

動物細胞が*in vitro*培養可能になったころ

西島 謙一

はじめに

切ってきた枝を地面に挿しておく、やがて根付く。平坦な切り口から直接根が出てきた様子は子供心に不自然で異様に感じられた。一方、動物の手足は、培養液につけておいても再生しない。分化全能性の問題であるが、もう一つ動物細胞は増殖しづらいという側面もある。比較的自由にいろいろな細胞が培養できるようになったのは最近のことである。

樹立された細胞株を入手・培養して実験材料として細胞を利用する現代の我々にとっては、なぜ細胞によってこうも異なる基礎培地が必要なのだろうか、どちらかというとな煩わしく感じがちである。しかし、培地を開発してきた往年の研究者の立場からすると、細胞にはすべて個性があり、栄養要求性も異なるため本来はそれぞれに適した培地を開発することも大切ということである。動物細胞培養時に日常何気なく採用している諸条件の意味を、多少歴史的な話を含めて少し整理してみよう。

細胞培養事始め

動物細胞培養の歴史は1910年代にさかのぼる。最初の細胞株とされるマウスL細胞樹立の報告は第二次世界大戦中の1943年、アメリカのアールによりなされている¹⁾。第二次世界大戦後は、四肢麻痺を起こす恐ろしい感染症であるポリオの予防をめざし、ワクチンを培養細胞から作ろうとして大きく技術が進んだ。

培養技術のない時代、どうやったら培養できると考えるだろうか。リンガー液のような古くから用いられてきた平衡塩類溶液をもとにするとして、後は何を加えたら良いだろうか。体内では増えているのだからできるだけ近い条件で培養を試みる、という発想は自然であり、先行した細菌培養にならい血漿・血清を用いる方法が模索された。ごく初期には、細胞がよく増えている時期の胚を使って、細胞を埋め込んだ固体培養法が試みられたそうである。細胞の増殖には体内とよく似た接着面(=足場)が必要なため(そう考えられた)、ニワトリ胚抽出液と血漿を混合してできた担体の中に組織片を入れ細胞をアウトグロースさせた。培養後の細胞は取り出せず、

大変な時代であったと聞く²⁾。やがて血漿の代わりに血清を使って、組織片の酵素処理により得られた分散細胞を、液体培地によって培養できるようになった。しかし、用いたニワトリ胚組織抽出液の活性は数日でなくなるため、膨大な手間のかかる実験であることに変わりはない。アミノ酸のもととして牛乳ラクトアルブミンの加水分解物とビタミン源として酵母エキスを加え、タンパク質などを供給する血清を添加した培地が登場し、培地調製はかなり楽になった。「本当に救われた思いがした」と、JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources, 日本の細胞銀行の草分けの一つ)の顧問であった高岡聰子先生が「培地の話」と題した文章に書かれている³⁾。それでも、どのメーカーの試薬を使うかで性能が大きく異なる時代だったそうである。

やがて、いくつか優れた細胞株が得られて培地のアミノ酸組成が調べられるようになり、現在の合成培地への道筋が拓けてきた。現在よく使われているDMEMやRPMI1640あるいはF12などの優れた基礎培地は、1950年代には早くも開発されていた原型を改良して作られてきた。血清を添加して使う「普通の」基礎培地はその時期にある程度完成されていたともいえる。199培地³⁾はパーカーが栄養素として良さそうな成分を加えていった栄養リッチな培地であり(1950年)、初代培養などに用いられている。MEM (1959年)はminimum essential mediumの略でイーグルにより開発された⁴⁾。低分子を透析により除いた血清添加条件下、L929 (最初に樹立されたクローン細胞、マウス由来)やHeLa (最初に樹立されたヒト由来株細胞)の増殖をもとに、細胞内の遊離アミノ酸濃度を参考に一つひとつ最低必要量を決定していくという膨大な努力によりなされた開発であった。MEMは種々の細胞に適用可能であり、新たな培地を生み出すもととなってきた。DNAがんウイルスの仕事でノーベル賞を取ったダルベッコのDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)はアミノ酸(2倍)やビタミン(4倍)を大きく拡充することでマウス胚細胞の培養に使われた。 α -MEMはマウス/ハムスターハイブリッド細胞培養用に開発された培地で一部のアミノ酸とビタミンを補強し、ピルビン酸を添加している。培地

改良にはさまざまな系譜がある。RPMI1640はRoswell Park Memorial Instituteで肝腫瘍細胞用に開発されたマッコイの5A培地をもとにして作られた。リンパ球培養用に開発された培地でカルシウムやマグネシウムが少なめで、リン酸とイノシトールが多い。F12は少数細胞のコロニー形成率を指標にハムにより開発された培地⁵⁾で、プロリン要求性のCHO (Chinese hamster ovary) 細胞の培養に現在も用いられている。

先史時代の痕跡？

プロトコールに則れば割と問題なく進むと考えられている動物細胞培養であるが、現在も面倒な点、ナマモノ的な側面が残っている。これらをいくつか見てみよう。

魔法の水 細胞増殖因子などのタンパク質や栄養成分のもととして、培地に血清を加える。通常使われるのはウシ胎児血清であり、種々の細胞で増殖をよくサポートできる。体中であらゆる細胞がすさまじい勢いで増殖している胎児血清には、増殖因子が多く含まれているのである。用途に応じて、子牛血清、新生児ウシ血清なども用いられている。また、神経細胞の培養では馬血清を添加するなど、未同定成分が効いていると思われる状況は今でも残っている。これらの血清は基本的に一点ものの天然物であり、自分の培養目的に適しているかロットごとにチェックをしてから用いる。血清が変わると再現できない実験もあるのである。この点については、たとえばES細胞培養に使えることを確認済みの血清なども売られるようになり、近年かなり楽になってきている。狂牛病が騒がれた際には、ウシ胎児血清の価格は高騰し、狂牛病のないオーストラリア産の血清がブランドとなったこともある。

血清の有効成分はどのようなものであろうか。FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor) やインスリン、トランスフェリンなどが、さまざまな高分子、低分子栄養成分とともに血清には含まれている。PDGF (platelet-derived growth factor) 発見の端緒は面白い⁶⁾。かつて、培養する細胞と同種の血清がのぞましいと考えられたことがあった。霊長類の血清は貴重で、サルを培養したいとき、一度採取した血液から血漿のみを取り、血球など他の成分は戻すことが試みられたそうである。成分献血のような発想である。しかし、血漿(血液の液体成分)と全血からそれぞれ調製した血清(体外で凝固した血液の上澄み)は、見かけはよく似ているにもかかわらず細胞増殖をサポートする活性は雲泥の差であり、この差を説明できるのがPDGFであった。血液凝固の際、止血のために血小板が血餅を

つくる。その反応はタンパク質分解のカスケード反応であり、この際一部可溶性の分子がPDGFとなって遊離することが分かっている。

ラボの水 日本語で「水が合う」という。培養初期にはまさにこのような現象が見られたそうである。蒸留水、イオン交換水、逆浸透水。さまざまな機器により製造した純水を用いて培地をつくるが、それでもいろいろな事件は起こる。魔法の水・ウシ胎児血清はここでも優れており、血清入り培地では水のクオリティをあまり気にせずとも安定した培養が可能となる。血清中のアルブミンなどの成分が、水に含まれる有害な不純物を吸着して中和してしまうと考えられている。逆に、無血清・無タンパクといった培養の場合は用いる水の性質が効いてくる場合がある。

炭酸ガスインキュベーター 通常細胞は5%の炭酸ガスを添加した空気中で培養する。このため、炭酸ガスインキュベーターを使わないと動物細胞は培養できない。インキュベーターが混んでいるとき、あるいは違った温度で培養したい時など、不便なことこの上ない。動物細胞用の培地は大きく分けてアール塩とハンクス塩の系統があり、pH緩衝作用をもたらず仕組みが異なる。ハンクス液は気相中の二酸化炭素と培地中の炭酸イオンとの平衡で緩衝作用を持つ。通常の動物細胞培地に使われているおなじみのシステムである。一方、アール塩はPBS (phosphate buffered saline) と同様にリン酸塩を緩衝液として使用している。こちらはpHを維持するのに炭酸ガスインキュベーターが不要である。MEMなど一部の培地はアール塩をもとにした組成のものも販売されている。二酸化炭素が不要な分、良いことづくめかというところも限らず、細胞がリン酸塩を代謝してしまうとpHの維持が難しくなる。また、リン酸カルシウムの沈殿を生じるのでカルシウムイオンはほとんど含めることはできない。現在は、気相の炭酸ガスによらずpHを保つ際には、培地にHEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)を少量添加することが多い。

最初の細胞株

試験管環境内で無限に増殖を続けるようになった細胞を細胞株という。最初に樹立されたのはマウス線維芽細胞のL細胞である。がん化すれば増えるだろうという発想で、初代培養細胞に発がん物質を入れて、長期にわたって培養している¹⁾。培地にはウマ血清やニワトリ胚抽出物などを添加したと記述されている。また、論文中の「材料および方法」の最初には、使用する器具の清浄化操作について詳しく記載されており、さまざまな技術が同時

並行で開発されていった様子が推定できる。

培養が難しかった頃、よく増殖する細胞を好んで用いた。発生途上の胚は活発に増殖を繰り返しており、マウスやニワトリの胚が正常細胞のもととして用いられた。もう一つよく増えるのがん細胞である。ヒトで最初の培養細胞株はHeLa細胞であるが、この細胞はアメリカ人女性の子宮がんから樹立されたものである。患者のヘンリエッタ・ラックスさんががんでなくなった後も何十年も世界中で細胞研究をサポートし続けている。HeLa細胞の増殖能は傑出しており、その後長らく「新しいヒト細胞株の樹立」は、培養中のアクシデントにより混入したHeLa細胞であるという事例が頻出している。

一方、1個の細胞を増殖させて株化細胞として樹立したものをクローンという。現在の感覚からすると不思議に思われるかもしれないが、クローン化細胞を得ることは非常に困難であった。周囲にいる細胞が生産する可溶性因子がオートクライン、パラクラインに作用して細胞の増殖をサポートするためである。最初のクローンはL細胞由来のL929細胞である⁷⁾。マイクロキャピラリーの中に単一細胞を植え込み、細胞あたりの培地量を極小にして、オートクライン因子の拡散を防ぎ、クローン化に成功した。クローンは、もともと単一細胞ということで理想的には均一な細胞集団が得られる。しかし、実際には、培養中に細胞の性質はさまざまに変化する。このことはたとえば染色体数のばらつきとして見ることができる。アメリカの細胞銀行であるATCC (American Type Culture Collection) のカタログには頒布する細胞株の染色体分布が記載されており、たとえばHeLa細胞では解析した50個の細胞が染色体70~164本の間分布していることがわかる。取扱い方法や培養法が変わると性質が大きく変わることもあり、株化細胞といっても油断は禁物である。

何か良いこと：

コンディションドメディウムとフィーダー細胞

細胞が互いに助け合う因子を生産するのであれば、細胞培養後の培地にはそのような活性物質が多く含まれているであろう。同種、異種の細胞の使用済み培地は培養上清、コンディションドメディウムと呼ばれ、培養時の添加剤としてよく用いられている。L929の培養上清は、マクロファージを分化させるM-CSF (macrophage colony-stimulating factor) を多量に含んでいることで有名である。筆者も昔、T細胞増殖因子として、ラット脾臓細胞のレクチン刺激後の培養上清を集めて、マウスのT細胞クローンをせっせと作っていたことがある。有効

成分未知でも、複数の成分が必要な場合でも、効果の高い添加物が比較的簡便に入手できる。ただし、微妙な調製法の違いにより成分が変わり、樹立できる細胞株の性質が異なるときもあり、注意が必要である。

培養上清中に因子を生産するのは細胞である。生産細胞がそばにいれば、拡散する前に必要な細胞に高濃度で届くかもしれない。また、たとえば接着分子のように細胞表面に生えているタンパク質が結合して活性化する場合も多く知られている。いっそのこと、お助け細胞と一緒に培養したら良いだろう。このような目的で加える細胞をフィーダー細胞という。細胞屋はひっくるめて「何か良いことをしれくれそう」という表現でフィーダー細胞に期待する。手間はかかるが、コンディションドメディウムより効果が上がるケースは多い。解凍後うまく増えないハイブリドーマに脾臓細胞をフィーダーとして播いたり(脾臓細胞はやがて死ぬがその前に良いことをしてくれる)、ES細胞を増やすために株化細胞であるSTOフィーダー細胞を使用したりする(ES細胞を差し置いてフィーダー細胞であるSTOの方が増えてしまった元も子もないので、STOが増殖できないようにあらかじめマイトマイシンCで処理したり放射線を当てたりしてから用いる)。

増えない細胞を増やす

成熟個体の体内では正常細胞は一部の例外を除き増殖していない。細胞が増殖するためには、細胞周期のG₁期からS期に進むためのチェックポイントをクリアせねばならない。うまくマッチした成長因子はこのチェックポイントを越えさせる働きがある。成長因子が見つからなくても、勝手に増えていってくれる細胞を作れないだろうか。

ウイルスの中にはがんを引き起こすものがある。ある種の皮膚がんの原因となるDNAウイルスの一種SV40ウイルスや白血病を起こすEBウイルスなどの感染によっていわば人工的に細胞をがん化・増殖させることができる。SV40ウイルスによるがん化の仕組みはよく研究されていて、large T抗原タンパク質というウイルスタンパク質が、細胞の持つがん抑制遺伝子Rbとp53に結合して失活させてしまうことが分かっている。似たような仕組みとしてはアデノウイルスのE1aとE2bと呼ばれるタンパク質があり、これは分担してRbとp53に結合して失活させてしまう。活性の本体であるlarge T抗原タンパク質の遺伝子のみを発現ベクターに組み込んで遺伝子導入して細胞株を作製することもなされている。一方、HeLa細胞もとの子宮頸がんは、ヒトパピローマ

ウイルス18型の感染により引き起こされたと考えられており、染色体に挿入されたウイルス遺伝子の一部 (E6, E7) が同様の働きをしている。また、large T抗原の他にも、細胞の増殖シグナルの下流にあるRasや (正常型Rasは必要なときにしか働かないので、ブレーキの外れた変異型Ras遺伝子を使う)、多くの細胞増殖遺伝子を発現させる転写因子mycなども細胞の株化を目的に用いられている。こうした努力が実を結ぶかどうかは細胞の性質などに依存しているが、現在も使われる細胞株の中にはこうして作られたものが多数含まれている。たとえば、293細胞はヒト胎児の肝臓からアデノウイルスの感染後樹立された細胞株である。また、マウスでも細胞種によっては増殖させることが難しいものがあり、初代細胞調製用にlarge T抗原タンパク質トランスジェニックマウスも作製されている。一方、株化細胞にlarge T抗原タンパク質をさらに導入することもある。large T抗原タンパク質にはもう一つSV40ウイルスの複製起点に作用して環状の小DNAを複製させる活性がある。このタンパク質を発現させたCOS細胞や293T細胞などはSV40ウイルス複製起点を持つプラスミドのコピー数を細胞内で増やして発現量を増やす目的で多用されている。

細胞の不死化

ヒトの死因のトップはがんであるのに、実はがんを防ぐ仕組みはヒトにいくつも備わっている。ヒト細胞の培養を続けると、やがて増えなくなってしまう。細胞が老化してしまうのである。この場合の老化とは細胞が分裂しなくなることを指すが、同時に形が変わったり特徴的な遺伝子発現の変化を見せたりすることもある。マウスの細胞では概してこのような心配がいらぬ。正常細胞を培養しているうちに不死化細胞を得られることも多い。

では、ヒトはなぜ老化してしまうのであろうか。分子生物学の講義で習うように、DNA複製ではRNAプライマーの後ろにDNAを合成していく。RNAプライマーは、上流から合成が進んできたDNAにより置き換えられて複製が進行する。では、線状染色体の一番上流5'末端のRNAプライマー部分はどのようにDNAに置き換えられるのだろうか。実は直鎖DNAからなる染色体ではこれは不可能で、DNA複製のたびにDNAが端から少しずつ短くなっていく。短くなくても平気なように染色体末端には遺伝子はコードされておらず、テロメアと呼ばれる単純な繰り返し配列が延々と続いている。このテロメアが一定限度以下にまで短くなると、細胞はそれ以上分裂をせずに細胞老化を起こすのである。生殖細胞など、次世代にそのままのゲノムを伝える必要がある細

胞では、酵素内のRNAを鋳型としてテロメアDNAを合成・延長するテロメラーゼがあり、テロメア長を維持している。マウスでは一般の細胞でもテロメラーゼが発現していることもわかってきた。また、がんの中でも特に悪性の高い種類はテロメラーゼを持ち、無限増殖能の一端を担っている。細胞を不死化させるために、テロメラーゼの発現ベクターをがん遺伝子とともに遺伝子導入することも試みられている。

ハイブリドーマ作製法

無限増殖能を持っているがん細胞と目的の正常細胞を合体させたら、がん細胞増殖のついでに正常細胞も分裂し、しかも正常細胞の機能はそのまま使えるようにならないだろうか。そんな、ある意味乱暴な方法が実用化されている。モノクローナル抗体で有名なハイブリドーマである。

現在の抗体医薬の隆盛から見ると意外に思えるが、ミルシュタインとケーラーはモノクローナル抗体を作製して医学に役立てようと思っていたのではなかった。抗体タンパク質を生化学的に研究するうえで、それまで使っていたがん細胞 (ミエローマと呼ばれる白血病の一種で特異性の不明な抗体タンパク質を大量に生産するものがある) ではなく、特異性の分かった抗体を生産する細胞で研究を進めたかったのである⁸⁾。正常細胞とがん細胞を合体させて無限に増やせたらすばらしいと思った人は多かつたはずであるが、実際に変異型のミエローマを樹立して、増殖の盛んながん細胞の中から、正常Bリンパ球細胞と融合したものだけを選択的に増やせる技術体系にしたのがすばらしかったのである。ここで、融合した細胞だけを選択できるシステムを確認しておこう (図1)。

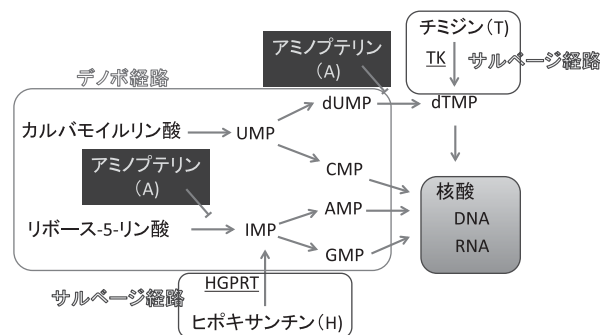


図1. HAT選択の原理. ミエローマはヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) を欠損しており、サルベージ経路が機能しない。このため、デノボ経路を阻害するアミノプテリンの存在下では増殖できない。正常細胞からHGPRTが供給されれば、H・Tを使うサルベージ経路により増殖できるようになる。TK欠損細胞も同様にHAT選択が可能である。

細胞工学の教科書には必ず出ている有名な原理である。細胞増殖に必要な核酸はデノボ経路とサルベージ経路の二つの経路でDNAに取り込まれる。前者は材料から新たに合成する方法、後者は再利用する方法である。ハイブリドーマ作製に使用するミエローマはサルベージ経路が欠損している。このため、デノボ経路をアミノプテリンで阻害するとこのミエローマは増殖できない。ここにサルベージ経路で使う核酸（ヒポキサンチン, チミジン）を添加すると、正常細胞と融合したミエローマだけが、欠損酵素を正常細胞から供給されてサルベージ経路を利用することで、増殖できるようになる。ミエローマの持つ増殖性と、正常Bリンパ球の持つ抗体生産能力をあわせもつ新たなハイブリドーマの誕生である。この選択法は融合後のセレクションに使われる培地に添加する3種の薬剤にちなんでHAT選択、使用される培地をHAT培地と呼ぶ。また、細胞を融合させる仕組みについては日本人としては忘れてはいけない点がある。細胞同士が融合する現象は発見地の都市名にちなんで名付けられた“センダイウイルス”の感染細胞で見つかり日本で研究が進んできた⁹⁾。ノーベル賞の対象となったミルシュタインとケーラーの仕事でも、センダイウイルスを用いて細胞を融合させハイブリドーマを作製している。現在は

扱いが楽な化学物質ポリエチレングリコールが用いられているが、細胞融合技術を生み出した功績は大きい。

おわりに

特に正常細胞の機能を維持したままで行う培養は、現在でも難しいケースはいくらでもある。分子生物学が隆盛を極める時代であるが、繊細な生き物としての細胞の個性に目を向ける視点も時には必要なのではないだろうか。

文 献

- 1) Earle, W. R.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **4**, 165 (1943).
- 2) 高岡 聰子: <http://cellbank.nibiohn.go.jp/legacy/information/history/takaoka/medium.htm> (2004)(2016/9/6).
- 3) Morgan, J. F. *et al.*: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**, 1 (1950).
- 4) Eagle, H.: *Science*, **130**, 432 (1959).
- 5) Ham, R. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **53**, 288 (1965).
- 6) Ross, R.: *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1207 (1974).
- 7) Stanford, K. K. *et al.*: *J. Nat. Cancer Inst.*, **9**, 229 (1948).
- 8) Kohler, G. *et al.*: *Nature*, **256**, 495 (1975).
- 9) Okada, Y.: *Exp. Cell Res.*, **26**, 98 (1962).