

第3章 動物細胞培養

3.1 動物細胞培養に必要な機器と器具

○クリーンベンチ

- ・HEPAフィルターで除菌した無菌空気を排出。
- ・紫外線殺菌灯で庫内を殺菌。

○炭酸ガスインキュベーター (CO₂ incubator)

- ・炭酸ガス濃度 5%。
- ・炭酸ガス緩衝系による pH 制御。
$$\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$$
- ・pH7.0~7.2 程度。
- ・培地中の水が蒸発しないように湿度が 100%に保たれている。

○小型卓上遠心機

- ・細胞の回収に用いる。
- ・1,000 rpm、5分間で細胞は沈殿。

○倒立顕微鏡 (Inverted microscope)

- ・シャーレなどで培養したままの状態で見極鏡観察するために対物レンズがステージの下にある。ゆえに倒立と呼ばれる。ステージ上に大きな空間があるため、シャーレや培養プレートで細胞を培養したままで観察できる。

○細胞計数装置 (Cell counter)

- ・電気的変化を検知することで、細胞数を計数する。

○オートピペッター

- ・基本的に液体培養なので、ピペット操作で行う。口では吸えないので、オートピペッターを用いる。電動ポンプ式で、吸ったり吐いたりする。

○アスピレーター

- ・廃液を吸い出すための吸引ポンプ。

○エアコン

- ・湿度調節する。湿度を下げれば、雑菌汚染の危険性が下がるので、湿度を 50~60%程度まで下げる。
- ・雑菌汚染は細胞培養の大敵。

3.2 各種滅菌装置

○微生物コントロールに関する用語

- ・滅菌: 病原菌、非病原菌を問わず、すべての微生物を完全に死滅除去すること。
- ・殺菌: 微生物の生命を奪い、不活性化すること。
- ・消毒: 病原性微生物の不活性化を意味し、非病原性微生物の残存・混入は問題としない。
- ・除菌: 対象物から菌を除いて減らすこと。
- ・静菌: 菌は殺さないが、その増殖を止めること。

○滅菌法の種類

●加熱滅菌法

・乾熱滅菌

- ・160℃以上の高温で器具を処理する。
- ・ガラス、陶器、金属など。
- ・滅菌の時間は温度に依存する。
 - 135～145℃ 3～5 時間
 - 160～170℃ 2～4 時間
 - 180～200℃ 0.5～1 時間
- ・ガラスピペットはピペット缶に入れて滅菌する。

・湿熱滅菌(加圧蒸気滅菌(オートクレーブ滅菌))

- ・最も一般的で、確実かつ経済的な滅菌法。
- ・高温の飽和水蒸気を充満させる。
- ・液体の滅菌も可能。
- ・滅菌条件:
 - 115℃ 30 分
 - 121℃ 20 分
 - 126℃ 15 分

●ろ過滅菌法

- ・0.22 μm、あるいは 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過。
- ・加熱によって変性する材料(タンパク質、ビタミンなど)の滅菌に用いる。
- ・空気中の菌の除菌にも用いる。
- ・細菌は除去できるが、マイコプラズマやウイルスは除去できない。
- ・ホローファイバー型フィルターでは、ウイルス除去可能(50 nm)なものもある。

●物理滅菌法

・紫外線滅菌

- ・殺菌作用が強い波長領域は 200～280 nm。
- ・線源と被照射物との距離が短いほど効果的(距離の二乗に反比例)。
- ・照射時間は長い方がよい。
- ・紫外線は直線的に進むので、陰になる部分には効果がない。
- ・紫外線の殺菌効果は可視光線の照射により弱められるので、暗所で行う必要がある。

・放射線滅菌

- ・X線、α・β・γ線、電子線、陽子線、中性子線が用いられる。
- ・プラスチックやゴムなど、熱に弱い器具の滅菌に有効。
- ・物質への透過力が強い。
- ・大がかりな特別な装置が必要。

・高周波滅菌

●化学滅菌法

・ガス滅菌

- ・プラスチックやゴムなど、熱に弱い器具の滅菌に有効。

◎エチレンオキシドガス

長所:

- ・あらゆる微生物に有効。
- ・加熱の必要がない。
- ・拡散浸透しやすく、プラスチックや紙、繊維などでつつんだ状態で滅菌できる。

短所:

- ・滅菌に時間を要する。
- ・**残留毒素**の問題がある。
- ・引火・爆発性がある。
- ・ヒトへの毒性が強い。

◎ホルムアルデヒドガス

- ・ホルマリン液を加熱することでホルムアルデヒドガスを発生させて殺菌する。
- ・一般細菌やウイルスなど、広い範囲に効果的で、室内の消毒に有効な消毒法。

・薬剤による滅菌

◎アルコール滅菌

- ・60～90%、通常は **70%**エタノールを用いる。これよりも薄くても濃くても効果が薄まる。
- ・**一般細菌**は 15 秒ぐらいで殺菌される。しかし、孢子や糸状菌には効果なし。
- ・蒸発するので、**残留**の危険性がない。

◎次亜塩素酸ナトリウム

- ・B型肝炎ウイルスにも有効。かなり殺菌効果が強い。

3.3 動物細胞の凍結保存に必要な器機

○凍結保存装置

●ディープフリーザー

- ・ -85°C 。
- ・1～2年の短期間の保存に適している。
- ・装置の故障の不安がある。

●液体窒素保存槽

- ・ -196°C 。
- ・半永久的な保存が可能。
- ・液体窒素の補充さえ忘れなければ、安定して保存可能。
- ・ディープフリーザーで予備凍結した後、液体窒素に移す。

○凍結保存の必要性

- ・培養中、動物細胞は常に突然変異をしている。確率は 10^{-4} 個に1個の割合。
- ・凍結保存中は変化しない。
- ・変化させずに長期間細胞株を維持するには凍結保存が必要。
- ・凍結傷害を抑制するため、DMSOを添加した凍結培地で凍結保存する。しかし、DMSOは有機溶媒であるので、極力低温かつ短時間に凍結・融解作業を行う。