

レーザーマイクロダイセクションによる培養細胞の回収と継代培養

1. はじめに

レーザーマイクロダイセクション (LMD) は、組織切片を顕微鏡下で観察しながら、切片上の標的とする細胞群をレーザーによって切り出し、回収することのできる装置である (図1)。しかし、今回紹介する方法では、組織切片ではなく培養細胞よりコロニーを回収し培養を行った。

2. 方法

細胞培養はディッシュの代わりにLMD専用のフォイル付きフレームを用いて行った。フォイル付きフレームはスライドガラスの大きさの金属フレームに穴が開いており、その穴にフォイルと呼ばれる薄い膜が張ってある。金属フレームの厚みは約1mmあり片面に膜が張ってあるため、深さ1mmの底が膜でできたディッシュのような構造となる (図2)。

具体的な手順は以下のとおりである。

- ① 滅菌したフォイル付きフレームに細胞懸濁液を約1ml載せる。
- ② フォイル付きフレームを10cmディッシュに入れ、細胞の状態を観察しながら、2~3日培養する。
- ③ 適当なサイズのコロニーまで成長したなら、細胞が培養されたフォイル付きフレームに滅菌したカバーガラスをかぶせて無菌状態を保ちながら、LMDにセットする。
- ④ 細胞回収用の容器にトリプシンを入れておく。
- ⑤ LMDのモニターで細胞を観察し目的のコロニーの周りをレーザーでカッティングする (図3)。
- ⑥ カッティングした後も細胞が載った膜は表面張力で浮いた状態になっているが、膜の端の方をレーザー照射すると下に落下し回収容器のトリプシンの中に回収される。
- ⑦ 細胞が回収された容器を装置から取出し、37度で5分程度インキュベーションし細胞を膜からはがす。
- ⑧ 細胞を回収し培養を行う。(図4)

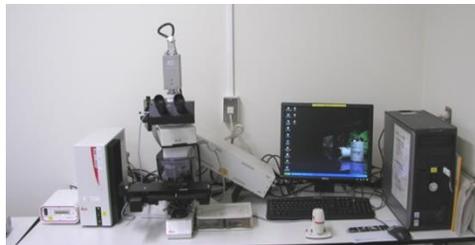


図1 ライカ社製レーザーマイクロダイセクション (AS LMD) 顕微鏡にレーザーが接続されており、顕微鏡の画像をモニターで見ながら、目的部位を切り出し回収することができる。

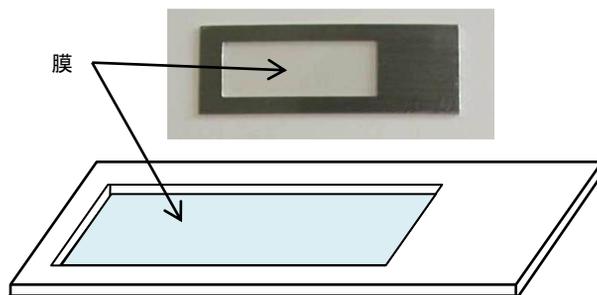


図2 フォイル付きフレームの外観及び模式図
穴の開いた金属フレームに薄い膜が張ってある。金属フレームの厚みは約1mmあり片面に膜が張ってあるため、深さ1mmの底が膜でできたディッシュのような構造となる。これに、細胞を培養する。

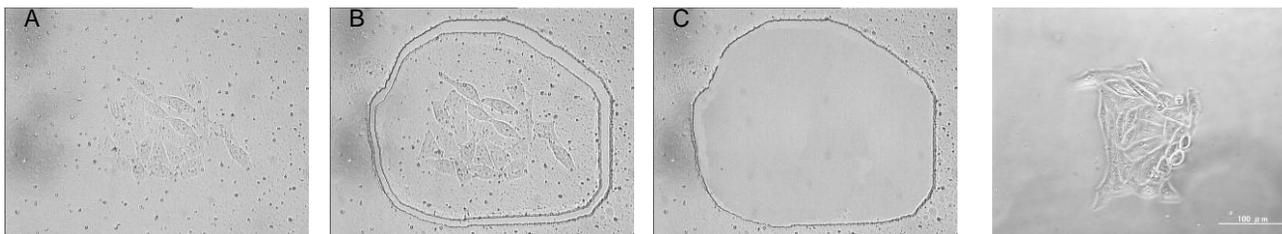


図3 HeLa細胞のコロニーをレーザーでカッティングし回収
A:カッティング前。この写真ではよく見えないが、中央にコロニーがある。B:コロニーの周囲をカッティングした後。膜が切れて表面張力で浮いた状態になっている。C:細胞を膜ごと下にある回収容器に落とした後。

図4 回収したHeLa細胞をトリプシンで膜からはがし、継代培養。

3. 結果

培地がある状態でのレーザーカッティングだが、特に問題なくフォイルを切ることができ回収も簡単であった。問題点としては、ライカ社製のレーザーマイクロダイセクション: AS LMDは切れたサンプルが重力で自然に落下して回収容器に落ちる構造になっているため、トリプシンを入れた回収容器が空気中にさらされ無菌状態が保てない点がある。しかし、実際に回収した細胞を培養してみると意外とカビなどのコンタミネーションが生じる確率は少なかった。細胞を分取する装置としてはセルソーターがあるが、形態を見ながら特定の細胞を分取したい場合は、このような方法も有効かもしれない。なお、この装置では蛍光観察も可能であるため、緑 (GFP、FITC等) や赤 (Rodamine、Texas Red 等) で蛍光ラベルされた試料も使用可能である。興味のある方は、ぜひご連絡ください。担当: 高木 (5573)