慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	文系学生を対象とした新しい生物学学生実験の開発 : 人工赤潮による植物プランクトンの大量増殖の実験
Sub Title	Development of a new biology experiment for non-science majors: experiment on proliferation of phytoplankton in artificial red tide
Author	豊田, 健介(Toyoda, Kensuke) 福澤, 利彦(Fukuzawa, Toshihiko)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2011
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 (The Hiyoshi review of the natural science). No.50 (2011. 9) ,p.3- 20
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	50号記念号 原著論文
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20110930-0003

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Hiyoshi Review of Natural Science
Keio University No. 50, 3-20 (2011)

文系学生を対象とした新しい生物学学生実験の開発

――人工赤潮による植物プランクトンの大量増殖の実験――

豊田健介*・福澤利彦*

Development of A New Biology Experiment for Non-Science Majors
—Experiment on Proliferation of Phytoplankton in Artificial Red Tide—

Kensuke Toyoda, Toshihiko Fukuzawa

1．はじめに

近年の目に見えた環境変化は，地球規模で生物に大きな影響をもたらしている。大学における一般教養科目としての“生物学”では，生命の成り立ちや，生物（ヒトを含む）にかかわる現象を，様々な観点から教えることが求められている。とりわけ，環境問題に関心が高まっている現代においては，生物・環境・社会がからみ合うテーマを設定し，学生に考察させることの意義は大きい。そこで，筆者らは赤潮という自然界の現象をテーマとして取り上げ，文系学生向けの新たな学生実験プログラムを開発した。

赤潮は，動植物プランクトンの異常増殖により，海，川，運河等の水面が変色する現象の総称であり，水の色が赤く染まることが多いために「赤潮（Red Tide，Bloom）」と呼ばれる。赤潮主因プランクトンの種類によって，茶褐色・黄褐色・緑色などの場合もある（図1は渦鞭毛藻類が要因の赤色）。赤潮の発生は，水系の富栄養化によるものが主な原因とされているが，護岸工事などによる潮流の改変や干潟の埋め立て，突発的な気温上昇，陸水や降雨による塩分低下など，様々な要因が考えられている。特定の種のみが大量に増殖するため，多くの場合，その水域に本来あるはずの種多様性が損なわれる事が多い。赤潮は，富栄養化（主にリンや窒素など）が進行しすぎた水域の自然浄化作用的な役割があるとも考えられるが，漁場被害が甚だしく，また，プランクトンの毒化も度々生じるため，毎年，数億円以上の被害が国内で報告される。赤潮の発生と被害については，環境汚染・自然の浄化・水産業被害・訴訟など，様々

* 慶應義塾大学日吉生物学教室（〒223-8521　神奈川県横浜市港北区日吉4-1-1）：Department of Biology, Keio University, 4-1-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8521, JAPAN
[Received Mar. 23, 2011]

図１．2010年６月中旬，静岡県伊豆市駿河湾における赤潮

な分野がからむ，自然と社会を如実に表わす現象と言える。

今回，赤潮の主因構成種として報告される海産浮遊性珪藻類を材料に用い，赤潮の発生要因について理解を深めることを目的として実験プログラムを組み立てた。学生には，15℃および25℃の温度条件で培養された珪藻を観察させ，細胞の計数とクロロフィル量の測定を課し，自然海域における珪藻の増殖と赤潮発生の因果関係を考察させた。2010年度慶應義塾大学日吉「生物学Ⅱ」において授業を実施し，その結果を検証したので報告する。

２．実験プログラムの背景と原理

2－1．珪藻類について

藻類とは，酸素発生型の光合成を行う生物の内，コケ植物，シダ植物，種子植物を除いたものの総称である。現在の地球上の生物により生産される有機物量の50%程度は，藻類によるものであると報告される。その中でも，海洋植物プランクトンのグループは，亜熱帯域に生育する全ての陸上高等植物と同等の炭素固定をおこなっていると予測されている。藻類は，自然水域の環境を考える上で非常に重要な役割を担っている生物であり，現在の地球環境を維持する為には必要不可欠である植物グループと言える。その中でも珪藻類は，生育環境や種が最も多様化した生物群の一つである。原始生物として紹介されることもしばしば見受けられるが，実際は，白亜紀以降（約８千万年前）に誕生した比較的新しい生物群である。珪素（ガラス）を主成分とする微細な殻を持ち（図２，図３参照），その種数は10万種とも100万種とも言われている。浮遊性，付着性，運動性といった特徴の異なる様々な種が存在し，海水，汽水，そして，淡水域と極域も含め，地球上の水分があるところならたいていどこにでも生育する。全て

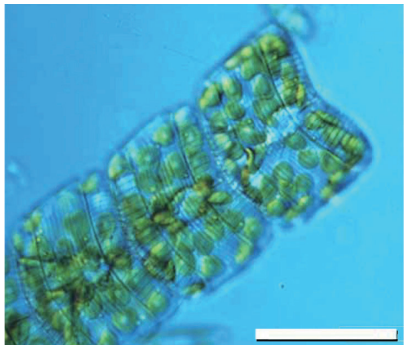


図２．アクナンテス属の種（光学顕微鏡写真）。透明な被殻の中に粒状の葉緑体が複数観察される。スケール=100μm

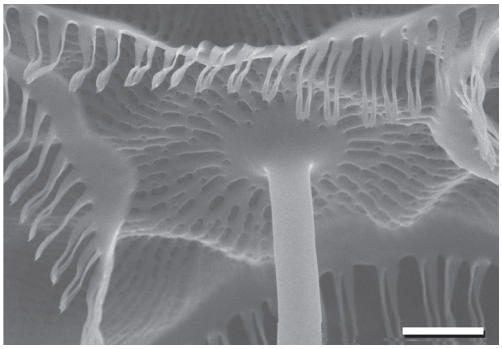


図３．ディティルム属の種（走査電子顕微鏡写真）。細胞の外壁は，SiO_2を主成分とする複雑な構造を形成している。スケール＝5 μm

の珪藻類は，核や葉緑体などの細胞質がケイ酸質（$Si_2(OH)_2O_2^-$）の被殻と呼ばれる複雑な構造の殻に覆われており，0.5~300μm 程度の大きさである。通常，光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた観察が行われる。

2－2. 種の選定および培養株の構築

本学生実験では，赤潮主因種として報告される単細胞浮遊性珪藻の *Chaetoceros affinis* Lauder 1864（キートケロス・アフィニス，図４）を実験対象種とした。本種は，運動性がなく，細胞の大きさは小型のものでも15μm 程度であり，学生実験に用いる光学顕微鏡（倍率400倍）においても十分に細胞の観察が行える。また，海水培養液中において最大 5×10^5cells/ml 以上の増殖が安定的に得られ，本実験プログラムで扱う植物プランクトンとして適していることから選定した。学生実験で用いる細胞は，2010年６月に東京都港区お台場海浜公園の海水より採集した。その後，直径20μm 程度に引き延ばしたパスツールピペットを用いて，採集された海水より本種１個体の単離を行い，培養条件下で増殖させた。培養液としては，0.2μm フィルターによりろ過した自然海水に，f/2培養液（Guillard and Ryther 1963, Sigma-Aldrich, Tokyo, JAPAN），ビタミンミックス（Sigma-Aldrich, Tokyo, JAPAN） 1 ml/L，飽和シリカ溶液（Na_2SiO_2）50μl/L を添加したものを用いた（pH7.8~8.0）。ある程度の安定的な増殖を得られた株を用いて，テトラサイクリンやペニシリンなどの抗生物質を複合した AM 9（Provasoli *et al.* 1959）およびアンピシリンを混ぜた海水培養液中において培養を行うことにより，細胞の無菌化の処理を施した。学生実験に使用される細胞は全て１個体からのクローンであること，そして，無菌であることから，サンプルによる１個体のクロロフィル含有量や増殖速度の相違，バクテリアによる殺藻の影響をほとんど考慮する必要が無い。得られたクローン細胞を1000cells/ml の細胞濃度で植物培養用フラスコに複数株用意し，各々 15℃および25℃の温度条件において14L：10D 明暗周期により１週間培養を行い，実験試料とした。

図４．*Chaetoceros affinis* の群体

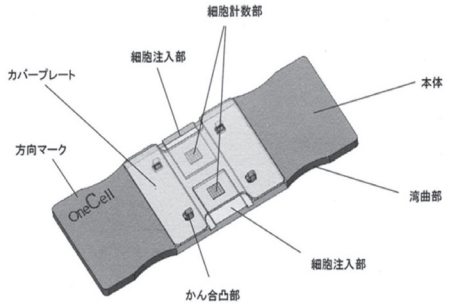


図５．ワンセルカウンタープレート概図

2－3. 計数盤による細胞の計数

ある水域の植物プランクトンの細胞密度のデータを得る方法として，血球計数盤による光学顕微鏡下での細胞の直接計数が，海洋調査の現場では行われている。ガラス製のフックスローゼンタールタイプの計数盤を用いて細胞の計数を行うことが一般的だが，本実験では，利便性を考慮し，プラスチック製のワンセルカウンタープレート（ERMA INC., Tokyo, JAPAN）を用いた（図５）。本計数盤において，４つの領域の細胞を計数して，平均値を出し，10^4を積算することによって細胞密度を求めることができる。つまり，最小可能計数細胞密度は2.5×10^3cells/ml となる。このセルカウンターには細胞計数部が２箇所あるので，１枚のプレートで２回の計数が行える。プレートはディスポーサルタイプであるが，数時間蒸留水に漬けた後に，超音波洗浄機で数分洗浄を行うことにより，再利用可能であることを確認した。

2－4. クロロフィルと植物生産量の測定

全ての酸素発生型光合成を行う生物は，光合成における明反応において，光エネルギーを吸収し，水から電子を得るための媒体として葉緑素（クロロフィル，Chl.）を持つ。主にクロロフィル *a, b, c1, c2, d, f* が存在し，各々の色素では，吸収できる光の波長が異なる。これらの中で，光合成細菌以外の酸素発生型光合成を行う全ての植物は，緑色色素である Chl.*a* を持つ。Chl.*a* の最大吸光スペクトルは430nm（青）と660nm（赤）周辺である（図６）。この吸光の

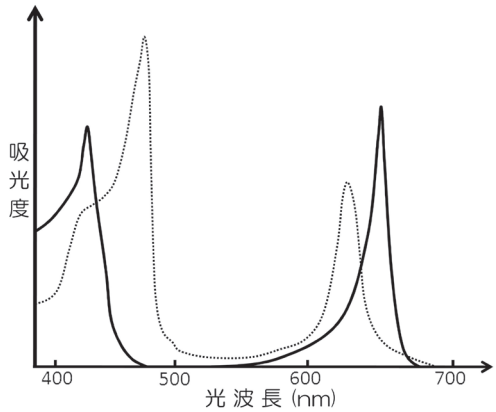


図６．クロロフィル*a*（―）および*b*（----）の吸光度

特性を利用し，クロロフィルを抽出し，分光光度計でクロロフィルを定量することにより，湖沼や海洋などのフィールドにおける植物生産量のデータを得ることができる。今日では，人工衛星を用いて海洋の吸光度を観測することにより，地球規模での植物プランクトンの総生物生産量が推定されている。光合成生物により，細胞の大きさやクロロフィル含有量が異なるため，ある特定の自然水域における全植物生産量を知るためには，生物個体数を計数して推定する方法よりも，クロロフィル量を測定して推定する方が適している。

クロロフィルはポルフィリン環にフィトール鎖がエーテル結合した構造を持ち，脂溶性物質である。水には溶けにくく，有機溶媒には溶けやすい性質を持つ。従って，アセトンやメタノール，ジメチルホルムアミドなどの有機溶媒を用いて細胞からクロロフィルを抽出するのが一般的である。しかし，多くの有機溶媒は劇物であるため，本学生実験では安全性を考慮して，80% エタノールによる抽出法を用いた。なお，予備実験において，問題なく珪藻の細胞からクロロフィルが抽出されることを確認した。

Chl.*a* の定量においては，異なるタイプのクロロフィルが混在した場合の吸光の影響を考慮し，通常は，664nm および630nm の２点の波長について吸光度を測定し，【Chl.*a*（μg/ml）$= 11.47 \times A_{664nm} - 0.40 \times A_{630nm}$】の式により Chl.*a* 量が求められる（Jeffrey & Humphrey 1975）。しかし，陸上高等植物とは異なり，珪藻類は，Chl.*a* と比較的近似した吸光スペクトルを持つ Chl.*b* を持たない（図６参照）。従って，珪藻類の Chl.*a* の吸光度を測定する際に，655nm 周辺では他の含有クロロフィルによる干渉が起こりにくいため，本学生実験では655nm の吸光度のみの測定を行うこととし，実験手法の簡素化に努めた。波長１点による吸光度測定では，厳密なクロロフィルの定量は行えないが，本実験の趣旨は異なる培養条件における複数サンプルの増殖の比較であるため，相対的な数値のみを扱うこととした。

図７．左：培養前（1.0×10^3cells/ml），右：培養後の人工赤潮（1.55×10^5cells/ml）。

３．実験プログラムの内容

3－1．実験要領

基本的に個人単位で実験を進めることとしたが，クロロフィル量の測定では，２人１組で実験操作を行うこととした。学生１人分の実験器具，試薬，実験試料を表１に示した。15℃の温度条件において1000cells/ml の細胞密度から１週間培養された人工赤潮の試料をサンプルＡとし，25℃をサンプルＢとした（図７参照）。実験のフローチャートを図８に示した。授業では，実験手順を示したプリント（資料１）を学生に配布した。また，新規学生実験を体験した学生の率直な意見を得るために，資料２に示したアンケートを配布した。

3－2．形態の観察（実験１）

細胞の形態観察は，実習用光学顕微鏡を用いて行い，本実験で用いる珪藻がどのような形態を持ち，どのようなものであるかを学生に認識してもらうことを目的とした。細胞密度が濃いサンプルＢのフラスコをよく振り，マイクロピペット（P20）を用いて20μlを取り出し，スライドガラスにのせる。カバーガラスをし，連鎖している細胞を選び400倍でスケッチすると共に，形態的特徴を記述する。被殻（ガラス質）や内細胞の構造をより明確に観察させるため，学生にはピント，光量，しぼりを随時調整するように指導する。

3－3．細胞の計数（実験２）

1）　培養細胞の入ったフラスコをよく振り，マイクロピペット（P20）を用いて10μlを取り出す。

2）　セルカウンターの脇（図９の細胞注入部）から１の溶液を10μlを注入する。

3）　顕微鏡を用いて100倍で各々４か所（図10左，A，B，C，D）の細胞数をカウントする。

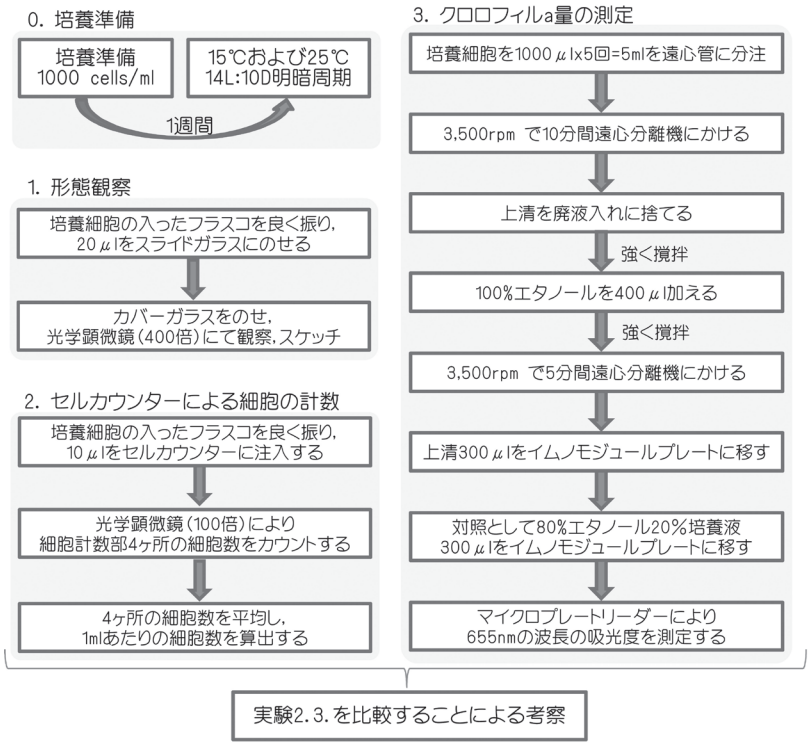


図８．実験フローチャート

表１．実験準備（機器・器具・試薬・実験試料）

準備したもの	必要数／学生	規格	備考
光学顕微鏡	1 台	正立	
プレートリーダー（分光光度計）	—	96well	1 クラス 1 台
遠心分離機	—	10ml 遠心管用	8 人に 1 台
ワンセルカウンタープレート	1 枚		再利用可
カウンター	1 個		
マイクロピペット 2 -20μl（P20）	1 本		
マイクロピペット100–1000μl（P1000）	1 本		
ピペットチップ -20μl	1 箱	96本入	テーブル共通*
ピペットチップ -1000μl	1 箱	96本入	テーブル共通*
スライドガラス	1 枚		再利用可
カバーガラス	1 枚	18×18mm	再利用可
イムノモジュールプレート	1 枚	8well	学生 2 人で 1 枚
遠心管	2 本	ガラス製10ml	
100% エタノール	400μl		1 テーブル 5 ml を準備*
20% エタノール80% 海水培養液	300μl		1 テーブル 5 ml を準備*
海水培養液	—		遠心機バランス用
培養サンプル A（15℃）	5.1ml	約5.0×10^4cells/ml	1 テーブル50ml を準備*
培養サンプル B（25℃）	5.1ml	約1.5×10^5cells/ml	1 テーブル50ml を準備*

*1テーブル8人

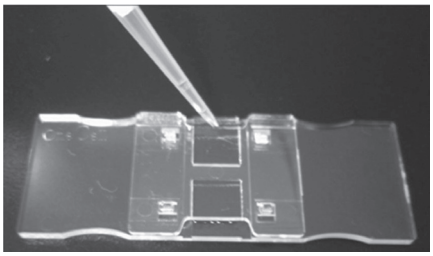


図９．計数盤の隙間から10μlの培養液を注入する。
上下合わせて２サンプルの計数が行える。

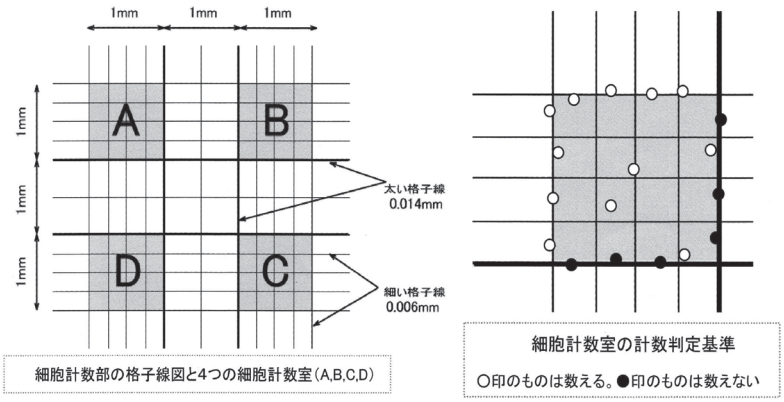


図10．細胞計数部の概図，A，B，C，Dの４ヶ所の領域上の細胞を計数する。
その際，太い格子線上の細胞は計数しないように注意する。

4）　４か所の細胞数を合計し，平均した値に10^4を積算し，１ml あたりの細胞数を算出する（小数第２位まで求める）。

過程１において，マイクロピペットを用いて培養細胞を取り出す際，細胞の多くはフラスコの底に沈んでいるため，フラスコを良く振り，直ちに10μlを取り出す事が重要である。細胞計数部A～Dの４ヶ所の領域上の太い格子線上の細胞は計数しないように注意する（図10右）。予備実験では，サンプルAの細胞密度は約5.0×10^4cells/mlであり，サンプルBは約1.5×10^5cells/mlであった。つまり，A～Dの領域上で計数される総細胞は，サンプルAにおいて約20細胞，サンプルBについて約60細胞である。

3－4．クロロフィルaの測定（実験３）

1）　培養養細胞の入ったフラスコをよく振り，マイクロピペット（P1000）で1000μlを遠心管に入れる。この操作を５回行い，全量を5000μlとする。

2）　培養液を用いてバランスをとり，3,500rpmで10分間，遠心分離機にかける。

3）　沈殿を確認し，上清を廃液入れに捨てる。

4）　内容物をこぼさないように，強く撹拌する。

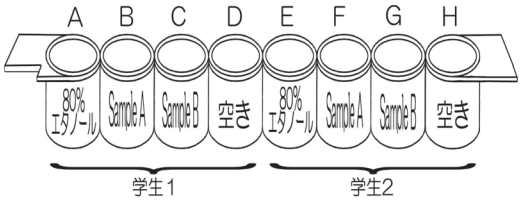


図11．イムノモジュールプレート，指定した箇所にサンプルを注入する。

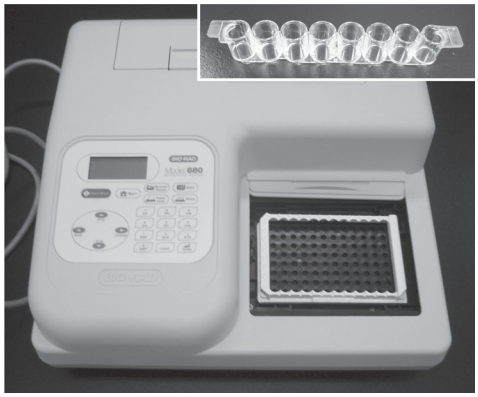


図12．BioRAD社，プレートリーダー　一度に96well24人分を測定することができる。

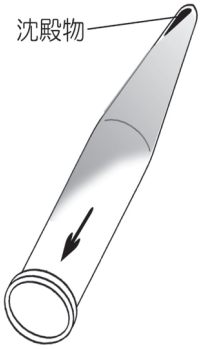


図13．遠心管模式図

5）　マイクロピペット（P1000）を用いて，100% エタノールを400 μl 加える。

6）　強く撹拌する。

7）　3,500rpm で 5 分間，遠心分離機にかける。

8）　マイクロピペット（P1000）を用いて，沈殿物を吸い取らないように上清300 μl をイムノモジュールプレートに移す（図11）。同時に対照として20% 培養液80% エタノール溶液を一番左のウェルに300 μl 入れる。

9）　マイクロプレートリーダー（図12）により，655nm の波長の吸光度の値を測定する。

10）対照の溶媒（20% 培養液・80% エタノール）自体が持つ吸光度の値を Sample A，B の吸光度の値から引き，純粋なクロロフィル a の吸光度の値を算出する。

過程 1 で細胞を取り出す際は，必ず，フラスコを良く振るように指示する。過程 3 において上清と共に細胞を破棄してしまわないように，図13のように，沈殿が確認される面を上にし，ある程度の勢いをもって捨てるよう指示する。エタノールを加えると，細胞同士の細胞外タンパク質の癒着が起こり，クロロフィル抽出効率が著しく悪化するため，過程 4 において細胞が均一に溶媒に分散するように強く撹拌する。エタノールにより抽出されたクロロフィルは，エタノールによる揮発と，自体の分解により吸光を示さなくなるため，抽出後は迅速にプレートリーダーにより吸光度を測定する。また，クロロフィル抽出に用いた溶媒自体の吸光を補正する為に，対照として80% エタノール・20% 海水培養液のみの吸光度も測定し，サンプル A，B の値から差し引きする事でクロロフィル a の吸光度の値を求める。

3－5．学生に与えた考察課題

本実験での結果と自然海域で起きる現象を関連付けて考察させるために，下記の 3 項目の考察課題を与えた。

1）細胞数を顕微鏡下で計数した値と，クロロフィル a の吸光度の値を比較し，この結果からわかることを考察しなさい。
2）自然海水より植物プランクトンを量的に調べて測定するにあたり，本実習で行った 2 つの方法（細胞の計数・クロロフィル量の測定）のメリットとディメリットを考察しなさい。
3）今年の夏は比較的降雨が少なく，観測史上最も暑かった夏と言える。多くの地域において，表層海水温が例年より 3 ～ 5 ℃高くなった事が報告されているが，これにより，自然海域においてどのような現象が起こることが予測されるか考察しなさい。

本年は猛暑が続き，台風もほとんど発生せず，表層海水温が例年より 3 ～ 5 ℃程度あがっているため，各地で赤潮が多発した可能性がある。そこで，実験結果を踏まえて，自然海域での状況を予測し，考察させた。また，今回の実験プログラムを体験した学生に対して，授業全般に関するアンケートも実施した。

4．実験プログラムの実施と検証

4－1．授業実施と学生の予備知識

2010年度慶應義塾大学秋学期の「生物学 II」において，文系学生 4 クラス（計89人）で本実験プログラムを実施した。授業時間は，2 時限連続の 3 時間であるが，その内，前半の50分を講義・実験説明にあて，残り130分を実験およびレポート作成にあてた。

アンケート結果によれば，授業を受けた全ての学生は，赤潮という現象を事前に知っていた

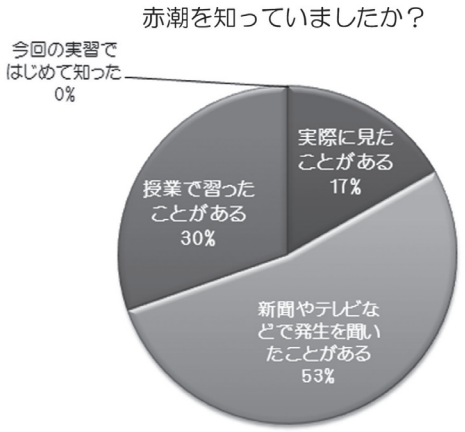


図14．アンケート項目１の結果

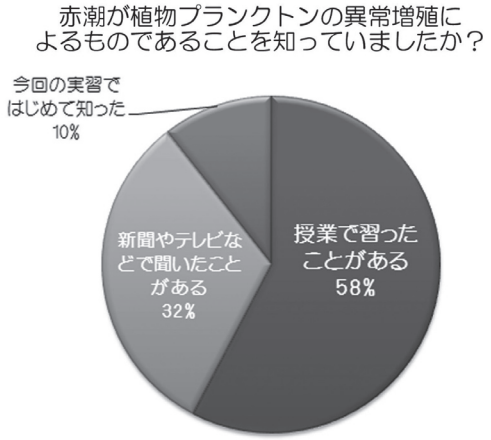


図15．アンケート項目２の結果

ことが分かった（図14）。また，赤潮の発生は，植物プランクトンが関与する現象であることも９割の学生が認知していた（図15）。一方，今回，赤潮を構成する生物を直接観察したのは初めてである学生が多かった（資料３参照）。

4－2．形態の観察について（実験１）

本実験の受講生は，春学期の「生物Ⅰ」において，既に顕微鏡の基本的操作方法を習得していた。そのため，多くの学生については，珪藻の細胞の観察に特別支障は感じられなかった。しかし，実験試料であるキートケロスは群体形成種であるため，群体を１細胞として認識する学生も多く，注意が必要であった。例えば，図４に示した群体は９細胞から構成されている。個々の細胞を認識することは，実験２において，細胞を計数するために必要不可欠である。また，試料の中には死細胞も多く含まれており，生細胞と死細胞の区別を行えるように，この段階で，しっかりと個々の細胞を認識できるように指導を行う必要があった。

4－3．細胞の計数について（実験２）

光学顕微鏡下でセルカウンターを使用する際，格子線が確認できないことが原因で，細胞計数部にピントを合わせる事に苦労した学生が多く，随時，しぼり，ピント，光量の調節を指示した。また，細胞を取り出す際，フラスコを良く振らなかった等の理由で，フラスコ内の細胞密度に偏りが生じ，計数部に１細胞も観察されないケースもあった。この際には，新たなセルカウンターを配布し，再度，やり直すように指示した。死細胞の多くは，被殻内の葉緑体（黄褐色）が失活しており，無色透明に観察される。しかし，中には，生細胞とも死細胞とも認識できる個体が存在し，それらを計数するかどうかは学生の判断に任せた。

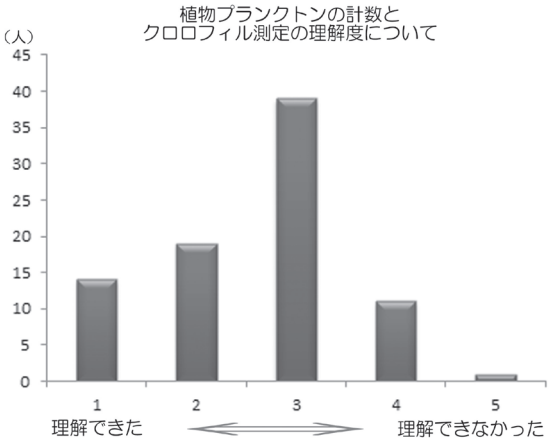


図16．アンケート項目３の結果（平均＝2.6）

4−4．クロロフィル a の測定について（実験３）

25℃のサンプルＢは，15℃のサンプルＡよりも細胞数が多く，セルカウンターによる計数値，Chl.a 量の測定値とも，２倍以上の数値を示すはずだったが，約１割の学生の答えは，細胞の計数値とクロロフィル量の測定値が培養温度と相関しない結果になった。この原因としては，(1) 細胞をフラスコから取り出す際に，フラスコを良く振らず，細胞がほとんど含まれない上清をサンプルとしてしまった可能性，(2) マイクロピペットの誤操作により計量ミスが生じてしまった可能性，が考えられる。

4−5．学生に与えた考察について

考察１に関して，本来，正確な実験操作が行われた場合には，細胞の計数値とクロロフィル a の測定値は，培養温度と相関するはずであった。しかしながら，前述のように，約１割の学生では予想に反する結果が得られた。しかし，どちらのサンプルの細胞密度が高いかは，実験前にフラスコの培養液の色の濃度で判断でき，サンプルＡ（黄色）の方が，サンプルＢ（黄褐色）よりも細胞密度が低いことが分かる。予想に反する結果が生じた学生には，フラスコの色から細胞密度の違いを確認させた上で，実験操作ミスの可能性も踏まえて考察するように指導した。なお，アンケートによれば，大多数の学生は細胞の計数とクロロフィル測定について，理解していたことが分かる（図16）。

考察２では，セルカウンターを用いた細胞の計数とクロロフィルの定量におけるメリットとディメリットを考察させた。多くの学生は，クロロフィル量の測定の方が細胞の計数よりも信頼のおけるデータであると判断していた（資料３参照）。クロロフィル量の測定実験は，マイクロプレートリーダーという高価な実験機器を使うため，正確なデータが得られるが，顕微鏡による細胞の計数はローテクノロジーのため，正確ではないと感じたようだ。しかし，実際は，どちらも水域の調査において行われている手法であり，各々のメリットとディメリットを補い

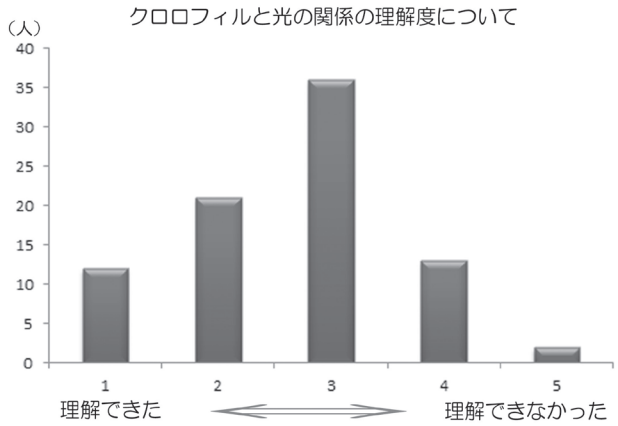


図17．アンケート項目４の結果（平均＝2.7）

合える手法である。また，クロロフィルと光の関係の理解度に関するアンケートでは，あまり理解できなかったとする学生が約２割におよび，クロロフィル量の測定法について，もっと分かりやすく説明する必要があると思われる（図17）。考察２に関しては，以下のようなメリット・ディメリットを挙げることができる。

○細胞の計数のメリット

自然水域には様々なプランクトンが存在する。細胞を顕微鏡を用いて肉眼で計数することにより，対象としたい種のみの細胞数を計数することが可能である。

○細胞計数のディメリット

同時に数サンプルのみの計数しか行えず，大量のサンプルの計数を行わなくてはならなくなった場合には非常に時間がかかる手法である。

○クロロフィル量の測定のメリット

同時に大量のサンプルを処理することができ，また，クロロフィル量を知ることにより，サンプル全体の炭素固定量を推測することが可能である。

○クロロフィル量の測定のディメリット

自然水域から得たものをサンプルとした場合，様々な植物プランクトンが含まれていることから，特定の種だけを対象とした測定を行うことが困難である。

今回，対象生物として扱ったキートケロス・アフィニスについては，多くの赤潮主因藻類と同様に，海水温の上昇と共に大量増殖する事例が自然海域のデータからも得られているが，逆に，海水温の低い時期（冬など）において，貧栄養水域に大量増殖する種も存在する。考察３に関して，多くの学生は「温度上昇＝赤潮」というように考察していたが，特定の生物種を使った特定の実験の結果が，そのままあてはまらない自然現象も存在するという事も解説する

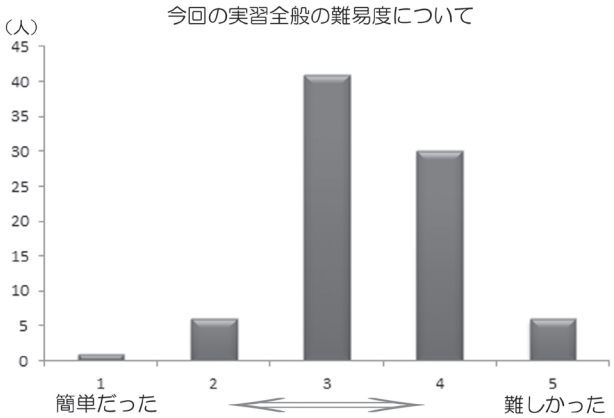


図18．アンケート項目５の結果（平均＝3.4）

必要があったと反省させられる。

4－6．今後の改善点

環境変化によって引き起こされる自然現象をテーマとして設定し，観察や測定を通して生物と環境の関係を考察させることには大きな意義があると考えられる。本実験プログラムでは，大多数の学生が実験に成功し，実験の趣旨を理解して考察を行った。予想通りの実験結果が得られなかった学生においても，その理由を多角的に考察しているケースが多く見受けられた。適切に実験プログラムを組み立てれば，多少難易度の高い実験でも，文系学生に実施する事は可能であると思われる。しかし，今回の実験プログラムには，改善すべき点もいくつか存在する。

本実験プログラム用の生物種を選定する条件として，(1) 細胞密度5.0×10^5cells/ml 以上の増殖が安定的に得られること，(2) １細胞の大きさが15μm 以上50μm 以下であること，(3) 運動性が無いこと，(4) 赤潮主因生物として報告があること，が必要とされた。今回，学生実験の対象種としたのはキートケロス・アフィニスであるが，本種は群体形成種であることから，計数盤による細胞の計数の際に誤差が生じる可能性がある。今後，別の単体性の種を試料として検討する必要があるかもしれない。

実際の授業では，約１/５の学生が時間内にレポートを提出できず，実習時間をオーバーしてレポートを書いたり，持ちかえって後日提出した学生もいた。アンケート結果（図18）および学生からのコメント（資料３）によれば，今回の実験プログラムの難易度が高いと感じた学生は少なからず存在した。学生は，光学顕微鏡，マイクロピペット，遠心分離機を使った，複合的な操作に戸惑った可能性がある。実験前にマイクロピペット操作の練習を良く行い，遠心分離の過程を1.5ml マイクロチューブ使用の卓上小型遠心機に変更するなど，一層の実験の簡素化と実験所要時間の短縮を検討する必要性があると思われる。

5．終わりに

本学生実験プログラムでは，「珪藻」という生物が引き起こす「赤潮」という現象を通して，今日の地球環境の底辺を支える生産者の役割を知ってもらい，そして，植物プランクトンの研究に使われる実験手法を体験してもらった。「人の活動による，二酸化炭素などの温室効果ガスの大量排出がもたらす地球温暖化」は，今日の環境問題の大前提としてとらえられている。これらを科学的に支持する研究データは取得されつつあるが，人社会が原因であるか否かということは必ずしも明らかにされていない。しかし，近年の異常とも思われる気象の偏りは，間違いない事実である。理系・文系を問わず，近代社会で生活を営んでいく限り，生物と環境の関係性を学ぶことは，ますます重要になっている。本実験プログラムが，自然と人と社会の繋がりについて考える契機になればと切に思う。

6．謝辞

本実験プログラムの開発は，慶應義塾大学（日吉）調整費の支援によって行われた。

7．参考文献

Guillard, R.R.L. & Ryther, L.H. 1963. Studies on marine planktonic diatoms.I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* Cleve. *Gran. Can. J, Microbiol,* 8: 229–239.

Jeffrey S. W. & Humphrey G. F., 1975. New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c 1 and c 2 , Biochem. *Physiol. Pflanz.,* 167: 194–204

Provasoli.L., Shiraishi.K. & Lance J.R. 1959. Nutritional idiosyncrasies of *Anemia* and *Tigriopus* in monoxenic culture. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,*77: 250–261.

資料１：学生実験概要（配布資料　Ａ４サイズ―２枚）

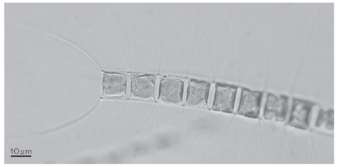
「人工赤潮による植物プランクトンの大量増殖の実験」

【背景と目的】

赤潮は，植物プランクトンの異常増殖により，海，川，運河等の水面が変色する現象の総称であり，水の色が赤く染まることが多いために「赤潮」と呼ばれる（赤潮主因プランクトンにより，茶褐・黄褐・緑色など）。赤潮の発生する要因は，水系の富栄養化によるものが主な原因とされているが，護岸工事などによる潮流の改変や干潟の埋め立て，突発的な気温上昇（温暖化）などが一因とも考えられている。赤潮は，富栄養化が進行しすぎた水域の自然浄化作用的な役割があると考えられるが，漁場被害が甚だしく，また，プランクトンの毒化も度々生じるため，毎年，数億から数百億円の被害が国内で報告される。赤潮の発生と被害については，自然の回復・環境汚染・漁業被害・訴訟と様々な分野がからむ，自然と経済を如実に表わす現象と言える。本実習では，赤潮の主因構成種となる珪藻類を用いて，異なる温度条件により培養された人工赤潮を観察し，細胞数の計数とクロロフィル量の測定を行うことにより，海水温度による細胞の増殖の変化を調べる。この結果をもとに，自然海域において，「赤潮」が発生する要因として温度がどの様に関わるのかを考察することを目的とする。

【材料】

ストラメノパイル・不等毛植物門・珪藻綱
Chaetoceros affinis Lauder 1864
（キートケロス・アフィニス）
Sample A　→　15℃
Sample B　→　25℃
○　シリカ+ビタミン添加海水培養液を用いて14時間明期/10時間暗期の条件で7日間培養
○　培養初期細胞密度は 1000 cells/ml



【方法】

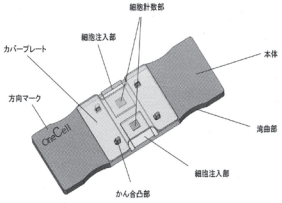
1. 形態の観察

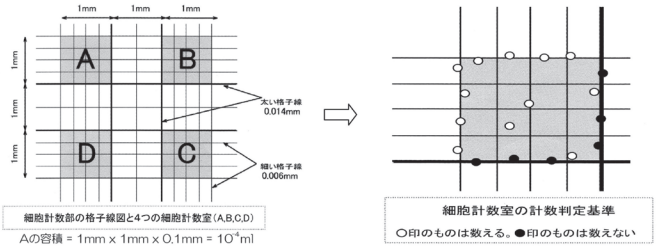
Sample B のフラスコをよく振り，マイクロピペット（P20）を用いて 20μl を取り出し，スライドガラスにのせる。カバーガラスをし，連鎖している細胞を選び 400 倍でスケッチする。形態的な特徴も記述しなさい。細胞がよくスケッチできるように，ピント，光量，しぼりを随時調整すること。

2. 細胞の計数と観察

① 培養細胞の入ったフラスコをよく振り，マイクロピペット（P20）を用いて 10μl を取り出す。
② セルカウンターの脇（右図の細胞注入部）から①の溶液 10μl を注入する。
③ 顕微鏡を用いて 100 倍で各々4 か所（次ページ模式図 A,B,C,D）の細胞数をカウントする。
④ 4 か所の細胞数を平均し，1ml あたりの細胞数を算出する（α は小数第 2 位まで）。

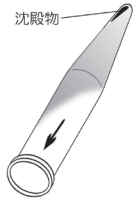
$$\frac{(A+B+C+D)}{4} \times 10^4 = \alpha \times 10^{\beta} \text{cells/ml}$$





3. クロロフィル *a* の測定

① 培養細胞の入ったフラスコをよく振り，マイクロピペット（P1000）で 1000μl を遠心管に入れる。この操作を 5 回行い，全量を 5000μl とする。
② 培養液を用いてバランスをとり，3,500rpm で 10 分間，遠心分離機にかける。
③ 沈殿を確認し，上清を廃液入れに捨てる。
⑤ 内容物をこぼさないように，強く撹拌する。
⑥ マイクロピペット（P1000）を用いて，100%エタノールを 400μl 加える。
⑦ 強く撹拌する。
⑧ 3,500rpm で 5 分間，遠心分離機にかける。
⑨ マイクロピペット（P1000）を用いて，沈殿物を吸い取らないように上清 300μl をイムノモジュールプレート（下図）に移す。同時に対照として 20% 培養液 80%エタノール溶液を一番左のウェルに 300μl 入れる。



⑩ マイクロプレートリーダーにより，655nm の波長の吸光度の値を測定する。
⑪ 対照の溶媒（20%培養液 80%エタノール）自体が持つ吸光度の値を，Sample A, B の吸光度の値から引き，純粋なクロロフィル *a* の吸光度の値を算出する。

【考察】

1. 細胞数を顕微鏡下で計数した値と，クロロフィル *a* の吸光度の値を比較し，この結果からわかることを考察しなさい。
2. 自然海水より植物プランクトンを量的に調べて測定するにあたり，本実習で行った 2 つの方法（細胞の計数・クロロフィル量の測定）のメリットとディメリットを考察しなさい。
3. 今年の夏は比較的降雨が少なく，観測史上最も暑かった夏と言える。多くの地域において，表層海水温が例年より 3~5℃高くなった事が報告されているが，これにより，自然海域においてどのような現象が起こることが予測されるか考察しなさい。
4. アンケートの記入（無記名）

資料２：人工赤潮による植物プランクトンの大量増殖の実験―アンケート原本―

【アンケート】　　曜日　　限

1. 赤潮を知っていましたか？
   ① 実際に見たことがある
   ② 新聞やテレビなどで発生を聞いたことがある
   ③ 授業で習ったことがある（ような気がする）
   ④ 今回の実習ではじめて知った　＿＿＿＿

2. 赤潮が植物プランクトンの異常増殖によるものであることを知っていましたか？
   ① 授業で習ったことがある（ような気がする）
   ② 新聞やテレビなどで聞いたことがある
   ③ 今回の実習ではじめて知った　＿＿＿＿

3. 植物プランクトンの計数とクロロフィル測定の理解度について（数字で答えて下さい）

   1　2　3　4　5
   理解できた　普通　理解できなかった　＿＿＿＿

4. クロロフィルと光の関係の理解度について（数字で答えて下さい）

   1　2　3　4　5
   理解できた　普通　理解できなかった　＿＿＿＿

5. 今回の実習全般の難易度について（数字で答えて下さい）

   1　2　3　4　5
   易しかった　普通　難しかった　＿＿＿＿

6. 難しいと答えた人はどのような事が難しかったのかを書いて下さい

7. その他，気がついた点や要望，感想を書いて下さい

資料３-１：人工赤潮による植物プランクトンの大量増殖の実験―アンケート項目６回答―

アンケート結果　項目6．難しいと答えた人はどのような事が難しかったのかを答えて下さい。

- ○ クロロフィルについての理解がいまいち追いつかなかった。
- ○ 顕微鏡で細胞を探したり，細胞計数部の格子線図を探せなかったので，先生に見つけてもらった。あと，クロロフィルと光の関係をもう少し詳しくゆっくりと説明してほしかった。
- ○ 過程が複雑で，注意を要し，数値などの失敗が生じるのではないかといった不安がつきまとったため，難しかったという印象がある。
- ○ 作業は簡単だったけど，内容を理解するのが難しかったです。
- ○ 吸光度など分からない。言葉の説明をしてほしい。
- ○ 失敗した。
- ○ 細胞の数をかぞえるのは誤差がでやすいが，そこでの誤差が考察にひびきわかりにくい。
- ○ クロロフィルが何なのか把握できていない
- ○ 手順が多かった。
- ○ マイクロピペットを多用するのが難しかった。
- ○ マイクロピペットの使用頻度が多く，細かい作業にともなうデータのずれ。
- ○ 植物プランクトンの計数とクロロフィル測定の内容，又それぞれの植物プランクトンの量との関係性が難しかった。
- ○ いつもよりやることが多かったので，難しかったというより大変だった。
- ○ 作業がいろいろあったので手間取って，ちょっと混乱した。
- ○ クロロフィルの吸光度のこと。
- ○ クロロフィルの測定についてあまり理解できなかった。
- ○ 作業が長くて大変だった。
- ○ クロロフィル a の吸光度の値を算出する際，間違った値が出てしまった。手順が複雑だったことが難しかったです。
- ○ 語句が難しくて，それぞれの関係性がわからなかったので，結果によって考察することが難しかった。
- ○ 顕微鏡で細胞を数える時，どれが一つの細胞かわかりにくい。マイクロピペットの使い方を少しまちがえると結果に大きく影響してしまう。
- ○ 顕微鏡の扱い方を忘れていたので。
- ○ 遠心管のバランスを取るのが難しかった。
- ○ 顕微鏡での操作が久しぶりだったので勝手がわからず，てまどってしまった。また，結果でも，予想とちがったものとなってしまい，操作ミスをしてしまったのだろうと思われる。
- ○ 作業が多くて大変でした。
- ○ 実験の過程が複雑だと思った。
- ○ クロロフィル測定の式。
- ○ 考察の部分が難しすぎて，自分の力で考えられなかったです。

資料3－2：人工赤潮による植物プランクトンの大量増殖の実験―アンケート項目7回答―

アンケート結果　項目7．その他，気がついた点や要望，感想を書いて下さい。

○ 質問にすぐに答えてくれてよかった。
○ 難しいというよりは過程が多かった
○ 新しい器具の使い方とかを実際にやってほしかった。
○ 赤潮という身近な事象についてのことだったので最初の説明の時間がとても面白く感じた。
○ 実験3で，マクロプレートリーダーの結果の紙がどこかへやってしまった人がいたので，徹底した方が良いと思った。
○ 実験の量が多くて，やるべきことがたくさんあったので大変でした。顕微鏡で観察するのが苦手だから，時間を取ってしまったのが残念…。でも，クロロフィルの実験は上手くいって成功したので，良かったです!!赤潮と温度が関係あることを知ってびっくりしました。楽しい実験でした。
○ 実験は色々学べるが，焦ってしまう。
○ テーマが今までの遺伝に関することと，今回は違ったので新鮮な感じがしました。
○ 考察1，2からどのように3につながるのかがわからなかった。
○ 楽しかったです。
○ 難しいが生活に則した実験であると思った。
○ 吸光度があまりよくわからなかったです。
○ しっかりサポートしてもらえたので，安心して実験ができました。
○ Sample A と B が見た目にも色が違って面白かった。
○ 植物プランクトンの細胞数がそのままクロロフィル a の数値に直結していたことに感動した。
○ 難易度は DNA の実験よりも容易だった。
○ 細かい作業が多く，大変だった。
○ 赤潮に関連する授業ではあったけれど，もっと直接的に赤潮とプランクトンの関係が分かるような実験がよかった。
○ とても楽しい実験でよかったと思います。
○ 吸光度によって細胞の数がわかるのが理解できた。
○ 実験の意図が分かったので，良かったと思う。
○ 植物プランクトンは温度が高いと多く存在することがわかった。
○ 温度によるプランクトン増殖の変化がよく分かった。
○ 興味がわくような内容で楽しかった。身近なものがテーマだとすごい親近感がわくし，純粋に知りたいと思う。
○ 予定だった「重量感覚のサイエンス」は正直に言って，あまりやりたいものであると思わなかったが，今回の実習は，現在問題となっている環境問題とも非常に密接にかかわっているので良いと思った。
○ セルカウンターの説明がもう少し欲しかった
○ 実験でやったことと，赤潮とが，自分の中であまり関連づけられなかった気がする。赤潮の自然浄化作用をもう少し詳しく知りたかった。
○ 実験前の説明が身近で，分かりやすかった。実験が今までに比べて，若干難しかったので，やりがいがあっておもしろかった。
○ 最初に赤潮について詳しい説明をして下さったので，間違った値が出ても，考察をする際間違った答えを書かずに済みました。

○ 正確な結果が多分出なかったので考察するのが難しかった。
○ 手順が多くて多少忙しかった。
○ 特に内容が難しいとは思わなかったが，多くのミスによって結果に影響が出たのが残念だった。
○ 時間にもう少しゆとりがあれば，計数の回数を増やした方がもっと正確な値が出せると思います。今回は計数の範囲が狭かったので，細胞の数のバラつきが大きくなりすぎていたと思います。
○ 赤潮現象は，水（海）の色が赤くなることだとしっていたが，色が変わる現象自体が赤潮現象だということに気づいた。また，ニュースで聞いたことのあることについて実験を行ったので，面白かった。
○ 身近な環境問題と関連しているので，興味を持てて楽しかった。
○ 今日の実験は作業が多く，顕微鏡の操作に苦労したが，先生方の補助によって上手く事を進めることができました。ありがとうございました。
○ 一つの実験で，観察や計数や測定といろいろなことをやったので，学期初めのまだ実験に慣れていないときだと，いろいろと時間が余計に消費されたので時間内にレポートを提出できなかった。もう少し実験に慣れたころにやってもいいと思った。