

生物教材研究 — 微細生物の長期間観察法の開発 —

A study on biology teaching — a micro-moist chamber method

広瀬 正紀, 宮本 典子, 北氏 隆江, 宮永 健史*

(和歌山大学教育学部生物学教室, *同物理学教室)

要 旨

ガス透過性の高い低密度ポリエチレン (LDPE) を利用して、従来のものより、簡便で、体積の小さい湿室を作った。この湿室をタイムラプスビデオと組み合わせて使用することにより、数日にわたり、微細生物の生活ぶりを連続記録することが出来た。

キーワード; 湿室法, ポリエチレン, タイムラプスビデオ, 生物教育

1. はじめに

細胞レベルでの生命活動は、水の中で行われている。従って、細胞レベルでの生命活動を——生きている状態で——観察しようとするとき、対象となる細胞は水環境中におかれている必要がある。

顕微鏡下で、かつ、長時間にわたってこの観察を行おうとするとき、蒸発などによる水の減少をどう抑えるか、または、減少した水をどう補給して、水環境を必要な期間にわたって維持して行くかの方法を持つことが必要となる。従来、そのための方法として、蒸発量を極力抑えようという考え方に立って、湿室法 (moist chamber method)、寒天法などが用いられてきた (佐藤重平他, 1958)。

今回、従来の湿室法を

- ① ガス交換を可能とする
- ② より簡便なものとする

という2点で改良した方法を開発し、いくつかの成果を得ているので報告する。

2. 従来の方法とその問題点

水環境を長期にわたり維持する方法として、従来よりさまざまなものがあるが、標準的なものとして湿室法と寒天法を取り上げ、紹介し問題点について検討を加える。

a. 湿室法

スライドガラス上にある形状、材質のスペーサーを置き、それを覆うようにしてカバーガラスをかぶせる。各々の間をワセリンでシールして密閉空間を作ることにより水の蒸発を防ぐ。スペーサーとしては、ガラス管を切ったリングなどが用いられる。

この方法では、密閉空間を作って水の蒸発、消失を防ごうとする訳だが、同時に、外部とのガス交換をも絶っている。そのため、細胞へのガスの供給を保障するために、密閉空間の体積を観察時間に見合う大きさとする必要があった。

また、顕微鏡観察のための光学条件を良好にするため、カバーガラスの下面に水滴を置き（懸滴法, hanging drop method）その中に目的の細胞を封じて観察するのが通常だった（ただし、倒立顕微鏡を使用するときは、スライドガラス上に水滴を置けばよい）。

懸滴中に細胞を封じるのは簡単ではなく、かつ、懸滴を長期にわたり維持するのも簡単なことではない。

しかし、例えば、ウニ卵の発生を24時間程度ビデオ撮影しようという場合には、この方法で十分である。

b. 寒天法

これは水の代わりに寒天（1～2%程度）を用いるものである。すなわち、スライドガラス上に寒天をシート状に切ったものを置き、その上に生物試料を置き、カバーガラスをかけて観察するというものである。

ムラサキツユクサの雄しべの毛をここに置き、体細胞分裂の様子を半日程度調べるには、この方法で十分である。

寒天の成分である線維と水との親和性のため、水の蒸発が防がれる。ただし、完全に抑えられるわけではなく、蒸発が遅くなるだけである。ガスの出入りは側方より自由である。寒天片の厚さを増せば、保水効果、ガス交換効果は上昇するが、観察するための光学条件は悪化していく。

3. 新しい温室法

低密度ポリエチレン（low density polyethylene, LDPE）シートを使用する新しい温室法を開発した。台所用のゴミ捨て袋としてスーパーマーケットなどで売られている透明なポリ袋が、低密度ポリエチレン製である。家庭用品品質表示法に基づく表示がされているから間違えることなく購入できる。厚さは、0.02ミリのものが普通である。以下、これを使用する。

スライドガラス上で、スペーサーとして市販のビニールテープ（厚さは、0.2ミリ）を用い、カバーガラス、低密度ポリエチレンシート、ワセリンを用いて体積の小さい温室を作った（fig. 1）。

プラスチックの物理的性質を調べてみると（表1、岩城硝子社資料）、市販されているプラスチックの中で、低密度ポリエチレンは、テフロンとともにもっともガスを透過しやすいものであ

表1. プラスチックのガス透過性

	N ₂	O ₂	CO ₂	
low density polyethylene	20	60	280	ml/cm ² ・sec・cmHg/mm
teflon	20	60	135	
polystyrene	3	15	75	
nylone	0.3	1.0	1.8	

る。(このため、両者は酸素電極法で常用されている。)この表には示されていないが、水(水蒸気、水分子)は、表中のガス(非極性分子)とは違って、極性分子なので、プラスチックに対する透過性は無視できるほど小さいとみなしてよい。厚さ、0.02ミリの低密度ポリエチレンシートを使用して作った温室(fig. 1)は、水分子の出入りはないがガス交換が行われる温室である。

この温室を作るに当たって、次の一点について、注意すると、顕微鏡観察の為の光学条件が十分なものとなる。Fig. 1に示すようにスライドガラスとカバーガラスの間に水滴を置き、その中に生物試料があるわけだが、注意する点はその上のカバーガラスと低密度ポリエチレンシートとの間である。この間に空気があると時間経過とともにシートの下側が曇ってくることもある。これは、顕微鏡照明による温室内の部分的温度上昇、蒸気圧上昇と外気温との関係によって生ずる。この曇りを生じさせないために、温室を作る際に、カバーガラスの上に少量の水滴を置き、この水を接着剤にして、カバーガラスとポリエチレンシートを密着しておけばよい(fig. 1)。顕微鏡で見ることの出来る視野、あるいはビデオテープに記録できる視野の広さは高々1ミリ角程度でしかない。従って、カバーガラスは、市販のものをガラス切りで切って、ここでは8×24ミリのものを使っている。

4. 新しい温室法の使用例

この温室を使って得た成果の一例を示す。

ラン藻 *Nostoc cycadae* を材料として、その生活の様子を7日間、顕微鏡に接続したタイムラプスビデオで記録し、その生活史の一部を実証的に明らかにすることが出来た(fig. 2)。光学顕微鏡のステージに温室を置き、タングステンランプで照明するが、この時、断熱フィルターを用いて、熱線吸収を図り、長時間照明し続けることによる温室の温度上昇を極力避けることが肝要である。上の例では、原核生物である *Nostoc cycadae* の通常糸状体の細胞が同調的に、減数分裂に似た2回続けての分裂をするとき、連鎖体と呼ばれる世代が生ずることなどが明らかになった。

5. おわりに

微細生物を長期間にわたって観察、記録する簡便な方法を開発した。

ここで作成した温室は、材料として、スライドガラス、カバーガラスの他に、低密度ポリエチレンとビニールテープ、ワセリンを使っている。このうち、特に後の3者はいずれも、家庭用品として身近かなものである。ガラス切りのテクニックに少しの熟練を要するかもしれないが、薄いものを割るように切れればよいので、さほどのことはない。この温室は、容易に作れるとともに、水環境を長期間にわたって維持することができ、ガス交換についても、問題はない。この温室を使って、ここに示した使用例のように、現代的装置(タイムラプスビデオなど)で記録を取れば、それに越したことはないが、通常の顕微鏡写真を記録系として使っても、いろいろな発見をする事が出来るだろう。

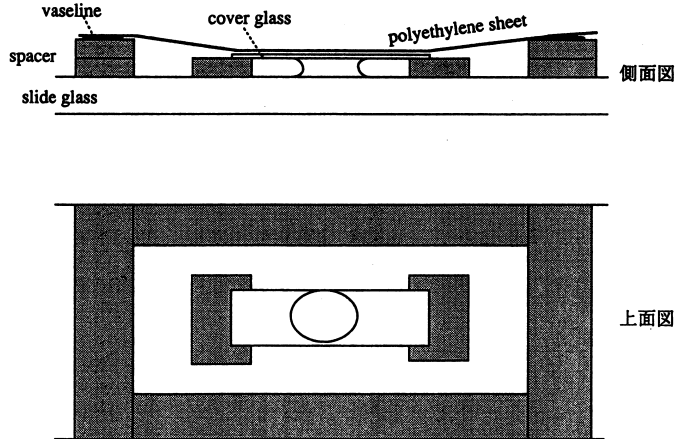


Fig.1 ミクロ湿室法

低密度ポリエチレンシートを利用したマイクロ湿室法。スライドガラスの中央部を示した。スペーサーは市販ビニールテープを切ったもので外周は二層に貼り、その上面にワセリンを塗ってポリエチレンシートを付ける。ポリエチレンシートとカバーガラスは水で密着させる。

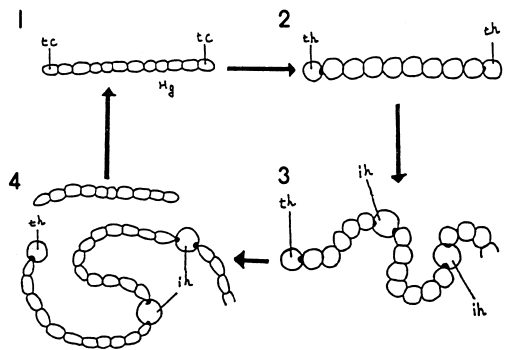


Fig.2 1週間の連続ビデオ記録で示されたラン藻 *Nostoc cycadae* の生活史の概要

1. ビデオ記録2日目。H_g;連鎖体、運動性を持っている。tc;連鎖体の末端細胞。
2. 3日目。通常糸状体となっている、運動性は消失。th;末端異形細胞。
3. 4日目。通常糸状体の細胞数が増加している。ih;内生異形細胞が出現している。
4. 5日目。2つの異形細胞間の通常細胞が2回続けて細胞分裂して、細胞体積1/4の小型細胞からなる運動性連鎖体が生ずる。

引用文献

石田寿老, 佐藤重平編。「生物の実験法」。p.33 1958年。裳華房
岩城硝子社。技術資料, 主なプラスチックの特性。1989年