

## 培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査

### 謝 辞

今回のマイコプラズマ検査にあたっては、多くの大学、研究機関、企業の研究所の先生方にご協力を頂き感謝いたします。また三光純薬株式会社には試薬の提供において多大なご協力を頂き感謝

致します。今後も、国内の培養細胞におけるマイコプラズマ汚染状況を把握する調査を継続してその改善に取り組む所存ですのでご協力をお願いいたします。

(Accepted 30 September 2007)

### Report of Mycoplasma contamination in Japan

Arihiro Kohara, Azusa Ohtani, Yutaka Ozawa, Setsuko Shioda, Tohru Masui, Hiroshi Mizusawa

National Institute of Biomedical Innovation Division of Bioresources, JCRB Cell Bank 7-6-8 Saitoasagi, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan

#### Abstract

Mycoplasmas are smallest self proliferating microorganism of about 1/10 of a bacterium. While they are existing with cell cultures, it is difficult to realize because medium does not become turbid. But we should not ignore the mycoplasma contaminations because they induce many bad effects for our researches using cell cultures. For example they induce cell death, abnormal induction of cytokines, or chromosome aberrations. Thus, the Japan Tissue Culture Association recently started a nationwide investigation for the mycoplasma contaminations with cooperatively with the JCRB cell bank by using the inspection kit called "MycoAlert<sup>®</sup>". We have analyzed about 1500 samples already, and average rate of the contamination was 22.4%. We would like to identify contaminating mycoplasma species, and to specify the infection route in future. We also would like to introduce decontamination methods.

#### Key words:

Mycoplasma, Mycoplasma contamination, MycoAlert<sup>®</sup>

## -190°C 気相式液体窒素細胞保存システム

水澤 博、増井 徹、竹内 昌男、小原 有弘

独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8

**要約** 培養細胞は液体窒素下で凍結保存するのが一般的であるが、最近-190°Cで保存できるという気相式の液体窒素保存容器が注目されつつある。細胞バンクでは各部の材質を熱伝導率の高いアルミニウムに変更して低温を実現した容器を最近導入した。良好な性能が得られた反面、細胞の出し入れの際には注意すべき点もあると思われるので、技術情報として紹介する。

**キーワード：** 培養細胞の液体窒素保存、気相式液体窒素保存容器、マイコプラズマ汚染防止

### 培養細胞の凍結保存

培養細胞の長期保存は、凍結保護剤（DMSO やグリセリン）を加えた培地 1 ml に $10^6$ 個から $10^7$ 程の濃度で細胞を浮遊させて、1.5 ml または 2 ml のスクリーキャップ付きのセラムチューブに入れて緩慢凍結してから液体窒素容器で凍結保存するのが一般的で、-150度以下とすれば10年以上保存することが可能であるとされている<sup>1,2)</sup>。通常の実験室では大型の容器が高価なこともあって、30リットル程度の小型液体窒素容器を利用することが多いが、小型の容器は液相式が多くセラムチューブは液体窒素に漬込まれてしまう。ここで問題になるのは、セラムチューブは蓋がネジ式になっているために、液体窒素による超低温下では容器が収縮すると同時に内部が陰圧になりネジと本体との間にできる僅かな隙間から液体窒素が浸

入し、液体窒素にまじっているマイコプラズマなどの汚染が広がる原因となっているのではないかと考えられている点である。現在、JCRB 細胞バンクでは国内の大学や研究機関の協力を得て、各研究室におけるマイコプラズマ汚染の状況を調査しているが、未だにかなり高い汚染率になっていることを確認しており、原因の一つはこのような細胞の保存方法にあるのではないかと危惧しているところである。

こうした問題を避けるために、細胞バンクでは液体窒素が浸入する心配の無いガラスアンプルの使用を原則にしているが、一般の実験室でガラスアンプルを使用するのは実用的ではなく、気相式の液体窒素保存容器を利用することが推奨される。この方式では、タンクの底部や周囲のみに液体窒素を置いてその冷気で庫内を冷却して液体窒素が直接セラムチューブに接触しないよう工夫したものである。ところが、この方式は間接的な冷却のため温度が液相式の-195.8度よりかなり高くなってしまふ点が気になる点であった。

近年再生医療研究が進展して培養細胞の医療利用も現実的な課題になりつつあり、いよいよマイ

---

#### 連絡者：水澤 博

独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8

TEL：072-641-9819、FAX：072-641-9851

E-mail: mizusawa@nibio.go.jp

コプラズマ汚染の防止を真剣に考えなければならぬ状況になりつつある。また、細胞の保存温度も十分に下げ、長期安定保存したいという希望も増えつつあるため、 $-190^{\circ}\text{C}$ まで保存温度を下げられるという気相式の液体窒素容器に注目が集まっている。

現在のところ、気相式で $-190^{\circ}\text{C}$ まで温度を下げられる方法には2種類ある。一つは容器全体を液体窒素ジャケット層で包んでしまうという方法で、タンクの真空層の内側に液体窒素層を新たに装備している。米国カスタムバイオジェニックシステムズ社のアイソサーマル(図1-1)がこれに相当する(液体窒素ジャケット型)。

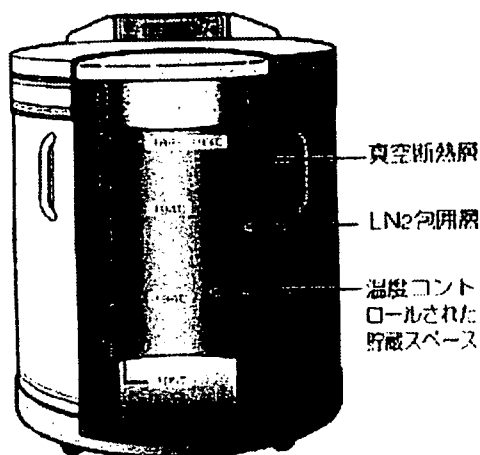
もう一つの方式は、タンクの内装に使う金属を従来のステンレスから熱伝導率の高いアルミニウムなどに変更する方法である。この方式を取っ

ているのは大陽日酸(株)のG430Sやチャート社(MVE)のエターンシリーズ(図1-2)などである(材質改良型)。

JCRB細胞バンクでは最近、大陽日酸製のG430Sを導入したので、その性能と使用上の注意点について報告する。当該容器は内部金属材料の材質を変更したもので従来のDR430LM型気相式容器と比べて外観的な変化は無い(図2-1、タンクそのものはステンレス製)。また、中に置かれるアンプル収納用のラックはアルミ製(図2-2)となり、旧機種で使用されていたステンレス製のラック(図2-3)とは異なった印象になり、ラックに入れる細胞を納めるトレイはプラスチック製となった(図2-2)。

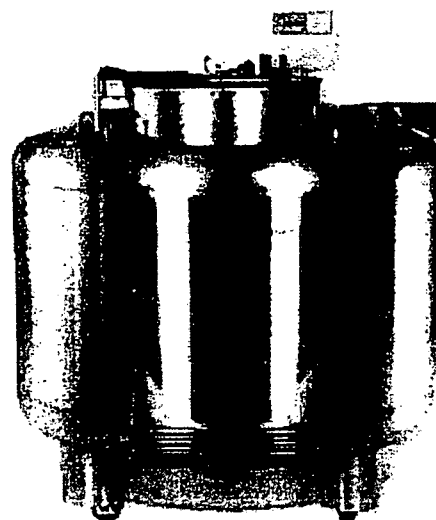
この容器を使うに先立って、我々は、ラックを出し入れする際のラック温度の変化やアンプル内

## 1 液体窒素ジャケット型



カスタムバイオジェニック社  
アイソサーマル

## 2 材質改良型



チャート社(MVE)  
エターン

図1  $-190^{\circ}\text{C}$ で保存できる気相式液体窒素細胞保存容器  
 $-190^{\circ}\text{C}$ に保てる気相式細胞保存容器。1はカスタムバイオジェニック社のアイソサーマルで液体窒素のジャケット層によって庫内温度を下げている。2はチャート社(MVE)のエターンシリーズで材質の改良により $-190^{\circ}\text{C}$ を実現した。

## 気相式液体窒素保存システム

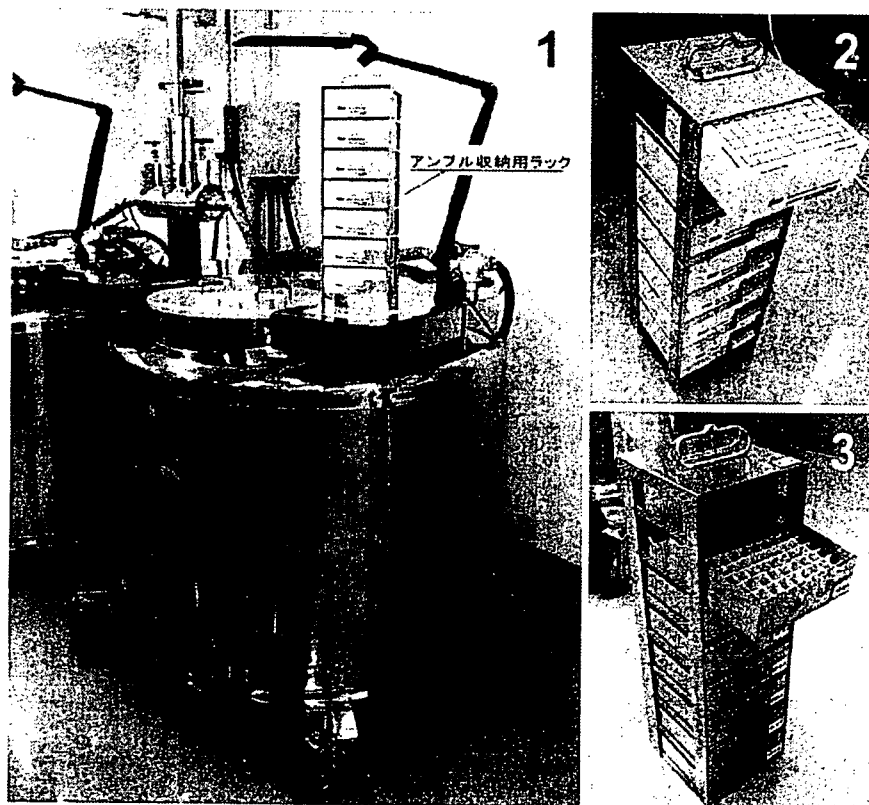


図 2 G430S 型液体窒素細胞保存容器とラック

G430S 型保存容器 (1) とラック (2、3)。容器の外観は従来の気相式液体窒素保存容器 (DR430LM) と変わりが無い。2、アンブル収納ラックもアルミ製となり、細胞を保存するトレイはプラスチック製となった。トレイの落下防止装置は従来と異なり、トレイごとに付けられている。3、比較のために使用した DR430LM 型液体窒素保存容器用のトレイとラックはステンレス製。

部の温度変化などを含めて、庫内の温度を実測した。

### 温度測定

温度の測定には K タイプの熱電対を使用し、図 3 のようにラックの上段、中絶、下段の三箇所に加え、上段に入れたアンブル収納箱中のアンブル内の培地温度を測定した。アンブルには 10% DMSO を含む培地を入れ、そこにセンサーを挿入して温度を測定した。準備が完了したら測定開始前の 1 時間は容器の蓋を閉じたまま静置して容器内の温度を安定させてから測定を開始した (図 4 の時間ゼロ)。比較のために従来型の気相式も同様

に測定した。

熱電対からのリード線はキーエンス社製のマルチチャンネル温度記録計、NR1000 (図 3) に接続して 30 秒ごとに記録した。データは NR1000 の CF メモリーに記録し、測定終了後エクセルに取り込んでグラフにした (図 4、時間軸の目盛は 30 秒ごと)。

測定結果は図 4 および表 1 に示した。測定開始直後 (図 4、0 分) のラック上段 (■) の温度は材質改良型 (G430S) が  $-186^{\circ}\text{C}$  で従来型 (DR430LM) が  $-167^{\circ}\text{C}$  (図 4) と新しい型のほうが  $20^{\circ}\text{C}$  も低くなっており、十分な性能があることを確認した。また、ラック上段と下段の温度差は従来型では  $26.7^{\circ}\text{C}$  もあったのに対し、新しい材質改良型では

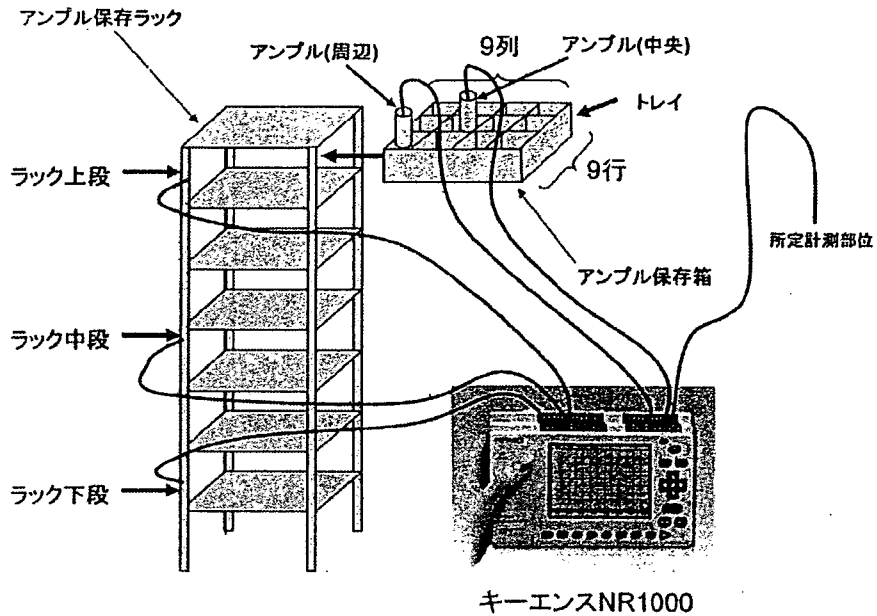


図3 温度測定部位

液体窒素容器内部の温度測定箇所。ラックの上段、中段、下段、および上段に入れたトレイの中央部と周辺部の2箇所にアンプルを入れ、そこに温度測定用センサー（熱電対）を取り付けた。熱電対からのリード線はキーエンス NR1000 マルチチャンネル磁気記録温度計に接続して温度を記録した。所定部位とは、液体窒素保存容器に組み込まれた記録用温度計が設置されている場所を示しており、中央の軸内部でラックの上から3段目に相当する高さに設置されている。

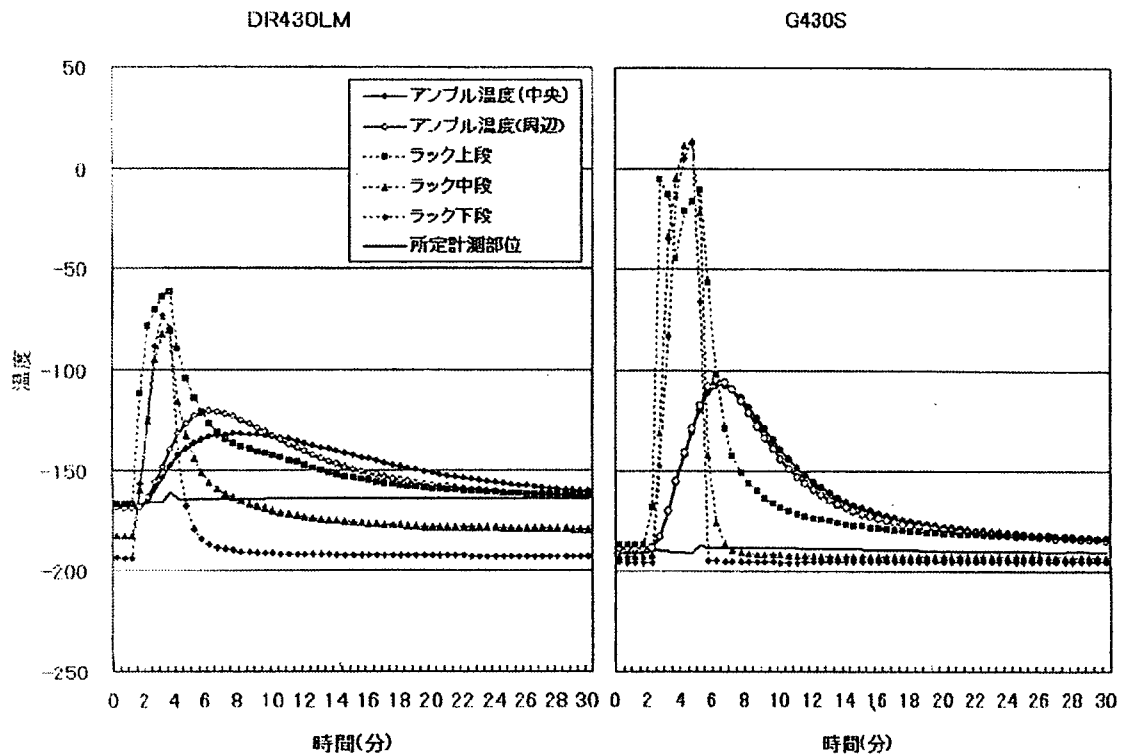


図4 測定結果

図3に示した測定部位に設置したセンサーで測定した各部位の温度の変化。センサー設置後蓋を閉めて1時間放置した後測定を開始した。-測定開始時間を0分とした。DR430LM型(左)とG430S型(右)を測定した。

## 気相式液体窒素保存システム

表1 安定期の庫内ラック温度比較

	(単位°C)		
	DR430LM	G430S	差
ラック上段	-166.9	-186.8	19.9
ラック中段	-182.5	-192.5	10.0
ラック下段	-193.6	-195.5	1.9
所定計測部位	-167.9	-191.0	23.1
上下差	26.7	8.7	

8.7°Cしかなく(表1)、熱伝導率が高いアルミ材料を使った効果が十分に現れていると考えられた。タンク内の温度を監視する自記温度センサーはターンテーブルの回転軸内に設置されているが、高めに表示されるので上から3段めのトレイの位置に合わせて設置しているとのことである(図4、実線)。

### ラックの取出し時における アンプル温度の上昇

以上のように容器内部の温度が十分に低いことを確認した後、細胞を出し入れする際の温度の変化について調べた。液体窒素保存容器からラックを取出す際の温度変化は図4のとおりである。ラックを取出し、上部の架台に2分30秒静置し、その後再びタンクに戻した。

ここでも材質改良型と従来型の差がはっきり現れた。材質改良型に使用されたアルミ製ラックの温度は容器から取出して僅か2分で0°Cを超えるまで上昇した。同じ時間で従来型に使用されているステンレス製のラックは-60°Cへ上昇しただけだった。アルミニウムは熱伝導率が高いことから予想されたことではあるが、温度変化の影響を敏感に受けることが確認された。

ラックを容器外に2分30秒放置した後再び容器内に戻したが、ラック温度が十分に低下するまでの1-2分間はアンプル内の温度も上昇し続け、最終的には-100度付近まで達した(図4、右)。

しかし、この時の温度の低下速度も材質改良型のほうが従来型のステンレス製ラックよりも速やかであった(図4-右)。

以上整理すると、内装を従来型のステンレス製からアルミ製に変えた材質改良型の気相式液体窒素細胞保存容器(430リットル)は、ラックを挿入して蓋をしてから30分以内で-190°Cに達し、従来型の-160度保存の気相式容器に比べて良好な性能が得られた。今後の再生医療などを考慮した細胞の保存管理に適しているものと考えられる。

しかし、ラックの材質もアルミ製のため、庫内に出し入れする際の温度変化が激しくなるので、作業を手早く行うよう注意する必要があるものと思われた。今回は条件を厳しくするために、敢えて2分30秒間もラックを容器外に放置したが、私達が実際に細胞を取出す場合にはこれほど長い時間ラックを外に出していることは無く、概ね30秒程度である。この程度の時間では-150度ぐらいまでしかアンプル温度は上昇しない(図4)ので大きな問題になることは無いと思われる。それでも気になるなら、材質改良型の容器にラックのみ従来型のステンレス製を使うという方法もある。その場合は庫内の安定温度はラック上部で-187°Cになるとのことである。

## 謝 辞

タンク温度測定にあたっては大陽日酸の吉村滋弘氏のご協力を頂き、感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 松村外志張 細胞の凍結保存法(pp 358-373) 培養細胞遺伝学実験法、黒田行昭編、共立出版、1981.
- 2) 動物培養細胞および癌細胞の凍結保存(pp 57-96)、凍結保存、酒井昭編、朝倉書店、1987.

(Accepted 30 August 2007)

## Liquid nitrogen cell storage system by air phase at $-190^{\circ}\text{C}$

Hiroshi Mizusawa<sup>1)</sup>, Tohru Masui, Masao Takeuchi, Arihiro Kohara

<sup>1)</sup> National Institute of Biomedical Innovation Division of Bioresources, JCRB Cell Bank 7-6-8 Saitoasagi, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan

**Abstract** We usually store the cultured cells in the liquid nitrogen system. A vapor phase system with  $-190^{\circ}\text{C}$  large container is good to prevent mycoplasma contaminations and for the long period safe storage. We obtained such a large container cell storage system with  $-190^{\circ}\text{C}$  recently, whose inner materials were changed to aluminum. Although the system works nicely but we realized that it should be handled quickly when getting out ampoules because of the quick temperature change.

**Key words:** cell storage in liquid nitrogen, vapor-phase liquid nitrogen tank, prevention from mycoplasma contamination

# 培養細胞で頻発する クロスコンタミネーションへの警戒

水澤 博, 小澤 裕, 小原有弘, 増井 徹, 佐藤元信, 岩瀬 秀, 深海 薫, 西條 薫, 中村幸夫

**ヒ**ト培養細胞にクロスコンタミネーションが多発していることが現在世界的に問題になっている。欧米では厳しく警戒をよびかけているが日本はどうであろうか。わが国のクロスコンタミネーションの現状についてJCRB細胞バンクと理研(理化学研究所)細胞バンクが調査を実施したのでその結果を紹介する。ぜひ事の重大さを認識して防止への対策を緊急に検討していただきたいと思う。

## はじめに

ヒトの体から取り出した細胞を体外で培養する *in vitro* 細胞培養技術はヒトを対象とする医学研究に多大な貢献を果たし、今や不可欠な実験技術となった。ところが、遺伝子研究の結果可能となったDNAフィンガープリント法により、かつて大問題となったHeLaコンタミネーション(コンタミ)以外にも多くのクロスコンタミネーション(検査試料や実験対象となるサンプル間の相互混入によるコンタミ)を起こした細胞(misidentified cells)が出回っていることが明らかになってきた。研究者にとっては公にしたくない話題ではあるが、こうした細胞から得られた結果が一人歩きしてしまった場合を考えると、早急に改善すべき問題である。また、改善の経過が明らかになるよう透明性を確保して対処するほうが好ましい結果をもたらすものと思われる。わが国では1985年以降、公的な細胞

バンクが整備されてきており、培養細胞に関する第三者評価を実施する基盤が確立しているため、それを有効に活用することを勧める。JCRB細胞バンクや理研細胞バンクでは1999年以降、それぞれが収集したヒト培養細胞を対象に遺伝子レベルでのクロスコンタミネーション調査を進めてきた。その結果、バンクに寄託されたヒト培養細胞の一割弱にクロスコンタミネーションがあったことを確認し、その多くを分譲停止するとともに、停止できない細胞については事実を明記したうえで分譲するよう記載を改めた。これについて欧米では強い危機感がもたれ、細胞バンクや学会などを通じて啓蒙キャンペーンがはじまっている。

## 培養細胞の クロスコンタミネーションの歴史

1952年にHeLa細胞が樹立<sup>1)</sup>されたが、それに触発されて長期継代培養可能なヒト細胞株が次々と樹立さ

### Vigilance and authentication on the cross culture contamination of cell cultures

Hiroshi Mizusawa<sup>1) 4)</sup> / Yutaka Ozawa<sup>1)</sup> / Akihiro Kohara<sup>1) 5)</sup> / Tohru Masui<sup>1)</sup> / Motonobu Satoh<sup>2) 3)</sup> / Shigeru Iwase<sup>3)</sup> / Kaoru Fukami-Kobayashi<sup>3)</sup> / Kaoru Saijo<sup>4)</sup> / Yukio Nakamura<sup>4) 5)</sup> : JCRB Cell Bank, Laboratory of Cell Resources, Division of Biological Research Resources National Institute of Biomedical Innovation<sup>1)</sup> / Human Science Research Resources Bank<sup>2)</sup> / RIKEN BioResource Center, Bioresource Information Division<sup>3)</sup> / RIKEN BioResource Center, Cell Engineering Division<sup>4)</sup> / A member of the Committee for Cell Bank in Japan Tissue Culture Association<sup>5)</sup> (JCRB細胞バンク, 医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室<sup>1)</sup> / ヒューマンサイエンス研究資源バンク<sup>2)</sup> / 理化学研究所バイオリソースセンター情報解析技術室<sup>3)</sup> / 理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室<sup>4)</sup> / 日本組織培養学会細胞バンク委員会<sup>5)</sup>)



表1 1978年にATCCが確認したHeLa マーカーをもつヒト細胞<sup>3)</sup>

ATCC番号	細胞名	登録時記述
CCL 2	HeLa	子宮頸癌
CCL 2.2	HeLa S3	CCL 2のサブクローン
CCL 3	Detroit 6	肺癌患者胸骨骨髓由来
CCL 4	Minnesota-FH	食道気管咽頭部
CCL 5	L-132	胎児肺
CCL 6	Intestine-407	空腸一回腸部
CCL 13	Chang Liver	正常肝
CCL 17	KB	口腔底部上皮癌
CCL 18	Detroit98	胸骨骨髓
CCL 18.1	Detroit98S	胸骨骨髓
CCL 18.2	Detroit98/AG	胸骨骨髓
CCL 18.3	Detroit98/AH-2	胸骨骨髓
CCL 18.4	Detroit98/AH-R	胸骨骨髓
CCL 19	NCTC2544	皮膚上皮
CCL 19.1	NCTC3075	皮膚上皮
CCL 20.2	Chang Conjunctive	結膜
CCL 21	AV3	羊膜
CCL 23	HEp-2	頬上皮腫
CCL 24	J-111	単球性白血病
CCL 25	WISH	羊膜
CCL 27	Giardi Heart	心臓
CCL 31	TuWi Wilm's tumor	腺癌
CCL 62	FL	羊膜
CCL 30	RPMI2650	鼻中隔腫瘍患者胸水
CCL136	RD	横紋筋肉腫
CCL138	Detroit562	咽頭癌患者胸水

ATCCがHeLaマーカー染色体の存在を確認した細胞の一覧<sup>3)</sup>。これらの細胞からはHeLaに特徴的なType AのG6PDが検出された。HeLaとHeLaS3を除いた24種がHeLaコンタミとされた細胞である。これらのなかには正常細胞とされたものも複数あった。

れた。米国ではIMR (Institute for Medical Research, <http://www.coriell.org/>) やATCC (American Type Culture Collection, <http://www.atcc.org/>) が設立されてヒト細胞の収集がはじまり、生命科学研究のインフラ整備がはじまった。しかし、これらのヒト培養細胞の多くはHeLa細胞らしいという指摘がGartlerによってなされ<sup>2)</sup>、細胞の樹立に携わっていた多くの研究者に強い衝撃を与えたが、これを重くみたATCCは調査にのり出し、収集した60種ほどのヒト細胞のうち24種がHeLaコンタミの可能性が高いという結果を1978年に報告したのである(表1)<sup>3)</sup>。GartlerがHeLaコンタミの疑念を報告してから10年経過していた。

HeLa細胞のコンタミはヒトという同一生物種内で発生する問題であったため、当時それらを識別するこ

とは困難であった。現在なら遺伝子レベルの多型性を検出する技術を思いつくが、当時(1960年代)はそこまで至ってはいなかった。偶然アインザイムを調べていたGartlerがG6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) の等電点電気泳動パターンが白人 (typeB) と黒人 (typeA) とでわずかに異なることを発見して気が付いたのである。ATCCはこれを確かめるためにGartlerとは異なる方法を使って調査し、HeLa細胞を特徴付けるマーカー染色体(HeLaマーカー)を発見した。そして、このマーカーをもつ細胞にHeLa型といわれたTypeA G6PDが共通にみられたことからGartlerの指摘が正しかったことを確認したのだった<sup>4)</sup>。それでもまだ不安が残ったのであろう、「HeLaマーカーが観察された」という婉曲な表現で注意を促したのであ

表 2 ヒト培養細胞の個別識別に利用する 8 カ所の STR 領域と性別判定用遺伝子

STR 領域	分布染色体	遺伝子定義	反復単位配列
D16S539	16q24-qter	非遺伝子領域	AGAT
D7S820	7q11.21-q11.22	非遺伝子領域	AGAT
D13S317	13q22-q31	非遺伝子領域	AGAT
D5S818	5q21-q31	非遺伝子領域	AGAT
CSF1PO	5q33.3-q34	<i>c-fms</i> proto-oncogene	AGAT
TPOX	2p23-2pter	<i>HUMTPOX</i>	AATG
TH01	11p15.5	<i>HUMTH01</i>	AATG
vWA	12p12-pter	<i>HUMVWFA31</i>	AGAT
Amelogenin (X)	Xp22.1-22.3	<i>HUMAMEL</i> (X)	非反復配列
Amelogenin (Y)	Yp11.2	<i>Amelogenin</i> -like (Y)	非反復配列

プロメガ株式会社, Power Plex 1.2 System

る (1978 年)<sup>5)</sup>。

この後、分子生物学は大きく発展して遺伝子配列レベルでの多型解析が可能になった。Jeffreys らは制限酵素断片長多型が個体識別に利用できることを示し<sup>6)</sup>、さらに 2~7 塩基対の短い配列 (short tandem repeat : STR) のくり返し回数に個人差があることが明らかになり<sup>7)</sup>、マルチプレックス STR-PCR 法により再現性高くヒト細胞を識別することが可能になった<sup>8)</sup>。その後、英国の Masters は各国の細胞バンクによびかけて世界中に拡散した HeLa 細胞を集めて (264 種類) HeLa 以外の 6,000 種類の細胞と比較分析して調べた結果、STR-PCR 法がクロスコンタミネーションの確認に有効であることを確かめた<sup>9)</sup>。こうして STR-PCR 法による識別作業は急速に進み、HeLa 以外の細胞の間でもかなりの数のクロスコンタミネーションが発生していることが明らかになったのである。

クロスコンタミネーションが問題であることは理解されるであろうが、自分が使っている細胞になると「そんなはずはない」と考えている方も多であろう。そして実際に確認した方もほとんどいないのではないだろうか。しかし、まさにこれが現在大きな問題となっている点である。2007 年の春に Science 誌が“Cases of mistaken identity”として大きく取り上げた<sup>10)</sup>後、米国の Nardone らは DHHS (US Department of Health and Human Services) の長官である Leavitt に何らかのアクションを起こすようにと公開書簡を提出した。書簡には J. R. W. Masters, J. A. Bradshaw, L. R. Jacobsen, R. W. Nims, P. J. Price, D.

Lewis, G. Stacey, J. J. McCormick, S. M. Gartler, S. Pathak, J. M. Butler, G. C. Buehring, E. J. Massaro, A. F. Steuer, M. Gold, R. I. Freshney, D. Krause, S. J. O'Brien ら 18 名の研究者がサインをした。最近 BBC ラジオが 40 分の番組を組んでこの問題の特集を放送した (2007 年 11 月 20 日) が、そのタイトルは“Cancer studies wasted millions.”と衝撃的であり、論文投稿にあたってはクロスコンタミネーションがないことを示すデータの添付を求めている。

### 遺伝子レベルでの クロスコンタミネーションの立証と結果

STR-PCR 法によるヒト培養細胞の個別識別は、STR にみられる「反復回数の個人差」を利用して行われる。マーカーとして使える STR 配列はゲノム上に多数存在しているため、細胞バンク間でデータを比較検討しようとするならばマーカーセットの標準化をはかる必要があるが、プロメガ社の PowerPlex 1.2 (表 2) がその役割を果たしている。細胞バンクでは誤った細胞の分譲を避けることを目的に、新規細胞を入手すると必ず識別実験を実施してクロスコンタミネーションの有無を最初に確認する。そして、この STR-PCR 法の結果はデータベース化して記録し、次の新規入手細胞のチェックに利用するシステムを構築している。このように細胞バンクでは新しく入手するヒト細胞を常にモニターする体制を確立しているため、クロスコンタミネーションを起こした細胞を分譲する危険性はかなり低くなっている (皆無とはいわない)。わが国の

細胞バンクはこうした体制を世界に先駆けて確立した。その結果、JCRB細胞バンクと理研細胞バンクは数多くのクロスコンタミネーションを発見してきた(表3)。JCRB細胞バンクでは638種のヒト細胞を検査し、そのうち38種がクロスコンタミネーションを起こした細胞であることを確認した(6.0%)。理研細胞バンクも565種を調査して53種にクロスコンタミネーションを確認した(9.4%)。

かなりの数のクロスコンタミネーションが発見されていることに驚かれるであろう。新たなHeLaコンタミが発見されたことに加えて、日本で樹立された細胞にもクロスコンタミネーションがかなり見つまっている。また、1つの研究室が系統的に樹立した細胞のなかで入れ代わっていたという事例もあった。今後も細胞バンクでは継続的に調査を実施して結果を公開するので、ぜひウェブサイトを定期的に確認していただきたい。また、個々の研究室においても検査を実施できるようにしておくことは今後必須になるであろう。米国のヒトES細胞研究ではこの点に関する注意も行きとどいており、米NIHのウェブサイト上にあるヒト幹細胞ユニットのサイト <http://stemcells.nih.gov/research/nihresearch/scunit/genotyping.htm> では17種のES細胞に関してPowerPlex 1.2による分析結果を公開し誰もが確認できるようにしてある。このデータはATCCの支援によって出されたそうである。

## クロスコンタミネーション防止のヒント



Nardoneらは先の公開書簡と同時に研究者向けにAmerican Society for Cell Biologyのニュースレター(2007年7月)を通じて“Cross Contamination of Cell Cultures: A Call for Vigilance and Authentication”という警告を発した。彼らはここに「クロスコンタミを防止する9カ条」を公表したが、原則的すぎてそのまま実行できないという批判もある。そこで9カ条が意図する趣旨を紹介して具体的な運用は個々の研究者に任せたいと思う。形式を真似るより本質を理解して工夫するほうが実効的であろう(9カ条はJCRB細胞バンクのウェブサイト <http://cellbank.nibio.go.jp/cellbank/qualitycontrol/crosscontami01.html> に掲載)。

クロスコンタミネーションが発生する原因は培地やピペットの使い方にあるというのが専門家の共通した認識である。ピペットの先端は「培養中の培地に接触させない限り汚染されない」という常識をもっていたら、まずそれが誤りだと認識していただきたい。ピペットから排出される溶液はゆっくり注いでも、かなりの勢いで培養皿の培地液面や皿の底を叩き微少な水滴をまきあげる。したがって、ピペットの先端は一度溶液を注いだ時点で汚染されたと理解すべきなのである。これをもとに培地やピペットの扱い方を見直すことがクロスコンタミネーションの防止策となる。9カ条には「1回操作するたびにピペットを交換せよ、絶対にピペットを往復させるな」とある。しかしディスプレイのピペットを大量に廃棄することになるため、それに抵抗を感じて少ないピペットで問題を解決したいと思われる方も多いであろう。その場合は培地を小分けしてから使うという方法が有効である。もちろんこの場合も一度使用したら、残った分は汚れた培地として使用後は必ず廃棄しなければならない(ここは譲れない)。こうすればピペットを往復させても他の細胞に影響を与えることはない。クロスコンタミネーションが発生する原理をよく理解し、周回な準備をしてから実験に望む癖を付けることが重要である。

実験中に培地が足りなくなって「ちょっと貸して!」という風景も研究室ではよくみかける光景であるが、このような場面で「貸さない!」と拒絶する勇気が求められている。また、つくった培地を知らぬ間に誰かに使われてしまったという話もよく聞く。このように実験室には1つの培地をいろいろな細胞に使いまわされてしまう危険性があるが、9カ条には「細胞の播種、継代、培地交換、トリプシン処理、などに使う試薬はすべて1つの細胞に専用にし、断じて他の細胞に使いまわしてはならない、培地や試薬の共用が最も危険である」と明記されている。注意深い研究室では1980年代から培地保管用冷蔵庫を個人専用とし、培地や添加物のセットに鍵をかけて保管するようにしているという。新規細胞の樹立をテーマとするならこれくらいの注意が必要だということになりつつある。

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

登録番号 <sup>#1</sup>	細胞名 <sup>#2</sup>	細胞の由来	実在細胞名 <sup>#3</sup>	細胞の由来	文献	入手可否
JCRB/HISRRB細胞バンクにおける調査結果						
1	IFO50004	WISH 羊膜	HeLa	子宮頸癌	3) 4) 5)	可
2	IFO50039	NC-37 リンパ芽球 (男)	Raji	パーキットリンフォーマ (男)	5)	可
3	IFO50079	Flow7000 正常皮膚上皮 (男)	HeLa	微量HeLa混入, 問題解決済み		可
4	IFO50290	Marcus アストロサイトーマ (女)	REF-IC-OK	肺癌		不可 <sup>#4</sup>
5	IFO50315	RMG-II 卵巣中腎腫	RMG-I	卵巣中腎腫		JCRB株を分譲 <sup>#5</sup>
6	IFO50318	RTSG 卵巣未分化腺癌	SNG-II	子宮内膜腫瘍		不可
7	IFO50319	RMUG-L 卵巣囊胞腺癌	SNG-II	子宮内膜腫瘍		不可
8	IFO50314	SK-MG-1 星状細胞腫	REF-IC-OK	肺癌 (女)		不可 <sup>#4</sup>
9	IFO50360	KNS-89 グリオブラストーマ (男)	U-251MG	アストロサイトーマ		不可
10	JCRB0067	Flow2000 正常皮膚上皮 (男)	不明	他所のFlow2000と一致せず		IFO株を分譲 <sup>#5</sup>
11	JCRB0073 (IFO50005)	J-111 単球性白血病細胞 (男)	HeLa	子宮頸癌	5) 11) 12)	可
12	JCRB0092	P39/TSU 骨髄芽球性白血病 (男)	HL-60	単核球性白血病 (女)		不可
13	JCRB0122	KO51 骨髄芽球性白血病 (男)	K562	骨髄性白血病		不可
14	JCRB0127	KOSC-3 歯肉扁平上皮癌 (女)	Ca9-22	歯肉癌 (女)		不可
15	JCRB0128	TK-1 グリオブラストーマ (女)	U-251 MG	星状細胞腫 (男)		不可
16	JCRB0171	SKG-II 子宮頸癌	SNG-II	子宮内膜腫瘍		IFO株を分譲
17	JCRB175	SNG-II 子宮内膜腫瘍	SKG-II	子宮頸癌		IFO株を分譲
18	JCRB0224 (IFO50043)	WiDr 直腸癌 (女)	HT-29	直腸癌	12)	可
19	JCRB0253	MKN28 胃癌 (女)	MKN-74	胃癌 (男)		可
20	JCRB0604	PSV811 ウェルナー, 上皮繊維芽	WI-38	胎児肺正常細胞 (女)		不可
21	JCRB0710	EJ-1 膀胱癌 (男)	T24	膀胱癌 (女)	13) 14)	可
22	JCRB0744	ECV304 膀胱癌 (女)	T24	膀胱癌 (女)	13) 15)	不可
23	JCRB0811	REF-LC-OK 肺癌 (女)	Marcus	星状細胞腫		不可
24	JCRB0823	YMB-1 乳癌	ZR-75-1	乳癌		可
25	JCRB0825	YMB-1-E 乳癌	ZR-75-1	乳癌		可
26	JCRB1013	KA-S1 腎盂癌	mouse	マウス		不可
27	JCRB1047	OVSAYO 卵巣癌	OVMIU	相互取違えの可能性 <sup>#7</sup>		可
28	JCRB1049	OVMIU 卵巣癌	OVSAYO	相互取違えの可能性 <sup>#7</sup>		可
29	JCRB1050	OVMIU-II 卵巣癌	なし	相互取違えの可能性 <sup>#7</sup>		可
30	JCRB1064	KYSE110 食道癌	KYSE200	食道癌		不可
31	JCRB1070	HSG c-C5 唾液腺 (男)	HeLa	子宮頸癌		可
32	JCRB1078	TMH-1 甲状腺癌 (女)	IHH-1	甲状腺癌 (男)		可
33	JCRB1127	HEC-155 子宮内膜漿液性腺癌	HEC 180	子宮内膜漿液性腺癌		不可
34	JCRB9016	FL 羊膜由来正常細胞	HeLa	子宮頸癌	3) 4) 5) 11)	不可
35	JCRB9027	KB 口腔上皮癌	HeLa	子宮頸癌		可
36	JCRB9062	HS-sultan 形質細胞腫 (男)	Jiyoye	男性, パーキットリンフォーマ	5) 16)	可
37	JCRB9066 (IFO50016)	Chang Liver 肝臓癌	HeLa	子宮頸癌	3) 4) 5) 11)	可
38	JCRB9094	DLD-1 大腸癌	HCT-15	大腸癌	17)	可 <sup>#8</sup>

(次ページに続く)

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

登録番号 <sup>#1</sup>	細胞名 <sup>#2</sup>	細胞の由来	実在細胞名 <sup>#3</sup>	細胞の由来	文献	入手可否
理研細胞バンクにおける調査結果						
39	RCB0004 RCB2276	HMV-1 メラノーマ	HeLa	子宮頸癌	#10	不可
40	RCB0077 RCB1457	HuL-1 胎児肝細胞	HeLa	子宮頸癌	#5	不可
41	RCB0100	HL1117S3 肺癌	HeLa	子宮頸癌	18)	不可
42	RCB0110	SQ-5 肺癌	HeLa	子宮頸癌	18)	不可
43	RCB0223	PSVS11 ウェルナー症候群患者 上皮線維芽細胞	WI-38	胎児肺正常細胞	#9	不可
44	RCB0392	NCU-F5 Ectodermal dysplasia患者 皮膚細胞(女)	不明	Y染色体あり	18)	不可
45	RCB0408	AKI メラノーマ(男)	HeLa	子宮頸癌	18)	不可
46	RCB0442	SCCTF 舌癌	SCCKN	舌癌	18)	不可
47	RCB0445	Namalwa パーキットリンパ腫	不明	他所のNamalwaと一致せず		不可
48	RCB0454	OST 骨肉腫	HeLa	子宮頸癌	#9	不可
49	RCB0458 RCB0491	Chang Liver 肝臓癌	HeLa	子宮頸癌	3) 4) 5) 11)	不可
50	RCB0460	HBL-100 乳癌(女)	不明	Y染色体あり	18)	不可
51	RCB0461	U251 グリオブラストーマ	U373-MG	グリオブラストーマ	#9	不可
52	RCB0465	Lu-130 肺癌	Lu-134	肺癌	18)	不可
53	RCB0553	Intestine 407 小腸上皮細胞	HeLa	子宮頸癌	#9	不可
54	RCB0640	TCC-1 子宮頸癌	TCS	子宮頸癌	18)	不可
55	RCB0656	HKMUS 子宮頸癌	SKG-II	子宮頸癌	18)	不可
56	RCB0686	HKMUS-SF 子宮頸癌	SKG-II	子宮頸癌	18)	不可
57	RCB0712	KMT-2 臍帯血由来単球系細胞	KG-1	急性骨髄性白血病	18)	不可
58	RCB0726	IMC-2 上頸癌(男)	HeLa	子宮頸癌	#10	不可
59	RCB0727	IMC-3 上頸癌(男)	HeLa	子宮頸癌	#10	不可
60	RCB0728	IMC-4 上頸癌(男)	HeLa	子宮頸癌	#10	不可
61	RCB0885	GT3TKB 胃癌	REF-LC-A1	肺癌	18)	不可
62	RCB1000	MKN28 胃癌(女)	MKN74	胃癌(男)	#9	不可
63	RCB1019	T3M-12 肺癌	T3M-1	口腔癌		不可
64	RCB1201	Mashwa-1 シュワン細胞腫	MMAc	メラノーマ	18)	不可
65	RCB1202	BSCC-93 有棘細胞癌	DJM-1	毛包癌	18)	不可
66	RCB1288	MEK 肝臓癌(女)	不明	Y染色体あり		不可
67	RCB1289	ETK-1 胆管癌	SSP-25	胆管癌	18)	不可
68	RCB1318	KU-YS 神経芽細胞腫(男)	KU-SN	外胚葉性腫瘍(女)		不可
69	RCB1386	Mash-1 シュワン細胞腫	MMAc	メラノーマ	18)	不可
70	RCB1427	ABS-9 急性骨髄性白血病(女)	不明	Y染色体あり		不可
71	RCB1496	FU-RPNT-2 腎癌	FU-RPNT-1	腎癌		不可
72	RCB1711	HaL-1-P3 胎児肝細胞	HeLa	子宮頸癌	#9	不可
73	RCB1888	KB 口腔上皮癌	HeLa	子宮頸癌		不可
74	RCB1889	HEp-2 喉頭癌(男)	HeLa	子宮頸癌		可
75	RCB1893	TE-7 食道癌	TE-2	食道癌		不可
76	RCB1908	WiDr-TC 直腸癌	不明	他所のWiDrと一致せず		不可
77	RCB1937	HPB-MLT T細胞白血病	HPB-ALL	急性リンパ性白血病		不可
78	RCB1944	KG-1 急性骨髄性白血病	mouse	マウス		不可
79	RCB1948	TE-2 食道癌	TE-7	食道癌		不可
80	RCB1957	DLD-1 大腸癌	HCT-15	大腸癌	17) #9	不可
81	RCB1958	HCT-15 大腸癌	DLD-1	大腸癌	17) #9	不可
82	RCB1961	LS174T 直腸癌	不明	他所のLS174Tと一致せず		不可
83	RCB1964	YMB-1-E 乳癌	ZR-75-1 (CRL1500)	乳癌		不可
84	RCB1984	CoLo-TC 大腸癌	COLO205	大腸癌		不可
85	RCB2096	PK-8 膀胱癌	不明	RCB1961直腸癌と一致		不可
86	RCB2137	EJ-1 膀胱癌(男)	T24	膀胱癌(女)	13) 14) #9	不可
87	RCB2215	NCC-RbC-70 レチノブラストーマ	NCC-RbC-54	レチノブラストーマ		不可
88	RCB2236	HE-5 胎児由来線維芽細胞	HE13	胎児由来線維芽細胞		不可
89	RCB2274	H-III 口腔癌	HeLa	子宮頸癌		不可
90	RCB2275	HSGc-C5 唾液腺(男)	HeLa	子宮頸癌	#9	不可
91	RCB2349	USAC 骨肉腫	mouse	マウス		不可

# 9 JCFB の調査と理研の調査で同じ結果となったもの。

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

## おわりに

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

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

## 文献

- 1) Gey, G. O. et al. : *Cancer Res.*, 12 : 264-265, 1952
- 2) Gartler, S. M. : *Nature*, 217 : 750-751, 1968
- 3) Lavappa, K. S. : *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 14 : 469-475, 1978
- 4) Lavappa, K. S. et al. : *Nature*, 259 : 211-213, 1976
- 5) Hay, R. J. et al. : *Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, 6 : 1988
- 6) Jeffrey, A. J. et al. : *Nature*, 316 : 76-79, 1985
- 7) Hammond, H. A. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, 55 : 175-189, 1994
- 8) Kimpton, C. P. et al. : *PCR Methods Appl.*, 3 : 13-22, 1993
- 9) Masters, J. R. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 8012-8017, 2001
- 10) Chatterjee, R. : *Science*, 315 : 928-931, 2007
- 11) Honma, M. et al. : *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 28A : 24-28, 1992
- 12) Lavappa, K. S., et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, 29 : 67A-67A, 1977
- 13) Tanabe, H. et al. : *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 18 : 329-338, 1990
- 14) O'Toole, C. M. et al. : *Nature*, 301 : 429-439, 1983
- 15) Dirks, W. G. et al. : *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 35 : 558-559, 1999
- 16) Drexler, H. G. et al. : *Blood*, 98 : 3495-3496, 2001
- 17) Chen, T. R. et al. : *Cancer Genet. Cytogenet.*, 81 : 103-108, 1995
- 18) Yoshino, K. et al. : *Hum. Cell*, 19 : 43-48, 2006

## Profile

著者プロフィール

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