

4. 培養の準備

4.1 培養機器の準備（使用前の点検）

細胞培養に必要なCO₂インキュベーター、クリーンベンチ（安全キャビネット）などの機器は、確実に稼働しているかあるいは、清潔な状態に保持されているか？など、事前にしっかり点検をしておいてください。近年、各種滅菌機能が装備されているCO₂インキュベーターが販売されており、培養前に庫内をクリーンな状態にすることが可能です。また、アルミブロックや恒温バスなど指定の温度に到達しているよう事前に稼働させておくと効率の良い実験が行えます。

4.2 培養容器の準備

細胞の特性によって、目的に適した培養容器を選択してください。培養フラスコ、ペトリディッシュ（シャーレ）、スピナーフラスコ、培養バッグなど、様々なメーカーから様々な容量の容器が販売されています。主な培養液量の目安は以下の通りです。

- ペトリディッシュ：接着細胞
 - 35mm 培養液容量 1~2mL
 - 60mm 培養液容量 3~6mL
 - 100mm 培養液容量 8~12mL
 - 培養フラスコ（Tフラスコ）：接着細胞
 - T-25 培養液容量 3~7.5mL
 - T-75 培養液容量 10~15mL
 - T-150 培養液容量 15~30mL
 - 培養フラスコ（Tフラスコ）：浮遊細胞 ※
 - T-25 培養液容量 10mL 以下
 - T-75 培養液容量 50mL 以下
 - T-150 培養液容量 150mL 以下
- ※ 通常は接着細胞と同程度の液量で培養します

4.3 培地、試薬の準備

培養する細胞に適した培地を選択します。培地には様々な種類があり、メーカーによって組成、添加剤などが異なっている場合もありますので、それぞれ取扱説明書をよく読んで調製及び、貯蔵してください。

その他、頻繁に使用する試薬の準備も無菌条件下で行ってください。

PBS（リン酸緩衝生理食塩水）

細胞の洗浄などに用います。通常、細胞培養用にはCa、Mgイオンが除かれているものを使用し、PBS(-)と記載されます。

トリプシン溶液（細胞分散用酵素溶液）

接着細胞の分散にはトリプシンまたは、トリプシン/EDTAによる処理が広く用いられています。メーカーや、種類により使用方法が異なることがありますので、それぞれの使用条件を確認した上で使用してください。

細胞染色液（生死判別用）

細胞計数盤を用いて細胞数を数える時に細胞の生存率を割り出すために、生細胞と死細胞を染め分けるのに使用します。

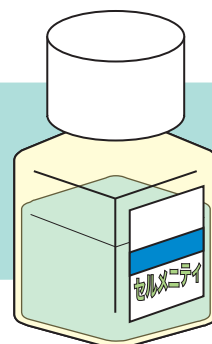
0.5%トリパンブルー溶液

0.02%エリスロシンB溶液 他

細胞凍結液、細胞凍結培地

自前での調製する場合と、市販品を用いる場合があります。

基本的には合成培地に牛胎児血清などの増殖因子を添加し、5~10%のDMSOを加えたものを使用します。また、安定した凍結保護作用を持つ優れた凍結保存液も市販されており、それらを利用する場合は各々の取扱説明書に従い調製して下さい。



細胞凍結保存溶液

4.4 血清の準備

多くの細胞培養では、血清を添加した培地を用います。主としてウシの血清が使われ、以下の3通りの選択があります。

- 1) 胎児血清 (FCSまたはFBS)
- 2) 新生児血清 (NBS)
- 3) 子牛血清 (CS)

どの血清を用いるかは、増殖支持と細胞障害などの要因を比較、検討して選択します。おおよその選択基準は以下の通りです。

増殖支持能力 (1>2>3)

細胞傷害性因子 (3>2>1)

また 同じメーカーの血清でもロット差があるので、目的の細胞に適しているかどうかを予めチェックする必要があります (各メーカーでロットチェック試験用の血清を用意しています)。一般的には血清の補体成分作用による細胞障害を阻止する目的で、非働化処理 (56℃・30分加熱) を行います。

1. 冷蔵保存されていた血清を溶かす



2. 恒温バスの温度を56℃に設定し、水温が設定温度に到達するのを確認する



3. 恒温バスに血清ボトルを入れ、血清が完全に溶けていることを確認する



4. 血清ボトルがしっかり浸かった状態で、30分放置する



5. 使用する容量を考慮して小分する

※ 非働化は必須ではなく、細胞によっては必要ないとの考えもありますので、事前に検討してください。

4.5 作業時の注意

作業の前にヒビテン (0.1~0.5%水溶液) などでよく手を洗います。クリーンベンチ内は、70%エタノールを用いてよく清拭してください。培養に使用する材料や器材も同様に、70%エタノールでよく拭いてからクリーンベンチ内に入れてください。

作業中は、無駄な会話や咳、くしゃみなどは厳禁です。また、クリーンベンチ外のものへの接触は可能な限り避けてください。触れた場合は70%エタノールを吹きかけてよく消毒してください。

基本的に、一度に扱う細胞は一種類とし、クロスコンタミネーションやエアロゾルによる汚染の拡散を予防してください。

※ ヒビテン消毒液は皮膚に対する刺激が少なく、残留して持続的な抗菌作用を発揮するため、手洗いなどに有効です。用途によってアルコールと使い分けると良いでしょう。

