

# 学校現場で可能な植物培養細胞の簡易培養法の検討

松村拓也・佐野(熊谷)史

群馬大学教育実践研究 別刷

第30号 37～40頁 2013

群馬大学教育学部 附属学校教育臨床総合センター



# 学校現場で可能な植物培養細胞の簡易培養法の検討

松村 拓也<sup>1)</sup>・佐野(熊谷) 史<sup>2)</sup>

1) 佐野市立北中学校

2) 群馬大学教育学部理科教育講座

A simple method of plant cell culture usable at school.

Takuya MATSUMURA<sup>1)</sup>, Fumi KUMAGAI-SANO<sup>2)</sup>

1) Kita Junior High School, Sano, Tochigi

2) Department of Science Education, Faculty of Education, Gunma University

キーワード：植物培養細胞、マグネチックスターラー

Keywords : Plant cultured cell, Magnetic stirrer

(2012年10月31日受理)

## 1. はじめに

タバコ懸濁培養細胞BY-2 (以下BY-2細胞) は、その大きさと増殖の速さから、植物の細胞学や細胞周期の研究に盛んに用いられている<sup>1)</sup> (図1)。この細胞を材料とすることで細胞自体や細胞内構造、分裂細胞の観察を容易に行うことができる。そのため中学校、高等学校の細胞関連の教材として活用が期待できるが、ほとんど利用されていないのが現状である。その理由は培養方法にある。

BY-2細胞を液体培地に懸濁して静置してしばらくすると細胞は沈み、そのまま放置するとやがて酸欠で死んでしまう。そのため図2に示すように、研究室では恒温振とう培養機内でフラスコごと振とうすることによって懸濁状態を保ち、酸欠に陥るのを防ぐとともに細胞の周囲の環境をできるだけ均質にして盛んな生育を維持している。しかし、学校現場には懸濁用の恒温振とう培養機は普及していないため、このままでは教材としての活用が難しい。同じ細胞を固形培地上で培養した未分化の細胞塊であるカルスは学校へ持ち込

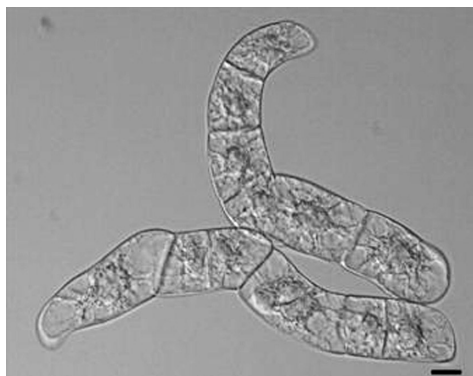


図1 タバコ懸濁培養細胞BY-2。スケールバーは10 $\mu$ m。



図2 振とう培養機で培養中のBY-2細胞の様子。

むことも容易な形状であるが、バイオテクノロジーの教材として示すことはできてはいても個々の細胞の観察には適していない。同じように懸濁状態で培養・維持されることが多い微生物や細菌の場合、大量培養する際にはファーメンターと呼ばれる装置がよく用いられる。この装置は培養槽内部の攪拌装置で液体培地ごと細胞を攪拌するものである。

そこで、実験室で液体の攪拌用途に用いている小型のマグネチックスターラーを使って培養液を内側から攪拌することで、BY-2細胞の培養が可能かどうかを検討することにした。マグネチックスターラーは磁石を水平方向に円を描いて動かす装置で、液体内に投入しておいた棒状の磁石（スターラーバー、回転子や攪拌子とも呼ばれる）を回転させることで液体を攪拌する装置である。この装置は小さいものでは10 cm角程度と場所をとらず、また1万円程度のももあるため、恒温振とう培養機（後述の機種は50 cm角、50万円程度）に比べれば手ごろであり、学校現場でも導入しやすいと考えられる。検討した結果、特定の形状のスターラーバーを用いることで数日間盛んな増殖を維持できることがわかったので報告する。

## 2. 方法

通常のBY-2細胞の懸濁培養は文献1にしたがって行った。まず、ムラシゲ・スクーグ培地（ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、和光純薬）を製造会社の示す濃度で蒸留水に溶解し、リン酸カリウム（混合塩類に含まれるものと合わせた最終濃度370 mg/L）、チアミン-HCl（最終濃度1 mg/L、以下同様）、myo-イノシトール（100 mg/L）、2,4-D（0.2 mg/L）、ショ糖（3%）を加えてpH5.8に調整した。作成した液体培地は容量300 mlの三角フラスコに約100 mlずつ分注してアルミホイルで蓋をしたのち、120°C、20分間加圧滅菌した。振とう培養の場合は、培地の温度が下がってから無菌的に培養7日目のBY-2細胞を5 ml程度植え継ぎ、恒温振とう培養機（タイテック、BR-23FP）にセットして27°C、130 rpm、暗所で培養した。マグネチックスターラーでの培養の場合は、加圧滅菌時に予めスターラーバーを入れておいた培地に植え継ぎを行い、スターラー（RS-1DN、アズワン、図3）に載せ、段ボールで遮光して培養を行った。培養開始0日～2日にか



図3 マグネチックスターラーで培養中のBY-2細胞。100 ml三角フラスコを使用。

けてほぼ同じ時刻に細胞を一部分取し、細胞計算板（OneCell、ケニス）を用いて細胞の密度を計算し、植え継ぎ0日目を1として計算して増殖を確認した。各培養法で実験は3回ずつ行い、再現性を確認した。

## 3. 結果と考察

### 3-1. 通常の振とう培養による増殖の確認

まず、通常の振とう培養におけるBY-2細胞の増殖を、増殖曲線を描いて確認した（図4）。振とう培養の場合、培養開始1日でおおよそ倍に増え、2日で約4倍、3日で約8倍と分裂細胞の増殖の特徴である指数関数的な増殖を示した。

### 3-2. 汎用型のスターラーバーを用いた培養

次に、マグネチックスターラーによる培養を試みた。用いたスターラーバーは、スターラーの付属品として提供された、直径0.9 cm、長さ2.0 cmの汎用型のもので

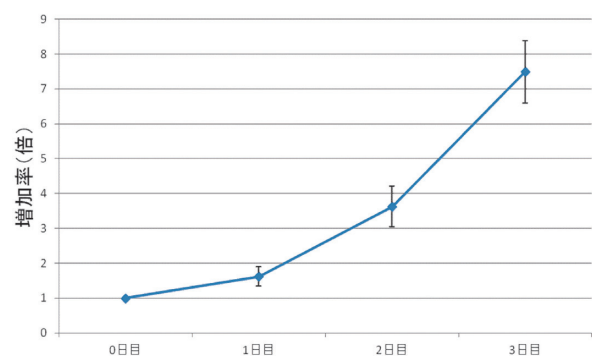


図4 通常の振とう培養におけるBY-2細胞の増殖。3回の実験の平均値をプロットした。エラーバーは標準誤差（以下同様）。

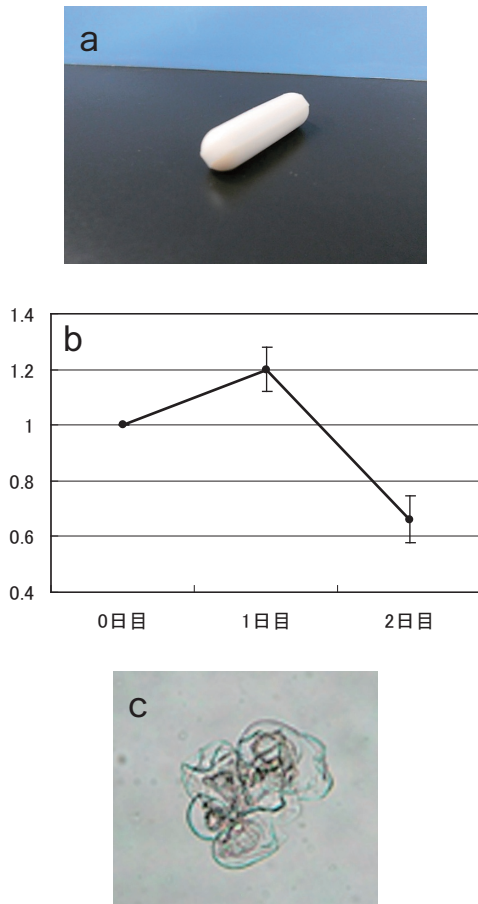


図5 汎用型のスターラーバーを用いた培養。a：用いたスターラーバーの形状、b：増殖の確認。c：壊れた細胞の一部。

ある(図5 a)。振とう培養の際の回転数が130 rpmであることから、スターラーバーの回転数を150 rpmに設定し、2日間培養を行った。培養開始1日では通常の振とう培養と同様におよそ倍に増えていたが、2日目になると培養開始0日より細胞の密度が低くなってしまった(図5 b)。このときの培養液を詳細に観察したところ、通常培養開始2日ではほとんど見ることがない死細胞が多く、さらに壊れた細胞の一部と思われる物体が浮遊していた(図5 c)。汎用型のスターラーバーを用いてBY-2細胞をいい状態で培養することは2日間という短期間であっても難しいことがわかった。

### 3-3. トライアングル型のスターラーバーを用いた培養

汎用型のスターラーバーをよく調べると、バーの中心付近が最も直径が大きく、端に行くにしたがって若

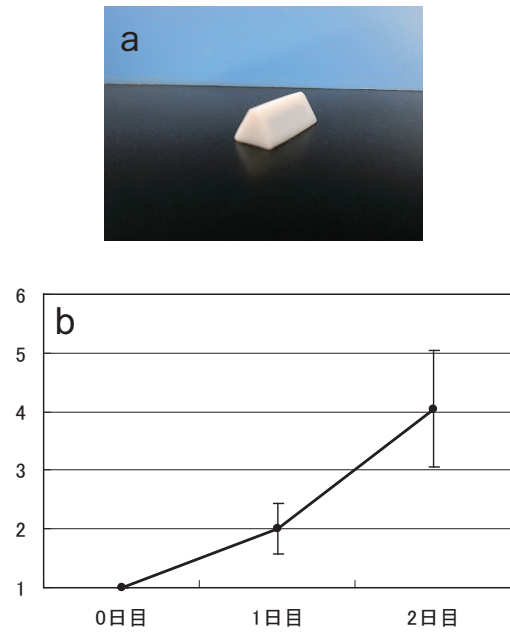


図6 トライアングル型のスターラーバーを用いた培養。a：用いたスターラーバー。b：増殖の確認。

干細くなっていた。そのためバーの中心付近を支点として回転した場合には細胞を含む培養液がバーとフラスコの底面の間を通り、その際に細胞がすりつぶされてしまうのではないかと考えた。そこで、市販のスターラーバーの形状を比較し、回転時にフラスコの底面との隙間が小さい、トライアングル型のスターラーバー(図6 a、三角形の一辺0.9 cm、長さ2.0 cm)を用いて培養を試みた。

その結果、培養開始1日、2日と指数関数的な増殖を示すことがわかった(図6 b)。同じスターラーバーで回転数を200 rpm、250 rpmに変えてみたが、増殖の程度に大きな影響は見られなかった(松村、未発表データ)。

## 4. まとめと今後の展望

本研究の結果から、トライアングル型のスターラーバーを用いたマグネチックスターラーによる培養により、振とう培養と同じような増殖率でBY-2細胞を培養できることがわかった。この培養方法であれば、必要なスペースはおおよそ20 cm角と小さく、学校の理科室でも十分培養できる。また、今回用いたマグネチックスターラーは定価2万円足らずと比較的安価であり、学校での購入も可能な範囲と考えられる。あるいは大学

で複数台揃えておいて、植え継いだ三角フラスコをマグネチックスターラーに乗せた状態で貸し出しを行うこともできるだろう。

BY-2細胞の利点は高い増殖率と細胞の大きさである。特に対数増殖期にあるときは、そのまま観察しても数%の分裂指数を示す。中学校では「生命の連続性」を実感させる実験として体細胞分裂の観察実験が行われるが<sup>2)</sup>、中学生が自分自身のプレパラートで分裂細胞を観察するのは容易でないようである。この実験は、ネギ芽生えなどの根端を固定、解離、染色して根端分裂組織内の分裂細胞で、体細胞分裂中の染色体を観察する実験である。しかし、観察に適切な試料を生徒の人数分調整するのは意外と手間がかかる上、作業が煩雑であり、さらに組織の細胞が重なっている場合、分裂細胞が存在していてもうまく見えないことがある。試料の調整に関しては細胞周期の同調を導入することで改善されるが<sup>3)</sup>、プレパラートがうまくできることが前提となる。BY-2細胞の場合、培養2日目で1 mlに $10^5$ 個程度の細胞が存在し、うち数%が分裂中であるため、培養中の細胞を1滴プレパラートにして観察するだけで分裂中の細胞が含まれる。組織内と異なり、解離の作業が不要な上、酢酸オルセインなどの染色液に含まれている酢酸の濃度である程度化学固定も行わ

れるようで、染色液と直接混合して少し押しつぶすだけで細胞核や染色体を観察することができる(佐野(熊谷)、未発表データ)。また、細胞が1列に並んでいることが多く、細胞が重なり合うことも少ないため、生徒が分裂細胞を見つけられる可能性が高いと考えられる。さらに、理科室で細胞を培養する様子が見られることで、バイオテクノロジーに対する興味・関心を喚起されるかもしれない。

今後は温度の影響についても検討し、より長期間培養するための工夫を考えていきたい。

なお、本研究は平成22~24年度日本学術振興会科学研究費(若手研究B, 課題番号22730684)の助成を受けて行った。

#### 参考文献

- 1) F. Kumagai-Sano, T. Hayashi, T. Sano, S. Hasezawa. (2007) Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. *Nature Protocols*, 1, 2621-2627.
- 2) 文部科学省(2008) 中学校学習指導要領解説—理科編一, 大日本図書
- 3) 佐野(熊谷)史(2012) 体細胞分裂観察実験への細胞周期同調手法の導入—大学学生実験における実践の試み—, 群馬大学教育実践研究, 29, 51-55

(まつむら たくや・さの(くまがい) ふみ)