
 報文

教材としての原生動物（2）—ゾウリムシ I

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

筆者は前報（丸岡2003）において、①2003年度から始まった高等学校新学習指導要領下における「生物」という教科の概略、②高校教科書における原生動物の取り扱い方、③原生動物の教材としての活用の現状、④教材化のための条件整備等について報告した。

今回からは、教材として教科書に出てくる原生動物や実験項目、あるいは今までに教材化の工夫が試みられた原生動物ごとに、その現状と課題を考えていきたいと思う。最初に取り上げる教材生物は、その最も代表的な種“ゾウリムシ”である。

ゾウリムシは、新課程用の高等学校「生物 I」および「生物 II」の教科書に扱われている21種類の原生動物のうち、関連学習項目が多様で記載頻度がとびぬけて高く、生徒向け実験材料として扱われている唯一のものである。

ゾウリムシの教科書上での扱われ方について簡単にまとめておくと次のようである。「生物 I」では「単細胞生物」の単元で細胞小器官が発達した代表種として図示されるほか、「生殖」では二分裂、「恒常性の維持」では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見られる。また、「生物 II」では「生態」の単元で、ガウゼの実験をもとにした種間競争、捕食者—被食者関係が多くの教科書で扱われているほか、「系統分類」では原生生物界の代表種としての記載が目立つ。また、生徒実験としては、「生物 I」のほとんどの教科書で「収縮胞による浸透圧調節」が記載され、行動（泳ぎ方）、重力走性、化学走性、細胞の

構造、食胞形成、採集、培養が少しの教科書で扱われている。「生物 II」では、1社の教科書のみが「課題研究：ゾウリムシを用いたさまざまな研究」というテーマで、採集、培養（条件）、観察法、行動、浸透圧調節、消化、接合、トライトンモデルによる繊毛運動と、多岐にわたる内容を記載している。

教材として利用価値の高いゾウリムシについては、今までにも、実験の入門的総説（柳生1955、篠原1967、見上・小泉1977、丸岡1980、山田・山極1980）やさまざまな工夫が教育関係者や研究者によって発表されてきたし、現在ではネット上でも公開されている（原生生物情報サーバ、水中微小生物図鑑「Microbio-World」など）。そこで、筆者は、教科書での取り扱いの詳細を紹介するとともに、これまでの教材化の動き、実施上の問題点、今後の課題などについて、今回と次回の2回にわたって総括し報告する

ゾウリムシは知名度ナンバー1？

高校1年生を教えていると、彼らがどのような微小生物をどの程度知っているのか気になる。それは、「単細胞生物として知っている生物例をあげなさい」という質問にアメーバ、ゾウリムシ・・・と2つほど名前が挙がったあと、とんと続かなくなるからである。このあと、ケイソウ、クロレラが出れば良いくらいでしつこく問えば、ミジンコ、クンショウモ、アオミドロ・・・と細胞群体や多細胞生物まで飛び出す。細菌を答える生徒はまずいない。

そこで、中学校教科書を調べると同時に、1年生にアンケートを実施してみた。

まず、中学校教科書であるが、本県では公立中学校でただ1種（東京書籍 新しい科学2分野 上・下、2002）が採択されている。上巻では、表紙にボルボックスの写真がデザインされており、「野外に出かけよう」で採集の仕方、プレパラートの作り方、淡水中の小さな生物としてハネケイソウ、アオ

*Corresponding author

Tel: +81-877-23-5248

Fax: +81-877-23-6013

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

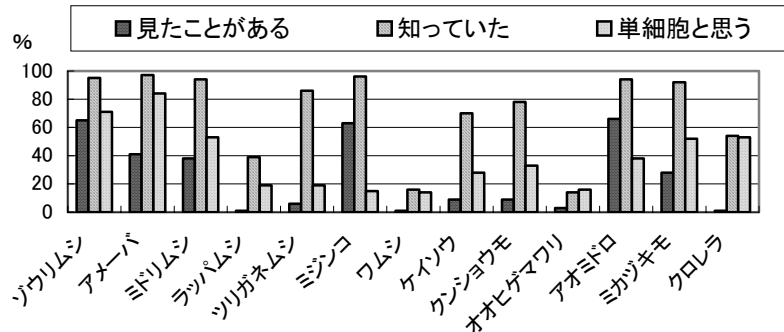


図1 高校1年生の微小生物の認知度

ミドロ、クンショウモ、ツリガネムシ、アメーバ、ミジンコの写真と名称が紹介されている。そのほか、「顕微鏡の使い方」でミドリムシの写真と名称、「自由研究例」で海中のプランクトンの写真（ケンミジンコ、ケイソウ）とヤコウチュウの写真と名称がある。下巻は、「単細胞生物の無性生殖」で図・写真とともにゾウリムシ、アメーバ、ミカヅキモの名称がある。そのほか、「食べる・食べられるという関係」で海中のケイソウ、ツノモの図や写真、「〈トライ〉煮干しの胃の中を見てみよう」でケイソウ、ツノモの写真が載っているが名称の記載はない。

つぎにアンケートである。1年生79名に、中学校での学習の実態を知るためとしてアンケートを実施した。『Q1. 中学校のときに「水中の微生物の観察」またはゾウリムシなどの「単細胞生物の観察」をしましたか。』の問に、「はい」66名、「いいえ」12名で87%の者は観察経験があった。『Q2. 1で「はい」と答えた人に質問します。あなたが行った実験は、次のどれですか。』では、「水槽または池や川の水をそのまま観察して、いろいろな微生物を見た。」51名、「純粋培養している微生物を見た。」は11名であった。続いて『Q3. 下記の微生物から自分が実際に見たことがあるものに○をしてください。』、『Q4. 下記の微生物から、中学校までの学習で自分が知っていたものに○をしてください。』、『Q5. 下記の生物のうち、単細胞生物だと思ふものに○をつけてください。』という問で13種類の微小生物名を挙げたところ、図1の結果になった。

「知っていた」「単細胞と思ふ」の項目から判断すると、中学校終了時の認知度はアメーバが1位、ゾウリムシは2位ということになる。実際に見た経験のある種は、ミジンコ、アオミドロが多く、単細胞生

物は頻度が低い。ゾウリムシやアメーバを「見たことがある」が比較的高い値を示しているが、観察経験者66名のうち、水槽や川・池の水を観察した者が77%を占めていることを思うと、遊泳している繊毛虫はすべてゾウリムシとされ、わけのわからぬゴミのようなものがアメーバにされた疑いもぬぐいきれない。ラップムシ、ワムシ、オオヒゲマワリ（ボルボックス）にいたっては、きわめて認知度が低い。

いずれにせよ、中学校段階では観察した種も単細胞生物としての認識度も驚くほど貧弱で、高等学校での学習や観察・実験がなされない限り、そのままの状態で大学に進学することになる。

ゾウリムシの確保（入手と培養）

ゾウリムシ (*Paramecium*) 属には、ゾウリムシ (*P. caudatum*)、ヒメゾウリムシ (*P. aurelia*)、ミドリゾウリムシ (*P. bursaria*) などいくつかの種があるが、生徒の実験材料とされるのはほとんどふつうのゾウリムシである（図2）。ミドリゾウリムシについては、分裂・接合や電気走性をテーマにした報告（高野1986）があるので参考にして欲しい。ここでは、ゾウリムシを中心に入手（採集）、培養法をまとめる。

教科書では、「採集」についてわずかに2社が、「培養」について3社が掲載している。

採集では、「初夏または初秋」、「水田、有機質の多い池、溝など」、「水底の水を枯葉などと一緒に採集」、「小川の岸や水面の落ち葉や水草付近の水をピペットで」、「低倍率で検鏡」、「細めの試験管にいれ水面付近に集まったものをスポイトで採集」などの記載が見られ、時期、採集場所、採水方法、観察・採集のコツについて簡単に述べられている。



図2 生細胞 (NiCl₂で運動抑制)
A:ゾウリムシ (*P. caudatum*) B:ミドリゾウリムシ (*P. bursaria*, 接合)

培養液については、「稲わら煮出し汁」が3社、「レタスジュース培養液」が1社で扱われている。そのうち記載が比較的詳しいのが、次の2社である。「数研出版 生物Ⅰ 007」では、稲わらを含んだ煮出し汁をオートクレーブし、納豆の糸を加えて枯草菌を添加する作り方の紹介がある。また、レタスジュースのほうが高密度に繁殖すること、黒い布・アルミホイルで覆って日が当たらない場所に置くなどが補足されている。「東京書籍 生物Ⅱ 001」では、レタスジュース培養液の作り方を紹介し、ミネラルウォーターに濃厚流動食(カロリーメイト缶)を0.1%で加える簡便培養法についても触れている。注意点として、室内の直射日光の当たらない場所に置くこと、2週間に1回は植え継ぐことも付記されている。

採集や培養を生徒に体験させるに当たっては、これらの教科書記載だけを頼りに進めるのはすこし困難で、多くの試行錯誤を覚悟しなければならない。指導者としては、やはり生徒にやらせるのに先立って、詳しい参考資料にあたり、自らが体験しておくことが不可欠であろう。採集や培養体験から得られる生物学的な情報はひじょうに多く、生徒・教師双方にとってたいへん意義深いことである。

しかし、採集・培養を目的とせず、実験材料としてゾウリムシを確保するためには、必要なときに株を入手し、実験に給するときだけ増殖・維持させる方法を知っていればよい。多くの生物教員にとってはこちらのほうが現実的かもしれない。

(1) 株の入手法

まず、身近な都道府県の教育センターや研究機関(ウェブサイト「原生生物情報サーバ」参照)などで分譲してくれるところを当たってみる(ほんとうは、各県で誰かが株を維持し、ゾウリムシ分譲の

核になるシステムができればこの上ない)。業者が市販もしているが結構高価である。接合実験では接合型の異なる株が必要だし、実験目的によっては突然変異株を利用することが有効であるが、そういう株は研究機関にお願いする。分譲してもらう場合は、余裕をもって問い合わせ、相手に負担をかけないように配慮したい。また、譲ってもらえる量は少量であるから、実験日から逆算して増殖させる期間を考えておく必要もある。さらに、株を分けてもらうときは培養法のアドバイスをもらう。培養環境が変わると増殖しないで死滅することもあるので、不慣れな人ほど、その株が維持されていた培養法を真似るのが一番である。研究機関ではゾウリムシを特定のバクテリアと二員培養しているのがふつうなので、可能ならバクテリアも分譲してもらうとよい。

(2) 採集

採集は、初夏から秋にかけての晴天が数日続いたときが適している。比較的有機質に富んだ水溜りや溝から、水草や枯葉などの沈殿物やその付近をかき回すようにして水を採取してくるとゾウリムシはたいてい採れる。どちらかといえば、ゾウリムシのほうがミドリゾウリムシよりも腐水性の強い水質に多く見つかる。ポリ瓶などで持ち帰る際には、酸素の供給を考慮して液量を半分程度にとどめ、30℃を超さないように注意する。

採集した水は、すぐに実体顕微鏡下で扱いやすい大きさ(たとえば9cm径)のペトリ皿(シャーレ)に移し検鏡する。すぐに見つからないか、いても個体数がごく少ないことが多いので有機物を少量添加して毎日検鏡する。添加する有機物としては煮沸した小麦粒(小鳥の飼料、ネット上でも入手可能)2~3粒またはレタスジュースや稲わら煮出し汁少量が適当であろう。小麦粒の場合、数日もすると小麦粒を中心にミズカビやバクテリアが増殖し、そのまわりに多数の虫が認められるようになる。

純粋培養をするには、他種からゾウリムシだけを単離する必要がある。単離・除菌の方法としては、1個体ずつマイクロピペットで吸っては無菌水の中を遊泳させることを数回繰り返す、ピペット洗浄法(詳しくは丸岡2003)を用いる。単離できたら培養にうつる。

(3) 培養

培養の方法はさまざまである。基本的には、ゾウリムシが棲める環境水で、餌となるバクテリアが繁殖できればなんでもよいから、あまり難しく考える必要はない。培養の失敗の多くは、不適切な水質、ゾウリムシに適さないバクテリアなどの微生物の混入が原因である。

培養に使う水は、脱イオン水、蒸留水が普通であ

るが、身近では市販のミネラルウォーターが便利である。ろ過した川や池の水、煮沸した水道水でもたいてい大丈夫であるが、硬水は適さない。細菌は簡便には自然混入したものや納豆菌（納豆の糸をいれる）が利用できるが、研究者は特定の細菌を培養して与えている。培養法については、多くの解説（小泉1975、山田・山極1980、樋渡・若原1982、重中1988）や教育関係者らの報告（篠原1967、小林ほか1975、猪狩1992）があるので参考にされたい。

小規模で失敗の少ない培養法としては、ペトリ皿を用いた小麦浸出液を勧めたい。この方法は、自然界から単離した原生動物を自然界から混入する細菌や小型原虫で培養する粗雑な培養法であるが、自然に近いだけ適用範囲も広い。ゾウリムシなど多くの繊毛虫のほか、アメーバの培養にも適している。Chalkley液やKnop液（調整法は重中1988参照）あるいは簡易には市販のミネラルウォーター（「六甲のおいしい水」など）をペトリ皿に半分の深さに入れ、煮沸した小麦粒を2〜3粒入れる。自然水中の細菌を利用する場合は、これにろ紙でろ過した採集水を少量添加するとよい。生徒実験などで材料が比較的多量に要る場合は、大きな容器で培養する。

培養法は、研究者の好みや実験目的によって変わる。一般にゾウリムシの生理学者は稲わら培養液、遺伝学者はレタスジュース培養液を用いているようである（野沢1981、楠元・内藤1980、見上・小泉1977）。前者は、後者に比べると増殖が遅く、増殖ピーク時の細胞密度も高くないが、長期間維持できるメリットがある。また、研究者は「二員培養」といって、ゾウリムシと特定の細菌（たいていは*Klebsiella pneumoniae*）の2種から構成される環境下で培養を行う。これにより生理条件のそろった細胞を高密度で収穫できる。

学校現場には、稲わら培養液が都合よい。餌の細菌は枯草菌を中心に自然混入したものを利用する。ゾウリムシは植え継ぎなしで2〜6ヶ月は死滅しない。ミドリゾウリムシは細胞内にクロレラを共生させているのでさらに飢えに強く、室内の散光下に置いておくと半年〜1年もの間、維持が可能である。

まず、ピーカーに稲わらを4〜5cmに切ったものを水1ℓに約10gの割合で加え、沸騰させる。沸騰したら火を弱くし、液が薄黄色になるまで2〜3分煮つめ、アルミホイルで蓋をして冷ます。稲わらは入れたまま利用する。筆者は培養器にコーヒーの空き瓶を利用しているので、1ℓの培養液をつくと3等分して3本の培養瓶を用意することができる。こ

れに、すでにゾウリムシを培養している培養器から、直接少量の培養液を植え継ぐ（ピペットを使わないのは、コンタミを避けるため）。培養は直射日光を避ければ、1年中、室温（5〜35℃、最適は26℃）で可能である。植え継ぎから2〜3日はゾウリムシよりも細菌の繁殖が先行し、そのため液は白濁する。5日〜7日で液が透明になった頃に細胞密度が最高になる。したがって、生徒実験をする場合は、実験日から逆算して5〜10日前に新しい培養液に植え継ぐとよい。株の維持だけなら、1〜2ヶ月ごとに植え継げば十分である。この方法で気をつけるべきは、ゾウリムシに適さない細菌の繁殖である。この手の細菌が増殖した場合は、ゾウリムシは増えず、液も白濁したままで何日経っても透明にならない。

筆者はこの培養法でほとんどの実験を実施している。ただし、「ゾウリムシの接合実験」だけは接合能の高い細胞を得るため、レタスジュース培養液を用いて二員培養を行っている。この方法および簡便法としてのカロリーメイト缶の利用については、「接合実験」のところで述べたい。

細胞構造の観察

たいていの教科書の「単細胞生物」の項では、細胞小器官が高度に発達した原生動物の代表としてゾウリムシの模式図が掲載されている。その模式図を比較した結果、「収縮胞、繊毛、細胞口、大核、小核、食胞」はほとんどの図にその名称が記載されているが、「細胞咽頭、細胞肛門」はごくまれで、「トリコシスト（毛胞）」を扱ったものは皆無であることがわかった。

教科書における「形態および細胞小器官の観察」は、核、収縮胞、食胞、繊毛に限られる。また、収縮胞については「収縮胞による浸透圧調節」というテーマでほとんどの教科書で扱われているので、これについては詳しく後述したい。

以下、実験・観察項目ごとに、今までの実践報告（柳生1955、篠原1967、桧垣1968、丸岡1980、石原・山上1983）やその成果を交えて詳しく見ていきたい。

(1) 細胞の濃縮

観察は、細胞密度がかなり高いほうが行いやすい。上述の稲わら培養液の場合、初夏など培養に適した温度下では、培養器の液面近くに、「白い帯」として肉眼ではっきりと確認できるほどゾウリムシが高密度に集まっていることがある。この場合はその部分をピペットで吸い取って実験材料とすればよい。

そのような高密度のゾウリムシが培養環境から直接得ることが難しい場合は、細胞を濃縮する。

ここでは、3通りの方法を紹介する。①電気走性を利用する方法：ペトリ皿に培養液を入れ、何重かに折り曲げた適当な大きさのアルミホイルを電極として、コードのついたワニクリップで皿の両端に固定し、3~9 V ほどの直流を流す。負極に高密度に集まるのでこれを使う。②ろ過する方法：培養液をろ紙でろ過し、ろ紙上の液が少なくなった頃にピペットでゾウリムシを回収する。③手回し遠心器を利用する方法：遠沈管に培養液をいれ、遠心する。ゾウリムシが底に沈むから上澄み液を手早くピペットで捨て去り、細胞密度を高める。

(2) 泳ぎ方の観察

生徒にとって、生きて動いているゾウリムシを見ることはきわめて興味深いことである。筆者の授業では、1時間の前半は「泳ぎ方の観察」、後半は運動を停止させての「細胞小器官の観察」を実施している。

ゾウリムシは、体を回転させながら、全体としては緩やかな螺旋を描くような軌跡で前進遊泳する。そして障害物にあたると、約1秒間後退し、体の後端を支点とした首振り運動をして方向転換し障害物を避ける。したがって、「泳ぎ方の観察」では、①前進運動をする際の遊泳運動の軌跡、②細胞の回転方向、③障害物にぶつかった際の回避反応を観察テーマに設定している。これは漠然と観察するのではなく、運動観察の視点を学習させるのが目的である。これらの観察には、透過照明の実体顕微鏡があれば言うことはないが、生徒実験では普通の光学顕微鏡しか利用できないことも多い。この場合、普段は使わない低倍率の対物レンズ($\times 4$)を用意し、総合倍率40倍での観察が可能になるようにしている。

まず、生徒はスライドガラスにゾウリムシを含む液を1滴分載せる。この際、暗い色を背景にして肉眼でゾウリムシを確認させる。単細胞生物は小さいから肉眼では見えないという先入観を払拭させるとともに、肉眼の分解能に近い0.2 mm (200 μm) という大きさを感覚的に体験させるためである。スライドガラスには、ホールスライド、ビニルテープを貼ったスライドガラス(丸岡2003参照)または少量の綿の繊維を載せたものを利用し、カバーガラスをかけて観察する。綿の繊維を用いる方法は、2社の教科書に綿の繊維にぶつかったときの回避反応を観察する方法としての紹介がある。この方法では、初めは動き回っている細胞が、しばらくすると正の接触走性により繊維に触れてじっと動かなくなるので、後述の細胞小器官の観察も可能である。

他の「泳ぎ方」の観察項目としては、「プレバートに衝撃を与えて遊泳が加速されるのを観察せよ」という内容も1社の教科書に掲載されている。

(3) 運動停止した生細胞での細胞小器官の観察

「一般形態(細胞小器官)の観察」では模式図を参考に構造を観察させる。筆者は生徒が前述の「泳ぎ方の観察」をしている間に、塩化ニッケル(NiCl_2)で繊毛運動を停止させたものを用意し、ビニルテープを貼ったスライドガラスに載せて配布している。この際の観察倍率は100~400倍である。①透明な試料は光を絞るとよく見えること、②上手にレボルバーを回して低倍から高倍に切りかえること、③実物は模式図どおりには見えないから先入観を捨てて見たとおりに描き、細胞小器官の名称を入れること、④繊毛を確認すること、⑤収縮胞を見つけ1回の収縮に要する時間を計測することが学習内容である。生細胞では、そのほか内部の顆粒や食胞に注目して原形質流動(サイクロシス)も観察できる(柳生1955、石原・山上1983)。

(4) 運動抑制の方法

生細胞をつかった構造観察では、運動停止させることが必要で、このためにはいくつかの方法があり、教科書にも紹介されている(丸岡2003)。

薬品を使わない方法：カバーガラス下の水をろ紙で吸い取ってカバーガラスの重みでゾウリムシが扁平に圧せられたのを観察する方法(柳生1955)や前述のように綿やティシュペーパーの繊維を利用する方法(石原・山上1983)がある。前者は、内部構造がよく観察できる点ですぐれているが乾燥が進行するとすぐに細胞が圧死するので長時間の観察には向かず、後者は運動が完全に停止しないので詳細な観察には向かない。

Ni^{2+} 麻酔法：ニッケルイオンは、繊毛運動のATPアーゼ(ダイニン)の阻害剤で、繊毛運動を麻酔するために、1~5 mM程度の濃度で塩化ニッケルや硫酸ニッケルが用いられてきた(桧垣1968)。しかし、濃度が高いと細胞が変形しやがて死滅するし、低いと麻酔効果が弱くなる。そこで楠元は、生徒観察のための適正濃度を詳細に検討し、その結果、最終の NiCl_2 濃度がゾウリムシでは0.5~5 mM、ミドリゾウリムシ、プレファリスマでは0.5~1 mM、ミドリムシでは25~50 mMであることを報告している(楠元1980、神奈川県立教育センター1982)。教科書では、形態観察のほか、「ゾウリムシの収縮胞による浸透圧調節」で広くこの方法が採用され、 NiCl_2 を0.01~0.026%で調整し、最終濃度がその1/3~1/2で利用している。筆者は0.01%で調整し、ゾウリムシ培養液と等量混ぜ、最終濃度0.005%で好結果を得ている。 Ni^{2+} イオンで運動を停止した個体は、低濃

度処理の場合は培養液などに戻すと運動を回復するが、高濃度で処理したり長時間そのままにしておくと変形や破裂など異常が見られるので注意する必要がある。上述の濃度では1時間以内の実験ならあまり影響は出ない。しかし、繊毛の運動を観察するには、繊毛運動は継続されているものの波動状の規則的な運動は見られない。正常な繊毛運動を観察する場合は、無害なメチルセルロースによる方法がよい。

メチルセルロースによる方法：液の粘度を高めて運動を停止もしくは抑制する方法である。古くは1%アラビアゴムや寒天、ゼラチン、最近では50%フィコール、1%ポリオックス、0.7%ジェランガムなども用いられるが、メチルセルロースが一般的である。メチルセルロースはいろいろな粘度のものが市販されていて、メチルセルロース100(粘度 100 cps)で5%、400(粘度 400 cps)で2%くらいが使いやすい(ウェブサイト 水中微小生物図鑑「Microbio-World」)。調整するときはなかなか溶けないが、均一に溶けない状態で冷蔵庫に1日くらい置くと溶解する。その後は室温で保存できる。メチルセルロース溶液を添加するため細胞濃度が低下するので、生徒実験では細胞濃度のたかい試料を用意する。筆者は、スライドガラスにゾウリムシを含む液を1滴とったところに、爪楊枝の先にメチルセルロースを1滴つけたものでかき混ぜ、カバーガラスをかけて検鏡している。

繊毛刈取法：5%エタノールで繊毛を折る方法である。この方法は、もともと、繊毛逆転の際の感受性が繊毛膜にあるのか本体の細胞膜にあるのかを調べる過程で考案された方法(Ogura & Machermer 1980)で、運動停止法としては今改訂の教科書にはじめて登場した。容器に試験管もしくは遠沈管を用い、ゾウリムシを含む培養液と10%エタノールを当量に比べ、指でふたをして30秒~1分間激しく振動する。これを蒸留水などで2~3回洗浄すると、繊毛のないゾウリムシが得られる(図3)。繊毛は、しばらくすると再生する。この方法はたいへん興味深いので、筆者も何度か試みたもののエタノールの濃度や振動



図3 5%エタノール処理で脱繊毛された細胞

処理の程度がなかなか難しく、状態のよい細胞を効率よく得るに至っていない。今後の課題としたい。

(5) 核の観察

生細胞でも注意してみると、かなり大きくて均質な構造が細胞内にあることがわかる。これが大核である。大核は、トリコシストを発射させるためにピクリン酸やタンニン酸で処理しても濃く染まる。しかし、核をはっきりと確認するには、やはり核染色のための色素で染色するのがよい。

一時標本の作製では、固定・染色を同時に行う酢酸オルセイン溶液、酢酸カーミン溶液が一般的である。スライドガラス上で、ゾウリムシの液1滴に対し酢酸カーミン溶液を1滴落とすと、トリコシストが発射されると同時に、大核だけでなく細胞質も濃く染まって観察しにくい。染色液をごく少量加えるのがコツである(篠原1967)。ゾウリムシをはじめ繊毛虫は大核と小核を有するのが特徴であるが、ゾウリムシでは分裂期や接合時以外は小核が大核の中に埋もれたように存在しているので、残念ながら小核を確認するのはなかなか困難である。市販のウンナ・パッペンハイムのピロニン・メチルグリーン溶液で固定せずに一時染色してみると、DNAの多い大核は青緑に、RNAの多い細胞質はピンクに染まる。この場合も染色液の量に注意すべきである。一時染色では固定効果が弱いので、カバーガラスが少しずれると細胞が壊れやすいので注意する。

永久標本を作る際は、フォイルゲン染色を行う(見上・小泉1977、重中1988)。この方法は、やや専門的であって、「固定→脱水→染色→脱水→封入」の処理を順次していくために時間や手間がかかるが、分裂や接合時の核の変化をテーマに、生徒の課題研究として利用できるだろう。分裂時の核を観察するには、新しい培養液に植え継いで1~3日たったものに分裂個体が多いからこれを染色する。

(6) 食胞の観察

教科書では、細胞濃度を高めたゾウリムシに水で薄めたポスターカラー(青または赤)を少量与えて、メチルセルロースで運動を抑制して観察する記載が多い。

食胞の観察方法には、中性赤(ニュートラルレッド)で生体染色する方法と、不溶性で色のついた微粒子を取り込ませる方法がある(柳生1955)。中性赤による生体染色はごく低濃度(0.01%中性赤を1~2滴、30 mlの培養液に添加すると0.0001%程度になる)で12時間~24時間かけてゆっくり染色するのがコツで(桧垣1968)、食胞が桜色に染まる。一方、微粒子を取り込ませる方法は、カーミン粉末、薄めた墨汁やポスターカラー(0.01%程度)、pH指示薬で染色した酵母菌やバクテリアなどが利用されてい



図4 食胞 コンゴレッドで染色された酵母菌を摂食

る。

前述のように教科書や他の生徒向け実験書には、最近ではポスターカラーを用いる方法が一般的に紹介されている。ポスターカラーは、色によっては比較的毒性の強いこともあるから注意する必要があるが、教科書に「青または赤」と色の指定があるのはそのためかもしれない。面白いところでは、スライドガラス上にウレタンシートで7つのプール（7色のポスターカラーを入れる）と水路をつくり、電気走性を利用してプールを順に移動させていわゆる“レインボーゾウリムシ”をつくる報告がある（山崎・田原1998）。ポスターカラーで食胞を美しく染め分けるのは、たしかに実験を楽しくする工夫であるので、文系の生徒などを対象にした興味づけとしては有効である。

しかし、理系の生徒にはもう少し科学的な発展が欲しい。この要求を満たしてくれるのが、pH 指示薬で染色した酵母菌（柳生1955）やバクテリアなどを利用する方法である。筆者は、小型ピーカーに水を1/3程入れ、少量の市販の乾燥パン酵母とごく少量のコンゴレッド（pH指示薬、青3.0 赤5.0）を加えて10分間加熱し、冷却後、飢餓状態（稲わら培養液で培養40日目のもの）のゾウリムシに少量与え、数分後にメチルセルロースで運動抑制し観察した。この方法はたいへん容易で、しかも結果は興味深い。すなわち、いくつかの個体を観察すると、青と赤の両方の色の食胞をもつ個体が見つかることから、食胞内 pHが時間とともに変化していることが分かる（図4）。Fokら（1982）は、ブロムクレゾールパープル、ブロムクレゾールグリーン、プロモフェノールブルーで染めた酵母菌を与えた実験から次のような事柄を報告した。「食胞内の pH は最初中性であるが、摂食後急速に酸性に変化し5~9分で最も酸性のpH 3にいたる。しかし9分後からはすぐに中性に向けて pH の上昇が始まり、12分くらいで中性に戻る。また、食胞の直径は、酸性が最も強くなるとき（コンゴレッドでは青色のとき）に最も小さな値

をしめす。そして、形成された食胞は20~40分ではほとんど細胞外へ排出される。」

食胞形成の定量実験としては、ポリスチレンラテックス粒子をもちいた報告があるので参考にされたい（見上・小泉1977）。

(7) トリコシトの観察

酢酸カーミン溶液やピロニン・メチルグリーン染色液を滴下して核を染色しようとする時、細胞表面から発射された、繊毛よりはるかに長い多数の糸状の放出体（エクストルソーム）を見ることができる。これがトリコシト（毛胞、糸胞、刺胞ともいう）である。この放出体については教科書に全く記載がないので、生徒のみならず教師でも知らない人が少なくない。

トリコシトは、細胞膜直下に約5,000~8,000個存在し、光学顕微鏡でも表面を高拡大すると発射されていない状態のものを容易に確認できる。そしてこの小器官は、種々の化学物質や捕食者からの刺激をうけると、すばやく体外に発射される。捕食者と接触した場合は、体表からの部分的な発射もおこるが、実験的に化学物質の水溶液に虫体をさらすと、体表面全体から発射される。実験では0.5%メチレンブルー、濃い緑茶、1%タンニン酸でも観察できるが、ピクリン酸飽和水溶液を用いることが一般的である。トリコシトの機能については、古くから生

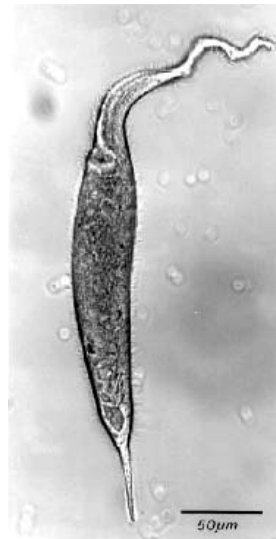


図5 ディレプタス (<http://mikamilab.miyakyo-u.ac.jp/index.html>より許可を得て転載)

細胞前端部（吻）を鞭状にゆっくりとくねらせて泳ぎ、鞭に接触した繊毛虫などをそこから発射される毒胞で麻痺させて捕獲し、体中央部やや前方に開く大きな細胞口から獲物を丸呑みする。



図6 ピクリン酸処理したゾウリムシ A: トリコシストを発射した野生株 B: トリコシストを発射しない突然変異株

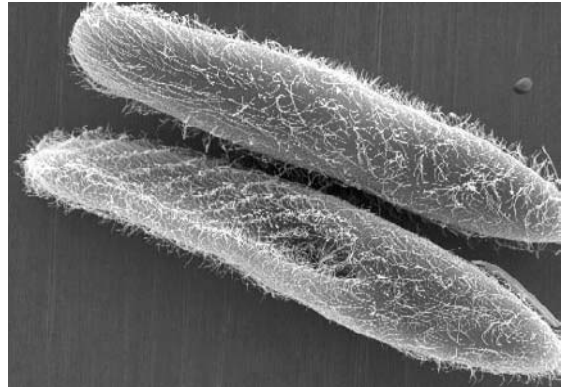


図7 ゾウリムシの走査電顕像 (洲崎敏伸氏のご好意による)

体防御、浸透圧調節、付着機能装置などいくつかの可能性が示されてきたが、最近になってようやく防御機能であることが証明された (春本2002)。

生徒の実験としては、従来、これら化学物質による発射の観察だけであったが、見上(1989)は、原虫捕食性の繊毛虫ディレプタス (図5、水田や稲株から高頻度で採集できる) とゾウリムシの野生株およびトリコシストを発射できない突然変異株 (図6) を用いることによって、トリコシストの生物学的な機能を理解させる教材に発展させた。筆者もそれら試料を提供してもらって、同様の実験をさせていただいたが、ディレプタスの捕食行動そのものもダイナミックでたいへん興味深く、また実験も簡単、結果も明瞭であった。おそらく生徒を魅了するすぐれた実験モデルになる。さらに、この実験と、「生物II」の教科書に記載のある専らゾウリムシを捕食するディディニウムの捕食行動の観察とを組み合わせれば、「ディレプタスには有効なトリコシストがなぜディディニウムには無効なのか」という問題提示ができ、捕食の仕組みとトリコシストの防衛機能をさらに考察する教材になりうる。

なお、放出体やゾウリムシとディディニウムの捕食行動についてはそれぞれの総説 (ハウスマン1989、三宅2002、岩楯2002) を参照されたい。

(8) 表層構造

繊毛虫など原生動物の一部は、細胞膜下に形態保持や形態形成などに機能する複雑な構造を発達させている。これら細胞表層領域は皮質 (コルテックス) と呼ばれ、その詳しい構造は主として透過型・走査型の電子顕微鏡による観察で明らかになってき

た (図7)。しかし、光学顕微鏡による観察でもいくつかの構造は観察が可能である。特に、繊毛虫を硝酸銀で処理し紫外光で還元させる手法による“渡銀法”は、銀線系とよばれる表層構造をきれいに染め出す (重中1988、ハウスマン1989)。この方法による銀線系の観察は、現在でも繊毛の形態形成や繊毛虫の分類の研究に有効な手段として用いられている。

ゾウリムシは、この渡銀法の材料として適している (柳生1955、桧垣1968、見上・小泉1977、丸岡1980)。いくつかの方法が工夫されているが、生徒実験には“クラインの乾燥法”が簡便である。方法は次のとおりである。①油をよく取り去ったスライドガラス上にゾウリムシを含む液を載せる。この時、マイクロピペットやろ紙などで水を吸い取り、液量はできるだけ少なくする。②風通しのよいところで自然乾燥させる。決して熱を加えない。③2% AgNO_3 に6~8分間浸す。④蒸留水を入れたペトリ皿に移し、5分間浸す (水洗)。⑤スライドガラスがちょうど水をかぶる程度に蒸留水をいれたペトリ皿に移して、これを白紙の上に置き光に当てる。銀が光で還元されると、鉄さびのような色調の膜ができて褐色になる。最適の露光時間は、紫外光源の種類や距離などによって異なるが、よく晴れた日の直射日光では10~20分である (時々検鏡して様子を見る)。⑥蒸留水で水洗した後、空気中で乾燥させ、グリセリンで封入すると一時標本、バルサムで封入すると永久標本ができあがる (図8)。分裂個体を染めて、形態形成を調べても面白い。



図8 渡銀法による表層構造



図9 位相差顕微鏡写真 左の前後に収縮胞や放射管が明瞭に認められる。細胞体中央やや下方に白く光っているのは細胞口

収縮胞による浸透圧調節

一般に、ゾウリムシには背側（口部と反対側）に前後2個の収縮胞（分裂前の個体には3個の収縮胞を認めることもある）が存在している。それらは交互に拡張と収縮を繰り返し、背側に開口する排泄孔より液体を外部に排出する。ゾウリムシでは、収縮胞、星形に配列したアンブル状膨大部、そこから細く伸びる放射管で収縮胞複合体が形成されている（図9）。機能としては、主として細胞内の浸透圧調節であるが、ナトリウムイオンの排出にも関与しているかもしれない（ハウスマン1989）。

このゾウリムシの“収縮胞による浸透圧調節”の実験が、他のゾウリムシの細胞小器官や行動などの実験に比べ、ほとんどの新課程教科書で取り上げられているのは特徴的である。この理由としては、最近、教科書実験の探究的な取り扱いが求められるなか、単に細胞構造の観察にとどまらず、その機能を考察し、またデータの個体間のばらつきをどのように処理するかなどの点において、生物実験の探究的過程を経験させることのできる数少ない実験の一つとして判断されたためと思われる。この実験が探究的テーマとして優れていることは、ウェブサイトなどをみても、複数の大学で同様の、あるいは発展的な内容の実験させていることから伺える。

以下、実験の方法を、①運動の抑制法、②観察法・浸透圧調整法、③データ計測と処理などの観点から、教科書の記載や筆者の追試実験の結果をもとに述べることにする。

“運動抑制法”としての教科書記載は、1つの教

科書に複数の方法を紹介しているものもすべて含めた場合、 NiCl_2 による麻醉法がほとんどで（7例）、5%エタノールによる脱繊毛法は2例、メチルセルロースによる方法はわずか1例である。 NiCl_2 による麻醉法は、濃度を0.01～0.026%で調整し、最終濃度は0.005～0.01%で利用している。これは $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ としてモル濃度に換算すると0.025～0.5 mMにあたり、楠元(1980)の推奨する濃度よりもわずかに薄い濃度になっている。ゾウリムシ培養液に0.01% NiCl_2 を等量加えて麻醉し、この試料と同量の各濃度のNaCl水溶液を加える方法で、追試を行った。その結果、運動抑制の効果は数分で現れ、細胞の変形もほとんどなく好結果を得たが、収縮リズムの個体間のばらつきは大きく、また、処理後の経過時間でもかなり結果に差が出ることがわかった。これは、楠元(1980)が指摘しているように浸透圧等の急激な環境変化や NiCl_2 処理そのものによる悪影響、また見上・小泉(1977)が指摘しているように時間経過にもない次第にもとのリズムに戻ることが影響しているのかもしれない。したがって、生徒実験に移す前に自分の培養条件での NiCl_2 の適正濃度を調べておくこと、また、生徒実験時には浸透圧を変化させた後、測定を開始するまでの時間を15分以内にするなどの注意が必要であろう。5%エタノールによる方法では、筆者の処理方法の未熟のためか、変形をしていないで運動を停止した細胞を多く得ることが困難であった。もしかするとこの方法はあまり適さないのかもしれない。教科書にはほとんど紹介のなかったメチルセルロースによる方法は、追試した方法のなかでは一番収縮リズムが安定していた。これについては、後

で詳述する。

“観察法”については、教科書では、 NiCl_2 麻醉法を使った場合はビニルテープを貼ったスライドガラスにゾウリムシを載せカバーガラスをかけて検鏡する方法が一般的である。メチルセルロースを用いる場合は、メチルセルロースの量が加わるので普通のスライドガラス上でカバーガラスをかけても大丈夫である。

“浸透圧調節法”としては教科書10種のうち、9例は食塩、1例はスクロースを用いている。そして実験液に入れてから3~5分順応させるように記されているものが多い。食塩の最高処理濃度は教科書によってまちまちで、最終濃度が0.1~0.6% (約20~100 mM = 40~200 mOsm) の範囲である。教科書に例示されたデータや筆者の測定からは、0.2~0.3%になると1回の収縮に1分以上要するようになり、生徒実験ではそれよりも高濃度は適していないと考える。スクロースを用いた例では、最終濃度0.5~2.5% (約15~75 mM = 15~75 mOsm) で水溶液を用意し、約2%でほぼ収縮が停止するデータが例示されている。食塩を用いた場合とスクロースを用いた場合では、実験データや細胞の形態変化に違いが見られる。食塩とスクロースとも濃度と1分間の収縮回数に負の相関関係が見られるが、食塩が直線的な関係にならないのに対し、スクロースでは直線的になる。また、両者の濃度から浸透圧を求めて比較すると、スクロースの方が食塩よりも高張液としての効果が大いことがわかる。さらに、光学顕微鏡による形態観察からは、食塩ではかなり高張液にいても細胞が目に見えて小さくなることはないが、スクロースでは細胞から水が奪われるために細

胞の体積が収縮し、扁平に変形する。ところで、最近の生物教科書は、化学を学習していない1年生や文系生徒に配慮して、濃度単位を質量%で表示している。しかし、浸透圧を計算するにはモル濃度でないと不便である。理系生徒を対象にした生物実験では、教科書では質量%でも授業ではモル濃度を用いるのが適切である。

“データ計測と処理の仕方”について各教科書を比べてみると、どの教科書も各濃度で平均値を算出してデータをグラフ化することで一致しているが、収縮回数の計測は、①1回の収縮に要する時間を測定、②5回の収縮に要する時間を測定、③1分間の収縮回数を数える場合に分かれる。そして、①では1個体について2~5回それを3~10個体計測、②、③では3~5個体について計測させ、平均値を求め、1分間の収縮頻度(回/分)に換算させる。1個体で測定する対象となる収縮胞については、「前後どちらかを決めて」、「前後どちらでもよい」、「1分間に2個の収縮胞が収縮する回数を測定」、あるいは全く指示がない、のどれかである。また、収縮回数は温度の影響を受けるから室温を記録しておくことの注意を書いてあるものもある。これらの方法については、どこまで厳密な測定を生徒に要求するかによって判断が分かれるところであるが、できるだけ科学的な要求をしておきたいものである。

その他、教科書には、生徒に実験結果を発表させるために、コンピュータでの測定値の処理、CCDカメラを使つての映像記録、デジカメを使つての写真記録を勧めているものが数例、「発展」として「マイクロメーターで収縮胞の最大直径(蒸留水中)を測定し、球として体積を求め、2個の収縮胞が、ゾウ

表1 浸透圧差による収縮胞の1回の収縮に要する時間の変化 (28°C)

溶液の種類	個体番号	1回目	2回目	3回目	個体平均	総平均
対 照 液 (0.01%Knop液)	1	6.8	7.2	7.2	7.1	7.2
	2	7.2	6.8	7.0	7.0	
	3	7.5	7.7	7.2	7.5	
対 照 液 +10 mM NaCl	4	11.2	9.0	9.5	9.9	8.8
	5	8.6	8.6	8.4	8.5	
	6	7.9	7.4	8.4	7.9	
対 照 液 +30 mM NaCl	7	18.2	15.4	15.6	16.4	19.8
	8	22.4	20.3	22.0	21.6	
	9	19.8	23.4	20.8	21.3	

(単位: 秒/回)

※対照液+50 mM NaCl中ではばらつきも大きく、2~5分という長時間を要した。

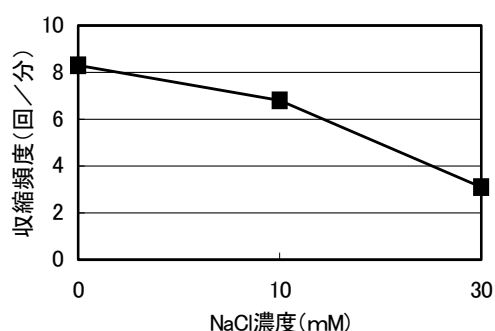


図10 浸透圧差による収縮胞の収縮頻度の変化 (28°C)

リムシの体積 (体長・体幅を測定し、円柱形として求める) 分の水を排出するのに何分かかかるかを計算させ、さらにヒトの腎臓の機能と比較しなさい」というかなり高度な内容も1例ある。

最後に、筆者が試みたメチルセルロースを用いた実験例を示す。あらかじめ1時間以上 0.01% Knop 液 (または蒸留水) に順応させたゾウリムシを用意する。また、実験液は、順応させるのに用いる液に0、10、30、50 mMの割合で NaCl を溶解させた後、粘度が高めになるようにメチルセルロースを溶したものを実験の前日以前に準備する。カバーガラスにごく少量の液とともにゾウリムシを数個体以上載せ、それよりはかなり多い量の NaCl・メチルセルロース溶液を加え柄つき針でよくかき混ぜる。これを懸滴法 (丸岡2003) により乾燥しないようにして検鏡する。なお、メチルセルロースによる浸透圧増加は分子量が大きいので無視できる。

実験は、28°C、1種の液について体長約 220 μm のものを3個体選び、後方の収縮胞について1個体当たり3回測定し、その平均を求めた (表1)。そして1分間あたりの収縮回数に換算して、濃度との関係が分かるようにグラフを作成した (図10)。

また、0.01% Knop 液中での収縮周期の平均は7.2秒/回で最大膨張時の直径は 10.2 μm であったことから排出能力の試算をした。1分間の収縮回数 f (=60/1回の収縮に要する秒) と収縮胞の半径 r から、2個の収縮胞で1分間に排出する総量が $4\pi r^3 \times f \times 2/3$ という式で求められる。これに、上記の値を当てはめて計算すると $9.3 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{分}$ となる。次に、ゾウリムシの体幅は約 50 μm であったから、細胞の形を考慮して半径 25 μm 、長さ200 μm の円柱として体積を求めると $3.9 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ となる。したがって、こ

のゾウリムシはこの条件下において、1分間に自分の体積の1/42の量の水を排出していることになる。

おわりに

ゾウリムシは教材としても研究材料としても代表種であるから、生徒実験について総括するだけでもかなりの内容がある。そのため、今回は「細胞小器官の観察・実験」を中心にまとめてみた。次回は、「行動」、「生殖・増殖」についてまとめてみたいと思う。

謝辞

筆者とゾウリムシのつきあいは、教員になって間もない頃からであるので、30年近くということになる。その間、いろいろな教材化を試みる中で、ほんとうに多くの方々に材料提供、助言などでお世話になった。今回の内容に関しては、特に、宮城教育大学の見上一幸先生、神戸大学の洲崎敏伸先生には度々のお世話を戴いた。ここに心より感謝申し上げる。

参考文献等

【教科書】

平成15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】

Fok,A.K., Lee,Y. and Allen,R.D. (1982) The correlation of digestive vacuole pH and size with the digestive cycle in *Paramecium caudatum*. J. Protozool.,29,409-414

Ogura,A. and Macheimer,H. (1980) Distribution of mechanoreceptor channels in the *Paramecium* surface membrane. J. Comp. Physiol., A,135, 233-242

猪狩嗣元 (1992) ゾウリムシの簡単な新しい培養方法。生物教育, 第32巻, 第4号, 267-270

石田寿老・佐藤重平 編 (1958) 生物の実験法。288-290, 裳華房

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

神奈川県立教育センター (1982) 第四集 教材開発および確保に関する研究。

楠元 守 (1980) NiCl₂溶液による微小生物の繊毛・鞭毛運動の抑制。遺伝, 34, 8, 59-66

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) ゴウリムシの培養。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
- 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) ミドリゴウリムシの教材化。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) ゴウリムシの実験。科学の実験, Vol.19, No.4, 392-395, 共立出版
- 樋渡宏一・茗原宏爾 (1982) 7. 原生動物。実験生物学講座1, 丸善
- 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 (2003) 教材としての原生動物 (1)。Jpn. J. Protozool. Vol.36, No.2, 113-122
- 見上一幸 (1989) 捕食されないためのゴウリムシの防御機構。宮城教育大学理科教育施設年報, 25, 15-19
- 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
- 山崎仁也・田原 豊 (1998) レインボーゴウリムシをつくらう!—ゴウリムシの走電性を活用した食料観察法。とっておき生物実験, 遺伝 別冊10号, 裳華房
- 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
- 【総説】
- 岩楯好昭 (2002) ゴウリムシ・ディディニウムのエクストルゾームの放出とカルシウム。Jpn. J. Protozool. Vol. 35, No.2, 135-141
- ハウスマン (1989) 原生動物学入門。扇元敬司訳, 弘学出版
- 春本晃江 (2002) ゴウリムシのトリコシストの防御機能。Jpn. J. Protozool. Vol.35, No.2, 125-133
- 三宅章雄 (2002) 細胞小器官エクストルゾームによる繊毛虫の細胞間相互作用—特にエクストルゾーム毒による捕食者の化学的攻撃と被食者の化学的防御。Jpn. J. Protozool. Vol.35, No.2, 97-117
- 【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シラバス
http://www.sci.osaka-u.ac.jp/students/syllabus2003/university/uindex_b.html
 姫路工業大学理学部生体物質化学 I 講座実験書
<http://www.sci.himeji-tech.ac.jp/life/biochem1/protocol/jissyuu.pdf>