

細胞株誤認証、クロスコンタミネーションへの対応

細胞認証試験による リスク管理の必要性

- 培養細胞における細胞株誤認証やクロスコンタミネーションの実情
- 細胞株認証の必要性
- STR 解析を用いた培養細胞株認証法
- STR 解析 (PowerPlex[®] System) の実際
- STR 解析データによる細胞管理の方法
- まとめ



細胞認証試験によるリスク管理の必要性

培養細胞におけるクロスコンタミネーションや細胞株の誤認証が頻発しており、世界的に問題となっています。このような事態は実験結果の間違った解釈を招くばかりでなく、実験に費やす多大な時間と費用の負担を伴います。本稿では、クロスコンタミネーションの実態と細胞株認証の必要性、また細胞株認証法について述べたいと思います。

1. 培養細胞における細胞株誤認証やクロスコンタミネーションの実情

培養細胞は組織、あるいは個体のモデル系として多くの実験に用いられています。特にヒトを対象とした研究の場合、個体や臓器での実験は難しく、株化したヒト培養細胞を利用した実験が行われているのが現状です。しかし培養細胞の取り扱いもやはり注意が必要で、歴史的にもクロスコンタミネーションなどの問題が指摘されてきました (1)。近年、Science や Nature などの学術誌でも細胞株誤認証、あるいはクロスコンタミネーションの問題が取り上げられ、ATCC (American Type Culture Collection) からは警告も出されています (2)。Science では、German Cell Bank (DSMZ) に寄託された 252 細胞株のうち 18% が間違えた細胞株、あるいはコンタミネーションがみられたという例が紹介されています (3)。さらにこの記事では論文を精査すると、35-40%の論文に疑わしいデータが含まれると推定しています。また、Nature Reviews Cancer には、16-18%の割合で誤認証がみられたことが報告されています (4)。日本においても、(独) 医薬基盤研究所 細胞バンク (JCRB) で 6%、理研バイオリソースセンター (BRC) で 9.4% にクロスコンタミネーションがあったという報告がなされています (表 1 参照) (1)。Capes-Davis らは、コンタミネーションの例をウェブ上で閲覧できるようにしており (<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/123276588/sm001.xls?PLACEBO=IE.pdf>)、このサイトを利用して細胞株誤認証・クロスコンタミネーション例を確認することができます (5)。

2. 細胞株認証の必要性

欧米では細胞株認証の必要性が訴えられ、細胞バンクや学会を通じて強い危機感が持たれていますが、日本においては、未だに細胞株認証に対する認知度が低いのが現状です。

しかし徐々に論文投稿の際に細胞株認証が要求され始めています。例えば、Nature では少なくとも ES 細胞株を樹立した際には STR データ (後述) を要求しており (3)、Cancer Research を含む American Association for Cancer Research (AACR) が発行する全ての雑誌、Springer 社発行の In Vitro Cellular & Developmental Biology、Cell Biochemistry and Biophysics、Wiley 社発行の International Journal of Cancer などでも投稿規定にはっきりと細胞株認証を行うことを求めています。

3. STR 解析を用いた培養細胞株認証法

米国のセルバンクである ATCC では細胞株の確認方法として、顕微鏡による形態観察、growth curve 解析、アイソザイム解析 (動物種推定)、STR (Short Tandem Repeat) 解析を推奨しています (2)。これらの方法の中で、識別能力やデータの客観性からヒト由来細胞

表 1. コンタミネーション例の一覧

(出典: 文献 (1) 実験医学 2008 年 Vol.26 No.4 より改変)

JCRB/ 理研細胞バンクにおける調査結果の一部

登録番号*	細胞名	細胞の由来	実在細胞名	細胞の由来
IFO50004	WISH	羊膜	HeLa	子宮頸癌
IFO50315	RMG-II	卵巣中腎腫	RMG-I	卵巣中腎腫
IFO50318	RTSG	卵巣未分化腺腫	SNG-II	子宮内膜腫瘍
IFO50319	RMUG-L	卵巣嚢胞腺癌	SNG-II	子宮内膜腫瘍
JCRB0092	P39/TSU	骨髄芽球性白血病 (男)	HL-60	単球性白血病細胞 (女)
JCRB0122	KO51	骨髄芽球性白血病 (男)	K562	骨髄性白血病
JCRB0127	KOSC-3	歯肉扁平上皮癌 (女)	Ca9-22	歯肉癌 (女)
JCRB0604	PSV811	ウエルナー、上皮繊維芽	WI-38	胎児肺正常細胞 (女)
JCRB0744	ECV304	臍帯血上皮 (女)	T24	膀胱癌 (女)
JCRB1070	HSG c-C5	唾液腺 (男)	HeLa	子宮頸癌
JCRB1078	TMH-1	甲状腺癌 (女)	IHH-1	甲状腺癌 (男)
JCRB9027	KB	口腔上皮癌	HeLa	子宮頸癌
RCB0004	HMV-I	メラノーマ	HeLa	子宮頸癌
RCB0454	OST	骨肉腫	HeLa	子宮頸癌
RCB0712	KMT-2	臍帯血由来単球系細胞	KG-1	急性骨髄白血病
RCB0885	GT3TKB	胃癌	RERF-LC-AI	肺癌

*細胞番号を示す記号。IFO は発酵研究所、JCRB は医薬基盤研の細胞バンク、RCB は理研細胞バンクの登録番号

株の確認方法として STR 解析がよく利用されています (5)。STR 解析は、もともと個人識別のために法医学分野で応用が始まった解析手法であり、その高精度な解析手法は培養細胞の識別にも非常に有用です。ATCC だけでなく日本のセルバンクにおいても STR 解析の結果をデータベース化し、細胞を管理しています (1)。さらに各国のセルバンクでも、ヒト由来細胞株のデータベースが構築されており、その際に Promega 社の PowerPlex® System がヒト由来細胞株の STR 解析の標準法として利用されています (6)。

4. STR 解析 (PowerPlex® System) の実際

STR は、2~7 塩基の短い DNA の繰り返し配列で構成され、多型性に富むことから個人識別の分野で有用なマーカーとして使用されています (7)。また、複数個のマーカーを解析することで識別能力が向上します。以下図 1 A には PowerPlex® System の遺伝子座情報を示します。これら複数のローカスにより細胞データベースが構築され、現状の細胞バンクにある細胞を識別することが可能になっています。STR 解析では各ローカスの STR 部位を、1本のチューブ内で Multiplex PCR により増幅し、その後電気泳動でそれぞれのア

A.

STR ローカス	染色体上の位置	繰り返し単位 (5' → 3')	Allelic Ladder に含まれる繰り返し数	K562 細胞での繰り返し数
Amelogenin	Xp22.1-22.3 and Y	X-specific band (106bp) Y-specific band (112bp)	—	X
D16S539	16q24-qter	GATA	5, 8-15	11, 12
D7S820	7q11.21-22	GATA	6-14	9, 11
D13S317	13q22-q31	TATC	7-15	8
D5S818	5q23.3-32	AGAT	7-15	11, 12
CSF1PO	5q33.3-34	AGAT	6-15	9, 10
TPOX	2p24-2pter	AATG	6-13	8, 9
TH01	11p15.5	AATG	5-11	9.3
vWA	12p12-pter	TCTA (complex)	11, 13-21	16

B.

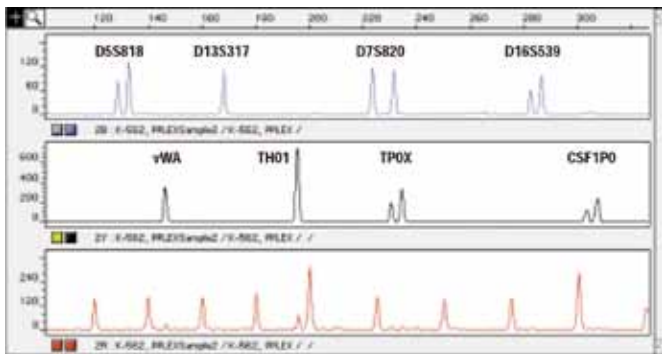


図1 PowerPlex 1.2® Systemに含まれるローカス情報とデータ

A: ローカスの情報と K562 細胞での繰り返し数。B: ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を使って K562 細胞の STR 解析をした泳動データ例

リルの塩基配列長を決定し、遺伝子型（繰り返し回数）の判定を行います。また、図1には泳動データと最終的な遺伝子型データも示します。なお、iPS 細胞を樹立した山中教授らの論文では、識別能力の高い 16 ローカスで判定するプロメガ社 PowerPlex® 16 System を用いて、樹立した細胞株とそのドナーの同一性を確認しています(8)。現在、樹立した iPS 細胞を分譲している理研バイオリソースセンターでも PowerPlex® System を用いた iPS 細胞の管理が行われています。

図2 医薬基盤研究所の細胞株認証データの確認・検索サイト (<http://cellbank.nibio.go.jp/str2/str006.html>)

PowerPlex® system を使って得られた遺伝子型データを入力することで、医薬基盤研究所が保有している約 800 種の細胞株と照合することができる。

Locus name	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
Enter your STR data ->	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Sample data (HeLa):	11,12	12,13,3	8,12	9,10	16,18	7	X	8,12	9,10
Caution:	Use comma (,) to separate the STR values in the single locus. The period (.) is used to show decimal point like 13.3 in the locus D13S317 of the HeLa.								

* EV = evaluation value

5. STR 解析データによる細胞管理の方法

では、実際どのように細胞認証が行われるのでしょうか？近年、ATCC が中心となって世界的な working group（日本では医薬基盤研究所が参加）が結成され、STR 解析を用いた細胞株認証のスタンダードプロトコルの確立と、研究者自身が保有する細胞株と比較するための細胞株データベースの構築を目指しています(9)。医薬基盤研究所でも細胞株を判定できるようにデータベースを構築し、情報を提供しています (<http://cellbank.nibio.go.jp/str2/str006.html>) (図2)。研究者は自身の持つ細胞株の STR 解析データを入力して、医薬基盤研究所が保有する約 800 種の細胞株の中でデータと照合し、細胞株を判定することができます。ただし、がん由来の細胞株では変異率が高いため、同じ細胞株に由来しても 100% マッチになることは少なく、そのため 80% マッチ以上を同一細胞株とする判定基準が提案されています(5)。現在医薬基盤研究所では、研究者から依頼されたヒト細胞個別識別検査を行っており (<http://cellbank.nibio.go.jp/information/jutaku/>)、さらに細胞株認証に関する証明書も発行しています。細胞株認証書は医薬基盤研究所独自のサービスですが、STR 解析による遺伝子型データの取得自体は様々な受託会社によっても行われており、またシーケンサーなどの機器環境が整えば研究者自身で判定を行うことも可能です。こうした細胞株認証は、可能であれば実験の最初と最後、あるいは必要に応じて実験途中でも実施することが推奨されています。

6. まとめ

ここまで細胞株認証の重要性をとりあげてきました。今後は大きな予算取得、あるいは論文投稿の際に細胞株認証データを求められるようになると考えられます。細胞株を扱う研究ではコントロール実験などのため、複数の細胞株を扱うことが多く、常にクロスコンタミネーションの危険を伴います。医薬基盤研究所では、ホームページ上 (<http://cellbank.nibio.go.jp/cellbank/qualitycontrol/crosscontami01.html>) でクロスコンタミネーションを防止する 9 カ条を紹介しており、日本組織培養学会でも細胞株のクロスコンタミネーションや取り違えに関する注意を呼びかけています (<http://jtca.umin.jp/>)。細胞株の管理方法や認証試験に対する重要性は今後ますます高まっていくと考えられます。

参考資料：

- (1) 実験医学 Vol.26 No.4 (3月号) 2008, 561-567
- (2) Cell Line Verification Test Recommendations, <http://www.atcc.org/Portals/1/Pdf/tb08.pdf>
- (3) *Science*, 2007, vol. 315. no. 5814, pp. 928 – 931 <http://www.sciencemag.org/cgi/content/summary/315/5814/928>
- (4) *Nature Reviews Cancer*, 2010, vol. 10, pp.441-448 <http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n6/abs/nrc2852.html>
- (5) *International Journal of Cancer*, 2010, vol.127, No. 1, pp.1-8 <http://www3.interscience.wiley.com/journal/123276588/abstract>
- (6) 実験医学 Vol.26 No.9 (6月号) 2008, 1395-1403
- (7) *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, vol. 49, pp.746-756 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683171/pdf/ajhg00081-0054.pdf>
- (8) *Cell*, 2007, Vol. 131, No. 5, pp.861-872 [http://www.cell.com/abstract/S0092-8674\(07\)01471-7](http://www.cell.com/abstract/S0092-8674(07)01471-7)
- (9) *Nature*, 2010, vol. 465, pp.537 http://www.nature.com/news/2010/100602/full/465537a.html?s=news_rss

最後に、本企画の実現に小原 有弘先生の多大なるご協力を頂戴いたしました。
ここにあらためて感謝申し上げます。

監修：独立行政法人 医薬基盤研究所 難病疾患資源研究部
JCRB 細胞バンク 小原 有弘先生
提供：プロメガ株式会社

製品案内

細胞株の認証に使用される STR 解析システム

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)	
PowerPlex® 16 HS System	100 回分	DC2101	380,000	PowerPlex® 16 System の改良型でホットスタート Taq プレミックスも含まれます。
PowerPlex® 16 System	100 回分	DC6531	340,000	細胞の同一性について iPS 細胞の研究にも使用される。識別能力に優れる STR システム
StemElite™ ID System	50 回分	G9530	160,000	Cell ID™ System のローカスにマウス由来のマーカが含まれ、マウス細胞の混入を検出できます。
Cell ID™ System	50 回分	G9500	150,000	10 ローカスを分析する STR システム。ホットスタート Taq プレミックスも含まれます。

STR 解析システムにより分析されるローカスと識別能力

製品名	識別能力	適合頻度	ローカス																	
			D5S818	D7S820	D13S317	D16S539	CSF1PO	FGA	D8S1179	TPOX	vWA	TH01	D3S1358	D18S51	D21S11	PentaD	PentaE	Amelogenin	Mouse	
PowerPlex® 16 (HS) System	高	<1/1.42×10 ¹⁰	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
StemElite™ ID System		<1/2.92×10 ⁹	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Cell ID™ System		<1/2.92×10 ⁹	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PowerPlex® 1.2 System (旧製品)	低	<1/2.74 ×10 ⁹	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● : JOE ● : TMR ● : Fluorescein

プロメガ株式会社

本 社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982
大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052
※製品の仕様、価格については2010年8月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店