

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業)

**創薬・疾患研究のための
細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究**

平成25年度 総括・分担研究報告書

課題番号： H25-創薬-指定-007

研究代表者 小原 有弘

**独立行政法人医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部 培養資源研究室
〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8
電話：072-641-9851
FAX：072-641-9859
URL：<http://cellbank.nibio.go.jp/>**

平成26年(2014年)5月

目 次

・ 総括研究報告

- 創薬・疾患研究のための細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究
小原 有弘

・ 分担研究報告

- 1．細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究
小原 有弘
佐藤 元信
 - 2．ハプロイド ES 細胞における遺伝子変異クローンの獲得法の確立に関する研究
竹田 潤二
 - 3．ホモ変異体マウス ES 細胞株の樹立に関する研究
堀江 恭二
 - 4．コンパニオン診断薬の開発を支援する高度ヒト細胞資源の充実化に関する研究
村上 孝
 - 5．細胞資源におけるウイルス検出法開発に関する研究
清水 則夫
 - 6．マイコプラズマ検査法に関する研究
原澤 亮
 - 7．新鮮組織・細胞の供給システムの整備及びヒト新鮮組織を用いた高品質細胞調製の検討
吉田 東歩
小阪 拓男
 - 8．創薬・疾患研究のためのヒト組織・不死化 B 細胞の資源化に関する検討、
及びヒト由来試料に関する情報データベースの構築
高橋 一朗
坂手 龍一
吉田 東歩
佐藤 元信
小阪 拓男
 - 9．細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究
内尾こずえ
- ・ 研究成果の刊行に関する一覧表

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

創薬・疾患研究のための 細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究

研究代表者：小原 有弘 医薬基盤研究所難病・疾患資源研究部

研究要旨

本研究を実施している『医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部』は、「生物研究資源基盤の整備」の実施を目的に研究を進めている。我々が取り組んでいる研究資源基盤とは 細胞、組織(研究資源・材料)の収集、収集した細胞の増殖(複製)、細胞あるいは組織の評価(品質管理)、評価した研究資源の適切な保存管理(資産管理)、

保存している研究資源の研究者への提供システム(分譲)の構築であり、我々は収集した研究資源を国家資産として適切に保管し国内外の生命科学研究の支援に有効に活用する責務を負っている。一方、細胞・組織は様々な問題が起こりうる研究材料であり、厳密な監視を必須とする研究材料である。従って本研究班の目的はこのような細胞・組織について、質的・量的な改善開発研究を行うとともに、適切な監視体制を確立し国の生命科学研究のレベルを向上させることにある。

組織培養技術は、無菌技術の開発により確立された便利な道具である反面、未だに様々な誤りが生じやすい。生体試料と共存する微生物や他の生体試料の混入などは認識し難い(マイコプラズマ、ウイルス、異動物種細胞、同動物種細胞)。誤認された生体試料や汚染された生体試料を使った研究は、捏造と誤解されかねない危険を含んでいると同時に、創薬研究においては正しい生体試料の利用やウイルスが混入していないことを証明した材料の提供が必須である。さらに、税金の適正執行が以前にも増して強く求められるようになってきている現在、正しい生体試料の提供がより重視されることは当然である。

しかし、生体試料を監視し調査研究を推進するには試料の集積を必要とするうえに多くの労力や研究費が必要となる地道な作業であるにも拘わらず、学問的には「試料の正誤」という単純な結果しか得られないと理解する研究者が多く、敬遠されがちな課題である。従って、多数の生体試料を収集する JCRB 研究資源バンクこそ、このような課題への積極的な関与が求められているのである。

そこで我々は、こうした課題に積極的に取り組み、細胞・組織へのウイルス混入に関する精密な調査研究の持続的実施や、細胞・組織の遺伝的な背景に関する調査研究を通じて生体試料の品質評価法の開発を実施した。また、結論が得られたものについては速やかに研究資源バンクの運営(分譲業務の実務)に取り入れて、ホームページを通じた利用者への情報公開を積極的に推進している。

分担研究者

竹田 潤二：大阪大学大学院医学研究科環境・生体機能学講座 教授

堀江 恭二：奈良県立医科大学生理学第二講座 教授

村上 孝：高崎健康福祉大学大学院薬学研究科腫瘍生物学研究室 教授

清水 則夫：東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス学 准教授

原澤 亮：特定非営利活動法人いわて野生生物疾病研究センター 理事長
吉田 東歩：独立行政法人医薬基盤研究所泉南資源研究施設 研究調整専門員
佐藤 元信：独立行政法人医薬基盤研究所泉南資源研究施設 研究調整専門員
小阪 拓男：独立行政法人医薬基盤研究所泉南資源研究施設 研究調整専門員
高橋 一朗：独立行政法人医薬基盤研究所難病資源研究室 主任研究員
坂手 龍一：独立行政法人医薬基盤研究所難病資源研究室 研究員
内尾 こずえ：独立行政法人医薬基盤研究所疾患モデル小動物研究室 主任研究員

研究の目的

培養細胞を含む生体試料を使った研究においては、かねてより微生物汚染された研究資源、誤認された研究資源の使用による研究費・研究労力の浪費が国際的に問題視されている。その典型的な例として、2000年に我々が実施した、培養細胞のマイコプラズマ汚染に関する調査研究において、全国の研究者が使用している培養細胞約3000検体のうち約26%がマイコプラズマ陽性のまま使用されていた事実を上げることができる。このような状況での研究の成果の発信は、国際的な信用低下を招く可能性を秘めている。

『医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部（JCRB 研究資源バンク）』は、総合科学技術会議答申（第5号）に基づいて厚生労働省として創薬研究（医学研究を含む）の研究基盤を整備する目的で、ヒトを中心とした生物系研究資源の収集と品質の高度化を目指した研究を実施するものである。JCRB 研究資源バンクは、かかる目的で各種疾病に由来するヒト培養細胞・組織ならびに正常ヒト培養細胞・組織を積極的に収集し、国の研究資産として保存管理している。その業務はおよそ次の5点に集約される。 細

胞、組織（研究資源・材料）の収集、 収集した細胞の増殖（複製）、 細胞あるいは組織の評価（品質管理）、 評価した研究資源の適切な保存管理（資産管理）、 保存している研究資源の研究者への提供（分譲）である。

これら当該業務を通じて収集した細胞研究資源は年間約 4300 アンブルが研究者に提供され、数多くの生命科学研究に利用されている。JCRB 研究資源バンクは、このように国内外の生命科学研究を支援しており、研究の活性化に貢献している。それ故誤認のある研究資源を分譲することは許されないことである。ところが生体試料とは本来ヒトの体の中に存在している組織や細胞を体外に取り出して人工的に培養しているため、利用しやすい反面、様々な誤謬を生じ易い研究材料であることがはっきりしてきた。過去の研究を洗い出してみると、数多くの研究が誤った細胞を利用して進められてしまっていたという事実が明らかになると共に、汚染微生物の混入に気が付かないまま研究を進めていたという事実も明らかになってきた。現在でも間違った細胞を使用した研究報告は後を絶たず、研究の成果に疑問が投げかけられているのが現状

である。こうした中、研究成果の公表時に生体試料の品質チェックをしなければならぬという、論文投稿規程の改訂が主要な科学雑誌において進んでおり、これらのチェックに対応した生物資源の使用が求められるようになった。

実際に生体試料を汚染する微生物としてはマイコプラズマや一部のウイルスが細胞と共存してしまうことが考えられるが、汚染が発生しても通常の研究利用によっては存在が認識されずに汚染した生体試料を研究に利用している例も多発している。これも PCR 法が開発されて以来分析技術の改良が進められて、微量混入微生物の高精度な検出が可能になったことよって明らかにされてきた。

本研究班は、こうした新しい遺伝子解析技術を積極的に導入して収集した生物資源を継続的に調査することによって資源における誤認の有無を確認してきた。また、PCR 法をさらに改良したりリアルタイム PCR 法によって生体試料を汚染する可能性のあるウイルスの検出を試みてきた。特に、企業研究者が国内の生物資源バンクから提供されている資源を利用できないと考えていた大きな理由がウイルス検査を実施していないという理由であったことから、この検査法の導入が急がれており、世界で初めて多種類のウイルスに関するウイルススクリーニング検査を実施し、生物資源の資源情報として提供してきた。この結果により、ウイルスが検出されなかった旨証明書を発行す

ることが可能になったことから、多くの研究者への貢献を果たすことが可能になった。

HeLa 細胞が樹立されてヒト培養細胞の長期継代技術が確立したが、これは同時に HeLa コンタミネーションと呼ばれる細胞誤認をもたらし、初代培養細胞だと信じられて樹立された多数のヒト細胞が実は HeLa 細胞であったという結末をもたらした(1978 年)。現在は PCR 法を利用した STR 分析法へとより汎用性が高い方法に発展しており、我々を含めて世界の細胞バンク関係者によって共通利用されヒト由来研究資源の識別に積極的に取り入れられ、本研究班においては培養細胞のデータを蓄積し、検索できるデータベース検索サイトの構築を目指しており、そのデータベース部分の構築を実施した。

我々は上記の方法を 1999 年から導入してヒト細胞のクロスコンタミネーション調査を開始し JCRB 細胞バンクが収集したヒト細胞の約 6% に誤りがあったことを明らかにし、ホームページを通じてその情報を公開している。しかし、重要な点はこの問題の深刻さを研究者自信に十分に認識してもらわなければならない点で、細胞バンクにおける研究はそこまで責任を持たなければならない。そのため、世界の細胞バンクと協力してクロスコンタミネーションを起こしている細胞の一覧表を雑誌に投稿し、wikipedia にて随時更新を行いながらリストの公開を行っている。来年度はホームページを通じてクロスコンタミネーションを

実際に検索できるよう検索サイトの設置など、情報の発信が重要であると考えている。

上記の研究活動を情報発信するため学会と協力して日本組織培養学会内に細胞品質管理等普及委員会を設置し、生物資源に関する品質管理の重要性ならびに現状に関する情報提供を開始している。

以上、紹介したように、当研究班は数多くの生物資源を研究資源化する過程で不可欠な品質評価法を検討すると同時に、目途がついた方法については収集した生物資源を評価するために日常的な業務の中に組み込んでいく作業も実施している。それにより利用者である研究者に対して高度な品質を持った生物資源を提供する基盤を確立することが可能になるものである。

研究の方法及び結果

<創薬・疾患研究のための細胞・組織コレクション整備>

・ホモ変異体マウスES細胞株の樹立

機能に関する情報の乏しい遺伝子や、疾患モデルの観点から興味深いと考えられる遺伝子を選定し、25個の遺伝子についてホモ変異体ES細胞株を樹立した。また、ES細胞の未分化維持に必須のLIFの非存在下でも多能性を維持できる変異体を同定・解析し、再生医学への応用のための基礎的知見を得た。

・ハプロイドES細胞における遺伝子変異クローンの獲得法の確立に関する研究

ハプロイド細胞の割合が90%の細胞に

バーコード付きの遺伝子トラップベクターを導入し、遺伝子トラップベクターが1コピー、ハプロイドES細胞に導入された細胞をバーコードと薬剤選択を組み合わせで獲得する方法の開発を行った。条件検討の結果、ハプロイドES細胞に遺伝子トラップベクターを効率よく、しかも1コピー導入できる条件が判明した。

・コンパニオン診断薬の開発を支援する高度ヒト細胞資源の充実化

食道癌、皮膚癌（有棘細胞癌）、肝細胞癌などの細胞を使用して、ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製を行った。乳癌、食道癌、皮膚有棘細胞癌に由来する6種類のルシフェラーゼ(Luc)発現がん細胞株を樹立し、JCRB細胞バンクに登録した。これらの細胞株はマウス等における実質的な生体内発光イメージング評価に耐えうる輝度の細胞資源といえる。

・ヒト組織供給体制整備・拡充

(独)医薬基盤研究所において、新たにヒト組織バンクの構築を行い、これまでヒューマンサイエンス研究資源バンクで実施してきた事業を継承した。その中でも新鮮組織の供給においては本年度16試料の提供（滑膜組織4試料；関節リウマチ1例、変形性関節症3例、大腸組織2試料、小腸組織7試料、内臓脂肪組織3試料）を実施した。また、滑膜組織より細胞を調製し、255本の凍結保存細胞を保管した。さらに調整した細胞の情報付加のため、遺伝子発現解析を実施し、炎症性マーカー等の発現情報を

取得を行い、細胞資源情報とした。

< 高品質研究資源の供給体制 >

・ マイコプラズマに関する研究

哺乳動物を宿主とするマイコプラズマの一群であるヘモプラズマに関して、その分類・同定法の開発を行った。また、日本薬局方の改訂に向けた多施設共同研究を実施し、核酸増幅法の感度、バリデーション方法の検討を行い、局方改定に向け提言のまとめを実施した。

・ 生体試料同士の混入・入れ替わりの排除

国際的にも問題となっている生体試料の誤認（生体試料の混入、入れ替わり）に関して、国際共同研究の一環として誤認細胞の登録、リスト化を実施し、情報発信した。また日本国内においても、日本の研究者をサポートするため生体試料認証のためのデータベース構築に着手し、その検索サイト設置を目指し、準備を進めた。

・ 微生物汚染の排除

ウイルス検査

培養細胞から抽出した核酸を検査試料として、東京医科歯科大学 清水らの方法でウイルススクリーニング検査を継続実施した。その結果、ヒト由来細胞を中心に 805 検体を検査し、67 検体(66 細胞株)でウイルス検査陽性の結果(確定検査未実施を含む)を得ることが出来、細胞資源のウイルス汚染の現状を把握することができた。

マイコプラズマ汚染検査

研究資源バンクで登録した資源に対して、

MycoAlert法などを用いたマイコプラズマ汚染検査を実施した。その結果細胞バンクに新規に登録した64種の細胞のうち13種(20.3%)にマイコプラズマ汚染が認められた。汚染を検出した研究資源に関しては薬剤処理と確認試験を実施し、マイコプラズマフリーの研究資源として登録を行った。

・ がん遺伝子プロファイル

次世代シーケンサー IonPGM を使用して50個のがん関連遺伝子に関するリシーケンス(再配列解析)を実施し、食道がん細胞を中心に40株の解析を実施した。これらの情報はがん細胞のプロファイル情報として有益であり、これらの情報を付加することでがんの悪性度や分化度、転移能などを予測することが可能となり、これらをターゲットとした創薬への応用が期待できる細胞資源となる。今後これらの情報をデータベース化し細胞情報として付加することで研究者が資源を選択する際の有用情報となることを期待している。

評価

1) 達成度について

(独)医薬基盤研究所・培養資源研究室はJCRB細胞バンクとして64種の新規細胞の収集、過去最高の分譲実績となる4,277アンプルの分譲を行い、本研究を通じて新たな品質管理法開発による、細胞資源

の品質高度化に取り組んだ。その結果ウイルス汚染検査実施は世界の細胞バンクに先駆けて我々の細胞バンクで確立することができた。今後、創薬・疾患研究など多岐にわたる研究に供される細胞資源は、ますます高品質であることが要求されると考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々は、本研究を通じて多くの研究者によって樹立された培養細胞の品質を高度化し、誤った細胞や汚染された細胞を排除するシステムを確立し運用している。さらに、誤謬や汚染を含む細胞を研究に利用することの問題点をホームページに掲載し、正しい細胞を利用するよう積極的な啓蒙活動も行っている。特に本年度は細胞誤認排除に向けた国際活動を実施し、研究社会に向けた提言を行った。これにより多くの研究者が誤謬や汚染を避ける必要性を強く認識するようになってきている。誤謬や汚染を含む研究材料を使った研究がどれほど研究費を浪費するかを考えれば、こうした細胞バンクの活動やそれを整備するための研究には極めて大きな社会的また学術的意味が強くある。

3) 今後の展望について

JCRB細胞バンクが分譲した細胞数は本年度4,277アンプルとなり、国内外の研究者に有用な細胞資源の供給を実施することが出来た。これは培養細胞を用いた研究が広く普及したことと、保有する細胞

資源の数が増加しているのに比例していると考えるのが妥当である。しかし、細胞を用いた研究にはトレンドのようなものがあるが、その予測は非常に困難である。しかしながら、品質管理を徹底的に行った高品質な細胞を常に供給する体制を整備することで、細胞バンクの存在価値が高まり、必然的に細胞バンクを利用する研究者が増え、研究社会に細胞バンクが貢献できると考えている。我々JCRB研究資源バンクは、より品質の高い細胞を提供する細胞バンクとの認知度を上げ、他の細胞バンクとの差別化につながることを期待している。また、研究者のニーズに合わせた細胞の供給を実現するため、創薬・疾患研究を支援する研究資源の供給体制を確立し、厚生労働省の研究資源バンクとして確固たる地位を築きあげること为目标としたい。

結論

細胞・組織などの研究資源のウイルス検査の実施ならびに新たなる品質評価法の開発を実施し、研究資源の高度化を行った。研究資源バンクが果たすべき役割を担うことで、研究者が安心して利用できる資源の確立に努めた。

今後、日本の厚生労働省の研究資源バンクとして国家の生命科学研究の推進に貢献する研究基盤の構築を目指すものである。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告書

細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究

研究代表者	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
分担研究者	佐藤 元信	(独)医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	研究調整専門員
協力研究者	塩田 節子	(独)医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	小澤 みどり	(独)医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	大谷 梓	(独)医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	家村 将士	(独)医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	樺山 明日香	(独)医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	平山 知子	(独)医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員
協力研究者	小堀 眞季	(独)医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部	技術補助員

研究要旨

JCRB 研究資源バンクは厚生労働省が主管する研究資源バンクであり、創薬・疾患研究等を推進する目的で設置運営されている。その中でも細胞バンクは1400株にもおよぶ細胞資源を保有しており、年間4300アンプル程度を国内外の研究者に提供している。また、創薬支援の観点から発光細胞や遺伝子改変細胞の資源化を進めており、これら有用細胞資源の品質管理ならびに品質評価法開発を通じて、生命科学研究の研究基盤の構築を目指している。本研究では創薬・疾患研究等の支援のための細胞資源化を行うとともに、細胞を扱う研究者の安全を確保する目的のため、細胞品質管理としてのウイルススクリーニング検査を継続実施し、細胞資源の登録情報として研究者へ提供することにより研究者の安全を確保し、細胞資源のウイルス汚染状況の調査研究を行った。その結果、ヒト由来細胞を中心に805検体を検査し、67検体(66細胞)でウイルス検査陽性の結果を得ることが出来、細胞資源のウイルス汚染の現状を把握することができた。さらに、細胞品質管理の一環として細胞のクロスコンタミネーションの有無を確認する目的でSTR分析を実施してデータベース(STR profile database)を構築してきた(1999年以来継続)。その結果多くのヒト細胞にクロスコンタミネーションのあることを明らかにしてきたが国際的にも大きな問題になりつつある。本年度、国際共同研究としてThe International Cell Line Authentication Committee (ICLAC)による活動を行い、クロスコンタミ細胞リストの更新公表等を行いながら、科学的根拠に基づくクロスコンタミ細胞のレビュー及び認定を実施するとともに、論文審査や研究費申請の際に審査員が使用できるCell Line Checklistを

作成し、科学雑誌編集担当者等への配布を開始した。今後、更なる検査項目の追加を行い、世界最高水準の細胞資源を保有する細胞バンクを目指す。

A. 研究目的

研究に用いる培養細胞の品質管理は非常に重要であり、研究によって得られた成果に非常に大きく寄与するが、研究者が研究に用いる培養細胞の品質に無関心であるのが現状である。細胞バンクとしてこれら細胞品質の保証を責務と考え、新たな品質管理法の開発ならびに品質評価法の開発を通じて、提供する細胞の高品質化を図り、これらの情報を、細胞バンクとして分譲する細胞の付加情報として整備することを目的とした。

本研究では創薬・疾患研究に有用な研究資源の拡充を行うとともに、細胞のウイルススクリーニング検査による細胞品質の高度化、細胞認証のために必要なデータベースの構築を実施した。

B. 研究方法

<創薬・疾患研究に有用な細胞の資源化>
ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を導入した発光がん細胞 8 株ならびにマウスホモ変異体 ES 細胞 15 株の増殖、品質管理、保管を実施し、供給体制の確立を行った。

<細胞の品質管理法の開発ならびに品質評価>

細胞のウイルススクリーニング検査

・ 細胞株からのゲノム DNA の抽出

培養細胞から Amersham 社製 GenomicPrep もしくは、QIAGEN 社製 AllPrep を用いてゲノム DNA を抽出した。

・ 検査プレートの作成

東京医科歯科大学 清水らの方法でウイルス検出用プライマーを付着乾燥させた検査用プレートを宅配便にて受け取り、検査に使用した。用いたプライマーの種類は表 2 にまとめた。

・ ウイルスゲノムの増幅

2xbuffer, RT-taq, RNase-Free H₂O からなる Master Mix に細胞の totalRNA を 100 ng/well となるように加え、Prism7300(アプライドバイオシステムズジャパン)で 50 30 分処理後、PCR 反応: 95 15 分処理後、94 15 秒, 60 60 秒の反応を 45 サイクルで行った。

マイコプラズマ汚染検査

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

がん遺伝子プロファイル

次世代シーケンサー IonPGM を使用して 50 個のがん関連遺伝子に関するリシーケンスを実施した。

<細胞認証に関わる国際共同研究>

クロスコンタミネーション細胞のリストを ATCC、DSMZ、など世界の細胞バンクならびに細胞生物学研究者とともに作成・更新した。また、論文審査・研究費審査の際に使用する為の Cell Line Checklist を作成し、細胞誤認排除のための活動を行った。

C . 研究結果

<創薬・疾患研究に有用な細胞の資源化>

共同研究者の高崎健康福祉大学村上先生より寄託されたホタルのルシフェラーゼ遺伝子導入がん細胞（発光がん細胞）のうち、乳がん2種、子宮内膜がん1種、食道がん（小細胞がん）1種、皮膚がん（有棘細胞がん）2種（表1）などの発光がん細胞の資源化を実施した。また、現在 JCRB 細胞バンクにおいて利用数が多く、他の細胞バンクに登録をされていない細胞16種（表2）に関して遺伝子導入による発光化を実施している。またホモ変異体マウス ES 細胞株に関しても32種の細胞の分譲体制を整備した（表3）。

<細胞の品質管理法の開発ならびに品質評価>

細胞のウイルススクリーニング検査

DNA 試料を用いたウイルス検査法によるウイルス検査を細胞バンクに登録されているヒト由来細胞で継続実施し、805細胞種の検査を終了した。細胞資源のウイルス検査法を実施し、細胞資源の登録情報として研究者へ提供することにより研究者の安全を確保するとともに、細胞資源のウイル

ス汚染状況の確認を行った。その結果、ヒト由来細胞を中心に805検体を検査し、67検体（66細胞）でウイルス検査陽性の結果（確定検査未実施を含む）を得ることが出来、細胞資源のウイルス汚染の現状を把握することができた。

マイコプラズマ汚染検査

本年度資源化した細胞64種のうち、13細胞種（陽性率20.3%）においてマイコプラズマ汚染が認められた。

がん遺伝子プロファイル

次世代シーケンサー IonPGM を使用して50個のがん関連遺伝子に関するリシーケンスを実施し、食道がん細胞を中心に40株の解析を実施した。その結果を細胞情報として付加するためのデータベース作成に着手し、データの見せ方に関する検討を行った。

<細胞認証に関わる国際共同研究>

昨年度までに、国際共同研究として The International Cell Line Authentication Committee (ICLAC) を立ち上げ、ガイドライン、SOP、クロスコンタミ細胞リストの公表等を行いながら、科学的根拠に基づくクロスコンタミ細胞のレビュー及び認定を実施した。本年度はクロスコンタミ細胞のリストの更新、クロスコンタミ細胞の新規レビューのほかに Cell Line Checklist (図1) の作成を行い、論文審査及び研究費申請の際に厳正な審査を行って頂き、細胞誤認が排除できるよう活動を行った。また国内細胞バンクの連携により細胞認証に必要なデータベースの構築を実施し、検索サイトの

整備を行った（図 2）。

D．考察

<創薬・疾患研究に有用な細胞の資源化>

発光がん細胞は高崎健康福祉大学の村上先生により作製され、非常に多くの発光細胞資源が寄託されており、世界最大規模の発光細胞コレクションとなっている。発光細胞はその細胞特性によりマウスに移植した際にがん細胞を麻酔下のマウスで継時的に細胞の動態を観察できる利点があり、創薬研究には非常に有用な細胞となっている。本年度新たに乳がんや皮膚がんなどを中心に珍しいがんの種類における発光細胞の分譲体制を確立することができた。今後これらの細胞を用いた研究が発展し、創薬につながることを期待したい。また、現在肝臓がん細胞を中心に JCRB 細胞バンクにしか登録の無い細胞で非常によく利用されている細胞の発光資源化を進めており、これらの細胞ができるだけ早く分譲できるよう体制整備を進める予定である。

ホモ変異体マウス ES 細胞に関しては、奈良県立医科大学の堀江先生らによって作製され、変異した遺伝子の機能評価を行うのに非常に有用な細胞資源であると考えられる。本年度までに 32 種の細胞の分譲体制を整備したが、今後さらなる資源の拡充に努め、創薬・疾患研究のための資源の拡充を行う予定である。

<細胞の品質管理法の開発ならびに品質評価>

細胞のウイルススクリーニング検査
JCRB 細胞バンクで保有するヒト由来細胞株

を中心にウイルススクリーニング検査を継続実施し、DNA 試料を用いたウイルス検査は既に 805 細胞株の検査を行った。その検査の中で、ウイルス陽性と判定されたのは 67 検体（66 細胞株）であり、そのほとんどが文献報告されているウイルス汚染であった。しかし、一部は文献報告のないウイルス汚染であり、非常に興味深い知見が得られたと考えられる。

マイコプラズマ汚染検査

研究に用いる細胞のマイコプラズマ汚染の状況は高い汚染率を示しており、我々が過去に行った調査研究においては約 25% の細胞がマイコプラズマに汚染されていると考えられる。これらの汚染細胞を用いて行った研究の信頼性・再現性にはその研究の信憑性を疑われるケースが多く、膨大な研究費・研究労力が無駄にあることが考えられる。その意味では細胞バンクが提供する細胞の品質保証は絶対的であり、そこにこそ細胞バンクの存在意義があると考えられる。本年度資源化した細胞 64 種のうち、13 細胞種（陽性率 20.3%）においてマイコプラズマ汚染が認められた。検出された汚染は 1 つの研究室内で多くの細胞に汚染が広がった例であり、細胞培養培地、試薬、培養器具の共有などにより水平に汚染拡大したと考えられる。この事象は他の多くの研究室でも日常的に起こっていることと考えられ、これらの汚染排除には 1．マイコプラズマに関する知識の普及、2．簡単に検査できる方法の普及などにより研究者への啓発活動が重要になると考えられる。こ

これらの責務も細胞バンクとして果たしていくよう、折に触れてマイコプラズマ汚染の影響、細胞の微生物汚染の影響に関する情報発信に勤めたい。また、本年度より日本薬局方改正のためのマイコプラズマ否定試験に関する共同研究を実施し、核酸増幅法による確実かつ有用なマイコプラズマ否定試験を日本薬局方に収載するべく研究活動を実施した。

がん遺伝子プロファイル

次世代シーケンサー IonPGM を使用して 50 個のがん関連遺伝子に関するリシーケンスを実施し、食道がん細胞を中心に 40 株の解析を実施した。これらの情報はがん細胞のプロファイル情報として有益であり、これらの情報を付加することでがんの悪性度や分化度、転移能などを予測することが可能となり、これらをターゲットとした創薬への応用が期待できる細胞資源となる。今後これらの情報をデータベース化し細胞情報として付加することで研究者が資源を選択する際の有用情報となることを期待している。

<細胞認証に関わる国際共同研究>

細胞のクロスコンタミネーションは世界的にも重要な事項として問題視されている。このクロスコンタミネーションによって多くの研究報告の信憑性が疑われ、多くの研究費・研究労力の浪費に繋がっているのは間違いのない事実である。既に報告されている間違った細胞を利用した研究も後を絶たず、これらが及ぼす研究社会への影響は計り知れないものだと考えられる。本年度

実施した、Cell Line Checklist の作成・配布は論文審査ならびに研究費申請の際に審査員がしっかりとした審査を行い、細胞誤認を排除するための方策であり、これが効果を上げ実際に細胞誤認がなくなるよう今後も活動を継続する予定である。

E. 結論

培養細胞研究資源を使用した研究の質を高めるために、細胞バンクの果たす役割は大きく、研究者が必要とする細胞資源をラインナップするとともに研究に使用する細胞の出来る限りの保証を代行することが大きな役割であると考えられる。細胞の品質評価法開発ならびに特性解析技術の開発は研究者により良い細胞資源を提供するために必須であり、これらの継続的な研究実施が不可欠なものである。研究社会において日本人研究者が良い成果を出すため、その基盤整備を怠ることは出来ない。今後、本研究班で資源化した細胞が細胞ツールとして創薬・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。また、細胞バンクが永続的に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の情報と研究者に必要な細胞資源の情報を提供して責務を遂行してゆくため、本研究班の継続実施が重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

適用なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*. 132(11):2510-2519 (2013)
- 2) 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)
- 3) Capes-Davis A, Alston-Roberts C, Kerrigan L, Reid YA, Barrett T, Burnett EC, Cooper JR, Freshney RI, Healy L, Kohara A, Korch C, Masters JR, Nakamura Y, Nims RW, Storts DR, Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG. Beware imposters: MA-1, a novel MALT lymphoma cell line, is misidentified and corresponds to Pfeiffer, a diffuse large B-cell lymphoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer*. 52(10), 986-988 (2013)
- 4) 家村将士、小堀眞季、小澤みどり、平山知子、川口英子、大谷梓、樺山明日香、塩田節子、小原有弘 DNA 多型解析によって明らかとなったヒト培養細胞のクロスコンタ

ミネーションの現状 DNA 多型学会誌 (2013 印刷中)

2. 学会発表

国内会議

JCRB 生物資源バンクの新展開 .佐藤元信、BIotech2013、第 12 回国際バイオテクノロジー展/技術会議、5 月 (東京)

DNA 多型解析によって明らかとなったヒト培養細胞のクロスコンタミネーションの現状 家村将士、小堀眞季、小澤みどり、平山知子、川口英子、大谷梓、樺山明日香、塩田節子、小原有弘 日本 DNA 多型学会 第 22 回学術集会 11 月 (仙台)

研究ツールとしての培養細胞の活用と問題点、小原有弘 日本薬学会東海支部講演会 1 月 (名古屋)

日局参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」の PCR 法の見直しに関する研究 内田恵理子、古田美玲、菊池裕、窪崎敦隆、遊佐精一、宮原美知子、佐々木裕子、小原有弘、大谷梓、松山晃文、大倉華雪、山口照英、日本薬学会第 134 年会 3 月 (熊本)

マイコプラズマ否定試験に利用可能な標準菌株および標準 DNA の調製 窪崎敦隆、菊池裕、宮原美知子、遊佐精一、島崎愛加、石橋侑季、鈴木俊宏、小原有弘、大谷梓、佐々木裕子、松山晃文、大倉華雪、古田美玲、内田恵理子、山口照英、日本薬学会第 134 年会 3 月 (熊本)

国際学会

- 1 . Japanese Cultured Cell Lines Collection from Hereditary Disease., Kohara A., Hirayama N., Ozawa M., Ohtani A., Kawaguchi E., Iemura M., Shioda S., Momiyama A., Kobori M., Masui T.: Japanese Cultured Cell Lines Collection from Hereditary Disease. International Society for Biological and Environmental Repositories: ISBER 2012 Annual Meeting & Exhibits 2013.5, Sydney, Australia.
- 2 . Genomic profiles of tumor cell lines collection analyzed by high-resolution array-based comparative genomic hybridization (aCGH) and next-generation sequencing (NGS). Kohara A., Hirayama N., Ozawa M., Ohtani A., Iemura M., Shioda S. American Society of Cell Biology: 2013 ASCB Annual Meeting, New Orleans, Louisiana (2013.12)
- 3 . Japanese Cultured Cell Lines Collection from Hereditary Disease. Kohara A., Satoh M., Yoshida T., Kosaka T., : 5th ANRRC International Meeting Shonan (2013.10)
- 4 . Human Tissue Bank at the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) : Kosaka T., Ohnishi A., Masui T., Kohara A.: Availability of Surplus Surgical Tissues for Biomedical Research. 5th ANRRC International Meeting Shonan (2013.10)

由来組織	細胞株	Luc発光
乳がん	SK-BR-3	Very Good
	MDA-MB-231	Good
子宮内膜がん	Ishikawa 3-H-12	Good
食道がん由来 (小細胞がん)	TYUC-1	Very Good
皮膚がん (有棘細胞がん)	HSC-1	Very Good
	HSC-5	Very Good

表1 本年度分譲可能となった発光がん細胞

がんの種類	細胞株名	がんの種類	細胞株名
肝細胞がん	HuH-7	肝細胞がん	HLE
	huH-1		HLF
	Hep G2	胆管がん	OZ
	JHH-1		HuH28
	JHH-2	胆嚢がん	NOZ
	JHH-4	肝芽腫	HUH-6 Clone5
	JHH-5	食道がん由来 (腺がん)	KYAE-1
	JHH-6		
	JHH-7		

表 2 現在遺伝子改変中のがん細胞一覧

細胞登録番号	細胞名	細胞登録番号	細胞名	細胞登録番号	細胞名
AYUK14G12	Nr5a2-K1	AyuK6F01	Gpatch4-K1	AyuK16E07	Lrch4-K1
AYUK13F05	Phf20-K1	AyuK6D12	Smg5-K1	AyuK18C02	1110007L15Rik-K1
AYUK8C12	Gm561-K1	AyuK8B01	Ilf2-K1	AyuK17A12	Lnx2-K1
AyuK8E11	Ube2c-K1	AyuK10A10	Cdc42se1-K1	AyuK10H04	Cbx3-K1
AyuK12C11	Ctdspl2-K1	AyuK15A08	Anp32e-K1	AyuK6E04	Armet-K1
AyuK14C04	Fubp3-K1	AyuK12C03	Fryl-K1	AyuK7G08	Rbm5-K1
AyuK14G01	Cdca7-K1	AyuK6B03	G3bp2-K1	AyuK8C06	Cnot10-K1
AyuK16A10	Fmn12-K1	AyuK17E05	Ptpn11-K1	AyuK8G11	Nedd4-K1
AYUK19F03	Nmt2-K1	AyuK7G11	Rsrc2-K1	AyuK17E10	Myh9-K1
AyuK11E04	Csnk2a1-K1	AyuK14E01	Kntc1-K1	AyuK6H07	Cbx1-K1
AyuK15G02	Kpna4-K1	AyuK16C10	Gnb2-K1		

表 3 分譲可能となったホモ変異体マウス ES 細胞

International Cell Line Authentication Committee | ICLAC.org

Cell Line Checklist for Manuscripts and Grant Applications

This checklist is designed as a resource for scientists who write or review manuscripts and grant applications that use cell lines. Some cell lines will give unreliable results if used for research – for example, cross-contaminated cell lines no longer correspond to donor tissue and so may not represent the correct species, tissue type or disease state. Such misidentified or false cell lines produce unreliable research data and we urge reviewers to highlight their use wherever possible.

This checklist will help the author or reviewer to look for obvious cell line quality concerns. The checklist may also be used to communicate any quality concerns to be addressed prior to publication or funding.

Manuscript or Grant Information

Title or Manuscript/Grant ID:	
Cell Lines used:	
Cell Lines used with Quality Concerns:	

Cell Line Information

Reporting Requirement	Yes or No (No includes Not Known) Add further comment if required
Cell line is known to be cross-contaminated or otherwise misidentified. See the ICLAC website for a database of known misidentified cell lines and Recommendation 1) below.	
Authentication testing has been performed: The method and results should be listed. See Recommendation 2) below.	
Human cell lines: STR profile is available with the manuscript/grant application. See Recommendation 2) below.	
Mycoplasma testing has been performed: The method and results should be listed.	

広く科学雑誌の論文審査員に頒布し、細胞使用研究におけるチェックを厳格化

チェックリストの内容

論文あるいは研究費申請タイトル、使用した細胞株名など基本の情報

①使用した細胞が誤認細胞のリストに記載されている細胞でないこと

②ヒト由来細胞であればSTR多型解析を実施し、そのデータを記載するとともに新規の細胞であればドナーのプロファイルと一致すること。既存細胞であればデータベースと照合した結果

③マイコプラズマに関する検査を実施し、検出されなかったこと

つづく

図1 国際共同研究によって作成した Cell Line Checklist の内容

STR

Top コンテンツ リンク

テストユーザー 様でログイン中です

Search Programs for the STR profile database of the JCRB Cell Bank

[1. Simple comparison among JCRB cells.](#)

Pick up one human cell from the database and compare with all other human cells in the database.

[2. Mutual comparison between selected JCRB cells.](#)

Select human cells as many as you want then compare between those selected cells.

[3. Matching analysis between your data and JCRB cells.](#)

Compare your STR data with cells in the JCRB cell bank.

図2 現在構築中の細胞認証に関するデータベース検索サイト（見本）

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

創薬・疾患研究のための細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究

（H25-創薬-指定-007）

研究分担者 竹田 潤二 大阪大学医学系研究科・教授

研究要旨

ハプロイド ES 細胞における遺伝子変異クローンの獲得法の確立に関する研究

A. 研究目的

ハプロイド ES 細胞は、ゲノムが1コピーしか存在しないので遺伝子とその機能の関係を探索するために適している。我々は、遺伝子機能を効率よく解析するためにはプロイド ES 細胞を宿主としたバンクを作製する。

B. 研究方法

ハプロイド ES 細胞は、ハプロイド状態からディプロイド状態に容易に推移する。そこで、ハプロイド細胞の割合が90%の細胞にバーコード付きの遺伝子トラップベクターを導入する。遺伝子トラップベクターが1コピー、ハプロイド ES 細胞に導入された細胞をバーコードと薬剤選択を組み合わせで獲得する。

C. 研究結果

条件検討を繰り返し、Neon によるトランスフェクション(1400V, 10msec, 3 pulses)が一番よいことが判明した。一方、遺伝子トラップベクターは、トランスポゾンシステムを利用しているが、その量はトランスポーゼース発現ベクターが1マイクログラムでトランスポゾントラップベクターは0.1マイクログラムである。この条件で、2000 個以上のコロニーをピックアップし解析中である。予備的結果では、2000 コロニーのうち、約 20%が目的のクローンであることが判明している。

D. 考察

ハプロイド ES 細胞に遺伝子トラップベクターを効率よく、しかも1コピー導入できる条件が判明したので、今後は効率よく破壊された遺伝子を同定して行きたい。

E. 結論

条件検討が終了したので、今後は効率よくバンク作製を行ないたい。

F. 健康危険情報

（分担研究報告書は記入不要）

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.) Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, **Takeda J**, Inokawa H, Horie K, Yagita K., An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2 α as an endogenous clock regulator. *PLoS One*. 28;8(6):e67241. doi: 10.1371/journal.pone.0067241., 2013.
- 2.) Yamanishi A., Yusa K., Horie K., Tokunaga M., Kusano K., Kokubu C. and **Takeda J**, Enhancement of microhomology-mediated genomic rearrangements by transient loss of mouse Bloom syndrome helicase. *Genome Research*. 23(9):1462-1473 doi:

10.1101/gr.152744.112., 2013

2. 学会発表

- 1.) 関西実験動物研究会 30 周年記念大会
(第 120 回研究会)「変異 ES 細胞バンクは変異マウス作製に代替たりうるか?」、京都府京都市、2013
- 2.) 第 32 回日本認知症学会学術集会「ES 細胞は遺伝子改変マウス作製に必要不可欠の存在か?」長野県松本市、2013
- 3.) Conference on Transposon and Genome Engineering 2013, Gene discovery by transposons in diploid and haploid ES cells, Budapest, Hungary, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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

ホモ変異体マウス ES 細胞株の樹立に関する研究

研究分担者 堀江 恭二 奈良県立医科大学・教授

研究要旨

遺伝子に変異の導入された細胞株は、遺伝子機能を解析する上で有用であるのみならず、創薬に向けた標的遺伝子の同定や疾患メカニズム解明のためのモデル系としても重要である。このような変異細胞を大量に資源化するために、我々が開発した手法をマウス ES 細胞へ適用して、遺伝子の両コピーに変異の導入されたホモ変異体 ES 細胞株を樹立した。さらに、これらのホモ変異体の遺伝子機能解析を行うことで、資源としての有用性を示した。

A. 研究目的

特定の遺伝子機能が破壊された細胞株は、創薬における標的遺伝子の探索や疾患メカニズム解明のためのモデル実験系として、極めて有用である。しかし、ヒトやマウスのような哺乳動物細胞では、遺伝子破壊の表現型を解析するには 2 コピー存在する遺伝子の両方を破壊したホモ変異体を取得する必要がある。従来の遺伝子破壊法では、多数の遺伝子に対して迅速にホモ変異体を単離することは困難であった。本研究では、我々が独自に開発したホモ変異体単離法をマウス ES 細胞へ適用し、創薬・疾患研究に有用な細胞資源を取得する。また、得られた細胞株を用いた遺伝子機能解析も行い、細胞資源としての有用性を示す。

B. 研究方法

我々は既に約 2,000 株のヘテロ変異体 ES 細胞株を取得済みである。これらのヘテロ変異体について、過去の文献を検索することにより、機能に関する情報の乏しい遺伝子や、疾患モデルの観点から興味深いと考えられる遺伝子を選定した。これらの遺伝子に対応するヘテロ変異体 ES 細胞に対して、我々が報告済みの手法（Nature Methods 8:1071-7, 2011）を用いて、細胞周期の 4N の時期における相同染色体間組換えを誘発し、ホモ変異体を誘発・単離した。また、得られた細胞株に対して、様々な分化誘導系を適用することで、初期分化に重要な遺伝子の機能解析を行った。

C. 研究結果

25 個の遺伝子についてホモ変異体 ES 細胞株を樹立した。また、ES 細胞の未分化維持に必須の

LIF の非存在下でも多能性を維持できる変異体を同定・解析し、再生医学への応用のための基礎的知見を得た。

D. 考察

今後は、遺伝子機能解析にとどまらず、創薬の標的遺伝子の同定へ向けた応用性についても検討を進めたい。

E. 結論

既に樹立済みの手法により、変異体の単離は順調に進行している。また、変異体を用いた遺伝子機能解析の有用性を示すこともできた。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

Yoshida J., Horie K. Genome-wide comparative analyses of retroviral and DNA-type transposon vector integration sites in mouse embryonic stem cells. Implication for reprogramming study. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2013 June 12-15, Boston, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

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

コンパニオン診断薬の開発を支援する高度ヒト細胞資源の充実化に関する研究

分担研究者 村上 孝 高崎健康福祉大学

研究要旨：平成 25 年度では、ホタル由来ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現する細胞の作製に当たり、高価組み換えレンチウイルスの至適作製条件を設定した。実際、乳癌、食道癌、皮膚有棘細胞癌に由来する 6 種類のルシフェラーゼ発現がん細胞株を樹立し、JCRB 細胞バンクに登録した。これらの細胞株はマウス等における実質的な生体内発光イメージング評価に耐えうる輝度の発光細胞資源であり、ヒトがん細胞を標的とした創薬開発試験では *in vitro* から動物実験 (*in vivo*) まで共通した評価系となりうる。改変標的細胞の性質に依存した遺伝子導入の課題は残るものの、ルシフェラーゼ発光を基盤とした細胞資源の充実化と認知向上によりがん創薬の促進を図りたい。

研究分担者

村上 孝

高崎健康福祉大学薬学部 教授

A. 研究目的

ゲノム情報を起点にがん創薬を促進する動きが加速化している。実際、EGFR、BCR-ABL、HER2などを標的分子とした治療薬の開発は一定の治療成果を納めている。このようなチロシンキナーゼや受容体変異に基づく「がん原性遺伝子」の再評価、並びに新たな発見を目的とした次世代型高速シーケンサーによるがんゲノム解析が世界規模で進行している (Nat Genet 2012: 27,760; Nature 2013: 502, 333)。この計画は未だ途中ではあるものの、KRAS や EGFR などに代表される細胞がん化を運命付ける変異遺伝子を有するがんの割合は、高々 3 割程度と捉えられている。すなわち、残り 7 割を占める多くのがんでは、その決定的な遺伝子変異を持たない可能性が至適されている。このような背景の中、次世代のがん創薬を一層促進するためには、実質的な薬効評価を簡便に行なえる動物モデルの存在は欠かせない。特にヒトがん細胞を（重症）免疫不全マウスに移植する異種移植モデルは前述の様々な薬効評価に欠かせないツールである。またがんのコンパニオン診断薬やバイオマーカーの開発では、適切な標的分子を発現する細胞資源や生体試料の採取が可能な小動物モデルが求められる。

本研究では、簡便かつ高感度なルミネッセンス発光による生体内イメージング評価系が利用できるがん細胞資源の充実により、がん創薬ならびにコンパニオン

診断薬の開発促進に貢献することを目的としている。

B. 研究方法

1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

食道癌、皮膚癌（有棘細胞癌）肝細胞癌などの細胞株ソースは JCRB 細胞バンクから供与を受け、各細胞の至適培養条件にしたがって細胞培養を行なった。今回、ホタル由来ルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) を安定発現する細胞の作製に当たり、組み換えレンチウイルスの至適作製条件の検討を行った。pLVSIN-CMV-puro (TAKARA) plasmid に pGL3 (Promega) 由来のルシフェラーゼ (luc) cDNA を組み込んだ pLVSIN-luc を作製した (XhoI-XbaI 部位に挿入) pLVSIN-luc 発現ベクターをレンチウイルス用パッケージング plasmid (Lenti-X HTX Packaging Mix) とともに 293T 細胞にトランスフェクションし、組み換えレンチウイルスを作製した (検討条件は後述)。その後、標的がん細胞株に感染させた後、ピューロマイシン耐性細胞を選択し、ルシフェラーゼ発現細胞株を樹立した。

2) ルシフェラーゼ発現細胞株のルミネッセンス発光
ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株について限界希釈系列を作製し、細胞数 (10^1 - 10^5 個) と *in vitro* ルミネッセンス発光量を試験した。機器は PerkinElmer 社、ARVO Light (1420 Luminescence counter) を用いた。また既存 luc 発現細胞株を用い、*in vivo* luciferase imaging 可能な発光量を求めた。実際、既に樹立 (寄託) されているルシフェラーゼ発現乳がん細胞株 4T1-luc の発光量を指標に BALB/c マウスの乳腺同所性移植を行ない、移植部位と自然転移病巣 (肺、脳、骨) につき

Caliper 社 IVIS®を用いてイメージング試験を行った。マウスへの細胞移植では Isoflurane (Abbott Laboratories, North Chicago, IL)による吸入麻酔を行い、左前肢部乳腺に細胞接種を行った。微少転移巣について観察するため、観察期間の終了時に各臓器を *ex vivo* に取り出しルシフェラーゼ発光の検定、もしくは病理検索を行なった。

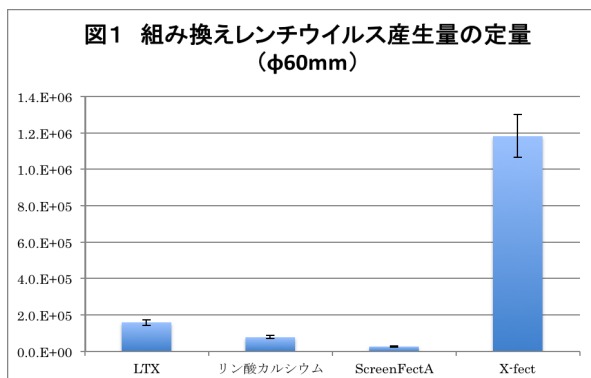
(倫理面への配慮)

本研究では、高崎健康福祉大学遺伝子組み換え実験安全委員会の指針にしたがい立案され、実験計画は同委員会の承認を得ている(承認番号:健大遺伝子第1102号)。また動物実験に関しても同大動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号:健大動物第1213号)。

C. 研究結果

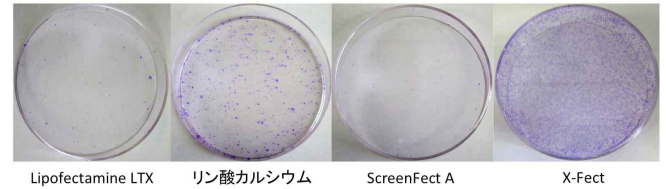
1) ルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株の作製

効率的なルシフェラーゼ発光細胞を作製するためには、細胞周期(細胞分裂)に依存することなく導入遺伝子が発現する系が必要となる。その観点からレンチウイルスベクターの利用が優れている。そのため、本研究では新しく pLVSIN-CMV-puro (TAKARA) plasmid に pGL3 (Promega) 由来のルシフェラーゼ (luc) を組み込んだ pLVSIN-luc を作製した。高力価の組み換えレンチウイルスを作製するため、パッケージング細胞 293T への導入系を最適化した(径60mmシャーレ)。古典的なリン酸カルシウム法に加え、低毒性型リポフェクション試薬3種類 (ScreenFect A [和光純薬], Lipofectamine LTX [Life Technologies], Xfect [TaKaRa/Clontech]) について検討を行なった。各遺伝子導入方法(試薬)における個々の最適条件を luciferase assay により検討した後、それらについてウイルス産生量を qRT-PCR にて定量した(図1)。その結果、Xfect [TaKaRa/Clontech] を用いた方法で最も高い力価を得ることができた。



さらに遺伝子導入効率の評価には、pCAGGS-EGFP plasmid の導入(24時間後)による GFP 陽性率を測定した (Tali® イメージベースサイトメーターにて計測)。その結果、リポフェクション試薬3種類ではいずれも GFP 陽性率はほぼ100%であり、試薬自体による毒性も観察されなかった(リン酸カルシウム法では細胞障害率が高く、約70%がトリパンブルー染色陽性であった)。実際、HCC-827 ヒト肺がん細胞株を用いて、ピュロマイシン耐性コロニー形成数を測定したところ、概ね前述のウイルス産

生量に比例したコロニー数が得られた(次図:クリスタルバイオレット染色)。



これらの結果から、細胞改変に向けた組み換えレンチウイルスの作製に Xfect [TaKaRa/Clontech] を用いることとした。当該システムを用い、本年度では利用可能なルシフェラーゼ発現ヒトがん細胞株6種類を作製し、JCRB細胞バンクに寄託した(表1)。

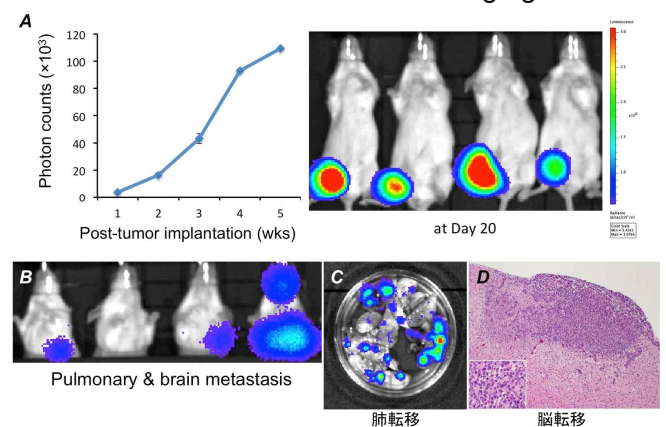
表1. JCRB 細胞バンクに寄託した発光がん細胞のリスト

由来組織	細胞株	Luc 発光
乳がん	SK-BR-3	Very Good
	MDA-MB-231	Good
食道がん	Ishikawa 3-H-12	Good
	TYUC-1	Very Good
皮膚がん	HSC-1	Very Good
	HSC-5	Very Good

2) ルシフェラーゼ発現細胞株のモデルマウスにおけるルミネッセンス発光

作製されたルシフェラーゼ発現がん細胞株の細胞数を 10^3 個 - 10^5 個までの限界希釈系列を作製し、PerkinElmer 社 ARVO Light (1420 Luminescence counter) を用いた発光量の測定を行った。 10^5 個細胞当たり 10,000 単位以上の高い発光を示すものを「very good」、10,000~3,000 単位 ($/10^5$ 個) を「good」、10,000 単位以下 ($/10^5$ 個) を「poor」とした。寄託細胞はすべて「good」以上のものとした(表1)。

図2 *In vivo* luciferase imaging



前述の *in vitro* で活性評価された数値が *in vivo* imaging 評価に耐えるか否かを試験するため、既存の細胞株 4T1-luc を用いて検討を行った。PerkinElmer 社 ARVO Light における 4T1-luc 細胞の発光値は約 2,000 単位/

10⁵個であった。この4T1-luc細胞（2X10⁵個）をBALB/cマウスの右肩径部乳腺脂肪組織内に移植し、ルシフェラーゼ発光を経時的に評価した（図2）。その結果、約2,000単位/10⁵個程度で「good」と評価された発光輝度では、約4週間にわたり実質的な発光イメージ画像とともに定量的な腫瘍増大が観察された（図2A）。また、約3-4週目において血行性転移が観察され、肺および脳転移病巣を観察することができた（図2B）。これらの転移病巣は ex vivoに取り出したイメージング解析（図2C）や病理組織解析（図2D）においても確認することができた。しかしながら、原発部位（移植部位）における発光強度が増すにつれ、転移病巣は検出されにくいというIVIS®画像解析系の欠点が挙げられた。転移病巣の観察においては、原発部位を黒色布等で覆い、観察期間中決まったポジションを定める必要性があった。また、正面および背部からの撮影に位置によって検出される深部からの発光量が異なるため、評価において注意を払う必要があった。

D. 考察

生体内イメージング評価系の長所は使用する実験動物の数を大きく削減できることにある。とりわけ近年の生体内イメージング技術の発展は顕著である。がん創薬の薬効試験では、モデル動物体内での腫瘍動態をリアルタイムに把握し、評価することができる利点から、製薬業界においても汎用化されつつある。その際に、利用するイメージング用プローブはがん細胞の生存状態と相関するものでなければならない。各種生体内でのin vivoバイオイメージング方法について長所と短所を比較すると下表のようになる。

In Vivoバイオイメージング方法の比較

方法	レポーター	長所	短所
ルミネッセンス	ルシフェラーゼ	高感度、迅速、定量性に優れる	基質が必要
蛍光	GFPなど	基質が不要	バックが高い、定量性が低い（死細胞でも光る）
PET	-	臓器代謝機能や血流、神経活動の観察が可能	放射性核種製造設備と投与が必要、遺伝子発現レベルとの相関研究
MRI	-	3次元解析、造影なしに血管の状態を観察可能	大がかりな装置が必要、遺伝子発現レベルでの観察不可

ルミネッセンス発光は生体透過性にも優れている

発光のプローブとして代表的なホタル由来ルシフェラーゼはATP要求性であり、細胞内ATPの状態を反映することから、細胞の生存状態とよく相関する。また発光波長は600nm付近と長波長側であるため生体透過性が高く、小動物を用いた画像解析に有利である。短所としては、発光には基質（ルシフェリン）投与が必要な点が挙げられる。これまでの試験経験では、マウス等の小動物を利用では、生体内の特定部位に基質が届かないことによる「発光しない」という問題は起きていない。生体表面に近い発光がより強く検出されること、黒色細胞（組織）では（発）光が吸収されてしまうため、検出感度が低くなることもある。また発光基質の性質としてセレンテラジンをを用いる必要のある

ルシフェラーゼでは、その基質特異性の違いから使い分けが易いように見える。しかし、セレンテラジン基質に由来する自家蛍光からシグナル/ノイズ比が低下してしまう欠点がある（必ずしも推奨できるものではない）。生命科学分野で多用されているGFPにおいては、細胞レベルでの個々の分子挙動を追跡する上では優れている。しかし、死細胞であっても緑色蛍光を発するため、薬効評価の観点では不向きである。またGFPは生体内イメージングにおいてもバックグラウンドが高くなるため、依然として創薬促進の用途ではルシフェラーゼに代表されるATP利用型の化学発光プローブが適している。

本年度プロジェクトにおいては、発現ベクターのシステムを至適化し、ルシフェラーゼ発光細胞を6種類登録することができた。その一方で、皮膚有棘細胞癌株HSC-5では、遺伝子導入後のピューロマシリン耐性細胞が樹立できているにもかかわらず、実質的なルシフェラーゼ発光に至らない細胞株が存在した。そのためHSC-5-Lucは細胞クローンとして分取することとした。また、組み換えレンチウイルスはVSV-G（水泡性口内炎ウイルスのGタンパク質）をエンベロープにもつため、細胞種に関わらず感染が成立するものと考えられたが、腺癌に由来する食道がん細胞株KYAE-1は依然としてLuc改変が進まない状況にある。これまでの経験では、高分化型腺癌では難しい傾向にあることが判っている。細胞表面におけるVSV-G受容体（全ての細胞タイプに存在するリン脂質を認識）の性質や組み換えウイルスによる細胞毒性の可能性など検討課題が残った。現在、肝癌細胞に対するLuc改変需用があるため、引き続きHuh-7等を含む15種類の改変による細胞資源の充実化を進めていきたい。

E. 結論

Luc発現改変がん細胞は、試験管内から動物実験までを一元的に評価できるため、がん創薬開発において有用な資源として期待されている。平成25年度では、乳癌、食道癌、皮膚有棘細胞癌に由来する6種類のルシフェラーゼ(Luc)発現がん細胞株を樹立し、JCRB細胞バンクに登録した。これらの細胞株はマウス等における実質的な生体内発光イメージング評価に耐えうる輝度の細胞資源といえる。細胞改変における安定した遺伝子導入方法等には課題が残るものの、ルシフェラーゼ発光を基盤とした細胞資源の充実化を進めることによりがん創薬の促進を図りたい。

F. 健康危険情報

該当なし（省略）

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morimura S, Sugaya M, Kai H, Miyagaki T, Asano Y, Tada Y, Kadono T, **Murakami T**, Sato S. Depsipeptide and roxithromycin inhibit proliferation of lymphoma cells by blocking ERK activation. *J Dermatol.* 2014; 41; 57-62.

2. Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, **Murakami T**,

Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg.* 2013; 257: 542-7.

2. 学会発表

1. Matsui A, **Murakami T**, Ezaki T. Expression of CXCL17 in tumors promotes their progression by inducing CXCL17-responding CD11b⁺Gr-1^{high} cells. 5th International Meeting on Angiogenesis. Amsterdam, Netherlands, Mar. 12-14, 2014.

2. **Murakami T**. CXCL17 (DMC/VCC-1) expression by tumor cells recruits CD11b⁺Gr-1^{high}F4/80⁻ cells and promotes tumor progression. Gradients and Signaling 2013. Okinawa Institute of Science and Technology Gradient University. Onna-son, Okinawa. Nov. 11-16, 2013.

3. 野口沙斗美、梶田昌裕、原田 忍、斎藤克代、**村上 孝**. 恒常的な上皮間葉転換刺激はマウス乳がん細胞株 4T1 の腫瘍進展を遅延させる. 第 134 回日本薬学会年会 熊本 2014 年 3 月 27-30 日

4. 松居 彩、梶田昌裕、横尾英明、**村上 孝**. H-RAS^{G12V} 及び v-SRC による NIH3T3 細胞の形質転換とマウス個体内転移動態の特徴. 第 134 回日本薬学会年会 熊本 2014 年 3 月 27-30 日.

5. 斎藤克代、舟山和夫、小林泰彦、**村上 孝**. 難治性がんに対するエピジェネティック制御と重粒子線感受性の増強. 第 134 回日本薬学会年会 熊本 2014 年 3 月 27-30 日.

6. 松居 彩、森川俊一、**村上 孝**、江崎太一. 固形腫瘍における CXCL17 発現が及ぼす影響について. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 栃木(自治医科大学)2014 年 3 月 27-29 日.

7. 手塚康裕、遠藤俊輔、松居 彩、佐藤篤子、斎藤克代、仙波憲太郎、高橋将文、**村上 孝**. インターフェロン 2 のヒト肺癌細胞に対する抗腫瘍効果. 第 54 回日本肺癌学会 東京 2013 年 11 月 21-22 日.

8. 佐々木和紀、湯田康勝、福岡勝志、西田志穂、林 譲、**村上 孝**、齋藤充生、大室 弘美. アトピー性皮膚炎患者への服薬やスキンケア等に関する情報提供のためのパンフレット作成を目的とした調査研究. 第 57 回日本薬学会関東支部会. 東京(帝京大学) 2013 年 10 月 26 日.

9. **Murakami T**, Matsui A, Hayashi M, Kajita M. *In vivo* metastatic behaviors of H-RAS (G12V)- and v-SRC-transformed NIH3T3 cells in athymic nude mice. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日.

10. Matsui A, **Murakami T**. CXCL17-responding neutrophil-like CD11b⁺Gr-1^{hi} cells promote tumor progression. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日.

11. Kajita M, **Murakami T**, Hayashi M. New methylated DNA biomarkers in circulating tumor genomes for the aggressive type of breast cancer cells. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3-5 日.

12. 斎藤克代、**村上 孝**. がん創薬を促進する発光ヒトがん細胞資源の開発とその利用方法. 第 8 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 横浜 2013 年 5 月 30-31 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

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

細胞資源におけるウイルス検出法開発に関する研究

分担研究者：清水 則夫 東京医科歯科大学 准教授

研究要旨

医薬品開発や再生医療研究を効率良く実施するためにはヒト培養細胞研究資源の有効活用が必要であり、培養細胞資源の品質が研究の質に直結するため、その品質管理の徹底が極めて重要である。特に研究用培養細胞資源への微生物汚染は不正確な実験結果を生む主要な原因であり、その対策として微生物汚染の有無を簡便・安価にチェックできる検査系の確立が求められる。本研究では、これまでに開発した網羅的ウイルス検査系を簡便に実施することを目指し、検査に使用する試薬を酵素も含めすべて乾燥・固化することにより作業者に起因する問題の低減と、随時検査を実施できる体制を構築することを目的に研究を行った。その結果、PCR 検査系において、性能を劣化させずに使用するすべての試薬を乾燥・固化する手法の開発に成功した。現在、性能を維持したまま安定に保存できる期間の検討と RT-PCR 検査系への応用を目指した研究を続けている。

A. : 研究目的

体性幹細胞や iPS 細胞を用いた再生医療研究・医薬品開発が加速されていることに伴い、ヒト培養細胞研究資源の重要性が著しく増しており、実際、再生医療の研究に用いる多分化能を持ったヒト由来培養細胞のバンクへの寄託は増加傾向にある。今後、再生医療研究の質を高めるためには、ヒト培養細胞研究資源の品質管理法を確立し、研究に使用する培養細胞の品質管理を徹底することが極めて重要である。実際、培養細胞に微生物が持続感染すると、細胞の性質・増殖性、遺伝子発現パターン、動物に接種した際の細胞の挙動や動物の反応などに大きく影響する可能性があるため、細菌・真菌・マイコプラズマ・ウイルスの汚染状況に関

する情報は非常に重要である。さらに、近年、外国に細胞を出荷する際には、ウイルス・マイコプラズマ汚染状況に関する情報の添付を求められる事が多く、今後その必要性が増していくと予想される。

培養細胞に持続的に感染し、検出が難しい微生物として、特にウイルスとマイコプラズマが重要である。我々はこれまでに、マルチプレックス PCR 法を応用した網羅的ウイルス検査法を作成し、培養細胞資源のウイルス検査に応用し成果をあげてきた。本研究では、ウイルスの網羅的検査を簡便・迅速に実施するための研究開発を目的に研究を行い、具体的には使用する検査試薬をすべて乾燥・固化することにより、

必要なときに随時検査できる体制を構築することための研究開発を実施した。そのようなあらかじめセットアップした Ready-to-Use の試薬（以下 RU 試薬と記載）が実用化すれば、随時ウイルス検査を実施できるとともに、作業者による試薬の取り違い・試薬の入れ忘れ・ペーティングミスによる試薬添加量の不安定性などの検査データが変動する可能性を低減し、安定した検査結果を得ることが可能になるとともに検査の自動化が非常に容易になる。なお、予備的な検討では、DNA ウイルスの検出を行う PCR 検査系と RNA ウイルスの検出を行う RT-PCR 検査系では試薬の作成法を変える等の調整が必要なことが示唆されたため、今回は DNA ウイルス検査を RU 試薬を用いて実施するための研究開発を行った。

B： 研究方法

1．検査対象ウイルス

以下の DNA ウイルスを検査対象とした。

HSV1, 2, VZV, EBV, CMV, HHV6, 7, 8, BKV, JCV, ADV, EBV, PVB19

2．増幅領域とプライマー・プローブ配列

GAPDH

F-tgtgctcccactcctgatttc

R-cctagtcccagggtttgatt

6FAM-aaaagagctaggaaggacaggcaacttggc-iowaB1
ack

HSV1/2

HSVF-cgcatcaagaccacctctc

HSVR2-GTCAGCTCGTGRTTCTG

HSV1-Cy5-tggcaacgcggccaac-iowaBK

HSV2-6FAM-cggcgatgcgccccag-iowaBK

VZV

VZVF-tcactaccagtcatttctatccatctg

VZVR-gaaaacccaaaccttctcgag

HEX-tgtctttcacggaggcaaacacgt-iowaBK

CMV

CMV4F-tcgcgcccgaagagg

CMV4R-cggccggattgtggatt

Cy5-caccgacgaggattccgacaacg-iowaBK

EBV (BMRF1 gene)

EBVF-ctgggcaaggagctgtttg

EBVR-ggccgcttgtaaaattgca

6FAM-ctcggctgtggagcaggctt-iowaBK

HHV6

HHV62F-gaagcagcaatcgcaacaca

HHV62R-acaacatgtaactcgtgtacggt

Cy5-aacctgtgcgcccgtccc-iowaBK

HHV7

HHV7F-cggaagtactggagtaatgacaa

HHV7R-ccaatccttccgaaacctg

HEX-ctcgcagattgcttggccatg-iowaBK

HHV8

HHV82F-cctgtcctctgtgccccat

HHV82R-atcgttgccatttcttttggcc

HEX-ccggcgtcagacattctcacaacc-iowaBK

ADV

ADVF-gacatgacttttgaggtgga

ADVR-tcgatgacgccggtg

6FAM-cccattggagagcccaccct-BHQ

PVB19

B19F-gggtttcaagcacaagYagtaaaaga

B19R-cggYaaactccttgaaaatg

6FAM-cagctgccctgtgg-MGB

BKV, JCV

F-ggaaagtcttttaggtcttctacctt

BKVR-gatgaagatttatttgccatgarg

JCVR-gaagacctgtttgcccataaga

6FAM-atcactggcaaacat-MGB

HBV

F- gtggtggacttctctcaatttctag

R- ggacaMacgggcaacataacct

6FAM- tgtctgcggcgctttt –MGB

3 . RU 試薬の作成

Primer.probe mix	2.7µl
Trehalose	3.0µl
X10 Buffer	1.7µl
100mM dNTP	0.17µl
Taq (1.5U)	0.6µl
Water	0.83µl

(primer.probe mix は、下記の各 well の検査項目に対応した primer と probe の混合物) 上記の試薬(合計 20µl)を 8 well strip の各 well に添加し、減圧遠心法により乾燥・固化した。8 well strip の各 well の検査対象項目は以下の通り。

1 . GAPDH, 2. HSV1, HSV2, HHV7, 3. BKV, JCV, 4. EBV, VZV, 5. HHV6, PVB19, HHV8, 6. ADV, 7. CMV, HBV, 8. 予備

RU 試薬の保存安定性におよぼす Trehalose の影響を調べる目的で、Trehalose を上記の分量で添加した RU 試薬 Strip と Trehalose の代わりに水を 3.0µl 添加した RU 試薬 Strip の 2 種類を作成した。

作成した RU 試薬 Strip は、暗所・室温で保存した。

4 . 検査実施

各検査項目に対するスタンダード、あるいは検査対象ウイルス陰性が確認されている試験細胞株の DNA300ng に各検査項目に対するスタンダードを添加した試験検体を RU 試薬 (8 well strip) の各 well に添加した。ピペティングを 10 回行って RU 試薬を完全に溶かし、シールを貼った後リアルタイム PCR 機(CFX96 : Bio-rad)にセットし、PCR 反応・結果解析を行った。

5 . PCR 反応条件

Denature	95	10 sec
PCR	95	5 sec
	60	30 sec
	(45 cycle)	

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要な研究は行なわなかった。

C : 結果

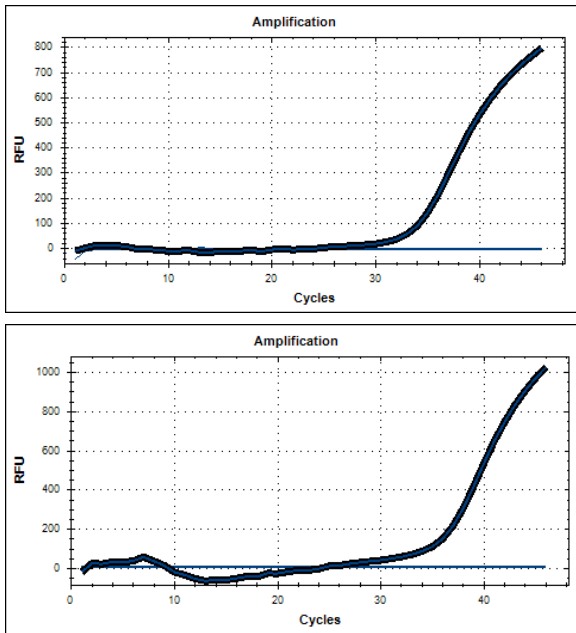
1 . 安定化剤の性能評価

今回使用したウイルス検査系はこれまでの実験により 10 copies/reaction の感度を持つことが確認されている。RU 試薬を作成する際に安定化剤として Trehalose を加えた場合と加えなかった場合の保存安定性を作成後 1 ヶ月の段階で比べた。RU 試薬は暗所・室温で保存した。サンプルには検査項目の合成スタンダード (50 copies/reaction) を使用し各 well に添加したところ、Trehalose を加えなかった場合はすべての検査項目に関し陽性シグナルが検出されなかったが、Trehalose を加えた場合にはすべての検査項目から陽性シグナルが検出され、核酸増幅酵素を含めた試薬の保存に対する Trehalose 添加の効果が確認された。

2 . RU 試薬の保存期間の検討

1 の実験で Trehalose の効果が確認されたため、Trehalose を添加した検査 Strip の保存期間と性能の劣化を検討する目的で実験を行った。実験は RU 試薬を作成後暗所・室温で保存し、1 ヶ月毎に合成スタンダード (50 copies/reaction) を含む試験サンプルを用いた検出操作を行う方法で実施した。その結果、6 ヶ月目の時点で問題なく増幅することが確認され、少なくとも 3 ヶ月間の保存は問題ないこ

とが確認された（下図を参照）。



図の説明：RU 試薬を作成した直後に検出操作を行った場合（上）と作成 6 ヶ月後に検出操作を行った場合（下）の比較検討結果（代表例として GAPDH スタンドの検出を例示）。

3 . 保存後の検出感度の検討

2 の実験から 6 ヶ月間 RU 試薬を保存しても安定であるとの結果が得られたため、各検査項目の検出感度の測定を行った。その結果、EBV を除く他の検査項目はすべて 10 copies / reaction の感度で検出できること可能だった。EBV に関しては 10 copies のスタンダードが検出される場合と検出されない場合があった。

D: 考 察

1 .RU 検査試薬の作成には Trehalose の使用が有効であり、作成した RU 試薬は暗所・室温で保存することが可能であり、検査が必要な際に随時実施することができるとともに、作業者に起因するミスを大幅に低減できるため、検査結果の信頼性が非常に増すと考えられる。

2 .今回 GAPDH と 13 種ウイルスの合計 14

項目の RU 試薬を作成し、6 ヶ月保存後の検出感度を検討したところ、EBV 以外の検査項目に関しては感度低下が認められなかった。EBV に関しては検査結果が不安定だったが、EBV の検査系は用時調製試薬を用いた際にも検出感度付近での安定性に欠ける場合もあるため、今回の実験で示された不安定性が試薬の長期保存に起因するかどうかは今後の検討課題である。

3 .まだ予備的な検討段階だが、RNA ウイルスの検出に使用する RT-PCR 関連試薬をすべて乾燥・固化して長期保存することには成功していない。その理由は明らかではないが、RT 反応に使用する酵素（Reverse Transcriptase）の保存安定性に問題がある可能性がある。解決法として添加する酵素量やトレハロースの増量が有効である可能性を示す予備的検討結果も得られているため、今後 RU 試薬の作成条件を検討してこれらの問題を解決していきたい。この取り組みは、上記の EBV 検出の不安定性解消にもつながる可能性もあると考えている。

E: 結 論

研究の質を担保するためには、使用する培養細胞資源の品質管理の徹底が極めて重要である。研究用培養細胞資源への微生物汚染は不正確な実験結果を生む主要な原因であり、その対策として微生物汚染の有無を簡便・安価にチェックできる検査系の確立が求められる。本研究では、これまでに開発した網羅的ウイルス検査系を簡便に実施することを目指し、検査に使用する試薬を酵素も含めすべて乾燥・固化することにより、検査の簡便化と作業者に起因する問題の低減することを目的に研究を行った。その結果、性能を劣化させずに PCR 反応に使用するすべての試薬を乾燥・固化する手法の開発に成功した。現在、保存期間の検討と RT-PCR 検

査への応用に関する研究を続けている。

F: 健康危険情報

事例無し

G: 研究発表

論文発表

- 1) Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.: Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences* 324, 190-194(2013)
- 2) Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q, Chng WJ.: EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *blood* 121: 4512-4520(2013)
- 3) Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N.: Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiration*, [Epub ahead of print] (2013)
- 4) Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T.: Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in

patients with liver dysfunction. *Internal Medicine*. 52(2):201-11 (2013)

著書

1. 北條浩彦、清水則夫(分担執筆) . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップUPシリーズ . 北條浩彦編 「基本編 - 原理と基本知識 - リアルタイム PCR を使った解析の基本 10 プライマー/プローブの設計手順 マルチプレックスの場合」p72-74 羊土社 , 2013
2. 清水則夫、渡邊健、外丸靖浩(分担執筆) . 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ . 北條浩彦編 「実践編 - プロトコールを中心に - 章 遺伝子量解析 15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」 p192-202 羊土社 , 2013

国内学会発表

- 1 . 今留謙一 松田剛 川野布由子 千葉佑規乃 新井文子 中澤温子 伊藤守 清水則夫 藤原成悦 難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究 日本ウイルス学会 11 月神戸
- 2 . 清水則夫 再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発 第 14 回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 9 月 (東京)

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 特定非営利活動法人いわて野生生物疾病研究センター 理事長
(岩手大学 名誉教授)

研究要旨

ヘモプラズマは哺乳動物を宿主とするマイコプラズマの一群で、赤血球に寄生して増し、感染動物に溶血性貧血を引き起すことが知られている。ヘモプラズマはこれまでの報告で述べたとおり、試験管内での人工培養に成功していないため、16S リボソーム RNA 遺伝子、16S-23S リボソーム RNA 遺伝子間スペーサー領域などの塩基配列に基づいて分類・同定が行われている。このほか、RNase P RNA 遺伝子も菌種に固有の塩基配列をもつことから、分類・同定に利用されている。本研究ではウシに感染するヘモプラズマ菌種について、RNase P RNA 遺伝子の構造を評価するための基盤となる調査研究を実施した。その結果、RNase P RNA 分子の P12 ヘリックス領域に想定される二次構造がヘモプラズマ菌種に固有の回文様塩基配列を呈することを示し明し、分類・同定のための根拠となることを明らかにした。

A．研究目的

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ている。これらヘモプラズマ菌種はいずれも、試験管内での人工培養が成功しないため性状解析ならびに分類学的な検討が遅れている。そのため、菌種の分類・同定は 16S リボソーム RNA 遺伝子、16S-23S リボソーム RNA 遺伝子間スペーサー領域あるいは RNase P RNA 遺伝子の塩基配列相同性に基づいて行われている。RNase P RNA は、触媒活性を有する RNA 分子のひとつで、バクテリア、

アーキア、ユーカリアを含むすべての生物に共通に検出されている。原核生物の RNase P RNA はリボザイムであり、tRNA 分子の 5' 側を切り離して、tRNA 分子を成熟、完成させる機能をもっている。バクテリアの RNase P RNA は、特異ドメインと触媒ドメインからなり、二次構造の違いからグラム陰性菌のものは A 型、陽性菌のものは B 型に分けられている。マイコプラズマの RNase P RNA は、グラム陽性菌と同じ B 型を呈している。マイコプラズマは細胞壁を欠くため、グラム染色では陰性に染まるが、分類学的にはグラム陽性菌の仲間である。本研究ではウシに感染するヘモプ

ラズマ菌種を対象に PCR 法により、RNase P RNA 遺伝子を検索し、その塩基配列から想定される二次構造を指標に、菌種の同定が可能かを検討した。

B. 研究方法

岩手大学農学部附属牧場で飼育されている黒毛和牛 20 頭から採取した全血 (EDTA 添加) を材料として、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出した。DNA を被検サンプルとして、ヘモプラズマの RNase P RNA 遺伝子を標的とした PCR を以下のとおり試みた。ウシのヘモプラズマ *M. wenyonii* の RNase P RNA 遺伝子の塩基配列に基づいて設計した Forward プライマー: 5'-AGTCTGAGATGACTR TAGTG-3' (*M. wenyonii* RNase P RNA 遺伝子の 1~20 番目の塩基配列に相当) および Reverse プライマー: 5'-TRCTTG MGGGGTTTGC-3' (*M. wenyonii* RNase P RNA 遺伝子の 170~189 番目の塩基配列に相当) を用い、サーマルサイクラー-Dice (タカラバイオ社) によりエンドポイント PCR を行った。増幅された DNA 分子を、さらに NucleoSpin Extract II kit (Macherely-Nagel 社) により精製し、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いてその塩基配列を決定した。

C. 研究結果

ウシには 2 種類のヘモプラズマ *M. wenyonii* および '*Candidatus M.*

haemobos' が感染することが知られているが、今回の PCR では、*M. wenyonii* の RNase P RNA 遺伝子のみが増幅できた。検出された RNase P RNA 遺伝子の一次構造は既知の *M. wenyonii* の配列と同一であり、その二次構造を推定したところ、P12 ヘリックスにおける終末ループの 4 塩基配列 GAAA が保存されていることが判明した (図 1)。

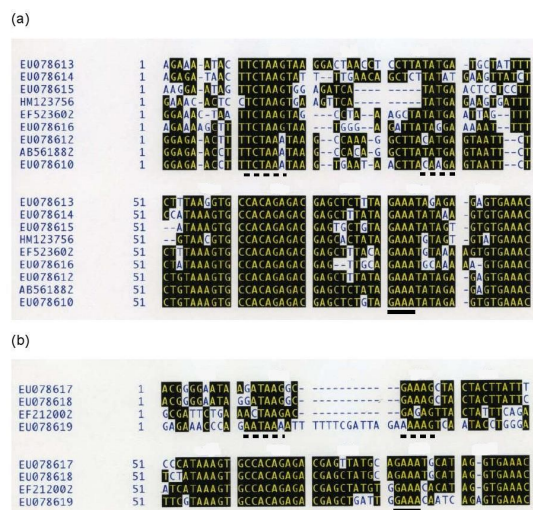


図 1) ヘモプラズマの RNase P RNA 遺伝子の整列比較。配列名は塩基配列のアクセッション番号により示した。上段 (a) はエペリスロゾーン群、下段 (b) ヘモバルトネラ群を示す。4 塩基配列 GAAA に下線を引いた。

P12 ヘリックスを形成するステム領域の多くは 7 塩基対からなっており、菌種に固有の配列であることが明らかになった。しかも、P12 ヘリックスにみられる回文様塩基置換がヘモプラズマ菌種に固有のパターンを示すことを見いだした (図 2)。

また、P10.1 ヘリックスの典型的な 11 塩基配列 (5'-TCTAAG-----TATGA-3') は、エ

ペリスロゾン群のヘモプラズマでよく保存されていた。

AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
G A	G A	G A	G A	G A	G A	G A
A-T	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T	A-T
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T*G	T-A
A-T	A-T	G*T	T*G	A-T	A-T	G*T
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
T-A	T*G	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	A-T	G*T
5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-T*G-3'
haemophilum	ovis	wenyonii	haemolamae	haemocervae	aotii	kahanei
[-5.40]	[-3.60]	[-4.20]	[-4.20]	[-7.20]	[-4.20]	[0.00]
AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
G A	G A	G A	G A	G A	G A	G A
A-T	A-T	A-T	A-T	G-C	G-C	G-C
C-G	C-G	C-G	C-G	T-A	T-A	T-A
A-T	G-C	G-C	T-A	T-A	T-A	A-T
T-A	T-A	A-T	A-T	A-T	A-T	G-C
T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A	T-A
5'-T-A-3'	5'-G A-3'	5'-T*G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'	5'-C-G-3'
suis	haematoparvum	haemofelis	haemocanis	turicensis	coccoides	
[-3.90]	[-5.20]	[-7.60]	[-9.70]	[-7.50]	[-6.90]	

図2) ヘモプラズマのRNase P RNA 遺伝子のP12ヘリックス領域に想定される二次構造。鍵括弧内は計算上の自由エネルギー値 (Kcal/mol)。

D. 考察

RNase P RNA 分子のP12ヘリックスのステム領域にみられる塩基置換は、二次構造を維持するように相補的に起きていることから、これを回文様塩基置換 (palindromic nucleotide substitution) と名付けた。この回文様塩基置換がヘモプラズマ菌種に固有の配列であることから、菌種の同定に有用であると考えられた。つまり、従来の分類・同定法は、一次構造の比較に基づく系統樹により行われていたが、P12ヘリックス領域の回文様塩基置換に基づく方法によると、系統樹の作製が不要となり、二次構造の比較により一義的に同定できることになる。例えば、*M. haemofelis* と *M. haemocanis* は、16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の系統樹だけでは、両者を区別することができないが、RNase P RNA 分子のP12ヘ

リックス領域の回文様塩基置換の配列の違いから直ちに鑑別同定が可能である。

また、想定される二次構造の自由エネルギーは負の値をとり、P12ヘリックス領域が安定なステム・ループ構造を呈することが示唆された。

B型のRNase P RNA 分子におけるP12ヘリックス領域のGAAA4塩基は、同分子のP10.1ヘリックスにある特定の11塩基からなるレセプターと親和性をもつことが知られている。したがって、P12ヘリックス領域における塩基置換は、P10.1ヘリックス領域における塩基置換と連動して起きることが想定される。点変異は無秩序に発生するが、これらの領域における変異は二次構造を保つように制御されていることが示唆された。換言すれば、致死変異となる点変異は、観察されることがない。つまり、RNase P RNA 分子の二次構造を構成する回文様相補配列において観察される点変異は、バイアスを受けた結果として、生き残ったものと考えられる。

E. 結論

住血マイコプラズマはヒトを含む多くの哺乳動物から検出されている、感染性貧血の病因微生物であり、細胞培養に用いるウシ血清のもとになる、ウシ胎児血液を汚染することから、警戒を要する汚染因子と考えられる。試験管内培養ができないことから、遺伝子レベルでの同定・分類に依拠せざるをえない。本研究により、RNase P RNA の二次構造から、菌種の同定が可能で

あることが示唆された。

F . 健康危険情報

動物のヘモプラズマのうち、ヒツジおよびブタのヘモプラズマがヒト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。また、ヒト固有のヘモプラズマが近年知られるようになっている。

G . 研究発表

1 . 論文発表

Iso, T., Suzuki, J., Sasaoka, F., Sashida, H., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., and Harasawa, R. 2013. Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Vet. Microbiol.* 163: 184-189.

Giangaspero, M., Orusa, R., Savini, G., Di Genaro, A., Osawa, T., and Harasawa, R. 2013. Serological survey to determine the occurrence of *Blue tongue virus*, *Bovine leukemia virus* and *Herpesvirus* infections in the Japanese small ruminant population from northern districts. *Clin. Microbiol.* 2: 104-109.

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. 2013. Numerical taxonomy of the genus Pestivirus: New software for genotyping based on the palindromic nucleotide substitutions method. *J. Virol.*

Methods 192: 59-67.

Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., Hirata, T., and Harasawa, R. 2013: Two genotypes among ‘*Candidatus* Mycoplasma haemobos’ strains based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 361-364.

Fujihara, M., Wakita, J., Kondoh, D., Matsushita, M., and Harasawa, R. 2013. Effects of urea on length distribution and morphology of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* cells. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7: 1780-1786.

Sashida, H., Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Nagai, K., Fujita, H., Kadosaka, T., Ando, S., and Harasawa, R. 2013. Two clusters among *Mycoplasma haemomuris* strains, defined by the 16S-23S rRNA intergenic transcribed sequences. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 643-648.

Giangaspero, M., Bonfini, B., Orura, R., Savini, G., Osawa, T., and Harasawa, R. 2013. Epidemiological survey for *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci* var. *ovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Coxiella burnetti*, *Brucella* spp., Leptospirosis, and *Orf virus* among sheep from northern districts

of Japan. J. Vet. Med. Sci. 75: 679-684.

Sashida, H., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., Kobayashi, S., Furuhashi, K., and Harasawa R. 2013. Detection of hemotropic mycoplasmas in free-living brown sewer rats (*Rattus norvegicus*). J. Vet. Med. Sci. 75: 979-983.

Fujihara, M., Kondoh, M., and Harasawa, R. 2013. The bacterial cell division protein FtsZ forms rings in swarmer cells of *Proteus mirabilis*. Ann. Microbiol. 63: 399-401.

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. 2013. Palindromic nucleotide substitutions: A new software for pestivirus genotyping. Int. Res. J. Biochem. Bioinf. 3: 52-63.

Giangaspero, M., Apicella, C., and Harasawa, R. 2013. Palindromic nucleotide substitutions software version 2.0. Genotyping based on the secondary structure alignment in the 5' untranslated region of *Pestivirus* RNA. J. Bioinf. Intell. Control 2: 40-64.

Giangaspero, M., Savini, G., Orusa, R., Osawa, T., Harasawa, T. 2013. Prevalence of antibodies against *Parainfluenza virus* type 3, *Respiratory syncytial virus* and bovine *Herpesvirus* type 1 in sheep from northern prefectures of Japan. Vet. Ital. 49: 285-289.

Mitsui, T., Fujihara, M., and Harasawa, R. 2013. Salivary nitrate and nitrite may have antimicrobial effects on *Desulfovibrio* species. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77: 2489-2491.

2 . 学会発表

なし

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

新鮮組織・細胞の供給システムの整備及び

ヒト新鮮組織を用いた高品質細胞調製の検討

所 属 (独) 医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部
研究分担者 吉田 東歩、小阪拓男

研究要旨 (財)ヒューマンサイエンス振興財団からヒト組織バンク事業が(独)医薬基盤研究所に移管された。(独)医薬基盤研究所においてヒト組織バンク事業を運営することについて倫理審査委員会にて検証し、承認された。医薬基盤研究所において新たに効率的なヒト新鮮組織・細胞の供給システムを整備・構築した。医療機関からの新鮮組織の受入れ、及び新規分譲申請について倫理審査委員会にて事前審査し、産学官の研究機関へ分譲を開始した。また需要に応じて供給可能な新鮮組織及び組織より調製した細胞の資源化及び拡充を検討した。調製した細胞については一般的性状を確認し、高品質化の検討を進めた。

A. 研究目的

医学・創薬研究には、疾患・病態を反映したヒト組織や対照となる正常組織が必須の材料となるが、欧米と異なり日本では医療機関から研究用ヒト組織の入手は極めて困難な状況にあり、研究用ヒト組織は主に手術摘出組織に限定される。このような状況下で 2001 年より(財)ヒューマンサイエンス振興財団において国内で初めてとなる、研究用ヒト組織バンク事業が開始され、手術摘出組織の研究資源化に取り組み、ヒト組織由来試料の研究利用を推進してきた。そして昨年 4 月に本事業は厚生労働省の方針により、効率化を図るため(独)医薬基盤研究所に移管され、ヒト組織を一般の研究機関へ分譲する事業を開始した。産学官の研究者の利用が可能であり、ヒト組織由来試料の研究利用をさらに推進させることが可能となった。また、国の研究倫理指針に基づき、適正なルールに従ってヒト組織を供給するバンク事業を充実させることは、国内のヒト組織利用環境を向上させ、創薬及び再生医療研究における研基盤を整備するために重要である。

今年度の研究では、ヒト組織バンク事業を(独)医薬基盤研究所において引き継いで実施し、発展させるために、ヒト新鮮組織及びヒト組織より調製した細胞の供給システムを再構築し、効率的な分譲体制を整

備し、確立する。そして可能な限り早期に研究機関へ分譲を再開する。そのために医療機関からの組織供給、ヒト組織バンクへの組織受け入れ、研究機関への分譲について実施体制を整える。またこれらの分譲体制に関しては、医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて検証する。また需要に応じた新鮮組織の安定供給を図るため提携先の医療機関との連携を強化する。新鮮組織より調製した細胞の供給についても拡充を図る。調製した細胞については、高品質化のため発現解析等により細胞特異的な機能解析を進め、利用価値の高い情報を得ることを検討する。

B. 研究方法

1) 新鮮組織の供給体制の整備

今回の研究では、(財)ヒューマンサイエンス振興財団から移管されたヒト組織バンク事業を(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクにおいて引き続き実施するために、ヒト新鮮組織及び新鮮組織より調製した細胞の供給システムを再構築し、効率的な分譲体制を整備した。そして早期に研究機関への分譲を再開した。医薬基盤研究所においてヒト組織バンクの運営細則等の規定を検討し、設定した。これに従い、分譲申請の受理から組織受け入れ、分譲実施に至

るまでのヒト組織バンク内の諸手続きを検討し、必要書式を整備した。

提携先の医療機関からの組織供給に関しては、提供先を(財)ヒューマンサイエンス振興財団から(独)医薬基盤研究所へ変更し、承継のための契約を締結した。インフォームド・コンセントにおいても、組織提供先の変更に関して内容を検討した。また組織の受入れ時に入手する医療機関からの提供通知書等の様式を整備した。

研究機関からの医薬基盤研究所・ヒト組織バンクへの分譲申請時には、研究機関内倫理審査の結果について確認した。また(財)ヒューマンサイエンス振興財団から分譲中の研究機関への分譲継続及び研究期間延長申請等について倫理審査を検討した。

医薬基盤研究所ヒト組織バンクで取り扱う対象は、手術摘出組織の病変部位とその周辺の正常部位で、病理診断に不要とされ、本来廃棄される組織とした。提供者は、重篤な疾病の原因となる病原体として梅毒、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エイズウイルスが陰性であることを条件に受け入れた。

実際に分譲に際しては、新鮮組織の場合は、事前に承認された範囲の事例のみ供給を実施し、事後に倫理審査委員会で事例報告した。供給に際して、手術の一週間程度前に医療機関から提供情報を入手し、複数の研究機関とマッチングを行い、分譲先を決定した。分譲日には、バンク担当者が医療機関でヒト組織を受け取り、連結不可能匿名化処理を行った上、診療情報を記載したデータシートと共に研究機関まで組織を冷蔵輸送した。

また需要状況に応じた新鮮組織の供給を図るために、旧(財)ヒューマンサイエンス振興財団ヒト組織バンクでのニーズ調査及び医薬基盤研究所への分譲申請状況を基にして分譲の対象となる組織を検討した。新鮮組織の供給を安定化するため、提携先の医療機関との連絡を密にして連携を強化した。今後も需要も見込まれる試料については、新たな入手先を検討した。

ヒト組織バンクへ受け入れた新鮮組織より調製した細胞供給の拡充についても検討した。調製した細胞については、一般的性状確認に加えて高品質化のため発現解析等により細胞特異的な機能解析を進め、利用価値の高い情報を得ることを検討した。

2) 新鮮組織から細胞の調製

滑膜細胞は以下の方法にて調製した。関節リウマチ患者及び変形性関節症患者の人工関節置換手術で摘出された滑膜組織を Hanks' balanced salt solution で数回洗い、脂肪及び腱組織を取り除いた後、1 mg/ml コラゲナーゼ を含む D-MEM 培地(50

µg/ml カナマイシン、0.25 µg/ml アンフォテリシン B 含有)中にて 37 °C、2 時間処理を行った。分散処理後の組織を 250 µm ナイロンフィルターでろ過し、細胞塊を取り除き、遠心後、沈殿した滑膜細胞を採取した。滑膜細胞は 10% 牛胎児血清を含む D-MEM 培地(50 µg/ml カナマイシン、0.25 µg/ml アンフォテリシン B 含有)に懸濁し、5% CO₂、37 °C で培養した。継代には 0.25% トリプシン-0.02% EDTA を用いた。1 回継代後、増殖した細胞をトリプシン処理し、細胞凍結保存液(十慈フィールド製、セルバンカー)に懸濁し(約 5 × 10⁵ cells/ml/チューブ)、プラグラミング・フリーザーにて緩慢凍結(1 °C/分)し、液体窒素タンクの気相(-160 °C)にて保存した。

3) 新鮮組織から調製した細胞の高品質化の検討 - 滑膜細胞の炎症反応性の検証及び発現解析 -

滑膜細胞を 24 時間通常培養後に無血清培地(DMEM)と交換しさらに 24 時間培養した時点で、各種濃度の炎症性サイトカイン TNF- α (recombinant TNF- α , R&D Systems) を培養系に添加して、24 時間培養した。細胞より総 RNA を抽出し(RNeasy Mini Kit, Qiagen)、逆転写反応により cDNA を合成してリアルタイム PCR 用の解析試料とした(Cell-to-Ct Kit, ABI)。リアルタイム PCR は以下の条件により実施した。リアルタイム PCR システム: StepOne Plus System, Quantitation-Comparative Mode。反応組成: cDNA 2 µl, TaqMan Gene Expression Assay (human MMP-3 或いは human IL-6 用) 1 µl, TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 µl, 大塚蒸留水 8 µl。反応条件: 95 °C、20 秒 (95 °C、1 秒 60 °C、20 秒) × 40 サイクル、反応時間: 約 40 分。相対的 mRNA 発現量は human G3PDH を基準として求めた。

デキサメタゾンによる TNF- α の効果抑制試験時には、関節リウマチ由来の滑膜細胞に TNF- α (10ng/ml) 添加と同時にデキサメタゾン(100 µM)を同時添加し 24 時間培養した細胞について上記と同様に解析した。

幹細胞関連遺伝子の発現解析は、関節リウマチ由来の滑膜細胞より調製した cDNA を試料とし、TaqMan Gene Signature Plate(96 well Stem Cell Array plate, ABI)を用いて上記と同じ PCR 条件にて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて実施した。医薬基盤研究所ヒト組織バンクにおいては、ヒト試料の取扱いに関しては上記の指針に従

い、試料ごとに医薬基盤研究所・研究倫理審査委員会において承認を受けて実施した。

また、ヒト試料の提供医療機関、供給を受ける研究機関においても機関内倫理審査委員会でそれぞれ承認を受けた。医薬基盤研究所ヒト組織バンクで取り扱う対象は、外科手術等で摘出され、診断などに不要と判断された組織またはその組織に由来する試料とした。これらのヒト試料は、医薬基盤研究所ヒト組織バンクに提供することについて提供者への十分な説明と同意のもとに、連結不可能匿名化などの個人情報保護のための手続きを厳正に行った。

C. 研究結果

1) 新鮮組織の供給システムの整備

医薬品等の研究開発に必要なとされる生物資源の効率的な活用を促進するため、ヒト組織バンクを含むヒューマンサイエンス研究資源バンクの全事業が平成 25 年 4 月 1 日付けで(独)医薬基盤研究所・ICRB 生物資源バンクに移管された。ヒト組織バンクについては、保管していた凍結試料、固定試料、組織から調製した細胞等の加工試料の 217 試料及びヒト試料供給事業の(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクへの移管についてヒューマンサイエンス振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議し、承認された。ヒューマンサイエンス・ヒト組織バンクと(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクは準拠する国の研究倫理指針、運営方法、インフォームド・コンセント等において同等であり、両者とも非営利・公共的な研究資源バンクであること、ヒューマンサイエンス・ヒト組織バンク担当者が引き続き当該業務を担当することで業務の継続性が確保されることも考慮され、移管が承認された。

今年度の研究では、(財)ヒューマンサイエンス振興財団から移管されたヒト組織バンク事業を(独)医薬基盤研究所において引き続き運営するために、ヒト新鮮組織及び細胞の供給システムを再構築した。移管された凍結組織、固定組織等のヒト試料は、適正に保管し分譲可能な状態とした。

これらのヒト試料の効率的な分譲体制を早期に整備し、分譲中及び新規分譲申請予定の研究機関の研究に支障が出ないように可能な限り早期に研究機関への分譲を再開できるように努めた。その結果、約 4 か月の整備期間の後、効率的な運営体制を構築し、分譲業務を再開することができた。そのために医療機関からの組織供給、ヒト組織バンクへの組織受け入れ、連結不可能匿名化処理、研究機関への分譲について、実施体制を整えた。またこれらの分譲体制に関しては、医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて事前に検証し、承認を得た。

提携先の医療機関の承継のために、組織提供先の(財)ヒューマンサイエンス振興財団から(独)医薬基盤研究所への変更およびインフォームド・コンセントの提供先の変更について医療機関と協議し、(独)医薬基盤研究所との間に組織提供の承継に関する新たな契約を取り交わし、継続した組織提供を可能とした。インフォームド・コンセントでは、組織が医薬基盤研究所ヒト組織バンクに提供され、研究利用されることについての同意を得た。また組織の受入れ時に入手する医療機関からの提供通知書及び受領書を整備した。各医療機関の外科からは消化器系手術時に摘出される組織、整形外科から人工関節置換手術等で摘出される組織の提供を可能とした。

また、医薬基盤研究所ヒト組織バンクの運営細則及び内規を検討して作成した。これに従い分譲申請の受理から組織受け入れから分譲実施に至るまでのヒト組織バンク内の諸手続きを定め、連絡経路、実施作業を設定して業務を分担し、作業の効率化を図った。具体的には分譲申請受付、倫理委員会への申請対応、組織の受け取り及び研究機関への輸送、医療機関への組織提供に対する対価の支払い、研究機関への実費相当額の請求等の各作業において業務を分担し、倫理審査委員会事務局、事務担当部門と連携して実施環境を整えた。以上の諸手続きについてヒト組織バンク標準作業手順書を検討し、順次作成中である。分譲申請関係の書式として、分譲申請書、送付書、受領書、請求書等の必要書式の記載内容等について詳細に検討を重ね整備した。また従来郵送で対応していた書類のやり取りを可能な限り電子メール或いは直接的に行うことにした。医療機関担当医への受領書の送付、会計担当者への請求案内は必要書類のファイルをメール添付で送付することにした。また研究機関への組織受け渡し時には、その場で受領書を頂いた。このように業務の効率化を図ることにより、迅速かつ円滑な新たな分譲実施体制を確立した。

研究機関から医薬基盤研究所・ヒト組織バンクへの分譲申請に際しては、研究機関内倫理審査承認結果を、承認書の写しにより確認した。また(財)ヒューマンサイエンス振興財団からの分譲継続中の研究機関については、(財)ヒューマンサイエンス振興財団・倫理審査委員会にて承認済みの研究内容は継続承認されるが、分譲申請先を医薬基盤研究所へ変更する必要があるため、改めて研究機関内での倫理承認を得ることを説明して承諾を得た。

分譲体制の整備後、今年度は医薬基盤研へ初めて 4 件の新規分譲申請を受け付け、基盤研研究倫理審査委員会にて審査され、すべて承認された。申請試料は、新鮮組織の滑膜組織、小腸組織、内臓脂

肪組織及び凍結滑膜細胞であった。小腸組織については、これまでに医療機関からの提供が可能となっていたが、分譲申請は初めてであった。分譲中の滑膜細胞についての追加分譲申請及び、研究期間延長に伴う6件の分譲継続申請については、迅速審査により承認された。

2) 新鮮組織の分譲

新鮮組織の供給システムの整備に関しては、関西、関東地区の二つの提携医療機関の外科と整形外科からの提供の継続を可能とし、定期的に組織提供予定に関する情報を入手し、研究機関とのマッチングが成立して提供される組織については、分譲までに提供通知書により提供者情報を入手した。平成25年度にヒト組織バンクに提供された新鮮組織は20試料であり、このうち滑膜組織4試料は研究機関とのマッチングが不成立となった事例で、バンク内で細胞調製に使用した。他の16試料(滑膜組織4試料; 関節リウマチ1例、変形性関節症3例、大腸組織2試料、小腸組織7試料、内臓脂肪組織3試料)は、研究機関に安定的に供給した(2-3例/月)。滑膜組織は、すべて人工膝関節手術により摘出された病変部位であった。大腸組織、小腸組織、内臓脂肪組織はいずれも消化器系の癌手術時に摘出され廃棄される正常部位であった。手術の種類は大腸癌(S状結腸癌、上行結腸癌、横行結腸癌、直腸癌)、胃癌、膵臓癌、十二指腸乳頭部癌であった。

提供者(20名)の内訳は、滑膜組織は、女性の罹患率が高い関節リウマチ患者或いは変形性関節症患者からの提供のため、8例すべてが女性であった。正常大腸組織、正常小腸組織、正常内臓脂肪組織の提供者は、女性が7例、男性が5例であった。提供者の年齢の範囲は52~84歳で平均年齢は約70歳であった。組織摘出処理後に冷蔵保存液に浸漬するまでの時間は、滑膜組織の場合1~2時間以内、大腸、小腸、内臓脂肪組織の場合は10分から1時間以内であった。

提供された組織量は、滑膜組織が約10g、小腸組織が、約10~30g、大腸組織が約5~10g、脂肪組織が約10~30gであった。脂肪組織の提供量は、過去の事例(1~5g)と比べると多量であり、利用者の要望に概ね応えられた。大腸組織の量も以前より多量に提供を受けた。

滑膜組織は主に関節リウマチの研究に、大腸、小腸組織は薬物の安全性研究等に、内臓脂肪組織は再生医療の基礎研究に利用された。

すべての提供者については梅毒、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エイズウイルスが陰性であることを提供通知書及び電子メール情報により、事前に確認し、組織を受け入れた。

今年度は新規に小腸組織を供給可能とし、分譲を開始した。小腸組織については、医療機関の協力を得て、対象となる癌手術の症例により十二指腸、空腸、回腸の各部位の供給が可能となり、小腸組織の中でも研究目的に合致した有用な部位の提供を実施できた。また小腸の各部位摘出時の手術法に関する情報も入手し、有用な情報として分譲先に伝えた。新鮮組織の供給では摘出から譲渡までの時間ができるだけ短いことが望まれるが、小腸組織については自己消化が速く組織が変性しやすいために、提供までの時間は特に注意を払う必要があった。自己消化をできるだけ防ぐためにプロテアーゼインヒビターを含む保存液(HBSS、DMEM)及び組織移植時の組織輸送用に開発された保存液(Custodil HTK Solution)等を検討し、目的の実験に使用しうる良好な結果を得た。小腸組織の場合、摘出されて輸送し、研究利用されるまでの時間はおよそ5~6時間で、小腸由来の膜調製及び薬理学実験が可能であった。

関節リウマチ由来滑膜組織については、生物学的製剤の使用歴がない或いは疾患活動性が中程度以上という希望条件のある申請例があった。薬歴は通常は分譲前に入手する提供通知書より確認するが、それよりも前にメール等で医療機関からこのような情報を得て、利用者に伝えことができ、円滑なマッチングが行えた。

また分譲資源の拡充を図るため、需要の大きい肝臓由来試料の入手について検討した。新たな入手源として生体肝移植手術において摘出される部位について医療機関と協議し、提供者の同意が得られる症例の場合には、ドナー及びレシピエント由来の新鮮肝組織、凍結肝細胞について、ヒト組織バンクへ提供可能であることが分かった。

2) 新鮮組織から細胞の調製

医薬基盤研究所において新鮮滑膜組織から滑膜細胞、脂肪前駆細胞を調製し、凍結チューブで分譲するシステムについて、新鮮組織の場合と同様の手続きにより整備した。本年度は滑膜細胞については関節リウマチ及び変形性関節症由来の新鮮滑膜組織より各2ロット計4ロット分を調製し、分譲可能な資源とした。用いた症例は関節リウマチ由来滑膜1例(70歳代)、悪性関節リウマチ及び全身性エリテマトーデス(SLE)合併症1例(50歳代)、変形性関節症2

例(いずれも70歳代)ですべて女性由来であった。これら4症例は整形外科にて人工関節置換手術で摘出された膝滑膜組織であった。いずれの症例も手術摘出後ヒト組織バンクに3時間以内に冷蔵状態で受け入れ、組織分散(約3時間)及び培養(1~2週間、継代数1)した。その結果、関節リウマチ滑膜組織1例より、 8.0×10^5 cells/tubeの凍結チューブを80本、関節リウマチ及びSLE合併症滑膜組織1例より 7.0×10^5 cells/tubeの凍結チューブを85本、変形性関節症2例より各々 7.0×10^5 cells/tubeの凍結チューブを55本と 5.5×10^5 cells/tubeの凍結チューブを35本調製した。液体窒素中で保存した滑膜細胞凍結チューブの解凍後の生存率は90%以上であり、再培養可能であった。細胞の形態は繊維芽様であることを確認した。細胞マーカーとしてCD105及びVimentinの発現を細胞免疫染色により確認した。また、微生物汚染検査(細菌、真菌、マイコプラズマ)については陰性を確認した。以上のような一般的性状検査の結果、品質上問題がないことを確認した後、医薬基盤研究所JCRB生物資源バンクホームページ及び関連学会等でロット情報を公開した。

平成24年度までに調製したロットも含め、分譲用凍結細胞は、滑膜細胞(22ロット;関節リウマチ由来13ロット、変形性関節症由来9ロット)、脂肪前駆細胞(11ロット;非糖尿病由来9ロット、糖尿病由来2ロット)となった。今年度は3件計24本の滑膜細胞凍結チューブを分譲し、関節リウマチ関連の研究に利用された。

3) 新鮮組織から調製した細胞の高品質化

滑膜細胞において炎症反応性の検証及び発現プロフィール解析、分化能解析等を検討中であり、今年度は途中経過について報告する。品質管理における一般的性状検査の一項目として実施する細胞マーカーCD105、Vimentinの発現確認は、従来より細胞免疫染色により行っているが、リアルタイムRT-PCRによるmRNA発現解析においても迅速かつ詳細な確認を可能とし、検査効率及び精度を向上させた。このような一般的性状検査に加えて高品質化を図るために、機能的性状検査の一項目として、滑膜細胞において

は、炎症反応性を検証してきた。

これまでに関節リウマチ由来及び対照となる滑膜細胞において、TNF- α 添加時の関節リウマチ関連遺伝子のmRNA発現変動について調べ、MMP-3及びIL-6について明瞭な発現上昇を認め、培養上清のELISAにより蛋白質レベルでも発現増加を確認した。今回この炎症反応性を検証するために、関節リウマチ治療薬として使用される免疫抑制剤デキサメタゾンによる抑制効果を予備的に検討した。関節リウマチ由来の滑膜細胞にTNF- α 添加とデキサメタゾンを同時添加して培養(24well培養系)した場合の効果について調べた結果、TNF- α によるMMP-3 mRNA発現上昇に対して顕著な抑制効果が検出された。また96well培養系によっても、同様の効果が認められた。IL-6に対しても同様に抑制効果を検討中である。

また発現亢進を確認したMMP-3及びIL-6の他に、顕著な発現増加を示す遺伝子として、MMP-1、MMP-8、IL-15、IL-1、CD40、TLR-1、TLR-2等が認められた。これらの中で自然免疫に關与するTLR分子に焦点をあて、細胞内での発現及び機能について検討している。予備実験の結果、滑膜細胞においてTLR-1、TLR-2が其々のリガンドと作用しIL-6等のサイトカインの発現を増加させることを確認した。

また新鮮組織より調製した細胞の高品質化のための一環として細胞に特徴的な発現プロフィールの解析を検討している。滑膜細胞においてはこれまでにその機能的性状として炎症関連の遺伝子の発現状態及び炎症性サイトカインに対する反応性を確認している。滑膜細胞は、このように機能的に分化した細胞としての性状を示す一方で、多種類の細胞への分化能をもつ間葉系幹細胞としての性状を示すことが明らかになっていることから、幹細胞としての性状を調べるために関連遺伝子の発現状態を解析中である。これまでに96well発現アレイ解析により、POU5F1(Oct-4)、Sox-2、Nanog等の多能性マーカーや、LAMA(ラミニン)Type1コラーゲン(COL1A1)、フィブロネクチン(FN1)細胞外マトリックス成分等のmRNA発現を確認している(表参照)。現在、これまでに調製した各ロットについて発現の有無と程度を引き続き解析中である。

Target Name	mRNA発現	Target Name	mRNA発現
ACTC1	ND	GCG	ND
AFP	ND	GCM	ND
BXDC2	+	GDF3	ND
CD34	+	GFAP	ND
CD9	+	GRB7	ND
CDH5	ND	HBB	ND
CDX2	ND	HBZ	ND
CGB	+	MNX1	ND
COL1A1	+	IAPP	ND
COL2A1	ND	IFITM1	+
COMM3	+	IFITM2	+
CRABP2	+	IL6ST	+
CTNNA1	+	IGF2BP2	+
DDX4	ND	INS	ND
DES	+	PDX1	ND
DNMT3B	+	ISL1	ND
LEFTY2	+	KIT	+
EEF1A1	+	KRT1	ND
EOMES1	+	LAMA1	+
FGF4	ND	LAMB1	+
FGF	ND	LAMC1	+
FLT1	+	LEFTY1	ND
FN1	+	LIFR	ND
FOXA2	ND	LIN28	ND
FOXD3	+	MYF5	ND
GABRB3	+	MYOD1	ND
GAL	ND	NANOG	+
GATA4	ND	NES	+
GATA6	+	NEUROD1	ND
GBX2	ND	NODAL	ND
NOG	ND	SERPINA1	+
NPPA	ND	SFRP2	+
NR5A2	ND	SOX17	+
NR6A1	+	SOX2	+
OLIG2	ND	SYCP3	+
PAX4	ND	SYP	+
PAX6	ND	T	ND
PECAM1	+	TAT	ND
PODXL	+	TDGF1	+
POU5F1	+	TERT	ND
PTEN	+	TFCP2L1	+
PTF1A	ND	TH	ND
RAF1	+	UTF1	ND
REST	+	WT1	ND
RUNX2	+	XIST	+
SEMA3A	+	ZFP42	ND

D. 考察

1) 新鮮組織の供給システムの整備

(財)ヒューマンサイエンス振興財団からヒト組織バンク事業及び保管試料が予定通り(独)医薬基盤研究所に移管された。(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクにおいてヒト組織バンク事業を運営することについては、非営利な公的バンクとしての同等性の観点から倫理審査委員会にて審査され、問題なく承認された。医薬基盤研究所において新たにヒト新鮮組織及び新鮮組織より調製した細胞の安定的な供給システムを整備・構築するために、基本的には(財)ヒューマンサイエンス振興財団における運営形態を基にし、(独)医薬基盤研究所での難病バンク事業の仕組み及び倫理審査制度に整合させるようにして、難病バンク担当者、倫理審査事務局、会計課等の関連部門の協力も得て迅速に効率的な分譲体制を整えることができた。また医療機関からの組織供給の承継のために必要となる契約締結については、(独)医薬基盤研究所が公的な研究機関であることから、円滑に協議が進められた。提携先の医療機関からの新鮮組織の受入れ、及び新規分譲申請につい

ては、倫理審査委員会にて事前審査し、産学官の研究機関の研究利用に対して大きな支障のないように早期に分譲を再開できた。今回構築したこのような分譲体制は、今年度の新規分譲申請に対応した分譲実施業務において円滑に機能したことから、効率的で有効なシステムであることが検証された。今後はこのシステムを基盤として維持しながら、必要な点は改良、補完することにより、さらに倫理面等も含めて効率化を検討する。

医薬基盤研究所における分譲体制の整備後に、受け付けた4件の新規分譲申請に関する倫理審査については、いずれも大きな問題なく承認され、速やかに分譲が実施された。分譲申請から初回の分譲の実施までの期間は、2~3ヶ月であり、比較的迅速な対応が可能であった。供給可能であった小腸組織を医薬基盤研究所において新規に分譲でき、確かな需要が確認されたことにより、今後の利用増加も期待される。

医薬基盤研の研究倫理審査委員会は定期的開催されるため、利用者には開催予定を連絡し、申請時期を検討して頂いた。また医療機関の担当医とは、随時の連絡が可能な状態を確保し、分譲承認後にタイムリーに提供情報を入手し、円滑なマッチングを可能とした。また研究計画に変更のない、分譲中の凍結細胞についての追加分譲申請及び研究期間延長等の延長申請については、軽微な変更申請として迅速審査により承認された。このようにヒト組織の分譲関連の申請に対する倫理審査体制及び連絡体制は有効に機能したと考えられる。

分譲を実施した新鮮組織及び凍結細胞の各事例、及び細胞調製事例については、年度末にまとめて倫理審査委員会にて報告する予定である。

今年度は、組織提供に際して医療機関との協力体制の強化により、バンク及び利用者が必要な情報を可能な限り早期に入手し、効率的なマッチングを可能とした。このように、通常入手する提供通知書に記載される以外の有用情報についても柔軟に入手することは円滑に分譲を進めるために重要であった。

最近のヒト試料の申請状況からみると、これまで利用の多かった癌組織については、潜在的ニーズはあるが利用の減少傾向が認められる。一方正常組織に関しては、小腸組織、大腸組織、脂肪組織等について新規な申請が増加しており、組織の需要に変化が認められる。正常組織は大腸、小腸組織等では薬剤の副作用を調べるための毒性評価を目的とした研究に利用されており、さらには腸管免疫研究への利用も期待される。また小腸由来細胞の調製用素材としても有用と思われ、利用価値の高い組織として資源化について検討する。また今回分譲した内臓脂肪組

織は、再生医療研究の基礎研究として体性幹細胞を調製するための素材として利用され、良好な結果が得られており、組織の質、量ともに十分に研究目的を満たすものであったと考えられる。内臓脂肪組織は従来の生活習慣病研究への利用も含めて重要な研究資源として利用を促進していく。また、最近体性幹細胞のソースとして有用性が見出された皮下脂肪組織の資源化についても検討する。

滑膜組織については、関節リウマチ及び変形性関節症由来の組織を分譲中であるが、関節リウマチの症例については、生物学的製剤による治療が進んだことから、対象となる人工関節手術例が減少しているため、提供例が減少傾向にある。関節リウマチ由来滑膜組織の需要は依然として大きく、今後対応が必要である。一方、変形性関節症由来の組織は主に関節リウマチ由来組織の対照として利用されているが、症例数が多く十分な供給が見込めるため、変形性関節症に関する基礎研究等への利用促進を検討する。また、関節炎等の疾病以外での交通事故やスポーツ時の傷害等の手術時に摘出される正常滑膜組織は、疾患対照組織或いは幹細胞の調製素材として利用価値が大きいと推測され、提携先の医療機関からの受入れの可能性について検討する。

新鮮組織より調製した滑膜細胞は分譲開始当初から主に関節リウマチに対する創薬研究に利用されてきたが、最近はこの細胞が、間葉系幹細胞として脂肪細胞や骨芽細胞への分化能を示すことから、細胞分化の研究にも利用され始めた。一方、変形性関節症由来の滑膜細胞はこれまで関節リウマチ研究において対照として利用されてきたが、昨年度は、変形性関節症に対する創薬関連の基礎研究に利用された。本疾患は原因不明で、現在の高齢化社会において患者数は数千万人と推定され、原因究明及び治療薬開発が望まれており、そのための研究資源として今後有用性が増すことが期待される。滑膜細胞は分譲開始から年々利用が増加しており、今後も利用拡大が見込まれる。また、今年度調製した自己免疫疾患 SLE を合併した関節リウマチ由来の滑膜細胞は、原因不明の難病である本疾患の研究にも利用可能な貴重な研究資源になると考えられる。

また、今回実施している発現プロファイル解析等の有用情報を付加することにより高品質化を図り、利用を促進していく。現在分譲可能な凍結細胞は、滑膜細胞と脂肪前駆細胞であるが、需要の大きい細胞試料を拡充するため、今後も細胞調製に関する最新情報の収集に努めるとともに、技術レベルの向上を図り、小腸、膵臓、皮膚等の新鮮組織より調製した正常細胞の資源化を検討する必要がある。

また分譲資源の拡充を図るため、薬物代謝研究や

肝臓癌等の研究分野において需要の大きい肝臓由来試料については、分譲していた凍結肝細胞が在庫切れとなったこともあり、新たな入手源を検討した。正常肝組織は、肝臓癌手術時に付随して摘出されるが、肝臓癌の症例は、肝炎ウイルス(HBV,HCV)が原因となる場合が多いため、組織の受入れが難しい。また過去に大腸癌等の転移性の肝臓癌手術或いはNASH(非アルコール性脂肪肝)等の手術由来の組織の分譲例はあるが、例数が非常に少なく、供給が難しい状態である。そこで今回、生体肝移植手術において摘出される部位について医療機関と協議を重ね、公的なヒト組織バンクを介した一般的な研究利用の可能性について検討した。その結果、ドナー及びレシピエント由来の新鮮肝組織及びこれより調製し、保管された凍結肝細胞について、ヒト組織バンクへの提供及び研究利用に関する提供者の同意が得られる症例の場合には、提供可能であることを確認した。今後も倫理面も含めて検討を進める予定である。

2) 新鮮組織からの細胞調製及び高品質化

今回滑膜細胞において TNF- α による炎症反応性を検証するために、関節リウマチ治療薬として使用される免疫抑制剤デキサメタゾンの効果を予備検討し、MMP-3 mRNA の発現に対する抑制効果が認められたことから、この反応がステロイドにより抑制される免疫反応であることが示唆された。この効果は 96well 培養系でも検出可能であったことから、本細胞は TNF- α の作用を制御する化合物のスクリーニングの構築にも利用可能と考えられる。このような情報は、創薬利用の観点から有用な情報となるため、提供情報として活用する。

滑膜細胞において自然免疫において機能する TLR-1 及び TLR-2 の mRNA 発現し、予備検討により各リガンドの作用が検出された。今後もさらに検討が必要であるが、ヒト新鮮滑膜組織より調製した滑膜細胞が、マクロファージ等の免疫系の細胞に発現する TLR 分子を発現し機能することが推定される。文献的にも、関節リウマチ由来滑膜細胞において TNF- α 添加時に TLR-2 の mRNA 発現が増加することから、関節リウマチの炎症拡大に寄与することが示唆されており、詳細に解析を進めている。

滑膜細胞の間葉系幹細胞としての性状に関する情報としては、幹細胞関連遺伝子の mRNA 発現プロファイルを解析中であり、複数の多能性マーカーの発現を認めている。このような発現情報は非発現情報も含めて、目的とする分化研究に利用可能かどうかを判断する場合に有用となる。骨髄由来等の一般的な間葉系幹細胞の発現状態とも比較検討し、本細胞の発現プロファイルを付加情報として公開し、再生

医療分野等において分化研究における利用を促進するために活用する。

これまで当バンクで新鮮組織より調製した滑膜細胞及び脂肪前駆細胞については、間葉系幹細胞の性状として、通常の分化誘導法により脂肪細胞及び骨芽細胞へと分化することを確認している。特に滑膜細胞は、分化細胞の性状としての炎症反応性を示す他に分化能を示すことは興味深く、多能性マーカーの発現も認められることから、脂肪細胞や骨芽細胞以外の細胞へも分化しうることが推定される。今後は軟骨細胞、神経細胞等の他の細胞への分化能についても検討を要する。

E. 結論

(財)ヒューマンサイエンス振興財団からヒト組織バンク事業及び保管試料が(独)医薬基盤研究所に移管された。(独)医薬基盤研究所においてヒト組織バンク事業を運営することについて倫理審査委員会にて検証し、承認された。同研究所において新たに効率的なヒト新鮮組織及び新鮮組織より調製した細胞の安定的な供給システムを整備・構築した。医療機関からの新鮮組織の受入れ、及び分譲申請について倫理審査委員会にて事前審査し、早期に産学官の研究機関へ分譲を再開した。分譲資源の拡充のため、需要に応じた新規な新鮮組織として小腸組織の分譲を開始した。関節リウマチ由来新鮮滑膜組織より効率的に細胞調製を行い、高品質化を図るため機能的性状として炎症反応性について詳細な解析を実施中である。さらに間葉系幹細胞としての性状確認のため、遺伝子発現プロファイルの解析を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
5th ANRRC International Meeting 2013

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

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

創薬・疾患研究のためのヒト組織・不死化B細胞の資源化に関する検討、及び
ヒト由来試料に関する情報データベースの構築

研究代表者：小原 有弘	独立行政法人医薬基盤研究所	培養資源研究室	主任研究員
研究分担者：高橋 一朗	独立行政法人医薬基盤研究所	難病資源研究室	主任研究員
：坂手 龍一	独立行政法人医薬基盤研究所	難病資源研究室	研究員
：吉田 東歩	独立行政法人医薬基盤研究所	泉南資源研究施設	研究調整専門員
：佐藤 元信	独立行政法人医薬基盤研究所	泉南資源研究施設	研究調整専門員
：小阪 拓男	独立行政法人医薬基盤研究所	泉南資源研究施設	研究調整専門員

研究要旨

創薬・疾患研究に必要な細胞・組織資源の充実化を行うために、H S 研究資源バンクから医薬基盤研究所へ移管されたヒト組織バンク及び日本人由来B細胞株・DNAバンクのヒト組織及び不死化B細胞について、体制の整備と新たな資源化に関する検討を行った。これらのバンクを含む医薬基盤研究所の生物資源バンクについて、JCRB 生物資源バンク (<http://bioresource.nibio.go.jp>) としてポータルサイトを構築し、ヒト由来の細胞、組織、不死化B細胞・DNA、遺伝子、そして実験動物について、利用者がOne Stopで情報を入手できる環境を構築した。さらに、研究所内外の他データベースとの情報連携により、国内有数の生物資源を創薬・疾患研究へ活用するプラットフォームの構築を図った。

A．研究目的

独立行政法人医薬基盤研究所（基盤研）が、1980年代から維持・管理してきた、創薬・疾患研究に有用な細胞・組織コレクションの資源の充実化、分譲体制の確立を一層進めることを目的とする。2013年4月1日付で、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク（H S 研究資源バンク）が基盤研へ移管され、ヒト由来試料の生体資源バンクの統合化のための体制整備と資源活用方針の検討が必要となった。そこで、H S 研究資源バンクから基盤研難病資源研究室へ移管されたヒト組織バンク及び日本人由来B細胞株・DNAバンクに関して、運用を滞りなく継続実施可能にするとともに、今後に向けた資源化に関する検討を行う。また、これらのバンクを加えた基盤研難病・疾患資源研究部の生物資源バンクについて、創薬・疾患研究を行う分譲希望者がヒト由来試料の入手に際し、One Stopで情報を入手できる環境を目指して、情報データベースの構築を進める。

B．研究方法

- 1．H S 研究資源バンクから移管された、ヒト組織バンク及び日本人由来B細胞株・DNAバンクについて、提供元機関（医療機関）との契約変更（ヒト組織バンク）等の運営体制の整備を行い、分譲を実施可能にする。また、新しいヒト由来試料の追加、細胞調製、品質管理、遺伝子発現解析等を実施し、次年度以降のための新たな資源化に向けた検討を行う。
- 2．基盤研難病・疾患資源研究部の生物資源バンクについて、ポータルサイトを構築することで連携を深め、H S 研究資源バンクから移管されたバンクを含めて、分譲希望者から見て統合的な利用環境に向けた情報データベースの構築を進める。また、複数の生物資源バンクを横断的に検索可能なシステムへの情報提供を行い、研究所内外のデータベースとの情報連携が可能なデータフォーマット等を検討する。

（倫理面への配慮）

ヒト由来試料（ヒト組織・不死化B細胞）の取扱いは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫

理指針」に基づいて実施した。分譲は分譲先機関での倫理審査承認を受けて行った。ヒト組織については、提供機関（医療機関）と分譲先機関において倫理審査承認を受けた。ヒト組織は手術等により摘出された、診断等に不要の余剰組織であり、提供者への十分な説明と同意のもと、連結不可能匿名化等の個人情報保護の手続きを厳正に行った。

C. 研究結果

1. ヒト由来試料を取り扱うための規程類（ヒト組織バンク運営細則、各種様式類）を体制変更に合わせて修正または新規作成し、提供元機関との契約変更（ヒト組織バンク）、倫理審査体制の整備、ホームページ（資料1）とパンフレット（資料2）による情報発信を行った。これにより、ヒト組織バンク約220試料、日本人由来B細胞株・DNAバンク約2,100試料を分譲可能な体制を整備した。本年度の分譲実績は、ヒト組織バンク：21件42試料、日本人由来B細胞株・DNAバンク：20件841試料となった。また、ヒト組織に関して259件、日本人由来B細胞株・DNA（遺伝子クローン事業を含む）に関して69件の各種相談を受け付け、分譲情報、技術情報を提供した。今後の資源化の検討については、以下のとおり実施した。（ヒト組織についての分担研究報告書も参照のこと。）

医療機関Aからの肝組織由来試料の受入れ、医療機関Bからの新鮮組織の受入れについて検討した。

関節リウマチ及び変形性関節症由来の滑膜組織（各2例）より計4試料の滑膜細胞を調製し、品質管理後、Web上で公開した。

滑膜細胞における炎症性反応等に関する遺伝子の発現状態を解析した。

滑膜細胞についてウイルス検査用の試料を随時調製した。

2. 基盤研難病・疾患資源研究部が保有する生物資源バンクのポータルサイトとして、「JCRB 生物資源バンク」のホームページ（Japanese Collection of Research Bioresources, <http://bioresource.nibio.go.jp>）を構築した（資料3）。HS研究資源バンクから移管されたバンクも含めて、利用者から見てどのような生物資源バンクがあるかを一度に把握できるようになった。情報データベース化を進める一環として、各生物資源バンクの分譲可能なヒト

由来試料等について、「医薬基盤研究所データベース横断検索システム」（<http://alldbs.nibio.go.jp>）に登録するための情報抽出・整備・提供を行い、生物資源以外の研究所のデータベースも合わせて、利用者が一括して検索可能とした。これらの情報は"Sagace"（<http://sagace.nibio.go.jp>）とも連携し、所外のデータとの連携も図っている。また、生物資源のデータを高度な検索システムに対応させて創薬・疾患研究への利用に供するため、各生物資源に関連する疾患名・生物種名・遺伝子名・変異情報等についての検索に適したフォーマット（RDF, Resource Description Framework）での取扱い、また、標準化タグ情報の付与（ICD10 疾患名等のマークアップ）に関して調査・検討を行った。

D. 考察

厚生労働省の研究機関である基盤研は、創薬・疾患研究に特化した、他に類を見ないヒト由来試料等の生物資源を保有している。これら細胞・組織等の生物資源の充実化により創薬・疾患研究の促進を図ることは、難病患者のQOL向上から国民全般の健康増進まで幅広く寄与するものである。しかし、ヒト由来試料の研究利用については、入手可能性、品質、付帯する臨床情報の欠如等、課題がある場合が多い。こうした状況の改善を図りつつヒト組織・不死化B細胞等の資源化を推進することが求められている。また、データベースを活用して様々なオミックス情報を連携させることで、生物資源の付加価値を高めることも重要である。本研究をふまえ、基盤研が保有する他に類を見ない研究資源について資源そのもの及び情報連携等の面からさらなる充実を図り、個別化医療実現のための研究基盤構築に寄与することを目指したい。

E. 結論

本年度にHS研究資源バンクから移管されたヒト組織バンクと日本人由来B細胞株・DNAバンクの運用体制の整備及び今後の資源化の検討を実施し、これらを含む基盤研の生物資源バンクのポータルサイトとなる、「JCRB生物資源バンク」ホームページを構築し、横断検索システムへの情報連携を図った。これらにより、基盤研が保有するヒト由来試料等の生物資源が創薬・疾患研究に資するための基盤を発展させた。

本分子生物学会年会、神戸国際展示場、2013年12月3-5日

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

【査読付 学術論文】

- 1) International Glossina Genome Initiative. (Sakate R) "Genome Sequence of the Tsetse Fly (*Glossina morsitans*): Vector of African Trypanosomiasis." *Science* 2014 Vol. 344 no. 6182 pp. 380-386
- 2) Fan Z, Zhao G, Li P, Du L, Yi Y, Batzer MA, Wang H, Sakate R, Osada N, Xing J, Zhang X, Yue B, Li J. "Whole genome sequencing of Tibetan macaque (*Macaca thibetana*) reveals its homozygous genetic background and genetic variation as compared with rhesus macaque and crab-eating macaque." *Mol Evol Biol.* 2014 Apr 2. [Epub ahead of print]

【誌上発表】

- 1) 佐藤元信 「培養細胞の管理～微生物のコンタミネーションを見つける、防ぐ、対処する」
実験医学 32(6): 921-928, 2014
2. 学会発表
 - 1) 坂手龍一 「基盤研データベース横断検索サイトの拡充について」平成25年度 厚生労働科学研究費補助金「創薬支援のためのバイオリソースデータベースのネットワーク整備と政策・倫理課題に関する研究」班会議、アルカディア市ヶ谷、2014年1月22日
 - 2) 高橋一郎、坂手龍一 「難病研究資源バンクの展開」講演 市民・研究者シンポジウム第4回「難病研究と創薬」、千里ライフサイエンスセンター、2013年12月15日
 - 3) 水口賢司、増井徹、坂手龍一、五十嵐芳暢、長尾知生子、森田瑞樹、陳怡安、深川明子、伊藤真和史 「医薬基盤研究所のデータベース統合と横断検索システム "Sagace"」(特別企画「使ってみようバイオデータベース - つながるデータ、広がる世界」) 第36回日

- 4) 坂手龍一、高橋一郎、古江-楠田美保、松田潤一郎、小原有弘、川原信夫、保富康弘、吉田東歩、増井徹 「厚生労働省：創薬・疾患研究用生物資源 - 薬用植物、医学実験用霊長類、ヒト組織、培養細胞、実験動物、幹細胞、難病資源 -」(特別企画「ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)」) 第36回日本分子生物学会年会、神戸国際展示場、2013年12月3-5日
 - 5) 増井徹、高橋一郎、坂手龍一 「難病バンクの現状と将来像」講演 第34回臨床薬理学会学術総会 ランチョンセミナー：稀少疾患の克服に向けて～研究基盤の重要性と課題～、東京国際フォーラム、2013年12月5日
 - 6) Kosaka T, Onishi-Kasamatsu A, Kohara A, Masui T "Human Tissue Bank at the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) : Availability of Surplus Surgical Tissues for Biomedical Research" ANRRC International Meeting、葉山、2013年11月1日
 - 7) 坂手龍一、深川明子、平田誠、山下智也、山田弘、高橋一郎、増井徹 「創薬・疾患研究をサポートする医薬基盤研究所のデータベース」 トーゴの日シンポジウム2013、時事通信ホール、2013年10月4-5日
 - 8) 倉田真由美、深川明子、坂手龍一、堤正好、増井徹 「個人情報 遺伝情報の取扱について 各指針の比較検討から」 トーゴの日シンポジウム2013、時事通信ホール、2013年10月4-5日
 - 9) 佐藤元信 「JCRB生物資源バンクの新展開」 Biotech 2013、東京ビッグサイト、2013年5月9日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

資料1 ホームページ：ヒト組織バンク（左）、日本人由来B細胞株・DNAバンク（右）

ヒト組織バンク

[ご利用の手引き](#)
[資源リスト](#)
[分譲関係様式](#)
[運営細則](#)
[ICRB生物資源バンク top](#)

医学・薬学等の分野における研究開発の最終到達目標は、ヒトについて何らかの知見を得ることであり、ヒトの細胞や組織を用いて研究を行うことが必要不可欠となります。

患者への十分な説明と同意のもとに摘出されたヒト組織を、匿名化などの個人情報保護に係る手続きを厳格に行った上で、当ヒト組織バンクに保管します。

ヒトの細胞や組織を用いて生命科学の研究に携わる研究者や医薬品などの研究開発を行う研究者などからの申請に応じ、分譲して行きます。これからの医療のためにご協力をお願いします。

日本人由来B細胞株・DNAバンク

[ご利用の手引き](#)
[分譲サンプルの性状](#)
[試料一覧](#)
[分譲依頼書・同意書](#)
[分譲手数料](#)
[ICRB生物資源バンク top](#)

日本人由来B細胞株・DNAバンクのご案内

約2,000名の日本人由来のB細胞を不活化した細胞株(*)と、同細胞株から抽出されたDNAを分譲しています。日本人の遺伝子多型解析などに有用な研究資源です。特に約1,400名の健常人（一般集団）に由来するB細胞株のDNAは、疾病を持つ集団との比較のために貴重なコントロールとして利用されています。

分譲可能な試料一覧

(*) 日本人由来B細胞株は、ファルマスニップコンソーシアムとバイオ産業情報化コンソーシアムからバンクに寄託されたものです。

精製DNAについては、50株分あるいは100株分のセット分譲も行っています。

EBV不活化

資源リスト

[ご利用の手引き](#)
[資源リスト](#)
[分譲関係様式](#)
[運営細則](#)
[ヒト組織バンク top](#)
[ICRB生物資源バンク top](#)

ヒト組織バンクで分譲可能な資源のリストです。分譲ご希望の際は、このリストに基づき手引きに従って申請してください。なお、本リストに記載されている試料でも、既に分譲が決定している場合がありますので予めお問い合わせください。

下記リンクより、リストを参照できます。

A 凍結試料

- 凍結組織（ブロック） 2010/11/3更新
[試料リスト](#)
- 口蓋扁桃由来リンパ球およびリンパ組織小片 2013/3/13更新
[試料リスト](#)
- 肝細胞 2011/10/07更新
[試料リスト](#)（現在譲渡可能な試料はありません。）
- 肝ミクロソームその他
[試料リスト](#)
- 脂肪前駆細胞（腸間膜・大網由来）
[試料リスト](#) 2012/09/14更新
- 滑膜細胞
[試料リスト](#) 2014/02/19更新

B 固定組織 2009/8/28更新
 • [試料リスト](#)

C 冷蔵（新鮮）組織 2012/01/07更新
 • [試料リスト](#)

試料一覧

[ご利用の手引き](#)
[分譲サンプルの性状](#)
[試料一覧](#)
[分譲依頼書・同意書](#)
[分譲手数料](#)
[ICRB生物資源バンク top](#)

日本人由来B細胞株・DNA

(2014年1月)

下記は現在の分譲可能な凍結細胞および精製DNA数です。変更がある場合はこのページでお知らせいたします。

PSC細胞株・DNA

日本人一般集団

年齢	男性	女性	total
20-29	108	135	243
30-39	207	136	343
40-49	132	50	182
50-59	109	37	146
60-69	31	13	44
70-79	4	5	9
不明	0	0	0
total	591	376	967

JBIC細胞株・DNA

健常人由来

年齢	男性	女性	total
20-29	49	73	122
30-39	79	44	123
40-49	68	42	110
50-59	35	27	62
60-69	7	9	16
70-79	0	2	2
不明	0	3	3
total	238	200	438

(独) 医薬基盤研究所 JCRB生物資源バンク
ヒト組織バンクにご協力ください

「組織」とはからだを
形づくっている「部分」のことです



これからの医療のために…

ヒト組織バンクは厚生労働省所管の
独立行政法人医薬基盤研究所によって運営されています

あなたのご協力が次の世代の医療に役立ちます

—生命科学や医療の進歩にとって優れた研究や開発が不可欠です—

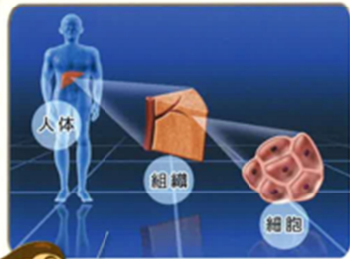
独立行政法人 医薬基盤研究所は、みなさまの受ける医療がもっとよいものになることを願っています。
その一助として人の組織が適切な手続きのもとに公正に利用できるように「ヒト組織バンク」を運営
しています。いま、あなたのご提供が医療を大きく変えようとしています。



生命科学や医療の進歩、優れた薬の開発などには人の組織を用いる研究が不可欠です。このよ
うな研究を進めるため、すでに数多くはヒト組織バンクがいくつか運営されています。わが国でも人
の組織が研究開発のために公正に利用できることを目的として、独立行政法人 医薬基盤研究所がヒト
組織バンクを運営しています。ヒト組織バンクは国内の医療機関から提供された人の組織を保管し、
大学や国立および企業の研究者に提供する役割を担っています。

-1-


提供をお願いする組織は？



手術で摘出された
組織は検査に用いら
れ、残った部分は医
療廃棄物として処分
されます。そのよう
に今まで活用されて
いなかった部分をご
提供いただければ、
多くの研究の為に
役立てることができ
ます。

ヒト組織バンクでは、この廃棄される組織
のご提供をみなさまにお願いしています。

ご提供いただく組織は明日の医療に役立ちます



人の体の働きを知るためには、
人の組織を調べることがとても重
要です。病気の原因は何か？薬が
効くかどうか？副作用が起こらな
いか？などを調べることで、これ
からの医療における病気の診断や
予防、治療に役立ちます。実際、
地道な研究が実を結び、抗がん剤
などが開発されています。

-2-

例えば新しい薬の開発の場で

3段跳から4段跳へ

新しい薬の
候補物質

試験管実験

動物実験

ヒト組織

人間(治験)

ヒト組織を使わない場合(3段跳)

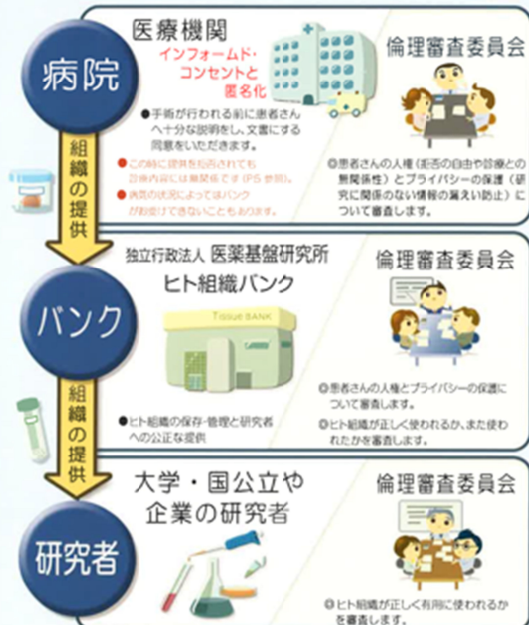
薬の効き方や安全性を確かめるための試験は今まで動物を使った実験
をずませてから人間に投与して臨床試験を行ってきました。そのため
人への有効性や予想外の副作用が十分に確かめられないうちに臨床試験が
行われることもあります。

ヒト組織を使う場合(4段跳)

ヒト組織を用いた試験を行うことにより、人への有効性や安全性の予測が
3段跳よりも確実になる上に、実験に使う動物の数を少なくすることが
できます。また、薬の効き方は、人種によってお薬に対する強さが違うようにそれ
ぞれ異なりますので、日本人に適した薬を作ったり、使う量を知るには、日本
人の協力がぜひとも必要なのです。

-3-

ご提供いただいた「ヒト組織」は適切に扱われます



※倫理審査委員会の役割によって定められたもので、人の組織や人体そのものを対象とする研究を行う用途に設置されています。研究計画の倫理的・科学的な妥当性を審査し、助言を与えたり、正しく研究が行われるようにする委員会です。委員は研究者だけでなく、一般市民の立場の人も含むことになっています。

-4-

提供と診療内容は無関係です

提供に同意するか、しないかによって診療内容が変わることはありません。



提供者の受ける利益は？



直接的な利益はありません。ご提供いただいたヒト組織は、医療の発展をめざした研究に活かされ、日本人はもとより人類全体の利益となることが期待されています。

-5-

プライバシーを厳重に守るよう工夫されています

個人のお名前は2段階で匿名化され、ご提供いただいた組織と個人情報とは結びつかなくなります。



-6-

厚生労働省

独立行政法人 医薬基盤研究所

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8
TEL 072-641-9811 FAX 072-641-9812
HP <http://www.nibio.go.jp/>

- 《独》医薬基盤研究所は、医薬品・医療機器の開発に資する基盤技術の研究し、研究開発を推進することを通じて、革新的医薬品などの創出に貢献し、国民保健の向上に資することを目的とし、平成17年4月に設立されました。
- 本研究所は創業支援を行う独立行政法人として、医薬品などの基盤的技術研究、難病、疾患資源研究、医薬品などの研究開発基盤の三事業を行い、民間企業、大学などにおける新たな医薬品・医療機器の開発を目的とした研究開発を支援しています。

JCRB生物資源バンク

HP <http://bioresource.nibio.go.jp/>

JCRB生物資源バンクは、国内外の研究機関から預かった貴重な研究資源を保存しています。約1,200種類の動物細胞株と約15,000種類の遺伝子を保存し、年間約9,000サンプルを国内外の研究者に提供し、世界有数の研究資源バンクです。ヒト組織を扱うヒト組織バンクは当バンクの一部門です。すでに約200種以上が集まり、外部の研究者に利用していただいております。

ヒト組織バンク
TEL/FAX 072-641-9016

●お問い合わせは上記ヒト組織バンクまで

2013年5月 作成

編集 医薬基盤研究所
独立行政法人
医薬基盤研究所
創薬・疾患資源研究部
難病資源研究部

絵野矢 伸
独立行政法人
医薬基盤研究所(センター)

作成 江ノデザイン



独立行政法人 医薬基盤研究所
JCRB 生物資源バンクホームページ
Japanese Collection of Research Bioresources



独立行政法人 医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部

培養資源研究室
難病資源研究室
疾患モデル小動物研究室

医薬品・医療機器の開発には、細胞、遺伝子、実験動物などの生物資源が欠かせません。独立行政法人医薬基盤研究所は、研究現場で必要とされる生物資源を開発するとともに、様々な生物資源を収集・保全し、研究現場へ安定的に供給するための研究を行っています。

ヒューマンサイエンス研究資源バンク業務移管のお知らせ

独立行政法人医薬基盤研究所は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 [ヒューマンサイエンス研究資源バンク](#) と連携して研究資源を皆様に供給して参りました。この度、平成25年4月1日より、研究資源の効率的な利用を促進するため、ヒューマンサイエンス研究資源バンクの業務全体(細胞、ヒト組織、日本人由来B細胞株・DNA、遺伝子クローン)を独立行政法人医薬基盤研究所へ移管することになりました(実験動物のバンク業務は平成24年度に移管済み)。利用者の皆様にご迷惑をおかけすることがないように努めてまいります。どうぞ今後ともバンク事業への変わらぬご愛顧をよろしくお願い申し上げます。

JCRB生物資源バンクでは、5つの生物資源バンクが3つの研究室によって運営されています。

細胞	ヒト組織	日本人由来B細胞株・DNA	遺伝子クローン	実験動物
<ul style="list-style-type: none"> ▶ 細胞検索 ▶ 細胞情報 ▶ 受託業務 ▶ 培養細胞寄託案内 ▶ 細胞バンクについて ▶ その他(お問い合わせ) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ ご利用の手引き ▶ 資源リスト ▶ 分譲関係様式 ▶ 運営細則 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ ご利用の手引き ▶ 分譲サンプルの性状 ▶ 試料一覧 ▶ 分譲依頼書・同意書 ▶ 分譲手数料 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ ご利用の手引き ▶ 遺伝子クローンリスト ▶ 分譲依頼書・同意書 ▶ 分譲手数料 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 資源リスト ▶ マウス分譲 ▶ 保護預かりサービス ▶ マウスの寄託 ▶ 価格表

▶▶ [培養資源研究室](#) — 細胞

私たちは、ヒト細胞(脳、肺、肝、腎、胃、血液など各種臓器由来)を主に収集し、各種検査を実施して、高品質な細胞を安定的に研究者へ提供しています。ヒト組織に由来する細胞は、貴重な研究資源として医薬品開発・再生医療研究など、広範囲で利用されています。さらに関連情報の積極的な発信、細胞セーフデポジットやマイコプラズマ汚染検査など研究者をサポートするサービスを提供しています。

▶▶ [難病資源研究室](#) — ヒト組織、日本人由来B細胞株・DNA、遺伝子クローン

私たちは平成25年4月よりヒューマンサイエンス研究資源バンクから移管されたヒト組織(凍結組織、固定組織、冷蔵(新鮮)組織など)を収集・分譲するとともに、約2,000名の日本人由来のB細胞株・ゲノムDNA、ヒトやチンパンジー、カニクイザルなどの遺伝子クローンを研究者に分譲します。また、私たちは難病資源の収集・分譲を行う [難病研究資源バンク](#) の運営も行っています。

▶▶ [疾患モデル小動物研究室](#) — 実験動物

私たちは有用なヒト疾患モデルマウス(先天代謝異常症、先天性腎疾患、心疾患など)を収集し、研究者へ提供しています。さらに関連情報の積極的な発信、マウス凍結胚・凍結精子による保護預かりサービスなど、実験動物を利用する研究者をサポートします。また、マウス飼育方法、繁殖方法などお困りの場合は、お気軽にご連絡ください。

メールなどでのお問い合わせの際に提供される個人情報、独立行政法人医薬基盤研究所個人情報管理規程に基づき厳正に管理されます。

独立行政法人 医薬基盤研究所
Copyright © 2005-2014 National Institute of Biomedical Innovation. All Rights Reserved.

資料4 独立行政法人医薬基盤研究所データベース横断検索 (http://alldbs.nibio.go.jp)



データベース横断検索

独立行政法人医薬基盤研究所で公開している12のデータベースを横断的に検索することができます。

下の検索ボックスにキーワードを入れて、検索ボタンを押してください。[使い方]

このサイトについて

このサイトでは、独立行政法人医薬基盤研究所が保有している下記のデータベースをまとめて検索することができます。

1. 細胞バンク
高品質なヒト等の細胞を安定的に提供
2. 遺伝子バンク
ヒトやカニクイザル等のcDNAと多型情報
3. 実験動物研究資源バンク
ヒト疾患モデルマウスの収集と提供
4. メディカル・バイオリソース・データベース
ヒト由来試料と疾患モデル動物の所在情報
5. 薬用植物データベース
薬用植物約100種の生薬・処方等の情報
6. GeMDBJ
ヒト5疾患のSNP Genome Scan情報
7. Open TG-GATEs
化合物暴露の毒性情報と発現プロファイル
8. TargetMine
創薬支援の統合データウェアハウス
9. 難病研究資源バンク
希少難病患者の生体試料の収集と分譲
10. 希少疾病用医薬品・希少疾病用医療機器
基盤研が開発をサポートする医薬品・医療機器の情報
11. ヒト組織バンク
ヒトの凍結組織、固定組織、冷蔵(新鮮)組織を分譲
12. 日本人由来B細胞株・DNAバンク
日本人由来のB細胞株と、同細胞株から抽出されたDNAを分譲

このサイトは厚生労働省科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業「創薬支援のためのバイオリソースデータベースのネットワーク整備と政策・倫理課題に関する研究」により運営されています。

新着情報

- 2014/3/19「ヒト組織バンク」と「日本人由来B細胞株・DNAバンク」を追加しました。
- 2012/12/25「難病研究資源バンク」と「希少疾病用医薬品・希少疾病用医療機器」を追加しました。
- 2011/4/15 医薬基盤研究所横断検索システムを公開しました。

リンク

- 医薬基盤研究所
- 総合科学技術会議HP

データベース統計情報(2014年5月2日現在)

データベース	データ統計
細胞バンク	1237(細胞数)
遺伝子バンク	179750(データ数)
実験動物研究資源バンク	122(系統数)
メディカル・バイオリソース・データベース	310(データ数)
薬用植物データベース	190(植物種数)
GeMDBJ	21209(データ数)
Open TG-GATEs	170(化合物データ数) 123(病理データ数)
TargetMine	15データベース
難病研究資源バンク	63(データ数)
希少疾病用医薬品・希少疾病用医療機器	351(データ数)
ヒト組織バンク	233(データ数)
日本人由来B細胞株・DNAバンク	5(データ数)

お問い合わせ

独立行政法人 医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部 政策・倫理研究室
✉ mbrdb@nibio.go.jp
〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8
TEL:072-641-9899 FAX:072-641-9829

細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究

分担研究者: 内尾こずえ (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

創薬・疾患研究にとって細胞は重要な研究ツールである。しかしながら、微生物汚染やクロスコンタミネーションした細胞の研究利用が大きな問題となっており、汚染や誤謬のない細胞の提供が資源事業の課題である。これまでに医薬基盤研究所・細胞バンクにおいて、ヒト細胞株のクロスコンタミネーション検査が既に行われていたが、マウス細胞株は検査が実施されていない状況であった。そこで本研究では、マウス由来細胞株のコレクションについて、マイクロサテライトマーカーを利用したクロスコンタミネーション検査を実施する。研究資源バンクから供給される細胞資源の高品質化に貢献し、創薬・疾患研究の発展の一助としたい。

研究目的

培養細胞は疾患研究に不可欠な研究ツールであり、研究の発展に大きく貢献してきた。しかしながら最近、細胞の汚染・誤謬が大きな問題となっている。医薬基盤研究所・細胞バンクにおいて、ヒト細胞株のクロスコンタミネーション検査法が確立されており、検査実施サンプル中の約10%がクロスコンタミネーションを起こしていることが報告されている。しかしながらマウス細胞株においては、これまで検査が実施されていなかった。疾患・創薬研究にはマウス細胞株も多く利用されていることから、品質管理は不可欠である。さらにマウスは疾患感受性に系統差があることが報告されていることから、系統の取り違えや誤謬

は研究の精度を著しく低下させるものである。そこで本研究において、マウス細胞株のクロスコンタミネーション検査を実施し、高品質な細胞提供に貢献したい。

研究方法

< マイクロサテライトマーカーの選択 >

ゲノム上には、1から複数塩基対の反復配列(マイクロサテライト)が広範囲に多数散在し、マウス系統によりその反復回数に多型が存在する。この反復配列の近傍にプライマーを設計し、PCRを行い、電気泳動パターンの多型として検出可能である。すでにマウス細胞のクロスコンタミネーション検査法として報告されている文献(Yoshino et al., IBC 2010; 2:14, 1-9)

を参照し、マウス系統の判別が可能な6箇所
のサテライトマーカー (D1Mit159, D2Mit395, D4Mit170, D5Mit357, D13Mit253, D17Mit51) を選択した。

< DNA抽出とPCR >

C57BL/6J, BALB/cB, DBA/2J, C3H/HeJ, FVB/N, 129SVJ マウスの約2ミリメートルの尾より QIAGEN EZ1 DNA extraction kit を用いて DNA を抽出した。またマウス細胞についても同様に QIAGEN All prepDNA/RNA kit を用いて DNA を抽出した。各マイクロサテライトマーカーのプライマーを用いて PCR を行った (Promega, GoTaq Master Mix)。センスプライマーには蛍光ラベルを施した (Backman, Dye2,3,4)。PCR 産物はキャピラリー電気泳動 (Beckman CEQ8800) にて解析した。解析結果は図1のようになる。

結果および考察

まず主要なマウス系統を判別できるマーカーを6箇所選択し、クロスコンタミネーション検査法を確立した (表1)。本年度は細胞バンクのコレクションから、多様なマウス系統 (C57BL/6, BALB, C3H, 129, ICR, swiss albino) 由来細胞株の検査を実施した。その結果、BALB/c マウスから樹立された BALB 3T3 (JCRB9005) を改変した細胞5株 (JCRB0601, 1356, 0149, 1355, 1357) が swiss albino マウス由来の細胞と判定され、クロスコンタミネーションを起こしていることが分かった。これら5種類の細胞はすべて同じ研究者より寄託された株である。解析

結果より、これら5種類の細胞は swiss albino マウスから樹立された 3T3 L1 株 (JCRB9014) と培養過程でクロスコンタミネーションを起こしたと考察された。また JCRB1215 は寄託者から C3H マウス由来細胞株と情報提供を受けたが、C57BL/6 マウス由来細胞株であることが判明した。さらに JCRB1198, 1199 についても樹立者から C57BL/6 マウス由来と情報提供があったが、解析の結果、C57BL/6 と CBA マウス由来のゲノムが混在していることが分かった。この細胞株はノックアウトマウスの組織由来であり、マウスのコンジェニック化が不完全である可能性が高かったため、寄託者に細胞を樹立した経緯を確認した。その結果、ノックアウトマウス作製には ES 細胞 TT2 株 (C57BL/6 x CBA) を使用しており、マウス樹立から2世代目で細胞株を樹立したことが分かった。そのため、C57BL/6 と CBA マウス両方のゲノムが検出されたと考察された。JCRB1198, 1199 については、クロスコンタミネーションではなく、マウスのコンジェニック化が不完全であると判断でき、今後由来マウス系統情報の表記を修正する。

これまでにヒト細胞株においてもクロスコンタミネーションが多数報告されているが、マウス細胞においても同様の現象が確認された。引き続き医薬基盤研究所 細胞バンクのマウス細胞コレクションのクロスコンタミネーションの有無を検査し、誤謬のない高品質細胞を提供できるよう尽力したい。

研究発表

<論文発表>

1. Uchio-Yamada K., Sawada K., Tamura K., Katayama S., Monobe Y., Yamamoto Y., Ogura A., Manabe N. Tenc1 Deficient Mice Develop Glomerular Disease in a Strain-Specific Manner. *Nephron Experimental Nephrology*. 2013; 123: 22-33
2. Tamura K., Uchio-Yamada K., Manabe N. Noto T., Hirota R., Unami A., Matsumoto M., Miyamae Y. Gene Expression Analysis Detected Low Expression Level of C1s Gene in ICR-derived Glomerulonephritis (ICGN) Mice. *Nephron Experimental Nephrology*. 2013; 123: 34-45
3. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K., Matsuda J. Zygosity Determination in Hairless Mice by PCR Based on Hr(hr) Gene Analysis. *Exp Anim*. 2013; 62(3): 267-273.

<学会発表>

1. 河原崎 正貴、矢口 文、千葉 洋祐、鎌田 彰、小泉 大輔、島田 昌彦、内尾 こずえ、根本 直「食餌誘導性肥満マウスにおける畜肉食あるいは魚食が代謝に及ぼす影響」第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 24-26 日、名古屋(口頭)
2. 河原崎 正貴、矢口 文、千葉 洋祐、鎌田 彰、小泉 大輔、島田 昌彦、内尾 こずえ、根本 直「食餌誘導性肥満マウス

- における畜肉食あるいは魚食が代謝に及ぼす影響」第 8 回メタボポロームシンポジウム、2013 年 10 月 3-4 日、福岡(口頭)
3. 里 直行、森-植田 茉莉、田中稔久、武田朱公、向園昌弘、澤口翔伍、内尾-山田 こずえ、篠原 充、村山繁雄、武田雅俊、樂木宏実、森下竜一「糖尿病はアルツハイマー病における恒常性維持機構を破綻させる」第 32 回日本認知症学会学術集会、2013 年 11 月 9 日、松本(口頭)
 4. 鈴木治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎「PTEN 抑制剤投与によるマウス卵巣の組織的变化」第 106 回日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 12 日-14 日、東京(ポスター)
 5. 鈴木治、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎「マウス清掃状態精子の受精能に及ぼす resveratrol の効果」第 60 回実験動物学会、2013 年 5 月 15 日-17 日、つくば(ポスター)
 6. 里 直行、森-植田 茉莉、田中稔久、澤口翔伍、向園昌弘、武田朱公、篠原 充、村山繁雄、内尾-山田 こずえ、上田裕紀、武田雅俊、樂木宏実、森下竜一「Abeta is prerequisite. But insufficient to cause tau phosphorylation in vivo: Tau phosphorylation in APP mice by diabetes.」第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3-7 日、神戸(ポスター)
 7. Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K., Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R.□ Possible involvements of

Abeta, insulin signaling and tau phosphorylation in the pathological interaction between Alzheimer disease and diabetes. □ AAIC 2013 The Alzheimer's Association International Conference 2013,

Boston, July 14, 2013 (ポスター)

知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. マウス系統のマイクロサテライトマーカー

Marker	D1Mit159	D2Mit395	D4Mit170	D5Mit357	D13Mit253	D17Mit51
C57BL/6	190	126	103	124	77	157
BALB	134	133	119	114	109	154
DBA	134	133	119	144	98	154
129	180	154	103	124	105	163
C3H	174	120	113	144	101	140
FVB	180	160	113	140	101	141

図 1 キャピラリー電気泳動像

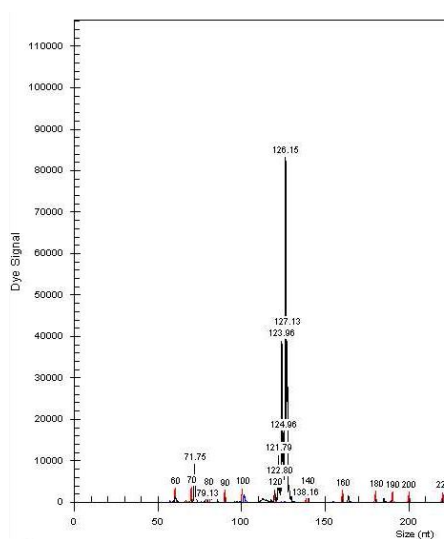


表2 マウス細胞株の検査結果

	細胞名	寄託者からの	
		マウス系統情報	判定結果
JCRB1204	KUM7	C3H/He	C3H/He
JCRB9014	3T3 L1	swiss albino	swiss albino
JCRB0017	P388	DBA/2	DBA/2
JCRB1348	3LL	C57BL/6	C57BL/6
JCRB0202	B16 melanoma	C57BL/6	C57BL/6
JCRB0706	tsFT101	C3H	C3H
JCRB1322	m5S	ICR/Jcl	ICR/Jcl
JCRB9003	NCTC Clone 929	C3H/An	C3H/An
JCRB0720	OTT6050	129/Sv	129/Sv
JCRB9005	BALB/3T3 A31	BALB/c	BALB/c
JCRB1202	KUM6	C3H/He	C3H/He
JCRB1349	Ex-3LL	C57BL/6	C57BL/6
JCRB1447	4T1-Luc	BALB/cfC3H	BALB/c
JCRB1474	B16-F0-Luc	C57BL/6	C57BL/6
JCRB9005	BALB/3T3 A31	BALB/c	BALB/c
JCRB0601	BALB/3T3 A31-1-1	BALB/c	swiss albino
JCRB1356	A31-1-1	BALB/c	swiss albino
JCRB0149	Bhas42	BALB/c	swiss albino
JCRB1355	1-1ras1000	BALB/c	swiss albino
JCRB1357	1-1src	BALB/c	swiss albino
JCRB1215	HS-22	C3H/He	C57BL/6
JCRB1199	R201C	C57BL/6	C57BL/6 and CBA
JCRB1198	GP8	C57BL/6	C57BL/6 and CBA

研究成果の刊行に関する一覧表

【書籍】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小原有弘	細胞培養中のマイコプラズマ・ウイルス対策	天願ルイス	再生医療における臨床研究と製品開発	技術情報協会	東京	2013	138-142
小原有弘	細胞培養	佐藤 章弘	実験者/試験検査員の誤ったデータの取り扱い・試験誤操作防止策	技術情報協会	東京	2014	580-586
小原有弘	動物培養細胞			技術情報協会	東京	2014 印刷中	
小原有弘	細胞誤認：その現状と研究者にもとめられる対策		「実験医学」	羊土社	東京	2014 印刷中	
北條浩彦、清水則夫 (分担執筆)	基本編 - 原理と基本知識 - リアルタイムPCRを使った解析の基本10プライマー/プローブの設計手順 マルチプレックスの場合	北條浩彦	原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド 最強のステップUPシリーズ	羊土社	東京	2013	72-74
清水則夫、渡邊健、外丸靖浩 (分担執筆)	実践編 - プロトコールを中心に - 章 遺伝子量解析15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査	北條浩彦	原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド 最強のステップUPシリーズ	羊土社	東京	2013	192-202

【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
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.	132 (11)	2510-2519	2013
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, Alston-Roberts C, Kerrigan L, Reid YA, Barrett T, Burnett EC, Cooper JR, Freshney RI, Healy L, Kohara A, Korch C, Masters JR, Nakamura Y, Nims RW, Storts DR, Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG.	Beware imposters: MA-1, a novel MALT lymphoma cell line, is misidentified and corresponds to Pfeiffer, a diffuse large B-cell lymphoma cell line	Genes Chromosomes Cancer	52 (10)	986-988	2013
家村将士、小堀眞季、小澤みどり、平山知子、川口英子、大谷梓、樺山明日香、塩田節子、小原有弘	DNA多型解析によって明らかとなったヒト培養細胞のクロスコンタミネーションの現状	DNA多型学会誌			2013 印刷中

Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, <u>Takeda J</u> , Inokawa H, Horie K, Yagita K.	An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2 as an endogenous clock regulator.	PLoS One	8 (6)	e67241. doi: 10.1371/journal.pone.0067241	2013
Yamanishi A., Yusa K., Horie K., Tokunaga M., Kusano K., Kokubu C. and <u>Takeda J</u>	Enhancement of microhomology-mediated genomic rearrangements by transient loss of mouse Bloom syndrome helicase.	Genome Research	23 (9)	1462-1473	2013
Morimura S, Sugaya M, Kai H, Miyagaki T, Asano Y, Tada Y, Kadono T, <u>Murakami T</u> , Sato S.	Depsipeptide and roxithromycin inhibit proliferation of lymphoma cells by blocking ERK activation.	J Dermatol.	41	57-62	2014
Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, <u>Murakami T</u> , Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E.	Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold.	Ann Surg.	257	542-547	2013
Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, <u>Shimizu N</u> , Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.	Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection.	Journal of the Neurological Sciences	324	190-194	2013
Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, <u>Shimizu N</u> , Huang G, Yu Q, Chng WJ.	EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyl transferase activity.	blood	121	4512-4520	2013
Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, <u>Shimizu N</u> .	Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome.	Respiration		Epub ahead of print	2013
Ito K, <u>Shimizu N</u> , Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T.	Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction.	Internal Medicine	52 (2)	201-211	2013
Iso, T., Suzuki, J., Sasaoka, F., Sashida, H., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K. and <u>Harasawa, R.</u>	Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (<i>Ursus thibetanus japonicus</i>)	Vet. Microbiol.	163	184-189	2013
Giagaspero, M., Orusa, R., Savini, G., Di Genaro, A., Osawa, T. and <u>Harasawa, R.</u>	Serological survey to determine the occurrence of <i>Blue tongue virus</i> , <i>Bovine leukemia virus</i> and <i>Herpesvirus</i> infections in the Japanese small ruminant population from northern districts	Clin. Microbiol.	2	104-109	2013

Giangaspero, M., Apicella, C. and Harasawa, R.	Numerical taxonomy of the genus Pestivirus: New software for genotyping based on the palindromic nucleotide substitutions method	J. Virol. Methods	192	59-67	2013
Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., Hirata, T. and Harasawa, R.	Two genotypes among ' <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> ' strains based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences	J. Vet. Med. Sci.	75	361-364	2013
Fujihara, M., Wakita, J., Kondoh, D., Matsushita, M. and Harasawa, R.	Effects of urea on length distribution and morphology of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> cells	Afr. J. Microbiol. Res.	7	1780-1786	2013
Sashida, H., Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Nagai, K., Fujita, H., Kadosaka, T., Ando, S. and Harasawa, R.	Two clusters among <i>Mycoplasma haemomuris</i> strains, defined by the 16S-23S rRNA intergenic transcribed sequences	J. Vet. Med. Sci.	75	643-648	2013
Giangaspero, M., Bonfini, B., Orura, R., Savini, G., Osawa, T. and Harasawa, R.	Epidemiological survey for <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Chlamydia psittaci</i> var. <i>ovis</i> , <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Brucella</i> spp., Leptospirosis, and Orf virus among sheep from northern districts of Japan	J. Vet. Med. Sci.	75	679-684	2013
Sashida, H., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Nagai, K., Kobayashi, S., Furuhashi, K. and Harasawa, R.	Detection of hemotropic mycoplasmas in free-living brown sewer rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	J. Vet. Med. Sci.	75	979-983	2013
Fujihara, M., Kondoh, M. and Harasawa, R.	The bacterial cell division protein FtsZ forms rings in swarmer cells of <i>Proteus mirabilis</i> .	Ann. Microbiol.	63	399-401	2013
Giangaspero, M., Apicella, C. and Harasawa, R.	Palindromic nucleotide substitutions: A new software for pestivirus genotyping	Int. Res. J. Biochem. Bioinf.	3	52-63	2013
Giangaspero, M., Apicella, C. and Harasawa, R.	Palindromic nucleotide substitutions software version 2.0. Genotyping based on the secondary structure alignment in the 5' untranslated region of <i>Pestivirus</i> RNA	J. Bioinf. Intell. Control	2	40-64	2013
Giangaspero, M., Savini, G., Orusa, R., Osawa, T., Harasawa, R.	Prevalence of antibodies against <i>Parainfluenza virus</i> type 3, <i>Respiratory syncytial virus</i> and bovine <i>Herpesvirus</i> type 1 in sheep from northern prefectures of Japan	Vet. Ital.	49	285-289	2013
Mitsui, T., Fujihara, M. and Harasawa, R.	Salivary nitrate and nitrite may have antimicrobial effects on <i>Desulfovibrio</i> species	Biosci. Biotechnol. Biochem.	77	2489-2491	2013
Junichi Watanabe, Ryuichi Sakate and a lot of others	International Glossina Genome Initiative. Genome Sequence of the Tsetse Fly (<i>Glossina morsitans</i>): Vector of African Trypanosomiasis.	Science	Vol. 344 no. 6182	380-386	2014

Zhenxin Fan, Guang Zhao, Peng Li, Naoki Osada, Jinchuan Xing, Yong Yi, Lianming Du, Pedro Silva, Hongxing Wang, <u>Ryuichi Sakate</u> , Xiuyue Zhang, Huailiang Xu, Bisong Yue, and Jing Li	Whole genome sequencing of Tibetan macaque (<i>Macaca thibetana</i>) reveals its homozygous genetic background and genetic variation as compared with rhesus macaque and crab-eating macaque.	<i>Mol Evol Biol.</i>	Epub ahead of print		2014
<u>Uchio-Yamada K.</u> , Sawada K., Tamura K., Katayama S., Monobe Y., Yamamoto Y., Ogura A., Manabe N.	Tenc1 Deficient Mice Develop Glomerular Disease in a Strain-Specific Manner.	Nephron Exp Nephrol	123	22-33	2013
Tamura K., <u>Uchio-Yamada K.</u> , Manabe N. Noto T., Hirota R., Unami A., Matsumoto M., Miyamae Y.	Gene Expression Analysis Detected Low Expression Level of C1s Gene in ICR-derived Glomerulonephritis (ICGN) Mice.	Nephron Exp Nephrol	123	34-45	2013
Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, <u>Uchio-Yamada K</u> , Matsuda J.	Zygoty Determination in Hairless Mice by PCR Based on Hr(hr) Gene Analysis.	Exp Anim.	62 (3)	267-273	2013