

京都教育大学
平成21年度 修士論文

生命活動における酸素の役割について考えさせる理科授業の研究

京都教育大学大学院 教育学研究科
教科教育専攻 理科教育専修
高橋 明夢
(学籍番号 085046)

指導教官 細川 友秀
指導教官 坂東 忠司

—目次—

1、研究の背景と目的	1～2
2、第1章 高等学校生物分野における酸素に関する学習項目の科目間比較	2～6
3、第2章 生命活動における酸素の役割を考えさせる理科授業の研究	7～28
4、第3章 生徒実験の基盤となるマウス脾臓細胞の活性酸素に対する感受性 についての研究	29～39
5、第4章 SAMP1 腹腔マクロファージの過酸化水素水に対する感受性につ いて	40～46
6、結論	47
7、謝辞・参考文献	47
8、巻末付録 1～6	48～55

研究の背景と目的

酸素水の販売や酸素カプセルによる疲労回復が話題となっているように、酸素がからだによいというイメージが流布している。息切れなどのことばにみられるように、私たちの生存に酸素が必須であることは感覚的に理解しやすいが、酸素が生物に障害を与えていることは一般に理解しにくい。酸素による障害を考える場合、生物の歴史を振り返る必要がある。

地球を特徴づける高い濃度で存在する大気酸素の大部分は、光合成生物の活動により発生した酸素に由来する。藍藻類 (cyanobacteria) やそれから進化してきた真核藍藻類が大気に酸素を供給しつづけ、大気中の酸素濃度が 10 % となったのが 4 億年前のシルル紀と推定される。シルル紀にはオゾン層が形成され生物が上陸し、それ以後は陸上植物も大気に酸素を供給し、現在の酸素濃度の大气をつくりあげてきた。この間に酸素の強い酸化作用によって生物の働きが損なわれ、多くの生物が絶滅していった。酸素の酸化作用から身を守る手段のひとつに好気呼吸の獲得が挙げられる。酸素分子はエネルギー生産効率の高い呼吸の電子受容体となる。このため、酸素を利用する能力を得た好気性生物が進化のうえで有利な位置を占め、酸素が生物進化の原動力になってきた。このように酸素が好気性生物にとって必須となり、エネルギー生産効率の高さが生存にいかにより有利であるかについてよく理解されてきたため、酸素の必須性のみが強調されていると考えられる。

酸化障害は、反応性の高い酸素の還元分子種 (スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル) による細胞成分 (標的分子) の非特異的な酸化によってもたらされる。この反応性の高い酸素の分子種をまとめて活性酸素と呼ぶ。好気性生物は呼吸により吸収される酸素の大部分を安全に利用しているが、数%の酸素が電子伝達系で活性酸素に変わる。生体内酸素の恒常性を維持できない場合、細胞内で活性酸素が増産され老化・発癌・炎症・心臓疾患など、多くの疾病につながるといわれている。このように活性酸素は生体にとって害をなす。一方で、活性酸素は病原微生物に対する感染防御に働き、多彩な生理活性物質として重要な役割を果たす。活性化されたマクロファージにより生産される一酸化窒素 (NO) は、感染から生体を防御する。生物は、このようにして酸素や活性酸素の酸化作用とうまく向き合いながら進化を続けてきた。

私は酸素の性質や酸素を呼吸することの本質の正しい理解を生徒に促すために、このような酸素の酸化作用に注目して研究を行ってきた。高等学校生物Ⅱでは、酸化還元反応を利用して生命活動のために必要なエネルギーを生産することを学習するが、このとき一部の酸素が還元されて生成した活性酸素種をもとに過酸化水素が作られていることは取り上げられていない。それにも関わらず生物体に含まれているカタラーゼの働きで過酸化水素を分解するという探究活動が取り上げられている。この時、過酸化水素が体内で発生すると記載されているが、過酸化水素が発生しこれを分解しなければならない理由を記述していない。過酸化水素を無毒化する生体の働きを取り上げるのならば、過酸化水素を生成する生体内反応や生体への影響を共に学習する必要があると思われる。本研究では、生徒の生命現象に対する知識と関心を深めるために、酸素の性質や酸素を呼吸することの本質を考えさせる授業の考案を研究の目的とする。

第1章

高等学校生物分野における酸素に関する学習項目の科目間比較

1.1 序論

酸素水の販売や酸素カプセルによる疲労回復が話題となっているように、酸素がからだによいというイメージが流布している。息切れなどのことばにみられるように、私たちの生存に酸素が必須であることは感覚的に理解しやすいが、酸素が生物に障害を与えていることは一般に理解しにくい。呼吸は生物が生存するために必須の生物現象であり、中学校や高等学校の生物分野で必ず取り上げられるため、酸素に関する学習の機会が多い。そこで中学校と高等学校における生物と酸素に関わる学習項目を抜粋し、科目間で活動内容を比較して酸素がどのように扱われているか調査した。これを酸素の性質や酸素を呼吸することの本質に迫る授業を考案するための基礎研究とする。

1.2 資料と方法

現行学習指導要領（平成10年度改訂）の高等学校理科の生物と酸素に関する学習活動を含む科目の教科書を対象として調査を行った。調査資料は、以下の教科書を用いた（Table 1）。

Table 1 調査した教科書

書籍名	著者	発行年	出版社
未来へつながる サイエンス第2分野（上）	竹内敬人 山極隆 森一夫 他45名	2005年（H17年）	啓林館
改訂 理科総合B	佐野博敏 他27名	2008年（H20年）	第一学習社
改訂 生物I	田中隆莊 他22名	2007年（H19年）	第一学習社
生物II	田中隆莊 他22名	2007年（H19年）	第一学習社

1.3 結果

酸素に関する学習項目は大きく4つに分類された。「同化に関連した活動」では、主に植物の光合成と呼吸に関連して酸素を取り上げていたが、生物Ⅱでは酸素以外の電子受容体をつかった反応も扱われていた。「異化に関連した活動」では、多くの生徒が履修する中学校理科や生物Ⅰで嫌気呼吸を取り上げていなかった。酸素を利用した好気呼吸については調査した全ての教科書で取り上げられていた。「生物と環境に関連した活動」では、生物の進化の中で酸素が生物や環境にもたらす影響を取り上げていた。また、理科総合 B や生物Ⅱでは酸素の酸化作用による酸素毒性を扱っていた。「生命の維持に関連した活動」では、さらに発展した生物Ⅰと生物Ⅱの科目において、過酸化水素水による消毒や体内で発生した過酸化水素水から身を守る働きが簡単に取り上げられていた。しかし、免疫の単元や呼吸に付随した活性酸素の発生とは関係していなかった(Table 2)。

Table 2 酸素に関連した学習活動の分類

教科書区分 学習内容	未来へつながる サイエンス 第2分野(上)	理科総合 B	生物Ⅰ	生物Ⅱ
同化に関連した活動	◇植物が葉緑体で光合成を行うとき酸素を出している ◇酸素の発生を確かめる(実験) ◇植物も生きるために呼吸を行っている	◇光合成生物が出現した ◇ラン藻類は光エネルギーを利用して有機物つくり酸素を放出した	◇葉緑体で光合成が行われ、酸素が発生した ◇オオカナダモに光をあて、発生した気泡の数を光合成速度とみなす(実験)	◇光合成の研究と歴史 ◇光合成で発生する酸素の由来を明らかにした研究 ◇細菌の光合成は酸素の放出がみられない ◇無機物を酸化したエネルギーを利用した細菌の化学合成
異化に関連した活動	◇動物の呼吸の仕方 ◇細胞に運ばれた酸素を利用したエネルギー生産	◇原始的な細菌類は酸素を用いずに呼吸した ◇好気呼吸を行う生物が誕生した ◇有機物が酸素を利用して分解される	◇呼吸では多くの場合、酸素を用いている ◇酸素はミトコンドリアで最も多く消費される	◇異化の働きは、酸素を使わない嫌気呼吸と、酸素を使う好気呼吸に分けられる ◇好気呼吸の研究と歴史

		◇ミトコンドリアは好気呼吸の場(発展)		◇酸化酵素の働きにより酸素が還元されエネルギーを放出する
生物と環境に関連した活動	◇光合成が地球をつくり変えた(発展)	◇原始地球には酸素がほとんど存在しなかった ◇光合成生物が大気組成を変化させた ◇酸素濃度が増え、酸化作用が強まった ◇オゾン層の形成により生物が陸上化した ◇物質の循環に伴いエネルギーが移動する	◇大気中の酸素は植物の呼吸にとって不可欠な環境要因である	◇人体・海水・地表を構成する元素の中で酸素元素の占める割合 ◇原始大気中には酸素が存在しなかった ◇光合成生物は大気組成変化をもたらした ◇環境中に遊離した酸素の強い酸化作用による生物への影響 ◇酸素は紫外線によりオゾンに変わりオゾン層を形成した ◇古生代末には海洋にて大規模な無酸素状態が生じた ◇大気中の酸素は生物の好気呼吸に不可欠な環境要因である
生命の維持に関連した活動	◇酸素はなぜ必要なのか ◇赤血球は酸素が必要な細胞に酸素を渡すことができる		◇傷口に薬用の過酸化水素をつけると盛んに酸素を生じる ◇赤血球は各組織へ酸素を運ぶ	◇酸素が不足するとかま状化した赤血球が血行障害を起こす ◇体内で発生した過酸化水素を分解するカタラーゼの働き(実験)

1.4 考察

中学校理科第2分野では、植物の光合成と呼吸に関連して酸素が取り扱われ、光合成における葉緑体の働きに触れている。動物の呼吸では外呼吸を中心に取り上げるとともに、細胞の呼吸についても簡単に取り上げている。このように生徒は、高等学校までに光合成や好気呼吸の概念を学習しており、酸素に対するイメージをある程度形成していることが考えられる。

理科総合Bでは、光合成生物による大気の組成の変化と好気呼吸の獲得による効率のよい生命活動との相互のかかわりにおける酸素の働きを学習する。その時、酸素の酸化作用によって多くの生物が絶滅した歴史を知り、生物にとって酸素は有毒でもあるという新たなイメージが形成されると思われる。生物Ⅰは、中学校理科第2分野や理科総合Bと比べやや発展した内容で光合成や呼吸の現象が取り扱われる。ここでは、酸素が有機物を生産する過程で発生しエネルギーを生産する過程で消費される記述にとどまり、酸素の性質や酸素がどのように働くかは取り扱われていない。生物Ⅱは、同化で主に光合成を、異化で好気呼吸を取り扱う。そして、それらの反応で酸素がどのように関わるか取り上げる。その時、酸化・還元など代謝を理解するために必要な化学の知識に触れる。また、生物の進化で酸素毒性についても取り上げられる。以上より高等学校理科生物分野の3科目すべてを履修すると、生物が酸素の酸化作用から身を守る方法を発達させながら、酸素に依存してエネルギーを生産する好気呼吸を獲得した、生物の進化の道筋が一本につながると考えられる。

よって現行のカリキュラムでは、生物Ⅱで生命活動における酸素の役割を考えさせる授業を実践することが望ましいと考えられる。生物Ⅱでは、生物が酸化還元反応を利用して生命活動のために必要なエネルギーを生産することを学習するが、同時に一部の酸素が還元されて生成した活性酸素種をもとに過酸化水素が作られていることは取り上げられていない。それにも関わらず生物体に含まれているカタラーゼの働きで過酸化水素を分解するという探究活動が取り上げられている。この時、過酸化水素が体内で発生すると記載されているが、過酸化水素が発生する反応やこれを分解しなければならない理由は説明されていない。過酸化水素を無毒化する生体の働きを取り上げるのならば、過酸化水素を生成する生体内反応や生体への影響もいっしょに学習するのが良いと思われる。

第2章

生命活動における酸素の役割を考えさせる理科授業の研究

2.1 序論

2009年3月9日に、文部科学省から高等学校の新学習指導要領が公示され、今回の改訂で設置させる科目の構成が変わった。生物分野では生物Ⅰと生物Ⅱがそれぞれ生物基礎と生物に改称され、科目間で単元の移行が見られた。例えば、現行の生物Ⅱや理科総合Bで扱われる生物の進化に関する学習内容は生物基礎全体で取り上げる。また、生物Ⅰと生物Ⅱで扱われる免疫に関する学習内容は生物基礎に集約され、免疫に関わる細胞については、マクロファージとリンパ球を取り上げることが記されている。生物基礎の内容は、日常生活や社会との関連を示すことで生物や生物現象に対して興味・関心を高めることを目標としている。そこで、われわれにとって最も日常といえるがあまりに身近すぎて意識されにくい酸素の性質に注目した。

酸素は私たちが呼吸をしてエネルギーを得るために必須であることを中学校で習う。そのため、酸素はからだに良い物質であると考える生徒は多い。しかし、生物は酸素の酸化作用から身を守る方法を発達させながら、酸素の酸化作用を利用して活動エネルギーを得る好気呼吸を獲得してきた。このような生物の進化を学習することで酸素の性質の正しい理解につながると考えた。また、免疫に関する学習ではマクロファージの機能を学習するとき、酸素の酸化作用を利用した生体防御のしくみを取り上げることで生命活動における酸素の役割に関する理解が深まると思われる。呼吸や生体防御は私たちの体内で起こる生物現象なので生徒の興味・関心をひきやすい学習内容である。呼吸や生体防御といった生物現象を扱う授業を、最も身近な酸素という物質に注目して行うことで、生徒の科学的な見方や考え方を養うことを本研究の目的とする。

2.2 材料

2.2.1 マウス

私たちの研究室でコンベンショナルな飼育環境下において維持しているSAMP1/Kue系マウスを使用した。

2.2.2 培養液・緩衝液・試薬の調整

培養液、緩衝液、試薬は特に記載のない限り以下に記した方法によって調整したものを使用した。

Eagle's MEM 培養液: Eagle's MEM 粉末培地 (ニッスイ製薬, 東京) 4.7 g をイオン交換した再蒸留水 500 ml に溶かし、120 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌を行った。常温まで冷却した後、7 % NaHCO_3 水溶液を 5-6 ml 加えて pH を 7.2 に調整した。

RPMI1640 培養液: RPMI1640 粉末培地 (ニッスイ製薬) 5.1 g をイオン交換した再蒸留水 500 ml に溶かし、120 °C で 20 分間高圧蒸気滅菌を行った。常温まで冷却した後、ウシの胎仔血清 (FCS) (Intergen Company, New York, USA) と L-glutamine (ナカライテスク, 京都) をそれぞれ 5 % と 2 mM になるように加え、7 % NaHCO_3 水溶液を 8-10 ml 加えて pH を 7.2 に調整した。その後、2-mercaptoethanol (2ME) (ナカライテスク) を 5×10^{-5} M となるように加えた。

リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.2): NaCl 8.0 g、 KH_2PO_4 0.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g、 KCl 0.2 g を再蒸留水 1 l に溶かし、120 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌を行った。

Coating buffer(pH 9.6): Na_2CO_3 1.59 g、 NaHCO_3 2.93 g、 NaN_3 (和光純薬, 大阪) 0.2 g を再蒸留水 1 l に溶かし、120 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌を行った。

PBS-Tween(0.05 % polyoxyethylene sorbitan monolaurate in PBS): Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) (ナカライテスク) 0.5 ml、 NaN_3 0.2 g を PBS 1 l に溶かした。

Triss wash buffer: Tris (hydroxymethyl) aminomethane (ナカライテスク) を 50 mM、Tween 20 (ナカライテスク) を 0.2 % となるよう再蒸留水にとかし、5N-HCl (ナカライテスク) で pH 7.2-7.9 に調整し全量を 1 l とした。

Diethanolamine buffer: Diethanolamine (和光純薬) 97 ml、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬) 0.1 g、 NaN_3 0.2 g を再蒸留水 800 ml に溶かし、5N-HCl (ナカライテスク) で pH 9.8 に調整し全量を 1 l とした。その後、120 °C で 20 分間高圧蒸気滅菌を行った。

0.2 % トリパンプルー溶液: PBS 100 ml にトリパンプルー (ナカライテスク) 0.2 g を溶かした。

亜硝酸ナトリウム水溶液: 亜硝酸ナトリウム (ナカライテスク) 70 mg を再蒸留水 100 ml に溶解させ、10 mM に調整した。

グリース試薬: 85 % リン酸 (ナカライテスク) 6 ml を再蒸留水 198 ml で希釈し、

2.5 %に調整した。これを溶媒として sulfanilamide (サルファニルアミド) (Sigma Chemical Co.) 2.06 g と N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩) (Sigma Chemical Co.) 206 mg を常温で溶解させ、それぞれ 1 %サルファニルアミド、0.1 %ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩となるよう調整した。

2.2.3 マイトーゲン

腹腔マクロファージを活性化し、NO 産生反応を誘導するグラム陰性大腸菌に由来するエンドトキシンであるリポポリサッカライド (LPS, Type B, *E. coli*, 0111 : B4, Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) を使用した。

2.2.4 酸化障害誘導物質

酸化障害を誘導する物質として、過酸化水素水 (hydrogen peroxide: H_2O_2) (和光純薬) を使用した。

2.3 方法

2.3.1 腹腔細胞と腹腔マクロファージ懸濁液の調整

マウスの頸部を切開して脱血死させ、70 %エタノールで消毒した後上皮をはがした。冷やした 5 % FCS 含 RPMI 1640 培養液を滅菌した注射器で 5 ml 腹腔内に注入し、氷上で腹壁をマッサージした。その後注射器で腹腔細胞を回収するという操作を 2 回繰り返し、粗製細胞懸濁液を作成した。これを 4 °C, 1000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てた後、5 % FCS 含 RPMI1640 培養液を加えて細胞懸濁液を作成した。

2.3.2 Fuchs 計算盤による細胞数の測定

細胞懸濁液 50 μ l をトリパンブルー溶液 50 μ l で 2 倍に希釈したものを Fuchs 計算盤に流し込み、染色されていない細胞を生細胞として数えて、細胞濃度を計測した。なお、顕微鏡の倍率を 400 倍にして、比較的大きく細胞質に富んだ細胞をマクロファージとみなした。

2.3.3 腹腔細胞の培養

上記のようにして作成した 1.0×10^6 cells/ml の濃度の細胞懸濁液を 96-well 細胞培養マイクロテストプレート (Falcon 353072, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA) に 200 μ l/well となるよう分注した。これを 5 % CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーター内で 2 時間培養して腹腔細胞をプレート底面に接着させた。その後非付着細胞を除去するために、各 well を 37 $^{\circ}\text{C}$ に温めた Eagle's MEM で洗浄して付着性マクロファージを得た。各 well にマクロファージ活性化物質として LPS の希釈液をそれぞれ 50 μ l ずつ、さまざまな濃度に希釈した過酸化水素を 50 μ l 加え計 100 μ l になるよう添加した。それを再び 5 % CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーター内で一晚培養し、NO 産生を誘導した。また、LPS は 5 % FCS 含 RPMI 1640 培養液を用いて 20 ng/ml に希釈したものを使用した。過酸化水素は 5 % FCS 含 RPMI 1640 培養液を用いて 10^{-8} ~ 10^{-4} M に希釈したものを使用した。

2.3.4 グリース (Griess)法による NO_2^- の測定

96-well 培養プレートに被検培養上清を 2 ~ 16 倍に、また positive control として亜硝酸ナトリウム水溶液を 100 μM ~ 3.125 μM に PBS を用いて段階希釈し 100 μ l/well となるよう分注した。その後、各 well にグリース試薬を 100 μ l ずつ添加して合計 200 μ l/well に混合した。それを室温で数分インキュベートし、発色を確認後マイクロプレートリーダーで 540 nm での吸光度を測定した。

2.3.5 腹腔細胞の酸化障害に対する防御機能の評価

上清回収後、96-well プレートの底に沈んだ腹腔細胞を良く懸濁し、トリパンブルー溶液により死細胞を染色した。生細胞数と死細胞数を数えて生細胞の割合を求めて腹腔細胞の酸化障害に対する防御機能の評価をした。

2.3.6 授業実践と授業評価

生命活動における酸素の役割を考える学習指導案を作成した (Table 3)。京都教育大学付属高校から生徒を募集して、指導計画における第四次の生物の体内環境の維持に関する探究活動を設定した。生徒は呼吸の基本的な概念を学習しており、スーパーサイエンスハイスクールの事業における SSC の活動でマクロファージの機能をいくつ

か観察・実験していた。このような生徒を対象として酸素の性質と酸化作用を利用した生体防御のしくみを観察・実験して、実験前後で酸素に対する概念に変化があったかをアンケート(巻末付録 1、2)によって調査した。

【実践授業】 日時：平成 22 年 1 月 5 日(火) 午後 1 時～6 時

6 日(水) 午後 1 時～7 時

対象：附属高校 1、2 年生

1 月 5 日(火) 午後 1 時～6 時(男子 1 名、女子 4 名、合計 5 名)

1 月 6 日(火) 午後 1 時～7 時(男子 1 名、女子 6 名、合計 7 名)

場所：京都教育大学

授業者：高橋 明夢

Table 3 学習指導案

第○学年理科(生物基礎)学習指導案

1. 日時 平成○○年○月○日○曜 第○校時

2. 学年・組 第一学年 計○名

3. 単元名 生命活動における酸素の役割

4. 単元の目標

(生物学への関心・意欲・態度)

- ・生物現象について興味を持ち、生命を維持する働きを理解しようとする。

(生物学的な考え方や見方)

- ・生物にとって酸素が不可欠である反面、有害に働くことに気づく。
- ・酸素の特徴や性質に注目し、酸素の酸化作用が生体を維持するために活用されている例を考える。

(生物学的な表現・処理)

- ・生物が酸素の酸化作用から身を守る方法を発達させながら、酸素に依存してエネルギーを生産する好気呼吸を獲得し、さらにこのような酸化作用を生体防御に利用するしくみも獲得した生物進化の道筋を酸素に注目して説明できる。

(生物学的な知識・理解)

・酸素に関する生物現象である光合成、呼吸、生体防御のしくみについて理解する。

5. 単元について

①教材観

生物学は観察、実験を通して生物や生物現象を探究し、解明し、理解する学問である。その基礎となる高等学校の生物基礎で、酸素が生物の生命活動にさまざまな影響をもたらすことを系統的に学習することは、生物や生物現象を正しく理解する上で重要である。高等学校の生物基礎では、「細胞とエネルギー」、「免疫」、「生物の進化」で酸素に関する学習活動が取り扱われている。

本単元では生物活動における酸素の役割について学ぶが、酸素は生物がはるか昔から生命活動に利用してきて、生物にとって最も重要な物質のひとつといえる。一方で、鉄がさびる現象を化学的に酸化で説明できるが、呼吸によって取り入れた酸素によって生体が酸化の影響を受けると聞くことは少ない。また酸素や活性酸素の酸化作用を、生物の体を侵入異物から守るために有効に使う細胞が存在する。このように酸素が生物現象と密接に関わっているため、本単元は生物学を身近に感じることでできる単元といえる。本単元の「生命活動における酸素の役割」では「生物の共通性と多様性」、「細胞とエネルギー」、「免疫」、「生命活動における酸素の役割に関する探究活動」が取り上げられる。本単元で得た酸素の性質に対する正しい知識が、生物と生物現象に深く関連していることを理解させ、探究実験を通じて科学的な見方や考え方を身に付けることもねらいとしている。

②生徒観

中学校では、第2分野「(3) 動物の生活と生物の変遷」で生物が長い年月をかけて進化したことを学習している。また、第2分野「(1) 植物の生活と種類」で光合成を、「(3) 動物の生活と生物の変遷」で呼吸によりエネルギーを取り出すことを学習しており、酸素が私たちに必要なものというイメージを持っていると思われる。本単元によって酸素の酸化作用による毒性を学習することで酸素の新たなイメージが形成されるであろう。免疫については、第2分野「(3) 動物の生活と生物の変遷」で食細胞の働きを簡単に学習している。

③指導観

本単元は酸素の性質の正しい理解を促すよう指導する。このとき酸素の必須性は感覚的に理解しやすいが、酸素が生物にとって有毒であることは理解しにくい。酸素の毒性を学習する場合は生物進化の歴史を振り返る必要があり授業展開が単調となりやすい。ただ知識だけを羅列するだけのような授業にならないよう心がける必要がある。また、酸素の毒性を学習すると酸素を恐れる生徒が現れる可能性がある。そこで、酸化に対する防御機能が生物には備わっていることや、酸化作用を利用して生体内に侵入した細菌を殺菌して体内環境を一定に保つ免疫系の細胞の存在を紹介する。探求活動では本単元の学習内容の理解を深めるとともに、自分の目で生物現象を観察することで生命の不思議さやすばらしさを実感させる。

6. 指導計画（全 14 時間）

第一次 生物の共通性と多様性 …2 時間

生物の進化のなかで、光合成生物による酸素の生産、酸素を利用した効率のよい呼吸のしくみを獲得したことによる生物の飛躍的な進化を理解させる。

第二次 細胞とエネルギー …2 時間

呼吸と光合成の概要を扱い、生命活動に必要なエネルギーと代謝について理解させる。

第三次 免疫 …2 時間

免疫にかかわる細胞として、マクロファージを取り上げ、異物を認識、排除して体内環境を保つ仕組みを理解させる。

第四次 生物の体内環境の維持に関する探究活動 …8 時間（本時）

- ・生徒実験「酸素の性質と酸化を利用した生体防御のしくみ」（5 時間）
- ・酸素と生物現象に関する学習活動と関連させながら、観察、実験により得られた結果を考察して、生物学的に探求する方法を習得させる。（3 時間）

7. 本時の学習

①本時の目標

- ・ 生体の酸化による影響を考え、結果を予想できる。
- ・ 酸素の性質を理解する。
- ・ 酸化作用を利用した生体防御のしくみを理解する。
- ・ 正確な実験操作を身につける。

②本時について

本時は、生体の活性酸素に対する感受性を測定する実験教材である。生物は酸素と活性酸素の酸化作用から身を守る方法を発達させながら、酸素に依存してエネルギーを生産する好気呼吸を獲得した。さらにこのような酸化作用を生体防御に利用するしくみも獲得した。生体防御を担う細胞であるマクロファージは、体内に侵入した病原体などを自身の産生する活性酸素により攻撃して体内環境を一定に保っている。そのためマクロファージは、他の免疫系の細胞より酸化作用に対し高い防御能をもつ事が考えられる。マクロファージと免疫系の細胞である脾臓のB細胞の活性酸素に対する防御能を測定し比較をすることで、酸素のもつ性質の正しい理解と酸化作用を利用した生体防御のしくみの理解をねらいとしている。

③本時の展開

○主たる指示・発問

■評価

区分	学習活動と内容 (予想される生徒の反応)	指導上の留意点・支援・評価 (教師の活動)	準備物・資料等
1 日目 導入 15 分	1. 既習事項の復習 ・ マクロファージの機能を 思い出す。 ・ 実験の概要を聞く。	・ マクロファージの様々な機能を説明し ながら、補足説明をする。 ○ 本日の実験概要を説明する。	・ 配布プリント

展開Ⅰ 90分	2. 実験操作(腹腔細胞の回収)と説明 ・クリーンベンチに移動し、腹腔細胞の回収を実施する。 ・実験の目的、操作、留意点について説明を聞く。必要事項をメモする。	○「クリーンベンチに移動し、腹腔細胞の回収を実施してください。」(腹腔細胞の接着には時間がかかるため。) ○実験の目的、操作について説明する。操作上の留意点は ・無菌操作の徹底 ・マウスの殺し方と表皮の剥ぎ方 ・シリンジと注射針の扱い方 ・腹腔細胞の回収方法 ・細胞懸濁液の調整方法 ・マイクロピペットの取り扱い である。 ■無菌操作ができたか。	・実験操作、実験器具、試薬等は配布プリントを参照 ・白衣着用
展開Ⅱ 30分	3. 実験の主旨説明を聞く。 ・アンケートを実施する。 ・実験予測をする。 ・酸素や過酸化酸素の性質について考える。 ・希釈の方法を考える。 ・LPSを加える意味を考える。	○講義室に戻って、本実験の主旨を説明する。 ○「アンケートを実施してください。」 ・実験予測をたてられているか。 ■生体の酸化による影響を考え、結果を予想できたか。 ○LPSや過酸化水素水の濃度はどのようにして調整しますか。」	
展開Ⅲ 90分	4. 実験操作(非接着細胞の洗浄とLSP、過酸化水素水による刺激) ・実験操作を実施する。 ・非接着細胞を丁寧に洗い流す。 ・時間に余裕のある班はLPSの添加を実施する。 ・過酸化水素水を希釈し、添加する。 ・後片付けをする。	○「クリーンベンチに移動して腹腔細胞の洗浄を行ってください。」 ・培養液を温める。 ○各班を机間指導し、進捗状況を確認する。 ・マクロファージを吸い込むことなく洗浄しているか。 ・過酸化水素水を正しく希釈しているか。 ・質問等に対応し必要に応じて助言する。 ○「早く終了した班は後片付けを始めてください。」 ・廃液の処理 ・器具の洗浄、返却 ・クリーンベンチの消毒	

2 日目 導入 30 分	5. 既習事項の復習 ・実験結果の予測を思い出す。 ・実験の概要を聞く。	・1 日目の作業の復習をする。 ○本日の実験概要を説明する。	・配布プリント
展開Ⅳ 90 分	6. 実験操作(グリース法) ・実験操作を実施する。 ・培養上清を希釈する。 ・亜硝酸ナトリウムを希釈する。 ・グリース試薬を加え、発色を確認する。 ・マイクロプレートリーダーで発色強度を測定する。 ・トリパンプブルー染色を実施する。 ・細胞の様子を観察する。 ・後片付けをする。	○「実験操作を開始してください。」 ○各班を机間指導し、進捗状況を確認する。 ・培養上清を正しく希釈しているか。 ・亜硝酸ナトリウムを正しく希釈しているか。 ・培養上清中の亜硝酸イオンは、過酸化水素水濃度に依存的な発色反応を示しているか。 ■培養上清中の亜硝酸イオン濃度に応じた発色が確認できたか。 ○「トリパンプブルーにより染色された死細胞を観察してください。」 ・正細胞の割合を測定する。 ○「早く終了した班は後片付けを始めてください。」 ・廃液の処理 ・器具の洗浄、返却	・実験操作、実験器具、試薬等は配布プリントを参照 ・白衣着用
展開Ⅴ 90 分	7. 実験操作(カレイダグラフによるデータ処理) ・エクセルで数値計算をする。 ・グラフを作成する。	○「実験操作を開始してください。」 ○各班を机間指導し、進捗状況を確認する。 ・エクセルによる数値計算 ・カレイダグラフによるグラフ作成 ■過酸化水素水濃度に依存的な NO 産生反応を確認できたか。 ■マクロファージは高濃度の過酸化水素水にのみ感受性を示したか。 ○「マクロファージと腹腔細胞のデータを比較してください。」	

まとめ 30 分	8. 実験結果の考察 ・アンケートを実施する。 ・マクロファージの過酸化水素水に対する高い防御の理由を推定する。 ・高濃度や低濃度の酸素を呼吸した場合の生体への影響を推測する。	○実験結果より考察をするように支持する。 ○「アンケートを実施してください。」 ■マクロファージの過酸化水素水に対する高い防御の理由を考察できたか。 ■高濃度や低濃度の酸素を呼吸した場合の生体への影響を考察できたか。	
---------------------	---	--	--

8. 評価（の観点と方法）

- ・生体の酸化への影響を考え、結果を予想し、確認操作をできたか。
- ・酸素の性質を理解できたか。
- ・酸化作用を利用した生体防御のしくみを理解できたか。
- ・雑菌が混入することなく培養操作ができたか。

9. 配布プリント

- ・巻末付録 3。

2.3 結果

2.3.1 実験前に生徒のもっていた酸素に対するイメージと生体での酸素の役割についての考え

酸素は体によいというイメージを持つ生徒はいなかったが、酸素は呼吸や生命活動に必要なものという考えが多かった。酸素の酸化作用を答えた生徒が1名いた。酸素は生命活動のためのエネルギーを生産する呼吸に使用されると全員が答えたが、どのようにして酸素が働くかは不明であった(Table 4)。

Table 4 酸素に対するイメージと酸素の役割についての考え

	酸素に対するイメージ	生体での酸素の役割についての考え
F 1	◇植物がつくる ◇肺で吸収される	活動するときエネルギーをつくるのに必要
F 2	人間にとって必要なもの	生体にいきわたって、細胞の呼吸に使われ、エネルギーをつくる助けをする
F 3	◇多くの生物が必要としている ◇二酸化炭素⇄酸素（ガス交換、物を燃やしたときなどから）	細胞に届けられ、細胞の呼吸につかわれる
F 4	生きるのに絶対必要	◇殺菌 ◇細胞の呼吸に必要
M 1	◇助燃性 ◇激しい酸化が燃焼というイメージ	◇細胞に送られて呼吸に使用 ◇どのように働くかは分からない

2.3.2 生徒のもつ活性酸素に関する意識調査

活性酸素に関する知識をもつ生徒は少なかった。強い酸化作用を持つと答えた生徒が1名おり、その生徒は呼吸によって活性酸素が生じると答えた。細菌の侵入時に活性酸素が発生すると全員の生徒が答えた(Table 5)。

Table 5 活性酸素に対する知識調査

		体内で活性酸素が発生すると思う活動				
	活性酸素について	呼吸	運動	細菌の侵入	喫煙	紫外線照射
F 1	知らない		○	○	○	
F 2	知らない			○	○	○
F 3	知らない		○	○		○
F 4	活性酸素の洗剤がある気がする			○	○	
M 1	強い酸化作用をもつと聞いた	○	○	○		○

2.3.3 過酸化水素水がマクロファージの NO 産生能に及ぼす影響の予測

マクロファージは過酸化水素水による酸化の影響を受けないため、マクロファージの機能は変わらないと予測した生徒が 2 名いた。また、過酸化水素水がマクロファージ機能を増強すると予測した生徒も 2 名いた(Table 6)。

Table 6 活性酸素のマクロファージへの影響

	NO 産生能	理由
F 1	増強する	直感
F 2	増強する	消毒液に過酸化水素が含まれるので増強されるから
F 3	変わらない	マクロファージは過酸化水素水の影響を受けないから
F 4	低下する	周りには既に過酸化水素水が大量にあるので NO は必要ないから
M 1	変わらない	マクロファージは過酸化水素水の影響を受けないから

2.3.3 過酸化水素水が抗体産生細胞の抗体産生能に及ぼす影響の予測

過酸化水素水は抗体産生能に影響を及ぼさないと考える生徒が多かった。M1 の生徒は、細胞の防御力の違いから予測をたてていた(Table 7)。

Table 7 活性酸素の脾臓の B 細胞への影響

	抗体産生能	理由
F 1	変わらない	抗体産生細胞が互いを傷つけて性能が落ちることはないから
F 2	増強する	消毒液に使われるからマクロファージを増やすことができるから
F 3	変わらない	抗体産生細胞も過酸化水素水の影響を受けないから
F 4	変わらない	活性酸素を放出する細胞と抗体を産生する細胞の働きは別物だから
M 1	低下する	活性酸素を生産するマクロファージと違って耐性がないから

2.3.5 マクロファージと抗体産生細胞の機能に影響を与えた過酸化水素水の濃度の比較と結果の考察

マクロファージの NO 産生能は、抗体産生細胞の抗体産生能に影響を与えた低濃度の過酸化水素水に対し感受性を示さないという実験結果をすべての生徒が得ていた。この感受性の違いについて生徒は、全体のまとめとしてさまざまな可能性を考えつつ、マクロファージは脾臓の抗体産生細胞と比較して過酸化水素水に対する防御力が高いという結論を導き出すことができていた(Table 8)。

Table 8 マクロファージと抗体産生細胞が影響を受ける過酸化水素水の濃度の比較

	マクロファージ	抗体産生細胞	結果のまとめと考察
F 1	$10^{-5} \sim 10^{-4}$ (M)	無回答	マクロファージは活性酸素を無毒化できるから活性酸素にやられにくい
F 2	10^{-4} (M)	無回答	マクロファージは脾臓より酸素に強いから
F 3	$10^{-5} \sim 10^{-4}$ (M)	$10^{-8} \sim 10^{-6}$ (M)	◇高濃度ではマクロファージや B 細胞が酸化作用によって死んだり、機能低下がおこるから ◇マクロファージは NO をつくるが、脾臓は活性酸素を作らないから ◇マクロファージは直接他のマクロファージから活性酸素をかけられるので B 細胞に比べ多少濃度が高くて機能に影響はでないのではないか
F 4	10^{-4} (M)	$10^{-8} \sim 10^{-6}$ (M)	◇マクロファージは自身が活性酸素を使うため、耐久性が高いと考えられる ◇脾臓はマクロファージほど活性酸素にさらされる機会がないためマクロファージに比べ弱い
M 1	10^{-4} (M)	$10^{-8} \sim 10^{-6}$ (M)	◇マクロファージが耐えられる活性酸素濃度を超えてしまったから ◇マクロファージは通常の細胞より活性酸素に耐える力を持っていると考えられる
F 5	10^{-4} (M)	$10^{-8} \sim 10^{-6}$ (M)	◇マクロファージと B 細胞では担当する機能が異なるから ◇マクロファージの周りには多くのマクロファージがいるため酸素につよい必要がある
F 6	$10^{-5} \sim 10^{-4}$ (M)	$10^{-8} \sim 10^{-6}$ (M)	マクロファージは酸素にやられにくい

2.3.6 実験で学んだ知識の定着度についての調査

二日間とも実験に参加した生徒(F1～F4 および M1 の 5 名)の教育効果を計るため以下の濃度の酸素を呼吸により吸収した場合、生体にどのような影響が起こるか質問調査した。空気中の酸素が 40 % の場合では酸化の影響が高まる、空気中の酸素が 10 % の場合では、酸化の影響が低下するという回答を期待して質問を行った。酸素濃度が 40 % の場合は酸素の毒性を、酸素濃度が 10 % の場合は酸素の必要性を調べた。酸素濃度が 40 % の場合は酸化作用によって生体に悪影響が及ぶと考える生徒が 5 名中 3 名いた。酸素濃度が 10 % の場合は酸化作用が弱まったり、活動エネルギーが作れなくなると 5 名すべてが答えた(Table 9)。

Table 9 知識の定着度についての調査

	酸素濃度が 40% の場合	酸素濃度が 10% の場合
F 1	エネルギーをたくさん生産できる	◇高山病みたいになる ◇力が出ず、眠くなる
F 2	抗体産生能力が低下する	細菌を殺す力が弱まる
F 3	◇活性酸素の濃度が高くなる ◇呼吸数が減るため体内に入る酸素の量は変わらない	◇活性酸素の濃度が低くなる ◇呼吸数や量が増え 21% と同じくらい酸素を取り入れる
F 4	◇酸素ポンプがあるくらいだから影響ない ◇過酸化水素水の分解反応を早める	◇高山病のような症状がでる（貧血、息切れなど）
M 1	細胞と細菌の死滅数が増える	細胞に供給される酸素が減り、酸化作用はさがる
F 5	B 細胞のように過酸化水素に対する防御が低い部分に影響がでる	酸素からエネルギーを作るため、エネルギー不足となる
F 6	◇酸素吸収効率を下げる ◇エネルギーを生産して活動するよりも、体の機能が低下する	酸素吸収効率を上げるため、体に負担がかかる

2.3.7 感想

全体的に実験手順や考察が難しいと感じる生徒が多かった。予測と違う結果が得られ印象的だったと答えた生徒がいた (Table 10)。

Table 10 感想

F 1	◇高度な実験で完全に理解できたか定かでなく勉強する必要があると感じた ◇数学ができないと、実験結果が得られないとわかった
F 2	難しかった
F 3	◇無菌操作をしてみたり、色々な経験ができてとても楽しかった ◇色々なことがわかって面白かった
F 4	◇慎重にする操作が多く、無菌を心がけるなど気を遣う実験で苦労したが、自分で考えて自分でグラフにしたりすることで理解が深まった ◇考察は難しいが面白い
M 1	◇単位や文面にある手順はとても難しかったが、一つ一つの手順をやっていく時は論理的に理解できたと思う ◇予想とは違う結果が印象的だった
F 5	◇過酸化水素水がマクロファージや抗体産生細胞に影響を及ぼすことがよく分かった ◇マクロファージの方が抗体産生細胞よりも影響を受けにくいことが分かった
F 6	◇理解するのに苦労したが、マクロファージの働きを年末の講座から通して見ることができて面白かった ◇ネズミを屠殺する時に、人間はこのような犠牲の上に発展を築いてきたと思い知った

2.3.7 実験のあとで生徒の気持ちの変化について

今回の実験のこと以外で、酸素に関して何か知りたいことがあるか質問をして実験のあとで気持ちに変化が起こったか調査した。無回答の生徒が多かったが2名は酸素についてさらに知りたいと感じたようであった(Table 11)。

Table 11 生徒の気持ちの変化

F 1	もっと色々
F 2	無回答
F 3	無回答
F 4	◇細胞の呼吸で酸素がどう使われているのか ◇酸素が平気な生物と苦手な生物の違い(元々は苦手だったが、進化の過程で酸素への耐久性がついたのでは?)
M 1	あるかどうかわからない
F 5	無回答
F 6	無回答

2.3.8 実験前後での酸素に対する概念の変化について

事前アンケートで生徒のもっていた酸素に対するイメージや役割について、事後アンケートで仮に空気中の酸素が40%の場合と10%の場合、それぞれの条件下で呼吸すると生体にどのような影響が現れるか質問した。これらを比較して、実験前後で酸素に対する概念に変化があったか評価した。

多くの生徒は、酸素は多くの生物に必要なものだが呼吸によって活性酸素が発生するとは考えていなかった。しかし、F3やM1は事後アンケートにおいて酸素呼吸に付随して発生する活性酸素と酸化の影響を結びつけて回答した。また、F1やF4は高濃度の酸素を呼吸した場合エネルギーを大量に生産できる、または酸化による影響はないと回答した(Table 12)。

Table 12 酸素に対する概念の変化

	実験前			実験後	
	酸素に対する概念	活性酸素が発生 すると思う活動		酸素濃度が 40% の場合	酸素濃度が 10% の場合
		呼吸	細菌 の浸入		
F 1	活動エネルギーを つくるのに必要		○	エネルギーをたくさん生 産できる	高山病のようになる、エネ ルギーが出ない
F 2	細胞呼吸に使われ、 エネルギーをつく るために必要		○	抗体産生能力が低下する	細菌を殺す力が弱まる
F 3	細胞呼吸に使われ、 多くの生物に必要		○	活性酸素濃度が高くなる	活性酸素濃度が低くなる
F 4	細胞呼吸や生きる ために絶対必要		○	過酸化水素水の分解を早 めるため影響はない	高山病のようになる
M 1	細胞呼吸に使用	○	○	細胞と細菌の死滅数が増 える	供給される酸素が減り、酸 化作用はさがる

2.3.9 授業評価について

事後アンケートにおける生徒の感想からいくつかの要素を抜き出し、項目ごとに整理し授業の分析を行った。項目は実験に関することと、科学的な考え方に分けられた。実験に関する項目は、さらに実験操作に関することと、実験理解に関することに分けられた。F3、F4 と M1 の生徒は、実験操作は難しかったが理解できたと回答していた。また、F1 や F4 は定量化について回答していた(Table 13)。

Table 13 授業評価

	実験について		科学的な考え方
	実験操作	実験理解	
F 1	高度な実験だった	理解できたか分からない	数学ができないと実験結果を得ることができないと分かった
F 2	難しかった		
F 3	無菌操作など色々な経験 ができて楽しかった	色々な事が分かって楽しか った	
F 4	慎重な操作や無菌操作に 苦労した	自分で考えてグラフ化する ことで理解が深まった	自分で考えてグラフ化することで理 解が深まった
M 1	実験手順はとても難しか った	一つ一つ手順をこなすこと で理解できた	予想と違う結果が印象的だった

2.4 考察

2.4.1 結果の予想について

過酸化水素水がマクロファージの NO 産生能に及ぼす影響と B 細胞の抗体産生細胞への分化に及ぼす影響を生徒に予測させた。生徒の多くはマクロファージや抗体産生細胞の機能は過酸化水素水の影響を受けないため変化しない、または過酸化水素水がこれら細胞の機能を増強するという予測した。この予測は、マクロファージ機能では高濃度の過酸化水素水に、抗体産生細胞では低濃度の過酸化水素水に対して感受性を示すという結果と一致しなかった。生徒は過酸化水素水の性質や生体への影響に関する知識をもっていなかったが、以前の SSC の活動でマクロファージが作る活性酸素によって微生物を殺す生体防御のしくみの概要を学習していた。このような予備知識と自分なりの活性酸素観から実験結果を予測していたと考えられる。生徒は予測していた結果を得ることはできなかったが、一連の探究活動を行うことで生物現象について自ら考えて問題を解決することの楽しさを味わうことができたと思われる。

トリパンブルー染色により酸化作用を受けた細胞を観察した時に、何名かの生徒は授業者のはたらきかけなしに、細胞数をカウントして定性的ではあるが死細胞の割合を算出していた。このことから、生徒は細胞を観察するだけでなく、観点に従い物事を捉えることができていたと思われる。また、数学ができないと実験結果が得られないとわかったというような感想や、自分で考えて自分で測定データをグラフ化することで理解が深まったという感想があった。数値を用いて客観的にデータを得る方法や、多数の測定値から平均値や標準誤差を求める処理をおこなうことで、生物現象に対して科学的な見方や考え方で接することができたと考えられる。

2.4.2 酸素の性質の理解度について

生徒の多くは実験前の調査から生物が生きて活動するために酸素は必須と考えていたが、酸素が呼吸の反応においてどのように働いているかわかっていないようだった (Table 4)。また、活性酸素がものを酸化するという性質を答えていた生徒がいたが酸化が自己を構成する細胞に影響を与えるとは思っていないようだった (M1)。今回の実験に参加した生徒の大部分は高校 1 年生のため、生物Ⅱの酸素の酸化作用を利用した呼吸の過程や生物の進化のなかで生物と酸化作用の関わりを学習していないことが原因と考えられる。よって生徒は酸素や活性酸素の酸化作用に対し予備知識をほとんど

もっていなかったので、実験を進めながら酸素に関するエピソードなどを話して興味付けを行えば良かったと思われる。

高濃度と低濃度の酸素条件下で呼吸することによる生体への影響を質問した(Table 9)。高濃度の酸素を呼吸した場合、酸化作用が高まり細胞や細胞の機能に影響がでると答えた生徒が現れた(F2、M1)。また、呼吸によって大量の活性酸素が発生することや活性酸素を消去する生体の働きと結びつけて答えた生徒も見られた(F3、F4)。一方でエネルギーを大量生産できると答えた生徒がいた(F1)。次に低濃度の酸素を呼吸した場合、活性酸素濃度の低下や生体への酸化作用の影響は低下すると考えた生徒が見られた(F3、M1)。殺菌に利用される活性酸素の材料となる酸素が不足するため殺菌力が弱まると、生体防御の機能と結びつけて答えた生徒も見られた(F2)。これらの結果は、酸素のもつ酸化作用という概念が実践によって新たに形成され定着したためと考えられる。一方で生命維持に必要なエネルギーが不足すると答えた生徒もいたため、酸素のもつ酸化作用という性質がどの程度理解されているか疑問が残った。この結果は、過酸化水素水を細胞に添加する意味を生徒に伝えられなかったことが原因と考えられる。過酸化水素水は、細菌の侵入時にマクロファージによって放出される活性酸素の一種であり、大量の細菌が侵入するとそれに応じて過酸化水素水も大量に放出されマクロファージや生体を構成する細胞に対する酸化作用が高まる。また、ヒトは運動をするとエネルギー不足となり酸素を体内に大量に取り入れるため、酸素呼吸に付随して大量に活性酸素が発生して生体への酸化作用が高まる。しかし、これらの酸化作用を直接測定することは困難であるため、細胞などに確実に酸化作用をもたらす過酸化水素水を添加した。このような背景をしっかりと理解できていなかった生徒は、高濃度の過酸化水素水を添加することと高濃度の酸素を呼吸することを一致させて考えることができなかったと思われる。

今回の実験のこと以外で、酸素に関して何か知りたいことがあるか質問をして実験のあとで気持ちに変化が起こったか調査した(Table 10)。無回答やあるかどうか分からないと答えた生徒が多く、酸素の性質に対し興味や関心をひきつけるようなエピソードを取り上げればよかったと思われる。F1のように酸素について色々知りたいのか生物全般を指すのか分からないが前向きに何かを学びたいという姿勢は評価できる。また、F4が呼吸で酸素がどのように利用されるか知りたいと答えた。酸素の性質を様々な視点から捉えるためにも、呼吸や生命活動における酸素の必要性を観察する実験教

材の開発も重要であると考えられる。

2.4.3 酸化作用を利用した生体防御のしくみの理解について

大腸菌の内毒素(LPS)を加えてマクロファージを培養すると、マクロファージが大腸菌と出会って活性化されるのと同じように活性化される。細菌と出会って活性化されたマクロファージは細菌を貪食して、食べきれない細菌を活性酸素を生成して殺菌する。生徒はマクロファージに LPS を加えて培養する意味を考えながら実験を行った。分からないことは積極的に質問をしてきたため、異物を殺菌するしくみの大筋は理解できていたと思われる。実験したすべての班で活性酸素の生成が検出された。結果のまとめと考察でも、活性酸素の酸化作用と生体防御のしくみに関連して生徒はさまざまな意見を出していた。このことから今回の経験が、免疫や呼吸のしくみを学習する時に記憶として残ることが期待できる。異物の侵入に対する生体防御のしくみを自分の目で実際に観察することで生体に備わる機能を身近に感じることができたと考えられる。

2.4.4 実験操作について

マクロファージの NO 産生能は、抗体産生細胞の抗体産生能に影響を与えた低濃度の過酸化水素水に対し感受性を示さないという実験結果をすべての生徒が得ていた。これは授業者の予備実験の結果を再現していて、生徒の実験操作の正確さを評価できる。感想でも多くの生徒が難しい実験操作と答えていたように、高校一年生でも一つ一つの作業を丁寧に行うことで複雑な生体反応を *in vitro* で再現することが可能である。また、雑菌が混入することなく無菌培養操作ができていた。この点についても生徒の実験操作の正確さを評価できる。しかし、無菌操作を行うためのクリーンベンチやマイクロプレータリーダーのような高価な機器を必要とする実験は教育現場では実現が難しい。より一般的で操作手順も分かりやすい実験を組み立てる必要がある。

2.4.5 授業評価と改善の方向性について

今回の授業における生徒の主要な到達目標は、酸素の性質や役割を総合的に考えることである。生徒の大部分は事前アンケートにおいて酸素は呼吸に必須と考え、活性酸素の性質や酸素呼吸において活性酸素が発生することを知らなかった。よって事後アンケートにおける高濃度と低濃度の酸素条件下で呼吸することによって生じる生体への影響の質問で、酸素呼吸に付随する活性酸素の発生と関連づけて推測を行った生徒は、この授業によって酸素の多面的な性質に触れることができたと考えられる (Table 12)。

事前アンケートで酸素呼吸により活性酸素が発生することを知らなかった F3 は、事後アンケートで酸素呼吸に付随して発生する活性酸素に関して回答した。F3 は酸素に対して新たな概念を形成し目標に達することができたため、F3 にとってこの実験は酸素の性質や役割を総合的に考える内容であったと評価できる。また、活性酸素の酸化作用や酸素呼吸により活性酸素が発生することを知っていた M1 は、事後アンケートで酸素呼吸に付随して発生する活性酸素の酸化作用による生体への影響を考察した。実験を受けたことで酸素や活性酸素に対する概念に変化が見られなかったことから、酸素や活性酸素の性質を正しく理解できていると考えられる。このことから F3 にとっては、酸素の性質や役割を総合的に考えさせる授業であったと評価できる。しかし、F1 や F4 では期待する教育効果が得られなかった。これは、マクロファージのもつ酸化に対する高い防御が強く印象づいたためと考えられる。マクロファージと脾臓細胞の過酸化水素水に対する感受性を比較したことの意図を生徒に伝えきれていなかったことが大きな反省点として挙げられるため、比較対照することで生物現象を科学的にとらえることを生徒にしっかり伝えることで改善を望められると思われる。

実験に両日とも参加した 5 名すべての生徒は実験操作を難しいと感じているようだったが、そのうちの 3 名は実験内容を理解することができていた。しかし、残りの 2 名は実験内容を理解できていなかった (Table 13)。実験主旨を伝えきれていなかったことや、授業者が配布した実験プリントを授業に活用できていなかったことが原因であると考えられる。このことから、授業者の意図を生徒にしっかり伝えられるよう入念な授業準備をする必要があると思われる。また、F1 や F4 は定量化について回答し、M1 は予測とは異なる実験結果を印象的だったと感想を述べていた (Table 13)。F1 や F4 は実験データを解析してグラフ化する過程で定量化することの意味にふれ、生物現

象を科学的に評価する方法の習得につながったと思われる。M1 は、なぜ予測と違うのか考察することで生物のもつ不思議さを学ぶ楽しみを味わうことができたと思われる。このことから、一連の探究活動を行うことで生物現象について自ら考えて問題を解決することの楽しみを味わうことができる授業であったと考えられる。

今回の実践では、参加したすべての生徒で酸素の性質の総合的な理解につながる実験とは言えなかった。今回の実験では、活性酸素を利用した生体防御のしくみと酸化の生体への影響と2つの生物現象を取り扱う実験内容であったため生徒理解が困難であったと思われる。また、活性酸素を利用した生体防御の側面から酸素の性質を考えさせようとしたため、過酸化水素の性質をそのまま酸素の性質と誤解している生徒がいた。酸素の本質に迫る授業を行うためにも、酸素の性質について直接触れることの出来るような実験教材も開発し、本単元に組み込むことでこのような誤解を解消できると考えられる。

以上のように酸素は、生物現象と密接に関わっている。その反応経路は複雑でこれを理解するためには、化学で学習するような酸化・還元反応の知識も必要とされる。今回実験に参加したすべての生徒が化学分野と生物Ⅱの分野の酸化還元反応を利用した呼吸のしくみや生物の進化のなかで生物と酸化作用の関いを履修していなかったことが本時の目標を達成できなかった理由と考えられる。よって「生物基礎」で今回設定した生命活動における酸素の役割を学ぶ授業を実践する場合、化学で学習する酸化還元反応の基礎知識を補いつつ、指導計画の第一次から第三次の講義を実施した後に同じ実験を行うことで高い教育効果が期待できると考えられる。

第3章

生徒実験の基盤となるマウス脾臓細胞の活性酸素に対する感受性についての研究

3.1 序論

生物は生命活動のために必要なエネルギーを生産するために酸化還元反応を利用している。エネルギーは電子の流れによって遊離されるがその原料となるのが食物に含まれるグルコースである。グルコースに含まれる水素中の電子は、ミトコンドリア内膜で電子に対し強い親和力を持ち酸化力の強い酸素に供給される。大部分の酸素は四電子還元され水素イオンと結合して水となる。これは電子伝達系の最後に起こる反応で、高等学校の生物Ⅱで学習する。しかし、この反応で同時に数パーセントの酸素は一電子還元され活性酸素種のスーパーオキシド (O_2^-) を生成してしまうことは学習しない。多くの生物は酸素に依存してエネルギーを作るため、エネルギーを効率よく生成するために起こる弊害を知ることは重要である。そこで、本研究では酸素を呼吸することの本質に迫る実験教材の開発を目指す。

活性酸素は強い酸化力を持ち、酸化障害は活性酸素による細胞成分の酸化によってもたらされる。 O_2^- が細胞内で酸化障害の原因物質として作用することを示すパラコートを用いた実験がある¹⁾。パラコートは細胞内で一電子還元を受けてパラコートラジカルとなり、酸素分子と反応して O_2^- を生成する。 O_2^- は二分子のプロトンとの不均化反応により過酸化水素 (H_2O_2) を生成し、さらに反応性に富む活性酸素種のヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) を生成する。このようにして生成された活性酸素種が細胞膜やDNAに障害を与えることが示されており、寿命の短縮への活性酸素種の関与が示唆されている。 H_2O_2 は微量 ($10^{-7} \sim 10^{-9} M$) ながらも常に生体内に存在している活性酸素種である²⁾。日常的には菌やバクテリアを殺す消毒液として用いられる。 H_2O_2 そのものが強い殺菌力を持っているのではない。 H_2O_2 は細胞膜を通過して生体内や細胞内に微量に存在する金属イオンと反応して、より強い酸化作用をもつ $\cdot OH$ を生成する。これが殺菌作用に関与していると考えられている。

生体内で活性酸素が増産され、生体を構成する細胞や組織に重大な障害を引き起こすと老化や発癌や炎症など多くの疾病につながるとされる。医療の発展に伴い、平均寿命の伸長が著しい現代の日本では急速に社会の高齢化が進んでいる。老化は誰しも

に起こる現象であるため、老化現象や老人特有の疾患と闘う人々が増えていくことが予想される。高齢者の健康維持のためにも、老化現象について考え、そのメカニズムを解明することはわれわれにとって大きな課題である。このことに注目した当研究室は、これまで成熟後早期より老化兆候を見せる老化促進モデルマウスを用いて、加齢に伴う免疫機能低下の機構についてさまざまな研究を行ってきた。老化促進モデルマウスの一系統である SAMP1 マウスでは、酸化障害に対する高い感受性が老化促進の要因として働くことが考えられる。そこで、本研究では活性酸素種による免疫系への酸化障害を SAMP1 マウスと対照系統である C3H/He マウスで比較した。そして、活性酸素種に対する感受性と SAMP1 系統マウス免疫機能における促進老化の関係を調査した。

3.2 材料

3.2.1 マウス

私たちの研究室でコンベンショナルな飼育環境下において系統を維持している SAMP1/Kue 系マウスと Shizuoka Laboratory Animal Center (SLC, 浜松, 静岡) から購入し、私たちの研究室でコンベンショナルな飼育環境下において維持している C3H/HeSLc 系マウスを使用した。月齢は 3 - 16 ヶ月のものを用いた。また、餌および水は自由摂取とした。

3.2.2 培養液・緩衝液・試薬の調整

培養液、緩衝液、試薬は特に記載のない限り以下に記した方法によって調整したものを使用した。

Eagle's MEM 培養液: Eagle's MEM 粉末培地 (ニッスイ製薬, 東京) 4.7 g をイオン交換した再蒸留水 500 ml に溶かし、120 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌を行った。常温まで冷却した後、7 % NaHCO₃ 水溶液を 5-6 ml 加えて pH を 7.2 に調整した。

RPMI1640 培養液: RPMI1640 粉末培地 (ニッスイ製薬) 5.1 g をイオン交換した再蒸留水 500 ml に溶かし、120 °C で 20 分間高圧蒸気滅菌を行った。常温まで冷却した後、ウシの胎仔血清 (FCS) (Intergen Company, New York, USA) と L-glutamine (ナカライテスク, 京都) をそれぞれ 5 % と 2 mM になるように加え、7 % NaHCO₃ 水溶液を 8-10 ml 加えて pH を 7.2 に調整した。その後、2-mercaptoethanol (2ME) (ナ

カライテスク) を 5×10^{-5} M となるように加えた。

リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.2): NaCl 8.0 g、 KH_2PO_4 0.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g、KCl 0.2 g を再蒸留水 1 l に溶かし、120 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌を行った。

Coating buffer(pH 9.6): Na_2CO_3 1.59 g、 NaHCO_3 2.93 g、 NaN_3 (和光純薬, 大阪) 0.2 g を再蒸留水 1 l に溶かし、120 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌を行った。

PBS-Tween(0.05 % polyoxyethylene sorbitan monolaurate in PBS): Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) (ナカライテスク) 0.5 ml、 NaN_3 0.2 g を PBS 1 l に溶かした。

Triss wash buffer: Tris (hydroxymethyl) aminomethane (ナカライテスク) を 50 mM、Tween 20 (ナカライテスク) を 0.2 % となるよう再蒸留水にとかし、5N-HCl (ナカライテスク) で pH 7.2~7.9 に調整し全量を 1 l とした。

Diethanolamine buffer: Diethanolamine (和光純薬) 97 ml、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬) 0.1 g、 NaN_3 0.2 g を再蒸留水 800 ml に溶かし、5N-HCl (ナカライテスク) で pH 9.8 に調整し全量を 1 l とした。その後、120 °C で 20 分間高圧蒸気滅菌を行った。

0.2 % トリパンブルー溶液: PBS 100 ml にトリパンブルー (ナカライテスク) 0.2 g を溶かした。

3.2.3 マイトーゼン

B 細胞を活性化し、ポリクローナルな抗体産生反応を誘導する、グラム陰性大腸菌に由来するエンドトキシンであるリポポリサッカライド (LPS, Type B, *E. coli*, 0111 : B4, Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) を使用した。

3.2.4 酸化障害誘導物質

酸化障害を誘導する物質として、パラコート(1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium Dichloroide : PQ) (和光純薬) と過酸化水素水 (hydrogen peroxide: H_2O_2) (和光純薬) を使用した。

3.3 方法

3.3.1 脾臓細胞懸濁液の作成

マウスの頸部を切開し脱血死させ、70 %エタノールで消毒した後上皮をはがした。腹部より脾臓を取り出し、Eagle's MEM 培地中で、切り込みを入れた脾臓をステンレスメッシュにこすりつけて粗製細胞懸濁液を作成した。これを脱脂綿に通して濾過した後、4 °C, 1000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後上清を捨て、10 ml 程度 Eagle's MEM を加えて細胞を再懸濁した後、同様に遠心した。この操作を 2 回繰り返し、最後に上清を捨てた後、5 % FCS 含 RPMI1640 培養液を加えて細胞懸濁液を作成した。

3.3.2 Thoma 計算盤による細胞数の計測

脾臓細胞懸濁液 25 μ l をトリパンブルー溶液 75 μ l で 4 倍に希釈したものを Thoma 計算盤に流し込み、赤血球を除く染色されていない細胞を生細胞として数えて、細胞濃度を計測した。これを目的の濃度に調整して培養に用いた。

3.3.3 培養

24-well プレート (Falcon 353047, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA) に細胞濃度が 1.0×10^6 cells/well となるよう脾臓細胞懸濁液を 1 ml 分注した。さらに LPS を 5 % FCS 含 RPMI1640 培養液によって希釈し、最終濃度が 5 μ g/ml の濃度になるように調整して 24-well プレートに 0.5 ml 分注した。その後、パラコートまたは過酸化水素水を 5 % FCS 含 RPMI1640 培養液によってさまざまな濃度に希釈し、24-well プレートに 0.5 ml 加え、いずれの well も全量 2.0 ml とした。これを 37 °C、5 % CO₂、加湿状態のインキュベーター (サンヨー、東京、日本) で一週間培養して、ポリクローナルな抗体産生反応を誘導した。また、パラコートは 5 % FCS 含 RPMI 1640 培養液を用いて 10^{-4} ~ 10^{-7} M に希釈したものを使用した。過酸化水素水は 5 % FCS 含 RPMI 1640 培養液を用いて 10^{-6} ~ 10^{-9} M に希釈したものを使用した。

3.3.4 酵素標識免疫吸着法 (ELISA 法) による IgM 抗体量の評価

96-well assay plate (Falcon 353915) に、coating buffer で 2000 倍に希釈した Goat anti-mouse IgM 抗体 (Cappel, Aurora, Ohio, USA) を 100 μ l/well 加え、

4 °Cで一晩置き、抗体を吸着させ固相化した。翌日、PBS-Tween で各 well を 3 回ずつ洗浄した後、牛血清アルブミン (BSA : ナカライテスク) を 0.5 % の濃度に溶解した PBS を各 well に 100 μ l/well ずつ加え、固相をブロックした。約 1 時間経過後、PBS-Tween で各 well を 3 回ずつ洗浄し、BSA を 0.05 % の濃度に溶解した PBS を使って、サンプルの培養上清を適当な濃度から 3 倍希釈していき、それぞれ 100 μ l ずつ well に加えた。またスタンダードとして、BSA を 0.05 % の濃度に溶解した PBS を使って、IgM のミエローマ蛋白 (Zymed Laboratories, San Francisco, California, USA) 溶液を 500 ng/ml の濃度から 2 倍希釈していき、それぞれ 100 μ l ずつ well に加えた。約 1 時間半室温で反応させた後、PBS-Tween で各 well を 8 回ずつ洗浄し、alkaline phosphatase (AP) で標識した Goat anti-mouse IgM 抗 (Zymed Laboratories) を PBS-Tween で 8000 倍に希釈して 100 μ l ずつ well に加えた。約 1 時間半室温で反応させた後、PBS-Tween で各 well を 8 回ずつ洗浄し、*p*-nitrophenylphosphoric acid disodium salt (和光純薬) を diethanolamine buffer で 1 mg/ml に溶解して、各 well に 100 μ l ずつ加えた。その後、プレート を遮光して発色反応させ、マイクロプレートリーダーで各 well の 415 nm と 450 nm における吸光度の差を求め、比色定量した。IgM の総抗体産生量は IgM ミエローマ蛋白による検量線により決定した。

3.3.5 有意差検定

結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.) で表し、各群間の比較は統計学的検定法である Student's *t*-test を用い、 $P < 0.05$ のとき有意差があると判定した。

3.4 結果

3.4.1 パラコートあるいは過酸化水素水を添加したマウスの脾臓細胞の培養における IgM 抗体産生反応について

C3H/He 雄マウスの脾臓細胞の抗体産生反応について

C3H/He 雄マウス脾臓細胞の抗体産生は、3 ヶ月齢でパラコート濃度が 10^{-7} ~ 10^{-5} M で無添加対照群と差がなく、 10^{-4} M で有意に低下した。また、過酸化水素水濃度が 10^{-9} ~ 10^{-7} M で無添加対照群と差がなく、 10^{-6} M で有意に低下した (Fig.1 a)。6 ヶ月齢以降では、より低濃度の活性酸素種に感受性を示した (Fig.1 b~d)。

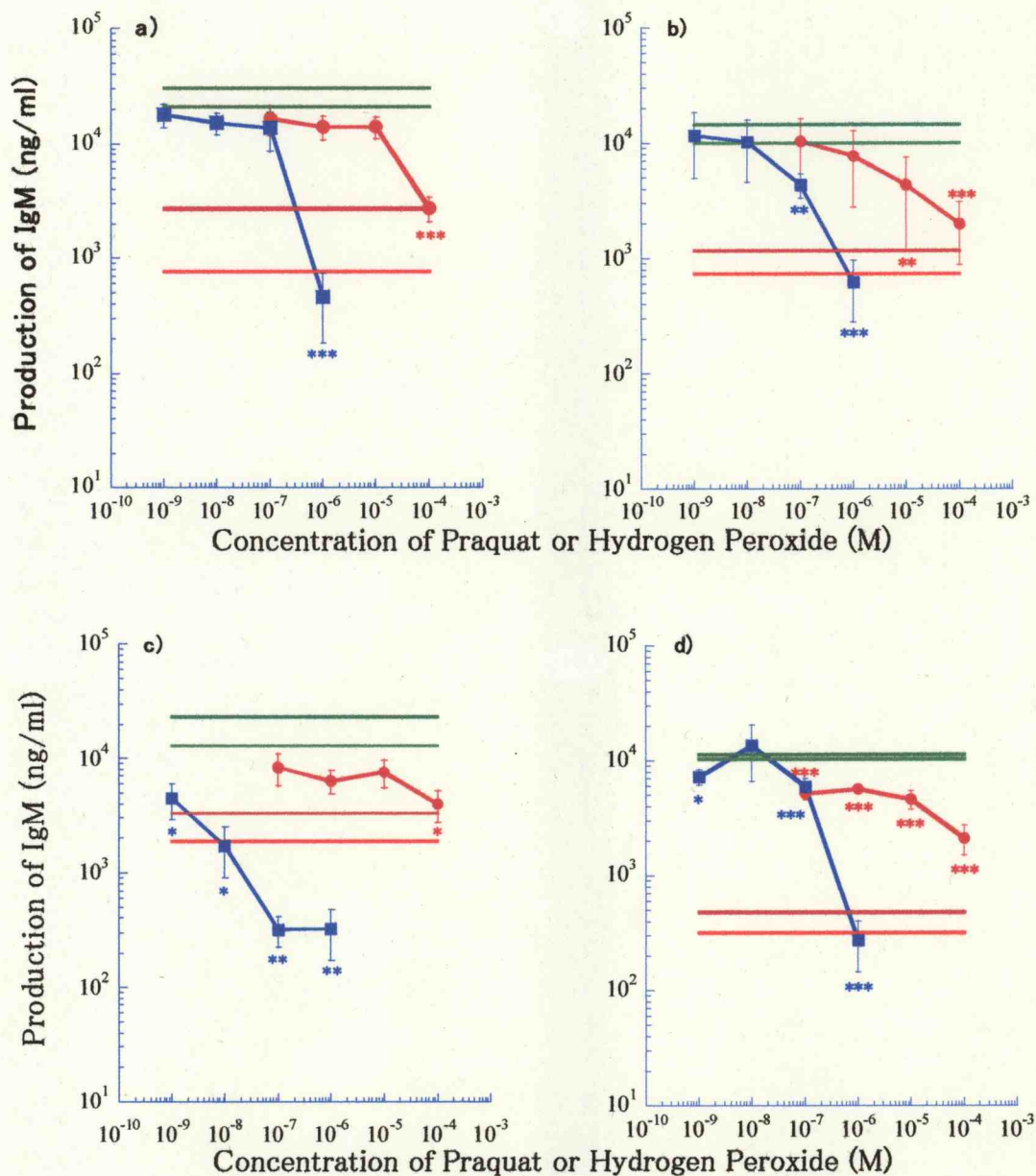


Fig. 1 パラコートあるいは過酸化水素水を添加した培養における C3H/He 雄マウスの脾臓細胞の IgM 抗体産生反応

LPS 5(μ g/ml)を添加し、PQ を $10^{-4} \sim 10^{-7}$ (M)の 4 点に希釈し添加したマウスの脾臓細胞の IgM 抗体産生量を測定した(赤折線)。LPS 5(μ g/ml)を添加し、 H_2O_2 を $10^{-6} \sim 10^{-9}$ (M)の 4 点に希釈し添加した(青折線)。マウスの脾臓細胞の IgM 抗体産生量を測定した対照群として、LPS と PQ あるいは H_2O_2 非添加の Negative control (その平均値 $\pm$ SE を各グラフ下方の x 軸に平行の 2 本の赤直線で示す) および LPS 5 (μ g/ml)を添加し PQ あるいは H_2O_2 非添加の Positive control (その平均値 $\pm$ SE を各グラフ上方の x 軸に平行の 2 本の緑直線で示す)を設定した。グラフの各プロットは、各培養条件での平均値 $\pm$ SE を示す。Positive control の平均値 $\pm$ SE と各培養条件での平均値 $\pm$ SE の比較 * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

a. 3 ヶ月齢(n=6)、b. 6 ヶ月齢(n=6)、c. 12 ヶ月齢(n=5)、d. 16 ヶ月齢(n=8)。

C3H/He 雌マウスの脾臓細胞の抗体産生反応について

C3H/He 雌マウス脾臓細胞の IgM 抗体産生は、3 ヶ月齢で比較的高濃度の活性酸素種に対し高い感受性を示した。また、低濃度の 10^{-9} ~ 10^{-7} M の過酸化水素水に対し感受性を示した (Fig.2 a)。9 ヶ月齢以降では、低濃度の過酸化水素水に対して高い感受性を示した (Fig.2 b~d))

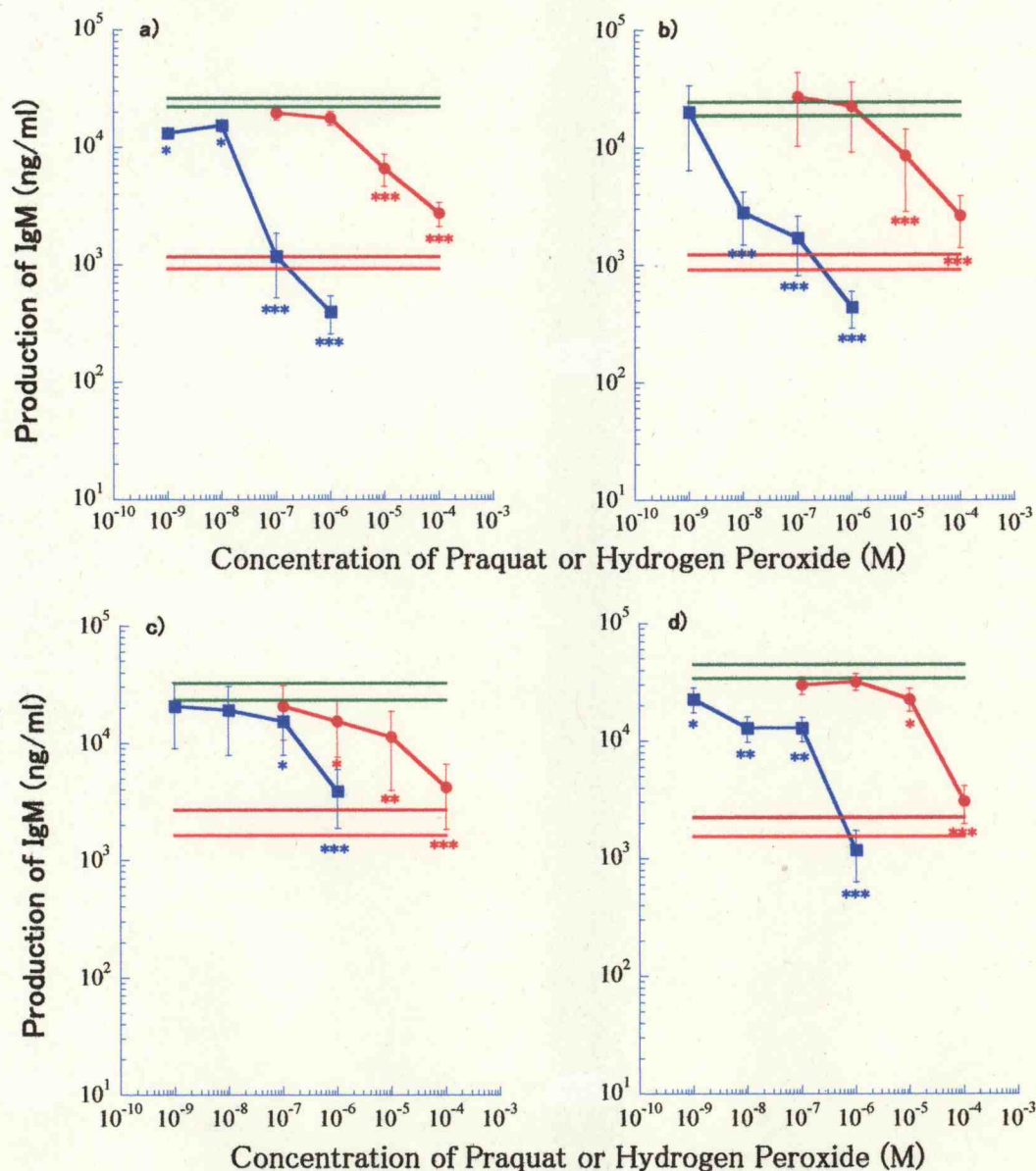


Fig. 2 パラコートあるいは過酸化水素水を添加した培養における C3H/He 雌マウスの脾臓細胞の IgM 抗体産生反応

Fig. 1 の説明を参照。a. 3 ヶ月齢(n=7)、b. 9 ヶ月齢(n=8)、c. 12 ヶ月齢(n=8)、d. 16 ヶ月齢(n=6)。

SAMP1/Kue 雄マウスの脾臓細胞の抗体産生反応について

SAMP1 雄マウス脾臓細胞の IgM 抗体産生は、3 ヶ月齢で低濃度の活性酸素種に対する感受性を示し、C3H/He 雄マウスより早期から酸化障害を受けることが示された (Fig.3 a)。この高い感受性は加齢に伴い継続して確認された (Fig.3 b,c)。15 ヶ月齢では低濃度の活性酸素種に対し感受性を示さなかった (Fig.3 d)。

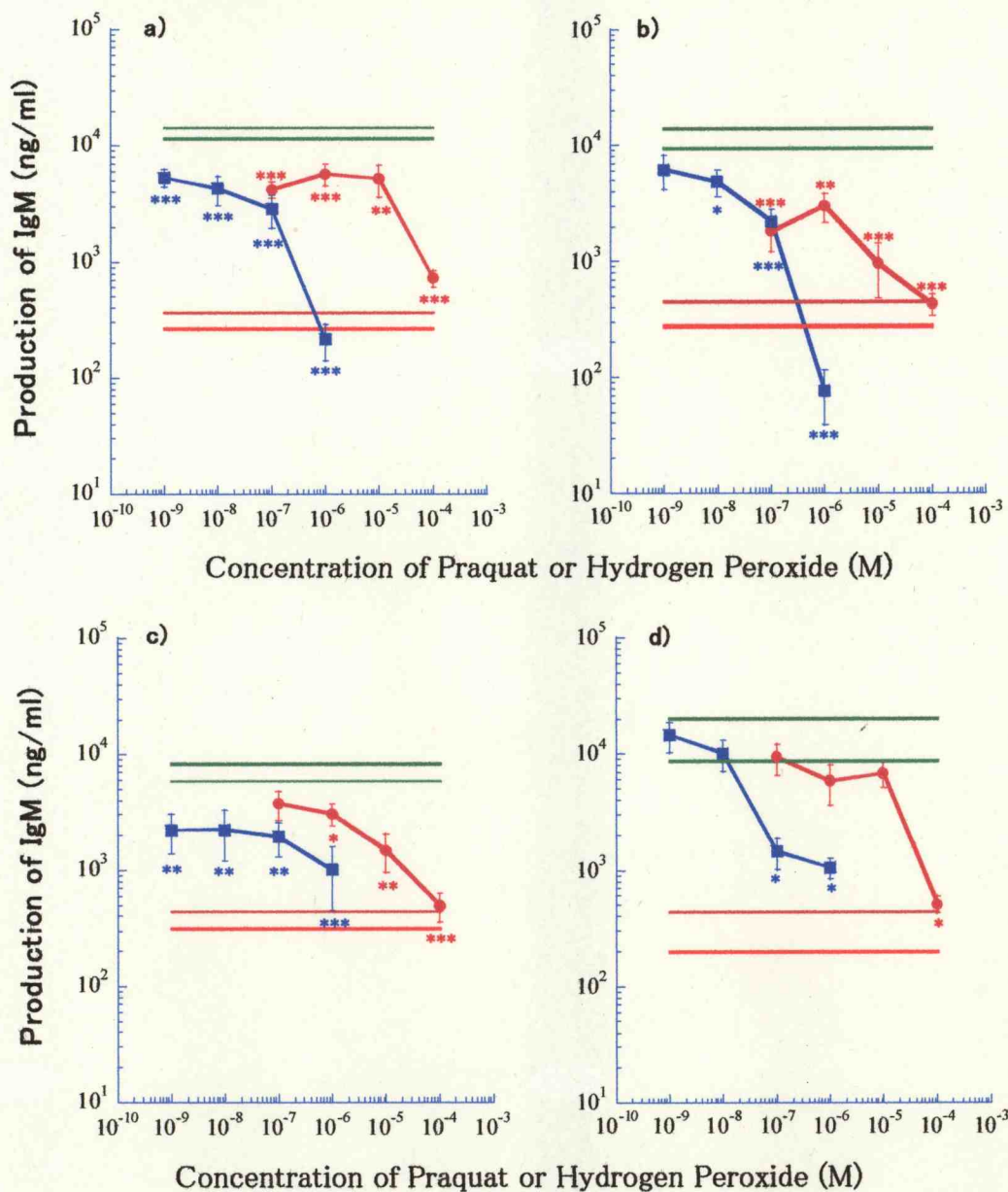


Fig. 3 パラコートあるいは過酸化水素水を添加した培養における SAMP1/Kue 雄マウスの脾臓細胞の IgM 抗体産生反応

Fig. 1 の説明を参照。a. 3 ヶ月齢(n=20)、b. 9 ヶ月齢(n=10)、c. 12 ヶ月齢(n=7)、d. 15 ヶ月齢(n=5)。

SAMP1/Kue 雌マウスの脾臓細胞の抗体産生反応について

SAMP1 雌マウス脾臓細胞の IgM 抗体産生は、3 ヶ月齢では高濃度のパラコートに対して高い感受性を示し、比較的低濃度の過酸化水素水に対し高い感受性を示した (Fig.4 a)）。6 ヶ月齢では活性酸素種に対する感受性が高濃度のみ観察された (Fig.4 b)）。9 ヶ月齢では低濃度の活性酸素種に対し感受性を示した (Fig.4 c)）。15 ヶ月齢ではすべての濃度の活性酸素種に対し感受性を示さなかった (Fig.4 d)）。

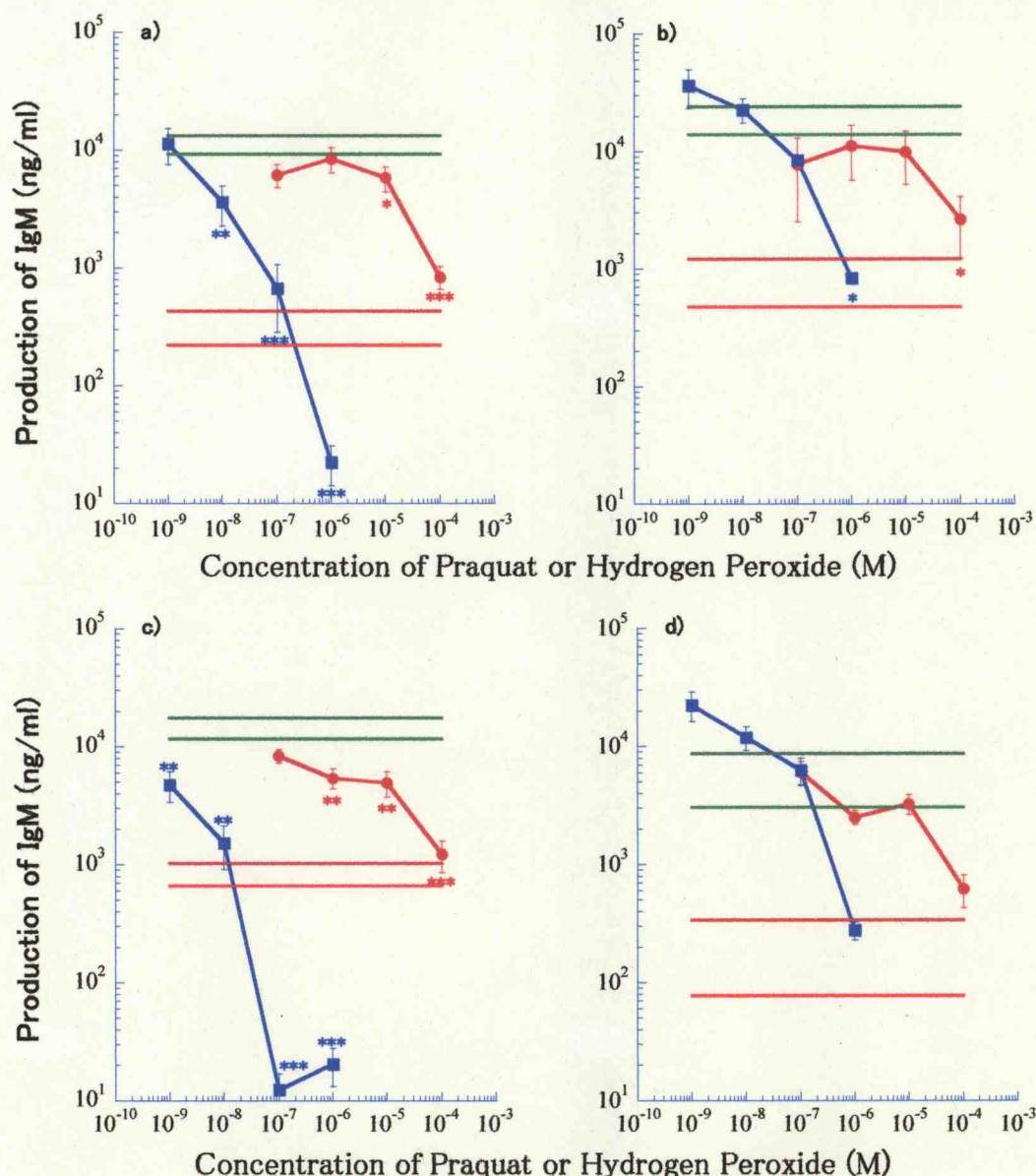


Fig. 4 パラコートあるいは過酸化水素水を添加した培養における SAMP1/Kue 雌マウスの脾臓細胞の IgM 抗体産生反応

Fig. 1 の説明を参照。a. 3 ヶ月齢(n=9)、b. 6 ヶ月齢(n=4)、c. 9 ヶ月齢(n=10)。d. 15 ヶ月齢(n=4)。

3.5 考察

3.5.1 系統間の比較について

C3H/He 雄マウスと SAMP1/Kue 雄マウスでの比較

C3H マウスの抗体産生反応は、3 ヶ月齢では低濃度の活性酸素種に感受性を示さなかった。この感受性は加齢に伴い徐々に高まり、16 ヶ月齢では低濃度の活性酸素種に対しても高い感受性を示した。一方 SAMP1 マウスの抗体産生反応は、3 ヶ月齢で低濃度の活性酸素種に対して高い感受性を示した。SAMP1 では、成熟後早期から低濃度の活性酸素種に対する防御力の低下が確認された。しかし、15 ヶ月齢の SAMP1 では 16 ヶ月齢の C3H のように低濃度の活性酸素種に対し感受性を示さなかった。SAMP1 マウスの平均的な寿命は 10 ヶ月ほどであるため、これを超えて生存してきた個体には低濃度の活性酸素種に対して防御力を持つ可能性がある。平均寿命と活性酸素との関係が示唆される。

活性酸素種は、低濃度ながらも常に生体内で発生している。生体にはこれら活性酸素種を除去する機能が備わっているが、活性酸素を完全にゼロにすることはできない。よって脾臓細胞が処理しきれない活性酸素種に感受性を示すと細胞成分が酸化される。これが積み重なると細胞は慢性的に機能障害をこうむる。これが加齢個体に見られる老化現象であるとするならば、成熟後早期から低濃度の活性酸素種に感受性を示す SAMP1 は、成熟してから寿命まで継続して機能障害を受けつづける。これが、SAMP1 にみられる成熟後早期から見られる老化兆候としてあらわれている可能性が考えられる。

C3H は、若齢では低濃度の活性酸素種に対して感受性を示さず、加齢とともに緩やかに感受性を示すようになるので、それに伴い機能障害の受けかたも緩やかになる。これが、C3H と SAMP1 での平均寿命の違いとしてあらわれているのではないだろうか。

C3H/He 雌マウスと SAMP1/Kue 雌マウスでの比較

C3H マウスの抗体産生反応は、3 ヶ月齢で比較的高濃度の活性酸素種に対して高い感受性を示した。また、低濃度の過酸化水素水に対して感受性を示した。SAMP1 マウスの 3 ヶ月齢は、低濃度の活性酸素種に感受性を示さなかった。若齢の C3H と SAMP1 では活性酸素種に防御は SAMP1 の方が高く、雄とは反対の結果となった。しかし、9 ヶ月齢で比較すると SAMP1 の方が低濃度の活性酸素種に対し感受性を示していた。雌ではサンプル数が少ないため傾向しか見られないが、やはり SAMP1 系

統の免疫機能低下は低濃度の活性酸素種に対し感受性を示すことと関係があると考えられる。15ヶ月齢のSAMP1では16ヶ月齢のC3Hのように活性酸素種に対し感受性を示さなかった。やはり平均寿命を超えて生存してきた個体には低濃度の活性酸素種に対して防御力を持つ可能性があり、平均寿命と活性酸素との関係が示唆される。

3.5.2 性別間の比較について

C3Hマウスの抗体産生反応を雌雄で比較すると3ヶ月齢の雄では高濃度の過酸化水素水に感受性を示した。雌は雄よりも過酸化水素水に対する感受性が高く、雄では感受性を示さなかった低濃度の過酸化水素水に対しても感受性を示した。また、雄では加齢に伴い過酸化水素水に対する感受性が高まるが、雌ではこの感受性が成熟後早期から加齢個体まで継続する傾向が確認された。過酸化水素水は主に生体に存在するカタラーゼやヒドロペルオキシダーゼといった生体内酵素により消去されるため、雌ではこの消去機構が成熟後早期から弱いことが考えられる。

一方、3ヶ月齢の雄では 10^{-4} (M)のパラコートに対して感受性を示し、雌では 10^{-5} (M)のパラコートに対して感受性を示した。12ヶ月齢での雄では低濃度のパラコートに感受性を示さなかったが、雌では低濃度のパラコートにも感受性を示した。パラコートの作用により発生するスーパーオキシドは生体に存在するスーパーオキシドジスムターゼにより消去されるため、雌は雄に比べこの消去機構が若干弱いことが考えられる。

スーパーオキシドや過酸化水素水は、排卵過程における卵胞破壊と黄体退縮に関与するという報告がある³⁾。活性酸素種が卵巣でホルモンにより誘導される一連の代謝過程で重要な成分として利用される可能性が示唆されている。よって、今回の実験において観察された雌雄の違いも、雌雄でのホルモン分泌の違いが影響している可能性が考えられる。

第4章

SAMP1 腹腔マクロファージの過酸化水素水に対する感受性について

4.1 序論

第3章では、脾臓細胞の活性酸素種に対する感受性を確認した。脾臓細胞の *in vitro* での抗 SRBC 抗体産生反応を調べた実験結果から、SAMP1 の抗体産生機能は成熟後早期から低下し、加齢に伴いさらにその能力が低下することが報告されている。一方で、SAMP1 の腹腔マクロファージの貪食作用や NO 産生反応が加齢に伴い上昇するという実験結果が得られている。このことから、早期からの抗体産生機能低下を代償するためにこれら防御機能が亢進する可能性が示唆された。したがって、SAMP1 の生体防御では、食細胞の働きが優位に働いていると考えられる。

マクロファージは NO のほかに過酸化水素 (H_2O_2) やスーパーオキシド (O_2^-) などさまざまな活性酸素を産生し、これらがマクロファージ機能のひとつである殺菌作用に関与している。NO は O_2^- と反応し、強い酸化力を有するペルオキシナイトライト (ONOO^-) となる。また過酸化水素は容易に分解され強力な酸化力をもつヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) を生成する。この強い酸化能が自己の細胞やマクロファージ自身にも酸化作用を及ぼす可能性がある。活性酸素による殺菌作用を優位に働かせる SAMP1 のマクロファージは酸化に対し高い防御能をもつことが考えられる。そこで、本研究では腹腔マクロファージに H_2O_2 を添加した際、マクロファージの NO 産生能への影響を調査して、この可能性を検討した。

4.2 材料

4.2.1 マウス

私たちの研究室でコンベンショナルな飼育環境下において維持している SAMP1/Kue 系マウスと Shizuoka Laboratory Animal Center (SLC, 浜松, 静岡) から購入し、私たちの研究室でコンベンショナルな飼育環境下において系統を維持している C3H/HeSlc 系マウスを使用した。

4.2.2 培養液・緩衝液・試薬の調整

培養液、緩衝液、試薬は特に記載のない限り以下に記した方法によって調整したも

のを使用した。

Eagle's MEM 培養液: 3.2.2 参照。

RPMI1640 培養液: 3.2.2 参照。

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.2): 3.2.2 参照。

0.2 % トリパンブルー溶液: 3.2.2 参照。

亜硝酸ナトリウム水溶液: 亜硝酸ナトリウム (ナカライテスク) 70 mg を再蒸留水 100 ml に溶解させ、10 mM に調整した。

グリース試薬: 85 %リン酸 (ナカライテスク) 6 ml を再蒸留水 198 ml で希釈し、2.5 %に調整した。これを溶媒として sulfanilamide (サルファニルアミド) (Sigma Chemical Co.) 2.06 g と N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩) (Sigma Chemical Co.) 206 mg を常温で溶解させ、それぞれ 1 %サルファニルアミド、0.1 %ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩となるよう調整した。

過酸化水素: 3.2.4 参照。

4.3 方法

4.3.1 腹腔細胞と腹腔マクロファージ懸濁液の調整

マウスの頸部を切開して脱血死させ、70 %エタノールで消毒した後上皮をはがした。冷やした 5 % FCS 含 RPMI 1640 培養液を滅菌した注射器で 5 ml 腹腔内に注入し、氷上で腹壁をマッサージした。その後注射器で腹腔細胞を回収するという操作を 2 回繰り返し、粗製細胞懸濁液を作成した。これを 4 °C, 1000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てた後、5 % FCS 含 RPMI1640 培養液を加えて細胞懸濁液を作成した。

4.3.2 Fuchs 計算盤による細胞数の測定

細胞懸濁液 50 μ l をトリパンブルー溶液 50 μ l で 2 倍に希釈したものを Fuchs 計算盤に流し込み、染色されていない細胞を生細胞として数えて、細胞濃度を計測した。なお、顕微鏡の倍率を 400 倍にして、比較的大きく細胞質に富んだ細胞をマクロファージとみなした。

4.3.3 腹腔細胞の培養

上記のようにして作成した 1.0×10^6 cells/ml の濃度の細胞懸濁液を 96-well 細胞培養マイクロテストプレート (Falcon 353072, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA) に 200 μ l/well となるよう分注した。これを 5 % CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーター内で一晩培養して腹腔細胞をプレート底面に接着させた。その後非付着細胞を除去するために、各 well を 37 $^{\circ}\text{C}$ に温めた Eagle's MEM で洗浄して付着性マクロファージを得た。各 well にマクロファージ活性化物質として IFN- γ と Lipopolysaccharide (LPS) の希釈液をそれぞれ 50 μ l ずつ、さまざまな濃度に希釈した過酸化水素を 50 μ l 加え計 100 μ l になるよう添加した。それを再び 5 % CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーター内で一晩培養し、NO 産生を誘導した。また、IFN- γ は 5 % FCS 含 RPMI 1640 培養液を用いて、6.0 ng/ml に希釈したものを、LPS は 5 % FCS 含 RPMI 1640 培養液を用いて 20 ng/ml に希釈したものを使用した。過酸化水素は 5 % FCS 含 RPMI 1640 培養液を用いて 10^{-4} ~ 10^{-8} M に希釈したものを使用した。

4.3.4 グリース (Griess) 法による NO_2^- の測定

96-well 培養プレートに被検培養上清を 2 ~ 16 倍に、また positive control として亜硝酸ナトリウム水溶液を 100 μ M ~ 3.125 μ M に PBS を用いて段階希釈し 100 μ l/well となるよう分注した。その後、各 well にグリース試薬を 100 μ l ずつ添加して合計 200 μ l/well に混合した。それを室温で数分インキュベートし、発色を確認後マイクロプレートリーダーで 540 nm での吸光度を測定した。

4.3.5 腹腔細胞の酸化障害に対する防御機能の評価

上清回収後、96-well プレートの底に沈んだ腹腔細胞を良く懸濁し、トリパンブルー溶液により死細胞を染色した。生細胞数と死細胞数を数えて生細胞の割合を求めて腹腔細胞の酸化障害に対する防御機能の評価をした。

4.3.6 有意差検定

3.3.5 参照。

4.4 結果

4.4.1 過酸化水素水を添加したマウスの腹腔細胞の培養における NO 産生反応について

5ヶ月齢と12ヶ月齢の SAMP1/Kue マウスの腹腔細胞の NO 産生反応について

SAMP1 マウス腹腔細胞の LPS と IFN- γ によって誘導される NO 産生は、5ヶ月齢で高濃度の過酸化水素水に対して感受性を示し、低濃度の過酸化水素水には感受性を示さなかった(Fig.5 a)、b)。12ヶ月齢の NO 産生も同様の傾向が見られ(Fig.5c)、d)。

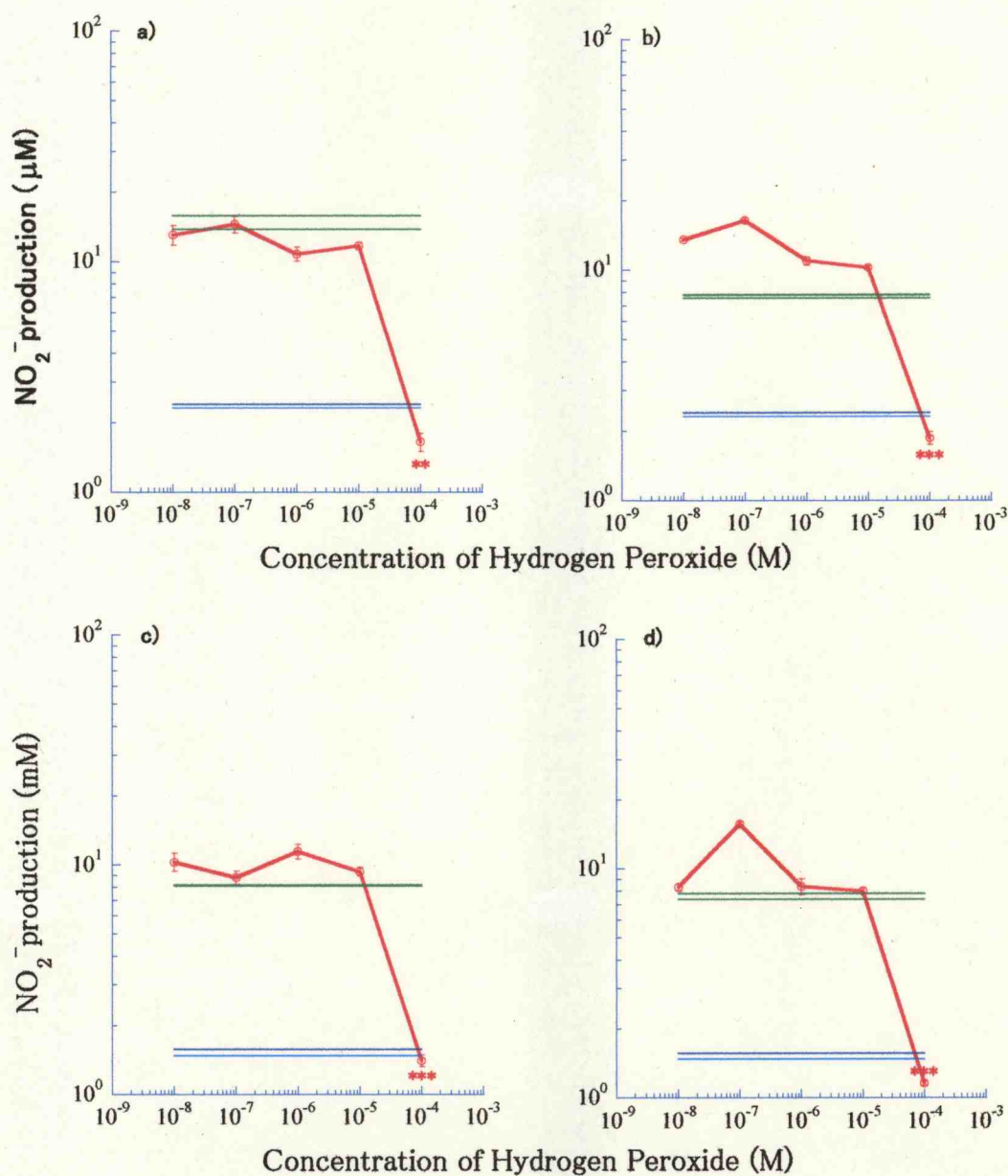


Fig. 5 過酸化水素水を添加した培養におけるマウスの腹腔細胞の NO 産生反応

LPS 20 (ng/ml)あるいは IFN- γ 6 (ng/ml)を添加し、H₂O₂を 10⁻⁴ ~ 10⁻⁸ (M)の 4 点に希釈し添加したマウスの腹腔細胞の NO 産生量を測定した。マウスの腹腔細胞の NO 産生量を測定した対照群として、LPS あるいは IFN- γ 、H₂O₂ 非添加の Negative control (その平均値 $\pm$ SE を各グラフ下方の x 軸に平行の 2 本の青直線で示す) および LPS 20 (μ g/ml)あるいは IFN- γ 6 (ng/ml)を添加し H₂O₂ 非添加の Positive control (その平均値 $\pm$ SE を各グラフ上方の x 軸に平行の 2 本の緑直線で示す)を設定した。グラフの各プロットは、各培養条件での平均値 $\pm$ SE を示す。Positive control の平均値 $\pm$ SE と各培養条件での平均値 $\pm$ SE の比較 *** : P<0.001

- a. 5 ヶ月齢の SAMP1/Kue 雄マウスの LPS 添加腹腔細胞の培養。
- b. 5 ヶ月齢の SAMP1/Kue 雄マウスの IFN- γ 添加腹腔細胞細胞の胞培養。
- c. 12 ヶ月齢の SAMP1/Kue 雄マウスの LPS 添加腹腔細胞の培養。
- d. 12 ヶ月齢の SAMP1/Kue 雄マウスの IFN- γ 添加腹腔細胞細胞の培養。

2.4.2 過酸化水素水を添加したマウスの腹腔細胞の培養における生細胞の割合について

Fig.5 に結果を示す実験の各培養における生細胞の割合を全て測定した。その結果を Fig.6 に示す。

5 ヶ月齢と 12 ヶ月齢 SAMP1/Kue マウスの腹腔細胞培養中の生細胞の割合について

5 ヶ月齢のマウスでは、LPS と IFN- γ と共に過酸化水素水を 10⁻⁴ (M)で加えた培養で生細胞の割合に有意な低下が見られた(Fig.6 a)、b))。12 ヶ月齢マウスの生細胞の割合も同様の傾向が見られた(Fig.6 c)、d))。

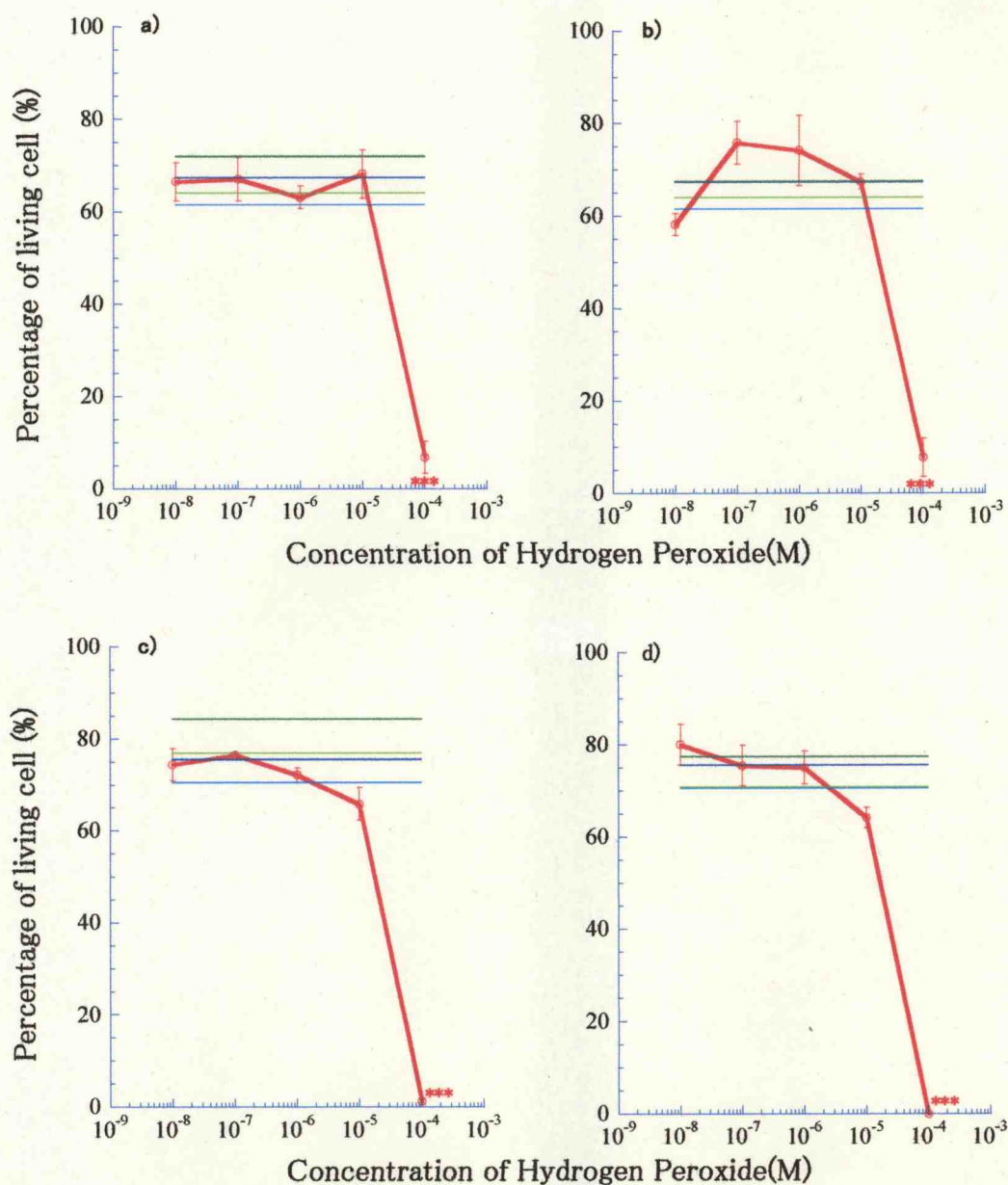


Fig. 6 過酸化水素水を添加した SAMP1/Kue マウスの腹腔細胞培養中の生細胞の割合の変化

Fig. 5 に結果を示す実験で、過酸化水素水を各濃度に希釈し、添加したマウスの腹腔細胞の培養中の生細胞数と死細胞数を測定して生細胞の割合を求めた。対照群として、Negative control (その平均値 $\pm$ SE を各グラフ上方の x 軸に平行の 2 本の青直線で示す) および Positive control (その平均値 $\pm$ SE を各グラフ下方の x 軸に平行の 2 本の緑直線で示す) を設定した。グラフの各プロットは、各培養条件での平均値と標準誤差を示す。Positive control の平均値 $\pm$ SE と各培養条件での平均値 $\pm$ SE の比較 *** : $P < 0.001$

- a. 5 ヶ月齢の SAMP1/Kue 雄マウスの LPS 添加腹腔細胞の培養。
- b. 5 ヶ月齢の SAMP1/Kue 雄マウスの IFN- γ 添加腹腔細胞細胞培養。
- c. 12 ヶ月齢の SAMP1/Kue 雄マウスの LPS 添加腹腔細胞の培養。
- d. 12 ヶ月齢の SAMP1/Kue 雄マウスの IFN- γ 添加腹腔細胞細胞培養。

3.5 考察

SAMP1 マウス腹腔細胞の LPS と IFN- γ によって誘導される NO 産生反応は、5 ヶ月齢と 12 ヶ月齢ともに 10^{-4} (M) の過酸化水素水にのみ感受性を示した。このときの生細胞をトリパンブルー染色によって観察したところ、大部分の細胞が死滅していた。また 5 ヶ月齢と 12 ヶ月齢の NO 産生能は、 10^{-4} (M) より低濃度の過酸化水素水に対して感受性を示さなかった。このときの生細胞の割合を測定すると、どちらも Positive control の平均値と有意な差が見られなかった。これより腹腔細胞の過酸化水素水に対する感受性は加齢によって変化しないことが分かる。

脾臓細胞の抗体産生反応と腹腔細胞の NO 産生能の加齢による過酸化水素水に対する感受性の変化を比較すると、脾臓細胞では若齢から老齢まで低濃度の過酸化水素水に対して感受性を示した (Fig. 3 c))。SAMP1 の脾臓細胞は日常で生体に発生する低濃度の過酸化水素水に対し成熟して寿命を迎えるまで継続して感受性を示すために慢性的に抗体産生能の低下が起こること考えられる。しかし、腹腔細胞は低濃度の過酸化水素水に対して感受性を示さず、高濃度の過酸化水素水に耐性を示した。腹腔細胞は、脾臓細胞より過酸化水素水に対して高い防御力をもち、この防御力は加齢によって変化しないと思われる。

ここで測定した腹腔細胞の NO 産生反応はマクロファージによるものであり、マクロファージなどの食細胞は NO や過酸化水素水などの活性酸素を産生して炎症反応や殺菌作用を示す。そのため、自身が産生し放出する活性酸素に対して高い防御力を持つことでその役割を遂行することが出来ると考えられる。

結論

本時で設定した授業において酸素の酸化作用と酸化作用を利用した免疫反応を学習することで生物のもつ多様性や適応性を生徒は実感できたと思われる。生物を学ぶには、実験によって生物現象を実際に自分の目で観察することが重要である。特に免疫の単位では観察実験の報告例が少ない。新学習指導要領では免疫分野は基礎科目に統一され、マクロファージと白血球の働きを学習すると記載されている。多くの生徒が免疫を学習するため、授業者がこれら機能に精通し実験方法をもっていることは大きな武器になると思われる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご助言、ご指導くださった細川先生、心より感謝いたします。また、丁寧に指導してくださいました理学科の先生方に心より感謝いたします。そして、実験協力していただいた当研究室の大学院 2 回生の西岡君、研究室の仕事をいただいた大学院 1 回生や 4 回生の皆さんに感謝いたします。

参考文献

- [1] Yonei,S., Noda,A., Tachibana,A., Akasaka,S.: Mutagenic and cytotoxic effects of oxygen free radicals generated by methylviologen (paraquat) on *Escherichia coli* with different DNA-repair capacities.: *Mutation Re.*, 163, 15-22(1986)
- [2] 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦, 活性酸素－生物での生成・消去・作用の分子機構, 共立出版株式会社, (1993)
- [3] 井上正康, 活性酸素とシグナル伝達－レドックス制御と生物の生存戦略, 講談社, (1996)
- [4] 文部科学省, 高等学校学習指導要領解説－理科編・理数編, 大日本図書株式会社, (1999)
- [5] 竹内敬人, 山極隆, 森一夫, ほか 45 名, 未来へひろがる サイエンス 第 2 分野 (上), 株式会社 新興出版社啓林館, (2005)
- [6] 佐野博敏, ほか 27 名, 高等学校 改訂 理科総合 B, 株式会社 第一学習社, (2008)
- [7] 田中隆莊, 他 22 名, 高等学校 改訂 生物 I, 株式会社 第一学習社, (2007)
- [8] 田中隆莊, 他 22 名, 高等学校 生物 II, 株式会社 第一学習社, (2007)

付録 1

事前アンケート

()年 名前()

1、今回の実験を行う前に次の質問にくわしく答えてください。

・あなたのもつ酸素のイメージについて書いてください。

・酸素は生体内でどのようにはたらきますか。

・活性酸素という物質を聞いたことがありますか。

① はい ② いいえ

・上で「はい」と答えた方は知っていることを答えてください。

・次の活動うち、体内で活性酸素が発生すると思うものすべてに○をつけてください。

① 呼吸 ② 運動 ③ 細菌の侵入 ④ 喫煙 ⑤ 紫外線照射

2、実験について予想してください。

・過酸化水素水の存在下では、マクロファージのNO産生能はどうなると思いますか。

① 低下する。 ② 変わらない。 ③ 増強する。

理由：

・過酸化水素水の存在下では、抗体産生細胞の抗体産生能はどうなると思いますか。

① 低下する。 ② 変わらない。 ③ 増強する。

理由：

ご協力ありがとうございました。

付録 2

事後アンケート

()年 名前()

次の質問にくわしく答えてください。

1、今回の実験結果をまとめてください。

・酸化作用を受けた細胞とそうでない細胞を観察して違いはありましたか。

・マクロファージと抗体産生細胞の機能に影響を与えた過酸化水素水の濃度はいくらでしたか。

・なぜこのような結果が得られましたか。

2、現在の大气組成では、酸素の濃度はおよそ 21 %です。以下の濃度の酸素を呼吸により吸収した場合、どのような影響があると思いますか。

① 酸素濃度が 40%の場合。

② 酸素濃度が 10%の場合。

3、今回の実験の感想を書いてください。

4、今回の実験のこと以外で、酸素に関して何か知りたいことはありますか。あれば書いてください。

ご協力ありがとうございました。

講師： 細川友秀（理学科教授）

高橋明夢（大学院理科教育専修 M2）

活動のタイトル(テーマ)： 免疫のしくみを調べる（その3と4： 2010年1月5日と6日）

この SSC の前半では食細胞の機能の内、異物を貪食する機能と貪食した異物の抗原情報をリンパ球に伝達する機能を調べました。後半では、食細胞の殺菌機能を調べます。

活動のサブテーマ： 酸素の性質と酸化作用を利用した生体防御のしくみを調べる

1月5日の活動内容概略：

酸素は皆さん知っているとおりに私たちの呼吸に必須であり、これがないと私たちはたちまち窒息死してしまいます。しかし、酸素は活性酸素に変化することがあり、酸素も活性酸素も強い酸化作用をもっていて、生体成分を酸化して生体機能を障害します。呼吸により取り入れた酸素の一部は、私たちの身体の中で活性酸素に変わります。私たちの身体は酸化による影響を受けるのでしょうか？

今日の実験では、マウスの腹腔内にいる大食細胞（マクロファージ）を培養液で回収し、大腸菌の内毒素（LPS）を加えてマクロファージを一晩培養します。これによってマクロファージは大腸菌に出会ってそれを貪食したのと同じ効果が得られて活性化されます。このときに食べきれない数の大腸菌を一気に殺菌するため、マクロファージは活性酸素（ H_2O_2 や一酸化窒素）を生産して放出します。マクロファージ周囲の活性酸素濃度は高まり細菌は死滅します。では、マクロファージ自身は自分が放出した高濃度の活性酸素の影響を受けないのでしょうか？

この疑問を確かめるため、いろいろな濃度に調整した過酸化水素水（ H_2O_2 ）を加えた条件下でマクロファージを LPS とともに培養します。この各培養条件で、マクロファージが産生する一酸化窒素（NO）の濃度を測定して、マクロファージの機能が受ける影響を評価します。

①マクロファージの機能は、高濃度の H_2O_2 による酸化作用の影響を受けるのでしょうか？

②おなじ免疫系の細胞である脾臓の B 細胞と比較すると違いはあるのでしょうか？

実験手順の概略：今回は細胞を1日培養しますので、無菌清潔操作が必須です！

（1）マウスを屠殺して腹腔から細胞を回収します。

マウスの頸部を切開し脱血死させ、70 %エタノールで消毒したあと表皮をはがします。冷やした培養液を滅菌した注射器で 5 ml 腹腔内に注入して、氷上で腹壁をマッサージします。その後注射器で腹腔細胞を回収するという操作を 2 回繰り返して、細胞液を得ます。これを 1000 rpm で 10 min で遠心し、上清を捨てた後、1 ml の培養液に再懸濁して最終的な細胞懸濁液を作成してください。

(2) 腹腔細胞を培養します。

細胞懸濁液の濃度を 1.0×10^6 cells/ml に調整して、96-well 細胞培養プレートの各 well に 200 μ l ずつ分注します。これを 37 $^{\circ}$ C 加湿条件下の CO₂ インキュベーター内で 2 時間培養して腹腔細胞をプレート底面に接着させます。その後培養上清をすてた後、各 well を 37 $^{\circ}$ C に温めた Eagle' s MEM で洗浄して非付着細胞を洗い流し、付着性のマクロファージを得ます。

(3) マクロファージの活性化と過酸化水素水による酸化を誘導します。

各 well にマクロファージ活性化物質として Lipopolysaccharide (LPS) の希釈液をそれぞれ 50 μ l ずつ、さまざまな濃度に希釈した過酸化水素水を 50 μ l 加え計 100 μ l になるよう添加します。それを再び 37 $^{\circ}$ C 加湿条件下の CO₂ インキュベーター内で一晩培養して、マクロファージによる NO 産生を誘導します。

1 月 6 日の活動内容概略:

きのう培養したマクロファージの生産する NO 濃度が培養条件によってどのように変化するか？

それを調べるために各培養 well の培養上清を回収して、その中に含まれる NO の濃度を測定します。

実際は、NO はすばやく反応して亜硝酸イオン NO₂⁻ に変化します。従って、培養上清中の NO₂⁻ をグリース法に従って測定します。

実験手順の概略: 今回は無菌清潔操作は不要です!

培養上清中の NO₂⁻ をグリース法に従って測定するとともに、96-well 培養プレートの底に沈んだマクロファージを良く懸濁し、トリパンブルー溶液により死細胞を染色して酸化による影響を観察します。

(1) グリース (Griess) 法により NO₂⁻ 産生量を測定します。

96-well 培養プレート上で被検培養上清を 2 ~ 16 倍に、また検量線として亜硝酸ナトリウム水溶液を 100 μ M ~ 3.1 μ M に PBS を用いて 2 倍の段階希釈によって 100 μ l/well となるよう分注します。その後、各 well にグリース試薬を 100 μ l ずつ添加して合計 200 μ l/well になるよう混合します。発色を確認後マイクロプレートリーダーで 540 nm での吸光度を測定します。

(2) トリパンブルー溶液により死細胞を観察します。

96-well 培養プレートに PBS とトリパンブルー溶液をそれぞれ 50 μ l ずつ加え、よく良く懸濁して死細胞を染色します。その後、顕微鏡によりマクロファージの状態を観察しましょう。

(3) カレイダグラフを使ってデータをグラフ化します。

マイクロプレートリーダーにより得たデータを解析して、酸化による影響を確認します。マクロファージと脾臓細胞のデータを比較して、生体の活性酸素に対する影響を考察しましょう。

実験器具、マウス等の準備

マウス

実験器具・試薬など Eagle' s MEM 培養液、RPMI1640 培養液、LPS、過酸化水素水 (30 %)、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、0.2 % トリパンプルー溶液、亜硝酸ナトリウム水溶液、グリース試薬、解剖セット、5 ml シリンジ、注射針、5 ml 試験管、50 ml 試験管、コマゴメピペット、マイクロピペット、血球計数盤、96-well 培養プレート、遠心機、CO₂ インキュベータ、マイクロプレートリーダー、顕微鏡

老化促進モデルマウス SAMP1 免疫系の酸化 障害に対する感受性について

高橋明夢, 細川友秀

京都教育大学・理学科・生命科学

「目的」促進老化を示す系統である SAMP1 マウスでは加齢に伴う早期の免疫機能低下がみられる。本研究では、早期の抗体産生機能低下と活性酸素種による酸化障害の関係を調べるため、若齢と成熟齢のマウスから脾臓細胞を得てパラコート添加培養における抗体産生反応を測定し、C3H/He マウスの場合と比較した。

「材料と方法」通常環境飼育による C3H/HeSlc と SAMP1/ Kue マウスの、2~8 月齢を使用。マウスから個体ごとに脾臓細胞を得て 5% FCS 含 RPMI1640 培地に懸濁した。ポリクローナル IgM 抗体産生刺激のため 5 μ g/ml の LPS を加え、さらに様々な濃度でパラコートを加えて 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ の条件下で 1 週間培養した。そして各培養上清中に分泌された IgM 抗体濃度を ELISA で測定した。

「結果と考察」C3H/He マウス脾臓細胞の IgM 抗体産生は、2 ヶ月齢と 8 ヶ月齢ともにパラコート濃度が 10⁻⁷~10⁻⁵M でパラコート無添加対照群と差がなく、10⁻⁴M で有意に低下した。この低下は 2 ヶ月齢の方が顕著だった。また、SAMP1 マウス脾臓細胞の培養では、2 ヶ月齢と 8 ヶ月齢ともにパラコート濃度 10⁻⁷M のとき無添加対照群と差がなく、10⁻⁶から 10⁻⁵M で有意な低下が始まり、10⁻⁴M で顕著に低下した。10⁻⁶~10⁻⁵M での反応低下は 8 ヶ月齢の方が顕著だった。

SAMP1 脾臓細胞の抗体産生機能の方が C3H/He より低濃度からパラコートに感受性であり、酸化障害を受けやすいことが示された。SAMP1 マウスではマクロファージの一酸化窒素(NO)産生機能が加齢に伴い亢進するという以前の結果と合わせて、SAMP1 免疫系の促進老化とマクロファージの炎症性機能亢進との関係が示唆される。

Keywords SAMP1、マクロファージ、酸化障害

高橋明夢、細川友秀

京都教育大学・理学科・生命科学

Susceptibility to oxidative stress of the immune system in SAMP1 mice

Hiromu Takahashi, Tomohide Hosokawa

Department of Life Science, Kyoto University of Education

【Abstract】 SAMP1 mice show characteristic features of age-associated early decline of immune functions. In this study, we examined the relation between early decline of the antibody-producing function and susceptibility to oxidative stress of the SAMP1 immune system. Two- to 16-month-old C3H/He mice and 2- to 12-month-old SAMP1 mice were used. Spleen cells from each mouse were cultured with 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS in RPMI1640 medium containing various concentrations of paraquat in 24-well culture plates at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 7 day in a CO_2 incubator. The concentration of IgM secreted in each culture supernatant was measured by ELISA. Antibody-producing responses of spleen cells from C3H/He mice at all ages tested were not affected by 10^{-7} ~ 10^{-5}M paraquat and were significantly suppressed by 10^{-4}M . By contrast, the antibody responses of SAMP1 spleen cells at all ages tested were not affected by 10^{-7}M paraquat and were significantly suppressed by 10^{-6} ~ 10^{-5}M . The suppressive effect to the antibody response of spleen cells from 8- to 12-month-old SAMP1 was more evident than that to the antibody response of spleen cells from 2- to 4-month-old SAMP1. These results and our earlier observation that NO-producing activity of Macrophage in SAMP1 mice was enhanced with aging suggest that the enhanced inflammatory activity on macrophages may be involved in the early decline of the immune function in SAMP1 mice.

【目的】 SAMP1 マウスでは加齢に伴う早期の免疫機能低下が見られる。本研究では、早期の抗体産生機能低下と活性酸素種による酸化障害の関係を調べるため、若齢と成熟齢の SAMP1 マウスから脾臓細胞を得てパラコート添加培養における抗体産生細胞を測定し、C3H/He マウス脾臓細胞の反応と比較した。

【材料と方法】 通常環境飼育の C3H/HeSlc 系統マウスの 2, 5~8, 16 ヶ月齢と SAMP1/Kue 系統マウスの 2~4, 8~12 ヶ月齢を使用。マウスから個体ごとに脾臓細胞を得て、5%FCS 含 RPMI1640 培地に懸濁し、24-well 培養プレートの各 well に 1.0×10^6 ずつ分注した。ポリクローナル IgM 抗体産生を誘導するため 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に LPS を加え、さらに様々な濃度でパラコートを加えて 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 の条件下で 1 週間培養した。そして培養上清中に分泌された IgM 抗体濃度を ELISA で測定した。

【結果】 C3H/He マウス脾臓細胞の IgM 抗体産生は、2, 5~8, 16 ヶ月齢ともにパラコート濃度 10^{-7} ~ 10^{-5}M でパラコート無添加対照群と差がなく、 10^{-4}M で有意に低下した。また、SAMP1 マウス脾臓細胞の培養では、2~4 ヶ月齢と 8~12 ヶ月齢ともに 10^{-7}M のとき無添加対照群と差がなく、 10^{-6} ~ 10^{-5}M で有意な低下が始まり、 10^{-4}M で有意に低下した。 10^{-6} ~ 10^{-5}M での反応低下は 8~12 ヶ月齢の方が顕著だった。

【結論と考察】 SAMP1 マウス脾臓細胞の抗体産生機能の方が C3H/He より低濃度のパラコートに感受性を示し、酸化障害を受けやすいことが分かった。SAMP1 マウスではマクロファージの一酸化窒素産生機能が加齢に伴い亢進するという以前の結果と合わせて、SAMP1 免疫系の促進老化とマクロファージの炎症性機能亢進との関係が示唆される。

老化促進モデルマウス SAMP1 免疫系の酸化障害 に対する感受性について(第 2 報)

京都教育大学・理学科・生命科学

高橋明夢、細川友秀

「目的」促進老化を示す SAMP1 マウスでは、加齢に伴う早期の免疫機能低下が見られる。本研究では、昨年に続いて早期の抗体産生機能低下と活性酸素種による酸化障害の関係を調べるため SAMP1 マウスから脾臓細胞を得て、さまざまな濃度の過酸化水素水添加培養における抗体産生反応を測定し、C3H/He マウスの場合と比較した。

「材料と方法」通常環境飼育による C3H/HeSlc マウスの 3~16 ヶ月齢と SAMP1/Kue マウスの、3~15 ヶ月齢を使用した。マウスから個体ごとに脾臓細胞を得て 5% FCS 含 RPMI1640 培地に懸濁した。ポリクローナル IgM 抗体産生刺激のため 5 μ g/ml の LPS を加え、さらに様々な濃度でパラコート、または過酸化水素水を加えて 37°C, 5%CO₂ の条件下で 1 週間培養した。そして各培養上清中に分泌された IgM 抗体濃度を ELISA で測定し、酸化障害の評価をした。

「結果と考察」3 ヶ月齢の C3H/He マウス脾臓細胞の IgM 抗体産生は、パラコート濃度が 10^{-7} ~ 10^{-5} M で無添加対照群と差がなく、 10^{-4} M で有意に低下した。また、過酸化水素水濃度が 10^{-9} ~ 10^{-7} M で無添加対照群と差がなく、 10^{-6} M で有意に低下した。6 ヶ月齢以降の C3H/He マウスでは、より低濃度のパラコートと過酸化水素水に対して感受性を示した。SAMP1 マウスでは、3 ヶ月齢で低濃度のパラコートと過酸化水素水に対する感受性を示し、C3H/He マウスに比べ若齢から酸化障害を受けやすくなることが示された。

SAMP1 マウスではマクロファージの一酸化窒素(NO)産生機能が加齢に伴い亢進するという以前の結果と合わせて、SAMP1 免疫系の促進老化と M ϕ の炎症性機能亢進との関係が示唆される。

Keywords SAMP1、マクロファージ、酸化障害