

じっけんレシピ

〒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4F
Tel: (03) 5796-7330 Fax: (03) 5796-7335 e-mail: sialjpts@sial.com

細胞の環境と培地を構成する物質

細胞環境と培地の種類

通常では、細胞培養には滅菌的な環境と増殖に必要な栄養が必要です。滅菌的な環境という基本的な条件に加え、細胞培養にはpHと温度の安定も求められます。過去約30年に渡り、様々な培地の組成が検討・開発され商業化されてきました。元来、平衡塩類溶液は哺乳類の心筋細胞の収縮性を維持するために使用されており、タイロッド液は初代哺乳類細胞に使用するために当初開発されました。その後、これらの培地は改良が重ねられ、必須アミノ酸、ビタミン、脂肪酸や脂質などが加えられるようになりました。その結果、現在のような様々な細胞が増殖可能な培地へと変化していったのです。培地の組成は各構成物が最適な濃度になるように厳密に定められています。

培地の基本的な組成

各培地は一般的に以下の様な物質で構成されています。

- ・無機塩類
- ・炭水化物
- ・アミノ酸
- ・ビタミン
- ・脂肪酸・脂質
- ・タンパク質・ペプチド
- ・血清
- ・微量元素

各構成物質の詳細な説明は次の通りです。

無機塩類

培地の中の無機塩類は様々な役割があります。無機塩の役割は、主に細胞の浸透圧の安定、ナトリウム、カリウム、カルシウムの供給による膜電位の制御に役立ち、細胞接着での細胞マトリックスにおいて酵素の補因子として必要になります。

バッファー類

ほとんどの細胞はpHの調製が必要であり、大体pH 7.2～7.4で調製するのが基本的な培養条件です。この至適条件は細胞によっても変化します。繊維芽細胞（フィブロブラスト）などは比較的高めのpH（7.4～7.7）を好みますが、形質転換した細胞などはより酸性に傾いた条件を好みます（pH 7.0～7.4）。pH調製は最初に細胞を播種する培地を確立する時に非常に重要で、通常1、2種類の方法から成ります。

- i) 培養細胞をより‘自然な’条件に近づけるために、CO₂ガスを送りCO₃/HCO₃の濃度を調製する（重炭酸）
- ii) HEPESなどの両性イオンで化学的に調製する。重炭酸を使用したものは、CO₂の濃度を5～10%に維持する必要があるため、CO₂インキュベータを使用します。本方法はあまり高価ではなく、また毒性も低く良い化学的な影響を細胞に与えます。HEPES（製品番号：H4034）は、pH 7.2～7.4の緩衝能に優れていますが、高価で、高濃度では一部の細胞に毒性を示します。またHEPESを使用する場合にはガス調製が不要です。フェノールレッド含有培地の場合、酸性になると黄色、アルカリ性になると紫になります。

お問い合わせ先：
製品の技術的なご質問 sialjpts@sial.com
価格・在庫のご質問 sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

〒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4F
Tel: (03) 5796-7330 Fax: (03) 5796-7335 e-mail: sialjpts@sial.com

炭水化物

炭水化物から得られるほとんどのエネルギーは糖の形で通常表されます。これらの糖はグルコース、ショ糖などですが、幾つかの培地にはマルトース、フルクトースがあげられます。多くの基礎培地の場合、糖の濃度は1~4.5 g/Lです。糖の濃度が高い培地ほど、様々な種類の細胞増殖に対応可能であると言われています。

アミノ酸

アミノ酸はタンパク質の基礎構成成分です。必須アミノ酸は細胞内では合成できないため、培地に必ず添加されなければいけないアミノ酸です。アミノ酸の培地における最低必要濃度は最大細胞密度によって変動します。一度アミノ酸が枯渇してしまうと、細胞はそれ以上の増殖が不可能になります。

細胞培養において、必須アミノ酸であるグルタミンは特に重要です。細胞が至適培養条件になるためにはグルタミンの添加が必須です。

非必須アミノ酸を培地に加える事によって、様々な細胞の細胞寿命と増殖が助長されます。

ビタミン

血清は細胞培養時に重要なビタミンの供給源です。しかし最近の培地はビタミン豊富な培地が多く、更に多様な細胞に対応できるようになりました。ビタミンは多くの補因子の前駆物質です。特にビタミンB群は細胞の分裂と増殖に必要で、特にB12は幾つかのセルラインにとって必須です。一般的な組成以外にも特にビタミンAやビタミンEの濃度を上げた培地などもあります。一般的に使用されるビタミンにはリボフラビン、チアミン、ビオチンなどです。

タンパク質・ペプチド

これらは特に無血清培地にとって重要なものです。アルブミン、トランスフェリン、フィブロネクチンやフェチインなどが血清の代替として添加される一般的なタンパク質・ペプチドです。

脂肪酸・脂質

タンパク質やペプチドのようにこれらも通常は血清中に含有する物質であり、無血清培地にとって重要なものです。例えばコレステロールなどのステロイドは細胞の構成に必要な必須の脂質です。

微量元素

微量元素とは、亜鉛、銅、セレンウム、クエン酸中間体などを含みます。セレンウムは抗酸化作用が高く、(有害金属などの) 毒素を排出すると言われています。

お問い合わせ先:
製品の技術的なご質問 sialjpts@sial.com
価格・在庫のご質問 sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

〒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4F
Tel: (03) 5796-7330 Fax: (03) 5796-7335 e-mail: sialjpts@sial.com

血清

血清はアルブミン、成長因子、細胞増殖阻害因子などを含み、細胞培養において非常に重要な構成物です。

現在多くの細胞培養にはFBS（ウシ胎仔血清：fetal bovine serum）が使用されています。そのほかに使用される血清としてはNCS（仔ウシ血清：newborn calf serum：生後数か月までのウシから採取される血清）やウマ血清などがあります。

血清のロット毎の品質や濃度は、その後の細胞培養に大きく影響しますので、実際に使用する前にはロットチェックを行ったほうが良いでしょう。ロットチェックとは目的の細胞を2～3回継代培養して細胞形態や増殖能力が良好であることを確認する作業の事です。

また血清のロットによってはクローニング効率やコロニー形成率にも影響し、その結果、細胞の特徴保持に影響してきます。血清は培養時に細胞の成長速度が遅い時や、播種密度が少ない時などにも有益です。また、攪拌培養やセルスクレイパーなどで受けた物理的なダメージを軽減する作用もあります。

血清のその他の利点としては成長因子を多数含んでいるので、どの培養にも広く対応できるという点です。他には毒素に結合し排出するという作用もあります。しかしながら、血清には先述のようにロット差が生じますので、それがプロトコルの標準化を難しくさせています。

また血清を使用するに当たり、コンタミネーションのリスクもあります。このリスクは、しっかりと大容量でのロット品質試験を行い、品質試験の結果を示す試験成績書(certificate of analysis)を提供する供給先を選定することによって軽減は可能です。

特に血清はBVDV（bovine viral diarrhoea virus：ウシウイルス性下痢症ウイルス）とマイコプラズマの試験は重視されます。血清の非働化（Heat inactivation：血清を56℃で30分間加熱をすることにより血清に含まれる補体成分を不活化する事）は何種類かのウイルスもこの作業により不活性化させるために、結果コンタミのリスクを軽減します。

しかし非働化させた血清を定期的を使用するのは細胞培養ではあまり頻繁に行われません。血清は高価な物という費用負担の観点からだけではなく、細胞培養後の実験内容にも影響してきます。

10%のFBSは培地中に約4.8mg/mLのタンパクを含むことになり、その後の細胞の使用でタンパク精製に影響が出る可能性もあります。

血清の使用に関するガイドライン

FBS（Fetal bovine serum）は長きに渡り生物学系の研究に使用され、その実績は高く評価されています。しかしBSE（Bovine Spongiform Encephalopathy：牛海綿状脳症、狂牛病、BSE）が1986年にヨーロッパを中心に広く発生し、またこの病がヒトのクロイツフェルトヤコブ病の病原体に関連性が高いとされたために、全てのウシ原料製品に安全性を注意する傾向が見られるようになりました。

1993年にFDA（Food and Drug Administration：米食品医薬品局）は“BSEを発生した国、およびその国に長く滞在したウシを原料とする製品の使用を推奨しない”としました。またEU（European Union）のガイドラインでもウイルス関連に対しては供給先、試験対象品目に着目し、特に屠殺、もしくは製品の原料となる物質の採取時のクロスコンタミネーションの可能性等に注意を払っています。

BSEに関して言えば、EUのガイドラインはBSE感染リスクは薬品のみに限られており、EMA（European Medicines Evaluation Agency：（旧）欧州医薬品審査庁）・410/01 Rev.2に依るとウシ由来の製品に関して安全性を期するためにも主要条件確認の実施は推奨されています。主要な条件とは、ウシ由来の由来国、採取時のウシの年齢、屠殺時の条件、ウシの使用可能な部位（組織）、また精製の過程などです。医薬品製造時の過程でのFBS使用は、幾つかの使用条件（原料供給先、ウシの年齢、感染性物質についての工程内管理試験に関する明確な書類）に限り許可されています。

お問い合わせ先：
製品の技術的なご質問 sialjpts@sial.com
価格・在庫のご質問 sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

〒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4F
Tel: (03) 5796-7330 Fax: (03) 5796-7335 e-mail: sialjpts@sial.com

培養の種類と形態に関して

初代培養

初代培養とは通常生体の組織から切り取られた、もしくは酵素消化によって分離させた細胞を体外で培養して最初の植え替えをするまでのものを指します。初代培養は*in vitro*の状態では培養器面を一層の細胞で覆うと分裂を中止するため、長い時間同じ状態では保持できません。この比較的短い時間の中で初代細胞培養はその細胞の持つ沢山の生体内での分化特性を保持します。

厳密に言えば初代培養の定義としては一回でも継代(*passage*)させていないものを指し、一回でも継代したものは細胞系(セルライン)と呼ばれ、「初代」ではありません。一般的に、提供者からもらった「初代培養細胞」は少ない回数で継代されている細胞のことを指します。

継代培養

継代培養は単一の細胞から、限られた回数(約30回程度、細胞によって変動する)までしか増殖できない培養(有限細胞系)か、または培養している間に何らかの変異を起こして無限増殖できる細胞の培養(無限細胞系)の2種類があります。限られた寿命をもつ細胞系(有限細胞系)は通常二倍体であり、ある程度の分化状態を維持しています。このような細胞系が約30回程度分裂した後に老化するという事実から、そのような株の長期維持を目的としたマスターセルバンクとワーキングセルバンクの構築が不可欠であるといえます。

無限増殖の出来る細胞(無限細胞系)は、癌細胞への形質転換によって無限増殖を可能にしていることがほとんどです。癌細胞株の大部分は、実際の臨床癌に由来していますが、ウイルス癌遺伝子や化学処理によって形質転換を誘導することもできます。形質転換された細胞株は、事実上無限に生存可能であるという利点がありますが、その反面、本来の*in vivo*での特性がほとんど失われているという欠点もあります。

培養形態

増殖状態にある細胞は大体1~2種類の形態で培養されます。浮遊培養系(シングルセル、もしくは小さな細胞塊になって浮いている状態)、もしくは一層で培養容器に接着する接着培養系です。

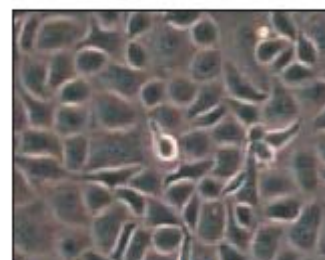
これらの細胞の形態は例えば生物の体内にあった時に血液内にあつたリンパ球や白血球などは浮遊系細胞が多く肺や腎臓などから採取した細胞は接着性細胞が多いなど、元々分化していた場所の特性を継ぐ傾向にあります。接着系細胞は更に分類され、上皮系細胞(*endothelial cell*, 例: BAE-1)、内皮細胞(*epithelial cell*, 例: Hela)、神経芽系細胞(*neuronal cell*, 例: SH-SY5Y) 繊維芽様細胞(*fibroblast*, 例: MRC-5)、など元の組織に由来している形態が多数あります。Table 1ではそれぞれの細胞形態によってよく使用される細胞株を紹介しています。

(Table 1 は次ページ)

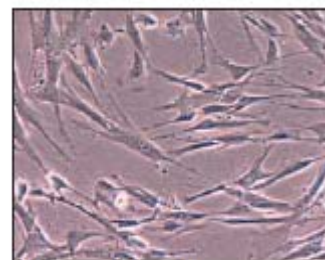
Figure 2. Examples of Cell Morphology



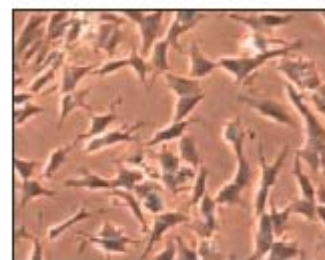
HeLa – epithelial



BAE-1 – endothelial



MRC-5 – fibroblast



SH-SY5Y – neuronal

お問い合わせ先:
製品の技術的なご質問 sialjpts@sial.com
価格・在庫のご質問 sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

〒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4F
Tel: (03) 5796-7330 Fax: (03) 5796-7335 e-mail: sialjpts@sial.com

Table 1. 各細胞形態において使用頻度の高いセルライン

接着性細胞株		
細胞株名	生物種及び組織	細胞形態
MRC-5	ヒト 肺	Fibroblast
HeLa	ヒト 子宮頸部	Epithelial
Vero	アフリカミドリザル 腎臓	Epithelial
NIH 3T3	マウス 胎仔	Fibroblast
L929	マウス 皮膚	Fibroblast
CHO	チャイニーズハムスター 卵巣	Fibroblast
BHK-21	シリアンハムスター 腎臓	Fibroblast
HEK 293	ヒト 腎臓	Epithelial
Hep G2	ヒト 肝臓	Epithelial
BAE-1	ウシ 大動脈	Endothelial
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫	Neuroblast
浮遊性細胞		
細胞株名	生物種及び組織	細胞形態
NS0	マウス 骨髄腫	Lymphoblastoid-like
U937	ヒト組織球性リンパ腫 Human Histiocytosis X	Lymphoblastoid
Namalwa	ヒト バーキットリンパ腫	Lymphoblastoid
HL60	ヒト 前骨髄球性白血病	Lymphoblastoid-like
WEHI 231	マウス リンパ腫・Bリンパ球様	Lymphoblastoid
YAC 1	マウス リンパ腫	Lymphoblastoid
U 266B1	ヒト 骨髄腫・Bリンパ球様	Lymphoblastoid

お問い合わせ先:
製品の技術的なご質問 sialjpts@sial.com
価格・在庫のご質問 sialjpcs@sial.com

じっけんレシピ

〒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4F
Tel: (03) 5796-7330 Fax: (03) 5796-7335 e-mail: sialjpts@sial.com

継体時期～増殖曲線とは～

実験を始める前に播種した細胞がどのような増殖を示す傾向にあるのかを知っておくのは大事なことです。その細胞の通常増殖以外の変化がわかれば、細胞に問題が起きたのが直ぐに分かりますし、もし分からなければその実験系に重大な影響があるかも知れません。典型的な増殖曲線はS字カーブを描き、また一般的な細胞は下の4つの期間からなる増殖曲線を描きます。

1. 遅滞期 Lag Phase

この時期では細胞は分裂しません。この時期、細胞は新しい環境に適応しようとしている状態で、この時期の長さは細胞密度や播種時の損傷回復の時間に依ります。

2. 対数増殖期 Logarithmic (Log) Growth Phase

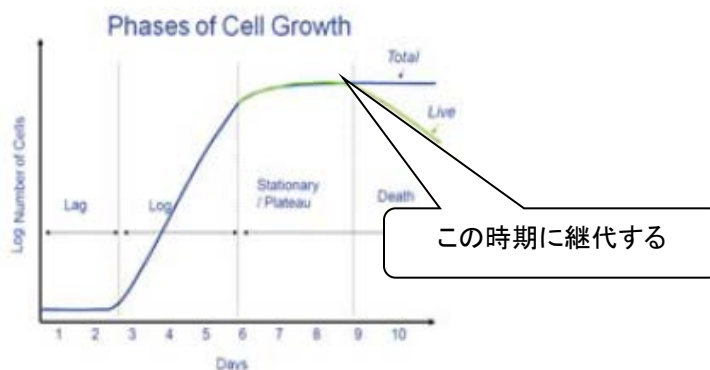
この時期の細胞は活発に活動し、細胞密度が指数対数的に上がります。細胞集団はこの時期に一番活発になるために細胞機能を評価するにはこの時期が一番適切です。各セルラインはそれぞれに異なった細胞増殖動態を示すためそれぞれの最適な細胞集団倍化時間をこの時期に算出します。この時期の後期に細胞を継代するのが一般的です。

3. 定常期 Plateau (Stationary) Phase

細胞密度が高くなり、細胞の増殖が止まる、または遅くなります。この時期の細胞数は活発な時期の増殖の0-10%程度になり、細胞が一番傷つき易い状態になります。

4. 死滅期 Decline (Death) Phase

細胞が死に始めた状態で生細胞が減少する時期です。この時期に死ぬ細胞は栄養成分の枯渇が原因だけではなく細胞周期の自然な流れにも拠ります。



In vitroにおける細胞の老化

細胞が培養の中でどれだけ生きられるかを示す指標としては二つあります。

1. 継代数 (passage number) : 細胞が継代 (細胞を別の培養容器に植え継ぐ) された数。
2. 細胞分裂回数 (the population doubling (pd) number : PDL) : 正常細胞では、ある一定の分裂回数を経て老化、死滅することから、継代数よりも確実な管理方法とされています。

細胞培養において、培養している細胞の年代を知るはその細胞の寿命を把握したり、継続的に培養することによって細胞の一部が変異して特性が変わったりするのを知るのにも有用です。

お問い合わせ先:
製品の技術的なご質問 sialjpts@sial.com
価格・在庫のご質問 sialjpcs@sial.com