

培養細胞系でのマイコプラズマの PCR 検出法

高田 容子¹、増井 徹¹、田辺 秀之¹、原澤 亮²、水澤 博¹

¹ 国立医薬品食品衛生研究所、変異遺伝部、細胞バンク

〒158-8501 世田谷区上用賀1-18-1

² 東京大学医学部附属動物実験施設

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

要約 マイコプラズマの汚染を迅速・正確に検出することを目的に、ネステッドプライマーを用いた2段階のPCR法（ネステッドPCR法）⁶⁻⁸⁾を利用した検出系を開発した。2段階のPCRは検出感度を高めると同時に、1段階目のPCRの特異性を確認できる利点がある⁸⁾。陽性コントロールとしてMycoplasma orale DNAを用い、テンプレートDNA濃度3~10 fg/ μ l（1反応あたり2~6コピー）が検出限界であることが明らかになった。更に、PCR法で増幅されたDNAを回収し、塩基配列を決定した結果、細胞に感染しているマイコプラズマ菌種を確実に同定することができた。この一連の方法の開発により、培養細胞に汚染しているマイコプラズマの検出感度、迅速性、また、信頼性を高め、細胞バンクの品質管理を向上させることが可能となった。

キーワード： マイコプラズマ、ネステッドPCR、DNA 蛍光染色法、塩基配列決定

序 文

培養細胞の品質管理に当たって、マイコプラズマ汚染を迅速に検出することは、最も基本的な課題の一つである。マイコプラズマ汚染は、培養細胞に様々な影響を与える。例えば、細胞の形態（核濃縮、細胞の空胞化等）、増殖動態に対する影響、分子生物学的解析に与える影響、細胞の代謝産物（インターフェロン産生等）に対する影響などがある¹⁾。このようなマイコプラズマによる細胞変性は、研究成績に大きな影響を与え問題となる。

国立医薬品食品衛生研究所・細胞バンクでは、培養細胞の品質管理の一つとして、マイコプラズマ検査をDNA 蛍光染色法により実施しているが、

マイコプラズマ汚染の程度が低い場合や被検細胞の生存率が低く、死細胞片が多く混在する場合には、判定が困難で熟練を要する。

そこで、我々はマイコプラズマ微量検出法であるネステッドPCR法^{5,6)}を導入し、数年前から培養細胞の品質管理に利用してきた。従来PCR産物のバンドサイズのみから種の同定をすることは困難であったが、本報で示すように、PCR増幅されたDNAを回収し、塩基配列決定を行なうことにより、マイコプラズマ種を正確・迅速に同定することが可能となった。

本報告では、マイコプラズマに汚染したGOTO細胞を例として、ネステッドPCR法と塩基配列決定を組み合わせた方法の特色・利点を中心に検討

する。

材料と方法

被検細胞として JCRB0612 GOTO 細胞 (Lot. 112495) を用いた。この細胞は過去にマイコプラズマ汚染があり、除染作業した後、供給されていた細胞であるが、DNA 蛍光染色法により再び陽性と判定された細胞である。因みに、マイコプラズマ汚染のある Lot. 112495 を MC-210 (大日本製薬製、細胞培養用マイコプラズマ除去剤) を最終濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ になる様に培地に添加して3週間培養することにより、DNA 蛍光染色法、ネステッド PCR 法ともに陰性となるように、除染することができた。今回、DNA 蛍光染色法とネステッド PCR 法の両手法を比較するために、以下の方法で検出を行なった。

1) DNA 蛍光染色法²⁻⁴⁾

- ①被検細胞は、抗生物質を含まない培地で少なくとも3代以上継代し、confluent になってから培地交換をしないで7日間培養する。
- ②トリプシンは用いず、スクレイパーで細胞を

掻き取り、12,000 rpm, 10分間 4°C で遠心し、培地の量を調整して細胞数がおおよそ 10^6 個/ml となるようにする。

- ③②の細胞懸濁液 100–200 μl を指標細胞である VERO 細胞 (実験前日に 10^4 個/ 2 cm^2 の密度で 4 well スライドチャンバーに播種) に添加して5日間培養後、固定標本を作製する (固定液; 酢酸: メタノール = 1:3)。
- ④標本をヘキスト 33258 で染色して蛍光顕微鏡で観察し (対物レンズ20倍および100倍)、汚染の有無を判定した。

2) ネステッド PCR 法⁵⁻⁸⁾

- ①7日間培養した被検細胞の培養上清 600 μl を等量のフェノールで抽出し、上清をエタノール沈殿して乾燥、注射用蒸留水に再懸濁して最終的に10倍濃縮した DNA の 5 μl (PCR 反応液の10%) を PCR のテンプレートとした。表1に反応液組成を示した。陽性コントロールとして *Mycoplasma orale* DNA を用いた。1段階目の PCR プライマーは、マイコプラズマの 16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子間スペーサー領域で、マイコプラズマ種に共通し

表1 ネステッド PCR 反応液組成

	1 段階目 PCR	2 段階目 PCR
10×PCR 緩衝液 ^{*1}	5 μl	5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	4 μl	4 μl
dNTPs (each 2.5 mM)	4 μl	4 μl
primer F1 (10 μM)	1 μl	—
primer R1 (10 μM)	1 μl	—
primer F2 (10 μM)	—	1 μl
primer R2 (10 μM)	—	1 μl
試料 (template)	5 μl	—
1 段階目 PCR 産物	—	2 μl
Taq DNA ポリメラーゼ (5 U/ μl) ^{*2}	0.25 μl	0.25 μl
滅菌蒸留水	29.75 μl	32.75 μl

^{*1} 10×PCR Buffer (PE Applied Biosystems) 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.3) 500 mM KCl

^{*2} AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems)

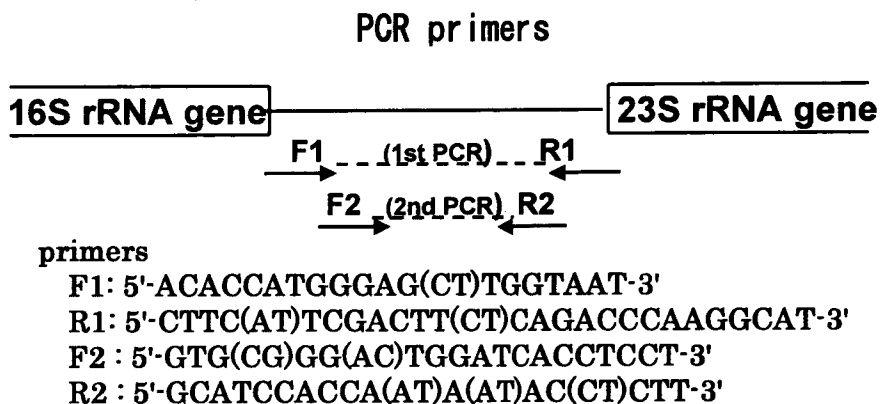


図1. PCR プライマー⁵⁻⁸⁾

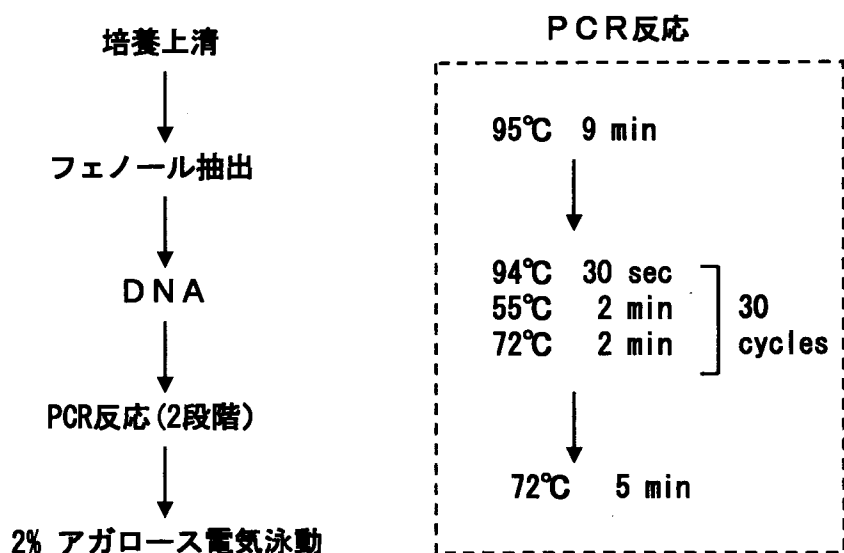


図2. ネステッド PCR 法による検出方法

た配列から1対設定されており、さらにその内側に2段階目PCR用としてネステッドプライマーが設定されている(図1)。

- ②PCR 反応は、図2に示した条件で30サイクル、2段階で行なった。PCR には TAKARA PCR Thermal Cycler MP (モデル: TP3000) を使用した。
- ③2段階目のPCR 反応終了後、PCR 産物 10 μ l に6倍濃縮色素液 2 μ l を混合して2%アガロースゲル電気泳動し、ゲルをエチジウムブロマイド染色した後、UV 照射下で検出されるDNAバンドの有無で判定を行なった。

3) 塩基配列の決定

検出されたマイコプラズマDNAの塩基配列を決定するために、GENECLEAN II (BIO 101 Inc.) でゲルからPCR増幅されたDNAを回収精製し、0.36 pmol (60 ng/約250 bp断片)をシーケンシング反応のテンプレートとして用いた。2段階目の片側のPCRプライマー 3.2 pmolとDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems)のプレミックス 8 μ lを用いてダイデオキシダイターミネーター法によりシーケンシング反応を行ない、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE

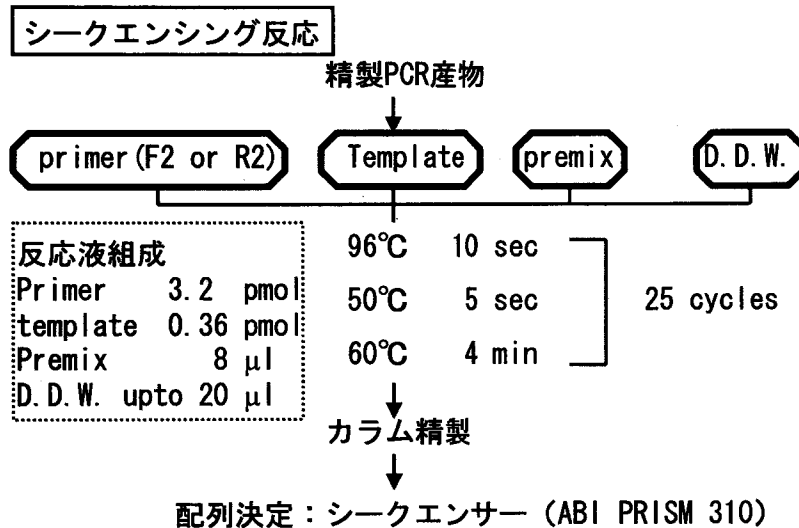


図3. 塩基配列の決定方法

Biosystems) で塩基配列を決定した (図3)。

結 果

DNA 蛍光染色法では、被検細胞を対物レンズ20倍で検鏡した場合には判定が困難であったが、100倍では明らかにマイコプラズマ汚染陽性と判定できた (図4)。

PCR 法での陽性コントロールの検出限界は、テンプレート DNA の濃度が 3~10 fg/ μ l であった (図5)。このことは、マイコプラズマのゲノムサイズを約80万塩基対*とした時に、1段階目 PCR 反応液の中にマイコプラズマ DNA がおよそ2~6コピー含まれていれば検出できることを示す。

被検細胞 DNA をテンプレートとして2段階のPCRの後、2%アガロースゲルで電気泳動した結果、GOTO細胞では230 bp付近にバンドが検出された (図5)。このバンドサイズから、GOTO細胞を汚染しているマイコプラズマ種は、*Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) あるいは *Mycoplasma*

arginini (*M. arginini*) であると予想された (表2)^{7,8)}。

塩基配列を決定し、DNA データベース (EMBL) 上でホモロジーサーチした結果、*M. hominis* とは98.2%のホモロジー (図6) があり、*M. arginini* とは82.0%の一致であった。その他マイコプラズマ種との検索結果は、*Mycoplasma salivarium* と75.2%、*Mycoplasma arthritidis* と61.1%、*Mycoplasma orale* と60.3%、*Mycoplasma fermentans* と60.2%であった。

以上の結果から、GOTO細胞を汚染しているマイコプラズマ種は *Mycoplasma hominis* と同定できた。

考 察

DNA蛍光染色法とネステッドPCR法の特徴を比較し、表3に示した。

DNA 蛍光染色法は、簡便で信頼性も高く安定した結果が得られる。しかし、結果がでるまでに日数がかかり、DNAを含む細胞断片あるいはマイコプラズマ以外の感染性微生物と、マイコプラズマ汚染との弁別など、結果の判定に熟練を要する。一方、ネステッドPCR法は検出感度、迅速性で優

* マイコプラズマ菌種のコンプリートゲノムサイズは、*Mycoplasma pneumoniae* M129を例にあげると816,394bp (U00089) である。

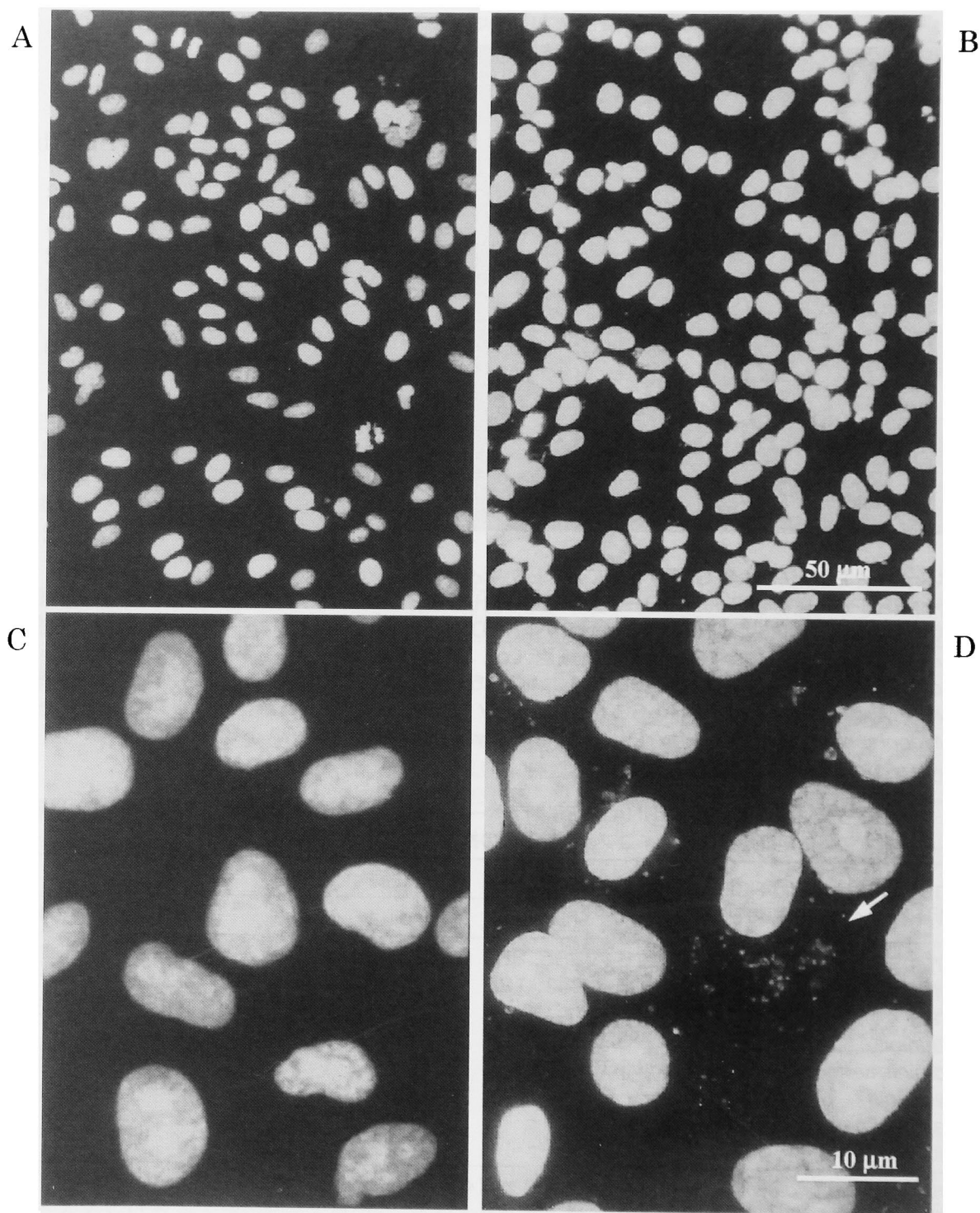


図 4. DNA 蛍光染色法による蛍光顕微鏡写真

上段 低倍率 (bar : 50 μm)

A : 陰性対照 B : GOTO 細胞

下段 高倍率 (bar : 10 μm)

C : 陰性対照 D : GOTO 細胞

A・B・C・Dとも大きく白く見えているのは VERO 細胞の核、100倍・D の矢印で示したところに白く粒子状のマイコプラズマが見える

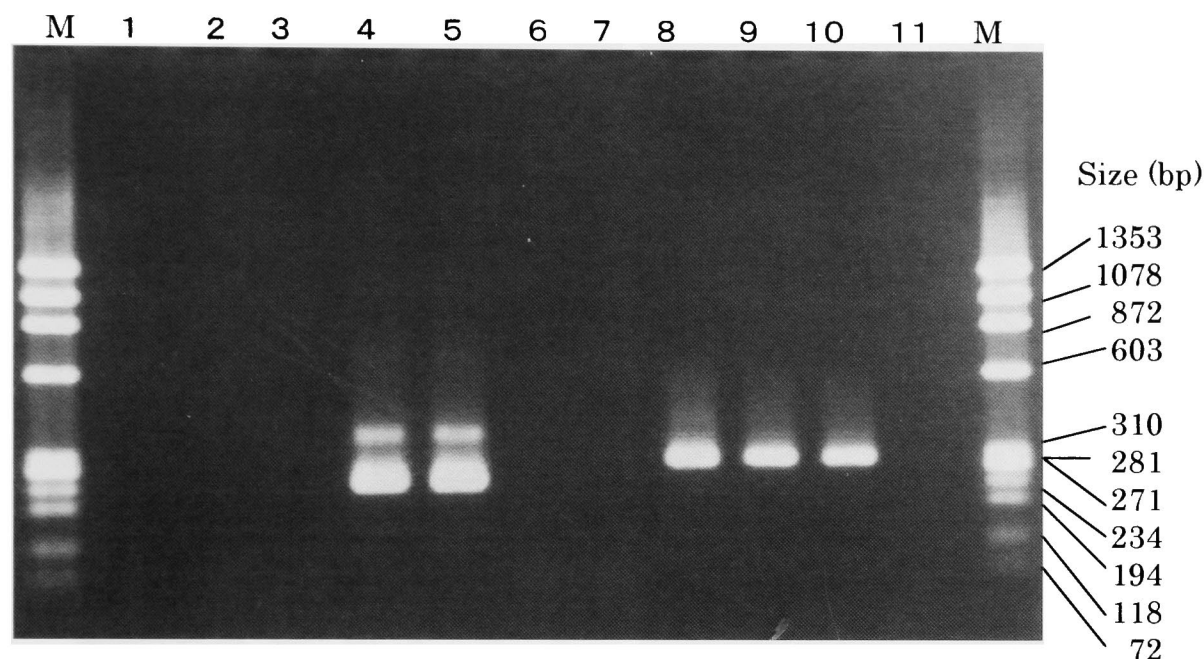


図5. ネステッド PCR 法による GOTO 細胞に混入したマイコプラズマの検出

2 段階目 PCR 産物を 2 %アガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後UV照射により DNA のバンドを検出。ゲルの両端は Marker (ϕ × 174 RF DNA Hae III digest)、レーン1:滅菌蒸留水 (陰性対照)、レーン 2,3 : JCRB104.2 KU812F 細胞 Lot. 081194、レーン 4,5 : JCRB0612 GOTO細胞 Lot.112495、レーン 6,7 : JCRB0254 MKN45 細胞 Lot. 111795、レーン 8 ~11は陽性対照；レーン8 : *Mycoplasma orale* DNA 30 fg/ μ l、レーン 9 : *Mycoplasma orale* DNA 10 fg/ μ l、レーン10 : *Mycoplasma orale* DNA 3 fg/ μ l、レーン 11 : *Mycoplasma orale* DNA 1 fg/ μ l

表2 マイコプラズマの 16S-23S rRNA 遺伝子間スペーサー領域の 2nd PCR 産物とその制限酵素消化断片を指標にした組織培養汚染マイコプラズマ菌種の推定 (文献⁸⁾ より転載)

マイコプラズマ 菌 種	2nd PCR 産 物	制 限 酵 素					
		Vspl	HindIII	HincII	Clal	PvuII	HaeIII
<i>M. pirum</i>	323 bp	169, 154	285, 38	196, 127	—	—	—
<i>M. fermentans</i>	365	270, 95	241, 124	—	—	—	—
<i>M. orale</i>	290	151, 139	—	—	—	—	221, 69
<i>M. arginini</i>	236	134, 102	—	—	—	—	—
<i>M. hominis</i>	236	123, 113	—	—	—	—	—
<i>M. hyorhinae</i>	315	—	—	—	253, 62	—	—
<i>M. salivarium</i>	269	—	—	—	—	—	—
<i>A. laidlawii</i>	430, 223*	—	—	+	—	+	+

* *Acholeplasma laidlawii* の 2nd PCR 産物は 2 本 (430 bp, 223bp) みられる。

— : 制限酵素部位を欠く, + : 3 本以上のバンドを生ずる。

れており、ゲル染色による判定も容易である。
DNA蛍光染色法は感染可能なマイコプラズマの存在を前提としており、その感度はCFU (colony forming unit) で表される。標的細胞で増殖したマ

イコプラズマ DNA を蛍光染色して検出することになる。我々の実験では、CFU を算出する実験は行っていないので、文献 1) から引用すると、試料 (培地) 1 ml あたり 100 CFU で検出可能である

培養細胞系でのマイコプラズマの PCR 検出法

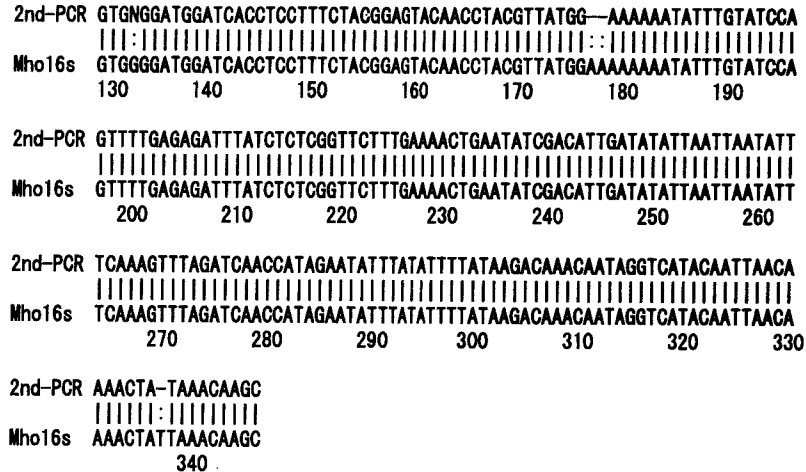


図6. 2段階目 PCR 産物の塩基配列とマイコプラズマ塩基配列のデータベース比較例
 上段 (2nd-PCR) : 2段階目 PCR 産物と下段 (Mho16s) : *Mycoplasma hominis* DNA の 16S-23S rRNA オペロンスペーサー領域の塩基配列の一致部分を示す。
 ホモロジー : 98.2%

表3 DNA 蛍光染色法とネステッド PCR 法の比較

	DNA 蛍光染色法	ネステッド PCR 法
検 出 方 法	視覚的検出	分子生物学的検出
検出に要する日数	5 日間	2 日間
種 の 同 定	形態学的、血清学的	塩基配列決定により確実に同定
判 定	マイコプラズマ DNA 染色像の有無	PCR 産物のバンド DNA の有無
特 徴	マイコプラズマと死細胞片との区別に熟練を要するが、安定した結果が得られる	リーズナブルなサイズの PCR 産物が安定して得られるようになるまで PCR の一般的なトレーニングが必要

という。

一方、われわれは、マイコプラズマの DNA 量を用いてネステッド PCR の感度を検討している。マイコプラズマの大きさを約 800 Kbp として検出感度を計算すると、1 段階目では 1.1×10^5 copies/ml 試料 (1 pg/ μ l)、2 段階目までは 400–1200 copies/ml (3–10 μ g/ μ l) 試料となる。また、Harasawa et al.⁷⁾ は CFU で検定したサンプルを用い、本報告と同じネステッド PCR 法で検出感度を算出し、1 段階目に 10^4 CFU/ml 試料、2 段階目の検出感度は 10^2 CFU/ml 試料であると報告している。これらの検出感度の結果を表 4 にまとめた。比較すると生物学的活性を基にした 1 CFU が、DNA 量を基に計算した約 10 コピーに相当することが示唆された。細

表4 ネステッド PCR 法と DNA 蛍光染色法の検出感度

ネステッド PCR 法	1 段階目 PCR	10^4 CFU/ml ^{7)*}
	2 段階目 PCR	10^2 CFU/ml ^{7)*}
DNA 蛍光染色法		10^2 CFU/ml ¹⁾

* PCR volume の違いを compensate した

胞に感染して増殖するためには 1 細胞あたり複数個のマイコプラズマの感染が必要であると考え、ネステッド PCR 法及び DNA 蛍光染色法はほぼ等しい感度を有すると考えられる。

一般にマイコプラズマに汚染した細胞の培地は 10^4 – 10^9 CFU/ml のマイコプラズマを含むと報告されている¹⁾。本報告では培地中からの DNA 精製において試料を 10 倍濃縮しているが、細胞バンクで

扱われている培養細胞ではネステッド PCR 法の一段階目で検出されるものは扱っていない。このことから、DNA 精製の効率等問題ではあるが、試料調製の濃縮を勘定にいれると培地中のマイコプラズマは 10^3 CFU/ml あるいは 10^4 copies/ml より低いと考えられる。一方、マイコプラズマで汚染された培養細胞について DNA 蛍光染色法とネステッド PCR 法での検出結果は常に一致する。しかし、まれには染色法だけでは、判断に迷うことがある。これらの結果により、われわれは、細胞バンクで扱っている細胞のマイコプラズマ汚染が低レベルであり、検出感度限界に近い汚染を扱っていると考えている。

しかし、ネステッド PCR 法は感度が高いため、操作過程でのマイコプラズマ DNA の混入等、擬陽性がでる可能性があり、サンプル調製、陽性コントロールの扱い、エアゾルによる操作時のクロスコンタミなどに注意が必要であり、安定した結果が得られるようになるまでには熟練を要する。マイコプラズマ菌種の同定は、染色法では困難である。しかし、本報告で示したように、PCR 増幅 DNA 断片の塩基配列を、2 段階目の PCR プライマーを用いて決定することにより、簡便で確実に菌種を同定することができた。表 2 に示すように、PCR 増幅 DNA 断片の長さ、あるいは制限酵素断片の長さを用いて菌種を同定する方法もある⁸⁾。しかし、本報告で示した直接的な菌種同定の方法は、従来のものに比してより確実、迅速なものである。ネステッド PCR 法と塩基配列決定によるマイコプラズマ菌種同定は、マイコプラズマの感染経路の解明にも役立つことが期待される。また、細胞バンクにおいて、ネステッド PCR 法の迅速性と高感度性は、経時的に除染作業の進行をモニターする目的にも有用である。しかし、培養細胞が同時に

複数のマイコプラズマに汚染されている場合には、この方法で塩基配列を決定し、菌種の同定をすることは難しいと予想される。

検出の正確を期するためには、一つの事象を異なった方法で独立に捉えておくことが重要である。マイコプラズマの DNA 蛍光染色法、ネステッド PCR 法は、それぞれに異なった特質をもつ。細胞バンクにおいては、この二重検出システムによって高品質の細胞を供給できるものとする。特にシードストックのマイコプラズマ検査において、両手法の特徴を理解し、相互に補って併用することが重要である。

謝 辞

本研究はヒューマンサイエンス振興財団の創業等ヒューマンサイエンス総合研究事業の助成を受けて行われた。

引用文献

- 1) 興水 馨、清水高正、山本孝史：マイコプラズマとその実験法、近代出版、P 309-329, 1988.
- 2) Hay, R. J.: ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. ATCC, Rockville, U. S. A., 1985.
- 3) 川瀬雅子、水沢 博、佐々木澄志、吉田東歩、竹内昌男、原沢 亮、石館 基：組織培養、12, 298, 1986.
- 4) 竹内昌男：組織培養の技術、第 2 版、日本組織培養学会編、朝倉書店、P 62-65, 1988.
- 5) Nakagawa, T., Uemori, T., Asada, K., Kato, I. and Harasawa, R.: J. Bacteriol., 174, 8163-8165, 1992.
- 6) Uemori, T., Asada, K., Kato, I. and Harasawa, R.: Syst. Appl. Microbiol., 15, 181-186, 1992.
- 7) Harasawa, R., Mizusawa, H., Nozawa, K., Nakagawa, T., Asada, K. and Kato, I.: Res. Microbiol., 144, 489-493, 1993.
- 8) 原沢 亮、水沢 博、竹内昌男：蛋白質核酸酵素、40, 2361-2368, 1995.

(Accepted 10 October 2000)