
報文

教材としての原生動物 (3) —ゾウリムシII

丸岡 禎*

香川県立丸亀高等学校

〒763-8512 香川県丸亀市六番丁1番地

はじめに

原生動物は、高等学校「生物」の教科書において、ごく限られた種がごく限られた単元で扱われているのみである(丸岡 2003)。そのなかで、ゾウリムシはさまざまな項目でたびたび登場する点において特異な存在である。「生物I」では、高度に分化した細胞小器官、二分裂、収縮胞による浸透圧調節、重力走性、回避反応、繊毛運動などの項目で、「生物II」では、ガウゼの実験を引用した種間競争、捕食者—被食者関係、また、系統分類の原生生物界の代表種などの項目で記載されている。

また、教科書に「生徒の実験教材」として取り上げられている原生動物は、ゾウリムシただ1種である(アメーバさえ実験教材として扱われていない現状を少しさびしく思う)。そのゾウリムシの実験項目として、「生物I」では、「収縮胞による浸透圧調節」が非常に多くの教科書で採用されているのに対し、行動(泳ぎ方)、重力走性、化学走性、細胞の構造、食胞形成、採集、培養については少数の教科書で扱われているだけである。「生物II」では、1社の教科書が課題研究の一例として「ゾウリムシを用いたさまざまな研究」を取り上げている。その内容は、採集、培養(条件)、観察法、行動、浸透圧調節、消化、接合、トリトンモデルによる繊毛運動などで、ゾウリムシを多目的な教材生物として扱っているのが特徴的である。

実験教材としてのゾウリムシの取り扱い方について、前報(丸岡 2004)では「採集・培養・観察の工夫

および核、食胞、トリコシスト、収縮胞など種々の「細胞小器官の観察・実験」を中心にまとめた。そこで今回はその続編として「行動」、「生殖・増殖」の項目について、その現状と課題を考えていきたいと思う。なお、ゾウリムシについては多くのすぐれた総説、実験書や報告がある。詳細についてはそれらも参考にしたい。

行動の観察

経験から言うと、生徒がはじめてゾウリムシを目にするときは、想像以上に興味や期待を膨らませているものである。この気持ちを大切にするには、まずは、活発に動いているゾウリムシを見せるのが効果的である。最初は肉眼で、大きさや形、泳いでいることなどを確認させることで、ゾウリムシがぐっと身近で現実的な存在になる。続いて、すばやく泳ぎ回るゾウリムシの行動を低倍率でじっくりと観察させたい。回転方向、泳ぐ軌跡、回避反応など、観察する視点を与えることがポイントである。これによって科学的な見方に気づくとともに、生きものとしてのゾウリムシへの興味がますます高まる。この興味づけに成功すれば、動きを抑制した材料での繊毛運動、収縮胞などの観察にも意欲的に取り組むことができるようになる。

さて、現行の教科書では、2~3社のものに、泳ぎ方や障害物の避け方(回避反応)、繊毛運動の観察を取り上げたものがあり、その観察法についてはすでに紹介した(丸岡 2004)。ここでは、単なる観察から一歩進めて、定性的あるいは定量的な観察・実験を中心に紹介したい。なお、この分野の総説として「単細胞動物の行動」(内藤 1990)を一読されることをお薦めする。

(1) 繊毛運動と遊泳

模式図で見るゾウリムシは、平面的で細胞の周囲

*Corresponding author

Tel: +81-877-23-5248

Fax: +81-877-23-6013

E-mail: nt-maru@mail2.netwave.or.jp

(Received: 18 May 2005)

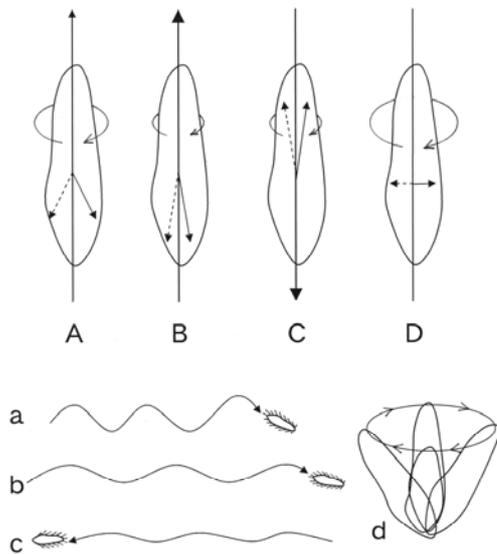


図1 繊毛打方向と遊泳行動

ゾウリムシの前端を時計の12時方向、後端を6時方向に定位させたとした場合、ふつうの速さで遊泳するときは、繊毛打の方向は4時半(実線矢印)、反対面は7時半(破線矢印)となり、左回転をしながら前進遊泳し(A)、全体としての遊泳軌跡は左螺旋を描くようになる(a)。容器に機械的なショックを与えたり、天敵に追われたりすると、繊毛打の方向は6時に近くなるとともに(B)繊毛打頻度も高くなり、螺旋のピッチが大きくなって速く泳ぐようになる(b)。細胞膜の脱分極により繊毛打方向が逆転し12時近くになると、左回転しながら後退遊泳し(C)、全体としては右螺旋の遊泳軌跡を描く(c)。ほとんど前後に動くことなく、後端を支点に大きく前端を右回転させる、いわゆる“首振り運動”(d)は、障害物をさけるときなどにしばしば観察される行動で、このとき繊毛打はちょうど3時方向であるため、前後への推進力はなく回転力のみ生じている(D)。

表1

1/60M CaCl ₂	1/40M KCl	ゾウリムシの行動 (22℃)
1 (滴)	15 (滴)	約40秒間直線的に後退→停止して、後端を支点に約20秒間時計回りに大きく首振り回転→大きく首を振りながらゆっくり前進し、やがて普通の前進遊泳に戻る
2	14	約15~20秒間少し首を振りながらであるが直線的に後退→停止して、約10秒間大きく首振り運動→40~60秒後に普通の前進遊泳に戻る
4	12	約7~8秒間後退→停止して3~5秒間大きく首振り運動→15~20秒後に普通の遊泳に戻る
8	8	1~2秒間、停止した状態で少し大きく首を振る→普通の前進遊泳に戻る
12	4	対照と見かけ上同じ前進遊泳、障害物に当たると普通に回避反応も起こる
16	0	同上

表2

1/60M CaCl ₂	1/40M BaCl ₂	ゾウリムシの行動 (22℃)
12 (滴)	4 (滴)	自発性方向変換が頻繁(1~2秒ごと)におこるが、後退遊泳の継続時間は短く、前進と後退のピストン運動を行う
8	8	試験液に移した直後は少し後退するが、前進遊泳をはじめ、比較的高い頻度で自発性方向転換(約10秒の直線的後退遊泳)をする
4	12	ほぼ同上
2	14	かなり長時間(20~60秒間)後退遊泳を継続後、自発的方向変換は少なく、普通の前進遊泳に戻る
0	16	試験液に移した瞬間はゆっくりと首振り運動をするが、15~30秒後に運動を停止する

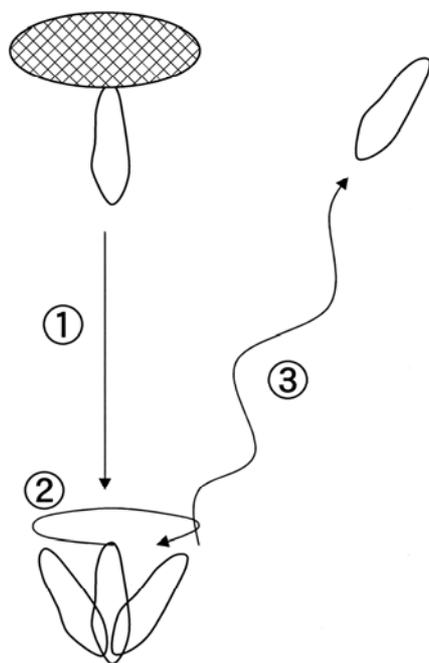


図2 回避行動

- ①前端が障害物に触れると繊毛打が逆転して後退する。②停止して“首振り運動”を行い方向転換する。③再び前進遊泳をする。

にだけ繊毛が描かれているので、ゾウリムシは扁平でその周りにだけ繊毛が生えているという印象を持っている高校生も少なくない。しかし、実際のゾウリムシは立体的で、その表面にはほぼ一様に約1万～1万5000本の繊毛が生えている。

1本の繊毛は、推進力を生み出す「有効打」と有効打開始の位置に戻るための「回復打」とを繰り返す。繊毛運動を生徒に顕微鏡観察させる場合は、スライドガラス上に粘性の高いメチルセルロース400の2%溶液を1滴落とし、その中央にできるだけ少ない液とともにゾウリムシを入れ、カバーガラスをかけて検鏡する。この場合、絞りなどの照明を工夫しながら繊毛運動が見やすいようにする。繊毛1本1本は非常に細く短いので観察しにくい、隣接する繊毛の位相が少しずつつづれている（ちょうど風になびく稲穂のように）ので、繊毛の先端の描く波形（繊毛波）はよく観察できる。

遊泳行動を観察するには、たとえば、スライドガラス上に脱脂綿の繊維をごく少量載せてゾウリムシ

を含む培養液を1～2滴加え、40～100倍の低倍率で行う。観察のポイントは、①細胞の回転方向、②遊泳軌跡、③回避反応などである。普通の速さ（1～1.5 mm/s程度）で前進遊泳をしているゾウリムシの有効打は、仮にゾウリムシの前端を時計の12時、後端を6時に定位させたとき、おおよそ4時半（反対面は7時半）の方向である。このため、前進する力とともにトルクが生じるので後端側から見ると左回転をしながら前進する（図1-A）。さらに、細胞が左右非対称であることや細胞口の繊毛が生み出す力などが作用して、全体としての遊泳軌跡は、後方から見た場合、ゆるやかな左螺旋（ピッチ約2 mm、幅約0.5 mm）を描くようになる（図1-a）。また、ゾウリムシを入れた器に軽く機械的ショックを与えると、ゾウリムシの泳ぐ速度は一斉に増加し、螺旋のピッチは大きく、幅は小さくなる（図1-B, b）。これは細胞後端が極めて機械的刺激に敏感で、細胞膜の過分極を引き起こし、繊毛打方向が6時に近くなるとともに繊毛打頻度も高くなって、前進遊泳速度が大きくなるからである。これを“逃走反応”といい、ディディニウムなどの天敵に襲われたときに役立つと考えられている。障害物にぶつかったときは、“回避反応”と呼ばれる行動を示す（図2）。これは、先端が障害物に触れたときの機械的刺激によって細胞膜の脱分極を引き起こされ、そのため繊毛打が逆転して後退遊泳を行い（図1-C, c、図2-①）、細胞膜の活動電位がしだいに静止電位に戻るにつれて、後退を停止させて細胞後端を支点に首を大きく右回転させて（図1-D, d、図2-②）方向を転換し、ついには元どおり前進遊泳する（図2-③）というものである。なお、後退遊泳は、特に障害物にぶつからなくても、前進遊泳の最中にときどき自発的におこり、これは“自発性方向変換”と呼ばれている。

(2) 外液組成による繊毛逆転反応

ゾウリムシは“泳ぐ神経細胞”と比喻されるように、細胞膜の興奮（活動電位）が繊毛逆転（有効打の方向が12時に近くなる）を引き起こす。すなわち、細胞膜が何らかの原因で脱分極をおこすと、脱分極感受性 Ca^{2+} チャネルが開いて Ca^{2+} イオンの細胞内への流入が起こり、それが繊毛打の逆転を生じさせ、結果として、ゾウリムシの後退遊泳や回避反応あるいは走性などの行動となる。神経細胞とゾウリムシでは、活動電位の生じる原因が Na^{+} イオンの流入によるか、 Ca^{2+} イオンの流入によるかという相違点はあるが、基本的に同じ原理である。そこで、外液のイオン組成を変えることにより、脱分極を引き起こしたり、 Ca^{2+} チャネルに影響を与えたりするこ

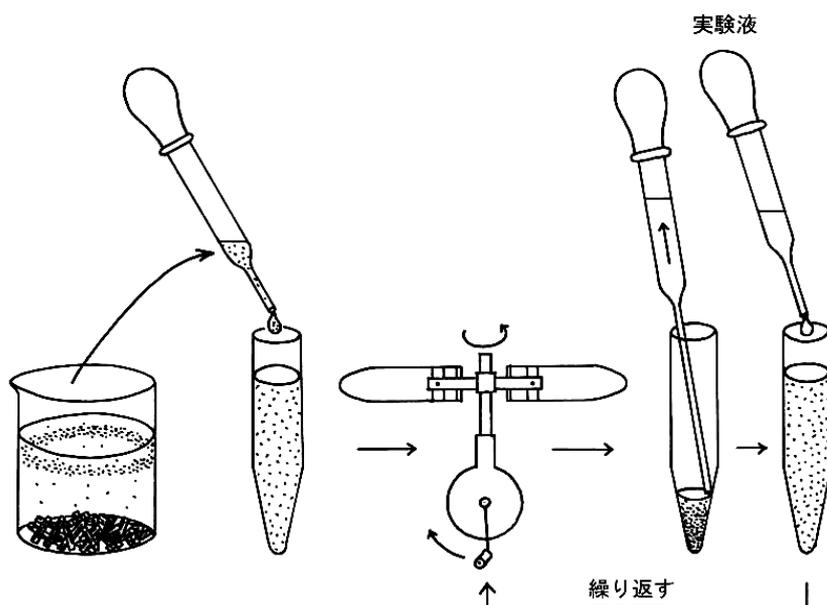


図3 手回し遠心器による洗浄方法

培養器からゾウリムシを遠心管に移し、手回し遠心器で細胞を沈めてから上澄みを捨てる。実験液を加え、前述の操作を3回ほど繰り返す。

とができるので、遊泳行動の変化が観察できる（見上・小泉 1977、丸岡 1980、石原・山上 1983、大阪大学および小倉明彦のホームページ）。

外液の $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ 比を変化させると、低濃度の Ca^{2+} 、高濃度の K^{+} 存在下で後退遊泳が起こることがわかる。実験としては、まず、ゾウリムシを手回し遠心器を用いて対照液で3度洗い（図3）、その液に10分以上順応させておいた。対照液にはミネラルウォーター“六甲のおいしい水”（ 0.74mM Na^{+} 、 0.21mM Mg^{2+} 、 0.63mM Ca^{2+} 、 0.01mM K^{+} 、 $\text{pH}7.4$ ）を用いた。実験液としては、 $1/60 \text{ M CaCl}_2$ 、 $1/40 \text{ M KCl}$ を用意した。生徒実験では、試験液の調整に際し、正確さに難はあるものの、手間を省くことができる次の方法によった。すなわち、前述の Ca 液と K 液を市販のパスツールピペットでそれぞれ吸い取り、いろいろな比で時計皿に滴下した後、時計皿をよく回転して液を十分に攪拌した。実体顕微鏡下で、この試験液にできるだけ少ない液とともにゾウリムシを添加し、直に行動を観察した。そして、①後退継続時間、②首振り運動継続時間、③元の前進遊泳に戻るまでの経過時間などをストップウォッチで測定するとともに気のついたことを記録させた。その結果（表1）から、外液の $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ 比によって膜電位が

段階的に変化したため、それが行動の変化となって現れていることを明瞭に推察できた。

次に発展的に、 Ca^{2+} チャンネルの阻害剤である Co^{+} イオンの効果を確かめるため、上記実験の $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}=4/12$ 液に $1/20 \text{ M CoCl}_2$ を1～2滴添加し試験液とした。すると、後退遊泳をせずに1～3秒間の首振り運動をし、やがて正常な前進遊泳に戻るのが観察された。これは $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}=8/8$ 試験液での反応と同程度である。このことから、 Co^{+} イオンの Ca^{2+} チャンネル阻害効果が確認できたと考えている。

また、ゾウリムシを Ba^{2+} を含む液に入れると、周期的に繊毛逆転を起こして前進と後退を繰り返す“バリウム・ダンス”をすることが知られている。これは Ba^{2+} イオンは Ca^{2+} チャンネル活性化剤で、 Ca^{2+} イオンよりも Ca^{2+} チャンネルを通りやすいため、正常では段階的な活動電位を生じる細胞膜が「全か無かの法則」に従うようになることが原因で起こる。そこで、前述方法で $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$ 比の異なる試験液における行動を調べてみた（表2）。生徒にバリウム・ダンスのおこるしくみを理解させるのはなかなか難しいことではあるが、イオン・チャンネルに興味をもたせる現象として利用できそうである。

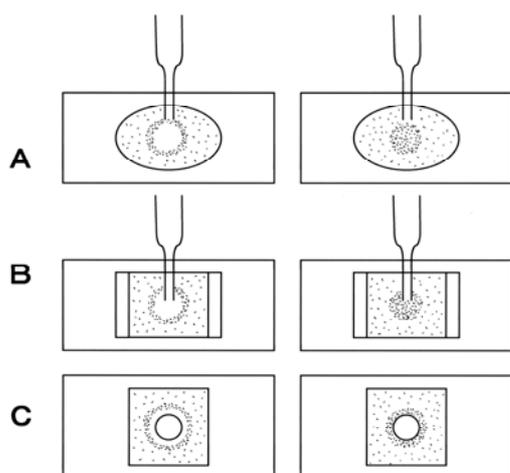


図4 化学走性の方法と酢酸溶液での結果

A : 上から試験液を滴下する方法 B : カバーガラスの間からマイクロピペットの先を挿入する方法 C : 中央に試験液を染み込ませた丸い紙を置く方法 A~C : 左 0.2%、右 0.02%。

(3) 走性

一般に、「走性」(タクシス, taxis)とは、動物が刺激源に対して定位しながら移動することをいう。しかし、ゾウリムシの場合、異なる環境条件下(化学組成、照度、温度、pH など)やその境界で起こる回避反応や逃走反応、定常的な前進遊泳速度や自発性方向変換頻度の変化が原因で、分布に片寄りが起こる「集合」(カイネシス, kinesis)を含め、広い意味で走性として扱っている。

そのうち、高校生物教科書の実験項目としては、酢酸を刺激源とする“化学走性”と培養液の上層に集合する“重力走性”が、数社によって取り上げられている。

生理実験を行う場合、試料の条件を一定にするため、研究者は対照液として標準塩溶液を用いる(楠元・内藤 1981)が、学校に普及している“稲わら培養液”(10g わら/1ℓミネラルウォーター)はこれよりもかなり低張なため、培養液から直にこの液に移すと細胞が大きくダメージを受ける。したがって、筆者は標準液を必要とする場合は、培養用ミネラルウォーターを用いている。また、生徒実験であまり厳密性を問わない場合は、培養液をそのまま用いることも多い。なお、標準液で洗う場合や細胞密度の高い試料を用意する場合は、手回し遠心器を利用す

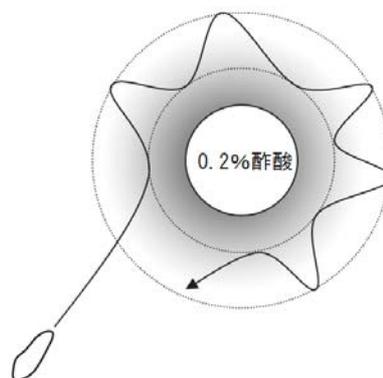


図5 0.2%酢酸溶液のまわりに集合するしくみ

中央に 0.2%酢酸をおくと周辺に拡散し濃度勾配が生じる。ゾウリムシは、飼育水から周辺の希薄な領域に侵入するときは回避反応を起こさないが、ある程度の濃い領域に接すると回避反応を起こし、次には希薄な領域と飼育水の境界でも回避反応を起こすため、結果として周辺の狭い領域に閉じ込められることになる。

ると便利である(図3)。

化学走性

実験方法としては、①スライドガラス上にゾウリムシ培養液をうすく広げ、その中央にマイクロピペットで試験液を滴下する方法(図4-A)、②ビニルテープを4枚ほど張り重ねたもので両端に枕を作ってカバーガラスをかけ、その隙間からマイクロピペットの先端を挿入し中央付近に試験液を注入する方法(図4-B)、③事務用パンチでろ紙に穴を開け、打ち抜いた丸い紙に試験液を染み込ませて中央におき、カバーガラスをかけて観察する方法(図4-C)などがある。

教科書や簡単な実験書には、試験液として希薄な酢酸溶液を用いているものが多い。0.2%酢酸溶液では、液をおいた場所から少しはなれたところにリング状に集まり、0.02%では酢酸溶液の中に集合する(図4-A~C いずれも左 0.2%、右 0.02%)。このような分布の片寄りの原因としては、①境界で回避反応が起こるかどうかが、②液中での遊泳速度が速いかどうか(遅い液のほうに存在する確率が高くなる)、③自発性方向変換頻度の3つが考えられるが(楠元・内藤 1981)、酢酸溶液の場合は液の境界面で起こる回避反応が主な理由である。たとえば、

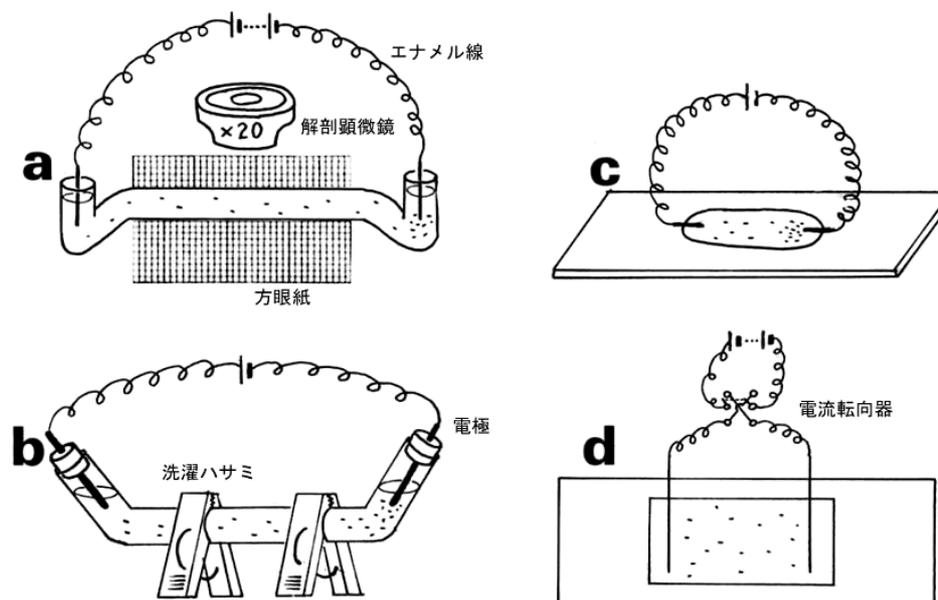


図6 旧生物教科書に記載されていた電気走性の観察装置の例

0.2%酢酸溶液を中央におくと周辺への拡散のために濃度勾配が生じるが、ゾウリムシは周辺部の飼育水から酢酸の薄い領域に侵入するときには回避反応を示さない。ところが、ある程度濃い領域に接するとその境界で回避反応を示し、また、薄い領域から飼育水に接する境界付近でも回避反応を起こす。このため、結果としてその狭い領域から出られなくなり、周辺にリング状に集まるように観察されるのである(図5)。

観察は10～40倍程度の低倍率で行うのが普通であるが、光の加減を工夫したり、黒い下敷きなどを下に敷くことで肉眼でもはっきりと観察できる。結果をはっきりと識別するには、細胞を濃縮させるなどして密度の高い試料を用意するのがコツである。また、図5に示したような化学組成の異なる液の境界における回避反応を詳しく観察するには、図4-B, Cのようにカバーガラスをかけた方がよい。

他の実験報告例としては、0.1% NaCl 溶液(負の走性)やカリウムイオン濃度の異なる液についての比較データ、カルシウム、ナトリウム、砂糖水などを用いることを示唆したもの(石田・佐藤 1958、楠元・内藤 1981)、また、ガラス細管の毛細管現象を利用し、まず一端を浸して高密度のゾウリムシが入った培養液を半分まで入れ、続いて同じ端を酢酸

溶液などの試験液につけて残り半分を満たし、10分ほど静置してどちらに集まるかを観察する方法(石原・山上 1983)がある。

篠原(1975)は、走性と実験液の種類・pHとの関係を詳細に調べ、発展的な内容を報告している。すなわち、0.2%酢酸にコンゴレッドを添加したものでは、中心の青い部分と周辺の赤い部分の境界にゾウリムシが集まった(この場合、コンゴレッドの変色域からpHを知ることができる)。また、化学走性が反対になる濃度境界を調べたところ、0.1～0.06%酢酸(pH 3.38～3.90)で負、0.04～0.01%(pH 3.91～4.05)で正の走性を示した。炭酸ナトリウム0.1～0.04%(pH 11.48～11.29)は負、0.02～0.01%(pH 11.01～10.2)では正の走性を示した。塩化ナトリウム0.1%(pH 5.60)は負、0.05%(pH 6.08)では正、0.025%(pH 6.08)では化学走性の反応はほとんど見られなかった。このことから、単にpHに対して反応が起こっているのではなく、化学成分が影響していることを指摘している。また、ゾウリムシは酢酸を用いたとき、pH 5.4～6.4に正の化学走性を示すという報告もある(小幡・桧垣 1979)。

電気走性

ゾウリムシは直流電圧をかけると陰極に向かう。

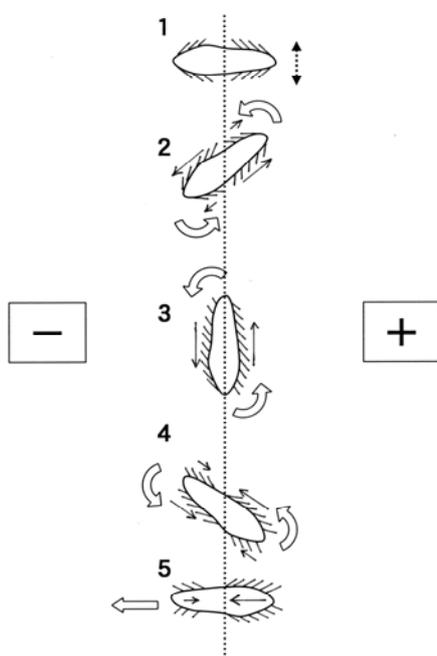


図7 電気走性のしくみ

直流電圧がかかると陰極側の繊毛打方向は逆転し、陽極側の繊毛打は強められる。1のように陽極側に向いていても、次の瞬間には破線矢印のどちらかの方向に体が振れることになる。仮に上方方向に振れた場合(2~4)、体の左右の推進力(実線矢印)の差により陰極に向かう回転トルクが生じ、ついには陰極に向く。5では前半の繊毛は逆転するが、後半の繊毛の推進力が勝るので陰極に向かって前進する。



図9 生徒による電気走性の定量的実験のようす

そこで、これを負の電気走性というが、他の走性とは概念が異なっていることに留意する必要がある。かつては、定性的あるいは定量的実験のための装置がいくつかの教科書に紹介されていたが(図6)、現行「生物I」教科書ではまったく扱われていない。

電気走性のしくみは次のように説明できる。細胞膜が陰極側で脱分極、陽極側で過分極するため、陰極に面している繊毛は繊毛打が逆転し、陽極に面している繊毛は繊毛打の頻度が増す。そのため、細胞の左側と右側で生じる推進力に差ができ、回転トルクを生じて陰極に向く。陰極側に向いたゾウリムシは、陰極側の繊毛逆転による後進力よりも後半部の繊毛による前進力が勝るため、ついには陰極に向かって泳ぐことになる(図7)。このように、生徒に細胞膜の電気興奮性から電気走性のしくみを説明することで、単なる現象の面白さに留まらず、より知的な関心を引き出すことができると考える。

筆者(丸岡 1984)は電気走性の実験のため、スライドガラスにリード線をはんだ付けした白金線電極(0.3mm径、電極間距離は3cm)とアクリルの細い棒枠をエポキシ系接着剤で取り付けプール状にしたもの、およびスチロール樹脂の箱に3V電池、ON-OFFおよび電極リバーシ・スイッチを組み込んだ電源装置を作製した(図8)。この装置では、定性的実験は肉眼(黒い下敷きを敷くと見やすい)で、定性的及び定量的実験は光学顕微鏡下で観察が可能である。定量的実験では、直流電源装置(乾電池を6~8個でもよい)を用意し、電圧を変化させたときの遊泳速度とリバーシ・スイッチを切りかえたときの方向転換に要する時間がどのように変化するかを生徒に調べさせた(図9)。遊泳速度の測定では、スライドガラスの下にOHP用透明方眼紙を敷

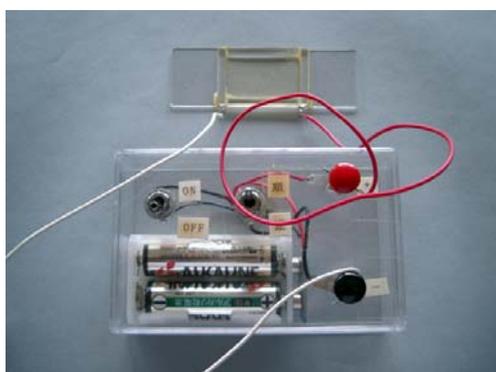


図8 自作した電気走性の実験装置

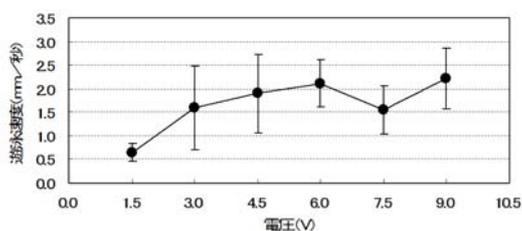


図 10 電圧と遊泳速度の関係 (生徒実験の例)

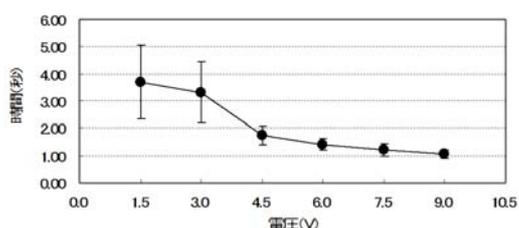


図 11 電圧と方向転換に要する時間の関係 (生徒実験の例)

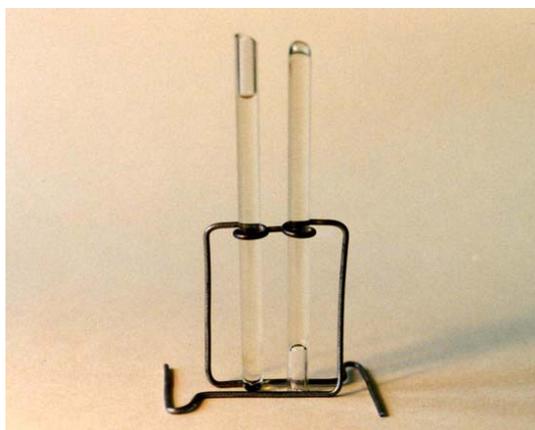


図 12 重力走性を調べるための器具 内径 4 mm のガラス管の一端を閉じて試験管様にし、正立したものと倒立したものを 2 本 1 組で利用することで、重力走性が酸素に対する化学走性かを考えさせる。スタンドは針金を曲げて作製した。

いて 2 mm を泳ぐのに要する時間を測定した。実験に際して厳密さを要求するならば、①組成のわかった塩類溶液を用いる、②長時間通電すると“慣れ”や電気分解の影響があるので通電時間を短くしたりゾウリムシを途中で取り替えるなどの配慮が必要である。

生徒実験の結果を図 10 及び 11 に示した。実験液として 0.01% クノッブ液 (0.24 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.14 mM KNO_3 , 0.06 mM MgSO_4 , 0.08 mM K_2HPO_4) を用い、室温 28°C で行った。遊泳速度および方向転換に要する時間の測定を、各電圧 7 個体ずつ実施するのに約 2 時間を要した。遊泳速度は、電圧を次第に高めていくとあるところまでは遊泳速度が増すが、さらに高くすると繊毛逆転領域が広がっていくので首を大きく振りながら前進し、結果としては遊泳速度が遅くなる。生徒の結果 (図 10) でそのことが明瞭でないのは、個体差やばらつきが多いのが原因であろう。したがって、データ数を多くするなどの工夫が必要であると同時に、速度測定だけでなく、各電圧での泳ぎの様態も詳しく観察し記録するなどすると、さらに考察が深まるものと思われる。それに対し、方向転換に要する時間は、電圧とともに短くなりばらつきも少ない結果になっている (図 11)。これは、回転トルクが電圧に比例して大きくなることを表していると考えられる。

他の電気走性実験の報告としては、ガラス管を利用した装置によるもの (石原・山上 1983)、スライドガラスを 2 枚はり合わせて水槽様の容器を作りスライド・プロジェクターで全員で観察する装置を工夫したもの (石野道男ほか 1972)、また、ミドリゾウリムシの緑色に注目し、白い紙を下に敷いて陰極に移動する様子や電極付近が緑色になることを肉眼で直接観察するもの (高野 1986) がある。

重力走性

ゾウリムシの走性実験が少ない中で、3 社の教科書が重力走性を取り上げ、探究的に考察させようとしているのは特徴的である。まず、「培養器ではどうして上層に集まるか?」の問題提起をし、①酸素仮説 (酸素に対する正の化学走性)、②浮力仮説 (比重が水よりも小さいことによる)、③重力走性仮説などを考察させる。①については、試験管に空気が入らないように液を満たしゴム栓をしても上方に集まること、②については、手回し遠心器で沈むことや NiCl_2 、エタノールで運動を停止させると下方に沈むことの検証実験から可能性を否定し、重力仮説は重力のない宇宙空間やスペースシャトルなら確認が可能であることが述べられている。また、ケーラーの実験 (鉄粉を食べさせ、磁石でひきつけると反対

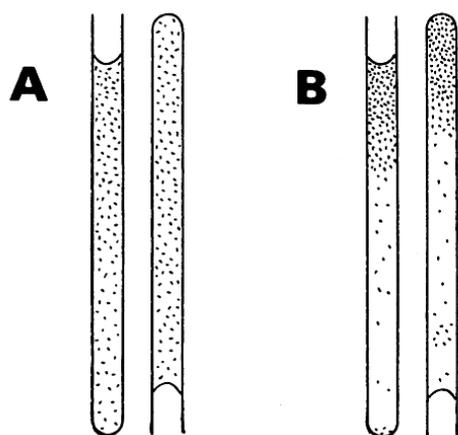


図 13 重力走性に及ぼす培養日数の影響 A : 培養 4 ヶ月のもの B : 培養 10 日目のもの (黒い点はゾウリムシの分布を示す)

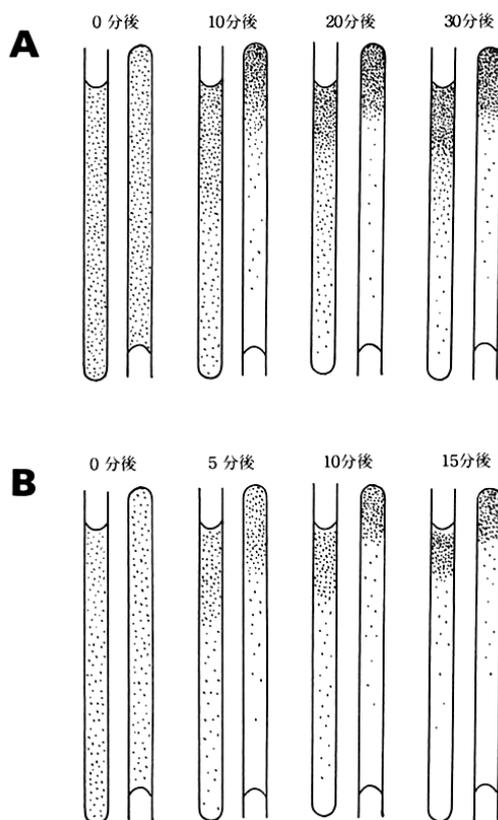


図 14 重力走性による時間的分布変化 細胞密度がやや高密度な方 (A) は分布状態が平衡に達するのに 20 ~ 30 分、やや低密度な方 (B) では 10 ~ 15 分を要した。

方向へ泳ぐ) を紹介したり、①でゴム栓をした際にゴムの成分に集まる可能性や光走性の関与などを検討させているものもある。

同様に生徒に仮説を立てさせる実験を、石野ら (1972) は次のように報告している。①比重仮説の検証：行動観察をすると、浮力によってスーとはまっすぐに浮いてくることはなく、再び下まで下がることもある。また、遠心分離機で沈むし、ゾウリムシの死体も水底に沈む。②空気 (酸素) 仮説の検証：U 字管、二又試験管などの使用で検証できる。③“上方にえさがあるため”の検証：餌を含まない塩類溶液を利用する。④水圧仮説の検証：U 字管、二又試験管を用いた実験から水圧の可能性は残る。

重力走性のしくみは、まだ十分には解明されていない。もちろん無重力では重力走性は見られず、その閾値は $0.3 G$ (G : 重力加速度) であることがわかっている。重力走性の要因の一つは、物理モデルで説明されている。すなわち、①比重-浮力モデルでは重心が細胞のやや後方にあることにより、②抵抗モデルでは細胞の形状において後方が太いために上向きトルクを生じるというものである。ニッケルイオンで麻酔して運動を止めたゾウリムシは、通常のゾウリムシよりも比重の小さい液体中では後端を下に沈降するが、パーコールという薬品で液体の比重をゾウリムシよりも少し大きくした液中では、ゾウリムシは前端を下にして浮上する。実際、生きたゾウリムシは高密度実験液では正の重力方向を示す。この現象は比重-浮力モデルでは説明できないので抵抗モデルを支持していることになる。重力走性のもう一つの要因は生理学モデルである。1 ~ 5 G の幅で重力を変化させてゾウリムシの遊泳速度を調べると、重力依存性で推進力を調節する性質 (gravikinesis) を持つことがわかった。実際の観察でも、上向きときは遊泳速度が速く、下向きときは遊泳速度が遅い。また、自発的方向変換頻度も下向きときのほうが高い。このことは上向きでは過分極、下向きでは脱分極していることを示唆している。ゾウリムシの前端と後端の距離がせいぜい $250 \mu m$ なので、この原因を静水圧差 (通常の機械刺激の 1 万分の 1 程度) による機械的刺激受容電位としては考えにくく、特殊な総合メカニズムを持っている可能性がある (最上ら 1995)。

筆者は生徒実験のために、定性的および定量的に重力走性を調べる用具を工夫した (丸岡 1990)。酸素に対する正の化学走性の可能性を検証するための方法としては、空気が入らぬように試験管をゴム栓で密閉する方法が教科書などに紹介されているが、実際に試してみると、ゾウリムシ培養液がたくさん要ることやゾウリムシが肉眼で観察しにくいこと、

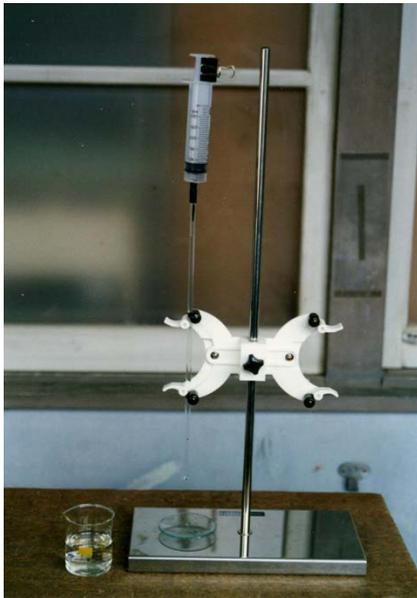


図 15 重力走性の定量的実験のための装置

また、空気を入れずにゴム栓をするのは結構難しいことなどの欠点があることがわかった。そこで、細いガラス管（内径 4 mm、長さ 10 cm）の一端を加熱して封じ、試験管様のものを作って 2 本 1 組で使用することとした（これより細いガラス管は正の接触走性のためか重力走性を示さなくなり、これより太くすると逆にしたとき液がこぼれだす）。ガラス管にゾウリムシ培養液を入れるときは、管が細いため液が入りにくい。そこで、ガラス管の底に届く程度に先端を長く引き伸ばしたマイクロピペットを用意すると便利である。

予備実験として、培養日数の影響を見るために、稲わら培養液で培養 4 ヶ月目のものと 10 日目のものでまず比較した。透明ピンを利用して培養をしている経験では、細胞は培養 10 日目では培養器上層に多く、培養 4 ヶ月目では底に沈んでいる。そのことから予想したように、培養 4 ヶ月目のゾウリムシはやはり重力走性を顕著に示さなかった（図 13）。両方のゾウリムシをニュートラルレッドで染色して調べたところ、培養 10 日目のものは細胞内に多く食胞を形成し細胞が丸みを帯びていたのに対し、4 ヶ月目のものは食胞も少なくやせていた。次に、重力走性を判別するにはどのくらい時間を要するか調べた。培養 10 日目のゾウリムシを用意し、細胞密度のことなる条件で比較した。その結果、細胞密度はあまり高くないほうが、肉眼で観察したときは短時間（10

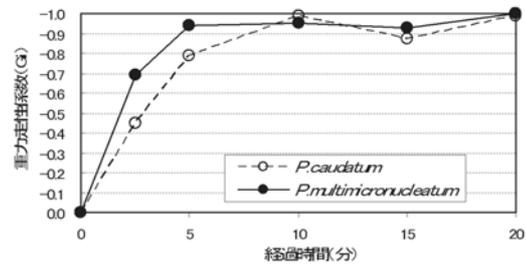


図 16 ゾウリムシ 2 種の重力走性

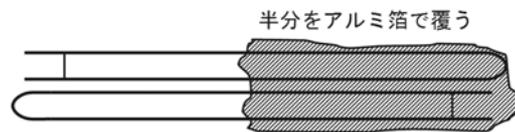


図 17 光走性の実験

～ 15 分) で負の重力走性を示すことをはっきりと認識できた（図 14）。したがって、重力走性実験では細胞密度が高すぎない方が良いことがわかった。なお、ガラス管内のゾウリムシは、暗室内（または黒い紙を背景）で横から懐中電灯で照らすと白い点に見えるので見やすい。

定量的実験は、次のように行った。まず、内径 4 mm、長さ 35 cm のガラス管を用意し、下端から 15 cm と 30 cm のところに目印の線を入れる。これをゴム管でディスプレイ注射器（30ml）と接続する。注射器のピストンを定位置で固定するためには、ダブルクリップを用いた（図 15）。実験操作は、①ガラス管の上線まで均一な密度（10 ～ 20 細胞/ml）の細胞懸濁液を小型ビーカーから吸い込んでピストンを固定し、このまま定温で放置する、②あらかじめ計画された一定時間が経過したところで、ピストンを下げて下半分の懸濁液を小型ペトリ皿に落とし、実体顕微鏡下で一匹ずつ数を数えながら、マイクロピペットで吸い取る、③その後、残りの上半分を別のペトリ皿に取り、同じようにその中のゾウリムシ数を数える、というものである。

上下の数が分かったところで、次式に代入して重力走性係数 (G_i) を求める（重中 1988）。

$$G_i = \frac{N_l - (N_l + N_u)/2}{(N_l + N_u)/2} = \frac{N_l - N_u}{N_l + N_u}$$

NI : 下半分にいるゾウリムシ数
Nu : 上半分にいるゾウリムシ数

この係数は、ゾウリムシすべてが負の重力走性を示して上半分に集まったときに $Gi = -1$ となり、反対にすべてが正の重力走性を示したときには $Gi = +1$ となるので、重力走性の程度が符号と数値で分かる点ですぐれる。また、この式はすべての走性を測る尺度としても利用できる。

生徒実験では、簡便化のため、実験液として稲わら培養液 (5g/ℓ) をそのまま用いた。重力走性は実験液の組成の影響を強く受ける (楠元・内藤 1981) ので、厳密さを求めるときは組成の分かった塩類溶液を用いる。試料としては、*Paramecium caudatum* および *P. multimicronucleatum* の 2 種、いずれも 25°C で培養 3 日目のも (両者とも培養器の中では顕著な負の重力走性が見られた) を用いた。ゾウリムシ数をカウントするためにはマイクロピペットの扱いに慣れる必要があるが、これも少しの練習でできるようになった。実験中の室温は 21 ~ 22°C で、2 種のゾウリムシについて、2.5 分、5 分、その後 5 分毎に 20 分経過までを 2 回ずつ測定し、 Gi の平均を求めた。その結果 (図 16) からは、2 種ともほとんど違いがないか、見方によってはやや *P. multimicronucleatum* の方が短時間で顕著な走性を示しているようにも思えた。このことをはっきりさせるには、さらに測定回数を増やしたり、条件を変えたりするなどの必要があるだろう。

光走性・温度走性

ゾウリムシの光走性や温度走性の実験を、生徒実験として取り上げた例は少ない。

光走性は、内径 4 mm のガラス管にゾウリムシを入れ、半分をアルミ箔で覆い、明るい場所において置くと、暗い方に集まることで確認できる。前述の重力走性で用いた試験管様ガラス管を用いてこれを試みたところ、容易に明確な結果が得られた (図 17)。すなわち、室温 20°C で 5000 ルクス程度の照度 (20W 蛍光灯 3 本点灯) の下、30 分置いておくと、開口部が明暗どちら側にあっても圧倒的に暗所に集まった (24 個体のうち明所側は 1 個体)。これは、暗い所から明るい所に向かうときには回避反応が起こるが、その逆では回避反応が起こらないためである。ミドリゾウリムシでは、これと全く反対に、明るい所から暗い所に向かうときに回避反応が起こるので明るい方に集まり、共生しているクロレラを除去すると反対の光走性を示すようになるようである (楠元・内藤 1981)。

温度走性実験は、“コ”の字に曲げた銅板 (厚さ

1 mm、幅 30 mm) を用意し、沸騰水の入ったビーカーと氷水の入ったビーカーの間を橋渡しして、一定の温度勾配を作り出す方法で行う。銅板の上に、縁を融点の高いパラフィンで 2 ~ 3 mm の高さの土手を作ったスライドガラスを用意し、これにゾウリムシ培養液を深さ 1 mm に入れたものを載せて 10 ~ 20 分放置すると、結果として培養温度の所に多く集まる。これは、培養温度では自発性方向変換頻度が低く、それより低温や高温中ではその頻度が高まるのが原因と考えられている。温度走性はかなり不安定で、条件によりうまく行かないこともあるらしい (楠元・内藤 1981)。

(4) トリトンモデル

界面活性剤の 1 種であるトリトン X-100 でゾウリムシを処理すると、繊毛の運動装置の機能を損ねることなく細胞膜の半透性を失った細胞を得ることができる (Naitoh and Kaneko, 1973, 樋渡・若原 1982)。これをトリトンモデルまたは除膜モデルと呼んでいる。したがって、外液の組成がモデル内の組成と同一であるので、遊泳の前進と後退は細胞内 Ca^{2+} イオン濃度で制御されていること、エネルギー源は ATP であること、モデルでも Ni^{2+} イオンにより繊毛運動が阻害されることなどを確かめることができる。

この実験は、主として理系生徒が履修する「生物 II」の教科書において、ただ 1 社が取り上げている (この教科書では、化学未履修の文系生徒を意識して試薬の濃度をすべて % 表示にしているが、これは感心できない)。筆者はかなり前からこの実験を試みたいと思っていたが、①試薬が特殊で高価であること、②多量の氷の入手が容易でないこと、③実験が長時間に及ぶこと、④少量の液で実験をするためにはマイクロピペットやピペットチップを揃える必要があることなど、高等学校では実施しにくい問題点があり、その機会を逸していた。昨年、神戸大学の洲崎敏伸先生のご好意により、研究室を訪問して実験をさせて戴くことができたので、その感想などを中心に述べさせてもらうことにする。

Naitoh and Kaneko (1973) におけるトリトンモデル細胞を得るための方法は次のとおりである (樋渡・若原 1982)。① 2 mM $CaCl_2$ を含む 1mM トリシュー HCl (pH 7.2) 緩衝液で洗う。②細胞懸濁液を氷で冷やして軽く遠心し、沈殿した細胞を 0 ~ 1°C に冷やした抽出液に懸濁する (抽出液: 0.01% トリトン X-100, 20 mM KCl, 10 mM EDTA 三カリウム塩、NaOH で pH 7.0 にあわせて 10 mM トリシューマリン酸緩衝液を含む)。③抽出液で 30 分処理後、50 mM KCl と 10 mM トリシューマリン酸緩衝液 (pH 7.0) で

洗い、トリトンと EDTA を洗い流す。実験に用いるまでに、少なくとも 30 分間この溶液に浸しておく。

④トリトンモデル細胞 100 ~ 500 を含む KCl 溶液 0.1 ml を約 1 ml のテスト溶液 (50 mM KCl とその影響をテストしたい物質を含む) に移す。つぎに ATP と Mg^{2+} を含む溶液にモデル細胞を移すとモデル細胞は動き出す。4 mM ATP、4 mM $MgCl_2$ 、3 mM EGTA、50 mM KCl、そして 10 mM トリスマレイン酸を含む溶液中でモデルは最も活発に動く。この溶液に 10^{-7} M 以下の Ca^{2+} しか含まれない場合モデル細胞は前進し、 10^{-6} M 以上の Ca^{2+} を含む場合は後退する。

上記試薬と、今回筆者が知り得た、神戸大・洲崎研究室と富山大・野口研究室の試薬等を比較してみると少し違いがある。たとえば、神戸大では、緩衝液に Pipes や Hepes (pH 6.9) を利用、抽出液は EGTA を用い、トリトン X-100 も 0.02% として処理時間を短縮、洗浄液は KCl ではなく $MgSO_4$ を含み、再活性化液の ATP や $MgSO_4$ の濃度は 10 mM 程度と高い。また、富山大・野口研では、pH 7.0 に調整し、再活性化液では KCl ではなく酢酸カリウム、そして 0.1 mM cAMP を加えたものを調整している。

神戸大での実験を実施しての感想の第一は、この実験はコツを知らないといふと意外と難しいということである。前述の研究室による違いは、おそらくは実験の成功実績からくる経験的なことも少なくないことを物語っているように思える。さて、実験プロトコルの詳細は別の実験書などを参考にさせていただきとして、気のついたコツをまとめてみると、①実験で準備する細胞懸濁液はかなり密度の高いものを用意すること、②抽出液で処理する前の細胞懸濁液は氷の中で 10 分以上よく冷やしておくこと、③トリトンでの除膜処理は、顕微鏡で見てまだ少数が泳いでいるくらいマイルドに処理をすることである。モデル細胞はほとんどカルシウムを含まない条件下で ATP と Mg^{2+} の存在下で再活性化されるが、生きた細胞ほどは速く泳がない。しかし、生きたものと同様に前進し、後退することを目の当たりにし、その活性化条件を理解することは、高校生にとっても大きな興味づけとなるに違いない。今後、高大連携や文部科学省の SPP 事業の動きの中で、高校生対象の実験として、大学の研究室に実施をお願いしたいものの 1 つである。

分裂と接合の観察

ゾウリムシの生殖法には、二分分裂による無性生殖と接合など遺伝子の新しい組換えを伴う有性生殖が知られている。

(1) 分裂

分裂中の個体は、盛んに増殖している培養器から容易に見つけ出すことができる。分裂個体は負の重力走性を示さないで、軽く遠心して底に沈んだものを集めると効率がよいという報告もある (桧垣 1968) が、ピペッティングで集めるのが普通である。分裂期に入った細胞はやや丸みを帯びるので、観察になれると分裂初期から見分けることも可能である。増殖のよい培養液としては、レタスジュース培養液 (後述) にバクテリア (*Enterobacter aerogenes*) を前日に接種したものを用いるとよい。懸滴法 (丸岡 2003) やホールスライドで観察すると、細胞中央がくびれ始めて細胞質が二分されるまでを 15 ~ 20 分ほどで見ることができる。分裂期に入った細胞の核を酢酸オルセイン染色やフォイルゲン染色によって染めると、小核はすでに 2 つに分かれて前後に移動し、大核は餅を引きちぎるように 2 つに分裂していくようすを観察することができる (石原・山上 1983)。

(2) 接合

ゾウリムシは、二分分裂だけを繰り返した場合、クローンとして老化し、数百回の分裂の後ついには死滅する。接合などの有性生殖は、このエイジングをリセットするので、いわゆる“若返り”現象として知られている。ところで、微小重力環境下ではゾウリムシの分裂速度は速くなることが知られているので、同様のクローン寿命をもつと考えられているヒトの場合も、微小重力環境下では寿命が短くなるのだろうか?! 宇宙ステーション時代を迎える現在において興味深い問題である (最上 2003)。

さて、少し前の生物教科書なら必ずといえるほど一般的に紹介されていたゾウリムシの接合は、今は全く記載がない (ただし、「生物 II」教科書で 1 社だけが接合実験を載せている)。この理由は、ゾウリムシの接合過程が二核性のために特殊で複雑に見えるためらしいが、これを学習し興味をもった世代の人間としては少しさびしい。それにとって代わったのはクラミドモナスの接合で、これはほとんどの教科書に記載されている。

接合やその実験方法については多くの優れた総説や報告があり、それらについては参考文献として末尾に紹介した。ここでは、「変異株を用いた接合実験」(見上 1987) を追試した経験をもとに接合実験について報告したい。

高校の生物教員であれば、接合型の発見者、ソネボーンは知らなくても、接合型とは何かくらいは知っている。しかし、それ以外の接合条件を知らないうちに、接合の観察は単に異なる接合型を混ぜれ

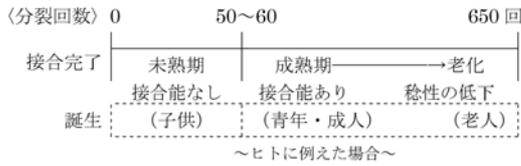


図18 分裂回数と接合能力の関係

ば簡単にできると思っている方々も多いのではない。正直なところ、今から15年ほど前にはじめて接合型の異なる株を山口大学の藤島政博先生より分けていただき、接合実験に挑戦しようとしたとき、筆者はそのように思っていた。先生からの親切なアドバイスにもかかわらず、株の維持や接合実験に失敗したのは、接合条件を十分に理解していなかったためだ。「意外と難しいものだ」とそのとき感じた。その後、宮城教育大学の見上一幸先生から再び *Paramecium caudatum* の接合型の異なる野生株と接合実験に有用な変異株を譲り受けることができ、失敗を繰り返しながらも何とか計画的に実験を組めるまでになったいきさつがある。

接合実験を経験して思ったのは、この実験の成否は培養にあるということである。なぜそうなのか、まずは、接合がおこる条件を整理しておきたい。

接合の起こる条件

接合を誘導するためには、①互いに相補的な接合型の2株であること、②それぞれの株が性的に成熟期にあること、③数日間さかんに分裂・増殖をした後、飢餓状態にあることの3つの条件をすべて満たす必要がある。

①については、*P. caudatum* では16のシンジェン(同質遺伝子個体群)が知られており、そのうち研究者の間で保存されているのはシンジェン1、3、12、13のみである。それぞれのシンジェン内の相補的な接合型はOとEの2つで、たとえばシンジェン1の場合はO1、E1、シンジェン3の場合はO3、E3のように示され、O1-E1は接合するが、O1-E3は接合しない。②については、図18のように、接合後50回以上分裂しないと成熟しないので、いわばヒトの青年期や成人期にあたるゾウリムシを用意する必要があるということである。また、③については、接合能力の発現は培養液中の餌の有無と密接な関係があり、餌を摂り分け分裂でどんどん増殖している状態(対数期または対数増殖期という)では接合能力がなく、餌を食べ尽くし分裂をしなくなった状態(定常期という)になって初めて接合能力を発揮するのである。バクテリアを食べつくして定常期に入る

と、培養液が白濁している状態から透明になるので容易に判別できるが、接合可能な期間は透明になって2~3日の間である。

株の入手と培養

野外から接合する株を採取し分離することは可能であるが、単離操作や無菌化など難しい作業もある。また、通年にわたる株の維持も、年に1度や2度の実験のためだけとなると大変な手間である。したがって、実験をしようとする少し前から余裕のある計画を立て、大学等の研究機関から株を少し分けてもらい、培養してから実験にかかるのが現実的である。株を分譲してもらえる情報は、ウェブサイト「原生物情報サーバ」や「見上研究室」から得ることができる。

培養

研究機関などから入手した株は、たいてい、ただ1種のバクテリアを餌として与え、それ以外の雑菌が混入しないようにして維持されていたものである。外からの雑菌のために培養及び実験を失敗することがあるので、培養操作はクリーンベンチや無菌箱、あるいは空気の落ち着いた室内で素早く行う必要がある。

学校でよく用いられる稲わら培養液は、研究者の間では生理実験でよく利用するが、遺伝実験ではレタスジュース培養液が一般的である。

レタスジュース培養液の作り方については、研究用の方法もあるが(樋渡・茗原 1982、山田・山極 1980、見上・小泉 1977)、ここでは簡便な方法を紹介する(見上 1987)。まず、家庭用のジューサーでレタスジュースを作り(ミキサーの場合は8枚重ねのガーゼでろ過)、小型容器に小分けしてフリーザーに入れ凍結して保存する。使用の際にイオン交換水(軟水の市販ミネラルウォーターや煮沸した水道水でもよい)で20~40倍に希釈し、オートクレーブ滅菌器で滅菌(121℃、20~30分)し、冷却後、白金耳でバクテリアを少量加えて1日置いてから使用する。オートクレーブ滅菌器がない場合は、家庭用圧力釜を利用するか、水浴で煮沸滅菌する。バクテリアを接種した培養液は1~2日以内に使用する。なお、バクテリアは株と同時に分譲してもらおうと都合だが、バクテリアを接種しなくても、送られてきた試料のなかに混在するバクテリアが増殖するので、実験は可能である(増殖率や接合能はやや劣る)。猪狩(1992)は、これに代わる簡便な培養液として、流動のカロリーメイト缶(大塚製薬)による培養液(カロリーメイトを“六甲のおいしい水”で0.1%に希釈—これは水500mlにカロリーメ

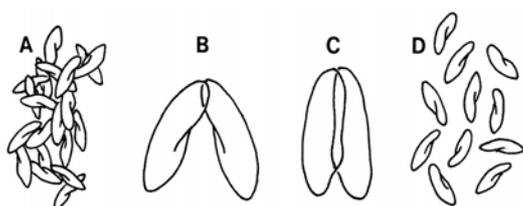


図19 接合型の異なる2株を混ぜてからの接合過程の時間的変化(25℃) A: 2~3分後 B: 45分後 C: 1時間後 D: 約15時間後

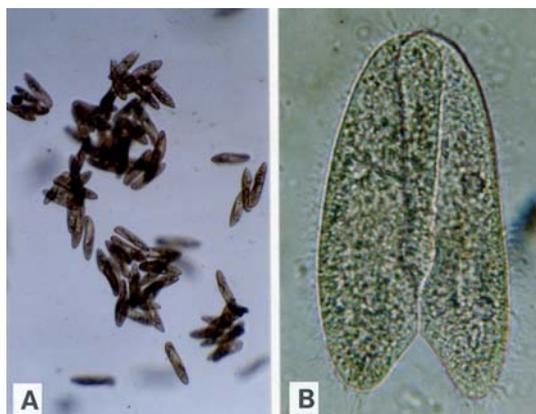


図20 接合過程 A: 細胞凝集反応(5分後) B: 接合対(5時間後)

イトを数滴添加する割合)を工夫し、接合能のある増殖率の高い細胞を得ている。カロリーメイト缶はいくつかの種類があるがどれでもよく、最近では大型薬店などの健康食品コーナーで入手できる。

培養が順調なときは、1日に3回の割合で分裂が起こる。3~4日後にはバクテリアで白濁した培養液がゾウリムシによる摂食で透明になり、数千細胞/mlの高密度のゾウリムシが得られる。このときから2~3日間は接合実験が可能である。培養液がいつまでも透明にならず、ゾウリムシの増殖も悪いときは餌として不適なバクテリアが混入しているので始めから培養をやり直す。

一定の期間、株を維持したいときは低温(10℃)で保存し1ヶ月ごとに培養液を足すか、常温の場合は1~2週間ごとに新しい培養液に植え継ぐ。

接合実験と変異株を使った例

前述のように、実験材料は4~5日前に培養を始めると、ちょうど実験日には接合能のある材料が得られることになる。準備した接合型の異なる2株を

混ぜると直ちに細胞凝集反応が起こり、25℃では40分を過ぎる頃から接合対が徐々に現れ始める(図19, 20)。1時間の授業ではそこまでしか見られないので、実験の2~3時間前にあらかじめ2株を混合したものを用意しておくことで接合対も同時に観察できる。午後の実験では、午前中から準備ができるので好都合であるが、朝の早い時間帯での生徒実験でも、前日の帰り際に混ぜておくともよい。

ところで、接合対は接合型の異なる個体間でのみ形成されるのだろうか。この疑問に対する答えは株を識別することで得られる。たとえば、一方をナイルブルー、他方をニュートラルレッドで生体染色するアイデアもあるが、識別するのに有効な突然変異株を利用する方法もある。見上(1987)は、接合型の異なる“野生株”と“トリコシストを放出しない突然変異株(27aG3株)”を利用し、これについての教材化を試みた。トリコシストは、ゾウリムシをピクリン酸飽和溶液(5%メチレンブルーや1%タンニン酸でもよい)にさらすと体表面から放出される長い糸状の構造で、低倍率でも容易に確認できる。実際に多くの接合対をピクリン酸で処理してみると、実験結果はたいへん明瞭であった(図21, 22)。すなわち、多数の野生型と突然変異株の対に混じって、少数ながら野生株同士の対、突然変異株同士の対が見つかった。生徒実験では、クラスの観察結果を集計し、それぞれの対が何%形成されたかを求めるとよい。

核の観察

核を観察するにはフォイルゲン染色が適している。この染色法はDNAとの特異性も高く、DNA量を測定することもできる。また、フォイルゲン染色した標本を、ファーストグリーンで二重染色すると美しい永久標本作製することができる(見上・小泉1977、山田・山極1980、石原・山上1983、高木ほか1986、ウェブサイト「見上研究室」)。

しかし、生徒実験では標本作製の十分な時間を確保することが難しいので、酢酸オルセイン溶液や酢酸カーミン溶液による一時染色が適している。この方法では小核や大核原基の染色がうまくいかないので、大核の変化を見ることになる。特に接合後十数時間後に見られる大核崩壊は興味深く観察できる(図23)。

成長曲線の作成

高校生物Ⅱの単元「生物の集団(生態系)」には「個体群とその変動」を扱った項目があり、その中で“成長曲線”は重要な学習テーマになっている。調べた7社の教科書のうち、成長曲線の説明のために

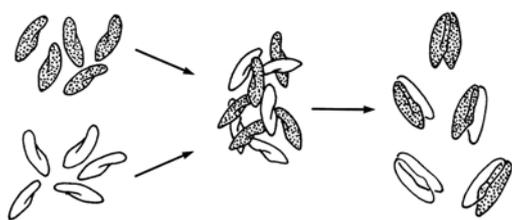


図21 細胞凝集反応と接合対の形成 黒：O 白：E



図22 野生株とトリコシストを放出しない突然変異株を混ぜたときの接合対形成 ほとんどは野生株と突然変異株の対 (B) であるが、数%の少ない割合で野生株同士 (A)、突然変異株同士 (C) の対も形成される。



図23 酢酸カーミンによる核の一時染色 A：接合前 B：接合対 C：接合対から離れた細胞（大核崩壊）

例示された生物は、ショウジョウバエ 4 社、バクテリア 2 社、アズキゾウムシ 1 社であった。また、関連内容として、ゾウリムシ、ヒメゾウリムシ、ミドリゾウリムシの単独培養および混合培養の成長曲線から種間競争や共存について言及したもの（ガウゼの実験の引用）が 6 社、ケイソウについてのそれは 1 社であった。

生徒実験「成長曲線を作る」は 6 社で取り上げられ、生物別では、ウキクサ 4 社、キイロショウジョウバエ 1 社、コウボ菌 1 社、ゾウリムシ 1 社となっている。ウキクサの例示が多いのは、大きくて動か

ないので数の計測がしやすく、さらに発展的に密度や水質の違いによる増殖の比較もできるからであろう。これに対し、キイロショウジョウバエは世代時間が長く、数えるためには麻酔をしなければならないこと、また、ゾウリムシや酵母菌は顕微鏡サイズなので個体数計測が生徒には容易でないことが採用の少ない理由として推察できる。

教科書の実験「ゾウリムシの成長曲線」の内容は、① 1ℓの稲わら培養液に 10 mlのゾウリムシを含む培養液を加え、定温で培養する、②毎日決まった時刻に培養液をよく攪拌して密度を均一にしてから計測数が 10 ~ 50 個体になる程度の一定量の培養液 (0.1 ~ 10 ml) を吸い取り、ニッケルイオンで動きを停止させてから個体数を数える、③培養液 10 ml に含まれる個体数に換算してからその経日変化をグラフに表す、というものである。

篠原 (1967) の方法もこれとほぼ同様である。まず、いろいろな種類の培養液を用意し、300 mlビーカーや腰高シャーレなどの容器に培養液 200 mlを入れ、200 個体を移植して実験を開始する (1 個体/1 mlからスタートしたことになる)。つぎに、容器内で不均一に分布しているゾウリムシをまずは十分に攪拌して均一にし、毎日一定時刻に 1 回の測定に 0.05 mlずつをピペットで吸い上げてスライドガラス上に広げ、ごく少量のホルマリン原液をマイクロピペットで加えて動きを止め、低倍率で全個体数を数え、20 倍して 1 ml中の個体数とする。

ところで、ゾウリムシの場合、①生徒の多くは動く生物に高い関心を示すこと、②継続実験での培養器の管理空間が少しですむことなどの利点もあるので、個体数を数え易くする工夫ができれば最適の実験材料になりうると考えられる。

そこで、筆者は、自分が大学時代に実習した方法、すなわち、一端を封じた内径 2 mm 長さ 10 cm の細いガラス管の中でゾウリムシを飼育し、毎日実体顕微鏡下やルーペ (生徒は肉眼でも見る) で個体数を直に数える方法を利用している。

この実験では、生徒にガラス管の一端を封じる作業やマイクロピペットの作製もさせる。ほとんどの者は、ガラス細工は初めての体験なので大変興味をもって熱心に作業をする。熱いガラスに触れて手をやけどしないこと、机の上を焦がさないこと、ガラスの破片に気をつけることなどの注意のもと、ガラス管を溶かしたり伸ばしたり自由にさせる。もちろん、作業の手本はみせるが、なかなかうまくはいかない。でも、まずは体験することに意味があると考えている。軟質のガラスを使えば、ガスバーナーは細工用の特別なものでなく、ふつうの実験用ガスバーナーで十分である。

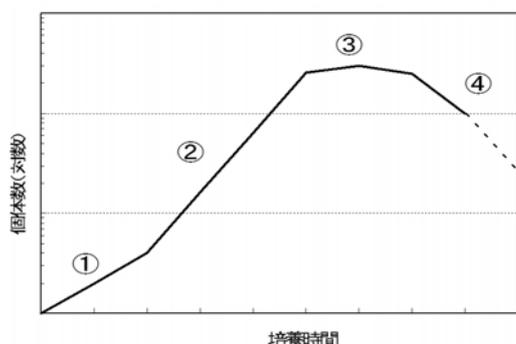


図24 成長曲線の模式図 ①誘導期 ②対数期 ③定常期 ④死滅期



図26 成長曲線作成のための用具 一端を封じたガラス管、先端の長いマイクロピペット、ガラス管の整理と区別のために利用したダンボール片

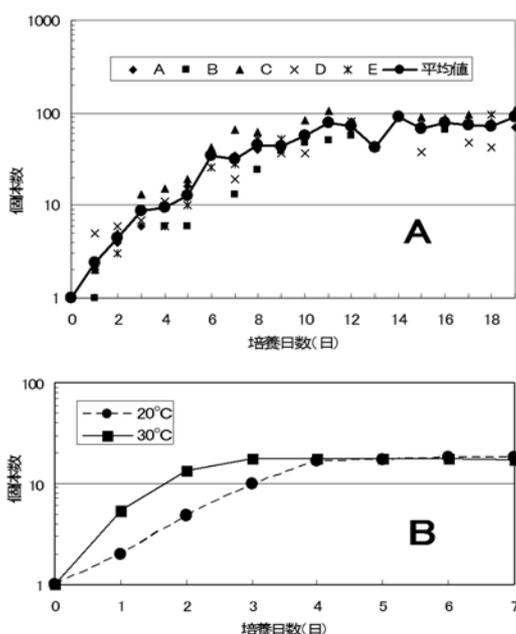


図25 実験例 A: 生徒A~Eのデータと平均値 (10月実施) B: 温度による違い

1時間のガラス細工のあと、いよいよガラス管に培養液とゾウリムシを入れる。先の長いマイクロピペットを用意して“バクテリアの繁殖した培養液”を吸引した後、一端を封じたガラス管の奥底までその先端を挿入し、気泡が入らないように注意しながらガラス管の口際まで培養液を静かに注入する。そこに、ゾウリムシを1個移植する。

1個だけを入れるのは苦勞するが、これも工夫

させると面白い。たとえば、実体顕微鏡下で普通にマイクロピペットを用い1個体を吸い取り移植する(意外とこれは難しい)、ゾウリムシをスライドガラスに滴下し1個体だけを含む一滴を見つけてこれを移植する、ガラス管に満たす培養液にあらかじめ低密度でゾウリムシを加えておくなどが考えられる。

生徒には、最低1本のガラス管を自分のものとして持たせ、毎日ほぼ同じ時刻に個体数を数えて記録することを課す。“自分の”ゾウリムシを持たせるのである。生徒は、最初1個体だった、いわばマイ・ゾウリムシの成長を他の友人のゾウリムシのそれと比べ、一喜一憂して見守る。実験はせいぜい2週間ほどで終わるが、生徒の中にはその後も何ヶ月にもわたり大事に維持する者もいる。こうした経験に重きをおくため、実験条件が不ぞろいになる点はある程度犠牲にしている。まとめとして、各自のデーターを持ち寄り、各グループで日ごとの平均値を求め、片対数グラフ成長曲線を描かせる。一般に、成長曲線は、誘導期、対数期、定常期、死滅期からなっている(図24)が、この実験では誘導期は無いようである(図25)。また、世代時間はグラフの対数期から読み取らせることができる。発展的には、培養温度や培養液の種類などを変えて、世代時間や最大個体数(すなわち密度)などを比較すると面白いだろう。

実は、1本のガラス管の中で何個体まで増殖するかは、ほとんど注入する培養液中のバクテリアの密度に依存している。また、ガラス管中の個体数は50個体程度まではかなり正確にカウントができるが、それ以上になると難しい(稲わら培養液を用いた生徒実験では、最大100個体程度まで増殖する)。した

がって、培養液の準備は重要なポイントになる。室温にもよるが、稲わら培養液の場合、稲わらの煮出し液 (5 ~ 10 g/l) を冷ましたら、ろ過した古い培養液か、納豆の糸を少量添加して3日ほど置く。すると、培養液が餌のバクテリアで白濁してくるからこれを用いるとよい。一度は予備実験をしておきたい。

なお、正確な実験データを得るには、1つの条件における測定は定温下、最低5本のガラス管で行い、その平均値を求めるのがよい。そのときの工夫の一つとして、ダンボール片をうまく利用してガラス管の区別をすると便利である(図26)。また、同様の実験方法は藤野(1986)も報告をしているので参考にされたい。

おわりに——新しい手法・アプローチの導入

新課程の高校生物教科書には、表計算ソフトを使って、実験データをパソコン処理したりグラフ化する例が多く見られるようになった。現在は、教科「情報」が必修となっているので、ハード面での学校間格差はあるが、積極的に活用する方向に進むであろう。デジタルカメラは接眼レンズに当てるだけで顕微鏡写真撮影が可能であるし、実験方法や結果について記録しておくにも最適である。CCDカメラでの顕微鏡映像の利用は、顕微鏡下では気づかなかつたことを見せてくれる場合もあるし、画面上の距離測定とストップウォッチとの組み合わせやコマ送りを利用するとデータ解析にも威力を発揮できる。ここに紹介したゾウリムシの実験の中にも、それらを活用することで新たな発展が生まれるものがあるように思う。また、これらの手法は、高校生にプレゼンテーションをさせる上でも有効に機能するであろう。

さらに、これからは突然変異株などの利用も可能性を広げるだろう。接合実験でトリコシストを放出しない株を紹介したが、繊毛逆転をしないCNR株で重力走性の影響を調べても面白い。ミドリゾウリムシの教材化はまだあまり進んでいないが、クロレラとの共生関係、行動との関係、サーカディアンリズムなど、野生株と白色個体を比較して考えるのも興味深い。

今後とも、多くの方々の、ゾウリムシをめぐる新しい教材化への取り組みを期待したい。

謝辞

ゾウリムシから原生動物の教材化を試みて、30年近くが過ぎようとしている。今回も、今までの足跡をたどりながらの執筆であったが、振り返ってみ

ると多くの先生方のお世話になってきた。繊毛運動や行動については、高知大学の種田耕二先生、お茶の水大学の最上善広先生、神戸大学の洲崎敏伸先生、富山大学の野口宗憲先生に多くの文献を送っていただいたり、実験のアドバイスをいただいたりした。また、接合については山口大学の藤島政博先生、宮城教育大学の見上一幸先生に文献や株の提供をしていただき、貴重な助言もいただいた。各先生方のご厚意に心より感謝するとともに、こうした出会いにも感謝する次第である。

参考文献等

【参考にした教科書】

平成15～17年度文部科学省検定教科書「生物I」および「生物II」

【実験の指導書・報告】

- Naitoh, Y. and Kaneko, H. (1973) Control of ciliary activities by adenosinetriphosphate and divalent cations in Triton-extracted models of *Paramecium caudatum*. *J. Exp. Biol.*, 58, 657-676
- 石田寿老・佐藤重平 編 (1958) 生物の実験法。288-290, 裳華房
- 石野道男ほか (1972) ゾウリムシの行動観察。科学の実験, Vol.23, No.3, 232-236, 共立出版
- 石原勝敏・山上健次郎 監修 (1983) 図説 教材生物上・下。科学と実験別冊, 共立出版
- 小幡悦子・桧垣守宏 (1979) ゾウリムシとpHの測定—培養・遊泳速度・走化性—。科学の実験, Vol.30, No.12, 共立出版
- 楠元 守・内藤 豊 (1981) ゾウリムシの走性。遺伝, 35, 12, 3-12
- 小泉貞明 (1975) ゾウリムシ。特集/教材生物の確保, 遺伝, 29, 3, 2-6
- 小林徳夫ほか (1975) ゾウリムシの培養。教材生物, 216-217
- 篠原尚文 (1967) 生物デモ実験の新しい進め方II。科学の実験, Vol.18, No.11, 共立出版
- 篠原尚文 (1975) 先生と生徒のための新しい生物実験。別冊 科学の実験, 共立出版
- 重中義信 監修 (1988) 原生動物の観察と実験法。共立出版
- 高野忠夫 (1986) ミドリゾウリムシの教材化。身近な自然を生かした生物教材の研究, 74-75, 東洋館出版
- 野沢義則 編 (1981) 原生動物細胞。講談社
- 桧垣守宏 (1968) ゾウリムシの実験。科学の実験, Vol.19, No.4, 392-395, 共立出版

- 樋渡宏一・若原宏爾 (1982) 7. 原生動物。実験生物学講座 1, 159-179, 丸善
- 藤野適宏 (1986) ゴウリムシの個体数推移の観察。身近な自然を生かした生物教材の研究, 84-85, 東洋館出版
- 丸岡 禎 (1980) ゴウリムシの教材化。香川高教研理化・生地部会会誌, 16, 30-50
- 丸岡 禎 (1984) ゴウリムシの走電性実験とその定量化の試み。理化香川高教研・生地部会会誌, 20, 33-42
- 丸岡 禎 (1990) ゴウリムシの走地性。理化香川高教研・生地部会会誌, 26, 75-81
- 丸岡 禎 (1992) ゴウリムシの接合実験。理化香川高教研・生地部会会誌, 28, 47-54
- 丸岡 禎 (2003) 教材としての原生動物 (1)。Jpn.J.Protozool.Vol.36, No.2, 113-122
- 丸岡 禎 (2004) 教材としての原生動物 (2) — ゴウリムシ I。Jpn.J.Protozool.Vol.37, No.1, 19-30
- 見上一幸 (1987) 有性生殖を考えるための教材— ゴウリムシの変異株を用いた接合実験。宮城教育大学理科学教育施設年報, 23, 15-20
- 見上一幸・小泉貞明 (1977) ゴウリムシの研究— その基礎と応用。採集と飼育, 39, 331-346
- 柳生亮三 (1955) ゴウリムシ。生物学実験法講座, 5 巻上, 1-30, 中山書店
- 山田卓三・山極 隆 編 (1980) 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
- 高木由臣ほか (1986) 特集 I・ゴウリムシの接合。遺伝, 40, 4, 裳華房
- 内藤 豊 (1990) 単細胞動物の行動。UP バイオロジー 85, 東京大学出版会
- ハウスマン (1989) 原生動物学入門。扇元敬司訳, 弘学出版
- 樋渡宏一 (1982) ゴウリムシの性と遺伝。UP バイオロジー 49, 東京大学出版会
- 樋渡宏一 (1986) 性の源をさぐる。岩波新書, 岩波書店
- 樋渡宏一 編 (1999) ゴウリムシの遺伝学, 東北大学出版会
- 最上善広 (2003) 宇宙生物学— これまで、そしてこれから。生物工学会誌, 81, 6, 213-227
- 最上善広ほか (1995) ゴウリムシは重力を感じているのか— ゴウリムシの重力走性のメカニズム。宇宙生物科学, Vol.9, No.1, 17-35

【参考にしたウェブサイト】

- 原生生物情報サーバ
http://protist.i.hosei.ac.jp/Protist_menu.html
- 見上研究室 水中微小生物図鑑「Microbio-World」
<http://mikamilab.miyakyo-u.ac.jp/index.html>
- 大阪大学理学部生物学科生物学実験シラバス
<http://www.sci.osaka-u.ac.jp/students/syllabus2004/university/u234.html>
- 小倉明彦のホームページ「学務関連アナウンス」
<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~oguraa/announce.htm>
- 富山大学野口宗憲研究室ホームページ
<http://www.sci.toyama-u.ac.jp/env/noguchi/noguchiJP.html>

【総説】

- 神谷 律・丸山工作 (1992) 細胞の運動。培風館
- 高木由臣 (1993) 生物の寿命と細胞の寿命— ゴウリムシの視点から。平凡社