

ミミズの組織透明化

静岡県立富岳館高等学校 自然科学系列

3年 土屋 亜美、長谷川 あゆみ、後藤 恵、佐野 萌帆子、山田 あけみ、遠藤 美優

2年 平野 伊吹、増田 江里奈

1 研究目的

本校では、昨年度より先輩方がヒメウズラを用いて組織透明化の研究を行ってきた。しかし、ウズラは卵の入手や孵化・飼育に時間がかかることから、本校の農場で多く入手でき、飼育が容易かつ透明化の前例が無いと考えられるミミズを選んだ。ミミズは組織透明化試薬（以下 CUBIC 液）で透明化するのか、もし透明化したら体内に蓄積されている内容物を解剖せずに確認できるのではないか、またミミズの完全な透明化により体内の内部構造を目視で把握できるのではないかと考え、研究を行った。

2 組織透明化（CUBIC）について

組織透明化（CUBIC）とは、Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis の略である。CUBIC 法は水溶液ベースであり、蛍光タンパク質を褪色させることなく組織透明化を達成した方法である。

CUBIC は、独立行政法人理化学研究所が開発した生体試料を透明化させることが可能な一連の技術の名称である。CUBIC 液は、元素の一種である尿素や、アルカン骨格にヒドロキシ基とアミノ基を持つ化合物であるアミノアルコール、そして分子内に親水性の部分と親油性の部分を持つ物質である界面活性剤を組み合わせることで、光の散乱を減らし、組織の透明度を上げている。またこれにより CUBIC 液を用いた透明化方法ではポルフィリンからなる、錯体であるヘムを溶け出させることができる。CUBIC 液の透明化の原理について、上記を簡潔にまとめると光の屈折を同一方向にし、血液中のヘムを溶け出させるため、組織が透明に見えるということである。

今回の研究では、本来の研究である脳の透明化を応用できないか、という考えのもとに CUBIC 液を用いてミミズの研究を行った。

3 透明化試薬（CUBIC 液）の組成

（1）CUBIC 液（Ⅰ）の組成

尿素、エチレンジアミン、トリトン X-100、水

（2）CUBIC 液（Ⅱ）の組成

スクロース、尿素、ニトリロトリエタノール、トリトン X-100、水



図1 実験前のミミズ

4 研究内容

今回用いたミミズは、本校の農場に豊富に生息していた、貧毛綱ナガミミズ目ツリミミズ科シマミミズ属のシマミミズと貧毛綱後生殖門目フトミミズ科フクロフトミミズ属のフツウミミズである。この2種類のミミズを4つの実験方法で CUBIC 液に浸し、ミミズ全体がどのように透明になるのかを実験した。

実験1（採取したミミズを組織固定後、透明化液に浸す）

農場で採取、水で洗浄後のミミズをホルマリンで組織固定し、PBS で洗浄し CUBIC 液に浸す。

透明化した後、解剖する。

結果

CUBIC 液（Ⅰ）につけた 24 時間後には体内の色素が溶出し、組織が透明化しており体内に土が残っている様子が確認できた。その後、何度か CUBIC 液（Ⅰ）の交換を行ったが、目視できる変化はなかった。次に CUBIC 液（Ⅱ）に浸けて 24 時間後に観察したが、変化がなかった。ミミズは体内の土により全体が黒く見え、容易に観察ができなかったため、解剖を行った結果ミミズの内部には土がそのまま残っていた。



図2 実験前のミミズ

実験2（新聞紙を餌として与えたミミズでの組織透明化）

実験1で得た結果をもとに、生きているミミズの体内の土を別のものに置き換えることで透明化に変化が起きるか確認するため、体内の土を新聞紙に置き換えるための飼育瓶を制作する。

結果

4 日後に確認したところ、ミミズが新聞紙を食べた形跡がなく、瓶の外へ出ているミミズが多数いた。新聞紙を与えたミミズに実験1と同様の操作を行い、その後 CUBIC 液（Ⅰ）に浸して 24 時間後に確認したところ、実験1と同様の結果だった。また解剖を行ったが体内には土がそのまま残っていた。

実験3（寒天を餌として与えたミミズでの組織透明化）

新聞紙での内部構造の置き換えができなかったので、ミミズの文献やミミズに詳しい先生の助言からミミズは甘味が好物と知ったため、砂糖を添加した寒天を作成し、ミミズの体内の土を寒天に置き換えることで体の内部まで透明にできるのではないかと考え、実験を行った。

結果

寒天培地に入れたミミズを確認すると、寒天に土が混ざっていた。寒天培地から取り出した段階でのミミズの見目は特に変化がなかった。しかし、透明化液に浸したミミズはわずかに残った土の部分以外はすべて透明になった。



図3 実験3のミミズ（拡大図）

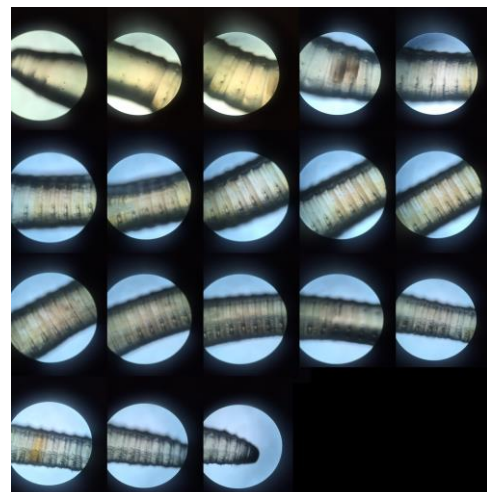


図4 実験3のミミズ（顕微鏡 60 倍）

実験4（餌となる寒天を着色して1時間ごと経過観察を行った）

ミミズを1時間ごとに固定することによってミミズの消化速度を求めることができるのではないかと考え、実験を行った。09時05分から14時05分までの計5時間行い、実験1と同様の方法で透明化実験を行った。

結果

実験3と比較したところ体内は完全に透明化しなかった。目視で確認すると1時間ごと透明化したミミズの体内に食紅寒天と墨汁寒天は確認できなかった。また、解剖したミミズを光学顕微鏡60倍で観察したところ、寒天とわずかな土は確認できたが、食紅寒天と墨汁寒天は確認できなかった。



図5 実験4結果①（顕微鏡60倍）

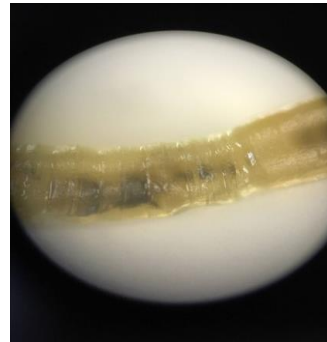


図6 実験4結果②（顕微鏡60倍）

5 考察

寒天を餌として与えることで内容物の土を排出させ、内部がすべて透明になるのではないかと考え実験を行った。その結果、4日間寒天を餌として飼育したミミズの体内に詰まった土は取り除かれ、ミミズの全体が透明化したことで、解剖せずに内容物を確認できた。しかし、一部分であるが透明化が出来ずに白く残った部分が確認できた。部位としては、観察したところ受精嚢や貯性嚢および精巢、卵巣と考えられる。また、ミミズの体内の土を完全に取り除くためには最低4日間必要だということがわかった。実験4より、体内に着色寒天が確認できなかったことから、餌として与えた寒天に変わる餌を考える必要がある。

6 感想

研究を通して、内臓の配置など不明な点が多く残ったので、さらに知識をつけるために様々な文献を読み、ミミズの内部構造や各部の名称を理解したうえで、今後の研究に繋げていきたいと考える。

7 今後の課題

仮説として、ミミズの消化速度を求めることが出来たとしたら、効率的に畑の土壌の質を改善することが可能となる。従って、現在人手が減少しつつある農林業・および第一次産業の復興に貢献することが出来ると考えられる。ミミズの各部内部構造の名称について不明な部分があった点、ミミズの体内に部分的に土が残ってしまった点、本実験において寒天がミミズの餌として機能していなかったという以上の三点を今後の課題とする。