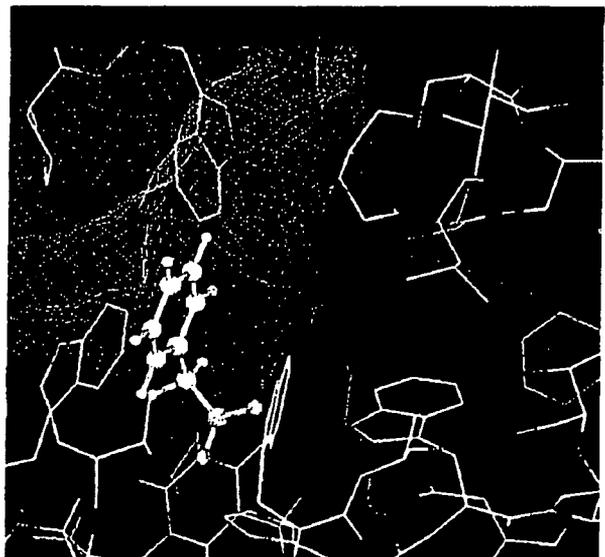
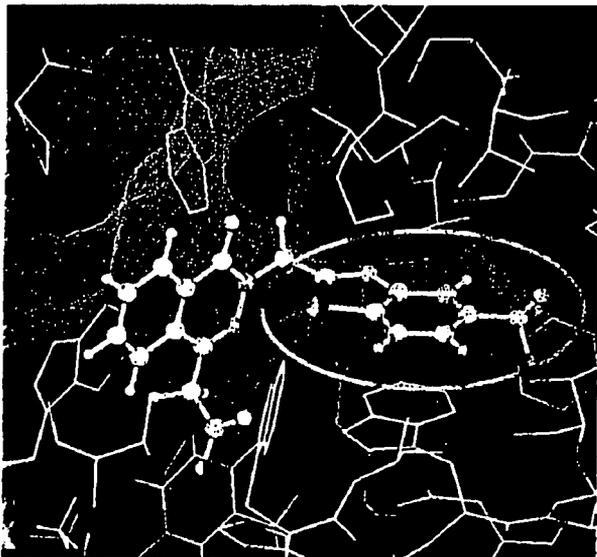


●図3 標的蛋白と類縁蛋白の結合キャビティの違いから選択性向上の指針が得られる  
MAPキナーゼ p38 に強い選択性を示すリガンドの、標的蛋白 p38 との結合様式 (左) と、同じ蛋白ファミリーの ERK2 との結合様式 (右) との比較。

カゴ状の表示はリガンド結合領域。p38 に特徴的な疎水性ポケット (赤線で囲んだ領域) が、ERK2 では小さくはっきりしない。リガンド結合キャビティの形状や性質の違い、それに伴うリガンドの推定結合様式の違いから、選択性向上の方向性を検討できる。



●図4 蛋白質はリガンドの有無や種類に応じて誘導適合を起こす

グルコース還元酵素で見られる誘導適合。強力な阻害剤ゾポルレスタットとの複合体結晶構造に見られる特異的サブポケット (左図、赤線で囲んだ領域) が、弱い阻害活性を示すフェニル酢酸との複合体では完全に閉じて無くなっている (右図)。蛋白構造のコンフォメーション変化によるものであるが、大きな誘導適合を理論的に予測することは難しい。

結合して活性を発現し得るリガンド候補を推定するアプローチである。ここで選別された少数の有望な候補化合物を入手し活性測定を行うことで、新規な骨格構造を持った、医薬開発の出発化合物を得ることができる。バーチャルスクリーニングでは、ごく少数の興味を持った化合物だけを扱う自動ドッキングと違って、サイズも骨格構造も物理化学的な性質も全く異なる多種多様な化合物群を、一律の条件でドッキングし、それぞれの標的蛋白への結合性を推定する必要がある。さらに、蛋白質はリガンドの有無や種類に応じて誘導適合を起こし、側鎖を中心に多かれ少なかれコンフォメーションが変化することにも注意しなければならない。(図4)。これらの困難な問題をクリアする有効な方法論の開発と、個々の標的蛋白の性質や目指す作用機序、目的、状況に応じた適切な戦略立案・条件設定を行うことが、論理的分子設計からの創薬の成功に欠かせない。

## ■ おわりに

筆者らは、現在までに20種類以上の酵素や受容体を標的にバーチャルスクリーニングを行い、それぞれの系で数多くの活性化合物を発見してきた<sup>23)</sup>。特に、I $\kappa$ Bキナーゼ $\beta$ の系においては、標的蛋白のモデリングからスタートして、バーチャルスクリーニング、シード化合物の発見、合成展開、前臨床試験のステップを踏み、英国でのフェーズI試験も無事に終了した。現在は、フェーズII前期試験を実施中である。論理的分子設計の実戦的創薬における威力が実証されつつある。

作用機序や標的蛋白を設定してスタートする現代の医薬開発に、論理的合理的な方法論と戦略は必須である。論理的分子設計は、21世紀の創薬の成功をもたらす大きな柱として、ますますの進歩と有効な活用が期待される。

## 文 献

- 1) Mizutani MY, et al: Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. *J Mol Biol* **243**: 310-326, 1994.
- 2) Mizutani MY, Itai A: Efficient method for high-throughput virtual screening based on flexible docking: Discovery of novel acetylcholinesterase inhibitors. *J Med Chem* **47**: 4818-4828, 2004.
- 3) Iwata Y, et al: Discovery of novel aldose reductase inhibitors using a protein structure-based approach: 3D-database search followed by design and synthesis. *J Med Chem* **44**: 1718-1728, 2001.



# 蛋白構造と論理的分子設計 に基づく創薬

Drug discovery based on protein structure and rational drug design

武藤 進・水谷実穂・板井昭子  
株式会社医薬分子設計研究所



武藤 進 (むとう すすむ)  
1987年静岡大学大学院理学研究科修士課程修了。専攻は有機合成化学。同年持田製薬株式会社入社。'98年株式会社医薬分子設計研究所に入社し、論理的分子設計による創薬研究に従事する。2001年創薬研究部長。'05年より、創薬研究専業部長。

## Key Words:

論理的創薬, バーチャルスクリーニング, HTS, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ Bキナーゼ $\beta$ (IKK $\beta$ )

## Abstract

株式会社医薬分子設計研究所 (IMMD) では長い間、標的蛋白の三次元構造を用いた独自の計算シミュレーションにより、論理的に医薬分子を設計する方法を研究してきた。最近の数年間この方法を用いて創薬研究を展開してきた結果、臨床第2相試験に入ったものも含め、いくつかの開発候補品を見出すことに成功しており、蛋白構造を利用した論理的創薬手法の有用性を実証できたと考えている。

## はじめに

株式会社医薬分子設計研究所 (IMMD) は分子の三次元構造を用いた独自の計算シミュレーションによる論理的医薬分子設計法に基づく創薬をコア技術とする会社である。長い間、分子設計理論とソフトウェアの開発と改良を行ってきた結果、特に標的蛋白の立体構造が利用可能な場合には信頼性高く分子設計と論理的創薬が展開できるようになってきた。任意の化合物について標的蛋白質との最安定複合体構造とその安定性を推定するドッキングスタディは、蛋白立体構造に基づく論理的分子設計法の中で最重要な技術である。

当社では世界ではじめてリガンド側の配座の自由度を考慮した自動ドッキング法の開発に成功し、さらにこの方法を利用して標的蛋白に対する結合

の強さの推定に基づいて膨大な化合物の三次元構造データベースから有望な化合物を選別するバーチャルスクリーニング (*in silico*スクリーニングともいう) 法の開発に成功した。蛋白立体構造としては、そのものずばりの結晶構造がないときにはコンピュータ上で類縁蛋白の結晶構造を鋳型に構築したモデリング構造を用いることができる。当社ではここ数年、これらの方法に合成・アッセイを組合わせた論理的創薬手法により実際に創薬を行ってきた。

## バーチャルスクリーニングの優位性

当社のバーチャルスクリーニングでは、データベース中の各化合物について、自動ドッキング法で推定した標的蛋白との安定複合体構造と安定性が予め設定したヒットの条件 (安定性や水素結合の数や特定部位の水素結合の形成) をクリアする化合物をさらに構造の薬らしさ等種々の条件を考慮することで選別した少数の有望なリガンド候補のみを入手して測定することで多数の医薬リードを発見することができる。通常30万程度の化合物を含むデータベースから100ヶ程度の有望な化合物を選別し入手して測定すると、数十ヶの独立の

Susumu Muto, Miho Mizutani, Akiko Itai  
Institute of Medicinal Molecular Design Inc.

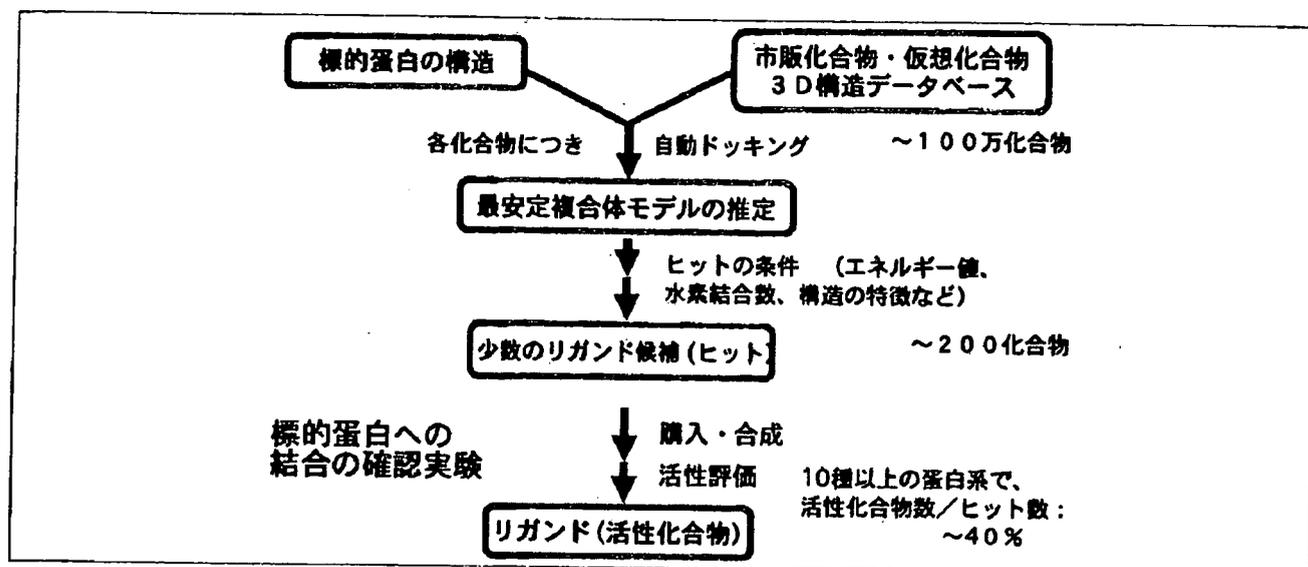


図1 IMMDの *in silico* スクリーニング

現在当社で行っている典型的なリガンド探索の戦略。バーチャルスクリーニングから100~200個の化合物を選択しアッセイを行う。通常この中から、~50個ほどのヒット化合物が得られる。

分子骨格の活性化化合物が得られる (図1)。そのうちの1ヶを選んで合成展開の出発点とし、設計・合成・アッセイの繰返しによって医薬として望ましい活性・物性をもち、毒性のない化合物を探索するという点では、HTSからのシードを出発点とする創薬と似ているように見えるが、実は以下に述べるような大きな違いがある。

近年殆どの製薬企業では、シード探索をHigh Throughput Screening (HTS) に頼っている。HTSはロボットを用いて、膨大な数の化合物を高効率に自動的にアッセイするものであり、多くの活性化化合物が見つかることが多いものの、欠点も多い。まず膨大な化合物を用意しておき片端から測るために、化合物に関わる費用やランニングコストが高い、膨大な化合物を測定するためにアッセイの精度や信頼性が低い、膨大な化合物を用意するために物性の悪いコンビ合成化合物をかなりの程度含めているのでそこから当たりが出やすいが創薬の出発点にしにくい、活性化化合物が多数あっても結合様式がわからないためにどうしても活性に引きずられてシーズを選ぶことになりその後の合成展開に失敗しがち等々である。

一方、バーチャルスクリーニングでは、安定性 (分子内・分子間エネルギー) の評価と共に標的蛋白との予想複合体構造が得られるので、アッセイ

対象のリガンド候補を選別する際にも、また活性化化合物群から最適化の対象とするシードを選ぶ際にも、結合様式、重要な相互作用や官能基、合成の容易さ、最適化における構造展開の可能性その他の有用な情報が得られる (図2)。そのため、HTSからスタートする創薬に比べて成功率が高く、効率的で、コストが安く済む。推定結合様式から合成展開の方針が示唆されるので、実用段階までの最適化が少ない合成で短期間で可能である。

このようにバーチャルスクリーニングに基づく創薬には利点が多いが、当社では独自に開発してきたソフトウェアを用いて成功しており、市販ソフトウェアを導入して形だけ真似ても決して成功しない。分子設計の問題は、2次方程式を解くのと違って、唯一解が存在するわけではなく、どんな手順によっても同じ解に行き着くということはない。例えば自動ドッキング法という同じ呼び名を冠していても、基づくコンセプトや科学的理解によって、さらにはソフトウェアへの実装法によって計算結果が大きく異なり、有用な解が得られないことが多い。

#### ■当社における成功例

多くの炎症アレルギー性慢性疾患についてNFκBの関与が知られている。NFκBは、細胞質中に存在

### 標的蛋白質との最安定複合体モデルの推定

- エネルギーその他により、有望なりガンドを選別
- 複合体モデルに基づき構造最適化

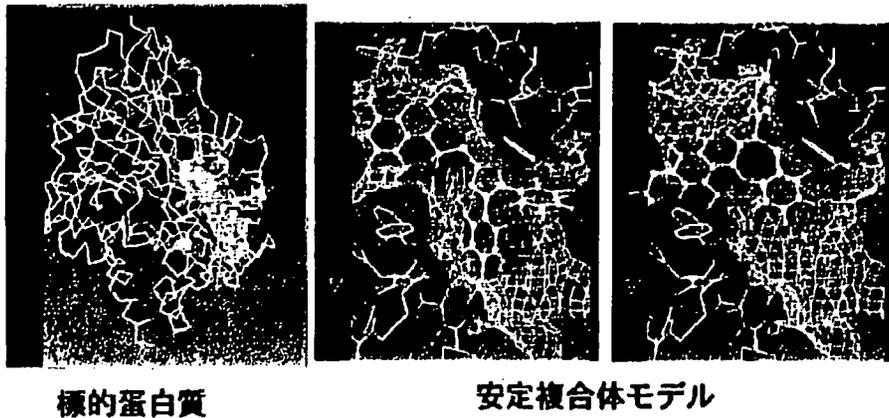


図2 *in silico* スクリーニングでの複合体モデルの例

図中の網目模様は蛋白質のキャビティの形状を示している。研究者は、この図から視覚的に最適化の方向性を容易に知ることができ、化合物の展開性も併せて評価が可能である。

する不活性化NFκB-IκB複合体中のIκBがTNFα等の刺激で活性化されたIκBキナーゼβ(IKKβ)によりリン酸化されると、遊離（活性化）し核内に移行してTNFα等炎症性サイトカインを転写産生する。それらが細胞外に出てまた刺激として働くことで炎症が慢性化し増悪するフィードバックシステムが知られている（図3）。そこで、著者らはNFκB活性化抑制に基づく慢性疾患の治療薬開発を目指してIKKβ阻害剤の開発を行った。

IKKβはkinase domain(KD), leucine zipper domain(LD), helix loop helix domain(HLH)の3つのドメインからなっている。IKKβのキナーゼ活性はKDにあるが、KDのアミノ酸配列が酷似しているにも拘らず、サリチレートがIKKαに全く阻害作用を示さずIKKβを選択的に阻害すること<sup>1)</sup>、及びαとβのHLHを交換するとサリチレートを結合できなくなることから、KDの活性はHLHの直接的制御を受けていると推定される<sup>2, 3)</sup>。また、intactなIKKβは単体では存在せず、IKKαとIKKβとIKKγ2ヶからなる複雑な複合体を形成し<sup>4)</sup>、さらにこの複合体がTNFα等の刺激により不活性化状態から活性化状態に変化するなど複雑な制御と構造変化を受けていること<sup>5)</sup>が示唆されている。

まず、IKKβのキナーゼドメインの立体構造をコンピュータ上で構築し、ATP結合サイトに結合する阻害剤を以下のような手順で設計した。まず、GenbankからIKKβの配列を検索し、次にBLAST検索により蛋白質結晶構造のデータベースであるプロテインデータバンク(PDB)からIKKβの配列との相同性が比較的高い(30%強)配列をもつ2つの蛋白キナーゼ(CamK, PKA)を鋳型として選び、更に、アスピリンの予想結合モードを基にHLHを付加し、IKKβのキナーゼドメインのモデリング構造を得た。次に、約20万市販化合物の3次元構造データベースを対象に、当社独自開発の自動ドッキングに基づくバーチャルスクリーニング法<sup>6, 7)</sup>を用いて検索し、独立な構造をもつ119ヶのリガンド候補を選別した。

これらの化合物を購入し、TNFαの存在下でレポーターアッセイを行ったところ、50μg/mLの濃度で50%以上の阻害率を示す化合物が39ヶ見つかった。結合様式、構造の薬らしさ、合成の容易さその他を考慮して、そのうちの1ヶを出発点として選び、最適化合成を行った結果、HEK293細胞においてTNFα存在下(20ng/mL)でIC<sub>50</sub>=11 nMのNFκB活性化抑制作用を示すIMD-0354を見出すことがで

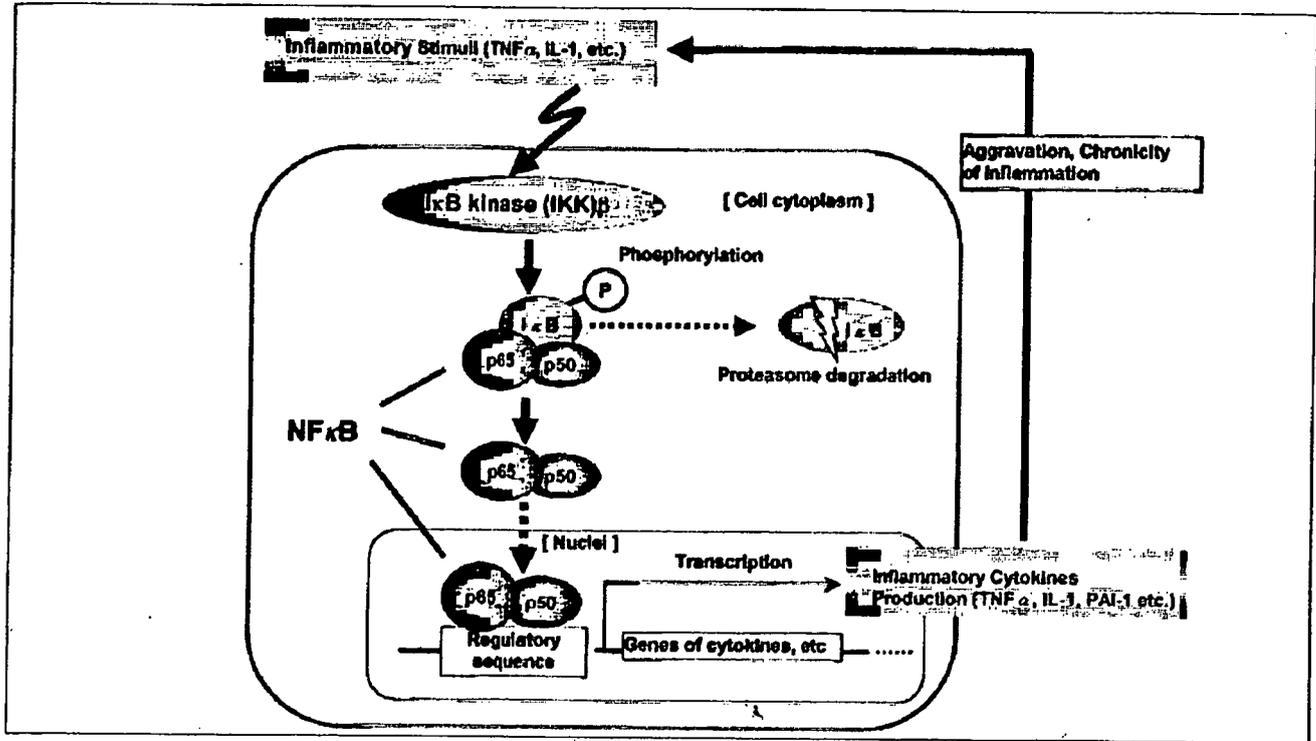


図3 NFκB活性化カスケード

炎症性刺激により働くNFκBの主要な活性化カスケードで、活性化（リン酸化）されたIKKがNFκB-IκB複合体のIκBをリン酸化することで、IκBの分解を促し、NFκBを遊離、活性化する。このカスケードは、正常な細胞中では働いていないため、このカスケードの選択的阻害薬は、副作用のない抗炎症薬となる可能性が高い。

きた<sup>8-10)</sup>。IMD-0354はIKKβ阻害剤として文献から予想される通りの幅広い作用と薬効を示した。現在IMD-0354及びその経口投与用prodrugであるIMD-1041について、臨床第1相試験を終了し、臨床第2相試験を実施中である。

また別の例として、国内の製薬会社との代謝性疾患治療薬の開発を目的とした共同研究において、蛋白結晶構造を利用した論理的創薬を行い、非常に短期間で開発候補品レベルの化合物の創製に成功した。この例は蛋白結晶構造と自動ドッキング・バーチャルスクリーニングを用いた論理的創薬の利点が発揮された典型的な例である。このプロジェクトでは、活性の強さや結合様式以外に、物性、展開性も考慮して評価しリード選択を行った。バーチャルスクリーニングから発見した活性化化合物群からリードとして選んだのは、推定結合様式、物性、展開性いずれも良いにも拘らず、測定感度ぎりぎりの低い活性しか示さない化合物であったが、推定結合様式に基づいて合成展開を行った結果、約3ヶ月で1000倍程度の活性の向上がみられ、約半年で開発化合物のレベルにまでするこ

とができた。

#### ■終りに

上記のように論理的創薬は非常に有用性の高い技術であり、サイズで劣るわが国の製薬企業が国際競争を生き抜くためには必須と思われる。しかし、結晶構造解析される蛋白質の著しい増加により応用対象が広がったにも拘らず、製薬企業の取組みは十分でない。論理的創薬で成功するためには優れたソフトウェアだけでなく、蛋白質の構造と機能、そしてリガンドとの相互作用の正しい理解に基づく新しい創薬科学の確立が必須であり、古典的な要素技術の伝達に留まっている薬学教育のあり方にも問題があると思われる。

#### 参考文献

- 1) Yin, MJ. *et al.*: Nature, 396 : 77-80, 1998
- 2) Delhase *et al.*: Science, 284 : 309-313, 1999
- 3) Kwak UT *et al.*: J. Biol. Chem., 275 : 14752-14759, 2000
- 4) Miller, B.S. *et al.*: J. Bio. Chem., 276 : 36320-36326, 2001
- 5) Zandi, E. *et al.*: Mol. Cell. Biol., 19 : 4547-4551, 1999
- 6) Mizutani, M. Y. *et al.*: J. Mol. Biol., 243 : 310-326, 1994
- 7) Mizutani, M. Y. *et al.*: J. Med. Chem., 47 : 4818-4828, 2004
- 8) Onai Y. *et al.*: Cardiovasc Res., 63 : 51-9, 2004
- 9) Kamon J. *et al.*: Biochem Biophys Res Commun., 323 : 242-8, 2004
- 10) Tanaka A. *et al.*: Blood, 105 : 2324-2331, 2005

## 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説明する研究。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、ガラスアンプ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	ロスモンド・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		

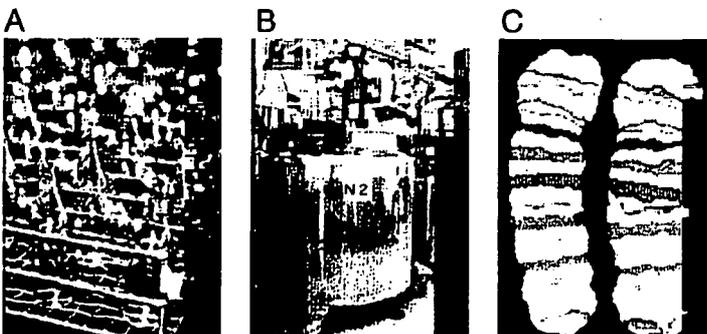


図1. JCRB細胞バンクでの細胞品質に関わる取り組み

A: 高品質な細胞アンプル。

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)<sub>n</sub>, (GC)<sub>n</sub> 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でぜひ参考にしていただきたい (<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<sup>1)</sup>。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

## 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 カ年総合戦略研究”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 寄託不活化血液細胞と 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<sup>1)</sup>。

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<sup>2)</sup>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<sup>1,2)</sup>、大谷 梓<sup>1)</sup>、小澤 裕<sup>1)</sup>、塩田 節子<sup>1)</sup>、増井 徹<sup>1)</sup>、水澤 博<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 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

<sup>2)</sup> 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  $\mu\text{m}$  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. hyorhinae* (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す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

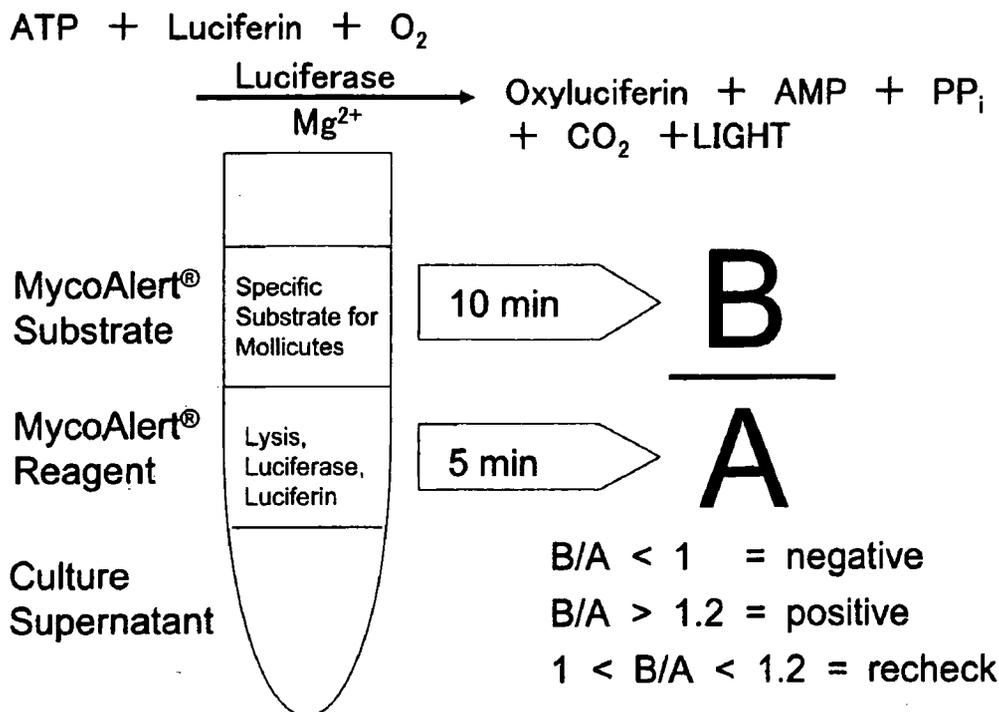


図 1 測定原理と結果の判定

測定に用いるのは培養上清 100  $\mu\text{L}$  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。

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<sup>1,2)</sup>。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)。

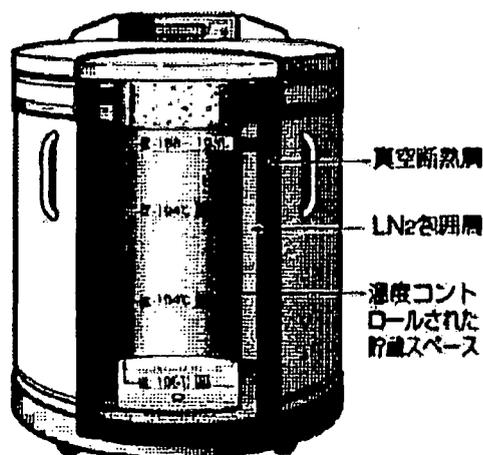
もう一つの方式は、タンクの内装に使う金属を従来のステンレスから熱伝導率の高いアルミニウムなどに変更する方法である。この方式を取っ

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)。

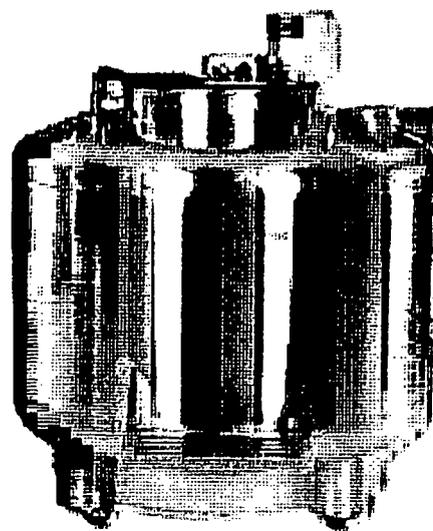
この容器を使うに先立って、我々は、ラックを出し入れする際のラック温度の変化やアンプル内

## 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ます。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。

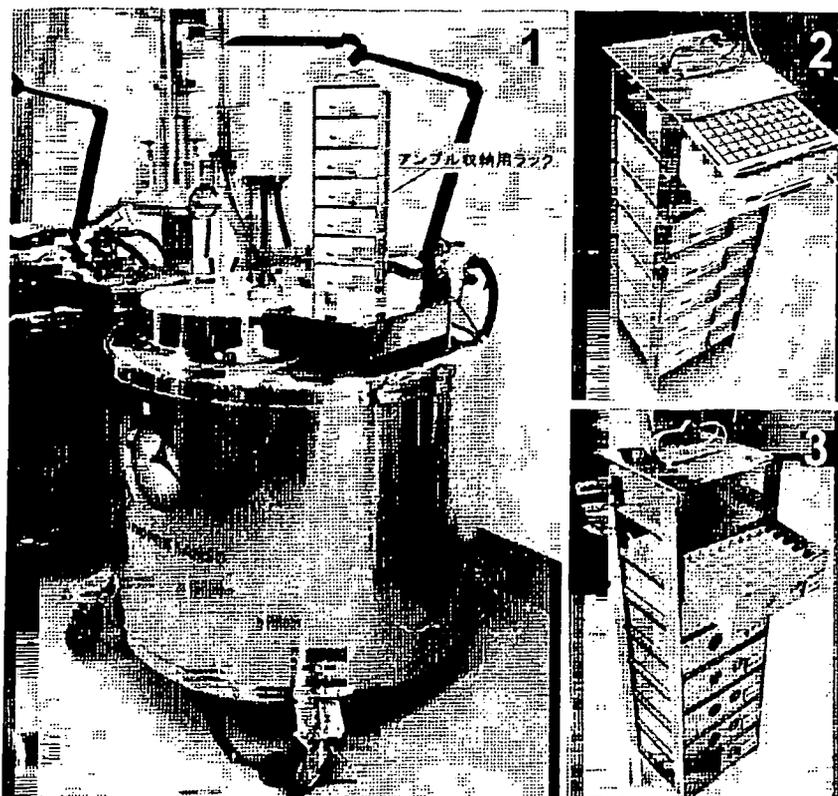


図 2 G430S 型液体窒素細胞保存容器とラック

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  $-186^{\circ}\text{C}$  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

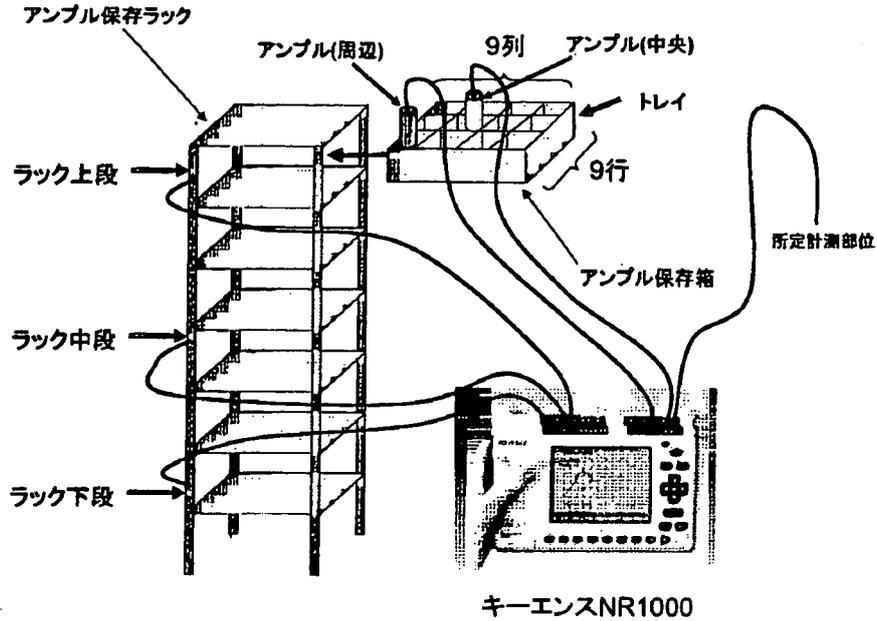


図 3 温度測定部位

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。

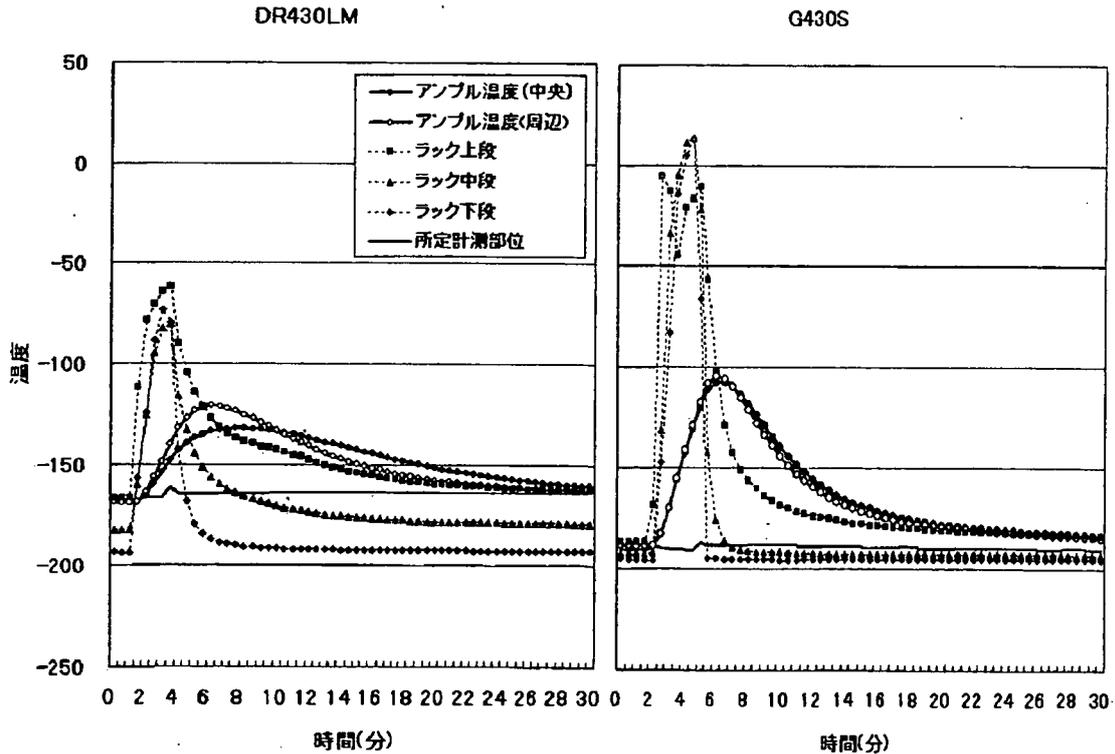


図 4 測定結果

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。

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 $-190^{\circ}\text{C}$

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