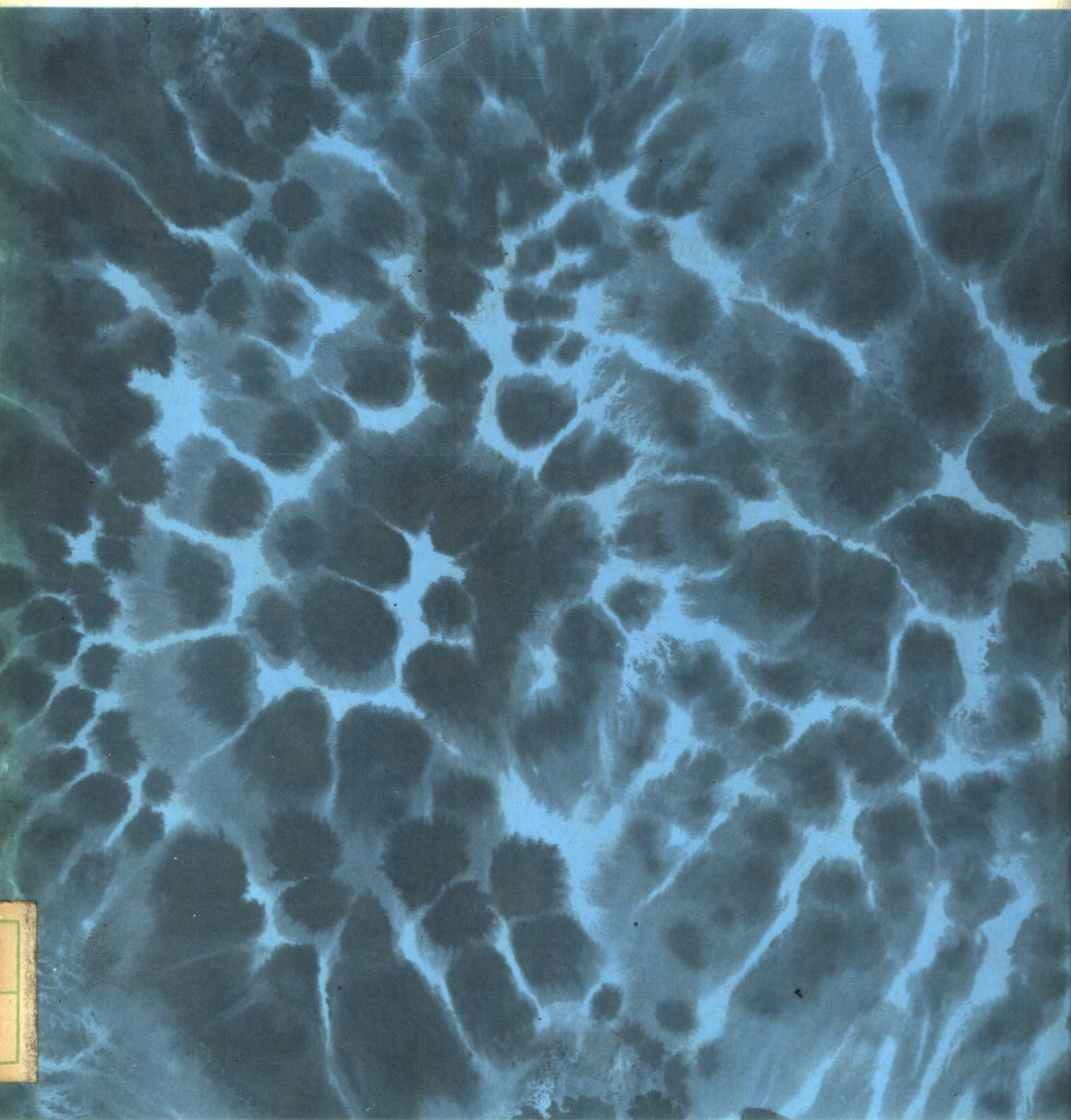


細胞培養マニュアル

宗村庚修／編



講談社サイエンティフィク

細胞培養マニュアル

宗村庚修／編

講談社サイエンティフィク

， /

編者紹介

そうむらやすのぶ
宗村庚修

1963年 京都大学理学部卒業

現 在 大日本製薬(株)総合研究所免疫研究室室長



NDC 463 250 p. 22 cm

細胞培養マニュアル

定価 3,500 円

1982年5月1日 第1刷発行

編者	宗	村	庚	修
発行者	三	木		章
発行所	株式会社	講	談	社

〒112 東京都文京区音羽 2-12-21
電話 (03) 945-1111 (大代表)
振替 東京 8-3930

印刷所	株式会社	平	河	工	業	社		
製本所	島	田	製	本	株	式	会	社

落丁本・乱丁本は、講談社書籍製作部宛にお送りください。
送料小社負担にてお取替えます。

© Yasunobu Sohmura, 1982

編集 講談社サイエンティフィク Printed in Japan

ISBN4-06-139463-0 (KS)

執筆者一覧

あきの 浅野	のりひで 哲秀	大日本製薬(株)総合研究所免疫研究室(技-12, 資-3)
あべ 阿部	しゅいち 守一	大日本製薬(株)ラボラトリープロダクツ部(技-7, 資-1)
くりもと 栗本	まさし 雅司	(株)林原生物化学研究所(技-10)
こばやし 小林	のぶひと 信人	大日本製薬(株)ラボラトリープロダクツ部(資-1)
さとう 佐藤	じろう 二郎	岡山大学医学部附属癌源研究施設(まえがき)
* そうむら 宗村	やすのぶ 庚修	大日本製薬(株)総合研究所免疫研究室(技-1, 6, 11, 資-1, 2, 3, 4, 5)
とこわ 常盤	たかよし 孝義	岡山大学医学部附属癌源研究施設(技-2, 3, 4, 5, 9)
ひだか 日高	ひでゆき 英幸	(株)林原生物化学研究所(技-10)
ひら 平井	よしかず 義一	岡山大学医学部細菌学教室(技-7)
みつはし 三橋	まさかず 正和	(株)林原生物化学研究所(技-10)
みやもと 宮本	かんじ 寛治	岡山大学医学部附属癌源研究施設(技-8)
よしもと 吉本	じゅん 純	岡山大学医学部泌尿器科学教室(技-4)

(五十音順, *は編者, カッコ内担当章)

(技:技術編, 資:資料編)

はじめに

今回講談社より発刊される「細胞培養マニュアル」は大日本製薬株式会社総合研究所組織培養センターの宗村庚修氏が多年にわたって培養細胞の頒布を行い乍ら研究者との間で交換された培養株細胞の取り扱いに関する多くの経験をもとに特に初心者向けに実用的具体的な知識をまとめあげたものである。従って培養をはじめめるための基礎的知識においても又培養の実施に当っても具体的に取り扱い者が困惑しないように丁寧に実用書として記載されている。個々の培養技法について(2項より12項まで, 101頁より144頁まで)は, それぞれの研究室において相違が見られるので詳細は30頁の一般文献を参照されることが望ましい。本書のもう一つの大きな特徴はその資料編にある。資料編1では58種の株細胞の顔とも云える位相差顕微鏡写真があり, 資料編2では一般的実用的な培地組成とその比較があり, 資料編3では組織培養用資材および供給業者一覧表が見られ, 資料編4では市販株細胞の一覧表が200種類を超えてヒト及び種属別に特徴, 文献, 形態, 増殖性, 染色体及びウイルス感受性に関して記述されている。このような資料編を記載した培養関係書は従来見当らない。細胞培養をはじめめる人のみならず, 現在培養に従事している方々も座右に置いて充分に利用する価値のあるものと確信するしだいである。

1982年3月

岡山大学 医学部附属癌源研究施設

佐藤二郎

目 次

まえがき

iii

技 術 編

1	これから細胞培養をはじめる人のために	1
	A. 細胞培養の必要条件	1
	B. 細胞培養に必要な装置・器具	3
	C. 細胞入手前の準備	5
	D. 株細胞の入手	10
	E. 細胞の培養	19
	F. 培養実験に際して	29
2	細胞増殖度の測定	31
3	細胞凍結保存法	32
4	オートラジオグラフィ	34
5	クローニング	36
	A. 単個培養法	37
	B. 希釈培養法	38
6	培養細胞の標識方法	39
	A. ^{51}Cr による標識方法	39
	B. ^3H または ^{14}C による標識方法	41
	C. ^{125}I による標識方法	42
7	組織培養細胞株のマイコプラズマ汚染	45
	A. マイコプラズマ汚染の防止	46
	B. マイコプラズマの検出	46
	C. マイコプラズマの除去	53

目 次

8	ヒトの染色体標本作製法	55
	A. 培養法	55
	B. 標本作製法	55
	C. 染色体数の観察	56
	D. バンド染色法	56
	E. 白血病患者材料の標本作製法	57
9	突然変異原性試験	57
10	インターフェロンの産生と生物活性測定	58
	A. インターフェロンの産生	59
	B. インターフェロンの生物活性測定	60
11	細胞の大量培養法	63
	A. 大量培養法の種類	63
	B. スーパービーズによる大量培養法	68
12	魚類細胞の培養法	71
	A. うろこの表皮細胞の培養	71
	B. うろことひれの表皮細胞の混合培養法	72
	C. 発眼胚培養法	73
	D. ひれの表皮細胞の培養法	73

資 料 編

1	各種株細胞の位相差顕微鏡写真	75
2	培地組成表	109
3	組織培養用資材および供給業者一覧表	127
4	株細胞特性一覧表	161
5	細胞株に関する索引	233
	索 引	241

1 これから細胞培養をはじめる人のために

A. 細胞培養の必要条件

細胞が試験管内で育成するためには、もとの生体内の状態にできるだけ近いものにする必要がある。そのためには、少なくとも次に示す6つの条件を満足させるようにしなければならない。

1) 無菌性

培養液中には多量の栄養物質が含まれているので、微生物が混入するとそれらは培養細胞よりも分裂時間がはるかに短いため急速に増殖してしまう。その結果、培養液中の栄養物質の消費や代謝によるpHの低下、さらには培養細胞にとって有害な物質の放出により目的とする細胞は死滅する。したがって、用いる培養液、器具類、操作場所および添加物質などはすべて無菌状態にする必要がある。

2) 温度

細胞には至適温度があり、由来した種(species)によって異なる。一般に至適温度を越えるとたやすく死滅するが、低い温度では死滅しない場合が多い。

哺乳類、鳥類……37～38.5℃

42℃では12～24時間、45℃では1時間以内に死滅する

魚類、両生類……20～25℃

30℃でも増殖可能な細胞もあるが大部分は死滅する

1. これから細胞培養をはじめる人のために

昆虫類……………25～30℃

3) pH

大部分の細胞は pH 7.2～7.4 で最もよく増殖する。細胞によってある程度の差はあるが、pH 6.8～7.6 の間であれば十分成育可能である。pH 6.6 以下あるいは 7.8 以上では 24 時間以内に死滅する。

4) 浸透圧

哺乳動物の細胞の至適浸透圧は約 7.6 気圧（氷点降下度 0.63℃）である。細胞は意外と浸透圧の変化に強く、10% 前後の変化ではほとんど影響を受けない。また、徐々に変化させればさらに上下させることも可能である。単層培養細胞に比べ、浮遊培養細胞のほうが影響を受けやすい。通常培養液の浸透圧は食塩およびブドウ糖で調節されている。

両生類由来の細胞では培養液の浸透圧を 15～40% くらい低下させる。

5) 栄養源

炭水化物、アミノ酸、ビタミン、ペプチドおよびタンパク質は必須の栄養素であり、そのほかに無機イオンや酸素、炭酸ガスも不可欠の成分である。さらに、細胞によってはある種のホルモンや補酵素を必要としたり、ヌクレオジドの添加により増殖性が高まるものもある。

細胞の種類や研究の目的に応じて、これらの各成分を適当に配合した種々の培養液が開発されている。特に最近では化学的に組成の判明している合成培地が多く使われる。しかし、合成培地のみで細胞を増殖させるのは一般に困難であり、各種血清をはじめ組織抽出物 (tissue extract)、イースト菌抽出物 (east extract)、ラクトアルブミン加水分解物 (lactalbumin hydrolysate) などの生物由来溶液を添加することが多い。なかでも血清が最も重要な添加物であり、ヒト、ウマ、ウシ、サル、トリなどの血清が使用される。これらの血清のうち特にウシ血清が頻用され、胎仔 (fetal calf)、新生仔 (newborn calf、生後 1 週間以内)、仔ウシ (calf、生後 6 ヶ月以内) および成牛 (bovine) の 4 段階に分けられ、年齢が経過するにつれて、細胞の増殖性が悪くなる傾向を示す。

6) 培養基

浮遊状態で増殖する細胞は別として、通常多くの細胞は培養容器の壁面に付着しないと成育できない。前者の培養を浮遊培養 (suspension culture)、後者を単層培養 (monolayer culture) または付着培養 (anchored culture) という。したがって、壁面への細胞の付着性がすぐれた培養容器を使用する必要がある。

以上6つの条件のうち、どれか1つが欠けても細胞はうまく成育してくれない。それゆえ、細胞培養を行なう際には、培地や血清以外に上記の要因を満足させるための装置や器械・器具類が必要となる。

B. 細胞培養に必要な装置・器具

すでに細胞培養を行なっているか、あるいは培養に必要な設備が整っている場合は別として、これから新しく細胞培養をはじめようとする場合、最低限どのような装置、器械および器具類が必要であろうか。一応必要と思われるものを表1.1に列挙した。しかし、最近は無菌再蒸留水や調製済みの各種培養液をはじめ、滅菌済みの培養容器類からピペット、試験管にいたるまで市販されるようになったので、これらを使用すればやや材料費は高くつくが、手軽に培養をはじめることができる。長期間細胞培養実験をするのでなければこれで十分であり、滅菌用の装置類は必ずしも必要ではない。ほかに無菌操作に必要な無菌箱（室）あるいはクリーンベンチ、孵卵器あるいは炭酸ガス培養装置、倒立顕微鏡および低速遠心機などがあれば一応の培養実験が可能である。

しかし、培養液を粉末から調製したり、ガラス製の培養びん、シャーレ、ピペット類を使うとすれば、乾熱滅菌器、高圧蒸気滅菌装置（オートクレーブ）、蒸留水採取装置、メンブランフィルター式の濾過滅菌装置などが必要となる。もちろん実験の種類や目的によって、このほかにも種々の装置や機器が必要になることはいうまでもない。

各装置、機器・器具などの詳細については、資料編3の“組織培養用資材および供給業者一覧表”の項又は他の組織培養に関する多くの参考書を参照

表 1.1 細胞培養に必要な装置および器具

装置または器具名	説 明
無菌箱(室)またはクリーンベンチ	クリーンベンチが最も便利であるが、ごく簡単な無菌箱でも可能
炭酸ガス培養装置または孵卵器	密栓式の培養であれば孵卵器でもよいが、シャーレやプレート培養の場合には、炭酸ガス培養装置が必要
倒立顕微鏡(位相差装置付き)	密栓式培養びんの場合には普通の顕微鏡でもある程度観察できるが、シャーレなどは倒立型を必要とする
低速遠心機	通常 500~1000 回転/分で使用することが多いので、最高回転数が 2000 回転/分くらいの低速専用のものが望ましい
冷凍冷蔵庫	培養液や血清の保存に必須である。細胞保存用には -80 °C くらいの超低温槽が必要
オートクレーブ(高压式蒸気滅菌器)	迅速高压式のものがよい
乾熱滅菌器	最高 200 °C まで可能な熱風式のものがよい
蒸留水採取装置	再蒸留水を使うほうがよいので、できれば 2 台(1 台は小型でもよい)備えたほうが便利である
濾過滅菌装置	加圧式のほうがよいが、吸引式でも可能。たとえば、直径 47 mm のフィルター(ポアサイズ 0.2~0.45 μ)セットおよび注射器用の直径 25 mm のフィルターセットの 2 種類があればある程度の滅菌作業が可能
培養容器	ガラス製あるいはプラスチック製の角びん、シャーレ、プレートなど実験の目的に応じてそろえる
ピペット メスピペット	先端目盛りで組織培養専用の短いものが使いやすいが、通常のものでも可能。1, 2, 5, 10, 25 ml の 5 種類くらいあるほうがよい。1 ml 以下は交換チップ式のマイクロピペットが便利である
駒込ピペット	絞り付き、目盛り付きの 2, 5, 10 ml の 3 種類もあれば十分である
バースツールピペット	絞り付きで 23 cm くらいの長さのものがよい。先端が細すぎると使いにくい
遠心管	ガラス製、プラスチック製いずれでもよいが、15 ml と 50 ml の 2 種類をそろえる。スピッツ型のもの
滅菌かん	ピペット、シャーレ、培養びん、遠心管それぞれ専用のものをそろえる。ステンレスかアルミ製がよいが、身近にある適当なかんでも結構役だつ
ゴム栓	スクリュウキャップ式の培養びんや試験管を使えば不要。できればシリコン製のほうがよい。
血球計算盤	Neubauer 式あるいは Tatai 式のものが使いやすい。やや高価ではあるが 2~3 枚あると便利である。カバーガラスはよく割れるので、いつも予備を保有しておくこと

されたい。

C. 細胞入手前の準備

細胞を実際に入手し培養しはじめるためには、少なくとも次の3つの準備作業が必要である。すなわち、細胞を植え継いだり、実験に用いるための培養容器やそのために必要なピペット、遠心管などの洗浄と滅菌および培養液の調製である。培養器具類の洗浄と滅菌は細胞培養の重要な要素の一つであり、これをおろそかにすると細胞をうまく培養することは不可能である。これらの詳細についてはすでに多くの参考書に記載してあるので、ここではそのポイントについて簡単に述べる。もちろん、調製済みの培養液や滅菌済みのディスポーザブルの器具類を使用すればこれらの作業は不要である。

a. 器具の洗浄

培養器具類のうち細胞が長時間接触する培養容器の洗浄には特に注意を払って行なう。購入したばかりの新しいガラス器具類には、アルカリが付着していることが多いので、1% HCl液に1晩浸し、水道水で十分洗ったのち、通常の洗浄を行なうとよい。ピペット類はそれぞれの長さに合わせた専用の洗浄用容器をつくると便利である。すすぎもその容器ごとサイフォン式のピペット洗浄装置に入れ、2～3時間行ない脱イオン水、再蒸留水を通しておく。ガラスびんは洗浄液をいっぱい満たしたのち、口が欠けないようにふたをしておくほうがよい。もちろんすべての器具についていえることであるが、洗剤液に浸すときには、容器の中に気ほうが残らないように完全に洗剤液を満たす。スクリューキャップのパッキングがはずれる場合には、1枚ずつはずしたのちすすぎを行なわないと洗剤が完全に洗い流されないことがあるので注意を要する。

使用済みの器具類の洗浄に際し、最も重要なことは使用後ただちに水につけ絶対にかかわさないことである。ガラス壁面上に乾固した細胞やタンパク質を完全に洗い落とすのは相当困難である。また、洗剤液に浸す前に必ず一度水洗いをしてマジック類などのよごれを落としておくと、洗浄効果も上がり洗剤も長持ちする。

1. これから細胞培養をはじめる人のために

一方、洗剤の選択もたいせつである。選択のポイントとしては、洗浄力が強いこと、低温から高温まで使用できる温度幅が広いこと、中性で皮膚に緩和であること、すすぎが簡単でガラス面に薄膜を張らないこと、さらに重要な条件として培養細胞に対して低毒性であることなどがあげられる。数多くの洗剤が販売されており、それぞれに長所短所があるが、ここでは最もよく使用されているセブンエックス (7 X) による洗浄法を例示する。

<使用例 1>

- ① 7 X 原液を 1 % に薄めた洗剤液をつくる
- ② 一度水洗いをしたガラス器具類を入れ、沸騰直前まで加熱しすぐに火を止めて自然に冷却させる
- ③ 洗剤液より器具類を取り出し、水道水で 3 回洗う。よごれがひどいときには、水道水で洗う前に柔らかいスポンジたわしで軽くこするか、静かにブラッシングする
- ④ その後、脱イオン水→蒸留水→再蒸留水の順でそれぞれ 1 回すすぐ
- ⑤ よく水をきったのち熱風乾燥する
- ⑥ 洗剤液は捨て、毎回新しくつくりなおす

<使用例 2>

- ① 7 X 原液を 5～10 % に薄めた洗剤液をつくる
- ② 一度水洗いをしたガラス器具類を入れる。このとき、もしマジックやガラス鉛筆などのマークがあれば、ナイロンたわしで軽くこすり落とす。ベンジンやアセトンなどでふき取ってもよいが、薄い油膜がはりつきなかなか落ちにくいことがある
- ③ 1～2 晩放置後 (室温)、洗剤液より器具類を取り出し、以後<使用例 1>と同様の処置を行なう
- ④ この方法であれば洗剤液はくり返し使用することが可能である。洗浄するガラス器具の量やよごれぐあいにもよるが、1 カ月に 1～2 回交換すればよい。また、水で薄まった分だけ、少量原液を補充してもよい

b. 器具の滅菌

洗浄および乾燥が済んだガラス器具類は通常乾熱滅菌が行なわれるが、場合によっては高压蒸気滅菌によることもある。

乾熱滅菌

通常 160℃、90 分間あるいは 180℃、60 分間加熱する。加熱終了後すぐに取り出さないで、室温近く冷えるまで放置しておく。あまり熱いうちに扉を開けると綿栓が燃えることがある。また急激に冷やすと外気はいり込んで雑菌が混入することがある。

シャーレ…………ふたをし適当な大きさの金属製滅菌かんに入れて滅菌する

培養びん、……アルミホイルで 1 本ずつしっかりとふたをするかあ
遠心管など
あるいは適当な金属製キャップをかぶせ、滅菌かんに入れて滅菌する

ピペット………… 1 本ずつ綿栓（脱脂されていないふとん綿がよい）
をし、ピペット専用の滅菌かんに入れて滅菌する。
折れやすい毛細管ピペットは、適当な太さの試験管
に数本ずつ分納して滅菌するとよい

高压蒸気滅菌（オートクレーブ）

通常 121℃、15 分間滅菌する。圧力は約 2 気圧に相当する。スクリュエーキャップ式のびんや試験管はキャップを少しゆるめておかないと中の温度や圧力が上昇しない。溶液を滅菌するとき、滅菌後液量が減っていることがあるので、あらかじめ滅菌前の液面をマジックなどで目印しておくとうい。大量の溶液を滅菌するときには、温度が上がらず完全に滅菌できないことがあるので、液量を減らすか、滅菌時間をやや長くする必要がある。

汙過滅菌器……吸引びんにフィルターホルダー、ガスケット、支持
メッシュ、メンブランフィルター、プレフィルター
などをセットする。吸引アームには綿栓の付いた三

1. これから細胞培養をはじめる人のために

方コックを付け、耐圧チューブで連結する。適当にアルミホイルで包んだのちオートクレーブする。なお、メンブランフィルターが破れていないかバブリングテストにより確認すること

キャップ、……適当なびんに入れてオートクレーブする
ゴム栓など

c. 培養液の調製

使用する細胞の培養液の種類や添加（補助）物質の有無あるいは自分の目的とする実験にその培養液が適しているかどうかなどを確認し、細胞入手以前に購入しておく。調製済みの液体培地を使用する場合には、無菌性や増殖性に関する品質試験が済んでいるので細胞と同時によい。粉末培地から調製する場合には、調製した培養液の各ロットにつき、少なくとも無菌試験くらは実施しておく必要がある。いくら無菌操作をうまく行なっても、培養液中にすでに雑菌が混入していたのでは全く意味がない。無菌試験には最低4～7日間くらいの期間をみななければならないので、細胞入手日より逆算して早めに培養液を調製しておくほうがよい。

なお、培養液を購入するとき、調製済みの液体培地にはグルタミンが添加されていないものもあるので、よく確認もししそうであれば忘れずに購入すること。また、Eagleの基礎培地（basal medium Eagle：BME）や最少必須培地（minimum essential medium：MEM）あるいは199培地には、Earle平衡塩類溶液（Earle's balanced salt solution：Earle's BSS）を基礎にしたものとHanks平衡塩類溶液（Hanks' BSS）を基礎にした2種類の培地があるので、購入時にはっきりと指示しまちがえないようにする。前者は NaHCO_3 量が2.2～2.3 g/lと高く5% CO_2 含有空気中で平衡状態になり、後者は NaHCO_3 量が0.2～0.3 g/lと低く通常の空気中で平衡状態になるようにしてある。細胞の増殖性が悪く、代謝活性が低いような場合あるいは培養器壁面への付着性が悪い細胞や植え込み細胞数が少ない場合にはHanks' BSS組成の培地が適している。したがって、この両組成の培地を共に用意し、細胞の状態をみながら適当に使い分けるとよい。

粉末培地から液体培地を調製するとき、最も注意すべき点は培地を溶解する水である。細胞がうまく培養できないとき、“まず水を疑え”といわれるくらいであり、溶解水には特に注意を払う必要がある。一般には、イオン交換樹脂により脱イオンした水を2回蒸留した再蒸留水を使用する。実験によっては3回蒸留した水を使用する場合もあるが、通常はそこまでする必要はない。また、最近はいオン交換樹脂とメンブランフィルターを組み合わせた純水製造装置により、蒸留を全くしない超純水も使用されることがある。

<粉末培地の調製法>

- ① 適当な大きさのビーカーに調製すべき容量より10～20%少ない量の再蒸留水を入れる。このとき再蒸留水は室温(15～30℃)のものをいい、加温しないようにすること
- ② スターラーでかくはんしながら、粉末培地を少しずつ加え完全に溶解させる。容器に残っている粉末培地も少量の再蒸留水で完全に溶かして加える

なお、10倍濃度の培養液を調製するようなとき、培地によっては完全に溶けないことがある。その場合には1N HClを少量滴下するとよい

- ③ 規定量の NaHCO_3 を加え完全に溶解させる

汙過滅菌後に滅菌 NaHCO_3 溶液を規定量加えてもよい。また、オートクレーブ可能な培地の場合には、滅菌後溶液が冷却したのを確かめてから、規定量の滅菌 NaHCO_3 溶液を加える

- ④ もし必要なら1N NaOHあるいは1N HClでpHを調整する。汙過滅菌中pHがアルカリ性に傾くので(特に吸引汙過の場合には著しい)、あらかじめpHを0.2～0.3くらい酸性にしておくほうがよい。オートクレーブによる滅菌の場合には滅菌後に調整する
- ⑤ メスフラスコに移し、規定容量まで再蒸留水を加える
- ⑥ あらかじめ滅菌しておいた汙過滅菌装置で汙過する。このとき吸引よりは加圧汙過のほうが望ましい。メンブランフィルターは0.2～0.22 μ のポアサイズのものを用いる。あまり高い圧力あるいは強い吸引力を

1. これから細胞培養をはじめる人のために

かけると、一部の菌が通過することがあるので注意を要する。

オートクレーブによる滅菌は 121 °C, 15 分間とする

- ⑦ 乾熱滅菌したガラスびんに無菌的に分注し、2~8 °C で保存する
- ⑧ 一部をとって無菌試験*1を行なう
- ⑨ 血清その他種々の補助物質を添加する必要がある場合には、使用直前に行なう。添加後の保存は添加補助物質の保存条件に従う（表 1.2 参照）

D. 株細胞の入手

a. 株細胞の選択

株細胞*2を用いて培養実験を行なうとき、自分が意図している研究目的に最も適した株細胞を選択する必要がある。株細胞はそれらが由来したもとの組織あるいは器官の特性を失っている場合が多いが、なかにはその特性の一部を保持しているものもある。そのような株細胞をうまく選択し利用することがたいせつである。一般に樹立された株細胞は一定の培養条件下では、樹立時の特性を失うことなくほぼ一定の速度で無限に増殖し続ける。特にクローニングされた株細胞はその遺伝的形質もより均一な細胞集団となり、種々の特性もさらに一定し、得られる実験結果の再現性も高くなる。そのためには、選び出した株細胞に最も適した培養条件で、じょうずに培養する必要がある。しかし、細胞によっては継代し続けるうちに、その株細胞の本来有している特性が変化するものもある。したがって、株細胞の選択に際しては、

*1 無菌試験

1) 簡便な方法としては、調製した培養液を適当な培養容器に入れ、細胞を培養する場合と同様の状態におき、経日的に顕微鏡で観察する。4~6 日経過しても全く雑菌の増殖が観察されなければ使用可能と考えてよい。この方法はあまり感度がよいとはいえないが、一応の目的は達せられる。

2) 一般には、無菌試験用のチオグリコール酸培地で細菌を、ブドウ糖ペプトン培地で真菌（カビ類）を検出する。たとえば、これらの培地を 10 ml ずつ試験管に分注してオートクレーブしておき、被検培養液 1 ml を加えたのちよく混和し、細菌の場合には 37 °C で 7~10 日間、真菌の場合には 25~28 °C で 10~14 日間培養後菌の有無を観察する。また、できればマイコプラズマの検査も行なうとよい。

*2 ここでいう株細胞とは細胞系（cell line）、樹立細胞系（established cell line）、細胞株（cell strain）およびクローン株（cloned cell line）などをすべて含むものとする。