

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501015

研究課題名(和文)極めて簡便な神経染色法を応用した高校生物実験パッケージの開発と実践的検証

研究課題名(英文) experiment package

研究代表者

相見 良成 (AIMI, Yoshinari)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20231756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：若者の理科離れが指摘されて久しいが、理科、さらには科学への興味を喚起するためには、どのような言葉を尽くすよりも、実際の実験を通して科学現象の不思議さ、精巧さ、美しさを児童、生徒、学生に体験してもらうことが重要である。そこで高校の理科室で実施可能な神経染色実験パッケージを開発した。これはNADPHジアホラーゼ染色法を用いたもので、低コストで安全に、動物から標本を採取して2時間以内に染色し、写真を撮影できる。解説スライドを含めた本パッケージは理科教育に大いに資するものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Experiments are very important for the science education of junior high school and high school students. Through experiments students experience the delicacy, beauty and wonder of nature. To enable this sort of experience a package of experimental material for neuronal staining has been developed. This package, using NADPH-diaphorase histochemical staining, is low-cost, safe, and can be performed within two hours in an ordinary science lab in the school. Students will discover how this simple method can let them examine the fine detail of nerve cells in the body. The package will contribute to science education and hopefully foster further scientific curiosity.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：科学教育・教育工学

キーワード：理科実験 メダカ 神経染色 高等学校 中学校 理科室 NADPH ジアホラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の代表者は、高等学校の理科教諭より「高校の理科室で、手軽に神経を染色することが出来ないか」との相談を受けた。これまでの中学・高校向けの理科実験では神経細胞を特異的に染色するような実験は無かった。

## 2. 研究の目的

若者の理科に対する興味を喚起し、将来の科学立国の基盤となる人材を育てることが重要であることはいうまでもない。若者の理科離れが指摘されて久しいが、彼らを理科、さらには科学へ惹きつけるためには、どのような言葉を尽くすよりも、実際の実験を通して科学現象の不思議さ、精巧さ、美しさを体験してもらうことが重要である。

そこで本研究では、高校の生物実験として、理科室で実施可能な神経染色実験を開発し、実際に試行してその教育効果を検証することを目的とした。実験の基盤となる『NADPHジアホラーゼ染色法』は極めて簡単かつ短時間の操作で、とても美しい神経組織の染色を行うことができる方法である。多くの論文に引用され、世界中の研究施設で用いられているこの方法について、高校の理科室で実施できるように改変を加え、試薬のキット化・実験操作の動画化等を含めた『神経染色実験パッケージ』として確立することを目指した。

## 3. 研究の方法

以下を目標に掲げ、動物種、臓器種、試料作成法、染色条件などを検討した。

- ・ 2時間以内で、動物から標本を採取して染色し写真を撮影すること。
- ・ 特殊で高価な器械(クライオスタットなど)を使用しないこと。
- ・ 特殊な動物でなく市中で入手可能な動物を用いること。
- ・ 再現性が高い明瞭な結果が得られること(失敗しないこと)。
- ・ 低コストで安全に行えること。

染色には以下の特長を持つ『NADPHジアホラーゼ染色法』を用いた。

- ・ 染色手順が簡素でかつ染色に要する時間が短い。
- ・ すべての神経でなく一酸化窒素(NO)作動性神経を特異的に染める。
- ・ ゴルジ染色のように明瞭に神経細胞体と突起を描出する。
- ・ 高価な試薬や観察機器を必要とせず低コス

トである。

検討を加えた項目など

動物種、臓器の選定：

市中で入手可能な食用の魚類(鰯、鮎など)、肉類(牛の腸管等)など様々な材料の染色を試みた。入手が簡単で顕微鏡観察に適したメダカの腸管を標本として選択した。

『NADPHジアホラーゼ染色法』の改変：

メダカの腸管を対象として、染色反応に用いる試薬の最適濃度や反応時間の再設定を行った。また安全に試薬を取り扱うための試薬の溶解法等を考案した。

特殊な機器を用いないための工夫：

メダカの腸管を圧平して全層標本とし、マイクロームを使用せずに顕微鏡下で観察可能とした。また恒温槽なしで37程度の反応環境を作り出すために携帯カイロを利用するなど、理科室での実験を可能にする工夫を行った。

これらの検討を通じて以下の実験パッケージを作り出し、実際に中学校・高等学校の理科室で施行して効果などを検討した。

## 4. 研究成果

メダカの腸管を用いた染色実験プロトコールを完成し、実験の手順や実験の背景を理科室で説明するためのパワーポイントによるスライドを作り上げた。また生徒32名が一度に実験するための試薬や器具などをとりまとめてキットとした。

以下にプロトコールなどの内容を示す。

### 【染色実験のプロトコール(教員用)】

『メダカ腸管神経のNADPHジアホラーゼ染色』

1 メダカ(ヒメダカ: *Oryzias latipes*)を麻酔する。

- 1.1 水槽より取り出したメダカを氷水に入れる。
- 1.2 10秒ほどで全く動かなくなる。

2 消化管を取り出す。

- 2.1 エラ蓋の後方端あたりの背側よりハサミで脊髄を切断する。
- 2.2 ピンセットを用いて開腹を行う。
- 2.3 ピンセットで軽く消化管をつまみ体外へ引き出す。

2.4 強く引っ張ると断裂するので、切れないように注意する。

2.5 引き出した腸管を口側、肛側の適当な部位で切断し摘出する。

### 3 消化管を固定する。

3.1 腸管を綿棒の先端で押し、さらに綿棒を廻すことで、蠕動運動の要領で腸管内容を除去する。

3.2 摘出した腸管を4%ホルマリン溶液(4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)に浸漬し固定する。30分間、室温で。

3.3 固定後、リン酸緩衝液(0.1 M phosphate buffered saline containing 0.3% Triton X-100, pH 7.4)で腸管を軽く洗う。

3.4 もう一度、別のリン酸緩衝液に浸けておく。

### 4 消化管にNADPHジアホラーゼ染色をおこなう。

4.1 反応液(10 mg NADPH, 5 mg NBT in 20 ml 0.1 M phosphate buffered saline containing 0.3% Triton X-100, pH 8.0)に腸管を浸漬する。貼るカイロで暖めながら(約35~40℃)60分間。

NADPH (reduced Nicotinamide Adenin Dinucleotide Phosphate)

FW 833.4  $C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$

NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

FW 817.6  $C_{40}H_{30}C_{12}N_{10}O_6$

4.2 反応後、リン酸緩衝液で腸管を軽く洗う。

### 5 顕微鏡下に観察する。

5.1 腸管を数滴のリン酸緩衝液と共にスライドグラスに載せる。

5.2 カバーグラスをかける。

5.3 顕微鏡観察を行う。

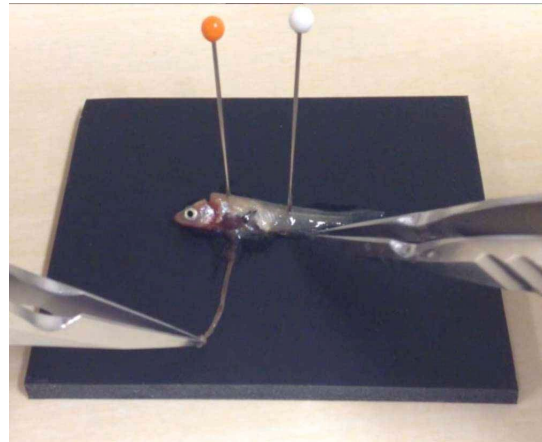
5.4 接眼レンズ越しに携帯電話のカメラなどで写真撮影が可能。

【生徒用の実験レジメと手順説明用パワーポイントの動画から抜粋した画像】

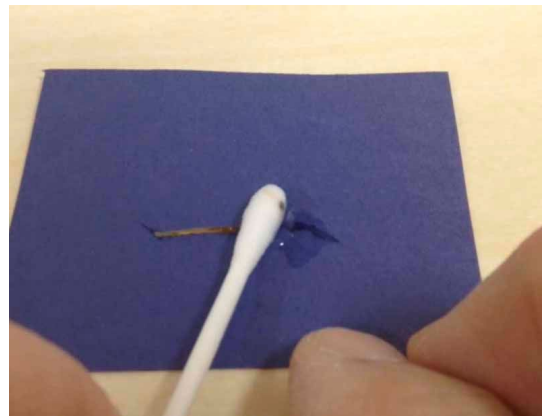
『実験テーマ：メダカの腸管神経の染色』

防具をつける

【メダカの処置】麻酔・犠牲死：氷水に浸ける。ゴム板にまち針で背と尾を固定し、頭部の背方から脊髄を離断する。腸管摘出：とげ抜きピンセットで開腹し、腸管をやさしく引き出し、長めに採取する。



【腸管の前処置】腸管の内容除去：腸管を青い紙に伸ばして置き、濡れ綿棒をローラーにして内容を絞り出す。



前処置液へのつけ込み：(F)の液へしっかり浸ける。30分間。

【洗浄液の準備】プレートに洗浄液を分注：紙コップの口を少し折り曲げておく。紙コップに洗浄液をいれ、そこから染色容器のAとBの列に洗浄液を分注する。Cの列は空けておく。

【観察の準備】顕微鏡の準備：チェック用の標本を見て、顕微鏡の使い方やコンディションを確認しておく。

【染色前の標本観察】前処置の停止：洗浄液Aで2分ほどすすぐ。標本をスライドにのせる：数滴の洗浄液と共に。観察：カバーグラスをかけて顕微鏡で観察。観察後カバーをはずして標本をBへ戻す。

【標本の染色】染色液の調製：50mlのビンに洗浄液を1/3ほど(約20ml)入れる。NADPHとNBTの小チューブの蓋を開けて、チューブごとビンに入れる。しっかり蓋を閉めてよく振る。



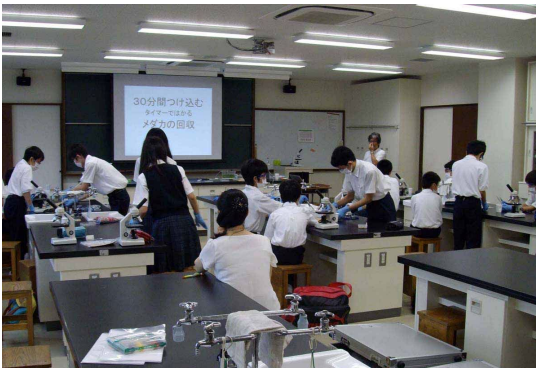
染色反応：染色液をCの列に注ぎ、腸管をつけ込む。カイロで暖めながら60分間反応させる。



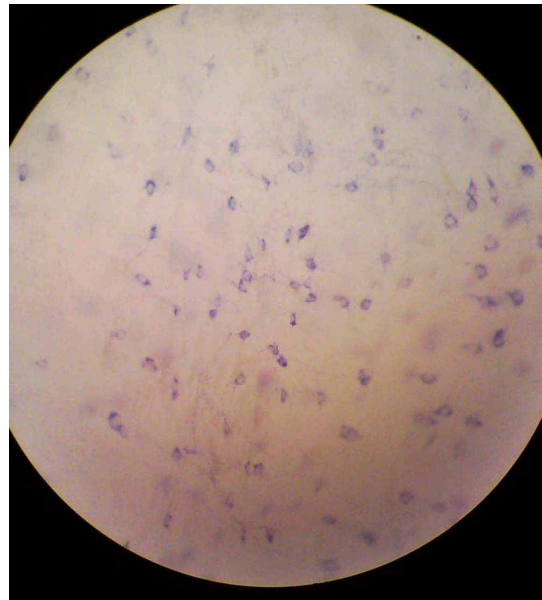
【標本の観察】染色反応を停止：CからBの列に移して1分すぐ。標本をスライドにのせる：数滴の洗浄液と共にスライドに載せ、横長に広げておく。カバーガラスをかける：カバーをかけ、軽く押さえる。

【後片付け】スライド、カバーガラス：コーヒーの空きビンに捨てる。廃液：漏斗を用い廃液ボトルへ。紙のゴミ：大きいゴミ袋へ。器具等：プレート、ピンセット、ハサミはクーラーボックスへ。

以上の実験パッケージを中学校1校、高等学校2校の理科室で行い、良好な結果を得た。



「中学校理科室での実践の様子」



「染色結果をスマートフォンのカメラで撮ったもの」

これまで中学校・高等学校の理科室で簡便に神経を染色する方法は無かった。解説のスライドなどを含めた今回新たに作り上げた実験パッケージは、簡便であるのみならず短時間に安全に施行することが可能であり、今後、中学校や高等学校の理科教育に資することができるものであると考える。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

発表者名：相見良成

発表タイトル：理科室で神経を染色する 極めて簡便な神経染色法を応用した高校生物実験パッケージの開発と実効性の検証

学会等名：第118回日本解剖学会総会・全国学術集会

発表年月日：2013年3月30日

発表場所：高松市

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

相見 良成 (AIMI, Yoshinari)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20231756

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：