

学校で簡易にできる

## ウズラ（ニワトリ）8日目胚細胞の初代培養

兵庫県立須磨東高等学校 薄井 芳奈

発生途中の胚の器官・組織の細胞をトリプシンを用いて解離し、培地を入れた細胞培養用のディッシュで培養します。それぞれの器官や組織が、さまざまな分化した細胞によって成り立っていること、それらの分化した細胞にはそれぞれ個性があり、細胞のはたらきに応じた特徴があることを観察し、細胞分化についての理解を深めることができます。

このような細胞の初代培養については、基本となる方法があり、生徒と共におこなうときには、その手法や手順の意味を正しく学び、理解するためにも、あまり省略簡易化した方法を用いることは勧められないと考えています。一方で、分化した細胞の姿を細胞が生きた状態で実際に観察することで得られる学びも大きなものがあります。そこで、ここでは、CO<sub>2</sub> インキュベータや位相差顕微鏡、また、血清や EDTA などを使わずに、主に観察のために教師が、少ない試薬と学校にある備品を利用して初代培養をおこなうことを想定した方法を紹介します。

なお、この実験に関して、基本となる正しい操作手順は兵庫県立大学大学院生命理学研究科 餅井真准教授のご指導によるもので、簡略化については高校でおこないました。

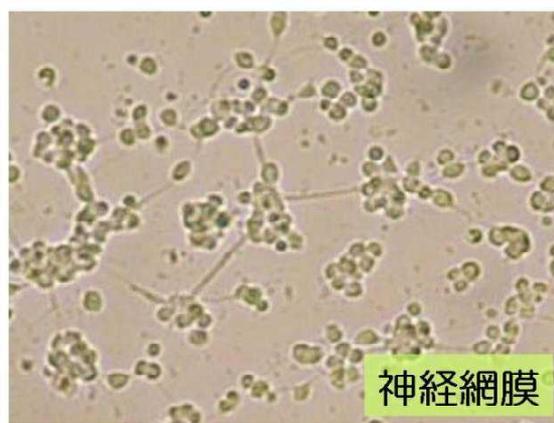
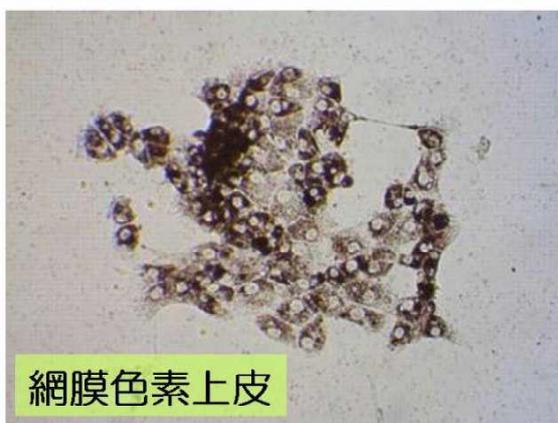
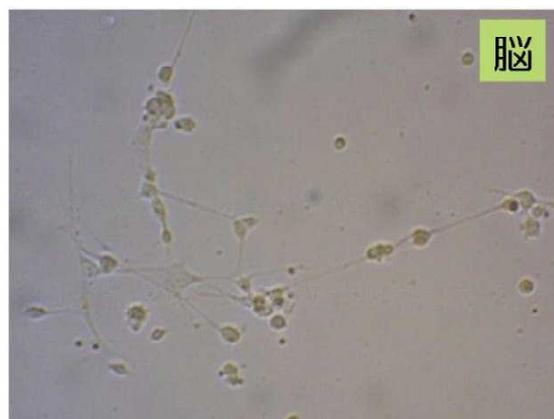
### 1. 8日目胚の器官形成の状態について

ウズラやニワトリの胚は、孵卵後8日目になると、すでにひとつおりの臓器が形成されてきています。小さいので解剖は実体顕微鏡下でピンセットを用いておこないますが、臓器の位置関係は成鳥のものに近く、よりシンプルで分かりやすいという利点もあります。脳や眼球、心臓、気嚢も観察できる肺、消化管、すい臓、肝臓、脾臓、雌雄の違いがはっきりと分かる生殖腺、腎臓、など、各器官の特徴がはっきりとしてきています。拍動する心臓、緑色の胆汁が溜まった胆嚢、さらにそれが通って管内部が緑色になっている十二指腸、など、構造と共にすでに機能もしながら発生が進んでいることも分かります。対象とする生徒の意識に十分配慮する必要がありますが、各器官やモモの骨格筋などは、市販されている食用の鶏レバーや骨付きモモ肉と外見もそっくりなものが多く、大きさを比較しながら写真などで紹介することも可能でしょう。



## 2. 簡易な初代培養による観察例

以下の写真は CO<sub>2</sub> インキュベータを用いずに 1 日だけ培養したものをシャーレごと生徒用顕微鏡のステージに載せ、しぼりを絞って観察撮影したものです。心筋では、ひとつの細胞やいくつかのつながった細胞、また、細胞のかたまりが拍動する様子も観察できます ([動画はこちら](#))。



## 3. 新規購入等の準備が必要なもの

～参考～ 商品名 メーカー名 (商品番号)

\* 培養用シャーレ小 : 35 mm Tissue Culture Dish IWAKI (3000-035)

\* 細胞培養液 : 動物細胞培養用汎用培地 GIT (ギット)

日本製薬(株) 製造 和光純薬工業(株) (398-00515) 500mL ¥6000程度

…血清、抗生剤抗真菌剤を別途購入して混ぜる必要のない動物細胞用オールインワン培地

\* トリプシン : 学校に粉のものがあれば 0.5% PBSに溶かす

\* PBS : D-PBS(-) 和光純薬工業(株) (045-29795) 500mL ¥1200程度

\* ガス濃度調整剤 カルチャーパルCO<sub>2</sub> 三菱ガス化学株式会社

2.5L容器用20袋入り ¥7000程度 2.5L専用容器 ¥7000程度

…CO<sub>2</sub> インキュベータがなくても密閉容器の中で二酸化炭素5%の環境を作れる

ただし、カルチャーパルなどで高CO<sub>2</sub> 環境を作らなくても培養は可能

## ウズラ（またはニワトリ）8日目胚細胞の初代培養

### 準備（組織2種類培養分）

|               |           |                     |            |
|---------------|-----------|---------------------|------------|
| ピンセット         | 2 本       | ウズラ 8 日胚            |            |
| 眼科ハサミ         | 1 本       | 70%エタノール(霧吹きに入れておく) |            |
| 滅菌シャーレ 大・中    | 1 枚ずつ     | 滅菌PBS               | 50 mL      |
| 滅菌シャーレ 小(培養用) | 2 枚       | 細胞培養液 (GIT)         | 5 mL       |
| 滅菌1.5mL チューブ  | 2 本       | トリプシン0.5%PBS溶液      | 5 mL       |
| 滅菌パスツールピペット   | 5 本       |                     |            |
| シリコン乳豆        | 3 個       |                     |            |
| 37℃インキュベータ    | 小型卓上遠心分離機 | 実体顕微鏡               | 生物顕微鏡 油性ペン |

操作はすべて滅菌状態で行う。使用する器具はオートクレーブ滅菌または乾熱滅菌するか、エタノールで消毒しておく。実験台、手などもエタノールで消毒する。

### 実験操作

1. ラップをテーブルに敷く。ピンセットとハサミと手を70%エタノールで消毒しておく。  
滅菌PBSを滅菌シャーレ（大、中）に充分に入れておく。
2. ウズラ卵の殻を70%エタノールでよく拭いて消毒する。
3. 尖った方を下にして、卵を縦にする。ハサミを用いて上部に直径 1cm くらいの穴をあけ、胚を滅菌PBSの入ったシャーレ（大）の中に取り出す。
4. 実体顕微鏡で観察しながら胚を解剖し、培養する器官（心臓、脳、肝臓、骨格筋（もも肉）など）を滅菌PBSの入ったシャーレ（中）の中に入れて軽く洗う。
5. 脳、肝臓は 1/3程度、もも肉と心臓は1つ分程度をとり、滅菌 1.5mLチューブに入れる。その他の器官、組織を取る場合も同程度の量を入れる。チューブに器官名を記入しておく。
6. PBS を0.5mL 加えたのち、ハサミをチューブ内に入れて器官を切り刻む。
7. 小型遠心分離機で遠心分離（3分）後、余分なPBSをパスツールピペットで吸って捨てる。
8. トリプシン溶液を 0.5mL加えて軽くボルテックスまたはピペッティングする。脳は室温で、その他の器官は37℃のインキュベータに5分間入れる。
9. 培養液を0.5mL加え、トリプシン分解反応を停止する。パスツールピペットで泡立たない程度に軽く吸ったり吐いたりして細胞を解離する。完全に細胞をバラバラにする必要はない。
10. 遠心分離（3分）後、余分な培養液を捨てる。
11. 細胞培養用シャーレ（小）に新しい培養液を 1.5mL入れる。シャーレのふたに（観察のじゃまにならないフチの方に）名前と器官名を記入しておく。
12. 沈殿した細胞に新しい培養液を0.5mL加えて、パスツールピペットでゆっくりと吸ったり吐いたりして沈殿をバラバラにする。大きな塊は取らず、バラバラにした細胞を培養液が入っている細胞培養用シャーレに、パスツールピペットで6~8滴程度入れる（濁って見える）。
13. 揺らさないようにシャーレをインキュベータ（37℃）に入れて静置する（1日培養）。
14. 翌日、生物顕微鏡を用いて細胞を観察する。浮遊している細胞が多い場合は、シャーレの培養液を捨て、新しい培養液を入れてから観察する。