アプリケーションデータシート #030

CO_2/マルチガスインキュベーター Prescyto MG-71C/M No.1

抗菌部材の検証と細胞の低酸素培養の事例

特にこれから細胞培養や低酸素培養を始める方へ：本製品の性能検証データ

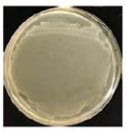
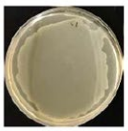
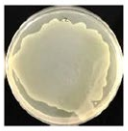
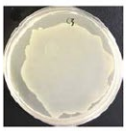
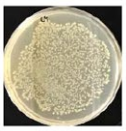
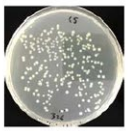
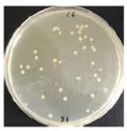
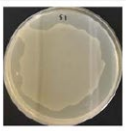
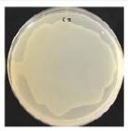
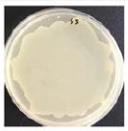
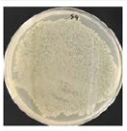
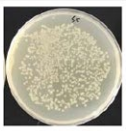
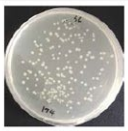
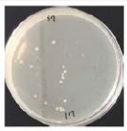
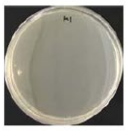
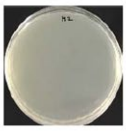
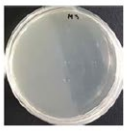
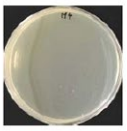
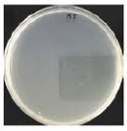
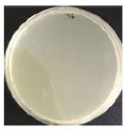
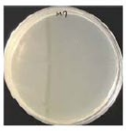
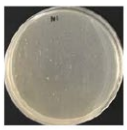
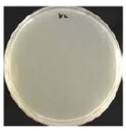
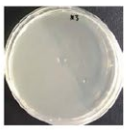
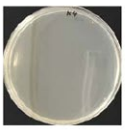
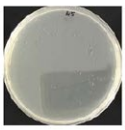
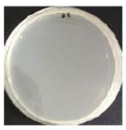
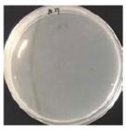
Precyto（プレサイト）MG-71シリーズについて

CO_2インキュベーター〈Prescyto MG-71C〉およびマルチガスインキュベーター〈Prescyto MG-71M〉はそれぞれ、旧製品〈MG-70C〉および〈MG-70M〉を経て発売された改良型である。組み込まれていたガスチェンジャーこそオミットされたが、ガス消費量の低減や各ガス濃度制御用センサーの保護の強化、棚板の抗菌メッキ加工等の改良が施された。マルチガスタイプである〈MG-71M〉ではさらに低酸素培養に便利な機能強化が図られている。すなわち『低酸素ブースター』だ。庫内を低酸素状態にするためには窒素ガスを送り込んで酸素を含む空気を追い出すことになるが、この窒素ガスの導入経路の見直し等により、旧製品の4倍の速さで低酸素状態にすることができるようになった（大気濃度から1%O_2まで約15分）。本製品は庫内容積が53Lという小型な部類であることも手伝って、他社製マルチガスインキュベーターと比較しても速い。無論、扉の開け閉めによる酸素濃度変化からの復帰も、速やかに行われるということだ。〈MG-71M〉は、特に高精度な低酸素培養を行いたい場合に活用して頂けるものと考えている。

抗菌メッキの効果検証

〈MG-71C〉および〈MG-71M〉は、棚板に抗菌メッキを施している。この抗菌メッキの効果を、JIS 2801「抗菌加工製品－抗菌性試験方法・抗菌効果」で指定されている方法（実験の利便性を考慮して一部改変）で検証した。

①UV照射で殺菌した基材（検証対象である抗菌メッキ棚板*、比較対象として通常の棚板、陰性対照として細菌培養用シャーレ、の3つ）を用意した。
②各基材の上に100μLの大腸菌液（7×10^4cells/mL）を滴下し、1.5mLマイクロチューブの蓋を被せて〈MG-71C〉の庫内で+37℃、24時間培養した。
③培養した菌液のうち50μLを回収し、10^{-1}から10^{-7}までの希釈系列を作成、それぞれ100μLをLB寒天培地に塗布して+37℃で一晩培養した。
④生育したコロニーを計数した。
（*）抗菌メッキには色ムラが生じる場合がある。色ムラが抗菌性能に影響するかどうかも検証した。

基材＼希釈倍数	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	結果
《陰性対照》細菌培養用シャーレ								生菌数 3.3×10^9cells/mL 相対値 1
	計数不能	計数不能	計数不能	計数不能	多数	326	38	
《比較対象》通常の棚板（ステンレス製）								生菌数 1.9×10^9cells/mL 相対値 0.59
	計数不能	計数不能	計数不能	計数不能	多数	194	17	
《検証対象》抗菌メッキ棚板								生菌数 100cells/mL未満 相対値 3.1×10^{-8}未満
	便宜上1未満とした	0	0	0	0	0	0	
《検証対象》抗菌メッキ棚板（色ムラ部分）								生菌数 100cells/mL未満 相対値 3.1×10^{-8}未満
	便宜上1未満とした	0	0	0	0	0	0	

[結果] 10^{-6}の希釈試料のコロニー数から菌液付着後24 時間後の生菌数を逆算した。ただし抗菌メッキ棚板上で培養した試料についてはコロニーが現れなかったため、1 未満として扱った。抗菌メッキにより、大腸菌を含む水滴の付着を想定した条件では通常のステンレス製棚板に比べて24時間で1900万分の一未満に増殖を抑制できたと考えられ、抗菌メッキは十分に抗菌効果があるものと言える。一部色ムラが生じていた部分についても、抗菌効果に差異は見られなかった。

〈MG-71C〉細胞の通常培養～抗菌メッキが細胞培養に悪影響を与えるかどうかの確認～

細胞：HeLa（接着細胞）、**培地**：EMEM with 10% FBS and antibiotics、**容器**：φ90㎜ 細胞培養用ディッシュ、**培養容量**：10mL
開始時細胞密度：9.3×10^3 cells/cm^2、**培養条件**：5% CO_2、+37℃、**培養時間**：約69時間、**評価項目**：細胞密度
判定基準：陽性対照である通常の棚板を用いた培養と同等……結果：通常の棚板で培養した場合と有意差は見られず。問題はなかった。

	ディッシュ静置場所	開始時細胞密度	終了時細胞密度	平均細胞密度	平均増殖率
《陽性対照》通常の棚板（ステンレス製）	A（上段）	9.3×10^3cells/cm^2	6.4×10^4cells/cm^2	6.7×10^4cells/cm^2	7.2倍
	B（中段）		5.3×10^4cells/cm^2		
	C（下段）		8.2×10^4cells/cm^2		
《検証対象》抗菌メッキ棚板	A（上段）		7.8×10^4cells/cm^2	7.0×10^4cells/cm^2	7.6倍
	B（中段）		7.6×10^4cells/cm^2		
	C（下段）		5.7×10^4cells/cm^2		

〈MG-71M〉細胞の低酸素培養～低酸素によるアポトーシス誘導～

細胞：PC12（ラット副腎髄質由来褐色細胞腫、接着細胞）
◉**通常培養用**……**培地**：RPMI1640 with 10% FBS, 5% horse serum and antibiotics、**培養条件**：5% CO_2、+37℃
◉**アポトーシス誘導用**……**培地**：RPMI1640 with 2% FBS and antibiotics、**培養条件**：1.0% O_2（N_2ガスで調整）、5% CO_2、+37℃
容器：φ35㎜ 細胞培養用ディッシュ、**評価項目**：アポトーシス／ネクローシス誘導効率（文献[1)]値と比較）

［手順］
①$5\times10^4$ cells/cm^{2}となるよう細胞を撒き、24時間培養した（通常培養の条件）。
②培地をアポトーシス誘導用に変えて細胞を9つのディッシュに分け、インキュベーター内の下図の位置に静置して24時間培養した（通常培養の条件）。
③低酸素状態にして、さらに60時間培養した（アポトーシス誘導の条件）。
④細胞を回収してPIとDAPIで二重染色し、形態観察によりアポトーシスおよびネクローシスを起こした細胞の割合をカウントした。

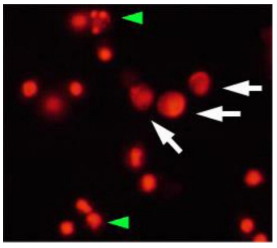
［結果］文献[1)]値と同等のアポトーシスが誘導されたとともに（平均値81% vs.文献値75%）、庫内静置位置による有意差も認められなかった（最小値÷平均値＝75%÷81%＝0.93、合否判定基準0.75）。

▼ディッシュ静置位置

【上段】		
1		2
3		4

【中段】		
	9	

【下段】		
5		6
7		8



▶アポトーシス誘導後の形態観察
緑矢尻：アポトーシス（核が断片化、または小さく凝縮）
白矢印：ネクローシス（核の大きさや形が生細胞と同様）

静置位置	アポトーシス	ネクローシス	÷平均値
1	83	17	1.02
2	81	19	1.00
3	79	21	0.98
4	80	20	0.99
5	79	21	0.98
6	86	14	1.06
7	82	18	1.01
8	75	25	**0.93**
9	84	16	1.04
平均	**81**	19	
5%O_2の場合（参考）	3	0	
文献値	75	25	
判定基準			0.75

好評発売中

Prescyto（プレサイト）MG-71C/M

〈MG-71C〉は、標準的な性能の小型CO_2インキュベーターです。棚板に抗菌メッキを施した他、オプションのUV殺菌ユニットもあります。〈MG-71M〉は、高精度な低酸素培養が可能です。窒素ガス発生装置やグローブ付きドア、酸素濃度プログラムユニット等のオプションも充実しています。

CO_2インキュベーター MG-71C

マルチガスインキュベーター MG-71M（オプション組合せ例）

オプションの価格はWebをご覧ください。

著者・編集

タイテック株式会社
企画開発部 宣伝企画グループ
〒343-0822 埼玉県越谷市西方2693-1
TEL：048-988-8341　FAX：048-988-8346　E-mail：senden@taitec.org
Web：http://taitec.net/

参考文献

1)Yoshimura et al., Ceramide Formation Leads to Caspase-3 Activation during Hypoxic PC12 Cell Death. *J. Biol. Chem.* (1998) **273**, 6921-7.

［2017年7月発行］
各製品や本紙の内容に関するお問い合わせは、左記までお願い致します。