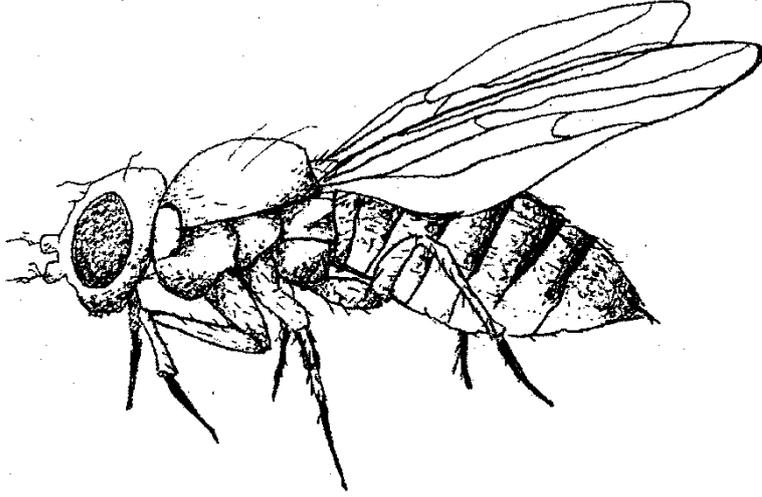
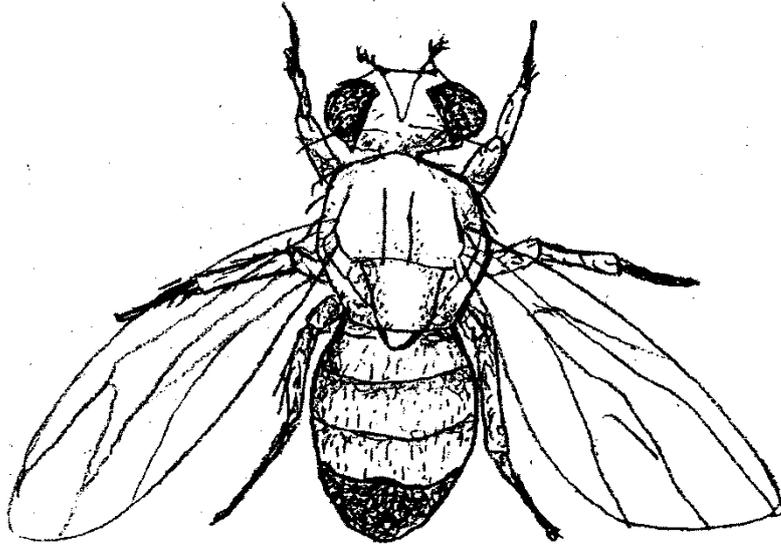


生物実験書



シヨウジョウバエ ♀



シヨウジョウバエ ♂

生野高校生徒作品

はじめに

本実験書は大阪府立生野高等学校で実施されてきた実験実習の内、本校オリジナルなものを中心に集めたものです。また、本校の実験実習では大阪府高等学校生物教育研究会の実験書に掲載された実験を改変したものを多く実施しています。また、生物実験では「生野高校生命倫理規定」にのっとり、必要以上に動物実験を行ったり、動物に対して苦痛を与えるような実験を行ったりすることのないように注意しています。

生野高等学校における生命倫理運用規定

一般原則 動物実験を行うことは生命科学の発展、理解において必要不可欠のものであるが、動物にも命があることを考え、生命倫理に基づく取り扱いが必要である。本校では生命倫理規定を定めているが、動物実験の実際の運用に関する取り決めを行う必要があるため、本運用規定を定めるものとする。なお、実際の運用を踏まえて運用規定を改定することがある。

I. 生徒実験・探究活動について

1. 動物実験の実施に関しては、実施前に生命倫理に関する説明、講義を必ず実施し、その実験の意義を生徒に理解させる。
2. 原則として脊椎動物以上の高等生物に苦痛を与える実験は実施しない。頸椎脱臼など実験動物の安楽死に関する措置は教員が行い、生徒に実施させない。
3. 知識の確認としての生体解剖、手術を行わない。すでに有資格者によって安楽死させた個体、臓器などの器官を用いる実習に関しては、必要最小限に絞って実施を認める。
4. 動物実験においては必要最低限の個体数、種類で実施する。代替可能なものは代替実験を行う。
5. 動物実験に関して、生徒の自由意思に基づく参加、不参加を認める。
6. 脊椎動物の発生の実験に関しては、必要以上の個体数を発生させないこと。胚を用いた実験に関しても要最低限の個体数、種類で実施する。代替可能なものに関しては代替実験を行う。ニワトリ胚は5日胚までの使用を認めるが、中枢神経系が完成した胚は安楽死を考えた措置をとること。カエル胚は尾芽胚までの使用を認めるが、神経胚以降は安楽死を考えた措置をとること。
7. 実験動物の飼育、保管、組織・細胞培養などに関しては教員の指導の下、生徒自身が行うよう実験計画を立てる。
8. 大学、研究所などで実施する動物実験に関しては、各施設の生命倫理規定に則った事前講義を受講し、大学や研究所などの指導監督の下に実施する。基本的に希望者参加の形態をとり、参加を強制するものではない。

II. 教員による演示実験について

1. 教員による演示実験に関しては、必要最小限の個体数を用いることとし、映像教材など代替方法を出来るだけ採用する。
2. 生命倫理規定にのっとり、可能な限り必要以上に動物に苦痛を与えないように実験を行う。
3. 動物実験を実施する教員は、動物実験に関する知識、経験を有するか、実験を実施する前に、大学が実施する動物実験を経験し、大学の生命倫理規定による講習（講義）を受講する必要がある。

目次

	はじめに	p 1
実験	ショウジョウバエの交配実験	p 3～16
解説	分子生物学をふまえたショウジョウバエの遺伝実験	p 17～19
教材	レリーフモデルの作製	p 20
実験解説	ブタ胎児の解剖	p 21～23
実験	ブタ眼球の観察	p 24～25
解説	ブタ眼球の観察	p 26～28
実験	腎臓の構造と働き（演示）	p 29～30
解説	腎臓の構造と働き（演示）	p 31～32
実験	血球の観察	p 33～34
解説	血球の観察	p 35～38
実験	色素胞の観察	p 39～40
解説	色素胞の観察	p 41～43
実験	ニワトリ胚の観察	p 44～46
解説	ニワトリ胚の観察	p 47～p 49
	後書き	p 50

平成 29 年 2 月 15 日

生野高等学校生物教室

北浦 隆生 大喜多 教子 右衛門佐 知子 中野 真弓

協力 生野高等学校生物研究部 生物選択生徒

【実験】 ショウジョウバエの交配実験

1. 目的

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) のいろいろな系統間で交配を行い、遺伝の法則を実際に確認する。

2. 交配に用いる遺伝形質と遺伝子記号

ショウジョウバエの染色体数は $2n=8$ であり、染色体地図も完成している。また近年、ゲノム配列も決定している。ショウジョウバエの遺伝子は次の染色体上に存在している。今回用いた遺伝子は下線を引いた7種類である。

第一染色体 (X染色体)	第二染色体	第三染色体
<u>y (yellow)</u> 黄体色	<u>b (black)</u> 黒体色	st(scarlet) 緋色眼
<u>w (white)</u> 白眼	cn (cinnabar) 辰砂色眼	<u>se (sepia)</u> セピア色眼
m (miniature) 短し	<u>vg (vestigial)</u> 痕跡翅	e (ebony) 黒檀体色
<u>v (vermilion)</u> 朱色眼		
B (Bar) 棒状眼		

+ (wild) 野生型：すべての形質について優性

cn · bw (cinnabar blown) 白眼 se · e (sepia ebony) セピア色眼 · 黒檀体色

vg · e (vestigial ebony) 痕跡翅 · 黒檀体色

3. えさの成分

水	1200cc	寒天	32g	酵母菌 (イースト菌)	24g
米糠	32g	黒砂糖	180g		

調整方法

- ① 水で戻した寒天と分量の水をなべに入れ、火にかけてかす。
- ② 酵母菌、米ぬか、黒砂糖を混ぜ合わせる。
- ③ なべを火から下ろし②を加え混ぜる。
- ④ ③を飼育びんに注ぎ固める。

(注：プラスチックの飼育ビンは高温に弱いので少しさましてから注ぐ)

4. 純系の交配法 (処女メスとオスを交配する)

ショウジョウバエ等の昆虫類のメスは、貯精囊をもっていて、一度交尾すると、精子を蓄えておくことができる。したがって、交配に用いるメスは未交尾 (処女) メスでなければならない。雄に関してはその限りではない。

5. 処女雌の取り方

・蛹隔離法

蛹を一匹ずつ隔離しておき、羽化してきたメスを使う。一匹しかいないからこのメスは当然処女である。

・追い出し法

系統保存している飼育びんの成虫を全て追い出し、蛹のみの状態にする。その後、羽化した成虫は、約8時間交尾しない。羽化後8時間以内のメスを処女雌とする。

6. 実験の手順

P×Pの場合

1. 配布された飼育ビン (先週交配済み) に、クラス・氏名をマジックで記入し、綿栓 (スポンジ栓) の上に ガーゼをかぶせ、輪ゴムで止める。
2. オスとメスの数を確認し、記録用紙に記入する。交配した系統を記入する。
左がメス、右がオスを示す。

意味 メスが $se \cdot e$ (セピア眼色・黒檀体色) 例: $se \cdot e \times +$ オスが野生型

3. 仮説の設定

交配の結果、 F_1 、 F_2 に出現する形質と、その比率を予想する。

4. 飼育観察

毎日、ビンの中を観察し、ハエの発育状況などを調べ、記録用紙に記入する。

例 ・幼虫が**匹 体長 **mm ・蛹ができた など

5. 親の追い出し

幼虫が生まれたら (3~4日後) 親を追い出す。親を追い出すにはエーテルで麻酔をかけ、親の形質を確認し、確実に殺す。

注: 放置しておくとも、親と F_1 が混在することになる。

6. F_1 (羽化した成虫) が誕生したら麻酔をして形質、雌雄の数を数え毎日記録する。

注: ハエの形質、雌雄を確認したら全て殺す。ハエが出尽くすまで (羽化が終わるまで) 続ける。ハエは殺してしまうので、ここでの麻酔は十分にかける。

カウントの方法

滅菌した紙の上に線を引き、オスとメスに分ける。形質に差があるときは、さらに区分けする。ピンセットで突き刺さないように翅をつかむようにする。

$F_1 \times F_1$ の場合

1. 交配

- ・滅菌した紙の上に麻醉した F_1 のハエを出し、ハネをつかんで新しい飼育びんに雌雄をそれぞれ 5 匹ずつ入れる。
- ・麻醉が覚めるまでビンは横にして置く。立てると麻醉されたハエが餌に張り付いて、死んでしまう。麻醉をかけすぎた（ハネを広げて固まった状態）個体は死んでいるので、使えない。
- ・ビンに交配した日、交配の種類、氏名を記入し、ガーゼをかける。

【課題】 ショウジョウバエの観察 生物実習書 2 5 (p55)

ショウジョウバエを麻醉して実体顕微鏡などで、雌雄を区別し、スケッチする。

短すぎると、作業途中で麻醉が覚めて逃げ出してしまう。注意 エーテルは劇薬である。直に匂いがかがらないこと。また、人間にも麻醉がかかるので、作業中は換気に注意すること。引火性が強いので、火気を近づけないこと。

2. 親の追い出し

- ・交配後、3~4 日で幼虫がうまれたら、 $P \times P$ の時と同様に親を追い出す。

3. 以後 $P \times P$ の時と同様に観察する。

4. F_2 が誕生したらその形質、雌雄を観察し、記録する。

注： F_2 の場合はいくつもの形質が誕生する可能性があり、また、雌雄で形質で異なる場合があるから、注意深く観察する。観察に際して、あらかじめ交配の種類から F_2 に誕生する形質とその比率を考えておくと観察しやすい。

5. 当分の間は 2 本の飼育びんを管理することになる。

注：飼育びんにカビが生えるなどの異常が発生したら必ず報告すること。

6. $P \times P$ 、 $F_1 \times F_1$ からハエが生まれなくなった時点で実験を終了する。

先生に確認してもらった後、オートクレーブにかけて処理する。

7. 余裕があれば、戻し交雑をやってみる。希望者は申し出なさい。

8. レポートの作成と研究発表をする。

- ・実験は約 1 月かかり、大変ではあるが、毎日欠かさずに観察すること。
- ・小さな変化も見逃すことなく、注意深く観察すること。
- ・不明なことがあれば、必ず生物科教員に聞くこと。

キイロショウジョウバエの交配実験 <ノート 2>

1. 一遺伝子雑種

常染色体 (第II・III・IV染色体) にもっている1個の遺伝子についての遺伝

例1

P (メス♀) × P (オス♂) F₁ (♀) × F₁ (♂)
 [vg] × [+] [+] × [+]
 表現型 痕跡翅 野生型 (正常翅) 野生型 野生型
 遺伝子型 $\frac{vg}{vg}$ $\frac{+}{+}$ $\frac{vg}{+}$ $\frac{vg}{+}$
 配偶子 卵 vg + 卵 vg : + = 1:1 精子 vg : + = 1:1

F₁ 遺伝子型 $\frac{vg}{+}$
 表現型 野生型 (正常翅)

卵 \ 精子	+	vg
+	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{vg}$
vg	$\frac{vg}{+}$	$\frac{vg}{vg}$

F₂ 表現型 野生型 : 痕跡翅

分離比 [] : []

例2

例1 にならって F₂ を求めよ

P (♀) × P (♂) F₁ (♀) × F₁ (♂)
 [+] × [se] • ×
 表現型 野生型 (赤眼) セピア眼色 •
 遺伝子型 $\frac{+}{+}$ $\frac{se}{se}$ •
 配偶子 卵 + 精子 se

F₁ 遺伝子型 $\frac{+}{se}$
 表現型 雌雄とも野生型 (赤眼)

卵 \ 精子		

F₂ 表現型 [] : []

分離比 [] : []

伴性遺伝

X染色体（性染色体）上にある遺伝子についての遺伝

例3

<p>P (メス♀) × P (オス♂)</p> <p>[y] × [+]</p> <p>表現型 黄色体色 野生型 (正常体色)</p> <p>遺伝子型 $\frac{X^y}{X^y}$ $\frac{X^+}{Y}$</p> <p>配偶子 卵 X^y 精子 $X^+ : Y$</p> <p>F₁ 遺伝子型 $\frac{X^y}{X^+}$ $\frac{X^y}{Y}$</p> <p>表現型 野生型 黄色体色</p>	<p>P (メス♀) × P (オス♂)</p> <p>[+] × [y]</p> <p>表現型 野生型 黄色体色</p> <p>遺伝子型 [] []</p> <p>配偶子 卵 [] 精子 []</p> <p>F₁ 遺伝子型 [] []</p> <p>表現型 [] []</p>
---	---

F₁ (♀) × F₁ (♂)

	卵	精子	X^y	Y
X^y				
X^+				

F₁ (♀) × F₁ (♂)

	卵	精子		

F₂ の表現型と割合

♀ 表現型 [] : []	♀ 表現型 [] : []
割合 [] : []	割合 [] : []
♂ 表現型 [] : []	♂ 表現型 [] : []
割合 [] : []	割合 [] : []

◎性染色体上の遺伝子は全て伴性遺伝

- キイロショウジョウバエは XY型の性決定様式 ♂は XY ♀は XX
- 雌雄で性染色体構成が異なるため、雌雄で分離比が異なることがある点に注意。

キイロショウジョウバエのX染色体上の遺伝子

黄色体色 yellow (y) 白眼 white (w) 朱色眼 vermilion (v)

単翅 miniatur (m) 棒状眼 Bar (B)

ヒトも同様に男XY、女XXの性染色体を持ち、このX染色体上に色盲や血友病の遺伝子が存在し、伴性遺伝をする。

F₁の配偶子形成

- オス→精子の形成 **完全連鎖**だから

$$\frac{cn \cdot bw}{+^{cn} +^{bw}} \quad cn \cdot bw : +^{cn} +^{bw} = [\quad] : [\quad]$$

- メス→卵の形成 **不完全連鎖**だから、連鎖と組み換えが起こる。

組み換えを起こす割合→組み換え価 (x%) : 連鎖地図により求める。

連鎖のみの割合 → (100-x) %

- 第二染色体の連鎖地図

b	cn	vg	bw
48.5	57.5	67.0	104.5

$$\frac{cn \cdot bw}{+^{cn} +^{bw}} \quad cn-bw \text{ 間の組み換え価は } [\quad] - [\quad] = [\quad] \%$$

組み換えによる卵は $cn +^{bw} : +^{cn} bw = [\quad] : [\quad]$

連鎖による卵 $cn \cdot bw : +^{cn} +^{bw} = [\quad] : [\quad]$

F₁ (♀) × F₁ (♂)

卵	精子		

F₂の表現型(遺伝子)と分離比

$$[\quad] (\quad) = [\quad]$$

$$[\quad] (\quad) = [\quad]$$

$$[\quad] (\quad) = [\quad]$$

$$[\quad] (\quad) = [\quad]$$

(1) 野生型のメスと黒体色・痕跡翅のオスを交配した場合 F₁ はすべて野生型が得られた。この F₁ どうしを交配すると F₂ ではどのような形質がどんな割合で得られるか。

(2) 痕跡翅(vg)のメスと褐色眼(bw)のオスを交配したところ、F₁ はすべて野生型であった。

①F₁ のオスに痕跡翅・褐色眼のメスを交配するとどのような形質のものがどんな割合で得られるか。

②F₁ のメスに痕跡翅・褐色眼のオスを交配するとどのような形質のものがどんな割合で得られるか。

③F₁ どうしの交配による F₂ の形質と分離比を求めよ。

キイロショウジョウバエの交配実験<ノート4>

二遺伝子雑種 : 2組の対立する遺伝子についての遺伝

伴性遺伝 と独立遺伝

P (メス♀) × P (オス♂)

[y · se] × [+]

表現型 黄色体色・セピア眼色 野生型(正常体色・赤眼)

遺伝子型 $\frac{X^y \text{ se}}{X^y \text{ se}}$ $\frac{X^+ +}{Y +}$

配偶子 卵 $X^y \text{ se}$ 精子 $X^{++} : Y+$

F₁遺伝子型 $\frac{X^y \text{ se}}{X^+ +}$ $\frac{X^y \text{ se}}{Y+}$

表現型 野生型 黄色体色 赤眼

P (メス♀) × P (オス♂)

[+] × [y · se]

野生型 (正常体色・赤眼) 黄色体色・セピア眼

[] []

[] []

卵 [] 精子 []

[] []

[] []

F₁ (♀) × F₁ (♂)

	メス		オス	
精子				
卵				

F₁ (♀) × F₁ (♂)

	メス		オス	
精子				
卵				

F₂の表現型と割合

♀
[] : [] : [] : []
() : () : () : ()

♂
[] : [] : [] : []
() : () : () : ()

合計
[] : [] : [] : []
() : () : () : ()

♀
[] : [] : [] : []
() : () : () : ()

♂
[] : [] : [] : []
() : () : () : ()

合計
[] : [] : [] : []
() : () : () : ()

ショウジョウバエの交配実験 まとめの方法

一ヶ月以上もかかって実験を行ってきました。実験はレポートを書いて完成します。実験ではいろいろと苦労して大変だったと思います。レポートをまとめることによりその苦労が報いられます。実験結果に基づき以下の要領でレポート作成をしてください。

レポート内容

1. 目的

単に「遺伝の法則を調べるため・・・」というのではなく、遺伝学の歴史や、いろいろな遺伝現象について調べ、その中で自分が何に興味を持ち、何に焦点を当てて実験をしようとしたかを克明に書くこと。

2. 使用器具・薬品

エサの成分、作成法なども含める。図示するなど工夫すること。

3. 実験材料

ハエの全てを探る！

キイロショウジョウバエとはどんな生物なのか、雌雄の区別の方法など、また、何故実験材料に用いられるのか、等を調べて記入する。ハエのスケッチもここに入れる。

4. 実験方法・実験手順

親の交配、 F_1 どうしの交配それぞれの方法など克明に示す。

その際に注意しなければいけないことなどを示す。

例1 麻酔の方法

2 処女雌のとり方

3 親の追い出し 等々 イラスト、写真などで示すとよい。

5. 実験結果

(1) 飼育観察記録

交配した後、成虫が誕生するまでの経過などを詳しく記入する。観察が不十分な場合は文献などで調べる。

卵→幼虫→蛹→成虫に要する日数やそれぞれの変化における特徴などを示すこと。

(2) データの整理

F_1 、 F_2 の個体数を雌雄別に表やグラフに示す。

(3) 観察記録用紙添付

各班で観察記録をコピーして添付する。

(4) データの検定

得られたデータが理論通りの結果にできたかどうか。プリント χ^2 (カイ二乗) 検定を参考にして検定を行う。データの検定をすることにより、実験結果が正しいものであるかどうか判定できる。

6. 考察

◎交配の結果、キイロショウジョウバエの遺伝がどのように行われているかを示す。各自の交配により F_1 、 F_2 にどのような形質のものがどんな比率で得られるかを示す。また、なぜそうなるかの理論を示すこと。伴性遺伝、二遺伝子遺伝、連鎖組み換えなど。

◎実験の結果は正しいものであったか、検定の結果に基づいて考察する。特に、理論通りにならなかった場合、どのような問題点が考えられるかなどを記入する。

7. 感想

実験を通しての感想。一ヶ月に及ぶ実験を通して苦労したことなど率直な感想を書くこと。→今後の参考になる。

8. その他

キイロショウジョウバエに関するトピックスなどがあれば調べたものを書いて良い。

9. 参考文献

レポートを書くにあたって調べた文献を示す。

図書館に参考文献を用意してありますが、学校外の図書館なども利用すると良い。

また、インターネットを活用して調べた場合、URL を必ず記入すること。

参考文献の記載方法

・ 文献名または論文のタイトル 著者 出典・書名 (ページ) 発行年度

【例】ショウジョウバエの遺伝実習 大阪府高等学校生物教育研究会編 高等学校生物 実習書
p55-56 2003

インターネット検索

【例】ショウジョウバエの突然変異 首都大学東京遺伝学研究室 [www.http//****.ac.jp](http://****.ac.jp)

10. 班単位のまとめ

7月はじめに班単位（最初に掛け合わせのビンを渡した班）で8分程度で発表してもらいます。パワーポイントを使って発表する。

発表のための準備；発表資料 B5 レポート用紙1枚にまとめて、発表の前日までに生物室へ提出。印刷します。資料には、自分の班の掛け合わせの種類、 F_1 、 F_2 の結果を明記すること。パワーポイントは、生物実験室に発表用のノートパソコンを用意してあります。先生に断ってから使ってください。

11. レポート提出日

月 日 () 午後 時厳守。

期日に間に合わない場合は、理由を必ず連絡すること。

12. 評価

前期の評価に入れる。

【解説】分子生物学をふまえたショウジョウバエの遺伝実習

1. はじめに

生野高校では、ショウジョウバエを用いた遺伝実習が20年以上にわたって実施されている。この実習は、かつて多くの学校で実施されてきたが、近年、準備と実施にかかる時間の問題からあまり行われなくなっている。いろいろな問題点をいくつかの工夫を加えることにより、リニューアルしてきた。現在は、新たな教育課程の中ではショウジョウバエの発生実習にかけられる時間が不足しており、探究活動のベーシック班の課題（テーマ）として生き残っている状態である。

2. 生野高校におけるショウジョウバエ交配実験の位置づけ

この実習は、課題研究・探求活動の一環としてとらえられ、長期の実験観察の実施で研究活動の雰囲気を経験する伝統行事である。また、実験の実施によりより実物の即した遺伝分野の総復習を行うことになる。さらに、分子生物分野を学ぶ機会を設け、分子生物学とメンデル遺伝の融合をおこなうことで現代生物学への橋渡しとなる。

3. 旧「生物I」遺伝分野の問題点と新「生物基礎」+「生物」の問題

旧課程は平成19年4月入学生で3学年がそろった。この教育課程で入学してきた生徒は初年度は旧課程の影響を一部残していたようなのだが、2年目からは、中学で削減された内容の影響（遺伝やイオンを学習していない）がうかがえる。そうした中、生物Iの遺伝分野はメンデル遺伝に偏重し、入試対策もあるのだろうが、パズルのような特殊な遺伝の比重が大きいものとなっている。また、遺伝子の本体がDNAであることだけ説明され、DNAの二重らせん構造は不完全な説明に終わっている。また、分子生物学の知識が全く抜けており、タンパク質合成のメカニズムや突然変異・進化について全くふれないものとなっている。実生活する上で、必要とされる分子生物学の知識が与えられない問題があった。

この後、新しい教育課程が始まり、生物基礎2単位と生物4単位の形に変更された。ここで生物基礎は分子生物的内容が中心となり、染色体について詳しく教える機会のないものになった。どちらにせよ、一長一短がある。

4. ショウジョウバエの遺伝実習

ショウジョウバエの実習は以下のような日程で実施された。

ショウジョウバエ実習日程 (H18実施例) 10月17日～12月16日

10月17日 観察開始

10月18・19日 F1交配 処女雌と雄5匹ずつ入れる

10月23・24日 親の追い出し・観察

11月13日 観察終了

12月22日 レポート締め切り

1月9日 プレゼンテーション資料提出 (冬休みの宿題)

1月22～27日プレゼンテーション

通常ショウジョウバエは、25℃で培養すると、産卵から約10日で羽化する。18℃で約20日と遅くなるので、実験日程の調節が可能である。30℃以上の温度では死亡率が高くなり、飼育は困難となる。したがって、夏季にインキュベーターのない環境では飼育が難しい。また、羽化は雌のほうが

がやや早い。従って、未交配雌を得るには羽化直後のびんから集めるのがよい。

25℃の場合、羽化後8時間くらい経つと交尾しはじめる。

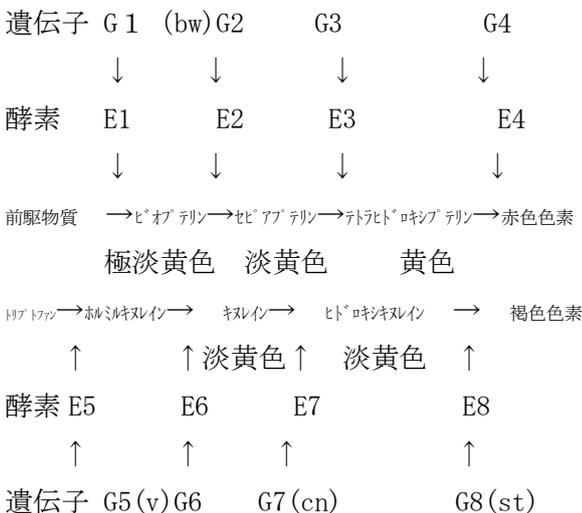
産卵は、交尾後数時間で始まる。雌1個体で50~80個/日の卵を産むが、羽化後2日~3日を経たものが実験に適する。こうした条件下で、交配実験は一ヶ月かかることになる。

実習では、まず、ショウジョウバエ実習についての講義(実験方法)と遺伝の復習で理論面の補強を行う(4時間)。独立遺伝と伴性遺伝、連鎖と組換え、ショウジョウバエの形質発現(遺伝子と酵素)、 X^2 検定が主な内容である。観察は昼休みと放課後を中心に実施し、4人1班、グループ内でローテーションを組むようにしている。

5. 遺伝子の形質発現について

生物Iでは、遺伝子がブラックボックスで 遺伝子があると形質がでる(丸暗記)という形で学ぶことになる。そこで、改善点として、一遺伝子一酵素説の・遺伝子(DNA) →タンパク質合成→ 形質発現を取り入れるようにした。ここでは、眼の色素合成をあつかった。ここでは、眼の色は劣性遺伝子でタンパク質合成できないため、多様な眼の色の変異が起きると理解する。

眼の色素の合成(1遺伝子1酵素説)



6. ショウジョウバエの実習における問題点及び改善

実習を通して、みられた問題点をその対策を考える。

- ・考察で X^2 検定が使いこなせないため、検定結果の解釈がうまくできない。検定結果で「有意の差がある」と「実験の失敗である」というだけの生徒が多く、何のための検定なのか、また、原因追及が甘いところがみられる。検定の意義、意味を伝え、原因解明の方法にまで指導を入れる必要がある。
- ・ショウジョウバエをきちんと観察スケッチできない生徒が多い。小中学校でのスケッチの訓練不足、観察の不足が原因と思われる。生物を観察する機会を増やす必要がある。

7. 新課程にむけての改良点

交配実験の改良のため、ハエの大型モデル(雄雌外形)を作成し、首都大学東京遺伝学教室の協力で、眼の色の異なるショウジョウバエやホメオティック突然変異体:アンテナペディアの準備などを行った。

結果、多様な形質の個体を見ることで興味づけてできた。また、昨年度より雌雄の区別や形質の判定でミスが少なくなった。

また、本校ではプラスチック製飼育ビンを導入した。牛乳瓶の飼育容器が割れたり、入手困難な状況になりつつある。それで、使い捨てのプラスチック製飼育ビンを使う用意した。結果、コンタミを起こす飼育びんがなくなった。生徒が乱暴に扱うため、牛乳瓶が割れていたものが、びんが割れなくなった。しかし、麻酔の時にたたいて起こる培地のはがれ落ちは防げなかった。ペットボトルの口を利用した漏斗をつけることで落下が防げるように工夫したが、あまりうまくいかなかったようである。

平成 20 年度の試みとして、実験結果の発表会を実施した。各班ごとに、自分たちの実験結果を 7 分程度で発表するようにした。発表方法は、すべてパワーポイントで行い、補助資料として説明プリント 1 枚を準備した。この発表会のために、メモリースティック 10 本、中古のノートパソコン 3 台を購入し、レーザーポインターや計時用のベル、スクリーンとプロジェクターも準備して、いかにも学会発表という雰囲気をつくった。現在の SSH 探究発表会の前身である。

実験結果を発表することで、自分たちの何がうまくいって何が悪かったのかがよく理解でいたようである。また、発表方法を少しアドバイスしただけで、いろいろな工夫がみられた。また、評価について生徒間の相互評価を導入し、真剣にほかの班の発表を見ることができた。

8. ショウジョウバエの交配実験の今後

ショウジョウバエは遺伝の教材としては現在でも有効なものである。しかし、準備やまとめなど、長期にわたる実験観察が時間的に苦しく、探究活動といった長期の研究活動が確保できる部分で活用することになる。

〔参考〕実験結果が理論通りにならなかった理由としては次のようなことが考えられる。

- ① 交雑実験に使った♀のハエが未交配雌でなかった可能性。
- ② F_2 をカウントする時期の問題。羽化は雌の方がやや早いので数回にわけてカウントするか、ほとんどの蛹が羽化した後にカウントする必要がある。
- ③ カウントの時に、雌、雄を間違える可能性。特に羽化直後は雌雄を間違えやすいので、翅の伸びきっていない個体や、体全体が白っぽく、腹が細く伸びている個体は、実体顕微鏡やルーペで、腹の先の生殖器を確認して雌雄を区別する必要がある。あるいは、判別しにくい個体は、統計から除くようにする。
- ④ 飼育びんより麻酔びんに取り出す時に、一旦逃げないように飼育びんの底を叩いてハエを落とす時、成虫が培地にくっついてしまって、全部が取り出せない場合がある。
- ⑤ F_3 個体の一部が入ってしまった場合。
- ⑥ 防カビ剤としてプロピオン酸を添加しているが、不注意でカビの発生を招くことが在り、ショウジョウバエの死亡につながる。
- ⑦ 系統によっては交尾が上手くいかないケースが考えられる。オスの痕跡翅の場合には、交尾が困難なことがいえる。

【参考文献】

- 駒井 卓編(1952)：ショウジョウバエの遺伝と実験、培風館
竹内正幸、石原勝敏編(1992)：生物の実験—基礎と応用—、裳華房
本城市次郎編(1967)：生物学ハンドブック、岩波全書
森脇大五郎編(1979)：ショウジョウバエの遺伝実習、培風館

【教材】レリーフモデルの作製

生物の学習を手助けするツールとして黒板貼り付け型半立体模型：レリーフモデルを紹介する。もともと、生物では実物を見せることが重要なファクターになっている。教材提示装置、顕微鏡のモニター提示が有効なことはいまでもないことである。しかし、実物が小さかったり、見るべきポイントが分かりにくかったりすることも多い。ポイントになる部分に着目してモデル化することで、何が大切なのか示すのにはよい方法である。

また、板書で図を描く事が多い生物の授業では、モデルを使用することによって、時間短縮の効果も大きい。ただし、生徒が図を写す時間がなくなるので、プリントを使うなどフォローの必要がある。

また、生徒がしっかり手を動かさないの、学習効果が小さくなることも考えられる。

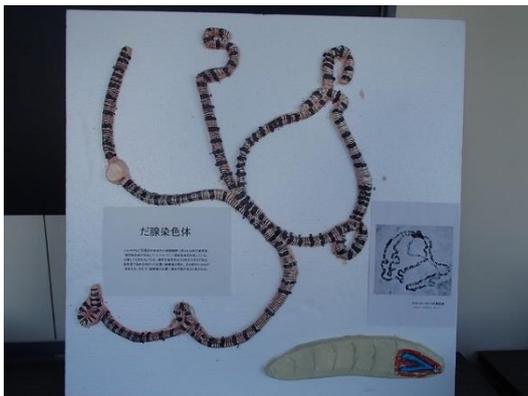
材料 発泡スチロールボード 厚さ 1～3cm (用途により変わる)

壁用水性塗料 木工用ボンド

マグネット カッターナイフ、色チョーク

作成方法

1. 作製するモデルの大きさ外形を図面に起こす。(貼り付ける黒板や生徒からの見やすさなどをめどに大きさを決める。
2. 色チョークで発泡スチロールボードに印を入れる。
3. カッターナイフで大きく部品を切り取り、細部を加工していく。
ニクロム線を利用したスチロールカッターを利用することもよい。
4. 部品を木工用ボンドで接着し、カッターナイフで細部を整える。
5. 壁用水性塗料を用いて彩色する。
6. 裏面にマグネットを固定して完成。



だ腺染色体モデル



ショウジョウバエホメオティック突然変異モデル

参考文献 とっておき生物実験 生物の科学 遺伝 別冊10 1998

【実験観察】 ブタ胎児の解剖

【実験のねらい】 食肉用に解体されるブタが妊娠していた場合、廃棄される胎児をつかって、動物の解剖実習を行う。すでに食肉処理場で屠殺、解体され冷凍状態で入手されるブタ胎児の場合、生命倫理的な問題点はなく、解剖実習が可能である。

【準備】 冷凍ブタ胎児、解剖皿、ゴムシート、解剖はさみ（キッチンはさみも可）
手術用ゴム手袋、ピンセット、注射器（駒込ピペットも可）、消毒用アルコール
白衣またはエプロン

【実験上の注意】 冷凍ブタ胎児は細菌などで汚染されていないと思われるが、ブタ自体細菌感染や寄生虫感染の可能性があり、無菌ブタ以外の生食が禁じられている。したがって、必ずゴム手袋を使用し、素手で解剖を行わないこと。

また、血液などで汚れる可能性が大きいので、白衣または作業着の着用が望ましい。解剖を長時間続けていると、赤色に目が慣れてしまうので、1時間ごとに休憩時間を入れ、連続作業とならないようにしたい。

実験 ブタ胎児の解剖

(1) 冷凍されたブタ胎児を流水中で解凍する。

冷凍胎児は、前日から冷蔵庫内で自然解凍しても良い。液がたれるので、バットなどで受けておくこと。

(2) 解剖皿にブタ胎児をおく。解剖用ゴム手袋をつけて解剖用ハサミで正面正中線から開腹する。胸部は内臓に注意して肋骨も切り開く。

正中線から切り開き



(3) 大きく内臓を露呈する。

(4) へその緒の血管が肝臓へつながっていることを確認する。

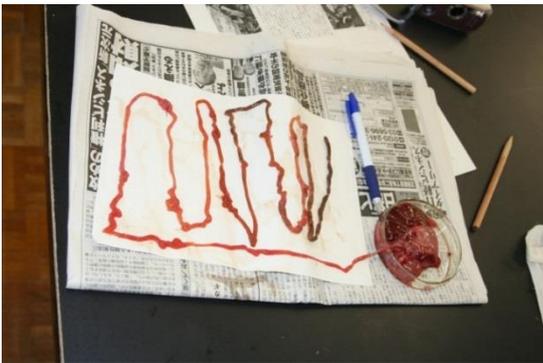
(5) 食道と直腸末端を切り離し、消化管全体を摘出する。食道、胃、十二指腸、小腸に肝臓、胆嚢、すい臓をつけて取り出す。

鉛筆の先の部分がすい臓



すい臓は、胃にくっついたような状態で見られる。子豚などでは素早く取り出さないと自身の消化酵素で分解され袋状のものが見られるだけのことが多い。

消化管



消化管をつなげて、取り出すには慎重な操作が必要。腸はその太さや色などで区別できる。

肺



(6) 肺と気管支、気管を取り出す。(肺は縮んだ状態)

(7) 気管に駒込ピペット(注射器)で空気を送り、肺の膨らむ様子を観察する。

胎児なので肺は、縮んだ状態で取り出される。(出生後、産声は初めての肺呼吸である。) 肺は右4葉、左3葉に分かれ、空気を送り込む気管支によって膨らむ部位が異なる。

(8) 大動脈と大静脈を切断して心臓を取り出す。

(9) 心臓を2つに切り広げて二心房二心室を確認する。

(10) 腎臓と腎動脈、腎静脈、輸尿管と膀胱を取り出す。消化管を除いた部分にある。

(11) 大腿部を切り開いて座骨神経を観察する。

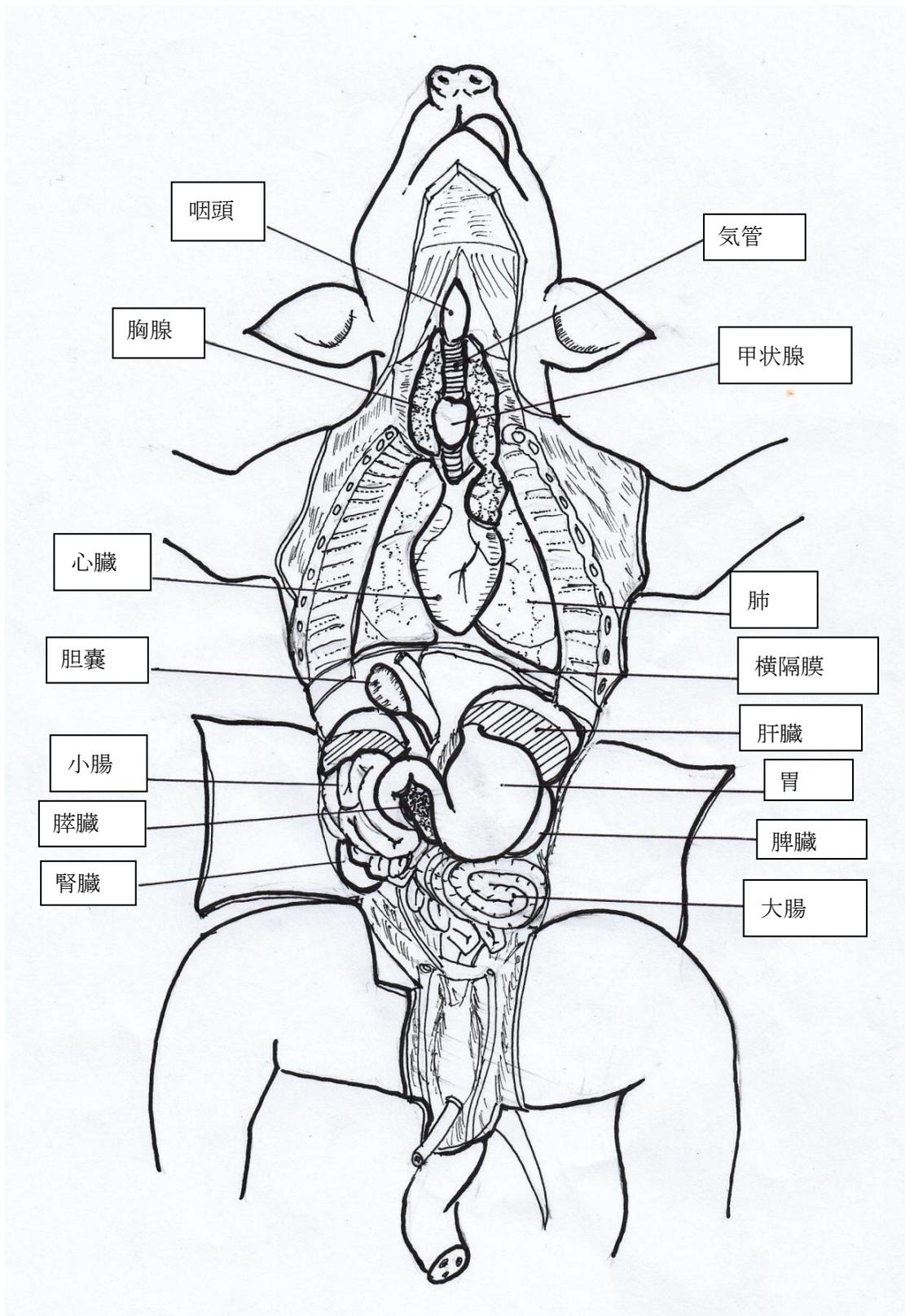
脳は冷凍処理によって溶けた状態になっている



(12) 脊椎骨を切断して、内部の空洞と脊髄神経を観察する。

日本動物解剖図説 池田嘉平、稲葉明彦 広島大学生物学会脊椎動物学解剖関係の書籍を利用して
いただきたい。海外のHPで解剖に詳しいものがある。

ブタ胎児解剖図

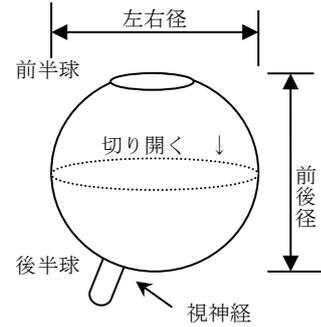


【実験】 ブタの眼球の観察

大阪府高等学校生物教育研究会生物実験集録より
ほ乳類の眼球を解剖し、眼球の構造とはたらきを理解しよう。

観 察

- (1) ゴム手袋をはめ、新鮮なブタの眼球の外観を観察する
前方から角膜、瞳孔、結膜を、後方から視神経を確認する。
- (2) 眼球の周囲の筋肉を解剖はさみ、ピンセットでとりのぞく。
筋肉を後ろ側にめくるようにすると切りやすい。視神経を切断しない!
- (3) 筋肉を取り除いて眼球だけになったら、**定規**でそのサイズを測定する。



→結果 1

- (4) 眼球の中央部をつまむようにカミソリで切り込みを入れ、ここから**解剖ばさみ**を入れて、眼球の周囲の強膜を切っていく。
- (5) 眼球の内側から見た前半球、後半球の様子を観察しスケッチする。→**結果 1**
- (6) 眼球内部を満たしているものがガラス体である。前半球の角膜に指を押し当て、ひっくり返すとガラス体がとれて水晶体が見える。水晶体の周りに放射状に筋の入った黒い模様は、毛様体の跡である。水晶体を**新聞紙**の文字の上において、どのように見えるか調べる。さらに指で押さえてみて、硬さ、色などを調べる。→**結果 2**

結果 1 虹彩、毛様体、水晶体(レンズ)、ガラス体、網膜、盲斑、視神経を観察し、スケッチする。
スケッチには各部の名称も入れる。

眼球の 左右径 mm ・ 前後径 mm

<p>眼球の後半球の内部構造のスケッチ (盲斑の位置を描き、裏返して視神経の束も確認)</p>	<p>眼球の前半球の内部構造のスケッチ (水晶体の周囲を注意深く観察し、ガラス体なども記録する)</p>
---	--

結果2

- ① 眼球を切った時の感触はどうだったか。
.....
- ② ガラス体について、色や形にどのような特徴があるか述べなさい。
.....
- ③ 後半球の内部を見てみると、乳白色の膜が見られる。これが網膜(の一部、視細胞を含む部分)である。その外側の膜は何色か。
.....
- ④ 水晶体を取り出し、新聞紙の文字の上に置いてみると、文字はどう見えるか。
.....
- ⑤ 水晶体の 直径mm 厚みmm
水晶体の 色 硬さや感触.....
- ⑥ 水晶体を取り去った後に瞳孔がはっきり見える。ヒトでは円形であるが、ブタの場合はどうか。

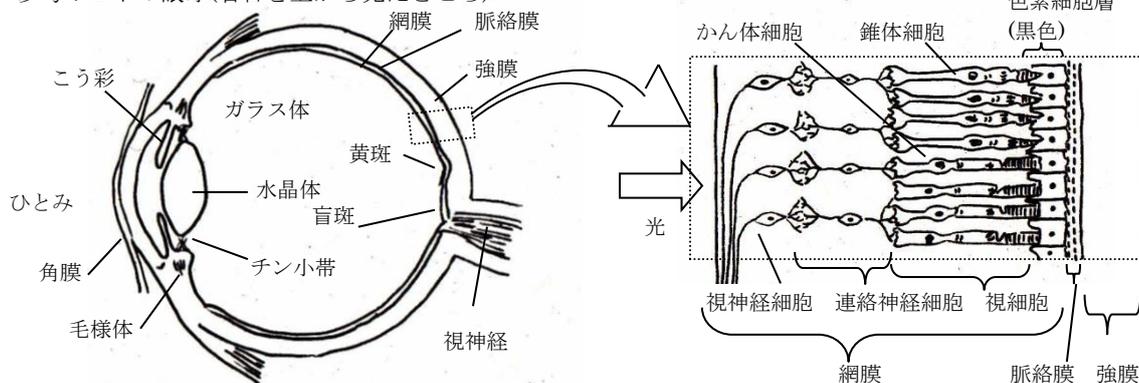
考 察

眼球の内部が黒いことによってどのような利点があると考えられるだろうか。

発 展

カラーコンタクトで世の中が色付きに見えないのはなぜか。

参考：ヒトの眼球(右目を上から見たところ)



月	日	年 組 番	氏名	検
		グループ番号()		

【解説】 ブタの眼球の観察

大阪府高等学校生物教育研究会生物実験集録より 加筆修正

【実験のねらい】

ほ乳動物の眼球を解剖して、そのつくりを調べ、眼球の構造の理解を深める。

【準備とその留意点】

- (1) ブタの眼球
- (2) 器具：バット、ゴム板、ピンセット、解剖バサミ、カミソリ、キッチンばさみ、定規、使い捨てビニール手袋、軍手、雑巾、時計皿、新聞紙

【実験上の留意点】

- ① 眼球は生命体の一部であり、生徒にとって見慣れないものであるため、取り扱いについては配慮を要する。
- ② 眼球はできるだけ新鮮な状態で使用する。やがてガラス体に弾力がなくなり、臭いがきつくなる。ウシの眼球は当面使用できなくなったので、ブタの眼球などを使用する。
- ③ 最初の眼球の切り開きが難しい。眼球を包む強膜は堅く、カミソリなどでケガをしないように注意する。眼球の表面は滑りやすいので、ケガ予防のため、軍手ないしは雑巾を使う。ハサミの先が入るぐらいの切れ目を、カミソリで開ける。
- ④ ガラス体を取り出すときに、素手になり、つかみ出すようにして水晶体も合わせて取り出す。ガラス体、水晶体、チン小体が一体になって取り出せる。



眼球の周辺に付着している筋肉や脂肪を除去する。



クリーニングがすんだ眼球



眼球を切り開く



眼球を切り開いたところ

実験プリント解説

【結果 1 の解答例】

- ・眼球の大きさについては、左右径・前後径とも約 20 mm 前後である。（この大きさはヒトの眼球の大きさとほぼ同じである。）
- ・スケッチ例は紙面の関係で省略

【結果 2 の解答例】

- ① まわりについている脂肪はやわらかいが、眼球は思っていたよりも丈夫であった。
- ② ガラス体は透明ではなく白くてゼリー状で、取り出すと流れ出てしまう。
- ③ 乳白色の網膜の外側は黒色で、ここは脈絡膜にあたる。
- ④ 文字は大きくみえる。約 3 倍くらいに見えた。
- ⑤ 水晶体の直径：約 8 mm、厚み：約 3 mm、色：ほぼ透明(古くなったものでは白く濁って乳白色となる)、硬さや感触：結構硬くてコリコリした感触
- ⑥ 円形、(ウシやネコの瞳孔は縦長の細長い形をしている。)

【考察の解答例】

角膜・水晶体を通して入ってくる光線は、網膜の視細胞に吸収されるが、その後方の色素上皮や脈絡膜は黒くて、すべての光を吸収して反射しない。もし、反射すると、この反射光と入射光とが視細胞に両方あたってしまうと混乱が生じるため。

【発展の解答例】

通常のカラーコンタクトレンズはレンズのまわりの部分だけ着色しており、水晶体にあたるレンズの真ん中の部分は着色していないため。

ただし、色覚異常の人のために、レンズの真ん中の部分を着色しているカラーコンタクトレンズも開発されている。

【解説：眼球の構造とその働き】

- ・ガラス体：透明でかなり柔らかいゼリー状。リンパ液で満たされている。眼球の内部を構成し、光の通り道になっている。
- ・こう彩：脈絡膜の伸びたものでメラニン色素によって黒く見える。
- ・水晶体：透明、扁平な厚みのある球形をしており、かなり弾力がある。光を屈折して網膜上に像を結ばせる。
- ・角膜：半透明で淡い白色。強膜の延長した部分で弾力があり丈夫である。眼球の前部を保護し、内側の前眼房にはリンパ液が入っている。涙は角膜の乾燥を防ぎ、酸素や養分補給には重要な働きをしている。
- ・網膜：薄い淡いピンク色をしており、盲斑から出ていることを確認する。
- ・盲斑：網膜の続きで、視神経の出ているようすを確認する。
- ・脈絡膜：後半側は淡い青白色に光っていて、血管が分布しているのが観察できる。脈絡膜をピンセットでつまみ上げると裏側は黒色になっている。外から入ってきた光を遮る。血管は網膜に酸素や養分を送る役目をしている。

【発展】

- ・水晶体の下の文字は拡大されて見える。しかし遠くの景色は倒立して見える。これらのことから、凸レンズの像のでき方の特徴を理解させる。そして、網膜上にはどのような像ができているのかを併せて考えさせる。
- ・焦点距離の調節はどのようにしておこなっているのか考えさせる。カメラとの違い。

【参考文献】

- ・2002年度版 表題「ビジュアル生物」 発行者：黒沢哲也 東京法令出版株式会社

【実験】腎臓の構造と働き（演示）

ヒトの腎臓に大きさ、構造ともによく似ているブタの腎臓を解剖し、腎臓の構造を観察し、その働きについて考えてみよう。

観察1 腎臓の構造 *使い捨てゴム手袋をする。

- (1) ブタの新鮮な腎臓を、業者などから入手する。
- (2) 腎臓の少しへこんでいる（腎門）付近の脂肪組織などをピンセットで除去し、腎動脈・腎静脈・輸尿管を探す。見つけたら止血かんし（クリップで代用）ではさんでおく。（図1参照）
- (3) 外形を観察し、スケッチする。
- (4) 腎臓の腎門と反対側の縁に沿ってメス（包丁）を入れ、縦断面を作る。この際、きちんと中央の面を切らないと、腎うが見られないことがあるので注意する。腎臓は、あとの観察のため切り離さないこと。
- (5) 断面を見て、皮質部分（黄色味を帯びた桃色）と髄質部分（赤紫色）を色の違いから区別する。髄質より腎門の側に、膜に包まれた空所である腎うがあることを見つける。いくつかのつながった形の髄質の先端部（腎乳頭）から尿が出てきて、腎うに集まる構造を観察する。これらを丁寧にスケッチし、部分の名称を入れる。（図2参照）
- (6) 腎うが尿の集まる所ならば、腎うと腎臓から出た尿の通る輸尿管はつながっているはずである。このつながりを確認するために、腎う内の腎門側に管の入り口を見つけて、そこからピンセットなどを差し込み、輸尿管へとつながっていることを確かめる。（図3参照）

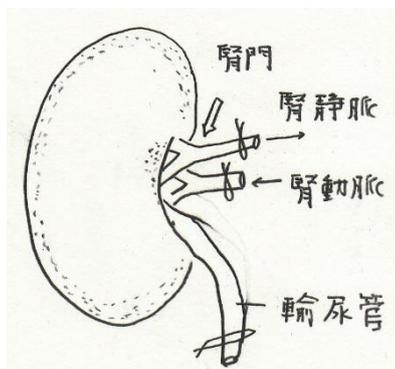


図1

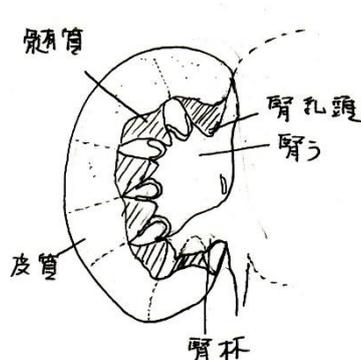


図2

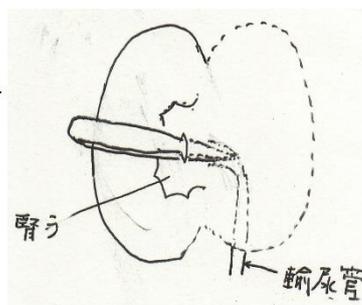


図3

注) 太くて白いのが輸尿管。管の断面が丸くて、しっかりしているのが腎動脈、薄く自力では丸い形を保てないのが腎静脈。

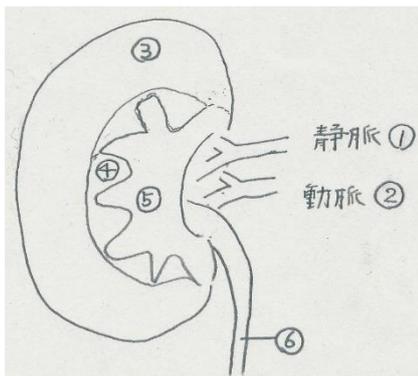
外形と断面図のスケッチをかく。

外形	断面図
----	-----

観察2

- (1) 駒込ピペットで動脈から墨汁をいれ、どの部分が黒くなるかを確認する。
- (2) 黒くなった部分の薄い切片を作り、顕微鏡で糸球体などを観察する。

スケッチ



考察 血液中の老廃物の流れを、左の腎臓の図（全体図と断面図を合成したもの）を参考に、図内の番号で順に示せ。

ヒント：腎小体は、皮質にある。

大静脈⇒心臓⇒大動脈⇒（ ）⇒（ ）⇒（ ）⇒（ ）⇒（ ）⇒ぼうこう⇒尿道

月	日	年	組	氏名		検
		グループ番号()				

【解説】 腎臓の構造と働き

大阪府高等学校生物教育研究会生物実験集録より 加筆修正

【実験のねらい】

体の中で、最も肝腎（肝心）な臓器の一つである〈腎臓〉の構造を、肉眼で観察するとともに、その働きの基本について学び、考える。肝臓や腎臓の観察は、教員による演示実験で行う。

材料としてブタの腎臓は、ヒトの腎臓に構造がよく似ており、ヒトのものよりかなり大きく（ヒトは11×5.5 cm、ブタは14×7 cm位）、肉眼で解剖・観察するにはちょうど良い大きさである。

【準備と留意点】

(1) 器具

解剖用バット、解剖用マット、鉗子（クリップ）、ピンセット、解剖用ハサミ、解剖用メス、注射器（スポイト）、墨汁（薄めて使用）、カミソリの刃、包丁、厚紙

(2) 材料

ブタの腎臓（腎動脈・腎静脈・輸尿管が残っているものが望ましい）

食肉業者または教材関連会社から入手する。冷凍庫で長期保存可能。価格は、教材関連業者で1個500円程度。

【実験上の留意点】

(1) 安全上の配慮

食肉用なので、基本的に清潔で安全だと考えられるが、動物の臓器を扱う実験であるので、実験用のゴム手袋などを着用して行うこと。実験後の手洗い、アルコール消毒を行う。消毒操作は、動物実験を行う場合の、基本的な実験手順である。

解剖用のメスは、非常に鋭利であり、その扱いについては十分に注意する。刃を自分や他の人に向けない。大型の包丁を使用する場合も同様である。

(2) 腎うの観察

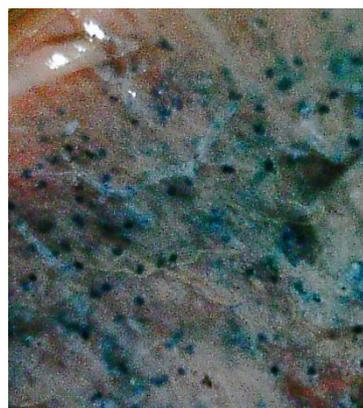
腎うは、個体によると大変厚みに差があり、薄くなっていることがある。観察を行うためには、ちょうど切断面が中央を通らないといけない。また、完全に切断してしまうと、腎うから輸尿管へのつながりわかりにくくなる。尿がたまる袋としての〈腎う〉が分かりにくいので注意する。

(3) 腎小体（糸球体）の観察

針先を切った注射器（10ml以上のスポイト）を使用する。墨汁の注入にはある程度圧力が必要である。腎動脈からうまく墨汁（5～10倍希釈）を入れることが出来れば、皮質の部分に黒い点々が浮かび、全体が黒っぽくなるのがわかる。（墨汁液が漏れないように注意する）動脈と静脈を間違えると、静脈には弁があるので墨汁は入っていかない。

黒くなった部分の薄片の観察には、カミソリの間に厚紙をはさみ、カミソリのすき間に皮質を挟むような形でそぎ落とし、顕微鏡で見ると糸球体（腎小体）に見える部分が見つかる。十分薄く切れている場合は、毛細血管も観察できる。

【観察 例】



【写真】（上段）左：外観（下は竹尺の目盛）

⇒腎門の脂肪組織は取り除いていないが、外側の膜は取り除いてある。

中：墨汁を注入したときの外観、腎動脈が枝分かれしているためか、全体が黒っぽくなることもあるが、一部だけが黒っぽくなることもある。表面に、黒い点々が広がるぐらいでやめればよいと思われる。

右：中を開いたときに、皮質の部分に見られる墨汁の点点。これが糸球体だと考えられる。肉眼でもある程度わかるが、実体顕微鏡などで拡大してみると分かりやすい。

下段：腎臓を開いた様子。外側の皮質部が墨汁で黒くなり、その内側に髄質、さらに白色の腎うが確認できる。ピンセットを差し込んであり、その先は腎門側の輸尿管につながっている。

【実験プリント考察の解答例】

大静脈⇒心臓⇒大動脈⇒(2)⇒(3)⇒(4)⇒(5)⇒(6)⇒ぼうこう⇒尿道

老廃物のうち、尿素は肝臓で作られ、肝静脈から『大静脈・心臓・大動脈』を経て、**②腎動脈**から腎臓に入る。**③皮質**にある腎小体で〈ろか〉され、原尿ができる。**④髄質**にある細尿管や集合管で、必要な成分が再吸収され、残りが尿となって**⑤腎う**にたまり、**⑥輸尿管**を経て、『ぼうこう』に蓄えられ、『尿道』から排出される。

【参考文献】

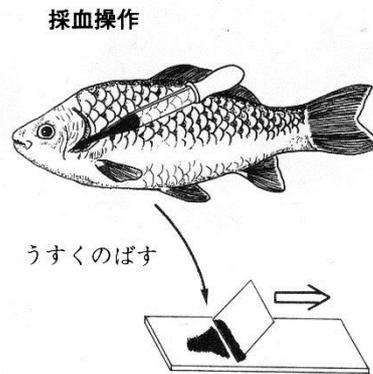
- (1) 飯島和重 ブタの腎臓の解剖と組織の観察 www.toray.co.jp/tsf/rika/pdf/h11_05.pdf
- (2) 事例Ⅲ 腎臓の働き www.tochigi-edu.ed.jp/center/cyosa/.../seibutsu_02-3.pdf
- (3) 嶋田正和ほか (2010) 生物基礎、数研出版
- (4) 腎臓の観察 www1.iwate-ed.jp/tantou/kagaku/3242.../h24_0404_2_14.pdf
- (5) 坂井健雄 (2013) 腎臓のはなし 中公新書
- (6) 二宮陸雄 (2006) 新編 医学誌探訪 医歯薬出版
- (7) 酒井シヅ (1998) 杉田玄白 解体新書 全現代語訳 講談社学術文庫

【実験】血球の観察

魚類のエラから採血し、塗抹標本を作って、血球を観察しよう。さらに、いろいろな動物の血球と比較してみよう。また、血液凝固を観察してみよう。

観察1 フナ（フナ）の血球の観察

- (1) フナなどのエラの部分に**パスツールピペット**を差し込み、傷口から採血する。
- (2) 血液を**スライドガラス**上に落とし、**カバーガラス**で血液が一層になるように薄くのばす。
- (3) 血液を5分間自然乾燥させた後、**メタノール**で、3分間固定する。
- (4) 10倍に希釈した**ギムザ染色液**を数滴落とし、10分間染色する。
- (5) プレパラートを水に浸けて余分な染色液を除き、**検鏡**する。形の異なる血球を探してスケッチし、赤血球、白血球等の名称を記入する。



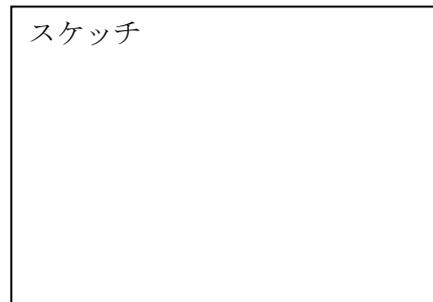
考 察

ヒトの血球と比較してどのような点が異なるか。

.....

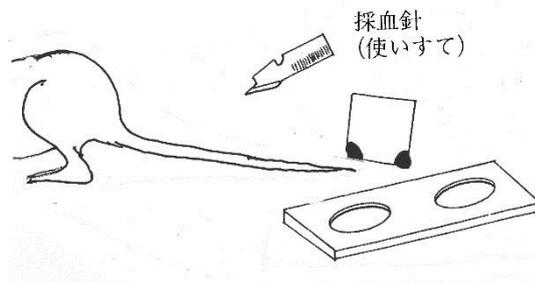
.....

.....



観察2 マウスの血液凝固の観察

- (1) 1枚の**スライドガラス**に**3.8%クエン酸ナトリウム溶液**と**生理食塩水**を別々に置く。
- (2) 右図のように、マウスの尻尾に**採血針**で少し出血させる。
- (3) **カバーガラス**の2つの角を使って血液をすばやくとり、それぞれの溶液と混ぜる。
- (4) しばらく放置した後、肉眼および**顕微鏡**で観察し、両者を比較する。



結 果 クエン酸ナトリウム溶液中の血液、.....
生理食塩水中の血液.....

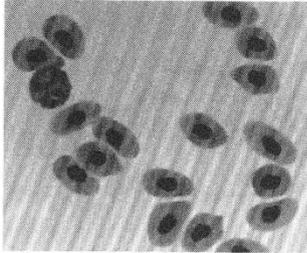
考 察 クエン酸ナトリウム溶液はどのような働きをしたと考えられるか。

発 展 蒸留水に採血した血液を加えて検鏡してみよう。(溶血の観察)

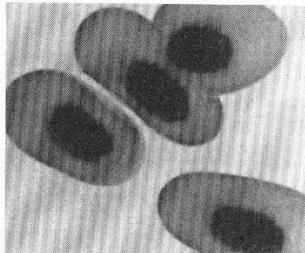
作業 脊椎動物の赤血球の比較

次は、いろいろな脊椎動物の血球の顕微鏡写真である。これらの写真によって、赤血球の形態を比較して、下の表を完成せよ。短径、長径は3つの血球を測定し、平均値を記入せよ。

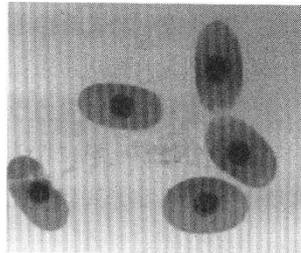
コイ (魚類)



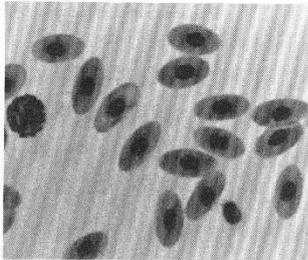
イモリ (両生類)



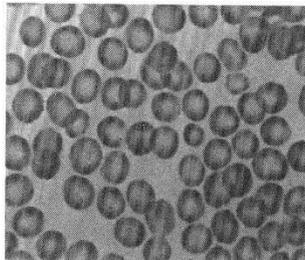
イシガメ (は虫類)



ニワトリ (鳥類)



ネズミ (ほ乳類)



図中の縮尺は

1 mmが0.5μmに相当。

結果

	赤血球の形	短径 (μm)	長径 (μm)	核の有無
コイ				
イモリ				
イシガメ				
ニワトリ				
ネズミ				

考察

(1) 陸上にすむ脊椎動物 (注) では赤血球の大きさや形にどのような傾向が見られるか。

.....

(2) ほ乳類の赤血球は他の脊椎動物の赤血球と比べて数が多く、小形である。これはどのような点で有利であると考えられるか。

.....

.....

(注) 生活環境が水中であるコイの血球は比較的小型になっている。

月 日	年 組 番	氏名	検
	グループ番号()		

【解説】 血球の観察

【実験のねらい】

本実験は、ヒトの血球の観察や血球凝集反応実験（血液型の推定実験）などが教科書から削除され、できるだけ実験操作において抵抗の少ない動物からの採血実験（この実験方法では傷つけるが、殺すことはない）を考えたものである。

さらに、いくつかの動物の血球を観察することにより、進化的な側面（血球の大きさと生活環境への適応関係）にまで考えさせるねらいがある。

【実験上の留意点】

(1) 血球観察実験

血球の観察実験ではフナなどの入手しやすい魚類のエラの部分から採血を行うようにしているが、魚類の血液は凝固しやすいのでうまく標本ができない場合がある。生徒に大量の生きた魚類を準備するより、1匹を解剖して心臓から採血して血液標本を作るほうが効率的である。1匹から数十枚のプレパラートが作れる。また、魚類以外の両生類やハ虫類、ホ乳類では、体の一部を傷つけ、出血したのから同様の方法でプレパラートが作成できる。これも、1匹を解剖して大量に標本を作るほうが効率的である。

標本を作る際、次の項目に注意が必要である。

- ① 血液に水などが混入すると、溶血を起こす。血球の内容物が流出したり、核だけが残る場合もある。
- ② スライドガラスが洗浄不十分だと、標本にムラができる。
- ③ 試料が厚すぎると、血球が重なりすぎて観察できない。
- ④ 試料が薄すぎると、血球どうしがくっついて球形にならない。
- ⑤ 血球の大きさの比較をする場合は、乾燥条件や実験条件をそろえる必要がある。

(2) 血液凝固実験

これまで血球凝集実験は、ヒトからの採血を行っていたが、ヒトからの採血は、感染症の問題や生命倫理上の問題などが提起されている。そこで、材料をヒトからマウスに変更した。マウスを使うときの注意点としては、健康なマウスを用意し、噛まれないようにすることである。ヒトで行うときの注意点としては、

- ①あくまでも自発的にやろうという意思のあるものだけ実習に参加させ、強制的に行ってはならない。
- ②実験器具は全て個人が操作できるようにそろえておき、血液を介したウィルス性疾患の感染を防ぐこと。
- ③実験に使用する器具は使い捨て（ディスポーザブル）を原則とし、滅菌操作や事後の処理を行わなくてよいようにする。
- ④血液型の推定の行える血球凝集反応の実験は可能だが、血液型判定は行わない。血液型判定は専門家でないといけない。また、学校レベルの実験では、数%の判定ミスが必ず起こるのでトラブルの原因となりやすい。

【実験プリント結果と考察解答例】

(1) 魚類の血球について

血球は、赤血球、白血球、栓球（ヒトの血小板に相当する）が観察される。さらに白血球は染色性の違いから好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球に分類される。

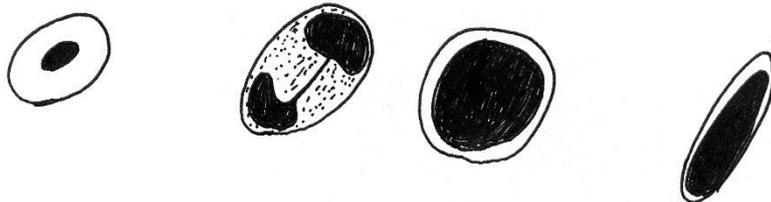
赤血球：楕円形で、核を有する。

サケマス類 $16 \times 10 \mu\text{m}$ 核 $7.5 \times 3.5 \mu\text{m}$

カワハギ $6 \times 5 \mu\text{m}$ 核 $3 \times 3 \mu\text{m}$

栓球：有核で、かん状または紡錘形の小型の細胞。細胞質は少ない。血液凝固に関与し、形態変化を起こしやすい。

白血球：血球の細胞質中に顆粒が観察される。（染色条件により染まらないものもある）。核は1個ないし数個に分葉しているが、分葉していても核糸でつながっている。



赤血球 白血球（左：顆粒球 右：リンパ球） 栓球

赤血球の大きさ (μm)

コイ	長径 12.38 ± 0.54	短径 8.15 ± 0.26	核：長径 5.36 ± 0.29	短径 3.26 ± 0.12
キンギョ	長径 11.22 ± 0.98	短径 7.75 ± 0.34	核：長径 5.21 ± 0.44	短径 3.05 ± 0.11
ギンブナ	長径 12.04 ± 0.16	短径 8.46 ± 0.34	核：長径 5.53 ± 0.14	短径 3.30 ± 0.11

(2) 脊椎動物の赤血球の比較【考察解答例】《測定値は省略》

- 1 陸上の生物では陸上生活に適応して、活発に活動しているものほど血球の大きさが小さくなっている。また、ほ乳類以外は楕円形をしている。哺乳類の赤血球は無核で円盤状の細胞になっている。
- 2 単位体積当たりの表面積が大きくなり、ガス交換が効率的に行われる。
- 3 ほ乳類の赤血球が無核で、小型の円盤状になっていることと、赤血球の数が多きことでガス交換の効率が高くなる。また、毛細血管がかなり細くなっても、折りたたまれたりして末端の組織の近くまで運ばれる。

【参考文献】

池田・尾崎・瀬崎(1986) 魚類血液図鑑、緑書房

小宮 正文 (1985) 図説血球のみかた、南山堂

笹川しげる・渡部準之介 (1991) 改定新版身近な血液ゼミナール、講談社ブルーバックス

山本 茂 (1986) 血液型、化学同人

北浦 隆生 (1992) 血球凝集反応、じっきょう理科資料 33、実教出版

【補足】血球を使った生物実験について

血液を使った生物実験は、恒常性の維持の項目の中で体液の一つとして取り上げられている。ここでは、これまで自分が取り扱ってきた血球に関する実験についていくつか取り上げ、諸氏の参考に供する。

血球凝集反応に関する実験

古くは、「血液型判定の実験」として行われ、抗 A 血清、抗 B 血清を用いて、血球凝集反応を行い、ABO 式血液型の判定を行った。血液型は自然免疫で、生まれながらにもっている抗原（凝集原）抗体（凝集素）である。しかし、高校の生物実験室レベルの実験では、エラーの可能性は 10% 近くにはのぼるといふ説がある。血液型判定は医療行為であるため、勝手に血液型判定をするのは「医師法違反」である。したがって、「血液型判定」実験ではなく「血球凝集反応」実験なのである。

ヒトの血液型は、ABO 式だけでなく、A 型からすべてのアルファベットの血液型（Z 型）まで、存在する。動物の血清と特異的に反応することで、P 式（ブタ）E 式（ウナギ）、Rh 式（アカゲザル）といったものが知られている。ラントシュタイナー一派が確立したヒトの赤血球と血漿による凝集反応だけで行われる ABO 式だけにとらえると意味が小さくなる。また、ABO 式血液型だけでも 20 種類も亜型が存在し、抗血清だけで判定することはできない。一般に、ABO 式血液型判定では、抗血清と A 型血球、B 型血球による（裏表）二重判定が標準である。血球凝集の様子をきちんと識別するため、一定の温度条件でホールスライドガラス上で反応させ、顕微鏡下で凝集の有無を判定する。学校現場では、標準血球が準備しにくいと、正確な判定は困難である。昔は、安易な血液型判定によって、誤った知識を与えたり、家庭の問題を引き起こしたりと実験がトラブルの種になったこともあった。いずれにせよ、現在、高校現場では血液型判定実験は実施されていないし、されるべきではない。

血液型物質（ABO 式）は、赤血球表面の糖タンパク質がもとなる。この物質は、ヒトの赤血球だけでなく、自然界に広く分布する。動物の血液型という言い方があるが、イヌやネコにおいても血液型物質が存在するし、ソバやある種のマメ科植物（ハリエンシダ）にも血液型物質が存在する。血球凝集反応で、こうした物質の存在を示すのも興味付けとして有効である。

「血液型性格判定」という迷信が流布され、その影響が無視できない現状がある。しかし、ABO 式以外の様々な血液型が存在し、すべてについて説明できないことから「血液型で性格を判定することは科学ではない」ことを理解させられるのではないかと考える。

近年、血液型では、臓器移植にともない、白血球の型が問題になっている。教材で取り上げられることは少ないが、組織適合性抗原もふくめ、生まれながらにもっている自然免疫についてももう少し取り上げてほしいのではないかと考える。

唾液や毛髪による血液型判定

犯罪捜査では、毛髪や体液、唾液などから血液型をもとめ、犯人逮捕の有力な証拠とするシーンが見られる。この実験は、血球凝集反応が起こる抗血清に対して唾液や毛髪を反応させ、抗体を取り除くことになる。そのため、反応させた血清を用いるとそれまで起こっていた凝集反応が起こらなくなることを利用して唾液や毛髪の血液型を判定するものである。

学校で行う場合、唾液の場合は唾液を湯煎で 100℃ 近くまで温度を上げ、唾液に含まれるよけいなタンパク質を凝固させ、濾過により除去する。その後、抗血清と反応させ、血清の反応がなくなることから血液型を推定する。毛髪の場合は、細かく切り刻んだ後、乳鉢で粉碎し、同様の実験を行う。生徒が唾液を提供するのをいやがるケースが増えてきたので、無理強いはいできない。教師側で未知のヒト（教師

が提供?)の唾液を準備すべきだろう。

赤血球の観察

赤血球は、哺乳類の場合、発生途中で核が細胞外に放出され、無核の細胞になる。ほかの魚類、両生類、は虫類、鳥類では有核の細胞である。しかし、いずれの核も凝集して小さくなっており、活動はしていないものと思われる。赤血球のサイズは陸上動物の場合、両生類→は虫類→鳥類→哺乳類の順に小型化する。これは、細胞のサイズが小さい方が代謝効率がよい(単位体積あたりの表面積が大きい)ことから、陸上生活に対する適応の結果ではないかと考えられる。赤血球の観察には、血球塗末標本が使われる。採血した血液を1滴スライドガラス上に滴下し、カバーガラスで血球が1層になるように薄くのぼし、乾燥させる。乾燥後、メチルアルコールで固定するか、そのままギムザ染色液で染色する。乾燥後、バルサムや合成樹脂で永久プレパラートにすれば、10年以上使用が可能である。血球標本は、形が単純で、観察が容易なので、初期の顕微鏡観察実習(マイクロメーターの使用)に使い易い教材である。

白血球の観察

白血球の観察では、アメーバ運動と食作用を観察したい。血液中に、生理食塩水ですった墨を濾過したものを注入することで、白血球に異物としての墨の粉を取り込ませる。これによって、生きた白血球の観察が容易になる。生きた白血球を多く得るには、腹部を解剖し、取り出した肝臓を切断し、切断面をスライドガラスにスタンプすることによって得られる。また、解放血管系であるバッタなどの昆虫の足を切断し、切断面をスライドガラスになすりつけることによって生きた白血球が得られる。ギムザ染色した場合には、染色性の違いから好酸球、好中球、好塩基球に分けられる。固定標本を観察するのもよい方法であると思う。

静脈血と動脈血

HbO₂(酸素ヘモグロビン)となっている場合の赤血球は鮮紅色であり、Hb(ヘモグロビン)の場合は暗赤色であると記述されている。新鮮な血液が入手できれば、血液を試験管に採り、クエン酸ナトリウムを加えて血液凝固を防ぎ、小型ガスボンベから酸素ガスや二酸化炭素ガスを吹き込むことで色の変化を観察させることが可能である。近年、血液を体外に導いて、高濃度の酸素を添加することで疲労回復などをうたい文句にするクリニックが出現している。静脈血の色を動脈血の色にすることで効果をうたっているが、果たしてどのような効果が見込めるのであろうか。

血小板と栓球

血液凝固に働くのは哺乳類では血小板であるが、鳥類では栓球と呼ばれる小型有核の細胞がその働きを行う。血小板は巨大血球が壊れた破片で、核がない。

血球の発生実験

ニワトリ胚から採血した血球標本とヒヨコや親鳥から採血した血液では血球の様子が異なる。これは胚の血球が発生途中で成体の血球と置き換わるためである。ヒトの場合でも新生児の黄疸は、胎児血球と幼児血球が急速に置き換わるため、赤血球を分解する肝臓におけるビルビリ色素が処理しきれないことで起こる。血球が幼児と胎児で異なることへの教材とできる。

発生初期の血球(幹細胞)はどの血球になるのか決定されていないと考えられる。直接幹細胞をとらえるのは難しいが、骨髄から血球を取り出すことで、類似の血球が観察可能である。骨髄血球は、胚や生体内を流れる血球に比較して大型で、特に細胞に対する核の割合が大きく、また、ギムザ染色では染色性も異なる(やや青みがかかる)。血球が分化途中であるためと考えられる。

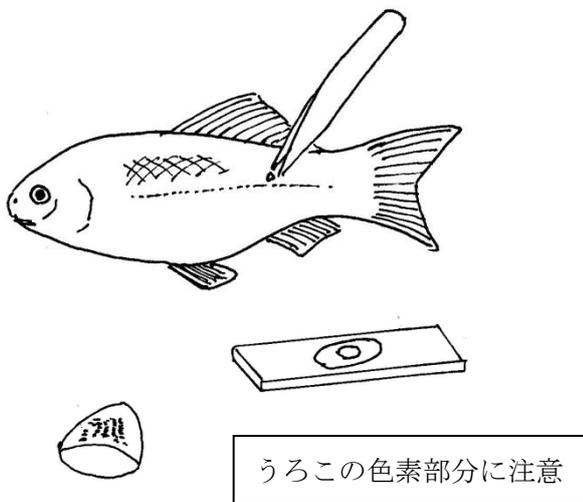
【実験】 色素胞の観察

フナやコイのうろこをとり、アドレナリンなどによる色素胞の変化を観察する。

実験1 色素胞の観察

- (1) メダカやフナの体側からピンセットで数枚のうろこを抜き取る。
- (2) 生理食塩水を満たしたホールスライドガラスにうろこを浸す。
- (3) 解剖顕微鏡下で柄付き針でうろこを分離する。うろこの表皮付着部分に色素細胞があるので、この部分に触れないように注意する。
- (4) スライドガラスにうろこをのせ、生理食塩水を滴下、カバーガラスをかけて検鏡する。

(×150、×600)



スケッチ

実験2 背地適応による体色変化

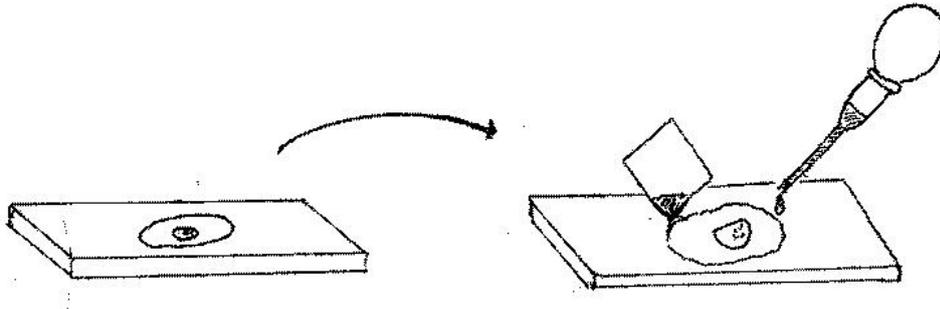
- (1) 白く塗った水槽と黒く塗った水槽にメダカを2匹ずつ入れ、明るいところにおく。
- (2) 体色が変わったところで、それぞれ1匹ずつからすばやく、うろこを抜きとり観察する。
- (3) 体色が変わったメダカの水槽を入れ替えて同様に実験して観察する。

スケッチ 白い水槽

スケッチ 黒い水槽

実験3 色素胞の変化

- (1) 実験1の方法でうろこを取りだし、スライドガラスにセットする。
- (2) 生理食塩水をろ紙で吸い取り、1%塩化カリウム溶液を滴下し色素胞を観察する。
- (3) 別のうろこをセットし、生理食塩水を吸い取り、0.1%塩化アドレナリン溶液を滴下し、観察する。



スケッチ

KCl 溶液	塩化アドレナリン溶液

考察

メダカやフナの体色変化はどのようなメカニズムで起こると考えられるか。

.....

発展 ヒメダカの黄色色素胞を取り出して、ルゴール液を1滴落として観察してみよう。

月	日	年 組 番	氏名	検	
		グループ番号()			

【解説】色素胞の観察

【実験のねらい】

メダカやフナの体色変化を うろこにある色素胞の変化で観察する。

アドレナリンやアセチルコリンによって色素顆粒の集散がおこり、体色変化がおこることを確認する。

【準備】

(1) 魚類用生理食塩水 (リンガー液)	NaCl	128	mM/L (7.5g/L)
	KCl	2.7	mM/L (0.2g/L)
	CaCl ₂	1.8	mM/L (0.2g/L)
	グルコース	5.6	mM/L (1g/L)
	NaHCO ₃	(0.2g/L)	→ pH6.8~7.2
(2) アドレナリン液	リンガー液 1L+0.1g アドレナリン	(0.01%≒ 5.5×10^{-4} M) (アドレナリン: C ₉ H ₁₃ NO ₃ : MW=183.21)	
(3) アセチルコリン液	リンガー液 1L+0.1g 塩化アセチルコリン	(0.01%≒ 5.5×10^{-4} M) (塩化アセチルコリン: C ₇ H ₁₆ ClNO ₂ : MW =181.66)	

【実験上の注意】

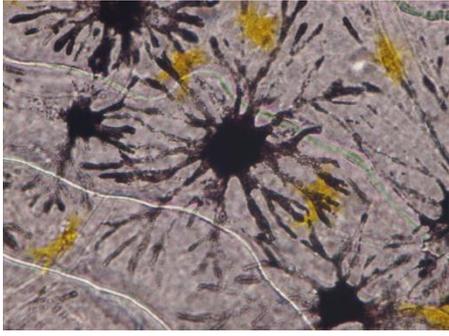
ピンセットの先は砥石で細くみがいておく。大きさにもよるが、メダカの場合片側から10枚程度抜き取るのが限度と思われる。フナなど大型のものを使うと抜き取りやすい。

うろこを抜き取る時は、リンガー液でしめらしたガーゼまたはペーパータオルで魚体を包むとあばれない。抜き取るうろこは、体側前部背面側から採取すると黒色素胞が多く含まれているものが採取できる。できれば同一のウロコを用いて本実験を行うことが望ましいが、実験に要する時間が長くなるので、余裕のある場合に実施する事が望ましい。その際、黒色素胞は壊れやすい細胞なので、ウロコの取り扱いはいねいに行う。メダカのうろこは直径約1mm程度である。

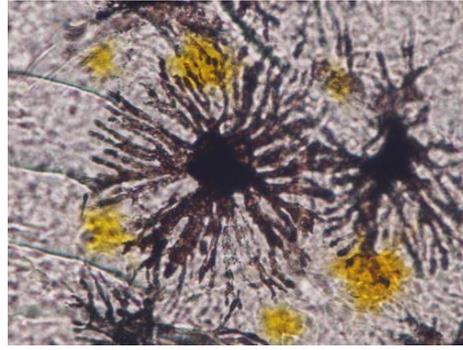
【結果と考察】

実験3 色素胞の変化 (観察例)

KCl 溶液

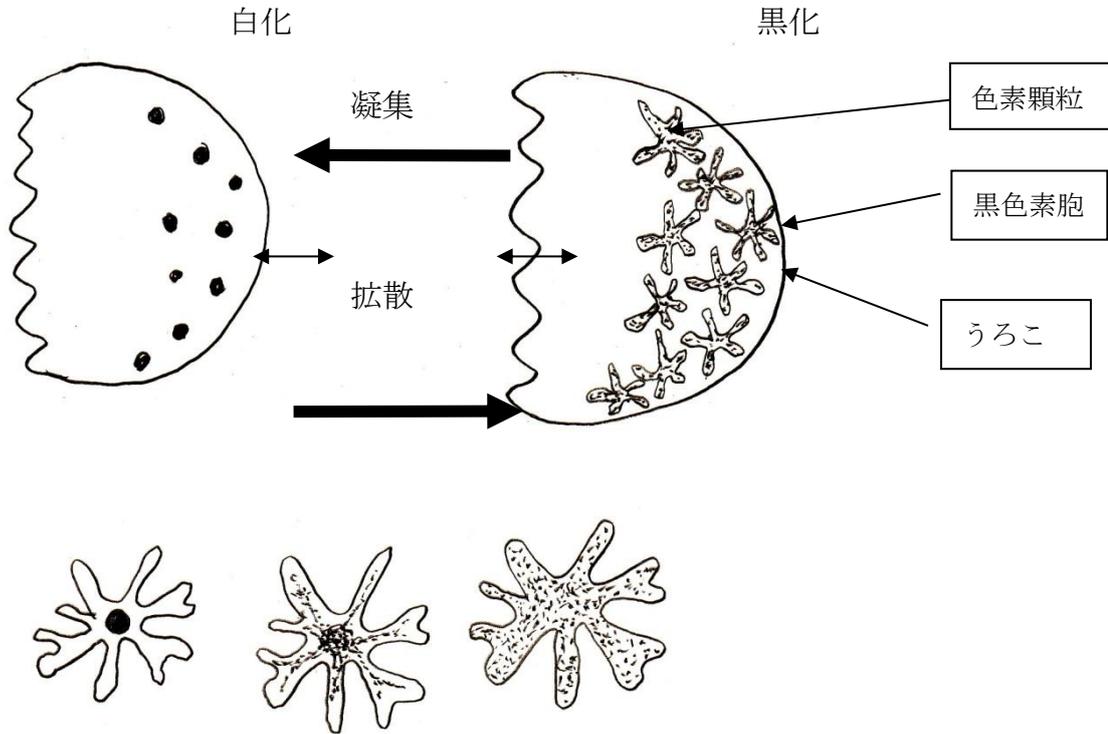


塩化アドレナリン溶液



KCl は K^+ になって神経末端を刺激し、神経伝達物質の分泌を促進し、ノルアドレナリンは色素胞の直接反応を誘起する。塩化アドレナリンはノルアドレナリンと同様に作用すると考えられる。

黒色素胞（メラノフォア）の拡散と収縮は、細胞そのものの形が変化するのではなく、内部に含まれる色素顆粒が細胞内輸送により、細胞の中心部に集まったり周辺部に広がったりすることにより起こる現象。



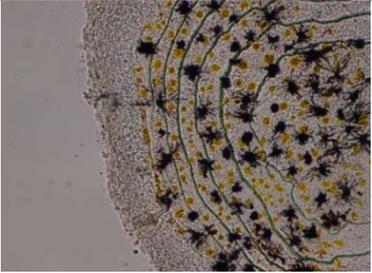
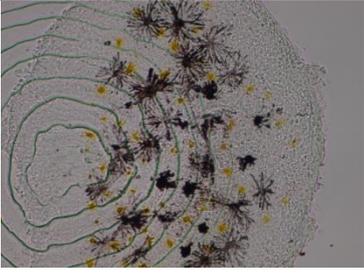
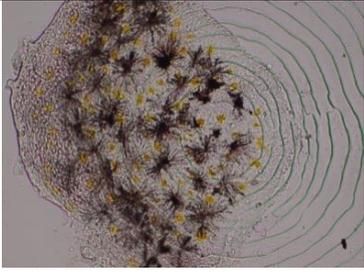
黒色素顆粒の移動

哺乳類、鳥類の体色変化は、主にメラノサイトと呼ばれる細胞によって生産されるメラニンの合成速度と、それが皮膚から失われる速度に依存している。従って体色変化はごくゆっくりしている。

これに対し、ハ虫類以下の脊椎動物や無脊椎動物では、色素そのものの量や色素細胞の数の変動による遅い変化（形態的変化）だけでなく、環境条件や自身の生理状態の変化によって、色素細胞自体の運動性に由来する、速く、振幅の大きな変化が見られる（生理的変化）。

魚の体色変化は後者の型に含まれるもので、この体色変化の調節はホルモンと自律神経系の支配により行われていると考えられている。メダカやフナなどの体色変化に関する色素細胞の細胞質中に黒色素胞（メラノソーム）とよばれる細胞小器官があり黒色素（メラニン色素）顆粒を

含む。黒色素の細胞内輸送による凝集・拡散が体色の変化を引き起こす。

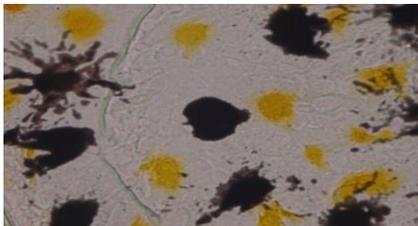
		
アドレナリン液中の黒色素胞	リンガー液中の黒色素胞	アセチルコリン液中の黒色素胞

写真の通り、アドレナリンにより黒色素顆粒が凝集し、アセチルコリンにより黒色素顆粒が拡散する。ただし、これら薬品による黒色素胞の反応は均一でなく、個々の細胞に反応の差がある。

実験では、溶液の入れ換えは、原形質復帰の実験と同様に片側から濾紙でスライドガラス中の溶液を吸いとる取り、反対側から新しい溶液を滴下して行う。アセチルコリン液では、リンガー液に浸けておいたときと比べ、拡散がはっきり見られないことがある。

背地適応による体色変化においては、「すばやくうろこを取る」ことで色素の拡散状態の違いを見るものだが、上手くいかない場合には、1匹ずつを熱湯に入れて即死させてからうろこを取る方法がある。1匹からいくつものうろこを採取でき、かつ、熱によって酵素反応がとめられるために際を観察させやすい。

【発展】 ヒメダカの黄色色素胞を取り出して、ルゴール液を1滴落として観察してみよう。



黒色素胞のまわりに見える薄い色の細胞（実際は黄色）は黄色素胞（キサントフォア）で、キサントフィル系の色素を含んでいる。ヒメダカは、黒色素胞のメラニン色素が作れずに、黄色素胞の色のみが表出されたメダカである。

【参考文献】 化学と実験別冊 図説教材生物 下 p. 56-72 1983 共立出版

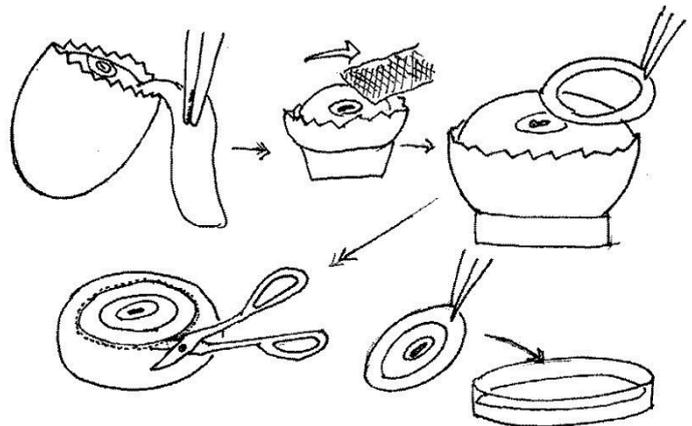
【実験】ニワトリ胚の観察

ニワトリの受精卵から胚を取り出し、発生の様子を観察しよう。卵殻外に取り出して培養して観察しよう。

実験1 ニワトリ胚の観察

- (1) ニワトリ受精卵（24～36時間孵卵）の卵殻のとがった方を割り、卵白を捨てる。
- (2) 卵立てに立てて、キムワイプなどで胚を中央に寄せる。
- (3) 胚が穴の真ん中に来るように穴あきろ紙リングを貼り付ける。
- (4) ろ紙リングの周りの卵黄膜を眼科用ハサミで切り出す。
- (5) 貼り付けた胚を鋭いピンセットでリングごとはがし、裏返しにして、シャーレにとる。
- (6) ニワトリ用生理食塩水で卵黄を流す。
洗い流した液はシャーレを斜めにしてキムワイプで吸い取る。

- (7) 実体顕微鏡で観察する。
- (8) 3日胚以降は卵殻に穴を開け、胚の周囲の膜を切り出し、葉さじですくい取り、生理食塩水を入れたシャーレにとって観察する。



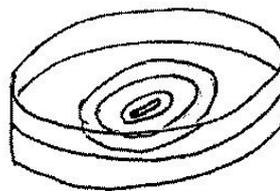
スケッチ

1 日胚	2 日胚
------	------

参考 www.interscience.wiley.com/developmentaldynamics

実験 2 NEW 培養 (卵殻外胚培養)

- (1) 2日胚を取り出すときと同様に卵殻のどがった方を割り、卵白を捨てる。
- (2) 卵立てに立てて、キムワイプなどで胚を中央に寄せる。
- (3) 胚が穴の真ん中に来るように穴あきろ紙リングを貼り付ける。
- (4) ろ紙リングの周りの卵黄膜を眼科用ハサミで切り出す。
- (5) 貼り付けた胚を鋭いピンセットでリングごとはがし、裏返しにして寒天培地におく。
- (6) ニワトリ用生理食塩水で卵黄を流す。洗い流した液はペトリ皿を斜めにしてキムワイプで吸い取る。
- (7) 胚を観察する。さらに、37°Cで1日培養後胚の変化を観察する。



スケッチ



発展 神経伝達物質の働き

アドレナリンとアセチルコリンによる心拍の変化を見よう。3日目胚までは胚膜が胚全体を覆っていないので、神経伝達物質を滴下し、変化を観察する。

- (1) 2日胚を培養皿に取り出す。
- (2) 胚に希釈したアドレナリンを滴下する。心拍の変化を測定したら、生理食塩水で胚を斜めにして流出させる。
- (3) 胚に希釈したアセチルコリンを滴下して心拍の変化を測定する。

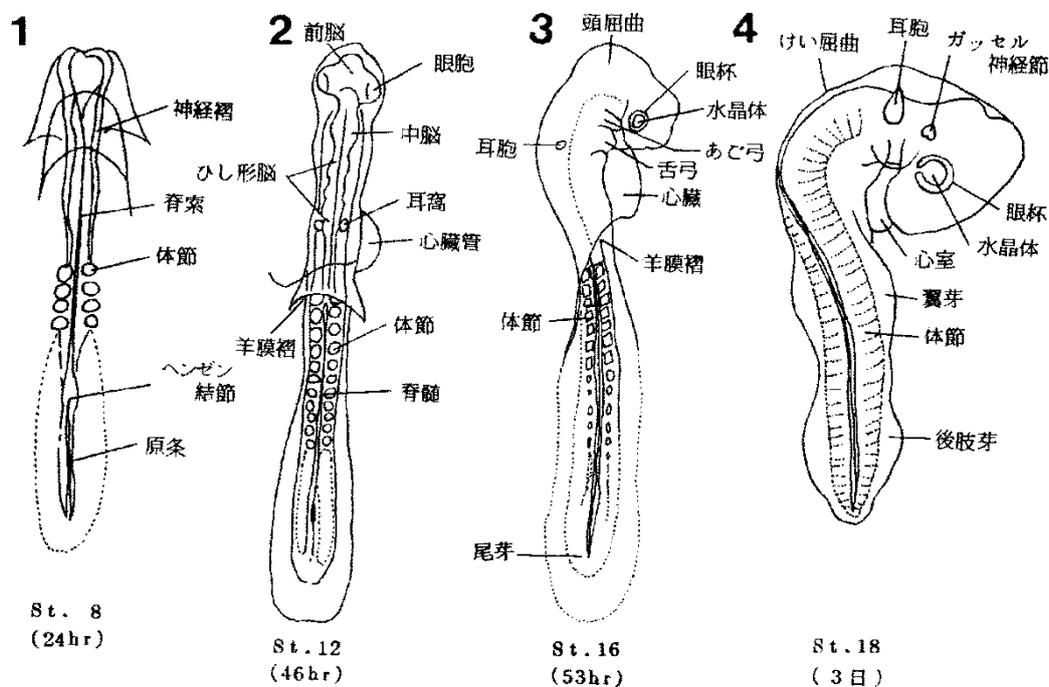
培地や薬品

寒天培地 (50ml 分) : 25ml 蒸留水に 0.25g アガロースを加熱溶解後、50℃に保温する。ニワトリ胚の薄い卵白 25ml に 5M NaCl 615 μ l と 10% グルコース 1.5ml を加えて静かに混合、50℃ まで加温する。アガロース液と卵白液を混合し、直径 3cm のシャーレに 2ml ずつ分注する。(プレート 25 枚)

塩化アセチルコリン液、塩化アドレナリン液 : それぞれの薬品を蒸留水で 0.01g/ml の濃度に溶かし原液とする。アセチルコリン液を 500 倍、アドレナリン液 1000 倍に希釈して使用。

穴あきろ紙リング : ろ紙を 2 cm 程度の円形に切り、胚に合わせて穴を切り抜く。

月 日	年 組 番	氏名	検
	グループ番号()		



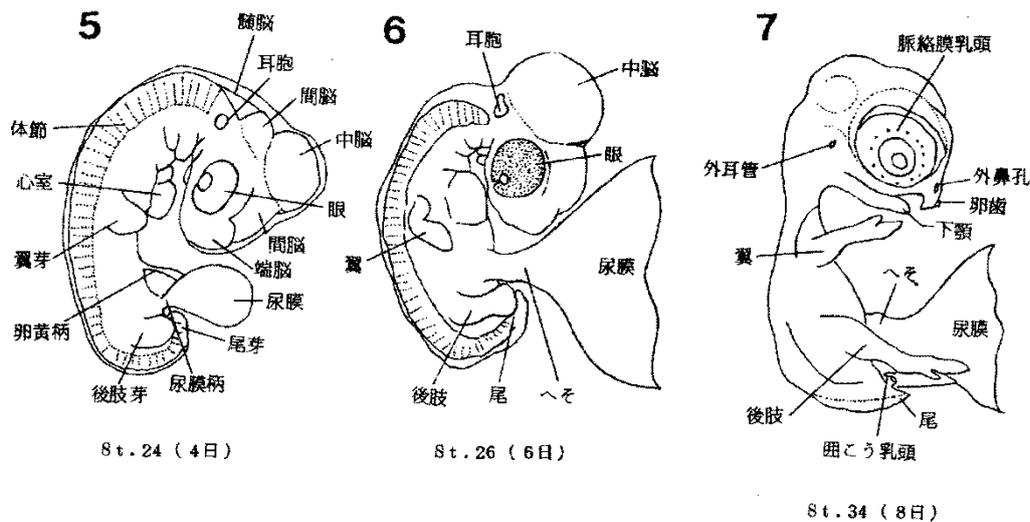


図 ニワトリ胚の発生過程

- | | | |
|-------------------------|----------------------|-----------------|
| 1 神経褶の隆起した時期
(×27.3) | 2 三脳胞ができる
(×31.7) | 3 尾芽胚期
(×19) |
| 4 3日胚
(×11.5) | 5 4日胚
(×8.1) | 6 6日胚
(×4.0) |
| | | 7 8日胚
(×2.6) |

【解説】ニワトリ胚の観察

【実験のねらい】

脊椎動物の中で発生実験によく使われるものの一つにニワトリがある。ニワトリは家禽としての歴史が長く、身近な存在である。なおかつ、有精卵を業者から容易に入手できるため、親を飼育し続ける必要がない。実験に必要なだけいつでも準備できる利点がある。ここでは、主に初期胚を観察するため胚を卵殻から取り出して培養することも含めた実習を試みている。

【準備】ニワトリの受精卵の準備

有精卵は業者に発注することで用意できる。受精率は平均 80~90%程度、季節、業者により差がある。10℃~15℃で保存すると1週間保存可能。

38℃湿度 50~60%で孵卵すると、20~21日で孵化する。発生を途中で停止させる場合には4℃で1日おけばよい。孵卵後、6日胚以上になるとヒヨコに近い形態になる。中枢神経系が完成し、この段階から実験を行う場合には、生命倫理規定が適用される。6日胚の安楽死は、頸部を解剖ハサミで切断する事で行う。

ニワトリの発生段階については、Hamburger and Hamiltonの発生段階表を標準として用いる。

*ニワトリ生理食塩水

- ・簡易生理食塩水： 0.1M NaCl (7.2gNaCl/1L水) を煮沸滅菌
- ・ニワトリ用リンゲル液：NaCl 8.5g、 KCl 0.42g、 CaCl₂ 0.25g
蒸留水で溶かして1000mlにする。オートクレーブ後冷蔵庫で保存。

*培養などに使う生理食塩水

- ・タイロード液

原液 (10 倍液：オートクレーブして常温保存可)

NaCl 160g、 KCl 4g、 CaCl₂ · 2H₂O 5.3g

MgCl₂ · 6H₂O 2g NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.1g Glucose 20g

蒸留水に溶かして2000mlにする。

使用時には、原液を蒸留水で10倍に希釈し、NaHCO₃を1gt溶かす。

*New 培養の際には、生理食塩水にペニシリン・ストレプトマイシン混合液 (ギブコ、Antibiotic-Antimycotec 1540-062 100ml) を通常の10倍希釈 (1000倍希釈) して 1L に対して1ml加える。

希釈液は5~10ml ずつ分注し、4℃で保存。

【NEW 培養 (卵殻外胚培養)】

1955年 Dennis New によって開発、2001年改良法が報告されている。ニワトリ胚を卵外の培地に取り出して培養する。数日培養可。(栄養が不足するため、あまり大きくはならない)

- ・簡易寒天培地

アガー (寒天粉末) を 0.3~0.6% になるように生理食塩水に煮沸して溶かし、直径 35mm のシャーレに 2.5ml ずつ分注して固める。

(120 枚の培地：寒天粉末 1.8g を、300ml 生理食塩水に溶かす)

- ・アルブミンプレート

25 枚の培地：50ml 分

① 25ml の水に 0.25g アガー (粉寒天) を加熱溶解して、50℃で保温。

② 未受精卵から卵白を取り出し、濃厚卵白をピンセットで除去した薄い卵白を使用。

1 個の未受精卵から 10~15ml 採取可能。冷蔵庫で保管する。

25ml の薄い卵白に 615 μl 5M NaCl と 1.5ml 10% グルコースを泡立たないように静かに反転混和する。これを 50℃に加温。

③ ①と②を静かに混和し、直径 30mm のシャーレに 2ml ずつ分注し、室温で静置して固める。

- ・塩化アセチルコリン液、塩化アドレナリン液：それぞれの薬品を蒸留水で 0.01g/ml の濃度に溶かし原液とする。アセチルコリン液を 500 倍、アドレナリン液 1000 倍に希釈して使用。

- ・穴あきろ紙リング：ろ紙を 2 cm 程度の円形に切り、胚に合わせて穴を切り抜く。

シャーレに入れて乾熱滅菌により無菌化可能。



【その他の観察方法】

窓開け法

鶏卵に穴を開けて、セロハンテープで穴を閉じておくことで生かしたままの観察が可能である。穴にワセリンパラフィンでカバーガラスを貼り付けて観察窓をつくる方法もある。窓内部が湿気で曇ることがあるが、ガラス棒を加熱して、カバーガラスにくっつけて加熱することで曇りを除くことが出来る。

ラップフィルムによる卵殻外の発生

ビーカーにサランラップなどでくぼみをつけ、そこに有精卵を割り入れる。くぼみの上からラップで覆うことで全体の観察が可能になる。孵化の直前まで育てることが出来るが、孵化させるには技術が必要である。2015年千葉県の高校で孵化に成功した事例が報告された。

ニワトリ胚の固定法

- ① 胚の不要な組織（胚膜など）をピンセット、ハサミなどで除去し、薬さじなどですくい取る。
- ② 胚が十分入るスクリー瓶などに、胚が浸る程度の固定液（4%パラホルムアルデヒド、95%エタノールなど）を入れ、4℃で一晩固定する。
- ③ 70%エタノール液で保存する。

New 培養の場合には、培地にそのまま固定液を加える。10%ホルマリン溶液、または70%エチルアルコールで固定する。

アポトーシスの観察

ニワトリ胚の7～8日胚を使用する

0.002%ナイルブルー染色液 : Nile Blue A (SIGMA N5632) の1%水溶液を使用直前に生理食塩水で100～500倍に希釈して使用する。（希釈後30分放置すると沈殿を生じる。）

- ① ニワトリ胚（7～8日胚）を取り出し、羊膜を取り除く。37℃の生理食塩水で洗う。
- ② 37℃生理食塩水50mlに1%ナイルブルー液を100 μ l加えて混和する。
- ③ ②の染色液に胚を入れ、20分37℃で静置、途中で数回攪拌する。
- ④ 胚をナイルブルー染色液から取り出し、生理食塩水中で後肢を観察する。

（染色が不十分な場合は、染色液を交換してさらに染色する）

アポトーシスした部分が青く染まって観察できる。

【実験上の注意】

ニワトリ有精卵は1年中購入可能であるが、夏暑いとき、および、暑い時期を過ぎた直後は、卵の調子がよくないことがある。可能ならば季候のよい季節に実験する方がよい結果が得られる。

また、ニワトリ有精卵は、多数の生徒実験をおこなうにはやや大きく、大型の孵卵器（恒温器）が必要である。価格も1個100円前後するので、費用も必要である。その場合、対策としてウズラ有精卵の使用を考えてはどうか。

価格的にはニワトリ有精卵の1/3程度の価格で、サイズも小さいので同じ孵卵器で3倍の卵を孵卵できる。初期発生は、ニワトリ胚とほとんど同じである。発生段階表はそのまま使用できる。

ただし、卵が小さいので、蒸発皿のような入れ物に胚を取り出して作業することが望ましい。

受精卵の購入については

城山鶏園 <http://www.houjuran.co.jp/>が便利である。

【参考文献】

Hamburger, v and Hamilton, H.L. (1951) J.Morphol.88, 49

岡田節人編 脊椎動物の発生 (1989) 培風館

スターン・ホランド著 八杉・西駕監訳 発生生物学必須テクニック

(1995) メディカルサイエンスインターナショナル

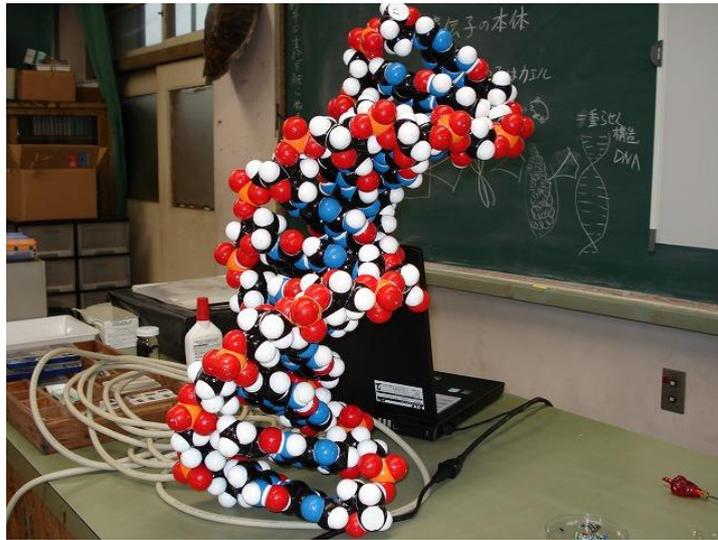
参考 www.interscience.wiley.com/debelopmemmtaldynamics

あとがき

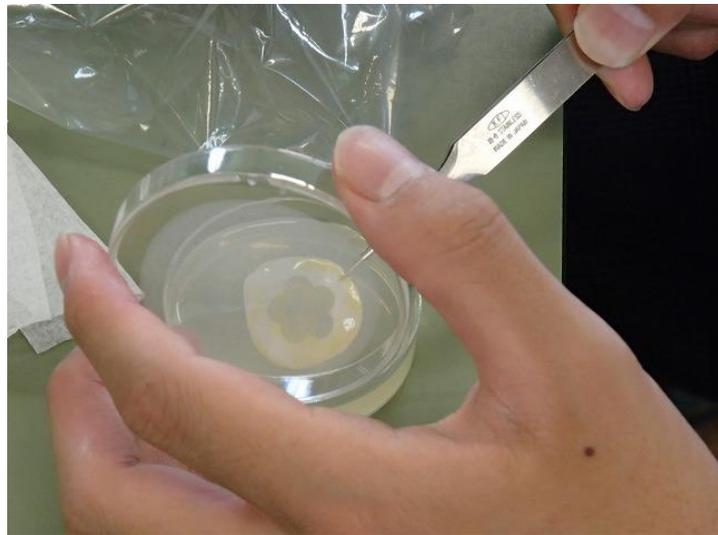
生野高校における生物実験は、過去数十年にわたる歴史の上に構築されてきたもので、現在でも、その時々状況に合わせて少しずつ変化しています。ショウジョウバエの実験では親子2代にわたって本校で交配実験を経験するといったケースもあり、母親が娘に「そろそろショウジョウバエの実験やね」と実験のコツを伝授したという話も聞きます。学習指導要領の内容が変化するとそれまで定番で実施してきたものでも、取りやめなければいけなくなります。逆に、過去のもものが復活したり、新たに作り出したり、他校で実施されている実験を導入するものもあります。幸い、7年前にSSH スーパーサイエンスハイスクールの指定をうけ、実験機材や消耗品について多少恵まれた環境を得ることができました。それでも、生物実験材料の飼育栽培を継続することは大変な労力を必要とします。

本実験書は、本校で生物実験として実施し、他校で参考にさせていただきそうなものを選択して編集しました。紙面の都合でいくつかの実験をカットしましたが、カットした実験類の大部分は「大阪府高等学校生物教育研究会生物実験集録」に掲載されております。参考にさせていただければ幸いです。

2017年2月



DNA 分子模型 生物部製作



ニワトリ胚の観察実験
ろ紙リング法による摘出