

## キャンパスフェスタにおける出展とゾウリムシの観察および走性実験に関する検討

著者	阿部 紗織, 木野 瑞萌, 山本 千尋, 道羅 英夫, 竹内 浩昭
雑誌名	技術報告
巻	22
ページ	33-40
発行年	2017-03-10
出版者	静岡大学技術部
URL	<a href="http://doi.org/10.14945/00010248">http://doi.org/10.14945/00010248</a>

# キャンパスフェスタにおける出展と

## ゾウリムシの観察および走性実験に関する検討

○阿部紗織<sup>1</sup>、木野瑞萌<sup>1</sup>、山本千尋<sup>1</sup>、道羅英夫<sup>2</sup>、竹内浩昭<sup>3</sup>  
技術部教育研究支援部門<sup>1</sup>、グリーン科学技術研究所<sup>2</sup>、理学部生物科<sup>3</sup>

### 1. キャンパスフェスタの企画概要

2016年11月19日(土)と20日(日)に静岡大学静岡キャンパスで第6回キャンパスフェスタ in 静岡が開催された。グリーン科学技術研究所と技術部の合同企画として行われた、「おもしろ実験・体験」の1つとして「ゾウリムシの走性を予想せい」を出展させて頂いた。当日は、技術部による体験実験や展示の他に、グリーン科学技術研究所関連の研究室による研究紹介も同時に行われた。企画の詳細は以下の通りである。

企画名	大学の研究紹介とおもしろ体験実験
日時	2016年11月19日(土)、20日(日)
場所	グリーン科学技術研究所 遺伝子実験棟
趣旨	大学の研究と技術部の活動を一般の人に知って頂く。
展示内容	家庭でもできる DNA 抽出 光る大腸菌で絵をかいてみよう！観察してみよう！ 色が変わる不思議な水 クマムシの世界 ミニミニミニ水族館 ゾウリムシの走性を予想せい グリーン科学技術研究所関連研究室による研究紹介 (朴、富田、道羅、成川研究室)

### 2. 出展に関して

#### 2.1 出展背景

私がゾウリムシの走性を題材に選んだ理由は次の2つである。1つ目に、ゾウリムシが簡単に手に入る環境であったことが挙げられる。グリーン科学技術研究所の道羅研究室がゾウリムシやミドリゾウリムシを扱っていたため、実験や観察に使用したゾウリムシはこちらの研究室から提供して頂いた。2つ目に、ゾウリムシの走性実験を学生時代に体験したことが挙げられる。実験を体験した当時、感銘を受けたことからより多くの人にこの実験の面白さを知って頂きたいと思い、出展に至った。

#### 2.2 走性とは

走性とは、動物がうまれつきもっている行動の1つである。ある刺激を加えると一定の方向に移動する性質を走性とよぶ。走性には2種類あり、刺激に対して近づく性質を正の走性、刺激に対して遠ざかる性質を負の走性とよぶ。ゾウリムシには、重力走性と電気走性、化学走性(化学物質に対する走性)があり、この3つの走性について実験を行った。

## 2.3 体験実験用に改良

学生実験で行った走性実験を体験実験として再現する際、次の問題があった。1つ目に時間が豊富にある学生実験とは異なり、周りに複数の出展がある体験実験では、1つの実験にかけられる時間が限られているという問題があった。さらに子供は集中が長く続かないため、実験を短時間で済ます必要があった。また、生物による反応は化学反応に比べて時間がかかり、見た目がわかりにくいという問題があった。したがって我々は、「より短時間で見た目をわかりやすくするにはどうしたら良いか。」という考えをもとに実験の改良を行った。

### ①重力走性における改良

ゾウリムシには、重力が働く向きとは遠ざかる方向に移動する性質（負の重力走性）がある。私が経験した実験には重力走性を観察する実験が盛り込まれていなかった。そこで我々は次の実験を試みた。まず、ゾウリムシの培養液が入った 15ml 容ファルコンチューブを用意する。チューブを逆さまにしてしばらく放置した後、観察する実験を行った。しかしこの実験には次の問題があった。まず、ゾウリムシが自然重力下ではチューブの底に十分に沈まず、反応が分かりにくいという問題があった。また、ゾウリムシが水面近くにくるまでに5～10分待ち時間があるという問題があった。この見た目のわかりにくさと待ち時間を解消すべく、次に手回し遠心機を用いる方法を試みた。手回し遠心機でチューブの底にゾウリムシを集めた後、すぐに観察する方法である。チューブの底に沈んだゾウリムシは白いペレット（沈殿物）として観察される。さらに反応が進むごとにこのペレットが小さくなるため、見た目のわかりにくさが解消された。さらにこの方法では時間を置かずとも、ゾウリムシが水面に泳いでいく様子が観察できるため、反応時間も解消することができた。この実験を成功させる秘訣は次の通りである。まず、エサをあげた元気なゾウリムシを用いることである。同じ実験を数日間絶食させたゾウリムシを使って試みたが、同様の結果は得られなかった。飢餓状態のゾウリムシでは遠心機によるダメージが大きく、大多数の個体が死滅してしまうからである。また、同じ実験を 1.5ml 容チューブと卓上遠心機を使って試みたが、同様の結果は得られなかった。ゾウリムシには負の重力走性があるが、水面近くをピンポイントで密集するわけではない。水面からある程度、縦に広がりをもって集まる習性がある（図 1）。したがって 1.5ml 容チューブでは水面から十分な高さを得られなかったことが失敗の原因として考えられた。3つめに実験には手回し遠心機を用いることである。同じ実験をファルコンチューブでも回せる大型遠心機で試みたが、多くの個体が死滅し同様の結果を得ることはできなかった。この実験により、回しすぎるとゾウリムシが死滅することが明らかとなった。また、参考文献によると遠心後、回転が止まるまでに時間がかかるとその間にゾウリムシが水面の方に泳いでくるため、失敗の原因になるとあった<sup>[1]</sup>。遠心が止まるまでに時間がかかることから卓上遠心機や大型遠心機は重力走性の実験には向いていないことが明らかとなった。4つ目に実験にはゾウリムシを使用することである。ミドリゾウリムシには重力走性がほとんどないためである。ミドリゾウリムシにはクロレラが共生しているため、体がゾウリムシに比べて重い。体が重い分、ゾウリムシより水面からさらに縦に広がりをもって集まるため、重力走性が観察しにくい。したがって重力走性の実験にはゾウリムシを使用することをおすすめする。

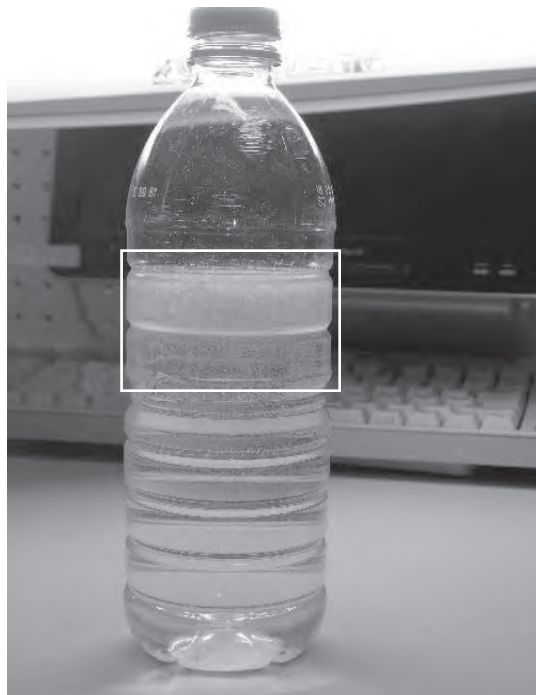


図1 水面に集まるゾウリムシ

## ②化学走性の改良

ゾウリムシには化学走性（化学物質に対する走性）があり、塩濃度や pH に対する走性がある。私が体験した実験では塩濃度に対する走性をみる実験を行い、実験の試薬にカリウム溶液を用いた<sup>[2]</sup>。しかしカリウム溶液は一般の人に馴染みがうすい。そこで我々は pH に対する走性をみる実験に変更し、食酢溶液を試薬に用いることにした。最初に、我々が予定していた実験は次のとおりである。2%と 0.02%に希釈した食酢を用意する。ゾウリムシをとったホールスライドグラスに食酢溶液を滴下し、実体顕微鏡下で観察する実験を行った。しかしこの実験には次の問題があった。まず、食酢溶液を滴下する毎に、ゾウリムシを交換しなければならないという問題があった。また、食酢溶液がゾウリムシの培養液中で拡散し、反応が見にくいという問題もあった。さらに酸に弱いゾウリムシは実験後、大多数が死滅してしまうという問題があった。これらの問題を解消すべく、次の方法を試みた。細かく切ったろ紙をあらかじめ用意しておく。ろ紙を1枚GSピンでとり、シャーレにとった食酢溶液に浸す。食酢溶液を浸したろ紙をホールスライドグラス上のゾウリムシの上に置き、実体顕微鏡で観察した(図2,3)。この方法によって食酢濃度を変える毎にゾウリムシを交換する必要がなくなった。また、食酢溶液がゾウリムシの培養液中で拡散しなくなったため、反応も見やすくなり、ゾウリムシの死滅も防ぐことができた。その結果、0.02%に希釈した食酢溶液をしみこませたろ紙を置いたときゾウリムシが近づき、2%に希釈した食酢溶液をしみこませたろ紙を置いたとき、ゾウリムシがろ紙から遠ざかる反応を示した。ゾウリムシには障害物に当たると後方にバックする習性がある。0.02%の食酢溶液のときはゾウリムシがろ紙にぶつかり、その後ろ紙に当たった衝撃でバックする行動を示した。この反応をろ紙から遠ざかる向きに泳いでいると勘違いした来場者がいたようである。2%の食酢溶液のときは、ゾウリムシがろ紙からある程度距離があるところまでしか寄って行かないことから我々にとっては比較的観察しやすい反応であったのだが、来場者にとってはわかりにくかったようである。

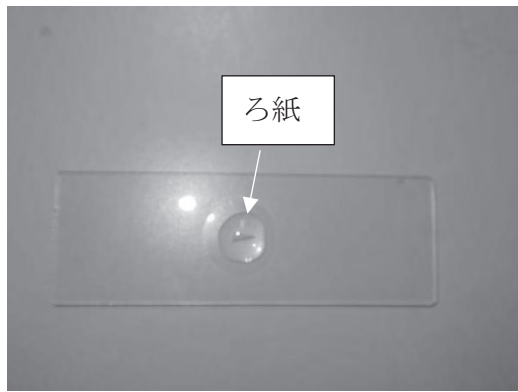


図2 ろ紙を用いた実験



図3 化学走性の実験

### ③電気走性における改良

ゾウリムシには電気走性がある。電流の向きとは遠ざかる向きに移動する性質がある。私が体験した実験では、ゾウリムシをとったホールスライドグラスに電極と電源装置を接続し、異なる電圧を与えたときの反応を実体顕微鏡下で観察するという実験を行った(図4、5)<sup>[2]</sup>。電気走性についてはほとんど改良した点がない。当日はゾウリムシの死滅を防ぐため、5Vの電圧をかけたときの反応のみ観察を行った。本出展では行わなかったが、電圧を上げると、よりゾウリムシの動きが俊敏になって面白い反応を示すようになる。電圧を変えたときの観察も取り入れると実験がより楽しくなったと考えられる。また、ホールスライドグラスがなければシャーレを代わりに用いても良い。ただし、シャーレを使用する場合はゾウリムシの液滴が広がりすぎないように注意する必要がある。液滴が広がりすぎると、ゾウリムシに局所的に電圧を与えることができなくなり、きれいな反応が見られなくなるためである。

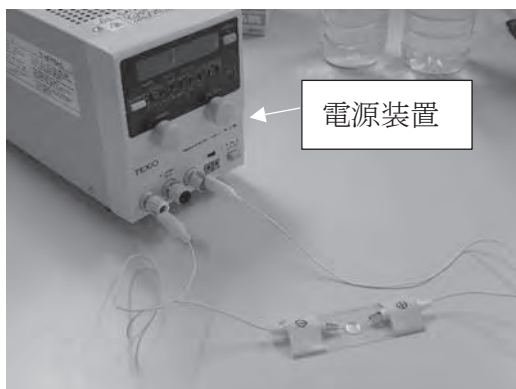


図4 電気走性用装置

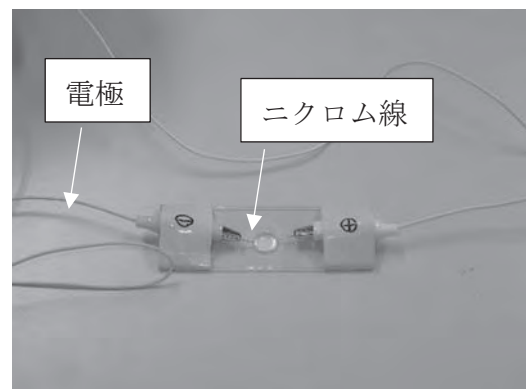


図5 図4を拡大

## 2.4.ゾウリムシおよびミドリゾウリムシの観察

ゾウリムシを知らない人が来場者の中にいるかもしれないという想定のもと、我々は走性実験コーナー以外にもゾウリムシを観察するコーナーを設けた。ゾウリムシに加えて、ミドリゾウリムシの観察を加えたのは、ミドリゾウリムシがクロレラを共生できる珍しい種であったからである。また、道羅研究室がミドリゾウリムシを扱う実験を行っていたため、研究室の宣伝もかねてミドリゾウリムシの観察を行うことになった。

#### 2.4.1 ゴウリムシの観察

ゴウリムシは繊毛運動が激しく、動きがすばやい。特に視野が狭くなる高倍率では観察が難しい。したがって動きがすばやい生物を観察するには何らかの方法で生物の動きを抑えて観察する必要がある<sup>[1][3]</sup>。そこでよくとられているのが次の方法である。まず、脱脂綿の繊維で動きを封じ込める方法である<sup>[1]</sup>。ここでは「脱脂綿封じ込め法」とよぶことにする。次に、溶液の粘性を上げて行う観察法がある。この観察法にはメチルセルロースを使う方法と、流動パラフィンを使う方法がある<sup>[1][3]</sup>。3つ目に、塩化ニッケル溶液などの麻酔で動きを止める方法がある<sup>[1][3]</sup>。我々はこれらの方法のうち、「脱脂綿封じ込め法」と「流動パラフィン法」を試みた。麻酔法だと、繊毛運動が完全に止まってしまい、ゴウリムシ本来の動きが伝わらないと考えたからである。「脱脂綿封じ込め法」は、ホールスライドグラスにゴウリムシの培養液をとり、薄く広げた脱脂綿をのせ、カバーグラスをかぶせて観察する方法である<sup>[1]</sup>。この方法では、脱脂綿の繊維が迷路のような役割を果たし、ある程度観察の時間をかせぐことが可能になる。しかし、脱脂綿ではゴウリムシの動きがあまり制御されず、高倍率ではほとんど効果が認められなかった。また、ゴウリムシの背景に脱脂綿の繊維が映り、見た目が美しくないという問題が生じた。他にも、脱脂綿が水分を吸い取るため、長時間の観察に耐えられないという問題が生じた。これらの問題を考慮し、次に「流動パラフィン法」を試みた。流動パラフィン法とは、ホールスライドグラスにゴウリムシの培養液をとり、その上にBSA（牛血清アルブミン）溶液をのせる。さらにその上に流動パラフィンをのせてカバーグラスをかぶせて観察する方法である<sup>[1]</sup>。BSA溶液は、ゴウリムシの細胞が培養液と流動パラフィンの界面で壊れないようにするために加える<sup>[1]</sup>。この方法ではゴウリムシに2種類の試薬を加えるので液量に注意が必要である。したがってこの観察法に用いるゴウリムシは、ろ紙か遠心機で濃縮したものを使用することをおすすめする。結果として「流動パラフィン法」がゴウリムシの観察法として最適であることが明らかとなった。しかしゴウリムシが視野から外れても、本来の動きを見せたほうがおもしろいと考えたため、そのままの状態のゴウリムシを見て頂くことになった。

#### 2.4.2 ミドリゴウリムシの観察

ミドリゴウリムシは、ゴウリムシと同様、そのままの状態を光学顕微鏡で観察して頂くことにした。しかし、道羅研究室から急遽、蛍光顕微鏡を借りられることになったため、当日は光学顕微鏡と蛍光顕微鏡（図6）の両方でミドリゴウリムシの観察を行うことにした。

##### ① 蛍光顕微鏡とは

蛍光タンパク質や蛍光抗体を標識に用いて、細胞やタンパク質を生きたまま観察できる顕微鏡である。生物顕微鏡と落射蛍光照明装置を組み合わせた構造となっている。落射蛍光照明装置には特定の波長のみを透過し、それ以外の光を通さないフィルターがついている<sup>[4]</sup>。したがって目的の波長の光のみでの観察が可能となる。光源に蛍光を用いる利点として、解像度の向上が挙げられる<sup>[4]</sup>。蛍光色素には、特定の波長の光が照射されると励起され、励起された状態から定常状態に戻る際、照射された光とは異なる波長の光を放出するという特徴がある<sup>[5]</sup>。ターゲットとなる部分を蛍光標識した細胞を蛍光顕微鏡下で観察することによって細胞の蛍光標識された部分とそうでない部分にコントラストが生まれ、細胞の細部にわたる観察が可能になる<sup>[4]</sup>。

## ②蛍光顕微鏡下でのミドリゾウリムシの見え方

ミドリゾウリムシは、クロレラが共生している生物である。クロレラの中には葉緑体があり、さらに葉緑体の中にはクロロフィルと呼ばれる色素が存在している。クロロフィルは蛍光色素の一種であり、UV や緑色の蛍光を当てると赤く光るといった特徴がある。クロロフィルに UV や緑色の蛍光を当てると赤く光る理由は次の通りである。クロロフィルは照射された光全てを光合成のエネルギーとして利用できるわけではない。光合成のエネルギーに変えられずに余った光が赤色光となって放出されることにより、クロロフィルは赤く光るようになると考えられている<sup>[6]</sup>。したがって、ミドリゾウリムシに緑色の蛍光を当てて観察すると、クロレラ部分だけが赤く光って見えるようになる（図 7、8）。緑色の細胞から赤い細胞になるこの現象は来場者にインパクトを与えたようである。

## ③蛍光顕微鏡下でミドリゾウリムシを観察する際の注意点

細胞がつぶされずに長時間観察できるという観点から我々は実験にはホールスライドガラスを使ってきた。しかし、蛍光顕微鏡で観察するときはホールスライドガラスを使うことをおすすめできない。なぜなら、光の屈折で細胞の細部が見えにくくなるからである。また、ミドリゾウリムシは、ゾウリムシと同様に繊毛運動が激しいので細胞の細部まで観察するときは動きを制御する必要がある。そこで取り入れた方法は次の方法である。普通のスライドガラスに濃縮したミドリゾウリムシをパスツールピペットで 1 滴とり、カバーガラスをかける。細くねじったキムワイプでサンプル中の水分を抜きながら観察を行う方法である。最初は活発に動いていたミドリゾウリムシも、脱水が進むにつれて動きが緩慢になり、次第に繊毛運動が完全に停止するようになる。この状態になったものを観察に用いた。ただし、この方法では細胞が短時間で押しつぶされてバラバラになってしまう。定期的にサンプルを新しいものに交換しなければいけないという手間はある。



図 6 蛍光顕微鏡での観察

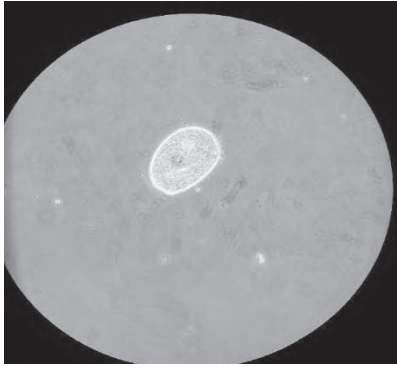


図7 通常透過光下

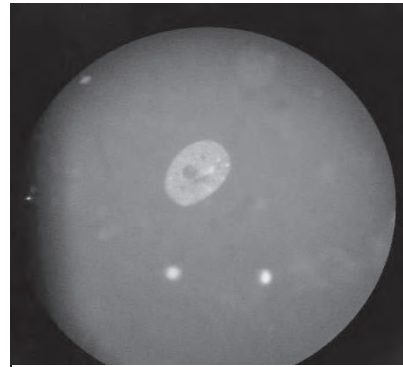


図8 緑色蛍光下

### 3. 当日の様子

当日は、我々の出展だけでなく、グリーン科学技術研究所関連研究室による研究紹介や他の技術職員による展示や体験実験も行われていた。ここでは写真のみでの紹介とさせて頂く。



図9 ミニミニミニ水族館



図10 クマムシの世界

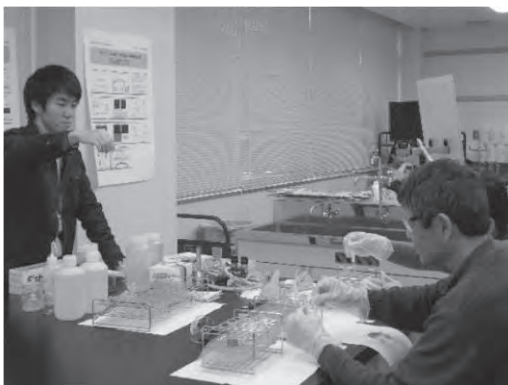


図11 色が変わる不思議な水



図12 研究紹介



#### 4. まとめ

走性は、高校生物にでてくる内容であるが入試での頻出度が低く、授業ではあっさり流されることが多い。そのため走性という言葉は知っているけれど実際に見たことはないという来場者がほとんどであった。今回の出展を通してゾウリムシはどこにでもいるありふれた生物であるが、走性という面白い性質があり、その機構について明らかになっていない部分が多くあるが、今後その性質をいかした技術が期待できる興味深い生物であることを一般の人に伝えることができ良かったと思う。また、今回の出展を通じてミドリゾウリムシという生物を初めて知り、ミドリゾウリムシには細胞内共生によって本来その生物がもちえない性質をもたせることができる、可能性を秘めた生物であることを知った。最後に今回の出展は、ゾウリムシについて見識を深めることに繋がっただけでなく、普段一緒に仕事をすることがない先生や技術職員と意見交換を交わし、仕事を行う貴重な機会となった。今後も機会があれば先生や他の技術職員とタイアップした企画を行っていきたいと考えている。

#### 謝辞

今回の出展にあたり、準備や実験に協力して下さった井上直己氏をはじめとする静岡大学技術部教育研究支援部門の方々に深くお礼を申し上げますとともに、出展の機会を下さったグリーン科学技術研究所森内良太氏に深く感謝致します。

#### 参考文献

- [1] 山田卓三, 山極隆編:「新しい教材生物の研究 飼育培養から観察実験まで」講談社 (1980), p50~51.
- [2] 北海道大学自然科学実験編集委員会編:「自然科学実験」学術図書出版社 (2011), p126~132.
- [3] 重中義信監修:「原生動物の観察と実験法」共立出版 (1988), p66~67.
- [4] ThermoFisher SCIENTIFIC:「落射蛍光顕微鏡の基礎」  
<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/epifluorescence-microscope-basics.html> (最終閲覧日 2017.1.22.).
- [5] 彦坂幸毅:「植物の光合成・物質生産の測定とモデリング」共立出版 (2016), p42~45.
- [6] スルメイカ:「クロロフィルの蛍光」  
<http://outdoor.geocities.jp/y44235/sub9.html> (最終閲覧日 2017.1.31).