

令和元年6月21日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01037

研究課題名(和文) 科学リテラシーを涵養するための動物細胞の培養技術の検討

研究課題名(英文) Experimental studies on the development of new animal cell culture technology for science literacy

研究代表者

浅賀 宏昭 (Asaga, Hiroaki)

明治大学・商学部・専任教授

研究者番号：80231877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の細胞の培養と機能の観察を中学・高校においても可能にするため、新しい実験方法の開発を行った。培養機材のクリーンベンチとインキュベーターについては廉価な材料で自作し、細胞にはサイズが大きく食作用の機能があること等からマウスマクロファージを選び、これに有色粒子を与えれば貪食の様子を観察しやすいと考えて検討した。その結果、蛍光ポスターカラーの粒子を細胞が貪食する過程を、位相差顕微鏡観察のほか、光学顕微鏡を用いての明視野観察、暗視野観察、およびブラックライトを用いた蛍光観察でも確認できることがわかった。培養後、核などの対比染色を行えば、光学顕微鏡観察に最適な多色の標本も作製可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学の研究の進展は速くなってきている。培養細胞を医療に用いた臨床研究の成功や細胞医薬品の実用化なども報道されていることから、研究成果の社会への応用も速くなっていると実感できる。一方、中学・高校において、ヒトに近い多細胞動物の細胞培養実験をして生徒に観察させることが出来れば、高い教育効果が得られると予想できるが、設備的、コスト的な問題があるため、これまでそのような実験はほとんどされてこなかった。本研究の成果は、中学・高校あるいは大学の教養の授業においても、哺乳類の細胞培養実験が可能であることを示し、またその機能である食作用の光学顕微鏡での新しい観察技術を開発した点で意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)： In order to make it possible to observe mammalian cell cultures and functions in junior and senior high schools, we developed new experimental methods. The clean benches and incubators for culture equipment were made with inexpensive materials, and mouse macrophages were selected as the cells for culture. We hypothesized that it would be easier to observe phagocytosis if color particles were given to cultured macrophages. As a result of examining these, it was found that the process of phagocytosing the particles of the fluorescent poster color can be confirmed by not only phase contrast microscope observation but also bright field observation, dark field observation and fluorescence observation using a blacklight. Moreover, after the culture experiment, it was possible to prepare multi-colored specimens suitable for light microscope observation by performing counterstaining of nuclei or the cytoplasm.

研究分野：細胞生物学および生物教育

キーワード：動物 細胞 培養 食作用 生物教育 科学教育 実験教材 科学リテラシー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生命科学は日進月歩の分野である。これを象徴するのが 2007 年に論文発表されたヒト iPS 細胞作製の業績で、そのわずか 5 年後にはノーベル医学・生理学賞受賞、そして 7 年後には早くも同細胞を応用した臨床研究につながった。これはまた、この分野の研究成果の社会への応用も速くなってきていることを示している。

一方、教育現場におけるヒトなどの哺乳類の細胞の観察については、固定・染色されたプレパラートを顕微鏡で観るのが主であった。座学での関連話題として再生医療等について授業等で触れることはあっても、細胞が生きている状態での観察は実施が困難であったからである。従って、細胞の動的、機能的な側面を生徒・学生に誤解なく伝えられているのか、疑わしい点があった。

教育現場で生きた哺乳類の細胞を観察する実験が実施できない理由は、コストとスペースの 2 つの問題が大きいと考えられた。すなわち、この目的を達成するためには哺乳類の細胞を培養する必要があるが、そのために必要な無菌操作のためのクリーンベンチと、5%二酸化炭素 95%大気中で保温するためのインキュベーターがいずれも高価で大型の装置のため、中学校、高校、および大学の教養の授業などでは、コストとスペースの両面で阻まれてきたのが実情であった。

### 2. 研究の目的

上で述べた背景から、本研究の目的は、中学校、高校、および大学の教養の授業などにおいても、哺乳類の細胞を培養可能にし、細胞の機能も観察できる技術の開発に主眼を置いた。具体的には、教育現場でも使える無菌操作のための小型クリーンベンチと、5%二酸化炭素 95%大気中で保温するための小型インキュベーターを廉価な材料で工夫して自作することで細胞培養実験を可能にし、細胞機能の観察についても低コストでシンプルかつ容易な新しい実験系を開発することとした。

### 3. 研究の方法

まず、小型のクリーンベンチについては、市販のやや大型の半透明ポリプロピレン製コンテナの本体を利用し、これの一側面の一部を切り抜いて、操作のための手が入られるように加工した。これを実験台へ上下逆に（伏せるように）して置き、この状態での上部に孔を明け、ミリポアフィルターを通過した清浄な空気が入り流れるようエアークンプレッサーに接続した。内部には使用直前に点灯して滅菌するための UV 灯に加え、火災滅菌効果を得るための小型電熱器を置くことにした。

次に、5%二酸化炭素 95%大気中で保温するためのインキュベーターについては、培養皿を置くためのチャンパーに密閉式の食品用容器（容量 2~3L）を選び、培養の際には、温度計と重炭酸ナトリウム（重曹）とクエン酸の水溶液を適量入れたビーカーを内部に入れることとした。このチャンパーを 37℃ に置くことで培養を可能にしようと試みることにした。

細胞については、観察かつ入手が容易な細胞であること、培養した際に機能が観察できることが望ましいこと、培養が比較的容易であることなどの点から、マウスの腹腔マクロファージとした。この細胞は食作用が顕著な機能であり、食べさせるものを工夫すればインパクトのある観察ができると考えたからである。

### 4. 研究成果

小型のクリーンベンチについては、廉価な材料で組み立てられた装置ながら、細胞培養のための無菌操作が行えることがわかった。本体が比較的小型で、全側面が半透明なので通常の実験室で内部に蛍光灯をつけずとも明るい環境で操作できること、周囲にいる生徒・学生も無菌操作の様子を見学できることが利点であった。さらに、使用後はエアークンプレッサー、フィルター、UV 灯、小型電熱器などの一式を、本体に収納して蓋をして他所へ片づけられるという利点も確認した。

インキュベーターについては、チャンパーの内部に、炭酸水素ナトリウム（重曹）とクエン酸の水溶液を適量入れたビーカーと温度計のほかに、ニュートラルレッドを入れた細胞を含まない培養液（RPMI1640）を置き、この色を 5%二酸化炭素 95%大気環境が適切に維持されているかの目安とした。細胞を培養している培養液（10%の牛胎児血清を添加した RPMI1640）にも同色素を入れるのが常法だが、細胞の代謝物のため pH がやや低くなる傾向があることを確認していること、さらにチャンパー内の湿度を 100%近くに維持するためにも貢献していると考えられることから、細胞を培養していない培養液だけの皿を内部に置くことは必ずすべきであると考えられた。チャンパーを密閉して、37℃ の温浴か孵卵器、または家電として販売されている足熱器を利用して保温することで、培養が可能であることを確認した。

培養対象とした腹腔マクロファージは、マウスの腹腔にチオグリコレート培地を注射した 3 日後にシリンジを用いて氷冷したリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で採取して用いた。従来のマクロファージの食作用を観察する方法は、薄めた墨汁やシリコンビーズを与えて培養してその過程を観察するという方法であったが、より観察しやすい方法を探したところ、あるメーカーのポスターカラーが、適度な大きさの蛍光色のついたエマルジョン粒子を含んでいることがわかり、これを試したところ良い結果が得られた。すなわち、培養開始後 4 時間程度で貪食され

ていく様子が確認でき、しかもその様子は、位相差顕微鏡観察のみならず、明視野観察、暗視野観察でも確認できた。その上さらにこのポスターカラーのエマルジョン粒子は蛍光性があるため、励起光としてブラックライトを当てるだけで蛍光観察が可能であることも確認した。このことは大きな利点である。すなわち、顕微鏡観察においても、生きた細胞は透明のため高価な位相差顕微鏡での観察が常法であるが、この方法によれば、位相差顕微鏡を使用せずとも観察が可能であるからである。培養後には、細胞を固定し、核などの対比染色を行えば、光学顕微鏡観察に最適な多色の標本も作製可能であることを確認した。

以上のように、本研究では、廉価な材料で小型のクリーンベンチと5%二酸化炭素95%大気中で保温するためのインキュベーターの代替装置を工夫して作製することができた。これらを活用すれば、教育現場において障害となっていたコストとスペースの問題を解決して、細胞培養ができることとなった。また、細胞にマウスの腹腔マクロファージを選び、これにポスターカラーのエマルジョンを与えることで貪食させ、その過程を位相差顕微鏡観察のほか、明視野観察、暗視野観察、そして蛍光観察も可能であることを実証することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

「医薬品の副作用、有害事象、有害反応、および関連用語の使用における問題点について」2018

「テントは細胞だ！ アナロジーで考える場の重要性」2017

「ことわざの科学的な再検討 生命科学教育に有効な言語技術の開発を目的として」2017

「感染性のがん 個体間を移動するがん細胞」2017

「ことわざを応用した科学教育の実践」2016

〔学会発表〕(計2件)

「Mouse Macrophage Engulfs Color Emulsion Particles: A Study toward the Development of Novel Observation Method for Animal Cells」2018

「医薬品の「副作用」、「有害事象」、および関連用語の用法について」2018

〔図書〕(計3件)

『生化学きほんノート』2017

『知っておきたい化学物質の常識84 身近な有害物質から体に良いと呼ばれるものまで』2016

『知っているとお心できる成分表示の知識 その食品、その洗剤、本当に安全なの?』2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。