

細胞工学の教育を目的としたES細胞の利用

— ES細胞を用いた基礎医学実習 —

王寺 幸輝*・小林 祐太・白柏 魅怜・清水 里美・北村 知嵩
小原 啓弥・吉川 正英・石坂 重昭

奈良県立医科大学 寄生虫学教室

(2009年11月18日受付 2010年1月25日受理)

学生の教育, 特に学生実習に対して細胞工学を利用したケースは, 近年, 需要がますます増加している. それは, 近年の細胞培養技術を用いた生物系研究とバイオ関連企業 (医歯薬学系および生物工学系など) の増加によるものと考えられる. また, 医学部においても, 細胞工学を利用した研究, 実習の重要度が増していることは言うまでもない. 医学部における基礎医学教育では, 生化学, 生理学, 薬理学, 寄生虫学, 病理学など多種の学問体系が存在し, それらの各論に対する実習は座学で学んだ内容をもとに, もっとも基本的な内容に焦点を絞った実験内容になってくる. 本学では, 基礎医学実習の集大成として, 第4学年の後期に基礎配属というカリキュラ

ムを設定し, 当教室ではマウス胚性幹細胞 (ES細胞) を用いた実習を行っている. その内容も含めて, 細胞工学の教育を目的としたES細胞を用いた医学教育実習の実際とその利便性, 意義について考察したい.

基礎配属の概要とES細胞を用いた実習

近年の医学教育における臨床および基礎研究は, 医学部を卒業する医師の幅広い知識と教養, そして専門的な医学的解釈をする上で重要である. そのためにも, 早期教育システムの重点化, 改変がさまざまな医学部で行われており, 本学もその一環として基礎配属なる新しいカリキュラムが平成19年度よりスタートした. 基礎配属

新コーナー「生物学教育」の企画趣旨

年次大会のプログラムの内容からわかりますように, 生物学がカバーする分野は大きく広がってきています. たとえば, 生物学の出発点ともいえる発酵・醸造, 生物化学工学, 基礎分子生物学, あるいは基礎微生物学から, 植物, 動物, さらに環境問題までをカバーするに至っています. このように大きな広がりを見せる生物学の将来を考えると, 研究の重点化や農芸化学など他分野との差別化はもちろん重要ですが, 生物学を今後担う若手の養成もまた重要であると考えています. 生物学関連の学部・学科で学ぶ若者にどのような教育を行うかも我々に課せられた大きな問題であります. 現在, 理科離れの時代と言われて久しく, 次世代の教育に大学や高等専門学校では苦慮される場面も少なくない状況となっています. そこで, 本誌編集委員会では「生物学教育」なるコーナーの新設を考えました. 会員・非会員を問わず, 生物学関連の部局で教育に当たられている方々より, 教育活動における工夫や問題点を投稿していただき, 相互の情報交換の場として有効に活用していただければと考えた次第です. 「生物学教育」では, 上記のように講義や学生実験での工夫・作られた教材・新規の実験プロトコル・学生の理解度の調査などの情報をご投稿いただきたいと思っております. 投稿いただいた情報については査読を行い, 教育論文としての性格を持たせるようにいたします. また, 掲載された内容に対してのご意見も歓迎いたします. さらに広く会員外にも投稿を呼びかけたく, 是非, 会員各位の周辺の方にも投稿をおすすめいたしますようお願い致します.

生物工学会誌編集委員会

は、医学部・医学科4年生を対象とした必修選択科目で、research mind を培うことを最大の目的としている。医学部医学科内および総合研究施設部の付属教室、計45教室より提出された約80テーマから学生自身の希望・抽選により配属が決定される。学生は各研究室で、約1カ月半程度の間、教官の指導を受け、各テーマに沿った内容での実習を行う。いったん学生が配属されると、教室、担当教官によって実習内容や時間配分もさまざま、配属教室の特徴を生かした実習が行われるという点で、学生にとっては“自分次第で充実度が変わる”といった非常にflexibleなカリキュラムになっている。

ところで、医学部に入学後、一般教養、基礎医学、臨床医学と進学する過程で、細胞培養を行う機会がほとんどないのが現状である。細菌学実習などでは無菌操作を習得するが、動物細胞培養技術とは若干異なる部分も多い。医学生が「ヒトのからだ」について学ぶ際、実際にどういった細胞が存在し、細胞の大きさはどのくらいか、また細胞の色は……など、実際に顕微鏡を覗いて初めて習得（理解）することも少なくはない。また、単一の細胞、いわゆる cell line を用いれば、その形態や特徴しか理解できず、時には細胞の増殖速度が遅いため、長期の観察時間を余儀なく費やすことになる。しかしながら、こういった事象を解消できる「便利な」細胞がないものか？と考えているうちに、ES細胞がこれらの条件を満たすのではないかと考えられた。当教室では、マウスおよびサル由来ES細胞を扱っており、培養技術も含め、多種多様な研究を行う『有用なソース』としての認識があった。そこで、実習での利用も十分可能であると考え、研究室基礎配属生のテーマのひとつとして扱うこととした。

実習の実際と意義

具体的な実験内容は以下であり、4週間にわたって行った。

- ES細胞の培養液調製
- ES細胞の未分化状態を維持する培養（細胞培養の基本的操作の習得）
- Hanging drop法によるES細胞から胚様体(embryoid body, EB)の作製
- 分化誘導培地を用いるES細胞から種々の細胞への分化誘導
- 特異的分化マーカーを用いた蛍光免疫染色による細胞を同定・解析

以上の内容には無菌操作を含め、細胞培養時の細胞形態の観察や培地交換など細胞培養の基本操作が含まれている。

配属された学生にとっては、無菌操作が初めての経験

であるため、その操作を一から教えた。無菌操作は「習うより慣れる」が効果的である。教員が基本的な操作をやりながら教授し、その後、学生に実際やってもらいながら復習させた。また、複数人の学生を一度に指導するのはスペース的な問題もあるため、1台のクリーンベンチに対し、教員1人（執筆者本人）、学生2人（学生A、B）という組み合わせがベストではないかと考えられた。まず、学生Aに教え、次に学生Aが実際に操作を行った。次の学生Bは、教員および前に『手を動かした』学生Aの操作を見よう見真似でやりながら、学生Aの指導の下、無菌操作を行った。この繰り返しで、学生同士はお互い注意点、問題点を指摘しながら、無菌操作を習得していった。このようにして、初めの数日間、教員が無菌操作を徹底的に指導した後は、学生の自主性に任せることが可能であった。

また、学生にはその日に習得した技術を実験ノートにまとめるように指導し、最終的に実習期間が終わるまでに、無菌操作を簡条書きすることで、オリジナルの「プロトコール」も作製させた（図1、web参照）¹⁾。実習期間が終了した後も、彼らがいつの日か、研究で細胞培養を行う場合、それらのプロトコールを参考にすることで、再び細胞培養を開始することができるという利点がある。

1. 実験方法

<基本培地の作製方法>

実験にあたりES細胞を培養するための培地の組成を以下に示す。

D-MEM	100ml
Non -Essential Amino Acid(×100)	1ml
2-ME(mercaptoethanol)	100 μl
Penicillin, streptomycin	250 μl
ウシ血清(FBS)	10ml

以上の試薬をクリーンベンチ内で混合した。雑代用培地には、更に LIF (leukemia inhibitory factor) を最終濃度 1000 unit/ml となるように加えた。

本実習で使用した培地は、

・雑代用: ES maintenance medium; ES-M(LIF+)

・分化培地:

の2種 <分化培養方法>

- ①まず冷蔵庫で4℃の gelatin, PBS, trypsin-EDTA, ES-M, ES-D を取り出し、アルコール滅菌してからクリーンベンチ内に入れた。冷たい培地は細胞に悪影響なので、室温に戻してから、使用した。
- ②維持していたES細胞のdishをインキュベータから取り出し、クリーンベンチに移した。Dishを傾けながら古い培地を吸引した。
- ③②にPBS 3mlをdishの壁に当てるように(直接細胞に当たらないように)加え、よくwashした。
- ④PBSを吸引した後、trypsin 1mlを加え細胞をdishから剥がした。この状態で数分待った。
- ⑤④にES-D 2mlを加え、細胞をdishから剥がすように強めにビベティングした。Dishを回転させながら泡立てないように注意した。
- ⑥⑤の細胞混濁液をオレンジcapのtube(10ml 遠心tube)に移し、1500rpm、5分、10℃の設定で遠心分離した。この際バランス用tubeを忘れないよう注意した。
- ⑦遠心分離後、tubeをクリーンベンチに戻し、上澄みとペレット(細胞)に分離したか確認し、注意深く上澄みを吸引した。泡立っている場合は先に泡を吸引した。
- ⑧⑦を指で強くtappingして、ペレットをよくほぐした。
- ⑨⑧にES-D 4mlを加え、ビベットでよくpipettingして混和した。
- ⑩ヘモサイトメーターに⑨を数滴たらして顕微鏡で細胞の数をカウントした。(1個の仕切りの中に細胞が何個あるかを16個の仕切りについて全て数えて合計する。これによりx個の細胞がカウントできたとする。⑩の濃度は $x \times 10^4$ cells/mlとなる)。

図1. 学生が作製したプロトコールの一部抜粋

また、細胞免疫染色については、予め抗体の至適濃度が分かっているものを使用することで簡素化を行った。染色方法の手順を十分理解できるよう、反応時間中などを利用して、今何を行っているのかを説明した。顕微鏡観察では、一般的に組織実習で行うhematoxylin-eosin染色などと異なり、光学的な顕微鏡観察から蛍光試薬を用いた蛍光顕微鏡の利用法を習得させ、それらの利点（たとえば、光学では観づらかった細胞が、特異的抗体によりはっきりと見分けることができるなど（図2C））を理解させた。

図2は、学生の実験結果とその考察の一部である。無菌操作を習得し、細胞培養を行うまでにはさまざまな習得内容があるため、実際にどういった実験内容で行ったのかをじっくり復習するにも役立つものと期待される。

学生Aには、ES細胞からEBを作製してもらい、35 mm dishへplatingを行う場合に、dishあたりのEBの密度の変化で分化にどういった影響を及ぼすのかを、学生Bには、神経細胞への分化誘導に有効なレチノイン酸（ビタミンA）を添加してもらい、無添加条件とどの程度分化

誘導率が異なるのかを検討させた。学生Aの結果から、密度を高くしてplatingすると、それぞれの細胞がお互いに影響し合い、分化誘導が促進されることが示された。また、学生Bは、神経細胞への分化誘導には、レチノイン酸の添加で分化誘導が促進されことを示し、レチノイン酸の濃度の影響について考察していた。

ES細胞は単層培養でも3次的に厚みのあるコロニーを形成しながら増殖してゆく。また、EBを形成後、platingした場合、その厚みはさらに立体的となり、通常の顕微鏡画像では観察しづらくなる（図2）。今回、長期的な培養での観察であったため、なおさらその傾向が強くなることが予想された。そこで、初期の観察では、通常の位相差顕微鏡を用いて観察させ、培養を開始してから1週間後からは、同時に実体顕微鏡での観察も勧めた。通常、病理実習などで医学生が使用する顕微鏡は位相差顕微鏡が一般的であり、実体顕微鏡の使用は、研究現場以外ほとんどお目にかからない。そこで、今回、実体顕微鏡観察の導入を行ったことで、学生からは「観察しやすくなった」との反応を得ることができた。また、今回、分化したES細胞から混沌とした細胞集団の中に存在する「神経細胞」を特定できる手法の一つとして、抗体免疫染色法を行わせた。実習レベルでこのような実験はほとんど経験できないということもあり、実習内容に組み込んだが、過去の基礎配属実習を経験した学生に比べると、その「視覚的評価法」の利点を十分理解させることができた。

簡単ではあるが、学生の実習前後における意識を表1にまとめた。配属された医学生は皆細胞を使った研究に興味があり、終始真面目に取り組み、今後（将来）、細胞を扱う研究の『準備』は達成できたのではないと思われる。実習中における種々のトラブル（特にコンタミネーション）に対する対処法や研究の進め方などを一通りマスターしたため、今後、これらの技術・知識を發揮していただきたい。また、この実習の目標でもある、“研究というものは「地味」な努力の積み重ね”であることを十分理解してくれたと感じることができた。それは、10 cmのディッシュ内で繰り広げられている細胞社会の出来事を4週間わたって観察するという地道な作業から、ひとつの研究が生まれてくるという楽しみを分かってくれたことに他ならない。また、種々の講義を受け、数々のレポートを作成し、提出しているにも関わらず、レポートの作成には戸惑っているのが現状であった。学生にとってレポート作成の基本を教わるのは、やはり研究室に配属されて、初めて指導教員や先輩である大学院生から教わるものであろうが、医師は研究者にならずとも、カルテや検案書などの数々の“報告書”を書く機会が多く、客観的に読まれて理解できるクリアな文章、表現力

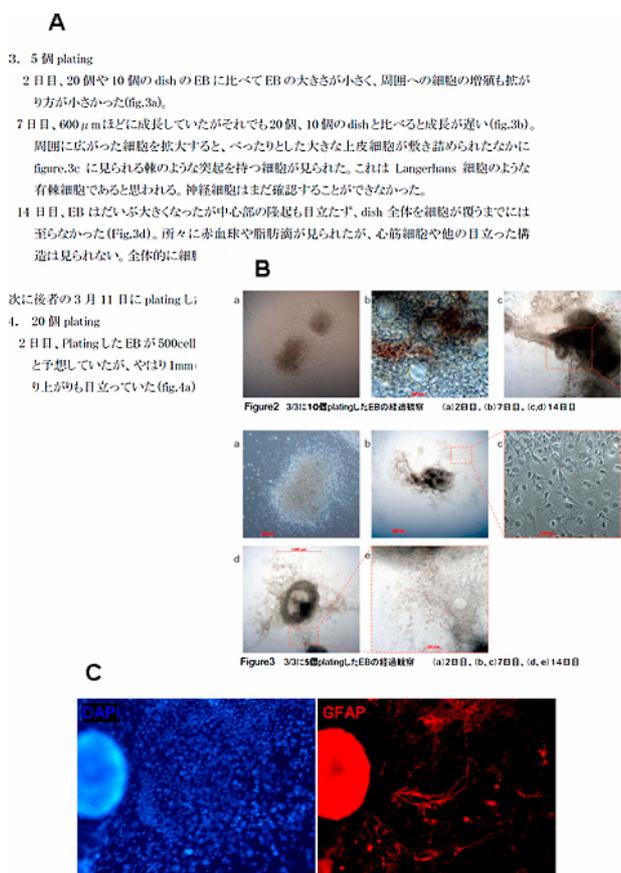


図2。(A)レポート結果と考察の一部抜粋、(B)レポート実験結果の一部抜粋、(C)蛍光免疫染色を行った結果。左はDAPIによる核染色(青色)、右は神経マーカーであるGFAP抗体により免疫染色を行った同一視野での結果(赤色)。

表1. 実習前後での学生の意識変化

	学生の反応	
	実習前	実習後
実習に対する姿勢	もともと配属希望の際に ES 細胞を使った実習ということを示していたため、「やる気のある学生」が集まった	実習に対する姿勢は終始真面目で、今後、ES 細胞のみならず、種々の細胞培養を行うことができる『自信』を身につけた
実習のスケジュール	1ヶ月に渡る集中実習のため、どのようなスケジュールになるのか不安が多かった	細胞培養技術を習得し、さらに免疫染色の発展的な研究を行うには、1ヶ月単位の時間が必要であることを経験できた
実験技術と知識	まったく無知であるが、細胞・培養とはどのようなものかという興味をすごく持っていた	培養技術はもちろんのこと、ES 細胞などに関する参考書を自ら読むなど、知識もかなり増えた
実習に対するやりがい	細胞を扱ってみたいという興味と技術習得のためのやる気	実習の枠を超え、『研究』はまさに地道な努力によるものだということを体得した
基礎配属実習の意義	『研究』を体験したいということだった	研究に必要なスキルを体得でき、それ以外にも表現力や発想力を養うことの重要性を学んだ

も必要となってくる。そういった意味でも、医学生にとって基礎配属というのは重要な意味を持っていると考えられる。

ES細胞を用いた実習

ES細胞とは、マウスでは受精後3.5日胚の内部細胞塊に由来する細胞であり、多分化能を有する細胞集団である²⁾。そして、現在では多くの研究が行われ、種々の培養方法や遺伝子導入により、各種成熟化細胞への分化誘導法が確立されている³⁻⁵⁾。

一般的なES細胞の分化培養方法として、hanging drop法⁶⁾があり、胚様体の形成により、マウスの発生過程を模倣できる。すなわち、ES細胞から種々の細胞に分化するため、一度に種々の細胞を観察でき、細胞系譜（三胚葉系の分化）を観察することが可能である。また、ES細胞は増殖能が高いため、細胞の準備にも時間を短縮できるという利点があり、たとえばRNAやタンパク質を解析するために十分な細胞量を必要とする際にはうってつけの材料といえる。

さらに、ES細胞は受精卵より成熟してゆく臓器の発生を模倣できるという点で、発生過程の基本を学ぶことが可能である。たとえば、肝臓を例に取れば、肝臓の原基は造血系臓器として初期に発生し、その後、内胚葉へと分化することで成熟化される。つまり、ES細胞からの分化過程を追跡することで、肝細胞の成熟過程を解析できる。ES細胞から分化誘導を行う際には、種々のホルモンや成長因子の添加により特異的分化誘導を促進できる報告が多数あるため⁷⁻⁹⁾、それらの分化誘導条件を再検討し、分化誘導時の遺伝子発現やシグナル伝達を詳細に解

析することでデータを蓄積し、これまでの論文報告と照り合わせることで、新たな発見が見いだされる可能性もある。すなわち、短期集中的な基礎配属学生の実験で、思いもよらない結果を得ることも考えられ、科学論文へ投稿する機会を得ることができるとも考えられる。

今後の改善点

これまで述べてきたように、ES細胞を利用した細胞工学教育については、教員の立場からすると、細胞の多様性を教授することができ、学生の立場からすると細胞操作はもちろんのこと、種々の細胞に分化できる細胞で分化プロセスを学ぶことができるというメリットが挙げられる。一方で、当教室でこれまでに行った基礎配属の内容を顧みると、いくつかの課題、改善すべき点が挙げられる。ひとつは、多人数（5人以上など）の配属学生に対する対応である。通常、学科あるいは専攻レベルでの学生実習となると数十人レベルでの対応となる。クリーンベンチやインキュベーターなどの機器、スペース的な問題がまずは挙げられるが、たとえばオープンスペースでの模擬的な無菌操作訓練を行い、一通りの操作試験をクリアした学生が初めてクリーンな環境で細胞を操作できるようにすればどうだろうか。そうすれば、模擬的な操作の段階では、無菌的な試薬培地、血清、細胞を用いる必要はなく、いきなり無菌操作が始まって、コンタミネーションすることで無駄な時間や経費を未然に防ぐことができる。実際に細胞を扱う段階で、今回の試みのように、教員監督のもと、初めの学生に無菌操作を行ってもらい、2人目以降の学生からは学生同士の指導を行うことで、「繰り返し」学ぶことができる。

また、実験と研究との関連性についての改善も必要であると考えられる。各学生にES細胞に関連した論文を提供し、配属期間内の実験以外の時間で精読させることで、実験と研究との関連性を学んでもらおうと考えていたが、ほとんどの学生は研究論文を読むのは初めてで、専門用語や解釈にかなりの時間を費やされていると感じられた。これは実験と論文との関連性をうまく融合できない状況に陥っていることが考えられたため、実験指導中にも専門用語や英会話を取り入れるなど、実験中の操作と実際の研究との関連性をより生かした指導を行うべきと考えられる。

おわりに

基礎医学以外の分野、特に生物工学の分野でも、細胞培養を行い、それらの解析や工学的利用を念頭においた研究が近年ますます増加傾向にある。たとえば組換えタンパク質の作製やハイブリッド型人工臓器の開発などはよい例であろう。また、培養液の開発や細胞特性を解析するうえで、生細胞を扱う培養技術は必須であるため、生物工学における細胞培養・技術は重要であることは言うまでもない。細胞を利用した研究・教育を行うにあたって、細胞の“扱いやすさ”や“入手のしやすさ”など、重要点がいくつか挙げられる。さらに、細胞を扱う技術以外にも発生工学的あるいは細胞工学的な利用価値のある材料(細胞)を選択することで萌芽的、発展的発想(思考)をトレーニングすることも生物工学的な教育として重要であり、その条件を満たす細胞としてES細胞が挙げられる。すなわち、生物工学教育においてもES細胞を用いた実習が有効であると考えられる。

細胞培養を行う研究機関としては、医歯薬学のみならず、工学、農学など幅広い分野で行われているのが現状であり、特にES細胞を扱う再生工学、組織工学といった境界領域の学問体系には最先端の培養技術を駆使した研究がなされている。大学あるいは大学院を卒業後、企業やアカデミックでの研究を引き続き行う場合や、大学と企業による共同研究においても、これら生物工学的な教育は重要であり、基礎医学的な知識も要求され、今や生物工学を専攻する研究者は医学的知見に基づいた考察が必要とされる。また、近年のめざましい培養、遺伝子導入技術などの工学的改良からも、基礎医学を専攻する研究者は、生物工学的なプロセス、開発の原理に立脚し、新規の研究データを得ることになる。そういった意味でも、本論文のキーとなるES細胞を用いた医学教育とは生物工

学的教育とかなり共通する部分が多く、医学、生物工学教育におけるES細胞を用いた実習は有目的であると考えられるため、今後さらに利用されることを期待したい。

最近では、ES細胞に代わるiPS細胞¹⁰⁾が注目を浴びているが、この細胞自身を扱うには組換えDNA実験での認可・登録などいくつかのハードルがある。そのため、ES細胞に比べるとまだまだ学生実習には実用的ではないと考えられる。今後、ES細胞を用いた実習が、医学教育のみならず、生物系、工学系などを含め、多数の分野で利用されることを望むとともに、得られたデータや実験手技の情報をインターネットを通じて共有し、データベース化することで更なる有効性を見いだせれば良いと考えている。

要 約

医学および生物工学においてES細胞を用いた研究は盛んに行われているが、ここでは、研究以外の利用価値について考察した。著者らは基礎医学実習において実験操作やトレーニングを行う上で、マウスES細胞は扱いやすい細胞であり、十分利用価値の高いソースであること経験した。ES細胞を用いた実習を通して、細胞あるいは生命科学に対して興味を引く学生が増えることを期待してやまない。

文 献

- 1) <http://www.naramed-u.ac.jp/~para/sub10.html>
- 2) Evans, M. J. and Kaufman, M. H.: *Nature*, **292**, 154–156 (1981).
- 3) Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., and Field, L. J.: *J. Clin. Invest.*, **98**, 216–224 (1996).
- 4) Potocnik, A. J., Kohler, H., and Eichmann, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10295–10300 (1997).
- 5) Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L., and Tzukerman, M.: *Diabetes*, **50**, 1691–1697 (2001).
- 6) Keller, G. M.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 862–869 (1995).
- 7) Schuldiner, M., Eiges, R., Eden, A., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Goldstein, R. S., and Benvenisty, N.: *Brain Res.*, **913**, 201–205 (2001).
- 8) Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L.: *J. Clin. Invest.*, **108**, 407–414 (2001).
- 9) Hayashi, H., Morizane, A., Koyanagi, M., Ono, Y., Sasai, Y., Hashimoto, N., and Takahashi, J.: *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 261–268 (2008).
- 10) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: *Cell*, **126**, 663–676 (2006).