

\* このテキストは概要説明です。実際に行う時は「生物学演習: Set 3」の参照が必要です \*



## <カバーガラス培養「細胞実験 A & B」のイメージ>

(左 QR コードは実験サイト/Set 3、

右 QR コードは実験実施要領)



いつでも・どこでも・だれでも「迅速・簡便・省エネ・低コスト」で可能なカバーガラス細胞培養実験:



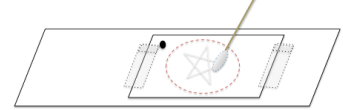
実験4工程: Step1 準備 → Step2 細胞液の調製 → Step3 細胞液の滴下・培養 → Step4 固定染色

### Step 1. 細胞培養用カバーガラス(CG)の準備 …所要時間 5分

実験 A. スライドガラス上にカバーガラス(CG)をテープ止めの後、パラフィン色鉛筆で液止め円を2つ描く(雛形を利用)。CG 左上には油性ペンの目印を付す。



実験 B. 非接着処理済みのカバーガラス(MC/CG)を実験 A と同様に準備し、液止め円はひとつ。加温溶解したゼラチンを付けた綿棒で任意の絵文字を描き、乾燥 30 分。



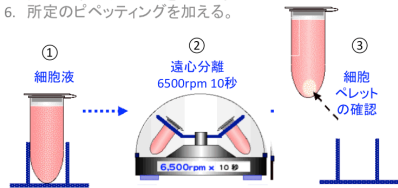
### Step 2 (Exp. A/B 共通). 細胞液の調製 (細胞の遠心再浮遊) …所要時間 5分

この工程は代表者が担当する。1) 細胞バッグに水平振動を与え分散させ、2) バッグを開封し、3) ピペッティングの後、4) その細胞液を遠心チューブ「A の場合は 1.5ml を1本へ、B では 2ml を2本のそれぞれへ」加える。5) 遠心分離 (6500rpm 10秒あるいは 1800rpm 90秒) の後、6) 上澄みを捨て、7) 紙・ろ紙で余液を除き、8) タッピング。9) 新品のスポイトで液体培地 B-Med を「A には 1.5ml、B は 1ml で2本のそれぞれへ」加え、10) ピペッティングで細胞を再浮遊させる(実験 B では2倍濃縮の細胞液2ml が完成する)。補足: 遠心処理は「手作り遠心機」でも可能 (Set3) 参照。



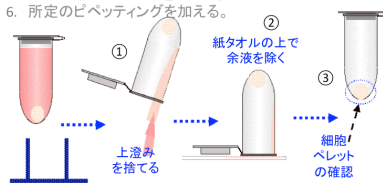
#### Step2. 細胞液の調製 (遠心再浮遊): その1

1. 遠心チューブ (2ml容量) に細胞液を分注する。
2. バランスを取って、遠心分離: 6500rpm 10秒。
3. 上澄みを捨て、余液は浸透吸水
4. テーブルに20回ほど強く打ち付ける。
5. 同量の培地 (B-Med) を加える。
6. 所定のピペッティングを加える。



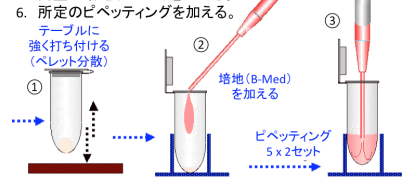
#### Step2. 細胞液の調製 (遠心再浮遊): その2

1. 遠心チューブ (2ml容量) に細胞液を分注する。
2. バランスを取って、遠心分離: 6500rpm 10秒。
3. 上澄みを捨て、余液は浸透吸水
4. テーブルに20回ほど強く打ち付ける。
5. 同量の培地 (B-Med) を加える。
6. 所定のピペッティングを加える。



#### Step2. 細胞液の調製 (遠心再浮遊): その3

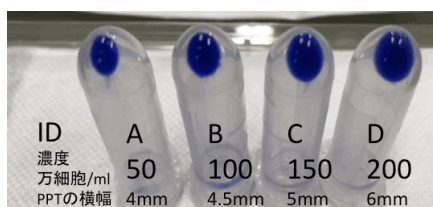
1. 遠心チューブ (2ml容量) に細胞液を分注する。
2. バランスを取って、遠心分離: 6500rpm 10秒。
3. 上澄みを捨て、余液は浸透吸水
4. テーブルに20回ほど強く打ち付ける。
5. 同量の培地 (B-Med) を加える。
6. 所定のピペッティングを加える。



上図 (Step 2) の操作イメージ: 細胞液の調製 (細胞の遠心再浮遊):

### 遠心処理後の細胞ペレット (染色液 CV で可視化)。

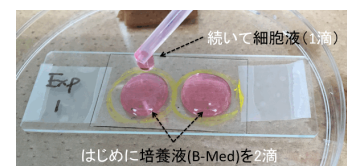
左図の A は 50 万細胞/ml、B は 100 万細胞/ml C は 150 万細胞/ml D は 200 万細胞/ml の細胞液を、それぞれ遠心チューブに 1.5ml 分注し、遠心分離、上澄み除去後のペレット (PPT) の写真。実験 A には、80 万細胞/ml で 1.5ml 遠心分離なので、図の A~B の大きさの細胞ペレットになるはず。\* 保管期間中に増殖するとペレットは大きくなる。その時は再浮遊後に適切に希釈し利用。



### Step 3. 細胞液 (遠心再浮遊液) の滴下と細胞培養 …操作時間は数分、培養は任意 (A は 20 分程度)

実験 A. 円内に 2 滴の液体培地 B-Med を滴下し、調製した細胞液 (遠心再浮遊細胞) を 1 滴の後、28°C 程度 5 分と 30 分培養。詳細はテキスト参照。

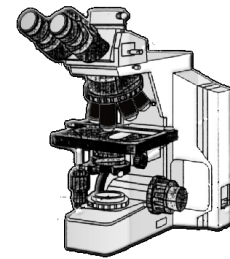
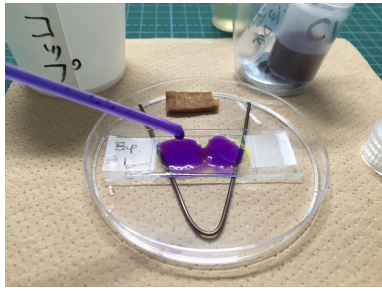
実験 B. 調製した細胞液 (遠心再浮遊細胞) を円内に 6 滴加え、適所に静置し培養 60-90 分。蓋などで乾燥防止を図る。室温培養 (28°C 以下)。



**Step 4 (共通). 固定・染色** …所用時間は約 10 分。

**実験 A.** 培養液を捨て、円内に固定液(Fix)を2滴 3 分。水洗後、染色液(CV)を2滴 3 分処理、水洗。

**実験 B.** 培養液を捨て、Fix は2滴 3 分。水洗後、CV は 3 滴 3 分処理、水洗。完成。

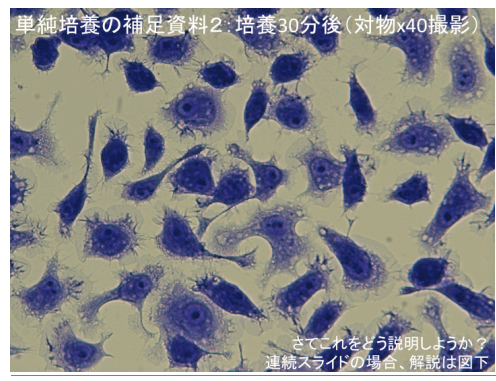
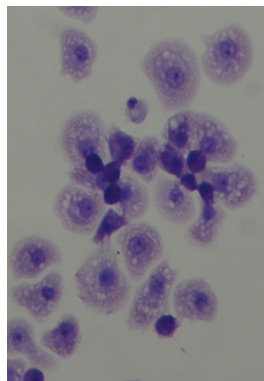
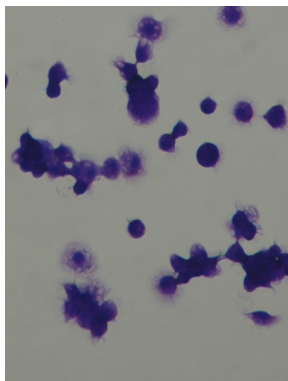


固定・染色のイメージ(固定処理のイメージは省略)

水封入(Step5)と観察

**Step 5 (共通). 観察のための水封入と観察** …所用時間は約 1分。

**共通:** 水封入法:乾燥スライドガラス中央に水1滴を滴下。CG 細胞面を下にして「滴水」の上に乗せる。ガラス表面の水濡れを紙で吸水除去(CG を押し付けない)。観察。



左:培養5分後、中:培養30分後、右:構造が明瞭な標本。右下のQRコードやWebサイト生物学演習「Set2」を参照。

<細胞標本観察の指針>

標本観察の方法の一例として「構造」という観点をを用いる。とても平易な取り組みであるが、意外なことが分かるはず。

培養条件:1. 培養時間の差異(実験 A)、2. 細胞濃度の差異、3. 接着基質の差異(実験 B)、

観察の指針: (1) 実体あるものには(2) 構造がある。構造とは(3) 要素の(4) 配置とその(5) つながり。

構 造 (の解析)		C. 繋がりと効果:区分・状態・結果
<b>A. 要素</b>	a. 基盤、b. 細胞(1. 球状、2. 扁平状)、 c. その他	a. 基質:ガラス、コラーゲン、メチルセルロース(血清アルブミン)、 b. 細胞:1. 接着未伸展細胞(球状)、2. 接着伸展細胞(扁平状)
<b>B. 配置</b>	<b>a. 単離独立</b> :細胞が独立してバラバラに散在する。	単離独立しているため伸展速度が速い。
	<b>b. 近接隣接</b> :複数の細胞が平面的に集まっている。	1. 円形(無軸放射状)、2. 不定形(多軸放射状)、 基質の開放域(未侵出域)へ仮足伸長がはじまり伸展する。コロニー状の隣接配列が形成される(伸展細胞による細胞シートの形成)
	<b>c. 上下配位(凝集塊)</b> :上に乗った細胞が含まれる。	凝集状態のため伸展速度は遅い。下層の細胞は伸展するが上に位置した細胞は基質との反応がないため球状を維持する。
	<b>d. 均等隣接:実験 B(底面充填密度)</b>	接着基質に依存した単層細胞シート(形状)を形成する。

細胞の状態に関わる平易な表現 (右 QR コードは「実験解説とその原理」など)

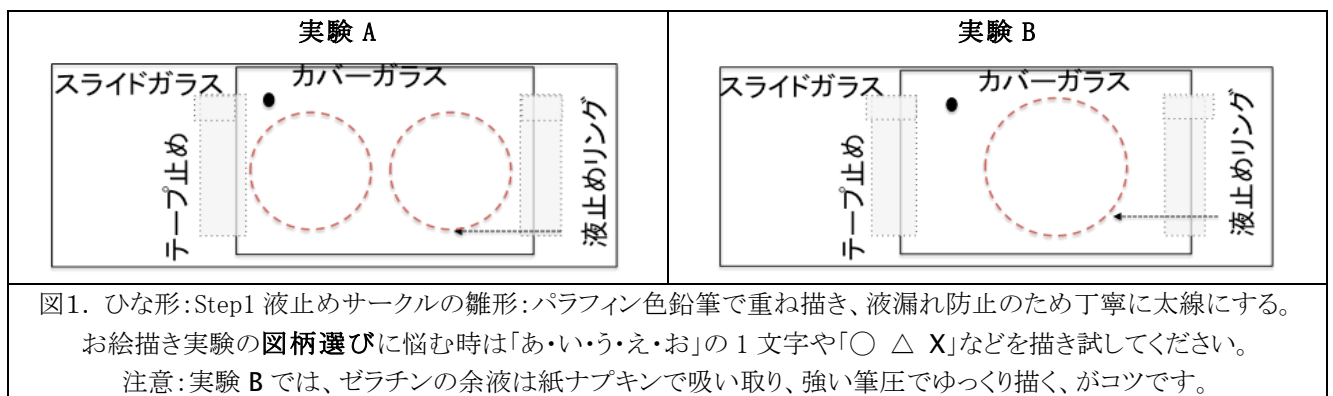
1. 浮いた(浮遊)・沈んだ(沈下)、2. 見える(確認)・見えない、3. 粒・粒々、4. 丸い(球状)・平たい(扁平)・広がった(伸展)、5. 張り付いた(接着/接着結合)、6. 散らばった(散在)・集まった(隣接・近接)・重なった(重層)、7. 多い(密度)・少ない、8. 濃く染まる(濃染)・薄く染まる(染色性が低い)、



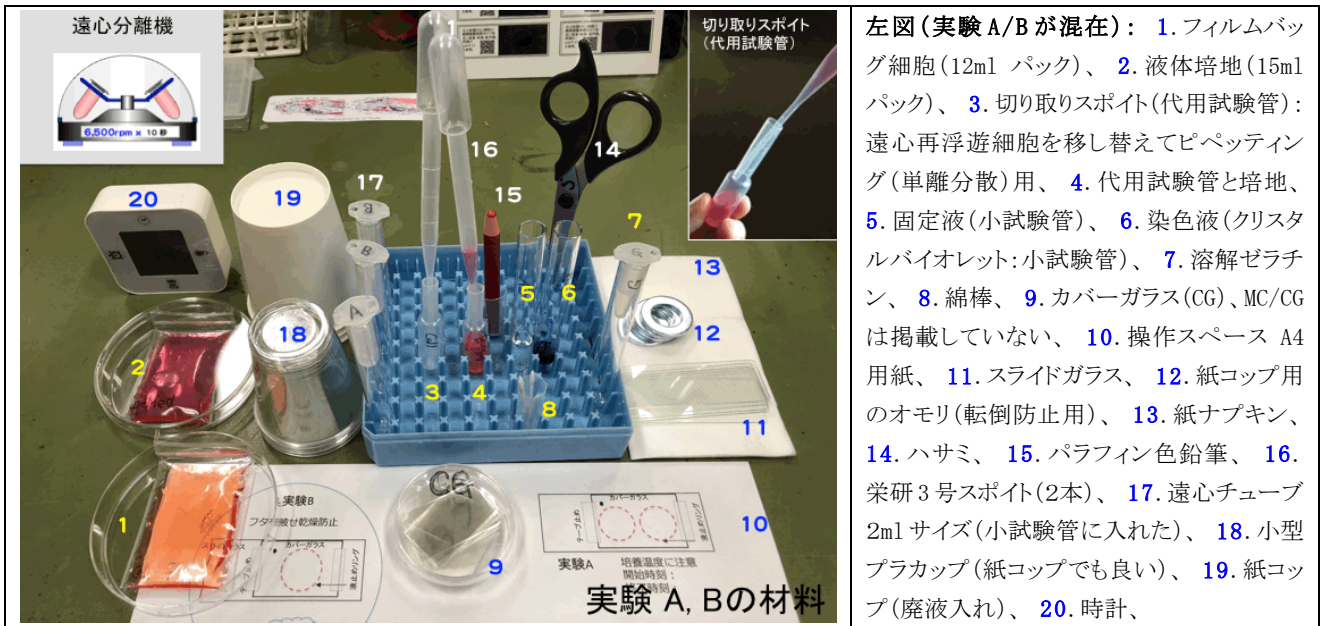
**質問・作業:** 上の表に記した「B. 要素の配置:a-d」に基づき、構造の観点から簡単な絵にしてみましょう(上から見た図)。

速読マニュアル・所要時間(時間制限)

実験 A は単純 CG 培養実験(2サークル/CG)。 実験 B. お絵描き CG 培養実験(1サークル/CG)		
工程	操作概要(物品ポイントや必要量については Set 5 を参照)。	時間
1.カバーガラスの準備	<b>実験 A.</b> スライドガラス上にカバーガラスをテープ止めの後、パラフィン色鉛筆で液止め円を2つ描く(雛形を利用)。CG 左上には油性ペンの目印を付す。	(___分) 事前準備
	<b>実験 B.</b> 非接着処理済みのカバーガラス CG(MC/CG)を実験 A と同様に準備し、液止め円はひとつ。加温溶解ゼラチンを付けた綿棒で任意の絵文字を描く(強い筆圧でゆっくり)。送風乾燥 30 分。	(___分) 事前準備
2.細胞液の調製(遠心再浮遊)	<b>共通(1班4人の分量):</b> 本工程の操作は実施責任者やグループ代表者が担当。 1) 細胞バッグに水平振動を与え分散させ、2) バッグを開封し、3) ピペッティングの後、4) その細胞液を遠心チューブ「A の場合は 1.5ml を1本へ、B では 2ml を2本のそれぞれへ」加える。5) 遠心分離(6500rpm 10 秒あるいは 1800rpm 90 秒)の後、6) 上澄みを捨て、7) 紙・ろ紙で余液を除き、8) タッピング。9) 新品のスポイトで液体培地 B-Med を「A には 1.5ml、B は 1ml で2本のそれぞれへ」加え、10) ピペッティングで細胞を再浮遊させる(実験 B では2倍濃縮の細胞液2ml が完成する)。	(___分)
3.細胞液の滴下・培養	<b>実験 A.</b> 円内に 2 滴の B-Med を滴下し、調製した細胞液(遠心再浮遊細胞)を1滴の後、28℃程度培養。ただし、同時に固定のため、左を開始したその25分後に右を開始し5分培養する同時固定する、培養時間は、右が5分、左が25分となる。	(___分)
	<b>実験 B.</b> 調製した細胞液(遠心再浮遊細胞)を円内に6滴加え、適所に静置し培養 90 分。蓋などで乾燥防止を図る。室温培養(28℃以上では Gel が溶解するから)。	(___分)
4.固定・染色	<b>実験 A.</b> 培養液を捨て、円内に Fix は2滴 3 分。水洗後、CV は2滴 3 分処理、水洗。	(___分)
	<b>実験 B.</b> 培養液を捨て、Fix は2滴 3 分。水洗後、CV は 3 滴 3 分処理、水洗。完成。	(___分)
水封入観察	<b>共通:</b> 水封入法:乾燥スライドガラス中央に水1滴を滴下。CG 細胞面を下にして「滴水」の上に載せる。ガラス表面の水濡れを紙で吸水除去(CG を押し付けない)。観察。	(___分)
標本化	<b>共通:</b> 60s 速乾性「爪トップコート」厳守。完全乾燥した染色細胞面にトップコートを1滴、スライドガラスを上からのせる。反転し完成。	(___分)
顕微鏡観察や考察の時は、視野に現れた「実体」について、「構造:要素の配置とその繋がり」の観点から確認し話し合ってください。どのような要素があるか、どのような繋がりがあるか、繋がり(配置)はどのような結果を招いたか?、用いた実験材料や方法を思い出しながら、丁寧に図式化してみてください。なお、実験原理や解説は右の QR コード、を参照です		



## <実践学習への対応:実験材料のイメージと工程別の必要物品>



左図(実験 A/B が混在): 1. フィルムバッグ細胞(12ml パック)、2. 液体培地(15ml パック)、3. 切り取りスポイト(代用試験管): 遠心再浮遊細胞を移し替えてピペッティング(単離分散)用、4. 代用試験管と培地、5. 固定液(小試験管)、6. 染色液(クリスタルバイオレット:小試験管)、7. 溶解ゼラチン、8. 綿棒、9. カバーガラス(CG)、MC/CG は掲載していない、10. 操作スペース A4 用紙、11. スライドガラス、12. 紙コップ用のオモリ(転倒防止用)、13. 紙ナプキン、14. ハサミ、15. パラフィン色鉛筆、16. 栄研 3 号スポイト(2本)、17. 遠心チューブ 2ml サイズ(小試験管に入れた)、18. 小型ブラカップ(紙コップでも良い)、19. 紙コップ(廃液入れ)、20. 時計、

### 工程別の必要物品 (4人/班あたりの必要数量:特性や仕様は Set5 を参照)

#### Step 1:カバーガラスの準備(CG培養器の調製)

実験A用: □1)操作スペースA4用紙(4枚)、□2)スライドガラス(4枚)、□3)カバーガラス(4枚:CG)、□4)スコッチメンディングテープ、□5)ハサミ、□6)パラフィン色鉛筆(2本)、□7)細書き油性ペン(2本)、

実験B用:□1)メチルセルロース(MC)処理済みのカバーガラス(MC/CG:4枚)、□2)スライドガラス(4枚)、□3)溶解ゼラチン液(Gel:0.5/1.5ml微量遠心チューブ)、□4)クラフト綿棒(4本)、□5)紙ナプキン、□6)扇風機、

#### Step 2, 3:細胞液の調製と滴下培養(実験A,B共通)

責任者用:□1)フィルムバッグ細胞(FHLS細胞)と栄研3号スポイト(1本)、□3)50mlビーカー(細胞バッグのスタンド)、□2)培地(B-Med)とスポイト(1本)、□4)ハサミ、□5)小型紙コップ(細胞と培地の分注用:それぞれ2個、補足:紙コップは転倒防止をすること)、□6)スポイト(細胞と培地の配布コップ用:それぞれ2本:合計4本)、

担当者用:□1)遠心チューブ(2mlサイズ:実験Aは1個、実験Bは2個)、□2)微量遠心分離機(約6500rpm・10秒)、□3)遠心チューブスタンド、□4)切り取りスポイト(代用試験管2本:細胞用と培地用)、□5)スポイト(細胞と培地の分注用:各1本)、□6)紙コップ(廃液入れ)、□7)培養温度の設定用品、□8)湿潤箱

注意:細胞液や培地を配布する紙コップ/ブラカップは必ず転倒防止策を行うこと

#### Step 4:固定・染色(実験A,B共通)

□1)スポイト(2本:使用済みを水洗で再使用)、□2)固定液(N-Fix)、□3)染色液(CV クリスタルバイオレット)、□4)ガラス小試験管(固定液、染色液の分注・配布用)、□5)水道水、□6)水洗用の紙コップ(2個)、□7)紙ナプキン、□8)下記「常備品」。必要に応じて「超速乾性の爪トップコート」

#### 常備品(実験A,B共通)

□1)オモリ(紙コップ転倒防止用:ワッシャー)、□2)紙コップ多数(転倒防止、廃液入れなど)、□3)お湯(湯煎や培養温度など)、□4)温度計(赤外線温度計)、□5)タイマー、□6)ピンセット、□7)ゴミ袋、

#### 補足:栄研3号スポイトの必要数と注意事項

\* 班当たりのスポイト必要数は4本(Step2, 3)。その内の2本は切り取りスポイト「代用試験管」とする(上図を参照)。

\* それ以外に、Step 2では、実施責任者が担当・用意・必要とするスポイトが5本。

\* 固定液・染色液の滴下には使用済みスポイトを水洗・水切りして用いる。

\* 意味不明な事項は必ず確認や問い合わせすること

注意:スポイトは用途を明記して使用する。混同して使用すると細胞培養と細胞運動に強い影響を与える。