

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22730684

研究課題名（和文） 細胞周期の同調と培養細胞の導入による体細胞分裂観察実験の改良

研究課題名（英文） Improvement of the observation of mitosis through introduction of cell cycle synchronization and use of cultured cells.

## 研究代表者

佐野 史 (SANO FUMI)

群馬大学・教育学部・准教授

研究者番号：30313018

研究成果の概要（和文）：中学校の体細胞分裂観察実験の理解を深める方策として細胞周期の同調の導入を試みた。同調によって細胞が見つけやすくなる効果は中学生対象の実践ではあまり認められなかったが、大学生では顕著に認められた。また、体細胞分裂の観察が容易なタバコ懸濁培養細胞 BY-2 を学校現場に導入する方法を検討し、振とう培養機の代わりにスターラーを用いた短期間の培養方法を確立した。さらに微小管を明視野で観察する方法を編み出し、染色体の観察像と合わせて HP で公開した。

研究成果の概要（英文）：In order to make junior high-school students understand mitosis deeper, the introduction of cell cycle synchronization to the observation of mitosis was tried. The use of synchronized specimen was quite effective with university students in finding the cells undergoing mitosis easily, but less with junior high students. As a different approach, the way to cultivate tobacco BY-2 cells, with which one can observe mitotic cells easier than with root tissues, at school was also examined. It was found that a stirrer can be used instead of a shaking incubator. A method to observe microtubules of BY-2 cells under the bright-field microscope was also developed, and the images were published on the web.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物教育

科研費の分科・細目：教育学・教科教育学

キーワード：中学校理科、体細胞分裂、教材開発、同調、培養細胞

## 1. 研究開始当初の背景

体細胞分裂の観察は中学校の「生命の連続性」の単元で行われる必須の実験の一つであり、高等学校でも実験が行われる。基本的な方法は、根端分裂組織など分裂細胞を多く含

む組織を化学固定し、組織を塩酸で解離したのち酢酸オルセインなどで染色することにより、細胞核および分裂中の染色体を顕微鏡下で観察し、細胞分裂を実感をもって理解しようとするものである。しかし、現場の教員

の話や文献によれば、生徒が自作したプレパラートでは分裂像を見つけることができず、最終的に教員が準備しておいたプレパラートを用いたり、初めから演示実験として行うなどの手段がとられていることも多い。

この実験における問題点は主に三点ある。一点目は、実験の作業が煩雑で中学生にとっては難しいことである。この点の改善に関しては既に多数の先行研究があり、新規染色剤の導入、押しつぶし方の改良などが報告されていたが、学校現場では教科書に書いてある方法を重視することが多く、普及の程度は不明であった。

二点目として、根の分裂組織における分裂細胞の割合があまり高くないことが挙げられる。この点に関しても分裂細胞の割合が高い材料や準備段階の条件検討などの研究があり、最大で 20%程度の分裂細胞の割合が報告されていた。しかし、細胞が重なりあっていることが多い生徒自作のプレパラートで、しかも中学校で一般的に使われている操作性のよくない生物顕微鏡を使うことを考えると、更に分裂細胞の割合が高い試料の調製が望ましい。

三点目は、生徒には分裂細胞かどうかの判断自体が難しいらしい、ということである。対策としては実験を行う前に体細胞分裂の進行のしかたについて生徒に十分把握させることのほか、二点目と同様、分裂像の多い試料を使うことが有効な可能性がある。

一方、細胞分裂に関連した現象の理学的な解析や農学的に核型を決定する際などには、薬剤処理などの方法で細胞周期の同調が行われる。この方法を適用すれば、分裂細胞の多い試料が得られるだけでなく、経時的な試料調製によって細胞分裂の時間軸を理解できる教材を開発できることが期待されるが、学校現場に導入した例はなかった。また、実験に用いる材料は主にネギやタマネギの根端であり、分裂組織以外に属し、分裂をほとんど行っていない細胞が多く含まれているため、本質的に観察がしづらい。この点に関しては均質に分裂を続けている植物の培養細胞を用いることが有効であると考えられたが、培養機材の必要性などの原因から、学校現場への導入例はなかった。

## 2. 研究の目的

以上の背景を受けて、本研究では細胞周期の同調技術を導入し、分裂細胞の多い試料を調製することで、中学校における体細胞分裂の観察実験をより学習効果の高いものに改良することを第一の目的とした。また、細胞が観察しやすく、培養も比較的容易なタバコ懸濁培養細胞 BY-2 (以下 BY-2 細胞) の学校現場への導入方法を探ることも目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、大きく二つのアプローチから、中学校における体細胞分裂観察実験の改良を試みたものである。

### (1) 細胞周期の同調を導入した体細胞分裂観察実験の改良

まず、中学校現場での課題を把握するために実態調査を行った。同調については、薬剤処理による細胞周期の同調方法が既に理学、農学分野で確立されているが、必ずしも学校現場で応用しやすいものではない。そこで、学校現場で扱いやすく、簡便な同調処理により効果が見られる材料を探索し、同調のプロトコルを確立した。確立した方法で同調した試料を用いて、大学の学生実験と中学校において授業実践を行い、導入の効果を検討した。

### (2) BY-2 細胞の導入

BY-2 細胞は、細胞の大きさが大きく直列に並んでいて個々の細胞の観察が容易であり、固定・解離を経ずに酢酸オルセインで核や染色体が染色可能であること、対数増殖期には継続して数%の分裂指数を示すことなどから、体細胞分裂の観察に適した培養細胞である。しかし、通常は振とう培養機で無菌培養しており、そのままでは学校に導入が難しい。そこで、振とう以外の方法による培養方法を検討した。また、体細胞分裂の装置である紡錘体の観察への活用を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞周期の同調を導入した体細胞分裂観察実験の改良

#### (1-1) 事前調査

まず、「生命の連続性」の単元で体細胞分裂の観察実験を行うことの意義を確認するために、群馬県の F 中学校 3 年生 (157 名) に対して、実験後約半年が経過した 2 月にアンケート調査を行った。その結果、自作のプレパラートで分裂細胞を観察できたことを記憶していた生徒は 45%であった。体細胞分裂については教科書に必ず顕微鏡写真が掲載されているが、自作のプレパラートで観察できた生徒のうち、教科書の写真でも十分であったと答えた生徒はわずか 7%に留まっていたこと (図 1)、自作で観察できなかった生徒の 63%がやり直して自分で見てみたいと答えたことから (図 2)、この単元での実験で、自作のプレパラートで観察することの重要性が確認できた。

また、観察できなかった理由について聞いたところ、79%の生徒が「プレパラートはできていたが、分裂細胞が見つからなかった」と回答しており、作業よりも試料の質の問題が大きいことが明らかとなった。

以上の結果から、体細胞分裂の観察実験において、生徒が自作のプレパラートで分裂細胞を観察できるように試料の質、すなわち分

分裂細胞の割合を上げることの重要性が示された。(以上、未発表データ)

図1 自分のプレパラートで見られたことについて

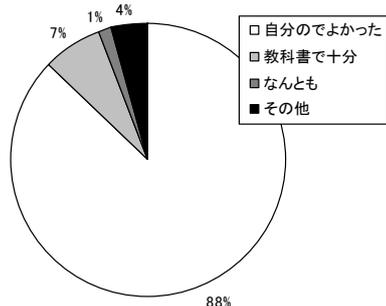
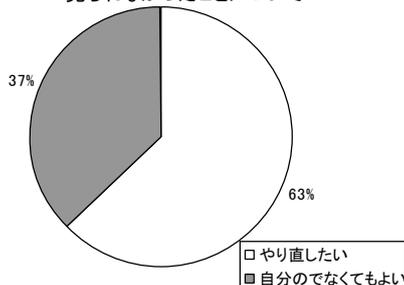


図2 自分のプレパラートで見られなかったことについて



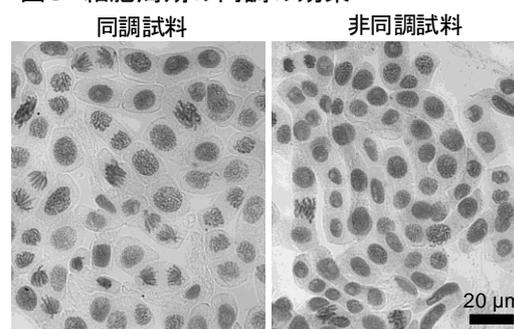
(1-2) 細胞周期の同調に適した材料の検討と学校現場で活用できるプロトコルの確立

細胞周期の同調方法として、農学分野で核型分析を行う際などに用いられる方法を採用した。この方法は、まず試料をDNA複製阻害剤であるヒドロキシ尿素で処理してDNA合成期付近に細胞を蓄積し、その後水洗することで薬剤を解除して、適当な時間培養を続けた後分裂細胞の多い時間帯で試料を回収するものである。ヒドロキシ尿素は毒物及び劇物取締法、消防法、化学物質管理促進法(PRTR法)などの規制も受けず、学校現場でも扱うことができる薬剤である。

材料として、まずは中学校で体細胞分裂の観察実験の材料としてよく用いられるネギ芽生えの根やタマネギ塊茎由来の根で同調処理を試みた。しかし、ネギ芽生えを材料とした場合には均等に処理をすることが難しく、同調によって分裂細胞の割合の上昇した個体と処理の効果が全くない個体が混ざった状態の試料となり、授業では使えないことがわかった。一方、タマネギ鱗茎由来の根は太くて扱いやすいが、分裂組織外の細胞の割合が高く、顕微鏡下で分裂細胞の割合の高い領域を見つけることが容易ではなかった。以上のことから新たな材料を探索した結果、ニンニクの鱗茎由来の根が安定して同調の効果がえられる材料であることがわかった。そこで、ニンニクを材料として学校現場でも可能な同調プロトコルを作成した。大まかな方法は以下のとおりである。まずニンニク鱗茎を2日間水栽培し、根が1~2cmに伸長した

ものを1mMヒドロキシ尿素水溶液に移す。そのまま16~18時間栽培を続けたのち、流水に10分間曝すことによって薬剤を除去する。このとき、流水が直接根に当たるように強く洗浄することが重要である。水栽培再開後7~8時間で約30%の分裂細胞の割合を示す試料を得ることができ、この値は水栽培3日目の根の3倍程度であった(図3)。以上のプロトコルを中学校の教員に提示したところ、この程度の処理であれば学校現場でも用いることができそうだ、との見通しを得たため、この方法で作成した試料を用いて授業実践を行うことにした。(雑誌論文②)

図3 細胞周期の同調の効果



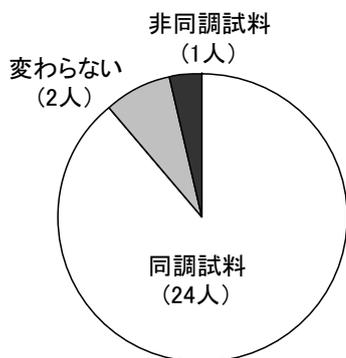
また、細胞周期を同調させた試料は、経時的に固定して観察することにより、体細胞分裂の時間軸を理解するための教材として活用することも可能である。ニンニクを材料とした場合には、薬剤解除後6時間から分裂前期の細胞が増え始め、8時間にかけて分裂中期、後期の細胞が増加し、その後分裂が終了していくというタイムコースが分かった。今後、現職教員向けの研修講座などで紹介するとともに中・高での実践を行い、効果を検証する。(未発表データ)

(1-3) 大学の学生実験における実践

同調の効果を確認するために、中学校における実践に先立って大学の学生実験で実践を行った。受講学生は理科専攻の学部1年生27人であった。彼らは前週の実験で同調を行っていないネギの根を試料として体細胞分裂の観察を行っており、手順はよく理解している状態であった。当日は同調処理を施したニンニク鱗茎由来の根(最大分裂細胞の割合約33%)と無処理の根(最大分裂細胞の割合約8%)をファーマー液で固定したものを試料とし、解離を行った後、根端の切り取りから押しつぶし、染色、プレパラート作成、観察までを学生に行わせた。各試料はマークの色の違う遠沈管に入れておき、同調の有無が事前にはわからないようにして実験を行った。アンケート結果から、同調試料の方が非同調試料よりも早く分裂細胞を見つけられた学生が多かったこと、非同調試料と比べて分裂中の細胞を見つけやすかったと感じた

学生が多いことがわかった（図4）。以上のように、大学生を対象とした場合には、同調処理の十分な効果が認められた。（雑誌論文②）

図4 分裂中の細胞が見つかりやすかった試料



#### (1-4) 中学校における実践

大学生を対象とした実験で効果が認められたため、同調試料を用いた体細胞分裂観察実験の実践を2校の中学校で行った。まず、G県F中学校で3年生4クラス、152名を対象として実践を行った。試料は、ニンニク鱗茎由来の根で、同調処理をしたものと処理していないものをそれぞれファーマー液で固定したものを用いた。各試料は形状の違う遠沈管に入れておき、同調の有無が事前にはわからないようにして実験を行った。授業は通常実験を行っているF中学校の理科の教員が担当し、解離から染色までの手順を生徒が行った。授業後にアンケート調査を行ったところ、分裂中の細胞がいずれの試料でも観察できなかった生徒が半数以上を占め、観察できた生徒でも同調の効果は認められなかった（図5）。

一方、G県K中学校における実践（3年生3クラス99名）では、分裂中の細胞を観察できた生徒が大部分を占め、さらに同調の効果も認められた（図6）。

このように学校によって異なる結果となった原因として、ニンニクの細胞が比較的小さく、400倍で観察を行ったため、生徒の顕微鏡観察経験の豊富さに結果が左右された可能性がある。授業に立ち会った際には、100倍で見つけた分裂中の細胞を400倍に変えたことで見失ったケースもあった。詳細な調査は行っていないが、400倍での観察に失敗した生徒には、プラスチックのカバーガラスを用いた生徒が多いようだった。一方で、分裂細胞を観察できたと申告した生徒の中には、重なった細胞核や、極端な場合には混入異物を誤って認識していたケースも見受けられた。また、クラスや学年の雰囲気などでもアンケートへの回答に偏りが生じることがあるらしく、アンケート結果の信憑性について疑問が残る結果となった。中学生対象の実践についてはアンケート調査の方法や実験前

の事前指導などを慎重に検討したうえで、改めて同調試料の効果を確認する必要がある。

図5 分裂中の細胞が観察できた試料(F中)

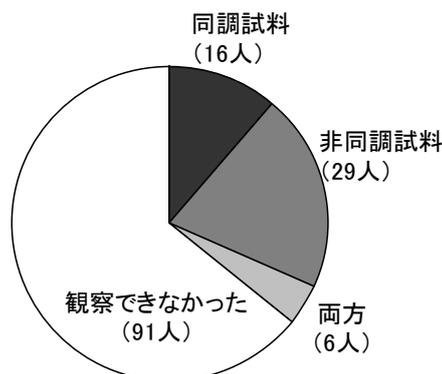
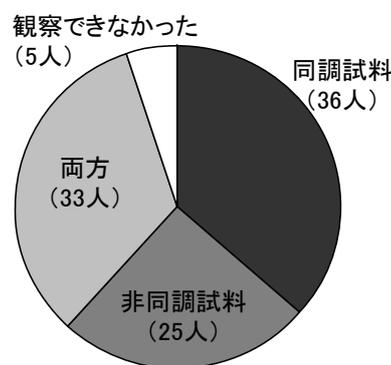


図6 分裂中の細胞が観察できた試料(K中)



以上の実践の結果から、体細胞分裂の観察実験に細胞周期の同調を導入することは分裂細胞のを見つけやすさに関して効果があることが示唆された。しかし、中学校で効果的な導入を行うためには、事前の指導を含め、工夫が必要であることがわかった。また、細胞周期の同調処理について中学生に説明する方法も今後の課題である。（未発表データ）

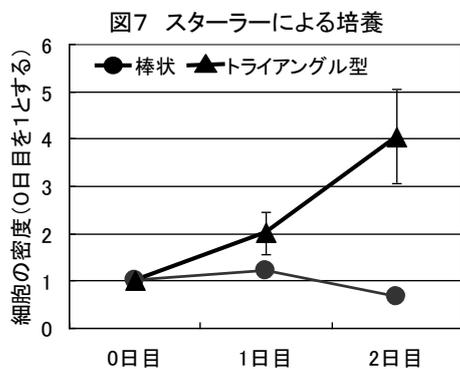
#### (2) BY-2細胞の導入

##### (2-1) 細胞の培養方法の検討

通常の実験室での培養は、300 mL 三角コルベんに細胞を無菌的に継代し、27°C、130 rpm、暗所の条件で振とう培養機で連続振とう培養を行っている。しかし、振とう培養機は学校現場にないため、他の培養方法を検討した。振とうの主な効果は、培地成分を行き渡らせることと酸素の連続的な供給である。したがって、容器全体を振る代わりに容器内部を攪拌する機材であるスターラーの利用を検討した。

まず汎用の棒状の攪拌子を用いたところ、培養開始後1日目までは細胞の増殖が認められたが、2日目になると1 mL当たりの細胞数がむしろ減り、同時に壊れた細胞の破片が見られるようになった。この結果から、棒状の攪拌子と三角コルベンの底面との間で細胞がすり潰されて破砕されると考えた。そこで、

容器底面とのすき間ができにくいトライアングル型の攪拌子を用いて培養を試みたところ、培養開始2日目まで良好な増殖が見られた(図7)。以上から、トライアングル型の攪拌子を入れた培地に無菌的に細胞を継代し、スターラーとセットにして学校現場へ持ち込めることがわかった。なお、研究のこの部分については学部学生(松村)の協力を得て行った。(雑誌論文①)



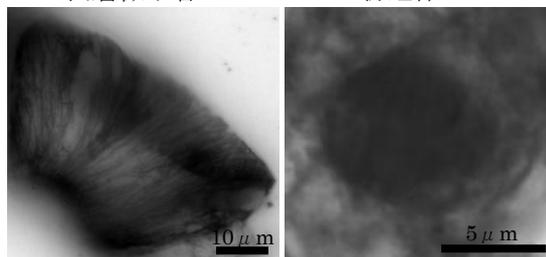
(2-2) BY-2細胞の微小管を明視野で観察する方法の確立

体細胞分裂における染色体の挙動を理解するためには、染色体を両極に分ける装置である紡錘体の存在と働きを知ることが重要である。紡錘体は高等学校の生物Iの教科書では体細胞分裂の模式図中に構造と名称が明記されているが、中学校の教科書ではその存在が図示されているにとどまっている。そこで、体細胞分裂の理解を深める補助教材として、明視野で紡錘体を観察できる試料を作成することを試みた。高等学校では新学習指導要領の元、細胞骨格について学習することとなったため、細胞骨格の一員である微小管を実際に観察することができればその理解の助けにもなることが期待できる。

BY-2細胞の微小管を間接蛍光抗体法で染色する方法は確立されていたため、金粒子で修飾された二次抗体を用いて明視野で観察できる試料の作成を試みた。何種類かの大きさの異なる金粒子で修飾された抗体を試したが、蛍光抗体を金粒子修飾抗体で置き換えただけでは微小管が観察されなかった。最終的に、非常に小さい金粒子(1.4 nm, Nanogold)で修飾された二次抗体を用い、さらに銀増感の手順を加えることで、明視野においてBY-2細胞の微小管を観察できる試料を作成できた(図8)。学部学生と高等学校の教員にプレパラートを観察してもらった結果、微小管の観察に慣れていなくても繊維状の構造の存在が十分に認められることがわかった。この方法に関しては教員免許状更新講習などの機会に紹介して普及を図る。しかし、現在までに確立した方法では、分裂間期に形成される表層微小管を良好に染色されるが、紡錘

体を繊維の向きがはっきりと分かる状態に染色できず、課題として残ってしまった。なお、研究のこの部分については学部学生(高橋)の協力を得て行った。(未発表データ)

図8 BY-2の微小管の明視野像  
表層微小管 紡錘体



(2-3) BY-2細胞の画像教材の作成

(1)でも述べたように、体細胞分裂の理解には固定細胞の観察を行うだけでなく、周辺の補助教材を活用することが望ましい。そこで、BY-2細胞の観察しやすさを活かして、分裂時の動画、静止画などの画像教材を作成し、HPで公開した。(1)のニンニクの分裂像や(2-2)の微小管の染色画像も同HPで公開中である。また、体細胞分裂や微小管の観察以外のBY-2細胞の学校での活用方法をまとめており、順次公開を進める。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

①松村 拓也、佐野(熊谷) 史、学校現場で可能な植物培養細胞の簡易培養法の検討、群馬大学教育実践研究、査読有、第30号、2013、pp.37-40

②佐野(熊谷) 史、体細胞分裂観察実験への細胞周期同調手法の導入—大学学生実験における実践の試み—、群馬大学教育実践研究、査読有、第29号、2012、pp.51-55

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://rika.edu.gunma-u.ac.jp/~fsano/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐野 史 (SANO FUMI)  
群馬大学・教育学部・准教授  
研究者番号：30313018

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし