

組織培養

助 績 篤 重 克 集
之 正 幸 正 編
井 根 田 上 川
中 山 山 井 堀

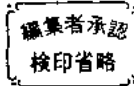
組織培養

助 績 篤 重 克 集
之 正 幸 正 編
準 根 田 上 川
井 山 山 井 堀
中 山 山 井 堀

朝 倉 書 店

組 織 培 養

昭和 51 年 9 月 30 日 初版発行



編集者代表

中 井 準 之 助

発 行 者

朝 倉 鏡 造
東京都新宿区新小川町2-10

印 刷 者

小 酒 井 益 三 郎
東京都新宿区神楽坂1-2

発 行 所

株式
会社

朝 倉 書 店

東京都新宿区新小川町2-10
郵便番号 162
電話 東京(260)0141(代)
振替口座 東京(-3673)番
印刷 日本協公会以

QJ 1976

研究社印刷・渡辺製本

〈紙断投分・転載を禁ず〉

3047-420009-0032

序

本書の前身である“組織培養—基礎と応用—”が朝倉書店から刊行されたのは1964年であるから、すでに10年以上を経過したことになる。10年前には組織培養技術に関する成書が少なく、また専門研究者の分担執筆によるこれだけ大部の技術書は皆無といってよく、かなり好評をもって迎えられたと思う。そして、これが日本語で書かれた組織培養技術の定本と自負してきた。

しかし、10年たってみると、組織培養についての事情がいろいろ変ってきたようである。まず、この間に組織培養の研究手段としての有用性がしだいに認識され、それまでごく一部の限られた研究者が実験手技として秘技のように扱ってきたものが、より一般的になり、研究人口の増加が著しくなってきた。そして、組織培養に新しく加えられた手法や大きく発展した技術が目立つようになった。これらが組織培養の一般化を促進したとも考えられる。たとえば、その当時すでに開発されていたが、一章として組むことができなかつたものに同調培養法がある。細胞増殖の研究に、組織培養がすぐれている点は、細胞増殖を同調させて、集団として1個の細胞内でおこる現象を追求することが可能になったことである。この細胞同調法は生体内の増殖細胞についてはのぞむべくもなく、細胞周期の概念の確立とともに組織培養のもつ役割を大きく進展させていったといえる。また、染色体分染法は“組織培養—基礎と応用—”の出版以後、ごく最近開発された手法で、分裂中期の染色体を単に比較的な大きさと外部形態から同定せざるをえなかつた以前の研究にくらべて、内部構造に迫る識別法であり、画期的な進歩をもたらされた。そのほか、突然変異株の分離手技、*in vitro*の発癌研究など、飛躍的な進歩を遂げた個所もある。さらに応用編の随所にみられるように、形質発現性を維持した培養細胞株も使われるようになり、大きな成果をあげつつある。これらの点に関して、本書は単なる改訂版ではなく新しいものになったのである。

このような技術の進歩に対応して、すばやく“組織培養—基礎と応用—”を改訂しようという動きはかなり早くから起っていた。しかし、諸般の事情から出版が今日に至った経緯は書き出すと切りがないので詳しくは述べないが、生みの苦しみに数年を要した。この間、研究の進展につれて、書き直しを依頼せざるをえなかつた部分もあり、また執筆者自身の申し出によって追加されたもの、あるいは完全に新しく書かれた章もある。ここに執筆者に対して、おわびとお礼を申しあげたい。そして、この手順のくりかえしで、よりよいものができたような気がするというのは、あながち苦しい言訳けばかりではないと思う。

新版“組織培養”を出版するに当たっての基本方針は、組織培養技術の単なる総説的な解説書ではなく、各執筆者の経験にもとづいたより実践的な技術書を作ることであった。そして、Merchantらの“*Handbook of Cell and Organ Culture*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1965”のような実習指針を兼ねることを期待した。しかし、技術がすべて完成されたものではないため、章ごとにいろいろ異なる記述法をとることになってしまった。同時に本書が組織培養技術の定本として、

いろいろな目的に使えるように欲張って多くの知識を盛りこめるように考えた。そのために膨大なものとなってしまった。旧版は、実験台の上において、実験のかたわら、疑問をすぐに調べることができるようにという配慮から小型のものにしたが、それが不可能になった。そこで、新しい酒は新しい皮ぶくろにもるべく、新版として表題を単に“組織培養”とし、“人棉細胞の培養”(朝倉書店、1975)と姉妹編となるようにB5版とした。“人棉細胞の培養”と合せて読まれば、おぎないあう点があると信ずる。また植物組織の培養は一章として残したが、詳細は別書“植物組織培養”(朝倉書店、1972)を参照されたい。

最後に、本書が広く利用され、組織培養を通じて、わずかなりとも自然科学、医学研究の進歩に寄与することを期待し、同時に、労の多い編集であったが、さらにまた改訂を余儀なくされるような組織培養技術の進歩をのぞんでやまない。

1976年8月

編集者・同

執 筆 者

立人、抗酸菌病研究所教授	山 根 績	国立遺伝学研究所細胞遺伝部 主任	野 藤 旌 夫
東北大学抗酸菌病研究所	村 上 修	国立公衆衛生院第一研究所 放射線科部長	関 口 豊 三
東北大学抗酸菌病研究所	草 野 敬 久	東北大学抗酸菌病研究所教授	及 川 淳
千葉大学看護学部教授	橋 爪 壮	自治医科大学教授	三 浦 恭 定
東京大学薬学部教授	山 田 正 篤	新潟大学医学部教授	大 星 章 一
東北大学抗酸菌病研究所助教授	松 谷 豊	東京大学医学部助教授	石 川 春 律
McArdle Memorial Laboratory for Cancer Research	梶 原 和 人	織紡株式会社薬務部、研究室	渡 辺 一 雄
東京大学医学研究所助教授	黒 木 登志夫	東京都立府中病院内科	別 府 宏 圀
東北大学薬学部助教授	後 藤 正 義	三菱化成生命科学研究所室長	天 野 武 彦
金沢大学薬学部教授	堀 川 正 克	信州大学医学部教授	志 水 義 房
東京大学医学部教授	中 井 準之助	京都大学ウイルス研究所助教授	井 上 幸 重
北海道大学理学部助教授	吉 田 廸 弘	大阪大学微生物病研究所教授	加 藤 四 郎
川崎医科大学助教授	難 波 正 義	大阪大学微生物病研究所教授	岡 田 善 雄
川崎医科大学教授	木 本 哲 夫	武田薬品工業株式会社 生物研究所部長	杉 野 幸 夫
横浜国立大学医学部助教授	佐 藤 温 重	武田薬品工業株式会社 生物研究所	五十嵐 貢 一
京都第一赤十字病院病理部部長	三 宅 清 雄	群馬大学医学部教授	三 橋 進
城西齒科大学教授	久米川 正 好	日本歯科大学新潟歯学部教授	齋 藤 和 子
国立遺伝学研究所 形質遺伝部室長	黒 田 行 昭	京都大学ウイルス研究所	難 波 雄二郎
岡山大学医学部教授	佐 藤 二 郎	国立遺伝学研究所細胞遺伝部部長	吉 田 俊 秀
東京大学医学部助教授	養 老 孟 司	京都大学数算部	尾 里 建二郎
北海道大学獣医学部助教授	中 西 宥	農林省農業技術研究所病理昆虫部	三 橋 淳
東北大学抗酸菌病研究所内教授	松 沢 大 樹	東京大学教養学部助教授	庄 野 邦 彦
東京大学医学研究所内教授	川 村 明 義		

(執筆順)

中井準之助 地3氏編 山田正房	組 織 培 養
大菅 弘 野 幸 一 編	人 癌 細 胞 の 培 養
中原・藤井・三浦 編	細 胞 生 物 学
湯 茂 明 著	細 胞 の 構 造 と 機 能
小 川 和 朗 編 著 水 野 塚 隆 雄	細 胞 学 図 説
中 尾 真 編	細 胞 膜 の 生 化 学
妹 尾 左 知 九 監 訳 内 海 耕 徳	ハニカ-細 胞 生 理 学 実 験
小川・武内・森 編	新 組 織 化 学
武内・清水・小川 編	酵 素 組 織 化 学
武内・小川・宇尾野編	病 態 酵 素 組 織 化 学
本 陣 良 平 著	人 体 発 生 学 入 門
尾 曾 越 文 和 亮 著 栗 山 寛 彦	基 礎 解 剖 学
岡 章 本 出 道 敏 雄 編	脳 の 解 剖 学
新 見 嘉 兵 衛 著	神 経 解 剖 学
船 尾 忠 孝 著	法 医 学 入 門*

	第1卷	概 説 ・ 細 胞 膜
細胞学大系	第2卷	基 質 ・ 小 器 官 I
《編 集》	第3卷	小 器 官 II
小 川 和 朗	第4卷	核
小 田 塚 昌 夫	第5卷	増 殖 と 分 化
黒 住 幸 夫	第6卷	運 動 と 興 奮
杉 野 幸 夫	第7卷	細 胞 学 各 論

*印は純刊予定

石田・田中・渡辺 編

小笠原・阿多 著
波多野

菅沼 悖 著

川名 林 治 著

植竹・渡辺・富沢 編

大湯 島・井上 編
浅渡

東石 田 名 著
昇香雄

植山 竹 久 著
本雄正

渡辺 力 著

三橋 進 編

奥野 良 臣 編
高橋 環

佐々木 正 五 編

中尾 亨 著

松林 久吉 編

西川 瀧 八 著
上彦 郎

緒方 正 名 編 著

渡辺 巖 一 著

小泉 明 著

野村 茂 著

山本 俊 一 著

豊川 宮 不 編
辺野 喜

藤原 喜久大 著

微 生 物 学

新版 微生物学入門 (増補版)

現代医学叢書 微生物学総論

現代医学叢書 微生物学各論

微生物遺伝学

現代の遺伝学 第3巻 微生物の遺伝

新ウイルス学 (I・II)

腫瘍ウイルス II

化学療法と耐性菌

薬剤耐性 (エピゾームと耐性因子)

微生物学シリーズ 麻疹・風疹

微生物学シリーズ 腸管と感染

微生物学シリーズ ウイルスの病原性

人体寄生虫ハンドブック

現代医学叢書 公衆衛生学

公衆衛生学入門

基礎環境衛生学 (増補版)

環境衛生学入門

現代医学叢書 産業医学

疫学入門

新編 食品衛生学

現代医学叢書 食品衛生学

上田英雄他11氏編
武内重五郎

内 科 学*

上田英雄編
原 雄 行

心 臓 学*

戸山靖一著

病態生理学 シリーズ 心 臓 病

笹本浩編

循 環 器 の 臨 床

東京女子医科大学附属
日本心臓血管研究所CCU訳

モデシ心筋梗塞 新しい診断と治療

笹本浩信編

呼 吸 器 の 臨 床

土屋雅春均編

消 化 管 の 臨 床

土石屋井龜谷編

肝・胆・膵の臨床

奥田邦雄著

現代医学書 肝・胆・膵疾患

阿部正和編

病態生理学 シリーズ 糖 尿 病

小坂垂井編

糖 尿 病 基礎と臨床

服部絢一著

現代医学書 血 液 疾 患

長谷川弥人編

血 液 の 臨 床

吉川原沢龜山編

老 年 医 学

大江田三浦編

老 年 学

吉江川上山田編

老 化 制 御*

三浦昌彰編

ポ リ ペ プ チ ド ホ ル モ ン

池田長谷川編

中 毒 症 基礎と臨床

辨原仔他8氏編

外 科 学

林四郎著

現代医学書 一 般 外 科 学

西本隆著

現代医学書 脳 神 経 外 科 学

稲田深著

現代医学書 胸 部 外 科 学

田嶋定夫著

顔 面 外 傷 診断と治療

*印は続刊予定

目 次

基 礎 編

1. 培養のための準備	3
1.1 培養器具	(山根 續) 3
a. ガラス容器	3
b. プラスチック容器	4
c. ピペット	4
d. ゴム製品	5
1.2 洗 い 方	(村上 修) 5
a. 洗 剤	6
b. クロム硫酸	6
c. 自動洗浄機	6
1.3 培 養 液	(草野 敬久) 7
a. 増殖培養液と維持培養液	7
b. 塩類溶液の作り方	12
c. 合成培養の作り方	15
d. 粉末培地	20
e. ラクトアルブミン, TPB などの利用	21
f. 血清分離法	22
g. CEE の作り方	23
1.4 滅菌と無菌試験	25
1.4.1 滅菌と無菌試験	(村上 修) 25
a. 滅 菌	25
b. 無 菌 試 験	29
1.4.2 マイコプラズマの検出と除去	(橋爪 壮) 29
a. 検 出 法	30
b. 培地の調製	30
c. 培 養 法	31
d. 除 去 法	32
1.5 無 菌 操 作	(山根 續) 34

1.6 pH のコントロール	(山田正篤)	35
2. 培養技術		39
〈細胞培養〉		
2.1 樹立細胞株の継代培養	(山田正篤)	39
a. 細胞株と細胞系		39
b. 樹立細胞株		40
c. 樹立細胞株の性格		41
d. 細胞分散法		45
e. 樹立細胞株の継代培養		45
2.2 初代培養	(松谷 豊)	47
a. 培養材料の用意		47
b. 組織片培養法		47
c. 細胞分散培養法		51
2.3 浮遊培養法	(梶原和人)	68
a. 浮遊培養に適した細胞の選択		68
b. 浮遊培養における細胞数の算定		70
c. 浮遊培養に必要な攪拌装置		71
d. 浮遊培養用培養液		71
e. ガス相と培養温度		73
f. 浮遊培養法		73
g. 浮遊培養における細胞増殖の動態と培養液交換		75
h. 細胞塊形成とその防止法		76
i. 大形または自動培養液交換による浮遊培養		77
〔付〕 静置浮遊培養法	(黒木登志夫)	77
2.4 同調培養法	(山田正篤)	80
a. 細胞周期		80
b. 同調培養		81
c. DNA 合成阻害剤による S 期同調法		82
d. 分裂細胞の採集同調法		85
e. コルヒチンによる分裂細胞の誘導同調法		86
f. その他の同調法		88
2.5 コロニー形成とクローニング法		90
2.5.1 細胞コロニー形成法と細胞系クローン分離法	(山田正篤)	90
a. Sanford のクローン分離法		92
b. Puck の細胞コロニー形成法		92

c. 細胞コロニー形成法の実際	94
d. その他の細胞コロニー形成法およびクローン分離法	97
2.5.2 寒天を用いたコロニー培養法——軟寒天内コロニー形成法および平板寒天培養法——	
(黒木登志夫・後藤正義)	99
a. 軟寒天内コロニー形成法の実際	100
b. 平板寒天培養法の実際	101
c. 寒天培養のための特別な注意事項	101
d. 各種細胞の寒天培地コロニー形成率	103
e. コロニーの形態	105
f. 寒天培養法の応用	106
2.5.3 レプリカ培養法 (堀川正克)	108
a. マスター・プレート, レプリカ・プレートおよびハンド・レプリケーターの準備	108
b. マスター・プレートへの単個細胞の植込みとマスター・プレートからレプリカ・プレートへの細胞の移し	109
c. レプリカ培養率	110
2.6 回転培養法 (中井準之助)	113
〈細胞培養の特殊な例〉	
2.7 末梢リンパ球の培養 (吉田 勉弘)	115
a. 組織の違いによるリンパ球の取り扱い方	115
b. 培養液	116
c. 培養方法	117
d. 株樹立の一般的特徴および継代培養のしかた	118
2.8 2倍体細胞株の培養 (難波正義・木本哲夫)	119
a. 培養組織の入手とその消毒	120
b. 組織片培養	120
c. 分散培養法	120
d. 培養液	121
e. pH の調整および培地の交換	121
f. 継代法	121
g. 正常ヒト2倍体細胞株の運命	122
h. WI-38	122
2.9 肝臓の培養 (難波正義・木本哲夫)	122
a. 肝臓組織および肝細胞のとり方	123
b. 培地	124
c. 培養法——ガス条件, 微小環境の調整, 培養器表面	125
d. 継代	127

e. 培養肝細胞の同定	127
f. 培養肝細胞の応用	129
2.10 パラビオーゼ細胞培養法	(山田正篤) 138
〈器官培養〉	
2.11 器官培養法	(佐藤温重・三宅清雄) 141
a. 器官培養における培養材料の摘出法	141
b. 器官培養における培養気相	142
c. 器官培養用培養液	142
d. 器官培養の手技	144
[付] Rose の還流培養法	(久米川正好) 151
a. Rose の還流培養法とは	151
b. 管内器具と培養液	152
c. 準 備	153
d. 組 立	155
e. 培養組織の形態的観察方法	155
f. 培養組織の酵素測定	155
g. 培養結果	156
2.12 旋 回 培 養	(黒田行昭) 158
a. 旋回培養器	159
b. 旋回培養のための細胞分散法	160
c. 旋回培養の諸条件	161
d. 旋回培養の結果の判定法	163
〈細胞の保存と輸送〉	
2.13 細胞の保存法および輸送法	(佐藤二郎) 168
a. 低温保存法	168
b. 凍結保存法	169
c. 培養細胞の輸送法	173
3. 実験操作法	177
3.1 位相差顕微鏡と電子顕微鏡	(美老孟司) 177
a. 位相差顕微鏡の使い方	177
b. 電子顕微鏡による観察	178
3.2 顕微鏡映画撮影法	(中西 有) 182
a. 撮影装置	182
b. 感光材料	184
c. 標本作製	184

d. 撮 影	185
e. 現像と編集	186
3.3 細胞の固定と染色	(山田 正 篤) 188
a. 顕微鏡標本を作るための細胞培養	188
b. 細胞の固定法	189
c. 細胞の染色法	190
3.4 ミクロラジオオートグラフィ	(松沢大 樹) 191
a. ミクロラジオオートグラフィの特徴と欠点	191
b. 定 義	191
c. 原 理	192
d. ミクロラジオオートグラフの作成	192
e. ディップ法	193
f. ストリップ法	193
g. コンタクト法	193
h. マウント法	193
i. ミクロラジオオートグラフの定量性を阻害する因子	193
j. よいミクロラジオオートグラフィを作るための数種の条件	198
[付] 超スピードミクロラジオオートグラフィ	199
3.5 蛍光抗体法(免疫蛍光法)	(川村明 義) 200
a. 蛍光抗体法とは	200
b. 組織培養分野への応用	200
c. 反 応 方 式	201
d. 特 性	202
e. 観察される蛍光の判別	202
f. 材料の調整	203
g. 染色(反応)法	205
h. 観 察 法	206
3.6 細胞の成長速度の測定法と生死の判別	(堀川正 克) 208
a. 細胞の生長速度の測定法	209
b. 細胞の生死の判別法	214
3.7 培養細胞の染色体標本の作り方	(加藤 雄 夫) 217
a. 株細胞の染色体標本	217
b. 短期培養細胞の染色体標本	219
c. バンド染色法	219
d. 染色体分析の実際	222
3.8 生化学的実験操作	(関口 豊 三) 223

a. 核酸の定量	223
b. タンパク質の定量	226
c. 細胞核および核成分の分離法	227
4. 培養細胞の性格	231
4.1 培養細胞の動態 (中井準之助)	231
a. 動きの観察	231
b. 細胞内部の動き	232
c. 細胞の移動	233
4.2 細胞の栄養要求 (山根 續)	236
a. 血 清	236
b. アミノ酸	238
c. ビタミンおよびプリン, ピリミジン	239
d. 糖, 無機塩, 緩衝剤	240
4.3 分化機能をもっている培養細胞株 (及川 淳)	243
a. 分化機能	243
b. 分化機能をもっている細胞の培養	244

応 用 編

1. 造血臓器の培養	251
1.1 造血臓器の培養 (三浦恭定)	251
a. 造血組織の培養の歴史	251
b. 赤芽球系細胞の培養	252
c. <i>In vitro</i> コロニー形成細胞	258
1.2 ヒト白血病細胞の培養 (大星章一)	265
a. 培養方法	266
b. 培養株細胞の性状	267
c. 培養株の起原細胞	273
d. 制癌剤感受性	273
2. 軟骨および骨組織の培養 (佐藤温重)	276
a. 軟骨の器官培養	276
b. 軟骨芽細胞, 軟骨細胞の培養	279
c. 骨組織の器官培養	281
d. 骨芽細胞の培養	282

e. 破骨細胞の培養	283
f. 芽体および原基の器官培養における形態的分化	283
g. 胚性長管骨の栄養要求	284
h. 骨基質の合成	285
i. 骨の石灰化	286
j. 骨のアルカリ性ホスファターゼ	287
k. 骨 吸 取	287
l. 上皮小体ホルモン, カルシトニン, ビタミン D の作用機序	288
3. 筋組織の培養	292
3.1 筋組織の培養 (石川春律)	292
a. 培 養 法	292
b. 形態分化と収縮	293
3.2 多核筋線維の形成 (渡辺一雄)	301
a. 筋肉細胞の培養系のもつ問題点	302
b. 細胞培養下での多核筋線維形成過程の概要	302
c. 筋肉細胞培養の実際	304
4. 神経組織の培養	308
4.1 神経組織の培養 (中井準之助)	308
a. 神経研究への応用とその発展	308
b. 材 料	308
c. 培養方法	312
d. 観 察	312
e. 培養所見	313
f. 成長と分化	314
g. シナプス形成	318
h. 神経成長促進物質	319
〔付〕 髄 鞘 形 成 (別府宏園)	320
a. 材 料	320
b. 方 法	320
c. 観 察	321
d. 培養所見	321
4.2 マウス神経芽細胞腫の培養 (天野武彦)	326
a. 培養方法	327
b. クローニングの方法	327

c. ニューロブラストーマクローンの性質	330
d. 神経突起伸長の調節	331
e. 神経細胞に特有な酵素の誘導	332
f. 薬理学的研究	335
g. チロシン, コリンの培養細胞への輸送	336
h. 細胞膜の生化学	337
i. 電気生理学的研究	337
j. 神経細胞の遺伝的解析	339
5. 電気生理学への応用 (志水義房)	343
a. 培養細胞の電気生理学的実験法	344
b. 培養細胞の電気生理学的性質	349
6. ウイルス学における応用	363
6.1 ウイルスの組織培養法 (井上幸重)	363
a. ウイルス学における組織培養の役割とその発展	363
b. ウイルス学領域における特殊性	364
c. ウイルス学領域における組織培養法	366
d. ウイルス増殖の観察	371
e. ウイルスによる <i>in vitro</i> トランスフォーメーション	373
6.2 ウイルス感染細胞の細胞学的観察法 (加藤四郎)	378
a. 組織培養とウイルス感染	379
b. 観察の時期	379
c. 洗 浄	379
d. 乾 燥	380
e. 固 定	380
f. 染 色 法	380
6.3 ウイルスによる細胞融合 (岡田善雄)	384
a. 細胞融合活性を示すウイルス	384
b. ウイルスによる細胞融合反応	384
c. B 型細胞融合反応を左右する因子	385
d. 不活化 HVJ による細胞融合反応の実際	387
e. 融合細胞の培養	388
【付】 病原微生物実験における危険防止対策 (杉野幸夫・五十嵐貞一)	389