

昆虫の血球による食作用の観察 — 色を発する異物の検討 —

澤 友美¹⁾・奥村雄暉²⁾・山下晟弥³⁾
松谷広志⁴⁾・中松 豊^{1,3)}

要旨：皇學館大学教育学部の理科教育学ゼミと生物学ゼミは近隣の高等学校に対して、生物基礎における探求活動の一つである「昆虫の血球による食作用の観察」という内容で出前授業を行っている。これまでの授業実践の中でいくつかの課題が見つかったが、今回は生徒自身で食作用を示している血球を識別できないという問題を取り上げた。その原因は血球と反応させる異物にあると考えられた。墨汁の中の墨粒は顕微鏡の光量の調節如何によっては、細胞内の小器官や内容物と区別できない場合があり、食作用していない血球も対象物として観察されてしまう。そこで今回は色のついた異物を供試することにより、これらの原因を克服しようと考えた。検討の結果、100円ショップなどで購入可能な青色の水溶性アクリル絵の具を、0.9%NaCl水溶液で2mg/mlの濃度に調整し、*in vitro*法における反応時間を15分で行えば、高等学校の1単位時間内でかつ生徒が自分で見つけることのできる探求活動を行えるものと考えられる。

キーワード：教材、食作用、昆虫の血球、異物、絵の具

I はじめに

新型コロナウイルスによる感染症 (COVID-19: coronavirus disease 2019) が世界中に広がり、感染の勢いが未だに止まらない。このような状況下において社会的に正しい言動や行動をとるためには、確かな情報の入手や免疫に関するある一定の知識が必要とされる。

ヒトには様々な生体防御機能が備わっており、外から侵入してきたウイルスや細菌などの非自己成分 (異物) は、胃の中の強酸やリゾチームなどによる化学的防御や角質層、粘液による物理的防御によりその侵入を阻止される (桑田・岡橋, 2015)。これらの生体防御機能を突破して体内に侵入してくる異物は免疫という生体防御機能により排除される。免疫には自然免疫と獲得免疫が存在し、ヒトの場合侵入してきた異物はまず自然免疫によって体内から排除される (河本, 2011)。その担当は主に好中球、他にはマクロファージ、樹状細胞などの白血球が担う。これらの白血球は

異物を貪食 (食作用) し体内への拡散を防ぎ、細胞への感染を許さない。体内に侵入してきたウイルスや細菌、カビに対して食作用を行うためには、これら異物を認識する必要がある。感染性の微生物の表面には、 β -1,3グルカン、リポ多糖、ペプチドグリカンが存在し、これらは昆虫を含め動物体内には存在しない。したがってこれらは異物としての目印になるものであり、pathogen-associated molecular pattern (PAMP) とよばれる (烏山, 2009)。PAMP を認識して結合し、その後の免疫反応を進める分子をパターン認識受容体 (pattern recognition receptor: PRR) という。PRRにはノーベル賞受賞につながったTollレセプター、Imd、レクチン、補体などがある。好中球は膜表面に発現したPRRにより侵入してきた異物を認識し、次々に食作用を行って感染性微生物の感染を防いでいる。

高等学校の生物基礎の教科書ではこの働きを実感してもらうため、バッタやコオロギなどの昆虫の血球を使った探求活動を掲載している。その際

1) 皇學館大学教育学部 2) 鳥羽市立加茂小学校 3) 皇學館大学大学院教育学研究科 4) 四日市市立日永小学校

異物として用いる墨粒は、小さくて血球がよく食作用を示すため、幅広く使われている。筆者らもこの墨粒を異物とし、アワヨトウ *Mythimna separata* (Walker, 1865) の血球を使った高等学校の1単位授業内で完結する探求活動を提案した(澤・中松, 2014)。しかしその後協力いただいた高等学校において授業実践を重ねる中で、多くの生徒が自分自身で食作用をしている血球を見つけれないことが明らかになった(川端ら, 2020)。

その原因は墨粒に対して食作用を示した血球を顕微鏡で観察したとき、ある程度絞りを絞る必要があるが、コントラストが強くなると細胞内の内容物の一部が黒い粒に見えて識別できなくなるからである(図1)。

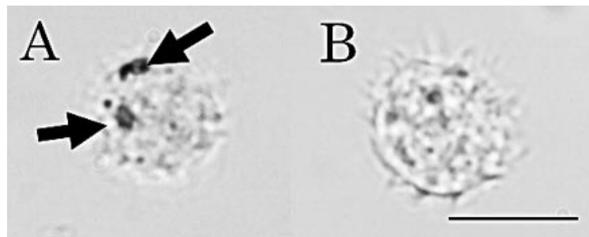


図1 墨粒を異物として食作用を示したアワヨトウ幼虫の血球

Aは墨粒を異物として与えたもの、Bは異物なし。矢印は墨粒を示す。スケールバーは10 μ mを示す。

第一学習社の生物基礎の教科書には、供試生物としてカイコガの幼虫を使い色水を異物として使用している。しかし、食作用を示している血球は一目で判別可能であるが、全血球数に対する食作用を示す血球数がやや少ないため、生徒にとっては若干対象物を探すのに時間がかかるものと考えられる(中松, 未発表)。

そこで生徒が自分自身で容易に見つけることができる、色で識別可能な異物の検討を行った。

II 材料と方法

1 供試虫

食作用を示す血球の観察に使用した材料は、皇學館大学教育学部生物学ゼミで継代飼育しているアワヨトウの6齢3日目の幼虫を使った。継代飼育は生物室の中の手造りの温室(簡易温室)内で、25 $^{\circ}$ C、16時間明期8時間暗期の長日条件で行った

(中松, 2019)。餌として5%三温糖水溶液を入れた横39cm縦34cm奥行27cmの段ボール内に雄と雌成虫を30匹ずつ入れ、産卵床に産んだ卵を回収した。卵から孵化した1齢幼虫を人工飼料を入れた直径9cmのペトリ皿に約100匹ほど入れ、3齢まで飼育した。その後蛹になるまでは、横30cm縦6cm奥行22cmのプラスチックケースに入れ、人工飼料を与えた。

2 色を発する2種類の異物の検討

100円ショップなどで手に入れることができる水彩絵の具と水性アクリル絵の具の色を発する異物としての検討対象とした。

それぞれの絵の具は0.9%NaCl水溶液(生理食塩水)1mlに対して2mg溶かして供試した。澤・中松(2014)の*in vitro*法に従い、スライドガラス上にまち針の柄の部分を使って、直径1cmになるように上記の絵の具5 μ lを薄く塗布し、その上に6齢3日目のアワヨトウ幼虫の体液を10 μ l滴下した。15分後に生理食塩水を入れたスポイトを用いて余分な血球や体液成分を洗い流し、カバーガラスをかけて検鏡した。

目視による画像の比較と1視野あたりの食作用を示す血球の数で評価を行うために、400倍の顕微鏡下で、1試行回数あたり任意に10視野写真を撮り、1視野に写る食作用を示したすべての血球をカウントした。写真撮影は4032 \times 3024ピクセルで行った。

3 水性アクリル絵の具を異物として用いた場合の色と濃度の検討

株式会社大創産業より購入した赤、青、緑の3色の水性アクリル絵の具を供試した。それぞれの水性アクリル絵の具は10, 4, 2, 1mg/ml生理食塩水の濃度で調整して供試した。2の方法に従って実験および撮影を行い、目視による画像の比較と1視野あたりの食作用を示す血球の数で評価を行った。

4 青色水性アクリル絵の具を異物として用いたときの反応時間の検討

青色水性アクリル絵の具を2mg/ml生理食塩

水の濃度で異物として供試し、反応時間を15, 30, 60分にそれぞれ設定した。1視野あたりの食作用を示す血球の数で評価を行うために、2と同様の方法で実験を行った。

5 統計処理

得られた実験結果のうち、独立した2群についてはF testを用いた後、Student's *t* testを行った。また、独立した多群については、Single-factor ANOVAを用いた後、Tukey-Kramer testを行った。

III 結果

1 色を発する2種類の異物としての絵の具

水彩絵の具と水性アクリル絵の具それぞれ2mg/ml生理食塩水を異物として、アワヨトウ6齢3日目の幼虫の血球を使って反応させたところ、どちらの絵の具に対しても食作用を示した(図2)。また、食作用を示した血球において、青

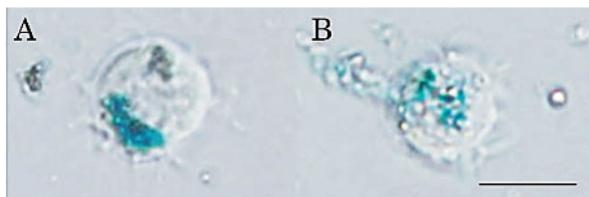


図2 異なる種類の青色絵の具に対して食作用を示した血球像

in vitro 法を用い、アワヨトウ幼虫の体液10 μ lに対してAは水性アクリル絵の具2mg/ml生理食塩水を5 μ l加えて反応させた場合、Bは水彩絵の具2mg/ml生理食塩水を5 μ l加えて反応させた場合を示す。スケールバーは10 μ mを示す。

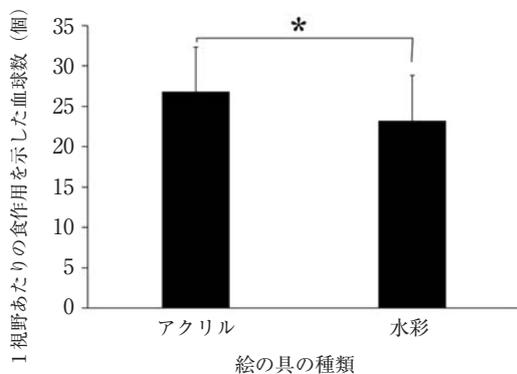


図3 異なる種類の青色絵の具に対する食作用を示した血球数

異物は青色水性アクリル絵の具2mg/ml生理食塩水と青色水彩絵の具2mg/ml生理食塩水を用いた。

*は有意な差があることを示す(Student's *t* test, $p < 0.05$)。縦線は標準偏差を示す。

色の異物を明瞭に観察することができた。しかし、1視野あたりの食作用を示した血球数においては、水性アクリル絵の具を異物として供試した実験区の方が有意に高い値を示した(図3)。

2 水性アクリル絵の具を異物として用いた場合の色と濃度について

水性アクリル絵の具の赤、青、緑の3色をそれぞれ2mg/ml生理食塩水の濃度で供試したところ、どの異物に対しても血球は食作用を行い、かつ色のついた異物をはっきりと観察することができた(図4)。



図4 異なる色の水性アクリル絵の具に対して食作用を示した血球像

in vitro 法を用い、アワヨトウ幼虫の体液10 μ lに対してAは赤色水性アクリル絵の具2mg/ml生理食塩水を5 μ l加えた場合、Bは青色水性アクリル絵の具2mg/ml生理食塩水を5 μ l加えた場合、Cは緑色水性アクリル絵の具2mg/ml生理食塩水を5 μ l加えた場合を示す。スケールバーは10 μ mを示す。

1視野あたりの食作用を示した血球数については10mg/mlの濃度がどの色に関しても高い値を示した(図5)。4, 2, 1mg/mlの濃度においては、青が他の色に比べ1視野あたりの食作用を示した血球数が多かった。

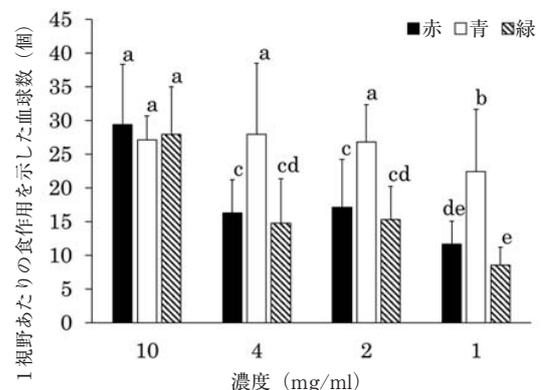


図5 異なる濃度および異なる色の水性アクリル絵の具に対する1視野あたりの食作用を示した血球数

in vitro 法を用い、アワヨトウ幼虫の体液10 μ lに対してそれぞれの濃度と色の水性アクリル絵の具5 μ lを加えて反応させた。

棒グラフの右肩にある異なるアルファベットは有意な差があることを示す(Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。縦線は標準偏差を示す。

3 青色水性アクリル絵の具を異物として用いたときの反応時間

水性アクリル絵の具の青を 2 mg/ml の濃度で、15、30、60 分反応させたときの、1 視野あたりの食作用を示した血球数を測定したところ、反応時間を長くかければかけるほど、多くの食作用を示した血球が観察された (図 6)。

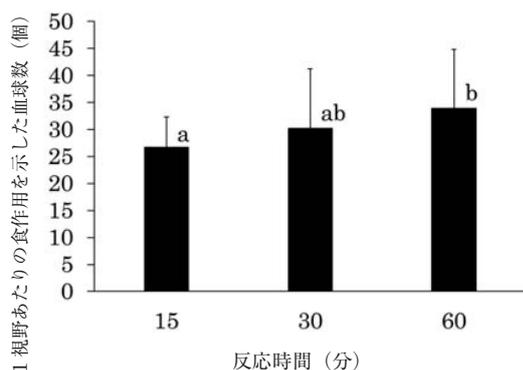


図 6 異なる反応時間における青色水性アクリル絵の具に対する 1 視野あたりの食作用を示した血球数

in vitro 法を用い、アワヨトウ幼虫の体液 10 μ l に対して青色アクリル絵の具 2 mg/ml 生理食塩水を 5 μ l を加えて 15、30、60 分反応させた。

棒グラフの右肩にある異なるアルファベットは有意な差があることを示す (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。縦線は標準偏差を示す。

IV 考察

平成 29 年度に出版された生物基礎の教科書では、血球による食作用を観察するための異物として、実教出版、数研出版、東京書籍は墨汁、啓林館は納豆菌を使用しているが、色水を使用しているのは第一学習社の教科書だけである。

昆虫の血球は墨汁の中の墨粒に対してはよく食作用を示し、顕微鏡の光量を調節すれば明瞭に観察できるため、優秀な異物として幅広く使われてきた (古畑・北野, 1983)。しかし、皇學館大学理科教育学ゼミおよび生物学ゼミによる高等学校における授業実践を繰り返す中で、アワヨトウ幼虫の血球を使い墨汁を異物として供試したとき、顕微鏡の光量を上手く調節できなかった場合は、細胞小器官などの内容物と墨粒の違いに気づくことができず、生徒自身で対象物を見つけられない場合が多く見られた (川端ら, 2020)。

そこで異物が発色すれば、細胞内容物との区別が明らかになると考え、100 円ショップで購入可能な水彩絵の具と水性アクリル絵の具を使い、色、濃度、反応時間を検討した。同じ青を使って水彩絵の具と水性アクリル絵の具を異物として用い、*in vitro* 法によって食作用を示す血球像を比較したところ、どちらも遜色なくらい食作用を示している血球を識別することができた。しかし、1 視野あたりの食作用を示した血球数は、水性アクリル絵の具の方が多かったため、高等学校の生徒にとっては見つけやすいものと推測される。

異物としての水性アクリル絵の具の色については、今回使用した赤、青、緑どれをとっても、食作用を示す血球を容易に識別できた。また、水性アクリル絵の具の濃度については最も高い 10 mg/ml がどの色についても 1 視野あたりの食作用を示した血球数が多かった。4、2、1 mg/ml の濃度においては、青が赤と緑に比べ、1 視野あたりの食作用を示した血球数が有意に高い値を示し、さらに、青の 10、4、2 mg/ml は 1 mg/ml に比べ 1 視野あたりの食作用を示した血球数は有意に高かった。しかし、青の 10 mg/ml と 4 mg/ml の濃度では、血球の周りに多くの絵の具が付着し、食作用をしている血球を識別しにくいという結果を得た (図 7)。これらのことを考慮に入れると青の 2 mg/ml が最も適した色と濃度であるといえる。

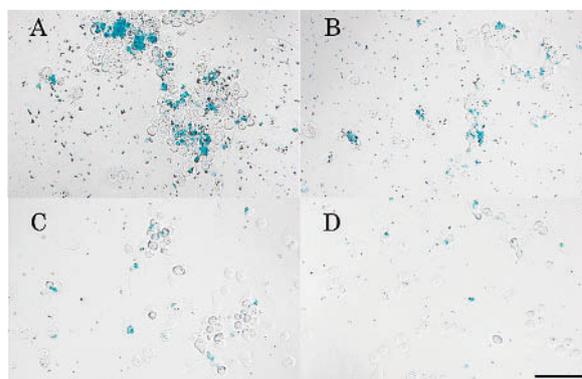


図 7 濃度の異なる青色水性アクリル絵の具を異物として与えたときの顕微鏡像

A は 10 mg/ml、B は 4 mg/ml、C は 2 mg/ml、D は 1 mg/ml の青色水性アクリル絵の具を異物として与えた場合の顕微鏡像を示す。スケールバーは 50 μ m を示す。

血球と異物の反応時間については、反応時間が長ければ長いほど1視野あたりの食作用を示した血球数が多くなるため、今回の実験からは60分が最も良い条件といえる。しかし、高等学校の1単位時間内で終了するためには反応時間を15分にしなければ、実験の手順の説明やまとめの時間を配分することができない(澤・中松, 2014)。今回の実験から15分でも1視野あたり25個程度の食作用を示した血球が観察されたため、高等学校の生徒でも十分に認識できるものと考えられる。

高等学校の生物基礎において、免疫に関する探究活動はどの教科書も血球による食作用の観察を取り上げているが、高等学校における実際の実施率は他の探求活動に比べて極端に低い(岩間・松原, 2019)。供試動物の選定とその確保、異物の選定とその条件、実験方法など原因は複数考えられ、筆者らはこの改善に取り組んでいる。今回は色のついた異物を使った食作用の観察・実験の条件を以下のように定めた。

【実験条件】

実験方法 - *in vitro*法(澤・中松, 2014)

材料 - 青色の水溶性アクリル絵の具

濃度 - 2mg/ml 生理食塩水

反応時間 - 15分

謝 辞

本研究を進めるにあたり昆虫の飼育や実験を手伝ってくださった、皇學館大学教育学部生物学ゼミおよび理科教育学ゼミの学生の皆様、鈴鹿市立神戸小学校の田中美有氏に心より御礼申し上げます。

また、本研究の一部は科学研究費補助金基盤研究(C)(課題番号19K02742, 研究代表者: 中松豊)の助成を受けて実施したものである。

参考文献

古畑貴子・北野日出男(1983) 中学校理科を対象とした昆虫の生体防御反応の教材化 - 血球

のはたらきを中心として。生物教育, 24(2), 17-26.

岩間淳子・松原静郎(2019) 高等学校生物基礎における探究活動の充実に向けて: 「生物の体内環境の維持」を例に。桐蔭論叢, 40, 47-55.

烏山一(編)(2009) 免疫学イラストマップ。羊土社, pp.16-175.

川端あづさ・澤友美・長嶋志帆・中松豊(2020) 蛍光ペンのインクを用いた誰でも一目でわかる食作用の観察・実験方法 日本生物教育学会第104回全国大会研究発表要旨集 p72.

河本宏(編)(2011) もっとよくわかる! 免疫学。羊土社, pp.10-168.

桑田啓貴・岡橋暢夫(訳)(2015) Lauren Sompayrac 免疫系の仕組み - 免疫学入門 - 第四版。(Lauren Sompayrac (2012) How the immune system works, 4th Ed. John Wiley & Sons, Ltd.), pp.22-178, 東京化学同人.

中松豊(2019) 伊勢神宮の森に棲息する生きものどうしの関係 - 寄生蜂の生活について - in 様々な資源から見た伊勢神宮の魅力。皇學館大学出版部, pp53-80.

澤友美・中松豊(2014) 50分でできる昆虫の血球の食作用の観察。生物教育, 55(1), 14-23.

本文中で参照した教科書

浅島誠 他24名(2020) 改訂生物基礎。東京書籍。平成28年 検定。

本川達雄 他17名(2019) 生物基礎改訂版。啓林館。平成28年 検定。

嶋田正和 他14名(2020) 改訂版生物基礎。数研出版。平成28年 検定。

庄野邦彦 他11名(2020) 生物基礎新訂版。実教出版。平成28年 検定。

吉里勝利 他20名(2016) 改訂生物基礎。第一学習社。平成28年 検定。

Observation of Phagocytosis by Insect Blood Cells — Examination of Colored Foreign Substances —

SAWA Tomomi¹, OKUMURA Yuki², YAMASHITA Akiya³
MATSUTANI Hiroshi⁴, NAKAMATSU Yutaka^{1,3}

1 Faculty of Education, Kogakkan University 2 Toba City, Kamo Elementary School
3 Graduate School of Education, Kogakkan University 4 Yokkaichi City, Hinaga Elementary School

Abstract : The science education seminar and the biology seminar of the Faculty of Education, Kogakkan University provide visiting lessons to neighboring high schools on the theme of “Observation of phagocytosis by insect blood cells” which is one of the searching activities of Basic Biology. Although several problems have been identified in the course practice, this time we took up the problem that students themselves cannot find blood cells showing phagocytosis. The cause was thought to be a foreign substances reacting with blood cells. This is because black ink grains are sometimes indistinguishable from organelles or contents in cells depending on the light intensity of the microscope. Therefore, we tried to overcome these causes by using colored foreign substances. As a result of the examination, it is considered that if blue aqueous acrylic paint available at 100 yen shops is adjusted to a concentration of 2 mg/ml in 0.9% physiological saline, and the reaction time in the *in vitro* method is carried out in 15 minutes, students can search for it by themselves.

Keyword : teaching materials, phagocytosis, insect blood cells, foreign substances, aqueous paints