

葉の断面の顕微鏡観察用試料の作成に関する研究

Research on preparation of specimens for microscopic observation of the structure of leaf cross-sections

中村琢¹, 田近葵²

NAKAMURA Taku¹, TAJIKA Aoi²

| | |
|------------------|---|
| [キーワード Keyword] | 植物の体のつくり, 葉の断面, 顕微鏡, 中学校理科, 維管束 |
| [所属 Institution] | ¹ 岐阜大学教育学部 (Faculty of Education, Gifu University), ² 岐阜大学大学院教育学研究科 (Graduate School of Education, Gifu University) |

[要旨 Abstract] 中学校理科第2分野の植物のつくりと働きの単元では, 葉の断面を薄く切断した試料を作成し, 維管束の構造を顕微鏡で立体的に観察する。この際の試料は, 葉脈の構造を観察するために, 主脈と垂直に100 μ m程度の均一な厚みに切断する必要がある。教科書等では試料の作成方法として, ピスなどの円柱形の別の材料を用いて, 上面に切り込みを入れ, 葉の切片をはさみ込んだものを, カッターナイフ等で材料ごと切り出す方法が紹介されている。しかし, この方法は試料の厚みの制御ができないために作成時に失敗が多く, 生徒実験としてやるには試料の生産効率が悪い。そこで, 試料を効率よく作成する方法を検討した。プレパラートで葉を押さえ, 第一段階としてプレパラートに沿って試料に90度の角度でカミソリの刃を引き, さらに第二段階としてそのままプレパラートを押さえた状態で, 試料に45度の角度でカミソリの刃を引くと, 厚みが均一で, かつ, 失敗する確率を10%以下に抑えることができた。教科書の方法も踏まえ, 試料作成方法と質について報告する。

1. はじめに

中学校理科第2分野, 生命領域の「植物のつくりと働き」の単元では, 植物の体の基本的なつくりを理解して, どのような働きをするのか, またその共通点や差異点に基づいて植物が分類できることを見いだすことなどを扱う。その際に, 葉の断面の構造を, 光学顕微鏡を用いて観察することは, 植物の体の構造を理解するうえで重要である。特に維管束は, 葉でつくられた養分が通る師管と, 根から吸い上げた水と養分が通る導管が立体的に束になって葉脈を形成していて, 根や茎に繋がっていることを示す。このため維管束の理解は, 植物が生命活動をしている様子を捉え, 植物全体の構造を知るうえで重要である。

葉の断面を観察するためには, 葉を薄くスライスした試料を切断面が光軸に垂直になるように, 透明なスライドガラスの上に置き, 光を葉の断面に透過させて観察する。葉の断面の構造を, 光学顕微鏡で隅々まで精密に, 明るい像として観察するためには, 試料の厚みをできるだけ均一になるようにし, かつ100 μ m程度の薄さにそろえてスライスすることが望ましい。100 μ m以上に厚くなると, 一般的な生物顕微鏡では光の透過率が低くなり像が暗くなる。また, 100 μ m以下の厚みにスライスすることは技術的に困難である。一般的な生物試料の顕微鏡観察では, 対物レンズの被写界深度は10 μ m程度であり, 対物レンズの焦点面を上下させることで葉の構造を立体的に観察できる。

教科書には葉の断面の顕微鏡写真やスケッチなどの概念図でその構造を示している。それらは顕微鏡観察をしない場合にも葉の構造を理解できるよう工夫されている。しかし, 試料の実物を手に取って顕微鏡を操作して観察することは, 立体構造を認識できるなど写真以上の情報を得られ, 実感を伴う理解につながるため, 顕微鏡で観察することの方が望ましい。教科書などの図では, 紙面のスペースの都合で, 光学顕微鏡の一視野の画像などのように, 葉の断面の一部分を掲載している例が多い。しかし, 実際の観察では, 葉の断面の試料は, 葉の端から端まで全体をスライスするため, 顕微鏡のステージを上下左右に動かして視野を追っていくことができることから, 葉の構造の詳細な特徴を捉えることができる。中学校には学習者に1人1台または, 数名の学習者に1台程度の光学顕微鏡が整備されているため, 試料を用意できれば, 観察は比較的容易にでき, スケッチなどを通してより詳細な気づきを得ることができる。また, 授業では異なる植物の葉を

観察することや、同じ種類の植物でも、個体は異なるため、互いに観察しあうことにより、その共通点や差異点を見だし、多様性の視点で考察することが可能となる。このように学習者が手を動かして観察することに意味がある。

加えて試料作成も学習者が行うことが望ましい。これは作られた試料は厚さが薄いので、断面と葉の表面の区別が難しい。断面と葉の厚みはともに0.1mm以下であり、プレパラート上で、断面と、葉の表面のどちらの面を観察面に置いているのかわかりづらいためである。

教員養成学部の子生向けの授業では、葉の断面を観察する実習が行われている。中学校の理科教科書で紹介されている方法で断面の試料を作成し、顕微鏡で観察するものであるが、試料作成がなかなか難しく、ねらい通りに顕微鏡観察ができないことが多い。そこで、本稿では葉の断面試料を作成する方法の難しさを分析し、作成の成功率が高い方法を検討する。

2. 教科書等における位置づけ

2.1. 学習指導要領における取り扱い

学習指導要領と解説で、該当の単元の取り扱いについて整理し、続いて検定教科書での扱いを整理する。表1に示すように、植物に関連する内容は小学校3学年から扱いがある。

表1. 学習指導要領における植物の体のつくりに関する内容

| 学 年 | 単 元 | 学 習 内 容 |
|-------|--|---|
| 小学校3年 | B 生命・地球 (1)身の回りの生物 | 植物の育ち方には一定の順序があること。また、その体は根、茎及び葉からできていること。 |
| 小学校4年 | B 生命・地球 (2)季節と生物 | 植物の成長は、暖かい季節、寒い季節などによって違いがあること。 |
| 小学校5年 | B 生命・地球 (1)植物の発芽、成長、結実 | 植物は、種子の中の養分を基にして発芽すること。植物の発芽には、水、空気及び温度が関係すること。植物の成長には、日光や肥料などが関係していること。花にはおしべやめしべなどがあり、花粉がめしべの先につくとめしべのもとが実になり、実の中に種子ができること。 |
| 小学校6年 | B 生命・地球 (2)植物の養分と水の通り道 | 植物の葉に日光が当たるとでんぷんができること。根、茎及び葉には、水の通り道があり、根から吸い上げられた水は主に葉から蒸散による排出されること。 |
| 中学校1年 | (1) いろいろな生物とその共通点、イ 生物の体の共通点と相違点、㉠植物の体の共通点と相違点 | 花のつくりを中心に扱い、種子植物が被子植物と裸子植物に分類できることを扱う。胚珠が種子になることにも触れる。裸子植物が単子葉類と双子葉類に分類できることについては、葉のつくりを中心に扱う。種子をつくらない植物が胞子をつくることにも触れる。 |
| 中学校2年 | (3)生物の体のつくりと働き、(ア)㉠生物と細胞 | 生物の組織などの観察を行い、生物の体が細胞からできること及び植物と動物の細胞のつくりの特徴を見出して理解する。植物と動物の細胞のつくりの共通点と相違点について触れる。 |
| | (イ) 植物の体のつくりと働き、㉠葉・茎・根のつくりと働き | 植物の葉、茎、根のつくりについての観察を行い、それらのつくりと、光合成、呼吸、蒸散の働きに関する実験の結果とを関連付けて理解する。光合成における葉緑体の働きにも触れる。葉、茎、根の働きを相互に関連付けて扱う。 |

※この表は、学習指導要領の内容の一部を抜粋し、関連する内容について筆者が編集した。

小学校では、植物の体のつくりと働き、季節による成長の違い、一年生植物の発芽、成長、開花、結実、枯死するまでの一生を扱い、さらに養分のできる過程や水の通り道について、条件を制御しながら実験・観察することにより理解させる。中学校では、植物の種類の特徴や相違点などから種類を分類すること、根、茎、葉などの組織を顕微鏡等で観察し、そのつくりと光合成、呼吸、蒸散などを関連付けて理解させる。茎や根の働きについては、水が根で吸収されること、水は根や茎にある維管束の中の導管を上昇することを茎などの断面の観察やデータと関連付けて理解させる。

2.2. 検定教科書における取り扱い

ここでは教科書で植物の試料作成を伴う観察についてまとめる。小学校第6学年では、植物を通常の栽培だけでなく、実験で用いて、詳細を観察するようになる。植物の水の通り道では、根から取り入れた水は植物の体のどこを通過して全体に運ばれるかについて、植物染色液や食紅などを用いて着色した水を植物に吸わせ、葉や茎に色素が運ばれている様子を観察することなどが紹介されている。この際に、葉は葉脈に沿って色素が運ばれている様子を肉眼で観察する。茎や根については、縦方向と横方向にカッターナイフで切り、色素で染まった部分に水が運ばれていることを確認する。中学校では葉の表皮細胞の観察や葉の断面の観察など、試料作成とともに扱っている。葉の断面の観察についての内容を表2に、観察による結果についての比較を表3にまとめる。

表2 教科書における内容の比較

| 出版社 | 葉の断面の試料作成法と観察の内容 |
|-----|---|
| A社 | ツバキの葉をなるべく薄く切り切片をつくる。切片はペトリ皿に入れた水に浮かべておく。プレパラートに載せ、顕微鏡で葉の断面のつくりを観察して、スケッチする。円筒形に成形した発泡ポリスチレン(または、ニンジンの根)の上面中央に垂直に数cm程の切り込みを入れ、その切り込みに葉の一部を切り取って入れる。カミソリの刃を上面に平行になるように横から当て、発泡ポリスチレンごとでできるだけうすく切る。 |
| B社 | ホウセンカの葉(またはツバキ、サザンカ、キャベツなどの葉など)の断面を双眼実体顕微鏡で観察する。細く切った葉を水に入れておく。たくさん切ると、そのうちのいくつかは、うまく切れているので、それを選んで観察する。ピスに切り込みを入れて、切り取った葉を差し込み、ピスの側面にカッターナイフの刃を垂直に当て、横から切る。 |
| C社 | ツバキの葉の断面を観察する。葉の一部を切り取ってピスに挟み、ピスごとうすく切って水に浸す。薄く切れたものを選び、プレパラートをつかって顕微鏡で観察する。ピスの上面に垂直に切り込みを入れ、四角に切った葉を挟む。カミソリの刃をピスの側面の奥側に当て、手前に刃を引くことにより、ピスごと薄く切る。 |
| D社 | 葉の断面のプレパラートをつくる。切れ目を入れたニンジンに小さく切った葉をはさみ、ニンジンごとT字かみそりで薄く切る。これを水が入ったペトリ皿に入れておく。うまく切れたものを選び、プレパラートをつくる。直方体に切ったニンジンの上面に垂直に数cmの切れ目を入れ、その切れ目に切り取った葉をはさみ、ニンジンごとカミソリで手前に引き、薄く切る。 |
| E社 | ピスに縦の割れ目をつくり、ツバキなどの葉の一部を切り取ってはさみ、できるだけ薄く切る。薄く切った切片を選んでプレパラートをつくり、顕微鏡で観察する。ピスの間に葉の一部を挟みカミソリの刃で後ろから手前に水平に引く図を示してある。 |

葉の断面の観察結果については、多くの教科書で顕微鏡写真の一視野分を載せ、その一部分に立体的な描面を書き込んで葉の構造を説明している。葉の構造を理解するためには効果的であり、顕微鏡観察ができなくても葉の構造の概要を理解できるように、工夫されている。しかし、肝心の維管束の部分はいずれも描面となっていて、顕微鏡写真を用いていない。一方、B社のみ1枚の葉の断面を端から端まで撮影した写真を載せているが、写真が小さいために内部の細胞や構造がわからない。このように教科書の誌面上での掲載は一長一短がある。

表3 葉の断面の観察結果についての取り扱い

| 教科書 | 観察結果の取り扱い | ページ数 |
|-----|--|------|
| A社 | ツバキの葉の断面の顕微鏡写真（カラー）とその一部分を描画にして、葉緑体、維管束、気孔、孔辺細胞の名称を紹介。維管束は立体的に描画を示している。「私のレポート」としてオオカナダモの葉の細胞のスケッチ、ツユクサの葉の裏側の細胞のスケッチ、葉の断面のスケッチを載せている。 | 2 |
| B社 | 染色した根の写真、茎の断面の写真、縦断面の写真、葉の断面の写真(内部構造が見えない)、葉の裏側の表皮細胞の顕微鏡写真を半ページで載せている。 | 0.5 |
| C社 | 方法の説明のところで、ムラサキツユクサの葉の表皮の表と裏の顕微鏡写真、ツバキの葉の断面の顕微鏡写真を載せている。結果のところで、ムラサキツユクサの葉の裏側の表皮のスケッチ、ツバキの葉の断面のスケッチ、ムラサキツユクサの葉の裏側の気孔の開閉の顕微鏡写真を載せている。 | 3 |
| D社 | 双子葉類のハウセンカと単子葉類のトウモロコシを比較できるように、茎の横断面写真、縦断面写真、茎の模式図、根の横断面写真、縦断面写真を載せている。双子葉類、単子葉類の維管束の図、ハウセンカとトウモロコシの茎の維管束の顕微鏡写真を掲載。葉の断面については一部分にのみピントの合った顕微鏡写真に、立体的な描画を加えることにより維管束と細胞の構造を示している。 | 2 |
| E社 | 結果のところで、ツユクサの葉の表皮(裏側)のスケッチ、ツバキの葉の断面のスケッチ、ツユクサの葉の表皮の表側と裏側の顕微鏡写真を載せている。ツバキの葉の断面の顕微鏡写真と、その一部分を立体的な描画、維管束、師管、導管、気孔の名称を説明している。 | 2 |

3. 教科書の方法による試料作成

ここでは、教科書に掲載されている方法で実際に試料を作成し、顕微鏡で観察して試料作成の質を評価する。

3.1. 準備物

T字カミソリ（DORCO社製で1枚刃、2枚刃、3枚刃を使用）、両刃カミソリ(フェザー安全カミソリS両刃(FEATHER, 型番:4902470010496)), 光学顕微鏡 (Nikon ECLIPSE E100), 時計皿, ツバキの葉, ピス(ニワトコの茎)。ピスとして使用するニワトコは落葉広葉樹の低木で、若い枝は緑色から灰褐色でコルク質であり、加工が容易にできる。

3.2. 試料作成の結果

(1)ピス（ニワトコの木）と両刃カミソリ

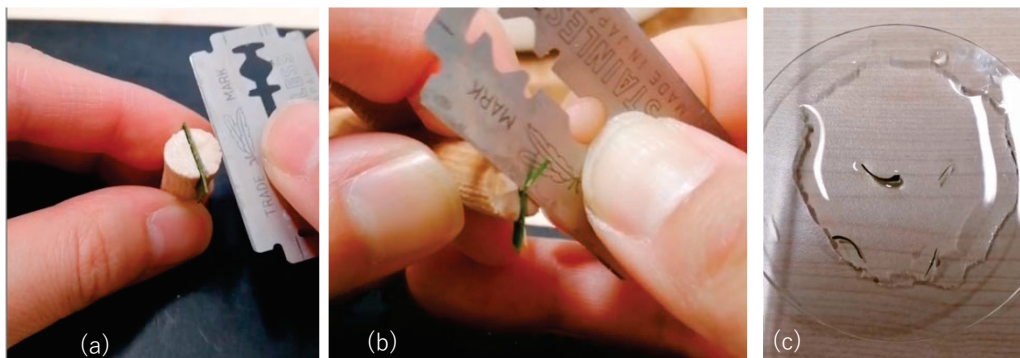


図1 (a)ピスの材料ごと試料を切断 (b)切断の失敗例1 (c) 切断した試料

ピスはコルクのように柔らかい樹木であり、カミソリの刃を断面に平行にあて、片手で切断が可能である。教科書5社中3社でピスが採用されている。図1(a)のように、ピスを机に垂直に載せて、横からカミソリの刃

を当てる一般的な方法では、切片の厚みを薄くすることが難しく、薄くしようとするとピスの表皮から刃がはみ出してしまい、図1(b)のようにピスを削らずに葉のみを切断してしまう失敗が多い。そうかといって、あらかじめ葉をピスのツラ面から100 μ m程度はみ出させておくと、切断中に葉の固定ができず刃の進行方向に試料が引っ張られるため、安定した厚みにそろえることができない。5社中4社の教科書では、切断で失敗することが前提として書かれており、多数の試料の中から、うまく切断できたものを選んで観察するように記述されている。切断した試料は図1(c)のように水をはった時計皿に入れておく。この段階で極端に厚みの不均一な試料や太いものなど、失敗した試料を見分けることが可能である。

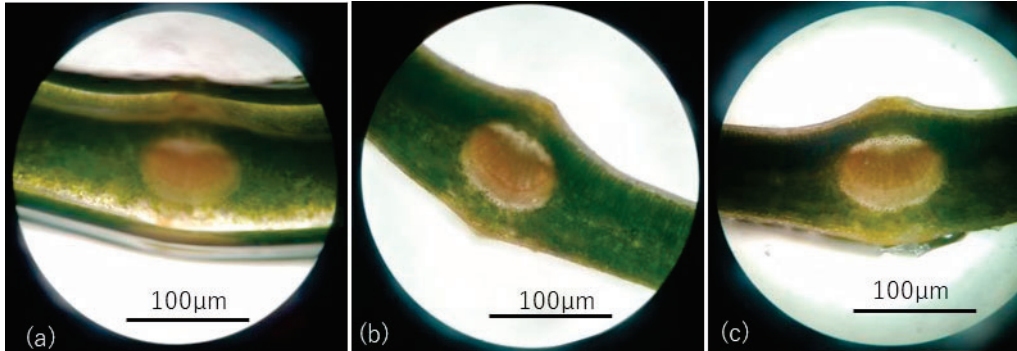


図2 両刃カミソリの刃で切断したツバキの葉の断面の顕微鏡写真(写真の上側が葉の表面、下側が裏面である。中央の丸い部分が葉脈の主脈。)

ある程度良さそうな試料を選んで顕微鏡観察したものが図2である。一見良さそうに思えても、(a)のように試料が厚くて光の透過条件が悪く細胞が見えないもの、(b)のように細長い柵状組織の方がわずかに見える程度で、全体が暗いもの、(c)のように主脈のみ観察可能なものなど、顕微鏡観察に適さない失敗例も多くなる。

(2)ピス(ニワトコの木)とT字カミソリ

同じくピスを用い、カミソリの刃の代わりにT字カミソリを用いる方法もある。中学生は両刃のカミソリの刃の取り扱いに馴染みがなく、刃の構造も知らないため、けがをしないように特に取り扱いに配慮が必要である。(1)では、試料に対して横方向に刃を動かすので、材料を切った瞬間に勢いよく飛び出す刃が危険である。このため、刃の向きを手前に向けないことや、90度倒して縦方向に切ることなども考えられる。ここでは、カミソリの刃の代わりに、T字カミソリを使う方法を図3に示す。

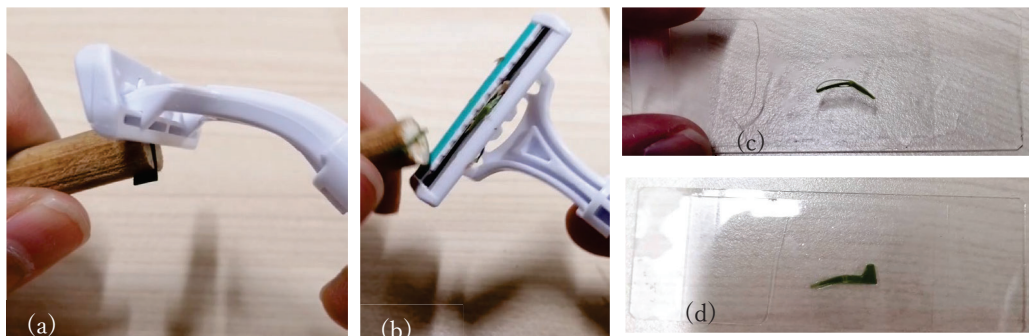


図3 (a)T字カミソリで試料を切断 (b)切断の失敗例2 (c)切断した試料 (d)切断した試料

T字カミソリは刃が2-4枚の複数の商品があるが、本用途には1枚刃が最適である。安全性を担保するために刃を取めるディスクがあり、刃の両側に挟み込む形で刃を保持している。図3(b)は試料がカミソリの刃とディスクの間に挟まってしまう失敗例である。カミソリの構造上、制御することが難しく、この巻き込みの失敗の頻度が高い。図3(c)、(d)は、切断がうまくいった例である。

図4はT字カミソリで切断した試料の顕微鏡の写真である。主脈に焦点が合うものの、試料の厚みのために、細長い柵状組織の細胞と海綿状組織の丸い細胞は区別がつかない。T字カミソリを使った試料はすべてこの

ように厚く，観察に適さなかった。

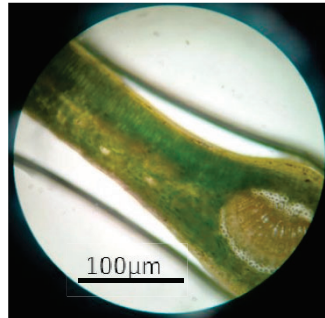


図4 T字カミソリで切断したツバキの葉の断面の顕微鏡写真

(3)ピス（発泡スチロール）と両刃カミソリ

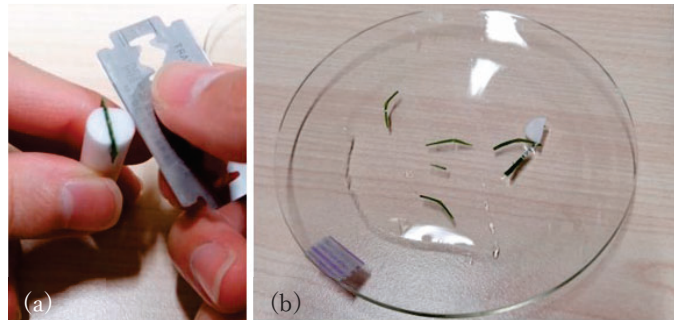


図5 発泡スチロールのピスを両刃カミソリで切断

ここでは，ニワトコの木ピスに代えて，発泡スチロールを円柱形に切り出したピスを用い，両刃カミソリで切断した(図5a)。ニワトコに比べて素材が柔らかく，切断しやすかった。しかし，試料の厚みを均一にすることは困難であった(図5b)。この方法も，(1)，(2)と同様に，試料の厚みを手で制御するしかないためである。

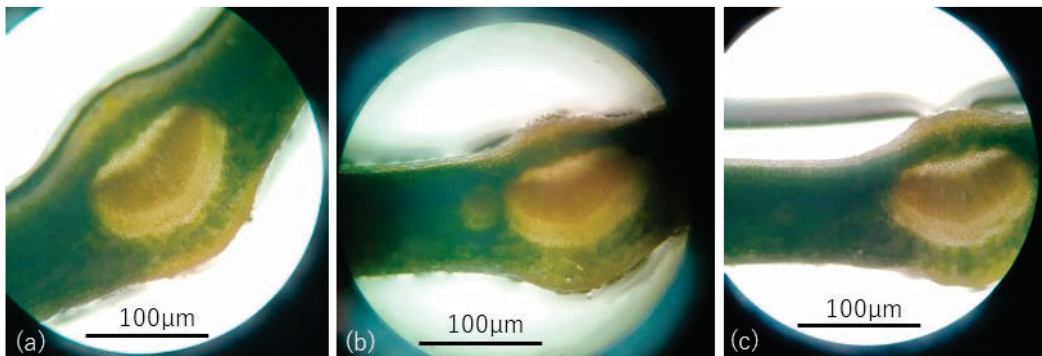


図6 発泡スチロールピスを両刃カミソリで切断したツバキの葉の断面の顕微鏡写真

顕微鏡観察の写真を図6に示す。何度試行しても試料の厚みが大きく細胞の観察には適さなかった。厚みの不均一性は傾向があるわけではなく，葉の表側が厚くなる(a)，全体的に厚くなる(b)，葉の裏側が厚くなる(c)，などいろいろなパターンが見られた。

(4) ピス（発泡スチロール）とT字カミソリ



図7 T字カミソリに発泡スチロールが絡まる

次に、発泡スチロールをピスとして用い、T字カミソリで切断した。(3)と同様にニフトコよりも発泡スチロールは切断しやすいものの、(2)で生じたように、試料や材料の発泡スチロールが刃とカミソリのディスクレットの間に挟まる失敗がすべての試行で発生した。発泡スチロールはニフトコよりも切断しやすいことから、カミソリの刃に発泡スチロール自体が挟まる症状が起こりやすく、この方法では顕微鏡で観察できる試料は作成できなかった。

4. 新たに考案する試料作成

これまでの作成方法では、いずれも葉の厚みを一様にそろえることができないため、確実な方法ではない。数多く試料を作成してたまたまうまくいった試料を選ぶしかなかった。ピスに挟む方法では、ピスと葉試料との固定ができない。葉を固定せずにピスの切り込みとの摩擦で止めているだけでは不十分であり失敗の原因となる。そこで、教科書の方針を変え、葉を直接固定する方法を検討した。

プレパラートに使用するガラスで葉を押さえつけ、ガラスの側面に沿って両刃カミソリの刃を葉面に垂直に当てて引き切断する。続いて葉を200 μm 程度引き出し、再度カミソリの刃を直角に当てて引く。この方法では、カミソリの刃の厚み分だけ葉の厚みが小さくなるため、カミソリの刃の厚みを考慮する必要がある。葉を引き出して再度スライドガラスで押さえつける作業は試料の厚みを決める重要な作業であるが、この方法では時間がかかる上に、厚みの精度が悪いことがわかった。必要とする100 μm 程度の厚みに切りそろえることは困難であった。100 μm は切断するには厚みが小さいため、多くの場合で、葉の途中で斜めに切れてしまった。これを避けようとする、100 μm よりも厚くなってしまった。

試行錯誤を経て、うまくいったのは、図8に示すスライドガラスを動かさない方法である。葉を机に置き切断する位置でスライドガラスを置く。第1段階としてスライドガラスの側面に沿って、葉面に対して直角にカミソリの刃を当てて引き(図8(a))、スライドガラスを固定したまま、第2段階としてカミソリの刃の角度を葉面に対して45度傾けて引く(図8(b))。このときのカミソリの刃の先端はスライドガラスの面よりも内側に入り込む。すると、100 μm 程度の厚みに均等にそろった試料ができあがる。この方法ではスライドガラスの固定しなおしがないため、失敗することはほとんどない。図9に顕微鏡で観察した画像を示すように、均一な厚みで薄く切断でき、細長い柵状組織の細胞と海綿状組織の丸い細胞がきれいに見える。

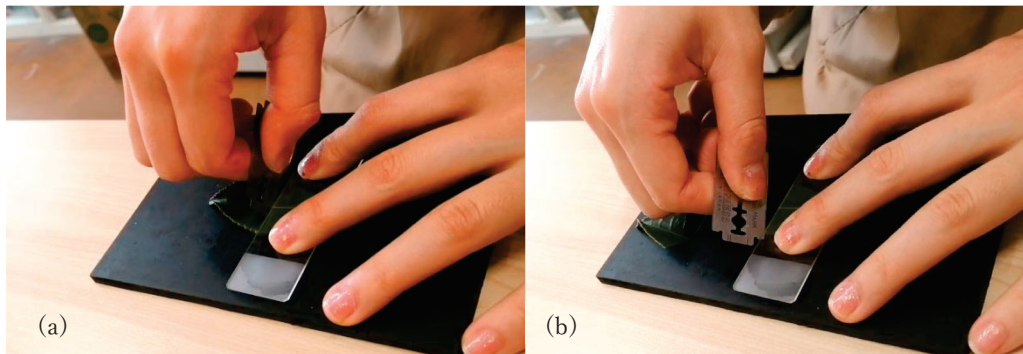


図8 (a)90度の角度で両刃カミソリで切断、(b)次に45度で切断

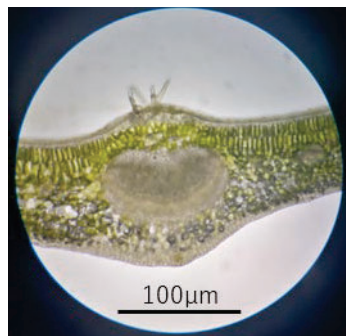


図9 45度の角度で両刃カミソリで切断した試料の顕微鏡写真

5. 評価と考察・まとめ

ここで3章, 4章で試行した作成方法を評価する。著者を含む3名がそれぞれの方法で試料を作成し, 肉眼で質を確認してうまくいったものを顕微鏡観察した。作成した試料数と顕微鏡観察までできた試料数を数えた。ニワトコのピスを台座とし, 両刃カミソリ用いた方法(1)は, 30回作成し観察できたものがなかった(成功率0%)。力の加え具合が難しく, 平行に試料を切断できず, 切断面が斜めになるのが主要な失敗例であった。葉の厚みが均一でなく, 多くの場合で厚くなり細胞を観察できなかった。

ニワトコのピスをT字カミソリで切断した方法(2)は, 20回作成して観察できたものが1回(成功率5%)であった。上述のように刃とディスクレットの間に試料がはさまることが主要な失敗であった。詰まった試料を取り除きながら切断すると, 試料の厚みが均一にならなかった。刃の枚数を2枚, 3枚としたものも同様に刃の間に材料が詰まって, 切片を作れなかった。

発泡スチロールのピスを両刃カミソリで切断する方法(3)は, 20回作成して観察できたものはなかった(成功率0%)。素材が柔らかいため切りやすいものの, 多くの場合で厚みが厚くなった。

4章で示した方法では, 20回作成し, 観察できたものは19回であった。うまくいかなかったのは, 1名の最初の1回目であり, 失敗の原因はスライドガラスを押さえる力が弱いために, 試料がずれたことであった。慣れるとこの失敗は回避できると考えられる。またこの方法は, カミソリの刃の角度が質の良い試料を作成する際のポイントとなる。そこで, 刃の角度を葉面に対して30度, 60度の2パターンを試した。30度のときは, 葉の厚みを均一にできるものの, 一様に厚くなり顕微鏡観察できなかった。60度のときは, 葉の端から端まで切ることができず途中で試料が切れてしまった。以上の結果から, 45度の角度でカミソリの刃を引く方法が最適であることが分かった。この方法ならば, 1試料当たり10秒程度で作成でき, 作業による差異もないため, 授業中に学習者に試料作成からやらせることもできる。

参考文献

- 有馬朗人 他, 大日本図書, 理科の世界1~3, 2021.
 大矢禎一 他, 啓林館, 未来へひろがるサイエンス1~3, 2021.
 梶田隆章 他, 東京書籍, 新しい科学1~3, 2021.
 文部科学省, 中学校学習指導要領(平成29年告示)解説理科編, 2017.
 文部科学省, 小学校学習指導要領(平成29年告示)解説理科編, 2017.
 室伏きみ子 他, 教育出版, 自然の探究 中学理科1~3, 2021.
 霜田光一 他, 学校図書, 中学校科学1~3, 2021.