

1 基本概念

1.1 糸状菌の遺伝子組換え実験において講じるべき拡散防止措置は、一般に微生物学者が行っている無菌操作をベースにして考えられる。すなわちコンタミネーションの防止法や滅菌操作法を活用して、肉眼ではとえられない孢子の存在を意識しつつ実験を行うことである。

1.2 アカパンカビについて

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) は子囊菌門フタマカビ目フタマカビ科に属する糸状菌 (図1) である。産業利用の例はなく、病原性についての報告もない。ビードルとテータムの一遺伝子一酵素仮説の提唱以来、遺伝学のモデル生物として用いられているのは、遺伝学的バックグラウンドがきれいであることや、遺伝子重複を嫌うという独自の性質に基づいており、DNA メチル化、概日リズム、RNA 干渉などの基礎科学研究をはじめ、オリジナリティのある研究が多く、遺伝学や分子生物学における知見は、応用分野に対する学術的基礎を提供している。近年、遺伝子組換え技術の発展に伴い、アカパンカビ研究においては、糸状菌において他



図1 無性生殖(栄養生殖)過程のアカパンカビ

に類を見ない全遺伝子ノックアウトライブラリーの作製、オルガネラの可視化などのような研究のプラットフォームが構築された。さらに、先に述べた基礎分野の研究においても、遺伝子組換え技術は欠かすことはできず、これらの先達的な学術的貢献とスキームの提案は、他の糸状菌類の研究において基礎・応用の両面においてモデルとされることが多い。アカパンカビの生活環は図2に示した通りである。遺伝子組換えのアカパンカビについての拡散防止の対象となるのは、無性孢子すなわち分生子 (conidium, conidia (pl.))、菌糸 (hypha, hyphae(pl.))、菌糸体 (mycelium, mycelia(pl.)) そして、有性生殖過程によって生じる子囊孢子 (ascospore) である。

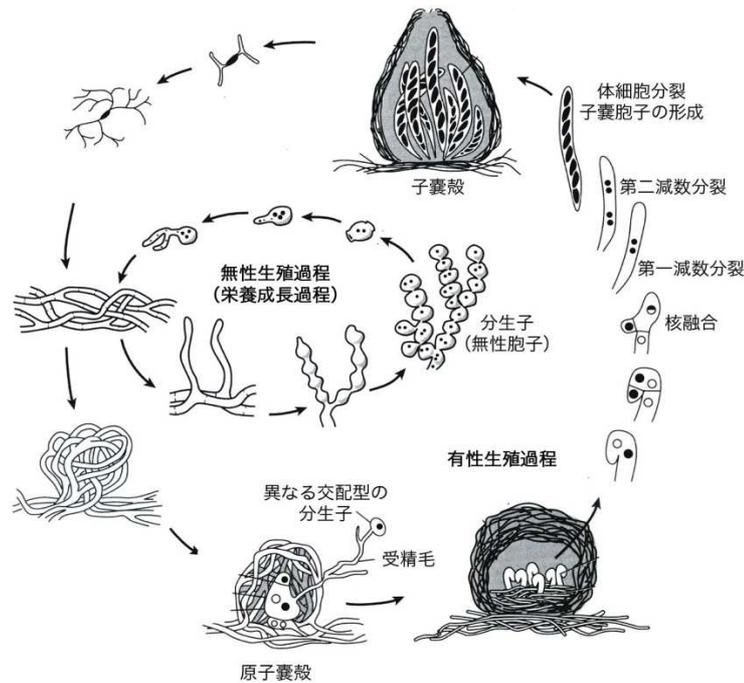


図2 アカパンカビの生活環 (R.H.Davis 著 NEUROSPORA より改変)

2 遺伝子組換え実験の要件

2.1 ソフト要件

アカパンカビはヒト等への病原性が無く BSL1 に属し、遺伝子組換え実験の宿主の分類としてはクラス 1 であるため、本項では P1 を前提とした組換え実験の例を述べるが、供与核酸によってはより高い拡散防止レベルが求められることになる。必要となる拡散防止レベルは研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等によって定められているので、実験ごとに確認すること。

一般的なカビ、キノコ等を用いた組換え実験においては、生物種ごとの特性、化学物質や物理的な感受性の差異、さらに、分生子（無性胞子）と有性胞子による違いを考慮し、実験毎に適宜検討することが肝要である。

2.2 ハード要件

2.2.1 実験室

表示：「P1 レベル実験中、関係者以外立入禁止」の表示等により、実験従事者以外の立ち入りを制限することが望ましい。

窓：閉じておくこと。

換気扇：使用しないこと。

着衣：実験室中だけで使用する専用の白衣が望ましい。持ち出しに際しては組換え体の付着を想定した不活化を実施する。

2.2.2 機器

安全キャビネット：通常 P2 レベル以上の遺伝子組換え実験の場合に、安全キ

ャビネットが必要要件となるが、カビやキノコ等の分生子・孢子などが飛散し易いことを考慮し、P1レベルであっても安全キャビネット内で実験操作を行うことを推奨する。安全キャビネット内に飛散した分生子等の不活化については、紫外線照射をはじめ、アルコール等の薬品処理などの対策を講じておく。

クリーンベンチ:クリーンベンチは微生物等無菌的に取り扱うための装置である。そのため、水平送風型や垂直送風型のように、外部から吸気した空気をHEPAフィルターなどによって浄化して内部に送り込む装置が多い。しかしながら、カビやキノコ等の分生子・孢子を扱う場合には、これらの方式はクリーンベンチ外への分生子・孢子の拡散を招く可能性があるため、外部に空気を排出しない「循環型クリーンベンチ」を使用する。

オートクレーブや乾熱滅菌機:実験に使用する器具等の滅菌及び、組換え体の不活化のために実験室や建物内に備えておくこと。具体的な方法については、「3. 組換え体の不活化方法」の項を参照のこと。

3 組換え体の不活化方法

3.1 加熱による不活化（「日本薬局方」の微生物滅菌法に準ずる）

3.1.1 オートクレーブ（121℃、15分など）

不活化する組換え体が培地を含む場合には、培地の形状（固形、液体）及びその容量によって不活化条件の変更（時間延長など）を検討する必要がある。

3.1.2 乾熱滅菌（160～170℃、2～4時間など）

使用器具、培養容器等の滅菌、および組換え体の不活化を行う。

乾熱滅菌器の機能として、タイマー運転、過熱防止装置などがあることが望ましい。電源の電圧や電流容量に応じて、過電流・漏電ブレーカー等の措置が適正かどうか確認する必要がある。

3.2 紫外線、拭き取り、浸漬等による不活化方法

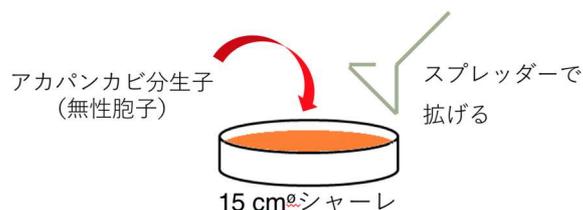
3.2.1 安全キャビネット内の紫外線殺菌灯

安全キャビネットの要件については、別記(この章ではない)参照のこと。

培養用の試験管などの培養栓の開閉などの操作によっても、分生子が飛散することを常に意識する。培養栓の開閉時に分生子がどの程度飛散しているかについては、《参考3 バーナーを用いた実験（開放系）》参照のこと。安全キャビネット内で飛散した分生子に対する殺菌灯の効果については、以下の《参考1》を参照のこと

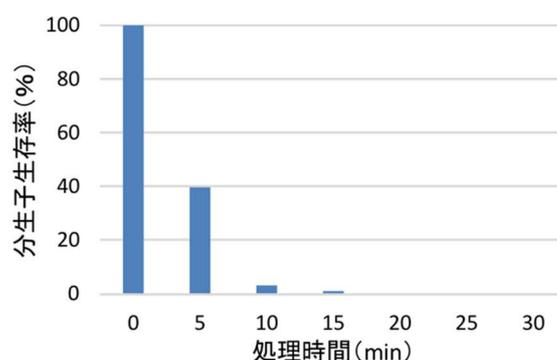
《参考1》安全キャビネット内に飛散した分生子に対する殺菌灯の効果について検証を行った。殺菌灯（GL-15、15W、培地表面までの距離：60cm）の照射

による、アカパンカビ野生株の分生子の生存率を経時的に測定した（図4、図5）。



- ① 培地*をシャーレにまき、よく乾かす。
- ② 分生子懸濁液(10⁴個/mL)を100 μL(1000個)スプレッダーで培地表面にぬり拡げ、培地表面を乾かす。
- ③ 安全キャビネット内でUV照射。
(UV照射時間：0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min)

図4 殺菌灯の効果についての検証実験の概要



UV照射時間 (min)	0	5	10	15	20	25	30
分生子生存率 (%)	100.0	39.5	2.96	0.078	0	0	0

図5 安全キャビネットの殺菌灯の効果

図5に示されている通り、安全キャビネットの殺菌灯（UV灯）は、残存するであろう分生子の不活化に有効であった。よって、UV灯（GL-15、15W、培地までの距離：60cm）によりキャビネット内を30分間殺菌することが望ましい。組換え体を扱う際には参考にされたい。UV灯のみに頼らず、実験終了時に70%エタノール等でキャビネット内を拭くことによって、実験環境を清浄に保ち、組換え体の不活化効果の増大が期待できる。

*培地：Vogel 最小培地（1%ソルボース、0.2%ショ糖、1.2%寒天を含む）16 mLを15 cm^φシャーレに固化した後、非処理区の生存分生子数が1,000個となるように懸濁して、シャーレに拡げ、紫外線照射を行なった。30°C、2日間培養

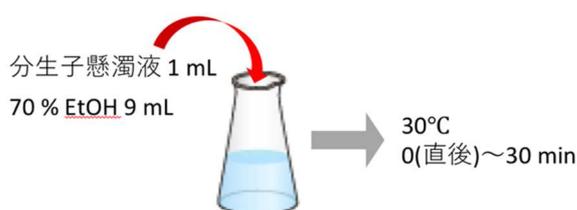
の後にコロニー形成数をカウントした。

3.2.2 70%エタノールによる分生子の不活化

一般的に、細菌の消毒に用いられる70%エタノールは、アカパンカビ分生子の不活化においても有効であり、適切に利用することで拡散防止効果が期待できる。下の《参考2》で述べるように、70%エタノールにより、瞬時に分生子は不活化される。

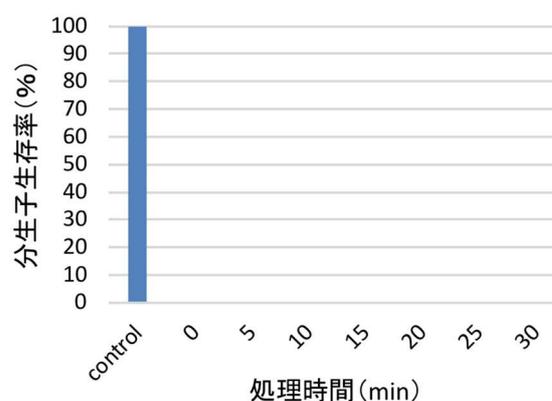
《参考2》70%エタノールのアカパンカビ分生子に対する効果

アカパンカビの分生子懸濁液と70%エタノールを混合し、1,000個の分生子あたりの生存率を経時的に求めた(図6、図7)。



- ① 分生子懸濁液1 mL(1×10^5 個/mL)と70% EtOH 9 mLを50 mLフラスコに入れ、30°Cで振とうする。(70% EtOH 処理時間: 0(直後), 5, 10, 15, 20, 25, 30 min)
- ② 70% EtOH 処理を行った後、培地*と分生子懸濁液100 μ Lを混合し、まく。

図6 70%エタノールの効果についての検証実験の概要



EtOH処理時間 (min)	control	0	5	10	15	20	25	30
分生子生存率 (%)	100.0	0	0	0	0	0	0	0

図7 70%エタノールのアカパンカビ分生子に対する不活化の効果

*培地: Vogel 最小培地 (1%ソルボース、0.2%ショ糖、1.2%寒天を含む) 16 mL に処理後の分生子を混合し、15 cm ϕ シャーレにまいた後、30°C、2日間培養してコロニー形成数をカウントした。

3.2.3 次亜塩素酸ナトリウムによる不活化

0.1%程度(有効塩素濃度)の次亜塩素酸ナトリウムあるいは市販の塩素系漂白剤等(0.1 M 水酸化ナトリウム、0.1% 次亜塩素酸ナトリウム、+ α)は、カビの不活化に有効である。また、成分の次亜塩素酸ナトリウムは単独でも、分生子を瞬時に溶解する。分生子懸濁液等の調製や、ガラス器具(血球計算盤、スライドガラスなど)、電気穿孔用キュベットなどのように、再使用する器具に付着した組換え体の不活化に利用できる。

塩素系漂白剤もしくは0.1% 次亜塩素酸ナトリウムに器具を1~10分間浸漬する。その後、純水でリンスし、オートクレーブ等の処置をする。

3.2.4 オスバン(塩化ベンザルコニウム)

陽イオン界面活性剤であり、バクテリアやカビの細胞表面へ吸着し、細胞膜成分の変性と細胞壁破壊による滅菌作用が期待される。通常市販品(10%)を100倍希釈して用いる場合が多い。70%エタノールと同様に、残存した組換え体の分生子の拭き取り除去および不活化、浸漬による不活化に利用する。10%製品は経口毒性が高く、成人致死量は10~30mLであることに留意し、製品原液のままでの使用しないように注意する。

4 植え継ぎ等、実験操作上の注意点

4.1 糸状菌を扱う実験操作(継代、植え出し、菌糸の回収など)の際には、通常、バーナーを用いた無菌操作を行うが、特に組換え体の分生子を用いた場合には、分生子の飛散に十二分に注意しなければならない。そのために重要な3つのポイントを述べる。

■分生子が拡散・漏出しない設備を用いること。

組換え体の糸状菌を扱う実験は、分生子が飛散することを十分に予見し、安全キャビネット、循環型クリーンベンチなどの設備・機器内で行う。これらの要件については、本章「2.2 ハード要件」を参照のこと。

■分生子の飛散を極力抑えるような操作を心がけること。

植継ぎ等の操作における培養栓の取り外し・取り付け、及び植継ぎ操作において、分生子の飛散の可能性を十分に考慮する。安全キャビネット、クリーンベンチを用いた場合にも留意すべきであり、吹き出し型のクリーンベンチまたは開放系で実験した場合については、組換え体の分生子の飛散が拡大されるとともに、実験者にも分生子が付着する可能性が飛躍的に増大することに注意を払う。

(開放系において、カビの分生子がどの程度飛散しているかは、《参考3 バーナーを用いた実験(開放系)》の項を参照のこと)

■設備・機器、および実験台等に残存する分生子等を不活化すること。

設備・機器などに、組換え体の分生子が残存する恐れがある。安全キャビネットでは、紫外線殺菌灯の点灯により不活化する。また、クリーンベンチ、実験台に残存する分生子等は、薬品等（70%エタノール、次亜塩素酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム）を浸み込ませた実験用ワイパー、実験用タオル等で拭いて、組換え体の除去および不活化を行う。また、実験に用いたディスポーザブル器具等は、回収したのちオートクレーブにより不活化して廃棄する。再利用するガラス実験器具等は上記薬品等に浸漬することで不活化する（前項 3. 組換え体の不活化方法を参照）。

4.2 培養栓について

4.2.1 シリコセン（図8）

シリコン樹脂を素材としており、スポンジ状のために通気性があり、乾熱滅菌が可能である。カビ、きのこの培養において幅広く使用されている。

長期間の培養によっては菌糸が立ち上がり、シリコセンのわずかな隙間から菌糸がでてくることもあるため、組換え体の培養の際には、拡散防止の観点から培養中の監視は不可欠である。



分生子を形成した培地のシリコセンを急に取り外すと分生子が飛散しやすくなるため、開ける際にはゆっくりと外すこと。また、シリコセンへの分生子や菌糸体の付着の有無を確認すること。

菌糸の立ち上がりの予防については、後の「シリコナイズ処理」の項を参照。

4.2.2 綿栓（図1）

寒天培地を用いたカビの前培養、本培養、子嚢胞子の単離などには、綿栓を用いることも多い。通気性においては、シリコセンよりも優れているが、組換え体の分生子の拡散防止と、もしくはコンタミネーションの防止のためには、綿栓自体にある程度の硬さが必要となる。綿栓を取り付けたのち、綿栓のみをつまんで軽く振っても外れない程度を目安とする。

綿栓はふとん綿を用いる。脱脂綿はオートクレーブの際の水分を吸着して通気性を損なうとともに、再乾燥に時間を要するため不向きである。また、ふとん綿の成分が菌糸の生育に影響を与えることもあるため、コストを考慮しない場合には、シリコセンを用いても良いだろう。

綿栓を使用した培地を用いた無菌操作における拡散防止としては、分生子の飛散を防止するために、シリコセンと同様に、急な綿栓の取り外しを行わず、ゆっくりと外す、綿栓への胞子の付着の有無を確認する等に注意が必要である。

4.3 使用器具等

4.3.1 **マイクロピペット**：組換え体を用いた実験の前後に消毒用アルコール等で拭く。本体への誤吸引を避けるために、急激なピペッティングの操作を避ける（フィルター付きチップの利用も有効である）。なお、オートクレーブ可能なマイクロピペットも市販されている。

4.3.2 **チップ、マイクロチューブ、スポイト、綿棒**：組換え体を用いた実験に用いるマイクロピペットの先端に取り付けるチップは使用後に不活化して廃棄する（次項参照）。マイクロチューブ（微量遠心管）の使用に当たっては、飛沫の拡散を防ぐために蓋の急激な開閉を避ける。掛け合わせなどにおいて、異株のコンタミネーションを防止するために、ディスポーザブルスポイト（トランスファーピペットなど）を用いる。綿棒（メンティップ、φ4.8×153mm など）は、分生子懸濁液の作製の効率化において用いる。これらの実験消耗品は使用後に不活化して廃棄する（次項参照）。

4.3.3 実験消耗品の不活化と廃棄

安全キャビネットなど実験スペースに、小さなオートクレーバブルバッグ（クリスタルパック S24-33.2 を使用）を設置する。実験に用いたチップ、微量遠心管等を一時的に回収しておく。作業終了後、まとめてオートクレーブによって不活化処理する。この時に、内容物を確実に不活化するためには、高圧水蒸気への曝露が必要であることから、バッグの開口部をあえて開放しておくことが肝要である。不活化処理後に口を閉じて廃棄する。

4.3.4 シリコナイズ処理

カビやキノコの培養時にガラス製の試験管や三角フラスコの内壁を菌糸が立ち上がることがあるが、これを防ぐ方法の一つとしてシリコナイズ処理が挙げられる。ガラス器具の内壁の微細な傷はカビやキノコの菌糸の足場となり、培養栓からの組換え体の漏出の危険性を増長しかねない。この処理は目視できない程度の傷をシリコンコーティングすることで、菌糸の足場を埋めることを目的とする。

ドラフト内において、シリコナイズ処理には2%ジクロロシラン/クロロホルム溶液（ジクロロシラン：吸入による危険性、眼の損傷、呼吸器系障害のおそれがあるので、取り扱いに十分注意する。クロロホルム：吸入により体内に吸収され、中毒性肝炎肝臓腫大などを起こす毒性があるため、換気および使用後の廃棄に注意する）をごく少量内部に入れ、数回塗布し、残余溶液は難燃性有機廃液として廃棄する。ドラフトの排気装置を稼働しつつ、容器等の内部の液体が見え無くなるまで放置する。水でリンスし（リンス廃液は難燃性有機廃液として廃棄）、中性洗剤で洗浄して使用する。

4.4 《参考3 バーナーを用いた実験（開放系）》

古来、バーナーやアルコールランプなどの燃焼によって発生した上昇気流を利用し、コンタミネーションの防止を企図した無菌操作が行われており、現在もより安価な手法として取り入れている研究室も多い。しかしながら、孢子等の飛散に留意しつつ操作を行っていても、分生子は火炎によって生じた気流に乗って飛散する。つまり、バーナー等を用いて遺伝子組換え体の実験操作をする場合には、安全キャビネット内であっても、分生子・孢子の飛散に留意をしなければならない。

以下は、実験台のような開放系において、ガスバーナーを用いてアカパンカビの野生株（非組換え体）の分生子懸濁液を調製した際に、分生子がどの程度飛散していたかのデータを示す。また、安全キャビネット、クリーンベンチでも分生子の取り扱いの際には分生子が飛散するということに留意すべきである。

実験台上のガスバーナーによる上昇気流のもと、アカパンカビの野生株の分生子の懸濁液を調製する作業、具体的には、培養によって分生子が形成された試験管に緩衝液を入れ、綿棒を用いて懸濁したものを 50 mL の遠心管に移す作業を 15 分間行った（遠心管 4 本程度）。実験終了後に滅菌水を染み込ませた脱脂綿により実験台を拭き取り、脱脂綿に含まれる分生子を滅菌水に再懸濁し、これを培地にまいてカウントした。この結果、面積 60×115 cm の実験台において、約 60 個の生存分生子がカウントされた。このことから、バーナーの気流に乗って、作業終了までに、実験台上に落下した分生子が約 60 個以上あったことが示された。

*培地：Vogel 最小培地（1%ソルボース、0.2%ショ糖、1.2%寒天を含む）16 mL に分生子懸濁液を混合し、15 cm ϕ シャーレにまいた後、30 $^{\circ}$ C、2 日間培養コロニー形成数をカウントした。

また、この実験台の上部の棚（約 1.5m 上）における落下菌も検出した（図 9）。

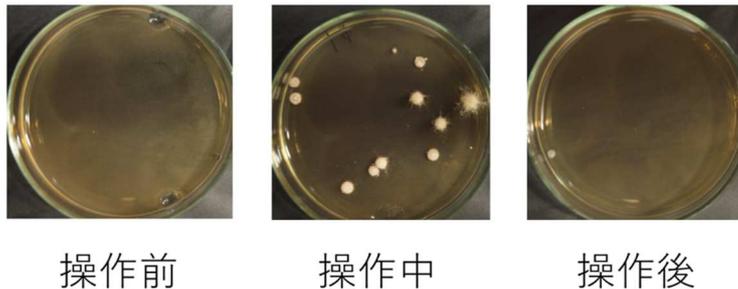


図 9 棚上の落下菌の検出

操作前・後（操作終了から約 3 分を経た頃合い）には落下菌は検出されなかったが、操作中にはアカパンカビ野生株のそれぞれ 1 個の分生子由来のコロニーが数個検出された。よって、バーナーを用いた操作中は飛散するが、操作後には空中にとどまることなく直ちに落下するという性質が示されている。この性質にも留意すべきである。

*培地：Vogel 最小培地（1%ソルボース、0.2%ショ糖、1.2%寒天を含む）16 mL を 9 cm^φシャーレにまいた後固化させ、操作の前・中・後に、棚の上に静置した。30°C、2 日間培養してコロニー形成数をカウントした。

4.5 《参考4 分生子懸濁液の作製》

アカパンカビの性質の定量的な評価、電気穿孔法による遺伝子導入などにおいて、分生子懸濁液を作製し、濃度を測定したのちに各種実験に使用する。

完全培地などで前培養（25°C、1 週間程度）し、分生子が形成された培地（試験管等）に、緩衝液を入れ、綿棒を用いて懸濁する。この操作時（培養栓の開閉など）に、分生子が飛散しないように注意する。ガラスウールを詰めたフィルターで菌糸を濾別し、分生子を 50 mL 遠心管に回収する。分生子を遠心によって集菌し、滅菌水*で洗浄する作業を 1～2 回行って、滅菌水で懸濁した後、一部を滅菌水で希釈し、血球計算盤を用いて、懸濁液の分生子濃度を求める。

分生子濃度測定に用いたチップ、微量遠心管などは回収し、オートクレーブによる不活化処理して廃棄する。血球計算盤はディスポーザブルのものを用いた場合もオートクレーブで不活化処理して廃棄するが、ガラス製など再利用する場合には、次亜塩素酸ナトリウム溶液による不活化処理を行う（3.2.3 を参照）。

*（電気穿孔による遺伝子導入の際には、さらに 1 M ソルビトールで置換する。それ以外の場合には緩衝液もしくは滅菌水を用いて分生子懸濁液を調製する。）

4.6 《参考5 子嚢胞子の単離》

掛け合わせによって生じた子嚢胞子（有性胞子、図2）の単離は、通常無菌的に行わない。子嚢胞子は実体顕微鏡下でニードルを用いて単離する。子嚢胞子は分生子とは異なり飛散しないが、付着等による拡散防止には十分に注意を払う。低温殺菌（60°C、45～60 分）によって、他の菌類が殺菌され、アカパンカビの子孫の子嚢胞子のみ単離が可能である。この処置により発芽が誘導されるが、誘導後に伸長した菌糸はこの温度に感受性であるため、処理時間の延長に留意する。子嚢胞子は通常のオートクレーブ処理によって不活化される。

5 培養時、保管時の注意点

5.1 カビダニ（コナダニ、*Acaroidea* に属する一群のダニの総称。カビダニは俗称）

カビの培養において留意すべきは、カビを食するカビダニの存在である。掛け合わせなど、長期間の培養の際にはカビダニの出現に特に留意しなければならない。ヒトの生育環境下では、カビやダニの存在を避けて通ることはできない。綿栓は、本来空気のみを通過させるものとして、カビの培養において重宝されているが、我々微生物学者の意に反して、カビダニは綿栓をかき分け培養試験管内に侵入し、カビの菌糸や分生子を食する。そのダニが別の培養試験管に侵入した場合にはコンタミネーションの原因となり、また、遺伝子組換えカビを付着させたダニが外部に

出た場合には、遺伝子組換え体の拡散が危惧される。

例えばアカパンカビの掛け合わせは3～4週間の長期間に渡るが、不運にも掛け合わせの培地の中に、アカパンカビのオレンジ色の分生子が詰まったダニを発見することもある。アカパンカビの掛け合わせの場合には、アルミキャップを用い、パラフィルムを巻くことでコンタミネーションを防いでいる。しかしながら、パラフィルムの巻き方が甘い場合にもカビダニの侵入が認められる。カビダニが侵入した場合には、培地の外に出ていくことも考慮するべきであるので、遺伝子組換え体の拡散を疑わざるをえない。なお、コナダニの繁殖に適した環境はカビのそれに非常に近い条件であるため(25～28℃、相対湿度75～85%)、培養室へのコナダニの侵入防止を講じることを推奨する。図10はアカパンカビ(非組換え体)の掛け合わせ培地に侵入したコナダニのヒポプス(hypopus、移動若ダニ；発達段階の途中で、過酷な温度・湿度、食糧不足に晒された場合に出現)と考えられ、特徴的な皿形の体型をした体長0.1mm程度のヒポプスが活発に動き回っている状態を捉えたものである。



図10 カビダニ

5.1.1 カビダニの防止策(粘着マット使用による拡散防止)

室内に入る際の防塵の目的として販売されている「粘着マット」(商品例:粘着マット(株式会社ブラストン))の利用によって、カビダニの侵入、および侵入を許してしまった場合の組換え体の拡散防止を狙うことができる(図11)。



図11 粘着マットによる拡散防止措置

5.1.2 カビダニの燻煙

5.1.3 侵入してしまった場合には、燻煙剤（バルサン等）などによって培養室を燻煙処理する。燻煙に先立ち、カビダニが侵入してしまった培地等は廃棄処分するとともに、通常培養している培地等も退避させる。バルサン（ライオン株式会社）には数種類あるが、水を用いる製品2種類で効果を確認している。いずれも有効成分として、1～2種類のピレスロイド系殺虫成分（害虫などの神経毒）と、1種類のオキサジアゾール系殺虫成分（アセチルコリンエステラーゼの阻害）が含まれている。これらの成分がカビの生育に及ぼす影響のデータはない。また、添加物としてアゾジアルボンアミドが含まれており、これは Ames 試験陽性、水生生物毒性を示す。これらを考慮した上で、燻煙の際には培養しているカビを培養室から退避させたほうが良いと考える。燻煙処理後は培養棚などをアルコールで拭き、薬品の残余がないように注意しなければならない。

5.2 保管時の注意

5.2.1 表示：冷凍庫などに保管し「P1 レベル実験中 遺伝子組換え生物保管中」等の表示をする。施錠することが望ましい。

5.2.2 施錠できる冷凍庫など

5.2.3 保管の仕方の例については、「6.糸状菌の保管」を参照のこと。

5.3 運搬時の注意

遺伝子組換え生物を実験や譲渡などの理由による運搬を行う際には、カルタヘナ法や各研究機関の規定等を遵守する。運搬・輸送に先立って、受入れ先の遺伝子組換え実験安全委員会などの委員長（若しくは安全主任者）の承認を受け、遺伝子組換え体に関する情報提供を行う。

運搬・輸送に当たっての具体的注意

- ・容器を丈夫なポリ袋等で、二重に密封する。
- ・遺伝子組換え体が入った容器等が破壊・破損しないように注意する。
- ・情報提供書などを同梱した上で、確実にパッキングする。
- ・「取扱注意」の表示をする。

《参考6 微生物ブリザを用いた組換え体の輸送》

遺伝子組換えカビの分生子の輸送の際に、WATSON・深江化成の製品「微生物ブリザ」を用いた例を紹介する。容器の破損の危険性が非常に少ない故に、輸送中の事故等による拡散防止上の利点のほか、調製に容易、輸送ボリュームの低減などの利点もある。

- a. 安全キャビネット等を用いて、調製した分生子懸濁液を製品のペーパーチップ（図12）に滴下する。
- b. 60分以上風乾したのち、保護シールを貼り付ける。
- c. ポリ袋やプラスチック袋に二重に封入し、輸送用の袋等に封緘して輸送。



図12 微生物プリザ（酵母用、96 ウェル）

- d. 到着後、ペーパーチップを直接培地に投下する。
- e. 分生子の発芽により、菌糸が伸長することを確認する。

6 糸状菌の保管

糸状菌の保管方法について、3つの方法を紹介する。

《参考7 シリカゲル・ストック》

アカパンカビの分生子の保存に用いる。冷蔵で長期間の保存が可能。使用時にシリカゲルの顆粒を適量培地に投下するだけで、再生できるため、手軽であるが、準備に若干手間を要する。

[方法]

シリカゲル（ナカライテスク、シリカゲル（白色）顆粒）を、ネジ口試験管（丸底、16×150 mm）に70%容量ほど入れ、乾熱滅菌（150℃、1時間）する。3.5%のスキムミルクを調製し、1 mL ずつ分注したのち10分間、121℃でオートクレーブする。これらを氷上で冷却しておき、スキムミルクにアカパンカビの分生子を直接懸濁する（分生子の濃度は任意であるが、濃度が高いほうが、再生率が上昇する）。懸濁液をスポイト、パスツールピペットなどを用いて、シリカゲルに少しずつ滴下しながら、ブレンダーでかき混ぜ、全体にまぶす。試験管の口を少し緩めて、1週間室温にて乾燥ののち、4℃保管。

用いたディスポ器具、ガラス器具は適切に処分・処理する。

[使用]

シリカゲルストックを室温に戻してから、無菌的に培地上にシリカゲルの顆粒をまいてから、通常培養しつつ発芽と菌糸の伸長を確認する。

《参考8 スキムミルク・グリセロール・ストック》

分生子の保存に用いる。ストック液の最終濃度は3.5%スキムミルク、25%グリセロール

[操作]

7% スキムミルクを調製し、10分間、121℃でオートクレーブ。50%グリセロール溶液を調製し、15分間、121℃でオートクレーブ。分生子を滅菌蒸留水またはバッファー等と混合する。2 mL のクライオチューブなどにとり、よく混合する。-50℃以下にて保存。

使用した器具等は、適切に滅菌等の処置を行う。

[ストックの再生]

白金耳をバーナーで熱し、凍結状態のストックに直接穿孔し、付着したストック液を培地に画線する。ストックは直ちに冷凍保管し、極力融解を避ける。

使用した器具等は、適切に滅菌等の処置を行う。

《参考9 液体窒素》

菌糸体の保存に用いられる。孢子を得られない菌株の保存にも使われる。

寒天培地に菌糸を生育させ、寒天ごと菌糸を切り出し、クライオチューブなどに入れて密栓したのち液体窒素に入れる。液体窒素の枯渇に十分に注意する。