第1章 細胞株の入手（分与・購入）

1. 細胞株とは

多細胞生物の培養細胞を用いた研究では，大きく分けて組織から細胞を単離培養した細胞（**初代培養細胞**）を用いる方法，株化された細胞（**株化細胞**）を用いる方法がある．表1に，それぞれの細胞の特徴を示す．

表1 初代培養細胞と株化細胞の特徴

	特徴
初代培養細胞	・生体組織から酵素などにより単離し，培養される細胞 ・生体のシグナル伝達系などの性質をそのまま備えていることが多い ・分裂に制限がある ・培養条件が由来となる組織や個体により多様であり，最適な培養条件を見つけることが難しいことがある
株化細胞	・回数に制限なく分裂可能 ・不死化処理として，がん化されているものもある ・増殖能が高く，たくさん細胞を得られる ・長期の継代や不死化処理の際に，生体内とは異なる性質を持ってしまう（生体内での性質を失ってしまう）場合がある

生体に近い細胞

不死化

●初代培養細胞

初代培養細胞は**生体の状態に近い細胞**ではあるが，その性質は，**培養条件や，採取した組織や個体差の影響を大きく受ける**．また，分裂回数に上限があるものが多く，それらは継代を繰り返すうちに，増殖能力が低下し，最終的に分裂が停止して死滅する．

●株化細胞

株化細胞は，原理的には**回数に制限なく分裂が可能**（**不死化**）である細胞のことを指し，由来する組織等に関連する名前がついていることが多い．また，株化細胞は**増殖能が高く**，培養条件によっては大量に得ることが可能である．さらに，後の章でも紹介するように，初代培養細胞と比べて**外来遺伝子を導入しやすい**．

本章では，汎用性の高い株化細胞を用いて細胞培養を始めるにあたり，器具・設備に先んじて，必要な「**細胞そのものの入手方法**」について紹介する．一般に株化細胞はメーカーからの購入や細胞バンク（バイオリソース）から入手することが多いが，共同研究者から分与してもらうこともある．MTA（material transfer agreement）手続きや海外からの輸入となると，器具・設備の準備よりも時間がかかることがあるので注意する．

COLUMN

分与してもらう際のポイント

他の研究者から細胞を分与してもらう際に，可能であれば，下記の点をお願いすると，自身の研究室における培養の立ち上げに役に立つ可能性がある．

①細胞だけでなく，その細胞の培養に用いている培地を少し分与してもらう

基本的に，指定された培地とその組成を守っていれば，細胞は増殖可能である．しかしながら，稀に培養環境が変わることで細胞の増殖に異常がみられることがあるため，ポジティブコントロールとして，提供元の研究室で使用中の培地を数10 mLほど分与してもらうとよいだろう．**分与してもらった培地で培養したものと自身の作製した培地で培養したもので細胞の形態や増殖に問題ないかを確認するとよい**．

②研究室に訪問可能であれば，培養室内の様子を観察させてもらう

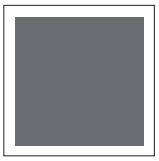
培養を日常的に行っている研究室では，コンタミネーションを防ぎつつ，効率よく実験が進められるように実験機器やクリーンベンチ内の器具が配置されている．また，日常的に培養室で行う作業について見学できる貴重な機会である．培養室に入るときの手順[*8]や細胞のディッシュの持ち方など，日常的に培養が行われている研究室では当たり前となっている操作が培養実験の上達につながるため，**細かい操作，配置**について，学ぶとよいだろう．

③細胞の写真を見せてもらう・撮影させてもらう

分与してもらう研究室で実際に培養されている細胞の形態を観察させてもらい，可能であれば撮影させてもらうとよい．自身の研究室で培養を立ち上げる際に，細胞の形態が正常かどうか，見た目で判断する際の判断材料となる．特に，継代直前頃の細胞を見せてもらえるタイミングがあれば，自身で細胞を育てていく際の参考になるだろう．

*8 手指の洗浄・クリーンベンチ内の洗浄の様子

＼ダウンロード／



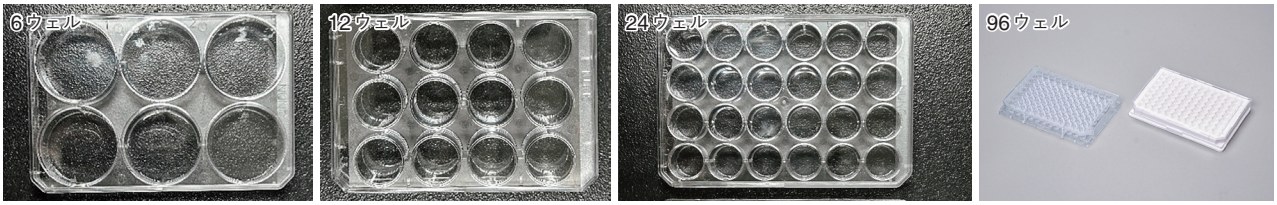
他のラボから分与してもらう時のチェックシート

引用・参考文献

1）CELL SERCH SYSTEM（RIKEN BRC 細胞材料開発室）
https://cellbank.brc.riken.jp/cell_bank/WebSearch/?lang=Ja

表3 ウェル数とサイズバリエーション

ウェル数	底面積（cm^2）	推奨培地の量（ウェル）
6	約9	2～5 mL
12	約4	1～2 mL
24	約2	0.5～1 mL
96	約0.3	50～200 mL



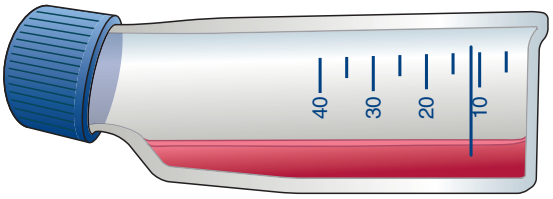


図13 アングル型のTフラスコ

●プレート

複数の条件で培養したいとき，複数の円形のウェルがある培養用の四角いプレートが用いられる．6ウェル，12ウェル，24ウェル，96ウェルなどの種類があり，ウェル数が増えるほど，1ウェルあたりの容量は小さくなる（表3）．サンプル数が少なく，細胞数が多く必要な実験の場合は6ウェル，プレートリーダーを用いて大量のサンプル測定を行う必要があるが細胞数が少なくてよい実験の場合は，96ウェル，といったように，実験目的に応じて使い分ける．これもコーティングあり/なしが存在するので，購入の場合はよく確認する．また，実験（蛍光や発光を検出する場合）によっては透明ではないもの（黒色や白色の96ウェルプレート）を用いることもあるので注意する．

●Tフラスコ

「T○○」と，細胞が接着する部分の表面積（培養面積）を表す数字が後ろについて呼ばれることが多い（T25なら，培養面積25 cm^2）．ねじ式の蓋が付いている培養容器であり，ディッシュより密閉性が高い（ディッシュよりやや高価）．また，開口部が小さいため，コンタミネーションのリスクが低く，長期の培養や継代用細胞の維持に適している．開口部の角度が異なるものがあり，開口部に傾斜がついているアングルネックタイプ（図13）と，開口部から底面まで直線的であるストレートネックタイプがある．アングルタイプを用いて細胞を培養する際は，口部が上を向くようにしてインキュベーターに入れる．また，接着細胞を培養する場合，アングルネックタイプの方が傾斜があるために容器内へマイクロピペットやスクレーパーを入れやすい．通気性のあるフィルターが付いている場合はキャップをしっかり閉めてもよい

3. 細胞を飼うために必要なもの

3-1 CO_2インキュベーター（図15）

培養細胞は生体内に存在した細胞に由来するため，生体内を模倣した環境で培養を行う必要がある．このとき重要となるのが，温度と気体組成である．哺乳類細胞の場合，37℃かつCO_2濃度5％が選択されることがほとんどである．ただし，実験条件によっては温度を変更することもある[*38]．

●種類

CO_2インキュベーターは，温度を一定にする恒温機能と庫内のCO_2濃度を一定にする機能を兼ね備えた装置[*39]である．加温の方式の違いに基づき，**ウォータージャケット式**と**エアージャケット式**の2種類に大別される．ウォータージャケット式はチャンバーの外層を水が循環してその水で加温するため，温度安定性が高く，停電しても温度が変わりにくいという特徴をもつ．エアージャケット式は，外層がヒーターで覆われており，直接温度制御する方式である．近年はメンテナンスが容易な後者のインキュベーターが多くなってきている．

●湿度

培地の水分が蒸発して培地組成が変化しないように，庫内を**95％程度の高湿度状態**に保つ必要がある．そのため，インキュベーターの最下段にはバットがあり，ここに滅菌された水を常に入れて運用する[*40]．このバットの水が汚染され，カビの発生やコンタミネーションの原因になることがある．その対策として，ヒビテン（クロルヘキシジン）0.1％溶液を入れたり，T-Pro Aqua EZ Clean（コスモバイオ社）などを使ったりするとよい．

●構造

CO_2インキュベーターの庫内は基本数段の棚に分かれている．棚の傾きはディッシュ内の細胞の偏りにつながるため，それぞれの**棚が水平であること**を確認してから培養容器を置くようにする．特に棚を清掃した後，元に戻す



図15 CO_2インキュベーター

*38 たとえば昆虫細胞は一般に27°C前後かつ開放系（オープンエアー）のインキュベーターで培養する

*39 温度やCO_2濃度が設定値より大きく変わるとエラー音が鳴る装置が多い．CO_2インキュベーターの扉を開けている時間が長いと，温度やCO_2濃度が下がり，エラー音が鳴ることがあるため，扉を開けている時間はなるべく短くする

*40 研究室の当番として，水の補充係が設定されることもある

第3章 培地・試薬の作製

1. 基本培地

細胞は生体内に近い液体環境（培地）の中でしか生きることができない．そのため，生体内環境を模倣した浸透圧，pH，栄養成分が含まれている培地を用意する必要がある．細胞の生存に必要な最低限の成分（無機塩・アミノ酸・グルコース・ビタミンなど）が含まれている培地を基本培地（基礎培地，basal medium）と呼び，さまざまなメーカーから販売されている．

●液体タイプと粉末タイプ（図1）

販売されている培地には液体タイプと粉末タイプがあり，後者は超純水に溶解したのちに滅菌処理をしてから使用する（➡p.41）．近年は必要な成分が溶解した滅菌済の液体タイプを使用することが多いと思われるが，研究に合わせて培地成分を調製したいときなど粉末タイプを選択することもある．

一般的に細胞培養の際は，基本培地単体では細胞の増殖に必要な因子が不足しているため，それを補うために血清を添加して使用する．代謝が活発な細胞に関してはアミノ酸を添加するなど，細胞種や実験内容に応じてさまざまな添加物を追加することもある．



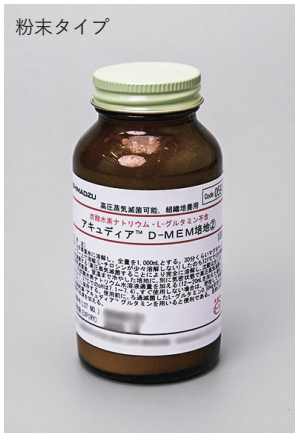
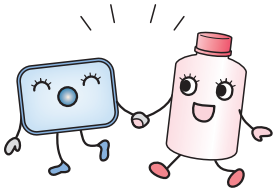


図1 培地

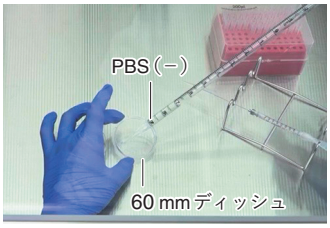
■ 1-1 細胞と培地の相性

培養細胞は生体組織から単離・株化されたものであり，どの組織由来かによって栄養要求性が異なる．そのため，細胞培養では，細胞に最適な培地（由来する組織の環境を再現した培地）を使用することが重要である．これまでに多くの研究者により細胞機能と培地の相性が検証されており，基本培地から改変された培地も数多く報告されている．また，各種メーカーからも独自に成分が調製された培地が販売されている．

表1に代表的な培地とその培地で飼育可能な細胞種（例）を記載した．基本培地として最も有名なものは，modified Eagle's medium（MEM）とDulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）だろう．DMEMはMEMを基本として改変されたものであり，アミノ酸やビタミンを高濃度にして栄養豊富にした培地である．これらの培地は幅広い種類の細胞の培養に適している．RPMIは浮遊細胞の培養に適した組成となっている．Ham's F-12には成長因子が多く含まれており，細胞のコロニー形成を促進する培地となっている．なお，バイオリソースやメーカーの細胞カタログには，細胞種ごとに最適な培地が記載されているので，新しく入手した細胞に関してはカタログ



□Step1　PBS(−)[*6] 5 mL を加え，ディッシュを前後左右に軽く揺らして，表面全体に行き渡るようにする
PBS(−)は壁面に沿ってゆっくりと入れ，細胞が剥がれないように注意する．



↓

□Step2　細胞を吸わないように注意しながら，PBS(−)を吸引除去する

●剥離酵素処理(トリプシン処理，動画3)

剥離酵素や反応時間は扱う細胞に応じて適切な条件を選択する．

□Step1　トリプシン溶液 2 mL を加え，ディッシュを前後左右に傾けて，表面全体に均一に行き渡るようにする



↓

□Step2　ディッシュに蓋をして，インキュベーター(37°C，5% CO_2)に入れる
他のディッシュやプレートの上を避け，直接棚板の上に置く．

↓

□Step3　37°C，5分
細胞の状態に応じて変更，処理時間が長すぎると悪影響が生じるため注意．
ときどきディッシュを軽く叩いて細胞を剥がし，様子を観察する．細胞が丸くなって，剥がれ始めることを確認する(図2)．

↓

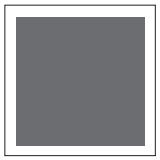
□Step4　細胞が十分剥離したことが確認できたら，ベンチに戻す
(完全に単離させない方がよい細胞もあるため，その場合は再懸濁時のほぐし方に注意する．)

↓

□Step5　培地(血清含む)8 mL を加え，反応を停止させる
総量 10 mL となる．

*6 Ca^{2+}とMg^{2+}を含まないPBS(−)を用いる

動画3



トリプシン処理

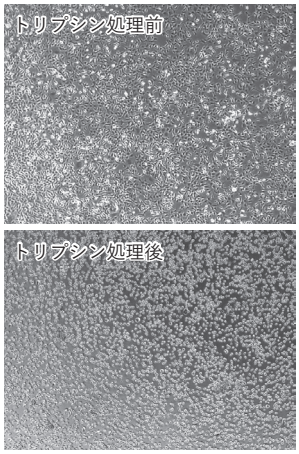


図2　トリプシン処理前後におけるHEK293細胞の様子
トリプシン処理により，細胞が剥がれ，形状が丸くなる．

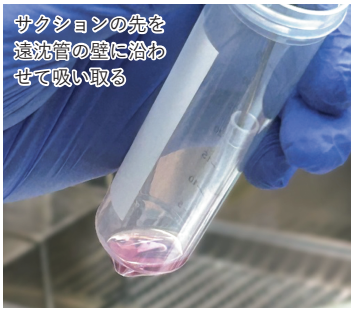
●再懸濁液の調製・細胞播種（動画5）

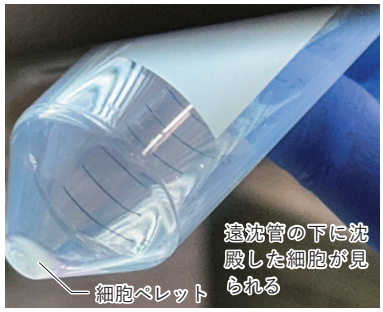
□Step1　新しい100 mmディッシュに7 mLの培地を加える
遠心中にやっておく.
蓋には，必要な情報（継代日・細胞の種類・継代数・実験者氏名など）を記載する.

↓

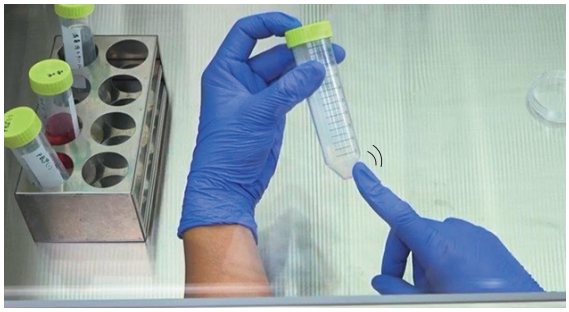
□Step2　沈殿した細胞を吸わないように，上清を吸引除去する

↓



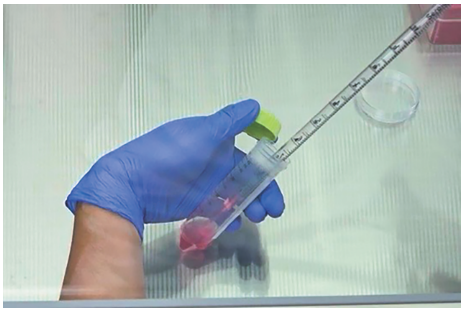


□Step3　遠沈管の先をタッピングして，細胞をほぐす



↓

□Step4　培地5 mLを加え，遠沈管の中で細胞を再懸濁する
播種する細胞量が決まっている場合には，適切な濃度になるように加える培地量を調整するとよい.



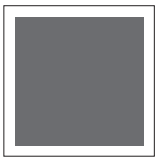
↓

□Step5　予め培地を加えておいたディッシュに1 mL（全体の1/5相当）の細胞懸濁液を加える
ゆっくりと数滴ずつ回しかけるように入れて，軽くディッシュを揺らす.

↓

□Step6　顕微鏡で観察し，細胞が存在することを確認する

動画5



細胞播種

3. 細胞の撒き方におけるトラブルシューティング

細胞を播種して次の日に観察したとき，密度が均一になっておらず，細胞が一部に偏っていたり，スカスカな部分が目立っていたりしたことはないだろうか．コンフルエンシーの違いが細胞の性状に影響を与える可能性をふまえると，継代用・実験用の別を問わず，接着した細胞の密度に偏りが生じないように，1枚のディッシュ内だけでなく，異なるウェルまたはプレート間においても，均一に播種できる方が好ましい．ここでは，基材上の細胞密度に不均一性をもたらす原因と対策方法についてまとめる．

3-1 同じ容器のなかで細胞密度にムラが生じる

・インキュベーター内で水平が保たれていない（図3）

インキュベーター自体が水平に設置されていることを点検する．ディッシュやプレート（培養容器）を積み重ねて静置する場合には，傾きが生じていないことを確認する．

・細胞が接着する前に培養容器が動かされてしまう

播種直後と気が付かず，別の実験者が培養容器を（雑に）移動させた結果，細胞に偏りが生じる可能性がある．実験者ごとにインキュベーター内の使用場所を決める，播種直後の培養容器はなるべく棚板の奥（取り出しの邪魔にならない場所）に静置するといった対策が有効．

・インキュベーター内に入れるときに培養容器が傾いてしまう

培養容器を静置する際，棚板に対して並行に動かすことを意識して，水平移動を心掛ける．インキュベーターを2段重ねで使用している場合，高い位置・低い位置の両方で傾いてしまうリスクがある点に注意．

・細胞懸濁液添加後の均一化の操作が十分でない（図3）

培養容器をぐるぐる回転させると細胞が中央に寄りやすい．前後左右にそれぞれ5回ずつ揺らす，もしくは傾ける方が経験的にうまくいく．ディッシュのサイズが大きくなると難易度が上がるので，ゆっくり行うとよい．培養容器を重ねて行う場合には，勢い余って培地がこぼれてしまわないように注意が必要である．

・練習不足

最初に細胞培養を習得するときに，一連の操作を経験して満足していないだろうか．細胞を均一に播種できるようになることを目標として，早いうちに，播種のプロセスを重点的に練習しておくと，その後が楽になる．また，細胞密度が薄いと濃淡が生じやすい．継代に慣れないうちは少し濃い目に播

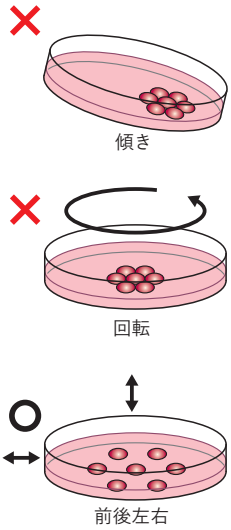


図3 細胞懸濁液添加後の操作の良い例・悪い例