

[5] 細胞培養中のマイコプラズマ・ウイルス対策

はじめに

細胞培養を行う上で注意を払わなければならないのが、微生物やウイルスの混入である。細菌や真菌などは培養液に混入すると、培地の濁りや変色などによって目視が可能であり、あまり問題とならない。一方でマイコプラズマ・ウイルスに関しては、その大きさが非常に微小であるために光学顕微鏡を使用しても検出することができない。このようなマイコプラズマ・ウイルスの混入を防ぐことは非常に重要であるが、あまり注意を払われていないのが現状である。細胞培養中に混入するマイコプラズマ・ウイルスについて正しい知識を身につけ、その検査法導入や混入防止対策を立てることが再生医療事業において今後重要な課題であり、再生医療実現には、これらの微生物に対する安全性を保証するために検討した方策、実施した試験や評価結果を明らかにし、その妥当性を示す必要がある。本項においては細胞培養中のマイコプラズマ・ウイルスに関してその対策法を概説する。

1. マイコプラズマ

マイコプラズマ (Mycoplasmas) とは自己増殖能をもつ、極めて小さい微生物であって、その大きさは一般に細菌の1/10 くらいの単細胞生物である。細菌と異なるところは細菌の形態を決定している細胞壁を持たないため細胞の形状に可塑性があり、0.22 μm フィルターを通過する。そのため、ろ過滅菌による細胞培養用培地の作製においては、マイコプラズマによるコンタミネーション (汚染) が見られることがある。細菌や真菌の汚染では培地が濁ることなどで目視することができるが、マイコプラズマのコンタミネーションでは顕微鏡下であっても小さすぎて目視することができない。また細胞傷害活性を示すことは少なく細胞膜に付着して培養細胞と共存し、不顕性感染を示すことが多いためコンタミネーションの発生を見逃しやすい。一方で、マイコプラズマのコンタミネーションによる培養細胞への影響としては、成長阻害、代謝経路への影響、遺伝子発現への影響などが確認されている。そのため、汚染細胞を用いて医薬品開発や再生医療が実施されると、重大な事態を招く可能性がある。一度マイコプラズマに汚染された細胞から完全にマイコプラズマを除去することは極めて困難である。したがって、マイコプラズマ汚染をさせない細胞培養技術、培養環境の整備は非常に重要である。本項ではマイコプラズマ汚染対策について概略を記す。

1.1 細胞培養において問題となるマイコプラズマ

マイコプラズマは *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Spiroplasma* およびその他の種を含むモリキュート綱に属しており、180 種類以上が登録されている。しかし、細胞培養中に混入が報告されているマイコプラズマ種は非常に少なく、6 種類程度でその汚染の96%を占めていると言われている。一方で、ヒトに対して病原性を示すマイコプラズマとして *M.pneumoniae* が有名であり、これらのマイコプラズマを検出可能な検査系で検査を実施することが求められる。

表1 細胞培養中に検出される主なマイコプラズマ

Strain	Host	Region
<i>M. arginini</i>	bovine · goat	oral cavity · urogenitalis
<i>M. fermentans</i>	human	urogenitalis
<i>M. hyorhinis</i>	pig	nasal cavity
<i>M. orale</i>	human	oral cavity
<i>A.laidlawii</i>	bovine	oral cavity · urogenitalis
<i>M. salivarium</i>	human	oral cavity

1.2 マイコプラズマ汚染検査法

マイコプラズマ否定試験としては直接培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法、PCR 法が利用されており、近年リアルタイム PCR 法などの検査キットも販売されるようになった。これらの検査方法は日本薬局方をはじめとして、ヨーロッパ薬局方、WHO ガイドラインなど多くの公定書に収載されており、医薬品製造に用いる細胞基材及び最終製品に対しては、マイコプラズマ否定試験を行うことが必要である。

直接培養法は、マイコプラズマを培養・増殖させて顕微鏡下、寒天平板培地上でコロニー形成を観察することにより判定する直接的検出法である。本方法が最も確実な検査方法であると言えるが、培養が難しいマイコプラズマへの対応や 14～21 日間の長期培養が必要なことを考えると、再生医療事業において一般化できる方法とは言えない。

DNA 染色法は、指標細胞を用いてマイコプラズマを増殖させ、DNA 特異的蛍光色素により染色し、マイコプラズマを細胞核外の微小な DNA 蛍光斑点として検出する方法である。しかし、DNA 染色はマイコプラズマ特異的な染色ではないため、断片化した核酸などを同時に染色してしまい、汚染を判定するときに紛らわしい場合もある。

PCR 法はマイコプラズマ特異的なプライマーを使用して高感度にマイコプラズマの混入を判定することができるが、プライマーによって検出できるマイコプラズマの種類に限界があるとともに、PCR によって核酸が増幅されたとしてもそれが非特異的な核酸増幅であったり、死んでいるマイコプラズマであったりすることも考えられる。

このようにいずれの方法においても長所短所が存在していることを理解し、2 種類以上の検査方法を組み合わせて検査を行い、偽陰性となるような状況を避けなければならない。今後はリアルタイム PCR 法を始め、多くの高感度検査法が開発されると考えられるが、検査の妥当性・合理性を説明できる検査を実施し、医薬品開発や再生医療におけるマイコプラズマ否定試験がより簡便・迅速かつ正確に実施できる体制を現場において確立することが重要である。

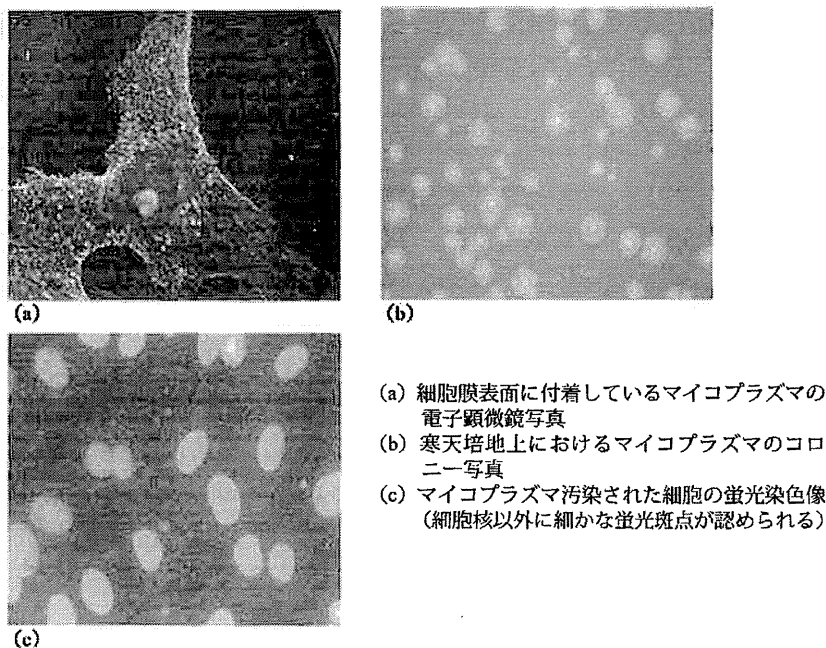


図 1

1.3 マイコプラズマ汚染対策

細胞培養中に見つかるマイコプラズマの混入経路を考えると、材料となるドナー組織・細胞がマイコプラズマの元々の宿主であり汚染していたか、細胞を培養する過程において人為的に混入（汚染細胞からの二次汚染、汚染試薬・培地の使用、実験者からの汚染など）させてしまったかのどちらかが考えられる。我々が行ったマイコプラズマ汚染調査では、研究に使用している細胞の 26% がマイコプラズマに汚染されていることが明らかとなっている。このことから考えてもマイコプラズマ汚染は深刻であり、対策を講じて汚染の拡大を阻止しなければならない。また、ウシやブタを自然宿主とするマイコプラズマ種の汚染が非常に多いことも判明した。これは実験者が宿主となって持ち込むマイコプラ

ズマはそれほど多くなく、既に汚染している細胞から水平に拡大させていることを示唆する結果である。

表2 研究に使用している細胞のマイコプラズマ汚染全国調査結果

検体提供機関	検体数	陽性検体数	汚染率
大学 (12 大学)	2434	681	28.0%
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	2788	727	26.1%

この調査を踏まえ、汚染対策を考えると、細胞を扱う実験者への正しい知識・技術の普及が不可欠であり、汚染を拡大させないためにも自分が取り扱う細胞のマイコプラズマ汚染検査を普段から実施するとともに、汚染させないための培養手技の徹底や培養環境・細胞保存環境の見直しを行うことが必要である。

1.4 マイコプラズマ除去法

細胞がマイコプラズマに汚染されてしまった場合は、細胞バンクなどから細胞を再度入手することを強く勧める。マイコプラズマを除去するには多くの時間と労力を要し、細胞に特性変化がないかを調べることも必要である。非常に貴重な細胞であったり、特別な細胞である場合にはマイコプラズマ除去を実践するが、良く使用されるのがキノロン系の抗生物質である。マイコプラズマは細胞壁をもたない微生物であるため、ペニシリンなどの薬剤は効果がない。また、マイコプラズマに効果のある薬剤 2 種類程度併用しなければ除染できないマイコプラズマも存在し、大変な作業となる。しかも一度マイコプラズマが除去できたと思っても、培養を継続していると再びマイコプラズマが検出されることが多々見受けられる。したがってマイコプラズマ除去にはキノロン系の薬剤を選択し、所定の薬剤処理期間を経たのち、1 か月程度継続培養を行い、マイコプラズマが完全に除去出来ていることを確認するとともに、細胞の特性変化がないかを確認することが必要である。このような除去方法を用いることでほとんどのマイコプラズマを除去することが可能である。

2. ウイルス

細胞培養中のウイルスに対する対策は、細胞を取り扱う実験者の身を守るためにも、また医薬品開発・再生医療事業における最終製品の安全性を担保する上でも非常に重要となる。これまでも薬害エイズ事件、ポリオワクチンへのSV40 混入など、ウイルス汚染による重大事件が起こっていることから考えると、ウイルスによる製品の汚染は人命にかかわる重要なものであり、しっかりとした対策を講じる必要がある。

ウイルスは生命の最小単位である細胞を持たないので、生物学上は非生物とされている。他の生物の細胞を利用して自己複製を行う微小な構造体で、タンパク質の殻とその内部に入っている核酸からなる。ウイルスといっても自然界における宿主も様々であり、非常に多くの種類が存在するので、その全てにおいて対策を講ずることが困難である。ICH ガイドラインにおいては、ウイルス面から見た安全性を確保する方策として主に考慮すべき事項が挙げられている。1) ウイルス汚染の可能性(汚染源)について熟知しておくこと、2) ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような細胞および試薬を選択すること、3) 使用する細胞に関して徹底的な解析を行い、ウイルスの存在の有無及び存在するウイルスの種類・性質について検討すること、4) ウイルスやウイルス様粒子が存在した場合、ヒトへの有害性が高いかを検討・確認すること、5) 製品製造工程においてウイルス否定試験を実施すること、6) ウイルスクリアランスを最大限達成するために製造工程中にウイルスの除去・不活性化に関する各種の方法を用いること、7) ウイルスクリアランス試験計画を立てること、8) ウイルス不活性化及び除去を評価する試験を実施し、評価すること。これらの方策による安全性確保のあり方について概説する。

2.1 細胞培養において問題となるウイルス

ウイルスの種類は非常に多岐にわたるが、細胞培養中に混入する経路から考えると細胞培養において問題となるウイルスを捉えやすい。①細胞樹立時の由来動物・由来組織におけるウイルス感染からの混入、②細胞株を樹立するためのウイルス使用（ウイルスによる細胞不死化、目的の遺伝子発現を誘導するためのウイルス使用等）、③汚染された生物起源由来の試薬の使用、④細胞取り扱い中における汚染。これらに対してしっかりとした対策を立てることが求められる。医薬品製造に用いられる細胞においても内在性のレトロウイルス、その他のウイルスあるいはウイルス由来の塩基配列を含むことが知られているものがある。しかし、これらの内在性レトロウイルスを含む細胞は、その後の対応を適切に行うことで使用可能とされている。また、内在性のレトロウイルス以外のウイルスを含有した細胞の使用可否は規制当局がその都度、考慮・判断し、製品使用におけるリスク／ベネフィットのバランスを勘案し、判断される。

2.2 ウイルス検査法

細胞のウイルス検査はマスターセルバンク（MCB）、ワーキングセルバンク（WCB）、細胞齢の上限まで培養した細胞（CAL）の各段階において内在性ウイルスおよび外来性ウイルスに関する試験を実施する必要がある。特に CAL における試験は MCB、WCB では発見できなかったものを長期間培養した段階で検出する可能性があるとして重要視される。内在性ウイルスや外来性ウイルスを検出するための試験には様々なものがある。代表的な試験の例を表3に示す。中でも電子顕微鏡観察はウイルス、細菌、マイコプラズマ等を検出するのに極めて重要な検査方法であり、厚生労働省指針、FDA、ICH のいずれのガイドラインでも広く推奨されている。

細胞バンクにおいては核酸増幅法（NAT 法）であるリアルタイム PCR 法を用いて、DNA ウイルス（CMV、EBV、HHV-6、HHV-7、BKV、JCV、ADV、HBV、ParvoB19、HPV18）、RNA ウイルス（HAV、HCV、HDV、HEV、HGV、HTLV-1、HTLV-2、HIV-1、HIV-2、XMRV）のスクリーニング検査を実施して、研究に用いる細胞の品質管理を実施している。

表3 各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験

	MCB ^a	WCB ^b	CAL ^c
レトロウイルス及び内在性ウイルス試験			
感染性試験	+	—	+
電子顕微鏡観察 ^d	+ ^d	—	+ ^d
逆転写酵素活性 ^e	+ ^e	—	+ ^e
その他細胞種特異ウイルス試験 ^e	適宜実施 ^f	—	適宜実施 ^f
非内在性ウイルス又は外来性ウイルス試験			
<i>In vitro</i> 試験	+	— ^g	+
<i>In vivo</i> 試験	+	— ^g	+
抗体産生試験 ^h	+ ^h	—	—
その他細胞種特異ウイルス試験 ^h	+ ⁱ	—	—

a. MCB：マスターセルバンク
b. WCB：ワーキングセルバンク
c. CAL：医薬品製造のために *in vitro* 細胞齢の上限にまで培養された細胞
d. 他の因子も検出可能
e. レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要
f. 細胞株個々の起源・由来から存在が予測されるウイルスを検出するために適した試験
g. 第1回目の WCB については、CAL の段階で実施すること。それ以降の WCB については、それ自体又は CAL の段階で *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験をそれぞれ1種類ずつ実施すること
h. げっ歯類由来細胞株に対する試験の例として、マウス抗体産生（MAP）試験、ラット抗体産生（RAP）試験、ハムスター抗体産生（HAP）試験がある
i. ヒト由来細胞株、ヒト以外の霊長類由来細胞株あるいはげっ歯類以外の動物由来細胞株である場合は、それぞれの細胞株に適切な試験を適宜実施すること

2.3 ウイルス汚染対策

細胞のウイルス汚染対策に関しては、最終製品（医薬品、再生医療材料など）においてウイルスあるいはその派生物が及ぼす影響を取り除く方法と細胞培養過程や製造ラインに新たなウイルスを混入させないようにする方法の両者が必要

と考えられる。前者においては細胞のウイルス検査を適切な段階で行うこと、製造工程においてウイルスを除去するための適切な措置を講ずることが必要であり、バイオ医薬品においてはウイルスクリアランス試験を実施する必要がある。ウイルスクリアランス試験の目的はウイルス不活性化や除去に有効であると考えられる工程について評価すること、それらの各工程をあわせて全体としてウイルスがどの程度減少したかを定量的に評価することにある。ICH ガイドラインには「工程評価試験」と「特性解析試験」という2つの異なるアプローチが提示されており、存在の可能性のあるウイルスについて精製工程や不活性化工程がウイルス不活性化/除去する能力があることを示すとともに、製造に用いる各工程が一般にどの程度ウイルス不活性化/除去に有効であるかを解析する必要性が示されている。これにより、最終製品におけるウイルス汚染の否定に関して十分な説明と妥当性を明らかにすることが求められる。

また、製造ラインに新たなウイルスを混入させないようにするためには細胞培養に関わる血清、試薬などにおいてウイルス検査を徹底的に実施するとともに、できる限り血清などの生物由来成分を代替品に置き換え、科学的に成分を定義づけられるよう培養系を制御することが求められる。もちろん製造過程における作業員由来の外来ウイルスに対する対策も必要であるが、これに関してはクリーンルームや安全キャビネットの使用、マスク手袋の使用などによりリスクを管理することが可能である。

文 献

- 1) マイコプラズマ図説，佐々木正五編，東海大学出版会，(1980)
- 2) マイコプラズマ，中村昌弘，尾形学，佐々木正五編，講談社，(1981)
- 3) バイオ医薬品の品質・安全性評価，早川堯夫，山崎修道，延原正弘編，エル・アイ・シー (2001)
- 4) 原澤亮，水澤博，竹内昌男，蛋白質核酸酵素，(1995)，40，2361-2368
- 5) 第十四改正日本薬局方第二部参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」
- 6) 小原有弘，培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査，(2007)，Tiss.Cult.Res.Comm. 26 159-163
- 7) ICH Harmonized Tripartite Guideline “Viral Safety Evaluation of Biotechnological Products Derived from Cell Lines of Human or Animal origin” (1997)

第14章 各実験室における作業規定・マニュアル作り

第13節 細胞培養

小原 有弘

(独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室 サブリーダー 博士(薬学)

(株)技術情報協会

書籍「実験者／試験検査員の誤ったデータの取扱い・試験誤操作防止策」

(2014.3.31 発刊)抜刷

第13節 細胞培養

はじめに

細胞の培養は、今や生命科学研究において欠かせない技術となっており、研究開発・医薬品製造・安全性/有効性検査など多くの現場で使用されている。これは細胞が生命の最小単位であり、生命現象を模倣するために非常に良い環境を提供してくれるためである。将来においても再生医療など様々な需要によって、細胞培養技術の使用は拡大されると期待される。しかしその一方で、細胞のマイコプラズマ汚染や細胞の取り違え等によるクロスコンタミネーションなどの発生は減少していない。このような細胞培養中に混入しうるマイコプラズマを含めた微生物について正しい知識を身につけ、その検査法や混入防止対策を立てることが今後重要な課題である。また、細胞を使用する研究や事業を行う上で予め考えておかなければいけないのは、細胞の培養条件とともに細胞の凍結保存や細胞の輸送方法である。再現性、信頼性ある成果を得るには細胞の凍結保存を行い、繰り返しの細胞使用に十分な在庫の確保を行い、一定期間ごとに再培養することが重要である。また、十分な細胞保存を行うことによって、微生物の混入や細胞の置き換わりのような不測の事態に対応が可能となり、安定した性質の細胞の供給や貴重な細胞の保存管理として重要な意味を持つ。さらに、細胞を入手する際や自分が樹立した細胞を共同研究者に送る際など、貴重な細胞資源を安全かつ確実に送ることが必要となる。本節においては細胞の培養に関する留意点をまとめて概説する。

1. 細胞培養の準備

1951年のHeLa細胞樹立以降、ヒト由来細胞は非常に様々な細胞株が世界中で樹立され、報告されている。近年ではヒトiPS細胞が樹立され、分化万能性・自己増殖能を併せ持つ細胞株として非常に注目されている。このように細胞は非常に多くあるが、まずは自分のニーズに合った細胞を見つけ出す必要がある。また、細胞に必要な培地や培養容器などの培養条件も準備のために必要な情報である。そこで活用されるのが論文情報に基づく細胞情報であり、さらには細胞バンクにおける細胞情報である。細胞バンクには細胞の特徴や培養条件など詳細な情報が集積されており、利用者に細胞を提供するとともに、これらの情報をweb上で公開している。本項においては細胞培養を開始するにあたって必要な準備の概略を記す。

1.1 細胞情報の収集

新しく細胞の培養を開始するには、その細胞の入手方法から調べる必要がある。基本的には論文、学会やその他の学術情報より細胞に関わる情報を入手し、細胞の樹立者との直接交渉により細胞の入手を考える。しかし近年研究に使用した細胞の第三者確認が重視されるようになっており、細胞バンクが果たす役割が大きくなっているため、汎用される細胞や既存の検査や試験に使用されるような標準細胞の入手は細胞バンクから行うのが通常となっている。

まずは学術情報を元に、必要とする細胞の情報を収集する。細胞の樹立情報（動物種（人種、系統など）、性別、年齢・週齢、採取組織、病歴等）とともに細胞の培養情報（培地（基礎培地、添加物、血清濃度など）、継代方法、培養温度、炭酸ガス濃度など）についても情報を入手する必要がある。学術情報に記載されている細胞の情報は今後使用する細胞の情報として非常に重要となるので、しっかりとまとめて記録しておく必要がある。

1.2 細胞の入手

実際の細胞入手に関しては、まず始めに世界の細胞バンクに登録がないかを検索することから開始する。世界で有名な細胞バンクのURLは表1にまとめたので、入手したい細胞の登録がないかをweb上で検索する。その際には学術情報に記載された細胞名をそのまま検索するとともに、「-（ハイフン）」の有無など登録細胞名に若干の違いがある場合があるので注意深く検索する。細胞バンクに必要なとする細胞の登録がある場合には、微生物の汚染がない確実な細胞が入手できるので安心である。しかし、研究者から入手しなければならない場合には第三者確認がなされていない細胞で

あるので、本当に目的とする細胞であるのかを含めて微生物汚染が無いかなどの検証試験をする必要がある。検証試験の内容に関しては後に述べるが、間違った細胞や汚染された細胞を使用した実験は、得られる結果に再現性や信憑性がないため、折角行った作業が全て無駄になるので注意が必要である。このような観点からも細胞バンクに登録されている細胞を使用するのが望ましい。細胞バンクからの実際の細胞入手に関しては、それぞれの細胞バンクの指示に従い分譲依頼をすることでドライアイス梱包された凍結細胞を入手できる。近年細胞の品質保証が問題となっているので、細胞の入手に関しても、いつどこから入手した細胞であるかをしっかりと記録しておく必要がある。その際には細胞に添付されていた品質保証書あるいは細胞データシートも大事に保管する。これにより、入手した際の細胞に汚染が無かったこと、これまでに行われた継代数や凍結保存方法などの重要な情報が記録できる。

表1 細胞バンク一覧

細胞バンク	URL
日本国内	
JCRB 細胞バンク (厚生労働省)	http://cellbank.nibio.go.jp/
理研細胞バンク (文部科学省)	http://www.brc.riken.jp/lab/cell/
海外	
American Type Culture Collection (ATCC, 米国)	http://www.atcc.org/
(国内総代理店: 住商ファーマインターナショナル)	http://www.summitpharma.co.jp/japanese/service/s_ATCC.html
European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, 英国)	https://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.aspx
(国内総代理店: DS ファーマバイオメディカル)	http://www.dspbio.co.jp/html/index.html
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, 独国)	http://www.dsmz.de/

2. 細胞の培養・品質管理

細胞培養を行う上で注意を払わなければならないのが、微生物やウイルスの混入である。細菌や真菌などは培養液に混入すると、培地の濁りや変色などによって目視が可能であり、あまり問題とならない。一方でマイコプラズマ・ウイルスに関しては、その大きさが非常に微小であるために光学顕微鏡を使用しても検出することができない。このようなマイコプラズマ・ウイルスの混入を防ぐことは非常に重要であるが、あまり注意を払われていないのが現状である。細胞培養中に混入するマイコプラズマ・ウイルスについて正しい知識を身につけ、その検査法や混入防止対策を立てることも細胞培養におけるマニュアルには重要である。また、細胞培養におけるトレイサビリティのためにも培養に使用した培地類、器具類に関する記録を管理していくことも重要である。本項においては細胞培養における培養管理ならびに品質管理について概説する。

2.1 細胞培養

細胞を培養する際には1つの細胞ごとにマスターセルバンク (MCB)、ワーキングセルバンク (WCB) を作製することより始める必要がある。MCBはその細胞を長期にわたって保管するため非常に重要なものであり、微生物汚染などが無いよう徹底的に品質検査をした保存細胞を作製する。その際には使用した培地、添加物、血清や器具などの記録を作成するとともに、細胞の写真記録を含めた詳細な培養記録を作成する。これによりその細胞の増殖速度や継代方法、継代のタイミングなどがマニュアル化できる。しかし注意が必要なのは培養に用いる血清などのロットが変わるだけで、細胞の増殖速度は変化するので、あくまでもマニュアルは目安である。このように作製した MCB は液体窒素保存容器内に保存し、培養記録、品質管理検査結果とともに厳重に管理する。もし、細胞使用中に何らかの異常が認められた場合には MCB より再度細胞を調製する作業を開始する。また、WCB は普段の実験・作業に必要な細胞のストックであり、再現性を確保するために一連の作業に必要な細胞を同一ロットとして保管するのが望ましい。例えば、細胞を用いた薬

効評価を50回実施する場合には、同一ロット（同一細胞保存日）の細胞を50本用意し、毎回細胞を解凍して、試験を実施する場合と、細胞を継代維持しながら50回の薬効評価を連続して行う場合においては、結果に明らかな差が出るはずである。試験結果の再現性保証のためにも、十分な量のWCBを作製することは非常に重要である。

また、上記のMCB・WCB作製のため、あるいはWCBを用いて行った培養に際して、実際に行った作業者がどのような作業を実施したのかを詳細に記録することが重要であり、定型的な培養記録として保存すべきである。その内容は、培養開始日、作業担当者、作業目的、使用した保存細胞の管理番号、実際行った作業内容、継代回数、使用した培地（添加物、使用血清ロットなどの情報を含む）、培地作製日、使用培養容器（ロット番号）、生細胞数（細胞生存率）、播種時の細胞濃度、培地量など非常に多岐にわたるものである（表2：JCRB細胞バンクにおける培養記録）。このような記録を毎回作成することで、行った作業に不備がなかったかを確認ことができ、例えば作業者が変わったとしても細胞の安定的な培養が可能となる。また、このような記録とともに細胞の写真記録、品質管理検査記録なども併せて保管することが望ましい。

表2 JCRB 細胞バンクにおける培養記録

JCRB Cell Bank

Notes

Token		Responsible person : Kohara A.		Product Information					
Registered cell No : N1HS0730		Lot.No : deposit		Passage Number : P1*	Viabel cell number (a) : 1.69×10 ⁶ cells/ml	Results of quality controls			
Cell strain name : NH3T3		Type of source :		Type of ampoules : glass	Total cell number (b) : 1.7×10 ⁶ cells/ml	Myco./VH	Myco./PCR	Bac./Fungi	Isoenzyme
Passage Number : Unknown				No of ampoules : 10	Viability (a/b×100) : 99.20%	(-)	(-)	(-)	
Location of Amp : N9-S-5-2		from : Dr.Murakami, T.		Lot number : #11202012	No of colonies/100 cells : %				
Date Prepared :				Location of amp : N11-M-1-5 (10)		Expected viability (defrost ampoule) : %			
Note :		Culture Conditions		Passage History : from P1* to P1*, 7 days					
				Subculture Method : 0.02% EDTA and 0.25% trypsin		Cell No, at passage : 5×10 ³ /cm2 ~ 7×10 ⁴ /cm2			
				Culture medium : DMEM medium with 10% FBS					
Date mm/dd/yy	Total culture days	Number of plates	Passage number	Medium Information :		Serum : 10% (HI) FBS lot#: SIGMA #027K03911		Inoculums Size	
						Freezing medium : Cell banker ; BLC-1, Nihon Zenyaku Industries		Start	End
11/12/2012	0	75cm2 flask, 4 25cm2 flask, 1	P1*	Retrieve culture : 1 amp, of cells were washed 1 times and suspended to 5 ml. The cells were counted with Tatai 2-fold dil. (252 ; 21, 4/8 block) Viability:92.3%. Approximately cell viable density;4.0×10 ⁵ /ml, 5 ml (Total;2.0×10 ⁶ cells) .Cells were cultured with 75cm2 flask, 1. (1.54×10 ⁵ /ml, 6.2×10 ³ /cm2, 8ml/25cm2 flask, 20ml/75cm2 flask)				1 . 5 4 × 5 . 4 7 × 10 ⁵ /25cm2 flask, 4.6 × 10 ⁵ /75cm2 flask (6.2 × 10 ³ /cm2)	10 ⁶ /75cm2 flask, (7.3 × 10 ⁴ /cm2) 98.3%
11/13/2012	1	75cm2 flask, 4 25cm2 flask, 1	P1*	Taking photographs (Deposit, day1 ; ×4, ×10, ×20, ×40)					
11/16/2012	4	75cm2 flask, 4 25cm2 flask, 1	P1*	Medium change (MC) 25ml/75cm2 flask, 10ml/25cm2 MycoA lert test. MycoA lert 08072012 (-)					
11/19/2012	7	75cm2 flask, 1	P1*	Cell freezing: Before harvesting, took photographs (FD; ×4, ×10, ×20, ×40) and inoculated the supernatant for 2-types of Myco tests MycoA lert #11202012 (-) Cells from 75cm2 flask ×3 were harvested with Trypsin-EDTA and by 300g 7min centrifugation, and resuspended to 11ml freezing medium (Cell banker ; BLC-1). The suspension was dispensed and frozen 10-glass ampoules as Token. Counted cell numbers with Tatai 4-fold dil. (264 ; 2, 2/8block, 215 ; 7, 1/8block) 1.69×10 ⁶ /ml. Viability : 99.2% The residual cells were inoculated to 2-test tubes and 1-blood agar dish for sterility test.				1 . 6 9 × 10 ⁶ / vial Viability : 99.2%	
		75cm2 flask, 10	P2*	Cells from 75cm2 flask ×1 were harvested with Trypsin-EDTA and by 300g 7min centrifugation. Cell count with Tatai 2-fold dil. (171;3, 1/8 block) Viability : 98.3%, Approx. cell density : 1.09×10 ⁶ /75cm2 flask, 7.3×10 ⁴ /cm2 Subculture (SC) : 1 : 10 75cm2 flask ×1 (total ; 5.47×10 ⁶ cells) ----->75cm2 flask ×10 15ml/flask, 5.47×10 ⁵ /flask, 2.9×10 ⁴ /cm2				5 . 4 7 × 10 ⁵ /75cm2 flask (2.9 × 10 ⁴ /cm2)	
11/20/2012	8	75cm2 flask, 1	P1*	MycoA lert test. MycoA lert #11202012 (-)					
		25cm2 flask, 1	P1*	Luciferase assay (+) #11202012 Luminescence : 37,460,052 1× CCLR : 300µl/T25 Flask					

2.2 細胞品質管理

細胞バンクに寄託される細胞の約 25%にマイコプラズマ汚染が、約 10%に細胞の取り違えが検出される。このような背景を考えると使用している細胞の品質管理検査は非常に重要である。特に細胞の入手時（受け入れ時）における品質管理検査を徹底的に実施し、これから使用する細胞に問題が無いことを保証する必要がある。受け入れ時の検査項目としては細菌汚染検査、マイコプラズマ汚染検査、動物種確認検査、ヒト細胞認証試験などが挙げられる。細胞バンクより提供される細胞にはこれらの品質管理検査が実施され、その成績証明書が添付されているのでこれを代用することができるが、研究者間の交流によって入手した細胞の場合においては、これらの品質管理検査の実施が必須となる。また、細胞を培養する作業過程において外因的な汚染を起こすことも否定できないので、定期的に微生物検査等を実施することも必要である。特にロット作製時におけるロット保証のための品質管理検査が重要となる。

実施する品質管理検査は凍結保存ロット作製時の抜き取り検査に重点を置いて実施し、日本薬局方などにおいて定義された試験方法によって実施することが望ましい。ほとんどの品質管理検査は微生物がいないことを証明する否定試験であるため、試験方法において十分な感度があること、試験系がワークしていることを確認しながら、試験成績には「A 試験法を用いて検出限界以下であった」という記載を行う。実際に行った検査に関しても検査の方法を SOP などマニュアル化するとともに検査の詳細な記録（試験日、作業担当者、使用試薬等、検査結果の記録、検査結果の評価など）を管理保存する。

3. 細胞の保管・輸送

細胞を培養する際に予め考えておかなければいけないのは、細胞の培養条件とともに細胞の凍結保存や細胞の輸送方法である。細胞を使った作業では長期間にわたって細胞を培養しなければならないこともあるが、その際の問題となるのが細胞の性質変化である。細胞の形態が変化するなどの可視的な変化もあるが、タンパク質発現レベルの変化、遺伝子発現レベルの変化、細胞ゲノムレベルの変化など見えない細胞機能の変化により、作業結果につながる重要な違いが生ずることがある。このような変化に影響されることなく、再現性、信憑性ある作業結果を得るには細胞の凍結保存を行い、繰り返し作業を行うのに十分な細胞を確保し、一定期間ごとに再培養することが重要である。また、十分な細胞保存を行うことによって、微生物の混入や細胞の置き換わりのような不測の事態に対応が可能となり、安定した性質の細胞の供給や貴重な細胞の保存管理として重要な意味を持つ。さらに、細胞を入手する際や作業上必要な細胞輸送など、貴重な細胞資源を安全かつ確実に送ることが必要となる。本項においては細胞の凍結保存方法、輸送方法における留意点をまとめて概説する。

3.1 細胞保管

細胞の保管は非常に重要であり、長期にわたって保存する場合にはルール・システム設計が大事となる。細胞使用者が入れ替わったとしても、細胞の取り違えを起こすことの無いような管理が必要である。細胞入手から細胞取り出し（細胞使用）、細胞保管、細胞輸送に至るまでの一貫した SOP（ルール）を策定して、作業者が入れ替わっても間違いの起こらないようにする。その際には細胞の登録番号やロット番号というような管理番号を使用するとデータベース管理がしやすい。また、液体窒素細胞保存容器には紙媒体の保管記録書類を整備すると実際の作業時に便利である。

細胞保管の際にもう一つ重要なことは細胞バイアルに記載する内容である。いくら管理がシステム化されていたとしてもバイアルの記載が曖昧であると、細胞移動や輸送の際、事故によるバイアルの落下などの際に、そのバイアルに入っている細胞がどのようなものであるかを判別することが不可能となる。したがって細胞バイアルの記載事項は重要であり、管理に必要な情報を必ず記載しなければならない。2次元バーコード（あるいは IC チップ）などを管理に使用することも可能であるので、確実な細胞保管システムを構築するには有用性が高いと言える（図 1：JCRB 細胞バンクにおける細胞バイアル添付シール）。



図1 JCRB細胞バンクにおける細胞バイアル添付シール

3.2 細胞輸送

細胞を輸送する際に最も利用される方法は凍結細胞をドライアイス（ -60°C 程度）梱包で輸送する方法である。輸送時には発泡スチロールなどの断熱効果の高い容器を使用し、ドライアイスは十分量（5 kg 以上）入れて発送することで不慮の事故・手違いによる配送遅延に対応することが可能である。ドライアイス梱包以外に、より低い温度での輸送を可能とする液体窒素凍結試料運搬容器（ドライシッパー）（図2）を使用することが可能である。この容器は液体窒素を特殊な吸収体に吸着させることで -150°C 以下を2週間以上保持しながら、液体が漏れることのないように開発された輸送用容器であり、航空機に搭載することも可能である（IATA Dangerous Goods Regulations 旅客または乗務員が携行する危険物 についての規定に準拠）。この容器を用いることで遠隔地に確実に低温輸送が可能であるが使い捨てにはできないので空いた容器を返送する必要がある。

細胞を含む生物資源の輸送においては、いろいろな法律・条約を遵守する必要がある。国内輸送においてはパイオハザードの観点からヒトに感染性を示すウイルスを産生する細胞あるいはウイルス検査等未実施のヒト由来細胞を輸送する場合においては世界保健機関策定の「感染性物質輸送規則に関するガイダンス」を遵守するとともに、厚生労働省・科発0316第3号「ゆうパックを利用して検体を送付する際の留意事項について」の記載内容に従う必要がある。その中では基本的に3重包装（検体を封入する1次容器、防水性及び密閉性を有する2次容器並びに外装となる3次容器により構成される包装）にて梱包し、密閉性のある2次容器には決してドライアイスなどの気化膨張するものを混入させないように注意することが記載されており、さらにこの3重包装を必ずジュラルミンケースに入れて4重包装として発送しなければならない。また、包装責任者を選定し、所在地の保健所等担当部局に届出を行い、確認証明表示を包装責任者明記で添付しなければならない。

国外への発送に関しては、まず始めにワシントン条約に抵触する生物種の生物資源の移動が制限される。これにより霊長類由来の細胞に関しては特別な書類（生物資源の由来を示す出生証明書等）が無い場合には国外への輸送が厳しく制限されている。また、感染性微生物が混入している資源に関しても厳しく移動が制限されているので、注意が必要である。また、輸送手段として航空機の使用が想定されるが、その際も先に述べたように航空法に抵触しない保存容器、梱包資材、内容物表示規則に従って生物資源の輸送を考える必要がある。

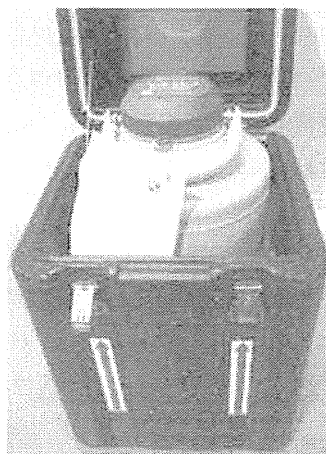


図2 細胞輸送用ドライシッパー

文 献

- 1) 細胞培養の技術 第3版 基礎編 凍結保存法, 朝倉書店, (1996)
- 2) 実験医学別冊 改訂 培養細胞実験ハンドブック, 羊土社, (2009)
- 3) 細胞培養実習テキスト, じほう, (2013)
- 4) 世界保健機関 「感染性物質輸送規則に関するガイダンス」
- 5) 厚生労働省・科発 0316 第3号 「ゆうパックにより検体を送付する際の留意事項について」, 平成24年3月16日発令

実験医学別冊

最強の
ステップUP
シリーズ

原理からよくわかる

リアルタイム

PCR

完全 実験ガイド

北條浩彦 [編]

次世代の
デジタル
PCR
も掲載!

羊土社
YODOSHA

10

プライマー/プローブの設計の手順②

マルチプレックスPCRの場合

北條浩彦, 清水則夫

マルチプレックスPCRは、1つのPCR反応液中で複数のターゲット遺伝子を同時に増幅し検出する方法である。この方法は、1回のPCRで多くの情報（データ）を得ることができることから貴重なサンプルの有効利用と迅速な解析に優れている。しかし、このマルチプレックスPCRを実行するためには、細密なプライマー設計とPCR反応条件の検討が必要である。

マルチプレックスPCRとそのポイント

マルチプレックスとは「多重化」の意味である。マルチプレックスPCRは、1つのPCR反応系（反応チューブ内）で複数の異なるターゲット遺伝子を同時に増幅し（複数ターゲット遺伝子/1反応系）、それらを識別して検出（解析）する方法である。通常の方法（1ターゲット遺伝子/1反応系）と比べて、マルチプレックスPCRは同じ量の鋳型DNAからより多くのデータを得ることができる。このため迅速な解析や網羅的な解析、そして貴重なサンプルの有効利用に長けている。このような解析を可能にするのは、①異なるターゲット遺伝子を同時に増幅させる特異性の高いPCRプライマーセットと②増幅したそれぞれのPCR産物を識別する異なる蛍光波長をもった数種の蛍光物質である。よって、特異性が高く相互干渉のないPCRプライマーセットの設計と細密なPCR条件の検討、そして識別可能な異なる蛍光波長をもった蛍光物質の組み合わせがマルチプレックスPCR実行の重要なポイントとなる。

プライマーデザインの簡単な方法

文献から定量用にデザインされたプライマーセットを見つけ出して表のプライマーダイマーチェックソフトで確認して相性のよいものを選択する。例えば、実践編-15のウイルスの迅速検査実験は本方法を使用している。

プライマーを初めからデザインする方法

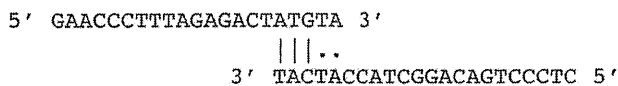
デザインソフトを使用してプライマーをデザインする（表）。いずれも以下の点を考慮して選択またはデザインする。③のプライマーダイマー形成の可能性については、図1の3種類について考慮する必要がある。

- ①Primer Tm値を合わせる。各プライマーの差がTm値±5℃以内（できれば2℃以内）になるように設定する。
- ②デザインされたプライマーの特異性をチェックする。プライマー配列をGenBank BLAST解析で特異性を確認する。GenBank DNA BLAST

表 本項で扱ったウェブアプリケーションとそのURLなど

Webアプリ名	URL	有償/無償	特徴など
プライマーダイマーチェック			
PriDimerCheck	http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/primer_dimer.html	フリー	—
IDT OligoAnalyzer	http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/	フリー	—
デザインソフト			
MPprimer	http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/	フリー	セット数に制限がないが多数のデザインは困難
PrimerStation	http://ps.cb.k.u-tokyo.ac.jp/mquery.php?language=ja	フリー	ヒトゲノムのみ
PrimerPrem	http://www.premierbiosoft.com/index.html	有料	お勧めするソフト。一度に100セットまで

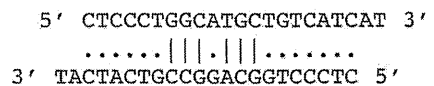
A 3'-ダイマー



プライマー同士の3'側が相補鎖になっている場合、これによりプライマーを鋳型にした増幅が起こる可能性がある

『 $> -2 \Delta G$ (kcal · mole⁻¹) 』

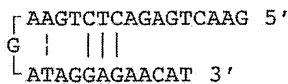
B Overall ダイマー(プライマー鎖全体)



プライマー同士が相補鎖に近いことによるダイマー形成

『 $> -6 \Delta G$ (kcal · mole⁻¹) 』

C ヘアピン形成



プライマー自身を鋳型にした形成。同一プライマー内に3'鎖と相補鎖があるとそれを鋳型にして伸長増幅する

『 $> -3 \Delta G$ (kcal · mole⁻¹) 』

図1 望ましくないプライマーダイマーヘアピン構造の例

『 』は、IDT OligoAnalyzerによって出力される望ましい値を示す

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) から nucleotide blast を選択、配列を Enter Query Sequence に入れてヒトサンプルであったら Database のところに Human genomic + transcript にチェックを入れて BLAST ボタンを押す。

- ③プライマーダイマー、ヘアピン形成のチェック。
- ④増幅産物サイズ。増幅産物の長さは短い方がよいがプローブ検出用にある程度必要なため100～300 bp程度が適当である。

1. MPprimer デザインの実際

Input DNA template 欄に FASTA 形式の DNA 配列を入力する。このソフトは PCR 産物を電気泳動でサイズを確認するデザインになっているので Product Size Ranges をすべて 100～300 bp にしてデザインする。デザインされたプライマーについて、MPprimer にある PriDimerCheck を使って、プライマーダイマーの確認を行い、最適なプライマーを選択する (図2)。

15

ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査

清水則夫，渡邊 健，外丸靖浩

リアルタイムPCR活用の目的とヒント

ウイルスは分離培養が難しいため，PCRによりウイルスゲノムを直接検出する手法はウイルス感染症の診断に欠かせない技術となっている。一方，健常人にも多くのウイルスが持続感染していることが知られており，ウイルスゲノムが検出されてもすぐに病気の原因と断定することはできない場合もある。われわれの研究室では，PCR法によるウイルスゲノムの検出法として定性的検査法と半定量的検査法の2種類を開発し，検査対象ウイルスの種類・目的・検査時間・検体量などにより定性的検査系と定量的検査系を使い分けている。

はじめに

ウイルス感染症が疑われる疾患の原因ウイルスを特定する際，一般には臨床症状などから予想されるウイルスを個別に検査する手法がとられている。しかしこのような検査では，予想外のウイルス感染が見逃されたり，複数のウイルスの重複感染や主たる病因ウイルスの感染が見逃される危険性がある。われわれは，多くのウイルスを網羅的・迅速・安価に検出することが可能になればウイルス感染症をより適切に診断できると考え，キャピラリーPCR装置を使用したマルチプレックスPCR法による多種類のウイルスを同時に検出できる検査法（定性検査）を開発した。さらに，多種類のウイルスの同時定量と検査系の自動化を目的にプレートタイプのリアルタイムPCR装置を使用した網羅的ウイルス検出法を開発した。

本項では，迅速性に重点を置いたキャピラリーPCR装置による定性的検査法と，一般に普及しているプレートタイプのリアルタイムPCR装置を用いた半定量的検出法と検査系の自動化に関する取組みを紹介する。

キャピラリーPCR装置を使用した網羅的・迅速検査系

本検査法は，マルチプレックスPCRにより1本のキャピラリー内で最大32種類の遺伝子が検出可能である。測定はPCR40分，融解曲線解析10分の合計50分程度ときわめて短時間で完了し，単一項目の検出を行う場合と同等の検出感度がある。

図1にマルチプレックスPCR法による，複数ウイルスの同時・迅速・高感度ウイルス検査系

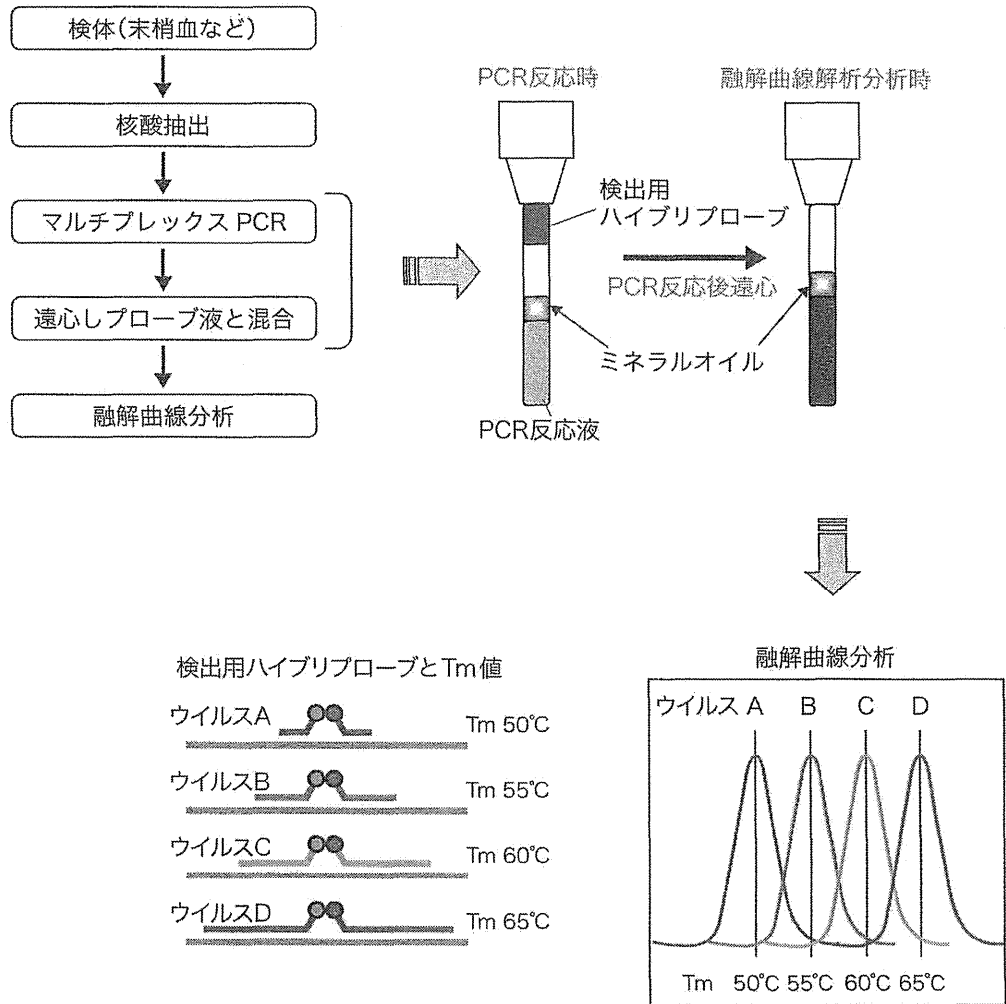


図1 複数ウイルスの迅速検査系の概略

の概略を示す。サンプルから核酸を抽出し、マルチプレックスPCRを行う。その後、検出用ハイブリプローブMixを加えて増幅配列にハイブリダイズさせ、FRETによる蛍光を検出し融解曲線分析 (Melting Curve Analysis) を行い、複数のウイルスを同時・定性的に検出・識別するシステムである。図1に示してあるようにハイブリプローブのTm値が異なるため、どのウイルス遺伝子が増幅されたか融解曲線分析により得られたピークのTm値から判定される。さらに、内在性コントロール遺伝子 (IC) も加え、PCR反応が進まないために生じる偽陰性を防止している。

はじめにPCRを行い終了後に検出用ハイブリプローブを混合するため、お互いの相性を考慮する必要性が低下しプライマー・プローブの設計が容易になる。

検出用ハイブリプローブの設定可能なTm値の範囲は50~75°Cであり、プローブ同士のTm値の差が3°C以上あればウイルス種を区別可能なため、合計8種類の異なるピークを区別できる。LightCycler® 2.0では、アクセプター色素としてLcRed640, 610, 670, 710の4種類の蛍光波長が使用可能であるため、理論上は1本のキャピラリーで4×8=32種類のウイルス種が検出可能なことになる。

準備

例として、ウイルス12種類を同時に検出する系を示す。なお、1度に32本測定できるため同時測定が可能なサンプル数は15検体である。

- LightCycler® 2.0 (ロシュ・ダイアグノスティックス社)
- DNAウイルス定性用試薬増幅酵素+ Bufferセット (日本テクノサービス株式会社 #D001-1)
詳細については日本テクノサービス株式会社へ直接問合せる。
- サンプル (検体) DNA 約1 μ g
DNAの精製度は結果に影響を及ぼすので非常に重要である。
- プライマー, ハイブリプローブ*1
株式会社日本遺伝子研究所などで購入可能。

	検出ウイルス名
A セ ツ	単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus : HSV-1, HSV-2)
	水痘・帯状疱疹ウイルス (Varicella-Zoster virus : VZV)
	パルボウイルスB19 (Parvovirus B19 : B19)
	ヒトヘルペスウイルス6型 (Human Herpes Virus type 6 : HHV-6)
B セ ツ	サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus : CMV)
	BKウイルス (BKV), JCウイルス (JCV)
	EBウイルス (Epstein-Barr virus : EBV)
	ヒトヘルペスウイルス7型 (Human Herpes Virus type 7 : HHV-7)
ト	ヒトヘルペスウイルス8型 (Human Herpes Virus type 8 : HHV-8)
	B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus : HBV)

*1 ウイルスセットのプライマー, プローブ配列は参考文献1, 2を参照。

- LightCycler® Capillaries (20 μ L)
- LightCycler® Centrifuge Adapters
あらかじめ4°Cで冷却しておく。
- LightCycler® 2.0 Sample Carousel (20 μ L)
- LC Carousel Centrifuge 2.0
- ミネラルオイル (M8662-SVL, シグマアルドリッチ社)
- 微量高速遠心機
1.5 mLチューブが遠心できるもの。

プロトコール

以下, Aセットを例にして示す (Bセットも同様)。

1. マスターミックスの作製

① プライマーミックスの作製

各プライマーセットを混合し10×濃度に調製しておく。

HSV primer F**2	20 μ L
HSV primer R	20 μ L
CMV primer F	80 μ L