

5. 基本的な細胞培養技術

細胞培養は、解剖などによって生体から分離した細胞を培養する初代培養 (primary culture) と、株化細胞 (cell line) と呼ばれる、無限の増殖能力を持った不死化細胞 ※1 の培養とに分けることができます。「細胞」と言う対象は同じですが、足場依存性、成長因子の要求度、増殖速度、分裂回数など多くの部分で違いがあり、一般には株化細胞が広く使われています。理由は、高い増殖性を持ち、その性状がよく知られていること、そして、細胞バンクから容易に入手でき、実績が多くあるので他所での実験データを参考にすることができるからです。そして、これまで多くの研究者が細胞培養を元にし先進の研究を進め、科学の発展に大きく寄与していることは疑いようがありません。細胞培養は有用な実験材料を安定して確保できる重要な技術なのです。ただし、注意も必要です。いずれの細胞も長期間の培養、多くの継代 (Passage) 数を重ねると、元の細胞の性質を必ずしも維持しているとは限りません。ですので、継代数管理やコンタミネーション及び、細胞の変化の確認が重要となるのです。※2

※1 有限増殖性の株化細胞も存在します ※2 P24からの「7. 細胞の評価」を参考にしてください

5.1 細胞の増殖 (増殖曲線)

細胞培養の増殖には3つの増殖フェーズと、1つの死滅フェーズがあります。

1. 誘導期 (LAGフェーズ)

凍結融解後や植え継ぎ後など、新しい培養環境に適応するまでの期間。

この期間の細胞はほとんど増殖しません。

2. 対数増殖期 (LOGフェーズ)

細胞固有の倍加時間 (Doubling time) で増殖する期間。

非常に活発に増殖します。

3. 定常期 (Plateauフェーズ)

一定の数以上に増殖しなくなる期間。

細胞密度の上昇、栄養分の枯渇、老廃物の蓄積などが影響しています。

4. 死滅期 (Death フェーズ)

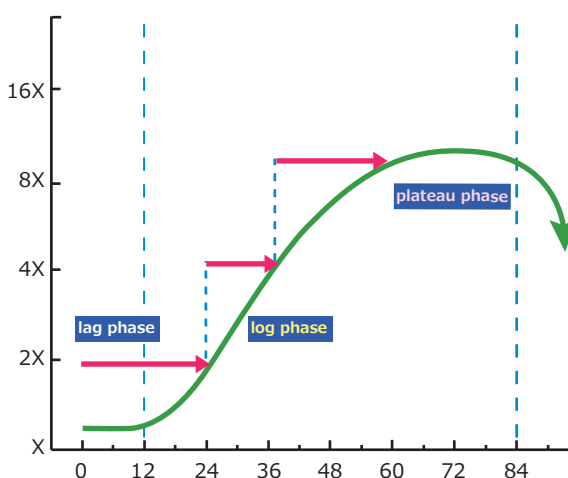
細胞によって緩やかに死んでいくものや急激に死滅するものなどがあります。

株化細胞を培養するにあたり、適正な継代培養の条件 (希釈率や継代間隔等) を知るためにはその細胞の増殖曲線を作成することが重要となります。この増殖曲線により最適な継代のタイミング (通常、対数増殖期に実施) を的確に推測することができます。

細胞の分裂回数

対数増殖期の細胞は、等比数列的 (2^n) に分裂して増殖していきます。

この n は、当該細胞の分裂回数 (population doublings, PDs) を示しています。



5.2 細胞融解（解冻）

凍結保存チューブ内の凍結細胞を融解させる作業の基本は「素早く融解」です。細胞内での再結晶（微細な氷結が大きな氷結に成長する）を抑制し、更に凍結保存液などの細胞毒性が働かないように工夫されている処理方法です。迅速な作業のために、全ての準備ができてから凍結細胞を取り出すようにして、融解後の培養に最適な播種密度を設定して、培地の量を調製してください。

液体窒素（液相）で保存されたチューブは、取り出し後の急激な温度上昇によって液体窒素が一気に気化（蒸発）し、チューブを破損させることがあります。

（注）必ず手袋、フェイスガードを着用して作業をしてください。

プロトコル：液体窒素（液相）保存

1. 恒温バス（水浴槽）を37℃に温めておく。

2. 15mLチューブに、培養用に調製した培地を10mL入れ、37℃に温めておく。

3. 液体窒素容器から凍結細胞保存チューブを取り出す。

4. チューブを取り出してすぐに蓋を少し緩め、気化した窒素ガスを放出する。（蓋を90度ほど回してゆるめて、チューブ内のガスを放出してから再度締める）※1

5. 37℃の恒温バスにチューブを浸す。蓋が水に浸らないよう注意し、蓋の5mmくらい下まで浸します ※2

6. 凍結保存溶液が60～70%融解するまで水浴で保持（氷片が浮いている状態）して、引き上げて軽く振って氷片が溶けるのを確認してから迅速に氷冷する（クールダウン）。※3

7. 引き上げたチューブの表面をきれいに消毒し、（特に蓋部分）氷冷しながらクリーンベンチ内へ入れる。ベンチ内に氷を入れたくない場合は冷却型アルミブロックなどを利用する。（4℃）

8. 予め37℃に温めておいた培地（10mL）の入った15mLチューブ内に、融解した細胞液を加えて攪拌する。

9. 遠心（130～150G/5分）後、アスピレーターで上清を取り除く。

10. 15mLチューブ内の細胞ペレットに培地を加え培養容器に播種して培養を開始する。

11. 一晩、CO₂インキュベーター内で培養する。

※1 -80℃フリーザー及び、液体窒素（気相）保存のチューブでは、窒素ガス放出作業は不要です。

※2 インキュベーターに入れるなど、ゆっくりと融解すると、ほとんどの細胞で生存率が低下します。恒温バスや融解専用機の使用をお勧めします。

※3 サンプルを一気に温めて0～5℃程度にした後、培地を加えるまでの間、一旦氷冷することでDMSOなどの保護剤の細胞毒性を抑えることができます。素早く融解するだけでなく、新たな培地を加えるまでの時間を如何に短くするかが、細胞を良い状態に保つ重要なポイントとなります。

5.3 細胞のカウント

培養細胞数のカウントは、増殖能の確認や継代のタイミングを計るなど、細胞を用いた実験では必須となります。更に、遺伝子の導入効率や凍結融解時の状態確認などでも、操作前と操作後の細胞数をカウントし、比較することはとても重要な操作となっています。

5.3.1 細胞計数盤でのカウント

プロトコル：ワケンカウンターを使用時の計数

1. 細胞懸濁液をピペットなどでよく攪拌して、すぐに細胞計数盤のサンプル注入口に流し込む。

※ 1



2. 1枚の計数盤で2サンプルを測定する場合は、上記の 1. の作業をもう片方のサンプル注入口にて繰り返します。 ※ 2



3. 細胞計数盤を顕微鏡ステージに置いて、4つの計数室の細胞数を順次カウンターにて数えて加算します。



4. 加算された細胞数をNとして、下記の数式にて細胞密度を計算します。

$$\text{細胞密度} = (N/4) \times 10^4 \text{個/mL} \quad \text{※ 3}$$

- ※ 1 サンプル注入後、細胞が沈下するのを1～2分待ってから計数すると、より確実に計数できます。
- ※ 2 懸濁液量は多すぎても少なすぎても、誤差が大きくなります。
- ※ 3 あらかじめ細胞懸濁液を希釈した場合は、希釈倍数を更に乗じてください。

注意事項

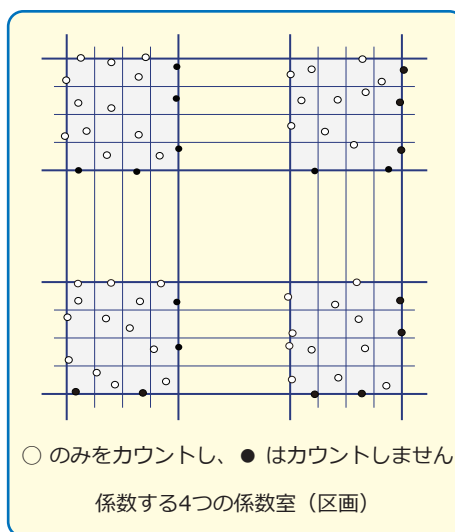
より正確な計算値を得るため、4つの係数室全てを計数し、加算してください。

細胞の生死判定のために染色液を利用する場合は、混和後20分以内に計数するようにしてください。染色液に敏感な細胞は5分以内に計数してください。

サンプル注入後は速やかに計数してください。長時間放置しておくと正確な計数ができなくなります。

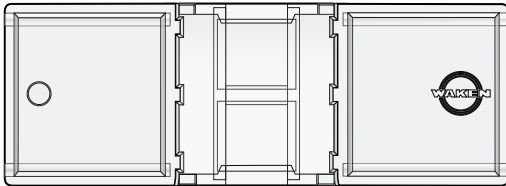
計数室の4辺の格子線上の細胞を計数する場合、左上の2本の線上の細胞は数え、右と下の2本の線上の細胞は数えないでください。

(下図参照)



ワケンカウンター (WC2-100/WC2-100S)

シンプルなグリッドパターンで、観察が容易な培養細胞用のディスプレイ細胞計数盤です。1枚で2サンプルの計数が可能です。



5.3.2 生細胞率の算出

細胞を用いた実験において、生細胞の割合をきちんと把握することはとても重要です。細胞の生存率を把握するためには、生細胞と死細胞を区別する必要があります。

一般に、生細胞よりも死細胞のほうが膜の透過性が高いことを利用し、トリパンブルーなどの色素を指示薬として使い、細胞生存率を算出しています。

その他、MTT試薬を利用してホルマザンの生成量による生細胞数の算出や、生細胞と死細胞を特異的に染める蛍光試薬を用いたものなど、様々な方法などがあります。

トリパンブルー計数法

死細胞は細胞膜がもろくなり、生細胞よりも膜の透過性が高くなります。トリパンブルーは濃い青色の色素で、死細胞の細胞内に入り込んで細胞全体を青く染めます。よって、青く染まったものを死細胞としてカウントし、染まっていないものを生細胞と判断することができるため、極めて容易な操作で生細胞率を算出できる方法として利用されています。

ただし、サンプルに混在している細胞片や赤血球なども青く染まりますので、確実に排除するためにはある程度の経験が必要かもしれません。青く染まっている部位の大きさや形状で、適切に判断してください。

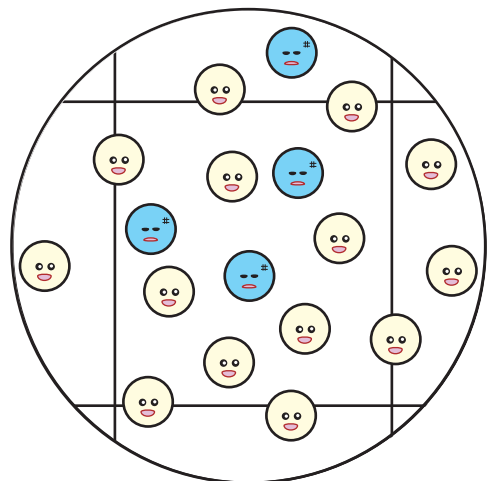
MTT測定法

MTT試薬は細胞膜を透過し、ミトコンドリアに集積してミトコンドリア内の脱水素酵素により還元されてホルマザン色素を生成します。このホルマザンの生成量と生細胞数には比例関係があり、この生成量を測定することで細胞数に換算できます。但し、ホルマザンは難溶性で析出するため、DMSOなどの有機溶媒で溶解してから吸光度を測定し、生細胞数を算出します。

注意事項

トリパンブルーは毒性の強い発癌性物質です。取り扱う時にはラボ手袋、ゴーグル、白衣などを着用し、直接接触しないよう十分に注意してください。また、蒸気等は吸い込まないようにしてください。

トリパンブルーを注入した後、時間が経つにつれて生細胞も徐々に青く染まってきますので、迅速な計数が求められます。



5.4 細胞の継代（接着細胞）

接着細胞は、栄養供給やガス交換が適切であれば、容器の表面全体を覆うまで増殖します。継代は対数増殖期に行うことが重要で、接着している細胞を一旦、懸濁させてから分けます。重要な点は、トリプシンなどを利用した剥離処理は、適切な処理時間、処理温度で行うことにあります。

プロトコル

1. 培養面積の70～80%ほど増殖した状態の細胞（サブコンフルエント）を用意する。※1



2. 古い培地を吸引除去し、接着している細胞の表面を軽くPBS(-)で1、2回洗い、吸引除去を行う。※2



3. トリプシン/EDTA溶液を、培養容器の容量に適した量を添する。※3
容器の底を軽く叩くと（タッピング）細胞の半分程が剥がれる程度（2～5分程度）で培地を4mL加えて攪拌し、15mL遠沈管に静かに移す。※4



4. 培地4mLを容器に加えて壁面に残った細胞を集め、15mL遠沈管に加える。



5. 130～150Gで3分間遠心を行い、上清を吸引除去したのち、新たに培地を5mL加えて再浮遊させ細胞数を数える。※5、※6



6. 目的の細胞数を新しい培養容器に播種する。容器を静かに揺らして、細胞が満遍なく均一に分散していることを確認し、CO₂インキュベーターに入れる。※7

参考事項

- ※1 細胞が一番状態の良い時期（対数増殖期）に継代します。100%のコンフルエントにまになると、コンタクトインヒビションによって増殖能が低下してしまうことがあります。（NIH 3T3細胞など）
- ※2 PBS洗浄では、容器をゆっくり揺らして細胞全体にPBSが触れるようにしてください。
- ※3 トリプシン処理は、細胞によって処理時間が異なり、適切な処理時間で処理することがその後の細胞の状態に非常に大きく影響します。剥がれにくい細胞の場合はインキュベーションすることでも有効です。トリプシンの添加量は培養容器の大きさに依存します。
- ※4 トリプシン処理が行われている間に次の作業の準備を完了しておいてください。トリプシン処理の時間は、剥がれるのを確認するまでの時間ではなく、培地を加える時までを指します。培地中の血清成分でトリプシンが不活化しますが、血清不含の培地の場合はトリプシンインヒビターを利用する必要があります。
- ※5 遠心は強くしすぎると細胞が痛むので、大体110～130G/3分程度に抑えると、良い結果が得られることが多いです。
- ※6 分散は、ピペッティングあるいは、遠沈管をタッピングして行います。ペレットが固すぎる時は遠心力が強すぎて細胞にダメージを与えている可能性があります。細胞の状態が良い時は、ペレットと培地の境界が比較的是っきりと見える傾向にあります。（全ての細胞には当てはまりません）
- ※7 培地容量は5～7.5mL/Tフラスコ（25cm²）程度ですが、継代直後は5mLで行う方が細胞接着を確実に行うことができます。細胞には、それぞれに最適なスプリット比率があり、事前にどれくらいの比率で分けるのか調査が必要です。

5.5 細胞の継代（浮遊細胞）

浮遊系細胞は、希釈培養法によって比較的容易に継代することができます。

プロトコル

1. 顕微鏡で細胞の状態を確認し、細胞の凝集やコンタミの確認をする。※1 細胞密度の目安は 1×10^6 cells/mL とし、 3×10^6 cells/mL 以上にならないようにする。※2



2. サンプルングし、細胞数を数える。



3. 計数した細胞数から得られた適切な希釈率にて希釈し、新しい培地に懸濁させる。※3



4. 3～5日おきに上記操作を繰り返す。但し適切な継代間隔は細胞によって異なる。※4

参考事項

- ※1 細胞の状態をしっかりと確認することは重要なことです。数多く観察しておくことで、継代のタイミングの判断が容易になります。
- ※2 細胞によって最適な密度が異なりますので、あくまでも参考数値と考えてください。
- ※3 完全に培地交換をしてから継代を行う場合は遠心操作（130～150G/3分）を行い、培地の交換を行います。
- ※4 細胞密度が高くなると細胞自身が代謝する産物の蓄積により環境が悪化します。おおよそ 1×10^6 cells/mL 程度に達した時点での継代（希釈分注）を目安としてください。

5.5.1 培地の交換

増殖の状況が悪い細胞の場合、培地を半分だけ交換して増殖能の回復を試みる場合があります。

プロトコル

1. 培養容器中の培地の半分量を、細胞とともに遠沈管に移す。



2. 110～130G/3分間で遠心操作を行い、上清を吸引除去したのちに、等量の新しい培地を加える。



3. 軽くピペティング操作にて再浮遊させ、元の（半分量の培地が残っている）培養容器に戻す。

参考事項

確実に上清（古い培地）を吸引したい場合は遠心操作を行います。通常よりも少し低回転域にて遠心することで、死細胞の除去も同時に行うことができます。

スピナーフラスコなどでの大量培養

大量に細胞が必要な場合、フラスコやシャーレで増やした細胞をスピナーフラスコや三角フラスコに移して培養を行うことがあります。基本、最初は培地量を少なめにして、低回転（低回転数）で培養し、細胞の状態を確認しながら培地を加えると良いでしょう。細胞が増えてくると酸素要求度が高まりますので、容器への通気性を十分に確保してください。通気性のあるフィルター付きキャップを利用したり、強制的にエアを供給したりするシステムの利用が便利です。

5.6 細胞の保存・凍結（接着細胞）

プロトコル

1. 培養面積の70～80%ほど増殖した状態の細胞（サブコンフルエント）を用意する。生存率が90%以上であることが望ましい。



2. 古い培地を吸引除去し、接着している細胞の表面を軽くPBS(-)で1、2回洗浄したのちに吸引除去する。



3. トリプシン/EDTA溶液を容器の容量に即した適量を添加し、容器の底を軽く叩く（タッピング）と細胞の半分ほどが剥がれる程度（2～5分程）で培地を4mL加えて攪拌し、15mL遠沈管に移す ※1



4. 培地4mLを容器に加え、壁面に残った細胞を集め、15mL遠沈管に加える。一部をサンプリングして、細胞数を数える。



5. 130～150G/3分間遠心を行う。 ※2



6. 培地を吸引除去した後に、細胞密度が $1\sim 5 \times 10^6$ cells/mLになるよう予め冷やしておいた細胞凍結保存液を加え、懸濁させる。 ※3



7. 各クライオチューブに1mLずつ分注する。チューブは必ず氷上で保持すること。



8. クライオチューブを密閉して、凍結保存容器（CoolCell/Biocision社）に入れて、 -80°C で凍結保存し、12時間以上してから液体窒素容器へ移す。 ※4

参考事項

※1 剥がれ易い細胞では、コールドトリプシン法を利用した方が、細胞の状態を良好に保つことが可能な場合があります。（血管内皮細胞、臍臓細胞など）

参考：Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomed & Biotechnol) 2013 14(7):596-603

※2 細胞を遠心している間にクライオチューブや、予め冷やしておいた凍結保存液をベンチ内へ移動させておくとういことです。

※3 凍結保存液と細胞を氷上（低温環境）で十分に馴染ませることで、融解時の生存率向上が期待できます。

※4 信頼性の高い凍結方法として、プログラムフリーザーを用いた $1^{\circ}\text{C}/1$ 分のレートで冷却する方法が勧められています。しかし、多くの研究室では高価なプログラムフリーザーでなく、CoolCell（Biocision社）などの簡易型のフリージングコンテナを用いることで同等の効果をj得ています。



フリージングコンテナ/CoolCell LX



CoolCell LX30

【コラム：2】 意外な狙い目？細胞凍結融解の最終兵器！

細胞の凍結及び、融解作業はとても重要な作業です。品質の高い細胞を維持することは、実験結果を大きく左右する要因であり、この凍結・融解作業も細胞の品質に大きく関与しているからです。

以前から、より安全な細胞の凍結保存での重要なファクターは「凍結温度レート」だとしてプログラムフリーザーが登場し、 $-1^{\circ}\text{C}/1\text{min}$ のレートでの冷却が理想とされていました。それは、DMSOなどの凍結保護剤を細胞内に浸透させ、ゆっくりと凍結させて過冷却状態を維持し、細胞に影響を与えないような微小な氷晶を一気に形成させるためです。中途半端に急速に冷やしたりすると、冷却状態がブレイクして大きな氷晶が形成され、細胞に悪影響を与えます。（過冷却状態： 0°C 以下になっても直ぐには氷結しない状態で、瞬時に結晶が生成されるが、大きな氷晶が形成されにくい）また、近年は融解時にも同様の配慮が必要であるとされ、ガラス転移点（ T_g ）や再結晶現象が関わっています。せっかく凍結時に注意して微細な氷晶形成にとどめていても、ガラス転移点以上の温度域で、再結晶現象が起きて細胞にダメージを与えてしまうことがあります。この現象を避けるために、素早く融解して再結晶の危険性を低減させることが求められています。しかし、温め過ぎると凍結保護剤に含まれているDMSOなどが持つ毒性の方が優位になり細胞への影響が出てきます。よってチューブ（細胞）の温度を 4°C 付近に維持しながら予め用意していた培地へ加えることが必要です。こうした情報を持たない作業員が安易に凍結チューブを恒温バスに浸し、適切なタイミングを理解せずに引き上げて振動を与えたり、逆にいつまでも恒温バスに浸けていたりすれば、細胞へのダメージは避けられないでしょう。さて、この融解時の課題に注目したメーカーがありました！米国のフリージング製品を手がけているBiocision社です。同社は2015年の初頭

に「ThawSTAR凍結細胞融解ステーション」を発売しました。本製品は、チューブを装置に差し込むだけで自動的にチューブ温度を測定し、最適なレートでヒーティングを実施し、融解中も温度測定をしながらヒーター制御している優れたものです。

水を使わないことも本装置の大きな特徴です。細胞処理センター（CPC）など、無菌性を重視する施設では、培養エリアで水を使用することを嫌います。



ThawSTAR 凍結細胞融解ステーション

ThawSTARは、そうした培養エリアの作業を安全且つ効率的に行うことを可能としました。誰が操作しても同様の結果が得られる、高い再現性も喜ばれている要因の一つです。更に融解終了の10秒前からカウントダウンを行い、チューブを抜かないと警報がなる機能が装備されています。この機能は、融解終了後の氷上保存など、有用な作業を積極的に促しているものであり、細胞の高い生存率を維持するためにとっても気の利いた機能です。

このように、細胞を良い状態に維持するための本質を理解した装置の登場が、細胞培養技術の標準化に繋がっていくものと考えられます。

備考：細胞は、ガラス化転移点（約 -130°C ）以下で安定した保存ができますが、それ以上の温度では不安定になり、失透現象のような結晶形成が起こる可能性があります。凍結、保存、融解の操作時にはこのガラス転移点を意識した作業が必要です。