

生命科学教育の教材化を目的とした 細胞培養法の簡易化

細川友秀¹⁾・谷岡直子¹⁾・森本容子¹⁾・嶋田 浩¹⁾・辻本 学¹⁾・早瀬善仁¹⁾

Simplification of a Cell Culture Procedure for the Education of Life Science

Tomohide HOSOKAWA・Naoko TANIOKA・Yoko MORIMOTO・Hiroshi SHIMADA・
Manabu TSUJIMOTO and Yoshinori HAYASE

抄録：学生実験の教材化を目的として、クリーンベンチ（無菌箱）を使用しないで通常の実験台の上で無菌操作を行い、癌細胞を培養することを試みた。実験は本学2回生有志、我々の研究室の卒業研究生、本学大学院修士1回生によって行われ、どの学生グループにおいても細胞培養中への微生物の混入は非常に少なく、良い成績を収めた。実験操作の各段階での十分な注意を怠りさえしなければ、知識と経験の少ない学生でもクリーンベンチなしで簡単な無菌操作を行うことができる。10人以上の規模で行うような学生実験で無菌操作と細胞培養を基本とする教育実験を組み立てる場合は、学生実験室内の空気の清浄化に努力する必要があると考えられる。

キーワード：生命科学，学生実験，無菌操作，細胞培養，クリーンベンチ

Abstract

We attempted to simplify a cell culture procedure in order to introduce a simplified procedure into the educational experiments for students of the Life Science course. B16 mouse melanoma cells or EL-4 mouse T-lymphoma cells were collected from tissue culture bottles and were washed and counted, and aliquots of the cell suspensions were put in various tissue culture dishes by 5 undergraduate volunteers, 3 undergraduate students in our laboratory, and 6 graduate students. Every step of the procedure was manipulated on an ordinary bench without using a clean bench. In every experiment, few, if any, dishes were contaminated by microorganisms.

The present results encourage us to introduce the simplified procedure into educational experiments for undergraduates and to set up further trials.

Key Words: educational experiment, cell culture, mouse tumor cells, clean bench

1) 京都教育大学

I. は じ め に

近年、生命現象や生物の諸機能について細胞レベルと分子レベルからの解明が進み、その成果が医療、農業、工業、環境保全など広く人間生活の向上発展のために活用されつつある。このような生命科学のめざましい進歩は、今後われわれの生活を大きく変化させ、また、自然や生命の尊厳に関する考え方に大きな影響を与えらると思われ。たとえば、われわれは家畜はもちろん、ヒトの個々の受精、妊娠、妊娠の継続と誕生までも自由に左右できる技術を獲得しつつある。現代の社会では、生命科学とその技術の進歩がもつ意味とその可能性について、われわれは正確な理解力と判断力を必要とし、それゆえ、学校教育においても生命科学の教育は今後さらに重要性を増すと思われる。

生命科学の研究においては、無菌操作と細胞培養は重要な基本的技術のひとつである。例えば、株細胞の樹立、細胞のクローニング、細胞融合と目的の機能をもつハイブリドーマのクローニング、細胞への遺伝子導入と遺伝子導入細胞の分離などにおいて、無菌操作と細胞培養の技術は広く活用されている。このような生命科学の重要な基本的技術の一端を、自らの手を動かして体験できれば、学生にとって生命科学の内容もいっそう身近なものになるだろう。また、無菌操作によって培養される細胞は生命の基本単位であり、細胞の諸機能について学ぶ教材となり、さらに多細胞生物にそなわる感染防御機構について考察するための優れた教材となる。

学生実験で細胞の培養をする場合、制限条件となる装置は無菌操作のためのクリーンベンチ（無菌箱）である。費用と実験室の容積の点からこの装置を何台も用意することは困難である。ここではクリーンベンチを使用しないで、通常の実験室で、通常の生物学実験や化学実験で使用する器具を使って、無菌操作と細胞培養法の簡易化を検討した。

II. 材 料 と 方 法

細胞：われわれの研究室で維持している、マウスの癌細胞であるEL-4細胞（Tリンパ細胞腫）とB16細胞（黒色細胞腫）を使用した¹⁾。

培地：市販のRPMI 1640粉末培地（ニッスイ製薬）を蒸留水（2回蒸留）に溶かし、500mlの耐圧ビンに入れて121℃で20分間オートクレーブして滅菌した。7%の炭酸水素ナトリウム水溶液と30mg/mlのL-グルタミン水溶液とを、0.22 μ m-pore-sizeのミリポアメンブレンフィルター（マイレックス社）を通過させて滅菌し、それぞれ18mlと5mlを500mlの滅菌RPMI 1640培養液に加えた。さらに、市販の滅菌牛胎児血清（ギブコ社）を25ml加えてよく混合して完全培地とした²⁾。培地には抗生物質や抗菌物質を添加せず、乾熱滅菌した100mlの耐圧ビンあるいはオートクレーブした50mlのプラスチック（ポリスチレン）遠沈管に25mlずつ分注して冷蔵庫に保存し、2週間以内に使用した。

細胞の洗浄には、市販のイーグルMEM粉末培地（ニッスイ製薬）を蒸留水に溶かし、オートクレーブした水溶液（MEM）を使用した。

器具の洗浄と滅菌：メスピペット、コマゴメピペット、耐圧ビンなどのガラス器具やポリスチレン製の50ml遠沈管は使用前に洗剤により汚れを落とし、次に水道水で洗剤をよく洗い流し、さらに2回蒸留水で3回濯いで水道水を除き乾燥した。乾燥したガラス器具は乾燥器により160-170℃で1.5時間乾熱滅菌し、プラスチック遠沈管はオートクレーブにより滅菌した。

B16細胞のトリプシン処理：B16細胞は細胞培養用プラスチックシャーレに接着して増殖する。細胞を回収するために、接着している対数増殖期の細胞をカルシウムイオンとマグネシウムイオン

を含まないリン酸緩衝液 (PBS (-)) で洗い、次に、0.05% のトリプシン溶液少量に浸し、室温で数分間放置し、ピペティングにより細胞をシャーレから脱離し細胞浮遊液を得た¹⁾。

0.05% のトリプシン溶液は0.25% のトリプシン溶液 (阪大微研) を0.02% のEDTA-PBS (-) 液 (阪大微研) で5倍に希釈して得た。

細胞数の算定: 培養容器から回収したEL-4細胞、あるいはトリプシン処理によって培養容器から回収したB16細胞は、MEMに浮遊し攪拌した後、1000rpm、10分間遠心し上清を捨て、MEMに浮遊した。その細胞浮遊液中に含まれる生細胞数は、トリパンブルー (ナカライ社) をPBS (-) に0.2% に溶解したトリパンブルー液と細胞浮遊液を1:1 または3:1 で混合し、色素に染色されない細胞を生細胞として血球計数板を用い顕微鏡下で算定した³⁾。

細胞の培養: 完全培地に適当濃度に浮遊した細胞浮遊液を直径3 cm、6 cm、または10cmの組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン社、またはコーニング社) にそれぞれ2 ml、5 ml、または8 ml入れ、37°C、5% CO₂、加湿条件の炭酸ガス細胞培養器で培養した。一部の実験ではこれらのシャーレに加えて、12-wellのプラスチック培養プレートも使用した。(炭酸ガス培養器を使用しない場合は、細胞浮遊液を組織培養用プラスチックチューブまたはプラスチックボトルに入れ、密栓して37°Cの孵卵器で培養できるが、ここでは無菌操作を簡便におこなうことが主要な目的であるので孵卵器は使用していない。)

無菌操作と細胞培養実験の実施者: 大学の学生実験の教材化を主な目的としているので、実験の実施者を、本学理学科2回生の有志5人、我々の研究室の卒業研究生3人、理学科大学院修士1回生のなかから6人選び、一般的な実験技術と経験と知識のレベルが異なると考えられるグループ間の比較を可能にした。

Ⅲ. 結 果

(1) 本学理学科2回生による無菌操作と細胞培養の成績

このグループの実験実施者は高等学校で生物の講義を受けていない者がほとんどであり、本学の生物基礎実験の単位を1回生の時に取得している。50mlプラスチック遠沈管に分注した完全培地を25ml、同じく分注したMEMを50ml、25cm²のスクリーキャップ付プラスチック培養ボトル中で浮遊状態で増殖している、対数増殖期のEL-4細胞を1ボトルずつ各人が使用し、以下の操作をクリーンベンチを使用せず通常の実験台の上で行った。

- ① 乾熱滅菌したガラスピペットを使い、EL-4細胞を培養ボトルからオートクレーブした50 mlプラスチック遠沈管に移す。
- ② 卓上低速遠心機で1000rpm、10分遠心し、上清をピペットで吸い取り捨てる。
- ③ 残った細胞ペレットにMEM液を2ml加えてピペットで優しく攪拌し、得られた細胞浮遊液から100 μ l程度を3回サンプリングして、浮遊液中の生細胞濃度を測定する。
- ④ 適当量のMEM液を加えて、細胞濃度を 2×10^5 個/mlに調整する。
- ⑤ ④の細胞浮遊液をよく攪拌し、0.2mlずつ取り、3 cmの組織培養プラスチックシャーレ12枚にいれ、さらに完全培地を1.8mlずつ加える。13枚目のシャーレには完全培地のみ2 ml入れて、使用した培地が微生物に汚染されていないことを確認する。
- ⑥ すべてのシャーレを炭酸ガス培養器に入れ細胞を培養し、培養開始後、0-6日の適当な時点で3枚ずつシャーレをとり、それぞれのシャーレ中の細胞数を測定する。

あらかじめ、実験台と実験者の両手は70%エタノールで清拭した。また、ガラスピペットは

金属製の試験管立の上に置き、使用時にアルコールランプで熱した。培養ボトル、50ml遠沈管などについても、スクリーキャップの脱着時にアルコールランプで熱して微生物の混入を防いだ。上記の、70%エタノールによる清拭とアルコールランプによる器具の加熱操作は、以下の(2)から(4)の実験すべてで行った。

結果は、5人分65枚のシャーレのどれにも細菌、菌類の混入と成育はなかった。また、どの実験者による培養でもEL-4細胞は増殖したが、その増殖の速さは実験者により異なっていた。図1に典型的な例を示す。

(2) 本学理学科大学院修士1回生による無菌操作の成績

この実験者のグループは、生物、化学、物理、理科教育の各分野の院生で構成されている。50mlのプラスチック遠沈管に分注した完全培地25mlと、B16細胞を 1×10^6 個

／mlの濃度にMEMに浮遊した細胞浮遊液を2mlずつ50mlのプラスチック遠沈管に分注したものを、各人が使って以下の操作を実験台の上で行った。

- ① 乾熱滅菌したガラスピペットを使い、6cmの組織培養プラスチックシャーレ4枚に完全培地を4mlずつ分注する。
- ② B16細胞浮遊液をよく攪拌した後、そこから0.1ml、0.2ml、あるいは0.3ml取り、それぞれ①のシャーレに入れ攪拌する。残りの1枚のシャーレは培養液への微生物の混入の有無を判定するために使う。
- ③ すべてのシャーレを炭酸ガス培養器に入れ、2日間培養する。

結果は、6人のうちひとりが3枚のB16細胞入りシャーレうち2枚のシャーレに桿菌様の細菌の増殖がみられ、さらに培地のみシャーレにも桿菌様の細菌の増殖がみられた。残り5人のシャーレには微生物の混入はみられず、B16細胞は増殖していた。

(3) 本学理学科4回生（我々の研究室の卒業研究生）による無菌操作と細胞培養の成績

このグループの実験者は、すでに数回無菌操作と細胞培養の予備実験をクリーンベンチを使って行っている。耐圧ビンに分注した完全培地を100ml、50mlプラスチック遠沈管に分注したMEMを50ml、同じく分注したPBS（－）を20ml、同じく分注した0.05%トリプシン溶液を2ml、25cm²のスクリーキャップ付プラスチック培養ボトルにモノレイヤー状態に増殖しているB16細胞を2ボトルずつを各人が使用し、以下の操作を通常の実験台の上で行った。

- ① 培養ボトル内の培養液をピペットで吸い取り捨てて、PBS（－）で2回洗いPBS（－）を捨てる。
- ② トリプシン溶液を1mlずつボトルに入れ、室温に放置して細胞を離脱させる。

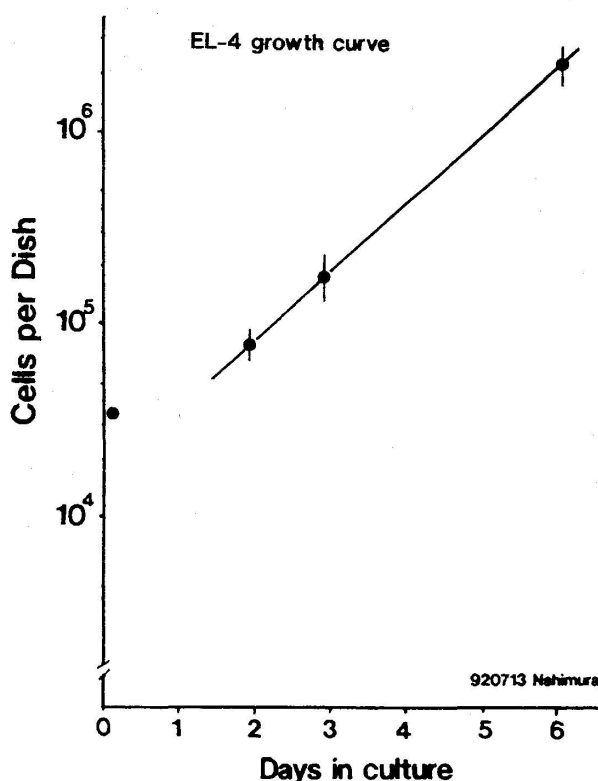


図1 2回生による培養で得られたEL-4細胞の増殖曲線の1例

- ③ 2つのボトルの細胞をピペットでよく攪拌して、プラスチック遠沈管に集め40mlのMEMに懸濁して1000rpm, 10分間遠心する。
- ④ 上清を捨て、完全培地に懸濁して細胞濃度を 1×10^6 個/mlに調整する。
- ⑤ ④の細胞浮遊液をよく攪拌し、その0.1ml, 0.3ml, 0.5mlを1枚の12-well培養用プラスチックプレートの各wellに、6cmの培養用プラスチックシャーレ3枚に、10cmの培養用シャーレ3枚に、それぞれ入れ、さらに完全培地をそれぞれ2ml, 5ml, 8mlずつ入れる。さらに10cmのシャーレ1枚に完全培地のみ8ml入れる。
- ⑥ すべてのシャーレとプレートを炭酸ガス培養器に入れ、10日間培養する。

結果は、ひとりのシャーレとプレートには全く微生物の混入は見られなかった。残り2人については、それぞれ2枚のB16細胞が入ったシャーレに連鎖球菌様と桿菌様の細菌の増殖が見られた。

(4) 実験室の空気の清浄さについての検討

完全培地を1mlずつ3cmのプラスチックシャーレ20枚に入れて、上の実験で使用した実験台の上でふたをとったまま放置し、5分, 15分, 30分, 60分, 240分後にそれぞれ4枚ずつふたををしていた（実験中は、その実験台の上ではその他の作業をしないようにしたが、実験室の中での作業は普通に行った）。そして最後の4枚にふたをした後、すべてのシャーレを炭酸ガス培養器にに入れて4日間培養した。その結果、30分の4枚のうちの2枚と240分の4枚のうちの1枚のシャーレに、連鎖球菌様と桿菌様の細菌の増殖がみられた。

IV. 考 察

3つの実験者グループによる無菌操作の実験結果を表1にまとめた。2回生による結果は微生物の混入が65枚のシャーレに対しゼロというものであり、実験経験と必要な予備知識がほとんどない学生でも、クリーンベンチを使わず通常の実験室内で簡単な無菌操作を行うことができることを示している。しかも、汚染されたガラス器具などの部分的な滅菌はアルコールランプによる加熱でも十分であることも示している。この研究は、来年度から新たに開設する本学3回生向けの生命科学分野の学生実験を組み立てるに際して、細胞培養と無菌操作を基本とすることが可能か否か検討することを目的のひとつとしている。そのため、現2回生有志の成績は非常に満足できるものである。また、この結果から、乾燥器、孵卵器に加えて、オートクレーブがあれば高等学校などでも、生物関係のクラブ活動で細胞培養と無菌操作に関連した教育と研究を行うことが可能であると思われる。

表1 各々の学生による培養における微生物混入の頻度－3つの実験のまとめ

	微生物が混入した培養数／全培養数				
実験1	0／13,	0／13,	0／13,	0／13,	0／13,
実験2	0／4,	0／4,	0／4,	0／4,	3／4
実験3	0／19,	2／19,	2／19		

第2グループの実験成績では6人のうちひとりが細菌を混入させたが、完全培地のためのシャーレにも混入が見られたことから、どこかの操作で培地を汚染させたためと考えられる。おそらくガラスピペットの先端部分を汚染したことに気付かず、アルコールランプによる加熱が不十分であった

のかもしれない。いずれにしても、クリーンベンチを使用しなかったことが細菌混入の原因とは考えられない。

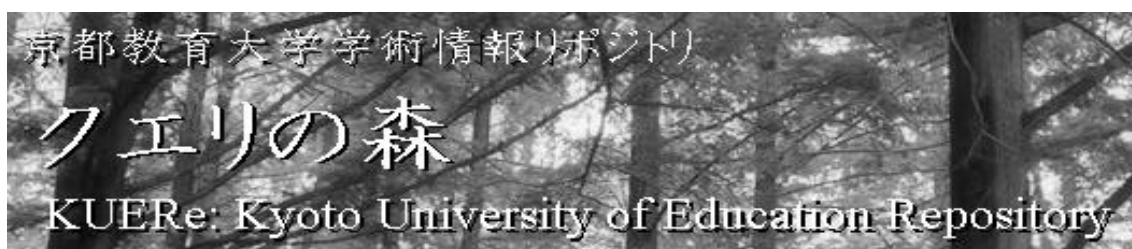
第3グループの実験成績は他の2つのグループに比べて悪いように見える。しかし、2つの培養ボトルからトリプシン処理によって細胞を離脱し、回収し、洗浄する操作が余分に加わっていること、培養するシャーレの底面積が広く容積が大きいものが含まれることを考慮すると、成績は悪くなく、むしろ良いといえる（細胞浮遊液や完全培地が軽度汚染した場合、個々のシャーレに分注する液量が少ないほど、そこに汚染微生物が混入する確率は小さくなる）。細菌を混入させた2人とも、2枚のシャーレにはそれぞれ異なった形状の細菌が増殖していたので、それぞれのシャーレを扱う操作で細菌が混入した可能性が大きい。これはクリーンベンチを使用しなかったことが原因と考えることもできる。しかし、これまでの経験では、クリーンベンチを使った通常の実験でもこの程度の頻度の細菌の混入はありうる。

今回の実験は、入り口で上履きにはきかえるようにして室内を比較的清潔に保った実験室で行った。実験4の結果から、直径3 cm程度の円形の口ならば5分間程度開放しつづけても、空中から微生物がその中に落下することはほとんどないといえる。このような条件であったので、クリーンベンチを使わなくても無菌操作が可能であったと思われる。また、同時に実験を行った人数が数人であったことも良い成績につながったと考えられる。学生実験では、土足で、しかも10人以上の者が室内を動き回るなどの悪い条件があるので、その点を今後検討していく必要があるだろう。

最後に、実験者になっていただいた平成4年度本学理学科自然科学コース2回生の有志諸君と本学理学科教育専修大学院修士1回生の6人の諸君に深く感謝します。

文 献

- 1) Nishi, Y., Hosokawa, T., Aoike, A., Kawai, K. and Kamahora, T. (1990) Early development of CD8-negative and CD8-positive MHC-unrestricted cytotoxic cells induced by alloantigen inoculation in mice. *Microbiol. Immunol.*, 34: 775-785.
- 2) Hosokawa, T., Hosono, M., Higuchi, K., Aoike, A., Kawai, K. and Takeda, T. (1987) Immune responses in newly developed short-lived SAM mice. I. Age-associated early decline in immune activities of cultured spleen cells. *Immunology*, 62: 419-423.
- 3) Hosokawa, T. and Cinader, B. (1983) Sensitized spleen B cells in tolerance-resisting SJL mice. *Immunol. Lett.*, 6: 51-57.



この文献は、国立情報学研究所において電子化されたものを、本学でテキスト加工したものです。

