

金魚の鱗細胞の初代培養 —教材開発のための研究—

Teaching material development: A method for primary culture of gold fish
keratocyte

野口立彦
(生物学科目)

(2025 年 1 月 14 日受理)

I. はじめに

生物学では、細胞が生命の単位であり、ヒトを含めた多細胞生物は細胞の集合した細胞社会であることを学ぶ^{1, 2)}。しかし、実習等の段階で本当に動物の身体を構成する細胞を取り出して観察をする機会を得る学生は稀であろう。初代培養は組織やそれを構成する細胞を実験的に取り出して培養液中で培養し、細胞の性質を観察することを可能にする技術である。しかし、設備投資が必要であることと、細胞種によっては手厚いケアが必要であり、初学者の実習には向かないというのが一般的な印象だろう。

魚類の鱗細胞（ケラトサイト）は、鱗表面を覆う上皮細胞であり、容易に取り出すことが可能である。また、そもそも魚の表面に露出している強靱な細胞であり、初代培養を行うのに適している。ケラトサイトをを用いた葉状仮足の運動と細胞遊走の研究は、アクチン細胞骨格調節と、細胞の移動メカニズムの解明に大きな役割を果たした^{3, 4)}。このため、大学の細胞生物学の教科書にも詳細が解説され、細胞生物学の分野において魚類ケラトサイトは有名な細胞である⁵⁾。

本研究では、安価で入手も飼育も容易な金魚からケラトサイトを初代培養する方法を検討し、学生が自分で細胞の初代培養を行い、細胞運動と細胞骨格の関係を実験を通して理解できるような実習をデザインした。過去に 4 年に渡り医学科 1 学年の少人数実習を通して出来上がったプロトコルをまとめたので、注意点などを含めて報告する。

II. 本研究の目的

1. 金魚のケラトサイトの教材としての研究。入手と管理方法、学生にとって容易な初代培養の方法、生細胞や蛍光染色した細胞の簡便化された観察方法、これら一連の実験を組み入れた実習の確立。
2. 学生が細胞運動をより良く理解できるようにするための教材開発、教育方策や実習展開の工夫と分析。

Ⅲ. 初学者向け実習としてのねらい

1. 本校の生物学の初学者（防衛医科大学校では、医学科及び看護学科の第一学年）向けの生物学実習において、生命の単位は細胞であり、環境を整えれば体外に単離して培養することが可能であることなど、私たちの身体についての基本的なルールを実習体験をもとに理解させる。
2. 培養下で運動している生きた細胞を自分の眼で観察し、解析することを体験させる。そして座学ではわからない細胞生物学の面白さの気づきへとつなげる。
3. 細胞培養は、顕微鏡観察や無菌操作など初学者には少し難しい操作も含む。実習では各操作の意味を説明しながら、合理的な実験操作の仕方、実験の段取りなど、常に能動的に考えながら実験する習慣を学生に身につけさせる。

Ⅳ. 実習の流れ

1. 実習前のレクチャー（下記Ⅴ参照）：
 - ① 人工的に恒常性が維持された環境を整えれば、高等多細胞生物の細胞も個体の死とは切り離して培養することができることを説明する。
 - ② 初代培養の手法の概要を説明する。また、初代培養と、無限分裂能を獲得し株化された培養細胞の違いを説明する。
 - ③ 培養実験に必須の無菌操作について、滅菌方法や感染症予防の観点から注意点などを説明する。
 - ④ 材料の金魚とその鱗の構造と働き、また細胞遊走やケラトサイトの研究の歴史について概説する。
2. 実験の実施：
 - ① 4～5名ずつ班を作り、培養と観察の開始。
 - ② 実験1～3について実施する（下記Ⅵ参照）。生細胞の観察法、阻害剤実験、蛍光染色については、都度時間を取って説明を行う。また、経験的に言うとして2班に1名程度教官や指導員を配置することが望ましい。
3. 結果のまとめとフィードバック：
 - ① 各班で記録したデータの解析をさせる。教官は各班の進捗について相談役として積極的に関わる。
 - ② 結果をスライドにまとめさせて班ごとに発表させる。
 - ③ 結果について全体でディスカッションをし、特に解析方法や結果のまとめ方について、教官から各班へフィードバックを行う。
4. 片づけ：

培養液の廃液など、特に注意点を明確にして片づけを行う（Ⅴ-1参照）。

Ⅴ. 実習を通して学生に与えるべき情報

本実験は必要な設備投資や実験ノウハウも多く、そのため学生を上手に誘導するには丁寧な説明と工夫が必要となる。実験の合間の待ち時間を上手に利用し、特に以下の事項について、予め情報を与えておくべきである。

1. 初代培養という技術についてとその注意点

- 組織培養の考え方：体内環境（温度、浸透圧、イオン濃度、pH など）は一定の条件に維持されている。この条件をシャーレの中で厳密に再現することで細胞を培養することができる。つまり培養液は体内で細胞が接している間質液に相当する。
- 実験器具の滅菌と無菌操作について：細胞培養向けの培養液は栄養に富むため、持ち込まれた雑菌はすぐに増殖してしまう。そこで、耐熱性の実験器具は乾熱滅菌（180℃、2 時間）や高圧蒸気滅菌（120℃、20 分）を行い、培養液などは無菌的なものを使用する。実習では雑菌を培養シャーレに混入させないための無菌操作についてデモンストレーションを行う。一方で、鱗は魚の体表にあるため、雑菌を含む。そこで培養液には必ず抗生物質を規定量加えて雑菌の増殖を抑える。
- 血清を使用することについて：組織培養では、一般的にウマ血清やウシ胎児血清を 10 ～ 20% 程度培地に添加する。これは、培養液に含まれる成分だけでは足りない様々な栄養や刺激因子などを血清が含むからである。ただし、研究用に販売されている血清は病原体の混入を極力抑えているとはいえ、実習をする場合は、ラボグローブを着用し、培養液の廃液や使用した器具については次亜塩素酸処理やオートクレーブなどを行ったうえで廃棄することを教育し徹底させる。

2. 観察方法について

- 位相差光学系を搭載した倒立顕微鏡について：倒立顕微鏡は、正立顕微鏡とは光路を上下逆向きにすることで、培養シャーレに入った試料の観察に適した構造になっている。その操作方法については概説が必要である。生物（明視野）顕微鏡は試料を通過した透過光をそのまま拡大して観察するため、染色されていない生きた細胞は無色透明でほとんど見えない。これに対して位相差顕微鏡は、屈折率の異なる物質を光が通過する際に生じる位相にずれを利用しコントラストをあげるため、屈折率の異なる細胞膜や細胞小器官は可視化される。この原理を説明したうえで、位相差機能の有り無しで同じ細胞を観察させると教育効果が高い。
- 蛍光染色法と蛍光顕微鏡の原理：組織内で特定因子を発現している細胞や、細胞内の特定の細胞小器官に局在している因子だけを観察する場合、抗体のように標的因子に特異的に結合する分子を蛍光ラベルしてプローブとする。試料内に自家蛍光がなければ、暗い視野の中で標的因子がプローブにより染色された部分だけが明るく蛍光を発する。蛍光顕微鏡は、励起光を当てた時に試料から生じる蛍光のみを蛍光フィルターで集めて観察する特殊な顕微鏡である。

3. ケラトサイトという細胞について

- ケラトサイトは魚類の鱗表面に存在する上皮細胞で、主に傷ついた部分に駆けつけて傷の修復をする細胞であると考えられている^{3, 6)}。培養系では特徴的な扇型の葉状仮足を伸ばしてシャーレ底面を遊走する。遊走のスピードは

細胞ごとに異なるが、広く使用されている哺乳類の培養細胞で知られている速度の10倍程度の速度で移動する。葉状仮足を使った移動は哺乳類を含む多くの動物の細胞遊走で見られる現象であるため、細胞遊走のモデルとして研究されてきた。葉状仮足の伸展と縮退においては細胞骨格であるアクチンの重合と脱重合のサイクルにより起こる、アクチン繊維の網目状構造の構築と崩壊が重要であることが解明されている^{7, 8)}。

VI. 材料と方法

【材料】 金魚（和金）（図1a, b）(*Caracius auratus*)

品種は問わないが、和金が形態的にも価格的にも適当である。体長10センチ程度まで成長し、鱗の直径が5mm以上ある方が学生は取扱いしやすいだろう。

【器具と機材】

◆ 準備

高圧蒸気滅菌機、乾熱滅菌器

◆ 初代培養実験用

解剖皿、ピンセット（細型、No.5）*、プラスチックシャーレ（直径3.5 cm、tissue culture 用）*、カバーガラス*、両面テープ（Scotch 社）、ピペット（5 mL 用）*、電動ピペッター、パストールピペット（ゴム球付き）*、ラテックス手袋*、キムワイプ、パラフィルム、培養液廃液用のビーカー、マイクロピペット（p-1000、p-200）、マイクロピペット用チップ*、エッペンドルフチューブ*、オートクレーブバッグを設置したゴミ箱、バケツ（氷冷麻酔用）、クリーンベンチ、インキュベーター（CO₂ ガスは必要ない）、位相差光学系付き倒立顕微鏡、CCD カメラ（動画撮影用）、PC（カメラ操作＋画像解析用）、画像解析ソフト（image J）、excel

◆ 蛍光組織染色実験用

カバーガラス（22 mm × 22 mm）、スライドガラス、10 cm プラスチックシャーレ、アルミホイル、固定液廃棄用ビーカー、ホルマリン廃液用 50 mL チューブ、蛍光顕微鏡

【試薬】

◆ 初代培養用

培養液（ライボビッツ L-15 培地＋10%ウマ血清（ウシ胎児血清でも良い）＋1/100 ペニシリン・ストレプトマイシン溶液）*、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）*、0.2% トリプシン - 0.02% EDTA（ethylenediaminetetraacetic acid）-PBS*、サイトカラシン B（アクチン重合阻害剤）、DMSO（Dimethyl sulfoxide）、消毒用エタノール、次亜塩素酸水溶液（キッチンハイターで良い）

◆ 蛍光組織染色用

固定液（10%ホルマリン pH7.2）、0.1% TritonX-100-PBS、蛍光（Alexa488-）ファロイジン（インビトロジェン社の規定の濃度）、1 mg/mL DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）、封入剤（80%グリセロールか mowiol（Calbiochem 社））

注）上記の*印のものは無菌的なものを購入するか、あらかじめ滅菌処理したものを使用する。

【方法】

◆ 前日までの準備

- ① 金魚を金魚専門店か熱帯魚店で購入し、飼育管理する。使用する鱗の数によって必要な匹数を用意する。大きさによるが、一度に1匹から5枚程度を目安にする。
- ② 金魚は10分ほど氷冷麻酔をする。
- ③ クリーンベンチに移動し、急いでピンセットで鱗をはがし、鱗をとった金魚は直ちに水槽に戻す。鱗の外側面を3.5 cm プラスチックシャーレの底面にしっかりと密着させて、カバーガラスをかけて10分ほど静置。1つのシャーレに2～3枚の鱗とする。
- ④ カバーガラスを除去して付着した鱗の上から培養液を0.5 mLほど滴下し、シャーレの蓋をしてパラフィルムで周囲をシールする（L-15 培養液はpH調整にCO₂を使用しないので、インキュベーターを使用する場合も温度調節のみ。設備投資を節約するには良い培養液である）。室温で一晩静置する。鱗からケラトサイトが這い出し、シャーレ底面に移動する^{4, 6)}。

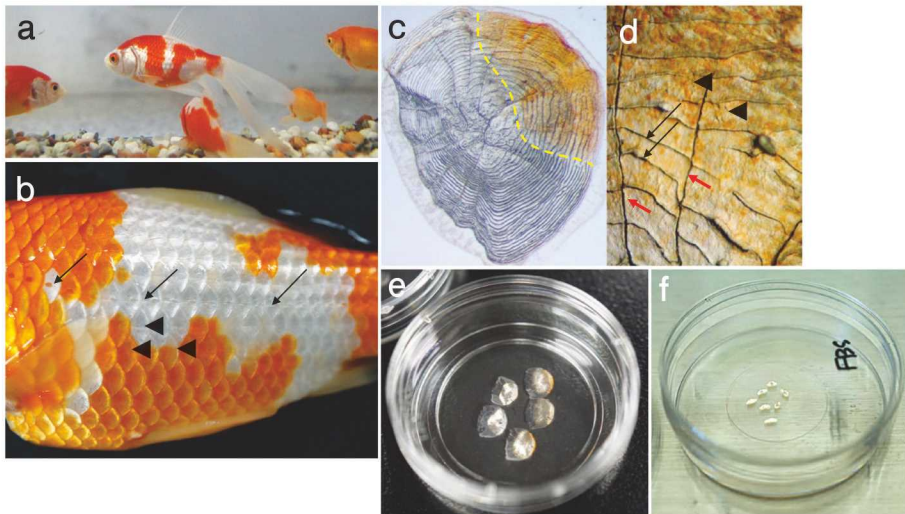


図1 金魚からのウロコの単離

- a. 金魚専門店や熱帯魚店で購入した和金。
品種により、様々な形態のパリエーションがあるが、少し大きい個体の方が実習には使いやすい。
- b. 体表を覆う鱗、金魚は円鱗を持つ（鑑）。体側に筋のように並んでいるのは感覚器官の側線（水圧や水流変化など機械的刺激を感知する。黒矢印）。
- c. 単離した鱗の微分干渉像。年輪のような同心円状の隆起線と放射状の溝条が観察される。体表に露出しているのは黄色点線より右側である。
- d. cのオレンジ色の範囲の拡大。この範囲は粘液に覆われて、色素胞（細胞）と共にケラトサイトが存在している。オレンジ色の色素胞（鑑）が見える。隆起線（黒矢印）、溝条（赤矢印）
- e. 鱗を1枚1枚ピンセットでつまんで剥がし、外側面が下向きになるようにおき、鱗表面とシャーレ底面を密着させる。
- f. ケラトサイトの蛍光染色を行う場合は、洗浄したカバーガラスに鱗を貼り付けて培養する。

◆ 実習当日の実験

班ごとに分かれて、以下の実験1～3を行う。各班で役割分担と実験の段取りを考えさせ、作業を開始する前に、以下の3点を確認する。

- (1) ラボグローブを着用すること
- (2) 培養液を流しに捨てないこと
- (3) 培養液を扱った器具はごみ箱に捨てずに、オートクレープバッグに捨てること
実験室の室温は22～25℃が適当である。

実験1：初代培養したケラトサイトの観察

- ① 溶液廃棄用のパストゥールピペットと廃液用ビーカーを用意する。
- ② 各班に配布された鱗の入ったシャーレのパラフィルムを剥がし、シャーレの蓋を開けて、培養液をパストゥールピペットで廃液ビーカーに捨てる。
- ③ 鱗をゆっくりピンセットではがし、鱗は廃液入れビーカーへ捨てる。
- ④ 2 mL の PBS を加えてパストゥールピペットで廃液する。この洗浄操作を3回繰り返す。洗浄を繰り返すことで鱗から持ち込まれた雑菌を減らす効果がある。また、血清にはトリプシンの阻害因子が含まれるので、血清を洗い流す効果もある。
- ⑤ 2 mL トリプシン-EDTA-PBS を加えて、約1分間静置。タンパク質分解酵素であるトリプシンと、細胞間接着に必要な Ca^{2+} をキレートしてしまう EDTA の作用により、細胞同士の接着が阻害され、細胞集団がバラバラになる。表面の粘液や色素胞などシャーレ底面に強く付着していない細胞を洗い流す効果も期待する。
- ⑥ トリプシン-EDTA-PBS を捨て、2 mL の培養液と交換する。上述の通り、培養液中の血清にはトリプシンの阻害効果があるので細胞の表面タンパク質の過度の分解を防ぐ。
- ⑦ 再び蓋をして、周囲をパラフィルムでシールし、培養液を加えて20分後から細胞が遊走する様子を位相差倒立顕微鏡で観察する。まず、細胞にはどのような形態のものがあるか分類させる。片側にだけ葉状仮足を伸ばして遊走するもの、複数方向に葉状仮足を伸ばすもの、細胞の周囲を360°取り囲むように仮足を伸ばしているものなど、さまざまなものがあるはずである。細胞遊走の観察には10倍か20倍の対物レンズ、葉状仮足の運動を観察するには、40倍か60倍の対物レンズを使用する。
- ⑧ 動画の記録条件は学生に検討させるが、おおよそ5秒から20秒に1フレームの割合で20分程度のタイムラプス撮影から始めることを薦める。動画を記録したら、細胞先端の葉状仮足の動きや細胞全体の移動の様子など、繰り返し再生して観察する。
- ⑨ タイムラプス撮影後に、作成された動画ファイルについては、image J などの画像解析ソフトを駆使して、低倍率動画については移動速度計測、移動経路の追跡と直進性の解析、MSD (mean square displacement) 解析、細胞の形態と移動速度の相関など、複数の測定方法を提示して細胞運動の性質をさまざまな角度から学生に自由に解析させるのが良いだろう。

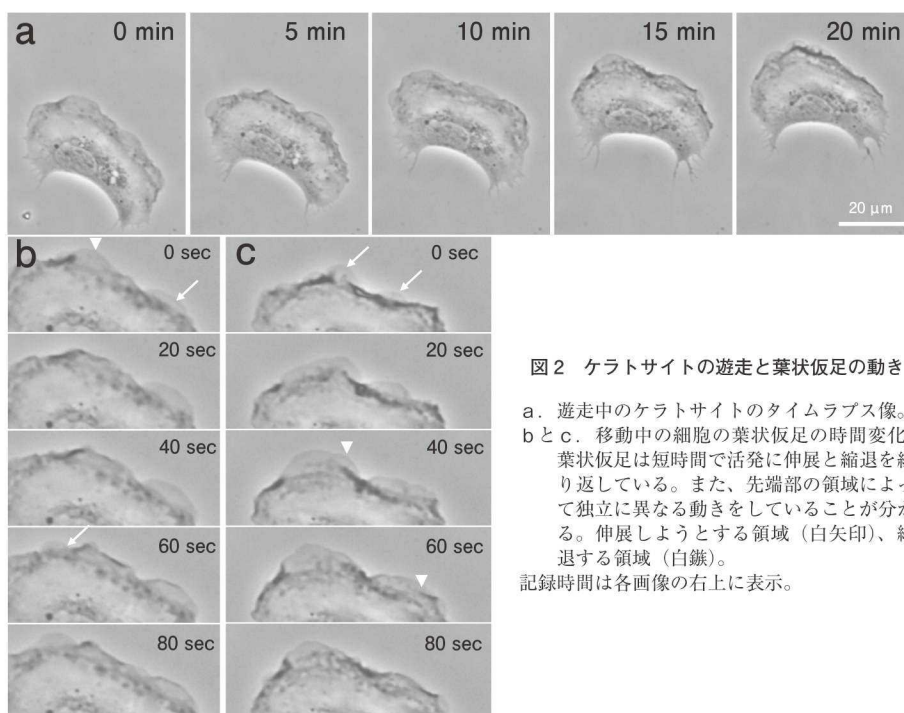


図2 ケラトサイトの遊走と葉状仮足の動き

a. 遊走中のケラトサイトのタイムラプス像。
bとc. 移動中の細胞の葉状仮足の時間変化。
葉状仮足は短時間で活発に伸展と縮退を繰り返している。また、先端部の領域によって独立に異なる動きをしていることが分かる。伸展しようとする領域（白矢印）、縮退する領域（白鋸）。

記録時間は各画像の右上に表示。



動画1 ケラトサイトの遊走
タイムラプス動画、5秒/フレーム



動画2 集塊を作るケラトサイト
タイムラプス動画、20秒/フレーム

実験結果：

通常の生物顕微鏡では無色透明なために観察が困難なケラトサイトの形態も、位相差レンズを使用して詳細に観察することができる。単独で遊走するケラトサイトの様子を5秒間隔のタイムラプス動画として撮影した（図2a、及び動画1）。高倍率の動画から、葉状仮足を活発に動かしながら前進する様子が分かる（図2b、c）。葉状仮足は、領域ごとに異なる複雑な動きをしており、伸展、縮退に加えて上方にめくれあがり動く様子なども確認できた。

遊走する細胞とは異なり細胞同士が接着し合っている細胞の集塊では、各細胞がそれぞれ異なる方向に葉状仮足を伸ばして引っ張り合いのような状態になっている（動画2）。しかし、移動しようとする力では細胞がちぎれることなく接着を保ったままである。

注）上記 QR コードから動画1と動画2を見ることができる。

実験2：アクチン重合阻害剤（サイトカラシンB）の影響

一般に細胞の葉状仮足の運動はアクチン細胞骨格が担っている。ケラトサイトの前進方向の先端付近で起こるアクチン繊維の重合により、葉状仮足の細胞膜が押し出されていることが、先行研究によって示されている^{3, 7, 8)}。本実習において、アクチン細胞骨格による葉状仮足の伸展と細胞遊走の関係性を確認する簡単な実験を行う。実験にはアクチンの重合阻害剤、サイトカラシンBを使用する。サイトカラシンBはモノマーアクチンに結合して、アクチンが重合しアクチン繊維となることを阻害する⁹⁾。実験は次の(1)～(3)を連続して1つの動画として記録する。

(1) 添加前5分間：

単独で遊走する細胞に注目して遊走の様子を記録する。動画は実験操作が入ることを考慮して、30秒毎に1フレームで撮影する。阻害剤の添加や培養液交換といった操作を行う際に、シャーレの位置が動かないように両面テープでシャーレ底面の縁を顕微鏡のステージに固定しておくのと標的の細胞を見失いにくい。

(2) 添加後10分間：

シャーレの蓋をとり、マイクロピペットを利用して最終濃度が0.5～2 µg/mLとなるようにサイトカラシンBを含む培養液1 mLを添加する。複数のシャーレが用意できるのであれば、複数の濃度について実験させるのも良い。添加した時点がわかるように添加している間の1フレームは顕微鏡の光量を下げて暗いフレームをわざと作ると動画を解析しやすい。

(3) 新しい培養液に交換して阻害剤を除去した後10分間：

阻害剤の効果が記録されたら、再び蓋を開けて廃液用パスツールピペットで培養液を吸い取り、新しい培養液を2 mL加える。この時も(2)同様、培養液交換の印として暗いフレームを1つ挟むと良い。

実験結果：

サイトカラシンB添加前のケラトサイトの移動の様子やその速度を記録しておくことは重要である(図3a)。サイトカラシンBを添加後、短時間で阻害効果が現れ、葉状仮足の縮退が始まり、やがて細胞移動が停止する。続いて葉状仮足はさらに縮退し、細胞は丸く変形してしまう(図3b)。しかし、培養液交換後、葉状仮足は徐々に回復し再び遊走が始まる(図3c)。

今回は、単独細胞の記録であるが、低倍率で細胞の集団の移動を記録し、image Jのparticle racking機能のプラグインを利用して、個々の細胞の記録から統計的な解析を試みても良い。

注) 下記QRコードから動画3と動画4を見ることができる。

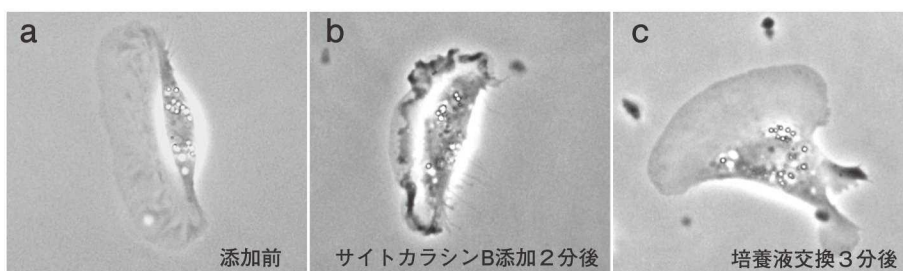


図3 ケラトサイトの遊走へのアクチン重合阻害剤サイトカラシンBの影響

- a. 遊走するケラトサイト（薬剤添加前）
 b. アクチン重合阻害剤サイトカラシンB（0.6 $\mu\text{g/mL}$ ）添加2分後。葉状仮足が激しく縮退し、この時点で細胞の移動は停止している。
 c. サイトカラシンを含まない新しい培地に交換して3分後。処理前とは異なる方向に、新たな葉状仮足が伸展し始めている。
 a～cは同一の細胞である。この細胞の動きは動画4で見ることができる。



動画3 1 $\mu\text{g/mL}$ サイトカラシンB処理

タイムラプス動画、10秒/フレーム

最初に画面が切り替わるタイミングで、薬剤の添加、2回目に切り替わるタイミングで培地の交換を行っている。



動画4 0.6 $\mu\text{g/mL}$ サイトカラシンB処理

タイムラプス動画、10秒/フレーム

最初に画面が切り替わるタイミングで、薬剤の添加、2回目に切り替わるタイミングで培地の交換を行っている。

実験3：ケラトサイトのアクチン細胞骨格の蛍光染色と観察

葉状仮足を伸展させるアクチン細胞骨格を観察するため、アクチン繊維に特異的に強く結合するタマゴテングダケ (*Amanita phalloides*) 由来のペプチド⁹⁾、ファロイジンに蛍光分子を付加した蛍光ファロイジンを使用する。同時にDNAに結合して蛍光を発するDAPIと共染色して細胞内のアクチン細胞骨格と核の位置関係を観察する。前日までの準備では、実験1と同様に鱗を採取し、カバーグラスに貼り付け、カバーグラスごとシャーレに入れて上から培養液を滴下し、一晚培養しておく。このカバーグラスはあらかじめメタノールと水で洗浄しておくことと細胞の付着性が良くなる。

- ① 実験1と同様に培養を開始し、細胞が遊走することを確認する。
- ② 培養液を除去した直後に固定液を2 mL 加え室温で15分間固定する。この時、PBSなどで洗浄せずに直接固定液を流し入れる。溶液を交換する際には、直接水流が細胞に当たらないようにシャーレの脇からマイクロピペットで溶液を入れる。
- ③ 固定液を廃液チューブに捨て、0.1% TritonX-100-PBSを2 mL 加え10分間静

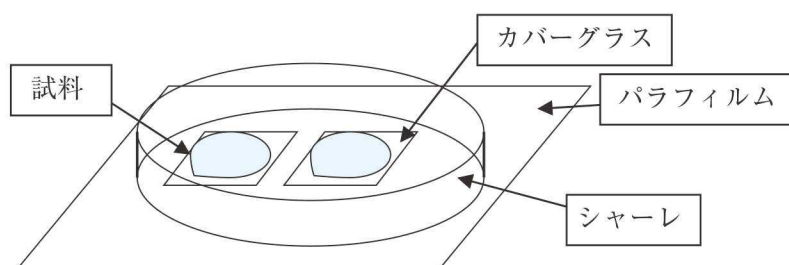


図4 染色の仕方

上からアルミホイルを被せて遮光し蛍光試薬の褪色を防ぐ。

- 置して、TritonX-100 の界面活性作用で細胞膜を壊す。
- ④ 2 mL PBS で洗浄、5 分間 3 回。
- ⑤ 細胞が付着したカバーグラスをパラフィルムの上に移し、1/300 希釈の蛍光ファロイジンと 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI を含む染色溶液をカバーグラスの上に 300 μL 滴下する。乾燥を防ぐため 10 cm のプラスチックシャーレ被せ、さらに上からアルミホイルを被せて遮光して 20 分間染色する (図 4)。
- ⑥ PBS で 2 回洗浄する。
- ⑦ キムワイプでカバーグラスの細胞の着いていない面の余分な水分を取り除く。封入剤をスライドグラスに一滴たらし、ピンセットを使って細胞のある面を下にしてゆっくりカバーグラスをスライドグラス上に下す。
- ⑧ 蛍光顕微鏡で染色した試料を観察する。蛍光ランプの電源を入れ適切な蛍光フィルターを選ぶ。本実験で使用する蛍光試薬は、Alexa-488 ファロイジンが青色励起光 / 緑色蛍光、DAPI が UV 励起 / 青色蛍光を発するので、対応する蛍光フィルターを選ぶ。特に葉状仮足のアクチン繊維については、高倍率 (40 ~ 100 倍の対物レンズ) で観察・記録する。
- ⑨ それぞれの蛍光像を記録した後に、各班の PC に画像データを移してアクチン細胞骨格と核の細胞内での位置関係が分かるように image J で画像の重ね合わせを行う。(1) 実験 1 で観察された葉状仮足にどのようなアクチン細胞骨格の構造が見られるか確認する。(2) それ以外の場所にも異なるタイプのアクチン細胞骨格の構造がみられるので、同様に観察・記述をする。(3) 遊走している細胞とそうでない細胞の違いや、単独でいる細胞と細胞同士で接着している細胞とでどのような違った構造が見られるか検討する。

実験結果：

蛍光ファロイジンと DAPI 染色により、ケラトサイトのアクチン細胞骨格を観察することができた (図 5)。扇形に伸展した葉状仮足の前方には、無数のアクチン繊維が交差するように並んで網目状構造を形成していることが観察された (図 5 a, b)。網目状構造の先端からの幅は一樣ではなく、局所的にアクチン重合が活発な領域とそうでない領域が存在することを示唆している (図 5 b, 黄色点線より左側の領域)。

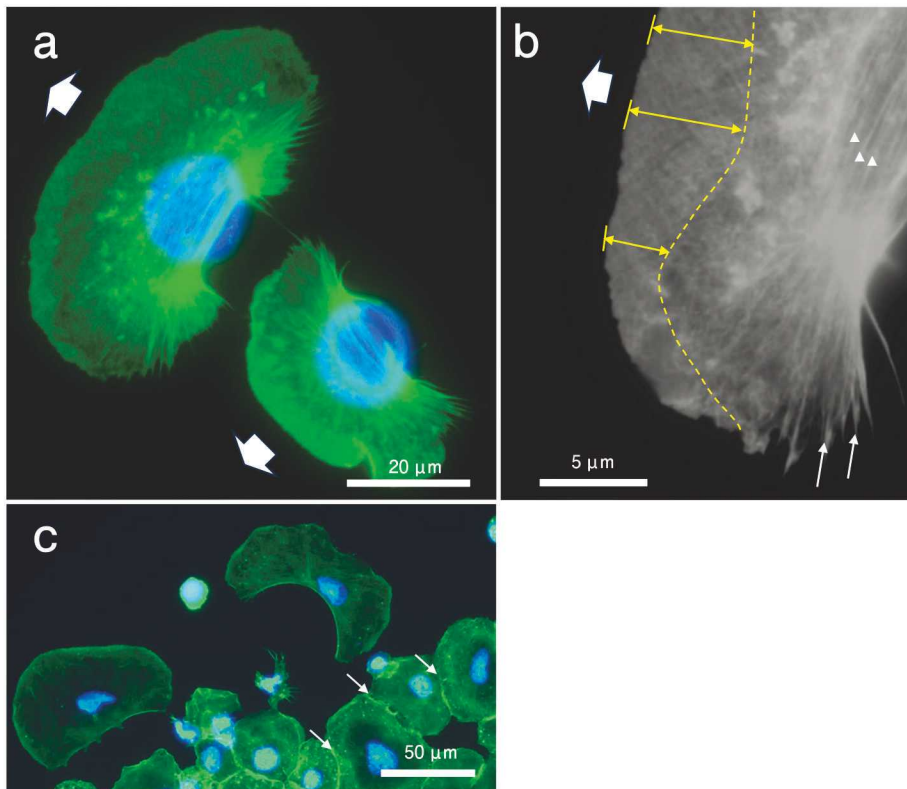


図5 ケラトサイトのアクチン細胞骨格

- a. 遊走中のケラトサイトの蛍光染色像。アクチン細胞骨格 (Alexa488-ファロイジン、緑色)、DNA (DAPI、青色)、細胞の進行方向 (白太矢印)。
- b. 葉状仮足のアクチン細胞骨格の拡大図。細胞の先端から黄色点線までの領域に網目状のアクチンの繊維が観察される (黄色両矢印)。網目構造の厚い場所は、葉状仮足が伸展している領域だと考えられる。伸展する葉状仮足に追隨して細胞核を前に引き寄せる繊維 (白太線) や細胞体を引っ張る時に生ずるリトラクションファイバーが細胞の後方に並んでいる (白細矢印)。
- c. 単独で遊走する細胞に比べ、接着し合っている細胞同士の間には接着構造を支える特徴的なアクチン細胞骨格の構造が見られる (白細矢印)。

先端付近のアクチン繊維が強く染色される領域と、核が青く染色される領域の間は、比較的繊維が少ない領域が存在する。その後側には核と核を取り囲み葉状仮足に引っ張られる形で細胞体を移動させるため平行に走るアクチン繊維の束が多数見られる (図5b、白太線)⁶⁾。

単独で遊走する細胞に比べ、接着し合っている細胞の接着領域には、接着帯を取り巻くように異なるアクチン繊維の構造が観察された (図5c、白細矢印)。

VII. 考察と今後の展開

令和7年度より、倒立顕微鏡などの必要な機材が適切な台数導入されることから、医学科第一学年の生物学実習で金魚ケラトサイトを初代培養する実習を行う。本報告はこれまで少人数の実習の経験をもとに作成した学生実習用プロトコールと、そ

の予備実験の結果をまとめたものである。

本実習の教育効果について：

脊椎動物の組織から培養された細胞を学生が見るのは初めてであるので、そのこと自体で学生の関心は高い。また、低倍率で顕微鏡を覗いて観察すると細胞の動きはほとんど認められないが、高倍率にしてタイムラプス像を記録することで、細胞運動の現象を認識することが可能になるという体験に刺激を受ける学生は多い。そしてデジタル化された画像を image J のさまざまな解析方法を使って解析することで理解が深まるという体験は、観察方法を工夫し、異なる視点から対象を捉えるという基本的な科学的思考に加え、データの扱い方の訓練としてもとても意義のあるものと考ええる。

顕微鏡の操作や無菌操作について、正しくできているか気にかかる学生は多い。そのような学生は、自分の行っていることによく注意が向いているので、質問に対して操作の意味などを丁寧に説明することで、考えながら実験する態度を学生に習得させる効果が期待できる。いずれにせよ本実験については丁寧な指導を必要とするため、特に学生に対してより多くの教官を配置するに越したことはない。

今回は単独の細胞の遊走を追う形の実験としたが、低倍率で細胞の集団を記録し、image J のパーティクルトラッキング機能等を使い、個々の細胞を追跡して移動速度や方向性などを定量することも可能であろう。学生にどのように PC を配布して使わせるか、画像解析の指導や方法の開拓など、まだ充実させるべきことは多く残っているのが現状である。

本実習は、倒立顕微鏡など設備投資が必要な上に、技術的にも難しい部分もあり、多人数の実習には不向きな部分もある。以下に設備投資を軽減するためにこれまでに試みた工夫をいくつか紹介する。

- ① 無菌操作をクリーンベンチで行わず、ガスバーナーの上昇気流で菌の落下を防ぐ簡易的な方法で代替することも可能である。1 日程度の培養であるので、気をつけて操作し培養液に抗生物質を添加しておけばほぼ問題ない。また観察前に培養液を交換することも効果的である。
- ② 今回使用している L-15 培養液は、既述の通り CO₂ インキュベーターを必要としないため、密閉して室温でインキュベーター無しでも培養することは可能である。
- ③ 倒立顕微鏡がない場合には、正立の生物顕微鏡に位相差光学系を装備できれば、工夫次第でケラトサイトを観察することは可能である。スライドガラスにビニールテープを貼り、中央を四角く切り抜いて、培養液を入れたプールを作り、ここにケラトサイトが貼り付いたカバーガラスを、細胞が培養液に接触するように被せると、簡易的な培養チャンバーができる。培養液の蒸発を防ぐためチャンパー周囲をワセリンなどでシールした状態であれば、数時間観察することが可能である。CCD カメラを装備した顕微鏡がない場合でも、スマートフォンを接眼レンズに装着する数千円のアダプターを購入し、スマートフォンのタイムラプス撮影機能を利用して細胞の動きを記録することは可能である。

- ④ 蛍光観察は蛍光顕微鏡が必要なため、実験3はオプションと考え、実験1、2の内容を充実させても十分なボリュームの実習となるだろう。

VIII. 謝辞

ケラトサイト実験の立ち上げ期に、統合ゼミの実習に参加して、さまざまなフィードバックをくれた医学科学生に感謝する。

IX. 参考文献

- 1) モリス生物学 監訳 八杉一郎、園池公毅、和田洋
- 2) 高校生物 東京書籍 監修 浅島誠ほか
- 3) The Shape of Motile Cells. A. Mogilner, K. Keren. *Current Biology*, 19, 2009 pp762–771.
- 4) Analysis of the Actin-Myosin II System in Fish Epidermal Keratocytes: Mechanism of Cell Body Translocation. T. M. Svitkina, A. B. Verkhovsky, K. M. McQuade, G. G. Borisy. *The Journal of Cell Biol.*, Vol. 139, 1997 pp397–415.
- 5) *Molecular Biology of the Cell* 7th edition. B. Alberts ほか 中村圭子監訳
- 6) Rotation of stress fibers as a single wheel in migrating fish keratocytes. *Scientific Reports* 8, 2018 pp10615-10624.
- 7) The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. R. D. Mullins, J. A. Heuser, T. D. Pollard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 95, 1998 pp6181–6186.
- 8) Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. T. M. Svitkina, G. G. Borisy. *The Journal of Cell Biol.*, Vol. 145, 1999 pp1009-1026.
- 9) Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. J. A. Cooper, *The Journal of Cell Biol.*, Vol. 105, 1987 pp1473-1478