

技術資料 CryoELITE® クライオジェニックバイアル

概要

細胞の保存は、細胞培養において非常に重要な要素です。細胞保存の最も有効な方法は、液体窒素または低温フリーザーを用いて細胞を凍結させることです。

必要品リスト

- > 滅菌済みDMSOまたはグリセロール
- > 培地
- > WHEATON製ガラスアンプルまたはクライオエリートクライオバイアル

背景

培養細胞の保存は、高い生存率が求められるという点では、バクテリアおよび菌類の保存とは異なります。微生物培養の一般的な生存率は1%なのに対し、細胞培養ではそのような低い生存率は受け入れられません。細胞株にとって高い生存率が求められる理由としては、調製のコストと労力、遅い増殖率、培養中の可変性が挙げられます。つまり、低温保存による細胞培養では高い生存率を得ることが必須条件となります。

インナーキャップかアウターキャップか

インナーキャップ型のバイアルは、キャップとバイアルの外径が等しいため、よりしっかりと密閉されると考えられる場合もあります。つまり、同じ温度下においてはキャップとバイアルが等しく膨張するため、よりしっかりと密閉されるということです。さらに、一般的にインナーキャップ型バイアルにはシリコン密封が施されているため、液体窒素に浸しても、液体がバイアル内に侵入することを防止できるとされています。

しかし実際は、液体窒素による収縮は非常に小さいため、密封状態に影響を与えることはありません。WHEATONクライオエリートバイアルは全て、内圧漏出耐性の基準をクリアしており、WHEATONクライオエリートアウターキャップ型バイアルには、内圧による漏れを防ぐための工夫がさらに加えられています。独自の調査により（表1参照）、WHEATONクライオエリートアウターキャップ型バイアルは、キャップの溝に2°の傾斜がついている構造のため、圧力に曝された環境下であっても最も信頼性の高い密閉状態を保つことが証明されました。この設計により、キャップとバイアル表面との接触が強くなり、絶対的な密閉状態が保たれるのです。アウターキャップ型バイアルのもう一つの利点は、ネジ山が外部の環境から守られているために培養物のコンタミネーションのリスクを低減できることです。また、インナーキャップ型バイアルよりも容量が多いという点もその特徴の一つです。

インナーキャップ型バイアルが選ばれる大きな理由の一つとして挙げられるのが、保存ボックスに入る本数が多いという点です。インナーキャップの外径はアウターキャップの外径よりも小さいため、標準的なフリーザーボックスに入れた場合、収納密度が19%も高くなります。

クライオバイアルのメーカーの中には、培養物を液体窒素に浸しても問題は無い、と主張するメーカーもありますが、多くの研究者はこの主張に異論を唱えています。ほとんどのバイアルは液体窒素内でも密閉状態が保たれるのですが、液体窒素がバイアル内に浸み込む可能性も依然として残っています。もしも液体窒素がバイアル内に浸み込んでいた場合、そのバイアルを温めると液体窒素が急速に気体となり、バイアルを破裂させてしまいます。

このことから、培養物は液体窒素の上の蒸気層に保存することが望ましいです。このような条件において液体窒素の保存容器の開閉作業を適切に行っている限り、細胞は適切な温度に保たれます。この際、液体窒素の保存容器を所定の位置に置くことによって、フリーザー内の培養物を容易に見つけることができ、フリーザーおよび培養物を扱う時間を短縮することができます。

ガラス製クライウルアンプルの熔封

WHEATONガラス製クライウルアンプルの熔封手順として、まずアンプルの首部を炎の中で回転させて柔らかく曲げやすい状態にします。そのまま回転させながらアンプルの首部をゆっくりと鉗子で引っ張ります。アンプルの熔封部分が本体から分離したら、先端部分を炎に曝して密封します。アンプルを冷却した後、メチレンブルーまたはトリパンブルー溶液に浸し、アンプルが密閉されていることを確認します。アンプルに付着した染色液を洗い流し、細胞懸濁液に染色液が混ざっていないかを確認します。アンプル内に染色液が入っている場合、しっかりと熔封されていないということですので、そのアンプルは破棄してください。

初期凍結&保存

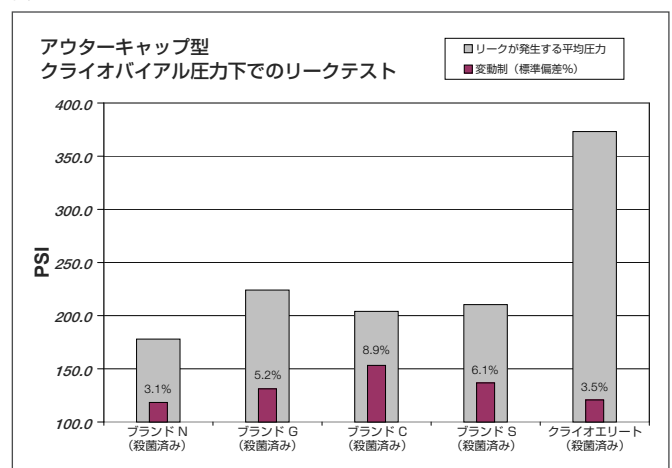
サンプルの冷凍スピードは、氷晶が形成される早さだけでなく氷晶のサイズや位置にまで影響し、その全ての要因が細胞の回復に関係してきます。多くの場合、周辺温度からゆっくりと1分間あたり-1℃のペースで冷却するのが効果的です。バイアルを使い捨てポリスチレンラックに収納し、-80℃フリーザーで2~3時間ほど冷却した場合、1分間あたり1℃に近い冷却ペースとなるので、この手法は様々なタイプの細胞に有効です。サンプルを予定温度まで初期凍結した後は、バイアルを長期保存に移します。

WHEATONクライオエリートクライオバイアルまたはガラス製クライウルアンプルを使用して初期凍結する場合、培養物を-80℃のフリーザーに一晩入れておくのが良い方法と言えます。凍結細胞を保存する温度は、細胞の生存率に影響します。一般的に、保存温度が低ければ低いほど、生存期間が長くなると言われております。-80℃で保存した場合、少量の未凍結水が原因の化学反応が徐々に引き起こされることがあり、細胞の死滅につながります。

融解

凍結の場合とは対照的に、細胞の生存を維持するためには急速な融解が必要です。バイアルをフリーザーから取り出す際は、低温火傷を防ぐためにクライオグローブを着用してください。フリーザーからバイアルを取り出したらすぐに37℃のウォーターバス内で攪拌融解してください（ハイブリドーマ細胞は除く）。氷晶が全て融解したら、ウォーターバスからバイアルを取り出します。水をふき取り、70%エタノールに浸すか噴霧し、バイオセーフティフード内で開封します。その後、トリパンブルーで細胞を染色し、生存している細胞の割合を算出することも可能です。

表1

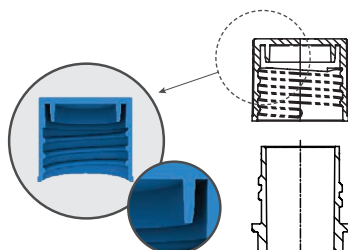


自立型

丸底型

アウターキャップ

インナーキャップ

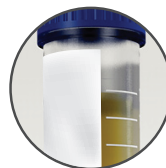


プラグ栓の溝に2°の傾斜がついていることによって、バイアル表面との接触がより強まり、確実に密閉されます。



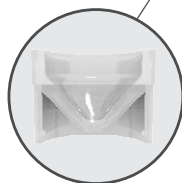
キャップに溝がついていることで、片手または自動化装置によるキャップの取り外しが容易です。

シリコン製O-リングのストレスレベルを超えることなく、高い圧力にも耐えることができます。

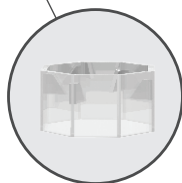


ガラス並みの透明度がある半透明材質により、内容物の確認が容易です。

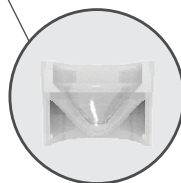
自立型底の特長



E-Z Ex-Tractionコンカルウェル設計 (E-Z Ex-Traction Conical Well Design) により、自動化およびマニュアルのリキッドハンドリングにおいて効率的なサンプル回収が可能となります。



オクタゴンバイアルスカート (Octagon Vial Skirt) により安定した自立が可能となるだけでなく、クライオエリートベンチメイトトラックに固定もできることから片手で容易に開閉することができます。



2Dデータマトリックス・バーコードインサートを取り付けることにより、サンプルの永続的なトレースが可能となります。

精巧な丸底設計により、最大17000RCF (xG) の遠心に耐えられます。