

動物細胞培養の基礎

高 井 明 徳*

大阪信愛女学院短期大学

Fundamentals of Animal Cell Culture

Akinori Takai

Human and Environment Vol. 7 (2014)

細胞培養は、生体内の細胞を生体外の適切な環境下で生育させる技術である。近年、細胞培養は、生命科学の基礎から応用に至るさまざまな分野で応用され、その発展に大きく貢献してきた。動物の細胞培養は、対象とする動物や応用分野は多岐にわたるが、無菌操作を基本とする基本技術は変わらない。本稿では、ヒトを含む哺乳類を中心とした脊椎動物の細胞培養を行う上での基礎について解説する。

1. はじめに

生体の一部を生体外の適切な環境下で生育させる技術を総称して「組織培養」(tissue culture)という。より具体的には、組織培養は、生体内の組織や器官、またはその一部を生体外に取り出し、無菌環境下で適切な培養液を含む培養器内で、適切な温度や pH 管理のもとで維持増殖させる技術である。

組織培養は、多くの場合 1 個 1 個の細胞を培養する「細胞培養」(cell culture)として行われている。細胞培養は組織片から増殖する細胞を培養するところから始まったが、トリプシン等消化酵素で組織を 1 個 1 個の細胞に単離させて培養する方法が確立され、細胞培養は大きく発展した。

細胞培養は、1910 年代から 1950 年代において、無菌操作技術の確立、合成培地(培養液)の開発、細胞株の樹立がなされ、共通の条件で行える状況が整った。その結果、細胞培養は生命科学における基礎から応用

に至る広範な研究分野において応用され、その発展に大きく貢献してきた。最近目覚ましい発展をとげ、大きく注目されている ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生医学・再生工学はまさに細胞培養応用の究極ともいえる。

細胞培養を行うためには、まず、①機器・器具を準備し、次いで、②細胞培養を行うための無菌操作技術を習得し、さらに、③適切な細胞培養を行うための細胞の状態を把握する観察力を養う必要がある。①についてはかなり経費がかかり、②③については経験が必要とされ、細胞培養は容易に行えるものではないとされるところでもある。

本稿では、ヒトを含む哺乳類を中心とした脊椎動物の細胞培養を行う上での基礎について解説する。はじめて細胞培養を行う場合に最低限必要とされる知識について簡潔にまとめた。動物の細胞培養はヒトを含む哺乳類の分野で発展し、他の動物にも応用されていった。対象とする動物や応用分野は多岐にわたるが無菌操作を基本とする基本技術は変わらない。本稿が細胞培養を行う上での手引き書・入門書として用いられれば幸甚である。

巻末にリストしたが[1–23]、現在細胞培養に関わる多数の書籍が刊行されているので、詳細な内容や文献等についてはそれらを参考にしていきたい。

*大阪信愛女学院短期大学

〒538-0053 大阪市鶴見区鶴見 6-2-28

Tel: 06-6180-1041, Email: takai@osaka-shinai.ac.jp

受付: 2014 年 12 月 20 日

©2014 大阪信愛女学院短期大学

2. 動物細胞培養概説

2.1. 組織培養・細胞培養の歴史

1800 年代後半、生体の一部を体外で保存する試みがなされ、平衡塩類溶液が開発された。

最初に生体の一部を取出して生育させたのはアメリカの生理学者 R.G. Harrison で 1900 年代の初めのことであった。彼はオタマジャクシの神経組織を取り出し、彼が考案したカバーガラス培養法により、神経線維が神経細胞より形成されることを明らかにした。以来、「組織培養」が、体外における細胞・組織等の培養を総称する言葉として用いられてきた。

組織培養の基本技術は 1910 年代前半フランスの A. Carrel によって確立された。当時、雑菌感染が組織培養を行う上での問題点であった。外科医であった Carrel は、外科手術における無菌操作技術を適用し、雑菌感染による問題を解決し、組織培養の基本となる無菌操作技術を確立した。また、彼は細胞増殖を促進する効果のあるニワトリ胚の抽出液を用い、長期培養に適したカレルフラスコを考案し、ニワトリ胚細胞の長期培養に成功した。

1940 年代から 1960 年代にかけて、ヒトを含む哺乳類の分野で各種合成培地が開発されると共に、さまざまな細胞株が樹立され、共通の条件で細胞レベルの研究が行えるようになり、細胞培養応用の基盤が確立した。

1950 年代後半に岡田善雄によりウイルス処理により細胞融合を人為的に行う方法が発見され、その応用は細胞培養を基礎とする新しい分野である体細胞遺伝学や細胞工学の誕生に貢献した。

細胞培養は、着実に発展し、応用が広がる中、細胞培養に必要なクリーンベンチやインキュベータ（恒温培養器）をはじめとする機器や器具、合成培地も普及していくが、なお、容易に行える技術ではなかった。しかし、1980 年代から大きく発展した生命科学やバイオテクノロジーにおいて、細胞培養は不可欠の技術として広く用いられるようになり、急速に普及していった。

2.2. 細胞培養の利点と問題

細胞培養を用いる利点として、以下の点が挙げられる。①細胞や組織レベルの研究をコントロールされた環境下で行える、すなわち、体内という有機的な繋がりを持つ複雑な環境から離れて、直接的に、またより単純化された条件で研究できる。②細胞株の利用により、細胞レベルの研究を同一条件で行うことができる。③均一なサンプルでウイルスや微生物と同様の定量的な研究が可能である。④染色体研究等、分裂する細胞を必要とする研究に有効である。④生体内で機能する組織や器官を再生できる（再生医学）。



図 1 初代培養細胞。キンギョの鰭由来線維芽細胞、単層状態で鰭組織より増殖。

一方、利点ばかりではなく、利点が問題点となることも考えなければならない。これは *in vitro*（生体外）と *in vivo*（生体内）の違い、すなわち、培養下で認められることは、必ずしも個体レベルで認められることとは合致しない。たとえば、ある化学薬品が細胞レベルでは発がん作用を示すが個体レベルでは示さないような現象は特殊なことではない（その逆も同じ）。

2.3. 細胞培養の方法

生体から器官、組織、組織片、細胞を取り出して培養することを「初代培養」（primary culture）という（図 1）。

組織や器官を酵素等で解離、または組織や器官から増殖してくる細胞の培養を「細胞培養」（cell culture）という。通常、細胞を培養すると、細胞の元の形態や機能は失われ、その由来にかかわらず細胞は培養器面に接着し単層状態で増殖する。このような細胞の培養を「単層培養」（monolayer culture）という。血液系細胞や腹水細胞、がん細胞等のように浮遊状態で増殖する細胞の培養を「浮遊培養」（suspension culture）という。

器官本来の形態や機能が保持または機能が発現するよう培養する方法を「器官培養」（organ culture）といい、特別な条件が必要とされる。細胞や組織の機能発現や分化の研究に有効である。

培養細胞は、増殖するスペースがなくなると増殖が抑制され、放置すると細胞の性質が変化するので、新しい培養液で適当な濃度に希釈した細胞を、新しい培養器に移し、増殖する細胞を維持していく必要がある。この操作を「継代」または「継代培養」（subculture, subcultivation）という。初代培養以後の培養は全て継代培養であり、継代培養による細胞培養を「二次培養」（secondary culture）ともいう。

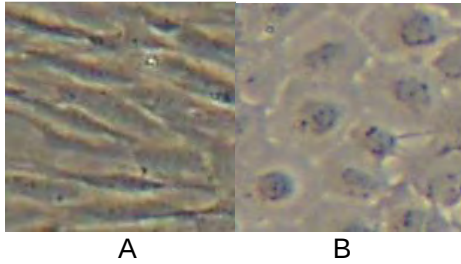


図 2 A：腺維芽様細胞（キングヨ緒由来）と
B：上皮様細胞（ドジョウ緒由来）。

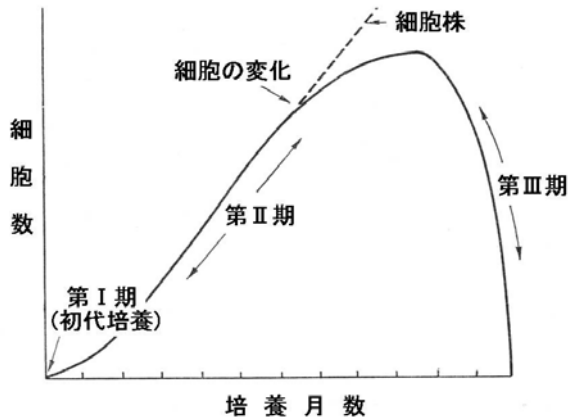


図 3 培養細胞の増殖と寿命. Hayflick & Moorehead (1961)に基づく。

2.4. 培養細胞の特徴

1) 培養細胞の形態

培養細胞は形態的に「腺維芽細胞」(fibroblast cell)と「上皮細胞」(epithelial cell)に分けられる。

腺維芽細胞は不規則紡錘形で密着度は低い(図 1、2A)。未分化で間充織由来、コラーゲンの産生、分化すると脂肪組織細胞になる(細胞内に脂肪球がたまる)。増殖能が高いが、これは一般培養条件(血清を含む培地の使用等)が腺維芽細胞に適している結果とも考えられる。上皮細胞は、互いに密着した多角形を示し、一層の細胞層を形成する(図 2B)。皮膚、消化管等の組織の表面を覆う細胞層である。

培養細胞の起源の同定は簡単ではないので、通常、「腺維芽様細胞」(fibroblast-like cell)、「上皮様細胞」(epithelial-like cell)と呼ぶ。

2) 培養細胞の増殖

培養細胞は、「細胞周期」(cell cycle)に従い増殖する。細胞周期は、G₁期(Gap 1)、S期(DNA synthesis)、G₂期(Gap 2)、M期(Mitosis)で構成され、S → G₂ → Mの時間は細胞によりあまり変わらない。よって、細胞周期はG₁の長さにより変わってくる。ほ乳類培養細胞の細胞周期は、おおよそ、S期：6-8時間、G₂期：1-2時間、M期：1時間である。

図 3 に示すように、正常組織を用い初代培養を行うと、細胞が培養環境になじむまで少し時間を要するが(第Ⅰ期)、細胞分裂が活発になると細胞周期に従い細胞分裂を繰り返し、増殖を続ける(第Ⅱ期)。活発に分裂する細胞も、ある一定回数分裂すると、分裂は停止し、しばらくすると死滅し始める(第Ⅲ期)(そのまま長く生存する場合もある)。

一方、がん細胞は無限に増殖を続ける。また正常細胞であっても何らかの原因により細胞に変化が生じて、無限に増殖するようになる場合がある(図 3)。無限増殖能を獲得(不死化)した細胞における変化を「形質転換」(transformation)といい、染色体異常等遺伝的な変化を伴っている。形質転換は発がん物質や変異原物質を作用させると起こる場合がある。また、自然に起こる場合もあり、自然形質転換という。がん細胞はがん化の過程で形質転換を起こし不死化した細胞である。

3) 培養細胞の寿命と形質転換による不死化

Carrel (1912) は「細胞は体外で培養すると永遠に増殖する」とした。しかし、Hayflick & Moorehead (1961) はヒトの胎児細胞を培養すると、5~8 カ月間でおよそ 50 回の分裂で分裂を停止することを見出した。Hayflick(1965)は、さらに年齢に応じ細胞分裂の回数が減少すること、動物の寿命と分裂回数には相関関係があることを見出した。Hayflick らによる研究は、細胞に寿命があることを明らかにした画期的な研究であった。1990 年、細胞老化の原因は、染色体のテロメア telomere におけるテロメア特異反復配列 DNA の短縮であることが明らかにされた。

現在、無限増殖能を有す多数の細胞株がある。この点については Carrel の見解は誤りではなかった。代表的なヒト由来の細胞株である HeLa 細胞は 1952 年以来今日まで生き続けている。しかし、HeLa 細胞はがん細胞由来である。

結論として、正常細胞には寿命があるが、無限増殖する細胞は形質転換し不死化した細胞であるといえる。

4) 正常培養細胞と形質転換細胞の性質の違い

正常細胞の増殖は、増殖するスペースがなくなると細胞分裂は停止する。より具体的には、増殖する細胞同士が接触すると細胞分裂が停止する。これを「接触阻止」(contact inhibition)という。接触阻止は正常細胞の重要な特徴であり、接触阻止により正常細胞は単層で増殖し、二層や多層になって増殖しない。

一方、がん細胞等形質転換細胞は、接触阻止が働かず、または弱いため、細胞が重層して増殖したり、細胞密度も高くなるので、細胞層は不均質で、ところどころで細胞が盛り上がって増殖している。

がん細胞を含め形質転換した細胞では、次のような性質が現れる。①無限増殖能の獲得、②形態的機能的変化(活発な増殖、高い細胞密度、接触阻止能の喪失、

接着性の低下、高いコロニー形成能、血清要求度低下)、③遺伝的变化(染色体構成<核型>の変化:異数性、倍数性、マーカー染色体の出現)、④がん化。以上の性質は、形質転換における遺伝的な変化の度合いにより異なる。

上記①②は、正常細胞において細胞増殖のコントロールが正常にできなくなった結果生じてくるものと考えられる。がん細胞は形質転換細胞の中でも正常細胞の正常性が最も損なわれた細胞であるといえる(がん細胞の中でも異常性の程度はかなり異なる)。

正常細胞に発がん物質等を作用させて形質転換し不死化した細胞は、必ずしもがん細胞と同等ではなく、がん細胞に近いものから正常細胞に近いものまでさまざまである。

2.5. 培養細胞の種類

培養細胞は「初代培養細胞」(primary cultured cell)と「継代培養細胞」(subcultured cell)に分類される。

継代培養細胞は、「細胞系」(cell line)、「樹立細胞系(株細胞)」(established cell line)、「細胞系統(細胞株)」(cell strain)に分類される。

細胞系は継代培養により維持される細胞、樹立細胞系は細胞系において無限増殖能を獲得し、安定した増殖を示すもの、細胞系統は細胞系または樹立細胞系の中で性状がはっきりしたものをいう。

株細胞・株化細胞と細胞株の用語が混乱して使用されることが多いようであるが、株細胞・株化細胞は樹立細胞系、細胞株は細胞系統をさす用語として用いるのが適当と考えられる。

2.6. 細胞株

1) 細胞株の樹立

最初の細胞株は、1943年 W.R. Earle により樹立されたマウス由来(C3H マウス皮下脂肪組織由来)のL細胞である。一方、ヒトの最初の細胞株は、1952年 G.O. Gey により樹立された HeLa 細胞である。HeLa 細胞は Henrietta Lacks さんの子宮頸ガン細胞由来で、その後、多くの変異株が樹立され、現在最も広く用いられている細胞株でもある。

2) 各種細胞株

(1) ヒト

- ◆ HeLa: 上皮性、ヒト子宮頸ガン細胞由来。1952年 G.O. Gey により樹立された最初のヒトの細胞株。
- ◆ HeLa S3: HeLa 由来。1956年 T.T. Puck により樹立。高いコロニー形成率(99%)を有す。

(2) マウス

- ◆ L: 腺維芽性、C3H マウス皮下脂肪組織由来。1943年 W.R. Earle により樹立された最も古い細胞株。

- ◆ NIH/3T3: NIH Swiss マウス胎仔由来。接触阻止。1969年樹立。DNA トランスフェクション、ウイルス感染に使用。

- ◆ Balb/3T3: Balb/c マウス胎仔由来。接触阻止。1968年樹立。形質転換実験に使用。

(3) チャイニーズハムスター

- ◆ CHO: 卵巣由来、プロリン要求性、1968年樹立。栄養要求株の分離、雑種細胞形成に使用。
- ◆ CHL: 肺由来、腺維芽細胞。1970年樹立。染色体異常試験に使用(染色体数=25)
- ◆ V79: 肺由来、腺維芽細胞。2倍体(2n=22)で株化。1958年樹立。染色体異常試験に使用。

(4) サル

- ◆ Vero: 上皮性、アフリカミドリザル腎由来。SV40研究用、ウイルス研究等幅広い用途。

3) 株細胞の維持・提供

- ◆ ATCC (American Type Culture Collection): 世界で最も歴史ある細胞バンク 約3400株。
- ◆ JCRB CELL BANK (Japanese Collection of Research Bioresources): 独立行政法人 医薬基盤研究所。
- ◆ RIKEN BRC CELL BANK: 理化学研究所細胞材料開発室。

3. 合成培地

3.1. 平衡塩類溶液

「平衡塩類溶液(BSS)」(balanced salt solution)は、器官や組織を体外で長時間にわたって正常な機能を保たせるための媒液として用いられる塩類の混合液で、適当なイオン組成、浸透圧、pHをもつ。

BSSは細胞内外の浸透圧をバランスよく保つためのイオン組成を有す等張液であり、最適pH(7.2~7.4)に調整されると共に、最適pHが保たれるための緩衝作用を有す。BSSは、組織の洗浄や一時保存に使用する他、培養液の基本成分としても重要である。

BSSは、 Na^+ ・ K^+ ・ Ca^{2+} ・ Mg^{2+} イオン等を供給するためにNaCl、KCl、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 MgSO_4 等を含み、緩衝作用を有すよう、リン酸塩、炭酸塩を含む。

表1に代表的なBSSの組成を示す。Earle液は5% CO_2 下での開放系培養用、Hanks液は閉鎖系培養用の培地の基本組成として用いられる。エネルギー源としてグルコースを含む。PBS(Phosphate buffered saline)はリン酸塩による緩衝作用をもたせたBSSである。

Ca^{2+} Mg^{2+} を含まないBSSをBSS(-)、またはCMF-BSS(Ca-Mg-Free BSS)といい、組織の一時保存や洗浄、組織から細胞を遊離させるためのトリプシン液の媒液等に使用される。PBS(-)がこの目的で広く使用される。

表 1 代表的 BSS の組成 (g/L)

成分	Earle ¹	Hanks ²	PBS ³
NaCl	6.80	8.00	8.00
KCl	0.40	0.40	0.20
CaCl ₂	0.20	0.14	0.10
MgSO ₄	0.10		
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.20	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.14		
Na ₂ HPO ₄			1.15
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O		0.06	
KH ₂ PO ₄		0.06	0.20
NaHCO ₃	2.20	0.35	
Glucose	1.00	1.00	

1. W.R.Earle (1943) : 5% CO₂ 下での開放系培養用
2. J.H.Hanks & R.E.Wallace (1949) : 閉鎖系培養用
3. R.Dulbecco & M.Vogt (1954) : Dulbecco's PBS (Phosphate buffered saline)。

*CMF-PBS, PBS(-) : Ca²⁺ Mg²⁺ を含まない PBS

より調整する。pH 調節は、指示薬を用い NaHCO₃ 溶液 (7.5%) により行う。指示薬はフェノールレッド液 (Phenol red solution) を用い、最終濃度が 0.005% 以下になるように加える (0.2% 液を 2~10mL/L 加える)。

閉鎖系培養では、開放系培養に比べると pH を安定に保つのが難しいので、pH 安定剤を用いるのが望ましく、HEPES (10~30mM) がよく使用される。

栄養物質は、生合成や代謝の基質、その過程の補酵素で、以下のものを含む。微量必須金属 (Fe Zn Se Cu Mn Mo)、糖類 (グルコース)、必須アミノ酸 (13 種)、非必須アミノ酸 (場合による) セリン、アスパラギン酸、プロリン、グリシン、各種水溶性ビタミン、コリン、イノシトール、ヒポキサンチン、チミジン。

多くの合成培養液は血清を添加して使用することを前提としている。血清には細胞成長因子等が含まれ、細胞を増殖させるためには不可欠である。血清を含めず使用する培養液を完全合成培地 (無血清培地) といい、血清における既知の成分等、細胞増殖に必要な成分を添加したものである。

3.3. 各種合成培地

合成培地は、1950 年代に主なものが開発された。それらを基本にした改良型培地も多数開発されている。

- ◆ BME (Basal Medium of Eagle、基本培地) : Eagle (1959) により開発された広く哺乳類の培養に適した最も簡単な組成の培地。
- ◆ MEM (Minimum Essential Medium、最小必須培地) : Eagle (1959) により開発され、最も広く使用される培地。細胞内の遊離アミノ酸量に基づく組成で (表 2)、血清使用を前提とする。MEM を基にした多数の改良培地がある。
- ◆ 改良 MEM (Modified medium of MEM)
 - ・ Alpha (α)-modified MEM : アミノ酸 8 種とビタミン 4 種を添加した MEM 培地で、栄養要求性の高い細胞に適す (Stanners 1971)。
 - ・ Dulbecco's MEM : アミノ酸 (×2)、ビタミン (×4) を増した MEM 培地 (Dulbecco 1955)。
- ◆ 199 : Parker (1950) により開発された最も古い培地であり、広く利用される。
- ◆ Ham F10・F12 : Ham (1963, 1965) によりクローニングや初代培養用に開発された培地。
- ◆ L-15 : Leibovitz (1963) により開発され、アミノ酸の遊離基により pH 調整を行う培地。閉鎖系培養用。
- ◆ RPMI 1640 : 血液系細胞 (浮遊細胞) 培養用で、Moore (1967) により開発される。

表 2 Eagle's MEM の組成 (mg/L)

成分	mg	成分	mg
NaCl	6,800	L-methionine	15
KCl	400	L-phenylalanine	32
CaCl ₂	200	L-threonine	48
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	L-tryptophan	10
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140	L-tyrosine	36
NaHCO ₃	2,000	L-valine	46
Glucose	1,000	Choline	1
L-arginine	105	Folic acid	1
L-cystine	24	Inositol	2
L-glutamine	292	Nicotinamide	1
L-histidine	31	Pantothenate	1
L-isoleucine	52	Piridoxal	1
L-leucine	52	Riboflavin	0.1
L-lysine	58	Thiamine	1

3.2. 合成培地

合成培地の組成は、平衡塩類溶液に栄養物質を添加したものである (表 2)。

合成培地に用いられる BSS は、Na⁺・K⁺・Ca⁺⁺・Mg⁺⁺イオン等塩類成分を含み、組織や細胞の生理的状態を保つ (浸透圧・pH)。閉鎖系培養には Hanks 液、開放系培養には Earle 液 (5% CO₂ 中)を用いる。

pH の調節は、最適の pH7.2 ~ 7.4 (6.6 ~ 7.8 で生存可能) になるように調節する。細胞が増殖すると pH は酸性化するので、リン酸塩、炭酸塩の緩衝作用に

3.4. 血清

通常の細胞培養では血清を添加する（通常 10%、5%～20%）。血清には、多くの複雑な成分（細胞成長因子、ホルモン、担体物質、接着因子等）が含まれ、細胞増殖に重要な役割を果たす。

細胞を増殖させるにあたり、細胞成長因子が必要であり、血清には細胞成長因子が含まれることが血清を使用する最も重要な点である。

血清は、牛の血清が最も広く用いられ、牛胎児血清 Fetal bovine serum (FBS)、新生児牛血清 New born bovine serum (NBS)、子牛血清 Calf serum (CS) がある。その他、馬血清 horse serum 等が用いられる。

FBS は最も効果的で、広く用いられる。初代培養は FBS 以外では困難である。ロットにより効果が異なるのでロットチェックを行うことが望ましい。非働化（56℃で 30 分間熱処理）を行い、補体を不活性化すると、細胞の増殖が促進することがある。

3.5. 細胞解離液(トリプシン液等)

組織や細胞の解離には、タンパク質分解酵素を含む溶液を用いる。酵素としてトリプシン (Trypsin) が最も広く用いられている。トリプシン液は、PBS(－) 等の BSS(－) にトリプシンを溶かす。また、細胞接着に関わる二価の陽イオンを除くためにキレート剤の EDTA も加える。

哺乳類の細胞培養に一般に用いられるトリプシン・EDTA 液は、0.25%トリプシン + 0.02% EDTA・2Na を含む。トリプシンは Difco の Trypsin (Difco 1:250) が広く使用されている。

トリプシン以外では、プロナーゼ、ディスパーゼ、コラゲナーゼ等が目的に応じ使用されている。

3.6. 合成培養液の作製

通常、市販の粉末培地を用い、二回蒸留水に溶かし、濾過滅菌を行う。高圧蒸気滅菌可能な培地として、イーグル MEM 培地「ニッスイ」が日水製薬株式会社より販売されている。

＜合成培地の作成法＞

- ① 市販の粉末培地を二回蒸留水 (Double distilled water : DDW) または脱イオン水の蒸留水 (Distilled deionized water : DDW) に溶解させる。
- ② 濾過滅菌：孔径 0.2μm～0.45μm のメンブランフィルターを用いる。
- ③ 抗生物質の添加：必要に応じ、カナマイシン (60mg/L) 等を加える。
- ④ pH 調節：NaHCO₃ (7.5%) を添加
- ⑤ 血清の添加：10% の FBS 等を加える。
- ⑥ 保存：通常は冷蔵庫で保存。長期末使用の場合、血清を添加せず冷凍保存する。

4. 細胞培養のための準備

4.1. 無菌室・クリーンベンチ・無菌箱

細胞培養は無菌環境にて行うので、無菌環境を提供できる施設・設備が必要である。従来は無菌室の設置が必要であったが、近年クリーンベンチが普及し、通常の実験室に設置して組織培養が行えるようになり、組織培養の実施が容易になった。

クリーンベンチはできるだけ清潔に保持され、人の出入りの少ない場所に設置することが望まれる。可能であれば専用の実験室に設置するのがよい。より厳格に無菌環境を維持するために無菌室にクリーンベンチをおく場合もある。

クリーンベンチには、細菌を通さない HEPA filter を取り付け無菌の風を噴出す送風装置が設置されている。使用時には、手・前腕をクリーンベンチ内に入れての操作が可能な程度に、正面のガラス戸を開ける。使用中は無菌の風が内部から外部に吹き出すようになっている。使用しない時には紫外線殺菌等を点灯しておく。高性能型のクリーンベンチには、正面のガラス戸が二重になり、手元に強い風が吹き出すエアーカーテン式のものがある。この場合は、内部の無菌の風は外に噴出さず内部で循環する。

クリーンベンチには実験機の上において使用できる簡易型のタイプもある。もう少し簡単な形のものに無菌箱がある。無菌箱は単なる箱タイプのものから HEPA filter を取り付けした送風装置が設置できるクリーンベンチに近いものまである。

4.2. 機器類

インキュベータ（恒温培養器）、倒立型位相差顕微鏡（対物レンズ 4×、10×、20×、40×）、乾熱滅菌器、高圧蒸気滅菌器（オートクレーブ）、乾燥器、純水製造装置（イオン交換水製造装置、蒸留水製造装置）、遠心分離器（～3000 回転）、冷蔵庫（4℃）、冷凍庫（－20℃、－40℃、－80℃）、吸引ポンプ、液体窒素タンク、恒温槽、pH メーター、顕微鏡、電子天秤等を使用。

インキュベータ（恒温培養器）：正確に温度が保持できる組織培養用のものが望ましい。培養中の pH を安定に保つことが出来る CO₂ インキュベータがあればよりよい。魚類等のように、30℃以下で培養する場合、特に夏季は低温インキュベータが必要である。

純水製造装置は、イオン交換を行ってから蒸留を行うタイプでは、培地に使用可能な二回蒸留水に相当する蒸留水が得られる。遠心分離機はオートバランス式のスウィング式のものがよりよい。冷凍庫は－80℃であれば約 1 年程度の細胞の凍結保存が可能である。

4.3. 小型器具類

1) ガラス・プラスチック器具類

培養器（シャーレ・フラスコ）、ピペット類、ボトル類、フラスコ、試験管、遠心管、メスシリンダー等を使用。

ガラス器具類は通常洗浄して使用する。現在、使い捨てタイプ（ディスポーザブルタイプ、略してディスポタイプ）の器具が普及している。ディスポタイプは便利であるが、費用がかさむ。

培養器（フラスコ・シャーレ）については、ディスポタイプを用いた方が容易に安定した培養を行うことができる（ガラス製は洗浄過程で傷がつくと、また洗剤が残存すると細胞の増殖に影響する）。

培養用に用いるプラスチック製のシャーレやフラスコは、細胞培養のための特殊コーティングを施した専用のものを用いる（一般のプラスチックシャーレでは細胞が増殖しない）。一般にシャーレは直径 6cm のものが用いられる。細胞量が少ない場合は 3.5cm 径のものを、多量の細胞を培養する場合は 9cm 径のものを、6cm 径のシャーレで使用する培地量は 4mL である。フラスコは培養面積が 25cm² のものが 6cm 径のシャーレとほぼ同じ培養面積のものとして一般に用いられる。

ピペット類は、先細ピペット、培養用短寸メスピペット、パストツールピペットを使用。2mL、5mL、10mL のものを準備する。通常の操作では 2mL の先細ピペットが使いやすく便利である。1mL 以下については、マイクロピペットを使用すると便利である。培地等で使用するボトル類は、通常使用する容量は 100mL か 200mL、凍結保存には 500mL のものを使用する。

2) ゴム類

ニップル（乳頭）、ゴム栓等、耐熱性で耐久性のあるシリコンゴム製品を使用。

3) 金属器具類

滅菌函（ピペット用、シャーレ用、試験管・遠心管用）、ピンセット・ハサミ・メス等を使用。

4) 濾過装置

メンブランフィルター型濾過装置（吸引式・加圧式）、スウィニー濾過器等を使用。

5) その他

バーナー、血球計算板等を使用。バーナーは点け続けるとベンチ内が高温になるので、必要な時に簡単に点火できる種火式でフットスイッチ点火式のものが必要である。

4.4. ガラス器具の洗浄

洗剤は扱いが簡単である。アルカリ性洗剤は洗浄力は強いが、洗剤が落ちにくく、ガラスを傷めやすい。中性洗剤は、洗浄力がやや弱いですがさすがに容易である。

その他、超音波洗浄による洗浄がある。30kc(20～40)

の強力なキャビテーションで 10～20 分間行う。自動洗浄器には超音波洗浄装置を備えているものもある。

<洗剤でのガラス器具の洗浄方法>

- (1) 使用後、よく水洗する。
- (2) 洗浄液に 1 昼夜以上浸す
- (3) ブラッシング
- (4) 温水で 10 回、次に脱イオン水で 3 回水洗
- (5) 乾燥

4.5. 滅菌法

滅菌法として、乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌、濾過滅菌、紫外線滅菌、抗生物質による滅菌、消毒液による滅菌等がある。

1) 乾熱滅菌

高温による滅菌。＜180℃で 60 分間＞行う。ピペットは綿栓をして滅菌函に入れる。シャーレは滅菌函に入れる。ビン類は口をアルミホイルで包む。遠心管・試験管は口をアルミホイルで包み滅菌函に入れる。

2) 高圧蒸気滅菌

高圧・高温による蒸気滅菌。＜2 気圧（1kg/cm²）、121℃で 20 分間＞行う。

蒸留水や BSS 等の液体類の滅菌：蒸気が内部に入るようキャップを緩め、キャップ部分をアルミホイルで包む。滅菌後、温度が下がってからキャップを閉める。

高温に不適当なプラスチック類やゴム類等の滅菌：アルミホイルで包む。使用時にアルミホイルを開くときには、手に触れる部分から露出するように工夫して包む。

3) 濾過滅菌

培養液等の高温による滅菌ができない液体は、濾過滅菌により滅菌を行う。濾過滅菌は、細菌を通さない＜孔径 0.22μm～0.45μm のメンブランフィルター＞を使用して行う。吸引濾過と加圧濾過による濾過法がある。吸引式では、吸引ポンプ又はアスピレータを使用し、吸引する。注射器で加圧して濾過する方式のスィニー式濾過器を簡便に使用できる。

4) 紫外線による滅菌

無菌室、クリーンベンチ等の殺菌用で、紫外線殺菌灯（15W）で 50～80cm 離れた位置に設置で 20 分以上行う。

5) 抗生物質による滅菌

培養細胞の細菌等汚染防止。カナマイシン（Kanamycin、60mg/L）、ストレプトマイシン（Streptomycin、100mg/L）、ペニシリン（Penicillin、100IU/mL）等を用いる。真菌汚染の防止にはファンギゾン（Fungison、2.5mg/L）等を用いる。初代培養では、複数組み合わせ、高濃度（2～10 倍）で用いる場合が多い。

6) 消毒液による滅菌・消毒

手指消毒：オスバン（ベンザルコニウム塩〈逆性せっけん〉）、ヒビテン・ヒビスクラブ（クロルヘキシジングルコン酸塩）、70%アルコール等を用いる。

外部組織・器具の殺菌：70%アルコール、次亜塩素酸ナトリウム、グルタルアルデヒド等を用いる。

5. 細胞培養の基本技術

5.1. 準備・滅菌操作等

1) 準備

- ① 細胞培養のための服装を整え、消毒薬を用い、手・前腕をよく洗う。手は必要に応じ、70%アルコール等で消毒する。
- ② クリーンベンチの準備：送風スイッチを ON にし、ガラス戸を少し開け、ベンチ台を 70%アルコールを含ませた脱脂綿やペーパータオル等（以下、アルコール綿等）で消毒し、ガラス戸を閉め、紫外線ランプを点灯する（点灯時間 20 分以上）。
- ③ 必要な器具・薬品類を準備する。培養液やトリプシン液は恒温槽に入れ、培養温度と同じ温度にする（ほ乳類では 37℃）。
- ④ 紫外線ランプを消灯し、ガラス戸を少し開け、使用する培地ビン等必要な器具類をアルコール綿等でよく拭き、クリーンベンチに入れ、配置する。ガス栓を開け、バーナーの種火を点ける。
- ⑤ 継代等を行う培養中のシャーレ等細胞培養器をクリーンベンチに入れ、操作を開始する。

2) 終了時

- ① ベンチ内のものを片付け、外に出す。
- ② バーナーの種火を消し、ガス栓を閉める。
- ③ ベンチ台をアルコール綿等でよく拭き消毒し、ガラス戸を閉め。送風スイッチを OFF にし、紫外線ランプを点灯する。

3) クリーンベンチ使用時の滅菌操作等

- ◆ 火炎滅菌（フレーミング〈flaming〉）：ピペット使用時やボトルのキャップ開閉時等、バーナーの火にかざし滅菌を行う。具体的には、ビン類のキャップを取った時にキャップの内側及びビンの口に火をかざす。閉める時も同様に火をかざしてからキャップをする。缶類や試験管、遠心管等も同様に行う。ピペットはニップルを取りつける時、ニップルを付けた後に本体全体に火をかざす。
- ◆ 培養操作中、培地等をこぼした場合は、すぐアルコール綿でよく拭きとり、消毒する。
- ◆ 手をベンチ外に出し、再度ベンチ内に入れる時は必ず 70%アルコールで消毒する。
- ◆ 培養器より除いた培地を廃液ビーカーに捨てる時は、しぶきが周囲に散らないように注意する。廃液は、ベンチ内の廃液ビーカーに捨てるより、

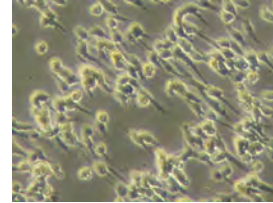


図 4 トリプシン処理により培養器面よりはがれ丸くなってきた腺維芽様細胞（キンギョ鰭由来）。

吸引式のピペットを使用し、外部に設けた廃液ビンに排出するのが望ましい。

- ◆ ピペットは先の部分が手やベンチ台、その他感染の恐れのある部分に触れたときは交換する。

5.2. 閉鎖系培養と開放系培養

培養器としてフラスコを用いゴム栓やスクリーキャップで閉じて培養を行う方法を閉鎖系培養という。細胞の増殖により培地が酸性化すると細胞の増殖が阻害される。そのため、培地は pH の変化を少なくするために緩衝作用のある成分を含むが限度があり、閉鎖系培養ではその影響が早期に出る。

開放系培養は、インキュベータ内を一定の CO₂ 濃度にして、pH の変化を少なくする。開放系培養では、常にインキュベータ内の空気が培養器内に入り込むように培養器にシャーレを用いる。

5.3. 継代培養

継代培養は、細胞培養における基本操作である。まず継代培養操作をマスターすることが必要である。

直径 6cm のシャーレ（培養液量 4mL）で培養の場合を以下に示す。フラスコでも方法は同じである。

<継代培養操作>

- ① シャーレから培養液を除きトリプシン液を入れる。
- ② トリプシン液を除き、再度トリプシン液を入れる（剥がれやすい細胞の場合は、この操作は省く）。
- ③ 細胞が剥がれてきたらトリプシン液を除く（図 4）。
- ④ 培養液を 4mL 加える。
- ⑤ ピペッティングにより細胞を培養器面より剥がし遊離状態にする。

<以下、細胞濃度を 1/2 にする場合>

- ⑥ 新しいシャーレに 2mL の細胞浮遊液を移す。
- ⑦ 培養液を 2mL 加える。
- ⑧ シャーレを恒温器に移す。

細胞濃度を 1/2 以下にする時は希釈度に合わせて⑥⑦の操作を調整する。一般に初代培養細胞直後の正常細胞では 2 倍程度の希釈度で行うが（細胞濃度を低くすると増殖しなくなる）、増殖度の高い細胞株では 5 倍から 10 倍程度に希釈する。必要な細胞量に合わせ、新しいシャーレを準備し、不要な細胞は捨てる。

培養液の交換は、継代培養を行う時だけでなく、細胞の状態をよく観察し必要に応じて行う。

5.4. 初代培養法

初代培養では組織片から増殖する細胞を培養する方法と、最初にトリプシン等消化酵素で細胞を分離し培養する方法がある。

1) 組織片培養法(組織片遊出細胞培養法)

＜内部組織＞

- ① 動物を麻酔する。
- ② からだ全体、特に切開する部分を 70%アルコールでよく消毒する。
- ③ クリーンベンチ内で、メスやハサミ等で切開し組織片を無菌的に取り出す。

＜外部組織＞

- ① 組織片を切取る。
- ② 滅菌 PBS(－)でよく洗う。
- ③ Dakin 液 (0.4%次亜塩素酸ナトリウム液 pH8.8) で殺菌。1 分間 2 回 (時間回数は組織の大きさにより調整)。

—以後、内部組織、外部組織共通—

- ④ PBS(－)を入れたシャーレに移す。
- ⑤ PBS(－)で数回洗う。場合により高濃度 (×2~10) の抗生物質を含む PBS(－)に浸し、しばらく放置する。
- ⑥ 組織を細片化 (数 mm 平方) し、培養器面に張り付け、少し放置。
- ⑦ 培養液を加え、動物種に応じた温度で培養する (哺乳類は 37℃)。
- ⑧ 組織片の周囲より細胞が遊出。
- ⑨ ある程度細胞が増殖したら、トリプシン等で細胞を解離して組織片を除く。

＜Dakin 液 (Dakin 1915) の作製＞

- ・ 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (約 12%) 144mL を 1L の蒸留水に希釈 (A)
- ・ 4ml の 6N 塩酸を 500mL の蒸留水に希釈 (B)
- ・ 32g の NaHCO₃ を 500mL の蒸留水に希釈 (C)
- ・ A+B+C を蒸留水を加え 4L にする

2) 遊離細胞培養法

- ① 上記方法①から⑤同様、組織片を取り出し、殺菌・洗浄等の後、細片化する。
- ② 細片化した組織を三角フラスコに移し、トリプシン液 (0.25% trypsin + 0.02% EDTA・2Na) を入れる。
- ③ マグネチックスターラー攪拌棒を滅菌してフラスコに入れる。
- ④ スターラーを動かし、緩やかに攪拌する。
- ⑤ 組織片がバラバラになり、単一細胞に近い細胞の浮遊液が出来たとき、細胞浮遊液を遠心管に移す。

- ⑥ 遠心分離 (1000rpm、5 分) し、上澄みを捨て培養液を加える。
- ⑦ 培養液中に細胞を浮遊させ、培養器に移す。
- ⑧ 動物種に応じた温度で培養する (哺乳類は 37℃)。

3) 初代培養から継代培養へ

初代培養中は培養液の交換を適切に行う。細胞がほぼ培養器面を満たす頃に、第 1 回目の継代を行う。細胞が密集している部分が散在する場合、細胞をはがし細胞を分散させる。細胞数の少ない時期に継代を行うと細胞密度が低くなり、細胞が増殖しなくなる。

5.5. 血液細胞培養法

1960 年前後に、Nowell や Hungerford らによりインゲン豆で抽出された物質 Phytohemagglutinin (PHA) が白血球を活性化し細胞分裂を促進する作用があることが発見され、血液培養に応用された。この PHA を用いる血液の短期培養法により容易に染色体が調べられるようになった。

細胞分裂促進物質を mitogen といい、PHA 以外にも、Concanavalin A (ConA)、Pokeweed mitogen (PWM) などが存在する。

＜末梢血培養法＞

- ① 内壁をヘパリン (Heparin) 100IU/mL でぬらした注射器で約 5ml 採血する。
- ② 注射器中の血液とヘパリンがよく混じるように注射器を上下に振る。
- ③ 試験管に移し氷水中に約 30 分放置すると、血漿と血球に分離する。分離が悪い時、約 400rpm (5 分) で遠心分離する。
- ④ 上澄み (血漿、白血球部分) を取り (約 1mL)、培養器に移す。
- ⑤ 培養液 (RPMI1640+10%FBS) を 4mL 入れる。
- ⑥ PHA-M (Difco) を 0.1mL 加える。
- ⑦ 48~72 時間培養 (哺乳類では 37℃)。

5.6. 細胞の凍結保存法

細胞は凍結保護材の使用により凍結保存することが出来る。-80℃の超低温冷凍庫で約 1 年間、-150℃以上の液体窒素タンク (-196℃) で約 10 年間凍結保存が可能である。

＜凍結方法＞5~10%のグリセリンまたはジメチルスルフォキシド(DMSO)を含む培養液に細胞濃度が 2×10⁶/ml となるように浮遊させる。冷凍は-1℃/分の速度で緩やかに行う。

NALGEN の凍結保存容器は内部をイソプロピルアルコールで満たし、凍結チューブをセットするようになっているが、この容器を-80℃の超低温冷凍庫に入れると-1℃/分の速度で細胞を容易に凍結していくことができる。

＜解凍方法＞25℃程度の水につけ迅速に解凍する。

5.7. 細胞の観察

培養中の細胞の観察は、倒立顕微鏡で行う。生きた細胞を染色せず、そのままの状態を観察するために位相差装置を使用する。対物レンズは 4 倍、10 倍、20 倍、40 倍を使用する。通常の観察は 4 倍または 10 倍で行う。

日々の培養細胞の観察は、細胞を適切に維持するために重要である。細胞の形態、細胞の増殖状況、培地の pH、細菌・カビの汚染の有無等を観察し、状況に応じた必要な対処を行う。細胞の状況に基づき、培地の交換や継代を適切に行わないと細胞が変化する可能性がある。細菌・カビの発生を認めた時は、すぐに細胞を処理し（アルコール・高圧滅菌による殺菌）、その原因を突き止める。培養液が感染している可能性があればすぐにチェックする。外部組織を用いる初代培養では細菌の発生状況を念入りに観察する。

6. 細胞培養の各種技術

6.1. 細胞標本の作製

細胞標本は以下のように作製する。

<方法>

- ・ 培養シャーレに滅菌したカバーガラスを入れ、適当な濃度の細胞を入れ、培養する。
- ・ 細胞はカバーガラス上に増殖する。
- ・ 培養終了後、軽く PBS で洗い、99% methanol で約 5 分間固定し、空気乾燥する。
- ・ ギムザ（Giemsa）染色を行う場合、4% Giemsa 液（pH6.8 リン酸緩衝液で希釈）で約 10 分間染色する。
- ・ 水洗し空気乾燥後、スライドガラス上に封入剤で封入する。DNA 部分(核)が赤紫色に、RNA 部分が青色に染色される。

6.2. 細胞数・細胞核の算定

1) 細胞数の算定

生細胞数のみ算定するために、トリパン青染色法による生死簡易判定法を用いる。生細胞は色素が通過しないので染色されないが、死細胞は色素を取り込み染色されるので、生細胞数や生細胞数の割合を求めることができる。

<方法>

- ・ 細胞浮遊液と 0.5% トリパン青（Trypan Blue）液（PBS(-)に溶かし濾過）を 1：2 で混合する。
- ・ 血球計算板で、全細胞数と青染した細胞（死細胞）数を算定する。
- ・ 生存率（%）は以下の式に従う。
生存率（%）
=（全細胞数－青染細胞数）×100／全細胞数

2) 細胞核の算定

細胞核の算定は、クエン酸処理・クリスタル紫染色法により染色し、核数を算定する。クエン酸処理で細胞膜を壊し、核を遊離させる。

<方法>

- ・ 0.5mL の PBS(-)に細胞を浮遊させる。
- ・ 0.05% クリスタル紫（crystal violet）液を含む 0.1M クエン酸液 3.5mL と混合する。
- ・ 37℃で 1 時間放置。
- ・ 遠心分離の後、3mL の上澄みを除き、残り 1mL の上澄みに核を浮遊させ、血球計算板で核数を算定する。

3) 細胞数等の自動計測

コールター・カウンターを使用すると自動的に迅速かつ正確に細胞数等の算定を行える。

6.3. 増殖曲線と増殖速度

1) 増殖曲線

日数とともに変化する細胞数をグラフ化する（縦軸：細胞数〈対数で示す〉、横軸：日数）。

増殖曲線は、一般に以下のような曲線を描く（図 5）。継代後新しい環境になじむまで増殖が遅い時期（増殖遅延期）、活発に増殖を行う時期（対数増殖期）、培養液が古くなり、また細胞の増殖するスペースがなくなり細胞の増殖が停止する時期（定常期）、放置すると死んでいく時期（死滅期）。

<方法>

- ・ 細胞濃度が 10^4 /ml の細胞浮遊液を調整。
- ・ 12 枚の 35mm シャーレに 2ml ずつ分注（シャーレあたり 2×10^4 個）。
- ・ 1, 3, 5, 7 日目に、それぞれ 3 個のシャーレの細胞数を算定。
- ・ 片対数グラフに全細胞数／シャーレをプロット、線で結ぶ。

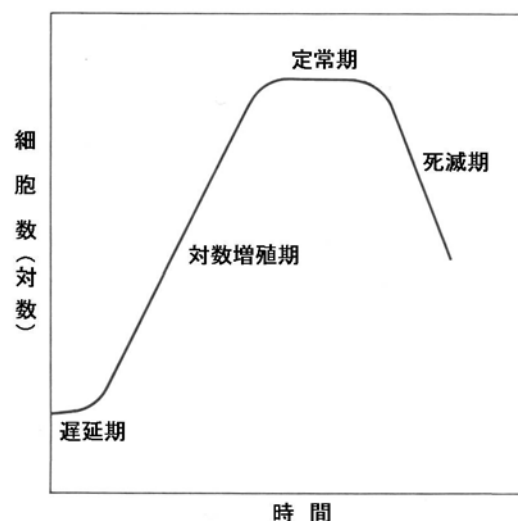


図 5 増殖曲線

2) 増殖速度

増殖速度は倍加時間 (doubling time[D.T.] : 細胞数が 2 倍になるのに要する時間) で判定する。

倍加時間 $D.T. = (t - t_0) \log 2 / (\log N - \log N_0)$

t, t_0 : 時間 N, N_0 : t, t_0 時での細胞数

6.4. マイコプラズマ検出法

マイコプラズマは自己増殖能を持つ最小の原生微生物 (0.3~0.8 μ m) で、一般細菌とは異なり、感染しても通常の顕微鏡観察では検出できない。細胞の増殖が悪くなった時など感染している恐れがある。

<検出方法>

- ・カバーガラスに Vero 細胞を 2×10^4 加え一夜培養。
- ・培地に検体 0.1mL を加え 5 日間培養 (陰性対象の Vero 細胞も培養)。
- ・酢酸メタノール固定液 (1:3) で 10 分間固定、PBS(-) で洗う。
- ・染色原液 (5mg Hoechst 33258 + 10mg thimerosal / 100mL PBS : 完全遮光で -20°C 保存) 0.15mL を PBS で 100ml に希釈したもので、30 分間染色
- ・蒸留水で 3 回洗浄、スライドガラス上に封入し、蛍光顕微鏡で観察。

6.5. 細胞融合法

1957 年岡田善雄は、HVJ ((Hemagglutinating Virus of Japan, Sendai Virus : マウス由来 RNA ウィルス [パラミクソウィルス類]) が細胞融合を促進することを発見。異種の細胞が融合すると細胞内に 2 個の異種の核を持つ一つの細胞 (heterokaryon) が形成される (同種の場合、homokaryon という)。後に 2 個の核が融合し 1 個の核を形成すると (synkaryon)、増殖可能な雑種細胞 (hybrid cell) となる。

現在、細胞融合にはポリエチレングリコール (PEG polyethylene glycol) が広く用いられる。他にパルス的に高圧の電氣的刺激を与える電気細胞融合法がある。

<PEG による細胞融合法>

- 同数の細胞 (2×10^6) を混合し遠心分離 (1200rpm、5 分) する。50% PEG* を 0.5mL 加え細胞を浮遊させ、1 分後に培地を加えよく混合し遠心分離。培地で洗浄 3 回。
- 単層培養で行う場合、前日に 2 種の細胞をよく混合し培養。当日、培地を除き、PEG を細胞表面を覆うように加える。1 分後、PEG を除き培地で洗浄 3 回。

*50% PEG : 分子量 (MW) 1000 の PEG 10 g を高圧滅菌し、 60°C に冷えたとき、10mL の血清を含まない培地を混合。PEG の MW は 1000~6000 が用いられる。

最後に

本稿は、近畿大学農学部水産学科で担当した「組織培養論」で配布した講義資料を基に作成した。「組織培養論」は、バイオテクノロジーの発展により組織培養の応用が急速に広まり、水産分野においてもその影響が及び、1994 年新しい専門科目として設定され、筆者が担当することになった。

組織培養・細胞培養に関する書籍は、1980 年以前はほとんどなく、黒田行昭著「動物組織培養法」(1974) [1] がほぼ唯一の実用的専門書であり、筆者も入門当時に入手し大変お世話になった。1980 年代に入り細胞培養関係の書籍の刊行が相次いだが、近畿大学で講義を行うにあたり手軽な入門書はなかった。

そこで、基本的内容をまとめた講義資料を作成した。使用する機器・器具、実際の培養操作は実感できるように別途スライドを作成した。

1990 年代中頃になると初心者用に非常にわかりやすい丁寧な解説の入門書が刊行されるようになり、細胞培養は初心者でも手探りで行えるほど身近なものになった。

一方、近畿大学での講義資料は、水産学科の大学院や学部学生、本学人間環境学科バイオコースの学生が細胞培養を行うにあたって、手軽で便利な入門書・実用書として活用され、それなりの役割を果たしてきた。

そこで、今回、加筆等を行い、入門書として体裁を整えてみた。紙面の都合で、具体的な機器や器具、培養操作を具体的に示す図等は掲載せず、身近において使用するための必要最低限の内容にとどめた。そのため、本稿だけでは十分な理解を得るのが難しい部分も多々あるかもしれない。今後、内容の充実を図るため、本稿の追補版を出すことができればと思っている。

本稿は、細胞培養に関するごく基本的内容を扱っているもので、個々の内容について特に引用を行っていないが、先に述べた黒田行昭先生の高著 [1] をはじめ、文献 [2・9・10・12] を主に参考にさせていただいた。黒田行昭先生をはじめこれらの文献の著者の先生方に感謝いたします。なお、本稿は筆者の経験的な部分も多分に含んでいることを記しておく。

筆者は、関西学院大学理学部小嶋研究室に卒業研究で入門し細胞培養の手ほどきを受けて以来今日まで細胞培養を染色体研究等において活用してきた。筆者が入門した当時、研究室では特にマニュアルはなかったが、先輩方の口伝により基本的な知識や技術が伝えられていた。すでに相当の年月が経ったが、小嶋研究室で学んだ細胞培養の基礎を入門書としてまとめることができたことは感慨深いものがある。

稿を終えるにあたり、今は亡き恩師関西学院大学名誉教授小嶋吉雄先生に心から感謝申し上げます。また、近畿大学での講義の機会をいただいた近畿大学名誉教授上野紘一先生に深く感謝申し上げます。

文 献

- [1] 黒田行昭：動物組織培養法．共立出版（1974）
- [2] 黒田行昭編：培養細胞遺伝学実験法．共立出版（1981）
- [3] 日本組織培養学会編：組織培養の技術．朝倉書店（1982）
- [4] 宗村庚修編：細胞培養マニュアル．講談社（1982）
- [5] 勝田甫，高岡 聡子：組織培養法．学会出版センター（1982）
- [6] 勝田甫，山田喬，高岡総子：癌細胞を撮る－勝田甫と組織培養．学会出版センター（1983）
- [7] 黒田行昭編：細胞培養の技法．ニュー・サイエンス社（1984）
- [8] 高岡聡子：組織培養入門．学会出版センター（1986）
- [9] 日本組織培養学会編：組織培養の技術（第2版）．朝倉書店（1988）
- [10] 日本生化学会編：細胞培養技術，新生化学実験講座第18巻．東京化学同人（1990）
- [11] R.L.P.Adams：細胞培養法 生化学への応用（山田正篤，山根績訳）．東京化学同人（1992）
- [12] 松谷豊：動物細胞培養入門，生物化学実験法 29．学会出版センター（1993）
- [13] 日本組織培養学会、日本植物組織培養学会編：組織培養辞典．学会出版センター（1993）
- [14] 瀬野悍二，小山 秀機，黒木 登志夫編：研究テーマ別 動物培養細胞マニュアル．共立出版（1993）
- [15] 日本組織培養学会編：組織培養の技術（第3版）．朝倉書店（1996）
- [16] 渡邊利雄：バイオ実験イラストレイティッド－すくすく育て細胞培養、秀潤社（1996）
- [17] 日本組織培養学会、細胞バンク委員会：細胞バンク・遺伝子バンク－情報検索と研究．共立出版（1998）
- [18] 井出利憲：細胞培養入門ノート．羊土社（1998）
- [19] 許南浩編：細胞培養なるほど Q&A、羊土社（2003）
- [20] 黒木登志夫，許南浩編：培養細胞実験ハンドブック－細胞培養の基本と解析法のすべて．羊土社（2004）
- [21] 秋山 徹，河府 和義：細胞・培地活用ハンドブック－特徴，培養条件，入手法などの重要データがわかる．羊土社（2007）
- [22] 井出利憲，田原栄俊：（改訂）細胞培養入門ノート．羊土社（2010）
- [23] 日本組織培養学会編：細胞培養実習テキスト．じほう（2013）

論文集「人と環境」Vol. 7 (2014)

大阪信愛生命環境総合研究所編
