

名札番号：	氏名：
-------	-----

日本生物学オリンピック 2015 本選 広島

実験試験Ⅰ 数理生物学 予備体験冊子 (40 分)

【予備体験の内容： 生物の数理的研究の紹介と具体的な計算の体験】

1. 本予備体験終了後、引き続き本試験を行う。
2. 配布されたトートバック内の電卓、定規を使用するので、机の上に準備すること。電卓、定規が無い人は挙手すること。
3. 机には、予備体験冊子（12 ページ）、予備体験解答用紙（2 枚）が配付されている。
4. 説明が始まるまでは、予備体験冊子を開かずに、このページをよく読んでおくこと。
5. 監督の指示の後、すべての解答用紙に名札番号と氏名を記入しなさい。また、このページにも名札番号と氏名を記入すること。
6. 椅子の高さはレバーで調節できる。各自、適切な位置に調節しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は、挙手すること。
7. 途中で、気分が悪くなったり、トイレ等のためやむを得ず途中退室を希望したりする場合は、挙手すること。
8. 予備体験冊子にメモを取ってもかまわない。予備体験冊子、予備体験解答用紙は本試験時に参考にしてよい。
9. 机の上には、すでに準備されているものの他、配付されたペンケース、筆記用具、時計、定規、電卓、ハンカチ、ティッシュ、目薬以外のものは置かないこと。

本試験における問題の背景と概要

この試験のテーマは、生物が日常の活動で見せる様々な「リズム」について、数理的な思考実験に基づいて考察する事である。

生物の体内リズム（概日リズム）

生物は細胞レベル、もしくは個体レベルで様々なリズムを刻んでいる。最も身近なものは、我々の体内時計とも呼ばれる「概日リズム」であろう。人間を含めて生物は体内で自ら活動のリズムを刻んでいるので、一日中明るい電気の下にいたとしても夜になれば眠くなるし、海外旅行に行くと昼夜と体内リズムがずれるため、時差ぼけになりやすい。近年ではこのような体内リズムがどのように生成されるのか、細胞レベル、遺伝子レベルでの研究が進んでいる。

このリズムを生成する最も基本的なメカニズムは、細胞内のあるグループのタンパク質量の変動、つまりあるグループの遺伝子発現の周期的な ON-OFF である。細胞内においてある遺伝子が ON になるか OFF になるのかは、別の遺伝子が ON であるか OFF であるのかによって変化する。すなわち遺伝子同士が互いの ON-OFF をコントロールし合う事で、細胞内のタンパク質量が適切にコントロールされ、生命活動が維持されている。体内リズムもそれを担う幾つかの遺伝子同士が、ある規則に従って ON-OFF し合う関係を築いていることで実現する。

これまで幾つかの生物で、概日リズムに関連する遺伝子のグループとその遺伝子間の関係が明らかにされている。例えばシロイヌナズナでは、図 1 のような遺伝子グループと、その遺伝子間の相互コントロール関係（ネットワーク）が知られている。そしてその知見を基にした数理的な解析や、その知見に基づく人工遺伝子制御ネットワークの作成による自律的なリズム生成の実験（図 2）が行われ、そのメカニズムが明らかにされつつある。

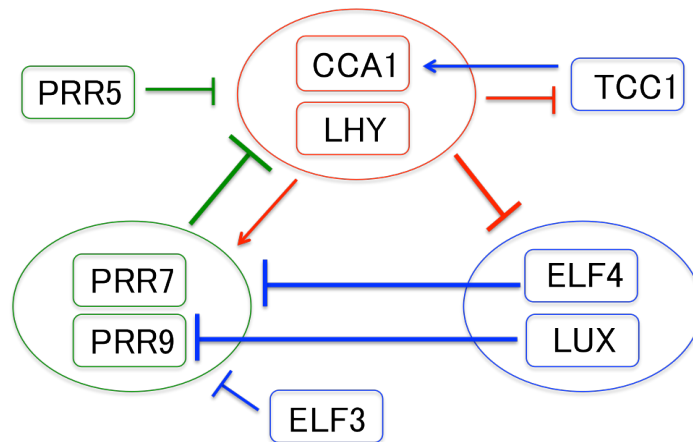


図1 シロイヌナズナの概日リズム生成に関わる遺伝子とその関係図
(Nakamichi M., (2011) PCP 52, 1709 を参考に作成)

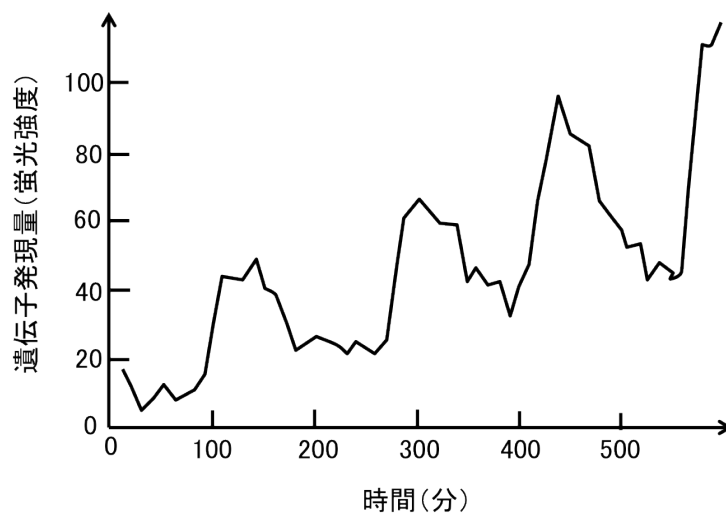


図2 人工遺伝子ネットワークで生成される, タンパク質量変化のリズム
(Elowitz, M. B. et al (2000) Nature 403, 335 を参考に作成)

生態系のリズム

また生物界における自発的なリズムの発生が、生物個体内に留まらないことも知られている。例えば第一次大戦期に行われた地中海における漁獲量調査から、魚の量の増減に、人間による漁獲頻度のみでは説明できない変動がある事が示唆され、数学者ボルテラにより、地中海中の被食者（小中型魚）量と捕食者（サメ等）量が時間的に振動する可能性が示唆されている。そのような食物網や種間の相互作用を介して生じる個体数増減のリズムは、例えばカナダにおけるカンジキウサギとオオヤマネコの個体数変化（図3）や、人工的な微生物生態系を用いた実験でも観察されている。このように生物界には、体内時計のような日単位のものから、個体数変動のような年単位の長いものまで、様々なリズムが存在するのである。

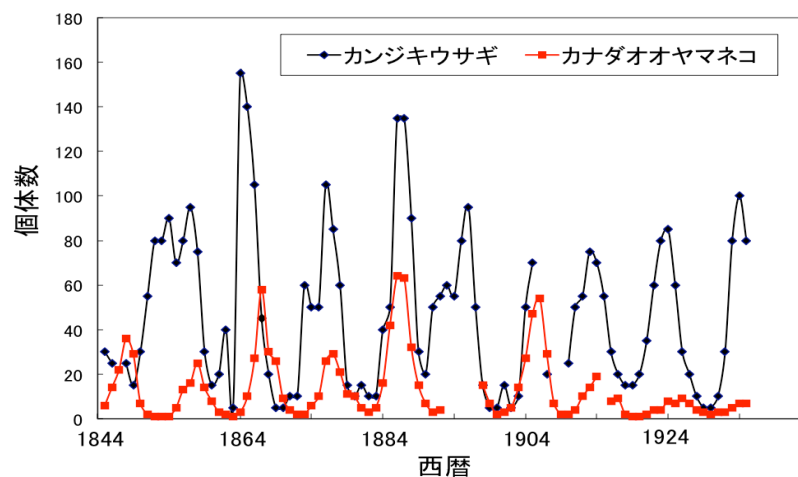


図3 カンジキウサギとオオヤマネコの個体数変動でのリズム

(<http://www.qmss.jp/qmss/text/supplements/differential-equation/lotka-volterra.htm>のデータを利用して作成)

このような個体数変動を理解する上で、1976年にロバート・メイによって提案された、昆虫の個体数年変動を例とした以下のような数理モデルにより、多くの知見がもたらされた。

このモデルでは、ある昆虫が春に卵からかえり、成長し、秋に卵を産み死滅すると仮定する。ここである年（ n 年）におけるその昆虫の個体数を Z_n 、その次の年の個体数を Z_{n+1} とする。また1匹の昆虫は十分に餌を食べて成長すると A 個の卵を産むとする。いまその昆虫の生息区域内の餌の量には限りがあり、

最大 Z_{\max} 匹分の餌しか無いとする。この場合、個体数が増えるとそれに応じて一匹あたりの餌が減り、産む卵の数が $A(1 - Z_n/Z_{\max})$ と減少する。ここで $Z_n/Z_{\max} = X_n$, $Z_{n+1}/Z_{\max} = X_{n+1}$ と書き直し、今後 X_n を n 年における個体数とする。このとき個体数変動規則を式で表すと

$$X_{n+1} = AX_n(1 - X_n)$$

と表せる。これは一見、非常に簡単な式に見えるが、個体数変動に現れるリズムを考える上で有用な知見を多数生み出してきた。

そこで本試験では、これらの生物の自律的なリズムについて、これまでに提案されてきた簡単な数学に基づいたモデルを実際に解析し、そのメカニズムを考察する。

以下、そのための準備として、幾つかの予備体験を行う。

予備体験

その 1：概日周期モデルの計算体験

図 1 で示したように、概日リズムの生成には多くの遺伝子が複雑に関係し合っているように見える。しかし近年、これらの関係は大まかには図 4 のような 3 つの遺伝子からなる関係を考えれば、理解できる事が示唆されている。ここでは仮にこれらの遺伝子を遺伝子 A, B, C とし、遺伝子 A, B, C は ON (OFF) になるとそれぞれ遺伝子 B, C, A を OFF (ON) にするという関係が作られているとする。

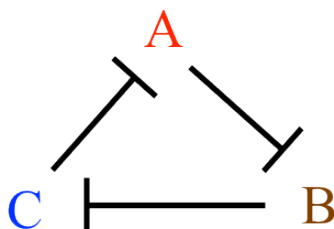


図 4 3 つの遺伝子 A, B, C と、それらの ON-OFF がリズムを刻む遺伝子間の関係

ここで T 字状の先の平たい矢印は、各遺伝子が ON (OFF) の時にその先の遺伝子を OFF (ON) にする事を示している。

これに基づいて各遺伝子の ON-OFF を定式化すると

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{時刻 } t \text{ で } A \text{ が ON (OFF) ならば 時刻 } t+1 \text{ で } B \text{ が OFF (ON)} \\ \text{時刻 } t \text{ で } B \text{ が ON (OFF) ならば 時刻 } t+1 \text{ で } C \text{ が OFF (ON)} \\ \text{時刻 } t \text{ で } C \text{ が ON (OFF) ならば 時刻 } t+1 \text{ で } A \text{ が OFF (ON) } \dots (*) \end{array} \right.$$

となる。ここで、時刻 0 で遺伝子 A, B, C のうち A のみが ON, 残りが OFF であったとした場合、その後各遺伝子の ON-OFF がどのような時間的変動を示すのか、観察してみる。

まず予備体験解答用紙「予備体験その 1」に、下図のように遺伝子 A, B, C について、升目と時刻を描きなさい。ここで一番左が時刻 0 での各遺伝子状態 (ON か OFF) を記述する箇所で、右に進むにつれ時間が 1 だけ進むとしている。

		時刻															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
遺伝子	A																
	B																
	C																

以下，各遺伝子の状態変化を見るために，左から順に遺伝子が ON であれば
 升目を塗りつぶしていく。まず時刻 0 では A のみが ON なので，下図のように
 A の一番左の升目を塗りつぶす。

		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
遺伝子	A	■															
	B																
	C																

次に時刻 1 での各遺伝子の状態を計算する。遺伝子の ON-OFF 変化の規則は
 上記＊で与えられているので，時刻 1 での遺伝子の状態は時刻 0 での状態から

時刻 0 で C が OFF なので 時刻 1 で A が ON
 時刻 0 で A が ON なので 時刻 1 で B が OFF
 時刻 0 で B が OFF なので 時刻 1 で C が ON

となる。よって時刻 0 では A のみが ON，B，C が OFF となっているので，
 時刻 1 の遺伝子 A，B，C の升目を次のように塗りつぶす。

		時刻															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
遺伝子	A	■	■														
	B																
	C		■														

同様に時刻 2 での遺伝子の状態は時刻 1 での状態から

時刻 1 で C が ON なので 時刻 2 で A が OFF

時刻 1 で A が ON なので 時刻 2 で B が OFF

時刻 1 で B が OFF なので 時刻 2 で C が ON

となるので、遺伝子 A, B, C の時刻 2 の升目を次のように塗りつぶす。

		時刻															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
遺伝子	A																
	B																
	C																

同様に時刻 3 での遺伝子の状態は、時刻 2 での状態から

時刻 2 で C が ON なので 時刻 3 で A が OFF

時刻 2 で A が OFF なので 時刻 3 で B が ON

時刻 2 で B が OFF なので 時刻 3 で C が ON

となるので、遺伝子 A, B, C の時刻 3 の升目を次のように塗りつぶす。

		時刻															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
遺伝子	A																
	B																
	C																

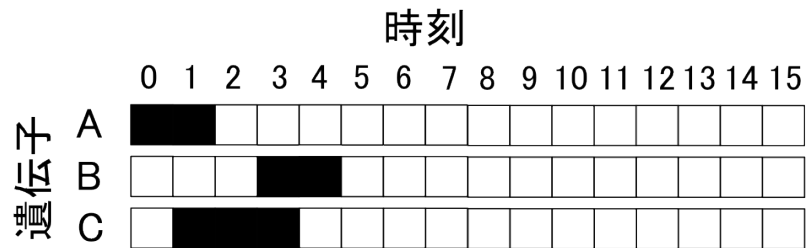
同様に時刻 4 での遺伝子の状態は、時刻 3 での状態から

時刻 3 で C が ON なので 時刻 4 で A が OFF

時刻 3 で A が OFF なので 時刻 4 で B が ON

時刻 3 で B が ON なので 時刻 4 で C が OFF

となるので、遺伝子 A, B, C の時刻 4 の升目を次のように塗りつぶす。



同様に時刻 5 での遺伝子の状態は、時刻 4 での状態から

時刻 4 で C が OFF なので 時刻 5 で A が ON
 時刻 4 で A が OFF なので 時刻 5 で B が ON
 時刻 4 で B が ON なので 時刻 5 で C が OFF

となるので、遺伝子 A, B, C の時刻 5 の升目を次のように塗りつぶす。



同様に時刻 6 での遺伝子の状態は、時刻 5 での状態から

時刻 5 で C が OFF なので 時刻 6 で A が ON
 時刻 5 で A が ON なので 時刻 6 で B が OFF
 時刻 5 で B が ON なので 時刻 6 で C が OFF

となるので、遺伝子 A, B, C の時刻 6 の升目を次のように塗りつぶす。



実は時刻 6 での状態は、時刻 0 での状態と同じであり、元の状態に戻っている。
 従って以下同じように塗りつぶしていく事で、時間と共に遺伝子 A, B, C の状態が、時間 6 の周期で規則的に変化する様子を見る事が出来る。各自実際に手を動かし、確認すること。



その 2：個体数の年変動モデルの計算体験

昆虫の個体数年変動について提案されたモデル

$$X_{n+1} = AX_n(1 - X_n)$$

について考える。ここでは仮に、0 年目 ($n = 0$) において $X_0 = 0.46$ であったとする (X_n は最大生息数に対する割合なので、小数であらわされる。)。産卵数 $A = 3.20$ のとき、この昆虫の個体数の年変動はしばらく年が経つとどのようになるのか、実際に電卓を使用して計算してみる。以下の計算では、小数点第 3 位を四捨五入して計算する。各自以下の説明に従い、予備体験解答用紙「予備体験その 2」に計算結果を記載すること。

まず 0 年目 ($n = 0$) の個体数から、上の式に従って 1 年目 ($n = 1$) の個体数 X_1 を求める。 $n = 0$ をモデルに代入すると

$$X_{0+1} = X_1 = AX_0(1 - X_0)$$

となりこのとき $X_n = X_0 = 0.46$ 、 $A = 3.20$ なので

$$X_1 = 3.20 \times X_0(1 - X_0) = 3.20 \times 0.46 \times (1.00 - 0.46) = 0.79$$

となる。次にその 1 年後、つまり 2 年目 ($n = 2$) の個体数 X_2 を 1 年目 ($n = 1$) の個体数 X_1 と上の式から求める。 $n = 1$ のとき $X_n = X_1 = 0.79$ なので

$$X_2 = 3.20 \times X_1(1 - X_1) = 3.20 \times 0.79 \times (1.00 - 0.79) = 0.53$$

となる。同様に 3 年目 ($n = 3$) の個体数 X_3 を 2 年目 ($n = 2$) の個体数 X_2 と上の式から求めると

$$X_3 = 3.20 \times X_2(1 - X_2) = 3.20 \times 0.53 \times (1 - 0.53) = 0.80$$

4 年目 ($n = 4$) の個体数 X_4 を 3 年目 ($n = 3$) の個体数 X_3 と上の式から求めると

$$X_4 = 3.20 \times X_3(1 - X_3) = 3.20 \times 0.80 \times (1 - 0.80) = 0.51$$

5 年目 ($n = 5$) の個体数 X_5 を 4 年目 ($n = 4$) の個体数 X_4 と上の式から求めると

$$X_5 = 3.20 \times X_4 (1 - X_4) = 3.20 \times 0.51 \times (1 - 0.51) = 0.80$$

となる。このように n について X_n を繰り返し求め、下図のような表にまとめる事で、個体数が一年おきに同じになる周期 2 年の個体数変動が現れることがわかる。(実際に計算し、表を作成することで確認すること。)

$$A = 3.20$$

年 (n)	0	1	2	3	4	5	6	7
個体数 (X_n)	0.46	0.79	0.53	0.80	0.51	0.80	0.51	0.80

→
周期的な変動

このように非常に簡単な数学モデルを用いる事で、生物界に現れる様々なリズムの発生を考察する事ができる。本試験でもこれらの計算をする事になるので、時間まで各自手を動かして慣れておくこと。

名札番号：	氏名：
-------	-----

日本生物学オリンピック 2015 本選 広島

実験試験 II 生理学 予備体験冊子 (70 分)

1. 本体験は，皮膚感覚点の分布計測を体験してもらうことが目的であり，得られたデータの良し悪しを評価することを目的とはしていない。従って，過度に慎重に行う必要はない。
2. 本予備体験終了後，引き続き本試験を行う。
3. 机には予備体験冊子（5ページ）が配付されている。
4. 説明が始まるまでは，予備体験冊子を開かずに，このページをよく読んでおくこと。
5. 監督の指示の後，このページと結果記録ページ（p. 4, 5）に名札番号と氏名を記入すること。
6. 椅子の高さはレバーで調節できる。各自，適切な位置に調節しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は，挙手をする事。
7. 途中で，気分が悪くなったり，トイレ等のためにやむを得ず途中退室を希望したりする場合は，挙手をする事。
8. 予備体験冊子にメモを取ってもかまわない。予備体験冊子は，本試験時に参考にしてよい。
9. 予備体験には実験 1 と実験 2 がある。まず実験 1 を行い，その後実験 2 を行う。実験 2 への移行は別途指示する。
10. 机の上には，すでに準備されているものの他，配付されたペンケース，筆記用具，時計，定規，電卓，ハンカチ，ティッシュ，目薬以外のものは置かないこと。

はじめに

皮膚感覚とは皮膚にある受容器から生じる感覚であり，触圧覚，温覚，冷覚，痛覚（痒覚）に分類される。これらの感覚は，生体を取り巻く外的環境を知り，それに適応するために用いられる。皮膚に触圧，冷，温，痛覚などの刺激を与え，最小限の感覚を起こす閾値を調べると，特に閾値が低い部位が存在する（感覚点）。本実験では，刺激毛を用いて触圧点の分布を調べる実験と，熱伝導子を用いてヒトの皮膚表面の温点・冷点の分布を調べる実験を，身体の各部位で行う。

【実験概要】

まず**実験 1**を行い，終了後に**実験 2**を行う。

【実験内容】

実験 1：触圧点の分布

【使用するもの】 刺激毛，方眼印判，記録用紙

【触圧点測定の手順】

1. 二人一組になる。被験者と施術者を決める。
 2. 被験者の以下の皮膚面に，1区角1 mm²からなる100区画の方眼印判を押す。
利き腕と反対側が望ましい。
 - ・人差し指先端の手のひら側
 - ・前腕内側（毛があまり無いところ）
 3. 触圧点を測定する。施術者は被験者に押された各マス目に刺激毛の先端を押し当てる。この時，刺激毛の先端が皮膚に直角，かつ毛が軽く曲がる程度の強さで当たるようにする。被験者は施術者の操作を見ないようにし，施術者の合図に応じて，その時の触圧感覚を記録用紙に記入する（感覚あり：○）。
 4. 上記2箇所 of 皮膚で計測し終わったら，被験者と施術者を交代して，同じ実験を行う。
 5. 触圧点の密度を計算し，記入する。
- ※ 測定終了後，各自刺激毛を皮膚に接触させて5秒間程度動かさずに置いた後に離してみる。その一連の動きの中で，自分が感じている触圧覚がどのように変化するか体験する。

実験 2 : 温点・冷点の分布

【使用するもの】 熱伝導子，氷水，温水（ウォーターバス内），メンソール（タイガーバーム：30%メンソールを含む），方眼印判，記録用紙

【温点・冷点測定の手順】（注意：メンソールに過敏症状があらわれる方は申し出てください。）

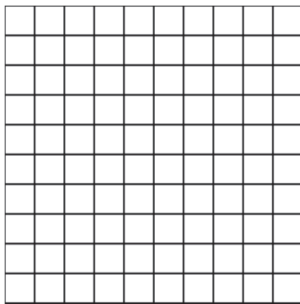
1. 各自，氷水の入った熱伝導子を実験補助員から受け取る。
2. 実験 1 で前腕内側につけた100区画のマス目を実験に用いる。
3. 冷点の分布の測定：
まず冷点の分布を調べる。氷水の入った冷たい熱伝導子の先端で，100区画のマス目に沿って，各自，点状に100点刺激する。冷たく感じる点があれば，記録用紙上（方眼紙上）の対応する点に○印を付ける。
4. 温点の分布の測定：
次に温点の分布を調べる。挙手して実験補助員から温水（55℃）の入った熱伝導子を受け取り，熱い（温かい）熱伝導子の先端で，100区画のマス目に沿って，点状に100点刺激する。熱く（温かく）感じる点があれば，記録用紙上（方眼紙上）の対応する点に○印を付ける。（注意：冷点測定と同一場所で温点を測定する。測定中にマス目が見えにくくなった場合，再び同一部位に押印し，同一部位で測定する。）
5. メンソール（タイガーバーム：30%メンソールを含む）を100区画のマス目の部位に塗布し，塗布後3分以内に，冷点・温点の分布を，3，4の手順に従い再び同一部位で測定する。

実験 1 : 触圧点の分布

名札番号 : _____ 氏名 : _____

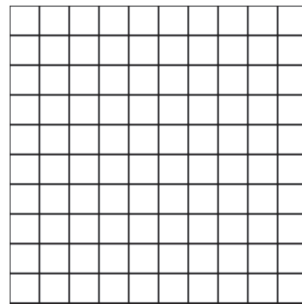
- (1) 触圧刺激に対して、感覚ありの場合は対応するマス目に○を記入する。
- (2) 各部位における感覚点の密度を求める (点/cm²)

人差し指



_____ 点/cm²

前腕内側



_____ 点/cm²

実験 2 : 温点・冷点の分布

名札番号 : _____ 氏名 : _____

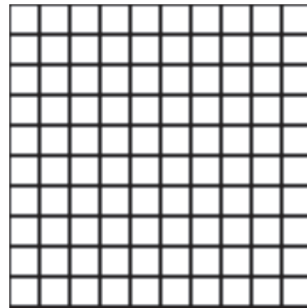
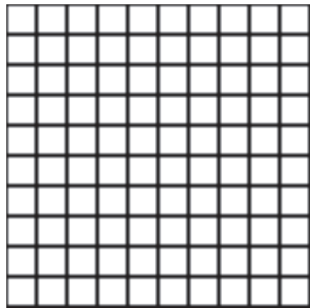
(1) 冷点・温点があれば, 記録用紙上の対応するマス目に○を記入する。

(2) メンソール塗布の前後で, 冷点・温点の密度を求める。

メンソール塗布前

冷点

温点



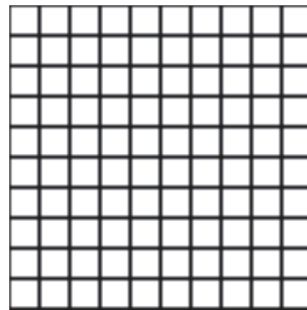
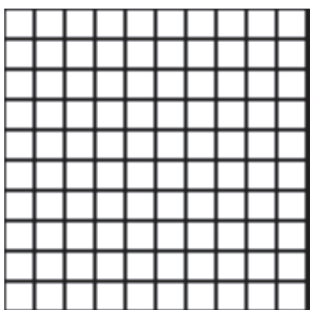
_____ 点/cm²

_____ 点/cm²

メンソール塗布後

冷点

温点



_____ 点/cm²

_____ 点/cm²

名札番号：	氏名：
-------	-----

日本生物学オリンピック 2015 本選 広島

実験試験Ⅲ・Ⅳ 予備体験冊子 (90 分)

【予備体験の内容：マイクロピペットの使い方，生物顕微鏡の使い方，切片の作成と観察】

1. 机には，予備体験冊子（15 ページ）が配付されている。
2. 説明が始まるまでは，冊子を開かずに，このページをよく読んでおくこと。
3. 解答開始の合図の後，このページに名札番号と氏名を記入すること。
4. 椅子の高さは，各自，適切な位置に調節しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は，挙手をする事。
5. 試験の途中で，気分が悪くなったり，トイレ等のためにやむを得ず途中退室を希望したりする場合は，挙手をする事。
6. 実験中は，必ず白衣を着用すること。また，実験用手袋は必要に応じて着用し，試料等が眼，口，皮膚などに直接触れないよう注意すること。
7. 予備体験冊子にメモを取っても構わない。試験終了後，冊子は持ち帰ること。
8. 実験机の上の実験道具は自由に使って構わない。実験中は位置も自由に動かして構わない。予備体験終了後はなるべく元の位置にもどしておくこと。
9. 顕微鏡のレンズが汚れていて観察に支障がある場合は，挙手して実験補助員に連絡すること。

サンプルと器具

<マイクロピペットと顕微鏡の基本操作>

<input type="checkbox"/> マイクロピペット(P20)	1本
<input type="checkbox"/> ピペットチップ (ケース(ラック)に立った状態で入っている)	1箱
<input type="checkbox"/> ゴムバンド	1個
<input type="checkbox"/> マイクロチューブ (各々A, B, C, D, Eと標識が書かれている)	5本
<input type="checkbox"/> 微生物の細胞培養液の入ったチューブ (Mと標識が書かれている)	1本
<input type="checkbox"/> 対物マイクロメーター	1枚
<input type="checkbox"/> スライドガラス	2枚
<input type="checkbox"/> カバーガラス	2枚
<input type="checkbox"/> ろ紙	2枚
<input type="checkbox"/> 生物顕微鏡	1台/2人
<input type="checkbox"/> 廃チップ回収用ポリ袋	1枚
<input type="checkbox"/> スライドガラス回収用の紙コップ	1個

<ピスを用いたローズガラスの葉の徒手切片の作成>

実験台にあるもの

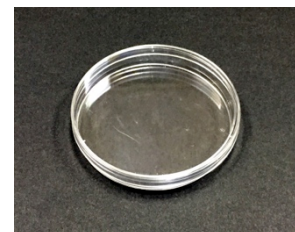
<input type="checkbox"/> 生物顕微鏡	1台/2人
<input type="checkbox"/> ペーパータオル	1袋
<input type="checkbox"/> 実験用ティッシュ(キムワイプ)	1箱

黄色のトレイにはいつている器具類

<input type="checkbox"/> ローズガラスのポット	1個
<input type="checkbox"/> 水道水(100 mL)が入ったコップ	1個
<input type="checkbox"/> スライドガラス	1枚
<input type="checkbox"/> カバーガラス	2枚
<input type="checkbox"/> ピス(約5 cm)	1本
<input type="checkbox"/> カミソリ	2枚
<input type="checkbox"/> 親指保護用サック(大・小)	各1個
<input type="checkbox"/> スポイト	2本
<input type="checkbox"/> ペトリ皿	1枚



ピス



ペトリ皿

トートバッグから出しておくもの

□ ペンケース（鉛筆，消しゴム，定規，ピンセット） 1 個

＜マイクロピペットの使い方＞

マイクロピペットは 1000 μL (1 mL)以下の微量の液体を測り取るときに使用し、プッシュボタンを上下させることにより本体内の空気を動かして、液体を吸い上げたり吐出したりできる構造になっている。今回使用するマイクロピペット(P20)は、目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量を設定することで、2 μL ～20 μL の容量を測り取ることができる。

マイクロピペットの操作方法

1. 調節ダイヤルを回して目盛りの表示を測り取りたい量に設定する。回らない時はロックされているので、調節ダイヤルの下にあるロックを解除してから回すこと。今回使用するマイクロピペット(P20)では、3つ目の数字は小数点以下を示している。図 1 は、20 μL に設定した例を示している。



図 1

2. ピペット本体にチップをしっかりと装着する。
3. チップイジェクトボタンを手の平側にして片手で本体を握り、プッシュボタンの上に親指の腹を乗せて押せる様に準備する。
4. プッシュボタンを第1ストップまで押し込み、その状態のままチップの先端を測り取りたい液につけ(図 2-①), ゆっくりとプッシュボタンを初期位置まで戻して設定した量の液をチップ内に吸い上げる(図 2-②)。チップの外側に液滴が付かない様, 注意する。
5. チップ内に液を吸った状態で、液を吐出する容器にピペット本体を移動する(図 2-③)。プッシュボタンを第2ストップまで押し込んで、チップ内の液を全て吐出する(図 2-④, ⑤)。チップ内に溶液が残らない様に、吐出操作は急がず確実に行うこと。

6. 液の吐出後、プッシュボタンを押したままでチップの先端が吐出した溶液外(空中)にある事を確認してから(図 2-⑤), プッシュボタンを初期位置まで戻す。
7. チップイジェクトボタンを押し、チップを外して捨てる(図 2-⑥)。

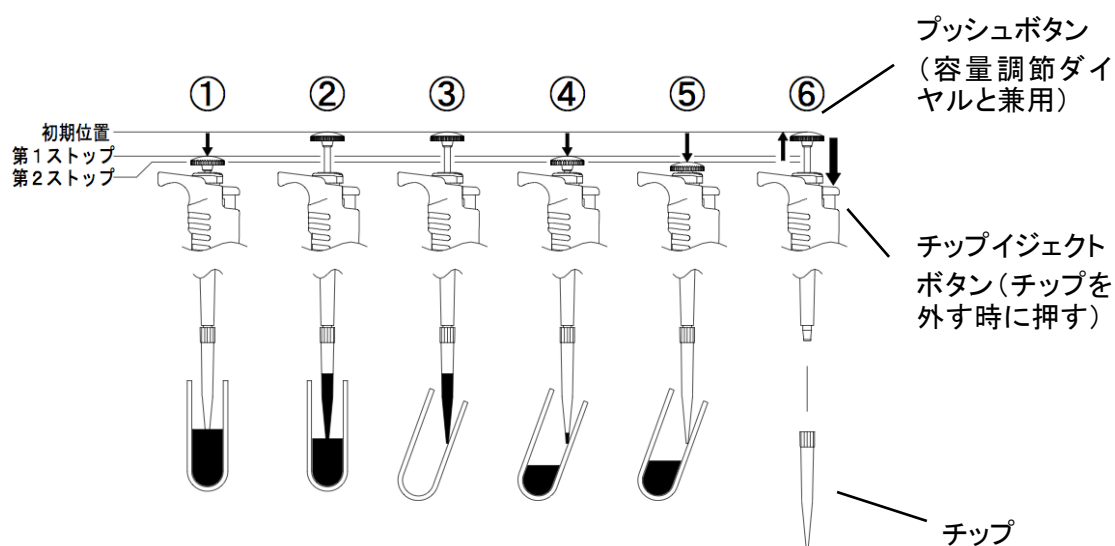


図2 マイクロピペット操作法
(ニチリョー社 ピペット取扱説明書より転載)

マイクロピペットの基本操作

以下の操作により、マイクロピペットを正しく扱う事ができているかをチェックする

1. 15.0 μL を測り取るため、目盛りを[150]に合わせ、チップを装着する。
2. Eのマイクロチューブに入っている水を使って吸い上げと吐出の操作を練習する。操作がよくわからない人は挙手すること。問題なくできる様になったら、次の操作に進む。
3. チップイジェクトボタンを親指で軽く押してチップを外し(専用のポリ袋に捨てる)、新しいチップを装着する。予備体験では以後の操作でもチップは交換しないが、**本試験では異なる液体を測り取る場合、その都度、新しいチップに付替える。**
4. Aのマイクロチューブ内の赤紫色の液体(ブロムフェノールブルー色素)を 15.0 μL 吸い取り、Bのマイクロチューブ(最初は何も入っていない)の底に入れる。この操作を合計で4回繰り返し、Bのマイクロチューブ内の液に順次追加する。
5. 目盛りを[200]に合わせてAのマイクロチューブから更に 20.0 μL を測り取り、Bのマイクロチューブ内の液に更に加える。この操作を合計で2回繰り返す。
6. Bのマイクロチューブ内の液量が、Cのマイクロチューブ(あらかじめ 100.0 μL の弱酸性の液が入っている)と同じ量か、目視で確認する。

(チェック項目) 溶液量の比較 同量 ☐ 異なる ☐

7. Bのマイクロチューブから 20.0 μL の溶液を測り取り、Cのマイクロチューブ内の液に加える。この操作をもう一度繰り返し、計 40.0 μL の液をBからCのチューブに測り取る。
8. 液を移した後、同じチップを使ってCのマイクロチューブ内の液体をゆっくりと出し入れし泡立てない様に注意しながらよく混ぜる(プッシュボタンを押し切らず第一ストップまでで止め、初期位置まで戻す。この動作を数回繰り返す)。最後にプッシュボタンを第二ストップまで押し込んでチップ内の液を全て排出した後、溶液の色の変化を観察して記録する。

(チェック項目) 色の変化 (色) → (色)

9. Cのマイクロチューブから 20.0 μL の溶液を測り取り、Dのマイクロチューブ(あらかじめ弱塩基性の液が入っている)に移す。この操作をもう一度繰り返して、計 40.0 μL の液をCからDのチューブに測り取った後、同じチップを使ってDのマイクロチューブ内の液体を出し入れして混ぜる。溶液の色の変化を観察して記録する。

(チェック項目) 色の変化 (色) → (色)

<顕微鏡の使い方>

バクテリア等の微小な細胞を顕微鏡で観察するためには，正確なピント合わせ等の技術が必要である。予備体験では，顕微鏡の基本的な使用方法と微生物等を顕微鏡で観察する技術を習得することを目的とする。

<生物顕微鏡使用マニュアル>

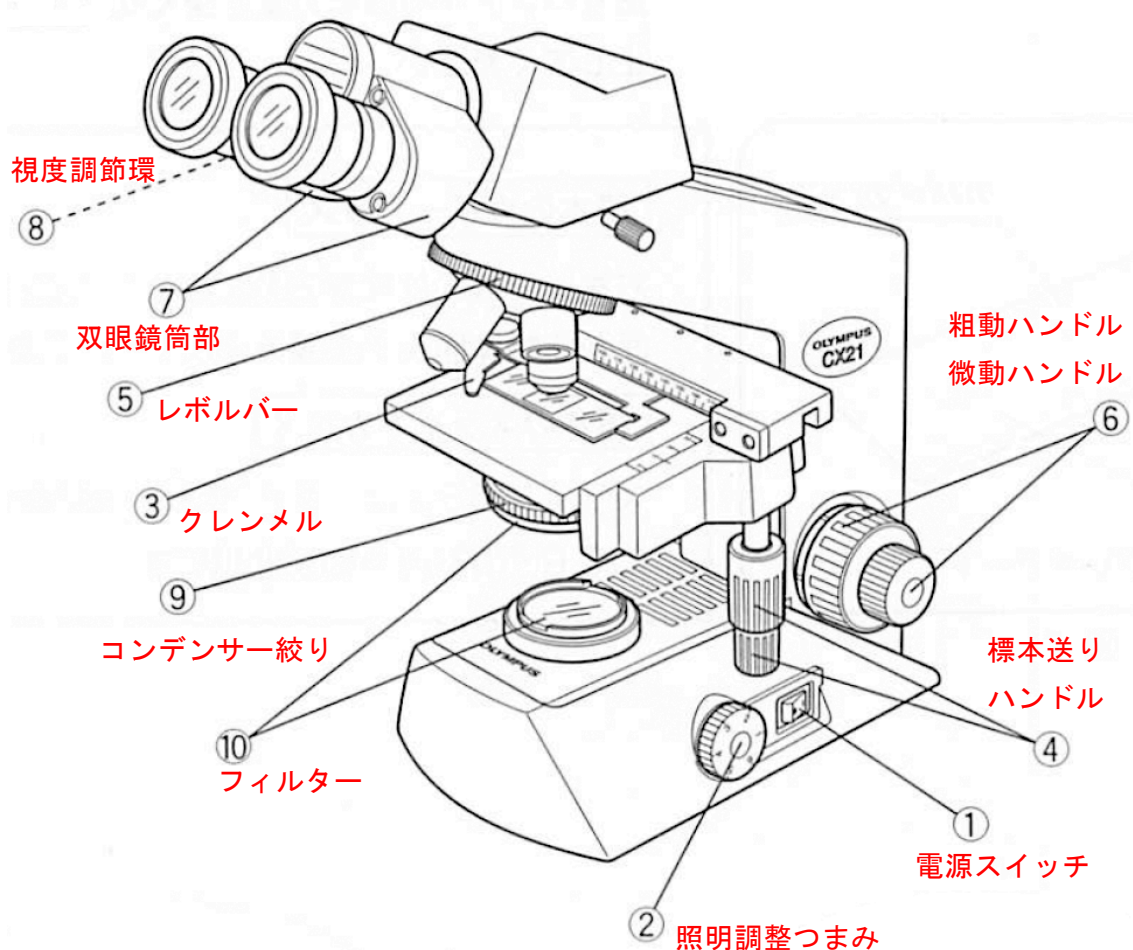


図3 顕微鏡と操作部の名称

(オリンパス社 顕微鏡取扱説明書より転載)

＜顕微鏡の基本操作と対物マイクロメーターの観察（図3を参照）＞

1. 電源スイッチを入れ(①), 照明調整つまみで光量を適当な明るさに調整する(②)。
2. 顕微鏡を覗き, 右の接眼レンズにマイクロメーターが入っている(目盛りが見える)事を確認する。(入っていない場合は, 挙手で知らせること)。
3. 粗動ハンドル(⑥, 外側)を回してステージを下まで下げる。
4. 標本(対物マイクロメーター)をステージにセットして標本押さえレバー(クレンメル(③))で固定し, 標本送りハンドル(④)で照明光の位置に観察したい部位を移動させる。
5. レボルバー(⑤)を回して対物レンズを 40 倍にする。レンズ本体を持って回さないこと。
6. 粗動ハンドル(⑥, 外側)を**少しずつ**回して, 標本を乗せたステージを対物レンズにできるだけ近づける。ステージを横から見ながら確実に操作し, ステージを上げすぎて対物レンズに当てない様に十分注意すること。
7. 両目で接眼レンズを覗きつつ, 粗動ハンドル(⑥)を用いてピントが合う位置までステージを下げる。ハンドルを逆方向に回していないか, 注意すること。目の間隔が合わない場合は, 双眼鏡筒部(⑦)の間隔を調節する。左右のレンズでピントが異なる場合は, 接眼レンズの視度調節環(⑧)を回して調節する。
8. 微動ハンドル(⑥, 内側)を回してピントを微調整する。
9. コンデンサー絞り(⑨)を使って, コントラスト, 焦点深度を調整する。
※ 眼幅や視度には個人差があるので, 各人の違いに合わせて補正すること。
※ 使用中, レンズが汚れた場合には試験補助員に申し出ること。
10. 対物マイクロメーターの目盛りは $1\text{mm}(=1000\mu\text{m})$ を 100 等分している。接眼マイクロメーターの目盛りと対物マイクロメーターの目盛りが一致する二点を探し(目盛りが平行になっていない場合, 接眼マイクロメーターが入った接眼レンズを回転させて合わせる), 接眼マイクロメーターの一目盛りが実寸で何 μm に対応するかを確認する。
ちなみに, 接眼 10 倍 x 対物 40 倍の場合, 接眼 20 目盛りが対物 5 目盛りに対応している。
($50 \div 20 = 2.5\mu\text{m}$ /接眼マイクロメーター1目盛り)。

＜微生物試料の観察＞

1. マイクロピペットで微生物試料（Mと表記のチューブ） $1\mu\text{L}$ を取り，スライドガラスに滴下する（図4）。静置時間が長いと，微生物はチューブの底にたまっている可能性があるので注意すること（チューブの底を数回，軽く指でたたき，よく混ぜてから使う）。



図 4

2. カバーガラスをのせる。
3. ろ紙（またはキムワイプ）ではさんで軽く押し，余分な水分を吸い取る（図5）。

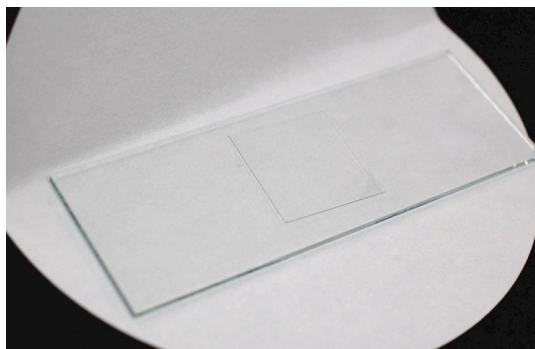


図 5

4. コンデンサーの絞りは絞りすぎると解像度が低下するので，通常は適切な絞り量の設定が必要である。今回は，対物が 40 倍のレンズで微生物を観察するためにコントラストを高める必要があるので，できるだけ絞っておく。
5. 顕微鏡の対物レンズを 10 倍にセットする。
6. カバーガラスの端が対物レンズの下に来るようにセットする。
7. 粗動ハンドルと微動ハンドルを使い，レンズにできるだけ近づけるように（しかしながらぶつからないように）目で確認しながら，ステージをゆっくりと上げる（図6）。

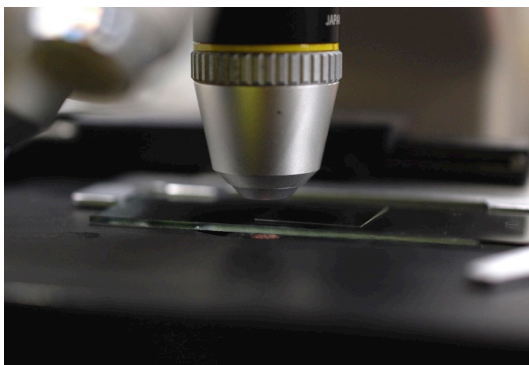
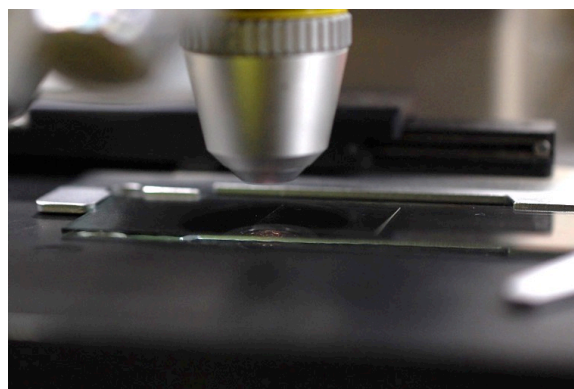


図 6

8. 接眼レンズを覗きながら、**微動ハンドル**を使ってステージをゆっくりと**下げる** (図 7)。逆方向に動かしてスライドガラスをレンズにぶつけないように注意すること。

図 7



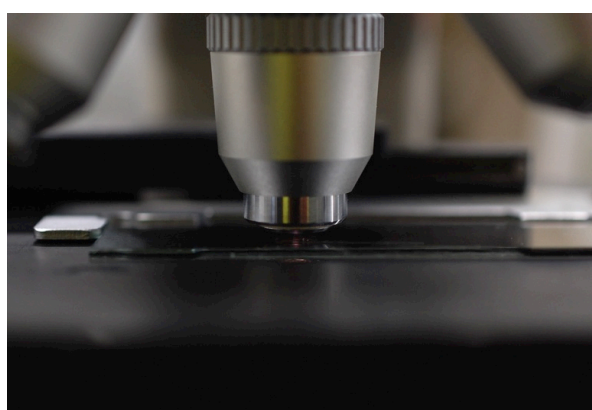
9. カバーガラスとスライドガラスの境界面にピントが合う位置までステージを下げて止める (図 8)。

図 8



10. 対物レンズのレボルバーをゆっくりと回転させ、対物レンズを40倍に変更する (図 9)。

図 9



11. この時点で、ピントをわずかに微調整することで、バクテリアの細胞を観察することが出来るはずである（図 10）。接眼レンズの視野と実際のスライドガラスの位置関係は**左右が逆になる**ので、操作時は注意する。

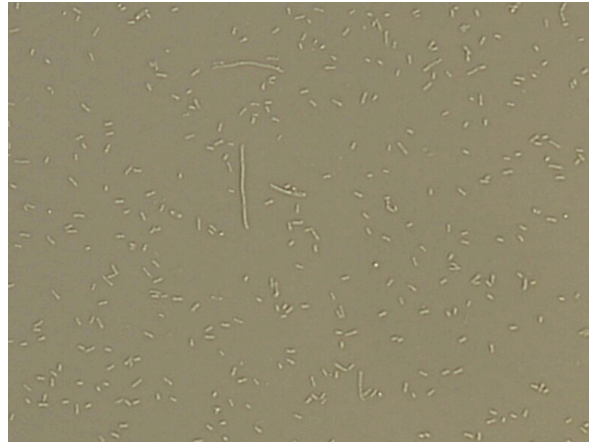


図 10

12. バクテリアの細胞が観察できない場合は、ピントの位置が合っていないためである可能性が高いので、慎重にピントを調整して細胞を探す。
13. それでも細胞が見つからない場合は、ステージをゆっくりと水平方向に動かして細胞を探す。カバーガラスの下のサンプルにゴミや泡が混入している場合は、それらをレンズの下に持ってきて、焦点の調節を行うとピントを合わせやすい。

図 10 に相当する細胞を観察する事ができた受験者は、顕微鏡の設定はそのままにして挙手し、補助員に連絡する。補助員は顕微鏡の像をチェックし、正しい像が観察出来ている事を確認する。正しい画像が観察できていなかった場合は、細胞の像の観察をやり直す（焦点合わせを再び行う）。

＜ピスを用いたローズグラスの葉の徒手切片の作成＞

植物組織の内部構造を顕微鏡で観察する際には，その組織を用いた薄い切片を作成することが必要である。薄い切片の作成にはピス（図 11）を用いるのが便利である。ピス（pith）とは維管束植物の髓のことであり，茎や根の中心部分の海綿状柔細胞からなる部分である。ピスの切れ込みに植物組織の一部をつぶさないようにしてはさみ込んだあと，植物組織をピスごと鋭利なカミソリの刃で切り出すことで容易に徒手切片（カミソリなどを用いて手で切り出した切片のこと）を作成することができる。この予備体験では，イネ科の牧草の一種であるローズグラスの葉を用いた徒手切片の作成を体験するとともに，生物顕微鏡の使用方法についても学習する。



図 11 ピス（スイカズラ科ニワトコの髓）

* 切片作成時にカミソリで指を切らないよう，じゅうぶん気を付けること。配付された親指保護サックを利き手ではないほうの親指（右手でカミソリを持つ場合には左手の親指）に装着すること（図 12）。

* もしカミソリで指を切るなどの怪我をした場合には挙手により知らせること。

* 生物顕微鏡は1台を2名で使用します。1名で使用し続けることの無いように，お互いにゆずり合って使用すること。

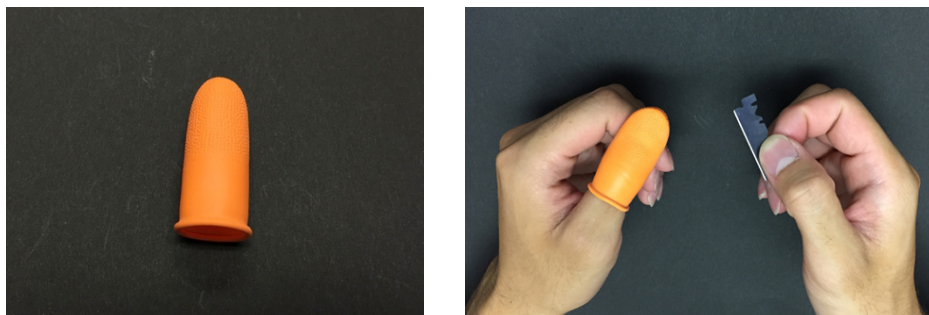


図 12 親指保護サック

操作

ピスの準備

1. 切片の作成にはカミソリを用いる（図 13）。使用し続けていると切れが悪くなることがあるので、そのつど、交換すること。

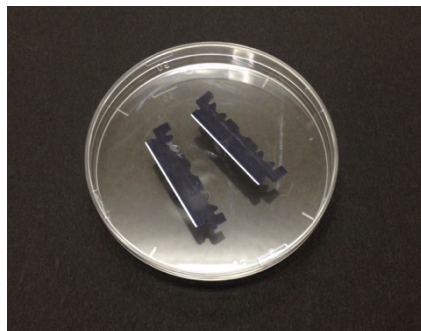


図 13 カミソリ

2. コップに入った水道水をペトリ皿の半分程度の深さまで注いでおく。これはカミソリで切り出したローズガラスの葉の切片やピス片を浮かべるために使用するためである。ペトリ皿のふたは、以下の 5. において、葉片をカミソリで切り出すときの下敷きとして使用する。
3. カミソリを用いてピスを 5 cm 程度の長さに切りだす（ただし、この実験試験予備体験ではすでに 5 cm 程度に切り出したピスが 1 本配付されている）。縦方向に 3~4 cm 程度の切れ込みを入れる（図 14）。

* ピスの再配付が必要な場合には挙手により知らせること。

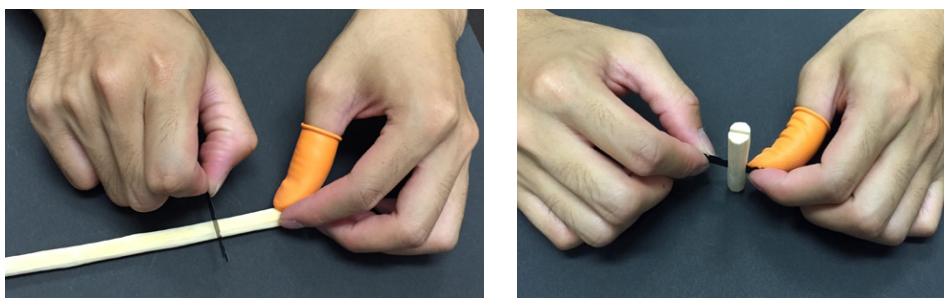


図 14 徒手切片作成用ピスの準備

ローズグラスの葉の徒手切片の作成

4. カミソリを使って、ポットに植えられたローズグラス一株を地ぎわから刈り取る。
5. ペトリ皿のふたの上で、ローズグラスの地上部の基部（地ぎわに近い、紫色の葉鞘部分）について長さ5 mm 程度をカミソリを用いて切り出す（図 15）。
6. 切り出した5 mm 程度の葉鞘部分をつぶさないようにして、ピンセットを用いてピスの切れ込みに挟み込む（図 16）。



図 15 ローズグラスの葉鞘部

切り出した葉鞘部

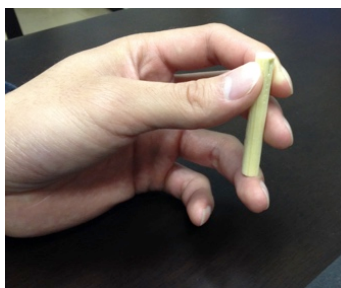
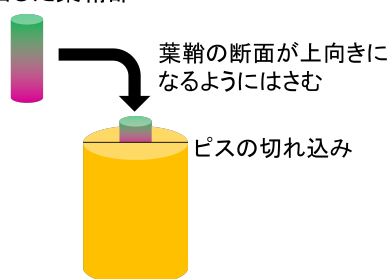
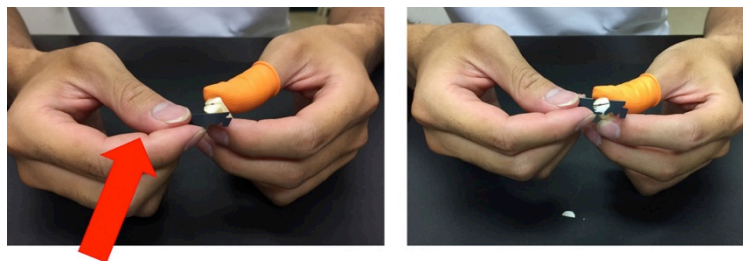


図 16 切り出した葉鞘のピスへのはさみこみとピスの持ち方

7. ピスは親指と人差し指に軽くはさみ込み、薬指あるいは小指でピスの下部を支えるようにして持つ（図 16）。
8. ピス上部からはみ出た試料はカミソリで切り捨てておく。
9. ピスを軽く支えたままカミソリを奥側（人差し指側）から手前側（親指側）に動かして試料をピスごと切り出す（図 17）。切り出された組織切片はペトリ皿中の水面に浮かべておく。以下に切り出す際のコツを記す。
*カミソリで切り出す際、ピスは指で軽く支えるようにして持つこと。**強くにぎりこむと組織片がつぶれてしまうことがある。**
*カミソリでピスの表面を軽くなでるようにしてなるべく薄い切片を切り出す。
*切片を切り出す際、指保護サックをつけた親指を切らないように注意すること。



切る方向(奥から手前へ)

図 17 ピスを用いた葉鞘の切片の作成

10. 数枚の葉鞘の切片を切り出した後、そのうちの 1 枚をスポイトを用いて、スライドガラス上にのせる。このとき、切片の断面が上向きになるようにスライドガラス上にのせること。切片がスポイトの吸引口よりも大きくて吸えない場合には、カミソリを用いてスポイトの先を切って使用してもよい。
11. カバーガラスをかける。余分な水分はカバーガラスの横からペーパータオルを当てて吸水・除去する。
12. 生物顕微鏡を用いてローズグラスの葉鞘の内部構造を観察する。最初は低倍率の対物レンズを使用して観察を行うこと。
13. 図 18 のような葉鞘の内部構造が観察されているか確認する。葉鞘の内部構造が観察できた場合には、実験補助員が確認を行うため、挙手により知らせること。
14. 制限時間内であれば、また別のローズグラス個体を使って切片作成の練習を行っても構わない。

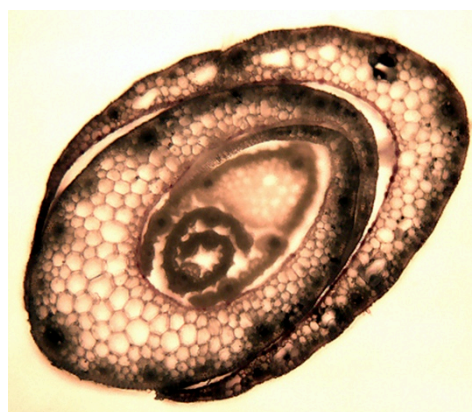


図 18 ローズグラス葉鞘の内部構造