

柴犬由来ガン細胞のポータブル保冷温庫での増殖について

ドルトン東京学園中等部・高等部

谷本直音（中2）

1. はじめに

中学校の理科では細胞を学ぶが、ディッシュや細胞培養フラスコで継続的に培養される培養細胞は維持管理に多額の費用がかかるため、扱いたくても扱うことができない。特に、培養細胞の維持管理に必要なCO₂インキュベーターは、その機械自体が高額であるだけでなく、二酸化炭素ポンプの定期的な交換が必要となり、維持管理費もかかる。この、CO₂インキュベーターは、細胞から出てくる乳酸などの酸性物質によって培地が酸性化してしまい、細胞が増殖しなくなったり、死んでしまったりすることを防ぐ機能がある。この時、CO₂インキュベーターでは培地のpHを一定にするために炭酸水素ナトリウムと二酸化炭素を利用する。具体的には培地に炭酸水素ナトリウムを加え、空気中の二酸化炭素を5%にして温度を37°Cに保つようになっている。しかし、炭酸水素ナトリウムのかわりにヘプスという物質を使うことで、二酸化炭素のコントロールをなくすことが可能と考えられる。これが実現すると、培養細胞の維持管理費を抑えることができ、中学校で培養細胞を扱うことが可能となる。

2. 方法

自分の研究では、簡単に動物培養細胞を増殖することができるようにすることを目的とした。ホームセンターで買うことができるポータブル保冷温庫でヘプスが入った培地を使って、細胞が増殖するか確認する。具体的にはすでにCO₂インキュベーターで培養可能な細胞（柴犬から作られたガン細胞であるCMMCを使用）をヘプスが入った培地に入れて細胞培養用フラスコで増やした後、培地を交換してからスクレーパーで細胞をはがした。細胞濃度を80万、40万、20万、10万細胞/mlに調製してから48wellプレートに0.1mLずつ入れた。つぎに新しい培地を0.1、0.3mLずつ入れた（*コントロールとして新しい培地を入れていない列もある）。このプレートを4枚用意し、ポータブル保冷温庫に入れて培養した。翌日、各wellに10%ホルマリンをスポイトで1滴入れてディフクイックで細胞染色を行った。具体的には、ホルマリンで15分固定し培地を捨て、「2滴ずつ入れ、10秒待ってから液体を捨てる」という動作を水色のディフクイック、赤色のディフクイック、青色のディフクイックの順に行った。最後に蒸留水を用いて染色液を落として乾燥させた。同じ作業を2,3,4日目に行い、4日間の細胞増殖の様子を観察した。

3. 結果

48wellプレートで培養した細胞を染色したものを図1に示した。培養1日目にはほとんど色付いていなかったが、2日目には「80万 cell/ml」の12wellが色付いていた。そのほかのwellも濃くなっていた。3日目になると

ほとんどのwellが濃くなっていたが、「80万 cell/ml+培地100μl」、「80万 cell/ml」のwellは薄くなっていた。4日目には「80万 cell/ml+培地300μl」も薄くなっていた。しかし、「80万 cell/ml」以外のwellは濃くなっていた。また、培地の多いwellの方が、色が薄くなり始める時期が遅かった。

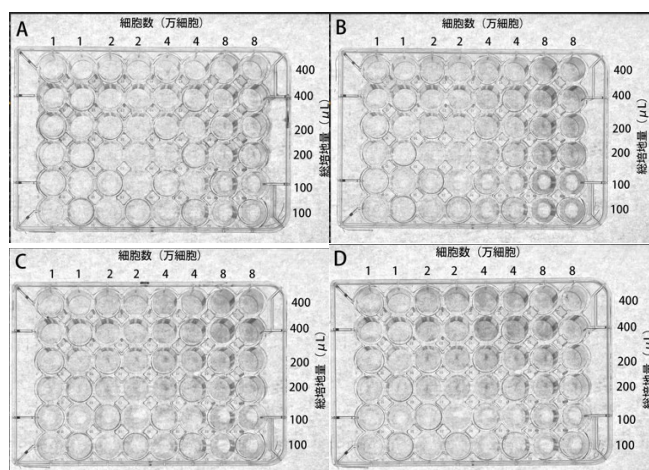


図1 ディフクイック染色後の様子

48wellプレートに、右から順に80万、40万、20万、10万 cell/mlを2列ずつ100μl入れた。また、上2行には培地を300μl、その下の2行には100μl入れた。このプレートを1日おきに4日分染色した。それぞれ培養から、A:1日、B:2日、C:3日、D:4日日経ったwellプレート。染色はディフクイックを使用。

4. 考察

2日目からだんだんと色が濃くなり始め、80万 cell/mlは3日目でも最も色が濃くなり、4日目でも色が薄くなった。また、培地の多いwellの方が薄くなり始める時期が遅かった。この結果から、ホームセンターで購入したポータブル保冷温庫でもヘプス入りの培地を使えば培養が可能だと考えられる。これらは10万~80万 cell/mlは2日目から増殖を始め、80万 cell/mlは3日目ごろに増殖のピークを迎え、4日目から死滅期に入ると考えられる。また、培地が多いと死滅期が遅れると考えられる。

5. 今後の展望

ホームセンターで買うことができるポータブル保冷温庫で培養することができたので、今後は理科同好会でも安価に細胞を使った研究を続けることが可能となった。この細胞はガン細胞なので、今後は抗がん剤や食品成分あるいは発がん物質の研究に取り組んでいきたい。

謝辞

本研究は公益財団法人双葉電子記念財団2020年度青少年創造性開発育成事業の助成を受けました