

工程別の必要物品（4人/班あたりの必要数量：詳細はSet5を参照）

| |
|--|
| <p>Step 1:カバーガラスの準備</p> <p>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)、</p> <p>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、</p> |
| <p>Step 2, 3:細胞液の調製と滴下培養（実験A, B共通）</p> <p>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)、</p> <p>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</p> |
| <p>Step 4:固定・染色(実験A, B共通)</p> <p>□1)スポイト(2本:使用済みを手洗いで再使用)、□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」</p> |
| <p>常備品(実験A, B共通)</p> <p>□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、□5)ピンセット、□6)ゴミ袋、</p> |

<実技操作:この頁の「Step 1 は事前準備と予習」、3頁目から実技実験>

Step 1. 細胞培養用カバーガラス (CG) の準備（事前に作製する）・材料と配置を確認、所用時間は約__分。

(注意:この工程は「時間的な余裕の確保と予習」の観点から、事前準備として実施してください:学習の場では重要)

実験 A(単純CG培養) はじめての人は培養サークルが1つでも良い(責任者の方針に従うこと)。

- 1) ひな形(下図)にスライドガラス(SG)を置き、その上にカバーガラス(CG)を載る。□2) 図1左のように短辺域数mmをテープ止め(ポイント:テープの角は重ね折りで剥がしやすくしておく)。
- 1) パラフィン色鉛筆で約1.5cmの円を2つ描く(液止め用:ゆっくり丁寧に重ね書きで太線にする)。□2) カバーガラス左上には油性ペンで目印(細胞面の確認用)、スライドガラスには「名前」などを書く。□3) その「CG培養ガラス」は次工程まで保管する。可能なら予備も1枚作成しておく。



実験 B(OEKAKI):MC/CGスライドガラスの準備とゼラチン塗抹: 責任者はGelを分注・配布

*下記「3.」では透明なゼラチンで「絵文字」を描く。透明なので不安になるが、**ゆっくり・強い筆圧で描くがコツ**。

- メチルセルロース(MC)処理済みのカバーガラス(MC/CG)を、スライドガラスにテープ止めし、□パラフィンペンで約2cmの円を一つ描く(右下のひな形)。
- 事前に加温溶解したゼラチン液に、□綿棒の数mm先端を浸す(5秒)。□先端を紙ナプキンに数秒間以上付け、余液を十分に除く(厚塗りにならないため:とても重要:ポイントです)。
- そのゼラチン綿棒で円内に任意の図柄を**強い筆圧でゆっくり**描く。厚塗りはダメ。そのまま保管で自然乾燥。
- もし、実験が継続可能な時は自然乾燥10分後、扇風機で送風20分程度、**完全に乾燥(重要)**。

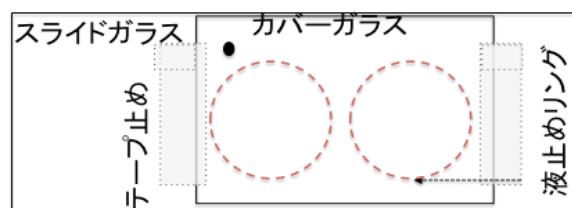
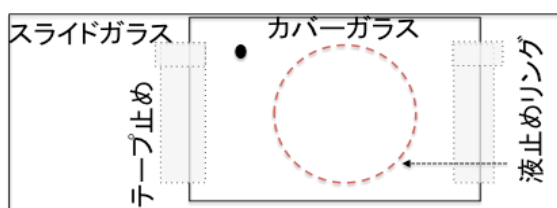
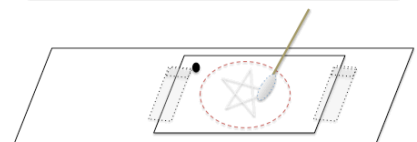
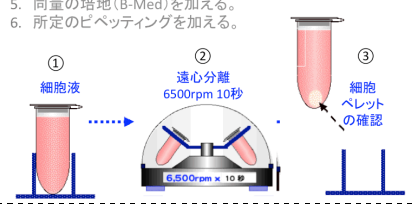
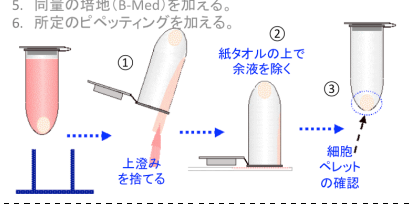
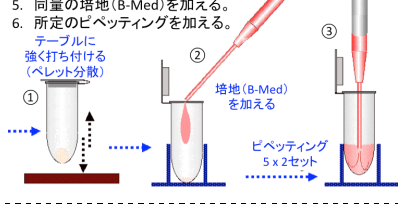


図1. ひな形:Step1液止めサークルの雛形:パラフィン色鉛筆で重ね描き、液漏れ防止のため丁寧に太線にする。お絵描き実験の**図柄選び**に悩む時は「あ・い・う・え・お」の1文字や「○ △ X」などを描き試してください。

細胞液の調製（細胞の遠心再浮遊）：Step 2 の操作イメージ

| | | |
|--|---|--|
| <p>Step2. 細胞液の調製（遠心再浮遊）：その1</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。  | <p>Step2. 細胞液の調製（遠心再浮遊）：その2</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。  | <p>Step2. 細胞液の調製（遠心再浮遊）：その3</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。  |
|--|---|--|

ポイントは、1) 上澄みをできるだけ除く、2) タッピングは想像以上に強く、3) ピペッティングは丁寧に。

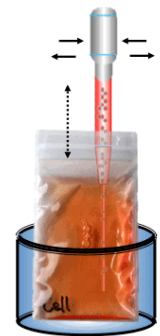
Step 2 (Exp. A/B 共通). 細胞液の調製（細胞の遠心再浮遊）・・・材料と配置を確認、所用時間は約__分。

(注意:担当者を決め必要物品を準備します。スポイトには 0.5ml 刻みのメモリがあります。1.5ml を確認して下さい)

注意:本工程は**実施責任者が担当**(役割分担を明らかに)。操作イメージは上図を参照。

1. フィルムバッグ(FB)細胞(12ml)の浮遊分散化(責任者が担当)

- 1) 細胞バッグの中に沈んだ白っぽい塊(細胞)を観察し、バッグに水平振動を与え、細胞の塊を浮遊させる。□2) 大きな塊がフィルムに付着の時は、もう一度、水平振動を行う。
- 3) 右図:細胞バッグをハサミで開封し、スポイトを差し込み、5回程度ピペッティング(液の出し入れ)を行う。□4) 目視確認し塊が「多い・大きい・目立つ」時は再度ピペッティングを行う。
- 5) その細胞液(12ml)を、転倒防止したディスポ紙カップ(新品・小型)などに分注する(例えば、左・右列の受講者に対応させ6mlx2カップ)。
- 6) そのカップにはスポイトをそれぞれ2本添える/入れる(次の操作で遠心チューブに細胞液を分注するためのスポイト)。
- 7) 同様に培地をカップ2つに分注(担当者取りに来るので新品スポイトを各2本添える)。



2. 細胞液の分注(班担当者1)

- 1) 担当者は、遠心チューブ1本(2ml サイズ))を持参し、カップから細胞液 1.5ml を分注する。□ 2) キャップを閉じて油性ペンで目印を書く。(□ 実験 B の場合は、2本の遠心チューブに各 2ml 加える。)

3. 遠心分離(班担当者2) :

- 1) 担当者は、遠心機にチューブを対角線 or バランス状態でセットし、6500rpm, 10 秒(あるいは 1800rpm で 80 秒)の遠心処理を行なう(スイッチ ON、10 秒後に OFF)。

4. 事後処理とタッピング(班担当者3) : 液を捨てる紙コップを用意する。

- 担当者は □ 1) 両手でキャップを開け、素早く逆さまにして上澄みを捨てる。□ 2) そのままで5秒ほど逆さまにした後、出口の残液を紙ナプキンでできるだけ吸い取る。□ 3) チューブ底に張り付いている細胞ペレットを素早く確認(大きさも)。□ 4) キャップを閉じ、チューブの底をテーブルに気持ち以上に強く(かなり強く)20 回以上打ち付ける(タッピング処理:細胞ペレットがほぐれる)。すぐ次へ。

5. 細胞の再浮遊(班担当者4) : 下記の操作では「必ず新品スポイトを用いる」こと。

- 担当者 1, 2 は物品確認: □切り取りスポイト(代用試験管)2本。□その1本には培地を培地カップから採取してくる(実験 A は 3ml、実験 B は 2.5ml)。同時に新品スポイト2本を班に持ち帰り、代用試験管に入れておく。

- 1) 遠心チューブのキャップを開け、実験 A チューブに培地 1.5ml をスポイトで加える。

- (□ 実験 B の場合は2本のチューブにそれぞれ 1ml を加える:細胞濃度は2倍になる)。

- 2) そのスポイトで、吹きこぼれないように・泡立てしないように、ゆっくり丁寧にピペッティング(細胞の単離分散)を5回程度行い、細胞を浮遊させる。□ 3) その細胞液を「未使用の代用試験管」に全量を移し換える。

- 4) 代用試験管では「吹きこぼれ」の心配がないので、強めポンピング(ピペッティング)で細胞液を十分に単離分散させる。□ その細胞液を透視し、塊がある場合はもう少しピペッティングを加える(細胞は単離分散する)。

- (□ 実験 B (2本チューブ)でも同様に操作するが、再浮遊液は合計 2ml/代用試験管、になる)。

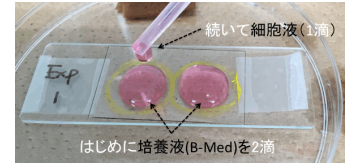
6. 完了したら中断することなく(休むことなく)、次の工程(Step 3)を開始する。

Step 3. 細胞液(遠心再浮遊液)の滴下と細胞培養 ・・材料と配置を確認、所用時間は約__分。

注意:スポイトで「液を滴下」の時はスポイトを立てる(45度以上の角度で)。また、スポイトを面に近づけ過ぎないこと(液滴の状態^で滴下)。片手を添え安定させゆっくり滴下する。責任者は培養する場所と温度を告げる。

実験 A. 液体培地と細胞液の滴下・培養(2サークル/CGの場合):Aでは乾燥防止は不要。

1. 1) 左円だけに培地(B-Med)をスポイトで**2滴**、 2) 続いて Step2 で調製した細胞液(遠心再浮遊液)**1滴**を滴下。 3) 所定の場所に移動・静置し培養開始(時刻を記録)。
2. 右円をいつものように使うかを再確認する。例えば、20分後に、
3. 右円に1)と同じ操作を行い、5-10分間培養する。
4. 予告:つまり、5-10分後、左右を同時に固定(Step4)する。 その必要な物品と方法を分担して確認する。



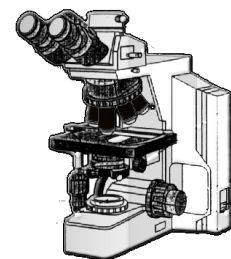
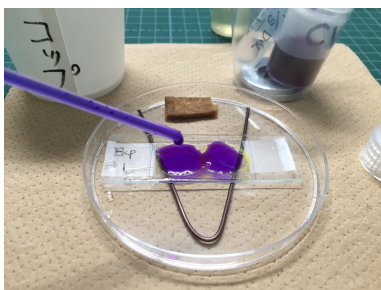
実験 B(OEKAKI). 遠心再浮遊した細胞液の滴下と培養

1. Gel 塗抹済み MC/CG 培養ガラスの円中央に、Step 2 で調製した細胞液を「**6滴**」滴下する。時刻を記録。
2. 所定の場所で最低90分は培養するが次のような乾燥防止を図る。 つまり、小さな濡れ紙をCG培養ガラスの側に置き、シャーレなどを被せ乾燥防止。注意:濡れ紙とガラスが接すると細胞液が浸透・消失する。
3. 室温培養が良いが、寒冷期は25℃程度が望ましい。チェック(____℃)。30℃以上ではゼラチンが膨潤し細胞が引き剥がす:28℃以下にする。 60分以上経過したら手にとって目視確認も可能。液が溢れたら改めて培地(B-Med)を滴下し、乾燥防止で培養を継続する。

Step 4 (共通). 固定・染色 ・・材料と配置を確認、所用時間は約__分。

注意:無害な酢酸-エタノール系固定液を用いる。固定液・染色液は飛沫しないように注意(付着したらすぐ水洗)。テーブルを整理する。物品確認(担当者1,2):使用済みスポイト2本を水洗・水切りし、ガラス小試験管に固定液と染色液を採取する(実験Aでは各1.5ml、実験Bでは各1.0ml)。水洗用の水カップを2つも用意。時計も。

1. 1) 下敷き(トレー)の上に紙ナプキンを数枚重ねて敷く。 2) CG 培養ガラスをその上に置く。 スライドガラスの長辺が接した状態で短辺を立てて、そのまま数秒放置する(培地が吸引される)。**乾燥防止:すぐ次へ。**
2. 1) 濡れのない紙ナプキン上に戻し、 2) **固定液**(Fix:透明液)をスポイトを立て円中央に**2滴**ゆっくり滴下。 3) 固定液がサークルの外に流れ出た時は液が載っていない場所に改めて滴下する。 4) そのまま**3分(以上)**処理(放置)する。 5) この間に次の操作(水洗)の水カップ2つなどを用意する。
3. 1) 固定液(透明液)を「**廃液入れ**:明記した紙コップ」に捨て、 2) 水(カップ)に漬け、やさしく揺すりながら5秒ほど水洗。 3) 新しい水カップでもう一度。 4) 1)と同じように、紙ナプキンに立て水を吸引。
4. 1) トレーに戻し、 2) **染色液**(青液)を滴下(実験Aは**2滴**、実験Bは**3滴**)。 3) 染色液が流れ出た時は液が載っていない場所に改めて滴下。 4) **3分(以上)**染色。 5) この間に紙コップの水を変える・準備する。
5. 1) 染色液を所定の「**廃液入れ**」に捨て、 2) **水紙コップ**に5秒ほど浸ける。 3) 軽く水切り後、次の水カップに同様に浸け、水洗する。
6. 1) テープを丁寧に剥がし、 2) CGの細胞染色面を上にして紙ナプキン上で乾燥(完成)。あるいはStep5へ。

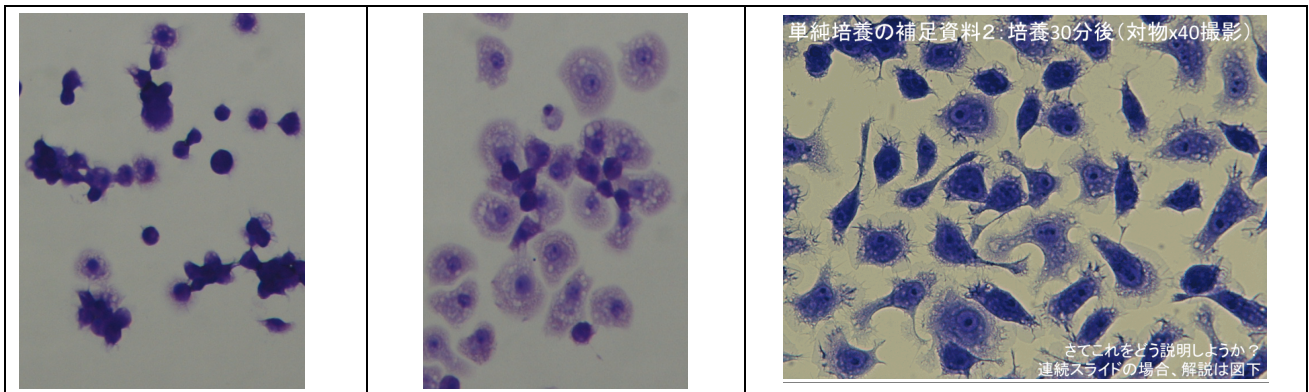


固定・染色のイメージ(固定処理のイメージは省略)

水封入(Step5)と観察

Step 5 (共通). 顕微鏡観察 (すぐ観察のための水封入法) 材料確認後、約__分で終了してください

1. 水分を拭き取ったスライドガラス(SG)を紙タオルの上に置き、 そのガラス中央に水道水1滴を滴下。
2. カバーガラスの細胞染色面を下にして「滴下水」の上に丁寧に載せる(カバーガラスは自然に張り付く)。
3. ガラス上面の水濡れを紙ナプキンの角で丁寧に吸水除去。**注意:**カバーガラスは押し付けてはいけない。
4. スライドガラスの裏面が濡れていない事を確認後、顕微鏡で観察する。油性ペン目印などで焦点合わせ。
.....
5. 水封入細胞標本(カバーガラス)を剥がす時は、指で CG スライドさせてはいけない。 紙コップの水に浸し、軽く揺ると自然に剥がれ落ちるはず(あるいは CG 面を霧吹き・濡らす)。 ピンセットなどを用いて CG を丁寧に取り出す。オモテ面を確認。 乾燥して保存。
6. 乾燥標本は封入なしでも観察が可能であるが、より明瞭にするには封入標本(永久標本)とする: 下記を参照。



観察結果. 左:培養 5 分後、中:培養 30 分後、右:構造が明瞭な標本。セット2を参照し構造から考察。

<補足 : ドライ封入標本の作り方>

封入標本を作る場合、その封入剤は化粧品(爪トップコート:100 円ショップ)の超速乾性(60 秒で乾燥)を用いる。その他の封入剤を用いると時間経過とともに脱色するので注意。

- 1) 綺麗なスライドガラスの中央にトップコートを少量滴下する。
- 2) 細胞染色面を間違えないようにください。CG 培養染色標本の細胞面を下にしてトップコートの上に載せる。
- 3) 十円硬化など軽いオモリをカバーガラスの上に載せ、ゆっくり密着させる。・・完成です。観察してください。

細胞標本観察の指針

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 (の考察) | | C. 繋がりの効果:区分・状態・結果 |
|--------------|--------------------------------------|---|
| A. 要素 | 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. 配置 | a. 単離独立: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。 1. 円形(無軸放射状)、 2. 不定形(多軸放射状)、 |
| | b. 近接隣接:複数の細胞が平面的に集まっている。 | 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) |
| | c. 上下配位(凝集塊):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。 |
| | d. 均等隣接:実験 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: 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」に基づき簡単な絵にしてみましょう(上から見た図)。