

<実践報告>

透明骨格標本の作製を通じた協働的探究活動

西川 洋史

(ドルトン東京学園中等部・高等部)

Collaborative inquiry activities through the preparation of transparent skeletal specimens

Hirofumi Nishikawa

Dalton Tokyo Junior and Senior High School

キーワード：透明骨格標本，食器用洗剤，探究活動，協働，

KEYWORDS：collaboration, dish detergent, inquiry activities, transparent skeleton specimens

抄録

透明骨格標本の作製では、骨格染色後に筋肉を透明化するため、微細な骨やそれらの立体配置は適切に保存される。特に小型魚は全身の骨格を観察が可能なので、骨の役割を学習するのに適している。現在、理科教材会社より透明骨格標本や標本作製キットを入手することが可能であり、授業での活用も広がっていることが伺える。しかし、透明骨格標本は高価であり生徒一人一人が観察をする分を準備することは難しい。標本の透明化にはタンパク質や脂質除去が重要である。本論では、食器用洗剤への長時間浸漬による透明化を試み、脊椎骨の観察が可能なレベルまで透明化するものを見出したのでこれを報告する。また、本実践では、生徒ごとに異なる実験条件に取り組みせ、その結果を互いに評価しあい、考察をさせた。この実践プロセスから、多数の仮説設定を生徒あるいはグループごとに分担させ、それを持ち寄って結論を導くという協働型探究学習を提案する。

Abstract

In order to make muscles transparent after skeletal staining, all small bones are preserved in the transparent skeletal specimen without destroying the three-dimensional structure. In particular, small fish can observe the skeleton of the whole body, so they are suitable for learning the role of bones. Currently, it is possible to obtain transparent skeletal specimens and specimen preparation kits from science teaching materials companies, and it can be seen that their use in classes is expanding.

However, transparent skeletal specimens are too expensive to prepare for each student. It is important to remove of protein and lipid for clearing specimens. In this practice, we tried to clear specimen of medaka by immersing in dish detergent for a long time, and found that it became so good transparent that the vertebrae could be observed. In addition, in this practice, each student was asked to work on different experimental conditions, and the results were evaluated and considered by each other. From this practical process, we propose collaborative inquiry learning in which a large number of hypothesis settings are shared by students or groups, and they are brought together to draw conclusions.

1. はじめに

透明骨格標本は、硬骨をアリザリンレッド S で軟骨をアルシアンブルーで染色した後に筋肉組織を透明にした標本である (Pottoff, 1984)。小型の生体であれば、解体せずに製作できるので、その個体が生存していたときの骨格の配列が保存される。中学校における理科では、脊椎動物と無脊椎動物の構造の違いについて脊椎骨に着目して学習する。高等学校では骨格系が体の支持・器官保護・運動機能に重要な役割を担っていることを骨格と筋肉の相互作用に着目して学習する。従って透明骨格標本は中学校及び高等学校の理科教育において適当な教材と言える。具体的な活用例としては海洋環境教育や理科教育を含める ESD (Education for Sustainable Development : 持続的発展教育) での事例がある。例えば、透明標本の解剖と消化管内容物の観察を通した海洋食物連鎖の学習 (河野ら, 2016) や、軟骨魚類と硬骨魚類の顎を構成する骨格や魚類の顎周辺の骨格とヒトの中耳骨格との関係を「相同」や「進化」の観点から学習するプログラム (河野ら, 2017) が挙げられる。又、河野ら (2018) は陸と海とを行き来する通し回遊魚であるアユの生態とその食性変化に伴う歯系変化を、アユの仔稚魚の透明骨格標本の観察を通して学ぶプログラムも作成している。

透明骨格標本の作製では、透明化にトリプシンや水酸化カリウムを使用するが、特定の食器用洗剤でも可能である (西川, 2020)。具体的には最終濃度が 0.5% となるように水酸化カリウムを溶解した洗剤に硬骨染色後の標本を 10 日間浸漬することで、脊椎骨やそのほかの微細な骨の観察が可能となる。しかし、水酸化カリウムは劇物のため、学校教育現場で活用するには注意を要する。組織の透明化は生体内の主な光散乱体である脂質やタンパク質を除くこと、および生体組織と溶媒の屈折率差をなくすことにより、組織の内部・表面で可視光線が透過することで実現できる。このことから食器用洗剤に強アルカリ物質を加えずとも、処理時間を長くすることで透明化できる可能性がある。

食器用洗剤に含まれるタンパク質及び脂質除去に関連する成分は界面活性剤である。界面活性剤は、油に親和性のある親油基 (疎水基) と水に親和性のある親水基の 2 つの相反する官能基を分子中に含む化合物である。界面活性剤は親水基の種類によって分類され、

アニオン性界面活性剤，カチオン性界面活性剤，両性界面活性剤，非イオン界面活性剤に大別される。また，疎水基による分類では，炭化水素類の他に，シリコーン類，フッ化炭素類があり，さらに炭化水素の中でも飽和・不飽和炭化水素，直鎖・分岐炭化水素など構造によっても区別される（近藤，2016）。このように様々な種類があり，その数は数百を超える。食器用洗剤に含まれる界面活性剤は，ポリオキシアルキレンアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムや直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム，アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム，脂肪酸カリウムなどがあり，それらの濃度や他に含まれる添加物も製品ごとに異なる。従ってどの洗剤が透明標本作製に適しているかは検討が必要である。裏返せば，製作に適した洗剤の成分を調べることで透明化に関与する物質を特定することも可能である。本実践では，生徒ごとに異なる食器用洗剤を使わせて標本作製に取り組ませ，完成した標本を互いに評価しあい，洗剤の組成表から透明化を促進する成分や条件について考察を進めた。また，そこから次にどのような実験をすることができるか提案させるなど探究的要素のある実験及び授業を展開した。

2. 材料と方法

2. 1. 材料および器具・機器

35%ホルムアルデヒド液，酢酸，アリザリンレッド S（試薬特級，富士フィルム和光純薬，大阪），チャーミー・マジカ（ライオン株式会社，東京），キュキュット（花王株式会社，東京），ヤシノミ洗剤（サラヤ株式会社，大阪），食器用洗剤（株式会社カインズ，埼玉），ジョイ（P&G ジャパン，神戸），水酸化カリウム（特級，関東化学株式会社，東京），を試薬溶液として準備した。実体顕微鏡（カートン工学株式会社，神奈川），15mL 及び 50mL 高透明度ポリプロピレン（PP）遠心分離用コニカルチューブ（コーニング，ニューヨーク州），カバーガラス「トロフィー」18×18 mm（松浪硝子工業株式会社，大阪），10cm プラスチックシャーレ，ピンセット（アズワン株式会社，大阪府）を作業及び観察のために準備した。標本試料となるミナミメダカ（*Oryzias latipes*，全長約 3 cm）は，学校の近所にある観賞魚店から購入した。なお，本実践で用いたミナミメダカは野生種（クロメダカ）ではなく，観賞魚店で入手できるうす橙色のヒメダカである。ヒメダカは，小学校の教科書でも扱われ生徒になじみもあり，学校現場では比較的手に入れやすいものである。

2. 2. メダカの前処理及び硬骨染色

35%ホルムアルデヒド液をイオン交換水で 10 倍希釈して 10%ホルマリン溶液とした。入手したメダカを 10%ホルマリン液に一晩室温に漬けて固定した後，水道水流水で一晩かけてホルマリン除去を行ってから実験に用いた。硬骨染色液は 0.15 g のアリザリンレッド S を酢酸 10mL，イオン交換水 120mL の混合液に溶解し，溶液が青紫色になるまで水酸化カリウムを加えた。カバーガラスで鱗をはがしたメダカを 15mL 遠心管に移し，硬骨染色

液を 5mL 程度入れてから室温にて一晩の染色を行った。次に 50mL 遠心管にメダカを移し、任意の洗剤を 30mL 程度入れて約 20 日間室温で保管した。同様に新しい同じ洗剤に移動し、さらに約 20 日間室温で保管した。

2. 3. 標本の評価

生徒が作成した標本をプラスチックシャーレに入れ、実体顕微鏡で観察させた。評価シートには標本の作成者、洗剤の種類、透明度、染色性の維持状態、洗剤の成分について記入する欄があり、全員に記入させた(図1)。次に記録から透明化に適した成分などを挙げさせた。

メダカの透明骨格標本の作製 適した溶液は何?

<はじめに>
前回の実験では様々な洗剤にメダカを入れて透明化を試みた。効果的なものを探す。

<実験手順>
① 用紙に必要な情報を記入し、メダカをディッシュに入れ、机に並べる
② それぞれの標本データを記録し、透明度を調べる
③ 洗剤の成分を調べる。
④ どの洗剤が最もよいか選ぶ。どの成分が要因であるのか選ぶ。

<記録>

作成者	洗剤	透明度 (++, +, -)	骨染色 (+, -)	洗剤の成分
西川	マメレモン	++	+	アルキルエーテル EDTA 安定化剤
A	ヤシノミ	+++	-	界面活性剤(16α-アルキルエチル 硫酸スルホナトリウム、脂肪酸アル コノールアミド)
B	マジカ	++	+	アルキルエーテル ポリオキシエチレンアルキルエーテル エチルアルコール(安室) アルキルスルホネートナトリウム トリエンスルホン酸(安室)
C	食器用	+++	-	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム アルキルエーテル 安定化剤
D	マジカ	+	+	ポリオキシエチレンアルキルエーテル 塩化マグネシウム アルキルグリセリルエーテル アルキルアミノオキッド
E	マジカ	++	+	
F	キッコー	++	+	ポリオキシアルキルエーテル トリエンスルホン酸ナトリウム アルキルグリセリル アルキルアミノオキッド アルキルセチロキシアルコバタイン シアルキルエチルホスホナトリウム

染色を残して透明化した洗剤: マジカ
透明化しただけの洗剤: ヤシノミ、食器用洗剤
透明化に適した成分: アルキルエーテル、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム。

図1 評価シート

互いの標本を実験結果として観察し、洗剤の種類や透明度、染色性の維持状態、洗剤の成分をシートに記入させた。この表から標本作製に適した洗剤が分かるとともに、関与する成分を考察できる。なお、本評価シートを記入した生徒は「ジョイ」について記していないが、成分について非常に細かく書いていることや透明度評価がしっかりしていることから代表例として挙げた。

3. 授業実践

3. 1. 実践対象及び時期など

千葉県にある私立 A 高等学校特別進学コース第 3 学年の生物基礎選択生徒 9 人（男子 6 人，女子 3 人）及び同コース第 2 学年の生徒 21 人（男子 16 人，女子 5 人）を対象として 2016 年の夏期休暇の直前 2 コマと夏季休暇後 1 コマで授業実践を行った。この前年度にカリキュラム改定があり，第 2 学年では生物基礎の履修が全員必須となったため，第 3 学年と同時期に行うことになった。

3. 2. 授業内容

夏期休暇の直前 2 回と夏季休暇後 1 回で授業を行った。第 1 回目の授業では，透明骨格標本の意義について説明をした。具体的には，魚類の稚仔魚のような小型の生体であれば，大型動物の骨格標本作製のように解体や組み立てを伴わないために，その個体が生存していたときの立体的な骨格の配列が保持されることや，硬骨の染色によって観察しやすくなることを紹介した。そのため解剖学や分類学，発生生物学などの研究でしばしば活用されることを説明した。次に一人あたり 3～6 匹のメダカを配布し，カバーガラスで頭部から尾部にかけて擦って鱗をはがすように指示した（図 2A）。メダカを 15mL 遠心管に移し，硬骨染色液を約 5mL 入れさせた（図 2B）。この遠心管を室温で一晩静置し，染色液を浸透させた（図 2C）。第 2 回目の授業ではチャーミー・マジカ，キュキュット，ヤシノミ洗剤，食器用洗剤，ジョイの中から任意の洗剤を 50mL 遠心管にそれぞれ約 30mL 程度を分注してから，染色後のメダカを入れさせた。また，同じ洗剤を入れた遠心管をもう 1 本準備させ，夏期休暇中の作業について指示した。具体的には，夏季休暇前の本授業から約 20 日後にシャーレにメダカと洗剤を一度移し，そこからメダカだけを同じ洗剤の入った新しい遠心管に入れるよう説明した。夏季休暇後の授業では実体顕微鏡で観察・評価を行った（図 2D）。評価シートに記入させた後，洗剤の成分を調べさせて透明化に効果的に関与する成分を特定させた。また，事後課題として本実験をどのように展開したらよいか記述させた。

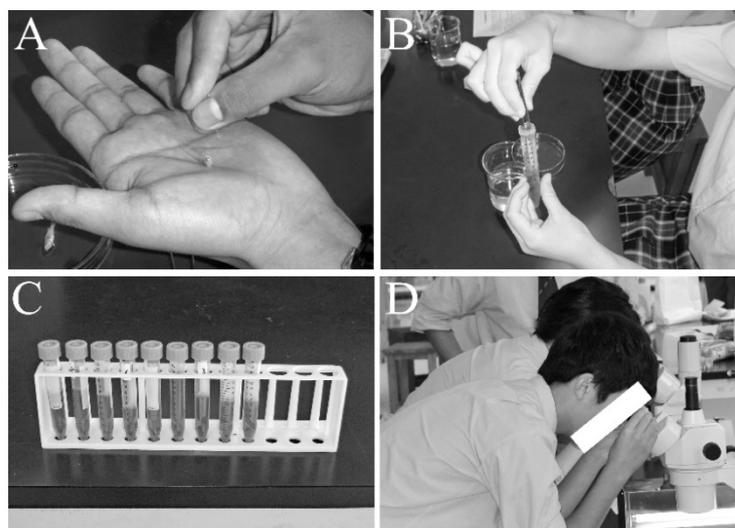


図 2 授業実践の様子

A:メダカの鱗をカバーガラスではがす様子。B:鱗除去魚のメダカはピンセットで15mL遠心管に入れ、硬骨染色液を約5mL入れた。C:硬骨の染色は室温で一晩行った。D:実体顕微鏡による各自の標本観察。

4. 結果

「食器用洗剤」では尾柄部の筋肉がやや透明化し、不明瞭ながら脊椎骨を確認した(図3A)。「ヤシノミ洗剤」及び「ジョイ」では透明度が高く、脊椎骨及びその周囲の骨を観察することができた(図3B, C)。しかし、これら3つの洗剤ではアリザリンレッドSによる硬骨の赤い発色が残らなかった。「キュキュット」は透明度がやや落ちるが、脊椎骨が赤く染色された状態が保たれた(図3D)。「チャーミー・マジカ」は筋肉の透明度も高く、脊椎骨は赤く染まった(図3E)。しかし、すべての標本において鰭条(鰭を支える骨)の染色は保持されておらず、その配列や構造を十分に観察することはできなかった。

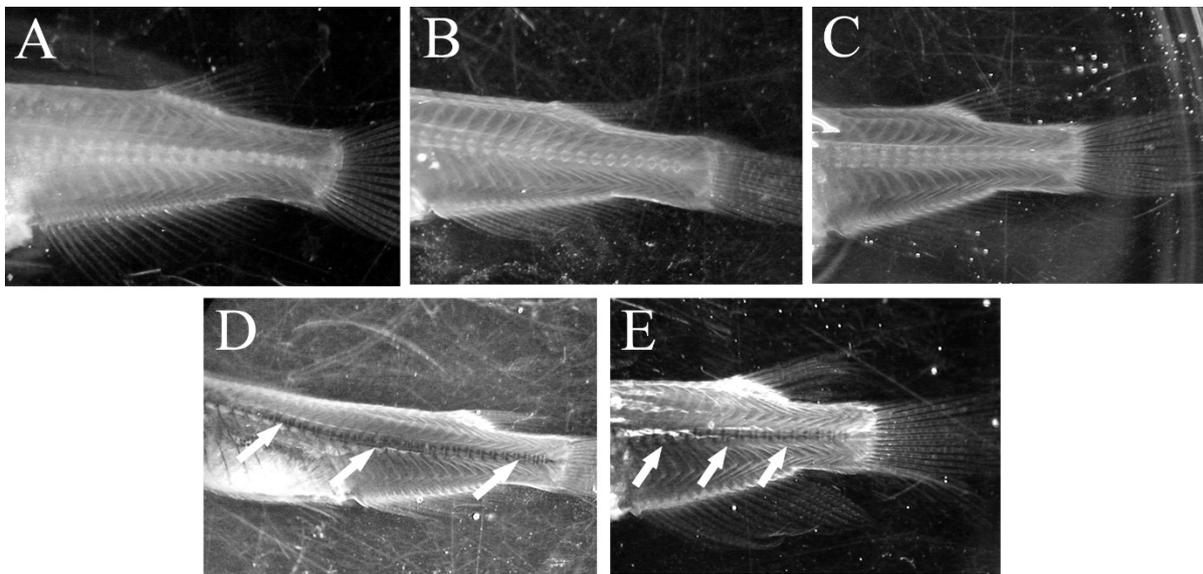


図3 生徒が夏期休暇中に作成した透明骨格標本

硬骨染色溶液に一晩漬けたメダカを「食器用洗剤」(A), 「ヤシノミ洗剤」(B), 「ジョイ」(C), 「キュキュット」(D), 「チャーミー・マジカ」(E)に入れ、室温で約20日間漬けてから同じ洗剤が入った遠心管に移し、さらに20日間ほど漬けた。矢印が示す部分は、色が濃い部分が赤く染色されていることを示す。

「チャーミー・マジカ」で作製した標本(67尾)に関する実体顕微鏡での観察では「透明」「やや透明」「透明ではない」の評価はそれぞれ74.6, 23.9, 1.5%であった。同様に「脊椎骨が染色されている」と評価された「チャーミー・マジカ」で作製したの標本は98.5%となった。このように「チャーミー・マジカ」で作製した透明骨格標本は多くの生徒が脊椎骨の観察は可能と評価した。洗剤成分の比較から透明化に適した成分を考察する項目では、ほぼ全員がアルキルエーテルと直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムを挙げ、

一つの結論に収束した。事後課題として「本実験を踏まえ、この次にどのような実験を行えばよいか自由に考えなさい（目的や背景があるとさらによい）」という質問も提示し記述させた。生徒らは自分たちができそうな実験に関する提案を多くした（表1）。その内容は以下のような観点で分けることができ、次の個別の探究につながられるものであった。

表1 生徒らが提案した次に行う実験の内容

観点	生徒記述内容
反応方法	<ul style="list-style-type: none"> ・触媒を使うと反応が進む可能性がある。 ・化学上よく知られている触媒を用いて反応速度が速くなるかどうか？ ・洗剤の濃度をさらに濃くしてみると、透明化の時間が短縮できるのではないか？ ・洗剤2種類を混ぜて同様の実験を試みる。洗剤成分同士で相乗効果があるかもしれない。 ・水酸化カリウムによるたんぱく質分解の併用。
反応条件	<ul style="list-style-type: none"> ・さまざまな温度の場所で実験を行い、どの温度が適しているのかを確認する。
他の生物種	<ul style="list-style-type: none"> ・どの魚が一番透明になるのかを求める。 ・めだか以外の大きな魚でも効くのか試す。 ・透明化する対象の物の大きさと透明化にかかる日数は関係があるのか？ ・キンギョとかドジョウで試してみる。
メカニズム	<ul style="list-style-type: none"> ・本当に透明化に適した成分か調べるために、その成分だけの薬品につけてみる。そしてその薬品を濃度別に何個かに分けてみる。アルキルエーテルと直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムが入手できたらそれが原因なのか正確にわかる。

5. 考察

透明骨格標本は中学理科2分野の「セキツイ動物の特徴」や高校生物の「進化での相同器官」の分野において、脊椎動物と無脊椎動物の体の構造学習に使うことができる（加藤，2016）。染色された骨格の美しさは生徒の興味関心を引き出す効果があり、最近の中学校教科書には、その写真が掲載されている。また、科学部や理科サークルなど課外活動で本標本の作製を実施している学校も多く、理科に対する意欲のある生徒にとっては魅力的なものであることが示唆される。通常、透明骨格標本の作製では軟骨染色のためのアルシアンブルーやトリプシン、高純度グリセリンを用いる必要があり、授業に導入するには時間及びコスト面で難しい部分がある。西川（2020）は、水酸化カリウムと食器用洗剤の混合物により短期間で透明標本作製することに成功しているが、授業で行うには強アルカリ物

質の使用について課題が残されている。本実践では、これをもとに強アルカリ物質を添加せず食器用洗剤のみでの透明化を試みた。その結果、「チャーミー・マジカ」では脊椎骨がアリザリンレッドSで赤く染色された状態で透明化した。食器用洗剤は市販されており安全かつ安価なので学校現場での導入はしやすい。ただし、本実践では鱈条の染色が保持されてなかったため、すべての骨が染色されるようさらなる検討を行い、実践導入に向けて手法を改善していく必要がある。具体的には炭酸水素ナトリウムや炭酸ナトリウムのような成分の添加が考えられる。

本実践ではまた、生徒各自に自分が検証してみたい食器用洗剤を選ばせて、実験に取り組みさせるようにした。標本作製の器具を自宅に持ち帰らせて作業させたので、温度などの実験条件を厳密にはコントロールできていない。しかし、各自が作ってきた標本すなわち実験結果を持ち寄り、互いにその評価を行ってデータを解析することで答えを導いていくことができた。このプロセスから生物学分野の探究型実験について考えを深めたい。通常の理科の実験では、検討する要因を1つ決め、それについて同じ実験デザインの作業を各自あるいは各グループで行う。そして次の授業では別の要因について同様の展開をする。例えば植物の生長に及ぼす影響として光を取り上げた場合、全員が光について同じ実験を行う(図4左)。しかし、植物の生長には光以外に水分や温度、土壌、養分、二酸化炭素濃度など多くの物理化学的な要因が影響を及ぼしている。それらの要因については授業に余裕があれば取り組むことができるが、すべて行うことは難しい。一般的には、生徒が知っておくべき植物の生育に及ぼす他の要因については教科書で学習して理解をすることとどまる。知識を重視する場合、このような授業展開は効率的と言える。また、実験操作について不慣れな生徒が、その場で同じ操作をすることで、リアルタイムに他の班と比較をしたり、作業手順を確かめたりすることができる。これによりすぐに自分たちの実験手順・操作を振り返り、修正しながら結果を求めるため、自分たちの実験結果が信頼に足るものかどうかの保証を担保することができる。また、誤った結果や比較・考察を教員が全生徒に向けて修正しながら解説することができるため科学的知識・手法の正確な教授が可能である。

一方、今後求められる探究活動では、自ら多様な仮説を立てて検証する能力を育成する必要がある。これは計算問題を早く正確に行うためにドリル学習を行うのと同様に、生徒が仮説検証を実施あるいはそれを目の当たりにする機会を増やさなければならない。つまり仮説立案検証の反復である。とくに、生物学における探究では不確定要素が多数あるため、ある結論を導くにはいかに多くの仮説を立てられるかがポイントになる。このような仮説立ての訓練をするには、1回の授業で各生徒あるいはグループごとに異なる要因を検証し、それらを集めて協働で考察をし、一つの結論を得るというモデルが考えられる(図4右)。このモデルであれば、従来の数倍の仮説を立て検証することができる。また、自分が行っていない実験結果について共有する必要がある。その思考過程では質疑応答やディスカッションなども実現できる。このような協働の要素も含まれる。本実践の展開は、時

間的に一人ではこなせない種類の実験条件を、各生徒が手分けをして結果を出し、それらを集めて結論を求めたもので、図4右側の概念図に相当する。この方法はジグソー法に類似するだろう。ジグソー法とは、教科書や資料を使った協働学習を促すためにアロンソンによって編み出された授業展開である(Aronson, 1975)。具体的には1つの長い文章を3つの部分に切って、それぞれを3人グループの1人ずつが受け持って勉強した後、それを持ち寄って互いに自分が勉強したところを相互に紹介して全体像を把握する手法である。理科教育ではジグソー学習は比較的多く使われている手法であり、話し合いを通じて知識を深めることに有効とされる(川合・西川, 2001)。従って、個々人の実験結果を持ち寄って総合的に考察するという協働型の探究実験は、仮説を立てる能力を高めるとともに探究テーマそのものに対する理解を深めることにつながると思われる。

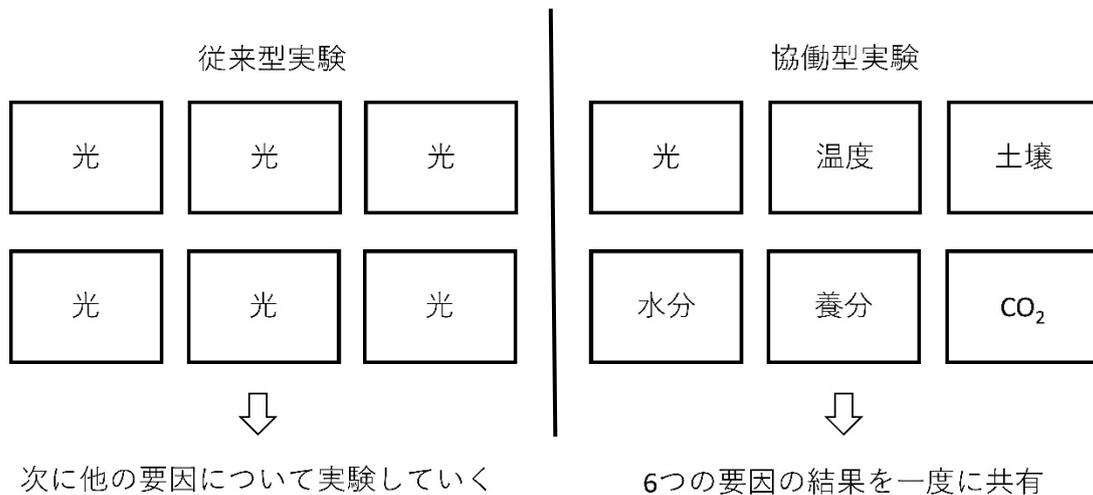


図4 従来型実験と協働型実験で検証できる要因数の違い

生徒の理科実験は多くの場合、生徒一人ひとりあるいはグループで一つの要因について、検証する形であった(左)。一方、複数の要因をそれぞれで分担し、最後にまとめる場合は短期間に多数の要因を検証することができる(右)。この生徒実験手法では相互に結果を共有し、議論や考察をしていくことでより多数の要因の影響を探ることができる。

引用文献

Aronson, E., Blaney, N., Sikes, J., Stephan, C., and Snapp, M. (1975) Busing and racial tension: The jigsaw route to learning and liking. *Psychology Today*, 8, 43-50.

加藤陽一郎 (2016) 「透明骨格標本プラスチックの開発と授業での活用」, 『早稲田大学高等学院研究年誌』第60号, 98-92.

川合千尋, 西川 純 (2001) 「Jigsaw 学習法における子どもどうしの相互行為の質的検討とその学習効果について」, 『学校教育研究』第16号, 170-185.

河野 博・谷田部明子・加瀬喜弘・齊藤有希 (2016) 「魚類骨格透明標本は海洋環境教育—海の中の「食う・食われる」を覗いてみよう—に有効である」, 『東京海洋大学研究報告』

第12号, 4-11.

河野 博・植原 望 (2017) 「魚類骨格透明標本を用いた理科教育の例 一顎の骨の変化を観察して魚と私たちとの関係を探ろうー」, 『東京海洋大学研究報告』第13号, 16-35.

河野 博・デイビッドエリックアンマリサン・石川 新・新城遥己・小野寺暁・手良村知功 (2018) 『魚類骨格透明標本を用いた ESD の例』, 「東京海洋大学研究報告」第14号, 38-57.

近藤行成 (2016) 「界面活性剤の定義と種類」, 『色材協会誌』, 第89巻2号, 59-63.

西川洋史 (2020) 「食器用洗剤を用いた小型魚類透明骨格標本の作製」, 『生物教育』, 第62巻第1号, 23-28.

Pottoff, T. (1984) Clearing and staining techniques. In “Ontogeny and Systematics of Fishes” (ed. by H. G. Moster, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall jr. and S. L. Richardson) Allen Press, Lawrence, USA, pp. 35-37.