

研究では、細胞バンクが保有するあるいは今後新たに寄託される培養細胞株の全数検査に使用する事が可能な実用的な新規ウイルス検査系を確立することを目的として研究を行なっている。本年度は、RT-PCR法を応用した新規ウイルスRNAの検査系を構築することを目的に研究を行った。

B: 研究方法

1. ウイルスゲノムの増幅

ウイルスゲノムRNAをRT-PCR法により増幅した。

- ・逆転写反応: 50°C30分処理
- ・PCR反応: 95°C15分処理の後、94°C15秒, 60°C60秒の反応を45サイクルで行なった。
- ・PCR試薬: QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen)
- ・プライマー: 通常のオリゴマーを使用 (配列は別途記載)
- プローブ: Taqman Probeを使用 (配列を別途記載)

2. 検査プレートの作成

ウイルスに対するプライマー、プローブと安定化剤としてトレハロースの混合溶液を作成した。96ウェルプレートを使用し5 μ l/well (プライマー、プローブミックス1.5 μ l, 1Mトレハロース二水和物 0.25 μ l, ヌクレアーゼフリーH₂O 3.25 μ l) の割合でマルチピペッターにより混合液を分注した (1ウェルで1種類のウイルスを測定するため、1ウェルに1種類の検査対象ウイルス用のプライマー、プローブを加える)。分注後遠心機で1000rpm, 1秒間遠心し、暗所に置いた真空デシケーター内で暗所一晚放置して乾燥させた。なお、PCR反応が進んでいることを示す陽性コントロールとして細胞遺伝子 β -actin mRNAの測定を行なった。

3. RT-PCRによる測定方法

・Master Mix 組成

RNA Sample	20 μ l
2xBuffer	25 μ l
RT-Taq	0.5 μ l
RNase Free Water	4.5 μ l

- a. 各ウェル2mlの96ウェルリザーバーを使用し、Master Mixを330 μ lとサンプルまたは陽性コントロール220 μ lを混合する。その際、サンプルのRNA濃度が1 μ g/ウェルになるように調整する。
- c. マルチピペッターで3回ピペッティングした後、あらかじめ作成した検査用96ウェルプレートに分注する。
- d. シールをして1000rpm, 3秒間遠心する。プレートを逆さにして1分間放置後、シェーカーでさらに1分振とうして、サンプルとプライマー・プローブをよく混合したのちRT-PCR反応を開始する。
- e. RT-PCR反応後、結果を解析して、ウイルスの有無および量 (半定量) を測定する。

4. プライマー、プローブ配列

★ β -actin

F- cttccttctctgggcat

R- tcttcattgtgctgggt

P- FAM- tccgcaaagacctgtacgcccaacac -iowaBk

★HAV

F- Rggtaggctacgggtgaaacc

R- gccgctgttacccatccaa

P- FAM- tacttctatgaagagatgc -MGB

★HCV

F- gtctagccatggcgttagta

R- ctgcgaagcaccctatcaggcagt

P- FAM- tgcggaaccggttagt -MGB

★HEV

F- ggtggtttctggggtgac

R- aggggttggttgatgaa
 P- FAM-tgattctcagcccttcgc-MGB
 ★HGV
 F- cggccaaaaggtggtgatg
 R- cggtagggccaacacctgtgga
 P-FAM-cagggttgtaggtcgtaaatcccgtca-iowa
 BK
 ★HTLV-1 & -2
 SHTF- ggccacctgtccagagca
 R1- ctgagccgataacgcgtcca
 R2- ctgagctgacaacgcgtcca
 P1- FAM-Mtcacctgggaccccatcgatgga-TAMRA
 ★HIV-1
 F1- ggacatcaagcagcYatgcaaag
 F2- ggacaccaRgcagctatgcaaag
 R1- tgctatRtacttccccttggttctct
 R2- tgctatatcacttcccctaggttcct
 R3- tgctatatcactcccctaggttctct
 P- FAM-achatcaatgaggaagctgcagaa-MGB
 ★HIV-2
 F- gcaggtagagcctgggtgttc
 R - cttgcttctaaYtggcagctttatt
 P- FAM-tgggcagaYggctccacgc-TAMRA

4. 検査系の感度、特異性の検討

(1) スタンダード作成

各種ウイルスの PCR 産物をクローニングしシーケンスにて配列確認した後、制限酵素 Sal I (T7 RNA polymerase の場合) または Nco I (SP6 RNA polymerase の場合) 消化した後一本鎖にし、フェノールクロロホルム処理・エタノール沈殿後、OD 値を測定した。RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems (プロメガ) により RNA を合成し、添付のマニュアルに従い、鋳型 DNA の分解後に RNA 精製した。バイオアナライザー 2100 (アジレント) にて合成した RNA 定量と純度測定した。結果より

濃度算出してコピー数をもとめ、ロシュ社製 MS2RNA 10ng/ul 溶液にて段階希釈液を作成した。

(2) 感度測定

各種ウイルスが陰性なことを確認した細胞 RNA (1 μg/well) に、作成した各種スタンダード 50 Copy を加えたもの感度測定に用いた。

(3) 特異性の確認

各種ウイルスプライマー、プローブ配列の相同性を GenBank にて検索し特異性を確認した。またプライマー、プローブ配列を引用した文献で実験的に特異性が調べられている場合は、文献の結果を採用した。陽性コントロールと特定のウイルスが検出された臨床検体を用いて、お互いの交差反応性の有無の確認をした。

(倫理面への配慮)

ウイルス検査系のバリデーションを行う際にはウイルス陽性の臨床検体を使用した。その際患者検体は匿名化した上で受け取り、患者の個人情報と解析結果との連結が不可能なように配慮した。また、ウイルス検査以外の検査(遺伝子検査など)は一切行わないこととした。

C: 結果

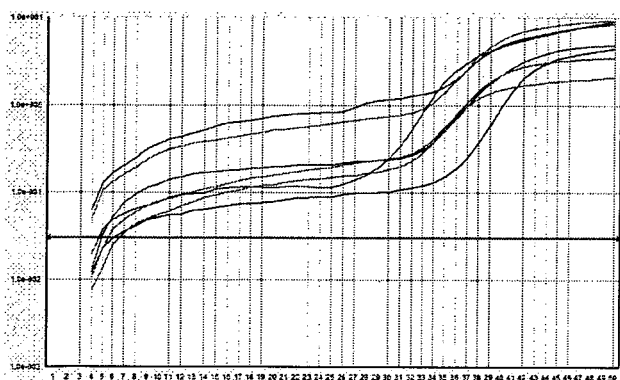
1. 検査対象細胞およびウイルスの選定

検査対象として下記のウイルスを選定した。
 1. A 型肝炎ウイルス (HAV) 2. C 型肝炎ウイルス (HCV) 3. E 型肝炎ウイルス (HEV) 4. G 型肝炎ウイルス (HGV) 5. ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 6. 同 2 型 (HTLV-2) 7. ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) 8. 同 2 型 (HIV-2)。9. またヒト遺伝子 β-actin mRNA の検出系を測定系が正しく動いていることを示すポジティブコントロールとして加え

た。

2. 検査系の感度測定

検査系の感度を測定するため、被検ウイルス陰性が確認されている細胞の RNA $1\mu\text{g}$ に各ウイルスのスタンダード RNA を 50 コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作成した。作成したサンプルを使用した検討の結果、ウイルススタンダードを加えなかった場合は全て陰性だったが、ウイルススタンダード RNA を加えたサンプルは、すべて陽性シグナルが検出され、測定系は全てのウイルスに対して 50 コピー/ウェルの測定感度を持つことが確認された（下図参照）。



図の説明：HAV, HCV, HEV, HGV, HTLV-1, HTLV-2, HIV-1, HIV-2 のウイルスを 50 コピー加えたサンプルをそれぞれ測定した結果を同時に表示した結果。バックグラウンドにばらつきはあるものの、すべてのウイルスを 50 コピー/ウェル以上の感度で検出可能だった。

3. 特異性（交差反応性）の検討

検査結果が陽性の際に他のウイルスが誤って検出される交差反応の有無を確認するため、被検ウイルス陰性が確認されている細胞の RNA $1\mu\text{g}$ に各ウイルスのスタンダード RNA を 100~10000 コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作成した。測定の結果は、

例えば HAV のスタンダード RNA ウイルスを加えた場合には HAV の測定用ウェルからのみ陽性シグナルを検出できたが、他のウイルス検出用のウェルからは陽性シグナルが検出できず、全て陰性と判定された。検査対象の 8 種につき同様の測定を行なったが、すべてスタンダード RNA を加えたウイルスの検出用ウェルのみ陽性で、他の 7 種類のウイルス検出用ウェルは陰性だった。したがって、検査対象の 8 種類のウイルスに関しては交差反応性が無く、検査系が特異的にウイルスを検出できていることが示された。

HAV, HCV, HEV, HGV, HIV1, HIV2 のプライマーおよびプローブは各ウイルスサブタイプ（下記）と配列が一致しており、対応するサブタイプの検出が可能と考えられる。

HAV: 1A, 1B, 2, 3A, 7

HCV: 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 2i, 2k, 3a, 3b, 3k,
4a, 5a, 6a, 6b, 6d, 6g, 6h, 6k, 10a, 11a

HEV: 1, 2, 3, 4

HGV: GBV/C-2a, -2b, -3

HTLV1: 1a, 1c

HTLV2: 2a, 2b

HIV1: M group A, B, C, D, E, F, G, H

HIV2: A, AB

HIV1 については NIBSC: National Institution for Biological Standards and Control から入手した HIV-1 Genotype Panel (NIBSC code 01/466) を用いてサブタイプが検出可能か確認した。HIV1 陽性血清および陰性血清から RNA 抽出後に RT-PCR にて定量した。その結果、本検出系によりメジャーな HIV-1 サブタイプである M グループをすべて検出でき、定量結果もほぼ同等の結果だった。しかし、O および N グループは検出できなかった。また陰性

血清は本検査系による検査でも陰性の結果が得られた。

HIV-2 については、J Virol Methods. 135(1): 102-8. 2006 より引用した。

HIV-2 genotype A (strain ROD), genotype B (strain EHO) は検出し可能だった。また特異性について検討したところ、HBV, HCV 及び HIV1 genotype A-F, M, O は陰性だった。

HEV については、J Virol Methods. 131:65-71, 2006 より引用した。HEV のサブタイプ 1-4 は全て検出可能だったが、HAV (1A, 1B, 2A, 2B, 3), Norovirus (G1, G2), Adenovirus (2, 5, 40, 41), Echovirus (1, 27, 29), Rotavirus (Group A), Coxsackievirus (A8, A10, B3, B4) は検出せず、特異性に問題はなかった。

D: 結論

RT-PCR 法を応用した RNA ウイルスの実用的検査法を開発し、バンクが保有している培養細胞に対するウイルス検査体制を確立することを目的に研究を行った。その結果、RNA ウイルスを 50 コピー/well の感度で同時・半定量測定系の開発を行い、8 種類のウイルス RNA (HIV-1, -2, HTLV-1, -2, HAV, HCV, HEV, GBV) の検出系を作成した。

E: 健康危険情報

なし

F: 研究発表

1. Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T, Akao N, Morio T, Mochizuki M. Identification of human herpesvirus 6 variant A in a patient with unilateral panuveitis. *Arch.of Ophthalmol.* in press.

2. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *Br. J. Ophthalmol.* in press.

3. Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of EBV DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Jap.J. Ophthalmol.* in press.

4. Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan Z, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, and Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R γ null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral Immune Responses. *Blood.* 109:212-218, 2007.

5. Kawaguchi T, Sugita S, Shimizu N and Mochizuki M. Kinetics of aqueous flare, intraocular pressure and virus-DNA copies in a patient with cytomegalovirus iridocyclitis without retinitis. *Int. Ophthalmol.* 27:383- 386, 2007.

6. Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N and Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2R γ null mice transplanted with hematopoietic stem cell under non-myeloablative condition show prolonged life spans and allow detailed analysis of HIV-1 pathogenesis. *J.Virol.* 81:13259-13264, 2007.

7. Kanno H., Watabe S, Shimizu N. and Sawai T. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clin.Exp.Immunol.* 151:519-527, 2007.

学会発表

1. 山本紗也香、杉田 直、岩永洋一、白井友香、菅本良治、望月 學、清水則夫、森尾友宏：急性網膜壊死（ARN）の眼内液のPCR法を用いたヘルペスウイルス遺伝子同定 第41回日本眼炎症学会 2007年7月 東京
2. 宮永 将、川口龍史、杉田 直、望月 學、清水則夫、森尾友宏、宮田和典：経時的に前房水ウイルス量を測定したサイトメガロウイルス前部ぶどう膜炎の1例 第41回日本眼炎症学会 2007年7月 東京
3. 木戸さやか、杉田 直、川口龍史、岩永洋一、望月 學、清水則夫、森尾友宏、宮永 将、宮田和典：VZV虹彩毛様体炎における前房水中のVZV-DNAコピー量と臨床所見との関連性 第41回日本眼炎症学会 2007年7月 東京
4. 木戸さやか、杉田 直、二神百合、堀江真太郎、岩永洋一、佐々木秀次、望月 學、清水則夫、森尾友宏：経過中に上皮型ヘルペスを合併した角膜内皮炎の4症例 第61回日本臨床眼科学会 2007年10月 京都
5. 鴨居功樹、杉田 直、木戸さやか、堀江真太郎、菅本良治、望月 學、清水則夫、森 浩士、宮永 将、宮田和典：皮膚症状を伴わない水痘带状疱疹ウイルス（VZV）虹彩毛様体炎の3例 第61回日本臨床眼科学会 2007年10月 京都
6. 清水則夫 森尾友宏、滝澤淳、渡邊健、水上美樹：口腔内骨膜を用いた組織培養におけるマイコプラズマ菌の検出 第7回再生医療学会総会 2008年3月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

わが国におけるヒト研究資源バンクの現状と今後

——JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) 細胞バンク (厚生労働省) から

水澤 博 (写真) 小原有弘 増井 徹

(独) 医薬基盤研究所生物資源研究部細胞資源研究室



厚生労働省研究資源バンクは、“対がん 10 ヶ年総合戦略研究”に質の高い培養細胞と遺伝子材料を提供する目的で、国立衛生試験所(現・国立医薬品食品衛生研究所)と国立予防衛生研究所(現・国立感染症研究所)に設置された(1985年)。当時、癌遺伝子の発見に触発され、癌と遺伝子のかかわりに注目が集まり、一気に癌を追い詰めようという機運が高まった時期であった。

研究の推進にあたって、日本の研究体制の脆弱さがたびたび指摘されていたことから、研究材料を分譲する部門を整備して癌研究の推進が試みられたのであった。近年、研究は巨大化してスピードが求められるようになってきており、ひとりの研究者が材料の準備から実験までのすべてにかかわることは困難となり、それぞれの専門機関を育成して分業化をはかる必要があるとわが国でも考えられるようになってきたが、システムの構成力に優れたアメリカでは1950年代から、Coriell Institute for Medical Research (CIMR) や American Type Culture Collection (ATCC) などの細胞分譲機関を整備し、生命科学研究の推進に役立てていた。1980年代に顕在化した経済摩擦は先進諸国に知的資産の囲い込みを促し、多くの国で研究資源バンク設置が進んだ。

わが国で研究資源バンク事業がスタートするとすぐに、培養細胞研究資源は重大な問題を抱えていることが判明した。それはマイコプラズマによる“汚染”と細胞の“誤謬”の問題であったが、研究資源バンクは単に研究材料を収集して提供するだけでなく、収集して提供するまでの間に十分な吟味を加え資源の品質を十分に見極めるところに本質的な意義があることが明らかになってきたのである。1960年代にアメリカで顕在化したヒト培養細胞への HeLa コンタミの解決に ATCC が果たした役割からも明らかであった。著者らは日本で収集した600種のヒト細胞の8%に誤謬があったことを明らかにし、日本人は器用で間違いを犯さないと信じているとしたらそれは迷信であると注意を促している。

その後、ヒトゲノムプロジェクトによりヒト遺伝子の全塩基配列が明らかにされ、細胞の品質管理法に大

きな影響を与えたが、培養細胞の誤謬を防止する目的で実施してきた遺伝子検査が細胞提供者のプライバシーを損なうかもしれないというおそれが出てきてしまったのである。現在のところ収集したヒト培養細胞は600種程度なので問題にはならないが、今後、生存中の方々からの試料提供を受ける必要が生じるようになると問題が顕在化すると考えられる。現在でも SNP 研究用の健康人1,000名分の対照実験用ゲノム DNA (PSC, JBIC 寄託不死化血液細胞と DNA) については、そのおそれを考えて細胞の誤謬を確認するためのデータをとらないことにしている¹⁾。

さらに問題となりそうな点は、インフォームドコンセントの範囲内で利用するという考え方である。もちろん、患者さんの立場ではインフォームドコンセントで許可した以上の使い方をしてほしくないことは十分理解できるが、一方で研究というのは予想もしなかった点から新しい発見があつて、それが人類の知識を増やして疾病の治療を可能にするのである。したがって、予想外の研究に使ってはならないという規制は、研究者にとってたいへんきびしい内容で、今後議論が必要となるのではないだろうか。

現在、提供しているおもなヒト試料は論文などで公知されたものなので、心配している問題は起こらないが、今後、本特集で話題になるような細胞や移植医療に直結するようなヒト試料が多数寄託される時代がくると、こうした問題が顕在化する可能性がある。だからといって問題が指摘されるまで手をこまねいて待つだけではわれわれに課せられた責任を果たせそうもないので、ヒト試料を扱う際に問題となりそうな倫理的課題についても研究課題と位置づけて検討を進め、ホームページ²⁾を通じて問題点を掲載し、掲示板を通じて批判的意見もいただけるようなシステムを整えている。現在、細胞バンクにヒト試料を扱うことに対する批判が直接来ているわけではないが、問題があると考えられる以上、批判をいただけるようなチャンネルを開いておくことは重要であろう。

1) 水澤 博・他：科学，71：1601-1607，2001。

2) <http://cellbank.nibio.go.jp/>

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づきにくい。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* (モリキューテス) 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

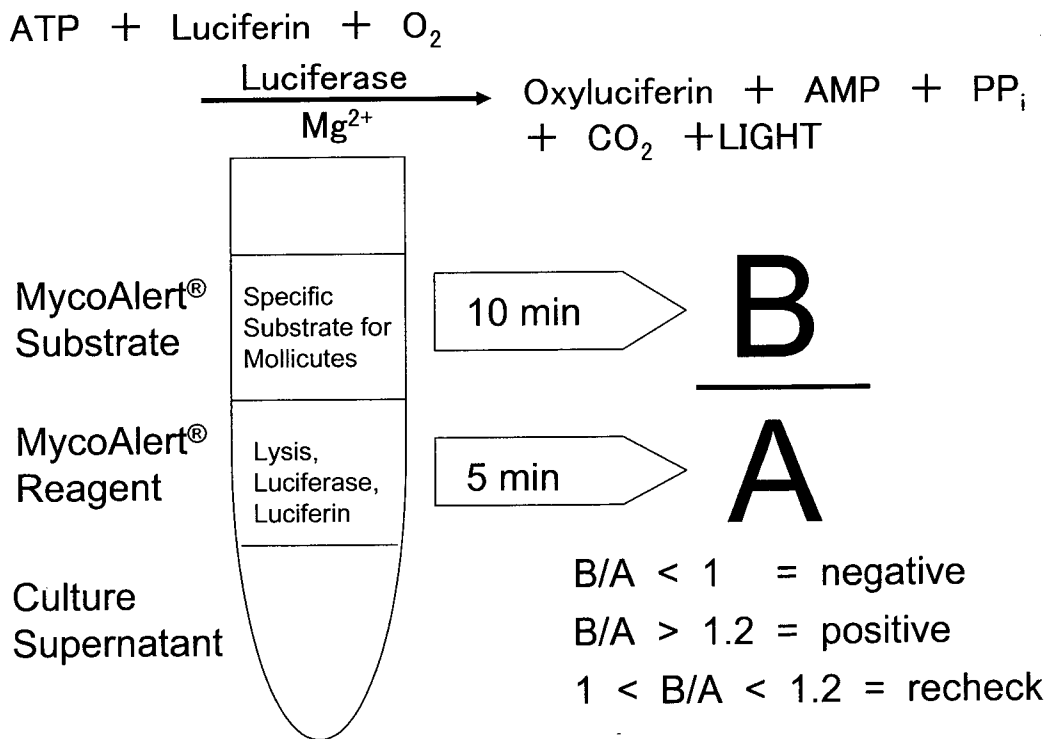


図 1 測定の原理と結果の判定

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。

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、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 μ L 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 μ L）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ば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用があろう。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。

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®". 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®

−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: 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ない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)。

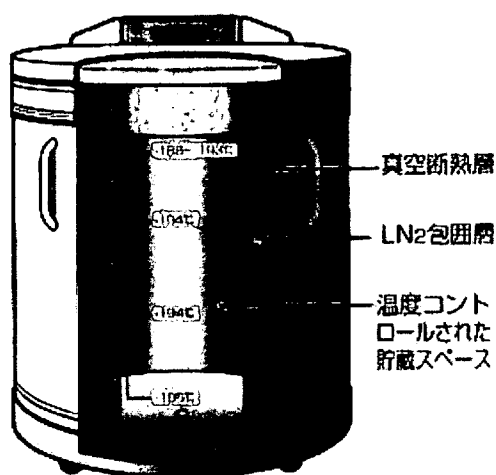
もう一つの方式は、タンクの内装に使う金属を従来のステンレスから熱伝導率の高いアルミニウムなどに変更する方法である。この方式を取っ

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)。

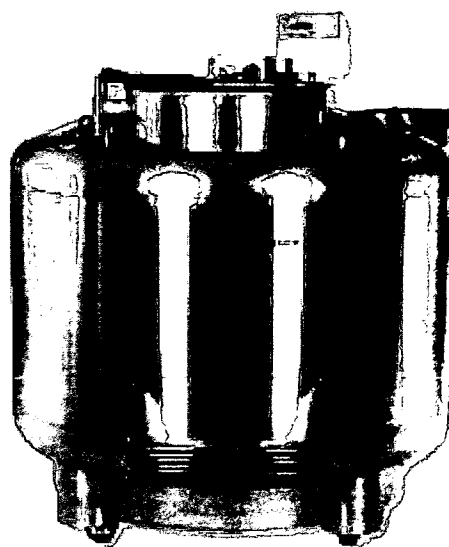
この容器を使うに先立って、我々は、ラックを出し入れする際のラック温度の変化やアンプル内

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°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) のエターンシリーズで材質の改良により -190°C を実現した。

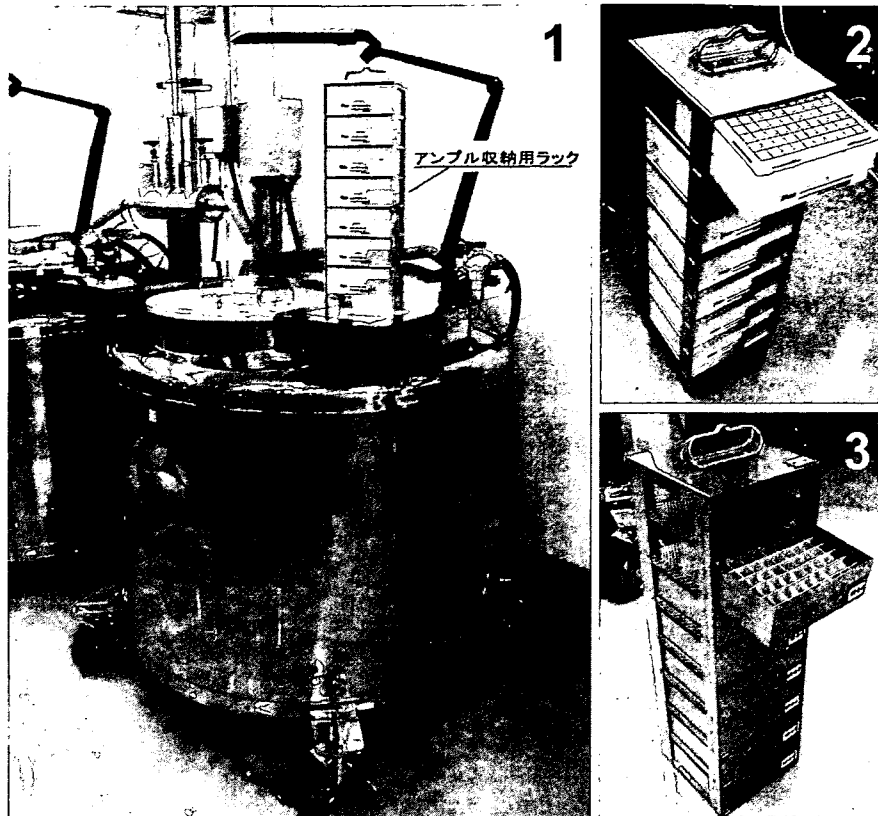


図2 G430S型液体窒素細胞保存容器とラック

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、中絶、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

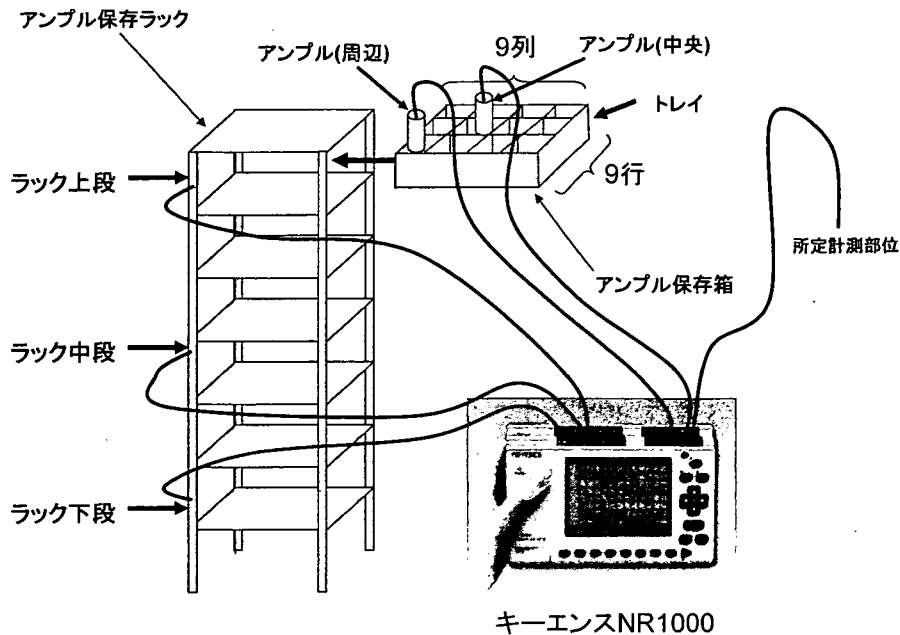


図 3 温度測定部位

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。

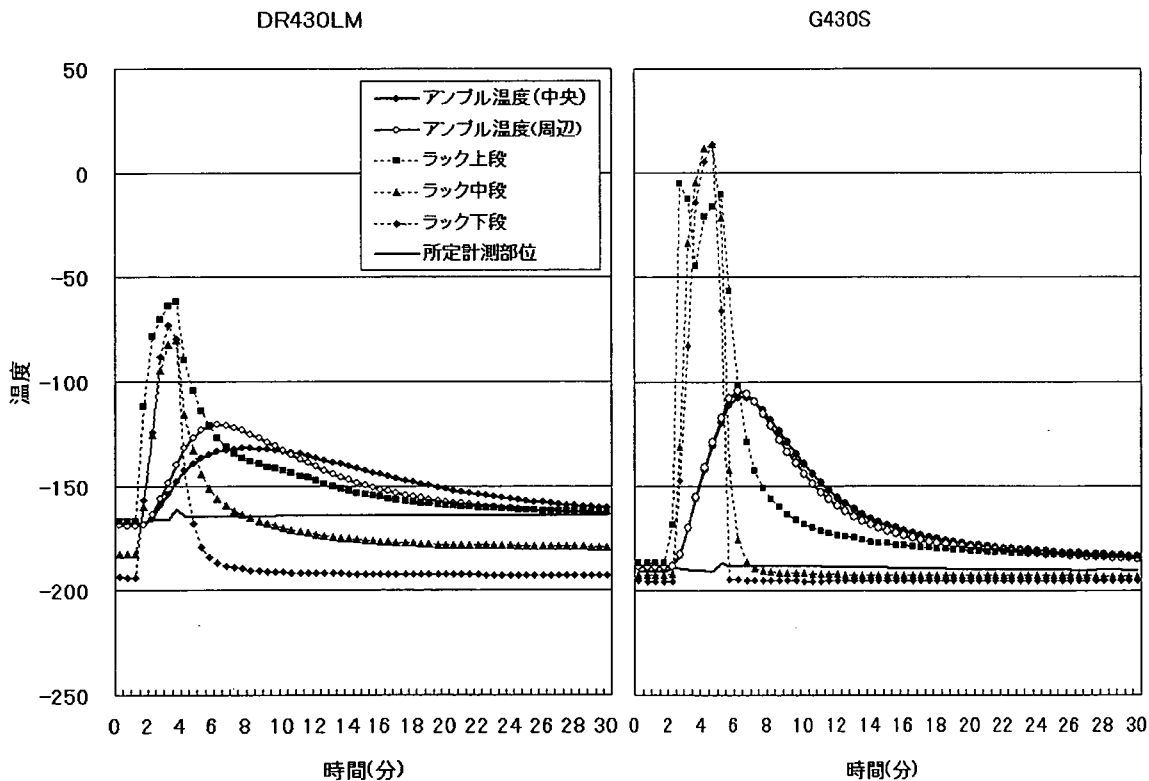


図 4 測定結果

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開けて 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。

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

Hiroshi Mizusawa¹⁾, Tohru Masui, Masao Takeuchi, Arihiro Kohara

¹⁾ 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°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

JCRB 細胞バンク：厚生労働省

小原有弘、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 (JCRB 細胞バンク)〕

機関名：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 (JCRB 細胞バンク)

URL：http://cellbank.nibio.go.jp/

I. リソースの特徴

培養細胞は生命科学研究にとって必要不可欠な研究資源として十分に認識されており、非常に広範な研究に利用されるリソースとなっている。細胞は生物の最も基本的な構成単位であり、生命現象を再現できる最小単位が細胞であると言える。細胞は培養条件を制御することにより増殖させたり、機能を持った細胞へ分化させることも可能である。細胞を用いた研究は多岐に渡っているが大きく3つの研究に分けられる。第1に培養細胞を生体の模倣として使用し、培養細胞内で起こる事象を解析することで、生体内で起こっていることをより詳しく解明する研究。第2に遺伝子導入や遺伝子ノックアウトなど生体内とは異なる環境・状況を培養細胞で構築し、その解析を行うことで作り出した環境・状況が生体に与える影響を考える研究。第3に培養細胞を抗体産生や生理活性物質生産などのツールとして使用する研究。これら3つの研究において細胞が万能であるとは言えないが非常に有用な研究資源と言える。以前はよく増殖し、広く頒布しやすい癌細胞などの株化細胞が研究に広く

利用されていたが、近年はヒトへの医療応用や治療法開発に向けて、機能や分化能をある程度維持したヒト由来の正常細胞や遺伝子導入細胞、不死化細胞の研究利用ニーズが高く、新たな研究資源の開発も進んでいる。

II. リソースの整備状況

JCRB 細胞バンクは1985年、厚生労働省（当時の厚生省）によって我が国初の細胞バンクとして設立され、生命科学研究全体の発展とともに細胞バンク事業も発展してきた。現在の登録細胞数は1,018種類（2007年6月）で、主にヒト由来細胞（622種類、61%）がコレクションされ厚生労働行政に資する研究に利用されている。また、2007年より京都大学放射線生物研究センターで収集された高発癌性遺伝病患者由来細胞1,999株（表1）の分譲を開始した。JCRB 細胞バンクでは高品質な細胞提供を行っており、マイコプラズマなどの微生物汚染検査、細胞のクロスコンタミネーション（細胞の入れ替わり）などを検査する細胞個別識別検査、染色体解析、性状検査などの品質管理を実施し、ガラスアンブルに細胞を封入した状態で液体窒素保存容器に保管した

表1. 高発癌性遺伝病患者由来細胞コレクション

疾患名	株数	疾患名	株数	疾患名	株数
網膜芽細胞腫	651	家族性白血病	23	甲状腺髄様癌	5
色素性乾皮症	411	ブルーム症候群	20	色素失調症	4
ファンconi貧血	232	ポイツ・イエーガー症候群	19	色素異常症	4
再生不良性貧血	124	疣贅状表皮発育異常症	14	基底細胞母斑症候群	4
コケイン症候群	83	シップル症候群	13	肝芽腫	4
毛細血管拡張性運動失調症	82	ダウン症候群	12	ベックウィズ・ウィーデマン症候群	4
家族性大腸ポリポーシス	71	ロスムンド・トムソン症候群	9	その他	159
先天性異常・先天性奇形	43	ガードナー症候群	8		

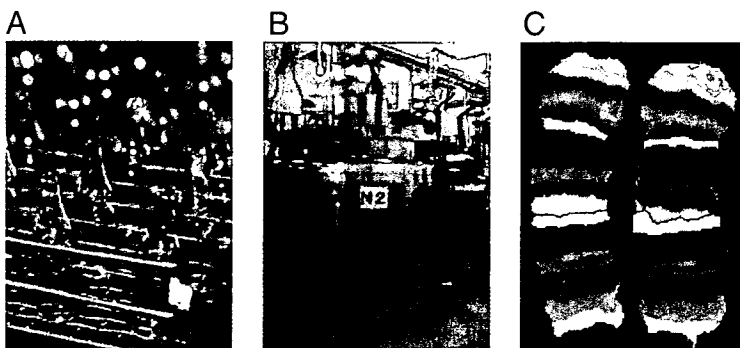


図1. JCRB 細胞バンクでの細胞品質に関わる取り組み

A: 高品質な細胞アンブル。

B: 超低温（液体窒素）細胞凍結保存容器。

C: mBand 法による染色体詳細解析。

細胞を分譲している。年間に分譲するアンプル数は3,000を超えて年々増加する傾向にあり、2006年度は3,529アンプルであった。また、リソースを海外に分譲する体制も十分に確立しており、年間250アンプル程度を欧米を中心に分譲しているが、近年はアジア諸国への分譲も増加している。

III. 国際連携

海外ではATCC (American Type Culture Collection) や ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures) に代表される細胞バンクが点在しており、非常に多くの細胞を保有している。海外のバンクとはJCRB細胞バンク設立当初より緊密に情報交換を行っており、クロスカルチャーコンタミネーションのデータは共通利用できるフォーマットを用いて連携して情報提供を行っている。また、The Society for In Vitro Biology においては細胞バンク委員会が設置され、品質管理方法の標準化や標準株の基準などに関して議論が進められている。その他国際共同研究としてHeLa細胞のクロスコンタミネーション状況に関する調査を実施し報告を行い、経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development; OECD) においては連携してガイドライン (Human Derived Material Best Practice) を制定するべく活動し、国際連携が積極的に行われている。

IV. 細胞資源の品質に関する調査と研究例

1. マイコプラズマによる細胞の汚染

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あり、培養細胞と共存して増殖するが、汚染しても培地が濁ったりしないので混入に気づきにくい。汚染した細胞のタンパク質の25%、DNAの25%程度はマイコプラズマ由来のものと考えられ、細胞の増殖や遺伝子発現など多くの細胞機能に影響を与えることが報告されている。2007年に簡易検査法 (Cambrex社製, MycoAlert™) による全国調査を行った結果、900検体中197検体 (約22%) において陽性判定となり、研究室で使われている細胞の汚染が深刻な問題となっていることが明らかとなった。

2. STR (short tandem repeat) 解析によるヒト由来細胞個別識別

STR解析はゲノム中に存在する2~数個の塩基から成る繰り返し配列 [(CAG)_n, (GC)_n など] の繰り返し回数に個人差があることから、その出現回数を分析することによって個体を識別する方法である。本方法を用いて収集したヒト由来の培養細胞に関する調査を実施してデータを蓄積し、

“ヒト培養細胞識別データベース”を構築した。本調査研究においてヒト培養細胞には意外と多くのクロスカルチャーコンタミネーションが発生していると明らかになった。これまでJCRB細胞バンクで収集した、ヒトに由来する培養細胞数は622種であるが、そのうち33種 (約5%) にクロスカルチャーコンタミネーションが見つかったのである。この結果は詳細な実験手法を含めてJCRB細胞バンクのホームページで公開しているのぜひ参考にさせていただきたい (<http://cellbank.nibio.go.jp/> のCellIDの欄に公開している)。

3. 染色体詳細解析による細胞特性解析

JCRB細胞バンクでは、高度な染色体詳細解析技術 (mFISH法, mBand法, アレイCGH法など) を組み合わせることで細胞の特性を解析している。不死化したヒト間葉系幹細胞における染色体詳細解析では、不死化のために導入した遺伝子の種類によっては、長期培養することにより非常に大きな染色体変化をもたらすことが明らかとなり、この結果は再生医療の実現を目指して様々に取り組まれている研究における基礎知見として重要であると考えられる¹⁾。また、研究に用いた染色体を詳細に解析する技術が、今後再生医療に用いられる種々の細胞の品質評価技術として発展することが期待される。

おわりに

細胞はすでに広く研究に活用される研究資源となっているが、一般の研究者は使用している細胞のマイコプラズマ汚染やクロスコンタミネーションなどの品質管理に手が回らないのが現状である。研究の再現性・信頼性向上のためにも、細胞の質に今一度注目し、細胞バンクに保存されている高品質な細胞を研究に利用されることを希望したい。

文献

- 1) Takeuchi M, et al: In Vitro Cell Dev Biol Anim (2007) 43: 129-138

小原有弘 (Arihiro Kohara)

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 (JCRB細胞バンク)

E-mail: kohara@nibio.go.jp

2002年名古屋市立大学大学院薬学研究科博士課程修了、博士 (薬学)。第一化学薬品株式会社薬物動態研究所、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部を経て、2005年より現所属、研究員。

水澤 博 (Hiroshi Mizusawa)

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 (JCRB細胞バンク)

E-mail: mizusawa@nibio.go.jp

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⁾)