

組織培養の教材化Ⅱ

—ポリプロ袋とコーヒー瓶を用いた展開例—

渡辺克己

神奈川県立教育センター

Application of Tissue Culture Technics to School Education II

Katumi WATANABE

KANAGAWA PREFECTURAL EDUCATION CENTER

はじめに

組織培養は高等学校のほとんどの教科書に取り上げられ、身近なバイオテクノロジーとして、部活動を中心にかなり普及してきた。しかし、現在行われている方法は、一定の訓練の後に整備された条件の下で作業することを前提に組み立てられたシステムであり、今までの教材化研究の多くは、これを簡略化するか、装置や器具を代用する工夫であったように思われる。今後、普通科の高等学校において組織培養を教材化するためには、実験の目的を明確にした上で、適切な材料を開発し、限られた時間内に未経験な多くの生徒が同時に実験するための新しい総合的な培養・作業システムと指導法を確立する必要があると思われる。

今回は、生徒実験を目指した組織培養法の一部として、ポリプロ袋とコーヒー瓶を用いる方法について、ニンジン材料とした場合の展開例を、用具の製作と作業手順を中心に報告する。

用具類の製作

未経験な生徒を対象に複雑な実験を行う場合は、煩雑な作業を極力避けることが必要である。そのためには、実験の流れのなかで、適切な用具を多数準備し、作業の効率化を計らなければならない。

1) ニンジン固定器

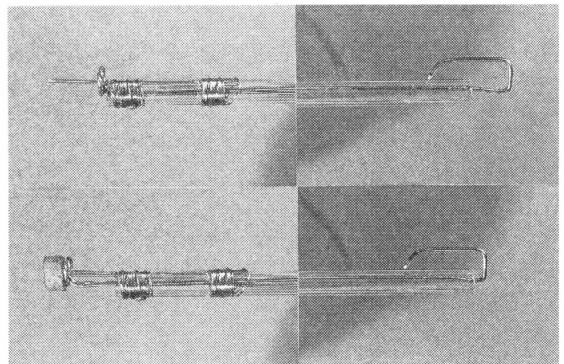
手を触れることなく、整形などの作業をするためにニンジンを固定する用具である。

菜箸を用いて太さ10mm、長さ150mmの柄を作り、

3本の太い針(有柄針用が便利)を、柄の先端から10mm程出るように針金を用いて固定する。

2) 組織片移植器

移植用ピンセットに代わるもので、培養容器の特定な位置に正確に組織片を移植するための用具である。ガラス管を押さえることにより組織片に針を刺して固定し、培養容器内に移動し、培地に密着させた後、ニクロム線を押すことにより組織片を放す仕組みになっている。



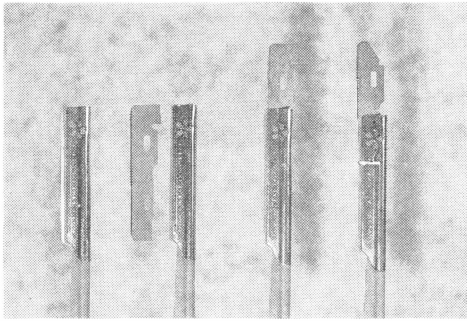
第1図 組織片移植器

①太さ5mm、長さ210mmのガラス管の先端にステンレス製の昆虫針を2本、細いニクロム線を用いて固定する。

②ガラス管内に太さ0.8mmのニクロム線を通し、長さを調節した後、両端部を適当な形に曲げる。

3) 剃刀製メス

解剖用メスに代わるもので、薄刃なためよく切れる。使いやすく組織を傷めない点で有効である。



第2図 剃刀製メス

①貝印カミソリ“ビューティM”の刃を外し、金切ばさみを用いて、刃の背側を2mm幅で中央部まで切り取る。

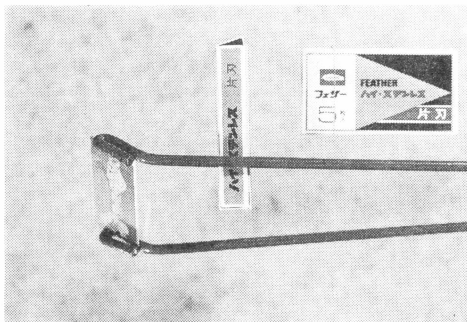
②加工した部分を再度ホルダーに納める(刃の1/2は出したままにする)。

③ホルダーの先端から20mmの所にやすりで傷をつけ、細い針金を巻き、刃をしっかり固定する。

④刃の形を整形する。

4) 整形用皮剥き器

後述の方法を行う際に必要となる、形成層外側の不用部分を削り取るための用具である。



第3図 整形用皮剥き器

①太さ3mmの、ビニールで被覆されている針金(園芸用支柱として市販されている)を、400mmの長さになり、中央で幅20mmのコの字形に折曲げる。

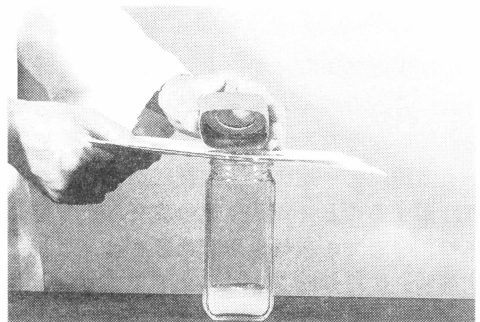
②先端部を揃え、15mmの所で同じ方向に折曲げ、剃刀の刃がやっと1枚挟める程度になるまで押しつぶし、さらに、反対側に45度曲げる。

③フェザークミソリ“ハイ・ステンレス片刃”を押しつぶした部分に挟み、刃の両端の窪み部分を利用して固定する。

なお、市販の野菜用の皮剥き器(柄の部分が耐熱性のもの)の刃を研ぎ、代用することもできる。

5) 培養容器(コーヒー瓶の蓋の加工)

今回は培養容器としてネスル日本株式会社製のインスタントコーヒー“ネスカフェゴールドブレンド”100g入りの空き容器を利用する。容器の蓋は、コーヒー瓶の蓋に穴をあけポリプロピレンフィルム(以後PPフィルムと表す)をコーヒー瓶の蓋と瓶の間に挟む方式とする。この容器は、蓋がワンタッチで容易に装着でき、誰が操作しても同様の気密性が得られることが最大の利点であるが、口も大きく角形で大きさも適当であり、現在多く用いられている200mlの三角フラスコよりも操作性において優れている。



第4図 コーヒー瓶の培養容器

①厚さ20mm程の木片をプラスチックの蓋の内側に入るように整形し、蓋に穴をあける際の支えを作る。

②ホール・ソウを電動ドリルに取り付け、パッキンを挟んだまま蓋に直径40mmの穴をあける。

③瓶はラベルをはがしよく洗っておく。

なお、一見同じ格好の瓶であっても、瓶と蓋の形が若干違う場合があるので、同じ組み合わせになるように注意する。

6) 蓋用PPフィルム

ポリプロ袋、OPP袋として市販されている製品は、いずれもポリプロピレンを素材としている。ポリプロピレンは耐熱性があり、このフィルムは雑菌を通すことはなく、酸素・二酸化炭素透過性に優れ、透湿性は低い。この性質を利用して組織培養容器の蓋の材料として使用する。

培養容器の蓋として現在多く用いられているガラス曲管付きゴム栓は、通気性・保湿性・雑菌の侵入

防止性の点で非常に優れている¹⁾が、ゴム栓の大きさにより利用できる容器が制限される点と、操作性において改良の余地があった。PPフィルムを用いる方法を開発することにより、多様な容器の利用が可能となり¹⁾、操作性が向上した。

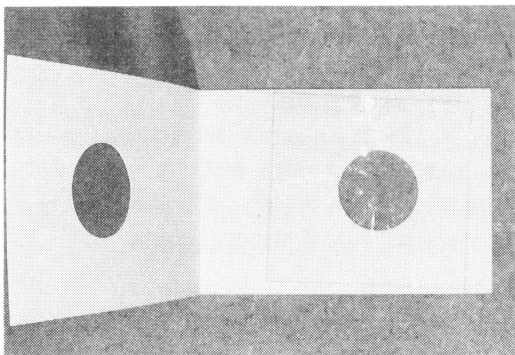
直径30mmの試験管により、厚さ20 μ mの二軸延伸ポリプロピレン膜(OPP袋)を用いて行った筆者の測定結果によると、酸素透過性はガラス曲管付きゴム栓の約1/3(0.3ml/hr)、透湿性は約3/4(0.11g/30days)¹⁾であった。

①蓋用PPフィルムとしては、野菜や果物の包装用として市販されている、みやこひも社製防曇OP規格袋“ミヤロンMF”Na13(260×380mm)を使用する。

②袋の周辺の接着部分を除いて、180mm×180mmの正方形に切断する。

7) PPフィルムホルダー

PPフィルムが薄い膜であるため、滅菌作業とコーヒー瓶に装着する際に必要となる用具である。



第5図 PPフィルムホルダー

①B5サイズの画用紙を2枚用意し、1枚の短い方の辺を20mm程折曲げる。

②折曲げた部分に他の1枚を挟みホッチキスで止める。

③画用紙を重ねたまま、中心部に直径80mmの穴をあける。この際、円切りカッターを用いると便利である。

④角形5号(190×240mm)の封筒を用意し、画用紙が取り出し易いように、封筒の蓋の部分にV字形の切れ込みを入れる。

無菌操作の流れ

I 準備作業

組織培養を生徒実験とする場合は、かなり多量の用具類や培地等を準備する必要があり、滅菌の方法と滅菌後無菌状態で保管する方法を工夫しなければならない。

1) 個人用具セットの準備・滅菌

実験中の滅菌操作を省くため、一人の生徒が使用する用具類はその生徒の専用とし、人数分だけ用具セットを作り滅菌する。太めの試験管にピンセット、組織片移植器、剃刀製メス等を入れ、口の部分にポリ塩化ビニリデンラップ(サランラップ等)を巻つける。120℃(ラップの耐熱温度は140℃である)で1時間以上乾熱滅菌する。外からセットの中が確認できることが必要である。

2) PP袋を用いた培地の滅菌

培養容器と蓋を別々に滅菌することにより、移植時の作業能率が向上する。培地の入った容器にPP袋“HEIKO ポリプロ袋”Na4(120×230mm)をかぶせ、口の部分に軽く輪ゴムをかける。滅菌後このままの状態でも室内に放置しても、雑菌が侵入することは殆ど無い¹⁾。

3) 蓋用PPフィルムの滅菌

PPフィルムをホルダーに挟み、これを1枚ずつ角形封筒に入れる。10枚まとめてPP袋に入れ、袋の口を折り曲げる。121℃で15分間の加圧滅菌を行う。袋の口を折り曲げたままにしておけば、雑菌に汚染される心配はない。

4) コーヒー瓶の蓋の滅菌

コーヒー瓶の蓋は耐熱性のプラスチックで造られているが、オートクレーブにかけると微妙に変形する場合があるので、チャック付きのビニール袋に蓋を入れ、70%エタノールを噴霧して滅菌する。エタノールは袋の表面から蒸発してしまうので影響は残らない。

II 組織片の切り出し作業

ニンジンを用いた組織培養では、コルクボーラーを用いて組織片を取り出す方法が行われているが、ニンジンは意外に硬く、作業が難しい、組織が傷む、組織片に形成層が含まれるか否かで結果にばらつきが生じ易い等の問題があった。ニンジンを周辺部分から形成層に近づくまで削り、形成層をリング

のまま培養することにより、作業能率が上がりカルス形成にも好結果が得られる。

1) 材料の選択

ニンジン細く、断面を見ると形成層部分が黄橙色で他の組織と明瞭に区別がつくものがよい。ミニキャロットは作業能率の点でも、カルスの生長速度の点でも、適当な材料である。

2) ポリプロ袋(PP袋)を用いた滅菌

ビーカーにピューラックスなどの殺菌剤を入れ滅菌作業を行う場合、ニンジンが浮き上がってしまったり、表面に泡が付いたりして十分な殺菌効果が得られないことがある。この点、PP袋にニンジンと殺菌剤を入れ、袋の口を絞って中の空気を出し、袋の外側から観察し操作を加えながら滅菌することにより、好結果が得られる。

3) PP袋を用いた水洗

滅菌作業の終了後、PP袋からニンジンを出さずに殺菌剤を捨て、代わりに滅菌水を入れる。水洗いの後、PP袋の口を閉じておけば滅菌された状態のまま維持され、その後の作業が容易になる。

4) ニンジンの固定

ニンジンでは形成層からカルスが形成される場合、組織片の茎端(生育時の上)面と根端(生育時の下)面では形成速度に大きな違いが見られ、茎端面からのカルス形成が著しい。このことから、ニンジンには明らかに極性が存在すると思われ、組織片の置き方によりその後のカルス形成に影響を生じる。

PP袋の中でニンジンを動かし、茎端を袋の入り口に向ける。袋の上からニンジンを抑え、茎端部にニンジン固定器の針をしっかりと刺し込む。

5) ニンジンの整形

ニンジン固定器の柄を握り、ニンジンの先端部(根端)の細くなっている部分を切り取り、断面で形成層の位置を確認する。次に、整形用皮剥き器を用いて、皮を剥く要領で周辺部の不用部分を取り去り、形成層が露出する直前まで進める。

6) 組織片の切り出し

剃刀製メスを用いて、形成層を含む厚さ1.5～2mm程の円盤状の植え付け用組織片を作る。組織片は茎端部を上にしてシャーレに並べておく。

Ⅲ 組織片の植え付け作業

原則として、無菌箱内では用具の滅菌を行わず、一人の生徒が滅菌した一組の用具セットを用いて実

験する、いわば使い捨て方式の採用と、班員が互に作業内容をチェックし合う相互指導方式を取り入れることにより、作業能率を一段と向上させ、実験の成功率を高めることができる。

1) 準備

①生徒の袖口から肘を包むようにラップを巻つけ、台所用の薄手の手袋をはめ、消毒用アルコールを噴霧する。

②無菌箱内でコーヒー瓶にかぶせてあるPP袋を外し、用具セットのラップをメス等を用いて切る。

③用具は試験管に入れたまま適当な位置に立てて置く。

④PPフィルムホルダーの入っているPP袋と、コーヒー瓶の蓋の入っているチャック付きビニール袋の口を開け、すぐ取り出せる状態にする。

2) 組織片の植え付け

①必要により組織片を再調整する。

②組織片移植器の針を円盤状のニンジン組織の中心部に刺す。この際、組織片の上下の關係に注意する。

③組織片をコーヒー瓶内の適当な位置に移し、培地の表面に密着させる。

3) 培養容器の蓋締め

①片手でPPフィルムホルダーを持ち、コーヒー瓶の口の真上に、穴の部分当てる。

②他方の手でコーヒー瓶の蓋を持ち、PPフィルムの上から押しつけながら蓋を締める。

おわりに

筆者が1988年に県立霧が丘高校において、34名の生徒を対象にして実施したイネの胚培養の実験は、2週間で期待する結果が得られ、生徒の満足度も高いものであった。また、今回の報告と同様な方法により、管瓶、遠沈管、シャーレ等様々な容器を用いた組織培養が可能であり、適当な材料を開発することにより、さらに教材化が進むものと期待している。

引用文献

- 1) 渡辺克己. 1994. 神奈川県立教育センター研究集録第13集