よく解る 実験プロトコル

細胞培養 ver. 4.1

Cell Cultivation

01

細胞の水族館

nacalai tesque
The quality for certainty.

目次

基礎：実験を始める前に 4

培養細胞とは 4

培養環境 4

無菌操作と滅菌 5

エンドトキシン 7

培地 8

培養容器 12

継代培養 13

継代とは 13

細胞増殖曲線と継代のタイミング 13

コンフルエント 14

実験プロトコル（接着細胞の継代） 14

実験プロトコル（浮遊細胞の継代） 17

トラブルシューティング 19

細胞の増殖が遅い 19

細胞の生存率が低い 19

細胞の形態がおかしい 19

培地の色が黄色い 19

細胞が接着しない 19

細胞が凝集する 20

トリプシンで細胞が剥がれない 20

トリパンブルーによる細胞数測定 21

トリパンブルーについて 21

実験プロトコル 21

トラブルシューティング 24

トリパンブルーで染色される細胞が多い 24

再現性が悪い 24

色素が凝集したようなものが観察される 24

セルカウンターで測定できない 24

細胞の保存 25

細胞の保存方法 25

Cell Reservoir One 25

Cell Reservoir One（DMSO 含有 / 不含）を用いた緩慢凍結法 26

Cell Reservoir One（ガラス化法用）を用いたガラス化法 31

トラブルシューティング 34

凍結融解後に生細胞が存在しない、生存率が低い 34

Appendix 35

培地組成表 35

平衡塩類組成表 39

コンタミネーション 40

細菌 / カビ / 酵母のコンタミネーション 40

マイコプラズマのコンタミネーション 41

細胞剥離 / 分散用試薬　トリプシン - EDTA 溶液 43

トリプシンと EDTA 43

目次

細胞剥離 / 分散用試薬　Accutase および Accumax 44
Accutase および Accumax 44
実験プロトコル（Accutase による細胞剥離）..... 45
実験プロトコル（Accumax を用いた細胞凝集体の細胞数カウント）..... 46
実験プロトコル（Accumax によるスフェロイドの分散）..... 47
選択的抗生物質 48

QR コードで動画へアクセス！

動画アイコンを掲載しているプロトコルは、実験動画をご視聴いただけます。

▶ 実験のポイントが動画で解る！

実験操作は文章やイラストではイメージしにくいことも。動画では操作の **注意点** や **ポイント** も紹介しています。
動画は **短時間で視聴できる** ので、ちょっとした確認に最適です。

視聴方法

動画アイコン付きプロトコルの末尾に QR コードを掲載しています。
スマートフォンなどで読み取るか、PDF の場合はクリックすることでもアクセスいただけます。

基礎：実験を始める前に

細胞培養とは、生体組織から分離した細胞を培養液中で維持 / 増殖することです。生体外で培養している細胞のことを培養細胞と呼び、細胞を培養するために用いられる組織間液を模した液体を培地と呼びます。本プロトコルでは、動物細胞（哺乳動物細胞）の培養について説明します。

培養細胞とは

培養細胞は主に初代培養細胞（Primary cell）と株化培養細胞（Cell line）に分類されます。初代培養細胞は生体（組織や臓器を含む）から直接採取した細胞集団、株化培養細胞は初代培養細胞の継代に由来して得られ、安定に継代される一定の特性をもつ細胞集団です。株化培養細胞は主に不死化した細胞（Immortalized cell）のことを指し、幹細胞（Stem cell）などは区別して記載することもあります。
また、培養系の違いにより、培養容器に付着して培養される細胞を接着細胞（もしくは付着細胞）、培地中で浮遊して培養される細胞を浮遊細胞と呼びます。一般的に、生体内で存在していた状態を反映する場合が多く、生体内で組織を構成していた細胞は接着細胞として、血液中を流れていた細胞は浮遊細胞として培養されます。

■ 初代培養細胞と株化培養細胞の違い

	初代培養細胞（Primary cell）	株化培養細胞（Cell line）
由来	生体から直接採取、培養した細胞	初代培養細胞の継代に由来して得られ、安定に継代される細胞
特徴	• 寿命があり、無限の増殖、長期にわたる培養ができない • 由来組織の性質を比較的反映している • 細胞の調製や、培養に特殊な技術 / 培養液が必要となる場合がある	• ほぼ無限に増殖可能な不死化細胞 • 由来組織の性質が失われていることが多い • 一般的な基礎培地で培養できることが多く、入手も容易*
細胞例	初代培養肝細胞、初代培養神経細胞など	HeLa 細胞、CHO 細胞、HL-60 細胞など

＊以下の細胞供給機関から入手可能です。
国内：JCRB 細胞バンク、RIKEN BRC - 細胞材料開発室
海外：ATCC（American Type Culture Collection）、ECACC（European Collection of Authenticated Cell Culture）

培養環境

細胞培養を行うためには、細胞培養に適した実験室や実験機器 / 器具類を準備する必要があります。

■ 細胞培養を行う実験室

培養を行う実験室は、細胞の汚染を防ぐためにクリーンな環境である必要があり、通常の実験室とは区切られた空間の確保が望ましいとされています。一方、実験従事者や外部環境への生物由来有害物質の曝露を低減 / 排除する観点から、バイオセーフティーレベル（BSL）が策定されています。BSL の詳細な情報は、世界保健機関（WHO）「Laboratory biosafety manual, 4th edition」もしくは国立感染症研究所「病原体等安全管理規程（改訂第三版）」を参照ください。
また、似たような区分に物理的封じ込めレベル（P レベル）があります。これは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（通称カルタヘナ法）の「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」において、遺伝子組換え生物等に係る核酸供与体と宿主の実験分類が定められているものです。どちらもそのレベルが示す危険性や必要な設備はほぼ同様ですが、異なる考えから設定されており、かつ P レベルは法令で規定されているものであることに注意しましょう。

基礎：実験を始める前に

■ 細胞培養に必要な機器類

名称	備考
クリーンベンチ	無菌操作を行うための作業台です。遺伝子組換え実験を行う場合や取り扱う微生物 / 病原体によっては、作業者 / 環境 / サンプル / サンプル間の相互汚染を防ぐために安全キャビネットが必要となる場合もあります。
CO_2 インキュベーター	細胞を一定の温度（多くは 37°C）、CO_2 濃度（5 ～ 10%）で保つために使用し、CO_2 ボンベと併せて設置します。インキュベーター内の清掃 / 滅菌は定期的に実施してください。
顕微鏡	培養容器に入った状態で細胞の形態を観察できる倒立位相差顕微鏡を一般的に使用します。
遠心機	継代や培地交換など、細胞を回収する際に使用します。
恒温水槽	培地などをあらかじめ温めておくために使用します。主に 37°Cで使用しますが、血清の非働化のために 56°Cに設定できるものをお薦めします。
オートクレーブ	器具や液体試薬（熱に強いものに限る）の滅菌に使用します。
冷蔵 / 冷凍庫	培地やその他試薬類の保存に使用します。
超低温フリーザー / 液体窒素保存容器	凍結した細胞の保存に使用します。一般的に細胞の保存は -80°Cの超低温フリーザーで行いますが、より長期での保存は液体窒素中（-196°C）での保存が適しています。

無菌操作と滅菌

細胞培養において、培養を目的としている因子以外の生物学的因子の混入をコンタミネーションと呼び、細胞の増殖や機能、実験結果に影響を及ぼします。特に微生物のコンタミネーションが発生しやすく、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内での無菌操作や滅菌された試薬 / 器具が必須です。

≫ コンタミネーションについては p. 40 を参照してください。

■ 無菌操作

無菌操作場所

埃や飛沫、その他の浮遊粒子などエアロゾルによる汚染を低減させるため、無菌操作はクリーンベンチ / 安全キャビネット内で行います。以下にクリーンベンチ / 安全キャビネットの使い方および無菌操作場所のポイントを紹介します。

< クリーンベンチ / 安全キャビネットの使い方 >

操作前：クリーンベンチ / 安全キャビネットの循環ファンをあらかじめ少なくとも 5 分運転させます。また前回の作業で発生した粒子が汚染源となる可能性があるため、必要に応じて作業域の清浄化を行ってください。

操作中：クリーンベンチ / 安全キャビネット内に持ち込む器具類は 70% エタノールなどで消毒した後に持ち込むようにします。

操作後：無菌操作終了後は不要なものはクリーンベンチ / 安全キャビネットから取り出します。作業面および前面のガラスの内側を 70% エタノールなどで消毒し、汚染源の残留を低減します。また循環ファンを少なくとも 5 分運転させ、汚染空気がクリーンベンチ / 安全キャビネット内から取り除かれるようにしてください。循環ファンを停止後に前面シャッターを閉じ、殺菌灯を点灯することで、微生物的清浄度を維持しても構いません。

< 無菌操作場所のポイント >

- クリーンベンチ / 安全キャビネット内には不要なものは置かないようにしてください。気流が乱れ、また物陰ができるため殺菌灯の効果が十分に発揮されず、清浄な環境を得ることができません。
- 培地 / 試薬類をこぼした際はすぐに 70% エタノールなどで消毒します。そのまま放置すると微生物汚染の原因になります。
- 使用済みのピペットやチップ、廃液などは都度廃棄するようにしてください。
- クリーンベンチ / 安全キャビネットのフィルターの目詰まりにご注意ください。定期的に点検することをお薦めします。
- 無菌操作場所とは異なりますが、培地などを温めておく恒温水槽からのコンタミネーションは非常に多く見られます。恒温水槽は常に清潔に保ち、恒温水槽で温めておいた培地などは 70% エタノールなどで消毒した後に無菌操作場所へ持ち込むようにしてください。

基礎：実験を始める前に

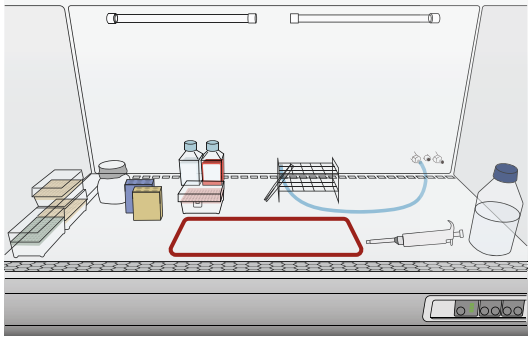
■ 無菌操作 つづき

無菌操作

無菌操作は微生物などの汚染を防ぐため、慎重かつ速やかに実施する必要があります。以下に無菌操作のポイントを紹介しますが、無菌操作は机上で学ぶよりもよりも実践して慣れることが重要です。
無菌操作を初めて行う場合や、コンタミネーションが発生した場合などは、熟練者の操作と比較したり、他者に自分の操作を確認してもらったりするなど、自分の無菌操作に問題がないか確認するようにしてください。

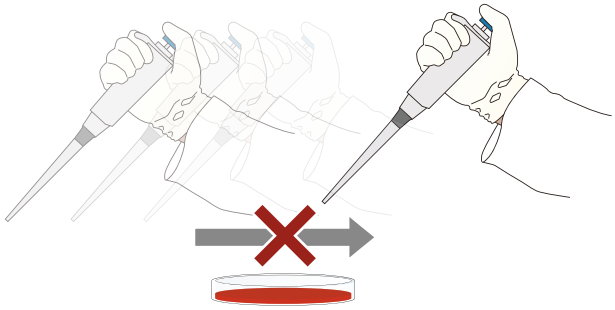
< 無菌操作のポイント >

- 操作前後は必ず手を洗います。また必要に応じて個人用防護具（手袋など）を着用してください。手洗い後および手袋装着後は、顔や髪の毛および清潔ではない実験台など汚染されたものに触れないように注意します。
- クリーンベンチ / 安全キャビネットの作業面の中でも、気流を乱さないように操作する必要があります。また、全てのサンプルは作業台の後部端側（ただし、後部スリットは防がないよう）に配置し、そのほかのかさばる物は左右片側に寄せて配置します。作業台の中央は操作の邪魔にならないように開けておきましょう。



の範囲で操作するよう心がけます。

- 浮遊粒子やエアロゾルによる培地や細胞への汚染を防ぐため、操作時にのみ試薬や培養容器の蓋を開け、その上を手が通らないようにします。



不必要に培地や細胞が入ったシャーレの上を手が通らないようにしましょう。

- シャーレやフラスコ、チューブ、ボトルなどの注ぎ口には手やピペット、チップの先が触れないようにします。
- 汚染を最小限に抑えるため実験の準備は十分に行い、培地など試薬は、ボトルなどから遠沈管などに必要量分注してから使用します。
- 無菌操作実施者もしくは無菌操作をしている近くで、会話など粒子を発生させたり気流を乱したりする恐れのある不要な動作は避けます。
- 長期休暇前や、研究員の入れ替わり時期、業務過多時など通常と異なる状態での操作は、予期せぬエラーを引き起こします。このような時の無菌操作は避けるもしくは細心の注意を払って実施するようにしてください。

＼動画はこちら！／

細胞培養の基本

詳しい製品情報は e-Nacalai *Search Version* (https://www.e-nacalai.jp/) で製品番号を入力し、検索してください。

基礎：実験を始める前に

■ 滅菌方法

名称	方法	対象物
オートクレーブ滅菌	高温 / 高圧の水蒸気を直接接触させて滅菌する方法です。一般的に、2 気圧、121℃、15 ～ 20 分の条件で実施されます。	• ガラス、耐熱性プラスチック製器具や熱変性しない塩類溶液など
乾熱滅菌法	一般的に、160～170℃、120 分または 180～190℃、30 分の条件で実施されます。	• 高温に耐え、直接蒸気に触れてはいけないもの • ガラス製ピペット、ディッシュ、炭酸ガスインキュベーターの棚、トレイなど
ろ過滅菌法	滅菌済メンブレンフィルターでろ過して滅菌する方法です。0.2 μm のフィルターでろ過することで、細菌、カビ、酵母などは除去できますが、ウイルスやマイコプラズマの一部は除去できません。	• 熱に不安定な成分を含む培地など

i 備考 このほか、エチレンオキシドガス滅菌、紫外線滅菌なども利用されます。
また、細胞培養用として滅菌済の試薬や滅菌済ディスポタイプの器具（ピペット、フラスコなど）も多く使用されます。

エンドトキシン

エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞壁の構成成分であるリポ多糖類であり、さまざまな生物活性を有する物質です。そのため、エンドトキシンが混入すると、各種サイトカインの産生や補体活性化などを誘導します。耐熱性が高く、失活には 250℃、30 分以上の乾熱滅菌が必要であり、一般的なオートクレーブ滅菌では、菌体が滅菌された後もエンドトキシン活性は残存してしまいます。エンドトキシン混入のリスクを低減 / 回避するために、以下のエンドトキシン発生源に注意を払うことが重要です。

■ 主なエンドトキシンの発生源とリスク回避方法

発生源	備考
水	培地や緩衝液類、細胞培養試薬の溶解などに使用する「水」はエンドトキシンの発生源となり得ます。エンドトキシン濃度が保証された水を購入する、もしくは純水製造装置の最終フィルターにエンドトキシンを除去できるフィルターを用いることで、混入のリスクを低減することが可能です。
細胞培養試薬	血清やトリプシンなどの生物由来物質や大腸菌由来遺伝子組換えタンパク質などを使用する場合は注意が必要です。エンドトキシン濃度が保証された製品の購入をお薦めします。
実験器具類	あらかじめエンドトキシンフリー｛多くは［Pyrogen（パイロジェン：発熱物質）フリー］と記載｝の製品を使用します。もしくは乾熱滅菌（250℃、30 分以上）した器具類を使用します。
作業者	ヒトの皮膚や毛髪、唾液には細菌が存在しており、これらがエンドトキシンの発生源となる場合があります。培養を行う場合は、エンドトキシンの持ち込みを最小限に抑えるため、正しく無菌操作を行ってください。

基礎：実験を始める前に

培地

培地は、動物細胞、植物、微生物などの培養において、対象の生育に必要な環境を与える固体または液体の物質のことです。本プロトコルにおいて、培地は動物細胞培養用の培地のことを指します。培地は細胞の維持 / 増殖に必要な栄養素、成長因子、ホルモンなどを供給し、また pH や浸透圧など培養に適当な環境を整えるといった役割を担っています。また一般的には、5 ～ 20% の動物血清を増殖促進成分として添加して使用します。血清は高価、ロット間差が著しく再現性が悪い、マイコプラズマなどの汚染の危険性が高い、などの理由から、これらを解決するために無血清培地や血清代替物が開発され市販されています。

■ 基礎培地

使用する培地は、細胞を譲受 / 購入する際に併せて提供される情報や論文などを基に選択します。
以下に、一般的に使用される基礎培地を紹介します。

一般的に使用される基礎培地

名称	備考
MEM	Eagle がマウス L 細胞や HeLa 細胞でアミノ酸、ビタミン、糖、無機塩類などの栄養要求性を調べて開発しました。最小必要量のアミノ酸しか含まれていないため、アミノ酸要求性の高い細胞などには、MEM 用必須アミノ酸、MEM 用非必須アミノ酸などの補助培地を別途添加して使用します。
α-MEM	1971 年に Stanners らが MEM を改変し、マウスとハムスターの融合細胞の培養に用いました。α-MEM は MEM の処方を基に、ビタミン、非必須アミノ酸、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシドなどを含有しています。
DMEM	1959 年に Dulbecco らが MEM を改変し、マウス胎児細胞の培養に用いました。MEM の処方と比べ、アミノ酸やビタミンなどが増量されています。Dulbecco は 1975 年にノーベル生理学・医学賞を受賞しました。接着細胞に幅広く使用されています。
IMDM	Iscove らが DMEM を改変した培地です。DMEM の処方を基に、セレン、アミノ酸、ビタミンが追加され、ピルビン酸、HEPES を含み、硝酸鉄の代わりに硝酸カリウムを含有しています。増殖の速い細胞の培養に多く使用されます。
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute（RPMI) で McCoy's 5A を基に開発された培地です。改良が加えられる度に 1629、1630、1634 と付番されました。カルシウム、マグネシウム量が少なく、リン酸、イノシトールが多いのが特徴で、浮遊細胞の培養に多く使用されます。
Ham's F-12	1965 年に Ham が、F-10 培地を CHO 細胞が効率よくコロニーを形成する培地に改良したものです。
DMEM/Ham's F-12	DMEM と Ham's F-12 が 1 : 1 で混合された培地です。線維芽細胞の培養などに使用されます。

基礎：実験を始める前に

■ 基礎培地 つづき

同じ名前の培地でも、特定の成分の含有 / 不含や含有量が異なるなど、さまざまなタイプの培地が存在します。以下にポイントとなる成分を紹介します。

培地組成のポイントとなる成分

名称	備考
グルコース	グルコースは細胞にとって維持 / 増殖するための栄養素です。DMEM では一般的に High（4500 mg/L）、Low（1000 mg/L）、不含のタイプがあります。グルコース濃縮液なども市販されており、グルコースを含有しない培地と共に使用することで、任意のグルコース濃度に調整することも可能です。
グルタミン	L- グルタミンは非必須アミノ酸ですが、細胞分裂時の補助的なエネルギー源や、タンパク質および核酸合成のための窒素源として使用され、細胞培養に不可欠な成分の１つです。そのため、細胞培養においては「必須アミノ酸」と称されることもあります。液体培地中では分解されやすいため、L- グルタミン濃度の影響を強く受ける細胞を培養する際は、L- グルタミン不含培地に L- グルタミンを都度添加し使用する場合があります。また、L- グルタミンよりも安定である L- アラニル -L- グルタミンを用いる場合もあります。
炭酸水素ナトリウム HEPES	炭酸水素ナトリウムおよび HEPES は培地の pH を調整するために使用します。CO_2 インキュベーター内の二酸化炭素と培地中の炭酸水素ナトリウムにより培地の pH を維持することが可能です。しかし、インキュベーター外で長時間細胞を扱う場合、CO_2 が不足し細胞の至適 pH を維持することができません。その場合、HEPES を含む培地を用いることで、pH を維持することができます。
フェノールレッド	pH 指示薬として使用します。フェノールレッドは酸性で黄色、中性で赤色、アルカリ性で赤紫色に呈色します。細胞が増殖しすぎると、その代謝物により培地は酸性に傾くため、フェノールレッド含有培地の場合、培地の色を確認することで細胞の状態を知ることが可能です。またコンタミネーションにより細菌が増殖した場合も、同様に酸性に傾くため培地は黄色に変色します。一方で、フェノールレッドは女性ホルモンの 1 つであるエストロゲンに類似した作用があるため、このようなホルモンに影響を受けやすい細胞（MCF-7 など）を用いる場合は注意が必要です。
ピルビン酸ナトリウム	ピルビン酸ナトリウムはグルコースと異なる炭素源として用いられます。解糖系を経由せずに、TCA 回路を介して代謝されます。また、抗酸化剤として添加される場合もあります。原処方で含有している培地もありますが（Leibovitz L-15 培地など）、特定の細胞や実験系において添加して用いることもあります。

基礎：実験を始める前に

■ 血清と無血清培地

血清とは、血液を凝固させてその上清を採取したものです。血清には培地サプリメントだけでは補えないさまざまな細胞増殖促進物質、細胞傷害保護因子、栄養因子などの成分が含まれており、基礎培地に血清を 5 ～ 20% 添加して培養に用いることが一般的です。血清にはウシ胎児血清（FBS）、新生仔ウシ血清（NBCS）、ウマ血清（HS）などがありますが、FBS が多く使用されています。
血清は必要に応じて使用前に加温し、細胞傷害活性のある補体成分を不活性化します。この処理を血清の非働化といいます。また、血清にはロット間差があり対象細胞に最適な血清を選択するため、予備実験としてロットチェックを行います。
無血清培地や血清代替物を使用する場合もあります。無血清培地とは、無血清でも培養が可能な成分で構成された培地です。さまざまな成分を含む血清を使用しないため、正確な細胞応答 / 作用機構の解明、タンパク質や生理活性因子の精製に利用されます。また、臨床応用などを見据え、対象種以外の因子の汚染を防ぐ目的で使用される場合もあります。

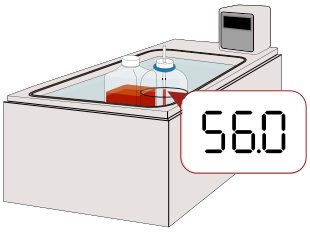
■ 実験プロトコル（血清の非働化）

① 凍結した血清を解凍します。

i 備考 4°Cで一晩から一日かけてゆっくりと解凍、もしくは室温で解凍させます。

② 解凍した血清を 56°Cの恒温水槽に入れ、血清が 56°Cになるまで加温します。

i 備考 冷凍庫から取り出した血清をすぐに 56°Cの恒温水槽に入れると容器が割れる可能性があるため、必ず解凍させてから加温するようにしてください。



③ さらに 30 分加温処理をします。

④ 滅菌済みの遠沈管などの容器に、適量分注します。

⑤ -20°Cで凍結保存します。

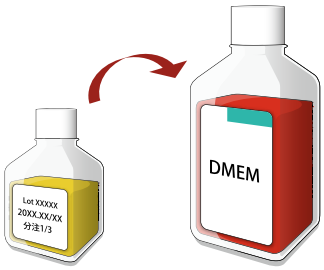
基礎：実験を始める前に

■ 実験プロトコル（培地の準備）

10% FBS 含有培地を準備します。

① 培地 500 mL に FBS 55 mL を添加します。

≫ 培地については p. 8 および p. 35（Appendix 培地組成表）を参照してください。



② L- グルタミン不含培地の場合、L- グルタミン溶液（製品番号：16948-04）もしくは L- アラニル -L- グルタミン溶液（製品番号：04260-64）を使用前に必要量添加します。培地の種類によって L- グルタミンの最終濃度は異なります。以下の表に従い、添加してください。

i 備考 L- アラニル -L- グルタミンは熱に安定で分解されにくいため、L- グルタミンに比べて、細胞増殖に必要なグルタミンを安定して供給することができます。一般的には L- グルタミンと同モル濃度で使用します。

各基礎培地に対する 200 mM L- グルタミン（または L- アラニル -L- グルタミン）溶液の添加量

培地	L-Gln 最終濃度	200 mM 溶液添加量（培地 500 mL あたり）	製品番号（弊社 L-Gln 不含培地）
DMEM	584 mg/L（4 mM）	10 mL	08488, 08489, 08490, 11584, 11585, 16972
Ham's F-12	146 mg/L（1 mM）	2.5 mL	—
DMEM/Ham's F-12	365 mg/L（2.5 mM）	6.25 mL	11583
MEM	292 mg/L（2 mM）	5 mL	—
α-MEM	292 mg/L（2 mM）	5 mL	—
IMDM	584 mg/L（4 mM）	10 mL	—
G-MEM	292 mg/L（2 mM）	5 mL	—
RPMI 1640	300 mg/L（2 mM）	5 mL	05176

③ 必要に応じて、抗生物質 / 抗真菌剤を添加します。

製品名	製品番号	推奨添加量（培地 500 mL あたり）
Penicillin-Streptomycin Mixed Solution Penicillin 5,000 u/ml, Streptomycin 5,000 μg/ml	26252-94	10 mL
Penicillin-Streptomycin Mixed Solution Penicillin 10,000 u/ml, Streptomycin 10,000 μg/ml	26253-84	5 mL
Penicillin-Streptomycin Mixed Solution(Stabilized) Penicillin 10,000 u/ml, Streptomycin 10,000 μg/ml	09367-34	5 mL
Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution(100x)	02892-54	5 mL
Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution(100x)(Stabilized)	09366-44	5 mL
Gentamicin Sulfate Solution(10mg/ml)	16672-04	2.5 mL
Gentamicin Sulfate Solution(50mg/ml)	11980-14	0.5 mL

≫ 抗生物質 / 抗真菌剤については p. 40 を参照してください。

④ 使用前に必要に応じて分注し、室温に戻す（または 37°Cに温める）など適した状態にしてから用います。

基礎：実験を始める前に

培養容器

細胞培養で使用される容器は全て滅菌済みのものを使用します。以下に広く使用されている培養容器を紹介します。

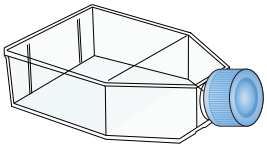
ペトリディッシュ（シャーレ）

さまざまな大きさがあり、培養スケールにより選択します。底面の一部がガラス製であるガラスボトムディッシュもあり、免疫染色後の顕微鏡観察に適しています。

種類（数値は直径）	培養面積
35 mm	約　9 cm^2
60 mm	約　21 cm^2
100 mm	約　57 cm^2
150 mm	約 145 cm^2

メーカーにより種類や培養面積は異なります。

培養フラスコ（T-フラスコ）

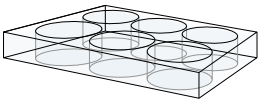


ペトリディッシュと同様にさまざまな大きさがあり、培養スケールにより選択します。T-25、T-75 と表現されることが多く、25 や 75 などの数字は培養面積を指しています。蓋にはフィルターなしとフィルター付きのものがあり、フィルターなしの場合はガス交換ができるよう培養中は蓋を緩めて使用します。一方、フィルター付きの場合は緩めることなく使用できます。

種類	培養面積
T-25	25 cm^2
T-75	75 cm^2
T-175	175 cm^2
T-225	225 cm^2

メーカーにより種類は異なります。

培養マルチウェルプレート

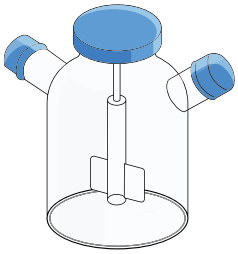


通常のウェルは底がフラットな形状ですが、ラウンド型や V 字型のものもあります。また、蛍光や発光での検出が行えるように底は透明、壁面が白色や黒色のプレートもあります。

種類	培養面積
6 ウェル	約 9.6 cm^2/well
12 ウェル	約 3.5 cm^2/well
24 ウェル	約 1.9 cm^2/well
48 ウェル	約 1.1 cm^2/well

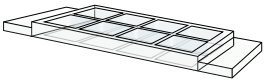
メーカーにより種類や培養面積は異なります。

スピナーフラスコ



浮遊培養したい場合に使用します。

チャンバースライド



スライドガラス上での培養時に使用し、2 ～ 8 ウェルのものが主流です。免疫染色後の顕微鏡観察に適しています。

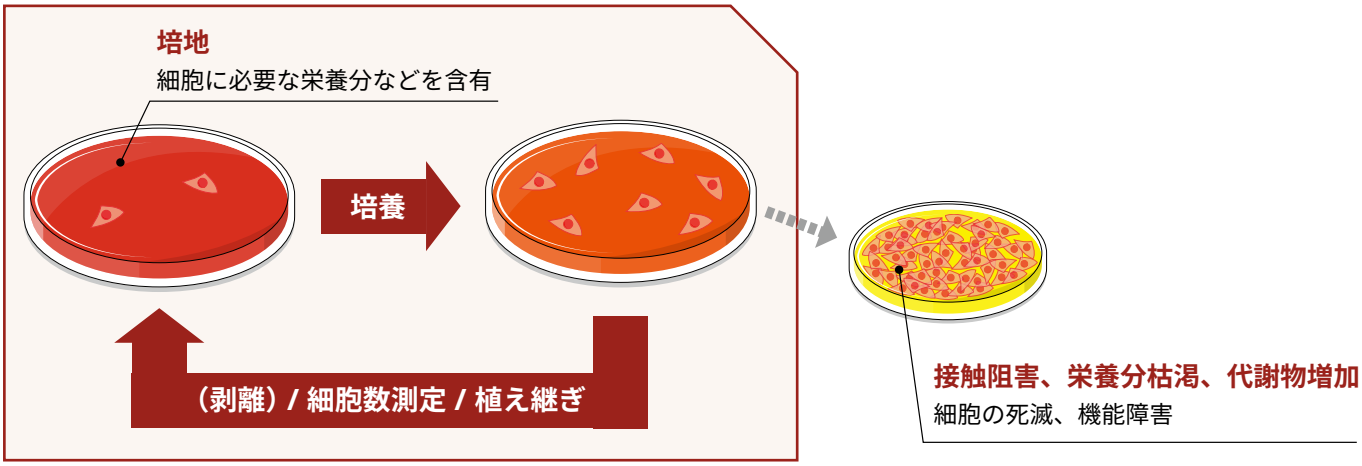
継代培養

培養細胞を用いた実験を成功させるためには、正しく培養細胞を維持 / 増殖させる必要があります。本項では、主に株化培養細胞の培養方法について説明します。

継代とは

細胞を培養する上で、細胞が増殖し培養容器内で細胞密度が飽和した場合は、細胞同士が接触することで増殖が停止する接触阻害(接触阻止)が発生したり、栄養分の枯渇や細胞の代謝物により細胞が死滅したりします。そのような状態に達する前に新たな培地と培養容器に移し替える必要があります。これを継代と呼びます。
本プロトコルでは株化培養細胞(接着細胞および浮遊細胞)における継代方法について説明します。

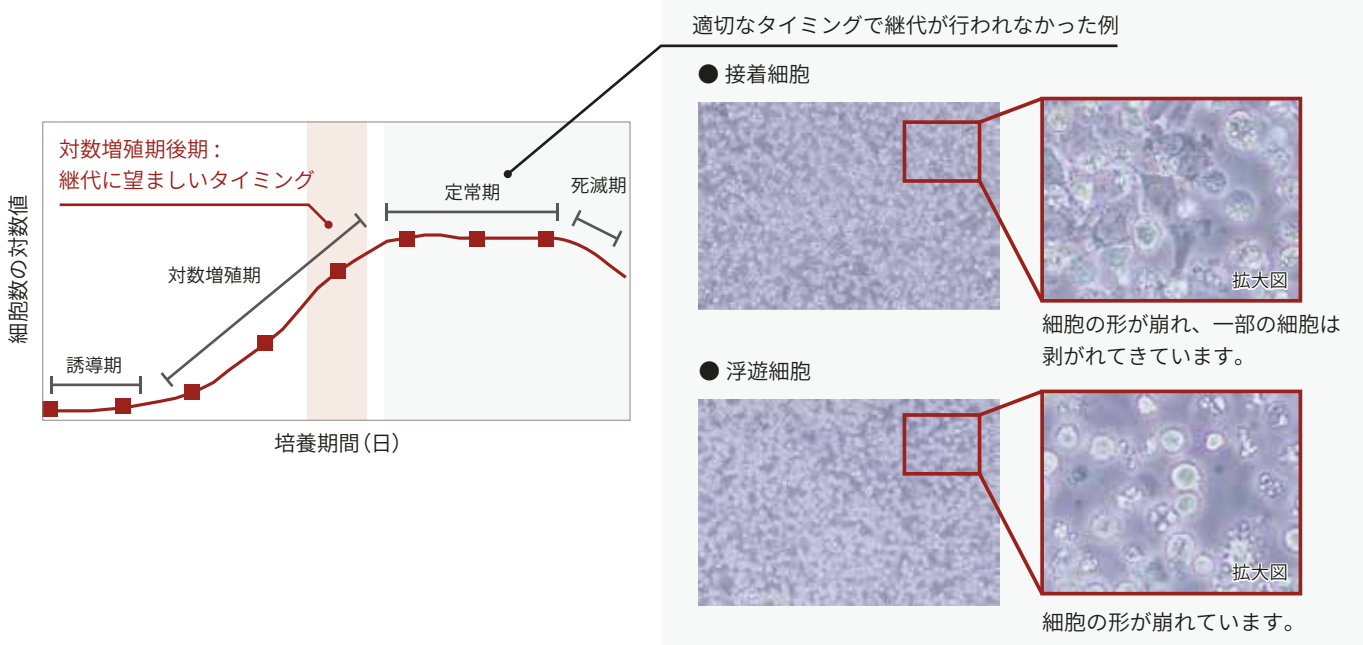
継代培養のワークフロー



細胞増殖曲線と継代のタイミング

一般的に、培養細胞の細胞数を経時的にプロットすると以下のグラフのような増殖曲線を描きます。播種後最初の期間は誘導期と呼ばれ、培養環境への適応など細胞増殖のための準備期間です。次に細胞が指数関数的に増殖する対数増殖期と呼ばれる期間があります。その後、培地中の栄養分枯渇などにより、細胞増殖が大幅に抑制もしくは停止します。これを定常期と呼びます。最後に、死細胞の増加により、細胞数が減少する死滅期があります。継代のタイミングとしては、対数増殖期の後期に行うことが望ましいとされています。

細胞の増殖曲線と継代のタイミング



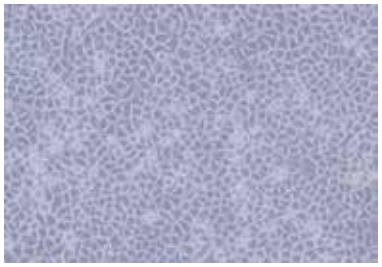
継代培養

コンフルエント

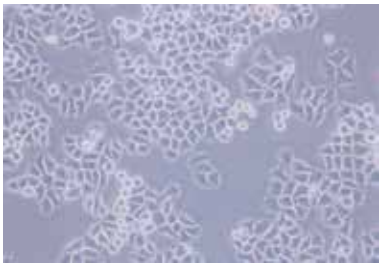
コンフルエントとは、細胞が培養可能領域を完全に占領し飽和している状態のことをいいます。また、培養可能領域を細胞が占めている割合を XX% コンフルエントと表現し、例えば培養可能領域の 70% を細胞が占有している状態を 70% コンフルエントと表現します。特に接着細胞の培養で用いられることが多く、「70% コンフルエントのタイミングで継代する」といったような表現がしばしば用いられます。
コンフルエント（100% コンフルエント）になると、細胞同士が接触することで増殖が停止する接触阻害が発生し、継代後の増殖能低下につながります。

接着細胞におけるコンフルエント

コンフルエント
（100% コンフルエント）



70% コンフルエント



実験プロトコル（接着細胞の継代）

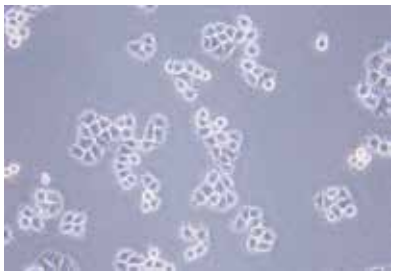
接着細胞は培養容器に付着しており、細胞同士も接着しているため、継代の際には剥離 / 分散操作を行います。

① 顕微鏡観察により、適切な継代のタイミングであることを確認します。

備考 細胞種によって、適切な継代のタイミングは異なる場合があります。

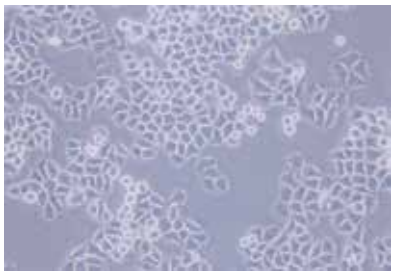
例）HeLa 細胞

20 ～ 30% コンフルエント



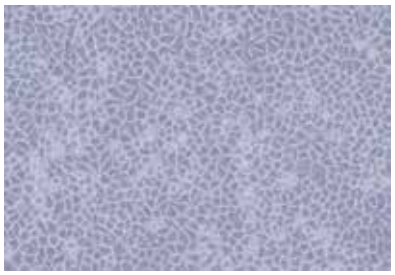
継代にはまだ早い状態です。必要に応じて培地のみ交換します。

70 ～ 80% コンフルエント



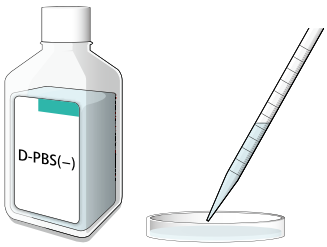
継代する適切なタイミングです。

100% コンフルエント



コンフルエントに達しています。このような状態になる前に継代しましょう。

② 培養容器から培地をアスピレーターで除去します。D-PBS(-)（製品番号：14249-95）を容器の壁に沿って静かに加え、細胞を洗浄後、D-PBS を除去します。



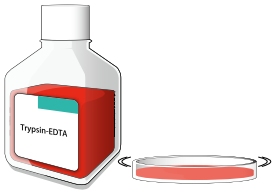
継代培養

③ トリプシン-EDTA 溶液(製品番号：32777-44)を適量添加し、培養容器全体になじませます。

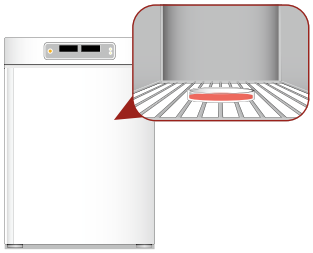
i 備考 トリプシンは、細胞 - 細胞もしくは細胞 - 培養容器間の接着に関与するタンパク質を分解します。EDTA はトリプシン活性を阻害するカルシウムイオンやマグネシウムイオンをキレートすることで、トリプシンの活性を保持します。

トリプシン / EDTA 濃度が異なる製品やトリプシンよりも温和な剥離作用を有する製品など、さまざまな製品をラインアップしています。

≫ 詳細については p. 43 および p. 44 を参照してください。



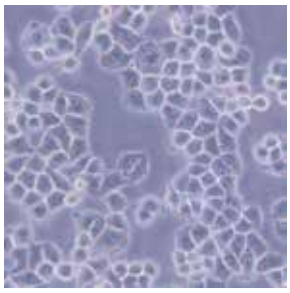
④ 37℃、5% CO_2 インキュベーターで静置します。



⑤ 顕微鏡で観察し、細胞の形が丸くなり、剥離し始めたことを確認します。

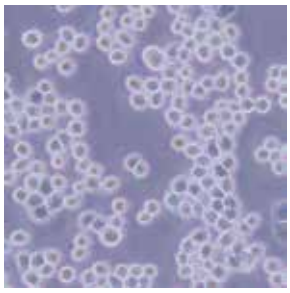
! 注意 トリプシン- EDTA 溶液との反応時間の目安は 3 ～ 5 分程度です。長時間の反応は細胞にダメージを与えるため注意してください。

添加前



トリプシン- EDTA 添加
5 分後

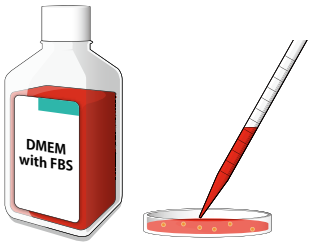
添加後



細胞の形が丸くなっています。

⑥ 培養容器の側面を軽くたたき、細胞を完全に剥離させます。その後、添加したトリプシン- EDTA 溶液の 5 ～ 10 倍量の血清含有培地を添加し、穏やかにピペッティングを行い、単一細胞にします。

i 備考 血清にはプロテアーゼ阻害物質が存在するので、血清含有培地を添加することにより、トリプシンの作用を停止することができます。無血清培地を使用している場合はトリプシンインヒビターを使用してください。

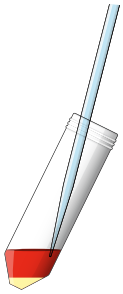


継代培養

⑦ 遠沈管に移します。

⑧ 180 × g、５分の条件で遠心分離し、上清を除去します。

i 備考 細胞種により適切な遠心条件は異なります。180 × g で 3 ～ 10 分を目安に適宜調整してください。



⑨ 培地を細胞ペレットに適量添加し、穏やかにピペッティングを行い、細胞を分散させます。

⑩ 細胞数をカウントします。

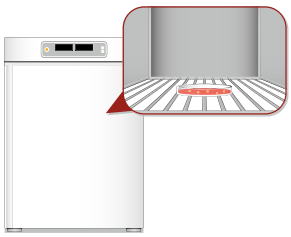
≫ トリパンブルーによる細胞数測定については p. 21 を参照してください。

⑪ 細胞懸濁液を培地で希釈し、適切な細胞密度に調整後、新しい培養容器に播種します。

i 備考 継代に適した細胞密度は細胞株入手元の情報を参考にしてください。

⑫ 37°C、5% CO_2 インキュベーターで培養します。

i 備考 一般的に動物細胞では 37°C、5% CO_2 条件で培養されることが多いですが、細胞種や目的によって異なる条件で培養することもあります。



＼動画はこちら！／

トリプシンを用いた
接着細胞の継代

継代培養

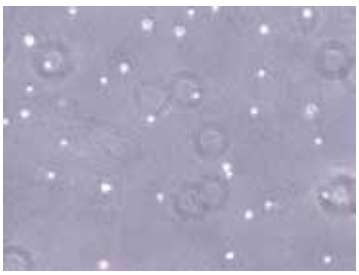
実験プロトコル（浮遊細胞の継代）

浮遊細胞では剥離操作は不要です。

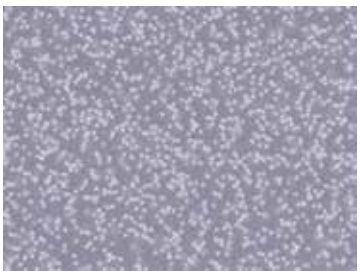
① 顕微鏡観察もしくはセルカウントにより適切な継代のタイミングであることを確認します。

i 備考 適切な継代のタイミングは、細胞株入手元の情報を参考にしてください。細胞種にもよりますが、浮遊細胞では 2×10^4 ～ 5×10^5 cells/mL の密度で播種され、2×10^6 cells/mL まで培養することができます。

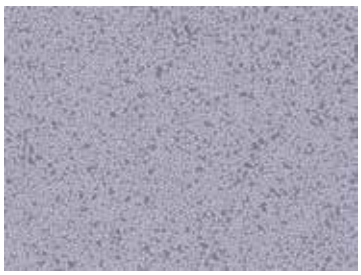
例）Jurkat 細胞



継代にはまだ早い状態です。必要に応じて培地のみ交換します。

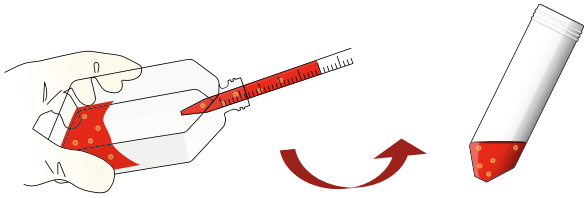


継代する適切なタイミングです。



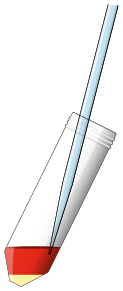
細胞が飽和しています。このような状態になる前に継代しましょう。

② 培養液を穏やかにピペッティングし、細胞を分散させ、遠沈管に移します。



③ 180 × g、5 分の条件で遠心分離し、上清を除去します。

i 備考 細胞種により適切な遠心条件は異なります。180 × g で 3 ～ 10 分を目安に適宜調整してください。



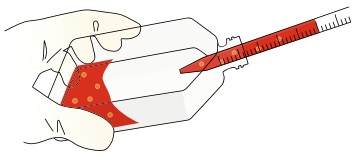
④ 培地を細胞ペレットに適量添加し、穏やかにピペッティングを行い、細胞を分散させます。

⑤ 細胞数をカウントします。

≫ トリパンブルーによる細胞数測定については p. 21 を参照してください。

⑥ 細胞懸濁液を培地で希釈し、適切な細胞密度に調整後、新しい培養容器に播種します。

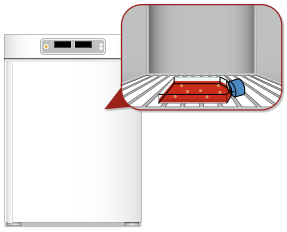
i 備考 継代に適した細胞密度は細胞株入手元の情報を参考にしてください。細胞種にもよりますが、浮遊細胞では 2×10^4 ～ 5×10^5 cells/mL の密度で播種されることが一般的です。



継代培養

⑦ 37℃、5% CO_2 インキュベーターで培養します。

i 備考 一般的に動物細胞では 37℃、5% CO_2 条件で培養されることが多いですが、細胞種や目的によって異なる条件で培養することもあります。



＼動画はこちら！／

浮遊細胞の継代

継代培養

トラブルシューティング

細胞の増殖が遅い

原因	解決策
培地が不適切	細胞の供給元が推奨する培地を使用してください。同じ培地名でもグルコース不含や含有量など組成が異なる場合があります。培地組成表を確認するようにしてください。
血清のロット間差	血清のロットにより増殖が遅くなる場合があります。血清を購入する際は、あらかじめロットチェックを行うことをお薦めします。
細胞の継代数が多い	継代数が増えるにつれて、増殖が遅くなる場合があります。継代数の少ない細胞を使用してください。
マイコプラズマによる汚染	マイコプラズマにより汚染した場合、増殖が遅くなる場合があります。マイコプラズマの確認 / 除去を行ってください(p. 41)。

細胞の生存率が低い

原因	解決策
培地が不適切	細胞の供給元が推奨する培地を使用してください。また、正しく培地が準備されているか(浸透圧や pH など)を確認してください。
剥離操作、剥離液が不適切	剥離操作や剥離液の組成が不適切、剥離液との反応時間が長いといった場合、細胞が傷害を受け、生存率が低下します。剥離操作、剥離液組成を確認してください。
細胞密度が高い状態で長時間維持した	細胞密度が高い状態で長時間培養すると細胞が傷害を受ける場合があります。適切なタイミングで継代を行ってください。

細胞の形態がおかしい

原因	解決策
細胞の継代数が多い	継代数が増えるにつれて、異常な形態の細胞が見られるようになります。継代数の少ない細胞を使用してください。
コンフルエントに達した後も培養を継続した	コンフルエントに達した場合、増殖できる空間がないため、細胞の形態が崩れる場合があります。適切なタイミングで継代を行ってください。

培地の色が黄色い

原因	解決策
細胞が増殖しすぎた	細胞の増殖に伴い、代謝物により培地が酸性に傾き、フェノールレッド含有培地は黄色くなります。適切なタイミングで継代を行ってください。
コンタミネーションしている	細菌のコンタミネーションにより、培地が黄色くなります。細胞は廃棄してください。

細胞が接着しない

原因	解決策
トリプシンなどの剥離液が残存している	トリプシンなどの剥離液が残存している可能性があります。トリプシンなどの剥離液は、不活性化した後、遠心分離により十分に取り除くようにしてください。
培養容器が不適切	細胞培養用の培養容器を使用してください。
コーティングが不適切	細胞によってはコーティングが必要となる場合があります。細胞の供給元が提供する情報を基に適切なコーティングを行ってください。

継代培養

細胞が凝集する

原因	解決策
継代操作や剥離条件などが不適切	継代操作や細胞の剥離条件が不適切な場合、細胞が傷害を受け、漏出した DNA により細胞が凝集することがあります。滅菌した DNase（1 mg/mL 水溶液）を添加することにより改善します。また、継代操作や剥離条件などを確認してください。
細胞密度が高い状態で長時間維持した	細胞密度が高い状態で長時間培養することにより凝集する場合があります。適切なタイミングで継代を行ってください。
遠心条件が不適切	強い遠心力をかけて遠心分離した場合、細胞が分散しづらくなる場合があります。適切な遠心条件を確認してください。

トリプシンで細胞が剥がれない

原因	解決策
血清などの除去が不十分	血清やトリプシンインヒビターが残存していると、トリプシンの作用が弱まります。トリプシン処理をする前は PBS などで細胞を洗浄してください。
トリプシン濃度が不適切	トリプシン濃度および EDTA 濃度が異なる製品が市販されています。製品のスペックを確認してください。
トリプシンの力価が低下している	トリプシンは温度や凍結融解により力価が低下します。新しいものを使用してください。
トリプシンの処理時間が短い	トリプシンの処理時間を延長することで、細胞はより剥がれやすくなります。ただし、細胞へのダメージも踏まえ、長時間の処理には注意が必要です。
トリプシン処理の温度が低い	トリプシン処理は 37℃で実施してください。
コンフルエントに達した後も培養を継続した	コンフルエントに達した後も培養を継続した細胞では、細胞と細胞の接合が強くなり、トリプシンが細胞と基質（培養容器）の接合へ反応できない場合があります。適切なタイミングで継代を行ってください。

トリパンブルーによる細胞数測定

細胞の継代や凍結保存時、また細胞を用いた解析を行う場合、細胞数を把握しておくことは再現性や正確性を担保するために極めて重要です。本項ではトリパンブルーを用いたセルカウントの方法を紹介します。

トリパンブルーについて

トリパンブルーはタンパク質に強く結合するアゾ色素の１つです。細胞膜に傷害を受けている細胞（死細胞）はトリパンブルーを細胞内に透過させ、また細胞外へ排出することもできないため、青く染まります。この特性により、死細胞と生細胞を区別して細胞数をカウントすることができ、細胞数の把握と同時に、細胞の生存率も確認することができます。簡易かつ安価に細胞数のカウントおよび生死判定ができるため、一般的に利用されていますが、トリパンブルーは、細胞毒性が強いという欠点があり、染色時間が長くなると生細胞まで青く染めてしまいます。そのため、手技によって生死判定に差が生まれるなどの問題もあります。また、目視で確認するため、多検体のカウントには不向きです。そのため、薬物による細胞毒性の確認などには、生細胞や死細胞の指標となる代謝生成物の量や酵素活性、細胞内物質の細胞外への漏出量などにより間接的に細胞数や状態を測定する方法が一般的に用いられます。

実験プロトコル

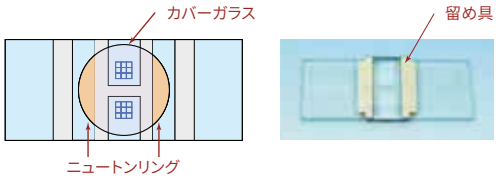
本プロトコルでは、ビルケルチュルク型の血球計算盤を使用した例を示しています。

① 血球計算盤を準備します。

血球計算盤およびカバーガラスをエタノールで洗浄し、キムワイプなどに押し付けるようにして拭います。
血球計算盤にカバーガラスを載せ、軽く擦り合わせてニュートンリングができるように圧着します（留め具で固定しても構いません）。

備考 血球計算盤の代わりに、自動細胞数測定装置を用いることもできます。

血球計算盤の計算室およびその周辺は擦らないようにしてください。傷がつき、正確なカウントができなくなります。ニュートンリングが現れない場合は、汚れが付着している可能性があります。再度、消毒用エタノールなどで拭き取ります。汚れが付着した状態での実施は、計算室の容積に誤差が生じるほか、液漏れの原因にもなり、正確なカウントができなくなります。



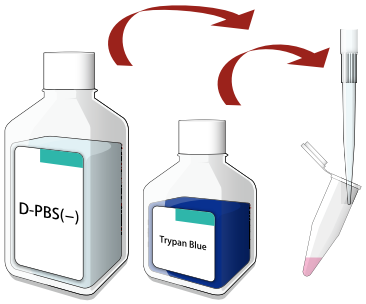
キムワイプは Kimberly-Clark Worldwide, Inc. の登録商標です。

② マイクロチューブに細胞懸濁液を適量分取します。

トリパンブルーによる細胞数測定

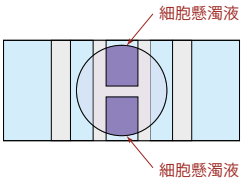
③ 必要に応じて分取した細胞懸濁液を D-PBS(-) で希釈します。希釈した細胞懸濁液とトリパンブルー溶液（製品番号：20577-34）を容量比 1：1 でピペッティングなどで穏やかに混合します。

i 備考 細胞密度に応じて、希釈倍率を決定してください。



④ トリパンブルー溶液を添加した細胞懸濁液をマイクロピペットなどを使用して、準備しておいた血球計算盤とカバーガラスの間に注入します。

! 注意 注入時は、液を入れすぎないよう（10 μL 程度あれば十分）、また気泡が入らないよう注意してください。

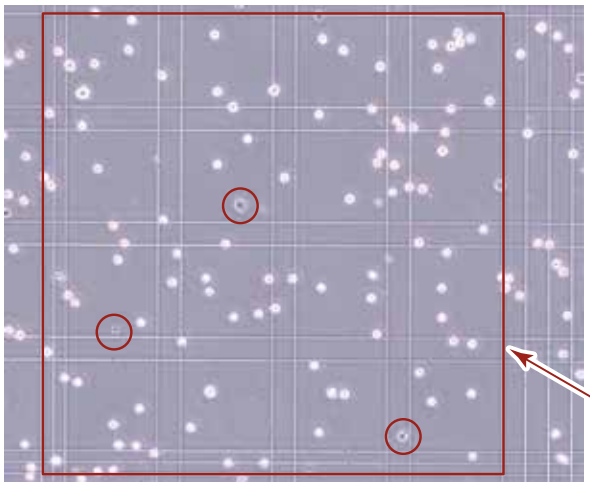


⑤ 顕微鏡下で観察し、血球計算盤の四隅の区画（範囲 1 mm^2 区画）の細胞数を数えます。白く光っているように見える細胞が生細胞、青く染まっている細胞（○）が死細胞です。血球計算盤の線上にある細胞は、相対する辺のいずれか一方の線上にある細胞のみ数えます。あらかじめ、どちらの辺を数えるか（例えば上側と右側を数える）を決めておきます。

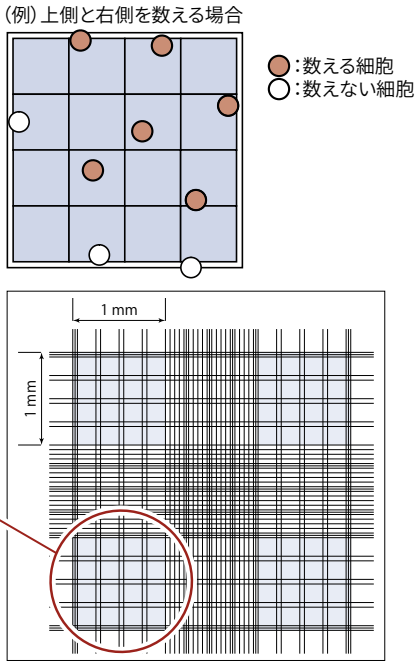
i 備考 染色時間が長くなると生細胞も色素を取り込み始めます。そのため、トリパンブルーの添加から計数終了までは概ね 5 分以内に行ってください。

1 区画当たりの数える細胞数は 50 ～ 100 個程度が妥当です。細胞数が少なすぎる場合は計数に誤差が生じやすく、細胞数が多すぎる場合は計数に時間を要することから、結果の信頼性が担保できません。希釈倍率の再検討をお薦めします。

総細胞数や細胞の生存率を求める場合は、生細胞と死細胞をそれぞれ数えてください。



（例）上側と右側を数える場合



血球計算盤（ビルケルチュルク型）

トリパンブルーによる細胞数測定

⑥ 以下のように細胞密度や細胞数、細胞生存率を求めます。

$$\text{細胞密度(cells/mL)} = \underbrace{\frac{\text{数えた細胞数の合計}}{\text{計数した区画数}}}_{\text{1 区画あたりの平均細胞数}} \times \underbrace{\text{希釈倍率}}_{\text{D-PBS(-) およびトリパンブルーで細胞懸濁液を希釈した倍率}} \times \underbrace{10^4}_{\text{0.1 mm}^3\text{ から 1 mL への換算}}$$

備考

生細胞を数えることで生細胞密度を求めることができます。継代時には生細胞密度を使用します。

備考

1 区画の容量は 1 mm^2（面積）× 0.1 mm（高さ）で 0.1 mm^3 です。

$$\text{細胞数(cells)} = \text{細胞密度（cells/mL）} \times \text{分取前の細胞懸濁液の容量}$$

$$\text{細胞生存率(\%)} = \frac{\text{数えた生細胞数の合計}}{\text{数えた全細胞数(生細胞、死細胞)の合計}} \times 100$$

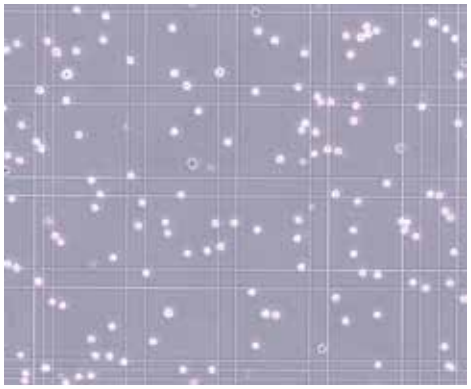
実施例

細胞懸濁液の容量　：5 mL
計数時の希釈倍率　：10 倍
計数した区画数　　：4 区画

細胞懸濁液	10 μL
D-PBS(-)	40 μL
トリパンブルー溶液	50 μL

区画	1	2	3	4	合計
生細胞数	92	89	96	83	360
全細胞数	98	95	99	88	380

計数した実際の一区画



$$\text{生細胞数} = \underbrace{360/4}_{\text{1 区画あたりの平均細胞数}} \times \underbrace{10}_{\text{希釈倍率}} \times \underbrace{10^4}_{\text{0.1 mm}^3\text{ から 1 mL への換算}} \times \underbrace{5}_{\text{細胞懸濁液の容量}} = \mathbf{4.5 \times 10^7\ cells}$$

$$\text{総細胞数} = 380/4 \times 10 \times 10^4 \times 5 = \mathbf{4.75 \times 10^7\ cells}$$

$$\text{細胞生存率} = 360/380 \times 100 = \mathbf{94.7\%}$$

＼動画はこちら！／

トリパンブルーを用いた細胞数測定

トリパンブルーによる細胞数測定

トラブルシューティング

トリパンブルーで染色される細胞が多い

原因	解決策
死細胞が含まれている	トリパンブルーでは死細胞が染色されます。もともと死細胞が多い可能性があります。また、細胞懸濁液希釈時に PBS や培地ではなく精製水などで行った結果、浸透圧の変化により細胞が死滅、トリパンブルーにより染色されてしまったことが考えられます。細胞の状態や希釈液を確認してください。
染色から計数終了までに時間がかかっている	トリパンブルーの染色時間が長いと、生細胞でも染色されてしまう場合があります。トリパンブルーの添加から計数終了までは、概ね 5 分以内に行ってください。

再現性が悪い

原因	解決策
カウントする細胞数が不適切	カウントする細胞数は 50 ～ 100 個程度が妥当です。細胞の希釈倍率を再検討してください。
染色から計数終了までの時間が異なる	トリパンブルーの染色時間が長いと、生細胞でも染色されてしまう場合があります。トリパンブルーの添加から計数終了までは概ね 5 分以内とし、毎回同程度の時間で計数するようにしてください。

色素が凝集したようなものが観察される

原因	解決策
アミノグリコシド系抗生物質が含まれている	アミノグリコシド系抗生物質とトリパンブルーが共存することにより、色素が析出 / 凝集します。培地中にネオマイシン硫酸塩などのアミノグリコシド系抗生物質が含まれていないか確認してください。含まれている場合は、当該抗生物質を含有しない培地を用いて細胞を懸濁、カウントしてください。

セルカウンターで測定できない

原因	解決策
トリパンブルー濃度が不適切	セルカウンターの種類によっては、トリパンブルー濃度により測定できない場合があります。適切な濃度に調整してください。

細胞の保存

培養細胞を使用する実験において、長期の継代培養による細胞の形質変化や、微生物による汚染など、トラブル発生時の被害を最小限に抑えるために、細胞を凍結保存しバックアップをとることは非常に重要です。凍結した細胞は解凍することで、再び実験に用いることができます。

細胞の保存方法

細胞の保存方法には緩慢凍結法とガラス化法があります。培地などの水溶液中で細胞を凍結すると、氷晶が形成され細胞の傷害へとつながります。そのため、緩慢凍結法およびガラス化法では、凍結時の細胞へのダメージを抑制する工夫がされています。

■ 緩慢凍結法とガラス化法

	緩慢凍結法	ガラス化法
特徴	一般的に用いられている凍結方法です。 凍結液には凍結保護剤が添加されており、プログラムフリーザーなどを用いて冷却速度を制御(-1℃ / 分)しながら徐々に凍結することで大きな氷晶の形成を避け、凍結時の細胞へのダメージを抑制します。	幹細胞や受精卵など緩慢凍結法では生存率が低い細胞の凍結に用いられます。 氷晶の形成を避けるため、結晶化せずにガラス状態で凍結します。専用の凍結液が必要であり、液体窒素などを用いて急速に凍結します。 凍結液への懸濁から凍結まで 15 秒以内(DAP213 の場合)に実施する必要があり、熟練した操作が必要です。
適用細胞	株化培養細胞、初代培養細胞、幹細胞など	幹細胞(ES 細胞や iPS 細胞)、受精卵
凍結液の例	DMSO やグリセリンなどの凍結保護剤を含む血清培地	特殊な凍結液(DAP213 など)

適切に保存された細胞は一般的に -196℃(液体窒素中)では半永久的に、-80℃では 1 ～ 2 年間保存可能といわれています。なお、細胞を保存する容器には凍結保存用チューブ(クライオバイアル)を用います。

Cell Reservoir One

弊社では、血清および哺乳動物由来成分不含の細胞保存液 Cell Reservoir One シリーズを販売しています。Cell Reservoir One シリーズでは、血清の代わりにマユ由来タンパク質のセリシンを使用することにより、無血清でありながら優れた凍結保存効果を示します。

※ 本シリーズは、セーレン株式会社との共同推進のもと製造しています。

用途	緩慢凍結法用		ガラス化法用
製品名	Cell Reservoir One (DMSO 含有)	Cell Reservoir One (DMSO 不含)	Cell Reservoir One (ガラス化法用)
製品番号	07485	07579	11325-62
製品特長	• 高い回復率(増殖能 / 機能)と生存率 • 無血清培養細胞の保存に最適 • DMSO 不含タイプではマウス ES 細胞保存にも使用可能		• 霊長類 ES / iPS 細胞の保存に使用可能 • 凍結までの操作時間が 60 秒でも高い生存率 • DMSO、アセトアミド不含で低細胞毒性 • 毒物としての管理不要

≫ 使用実績細胞や凍結後の生存率などの詳細については p. 28(参考 : Cell Reservoir One 使用　凍結保存細胞実績)を参照してください。

細胞の保存

Cell Reservoir One（DMSO 含有 / 不含）を用いた緩慢凍結法

実験プロトコル（凍結方法）

一部の初代培養細胞など凍結 / 解凍ができない細胞もあります。凍結する前に凍結 / 解凍が可能か細胞株入手元のデータシートや論文などで確認してください。

① 顕微鏡観察により、細胞が対数増殖期の状態にあることを確認します。また、必要に応じて培地交換を行います。

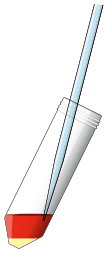
備考 細胞が対数増殖期の状態にない場合、必要に応じて培養を継続、もしくは継代するなどの対応をとってください。

② 常法により細胞を回収し、細胞数をカウントします。

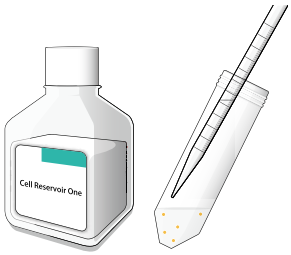
備考 生存率が 90% 以上であることが望ましいです。
≫ トリパンブルーによる細胞数測定については p. 21 を参照してください。

③ 180 × g、5 分の条件で遠心分離し、上清を除去します。

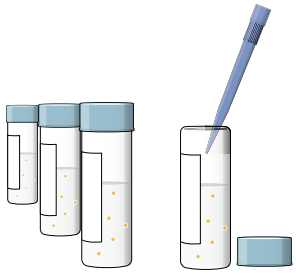
備考 細胞種により適切な遠心条件は異なります。180 × g で 3 ～ 10 分を目安に適宜調整してください。



④ 細胞数が 5×10^5 ～ 1×10^7 cells/mL となるように Cell Reservoir One を添加し、懸濁します。



⑤ 凍結保存用チューブに分注します。



⑥ -80℃で凍結保存します。-80℃で凍結した細胞は、液体窒素でも保存可能です。

備考 プログラムフリーザーなどを用いた予備凍結は必要ありません。

細胞の保存

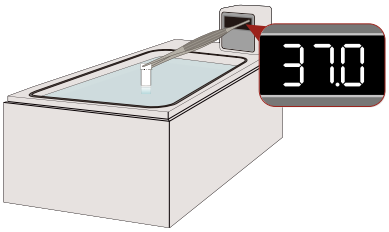
実験プロトコル（解凍方法）

① 細胞凍結液の 10 倍量の培地を、あらかじめ遠沈管に分注しておきます。

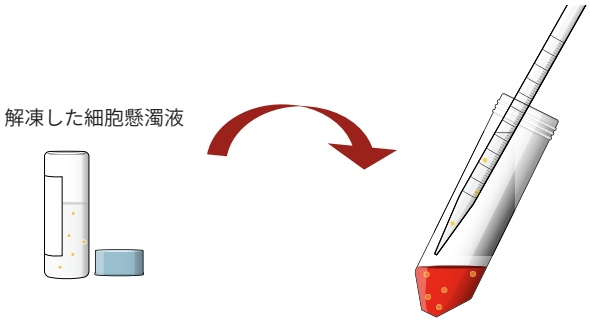
i 備考 解凍した細胞懸濁液を素早く培地で希釈できるようにあらかじめ準備します。
例）HeLa 細胞（1 × 10^6 cells/1 mL/tube）の場合
遠沈管に 10% FBS 含有 DMEM 10 mL を分注しておきます。

② 凍結した細胞を 37°Cの恒温水槽中で速やかに解凍します。

i 備考 体温により徐々に融解することを防ぐため、凍結液面を手で触らないようにします。
37°Cで解凍する時間は 1 ～ 2 分を目安としてください。
この時、凍結用チューブ内に氷が少し残っている状態で恒温水槽から取り出し、③の操作時に完全に解凍している状態が理想です。



③ 完全に解凍した細胞懸濁液を①で準備した遠沈管に直ちに移します。



④ 180 × g、5 分の条件で遠心分離し、上清を除去します。

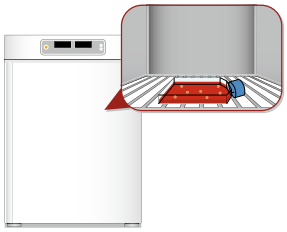
i 備考 細胞種により適切な遠心条件は異なります。180 × g で 3 ～ 10 分を目安に適宜調整してください。

⑤ 培地を適量添加し、ピペッティングなどで穏やかに細胞を分散させます。

i 備考 必要に応じて細胞数をカウントしてください。
≫ トリパンブルーによる細胞数測定については p. 21 を参照してください。

⑥ 細胞懸濁液を適切な細胞密度に調整後、培養容器に播種し、37°C、5% CO_2 インキュベーターで培養します。

i 備考 播種する際の細胞密度は細胞株入手元の情報を参考にしてください。



＼動画はこちら！／

Cell Reservoir One を用いた
緩慢凍結法

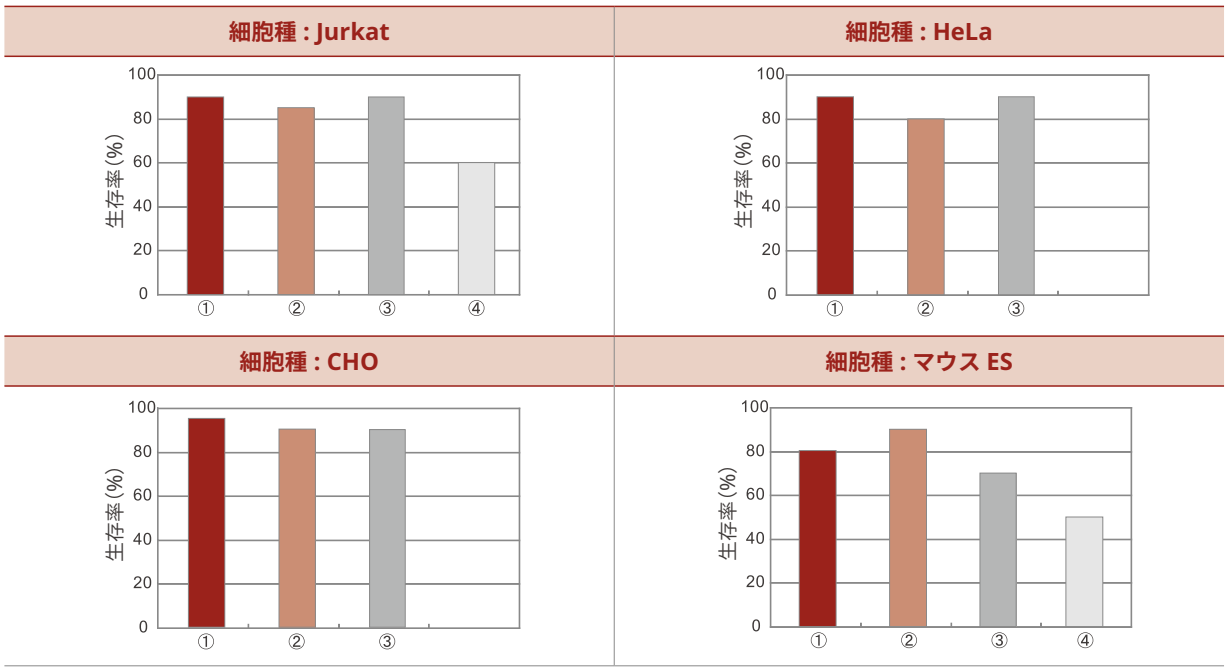
細胞の保存

参考 : Cell Reservoir One 使用　凍結保存細胞実績

以下に Cell Reservoir One を用いて凍結した細胞の凍結保存試験（生存率）の結果および保存実績を紹介します。

i 備考 Cell Reservoir One の主成分であるセリシンは、血清と同程度の凍結保存効果を有する上に、DMSO の毒性緩和作用も示します。ただし、一般的に DMSO が細胞の機能に影響を与えることが指摘されていることから、DMSO 含有と DMSO 不含の 2 種類の製品をラインアップしています。

■ 凍結保存試験（生存率）



① Cell Reservoir One（DMSO 含有）　② Cell Reservoir One（DMSO 不含）
③ 製品 B（血清 / DMSO 含有）　④ 製品 D（血清不含 / DMSO 含有）

凍結条件 : -80℃、1 年

動物種	細胞種	由来組織	凍結期間	Cell Reservoir One 生存率（%）	
				DMSO 含有	DMSO 不含
ヒト	Jurkat	血液	1 年	90	85
ヒト	HL-60	血液	1 年	90	80
ヒト	WIL2-NS	脾臓	1 年	90	70
ヒト	MSC	骨髄	1 年	90	70
ヒト	HeLa	子宮頸部	1 年	90	80
ヒト	HepG2	肝臓	1 年	85	70
ヒト	NHDF	正常皮膚	1 年	90	75
マウス	KUSA-A1	骨髄	9 カ月	90	80
マウス	2E3-O	ハイブリドーマ	1 年	90	80
マウス	P3U1	骨髄	1 年	90	80
マウス	OP9	頭蓋冠	10 カ月	95	85
マウス	ES	胚	1 年	80	90
ラット	PC-12	副腎	1 年	90	70
ハムスター	CHO	卵巣	1 年	95	90
ウサギ	RC4	角膜	1 年	90	70
昆虫	Sf-9	卵巣	1 年	75	70

保存温度 : -80℃

凍結保存実績　細胞例

3T3-L1	Caco-2	HT-1080	MCF-7	NIH/3T3
A-431	COS-7	HuH-7	MDA-MB-231	RAW264.7
A549	HaCaT	HUVEC	MDCK	SH-SY5Y
BHK-21	HCT116	K-562	MEF	SW480
C2C12	HEK293	MC3T3-E1	Neuro-2a	U-87 MG

細胞の保存

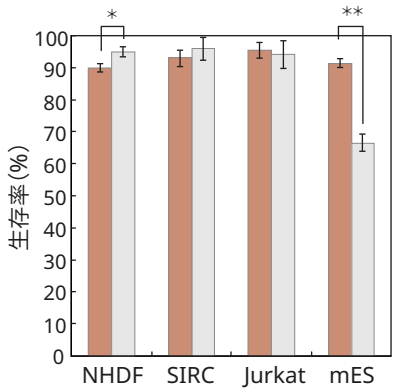
実施例 1 Cell Reservoir One（DMSO 不含）のマウス ES 細胞への適用

Cell Reservoir One（DMSO 不含）を用いて凍結保存したマウス ES 細胞を解凍し、生存率、増殖能、未分化維持および拍動心筋分化への影響を評価しました。

■ 解凍後の細胞生存率

生存率が低下しやすいマウス ES 細胞においても高い細胞生存率を示しています。

解凍後の細胞生存率



Cell Reservoir One（DMSO 不含）
FBS / 10% DMSO

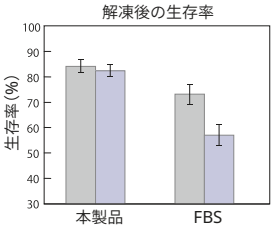
＊ p<0.05, ＊＊ p<0.01

NHDF ：正常ヒト皮膚線維芽細胞
SIRC ：ウサギ角膜由来細胞
Jurkat ：ヒト白血病由来細胞
mES ：マウス ES 細胞

凍結条件：-80℃、1 週間

i 備考 細胞の凍結時は、可能な限り細胞の懸濁から凍結までを素早く実施する必要がありますが、Cell Reservoir One を使用することにより、凍結操作時間の延長による生存率低下を抑制することができます。
Cell Reservoir One は、細胞を懸濁してから 30 分後に凍結した場合でも、高い細胞生存率を示しています。

解凍後の生存率



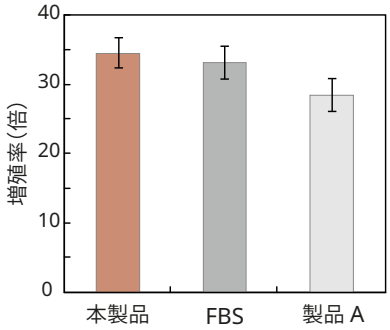
細胞を懸濁直後に凍結
細胞を懸濁後、30 分後に凍結

本製品 ：Cell Reservoir One（DMSO 不含）
FBS ：FBS / 10% DMSO
凍結条件 ：-80℃、3 週間
細胞 ：マウス ES 細胞

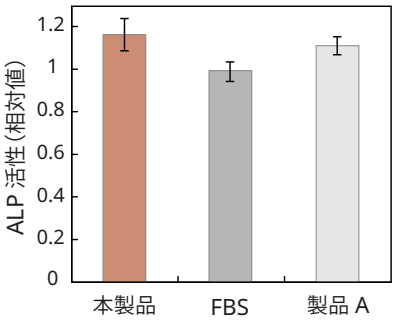
■ 増殖能 / 未分化状態への影響

解凍後の細胞においても増殖能および未分化状態を維持しています。

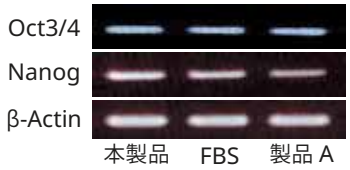
解凍後の細胞の増殖能（3 日目）



解凍後の細胞の未分化状態（3 日目）



解凍後の細胞における未分化マーカーの発現（3 日目）

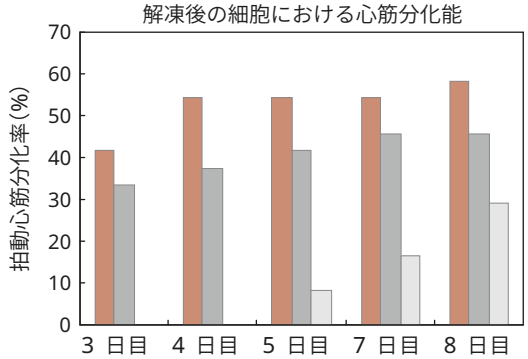


本製品 ：Cell Reservoir One（DMSO 不含）
FBS ：FBS / 10% DMSO
製品 A ：血清不含・DMSO 含有
凍結条件 ：-80℃、1 週間
細胞 ：マウス ES 細胞

■ 拍動心筋分化への影響

解凍後の細胞においても心筋への分化能を維持しています。

解凍後の細胞における心筋分化能



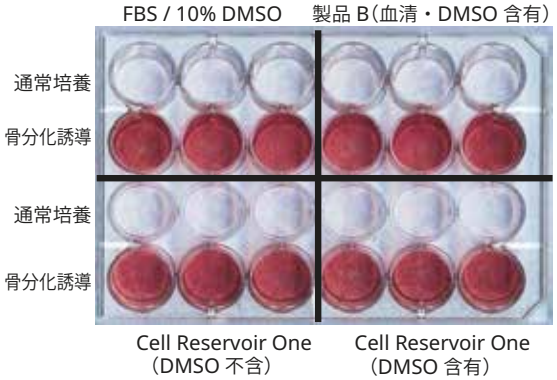
Cell Reservoir One（DMSO 不含）
FBS / 10% DMSO
製品 A（血清不含・DMSO 含有）

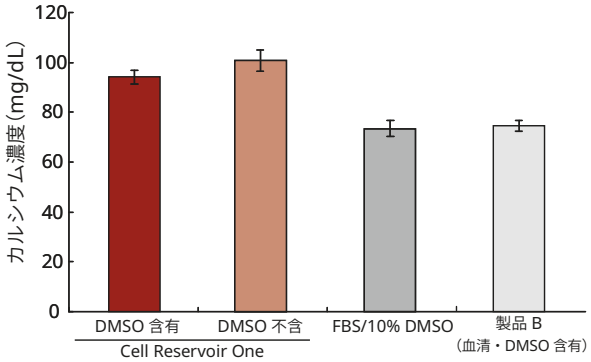
凍結条件：-80℃、1 週間
細胞 ：マウス ES 細胞

細胞の保存

実施例 2 Cell Reservoir One のヒト不死化間葉系間質細胞（hMSC）への適用

Cell Reservoir One を用いて凍結保存したヒト不死化間葉系間質細胞（hMSC）を解凍し、骨分化への影響を評価した結果、骨への分化能を維持していました。





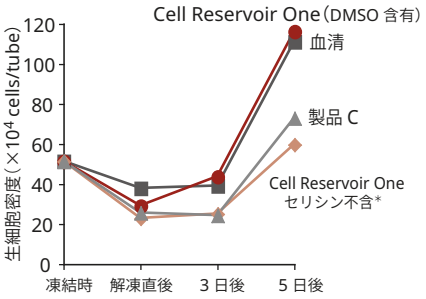
凍結条件：-80℃、1 カ月
評価方法：分化誘導 4 週間後にアリザリンレッドで染色（左）　分化誘導後に沈着カルシウム量を定量（右）

実施例 3 Cell Reservoir One（DMSO 含有）のラットインスリノーマ由来細胞株（RIN-5F）およびヒトヘパトーマ由来細胞株（HepG2）への適用

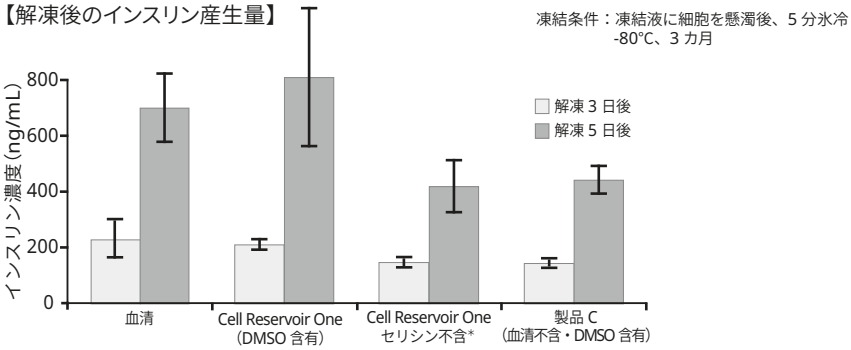
Cell Reservoir One（DMSO 含有）を用いて凍結保存した RIN-5F および HepG2 を解凍し、増殖能およびタンパク質産性能への影響を評価しました。 Cell Reservoir One で保存した細胞では細胞増殖能だけでなくインスリンやアルブミン産性能も維持されており、またそれらには Cell Reservoir One の主成分であるセリシンが大きく寄与していました。

■ RIN-5F を用いた膵島移植モデルにおける評価

【解凍後の細胞増殖能】



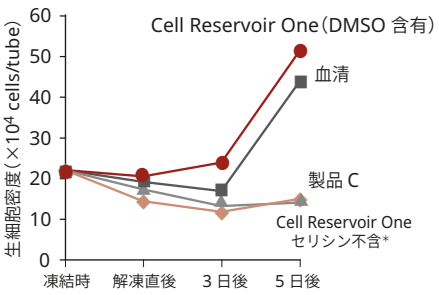
【解凍後のインスリン産生量】



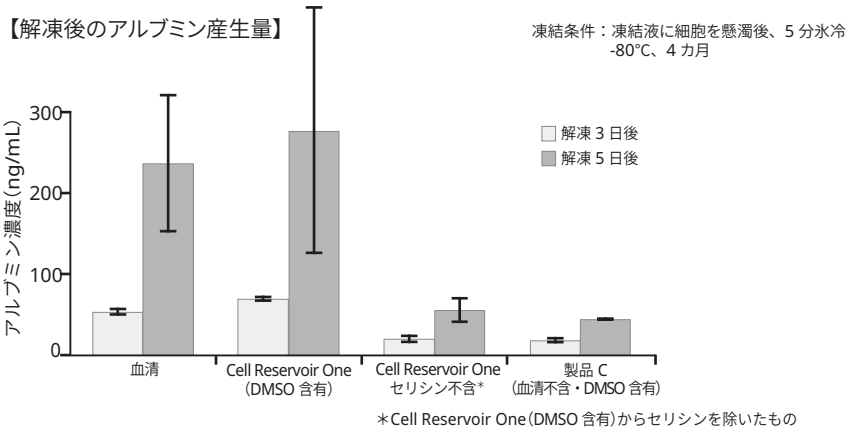
＊Cell Reservoir One（DMSO 含有）からセリシンを除いたもの

■ HepG2 を用いた人工肝臓モデルにおける評価

【解凍後の細胞増殖能】



【解凍後のアルブミン産生量】



＊Cell Reservoir One（DMSO 含有）からセリシンを除いたもの

本データは福井大学 様よりご提供いただきました。

細胞の保存

Cell Reservoir One（ガラス化法用）を用いたガラス化法

実験プロトコル（凍結方法）

ガラス化法において高い細胞生存率を維持するには、迅速な凍結および迅速な解凍が重要です。速やかに操作を行えるように、あらかじめ準備を整えてから操作を開始するようにしてください。

① 顕微鏡観察により細胞が対数増殖期の状態にあることを確認します。また、必要に応じて培地交換を行います。

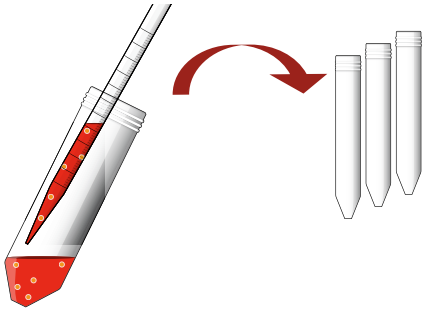
i 備考 細胞が対数増殖期の状態にない場合、必要に応じて培養を継続、もしくは継代するなどの対応をとってください。

② クリーンベンチの近くに、液体窒素とピンセットを準備しておきます。

③ 常法により細胞を回収し、必要に応じて細胞数をカウントします。

≫ トリパンブルーによる細胞数測定については p. 21 を参照してください。

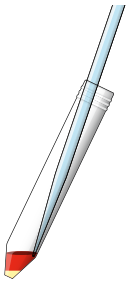
④ 細胞懸濁液を遠沈管に適量分注します。



⑤ 180 × g、5 分の条件で遠心分離し、可能な限り上清を除去します。

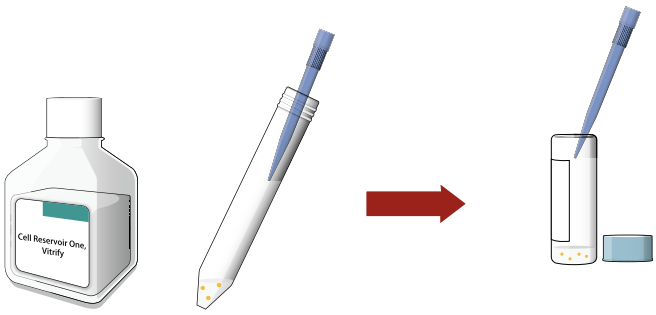
! 注意 ⑥〜⑦を 60 秒以内に行う必要があるため、細胞を小分けにした遠沈管を 1 本ずつ操作するようにしてください。

i 備考 細胞種により適切な遠心条件は異なります。ご使用の細胞に適した遠心条件で実施してください。
上清が残存していると、細胞保存液が希釈され、生存率が低下する場合があります。



⑥ Cell Reservoir One（ガラス化法用）を200 μL 添加し、4 〜 5 回穏やかにピペッティングし、凍結保存用チューブに移してしっかりと蓋をします。

! 注意 ⑥〜⑦は 60 秒以内に行う必要があります。



⑦ ピンセットでチューブを挟み、チューブの口が液体窒素の液面につからないところまで沈めて 10 秒待ち、その後完全に沈めて凍結させます。

! 注意 ⑥〜⑦は 60 秒以内に行う必要があります。

⑧ 液体窒素に浸したまま液体窒素タンクの近くまで運び、タンクの中に素早く移して保存します。

細胞の保存

実験プロトコル（解凍方法）

ガラス化法において高い細胞生存率を維持するには、迅速な凍結および迅速な解凍が重要です。速やかに操作を行えるように、あらかじめ準備を整えてから操作を開始するようにしてください。

① 解凍用の培地 20 mL 程度を 37°Cに温めておきます。幹細胞（ES 細胞や iPS 細胞）の場合は、Y-27632（製品番号：18190）を最終濃度 10 μM になるよう添加してください。

② 遠沈管に①で準備した培地 10 mL を分注します。

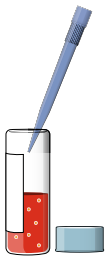
③ 液体窒素タンク内から凍結細胞の入った凍結保存用チューブを取り出し、小分けした液体窒素に沈めてクリーンベンチの近くまで運びます。

注意 ③～⑥はできるだけ短時間で操作してください。

④ 凍結保存用チューブを液体窒素から取り出し、クリーンベンチの中に入れます。①で準備した 37°Cに温めておいた培地 800 μL を添加し、底部に吹き付けるようにピペッティングし、素早く解凍します。

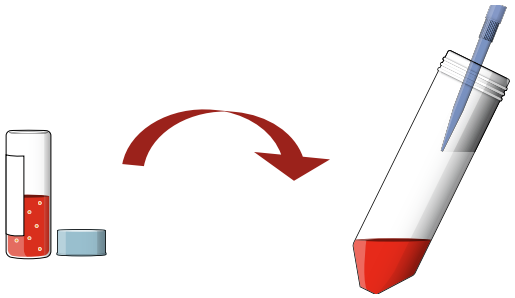
注意 ③～⑥はできるだけ短時間で操作してください。

備考 添加する培地量が多いほど急速に解凍することができます。使用するチューブのサイズに合わせて、なるべく多くの培地が添加できるように添加量を調整してください。



⑤ 細胞懸濁液を②で準備した遠沈管に移します。

注意 ③～⑥はできるだけ短時間で操作してください。



⑥ ①で準備した培地で細胞の入っていた凍結保存用チューブを洗い、⑤の遠沈管に移します。

注意 ③～⑥はできるだけ短時間で操作してください。

⑦ ⑤の遠沈管を 180 × g、5 分の条件で遠心分離し、可能な限り上清を除去します。

備考 細胞種により適切な遠心条件は異なります。180 × g で 3 ～ 10 分を目安に適宜調整してください。

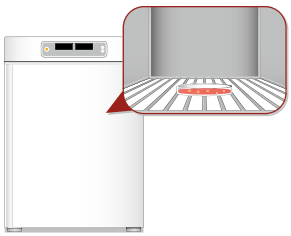
⑧ ①で準備した培地を適量添加し、ピペッティングなどで穏やかに細胞を分散させます。

備考 必要に応じて細胞数をカウントしてください。

≫ トリパンブルーによる細胞数測定については p. 21 を参照してください。

⑨ 細胞懸濁液を適切な細胞密度に調整後、培養容器に播種し、37°C、5% CO_2 インキュベーターで培養します。

備考 播種する際の細胞密度は細胞株入手元の情報を参考にしてください。



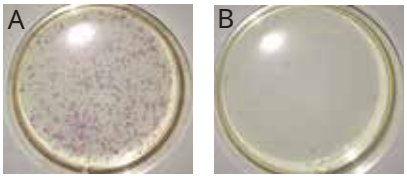
⑩ 培地に Y-27632 を添加している場合は、翌日、Y-27632 を含まない培地に交換してください。

細胞の保存

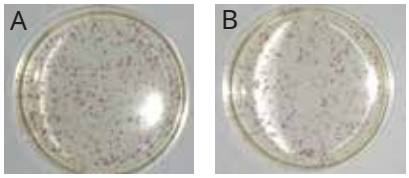
実施例 1　ヒト iPS 細胞 201B7 株での生存率

ヒト iPS 細胞 201B7 株を Cell Reservoir One（ガラス化法用）および DAP213 を用いて、ガラス化法により凍結しました。液体窒素中で 2 週間以上保存した各細胞を解凍し、培養 4 日目にアルカリホスファターゼ染色を行いました。
Cell Reservoir One（ガラス化法用）を用いたガラス化法では、凍結操作時間が 60 秒の場合でも、DAP213 を用いたガラス化法と比較し高い生存率を示しました。

凍結操作時間 60 秒



凍結操作時間 15 秒



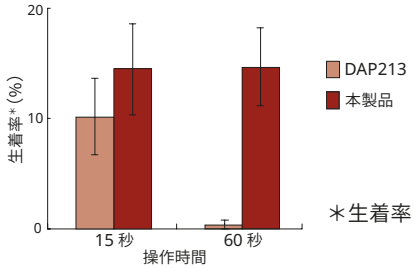
	使用した保存液	コロニー数	
		凍結操作時間 60 秒	凍結操作時間 15 秒
A	本製品	672	563
B	DAP213	37	479

本データは外部研究機関 様よりご提供いただきました。

実施例 2　ヒト iPS 細胞 253G1 株での生着率と未分化能の確認

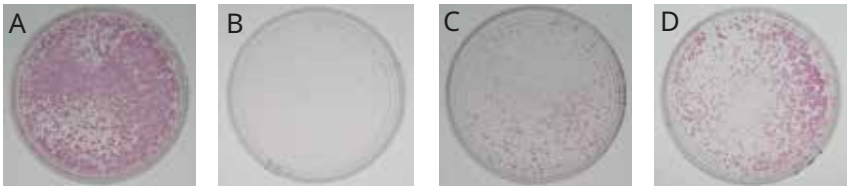
ヒト iPS 細胞 253G1 株を Cell Reservoir One（ガラス化法用）および DAP213 を用いて、ガラス化法により凍結しました。その後解凍し、生着率および未分化マーカー遺伝子の発現を確認しました。
Cell Reservoir One（ガラス化法用）を用いたガラス化法では、DAP213 と比較して生着率が高く、凍結操作時間による影響が少ないことが示されました。また、未分化マーカー遺伝子も発現しており、未分化状態を維持していました。

■ 生着率



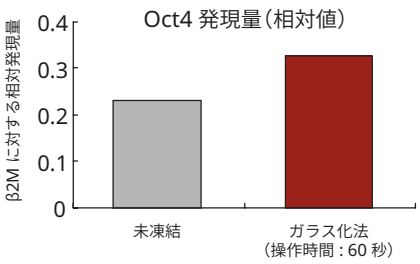
$$*\text{生着率}(\%) = 100 \times \frac{\text{ガラス化・解凍後の生着コロニー数}}{\text{通常継代時の生着コロニー数}}$$

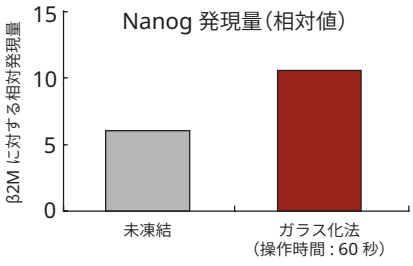
■ アルカリホスファターゼ活性



A : 未凍結
B : FBS / 10% DMSO（緩慢凍結法で凍結）
C : DAP213（ガラス化法、操作時間 : 15 秒）
D : 本製品（ガラス化法、操作時間 : 15 秒）

■ 未分化マーカー遺伝子発現





β2M : β2 ミクログロブリン

本データは福井大学 様よりご提供いただきました。

細胞の保存

トラブルシューティング

凍結融解後に生細胞が存在しない、生存率が低い

原因	解決策
凍結前の細胞の状態が悪い	細胞は継代数ができるだけ少なく、対数増殖期にあり、生存率が 90% 以上ものを保存するようにしてください。
細胞保存液が不適切	細胞に適した細胞保存液を使用してください。細胞の供給元が推奨する細胞保存液または過去実績のある細胞保存液を使用してください。細胞によっては凍結保護剤である DMSO に対し毒性を示す場合があります。
細胞凍結時の細胞密度が不適切	細胞密度が低いと生存率が低下する場合があります。一般的に 1×10^6 ～ 1×10^7 cells/mL で凍結させることが望ましいとされています。
細胞保存液を添加してから凍結までの工程に時間を要した	細胞を細胞保存液に懸濁後、凍結までは可能な限り素早く行ってください。この工程で時間がかかると、細胞へ傷害を与えます。凍結保存用チューブなどはあらかじめラベリングしておくことをお薦めします。
細胞の凍結方法が不適切	ご使用になる細胞保存液に適した方法で細胞を凍結してください。DMSO やグリセリンを含む血清培地など従来の細胞保存液では大きな氷晶の形成を避けるため、プログラムフリーザーなどを用いて -1℃ /分の速さで凍結する必要があります。 また、ガラス化法用の細胞保存液を用いる場合は、必ずガラス化法にて凍結を行ってください。ガラス化法用の細胞保存液で緩慢凍結法を行うと、細胞に傷害を与えます。
細胞の保存方法が不適切	保存温度が高い場合、長期間の保存により細胞が劣化します。1 ～ 2 年以上保存する場合は、液体窒素（-196℃）中に保存することをお薦めします。
細胞の解凍方法が不適切	細胞保存液に適した方法で細胞を解凍してください。細胞保存液中で解凍した細胞は時間経過とともに傷害されます。細胞保管場所と解凍する作業場所が離れている場合は、氷冷ではなくドライアイスや液体窒素中で凍結させたまま運ぶようにします。 緩慢凍結法により凍結した細胞の解凍は、37℃の恒温水槽中で速やかに行い、またできるだけ早くあらかじめ準備した大量の培地で希釈してください。 ガラス化法により凍結した細胞の解凍は、あらかじめ 37℃に温めておいた適量の培地で細胞を一気に解凍し、すぐに大量の培地で希釈してください。
解凍に使用した培地が不適切	解凍に用いる培地は、細胞の供給元が推奨する培地を使用してください。同じ培地名でもグルコース不含や含有量など組成が異なる場合があります。培地組成表を確認するようにしてください。

Appendix

培地組成表

(mg/L)

		DMEM (High Glucose)									DMEM (Low Glucose)		DMEM (No Glucose)
製品番号		08457	08458	08459	08488	08489	11584	11585	16971	16972	08456	08490	09891
Inorganic Salts	Calcium Chloride・$2H_2O$	265.00								—	265.00		265.00
	Iron(III) Nitrate・$9H_2O$	0.10									0.10		0.10
	Magnesium Sulfate	97.67									97.67		97.67
	Potassium Chloride	400.00									400.00		400.00
	Sodium Chloride	4750.00	6400.00					4750.00	6400.00		6400.00		6400.00
	Sodium Dihydrogenphosphate	109.00									109.00		109.00
	Sodium Hydrogen Carbonate	3700.00							1500.00	3700.00	3700.00		3700.00
Amino Acids	L-Arginine・HCl	84.00									84.00		84.00
	L-Cystine・2HCl	62.60									62.60		62.60
	L-Glutamine	584.00			—				584.00	—	584.00	—	584.00
	Glycine	30.00									30.00		30.00
	L-Histidine・HCl・H_2O	42.00									42.00		42.00
	L-Isoleucine	105.00									105.00		105.00
	L-Leucine	105.00									105.00		105.00
	L-Lysine・HCl	146.00									146.00		146.00
	L-Methionine	30.00									30.00		30.00
	L-Phenylalanine	66.00									66.00		66.00
	L-Serine	42.00									42.00		42.00
	L-Threonine	95.00									95.00		95.00
	L-Tryptophan	16.00									16.00		16.00
	L-Tyrosine・$2Na$・$2H_2O$	104.00									104.00		104.00
	L-Valine	94.00									94.00		94.00
Vitamins	Choline Chloride	4.00									4.00		4.00
	Folic Acid	4.00									4.00		4.00
	myo-Inositol	7.20									7.20		7.20
	Nicotinamide	4.00									4.00		4.00
	D-Pantothenic Acid Calcium Salt	4.00								—	4.00		4.00
	D-Pantothenic Acid Sodium Salt	—								4.00	—		—
	Pyridoxine・HCl	4.00									4.00		4.00
	Vitamin B_1・HCl	4.00									4.00		4.00
	Vitamin B_2	0.40									0.40		0.40
Others	D-Glucose	4500.00									1000.00		—
	HEPES	5958.00	—					5958.00	—		—		—
	Phenol Red	14.93				—	14.93				14.93	—	14.93
	Sodium Pyruvate	—	110.00	—			110.00	—	110.00	—	110.00		—

Appendix

培地組成表

(mg/L)

		Ham's F-12	DMEM/Ham's F-12					
製品番号		17458	05177	08460	09893	11581	11582	11583
Inorganic Salts	Calcium Chloride・$2H_2O$	44.10	154.52					
	Copper(Ⅱ) Sulfate・$5H_2O$	0.0025	0.0013					
	Iron(III) Nitrate・$9H_2O$	—	0.05					
	Iron(Ⅱ) Sulfate・$7H_2O$	0.834	0.42					
	Magnesium Chloride・$6H_2O$	123.00	61.20					
	Magnesium Sulfate	—	48.84					
	Potassium Chloride	224.00	311.80					
	Sodium Chloride	7599.00	6996.00					
	Sodium Dihydrogenphosphate	—	54.30					
	Sodium Hydrogen Carbonate	1176.00	1200.00			2483.00		1200.00
	di-Sodium Hydrogenphosphate	142.04	71.02					
	Zinc Sulfate・$7H_2O$	0.863	0.43					
Amino Acids	L-Alanine	9.00	4.45					
	L-Arginine・HCl	211.00	147.50					
	L-Asparagine・H_2O	15.01	7.50					
	L-Aspartic Acid	13.30	6.65					
	L-Cysteine・HCl・H_2O	35.00	17.56					
	L-Cystine・2HCl	—	31.29					
	L-Glutamic Acid	14.70	7.35					
	L-Glutamine	146.00	365.00					—
	Glycine	7.51	18.75					
	L-Histidine・HCl・H_2O	20.96	31.48					
	L-Isoleucine	3.94	54.47					
	L-Leucine	13.10	59.05					
	L-Lysine・HCl	36.50	91.25					
	L-Methionine	4.48	17.24					
	L-Phenylalanine	4.96	35.48					
	L-Proline	34.50	17.25					
	L-Serine	10.50	26.25					
	L-Threonine	11.90	53.45					
	L-Tryptophan	2.04	9.02					
	L-Tyrosine・$2Na・2H_2O$	7.78	55.79					
	L-Valine	11.70	52.85					
Vitamins	D-Biotin	0.0073	0.0035					
	Choline Chloride	13.96	8.98					
	Folic Acid	1.32	2.66					
	myo-Inositol	18.00	12.60					
	Nicotinamide	0.037	2.02					
	D-Pantothenic Acid Calcium Salt	0.48	2.24					
	Pyridoxine・HCl	0.062	2.03					
	Vitamin B_1・HCl	0.34	2.17					
	Vitamin B_2	0.038	0.22					
	Vitamin B_{12}	1.36	0.68					
Others	D-Glucose	1802.00	3151.00		—	3151.00		
	HEPES	—	3574.50		—			3574.50
	Hypoxanthine	4.08	2.10					
	Linoleic Acid	0.084	0.042					
	Lipoic Acid	0.21	0.11					
	Phenol Red	1.30	—	8.10			—	8.10
	Putrescine・2HCl	0.161	0.081					
	Sodium Pyruvate	110.00	55.00					
	Thymidine	0.73	0.37					

詳しい製品情報は e-Nacalai *Search Version* (https://www.e-nacalai.jp/) で製品番号を入力し、検索してください。

Appendix

培地組成表

(mg/L)

		MEM			α-MEM		IMDM	G-MEM
製品番号		09848	21442	21443	21444	21445	11506	12965
Inorganic Salts	Calcium Chloride・$2H_2O$	265.00			265.00		—	—
	Calcium Chloride	—			—		165.00	200.00
	Iron(III) Nitrate・$9H_2O$	—			—		—	0.10
	Magnesium Sulfate	97.67			97.67		97.67	97.67
	Potassium Chloride	400.00			400.00		330.00	400.00
	Potassium Nitrate	—			—		0.076	—
	Sodium Chloride	6800.00			6800.00		4500.00	6400.00
	Sodium Dihydrogenphosphate	122.00			122.00		109.00	107.82
	Sodium Hydrogen Carbonate	2200.00			2200.00		3024.00	2750.00
	Sodium Selenite	—			—		0.0173	—
Amino Acids	L-Alanine	8.90	—	8.90	25.00		25.00	—
	L-Arginine・HCl	126.00			126.00		84.00	42.00
	L-Asparagine・H_2O	15.00	—	15.00	50.00		28.40	—
	L-Aspartic Acid	13.30	—	13.30	30.00		30.00	—
	L-Cysteine・HCl・H_2O	—			100.00		—	—
	L-Cystine・2HCl	31.30			31.30		91.20	31.00
	L-Glutamic Acid	14.70	—	14.70	75.00		75.00	—
	L-Glutamine	292.00			292.00		584.00	292.00
	Glycine	7.50	—	7.50	50.00		30.00	—
	L-Histidine・HCl・H_2O	42.00			42.00		42.00	21.00
	L-Isoleucine	52.00			52.00		105.00	52.00
	L-Leucine	52.00			52.00		105.00	52.00
	L-Lysine・HCl	72.50			72.50		146.00	73.00
	L-Methionine	15.00			15.00		30.00	15.00
	L-Phenylalanine	32.00			32.00		66.00	33.00
	L-Proline	11.50	—	11.50	40.00		40.00	—
	L-Serine	10.50	—	10.50	25.00		42.00	—
	L-Threonine	48.00			48.00		95.00	47.60
	L-Tryptophan	10.00			10.00		16.00	8.00
	L-Tyrosine・2Na・$2H_2O$	51.90			51.90		104.00	52.00
	L-Valine	46.00			46.00		94.00	46.80
Vitamins	L-Ascorbic Acid	—			50.00		—	—
	D-Biotin	—			0.10		0.013	—
	Choline Chloride	1.00			1.00		4.00	2.00
	Folic Acid	1.00			1.00		4.00	2.00
	myo-Inositol	2.00			2.00		7.20	3.60
	Nicotinamide	1.00			1.00		4.00	2.00
	D-Pantothenic Acid Calcium Salt	1.00			1.00		4.00	2.00
	Pyridoxal・HCl	1.00			1.00		4.00	2.00
	Vitamin B_1・HCl	1.00			1.00		4.00	2.00
	Vitamin B_2	0.10			0.10		0.40	0.20
	Vitamin B_{12}	—			1.36		0.013	—
Others	Adenosine	—			10.00	—	—	—
	Cytidine	—			10.00	—	—	—
	2'-Deoxyadenosine	—			10.00	—	—	—
	2'-Deoxycytidine・HCl	—			11.00	—	—	—
	2'-Deoxyguanosine・H_2O	—			10.67	—	—	—
	D-Glucose	—	1000.00		1000.00		4500.00	4500.00
	Guanosine	—			10.00	—	—	—
	Lipoic Acid	—			0.20		—	—
	Phenol Red	10.00			10.00		15.00	15.00
	HEPES	—			—		5958.00	—
	Sodium Pyruvate	—			110.00		110.00	—
	Thymidine	—			10.00	—	—	—
	Uridine	—			10.00	—	—	—

Appendix

培地組成表

(mg/L)

		RPMI 1640					
製品番号		05176	06261	09892	16970	30263	30264
Inorganic Salts	Calcium Nitrate・$4H_2O$	100.00					
	Magnesium Sulfate	48.84					
	Potassium Chloride	400.00					
	Sodium Chloride	6000.00				5650.00	6000.00
	Sodium Hydrogen Carbonate	2000.00			1500.00	2000.00	
	di-Sodium Hydrogenphosphate	800.00					
Amino Acids	L-Arginine	200.00					
	L-Asparagine・H_2O	56.82					
	L-Aspartic Acid	20.00					
	L-Cystine・2HCl	65.20					
	L-Glutamic Acid	20.00					
	L-Glutamine	—	300.00				
	Glycine	10.00					
	L-Histidine	15.00					
	Hydroxy-L-proline	20.00					
	L-Isoleucine	50.00					
	L-Leucine	50.00					
	L-Lysine・HCl	40.00					
	L-Methionine	15.00					
	L-Phenylalanine	15.00					
	L-Proline	20.00					
	L-Serine	30.00					
	L-Threonine	20.00					
	L-Tryptophan	5.00					
	L-Tyrosine・$2Na・2H_2O$	28.83					
	L-Valine	20.00					
Vitamins	*p*-Aminobenzoic Acid	1.00					
	D-Biotin	0.20					
	Choline Chloride	3.00					
	Folic Acid	1.00					
	myo-Inositol	35.00					
	Nicotinamide	1.00					
	D-Pantothenic Acid Calcium Salt	0.25					
	Pyridoxine・HCl	1.00					
	Vitamin B_1・HCl	1.00					
	Vitamin B_2	0.20					
	Vitamin B_{12}	0.005					
Others	D-Glucose	2000.00		—	4500.00	2000.00	
	Glutathione	1.00					
	HEPES	—			2383.00	5958.00	—
	Phenol Red	5.00	—	5.00			
	Sodium Pyruvate	—			110.00	—	

詳しい製品情報は e-Nacalai *Search Version* (https://www.e-nacalai.jp/) で製品番号を入力し、検索してください。

Appendix

平衡塩類組成表

(mg/L)

	D-PBS(+)*	D-PBS(-)			PBS		
製品番号	**02492**	**07269**	**11482**	**14249**	**11480**	**11481**	**13397**
備考	D-PBS(+) Preparation Reagent(100x)	Powder**	D-PBS(-)(10x)	D-PBS(-)(1x)	PBS(-)(pH 7.2)	PBS(-) (pH 7.2)*** (10x)	PBS(-)(pH 7.4)
Calcium Chloride	10000.00	—			—		
Calcium Chloride・$2H_2O$	—	—			—		
D-Glucose	—	—			—		
Magnesium Chloride・$6H_2O$	10000.00	—			—		
Magnesium Sulfate	—	—			—		
Phenol Red, Sodium	—	—			—		
Potassium Chloride	—	200.00	2000.00	200.00	—		
Potassium Dihydrogenphosphate	—	200.00	2000.00	200.00	210.00	2100.00	144.00
Sodium Chloride	—	8000.00	80000.00	8000.00	9000.00	90000.00	9000.00
Sodium Hydrogen Carbonate	—	—			—		
di-Sodium Hydrogenphosphate	—	1150.00	11500.00	1150.00	—		
di-Sodium Hydrogenphosphate・$7H_2O$	—	—			726.00	7260.00	795.00

＊ D-PBS(-) に本製品を添加することで、D-PBS(+) が調製可能
＊＊本製品 9.6 g を蒸留水に溶解し 1 L にメスアップすることで、D-PBS(-)(1x) が調製可能
＊＊＊ 10 倍希釈した際の pH

(mg/L)

	HBSS(+)		HBSS(-)	
製品番号	**09735**	**17459**	**17460**	**17461**
備考	HBSS(+) without Phenol Red(1x)	HBSS(+) with Phenol Red(1x)	HBSS(-) with Phenol Red(1x)	HBSS(-) without Phenol Red(1x)
Calcium Chloride	—		—	
Calcium Chloride・$2H_2O$	184.45		—	
D-Glucose	1000.00		1000.00	
Magnesium Chloride・$6H_2O$	—		—	
Magnesium Sulfate	97.67		—	
Phenol Red, Sodium	—	10.20	10.20	—
Potassium Chloride	400.00		400.00	
Potassium Dihydrogenphosphate	60.00		60.00	
Sodium Chloride	8000.00		8000.00	
Sodium Hydrogen Carbonate	350.00		350.00	
di-Sodium Hydrogenphosphate	47.88		47.88	
di-Sodium Hydrogenphosphate・$7H_2O$	—		—	

コンタミネーション

細胞培養において、培養を目的としている因子以外の生物学的因子の混入をコンタミネーションと呼びます。また、その中でも目的外の細胞が意図せず混入した状態をクロスコンタミネーションと呼びます。コンタミネーションを予防するために、まずは信頼できる細胞供給機関から細胞を入手し、そして無菌操作を習熟することが重要です。

≫ 無菌操作と滅菌については p. 5 を参照してください。

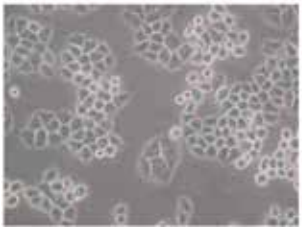
細菌 / カビ / 酵母のコンタミネーション

■ コンタミネーションの確認

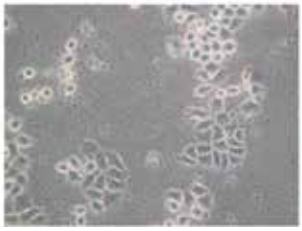
細菌 / カビ / 酵母のコンタミネーションは以下のように目視および顕微鏡観察により確認できます。

- 培地が通常よりも酸性または塩基性に傾いている（フェノールレッド含有培地の場合、黄色または赤紫色に変色している）
- 培地が濁っている
- 培地に異物が浮遊している
- 顕微鏡観察時、目的の細胞以外に微小な点や綿状のものなどが観察される（下図参照）

正常な状態

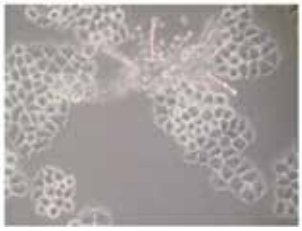


細菌のコンタミネーション



微小な点が多数存在

カビのコンタミネーション



綿状のものが存在

コンタミネーションが確認された培養容器などは、速やかに廃棄するのが一般的です。

■ コンタミネーションの予防

細菌 / カビ / 酵母のコンタミネーションは、培地へ抗生物質や抗真菌剤を添加することで予防することもできます。ただし、細胞に影響を与える可能性や薬剤耐性菌発生のリスクもあります。そのため抗生物質や抗真菌剤は、必要に応じて短期間に限り使用することをお薦めします。

抗生物質 / 抗真菌剤の種類によって作用対象などが異なります。そのため、数種類の抗生物質 / 抗真菌剤を組み合わせて使用する場合もあります。

以下によく使用される抗生物質 / 抗真菌剤を紹介します。

種類	作用対象	作用機序	使用濃度目安
Amphotericin B	真菌	細胞膜成分（エルゴステロール）と結合することにより膜傷害を引き起こす	0.25 μg/mL
Fungin	真菌	細胞膜を介したイオン交換を阻害する	10 ～ 50 μg/mL
Gentamicin	グラム陽性菌 グラム陰性菌 マイコプラズマ	タンパク質合成を阻害する	50 μg/mL
Kanamycin Monosulfate	グラム陽性菌 グラム陰性菌 マイコプラズマ	タンパク質合成を阻害する	10 ～ 100 μg/mL
Penicillin G	グラム陽性菌	細胞壁（ペプチドグリカン）の合成を阻害する	50 ～ 100 units/mL
Streptomycin	グラム陽性菌 グラム陰性菌	タンパク質合成を阻害する	100 μg/mL

また、抗生物質によってはトランスフェクションされた細胞の迅速な選択や、一過性トランスフェクションが排除された安定発現株獲得のために使用される抗生物質もあります。このような抗生物質を選択的抗生物質と呼びます。

≫ 選択的抗生物質については p. 48 を参照してください。

Appendix

コンタミネーション

マイコプラズマのコンタミネーション

マイコプラズマはモリクテス綱マイコプラズマ目に属する細菌の一種です。細胞壁を持たず、一般的な細菌の 1/10 程度の大きさであり、継代時の顕微鏡観察では確認することができません。また、培養液の見た目に明確な変化はなく、マイコプラズマの感染に気付かない場合も多くあります。
しかし、マイコプラズマによる汚染が実験結果に及ぼす影響は多大です。サイトカインの発現異常や染色体異常、さらには細胞死(アポトーシス)を引き起こす恐れもあります。
本項では、マイコプラズマ汚染の確認方法や、予防 / 除去の方法について紹介します。

■ マイコプラズマ汚染の確認

マイコプラズマ汚染の確認方法として、培養法や DNA 蛍光染色法、Nested-PCR 法が挙げられます。これらは日本薬局方においてマイコプラズマ否定試験として挙げられている方法です。ほかにも、酵素法や等温 PCR 法を利用したキットなども市販されており、より簡便にマイコプラズマを検出することが可能です。
以下に各方法の特徴についてまとめています。

		概要	メリット	デメリット
培養法		直接培養し、マイコプラズマ特有の目玉焼き状のコロニーを計数	• 高感度 • 培養可能な菌株を広範に検出可能 • JP / USP / EP に掲載	• 判定まで 28 日以上必要 • 必要なサンプルが多量
指標細胞を用いた DNA 染色法		指標細胞(Vero 細胞など)とサンプルを共培養し、Hoechst 33258 などで核酸を染色することにより判定	• 培養できない株の検出も可能 • 必要なサンプルが少量 • 安価 • JP / USP / EP に掲載	• 培養法ほど高感度ではない • 判定まで 1 週間程度必要 • マイコプラズマ以外の核酸も染色されるため判定には経験が必要
Nested-PCR 法	エンドポイント法	培養上清などから核酸を抽出後、PCR を実施し、マイコプラズマ由来の核酸の存在有無を電気泳動で確認	• 迅速(1 ～ 2 日) • 必要なサンプルが少量 • JP / USP / EP に掲載 (バリデーションが必要)	• 配列が既知の株に限られる • 感度や特異性がプライマーに依存する • 死菌も検出される
	qPCR 法	培養上清などから核酸を抽出後、qPCR を実施し、マイコプラズマ由来の核酸の存在有無により判定	• 高感度 • 迅速(1 ～ 2 日) • 必要なサンプルが少量 • 多検体処理が可能 • JP / USP / EP に掲載 (バリデーションが必要)	• 配列が既知の株に限られる • 感度や特異性がプライマーに依存する • 死菌も検出される
酵素法		マイコプラズマ特有の酵素反応を利用して検出	• 比較的高感度 • 簡便 • とても迅速(1 時間以内) • USP に掲載 • 培養可否や配列の既知 / 未知によらず検出可能	• ルミノメーターが必要 • 細菌のコンタミネーションにより擬陽性の可能性がある
等温 PCR 法		培養上清などを用いて等温 PCR を実施し、マイコプラズマ由来の核酸の存在有無により判定	• 比較的高感度 • 簡便 • とても迅速(1 時間以内) • 少ない検体量でも試験可能	• 感度や特異性はプライマーに依存 • 死菌も検出される

≫ 等温 PCR 法を利用した簡便かつ高感度なマイコプラズマ検出キットとして MycoStrip(InvivoGen 社)を販売しています。詳細は Web ページを参照してください。

MycoStrip

＼動画はこちら！／

MycoStrip を用いた
マイコプラズマの確認方法

マイコプラズマ汚染が確認された場合は、感染した細胞を廃棄したり、マイコプラズマを除去したりします。また、ほかの細胞にまで汚染が広がっていないか確認することも重要です。

コンタミネーション

■ マイコプラズマの予防 / 除去

予防

マイコプラズマ汚染を予防するには、信頼できる細胞供給機関から細胞を入手し、無菌操作を習熟することが何よりも重要です。マイコプラズマは細胞壁を持たないため、ペニシリン系抗生物質に効果は無く、さらにゲンタマイシンやカナマイシンに耐性を持つマイコプラズマも多いことから、これらの抗生物質を使用しても効果は期待できません。
InvivoGen 社ではマイコプラズマ予防用の抗生物質を販売しています。

≫ 詳細は Web ページを参照してください。

**マイコプラズマ
予防試薬**

除去

マイコプラズマのコンタミネーションが確認された場合でも、除去試薬を用いてマイコプラズマを除去することが可能です。ただし、除去試薬が細胞に与える影響も考慮する必要があります。さらに、除去試薬を日常的に使用することは、除去試薬に対する耐性菌の発生リスクにつながるため注意が必要です。
InvivoGen 社では動物細胞への毒性が低いマイコプラズマ除去試薬を販売しています。

≫ 詳細は Web ページを参照してください。

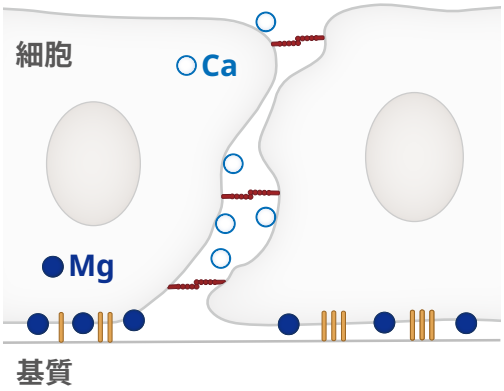
**マイコプラズマ
除去試薬**

細胞剥離 / 分散用試薬　トリプシン - EDTA 溶液

トリプシンと EDTA

細胞 - 細胞間もしくは細胞 - 培養容器間の接着にはタンパク質が関与しています。細胞の剥離や分散には接着に関与するタンパク質を分解する必要があり、一例としてトリプシンが使用されます。また、接着にカルシウムイオンやマグネシウムイオンが関与する場合があります。この場合、EDTA を添加することでこれらの金属イオンと錯体を形成し、接着を弱めることができます。このように、トリプシンの効果を高めるためにトリプシン - EDTA 溶液が用いられることもあります。

■ 細胞の接着とトリプシン / EDTA の役割



トリプシン ➡ 細胞 - 細胞間結合に作用

トリプシン ➡ 細胞 - 基質間結合に作用

EDTA ➡ 金属イオン（Ca、Mg）と錯体形成

■ 製品ラインアップ

弊社ではさまざまな組成のトリプシンおよび EDTA 溶液を販売しています。一般的に、トリプシンは 0.05 ～ 0.25%の濃度で使用されることが多く、使用濃度に応じて選択することができます。

製品名	製品番号	トリプシン濃度		EDTA 濃度（mmol/L）	Phenol Red	溶媒
		(g/L)	(%)			
0.5g/l-Trypsin/0.53mmol/l-EDTA Solution	35553	0.5	0.05	0.53	—	HBSS(-)
0.5g/l-Trypsin/0.53mmol/l-EDTA Solution,with Phenol Red	32778				○	
2.5g/l-Trypsin/1mmol/l-EDTA Solution	35554	2.5	0.25	1.0	—	
2.5g/l-Trypsin/1mmol/l-EDTA Solution,with Phenol Red	32777				○	
2.5g/l-Trypsin Solution	35555			—	—	
5.0g/l-Trypsin/5.3mmol/l-EDTA Solution	35556	5	0.5	5.3	—	
25g/l-Trypsin Solution	18172	25	2.5	—	—	Saline
0.5mmol/l-EDTA/PBS Solution	13567	—	—	0.5	—	PBS(-)
0.2g/l-EDTA Solution	14367	—	—	0.44	—	

細胞剥離 / 分散用試薬　Accutase および Accumax

Accutase および Accumax

Accutase および Accumax は、海洋生物から抽出された酵素を成分とする温和な細胞剥離液です。タンパク質分解活性およびコラーゲン分解活性を持つ天然の酵素の混合物であり、哺乳類やバクテリア由来の成分を含みません。Accumax は Accutase と比較して酵素濃度が３倍高く、細胞凝集体の剥離に適しています。

■ 製品ラインアップ

製品名	Accutase	Accumax
製品番号	12679	17087
製品画像		
特長	• 温和かつ迅速な細胞剥離が可能 • 血清や阻害剤による中和が不要 • ほとんどのエピトープが保存されるためフローサイトメトリーに有用	• Accutase と比較し 3 倍高い酵素濃度 • 細胞凝集体やスフェロイドの分散に最適
Phenol Red	○	―
溶媒	D-PBS(-)	
使用実績*	ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞、ヒト間葉系間質細胞、骨髄幹細胞、ヒト神経幹細胞、ニューロスフェア（Accutase のみ）、マクロファージ、ケラチノサイト、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、肝細胞、肝前駆細胞、ニワトリ胚神経初代細胞、線維芽細胞、接着性 CHO 細胞、BHK 細胞、293 細胞、L929 細胞、不死化マウス精巣胚細胞、3T3、Vero、COS、HeLa、NT2、MG63、M24、A375、U251、MRC5（Accumax のみ）、D54、HT1080、Sf9	

＊一部の細胞を掲載しています。

≫　使用文献については、Web ページ を参照してください。

Accutase　　Accumax

実験プロトコル（Accutase による細胞剥離）

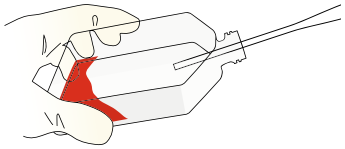
① Accutase（製品番号：12679）を解凍します。

注意 37℃では解凍しないでください。37℃で 1 時間以上放置すると活性が失われます。

備考 解凍後は 2 カ月以上の冷蔵保存が可能です。使用後は、本製品の温度上昇に注意し、速やかに冷蔵庫へ戻してください。

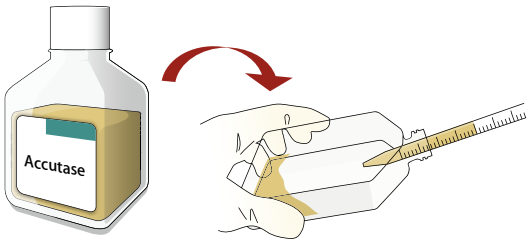
② 培養容器から培地をアスピレーターなどを用いて除去します。

備考 トリプシンによる剥離とは異なり、剥離前に D-PBS による洗浄は不要です。



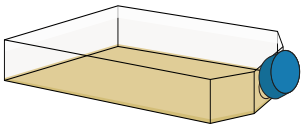
③ 細胞を覆う程度の Accutase を添加します。

備考 T-25 フラスコの場合、2.5 ～ 5 mL を添加します。
Accutase は調製済みの製品のため、希釈せずにそのまま使用可能です。



④ 室温で 5 ～ 10 分静置し、反応させます。

備考 37℃ではなく室温で反応させてください。反応時間は最長 1 時間まで延長できます。



⑤ 顕微鏡観察により、細胞の形が丸くなり、剥離し始めたことを確認します。その後、培養容器の側面を軽くたたき、完全に細胞を剥離します。

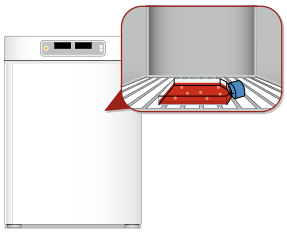
備考 血清や阻害剤による中和操作は不要です。

⑥ 常法により細胞を回収し、細胞数をカウントします。

≫ トリパンブルーによる細胞数測定については p. 21 を参照してください。

⑦ 細胞懸濁液を適切な細胞密度に調整後、培養容器に播種し、37℃、5% CO_2 インキュベーターで培養します。

備考 播種する際の細胞密度は細胞株入手元の情報を参考にしてください。



Appendix

実験プロトコル（Accumax を用いた細胞凝集体の細胞数カウント）

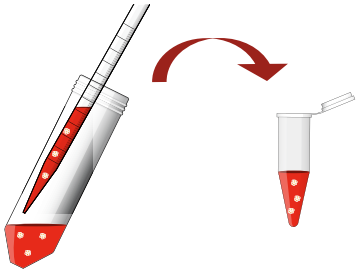
細胞凝集体の細胞数をカウントする際には、細胞凝集体を分散させる必要があります。以下に細胞数カウントのための細胞凝集体の分散方法を紹介します。

① Accumax（製品番号：17087）を解凍します。

! 注意 37℃では実施しないでください。37℃で 1 時間以上放置すると活性が失われます。

i 備考 解凍後は 2 カ月以上の冷蔵保存が可能です。使用後は、本製品の温度上昇に注意し、速やかに冷蔵庫へ戻してください。

② 細胞凝集体を含む培地 0.5 ～ 1.0 mL をチューブに移します。



③ Accumax と②で分取した培地を容量比 1 : 1 で混合します。

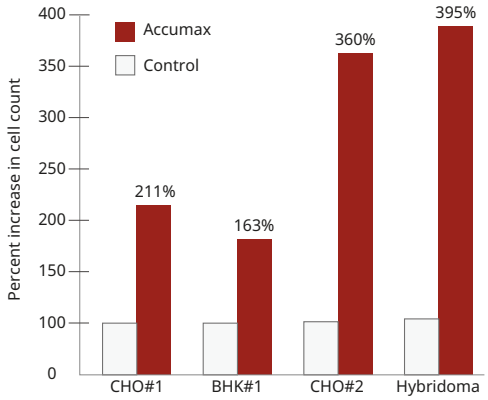
④ 室温で 5 ～ 10 分静置して反応させ、細胞凝集体を分散させます。

⑤ 常法により細胞を回収し、細胞数をカウントします。

≫ トリパンブルーによる細胞数測定については p. 21 を参照してください。

実施例 Accumax を用いた細胞凝集体の細胞数カウント

血清またはタンパク質フリーの培地で増殖させた CHO 細胞、BHK 細胞、ハイブリドーマの一部を採取し、等量の PBS（コントロール）もしくは本製品とインキュベーション後（37℃ / 5 分）、細胞数をカウントしました。より正確かつ再現性に優れた細胞数のカウントには、凝集体を分散させた状態で実施することが必要です。



Appendix

実験プロトコル（Accumax によるスフェロイドの分散）

① Accumax（製品番号：17087）を解凍します。

注意 37℃では実施しないでください。37℃で 1 時間以上放置すると活性が失われます。

備考 解凍後は 2 カ月以上の冷蔵保存が可能です。使用後は、本製品の温度上昇に注意し、速やかに冷蔵庫へ戻してください。

② スフェロイドが培養容器に接着している場合

培地をアスピレーターなどを用いて除去し、細胞を覆う程度の Accumax を添加します。剥離には数分要します。

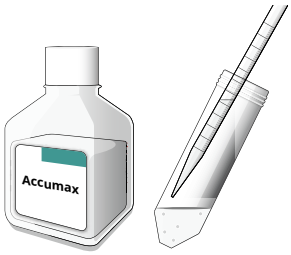
スフェロイドが浮遊している場合

サンプルを遠沈管に移し、遠心分離後、培地をアスピレーターなどを用いて除去します。

③ Accumax を適量添加します。

通常、スフェロイドが浮遊する程度の Accumax を添加します。

備考 50 mL 遠沈管の場合、15 ～ 20 mL を添加します。



④ 室温でシェーカーなどを用いて前後にゆっくり振とうし、浮遊しているスフェロイドの構造を 5 分ごとに観察してください。

注意 この操作は 37℃では実施しないでください。

⑤ スフェロイドの構造が崩壊し始めると、断片が観察されます。ピペッティングなどで穏やかに断片を分散させてください。スフェロイドを分散させるため、数分ごとにこの操作を繰り返してください。

Appendix

選択的抗生物質

トランスフェクションされた細胞の迅速な選択や、一過性トランスフェクションが排除された安定発現株獲得のために使用される抗生物質を選択的抗生物質と呼びます。あらかじめ導入する遺伝子上に選択的抗生物質の耐性遺伝子を組み込んでおくことで、トランスフェクションされた細胞のみが選択的抗生物質を含む培地中でも生存するため選択できます。以下に代表的な選択的抗生物質を紹介します。

種類	概要	使用濃度目安
Blasticidin S	細菌や動物細胞などの選択に用いられるペプチジルヌクレオシド系抗生物質です。Blasticidin Sに対する耐性は、*B. cereus* 由来のBlasticidin S耐性遺伝子(bsr)や、*A. terreus* 由来の Blasticidin S deaminase 遺伝子(bsd)などにより付与されます。	細菌 : 25 ～ 100 μg/mL 動物細胞 : 1 ～ 10 μg/mL
G418 (Geneticin)	酵母、動物細胞、植物細胞などの選択に用いられるアミノグリコシド系抗生物質です。G418 に対する耐性は、Neomycin 耐性遺伝子(neo^r)などにより付与されます。	動物細胞 : 400 ～ 1000 μg/mL
Hygromycin B	細菌、真菌、動物細胞などの選択に用いられるアミノグリコシド系抗生物質です。Hygromycin B に対する耐性は、*E. coli* 由来の Hygromycin 耐性遺伝子(hph または hyg)などによって付与されます。	細菌 : 50 ～ 100 μg/mL 動物細胞 : 50 ～ 200 μg/mL
Phleomycin	細菌、真菌、動物細胞、植物細胞などの選択に用いられるグリコペプチド系抗生物質です。Zeocin® に対して感受性の低い糸状菌などの選択に有用です。Phleomycin に対する耐性は、*S. hindustanus* 由来の Bleomycin 耐性遺伝子(Sh ble)などにより付与されます。	酵母 : 10 μg/mL 糸状菌 : 25 ～ 150 μg/mL
Puromycin	細菌、動物細胞、昆虫細胞などの選択に用いられるアミノヌクレオシド系抗生物質です。Puromycin に対する耐性は、*S. alboniger* 由来の Puromycin N-acetyltransferase 遺伝子(pac)などによって付与されます。	動物細胞 : 1 ～ 10 μg/mL
Zeocin®	細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞などの選択に用いられる Phleomycin D1 を主成分とした抗生物質です。Zeocin® に対する耐性は、*S. hindustanus* 由来の Bleomycin 耐性遺伝子(Sh ble)などによって付与されます。	細菌 : 25 μg/mL 動物細胞 : 50 ～ 400 μg/mL

Zeocin は INVIVOGEN の登録商標です。

Memo

Memo

Memo

※掲載内容は 2025 年 6 月現在のものです。

ナカライテスク株式会社

URL https://www.nacalai.co.jp/

価格・納期のご照会 0120-489-552（試薬はここに）

製品に関する技術的なご照会 https://www.e-nacalai.jp/URL/?P=Contact

※ 試験・研究用以外には使用しないでください。
※ 掲載内容は予告なく変更になる場合があります。
※ QR コードは株式会社デンソーウェーブの登録商標です。

2506P