

sequence of Vero cells will also be an invaluable resource for engineering the specific genes of cells by recently advanced genome-editing technologies.

In conclusion, this study showed the genomic characteristics of Vero cells, which have been a good cell model for microbial infection for a long time. In addition, the genome landscape will be a crucial resource not only for the quality control of Vero cell lines, but also for the development of novel sub-lines in the future.

Authors' contributions

Overall planning: K.H.; design and performing experiments: N.O., A.K., T.Y., and M.K.; data analysis: N.O., A.K., T.Y., N.H., F.K., T.S., M.K., and K.H.; manuscript writing: N.O., A.K., T.Y., T.S., M.K., and K.H. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements: We thank Makoto Takeda and Yuichiro Nakatsu (Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, Japan) for their helpful comments on interferons, and also Tomohiko Maehama (Department of Biochemistry & Cell Biology, National Institute of Infectious Diseases, Japan) for his helpful comments on cell cycle regulation.

Supplementary data: Supplementary Data are available at www.dnaresearch.oxfordjournals.org.

Funding

This work was supported by the Japan Society for the Promotion of Science KAKENHI Grant numbers 22370054 and 25670065 (to K.H.) and also by Takeda Science Foundation (to K.H.). Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by a Grant-in-Aid of Takeda Science Foundation (to K.H.).

References

1. Yasumura, Y. and Kawakita, Y. 1963, Studies on SV40 in tissue culture: preliminary step for cancer research in vitro (in Japanese), *Nihon Rinsho*, **21**, 1201–15.
2. Yasumura, Y. and Kawakita, Y. 1988, Studies on SV40 in tissue culture: preliminary step for cancer research in vitro, In: Simizu, B. and Terasima, T. (eds.), *VERO cells: origin, properties and biomedical applications*. Department of Microbiology School of Medicine Chiba University, Chiba, Japan, pp. 1–19.
3. Sasaki, K., Makino, S. and Kasahara, S. 1964, Studies on measles virus. II. Propagation in two established simian renal cell lines and development of a plaque assay, *Kitasato Arch. Exp. Med.*, **37**, 27–42.
4. Rhim, J.S. and Schell, K. 1967, Cytopathic and plaque assay of rubella virus in a line of African green monkey kidney cells (Vero), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **125**, 602–6.
5. Liebhaver, H., Riordan, J.T. and Horstmann, D.M. 1967, Replication of rubella virus in a continuous line of African green monkey kidney cells (Vero), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **125**, 636–43.
6. Simizu, B., Rhim, J.S. and Wiebenga, N.H. 1967, Characterization of the Tacaribe group of arboviruses. I. Propagation and plaque assay of Tacaribe virus in a line of African green monkey kidney cells (Vero), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **125**, 119–23.
7. Rhim, J.S., Schell, K., Creasy, B. and Case, W. 1969, Biological characteristics and viral susceptibility of an African green monkey kidney cell line (Vero), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 670–8.
8. Miyamura, K., Nishio, S., Ito, A., Murata, R. and Kono, R. 1974, Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration, *J. Biol. Stand.*, **2**, 189–201.
9. Speirs, J.I., Stavric, S. and Konowalchuk, J. 1977, Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with vero cells, *Infect. Immun.*, **16**, 617–22.
10. Konowalchuk, J., Speirs, J.I. and Stavric, S. 1977, Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, **18**, 775–9.
11. Remis, R.S., MacDonald, K.L., Riley, L.W., et al. 1984, Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7, *Ann. Intern. Med.*, **101**, 624–6.
12. Mizusawa, H. 1988, Cell line Vero deposited to Japanese Cancer Research Resources Bank, In: Simizu, B. and Terasima, T. (eds.), *VERO cells: origin, properties and biomedical applications*. Department of Microbiology School of Medicine Chiba University, Chiba, Japan, pp. 24–5.
13. Earley, E.M. and Johnson, K.M. 1988, The lineage of the Vero, Vero 76 and its clone C1008 in the United States, In: Simizu, B. and Terasima, T. (eds.), *VERO cells: origin, properties and biomedical applications*. Department of Microbiology School of Medicine Chiba University, Chiba, Japan, pp. 26–9.
14. Ohara, H. 1988, Cytogenetic examination of VERO cells derived from the present stock, In: Simizu, B. and Terasima, T. (eds.), *VERO cells: origin, properties and biomedical applications*. Department of Microbiology School of Medicine Chiba University, Chiba, Japan, pp. 36–8.
15. Levenbook, I.S., Petricciani, J.C. and Elisberg, B.L. 1984, Tumorigenicity of Vero cells, *J. Biol. Stand.*, **12**, 391–8.
16. Vincent-Falquet, J.C., Peyron, L., Souvras, M., Moulin, J.C., Tektoff, J. and Patet, J. 1989, Qualification of working cell banks for the Vero cell line to produce licensed human vaccines, *Dev. Biol. Stand.*, **70**, 153–6.
17. Barrett, P.N., Mundt, W., Kistner, O. and Howard, M.K. 2009, Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines, *Expert Rev. Vaccines*, **8**, 607–18.

18. Montomoli, E., Khadang, B., Piccirella, S., et al. 2012, Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production, *Expert Rev. Vaccines*, **11**, 587–94.
19. Horimoto, T. and Kawaoka, Y. 2006, Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses, *Trends Mol. Med.*, **12**, 506–14.
20. Ellis, D.S., Stamford, S., Tvoey, D.G., et al. 1979, Ebola and Marburg viruses: II. Their development within Vero cells and the extra-cellular formation of branched and torus forms, *J. Med. Virol.*, **4**, 213–25.
21. Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D. and Fouchier, R.A. 2012, Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia, *N. Engl. J. Med.*, **367**, 1814–20.
22. Skowronski, D.M., Janjua, N.Z., De Serres, G., et al. 2014, Low 2012–13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses, *PLoS One*, **9**, e92153.
23. Joung, J.K. and Sander, J.D. 2013, TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 49–55.
24. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., et al. 2013, RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science*, **339**, 823–6.
25. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., et al. 2013, Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, **339**, 819–23.
26. Seabright, M. 1973, Improvement of trypsin method for banding chromosomes, *Lancet*, **1**, 1249–50.
27. Boetzer, M., Henkel, C.V., Jansen, H.J., Butler, D. and Pirovano, W. 2011, Scaffolding pre-assembled contigs using SSPAGE, *Bioinformatics*, **27**, 578–9.
28. Simpson, J.T. and Durbin, R. 2012, Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data structures, *Genome Res.*, **22**, 549–56.
29. Stanke, M., Steinkamp, R., Waack, S. and Morgenstern, B. 2004, AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes, *Nucleic Acids Res.*, **32**, W309–12.
30. Li, H. and Durbin, R. 2009, Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform, *Bioinformatics*, **25**, 1754–60.
31. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., et al. 2010, The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data, *Genome Res.*, **20**, 1297–303.
32. Boeva, V., Popova, T., Bleakley, K., et al. 2012, Control-FREEC: a tool for assessing copy number and allelic content using next-generation sequencing data, *Bioinformatics*, **28**, 423–5.
33. Terasima, T. and Yasukawa, M. 1988, History of Vero cells in Japan, In: Simizu, B. and Terasima, T. (eds.), *VERO cells: origin, properties and biomedical applications*. Department of Microbiology School of Medicine Chiba University, Chiba, Japan, pp. 22–3.
34. Emeny, J.M. and Morgan, M.J. 1979, Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production, *J. Gen. Virol.*, **43**, 247–52.
35. Horaud, F. 1992, Absence of viral sequences in the WHO-Vero Cell Bank. A collaborative study, *Dev. Biol. Stand.*, **76**, 43–6.
36. Stock, A.D. and Hsu, T.C. 1973, Evolutionary conservatism in arrangement of genetic material. A comparative analysis of chromosome banding between the rhesus macaque (2n equals 42, 84 arms) and the African green monkey (2n equals 60, 120 arms), *Chromosoma*, **43**, 211–24.
37. Finelli, P., Stanyon, R., Plesker, R., Ferguson-Smith, M.A., O'Brien, P.C. and Wienberg, J. 1999, Reciprocal chromosome painting shows that the great difference in diploid number between human and African green monkey is mostly due to non-Robertsonian fissions, *Mamm. Genome*, **10**, 713–8.
38. Grubb, P., Butynski, T., Oates, J., et al. 2003, Assessment of the diversity of African primates, *Int. J. Primatol.*, **24**, 1301–57.
39. Haus, T., Akom, E., Agwanda, B., Hofreiter, M., Roos, C. and Zinner, D. 2013, Mitochondrial diversity and distribution of African green monkeys (*Chlorocebus gray*, 1870), *Am. J. Primatol.*, **75**, 350–60.
40. Wertheim, J.O. and Worobey, M. 2007, A challenge to the ancient origin of SIVagm based on African green monkey mitochondrial genomes, *PLoS Pathog.*, **3**, e95.
41. Osada, N. and Akashi, H. 2012, Mitochondrial-nuclear interactions and accelerated compensatory evolution: evidence from the primate cytochrome C oxidase complex, *Mol. Biol. Evol.*, **29**, 337–46.
42. Raaum, R.L., Sterner, K.N., Noviello, C.M., Stewart, C.B. and Disotell, T.R. 2005, Catarrhine primate divergence dates estimated from complete mitochondrial genomes: concordance with fossil and nuclear DNA evidence, *J. Hum. Evol.*, **48**, 237–57.
43. Perelman, P., Johnson, W.E., Roos, C., et al. 2011, A molecular phylogeny of living primates, *PLoS Genet.*, **7**, e1001342.
44. GP Consortium. 2010, A map of human genome variation from population-scale sequencing, *Nature*, **467**, 1061–73.
45. Rausch, T., Zichner, T., Schlattl, A., Stütz, A.M., Benes, V. and Korbel, J.O. 2012, DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis, *Bioinformatics*, **28**, i333–9.
46. Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M.S., et al. 2010, Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus, *J. Virol.*, **84**, 6033–40.
47. Onions, D., Cote, C., Love, B., et al. 2011, Ensuring the safety of vaccine cell substrates by massively parallel sequencing of the transcriptome, *Vaccine*, **29**, 7117–21.
48. Desmyter, J., Melnick, J.L. and Rawls, W.E. 1968, Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero), *J. Virol.*, **2**, 955–61.
49. Diaz, M.O., Ziemin, S., Le Beau, M.M., et al. 1988, Homozygous deletion of the α - and β 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5259–63.
50. Kim, W.Y. and Sharpless, N.E. 2006, The regulation of *INK4/ARF* in cancer and aging, *Cell*, **127**, 265–75.

51. Popov, N. and Gil, J. 2010, Epigenetic regulation of the *INK4b-ARF-INK4a* locus: in sickness and in health, *Epigenetics*, **5**, 685–90.
52. Yang, L., Luquette, L.J., Gehlenborg, N., et al. 2013, Diverse mechanisms of somatic structural variations in human cancer genomes, *Cell*, **153**, 919–29.
53. Knezevic, I., Stacey, G., Petricciani, J. and Sheets, R. 2010, Evaluation of cell substrates for the production of biologicals: revision of WHO recommendations. Report of the WHO Study Group on Cell Substrates for the Production of Biologicals, 22–23 April 2009, Bethesda, USA, *Biologicals*, **38**, 162–9.
54. Ma, H., Ma, Y., Ma, W., Williams, D.K., Galvin, T.A. and Khan, A.S. 2011, Chemical induction of endogenous retrovirus particles from the vero cell line of African green monkeys, *J. Virol.*, **85**, 6579–88.

細胞誤認： その現状と研究者にもとめられる対策

小原有弘, 佐藤元信, 西條 薫, 中村幸夫

ヒ ト培養細胞は現在の生命科学研究において必須の研究ツールとして非常に多くの研究者が使用している。しかし細胞の品質や細胞認証に目を向ける研究者は少なく、間違った細胞（誤認細胞）を研究に使用し、研究に費やす多大な時間と費用を無駄にしているのが現状である。今後の研究費申請、論文投稿の際には細胞認証データが求められるようになって考えられるので、細胞認証の必要性和研究者に求められる対策について解説する。

はじめに

1952年にヒト由来の培養細胞株 HeLa が樹立¹⁾されて以降、ヒト由来細胞株は次々と樹立されるに至った。しかしながらそのなかには他の細胞との取り違い（置き換わり）や混入により当初の由来や記述と異なる細胞（誤認細胞）が研究に使用され、広く汎用されるようになったのも事実である。当時は誤認細胞を明確に見分ける術がなかったが、1990年代にDNA鑑定技術が進歩し、short tandem repeat (STR) 多型解析によって遺伝子レベルで細胞（由来個人）を見分けることが可能となった²⁾³⁾。これを用いて細胞バンクでは品質管理の一環としてヒト由来培養細胞における誤認（クロスコンタミネーションや取り違いなど）の調査がはじめられた。2008年にはその時点における登録細胞の解析を終了し、JCRB細胞バンク：638種解析中38種（6.0%）、理研細胞バンク：565種解析中53種（9.4%）の誤認細胞を報告した⁴⁾。その後も一定の割合で寄託細胞のなかに誤認細胞が認められ、その数は増加しつつある⁵⁾。これらの現状を踏まえ、世界の細胞

バンクならびに特に強い危機感をもっている欧米の研究者を中心に啓発キャンペーンがはじめられている。Science 誌⁶⁾やNature 誌⁷⁾にも記事としてとり上げられ、その歩みが加速しているので本稿にて概説する。

世界における取り組み

細胞誤認を研究社会から排除する取り組みは以前より積み重ねられてきたが、2007年の春にScience 誌に“Cases of mistaken identity”⁶⁾として大きくとり上げられたのが、世界の細胞バンクが協力して歩みを進めるきっかけとなった。まずはじめの取り組みは細胞認証方法に関するガイドラインの策定である。これはアメリカのATCCが主導してボランティアを募り、ATCC[®] Standards Development Organizationのワーキンググループとして「Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling (ANSI/ATCC ASN-0002-2011)」⁸⁾を2011年にまとめた。その内容はヒト細胞認証にかかわる歴史から詳細なSTR解析プロトコルまでを規格化しており、

Misidentification of cell lines: How can we eliminate it?

Arihiro Kohara¹⁾³⁾/Motonobu Satoh¹⁾³⁾/Kaoru Saijo²⁾³⁾/Yukio Nakamura²⁾³⁾: JCRB Cell Bank, National Institute Biomedical Innovation¹⁾/Cell Bank, RIKEN BioResource Center²⁾/The Japan Tissue Culture Association³⁾ (医薬基盤研究所 JCRB細胞バンク¹⁾/理研バイオリソースセンター細胞材料開発室²⁾/日本組織培養学会細胞品質管理等普及委員会³⁾)

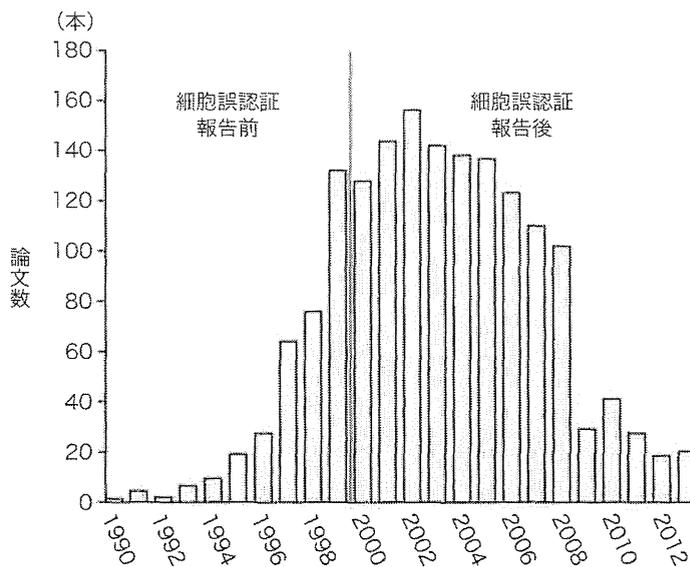


図 ECV304細胞が誤認証細胞であるという論文報告前後の発表論文数
ECV304が誤認証細胞であるという論文が発表(1999)されても、血管内皮由来細胞としての研究利用、研究発表は未だに続いている(文献9より引用)

現在の試験法の標準となっている。これにより細胞誤認排除のための基盤ができたといえる。またこれと同調して、科学雑誌(Nature, Science, Cancer ResearchをはじめとするAACR発行誌, etc.)における投稿規定の改訂が進み、細胞を使用した研究には細胞品質検査を実施し、認証された細胞株であるかを論文に記載することが規定に盛り込まれた。これにより誤認細胞を使用した研究発表が減少すると考えられたが、論文審査員に周知できておらず、未だに誤認細胞を使用した研究発表は後を絶たない。例えば、ECV304という細胞は日本で樹立されたとされる臍帯血管内皮由来細胞であるが、1999年にドイツのDirksらの研究により膀胱がん由来T24細胞の誤認細胞であることが明らかとされた⁹⁾。しかしながらその後もECV304は血管内皮細胞株として研究発表に使用され続け、PubMed検索すると2013年においても血管内皮由来細胞として21報の論文が報告されている(図)。このような状況は研究に費やす労力・資金を無駄にすることに他ならず、研究者にはこの点に関して危機感をもっていただくことを強く切望する。現在はさらなる国際連携強化を図り、研究者への認知度を高めるため、

International Cell Line Authentication Committee (ICLAC: <http://iclac.org>) を設立し、これまでに明らかにした誤認細胞のリスト(表)¹⁰⁾を公開し、新たな誤認細胞の認定・公表を行いつつ、研究社会への提言を行っている。そのなかでも、最も重要と考えられるのが、論文審査員に対する“Cell Line Checklist”(見本)の普及を目指した科学雑誌社あるいは編集者への活動である。このChecklistが論文審査の際に周知徹底できれば、細胞誤認の問題は終息の方向に舵を切ることができるだろう。

日本における取り組み

日本の細胞バンク(JCRB細胞バンク、理研細胞バンク)においては1990年代より細胞品質管理の一環としてSTR多型解析による調査を開始し、現在は登録細胞情報としてSTR多型解析情報を細胞それぞれに添付した形で提供している。したがって、細胞バンクから分譲される細胞は検証された、安心して使用できる細胞である。しかしながら日本の研究者は細胞の品質、特にマイコプラズマ汚染や細胞誤認に対して関心が低い

表 ICLAC コンタミリスト抜粋

誤認証細胞 (細胞として存在が確認できていない細胞)		
細胞名	由来種	細胞タイプ
① A2008	ヒト	卵巣がん
② ECV-304	ヒト	(不死化) 血管内皮細胞
③ EJ-1	ヒト	膀胱がん
④ HEP-2 (H.Ep.-2)	ヒト	喉頭がん
⑤ HSG	ヒト	唾液腺がん
⑥ KB	ヒト	口腔がん
⑦ KU7	ヒト	膀胱がん
⑧ MT-1	ヒト	乳がん
⑨ P39/TSUGANE (P39/TSU)	ヒト	白血病
⑩ WiDr	ヒト	大腸がん
⑪ WISH	ヒト	羊膜



クロスコンタミネーション細胞 (解析によって明らかとなった実在する細胞)				
細胞名	由来種	細胞タイプ	根拠となる論文	PMID
① ME-180	ヒト	子宮頸がん	Korch et al, 2012	22710073
② T-24	ヒト	膀胱がん	Dirks et al, 1999; MacLeod et al, 1999	10614862, 10508494
③ T-24	ヒト	膀胱がん	Masters et al, 2001	11416159
④ HeLa	ヒト	子宮頸部腺がん	Nelson-Rees et al, 1981; Chen, 1988	6451928, 3180844
⑤ HeLa	ヒト	子宮頸部腺がん	ECACC website	No PMID
⑥ HeLa	ヒト	子宮頸部腺がん	Gartler, 1967; Lavappa et al, 1976; Nelson-Rees et al, 1981	4864103, 1250349, 6451928
⑦ HeLa	ヒト	子宮頸部腺がん	Jäger et al, 2013	23500642
⑧ HeLa	ヒト	子宮頸部腺がん	MacLeod et al, 1999	10508494
⑨ HL-60	ヒト	白血病	Drexler et al, 2003; JCRB website	12592342
⑩ HT-29	ヒト	大腸がん	Chen et al, 1987	3472642
⑪ HeLa	ヒト	子宮頸部腺がん	Lavappa, 1978; Nelson-Rees et al, 1981	566722, 6451928

ICLACにおいて提供している2013年8月時点での誤認証細胞(494種から抜粋)。

上表の丸数字と下表の丸数字が対応

のが現状であり、論文審査員に指摘されてはじめて細胞品質管理検査を実施することが多い。われわれはこの現状を学会、講演会、講習会、執筆活動、ホームページ等を利用して啓発しているが、まだまだ認知度が低いといえる。これまでも、細胞認証のためのSTR多型解析データのデータベース構築に早くから取り組み、世界の細胞バンクとデータを共有することにより自分の解析データとデータベース登録細胞との比較が可能な検索サイトを設置してきた¹¹⁾。また、2013年からは日本組織培養学会・品質管理等普及委員会を立ち上

げ、その活動のなかで日本の研究者に向けた情報発信を目指して、細胞の品質管理にかかわる情報やニュースなどを提供できるサイトを設置するに至った(<http://jrcbcelldata.nibio.go.jp/str/>)。さらには、日本組織培養学会において細胞培養基盤技術コースを開設し、細胞培養技術の普及に努めている。今後、日本発の生命科学の発展には、このような基盤となる知識・技術に目を向け、間違いのない、質の高い研究を実施していくことが必要である。

Cell Line Checklist for Manuscripts and Grant Applications

This checklist is designed as a resource for scientists who write or review manuscripts and grant applications that use cell lines. Some cell lines will give unreliable results if used for research – for example, cross-contaminated cell lines no longer correspond to donor tissue and so may not represent the correct species, tissue type or disease state. Such misidentified or false cell lines produce unreliable research data and we urge reviewers to highlight their use wherever possible.

This checklist will help the author or reviewer to look for obvious cell line quality concerns. The checklist may also be used to communicate any quality concerns to be addressed prior to publication or funding.

Manuscript or Grant Information

Title or Manuscript/Grant ID:	研究名・グラント ID、使用した細胞名などの基本情報
Cell Lines used:	
Cell Lines used with Quality Concerns:	

Cell Line Information

Reporting Requirement	Yes or No (No includes Not Known) Add further comment if required
Cell line is known to be cross-contaminated or otherwise misidentified: See the ICLAC website for a database of known misidentified cell lines and Recommendation 1) below.	① 使用した細胞が誤認細胞のリストに記載されている細胞でないこと
Authentication testing has been performed: The method and results should be listed. See Recommendation 2) below.	② ヒト由来細胞であれば STR 多型解析を実施し、そのデータを記載するとともに新規の細胞であればドナーのプロファイルと一致すること、既存細胞であればデータベースと照合した結果
Human cell lines: STR profile is available with the manuscript/grant application: See Recommendation 2) below.	
Mycoplasma testing has been performed: The method and results should be listed.	④ マイコプラズマに関する検査を実施し、検出されなかったこと
Source for cell line is listed: The catalogue number should be included if obtained from a cell line repository. See Recommendation 3) below.	
Sufficient information is given to replicate experiments using the cell line: See Recommendation 4) below.	

見本 レビューチェックリスト

リストは ICLAC Cell Line Checklist Version 1.2 (2014年3月) より転載。赤字部分は筆者らによる

研究者に求められる対策

日本の研究者には、まず細胞使用研究に起こっている現状をしっかりと把握し、細胞誤認による研究社会の損失について危機感をもち、自覚していただくことが必要である。細胞誤認は研究報告の信頼性を大きく左右するものであり、これは他人の研究報告によって自分が被害を受けることになるかも知れないし、逆に自分の研究報告が他人に迷惑を掛けるかもしれないということにつながる。そのうえで、細胞誤認排除に向けた研究者一人ひとりの取り組みが重要となる。今後は論文投稿時に細胞認証を含む細胞品質に関する情報記載が必須となると考えられるため、研究者が細胞を研究使用する際には、その細胞を受け入れたときからその細胞の品質にも目を配る必要がある。特に、他の研究者から譲り受ける際には細胞認証を含めてしっかりと品質管理を受け入れ時に行う習慣をつけることが重要である。細胞バンクから分譲された細胞においても、論文投稿の際には細胞認証を含めて再度品質管理を実施する必要があるため、研究計画のなかで使っている細胞の管理を徹底しなければならない。実際に論文発表のために行わなければならないのは、論文審査員に普及を目指している前述のChecklistに記載された以下①～④の項目である。

- ①使用した細胞が誤認細胞のリストに記載されている細胞でないこと
- ②ヒト由来細胞であればSTR多型解析を実施し、そのデータを記載するとともに新規の細胞であればドナーのプロファイルと一致すること、既存細胞であればデータベースと照合した結果
- ③ヒト由来以外の細胞に関しては、染色体解析、アイソザイム解析、ミトコンドリアDNAのタイピング¹²⁾などにより、使用した動物種が正しいこと
- ④マイコプラズマに関する検査を実施し、検出されなかったこと

今までに実施していなかった研究者にとっては非常に煩わしく、資金もかかる内容であるが、責任をもって世の中に研究成果を公表するには欠かすことができないものである。一刻も早く細胞誤認を排除するためには、上記の内容に目を向けることが当たり前になる研究社会を構築しなければならないので、論文審査員

の意識改革を皮切りに、研究者個人へ細胞誤認廃絶に向けた取り組みが広がることを切望するものである。

今後の問題点と展望

ヒト由来細胞に関してはDNA鑑定により由来個人(細胞一つひとつ)を同定することができるようになったが、マウスやラットをはじめとするヒト以外の動物細胞などは、近交繁殖がくり返された結果、遺伝子解析により細胞株を一つひとつ見分けることができず、その由来系統を遺伝子型で見分ける程度の技術に留まっているのが現状である¹³⁾。また、ヒト由来細胞においても細胞の樹立情報が必ずしも正しいことが証明できてはいない。それは由来臓器・組織を現在の技術では完璧に見分けることができないからである。分子マーカープロファイルや遺伝子発現解析などを組み合わせればある程度細胞の由来組織を推定することは可能であると考えられるが、細胞バンクにおいても、そこまで細胞の特性を保証した状態で細胞を管理できているわけではなく、樹立者の情報を元に由来組織情報を表示しているに過ぎない。これらの問題は、今後さらなる技術開発が進み、多くの細胞プロファイル情報が付加され、蓄積されていくことにより、ある程度解決するであろう。また、細胞プロファイル情報が充実することによって、これまでの由来組織情報を基にした細胞選択ではなく、遺伝子やレセプターの発現状態の情報を基にした細胞選択が、近い将来可能になると考えられる。

文献

- 1) Gey GO, et al : Cancer Res, 12 : 264-265, 1952
- 2) Kimpton CP, et al : PCR Methods Appl, 3 : 13-22, 1993
- 3) 水沢 博, 他 : 実験医学, 26 : 1395-1403, 2008
- 4) 水沢 博, 他 : 実験医学, 26 : 561-567, 2008
- 5) American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002 : Nat Rev Cancer, 10 : 441-448, 2010
- 6) Chatterjee R : Science, 315 : 928-931, 2007
- 7) Masters JR : Nature, 492 : 186, 2012
- 8) ANSI/ATCC ASN-0002-2011 : ANSI eStandards Store, <http://webstore.ansi.org/RecordDetail.aspx?sku=ANSI%2FATCC+ASN-0002-2011>
- 9) Dirks WG, et al : In Vitro Cell Dev Biol Anim, 35 : 558-559, 1999
- 10) Capes-Davis A, et al : Int J Cancer, 127 : 1-8, 2010

- 11) Dirks WG, et al : Int J Cancer, 126 : 303-304, 2010
 12) Ono K, et al : In Vitro Cell Dev Biol Anim, 43 : 168-175, 2007
 13) Yoshino K, et al : IBC, 2 : 1-9, 2010

Profile

筆頭著者プロフィール

小原有弘：1997年，名古屋市立大学薬学部卒業。2002年，名古屋市立大学薬学研究科博士課程修了。博士（薬学）。'02～'04年，第一化学薬品株式会社薬物動態研究所。'04年，国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部を経て医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室においてJCRB細胞バンク業務に従事。現在に至る。さまざまな手法を用いた細胞特性解析研究に従事しながら，日本組織培養学会細胞品質管理等普及委員会委員長，ICLAC委員，ATCC-SDOメンバーとして研究利用される細胞の品質管理に関する研究活動を実施している。



Book Information

理系なら知っておきたい

ラボノートの書き方【改訂版】

論文作成，データ捏造防止，特許に役立つ書き方+管理法がよくわかる！

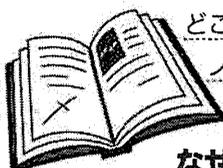
編集／岡崎康司，隅藏康一

ラボノートはなぜ必要？ ルーズリーフでも大丈夫？

どこまで詳細に書けばいい？ 必ず記載すべきことは？

ノートに貼れない実験データはどうする？

家に持ち帰ってもOK？ 異動する時は？ 等々



なぜ書く？ どう書く？ が実例とポイントで一目瞭然！

好評発売中



- ◆定価（本体 3,000 円＋税）
- ◆3色刷り B5判 148頁
- ◆ISBN978-4-7581-2028-9

発行 羊土社

DNA 多型解析によって明らかとなったヒト培養細胞の クロスコンタミネーションの現状

独立行政法人医薬基盤研究所・培養資源研究室 (JCRB 細胞バンク)

家村 将士 小堀 眞季 小澤みどり 平山 知子 川口 英子
大谷 梓 縦山明日香 塩田 節子 小原 有弘

1. はじめに

現代の生命科学研究において、培養細胞は必要不可欠な研究ツールとして幅広い研究分野において利用されている。これは細胞1つが生命体であり生命現象を模倣する最小単位のモデルとして利用価値が高いためである。しかしながら、培養細胞を使用している研究者はその細胞の品質について無関心であるため、マイコプラズマに汚染された細胞、クロスコンタミネーションが起こった細胞とは知らずに研究に利用しているのが現状である^{1), 2)}。

そこで、我々 JCRB 細胞バンクにおいては、1999 年よりヒト由来培養細胞の品質管理の一環として DNA 多型解析による細胞のクロスコンタミネーション検査を実施し、品質管理された確実な細胞を提供できる体制整備を実施してきた。

しかしながら、細胞のクロスコンタミネーションは未だ解決できておらず、間違った細胞を使用した研究報告が後を絶たない。この問題は研究社会において深刻な問題であり、研究労力・費用の浪費が世界的に問題視されている³⁾。

そこで我々 JCRB 細胞バンクは、世界の細胞バンクと協力しながらヒト培養細胞における細胞認証試験のガイドライン策定を行うとともに、DNA 多型データベースの構築とクロスコンタミネーション細胞リストの公開を行い、研究者への啓蒙普及活動に取り組んでいる。本研究では培養細胞におけるクロスコンタミネーションの現状と構築したデータベースについて報告する。

2. 材料と方法

(1) 細胞 DNA の収集と保管

JCRB 細胞バンクに寄託あるいは提供されたヒト培養細胞を用い、その細胞を 5×10^5 cells/mL の濃度に調整し、1 スポットあたり $40 \mu\text{L}$ を FTA Elute マイクロカード (図 1) に塗布して常温乾燥保存した。

(2) 細胞 DNA の抽出

常温乾燥保存した FTA Elute マイクロカードより生検トレパン (図 2) を用いて一部を切り取り、 95°C で 30 分間、加熱処理することにより細胞 DNA を抽出した。

(3) PCR 増幅, 電気泳動, STR-PCR 解析

PCR 増幅には GeneAmp[®] PCR System 9700 (LifeTechnology, USA) を用いて、STR タイピングキットである Promega 社製 PowerPlex[®] 16 HS System によって実施した。PCR 産物は 3500xL Genetic Analyzer (LifeTechnology, USA) で電気泳動を行い、得られたデータを GeneMapper ID ver. 3.2 ソフトウェア (LifeTechnology, USA) で解析し、STR 型を取得した。解析した STR ローカスはアメロゲニン座位を含む 16 ローカス (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, Amelogenin, vWA, D8S1179, TPOX, FGA, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D) である。

(4) データベース構築

細胞 (ロット) 毎に得られた STR 型を CellID として数値化データベースを構築した。その際、同じ細胞であっても検査試料調製日が異なるものはロット違いのデータとしてデータ登録を行った。

The current state of cross-contamination of human cultured cell lines revealed by DNA polymorphism analysis (STR-PCR analysis).

Masashi Iemura, Maki Kobori, Midori Ozawa, Noriko Hirayama, Eiko Kawaguchi, Azusa Ohtani, Asuka Momiyama, Setsuko Shioda, Arihiro Kohara. JCRB Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation.

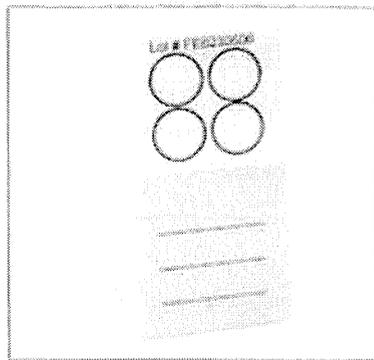


図1 細胞のDNA収集・保管・抽出に使用したFTA Elute マイクロカード

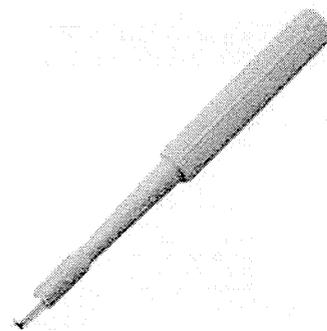


図2 細胞のDNA抽出の際にFTA Elute マイクロカードを切り取るのに使用した生検トレパン

表1 STR-PCR 解析した総数とクロスコンタミネーション細胞数

総解析数	クロスコンタミネーション細胞数	クロスコンタミネーション率
2362	162(※)	6.4%

※ヒト由来細胞でなかった25種の細胞を含む

(5) データ検索エンジンの構築

構築したデータベース内での検索ならびに新たなデータとの比較検索を行うための検索エンジンの開発を行った。検索項目としては単純比較、指定相互比較、ユーザーデータの検証の3つである。

3. 結果と考察

(1) FTA Elute マイクロカードによる細胞DNAの収集・保管・抽出

細胞のDNA収集・保管・抽出のためFTA Elute マイクロカードを使用した。今回解析に用いたDNAにおいて、その量と質に問題はなかった。本方法は細胞を直接カードに塗布するだけでDNAの収集と長期保管が可能であり、細胞のDNAリファレンスを作成するのに非常に有効な方法と考えられる。また、抽出できるDNAにおいても解析に必要な十分量を確保でき、検査に問題ない品質が確認できた。

(2) 培養細胞におけるクロスコンタミネーションの頻度

JCRB 細胞バンクに登録あるいは提供された細胞に関して解析を実施した結果、解析総数 2362、クロスコンタミネーション検出細胞数 164 (6.4%) であった (ヒト由来細胞以外であった 25 細胞種を含む) (表 1)。また、JCRB 登録細胞においては表 2 に示すように 43 種の細胞においてクロスコンタミネーションが見

つかった。

このクロスコンタミネーションの頻度は、2008 年に JCRB 細胞バンクと理研セルバンクで報告した^{2, 4)} 培養細胞のクロスコンタミネーション検出 (表 3) とほぼ同じであり、変わっていない。しかしながら、検査対象とした細胞は細胞バンクへの寄託細胞を大部分として、細胞の品質管理に関して意識の高い研究者からの検査試料である。我々が以前に研究者が普段使用しているマイコプラズマ汚染細胞の研究への使用頻度調査結果が約 26% であったことから、品質管理に無関心な研究者が使用している細胞のクロスコンタミネーション率は、より高いことが容易に予測される。

(3) 細胞クロスコンタミネーションデータベースと検索エンジン開発

STR-PCR 解析によって得られた細胞の STR 型を CellID として数値で表現し、その数値を用いたデータベースが構築できた。さらに一致率判定のために、評価値 (EV) (図 3) を用いた。その結果、全データを用いた経験則から、 $EV \geq 0.85$ を同一のヒト由来細胞と判定することができた。また、データベースを検索する検索エンジンを開発し、単純比較、指定相互比較、ユーザーデータの検証が可能なサイトを設置し、研究者自らが比較や検証を行うことができるようになった。これにより、細胞を認証するための基盤構築ができた。

表2 JCRB 細胞バンクに登録細胞において検出されたクロスコンタミネーション細胞一覧

No.	登録番号	細胞名	細胞型	クロスコンタミ細胞名
1	JCRB0001	AZ-521	Gastric carcinoma	HuTu 80
2	JCRB0033	CORF-CEM	Leukemia, acute lymphoblastic, T cell	AG-F, COC- COLE, EU-7, MKB-1, RG-2A, HTMB-460, WSH-ALCL
3	JCRB0110	PC-3	Prostate carcinoma	ALVA-31, ALVA-41, ALVA-95, ALVA-101, DuPro-1, JHU019, PCI-3, PPC-1
4	IFO50288	U-251 MG	Glioblastoma	B2-17, KNS-69, SNB-19, TK-1
5	JCRB0830	PEER	Leukemia, acute lymphoblastic, T cell	BE-13
6	JCRB0134	MCF-7	Breast carcinoma	BC-1, HTERF-EEC, KPL-1
7	JCRB0810	ME-180	Cervical carcinoma	AZ008, C13, OV2008, OV2008/C13, SF767
8	JCRB0650	IMR-92	Neuroblastoma	CHP-100
9	JCRB0225	COLO320 DM	Colon carcinoma	COLO-597
10	JCRB0662	HEL	Leukemia, acute myeloid, M6	DAMI
11	JCRB1505	Ishikawa 3-H-12	Endometriai carcinoma	ECC-1
12	IFO50073	MRC-5	Lung cells, embryonic fibroblast	Flow 13000
13	JCRB0668	Flow3000	Lung cells, embryonic fibroblast	Flow 7000
14	JCRB1954	Hep G2	Liver, hepatocellular carcinoma	H7D7A, H7D7B, H7D7C, H7D7D
15	IFO50022	HL-60	Leukemia, acute myeloid, M2	HIMEQ-1, P39/TSGANE(P30/TSU), PLB-985, RED-3, YJ
16	JCRB1036	HSC-42	Gastric carcinoma	HSC-41
17	JCRB0976	A549	Lung carcinoma	JHU029
18	JCRB0921	U937	Lymphoma, histiocytic	JOSK-1, JOSK-K, JOSK-M, JOSK-S, MOBS-1, SAML-1, YAA, YAP
19	JCRB0919	K562	Leukemia, chronic myeloid, blast crisis	DD, K051, PC-MQ5, RM-10, RS-1, SAM-1, SPI-801, SPI-802, T-33, TI-1
20	JCRB0905	KG-1	Leukemia	KMT-2
21	JCRB0625	Ca9-22	Oral carcinoma	MSK-922, K05C-3
22	JCRB0111	VERO	Kidney, normal renal cells	ECTC
23	JCRB0255	MKN74	Gastric carcinoma	MKN28
24	IFO50040	Nanawa	Lymphoma, Burkitt	MUT2-1
25	JCRB0612	RAJ1	Lymphoma, Burkitt	NC-37, TDL-4
26	JCRB0141	PHK16-0b	Skin, immortalized keratinocytes	NGC16
27	JCRB0983	LoVo	Colon carcinoma	NGCL-1
28	JCRB0226	COLO201	Colon carcinoma	NS-3
29	JCRB1047	OVSAYO	Ovarian carcinoma	OVMIU
30	JCRB0113	HT-1080	Sarcoma (fibrosarcoma)	PEAZ-1
31	JCRB0070	MJA PaCa-2	Pancreatic carcinoma	PH61-N
32	JCRB0516	Wi-38-40	Lung, normal diploid fibroblasts	PSV811
33	JCRB0812	RERF-LC-MA	Lung, squamous cell	SK-MES-1
34	JCRB0172.1	RMG-II	Ovarian carcinoma	RMG-1
35	IFO50312	SNG-II	Endometrial carcinoma	RMUG-L, RTSG
36	JCRB0801	Calu-1	Renal cell carcinoma	SLK
37	JCRB0635	RPMT 1708	Lymphoblastoid cell line, normal donor	TDL-3
38	JCRB0972	RD	Sarcoma (rhabdomyosarcoma)	TE671, TE671 Subline No 2
39	JCRB1079	IHH-4	Thyroid, papillary thyroid carcinoma	TMH-1
40	JCRB0423	YMB-1	Breast carcinoma	ZR-75-1
41	JCRB0825	YMB-1-E	Breast carcinoma	ZR-75-1
42	JCRB1062	JHH-1	Liver, hepatocellular carcinoma	Mouse
43	JCRB1144	HEC-18D	endometrial serous adenocarcinoma	HEC-155

表3 2009年に報告したJCRB 細胞バンクと理研細胞バンクにおけるクロスコンタミネーション細胞数

	検査細胞数	クロスコンタミネーション細胞数	クロスコンタミネーション率
JCRB細胞バンク	638	38	6.0%
理研細胞バンク	565	53	9.4%
合計	1203	91	7.6%

(4) 細胞クロスコンタミネーション廃絶のための国際的取り組み⁵⁾

これまでに多くの細胞のクロスコンタミネーションが報告されているが、間違った細胞の使用は廃絶されておらず、今でも多くの研究報告の中に間違った細胞の使用が認められる⁶⁾。このような研究の信憑性・再現性を脅かす事態に対して、世界の細胞バンクが協力して、細胞の認証試験の重要性を訴え、近年は論文投稿時に必要な細胞の品質管理検査として投稿論文への情報記載が義務付けられ始めている⁷⁾。既に多くの有名雑誌 (Science, Nature, Cancer Res. など) は、使用した細胞に対して、1. いつ, どこから, 入手した細胞なのか?, 2. 品質管理試験が実施され認証された細胞株かどうか?, 3. 品質管理試験項目?, 4. 品質管理試験は, いつどのように実施されたか? について記載を義務付けている。今後このような情報記載が必要になる流れは促進されると予想され, そのためにもデータベースの整備・維持は必須であり, 世界の細胞バンクが連携してその構築に取り組んでい

$$\text{評価値 (EV)} = \frac{\left[\frac{\text{2種の細胞間で一致して検出された繰り返し配列種の数}}{\text{2種の細胞の全てのローカスで検出された繰り返し配列種の総数}} \right] \times 2}{2}$$

図3 細胞同士の一一致率を表す評価値 (EV) の計算式

る。現在までに細胞認証に関するガイドラインの策定, クロスコンタミネーション細胞リスト⁸⁾, NCBIへの細胞情報登録など (表4) を実施した。

4. まとめ

細胞バンクに寄託される細胞の約6.4%にクロスコンタミネーションが起こっていることが明らかとなった。これは世界的にも大きな問題となっており, 今後論文投稿規定の厳格が促進され, STR-PCR解析によって研究に使用した細胞が正しい細胞であることを認証しなければいけない状況となる。それに先駆け

表4 細胞認証に関する情報提供 URL 一覧

細胞認証に関わるサイト	URL
構築したSTRデータベースと検索サイト	http://cellbank.nibio.go.jp/legacy/str2/top.html
細胞認証に関するガイドライン	http://www.ansi.org/news_publications/news_story.aspx?menuid=7&articleid=3264
クロスコンタミネーション細胞リスト	http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_contaminated_cell_lines
NCBI細胞登録サイト	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample

てヒト由来細胞のSTR データベースを構築した意義は大きく、今後構築したデータベースが有効活用されることが期待される。研究の信頼性・再現性保証のため細胞品質管理の重要性が注目されているので、研究者一人一人が高い意識を持って、自分が行った研究に責任を持つため細胞の品質に関しても意識の改革が必要と考えられる。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金によって実施された成果である。また、JCRB 細胞バンクにおいて細胞バンク事業に従事したスタッフ一同によってなされた研究成果であるので、皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 小原有弘, 大谷梓, 小澤裕, 塩田節子, 増井徹, 水澤博: 培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査. *Tiss. Cult. Res. Commun.* 26: 159-163 (2007)
- 2) 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: 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. *実験医学* 26(4):561-567 (2008)
- 3) It is time for all involved to tackle the chronic scandal of cell-line contamination. *Funders first. Nature* 457, 935-936 (2009)
- 4) 水澤博, 小澤裕, 増井徹, 平田誠, 小原有弘: STR 分析によるヒト培養細胞の迅速同定法, - 培養細胞のクロスコンタミネーション防止のために -. *実験医学* 26(9):1395-1403 (2008)
- 5) John R. Masters: Cell-line authentication: End the scandal of false cell lines. *Nature* 492, 186 (2012)
- 6) MacLeod RA, Dirks WG, Drexler HG: One falsehood leads easily to another. *Int. J. Can.* 122(9), 600-607 (2008)
- 7) American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002: Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer.* 10(6), 441-448 (2010)
- 8) Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI: Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer.* 127(1), 1-8 (2010)

特集：再生医療における最新動向と細胞培養施設・装置

日常の細胞培養管理から考える 培養関連機器に求められる機能と製品像

(独)医薬基盤研究所 小原 有弘

○ はじめに

再生医療は日本発でヒトiPS細胞が報告されて以降、国を挙げて盛んに研究が進められ、事業化が始められている。また、それに付随して再生医療に用いる細胞培養方法の開発、大量培養に向けた足場などの培養資材・基材の開発、培養に用いる容器の開発など、非常に活発に機器・器具等の開発が進められている。実際に大学病院等の医療機関には大型の細胞調製センター(Cell Processing Center: CPC)が完備され、その中ではクリーンな環境で安全かつ高品質な多くの細胞を取り扱うことができるように、部屋全体が設計され、再生医療研究が行われている。しかしながら、再生医療に用いる細胞ならびにそれに付随する機器や器具等の管理をどのように取り扱うかにはさまざまな指針が発令され定義されているが、まだまだ議論の余地があると言える。再生医療が身近な治療となるためには、この分野における製品開発がさらに活発化され、より良い培養関連機器開発が必須であり、日常の細胞培養管理から考えなければならぬ部分も非常に多い。再生医療の産業化を推進する上で安全かつ品質を保証した製品を生産することが重要であり、自動培養装置や無菌的な培養を行うためのアイソレータなどの開発が重要であると考えられるが、本稿では細胞バンクで行われている日常の細胞培養から考える問題点を整理し、特に細胞の保管、輸送に目を向けた解説を行う。

○ 日常の培養管理から考える問題点の整理

JCRB細胞バンク(厚生労働省の細胞バンク)は、日本国内初の公的細胞バンクとして設立から30年が経ち、現在は年間100種類以上の細胞を培養し、常時多数の細胞を並行して培養しながら、徹底的な品質管理に重点を置いている。そこで問題となるのが細胞培養中の管理である。細胞の培養中に取り違いや、他の細胞の混入が起これば大きな問題となる。また、1つ1つの細胞が微生物やウイルス汚染のない細胞とは限らないので、それを他の細胞に広げることのないような培養管理が必要と考えられる。また、培養中以外にも細胞の保管や輸送における管理は非常に重要である。細胞バンクにおける細胞保管は原則として液体窒素タンクで行っているが、液体窒素タンクには液相保存用のタンクと気相保存用のタンクが存在し、それぞれにおいて長所と短所が存在するので、保管中に微生物・ウイルスの混入を防ぐとともに、温度上昇のない確実な保管をするための管理が必要となる。さらに細胞の輸送においても目を向ける必要がある。細胞輸送中の品質劣化や誤発送においても管理しなければならないし、生体試料としての輸送上の安全性も考慮しなければならない。本稿においては細胞培養中の管理、細胞の保管管理、細胞の輸送管理に関して概説する。

○ 細胞培養中の管理

細胞培養中の管理が再生医療に用いる細胞を準備する上で最も重要となる。細胞の取り違いや微生物汚染、ウイルス汚染を細胞培養中に起こすことのないように管理するには、細心の注意が必要である。そこで細胞培養中は1つ1つの細胞をしっかりと区別することが重要となる。そのためには培養に用いるインキュベーターを別々にすることも有効であるが、トレイなどを使用して区別することも有効である(図1)。また細胞取り違い防止には直接培養容器やトレイに入れ替わりが起これない形で検体管理のためのタグをつけることが望ましい。もし、培養容器のフタやトレイにだけタグをつけてしまうと、フタの入れ替わりやトレイへの入れ違いによって容易に細胞の取り違いが起これてしまうことになる。また、このタグをつけることで、作業者が取り扱った細胞を管理記録し、取り違いを防

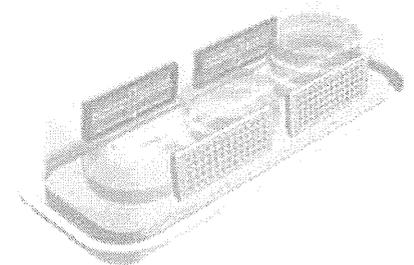


図1 細胞培養中の管理に使用するトレイ
(製品名: マイキャニスタ)
他からの汚染を防ぐとともにインキュベーターを汚染しないために使用が勧められる。
(出典: 日本ジェネティクス社製)

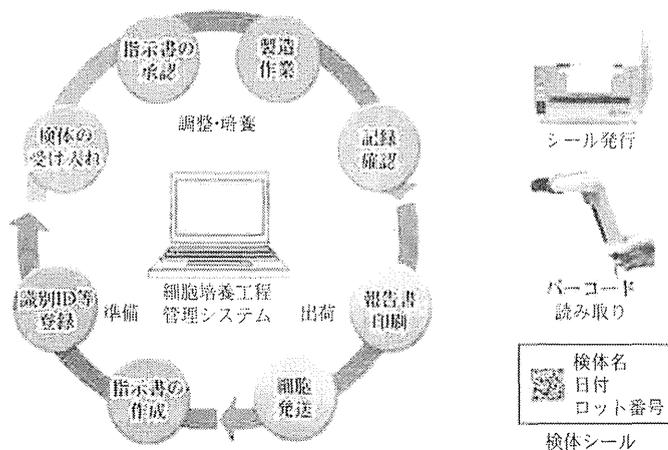


図2 細胞培養工程管理システム概念図
(出典：Panasonic社HPより抜粋、一部改変)

ることが可能となる。実際の作業の際にはクリーンルーム内で作業をするため、できる限り余分なものの持ち込みを制限しなければならないので、最近では作業者の入退室管理とともに、作業者がどの細胞を用いてどんな作業を行ったかをPC管理できるよう、二次元バーコードやICタグと簡易型の端末が利用され、クリーンルームの外から出された作業指令に対して、どの作業者がどの細胞を使用し、どのような作業をしたかを記録する培養工程管理システムが開発されている(図2)。

● 細胞の保管管理

細胞の保管は再生医療を行う上では絶対必要と考えられる。たとえ、生体より取り出した細胞を増殖させ、それを生体に戻すような治療を行ったとしても、トレイサビリティあるいは治療時の安全性保証のためにも、一部の細胞保管が必要である。したがって細胞の保管管理のための設備を用意し、しっかりとした管理を行うことが重要となる。細胞の保管は通常凍結した状態で、液体窒素タンクを用いて行う。細胞を凍結すると全ての代謝が止まり、長期の保存が可能となるので、貴重な細胞の保存・管理には、細胞の凍結保

存法は必要不可欠な技術である。また凍結することによって細胞の輸送を容易にでき、国内外への細胞輸送が可能となる。凍結した細胞は液体窒素中に保存することによって半永久的に保存可能とされており、1951年に初めて樹立されたヒト子宮頸がん由来細胞であるHeLa細胞は今でも多くの研究者によって使用されている。-80℃の超低温フリーザー内でも細胞の種類や条件によっては数か月間の保存が可能であるが、その間確実に細胞生存率が低下する。細胞バンクにおいては自動供給装置付きの430Lサイズの液体窒素保存容器(写真1)を使用し、気相タンクと液相タンクの使い分けをしている。培養初期の微生物汚染検査が終了していない細胞や分譲用に用いる細胞

などは気相タンクに保存し、液体窒素を媒介とした汚染が起こらないよう心がけている。液相タンクには長期安定的に保存が必要な種細胞を完全密封されたガラスサンプルに入れて保存している。

細胞保存の際に最も重要となるのは細胞保存に関する記録の作成である。記録に必要な情報としては細胞名(細胞株名)、細胞登録番号、凍結年月日、凍結者、凍結保存本数、保存細胞濃度・量、凍結保存培地組成と凍結保存場所などである。これらの記録ならびに保管管理を実現するため最近では非接触式RFID(ICタグ)を採用した凍結保存チューブならびに管理システムが開発されている(写真2)。また、使用する容器もできる限り密封できる容器を採用することにより、外からの混入を回避することが望ましい。

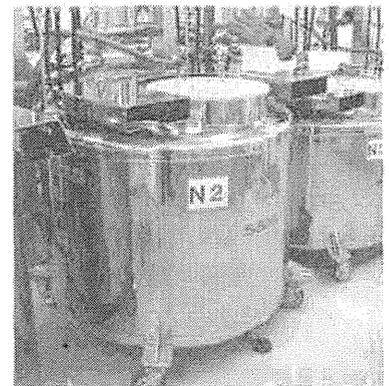
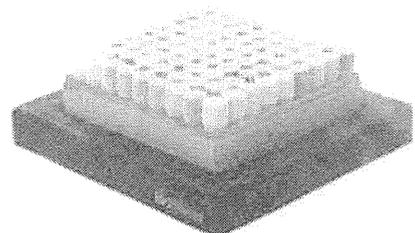


写真1 細胞バンクで使用している430L液体窒素タンク



写真2 凍結保存チューブの非接触式RFID(ICタグ)管理



● 細胞の輸送管理

再生医療が身近な治療となるためには、治療に用いる細胞を安全かつ確実に輸送する手段が必要となるはずである。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。細胞バンクでもこの方法を用いて細胞分譲を実施しているが、梱包時・輸送時に凍結細胞が温度上昇しないように注意する必要がある。細胞を液体窒素容器から取り出し、ドライアイス梱包する際においてもできる限り低温状態で作業を実施し、手早く作業を終了しなければ、温度上昇に伴う細胞生存率の低下を招くことになる。また、凍結細胞を梱包する際にも断熱効果の高い梱包資材（エアークッションなど）を直接細胞の周りにおいてしまうと一時的な温度上昇により凍結細胞の品質低下を招くので注意するべきである。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。また、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）（写真3）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。細胞凍結ができない細胞やドライアイス梱包による輸送が不可能な地域への細胞輸送には培養状態で細胞を輸送することも考えなければならない。細胞の種類としては浮遊細胞と接着細胞の2種類が考えられるが、それぞれに適した容器を選択し、培養状態で細胞輸送を行う（写真4）。浮遊・接着いずれの場合においても細胞濃度、輸送温度、輸送状態に注意を払う必要がある。まず細胞濃度は輸送中にも細胞が若干増殖することも考慮に入れて過増殖しない細胞濃度に調整する必要がある。細胞量が少なすぎても、多すぎても到着地での細胞増殖の不良が認められる。次に輸送温度であるが断熱効果の高い容器に入れた状態で室温輸送するのが好まし

い。通常細胞培養に用いる温度は 37°C 程度である。この温度より低い温度であれば通常の細胞株であれば増殖速度は遅くなるが、死滅することはない。輸送状態は液漏れを防ぐよう、蓋の部分のシーリング、二次容器（ビニール梱包）の使用、万が一培養液が漏れた際の吸収材の使用などを行い、安全に確実に輸送する必要がある。上記のいずれの細胞輸送の際にも、温度管理には温度データロガーを使用することで、輸送中の温度管理が実施できるので、確実な温度の管理には非常に便利である。

● おわりに

日常の細胞培養管理から考えると、再生医療に向けた培養関連機器の製品開発においては、細胞培養の自動化や、如何にクリーンな環境で製品を作製するかというところに重点が置かれているように見受けられる。しかしながら、品質保証の問題、トレイサビリティの問題、細胞保管・輸送の問題など製品開発によって乗り越えなければいけない課題が山積しているのが現状ではないであろうか？特に細胞保管や細胞輸送に関しては非常に重要な課題であり、クリーンな環境で安全かつ確実な保管と輸送が実現できなければ、再生医療が広く浸透するには至らないであろう。また、この部分の安全性担保については誰も検証に至っていないのが事実であろう。今後これらの課題に取り組み、新しい視点の製品開発が進むことで、広く再生医療分野の産業活性化が期待できると考えられる。



写真3 液体窒素凍結試料運搬容器（ドライシッパー）



写真4 培養状態の細胞輸送

筆者紹介

小原有弘

（株）医薬基盤研究所
培養資源研究室（JCRB細胞バンク）
サブリーダー

平成24年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告

細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験の
PCR法の見直しに関する研究^{*5}

内田 恵理子^{*1, #}, 古田 美玲^{*1}, 菊池 裕^{*1}, 窪崎 敦隆^{*1}, 遊佐 精一^{*1}, 宮原 美知子^{*1},
佐々木 裕子^{*2}, 小原 有弘^{*3}, 大谷 梓^{*3}, 松山 晃文^{*4}, 大倉 華雪^{*4}, 山口 照英^{*1}

Collaborative Study on the PCR Detection Method of Mycoplasma Testing for Cell Substrates;
The Revision for General Information of JP

Eriko UCHIDA^{*1, #}, Birei FURUTA^{*1}, Yutaka KIKUCHI^{*1}, Atsutaka KUBOSAKI^{*1},
Seiichi YUSA^{*1}, Michiko MIYAHARA^{*1}, Yuko SASAKI^{*2}, Arihiro KOHARA^{*3}, Azusa OHTANI^{*3},
Akifumi MATSUYAMA^{*4}, Hanayuki OKURA^{*4} and Teruhide YAMAGUCHI^{*1}

1. 緒言

マイコプラズマは細胞壁のない原核生物で、自己増殖能を持つ最小の微生物である。培養細胞を汚染する代表的な微生物であり、国内でも培養細胞のマイコプラズマ汚染は高頻度に認められている¹⁾。細胞培養の過程で細胞がマイコプラズマに汚染しても不顕性感染となり見逃されやすい。しかし、マイコプラズマの汚染により細胞は増殖性や形態、表面マーカーの変化や染色体の異常、サイトカインの誘導など様々な影響を受け、またマイコプラズマの菌体成分が抗原性を呈する可能性もあり、医薬品の製造に汚染細胞を用いることは不適切である^{2,3)}。したがって、バイオ

医薬品の製造に用いる細胞基材について、適切な方法でマイコプラズマ否定試験を実施し、その存在を否定することが必要である。このための試験法として、日本薬局方(日局)参考情報に「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」⁴⁾が記載されている。一方で、細胞そのものを治療に用いる細胞・組織加工医薬品等でも、マイコプラズマによって汚染されることにより治療を受けた患者に重篤な感染症をもたらす可能性があり、最終製品でのマイコプラズマ否定試験の実施が求められている^{5,6)}。細胞・組織加工製品でも、マイコプラズマ否定試験として日局参考情報が広く利用されている。

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^{*2} 国立感染症研究所 東京都武蔵村山市学園 4-7-1 (〒208-0011)

National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan

^{*3} 独立行政法人医薬基盤研究所 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8 (〒567-0085)

National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan

^{*4} 公益財団法人先端医療振興財団 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2 (〒650-0047)

Foundation for Biomedical Research and Innovation, 2-2 Minatojima Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan

^{*5} 本研究は、平成24年度(一財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の「日本薬局方の試験法等に関する研究」により実施したものである。

責任著者 Corresponding author

日局参考情報には、医薬品の製造に用いる細胞基材についてマイコプラズマ汚染を否定するために実施すべきと考えられる試験法として、培養法、指標細胞を用いたDNA染色法、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法の三つの試験法が提示されている。特に、PCR法はマイコプラズマの迅速・高感度な試験法であるが、日局では原則として、従来より実績のある培養法及び指標細胞を用いたDNA染色法による実施を求めており、PCR法はあくまでDNA染色法を補完する二次的な試験と位置付けられている。しかし、バイオ医薬品の製造では、細胞基材のみならず、バルクハーベストや製造工程での工程管理試験としてもマイコプラズマ試験が実施されており、PCR法を含む核酸増幅検査(NAT)等の迅速試験法が要望されている。細胞治療・再生医療製品の試験として実施する場合も迅速な試験法の要望が高く、日局の改正が望まれている。このような背景のもと、17局に向けてマイコプラズマ否定試験のPCR法の改正を生物薬品委員会で行うこととされた。

現行の日局PCR法は、特定のPCR用プライマーセットを用いた二段PCR法が例示されている。一方、欧州薬局方(EP)にはマイコプラズマ検出用NATのパリデーション法が記載され、パリデーションに適合すればどのようなNATでも培養法又はDNA染色法の代替法として使用可能である⁷⁾。既に、EP準拠のパリデーションに適合するとされるマイコプラズマ用PCR検出キットが複数市販されており、NAT法を製造工程管理に用いた医薬品が承認されている。また、日局例示のプライマーでは、EPのパリデーションに用いられる標準菌種が検出されないという問題点も指摘されている。更に最近、生物学的製剤基準(生物基)のマイコプラズマ否定試験法が改正され、核酸増幅法が新たに記載されたが、生物基の核酸増幅法も具体的な方法を規定するものではなく、特異性や検出限界、頑健性の確認を含めた試験法実施の注意点が示されたものとなっている⁸⁾。このような現状から、日局改正案の方向性としては、現行のように特定のPCR法を示すのではなく、EPに準じてパリデーションの条件を示すという方向で検討するのが適当と考えられるが、そのためにはEPのパリデーション項目の妥当性を検証する必要がある。そこで本研究では、4施設からなる共同研究班を組織し、EPに適合しているとして市販されている複数のPCRキットのうち、プライマーが公開されているものをモデルとして取り上げて共同検定を行い、日局PCR法との比較を行うと共に、EPのパリデーションの妥当性とNAT実施上の注意点について検討した。

2. 実験方法

2.1 マイコプラズマ参照品の調製とコロニー形成単位の算出

菌株の培養とコロニー形成単位(Colony forming unit, CFU)の算出は、既報⁹⁾を若干改変して行った。

液体培地はHayflickの変法培地を用いた。超純水800mLにDifco PPLO broth(日本BD, 商品番号255420)21g, グルコース(和光純薬工業)又はアルギニン塩酸塩(ナカライテスク)3.0g, フェノールレッド(ナカライテスク)20mgを加えてオートクレーブ滅菌(121°C, 20分間)し、室温まで冷却後に注射用ペニシリンGカリウム(Meiji Seika ファルマ)50万単位, 非働化ウマ血清(Biowest)100mL, 25%新鮮酵母エキス[ニッテンドライイースト(日本甜菜糖)で自家調製]100mLを加えて1Lとし、グルコース添加Hayflickの変法培地には1mol/L NaOHを加えてpH7.6~7.8に、アルギニン添加Hayflickの変法培地には1mol/L HClを加えてpH7.0~7.2にそれぞれ調製した。Hayflickの寒天平板培地は、超純水800mLにDifco PPLLO agar(日本BD, 商品番号241210)35gを加えてオートクレーブ滅菌し、60°Cまで冷却後に注射用ペニシリンGカリウム50万単位, 非働化ウマ血清100mL, 25%新鮮酵母エキス100mLを加えて1Lとし、9cmシャーレに25mLずつ分注した。

菌株は製品評価技術基盤機構(NBRC)から *Acholeplasma laidlawii* NBRC 14400, *Mycoplasma fermentans* NBRC 14854, *M. hyorhinis* NBRC 14858, *M. orale* NBRC 14477, *M. pneumoniae* NBRC 14401及び *M. salivarium* NBRC 14478を、American Type Culture Collection(ATCC)から *M. arginini* ATCC 23838をそれぞれ購入し、パリデーション用選定菌種とした。各菌種の由来、自然界の宿主及び培養に用いた液体培地をTable 1に示した。前培養したF1からF4の各菌種1mLを接種した100mLの液体培地をインキュベーターで培養(36°C)し、pHが下がってグルコース添加Hayflickの変法培地が黄色に、pHが上がってアルギニン添加Hayflickの変法培地がピンク色にそれぞれ変わった直後の菌体を含む培養液を1mLずつクライオチューブに分注し、凍結保存(-80°C)してマイコプラズマ参照品(アコレプラズマを含む)とした。

CFUは2施設で複数回測定し、post preservation titerを算出した。各参照品を融解後、滅菌生理食塩水で 10^1 から 10^8 倍液の10倍希釈液を作製し、Hayflickの寒天平板培地に5µLの希釈液を2スポット滴下し、シャーレにフタをした状態で乾燥させた後、上下反転させたシャーレをCO₂インキュベーターで培養(5% CO₂, 36°C)し、実体

Table 1 バリデーション用に選定した菌種

菌種	由来	宿主	液体培地
<i>Acholeplasma laidlawii</i> NBRC 14400	Sewage	Bovine	グルコース添加 Hayflick の
<i>Mycoplasma hyorhinis</i> NBRC 14858	Nasal cavity of pig	Swine	変法培地
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> NBRC 14401	Human atypical pneumoniae	Human	
<i>Mycoplasma arginini</i> ATCC 23838	Mouse brain experimentally infected with scrapies	Bovine, Caprine	アルギニン添加 Hayflick の
<i>Mycoplasma fermentans</i> NBRC 14854*	Ulcerative balanitis	Human	変法培地
<i>Mycoplasma orale</i> NBRC 14477	Human oropharynx of child	Human	
<i>Mycoplasma salivarium</i> NBRC 14478	Saliva	Human	

*グルコース添加 Hayflick の変法培地でも培養可能

顕微鏡下でマイコプラズマのコロニー数を計測した。

なお、*M. arginini* は1回目の試験ではATCCによりCFU値が表示された参照品をそのまま測定に用い、2回目の試験ではATCCより入手後に培養・増幅して-80°Cで凍結保存後にCFUを測定したものを使用した。

2.2 マイコプラズマ参照品のコピー数測定

マイコプラズマ参照品のゲノムコピー数測定は、3施設において以下の方法により実施した。まず、凍結融解後のマイコプラズマを14,000×g、4°C、30分間で遠心分離し、回収したペレット状の菌体を洗浄せずにPBSに懸濁した。得られた菌体全量からPureLink Genomic DNA mini kit (Life Technologies)を用いてゲノムDNAを抽出した。DNA含量を260nmの吸光度測定により求め、以下の計算式を用いてゲノムコピー数を算出した¹⁰⁾。

$$\text{Copies/mL} = [\text{DNA contents } (\mu\text{g/mL})] \times 10^6 \times (0.978 \times 10^9) / [\text{genome size}]$$

2.3 マイコプラズマPCR検出のための試料調製

バイオ医薬品の製造に汎用されているCHO細胞をモデルとして取り上げ、市販されているCHO-DG44細胞をCD DG44培地(GIBCO)を用いて 5×10^6 cells/mLの細胞懸濁液として調製し、マイクロチューブに900μLずつ分注した。マイコプラズマ参照品7種を溶解後、無血清MEM培地を用いて段階希釈し、細胞懸濁液に1/10量スパイクした。共同検定は2回実施し、1回目の共同検定(2013年1~4月実施)ではマイコプラズマの最終濃度が100, 10, 1, 0.1, 0.01 CFU/mLとなるように調製した。2回目の共同検定(2013年7~8月実施)では*M. fermentans*を除く6種のマイコプラズマ参照品について10, 3, 1 CFU/mLとなるように調製した。2回目の共同検定が1回目の試験となる場合は7種のマイコプラズマをそれぞれ、最終濃度が100, 10, 3, 1, 0.1 CFU/mLとなるように細胞懸濁液に添加して調製した。マイコプラズマをスパイクした細胞懸濁液及び陰性対照となるマイコプラズマ非感染

細胞懸濁液450μLをそれぞれ2本ずつマイクロチューブに分注し、MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Prep Kit (Roche Diagnostics)を用いて、マニュアルに従いマイコプラズマDNAを抽出し、DNA溶液各200μLを得た。得られたDNA抽出液を用いて、以下のマイコプラズマPCR検出試験を実施した。

2.4 マイコプラズマのPCR検出法

2.4.1 二段PCR法

日局に例示されているマイコプラズマ検出用プライマーセット又はJISのアコレプラズマ検出用プライマーセット⁸⁾を用いて二段PCRを実施した。使用したプライマーの塩基配列をTable 2に示す。反応条件は日局に準じて一次PCR、二次PCRともに94°Cで30秒の変性、55°Cで2分間のアニーリング、72°Cで2分間の伸長を30回繰り返して増幅した。一次PCRにはMycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Prep Kitを用いて抽出したDNA抽出液20μLを用い、二次PCRには1次PCRの反応生成物1μLを用いた。検出はエチジウムブロマイド染色後アガロースゲル電気泳動、又はゲルによる検出との相関性が確認されたマイクロチップ電気泳動MultiNA(島津製作所)を用いてCYBR Goldで検出し、目的とするサイズの特異的なバンドの出現を陽性と判定した。

2.4.2 PCR法

MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit (Roche Diagnostics)を用いてキットのプロトコールに従い実施した。PCR一反応につきDNA抽出液20μLを使用した。プライマーはキットに添付されているユニバーサルマイコプラズマプライマー¹¹⁾(Table 2)を使用した。反応条件はキットのプロトコールに従ってタッチダウンPCRとし、94°Cで10分間の変性後、94°Cで30秒の変性、70°Cで30秒のアニーリング、72°Cで45秒の伸長のサイクルを2回、以後アニーリング温度のみ69°Cから61°Cまで2サイクルごとに1°Cずつ下げて変性、アニーリング、伸長反応を行った後、アニーリング温度60°Cで25サイクル、最後に

Table 2 各試験法に使用するプライマー配列

試験法	Primer Sequences	
JP nested PCR	1st PCR	F1: 5'-ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT-3' R1: 5'-CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCAAAGGCAT-3'
	2nd PCR	F2: 5'-GTG(G/C)GG(A/C)TGGATCACCTCCT-3' R2: 5'-GCATCCACCA(A/T)A(A/T)AC(C/T)CTT-3'
JIS nested PCR for <i>Acholeplasma</i>	1st PCR	AF5: 5'-CTAACTAACACTTAGCACAA-3' AR6: 5'-ACTGTGTGCCCTTTGTTCCTT-3'
	2nd PCR	AF3: 5'-GTCACCTCAAACAAGTAACCA-3' AR5: 5'-TTTCAAAGATCTCAATTAGG-3'
MycotoOL PCR	Universal Mycoplasma primer	forward: 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3' reverse: 5'-CGGATAACGCTTGCACCTATG-3'
MycotoOL Real-Time PCR	Unknown mixed primer-probe set	

72°Cで4分間の伸長反応を行った。反応後の検出はプロトコール通り6% TBE アクリルアミドゲル電気泳動又はMultiNAを用いて行い、目的とするサイズのマイコプラズマ特異的なバンドが検出された場合に陽性と判定した。

2.4.3 リアルタイムPCR法

MycotoOL Mycoplasma Real-Time PCR kit (Roche Diagnostics)を用いて、キットのプロトコールに従い実施した。一反応についてDNA抽出液20μLを使用した。使用機器は施設により異なり、7300/7500 real-time PCR (Applied Biosystems)又はLight cycler (Roche Diagnostics)を使用した。反応条件、カットオフ値も機種により異なるが、キットのプロトコールに準じた。なお、MycotoOL Mycoplasma Real-Time PCRは各施設とも、1回目の共同検定でのみ実施した。

3. 結果

3.1 マイコプラズマ参照菌種の選定

日局マイコプラズマ否定試験は主としてバイオテクノロジー応用医薬品の生産基材である哺乳類由来の培養細胞を細胞バンクとして用いる場合を対象としている。EPではバリデーションに用いることが最適な標準菌種の組み合わせとして、培養細胞の汚染の出現頻度や系統発生の観点から *A. laidlawii*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. pneumoniae* 又は *M. gallisepticum*, *M. synoviae* (鳥類由来製品を製造に用いる場合), *M. arginini*, *Spiroplasma citri* (昆虫や植物由来製品を製造に用いる場合)の9種が挙げられている。これを基に日局のバリデーションに用いる菌種を検討し、ワクチン製造に用いられる鳥類由来細胞や、まだ医薬品製造に使用されていない植物由来細胞や昆虫由来細胞に由来するマイコプラズマはリストからははずすこととした。EPの標準菌種のうち、*M. gallisepticum*及び*M. synoviae*は鳥類由来、*S. citri*は植物・昆虫由来であり、*M. gallisepticum*と*M. synoviae*は輸入禁止菌種で

もあることから対象から除外した。ただし、医薬品製造に鳥類や植物、昆虫に由来する細胞や培養添加物を用いる場合には、これらの菌種をバリデーションに含めるべきであることを局方に記載する際には注記する必要がある。一方、EPの標準菌種には含まれないが、培養細胞での汚染が観察される *M. salivarium* を日局の参照菌種のリストに含めることとした。

以上を踏まえ、Table 1の7種をバリデーション用マイコプラズマとして選定した。ただし、これらのリストはNATのバリデーション用であり、毎回の試験で陽性対照として用いることは想定されていない。Fig. 1には選定したマイコプラズマの系統樹上の位置を示す。また、共同検定に使用したバリデーション用マイコプラズマ参照品のCFUとゲノムコピー (GC) 数の測定結果をTable 3に示した。参照品について、生菌数と分散性の尺度となる

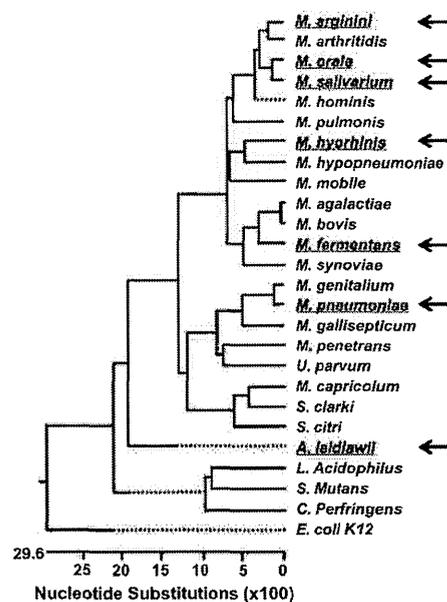


Fig. 1 マイコプラズマの系統樹とバリデーション用に選定した菌種