

## ゾウリムシの維持とこれを使った生物学実習

小野勝彦、後藤仁志、野村真

京都府立医科大学大学院神経発生生物学・医学科生物学教室

### はじめに

生物学教室では、医学科1年生に対する生物学実習の一つとしてゾウリムシの観察を行っている。平成28年度の実習の直前に、維持していたゾウリムシが絶えていたという失敗をしたので、その反省も含めて、ゾウリムシの維持についてまとめておこうと思う。

ゾウリムシは、繊毛虫門、貧膜口綱、ゾウリムシ目、ゾウリムシ科、ゾウリムシ属に分類される原生生物、つまり単細胞生物である。英語名は、**slipper animalcule** で「スリッパ状の微小動物」という意味である。ゾウリムシという和名はこの **slipper** を草履（ぞうり）と訳したことに由来する。門名にあるとおり、細胞表面に線毛（「繊毛」と記載しない理由は後述）がびっしりと生えており、顕微鏡下でその動きを観察することができる。線毛は、カエルでは口腔粘膜に見られるが、われわれの人体では、気道や卵管の上皮にのみ見られるもので、動いている線毛を観察できる機会は少ない。ウリムシを使った実習の目的は、まさに動いている線毛を見せることにある。

### ゾウリムシの入手方法

上述の通り、ゾウリムシを使った実習を行う2週間前に、教室のゾウリムシが絶滅したことに気づいたときには非常に焦った。それまで使っていたゾウリムシは、奈良教育大学理科教育講座の石田正樹教授からいただいたものである<sup>(1)</sup>。再び石田教授に連絡して、今回は奈良教育大学までうかがい、ゾウリムシをいただいて実習に間に合わせる事ができた。公式な入手ルートとしては、ナショナルバイオリソースプロジェクトの中にゾウリムシの系統維持も含まれており、ここから入手することができる。具体的には、山口大学理学部で25系統が維持されており<sup>(2)</sup>、ここに依頼

すれば、MTA をかわしたのちに、40mL が 310 円で供与される。細胞密度は 200 ~ 1000cells/mL ということで、相当数のゾウリムシをもらうことができる。

### ゾウリムシの維持

ゾウリムシは、枯草菌をエサとして増える。このため、一般的には、稲わらの煮汁やレタスジュースを作り、この中で枯草菌を増やすとともにゾウリムシを維持する。わらの煮汁の中で維持すると、最長で半年くらいは放置したままで維持できるといわれており、実際には 3 か月おきに継代していた。このゆとりが絶滅という失敗を招いたのかもしれない。以下に、一般的なゾウリムシの維持、継代方法を記載する。石田教授の Website にも詳細な記載がある<sup>(1)</sup>。なお、以下のいずれの方法も、20 ~ 25°C の恒温器の中で維持することになっている。

#### (1) 稲わらの煮汁法

もっとも一般的なゾウリムシの維持方法で、影山哲夫前准教授から教わったものである。ホームセンターから稲わらで作った縄を購入し、これを 20cm 程度に切っておく。これを 3 本程度ほぐして三角フラスコに入れ、さらにわらが完全に浸るよう 500 ~ 700mL 程度の水を加えて、これに一晩つけておく。翌日、その水を捨て、これで農薬などを洗い流したことにする。その後、再び同量の水を加えて、アルミ箔などで蓋をしてオートクレーブして稲わらの抽出液を作る。滅菌ではなく、抽出液を作るのである。冷めたら、アルミ箔の蓋をとって実習室など静かな環境に一晩おいておく。この間に枯草菌が入る。さらに翌朝、すでにあるゾウリムシの培養液を 5mL 程度入れる。1 か月くらいすると、泳いでいるゾウリムシがチンダル現象として肉眼で認められるようになる。これを 3 か月に一度繰り返すことで、ゾウリムシを維持できる。

#### (2) 青汁法

ビーカーに蒸留水 40mL、大麦若葉入り青汁の粉（株式会社ダイショー、東京都）3g 入れて、スターラーで攪拌し懸濁液を作る。これをオートクレーブし、冷めたら 50mL のコニカルチューブに入れ 3000rpm で 10 分間遠心し、上清を新しいコニカルチューブに移す。沈殿物は捨てる（きれいなので食べてもいい）。蒸留水を加えて 50mL 程度にした後、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を 1g 加えて（12 水和物では 2.4g）、1N の HCl で pH を 7.0 に合わせる。これを、蒸留水で 1000mL に希釈してオートクレーブし、保存液とする。ゾウリムシの増殖・継代では、これをコニカルチューブに 24mL とりゾウ

リムシの入った液を 2mL 加えて蓋をして 25°C に静置しておく、1 週間で高密度のゾウリムシ培養液となる。石田教授の最もお薦めの方法である。なお最近では、1 N (規定) という言葉を高校までに習わないようである。

### (3) カロリーメイト法

1 L の三角フラスコに蒸留水 500mL をいれ、これに液体カロリーメイトを 0.5mL 加える。さらに、ゾウリムシ培養液を 2 ~ 3mL 入れ、アルミ箔で蓋をして 25°C に置いておく。これを 1 か月ごとに繰り返す。液体カロリーメイトは、1mL ずつマイクロチューブに分注して -20°C で保存している。一番簡単で、気に入っている方法である。次の項で、少し詳しく述べる。

### (4) レタスジュース法

一番よく増殖すると言われている方法であるが、一番煩雑なので著者らは実践したことはない。石田教授のサイト<sup>(3)</sup>を参考に以下に記載する。

レタスを購入し重さをはかる。レタス 500g から 1 L のジュースを作るので、この時に計った重さから加える水の量を換算するためである。レタスを蒸留水で洗い、次に沸騰させた蒸留水に 30 秒つけて、酵素を失活させ、さらに室温の蒸留水につける。レタスに水を少量加えてミキサーかジューサーにかけて粉碎し、ジュースにする。得られたジュースを 8 枚重ねのガーゼでろ過して、ろ液を三角フラスコに入れて蒸留水で希釈する。最初の重さから、500g で 1 L となる割合で蒸留水を加える。三角フラスコの口に綿栓をして、間欠滅菌 (100°C 15 分を 3 日間) し、冷蔵庫で保存する。冷凍保存してもよい。使用する際には、これを蒸留水で 40 倍希釈し、NaHCO<sub>3</sub> を 1L あたり 1g 入れてオートクレーブで滅菌する。これに枯草菌を加えて (これができなかったのが実施しなかった; ふたを開けて実習室に放置することで可能か)、その翌日にゾウリムシの培養液を加える。

## カロリーメイト法によるゾウリムシの維持

平成 28 年 6 月にゾウリムシを使った実習が終わってから、上記の方法のうち、青汁法とカロリーメイト法によりゾウリムシの維持を試みた。このうち、青汁法ではストック液にカビがはえて塊ができ、なんとオートクレーブ後もこの塊が成長したので、この方法はやめた。カビ恐るべし、である。

一方、カロリーメイト法では、継代後 2 ~ 4 週目には、モヤモヤがみられたが (図 1)、

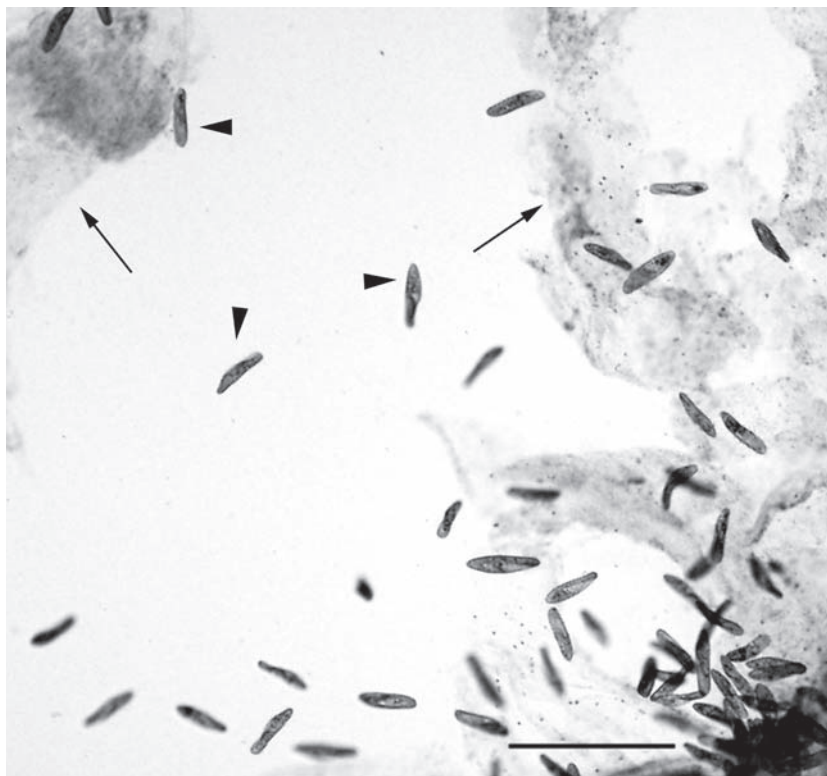


図1 細胞密度を数える際のゾウリムシ（矢頭）. 矢印は培養中に一時的に現れるモヤモヤ。スケールは500 $\mu$ m

その後は消失しゾウリムシは順調に増えていった。三角フラスコを1つ使って、これを順次植え継いで継代を行った。9月以降にカロリーメイト法を用いて継代することを決め、その後、経時的に細胞密度を調べた。細胞密度は、ゾウリムシの培養液をよく振って混ぜ、これを50 $\mu$ Lとりスライドガラスに載せて、x2対物レンズで泳いでいるゾウリムシを数えて1mL当たりの細胞数として調べた（図2）。ゾウリムシの密度から予想される増殖は、培養ごとに大きなばらつきがあったが、これが不慣れでやや雑な実験手技によるものか本来のものかは不明である。すべての培養で、継代開始60日目でゾウリムシは絶滅した。その一方で、継代開始後1か月（30日）目では、すべての培養で一定数の密度のゾウリムシがみられた。このことから、継代開始後1か月目に次の継代を行っている。また、この時期の培養液50 $\mu$ Lの中には、数匹～10匹のゾウリムシが得られることになるので、実習に用いるにも十分な濃度でもある。

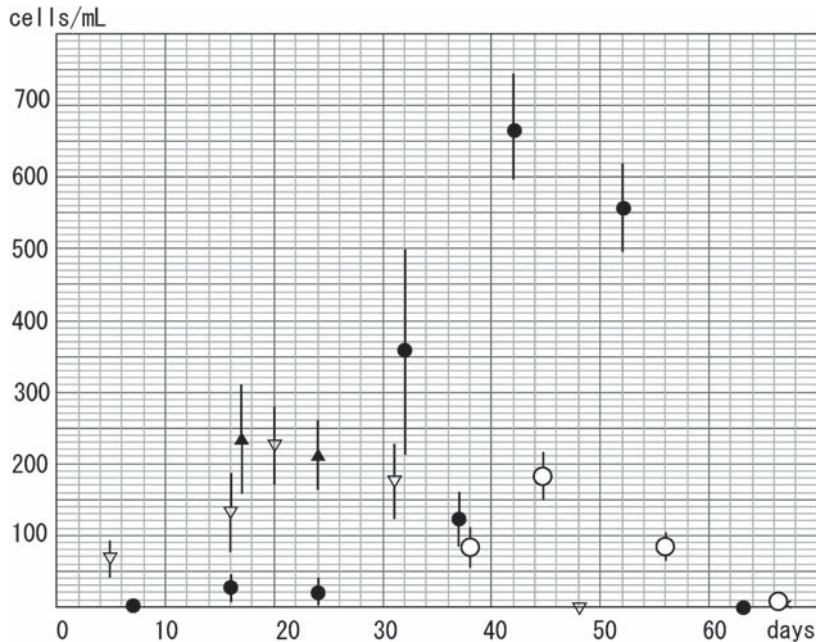


図2 ゾウリムシの培養日数と密度の変化. 培養開始後30～35日目が、密度が安定している。

### ゾウリムシを使った実習

線毛運動には、その動きにより管腔内の物を移動させるはたらきがある。哺乳動物の気道では、吸気により入ったほこりなどの異物を粘液によりからめとり、これを痰として体外に排出する。卵管では、卵巣から放出された卵細胞を子宮まで運ぶ役目を担っている。また、初期発生では左右軸の形成に重要な働きをする。

実習前の説明では、こうした線毛の運動異常によって引き起こされる疾患の一例としてカルタゲナー症候群（原発性線毛機能不全症候群）を紹介している。この疾患は慢性副鼻腔炎、気管支拡張症、内臓逆位など様々な症状を示すが、原因はすべて細胞表面上の一次線毛の運動異常に起因する。特に内臓逆位の発症機序は興味深く、これは発生の非常に初期、原腸胚期の原始結節（ノード）の細胞表面上に存在する一次線毛の動きに依存している。この線毛の運動は細胞外液に流れ（ノード流）を生じさせ、この水流により細胞外に存在するソニックヘッジホッグのような様々なモルフォジェンが胚の局所に存在するようになる。こうしたモルフォジェンの局在が胚の左右軸の形成に極めて重要であり、発生後期における内臓の非対称性の源となる。本疾患は、

一見独立した臨床症状が実は共通した細胞生物学的基盤に依存していることを示す興味深い例であり、原生動物の線毛の運動という基礎生物学的現象が疾患の理解につながることを理解させる一つのトピックとして取り上げている。

言うまでもなく、ゾウリムシは原生動物 (Protozoa) と呼ばれて繊毛虫門に属する生物であり、単細胞、液胞による浸透圧調節、分裂による無性生殖や接合による核の交換と言った基礎生物学的な知識と現象を理解させるのに格好の材料である。さらに医学的には、トキソプラズマ、アメーバ、マラリア原虫など多くの原生動物が感染症の原因となるため、一見ヒトとは縁遠いこうした原生動物の独特の性質を理解することも、医学的に非常に重要であるということを実習では紹介している。

線毛の動きは、生体の管腔内で見られる現象であり、顕微鏡下で観察することは、カエルの口腔粘膜を使うことができるが、一般的には困難である。最近では、youtube で上皮の線毛運動を紹介しているサイトも見られるが<sup>(4)</sup>、「体験」として観察できるのは、このような原生物を用いるのが実習では簡単である。

### 今後の課題

ゾウリムシを使った生物学実習では、上述の通りポスターカラーを使った食胞の観察 (phagocytosis の観察) や、異なる塩濃度の液に入れての収縮法の観察 (浸透圧調節の観察) などがよく行われる。また、線毛やその基部にある基底小体を免疫組織化学的に染色することも可能である。このような実習は、現段階では行っていない。今後は、生物科学と現代生命科学の講義の内容とをすり合わせて、「体験」させるにはどのような内容が効果的かつ重要であるかを考えながら、実習内容を改変・追加していきたい。

最後にもう一点、「繊毛」と「線毛」について簡単に述べる。生物学の「繊毛」と医学の「線毛」と同じ *cilia*, *cilium* を指す。生物学で「繊毛」と記載するのは、原核生物の線毛と区別するためである。英語でも、繊毛は *cilium*、線毛は *pilus* と区別されている。原核生物の線毛は、細胞運動とは全く関係なく、細菌間での DNA のやり取りや宿主細胞表面への結合、つまり感染の初期段階などにかかわる。日本語の立場からは「繊毛」が正しいそうである。「繊」には細く短いという意味が含まれるが、「線」には細いという意味しか含まれないそうである。歴史をさかのぼって教科書・文献を見ていくと、戦前の組織学の教科書では「顫毛」(しかも *cilia* ではなくドイツ語の

Flimmer. Zilie という単語もある) であるのに対し<sup>(5,6)</sup>、動物学ではこの時期にすでに「絨毛」が使われている<sup>(7)</sup>。さらに、昭和 30 年代には組織学の教科書でも「絨毛」が使われているが<sup>(8)</sup>、昭和 40 年代半ばからは現在使われている「線毛」がみられるようになっている<sup>(9)</sup>。医学分野では、難しい漢字を使うのは避けようという考えがあるということで、「線毛」を使うようになったといわれている。医学系では、どのような変遷があるのか、上記以上のものがあるのか、調べてみるのも面白いだろう。

### 謝辞

ゾウリムシの供与に関しては、文中にある通り奈良教育大学教授の石田正樹先生にお世話になり、なんとか実習に間に合いました。また、「線毛」・「絨毛」という術語の項に関しては、神戸大学名誉教授の寺島俊雄先生、本学生体機能形態科学講師の小林大介先生にご助言をいただきました。この場を借りて、三人の先生方に厚くお礼を申し上げます。

COI, No.

### 文献および参考になる Website

- (1) <http://www.nara-edu.ac.jp/guide/list/science/masaki.html>
- (2) <http://nbrpcms.nig.ac.jp/paramecium>
- (3) <http://mail2.nara-edu.ac.jp/~masaki/CBL-SITE/LabNote.html>
- (4) <https://www.youtube.com/watch?v=dg-z3zLTGSc>  
<https://www.youtube.com/watch?v=vPp6ukhIRKo>  
<https://www.youtube.com/watch?v=6IORN0jtKDO>
- (5) 二村領次郎 (西成甫改訂) 『掌中 解剖術語収覧』金原商店 1927
- (6) 横尾安夫『組織学綱要』南山堂書店 1941
- (7) 岡村周諦『動物実験の指針』大観堂書店 1941
- (8) 戸苺近太郎『組織学』南山堂 1964
- (9) 吉浦貞二 各種動物の線毛運動様式および線毛装置の微細構造に関する比較研究. 日本耳鼻咽喉科学会会報 73: 1662-1673, 1970.

(文献中の旧字体の文字は新字体に直して記しています)

