

組織透明化による「ミミズの消化速度研究」

静岡県立富岳館高等学校

自然科学系列 3 年 田中彩菜、平野伊吹、遠藤祥、増田江里奈

1 研究の背景

本校では一昨年度、上級生が組織透明化試薬（以下 CUBIC 液）を用いてヒメウズラの組織透明化の研究を行った。昨年度はヒメウズラに比べて入手と飼育が容易で、かつ透明化の前例が無いと考えられるミミズを選んで組織透明化の研究を行い、ミミズの完全な透明化に成功した。また、透明な寒天をミミズに食べさせてから透明化することで、ミミズの内部構造を目視で確認することができた。このとき、ミミズの体内はほとんど消化管だけであること、また土は透明化せずにそのまま残ることもわかった。

この成果から本研究では、ミミズのエサを工夫して透明化を行えば、食べたものを時間とともに追うことができるのではないかと考えて、ミミズの消化速度の研究を行った。昨年度の研究の課題として、ミミズの寒天に対しての食いつきには個体差があることと、寒天の種類によってはミミズが全く食べない寒天もあった。したがって、本研究では以下の二つの目的を設定した。一つ目は、ミミズの食いつきがよりよい寒天の作製方法を見つけること。二つ目は、その寒天を用いて、ミミズの消化速度を求めることである。なお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である。

2 組織透明化法（CUBIC 法）について

CUBIC 法は、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、Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis の略である。水溶液をベースとした組織透明化法であり、タンパク質を褪色させることなく透明化ができる。

（1）透明化の原理

CUBIC 液は、光の屈折を同一方向にし、血液中のヘムを溶解させるというものである。CUBIC 液は、尿素やアミノアルコール、界面活性剤を組み合わせることで、光の散乱を減らして組織の透明度を上げる。また CUBIC 液を用いた透明化方法では、ヘムを溶解させることができるため、血液を含む臓器であっても内部まで視覚化させることができる。

（2）CUBIC 液の作製手順

- ①トリトン X-100 は常温で固まっているため、柔らかくなるまで鍋で湯煎する。鍋に水を入れ、ビニール袋に入れたトリトン X-100 を、鍋底に敷いた金網の上で加熱する。
- ②ビーカーに水 35 g、尿素 25 g、エチレンジアミン 25 g を、それぞれ測り入れる。
- ③加熱して柔らかくなったトリトン X-100 を 15 g 測り入れる。
- ④全体が透明になるまでガスバーナーで加熱しながら混ぜる。

3 研究内容

（1）実験 1

ア 目的 ミミズの食いつきがよりよい寒天の作製方法を見つける

イ 方法

ミミズの栄養分となる砂糖や、ミミズがコーヒーを好むという調べから水の代わりにコーヒー液を混ぜた寒天など、表1に示した4種類の寒天を作り、その中でミミズを飼育してミミズの生存率を調べ、生存率の高い寒天を用いて実験2を行うことにした。

表1 材料の分量（重量比）

	軟寒天	硬寒天	砂糖8% 軟寒天	コーヒー 軟寒天
水	100	100	100	
寒天(粉末)	1	2	1	1
スクロース	4	4	8	4
コーヒー				100

ウ 寒天の作製手順とミミズの生存率調べ

- ① 水（またはコーヒー）に粉末寒天、スクロースを入れて、全体が透明になるまで混ぜながら加熱する。
- ② 固体化した際の厚さが 5mm になるようにプラスチックバットに流し込み、固まるまで放置する。
- ③ 作成した寒天を約 3cm 四方になるように切り、ビーカーにいれる。
- ④ それぞれの寒天が入ったビーカーにミミズを入れて、25℃に設定した恒温器で 24 時間飼育する。
- ⑤ 24 時間後の生存個体数を数えて、各寒天でのミミズの生存率を調べる。



図1 寒天の作製（手順①）



図2 恒温器に入れる前のミミズ（手順④）

エ 結果と考察

生存率はそれぞれ、軟寒天が 93.3%、硬寒天が 40%、砂糖 8%軟寒天が 96.6%、コーヒー軟寒天が 0%であった。全体数と生存数と生存率を表2に、生存率のグラフを表3に示す。軟寒天では高い生存率であったが、硬寒天とコーヒー寒天は低い生存率だった。特にコーヒー寒天で飼育した場合は、生存したミミズがいなかった。

砂糖の濃度が 4%の軟寒天と 8%の硬寒天では、ミミズの生存率がほぼ同じ程度であったため、砂糖の濃度は 4%よりも高ければよいことがわかった。また、硬寒天は、ミミズを取り出した際に、ミミズがかじった跡が残されていなかった。そのため、ミミズにとって硬寒天が硬すぎて食べることができず、餓死してしまったと考えられる。

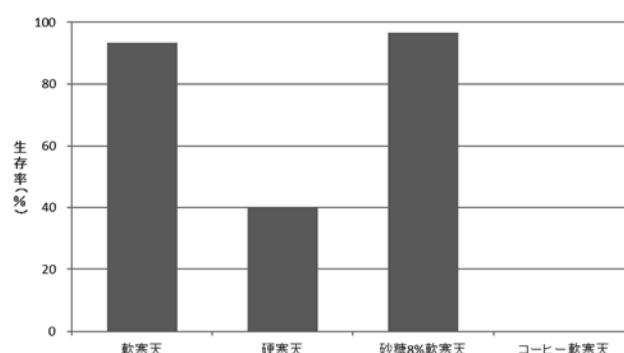
砂糖 4%の寒天では生存率が 93.3%であったのに、コーヒー寒天では生存率が 0%になってしまった。砂糖と粉末寒天の量はどちらも同じであるため、この理由はコーヒーが原因であると考えられる。実験前にインターネットで調べた際、ミミズがコーヒーを好むという情報があ

ったため実験したが、本研究の結果からはそれが否定された。

表2 ミミズの生存率

	全体数	生存数	生存率
軟寒天	30	28	93.3
硬寒天	5	2	40.0
砂糖8%軟寒天	30	29	96.7
コーヒー寒天	5	0	0

表3 ミミズの生存率グラフ



(2) 実験2

ア 目的 ミミズの消化速度を求める

イ 方法

予備実験で、24 時間で寒天だけを食べさせたミミズを作製した。しかしこのミミズを透明化しても、何も食べていない状態との区別がつかなかった。そのため更に 24 時間、土を食べさせることで、「土・寒天・土」のサンドイッチ状態のミミズを作製することにした。透明化した際に、サンドイッチ状態となったミミズを成功固体とし、口から寒天までの距離をもとに、ミミズの体内で 24 時間に寒天が進んだ速さを消化速度とした。

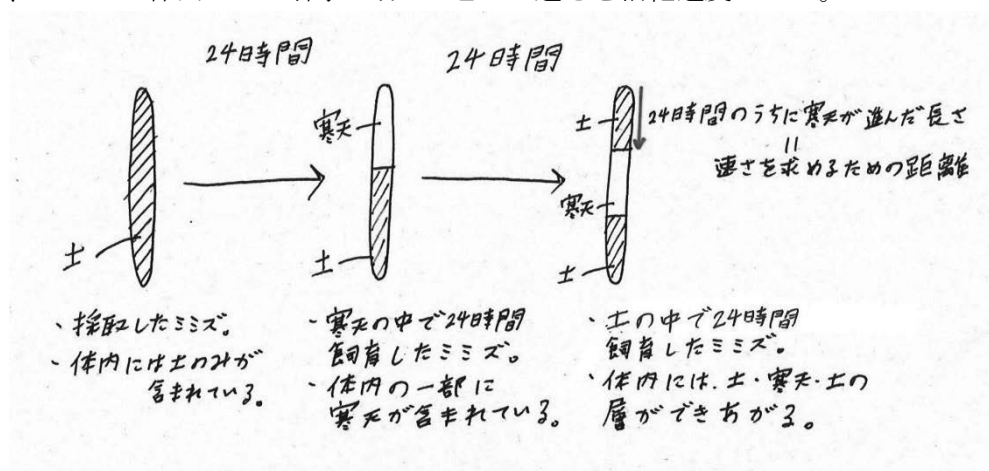


図3 作製したい状態のミミズ

ウ 実験手順

- ① 実験1と同様に寒天を作製する。
- ② 寒天の入ったビーカーにミミズを 10 匹ずつ入れ、アルミホイルに小さな穴をあけたもので蓋をし、25℃の恒温器内で 24 時間飼育する。
- ③ ミミズを取り出して、土の入ったビーカーに入れて、25℃の恒温器内で 24 時間飼育する。
- ④ ホルマリンに 48 時間浸して固定する。
- ⑤ リン酸緩衝生理食塩水でホルマリンを洗い流す。
- ⑥ CUBIC 液に 48 時間浸す。
- ⑦ 溶け出した色素が再びミミズに戻るのを防ぐため、新しい CUBIC 液に浸け替えて、更に

48 時間浸す。

⑧ 透明化したミミズを水で簡単に洗ったあと観察を行う。

⑨ 「土・寒天・土」のサンドイッチ状のミミズの全長と、口から寒天までの長さを測る。

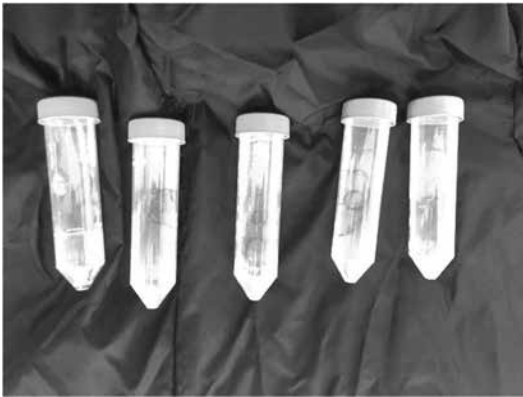


図4 CUBIC 液に浸したミミズ（実験手順⑥）

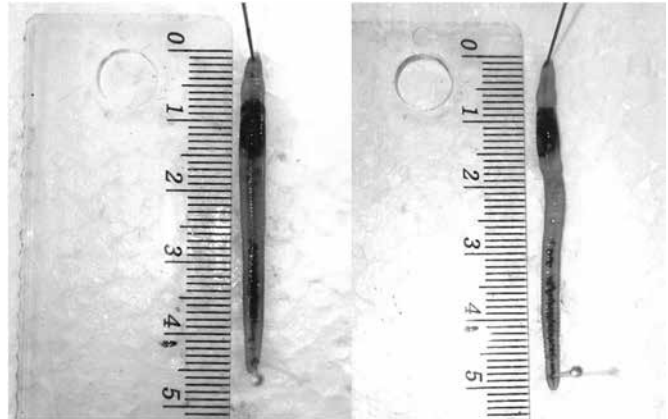


図5 「土・寒天・土」のサンドウィッチ状になったミミズ（実験手順⑨）

エ 結果と考察

30 匹中、28 匹が生き残り、その内 12 匹が目標とする「土・寒天・土」のサンドウィッチ状の層をもつミミズとなっていた（図6）。図6のようにサンドウィッチ状になった全てのミミズの全長（mm）と、口から寒天までの長さ（mm）を測り、消化速度を計算した（表4）。

ミミズによって体長の大きさが違うため、口から寒天までの長さをそのまま計算には使わず、全長に対する割合（％）に変換してから速度を求めた。時間は、最後に土に入れて飼育した時間が 24 時間（＝1day）であるため、消化速度の単位は〔％／day〕とした。

これは、ミミズの食べたものが、1 日あたり全長の何％進んだか（消化したか）を表している。表4よりミミズの消化速度の平均は 22.9（％／day）であることがわかった。ミミズの平均の消化速度が 22.9（％／day）であるということは、1 日で体長の 5 分の 1 程度を消化すると考えられる。したがってミミズは 5 日間で体内の土がすべて入れ替わると考えられる。

表4 ミミズの消化速度

個体	全長 (mm)	口から寒天 までの長さ (mm)	消化速度 (％／day)
1	42	27	64.2
2	53	29	54.7
3	35	9	25.7
4	49	9	18.3
5	40	7	17.5
6	35	6	17.1
7	41	7	17.0
8	40	6	15.0
9	36	5	13.8
10	35	4	11.4
11	47	5	10.6
12	38	4	10.5
平均	40.9	9.8	22.9

4 研究の成果

- (1) ミミズの生存率が、96.7%の寒天の作製方法を確立した。
- (2) ミミズの消化速度を求めることができた。
- (3) ミミズの平均の消化速度は22.9 (%/day) であることがわかった。
- (4) ミミズは、5日間で体内の土がすべて入れ替わるという考察ができた。

5 今後の課題

今回の研究からミミズは5日間程度で体内の内容物が排出されると考えられるため、実験2と同様の方法で、土を食べさせる日数を5日まで延長し、考察通り5日で体内の土が入れ替わるかどうかの研究をしたい。また、今回の実験ではシママミズを使用したけど、他の種類のミミズでも同様の実験を行い、ミミズごとの消化速度の違いについても研究したい。

ミミズは土壌中の有機物を植物や微生物が吸収可能な化合物に変換する。また排泄する糞は団粒構造の形成に重要な役割を果たしている。本実験の結果をもとに、ミミズがどのくらいの速さで土壌中の有機物を分解し、優れた土壌を作るのか調べたい。

6 感想

作製したかった「土・寒天・土」の3層を体内に持つミミズを作製できたことで、前年度立てた目標の消化速度を調べることができたので良かった。前年度の研究では寒天を食べずに死んだと思われるミミズが多くいたため、研究は食べるミミズの個体数を増やすことから始めた。寒天の硬さや砂糖の量を調節し、ミミズの食いつきが高い寒天の目途をつけるのに半年以上の時間がかかったのは大変だった。ミミズは個体差の生じる生体試料であったため、実験結果のデータが偶然か否か確かめるための予備実験を何度も行い、1年間の研究で約500匹以上のミミズを用いて実験した。慣れない論文作りにも時間がかかり、毎日放課後に学校に残って実験や作業を続けたので、自分達の考えた実験方法で実際にミミズの消化速度が求められた達成感はとても大きかった。

7 謝辞

本研究のきっかけとしてミミズの消化速度の実験を薦めて下さった静岡市立静岡高等学校の杉村正道先生と、研究の助言をしてくださった本校の嶋田龍彦先生に心より感謝申し上げます。

8 参考文献

- ・土屋亜美ら「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 (2017)
- ・マウスを丸ごと透明化し1細胞解像度で観察する新技術～血液色素成分を多く含む臓器なども脱色して全身を透明化～ www.TCIchemicals.com/ja/jp/
- ・<https://www.jst.jo.jp/pr/announce/20141107/inndex.html>