

面接授業レポート 2019年10月 8日

面接授業科目名	一步進んだ生物学実験
担当講師名	鈴木美穂・山野春子・奥野誠・内田英伸
科目コード	2532727
氏名	中野 圭一
クラス	B
学生番号	1910016985

該当欄に○	レポート内容 (提出先)		
	実験項目 1-4 (shoji-baba@nifty.com)	共同実験者名	杉浦 嘉彦
		月日, 時間	20191027
	実験項目 5-8 必須課題 (botry2018@yahoo.co.jp)	共同実験者名	
		月日, 時間	
	実験項目 5-8 任意課題 (botry2018@yahoo.co.jp)	共同実験者名	
		月日, 時間	

目次

1：動物・植物組織の観察とデジタルカメラ記録	： 2 ～ 4 P
2：植物組織・動物細胞標本の作製とデジタルカメラ記録	： 5 ～ 9 P
3：クラミドモナスの走性の観察	： 1 0 ～ 1 3 P
4：精子遊泳運動の観察	： 1 4 ～ 1 5 P
5：感想及び参考・引用文献	： 1 6 P

1：動物・植物組織の観察とデジタルカメラ記録

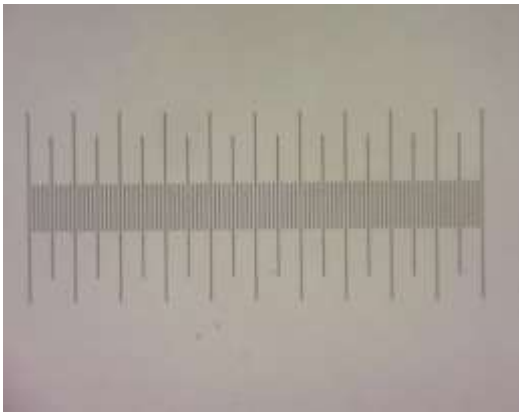
1－1：目的

本実験では顕微鏡の取り扱いを学び、既成の動物及び植物組織のプレパラート標本を観察し、その標本を顕微鏡下でデジタルカメラによって記録するまでの操作を体験・習得することを目的とする。

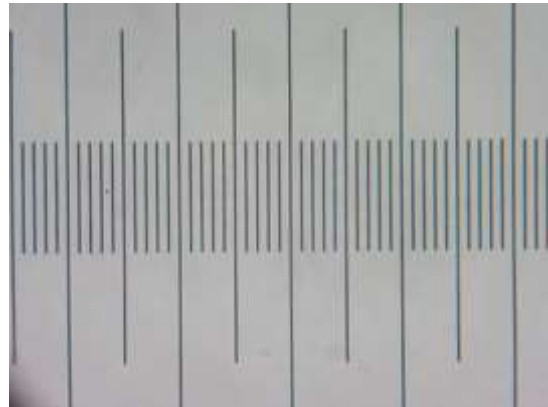
1－2：方法

顕微鏡及びアダプター付きデジタルカメラは既にセッティング済みのものを使用した。

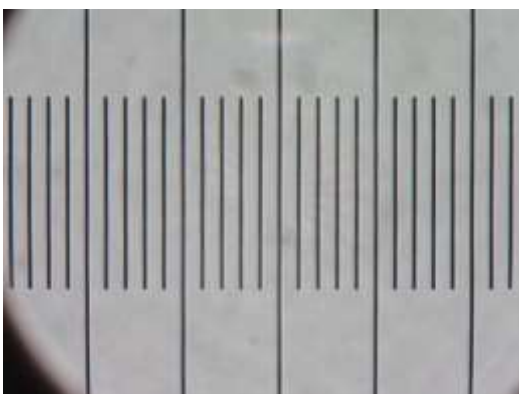
まず顕微鏡とデジタルカメラの練習をかねて、4倍・10倍・20倍・40倍の各対物レンズを使用し、マイクロメーターを撮影した。



対物レンズ 4 倍



対物レンズ 10 倍



対物レンズ 20 倍



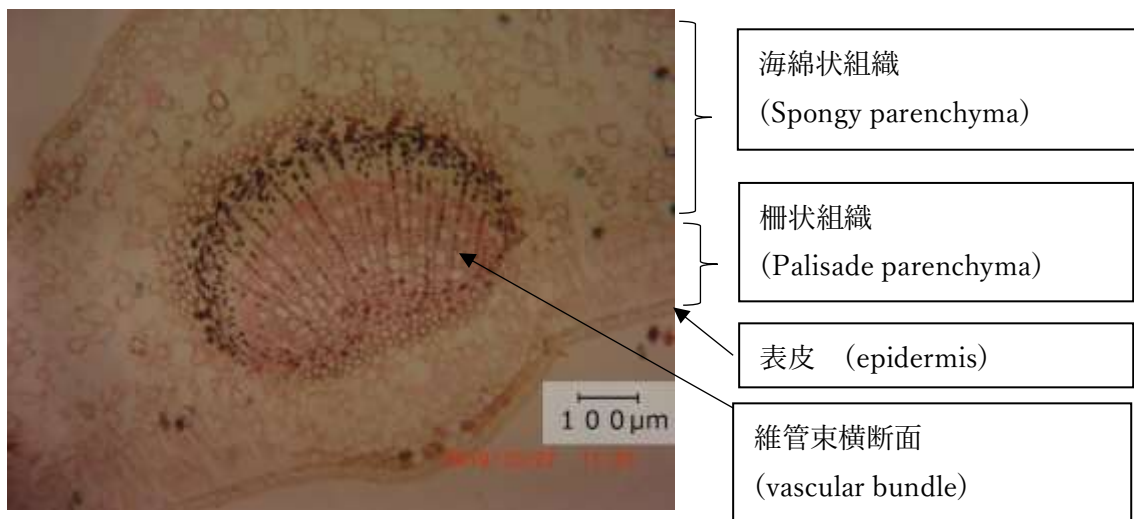
対物レンズ 40 倍

次に既成のツバキの葉の染色標本（横断面）を観察し、撮影を行った。

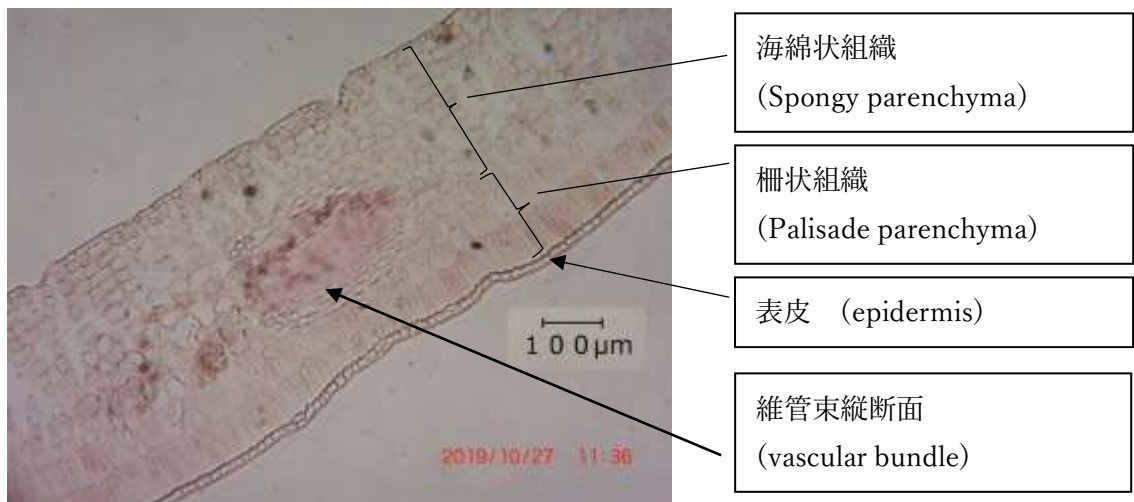
動物組織標本は時間が足りなかったため観察はしなかった。

1－3：結果

ツバキの葉横断面染色標本の写真を以下に示す。



ツバキの葉横断面（中心部）



ツバキの葉横断面（端部）

1－4：考察

デジタルデータの取得と加工の手技に関しては、ほぼ習得出来たものと思われるが、レポートの記述形式まで考慮した写真の構図は取れていないので、そこは今後の課題であろう。使用したデジタルカメラが使用経験の無い機種だったので、モード設定などで手間取ることがしばしばあり、これも何らかの対策が必要と思われる。

2：植物組織・動物細胞標本の作製とデジタルカメラ記録

2－1：目的

1：動物・植物組織の観察とデジタルカメラ記録で習得した顕微鏡及びデジタルカメラアダプターの取り扱いを踏まえて、自分で植物組織・動物細胞の標本作製し、観察と撮影を行うことを目的とする。

2－2：方法

植物組織標本作成に使用した資材は以下の通り。

- ・ツバキ (*Camellia japonica*)の葉
- ・ヤツデ (*Fatsia japonica*)の葉
- ・エタノール液 8% (消毒用エタノール液 10 倍希釈)
- ・ミリポア水
- ・スライドガラス・カバーガラス・両刃安全カミソリ (一枚を 4 等分に折って使用)・ハサミ・ピンセット

薄片標本の切り出し方法は以下の通り。

- I：2枚のスライドガラスの長辺を揃えてメンディングテープで一辺を貼る。
- II：間にハサミで形を細長く整えた葉を挟む。
- III：別のスライドガラスをテーブル上に置き、2枚のメンディングテープを 2 cm 程度離して平行に貼り付ける。
- IV：IIで挟んだ葉を一旦スライドガラスの縁に揃えてカミソリで削ぐ。
- V：葉を挟んだスライドガラスを、メンディングテープを平行に貼ったスライドガラスの上に置き、メンディングテープの厚さ (大体 40 μ m くらい) だけ葉を引き出して揃える。
- VI：引き出した部文をカミソリで削ぎ落とし、別のスライドガラスに垂らしたミリポア水の上に落とす。
- VII：カバーガラスをかけて、気泡を叩き出す。

この操作をツバキ及びヤツデの葉で行った。(写真)

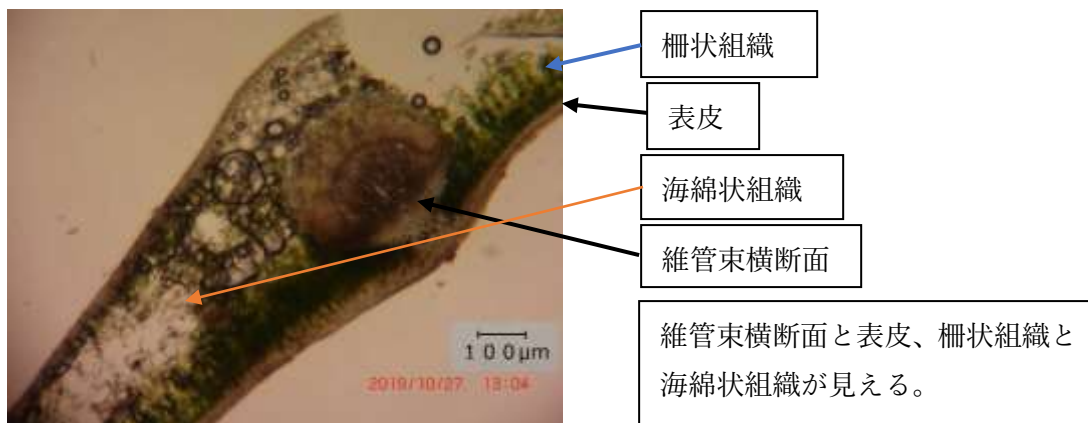
さらに、それぞれの葉の裏側表皮部分を薄く削ぎ落とす操作を、実体顕微鏡下で行った。(写真)

動物細胞標本の作成に使用した資材は以下の通り。

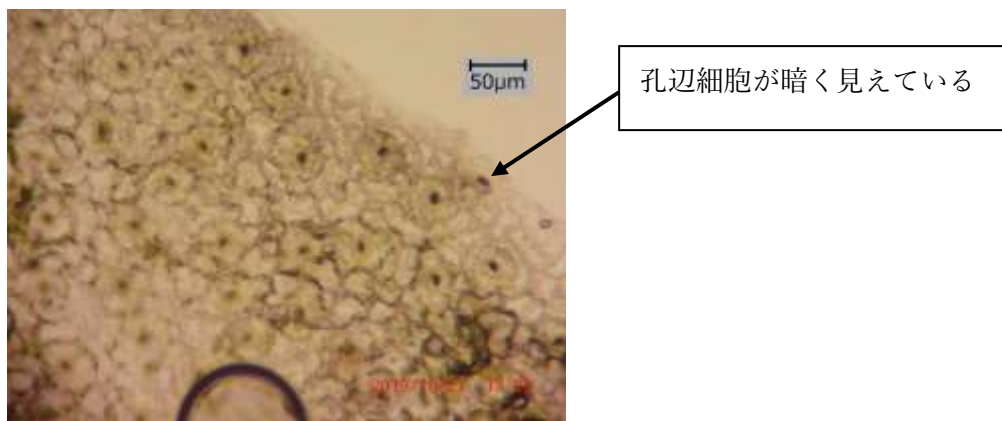
- ・ 各自の口腔粘膜上皮細胞（綿棒でこすり取る）
- ・ ギムザ液
- ・ 生理食塩水
- ・ スライドガラス・カバーガラス・綿棒・駒込ピペット・ピンセット

スライドガラスを2枚用意し、綿棒でこすり取った口腔粘膜上皮細胞をそれぞれにこすりつけ、片方には生理食塩水を、もう片方にはギムザ液を一滴たらし、カバーガラスをかけ、はみ出た液は濾紙で吸い取った。

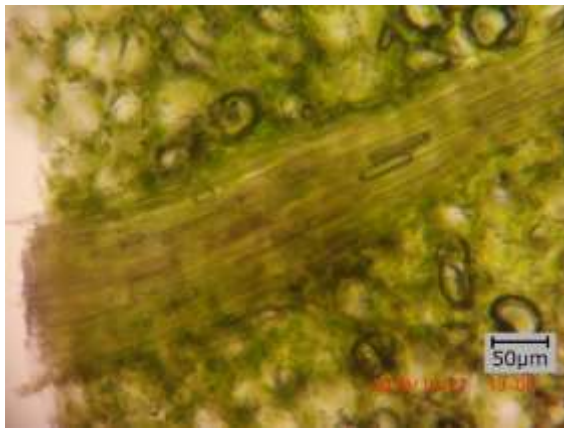
2－3：結果



ツバキの葉（横断面）

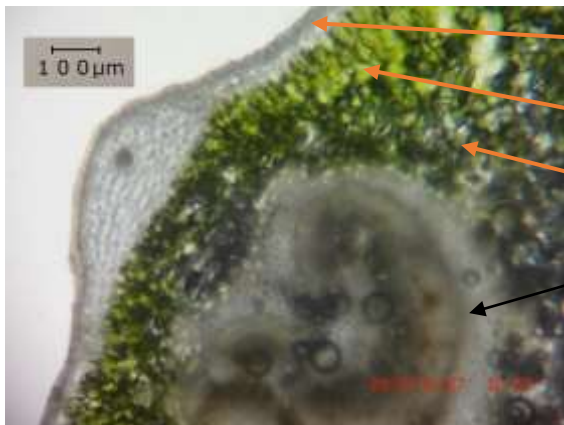


ツバキの葉（表面 気孔）



維管束縦断面が筋状に見える

ツバキの葉（維管束縦断面）



表皮

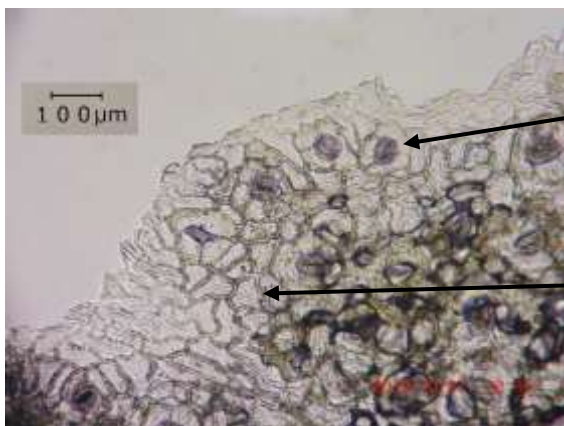
柵状組織

海綿状組織

維管束横断面

比較的良く各組織が形を保っている

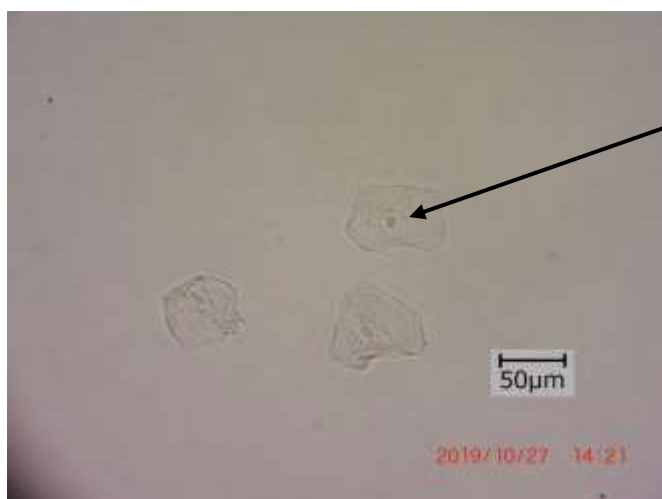
ヤツデの葉（横断面）



孔辺細胞がやや暗く見えている

表皮細胞には葉緑体が見えない

ヤツデの葉（裏面 気孔）



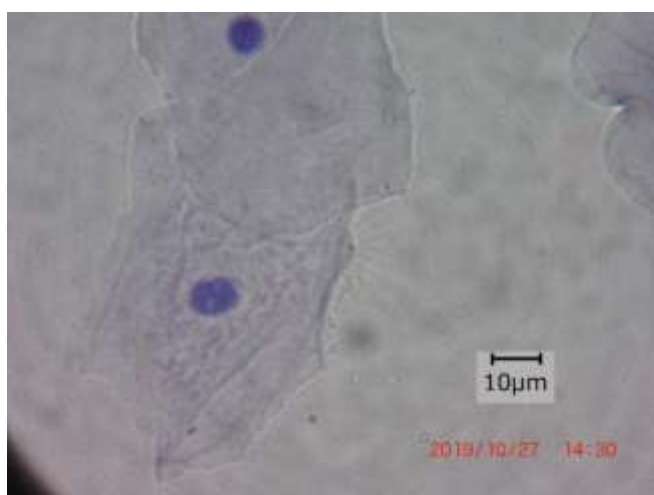
核は判別出来る

口腔粘膜上皮細胞(生食中)



核が青紫色に染まっている

口腔粘膜上皮細胞（ギムザ染色）



細胞内の構造が少し見えているが鮮明ではない。

口腔粘膜上皮細胞（ギムザ染色）

2－4：考察

植物の葉を薄片にする際、薄い方が顕微鏡下での観察はしやすい（光が透過しやすい）が、あまり薄くしすぎると構造が壊れてしまい観察が出来ない。ちょうどよい加減を見つけるのが難しかったが、かなり良い結果が得られたのではないだろうか。

口腔粘膜上皮細胞のギムザ染色は、ややギムザ液が少なかったのか少し濃度が足りなかったように思われる。もう少し濃く染めると微細構造が判ったかもしれない。

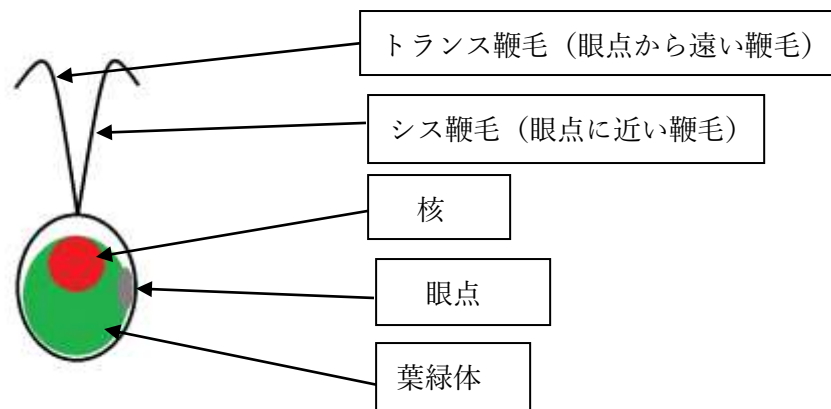
3：クラミドモナスの走性の観察

3－1：目的

前述の実験を踏まえて、顕微鏡下で動き回る生体の観察及び微細構造の観察（暗視野照明装置の利用）を行うことにある。

3－A－2：方法

クラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）は緑藻類の一種の単細胞生物であり、葉緑体を持ち光合成を行うので、光源に向かって移動する正の走光性を示す。



クラミドモナス模式図

クラミドモナスの光応答実験に使用した資材は以下の通り。

- ・クラミドモナス（培養液から配布を受ける）
- ・6cmシャーレ セロテープ 暗箱（黒厚紙で作成）LED ランプ
ハサミ

実験手順

- i：シャーレにクラミドモナス培養液を深さ5mm程度注ぐ
（この際、クラミドモナスが均一濃度になるよう注意）
- ii：図1のように暗箱にシャーレを収め、穴からLED電球で照明を行う。
- iii：ほぼ10分後、暗箱の蓋を取り写真記録する。
- iv：クラミドモナスが濃くなった部分を取り、3－2－Bの実験に使用する。

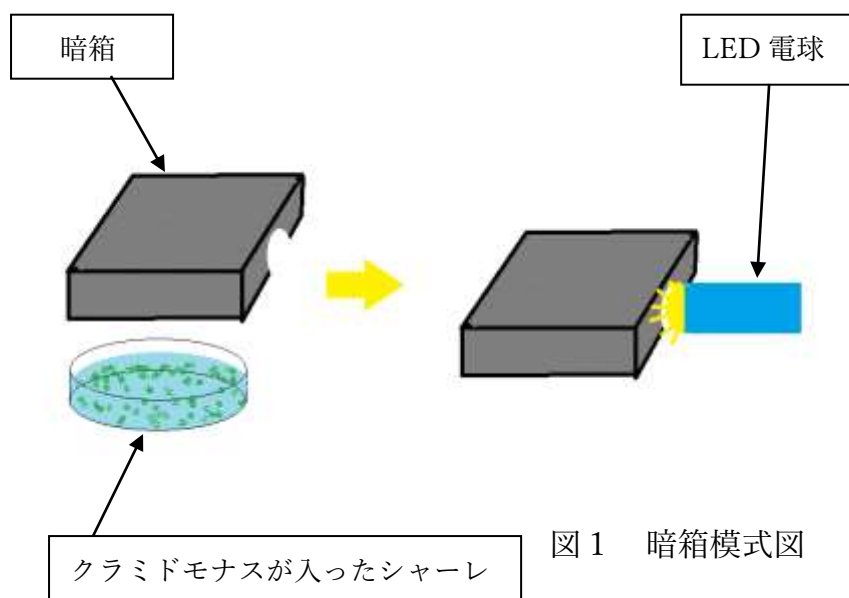
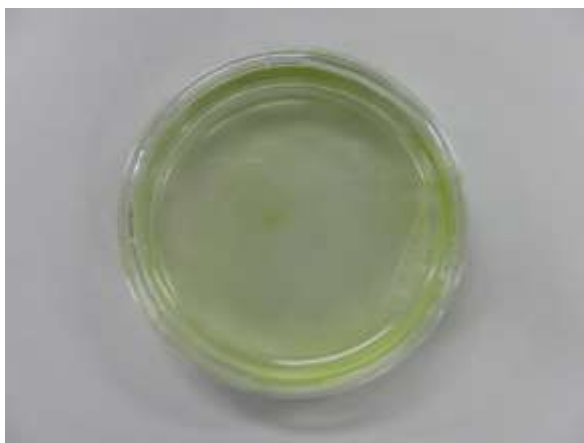


図1 暗箱模式図

3-A-3：結果

以下に暗箱を被せる前、暗箱を被せて6分後、10分後の写真を示す。



暗箱を被せる前（0分）



LED 照明開始後 6 分



LED 照明開始後 10 分

3-A-4：考察

中間点過ぎた 6 分の時点でもかなり密度が上がっているが、10 分後ではさらに集中しているのが判る。6 分時点での写真で、シャーレの照明装置側の正反対の位置に反射かまたは屈折の焦点が明るく光っている部分があり、その周辺にもわずかながらクラミドモナスが集まっていて、完全に強い方の光に集まるわけではないことがうかがえる。

3-B-2：方法

3-A-3 で高密度に集めたクラミドモナスをピペットで採取し、顕微鏡下で行動を観察し、暗視野装置を用いて鞭毛の観察と撮影を行った。

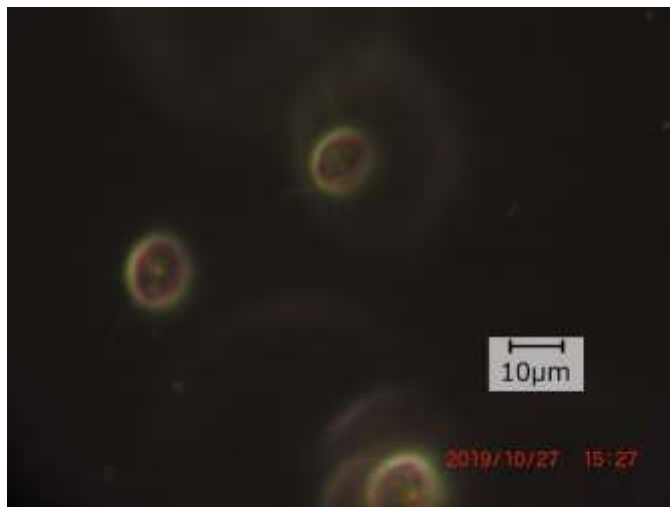
使用資機材

- ・顕微鏡（暗視野装置装着）
- ・顕微鏡アダプター付きデジタルカメラ
- ・スライドグラス カバーグラス ピペット

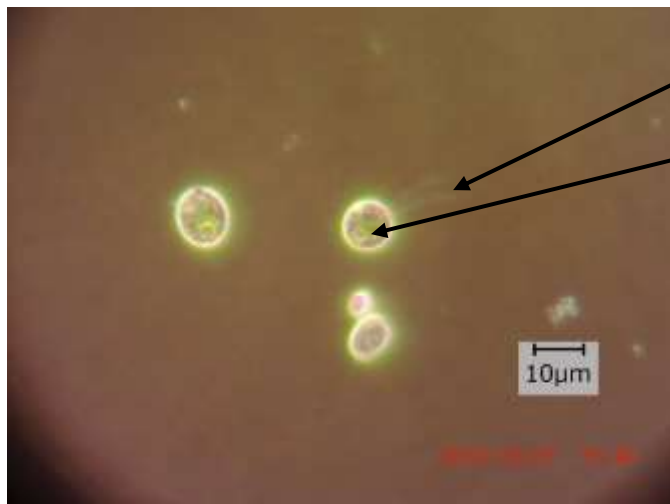
ピペットで採取した高濃度クラミドモナス入り液を一滴スライドグラスに滴下し、カバーグラスをかけて顕微鏡で観察する。動きが激しすぎたりピントが合いづらかったりした場合、カバーグラス下の水分を濾紙で吸い取り、スライドグラスとカバーグラスの間隔を狭めていくとクラミドモナスの動きが制限されて観察がしやすくなる。

3-B-3：結果

撮影した写真を以下に示す。



露出を絞って鞭毛を目立たせようとしたが、液部分が多くて動きが速い上にシャッタースピードが遅くて写りが悪かった。



鞭毛

眼点

反省を生かして撮影したもの。
これなら成功と言えるのではないだろうか。

3-B-4：考察

顕微鏡下での撮影は倍率を上げるほど光量が落ちてシャッタースピードが遅くなる。出来るだけ動きは制限した方が取りやすいが、写りが不自然になりがちでもあり、バランスが難しい。利用するデジタルカメラの性能をしっかりと理解して使いこなすことが重要であろう。

4：精子遊泳運動の観察

4－1：目的

今まで習得した顕微鏡の取り扱いの延長で、顕微鏡下スライドガラス上で試料を直接扱って実験をし、試料の変化を観察・記録してみることを目的とする。

4－2：方法

動物精子の運動活性化条件を調べる。

「運動能を十分に備えた精子も雄性生殖器内では運動を止められている。不十分な消耗は精子の受精能を低下させるからである。このことは種の存続にとって重大であり、だからこそ厳重な鍵がかけられている。希釈しない精液中では精子は微動だにしない。そして精子が体外に放出された瞬間、実験的には、海水、淡水、生理食塩水など受精の行われる環境やそれに似せた溶液に希釈すると一斉に運動を始める。」¹ このことをニジマスの精子を使って確かめる。

ニジマスの精子において運動活性化がおこる条件としては、 K^+ による抑制²が知られており、また淡水中で産卵することから、体液の浸透圧下から淡水の低浸透圧下への放出が引き金になりうると考え、 K^+ 濃度と浸透圧を変えた液を用意し、その液中にニジマスの体内から採取した精子を添加して、顕微鏡下で動きを観察した。

実験に使った資機材は以下の通り。

- ・ニジマス精子
- ・顕微鏡（暗視野照明）
- ・スライドガラス カバーガラス ピペッター プラスチックチューブ 爪楊枝 キムワイプ

準備した溶液

- ・NaCl 溶液 浸透圧 1000mOsm・500mOsm・250mOsm・100mOsm
- ・ K^+ 溶液（KCl 溶液）50mM・25mM・12mM・4mM
- ・マニトール溶液 浸透圧 800mOsm・600mOsm・400mOsm・200mOsm
- ・淡水

4－3：結果

ニジマスの精子は20秒程度しか運動しないので、撮影は出来ず観察のみで判定した。各溶液中での反応は以下の通り。

※記号は（運動せず －）（ゆるやかに動く △）（活発に動く ＋）

NaCL 濃度	反応
1000mOsm	－
500mOsm	－
250mOsm	－
100mOsm	△
0 mOsm	＋

K ⁺ 濃度	反応
50mM	－
25mM	－
12mM	－
4mM	－
0mM	＋

マニトール 濃度	反応
800mOsm	－
600mOsm	－
400mOsm	－
200mOsm	－
0mOsm	＋

4－4：考察

抑制因子とされる K⁺については、4mM というごく低濃度でも活動せず、かなりシビアに効いていることが伺えた。

浸透圧に関しては、100mOsm で少し動きが見えたが 0mOsm 時よりかなり緩慢な動きであり、多少の抑制効果はあるように見えた。

実験を終えて（感想）

ピペットなどを使って実験室で行う実験は久しぶりで懐かしく感じました。
顕微鏡は現職でもかなり使うので問題はありませんでしたが、デジカメは馴染みのない機種でやや操作に戸惑い、満足のいく写真はなかなか撮れなかったのが残念でした。加えて、実験の流れをきちんと俯瞰して必要な写真を抑えることも出来ていなかったのも、レポートを書く時点で「あの写真も撮れば良かった」と後悔する羽目にもなりました。
次があるようなら、その辺りをしっかり肝に銘じたいと思います。

有難うございました。

文献

- 1) 森沢 正昭 (1988) 生物物理 vol28 No 3 27 P
- 2) Morisawa, M., Suzuki, K. (1980) Science, 210, 1145-1147.