

細胞培養

渡辺敦光

筑豊生物研究会

会誌第15号(昭和45年12月)別冊

# 細胞培養

渡辺 敦光<sup>※</sup>

はじめに

1個の細胞を試験管の中で自由に培養し、成長させる事が出来たらどんなに素晴らしい事だろう、と考えたのは今に始まった事ではありません。その様な考えは、遠い果し無い宇宙へと飛び出せたらと考えたと同様に、昔から人の夢の中で一般的ではなかったでしょうか。今回は少し培養方法、特に1個の細胞から完全な個体を作る事が出来るかについて述べてみようと思います。

歴史

培養の歴史は1902年に逆か昇る事が出来ます。丁度その半世紀前に、細胞が生命の基本単位であるという細胞説が発表されました。Harberbanhはその説に立って、細胞レベルにまで下げて、1個の細胞は分裂能力を失わないだろうという考えの下に、多くの種類の緑色植物組織を材料にして培養を試みましたが、失敗に終わっています。だから植物細胞の培養の分野ではこの時代に殆ど成果は上りませんでした。

しかし今世紀の始めの10年間に動物組織培養は著しい進歩を見ました。Harrisonは1907年、始めて試験管の中で神経細胞の培養に成功したのです。彼はカエルの神経胚から神経管を取り出し、カエルのリンパ液の中で培養すると神経芽細胞の一種が突出し、これが伸びて、ついに神経繊維が作られたのです。この事は単に組織が体外で培養出来るというだけでなく、次の問題に解決を与えました。すなわち当時、神経繊維が神経細胞から出来たものであるかどうかについて激しい論争が学者の間で繰り返されていた時だったのです。彼の試験管の中で神経細胞が神経繊維になったという結果が、この論争に対し

て完全な終止符を打つ事になりました。何れにしても彼は組織培養の創始者だったわけです。組織や器官の間では多くの相関関係が存在していて、これが「生きている」という事実に重要な意味を持っています。そこで、生体内 (*in vivo*) よりはるかに単純な試験管内 (*in vitro*) の環境で生きた細胞を育てるという事は、多くの問題を残してはいますが、多細胞生物を対象とする生物学にとって、全く画期的な発見だったわけです。そこで人は生体を構成する体細胞を生体外に取り出して、いつまでも生き続けさせる事が出来るのではないだろうかと考えたわけです。

1910年代から20年代にかけては動物細胞の組織培養技術の基礎固めが行われました。その後、培養細胞系の分離で本質的に微生物の培養と異なる動物細胞の培養法が考えられました(1950年代)。

応用

今日ではこの細胞培養法の応用は、実験生物学、実験医学、特に細胞学、組織学、発生学、細胞生理学、細胞病理学、細菌学、ウイルス学、免疫学及び 瘍学等にまで及んでいます。

ここではその例を1つだけ簡単に述べておきます。人類の染色体は48本説と、47本説とが長い間対立を続けてきました。ところが培養技術の発達により、今まで困難であった人類の染色体の研究も可能になったわけです。1956年に人類の胎児の肺組織を培養し、増殖した細胞の染色体を観察した結果、その数は46本である事が明確に証明されました。その後、世界中でこの方法を用いて染色体の研究が行われ、その結果はどの民族に於いても全く差がなく、46本の染色体から

※ 九大・理・生物

成り、その構成は22対の常染色体と2個の性染色体から成っていて、男性はXY型、女性はXX型である事が明らかになったわけです。この事は細胞の培養技術を有効に利用して、今まで不明だった生命現象の解析に役立った例です。

#### 植物細胞の培養

まず植物の培養をした場合に関しては有名な *Steward* とその共同研究者の行ったニンジンの細胞培養結果を述べるのが最も効果的だろうと思います。

彼等はニンジンの根の細胞を無菌的に取り出し、その切片を暗所で27℃に於いて培養した。この場合、培養地は次の様に調製されます。必須10元素の無機塩と微量要素(第一表)、エネルギー源としての蔗糖、それにビ

第一表 培地無機塩類組成

*White* (1943)による

$KCl$ ; 65,  $KNO_3$ ; 80,  $Ca(NH_3)_2 \cdot 4H_2O$ ; 300,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 720,  $Na_2SO_4$ ; 200,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ; 6.5,  $Fe_2(SO_4)_3$ ; 25,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ; 7,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 3,  $H_3BO_3$ ; 15,  $KI$ ; 0.75 (mg/l)

タミン  $B_1$ 、 $B_6$  及びニコチン酸の混液に、植物の生長ホルモンであるオーキシン、それに有効成分が何であるのかは未だ不明ですが、ココナツヤシ胚乳液を加え、寒天培地を作ったのです。この様な条件ですと、ニンジンの根の細胞はどんどん成長して、不定形の細胞集団、カルスになります。この細胞は何代も何代も培養出来ます(継代培養)。カルスの一部を切り出し、ココナツ胚乳液やその他種々の物質が入っていますが、前述したのと異なる濃度の培地に移しますと、1つの細胞が分裂を繰り返えし、同心円状の細胞配列を持つ小組織塊となり、その小塊の上に若枝が反対側に根が形成され、ついに完全なニンジンが出来あがりました。すなわち、カルスの

1個の細胞から正常な胚がたどると同様な道を経て、再び成体になったわけです。

長期間培養によって馴化した株でもオーキシンとか、植物の細胞核分裂を引き起こすカイネチン、又は核酸の前駆物質のアデニンの濃度を調節する事によって、完全な個体を作ったり、根だけとか、葉だけとかを作ったりする事が出来ます。

この培養はニンジンの根以外の組織や、他の植物に於いても、多少困難性はありますが可能です。すなわち一度カルスを作る事により脱分化又は胚もどりを起し、その細胞の培養を続ける事によって完全な植物体を作る事が出来るわけです。一般に若いもの程、未分化な細胞程、その力は強い様です。始めに *Harberband* が培養に失敗した事を述べましたが、あまりにも分化の進みすぎた植物組織を使用し、かつ培養技術も未だ幼稚だったせいだと思います。最近では1個の花粉からでも、完全な植物体の発生が可能になっている様です。

一寸と横道に逸れますが、この様な事が可能なら、畑なしで農作物の生産が可能なわけです。しかし残念な事にこの方法は大変面倒な事と、自由に畑で太陽のエネルギーを利用して生長している植物と比較すると大変高価につく事で、目下のところ未だ研究の段階にとどまっている様です。

#### 動物の場合

ここでは動物細胞の培養の一般的な手法について述べ、次にクローン培養について話を進めて行きます。

##### 1. 培養方法

動物を選択し、必要な組織を無菌的に切り出します。これは植物の場合と同様で以下の操作は凡て無菌的に行わねばなりません。周りの組織を完全に除き、目的の組織のみにします。そして良く切れるメスで1mm<sup>2</sup>ぐらいの大きさの組織片にします。組織や器官が通

例、バラバラにならず形態が保たれているのは、細胞どうしが蛋白質と多糖類を主成分とする1種の糊でくっついているからです。

培養の手始めは、この細胞間物質を除いて単離細胞にしなければなりません。そのため一般には蛋白質分解酵素の1つトリプシンを用います。分離し難い場合は脾臓から抽出されるパンクレアチンを用いたり、コラーゲン等で回りを囲まれている結合組織などはコラーゲナーゼという酵素で単離細胞にします。又細胞表面では2価の陽イオン、特にカルシウムイオンが細胞結合に関係していますので、そのイオンを除くためにEDTAと略される金属イオン特に2価のイオンを取り除くキレート剤が広く使われています。最近の研究によりますと、EDTAは単に陽イオンを除くだけでなく、トリプシン様の作用をし、かつ細胞の透過性を低下させる事が知られていますので、細胞を傷つけないで、しかも完全に細胞を単離出来る条件を選ばねばなりません。

この様にして単離した細胞を適当な培養液を用いて培養するわけです。この際、 $10^5$  個/ml以上の細胞濃度がないと、単離細胞は死んでしまいます。1見害になっていない様な薬物を使用したとしても、細胞にとっては人間並なのでしょう。すなわち、今まで細胞どうしてオシャレをしていたのに急に無理に離され、開きには話し相手がいなくなったのでノイローゼになったのかも知れません。冗談はさておき、トリプシン等で処理すると、細胞膜自体の透過性が変化し、細胞自体の産出する代謝物がどんどん外に出され、作られるよりもその量が多くなり、最終的には一種の栄養失調となり死んでしまうと考えられます。ある一定細胞濃度以上( $10^5$  個/ml)を培養しますと、細胞はガラス面に付着し、丁度アムーバ状の細胞型をとり始め、多くの偽足を伸ばして這い回ります。この間に活発にDNA合成を行い、細胞は分裂を盛

んに行ない、増殖し続けます。この際、細胞は一般的に生体内の機能や、分化の特異性などは失われてゆきます(前に述べました脱分化です)。そして一層の細胞群が出来あがります(単層培養; *monolayer culture*)。これをもとにして培養細胞系(*cell line*)が作られるわけです。この培養細胞系の最も有名なものはマウスの皮下細胞より分離されたL細胞と、ヒトの子宮癌組織から分離されたHela細胞とがあります。後者は名前と姓の始めがHe... La... という31才の黒人女性の子宮癌の1部から培養され得られたものです。本人はその後9ヶ月で全身の癌腫症により死亡しましたが、彼女の細胞の1部は20年経った今でも生き続けているのです。

その他人類では脳結膜、肺癌患者の胸部骨髓、リンパ性癌患者の胸水、羊膜、喉頭癌、急性単球性白血病患者血液、口底癌、肝臓等の細胞が細胞培養株として確立されております。又、サル、ウマ、イヌ、ラット、マウス、イモリ、カエル及び昆虫からですら同様な系が得られています。

## 2. クローン培養

では植物の様に単一細胞から完全な個体を作る様に動物の場合にも可能でしょうか? 答は "No" なのです。しかし単一細胞からの培養は可能になりました。

まずHela細胞の場合から述べましょう。細胞を $10^5$  個/ml程度をシャーレに播いて1晩培養します。そしてある強さのX線を照射しますと、その細胞は活発に代謝しますが、染色体中のDNAがあらこち切れてしまい細胞分裂をする事が出来ずコロニーを作りません。すなわち増殖力だけが失活してしまいうわけですが、細胞質はそのまま代謝活性を持続けます。その様な状態になった細胞層(*feedre layer*)の上に今度は少数のHela細胞を植えますと、単一の細胞が、どんどん増殖して、丁度細菌のコロニーの様になりま

す。これをクローン培養と言います。今では培養液が改良されて、前記の操作を行わないで培養出来る様になりました。しかし何代培養しても *HeLa* 細胞は *HeLa* 細胞で他の細胞には分化しませんでした。

ではかなり分化した正常な単一細胞の培養は可能でしょうか？ここでは筋原細胞の筋肉への分化について述べてみましょう。一般に単離した細胞を大変高い密度で培養したり、再凝集したり、単離せず組織片のみで培養すると分化は起ります。筋原細胞1個からの培養の場合には *HeLa* で行われた様に多くの細胞をまず培養し、それから細胞を含まない遠心血清を集めます。この血清に筋原細胞を200個/8cmシャーレに播きますと、その1個1個が分裂してそれぞれ集団を作り、その細胞どうしが融合し、多核となり、横紋を持ち、かつリズムカルな収縮をしました。いわゆる1個の細胞から完全な機能を持った筋肉が分化したのです。この仕事は *Konigsberg* により始めて行われ、非常に反響を呼びました。彼は更に、その血清中にコラーゲンが存在する事を電子顕微鏡で観察し、又コラーゲンの中だけしか存在しないハイドロキシプロリンに注目して、放射能でラベルしたその前駆物質のプロリンを培地に入れて筋原細胞を培養して血清を分析しますと、確かにコラーゲンが培地の中に合成されている事を確めました。更にコラーゲン膜をシャーレの底に引く事により筋原細胞が筋肉に分化する事が *Yaffe* により報告されております。彼はまた、適当な条件でその細胞を処理する事により、筋原細胞の培養細胞系として2年以上も継代培養を続けております。当然その細胞はアメーバ状の形態を持ついわゆる脱分化の状態にあるわけです。一見筋原細胞として認められない様な継代培養の細胞の例のコラーゲン膜の上で培養しますと、驚どろくべき事に完全な筋肉に分化したのでした。又一般に培養を

続けて行きますと染色体が増加して行きますが、この筋原細胞の場合でもその例にもれず染色体の増加が見られるものもあります。この場合でもコラーゲンの膜の上で筋肉になりました。

この筋原細胞の継代培養が注目される最も大きな理由は、以上の結果が極めて例外的である事です。一般に培養細胞は変質し、再分化を起し得ないのです。しかしコラーゲンがどの様な作用を持っているのかは現在でも未だ解決されていません。ひょっとすると細胞の代謝物の漏れを防止しているのかも知れません。

以上の結果はある1つの細胞はいつまでもその細胞本来の性質を持ち、他の方向に進まない事を示したにすぎませんでした。

#### *in vivo* の場合

では次に分化した動物の細胞は分化の方向を変えないだろうかという事を考えてみましょう。分化の方向が転換する例として、一昨年本誌で述べました眼の組織があげられます。例えば虹彩や網膜、角膜から水晶体への変換、網膜の色素細胞が神経性の網膜に変る事等々があります。もう1つの例として、イモリ等の肢の再生の場合があります。この場合は筋肉や軟骨細胞は一度未分化な形に戻り、再び他の方向へ分化が進んで行くわけです。

1個の受精卵から出発し、完全に分化した細胞は凡ての遺伝子を持っていると言われております。しかし例えば筋肉細胞では、アクチンとミオシン等の特別な蛋白質を作る遺伝子の部分しか読み取られていず、他の部分の遺伝子は発現していないと考えられています。ではこの様な状態まで分化した細胞を何らかの方法で未分化な状態に戻してやる事が出来るでしょうか？ *Gordon* はアフリカツメガエルの未受精卵をX線で処理し、核を失活させた後に、腸の細胞の核のみを未受精卵に移植しました。するとその核はどんどん膨潤し

て行き、卵割が始まり、正常に発生し、カエルにまでもなるものが出て来ました。この場合腸の細胞のみで発生を続けさせる事が可能だったわけです。つい最近、彼はオタマジャクシの胚をトリプシンで単離し、単層培養を行い、その核を例の未受精卵に移植してやりますと、大部分が卵割に失敗し、残りは胞胚期まで進み、1%以上は神経胚の後期まで発生が進みます。今度は第1番目に移植して胞胚期まで進んだ核を第2の未受精卵の核の失活したものに移植しますと、大部分が正常に発生し、若いカエルにまで発生したという報告を発表しています。すなわち、植物のカルスの場合と同様に、単層細胞にし、脱分化を起し、核の分裂のリズムを変え、次に未受精卵の環境で核の性質を変え、更にもう一度未受精卵の環境に変えられる事により、分化した細胞核は未分化に変わったのではなからうかと思われまます。

すなわち動物細胞でも1個の分化した細胞でも環境条件を変える事により完全な動物体が出来るだろうという事を彼の実験は示している様です。今まで1個の細胞から完全な植物体が出来ても、動物体が出来なかったのは、後者の方が分化の度合が高く、未分化にもどす環境条件、又はその未分化な細胞の分化の方向を変える環境条件が不適当だったと思われまます。

おわりに

動植物の細胞の培養について述べました。そして未だ1個の動物細胞から培養による完全な動物体を作ることは完成されてはいないが、その可能性を述べました。もし1個の動物細胞から1個の完全な個体が出る環境が確立したならばHe...La...さんを再び地上に生き帰らせる事が出来るでしょう。もし出来たとしたら自然に対しての冒瀆なのかも知れませんし、世界の平和を乱す事になるかも知れません。しかし自然科学から眺めて

見ると、これ程興味のある問題はありませんし、多くの研究者により研究されている様ですが、今のところその実現はまだまだ先の事の様です。

謝 辞

本稿のご高閲をいただき励ましと、種々の有益な示唆教示を受けた九州大学理学部生物学教室の川上泉教授に感謝の意を表します。

文 献

日本で発行された培養の本のみをあげておきます。

黒田行昭：動物の細胞培養技術（1～10）  
遺伝22, (7) P75 (1968)  
～より10ヶ月。

中井準之助他：組織培養—基礎と応用—  
朝倉書店（1964）。