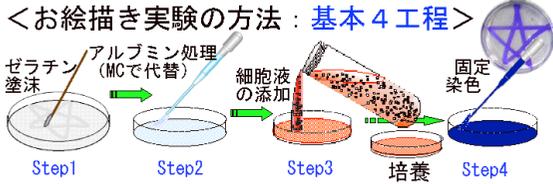


### ＜お絵描き実験の方法：基本4工程＞

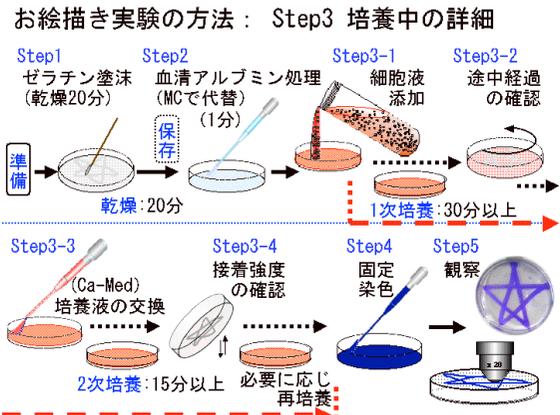


- ゼラチンでシャーレに「絵文字」を描く（乾燥後は透明/保存可能）。
- 血清アルブミンでシャーレ底面を濡らす（1分程度：メチルセルロースで代替可能）。
- 細胞液を加え、培養する（最低45分）。
- 「絵文字」が現れる。固定/染色する。

細胞実験キットを使えば、迅速簡便な「お絵描き実験」

#1：

### お絵描き実験の方法：Step3 培養中の詳細



- Step1 ゼラチン塗抹（乾燥20分）
- Step2 血清アルブミン処理（MCで代替）（1分）
- Step3-1 細胞液添加 1次培養：30分以上
- Step3-2 途中経過の確認
- Step3-3 (Ca-Med) 培養液の交換 2次培養：15分以上
- Step3-4 接着強度の確認 必要に応じ再培養
- Step4 固定染色
- Step5 観察

#2：

### 細胞実験キットの構成品：お絵描き実験用



細胞のフィルムバッグ (FHLS細胞) 培養シャーレ (☆印と無印)

栄研3号 スポイト

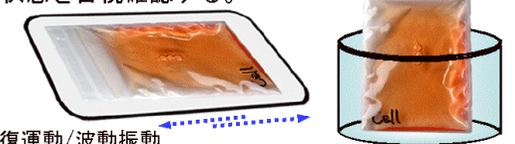
- ①ゼラチン (Gel)
- ②メチルセルロース (MC)
- ③培養液 (Ca-Med)
- ④固定液 (G-Fix)
- ⑤クリスタル紫 (CV)

綿棒

#3：

### ＜Step0. フィルムバッグ細胞の確認＞

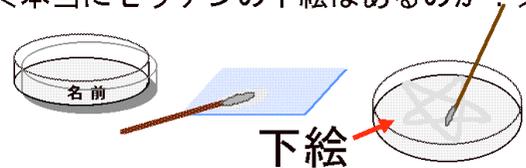
- 細胞塊の目視確認  
フィルムバッグを透視して底面に沈下している細胞塊を確認する。異物混入の有無を確認する。溶液の色合いを確認する（正常は赤橙色）。
- 細胞塊の分散  
トレーにバッグを静置し水平往復運動（溶液の波動振動）を充分に行う。細胞塊が分散する。状態を目視確認する。



往復運動/波動振動

#4：実験実技 Step 1

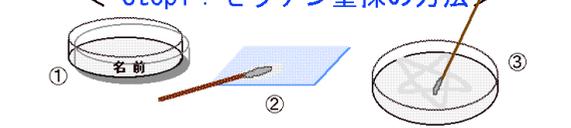
### ＜本当にゼラチンの下絵はあるのか？＞



- シャーレ側面の番号をメモして下さい。
- シャーレ底面を観察し、どんな「絵文字」が書いてあるか確認してください。
- 質問：どうすれば下絵の図柄を知ることができるか？

#5：

### ＜Step1：ゼラチン塗抹の方法＞

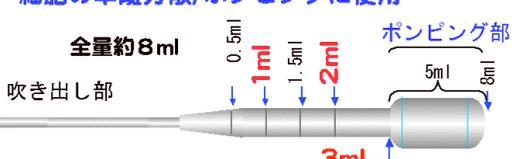


- シャーレの側面に油性ペンで名前/IDを書く①
- 湯煎溶解した高温のゼラチンに綿棒を浸し充分に浸透させる。
- 紙タオルの上に数秒間「横倒し」にして、側面の余液を軽く取り除く：②。
- シャーレ底面に強い筆圧で図柄を描く：③。
- 扇風機送風で完全に乾燥させる（20分放置）

#6：

### ＜スポイト/栄研3号：目盛りを確認＞

#### 細胞の単離分散/ポンピングに使用



全量約8ml

吹き出し部

ポンピング部

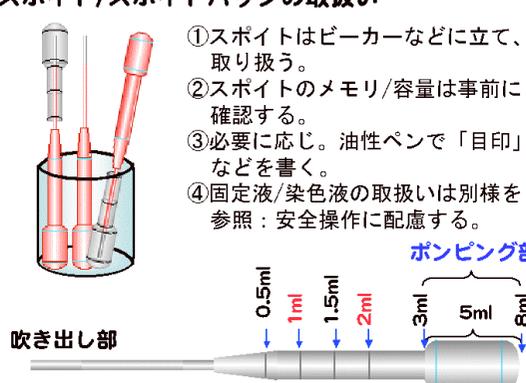
0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml, 3ml, 5ml, 6ml

### ＜注意補足＞

- 1) 1ml, 2ml の位置は油性ペンで「線」を書いておく。
- 2) 液の出し入れ時は、気泡を液中に吹き出さない。
- 3) ポンピングする時は、人差し指/中指と親指で広い面で行う。
- 4) 上図のスポイトは、簡易加工で多目的な用途に転用できる（関連図を参照）。

#7：

### スポイト/スポイトパックの取扱い



- ①スポイトはピーカーなどに立て、取り扱う。
- ②スポイトのメモリ/容量は事前に確認する。
- ③必要に応じ、油性ペンで「目印」などを書く。
- ④固定液/染色液の取扱いは別様を参照：安全操作に配慮する。

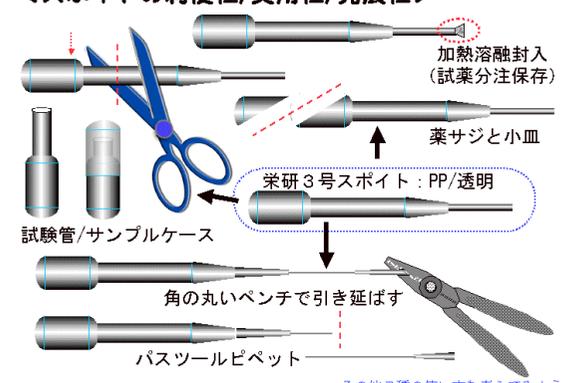
ポンピング部

吹き出し部

0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml, 3ml, 5ml, 6ml

#8：

### ＜スポイトの利便性/実用性/発展性＞



加熱溶融封入 (試薬分注保存)

葉サジと小皿

栄研3号スポイト：PP/透明

試験管/サンプルケース

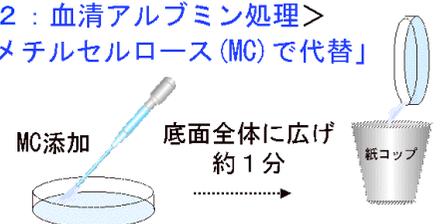
角の丸いペンチで引き延ばす

パスツールピペット

その他7種の使い方も考えてみよう

#9：

### <Step 2 : 血清アルブミン処理> 「メチルセルロース (MC) で代替」



MC添加 底面全体に広げ 約1分 紙コップ

- 1) スポイトパックの先端をハサミで切り取り開封。メチルセルロース (又はBSA) を約2ml 加え、底面全体に隙間なく広げる。
- 2) 1分ほど経過したら、シャーレを傾け捨てる。又はスポイトでMCを吸い取る。フタを被せる。

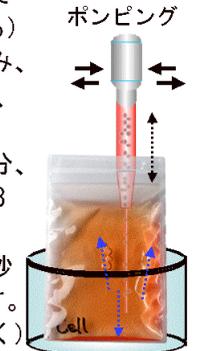
#10 :

### <Step3-1 (1) : 細胞塊の単離分散処理>

重要な操作 ポンピング

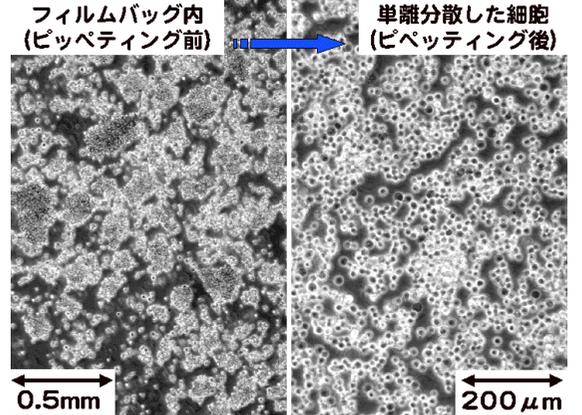
- 1) ジップシールの上をハサミで切り取り、開封 (容器に立てる)
- 2) スポイトを中程まで差し込み、2-3ml程度の細胞液を吸い込み、強く液を吹き出す。
- 2) このポンピング操作を液量分、繰り返す。つまり13mlの時は13回ポンピングを行なう。

補足 : 約2.5mlの吸引/排出を1秒1回くらいのペースで繰り返す。(スポイトはそのまま入れておく)



#11 :

フィルムバッグ内 (ピペティング前) → 単離分散した細胞 (ピペティング後)



0.5mm 200μm

#12 :

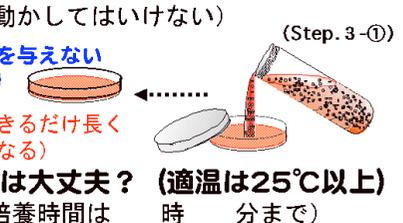
### <Step3-1 (2) : 細胞液の添加と「培養1」>

- 1) 均一化した細胞液を、スポイトを用いてシャーレに、6ml程度加える。(事前にスポイト目盛りの確認)。
- 2) 所定の場所にシャーレを移動し静置する
- 3) そのまま最低30分以上培養 (放置) する。(決して動かしてはいけない)

培養中は振動を与えない (動かさない)

培養時間はできるだけ長く (良い結果となる)

培養温度は大丈夫? (適温は25℃以上) (予定の培養時間は 時 分まで)



#13 :

### <Step3-2 : 途中経過の評価1>

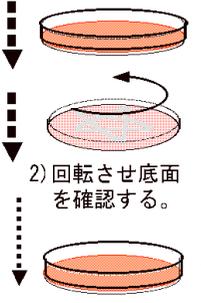
30分以上経過したシャーレ底面を覗く

#### <底面の状態確認+α>

- 1) 30分以上培養したシャーレの底面を覗く。何が見える?
- 2) シャーレを回転させ、細胞を浮遊させ、底の状態を再度観察する。
- 3) 所定の「形状」が見えたらOK。確認後はそのまま培養を継続しても良い。

2) 回転させ底面を確認する。

可能なら培養を継続する。できるだけ長く培養を継続する (と良い結果となる)。



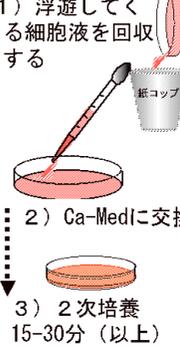
#14 :

### <Step3-3: Ca培養液へ置換と「培養2」>

- 1) 浮遊してくる細胞液を回収する
- 1) もう一度、シャーレを回転させ、細胞を浮遊させ、底面を再確認する。
- 2) 細胞液を紙コップ (新品) などに回収する。
- 3) Ca培養液 (Ca-Med) を約5ml 加える。但し、絵文字の部分にCa-Medを吹き付けけないこと。
- 4) Ca培養液を入れたら2次培養 : 15-30分程度 (以上) 培養する (培養時間は長いほうが良い結果となる)。

2) Ca-Medに交換

3) 2次培養 15-30分 (以上)



#15 :

### <Step3-4 : 途中経過の確認2>

#### タッピング処理

- 1) シャーレの底面状態を目視で確認/記録する。
- 2) 細胞液を紙カップ/又はシャーレの蓋の中に回収する。
- 3) シャーレの角をテーブルに1回打ちつける。
- 4) 図柄の様子を注意深く見る (細胞粒子が流れているはず)
- 5) 更に2回タッピングを繰り返す (どうなるか、確認する)。

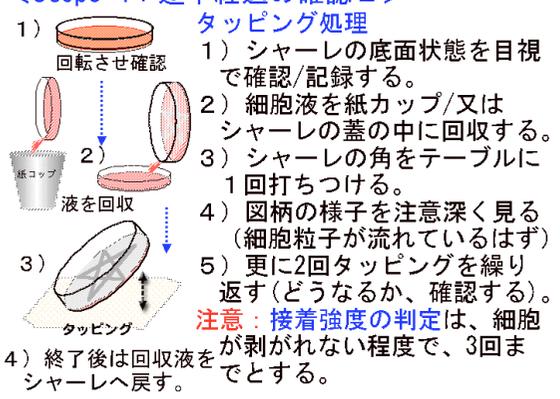
注意 : 接着強度の判定は、細胞が剥がれない程度で、3回までとする。

1) 回転させ確認

2) 液を回収

3) タッピング

4) 終了後は回収液をシャーレへ戻す。



#16 :

### <スポイトパック固定液/染色液の取り扱い: 重要>

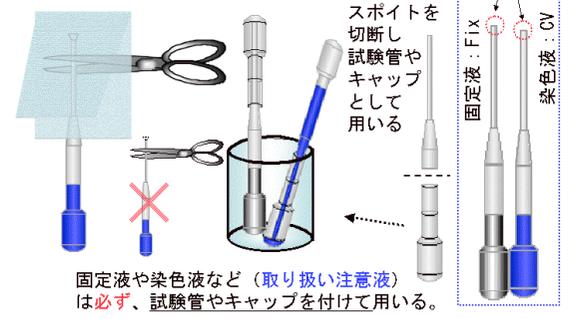
「固定液、染色液」はビニール袋や紙タオルなどでカバーし、必ず安全を確保した上で切り取る。

開放放置は危険/厳禁

固定液: FIX 染色液: CV

スポイトを切断し試験管やキャップとして用いる

固定液や染色液など (取り扱い注意液) は必ず、試験管やキャップを付けて用いる。



#17 :

### <Step 4 : 固定/染色の方法: 取扱い注意>

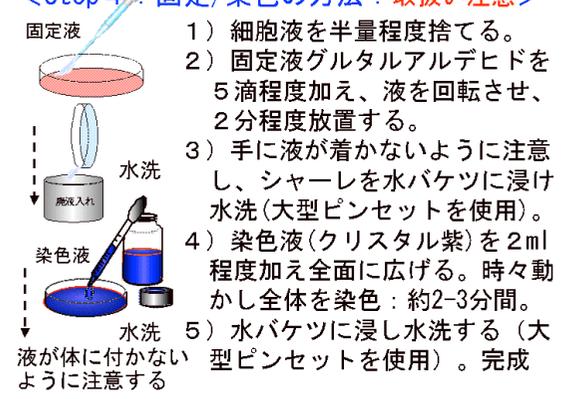
- 1) 細胞液を半量程度捨てる。
- 2) 固定液グルタルアルデヒドを5滴程度加え、液を回転させ、2分程度放置する。
- 3) 手に液が着かないように注意し、シャーレを水バケツに浸け水洗 (大型ピンセットを使用)。
- 4) 染色液 (クリスタル紫) を2ml程度加え全面に広げる。時々動かし全体を染色 : 約2-3分間。
- 5) 水バケツに浸し水洗する (大液が体に付かないように注意)

固定液

水洗

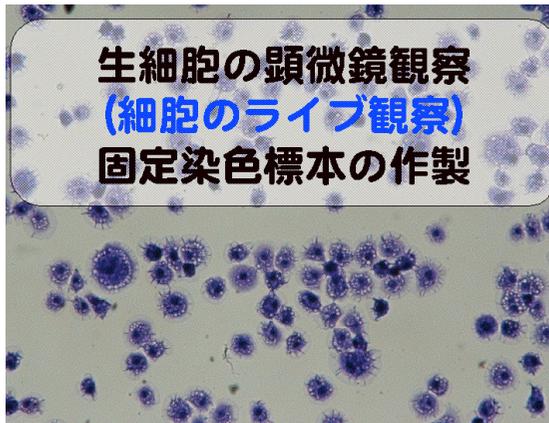
染色液

水洗



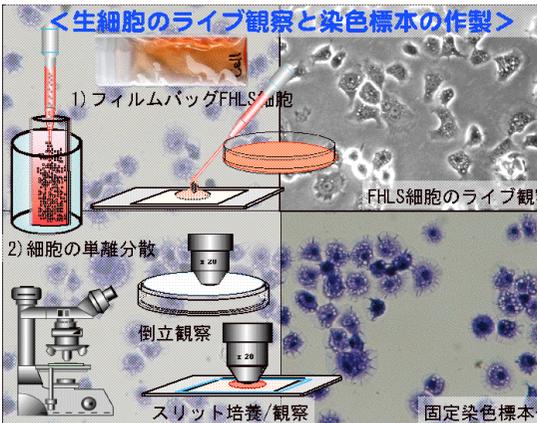
#18 :

## 生細胞の顕微鏡観察 (細胞のライブ観察) 固定染色標本の作製



#19 :

### <生細胞のライブ観察と染色標本の作製>



1) フィルムバッグFHLS細胞

FHLS細胞のライブ観察

2) 細胞の単離分散

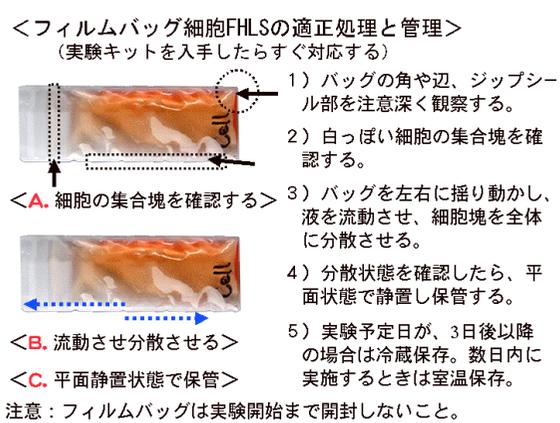
倒立観察

スリット培養/観察

固定染色標本像

#20 :

### <フィルムバッグ細胞FHLSの適正処理と管理> (実験キットを入手したらすぐ対応する)



1) バッグの角や辺、ジップシール部を注意深く観察する。

2) 白っぽい細胞の集合塊を確認する。

3) バッグを左右に揺り動かし、液を流動させ、細胞塊を全体に分散させる。

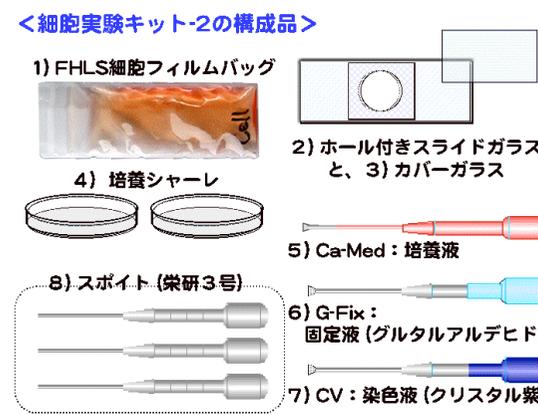
4) 分散状態を確認したら、平面状態で静置し保管する。

5) 実験予定日が、3日後以降の場合は冷蔵保存。数日以内に実施するときは室温保存。

注意：フィルムバッグは実験開始まで開封しないこと。

#21 :

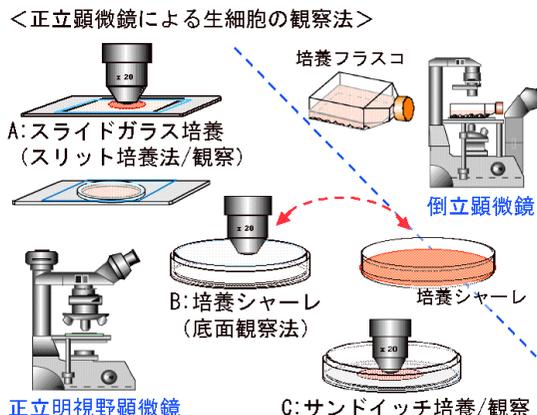
### <細胞実験キット-2の構成品>



- 1) FHLS細胞フィルムバッグ
- 2) ホール付きスライドガラスと、3) カバーガラス
- 4) 培養シャーレ
- 5) Ca-Med : 培養液
- 6) G-Fix : 固定液 (グルタルアルデヒド)
- 7) CV : 染色液 (クリスタル紫)
- 8) スポイト (栄研3号)

#22 :

### <正立顕微鏡による生細胞の観察法>



A: スライドガラス培養 (スリット培養法/観察)

倒立顕微鏡

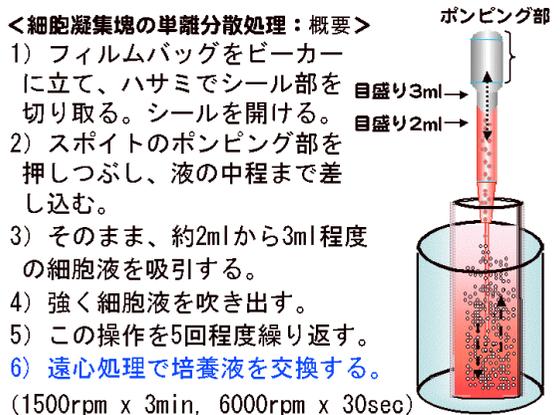
B: 培養シャーレ (底面観察法)

正立明視野顕微鏡

C: サンドイッチ培養/観察

#23 :

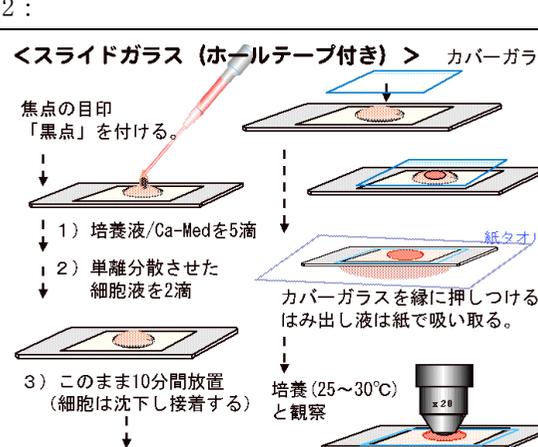
### <細胞凝集塊の単離分散処理：概要>



- 1) フィルムバッグをビーカーに立て、ハサミでシール部を切り取る。シールを開ける。
- 2) スポイトのポンピング部を押しつぶし、液の中程まで差し込む。
- 3) そのまま、約2mlから3ml程度の細胞液を吸引する。
- 4) 強く細胞液を吹き出す。
- 5) この操作を5回程度繰り返す。
- 6) 遠心処理で培養液を交換する。(1500rpm x 3min, 6000rpm x 30sec)

#24 :

### <スライドガラス (ホールテープ付き) >



カバーガラス

焦点の目印「黒点」を付ける。

- 1) 培養液/Ca-Medを5滴
- 2) 単離分散させた細胞液を2滴
- 3) このまま10分間放置 (細胞は沈下し接着する)

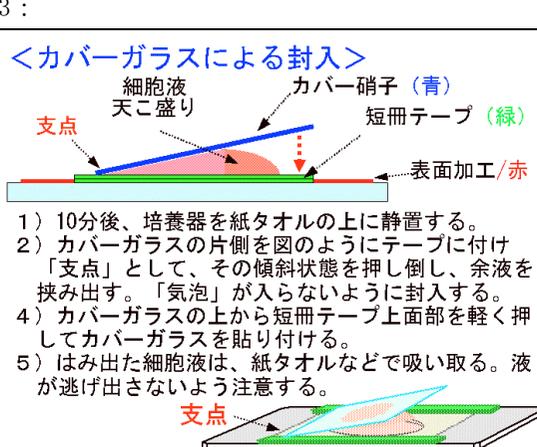
紙タオル

カバーガラスを縁に押しつける。はみ出し液は紙で吸い取る。

培養 (25~30°C) と観察

#25 :

### <カバーガラスによる封入>



細胞液 天こ盛り

カバー硝子 (青)

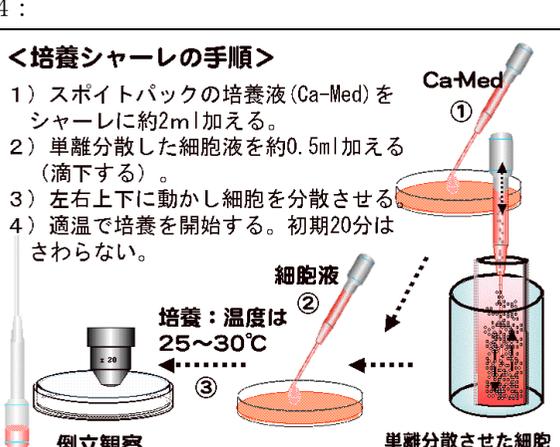
短冊テープ (緑)

表面加工/赤

- 1) 10分後、培養器を紙タオルの上に静置する。
- 2) カバーガラスの片側を図のようにテープに付け「支点」として、その傾斜状態を押し倒し、余液を挟み出す。「気泡」が入らないように封入する。
- 4) カバーガラスの上から短冊テープ上面部を軽く押し付けてカバーガラスを貼り付ける。
- 5) はみ出した細胞液は、紙タオルなどで吸い取る。液が逃げ出さないよう注意する。

#26 :

### <培養シャーレの手順>



- 1) スポイトパックの培養液 (Ca-Med) をシャーレに約2ml加える。
- 2) 単離分散した細胞液を約0.5ml加える (滴下する)。
- 3) 左右上下に動かし細胞を分散させる
- 4) 適温で培養を開始する。初期20分はさわらない。

Ca-Med ①

細胞液 ②

培養：温度は 25~30°C

倒立観察

単離分散させた細胞 ③

#27 :

### <生細胞の顕微鏡観察：光軸傾斜法>

通常観察      光軸傾斜法

#28 :

A : 明視野光軸直射像      B : 明視野光軸傾斜像  
左右は同一視野

C : 位相差顕微鏡像      D : 微分干渉顕微鏡像

#29 :

5分後      15分後

30分後      60分後

FHLS細胞

#30 :

### <スポイトパック固定液/染色液の取り扱い：重要>

「固定液、染色液」はビニール袋や紙タオルなどでカバーし、必ず安全を確保した上で切り取る。

開封放置は危険/厳禁

スポイトを切断し試験管やキャップとして用いる

固定液：FIX      染色液：CV

固定液や染色液など（取り扱い注意液）は必ず、試験管やキャップを付けて用いる。

#31 :

### <Step5：お絵描き実験の顕微鏡観察>

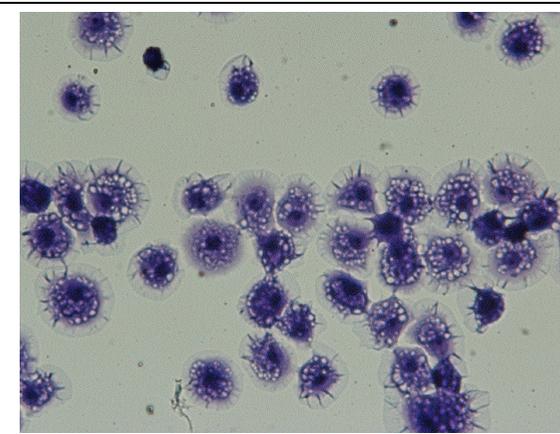
光 ↓      光 ↑

正立明視野顕微鏡      倒立顕微鏡/位相差装置付き

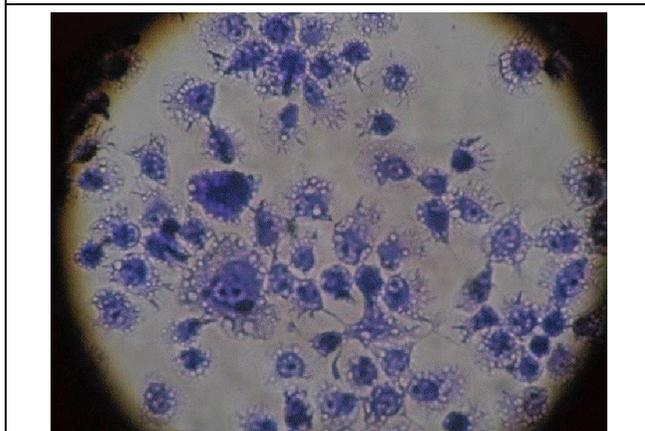
A      B

高倍率で観察するときは「B」の方法

#32 :



#33 :



#34 :

メモ

#35 :

メモ

#36 :