



細胞培養 プロトコール

培養操作に磨きをかける!

基本の細胞株・ES・iPS細胞の知っておくべき性質から品質検査まで

序 ————— 中村幸夫

序章 18

研究材料としての細胞 ————— 中村幸夫 18

- ① 細胞培養の歴史 ② 細胞の不死化 ③ 幹細胞という概念 ④ 胚性幹細胞
- ⑤ 細胞分化の可逆性 ⑥ 人工多能性幹細胞 ⑦ 幹細胞の応用分野
- ⑧ 細胞材料の品質

1 章 細胞を用いた研究の種類と原理 25

1 細胞材料の種類と特徴 ————— 中村幸夫 25

- ① 由来動物種による分類 ② 細胞特性による細胞の分類
- ③ 由来および培養期間によるヒト細胞の分類 ④ 研究内容による分類
- ⑤ 増殖方法による分類 ⑥ 細胞材料の安定性 ⑦ 最近のトピックス

2 細胞材料を使用する研究に係る生命倫理 ————— 中村幸夫 35

- ① 生物多様性の維持 ② 動物を使用する実験に係る法令および指針等
- ③ ヒトを対象とする実験に係る法令および指針等
- ④ ヒト細胞を使用する場合の提供者からの同意の取得
- ⑤ 細胞バンクへの寄託について ⑥ 個人情報の保護
- ⑦ 社会的なコンセンサスの重要性

3 がん細胞株・不死化細胞を用いた研究 ————— 檀上稲穂 40

- ① がん細胞株、不死化細胞の定義とは ② がん細胞株を用いた研究のトピックス
- ③ 不死化細胞を用いた研究のトピックス ④ 今後の課題と展望

4 ヒトゲノムインキュベーターとしての細胞を用いた研究 — 檀上稲穂 46

- ① ゲノムインキュベーターとは何か？
- ② ゲノムインキュベーターとしての細胞の種類と特徴
- ③ B-LCLが整備されてきた経緯
- ④ ヒトゲノムインキュベーターとしてのB-LCLを用いた研究 ⑤ 今後の課題

5 体性幹細胞等のプライマリー細胞を用いた研究 — 須藤和寛 52

- ① プライマリー細胞と細胞株 ② プライマリー細胞を用いた研究

6 マウスES細胞を用いた研究—ノックアウトマウス作製研究 — 吉木 淳, 目加田和之 57

- ① 人類に役立つノックアウトマウス ② ノックアウトマウス作製の工程
- ③ ノックアウトリソースの活用法 ④ ノックアウトマウスは近交系が理想
- ⑤ ノックアウトマウスの種類 ⑥ ノックアウトマウス作製に使われているES細胞
- ⑦ 129由来のES細胞の問題点 ⑧ ノックアウトマウスの命名法 ⑨ 法令遵守

7 ES細胞・iPS細胞を用いた研究 — 寛山 隆 66

- ① マウスES細胞 ② ヒトES細胞 ③ iPS細胞
- ④ ES, iPS細胞研究者の悩み ⑤ 今後の展開

8 植物細胞を用いた研究 — 安部 洋, 小林俊弘 71

- ① 植物培養細胞の種類 ② 環境ストレス応答 ③ 植物防御応答
- ④ メタボローム研究 ⑤ 細胞分裂・小胞輸送 ⑥ まとめ

2章 動物細胞の培養に必要な基本事項 76

1 培地・試薬等の調製法 — 西條 薫 76

- ① 培地, 血清, 抗生物質, 細胞増殖促進物質 ② リン酸緩衝食塩水
- ③ Hanks液 ④ 細胞剥離液 ⑤ 培地, 試薬の滅菌方法

2 無菌培養操作の基本 — 西條 薫 94

- ① 無菌操作 ② 培養操作

3 細胞数の計測法・生存率の計算法 — 飯村恵美 111

- ① 浮遊細胞の準備 ② 付着細胞の準備 ③ 細胞数の計測

4 緩慢冷却法による細胞の凍結・融解法 — 永吉満利子 121

- ① 細胞の凍結保存法 ② 細胞の融解法

5 急速冷却法によるヒトES・iPS細胞の凍結・融解法 — 藤岡 剛 129

- ① 凍結保存の原理 ② 急速冷却法によるヒトES・iPS細胞の凍結方法
- ③ 急速冷却法によるヒトES・iPS細胞の融解方法

1 プライマリー細胞—継代培養方法 — 須藤和寛 139

- ① ヒト線維芽細胞とヒト間葉系幹 / 前駆細胞の特徴
- ② ヒト線維芽細胞およびヒト間葉系幹細胞の継代方法
- ③ 細胞分裂の限界と細胞の老化

2 付着性がん細胞株—樹立培養方法および維持培養方法 — 西條 薫 149

- ① 樹立に用いる材料 ② 組織の前処理 ③ 初代培養 ④ 組織片の凍結
- ⑤ 胸水・腹水培養法 ⑥ がん細胞の選択

3 非付着性細胞株—樹立培養方法および維持培養方法 — 寛山 隆 166

- ① ヒト臍帯血からの脱核赤血球誘導培養
- ② ES細胞からの血液細胞誘導と細胞株の樹立

4 Bリンパ芽球様細胞株(B-LCL)—樹立培養方法および維持培養方法 — 檀上稲穂 176

- ① 血液検体からのPBMNCの分離 ② EBV溶液の調製とウイルスの力価測定
- ③ B-LCLの樹立

5 マウスES細胞—樹立培養方法および維持培養方法 — 廣瀬美智子, 小倉淳郎 187

- ① 培地の調製 ② フィーダー細胞の調製 ③ ES細胞の樹立
- ④ 分化阻害剤処理について ⑤ 特殊なES細胞について

6 ヒトES細胞—維持培養方法 — 宮崎隆道, 末盛博文 198

- ① 実験の概要 ② フィーダー細胞ディッシュの調製 ③ ヒトES細胞の継代培養
- ④ ヒトES細胞の無フィーダー培養法

7 iPS細胞—樹立培養方法 — 青井貴之, 大貫茉莉, 沖田圭介 210

- ① iPS細胞の樹立から単離までの流れ ② プロトコールⅠ：フィーダー細胞の調製
- ③ プロトコールⅡ：レトロウイルスを用いたヒト/マウスiPS細胞樹立
- ④ プロトコールⅢ：エピソーマル・プラスミドを用いたヒトiPS細胞樹立
- ⑤ プロトコールⅣ：iPS細胞コロニーの単離

8 マウス胎仔線維芽細胞—作製方法 — 藤岡 剛 229

- ① 実験の概要 ② 妊娠マウスからの初代培養細胞の調製 ③ 継代 ④ 凍結保存

9 植物培養細胞株—樹立培養方法および維持培養方法 — 小林俊弘 242

- ① 懸濁培養細胞株の樹立方法および維持方法 ② 超低温保存

4 章 細胞の標準化 253

1 細胞の標準化の重要性 ————— 中村幸夫 253

- ① 微生物汚染 ② 細胞誤認 ③ 遺伝子発現解析 ④ 細胞の標準化
- ⑤ 技術研修～技術の標準化のために～

2 マイコプラズマ汚染検査方法 ————— 西條 薫 258

- ① DNA 検出法 ② PCR による検出法 ③ マイコプラズマの除去
- ④ マイコプラズマ汚染の予防

3 細胞誤認検査方法—ヒト細胞, マウス細胞 ————— 吉野佳織, 中村幸夫 273

- ① ヒト細胞の個別識別検査 ② マウス細胞の系統識別検査

5 章 細胞培養研究に関連する規則 281

1 細胞培養研究に関連する法令・指針等 ————— 片山 敦 281

- ① 臨床研究に関する倫理指針（臨床指針）
- ② ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（ゲノム指針）
- ③ ヒト ES 細胞の使用に関する指針（ES 使用指針）
- ④ ヒト iPS 細胞またはヒト組織幹細胞からの生殖細胞の作製を行う研究に関する指針（生殖細胞作製指針）
- ⑤ 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（遺伝子組換え生物等規制法）
- ⑥ 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（基本指針）

2 申請の具体例 ————— 片山 敦 289

- ① 臨床研究（ヒト由来試料使用研究）/ ヒトゲノム・遺伝子解析研究
- ② ヒト ES 細胞使用研究 ③ 遺伝子組換え実験 ④ 動物実験 ⑤ まとめ

付録 理研 BRC からのリソースの入手方法 ————— 299

索引 ————— 304