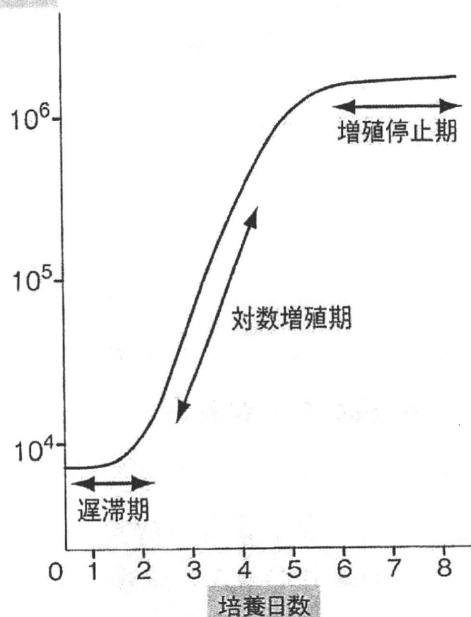


細胞の性質 増殖曲線 (Growth curve)

増殖曲線

細胞数



細胞数の変化を経時的に追いかけて描いたもの

遅滞期 播種直後の損傷回復や新しい環境への適応で増殖の見られない期間。

対数増殖期 活発に増殖する期間。

増殖停止期 細胞密度が高くなり接触阻止を起こす。または栄養成分の枯渇や老廃物の蓄積などにより増殖を停止する期間。

* 接触阻止 (contact inhibition)

細胞が相互に隙間無く接触する事により増殖が止まること。

➡ **継代**

細胞を植え継ぐこと。細胞を剥がしてその一部を新しい容器に移す。

細胞培養を行う環境と周辺機器

細胞培養を行う部屋 (無菌作業を行う部屋)

培養室 Cell Processing Center (CPC)

無菌作業を行う機器

安全キャビネット

クリーンベンチ

細胞培養器

CO₂インキュベーター

通常温度 37°C CO₂濃度 5%

細胞培養でよく使う器材

培養容器

ディッシュ(シャーレ)

35mm, 60mm, 100mm, 150mm

フラスコ

25cm², 75cm², 175cm²

マルチウェルプレート

6well, 12well, 24well, 96well

メスピペット

1mL, 2mL, 5mL, 10mL, 25m, 50mL

遠沈管

15mL, 50mL, 250mL, 500mL

凍結用チューブ など

➡ ロットナンバー
使用期限、製造(滅菌)年月日の確認

記録を残す

細胞培養でよく使う試薬-1

培地

“えさ” 細胞を培養し、増殖させる為の栄養素を供給
アミノ酸・ビタミン・ミネラル・ブドウ糖など

細菌やカビは
非常によく生える!

pH緩衝作用

(pH指示薬フェノールレッド)

血清

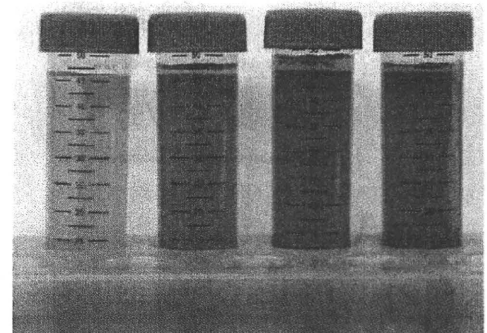
(血液を凝固させ上清を取ったもの)

細胞増殖促進物質(成長因子)

・細胞障害保護因子・栄養因子



ウシ胎仔血清(Fetal bovine serum)
自己血清



培地のpH 6.8 7.2 7.4 8.0
pHが低く 培養に不適當 培養に適したpH範囲 pHが高く 培養に不適當

細胞培養でよく使う試薬-2

抗生物質

細胞にとって毒性のない濃度、
種類の異なる菌に広く作用するものを選ぶ

ペニシリンG・硫酸ストレプトマイシン

アンホテリシンB・ゲンタマイシン・カナマイシン

トリプシン-EDTA

細胞と細胞同士、細胞とディッシュとの接着を剥がす

トリプシン:タンパク質による接着を壊す

EDTA:カルシウムを介した結合を壊す

➡ TrypLE Select(動物由来成分不含)

PBS(-)

NaClで等張にしたリン酸緩衝液

細胞の洗浄、試薬の調製に使用する

ロットナンバー
➡ 使用期限
製造年月日
の確認

記録を残す

CoA
Certificate of Analysis

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	ダルベッコ改変イーグル培地(低グルコース), With 1000 mg/L glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate, liquid, sterile- filtered, cell culture tested	
Product Number	D6046	
Product Brand	SIGMA	
TEST	SPECIFICATION	LOT RNBB4647 RESULTS
Storage:		COOLER/REFRIGERATED
Print Date:		18 AUG 2010
Expiry date:		JUL 2011
Date of QC Release:		18 AUG 2010
Place of Manufacture:		Irvine, United Kingdom
Production Date:		JUL 2010
Appearance (Turbidity)	Clear	Clear
Appearance (Form)	Solution	Solution
pH	7.0 - 7.6	7.3
Osmolality	308 - 340 mOs/kg	326 mOs/kg
Cell Culture Testing - MTT	Pass	Pass
Cell Line	Cell Line - Cell Types	3T3
Key Element Conc - ICP	Pass	Pass
Amino Acid Analysis	Pass	Pass
Sterility	Pass	Pass
Endotoxin Level	<= 1 EU/ml	< 1 EU/ml
Glucose Concentration	0.9 - 1.1 g/l	1.0 g/l

Jane Findley

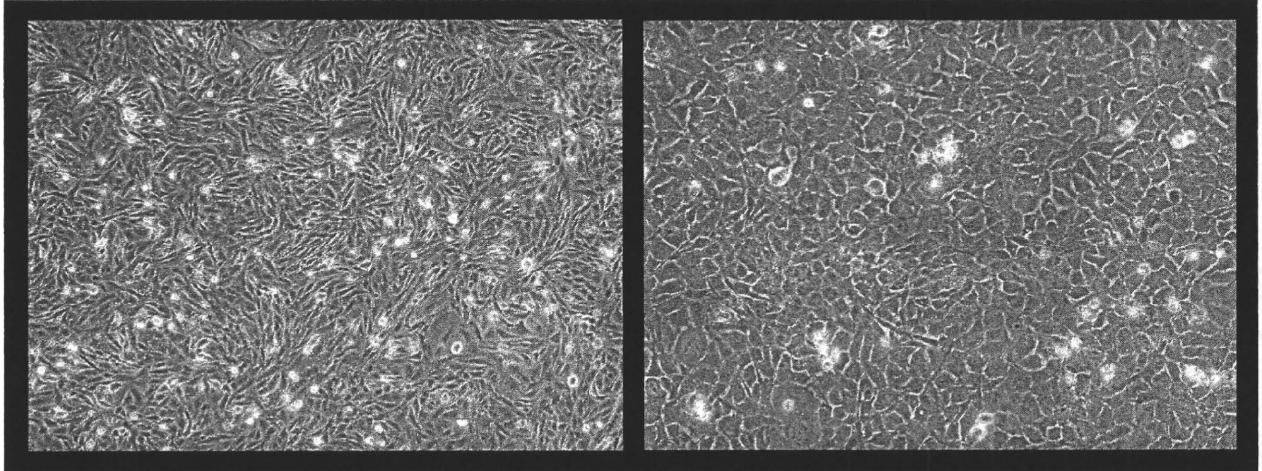
Jane Findley, Manager
Quality Control
Irvine, United Kingdom

実習で使用する細胞

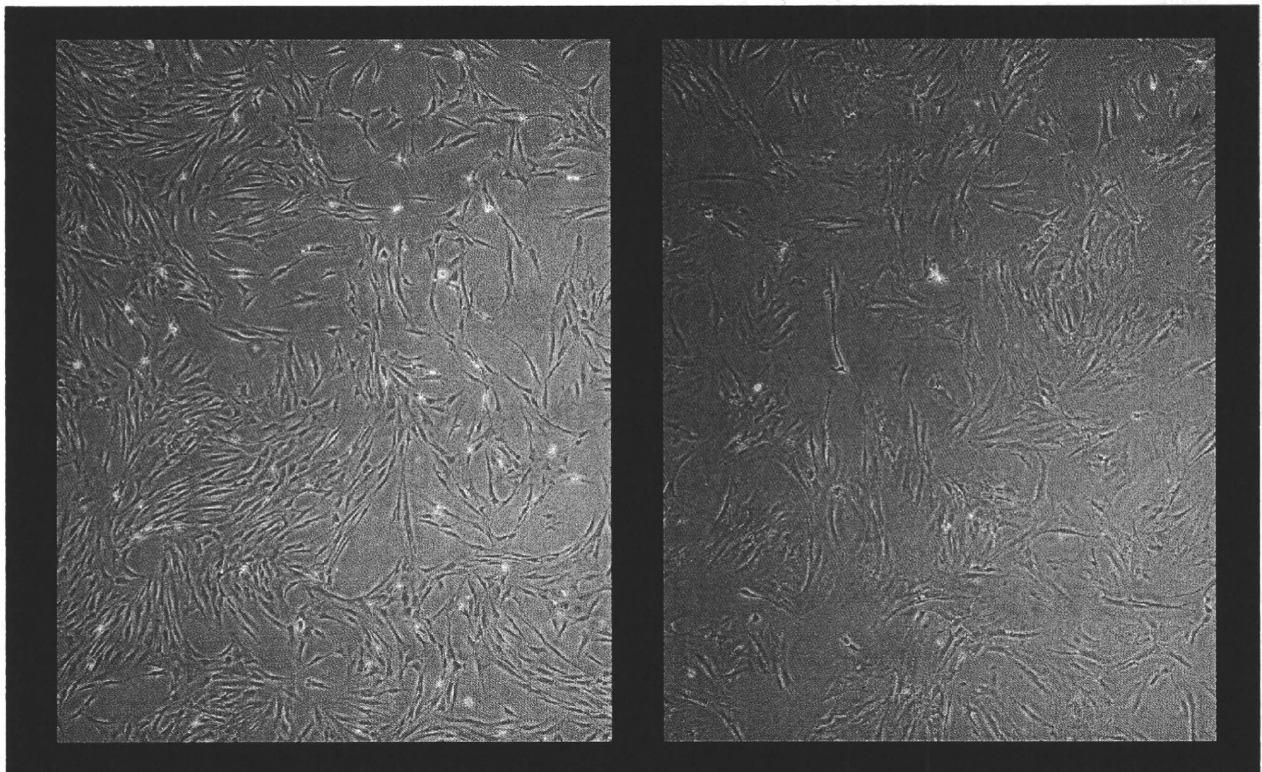
ヒト骨肉腫由来

Saos-2

U2OS



骨髓間葉系幹細胞



細胞培養の手順（実習内容）

<試薬・器材の準備>

1. Lot, 使用期限, 製造年月日, 滅菌年月日の確認及び記録
2. 試薬・器材のアルコール清拭、安全キャビネットへの持ち込み

<細胞播種>

1. 細胞観察
2. 培養皿からの細胞剥離
3. 細胞数の測定
4. 細胞の播種

➡ 2日目、4日目 細胞数を計測 ➡ 倍加時間を求める

細胞培養でよく使う用語

- 継代** 細胞を植え継ぐこと。細胞を剥がしてその一部を新しい容器に移す。
- コンタミ** 汚染を意味する英語Contaminationを略した言い方。培養中の細胞に微生物や他の種類の細胞が混入すること。
- サスペンド** 「浮遊する」を意味する英語 suspend
「懸濁する」とも言う。
培地などの溶液に細胞を浮遊させること。
振る・指でたたく・指ではじく(タッピング)
・ピペッティング
- ピペッティング** ピペットで液を吸ったり吐いたりすること。
細胞の塊を小さくしたり、細胞を浮遊させる為に行う。
あまり激しくやると細胞を傷つけるので注意！

無菌操作について

谷 美穂

なぜ無菌培養が必要なのか？

<細胞培養>

目的とする細胞だけをフラスコやシャーレなどの中で培養しなければならない。



私たちの生活環境の中にはどこにでも雑菌がいる。



細胞培養を行うにあたっては、雑菌の混入を防ぐことが何よりも重要。



そのために、余計な雑菌を排除する必要がある。
(雑菌を排除しなければ汚染(コンタミ)の原因になり目的の細胞の培養が行えない)

* 一度コンタミしてしまうと雑菌を除去するのはほとんど不可能



そのために、適した環境での適した操作(無菌操作・滅菌)が必要である。

<無菌操作とは>

培養中の細胞に雑菌が入らないようにする操作

そのためには・・・

- ①作業環境や使用する器具・材料が微生物に汚染されていないことが重要
(無菌操作に適した作業環境とは
雑菌が混入しない綺麗な所
→無菌室、クリーンベンチ等)
- ②ヒトを通じての汚染防止も重要
(衣服のほこり、手の雑菌や、口の中の雑菌など)

そのために・・・

- ・雑菌の殺菌、滅菌が必要 → 環境や器具類
- ・ヒトに関しては作業前の手洗い消毒、白衣・手袋・マスクなどを着用して雑菌の飛散などを防ぐ

<滅菌とは>

無菌操作に用いる材料内部や容器表面に存在する雑菌を殺菌する方法

滅菌方法

高圧蒸気滅菌、放射線滅菌、フィルター濾過滅菌、アルコール滅菌など

無菌培養の方法①

<事前準備>

使用する器具や容器、培養液を滅菌処理しておく
器具・容器・・・できる限りディスポ製品を使用無
理な物は適切な滅菌処理を行っ
ておく

試薬・・・無菌が保証されている製品をその都度
購入し、使い回しはしない
(分注している物を使用する場合は無
菌性が担保されていることを確認する
こと)

滅菌方法の例・・・フィルター濾過滅菌、オートク
レイブ滅菌、乾熱滅菌等

(1) 作業者

- ① 白衣を着用し、長髪の方はまとめておく
- ② 手を石鹼で洗い、アルコール消毒をして
手袋を着用する
- ③ 手袋の上からも消毒用エタノールで消毒す
る

(2) クリーンベンチ

- * クリーンベンチ内に持ち込む道具は、事前に消毒用アルコールで外側を清潔にしておかなければならない
→表面に付着している微生物を殺菌するため

- ① クリーンベンチ床面をアルコール清拭する
- ② クリーンベンチ内で使用する全ての器具・試薬をアルコール清拭して持ち込む

無菌操作方法③

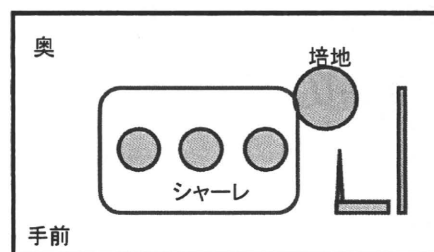
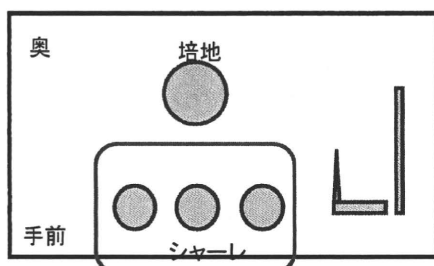
- ① クリーンベンチ内の物の配置を確認する
 - ・ベンチの手前は外部からの混入の機会が多く、風の流れは上から下、奥から手間なので、できるだけ奥の方を使用するようにする。
- ② 作業中は容器の内部を空気中にさらすことは極力避ける。(どうしてもさらさなければならない場合は短時間に留める)
ex シャーレの場合は蓋を開けっ放しにせず蓋を縁にかける、フラスコは斜めに持つなど

③ 容器の蓋を置く場合

床面に内側を下にして置く場合は、置く場所を決めアルコールを含ませた布で清拭するか、チューブ立ての上などに置く。

* 蓋が空いているチューブ・容器がある場合は、その上を手などが決して通らないように気を付けなければならない。

* 左の図はシャーレが手前にありすぎるので、外部からのコンタミの危険性が高い。培地がシャーレの真上にあるので取るときに手がシャーレの上を通らざるを得ない



実践編

無菌操作説明 & デモンストレーション



谷 美穂 & 上田路子

培養室に入る前に

白衣着用・髪をまとめる・アクセサリを外す

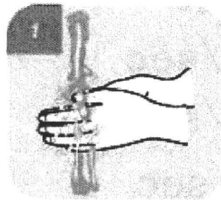
手洗い & 消毒

手を石鹼で洗い、アルコール消毒をする

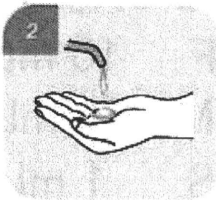
手袋・マスク着用

手袋の上からもアルコール消毒する

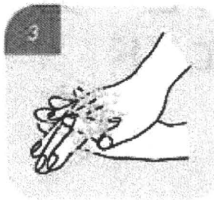
手洗いの手順



流水で洗淨する部分をぬらす。



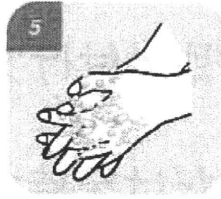
薬用石けんまたは消毒薬などを手掌にとる。



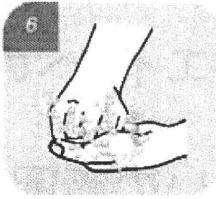
手掌を洗う。



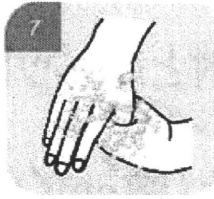
手掌で手の甲を包むように洗う。反対も同様に。



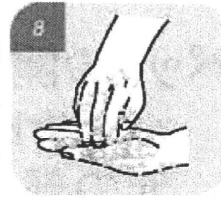
指の間もよく洗う。



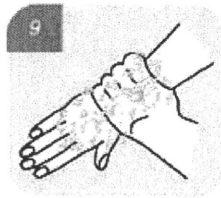
指先をよく洗う。



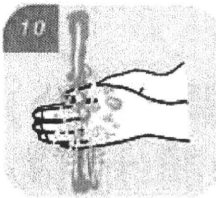
親指の関節もよく洗う。



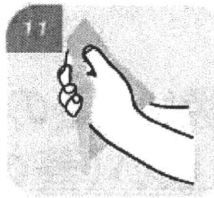
指先、爪もよく洗う。



手首も洗う。



流水で洗い流す。



ペーパータオル等で拭く。

吉田製薬株式会社
ホームページより

安全キャビネットの用意

安全キャビネット内をアルコール清拭する
滅菌敷布を敷く(吸水面を上)

必要な物品を安全キャビネットへ入れる

アルコール清拭して安全キャビネット内へ入れる

★物品を置くときに配置を考える

手が交差しないか？

手が器具の上を通らないか？

ピペットエイド、ピペットマンの取り扱い

ピペットエイド F 10 mL/sec

 M 5 mL/sec

 S 1 mL/sec

ピペットマン P-1000 P-200

ピペットの開封とピペットエイドへの取り付け方
バナナピール

元の部分(数cmくらいの範囲)だけを持つ

➡ 常にピペットの先に注意する

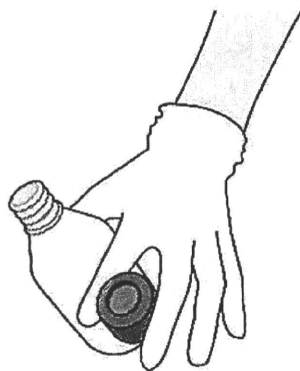
ボトルの取り扱い(蓋の開け閉め)

遠沈管の取り扱い(蓋の開け閉め)

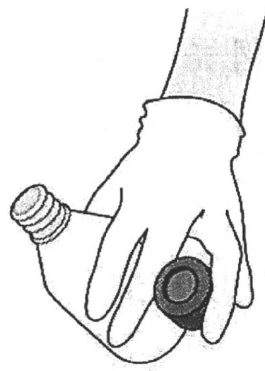
ボトル・遠沈管の取り扱い方

フタの持ち方

人差し指と中指ではさむ



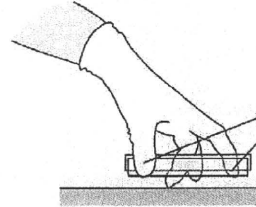
中指と薬指ではさむ



フタを持ったまま作業がしにくい場合は、**清潔な場所**に置く

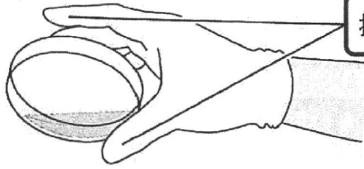
培養皿の持ち方

ディッシュのフタだけを持たない



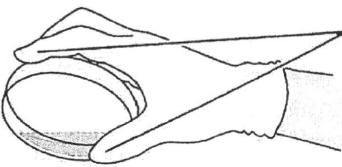
指がフタだけでなくディッシュの身までかかっていること感触をつかむ

良い持ち方

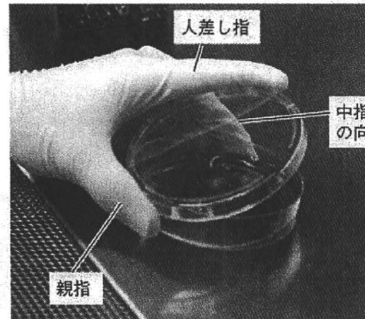


指が縁に触れないように

悪い持ち方



指が縁に触れている



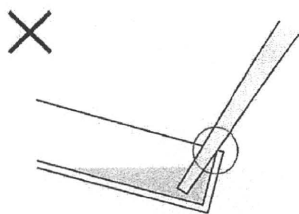
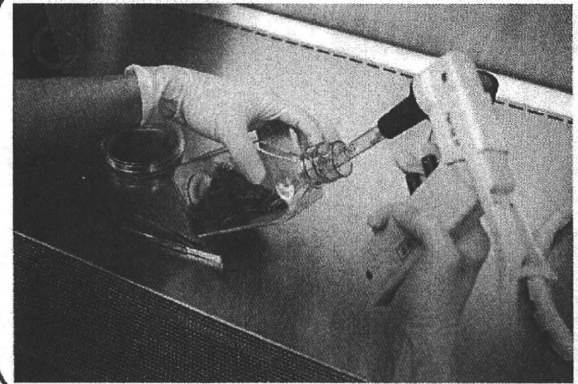
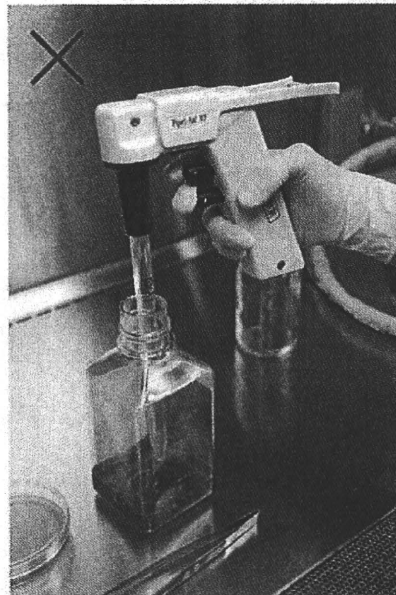
人差し指

中指でディッシュの身の向こう側を支える

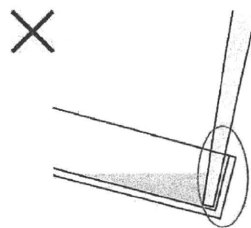
親指

フタを置く場合は、清潔な場所に置く

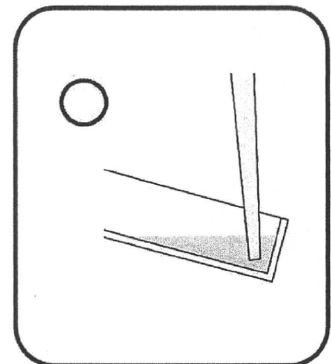
ピペッターから雑菌が落下する可能性がある



ピペットがディッシュの端に触れている



ピペットとディッシュの間を培地が昇る



細胞治療における 安全性の確保と品質管理

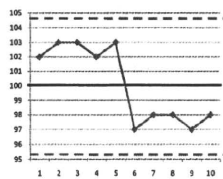
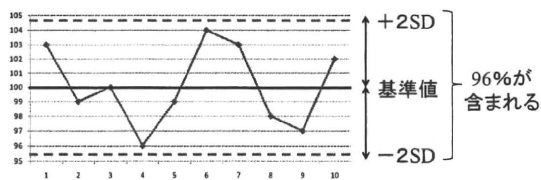
言葉の意味

- 安全性・・・「安らかで危険のないこと。」

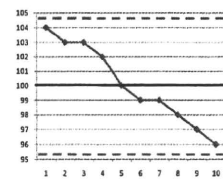
➢ 医薬品は、投与量や使い方でスリにも毒にもなる。
➢ 原則として、医薬品は純粋な化学物質を原料とし製造されるが、細胞や組織は様々な物質が含まれており、個体差も大きい。

- 品質管理・・・「定められた規格に合っていることを統計学的に解析し確認すること。」

➢ 管理幅(許容範囲)の設定が重要。
➢ 許容範囲内であっても、トレンド解析が必要。



シフト現象



トレンド現象

言葉の意味

- 安全性・・・「安らかで危険のないこと。」

➢ 医薬品は、投与量や使い方でスリにも毒にもなる。
➢ 原則として、医薬品は純粋な化学物質を原料とし製造されるが、細胞や組織は様々な物質が含まれており、個体差も大きい。

- 品質管理・・・「定められた規格に合っていることを統計学的に解析し確認すること。」

➢ 管理幅(許容範囲)の設定が重要。
➢ 許容範囲内であっても、解析が必要。

言葉の意味

- 安全性・・・「安らかで危険のないこと。」

品質を保証し、安全性を高めるには、潜在している危険を見付けだす必要がある。

厄介なのは「ヒューマンエラー(人為的過誤)」

➢ 許容範囲内であっても、解析が必要。

ヒューマンエラーを減らすには、

- 教育訓練を受け、一定レベルの技術と知識を身につける。

➢ どのような作業であっても、十分に理解したうえで実施する。
➢ 小さな異変でも、原因が明らかでない場合には要注意。
➢ 定期的に再教育訓練を受ける。

- 重要な作業は、複数の作業員で実施する。

➢ ダブル・チェック (人と人、人とコンピューターなど)
➢ 作業手順書に従って作業を実施し、作業記録を残す。

「滅菌」と「消毒」

どこが違うのか・・・ 「滅菌」「消毒」「殺菌」などの用語

「滅菌」とは

すべての菌（微生物やウイルスなど）を死滅させ除去すること。菌を取り除くため最も厳しい対応。人体に対しては行えないので、器具などの菌に対しての用語。

「消毒」とは

病原性微生物を死滅または除去し、害のない程度まで減らしたり、あるいは感染力を失わせるなどして、毒性を無力化させること。滅菌しても毒素だけが残ることがある。

「殺菌」とは

この用語には、殺す菌の対象や殺した程度を含んでいない。このため、一部の菌を殺ただけでも殺菌といえる。この用語を使う場合、厳密な有効性は保証されない。

ついでに・・・ 「除菌」「抗菌」などの用語

「除菌」とは

「限られた空間に含まれている微生物の数を減らし、清浄度を高める」という意味があるが、学術的な専門用語としてはあまり使われない。

「抗菌」とは

この用語には「菌の繁殖を防止する」という意味があるが、経済産業省の規定では細菌のみを対象としていて、カビ等は対象外である。これも対象や程度を含まない概念。

日常生活でのイメージでは、「消毒」が菌を取り除くイメージが最も強い。

無菌と無菌の保証レベル

無菌 (Sterile) とは、

「生菌の存在しない状態」

注：無菌状態の完全な証明は、現実的に不可能である。

滅菌医薬品の無菌保証レベル (Sterility Assurance Level)

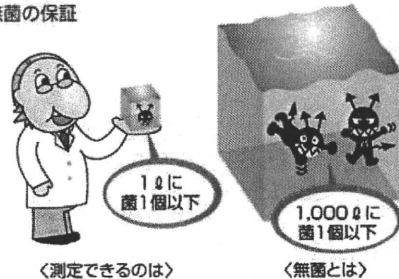
「通常、 1×10^{-6} 以下の無菌性保証水準が得られる条件で滅菌を行わなければならない。」

(第15改正 日本薬局方)

このレベルは、無菌試験の保証限度を超えるものであり、プロセスバリデーションの実施によりはじめて保証される。

無菌管理

無菌の保証



〈測定できるのは〉

〈無菌とは〉

オーバーキルアプローチ

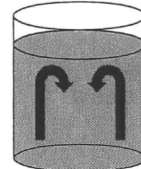
オーバーキルアプローチとは、初期菌数の調査を必要としない滅菌条件をいう。

- 菌数の減少が $12\log(10^{12})$ 桁以上
- 滅菌後の到達菌数が $10^{-6}/\text{ml}$ 又は g 以下を満足する。

【例】 高圧蒸気滅菌 121℃ 12分以上
乾熱滅菌 170℃ 30分以上

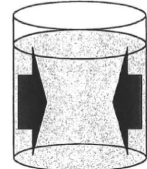
滅菌を行う際の注意点

滅菌を行う物質中で、熱がどの様に伝わるか考慮する。



液体

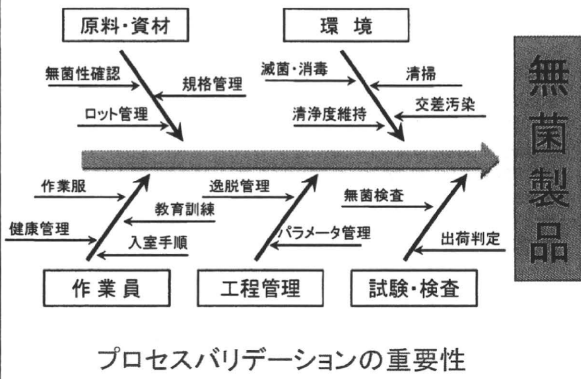
対流があれば、均一になりやすい。



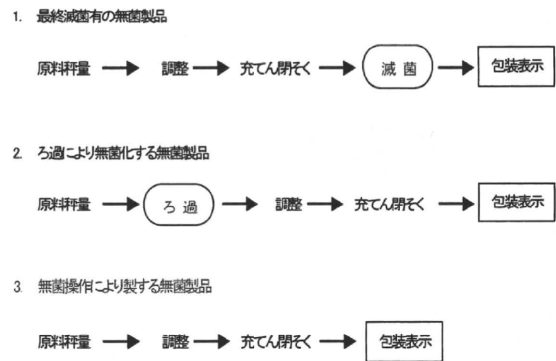
粉末など

温度上昇の度合いが、不均一になる。

無菌製品製造の特性要因図



無菌製品の製造工程



高圧蒸気滅菌と乾熱滅菌の比較

	オートクレーブ	乾熱滅菌
滅菌条件	121℃ 12分以上	170℃ 30分以上
メリット	比較的低温で滅菌できる。 芽胞を形成する菌にも効果的。	180℃、30分以上で、芽胞にも完全に殺せる。 250℃、30分以上で、パイロジェンを分解できる。
デメリット	パイロジェンは分解できない。 熱に弱いプラスチック器具を滅菌できない。	水分を多く含むものは滅菌できない。 高熱に弱い素材は滅菌できない。

殺菌灯(UV灯)の効果

- ・ 紫外線による殺菌の原理は、細菌細胞内にエネルギーの大きい紫外線が吸収されて、核蛋白構造が変化し、細菌生命の維持や新陳代謝に障害をきたし、死滅すると考えられている。紫外線で発生するオゾンの量は僅かである。
- ・ 殺菌作用は波長253.7nm付近が最も強く、その殺菌力は直射日光にも含まれている波長350nmの紫外線の約1,600倍にも達する。
- ・ UV灯の寿命は、一般的に6000～8000時間とされている。1日12時間使用すると、500～650日で規定の出力は出なくなる。
- ・ 殺菌効果があるのは、ランプから1m以内まで。殺菌効果は、距離の二乗に反比例する。また、反射光は効果が大きく下がる。
- ・ パスボックス内のUV灯は、物が何も入っていない状態でパスボックス内の殺菌を目的としている。

ろ過滅菌の完全性試験

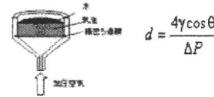
細菌濾過法
(バクテリアチャレンジテスト)

薬液ろ過：フィルター孔径：0.2μm
フィルターの性能を保証推定する非破壊試験。
大きさのわかっている細菌を濾過して、その漏れの程度によって膜の細孔径を決定する方法。

公称孔径 0.22μmを決める指標菌 (Pseudomonas diminuta)、
および 0.45μmを決める指標菌 (Serratia marcescens)
(いずれも1.5:1の長さ：径比をもつ短桿菌)が決められる。

バブルポイント法：

精密濾過膜をよく濡らす液体（水またはアルコール）をあらかじめ膜の細孔内に吸収させておき、下記のような器具に設置する。膜の裏側から空気圧をかけて、膜表面に気泡の発生が観察できる最小圧力を測定する。これをバブルポイントと呼ぶ。液体の表面張力とこの圧力との関係式から細孔径が推算できる。



$$d = \frac{4\gamma \cos\theta}{\Delta P}$$

[d[m]: 細孔径、θ: 膜素材と溶媒の接触角（完全に濡れる溶媒（イソプロピルアルコール）の場合は0°で、cosθ=1）、
γ[N/m]: 溶媒の表面張力、ΔP[Pa]: バブルポイント圧力]

消毒剤の選択

無菌・清浄区域の清掃と消毒

- ・清掃と消毒は定期的に行うべきである。
- ・洗剤は、最終製品と接触しない区域にのみ使用する。
- ・環境菌をモニタリングし、使用する消毒剤の適合性を確認する。
- ・消毒剤は、使用前に滅菌処理を行う。
- ・消毒剤は、ロット毎に管理し、有効期限を表示し、詰め替えはしない。
- ・耐菌性の観点から、違う種類の消毒剤と交替使用を検討すべきである。
- ・カビ、酵母が発生した場合、胞子殺滅剤の使用を検討すべきである。
- ・製品接触面で消毒剤の残留が無いことを確認する。
- ・定められた条件に従って、消毒剤を保管する。

消毒の基本原則

消毒の効果＝ 消毒薬の効力
× 消毒の技術・機械の性能
× 徹底度・丁寧さ
× 頻度

エンドキシン(Endotoxin: 内毒素)

- エンドキシンは、グラム陰性桿菌の細胞壁外膜の構成成分の1つであり、リポ多糖体(Lipopolysaccharide:LPS)である。パイロジェンと同義語として用いられている。
- エンドキシンは、菌体の形状保持だけでなく、外部からの攻撃に対して、細胞内部を保護する役目を有している。
- エンドキシンが非経口的投与により体内に入ると、発熱やショック、白血球増多など多彩な生体作用を引き起こし、致死に至ることもある。
- エンドキシンは熱に安定であり、通常の滅菌処理では除去できないので、原料段階から汚染管理が必要である。
(250°C、30分間の乾熱滅菌でエンドキシンは分解可能)

エンドトキシンの定量

リムルス試験

- カプトガニの血液成分 (Limulus Amoebocyte) とエンドトキシンとが反応し凝固することを応用した試験。
- エンドトキシンの単位として重量単位の「pg」と、力価を示す「EU」が用いられる。
- E. Coli の UKT-B 株では 125pg が 1EU に相当するが、グラム陰性菌の菌種によって力価は異なっている。

日本薬局方 (JP) では、医薬品に含まれるエンドトキシン量に関して厳密な規定を設けている。

エンドトキシン規格値の設定 (第15改訂 JP)	
投与経路	(EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内: 放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2

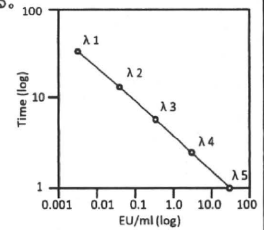
エンドトキシン測定標準操作法

➢ 検量線の作成

使用するリムルス試薬の測定範囲内で、少なくとも3濃度以上の標準液を使って検量線を作成する。

➢ 検量線の信頼性確認

検量線を作成して相関係数「r」を求める。「r」の絶対値は、0.980 以上でなければならない。



➢ 反応干渉因子試験

試料中のエンドトキシンを測定する場合には、既知の濃度のエンドトキシンを添加し、その回収率を調べ、反応に影響を及ぼす因子の有無を試料ごとに調べる必要がある。



トキシノメータ ET-2000

細胞培養で使用する装置の基礎知識

- CO2インキュベーター
- 安全キャビネット

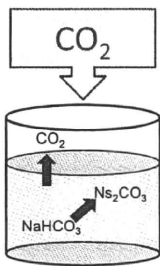
CO₂インキュベーター

金属製のトレーには、水が入っている。

チャンパー内の湿度を100%にして、培地の蒸発を防ぐ。

カビや雑菌が繁殖しやすい！

なぜ、培養にCO₂が必要なのか？



- 培地のpHや浸透圧を一定の範囲に維持するため、培地の中にはNaHCO₃が含まれている。
- 37°Cに保温された培地の中では、NaHCO₃からCO₂が放出され、その結果Na₂CO₃が残りpHが上昇する。
- 一定圧の炭酸ガスをインキュベーター内に吹きこむと、pHが下がり生理的なpH(7.2~7.4)で維持できる。

インキュベーターの温度制御方式

- ウォータージャケット方式: 外壁と内壁の空間に満たされた水を、ヒーターで温めて温度制御を行う方法。

 メリット: 保温効果が高く、温度が安定している。
 デメリット: 構造が複雑なため、若干高価。大量の水を扱うので、クリーンルーム内には不適切。
- エアージャケット方式: チャンバーの各壁面に設置したヒーターにより直接チャンバーを温めて温度制御を行う方法。

 メリット: 設定温度の変更が速やかに行える。乾熱滅菌することもできるタイプもある。
 デメリット: 外気の影響を受けやすい。停電があると、短時間で温度が低下する。

「クリーンベンチ」と「安全キャビネット」の違いを知っていますか？

間違えると、大変なことに...

