

第3節 動物の体細胞

3.1 目的

本節では体細胞の一例としてラットの後肢より単離した筋衛星細胞の培養を行うことにより、細胞培養の基礎を修得する。

3.2 筋衛星細胞とは

骨格筋は、筋線維（筋細胞）と呼ばれる直径が10~100 μm 、長さ数cmにも及ぶ巨大なシリンダー状の多核の細胞、未分化な単核の筋衛星細胞（筋芽細胞）、線維芽細胞や血管を形成する細胞を含む。筋線維は、骨、軟骨細胞、脂肪細胞に成り得る多能性中胚葉細胞から筋細胞に成ることが決定された筋芽細胞への変化、さらにそれに引き続く分化によって形成される。筋衛星細胞は、1961年にカエル骨格筋で発見された筋線維の細胞膜と基底膜の間に存在する細胞で、筋再生において中心的な役割を担う。筋が何らかの原因により損傷を受け欠損すると、筋衛星細胞は活性化され盛んに増殖を行う。またいくつかの筋衛星細胞は筋再生に参加するために遊走する。増殖を停止して最終分化に移行した筋衛星細胞は筋特異的遺伝子を発現するとともに互いに融合して多核の筋管細胞を形成し、さらに筋管細胞は集合して筋線維へと変化し損傷部を補修する。

大抵の脊椎動物は、生まれた時点で筋線維の数はほぼ決っており、出生後はむしろ減少すると言われている。これは多核の筋線維は分裂増殖する能力を持たないことに起因する。しかし我々は筋力トレーニングを行うことによって筋肉が太くなることを知っている。ではいったいどうやって筋肉は太くなるのだろうか？出生後、筋線維の数は増加しないが、筋線維内のDNA量は成長に伴い増加することが知られている。しかしこのためには筋線維以外の細胞からのDNAが供給されると考えなければいけない。そこで注目されたのが筋衛星細胞の存在である。筋収縮などの運動による刺激によって活性化された筋衛星細胞は分裂増殖によってその数を増加させ、やがて筋線維と融合しDNAの供給とともに筋肉量の増加をもたらすといわれている。このように筋衛星細胞の活性化から融合に至る細胞挙動が筋肉の再生、維持、さらには筋肉の成長、肥大に関わっていることは明らかである。

今回我々の行う骨格筋細胞の培養は、既に成長分化した筋細胞を分離し培養することを意味していない。先にも述べたように細胞の分裂周期を脱して分化を遂げた骨格筋細胞は、基本的には以後分裂しないと考えられているからである。従って骨格筋培養は、ほとんどの場合、幼若な胎児や胚の筋線維中に大量に存在する未分化な分裂能力のある単核の筋芽細胞か、成長した筋組織を用いる場合でも筋線維の間に少量存在する筋衛星細胞を分離して培養することになる。培養条件下でこの筋衛星細胞は生体内での筋発生とほぼ同様な経路を経て、多核の筋線維へと分化する。

3.3 筋肉組織からの筋衛星細胞の単離

【実験上の注意】細胞培養には、栄養分の高い培養液を用いるために作業中にカビ、バクテリアや酵母のような微生物が混入すると数日後には培養液中に微生物が大量に発生してしまう(微生物は動物細胞と比較し著しく増殖速度が速い)。微生物は実験者の手指や唾液を介して混入する機会が多いため、作業中は微生物を混入しないように慎重を期すこと。またこまめに手指を消毒し、実験前には爪を短く切っておくこと。さらに細胞を扱う場合にはむやみにしゃべらず、唾液の飛散を防ぐこと。

【試薬】リン酸緩衝生理的食塩水 (PBS(-)), Hanks 緩衝液, ジエチルエーテル, 70%エチルアルコール, コラゲナーゼ*, ディスパーゼ*

*コラゲナーゼ, ディスパーゼ

細胞培養では生体から摘出した組織の細胞を1つ1つ解離する必要がある。機械的な振とうによる解離では細胞の収率は低く、解離後再び集塊を作る傾向にあるため、酵素処理により解離細胞を得る方法を用いる。用いられる酵素としてはコラゲナーゼ, ディスパーゼ, トリプシンが通常である。

【器具】培地ビン, 高圧滅菌器 (オートクレーブ), ラット固定台, ピンセット, ハサミ, 10 ml ディスポーザブル注射筒, 注射針 (22 ゲージ), ウォーターバス, プラスチック遠心管

【滅菌】用いる試薬, 器具類はすべて滅菌しなければならない。培地, 血清, 器具等滅菌するものの性質を損なわないように滅菌法を選択しなければならない。

ハサミ等の金属製品, ガラスピペット等は160°C, 90分で乾熱滅菌を行う。

水, オートクレーブ可能な溶液, プラスチック遠心管等は培地ビンに入れフタをアルミホイルで覆う, アルミホイルでくるむ, ビーカーに入れてアルミホイルでフタをする等適当な方法でオートクレーブに入れ, 120°C, 20分で高圧滅菌する。但しスクリューキャップ式のビンを滅菌する際はキャップを緩めてから滅菌する。滅菌終了後は熱いうちに密閉すると爆発する恐れがあるので十分冷えてから口を閉める。

熱に不安定な成分を含むグルタミン, 抗生物質等は孔の径が0.5µm以下のメンブレンフィルターでろ過滅菌することにより細菌やカビ等を除去することができる。ろ過器には吸引式と加圧式とがある。

その他にディスポーザブル注射筒, フラスコ培養器等多くのプラスチック製品に関してはγ線照射等により既に滅菌済みのものが市販されているのでそのまま用いる。

【PBS(-)の調製】PBSからCa²⁺, Mg²⁺を除いたもので、細胞の洗いやトリプシンの溶媒として用いられる。

- 1) NaCl 4.0g, KCl 0.1g, Na₂HPO₄ 0.575g, KH₂PO₄ 0.1g を滅菌水 500ml に溶かし, 培地ビンに移す。
- 2) キャップを緩めて上からアルミホイルで覆い120°C, 20分で高圧滅菌する。

【Hanks 緩衝液の調製】

- 1) NaCl 4g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄·7H₂O 1.45g, KH₂PO₄ 0.1g, グルコース 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, CaCl₂ 0.07g, NaHCO₃ 0.175g を滅菌水 500ml に溶かし, 培地ビンに移す。
- 2) キャップを緩めて上からアルミホイルで覆い120°C, 20分で高圧滅菌する。

【筋肉組織の採取】

- 1) ラットをイソフルランにより麻酔する。
- 2) ラット固定台に仰向けに固定する。
- 3) 腹部を70%エチルアルコールにより湿らす。なお場合によっては剃毛をした方がよい（この操作は滅菌の意味もあるが、体毛を湿らすことにより組織採取時における体毛の汚染を防ぐことを目的としている）。
- 4) 腹部大動脈に注射器を刺し、放血により屠殺する（採取組織への血液混入を防ぐ）。
- 5) 屠殺後、滅菌したピンセットとハサミを用いてラット後肢の筋肉を採取する。

【組織の消化】

- 1) 採取した組織をPBS(-)で洗い流す。
- 2) 0.1%コラゲナーゼ, 1,000 U/ml ディスパーゼ（各 15 mg/15 ml, 50 mg/15 ml）を含む Hanks 緩衝液（15 ml）を入れたプラスチック遠心管中に浸ける。
- 3) 結合組織を取り除き、勢いよく組織が浮遊するようにハサミで細かく刻む。
- 4) ウォーターバスにて 100 cycle/min・37°C・60 分酵素による消化を行う。（どろどろになるまで）

3.4 細胞の播種

【実験上の注意】 3.3 と同様に作業中は微生物を混入しないように慎重を期すこと。クリーンベンチで作業に入る前には時計等はずし、肘まで石鹸で良く洗う。さらに、手指、爪の間を70%エチルアルコールで消毒する。またピペットはピペッターで吸う（口で吸わない）。

【試薬】 ペニシリン*, ストレプトマイシン*, ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), グルタミン, 7.5%NaHCO₃, ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) *

*ペニシリン, ストレプトマイシン

培養時に微生物の生育を阻止あるいは殺すために培地中に添加する抗生物質。

*FBS

培地は細胞が生存, 増殖, 分化するための生理的環境を *in vitro* で再現するために必要な栄養素や微量成分を含んでいなければいけない。しかし培養細胞の増殖等に必要な因子の解明はまだ不十分であるため, 一般的に培地には血清などの天然物を加える。

【器具】 培地ビン, 高圧滅菌器 (オートクレーブ), クリーンベンチ*, メンブレンフィルター (孔径 0.45μm), 50μm ナイロンメッシュ, プラスチック遠心管, ガラスピペット, ピペッター, 遠心機, 試験管ミキサー, コラーゲンコーティングフラスコ培養器, 100mm 培養皿, 60mm 培養皿, CO₂ インキュベーター*

*クリーンベンチ

細胞培養をするにあたって最も配慮しなければいけないことは微生物の混入を防ぐことである。そのため, 操作をできる限り微生物の少ない所で行うことが必要となるためクリーンベンチを使用する。クリーンベンチは幅 90~170cm, 奥行 80cm, 高さ 190cm 程度の箱型の実験台で, 天井あるいは正面からフィルターで濾過された無菌空気が流入するような構造になっている。

正面は上下に動くガラス戸になっており、実験台上にはガスコックや吸引用真空ラインが設けられている。

クリーンベンチの使用にあたっては、正面のガラス戸を上げ、消毒した手を入れて無菌操作を行う。クリーンベンチ内は清潔に保ち、不必要なものは放置しないようにする。

*CO₂インキュベーター

インキュベーターは細胞を一定温度で培養するために必要となる。密栓した容器で培養するときには普通のインキュベーターでも培養できるが、培養皿など開放系で培養する時にはCO₂インキュベーターを使用する。このインキュベーター内の気相は空気と炭酸ガスとを一定の比率で混合し（ここでは5%CO₂）、かつ湿度を100%に維持している。

CO₂インキュベーターは湿度の高い状態に保つので、使用しているうちに微生物、とくにカビ、バクテリアや酵母に汚染されることがある。使用前に70%エチルアルコールをインキュベーター内部に噴霧し、きれいに清拭してから使用する。

【ペニシリン， ストレプトマイシン溶液の調製】

- 1) ペニシリン 1,000,000U， ストレプトマイシン 1g， NaCl 0.85g を蒸留水 100ml に溶かす。
- 2) クリーンベンチ内でフィルター滅菌した後、冷凍庫に保存する。

【7.5%NaHCO₃の調製】

- 1) NaHCO₃ 37.5g を滅菌水 500ml に溶かし、培地ビンに移す。
- 2) キャップを緩めて上からアルミホイルで覆い 120°C， 20 分で高圧滅菌する。

【10%FBS を含む DMEM 培地の調製】

- 1) 市販のDMEM 粉末培地 4.75g を滅菌水 450ml に溶かし、培地ビンに移す。
- 2) キャップを緩めて上からアルミホイルで覆い 120°C， 20 分で高圧滅菌する。
- 3) グルタミン 0.292g を滅菌水 10ml に溶かし、クリーンベンチ内でフィルター滅菌後培地に加える（グルタミンのように溶液状態で熱変性を受けるものは高圧滅菌できないため、フィルター滅菌する）。
- 4) ペニシリン， ストレプトマイシン溶液 5ml を培地に加える。
- 5) 7.5%NaHCO₃ で pH 調整する（培地の色が柿色になるまで）。
- 6) FBS 50ml を培地に加える。

【細胞のろ過， 洗浄】

- 1) クリーンベンチ内で 50μm のナイロンメッシュで消化した組織をろ過する。ろ液は別のプラスチック遠心管で受ける。
- 2) ろ液を 1500rpm×5 分で遠心分離する。
- 3) クリーンベンチ内で上清を躊躇せず一気に捨てる。
- 4) 沈さに 10%FBS を含む DMEM 培地（10ml）を加える。
- 5) 試験管ミキサーにより再懸濁し、再度遠沈をかける（この操作を2回繰り返す）。

【接着による細胞の分別】（今回は実施しない）

- 1) 10%FBS を含む DMEM 培地（10ml）で再懸濁し、コラーゲンコーティングしていない 100mm 培養皿に播種する。
- 2) 30 分間 CO₂インキュベーター内で培養する。
- 3) 上清で培養皿の底をゆっくり洗って、その上清を採取する（この操作により組織消化物中に含まれる培養皿に接着しやすい線維芽細胞等を取り除くことができる）。

- 4) 上清 10ml のうちコラーゲンコーティングしているフラスコ培養器に 8ml, 60mm 培養皿に 2ml, 底面に均等に細胞が散らばるように播種する.
- 5) CO₂ インキュベーター内で培養する.

【培養皿の足場が細胞の付着ならびに成長に及ぼす影響】

- 1) 培養皿の底面が I 型コラーゲンでコーティングされている, もしくはされていない 60mm 培養皿を 2 枚ずつ無菌的に取り出す.
- 2) 10%FBS を含む DMEM 培地 (8ml) で再懸濁し, それぞれの培養皿に 2ml ずつ播種し, 細胞が底面に均等に散らばるようにする.
- 3) CO₂ インキュベーター内で約 1 週間培養する.

3.5 培地交換 (TA が実施する)

細胞は生きているので, 培地中の栄養素を消費し, かつ老廃物も貯まる. そこで培地の交換が必要となる.

【実験上の注意】 3.3, 3.4 と同様である. ここでの作業を慎重に行わず微生物を混入させてしまえば, 全てこれまでの作業が無駄となるので十分に注意する.

【試薬】 10%FBS を含む DMEM 培地

【器具】 ガラスピペット, ピペッター

【培地交換】

- 1) CO₂ インキュベーターよりフラスコを取り出し, ピペットで培地を除く. このときフラスコを傾け細胞の付着していない側面にピペットの先端を当て吸引し, 細胞面を傷つけないように注意する.
- 2) 10%FBS を含む DMEM 培地 (2ml) を細胞が剥がれないようにゆっくり加える. その後 CO₂ インキュベーター内にフラスコを戻す. 培地交換は播種した翌日に 1 度, その後は 2~3 日後に 1 度行う.

3.6 細胞数の計測と生死判別

トリパンブルーは死細胞を青染するが生細胞を染色しないので, 細胞をトリパンブルーで染色した後, 染色されない細胞数を数えれば生細胞数を求めることができる. これにより生細胞の割合を求める.

【試薬】 PBS(-), 0.25%トリプシン 2.65mM EDTA 溶液, 10%FBS を含む DMEM 培地, 0.3%トリパンブルー/PBS(-)液, エチルアルコール

【器具】 血球計算板*, CO₂ インキュベーター, 顕微鏡, 遠心機, ディスペンサー (ピペットマン), サンプルングチューブ

*血球計算板

血球、細胞などの浮遊液中の密度を測定する器具である。血球計算板の計算枠の線の引き方にはさまざまある。単細胞からなる浮遊液をつくり、計算板とカバーガラスの隙間に静かに細胞液を入れる。低倍率の顕微鏡を用いて、計算板の1mm×1mmの枠内(図2-1)の全細胞数を数える。計算枠の面積は0.01cm²、深さは0.01cmであるから、細胞の存在した液量は1×10⁻⁴cm³となる。計算枠の細胞数がA個であった場合、A×10⁴個/mlとなり、これに希釈倍数を掛けたものが実際の細胞数となる。

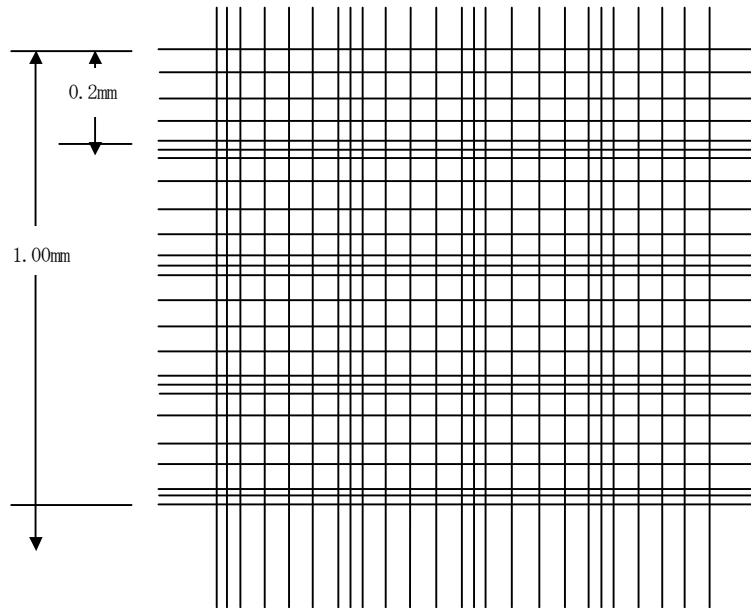


図2-1 血球計算板 (Thoma 型) [深さ 0.01mm]

【トリパンプルー染色】

- 1) CO₂ インキュベーターより培養皿を取り出し、ピペットで培地を除く。このとき培養皿を傾け細胞の付着していない側面にピペットの先端を当てて吸引し、細胞面を傷つけないように注意する。
- 2) PBS(-)を1ml入れ細胞表面を洗った後、液は出来るだけ除く。これを2回繰り返す。この操作によりFBS中のトリプシンインヒビターを完全に除去する。
- 3) 0.25%トリプシン2.65mMEDTA溶液を0.3ml加えCO₂ インキュベーターで5分間保温して細胞が遊離し浮遊状になったことを顕微鏡により確認する。
- 4) 新たに10%FBSを含むDMEM培地を0.8ml加えトリプシンの反応を止める。
- 5) 細胞懸濁液をサンプリングチューブに移し3000rpm×3分で遠心分離する。
- 6) 上清を捨て新しく培地を100μl加え、ピペッティングにより細胞を1個1個バラバラにする。
- 7) この細胞懸濁液を培地で希釈し、原液、2倍希釈、4倍希釈溶液を用意する。
- 8) それぞれの細胞懸濁液からディスペンサーで10μlとり、そこに0.3%トリパンプルー/PBS(-)液をピペットで10μl加え混合する。
- 9) 血球計算板にカバーガラスを置く。この時カバーガラスが付着する部分をわずかに湿らせてからカバーガラスを置き、指でずらすように計算板に押しつけながら密着させ密着部分にニュートンリングが出来ることを確かめる。
- 10) トリパンプルー染色した細胞懸濁液を良く振り混ぜながらピペットで10μlとり、計算板とカバーガラスの隙間に静かにしみ込ませる。

- 1 1) 顕微鏡により計算板の計算枠内の全細胞数を数える。ついでトリパンブルーによって青染されている死細胞数を数える。ただし、計算枠の下辺と右辺の線上にある細胞は除外する。
- 1 2) 生細胞の割合を次式により求める。
$$\frac{\text{全細胞数} - \text{青染された細胞数}}{\text{全細胞数}}$$
- 1 3) 細胞懸濁液の量、および計数までの希釈倍率を考慮して、培養皿あたりの生細胞数を算出する。
- 1 4) それぞれの細胞懸濁液からディスペンサーで 10 μ l とり、そこに毒性を有するエチルアルコールを 6 μ l 加え混合する。0.3%トリパンブルー/PBS(-)液をピペットで 10 μ l 加え混合した後、同様の操作を行い生細胞の割合を求める。

3.7 分化した細胞（筋管）の観察とスケッチ

培養開始から約 1 週間後に倒立型位相差顕微鏡により細胞を観察する。

併せて、継代培養細胞で筋芽細胞株である C2C12 細胞の分化の様相も観察する。

C2C12 細胞は成長マウスの筋再生部より樹立された細胞株で、筋衛星細胞に由来すると考えられている。コンフルエント（培養皿の底面が細胞で完全に覆われた状態）に達した C2C12 細胞を、2%ウマ血清を含む培地（分化誘導培地）で培養すると、C2C12 筋芽細胞の融合が起こり、筋管細胞に分化する。今回は、分化誘導培地で培養する前の C2C12 筋芽細胞ならびに筋管細胞を観察する。

また、分化誘導培地で培養する直前に、0.5-1.0 μ g/ml のツニカマイシンで 60 分間処理すると、筋線維にまで分化することが報告された(FASEB J, 21: 2994. 2007)。今回は、この方法で分化させた細胞の観察も行う。

【器 具】倒立型位相差顕微鏡*

*倒立型位相差顕微鏡

倒立型顕微鏡は、照明装置が上部にあり、照明光はステージ上の試料にあたる。ステージの下に対物レンズがあり、結像光線を下部の反射鏡で反射させ、接眼レンズで観察する。従って、培養細胞などの入ったシャーレなどをステージの上に置いた場合でも、観察する面がシャーレの底面になり、スライドグラスを用いたときと同様に明瞭に観察することが出来る。

また位相差顕微鏡とは、極くわずかな屈折率の差を明暗の差に換えて観察するように工夫された顕微鏡である。培養細胞も固定し染色すれば組織標本と同じように顕微鏡下で観察できる。しかし、培養細胞の形態観察における利点は、個々の細胞が生きてままで、経時的に観察できることにある。ところが、生きている細胞の多くは無色透明に近いので通常の顕微鏡ではコントラストが小さく観察が困難であったが、この位相差顕微鏡を使うことにより培養細胞の形態の微小な部分まで観察できるようになった。

【細胞の観察とスケッチ】

筋衛星細胞や、筋衛星細胞が融合してできた多核の筋管細胞をスケッチする。スケッチは、一つ一つの細胞を抽出して描くのではなく、隣接した細胞の間の位置関係や大きさ・形態の違いが分かるように、細胞群として描くこと。また、細胞の輪郭だけでなく、核や細胞内小器官も含めて濃淡を使って描くこと。