

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 4月22日現在

機関番号：14302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500808

研究課題名（和文）生物における課題研究内容の充実・簡便な動物組織実験法の開発と応用

研究課題名（英文）Enrichment of the contents to study animal tissues in Biology class/
Development and application of the brief method to observe animal tissues

研究代表者

梶原 裕二 (KAJIWARA YUJI)

京都教育大学・教育学部・教授

研究者番号：10281114

研究成果の概要（和文）：高等生物で動物の組織実習は実施されない。本研究では、凍結包埋剤と20%アルコールで置換したブロッコリーの髄を支持体にするすることで、凍結後にカミソリで徒手切片を作成する簡便な手法を考案した。マウスの精巣、小腸、ニワトリ胚の組織構造が従来の煩雑なパラフィン切片と同質で観察できた。この手法が、これまで敬遠されてきた高校生物で実施できることが示された。新設の理科課題研究で、研究課題の充実に寄与すると思われる。

研究成果の概要（英文）：There have been few experimental studies that observed the animal tissues in the biology class in high schools. In this experiment, a brief method to observe the animal tissues was developed using both an embedding medium for frozen tissue specimens and a broccoli stem as their holder. The samples frozen with the embedding medium in the broccoli stem has been sectioned with a razor-blade by hand. The tissue structures of the testis and the small intestine, as well as chick embryos could be observed with the slide prepared for a microscope. Thus, it was shown that the present method was good for the biology class of high schools.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：科学教育・高等教育

キーワード：生物教育、課題研究、動物組織、凍結切片

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の体では、同じ機能や形態をもつ細胞がいくつかの組織集団をつくり、それらの組織が秩序だてて組み合わされて器官を形成し、多くの器官が集まって統一のとれた体ができている。これらの規則正しい組織の構造を観察する実習は、複雑な多細胞生物の体のつくりを理解する基礎となる。

多くの組織実習の場合、ハウセンカヤトウモロコシなどの草本植物の茎や、木本植物のツバキやヒイラギの葉が用いられる。これらの材料は硬い細胞壁をもち、カミソリの刃を用いた徒手切片法により簡便に組織切片が作成できることから、多くの教科書に記載されている。このような、限られた種類の硬い木本植物の葉を用いた組織実習は、植物の葉の基本構造を理解する実習としては充分である。しかし、身の回りには、多様な植物が存在しており、また、同じ植物でも多様な器官や発達段階が存在しているため、改めて、様々な生物の構造を知るといふ組織実習の本来の意味に戻ると、より広範囲な植物を材料にして、多彩な興味深い実習が可能ならずである。例えば、柔らかいパンジーの葉や小さな身近な雑草であるヤエムグラの葉はいったいどのような構造をしているか、あるいは、硬い葉や茎、根の構造以外、例えば、柔らかい花やガクがどのような組織構造をしているかなど、観察課題に事欠かない。このように、硬い木本の葉や草本の茎といった限定された材料という要因が外れると、特に草本の柔らかい植物の葉や花が材料にできると、実に豊富な観察対象が存在することがわかる。より広範囲な植物の組織実習が整備できれば、自ら課題を見つけ易く多様な探求活動の実験例が選択できる。

まず、植物の内部構造、組織を詳しく見る

手法の開発を行ったが（梶原、06,07,09）、身近な生物としては、植物に限らず動物も存在する。ヒトの体の理解の基礎、様々な系統の動物の体の理解、体の構造の作られ方の理解を図るため、外部からの観察に加え、内部構造を詳しく観察する「簡単な手法」があれば、授業の中で生徒が実物を用い、体験を通じた実感をともなった授業が実施できる。また、解剖実習に加えて、組織実習を実施すれば、貴重な動物を有効に利用して学ぶことにも繋がる。加えて、前述の柔らかい植物を含めた多くの植物に加え、動物にまで広げると、昆虫や魚、カエルなど身近な生き物を、内部構造を調べる課題研究の対象として利用することができ、生徒の活動の機会が広がると期待される。従来、長い期間と特別な器機、技術を必要とした動物の組織を、自分の学校の実験室で、簡単に観察する手法を考案することは、このように、生徒が調べる内容を潜在的に広げる上で意義深いと考える。

2. 研究の目的

植物の組織実習の対象を広範囲な身近な草本植物まで広げると、多くの課題研究が立案可能となった。そこで、より組織切片の作成が困難で、時間がかかる動物の組織実習を見直し、もし、植物の場合のように、動物組織実習を簡単にすることができれば、

(1) 従来、図版による動物組織の学習、あるいは既存の標本の観察であった組織実習を実際の生徒の活動として実施できる。

(2) 動物の身体が、細胞、組織、器官、個体という階層性をもった構造をしているという、生物の重要な概念を実際の活動を通じた実習として理解できる。

(3) この方法で、多くの動物組織を課題研究の観察対象とすることができ、課題研究の内容を広く求めることができる。

(4) 実験操作による動物組織の変化を調べる課題研究に、外部形態以外に、ほとんど考慮されていなかった組織学的変化を見ることができ、活動の多様性が大幅に増す。特に、(3)(4)の動物の変化を組織学的に検討する内容は、従来の中学校・高等学校の生物にはほとんどない。そこで、多様な動物組織を観察する手法を開発し、中学校、高等学校の実習時間内で実施可能な簡便な組織実習の方法や材料を考案すること、さらに、考案した動物組織を観察する簡便な手法を用いて、高等学校で実施できる組織実習の具体例を数例考案し、高等学校で実践することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 凍結包埋剤と徒手切片法を用いた簡便な動物組織実習法

材料はマウス(*Mus musculus*)のC57BL系統及びICR系統/雄を用いた。エーテル過剰麻酔死させたマウスから取り出した試料を10%ホルマリン(リン酸緩衝生理食塩水)中で固定・保存した。標本作製に際し、まず試料を3・5 mm角にトリミングし、ティシューテック社の包埋容器中に、凍結包埋剤(OCTコンパウンド、サクラファインテックジャパン)で包埋した。

(2) 凍結包埋剤を用いた徒手切片法の改良

ブロッコリーの髓を試料の保持体として用いた。予め約1 cm角(長さ約2 cm)に切断したブロッコリーの髓を、20%エタノール中で真空ポンプを用いて脱気するとともに、内包する水分を20%エタノールで置換・保存した。中心部に小さな穴をあけ、試料と凍結包埋剤を入れ、冷凍庫で冷却・固化した。あるいは、ドライアイス小片を凍結包埋剤の上に数分放置・固化させた。凍結・固化したブロックを、小型ナイフを用いて、適切な断面

が得られるよう余分な凍結包埋剤をトリミングした。どこでも実施できる手法を想定し、クリオスタットを使用せずに薄切を行った。安全カミソリの刃(フェザー両刃カミソリ・ハイステンレス)を用いて、徒手切片法により標本作製した。凍結包埋剤とともに薄切された切片は、シャーレに入れた生理食塩水に浮かべ、凍結包埋剤を水に溶解した。切片をピンセットでスライドグラス上に取り、マイヤー氏ヘマトキシリン液、または酢酸オルセイン液で染色した後、カバーガラスをかけた顕微鏡で観察した。組織標本は光学顕微鏡(ECLIPSE-E200;ニコン)で観察し、顕微鏡用デジタルカメラ(DSカメラ・DSL-2;ニコン)で写真撮影を行った。

4. 研究成果

本研究にて開発した簡便な徒手切片法による組織実習例を以下に示す。

(1) マウス組織の詳細な観察

論文①で示したように凍結包埋剤とブロッコリー髓を用いた徒手切片法による動物組織像はパラフィン切片とほぼ同様の質もつ標本が得られた。精細管が多数集まった精巢の構造、腎臓の皮質、髓質や糸球体やボーマン嚢の構造、周囲部の多数の尿細管、大脳皮質全体の構造と大脳皮質内部の錐体細胞の存在、小脳内部の多数の細胞からなる顆粒細胞層とその周囲の大型のプルキンエ細胞、またその外側には分子層、肺の多数の肺胞が集まった粗いスポンジ状の構造が存在がわかる。小腸の特徴的な組織を以下に示す(図)。小腸のルーメン内の円柱状の絨毛が、絨毛の表面には上皮細胞が密に配列し、上皮下には間充織が存在する。絨毛の底面にはクリプトが存在する。また、小腸の外側には縦走、輪走2層の筋層が存在する。通常のパラフィン包埋法で作製された組織標本と比較しても、

ほぼ同様な質で観察できることがわかる。

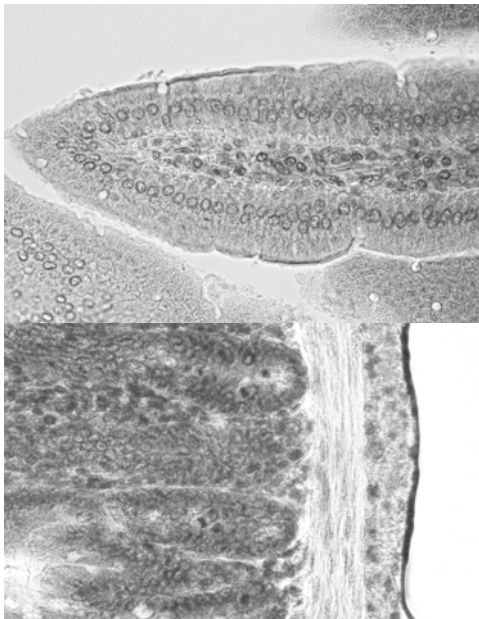


図1 マウス小腸絨毛の組織像

(2) ニワトリ胚の観察

本手法の軟弱な組織でも簡便に薄切できる長所を利用して、成体組織より軟らかく、小さいニワトリ胚の標本作成を行った。その結果、体幹部を構成する神経管、体節、表皮などの基本的な構成要素を観察できる標本が得られた(図2上)。この標本から、体を前後に支える大きな脊索、羊膜、羊膜腔の存在も確認できた。また、神経管や体節を構成する円柱上皮構造(図2下)や体側中胚葉と表皮からなる羊膜の構造、臓側中胚葉と内胚葉からなる内臓板の構造、体腔の存在などが確認できた(図2上)。このように短時間の操作でありながら、観察に十分な質をもち、高校生物に記述される従来のカエル胚横断切片と比較し格段に詳しい標本が得られた。

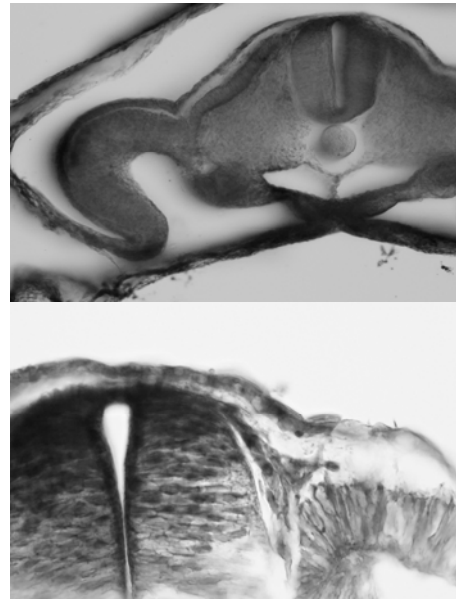


図2 ニワトリ胚胴部の断面図

(3) マウス分裂細胞の検出

マウスはICR系統を用いた。チミジンの相同体であるBrdUを1mg/mlの濃度で飲料水に溶かし、24時間摂取させた。成体から小腸と精巣を取り出し、ブアン氏固定液で固定・保存した。BrdUは抗体(BrdU In-Situ Detection Kit(日本BD社))を用いて原法を大幅に簡略化して検出した。

簡易凍結徒手切片法にて切片作成後、BrdU抗体でマウスの分裂細胞を検出した結果、小腸のクリプトから分裂産生され絨毛上部へ移動する上皮細胞(図3)が観察できた。また、精細管の周辺部に位置する分裂活性の高い精原細胞が観察できた。

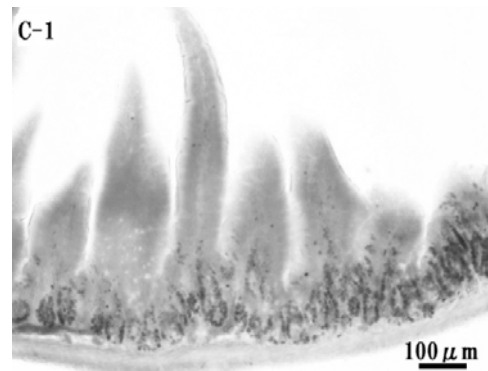


図3 マウス小腸上皮の分裂細胞

(4) 安価で身近な動物の解剖・組織実習

身近な動物の解剖・組織実習として、フナ、キンギョ、アジアウキガエルを材料として、解剖とそれに続く組織実習を考案した。麻酔薬で深麻酔させた後、フナ・キンギョは左腹壁、カエルは腹壁を開腹し内臓器官を観察した。眼胞、腸、鰓、卵巣を取り出し、ブアン氏固定液で固定・保存した。試料を簡易凍結切片法で組織標本にした。

キンギョとアジアウキガエルの解剖から、消化管、鰓、肝臓、鰓、生殖器など様々な器官の観察が可能であった。腹腔の内臓器官の配置に関しては、魚類では左側面を観察することになるが、カエルでは腹側から観察することになり、教科書などのヒトや実験動物の器官の配置を学ぶ上では、カエルが良いと思われる。

解剖後、固定した標本から凍結切片を作成した。フナの網膜(図4上)、腸(図4下)、卵巣、鰓の組織、アジアウキガエルの網膜、胃、腸の組織が詳細に観察できた。これらの組織は、マウスと同様な構造であり、代替動物として十分な質であった。

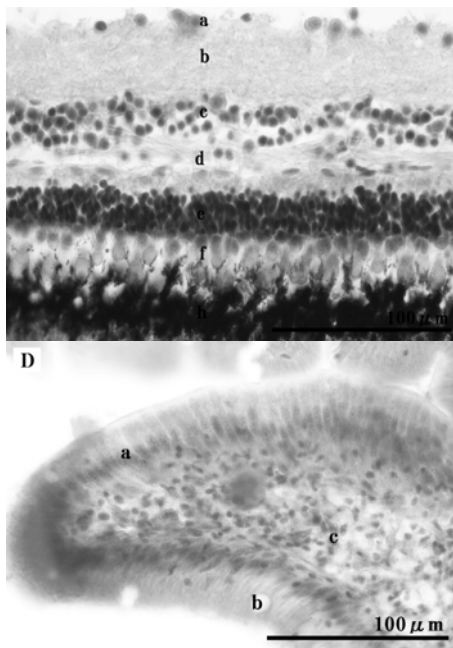


図4 フナの組織像

(5) 高等学校での実践例

京都府立城南菱創高等学校教養科学科自然科学系統の生徒40名を対象に、「簡易凍結徒手切片法を用いた動物組織の観察 -動物の体の中で細胞が・・・」の課題のもと、平成23年度高大連携授業を、2012年2月22日、及び2013年2月20日に実施した。

簡易凍結切片法を用いた動物の組織実習を実施した。流れとしては、ビデオによるマウス解剖と器官の説明、固定した腸、精巣の組織標本の作成と観察である。分裂細胞の検出を予定していたが、分裂細胞の検出は時間の関係で実施できなかった。

京都府立山城高等学校普通科II類理数系の生徒40名を対象に、「体の作られ方を学ぶ -有羊膜・ニワトリ胚の体-」の課題のもと、平成24年度SPP講座型授業(AG120509)を、2012年9月13日、及び2012年9月20日に実施した。この授業は、京都府立山城高等学校理科、園山博教諭の申請によるSPP型授業であり、その結果は平成24年度日本理科教育学会近畿支部大会(奈良教育大学)で発表された。

京都教育大学附属高等学校及び京都府下高等学校の生徒約15名を対象に、「動物の組織・分裂細胞を見てみよう」の課題のもと、平成24年度SSC活動を2012年10月27日に実施した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

① 梶原裕二、山崎康平、簡易凍結切片法を用いた身近な魚類と両生類の解剖・組織実習、京都教育大学紀要、査読無、121号、2012、43-52

② 梶原裕二、八十田茂樹、凍結包埋剤を用いた簡便な徒手切片法による動物組織とニワトリ胚の観察、生物教育、査読有、52巻3号、2011、112-120

〔学会発表〕(計5件)

①園田博、梶原裕二、ニワトリ胚の切片観察を取り入れた発生分野の学習、日本理科教

育学会平成 24 年度近畿支部大会、2012 年 12 月 1 日、奈良教育大学・奈良市

②山崎康平、梶原裕二、簡易凍結切片法を用いた動物組織の実習例：身近な魚類と両生類の解剖・組織実習、及びマウス分裂細胞の検出、日本理科教育学会第 62 回全国大会、2012 年 8 月 11 日、鹿児島大学・鹿児島市

③梶原裕二、山崎康平、簡易凍結徒手切片による動物組織の詳細な観察方法、日本生物教育学会第 92 回全国大会、2012 年 1 月 8 日、神戸学院大学・神戸市

④梶原裕二、凍結包埋剤を用いた徒手切片法によるニワトリ胚の観察、日本理科教育学会第 61 回全国大会、2011 年 8 月 21 日、島根大学・松江市

⑤八十田茂希、梶原裕二、凍結切片法を利用した簡便な動物組織実習の開発、日本理科教育学会第 60 回全国大会、2010 年 8 月 8 日、山梨大学・甲府市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 裕二 (KAJIWARA YUJI)

京都教育大学・教育学部・教授

研究者番号：10281114