HOKUGA 北海学園学術情報リポジトリ
学校法人北海学園
北海学園大学
北海商科大学

タイトル	水棲環境中のカルシウムはプラナリアの生育と再生に必要かつ十分な金属元素である
著者	板垣，航平；髙橋，考太；ITAGAKI，Kouhei；TAKAHASHI，Kohta
引用	北海学園大学工学部研究報告(52)：27-53
発行日	2025-01-10

Hokkai-Gakuen Organization of Knowledge Ubiquitous through Gaining Archives.

水棲環境中のカルシウムはプラナリアの生育と再生に必要かつ十分な金属元素である

板　垣　航　平*・髙　橋　考　太**

Calcium in the Aquatic Environment is a Necessary and Sufficient Metal Element for Planarian Growth and Regeneration

Kouhei ITAGAKI* and Kohta TAKAHASHI**

要　旨

本研究では，淡水に棲む扁形動物プラナリアをモデル生物として使用し，環境水中に含まれる金属イオンの役割について検討した．プラナリアは，他の生物には類を見ない高い再生能力や原始的な脳にあたる中枢神経系を持つなど，再生医療にも資するユニークな特徴を合わせ持つ．金属元素を含有しない純水でプラナリアを飼育すると数日で死滅し，最終的に溶解してしまうのに対し，ナトリウム（Na^{+}），カリウム（K^{+}），マグネシウム（Mg^{2+}），カルシウム（Ca^{2+}）の４種の金属イオンと塩素イオン（Cl^{-}）の５種類の元素を含有するミネラル合成水で飼育すると長期間生存できることがわかった．すなわちプラナリアが摂食で補う体内金属以外に，環境水中に含まれる４種の金属イオンにプラナリアの長期生存に必須な金属成分が存在することが強く示唆された．そこで本研究では，プラナリアの生存に必須な環境水中の金属元素の同定とその生理的な役割の解明を目標に実験を行った．まず飼育に用いた市販ミネラル天然水のナトリウム，カリウム，マグネシウム，カルシウムの成分濃度を模して作製した人工ミネラル合成水を基準にして，各金属イオン１種類だけを含有する塩化物水溶液でプラナリアを飼育し，生存に必須な金属元素を調べた．その結果，カルシウムを唯一の金属元素として含む水溶液の中で，プラナリアは長期間生存可能で，切断実験を行った際にも正常な再生が起こることがわかった．またカルシウムの選択的キレート剤であるBAPTAを十分量添加したミネラル天然水中では，純水中と似た反応を示しすべての個体が溶解したことから，プラナリアの生存と再生，および個

* 理科教諭，釧路市立景雲中学校；北海学園大学工学部生命工学科，2023年度卒業

* Science Teacher, Keiun Junior High School ; Graduated in 2023, Department of Life Science and technology, Faculty of Engineering, Hokkai–Gakuen University

** 教授，北海学園大学工学部生命工学科

** Professor, Department of Life Science and technology, Faculty of Engineering, Hokkai–Gakuen University

体維持には環境水中にカルシウムが含まれていることが必要であると結論した．膜電位依存性L型カルシウムチャネルの阻害剤である塩酸ニカルジピンをミネラル天然水に加えると，激しく体をくねらせ頭部を回転し続ける特徴的な痙攣様表現型を示し，純水中やカルシウムをキレートしたミネラル天然水中とは異なる表現型を呈することがわかった．カルシウムイオンは，生体膜電位を維持するために必要とされるので，アニオン性膜電位感受性色素$DiBAC_4(3)$を利用し，純水中とカルシウムイオンを含む飼育水中で，プラナリアの体表の膜電位形成に差が見られるかを観察した．その結果，測定精度の範囲内では，顕著な差を見出せなかったので，カルシウムを欠く純水中で極端な膜電位形成異常が誘起されたために致死となっている可能性は低いと結論した．

1．序論

1.1 アメリカツノウズムシとアメリカナミウズムシ

扁形動物門有棒状体綱三岐腸目に属するプラナリアの体表には繊毛があり，それで遊泳すると水面に渦が起こるため，そこから別名ウズムシとも呼ばれている．プラナリアは一般的に１～３㎝の大きさで，肉眼でもよく見え，繊毛運動によって水面下を逆さまになって遊泳する様子が観察される[1]．主に肉食で海水，淡水，湿った陸上に生息している．本研究で使用したプラナリア種，アメリカツノウズムシ（*Girardia dorotocephala*）とアメリカナミウズムシ（*Girardia tigrina*）は，近年，国内でも生息が報告されるようになってきた外来種で，河川や湧き水などで繁殖する淡水性である．実験室では，鳥のレバーなどを餌として与え，市販のミネラル天然水中で飼育することができる（材料と方法，2.2 プラナリアの飼育法）．日本では，京都大学（現，基礎生物学研究所）の阿形清和らのグループにより日本の固有種であるナミウズムシ（*Dugesia japonica*）を用いた再生機能や神経系の進化に関する先駆的な研究が行われてきた[2),3)]．ナミウズムシは，比較的きれいな淡水を好み，夏場など水温が高温になると溶けてしまうので，水質と水温の管理が必要である．一方，アメリカツノウズムシとアメリカナミウズムシは，日本産ナミウズムシに比べると水質の悪化に対して耐性があると言われており，入手のしやすさ（2.1 プラナリアの入手方法）に加えて管理・飼育のしやすさが，本研究でモデル生物として導入するに際してのメリットであった[1),4)]．

進化上，プラナリアはヒラムシやサナダムシが属する扁形動物門に位置し，近くには環形動物のミミズや軟体動物である貝類，イカ，タコの仲間が位置している．扁形と呼ばれるようにこの門の動物の体は平らな左右対称形をしており，循環器官や特別な呼吸器官を持たず体の表面から直接ガス交換を行う．扁形動物はほとんどが雌雄同体で，複雑な生活環を持つ．２匹の扁形動物が交尾を行う場合は，精子を交換し合い，双方が受精する．このような有性生殖に加えて，プラナリアの生殖様式には，多細胞動物でありながら，自らが体をねじって分裂しクローンとして再生する無性生殖の２種類がある[1]．

1.2 モデル生物としてのプラナリアの特徴

プラナリアは再生能力や神経系の研究，環境評価などの分野でユニークな役割を果たしているモデル生物である．プラナリアは再生能力が非常に高く，例えば体の一部を失ってもその部分を再生し，完全な個体に戻ることができる．この驚くべき能力は，細胞の分化と再配置が迅速かつ効率的に行われることによって実現されており，再生医療分野において大きな関心を集めている．またプラナリアの神経系は非常に単純でありながらも，学習や記憶，行動などの基本的な神経プロセスを研究するのに適した特徴を備えており，神経学や脳科学分野の重要な研究モデルとしても注目されている[2),3)]．さらにプラナリアは比較的きれいな淡水を好み，水棲環境の汚染に敏感に反応するため，環境汚染や毒性物質の影響を評価するためのバイオマーカーとしても利用されている[5)]．以下では，本研究において特に重要と考えられるプラナリアの３つの特徴を説明する．

１つ目はプラナリアの摂食様式に関する特徴で，体内の各細胞に金属イオンを含むさまざまな栄養素をどのように供給しているのかに関連している．プラナリアは，体全体に消化管である腸が分散分布している．消化器官は，口，咽頭，腸からなり，口は腹部下面に開口していて，ここから咽頭を自由に出し入れして，摂食を行う．咽頭表面には粘液があり，咽頭内に消化酵素が分泌している．取り込まれた餌は，腺細胞から分泌されるエンドペプチダーゼによりある程度消化されてから腸へ送られている[1)]．したがってプラナリアの体内の各細胞には，摂食により得た食物の栄養素が常に消化管によって供給されているため，環境水から上皮細胞を介して特定の栄養素を吸収する必要性は低いことがわかる．本研究では，飼育水中から金属イオンを取り除いた場合でも，プラナリア個体の組織内や細胞内には摂食により得た金属イオンのストックが十分量存在している可能性が高いことに留意しておく必要がある．

２つ目はプラナリアの運動と遊泳に関する特徴である．運動と遊泳は，摂食だけでなく外敵や劣悪な環境から退避するためにも必要で，少なくとも以下の３つの基本的な運動パターンの組み合わせにより制御されていると考えられている[1)]．本研究では，各種の金属イオンの組成を変化させた水溶液中で，特徴的なプラナリアの行動異常が観察されたが，それらがどのステップの運動阻害を原因としているのかを理解していく必要があるだろう．１）繊毛運動；プラナリアの覆面は繊毛で覆われており，隣り合う繊毛が位相をずらして波打つことによってつくられる連続的な波によって滑らかな滑走運動を行っている[6)]．２）筋収縮；プラナリアは繊毛以外にも運動器官として筋を持って，伸縮運動などを行う．この筋収縮と繊毛運動が同時に起ることでプラナリアは滑走運動を行うことができる．筋収縮を制御しているのは主に筋細胞であるが，再生時の組織のパターニングに必要な位置情報も主に筋細胞が持っていることがわかっている[7),8)]．３）首振り運動（自発振動）；プラナリアは自発的な首振り運動を行うことがあるが，この運動はプラナリアが光の方向を正確に認識し，効率的に光から逃げるために不可

欠であることが確認されている[9]．プラナリアは首を左右に振ることで左右の目に入る光の差を感知し，体の向きを変えている．光から逃げるだけでなく，窪地などに隠れるための行動でも首振り運動を行っている．

本研究にとって重要な３つ目の特徴は，その驚異的な再生能力である[1),3),7),8)]．プラナリアを刃物で３分割すると，１～２週間後には頭部から胴部と尻部が再生し，胴部からは頭部と尻部，尻部からは胴部と頭部が再生する無性生殖を行うことが知られている[1)]．切断前後で完全体が出来るためプラナリアのクローンができる．プラナリアを人為的に切断して再生反応を誘起した場合，刃物による切断直後は，切断面に位置する体内細胞は外部の飼育水に直接暴露される可能性があるため，飼育水中の成分の影響を受けやすい状況が発生すると考えられる．

1.3 飼育水中の金属イオンの役割の検討とHessによる先行研究

これまで本研究室では，主に分裂酵母をモデル生物に用いた細胞分裂の研究を行ってきたが，2023年の夏から，大学のオープンキャンパス展示用にプラナリアを飼育することになったのをきっかけとして，その飼育方法や再生実験方法の検討を始めた．その過程で，人工飼育水の作製を試み，本研究で報告するプラナリアの生存に飼育水中のカルシウムが必須であることを見出した．当初，類似する先行研究がないかを生命科学・医学分野の代表的な文献情報データベースであるPubMedを使って詳細に調べたが，該当する論文が見つからなかったため，研究を進めることとした．その後，カルシウムがプラナリアの生存と再生に必要十分な人工飼育水中の唯一の金属元素であることを実験的に確認した段階で，プラナリアの摂食行動におけるカルシウムの役割を報告した最近の論文[10)]の序論中に，100年近く前にシカゴ大学のOlga Theodore Hessが同様の結論を報告していたという記載のあることを見つけた．Hessの論文[11)]は，PubMedにも登録されておらず，研究テーマもプラナリアの呼吸に与える金属イオンの影響を調べるものであったため，本研究を進める前に先行研究としてその内容を把握することが難しかった．本研究は，Hessの論文報告と主要な結論は同じであるが，研究の目的や実験条件・手法が異なっており独立した立場からHessの結論を再確認していること，新たに$DiBAC_4(3)$やBAPTA，塩酸ニカルジピンを用いた実験を行ってカルシウムイオンの役割についての新しい知見を得ていることから，実験記録として記載しておく価値があると判断し報告する．

2．材料と方法

2.1 プラナリアの入手方法

プラナリア個体は，通販サイト楽天のペットショップ（charm 楽天市場店）から購入した．説明書には，プラナリアの種はアメリカツノウズムシ（*Girardia dorotocephala*）とアメリカナミウズムシ（*Girardia tigrina*）の２種のいずれかであると記載されている．これらの種の由来

については明記されていないので，このペットショップ経由で得たプラナリアについては，ゲノム解析をする以外に厳密に種を同定する方法がない．アメリカツノウズムシは，アメリカナミウズムシと比較すると大きく，体表面には模様があまり無い．他にも頭部両側にツノのように見える突起があるのが特徴である[1]．それに対してアメリカナミウズムシは，体表面にまだら模様が見え，頭部の形状は滑らかである[1]．これらの特徴から２種の個体を見分け，比較実験を行う場合は同じ種の個体を使用した．ただし，このペットショップのプラナリアはクローンではない可能性が高く，同じ種であっても遺伝的な個体差が存在する可能性がある．さらに上記の２種以外の種が混在している可能性も否定できない．プラナリアは無性生殖を主に行うが，水質環境が悪くなると有性生殖を行うことがあるので定期的に水を交換することが大切である．

2.2 プラナリアの飼育法

プラナリアは滅菌したミネラル天然水中で容易に飼育することができる[1),4),12)]．購入したプラナリアはプラスチックの容器に移し替え，20℃のインキュベータ中で飼育する．飼育水は市販のミネラル天然水（い・ろ・は・す白洲の天然水；コカ・コーラボトラーズジャパン㈱白洲工場：採水地，山梨県北杜市白洲町）を主に用いた．含まれる金属イオンの濃度は少し異なるが，同社の別の採水地由来のミネラル天然水（い・ろ・は・す北海道の天然水；コカ・コーラボトラーズジャパン㈱札幌工場：採水地，北海道札幌市清田区）でも良好な飼育が可能であった．餌は新鮮な鶏のレバーを用いる．飼育水は１週間に１度，新鮮なミネラル天然水と入れ替える．各種の陽イオンやキレート剤を含む水溶液で飼育する場合は，特に断らない限り，同程度の大きさの個体をコントロールにして，55mmシャーレに入れ20℃のインキュベータ内で静置飼育した．個体間の栄養状態の差をある程度揃えるために，最後に餌のレバーを与えてから10日間以上経過した同じタイミングで餌を与えているバッチ中の個体を実験に使用した．

2.3 再生実験のためのプラナリアの切断方法

プラナリアを切断する際は剃刀の刃を用いる．あらかじめ冷凍庫で冷やしておいたアルミブロックの上にシャーレを置き，その中に飼育水から取り出したプラナリアを配置して動きが鈍くなりかつ個体が伸び切ったタイミングで切断する．

2.4 プラナリアの洗浄方法

チップの先端部分をハサミで短くカットした１mL容量のマイクロピペットを用いて実験で使用するプラナリアをシャーレに移す．シャーレ内の飼育水を，実験で使用する水溶液10mLと入れ換え，５秒ほど軽くゆすいで洗浄する．同様の操作を３回繰り返し行う．

2.5 プラナリアの観察・撮影方法

プラナリアを実験で使用する水溶液に浸した後，実体顕微鏡で観察を行った．カートン社製実体顕微鏡（DSZ44–TR，倍率10x～44x）もしくはライカマイクロシステムズ社製実体顕微鏡（S8 APO，倍率10x～80x）にアズワン社製顕微鏡用USB接続デジタルカメラ（HDCE–X3N）を装着して，接続したノートPCのカメラの録画機能を使って撮影を行った．ライカマイクロシステムズ社製正立型蛍光顕微鏡（DM5000B）で膜電位を撮影する場合は，倍率40xで以下の設定で観察を行った．TL–DIC：Exposure Time 50.0ms，Gain 1.0，Intensity 100.，GFP（FLUO）：Exposure Time 200ms, Gain 1.0，FIM 17%．プラナリアは蛍光顕微鏡の励起光を嫌って暴れて動くためピントが合いづらいことが難点である．プラナリアを固定するために，35mmガラスボトムディッシュのホール部分にプラナリアを投入し，ホール上から３%低融点アガロースを流し込み，カバーガラスで封をして固化させた．低融点アガロースは，それぞれ使用する水溶液（ミネラル天然水，純水，カルシウム水溶液など）を溶媒にして準備したものを使用する．低融点アガロースを流し入れた直後は，プラナリアは動きまわろうとするため，あらかじめ冷やしておいたアルミブロック上にディッシュを数分間静置し，プラナリアを冷却して動きを止めゲルをすばやく固化させる．

2.6 使用した各種水溶液・試薬の調整法

2.6.1 純水の調整

ヤマト社製純水製造装置ピュアライン（WL200）を用いてイオン交換方式で製造したJIS K 0557 A3レベルの純水を使用した．超純水（LC/MS用 FujiFILM 210–9303）と比較して，プラナリアの個体が崩壊するまでの過程にほとんど差がないことを確認している[13]．

2.6.2 各金属のストック溶液とミネラル合成水の調整

飼育水として使用したミネラル天然水の成分表示をもとに，×1,000濃度で調整した各金属の塩化物ストック水溶液を作製した．ミネラル天然水（い・ろ・は・す 白洲の天然水）は，ナトリウム 1.1mg，カリウム 0.09mg，カルシウム 0.72mg，マグネシウム 0.23mgを100mL中に含有しているので，それぞれ純水１L当たりNaClを28.0g，KClを1.7g，$CaCl_2$を19.9g，$MgCl_2$・６H_2Oを19.2g溶かしてストック水溶液とした．ミネラル合成水は，純水に対してそれぞれのストック溶液を１/1,000量添加することで調整した．ミネラル合成水中の５つのミネラル成分の最終濃度は，ナトリウム 0.48mM，カリウム 0.023mM，カルシウム 0.18mM，マグネシウム 0.095mM，塩素 1.1mMとなる．塩素を取り除く実験では，カルシウム濃度が0.18 mMになるように$CaSO_4$・２H_2Oを純水に溶解させてカルシウム水溶液を調整した．

2.6.3 BAPTA溶液の調整

BAPTAはCa^{2+}の選択的キレート剤で，正式名称は，1,2－ビス（２－アミノフェノキシ）エ

タン－N, N, N', N' －四酢酸，東京化成工業株式会社製B3895を使用した．DMSOを溶媒として50mMストック溶液を調整，50，100または500μMの最終濃度になるようにプラナリア飼育水に添加した．BAPTAはMg^{2+}よりもCa^{2+}に高い選択性をもつキレート剤で[14]，細胞膜非透過性であるため，プラナリアの細胞内のCa^{2+}はキレートせずに，飼育水中のCa^{2+}のみをキレートすることができる．コントロールサンプルには等量のDMSOを加えた．

2. 6. 4 塩酸ニカルジピン溶液の調整

塩酸ニカルジピンは膜電位依存性L型カルシウムチャネルに特異的に結合し，細胞内へのカルシウムの流入を減少させる[15]．正式名称は，1, 4－ジヒドロ－2, 6－ジメチル－４－（３－ニトロフェニル）－3, 5－ピリジンジカルボン酸メチル２－［メチル（フェニルメチル）アミノ］エチルエステル塩酸塩，東京化成工業株式会社製N0635を使用した．メタノールを溶媒として10mMストック溶液を調整，５または10μMの最終濃度になるようにプラナリア飼育水に添加した．コントロールサンプルには等量のメタノールを加えた．

2. 6. 5 $DiBAC_4(3)$溶液の調整

陰イオン（アニオン）性膜電位感受性色素$DiBAC_4(3)$は，脱分極された細胞に入った後，細胞内タンパク質または膜に結合して，強い蛍光を示すため，膜電位の状態変化を蛍光検出する際に用いる[15),16]．通常，細胞内は細胞外と比べて負の電荷を持っている．この電気的不均衡を維持するために，イオンが細胞膜を横切って輸送されるが，脱分極は細胞内の電荷分布が変化し，細胞内の負電荷が細胞外よりも少なくなった状態である．脱分極の増大は，陰イオン性蛍光色素$DiBAC_4(3)$の細胞内へのさらなる流入と蛍光の増加をもたらす．それとは反対に，過分極は蛍光の減少によって示される．$DiBAC_4(3)$の正式名称は，ビス－（1, 3－ジブチルバルビツール酸）トリメチンオキソノールで，東京化成工業株式会社製B5593を使用した．DMSOを溶媒として最終濃度１mg/mLで×1, 000のストック溶液を調整，遮光マイクロチューブ内に分注し冷蔵保管する．サンプルに添加した後は，蛍光褪色を防止するため，アルミホイルなどでシャーレを遮光しながら染色する．

2. 6. 6 低融点アガロースの調整

37℃以下で固まり始める３％の最終濃度で低融点アガロースを含むゲルを調整する．ミネラル天然水，純水，カルシウム水溶液のそれぞれで飼育したプラナリアを観察する場合は，低融点アガロースもそれぞれミネラル天然水，純水，カルシウム水溶液に溶かして調整する．

2. 7 $DiBAC_4(3)$による膜電位変化の蛍光検出

$DiBAC_4(3)$によるプラナリア表皮の膜電位変化の検出は，Emmons–Bellらの方法[15),16]を参考に，プラナリアの固定方法などは適宜改変して行った．$DiBAC_4(3)$を加えていないネガティブコントロールで，自家蛍光を検出しない測定感度をあらかじめ確認した．ミネラル天然水で適

度な蛍光が表皮に検出できる条件を探り，同じ条件ですべての撮影を行った．プラナリアをマイクロチューブに移し，観察に使用する水溶液（純水，ミネラル天然水，カルシウム水など）で１度洗浄後，×1,000の$DiBAC_4(3)$ストック溶液を１μL加えた新しい水溶液１mLに浸す．褪色を防ぐためにアルミホイルで遮光し，室温で30分間静置，それぞれの水溶液で作製した低融点アガロースに埋包して観察する．

３．結果

本研究では，アメリカツノウズムシとアメリカナミウズムシ（以下，プラナリア）を研究材料として，プラナリアの生存と再生に必須な飼育水中の成分元素の分析を行った．

3.1 純水およびミネラル合成水中のプラナリアの挙動

異なる特徴を持つ生物種に対して超純水が与える致死的影響を検討する過程で，多細胞動物のモデル生物として実験を行ったプラナリアについては，超純水中ですべての個体が数日以内に特徴的な溶解を起こし死滅することがわかった[13]．超純水の代わりにフィルター濾過により調整した純水を用いても基本的に同じ結果を得たため，本研究では純水および純水を溶媒とする各種水溶液を以降の実験に用いた．**図１**に，通常の飼育水として使用しているミネラル天然水から純水中に移されたプラナリアの反応を示した．ミネラル天然水中では，プラナリアは滑らかな動きで活発に遊泳し，緩やかな頭部の自発振動をみせる．体は伸長しておりスムーズに変形できる（**図１A**）．また飼育水を取り換える場合に，シャーレの底にしっかりと吸着したままの状態を保つことができている．これに対し純水中に移されると，プラナリアは直ちに遊泳運動を停止し，特徴的な頭部の変形を示しながらその場で体を縮める収縮反応（**図１B**左）や尾部をシャーレ面につけて頭部を反らして回転させる反応（**図１B**中央），あるいはらせん状に体を捻じる反応を含むひねり運動（**図１B**右）などを繰り返し行う．この初期反応はおよそ15～30分程度続き，その後は動きが止まることが多い．邪魔されなければ，その場で頭部を

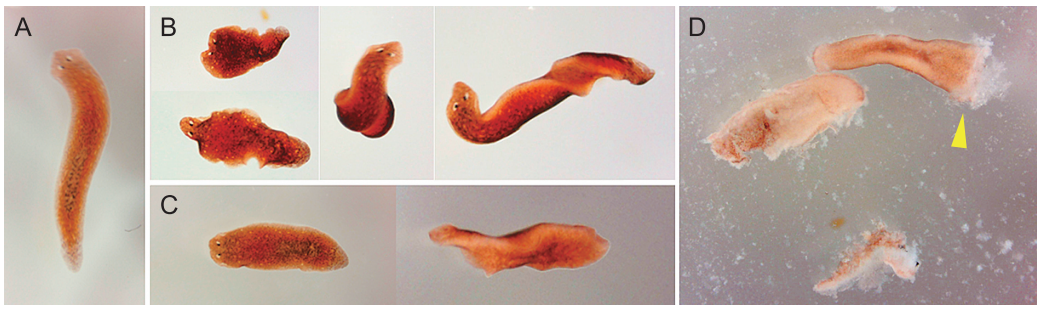

図１．純水中のプラナリアの表現型
（A）ミネラル天然水中のプラナリア，（B）純水に移行した直後のプラナリア（15分以内），（C）静止期のプラナリア，（D）崩壊過程のプラナリア．

すくめ，体全体を大きく萎縮させた状態でシャーレの底に付着したままになる（**図１C**左）．頭部の両側や体の周縁部が襞状にまくれ上がったようになる個体も多い．この時期は致死状態にあるわけではなく，ピペットの先などで刺激すると再度その場で初期反応と同じような動きを短時間繰り返すことができる．その後の数時間はこの静止期が続き，徐々に死に至ると考えられる．純水での洗浄操作を30分おきに繰り返した場合は，４～６時間のうちにシャーレ面との接着ができなくなった．シャーレから離脱した個体は，横向きになって動きを止めることが多く（**図１C**右），体を丸め襞状に波打つ周縁部を示す個体も現れる．この後，開始時期に個体差はあるが，最終的に数日のうちにすべての個体で体の崩壊が起こる（**図１D**）．多くのケースで純水中での体の崩壊は頭部から始まり（**図１D**，三角矢印），典型的には体の前方から後方，周縁部から内部に向けて進行する．溶解する際，崩れ始めた体表面から白い綿のようなものが出始める．

このように純水に投入したプラナリアは，数日で溶解してしまってその多細胞体を維持できないのに対し，市販のミネラル天然水を飼育水として利用した場合は，溶けずに問題なく個体を維持，生存を続けることができる．したがってプラナリアが溶解してしまう理由は，ミネラル天然水に含まれている各種の金属イオンや微量元素などの生体維持に必須な成分が純水では不足しているためかもしれない．そこで次に，純水とミネラル天然水の違いであるミネラル成分に注目し，プラナリアの生存に必要な元素を絞り込むための実験を行った．本研究で飼育水として利用しているミネラル天然水（い・ろ・は・す 白洲の天然水；コカ・コーラボトラーズジャパン㈱白洲工場：採水地，山梨県北杜市白洲町）は，採水地の湧き水に由来する多くの微量ミネラルを含有しているが，成分操作を可能にする実験系を構築するため，い・ろ・は・す天然水の成分表示に記載のあるナトリウム，カリウム，マグネシウム，カルシウムの金属元素を成分表示の濃度と同じになるように，それぞれの塩化化合物を純水に加えたミネラル合成水をまず作製してみた（材料と方法，2.6.2 各金属のストック溶液とミネラル合成水の調整）．ミネラル天然水は，甲斐駒ヶ岳の麓から採水した天然水をもとに滅菌製造されているので，成分表示されている４つの金属元素以外にもさまざまな微量元素が溶け込んでいるのに対し，作製されたミネラル合成水は，微量元素を含まず，ナトリウム，カリウム，マグネシウム，カルシウムおよび塩素の５つの元素のみを含有する水溶液である．このミネラル合成水を使って飼育実験を行ったところ，すべての個体が長期間生存可能であることがわかった（**表１**；青字は活発に遊泳し外見上判別可能な異常を示さなかったサンプル，赤字は実験期間内に溶解したか，顕著な異常を示したサンプル．数字は溶解せずに残った個体数，灰色部分は全個体が溶解したことを示す．１日目は，実験を開始した当日を表す．以下，すべての表で同様の基準で表記）．飼育水にミネラル天然水とミネラル合成水をそれぞれ使用した場合，飼育中のプラナリア個体の外見や遊泳行動に違いがみられず，いずれも長期間の生存が確認できたた

め，プラナリアの生育には，ナトリウム，カリウム，マグネシウム，カルシウム，塩素以外の微量元素は飼育水中から供給されなくても問題ないと考えられる．そこで次に，これら５つのうちのどの元素が，プラナリアの生体維持に必要なのかを調べることにした．

表１．各金属イオン水溶液中のプラナリアの挙動Ⅰ

飼育水	１日目	２日目	３日目	４日目	５日目
ミネラル天然水	3	3	3	3	3
ミネラル合成水	3	3	3	3	3
純水	3	1	0	0	0
Na	3	3	2	1	0
K	3	3	2	2	2
Na+K	3	2	2	2	2
Mg	3	2	1	0	0
Ca	3	3	3	3	3
Mg+Ca	3	3	3	3	3

3.2 飼育水中の各金属イオンがプラナリア生育に与える影響

最初に必須元素の候補を絞り込むため，１価および２価の陽イオンのペアを組み合わせた水溶液中で予備的な観察を行ってみたところ，驚いたことにプラナリアの反応に明瞭な違いがみられることがわかった．１価の陽イオンのペア（ナトリウム＋カリウム）の水溶液中のプラナリアは，遊泳速度が落ち異常行動を示し続けるのに対し，２価の陽イオンのペア（マグネシウム＋カルシウム）の水溶液中のプラナリアは，投入直後こそ純水に暴露した時と同じような初期反応を示す個体がいるものの，最終的にはミネラル合成水中と見分けのつかない活発な活動を行うことができるようになった．この結果を受けて，９つの水溶液（ミネラル天然水，ミネラル合成水，純水，ナトリウム＋カリウム，マグネシウム＋カルシウム，ナトリウム（0.48 mM），カリウム（0.023mM），マグネシウム（0.095mM），カルシウム（0.18mM））を飼育水として用いてプラナリアの飼育実験を行った（**表１**；材料と方法，2.6.2 各金属のストック溶液とミネラル合成水の調整）．各金属元素の濃度は，ミネラル天然水とほぼ同じ濃度になるように調整している．個体差が出ることを考慮して，１つの水溶液に対してプラナリアを３匹ずつ投入して実験を行った．プラナリア各個体から溶出する成分元素の実験への影響を抑えるため，実験開始時と翌日の２度にわたって，それぞれ使用している水溶液を新しいものに３回交換する洗浄操作を行った（材料と方法，2.4 プラナリアの洗浄方法）．

0.48mMナトリウム水溶液については，入れ替えた直後は体全体を収縮させるような動きを示したが，その後，その場で運動を停止した．ピペットの先で刺激すると泳ぐことはできないが頭部を振る反応をみせた．頭部をすくめて頭尾軸方向に収縮した体形をとり，周縁部は襞をうったような形に変形する．その後，シャーレ面との接着もできなくなり浮き上がる個体がでてくる．２日目には，１個体が溶解し，残りの２個体については，ピペットで刺激すると泳ぎだす個体とほとんど泳がずその場で停止したまま頭部を振る個体が現れ，個体差が生じていた．泳ぐ速さについてはいずれも格段に遅くなった．４日後には，さらに１個体が溶解し消滅した．

0.023mMカリウム水溶液に関しては，ナトリウム水溶液と同様，入れ替え直後はその場で停止していたが，ピペットで刺激すると泳ぎだす個体もいれば，その場で頭部や胴部をひねりながら動かす個体も確認できた．カリウム水溶液に入れたプラナリアは，最終的に１匹が溶解したが，残りの２個体については４日目も消失せず，ピペットの先で刺激すると泳ぎだすことを確認した．いずれも遊泳速度はミネラル天然水中に比べると格段に遅くなっていた．

ナトリウム＋カリウム（0.48mMナトリウムと0.023mMカリウムの混合水溶液）については，上述したナトリウム単独やカリウム単独の水溶液で飼育したプラナリアとほぼ同様の挙動を見せた．４日目までに１匹が溶解したが，残りの２匹は溶解までは至らないものの，ほとんど動きを止めて刺激を与えた後の遊泳速度も低下した．

次に0.095mMマグネシウム水溶液に関しては，プラナリアを入れた直後はミネラル天然水やミネラル合成水中と同様に体が伸びた状態を保ち，ナトリウム単独やカリウム単独の水溶液で観察された体が収縮する反応はあまり見られなかった．ただし遊泳はあまりできず，その場で頭部を振っている状態が多く確認された．その後１日経過するごとにプラナリアは順次溶解し，４日目には全滅してしまった．

入れ替え直後から何らかの異常が見られた以上の各水溶液に対し，0.18mMカルシウム水溶液については，ミネラル天然水中と同様に，体を優雅にゆっくり回転させながら活発に動き回る様子が確認できた．その後もカルシウム水溶液を入れ替えながら飼育を続けたが，常に活発に活動し異常な反応は長期間にわたり観察されなかった．以上の結果から，金属元素が単体で入っている水溶液では唯一，カルシウム水溶液中の個体だけが３匹とも生き残り，継続的に活発な遊泳を続けることができることがわかった．カルシウム＋マグネシウム（0.18mM $CaCl_2$と0.095mM $MgCl_2$の混合水溶液）についても，カルシウム水溶液同様，４日後以降も活発に活動する様子が見られた．可能なすべての元素の組み合わせで観察を行ってはいないが，これまでのところ，カルシウムイオンが飼育水中に存在する条件では，プラナリアは生存が可能である．

3.3 プラナリア生育への塩素イオンの影響

上記の実験において，金属イオンを添加するために用いた試薬はすべて塩化化合物であったため，$CaCl_2$水溶液中で確認されたプラナリアの生存について，塩素イオンの影響がどの程度あるのかを調べる実験を次に行った．カルシウムイオンの供給源として，塩化カルシウムではなく硫酸カルシウム（0.18mM $CaSO_4$）を用い，１つのシャーレに３匹を飼育した．**表２**に示すように，$CaSO_4$水溶液中でも$CaCl_2$水溶液中と同様に長期間活発に活動でき，死滅して溶解する個体も現れなかったため，プラナリアの生存に対する塩素イオン欠如の影響は無視し得ると考えられる．

表２．各金属イオン水溶液中のプラナリアの挙動Ⅱ

飼育水	含有イオン	１日目	４日目	７日目
ミネラル合成水	Na^+，K^+，Mg^{2+}，Ca^{2+}，Cl^-	3	3	3
純水		3	0	0
Na+K+Mg	Na^+，K^+，Mg^{2+}，Cl^-	3	3	0
Ca（$CaCl_2$）	Ca^{2+}，Cl^-	3	3	3
Ca（$CaSO_4$）	Ca^{2+}，SO_4^{2-}	3	3	3

3.4 ナトリウム＋カリウム＋マグネシウム水溶液とカルシウム水溶液の生育比較

ミネラル合成水の成分のうち，カルシウム以外の３種類の金属イオンを混合させた0.48mM NaCl 0.023mM KCl 0.095mM $MgCl_2$水溶液，0.18mM $CaCl_2$水溶液，および純水の３つの液中で生存実験を行った（**表２**）．その結果，純水では投入直後にプラナリアの調子が悪くなり，３日後には全個体が溶解したのに対し，カルシウム水溶液では長期間活発に活動する様子が見られ，前述の実験の再現性がとれた．カルシウムを欠乏させたナトリウム＋カリウム＋マグネシウム水溶液に関しては，水溶液に入れた直後は体をよじらせる反応を示したものの，しばらくすると比較的正常に遊泳するようになったが，４日後には泳ぐことができずその場で体を縮めるような挙動を示すようになった．ピペットの先で刺激すると，体を捻じらせ動く様子は見られるものの遊泳はできない状態であった．プラナリアの動きは極めて悪くなるが，純水中のように溶解してしまう個体は４日目までは見られなかったため，さらに飼育を続けたところ，７日後には全個体が溶解していた．

3.5 プラナリアの栄養状態が飼育実験に与える影響

以上の実験で異常が観察された水溶液中のプラナリアの反応の程度には，かなりの個体差が見られた．ピペットで刺激しないと動かない個体や，体をねじる動きを示す個体に加え，２日

目になっても泳ぐ速さは遅くなるが動くことのできる個体も存在した．このような個体差がみられた理由として，個体によって摂食による栄養補給の程度が異なっていてそれが影響した可能性や，先に溶けてしまった個体から溶出したカルシウムなどの必須元素が個体の生育に影響した可能性などが考えられる．

標準的な飼育法では，細かく切って保存した冷凍の鶏レバーを室温に戻して，１週間に１度シャーレに添加し給餌することになっている（材料と方法，2.2 プラナリアの飼育法）．しかしプラナリアは，１カ月ほど給餌しなくてもミネラル天然水中で十分生存可能である．上記の３つの実験で用いたプラナリアはいずれも，通販サイトから購入後，２～４週間にわたって給餌せず，軽い飢餓状態にある個体を使用している．本研究における観察では，純水に入れた後数日でプラナリアが溶解することが多かったのに対し，他の研究論文では純水中で３週間ほど生存し得るとの記載があったため[10]，プラナリアの栄養状態が実験結果に影響している可能性がある．そこで餌を与えた個体と与えなかった個体の純水中の生存について比較実験を行った．実験の前日に餌の鶏レバーを十分量与えた個体と，４週間以上飢餓状態にした個体を３個体ずつ用意し，純水中の挙動を観察した．その結果，餌を与えた個体は，純水に暴露した直後は**図１B**に示したような初期反応を共通して示すものの，純水中で飼育し続けた４日後も活発に活動することができ，さらにその後１週間たっても遊泳が可能な状態であることが確認できた．一方，餌を与えていない個体では，これまでの実験で観察された反応と同様に，純水に移行した直後から**図１B**に示したような典型的な反応が起こり，１～２日で溶解する個体が現れ，４日後には３匹とも全滅してしまった．以上の結果から，プラナリアが飢餓状態にあるか否かで，純水中の生存実験の結果が左右される可能性があると考えられる．

死滅した個体からの栄養物の流出が生存期間の個体差を生み出している可能性について，本研究では結論を導き出せるような厳密な比較実験を行っていないが，溶解した個体がでたシャーレでは，生き残っている個体を３回洗浄した後，新しい溶液と入れ替えているため，他個体への影響は限定的なのではないかと考えている．

3.6 プラナリア生育への金属イオン濃度の影響

以上の実験で使用した水溶液については，ベースとなったミネラル天然水の金属含有量に合わせて各金属イオンの濃度を調整したものを使用していた．飼育水中の金属イオン濃度や浸透圧がプラナリアの生死にどの程度影響しているのかを査定するため，次の実験では４つの単体金属の濃度を0.1mM，1.0mM，10mMの３つの濃度にそろえて比較実験を行った（**表３**）．１つのシャーレにつきプラナリア３匹を飼育し，各個体の様子を４日間にわたり記録した．その結果，ナトリウム，カリウム，マグネシウムの各水溶液については，いずれの濃度においても，基本的に**表１**の純水中と同様の初期反応を示し，多くの個体が数日以内に溶解して死滅し

た．例外として，1.0mMマグネシウム水溶液中で４日目まで生存していた個体１匹については，目立った異常は示さず遊泳速度も正常であった（**表３**，＊のついた個体）．マグネシウム水溶液については，いずれの濃度でも顕著な収縮反応を起こすことはなかったが，尾部をシャーレ面につけて頭部を反らし，とぐろを巻くような形に体をくねらせる反応を繰り返し示す個体が多く出現した（**図２A**）．遊泳行動は停止する個体が多く，日数を重ねるうちに溶解する傾向にあった．ナトリウム水溶液については，濃度が高くなるにつれて溶解し消失する個体数は減る傾向にあったが，波打った周縁部を丸めて浮き上がり，ピペットの先で刺激してもいずれの個体もほとんど動かなくなっていた（**図２B**）．カリウム水溶液は，他の同濃度の金属イオン水溶液と比べると明らかにプラナリアに対する毒性が高いことがわかった．本研究で用いたミネラル天然水中のカリウム濃度は0.023mMと比較的低濃度であることから，前述したカリウム単独の水溶液中ではナトリウム単独やマグネシウム単独の水溶液と比べると溶解する個体数が減少していたが，より高濃度のカリウム添加実験では，明瞭な致死効果を示した（**表３**）．10mM濃度では，投入直後から体を捻じって悶えるような挙動を示し，２時間後には咽頭を突出させる個体が続出した（**図２C**，三角矢印）．さらに１日後には，咽頭が体から飛び出たような個体や，溶解が始まる個体が多く観察された（**図２D**）．

以上の３つの金属イオンの水溶液に対して，カルシウム水溶液については，いずれのイオン濃度でもプラナリアは活発に活動し（**図２E**），長期間生存できることがわかった（**表３**）．そ

表３．モル濃度をそろえた４種類の主要金属イオン水溶液中のプラナリアの挙動比較

水溶液	mM	１日目	２日目	３日目	４日目
NaCl	0.1	3	3	1	0
	1.0	3	3	2	1
	10	3	3	3	3
KCl	0.1	3	1	0	0
	1.0	3	0	0	0
	10	3	0	0	0
$MgCl_2$	0.1	3	1	0	0
	1.0	3	2	1＊	1＊
	10	3	1	1	0
$CaCl_2$	0.1	3	3	3	3
	1.0	3	3	3	3
	10	3	3	3	3

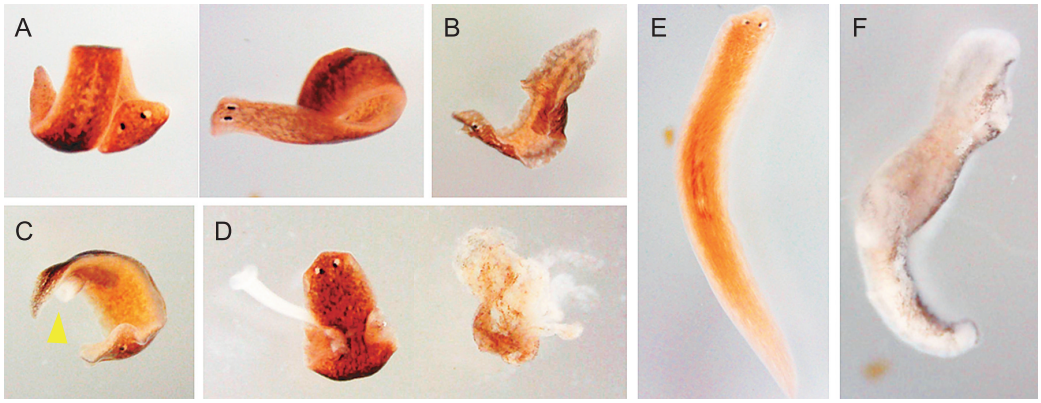

図２．マグネシウム，カリウム，ナトリウム，カルシウム，各金属元素の単独水溶液中のプラナリア表現型
（A）10mM $MgCl_2$水溶液，投入直後．（B）10mM NaCl水溶液，１日後．（C）10mM KCl水溶液，投入２時間後．（D）10mM KCl水溶液，１日後．（E）10mM $CaCl_2$水溶液，１日後．（F）高濃度100mM $CaCl_2$水溶液，１日後．

こでカルシウム水溶液のみ，0.01mMと100mMの各イオン濃度で３匹ずつ追加実験を行ったところ，0.01mMカルシウム水溶液では２日目に全個体が溶解した．100mMカルシウム水溶液では，投入した直後に咽頭を突出させてピペットの先で刺激しても反応しなくなり，２日目にはすべての個体で体の周縁部がクリーム色に変色して靄がかかったような形状になり，形が崩れ始める（**図２F**）．このように，飼育水中のカルシウムイオンには，プラナリアにとって生存可能な濃度限界があると考えられる．

純水が生体にとって毒性を持つ理由の１つとして，浸透圧の極端な低下が考えられる．カルシウム以外の塩類であっても適度に含まれている水溶液の方が，プラナリアの溶解速度を遅延させる効果があるので，浸透圧のバランスを保つことがプラナリアにとって一定の保護効果を持つことはおそらく間違いないと思われる．しかし本実験から明らかなように，同程度の濃度の金属塩類ではカルシウム塩の劇的な保護効果を代替できないので，飼育水にカルシウムが含まれているかどうかがプラナリアの生存を左右する最も根源的な決定因子と考えられる．

3.7 カルシウム水溶液中におけるプラナリアの再生実験

モデル生物としてのプラナリアの最大の魅力はその類まれなる再生能力であろう．本研究でも，ミネラル天然水中でプラナリアをさまざまな切り方で切断してみたところ，１～２週間後には再生に成功することがわかった．そこでカルシウム水溶液中で，プラナリアの再生が起こるかを次に検討することにした．まずプラナリアの個体を頭尾軸方向に剃刀を使っておおよそ３等分して頭部，胴部，尾部に切り分け（**図３A**），それぞれをカルシウム水溶液中に投入して再生過程を観察した．切断面から体液が飼育水中に溶出し各種の金属元素をはじめとする体

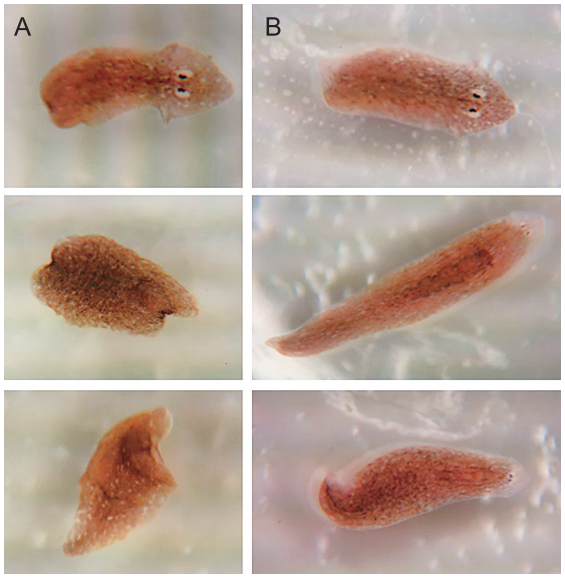

図 3．カルシウム水溶液中のプラナリア再生
（A）１個体を頭部（上），胴部（中央），尾部（下）の３つに切断した直後の各断片，
（B）１週間後の各断片からの再生個体．

内成分が流れ出てきて実験結果に影響を与える可能性があったため，１日１回カルシウム水溶液で切断した各個体部分を３回洗浄する操作を繰り返した．その結果，カルシウム水溶液中でもミネラル水と同様に１週間前後で再生が完結することが確認できた．頭部断片からは胴部と尾部が，胴部断片からは頭部と尾部が，尾部断片からは胴部と頭部が，遅延なく生成した（**図 3 B**）．再生途中の各断片について，ピンセットの先で刺激するとその場で動く様子や，ある程度の大きさになると遊泳しだす断片も観察することができた．それぞれの再生途中の断片の動きについては，カルシウム水溶液中とミネラル天然水中とで，大きな差はなかった．ピペットの先で刺激すると泳ぎだすものやその場で体をよじらせる断片部分の反応については，いずれの溶液中でもある程度の大きさに断片の再生が進むと観察できるようになる．

3.8 カルシウムキレート剤のプラナリア生育に対する影響

さまざまな元素を含むミネラル天然水中で，カルシウムが欠失するとプラナリアの生育にどのような影響が出るのかを確認するために，二価の陽イオンのうち特にカルシウムへの選択性が高いキレート剤であるBAPTA[14]を添加したミネラル天然水と純水を飼育水にして，５匹ずつ飼育する実験を行った（**表 4**）．

表 4．カルシウム選択的キレート剤添加水溶液中のプラナリアの挙動

飼育水	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	7 日目
ミネラル天然水	5	5	5	5	5
天然水＋50μMBAPTA	5	5	5	5	5
天然水＋100μMBAPTA	5	5	5	5	5
天然水＋500μMBAPTA	5	0	0	0	0
純水	5	4	4	3	3
純水＋50μMBAPTA	5	2	0	0	0
純水＋100μMBAPTA	5	0	0	0	0

経過観察中は 1 日ごとにそれぞれの飼育水を新しく調整したフレッシュな飼育水と交換して，BAPTAの分解の影響を抑えつつ，プラナリア個体や溶解した個体から新たに溶出する可能性のあるカルシウム等の金属イオンを除去する対策を講じた．50μMおよび100μMの最終濃度でBAPTAをミネラル天然水に添加したところ，コントロールのDMSOを等量添加したミネラル天然水中のプラナリア（**図 4 A**）と比較して，7 日後までの個体の溶解率はいずれも 0 % で毒性を示さず，プラナリアの遊泳速度や挙動にも添加直後から数日後までの経過観察中にこれといった異常を見出すことができなかった（**図 4 B**）．これに対して，同量のBAPTAを純水中に添加した場合，顕著に純水の毒性が高まり，コントロールの純水＋DMSO中では静止期にあって刺激に対してはまだ反応できる24時間後の時期に（**図 4 C**），100μMの濃度ではすべての個体が完全溶解あるいは部分溶解し，消失した（**図 4 D**）．50μMの濃度でも，翌日に 5 匹中 3 匹が完全溶解し，残った 2 匹も刺激に反応しなくなっていた．この実験に使用したプラナリアの飼育バッチは，給餌してから10日後程度のおそらく比較的栄養状態の良い個体であったため，コントロールの純水＋DMSO中の個体の消失にはばらつきがあり，7 日後でも溶解しない個体があった．このコントロールと比較すると，BAPTAの添加には濃度依存的にプラナリアに対する毒性の亢進効果があることがわかる．純水中には極めて低濃度のカルシウムしか溶存していないため，BAPTAの添加がもたらす毒性効果は，プラナリア個体から排出・溶出するカルシウムが，純水中でのプラナリアの生存と個体維持に一定程度貢献している可能性を示唆しているのかもしれない．ミネラル天然水に添加して致死的な影響を示さなかった低濃度のBAPTAが純水中では顕著な毒性を示したことを受けて，さらに高濃度の500μM BAPTAをミネラル天然水に加える実験を行ったところ，添加後わずか 6 時間以内にすべての個体が消失するか溶解を始める状態に至ることがわかった（**表 4**，**図 4 E**）．このことから100μM BAPTAは溶存するすべてのカルシウムをキレートすることができておらず，ミネラル天然水中からプラナ

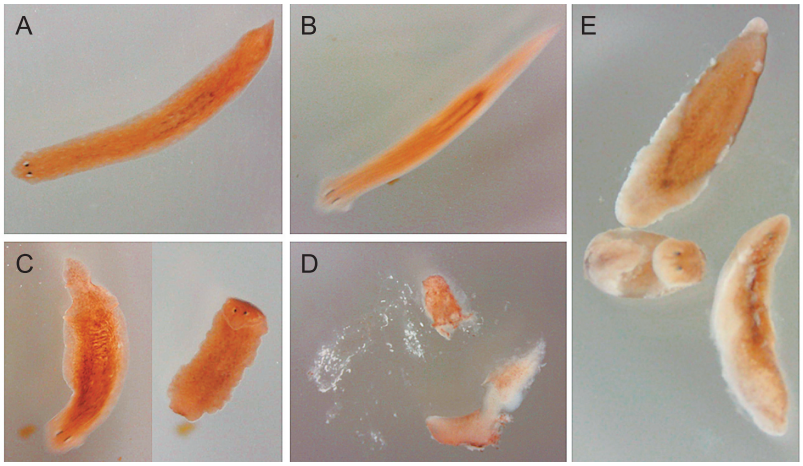

図 4．カルシウム選択的キレート剤添加の表現型
（A）ミネラル天然水＋DMSO，7 日後．（B）ミネラル天然水＋100 μM BAPTA，7 日後．（C）純水＋DMSO，1 日後．（D）純水＋100μM BAPTA，1 日後．（E）ミネラル天然水＋500μM BAPTA，6 時間後．

リアに毒性を示す閾値までカルシウムを除去するためには，より高濃度のBAPTAが必要であったことが示唆される．以上の実験から，ミネラル天然水中のカルシウムを十分キレートすると，プラナリアは生存できなくなりすぐに溶解してしまうことがわかった．

3.9 カルシウムチャネル拮抗阻害剤のプラナリア生育に対する影響

次に飼育水中のカルシウムが，どのような経路でプラナリアの生存に関わっているのかについての知見を得るために，L－型カルシウムチャネル阻害剤である塩酸ニカルジピンを，5 μMと10μMの最終濃度で飼育水に添加した[15]．塩酸ニカルジピンを加えていないコントロールには，溶媒であるメタノールを等量加えた．膜電位依存性L－型カルシウムチャネルは，細胞膜のカルシウムイオン流入経路として，膜電位の脱分極によって開口することが知られている[8),15)]．神経細胞や筋細胞などの興奮性細胞で働き，神経伝達物質放出，筋収縮，遺伝子発現などのカルシウムイオン依存性細胞応答を制御している．L型はLong–lastingの略で，チャネルが開いた後，長時間開いたままとなる性質を示し，持続的なカルシウムの流入を可能にしている．塩酸ニカルジピンを加えた飼育水中では，このカルシウムチャネルの機能が阻害され，プラナリアの細胞内へのカルシウムイオンの流入が起こりにくくなることが予測される．

ミネラル天然水および純水に対して，塩酸ニカルジピンを投与して飼育水に使ったところ，純水にプラナリアを暴露した時とよく似た初期反応を示した．その後，純水＋塩酸ニカルジピン中では徐々に動きが止まって静止期に入るのに対し，ミネラル天然水＋塩酸ニカルジピン中では，激しく体をくねらせて同じ場所で頭部を回転し続ける表現型が見られた（**図 5 A**）．塩

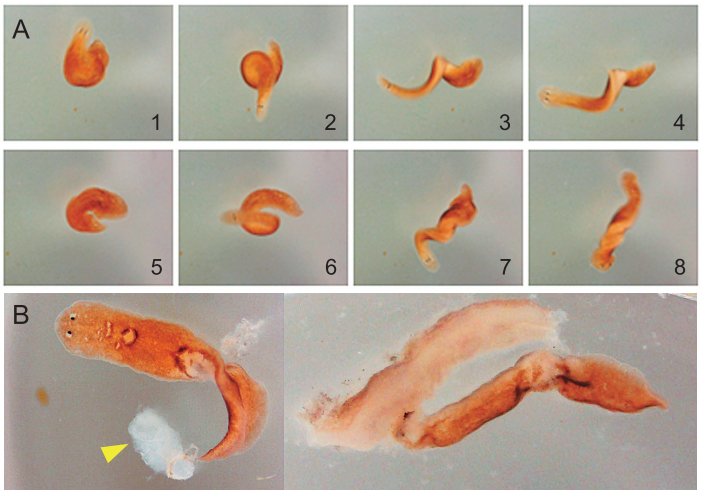

図 5．膜電位依存性L型カルシウムチャネル阻害剤添加の表現型
（A）ミネラル天然水＋5 μM塩酸ニカルジピン．添加5分以内に起こる激しいうねり運動．左上から右下に向かって番号順におおよそ1～2秒間隔で撮影．
（B）ミネラル天然水＋5 μM塩酸ニカルジピン．1日後，刺激に対してわずかに動くが，咽頭部分が脱離している個体（左）．刺激に対して反応しなくなり部分的に溶解を始めた個体（右）．

酸ニカルジピンを加えたミネラル天然水中では，翌日（2日目）には完全溶解，あるいは部分的に溶解を始めるものが多くみられ（**図 5 B**右），純水中の個体の溶解よりも早く異常が観察される傾向にあった（**表 5**）．溶解を免れている個体についても，マイクロチップの先で刺激を与えると動き出しはするが，咽頭部が体から抜け出たように見え，泳ぎだすことはできなかった（**図 5 B**左）．3日目（48時間後）には，5 μMと10μMのいずれの濃度でも塩酸ニカルジピンを加えたミネラル天然水中の個体はすべて完全に溶けてしまった．コントロールのミネラル天然水では，7日目以降もすべての個体が活発に動き回っていた．これに対し純水中のプラナリアは，徐々に溶解する個体が増えたが，7日後でも溶解しない個体があった．塩酸ニカルジピンを加えた純水中では，3日目に100μM濃度で溶解する個体数の増加が観察されたが（**表 5**），ミネラル天然水に加えた場合と比較すると，その毒性は限定的である．塩酸ニカルジピンを添加した純水中では，細胞外にもともとカルシウムイオンが存在しないので，カルシウム

表 5．膜電位依存性L型カルシウムチャネル阻害剤添加水溶液中のプラナリアの挙動

飼育水	1日目	2日目	3日目	4日目	7日目
ミネラル天然水	5	5	5	5	5
天然水＋5 μMニカルジピン	5	2	0	0	0
天然水＋10μMニカルジピン	5	0	0	0	0
純水	5	4	3	2	2
純水＋5 μMニカルジピン	5	5	4	4	0
純水＋10μMニカルジピン	5	4	2	1	0

チャネルが阻害されてもあまり表現型に影響がでないのは当然かもしれない．カルシウムの流入が阻害されるという点では，ミネラル天然水中でも純水中でも同じだが，ミネラル天然水のように他のイオンが環境水中に存在する場合は，激しいうねり運動を起こし継続することがわかった．

3.10 カルシウムイオンの膜電位形成への影響を測定する実験

カルシウムイオンは細胞の膜電位を形成するために重要な働きを持っていることが知られている[8),17)]．カルシウムイオンが存在しない純水中では，この膜電位の形成に何らかの異常が発生する結果，プラナリア表皮の細胞の安定維持に影響が出ている可能性を検討した．プラナリアの体表の膜電位の状態変化を可視化して測定するため，アニオン性膜電位感受性色素$DiBAC_4(3)$を用いて，ミネラル天然水，純水，カルシウム水溶液の３つの飼育水中で飼育したプラナリアを染色し，蛍光観察を行った（材料と方法，2.5 プラナリアの観察・撮影方法）．純水中では１日以上時間を置くと個体が溶けてしまう可能性が高いので，それぞれの水溶液に置き換えてから６時間後に$DiBAC_4(3)$による染色を開始した．30分間の遮光状態での染色後，それぞれのサンプル個体を低融点アガロースに埋め込んでガラスボトムディッシュのホール部分に固定し，蛍光顕微鏡で観察を行った．カバーガラス面に接した扁平な個体周縁部分を探してピントを合わせ，撮影を行った．

図６の上のパネルがプラナリア個体の微分干渉像で個体の表皮外形を，下のパネルが$DiBAC_4(3)$の緑色蛍光波長を検出した膜電位の変化を示す撮影像になる．$DiBAC_4(3)$を添加していないミネラル天然水中のプラナリアでは蛍光が全く観察されないため，検出された緑色蛍光は$DiBAC_4(3)$の局在を反映しており，自家蛍光に由来するシグナルではないことがわかる．またミネラル天然水中のプラナリアでは，$DiBAC_4(3)$の蛍光シグナルが，これまでに報告されている通り[15),16)]，表皮の周縁部に集積していることがわかる．同様の条件下で，純水中，およびカルシウム水溶液中のいずれのプラナリアについても，表皮付近に$DiBAC_4(3)$の集積が同程度検出されたため，表皮部分の膜電位の状態変化がこの３つの液中で著しく異なっているわけ

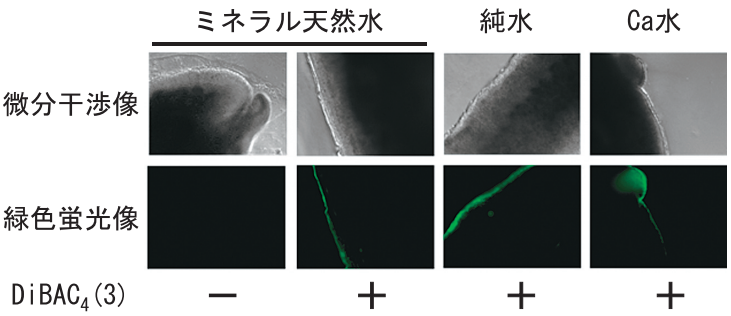

図６．$DiBAC_4(3)$によるプラナリアの膜電位変化の測定実験
上；微分干渉像，下；緑色蛍光波長で$DiBAC_4(3)$の分布を撮影．ミネラル天然水に$DiBAC_4(3)$を添加していないサンプルをネガティブコントロールとした．

ではないことがわかる．純水中の個体の表皮内部に，$DiBAC_4(3)$のシグナルが比較的強く浸透する傾向にあるが，現時点では，本研究室の$DiBAC_4(3)$の実験プロトコルが最適化されているとはいえない状態なので，同一の水溶液を用いた同条件の観察でも，サンプルによってある程度の蛍光強度の強弱の差が出てしまう．したがって膜電位の状態に微妙な差があったとしても，検出精度の範囲内では結論を下すことができなかった．カルシウムの選択的キレート剤BAPTAを低濃度で純水中のプラナリアに投与すると個体の崩壊速度が速まるという結果（**図4 C, D**）を考慮すると，本実験でも純水に100μM BAPTAを加えて実験したサンプルを観察し比較してみることが必要だったかもしれない．膜電位依存性カルシウムチャネルの阻害によって，ミネラル天然水中のプラナリアの溶解が劇的に誘起されることからも（**図5**），飼育水中成分のカルシウムイオンがプラナリアの体表の膜電位の状態に影響を与えている可能性は依然として残るため，今後より厳密な測定を可能にする実験条件の検討が望まれる．

4．考察

本研究では，外来種プラナリアであるアメリカツノウズムシとアメリカナミウズムシの生育と再生にとって，環境水中のカルシウムが決定的に重要であることを明らかにした．カルシウムを欠いた飼育水中では，少なくとも飢餓状態にあるプラナリアは数日のうちに溶解するのに対し，カルシウムを含む水溶液中では長期間，活発に遊泳を続けることができた．これらの結果の確認実験を行っている過程で，同様の結果が，100年近く前に論文報告されていることに気づいた[11]．そこで本研究では，カルシウムのキレート剤やカルシウムチャネルに対する拮抗阻害剤を用いた実験を行い，カルシウムの生理的役割についての考察を行った．プラナリアの行動に果たす役割については，水環境中のカルシウムイオンが摂食行動の促進に必要であることが報告されている[10]．

4.1 Hess論文の結果との比較と新しい知見

図らずも本研究では，シカゴ大学のOlga Theodore Hessによっておよそ100年も前に発表された研究結果を，独立に再発見することとなった．Hess論文[11]の主な目的は，３つの金属イオン，ナトリウム，カリウム，カルシウムがプラナリアの呼吸過程，特に酸素消費に対しどのような影響を持つのかを調べることであった．時代背景として，当時はウニ卵などを材料に，これらの金属イオンの添加が生物の酸素消費量を変化させる現象（ナトリウムの促進作用，カルシウムの抑制作用など）が見つかっていて[18]，同じことが他生物種でも起こるのかに関心が持たれていたようである．この研究過程でHessは，*Planaria dorotocephala*種が他の淡水棲のいくつかの種，例えば*P. maculata*（スクミリンゴガイ）よりも蒸留水に弱いことを見出している．Hess論文では*Planaria dorotocephala*と記載されているが，おそらくこれは本研究で用いたアメ

リカツノウズムシ*Girardia dorotocephala*のことだと推察される．

Hessはプラナリアの酸素消費量の変化を，蒸留水，塩化ナトリウム，塩化カリウム，塩化カルシウムの各水溶液中で測定，蒸留水と塩化ナトリウム水溶液中では正常，塩化カリウム水溶液中では酸素消費量が上昇し，致死となることを明らかにしている．塩化カルシウム水溶液中では，暴露直後に酸素消費量が減少するが，しばらくすると正常に戻り，このカルシウムと塩素のみを含む0. 2mMから20mMまでの濃度の純水溶液中で，プラナリアは非常に長期間，おそらく無期限に生き続けることができるだろうことを報告している．また１カ月以上の長期間，塩化カルシウム水溶液中で給餌せずに飼育したプラナリアでも，分裂の場合には活発な再生が起こったことも記載されている．Hessとは独立に，本研究でも金属イオン水溶液を用いてプラナリアの生育と再生についての観察を行い，ほぼ同様の結論を得ている．

図２に示した各水溶液中のプラナリアの挙動についても，我々の結果はHessの観察と良い整合性を示した．特に塩化カリウムの致死効果が，塩化ナトリウムのそれよりもはるかに顕著で，咽頭が口外に突出するか，背側の壁を突き破って体から完全に分離する特徴的な表現型を示すこと（**図２C**，**D**）や，塩化ナトリウム水溶液で観察される体の両端がほとんど触れ合うように湾曲し，襞状の周縁部を持つ腹面を凹ませて横向きに浮き上がる表現型（**図２B**）などは，Hess論文と本研究との間で高い再現性を示した．Hess論文には，高濃度の塩化カルシウムは致死的で，暴露直後は体を曲げたり，ひねったり，伸ばしたり，持ち上げたりする激しい筋肉活動が連続し，その後は咽頭が口から突き出て静止すること，１日後には非常に大量のスライムが放出され，プラナリアは硬くなった不透明な粘液の束で固められることなどが記述されているが，同じ現象は本研究でも観察された（**図２F**）．Hessによると，扁形動物では，培地中の高濃度のカルシウムは粘液の過剰生産をもたらし，逆にカルシウムが不足すると粘液の生産が減少することが知られているとのことなので，本研究の100mM塩化カルシウム水溶液で観察されたクリーム色の靄のような付着物は．プラナリアが作り出した粘液の塊りなのかもしれない．Hessは0. 2mMから20mMまでの濃度の塩化カルシウム水溶液におけるプラナリアの生存を確認しているので，同様の実験と硫酸カルシウム水溶液を用いた本研究結果などと合わせると，0. 1mMから20mMまでの濃度でカルシウムイオン（とそれに釣り合う陰イオン）が環境水中に存在すれば，プラナリアは長期間活動を続けることができることがわかる．

本研究で実施した塩化物水溶液の観察のうちHess論文で記載されていないのは，塩化マグネシウムに関する実験である．ミネラル天然水と同じ濃度（～１mM）のマグネシウムイオン存在下では，顕著な表現型は観察されなかったが，10mM塩化カルシウム水溶液中では，プラナリアは特徴的なうねり運動を繰り返し示し始めることがわかった（**図２A**）．これとよく似ていてより顕著な表現型が，ミネラル天然水に膜電位依存性L型カルシウムチャネル拮抗阻害剤を添加した場合に観察されている（**図５A**）．Hess論文には，20～100mMの高濃度塩化ナトリ

ウム水溶液中で，プラナリアのリズミカルな収縮の波からなる筋活動が起こること，10mM以下の濃度ではそれが見られなくなるという観察結果が記載されている．そこで100mM塩化ナトリウム水溶液にプラナリアを暴露させる追加実験を行ったところ，10mM塩化マグネシウム水溶液中のうねり運動によく似た挙動をとることもわかった（データは示さない）．

飼育水の組成変化や生理活性を持つ物質の添加によって，プラナリアが示すいくつかの特徴的な行動が報告されている[19]．すなわち，Headbops（シャーレの底を滑走中のうなずくような頭部を振る動き），Corkscrews（浮遊／遊泳中のらせん渦巻回転），Tailtwists（尾部の先端を曲げる）．Headswings（尾部をシャーレの底に固定したまま，滑走せずに頭部を回転させる）などである．この他には麻痺様活動として，体をC字に屈曲させるC–shape発作が，コリン作動薬やニコチンに暴露された後などに出現する筋収縮として報告されている[20]．我々が観察した上記のうねり運動は，CorkscrewsとHeadswingsが連続して起こっているような印象で，筋細胞制御異常に起因しているのかもしれない．カルシウムイオンは筋細胞収縮において重要な役割を果たしており，カルシウム濃度の制御異常により，筋の過度の緊張や痙攣などが起こって特徴的なうねり運動が反復する表現型に結び付いたのかもしれない．この観点からは，100mMナトリウムイオン，10mMマグネシウムイオンなどの陽イオンのバランス異常と，カルシウムチャネル阻害によるカルシウム流入の停止が見かけ上よく似た運動障害を引き起こしたことは示唆に富む知見である．

Hess論文では，塩化カルシウム水溶液が飼育水としてプラナリアの生存と再生を保障するのに十分であることが報告されているが，本研究では飼育水であるミネラル天然水からカルシウムイオンを選択的にキレートするとプラナリアが死滅することも示している（**表 4**，**図 4 E**）．これはミネラル天然水中に含まれるカルシウムイオン以外の複数の元素の組み合わせでは，カルシウムの必須機能を代替できないことを強く示唆している．ただマグネシウム＋カリウム＋ナトリウム混合水溶液中では，純水中よりも溶解に至る時間が長くなる傾向にあるので（**表 2**），他の金属イオンも浸透圧緩和などのプラナリアの生存にとってポジティブな役割を持っている可能性がある．

本研究では，膜電位依存性カルシウムチャネルを介して環境水中のカルシウムがプラナリア生存に関わっている可能性について検討した．L型カルシウムチャネルの阻害剤である塩酸ニカルジピンを添加したミネラル天然水中のプラナリアは，特徴的なうねり運動を継続的に起こし続け致死となる（**表 5**，**図 5**）．これはカルシウムチャネルの機能攪乱により，プラナリアの筋細胞の制御異常が連続して発生していることを反映しているのかもしれない．プラナリアでは筋組織内で発現する形態形成遺伝子群が体作りにも決定的に重要であること[8]を考え合わせると，大変興味深い知見である．

4.2 環境水中のカルシウムの生理的役割

一般的にカルシウムの生理的な役割については，膜電位形成に関与，細胞内シグナルの伝達物質として働く，カルシウム結合タンパク質の補因子として働く，などの多彩な細胞機能が知られている．

このうち膜電位形成の機能については，細胞膜の内外におけるイオンの濃度勾配と，膜上のイオンチャネルによる選択的な透過性が，膜電位を形成することが知られており，カルシウムイオンはこのプロセスに重要な影響を与えている．通常，細胞膜の内側は負電荷を，外側は正電荷を帯びていて，この電位差を細胞の膜電位と呼ぶ．細胞膜はカリウムイオンやナトリウムイオンのような１価の陽イオンに対して相対的に透過性が高いのに対し，カルシウムイオンのような電荷を２つ持つ陽イオンは細胞膜を通過するのが難しいため，細胞膜にはATPを利用してカルシウムイオンを輸送するポンプが存在し，細胞内のカルシウムイオン濃度を低く抑えて膜電位の維持に寄与している．膜電位形成に直接的に関わるのはカリウムイオンとナトリウムイオンだが，カルシウムイオンの濃度や動態も細胞膜の電位に影響を与える重要な要素である．しかしながら，本研究の$DiBAC_4(3)$を用いた膜電位測定実験から，飼育水中のカルシウムの有無は，プラナリアの表皮の膜電位の状態を決定的に左右する影響要因ではない可能性が高い．したがって純水におけるプラナリア溶解の主原因が膜電位の形成異常によるとは結論できなかった．少なくとも飼育水に直接接触する可能性のある表皮細胞では，純水中では膜電位状態の顕著な異常が誘起されてもおかしくないが，プラナリアは個体内部（おそらく組織液）のイオンを利用して，表皮付近の膜電位を維持しているのかもしれない．

カルシウムの細胞内シグナル伝達物質としての役割については，セカンドメッセンジャーとして多くのシグナル経路で働いているので，その欠乏は深刻な生体機能の低下を引き起こすことが予想される[8]．しかしプラナリアは摂食を通して餌からカルシウムを取り込み，組織液を通じて体全体に供給できるため，環境水中のイオン濃度の減少が細胞内カルシウム濃度に即時的な影響を与える可能性は低いだろう．しかし餌を与えた直後のプラナリアは，飢餓状態にあるプラナリアに比べると純水中での生存期間が長くなることから，体内へのカルシウムの補給が純水中では不可能になる結果，さまざまなシグナル経路の不調をきたし恒常性が破綻して，プラナリアの溶解が起こる可能性は否定できない．実際，プラナリアの前後（AP）軸の制御には局所化されたWntシグナルが，背腹（DV）のパンターン化制御にはBmpシグナルが中心的な役割を果たしているが，これらのシグナル伝達経路はどちらもカルシウムイオンシグナルによって制御されることが知られている[8]．さらにプラナリアでは，位置制御遺伝子（PCG）と呼ばれるパターン形成遺伝子群が，形態形成と再生に必須な唯一の幹細胞である新芽細胞（Neoblast）の位置シグナリングに関与していることが知られているが，興味深いことに，PCG発現の組織部位は体壁筋（body wall muscle）で，おそらくすべて表皮下の筋内で発現してい

る[8]．したがってプラナリアの体壁の筋線維は，カルシウムによって制御される筋肉の収縮機能に加えて，再生反応を調整するユニークな追加的役割を担っていると考えられている．多くの極性調整に影響を与える薬剤が，同時に筋のカルシウムイオンの恒常性を擾乱するのもそのためかもしれない[21]．今後，さまざまな膜チャネルに対する特異的阻害剤などを用いて，細胞内外のカルシウムやその他の金属イオンが，プラナリアの生死や溶解現象にどの程度関わっているかを逐次検証してゆくことが重要となるだろう．

純水中ではカルシウムが不足するため，表皮のカルシウム結合タンパク質の働きが阻害されることによって，純水中でプラナリアが溶解した可能性については，現在のところ，想像の域を出ないが，あり得るシナリオの１つかもしれない．真核生物では非常に多くのカルシウム結合タンパク質が知られているが，１）環境水中のカルシウムの影響を直接受けること，２）機能が阻害されることで生体の溶解が誘導されること，以上の２つを満たす候補として，表皮の膜上に存在するカルシウム依存性細胞接着因子カドヘリンなどは，純水中で機能不全を起こしうる接着分子としての候補になるかもしれない[22]．

最後に，もう一つ別の観点から，環境水中のカルシウム欠損がプラナリア溶解を引き起こす原因について考察してみたい．そのヒントになるのは，純水に低濃度のカルシウムの選択的キレート剤であるBAPTAを添加した場合，飼育水にはカルシウムなどの金属イオンが一切存在しないはずにもかかわらず，純水だけの場合より明らかに溶解を開始するまでの時間が短くなるという結果（**図４C, D**）である．おそらくプラナリア個体からカルシウムを含む各種の金属イオンが低濃度で飼育水中に排出されている可能性があるのではないだろうか．それがBAPTAでキレートされた結果，溶解が早まったと考えると辻褄が合う．体内カルシウムのストックのある給餌直後のプラナリアが飢餓状態のプラナリアに比べて純水中でより長く生存できることの説明にもなる．Hessは，カルシウムを含まない純塩水溶液でも蒸留水でも，飼育水を交換しないとプラナリアの生存期間が延びることを示し，プラナリアによる環境水のある種の改変が行われていることを示唆している[11]．この個体から排出される改変物質として興味深いのは，粘液である．プラナリアは，粘液を出して体を覆うことで，環境水の変化に対抗してある程度の体内環境を保っている．前述したように扁形動物では，環境水中のカルシウム濃度が粘液の生産量に影響し，カルシウムがないと粘液の生産が減少することが知られている．哺乳類の上皮表面の粘液形成でも，粘液のもととなるムチン顆粒のエキソサイトーシスがカルシウムイオン依存的に制御されている[23]．環境水がカルシウムを含むと，プラナリアは粘液を出して体を覆い，切断面も効率的に保護して純水への暴露によるダメージを回避できているのだろう．それがカルシウム水溶液中でプラナリアの再生が可能になる理由であり，カルシウムが不足すると，粘液を介さずに純水に直接晒される結果，多細胞体維持のための恒常性が攪乱されて溶解してしまうのかもしれない．今後，飼育水中のカルシウムの有無と粘膜の排出量の関

係，および個体の溶解のタイミングとの関係に着目して実験を行うことで，この仮説を検証することが可能になると思われる．

謝辞

本研究は主に板垣航平の2023年度卒業研究[24]の結果をベースにして一部実験を追加してまとめたものである．当該研究で使用したミネラル合成水の作製と純水中におけるプラナリア溶解の観察[13]を行った2023年度卒業研究生の山﨑南さんに感謝する．また100年近くも前の研究環境で，再現性の高い観察結果と詳細で正確な実験記録を残したOlga Theodore Hess博士に敬意を表したい．

参考文献

1）手代木渉：プラナリアの生物学 基礎と応用と実験，共立出版株式会社，1987.

2）Y. Umesono, J. Tasaki, K. Nishimura, T. Inoue, K. Agata. Regeneration in an evolutionarily primitive brain−the planarian Dugesia japonica model. *Eur J Neurosci.,* 34, 6, pp.863−869, 2011.

3）Y. Umesono, J. Tasaki, Y. Nishimura, M. Hrouda, E. Kawaguchi, S. Yazawa, O. Nishimura, K. Hosoda, T. Inoue, K. Agata. The molecular logic for planarian regeneration along the anterior−posterior axis. *Nature,* 500, 7460, pp.73−76, 2013.

4）Rink JC (edt). Planarian Regeneration : Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* (MIMB, volume 1774). *Humana Press Inc.,* 2019.

5）J.P. Wu, M.H. Li. The use of freshwater planarians in environmental toxicology studies : Advantages and potential. *Ecotoxicol Environ Saf.,* 161, pp.45−56, 2018.

6）P. Rompola, R.S. Patel−King, S.M. King. An outer arm Dynein conformational switch is required for metachronal synchrony of motile cilia in planaria. *Mol Biol Cell.,* 21, 21, pp.3669−3679, 2010.

7）J.N. Witchley, M. Mayer, D.E. Wagner, J.H. Owen, P.W. Reddien. Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. *Cell Rep.,* 4, 4, pp.633−641, 2013.

8）J.S. Marchant. Ca^{2+} Signaling and Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.,* 11, 11, a035485, 2019.

9）Y. Akiyama, K. Agata, T. Inoue. Coordination between binocular field and spontaneous self−motion specifies the efficiency of planarians' photo−response orientation behavior. *Commun Biol.,* 1, 148, 2018.

10）M. Mori, M. Narahashi, T. Hayashi, M. Ishida, N. Kumagai, Y. Sato, R. Bagherzadeh, K. Agata, T. Inoue : Calcium ions in the aquatic environment drive planarians to food. *Zoological Lett.,* 5, 31, 2019.

11）O.T. Hess : The Effects of Pure Solutions of Sodium, Potassium, and Calcium Chlorides on the Oxygen Consumption of Planaria dorotocephala. *Physiological Zoology,* 3, 1, pp.9−47, 1930.

12）M.R.P. Dean, E.M. Duncan. Laboratory Maintenance and Propagation of Freshwater Planarians. *Curr Protoc Microbiol.* 59, 1, e120, 2020.

13）山﨑南，板垣航平，野沢悠太，高橋考太．異なる３つのモデル生物，分裂酵母，ゾウリムシ，プラナリアに対する超純水の致死的影響の分析．2023年度 高橋考太研究室 卒業論文集６．

14）P.W. Marks, F.R. Maxfield. Preparation of solutions with free calcium concentration in the nanomolar range using 1,2−bis(o−aminophenoxy)ethane−N,N,N',N'−tetraacetic acid. *Anal Biochem.,* 193, 1, pp.61−71, 1991.

15）M. Emmons−Bell, F. Durant, A. Tung, A. Pietak, K. Miller, A. Kane, C.J. Martyniuk, D. Davidian, J. Morokuma, M. Levin : Regenerative adaptation to electrochemical perturbation in planaria : a molecular analysis of physiologi-

cal plasticity. *iScience,* 22, pp.147–165, 2019.

16）N.J. Oviedo, C.L. Nicolas, D.S. Adams, M. Levin. Live imaging of planarian membrane potential using $DiBAC_4(3)$. *CSH Protoc.,* 2008, pdb.prot5055, 2008.

17）P.G. Barghouth, M. Thiruvalluvan, N.J. Oviedo. Bioelectrical regulation of cell cycle and the planarian model system. *Biochim Biophys Acta.,* 1848, 10 Pt B, pp.2629–2637, 2015.

18）O. Warburg. Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigelei. *Hoppe Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.,* LVII, i. 1908.

19）R.B. Raffa, P. Desai. Description and quantification of cocaine withdrawal signs in Planaria. *Brain Res.,* 1032, 1–2, pp.200–202, 2005.

20）A. Kim, S.M. Rawls. Nicotine–induced C–shape movements in planarians are reduced by antinociceptive drugs : Implications for pain in planarian paroxysm etiology? *Brain Res.,* 1778, 147770, 2022.

21）T. Nogi, D. Zhang, J.D. Chan, J.S. Marchant. A Novel Biological Activity of Praziquantel Requiring Voltage–Operated Ca2+ Channel β Subunits : Subversion of Flatworm Regenerative Polarity. *PLoS Negl Trop Dis.,* 3, 6, e464, 2009.

22）M. Takeichi. The cadherins : cell–cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development,* 102, 4, pp.639–655, 1988.

23）N. Yang, M.A. Garcia, P.M. Quinton. Normal mucus formation requires cAMP–dependent HCO^{3-} secretion and Ca^{2+}–mediated mucin exocytosis. *J Physiol.,* 591, pp.4581–4593, 2013.

24）板垣航平，山﨑南，髙橋考太．プラナリアの生育と再生に唯一必要な環境水成分カルシウムイオンの生理的役割．2023年度 髙橋考太研究室 卒業論文集７.