

ゼブラフィッシュから見える世界

飯田朋華 片岡礼 川口よしの

要旨

ゼブラフィッシュの色覚について調べるために、ゼブラフィッシュの成魚に対して、エサによる報酬や電気ショックによる罰を色の識別と関連付ける行動実験を行った。その結果、ゼブラフィッシュは赤色と青色が識別できるうえ、ピンクや紫も赤と識別できることが分かった。

1. はじめに

色覚とは、光の波長の違いを識別する感覚である。色覚が優れているとは、より多くの色を識別できるということである。感じる波長域の異なる光センサーを眼の中に何種類持っているか、そしてそれらの感受波長域の重なりがどれくらいかで色覚は大体決まる。色覚用の光センサー(錐体オプシン)はヒトの場合3種類で、それぞれいわゆる赤の領域、緑の領域、青の領域の波長を分担している。ヒトの見ることのできる色の数は実はかなりの制約を受けている(河村, 2009)。ゼブラフィッシュ *Danio rerio* は4種類の視物質(赤, 青, 緑, 紫外線)を持つと分かっている。さらに細かく分類すると、緑タイプオプシン RH2の中には4つのサブタイプが存在し、赤-緑タイプオプシン M/LWS は2つのサブタイプが存在するため、8種類の視物質を持っている(河村, 2012)。このように、視物質の種類がゼブラフィッシュではヒトより多いので、ヒトと同等以上の色覚をゼブラフィッシュは持つのではないかと考えられる。

このことを前提として、本研究ではゼブラフィッシュの色の識別の能力がどれくらいあるかについて調べた。

2. 研究試料

本研究で用いたゼブラフィッシュ(図1)は、もともと学校で飼育していたものと、新たに購入したもの、計20匹を使用した。メスとオスが混在しており、そ

れらを区別することは難しかった。オスとメスで色覚には違いがあるかもしれないが、そのため本研究では、メスとオスの割合は調整しなかった。飼育方法は、 $24.5 \times 16.5 \times 16$ cm の水槽を2つ用意し、それぞれにゼブラフィッシュ10匹とフィルターを1つずつ入れた。エサはフレーク状のものを使用した。

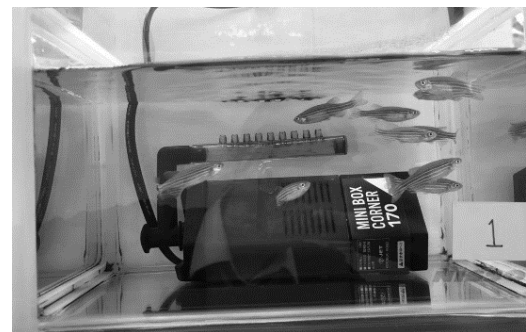


図1. ゼブラフィッシュの飼育の様子

3. 実験1

3-1. 研究方法

ゼブラフィッシュは色を識別できるのか、また色を学習する能力があるかどうかを調べた。ここでは、赤と青を認識、区別させた。赤と青は色を数値化するために Color Picker(yuki tanabe)というアプリケーションを使用した。

赤では、水槽の側面の1つに赤(赤 255, 青0, 緑0)を表示した iPad を設置した。赤を表示した iPad を置いた側面から7cmのところ、エサが流れないようにガラス製のしきりを入れ、iPadの画面に赤色が表示されている間にエサを与えた。エサ

は平日の朝と昼に与えた。青では、赤と同様に水槽の側面の1つに青(赤0, 青 255, 緑0)を表示した iPad を設置した。赤の時と同様にしきりを用いた。青の iPad を設置した側に直流電源装置に繋いだ炭素棒を入れ、10 ボルトで5秒間電流を流した。条件を揃えるために、赤の実験でも炭素棒を入れた。ただし、電流は流さなかった。

以上の実験を約6週間反復して行ったのち、ゼブラフィッシュがどの程度赤と青を区別できるかを調べるために次のように測定を行った。水槽の側面の1つに赤を表示した iPad を置き、5秒表示した。赤を表示してから1秒後、3秒後、5秒後、に赤を表示した側面から7cm以内(範囲A)にいるゼブラフィッシュの数を計数した。青の場合も同様に実験を行った。

3-2. 結果

赤と青をそれぞれ3回ずつ2つの水槽で測定し、水槽ごとに平均値を算出した。結果を図2と図3に示した。

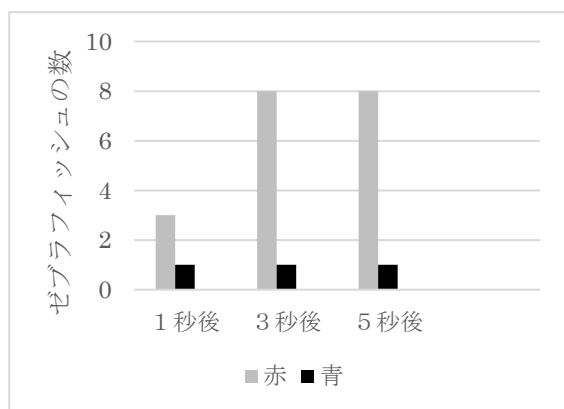


図2. 水槽①におけるゼブラフィッシュの赤と青の認識実験の結果

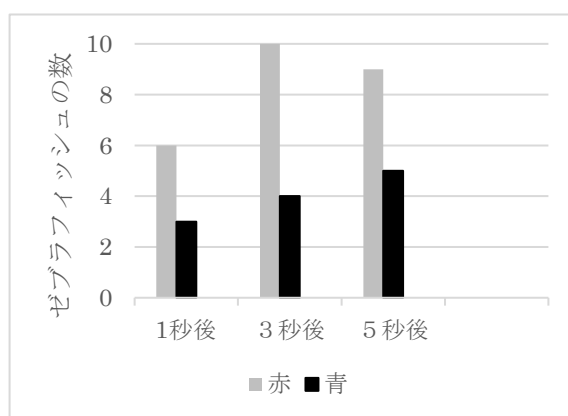


図3. 水槽②におけるゼブラフィッシュの赤と青の認識実験の結果

実験時に見られたゼブラフィッシュの様子として、水槽①②ともに共通して、iPad の画面に赤を表示したときは iPad に近寄っていき、青を表示したときは iPad から遠ざかろうとする傾向が見られた。また、赤を表示したときは、1秒後よりも3秒後、5秒後の方が iPad に近寄っていくゼブラフィッシュの数が多かった、

3-3. 考察

水槽①(図1)、水槽②(図2)の結果から、ゼブラフィッシュは赤と青を区別していることが分かった。また、赤に寄るとエサがもらえ、青に寄ると電気ショックが与えられると認識していると考えられる。特に、赤を表示した直後よりも、3秒後や5秒後の方が iPad に近寄っていくゼブラフィッシュの数が多かったため、ゼブラフィッシュは赤をはっきり認識していると考えられる。

実験1の結果から、ゼブラフィッシュは赤と青を区別できると分かったため、次に、表示する色を赤から青に徐々に近づけ、どの段階でゼブラフィッシュが赤または青と判断しなくなるのか調べた。

4. 実験2

4-1. 研究方法

実験1のときと同様に、赤(赤 255, 青0, 緑0)で1日2回エサを与え、青(赤0, 青 255, 緑0)で1週間に1回電気ショックを与え続けた。表示する赤を青に近づけるために、ピンク(赤 255, 青 255, 緑0)と紫(赤 128, 青 255, 緑0)を用意した。実験1と同じように、ピンクを表示した iPad を水槽の側面に置き、側面から7cm 以内にいるゼブラフィッシュの数を測定した。また、紫でも同様に測定した。

水槽内に発生した原因不明の病気により、水槽②のゼブラフィッシュの大半が死んでしまったため、ここからの実験は水槽①のみで行った。

4-2. 結果

ピンクと紫をそれぞれ1回ずつ測定し、グラフ化した。結果を図4に示した。

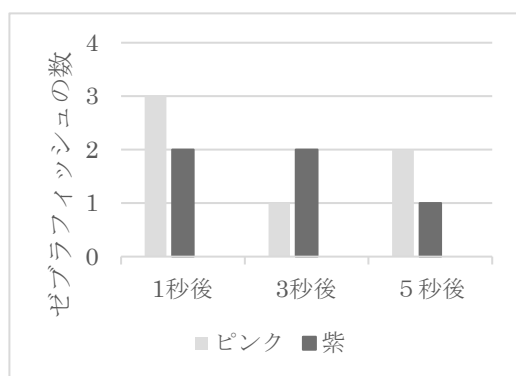


図4. 水槽①におけるゼブラフィッシュのピンクと紫の認識実験の結果

実験時に見られたゼブラフィッシュの様子として、iPad の画面に紫を表示したときに、iPad から遠ざかろうとする傾向がピンクを表示したときよりも強く見られた。

4-3. 考察

図4からピンクや紫を赤と区別していることが分かった。また、測定時のゼブラフィッシュの様子から、紫は青に近い色だとゼブラフィッシュは認識していると考えられる。そして、ピンクと紫の結果に差がみられるため、ピンクと紫も異なる色で、ピンクは赤により近い、あ

るいは青により遠い色であると認識していたと考えられる。

5. まとめと今後の課題

実験1と実験2から、ゼブラフィッシュは少なくとも人間と同じ程度に色を識別できるらしいことが分かった。また、赤と青という原色に近い波長の光が識別できるだけでなく、ピンクや紫といった色も赤と弁別できると分かった。また、赤が表示されるとエサがもらえ、青が表示されると電気ショックが与えられるとゼブラフィッシュは認識しているという学習能力も確認することができた。

ゼブラフィッシュは特に緑オプシンを多く持っているため(河村, 2009)、緑色を用いて同様の実験を進めることができれば、より細かな色の差に対する反応を調べられると考えられる。また、ゼブラフィッシュの持つ視物質はメダカ *Oryzias sp.* と比べて青オプシンが1種類少なく、緑オプシンが1種類多いため、メダカとゼブラフィッシュに青色と緑色を区別させ、認識度に違いが出るのかを調べるなどの展開も面白そうだ。

6. 謝辞

京都大学情報学研究科生体情報処理分野の前川真吾先生には実験の開始にあたり、ゼブラフィッシュの飼育方法やハンドリングの方法などについて、様々なアドバイスをいただきました。

7. 参考文献

- 河村正二, 2012, 視覚センサー遺伝子の適応と進化多様性 魚類から霊長類まで. 化学と生物, 50, 5, 325-336
- 河村正二, 2009, 錐体オプシン遺伝子と色覚の進化多様性: 魚類と霊長類に注目して. 比較生理生化学, 26, 3, 110-116

環境にやさしい洗剤づくり

～ サポニンを多く含む植物を用いて ～

岩井温子 内田冴香 梅谷結佳 前田悠花

要旨

本研究では、植物由来の環境にやさしい洗剤の効果と、一般的な洗剤と比較した洗浄力の強弱を調べるため、界面活性作用を示す配糖体であるサポニンを多量に含む植物を用いて抽出液を作成し、汚染布を洗浄した。その結果、ダイズとニンジンを組み合わせて作製した洗浄液が最も洗浄効果が高かったが、標準洗剤より洗浄力がある洗浄液はなく実用化は難しいと結論づけた。特に、事前調査から洗浄効果が高いと予想していたサイカチ(図2)の抽出液を含む洗浄液は再汚染の影響が大きく、洗剤としての利用はかなり厳しいと考えた。

1. はじめに

日本では明治以後の急速な産業革命や昭和30年代から始まった高度経済成長において、工業化及び都市化が進行したことに伴い、大都市を中心に水質汚濁が問題となった。近年では様々な対策が取られるようになったがまだ十分ではない。そこで我々は水質汚濁原因の一つである洗剤に焦点を当てた。天然由来の洗剤はすでに市販されているが、植物由来の環境にやさしい洗剤を作成しその効果を調べて市販の一般的な洗剤と比較することで、よりよい天然洗剤を作るヒントになるのではないかと考え研究を進めた。

個体差はあるが、多くの植物には洗浄作用を持つサポニン(図1)が含まれており、サイカチや大豆、枝豆、ゴボウ、ニンジンなどには特に多く含まれていることが分かっている。

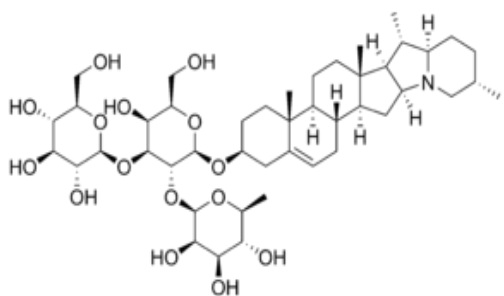


図1. サポニンの一つであるソラニン

図1のようにサポニンは分子内に親水基と疎水基を持つため界面活性作用を示す。

そこで予備実験として、大豆を一日水に浸けて取り出した抽出液で、醤油、朱肉、墨汁などで汚した布をもみ洗いしたところ、確かに洗浄効果がみられた。

予備実験の結果を受けて我々は、汚れの種類や洗浄方法を改善した上で大豆以外の植物でも同様の実験を行い、その効果について調べることにした。

2. 材料・研究方法

2-1. 洗浄実験①

2-1-1. 実験の材料

私たちは、洗浄液として平安時代から洗剤として使用されていたサイカチに加え、サポニンを多く含む乾燥大豆(ダイズ)、枝豆(ダイズ)、ニンジン、ゴボウを使用した。サイカチは、本校副校長である遠山先生にご提供頂いた。また、対照実験として合成洗剤(アリエールイオンパワージェルサイエンスプラス、以下洗剤と表記する)を使用した。さらに、布に付ける汚れとして、トマトピューレ、醤油、墨汁、朱肉を用いた。

洗浄対象として綿 100%, 7×7cmの木綿布を汚し

て用いた。

2-1-2. 研究方法

2-1-2-1. 抽出液の作成

- ①ニンジン、ゴボウを 1 cm 角に切り、枝豆は実を鞘から取り出し、サイカチはさを 2.5 cm に切った。
- ②ニンジン、ゴボウ、大豆、枝豆をそれぞれ 100 g、サイカチ 10 g を量り取り、ビーカーに純水 200 ml とともに入れた。
- ③一晩つけた。

2-1-2-2. 汚染布の作成

- ・シャーレにとった墨汁に、布を浸した。
- ・トマトピューレを茶こしでこし、液体のみをシャーレに入れて布を浸した。
- ・シャーレに入れた醤油に、布を浸した。
- ・布を朱肉に押し当てて、布全体が赤く染まるようにした。
- ・すべて広げた新聞紙の上に並べて乾かした。

2-1-2-3. 洗浄方法

50 ml コニカルチューブに抽出液 30 ml と汚染布を入れ、約 25 cm ストロークで 50 回振って洗浄した。

2-2. 洗浄実験②

2-2-1. 実験の材料

洗浄液として洗浄実験①で洗浄力が期待できる乾燥大豆、ニンジン、サイカチ、そして標準洗剤を使用した。また、布を汚す材料として、トマトピューレ、朱肉、インスタントコーヒー、オレイン酸とエタノールから作成した皮脂汚れを用いた。

2-2-2. 実験方法

2-2-2-1. 抽出液の作成

- ①ニンジンを 1 cm 角に切り、大豆は水につけて戻し、半分に切り、サイカチは 1 cm に切った。
- ②それぞれ 150 g 量り取り、ビーカーにぬるま湯 (40℃) 800 ml とともに入れた。
- ③一晩つけた。

2-2-2-2. 汚染布の作成 (図 3)

- ・トマトピューレを茶こしでこし、液体のみをシャー

レに入れ、布を浸した。

- ・布に朱肉を押し当てて、布全体が赤く染まるようにした。
- ・インスタントコーヒーをお湯 150 cc に葉ざじ山盛り 5 杯入れて溶かし、布を浸した。
- ・オレイン酸 15 ml、エタノール 15 ml を混合し、油性インク(青)を浸して着色した。

2-2-2-3. 洗浄方法

一人の人が目隠しをした状態で布の両端をつかみ、20 回もみ洗いしたら一度抽出液につけてつかむ辺を 45 度回して変え、20 回もみ洗いをし、再度抽出液につける、というのを 4 回繰り返した。三種の抽出液をそれぞれ組み合わせた洗浄液と、洗剤、純水の 9 通りで洗浄した。

3. 結果 (図 4)

結果の数値化には色彩色差 CR-400/410 (図 5) を、データの分析には $L^*a^*b^*$ 色空間 (図 6) と呼ばれる表色系を用いた。

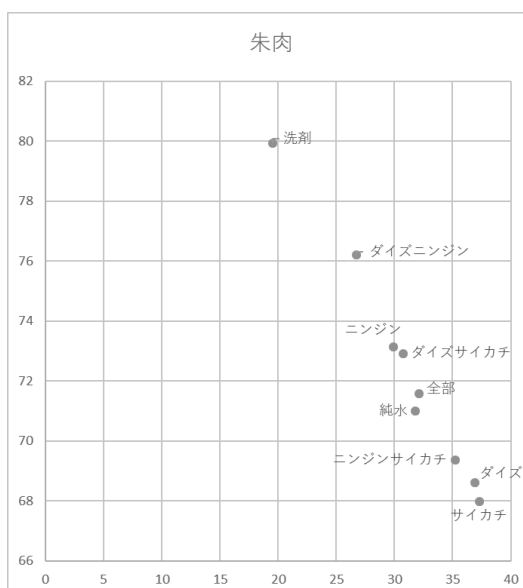
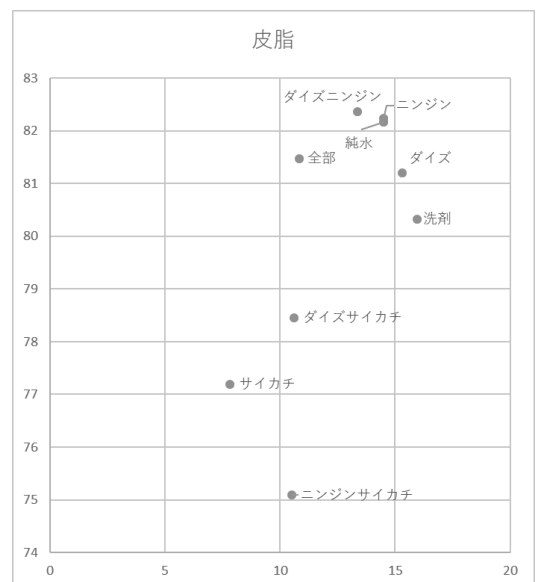
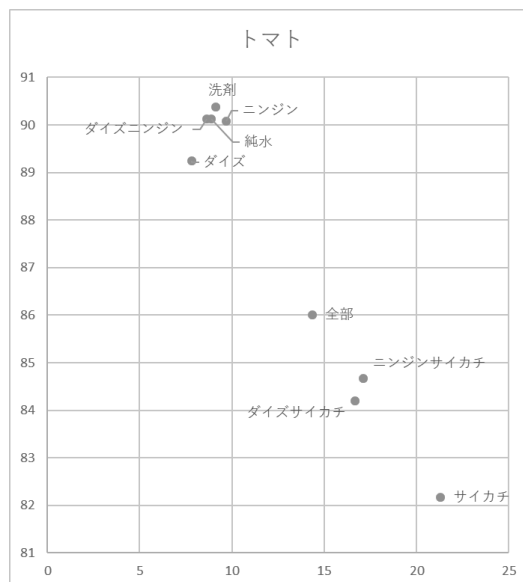
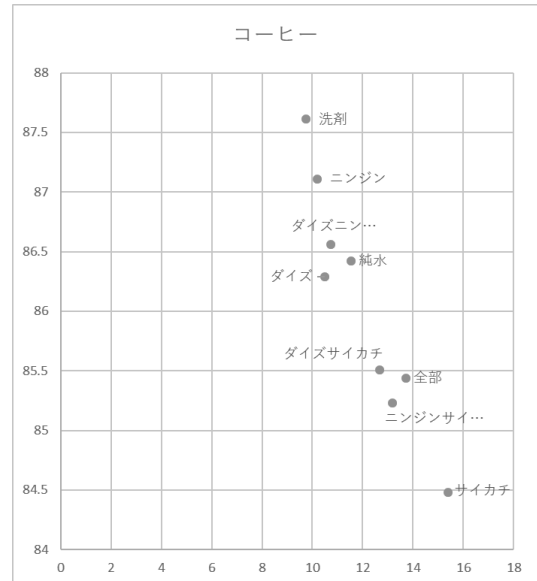
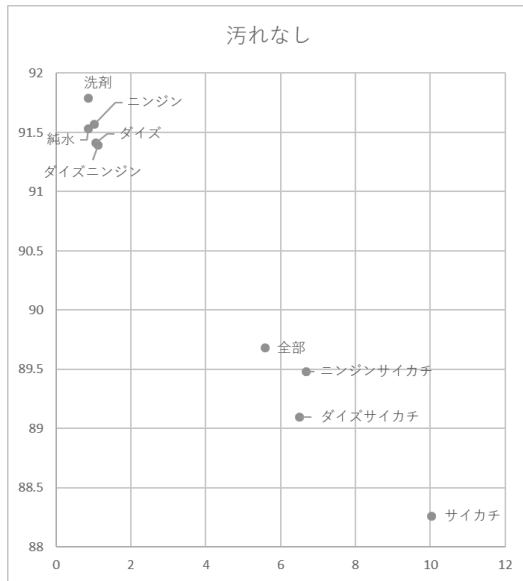
$L^*a^*b^*$ 色空間では、明度を L^* 、色相と彩度を示す色度を a^* 、 b^* で表す。図 6 は、 $L^*a^*b^*$ 色空間色度図である。図からわかるように、 a^* 、 b^* は、色の方向を示しており、 a^* は赤方向、 $-a^*$ は緑方向、そして b^* は黄方向、 $-b^*$ は青方向を示している。数値の絶対値が大きくなるにつれて鮮やかな色を示し、小さくなるに従ってくすんだ色を示す。彩度 C^* は a^* 、 b^* を用いて次の式で求められる。

$$(C^*) = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

(KONICA MINOLTA, 色色雑学より)

今回の研究ではデータの図式化のため、横軸を彩度 C^* 、縦軸を明度 L^* として (図 7) 散布図を作成した。点の位置は色調を示している。この散布図では、左上の点ほど明度が高く彩度が低い色を表しているため、左上の点が表す洗浄液ほど洗浄効果が高く、同様に右下の点が表す洗浄液ほど洗浄効果が低いと判断した。

結果は以下のようである。



4. 考察

サイカチを用いて作製した洗浄液(サイカチ、ダイズ+サイカチ、ニンジン+サイカチ)は、どの汚れにおいても洗浄効果が低かった。このことから、サイカチから抽出された色素が布を再汚染し、その影響はかなり大きかったと考えられる。サイカチは平安時代以降洗剤として利用されていたことがあったという記録(日本清浄文化史, 1971)があるため洗剤に特に適していると予想していたが、本実験の結果から考えると洗剤として利用することは難しいといえる。

皮脂において、サイカチを用いて作製した洗浄液の彩度が他と比較して低くなっているのは、皮脂汚れの青色とサイカチの茶色が打ち消しあったためと考える。

本研究では、洗剤と同等以上の洗浄力をもつ植物由来の環境にやさしい洗剤を作ることを目的としていたが、どの汚れにおいても洗剤の洗浄力は安定して高く、洗剤に勝る洗浄力を有する洗浄液はなかった。汚れなしにおいて、純水で洗浄した際より洗剤で洗浄した際の方が布の色の明度が高くなっていたのは、洗剤に蛍光増白剤が含まれているためと考えられる。

ダイズニンジンの洗浄液の洗浄効果は朱肉と皮脂に対して高かった。これはダイズニンジンに油汚れへの効果が高い構造をもつサポニンが含まれるためと予想する。

5. まとめと今後の課題

以上よりサイカチは洗剤の成分には不向きであり、ダイズニンジンが総合的に見て洗剤に一番向いている。しかし、どの抽出液も洗剤よりも洗浄力が劣る点、洗浄後ににおいが残る点から実用化するには厳しいといえる。

また、抽出方法について、今回の方法はサポニン以外の物質も抽出される上に十分な量のサポニンが抽出されたかが分からないので、サポニンのみを効果的に抽出する方法も再検討する余地がある。洗浄方法においても、今回は人による洗

浄が最適であると判断したが、力にむらが出てしまうので、より良い洗浄方法も再検討する必要がある。

今回の実験により野菜から抽出したサポニンだけでは洗浄力に限界があるとわかったため、洗浄力向上、においの除去を目的として、天然成分である重曹を加えるなどして天然成分のみで作られた洗剤の実用をめざして改良を進めていきたい。また、サポニンの中には脂溶性の汚れに効果が高いものと水溶性の汚れに効果が高いものがあったため、サポニンの構造を調べ構造による効果の違いを解明することでよりよい洗剤の作製につながると思う。

6. 謝辞

布の汚れを数値化するにあたって、京都府立大学の神代圭輔准教授および神代研究室の皆さんに色彩色差計を貸していただき、研究の考察について様々な助言を頂きました。本研究に携わってくださった皆様に多大なる感謝を申し上げます。

7. 参考文献

高橋兆子, 藤居眞理子, 2003, サイカチ、ムクロジ、灰汁の洗浄性と溶液物性, 東京家政大学紀要, 第 43 号, 3-4

花王石鹼株式会社, 1971, 日本清浄文化史, 164

株式会社だいずデイズ, サポニンが多く含まれる食品と大豆,
<https://daizu-days.com/dic/saponin2/>, 2018.4.26

KONICA MINOLTA, 色色雑学,
<https://www.konicaminolta.jp/instruments/knowledge/color/section2/02.html>, 2018.12.19

8. 添付資料



図2. サイカチ

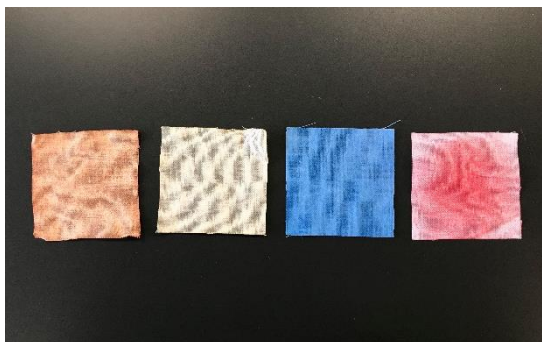


図3. 実験②の汚染布



図4. 実験②の結果



図5. 色彩色差計を用いた測定の様子

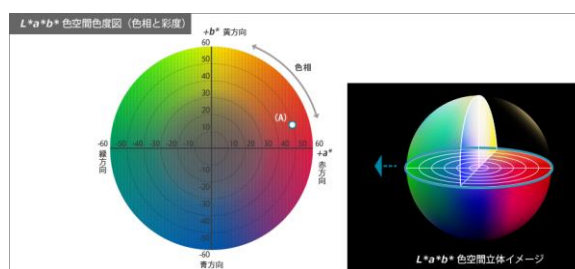


図6. $L^*a^*b^*$ 色空間色度図(色相と彩度)
(KONICA MINOLTA, 色色雑学より)

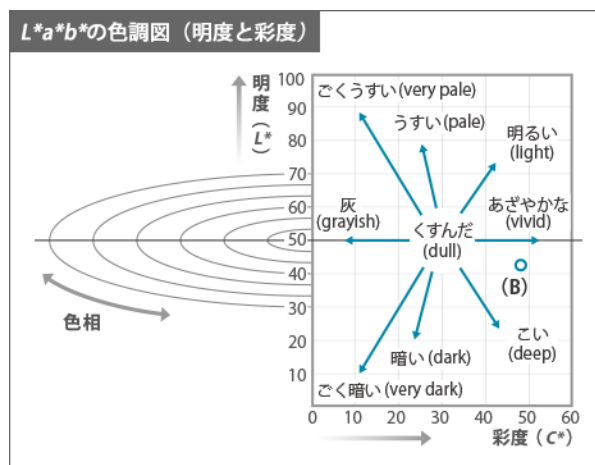


図7. $L^*a^*b^*$ 色調図(明度と彩度)
(KONICA MINOLTA, 色色雑学より)

刺身パックに秘められた工夫

桶谷剛汰 四方裕一朗 中江亮太 和谷悠矢

要旨

本研究では、刺身パックに入っているわさびや醤油、つま、しそなどは味を良くするためだけでなく、菌を殺したり、抑制したりする効果があると考えたのでそれを調べたいという動機のもとわさびや醤油の殺菌効果があるかやわさび醤油にわさびと醤油がそれぞれ持つ抗菌効果を合わせた相乗効果があるかどうかを目的として、わさび、醤油、わさび醤油を用いた大腸菌に対する殺菌効果、抗菌効果を調べた。結果として、わさびの殺菌効果、抗菌効果はともに見られ、醤油の抗菌効果は確認できたが、殺菌効果は見られなかった。わさび醤油の殺菌効果は見られたが、期待していたような相乗効果は見られなかった。抗菌効果は確認できた。

1. はじめに

刺身パックについてくるわさびや醤油、しそ、つまといったものは、味を整えるためだけではなく、菌の増殖を抑制する働きがあるのではないかとすることに注目して、わさび、醤油、そして相乗効果を期待したわさび醤油の殺菌効果、抗菌効果を実験で調べた。なぜ抑制効果があると考えたのかというところには殺菌効果があると聞いたことがあり、また刺身はしそやつまのうえに置かれていることが多く、しそやつまに効果があるからそういう配置ではないかと思ったからである。先行研究からわさびに含まれるアリルイソチオシアネートに殺菌効果、抗菌効果があることはもともとわかっており（日本食品分析センター、2010）、また一般的な醤油の塩分濃度は15%で大腸菌はほとんど死滅するので殺菌効果があることが分かっていた（芝崎勲、2004）。殺菌は病原性や有害性を有する細菌、ウイルスを死滅させる操作のことで抗菌は細菌やウイルスの増殖を抑制する操作のことを指す。このことからわさびと醤油のもつ効果を合わせたわさび醤油はより高い殺菌効果をもつのではないかと考え、それを確かめるためにまず殺菌効果を調べる実験

を行い、また補足的に抗菌実験も行った。

2. 材料・研究方法

2-1. 研究試料

本研究で用いた醤油、わさびは市販品（キッコーマン醤油株式会社、ねりわさび（ハウス食品））を用いた。大腸菌はJM109株、培地にはLB培地（液体、寒天）を用いた。

2-2. 研究方法

殺菌効果を調べる実験では、事前に起こした大腸菌を100 μ Lずつ5mLの液体培地8本に加えて37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターで1日培養した。その後わさび1g、醤油0.1mL、わさび醤油（わさび1gと醤油0.1mLを混ぜたもの）、水0.1mLを2本ずつそれぞれの液体培地に加えて、3日間培養した。その後、それぞれから50 μ Lずつを寒天培地の上に広げて培養し、大腸菌の増殖数を調べた。抗菌効果を調べる実験では、殺菌効果の実験と同様十分培養した大腸菌100 μ Lを寒天培地に塗り広げ、その上にわさび1g、醤油50 μ L、わさび醤油（わさび1gと醤油50 μ L）、水50 μ Lを、間隔をあけて滴下して、大腸菌の生育を観察した。マグロ2切れ

を4つのシャーレに置いて、何も加えなかったもの、わさび 3g, 醤油 60mL, 二つを加えたものの4つに分けた。4日間後に醤油を抜いて、菌の繁殖率を観察した。

3. 結果

まず殺菌効果の実験では、図1よりわさび、わさび醤油において大腸菌が一部死滅していることが確認された。水、醤油においては菌の死滅は確認されなかった。その一方で水、醤油に比べてわさびとわさび醤油で大腸菌が少なかったので一部が死滅していたと考えられる。抗菌効果の実験では図2よりわさび、醤油、わさび醤油のまわりで菌の増殖が抑制されていることが確認された。水のまわりで菌の増殖の抑制は見られず、わさび、醤油、わさび醤油に抗菌作用があると考えられた。

マグロ漬けの実験では、わさび、醤油、わさび醤油いずれでも菌の増殖が抑制されていた。また、わさび醤油は醤油、わさびを加えたものよりも増殖率は低かった。

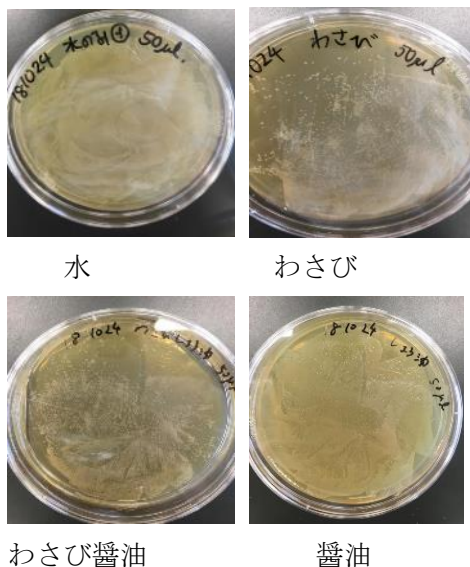


図1：殺菌実験の結果



図2：抗菌実験の結果

4. 考察

わさびにはアリルイソチオシアネートが含まれており、殺菌効果はある。また、醤油の塩分濃度により大腸菌はほとんど死滅するとわかっていた。しかし、殺菌実験の結果からわさびの殺菌効果は観察できたが、醤油の殺菌効果、わさびと醤油の相乗効果は確認できなかった。その理由としてはそもそもわさびと醤油の間で殺菌効果を向上させるような反応は起きないかもしくは今回の実験では大腸菌のみに対する効果だったのでそれ以外の菌に対する効果はわからなかった、醤油の抗菌作用は液体培地に入れたことで塩分濃度が薄まり、効果がなくなったのではないかとことが挙げられる。まぐろ漬けの実験より、わさびや醤油、わさび醤油の大腸菌以外に対する殺菌効果は確認できたが、目視ではどれに一番効果があったかなどの比較ができなかったので、数値化できないというところに問題点があった。

5. まとめと今後の課題

わさびや醤油の濃度がだまかで正確な数値が取れなかった。また殺菌効果の実験で菌がどれだけ死滅したのかを目視でしか数値化できなかったので、殺菌効果の実験を醤油の液体培地に入れた時点での塩分濃度を正確に測ると、大腸菌の数を調べるために液体培地の希釈をして寒天培地に移すという点を踏まえてもう一度行う。また、刺身パックに含まれているつまや、しその揮発性による効果についても追加の実験として行う。まぐろの腐る基準が曖昧であり、菌の増殖を確認しづらかった。腐る基準を明確にすることができれば単位面積あたりの腐食範囲を調べ、数値化して、

比較することができる.

6. 参考文献

- 雨宮一彦, 中村由紀, 新井由紀, 2008, 市販わさびの蒸散状態による抗菌作用, 国際学院埼玉短期大学研究紀要,
[https://ci. nii. ac. jp/els/contents110006992810. pdf?id=ART0008905018](https://ci.nii.ac.jp/els/contents110006992810.pdf?id=ART0008905018)
- 円谷悦造, 浅井美都, 辻畑茂朝, 塚本義則, 太田美智雄, 1998, 腸管出血性大腸 O157; H7 をはじめとする食中毒菌に対する食酢の抗菌作用(その 1) 静菌作用及び殺菌作用,
[http://journal. kansensho. or. jp/kansensho/backnumber/fulltext/71/443-450. pdf](http://journal.kansensho.or.jp/kansensho/backnumber/fulltext/71/443-450.pdf)
- 円谷悦造, 浅井美都, 辻畑茂朝, 塚本義則, 太田美智雄, 1998, 腸管出血性大腸 O157; H7 をはじめとする食中毒菌に対する食酢の抗菌作用(その 2) 殺菌作用に及ぼす塩化ナトリウムと温度の影響,
[https://www. jstage. jst. go. jp/article/kansenshogakuzasshi1970/71/5/71_5_451/_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kansenshogakuzasshi1970/71/5/71_5_451/_pdf/-char/ja)
- 日本食品分析センター, 2010, 植物の辛み成分について,
[http://www. jfrl. or. jp/jfrlnews/files/news_vol3_no21. pdf](http://www.jfrl.or.jp/jfrlnews/files/news_vol3_no21.pdf)
- 芝崎勲, 2004, 食品加工と微生物 その 24 食塩による微生物制御,
[http://www. asama-chemical. co. jp/PN/P102. PDF](http://www.asama-chemical.co.jp/PN/P102.PDF)

恐怖は伝染するか？

～ ゼブラフィッシュの警報物質を用いた研究 ～

生形綾音 棕橋直陽 櫻井太翔 平田艶羽

要旨

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) では視覚情報による恐怖の伝播が起こるのか明らかにするために実験を行った。ゼブラフィッシュを入れた 2 つの隣接した水槽を用意し、その片方に警報物質を投与して不安反応を誘発させ、他方の水槽内の個体の行動を観察し、投与前後の比較を行った。結果、不安反応である“潜行”や“フリージング”する時間の割合の増加が確認された。ゼブラフィッシュは恐怖にさらされた行動をとる他個体を視認すると類似の不安反応を起こす、すなわち恐怖の伝播が起こることが分かった。

1. はじめに

魚類には社会性があることが知られている。例として、メダカのメスは初めて見たオスよりも以前同じ水槽にいたことがあるオスをパートナーとして選ぶ傾向があることが報告されている (奥山ほか, 2014)。

また、ゼブラフィッシュは警報物質を持つことが分かっている。警報物質とは、多くの魚類 (特にコイ目などを含む骨鰐上目) の表皮中に含まれる物質で、捕食者による攻撃などで表皮細胞が壊れることで、水中に放出される匂い物質であると考えられている。警報物質は捕食者の存在を周囲の同種もしくは近縁種に示す。これを嗅覚で受容した個体は本能的な不安反応を発現する。多くの場合、でたらめな方向転換を急激に繰り返す (エラティックムーブメント)、水底を好んで泳ぐ (以下“潜行”と呼ぶ)、フリージング (水底付近で停止する行動)、密な群れを作る、などがある (吉田, 2011)。警報物質は極めて低濃度でもこれらの効果を示すため、水槽に投与することで容易に不安反応を発生させることができる。

そこで我々は、警報物質を用いてゼブラフィッシュの社会行動に関する研究を行うこととした。

警報物質を用いた先行研究で、隣接する水槽に恐怖にさらされていない複数の同種固体を視認できる状態だと、警報物質を投与されて引き起こされるゼブラフィッシュの不安反応が通常よりも短くなったことが報告されている。平静な仲間を視認することで、恐怖が薄らいだと推測されている (Faustino ほか, 2017)。

そこで、我々はこの先行研究とは反対に、「警報物質を投与されて不安反応を起こしている複数の同種個体を視認した隣接水槽のゼブラフィッシュは警報物質を直接受容しなくても不安反応を引き起こす」という仮説をたてて検証実験を行った。不安反応として、今回は特にフリージングと潜行の 2 つの行動を取り上げた。

2. 材料・研究方法

2-1. 警報物質の採取方法

- ① ゼブラフィッシュをビーカーに入れた氷水で麻酔した。
- ② シャーレ上に置き、メスで頭から尾に向かってなでるように鱗を削りとった。
- ③ 鱗は純水で流して乳鉢に入れた。水は 3 匹につき約 10mL 使用した。
- ④ 表皮細胞を破壊し内容物を出すため、乳棒で

鱗をすりつぶした。

⑤ うわづみをマイクロピペットで 0.5mL ずつ分けてマイクロチューブに入れ、冷凍保存した。

2-2. 実験方法

① 隣接する 2 つの水槽 A, B を用意し、ゼブラフィッシュを A には 1 匹, B には 2 匹入れた。

メスの場合、性周期によって反応に大きな差が出る恐れがあるため、実験に使うゼブラフィッシュは全てオスであるのが望ましい。そこで、少なくとも、水槽 A の個体にはオスを使用した。

② ゼブラフィッシュを移動後の水槽に慣れさせるために、15 分間静置した。この時から実験終了まで、ゼブラフィッシュが水槽から飛び出さないように、警報物質を入れるための穴があるプラスチック板で蓋をした。

③ 水槽 A を約 5 分間観察し、ビデオで録画をした。これを対照実験とした。

④ 水槽 B に警報物質 0.5mL 投与し、水槽 A の 1 匹を観察し、ビデオで録画した。録画時間はおよそ 10 分とした (表 1)。

⑤ ①～④を繰り返し 8 回行った。

⑥ 水槽 A に入れるゼブラフィッシュは観察ごとに異なる個体で行った。水槽 A に入れて実験した個体は実験終了後に取り出した水槽とは別の水槽に移し、他個体と混ざらないようにした。

⑦ 水槽の下層 (約 3/8 より下) を泳ぐ状態を潜行とみなし、1 秒以上の静止をフリージングとみなした。それぞれの状態にあった時間をストップウォッチで計測した。



図1. 隣接した二つの水槽 A(左)と B(右)

3. 結果

観察された水槽 A の潜行時間とフリージング時間の結果を表 1 と図 2 に示す。

表 1. 時間計測した結果

隣接した水槽 B への警報物質 (AS) 投与前 (上段) と後 (下段) で、それぞれ記録された水槽 A のゼブラフィッシュの行動観察時間と、そのうち潜行が観察された時間及びフリージングが観察された時間を示す。

結果	時間 (分:秒)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目
コントロール (AS投与前)	観察時間	5:00	5:00	5:00	5:00	5:00	5:00	5:00	5:00
	潜行時間	3:00	1:55	0:38	1:48	1:38	4:39	3:35	4:58
	フリージング	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:00	0:20
AS投与後	観察時間	10:19	9:15	10:34	14:18	11:39	11:56	10:58	12:55
	潜行時間	9:36	8:46	4:00	5:30	7:50	11:44	9:25	12:55
	フリージング	0:00	1:16	0:00	0:00	0:50	1:20	0:00	3:59

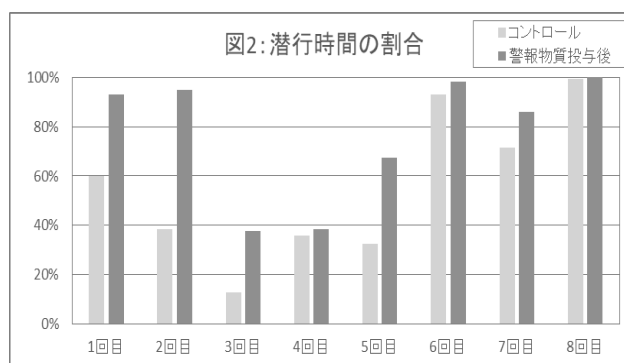


図 2. 潜行時間が観察時間に占める割合

縦軸は潜行時間の観察時間に占める割合 (%), 淡色のバーは警報物質投与前, 濃色のバーは警報物質投与後のデータである。

警報物質投与前では、隣に両水槽の個体がそれぞれ隣の水槽に近い側へ向かって活発に泳ぐ様子が観察された。この行動は2つの水槽を隣接させる前には観察されなかった。したがって、両水槽の個体は他水槽の個体を認識していたと考えられる。

警報物質投与後では、8回の実験の内4回で、水槽 A において、フリージングが観察された（表 1）が、投与前では8回目の実験で一度だけごく短時間起こったのみであった。

8回全ての実験で、フリージングは投与前にも投与後にも見られたが、観察時間に占める割合は、警報物質投与前よりも投与後の方がすべての観察で高くなっていた。（図 2）

また、個体によって示す恐怖反応や不安反応の種類や時間にかなりのばらつきが見られた。

4. 考察

8回すべての実験で潜行時間の増加が起きた。投与後にフリージングが見られた4回のうち3回では、投与前ではフリージングが見られなかった。投与前でもフリージングが観察された8回目の実験では、実験中に外部から音と視覚の刺激があったので、その刺激に対して個体が恐怖を感じたのではないかと考えられる。つまり警報物質投与前から恐怖を感じていたと考えられるが、それでも投与後にフリージングの割合は投与前の 7%から投与後の 31%に大きく増加した。

以上から、8回すべての実験で、水槽 A のゼブラフィッシュは他個体の警報物質に対する反応を見ただけで不安を感じたと考えられる。したがって、ゼブラフィッシュでは視覚情報のみから恐怖が伝播するという仮説が支持されたと考えられる。

本研究では、実験を長期間にわたって断続的に行った。それに伴い、気温などの実験環境が実験ごとに大きく変わってしまった。個体が実験に慣れることを恐れ、実験ごとに水槽 A の

個体を変えて行ったが、実験環境以外の条件をなるべく統一するためにも、複数の個体を用意して、短い間にそれぞれの個体に対して複数回実験を行ってみてもよかったかも知れない。それによって、実験ごとに変化する要素が少なくなり、それぞれの実験結果を比べることもできるだろうと考えられる。

5. まとめと今後の課題

ゼブラフィッシュは同種個体の不安反応という視覚情報を得た時にどのように反応するのかということを調べた。その結果、不安反応である「潜行」と「フリージング」の時間の割合がすべての実験で増加した。したがって、同種個体の不安反応を見たゼブラフィッシュは不安を感じるということが分かった。

また、水槽 A の個体の行動のばらつきには隣の水槽 B の個体の行動が影響していると考えられるため、水槽 A の個体の動きについて述べる上では、水槽 B の個体の行動を詳しく分析する必要があると考えられる。水槽 B と水槽 A の個体の行動に関係性を見出すことができれば、水槽 A の個体の不安反応が水槽 B の個体のどのような行動によって引き起こされたのか、つまり、ゼブラフィッシュが何に対して不安を感じるのか、より詳しく考察できると考えられる。

6. 謝辞

福井大学大学院医学部医学科教授の深澤有吾先生には考察の際に、丁寧なご指導をいただきました。深く御礼申し上げます。

広島大学大学院生物圏科学研究科准教授の吉田将之先生には、夏の暑さの中で実験がうまくいかなかった際に、実験を進めるための多くのご助言をいただきました。心より感謝いたします。

また京都大学大学院情報学研究科助教授の前川真吾先生には飼育施設を見学させていた

だき、ゼブラフィッシュの飼育について多大な助言を賜りましたことに感謝の意を表します。

7. 参考文献

Ana I. Faustino・André Tacão・Monteiro・Rui F. Oliveira, 2017.3.31, Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5374490/>

理化学研究所広報室, 2014.3.5, RIKEN

NEWS No.393, 理化学研究所, 46p.

Allan V. Kalueff・Michael Gebhardt・Adam Michael Stewart・Jonathan M. Cachat・Mallorie Brimmer・Jonathan S. Chawla・Cassandra Craddock・Evan J. Kyzar・Andrew Roth・Samuel Landsman・Samuel Landsman・Kyle Robinson・Erik Baatrup・Keith Tierney・Angela Shamchuk・William Norton・Noam Miller・Teresa Nicolson・Oliver Braubach・Charles P. Gilman・Julian Pittman・Denis B. Rosenberg・Robert Gerlai・David Echevarria・Elisabeth Lamb・Stephan C. F. Neuhauss・Wei Weng・Laure Bally-Cuif・Henning Schneider, 2013.3.10, Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3629777/>

奥山輝大, 竹内秀明, 2014, メダカを用いた分子遺伝学的手法による魚類「社会脳」の分子神経基盤の解明, https://www.researchgate.net/profile/Hideaki_Takeuchi/publication/285554246_Exploring_the_neural_geography_of_the_social_brain_using_medaka_fish/links/568c4ffc08aeb488ea2fd5

07/Exploring-the-neural-geography-of-the-social-brain-using-medaka-fish.pdf

吉田将之, 2011, 魚類における恐怖・不安行動その定量的観察,

https://www.jstage.jst.go.jp/article/hikakuseiriseika/28/4/28_4_317/_pdf-char/ja

尾崎まみこ, 村田芳博, 藍浩之, 定本久世, 吉村和也, 神崎亮平, 日本比較生理生化学会, 2015, 研究者が教える動物実験 3 行動. 共立出版, 134-138p.

広島大学大学院生物圏科学研究科 生物資源科学専攻, 2018.6.10, 「動物の心は, 脳のどのようなはたらきによって生じるのだろうか」, <https://sites.google.com/site/biopsychologylab/>

吉田将之, 2017, 魚だって考える. 築地書館, 208p.

未知なるトビケラシルクの性質に迫る

島田望未 土屋恵里 堀井彩名 松崎日南

要旨

本研究では鴨川に生息するヒゲナガカワトビケラを採取し、それらが分泌するトビケラシルクを用いて、熱・酸・塩基・塩水への耐性、トビケラシルクが接着し得る素材を調べ、その性質について考察した。また、トビケラの生態を知るために、トビケラが巣を作る過程を観察した。最後に、エネルギー分散型 X 線分析装置(EDS)を用いてトビケラシルクの接着面の元素組成を分析した。

1. はじめに

トビケラの幼虫は殆どが水生で細長いイモムシ状であるが、脚は発達しており、砂利等を利用し水中に巣を作るものが多い。幼虫の生息する水域は種によって異なるが、溪流やきれいな川が一般的である(竹門ら, 2014)。今回用いたヒゲナガカワトビケラ(*Stenopsyche marmorata*)の幼虫は、石に巣を固定し、その中で生活する造網型である。シルクを吐糸して巣網を張り、流れてくるプランクトン等の有機物栄養源を捕集している。トビケラシルクは粘着性の観点から、水中接着剤や医療用接着剤としての利用が期待されているが、研究が進んでいないのが現状である(新井ら, 2017)。

これらの研究を進める上で、トビケラシルクの性質の解明は必要不可欠である。本研究ではまず、予備実験として、トビケラシルクの熱への耐性を調べた。その結果、0℃～100℃の間では目に見える変化はなかった。そこで、トビケラシルクの酸・塩基への耐性、様々な素材への接着性、トビケラが巣を作る過程、トビケラシルクの接着面等の実験を行った。また、水中接着剤への利用を考え、トビケラシルクの塩水への耐性を調べるなど多角的な視点から実験を行った。本論文では、実験の結果からトビケラシルクの性質について考察した。

2. 材料・研究方法

本研究で用いたトビケラは、2018年5月から11月に複数回、鴨川から採取した。

2-1. 酸・塩基への耐性

0.1mol/Lの塩酸と0.1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を用意した。それらを希釈して、pH1から13の溶液を作った。約1cm²の切片をトビケラの巣から切り出し、それぞれの溶液に24時間浸した。トビケラシルクを溶液から取り出して純水につけた後、電子顕微鏡で観察した。

2-2. 塩水への耐性

海水の塩濃度に相当する3.5%の食塩水を用意した。トビケラシルクをこの食塩水に5日間浸した。そして電子顕微鏡でシルクに変化があるか観察した。

2-3. 様々な素材への接着性

トビケラは大きめの石の平面を基盤にして、小石や砂を綴り合せて造巣する。そこで、小石だけでなく次のような巣材で造巣するかを実験で確かめた。ビー玉(Φ21mm)、鉄球(Φ8mm)、ゴム球(Φ21mm)、小石(Φ5mm)をそれぞれ、ザルの底が隠れる位に入れた。それぞれのザルに、トビケラ1～2個体と基盤となる石を入れて4日間、鴨川に設置した後、引き上げて、造巣の有無を確認し

た。

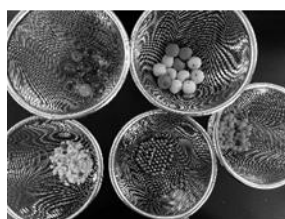


図 1. 巢材



図 2. 実験の様子

その結果、ゴム球にはトビケラの巣が作られなかった。これは、ゴム球のみ平滑でないことが要因だと考えられた。

そこで、使用したゴム球、ゴム製の平滑な一辺約 1cm の立方体、石を入れた 30cm 水槽を用意した後、トビケラ 7~8 個体を入れ、3 日間放置し、造巣の有無を確認した。

2-4. トビケラが巣を作る過程

水槽に小石を満遍なく散布し、トビケラが巣を作る様子を約 3 時間水槽の底から撮影した。

2-5. 接着面の様子及びその成分

塩化ビニル製のシートを水槽の側面と底面に貼り付け、そこにシートを基盤にした巣をトビケラに作らせた。その後、トビケラシルクとそのシートの接着面を電子顕微鏡で観察し、エネルギー分散型X線分析装置 (EDS) で分析した。

3. 結果

3-1. 酸・塩基への耐性

pH1 では pH7 とトビケラシルクの外見に変化が見られなかった。pH11 から 13 にかけて繊維が崩れていき、pH13 では原型を留めていなかった。

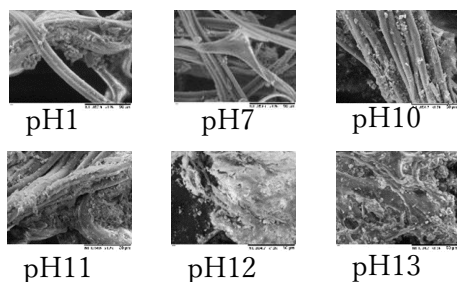


図 3. トビケラシルクの酸・塩基による変成の様子

3-2. 塩水への耐性

食塩水に浸した後の観察では、1200 倍の観察では繊維の表面に凹凸が見られなかったが(図4左), 更に 4000 倍に拡大すると表面にひだが見られた(図4右)。

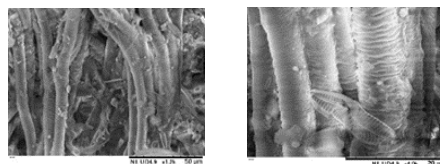


図 4. 1200 倍(左), 4000 倍(右)

3-3. 様々な素材への接着性

鴨川での野外実験では、ビー玉、鉄球、小石にはトビケラの巣が作られたが、ゴム玉には作られなかった。

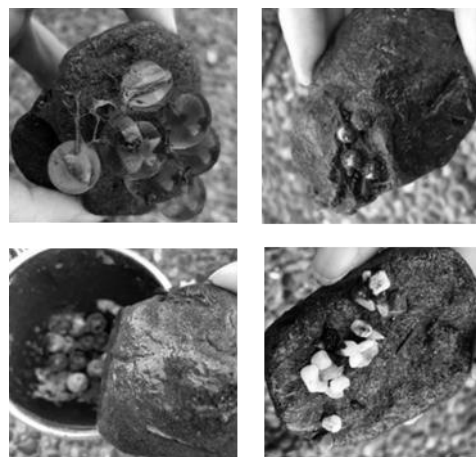


図 5. 各材料の接着の様子

水槽でのゴムの巢材を用いた実験では、ゴム球には造巣し、平滑なゴム製の立方体には造巣しなかった(図 6)。



図 6. 異なる形状のゴムへの接着の様子

3-4. トビケラが巣を作る過程

造巣の過程を観察するための室内実験では、トビケラが脚と口で小石を選定している様子は見られたものの、巣を作るために小石を運搬している様

子は観察できなかった。

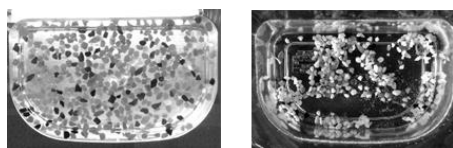


図 7.2-4 観察開始(左), 終了時(右)

3-5. 接着面の様子及びその成分

塩化ビニルを基盤にしたトビケラシルクを電子顕微鏡で観察したところ、トビケラシルクの先端を溶かして接着面を広げ、塩化ビニル製のシートに接着していた(図 8)。EDS の分析により、接着面と考えられる部分には C と P が多く見られ、その周りには Cl と Pd が多く見られた(図 9, 10)。

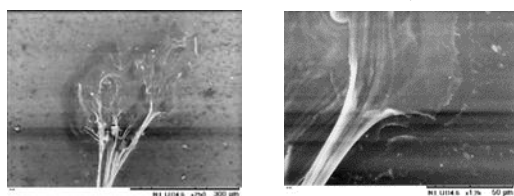


図 8. 250 倍(左), 1200 倍(右)

4. 考察

4-1. 酸・塩基への耐性

トビケラシルクは酸には強く、塩基には弱い。また、pH11 付近で繊維が崩れ始める。

4-2. 塩水への耐性

海水に浸けたトビケラシルクでは、確かに表面に変化が見られた。しかし、強い塩基による表面構造の崩れと比較すると、海水に弱いと断定するに至らなかった。

4-3. 様々な素材への接着性

造巢の有無にゴム製かどうかは関わりがなく、本実験で使用した全ての素材に巣がつくられた。しかし、ゴムへの接着は他と比べて強力ではなかったため、トビケラは巢材としてゴムを好まない傾向にあることが分かった。また、野外実験では川の水流があったため、軽くて安定性のないゴム球には巣が作りにくかった可能性がある。

4-4. 巣を作る過程の観察

トビケラは巣を作る際に用いる小石に対して多少の好き嫌いはあるが、あくまで自分の周りにある石を用いる傾向にあることがわかった。

4-5. トビケラシルクと巢材の接着

トビケラはトビケラシルクを接着するにあたり、特別な粘液等を分泌しているのではなく、シルクそのものの接着面を広げることで接着していると考えられる。Cl と Pd は塩化ビニル製のシートの成分だと考えられるので Cl と Pd が少なく、C と P が多く見られた部分がトビケラシルクの接着面だと考えられる。トビケラシルクがタンパク質だとすると、N と S にピークが見られるはずだが、本実験では見られず、P に反応があった。これについては現在のところ、その理由などについてはよく分からない。

5. まとめと今後の課題

今回私たちが研究を行うにあたり、先行研究が多くないことを知った。よって様々な観点から実験を行うことで少しでもトビケラ及びトビケラシルクの性質を解明しようと試みた。一連の実験を通し、様々なことが分かったものの、水中でのトビケラシルクの強度の理由や接着面の成分、海水につけることで起こる変化の原因は分らなかった。トビケラシルクを実用化していく際、このような点について、更に研究を続けることが望まれる。

6. 謝辞

京都府立大学の神代圭輔准教授には研究機関を通して、多大なご指導をいただき、また、電子顕微鏡や EDS を使用させていただきました。

7. 参考文献

新井亮一, 平林公男, 大川浩作, 2015. 8. 31, 水中昆虫トビケラシルクの新規タンパク遺伝子の発見及び解析に成功, <http://fiber.shinshu-u.ac.jp/arai/Caddis>

flySilkPressRelease20150831.pdf, 201

8.4.30

国土交通省, 2012.2.26, ヒゲナガカワトビケラ -

河川生態ナレッジデータベース,

Kasenseitai.nilim.go.jp/index.php, 201

8.11.23

Stewart, Russell., Wang, Ching Shuen, a

nd Ashton, Nick, 2010. 3. 1, Glue,

Fly, Glue,

Archive. unews.utah.edu/news.releas

es/glue-fly-glue/, 2018.11.16

竹門康弘, 小林草平, 多田重光, 濱田博, 日下

哲也, 脇坂英昭, 安田美樹, 2014. 2, 宇

治川に発生するトビケラに関する報告書,

2018. 11. 23,

[http://www.city.uji.kyoto.jp/cmsfiles/co](http://www.city.uji.kyoto.jp/cmsfiles/contents/0000012/12796/uji-tobikerahou)

[ntents/0000012/12796/uji-tobikerahou](http://www.city.uji.kyoto.jp/cmsfiles/contents/0000012/12796/uji-tobikerahou)

[koku.pdf](http://www.city.uji.kyoto.jp/cmsfiles/contents/0000012/12796/uji-tobikerahou)

8. 参考資料

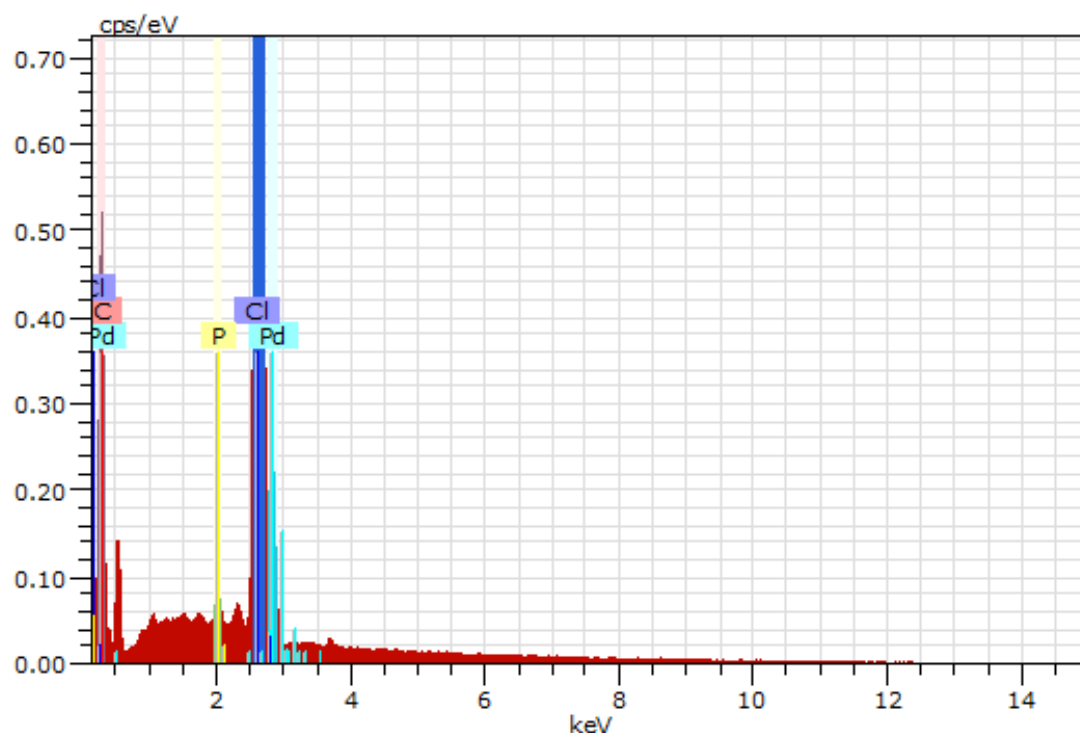


図 9. EDS による分析の結果を示すスペクトルグラフ

電子顕微鏡で観察したサンプル全体から得られた、EDS による分析結果のスペクトルグラフ。スペクトルのピークが Pd, C, P, Cl を含むサンプルであったことを示している。

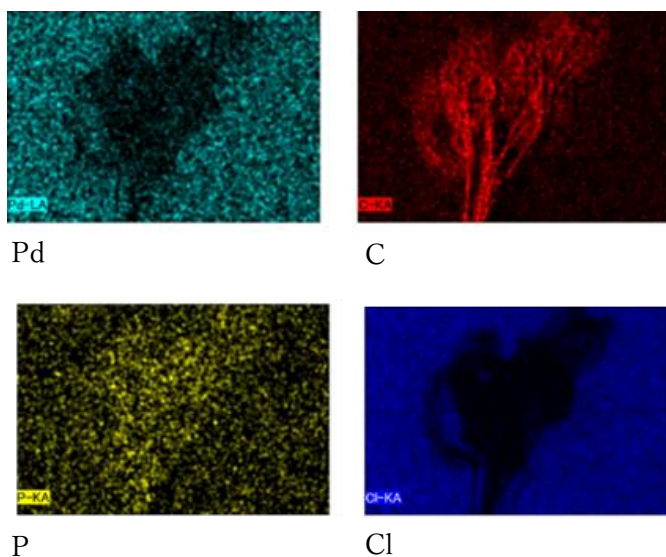


図 10. 電子顕微鏡(250 倍)で観察したトビケラシルクと塩化ビニルの接着面

Pd(左上), C(右上), P(左下), Cl(右下)について、着色されている部位がそれぞれの元素の局在を示す。トビケラシルクには C(右上)と P(左下)、塩化ビニルには Pd(左上)と C(右上)の局在が見られた。

藻類を用いた省エネかつ効率的な緑のカーテンの実現に向けて

井上颯 大木萌花 小笠原彩花

要旨

本研究は、一年中使用可能で労力の比較的小さい緑のカーテンの実現の第一歩として、藻類を水中以外の環境でキープ(保持・培養)するという実験を行った。その結果、キープするつもりであった藻類と異なる藻類が育ったものの、水中以外の環境でも藻類をキープすることができた。

1. はじめに

緑のカーテンは、植物の光合成により二酸化炭素を吸収し、光を遮ることから、地球温暖化対策につながると期待されている。しかし、通常ツルレイシやアサガオなどは一年草であり、一年中二酸化炭素を吸収するというわけではない。さらに、水やりや枯れた後の片付けなどの労力を必要とする。そこで一年中光合成をし、水やりなどの手間の発生しない藻類に着目した。特に、本来の緑のカーテンで使われるツルレイシが食用となる実の収穫も兼ねていることから、将来の食料難に対応する生物として近年注目されているミドリムシに目をつけた。本論文では、藻類を用いた緑のカーテンの実現に向け、藻類を水中以外の環境でキープする手法について考察する。

2. 予備実験

2-1. 材料と方法

本研究で用いたミドリムシはある教育機関から譲り受け、校内で継代培養してきたものである。ただし、予備実験2で用いたミドリムシはこれを遠心分離(1分間3000回転)した。予備実験2で用いた人工種子はアルギン酸NaをCaCl₂に滴下して作製したものである。ミドリムシは成人用紙おむつの中身(高分子吸水性ポリマーを含んだ綿状パルプ)を十分に湿潤させたものの上でキープした。純水はイオン交換水を用い、肥料は0.1%ハイポネックス水溶液を用いた。水槽の水とは、魚を

飼育している水槽の水である。キープの際は、基本的には人工気象装置(日本医化器械製作所製)を用い、気温約20℃、明暗周期12時間、照度4000ルクスで行った。

2-2. 予備実験1

2-2-1. 目的

ミドリムシが高分子吸水性ポリマー上で育つかを確かめ、水の純度、酢酸の有無で生息状態が変化するかを調べる。

2-2-2. 実験

ほぐした紙おむつを直径7.2mmのシャーレに厚さ5mmほどになるように広げ、紙おむつ内の高分子吸水性ポリマーに水を限界まで(高分子吸水性ポリマーから吸収しきれなかった水がわずかに出るほど)吸収させ、そこにミドリムシ30μLを加えた。入れた水の条件を変えてラップで包んで人工気象装置でキープした。条件はTable1のようになる。

	条件
A	0.1%ハイポネックス溶液約1mLと純水
B	水槽の水15mLと純水
C	水槽の水15mLと5%酢酸水溶液3mLと水道水

Table 1

A, B, Cを人工気象装置に入れてキープした。

2-3. 予備実験 2

2-3-1. 目的

ミドリムシは通常水中に生息する。そこで、水を有形のものにできる人工種子の中でミドリムシが育つかを確かめる。

2-3-2. 実験

1%アルギン酸 Na 水溶液をミドリムシと混合して 20%CaCl₂ 水溶液に滴下し、ミドリムシを内包する人工種子を作成した。そこに 0.1%ハイポネックス水溶液を加え、ラップで包んで人工気象装置に入れてキープした。

3. 予備実験の結果

3-1. 予備実験 1 の結果

人工気象装置に入れてから 1 週間後、A は全体的に緑色になっており、B はわずかに緑色になっていた。しかし、C にはカビが生えた。また、A のみジェル状の物質が見られた。B、C は乾燥していた。人工気象装置に入れてから約 4 か月後に A の一部を光学顕微鏡で観察したところ、Fig 1 のような藻類が見られた。A については 2 週間後に緑が一層濃くなり、色はそのまま 7 か月キープした。ただし、ジェル状の物質は 6 か月ほどでなくなった。

3-2. 予備実験 2 の結果

人工気象装置に入れてから 1 週間後に人工種子の外側に粉末状のミドリムシが見られた。人工種子を切断して、光学顕微鏡で観察すると、観察した範囲では何の生物も見られなかった。2.5 か月後には人工種子が乾燥して球体から円に形が変化し、つぶれた。

4. 予備実験の考察

4-1. 予備実験 1 の考察

A で見られた生物は、用いたミドリムシ(Fig 2)と大きさも形も違うため、ミドリムシではないと思われる。フラスコの底に濃い緑のものがたまっていたた

め、この藻類は用いたミドリムシに混入していた生物だと考えられる。また、この藻類はミドリムシよりも紙おむつの環境に適していると言える。

A と B の緑色の濃淡の差は、ハイポネックス水溶液に含まれる養分と水槽の水に含まれる養分の違いだと考えられる。また、B の乾燥が一つの要因かもしれない。

C ではカビが生えてしまったが、これはミドリムシ以外の生物を殺す効果を望んで入れた酢酸が逆にカビなどほかの生物のえさとなってしまう、ミドリムシが捕食されたからだと考えられる。

4-2. 予備実験 2 の考察

人工種子が平面になってしまった原因としては、肥料を与えたときの浸透圧で壊れた、あるいは既に穴が空いていたことが考えられる。そのため、人工種子の中のミドリムシについては、人工種子内の水が枯渇し、生命を維持するのが難しい環境になったと言える。また、人工種子が崩壊したことで、人工種子の中に入れたはずのミドリムシが外側で見られたのかもしれない。

5. 本実験

5-1. 材料と方法

本実験では、ミドリムシと混合していた藻類のほうは紙おむつの環境に合っていることから、この藻類を用いることにした。この藻類は予備実験で用いたミドリムシの入った三角フラスコの沈殿物から採取して用いた。その他の研究試料は予備実験で用いたものと同じものを用いた。

5-2. 本実験 1

5-2-1. 目的

定期的に肥料を加えることが、成長にどのような影響を与えるかを調べる。

5-2-2. 実験

予備実験 1 と同じく、ほぐした紙おむつを直径 7.2mm のシャーレに厚さ 5mm ほどになるように

広げ、紙おむつ内の高分子吸水性ポリマーに水を限界まで吸収させた。そこにミドリムシ 400 μ L、0.1%ハイポネックス溶液を加えた。これを 2 つ用意し、次のような条件にしてラップで包み、人工気象装置に入れてキープした。

	条件
D	何もしない
E	2 週間に 1 回 0.1%ハイポネックス溶液を 1.5mL 加える

Table 2

5-3. 本実験 2

5-3-1. 目的

肥料は減少した藻類を増やすことができるのかを調べる。

5-3-2. 実験

A の緑色が徐々に薄まり、藻類が減少したといえるのでこの実験では A を用いた。

A を 4 分の 1 の量にしたものを 2 つ用意し、次のような条件にしてラップで包んで人工気象装置に入れてキープした。

	条件
F	0.1%ハイポネックス水溶液 1.5mL を 1 週間に 1 回加えた
G	0.1%ハイポネックス水溶液と水をそれぞれ 1.5mL ずつ 1 週間に 1 回交互に加えた

Table 3

5-4. 本実験 3

5-4-1. 目的

藻類は何なのかを調べる。

5-4-2. 実験

A で見つかった藻類は何かを調べるため、A と同じ方法を用いて予備実験 1 で見つけた藻類を増やした。その増やした藻類をすりつぶしたものにメタノールを加えてクロロフィルを抽出し、遠心

分離して上澄みと薄層クロマトグラフィー(展開液として、石油エーテル:アセトン=7:3)を用いた。また、分光計で吸収スペクトラムを分析した。

6. 本実験の結果

6-1. 本実験 1 の結果

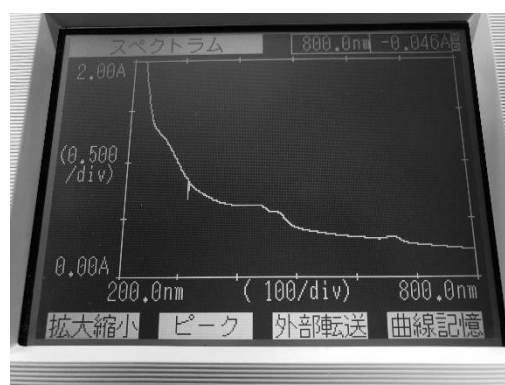
約 1.5 か月後に観察すると、D は緑色が濃くならなかった(Fig 3, 4)。一方、E は緑色が濃くなり、緑色の範囲も広がった(Fig 5, 6)。また、E よりも D のほうが乾燥しており、D にも E にもジェル状の物質は見られなかった。

6-2. 本実験 2 の結果

F は 2 週間後(Fig 8)には作成直後(Fig 7)と比べ緑色が濃くなったが、約 1 か月後には元の濃さに戻った(Fig 9)。G は作成直後(Fig 10)と比べ、約 1 か月後(Fig 11)は緑色が薄かった。また、F も G も肥料または水を与える前には乾燥していた。

6-3. 本実験 3 の結果

薄層クロマトグラフィーは Fig 12 のようになり、見つけた藻類のクロロフィルを特定することはできなかった。また、吸収スペクトラムは Graph 1 のようになり、吸収スペクトラムからもこの藻類は何かを調べることはできなかった。



Graph 1

7. 考察

7-1. 本実験1の考察

肥料を与えた方が、成長が促進された。しかし、Dの乾燥を考えると、肥料の有無ではなく、水分を与える頻度によって成長状態が変化したとも考えられる。藻類を確実に育てるためには、乾燥の原因を解明し、対策を講じることが必要である。

7-2. 本実験2の考察

Fの観察(Fig 7~9)から、定期的に無機塩類を与えることにより減少した藻類を一時的に増やすことができた。また、F、Gが肥料または水を与える前に乾燥していた原因として、A~Eより用いた紙おむつの量が少なく、保持できる水の量が小さかったことが考えられる。

7-3. 本実験3の考察

クロロフィルの薄層クロマトグラフィーからも吸収スペクトルからもキープしていた藻類が何かわからなかった原因として、十分な量のクロロフィルが抽出できていなかったと考えられる。大きさから原核生物だと考えられるが、この藻類を特定するためには遺伝子解析等さらに詳しい分析を行う必要がある。

8. まとめと今後の課題

これまで、ミドリムシ及び混入していた藻類のキープの手法について模索してきた。その結果、ミドリムシよりは混入していた藻類のほうが紙おむつの環境に適していると考えられる。この環境で、緑のカーテンを作製するために、障子状にすることを考えた。しかし、障子を作製する過程で環境に負荷をかけることになり、簡素にキープすることが求められる。

また、ミドリムシも混入していた藻類も乾燥が増殖に影響することがわかった。肥料も増え具合に関連すると考えられる。

今後の課題としては、まず乾燥の原因を解明したい。また、Aのみジェル状の物質が現れ、6か月

キープできたことから、ジェル状の物質が長期間のキープに重要な役割を果たしている可能性がある。そのため、ジェル状の物質の発生についても調査したい。最終的には乾燥を防ぐ環境をつくるのが緑のカーテンを作製する上で、鍵となると考えている。今回の実験ではラップを使用したけど、劣化によりシャーレとの隙間が生じ、乾燥を招いてしまった。また、ラップは水蒸気だけでなく、空気も閉じ込めてしまうため、光合成を阻害する可能性がある。劣化しにくく、空気を通して水蒸気を通さないフィルムが必要である。混入していた藻類が何なのか特定することができれば、その藻類に近い種からより紙おむつの環境に適した種をみつけられる可能性があるため、この藻類の特定も今後の課題としたい。

9. 参考文献

- Julian Melchiorri, Silk Leaf, 2014.4,
julianmelchiorri.com/silk-leaf, 2018.6.21
新潟大学工学部複合微粒子研究室, 人工イクラの作り方(実験用簡易版),
<http://capsule.eng.niigata-u.ac.jp/lecture/open01/index.html#ikura01>, 2018.6.21
一般社団法人日本衛生材料工業連合会, 紙おむつの構造,
<http://www.jhpia.or.jp/product/diaper/data/structure.html>, 2018.6.21

10. 添付資料

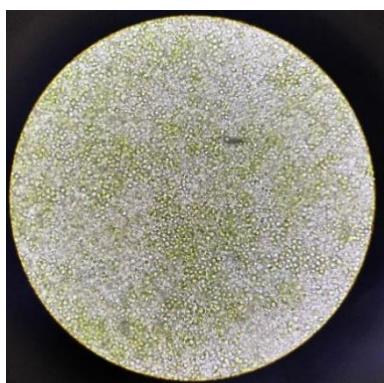


Figure 1 600 倍



Figure 2 150 倍



Figure 3 2018.11.8 撮影



Figure 4 2018.12.20 撮影

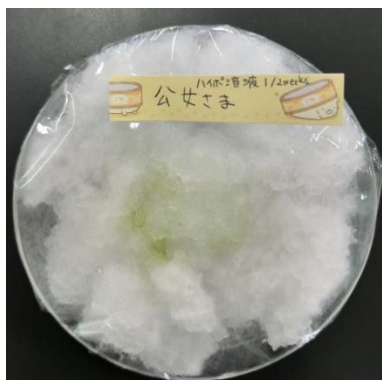


Figure 5 2018.11.8 撮影



Figure 6 2018.12.20 撮影



Figure 7 2018.11.15 撮影



Figure 8 2018.11.29 撮影



Figure 9 2018.12.20 撮影



Figure 10 2018.11.15 撮影



Figure 11 2018.12.20 撮影



Figure 12