

応用生物実験の基本操作 (Ver. 1.52)

— 安全に正しく実験を行うために —

1. はじめに	2
1.1. 実験は危険を伴う	2
1.2. プロとしての自覚を持つ	2
2. 安全に実験を行うために	3
2.1. 日常生活	3
2.2. ガラス器具の取扱い、洗浄	4
2.3. オートクレーブ	7
2.4. 遠心分離機	9
2.5. 恒温槽	13
2.6. 減圧操作	15
2.7. 紫外線ランプ	16
2.8. 試薬の取扱い	16
2.9. 液体ガス、ガスボンベの取扱い	26
3. 正しく実験を行うために	21
3.1. 試薬、試料の保存	21
3.2. 天秤	21
3.3. メスピペット	22
3.4. ピペットマン	22
3.5. スターラー	24
3.6. ボルテックスミキサー	24
3.7. クリーンベンチ	25
3.8. pHメーター	26
3.9. 分光光度計	28
3.10. 電気泳動	27
4. 参考	30

1. はじめに

1.1. 実験は危険を伴う

実験は、必要な注意を怠れば、人身事故、爆発火災事故につながります。特に

- ・危険な試薬、試料（引火性、爆発性、発ガン性、病原性・・・）
- ・高温になる機器（電気機器は全て火災、火傷につながると考えよ）
- ・高圧（陰圧）になる機器（オートクレーブ、エバポレーター・・・）
- ・大きな運動エネルギーを持つ機器（遠心分離器、振とう培養機・・・）
- ・破損しやすい器具（ガラスなど）

などを取扱う際には十分な予備知識と注意が必要です。

事故を起こせば、あなたは痛い目に合い、周囲の人にケガをさせることもあります。また、火災を起こせば、高価な研究機材だけでなく、金銭には代えることのできない貴重な試料やデータを失うこととなります。このような事態になれば、関係者に多大な迷惑をかけ、あなたは一生後悔することとなります。また、操作を誤ったりメンテナンスを怠れば、高価な機器の寿命を縮めるだけでなく、実験が失敗したり、実験精度が大きく低下したりします。

1.2. プロとしての自覚を持つ

研究に使用する機器類はプロ用の機器です。家庭電化製品とは異なり、いい加減な使い方をして事故が起こらないような配慮がなされていない機器も少なくありません。数年前に吹田キャンパス内でボヤがありましたが、その原因は学生が機械の操作に習熟していなかったためです。「知らなかったから」、「教えてもらっていないから」、「調べるのがめんどうだから」は言い訳になりません。「知っていたけど面倒だから」は言語道断です。広辞苑によれば、「プロフェッショナル：専門的、職業的」となっています。私達は研究を専門的、職業的に行うわけですから「プロ」なのです。どの世界に上記のような言い訳をするプロがいるでしょうか。どの世界に自分の使う道具に関する十分な知識を持たないプロがいるでしょうか。プロとしての自覚を持ち、実験を始める前に、**あなた自身が、使用する実験機器や試薬の取扱いについて十分な下調べを行わなくてはなりません**（先輩や先生の使い方が正しいとは限りません）。実験機器を正しく使用し、実験の効率を上げ、精度に注意を払うことは研究者の基本的な義務の一つです。

多くの失敗は「過失」であり、誰にでもあることですが、**失敗を放置したり報告を怠るのは「故意」であり許されません**。また、関係者に危害が及ぶのを知りながら危険な状態を放置することは犯罪行為であることも肝に銘じておかなければなりません。

このテキストでは、生化学系実験における一般的な事項として、

- (1) 安全に作業を行うための注意事項
- (2) 実験機器の寿命を縮めないために必要な注意事項
- (3) 実験を効率良く行い、精度を保つためのコツ

についてまとめてあります。このテキストに記載されていない特殊な機器類の使用にあたっては、各自が担当教員に十分な指導を受けた上、更に、自分自身で取扱い説明書を熟読して下さい。

2. 安全な実験操作のために

2.1. 日常生活

2.1.1. 時間帯

指導教員がいる時間帯に実験するのが原則。指導教員が不在であれば、適切な指導を受けることができず、緊急時にも適切な対応ができない。また、教員のたった一言のアドバイスで失敗せずに済む（失敗をリカバーできる）場合も少なくない。以下の事故は何れも教員が不在の時に起きている。

- ・真空蒸着装置が爆発 院生 2 名が死亡
- ・ジーンパルサーで感電 院生が死亡
- ・エーテル蒸留中に爆発 4 年生が失明
- ・凍結乾燥用のバイアル瓶が爆発 院生が顔に裂傷

2.1.2. 異臭・異音に気づいたら

異臭・異音は事故の前兆である。異常反応、装置やケーブルの過熱、駆動部の摩滅、ガス漏れなど、放置すれば重大事故につながる可能性が高い。直ちに教員に報告し（例え夜中であっても）、指示を受けること。

2.1.3. 頭痛・体調不良

実験中に頭痛がしたり、だるさなどの体調の不良を感じたら、実験を中止し、自分の周りの環境を調べる。一酸化炭素など無臭の有毒ガスが発生している可能性がある。風邪や疲れなどから来る頭痛であった場合でも、一旦実験を中止すること。疲れた状態、すなわち、判断力が低下した状態のまま実験を行うことは、大きな事故を招く原因となる。

2.1.4. 電気を使用する器具

- (1) 濡れた手で触らない。感電する。
- (2) アースを取る。万一漏電していた場合、感電して危険である。
- (3) 不用意に延長コードを使用しない。例えば、1500W のインキュベーター（15 A の電流が流れる）に 6 A しか容量のない延長コードを用いれば火災の原因になる（2.5.1.(4)参照）。

2.1.5. 退室時の注意

- (1) 後始末
自分が使用した器具、備品の後始末を行い、実験台を必ずその日のうちに責任を持って片付けること。また、退室することを同室の者に知らせる。

- (2) 各部屋の最終退室者が確認すべき事項

- 1) ガス栓、湯沸し器 → 火災防止
- 2) 終夜運転表示のない機器の停止。 → 火災防止と省エネルギー
- 3) エアコン、ストーブの停止。 → 省エネルギー、火災防止
- 4) 出入り口、窓の施錠。 → 盗難防止
- 5) 消灯。 → 省エネルギー

- (3) 最終退出者への配慮

最終退出者の前の退出者は、最後に残る者に最終退出者となることを告げる。最終退出者となる者が希望する場合、最終退室者を援助すること。

2.1.6. 終夜運転

- (1) 使用者名、終了予定日時を表示する

終夜運転を行う場合、使用者名、終了予定日時を必ず表示すること。最終退室者は、終夜運転の表示がない機器の電源を切る。電源を切られて実験が失敗しても、それは全て、必要な表示をしなかった実験者の責任である。

- (2) 定常運転を確認する

終夜運転を行う場合、その機械が定常に入るまで下校してはならない。目安として下校 1 時間前にはスタートし、設定電流（電圧）や設定温度に達するなどして定常運転に入ったことを必ず確認する。やむを得ない事情で下校する場合は、残っている者に確認を依頼すること。これは安全面だけでなく、実験を失敗しないためにも重要である。

2.1.7. ストーブ、ガスバーナー

- (1) ストーブやガスバーナーの周囲に可燃物を置いてはならない。有機溶媒の容器を裸火のそばに置くのはもってのほかである。
- (2) 部屋を無人にする場合、こまめにストーブ、ガスバーナーを消すこと。
- (3) **有機溶媒を「持つ」時もストーブ、ガスバーナーなどの裸火を全て消すこと。**ある大学で、有機溶媒の瓶を取り落として割れ、ストーブの火が引火して研究室が一つ丸焼けになった。貴重なデータ、研究試料は全て灰になり、何名かの学生は卒業が遅れた。有機溶媒を「使う」時だけでなく、「持つ」時も火気厳禁である。

2.1.8. 飲食喫煙

実験室内で飲食、喫煙、化粧は禁止。理由は、

- (1) 実験室では劇毒物、発ガン性物質、病原性微生物などを扱い、これらの経口吸収は非常に危険である。化粧はこれら有害物を肌の広い範囲に塗り広げる可能性がある。
- (2) 食べこぼし、残飯は雑菌の巣になり、コンタミネーションの原因となる。

2.1.9. タバコの吸い殻

実験室および廊下は禁煙。なお、**灰皿の吸い殻を捨てる前には必ず水をかけること**。消防庁の実験で、灰皿でタバコを消してから 18 時間後に火出した事例がある。**消えているように見えても必ず水をかけてから捨てること**。

2.1.10. 省エネルギー、節水、漏水

- (1) 長時間席を外す場合、パソコンは電源を切る。
- (2) 無人の部屋の照明、冷暖房は、特に理由がない限り、こまめに電源を切る。
- (3) アスピレーター（サッカー）の使用は避ける。

節水のため、循環式水流ポンプ、ダイヤフラム型ポンプ等を使用するよう心がける。

- (4) 冷却水を不必要に流さない。

蒸留装置、ロータリーエバポレーター、ジャーファーマンターなどに冷却水を流す場合、過剰な冷却水を流さないように注意する。また、夜間は水道の使用量が減るので、水圧が上がることに注意すること。夜間の水圧上昇によって冷却水のホースが破れて（外れて）、階下まで水浸しになり、高価な機器が使用不能になった例がある。水道にホースをつなぐ際には必ず留め金をすること。

- (5) 逆浸透水の調製

逆浸透水の製造装置は、逆浸透膜を洗浄するために逆浸透水 20 L 当たりドラム缶一杯の水道水が使われている。逆浸透水を無駄遣いすれば、その 10 倍の水道水を無駄遣いすることになる。

2.2. ガラス器具の取扱い

研究におけるケガの原因で、ヤケドと並んで頻度が高いのがガラス器具による切り傷である。最悪の場合、腱や神経まで切断し、日常生活に支障をきたすこともある。

「無理な力かけるとガラスは割れる」ことを忘れてはならない。

2.2.1. 安全に関する一般的な注意事項

- (1) ヒビが入ったガラス器具は廃棄する

ヒビが入ったガラス器具は割れ易い。割れたガラスでケガをする危険があるだけでなく、有機溶媒や劇毒物などの危険物を撒き散らすことになる。見つけ次第、廃棄すること。

- (2) 欠けたガラス容器は直ちに適正な処理をする

ガラス容器の縁が欠けた場合、その場でヤスリをかけるかバーナーであぶって丸めること。放置すれば次に使う人がケガをする。

- (3) 大容量の容器は原則としてプラスチック製を購入

1 L 以上のビーカー、メスシリンダーは破損しやすく、また高価である（表 1 参照）。有機溶媒を使用するなどの特別な事情がない限りプラスチック製のものを購入するべきである。

- (4) 整理整頓

狭いスペースでの実験は、作業効率が悪いだけでなく、危険である。容器を倒して内容物をこぼしたり、ガラス器具を物品にぶつけて割ったり、実験台から落下させる原因となる。実験台は常に整理整頓し、十分な作業スペースを確保すること。

- (5) ひっかけ防止

実験台などの端に物品を置いてはならない。通行の際にひっかけて落下し破損する。通行の際にひっかける可能性のある器具を見つけたら、そのつど安全な場所に移すよう心掛けること。

- (6) 油性マジックで直接記入するのは避ける

油性マジック（特に太いマジック）でガラス器具にサンプル名などを記入すると、洗浄しても消えにくく、無理に力を入れてこすれば破損してけがをする。ビニールテープなどを貼って記入する。やむを得ずマジックで記入した場合は、一晩水につけて落ちやすくしてから洗浄するか、エタノールやアセトンなどの溶媒で消してから洗浄すること。

- (7) スターラーのマグネットバーを入れる場合

ガラス容器にマグネットバーを入れる場合、容器を斜めにして滑らせるようにして入れる。スターラーには強力な磁石が入っているので、ガラス容器をスターラーの上に乗せてからマグネットバーを入れると、ガラス容器が強い衝撃によって割れてしまう。

2.2.2. ガラス管のゴム栓への（ピペットのピペッターへの）挿入

- (1) 無理に狭い穴に太いガラス管を入れてはならない。
- (2) ガラス管には水（事情が許せばワセリン）を付けて滑りを良くしてから挿入する。ただし、メスピペットをピペッターに挿入する場合、水やワセリンは使用しない。

(3) **ガラス管の端から約 2 cm の部分を、親指、人差し指、中指の 3 本で持ち、回しながら注意深く挿入する。**

ガラス管の破損は、多くの場合、ゴム栓の根本、または、ゴム栓の根本から数 cm の部位で起こる。ゴム栓から遠い位置を持ってガラス管を挿入すれば、ゴム栓部分を支点としてガラス管に大きな曲げ応力がかかる。5本の指でガラス管を握った場合、支点からさらに遠い薬指と小指の力によって曲げ応力はさらに大きくなる。また、5本の指でガラス管を握れば、ゴム栓部分を支点として、親指でガラス管を押し上げ、小指でガラス管を押し下げることになり、親指の位置にガラス管を折るには十分な力が加わる。そこで、ゴム栓から 2 cm 以内の位置を、親指、人差し指、中指の三指で持ち、薬指、小指を使わないようにすれば、ほとんどの破損事故は防ぐことができる。三指では力が入らないからと言って五指で挿入してはならない。三指で挿入できないのはゴム栓の穴が小さ過ぎるからであり、適当な径の穴を開け直すこと。

2.2.3. 大きなガラス容器、危険な試薬瓶は両手で持つ

- (1) 500 mL 以上のビーカーを片手で鷲掴みしてはならない。溶液が入っているビーカーを片手でつかもうとすれば、その重さを支えようとして指が入る。この力でビーカーが割れる場合がある。筆者の知人はこれで指の神経を切断し、リハビリに 1 年近くかかった。
- (2) ガロン瓶は両手で持つ。瓶の首に付いている取手だけを持って持ち運ぶと、瓶の重さで取手がもげることがある。取手は、持ち運びのためについているのではなく、内容物を注ぐときに瓶を傾けやすくするために付いていると考えよ。

2.2.4. ガラス容器のフタが開かなくなった時

バイアル瓶、ネジブタ付き試験管など、ガラスが薄い容器は特に注意が必要である。「無理な力をかけるとガラスは割れる」ことを忘れてはならない。ガラス側を氷で冷やし、フタを暖めるなどして、無理なく開ける工夫をしなくてはならない。家庭にあるジャムなどの瓶は、力を入れても割れないようにガラスに十分な厚みをもたせてあるが、バイアル瓶、ネジブタ付き試験管などはガラスが薄く、力を入れれば破損する。

2.2.5. アンブルの開封

アンブルに入っている試薬は、必ずそれなりの理由があってアンブルに入っている。酸素や水分を極端に嫌う、猛烈な臭気をする、蒸気が猛毒である、など必ず理由がある。まず、なぜアンブルに入っているのか、その理由を調べ、十分な準備をしなくてはならない。

- (1) 開封した試薬を使い切らないのであれば、まず、密封保存できる適当な容器を用意する。

- (2) 揮発性物質のアンブルの場合、氷水などで十分冷却し、水気を十分に拭き取る。

- (3) やすりで傷を入れる。

- (4) 折った時の勢いで手を切らないように注意して開封する。左手でアンブルを握り、折れたはずみで手を切らないように、右手で左手ごと握るようにして折る（左利きの場合は逆）。乾いた布などで包んでから折っても良い。

5 mL 以上のアンブルの開封、及び危険な（毒物、特殊引火性物質、爆発性物質など）試薬の開封を行う場合、必ず十分な経験を持つ教員に指導を仰ぐこと。

2.2.6. 破損時の後始末

ガラス器具が破損した場合、素手での処理は極力避け、ほうき、掃除機を使用すること。破片は非常に危険なので完全に回収すること。また、溶液の入ったガラス器具を破損させた場合、こぼれた溶液は紙タオルなどで拭き取る。雑巾を使用すると、目には見えなくても細かな破片が雑巾に残り、絞ったときに手を切る。

2.2.7. ガラス器具の取扱いに関するその他の注意点

- (1) すり合わせのガラス器具

- 1) 本体と蓋の口径とピッチが合っていない。すり合わせのガラス器具の本体と蓋には番号が付いており、同じ番号のもの同士でなければ密栓できない。
- 2) 乾いた状態で擦り合わせ部分を回してはならない。ガラスが削れ、密栓できなくなる。
- 3) 保管の際には、乾燥後、本体と蓋の間に短冊状の紙をはさんでおく（抜けなくなる）。
- 4) アルカリ性溶液の保存に用いてはならない。ガラスがアルカリで溶着して開かなくなる。

- (2) マジックで記入する場合

白文字で印刷されている部分、及び曇ガラス部分には原則として記入しない。消えなくなる。

- (3) ラベル、マジックは必ず落とす

ラベルをはったまま、また、マジックを落とさないまま乾熱器や乾燥器に入ると取れにくくなる。無理に取ろうとするとガラス器具の破損事故につながる。

- (4) 目盛りの精度

メスシリンダーやメスフラスコなど、秤量に用いる器具を除いて、目盛りには 5% 以上の誤差のあるものも稀ではない。目盛付き試験管の精度もこの程度であるものが少なくない。精度が要求される実験に用いる場合、一定容量の水を入れて重量を測定するか、メスシリンダーやメスピペットで一定量の水を入れ、目盛りの精度を確認してから使用する。

2.2.8. 洗浄の際の注意

(1) 作業スペースを確保する

洗浄作業をする場合、十分な作業スペースを確保する。少なくとも洗いの半分は何も置いていない状態にしてから（洗い物の一部をバットなどに入れて外に出してから）作業を始めること。

(2) 洗しに器具を放置しない

家事のプロは使った食器をすぐに洗う。これは使用した食器がひからびると汚れを落とすのに多大な労力を要するからである。直ちに洗浄できない事情があるのであれば、バットなどに入れて水に浸し、**自分の実験台の上に置くこと**。洗い場に放置すれば他の者に以下のような迷惑がかかる。

- 1) 危険な試薬を扱った器具かどうか判断できない。
- 2) 洗浄スペースが確保できない。
- 3) 使いたい器具がない。

(3) 流しにメスシリンダーを置く時は寝かせる

メスシリンダーは重心が高く、倒れて破損しやすい。流し場では必ず寝かせること。

(4) マジックとテープは必ず落とす

マジックやテープを落とさないまま乾燥器（乾熱器）に入れると落ちなくなる。たとえ落とすことができても、それには多大な労力を要し、ガラスの破損事故にもつながる。

(5) クレンザーを使用しない

マジックを消す場合や、こびり付いた汚れを落とす場合などにクレンザーを使用してはならない。たとえクリームクレンザーであってもガラス面に微細なキズをつける。破損しやすくなるだけでなく、キズに付着した汚れは落ちにくく、実験精度に影響する。

(6) ブラッシングは十分に

ブラシを2～3度出し入れするだけでは洗ったことにならない。ブラシの形状を良く見て器具が十分にブラッシングされているか（特に、底の角の部分にブ

ラシが届いているか）どうかを確認すること。ピーカーなど口の広い容器はスポンジを用いる。例えばリンの定量、フェノール硫酸法などによる還元糖の定量、蛍光分析などの微量分析には専用のガラス器具を用いるが望ましい。例えば、大きなステンレスなどの容器に入れ、0.5%程度の中性洗剤（アルカリ性の洗剤は不可）に浸してオートクレーブするときれいに洗浄することができる。

(7) アルカリ洗剤に関する注意

アルカリ性の洗剤を用いる時は保護メガネと手袋を着用すること。また、強アルカリによってガラスは溶ける。アルカリ性の洗剤を用いる場合、長時間浸したり、不必要に加温すると、ガラス表面が溶けたり、微細なキズが入るので注意が必要である。

(8) ガラス器具は内面だけでなく外側も洗浄する

外面と口の部分はスポンジ等で洗浄する。口の部分には、付着した溶液が乾いて溶質がこびりついている可能性が高い。外面の汚れを落とさなければ、器具を逆さにして乾燥する際、外面を伝い落ちた水滴が器具の口を汚す。

(9) すすぎ

すすぎはブラッシング以上に大切である。すすぎが不十分な場合、「洗剤で器具を汚す」ことになる。最低5回以上、試験管は10回以上すすぐことが望ましい。

(10) 純水でリンスする

試薬の調製に純水を使用しても、水道水で洗浄しただけの器具を使用したのでは意味がない。水道水で洗剤をすすいだ後、器具の内面だけでなく、外側も純水でリンスすること。

(11) 床に水をこぼしたらすぐ拭き取る

床が濡れていると滑って非常に危険である。すぐにモップなどで拭き取ること。

「ガラスは無理な力には耐えられない」、「割れたガラスは鋭利な凶器である」という常識を忘れた時に事故が起こる。例えば、

- (1) ガラス管（ピペット）をゴム栓（安全ピペッター）に挿入する時（2.2.2.参照）。
- (2) ピーカーを上から鷲づかみにした時（2.2.3.参照）。
- (3) バイアルのフタを無理に開けようとした時（2.2.4.参照）。
- (4) 試料名をマジックで記入し、それをこすって落とそうとした時（2.2.7.(5)参照）。
- (5) 割れたガラス器具を放置した時（2.2.1.(2)(3)及び2.2.6.参照）。

2.3. オートクレーブ

2.3.1. オートクレーブの構造

研究におけるケガで、ガラスによる裂傷に並んで頻度が高いのがヤケドであり、オートクレーブが絡んでいることが多い。オートクレーブは危険な作業であることを認識して使用すること。

生化学分野で最もポピュラーなオートクレーブの構造を図1に示す。タイマーで設定する時間は、設定温度に達した後、その温度を保つ時間(図2-A,Bの矢印の範囲)で、121°C 10~20分が標準である。

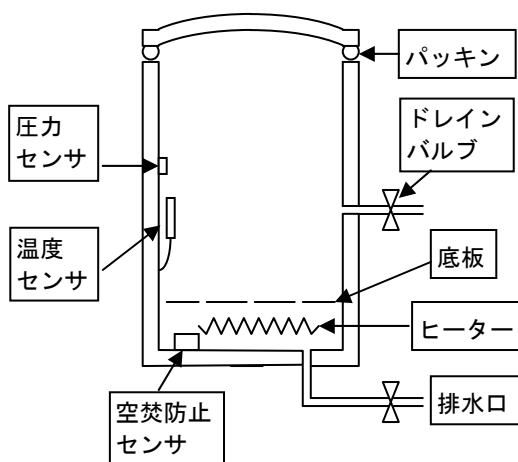


図1. オートクレーブの構造

2.3.2. 使用手順

- (1) カマの中に底板レベルまで水があることを確認する。
- (2) ドレインバルブが閉まっていることを確認する。
- (3) フタを適度に締める。

締めつけが緩ければ蒸気が漏れ、過度に締めればパッキンがすぐに劣化し、やはり蒸気漏れの原因になる。

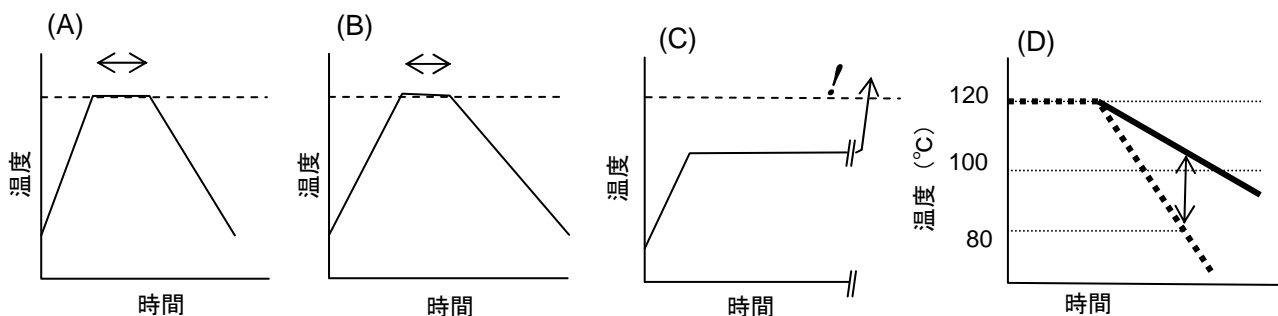


図2. オートクレーブの温度の経時変化

- (A) 少量の培地を滅菌する場合、(B) 大量の培地を滅菌する場合、(C) 蒸気漏れがある場合、(D) 冷えにくい液体の実際の温度(実線)と温度計の表示(破線)とのずれ。

例えば、ハンドルを人差し指1本で回し、回らなくなったら両手でさらに1/4回転閉める、などのルールを決めておくと良い。

- (4) 時間をセットして滅菌を開始する。
- (5) 少なくとも 70°C以下に下がるまで待つ (2.3.3.(2)-(3)を参照のこと)。
- (6) **温度が70°C以下であり、かつ、圧力も0であることを確認する。**温度計が壊れていて、吹き出した蒸気で上半身に大やけどを負った実例がある。必ず両方確認すること。
- (7) 更に、ドレインバルブを開け、蒸気が出ないことを確認してからフタを開けること (ドレインバルブがない、あるいは開閉が自動で行われるオートクレーブもある)。

2.3.3. 安全上の注意

- (1) **タイマーが切れるまで部屋を無人にはしない。**パッキンの経年劣化などによって、蒸気が漏れた場合、空焚きになるからである。蒸気漏れがあれば、所定温度に達しないのでタイマーは進まず、加熱され続ける。最後には水がなくなり空焚きになる(図2-C参照)。タイマーが切れる前に帰宅してはならない。雑誌会やゼミなど、全員が部屋を空ける場合も同様である。空焚き防止センサーはいつも正常に機能する保証はなく、正常に機能するかどうかを確認することもできないので、過信してはならない。
- (2) オートクレーブした液体の実際の温度と温度計の表示にはズレがある(外側から冷えるので温度計部分が先に冷える)。**寒天培地、消泡剤、高濃度の糖やグリセリンなどの粘度の高い液体、大容量の溶液などの場合、温度計の表示が80°Cを切っている、これらの溶液の実際の温度は100°C以上になっている場合がある(図2-D)。**これを取り出せば突沸して火傷を負う。

これらをオートクレーブする場合、温度計の表示が60～70℃に下がるまで待つべきであり、また、取り出す際にも、突沸に備えた体勢で取り出し、**取り出した直後に決して溶液を振り混ぜたりしてはならない。**

- (3) 寒天培地は容器の容量の1/2以上入れてはならない。例えば500 mL容の三角フラスコなら、上限は250 mLである。これ以上入れると突沸の危険が増し、オートクレーブ後に混ぜにくくなる(寒天は沈むのでオートクレーブ後の底の部分の寒天濃度は高い)。オートクレーブ直後に混ぜると突沸する危険がある。室温で数分程度放冷してから混ぜること。
- (4) 有機溶媒など沸点の低い物質をオートクレーブしてはならない。場合によっては引火、爆発の危険があり、臭いで周囲に迷惑をかける。そもそも蒸発によって濃度が大きく狂ってしまう。

2.3.4. その他の注意点

- (1) 器具をオートクレーブする場合、オートクレーブしても良いものであるかをカタログ等を調べて必ず確認すること。例えば**ギルソンのピペットマンはオートクレーブできない**。プラスチック製の器具にもオートクレーブできないものは少なくない。
- (2) 揮発性の強酸(塩酸、硝酸)はカマを痛める。適当な材質のフィルターで滅菌すること。
- (3) 強アルカリをオートクレーブすると容器のガラスが溶ける。何度も繰り返してオートクレーブするとガラスは次第に薄くなり、破損事故につながる(ガラスの成分がアルカリに混入することに注意)。
- (4) ジャーファーメンターをオートクレーブする場合、原則として60℃以下になるまでフタを開けない。大量の培地は冷えにくく、図2-Cのように突沸の危険があるだけでなく、圧力の変化でpHセンサー、溶存酸素濃度(DO)センサーを痛めることがある。
- (5) オートクレーブする容器のフタは必ず緩めておくこと。密栓すると、昇温時には容器の外側の圧力が先に上がり、降温時には容器の外側の圧力が先に下がる。この圧力差によって、ガラス容器が割れる場合があり、

プラスチックの容器は変形する場合がある。

- (6) 遠心管などのプラスチック容器をオートクレーブする場合、多少フタを緩めていても、オートクレーブ後に冷えて中が陰圧になった時にフタが本体に密着し、さらに冷えて内圧が下がれば変形する。従って、フタを外して殺菌するか、フタを十分緩めた状態でアルミホイルを巻いてフタが本体に密着しないようにしてオートクレーブすること。
- (7) 1気圧程度の圧力に耐える傷のないメジウム瓶などであれば密栓してオートクレーブすることができるが、この場合、中に1滴蒸留水を入れておかなければ滅菌することはできない(乾燥状態での滅菌には160℃3時間程度を要する)。
- (8) 過度の加熱は試料を変質させる場合がある。例えば、酵母エキスとグルコースのように、アミノ基を持つ化合物と還元糖を同時にオートクレーブすると、メイラード反応が起こって培地は褐変し、場合によっては供試菌の生育を阻害する。この反応は加熱時間が長いほど、pHが高いほど(pH>6)顕著であり、また、少量の培地をオートクレーブした場合(図2-A)よりも大量の培地をオートクレーブした場合(図2-B)の方が顕著である。
- (9) オートクレーブ内に試料をこぼした(吹きこぼれた)場合、洗浄しなければならない。また、こぼしていても、通常は1週間に1回程度の水の交換、2～4週に1回の洗浄が必要である。

オートクレーブによる事故例を挙げておく

- ・ビン状の容器に9割程度の寒天培地を入れてフタをしてオートクレーブ。90℃以下で取り出したが突沸してフタが飛び、顔面にヤケド。
- ・ジャーファーメンターを90℃以上で取り出し、突沸して上半身に大ヤケド(ケロイドが残った)。
- ・消泡剤をフラスコでオートクレーブ。入れた容量は容器の1/4程度だったが、90℃近い温度で取り出した際に突沸し、手に全治1ヶ月のヤケド。

- (1) タイマーが切れるまで部屋を無人にしてはならない。
- (2) 70℃以下に下がるまでフタを開けない。
- (3) 70℃以下でも熱伝導の悪い(粘度の高い or 大量の)試料は突沸することがある。
- (4) 有機溶媒、強酸、強アルカリはオートクレーブしてはならない。

2.4. 遠心分離機

まず、下記の設問に答えてみよう（答えは次のページ）。

- Q 1. 天秤でバランスをとれば形状の異なる遠心管を用いても良い。
- Q 2. 試料が1本の場合、同じ形状の遠心管に水を入れてバランスを取れば良い。
- Q 3. 試料が1本の場合、同じ形状の遠心管に、試料と同じ比重のシュクロースなどの溶液を入れてバランスを取れば良い。
- Q 4. 室温で遠心分離する場合、冷却機のスイッチは入れなくても良い。
- Q 5. 遠心管の外側が濡れている場合、拭き取ってからバランスを合わせるのはなぜか？
- Q 6. 遠心分離中に試料が漏れた場合、どのような危険が生じるか？
- Q 7. 使用後、ローターを伏せて置くのはなぜか？
- Q 8. 遠心機の蓋は、冷却状態で待機中は閉め、使用後は蓋を開けておくが、その理由は？

全問正解できたでしょうか？ 遠心機は高速で回転し、その運動エネルギーも大きい。使用方法を誤ると、重大事故につながったり機械の寿命を著しく縮めことになる。以下に詳細を記すので正しい使い方を身につけ、その理由も十分に理解しておくこと。

2.4.1. 最大回転数に関する注意

原則としてローターの最大許容回転数の8割以下で使用する。各遠心機のそれぞれのローターについて最大許容回転数が決っており、必ずそれを確認してから使用すること。**どのような事情があろうと絶対に最大許容回転数を越えて使用してはならない。**また、最大許容回転数はローターに汚れや傷がなく、機械を正しく使用し定期的なメンテナンスが行われていた場合の許容回転数で

ある。従って、通常はその8割以内で使用すべきである。

なお、回転数を2割減じた場合、遠心分離の時間を5割増せば、ほぼ同等の分離効果が得られる。

2.4.2. 遠心管についての注意

- (1) 許容遠心力、耐溶媒性を確認する。

使用する遠心管がどれぐらいの遠心力に耐えるかを必ず確認すること。また、溶媒や強酸などを遠心分離する場合、遠心管の材質がそれに耐えるものであるかも確認しなければならない。表1及び以下のサイトを参照のこと（ブックマークに登録しておくが良い）。なお、許容される最大の遠心力は、ローターの形状と遠心管の形状がピッタリフィットする場合の値である。例えば、丸底のローターに先端が尖った遠心管を使用した場合、許容範囲内の遠心力でもその遠心管は破損する。

<http://www.hitachi-koki.co.jp/himac/support/m-tube.htm>

各社遠心管の耐久性能

<http://www.nalgenunc.co.jp/html/info.shtml>

耐久性能、溶媒耐性、洗浄方法、滅菌方法

<http://www.assist-sar.co.jp/>

各種プラスチック製品の耐久性能

- (2) 変形、ヒビのある遠心管を使用しない

遠心管は使用しているうちに必ず劣化する。変形やヒビが認められる遠心管は使用してはならない。なお、テフロン製の遠心管のように、少量の試料で遠心分離すると許容遠心力内で遠心しても変形するものがあるので注意すること（遠心管の8~9割以上の溶液を入れなければならない）。また、ディスポーザブルタイプの遠心管はその名の通り、繰返し使用を前提にしていけないので特に注意すること。

表1. ディスポーザブルタイプの遠心管の許容最大遠心力

メーカー	容量(mL)	材質	最大遠心力(g)
アシスト	50	ポリプロピレン	4,000
		ポリスチレン	4,000
	15, 13	ポリプロピレン	4,100
		ポリスチレン	1,800
Corning	50	改良ポリスチレン(Cat.No.430304)	1,800
		ポリプロピレン (Cat.No. 430290, 430291, 430828, 430829, 430522)	6,000
	15	改良ポリスチレン (Cat.No.430053, 430055, 430788, 430789)	1,800
		ポリプロピレン (Cat.No. 430052,430766, 430790, 430791, 430630)	6,000

- A1. No (モーメントバランスが取れない)
- A2. No (モーメントバランスが取れない)
- A3. No (試料が分離されるとモーメントバランスが崩れる)
- A4. No (モーターの発熱、ローターと空気との摩擦で温度が上がってしまう)
- A5. 遠心管の外側の水は遠心分離でローターの底に移動し、モーメントバランスが崩れる。
- A6. (1) アンバランスによる機械(軸、モーター、ローター)のダメージ。
(2) 漏れた試料による生物的汚染、化学的汚染、腐食、引火(爆発)。
- A7. ローター内に落下する埃、結露する水によるアンバランスを避けるため。
- A8. チャンバー内の結氷が遠心分離時の風圧ではがれ、ローター等を損傷するのを防ぐため。

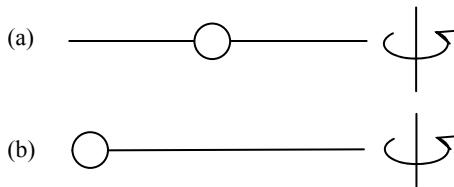


図3. 重量バランスとモーメントバランス

2.4.3. バランスに関する注意

遠心分離を行う場合、重さのバランスではなく、モーメントバランス(重さ×重心の回転半径)が取れていなければならない。例えば、図3のように、同じ重さの粘土をヒモの中央に付けた場合(a)と先端に付けた場合(b)とを比べると容易に理解できる。ヒモを振り回した時に腕が感じる力は、(b)の場合の方が大きいのは明らかである。

- (1) 形状の異なる(重心の位置が異なる)遠心管同士ではモーメントバランスは取れない。
- (2) 比重1.2の溶液と、1.2倍容量の水(比重1.0)では、重量のバランスは取れてもモーメントバランスは取れていない(重心から回転軸までの距離が異なる)。
- (3) 例えば、比重1.2の菌体の50%懸濁液(懸濁液としての比重は1.1)を、比重1.1の食塩水でバランスを取った場合、遠心分離前のモーメントバランスは取れている。しかし、遠心分離後は比重1.2の菌体が管底に集中するので(重心が回転軸から遠ざかるので)、モーメントバランスを取ったことにならない。
- (4) 遠心管の外側に水滴が付いた状態でバランスを取った場合、ローター内に水が結露している場合もバランスを取ったことにならない。

フタも含めて同一形状(材質)の遠心管に同一試料を等分するのが正しいバランスの取り方である。実際には、比重に起因するモーメントのアンバランスはある程度許容される(例えば通常の大腸菌培養液のバランスを水で取る場合)。しかし、許容される最大の回転数で分離する場合や、高濃度の硫酸アンモニウム、シュークロース、グリセリンなどの溶液や、高い濃度の菌体(細胞)懸濁液を遠心する場合などは、同一試料を等分してバランスを取らなければならない。

2.4.4. 試料の漏れに関する注意

アングルローターの場合、分離中の液面は鉛直(回転軸に対して平行)になる(図4-A)。液面が遠心管の縁を越えた場合、遠心管と蓋の密閉性が悪ければ試料は漏れる。試料が漏れれば、アンバランスが生じて機械やローターにダメージを与えるだけでなく、漏れた試料による生物的汚染(人体に有害な菌や、他の実験にとって有害なファージ)、化学的汚染(例えば発ガン物質や劇毒物)、腐食(例えば硫酸アンモニウムは放置するとアルミ合金ローターをひどく腐食させる)、最悪の場合は引火爆発(有機溶媒の場合)を引き起こす。従って、蓋のシールが不完全な場合を想定して、**回転時の液面が遠心管の縁を越える量を入れてはならない。特に、引火点の低い溶媒(例えばエタノール)を含む試料を遠心分離する場合、どのような事情があろうとも絶対に回転時の液面が遠心管の縁を越える量を入れてはならない。また、ヒビの入った遠心管、変形した遠心管は絶対に使用してはならない。もし危険な試料を漏らした場合、必ず教員に報告した上で対処すること。**なお、試料を入れてフタをした遠心缶を指で押してみても洩れないからと言って蓋のシールが完全である保証はない。仮に図4Bで、液面が遠心管の縁よりも1cm回転軸側にあったとする。1xgでは10mの水柱の圧力が1気圧であるから、これを10,000xgで遠心分離した場合、1cmの水柱は10気圧の圧力に相当する。

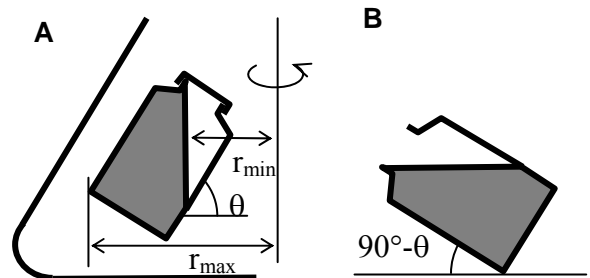


図4. 回転時の液面(A)と安全な液量の求め方(B)

- (1) 使用するローターのアングルθを調べる。
- (2) 水が一杯に入った遠心管を90-θ傾ける。
- (3) 残った液量が上限の液量。

2.4.4. 運転に関する注意

(1) ローターを確実に装着する

ローターの底部のツメと回転軸のツメがかみ合う方向を確認して、確実にセットしなければならない(ツメがない機種もある)。また、ツメを曲げたり折ったりしないように丁寧に扱わなければならない。セットした後、手でローターを軽く回して確実にセットされているかを確認すること。ローターのフタを締める際に何回まわすかを憶えておけば、正しくセットされていない時、いつもより回した回数が少ないので気付くことができる。

(2) パッキンの装着を確認する。

ローターとフタの間にはパッキンを装着しなければならない。ローターのフタのネジは、加速によって締まる方向に切っただけである。逆に言えば、減速時には緩む(ローターは減速するが、フタは慣性で回り続けようとする)。パッキンの装着を怠れば、十分な締め付けが行えず、減速時にフタが緩んで外れる可能性がある。回転中にフタが飛ばば、ほとんどの場合、多額の修理費用(数十万円以上)を要する。これが原因と推定される事故は、筆者の知る限りでも、当専攻で過去3件起きている。

(3) 定常運転に入るまで監視する。

回転が設定まで上がって定常に達するまでその場を離れてはならない。遠心管のセットミス、バランスの取り忘れ、遠心管の破損などがあっても、その場をはなれてしまうと対処できない。もし異常があった場合(異常な音がした場合)、直ちに停止スイッチを押すかタイマーをゼロにする。完全に停止するまで避難し、他の者を近づけないようにする。

(4) 運転中に絶対に蓋を開けてはならない。

運転中に異音が出た場合もあわてて蓋を開けてはならない。遠心管が破損していた場合、破片が高速で飛び散り、失明等の大ケガをする。

(5) 絶対に手でローターを止めてはならない。

巻き込まれて骨折等の重大事故につながる。回転軸が曲がり、遠心機の寿命を著しく縮める。「急ぐから」は全く理由にならない。心に余裕を持って完全に停止するまで待たなければならない。

(6) 冷却機は常に電源を入れる

モーターの発熱、ローターと空気の摩擦による発熱によって温度は上がる。従って、室温で遠心する場合も冷却機の電源を入れておかなければならない。

(7) チャンバーの蓋

冷却機のスイッチが入っている時はチャンバー内での結露、氷結を防ぐために遠心機の蓋は閉めておく。逆に、冷却機のスイッチを切った時は、チャンバー内を乾燥させるために蓋を開けておく。極端な結氷があ

った場合、分離時の風圧ではがれて飛び散り、ローターやチャンバーにダメージを与える場合もある。

(8) 使用後のローターについて

ローターを外して試料の漏れによる汚れがないことを確認する。外したローターは伏せて置いておくこと。これは、落下する埃や結露した水がローター内に溜まり、次回の遠心分離の際にバランスが崩れるのを防ぐためである。試料が漏れた場合、直ちに洗浄すること。ローターの汚れはバランスを崩すだけでなく、ローターを腐食させ、破損事故につながる。また、**危険な試料(組換え生物、発ガン物質、劇毒物、腐食性物質、引火性物質など)を漏らした場合、必ず教員に報告した上で適切な対処をすること。**

2.4.5. 超遠心分離に関する注意

(1) 教員立ち会いの元で使用すること

超遠心分離機は、最大 100,000 rpm 前後の超高速で回転する。バランスの取り忘れや試料漏れを生じた場合、ローターが飛び大事故になるので特に注意が必要である。もし、ローターがチャンバーを突き破れば、ローターが高速で走り回り、実験室は壊滅する。通常の遠心機を普通車に例えるなら、超遠心機はF1マシンである。小さなミスでも重大事故に直結する。**十分に習熟するまでは教員の立会いのもとで使用すること。教員に十分に習熟したと認められるまで単独で使用してはならない。**

(2) プラスミド精製時の注意

プラスミド DNA を塩化セシウム-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離で精製する際、**温度設定には十分注意すること。**密度勾配が形成されると遠心管底部の塩化セシウム濃度は上昇するので、誤って4℃などに設定すると、底部で飽和濃度を超えて塩化セシウムの結晶が出来る。結晶の密度は溶液の密度よりも遙かに大きいので**モーメントバランスが崩れ、ローターが飛ぶ。プロトコールに示された温度と時間を厳守すること。**

なお、エチジウムブロマイドは発ガン物質であり、平衡密度勾配遠心分離には高濃度のものを使用する(RIよりも危険であると考えよ)。**こぼした場合、必ず教員に報告し、適正に除染すること。**特に地下の共通機器室のBeckmanの超遠心機の場合、遠心管のヒートシールの際に汚染しやすい。シーラーの使用前後に、備え付けのUVランプを用いて汚染の有無を確認すること。部屋を暗くして短波長の紫外線を当て、オレンジ色に光れば汚染している。ただし短波長の紫外線は肌に直接当たったり、裸眼で見たりしてはならない(2.7参照)。

(3) ヒートシールについて

遠心管の口を熱で融かしてシールする場合、遠心管の口に溶液が付着しているとシールが不完全になる(遠心力による内圧上昇→液漏れ→アンバランス→大事故)。**取**

扱い説明書を熟読した上で、以下の点に注意してシールすること。

- 1) 試料は図5のレベルまで入れる。これより多いとシールが不完全になりやすく、少ないと遠心力による圧力で遠心管が変形し、やはりアンバランスの原因となる。
- 2) 口に付着した試料溶液を、キムワイプのコヨリなどで完全に拭き取る。溶液が付着している部分はヒーターで加温しても温度が上がらないので（溶けないので）シールが不完全になる。口に付着した溶液が乾燥すると、溶液に含まれていた溶質がこびりついた状態で残るので、やはりシールは不完全になる。

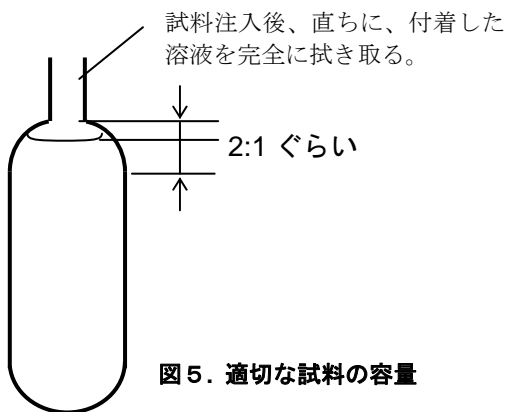


図5. 適切な試料の容量

2.4.6. スイング型遠心機 (clinical centrifuge) に関する注意

試験管を遠心分離できるスイング型の遠心分離機には、4つのアームに全て同じアセンブリーを装着して運転しなければならない。例え試料が1本（バランスを入れて2本）であっても、4つとも同じアセンブリーを装着しなければならない。一般に、1つに8本入る試験管用のアセンブリーを装着した場合の上限回転数は 2,000 rpm である（機種によって異なるので必ず各自で確認すること）。

2.4.7. 遠心分離に関する know how

(1) 理論式から導けるコツ

遠心分離の対象となる粒子のストークス半径と比重をそれぞれ R 及び ρ 、回転速度を ω 、溶媒の比重と粘度をそれぞれ ρ_0 及び η 、回転軸から液面までの距離を r_{min} 、回転軸から遠心管の底までの距離を r_{max} とすれば、対象粒子の沈降に要する時間は

$$t = \frac{9}{2} \frac{\eta}{\omega^2 R^2 (\rho - \rho_0)} \ln \frac{r_{max}}{r_{min}}$$

で与えられる。従って、

- 1) 遠心分離の効果は、遠心力（回転数の2乗）と時間の積に比例する。従って、回転を 1.2 倍にすれば 1.44 倍の効果が得られる（ただし、最大許容回

転数を厳守すること）。また、回転数を上げられない場合、時間を延長すれば良い。

- 2) 高濃度の塩や糖の溶液に含まれる粒子を遠心分離する場合、 $\rho - \rho_0$ が小さくなるので分離には時間がかかる。この時、溶液を薄めることが許されるのなら、水や緩衝液で希釈してから遠心分離すると良い。例えば、比重 1.20 の溶液中の、比重 1.21 の物質を分離する場合、比重の差は 0.01 だが、溶液を等量の水（比重 1.00）で希釈して比重を 1.10 とすれば、比重の差は 0.11 となり、一桁短い時間で分離することができる。また、希釈は溶液の粘度を下げる効果もある。
 - 3) 溶液の温度が上がれば粘度は下がる。事情が許すなら、設定温度を上げたり、水で希釈すれば粘度が下がり、分離に要する時間を短縮することができる。
 - 4) r_{max} / r_{min} が大きいスイング型のローターよりも、これが小さいアングル型のローターの方が早く分離できる。
- (2) 沈殿の懸濁に苦労しているなら

多くの場合、その回転数で分離することが目的ではなく、沈殿を回収するのが目的であるから、回転を下げてみると良い。また、沈殿の再懸濁の際、溶液を加える前に沈殿だけの状態でボルテックスミキサーにかけて沈殿を緩めておくと、懸濁が容易になる。

(3) ローターの予冷について

使用する 30 分～1 時間前にローターを装着して温度を設定し、予冷しておくのが原則であるが、急いでローターを冷やしたい場合は、ローターと蓋を正しく装着した後、1,000～2,000 rpm で 5～10 分空回しをすると良い。

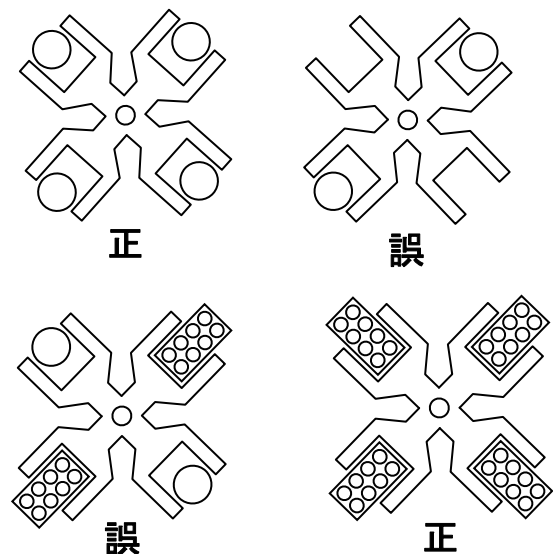


図6. スイング型遠心分離機アセンブリーの正しい装着と誤った装着

通常の遠心分離機に関して

- (1) 重量ではなく、モーメントのバランスを合わせる。
- (2) 最大回転数を厳守し、通常はその8割以内で使用する。
- (3) 遠心管はその遠心力、その溶媒に耐えられるかを確認する。
- (4) 試料の漏れ＝危険（アンバランス、生物的汚染、化学的汚染、爆発火災事故）。
- (5) 冷却装置が付いていれば必ず使う。
- (6) スイング型ローターには全てのアームに同じアセンブリーを装着する。
- (6) 回転が定常に達するまで監視する。
- (7) 回転中はフタを開けない。
- (8) 手でローターを止めるのは言語道断
- (9) もし試料が漏れていれば教員に報告する。

超遠心分離機に関して

- (1) 十分に習熟するまで教官に立ち会ってもらおう。
- (2) 平衡密度勾配遠心の際には温度を厳守。
- (3) エチジウムブロミドで汚染しないように細心の注意を払う。

2.5. 恒温槽

普段何気なく使っている機械だが、火災などの大事故につながる危険がある機械である。当研究科でも、ウォーターバスの空焚き、オイルバスの加熱によるボヤ、乾燥機でプラスチックが融け異臭が立ちこめる発火寸前の事故が起きている。また、事故には至らなくても、正しく使用しないと正確に温度がコントロールできずに実験が失敗する。

2.5.1. 共通注意事項

- (1) 終夜運転時の使用者名、終了予定日時の明記

終夜運転を行う場合、使用者名、終了予定日時を必ず明記すること。使用者名、終了予定日時が表示されていない機器は、最終退室者が電源を切ることとする。電源を切られて実験が失敗しても、それは全て、必要な表示をしなかった実験者の責任である。

- (2) 無人（終夜）運転時の注意

安全装置がついていない装置での無人（終夜）運転は禁止する。安全装置がついている機器であっても、温度コントローラーが常に正常に作動する保証はない。**設定温度に達して定常に入ったことを確認しないうちは下校してはならない。**やむを得ない事情で下校

する場合は、他の者に確認を依頼すること。

- (3) 電源容量に関する注意

恒温槽は電力消費量が大きい（12～20 A, 12～20 kW）。電源の容量が十分かどうか確認すること。タコ足配線は厳禁である。

- (4) 延長コードの使用について

容量が十分ではない延長コードを使用すると発熱し、火災の危険がある。原則として恒温槽に延長コードを使用してはならない。15 A以上の電流が流れる恒温槽も珍しくなく、延長コードを使用する場合、これに耐える十分な電流容量のコードを使用しなければならない（ちなみに、家庭用の延長コードは、6 Aしか容量がないものもある）。

- (5) 制御部に水をかけてはならない

火災、感電の危険がある。また、回路がショートして恒温槽を壊す可能性がある。もし水がかかったら電源プラグを抜き（濡れた手で抜いてはならない）、可能な限り水を拭き取った後、メーカーに点検を依頼すること。

- (6) ベースヒーターとコントロールヒーター

機種によってはコントロールヒーター（設定温度より上がれば切れ、下がれば入るヒーター）の他に、常に電流が流れるベースヒーターを備えているものが

ある。ベースヒーターは、温度を速やかに上げたい場合や、設定温度が高くてコントロールヒーターの能力が不足する場合にのみ使用するヒーターである。従って、通常の運転時にベースヒーターを使用すると温度はどんどん上昇し、実験が失敗するばかりでなく、火災の危険も出てくる。

(7) 温度計の精度

温度計によっては2～3℃狂っているものもある。一般に、化学反応（酵素反応）は温度が1℃上がれば6%早くなる。温度が重要な実験なら、用いる温度計の精度を標準温度計でチェックすること。なお、標準温度計は高価であるから、温度計のキャリブレーションにのみ使用し、通常の実験には使用してはならない。また、温度計の先端が恒温槽の壁面や底面に接していると正しい温度を測定できないので注意すること。

2.5.2. ウォーターバスについて

(1) 終夜運転、無人運転についての注意

空焚き防止装置が付いていないウォーターバスで終夜運転を禁止する。また、昼間であっても無人で運転してはならない。毎回、空焚き防止装置が正常に作動することを確認してから使用すること。水位が低下してフロートが下がれば通電が遮断されるタイプの空焚き防止装置の場合、フロートに水垢が付着すると、フロートが動かなくなり、水位が低下しても作動しなくなる。フロート付近に汚れが付着しないよう、手入れを怠らないこと。

(2) 水の補給

インキュベーターの水は蒸発して減る。必ず十分な量の水を入れておくこと。室温と水温の差が大きく湿度が低い冬季は蒸発量が増えるので特に注意すること。終夜運転を行う場合、自動給水装置を工夫するか、アルミホイルや発泡スチロールで覆って蒸発を防ぐ工夫をすること。特に、高温で使用する場合、単位時間当たりの水位の低下を調べ、翌日登校するまで安全な水位が保てるかどうかを確認すること。なお、プラスチック球や発泡スチロールを水面に浮かべるのは危険。ヒーター部分に接触して発火する恐れがある。

(3) 水位の確認

最終退室者は、例え自分の実験でなくても、終夜運転しているウォーターバスの水位を確認し、十分でなければ補給すること。

(4) 安全装置を過信してはならない。

空焚き防止装置を備えた機種での取り扱い説明書には「毎回安全装置の動作の確認をすること」と明記されている。これを実行していない限り動作は保証されない。**そもそも、安全装置が働けば電源が切れ、温度が保てなくなって実験は失敗する。**例え安全装置が付

いている機種であっても、水の補給に注意を払わなくても良い理由にはならない。

(5) 振盪時の注意

振盪機の付いたウォーターバスを使用する場合、振盪によって水が飛散らないよう、水位や振盪速度を調整しなければならない。特に無菌操作を必要とするサンプルを振盪する場合、ウォーターバスの汚い水（ 10^7 /mL以上の雑菌がいても不思議ではない）が綿栓やシリコ栓にかからないような工夫をしなければならない。

2.5.3. 孵卵器、乾燥器、乾熱滅菌器について

(1) 孵卵器、乾燥機、乾熱滅菌は防爆構造ではない

有機溶媒、可燃性ガス等は絶対に入れてはならない。

(2) 乾熱滅菌器には可燃物を入れてはならない。

プラスチック、紙などの可燃物は乾熱滅菌器に入れてはならない。綿栓のみ例外とする。

(3) 温度設定ダイヤルはテープなどで固定する

温度設定がダイヤル式の恒温槽は、物品などが当たって設定温度がずれないようにテープを貼ってダイヤルを固定すること。当専攻で、設定がずれてプラスチック器具が融けた実例がある（幸い、異臭で気づいて火災には至らなかった）。

(4) 乾燥機、乾熱滅菌機に器具を入れる場合、その器具がその温度に耐えられるかを必ず確認する

一般にプラスチック器具（ピペットマン等も含む）は乾熱滅菌の温度（160℃）には耐えない。チップ、エッペンドルフチューブ、プラスチックビーカーなどを乾熱滅菌すれば、溶けて高温のヒーター部分に流れ込んで発火し、火災につながる。

(5) 空気循環を妨げてはならない

ファンの吹出し口にサンプルや器具を置いてはならない。また、庫内に大きな物品を入れたり、物品をぎっしり入れてはならない。一般に温度センサーは庫内の上部に、ヒーターは下部に設置されているが、空気の循環（対流）が妨げられると、温度がコントロールできなくなる。上部の温度が設定温度に達しなければヒーターの通電が続き、下部は高温になる。これによってプラスチック器具が融け、赤熱したヒーター部分に流れ込んで出火した実例がある。

(6) 底板を外してはならない

庫内の底部に敷かれている板は、高温になる底板と物品を隔離し、空気循環を確保するためのものである。背の高い試料を入れたいからと言って底板を外してはならない。火災事故の原因となる。

(7) 試料をこぼした場合

孵卵器内に試料をこぼした場合は必ず直ぐに拭き取ること。腐敗してコンタミの原因になる。

共通

- (1) 終夜運転時には氏名と終了予定時刻を明記する。
- (2) 安全装置がついていない機器では無人（終夜）運転禁止。
- (3) 温度が定常になったことを確認する。
- (4) タコ足配線厳禁。
- (5) 延長コード使用時は電気容量に注意。
- (6) 制御部は水厳禁。

ウォーターバス

- (1) 水の量は十分か（水なし+機能しない安全装置=火災）。
- (2) 毎回、空焚き防止装置が正常に機能することを確認する。
- (3) 最終退室者は自分の実験でなくても水量を確認する。

孵卵器、乾燥器、乾熱滅菌器

- (1) 溶媒、可燃性ガスを入れてはならない。
- (2) 庫内の空気循環を妨げない。
- (3) 乾熱滅菌器は可燃物厳禁。

2.6. 減圧操作

2.6.1. 装置に関する注意

(1) 水流ポンプでベンゼンや含ハロゲン溶媒を吸引してはならない。

ベンゼンや含ハロゲン溶媒（クロロホルム、ジクロロメタン、クロロエチレン）などを水流ポンプで吸引してはならない。下水に含ハロゲン溶媒が流れ、環境を汚染する。循環式水流ポンプであっても吸引してはならない（循環式水流ポンプの水を交換する時、含ハロゲン溶媒を含む水を下水に流すことになる）。

(2) 真空ポンプで酸性のガスを直接吸引してはならない。

例えば塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸などはポンプ内部を腐食させ、機械の寿命を著しく縮める。テフロンコートした特別なポンプを用いるか、水酸化ナトリウムなどを入れたトラップを使用すること。

(3) オイル式真空ポンプで有機溶媒及び水溶液を直接吸引してはならない

酸性ガスほどではないが、ポンプの寿命を縮める。また、吸入した溶媒や水の蒸気圧のため、十分な真空度が得られなくなる。液体窒素かドライアイス-エタノール（メタノール）などを用いたコールドトラップを通して吸引すること。水溶液の場合、シリカゲルカラムで代用することもできる。この場合、シリカゲル

は色が変わったら（赤みを帯びてきたら）交換しなければならない。

(4) 真空を破ってからポンプを停止する

ポンプを停止させる場合、3方コックを使うかホースを外すなどして、減圧を破ってから停止させる。真空ポンプの中には逆流防止弁が付いていないものもあり、減圧を破る前にポンプを止めるとオイルが逆流し、試料がだめになる（後始末も大変）。水流ポンプには通常、逆流防止機構は付いていない。手順を誤ると水が逆流して大切な試料がだめになる。特に、デシケーターなどで減圧乾燥を行う場合、逆流した水が乾燥剤（五酸化リン、塩化カルシウム、濃硫酸など。シリカゲルも例外ではない）と激しく反応して事故の原因となる。なお、そもそも減圧乾燥に水流ポンプを用いるのは間違いである（水流からの水蒸気のため厳密な乾燥はできない）。

2.6.2. 減圧操作に関する注意事項

(1) 容器は減圧に耐える容器でなければならない

減圧ビン、吸引ビン、デシケーターなど減圧を前提にした肉厚の容器しか減圧してはならない。また、ヒビやキズがないかどうかを毎回確認してから使用すること。三角フラスコなどは減圧すると割れると考えよ。破片や内容物が激しく飛散り、非常に危険である。

(2) 即座に突沸に対応できなければならない

溶媒を減圧する場合、**突沸した時、即座に減圧を中止できるように**、三方コックなどを取り付けておくこと。特に、減圧を開始した直後、試料を加温し始めた時、試料の溶媒がなくなる直前は突沸しやすいので、常に監視し、突沸した時にすぐにそれに手をかけておくなどの工夫をしなければならない。減圧を始めてすぐにその場を離れるのは言語道断である。

2.6.3. ロータリーエバポレーター

(1) 排気は徐々に注意深く

発泡や突沸が起った場合に直ちに減圧を破れるようにコックに手を掛けながら排気を始める。減圧を始めてすぐにその場を離れるような非常識なことをし

てはならない。

(2) 通常は真空ポンプを使用しない

通常は水流ポンプを用い、真空ポンプは使用しない。真空ポンプを使用する場合、先に述べたように液体窒素かドライアイス-エタノール（メタノール）で冷却したトラップを通すこと。

(4) 十分に減圧が安定するまで加熱してはならない

十分減圧となり発泡も突沸も起こらなくなってから加熱する。

(5) 冷却水的水流停止は火災事故につながる

減圧を始めてから5分後、及びその場を離れる時には冷却水が十分流れているか確認せよ。溶媒が回収されずに排気され、爆発や火災につながる場合がある。

- (1) 減圧することを前提に作られた容器を使う。
- (2) ロータリーエバポレーターの冷却水停止は爆発火災事故につながる。
- (3) 乾燥剤+水の逆流=危険（ポンプを止めるのが最後）
- (4) 水流ポンプは含ハロゲン溶媒、ベンゼン厳禁
- (5) 真空ポンプには適当なトラップを付ける。

2.7. 紫外線ランプ

紫外線、特に、短波長の紫外線は人体に有害である。また、DNAを染色して観察する場合、短波長の紫外線はDNAにチミンダイマーの形成、切断などのダメージを与える。

(1) ランプを点灯させる際には短時間であっても必ず保護メガネを着用すること。

(2) アガロースゲルからのDNA断片の回収など、数秒間以上の作業を行う場合、長袖の服（白衣）と手袋を着用し、フルフェイスのフェイスマスクを着用すること。

(3) クリーンベンチなどに取り付けられている紫外線ランプは有害な短波長（通常245~254 nm）のランプが使われている。紫外線はガラス、アクリル板で遮蔽できるが、直接肌に浴びたり裸眼で見たりしてはならない。なお、トランスイルミネーターに用いられている長波長ランプ（通常312~365 nm）とは異なるので、交換の際に混同しないように注意すること。

(4) 波長の切り替えが可能なトランスイルミネーターの場合、DNA断片の切り出しには長波長側を用いること（切り替えスイッチの表示がH、Lとなっている機種の場合、これは出力の高低ではなく、波長の高低を意味することに注意せよ）。

2.8. 試薬の取り扱い

試薬を取り扱う場合、必ず保護メガネを着用すること。

万一危険な試薬（溶液）が目に入った場合、直ちに（数秒以内に）多量の水で15分以上洗浄した後、医師による処置を受けること。特に、アルカリや有機溶媒などが目に入った場合、寸秒を争って洗浄すること。洗浄が一秒遅れるごとに失明のリスクが増す。また、早く医師の診察を受けるよりも、十分に洗浄することが重要である。

実験で試薬を使用する際には、全て、取り扱い上の注意を理解してから使用しなければならない。また、「実験を安全に行うために」（化学同人）などの手引書を読んでどのような物質がどのように危険なのか、事故の時どのように対処すべきかと言ったことに関する一般的な基礎知識を持っていなければならない。更に、使用する個々の試薬について、メルクインデックスなどを調べ、例えば以下の点に関して十分な予備知識を持っていないとしない。

- (1) どの程度人体に害があるのか、
- (2) 引火、爆発の危険はないか、
- (3) こぼした時の処理はどのようにすれば良いのか、
- (4) 廃液の正しい処理方法
- (5) 正しい保存方法（冷蔵、冷凍、遮光、窒素置換など）

2.8.1. 取扱に注意を要する試薬の例

今まで何気なく使っている試薬の中にも意外に危険な試薬がある。以下に身近な実例、及び、めったに使わないが特に注意を要する試薬についてその例を示す。

(1) 特殊引火物

エーテルなどが該当する。消防法では最高ランクの危険度であり、部屋中の裸火を消してから取扱わなければならない。ここで言う取扱いは、溶媒ビンを「持つ」ことも含む(2.1.2.参照)。着火温度が極めて低く、引火しやすい。また、一度引火すると爆発的に広がり消化が困難であり、十分な注意が必要である。なお、**これらの溶媒の遠心分離はいかなる事情があっても厳禁である**(防爆型の特殊な遠心分離機が必要で、当専攻にはない)。

(2) 高引火性物質

エタノール、メタノール、アセトニトリル、ヘキサン、アセトン等がこれに該当する。特殊引火物同様、取り落として割れた場合を考え、ビンを「持つ」時はストーブなどの裸火を全て消すこと。また、水溶性の溶媒であるからと言って流しに廃棄するのは危険である。液の表面積が広がるので溶媒蒸気の量が増え、湯沸かし器の火、遠心機のモーターの火花などで引火、爆発する可能性がある。

(3) 毒劇物

シアン化カリ、シアン化ナトリウム、アジ化ナトリウム、水銀化合物、砒素化合物など。他にフェノール、クロロホルム、アクリルアミド、硫酸、塩酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アセトニトリルなどもこれに該当する。施錠できる専用保管庫に保管し、台帳を作成して重量管理しなければならない。また、**紛失、台帳への記入漏れに気づいた場合、直ちに教官に報告しなければならない。**

毒劇物を購入し、納品されたら、忘れずに台帳へ記入すること。また、研究室間での貸し借りは必ず教員の下承を得ること。

(4) その他、身近な危険物

・過酸化水素水

金属が混入すると爆発的に反応する場合がある(小中学校の理科の実験で行った過マンガン酸カリウムを触媒に過酸化水素水から酸素を発生させる実験を思い起こしてみると良い)。微量の錆が混入して爆発事故が起きた例もある。**金属の容器や注射器などを絶対に用いないこと。**

・過硫酸アンモニウム

ポリアクリルアミドゲルの重合開始剤として用いられるが、これも希ではあるが**金属と爆発的に反応する場合があるので秤量の際には金属製の薬サジを用いてはならない。**プラスチックまたは竹の薬サ

ジを用いる。ポリアクリルアミドゲルの調製に用いるなら以下の方法を推奨する(多少割高だが、電気泳動用の10%溶液も市販されている)。

- 1) 1 g 単位で購入する。
- 2) 純水 3~5 mL を試薬瓶に直接加えて溶解する。
- 3) 15 mL 容のディスポーザブルチューブに移し、その目盛りで 10 mL にメスアップする。
- 4) 1 回で使い切る 100~500 μ L の適当な単位でエッペンドルフチューブに分注する。
- 5) -20°C 以下で冷凍保存する。

多くのプロトコールでは過硫酸アンモニウムは使用時調製となっているが、分注して冷凍保存すれば全く問題ない。また、この方法で調製する場合の誤差は、アクリルアミドゲルの重合開始剤として用いる場合、問題にならない。

・アクリルアミド

神経毒である。肌が付いた場合、直ぐに洗えば問題ないが、放置すれば麻痺することもある。

・フェノール

腐食性物質であり、皮膚につけば火傷を負う。核酸の抽出を行う際の注意点を 2.8.6. に示す。

・クロロホルム

劇物、腐食性物質、特定有害物。皮膚につけばフェノールほどではないが火傷を負う。長期にわたって吸入すれば肝臓癌になるとされている。必ずドラフト内で使用すること。核酸の抽出を行う際の注意点を 2.8.6. に示す。

・エチジウムブロマイド、ニトロソグアニジン、エチル(メチル)メタンスルホン酸

強力な発癌剤である。アイソトープよりも危険であると考えよ。取扱いに十分習熟するまでは教員の指導の元で使用すること。また、こぼした場合の対処方法や廃棄する場合の処理方法を熟知していなければならない。 2.8.4. 及び 2.8.5. を参照のこと。

・五酸化リン、生石灰(酸化カルシウム)、濃硫酸、シリカゲル

乾燥剤としても用いられるこれらの試薬は水と激しく反応する。シリカゲルでさえ水につければ弾けて危険である。デシケーターの内容物を廃棄する場合、十分な注意が必要である。

2.8.2. 購入時の注意事項

(1) 購入しようとする試薬に関する正しい知識を持つ

メルクインデックス等で必ず使用する試薬についての知識を持つ。これは上に述べたような毒性や爆発性などに関する正しい知識を得るためだけでなく、実験を失敗しないためにも必要である。例えば、難溶性の試薬の水溶液の調製方法(pH を少し変えたり、一

且他の溶媒に溶かす) や、試薬の安定性など、有益な情報を得ることができる。

(2) 必要最低限の単位で購入する

試薬の廃棄には、購入時の何十倍、何百倍もの費用がかかることも珍しくない。大量に買って余らせれば、それ自体もったいないだけでなく、余分な廃棄費用が必要になることを認識しておくこと。

保存によって劣化する試薬も少なくない。特殊な保存方法が要求される試薬(吸湿性試薬、アンブル入り試薬、遮光、窒素置換、冷蔵、冷凍保存などを必要とする試薬)は、必要最小限の単位で購入すること。例えば、1 g 瓶と 10 g 瓶が市販されており、実験に 2 g 必要であれば、1 g 瓶を 2 本購入する方が結果的に安上がりになる場合も多い。

2.8.3. 使用時の注意事項

(1) ラベルの確認

誤った試薬を使わないようにラベルを 3 回確認する。1 回目は試薬棚から出す時(探す時にラベルを見るはず)、2 回目は秤量する時(複数の試薬瓶を天秤のそばに持って行ったら、秤量する時にもう一度見るはず)、3 回目は試薬棚に戻す時(元あった場所に戻すために試薬のラベルを見るはず)。以下に間違い易い例を挙げておく。

1) リン酸、クエン酸、EDTA、ATP などの多価アニオン
例えば、4 価の EDTA の場合、free acid, 1~4 ナトリウム塩の 5 種類がある。リン酸にはナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩などがそれぞれ 3 種類ある。

2) 結合水の数

例えば、 Na_2HPO_4 の場合、無水物、7 水塩、12 水塩の 3 種類がある。モル濃度の場合、それぞれの分子量を用いれば秤量すべき量を計算できるが、重量濃度の場合、どの塩を用いるかで濃度は異なるので注意すること(実験ノートには用いた試薬の結合水の数も正確に記録する)。

(2) こぼした場合

秤量時に試薬をこぼしたら必ず後始末をすること。放置すれば、次に別の試薬を秤量する際に、こぼれていた試薬は薬包紙の裏に付着して混入する。**こぼした試薬の素性を知っているのは、こぼしたあなただけあり、放置すれば適切な後始末ができなくなる。**

(3) 薬サジ

秤量に使用する薬サジは必ず良く洗って純水でリンスしたのち、完全に乾燥させたものを用いる。濡れた薬サジを使用すれば試薬が湿気で劣化を促進する場合もあるし、正確に秤量することができなくなる。極微量の不純物のために失敗する実験も少なくない。

なお、過硫酸アンモニウムなど、金属製の薬サジを使用してはならない場合があるので注意すること(2.8.1.(4)参照)。

(4) 試薬は必ず元に戻す

使用した試薬は必ず直ちに元あった場所にラベルを手前に向けて戻す。ラベルが剥がれかかっていたり、消えかけていれば、貼りつけたり、改めて記入したりと言った適切な処置を取らなければならない。内容物が不明の試薬の廃棄には非常に高額の費用を要する。

(5) 冷蔵、冷凍していた試薬の開栓

冷蔵あるいは冷凍保存している試薬を使用する場合、必ず**室温に戻してからフタを開ける**。冷えている状態のままフタを開けると空気中の水蒸気が結露して試薬が湿気てしまう。湿気れば劣化を促進するし、もはや正確に秤量することができなくなる。なお、短時間室温にさらすことによる試薬の劣化は、湿気た状態で長期間低温保存する際の劣化に比べて無視できる。ただし、以下の(6)と(7)は例外である。

(6) アンモニア水、過酸化水素水、腐敗した糖液

アンモニア水、過酸化水素水などは瓶の中が高圧になっている場合がある。気温が高い時は氷水などで冷却してから蓋を開けるべきである。なお、密封された容器の中で糖を含む培地が腐敗し、炭酸ガスで内部が高圧になっている場合、不用意にフタを緩めると爆発的に飛び散ることがあるので注意すること。**何れの場合も必ず保護メガネを着用すること。**

(7) アンブルの開封

アンブルを開封する場合は氷水などで冷却してから開ける。その実験で使い切らない場合、密閉保存できる適当な材質と大きさの容器を用意してから開封する。アンブルに入っている試薬は、それなりの理由(例えば、酸素や水分を極端に嫌う、悪臭がするなど)があつてアンブルに密閉されているのだから、開封後も密閉して保存しなければならない。なお、パラフィルムには通気性があるので密封したことにはならないことに注意。

2.8.4. 発癌性物質の取扱い

エチジウムブロマイド、ニトロソグアニジン、エチルメタンスルホン酸などの物質は強い発ガン性があり、こぼして放置すれば、例え微量であっても、本人はもちろん、関係者全員を長期に渡って危険にさらすことになる。**こぼした場合の検出が難しいため、アイソトープよりも危険だと考えるべきである**(エチジウムブロマイドは紫外線を当てれば検出できる)。使用する場合は例えば以下のようにアイソトープと同様に(アイソトープ以上に)細心の注意が必要である。なお、使用する試薬、実験目的によって使用手順は異なるので、**必ず教員の指導の元**

で実験を行うこと。

- (1) **必ず手袋と保護メガネを着用する。**決して素手で扱ってはならない。なお、**使用した手袋は汚染しているものとして取扱い、手袋をしたまま不用意に物品に触ってはならない。**
- (2) **秤量の際は教員に立ち会ってもらおうこと。**微量でもこぼさないように細心の注意を払う。
- (3) 試薬瓶は新しい透明な袋に入れて口を閉じて保管する。
- (4) 試薬が入っていた古い袋は(8)に示す方法で廃棄する。
- (5) 作業する実験台には十分な大きさのポリエチレンコートされた濾紙などをひく。
- (6) **濾紙以外も場所にこぼしたら教員に報告し、直ちに適正かつ十分な中和処理を行うこと。**
- (7) 使用した全ての器具（試験管などの容器、チップ、葉さじ、葉包紙）について必ず中和処理を行うこと。
- (8) 使用した手袋、実験台に敷いた濾紙、試薬を入れていた袋などは、人が（関係者だけでなく廃棄業者も含めて）触れることがないようにして廃棄する。例えば手袋をしたまま廃棄したい袋をつかみ、それを包み込むように裏返しに手袋を脱ぎ、口を縛る。さらにこれを別の袋に入れ、口を縛って廃棄する。この際、中にチップなどの先のとがった袋を破る可能性のある物を入れてはならない。チップ類は別途中和処理を行って廃棄すること。

2.8.5. 発癌性物質の処理

以下に述べる方法は一般的なものであり完全ではない。状況に応じた処理方法を各自で調べ工夫すること。

(1) エチジウムブロマイド

次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理することが多いが、完全に発ガン性を中和できるわけではなく、かえって毒性が強くなるとも言われている。また、Molecular Cloning 第2版 E8 に記載されている過マンガン酸カリウムなどによる酸化処理も完全ではない。そこで、ゲル染色液などの希薄な溶液、平衡密度勾配遠心に用いた濃厚な溶液は、共に含ハロゲン廃液として専門業者に処理を委託する。なお、希薄な廃液の場合、活性炭あるいは Amberlite XAD-16 に吸着させて処理する（Molecular Cloning 第2版 E9 参照）。ただし、使用した活性炭、Amberlite XAD-16 を適切に処分すること。

なお、エチジウムブロマイドで汚染した箇所は、暗所で紫外線ランプをあてるとオレンジ色に光る。短波長の紫外線を用いた方が検出感度が高いが、短波長の紫外線自体にも発ガン性があるので注意すること。万一皮膚に付着した場合（付着した可能性がある場合）、長波長の紫外線ランプで確認し、オレンジ色に光らな

くなるまでブラシと石鹼を用いて洗浄する。

(2) ニトロソグアニジン

酸性もしくはアルカリ性溶液としてオートクレーブで加熱すれば分解する。加熱処理できない所に絶対にこぼさないように細心の注意を払わなければならない。

(3) エチルメタンスルホン酸（EMS）

次亜塩素酸ナトリウム溶液もしくはチオ硫酸ナトリウム溶液で中和する。「微生物遺伝学実験法」によれば、3%の EMS 0.2 mL を中和するのに 6%次亜塩素酸ナトリウム溶液 9.8 mL を使用している。また、万一こぼした場合は手袋をして次亜塩素酸ナトリウム溶液で十分に拭くこと。

2.8.6. 核酸のフェノール/クロロホルム抽出

(1) 保護眼鏡をかけ、手袋をして扱う

フェノール/クロロホルム抽出を行う場合、密閉性に問題ないメーカーのチューブを用いること。チューブのメーカーによっては密閉性が悪く試料が漏れるチューブが一部混ざっている場合があり、ボルテックスする際には特に注意が必要である。**必ず保護眼鏡をかけ、手袋をして扱うこと。**

(2) フェノールもしくはクロロホルムが目に入ったり皮膚に付着した場合

万一目に入った場合、直ちに（数秒以内に）多量の水で 15 分以上洗浄した後、医師による処置を受けること。**皮膚に付着した場合、絶対にエタノールなどの溶媒で拭いてはならない。**溶媒で皮脂が除去され、よけいにひどい火傷を負う。皮膚に付着したら直ちに水で流した後、石鹼で洗う。

(3) 廃液は回収する

廃液は必ず回収し、然るべき廃棄業者に処理を委託すること。チューブに入れたまま捨ててはならない。不燃物として処理されるチューブは、多くの場合埋め立て処理されるので、環境を汚染し、作業員を危険にさらす。

2.8.7. 注意すべき英語の表示

May cause cancer	癌になる可能性がある
Mutagen	変異剤（発癌剤）
Flammable	強燃性
Combustible	可燃性
Harmful	有毒、有害
Harmful by inhalation	吸入すると有害である
Corrosive	腐食性
Lachrymator	催涙性
Irritant	刺激物
Cause irritation	刺激がある

Do not breathe fumes	蒸気を吸ってはならない
Avoid breathing dust	粉末を吸い込むのを避けよ
Store desiccated	デシケーターに保存せよ(湿気を避けよ)
Store below ~ °C	~°C以下で保存せよ
Store at room temperature	室温で保存せよ(冷蔵、冷凍してはならない)
Store under nitrogen	窒素置換して保存せよ
Air sensitive	空気を嫌う(酸素、湿気で分解する)
Protect from light	遮光せよ

2.9. 液体ガス、ガスボンベの取扱い

水素などの可燃性ガス、酸素ガスなどは爆発火災に関する注意が必要なものは容易に理解できるが、窒素、アルゴン、炭酸ガスなども窒息死亡事故につながる場合があり、注意が必要である。

2.9.1. 運搬にエレベーターを使う場合

運搬にエレベーターを使う場合、**液体ガス容器やボンベと同乗してはならない**。希にボンベのバルブが壊れてガスが噴出することがあり、同乗していれば高い確率で窒息死する。また、液体ガスの場合、万一エレベーター内でこぼした場合、気化したガスで窒息することがある。停電などでエレベーターが止まった場合、こぼさなくても気化したガスで窒息する場合がある。液体ガスの容器やボンベをエレベーターに載せたら、目的階のボタンを押して無人運転し、人は階段を利用しなければならない。なお、エレベーターのドアが開いたとき、ボンベや容器が載っていればそのエレベーターには乗ってはならない。

2.9.2. 液化ガスを扱う場合

低温センターの講習会を受講した上、講習会で配布されるマニュアルを熟読した者以外が単独で液化ガスを取り扱うことを禁ずる。

液体窒素などの液体ガスを扱う場合、**冬期であっても窓を開けること。換気できない部屋での使用を禁ずる。**複数の大学や企業で、換気のない部屋で液体窒素を使用して窒息死する事故が実際に起きている。酸素欠乏状態になると、意識が朦朧となり、気づいたときには脱出したり助けを呼んだりすることはほとんど不可能な状態になる。

2.9.3. ガスボンベを扱う場合

高圧ガスに関する安全取り扱い講習会を受講した者以外が単独でガスボンベを取り扱うことを禁ずる。

(1) 必ず転倒防止措置を講ずる

転倒したボンベの下敷きになって負傷する直接的な危険の他に、バルブが破損してガスが噴出すれば、ボンベはロケットのように飛び、爆発火災事故や窒息死事故にもつながる。専用のボンベ台を設置し、チェーン等で確実に固定すること。

(2) 漏れのチェックを行う

レギュレーターを取り付けたら必ず石鹼水を塗るなどして漏れのチェックを行うこと。可燃性ガス、有毒ガスは洩れると危険であることは言うまでもないが、酸素も多量に洩れると、普段は発火しないものも発火して危険である(綿などは自然発火し、金属は軽く触れあうだけでも大きな火花が散る)。

(3) ボンベの元栓を開ける作業は危険な作業である。

ボンベの元栓を開ける際には、レギュレーターを取り付けてある方向に立ってはならない。万一レギュレーターの取り付けが不完全であった場合、レギュレーターが高速で飛んでくる。元栓を開ける際には、レギュレーターの取り付けである方向は無人であり、かつ、破損したら危険を生じる器具がない状態でなければならない。

3. 正しく実験を行うために

3.1. 試薬、試料の保存

3.1.1. 希釈した溶液は不安定である。

一般に希釈した試薬、試料は不安定である。保存は濃厚な状態で行うべきである。

(1) 酵素的分解

微量でもヌクレアーゼ、プロテアーゼが混在すれば（雑菌の混入はヌクレアーゼ、プロテアーゼの混入を意味する）その試料は分解する。この時、試料が高濃度であれば大部分は分解を免れる。

(2) 容器への吸着

プラスチック、ガラスは 1 cm^2 当たり $0.1\sim 1\text{ }\mu\text{g}$ 程度の核酸や蛋白質を吸着する。容器への吸着によるロスは、核酸溶液の場合は容器をシリコナイズすることによって（Molecular Cloning E1～E2 参照）、蛋白質溶液の場合は 0.1% 程度の牛血清アルブミン（BSA）を添加することによってかなり防ぐことができる。

(3) 酸化

30°C の純水は最大 7.4 mg/L ($=0.23\text{ mM}$) の酸素分子を含み、低温では更に高濃度の酸素分子が溶解する。例えば 1 価のチオール 4 分子は酸素分子 1 分子で酸化されるので、 1 mM 以下の溶液は密閉保存しても溶存酸素によって酸化されてしまう。

3.1.2. 「生もの」の冷蔵、冷凍保存時の注意

あなたは何日も冷蔵保存した刺身を食べますか？ 刺身は例え 1 日でも保存すれば風味が変化し、風味の変化は成分の変化を意味する。細胞には必ずヌクレアーゼ、プロテアーゼが含まれており、細胞から抽出した蛋白質や核酸などの試料は、高度に精製しない限り、これらによる分解を受ける。できるだけ低温で扱い、手早く実験を終えるような工夫が必要である。冷凍した場合も安定であるとは限らない。冷凍保存時の劣化は程度の問題であるから（全く劣化しない保存方法はあるが）、必要以上に神経質になる必要はないが、以下の点に留意する必要がある。

- (1) 細胞を凍結させると、細胞内の水の氷結による物理的な力によって大きなダメージを受ける（水は凍ると体積が増加し、細胞にダメージを与える大きな氷の結晶は -20°C 前後で特に成長が早い）。また、大きな蛋白質分子も凍結すると失活する可能性がある。グリセリンなどの適当な保護剤を添加する必要がある。
- (2) 冷凍温度が -20°C 程度である場合、不凍水部分でプロ

テアーゼ、ヌクレアーゼが有意に働く（細胞由来の粗精製試料には必ずプロテアーゼ、ヌクレアーゼが含まれている）。

- (3) 試料に含まれる塩の溶解度の関係で、凍結させると大きく pH が変化する場合がある。例えば pH 7 のリン酸ナトリウム緩衝液は NaH_2PO_4 と Na_2HPO_4 を混合して作るが、冷却すると、まず水が氷り、不凍水部分のリン酸ナトリウムの濃度が上がる。 Na_2HPO_4 の溶解度は NaH_2PO_4 のそれよりも低いいため、まず、 Na_2HPO_4 が析出する。残った NaH_2PO_4 の pH は低く、不凍水部分の pH は 4 程度まで下がり、蛋白質が失活する可能性がある（この場合、蛋白質濃度が高ければ、蛋白質自体に緩衝能があるのでこのような極端な pH の変化を避けることができる。また、 10% (w/v) 程度のグリセリンを添加すると pH の変化はかなり軽減できる）。
- (4) 不安定な試料は、一般に、 -20°C で凍結保存するよりも -80°C で凍結保存する方が無難である（ただし凍結によって失活するものもあるので注意すること）。

3.1.3. 保存方法

(1) 蛋白質

個々の蛋白質によって安定な保存方法は異なるが、一般に $2\sim 3\text{ M}$ の硫酸アンモニウム懸濁液、 50% (w/v) グリセロール溶液として低温（蛋白質によって適当な温度は異なる）で保存するのが安定である。また、適当なプロテアーゼ阻害剤を添加しておくことが望ましい。

(2) 核酸

乾燥状態、もしくは、TE 溶液に等量のエタノールを添加して -20°C で凍らせずに保存するのが最も安定であるとされている。

3.2. 天秤

電子天秤は 5 桁、6 桁表示するものもあるが、気圧、湿度によって浮力は異なり、上皿天秤以外は緯度や高度（重力）によって重量は異なる。また、試薬は多かれ少なかれ吸湿する。従って、適正なキャリブレーションを行い、吸湿に十分配慮しない限り、4 桁目以降は信用できないと考えるべきである。乾燥重量を測定する場合な

どを除いて、秤量した試薬のほとんどは溶液として使用するのだから、メスシリンダー、メスフラスコの誤差（それぞれ0.5%、0.1%程度）も考慮すること。

3.2.1. 使用上の注意

(1) 水平を確認する。

精密天秤には水準器が付いており、これを用いて水平をとること（ θ 度傾いていれば $\sin \theta$ 低い値が表示される）。

(2) キャリブレーションを行う

上にも述べたように、気圧によって浮力は異なるので、正確に秤量したいのならキャリブレーションをしてから使用すること。キャリブレーションの方法は天秤によって異なるのでそれぞれの取扱説明書を参照

すること。

3.2.2. 試薬をこぼしたら

こぼしたらその場で拭き取る。放置すれば以下のような問題をひき起こす。

- (1) こぼした試薬が天秤を腐食させたり、腐敗して微生物的汚染を引き起こす（微生物的汚染＝ヌクレアーゼ＋プロテアーゼ）。
- (2) こぼした試薬の処理方法は試薬によって異なる。処理法が不明なら教員の指導を仰ぐこと。
- (3) こぼした試薬は、次の試薬を秤量する薬包紙の裏に付着し、次の試薬に混入する。

こぼした試薬の素性を知っているのは、こぼしたあなただけです。あなたがその場で適切な処理をする義務があります。放置すれば関係者に危害を及ぼしたり実験を失敗させることを肝に銘じなくてはなりません。

3.3. メスピペット

3.3.1. 安全ピペッター

安全だと判っている溶液以外は安全ピペッターを使用する。なお、安全ピペッターにメスピペットを挿入する際には、2.2.2. に述べた注意が必要である。また、安全ピペッターに誤って溶液を吸い込んでしまった場合、直ちに以下の要領で洗浄すること。放置すれば次に使う者に危害を与える（排気する際に吸い込んだ溶液が飛び散る）。

誤って吸い込んだ場合、蒸留水を吸い込んで捨てる操作を10回以上繰り返す。その後、弁の部分大型クリップなどでつまんで開放した状態でコンプレッサー等を用いて通気し、乾燥させる。

3.3.2. 誤差

(1) 誤差の要因

メスピペット、ホールピペットの標示量は、標線まで吸上げた20℃の水を自然落下させた時の流出量である。従って、以下の場合は正しく採量できない。なお、ディスポーザブルピペットは検定が行われていないものもあり、中には1割近い誤差があるものもある。

- 1) 口で吹出した時
- 2) 洗浄が不十分でピペット内壁に水滴が残留する時

3) 外壁に溶液が付着している時

4) 高温の溶液

5) 高粘度溶液

(2) 高粘度溶液の取り扱い

高粘度の溶液（例えば、高濃度の糖、グリセリン、蛋白、界面活性剤などの溶液）は内壁に残る量が多く、正確に採量できない。1) 重量で測定する（Merk Indexなどで比重を調べて計算する）、2) 注射器を用いるなどの個別の手段を講じるべきである。

3.4. ピペットマン

3.4.1. 基本操作

- (1) チップを確実に取り付け、チップの先を必要最小限溶液につける。
- (2) ピペットマンを垂直に持ち、ゆっくり溶液を吸上げる。
- (3) ゆっくり溶液を押出す。チップの内壁の溶液がチップの先まで下りるのを待ってから最後まで押込む。
- (4) チップの内側は溶液が残っていないことを確認する。
→ 少なくなる

3.4.2. 注意点

(1) 揮発性の強酸溶液を吸ってはならない

塩酸、トリフルオロ酢酸などは蒸気がピペットマン内部のステンレス製のピストンを腐食させる。これらを使用した場合、使用不能になる場合があるので直ちに3.4.4の要領で分解洗浄する。

(2) チップの先に残った溶液に注意する

溶液を吸引する場合にはピストンを一度押込むが、この時にチップの先から空気が押し出される。一度使用したチップの先には溶液が残っている場合が多く、これに気付かずにピストンを押し込めば、**チップの先に残った溶液は細かな飛沫となって飛び散る**。危険な溶液（発癌物質、劇毒物、微生物、強酸、強アルカリなど）を扱う場合、特に注意が必要である。これを避けるためには、

- 1) チップの先に溶液を残さないように十分時間をかけてゆっくり排出する。
- 2) チップを再使用しないようにする。
- 3) ピストンを押し込む際にチップの先を容器の中に入れておく。

と言った十分な配慮が必要である

(3) ゆっくり操作する

急に吸い込めば、本体にまで溶液を吸い込んでしまうし（直ちに3.4.4の要領で分解洗浄する）、正確な量を吸引できない。また、急に押し出せばチップの内壁に溶液が残留し、やはり正しく計量できない。

(4) 目盛の限界を越えて設定してはならない

例えば、P-20で25 μL に設定したりしてはならない。狂う。故障の原因になる。

3.4.3. 誤差

十分なメンテナンスを行い、新しいチップを用いて正しい手順で操作すれば再現性はあるが、絶対量に関しては2~3%狂っていることも希ではない。絶対誤差が問題になる実験に使用する場合、純水（比重は1）を天秤で秤量してキャリブレーションしてから使用すべきである。また、以下の溶液は正確に計量できないと考えるべきである。

- 1) 高粘度溶液（高濃度のグリセリン、糖、界面活性剤、高濃度タンパク質溶液など）
- 2) 高温の溶液（室温まで冷却してから計量すべきである）
- 3) 揮発性溶媒（クロロホルム、アセトンなど）

3.4.4. メンテナンス

試料溶液を本体に吸い込んでしまった場合、及び腐食性の酸を扱った場合は分解洗浄をしなくてはならない。怠ればステンレス製のピストンが腐食し、簡単に修理で

きなくなる。培地成分や培養液を吸込んだ場合は内部で雑菌が繁殖し、微生物やヌクレアーゼのコンタミのもとになる。分解洗浄の手順は以下の通り、

- 1) リムーバーを外す。
- 2) ノーズを取り外し、洗浄する（最後は純水でリンスする）。
- 3) ピストンにはめ込まれたO-リングとテフロン製のシールを取り外す。
- 4) 純水かエタノールなどをしみ込ませたキムワイブなどでピストン部分を十分に拭く。汚れがひどい場合、柔らかいスポンジに洗剤をつけてこする。また、サビは0.1~1 M程度の dithiothreitol（古いものでも良い）溶液で拭くとよく落ちる。
- 5) ピストン、ノーズを十分に乾燥させた後、元通り組み立てる。
- 6) 天秤で水を秤量し、再現性と溶液の漏れ（チップから溶液がしたたり落ちないか）を確認する。もし再現性にとぼしかったり、漏れがあれば、再度分解し、O-リングとテフロン製のシールを新しいものに交換する。O-リングとテフロン製のシールは常備しておくことが望ましい。



図7. ピペットマンの校正

3.4.4. ピペットマンによる容量の測定

ピペットマンの目盛りを予想される容量よりやや少ない目に合わせて計量したい溶液を吸う (A)。チップを溶液につけたままツマミを回すことによって溶液を全部吸い取る (B)。一度溶液を戻し (C)、再度吸い取った時、丁度溶液を全部吸い取った状態になるかを確認し、必要なら目盛りを再調整する。その時の目盛りがその溶液の容量 (D)。ただし、キャリブレーションしたピペットマンを正しく使うこと。

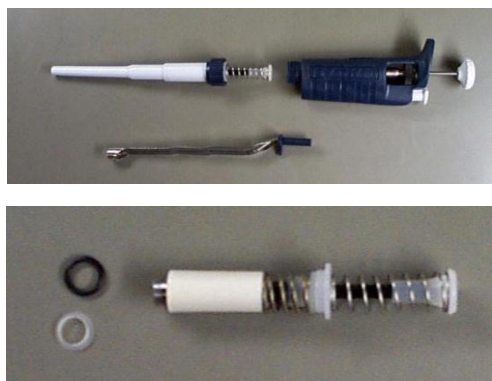


図8. ピペットマンの分解と手入れ

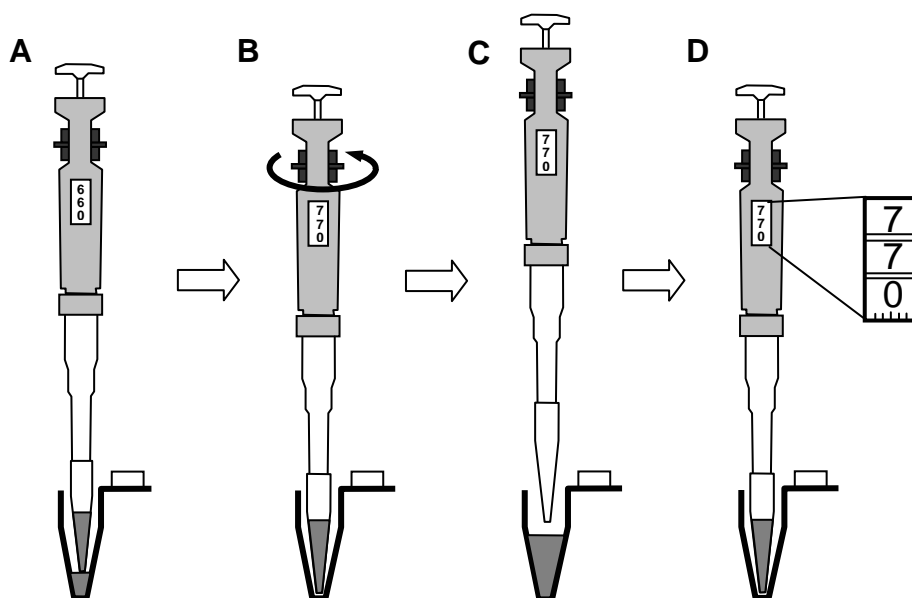


図9. ピペットマンによる容量の測定

3.5. スターラー

3.5.1. マグネットバーの入れ方

マグネットバーをガラス容器に入れる場合、容器を斜めにして滑らせるように入れること。既に溶液が入っていて斜めにできない場合などは、マグネットバーを容器側面に当てた磁石にくっつけ、ゆっくり容器の底に導くようにする。スターラーの上に乗せた状態で上からマグネットバーを落としたりしてはならない(2.2.1.-(7)参照)。

なお、マグネットバーには金属(磁石)が入っているので、マグネットバーを入れたまま電子レンジで加熱してはならない。

3.5.2. 加熱装置付きスターラー

(ホットプレートスターラー)

加熱中にその場を離れてはならない。忘れて試料が焦

げ付いたり、他の者が触れて火傷をする場合がある。また、ガラス容器のみを使用し、プラスチック容器を用いてはならない。

3.6. ボルテックスミキサー

3.6.1. 使用時の注意

(1) 溶液は手で支えた位置まで上がってくる

ボルテックスミキサーは回転運動をするので、ある程度の液量があれば支点(手で持った位置)まで液が上がってくる。逆に言えば、試験管の口を持てば溶液はこぼれる。

(2) 1/3以上溶液が入った試験管を混合するべきではない
特にその溶液が危険な試薬を含んでいる場合、こぼ

して事故のもとになる。このような場合は、1/3以下の容量で混合できるように実験系を考え直すか、パラフィルムで口を覆って、逆さにして混ぜるなどの工夫をするべきである。

3.6.2. 完全に混合するには

- (1) 2～3回まわしただけでは完全混合はできない

溶液は層流となって回るので(溶液の上層は上層で、下層は下層でまわるので)、回転-停止のサイクルを少なくとも数回以上繰り返して乱流を作らなければ完全に混合することはできない。

- (2) 溶液の量は1/3以下にするべきである

1/3以上溶液が入っている場合、よほど丁寧に混ぜない限り完全混合はできない。パラフィルムを巻いて数回逆さにして混ぜる方が早くて確実である。

3.7. クリーンベンチ

3.7.1. 安全上の注意

- (1) ガスバーナーを消す

作業終了時はもちろん、クリーンベンチを離れる場合、例えば短時間であってもガスバーナーを消すこと。なお、ガスバーナーはクリーンベンチの壁面から十分に離して置くこと。壁面が熱くなるような位置に置いてはならない。

- (2) 殺菌用エタノールの使用には十分注意する

コンラージ棒にエタノールを付けて燃やし殺菌する場合があるが、溶媒と火を同時に使う危険を十分に認識し、以下のように十分に注意しなければならない。

- 1) 不必要に多量のエタノールをクリーンベンチ内に持ち込まない
- 2) **エタノールはフタ付きの金属容器に入れ、作業中はフタを手元に置いておく。**万一火が入った場合、あわてずフタをして消す。
- 3) エタノールは、引っかけても容易に倒れない安定した容器に入れる(例えば大きなガラスシャーレに容器を接着し、底面を大きくする)。
- 4) ガスバーナーとエタノールはできるだけ離す。特に、エタノールをガスバーナーの風上に置いてはならない。

3.7.2. 無菌操作のポイント

- (1) 手を洗う

微生物が増殖するのに必要な3要素は、水と栄養分と温度であり、人間の皮膚や唾液にはこの3つ全てが備わっている。手のひらには $10^4 \sim 10^6/\text{cm}^2$ の雑菌がいるとき

れている。また、爪アカは雑菌のかたまりであり、 $10^7 \sim 10^8$ の雑菌いても不思議ではない。即ち、実験室内で最も汚い物は人間である。

ある条件で N_0 個の菌を t 分間加熱殺菌した時の残存生菌数 N は、 $N=N_0e^{-kt}$ で与えられ (k は死滅速度定数)、薬剤による殺菌の場合にも、ほぼこの式が当てはまる。式から分かるように、残存性菌数を限りなくゼロに近づけるには、 kt を大きくする(より厳しい条件で長い時間殺菌する)方法の他に、 N_0 を少なくする方法がある。バクテリアの栄養細胞は70%エタノールで滅菌できる場合が多いが、カビやバクテリアの胞子は滅菌できない(この場合、 k はほぼゼロ)。これに対して、石鹸で手を洗えば N_0 を3～4桁下げることができる。なお、爪アカは雑菌のかたまりであり、 $10^7 \sim 10^8$ の雑菌がいても不思議ではない。雑菌のかたまりを全て薬剤で殺菌するのは非常に難しい(消毒用エタノールや逆性石けんを過信してはならない)。外科医が手術前に行うように手指を丁寧にブラッシングするのが最も効果的な方法である。

コンタミさせない最も効果的で、かつ、最も簡単な方法は、作業前に手を石鹸で洗うことである。

- (2) 窓を閉める。

クリーンベンチ内に風が入れば当然無菌に保つことはできない。エアコンの風がクリーンベンチに直接当たった場合も同様である。

- (3) 無菌に保ちたい物の上に手(たとえ手を洗っても手はクリーンベンチの中で最も汚い)をかざさないよう、配置、作業手順を良く考える。

- 1) 無菌に保ちたい物を奥に、無菌ではないものは手前に配置する。
- 2) 原則として右手で扱うものは右側に、左手で扱うものは左側に置く。
- 3) ビンのフタを開けるなどの両手が必要な作業は、物を持つ前に済ませておく。

- (4) シャベらない。

唾液は雑菌の巣である。手術をする医師がマスクをかける意味を考えると良い。

- (5) クリーンベンチ内を清潔に保つ

培地等をこぼした場合、速やかに丁寧に拭き取らなければならない。腐敗して雑菌の巣になる。

- (6) 不必要なものを放置してはならない。

クリーンベンチ内に未使用のシャーレ、培地、ピペットマンやミキサーなどの器具などを放置してはならない。以下のような問題が生じる。

- 1) 作業スペースが狭くなる。
- 2) 紫外線ランプの影になる部分が増え、その部分は滅菌できない。
- 3) 紫外線で器具、特にプラスチック部分が劣化しロボロになる。

3.7.3 ピペット、ピペットマンを使用する場合

(1) ピペットマン

ピペットマン内部は無菌ではない。ピペットマン本体内部に溶液(特に培地や培養液)を吸い込んだ場合、直ちに洗浄しないと雑菌が繁殖し、コンタミの原因となる。ピペットマンはオートクレーブできないので、フィルター付きのチップを使用するか、オートクレーブ可能なベンチメイトを使用する。なお、ピペットマンの外側も無菌ではない。逆性せっけん(塩化ベンザルコニウム溶液)などで拭いてから使用するべきである。

(2) ピペット

ピペットを口で吸うとコンタミのリスクが増す。ピペッターの内部も無菌ではない。フィルター付きのディスプレイザブルピペットか、綿を詰めたメスピペットを使うか、フィルターを内蔵した電動ピペッターを用いるなどの対策が必要。

- (7) センサー上部のゴムキャップを閉じる。開けたままだと内部液の水分が蒸発し内部液の塩化カリウムが析出する。塩が析出すると内部液の交換ができなくなり、以後正確な pH の測定ができなくなる。
- (8) センサーを純水で洗浄し、純水につける。最近のセンサーは塩化カリウム溶液ではなく、純水に浸けて保存するよう推奨されているものもある。最適な保存液は個々にセンサーの取扱説明書で確認すること。なお、複合型 pH 電極は、その構造上、微量の内部液 (KCl) が pH を測定する溶液に混入することを理解しておかなければならない。カリウムや塩素が混入すると不都合な実験の場合、溶液を 2 等分し、一方の pH 調整に要した酸(またはアルカリ)と等量の酸(またはアルカリ)を他方に加えて調整すると良い。

3.8. pH メーター

3.8.1. 測定手順

- (1) 電源を入れ、センサー上部のゴムキャップをはずす。
- (2) 比較電極内部液の液面が液絡部より十分上の位置にあることを確認し、不足していれば内部液を補充する。
- (3) キャリブレーションを行う。
- (4) センサーを純水で洗浄し、必要ならキムワイブ等で拭く。
- (5) 溶液をスターラーで攪拌し、マグネットバーの回転が定常になるまで待つ。pH は溶液を攪拌しながら測定しなければ正しく測定できない。
- (6) 液絡部(センサー先端部の横にある穴)が浸かるまでセンサーを溶液に浸ける。この穴の位置まで溶液にセンサーが浸かっていなければ正確な pH を測定できない。また、回転するマグネットバーにセンサーが触れて破損しないように注意すること。溶液量が少ない場合は、より細い容器に入れ替えるなどしてマグネットバーとセンサーを近づけない工夫をしなければならない。
- (7) 表示を読む。通常の測定操作では 3 桁目の表示は信用できない。有効数字が 3 桁必要な実験の場合、清浄に管理されたセンサーを用い(天然培地などの不純な溶液の測定によって汚れた pH センサーでは不可)、温度、イオン強度、空気中の炭酸ガスやアンモニアの吸収などに細心の注意を払う必要がある(詳細は pH の理論と測定、益子安著、東京化学同人(1967)などの成書を参照のこと)。

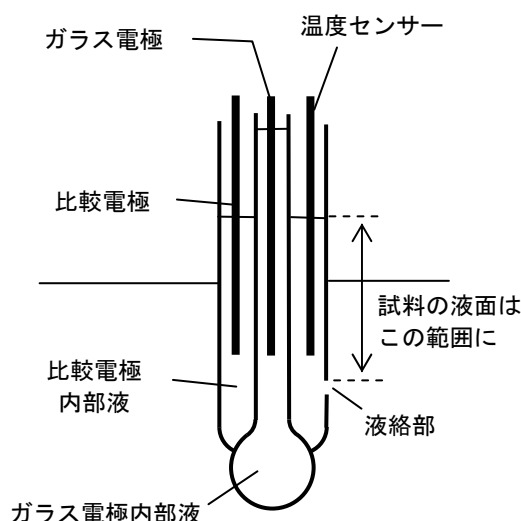


図 10. pH 電極の構造

3.8.2. キャリブレーション

- (1) 標準緩衝液にはいかなる溶液も混入させない
センサーは必ず純水で洗浄し、キムワイブ等で水分を拭取ってから標準緩衝液につける。
- (2) 標準緩衝液の選び方
通常は pH 7 の標準緩衝液でゼロ点調整を、pH 4 の標準緩衝液で感度調整を行う。pH 9 (pH 10) の標準緩衝液もあるが、空気中の炭酸ガスを吸ってすぐに pH が狂うので、必ず新鮮な標準緩衝液を用いること。
- (3) 温度に関する注意
手動で(自分でつまみを回して)キャリブレーションを行なうタイプの pH メーターの場合、標準緩衝液自体も温度によって pH が変動することに注意しなければならない。即ち、標準緩衝液のその時の温度における pH に合わせなければならない。例えば、リン酸の標準緩衝液の場合、25°C なら 6.86 に合わせるが、15°C

であれば 6.92 に合わせなければならない。また、厳密に pH を調整する必要がある場合、清浄に管理されたセンサーと新鮮な標準緩衝液を用い、使用する温度においてキャリブレーションを行わなくてはならない (3.8.3.参照)。

3.8.3. 温度と希釈

溶液の pH は温度によって変化し、希釈によっても変化する。具体的には例えばトリス緩衝液の場合 0℃で pH 8.85 の溶液は 25℃では 8.08 に低下する。各種の緩衝液の pH が温度によってどの程度変化するかは蛋白質・酵素の基礎実験法 (改訂第 2 版、堀尾武一編、南江堂) の第 12 章を参照のこと。また、イオン強度が 0.2 を超えると液間電位差の影響が次第に顕著になり、正確な pH 調整はできなくなる (詳細は pH の理論と測定、益子安著、東京化学同人 (1967) などの成書を参照のこと)。温度や液間電位差の影響は実験の目的によっては誤差の範囲を遙かに越える。例えば、pH を 8.0 に調整したつむりの 1 M Tris-HCl を 100 倍希釈して 10 mM 溶液を調製すると、場合によっては 0.5 以上 pH がずれることもある。緩衝液の pH は使用する温度と濃度で調整するべきである。

10 倍濃度の緩衝液を 1 L 作成する手順を以下に示す。

- (1) 10 L 分の試薬を溶解し、メスシリンダーで全量を 900 mL とする。
- (2) メスシリンダーを用いてこのうち 90 mL を取り、ビーカーに移して全量を 800~900 mL とする。
- (3) 使用する温度に暖める (冷却する)。
- (4) 適当な濃度の酸 (アルカリ) を適当な容器に取り、容器ごと重量を測定する (W1)。
- (5) (3) の pH を (4) の酸 (アルカリ) で所定の値に調整する (1 L にメスアップしてそのまま使用できる)。
- (6) 残った酸またはアルカリの重量を容器ごと測定する (W2)。
- (7) W1-W2 の 9 倍量の酸 (アルカリ) を (1) の残り (810 mL) に加え、900 mL にメスアップする。

3.9. 分光光度計

3.9.1. 濁度を測定する場合の注意

- (1) 濁度は分光光度計の機種によって異なる

濁度は、細胞などの粒子によって検出器に届く光が減少することを利用して測定する。このとき、粒子で散乱した光も一部検出器に届く。検出器に届く散乱光の量は、検出器側のスリットの幅が広いほど、セルと検出器の距離が短いほど多くなり、結果として濁度は低くなる。従って、分光光度計のメーカー、型番が異

なれば、同じ濁度の試料を測定しても値は異なる。特に酵母などの大型の細胞の場合、機種によっては 3 倍以上値が異なる場合がある。

- (2) 細胞濃度と濁度が比例する範囲

細胞濃度と濁度が比例する範囲は、測定に用いる分光光度計によって、分光光度計のメンテナンスの状態、対象とする細胞によって異なる。測定に用いるそれぞれの分光光度計について確認すること。

- (3) 濁度に影響する他の因子

- 1) 培地 例えば最少培地と合成培地では、細胞表層の光学的状態が異なり、同じ細胞濃度でも濁度が異なる。
- 2) 浸透圧 培地や希釈水の浸透圧が異なれば、細胞が膨張あるいは収縮して濁度は変化する。細胞試料の希釈には、培地そのものか、培地と同じ浸透圧の食塩水等を用いるべきである。
- 3) 菌株 菌株が異なる場合 (例えば同じ *E. coli* であっても)、同じ細胞濃度でも濁度は異なる。
- 4) 培養フェイズ 対数増殖期、定常期、減衰期それぞれで細胞の状態は異なるので、同じ細胞濃度でも濁度は異なる。

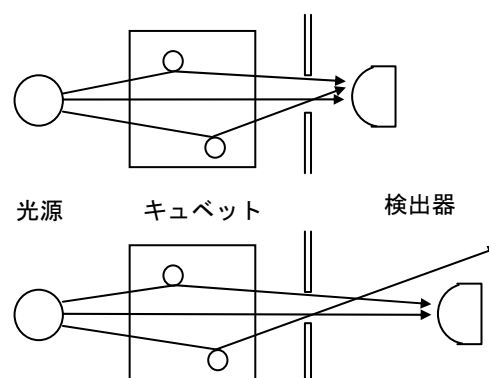


図 11. 濁度測定における検出器の位置の影響

検出器が近ければ (スリット幅が大きければ) より多くの散乱光を拾う。

3.9.2. キュベット (セル)

石英、ガラス、プラスチックのものがある。石英は紫外部でも使用できるが非常に高価である。用途に応じて使い分けることが望ましい。

表 3. キュベットの材質と特徴

材質	価格	耐久性	紫外部での使用	熱伝導	光学的精度
石英	高	×	○	○	○
ガラス	中	×	×	○	○
プラスチック	低	○	△*or×	×	△*or×

* 使用可能なものもある。

3.10. 電気泳動

蛋白質や核酸は溶媒に分散させるとコロイド粒子となり、pH、イオン強度、温度が一定の条件ではある荷電 Q を持つ。このコロイド溶液に電場 E をかけるとコロイドは $Q\cdot E$ なる力で荷電と反対符号の電極に向かって移動する。この時、粒子に対する溶媒もしくは支持体との摩擦抵抗を f 、粒子の移動速度を v とすれば、 $Q\cdot E=fv$ の関係がある。電気泳動における試料の移動速度は電圧によって決まり、電流の大きさは直接関係しない。

3.10.1. 定電圧、定電流、定電力の意味

電圧(V)=抵抗(Ω)×電流(A)、電力(W)=電圧(V)×電流(A)である。

(1) 定電圧

常に一定の電圧をかける。回路の抵抗が小さければ(緩衝液のイオン濃度が高ければ)大きな電流が流れる。

(2) 定電流

常に一定の電流を流す。回路の抵抗が大きければ高い電圧がかかる。もし回路が断線していればとんでもない高電圧がかかり(例えば1M Ω の回路に1mAの定電流を流そうとすれば電圧は1000Vにもなる)、放電、感電等の事故を起こす。安全装置が付いていない電源装置も少なくないので十分な注意が必要である。

(3) 定電力

常に一定の電力を消費するように電圧または電流を制御する。シークエンスゲルのように、通電による発熱を一定にしてゲルの温度を一定に保ちたい場合などに使用する。回路の抵抗が大きければ、電流は少なく、電圧は高くなる。安全装置がついている電源装置が多いが、(2)同様に回路の断線には十分な注意が必要である。

3.10.2. 通電手順

(1) 電源スイッチを入れる前に、電源装置の電圧(電流)調整つまみが最小にセットされていることを確認する。

(2) 回路が正しく接続されているかを確認する。定電流で流す場合、電源—電極—緩衝液—ゲル—緩衝液—電極—電源がつながっているかを確認する。具体的には、

- 1) 緩衝液を入れ忘れていないか。
- 2) 緩衝液が漏れてゲルや電極が露出してないか。
- 3) ゲル作成時に使用したシールチューブを取り忘れていないか。
- 4) ゲルの下端に泡が入っていないか。

(3) 電源を入れる。

(4) 電圧計と電流計を見ながら、徐々につまみを回して電圧を上げる。

(5) 正常な通電時の電流、電圧と異なる場合は直ちにつまみを最小にして電源を切り、3.10.3.を参考に点検を行う(正常な電流値、電圧値を知らない者は必ず経験者に立ち会ってもらおうこと)。

3.10.3. 通電時の異常とその原因

定電流で流すのは危険である。電圧のリミッター機能を持たない電源装置を使う場合、定電流ではなく、定電圧で泳動すること。

(1) 定電流で泳動した時、電圧が正常時よりも

1) 大きい場合

極端に大きい場合、回路がどこかで切れていると考えられるので、再度3.10.2.(3)の点検を行う。ケーブル、電極の白金線の断線についてもチェックする。また、ゲル作成に用いた緩衝液、泳動に用いる緩衝液の濃度を間違えている(所定濃度よりも薄い)可能性もある。

2) 小さい場合

回路がどこかでショートしている可能性がある。また、ゲル作成に用いた緩衝液、泳動に寝用いる緩衝液の濃度を間違えている(所定濃度よりも濃い)可能性もある。

(2) 定電圧で泳動した時、電流が正常時よりも

1) 大きい場合

回路がどこかでショートしている可能性がある。ゲル作成に用いた緩衝液、泳動に寝用いる緩衝液の濃度を間違えている(所定濃度よりも濃い)可能性もある。

2) 小さい

極端に小さい場合、回路がどこかで切れていると考えられるので再度3.10.2.(3)の点検を行う。ケーブル、電極の白金線の断線についてもチェックする。ゲル作成に用いた緩衝液、泳動に用いる緩衝液の濃度を間違えている(所定濃度よりも薄い)可能性もある。

3.10.2. 核酸のアガロースゲル電気泳動

(1) ゲルの作成

- 1) 所定の緩衝液にアガロースを加え、完全に溶解する。オートクレーブを用いるのが望ましい。電子レンジで加熱して溶解することができるが(突沸による火傷に十分に注意すること)、完全に溶解させないと良い泳動パターンは得られない。なお、過剰に加熱して水分の蒸発量が多ければ、ゲル濃度が上がると同時に、緩衝液の濃度も上がることに注意せよ(3.10.2.(2)-1参照)。

- 2) 50~60℃まで冷やしてからゲルメーカーに注ぐ。熱すぎるとゲルメーカーを変形させ(変形すれば均一な厚さのゲルを作れなくなる)、冷めすぎるとゲルの網目構造が一定ではなくなり、泳動パターンが乱れる。
- 3) 水平な場所で固化させる(ゲルの厚みが均一でなければ均一に泳動できない)。固化が完全でない場合、泳動パターンは乱れ、多くの場合ディフューズしたバンドになる。ラップで覆って冷蔵庫に20~30分入れて完全に固化させると良い。なお、ラップで覆わずに放置すれば、ゲル表面のゲル濃度が上がり、ディフューズしたバンドになる(図12A)。

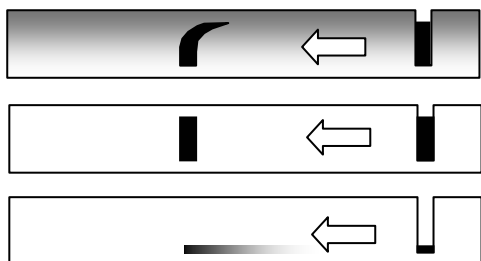


図12. アガロースゲル電気泳動のバンドが乱れる原因。

- A ゲル表面が乾燥した場合
- B 正常な泳動
- C 少ない容量でアブライした場合

(2) 緩衝液及びサンプルのアブライに関する注意

- 1) ゲルの溶解に使用した緩衝液と、泳動に使用する緩衝液の濃度が異なれば、ゲルの表面に近い部分と遠い部分で移動度が異なり、結果としてディフューズしたバンドになる。
- 2) 泳動時に温度が上昇すれば(40℃以上は危険)ゲルの網目構造が乱れ、ディフューズしたバンドになる。1×TAE 緩衝液を用いると発熱が大きいので、これを倍に希釈した 1/2×TAE 緩衝液を用いるべきである。通常の核酸のアガロースゲル電気泳動は定電圧で行うので、緩衝液を倍に希釈すれば電流は半分になり、発熱は半分になる(この場合、ゲルも半分に希釈した緩衝液で作成すること)。
- 3) DNA 量が同じでも液量が少なければ(濃ければ)局所的にオーバーチャージとなりテーリングする(図12C)。
- 4) サンプルのイオン強度が異なれば移動度は異なる。これは Mupid などを用いて短時間で泳動する場合特に顕著である。例えば、H buffer 及び L buffer を用いて制限酵素処理した DNA の移動度を厳密に比較したい場合、それぞれに 1/9 量の水及び 1 M NaCl を加え、試料のイオン強度をそろえてから泳動するべきである。

3.10.2. ポリアクリルアミドゲルの作成

(1) ゲルの作成に失敗する主な原因

- 1) 過硫酸アンモニウムに問題がある。
2.8.4.(4)に示す方法で調製保管すればほとんどの場合問題はない。
- 2) 脱気が不十分。
溶存する酸素はゲル重合を阻害するので、ゲル溶液は十分に脱気しなければならない(3.10.2.(2)参照)。
- 3) ゲル溶液の温度が低い。
重合は化学反応であるからゲル溶液の温度が低ければ反応は遅い(一般に10℃温度が下がれば反応速度は半分に低下する)。また、温度が低ければ気体の溶解度が高くなるので脱気が不十分になる。
- 4) ゲルの重合が早すぎる。
ゲルの重合が早すぎる場合、十分に脱気した後(先に冷やすと脱気にしにくくなるので注意)、過硫酸アンモニウムを入れる前に溶液を氷で冷やして重合速度を調整するのが簡便である。過硫酸アンモニウムの量を減らしても良い。

(2) ゲル溶液の簡便な脱気方法

- 1) SDS、TEMED、過硫酸アンモニウム溶液以外の溶液を、減圧に耐える適当な大きさの容器に取り、室温(20~30℃)まで暖める。減圧脱気は、ヘッドスペースが小さいほど効率が良い。ピーカーをデンキーターに入れて脱気するよりも、減圧に耐える小さな容器に入れた方が効率が良い。ただし、小さすぎると突沸した時に対応できないので注意すること。
- 2) 超音波洗浄機に容器を浸けるか、小さいマグネットバーを入れて攪拌しながら、減圧脱気する。
- 3) SDS、TEMED、過硫酸アンモニウム溶液をこの順に入れ、容器にフタをして(パラフィルムをかけ)穏やかに数回逆さにして混合し、ゲルプレートに注ぐ。

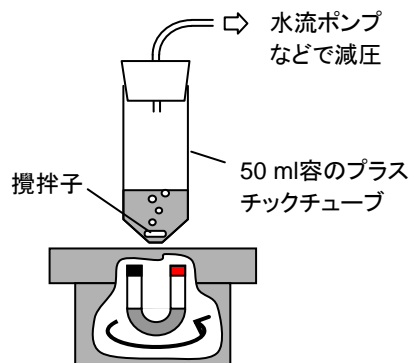


図13 アクリルアミド溶液の脱気

3.10.2. 蛋白質のポリアクリルアミドゲル電気泳動

Tris-Glycine 系の電気泳動においては、分離ゲル、濃縮ゲル、泳動緩衝液の組成の差を巧みに利用して蛋白質バンドの濃縮を行っている（蛋白質・酵素の基礎実験法改訂第2版、堀尾武一編、南江堂の第6章参照）。従って、サンプルの緩衝液組成は濃縮ゲルとそれと同じであるのが理想である。濃縮ゲルの緩衝液は 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 であるから、試料の pH がこれと大きく異なったり、高濃度の塩や核酸を含んでいれば、蛋白質バンドは濃縮ゲル中でうまく濃縮できない。きれいな泳動パターンを得たい場合、以下の操作が必要である。

(1) 試料の pH が異なる場合

pH 試験紙を用い、0.1 M HCl または NaOH で試料の pH を 6.7~6.9 に調整する。

(2) 試料のイオン強度が高い場合

- 1) 水で希釈して泳動し、より感度の高い染色法を用いて染色する（例えば銀染色は CBB 染色よりも 1 桁以上感度が高い）。
- 2) 限外濾過、透析などによって脱塩する（pH 調整も同時に行える）。分子量 10 k 以下の低分子蛋白質を扱う場合を除いて、適当な排除限界を持つ市販の限外濾過カートリッジを用いて脱塩するのが最も簡便である。

4. 参考

1. <http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/sfbj/wakate/>

生物学若手研究者の集いホームページ。「バイオテクノロジーフォーラム」から「第4回電子討論会」に入れば、「研究における事故例」を見ることができる。

2. http://biochem2.umin.jp/contents/manualindex_j.html

東京大学医学部生化学教室(細胞情報研究部門)のラボマニュアルで、様々なプロトコール、安全な取扱い方法を見ることができる。

3. <http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/>

国立環境研究所と神奈川県環境センターが共同で公開している化合物データベース。化合物名、化学式、CAS No. での検索が可能で、物理化学的特性、毒性、発ガン性、法規制、事故例などを見ることができる。

4. <http://www.yk.rim.or.jp/~aisoai/molbio-j.html>

分子生物学研究ツールのリンク集

5. <http://www.biwa.ne.jp/~fumika/law.htm>

法律、規制、ガイドラインのリンク集

6. タンパク質精製法—理論と実際(第2版、ロバート K スコープス著、シュプリンガーフェアラーク東京) 蛋白質試料の取扱い、精製、保存に関する実践的な指導書。

7. 片倉啓雄, "バイオ実験のツボ", 化学, Vol. 55., No.7 (2000)~Vol. 56, No.10 (2001).

8. 片倉啓雄・山本仁, 「バイオ系実験安全オリエンテーション」, 東京化学同人 (2009).