

文部科学省委託事業 ナノテクノロジープラットフォーム
令和元年 技術スタッフ交流プログラム参加報告書

研修テーマ：種々の顕微鏡を使った 細胞イメージング実習

研修機関名：国立研究開発法人物質・材料研究機構

ホスト : 箕輪 貴司

研修期間 : 平成 元年 11月 18日 ~ 平成 元年 11月 20日 (3日間)

研修内容：

一日目 細胞培養についての座学、細胞培養実習 (位相差顕微鏡での観察)

二日目 細胞の固定と染色実習、SEM を用いた細胞観察及び顕微鏡観察に関する座学

三日目 共焦点蛍光顕微鏡 SP5 での観察

研修の成果等：

一日目は、細胞培養の基礎知識を学んだ。そして、細胞の培養方法や無菌操作を実際にクリーンベンチ内で行った。NIH3T3 (線維芽細胞) と RAW264 (マクロファージ前駆細胞) をそれぞれ培地が入ったフラスコに播種し培養を行った。また、細胞の継代方法と冷凍保存についても実際に行った。位相差顕微鏡で細胞の観察を行い、細胞数のカウント方法を学んだ。細胞数のカウントを行い培養液に播種する細胞量の算出をした。

二日目は、種々の細胞の染色方法と顕微鏡での観察方法について学んだ。前日に播種した細胞の染色を実際に行った。染色をしていない細胞のサンプルも準備した。卓上電子顕微鏡 (SEM) の観察比較を行った。(図 1,2) 細胞染色を行ったサンプルは細胞の形が鮮明だった。細胞染色の重要性を再確認した。また、種々の試料を卓上電子顕微鏡での観察を行った。(図 3,4)

三日目、

前日に染色を行った 2 種類の細胞を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。(図 5,6) 顕微鏡の操作方法やサンプルを観察するための注意点について学んだ。

研修の成果等（続き）：

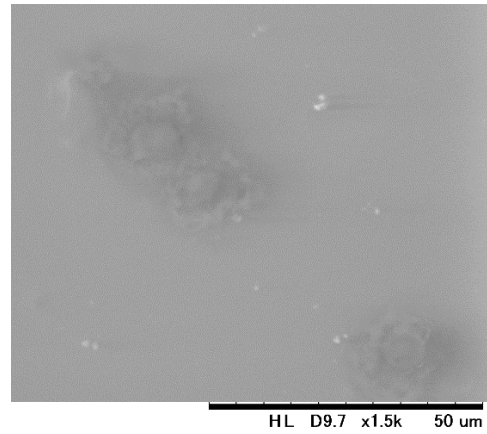
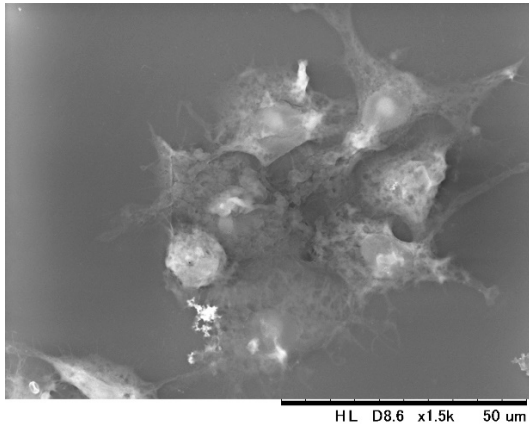


図1 SEM画像 染色ありRAW264 (×1.5k) 図2 SEM画像 染色なしRAW264 (×1.5k)

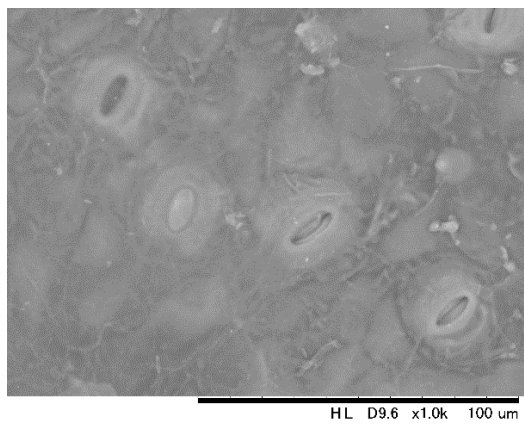
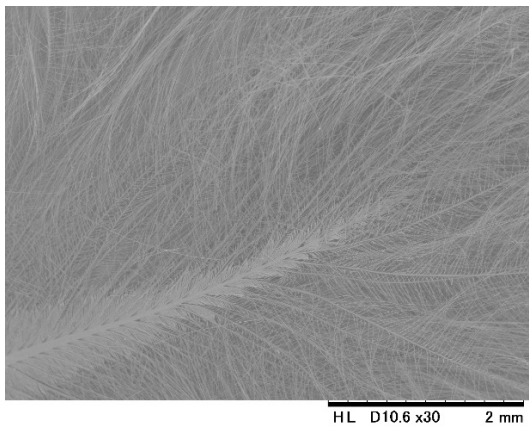


図3 SEM画像 鳥の羽 (×30)

図4 SEM画像 つつじの葉 裏側 (×1000)

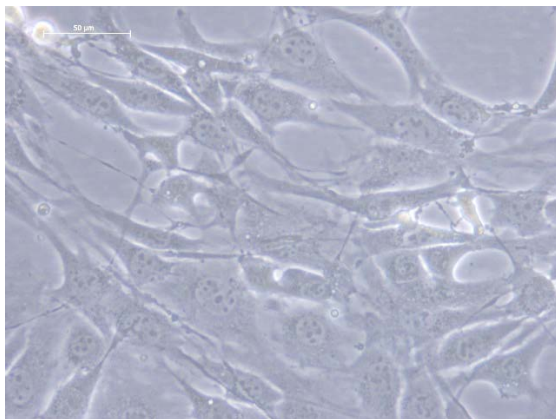


図5 NIH3T3 (×1000)

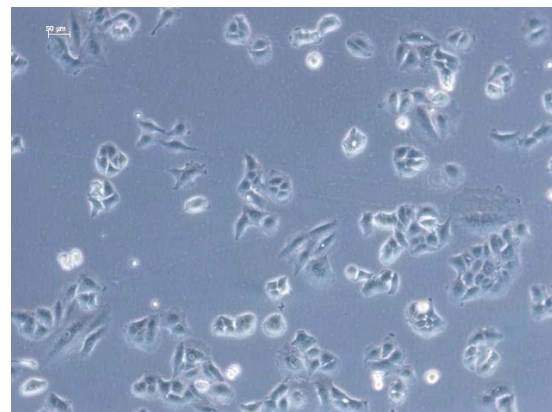


図6 A549 (×10000)

以上

<備考>

備考1. 本報告書は、研修期間終了後3週間以内、【最終締切：2020年2月17日(月)】までにご提出をお願いいたします。

提出先：ナノテクノロジープラットフォームセンター 井上 <NPF_ts@ml.nims.go.jp>

備考2. 適当な図、写真がありましたら、本報告書に説明を付して添付してください。

備考3. 本報告書は、本プログラムの報告会で配布を予定しているほか、文部科学省に開示する可能性があります。

備考4. 本報告書（アンケート部分は除く）は、提出前に研修先機関の許可を取ってください。

※以下は参加者アンケートです。今後のプログラム企画の参考とさせていただきますので、ご協力をお願いいたします。

■ 何を期待して参加しましたか？
共焦点レーザー蛍光顕微鏡の操作及びサンプルの調製方法の習得
■ 期待はどのくらい満たされましたか？
<input checked="" type="checkbox"/> 満たされた・ <input type="checkbox"/> どちらとも言えない・ <input type="checkbox"/> 満たされなかった (いずれかの <input type="checkbox"/> をチェックしてください)
■ 上記の他、研修に参加して得られたものは何ですか？
細胞の培養方法などの細胞の取り扱い方法を習得した。 顕微鏡観察技術 細胞の染色方法
■ 研修先の対応はどうでしたか？
とても親切で丁寧に指導していただきました。初心者だった私の初歩的な質問にも丁寧に答えていただきました。
■ 滞在中の最も印象的な出来事は？
自分で播種して培養した細胞を染色して共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察できたこと。
■ 今後どのようなプログラムに参加したいですか？
(研修内容、期間、形式、初心者/経験者/上級者等のレベル分け等々) LC/MS の初心者向け研修 (1日～2日)
■ このプログラムで今後改善すべき点は何ですか？
特になし。今回参加できてとても勉強になりました。このプログラムが継続していくと嬉しいです。

上記枠内に書き切れない場合は、適宜枠を拡張してご記入ください。

文部科学省委託事業 ナノテクノロジープラットフォーム
令和元年 技術スタッフ交流プログラム参加報告書

研修テーマ：種々の顕微鏡を使った 細胞イメージング実習

研修機関名：NIMS

ホスト : 箕輪貴司

研修期間 : 令和 元年 11月 18日 ~ 令和 元年 11月 20日 (3日間)

研修内容：

細胞培養・細胞染色の基本的な技術を学び、実体顕微鏡、共焦点蛍光顕微鏡、低真空 SEM などの顕微鏡を使用した細胞観察を行った。

研修の成果等：

研修で用いた細胞は、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549、線維芽細胞 NIH3T3、及びマクロファージ前駆細胞 RAW264.7 の 3 種である。

1. 細胞培養

18日午前中に、クリーンベンチの使い方、培養に関する用語の説明を受け、A549 を用いて無菌操作の練習と細胞播種を行った。播種の状況は位相差顕微鏡で観察・確認した。

18日午後に、NIH3T3 を用いて、細胞の継代方法を学んだ。適切な細胞数を播種するために、トリパンブルーで染色後、細胞計数板を使って細胞数をカウントした。フラスコへの継代だけでなく、顕微鏡観察のためにガラスボトムディッシュへの播種も行った。

20日、細胞の培養状況を位相差顕微鏡で観察・確認した。観察すると、接着している細胞と、細胞分裂中で小さく丸まっている細胞があり、順調に培養できていることがわかる。

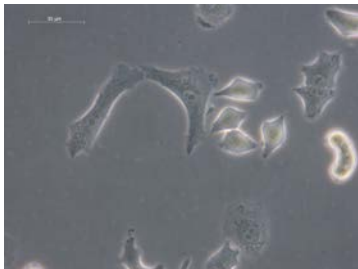


図 1. A549 (×40 倍)

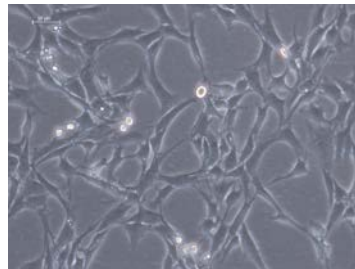


図 2. NIH3T3 (×20 倍)

研修の成果等（続き）：

2. 細胞染色・共焦点レーザー走査型顕微鏡での観察

19日午前中に、NIH3T3の細胞核をDAPIで、細胞骨格であるアクチンをAlexa Fluor 555 Phalloidineで染色した。パラフォルムアルデヒドを用いてタンパク質を架橋して固定したあと、界面活性剤（Triton）で細胞膜に穴をあけ、4℃ over night で蛍光染色した。

染色作業では固定した細胞がはがれないように、①溶液入れ替え作業中に乾燥しないよう手早く行うこと、②溶液を入れるときは丁寧に細胞に直接かけないこと、の2点が非常に重要であることがわかった。

20日、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察を行った。自身で準備したNIH3T3は、細胞が不均一であった。原因は、播種した細胞が少なすぎた、播種後すぐにディッシュを揺さぶった、または、染色中に固定した細胞がはがれた可能性がある。今回の実習の中では原因はわからなかった。観察では、共焦点レーザー走査型顕微鏡の特徴であるZスタック撮影により3Dイメージを取得した。その後、動画及びMIP（最大値投影法：Maximum Intensity Projection）画像として保存した。細胞分裂中で、染色体になっているものも観察することができた（図4）。

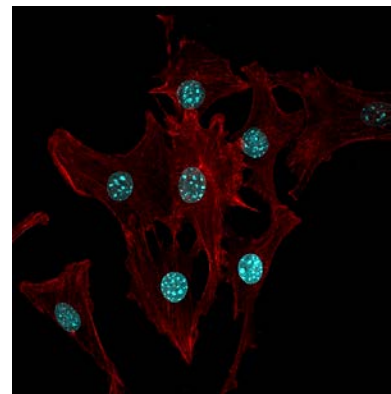


図 3. NIH3T3

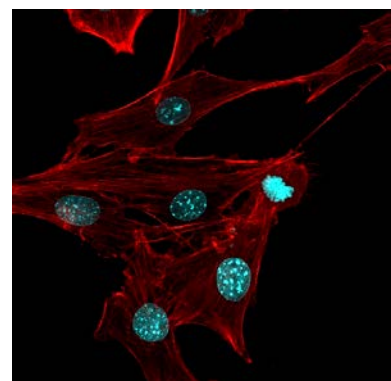


図 4. 右中央の細胞が細胞分裂中

3. 走査型電子顕微鏡観察

19日午後に、NIH3T3及びRAW264.7をTIブルー染色後、走査型電子顕微鏡で観察した。染色しないものと比較することで、電子顕微鏡における染色の重要性を認識することができた。

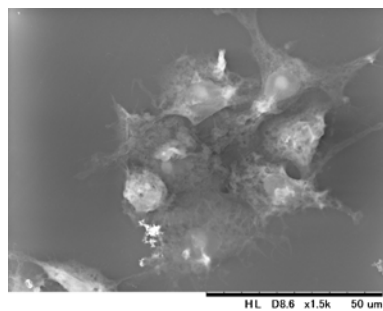


図 5. RAW264.1（染色あり・1,500倍）

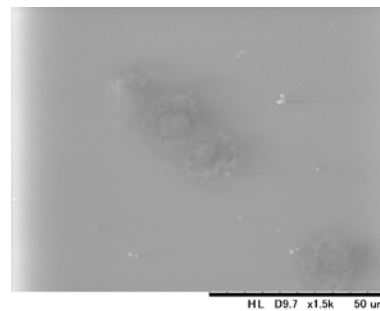


図 6. RAW264.7（染色なし・1,500倍）

以上

<備考>

備考1. 本報告書は、研修期間終了後3週間以内、【最終締切：2020年2月17日（月）】までにご提出をお願いいたします。

提出先：ナノテクノロジープラットフォームセンター 井上 <NPF_ts@ml.nims.go.jp>

備考2. 適当な図、写真がありましたら、本報告書に説明を付して添付してください。

備考3. 本報告書は、本プログラムの報告会で配布を予定しているほか、文部科学省に開示する可能性があります。

備考4. 本報告書（アンケート部分は除く）は、提出前に研修先機関の許可を取ってください。

※以下は参加者アンケートです。今後のプログラム企画の参考とさせていただきますので、ご協力をお願いいたします。

■ 何を期待して参加しましたか？
細胞の培養方法及び染色について、基礎から応用まで学べると思って参加した。顕微鏡はメーカーが違うことがわかっていたので、取扱説明というよりはメンテナンス的な内容や、運用方法、もう一歩きれいな画像を得るためのコツなどを教えていただけることを期待していた。
■ 期待はどのくらい満たされましたか？
<input checked="" type="checkbox"/> 満たされた・ <input type="checkbox"/> どちらとも言えない・ <input type="checkbox"/> 満たされなかった (いずれかの <input type="checkbox"/> をチェックしてください) 培養から染色方法までのことは満たされた。顕微鏡のメンテナンス等まで説明していただく時間はなかったが、自身で培養した細胞を観察できたことは大変満足いくものだった。
■ 上記の他、研修に参加して得られたものは何ですか？
同じような装置を扱っている人と、初めて実習という形で接したことで、自分自身が意外にも装置の扱いを心得ていることに気づいた。また、生命科学では画像の定量がマストであるが、工学系では確認の意味が強く、定量することがない等、分野による違いに気づくことができた。
■ 研修先の対応はどうでしたか？
大変よくしていただきました。可能なら、もう少し、技術職員の方々とお話する時間もあつたら嬉しかったです。とてもタイトな時間設定だったことは重々承知しておりますが。
■ 滞在中の最も印象的な出来事は？
バックグラウンドと現在の仕事の分野が異なるので、自分で播種した細胞が培養できていて、染色して観察できた瞬間、本当に感動して嬉しかった。また、細胞分裂の様子を観察できたことも非常に印象的だった。
■ 今後どのようなプログラムに参加したいですか？
(研修内容、期間、形式、初心者/経験者/上級者等のレベル分け等々) みんなでサンプルを持ち寄って、「これどうする!？」というような、分野横断的な実習 失敗例から解決策を話し合うような実習 取扱説明を中心に、3分クッキング的な内容や、絶対成功する内容が一般的ですが、技術職員向けの実習だからこそ、失敗やエラーから学ぶ内容のものも受講してみたい。他の方がどのように試行錯誤するのも聞きたい。
■ このプログラムで今後改善すべき点は何ですか？
コンデンサーの調整方法、しぼりの調整等、光学顕微鏡自身のマニュアル的な調整についても教えてもらいたかった。上記にも記載したように、失敗例も観察して、改善方法についてディスカッションする時間があってもよかった。

SEM の観察時間では、細胞以外の物も観察したが、その場で見えるものを調達するよりは、事前に相談してもらっていただければ材料を持ち込めたと思う。

上記枠内に書き切れない場合は、適宜枠を拡張してご記入ください。

