

国内学会発表

1. 吉山裕規 他3名 EBV遺伝子BNLF2aとBNLF2bは溶解感染初期と潜伏期に発現し、腫瘍化に関与する 第60回日本ウイルス学会 2012年11月 (大阪)
2. 松田剛 他15名 ヒト化マウスを用いたEBウイルス関連リンパ増殖性疾患に対する免疫細胞治療のモデル実験 第60回日本ウイルス学会 2012年11月 (大阪)
3. 清水則夫 網羅的ウイルス検査法の開発と臨床ウイルス学的検査への応用 第30回日

- 本染色体遺伝子検査学会学術集会 2012年
11月 (東京)
4. 清水則夫 移植医療・細胞治療におけるウイルス検査系の開発輸血学会関東甲信越支部会 2012年9月 (東京)
 5. 今留謙一 他4名 細胞表面抗原マーカー解析によるEBV特異的CTL誘導の検討 第27回ヘルペスウイルス研究会 2012年6月 (名古屋)
 6. 小川学 4名 真菌28S rRNA領域定量PCRの真菌性眼内炎診断における有効性の検討 第116回日本眼科学会総会 2012年4月 (東京)
 7. 今留謙一 他10名 EBウイルス関連血球貧食症候群モデルマウスの作成と解析、第21回EBウイルス感染症研究会 2012年3月 (東京)
 8. 今留謙一 他8名 EBV関連血球貪食リンパ組織球症モデルマウスの作製と病態発現解析 第21回EBウイルス感染症研究会 2012年3月 (東京)
 9. 伊藤仁也 他11名 網羅的ウイルス・真菌PCR法を用いた造血細胞移植後肺障害の迅速診断 第33回日本造血細胞移植学会 2011年3月10日 (松山)
 10. 谷ヶ崎博 他5名 非血縁骨髄ドナー由来のChromosomal integrate HHV-6 (CIHHV-6) の1女児例 第33回日本造血細胞移植学会 2011年3月10日 (松山)
 11. 小川学 他7名 ヘルペスウイルスの関与が疑われるぶどう膜炎に対する眼内液PCR検査の有用性の検討 第114回日本眼科学会 2010年4月 (名古屋)
 12. 小川学 他5名 PCR法を用いたアcant・アメーバ角膜炎の補助診断 第21回臨床寄生虫学会 2010年6月 (東京)
 13. 今留謙一 他7名 EBウイルス関連血球

貪食症候群モデルマウスの作製と解析
第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月 (徳島)

14. 今留謙一 他8名 EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と解析 第7回EBウイルス研究会 2010年7月 (札幌)
15. 今留謙一 他11名 EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患モデルマウスの政策と病態発現解析 第20回EBウイルス感染症研究会 2010年3月 (東京)
16. 満生紀子 他11名 当科で施行した造血幹細胞移植患者における網羅的PCR法による経時的ウイルス 第32回日本造血細胞移植学会総会 2010年2月 (浜松)

国際学会発表

1. Imadome K, et al. Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV0HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. XV International Congress of Virology, Sept 2011, Sapporo, JAPAN.
2. Ogawa M, et al. Use of Human Herpes Virus (HHV) PCR Assays to Detect Viral DNA in Ocular Fluids of Patients with Herpetic Eye Diseases. ARVO 2010, Fort Lauderdale, Florida.
3. Imadome K, et al. A xenotransplant model of chronic active EB virus infection by use of NOG mice. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases, Sept 2010, Birmingham, UK.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

マイコプラズマ検査法に関する研究

研究分担者 原澤 亮 岩手大学農学部 教授

研究要旨

培養細胞は、動物個体と異なり、感染防御機構をもたないためさまざまな微生物の感染を受けやすいといわれる。しかも個体レベルでは種特異性という障碍もあるため、一般にマイコプラズマは本来の宿主以外の動物種への感染が成立しないのであるが、培養細胞では、この種特異性が発揮されず、種の壁を超えて感染が成立する。初年度は培養細胞を汚染する特定のマイコプラズマ菌種を選定し、その検出法を検討した。次年度はヘモプラズマと呼ばれる住血マイコプラズマについて、PCRを応用してその検出法を開発した。これは細胞培養にはウシ血清が用いられることからウシのヘモプラズマに焦点を絞ったものである。最終年度はその検出法を用いて、わが国のウシにおけるヘモプラズマ感染の実態を調査し、その感染が広く国内に浸潤していることを明らかにした。

A. 研究目的

マイコプラズマは無細胞壁原核生物の総称で、多くは人工培養が可能であるが、赤血球寄生性のヘモプラズマは人工培養が成功していないため、その性状がほとんど明らかにされていない。ヘモプラズマにはかつてリケッチア目アナプラズマ科のヘモバルトネラ属あるいはエペリスロゾーン属に属していた菌種のほか、新たに発見された菌種が含まれる。これらヘモプラズマ菌種はいずれも、16S rRNA 遺伝子の塩基配列相同性、宿主細胞外での増殖、および細胞壁ペプチドグリカンの欠如などの性状からマイコプラズマ属の菌種として認定されたものである。本研究では既知のマイコプラズマ検出法を初年度に比較し、そのうちとくに PCR 法を選び、また動物細胞

培養にウシ血清が用いられることに着目し、ウシを宿主とするヘモプラズマ 2 菌種 (*Mycoplasma wenyonii* および '*Candidatus Mycoplasma haemobos*') について、その検出法を検討し、あわせてその用法を用いてわが国で飼育されているウシにおける本マイコプラズマ感染を調査した。

B. 研究方法

初年度は特許微生物寄託センターにおいて予め調製された 10 倍階段希釈列（6 濃度）のマイコプラズマ菌液について、室温輸送されたもの（RT と表記）と冷凍輸送されたもの（F と表記）をそれぞれ、培養法と 2 段階 *in vitro* DNA 増幅法により力価測定した。

1. 培養法

12本の菌液について、それぞれの10マイクロリットルをマイコプラズマ用寒天平板培地へスポットし、液が流れないことを確認してからアネロバック培養容器へ入れて、37℃で2週間培養し、集落数を計測した。

マイコプラズマ用寒天平板培地はつぎのように作製した。

Difco PPL0 Broth w/oCV	6.3 g
Difco Agar Noble	3.6 g
Distilled water	207 ml

上記を三角フラスコへ入れて加温溶解後、回転子を入れてオートクレーブ滅菌する。温度が下がったら、50℃のウオーターバスへ移す。50℃のウオーターバスには、予めウマ血清、新鮮イースト抽出液、ペニシリン溶液を入れて保温しておく。

新鮮イースト抽出液はつぎのようにして調製した。ニッテン・ドライ・イースト 500 g (1缶 500 g 入)を蒸留水 1,500 ml に加え、100℃、30 分間加熱し、冷却後 3,000 rpm で20 分間遠心した。上清を回収して、1N NaOHにより pH 7.8~pH 8.0 に修正してから、115℃、15分オートクレーブし、2日間冷蔵庫に置いて不溶物を含む沈澱層を除いてから上清を回収した。

三角フラスコの寒天が50℃程度に下がったら、これに以下のものをスターラーを回しながら加える。

Horse serum	60 ml
Fresh yeast extract	30 ml
Penicillin solution	3 ml

すべてを入れたら、ペトリ皿へ流し入れる。

2. 2段階 *in vitro* DNA 増幅法

12本の菌液から DNA を抽出し、日本薬局方および日本工業規格に示された方法に従って2段階 *in vitro* DNA 増幅をオイルバスを用いて実際の温度を確認しながら行った。

次年度はわが国で飼育されている乳牛から採取した全血 (EDTA 添加) を被検サンプルとして、ヘモプラズマの検出をリアルタイム PCR により試みた。マイコプラズマに共通のプライマーを設計し、サーマルサイクラーを用いて94℃30秒、55℃2分、72℃2分の条件で30サイクルの増幅反応を行った。また、反応後、PCR産物の Tm 値を測定した。

最終年度は宮城県、岩手県、広島県、宮崎県で飼育されている乳牛から採取した全血 (EDTA 添加) から QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した DNA を被検サンプルとして、ヘモプラズマの 16S rRNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR を試みた。ウシのヘモプラズマ2菌種に共通の Forward プライマー：5' -ATATTCCTACGGGAAGCAGC-3' (*M. wenyonii* 16S rRNA 遺伝子の 328~347 番目の塩基配列に相当) および Reverse プライマー：5' -ACCGCAGCTGCTGGCACATA-3' (*M. wenyonii* 16S rRNA 遺伝子の 503~522 番目の塩基配列に相当) を設計し、スマートサイクラー (Cepheid 社) を用いて PCR を行い、最後に60℃から95℃まで、毎秒0.2℃ずつ昇温させて、PCR産物の Tm 値を測定し、その違いに基づいて菌種を同定した。

C. 研究結果

初年度の結果では2段階 PCR がマイコプラズマ検出法として有用であることが示唆された。そこで次年度に設計したプライマー配列を用いて PCR を行うことにより、ウシに感染する2種類のヘモプラズマのうち、*Mycoplasma wenyonii* からは増幅産物が得られなかったが、‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ の16S-23S rRNA 遺伝子間スペーサー領域を増幅させることに成功した。さらに PCR 産物の塩基配列を決定し、この領域にスペーサー-tRNA 遺伝子が欠如していることを明らかにした。一次構造の比較からヘモプラズマが *Mycoplasma fastidiosum* と同じ分類群に属することが示唆された。また、想定される二次構造を調べたところ、boxA および boxB に相当する配列が保存していることが判明した。最終年度の研究では、ウシに感染する2種類のヘモプラズマのうち、*Mycoplasma wenyonii* の T_m 値は $82.04 \pm 0.27^\circ\text{C}$ であり、一方 ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ のそれは $86.86 \pm 0.12^\circ\text{C}$ であることから、これを基準にして菌種を同定した。その結果、広島県と宮崎県においてそれぞれ 69.4%(25/36), 93.8%(30/32) のウシのヘモプラズマ感染が見つかった。広島県のウシ 36 頭のうち 18 頭は1歳から2歳で残りの18頭は成牛であったが、年齢とヘモプラズマ感染を関連づける証拠はみつからなかった。宮崎県では非常に高いヘモプラズマ感染がみられ、生後3ヶ月以内で冬に生まれたウシからもヘモプラズマが検出された。

D. 考察

ウシの2種類のヘモプラズマのうち1種類について、その16S-23S rRNA 遺伝子間スペーサー領域の構造を決定することに初めて成功した。この領域は近縁の菌種間の系統的な違いを見出すために微生物分類学で汎用されていることから、これを用いて既知のマイコプラズマ菌種との系統関係を調べたところ、ヘモプラズマが *M. fastidiosum* と同じ系統に含まれることが明らかになった。また、二次構造を調べたところ、ヘモプラズマの16S-23S rRNA 遺伝子間スペーサー領域は従来から知られている一般のマイコプラズマでの相当領域と極めて類似の構造上の特徴を備えていることが判明し、アンチターミネーターとしての機能を備えていることが示唆された。

E. 結論

マイコプラズマ検出法としての2段階 PCR 法の有用性は示唆された。そこで、ウシを宿主とする住血液マイコプラズマ ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ の16S-23S rRNA 遺伝子間スペーサー領域を2種家のエンドポイント PCR により増幅させ、その塩基配列を初めて明らかにした。その配列に基づき、ヘモプラズマの系統分類上の位置を推定することができた。また、開発したリアルタイム PCR 法によりわが国におけるウシヘモプラズマ感染の状況を調査し、広範に本マイコプラズマが浸潤していることが判明した。

F. 健康危険情報

ウシのヘモプラズマについては報告がないが、ヒツジおよびブタのヘモプラズマが人へ感染

することが海外で報告されていて、人獣共通病原体として認識されるようになってきた。

G. 研究発表

3. 論文発表

Ohtake, Y., Nishizawa, I., Sato, M., Watanabe, Y., Nishimura, T., Matsubara, K., Nagai, K., and Harasawa, R. (2011) *Mycoplasma ovis* detected in free-living Japanese serows, *Capricornis crispus*. J. Vet. Med. Sci. 73: 371-373.

Obara, H., Fujihara, M., Watanabe, Y., Ono, H.K., and Harasawa, R. (2011) A feline hemoplasma, '*Candidatus Mycoplasma haematominutum*', detected in dog in Japan. J. Vet. Med. Sci. 73: 841-843.

Giangaspero, M., and Harasawa, R. (2011) Species characterization in the genus *Pestivirus* according to palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. J. Virol. Methods 174: 166-172.

Suzuki, J., Sasaoka, F., Fujihara, M., Watanabe, Y., Tasaki, T., Oda, S., Kobayashi, S., Sato, R., Nagai, K., and Harasawa, R. (2011) Molecular identification of '*Candidatus Mycoplasma haemovis*' in sheep with hemolytic anemia. J. Vet. Med. Sci. 73: 1113-1115.

Fujihara, M., Obara, H., Watanabe, Y., Ono, H.K., Sasaki, J., Goryo, M., and Harasawa, R. (2011) Acidic environments induce differentiation of

Proteus mirabilis into swarmer morphotypes. Microbiol. Immunol. 55: 489-493.

Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., and Harasawa, R. (2011) Rapid identification of hemoplasma species by palindromic nucleotide substitutions at the GAAA tetraloop helix in the specificity domain of ribonuclease P RNA. J. Vet. Med. Sci. 73: 1517-1520.

Giangaspero, M., Ibata, G., Savini, G., Osawa, T., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kimura, A., and Harasawa, R. (2011) Epidemiological survey of *Border disease virus* among sheep from northern districts of Japan. J. Vet. Med. Sci. 73: 1629-1633.

Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Nagai, K., and Harasawa, R. (2011) Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA genes. J. Vet. Med. Sci. 73: 1657-1661.

Giangaspero, M., Osawa, T., Orusa, R., Frossard, J.-P., Naidu, B., Robetto, S., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kato, K., Kimura, A., and Harasawa, R. (2011) Epidemiological survey for visna-maedi among sheep in northern prefectures of Japan. Vet. Ital. 47: 437-451.

Fujihara, Y., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Ooshita, K., Ano, H., and Harasawa, R. (2011) Prevalence of hemoplasma infection

among cattle in the western part of Japan. J. Vet. Med. Sci. 73: 1653-1655.

Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Watanabe, Y., Nagai, K., and Harasawa, R. (2012) Examination of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' and *Mycoplasma haemofelis*. J. Vet. Med. Sci. 74: 83-87.

Watanabe, Y., Fujihara, M., Suzuki, J., Sasaoka, F., Nagai, K., and Harasawa, R. (2012) Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers. J. Vet. Med. Sci. 74: 1315-1318.

Giangaspero, M., Nicholas, R.A., Hlusek, M., Bonfini, B., Osawa, T., Orusa, R., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kato, K., Kimura, A., Harasawa, R., and Ayling, R.D. (2012) Seroepidemiological survey of sheep flocks from northern Japan for *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma agalactiae*. Trop. Anim. Health Prod. 44: 395-398.

Giangaspero, M., Osawa, T., Bonfini, B., Orusa, R., Robetto, S., and Harasawa, R. (2012) Serological screening of *Coxiella burnetii* (Q fever) and *Brucella* spp. in sheep flocks in the northern prefectures of Japan in 2007. Vet. Ital. 48: 357-365.

4. 学会発表

笹岡文菜, 鈴木 尋, 渡邊祐策, 藤原正俊, 原澤 亮 (2011) ヘモプラズマの RNase P RNA 遺伝子および 16S-23S rRNA 遺伝子間領域の解析. 第 65 回日本細菌学会東北支部総会 (山形市) 8 月 18 日

藤原正俊, 原澤 亮 (2011) 尿素添加液体培地における菌体長の変化について. 第 65 回日本細菌学会東北支部総会 (山形市) 8 月 18 日

小田伸一, 赤川彰崇, 田崎智子, 小林沙織, 鈴木 尋, 原澤 亮 (2011) ヒツジおよびヤギにおける重度貧血とヘモプラズマ感染. 第 114 回日本畜産学会 (十和田市) 8 月 26 日

上坂友香理, 西村貴志, 西部進矢, 出口善隆, 藤原正俊, 原澤 亮, 松原和衛 (2011) 盛岡市乙部地区周辺のニホンカモシカ (*Capricornis Crispus*) の生息状況調査. 第 17 回日本野生動物医学会大会講演要旨集: 139. (東京) 9 月 30 日

Suzuki, J., Sasaoka, F., Fujihara, M., Watanabe, Y., Tasaki, T., Oda, S., Kobayashi, S., Sato, R., Nagai, K., and Harasawa, R. (2011) Molecular identification of '*Candidatus Mycoplasma haemovis*' in sheep with hemolytic anemia. IUMS2011, Sapporo, Sept. 8.

Giangaspero, M., Bonfini, B., Orusa, R., Osawa, T., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kato, K., Kimura, A., and Harasawa, R. (2011)

Serological evidence of *Coxiella burnetii* (Q Fever) in sheep flocks in northern prefectures of Japan. IUMS2011, Sapporo, Sept. 8.

Fujihara, M., Nosaka, Y., Aizawa, S.-I., and Harasawa, R. (2011) Swarming motility of *Paenibacillus alvei* was suppressed by Tn916 insertion into FliD operon or sensor histidine kinase gene. IUMS2011, Sapporo, Sept. 8.

Giangaspero, M., Harasawa, R., Bonfini, B., Orusa, R., Osawa, T., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kato, K., Kimura, A. (2011) Bacterial diseases with zoonotic potential in sheep flocks in northern Japan. IUMS2011, Sapporo, Sept. 9.

Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., and Harasawa, R. (2011) Two clusters in hemoplasmas detected from a commercial pig farm in Japan. IUMS2011, Sapporo, Sept. 9.

Giangaspero, M., Ibata, G., Savini, G., Osawa, T., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kimura, A., and Harasawa, R. (2011) Epidemiological survey for *Border disease virus* among sheep from northern districts of Japan. IUMS2011, Sapporo, Sept. 15.

Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., and Harasawa, R. (2012) Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using species-specific primers in Japan. 19th meeting of

the International Organization for Mycoplasma, July 15-20, Toulouse, France.

Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Watanabe, Y., and Harasawa, R. (2012) Features of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences of *Hemoplasma*. 19th meeting of the International Organization for Mycoplasma, July 15-20, Toulouse, France.

Suzuki, J., Takemura, K., Fujihara, M., Okada, K., Sato, S., and Harasawa, R. (2012) *Mycoplasma dispar* in sporadic otitis media among beef calves in Japan. 19th meeting of the International Organization for Mycoplasma, July 15-20, Toulouse, France.

Obara, H., Kondou, D., Fujihara, M., Watanabe, Y., Sasak9, T., Seki, M., Suzuki, G., and Harasawa, R. (2012) Apoptosis in arthritis and pneumonia lesions of swine infected with *Mycoplasma hyorhinis*. 19th meeting of the International Organization for Mycoplasma, July 15-20, Toulouse, France.

Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Nagai, K., and Harasawa, R. (2012) Real-time PCR using species-specific primers revealed the prevalence of *Mycoplasma suis* and *M. parvum* in Japan. 22nd International Pig Veterinary Society Congress, June 10-13, Jeju, Korea.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

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
DirksWG, 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.	International Journal of 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.	International Journal of Cancer	127(1)	1-8	2010
American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002.	Cell line misidentification: the beginning of the end.	Nature Reviews 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 Cellular & Developmental Biology - Animal	46(9)	727-732	2010
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.	Molecular Therapy	Feb;19(2)	400-7	2010
Yohei Hayashi, Techuan Chan, Masaki Warashina, Masakazu Fukuda, Takashi Ariizumi1, Koji Okabayashi, Naoya Takayama, Makoto Otsu, Koji Eto, Miho Kusuda Furue, Tatsuo Michiue, Kiyoshi Ohnuma, Hiromitsu Nakauchi, Makoto Asashima.	Reduction of N-glycolylneuraminic Acid in Human in Induced Pluripotent Stem Cells Generated or cultured under Feeder- and Serum-free Defined Conditions.	Plos One	Nov23;5(11)	e14099	2010
Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa H., Furue-Kusuda M., Mizuguchi H.	Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells.	Cellular Reprogramming	Oct;12(5)	501-7	2010
Yuko Aihara, Yohei Hayashi, Mitsui Hirata, Nobutaka Ariki, Shinsuke Shibata, Narihito Nagoshi, Mio Nakanishi, Kiyoshi Ohnuma, Masaki Warashina, Tatsuo Michiue, Hideho Uchiyama, Hideyuki Okano, Makoto Asashima and Miho Kusuda Furue.	Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture.	International Journal of Developmental Biology	54	1287 - 1294	2010
Jie Na, Miho K. Furue and Peter W. Andrews.	Inhibition of ERK1/2 Prevents Neural and Mesendodermal Differentiation and Promotes Human Embryonic Stem Cell Self-renewal.	Stem Cell Research	5(2)	157-69	2010
Miho Kusuda Furue, Daiki Tateyama, Masaki Kinehara, Jie Na, Tetsuji Okamoto, J. Denry Sato.	Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium.	In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	46	573-576	2010
Nagasawa M., Ogawa K., Nagata K., Shimizu N.	Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm.	British Journal of Haematology	148(5)	812-814	2010
Zhang Y, Ohyashiki JH, Shimizu N, Ohyashiki K.	Aberrant expression of NK cell receptors in Epstein-Barr virus-positive gammadelta T-cell lymphoproliferative disorders.	Hematology	15(1)	43-47	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J.	Dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome.	Cancer Science	101(4)	876-881	2010
Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H.	Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection.	Journal of General Virology	91(Pt1)	42-50	2010
Chan KK, Shen L, Au WY, Yuen HF, Wong KY, Guo T, Wong ML, Shimizu N, Tsuchiyama J, Kwong YL, Liang RH, Srivastava G.	Interleukin-2 induces NF-kappaB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells.	The Journal of Pathology	221(2)	164-174	2010
.Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N., Imadome K., Horiuchi Y., Onda K., Yajima M., Nakamura H., Katagiri Y., Okita H., Morio T., Shimizu N., Fujimoto J. and Fujiwara S.	Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin.	Immunology	128(3)	405-419	2010
Nishizawa, I., Sato, M., Fujihara, M., Sato, S., and Harasawa, R.	Differential detection of hemotropic Mycoplasma species in cattle by melting curve analysis of PCR products.	The Journal of Veterinary Medical Science	72	77-79	2010
Fujihara, M., Ishida N., Asano K., Matsuda K., Nomura, N., Nishida, Y., and Harasawa R.	Variation of genes encoding GGPL synthases among Mycoplasma fermentans J.	The Journal of Veterinary Medical Science	72	805-808	2010
Obara, H., and Harasawa, R.	Nitric oxide cause anoikis through attenuation of E-cadherin and activation of caspase-3 in human gastric carcinoma AZ-521 cells infected with Mycoplasma hyorhinis.	The Journal of Veterinary Medical Science	72	869-874	2010
Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Matsubara, K., Yamauchi, K., and Harasawa, R.	Novel hemoplasma species detected in free-ranging sika deer (Cervus nippon)	The Journal of Veterinary Medical Science	72	1527-1530	2010
Giangaspero M., Orusa R., Nicholas R. A. J., Harasawa R., Ayling R.D., Churchward C. P., Whatmore A., Bradley D., Robetto S., Sacchi L., Domenis L.	Characterization of mycoplasma isolated from an ibex (Capra ibex) suffering from keratoconjunctivitis in northern Italy.	Journal of Wildlife Diseases	46	1070-078	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	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
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	ヒト多能性幹細胞の命名法の国際統一規格案について.	再生医療	vol.11	2-8	2011
Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M.	Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR.	Br J Ophthalmol	95(3)	345-349	2011
Ng SB, Selvarajan V, Huang G, Zhou J, Feldman AL, Law M, Kwong YS, Shimizu N, Nagami Y, Aozasa K, Salto-Tellez M and Chng WJ.	Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling.	J Phatol.	223	496-510	2011
Abe T, Segawa Y, Watanabe H, Yotoriyama T, Kai Y, Yasuda A, Shimizu N and Tojo N	Point-of-Care Testing System Enabling 30-min Detection of Influenza Genes.	LAB CHIP	11	1166-1167	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yagasaki H, Kato M, Shimizu N, Shichino H, Chin M and Mugishima H.	Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV6).	Ann Hematol	90 (7)	851-852	2011
Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N and Sawada K.	The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma.	Leukemia	25 (8)	1324-1334	2011
Sugita S, Ogawa M, Inoue S, Shimizu N and Mochizuki M.	Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiples and quantitative real-time.	Jpn J Ophthalmol.	55	495-501	2011
Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M.	Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis.	Graefe Arch Clin Exp	250 (3)	391-398	2011
Ng SB, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay J, Lin B, Bi C, Tan J, Kwong YL, Shimizu N, Aozasa K, Chng W.	Dysregulated MicroRNAs Affect Pathways and Targets of Biological Relevance in Nasal-type Natural Killer / T-cell Lymphoma.	Blood	118(18)	4919-4929	2011
Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, and Fujiwara S.	Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells.	PLoS Pathogens	7(10)	e1002326	2011
Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M and Fujiwara S	Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice.	PloS ONE	6(10)	e26630	2011
Ramakrishnan R, Donahue H, Garcia D, Tan J, Shimizu N, Rice AP and Ling P.	Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas.	PloS ONE	6(11)	e27271	2011
Ohtake, Y., Nishizawa, I., Sato, M., Watanabe, Y., Nishimura, T., Matsubara, K., Nagai, K., and Harasawa, R.	Mycoplasma ovis detected in free-living Japanese serows, Capricornis crispus.	J. Vet. Med. Sci.	73	371-373	2011
Obara, H., Fujihara, M., Watanabe, Y., Ono, H.K., and Harasawa, R.	A feline hemoplasma, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', detected in dog in Japan.	J. Vet. Med. Sci.	73	841-843	2011
Giangaspero, M., and Harasawa, R.	Species characterization in the genus Pestivirus according to palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region.	J. Virol. Methods	174	166-172	2011
Suzuki, J., Sasaoka, F., Fujihara, M., Watanabe, Y., Tasaki, T., Oda, S., Kobayashi, S., Sato, R., Nagai, K., and Harasawa, R.	Molecular identification of 'Candidatus Mycoplasma haemovis' in sheep with hemolytic anemia.	J. Vet. Med. Sci.	73	1113-1115	2011
Fujihara, M., Obara, H., Watanabe, Y., Ono, H.K., Sasaki, J., Goryo, M., and Harasawa, R.	Acidic environments induce differentiation of Proteus mirabilis into swarmer morphotypes.	Microbiol. Immunol.	55	489-493	2011
Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., and Harasawa, R.	Rapid identification of hemoplasma species by palindromic nucleotide substitutions at the GAAA tetraloop helix in the specificity domain of ribonuclease P RNA	J. Vet. Med. Sci.	73	1517-1520	2011
Giangaspero, M., Ibata, G, Savini, G, Osawa, T., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kimura, A., and Harasawa, R.	Epidemiological survey of Border disease virus among sheep from northern districts of Japan.	J. Vet. Med. Sci.	73	1629-1633	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Nagai, K., and Harasawa, R.	Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA genes.	J. Vet. Med. Sci.	73	1657-1661	2011
Gianguaspero, M., Osawa, T., Orusa, R., Frossard, J.-P., Naidu, B., Robetto, S., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kato, K., Kimura, A., and Harasawa, R.	Epidemiological survey for visna-maedi among sheep in northern prefectures of Japan	Vet. Ital.	47	437-451	2011
Fujihara, Y., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Ooshita, K., Ano, H., and Harasawa, R.	Prevalence of hemoplasma infection among cattle in the western part of Japan.	J. Vet. Med. Sci.	73	1653-1655	2011
Kinehara M, Kawamura S, Tateyama D, Suga M, Matsumura H, Mimura S, Hirayama N, Hirata M, Uchio-Yamada K, Kohara A, Yanagihara K, Furue MK.	Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal.	PLoS One.	8(1)	e54122	2013
Capes-Davis A, Reid YA, Kline MC, Storts DR, Strauss E, Dirks WG, Drexler HG, Macleod RA, Sykes G, Kohara A, Nakamura Y, Elmore E, Nims RW, Alston-Roberts C, Barallon R, Los GV, Nardone RM, Price PJ, Steuer A, Thomson J, Masters JR, Kerrigan L.	Match criteria for human cell line authentication: Where do we draw the line?	Int J Cancer.			2012 in press
Manabu Ogawa , Sunao Sugita , Norio Shimizu , Ken Watanabe, Chiro Nakagawa , Manabu Mochizuki	Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis	Jpn J Ophthalmol	2012 Nov	529-35	2012
Manabu Ogawa & Sunao Sugita & Ken Watanabe & Norio Shimizu & Manabu Mochizuki	Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	2012 Dec; 250 (12)	1877-83	2012
Sugita S; Shimizu N, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M.	Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders.	Invest Ophthalmol Vis Sci	Jul 12;53(8):	4692-8	2012
Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Watanabe, Y., Nagai, K., and Harasawa, R.	Examination of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences of 'Candidatus Mycoplasma haemobos' and Mycoplasma haemofelis.	J. Vet. Med. Sci.	74	83-87	2012
Watanabe, Y., Fujihara, M., Suzuki, J., Sasaoka, F., Nagai, K., and Harasawa, R.	Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers.	J. Vet. Med. Sci.	74	1315-1318	2012
Gianguaspero, M., Nicholas, R.A., Hlusek, M., Bonfini, B., Osawa, T., Orusa, R., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kato, K., Kimura, A., Harasawa, R., and Ayling, R.D.	Seroepidemiological survey of sheep flocks from northern Japan for Mycoplasma ovipneumoniae and Mycoplasma agalactiae.	Trop. Anim. Health Prod.	44	395-398	2012
Gianguaspero, M., Osawa, T., Bonfini, B., Orusa, R., Robetto, S., and Harasawa, R.	Serological screening of Coxiella burnetii (Q fever) and Brucella spp. in sheep flocks in the northern prefectures of Japan in 2007.	Vet. Ital.	48	357-365	2012

Database of misidentified cell lines

R. Ian Freshney

Center for Oncology and Applied Pharmacology, Division of Cancer Sciences and Molecular Pathology, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, United Kingdom

Dear Sir,

Much of current cancer and cell biology research depends on the use of cell lines cultured from normal and malignant tissue. However, ever since the time when continuous cell lines were first established, there has been a problem of the more vigorous lines contaminating and overgrowing more slowly growing cultures. This has been compounded by confusion of one cell line with another by mislabeling in routine culture or during and after cryopreservation. The result is that some 15–20% of cell lines in current use may not be what they are claimed to be. This has prompted a number of recent reports in the literature^{1–7} and discussions at scientific meetings. One of the main conclusions is that there needs to be a way to alert scientists using established and frequently propagated cell lines that there is a significant risk that they may be using cell lines which are not what they need them to be. This issue of *International Journal of Cancer* will address this problem and wants to increase the awareness of authors submitting their work for publication and of reviewers considering the merit of the work. Restrictions and conditions will be imposed regarding proof of authentication of cell lines used and advice given on how to authenticate cell lines (see editorial and letter by W. Dirks). My purpose in this letter is to notify the scientific community of the existence and free availability of a list of cell lines which are known or suspected to be falsely identified or cross contaminated. This will allow scientists embarking on a project or reviewers considering the work for publication, to have access to a data source which will advise them on the respective cell line's authenticity. This list is available for download from: <http://www.hpacultures.org.uk/services/celllineidentityverification/misidentifiedcellines.jsp> by following the link after my and Amanda Capes-Davis's names. It has been compiled from quality assurance carried out by a number of cell banks (ATCC, CellBank Australia, sDSMZ, ECACC, JCRB, and RIKEN) and published on their websites, from an entry in Wikipedia, and from reports in the scientific literature. It must be emphasized that while many of the cell lines listed are clearly and incontrovertibly not what they are supposed to be, original and authentic stocks of other lines may yet exist. Where this is believed to be the case the line is included in the second table. This list will be published (Capes-Davis *et al.*, ms in preparation).

I would request that anyone who uses this list and finds that some misidentified cell lines have been omitted or that some cell lines reported as misidentified do have authentic stocks available should contact me (i.freshney@ntlworld.com), and I will arrange to have the database updated.

The recommended procedure for anyone contemplating the use of cell lines is as follows:

- Check that the cell line that you intend to use is not listed in the above database.
- Ensure that the cell line is obtained from a properly authenticated source (and that may not be the originator), preferably from one of the recognized cell banks.
- Authenticate cell lines received from a nonauthenticated source on receipt (see letter of W. Dirks, this issue, and instruction for authors of IJC).
- Repeat authentication at intervals of 3–6 months for cell lines used for an extended study, before cryopreservation, and after thawing for further use.

It may not be possible to eliminate misidentification entirely, as new examples will continue to appear, but following these precautions should reduce the frequency and minimize the spread of the problem.

Yours sincerely,
R. Ian Freshney

References

1. Stacey GN, Masters JRM, Hay RJ, Drexler HG, MacLeod RAF, Freshney RI. Cell contamination leads to inaccurate data: we must take action now. *Nature* 2000;403:456.
2. Masters J. Re: false cell lines. *Exp Cell Res* 2002;272:216.
3. Drexler HG, Dirks WG, Matsuo Y, MacLeod RA. False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia*. 2003;17:416–26.
4. Nardone RM. Curbing rampant cross-contamination and misidentification of cell lines. *Biotechniques*. 2008;45:221–7.
5. Lacroix M. Persistent use of "false" cell lines. *Int J Cancer*. 2008;122:1–4.
6. MacLeod RAF, Dirks WG, Drexler HG. One falsehood leads easily to another. *Int J Cancer*. 2008;122:2165–8.
7. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenth U, Benzra M, Knauf JA, Fagin JA, Marlow LA, Copland JA, Smallridge RC, Haugen BR. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:4331–41.

DOI: 10.1002/ijc.24998

History: Received 3 May 2009; Accepted 12 May 2009; Online 23 October 2009

Correspondence to: R. I. Freshney, 24 Greenwood Drive, Bearsden, Glasgow G61 2HA, Scotland, United Kingdom, E-mail: i.freshney@ntlworld.com

Cell line cross-contamination initiative: an interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines

Wilhelm G. Dirks¹, Roderick A. F. MacLeod¹, Yukio Nakamura², Arihiro Kohara³, Yvonne Reid⁴, Herbert Milch¹, Hans G. Drexler¹, Hiroshi Mizusawa³

¹DSMZ—Department of Human and Animal Cell Cultures, Braunschweig, Germany

²RIKEN—Cell Engineering Division, Tsukuba, Japan

³JCRB—Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Japan

⁴ATCC—American Type Culture Collections, Manassas, VA

Dear Sir,

Recent reports^{1–4} demonstrate the growing perception in the scientific community that cross contamination (CC) of mammalian cell lines represents a major risk for generating false scientific data. The level to which research has been compromised by the use of contaminated or misidentified cell lines has become a major concern for scientists, granting agencies, and, increasingly, scientific journals. In 2007, a group of cell biologists led by Roland M. Nardone petitioned the United States Secretary of Health and Human Services to develop an active program for cell line authentication.⁵ They stressed that research and teaching tools in diverse fields of science and industry would be unimaginable without cell cultures. Despite the key importance of cell cultures, only little consensus exists regarding the technical means by which cell line identity can be controlled and how to follow through the results of any such testing.

The key problems of CC are known and chronic in nature: neglecting guidelines for quality control and disregarding adequate cell culture techniques are the main reasons why cell lines have been misidentified or cross contaminated. The incidence of CC in directly and indirectly provenanced cell lines alike^{1,3} implies that the majority of false cell lines are perpetrated in originators' own laboratories, presumably by failures during the establishment of new cell lines. A plethora of reports unmasking bogus cancer cell lines, including members of the NCI-60 panel used to generate reference baseline transcriptional drug responses has triggered calls for remedial action.^{5,6} Nevertheless, standard authentication procedures for testing cell line identity have yet to be defined.

Short tandem repeat (STR) microsatellite sequences are highly polymorphic in human populations, and their stability throughout the lifespan of individuals renders STR profiling (typing) ideal for forensic use. STR typing has served as a reference technique for identity control of human cell lines at Biological Resource Centers (BRCs) since the turn of the millennium.⁷ Ideally, authentication involves coincident STR typing of paired donor and derived cell line samples. However, this ideal is met by a few recently established cell lines only. Most widely used cell lines are decades old and their

identification is largely retrospective and multidisciplinary, combining diverse criteria such as uniqueness and the congruence of STR profiles across independent samples with the consistency of observed karyotypes with those reported by the originators.

The DSMZ as well as the ATCC, JCRB, and RIKEN repositories have generated large databases of STR cell line profiles. By using the same microsatellite loci at these BRCs, individual databases could be merged, thereby facilitating interactive searches. This work was piloted at the DSMZ to generate an international reference STR profile database for human cell lines. To render it user friendly, a simple search engine for interrogating STR cell line profiles has now been made available on the homepages of JCRB and DSMZ (http://cellbank.nibio.go.jp/cellbank_e.html, <http://www.dsmz.de/STRanalysis>). Registered users simply login at the search-site on the DSMZ homepage and will be guided. Aided by simple prompts, users can input their own cell line STR data to retrieve best matches with authenticated cell lines listed on the database.

Once the problem of false negatives due to discrepant representation of single STR alleles, e.g., by losses of heterozygosity and bottlenecking selection—has been tackled and unambiguous search results are produced, human cell lines will need to be consistent with consensus STR reference data sets. STR profiles of all human cell lines distributed by DSMZ, JCRB, and RIKEN and one-third of the cell lines distributed by ATCC are now publicly accessible on interactive databases where match criteria have been arbitrarily set to 95%. Inevitably, reference profiles remain subject to revision until all commonly held cell lines have been STR typed across participating repositories. At present, about 2,342 such cell lines have been STR typed and are represented as reference sets on the database.

The authors of this article are currently participating in an international workgroup organized by the ATCC Standards Development Organization, (ATCC SDO) to develop a standardized methodology (protocols and procedures for STR analysis) for authenticating human cell lines. An additional

goal of the workgroup is to establish a global database for STR profiles of human cell lines. The development of the consensus standard offers a new tool to the cell biology community that will foster reproducibility and comparability of cell lines used in different laboratories. Armed with these tools, online verification of cell line identity should prove a vital weapon to combat the havoc of cell line cross contamination which has dogged cancer research since inception.

Yours sincerely,
 Wilhelm G. Dirks
 Roderick A. F. MacLeod
 Yukio Nakamura
 Arihiro Kohara
 Yvonne Reid
 Herbert Milch
 Hans G. Drexler
 Hiroshi Mizusawa

References

1. Drexler HG, Dirks WG, Matsuo Y, MacLeod RAF. False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* 2003; 17:416–26.
2. Liscovitch M, Ravid D. A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* 2007; 245:350–52.
3. MacLeod RAF, Dirks WG, Kaufmann M, Matsuo Y, Milch H, Drexler HG. Widespread intra-species cross-contamination of human tumor cell line arising at source. *Int J Cancer* 1999;83:555–63.
4. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenti U, Benzra M, Knauf JA, Fagin JA, Marlow LA, Copland JA, Smallridge RC, Haugen BR. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93: 4331–41.
5. Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biol Toxicol* 2007;23:367–72.
6. Stacey, GN, Masters, JRM, Hay, RJ, Drexler, HG, MacLeod, RAF, Freshney, RI. Cell contamination leads to inaccurate data: we must take action now. *Nature* 2000;403:456.
7. Masters JR, Thompson JA, Daly-Burns B, et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:8012–7.

DOI: 10.1002/ijc.24999

History: Received 24 Jun 2009; Accepted 16 Oct 2009; Online 26 October 2009

Correspondence to: W. G. Dirks, DSMZ—Department of Human and Animal Cell Culture, Braunschweig, Germany,
 E-mail: wdi@dsmz.de

Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines

Amanda Capes-Davis¹, George Theodosopoulos¹, Isobel Atkin², Hans G. Drexler³, Arihiro Kohara⁴, Roderick A.F. MacLeod³, John R. Masters⁵, Yukio Nakamura⁶, Yvonne A. Reid⁷, Roger R. Reddel¹ and R. Ian Freshney⁸

¹ CellBank Australia – Children’s Medical Research Institute, Westmead, NSW, Australia

² European Collection of Cell Cultures (ECACC) – Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, United Kingdom

³ DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany

⁴ JCRB – Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Japan

⁵ Institute of Urology, University College London, London, United Kingdom

⁶ RIKEN – BioResource Center Cell Engineering Division, Tsukuba, Japan

⁷ ATCC – American Type Culture Collections, Manassas, VA

⁸ Centre for Oncology and Applied Pharmacology, Glasgow University, Glasgow, United Kingdom

Continuous cell lines consist of cultured cells derived from a specific donor and tissue of origin that have acquired the ability to proliferate indefinitely. These cell lines are well-recognized models for the study of health and disease, particularly for cancer. However, there are cautions to be aware of when using continuous cell lines, including the possibility of contamination, in which a foreign cell line or microorganism is introduced without the handler’s knowledge. Cross-contamination, in which the contaminant is another cell line, was first recognized in the 1950s but, disturbingly, remains a serious issue today. Many cell lines become cross-contaminated early, so that subsequent experimental work has been performed only on the contaminant, masquerading under a different name. What can be done in response—how can a researcher know if their own cell lines are cross-contaminated? Two practical responses are suggested here. First, it is important to check the literature, looking for previous work on cross-contamination. Some reports may be difficult to find and to make these more accessible, we have compiled a list of known cross-contaminated cell lines. The list currently contains 360 cell lines, drawn from 68 references. Most contaminants arise within the same species, with HeLa still the most frequently encountered (29%, 106/360) among human cell lines, but interspecies contaminants account for a small but substantial minority of cases (9%, 33/360). Second, even if there are no previous publications on cross-contamination for that cell line, it is essential to check the sample itself by performing authentication testing.

Key words: authentication, cell culture, cell lines, cross-contamination, DNA profiling, misidentification

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Novelty and Impact: This manuscript reviews the literature relating to cross-contamination of cell lines. Its novelty comes from the inclusion of a list of known cross-contaminated cell lines (over 300 lines named), allowing researchers to check their own cell lines with reference to the article. Recent developments in this field, including methods of authentication testing, are also discussed.

Grant sponsor: National Health and Medical Research Council of Australia

DOI: 10.1002/ijc.25242

History: Received 24 Nov 2009; Accepted 18 Jan 2010; Online 8 Feb 2010

Correspondence to: Amanda Capes-Davis, CellBank Australia, Children’s Medical Research Institute, Locked Bag 23, Wentworthville, NSW 2145, Australia, Fax: +61 2 9687 2120, E-mail: acapdav@gmail.com

Cell Lines as Model Systems

Continuous cell lines represent a readily accessible and easily studied resource for research into health and disease. These cell lines have acquired the ability to proliferate indefinitely if grown in the appropriate culture conditions; usually this is a rare event, since the majority of cells even in tumor tissue will cease proliferation after a limited number of cell divisions.¹ However, once established, a continuous cell line can be repeatedly passaged, reliably recovers from cryopreservation and retains many of the properties of its cell type or tissue of origin.^{2,3} These advantages make continuous cell lines effective, and widely used, model systems for normal cellular processes and for a variety of disease states.

Cell lines are particularly attractive models for studying malignant disease. The genetic changes in tumor-derived cell lines closely resemble those of the tumors of origin.⁴ Moreover, the genetic changes required to establish continuous cell lines from normal cells recapitulate many of the genetic changes occurring in cancer.^{5,6} These genetic changes are required to overcome replicative senescence, in which normal cells continue to be metabolically active but are restricted from further division.¹ Cells able to overcome senescence continue