

細胞分裂の観察法に関する一考察

—酢酸カーミン液とピロニン・メチルグリーン液を用いた展開例—

渡辺克己

神奈川県立教育センター

Using Observational Techniques for
Cell Division in School Education

Katuki WATANABE

KANAGAWA PREFECTURAL EDUCATION CENTER

はじめに

細胞分裂の観察は、基本的な生物実験の一つであり、多くの方法が報告されている。しかし、そのほとんどは核分裂の観察法であり、細胞分裂の全体像を理解させる実験としては若干物足りなさを感じていた。また、材料の確保に苦労する、染まりが良くない、押しつぶしがうまく行かない等の声もよく耳にする。

今回はタマネギの根端を用いた押しつぶし法による細胞分裂の観察法について、生徒実験を念頭に置き従来の方法にいくつかの工夫を加え、実験のねらい、染色液と作業手順の両面から整理した。さらに、酢酸カーミンによる染色像とピロニン・メチルグリーンによる染色像とを比較することにより、細胞分裂の全体像を理解させる方法について検討した。

細胞分裂の実験方法と作業手順

現在行われている実験方法について、実験目的の力点の置き方の違いから以下のように整理した。

方法Ⅰ：標準的な方法であるが、実験の全行程を1時間で行うには無理があり分業が必要。

方法Ⅱ：1時間内で材料の採取から観察までを行うことに主眼を置いた方法。

方法Ⅲ：DNAとRNAを染め分け、分裂時の染色

体以外の細胞質の変化の観察を目指した方法。

| | (方法Ⅰ) 標準的方法 | (方法Ⅱ) 短時間で行う方法 | (方法Ⅲ) DNAとRNAの染め分け法 |
|-----------------|-------------------------------|-------------------|------------------------|
| (1) 材料の準備 | 鱗茎の水栽培 種子の播種 | 方法Ⅰに同じ | 方法Ⅰに同じ |
| (2) 固定の方法 | 酢酸エタノール (保存可) | (2)(3)(4)を同時に行う | 方法Ⅰに同じ |
| (3) 解離の方法 | 1 mol塩酸を60℃湯煎 水洗い (保存可) | | 60℃・1 mol塩酸水洗い |
| (4) 染色の方法 | 酢酸カーミン(保存可) 45%酢酸による洗い | 塩酸サフラニン・ファストグリーン | ピロニン・メチルグリーン液(A・B・C) |
| (5) 押しつぶしの方法 | 砕き→(染色)→伸展(叩き)→押しつぶし | 伸展(叩き)→押しつぶし | 方法Ⅰに同じ |

1. 方法Ⅰの作業手順と留意点

1) 材料の準備

①タマネギの種類

細胞分裂の観察にはミニタマネギ(ペコロス)が発根期間も長く根の太さも適当で使いやすい。

②水栽培の方法

適当な深さの容器に試験管立てを置き、タマネギを並べて、水道の水を少し流しておくといよい。

③発根促進処理

タマネギは4月から、ミニタマネギは5月から新しくなる。これらは休眠期間に入るため秋まで発根しにくい。しかし、7月下旬になればへたの部分に十字に切れ込みを入れることで発根を促進できる。

④種子の播種

シャーレにろ紙を敷き水で濡らしてネギやタマネギの種を蒔けば数日後には実験が可能となる。時季にとらわれない点ではよいが分裂像がやや少ない。

2) 酢酸カーミン液の作製

①カーミン粉末の購入

カーミン粉末はメルク社製を購入する。メーカーにより染まり具合に差がある。(25g 7000円程度)

②酢酸カーミン液の作製

45%酢酸にカーミン粉末を1%加え、24時間還流フラスコで還流する。冷却後ろ過し褐色瓶で保存すれば長期間使用できる¹⁾。

3) 作業手順

根端の採取

↓

- ・根の中の伸びのよいものを用いる
- ・根は後の生徒が混乱しないように基部から切り取る
- ・長いままの方が利用価値が高い
- ＊基部を1mm程削れば再度発根する

固定

↓

- ・酢酸アルコール(氷酢酸1:エタノール3)で30分間~24時間
- ＊固定後そのままで冷凍保存が可能
- ＊固定後70%エタノールで冷蔵保存

水洗い

↓

- ・5~15分間程度(省略可能)

解離

↓

- ・1 mol 塩酸 3 ml に根端を入れ60℃で3~5分間湯煎する
- ・根が半透明になりかけた頃が適期

水洗い

↓

- ・ビーカーで5~10分間水洗する
- ＊70%エタノールで冷蔵保存可能
- ＊シャーレに水を入れ冷凍すれば保存可能²⁾

砕き

↓

- ・有柄針で根端部2mm程を切り取り水を拭きスライドガラス上で4×4mm程度に広がるまで丁寧に砕く

染色

↓

- ・酢酸カーミンを1滴加える
- ・極く弱火にしたアルコールランプで加熱した後、2~3分間放置

酢酸洗い

↓

- ・酢酸カーミンをろ紙で吸い取る
- ・45%酢酸を2~3滴加え余分なカーミンを洗う³⁾
- ・余分な酢酸をろ紙で吸い取る
- ＊この作業により細胞質部分の透明度が際だつ(省略可能)

伸展(叩き)

↓

- ・根端の中心から1cmの所に端が来るようにカバーガラスを置き“枕”にする⁴⁾
- ・枕に2mm程かぶさるようにカバーガラスをかける
- ・2枚のカバーガラスを左手の中指と人差し指で押さえる
- ・竹ぐしや有柄針の柄により、カバーガラスの弾力を利用して根端を押し広げる
- ・十分広がったところで枕を外す

押しつぶし

- ・ろ紙を半分折りスライドガラスを挟み、机の端に置く
- ・親指をカバーガラスの上に置き、親指と残りの4本の指とで机の板を挟むようにして押しつぶす
- ・強く押しすぎると空気が入り見にくくなる場合もあるので注意する

2. 方法Ⅱの作業手順と留意点

1) 固定・解離・染色複合液の作製

①塩酸サフラン液⁵⁾

サフラン0.25gをエタノール10mlに溶かし、水40mlを加えろ過する。この溶液に等量の1mol塩酸を加える。褐色瓶に入れば長期間保存できる。

②塩酸サフラニン・ファストグリーン液⁶⁾

サフラニン0.30 gとファストグリーン0.05 gをエタノール10mlに溶かし、水40mlを加えろ過する。この溶液に等量の1 mol塩酸を加える。褐色瓶に入れ保存する。

2) 塩酸サフラニン液の場合の作業手順⁷⁾

根端の採取

↓

- ・方法 I に同じ
- ・一人 3 本 3 ~ 4 cm 程の長さのものをそのまま使用

固 定
解 離
染 色

↓

- ・塩酸サフラニン液を試験管に 2 ml とる
- ・根端を塩酸サフラニン液につける基部は溶液の外に出ている
- ・65℃で 5 分間湯煎する

水 洗 い

↓

- ・試験管に水を入れる
- ・浮いてきた根をピンセットでビーカーに移し 5 分間程水洗いし余分な色素を流す

伸展(叩き)

↓

- ・スライドガラス上で根端部 2 mm 程を切り取る
- ・水を 1 滴加える
- ・後は方法 I に同じ

押しつぶし

- ・方法 I に同じ

3) 塩酸サフラニン・ファストグリーン液の場合の作業手順

塩酸サフラニンの場合と同じ方法でよいが、ファストグリーンの染色むらを生じる。これを防ぐためには、実験の目的からははずれるが、加熱する前に 2 ~ 24 時間染色すると好結果が得られる。

3. 方法Ⅲの作業手順と留意点

1) ピロニン・メチルグリーン液の作製

①ピロニンの精製⁸⁾

ピロニンの飽和水溶液を作り、その一定量に 1 ~ 2 倍のブタノールを加えてふる。ブタノール溶液を分離し減圧乾燥する。

②メチルグリーンの精製⁹⁾

必要濃度のメチルグリーン水溶液を作り、適当量のクロロホルムを加えてよくふる。混在したメチルバイオレット等はクロロホルム層に移るので、上層の水溶液部分をそのまま用いる。

③ピロニン・メチルグリーン液(処方 A)の作製

2%ピロニン Y 水溶液 12.5 ml, 2%メチルグリーン水溶液 7.5 ml, 蒸留水 30 ml を混合する。

④ピロニン・メチルグリーン液(処方 B)の作製

ピロニン G 0.9 g, メチルグリーン 0.1 g, グリセリン 10 g, 0.5% 石炭酸水溶液を加えて、全量を 100 ml にする。これに 96% エタノール 9 ml を加える。

⑤ピロニン・メチルグリーン液(処方 C)の作製

5%ピロニン Y 水溶液 3.5 ml, 2%メチルグリーン水溶液 2.0 ml に蒸留水 50 ml を加え I 液とする。0.1 mol/l 酢酸 8 ml に 0.1 mol/l 酢酸ナトリウム 12 ml を加えて II 液 (pH 4.8 の酢酸緩衝液) とする。I 液と II 液を等量ずつ混合して使用する。混合してからの使用可能期間は 1 週間程度である¹⁰⁾。

2) 作業手順

根端の採取

↓

固 定

↓

水 洗 い

↓

解 離

↓

水 洗 い

↓

水 洗 い

↓

砕 き
染 色

↓

水 洗 い

↓

水 洗 い

↓

伸展(叩き)

↓

押しつぶし

- ・ 3 ~ 4 cm の長めのものを用いる
- ・ 方法 I に同じ
- ・ 5 ~ 15 分間行う
- ・ 1 mol 塩酸を入れた管瓶やビーカーを湯煎し、塩酸を 60℃ に保つ
- ・ 根の基部をピンセットで挟む
- ・ 根の先端部を 8 ~ 10 秒間つける

- ・ 素早く水に入れ、5 ~ 10 分間洗う
- ・ 方法 I に同じ
- ・ 処方 A 液、C 液の場合は不用
- ・ 処方 B 液の場合は、色素液を吸い取り、水を 2 ~ 3 滴たらし、1 ~ 2 分間後吸い取る

- ・ 方法 I に同じ

結果と考察

1) 方法 I に関して

①酢酸カーミン液を作製する場合、メルク社製のカーミン粉末を用いることと、長時間還流しながら加熱することにより、鉄イオンを加えなくてもよく染まるものができた。また、カーミンの鮮やかさが保たれ、染色結果もきれいであった。

②押しつぶしの方法について、染色前に根端を砕くことにより染色むらをなくし(砕き)、細胞をバラバラにすることにより染色と余分な色素の脱色を促進し(伸展)、押しつぶすことにより余分な液を押し出し細胞を一平面に並べる(押しつぶし)と、各作業とその目的を整理することにより、実験方法を効率的に整理することができた。

③45%酢酸を用いてカーミンを洗う作業を加えることにより、細胞質の透明度が増し、カーミンが核及び染色体に特異的に結合することが確認できた。また、この作業は細胞の観察実験においても極めて有効であった。

④カバーガラスを枕にして伸展する方法は、細胞が重ならず見やすいプレパラートを作るために非常に有効な方法であった。

2) 方法Ⅱに関して

①塩酸サフラン法は、非常に安定した方法で失敗が少ない。染色後の水洗いをきちんと行うことにより、かなりきれいな像を見ることができた。

②塩酸サフラン・ファストグリーン法は、核と染色体が赤く、細胞質が青く染まる点でカラフルで美しい像を得ることができる。予備染色をしなくても、根端部0.5mm切ることにより染色の効果を高めることができた。

3) 方法Ⅲに関して

①ピロニンとメチルグリーンを用いることにより、RNAはピロニンにより濃桃色に、DNAはメチルグリーンにより緑～青緑～緑紫色に染まることが知られている。しかし、方法Ⅰに従って解離した場合、全て濃桃色に染まってしまうDNAの存在を確認することはできなかった。

②方法Ⅲに従って解離した場合、細胞質が濃桃色に、核と染色体が青紫色に染まりDNAとRNAの存在が確認できた。

③今回用いたピロニン・メチルグリーン液は組織切片の染色を目的として処方されており、加水分解を行った根端の押しつぶし標本を短時間で染色した

結果と思われるが、メチルグリーンの発色がやや弱かった。ただし、タマネギの表皮を1分間ほどエタノールで固定しこれらを使用した場合は、いずれも核が青紫色に、仁と細胞壁に沿った細胞質部分が薄桃色に染色された。

④ピロニン、メチルグリーンともpHにより発色が影響されることが知られている。処方Cは酢酸緩衝液が含まれているためか、押しつぶした後のメチルグリーンの退色が少なかったように思われた。反面、原形質の収縮が若干見られた。

⑤方法Ⅰの結果では、成長点付近の細胞は小形で仁の大きい核が密に並んでおり、拡大すると、染色体が確認できるが周囲の細胞質は透明であった。方法Ⅲの結果では、成長点付近は全体が濃桃色で、拡大すると、染色体が確認できるが周囲の細胞質は濃桃色であった。両結果を比較することにより、染色体の動きのみに注目するのではなく、静止期であっても分裂時の細胞が盛んにRNAを合成していることを実験的に確認することができた。

おわりに

ピロニン・メチルグリーン液の利用は、細胞と細胞分裂の理解に有効に作用すると思われる。

今回の実験に際し元横浜国立大学教授の斎藤実先生に貴重な色素をいただき、文献をお貸しいただいた。厚くお礼申し上げます。

参考・引用文献

- 1)3) 横浜市大木原生研, 1993, バイテク研究会実験法
- 2) 篠田秀子, 1994, 県立教育センター研修レポート
- 4) 笹隈哲夫, 1993, 県立教育センター研修講座
- 5)6) 山田卓三他編, 1980, 新しい教材生物の研究
- 7) 楠元守, 1983, 簡易体細胞分裂観察法 神生研
- 8) 伊東俊夫, 1954, プレパラート製作法 中山書店
- 9)10) A. G. EVERSON PEARSE HISTOCHEMISTRY