

プラナリアの染色体分析

金繁 陽子 山中 ひかる

【概要】

私たちは、清流園瀬川でプラナリアを発見した。初め、プラナリアの再生能力に魅せられ、再生実験から取り組んだ。結果、切断後から約10日間で全ての切断片において、切断片の数と同数の生体が形成された。そこで、細胞分裂をしている部分から、染色体を発見することが出来るのではないかと思い、「染色体分析」を行うことにした。結果、プラナリアの染色体分析には、0.4%ギムザ液を用いた空気乾燥法が適していることが分かった。

We discovered Planaria in the Sonose River that has clear stream. To begin with, we were fascinated by Planaria's regeneration power, so we carried out regeneration experiment. Considering the number of all cutting parts(regions), it is same as the number of living bodies which were formed in ten days after cutting. So we guessed that we could discover some chromosome from the part of cell division. Therefore, we decided to research on "The analysis of chromosome". As a result, we found that this research is adequate to use the air drying way with 0.4% Giemsa.

【研究の目的】

本校の近くには、清流園瀬川があり、この川の水生昆虫などを調査した際に、石の裏に、かつて見たことのない生物を発見した。私たちは、その生物の正体を探るため、採集し、生物図鑑で詳しく調べたところ、プラナリアという生物である事が分かった。図鑑を読むうちに、私たちはプラナリアに魅せられ、またプラナリアの愛らしさに心奪われた。さらに詳しく調べたところ、最近では、プラナリアの再生能力に着目した最先端医療や、高度な実験が生物界に衝撃を与えていることから、私達もプラナリアと密接に関わっていきたいと考えた。城南高校は清流園瀬川にも近く、プラナリアは数多く存在し、また、1年中採集出来る事から、私達はこの生物にスポットを置き、実験材料とすることにした。

始め、プラナリアの特性である再生能力に着目し、再生実験を行った。プラナリアを3種類の方法（①横方向に1カ所切断し2個体にする方法、②横方向に2カ所切断し3個体

にする方法、③縦方向に1カ所切断し2個体にする方法）で切断し、その後の経過を観察する。切断後から約10日間で全ての切断片において、再生能力が次のように見られた。

①では、頭部から尾部、尾部から頭部が形成され、②では、頭部から尾部、尾部から頭部、腹部では切断箇所の頭部に近い側から頭部が、尾部に近い側からは尾部が形成された。③では、左断片から右断片、右断片から左断片が形成された。以上の結果から、切断片の数と同数の生体が形成されることが分かった。

そこで、私達はこの実験結果から、新たな疑問が芽生えた。それは、「再生する」つまり、盛んに細胞が分裂しているに違いない。分裂している細胞は、様々な特徴が見られるれ、さらに、分裂をしている細胞から、染色体を発見し分析出来るのではないか。また、分析の際に、プラナリアの種類が異なれば、本数や形も異なるのではないか。ということである。その疑問を解決するため、次なる課題である、染色体分析を行うことにした。

【仮説】

再生実験によって、プラナリアの再生能力が証明された。そこで、再生能力が見られる部分では細胞分裂が活発であると同時に、染色体の動きも活発に見られるのではないかと考えた。

再生実験と同様、染色体分析実験も、プラナリアを頭部・腹部・尾部の3個体に分けて切断する。なぜなら、頭部・尾部は切断ヶ所が1ヶ所であるのに対し、腹部は切断ヶ所が2ヶ所であるからだ。切断ヶ所の数を考慮すると、実験の成功率（染色体が観察できる確率）が最も高いのは腹部なのではないか。

また、採集したプラナリアを観察すると、園瀬川上流で採集したプラナリアと中流で採集したプラナリアに違いがみられた。それは、上流で採集したプラナリアは、全体的に茶褐色であるが、中流で採集したプラナリアは、表面に黒い斑点がある点であった。そこで、この2種類のプラナリアの違いに着目し、染色体にも何らかの違いが見られるのではないかと考えた。

実験方法には、空気乾燥法と押しつぶし法の2種類を行うが、両者ともにほぼ同様の染色体が見られるのではないか。

また、プラナリアの細胞を染色する際、ああ0.4%ギムザ液と酢酸オルセイン液の2種類を使用するが、染まった色が違うだけで、どちらも同様の染色体が観察できるのではないかと考えた。



上流で採集したプラナリア



中流で採集したプラナリア

【実験器具・装置】

脱塩素水

コルヒチン溶液

0.1%KCL 溶液

固定液1（酢酸3：エタノール3：蒸留水4）

固定液2（酢酸1：エタノール1）

固定液3（酢酸）

0.4%ギムザ液

酢酸オルセイン液

脱塩素水

スライドガラス

カバーガラス

スポイト

濾紙

電子天秤

えつき針

電子顕微鏡

マニキュア



コルヒチン 500mg

【実験方法】

・ 空気乾燥法

- ① 絶食させたプラナリアを横方向に2カ所切断し3個体にして、脱塩素水中で、再生させる。
- ② 試薬（固定液1，固定液2，固定液3，0.1%KCL 溶液，4%ギムザ液，コルヒチン溶液）を作る。
- ③ 再生2～4日目の各小断片を十字型に、更に4個体に切断し， 10^{-5} Mコルヒチン溶液で3～4時間処理する。
- ④ コルヒチン処理後の小断片を0.1%KCL 溶液で1～3時間低張処理する。
- ⑤ 1～2個の小断片をスライドガラス上に移し，固定液1を数滴ふりかける。
- ⑥ 余分の固定液を濾紙で吸いとり，新たに同固定液を1，2滴加え，柄付

き針の先で小断片をほぐすように細切し，細胞を解離させる。

- ⑦ 解離細胞に固定液 2 を加え，余分の同固定液をすて，約 1 分間放置して半乾きにする。ここで細胞はこわれ染色体は分散する。
- ⑧ 固定液 3 を 2，3 滴加え，次に余分の酢酸を捨て，約 20 回手でよく振って室温で乾燥させる。
- ⑨ 作製した染色体標本は 1 日おいてから 0.4% ギムザ液または酢酸オルセイン液で 10～15 分間染色し，流水中で寸時水洗いして検鏡する。なお，固定液と染色液は使用直前に調整しなければならない。

本法の特徴は，染色体のひろがりがよく，殆ど重ならないことと，染色体だけが染色されて鮮明な像が得られることである。

・ 押しつぶし法

- ① 絶食させたプラナリアを横方向に 2 カ所切断し 3 個体にして，脱塩素水中で，再生させる。
- ② 各固定液を作る (0.1% KCL 溶液，0.4% ギムザ液，コルヒチン溶液)
- ③ 再生 2～4 日目の各小断片を十字型に，更に 4 個体に切断し， 10^{-5} M コルヒチン溶液で 1～3 時間処理する。
- ④ 小断片を 0.1% KCL 溶液で 30～60 分低張処理する。
- ⑤ 切断片をピペットでスライドガラス上にうつし，KCL 溶液をできるだけ吸い取る。0.4% ギムザ液または酢酸オルセイン液を 1，2 滴おとし，静かにカバーガラスをかけその上から軽く押す。ピンセットでカバーガラスをはがし，上向け

におく。染色液をカバーガラスとスライドガラスの両方に数滴落とし，5～30 分間放置する。

- ⑥ スライドガラスの上にカバーガラスを元通りにかけ，余分な染色液を吸い取る。上から軽く押す。
- ⑦ 徐々に力を加え，場所を変えながら押し付けていく。
- ⑧ カバーガラスの端にマニキュアを塗って封じる。(プレパラート完成)
- ⑨ プレパラートを顕微鏡で観察する。

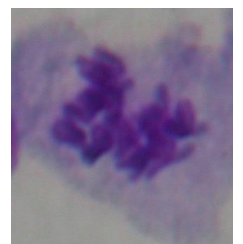
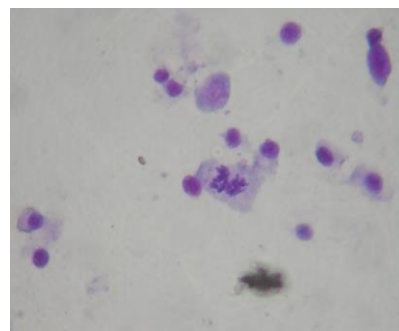


押しつぶしている様子

【結果】

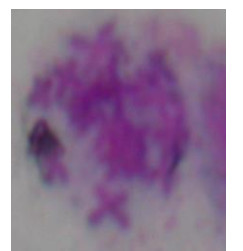
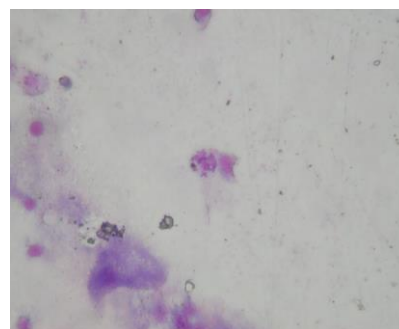
実験 I (空気乾燥法・0.4% ギムザ液)

上流で採集したプラナリア



拡大図

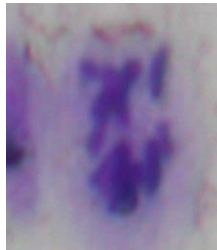
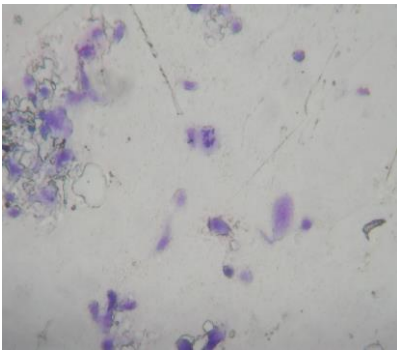
中流で採集したプラナリア



拡大図

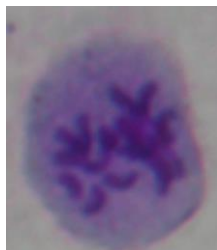
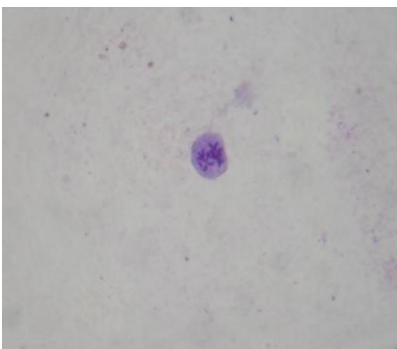
実験Ⅱ（押しつぶし法・0.4%ギムザ液）

上流で採集したプラナリア



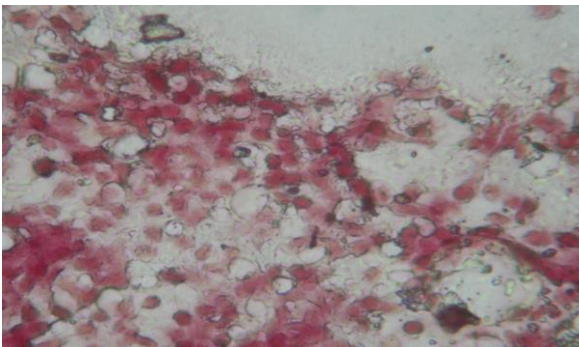
拡大図

中流で採集したプラナリア

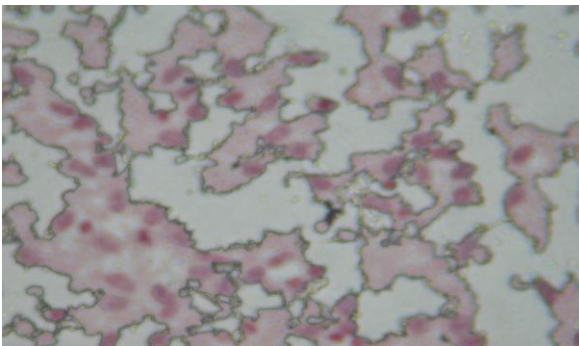


拡大図

酢酸オルセイン液で染色すると…



空気乾燥法



押しつぶし法

あまり綺麗に染色できないため、染色体が観察できるどころか、細胞の原型がほとんど見られない。いくつか観察できたものもあったが、ギムザ液の方が高い確率で観察できた。

実験ⅠⅡ総合の出現率

| 部位 | 出現率 |
|----|--------|
| 頭部 | 29.29% |
| 腹部 | 49.09% |
| 尾部 | 26.67% |

結果、腹部の染色体出現率（染色体が観察できた確率）が最も高いと分かった。また、空気乾燥法が押しつぶし法より出現率が高かった。

【考察】

部位による染色体出現率を求めたところ、頭部・腹部・尾部のどの部位においても、空気乾燥法で実験を行った方が押しつぶし法より出現率が高い事が分かった。頭部における空気乾燥法による出現率は、押しつぶし法での出現率に対して約8倍、腹部においては6倍、尾部においては13倍であった。これは、押しつぶし法よりも空気乾燥法の方が確実に細胞を解離させる事ができたからだと思われる。押しつぶし法については、押しつぶす際にプレパラートがなんらかの理由でずれたため、細胞や染色体が見えにくくなり出現率が低くなったと思われる。

部位（頭部・腹部・尾部）による染色体出現率は腹部が一番高かった。これは、頭部・尾部の切断部が1ヶ所であるのに対し、腹部は切断部が2ヶ所あることが関係していると考えられる。染色体は、細胞分裂が活発である成長芽に顕著に見られるので、頭部・腹部・尾部、同じ条件で実験を行っても再生芽が2個ある腹部の染色体出現率が高くなると考えられる。

【感想】

私たちはこの研究を通して、研究は時間をかければかけるだけ結果がついてくるという事、仮定した結果だけでなく想定外の結果も得られるという事を学んだ。

【参考文献】

プラナリアの生物学 - 基礎と応用と実験
手代木 渉 編著