

<資料論文>

**簡易倒立顕微鏡を用いた観察における光路遮蔽による明瞭度の向上と
生徒による動物培養細胞の短期培養への活用
—付箋紙による簡易傾斜照明法—**

西川洋史

埼玉県立進修館高等学校

Improvement of clarity by light path shielding in observation using a simple inverted microscope and its use for short-term culture of animal cell line by students.

-Simple oblique lighting method with sticky notes-

Hirofumi Nishikawa

Saitama Prefectural Shinsyukan Senior High School

キーワード：傾斜照明，明瞭度，倒立顕微鏡，動物培養細胞

KEYWORDS : Oblique lighting, Clarity, Inverted microscope, Animal cultured cell line

抄録

近年の生命科学の進歩は著しく、再生医療やゲノム編集など社会的なインパクトが強まっている。従って学校における生物の授業には、生命科学の進歩を生徒がより身近なもの、現実的なものとして捉えられる教材も必要だろう。動物培養細胞はそのような教材の一つになりうるが、細胞の維持管理には倒立位相差顕微鏡による増殖確認が必須である。倒立位相差顕微鏡は高価かつ他の観察器具への代替が不可能であったが、近年海外で販売された簡易倒立顕微鏡を用いると培養フラスコ中の細胞を見ることができる。しかし、明視野観察のため視認性に劣る。本研究では、培養フラスコの上面または顕微鏡の光学フィルターに紙を貼付するだけで培養細胞の明瞭度が上昇し、視認性が高まるを見出した。この手法であれば、学校現場でも動物培養細胞の維持が可能となり、培養細胞を扱った各種実験が可能となるだろう。本研究の成果が、培養細胞の教材化と普及に寄与することを期待する。

Abstract

Life sciences have made remarkable progress in recent years, with regenerative

medicine and genome editing having a growing impact on society. Therefore, biology classes in schools should include teaching materials that allow students to view the development of life science as something more familiar and realistic. Cultured animal cells can be one of such teaching materials, but using an inverted phase contrast microscope is essential for cell maintenance and management. Although inverted phase contrast microscopes have been expensive and irreplaceable, a simple inverted microscope recently marketed overseas allows to see cells in culture flasks. However, it has poor visibility due to bright-field observation. In this study, we report that simply attaching a piece of paper to the top surface of the culture flask or to the optical filter of the microscope increases the clarity of cultured cells and improves visibility. This technique would make it possible to maintain animal cultured cells at school sites and to conduct various experiments dealing with cultured cells. We hope that the results of this study will contribute to the development and dissemination of educational materials on cultured cells.

1. はじめに

近年の急速な生命科学の進歩とその社会的なインパクトを踏まえると、中高生が生命科学に興味を持つことは、将来の職業に関する視野を広げるためにも望ましい。これを実現していくためには、先端科学の一端に触れられるような教具・教材を生み出すことも必要だろう。現在、高等学校では遺伝子組み換えや PCR、電気泳動といった実験が教科書に掲載されている。より先進的な学校では RT-PCR を用いた植物の環境応答と遺伝子発現の関連づけ（園山・渥美, 2019）や SDS-PAGE によるタンパク質解析などの理科実験（本橋, 2022）が報告されている。このような生命科学の基礎的な実験は、生徒が遺伝子工学やタンパク質工学、細胞培養・組織培養、微生物学、バイオインフォマティクス等の専門領域を理解するための足場掛けとして効果的な役割を果たすと考えられる。

さて、よく知られている通り、iPS 細胞を活用した再生医療やスマート細胞などの、培養細胞をベースにした産業の成長は強く期待されている（経済産業省, 2021）。高等学校における細胞に関する学びの内容は高等学校学習指導要領（平成 30 年告示）に表記されており、生物の「2 内容」の項目の「(2) 生命現象と物質」において「⑦生体物質と細胞 生体物質と細胞に関する資料に基づいて、細胞を構成する物質を細胞の機能と関連付けて理解すること」とある（文部科学省 2018）。続く「3 内容の取扱い」では、生体膜や細胞骨格に触れるよう指示されている。高校生が使用する教科書や資料集には G タンパク質共役受容体や cAMP など、初步的ではあるが、従来は大学で学んでいた細胞生物学の内容が履修標準 4 単位の生物で扱われるようになった。このことは現代において、細胞生物学に関する理解を深めることが重要であることを意味する。動物培養細胞を使った実験はそのような内容をテーマにしたものが多くある。研究現場で行われている実験のうち、高等学校

の教科書の内容に即した例を挙げると、細胞増殖阻害剤などによるガン細胞の増殖抑制（細胞周期や細胞分裂に関連）、Gタンパク刺激あるいはIgE刺激によるマスト細胞のエキソサイトーシス評価（生体防御に関連）、細胞骨格の観察や細胞外マトリックスに応じた細胞の接着性の違いの検討（細胞と物質に関連）などがある。このような細胞生理学的な実験が可能になれば、生徒らは現代の生物学を体験的に深く理解できるようになるだろう。しかし、いずれの実験系も動物培養細胞を維持・管理することが前提となる。理科の授業でメダカの血流観察をするには、メダカを飼育しなければならないことと同様に、動物培養細胞の実験を行うためにもまずは細胞を培養することが肝心である。

動物培養細胞を理科室で扱えるようにするには、細胞の維持管理や観察を簡単に行える条件を整えていくことが必要である。動物培養細胞を扱った中高生向けの教材開発や教育実践はいくつかの報告がある（細川ら 1993, 永山ら 2018）。しかし、培養関連の器具・機器は高額であり、導入の障壁になっていることが指摘されている。これを解決するにはより簡単に培養できる細胞種に変更する方法もあるだろう。いくつかの動物培養細胞はCO₂添加をせずに培養可能であり、通常の定温機をCO₂インキュベーターの代わりに使うことができる。また、無菌操作で必要となるクリーンベンチやオートクレーブは分子生物学実験やバイオテクノロジーの実験でも使用できる。つまり汎用性が高く様々な生物学実験に対応できることから、培養細胞の実験だけにターゲットを絞らずに導入していくことが可能である。培養細胞の観察で必要となる倒立位相差顕微鏡は安価なものでも40万円を超える、多くの学校では予算内で購入することは極めて難しい。このことから倒立位相差顕微鏡も代替を検討すべき実験機器に該当する。倒立位相差顕微鏡は顕微鏡とは異なり、ステージの下に装着された対物レンズによって物体を観察する仕組みになっている。対物レンズの上側に観察対象物を載せる理由は、動物培養細胞が高さのある培養容器（以下、培養フラスコ）中で無菌的に培養されており、観察対象となる細胞自体が容器底面に付着しているからである。小中学校にある生徒用顕微鏡では、対物レンズと接眼レンズの間が狭く、培養フラスコを入れることができない（図1）。また、たとえ入ったとしても焦点を合わせることは困難である。通常の学校にある生物顕微鏡で培養細胞を観察するには、培養フラスコから細胞を剥がして外に出し、スライドガラスに細胞を載せる必要がある。ただし、培養フラスコのキャップを空けた途端、空気中の微生物がその内部に混入・増殖するため、それ以降の継続的な細胞培養は不可能となる。従って細胞の継代や溶液を添加するなど無菌操作を伴う実験を継続して行うには、培養細胞基に付着したまま細胞の観察が可能な倒立型の顕微鏡が必須となる。細胞の継代が実施可能になると、理数探究などにおいて扱えるテーマの種類が各段に増え、細胞を扱った実験を希望する生徒に応えることもできるが、現状では代替となる観察機器は限られる。一例として、スマートフォンのセルフィーレンズ部にDVDプレイヤーから取り出したレンズを貼り付けることで培養細胞を観察する方法が挙げられる（Matsuda & Okiharu, 2024）。ただし、解体してレンズを取り出せるDVDプレイヤー（破損品を想定）の準備や、分解作業が必要となる。また、ピントを合わせる

ためにスマートフォンと培養フラスコの距離を調整するジャッキが別途必要など一工夫必要となる。

さて近年、Web ショップにて販売されている子供用の簡易倒立顕微鏡は、価格が 2 万円程度であり、研究で使用する倒立位相差顕微鏡と同様の形状をしている。この形態的類似性は、生徒が理化学機器の原理を視覚的に理解する上では利点になるだろう。また、デジタルカメラ機能を有する接眼レンズを接続すれば、付属のアプリケーションを使うことすぐに PC 画面上で観察を行うことができる。PC が必須であることが懸念事項になるが、すでに 2021 年 3 月の段階で教育用コンピュータ 1 台当たりの児童生徒数が 1.4 人、PC や大型提示装置の整備率は 70.3% となっており（文部科学省、2021），導入にあたっての障壁は現在さらに低下していると考えられる。ただし、この顕微鏡による観察は一般的な顕微鏡と同様の透過明視野で行われるため、透明な試料を視認することが難しい。

動物培養細胞は透明であり、透過明視野では観察できないので、一般的には位相差観察、微分干渉観察、レリーフコントラストによる観察が行われる。いずれも専用のコンデンサーにおいて光を屈折させ、生細胞内部の細かな像や立体像の観察を可能としている。位相差観察では細胞が平面的に見えるのに対し、微分干渉観察とレリーフコントラスト観察では、細胞表面の明暗コントラストが高まり、観察像が立体的に見えるのが特徴である。位相差観察と微分干渉観察では、それぞれ位相差対物レンズや対物レンズ側の微分干渉プリズムが必要となる。細胞の視認性を高めることは、通常授業においては生徒の理解を促し、個人あるいはグループでテーマを決めて実験を進める探究的な活動では、観察のハードルを下げることでそれ以外の評価項目に注力することが可能となる。

筆者は位相差顕微鏡のコンデンサースライダーの形状に着目し、これに倣って簡易倒立顕微鏡の光路を光学フィルターまたは培養フラスコ上面で一部遮ったところ、動物培養細胞の明瞭度（明瞭度はコントラストの一種で、画像の輪郭やディテールを調整する項目）が向上することを発見した。そこで、培養フラスコ上面及び顕微鏡の光学フィルターの光路を紙で遮蔽した 2 つの場合について、紙のサイズと明瞭度の関係性を検討したところ、適切なサイズがあることを見出した。その結果をもとに、動物培養細胞を扱った課外授業を実施したところ、実験経験が浅い生徒にも細胞培養や顕微鏡観察・記録が十分に可能であることが示された。本手法は、動物培養細胞の維持管理に必須の倒立位相差顕微鏡の代替手法の一つであり、様々な動物培養細胞を教材化するための基盤になるだろう。



図 1 通常の生物顕微鏡の対物レンズ下に動物細胞培養フラスコを入れようとした様子

2. 方法

2. 1 機器・器具・試薬

細胞観察用機器として研究用倒立位相差顕微鏡（AE2000, 株式会社島津理科, 東京), 簡易倒立顕微鏡「IQCrew IN 50, STEM Science Discovery Series 40X-500X Inverted Microscope」(AmScope, カリフォルニア州, USA) (図 2A), 顕微鏡デジタル接眼レンズ「SWIFT USB 5.0 CMOS Digital Eyepiece Microscope Camera」(Microscope World, カリフォルニア州, USA) (図 2B) を使用した。細胞培養容器として細胞培養用 24 ウエルプレート「NuncTM Cell-Culture Treated Multidishes, Cat. No. 142475」, 細胞培養用フラスコ「NuncTM EasYFlaskTM Cell Culture Flasks, Cat. No. 156340」(サーモフィッシュジャーサイエンティフィック株式会社, 東京) を使用した。光源からの光を部分的に遮る素材として①学校現場に常にあること（入手性）や加工・脱着が容易（簡易性）という観点から弱い粘着性のある付箋紙を使うことにした。具体的には付箋紙「ポスト・イット®」(厚さ 0.07mm) (スリーエム ジャパン株式会社, 東京) をメイン素材として用いた。なお、付箋紙の色はパステルカラーの黄色, ピンク色, 水色, 黄緑色を検討した。また、素材及び形状の比較対照として、アルミホイル「クリップホイル長巻」(厚さ 0.011mm) (株式会社エムエーパッケージング, 東京) と黄色の円形シール「マイタックカラーラベル」(直径 16mm, 厚さ 0.11mm) (ニチバン株式会社, 東京) を準備した。

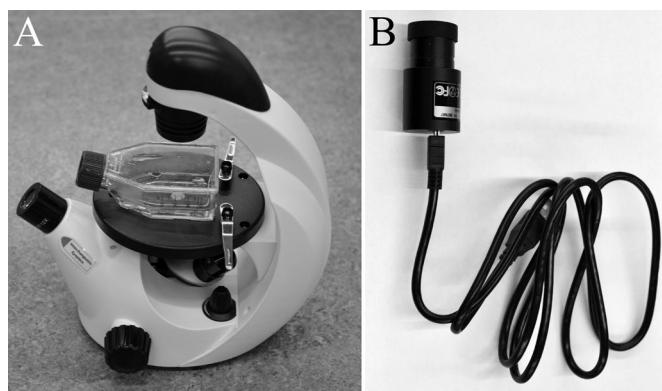


図 2 簡易倒立顕微鏡と顕微鏡デジタル接眼レンズ

A: 簡易倒立顕微鏡 IQCrew IN 50, B: 顕微鏡デジタル接眼レンズ SWIFT USB 5.0 CMOS Digital Eyepiece Microscope Camera.

2. 2 動物培養細胞の培地調製及び維持

本研究では観察対象としてイヌ肥満細胞腫由来マスト細胞 Canine Mastocytoma derived Mast Cell (CMMC) (Takahashi et al., 2001) を用いた (図 3)。本細胞は 10%FBS, 1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液を含有する RPMI-1640 培地で培養し, 6~8 日おきに 10 倍希釀による継代培養を行った。なお、培地は 20mM HEPES で pH7.4 に緩衝されており, CO₂ の添加を必要としないものを用いた。

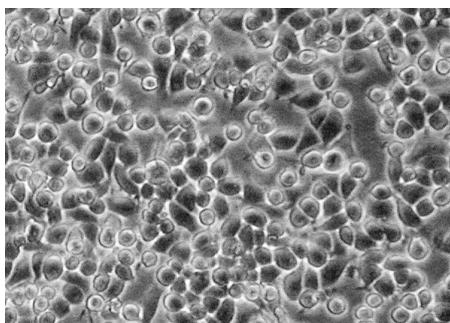


図3 研究用倒立位相差顕微鏡 AE2000（島津理科）にて観察したCMMCの様子

2.3 画像解析アプリケーション

顕微鏡画像編集アプリ「Swift Easy View_Windows (32 bit-64 bit)」または「Swift Easy View_Mac」(Swift Microscope, カリフォルニア州, USA)で細胞画像を取り込み, JPEG形式で保存した。画像編集にはデジタル写真編集アプリ「Adobe Photoshop Elements 15」(アドビ株式会社, カリフォルニア州, USA)を使用した。培養細胞の全てのデジタル画像は Photoshop の「画質調整」の「モノクロバリエーション」, スタイルの選択では「スナップ写真」で画像編集を行った。

2.4 動物培養細胞の観察

この倒立顕微鏡は鏡筒が短いため, 実験机に載せた状態での観察は困難である。そのため顕微鏡デジタル接眼レンズを用いてPC画面で観察した(図4)。

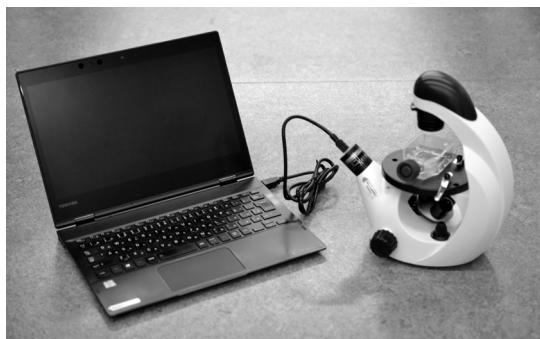


図4 簡易倒立顕微鏡とデジタル接眼レンズをPC接続した様子

2.5 光の遮蔽方法

事前の検討で, 光学フィルター及び培養フラスコ上面の光路を一部遮ることで培養細胞の明瞭度が改善されることを見出した。光路を遮る面積と明瞭度の関係性を把握することを目的にいくつかの遮蔽条件を検討した。現場でも実施しやすいよう, 光路の遮蔽はなるべく単純化して二通り行った。一つ目は培養フラスコ上に紙を貼り, 紙の辺が光路の直径軸長さの $1/4$, $1/2$, $3/4$ を遮蔽する方法である(図5A)。この方法ではさらに光学フィルターの有無による細胞の見え方を比較した。二つ目は, 顕微鏡の光学フィルターの中央

に幅 5, 10, 15, 20 mm 四方の紙を貼り（図 5B），紙面が LED ランプ側になるようにして装着する方法である（図 5C）。アルミホイルは 15 mm 四方に切り出し，両面テープで光学フィルターの中央に貼った。

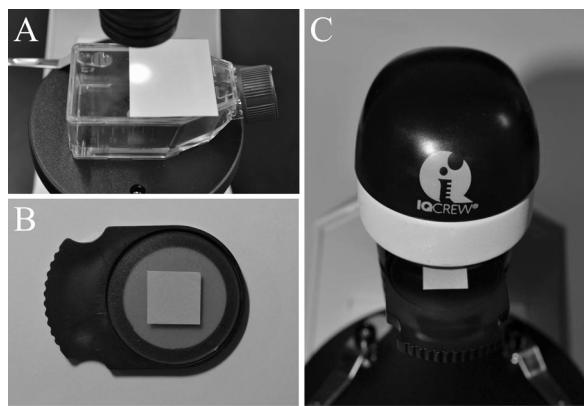


図 5 光路の遮蔽方法

A：培養フラスコ上に紙を貼付した様子，B：光学フィルターに紙を貼付した様子，C：紙が貼付された光学フィルターの挿入。

2. 6 生徒による動物培養細胞の観察

東京都調布市にある私立中学・高等学校において，2021 年度に課外授業「Cell Lab」（50 分 1 コマとして 2 コマ連続の授業）を希望する中等部 1 年生 5 名を対象とした。この授業では，ガン教育の一環として実際にガン細胞モデルとして CMMC を扱った。具体的には，ガン予防のための食生活習慣を培養細胞レベルで理解することを目的とし，抗腫瘍作用のある食品機能成分緑茶カテキンの添加によって動物培養細胞の増殖抑制がかかるることを実験で観察するという内容とした。生徒らには授業当日の 1 週間前に Swift Easy View のダウンロードとインストールを指示した。当日の授業準備として，クリーンベンチ内にはあらかじめ新しい培養フラスコと滅菌スポット，細胞剥離用スクレーバーを入れて 1 時間以上の紫外線照射で殺菌した。授業直前にクリーンベンチのファンを起動させ，遠心管に小分けした培地を人数分入れた。第 1 回目の授業では，最初に Swift Easy View の使い方について説明をし，プレパラートを用いてピント合わせとデジタル画像の撮影練習を行った（図 6）。

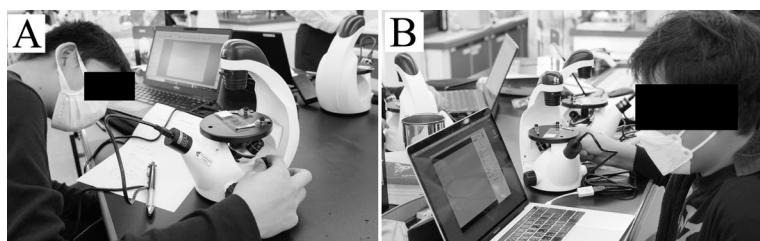


図 6 簡易倒立顕微鏡による観察練習に取り組む生徒

A:対物レンズとプレパラート標本を近づける生徒，B:PC 画面上のアプリケーションでピントを合わせ，画像を撮影する生徒。

その後、培養細胞について説明を行うとともに「細胞」を刺激言語としたコンセプトマップ作成を行った。その後、本授業で扱う培養細胞の入ったフラスコを配布し、PC画面上で顕微鏡観察を行った。以上を約40分間で行ってから休憩をはさみ、培養細胞の継代に取り掛かった。最初に教員が実際の作業を見せながら説明し、そのすぐ後に生徒に行わせるというタスクシャドウリング形式で無菌操作による細胞継代の手法を教授した。具体的には、袖を肘の上までめくり、腕及び手を水道水で軽く洗った後、全体を石鹼で2回洗浄し、ペータオルでふき取った。この段階では指先及び指の間、手の側面の雑菌を十分に落とすよう指示した。つぎにクリーンベンチ前に移動し、培養細胞の継代作業について一連の流れを見せながら説明し、生徒らに実施させた。生徒らが行った作業は次のようになる。まず70%エタノールで腕及び手を消毒してからクリーンベンチに物品を入れた(図7A)。クリーンベンチ内では、中央をワーキングスペースとして空け、その周辺に器具を配置した。このとき培養フラスコや培地のキャップをすぐに外せるように緩める作業をした(図7B)。次にスクレーパーで接着している細胞を剥離し、細胞懸濁液を調製した(図7C)。続いて新しい培養フラスコに、小分けした培地をデカントで入れた(図7D)。ここに細胞懸濁液を滅菌スポットで約0.5mL入れ(図7E)，キャップを閉めた(図7F)。継代後の培養フラスコは37℃保温庫に入れ、1週間培養した。

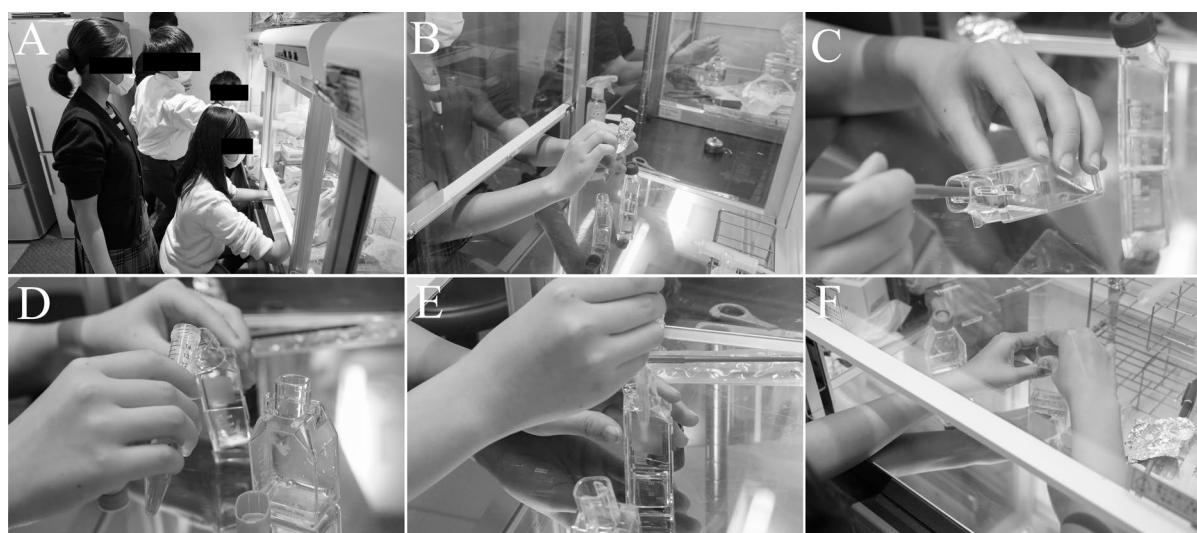


図7 生徒による無菌操作のプロセス

A:クリーンベンチ内の作業に助言をしている様子、B:継代作業に必要な物品を入れる様子、C:コンフルエントに達している細胞をスクレーパーで剥がす様子、D:新しい培地をデカントで培養フラスコに注ぎ入れる様子、E:古い培養フラスコにある細胞懸濁液を新しいほうに無菌スポットで移動する様子、F:継代作業後に培養フラスコのキャップを閉める様子。

第2回目の授業では前半約50分間で、増殖した細胞を顕微鏡で撮影記録した後に、ガン細胞の性質についてがん教育推進のための教材をテキストにして説明を行った。また、本培養細胞がアレルギー治療薬や機能性食品成分のスクリーニングに実際に使われていることを説明したうえで、培養細胞の素材としての役割を紹介した。後半の授業では、抗腫瘍活性のある食品機能成分として緑茶ポリフェノールの一種エピガロカテキンガレートEGCGを例に挙げ、培養細胞の継代と同時にこれを添加させる作業を行った。具体的にはクリーンベンチ内にて細胞を継代したフラスコを2本準備してもらい、一方には100μg/mlとなるようにエピガロカテキンガレートを添加した。両フラスコとも保温庫に入れ、1週間培養した。

3回目の授業では前半約50分間において、カテキンによる細胞の増殖抑制効果を確認した後、ガンの予防方法について資料を用いて講義を行った。その後、「細胞」を刺激言語としたコンセプトマップ作成を行った。なお、3回目の授業は早めに終了しており、全体としては50分5コマの授業構成であった。

3. 結果

3.1 培養フラスコ上面で光遮蔽をした場合の動物培養細胞の見え方

顕微鏡本体の光学フィルターを外してから培養フラスコ上面に紙を貼って観察した場合、貼らなかった場合（図8A）に比べると、光路直径軸の1/4及び2/4を遮ったフラスコでは動物培養細胞の輪郭がぼやけた（図8Bと8C）。

| | 0 | 1/4 | 2/4 | 3/4 |
|-----------|---|-----|-----|-----|
| 光路と紙の位置関係 | | | | |
| フィルターなし | | | | |
| フィルターあり | | | | |

図8 培養容器上面に紙を貼付した場合の培養フラスコにおける培養細胞の見え方

しかし、3/4では動物培養細胞の明瞭度が上がり、より立体的に観察できた（図8D）。顕微鏡本体の光学フィルターが装着された状態でも同様の結果となった。紙を貼付しない場合（図8E）に比べると、光路直径軸の遮断が1/4及び2/4では動物培養細胞の輪郭がぼやけたが（図8Fと8G）、光路直径軸の3/4を紙で遮った場合は、動物培養細胞の輪郭が明瞭になった（図8H）。なお、全体的に顕微鏡に付属するフィルターが無いほうが培養細胞の明瞭な観察が可能であった。研究用倒立位相差顕微鏡の接眼レンズを通して観察した様子に比べると内部構造を把握することが難しく、明瞭度も弱いが、細胞の増殖具合を把握するには十分な像が得られた。

3.2 光学フィルター上で光遮蔽をした場合の培養フラスコ内の動物培養細胞の見え方

光学フィルターをセットしない状態と紙片を貼らない光学フィルターでの観察では、細胞の輪郭はぼやけた状態で見られた（図9Aと9B）。5 mm四方の紙片では、細胞の輪郭がややシャープになったが紙片を貼らない場合とほぼ同じであった（図9C）。一方、10 mm四方の紙片になると細胞の輪郭がシャープになり位相差顕微鏡で観察した際の像に近づいた（図9D）。15 mm四方の紙片では、細胞の輪郭及び表面がシャープになり、より立体的な観察像となった（図9E）。なお20mmでは角度によっては光が遮られ観察できないこともあります、実行的ではなかった。この結果をもとに、15mm四方のパステルカラー付箋紙（黄色、ピンク色、水色、黄緑色）及び同サイズのアルミホイル、円形のマイタックシールで見え方を検討したところ、素材及び形状による違いはほとんどなかった（図10）。

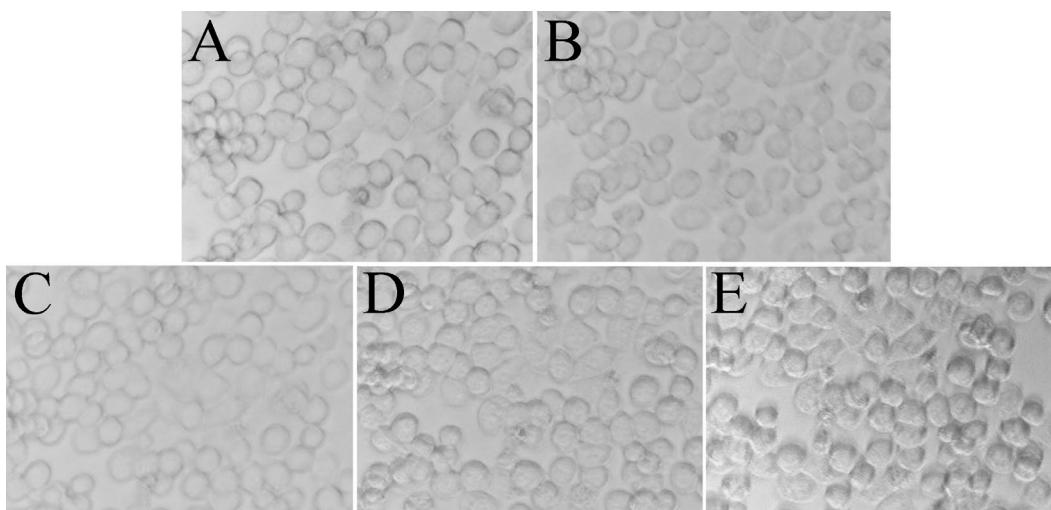


図9 光学フィルターへの紙の貼付による培養フラスコにおける動物培養細胞の見え方。
A：光学フィルターなし、B：光学フィルター有り・添付なし、C：5 mm 四方、D：10 mm 四方、E：15 mm 四方。写真是個々の細胞のコントラストが分かりやすいよう、画像アプリによって拡大して示した。

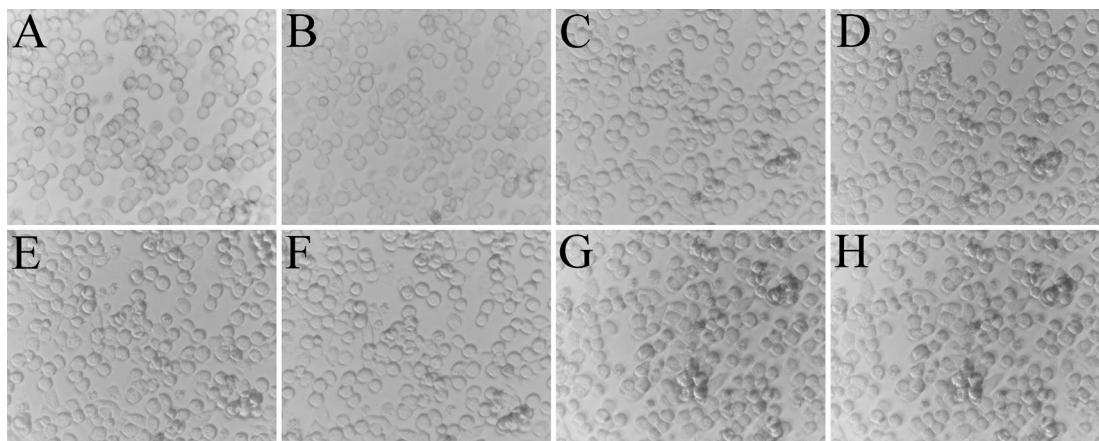


図 10 貼付する素材及び形状による培養フラスコにおける動物培養細胞の見え方の違い
A : 光学フィルターなし, B : 光学フィルター有り・添付なし, C : 黄色, D : ピンク色,
E : 水色, F : 黄緑色, G : アルミホイル, H :マイタックラベル（円形）。*G, H は撮影
場所がややすれてしまったが、他の付箋紙と明瞭度に差はなかった。

3. 3 光学フィルター上で光遮蔽をした24ウェルプレートにおける細胞の見え方

24ウェルプレートは培養細胞実験において頻繁に使用される器具である。この培養器にある細胞の観察では、光学フィルターを装着しないほうが細胞の輪郭が明瞭になった（図11A 及び 11B）。しかし、光学フィルターに紙を貼付すると、培養細胞の明瞭度が高まり、フィルターなしの時よりも立体的に観察することが可能となった（図11C）。

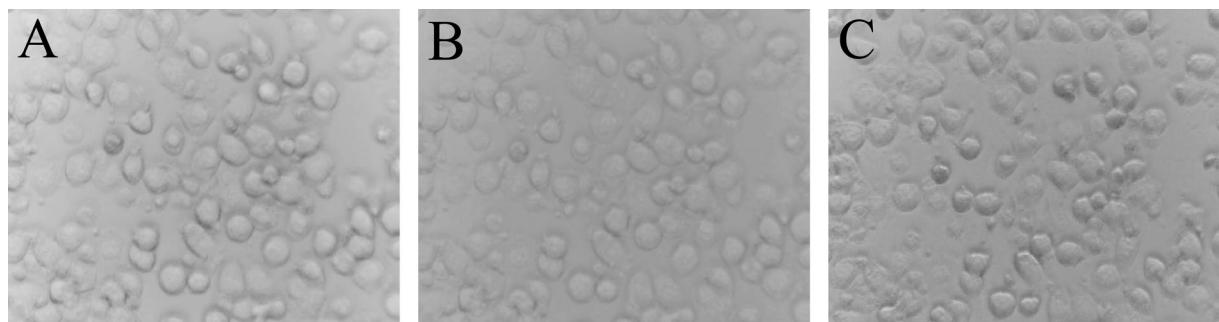


図 11 光学フィルター面に紙を貼付した24ウェルプレートにおける培養細胞の見え方
A : 光学フィルターなし, B : 光学フィルターあり, C : 光学フィルターに 15 mm 四方の紙
を貼付。

3. 4 生徒による観察と知識の広がり

生徒らのPC画面上で観察された動物培養細胞の様子を、プリントスクリーン機能で撮影した（図12）。3.1の検討結果と同様、光路を3/4程度遮ることで、細胞の輪郭が明瞭で立体的な像を観察することができた。5人中2名の生徒は、ピント合わせにやや時間を要し、教員の個別指導が必要となった。しかし、活動時間内に5名全員が細胞の観察とデジタル顕微鏡写真の撮影を成し遂げた。エピガロカテキンガレートによる増殖抑制について

では、5名全員のフラスコにおいて確認された（図13）。授業後のコンセプトマップづくりでは、細胞を刺激言語とした広がりが初期に比べると3～6倍になり、知識の関連性が高まつたことが窺われた（図14）。

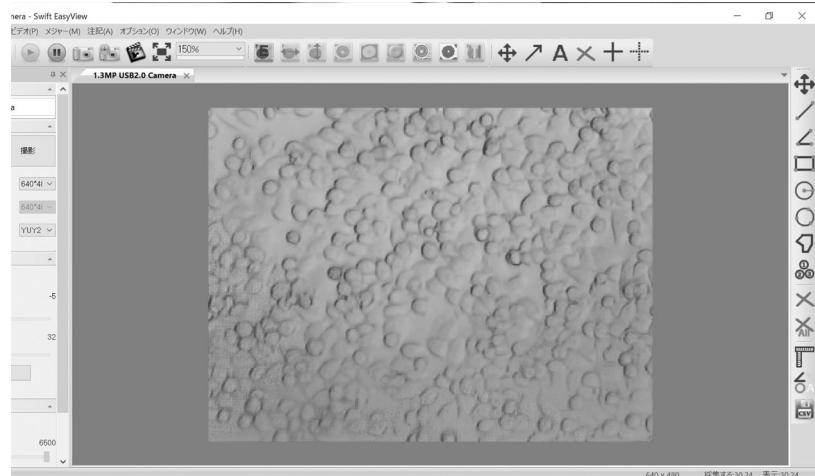


図12 生徒のPC画面のアプリケーションに映し出された動物培養細胞像

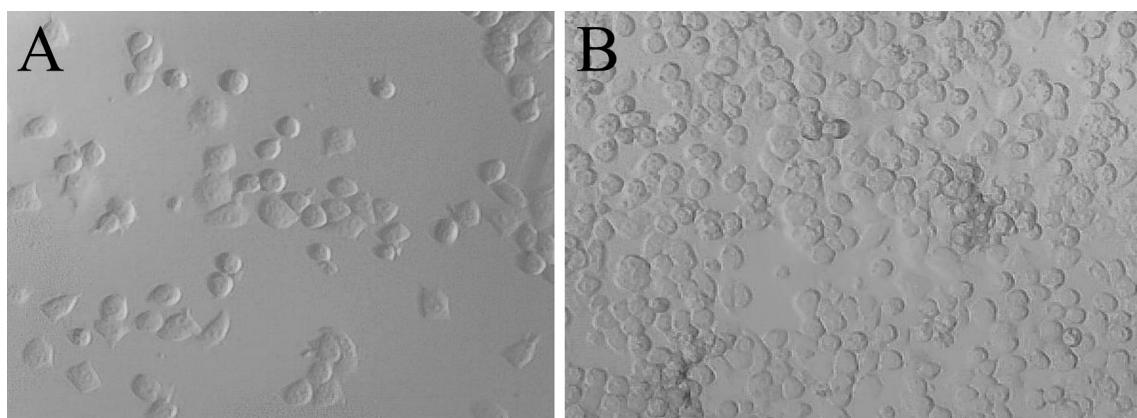


図13 緑茶ポリフェノールエピガロカテキンガレートによる細胞の増殖抑制

A : 100 µg/mL エピガロカテキンガレートを添加した培養フラスコにおける細胞増殖の様子, B : コントロール（無添加区）における細胞増殖の様子。

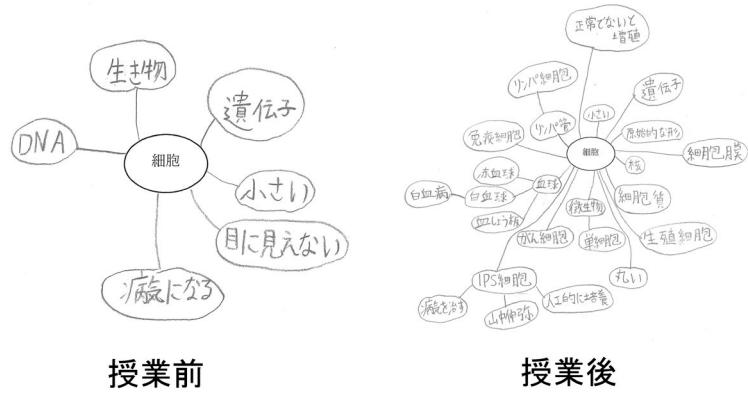


図14 生徒Aのコンセプトマップの変化

4. 考察

動物培養細胞の観察に用いられる倒立位相差顕微鏡は、安価なものでも40万円を超える。多くの学校では予算内で購入することは極めて困難であるが、本顕微鏡はレンタルすることでコストを抑えることも可能である。例えば研究現場において標準的に使用されているタイプであれば10日間で1~4万円となっている。ただし、授業準備や生徒への指導方法を検討することを踏まえると短期間での貸し出しによる実験は、教員側があらかじめ多くの知識があることが前提になるだろう。確かに本実践で用いた簡易倒立顕微鏡では、研究用顕微鏡で得られるような明瞭度の高い顕微鏡像、具体的には内部の顆粒まで判別できるほど像を得ることはできない。しかし、常に教員の手元に置いておけば、操作性を小まめに検討することはできる。授業アイデアがひらめいたときに、具体的にイメージしながら即座に授業を検討できる状況は、現場の教員にとってはメリットが大きい。また、数カ月にわたって生徒が取り組む探究活動では、生徒が比較的自由に触れる状態にすることが望ましい。授業時間だけではなく、昼休みや放課後などに生徒がすぐに観察できる状況を作り出せる。理科教育では実験機器・器具の生徒による破損・故障リスクはつきものであるが、そのリスクを教育側が負い、それを許容することが科学・技術を担う者を育成する上で大切な覚悟である。とは言え、教員・生徒に過度な心理的負荷はかかるないことが望ましい。簡易倒立顕微鏡の利点はそのような部分にもある。

本研究では培養細胞の明瞭度を上げるために光学フィルターあるいは培養フラスコ上面など、対物レンズに光が入る前段階の光路を一部遮断する工夫を検討した。本手法はコンデンサーや位相差用対物レンズなどを使用しておらず、位相差観察や微分干渉観察とは異なる原理で細胞の明瞭度を上げていると言える。この原理について考察をする。候補としては明視野観察法と暗視野観察法がある。暗視野観察はコンデンサー側に不透明な絞りがあり、ここで光が遮断されると、斜角から標本を通過した光が回折、屈折、反射して顕微鏡の対物レンズに入射するようになる。その結果、暗視野観察では暗い背景の中に標本の明るい画像がつくられるようになる。本研究で用いた顕微鏡はコンデンサーが付属しておらず、フィルターや培養フラスコ上面など対物レンズの手前で光路を一部遮断している。光を遮るという点では暗視野観察に似るが、得られた観察像は背景が明るくなっていることから、厳密な意味では暗視野観察法とは言えないだろう。一方、偏斜照明法は、通常は平行である光軸と光源をずらすなどを行い、光路の中心部を使わず周辺部から光を入射させ、散乱光によって試料の立体感を出す手法である。本研究では培養フラスコ面の光路を3/4遮蔽したものと光学フィルターの中央に紙を貼付したときに明瞭度が大幅に上昇した。光路を部分的に遮蔽することにより、対物レンズに向かう光は光路中央から直線的に入り込む光ではなく、その周辺部から斜めに入ってくる光の散乱光によって得られる像となるため偏斜照明法による観察と言えよう。

本研究では光路を遮断する素材として入手しやすく脱着が容易な付箋紙を中心に、色合いと形状、遮光性の影響について検討した。その結果、色及び遮光の程度、遮光物の形状

は細胞の見え方にはほとんど影響しないことがわかった。この理由は、光源の光はほとんど紙によって遮られてしまうことや、また例えば光が通過しても紙片の下側に来る青い光学フィルターによる光学的バンドパスの作用により影響がなかったのだろう。また完全遮光のアルミホイルでも明瞭度を高めることができたことから、周辺部から入ってくる光の散乱光が重要であることが伺える。また、形状については正方形と円形では差がなかった。結果には示していないが長方形でも同様の像が見られたことから、明瞭度を高めるための条件は比較的柔軟性があり、現場の教員としては実施しやすいと言えよう。

倒立顕微鏡は高さのある容器で観察できるため、培養フラスコやウェルプレートの中に様々な培養環境を作り出し、長期培養による比較実験を行うことができる。また、実験スペースの限られる学校では、このような少量化は生徒一人一人に実験に取り組む機会を与えるものになる。動物培養細胞以外でウェルプレートを活用した実験としては、海藻による下水処理のバイオアッセイ（鈴木, 2020）や有毒渦鞭毛藻類の増殖特性の解析が挙げられる（夏池ら, 2021）。このような実験を参考にして、実験条件や生物種を変えることで生徒の探究活動に展開することは可能だろう。本実験では培養器に直接紙を貼付する場合と顕微鏡の光学フィルターに添付した場合の両方で明瞭度を上げられることを明らかにした。前者の方法では、通常の透過明視野観察にすぐに変更可能であり同一サンプルの見え方が光の照射方法によって異なることを提示するのによい手法である。後者の方法では常に適切な明瞭度で観察できることから、複数のフラスコを比較する場合に操作性の面で優れている。その時々の実験内容によって両手法を使い分けることができるのも本手法の利点である。

実践では、生徒らに培養フラスコの上面に紙を貼らせて、光路を一部遮らせるよう指示してから動物培養細胞の観察をしてもらった。実践当時、高校生が在籍していなかったため、対象者が中学生に限定されてしまったが、通常の授業時間と同じ時間区切りの課外授業で動物培養細胞を確認することが可能だった。これは、細胞を観察するためのアプリケーション操作や顕微鏡の使い方などの指導が、通常授業の 50 分間を活動の区切りとして実施可能ということを示す。また、緑茶カテキンによる増殖抑制の実験では、その前提として生徒によるクリーンベンチ内の無菌操作や細胞の継代が必要であるが、培養フラスコのまま観察できたことにより細胞の長期培養が可能となつたため実現した。このことは細胞生理学実験への道筋がついたことを示す。中学生でも十分に観察可能であったことやコンセプトマップ解析において知識の拡張が窺われたことから、細胞について本格的に学ぶ高校生ではさらに効果的だろう。本研究成果は、教材生物となる動物培養細胞を維持・管理する方法の一つを構築したことになり、その先にある様々な培養細胞の教材化と普及に寄与することを期待したい。また、本教育実践の流れはガン教育に動物培養細胞をガン細胞として扱った事例になるが、この流れをもとに生徒らの知識の増加やカテゴリー化がどのように変容するか解析することが今後のテーマになるだろう。

付記

本研究は公益財団法人武田科学振興財団の2021年中学校・高等学校理科教育振興助成の一
部によって行ったものです。本実践報告に関して、開示すべき利益相反関連事項はあ
りません。なお、論文に掲載している図及び記述内容は、2022年12月の教育実践学会に
おけるポスター発表及び学会要旨に加筆・修正したものです。

引用文献

- 細川友秀・谷岡直子・森本容子・嶋田 浩・辻本 学・早瀬善仁（1993）. 生命科学教育の教
材化を目的とした細胞培養法の簡易化, 京都教育大学環境教育研究年報, 1, 67-72.
- 経済産業省（2021）. 「バイオテクノロジーが拓く『第五次産業革命』」. Retrieved from
https://www.meti.go.jp/shingikai/sankoshin/shomu_ryutsu/bio/pdf/20200202_2.pdf
 (2025年8月15日閲覧)
- Matsuda, R., & Okiharu, F. (2024). Bringing cell biology into classroom: tips to
culture and observe skeletal muscle cells in high school and college. *In Vitro
Cellular & Developmental Biology-Animal*, **60**(7), 740-747.
- 文部科学省（2018）. 高等学校学習指導要領（平成30年告示）解説理科編理数編, 134-135.
 Retrieved from https://www.mext.go.jp/component/a_menu/education/micro_detail/_icsFiles/afieldfile/2019/11/22/1407073_06_1_2.pdf (2025年8月15日閲覧)
- 文部科学省（2021）. 「令和2年度学校における教育の情報化の実態等に関する調査結果（概
要）（令和3年3月1日現在）」. Retrieved from https://www.mext.go.jp/content/20210827-mxt_jogai01-000017383_08.pdf (2025年8月15日閲覧)
- 本橋 晃（2022）. 果汁に含まれるタンパク質分解酵素の作用を SDS-PAGE により確認す
る, 生物教育, **63** (2), 91-96.
- 永山昌史・坂本一真・和泉里菜（2018）. メダカ由来細胞の顕微鏡観察を教材化する試み—
動物細胞の動きを実感できる中学校理科の授業—, 生物教育, **59** (2), 75-82.
- 夏池真史・金森 誠・菅原 玲・坂本節子（2021）. 北海道函館湾および噴火湾から単離さ
れた有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium pacificum* の麻痺性貝毒成分組成ならびに水温, 塩分,
光強度に対する増殖特性, 日本プランクトン学会報, **68** (1), 1-9.
- 園山 博・渥美茂明（2019）. 植物の環境応答を遺伝子発現と関連づけるためダイレクト
RT-PCR 法を用いた実験教材の開発と授業実践, 生物教育, **60** (2), 40-49.
- 鈴木祥広（2020）. マイクロプレートによる海藻バイオアッセイの応用例：下水処理水によ
る海藻スサビノリの生長促進効果, 日本海水学会誌, **74** (1), 2-8.
- Takahashi, T., Kitani, S., Nagase, M., Mochizuki, M., Nishimura, R., Morita, Y., &
Sasaki, N. (2001). IgG-mediated histamine release from canine mastocytoma-derived
cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, **125**(3), 228-235.