

# 本書の構成と使い方

## 本書の構成

### 1章 研究背景を知る

培養操作を行うにあたり、まずは細胞について理解を深めよう。各種細胞の知っておきたい性質や活用される研究分野、研究戦略について紹介。

### 2章 基本操作を知る

続いて細胞培養に共通の基本操作をマスター。培地・試薬の調製法から無菌操作、細胞数の計測、細胞の凍結・融解法まで解説。

### 3章 実験をする

代表的な細胞について、樹立・維持培養のプロトコルを紹介。確実な培養操作と上達のコツがよくわかる。操作イラストやトラブルシューティングも充実。

### 4章 検査をする

再現性ある結果を得るために大切な細胞の標準化について解説。さらにマイコプラズマ汚染・細胞誤認を調べるための具体的な品質検査法を紹介。

### 5章 ルールを知る

ゲノム解析、生殖細胞作製、遺伝子組換え生物の使用等、細胞培養研究に関連する法令・指針について申請の具体例とともに解説。

## プロトコルの使い方

**プロトコル**  
▶線維芽細胞および間葉系幹細胞の継代方法  
● PBS (-), トリプシン-EDTAを室温に戻す  
● ① 培地を傷つけないように、培養容器を傾けるなどしながら古い培地を取り除く  
● ② 当日使用する分だけを分注できる場合は、37℃で温めた方がすべての処理が早くなる。  
● ③ ④ トリプシンは細胞培養に使用する酵素の中には比較的高い活性をもつが、実験に使用する前を剥離させる場合に問題になることがある。細胞膜上のタンパク質の発現解析を行うような実験場合には、事前に目的とするタンパク質がトリプシンで分解されるかどうかを確認しておいた方がよい。特に、FACSなどを使用して細胞表面抗原発現を抗体を用いて調べる場合は要注意である。未発現しているはずの抗原が検出できない場合はトリプシンが全滅されている可能性がある。

プロトコルの左段に実際の操作を記述。注意点や補足がある場合「a」などを付けていますので、対応する右段の解説を参照。

プロトコルの右段には、実験操作の注意点や根拠、コツなどを解説。

トラブルの「原因」と「原因の究明と対処法」の数字は対応しています。

**マウス ES 細胞** **トラブルシューティング**  
▲ 樹立時に ICM の増殖が悪い  
原因  
① 胚盤胞の質が悪い。  
② フィーダー細胞が古い。  
原因の究明と対処法  
① 発生が進みすぎた（ハッチング気味の）胚は使用しない。胚盤胞前の胚からでも ES 細胞が樹立できることが報告されているので、胚採取のタイミングが遅すぎないように調整する。  
② フィーダー細胞はできるだけ新鮮なものを用いる。

### ▶ 遠心操作について

本書では、回転数 (rpm) と重力加速度 (G) を併記しています。使用するローターに応じて、適宜重力加速度の数値から回転数を求め、遠心操作を行ってください。

### ▶ “水”について

本書では、特に断わらない限り下のいずれかの水を使用しています。

**脱イオン水**: 逆浸透膜やイオン交換膜により塩、イオンを除去した一次純水

**超純水**: 一次純水を超純水用イオン交換樹脂に通し、殺菌、濾過後、比抵抗が18 MΩ・cmを超える水