

細胞培養の基礎技術の習得と講習会の質向上を目指して

○田中稔、依藤絵里

医学系技術支援室 生物・生体技術系

概要

生物学分野研究において、細胞培養は必須の基礎技術である。今回、技術研鑽プログラムで細胞培養技術の習得、再確認の機会を得た。このプログラムでは、最初に外部の講習（アドバンテック研修センターの「細胞培養技術者養成コース<5日間>」）を受講して、細胞培養の一連の操作を再確認するとともに、コンタミネーションの対処法や安全対策等の情報収集を行った。受講後、講習で得た知識を設備管理及び実験手順に反映させた。また、医学部分析機器部門で培養操作の復習を行い、培養操作技術の向上に努めた。さらに、生細胞を講習会用の材料として使用できるように、凍結細胞ストックを作成した。そして、ストック細胞と医学部分析機器部門の共用機器を使用して、シングルセルクローニングの作業効率改善を検討した。その作業効率改善の検討結果を基に講習会を企画・実施した。

1 講習会の受講

アドバンテック研修センター (<https://advant-kensyu.com/>) が開講している「細胞培養技術者養成コース<5日間>」を受講して、細胞培養の一連の操作を再確認した。講習内容を表1に示す。

表1. 細胞培養技術者養成コース<5日間> の講習内容

1 日 目	講習	バイオ安全教育、使用機器説明、無菌操作の注意事項、凍結細胞の起こし方、細胞の生死判別とカウントの仕方
	実習	培養関連機器の使用法、無菌操作練習、電動ピペッター・アスピレーターの使用法、培養細胞の解凍播種（浮遊・接着細胞）、計数盤による細胞のカウント
2 日 目	講習	細胞の種類、培地の成分と種類、滅菌方法、培養細胞の継代法、継代及び凍結保存の仕方
	実習	顕微鏡による細胞観察、培地交換、培養細胞の凍結保存（保存液を変えて、影響の有無を接着細胞により評価）、計数盤による細胞のカウント
3 日 目	講習	コンタミネーション（コンタミネーション時の対処/クロスコンタミネーション防止/マイコプラズマ検出法）、凍結ストック作製法、iPS細胞の培養、再生医療概論
	実習	培養細胞の継代（浮遊・接着細胞）、培養細胞の凍結保存、計数盤による細胞のカウント、オートクレーブによる滅菌
4 日 目	実習	培養細胞の解凍播種（浮遊・接着細胞-抗生物質あり、なし）、2日目の凍結保存細胞をカウント後、解凍播種（保存液による細胞の状態観察とバイアビリティにより評価）
5 日 目	実習	培養細胞の継代（浮遊・接着細胞-抗生物質あり、なし）、4日目に解凍した細胞を顕微鏡観察後、カウント（保存液による細胞の状態観察とバイアビリティにより評価）

講習会受講後、講師の助言を基にクリーンベンチ内での火炎滅菌を取り止めた。近年ではプラスチックの滅菌済ディスク製品を使用することが多く、当施設でも主に同製品を使用している。プラスチック製品に対する火炎滅菌は、注意深く行っても容器の変形を招く恐れがあり、適切な無菌操作ができてさえいれば

滅菌済製品に対する更なる滅菌は不要であるため、火炎滅菌を取り止めた。また、臨床材料や病原体等有害物質の含まれた細胞を扱う際は、クリーンベンチではなくバイオハザード対策用キャビネット（BSC。安全キャビネット）を使用するが、BSCではバーナーが気流を乱して有害物質の封じ込めが不良になる可能性があり、火炎滅菌は使用できない。BSCでの細胞培養も考慮に入れ、普段のクリーンベンチでの無菌操作でも火炎滅菌を行わないこととした。

その他、安全対策として廃液および廃容器の処理方法のルール化を行い、CO₂ インキュベータおよびクリーンベンチの管理においては清掃後に清浄度評価を行うようにした。

2 培養操作の復習およびストック細胞の作成

受講後、培養操作の復習として細胞の購入からストック細胞（凍結保存細胞）の作製までの一連の操作を行った（図1）。

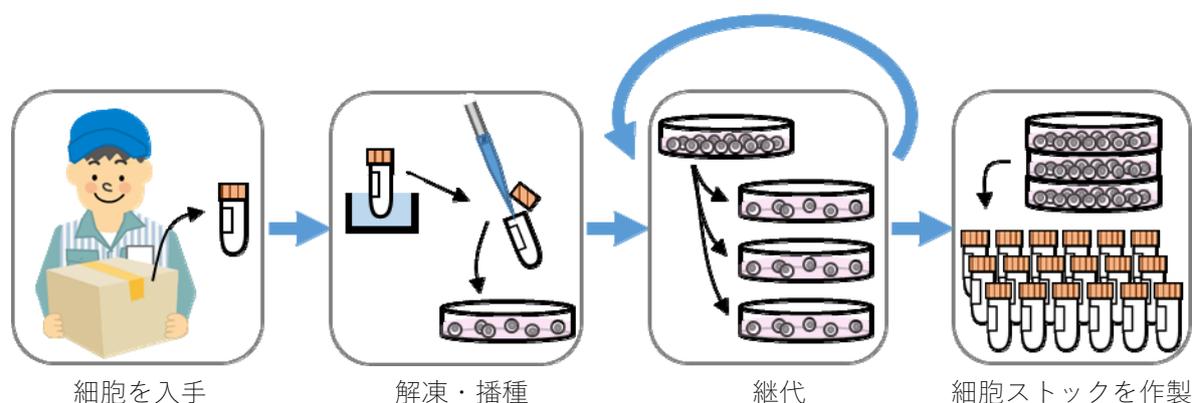


図1 細胞培養の流れ

接着細胞として HeLa 細胞株を、浮遊細胞として HL60 細胞株を理化学研究所バイオリソースセンター（BRC）から購入した。購入した HeLa 凍結細胞は、解凍して培地に播種し、CO₂ インキュベータで培養した。その後継代を 3 回繰り返して細胞数を増やし、1 次ストックを 11 個作製した。1 次ストックから同様の手順で 2 次ストックを 10 個、そこからさらに本プログラムの実習用細胞としてワーキングストックを 20 個作成した。HL60 細胞は同様の操作で 1 次ストックを 2 個作製した。さらに、医学系研究科分子細胞免疫学講座から譲り受けた Jurkat 細胞株（浮遊細胞）も 1 次ストックを 8 個、2 次ストックを 13 個作製した。

HeLa 細胞のワーキングストックを使用し、抗生物質を含まない培地での培養を行い、抗生物質が無くても雑菌の繁殖を伴わずに培養できることを確認した。（図3）これらにより細胞培養の一連の無菌操作が適切に行えていることが確認できた。

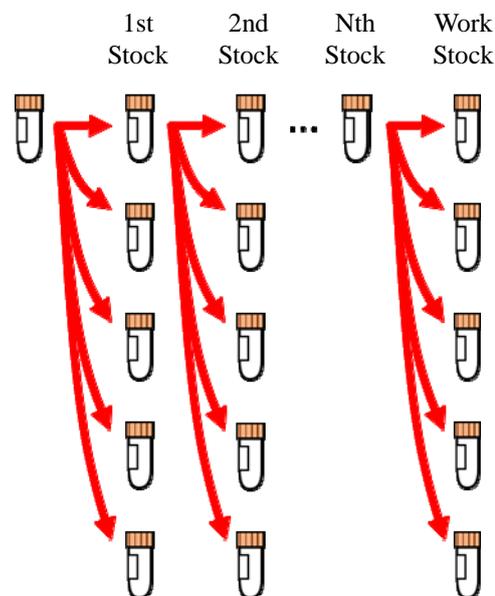


図2 凍結細胞ストック作製の概念図

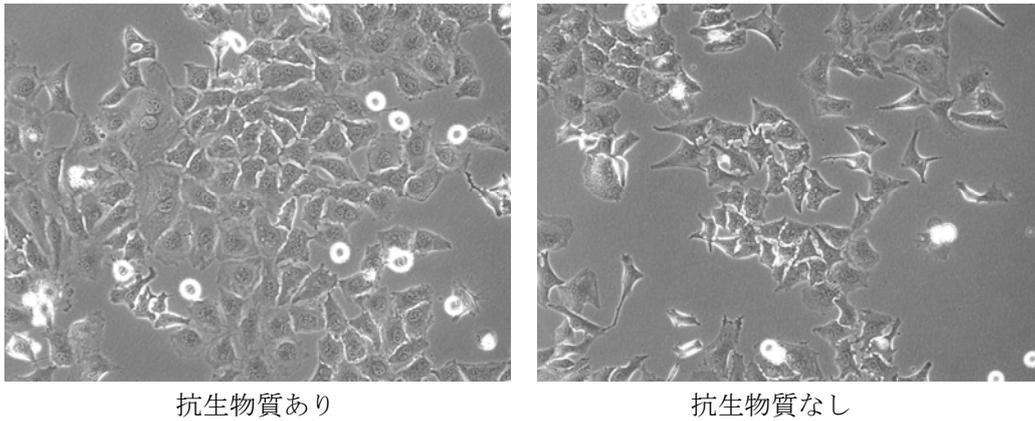


図 3 ワーキングストックから培養した HeLa 細胞

3 シングルセルクローニング

たった 1 個の細胞から増殖した細胞群はその全ての細胞が同一の形質を有すると考えられており、このような均質な細胞群を得るための「シングルセルクローニング」は重要な技術である。

シングルセルクローニングは、マイクロプレートの各ウエルに細胞を 1 個ずつ播種して培養し、顕微鏡でコロニー（単一細胞由来の細胞塊）を探しながら、コロニーが 1 つしかないウエルを選択して継代していく。伝統的に細胞播種は限界希釈法で、ウエル選択は肉眼による顕微鏡観察で行われるが、手技が多少煩雑で作業効率が悪い。我々は作業効率の改善と我々が管理する共用機器の利用拡大を目的として、細胞播種をセルソーター（FACS Aria）で、ウエル選択を生細胞解析装置（IncuCyte ZOOM）で行い、従来法との比較検討を行った。この実験では前章で作成した HeLa 細胞のワーキングストックを使用した。

3.1 細胞播種での比較

限界希釈法による細胞播種は、HeLa 細胞を 1cell/100uL になるように培養液で希釈した細胞懸濁液を用意し、倍々希釈を行って 4 系列（1cell, 0.5cell, 0.25cell, 0.125cell/100uL）の細胞懸濁液を準備した。4 系列それぞれを 96 ウエルプレートの 32 ウエルに 100uL ずつ播種した。セルソーターによる細胞播種は、あらかじめ 96 ウエルプレートの各ウエルに 100uL の培養液を分注しておき、次に 0.5mL の HeLa 細胞懸濁液（in PBS, 0.8×10^6 cells/mL）を調製して、そこに 5uL の 7-AAD(50ug/mL)を添加し 30 分間染色を行った。そしてセルソーターの ACDU オプションを使用して、96 ウエルプレートの各ウエルに 1cell ずつ播種（セルソート）した。ただし、観察時のフォーカス合わせを容易にするために A1 ウエルのみ 100cells を播種した。

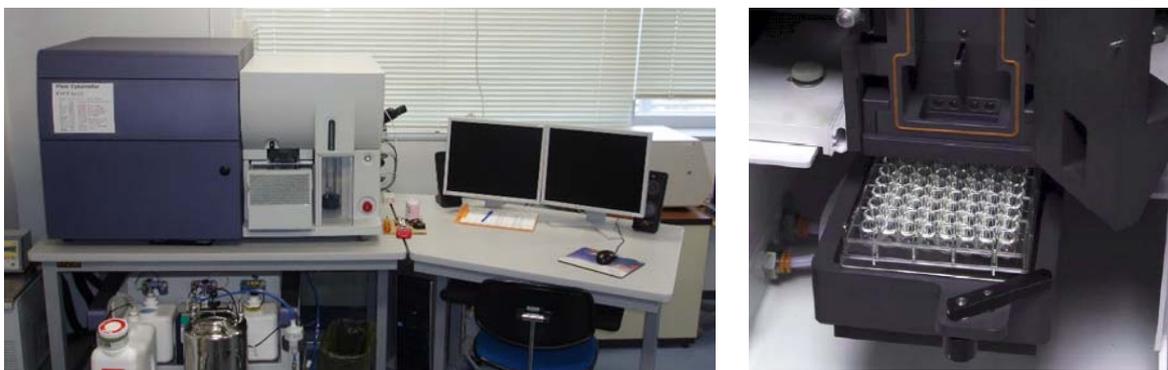


図 4 セルソーター FACS Aria と ACDU オプション

播種後の細胞生着の確認は、6 日後に生細胞解析装置で行った。ウェル全体の画像撮影後、その画像から各ウェルのコロニー数を確認し、コロニーがなかったウェル数、1 コロニーのみが確認されたウェル数、2つ以上のコロニーが確認されたウェル数をそれぞれ数えて播種方法による違いを比較した (図 5)。シングルコロニー (1 コロニー) 率が最も高かったのはセルソーターによる細胞播種であった。

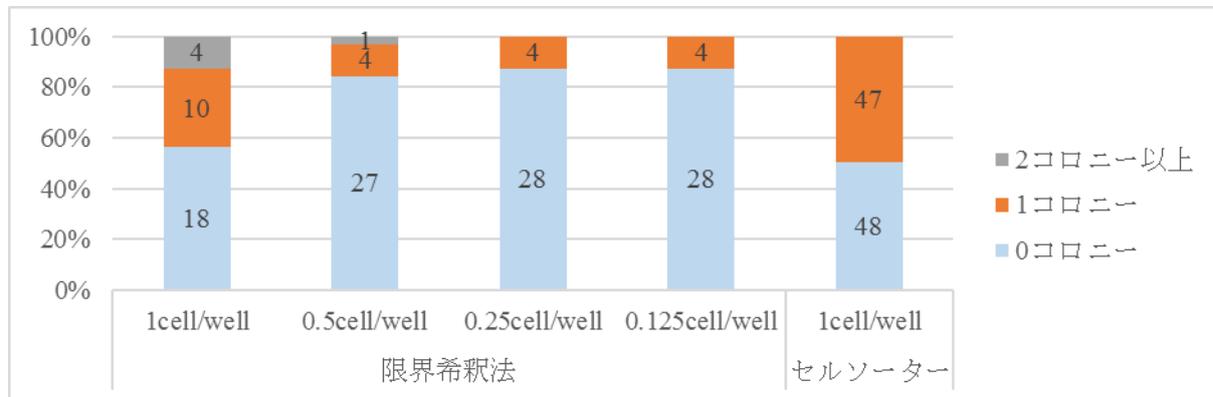


図 5 出現コロニー数別のウェル数

縦軸は%。グラフ中の数字はウェル数で、限界希釈法の総ウェル数は 32、セルソーターは 95。

シングルセルクローニングではシングルコロニーのウェルのみが継代の対象となるため、シングルコロニー率が高いほど作業効率において優位であると言える。限界希釈法による播種でも 1cell/well 濃度では比較的シングルセルコロニー率が高かったが、複数コロニーの出現が数ウェルであったため、この濃度での播種は不採用とした。それは、単一細胞由来を担保することがシングルセルクローニングにおいては重要であるため、複数コロニーのウェルがほとんど出現しない希釈濃度での播種が推奨されるためである。よって、シングルコロニー率が最も高く、かつ、複数コロニーの出現率が非常に低いセルソーターによる細胞播種は、作業効率において優位であるといえる。

3.2 シングルコロニー探索での比較

肉眼での顕微鏡観察によるシングルコロニーの探索は、10 倍の対物レンズで位相差像観察を行い、各ウェルでのコロニーの有無を確認した。コロニーが見つかった場合は、プレート蓋の該当位置に丸印を記入していった (図 6 左)。生細胞解析装置によるシングルコロニーの探索は、4 倍の対物レンズでウェル全体の位相差像の撮影を行った。撮影後、PC 上で画像を目視してコロニーの有無を確認した (図 6 右)。

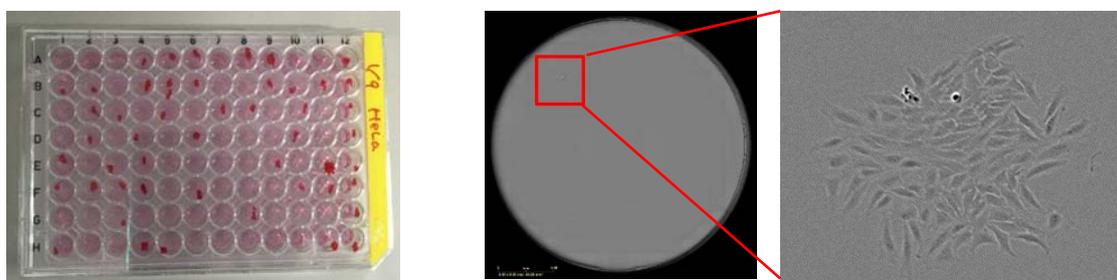


図 6 コロニー確認後の 96 ウェルプレート (左) と生細胞解析装置で撮影した位相差像 (右)

細胞播種後 6 日後と 10 日後でコロニー有無の確認を行い、方法による違いを比較した。6 日後の観察においては、コロニーが肉眼では確認ができなかったが生細胞解析装置では確認できたウェル (肉眼[-],装置[+])

が多くみられた（表 2）。10 日後の観察では、肉眼[-],装置[+]は大幅に減り、肉眼[+],装置[+]が増えた。また、肉眼[+],装置[-]は、6 日後の観察では見られなかったが 10 日後では数例おきた。該当ウエルの 10 日後の撮影画像ではフォーカスが細胞に合っていないかった。

表 2 検索方法に違いによるコロニー確認精度の比較

播種後の日数	コロニーが確認できたウエル数		
	肉眼[+] 装置[-]	肉眼[+] 装置[+]	肉眼[-] 装置[+]
6 日後	0 (0.0%)	18 (38.3%)	29 (61.7%)
10 日後	3 (6.1%)	41 (83.7%)	5 (10.2%)

培養初期では細胞数が少ないなどの理由でコロニーが非常に見つけにくい。しかし、単一細胞由来を担保するためには培養初期の細胞数が比較的少ない状態でシングルコロニーを確認することが重要である。生細胞解析装置は画像のコントラスト高く、培養初期でも肉眼に比べ比較的コロニーが見つけやすかった。また、画像ファイルとして保存しているの、培養初期で見落としした場合でも過去の画像を見直すことができた。

さらに装置付属のトラッキング機能を使えば、時間を遡ってコロニー成長を容易に検証することができる。今回の実験でも播種 11 日目時点でシングルコロニーに見えるウエルにおいて、時間を遡ってコロニー成長をトラッキングしていくと 2 細胞由来のコロニーであると判明した事例があった（図 7）。

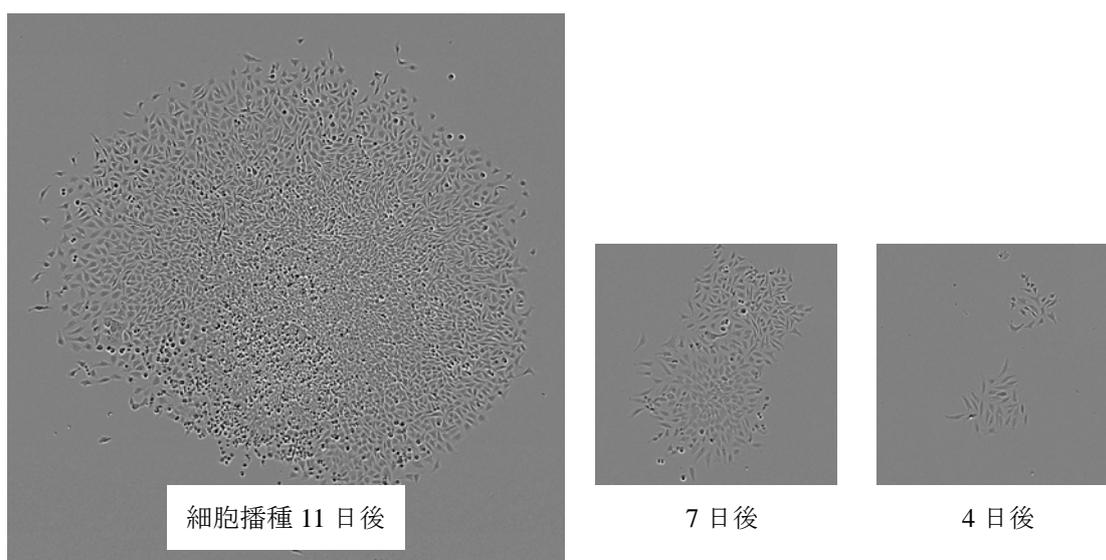


図 7 トラッキングでコロニーの単一細胞由来を否定した例

生細胞解析装置はオートフォーカスで画像を撮影するため、ごみや泡などが原因でフォーカス面が細胞に合わず、コロニーを見落とすリスクが存在する。今回も 6 日後にコロニーが確認できたウエルで 10 日後には確認できなかった例があった。このリスクを回避するためにも、コロニー成長をトラッキングすることが推奨される。

前述のようなリスクはあるが、コロニーの探しやすさに加えコロニーが単一細胞由来か否かを容易に検証できる生細胞解析装置は、シングルコロニー検索での作業効率改善に有用であった。

4 講習会の実施

前章で検討したシングルセルクローニングの作業効率の改善結果を基に、医学部分析機器部門において講習会を開催した(図8)。①HeLa細胞でのシングルセルクローニング例の紹介、②セルソーターを使用して96ウェルプレートへの1細胞播種のデモ、③生細胞解析装置を使用してコロニー撮影(観察)のデモを行った。この講習会には5名が参加し、うち2名から技術支援の依頼があった。その他、Jurkat細胞のストックを使用して、「フローサイトメトリー細胞周期解析講習会」を行った。

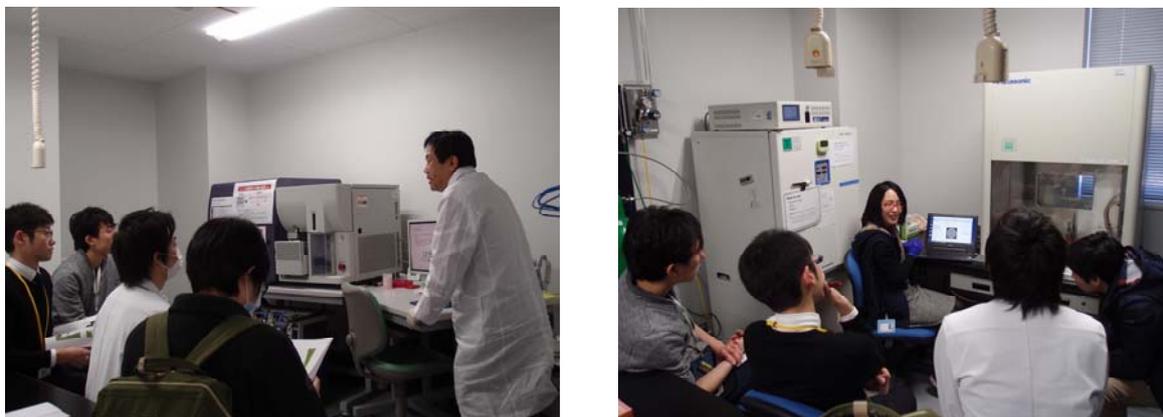


図8 シングルセルクローニング講習会の風景

5 まとめ

今回、細胞培養技術の習得・再確認を行い、培養操作技術の向上および関連設備の管理方法の適正化を行うことができた。また、凍結細胞ストックを作製できたことで、生細胞を用いた講習会など、より実践的な内容の講習を定期的で開催できるようになった。加えて、機器や測定手法などの評価も生細胞を用いて行えるようになったことから、技術向上のための基盤を構築することができたと考えている。

6 謝辞

本研修は全学技術センター平成29年度技術研鑽プログラムの支援により実施されました。アドバンテック研修センターの講師の皆様には丁寧な指導・助言をいただきました。医学系研究科分子細胞免疫学講座の伊藤講師、杉山研究員から細胞の分譲および助言をいただきました。また、医学系研究科病態解析学講座の松島講師には細胞培養実習の見学をさせていただきました。ご協力頂いた皆様に、厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 細胞培養技術者研修テキスト, アドバンテック研修センター
- [2] 中村幸夫監修, あなたの細胞培養、大丈夫ですか?!, 羊土社