

実践報告

Newの培養法によるウズラ胚の観察 —ニワトリからウズラへのスケールダウンの工夫と授業実践—

兵庫県立須磨東高等学校 薄井芳奈

はじめに

ろ紙リングを用いたニワトリ初期胚の観察法に出会ったのは、2009年10月に理化学研究所発生・再生科学総合研究センター（理研CDB）で実施された「高校生物教職員のための発生生物学リカレント講座」首都大学東京 理工学研究科 福田公子准教授の講座であった。その講座内容をもとにして、同年11月、本校岡田健司教諭を中心に、2年生・3年生の理系生徒を対象に「Newの培養法によるニワトリ胚の観察」の授業実践を行った。

そのとき、最大のネックとなったのは、インキュベーターが小さく、多くの生徒が実習できる数の鶏卵を同時に孵卵できないことであった。

ニワトリでの難点を解決する方法として、2010年3月からニワトリ胚と同じ手法を用いて、「Newの培養法によるウズラ胚の観察」の試行と教材化の試みを始め、授業での実践や教員研修での紹介を行ってきた。その手法をまとめ、経過を報告する。

鳥類の初期胚観察を取り上げる意義

脊椎動物の発生について、教科書では両生類を中心に学習する。胚膜を扱わなくなったこともあり、鳥類は、誘導や分化の極性の例など発展的内容としてわずかに取り上げられる程度である。

ところが、実際に観察となると、両生類の胚は小さく、また外側から内部の様子を観察することができないため、切って断面を見るといった観察になる。親を飼育していなければ、卵や胚は固定標本を購入することになる。

そこで、鳥類の初期胚である。まずは、親を飼育しなくても、生きた受精卵を業者から簡単に購入できる。38℃に設定できる定温器さえ用意できれば、孵卵も簡単で、いろいろなステージを見られる。

胚は透明性が高く扁平で、胚を卵黄から分離することによって、背側からも、腹側からも、その構造を観察することができる。両生類の発生過程で学習した脊索や体節がはっきりと観察でき、なぜ「体節」と呼ぶのかも一目瞭然である。神経管が閉じていく過程、眼胞や眼杯から目が形成される過程、さらに、耳胞や鰓裂なども観察できる。心房と心室が1つずつ形成されてようやくループ状になった心臓が拍動する様子は、生徒の目を引きつけるとともに、脊椎動物の心臓の形成過程について理解を深めるよい材料となる。2日胚までなら赤い血管も目立たず、生徒の心理的な抵抗が比較的少なく、その美しさに感動する生徒も多い。

ウズラを用いるメリット

ウズラを用いるメリットとして、次のようなことがあげられる。

- 卵が小さいのでインキュベーターの限られたスペースにたくさんの卵を入れることができる。
- 鶏卵と比較して廃棄物の量が圧倒的に少ない。
- 卵殻が薄く、殻を開ける操作が簡単。専用の殻割りハサミも安価に市販されている。卵白も少なく、取り除きやすい。
- 種卵（有精卵）の値段が安い（質のよいニワトリ有精卵の2～3分の1の価格）。

さらに、ウズラは卵のサイズは小さく、孵化までの日数はニワトリより4日少ない17日であるが、胚の大きさや発生の進行は8日目まではニワトリ胚とほぼ同じで、ニワトリ胚の発生段階の目安として用いられている「Hamburger-Hamilton stages（ハンバーガー・ハミルトンの発生段階表）」を使うことができる。また、ウズラ卵は鶏卵と同様生徒にとって身近である上に、ウズラはニワトリとともに発生

生物学研究のモデル生物となっている。

ウズラ卵に対応する工夫

ウズラ卵は小さいことがメリットである一方、小さいためにニワトリのように卵殻の中で作業を進めることが難しい。卵黄表面のカーブが急で、ろ紙を貼り付けにくい。また、比較的早い段階から卵黄が消費されてゆるくなり、シャーレに取り出すと卵黄自身の重みで卵黄膜が破れやすい。このようなウズラ卵に対応するために、次のような工夫をした。

①「卵殻の代用」として「丸底の蒸発皿」を使う。蒸発皿は底が緩やかな曲面で開口部が広く、あまり

深くないため、卵白を流し出したり、卵黄を回転させたりする作業がしやすい。また、卵黄が破れない程度に適度にへしゃげて、ろ紙を貼り付けやすくなる。



②ろ紙リングの幅は細めにし、形を楕円形にする。

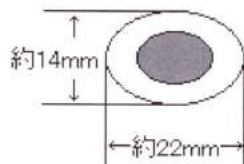


③市販の「殻割りハサミ」(写真)を使い、卵殻を手早く上手に開ける。

観察の方法

1. 準備

- ・眼科バサミ
- ・ピンセット (尖頭)
- ・ウズラ用殻割りハサミ (あれば便利)
- ・卵立て (ペットボトルのキャップでよい)
- ・シャーレ (不要な卵白などを受ける)
- ・丸底蒸発皿 (取り出した卵黄を受ける)
- ・生理食塩水 (7.2g/L NaCl水溶液)
- ・パストツールピペット
- ・ろ紙リング (右図)
リングの幅は4mm程度
- ・アガロースゲルのプレート
アガロース (アガーも可)
を生理食塩水に0.5%に溶かし、直径35mmのディッシュに2.5mLずつ入れて固める。



- ・キムワイブ
- ・ティッシュペーパー

ウズラ種卵は38℃で孵卵する。定温器に水を入れたバットなどを置いて加湿する。初期胚の観察なら転卵はしなくてもよい。すぐに孵卵しないときは14℃ (秋～春で20℃以下なら室温でも可) に置く。

2. 手順

①卵は鈍端を下側にして卵立てにししばらく置く。

卵の上下をひっくり返し、卵黄が浮き上がる前に殻割りバサミで卵の鈍端を切る。または、ピンセットの先で殻に穴をあけ、そこからピンセットかハサミを使って鈍端を切り取る。

②流れる卵白は捨て、蒸発皿に中身を出す。この段階で卵白は残ってもよい。

③卵白を取り除く。濃厚卵白はハサミで切り取るようにしてシャーレに流す。ニワトリと比べて卵白の量が少ないので、神経質に卵白を取り除かなくても、ろ紙リングを貼り付けることはできる。

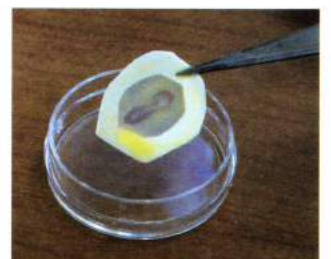
④キムワイブを卵黄の表面にくっつけて卵黄を回転させ、胚を上側に持ってくる。発生が進むと膜が破れやすいので注意する。



⑤胚がリングの中心になるように、ろ紙リングを卵黄にのせる。この時、リングの長径と胚の頭尾軸の向きを合わせる。孵卵開始から35時間ぐらいまでは胚の向きがわかりにくいので、実体顕微鏡下で行うと確実にできる。この段階でリングが卵黄膜に沿っていないようでも、このあと膜に切り込みを入れると卵黄の表面が平らになってくるのでリングが膜に貼り付く。

⑥ろ紙リングの周りに沿って卵黄膜を一周切る。卵黄が流れ出て行くと切りにくくなるので、ハサミを立てるようにして手早く切る。

⑦パストツールピペットを卵黄膜の切れ込みから胚の下に差し込み、生理食塩水を注入し、胚の直下



にある卵黄を吹き飛ばす。

⑧ろ紙リングをピンセットでつまみ胚をつり上げ、ゲルプレートに表裏をひっくり返してのせる。つまり、胚の腹側が上になる。

プレートにのせるときに胚の下に空気を入れないように注意する。気泡が入った場合は、ろ紙を少し持ち上げて追い出す。

⑨卵黄はパスツールピペットの生理食塩水で洗い流し、ティッシュペーパーで吸い取る。

⑩背側、腹側の両方から実体顕微鏡で観察する。

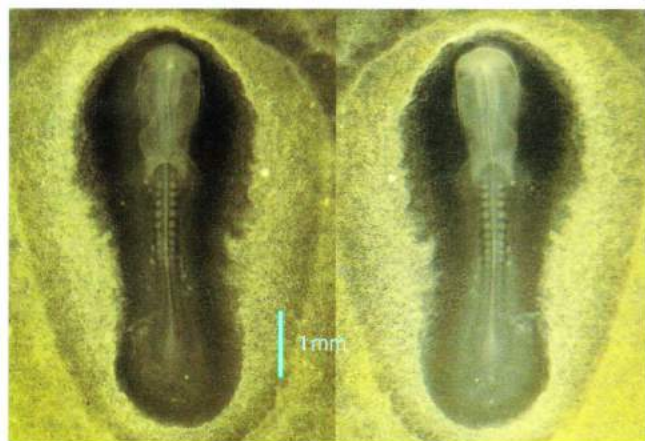
⑪1日胚、2日胚の早い時期で、卵黄上の胚の位置や向きがよく見えな
いときには10倍にう
すめた墨汁を注射器
で胚の下に注入する
と確認できる。



↑ 孵卵28時間 墨汁で観察

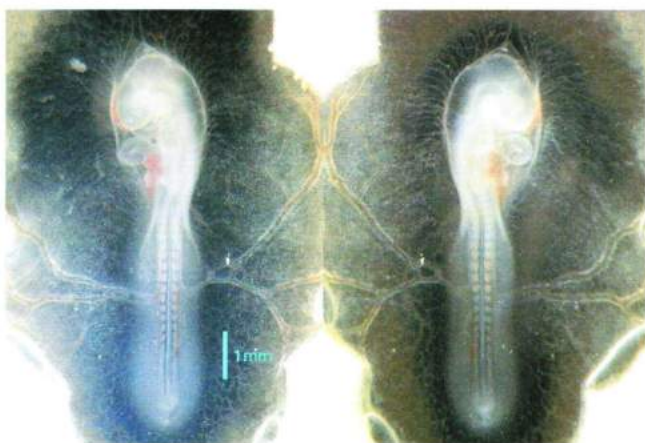
この方法で胚はそのまま背側から観察できる。

3. 観察例



孵卵35時間 ↑ 腹側

背側 ↑



孵卵48時間 ↑ 腹側

背側 ↑

実践報告

本実践は、兵庫県「魅力ある学校づくり推進事業～インスパイア・ハイスクール～」と「学力向上推進プロジェクト事業」の取り組みとして行った。

①2010年3月にウズラでの試行を開始した。

②4月からは平成22年度(2010年度)インスパイア・ハイスクール事業の取り組みとしての位置づけを得て、双眼実体顕微鏡14台を導入することができた。

③夏季休業中に試行・教材化の工夫・予備実験・生徒実習の準備などに取り組み、8月5日(木)には「日本生物教育会第65回全国大会(兵庫大会)」の教員研修会「すぐできる発生実験」(理研CDB)で資料を配付させていただいた。

④9月24日(金)、学力向上プロジェクト事業の一環として、理研CDBの南波直樹サイエンスチーフコーディネーターをお招きし、3年文系生物Iでウズラ胚観察の研究授業を実施した。

さらに、方法に工夫を加えて、10月14日(木)にも3年文系生物Iで生徒実習を実施した。

⑤10月2日(土)3日(日)「高校生物教職員のための発生生物学リカレント講座」(理研CDB)にて、本校での取り組みと実践の報告、ウズラ胚の観察法のデモンストレーションを行った。

⑥平成23年度(2011年度)もインスパイア事業の柱として取り組むことになった。さらに、2011年4月、本校と理研CDB



広報国際化室、兵庫県立大学理学部生命科学科細胞制御学I講座との連携講座「鳥類の発生観察からわかること～ウズラ胚の観察と胚細胞の培養」が(独)科学技術振興機構(JST)の平成23年度SPP(サイエンス・パートナーシップ・プロジェクト)に採択された。

⑦夏季休業中に試行、予備実験と教材化に取り組み、9月7日(水)生徒実習「ウズラ初期胚の心拍数～アドレナリン、アセチルコリンの作用」を3年文系生物I・理系選択生物Iで実施した。

⑧10月1日(土)2日(日)「高校生物教職員のた

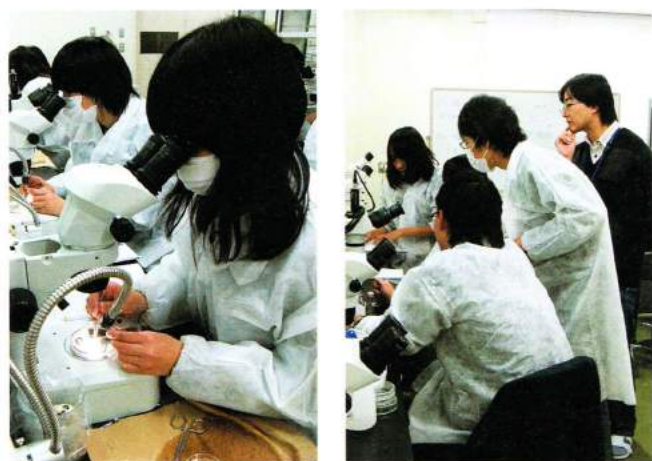
めの発生生物学リカレント講座」(理研CDB)でSPP支援講座と共通の内容(アポトーシス観察)の実習と、本校での実践報告、心拍数の実習の紹介とデモンストレーションを行った。

⑨10月5日(水)6日(木)生徒実習「ウズラ胚の観察」を2年理系生物Iで実施した。

⑩SPP支援講座の打ち合わせ・予備実験を重ね、テキストを作成、12月7日(水)に1年生対象、21日(水)に全員対象の事前学習を本校で行った。

⑪12月26日(月)・27日(火)理研CDBにてSPP支援講座を実施した。実習講師は兵庫県立大学の餅井真准教授、理研CDBの担当は南波直樹サイエンスチーフコーディネーター、講義は理研CDB 茂田昌樹研究員のお世話になった。

参加者は本校1・2年理系から希望者15名。



詳細は須磨東高校HPの報告を参照いただきたい。

<http://www.hyogo-c.ed.jp/~sumahigashi-hs/>

発展的な展開

1. さらに発生が進んだ胚の利用

①4日胚からは卵黄からはずして、羊膜から取り出して観察する。前肢・後肢の発生過程や、羽毛や脚のうろこの分化も観察できる。8日胚を実体顕微鏡下で解剖し、心臓、前胃、砂のう、小腸、肝臓、胆のう、肺、腎臓や生殖腺、脳や眼球などの器官を観察することもできる。

②7日胚をナイルブルー染色すると、肢芽でアポトーシスがおこっていることを観察できる。

③8日胚から心筋、神経、肝臓などの組織を取り出して培養すると、分化した細胞を観察できる。

この①～③については、2011年12月に実施したSPP支援講座の実習内容として行った。

2. 新課程「生物基礎」への利用

「生物基礎」で「発生」は扱われないが、「体内環境」の単元で以下のような実験を行うことができる。「ウズラ初期胚の心拍数」

2日胚をろ紙リングでプレートに取り出したものに 10^{-6} ～ 10^{-5} %程度のアドレナリン溶液、アセチルコリン溶液を滴下し、心拍数の変化を調べる。あらかじめ教師が胚を摘出しておき、スクリーンに胚をリアルタイムで投影し、生徒に心拍数の変化を記録させることで、50分の授業内に十分実施することができる。心拍数の実験は2011年9月、本校3年生を対象に授業で行った。

おわりに

ろ紙リングを用いたニワトリ初期胚の観察法は、「NHK高校講座生物」でも紹介され、広く知られるようになってきている。実習の目的や生徒数、各校の設備に合わせて、ニワトリ、ウズラを使い分けることで、実施へのハードルはより低くなるだろう。孵卵し続ければヒヨコになることを強く意識し、どの生徒も卵や胚を大切に扱い、真摯な気持ちで実習に取り組んでいる。授業評価アンケートでも心に残った実験としてあげる生徒が多い。今後、多くの学校で実践されることを願っている。また、発展的な展開についてもより一層の工夫を加えていきたい。

謝辞

ウズラを使うきっかけをくださった兵庫県立大学の餅井真先生と継続的に助言いただいている理研CDBの南波直樹先生には実験方法についての指導助言、実習手順の試行、SPP支援講座の実施など、本当にお世話になりました。深く感謝いたします。ニワトリ胚観察の基本を指導して下さった首都大学東京の福田公子先生、京都産業大学の八杉貞雄先生、石井泰雄先生、ナイルブルー染色について快く助言下さった名古屋大学理学部の黒岩厚先生、白石洋一先生にも感謝の意を表します。また、実習にあたり、不足分の双眼実体顕微鏡を兵庫県立伊川谷北高等学校からお借りしました。ありがとうございました。

参考文献

Sophie J. Ainsworth *et al.* Developmental stages of the Japanese quail *Journal of Anatomy* 216, 3-15 (2009)

高校生物教職員のための発生生物学リカレント講座テキスト (独)理化学研究所CDB (2009・2010)