

プラナリアの電場における特性
～細胞の効果的再生を目指して～

真和高等学校 1年 小河 百合

研究の背景と目的

小学校4年生の時に体をどんなに切られても、再生できる「プラナリア」に出会い、再生医療研究への新発見に繋げることを目標に研究に取り組んできた。研究の取り掛かりとして、プラナリアの負の走性ついて、その特性を追究してきた。電場による外部刺激を与え、マイナス電極へ泳動する、負の電気走性を2020年に発見した。2021年には負の電気走性に水質が影響していることを導き出した。プラナリアの捕獲場所（江津湖）の水、合志市の水道水など湧水を主成分とする水では負の電気走性が発動し、電解質を多く含む他府県の水道水では発動しない。昨年度の研究では、電解質の濃度調整により、負の走行性が発動しないことを確認した。これには溶液中のイオンなどに対する化学走性の影響の可能性がある。

今年度は、純水に電解質を溶解し、負の走行性の発動と影響する物質の特定を試みる。また、走行性における定量化を画像解析ツールを用い、プラナリアの泳動における軌道の可視化を試みる。

2022度の検証：
電気分解の負の走行性への作用

負の電気走性を示す江津湖の水や合志市の水道水には共通して、硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素が多く含まれ、負の走行性が再現する。一方、川西市や合志市の水道水には江津湖の水に比べ、導電性を上げる電解質を多く含んでいる(表1)。川西市、合志市の水道水のナトリウム濃度と同等となるよう硝酸ナトリウムを溶解した水溶液では電気刺激を与え、電圧印加10分後には負の走行性が解消していた(図1)。電気分解によるナトリウムや硝酸のイオンに対する「化学走性」が影響している可能性を示した。

表1 平成21年度 水質調査データ（一般公開データ）

(単位:mg/L)	採水地点		川西市	合志市	江津湖
	項目				
病原生物	大腸菌(MPN/100ml)		0	0	3600
	硝酸態窒素及び 亜硝酸態窒素(10mg/L以下)	※1	0.6	3.4	3.7
無機物/重金属	フッ素及びその化合物		0.16	0.37	0.14
	ホウ素及びその化合物		0.1	0.59	
一般有機物	塩素酸		0.1	0.06未満	
着色	鉄及びその化合物		0.03未満	0.03未満	0.14
味	ナトリウム及びその化合物		21.6	39	13
味	塩化物イオン		22	20未満	10
	カルシウム、マグネシウム等 (硬度)		66.2	77	19、8.6 (かりム5.0)
	蒸発残留物		162	270	

ピンク色/青色塗り：走行性に関連する物質(推定)。

黄色塗り：水道水に多く含まれる。導電性の高い電解質。

赤文字：生息地の水で顕著に多く含まれる。

*1：化学肥料や畜産堆肥物が流れ込んだ湧水などで数値が高い。

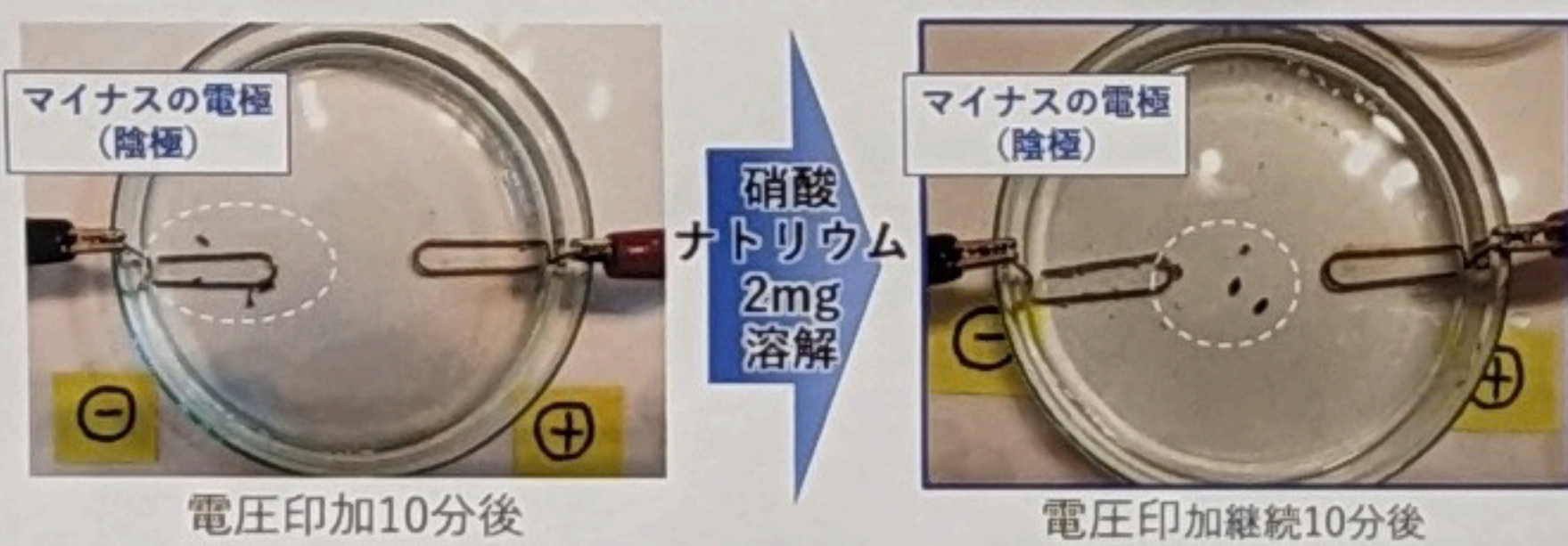


図1 電場中の硝酸ナトリウム溶解前後の江津湖の水を泳動するプラナリアの様子

実験1：走行性とイオン物質の関係

江津湖の水、水道水には有機物、無機物、蒸留残留物など不純物が溶解していることから、走行性に関与する物質の特定には困難と考える。

そこで、「純水」を用いて関連する物質を溶解し、走行性を探ることで特定できないか試みる。実験には、水質調査で含有量に有意差のあった物質として、塩化ナトリウム、硝酸ナトリウムを用いて行う。

今年度は、熱帯魚の店舗からプラナリアを譲り受け、検体に加える。熱帯魚の店舗譲渡のプラナリアは、江津湖捕獲のプラナリア(=在来種「ナミウズムシ」)が1cm未満の大きさに対し、2cm程度と大きく、頭部の「耳葉」の形状から、熱帯魚の水槽で見つかる北米原産の外来種「アメリカツノウズムシ」であることがわかった(図2)。

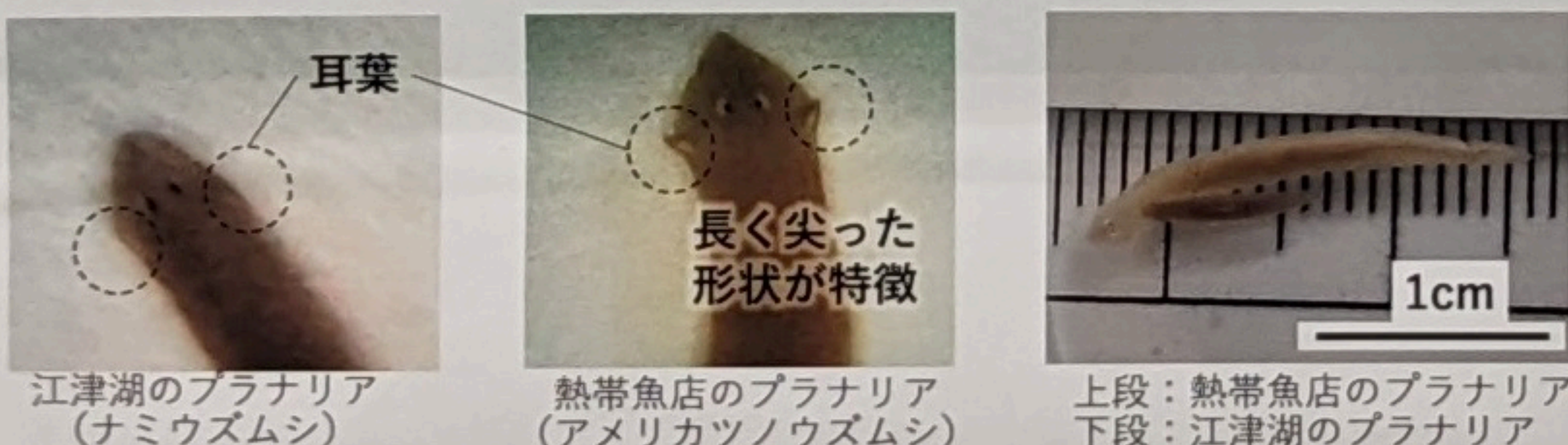


図2 実験に使用するプラナリア

(1)実験方法

・実験装置・材料：シャーレ(内径92mm)、電源装置、導線、炭素棒(φ3mm)、塩化ナトリウム(化学実験用)、硝酸ナトリウム、pH紙(5.5～9.0検出用)、純水(高純度精製水[JIS種別A3相当])

・方法

純水に、表1の川西市の水道水および江津湖の水の硝酸態窒素・亜硝酸態窒素、ナトリウム、塩化物イオンに相当する量を溶解し、水溶液を作成する(表2)。

シャーレには炭素棒を電極として配置し、電源装置にて3Vの電圧を印加する。印加後20分経過までシャーレ内のプラナリアの泳動の様子を観察する。途中、10分置きに水溶液の状態をpH紙で確認する。また、印加10分後に、電極を切り替え、極性を反転させて、負の走行性に対する再現性を確認する。これを熱帯魚店と江津湖のプラナリアでそれぞれ実験する。

表2 純水と塩化ナトリウム及び硝酸ナトリウムの配合量

	ナトリウム・塩化物イオンの含有量	硝酸態窒素・亜硝酸態窒素の含有量	水溶液の含有量			
			純水[ml]	塩化ナトリウム[mg]	硝酸ナトリウム[mg]	pH
実験1-a	江津湖の水		50	1.15		5.5
実験1-b	川西市の水道水		50	2.18		-
実験1-c	江津湖の水		50		0.03	-
実験1-d	江津湖の水		50		0.185	6.0
実験1-e	江津湖の水		50	2.18	1.15	5.5

(2)実験結果

電圧印加後、5分毎の電極に対する走性を水溶液別に表3～表7、図3～図7に示す。江津湖の水含有のナトリウム、塩化物イオン、硝酸態窒素模擬を想定した水溶液では、熱帯魚店のプラナリアに負の走行性らしき傾向がみられた。但し、極性反転前後でその傾向に再現性はなく、負の走行性はないと考える(表3、表6、表7)。江津湖のプラナリアでは通電経過5分以降でその傾向すらみられず、負の走行性はないと判断する。電極付近のpH値に変化はなく、イオンの濃度勾配による影響はなかった。

表3 実験1-a：江津湖の水含有のナトリウム・塩化物イオンを想定した溶液(予想:負の走行性)

時間経過[分]	走性の方向(+/+)	熱帯魚店		走性の方向(+/+)	江津湖	
		マイナス電極	プラス電極		マイナス電極	プラス電極
5	-	6.0	6.5	-	6.0	6.0
10	-	6.0	6.0	-	6.0	6.5
15	-	5.5	6.0	-	5.5	6.0
20	-	5.5	6.0	-	5.5	6.0

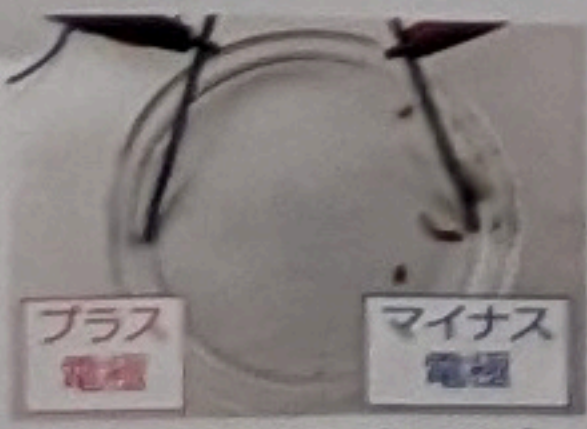


図3 熱帯魚店のプラナリア 20分後の様子

表4 実験1-b：川西市の水道水含有のナトリウム・塩化物イオンを想定した溶液(予想:自由に泳動)

時間経過[分]	走性の方向(+/+)	熱帯魚店		走性の方向(+/+)	江津湖	
		マイナス電極	プラス電極		マイナス電極	プラス電極
5	-	6.0	6.5	-	6.5	6.0
10	-	6.0	6.5	-	6.5	6.0
15	-	6.0	6.0	-	6.0	6.5
20	-	6.0	6.0	-	6.0	6.5

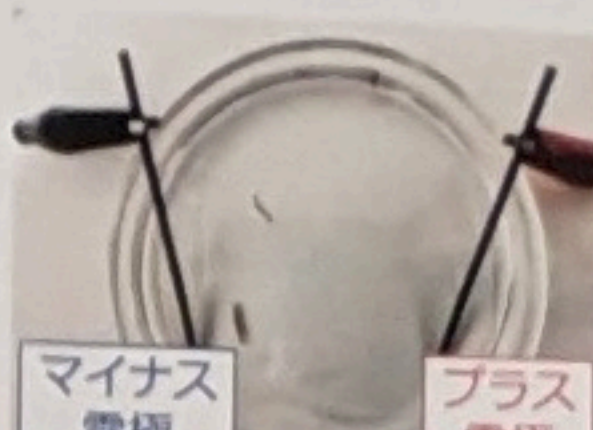


図4 熱帯魚店のプラナリア 10分後の様子

表5 実験1-c：川西市の水道水含有の硝酸態窒素の模擬状態を想定した溶液(予想:自由に泳動)

時間経過[分]	走性の方向(+/+)	熱帯魚店		走性の方向(+/+)	江津湖	
		マイナス電極	プラス電極		マイナス電極	プラス電極
5	-	6.0	6.5	-	6.0	6.5
10	-	5.5	6.0	-	未取得	未取得
15	-	5.5	6.0	-	未取得	未取得
20	-	5.5	6.0	-	5.5	6.0

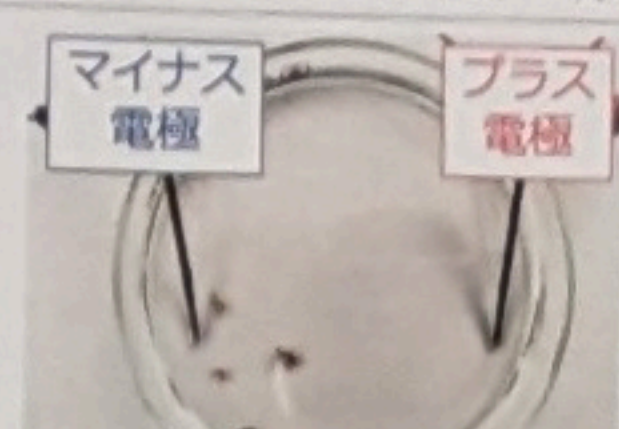


図5 江津湖のプラナリア 5分後の様子

表6 実験1-d：江津湖の水含有の硝酸態窒素の模擬状態を想定した溶液(予想:負の走行性)

時間経過[分]	走性の方向(+/+)	熱帯魚店		走性の方向(+/+)	江津湖	
		マイナス電極	プラス電極		マイナス電極	プラス電極
5	-	6.0	6.5	-	6.0	6.5
10	-	6.0	6.5	-	6.0	6.5
15	-	6.0	6.5	-	6.0	6.5
20	-	6.0	6.5	-	6.0	6.5

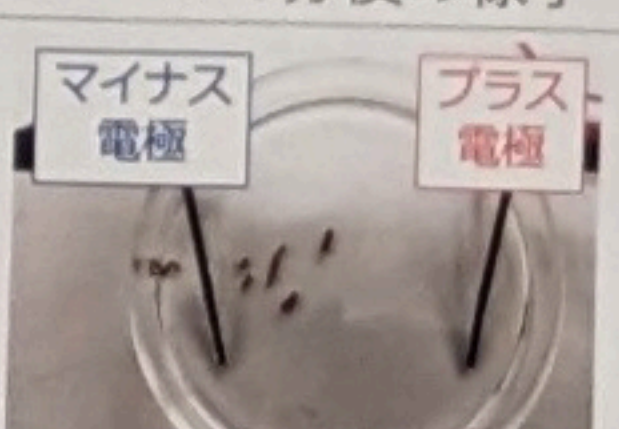


図6 熱帯魚店のプラナリア 10分後の様子

表7 実験1-e：川西市の水道水を想定した溶液に江津湖の水の硝酸態窒素の模擬水を混合液(予想:負の走行性)

時間経過[分]	走性の方向(+/+)	熱帯魚店		走性の方向(+/+)	江津湖	
		マイナス電極	プラス電極		マイナス電極	プラス電極
5	-	6.0	6.5	-	6.0	6.5
10	-	6.0	6.5	-	6.0	6.5
15	-	6.0	6.5	-	6.0	6.5
20	-	6.0	6.5	-	6.0	6.5

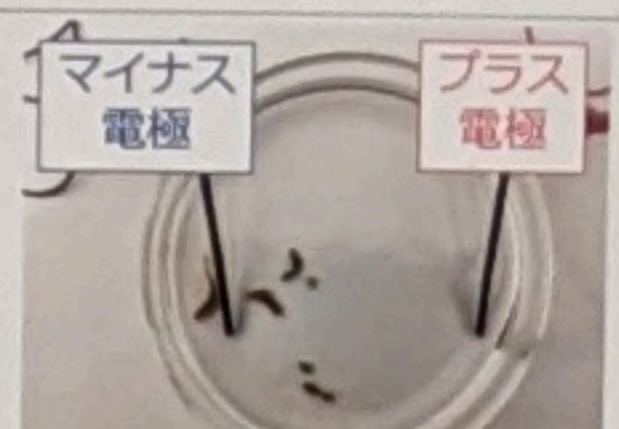


図7 熱帯魚店のプラナリア 10分後の様子

[表の説明]

走性の方向：- … マイナス電極へ移動、+ … プラス電極へ移動
(空白) … 自由に泳動

(3)考察

ナトリウムイオン、塩化物イオン、硝酸イオンだけで負の走行性は発動しないと考える。江津湖の水、生活用水には他に有機物、その他の電解質、大腸菌など溶解しており、それらが影響していると言える。本実験で純水にナトリウム、硝酸塩を溶解した水溶液で塩水による弱体化が一部のプラナリアでみられており、それら関与の裏付けと言える。

また、電気分解による電極付近では水素イオンやナトリウムイオンなど時間経過によるイオンの濃度勾配も影響に考慮すべきと考える。

実験2：走行性の定量化(可視化)

電気刺激における負の走行性は、電極とプラナリアが写る定点画像からマイナス電極とプラナリアの距離を経過時間ごとに数値化し、結論を導いた。但し、その距離はプラナリアの個体差によるばらつきがあり、断片的な数値であることから、更なる定性性が求められる。

そこで、生物学の研究分野では昔から広く使用されている画像処理ソフト「ImageJ」(オープンソース)が活用できないか検討する。溶液を泳動するプラナリアの動画から、画像解析によりその軌道を描くことで走行性を追うことができないか、試す。

(1)実験方法

- ImageJのプラグインから、WEBカメラ(図8)のキャプチャの機能を追加し、プラナリアの動画をWEBカメラで撮影し、連続画像としてTIFF形式で保存する(図9)。
- 保存したファイルを開き、プラナリアを追跡するための画像加工を行う(図10)。
- 解析処理を実行し、動画の撮影間隔ごとにデータ処理され、X、Y方向の追跡データが算出される(図11)。
- データファイル(csv形式)を表計算ソフトExcelで開き、散布図で表す。



図8 WEBカメラ

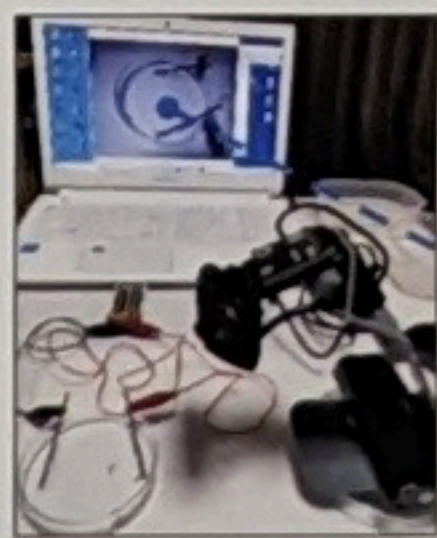


図9 動画撮影の風景、WEBカメラ起動画面



撮影画像

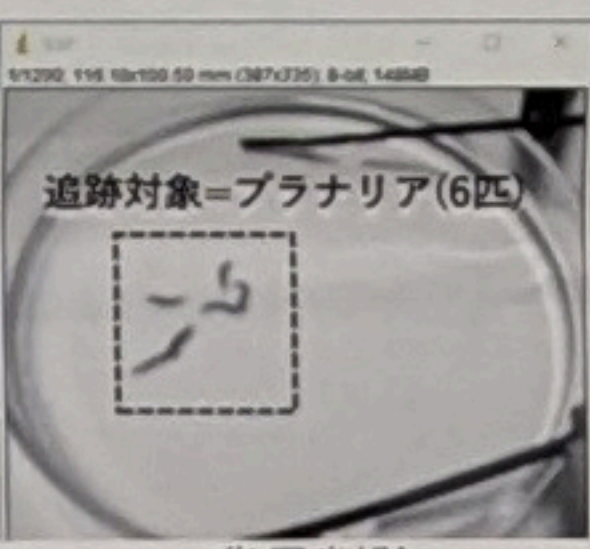
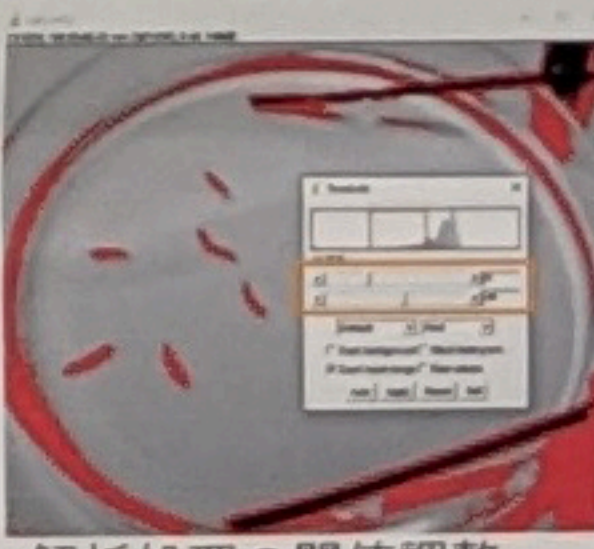
背景削除
(追跡領域の設定)解析処理の閾値調整
(追跡対象(赤)の絞り込み)

図10 プラナリアを追跡するための画像加工処理

	A	B	x座標	D	E	y座標
1	Label	Area	1Xm			1Ym
2	1 2bit1	0.031	85.221			2.031
3	2 2bit1	4.711	43.065			14.263
4	3 2bit1	20.558	39.906			17.221
5	4 2bit1	12.26	32.419			21.143
6	5 2bit1	0.031	85.397			0.618

図11 画像解析処理後の追跡データ(プラナリアの位置座標)

(2)実験結果

3Vの電場刺激を江津湖のプラナリア個体6匹に10分間与え、0.5秒間隔で撮影し、画像解析をおこなった。追跡データのx座標、y座標を用い、散布図を図12に示す。画像処理前のプラナリアの位置と照合し、プラナリアの泳動する軌道が描画できたと言える。

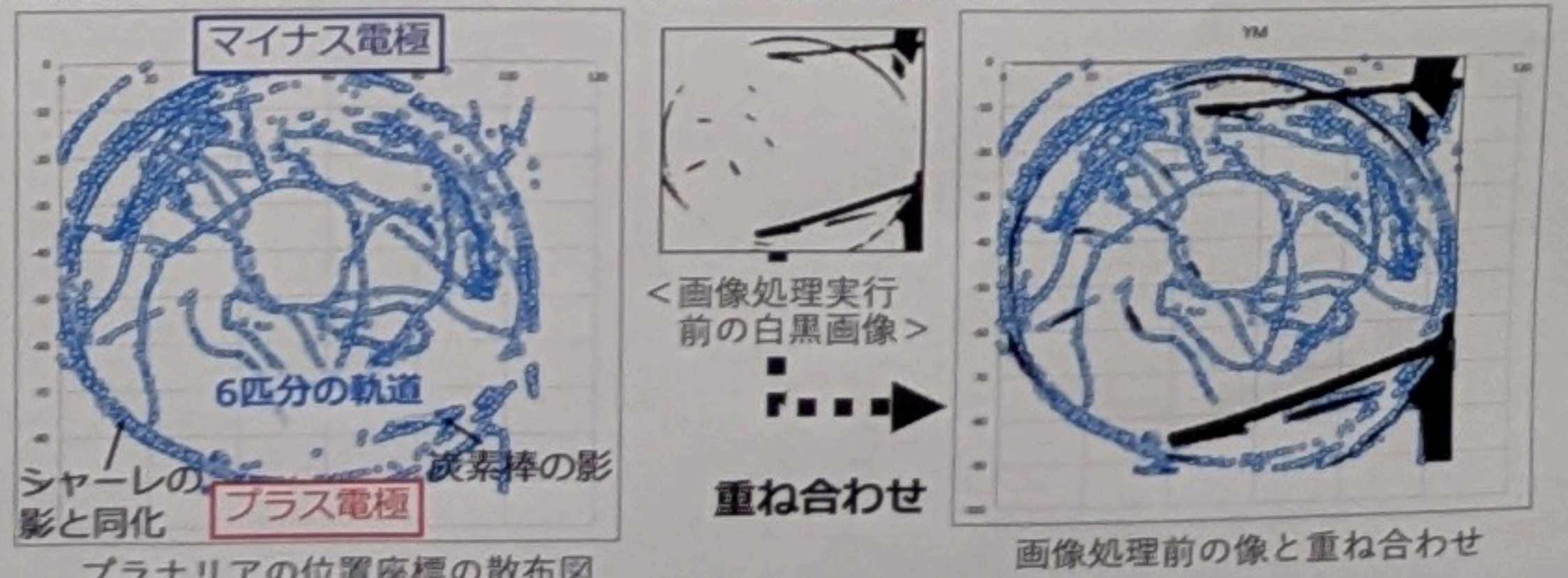


図12 プラナリアの泳動する軌道

(3)考察・所感

実験には川西市の水道水を使用し、負の走行性のないことをその軌道から読み取ることは難しい(マイナス電極直前で分散していると感じた)。プラナリアの泳動が、動画撮影時の反射による影やシャーレの側壁と重なり、画像処理時に同化し、軌道が読み取れなかった(図10 右図の赤色領域)。今後、撮影環境の工夫を検討していく。

まとめと今後

- 塩化ナトリウム・硝酸ナトリウムの電解質は負の走行性に影響しなかった。江津湖の湖水、水道水の不純物が複雑に走性に影響していると考えられる。熱帯魚店のプラナリアを検体に用い、江津湖の水、合志市の水道水で負の走行性を検証し、再考する。
- 画像解析ソフト「ImageJ」を用い、プラナリアの泳動する軌道の描画に成功した。但し、動画撮影時に映りこむ影と軌道の同化など実験環境に課題がある。走性には光も影響することから、実験器具や撮影環境の工夫を今後検討する。