

魚病診断マニュアル

コイ春ウイルス血症（SVC）の診断
細胞培養（細胞の継代・分散・保存）

（平成 20 年 8 月 改訂版）

独立行政法人 水産総合研究センター

養殖研究所 魚病診断・研修センター

1. 注意事項

- ・ 使用培地の確認。密栓系 (培養フラスコ), 開放系 (24well・96well プレート), 炭酸ガス下それぞれの培養条件による適切な培地・緩衝系の選択。
- ・ ウイルス分離や培養に用いる細胞は, 原則として2週間以内に分散したものをを用い, 分散翌日にウイルスや検査試料を接種する。
- ・ 細胞はできるだけ凍結保存しておく (付録3)。

2. 必要な実験装置と試薬類

1) 試薬・実験器具



- ・ 細胞 (コンフレントなもの)



- ・ 試薬

1. 培地 (市販の液体 MEM500mL (例 : Invitrogen-Gibco, 11575) に血清 (例 : Invitrogen-Gibco, 500mL, 12483) を 50mL (10%) と抗生物質 (例 : Invitrogen-Gibco 抗生物質-抗真菌剤, 100x, 100mL, 15240-062 なら 5mL、抗真菌剤のない抗生物質、例えば、ペニシリンとストレプトマイシンだけのもの (Invitrogen-Gibco, 15140-122) でもよい) を加える。さらに、オプションとして、マイコプラズマ感染の予防対策用に、例えば Plasmocin (InvivoGen, 25mg/mL, 1mL) を 1/5000 (5 μ g/mL) (500mL 培地なら 100 μ L) にして加えてもよい。



2. PBS (-) -EDTA 液 (例 : Invitrogen-Gibco, 100mL, 15040 066)
3. 細胞分散液 (0.05% トリプシン-EDTA 液) (冷蔵保存) (例 : Invitrogen-Gibco, 100mL, 25300 0540)

1,2 を自分で調整する場合は付録 1,2。

- ・ ピペット (滅菌済み)

培養器(フラスコ・プレート) (滅菌済み)

2) 主な実験機器・装置



- ・ クリーンベンチ



- ・ 倒立顕微鏡

- ・ 冷蔵庫 (培地類の保存)
- ・ オートクレーブ
- ・ インキュベータ

3. 手技



- ① 分散する細胞の状態と密度を確認する。分散倍数 (1本から何本の培養フラスコを作るか) を決める。細胞によるが、通常、3~5倍程度。



- ② 細胞培養フラスコ（器）および細胞分散の試薬瓶をアルコールスプレーしてクリーンベンチ内に搬入する。



- ③ 試薬瓶や培養液瓶を開けていく。キャップや瓶口は，バーナーで軽く火炎滅菌する。



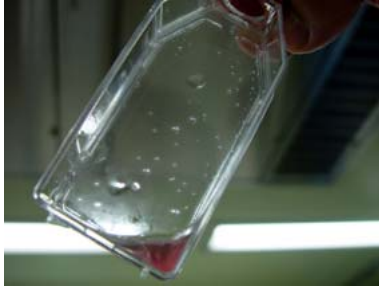
- ④ 培養フラスコの培養液を抜き取る。



- ⑤ PBS(-)-EDTA 液を数 mL 程度フラスコに加え，細胞表面を洗い流すように PBS(-)-EDTA 液をなじませる。そのまま 1,2 分間程度静置する。



- ⑥ PBS(-)-EDTA 液を抜き取った後，細胞分散液(トリプシン-EDTA 液)を数滴加え，細胞表面全体にいきわたらせ，静置する。時々細胞表面が乾かないように液をいきわたらせる。



⑦ 細胞が白く見えるようになってきたら、フラスコ側面を軽く叩いてみる。細胞がフラスコ面から容易に剥離するようであれば、トリプシンによる化学的消化を終了させるため⑧へ移行。

⑧ 培地数 mL を加え、トリプシン反応を停止させる。ピペティングを数回行うことにより物理的分散を行う。分散倍数（何本のフラスコとするか）に応じて必要量の培地をさらに加え、細胞浮遊液とする。（通常、3～5 倍程度）

⑨ 各フラスコに細胞浮遊液を入れる。25cm²では5～7mL、75cm²では15～20mL、24 穴プレートでは各穴1mLを目安とする。

⑩ 細胞のラベルを作る。細胞名、継代数、倍数、培地（血清濃度）、日付を記入し、フラスコに貼る。

⑪ 細胞の分散状態を観察する。

⑫ 供試細胞・使用目的に応じた温度のインキュベーターに收容する。

付録 1 : Hanks' 培地の調製法

粉末培地 : ろ過滅菌

必要な実験装置と試薬類

- ・ スターラー
- ・ スターラーバー
- ・ ビーカー
- ・ 蒸留水
- ・ メディウムビン
- ・ フィルターユニット(0.22 μm)
- ・ オートクレーブ



Hanks' MEM 粉末培地に抗生物質が含まれているものがあるので、用途に応じて選択する。

- ① ろ過滅菌して調整する市販粉末培地。通常 1 L 用。L-グルタミンなどは通常含まれているので、蒸留水で溶解し、ろ過滅菌後、血清と抗生物質を加えればすぐに使用できる。
- ② 1L の蒸留水を計り取ったビーカーを準備し、スターラーバーを入れ、スターラーを回しながら、粉末培地を徐々に投入し、良く溶解させる。炭酸水素ナトリウムおよび必要であれば抗生物質も添加する。
- ③ 粉末培地が完全に溶解したら、クリーンベンチに搬入し、培地瓶に 0.22 μm フィルターユニットを取り付け、減圧してろ過する。



- ④ ろ過後，必要であれば，血清を加える。冷蔵保存。

付録 2 : PBS(-)-EDTA 液の調製法



- ① 日水製薬ダルベコ PBS(-)を 500mL 以下の培地瓶に測り取る。さらに，0.02%となる EDTA・4Na を測り取り培地瓶に入れる。規定量の蒸留水を加え溶解する。
- ② 121℃, 15 分間のオートクレーブを行う。
- ③ 室温あるいは冷蔵庫で保存する。

付録 3 : 細胞凍結保存

1. 注意事項

- ・ 凍結する細胞の密度に注意。原則としてクライオバイアル 1 本から 25cm² フラスコへ細胞を起こす密度とする。それより細胞数が少ない場合には、起こすときに使用すべき培養器 24 穴あるいは 12 穴プレート用などをクライオバイアルのラベルに明記しておくこと。
- ・ 保存する細胞は、増殖期のものを使用する。
- ・ 複数のバイアルを一度に凍結保存し、数日後、その内の 1 本を起こし、生存状態などを観察して凍結保存が成功していることを確認すること。

2. 必要な実験装置と試薬類

1) 試薬・実験器具



- ・ 増殖期の細胞
例えば、5 本保存する場合、25cm² フラスコを 5 本程度準備する。



- ・ 通常使用する培地
- ・ PBS(-)-EDTA 液 (調製法は付録 2)
- ・ 細胞分散液(トリプシン-EDTA 液) (冷蔵保存)
- ・ ピペット (滅菌済み)
- ・ 培養器 (滅菌済み)
- ・ 凍結保存培地 (セルバンカー (血清タイプ) など)
- ・ クライオバイアル(例 : NUNCTM Brand Products, Cat.No.375418)
- ・ タオルまたはバイセル(例 : 日本フリーザ)



2) 実験装置

- ・オートクレーブ
- ・クリーンベンチ
- ・倒立顕微鏡
- ・遠心機（室温で 1200rpm 程度の遠心ができればよい。）
- ・-80℃超低温冷凍庫

3. 手技

1)凍結保存



- ① 細胞浮遊液を作成する。（ここまでは、細胞培養法—手技①～⑫の操作に従う。）



- ② 細胞浮遊液を遠心管に入れ、室温、1200rpm で3分間遠心する。



- ③ 細胞が沈澱し、パックとなっていることを確認し、上清の培養液を除去した後、クライオバイアル1本あたり 1mL の凍結保存培地で軽くピペッティングして細胞を浮遊させる。



- ④ 直ちに、クライオバイアル1本に1mLずつ分注する。



- ⑤ +4℃に予冷しておいたバイセルにバイアルをいれて、そのまま-80℃超低温冷凍庫へ保存する。バイセルのかわりにペーパータオルを使用する場合はバイアルに室温のペーパータオルを巻いて、そのまま-80℃超低温冷凍庫へ保存する。

2) 細胞起こし



数日したら、凍結保存が成功しているか、1本溶かして細胞を起こして確認してみる。

- ⑥ クリーンベンチ内に培養液を準備する。培地の血清濃度は10%程度と高い方がよい。25cm²フラスコおよび15mL容の滅菌済み遠心管も準備する。



- ⑦ -80℃超低温冷凍庫からクライオバイアル1本を取り出す。水に浸し、時々静かに揺り動かして融解させる。このときに、あまり激しく振ってかき混ぜて溶かしてはならない。



⑧ 融解したら、すぐにクリーンベンチに搬入する。



⑨ 直ちに細胞液を遠心管に移し、培養液を 9mL 程度加え、軽く混合する。



⑩ 室温，1200rpm で3分間遠心する。



⑪ 細胞が沈澱し、パックとなっていることを確認し、上清の培養液を除去する。



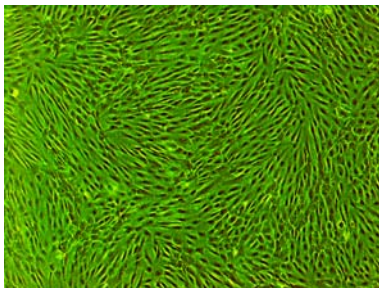
⑫ 培養液 5～7mL を加え、ピペットで細胞を静かに浮遊させる。



- ⑬ 25cm²培養フラスコに細胞浮遊液を移す。



- ⑭ 顕微鏡で観察し, 多数の細胞が輝きのある球形であることを確認する。



- ⑮ 至適温度(20-25℃)で培養する。翌日に多数の細胞が底面に貼付き, 伸張していることを確認する。ほとんどの細胞が浮遊してしまっている場合には, 凍結保存が上手くいっていない。もう一度, 保存操作を行う。

一旦凍結保存が成功すれば, 冷凍庫に事故のない限り, -80℃超低温冷凍庫内で1,2年以上は保存できる。生存状態を調べつつ, 定期的に細胞を起こし, 増殖させ, 再度凍結保存する。定期的に起こした細胞を用いれば, 細胞の性状の変化をあまり気にすることなく, 一定の細胞継代数の範囲内で常に試験が可能となる。

参考資料

- 1) 組織培養の技術 (第二版), 日本組織培養学会編, 朝倉書店
- 2) 微生物学実習提要, 東京大学医科学研究所学友会編, 丸善株式会社
- 3) 魚病対策技術研修-ウイルス学実習の手引き-, (社) 日本水産資源保護協会
- 4) バイオ実験イラストレイテッド(6巻、すくすく育て細胞培養)、秀潤社