

ニンジン形成層からの 組織培養

——成功率を上げるための勘どころ

花輪 俊宏 *Toshihiro Hanawa*

湘中央生命科学技術専門学校 応用生物科学科教員

ニンジンを利用した組織培養は、植物組織培養における組織片からカルス形成を経て、植物体を再生する基本的な流れ（脱分化→再分化）を観察する意味で、取り入れやすい内容である。この実験を学校の実習でおこなうにあたり、無菌操作を適切におこなうことがポイントであるので、この部分の参考になることを中心に紹介する。

① はじめに

ニンジン形成層を用いた組織培養は、肥大根の形成層から未分化な細胞塊であるカルスを誘導し、そこから特定の組織・器官を再分化させることが比較的容易にできることから、植物組織培養の一連の基本的な流れを理解できるモデルとして、紹介されることが多いものである¹⁾。しかし、実際にそれをおこなってみると留意しなければならない、いくつかのポイントや学生実習としておこなった際に学生が失敗しやすいところがあるため、これまで当学科の学生実習で経験してきたことを踏まえ、実験手順を紹介しながらこれらについてまとめ、ご紹介したいと思う。なお、学生実習でおこなうという視点で、なるべく簡便に安全に実験を実施できるような内容をご紹介するので、最新のエビデンスに基づく研究成果とは異なるものであるということをご承知おきいただきたい。

② 作業の流れ

- 実験の準備
 - ①ニンジンの準備 ②培地の調整
 - ③使用器具の準備・滅菌、滅菌水の作製
 - ④クリーンベンチの準備
- 実験操作の概要
 - ①ニンジンの殺菌 ②ニンジン試料の調整
 - ③培地へのニンジン試料の置床
 - ④ニンジン試料の培養

③ 実験の準備

〈ニンジンの準備〉

使用するニンジン肥大根は新鮮なものであれば、スーパー等で市販されている普通のニンジンで構わない。ニンジンの品質にもよるが、使用する試

料はニンジン根の部分であるので、殺菌しても雑菌を取り除ききれない場合がある。そのため、もともと雑菌が繁殖（以下、コンタミと表現する）しやすい試料であると認識して、コンタミがあることを前提にしておく。なお、コンタミしやすいニンジンかどうかの判断は、見た目では難しい。

〈培地の調整〉

培地は、MS (Murashige & Skoog) 培地を基本培地として、ニンジン肥大根形成層からカルスを誘導する場合、MS基本培地に人工オーキシンの一つである2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（以下、2,4-Dとする）を加えた培地を使用している²⁾。2,4-Dは除草剤として使われる化学物質でもあるので、植物組織培養では高濃度で使用するのではないが、2,4-D濃度を変化させた培地を何種類か作製して、培養にどのような影響が出るのかを見るのも、実習としてはおもしろいのではないかと思う。なお、培地を作製する際に溶媒として使用する水の質は、植物の生育に大きな影響を与えるので、水道水ではなく、なるべく蒸留水を使用する。培地固化剤は粉末寒天を使うこともあるが、寒天培地は培地に透明感がなく、根の観察が難し

いことから、ゲランガム（ジェランガム）³⁾を使用している。また、ニンジン肥大根の品質にもよるが、コンタミすることを視野に入れて、ニンジン試料を一つずつ個別に培養できるように平底試験管（内径23 mm×長さ100 mm程度のものが学生実習では使いやすい）を容器として培地を作製するとよい。また、培地固化剤を溶解する際には、一般的に電子レンジを使用するが、突沸と蒸気による火傷には十分に注意し、溶解には、あまり時間をかけすぎないように注意する。突沸による事故を防ぐために、培地を入れている容器を触るときには、容器側面を指で軽くたたき、培地溶液に振動を与え、突沸の気配の有無を必ず確認するように習慣化する。

溶解にあまり時間をかけないようにするのは、水分の蒸発により、培地調整量との差異が大きくなること、ゲランガムを使用している場合にこれが不溶化してしまうことがあるためである。そのため、吹きこぼれる前に一度止めて、ガラス棒等がかき混ぜ、再度加熱を繰り返すが、吹き出ない程度に沸騰させながら、培地固化剤の溶解はできるだけ短時間で済ませる。なお、火傷防止のため軍手などを使用する。ただ、加温している培地が



図1 使用器具の準備

写真前方左より、メス、コルクボーラーとその押し棒、ピンセット。
写真後方左より、シャーレ、マヨネーズビン。



図2 使用器具の滅菌準備

写真前方左より、メス、コルクボーラー、写真後方はマヨネーズビン。

突沸した際には、素手のときより火傷の重症度リスクは高まる。絶対に突沸させないように注意する。

溶解した培地を容器に分注する際にはできるだけ培養容器上方内面に培地が触れないように、ガラス棒を伝わらせて分注するようにする。これはコンタミの防止のためと培地にニンジン試料を置床するときに培地容器の口を火炎滅菌する際、付着している培地が火炎で熱せられて、培地中のショ糖が炭化して観察しづらくなることを防ぐことにもなる。

また、培地容器のフタはアルミホイル、耐熱性プラスチック製キャップ、通気性の膜があるアルミホイルまたはプラスチック製のフタなどがあるが、ビトリフィケーション（ガラス体化、膨潤化）を防止する必要がある場合には、通気性の膜のあるフタを利用する。培地の滅菌は、オートクレーブ（121℃、15分間）でおこなっている。

〈使用器具の準備・滅菌、滅菌水の作製〉

コルクボーラー、メス、ピンセット、シャーレを必要数準備する（図1）。コルクボーラーは押し棒と一緒に全体をアルミホイルで包み、メスの刃の部分もアルミホイルで包み、弁当箱型の滅菌缶に入れて、滅菌すると便利である。ピンセットはアルミホイルに包んで、一緒に弁当箱型の滅菌缶に入れるか、ピンセット用の滅菌缶にそのまま入れて滅菌する。また、これらの器具は、使用時以外は消毒用アルコールに浸しておくためのガラス容器（ビーカーやマヨネーズビンなど）も二重にしたアルミホイルで口の部分を包み、滅菌しておく（図2）。なお、殺菌したニンジンから殺菌液を洗い流すのに使用する滅菌水を使用器具の滅菌と一緒に準備することを忘れないようにする。

• コルクボーラー

ニンジン肥大根形成層を含む部分を打ち抜いてニンジン試料とするので、コルクボーラーNo.3（内径7 mm程度のもの）を準備する。コルクボーラーは、前回の使用から日数が経過していると、筒の内側が錆びていることがよくある。そのため、

前回の使用から日数が経過している場合には、滅菌前に小型のブラシやコルクボーラーの押し棒に水をつけながら筒の内側をこすって、錆を落としおいてから滅菌するようにする。そして、滅菌後、ニンジン試料の調整前に実験で使用しないニンジン組織を何回かくり抜いて、ニンジンに錆が付着しないかどうかを確認してから、使用する。錆がニンジン試料に付着すると、試料の生育に影響が出るので、錆の付着の確認を忘れないようにする。

• メス

殺菌液で殺菌したニンジンをコルクボーラーで打ち抜いた後、殺菌液でダメージを受けた部分を切断して取り除くために使用する。メスはメスホルダーに替え刃を装着するタイプや使い捨てのタイプなどがある。ニンジンの切断面がなるべくきれいになるように、切れ味のよい新品のメス刃を使うようにする。

• ピンセット

ピンセットは、ニンジン試料を培地に置床する際に支障がない十分な長さのピンセットを選ぶ。今回とは異なるが、ピンセットを火炎滅菌して、滅菌水で冷却して使用する場合は、コンタミ防止のため、培地容器に入る部分をガスバーナーの火炎に通してから使用することも考慮に入れ、ピンセットの長さを決める。

4 実験操作

〈ニンジンの殺菌〉

ニンジンを輪切りにして皮をむく。輪切りの幅は、ニンジン試料の長さの1.5倍程度とする。なお、長すぎるとコルクボーラーで打ち抜きづらく、短すぎると必要な試料の長さを確保できないので、適度な長さにする。殺菌液は有効塩素濃度1%程度の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用しており、殺菌するニンジン体積の10倍以上の殺菌液で殺菌するようにしている。また、殺菌液に浮くニン

ジンと沈むニンジンがあるので、浮くニンジンの場合はガラス棒で適度な頻度で沈めるようにする。沈んでいるニンジンについても、ガラス棒で適度に触れるようにする。これは殺菌効率を上げるためにもおこなった方がよい。ただし、ガラス棒でニンジンを頻繁に触りすぎると、ニンジンが傷つくことがあるので、それも考慮に入れながらニンジンを扱う。また、スターラーで攪拌するという方法も考えられるが、スターラーバーにニンジンがぶつかり、傷つくので、本稿では紹介しない。殺菌時間は殺菌液の濃度や液温などにも影響を受けるので、適切な殺菌時間を検討する必要があるが、当方では15～20分間殺菌している。殺菌時間は、ニンジンを滅菌水で水洗し始めるまでの時間である。

水洗はクリーンベンチ内でおこなう。時間どおりにニンジンの水洗ができるように、クリーンベンチ内の準備を整えておかなければならないので、クリーンベンチ内の作業面にアルコールスプレーを噴霧して消毒しておき、容器入りの滅菌水、殺菌液等を捨てるための廃液入れ容器（ポリビーカー等、廃液を捨てるだけなので、事前の滅菌は必要なし）を、アルコールスプレーを噴霧した後にクリーンベンチ内に持ち込んでおく。ニンジンに殺菌している容器を、クリーンベンチ内にアルコールスプレーしてから持ち込み、ニンジンを廃液入れに入れられないように注意しながら、準備した廃液入れに殺菌液を捨てる（この後、滅菌水で水洗するので、殺菌液は完全に捨てられなくてもよい）。殺菌したニンジンが入った容器に滅菌水を適量注いで水洗して、その洗液を捨てる作業を2～3回繰り返して、ニンジンの殺菌作業の終了となる。

〈ニンジン試料の調整のための準備〉

殺菌したニンジンを調整する前に使用する器具の準備は終了しておく（図3）。最初に滅菌した器具をクリーンベンチ内に持ち込む。その持ち込む際、滅菌缶や器具表面をアルコールスプレーして消毒してから持ち込む。コルクボーラー、メス、

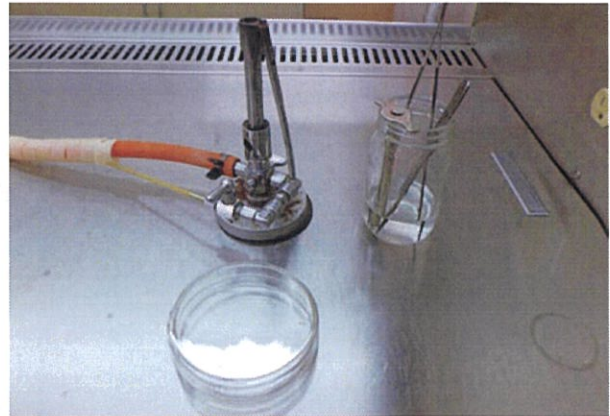


図3 クリーンベンチ内の使用器具の配置

ピンセットを入れるガラス容器は、包んでいるアルミホイルを丁寧に外し、消毒用アルコールを容器容量の1/5～1/4程度入れる。コルクボーラー、メス、ピンセットは滅菌缶から取り出し、包んでいるアルミホイルを外してから、器具の先端部分を消毒用アルコールにつける。シャーレは滅菌缶から取り出し、フタを開けずに作業面に置いておく。シャーレは自分の正面に、コルクボーラー、メス、ピンセットの入った容器は利き手側に、殺菌したニンジンが入った容器は利き手と逆の位置に置けるようにスペースを空けておく。

・アルコール浸漬器具扱いを安全におこなうために

ここで消毒用アルコールに浸けてある器具の使用上の注意について、確認しておく。消毒用アルコールに浸している器具は、使用時に取り出し、クリーンベンチ内のガスバーナーのパイロットバーナー（種火）にかざしてアルコールに引火させ、アルコールを飛ばした後に使用する。そして、使用後はそのまま消毒用アルコールに戻す。これを基本操作として徹底する。学生実習では容器内の消毒用アルコールに引火させることに起因する事故が最も怖いので、ここはしっかりと確認すべきポイントである。アルコールに引火した場合は炎の色が淡く、引火していることに気づきづらいので、注意する（引火していると液面がもやもやしている）。気づかずに浸かっている器具に触れると、器具が熱せられていて火傷をすると同時に、

容器を倒してアルコールがこぼれ、大きな事故につながる。万が一のことを考え、アルコールに浸かっている器具に触れるときには軽く触れて引火がないことを確認してから使用するなどの配慮を考える。アルコールに引火させたときに備え、クリーンベンチの外に濡れ雑巾を用意しておき、引火したら、その容器を濡れ雑巾で覆い、消火する。

• アルコールを器具表面に残さない

アルコールを飛ばすときに、学生実習でよく見られることだが、種火でしばらく加熱する学生が見受けられる。液体が器具の表面に残っていて、それがすべて飛ぶまで加熱しがちである。しかし、残っているのは水で、アルコールは種火にかざした瞬間に引火するので、それで十分である。加熱が長いとメスやコルクボーラーの切れ味が悪くなったり、加熱した器具を使うことによるニンジン試料への影響が出たりすることにもつながるので、種火で器具を加熱しすぎないようにする。純アルコールを使用してはどうかと考えられるかもしれないが、純アルコールは消毒の効果が低い。消毒用アルコールにしておく方が無難であると筆者は考えている。

• 試料へのアルコール付着ミスを防止する

消毒用アルコールが付着している器具で試料を扱うケースも見られる。アルコールが付着した器具を使い、ニンジン試料にアルコールが付着することになると、試料の細胞が壊れ、白化してしまう。こちらにも注意が必要である。このケースは特にコルクボーラーで見られる。細い金属の筒の内側は空気の流入が悪いので、アルコールに引火させても火が消えてアルコールが内側に残りやすい。それを知らずにアルコールが残ったままでこれを使うと、ニンジン試料にアルコールが付着してアルコールの影響を受けることになる。ここではアルコールが残っていないかどうか、使用前の確認が重要となる。コルクボーラーに押し棒を入れた状態で種火にかざすことが学生実習ではよく起こる。コルクボーラーと押し棒を別に種火にかざすように指示して、ニンジン試料にアルコールが付

着するミスを防止する。また、消毒用アルコールが入った容器にメスを戻す際は、メスの先端が曲がらないようにするため、そっと戻すようにする。メスの先端が曲がると、ニンジン試料をキレイに切断できなくなり、必要以上に試料の組織が傷つけられ、その後の培養結果に大きな影響が出ることもなりうる。

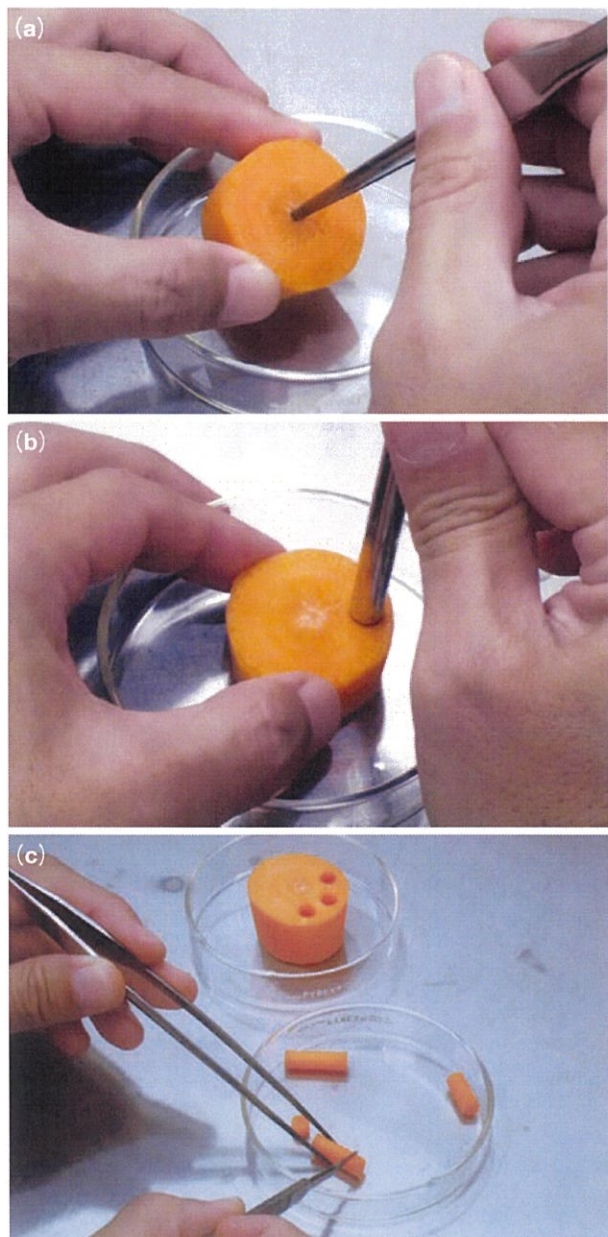


図4 ニンジン試料の調整の仕方

- (a) 髓の部分に刺しての殺菌したニンジンの移動。
- (b) 手で押さえてのニンジン試料のくり抜き。
- (c) ニンジン試料調整時の配置例。上シャーレ上で試料をくり抜く。下シャーレ左上にくり抜いた試料を打ち出し、下で試料を調整、右上に調整後の試料を置く。

〈ニンジン試料の調整〉

クリーンベンチ内で使用器具の準備ができれば、いよいよニンジン試料の調整に入る。滅菌水で水洗したニンジンをピンセットでシャーレ内に移動する。この際にピンセットでニンジンをはさんでシャーレに移動させると、途中で落とすことがある。そこで、たとえばニンジン髄の部分ピンセットで刺し、移動させるのも一つの方法である〔図4(a)〕。シャーレに移動させたら、ニンジン髄の形成層を含む部分をコルクボーラーで打ち抜く。形成層は髄とニンジン髄の外周の間で細胞が密となっている部分として肉眼でも観察できる(図5)ので、その部分を含むように垂直に打ち抜き、コルクボーラーの先端がシャーレに触れたら、少しコルクボーラーを回してから、ニンジンから抜くようにする。コルクボーラーでニンジンを打ち抜く際は、殺菌したニンジン髄の表皮をむいたニンジン本体の側面を手で押さえて扱っても問題ない。むしろ、手で扱った方が安定してよい〔図4(b)〕。しかし、それ以外の部分に手が触れないように注意する。また、押し棒を刺したままでニンジンをくり抜くのは、くり抜き方によっては、押し棒に余計な力がかかり、ニンジン試料にダメージを与えることにつながる。これを避けるようにする。次にコルクボーラーでくり抜いたニンジン試料を取り出す際には、押し棒を用いる。この押し棒でのニンジン試料の押し方がポイントとなる。ニンジン試料の中央を押してコルクボーラーから押し出すのではなく、押し棒をコルクボーラーの内筒に押しつけながら押し出すようにすることで、ニンジン組織に与えるダメージを軽減することができ、勢いよくシャーレの外にニンジン試料が飛び出してしまうことを防ぐこともできる。なお、ニンジン試料を押し出す場所は、殺菌したニンジンを取り出して置いたシャーレのフタ部分や、別の滅菌シャーレとする。コルクボーラーから押し出したニンジン試料は、円柱状のニンジン試料の中央部分をピンセットでソフトに押さえ(ピンセットを、箸を持つ感覚で)、殺菌液でダメージを受



図5 ニンジン肥大根の殺菌前断面(左)と殺菌後断面(右)

けた両端部分を確実に取り除けるように、両端の少し内側を、切断面がなるべくきれいになるようにメスで一気に切断する。この調整が終わったニンジン試料は、シャーレの別の部分に置く。これで培養前のニンジン試料の調整は完了である。

ニンジン試料を調整する際には、殺菌したニンジンを置く位置、コルクボーラーでくり抜いたニンジン試料を置き、殺菌液でダメージを受けた部分を取り除く位置、すべての調整が終わったニンジン試料を置く位置というようにシャーレの中で置く位置を分けることで、コンタミ防止、培養で使用するニンジン試料の清浄度を保つことにつながる。これを意識して作業をするようにする〔図4(c)〕。

5 培地の準備と培養

調整が終わったニンジン試料を培地に置床する。試験管培地のフタをそっと開け、試験管の口をガスバーナーで火炎滅菌した後、ニンジン試料を置床する位置の培地表面をピンセットで、あらかじめニンジン試料の大きさに合わせて傷をつけておく。傷をつける深さは、ニンジン試料を置床する方向にもよるが、ニンジン試料の1/3～1/2程度とする。培地にあらかじめ傷をつけておいて、培地とニンジン試料の間の培地部分に亀裂が入った

り、培地が盛り上がりすぎてしまったりしないように注意しながら、ニンジン試料が均一に培地に触れるように置床する(図6)。ニンジン試料置床後は再度、試験管培地の口の部分をガスバーナーで火炎滅菌して、火傷に注意しながら、速やかに試験管培地のフタを閉める。

置床の仕方や置床するニンジン試料の方向が培養結果に影響を与えるので、このようなことも意識して、実験を組み立てるのも一つの方法である。また、クリーンベンチ内操作(無菌操作)全般を通して意識したいことは、次のとおりである。コンタミさせてはいけない部分の上に物や手指をできるだけ通過させないようにする。特に培地に試料を置床する際には、これが起こりやすいので、培地容器のフタの開放時間をできるだけ短くする(その際、フタを下向きに置く)。培地容器を斜めに持ち、開放時は容器の口が真上を向いた状態にならないようにする。

• 培養における物理的環境の設定

培養する場所の温度、湿度、照明の照度、明暗

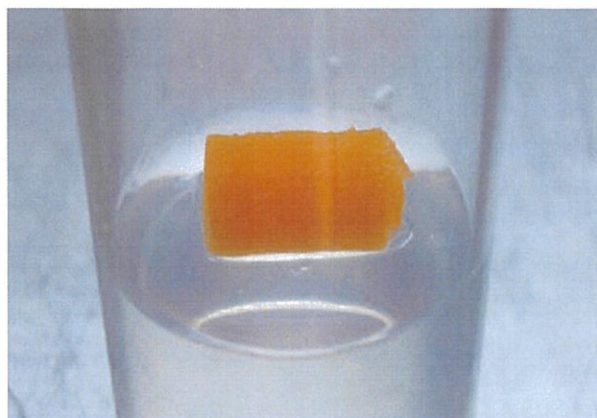


図6 培地に置床したニンジン試料

[実教出版社「サイエンスビュー生物総合資料」(筆者提供)より転載]

サイクルなどの環境要因が培養に影響するが、その施設の実態に合わせて、できる範囲でコントロールすれば、十分に実験の目的は達成するものと思われる。実際には、培養容器内の温湿度は、室内の温湿度よりも高いので、室内の温度を低めに設定することをお勧めする。先にも記載したが、特にビトリフィケーションを防止する必要がある

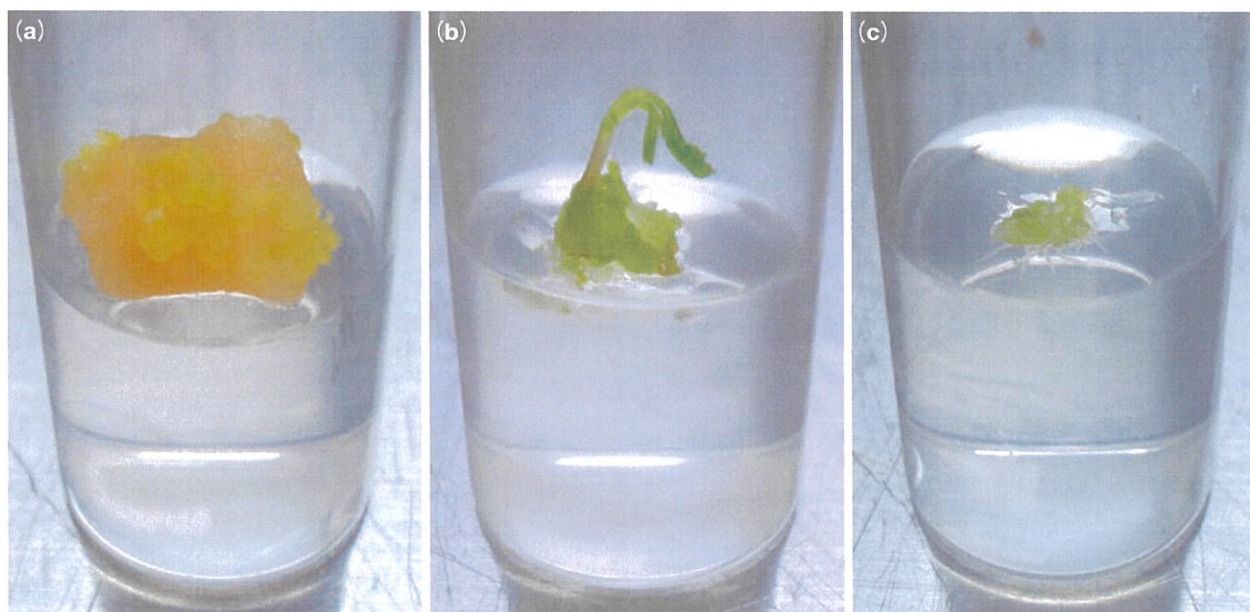


図7 ニンジン組織培養例

(a) ニンジン試料からのカルス形成 (b) カルスからの不定芽形成 (c) カルスからの不定根形成。(a)は、試料をMS・2,4-D (1.0 mg/L) に置床して明所で培養。(b)は、生成したカルスのみをMS基本培地(ホルモンフリー)に置床して明所で培養。(c)は、(b)より少し長い期間培養の後、カルスのみをMS基本培地(ホルモンフリー)に置床し明所で培養(再現性は高くない。別法あり)。

[実教出版社「サイエンスビュー生物総合資料」(筆者提供)より転載]

場合には室温設定と一緒に、試験管培地のフタに通気性の膜のついたものを使用すると効果がある。培養後の継代については、培養の状況を見て、タイミングを見極める。この部分も、観察眼を磨く意味で、実習の課題とできる内容でもある。

• 実習課題例

今回の実習の延長として、以下のような課題を学生に提示して、実験を実施するのも意義深いのではないかと思う。

- ① ニンジン肥大根の形成層はもともとコンタミが出やすいので、コンタミを防ぐにはどのような工夫をすればよいかを課題として提起する。
- ② 植物ホルモンの種類や濃度を変えた培地を複数種類準備して、それらで培養することで、植物ホルモンの影響を見る [図7(a)・(b)・(c)]。
- ③ MS基本培地の成分に着目して、その成分の濃度を変えて、培養の結果にどのような影響が出るかを観察する。
- ④ 培養するニンジン試料の大きさ(直径や長さ)を変えて、コンタミのしやすさ、培養結果に違いが見られるかを観察する。
- ⑤ 明所・暗所で培養をおこない、比較してみる。
- ⑥ 継代培養のタイミングを変えてみる。

基本的な実習が終わった後に、学生たち自らテーマを見つけて、実験を実施するのも、意義深いことであろう。

6 おわりに

ニンジン胚軸を利用する方法も紹介されている。ニンジン肥大根を利用する組織培養法とは別に、種子から発芽させ、しばらく培養した後の胚軸を利用する方法もある。種子は種皮に覆われている

ので、濃度の高い殺菌液で殺菌することができる(当方では、有効塩素濃度3%程度の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を使用している)。そのため、肥大根を使う方法に比べるとコンタミの減少につながる。しかし、種子から発芽させ、伸びてきた胚軸を使用するため、「①ステップが一つ多くなる。②胚軸試料の切断部分にカルスが形成されるので、カルス化までに時間がかかる。③形成されるカルスの量が少ない。」などのデメリットがある。目的によっては、ニンジン胚軸を試料とする方法も一考に値するものだと思うので、必要に応じて、検討いただきたい。

ニンジンの組織培養は、植物組織培養の導入としてはとても取り組みやすいものです。多くの学生たちが、この実験をきっかけにして、植物組織培養に興味を持ち、さらに世界を広げて行ってくれるきっかけになれば、こんなに嬉しいことはありません。

なお、実際に実験をしてみて疑問に思うことや壁に当たるようなことがあったら、当方が技術的な面でお役に立てそうなことがあれば、ご連絡ください。できるだけ協力したいと思います。

[文献]

- 1) 三位正洋ほか. 植物バイオテクノロジー. 19-84 (実教出版, 2023).
- 2) 大澤勝次ほか. 生物工学基礎. 49-84 (農文協, 2003).
- 3) 古川仁朗. 図解バイオテクマニュアル. (誠文堂新光社, 1990).



花輪 俊宏 Toshihiro Hanawa

湘央生命科学技術専門学校 応用生物科学科教員

専門学校では植物組織培養、実験動物、遺伝子工学などの講義と実習、毒物劇物取扱者試験や危険物取扱者試験などの試験対策を担当しており、共著書「毒物劇物取扱者合格教本」は多くの本試験受験者に利用いただいている。実験動物技術指導員、愛玩動物看護師でもある。