

培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査

小原 有弘^{1,2)}、大谷 梓¹⁾、小澤 裕¹⁾、塩田 節子¹⁾、増井 徹¹⁾、水澤 博^{1,2)}

¹⁾ 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

²⁾ 日本組織培養学会、細胞バンク委員会

【要約】 マイコプラズマは自己増殖能を持つ、細菌の1/10程度の大きさの微生物で培養細胞と共存して増殖する汚染しやすい微生物とされているが、培地が濁ることがないので混入に気付きにくい。しかし、マイコプラズマ汚染が研究に及ぼす影響は多大であり、サイトカインの発現異常、染色体の異常、細胞死などを引き起こし、その混入を軽視することはできない。そこで日本組織培養学会細胞バンク委員会と JCRB 細胞バンクは協力して、マイコプラズマ簡易迅速検査キット「MycoAlert[®]」を利用したマイコプラズマ汚染に関する全国実態調査を開始し、今までに11大学、2 国立研究所、3 企業の協力が得られている。既に1500検体程度の解析を実施したが、平均汚染率は22.4%という結果を得たのでその概略を中間報告として紹介する。今後我々は、さらに調査を進めると共に、細胞に汚染していたマイコプラズマ種の同定も行い汚染源の特定なども行いながら、マイコプラズマ汚染の予防法や除去法についての紹介も今後行っていきたいと考えている。

【キーワード】 マイコプラズマ、マイコプラズマ汚染、MycoAlert[®]

マイコプラズマについて

マイコプラズマは *Mollicutes* (モリキョーテス) 綱に属する微生物であり、自己増殖能を持つ最小のバクテリアとされている。ゲノムサイズは55万塩基対程度と細菌の1/10ほどの大きさで(300 nm-1000 nm)、0.22 μm のフィルターを通過する。細胞壁を持たないためにペニシリン系抗生物質は無

効で、カナマイシンやゲンタマイシンなどに耐性を持つものが多いなどの特徴をもっている。マイコプラズマには非常に多くの種類が存在することがわかっているが、細胞を汚染するマイコプラズマの種類は限られており、*M. Arginini* (自然宿主: ヒト・ヤギ、生息部位: 口腔咽頭・尿生殖器)、*M. fermentans* (自然宿主: ヒト、生息部位: 尿生殖器)、*M. hyorhinis* (自然宿主: ブタ、生息部位: 鼻腔)、*M. orale* (自然宿主: ヒト、生息部位: 口腔咽頭)、*A. laidlawii* (自然宿主: ウシ、生息部位: 口腔咽頭・尿生殖器)、*M. salivarium* (自然宿主: ヒト、生息部位: 口腔咽頭) の6種類が全汚染の96%を占めていると言われている。現在では細胞

連絡者: 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

TEL: 072-641-9851、FAX: 072-641-9851

E-mail: kohara@nibio.go.jp

培養に用いる血清や添加物などの製品の品質が改良されてきたことに伴い、マイコプラズマの汚染源となるところは変わってきたと思われるが、研究に利用されている培養細胞のマイコプラズマ汚染は未だに減少していないとも言われている。そこで、我々は実態把握のための広範囲な国内調査が必要であると考えた。

細胞のマイコプラズマ汚染検出法

マイコプラズマの検出法の主なものには分離培養法、DNA 蛍光染色法、ネステッド PCR 法があり日本薬局方や JIS 規格によって定められてきた。分離培養法はその名の通り、マイコプラズマを培養してその有無を確認する方法でありコロニーが生成すれば正確な結果を期待できるが、検査には嫌気培養法なども使わなければならないなどの面倒な点も多いうえに検査に要する期間も 2

週間から 3 週間程度かかってしまう。また、まだ分離用培地が開発されていないマイコプラズマ種も確認されていることなどから我々が日常的な検査に用いるには適切な方法とはいえない。そこで、細胞バンクでは DNA 蛍光染色法とネステッド PCR 法の二つの方法を細胞の品質検査に採用して実施してきた。この 2 つの検出方法はともに高感度で確実な結果が出る点と、検査に要する時間が分離培養法に比べて短期間で済む点が有利であった。それでも検査を始めてから結果が出るまでには 1 週間以上もの時間を要してしまう点が、マイコプラズマ汚染検査が一般にはなかなか普及しないという理由となっているように思われた。そのような中で最近になって MycoAlert® (Lonza Rockland, Inc. ME, USA) 法という、およそ 20 分程度でマイコプラズマ混入に関する検査結果が得られるという、迅速な試験キットが市販されることとなった。そこで、JCRB 細胞バンクでは 2007 年 5 月に開催

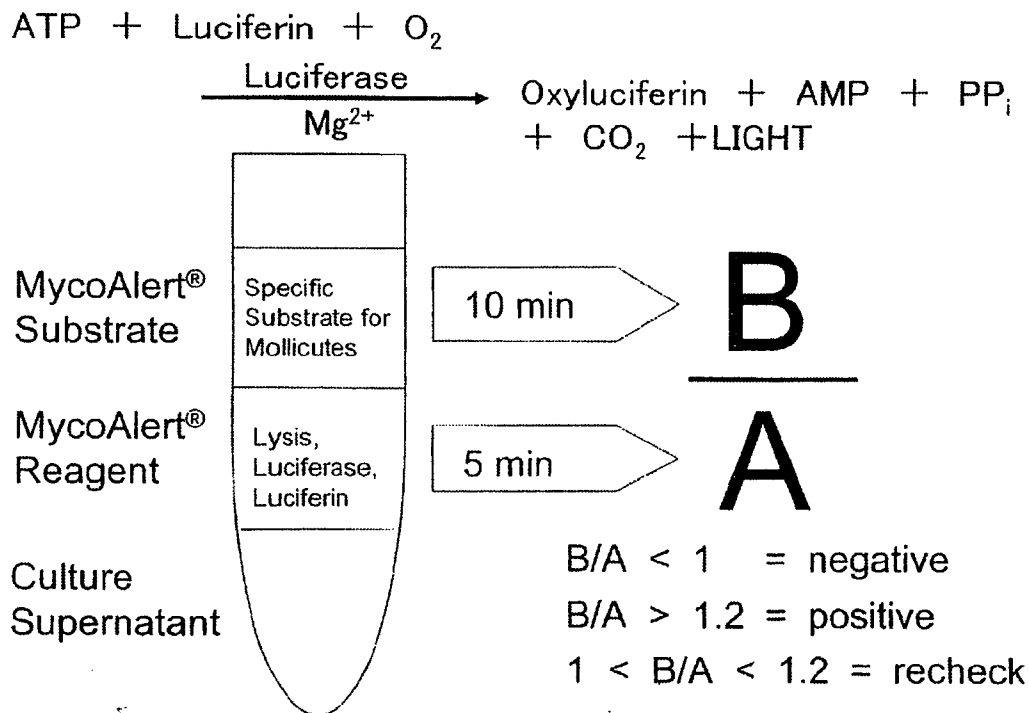


図 1 測定の原理と結果の判定

測定に用いるのは培養上清 100 μL で、MycoAlert® Reagent を添加して 5 分後にルミノメータによりバックグラウンド値を測定し、MycoAlert® Substrate を添加して 10 分後にマイコプラズマ特有の酵素活性を測定する。

培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査

された日本組織培養学会（第80回大会）を契機に、日本組織培養学会の細胞バンク委員会と協力をして、我国のマイコプラズマ汚染に関する全国実態調査を試みることにした。MycoAlert®法の特徴を生かせば多数の試料を短時間で処理することができるので、我国におけるマイコプラズマ汚染の実態調査が可能になるのではないかと考えたのである。また、こうした調査を通じて検査が容易であることに気づいて頂ければ、マイコプラズマ汚染検査を日常的に実施する習慣を身に付けることが可能になるのではないかと考えたところである。

MycoAlert®法はルミノメーターを用いてマイコプラズマに特異的な酵素反応を検出するものである。細胞の培養上清 100 µLを用い、小数の試薬を添加してからルミノメーターで光度を測定するだけなので20分ほどで結果が出る。そのため、忙しい実験の合間にマイコプラズマ汚染の有無をチェックしてしまうことも可能であろう。検査の概略は図1に示した。細胞の培養上清（100 µL）に MycoAlert® Reagent（試薬）を添加して5分後に反応液中の ATP とルシフェラーゼによるバックグラウンド値をルミノメーターで測定し、その後 MycoAlert® Substrate（基質）を添加して10分後に再度ルミノメーターで値を読み取る。培養上澄にマイコプラズマが存在していればこの2回目の読み取り値が上昇する。この上昇がマイコプラズマに特異的な酵素の反応によるものである。この値を最初に測定したバックグラウンド値で割った値を用いてマイコプラズマの有無を判定した。この比が1.2以上なら陽性、1.0未満は陰性、1.0以上1.2未満を要再検査と判定した。

マイコプラズマ汚染検査結果

これまでに11の大学、2つの国立研究所、3社の企業と JCRB 細胞バンクが所属する（独）医薬基盤研究所に依頼して収集した1470検体について三光

純薬（株）（販売元）の協力を得て検査を実施し、陽性330検体、陽性率22.4%という結果（表1）を得た。調査では大学の研究室からのサンプルが多く汚染率も平均値を上回った。また、国立研究所や企業は比較的低いという結果であったがサンプル数が少ないので今後さらに調査を進めて確認したい。個別の研究室の汚染率については、それらのデータを示すことは出来ないが、研究室ごとにはばらついており、今回の平均値より高い値が出た研究室では十分に注意をされたい。大学で比較的高い汚染率が出たことについては色々な理由が考えられると思われるが、学生の入れ代わりが多い点にも原因があるのではないだろうか。十分な教育が必要であることを物語っているように感じられる。

表1 マイコプラズマ汚染検査結果

| 検体提供機関 | 検体数 | 陽性検体数 | 汚染率 |
|------------|------|-------|-------|
| 大学（11大学） | 1116 | 284 | 25.4% |
| 国立研究所（2機関） | 58 | 1 | 1.7% |
| 企業（3社） | 46 | 5 | 10.6% |
| 医薬基盤研究所 | 250 | 40 | 16.0% |
| 合計 | 1470 | 330 | 22.4% |

国立研究所、企業におけるマイコプラズマ汚染率は大学におけるマイコプラズマ汚染率よりも低い。

なお、我々は、ここで得られた結果を確認するために、これらのサンプルをランダムに選択してさらにネステッド PCR 法や蛍光染色法を実施してマイコプラズマの有無を確認した。その結果はここで示した MycoAlert®法の結果と矛盾することは無かった（データは示さない）。

マイコプラズマ除去法

マイコプラズマは先にも述べたようにヒトに常在する微生物であり、樹立当初は汚染されていなかった細胞も研究の過程で汚染してしまう可能性

が十分にあるので注意しなければならない。汚染除去には抗生物質を用いて汚染細胞を処理することになるが、マイコプラズマにも薬剤耐性が出現していることが知られており、抗生物質が効かないマイコプラズマ種も存在しているようである。また、マイコプラズマを除去する薬剤が細胞に与える影響も十分に考えなければならず、その影響により細胞の性質が変わることもあるので、抗生物質処理を行った場合は除去後細胞の性質を再確認する必要もある。除去に用いられる抗生物質は、キノロン系の MC-210 (大日本住友製薬製) やブレウロムチリンとテトラサイクリンの誘導体 2 つの抗生物質より構成される BM-サイクリン (ロシュ社製) が利用されることが多いが、マイコプラズマ汚染の除去には色々な方法を組み合わせてやっと除去に成功するなど悪戦苦闘することも多く手間がかかる作業である。JCRB 細胞バンクではこれまでに 50 株程度の培養細胞についてマイコプラズマ汚染除去を試みて 9 割程度で成功した実績を有している。ただ、MC210 などの新しい試薬がマイコプラズマの除去に有効であるからといって、これらの試薬をけして日常的に培養液に添加して培養するなどの方法を取ってはならない。こうした安易な取り扱いが MC210 耐性菌を増やし、マイコプラズマ除去を不可能にしてしまうので注意すべきである。

こうした薬剤によるマイコプラズマ除去を試みる場合は、薬剤の仕様書に従って注意深く行うべきである。

マイコプラズマ汚染の予防

今回の調査では培養細胞のマイコプラズマ汚染率の平均値は 22.4% であった。この数字は 30 年前とはほぼ同じであり、血清や培地添加物の品質が向上してマイコプラズマの汚染源とならなくなったにもかかわらず未だに高い汚染率で推移している

と言わざるを得ない。マイコプラズマに汚染されてしまったら除去を考えざるを得なくなるが、汚染しないように予防するほうが遥かに有意義であるし、研究へのコストも低く抑えられる。

マイコプラズマはヒトの口の中にも常在する微生物なので、培養作業中に唾液が飛べば汚染の原因となる。従って、十分に整備された実験環境 (クリーンベンチ、安全キャビネット使用) でゴム手袋やマスクの着用を心がけたとしても、実験中に話をすれば、それが汚染の原因になってしまう。そのため、それぞれの実験実施者が汚染の拡大を防ぐ意識を持って、私語を慎むなど自制することが重要だと思われる。また、マイコプラズマの汚染の拡大は汚染された細胞から非汚染細胞へ移ることも多いと言われている。特に、培地を介しての汚染の拡大はクロスコンタミネーションの原因ともなると考えられているので、ピペット等を培養中の細胞と培地瓶の間を往復させずに一方向になるような操作を心がける必要がある。さらに、マイコプラズマで汚染した培地を実験台にこぼしてしまったような場合にも、いずれ乾いてしまうから大丈夫だろうとはけして考えず、すぐに殺菌剤を含む布巾でぬぐい取っておくなどの配慮が必要である。培地には乾燥に対する保護剤となるタンパク質や糖分が豊富にふくまれており、乾燥してもマイコプラズマが十分生きているという指摘が McGarity らによって既になされている。

こうした諸点に注意を払って培養実験を行うには研究者自らが、日常的にマイコプラズマ汚染は排除すべきであるという強い意識を持つことが有効であると思われる。今後、マイコプラズマ汚染に関する全国調査をさらに進めると共に、汚染していたマイコプラズマ種の同定も行い、汚染経路の特定なども試み注意を促したいと考えている。

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 "MycoAlertSM". 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, MycoAlertSM

−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^{1,2)}。通常の研究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、一般の研究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: rmizusawa@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て長期安定保存したいという希望も増えつつあるため、 -190°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°C まで温度を下げる方法には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)。

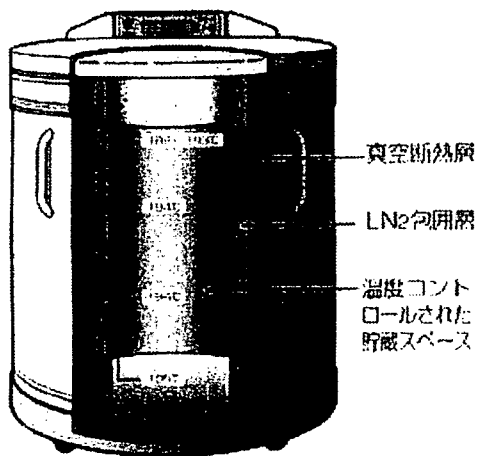
もう一つの方式は、タンクの内装に使う金属を従来のステンレスから熱伝導率の高いアルミニウムなどに変更する方法である。この方式を取って

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)。

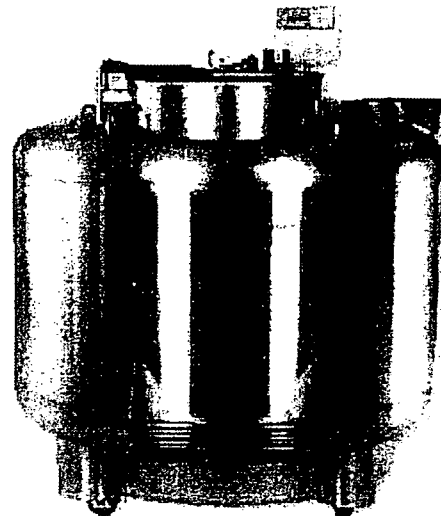
この容器を使うに先立って、我々は、ラックを出し入れする際のラック温度の変化やアンプル内

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

図1 -190°C で保存できる気相式液体窒素細胞保存容器
 -190°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)のエターシリーズで材質の改良により -190°C を実現した。

気相式液体窒素保存システム

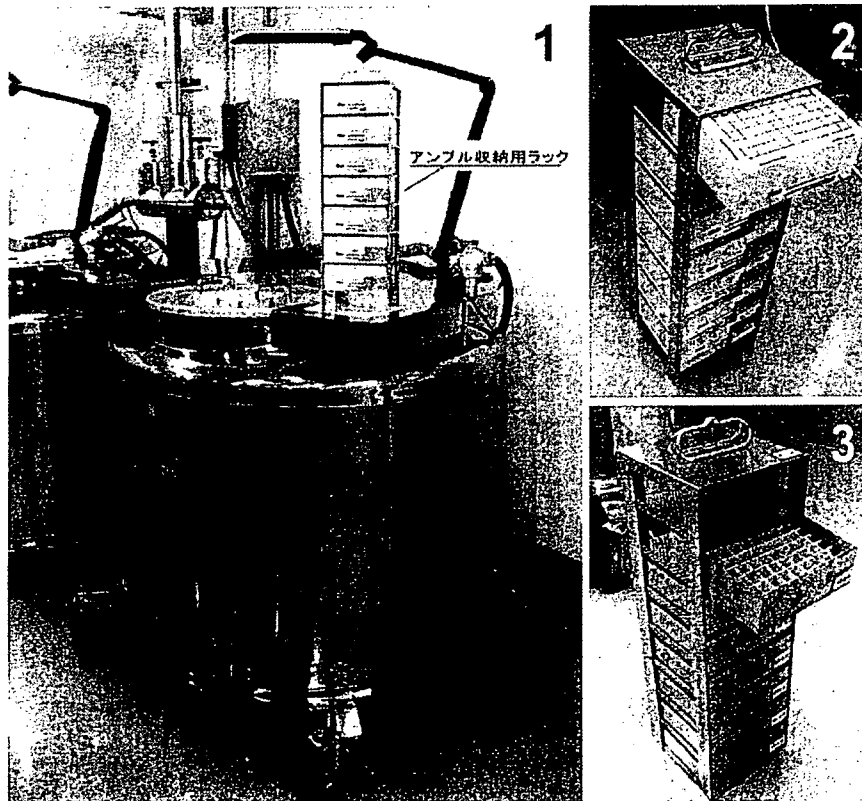


図2 G430S型液体窒素細胞保存容器とラック

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、アンプ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、中段、下段の三箇所に加え、上段に入れたアンプル収納箱中のアンプル内の培地温度を測定した。アンプルには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°C で従来型(DR430LM)が -167°C (図4)と新しい型のほうが 20°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°C もあったのに対し、新しい材質改良型では

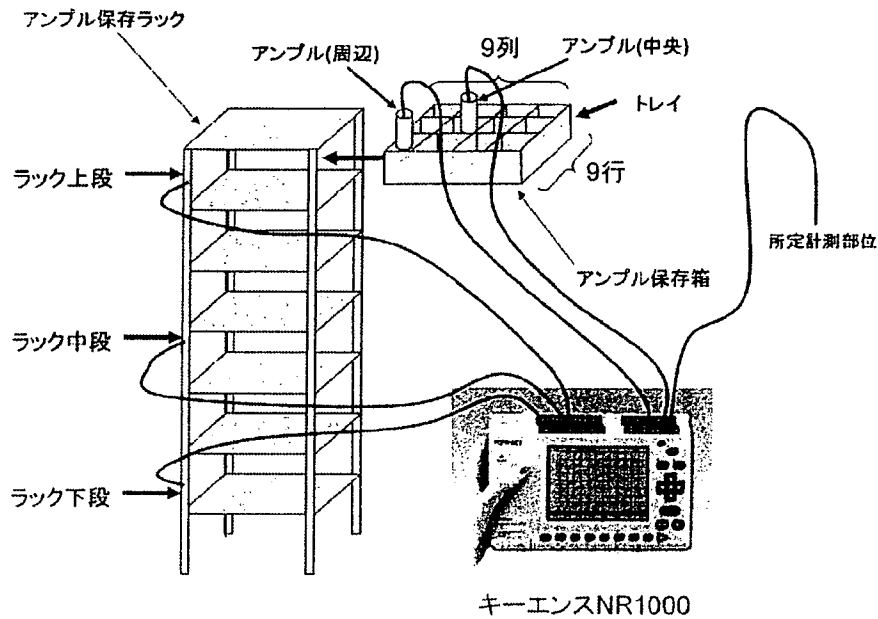


図3 温度測定部位

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は設置されている。

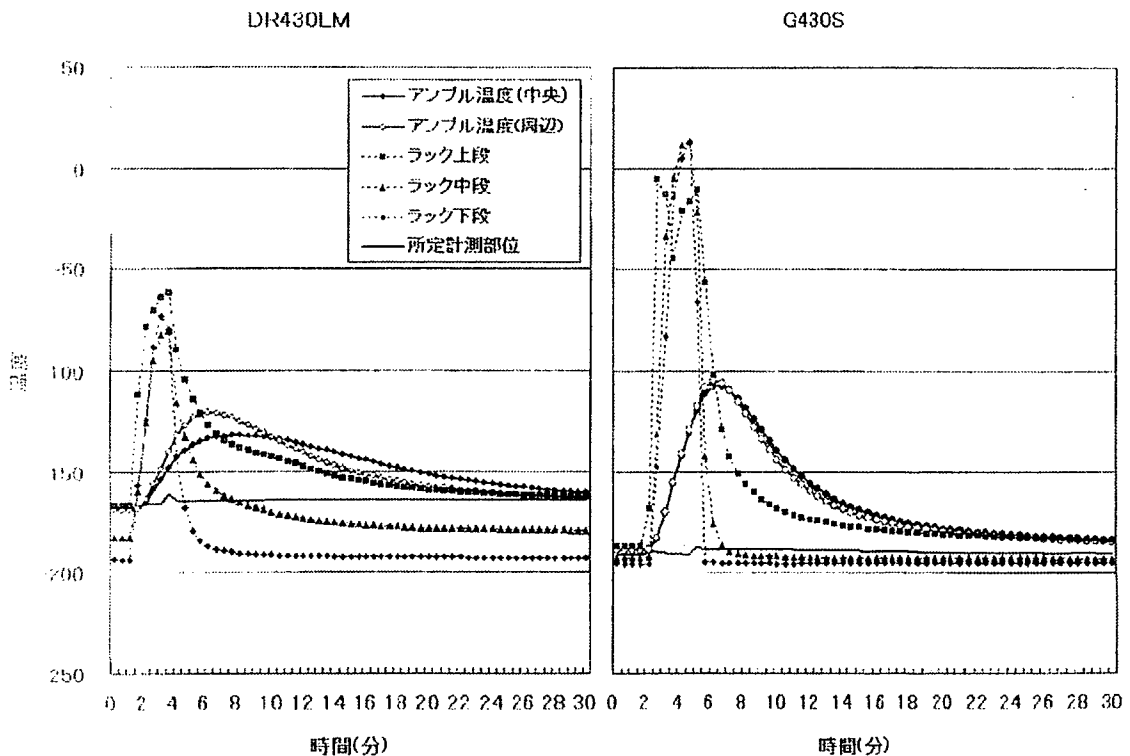


図4 測定結果

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°C

Hiroyuki Matsuda¹, Tohru Masui, Masao Takeuchi, Arihiro Kohara

¹ National Institute of Biomedical Innovation Division of Bioresources, JCRB Cell Bank 7-6-8 Saitoasagi, Ibaraki-shi, Ibaraki 307-0085, Japan.

Abstract: We usually store the cultured cells in the liquid nitrogen system. A vapor phase system with -190°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°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い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部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¹⁾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^{1) 5)} / Yutaka Ozawa¹⁾ / Arihiro Kohara^{1) 5)} / Tohru Masui¹⁾ / Motonobu Satoh^{2) 5)} / Shigeru Iwase³⁾ / Kaoru Fukami-Kobayashi³⁾ / Kaoru Saijo⁴⁾ / Yukio Nakamura^{4) 5)} : JCRB Cell Bank, Laboratory of Cell Resources, Division of Biological Research Resources National Institute of Biomedical Innovation¹⁾ / Human Science Research Resources Bank²⁾ / RIKEN BioResource Center, Bioresource Information Division³⁾ / RIKEN BioResource Center, Cell Engineering Division⁴⁾ / A member of the Committee for Cell Bank in Japan Tissue Culture Association⁵⁾ (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¹⁾ / ヒューマンサイエンス研究資源バンク²⁾ / 理化学研究所バイオリソースセンター情報解析技術室³⁾ / 理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室⁴⁾ / 日本組織培養学会細胞バンク委員会⁵⁾)

表1 1978年にATCCが確認したHeLaマーカーをもつヒト細胞³⁾

| 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-FE | 食道気管咽頭部 |
| CCL 5 | L-132 | 胎児肺 |
| CCL 6 | Intestine407 | 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³⁾。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²⁾、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)³⁾。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⁴⁾。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)⁵⁾。

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別識別に利用できることを示し⁶⁾、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⁷⁾、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⁸⁾。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⁹⁾。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¹⁰⁾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. Bradlaw, 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. L. Fresliney, 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。

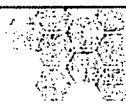
遺伝子レベルでの クロスコンタミネーションの立証と結果

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ので、細胞バンク間でデータを比較検討しようとするれ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ホルダー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 ^{#1} | 細胞名 ^{#2} | 細胞の由来 | 実在細胞名 ^{#3} | 細胞の由来 | 文献 | 入手可否 | |
|-------------------------|------------------------|-------------|---------------------|------------|-------------------------|--------------|------------------------|
| JCRB/HSRRB細胞バンクにおける調査結果 | | | | | | | |
| 1 | IFO50004 | WISH | 羊膜 | HeLa | 子宮頸癌 | 3) 4) 5) | 可 |
| 2 | IFO50039 | NC-37 | リンパ芽球 (男) | Raji | パーキットリンフォーマ (男) | 5) | 可 |
| 3 | IFO50079 | Flow7000 | 正常皮膚上皮 (男) | HeLa | 微量HeLa混入, 問題解決済み | | 可 |
| 4 | IFO50290 | Marcus | アストロサイトーマ (女) | RERF-LC-OK | 肺癌 | | 不可 ^{#4} |
| 5 | IFO50315 | RMG-II | 卵巣中腎腫 | RMG-I | 卵巣中腎腫 | | JCRB株を分譲 ^{#5} |
| 6 | IFO50318 | RTSG | 卵巣未分化腺癌 | SNG-II | 子宮内膜腫瘍 | | 不可 |
| 7 | IFO50319 | RMUG-L | 卵巣嚢胞腺癌 | SNG-II | 子宮内膜腫瘍 | | 不可 |
| 8 | IFO50344 | SK-MG-1 | 星状細胞腫 | RERF-LC-OK | 肺癌 (女) | | 不可 ^{#4} |
| 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 | | JFO株を分譲 ^{#6} |
| 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, 上皮線維芽 | WI-38 | 胎児肺正常細胞 (女) | | 不可 |
| 21 | JCRB0710 | EJ-1 | 膀胱癌 (男) | T24 | 膀胱癌 (女) | 13) 14) | 可 |
| 22 | JCRB0744 | ECV304 | 臍帯血上皮 (女) | T24 | 膀胱癌 (女) | 13) 15) | 不可 |
| 23 | JCRB0811 | RERF-LC-OK | 肺癌 (女) | Marcus | 星状細胞腫 | | 不可 |
| 24 | JCRB0823 | YMB-1 | 乳癌 | ZR-75-1 | 乳癌 | | 可 |
| 25 | JCRB0825 | YMB-1-E | 乳癌 | ZR-75 1 | 乳癌 | | 可 |
| 26 | JCRB1013 | KA-S1 | 腎盂癌 | mouse | マウス | | 不可 |
| 27 | JCRB1047 | OVSAYO | 卵巣癌 | OVMIU | 相互取違えの可能性 ^{#7} | | 可 |
| 28 | JCRB1049 | OVMIU | 卵巣癌 | OVSAYO | 相互取違えの可能性 ^{#7} | | 可 |
| 29 | JCRB1050 | OVMIU-II | 卵巣癌 | なし | 相互取違えの可能性 ^{#7} | | 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 | 甲状腺腫 (女) | IHH-1 | 甲状腺腫 (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 ^{#8} |

(次ページに続く)

- ※1 細胞番号を示す記号。IFOは発酵研究所, JCRBは厚生労働省細胞バンク, RCBは理研細胞バンク。
- ※2 STR-PCR実験により(2)の細胞と同一細胞であると識別された細胞。樹立年や該当研究室への聞き取り調査を行い、実在していないと推定した細胞をこの欄に記載した。推定にあたっては両細胞の樹立年を重視し、(1)欄に記載した細胞を樹立する際に(2)欄に示した細胞が該当研究室に存在していたか否かを重視した。
- ※3 (1)の推定の結果、実在していると思われる細胞をこちらの欄に記載した。
- ※4 どちらかが正しい細胞が判明していない。SK-MG-1がMarcusの別名で、RERF-LC-OKが誤って同定された細胞である可能性も否定できない。
- ※5 JCRB0172.1 RMG-IIはユニークなのでJCRB株を分譲している。
- ※6 IFO50089: Flow2000はユニークなのでこの株を分譲している。
- ※7 OVMIUとOVMIU-IIは同一人から採取したと記載されているにもかかわらずSTR分析の結果、別人由来であることが確認されたが、同じ寄託者によって寄託された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 ^{#1} | 細胞名 ^{#2} | 細胞の由来 | 実在細胞名 ^{#3} | 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 | ^{#9} | 不可 |
| 41 | RCB0100 | HL111783 肺癌 | HeLa | 子宮頸癌 | 18) | 不可 |
| 42 | RCB0110 | SQ-5 肺癌 | HeLa | 子宮頸癌 | 18) | 不可 |
| 43 | RCB0223 | PSV811 ウェルナー症候群患者 上皮線維芽細胞 | WI-38 | 胎児肺正常細胞 | ^{#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 | | 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 | | 不可 |
| 53 | RCB0553 | Intestine 407 小腸上皮細胞 | HeLa | 子宮頸癌 | ^{#9} | 不可 |
| 54 | RCB0640 | TCO-1 子宮頸癌 | TCS | 子宮頸癌 | 18) | 不可 |
| 55 | RCB0656 | HKMUS 子宮頸癌 | SKG-II | 子宮頸癌 | 18) | 不可 |
| 56 | RCB0686 | HKMUS-SF 子宮頸癌 | SKG-II | 子宮頸癌 | 18) | 不可 |
| 57 | RCB0712 | KMT-2 臍帯血由来単球系細胞 | KG-1 | 急性骨髄性白血病 | 18) | 不可 |
| 58 | RCB0726 | IMC-2 上顎癌(男) | HeLa | 子宮頸癌 | ^{#10} | 不可 |
| 59 | RCB0727 | IMC-3 上顎癌(男) | HeLa | 子宮頸癌 | ^{#10} | 不可 |
| 60 | RCB0728 | IMC-4 上顎癌(男) | HeLa | 子宮頸癌 | ^{#10} | 不可 |
| 61 | RCB0885 | GT3TKB 胃癌 | RERF-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 | HuL-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-B 乳癌 | ZR-75-1 (CRL1500) | 乳癌 | | 不可 |
| 84 | RCB1984 | CoLo-1C 大腸癌 | COLO205 | 大腸癌 | | 不可 |
| 85 | RCB2096 | PK-8 肺癌 | 不明 | RCB1961 直腸癌と一致 | | 不可 |
| 86 | RCB2137 | EJ-1 膀胱癌(男) | T24 | 膀胱癌(女) | 13) 14) ^{#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 | HE15 胎児由来線維芽細胞 | HE13 | 胎児由来線維芽細胞 | | 不可 |
| 89 | RCB2274 | H-1H 口腔癌 | HeLa | 子宮頸癌 | | 不可 |
| 90 | RCB2275 | HSGc-C5 唾液腺(男) | HeLa | 子宮頸癌 | ^{#9} | 不可 |
| 91 | RCB2349 | USAC 骨肉腫 | mouse | マウス | | 不可 |

※ 9 JCRB の調査と理研の調査で同じ結果となったもの。

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

おわりに

以上、クロスコンタミネーションが発生する原因と対応策についてのヒントを示したがぜひ参考に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) Jeffreys, A. J. et al. : Nature, 316 : 76-79, 1985
- 7) Hammond, H. A. et al. : Am. J. Hum. Genet., 55 : 175-189, 1994
- 8) Kimpton, C. P. et al. : PCR Methods Appl., 3 : 13-22, 1993
- 9) Masters, J. R. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 : 8012-8017, 2001
- 10) Chatterjee, R. : Science, 315 : 928-931, 2007
- 11) Hourna, M. et al. : In Vitro Cell Dev. Biol., 28A : 24-28, 1992
- 12) Lavappa, K. S. et al. : Am. J. Hum. Genet., 29 : 67A-67A, 1977
- 13) Tanabe, H. et al. : Tiss. Cult. Res. Commun., 18 : 329-338, 1999
- 14) O'Toole, C. M. et al. : Nature, 301 : 429-439, 1983
- 15) Dirks, W. G. et al. : In Vitro Cell Dev. Biol. Anim, 35 : 558-559, 1999
- 16) Drexler, H. G. et al. : Blood, 98 : 3495-3496, 2001
- 17) Chen, T. R. et al. : Cancer Genet. Cytogenet., 81 : 103-108, 1995
- 18) Yoshino, K. et al. : Hum. Cell., 19 : 43-48, 2006

Profile

著者プロフィール

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