



迅速なプラナリアの核相判定法の開発

東京都立小石川中等教育学校 5年

1. 要点

プラナリアの核相判定に要する日数を1日短縮した

2. 初めに

・研究の動機

保有個体の核相を調べる最適な方法を模索す

・プラナリア

非常に高い再生力を持つ。今回使用したのはアメリカナミウズムシである。



・プラナリアの核相

プラナリアには二倍体と三倍体が存在し、二倍体なら 16、三倍体なら 24 本の染色体が見られる。

3. 実験方法

分裂期にあり、細胞膜が割れて 24 本の染色体を数えられる細胞が観察出来れば成功である。

空気乾燥法（予備実験 1）

- ① プラナリアの断片を低張液 [0.35% KCl 40 μg/ml コルヒチン] 1ml につけ、15°C で 1h 反応させた。
- ② 低張液を新しく変え、26°C で 30 分反応させた。
- ③ 前固定液 [MetOH:CH₃COOH:H₂O=3:3:4] 1.0ml に変え、26°C で 30 分反応させた。
- ④ 後固定液 [MetOH:CH₃COOH=1:1] 1.0ml に変え、3 h 反応させた。
- ⑤ 固定液を 0.5ml 除去し、強度を様々に変えてピペッティングを行い、細胞を解離した。
- ⑥ スライドガラスに高い位置から滴下し、酢酸でカバー後、1 日風乾し、ギムザ染色液で染色した。

トリプシン法（予備実験 2）

- ① プラナリアの断片をトリプシン 2.5g/L EDTA 1mmol/L 1ml につけ、37°C で 20 分反応させた。
- ② ボルテックスで 5 分間攪拌し、約 6000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄みを半分除いた。
- ③ 再び攪拌し、スライドガラスに滴下、染色した。

トリプシン改善法 1

トリプシン法の③における、滴下の位置を高くした。

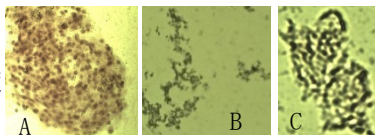
トリプシン改善法 2

トリプシン法の工程①・②を行った後に、空気乾燥法の②～④を、反応時間 1/3 で行った。また、対照実験として通常の空気乾燥法も再度行った。

4. 結果

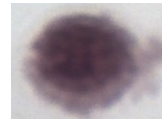
空気乾燥法

※ピペッティングの強度は A<C<B であった。



	A	B	C
成否判定	失敗	失敗	成功
細胞数	多い	少ない	多い
解離の度合	不足	過剰	適度
状態の良い細胞	2個	1個	多数

トリプシン法



> 解離は十分で細胞の数も多い。

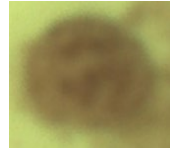
> 細胞膜が割れていない。

⇒ 失敗。ただし待ち時間は短縮された。

改善法 1

> 細胞膜は割れなかった。

> トリプシンだけでは細胞膜が割れないため、追加の薬品処理が必要だと考えた。



改善法 2

> 通常の空気乾燥法は成功した。

> 改善法も通常の方法と同じく成功し、状態の良い細胞を多く得ることができた。

> 空気乾燥法と同等の結果を、作業時間を 3 時間短縮して得ることができた。



5. 考察

空気乾燥法では、ピペッティングの強度によって結果が変わり、適切な強度で行うことが重要だと考えた。また、①～④の処理時間が長かった。そのため、この工程に要する時間の短縮を試みた。通常のトリプシン法では細胞膜を割ることができなかつたため、細胞を滴下する高さを変えた(改善法 1)。しかし結果は変わらなかつたので、細胞膜を割る処理が必要だと考え、改善法 2 を試した。その結果、3 時間の時間短縮に成功した。

6. 今後の展望

1. 改善法で二倍体を見つける。
2. 改善法で所要時間がどこまで短縮できるか調べる。

7. 参考文献

- ・ 宮崎武史『プラナリアって何だろう?』幻冬舎ルネッサンス (2012 年)
- ・ 高星和浩『プラナリアの分裂と再生の関係』つくば生物ジャーナル (2012 年)

8. 謝辞

英国のカーディフ大学の教授方、慶應義塾大学・松本緑先生、錦木百氏、学習院大学・井上武先生にご指導及びプラナリアを譲渡して頂きました。本当にありがとうございました。