

2. 細胞及び培養方法の選択

実験の目的に適した細胞を選択することはとても重要です。事前に実験によく使用されている細胞を調べ、その特性を考慮した上で選択してください。一番簡単な選択方法としては、実験目的に類する関連専門誌に多く引用されている細胞を調べ、選択することです。そうすることで、他の実験と比較できて共通性や相違点を元にして実験結果の類推が可能となります。（あくまでも大雑把な傾向がみられる程度と考えてください）また、細胞は、研究室で以前から保存・継代してきた細胞の利用、或いは細胞バンクから入手するなどの方法がありますが、共に注意すべきことはその細胞の品質が保証されていることです。株化された細胞であれば一般性状、継代方法、培養培地、継代数などの情報が揃っている細胞の使用をお勧めします。また、組織から採取した細胞を培養系に移して継代を試みる、いわゆる初代培養細胞を用いる実験系も増えていますが、典型的な細胞老化を示すものや、形質転換して不死化（株化）するものなど、その細胞の特性を十分に理解して使用する必要があります。

2.1 細胞の入手方法

実験に使用する細胞を持っていない場合は、細胞供給機関から入手する手続きが必要となります。主な入手機関は以下の通りです。

- ◎ JCRB細胞バンク
医薬基盤・健康・栄養研究所
- ◎ 医用細胞資源センター
東北大学加齢医学研究所
- ◎ RIKEN BRC - 細胞材料開発室
理化学研究所バイオリソースセンター
- ◎ ATCC (American Type Culture Collection)
取扱い：住商ファーマインターナショナル
- ◎ ECACC (European Collection of Cell Cultures)
取扱い：DSファーマバイオメディカル

上記機関に取扱いがない場合は、希望する細胞を樹立した研究者から直接分けてもらうようお願いする必要があります。供与してもらった細胞の品質検査及び、管理は自らの責任で実施する必要がありますので、しっかりと調査した上で供与をお願いするようにしてください。

2.2 基本的な培養方法

細胞培養を行うにあたり、どのような器具や装置を用いるか選択しなければいけません。ディッシュの平面上に培養するものもあれば、スピナーフラスコや培養バッグを用いた浮遊系の培養、更にはゲルやディスクベッド等の3次元構造支持体を用いた培養など、細胞の性状や実験目的によって様々な方法を選択することができます。実験計画を策定するにあたり、細胞の選択とともに培養方法の選択も合わせて進めるようにしてください。

以下に、基本的な培養方法を列挙します。

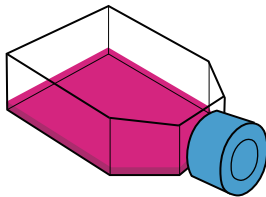
2.2.1 静置培養（単層培養）

細胞を培養容器に接着させ、単層の状態では培養する方法です。基本的には正常細胞を培養系に移すと単層状に伸展・増殖します。単層上に伸展するので Monolayer Culture（単層培養）と呼ばれ、培養容器の培養面積を覆い尽くすと、正常細胞ではそれ以上の増殖が抑制されますが（接触阻止現象：contact inhibition）、株細胞では過増殖状態となり、形態の変化や死滅の原因となります。

容器はペトリディッシュ（シャーレ）、培養フラスコ、マルチウェルプレートなどが用いられ、大量培養の必要がある場合は、容器の数を増やして対応します。また、幹細胞の培養ではフィーダー細胞を用いた培養方法も確立されており、目的の細胞の機能を促進させる補助的な役割を果たす他の細胞種をあらかじめ培養し、増殖しないように不活化してから目的の細胞を播種することで、幹細胞の増殖や分化、多様性の維持などの有効な手法となっています。昨今、化学固定フィーダー細胞の開発や、培地の改良によるフィーダーレス培養など、著しく技術は進化しています。



ペトリディッシュ



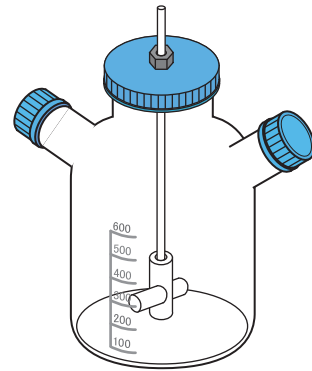
培養フラスコ

2.2.2 浮遊培養

細胞を培地に浮遊させた状態で増殖させる培養方法です。血球由来の細胞は、培養容器に接着せずに浮遊した状態で増殖しますので細胞が接着しないようにコーティングされた浮遊系細胞用の培養容器を用います。大量に培養する場合は、振とうフラスコやスピナーフラスコを用いて培養します。血球由来の細胞以外にも、癌化した細胞や意図的に浮遊状態での培養を可能にした細胞などがあります。

浮遊系細胞の培養は培養容器の接着可能面積に依存しないため、大きな培養容量（体積）が確保できます。そのため、大量培養に有利な細胞として利用され、省スペースでの生産レベルの大量培養に貢献しています。

しかし、接着系から浮遊系にアダプトされた細胞の注意としては、すでに浮遊培養が可能になって長期の実績を持つ細胞以外の（直近で選別された）細胞では、オリジナルの細胞株の性状や特徴を喪失していたり、異なる機能を獲得していたりする可能性（危険性）があることも理解した上で培養を実施する必要があります。



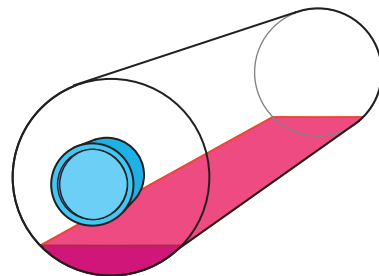
スピナーフラスコ

2.2.3 回転培養（ローラー培養）

ローラーボトルと呼ばれる回転培養専用の培養容器を緩やかに回転させながら、そのボトルの内壁に細胞を接着させて培養する方法です。培養方法の基本としては、単層培養と同じであり培養条件の検討が比較的容易に行えます。

相対的に少量の培地で、効率的なガス交換が可能であり、ボトル本数を増やすことで大量培養に対応することができます。

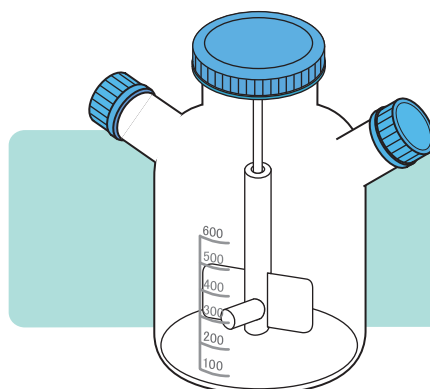
一番シンプルな大量培養方法とすることができるでしょう。



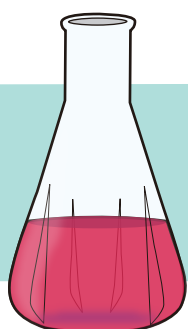
ローラーボトル

2.2.4 旋回培養（振とう培養）

浮遊系細胞の培養方法として利用され、主に菌体や植物細胞の培養等に利用されてきました。また、リンパ球由来細胞の培養や、スフェロイド形成（細胞集塊）に用いられることも多く、後者については、適切な回転速度で水平に旋回させると浮遊物が中央に集まる性質を利用しています。近年、元々接着系の細胞を浮遊系にアダプトして、高いタンパク質の発現能力を有する細胞が開発されており、動物細胞の培養にも広く利用される培養方法となっています。浮遊系細胞は回収作業が容易なため、生産用の大型容器で培養する細胞を必要な量にまで増やすための作業に、スピナーフラスコと共によく用いられています。（バイオ医薬品生産に用いる種細胞の培養など）



マイクロキャリアスピナーフラスコ



振とうフラスコ

2.2.5 担体を使用した培養

マイクロキャリア、ディスクベッドなど小さなキャリア（ビーズなどの担体）の表面に細胞を生着させて、そのキャリアを攪拌することで、あたかも浮遊培養のような手法で行う接着性細胞の培養方法です。大きな培養面積と培養容量が確保できるので、大量培養が可能となっています。また、近年は、キャリアやディスクベッドを専用容器にセットし、そこに培地を循環させて高密度培養が可能なバイオリクターとして利用することが可能となっています。特にディスクベッドタイプの担体は、適切に浮遊させるための比重調整などを考慮しなくても良く、繊維質マトリックスなど、種々の多孔質担体が開発されています。

2.2.6 三次元培養（多孔性ゲル、微重力 etc）

単層培養などの2次元（平面）での培養とは異なり、高さ方向（厚み）でも細胞を増殖させる立体的な培養方法です。細胞の接着及び増殖を支え、立体的3次元構造を維持するための担体をスキャフォールド（足場）と呼び、その足場が作り出す培養環境はより生体内の状態に近く得られた結果も生体内の反応との相関性が高いと考えられています。再生医学研究を進める上で生体内に近い環境での培養は非常に重要であり、様々な材質、構造の足場の開発が進められています。例えば多孔性軟質ゲルや、生体親和性の高い微小孔材料を用いて細胞塊を作る試みがなされており、より生体内の性状に近い細胞が得られています。

また、微小重力などの、培養の「場」の環境を制御することで均一性の高い品質の細胞塊を作る試みもなされており、培養に必須と言われていたタンパク質を用いずにES細胞の分化を抑制したとの報告もあります。

その他にもスフェロイド形成に有利な微細構造を有する無機物を用いた足場の開発も進められており、三次元培養法は再生医学研究を進める上で、もっとも注目されている培養方法の一つとなっています。