**一歩進んだ生物学実験**

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　提出先：shoji-baba@nifty.com

実験場所：東京文京学習センター

実験日：2019年10月26日（土）

学籍番号：1610016431

氏名：高橋　育子

共同実験者：船山 由紀

　　　　　　　　　　　　　 グループ：A-4

**1．目的**

　動物・植物組織の成り立ちの観察とデジタル顕微鏡画像法の習得

**2．方法**

A：**顕微鏡の操作方法の習得**

　　　文京学習センターにある３種類の顕微鏡のうち２種類の顕微鏡（オリンパス型、実体顕微鏡）の使い方を習得。

　　顕微鏡での長さの測定、接眼マイクロメータ（㎛）をものさしとする。

　　　実際の標本撮影と同じ倍率条件で対物マイクロメーターを撮影しておき、デジタルカメラでの撮影画像にスケールを表示。

　　　動物・植物組織をデジタルカメラで撮影し、組織の成り立ちを観察し記録をする。

　　　　　　　　表1-1　対物レンズの種類とその光学的パラメーター

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 倍率 | 開口数 | 分離能（㎛） | 作動距離（mm） |
| 4 | 0.1 | 3.1 | 18.23 |
| 10 | 0.25 | 1.2 | 7.18 |
| 20 | 0.4 | 0.76 | 1.63 |
| 40 | 0.65 | 0.47 | 0.60 |

**B：標本観察**

1. 薄切標本観察

材料：ツバキの葉とヤツデの葉を使用

徒手切片を作成し植物組織の有り様を観察。

1. 動物細胞の観察

口腔粘膜上皮細胞（綿棒で擦り取る）

1. クラミドモナス（緑藻類の一種の単細胞生物）の走性の観察

クラリミドモナスを培養液ごと小シャーレに取り、暗箱にシャーレを収め、蓋をし、

一方の孔からLED電球で証明し、10分後暗箱の蓋を取り観察し写真に記録。

顕微鏡で観察し、クラミドモナスの遊泳の様子を観察。

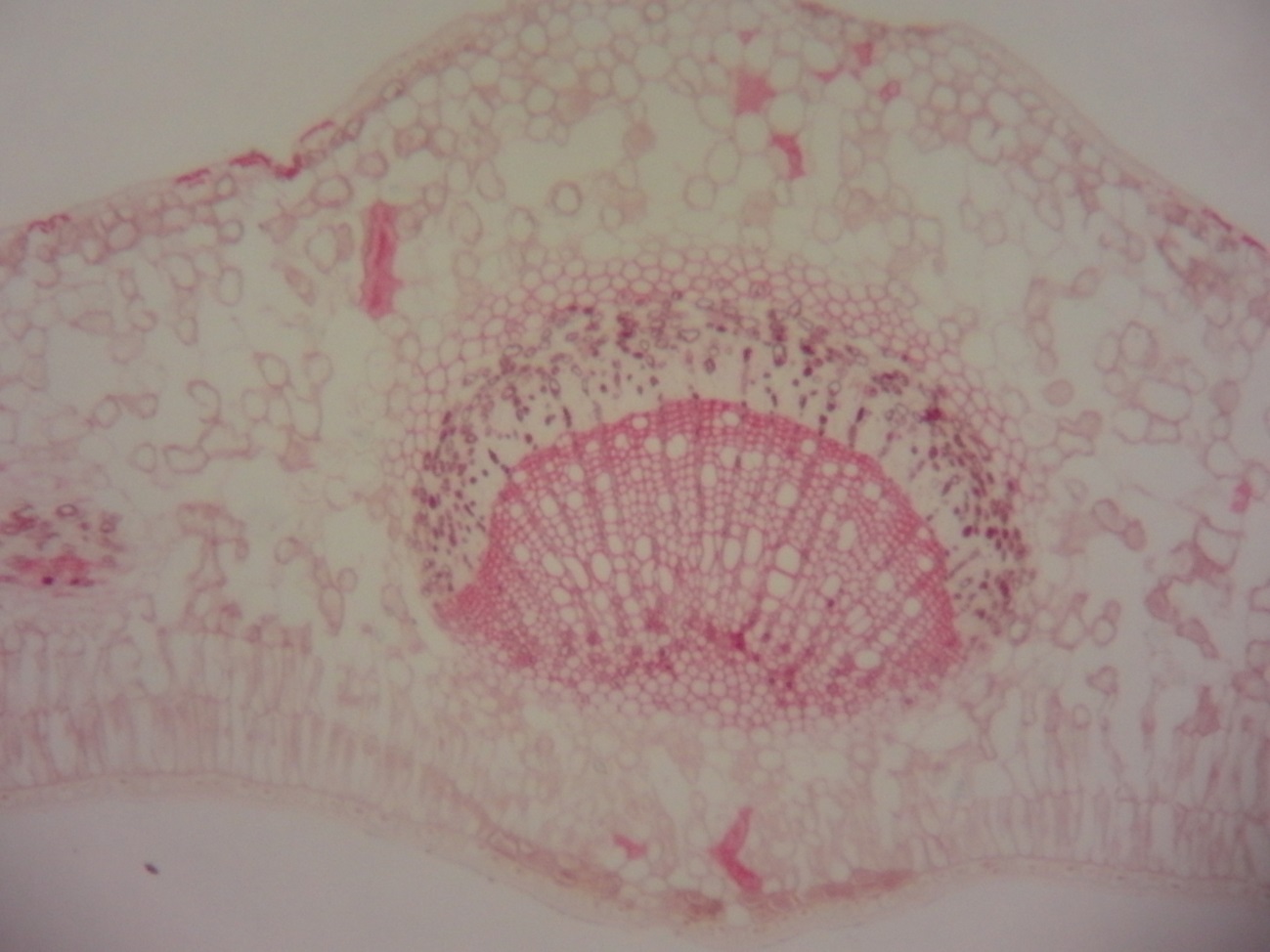
1. 精子遊泳運動の観察（ニジマスを使用、硬骨魚類の一種）

①どのような細胞外の環境因子が精子の運動を調整しているのかを見る。

②運動活性化した精子はどのような遊泳運動をするのかを見る。

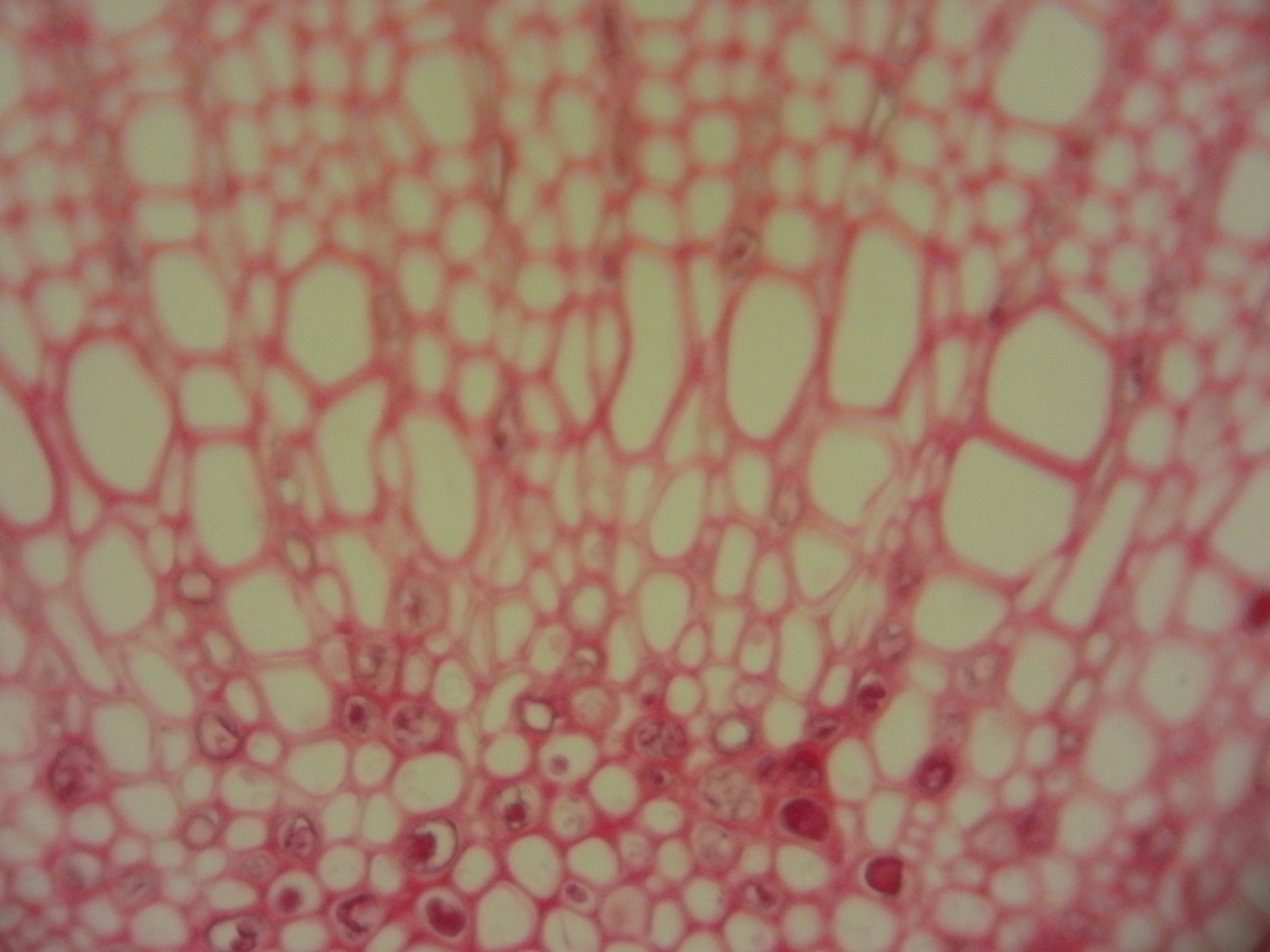
**3．結果**

**B-1　ツバキの葉**　　　　表皮

****

50㎛

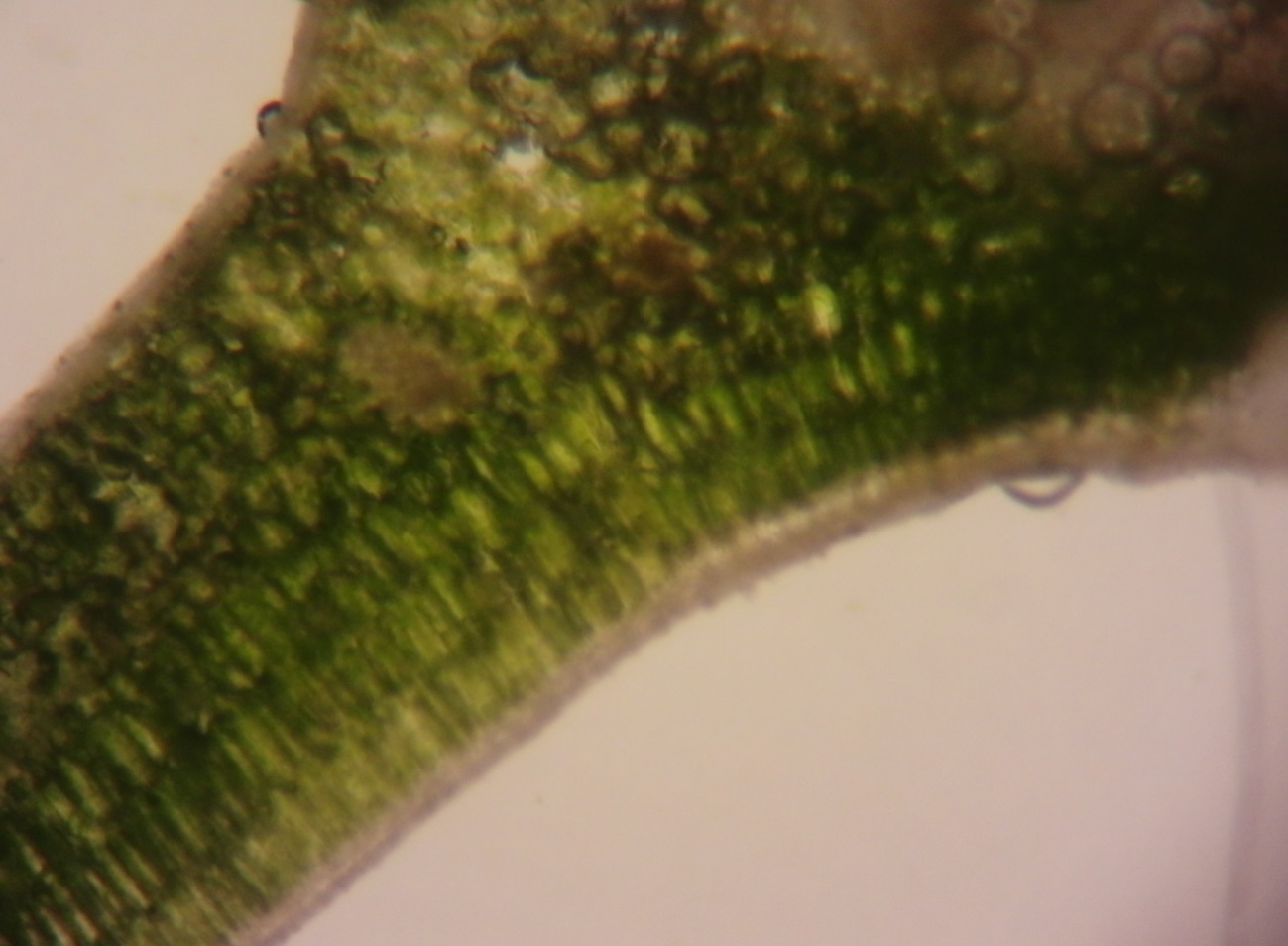
（4倍：50㎛）　　　　　維管束横断面　　　　　　　　柵状組織

****

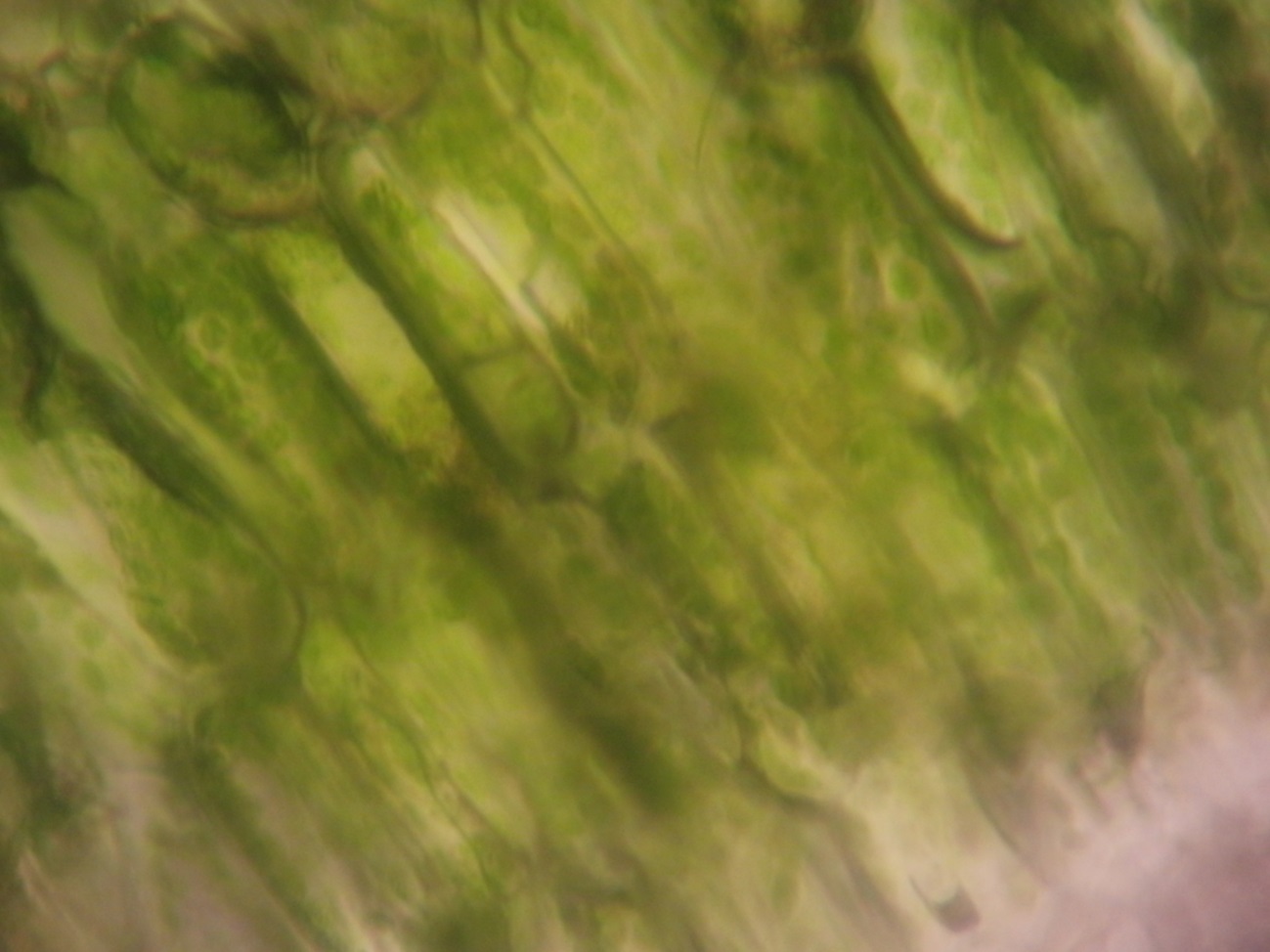
50㎛

（40倍：50㎛）　　気孔

**B-1　カエデの葉**

****

（4倍：50㎛）　　　　　　　　　　表皮　　　　　　柵状組織　　維管束横断

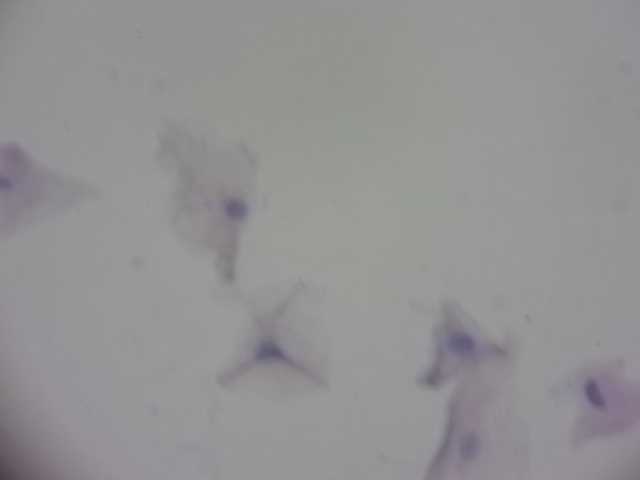
****

50㎛

50㎛

（20倍：50㎛）　　　気孔

**B-2　動物細胞の観察**

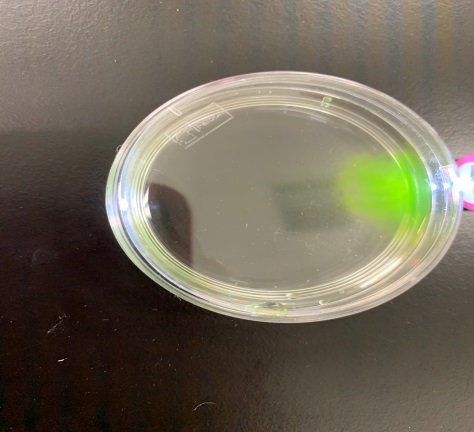
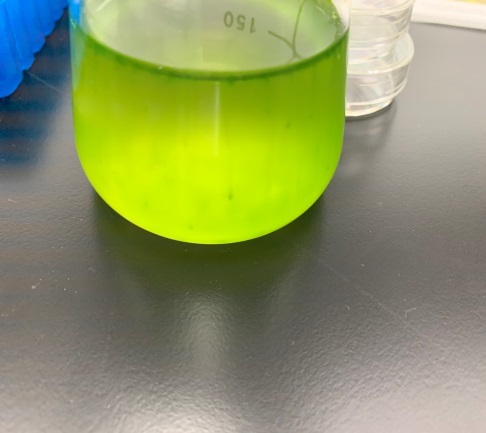
****

50㎛

（20倍：50㎛）ギザム液で染色したヒトの口腔粘膜上皮細胞　（共同研究者の口腔膜上皮細胞）

ヒトの口腔は粘膜で保護されていて、粘膜の上皮細胞は絶えず剥がれ落ち再生されているので、綿棒などで頬の内側をこするだけで簡単に採取できる。

**B-3　クラミドモナス**（緑藻類の一種の単細胞生物）の走性の観察

****

**クラミドモナス**クラミドモナスを暗箱に入れて一方の孔からLED電球で証明を当て集まった様子

クラミドモナス葉緑体もち、光合成を行うので、光を求める運動性を示します。（走光性：フォトタキシス）と呼ぶ。

光に反応して遊泳が変化する。（走光性：フォトタキシス）

****

50㎛

（20倍：50㎛）

静止画像であるが、遊泳していることが目で確認できた。

2本の鞭毛を確認することはできなかった。

**B-4　精子遊泳運動の観察**（ニジマスを使用、硬骨魚類の一種）

Fig5-1 ニジマス精子採取の様子



溶液①淡水：10ｍM　HEPES‐NaOHｐ８が含まれている。（便宜上浸透圧0ｍMOｓｍの淡水とする）

溶液②500ｍM NaCI溶液：500mM NaCI，10ｍM HEPES-NaOHpH8（浸透圧は1000ｍOｓｍとする）

溶液③50ｍM KCI溶液：50ｍM KCI,10ｍM HEPES-NaOH ｐH8(浸透圧は100ｍOｓｍとする)

調整する溶液

（1）溶液①と溶液②を表1の比率で混合することによって、NaCIによってさまざまな浸透圧の溶液を作る。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表1　様々な浸透圧溶液（1M NaCIを用いる） | | | | |  |
|  | 1ml 調整するための量（ml） | | 10ml 調整するための量（ml） | |  |
| 浸透圧（mOsm） | 溶液①（ml） | 溶液②(ml) | 溶液①(ml) | 溶液②(ml) | 動き |
| ★0 | 1 | 0 | 10 | 0 | （10秒） |
| 100 | 0.9 | 0.1 | 9 | 1 | － |
| ★200 | 0.8 | 0.2 | 8 | 2 | （15秒） |
| 300 | 0.7 | 0.3 | 7 | 3 | － |
| 400 | 0.6 | 0.4 | 6 | 4 | － |
| ★500 | 0.5 | 0.5 | 5 | 5 | （20秒） |
| 600 | 0.4 | 0.6 | 4 | 6 | － |
| 1000 | 0 | 1 | 0 | 10 | － |

★印について遊泳を確認。

(2) 溶液①と溶液③を表2のような比率で混合することによってさまざまなK+濃度の溶液をKCIで作る。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表2　様々なK+濃度の溶液を作る（150ｍM NaCIを用いる） | | | | |  |
|  | 1ml 調整するための量（ml） | | 10ml 調整するための量（ml） | |  |
| 浸透圧（mOsm） | 溶液①（ml） | 溶液②(ml) | 溶液①(ml) | 溶液②(ml) | 動き |
| 0 | 1 | 0 | 10 | 0 | － |
| 4 | 0.9 | 0.1 | 9 | 0.8 | － |
| 8 | 0.8 | 0.2 | 8 | 1.6 | － |
| 12 | 0.7 | 0.3 | 7 | 2.4 | － |
| 16 | 0.6 | 0.4 | 6 | 3.2 | － |
| 20 | 0.5 | 0.5 | 5 | 4 | － |
| 30 | 0.4 | 0.6 | 4 | 6 | － |
| 50 | 0 | 1 | 0 | 10 | － |

※　（2）については実施できず。

魚類は大きく分けると、淡水魚と海水魚に分けられる、共に体液の浸透圧は人間とほぼ同じで、およそ300ｍOｓｍ（ミリオスモール）で、食塩（NaCl）濃度に換算するとおよそ150ｍMで、海水のおよそ1/3で、純水は0ｍOｓｍです。

淡水魚では、体液（精媒）の浸透圧下にあった精子が淡水という低浸透圧に曝されることが、海水魚では、高浸透圧の海水に曝されることが運動開始の引き金となっているだろうと想像されることを調べる。

ニジマス精子運動は浸透圧だけでなく、K＋イオンによっても調整される。

淡水中に放精されるとその濃度が一気に減少し、細胞膜電位が低下します。これが引き金となって細胞内のCa2＋濃度が高くなり、下流のシグナル伝達経路を伝わって鞭毛運動の開始をもたらす。ニジマスは二重の調整機構を備えている。ニジマスなどサケ科魚類の多くが海から河川へ遍遡上し、淡水中で産卵を行うための合理的な仕組みであると考えられる。

ニジマス精子は、運動開始直後では100Hzに近いが、直ぐに60Hzほどに低下する。これは肉眼で追える振動ではない。そこで、本実験では精子の頭部の運動を暗視野顕微鏡で観察した。

ニジマス精子は、ほんの20秒程度しか運動を持続できないので、注意をして観察をした。

**4.考察**

１．薄切標本観察

　　　ツバキの葉の組織を顕微鏡で観察する薄さにスライスする行程は、中学以降実験に触れずに来た者にとっては、大変難易度の高かい行程であった。顕微鏡から観察したカエデの葉の組織がはっきりと観察できた事で、葉であろうが、生き物の凄さを感じる事ができた。また、先生に説明していただいた表皮、維管束横断面、柵状組織、気孔等を観察することができた。組織の成り立ちについて学ぶことができた。

２. 動物細胞の観察

　　　今回はヒトの口腔粘膜上皮細胞を観察し実際のヒトの細胞を顕微鏡で観察した。

　　DNA等にも使用できると聞き、目で見えない細胞の凄さを改めて感じる事ができた。

３. クラミドモナス（緑藻類の一種の単細胞生物）の走性の観察

　　　クラミドモナスは、見ても生き物とは思えない程でしたが、暗箱でLED電球を当て、時間を置くと

　　光を求めて、一か所に集まっているのを目視し、光応答していることを確認することができた。

　　更に顕微鏡でクラミドモナスの遊泳の様子を観察し、顕微鏡でなければ確認できない生物が遊泳しているのを確認することができた。

４. 精子遊泳運動の観察

　　　ニジマス精子の摂取をする所から観察することができ貴重な体験をする事ができた。

　　ニジマスの精子の観察は実体顕微鏡での観察で、調整するのが難しかったが、ニジマスの遊泳を

　　観察でき、すごい動きの速さであったが溶液によって遊泳の動きの時間（秒）が違う事も確認でき

　　た。動きは、ほんの数秒で力を失ってしまうことも確認できた。また、溶液によっても、遊泳時間（秒）に差が生じたことも、確認することができた。

※全体として

　　今回、一歩進んだ生物学実験に参加することができ、実験の凄さを改めて感じる事となった。

　中学以来、実験に携わる事がなかった中で、今回の顕微鏡での細胞組織の成り立ちや、細胞の遊泳の様子を顕微鏡を通して観察することができ、生物の凄さを改めて感じる事ができた。