

生物学演習講義1:動物細胞培養実験#1

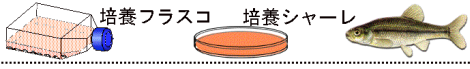
カバーガラス(CG)培養法による細胞染色標本の作製:細胞運動・形態の観察と基本的性質の考察

(受講者の実験学習資料は p.1-4、 担当者資料は p5-11、 アンケートは p11)

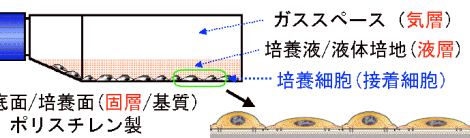
A. はじめに

実験目的: 体の基本単位「細胞」を生きのまま取り扱う細胞培養実験(実験概要は下図)を通じて、体の成り立ちの基本を考えます。「細胞を容器に入れたらどうなるか」という課題(共有命題)に基づき、細胞の行動・運動(形態変化)を観察します。つまり、「細胞の基本的性質」とはどのようなことか、を考えましょう。

<培養細胞/細胞培養:足場依存性>
 体の細胞(体細胞)はシャーレやフラスコの中で飼育することができる。それら細胞を**培養細胞**と言い、その行為を**細胞培養**と言う。今回は「ファッドヘッド ミノー」という小魚に由来する培養細胞(FHLS細胞)を使用。



<細胞培養3層構造>
 *動物細胞は底面/基質に接着し生きる:**足場依存性***
 ガススペース(気層)
 培養液/液体培地(液層)
 培養細胞(接着細胞)
 底面/培養面(固層/基質)
 ポリスチレン製



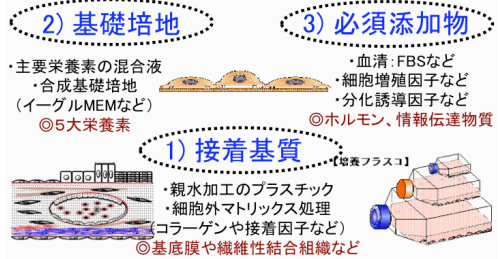
培養細胞が生きるに必要な環境とは?
<細胞培養3要素+α>

2) 基礎培地
 ・主要栄養素の混合液
 ・合成基礎培地(イーグルMEMなど)
 ◎5大栄養素

3) 必須添加物
 ・血清:FBSなど
 ・細胞増殖因子など
 ・分化誘導因子など
 ◎ホルモン、情報伝達物質

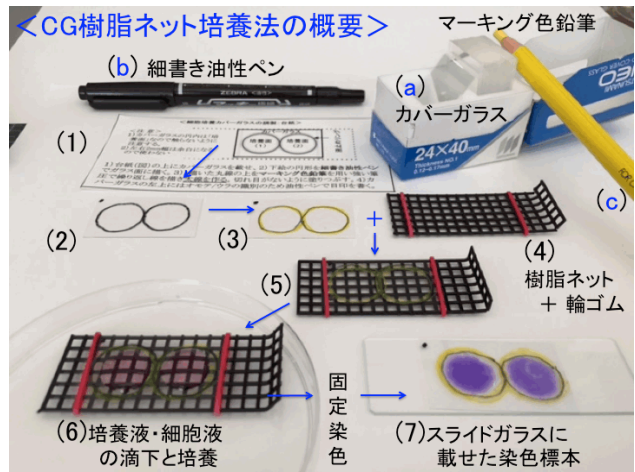
1) 接着基質
 ・親水加工のプラスチック
 ・細胞外マトリックス処理(コラーゲンや接着因子など)
 ◎基底膜や繊維性結合組織など

その他:培養温度、pH、無菌性、継代管理、



培養細胞・細胞培養について: 培養細胞とは生体の組織細胞に由来し人為的に維持管理される細胞のこと。細胞培養とは生体組織の細胞が生きるその存在様式(微小環境)をシャーレなどに再現すること。具体的には、固相・液相・気相(細胞培養3要素+α:上図)の設定と管理により成り立つ。その結果、培養細胞は生体細胞の基本的な性質を少なからず顕示する。細胞培養実験の方法、経過、結果は、従って、生体との類似性や相関性から考察すべき対象である。*補足:培養3要素+αについて具体的な物質や役割を意識してみると興味深いことが分かるはずです。(なに・なぜ・どうして・どのようにして:それ本当?)

<CG樹脂ネット培養法の概要>



マーキング色鉛筆
 (b) 細書き油性ペン
 (a) カバーガラス
 24×40
 (c) 樹脂ネット + 輪ゴム
 (1) (2) (3) (4) (5) (6) 培養液・細胞液の滴下と培養 (7) スライドガラスに載せた染色標本
 固定染色

実験方法の概要(左図)

- * (1-5): カバーガラス(CG)に液止めリング(培養枠)を描き、樹脂ネットに装着し、トレーに置く。
- * (6): 遠心処理で細胞液を準備した後、CG培養面に培養液→細胞液の順でその溶液を滴下。
- * そのまま培養する(待ち時間?)
- * (7): 固定・染色したカバーガラスをスライドガラスに載せて顕微鏡観察する。

用語解説: 1) 動物細胞の基本的な性質の1つに**足場依存性**(適切な物質を識別・接着し生きる性質)があげられます。2) 細胞が底面に張り付く行動を**細胞接着・接着結合**と言います(インテグリンとECMの結合)。3) 細胞が接着する部分・物質を**接着基質**と言います。4) 基質の類似用語には、**培養基質**、**足場**、**細胞外マトリックス(ECM)**、生体では**基底膜**などと言います。ちなみに**基質(マトリックス)**とは何かを生み出すところというニュアンスです。5) 細胞培養には**時間**が必要であり、我々にとっては「待ち時間」ですが、細胞にとっては「生きるに必要な自律的な活動時間」としてたいへん重要です。

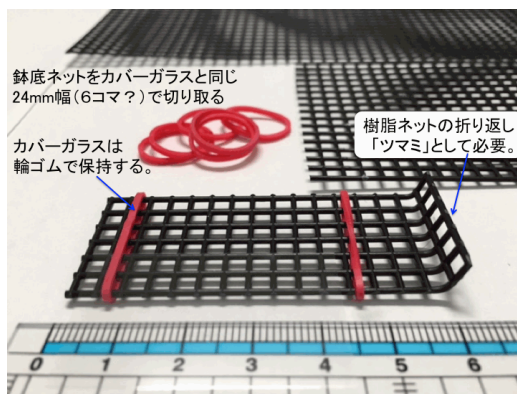
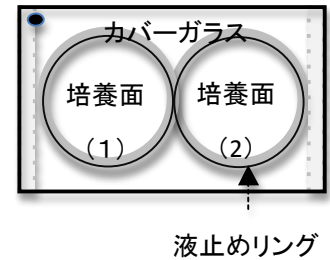
B. 実験方法:実技操作・手順

□ Step1.カバーガラス(CG)細胞培養装置の作製(授業時間を考慮し本工程は事前準備として行う)

注意: 1)カバーガラスには手書きの「黒印」がある。その印が左上になるガラス面が「細胞の培養面」である。また、図の丸内が培養面なので触らないように注意する。2)カバーガラスの左右2mm幅は余白(輪ゴム止め域)とする(下図参照)。3)液止めリングをCGに描く時は、「ガラス割れ」を防止するため、固い平板(テーブル)に台紙(ひな形)・CGを載せ描く(紙タオルなどの上ではひび割れが生じる)。

液止めリングの作成

- 1) 黒印が左上の状態¹⁾でカバーガラスを台紙(右図)に載せる。
- 2) 下絵の円をガラス面に細書き油性ペンで描く。
- 3) 描いた丸細線の上を、マーキング色鉛筆(あるいはパラフィンブロック)を用い、強い筆圧で繰り返し「線」を描き、液止めリングとしての太線を作る。切れ目がないように塗りつぶす。
- 4) 培養面を上にしてCGを樹脂ネットに輪ゴムで装着し、トレー(シャーレ)に置く。完成



完成(準備完了):樹脂ネットCG細胞培養装置



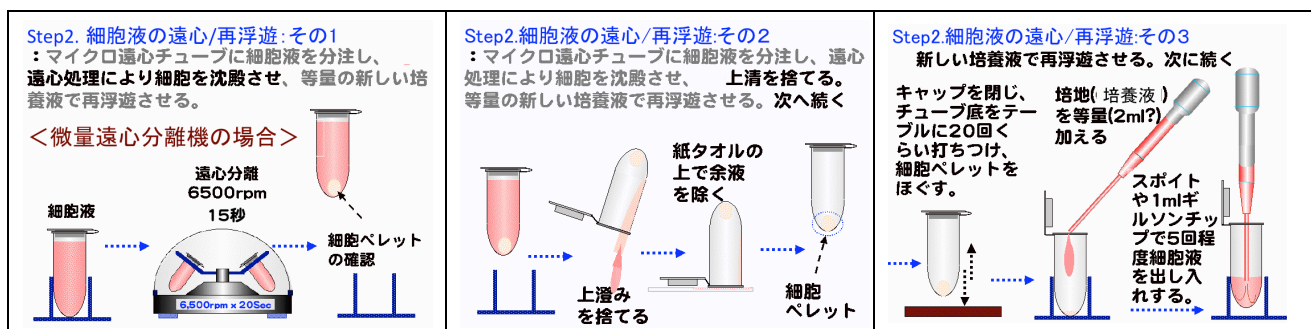
□ Step 2.細胞液の調製(遠心分離と再浮遊):下図を参照。

<細胞液の確認と準備:実施担当者の作業>

1. 細胞のフィルムバッグを摘み持ち目視観察する。細胞の塊が見えるはず。異常がないかを確認する。
2. 補足:顕微鏡にフィルムバッグをセットして低倍率で観察すると細胞の塊が見えるはず。
3. フィルムバッグを手のひらに載せて、水平振動を加え細胞液を十分に流動させ、巨大な細胞の塊を分散させる。目視確認する。
4. 50ml ビーカーなどに細胞のフィルムバッグを立て、ジップロックシールの上(溶着シールの下)をハサミで切り取り、バッグを開封する。
5. ポンピング部を押しつぶした状態で、栄研3号スポイトをフィルムバッグに差し込み、ポンピング操作を数回行い、細胞を分散させる。目視確認。

<細胞の遠心分離と再浮遊>

□1) フィルムバッグの細胞液 1.5ml を小型遠心チューブに取り、遠心分離 (6500rpm くらいで 15 秒)。補足; 本操作は実施担当者が行い遠心後のチューブを配布する。遠心後は細胞ペレットの所在を目視確認。



□2) 受け取った遠心チューブを開け、上澄みを逆さにて捨て、口元の余液は紙タオルに付け吸い取る。

□3) キャップを閉じ、テーブルに遠心チューブの底を強く 20 回打ち付ける(タッピング処理)。

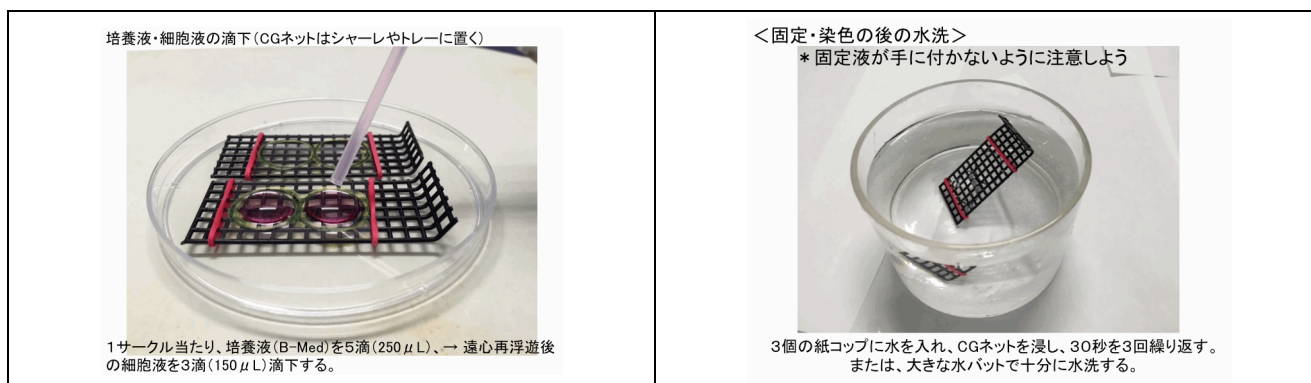
□4) フタを開け培養液(B-Med) 1.5ml を加え、スポイトで軽く 5 回ピペティングし細胞を再浮遊する。

□Step 3.培養液・細胞液の添加と培養

(作製した樹脂ネット CG 培養器はトレーやシャーレ内に置いて操作する)

□1) スポイトを用いて、左側の液止めリング内(培養面)に培養液(B-Med) 5滴、続いて、再浮遊した細胞液 3滴を滴下し培養を開始する(動かさない、室温を確認____℃)。

□2) 15 分から 25 分後(あるいはそれ以上)に、右側の培養面に培養液と軽く再浮遊させた細胞液を上記と同様に滴下し、更に5分間くらい培養する。



Step4, 5, 6: 固定と染色処理、検鏡準備

注意: 固定液と染色液は危険液と考え慎重に扱います。手に付いたら水洗してください。

□Step4-1. **固定処理**: 樹脂ネットを立てて細胞培養液を捨て、2つの培養面に固定液(G-Fix) 2 滴を滴下し2分間くらい放置。その間に、次の水洗のため水コップ3個を用意する。

□Step4-2. **水洗**: 樹脂ネットのつまみで持ち上げ、水コップ(1)に 30 秒ほど浸ける。沈下した時はピンセット(割り箸)で取り上げ、更に水コップ(2)と(3)に 30 秒くらい(以上)繰り返し浸ける。終了後、樹脂ネットを軽く水切り(CG が飛ばないように注意)し、トレー(シャーレ)に戻す。

□Step5-1. **染色処理**: 染色液 (CV) を3滴ほど滴下し、2 分間(それ以上) 放置する。その間に、次の工程「水洗」のためコップの水を入れ替える。

□Step5-2. **水洗**: 上記 Step4-2 と同じ操作を行う。トレー/シャーレ内に付着した固定染色液は水道水で洗淨しよう。

□Step6. **検鏡準備**: 樹脂ネットの輪ゴムを外し、そのままCG 細胞面の上に水を1滴ほど滴下し、スライドガラスを載せ(水で) 密着させ(押しはいけない)、スライドガラスを反転させる(細胞面が水で封入される: 水封入)。あるいは CG 標本が乾燥した後、スライドガラスに細胞面が上の状態で CG を載せ、両サイドをテープで貼付ける。

注意: 水封入標本は乾燥するとその後の観察には使用できない(細胞が変形する)。乾燥前に紙コップの水に浸け 10 分程度放置し、自然にカバーガラスが遊離したら、細胞面に注意し取り上げ、自然乾燥させ、保存する。あるいはその前に再染色する。

以上で**完成**。**顕微鏡観察**を開始する。使用した物品の整理(片付け)も行うこと。

<4. 観察と結果考察法>

| | |
|---|--------------------------|
| 結果 1: ____分培養の細胞形態(スケッチ) | 結果 2: ____分培養の細胞形態(スケッチ) |
| <p>結果と考察: 今回の実験法や観察結果から、細胞はどのような行動や形態を示しましたか。染色標本を観察し簡単なスケッチを行い、気づいたことを丁寧に箇条書きにし、更に、話し合いを行ってください。</p> <p>例えば、ある野生動物の基本的な行動・活動について問われた場合、貴方はどのように回答するでしょうか(その動物の基本的性質とは?)。つまり、同じような観点から細胞についても考察し、細胞の基本的な性質とは何かを話し合ってみましょう。</p> | |

C. 実験材料と実践概要

<1. 主な材料>

実験キット構成品：□1. カバーガラス(略号 CG)、□2. 樹脂ネット+輪ゴム、□3. 細胞(魚類細胞 FHLs)、□4. 栄研3号スポイト、□5. 小型遠心チューブ、□6. 培養液(B-Med)、□7. 固定液(G-Fix:グルタルアルデヒド混液)、□8. 染色液(CV:クリスタルバイオレット)、**実施者が準備する物品**：□9. マーキング色鉛筆(又はパラフィンブロック)、□10. トレー(又はシャーレ)、□11. ガラスピーカー(50ml用)、□12. 遠心分離器、□13. はさみ、□14. 細書き油性ペン、□15. スライドガラス、□16. 紙タオル、□17. 紙コップ(水洗やゴミ捨て用)、□18. スコッチテープ、□19. ピンセット、□20. 温度計、□21. タイマー、□22. 光学顕微鏡

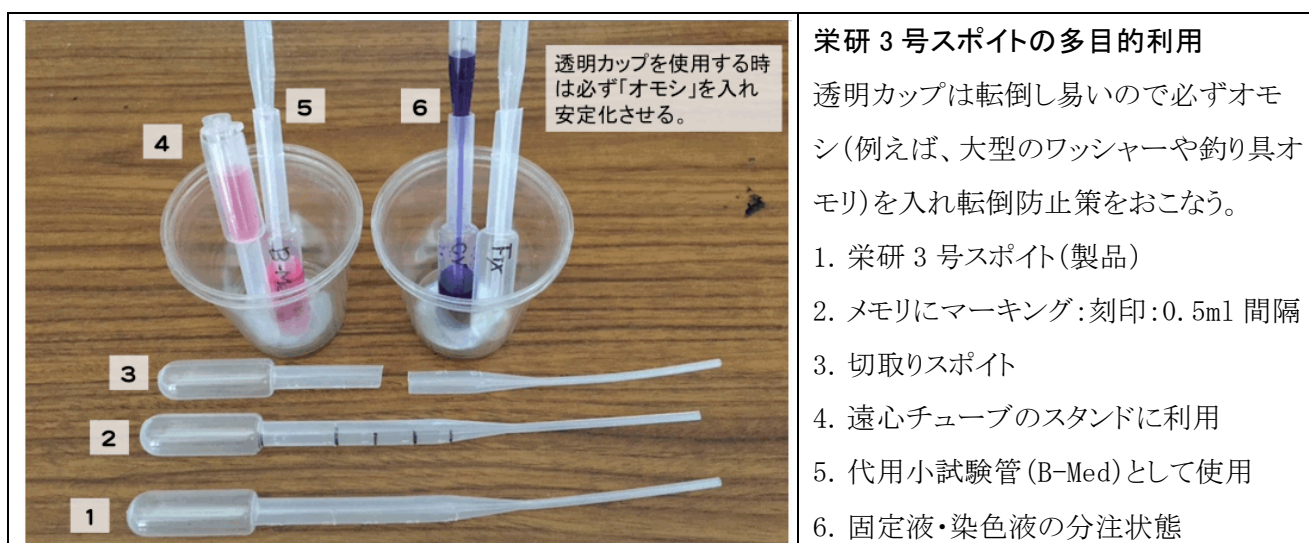
補足：1) 液止めリングを描く台紙(ひな形)は当該 Web サイトで表示印刷し使用する。2) 実験キットの溶液(B-Med, G-Fix, CV)の必要量が少量の場合、スポイトパック(溶液を入れ先端を熱溶着・封入したスポイト)で提供する時もあります(その時は Web サイトの Fig28 を参照)。

<2. 実践的な栄研3号スポイトの多目的な利用(授業実験における溶液の配布法)>

少量の溶液の取扱いは生徒さんが苦手とする作業です。それで溶液、特に固定液や染色液は安全・確実な操作のため「清浄な小試験管」に分注し、転倒防止のため試験管スタンドに立て、スポイトでその溶液を使用することが基本と思います。

しかし、迅速・簡便・確実に加え安全、更に後始末も考慮すると下図の様式(イメージ)もその理にかなっているような気がしています。つまり、栄研3号スポイトの多目的な利用です(下図を参照)。

栄研3号スポイトの刻印 1.5ml レベルをハサミで切り取ったものは代用試験管(5ml 容量)になります。「肩」があるため安全操作に適しています。実践的には、1) その溶液チューブ(代用試験管)が倒れないこと(透明カップなどの場合は必ずオモシを入れ安定化させる)、2) 溶液を滴下するスポイトに取り違えが生じないこと、加えて、3) 後始末が容易なこと、にも配慮する必要があります。補足：細胞液・培養液に使用したスポイトの洗浄や再生が簡単です。固定液染色液スポイトは破棄する。



<3. 実験実施の前に：対照実験の必要性>

本実験「細胞染色標本の作製・観察：細胞運動と基本的性質」は迅速・簡便な6工程である。

Step1. カバーガラス(CG)細胞培養装置の作製、 Step2. 細胞液の調製、

Step 3. 培養液・細胞液の添加と培養、 Step4. 固定処理、 Step5. 染色処理、 Step6. 観察、

実験の心構えは「実験とはともかく何かを確かめること、では何を知りたい・確かめたい」としたい。つまり、「細胞を容器に入れたらどうなるか」ということを念頭としてほしい。その為に必要なヒントを以下に記す。

本実験に関連した生細胞の運動に影響を与える重要な要素は、1)培養基質、2)培養時間、3)培養温度、4)細胞密度、である。そこで時間的な余裕がある時は、それぞれについて下記の方法で分担検討してみることも有意義であるとする(対照実験の必要性:実験担当者が担当実施するも良い)。

- 1) 培養基質:カバーガラスの対照として「スライドガラス面」に液止めリングを描き細胞培養をしてみる。
- 2) 培養時間:細胞の自律的な活動時間なので、室温レベルでは、45分程度まで設定してみる。
- 3) 培養温度:細胞活動の適温を 25℃から 28℃とした場合、低温 20℃で行うとどうなるかを検討する(氷水の袋をシャーレのフタの上に乗せ培養、あるいは高温域として使い捨てカイロを載せる)。
- 4) 細胞密度:細胞液の滴下量を多くする・少なくするとどうなるか。また、遠心分離処理を行わず細胞液を滴下するとどうなるか、についても検討する。

<細胞の培養時間と形態変化:実験プラン(事例)>

時間差を付けて細胞液を添加し、培養時間に差異を与える。

<カバーガラス細胞培養法:染色細胞像>

<4. 観察と結果考察法の事例>

| | |
|--|--------------------------|
| 結果 1: ____分培養の細胞形態(スケッチ) | 結果 2: ____分培養の細胞形態(スケッチ) |
| <p>考察:今回の実験法や観察結果から、細胞はどのような行動や形態を示しましたか。丁寧に箇条書きにしてみましょう。例えば、ある野生動物の基本的な行動・活動について問われた場合、貴方はどのように回答するでしょうか(つまり、その動物の基本的性質とは?)。同じ観点から細胞について考えてみましょう。話合ってみましょう。</p> | |

D. 結果考察:実験を通じて培養細胞が示した基本的な性質や現象(事例)

(下記は考え方の事例。⑥、⑦、⑧は今回の実験では確認できないので補足。詳細は Web サイトで)

- ① **接着**: はじめ浮遊していた球状の細胞は、底面に沈下後、足場/基質となる物質(カバーガラスの表面物性、あるいはコラーゲンなど)を認識し接着した(容器を動かしても浮遊しなくなった)。
- ② **伸展**: 培養時間の経過に従い扁平な形に伸展した。つまり、接着という反応・信号が細胞内に伝わり細胞骨格「アクチン線維」の変化をもたらし形が変化した。
- ③ **形態**: その過程で細胞骨格に基づく糸状仮足や葉状仮足が生じた(観察された)。仮足部分は膜伸長であり細胞骨格以外の細胞小器官は観察されない。
- ④ **移動・配列**: 伸展細胞は隣接細胞と協調的に移動・配列し重なることはなかった。結果的に細胞密度が適度な場合、敷石を敷き詰めたようなコロニーのような配列を示した。数の多いところでは単層の細胞シート状を示した。
- ⑤ **その他**: 底面の接着細胞の上に位置した細胞は基質との接触がないため、また細胞-細胞間反応のためほとんど形態変化を示さなかった。足場や隣接細胞に影響を受けない細胞は足場非依存性: ガン化細胞など。

つまり、上記に関連する学習項目を図説集などに探してみよう。継続的な発展実験としては「細胞シートの形成」「培養細胞による組織形成の基礎実験:お絵描き実験」などが成り立つ。また、細胞培養3要素+ α (Fig3)の各項目の具体性や役割を考察しよう。その視座は学習マトリックス。上皮組織についてはデジタル組織顕微鏡観察で、または組織自主トレで。

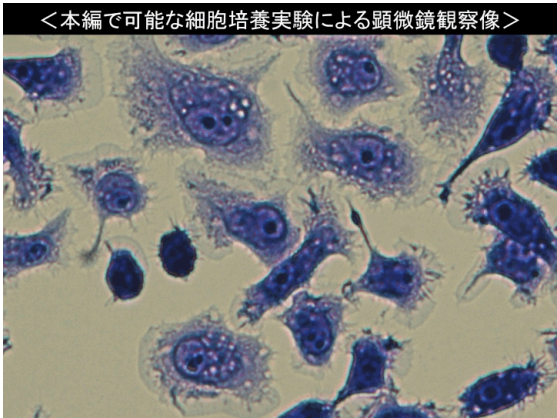
- ⑥ **増殖・接触阻害**: 長時間の培養を行えば、隙間があれば分裂増殖し、切れ目のない細胞シートを形成する。但し、隣接細胞と接すると細胞増殖が停止する(接触阻害という現象)。
- ⑦ **細胞シートの形成**: 最終的に切れ目のない集落「単層の細胞シート:上皮組織様の形態」を形成した。
- ⑧ **機能発現/分化**: 例えば、培養3要素などの培養条件を整えると機能的な細胞となる。最終的には細胞死に至る。

「動物細胞の基本的性質」

* 結論:細胞は社会性を示す。足場依存性と単層細胞シートの形成である。

細胞は「基質」を認識し、① 接着/伸展し → ② 移動/運動・配列し → 隙間があれば ③ 分裂増殖と接触阻害になり → ④ 単層の「細胞シート」を形成する → 条件を整えば ⑤ 機能発現/分化

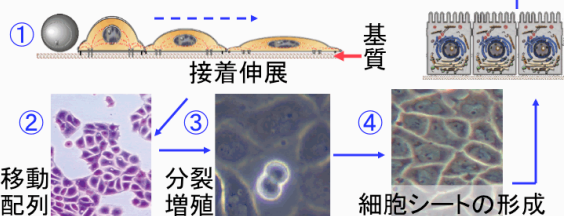
<本編で可能な細胞培養実験による顕微鏡観察像>



まとめ「動物細胞の基本的性質」

細胞は「基質」を認識し、

① 接着/伸展し → ② 移動/運動・配列し
→ 隙間があれば ③ 分裂増殖と接触阻害になり
→ ④ 単層の「細胞シート」を形成する
→ 条件を整えば ⑤ 機能発現/分化



細胞死

E. 実験材料のリクエスト表(樹脂ネット CG 細胞培養法:Exp1):

細胞実験キット(CG-1)の基本単位は4人分(1グループ/班分)、あるいは4回分(カバーガラス4枚:8培養)と考えてください。下表は「授業実験」を想定したものです。個別の予備実験などにも用います。下線に数値をもれなく記入し、実施目的などのコメント、使用予定の遠心分離機も添え、お知らせください。

*カバーガラス1枚で2培養を行う。 *栄研3号スポイトによる1滴は0.05mlとする。

*授業実験の場合は「予備」数量を2班分と考えていますが、如何でしょう: _____

*試行/予備実験の時は右列の「希望数量」のみを目的に従い算出し提出してください。

| 実験項目:樹脂ネット CG 培養法による細胞染色標本の作製 実施担当者: _____ | | | | |
|---|-------------|--|---|--------|
| 目的: <input type="checkbox"/> 試行: _____、 <input type="checkbox"/> _____ のための予備実験、 <input type="checkbox"/> 授業実験: _____ | | | | |
| 実施日:H__年__月__日、実施時間/時間構成: _____ | | | | |
| 担当者__人+受講者__人=参加者総数__人。 総数÷4人 = _____ : _____グループ(班) | | | | |
| # | 材料/物品(略号) | 必要量/1人 | 必要数量の算出(総班数+予備1班分) | 希望数量 |
| 1 | カバーガラス (CG) | 1枚/1人:2培養 | 4枚/班 x グループ数__班 = __枚+予備__枚 | ____枚 |
| 2 | 樹脂ネット | 1枚/1人 | 4枚/班 x グループ数__班 = __枚+予備__枚 | ____枚 |
| 3 | 輪ゴム | 2個/樹脂ネット | 8個/班 x グループ数__班 = __個+予備__個 | ____個 |
| 4 | スポイト:栄研3号 | 1パック10入り:下記「スポイトの用途と必要量」を参照。 | | ____pc |
| 5 | 培養液 (B-Med) | 0.6ml/2培養/1人 (6滴/1培養) | 2.5ml/班 x グループ数__班 = _____ml+予備_____ml | ____ml |
| | | 遠心再浮遊用:1.5ml/チューブ x グループ数__班 = _____ml | | |
| 6 | 細胞 (Cell) | 0.3ml/2培養/1人 (3滴/1培養) | 1.5ml/班 x グループ数__班 = _____ml+予備_____ml | ____ml |
| 7 | 微量遠心チューブ | 1個/班 | グループ数__班+予備2個 = _____個 | ____個 |
| 8 | 固定液 (G-Fix) | 0.1ml/2培養/1人 (2滴/1培養) | 0.5ml/班 x グループ数__班 = _____ml+予備_____ml | ____ml |
| 9 | 染色液 (CV) | 0.4ml/2培養/1人 (4滴/1培養) | 2ml/班 x グループ数__班 = _____ml+予備_____ml | ____ml |

*パラフィンブロック(マーキング色鉛筆の代用)など、下記を必要とする時は記入する。

| | | | | |
|----|------------|-------|--------------------------|-------|
| 10 | パラフィンブロック | 1個/班 | 1個/班 x グループ数__班 = _____個 | ____個 |
| 11 | φ10cm シャーレ | 1枚/一人 | 用途:CG培養装置のトレー | ____個 |
| 12 | φ35mm シャーレ | | 倒立顕微鏡を現有する場合 | |

*液止めリングのひな形台紙は解説サイトのPDFを利用してください。あるいはリクエスト:____人分。

*遠心機の種類:マイクロ遠心機(約6500rpm)、一般遠心機(約1800rpm)、自作遠心装置__rpm)

<栄研3号スポイトの用途・必要量 …… □必要総数は_____本>

*実施担当者のスポイト必要量 ……□必要数は_____本

- 1)細胞液(Cell)を遠心チューブに分注するスポイト→1本、
- 2)培養液・固定液・染色液を分注するスポイト→各1本で3本、
- 3)培養液・固定液・染色液を各斑に配布するため必要なスポイト(切断スポイト/代用試験管用)
:3本/班 x グループ数__班 = _____本、

*受講者のスポイト必要量 …… □必要数は_____本

(班当たりの必要量は9本)

- 1)遠心分離した細胞の再浮遊用:1本/班 x グループ数__班 = _____本
- 2)培養液(B-Med)の滴下用(2人で1本):2本/班 x グループ数__班 = _____本
- 3)再浮遊した細胞液の滴下用(2人で1本):2本/班 x グループ数__班 = _____本
- 4)固定液(G-Fix)の滴下用(4人/班で1本):1本/班 x グループ数__班 = _____本
- 5)染色液(CV)の滴下用(4人/班で1本):1本/班 x グループ数__班 = _____本

*予備のスポイト必要量 …… □必要数は_____本

:予備は各班当たり2本くらいと考えてください。

追加補足1:栄研3号スポイトの用法について(授業実験を想定して)

- 1)スポイトを立てても倒れない「50ml ガラスビーカー」を試験管スタンドとして使用する。ない場合は「透明使い捨てカップ:おもりを入れて安定化させる」を使用する。
- 2)培養液、固定液、染色液の分注用の容器は、スポイトの1.5ml レベルをハサミで切り取った「代用試験管」を使用すると迅速簡便。
- 3)班当たりの各溶液の必要量は1人分を予備として加え分注、グループ(斑)に配布する。
- 4)溶液を滴下するスポイトは、安全確実・取り違えが生じないように、使用前に名称・ID 略号を記入し使用する。スポイトの使い回しをしない。
- 6)使用器具は使い捨てもあり得るが、廃棄物削減のため、あるいは繰り返し実験のために、再生することも可能である。栄研スポイトの洗浄はとても簡単なので、再利用が可能と思います。
- 7) なお、マイクロ遠心チューブ(2ml 容量)のスタンドが見当たらない時は、コルクボーラーで穴をあけた厚手の発泡スチロールを使用する。

実験方法の補足「遠心分離」について:

*一般的な遠心分離機(15ml バケツ)の場合の条件は「1800rpm x 90 秒」。これについては本編の Web サイト「樹脂ネット CG 細胞培養法」の実験方法「Step2」を参照。

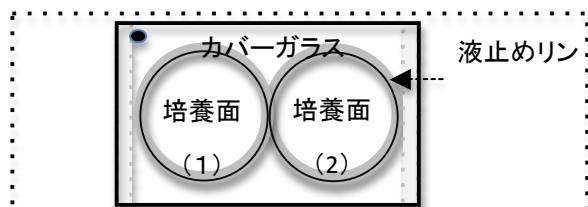
*遠心分離機がない場合は、同様に上記サイトの図 34 を参照し、自作遠心装置を作り、安全確保の上で上記の条件くらいで実施する。

カバーガラス(CG)培養法に用いる「液止め丸枠のひな形」台紙。

注意: 1) カバーガラスには手書きの「黒印」がある。その印が左上になるガラス面が「細胞の培養面」である。また、右図の丸内が培養面なので触らないように注意する。2) カバーガラスの左右 2mm 幅は余白(輪ゴム止め域)とする(下図参照)。3) 液止めリングを CG に描く時は、「ガラス割れ」を防止するため、固い平板(テーブル)に台紙(ひな形)と CG を載せ描く(厚みのある紙タオルなどの上ではひび割れが生じる)。

方法:

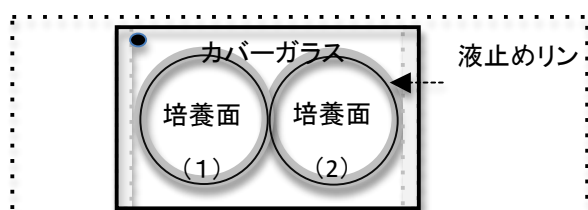
- 1) 台紙(図)の上にカバーガラスを載せ、
- 2) 下絵の円形を細書き油性ペンでガラス面に描く。
- 3) 描いた丸線の上をマーキング色鉛筆を用い強い筆圧で繰り返し線を描き太線を作る。切れ目がないように塗りつぶす。
- 4) カバーガラスの左上にはオモテ/ウラの識別のため油性ペンで目印を書く。



注意: 1) カバーガラスには手書きの「黒印」がある。その印が左上になるガラス面が「細胞の培養面」である。また、右図の丸内が培養面なので触らないように注意する。2) カバーガラスの左右 2mm 幅は余白(輪ゴム止め域)とする(下図参照)。3) 液止めリングを CG に描く時は、「ガラス割れ」を防止するため、固い平板(テーブル)に台紙(ひな形)と CG を載せ描く(厚みのある紙タオルなどの上ではひび割れが生じる)。

方法:

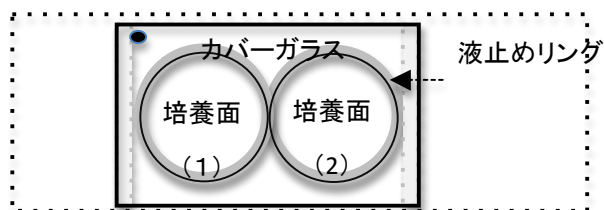
- 1) 台紙(図)の上にカバーガラスを載せ、
- 2) 下絵の円形を細書き油性ペンでガラス面に描く。
- 3) 描いた丸線の上をマーキング色鉛筆を用い強い筆圧で繰り返し線を描き太線を作る。切れ目がないように塗りつぶす。
- 4) カバーガラスの左上にはオモテ/ウラの識別のため油性ペンで目印を書く。



注意: 1) カバーガラスには手書きの「黒印」がある。その印が左上になるガラス面が「細胞の培養面」である。また、右図の丸内が培養面なので触らないように注意する。2) カバーガラスの左右 2mm 幅は余白(輪ゴム止め域)とする(下図参照)。3) 液止めリングを CG に描く時は、「ガラス割れ」を防止するため、固い平板(テーブル)に台紙(ひな形)と CG を載せ描く(厚みのある紙タオルなどの上ではひび割れが生じる)。

方法:

- 1) 台紙(図)の上にカバーガラスを載せ、
- 2) 下絵の円形を細書き油性ペンでガラス面に描く。
- 3) 描いた丸線の上をマーキング色鉛筆を用い強い筆圧で繰り返し線を描き太線を作る。切れ目がないように塗りつぶす。
- 4) カバーガラスの左上にはオモテ/ウラの識別のため油性ペンで目印を書く。



F. アンケート（CG 培養法）属性: 学年__年、男・女

今回は CG 樹脂ネットを用いた細胞培養実験（細胞染色標本の作製）を行いました。

質問 1. 生物系の教科は好きですか。

- a. 大好き、b. 結構好き、c. 普通、d. 苦手、e. 嫌い

質問 2. 生物系の教科は得意ですか。

- a. 大得意、b. 結構得意、c. 普通、d. 苦手、e. その他

質問 3. 実験授業（細胞培養実験）に参加して(1)楽しかったですか、(2)内容は有意義でしたか。

- 1) a. 非常に楽しかった、b. 楽しかった、c. 普通、d. 良くなかった、e. その他
2) a. 非常に有意義だった、b. 有意義だった、c. 普通、d. 良くなかった、e. その他
-
-

質問 4. 実験の実技操作は(1)難しかったですか、(2)染色標本はうまく作れましたか。

- 1) a. かなり難しかった、b. 少し難しかった、c. 普通、c. 簡単であった、d. その他
2) a. かなり上出来であった、b. 普通、c. 少し失敗した、d. 完全に失敗した、e. その他
-
-

質問 5. 細胞培養実験を行い特に印象に残ったこと・納得できたことは何ですか。

質問 6. 今回の経験「細胞培養実験の受講」を機会があれば下級生に勧めますか。

- a. 強く勧める、b. 普通に勧める、c. 勧めない、e. その他
-
-

質問 7. 現在、高校レベルで細胞培養実験を行う学校は稀ですが、今回の経験から細胞培養実験は教科生物の理解のために必要と思いますか。

- a. 是非必要と思う、b. ある方が良くと思う、c. どちらでも良い、d. なくても良くと思う、e. その他

質問 8. 今後、改めて細胞培養実験に関わる実験授業を開催してほしいと思いますか。

- a. 是非思う、b. ある方が良くと思う、c. どちらでも良い、d. なくても良くと思う、e. その他
-
-

質問 9. 意見・感想を自由にお書きください（紙面が足りないときは裏面も使ってください）。
