

## 哺乳類細胞の継代培養のための準備

注記：Clonetics™とPoietics™のヒト初代細胞と動物細胞には適しません。

細胞培養では、しばしば細胞を継代培養する必要が生じます。継代することによって、細胞数を増やす、または用途に応じた培養容器に細胞を移すことができます。細胞を1つの培養容器から取り除き、別の容器に移すには数多くの方法があります。細胞は以下の方法によって、付着している表面から剥離させることができます。

- 機械的な手段（スクレーピング）
- キレート剤、エチレンジアミン四酢酸 [EDTA]
- 酵素（トリプシン、プロナーゼ、コラゲナーゼ）

酵素およびキレート剤はしばしば併用されます。トリプシンはブタ膵臓の含水粗細胞抽出物です。トリプシンは、細胞を表面や無傷組織から取り除くために使用される最も一般的な方法です。トリプシン組成にはトリプシンに加えて他のプロテアーゼ、リパーゼ、カルボヒドラーゼが含まれるため、トリプシンという名称は少し誤っています。膵臓が産生する数多くの消化酵素が、トリプシン組成にも含まれると考えられます。純粋な結晶トリプシンを使用することも可能ですが、これは粗トリプシンよりも高価で、特に細胞を無傷組織から調製した場合は、粗トリプシンほど働かない場合が多くあります。

トリプシン活性の最適条件は pH 7.6~7.8、温度37°Cです。トリプシンの効果は、細胞同士または基質表面に結合する細胞内基質を分解することです。

トリプシン活性に対する化学的基準はありません。ロンザはトリプシンの品質保証試験を実施しており、標準時間内に、損傷を引き起こすことなく、どれだけ基質表面から細胞を剥離するかを測定しています。これは滅菌用通常試験に並行して実施されます。通常トリプシンは、0.05%~0.25%濃度で使用されます。ただし用途によっては、この範囲以外の濃度が必要になることもあります。Versene® (EDTA) は、トリプシン活性を高めるため効率的な細胞剥離に必要なトリプシン濃度を下げることができます。

濃縮トリプシン (2.5%、カタログNo.17-160) は、カルシウムやマグネシウムを含まない平衡塩溶液 (BSS) (ハンク BSS、カタログNo.10-543、またはダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、カタログNo.17-512) で希釈してください。溶液が低張となって細胞に損傷を与えるため、水による希釈は推奨されません。生理食塩水単独による希釈も細胞に損傷を与えます。

### トリプシン処理の手順

細胞培養は、コンフルエントまたはそれに近い状態になると、通常継代培養されます。原則として、最初にコンフルエントになってから継代培養されるまでの時間が長くなればなるほど、トリプシンが作用するまでの時間が長くなります。

1. 培養容器から培地を別の容器へ移します。血清はトリプシン活性を阻害するため、血清を含む培地は完全に除去する必要があります。
2. トリプシン/Versene® (カタログNo.17-161) を添加する前に、細胞の層をカルシウムやマグネシウムを含まないBSSですすぎます。単層をBSSで完全に覆ってください。このすすぎはすぐに終わりますが、最長4時間まで細胞層上にBSSを残しておいてもかまいません。
3. すすぎに使用した培地を洗い流します。トリプシン/Versene®は、各容器に以下のように添加します。

75 cm <sup>2</sup> フラスコ	2.5 ml~5.0 ml
150 cm <sup>2</sup> フラスコ	5.0 ml~10.0 ml
850 cm <sup>2</sup> ローラー瓶	10.0 ml~20.0 ml

4. 単層はトリプシン/Versene®で完全に覆ってください。トリプシン/Versene®のロットが異なると、強度が異なる場合があるため、最初の30秒間、室温でトリプシン処理をモニターすることが推奨されます。これによって、トリプシン処理が過剰な速度で進んでいないか確認することができます。
5. その後、細胞容器を手のひらで軽く叩いて細胞が剥離するか確認します。容器を垂直に明かりの下にかかげて、容器面から剥がれ落ちている細胞層を探します。単層全体が剥離したら、手順#6に進みます。そうでない場合は37°Cでインキュベートし、1分毎に容器を観察して剥離状態を確認します。培養容器を再度手のひらで叩いて、すべての細胞が剥離したことを確認します。培養容器をインキュベーターから取り出します。

## 哺乳類細胞の継代培養のための準備

続き

6. 10%血清を添加した培地を入れた容器に剥離したすべての細胞を直ぐに移します。培地と細胞をピペットで吸引して容器に移し、残りの細胞をすべて取り除きます。ばらばらに分離した細胞を得るために、小さなピアピペットを使用して可能な限り完全にこの吸引を行うことが重要です。細胞が分離していない場合、新しい培養液に数多くの微小コロニーができる場合があります。容器に移した細胞は、スターラーバーを使って渦が発生しない速度（約100~200 rpm）で攪拌するか、手で攪拌します。この時点で、使用されるトリプシン/Versene®量の少なくとも10倍の血清を含む培地を追加することが大切です。これによって、消化酵素が阻害されます。
7. ピペットで吸引した懸濁液に新鮮な培地を十分追加して、その総量が2つの培養容器底面を覆うようにします。各容器の底面積は、最初の培養容器と同じになるようにします（または最初の容器の2倍の底面積を持つ単一の培養容器を使用します）。分割比は1:2になります。増殖の盛んな細胞集団に対しては、別の分割比を適用してもよいでしょう。
8. 1つ（または複数）の培養容器を37°Cでインキュベートします。
9. 1:2分割を行う際、ヒト2倍体細胞の継代培養は3~4日のスケジュールを厳守してください。この間にコンフルエントな細胞層ができます。余分な細胞は凍結し、液体窒素で保存できます。
10. 無制限に培養の可能な母集団は、コンフルエントな状態になる度に連続的に継代培養できます。培養細胞が、有限倍化能力をもつ2倍体集団である場合、各1:2継代培養（分割）において、集団倍化レベル（PDL）数を1つずつ増やします。
11. 繰り返し1:2分割（週に2回）を行うことにより、培養容器の数が幾何学的（1、2、4、8、16、32、64など）に増大します。これは短期間で達成でき、さまざまな用途で大量の培養を行うことができます。
12. 連続的に継代しつづけると最終的にその株は失われますが、可用性が失われるわけではありません。なぜなら凍結アンプルはほぼすべての代で取得でき、のべで最大約50分裂回数まで連続継代を再開するために細胞株を復元できるからです。この手順を繰り返すことによって、取得可能な細胞数はあらゆる実際的目的のためにほぼ無限大となります。
13. ヒト胚2倍体細胞株は、*in vitro* でおよそ50回の1:2継代培養または細胞分裂寿命持ちます。寿命がくると、細胞は分割を停止し、最終的には死に至ります。
14. 1:2よりも高い分割比を使用すると、特定の細胞密度または培養容器数を得るのに必要な操作を最小化できるという利点があります。ヒト胚2倍体細胞株は、*in vitro* で細胞分裂を有限回数行うため、終了した分裂回数を記録する必要があります。1:2の分割比では、単純に“1”を各分割に足します。なぜならこの比率によって、1集団が倍加されるからです。より大きな分割比も使用できます。例えば、1:4の分割比は1:4分割毎に2倍化を行います。1:8分割比は1:8分割毎に3倍化を行います。分裂停止の条件を知るために、終了した細胞分裂回数を記録すること重要です。
15. ヒト2倍体細胞は分裂によって増殖するため、母集団数の増加は、以下のように細胞毎に発現する可能性があります。

1	2	4	8	16	… 細胞数
0	1	2	3	4	… 母集団倍化レベル

## 参考文献

1. Hayflick, L. and Moorhead, P.S. [1961] The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Research* 25:585.
2. Hayflick, L. [1970] Aging under glass. *Exp. Geront.* 5:291.
3. Hayflick, L. [1965] The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37:614.
4. Hayflick, L. [1968] Human cells and aging. *Scientific American* 218:32.
5. Hayflick, L. [1973] Subculturing human diploid fibroblast cultures. *Methods and Applications of Tissue Culture* Eds. Patterson, M.K. and Kruse, P.F., Academic Press, N.Y.
6. Freshney, R.I. [1983] *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Alan R. Liss, Inc., New York.