



基本的な細胞培養の概説

哺乳類動物細胞の培養における基本の紹介

はじめに

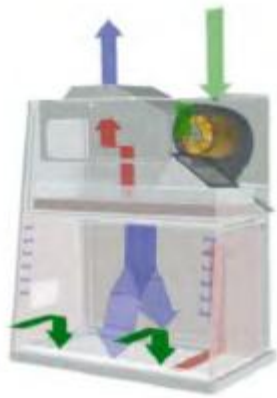
- 1900年代初頭に樹立された
- ウィルス学研究を支援するために1940年代に確立され、さらにワクチン用のウィルスを得るために1950年代に開発が進みました。
- 今日では、多種多様な研究に利用されています。
 - モデルシステム(系)
 - 疾患の状態を理解する
 - パーキンソン病
 - 糖尿病
 - 多発性硬化症
 - 組織や臓器の開発研究

必要なもの（通常研究室にある機器・消耗品に加えて）

- 細胞!
- クリーンベンチ（安全キャビネット）
- CO₂ インキュベーター（ほとんどの哺乳類細胞に必要）
- 細胞増殖用のプラスチック容器（ケース）
- 滅菌フィルター（0.2 μ m）
- 培地
- 顕微鏡
- 細胞計数用の道具 - 血球計算盤もしくは機器
- 培地添加物
- その他：ピペット、吸引ポンプ（アスピレーション）、遠心機、恒温器、フリーザー、冷蔵庫

クリーンベンチ

- 滅菌作業エリアを維持
- 水平もしくは垂直のエアフロー
- 隔離されたクリーンルームの場合にはフード付き作業エリアは不要
- 垂直気流方式のクリーンベンチまたは、安全キャビネット
 - 通常は使用前、使用後に作業スペース表面を滅菌のためUVライトを照射
- クリーンベンチは保管場所ではありません。



Arrows indicate airflow



インキュベーター(孵卵器)

- すべての哺乳動物細胞はCO₂インキュベーターを必要とします。
- 多くの哺乳動物細胞は以下が必要です。
 - 温度 = 37°C
 - 湿度 = 95%
 - CO₂ = 5%
 - ウォータージャケット付きもある。



■ 不死化(樹立された)細胞株 (Cell lines)

- ATCC(American Type Culture Collection) と ECACC(European Collection of Cell Cultures) が主な供給源です。それらでは80種類以上の種から 3,400 以上の細胞株がラインナップされています。
- 細胞は安定していて、凍結保存可能(液体窒素)です。また、規定の継代数培養可能です。
- 一般的な細胞株の例: 3T3,293,CHO,COS,HeLa

■ 初代培養細胞 (Primary cells)

- 組織や器官から直接取り出して培養する。
- ほとんどは限られた寿命を持ち、有限回数の細胞分裂の後に増殖が停止する
- 以下のようないくつかの方法によって培養のために組織から単離される。
 - 血液からの精製: PBMCs
 - コラーゲナーゼ、トリプシン、プロネーゼのような酵素によって軟組織から分離



細胞株と初代培養細胞の比較

細胞株	初代培養細胞
広く使用されている。しかし、細胞株を用いて得られる情報は、初代培養細胞を用いて得られる情報より生物学的に正確でない可能性もある。	医学的もしくは生理学的により正確である。 (元の器官・組織の細胞の性質を反映している)
簡単に増殖。無限に増殖する。	時に増殖が困難： 培養しても限られた細胞寿命である。
凍結保存することができる。	元の組織・器官の細胞から性質的変更がない。
細胞の性質が変わっている（例：多くががん組織に由来している）、由来した組織細胞の性質は失われている。	動物もしくは組織から得られる
遺伝的に同一である(ATCC以外から入手した場合には注意が必要です。ちゃんとした細胞株ではないかもしれません)	目的の細胞以外が混入している可能性がある。

組織からの一般的な細胞株

動物の組織は、以下の大きく4つの種類に分類される。

組織名	Tissue name	細胞株例
上皮組織	Epithelial tissue	CHO(Chinese hamster ovary)、HeLa、Hep-2、MCF-7,U373
結合組織	Connective tissue	293,3T3,COS
筋組織	Muscle tissue	血液平滑筋細胞
神経組織	Nervous tissue	Neuro 2A, PC12, C6

多くの細胞株は癌の腫瘍由来です。これらの細胞は表面に付着して増殖するため、付着細胞として知られています。



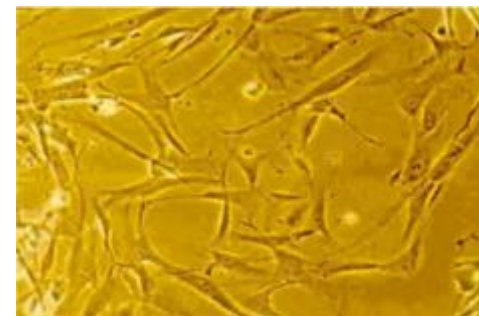
CHO細胞

reprint Filckr



マウス胚線維芽細胞(MEF)

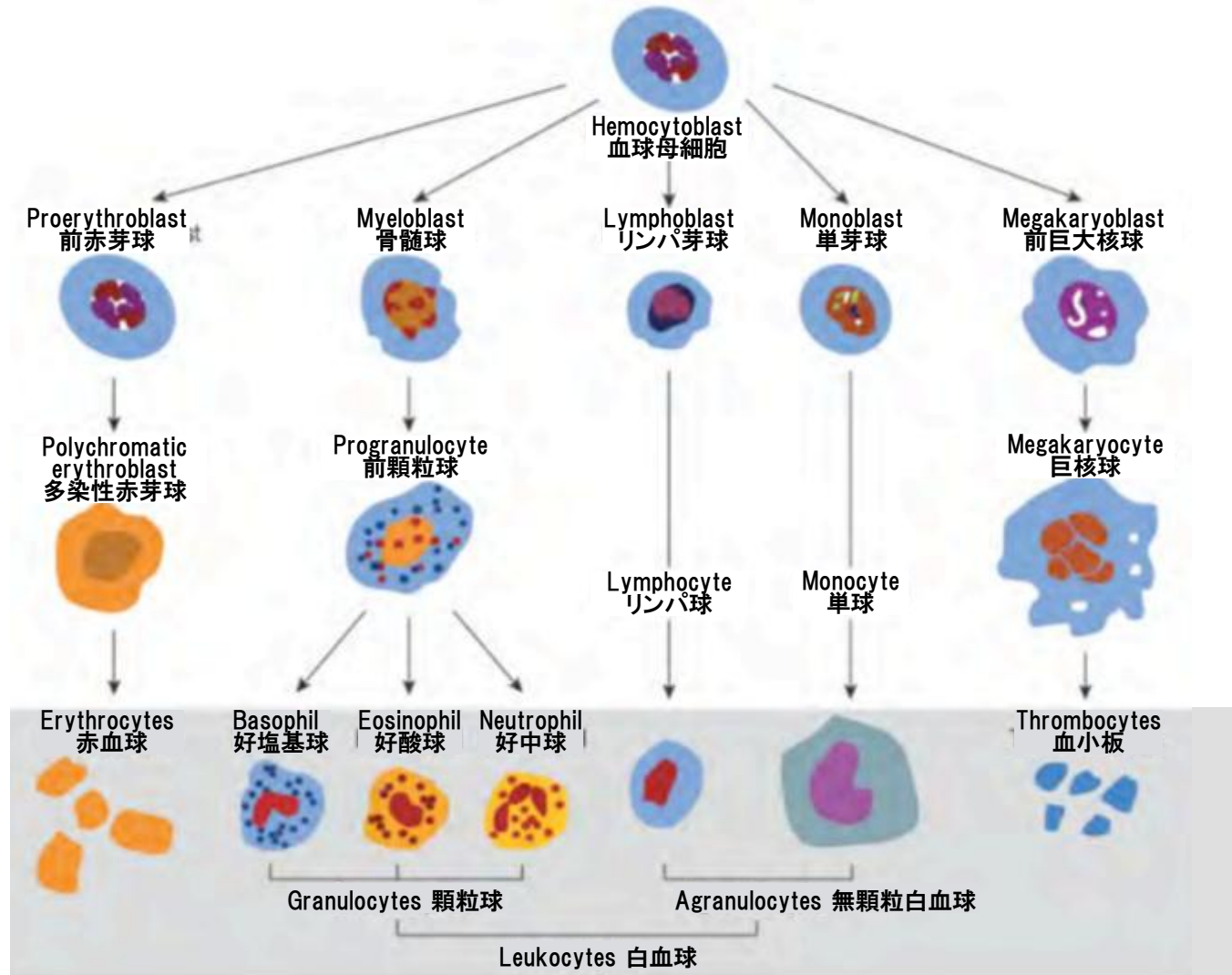
reprint Wiki



平滑心筋細胞

reprint Wiki

血液細胞(血球細胞)



- これらの細胞は懸濁液中だけで増殖する。; リンパ球は良く研究に用いられている。
-リンパ球もしくはリンパ芽球の例: HL-60, Jurkat

一般的な培地

最も良く使われる培地

-D-MEM / F12 培地

D-グルコース(ブドウ糖)、L-グルタミン、HEPES緩衝液、ヒポキサンチンナトリウム塩、リノール酸、 α -リポ酸、プトレシン二塩酸塩、フェノールレッド指示薬、ピルビン酸ナトリウム、チミジン、アミノ酸、ビタミンが含まれています。

-グルタミン添加 RPMI 1640

L-グルタミン、HEPES緩衝液、フェノールレッド指示薬が含まれています。

一般的な追加試薬

-HEPES緩衝液

-EDTA

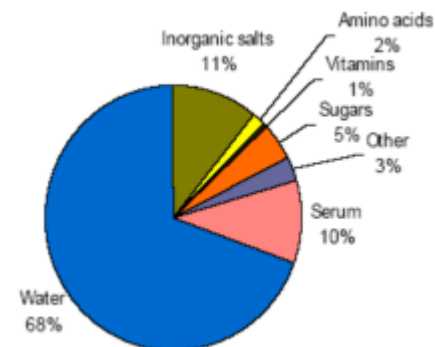
-L-グルタミン

-抗生物質: ペニシリン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン/ペニシリン

-抗真菌剤: ファンギゾール(Fungizole)

-ウシ胎児/ウシ血清(Fetal calf/bovine serum)

細胞培養用培地



多くの培地はpH7.2-7.5です。その多くはpH変化を色で知らせる色素が培地に含まれています。

細胞培養用容器

■ 付着細胞* もしくは浮遊細胞

*容器等表面に付着して増殖します。



■ T-フラスコ

(T-25, T-74, T-150; 数値は培養面積 cm²)



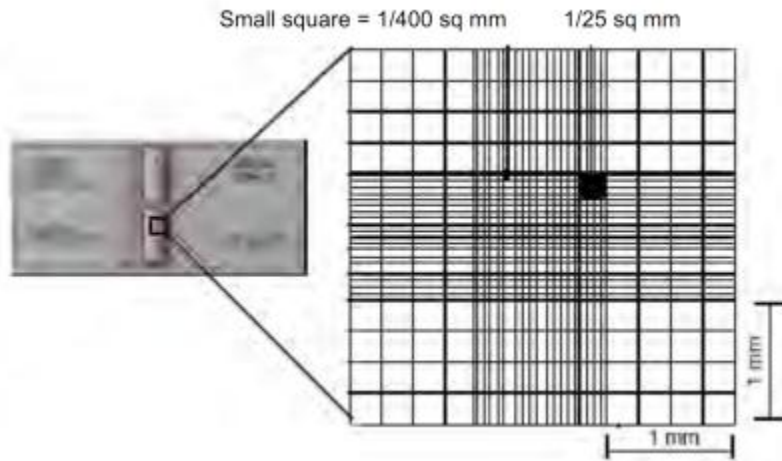
- 典型的な細胞濃度: $5 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ /ml
- 供給メーカー: コーニング、ヌンク、BD、Wheaton

■ 浮遊細胞のみ

■ スピナーフラスコ



細胞計数(セルカウンティング)

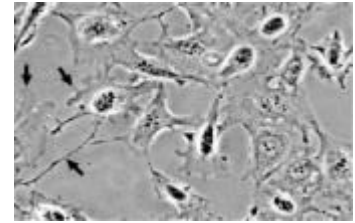


細胞は血球計算盤(¥15,000-¥35,000)でカウントされるのが一般的です。少量の細胞懸濁液を血球計算盤上に滴下して、上からカバーガラスをおきます。血球計算盤を顕微鏡にセットして、指定領域内(例:上左図の黒塗り部分)の細胞数を数えます。

細胞の希釈率に基いて細胞数計算し、継代培養に必要な細胞濃度を算出します。自動計測できるセルカウンター機器が入手可能です。

■ 1日目

- 凍結状態の細胞を得る。(これは細胞株の場合だけです。初代培養細胞の場合には新鮮な状態[凍結していない]から始めます。)
- 37℃のウォーターバスに凍結したバイアルを入れ、細胞を解凍します。その後、新鮮な培地で一度洗浄します。(遠心して細胞を集めます)
- 適切な容器に移し、一晩インキュベートします。
- (注意:細胞の生存率は約1時間後にチェックすることができます。)



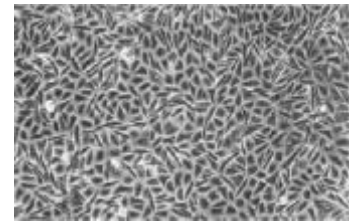
1日目

■ 2-4日目

- 低倍率の顕微鏡を用いて、組織培養フラスコに付着した細胞を観察します。細胞が十分間隔をおいて、容器表面に単層(モノレイヤー)を形成している必要があります。
- 2-3回/週の間隔で、培地を除去して、新鮮な培地に交換する

■ 6-9日目

- 細胞がコンフルエントになる(非常に接近し、密集した状態)、その状態から、二次培養、株分け、継代される必要があります。



6-8日目
コンフルエント状態
の細胞

■ 付着細胞

- 培養フラスコから培地を取り除く
- PBSもしくは培地にトリプシンを混ぜた溶液を少量 (1-2ml)に加え、細胞を溶液で覆う。(時々、EDTAがトリプシンの代わりに用いられます。;もしくは代わりにスパチュラを用いて細胞を物理的に剥がします)
- 37°C で2-5分インキュベートします。
- 細胞を剥がすために、フラスコをタップします。
- トリプシンを阻害するために培地を3-5ml加えます。
- 不要な細胞を除去して、一定量の細胞を希釈/細胞計数を行う。
- 一定量の細胞懸濁液を新しい培養に使う。

■ 浮遊細胞

- 細胞懸濁液から一定量の細胞を細胞計数する。
- 新しい細胞を適切な分量取り、新規培養を始める。

- ATCC(American Type Culture Collection)- www.atcc.org/
- ECACC(European Collection of Cell Cultures) - www.hpacultures.or.uk/collections/eacc.jsp/
- DSMZ(German Collection of Microorganisms and Cell cCultures) - www.dsmz.de/
- Gene Transfer Protocol Library - www.bio-rad.com/genetransferprotocols/

**BIO-RAD****バイオ・ラッド ラボラトリーズ 株式会社**
ライフサイエンス事業部Visit us at <http://discover.bio-rad.co.jp>

本 社	〒140-0002	東京都品川区東品川 2-2-24 天王洲セントラルタワー	TEL:03-6361-7000	FAX:03-5463-8480
大阪営業所	〒532-0025	大阪市淀川区新北野1-14-11 第一生命ビル	TEL:06-6308-6568	FAX:06-6308-3064
福岡営業所	〒812-0013	福岡市博多区博多駅東2-5-28	TEL:092-475-4856	FAX:092-475-4858
		*学術のお問い合わせは	TEL:03-6404-0331	FAX:03-6404-0334

※価格(税抜き)、仕様などは予告無く変更することがありますので、ご了承ください。
※価格は2015年5月現在のもので、メーカー希望小売価格(税別)です。
※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。