

ゼブラフィッシュ(コイ科魚類)の教材としての有効性[†]

稲葉 貴世*・福島 一欽*・上田 高嘉**

宇都宮大学大学院教育学研究科*

宇都宮大学教育学部生物研究室**

現在の高等学校生物において、体細胞分裂、分化や発生、体のつくりなどは個別の単元として扱われていることが多くみられる。体細胞分裂をへて細胞が分化し、一つの個体へとなる、その過程が短時間かつ容易に観察できる教材が望まれると考える。そこで本論では、ゼブラフィッシュの卵を用いることを提案し、その教材性を検討した。

キーワード: ゼブラフィッシュ, 理科教育, 高等学校教育, 魚類の飼育, 魚類の発生, 生命

1. 序論

実験や研究を行っているとき、本来の目的とは別に、思わぬ副産物が生まれたりすることがある。今回このゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) という、日本の固有種でもない、あまり聞きなれない魚類を高等学校教育生物の教材に用いることができるのではないかという思いに至ったのは、実は別の目的で研究を進めている中で、考えたものである。

ゼブラフィッシュとは、インド原産の熱帯魚で、主にペットショップなどにいけば、1匹100円前後で比較的容易に購入できる、観賞用の魚類である。今回は、このゼブラフィッシュ成魚を観賞用としてではなく、成魚から得られる卵を用いて、その発生段階を見ていく。その中で、高等学校生物の内容である細胞分裂、分化、減数分裂などの複数ある単元を、1つの生命の営みの中でつながりを感じさせることが、大きな目的である。

ではなぜゼブラフィッシュなのかということから目的の具体的内容に入っていく。先にも述べたが、1つの生命の営みの中で、複数の単元のつながりを感じさせるには、世代交代が短く、発生の段階が明確に分かっていて、観察が容易であり、かつ高等学校という現場でも飼育や実験材料入手が容易であることが望まれる。そこでこれらの条件を満たしている

ものを考えたとき、他のどの材料よりも適していたのが、ゼブラフィッシュであった(表1)。

ゼブラフィッシュの卵は、直径1mmほどで、卵膜につつまれた胚が見えるほどその透明度がよい。しかも、受精から約3日で孵化し、約3か月後には生殖能力を持つようになる。一匹の雌は、1週間に1回、数百から数千の卵を産む。さらに室内でもヒーターを入れて27℃前後に保っておけば、1年中自然産卵ができる。生物の実験を行う際は、何といても材料の入手が容易かどうか重要になってくる。このゼブラフィッシュは、うまく飼育ができれば、一度成魚を購入するだけで、あとは自然産卵させたものを飼育し、再び産卵させていけばよく、経済面から、非常にすぐれた教材だと考えられる。

このように、ゼブラフィッシュは様々な面から教材に適している。最終的に、このゼブラフィッシュを用いることによって、生命の神秘、大切さを学んでいければよいと考える。以上のことを踏まえ、ゼブラフィッシュを教材として用いる際の具体的な内容について検討した。

2. 入手方法

身近なペットショップまたは熱帯魚を扱っている店舗で1匹80円~100円程度で買うことができる。まれに、ペットショップなどで購入したゼブラフィッシュから、ホワイトパールダニオ、レオパードなどの種が生まれることがあるが、卵の発生だけを観察する場合にはまったく気にしなくてもよい。気に

[†] Takayo INABA*, Kazuyoshi FUKUSHIMA* and Takayoshi UEDA** : Usefulness of zebrafish (*Danio rerio*) as a possible teaching material.

* Graduate School, Utsunomiya University

** Department of Biology, Faculty of Education, Utsunomiya University

表1 教科書でよく見る生物の孵化までの時間、各発生段階の観察の容易さの比較^{1,2,3)}。

生物名	孵化までの時間	発生過程の観察の容易	産卵時期、材料入手、自然産卵の容易さ
バフンウニ	約1日	比較的容易	産卵時期が決まっている 材料入手が困難
アフリカツメガエル	23℃で約1日半	容易	研究室等での自然産卵は難しい
ヒメダカ	25℃で約10日	比較的容易	1日13時間以上の日長が必要
ゼブラフィッシュ	3~4日	容易	1年中産卵でき、材料入手も容易 研究室等での自然産卵も容易

なる場合には隔離して、ゼブラフィッシュだけを産卵用水槽に入れればよい。初めはどれも黒い体色だが、約1か月経過すると、ゼブラフィッシュは体に青いきれいな横縞が、ホワイトパールダニオは体全体が白っぽくなり、レオパードは体の縞模様がゼブラフィッシュのように線ではなく、ドットの線としてあらわれてくる。

3. 飼育方法

今回、有用な飼育方法、卵の採取、および学校でも可能な産卵方法等を検討したので、その結果を報告する。

(1) 成魚飼育方法

受精卵は販売されていないので、成魚から卵を得るところから始めることになる。

① 水温

27±1.0℃(冬場はヒーターが必要)。

② 餌

市販の熱帯魚用餌を使用。午前と午後に1回ずつ与えた。1日に1回でも大丈夫だが、与える回数を多くしたほうが、卵をよく産卵していた。1回に与える餌の量は、1分間に食べきれぬ量が望ましい。若い成魚(3~4ヶ月)の水換えは、2週間に1回程度。基本的に汚くなったら換える。

4ヶ月過ぎた成魚の水替えは、最低1ヶ月に1回程度でも飼育可能である。餌の摂取量が減ってくるため、排泄物などによる水の汚れが減り水換え頻度は低くても飼育が可能である。

(2) 孵化後の飼育方法

① 稚魚の飼育方法(孵化直後)

温度を保てれば、明るい室内で飼育も可能。砂利のない虫かご程度の水槽(12cm×19cm)にて飼育す

る。エアーは入れても、入れなくてもよい。ただし入れる場合、エアーが強い場合は水槽内に水流が発生してしまい、死亡率が上昇してしまうので、気をつける。泳ぎだすまでは、卵黄があるため、特に餌もいらぬ。水換えも不要。基本的に放っておくのが良い。ただし温度は27±1.0℃にすること。最初は水槽の底に沈んでいるが、2~3日で壁にはりつくようになる。この時期の死亡率は高めである。

② 孵化後1~2週間後の飼育方法

ぎこちなく泳ぎだす。このころから水槽は、孵化直後の時よりやや大きめの水槽にし、底に砂利を敷き、餌を与えなければならず、1日に1回程度、粉状の餌を与えるのがよい。エアーも必要になるが、やはり強すぎるエアーは、稚魚にあまりよい影響をあたえないため、気をつける。水槽の底に粉餌がたまってきたら掃除する(3.5日に1回程度)。掃除方法は、稚魚を砂利ごとポンプでバケツに吸い上げていき、バケツの水を捨てながら稚魚がいた場合、ピペットで吸い上げる。死亡率は高めである。

③ 3週間後の飼育方法

スムーズに泳ぎだす。全体的に、体の色が黒っぽく変化し、体の構造が成魚に近づいていく。水槽の底に粉餌がたまってきたら掃除する(1週間に1回程度)。掃除方法は、稚魚を網ですくい、すくいきれなかった稚魚は砂利ごとポンプでバケツに吸い上げていき、稚魚がいた場合、網ですくう。ここまで生き残ってきた稚魚は、ほぼその後も成長する。

④ 1ヶ月後の飼育方法

体にゼブラ模様が約1ヶ月程度で現れてくる。このころから、食欲旺盛になり、1日に3回程度餌を与える。テトラミンを手で細かくして与えるか、粉餌を与える。掃除方法は、孵化後1~2週間後の飼育方法に記載されている方法と同じ。このころから、死亡率は激減する。

⑤3ヶ月までの飼育方法

孵化から3ヶ月たつと、成魚となり、雄雌判別もできるようになる。産卵可能な雌は腹側が膨れてくるので、網の中に雄雌を入れておけば、産卵するようになる。

4. 産卵方法および卵の採取方法

ゼブラフィッシュは夜明けとともに産卵する習性があり、明暗時間を設定して飼育すると、照明の点灯とともに産卵するようになる。しかし、産卵した卵はそのままだと成魚に食べられてしまうことから、本研究においては、ゼブラフィッシュを水槽内の網の中で飼育し、卵を網の下に落とさせることでこれを回避した。そして、底にたまった卵を、ピペットおよび、ポンプにて傷つけないように注意しながら回収し用いた。

①雄雌の見分け方について

- 雄は全体的に黄色みがかっていて、細身。雌より若干小さい(図1)。
- 雌は全体的に白っぽい。特に腹側が白く、産卵時期が近づくとビー玉のように腹が大きく膨らむ(図2)。しかし、婚姻色も黄色っぽいので分かりにくい。

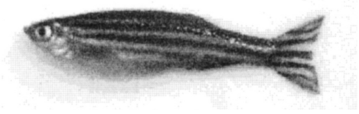


図1 雄ゼブラフィッシュ (約3 cm)。

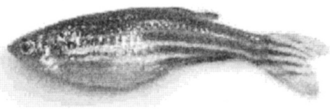


図2 雌ゼブラフィッシュ (約3 cm)。

②産卵数

本研究中では、1匹の雌につき1週間に1回、約100~200程度産卵した。毎日受精卵を得たい場合は、一つの水槽に雌4、雄3ぐらいの割合で飼育すれば、ほぼ毎日100~200個程度の受精卵が得られる。

③ 卵時間

1) 人工的に産卵させる場合

明14時間、暗10時間で飼育(例:午前8時に20W発光灯を点灯、午後10時に消灯)。

2) 自然に産卵させる場合

日のあたる場所を選んで飼育する水槽を設置すれば、日の出から約1時間の間くらいに産卵する。前日は飼育している部屋をできるだけ暗くする。ただし窓に、カーテン、ブラインド等がかかっている場合は、開けておくと光が入りやすくなるため良い。

④ 受精方法

1つの水槽内にゼブラフィッシュの雄と雌がいると、朝日の光が当たるときに卵を産む。オスがメスのあとを追いかけて、寄り添うように泳ぐ。そして、雌が卵を産卵。すると雄は雌から離れる。

⑤ 卵の採取方法

卵を得たい日の前日夕方くらいに、網の中に成魚になったゼブラフィッシュをオス3匹メス4匹ほど入れる(図3)。点灯後、もしくは日の出後~1時間くらいに、産卵していれば、卵が水槽の底にたまっている。卵は灯油をくみ上げるポンプ(色々試した結果、このポンプによる卵採集が、最も速くかつ、あまり卵を傷つけることなく採集できた。)で、バケツに吸い上げる(図3)。灯油ポンプの先が尖っている方の口を水槽側に、尖っていないほうをバケツ側にする。尖っている部分をうまく利用して、掃除機のように水槽の底にたまっている卵を吸い上げていく。卵以外に水やごみも吸い込んでしまっても、あとで取り除くので、あまり気にしなくてよい。

吸い上げた卵をいったん小さな水槽(12 cm×19 cm程度のもの)に移して、ピペットで、シャーレに集めていく(図4)。シャーレに卵を移す際は、なるべくごみ等が入らないようにすると、後の卵を観察する際に見やすくなる。卵を小さな水槽から、シャーレに移す際は、それぞれ下に黒い板(ラバーなど黒くて平らなものならなんでも良い)を敷くと、透明な卵を採取しやすくなる。

(1) 卵観察方法および保管方法

卵をシャーレに採集後、余ったりすぐ使わない場合は、できるだけ早く光の入らない恒温器などに、シャーレに蓋をしてから入れる。常温下に放置しておく、光や低温などにより、発生が遅れたり、死亡率が上昇したりしてしまうので、気をつける。恒温器がない場合は、卵を入れたシャーレに蓋をして、その上からアルミホイルで覆う。その後夏場は室内に、冬場はできるだけ暖かい場所に置いておく。その際、季節にかかわらず、随時温度計を用いて温度の上がりすぎなどをチェックする。

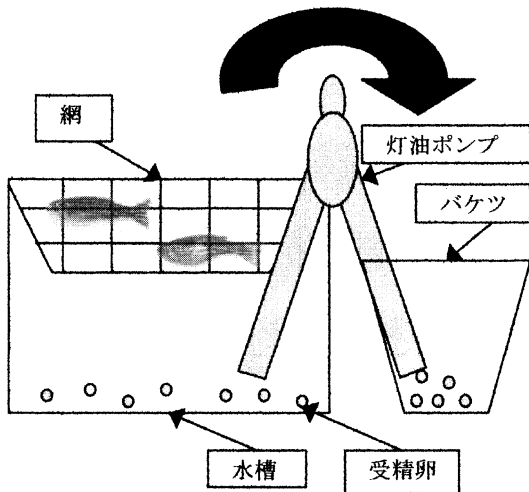


図3 卵の採取方法1。水槽の大きさは30×19cm、網の目の大きさは、0.3mm、ポンプの口の直径は1cmのものを使用した。

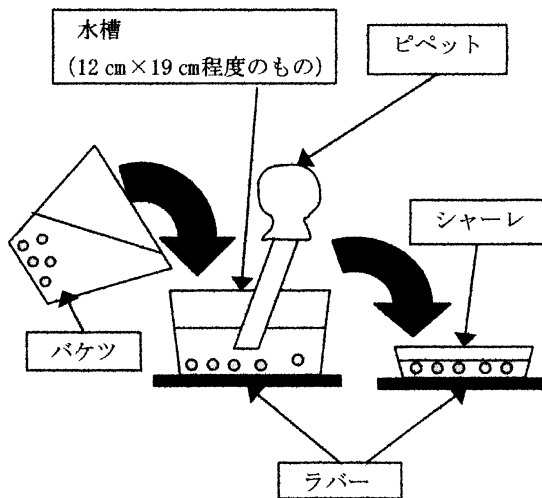


図4 卵の採取方法2。バケツの直径は約28.5cm。

5. 発生の観察

最短で、発生から孵化までの様子を3日間で観察することができる。どの時期においても、卵の透明度がよく、観察しやすい。

(1) 観察方法

①光学顕微鏡を用いた観察方法

観察用の小さめのシャーレに水をはり、数個の卵をピペットにて、保存用の大きめなシャーレから慎重に移す。保存用シャーレは、すばやく保温器などに必ずしまう。その後、光学顕微鏡（接眼レンズ：

対物レンズ=15×40）のステージ上にシャーレを静かに乗せ、観察する。観察に用いた卵をその後も発生を観察する際には、すばやく観察することが望ましい。卵に光を長時間当てていると、その後の発生段階に影響がでることがあるからである。

②ルーペを用いた観察方法

観察用の小さめのシャーレに水をはり、数個の卵をピペットにて、保存用の大きめなシャーレから慎重に移す。その後、ルーペを用いて卵を観察する。光学顕微鏡のように、強い光を当てていないので、多少の時間は観察可能だが、こちらもその後観察に使用する場合は、できる限りすばやく保温器等に戻した方がよい。

光学顕微鏡を用いた方が、より鮮明に観察ができた。ルーペを用いての観察では、拡大に限界があり、シャーレに張った水面すれすれで観察しても、顕微鏡におとる大きさだった。一方、光学顕微鏡は、観察には優れていたが、ピントを合わせることが少し難しかった。

(2) 胚の発生段階

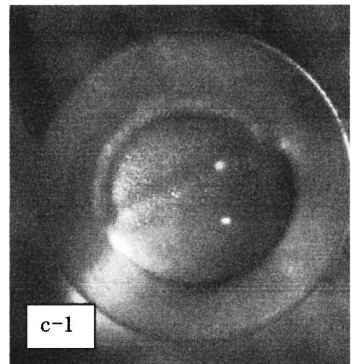
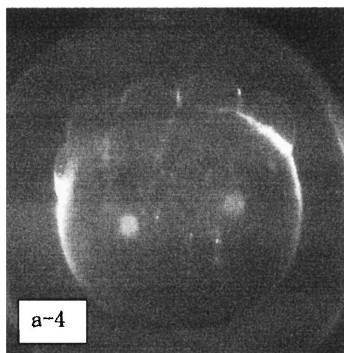
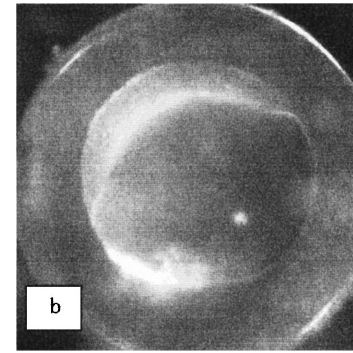
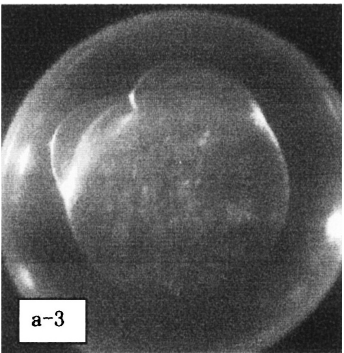
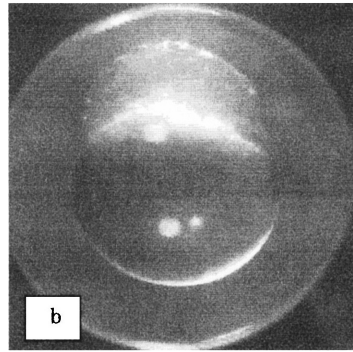
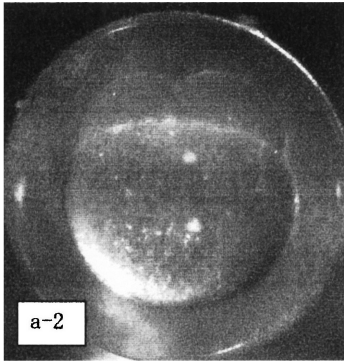
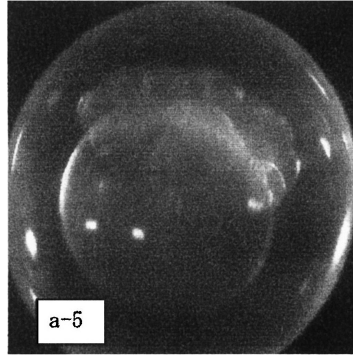
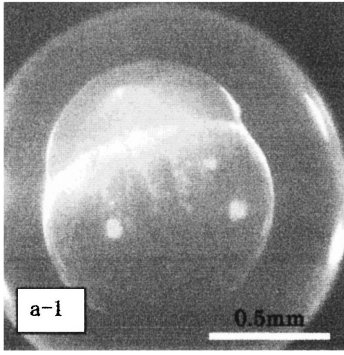
ゼブラフィッシュは、胚の形態により、7つの時期に分けられる⁴⁾。その発生段階を表2および図5で示す。時間に差があるのは、個体差によるものである。(e)および(f)は、適切な日本名がなかったため、英名のままにした。

表2 ゼブラフィッシュ発生段階。

記号	発生段階		受精後の時間
	英名	日本名	
(a)	Zygote Period	接合子期	10~30分
(b)	Cleavage Period	卵割期	1~2時間
(c)	Blastula Period	胞胚期	3~6時間
(d)	Gastrula Period	原腸胚期	7~14時間
(e)	Segmentation Period		14~24時間
(f)	Pharyngula Period		4~48時間
(g)	Hatching Period	孵化期	48~72, 96時間

6. 染色体の観察

ヒトの染色体図はよく高等学校生物の教科書でみかけるが、その他の生物の染色体はあまり掲載がない。ヒトの染色体との比較もかねて、魚類であるゼブラフィッシュの染色体を見せることは効果的



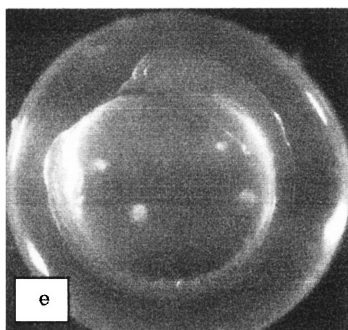
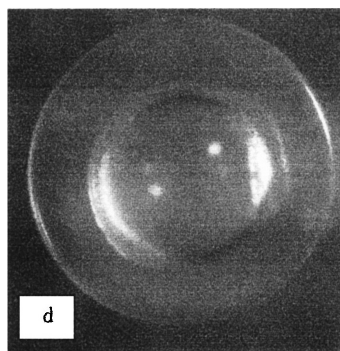
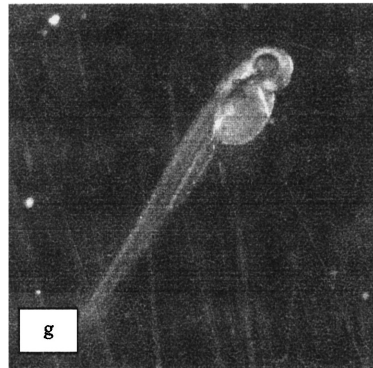
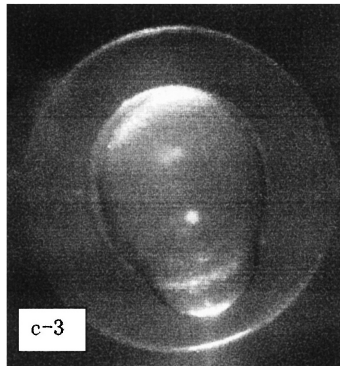
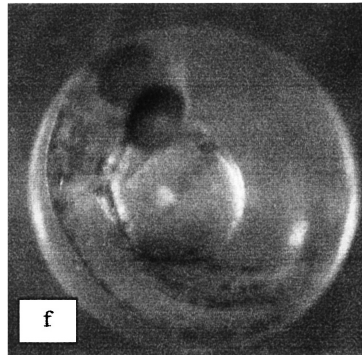
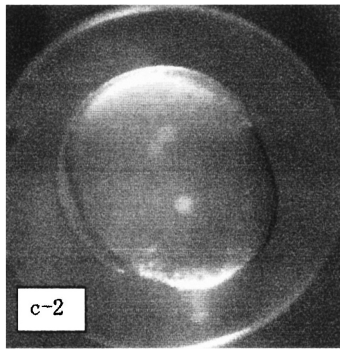


図5 ゼブラフィッシュの発生過程。水温 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 。卵の直径約 1mm 。(a)接合子期、(b)卵割期、(c)胞胚期、(d)原腸胚期、(e) Segmentation Period、(f) Pharyngula Period、(g)孵化期。(a-1)受精 10 分～30 分後、(a-2) 2 細胞期、(a-3) 4 細胞期、(a-4) 8 細胞期、(a-5) 桑実胚期、(c-1)原腸胚初期、(c-2)原腸胚中期、(c-3)原腸胚後期。

であると考えられる。ゼブラフィッシュの染色体数は $2n = 50$ で、コイなどの他の魚類に比べて染色体数が少なく、大きさも比較的大きい。顕微鏡では、接眼レンズ×対物レンズ = 15×40 ほどで十分観察できる (図6)。

(1) 染色体標本の作製 (空気乾燥法)

①淡水魚用リンゲル液 (NaCl 39.90g, KCl 1.40g, CaCl₂ 1.77g, および NaHCO₃ 0.10g を 5 リットルの蒸留水に溶解) の入ったプラスチックシャーレに、MMC 処理を終えた受精卵を入れ、ピンセットを用いて実体顕微鏡下で卵膜と卵黄を取り除き、胚細胞を取り出す。

②培養液 (0.005% コルヒチン含) の入った 1.5ml

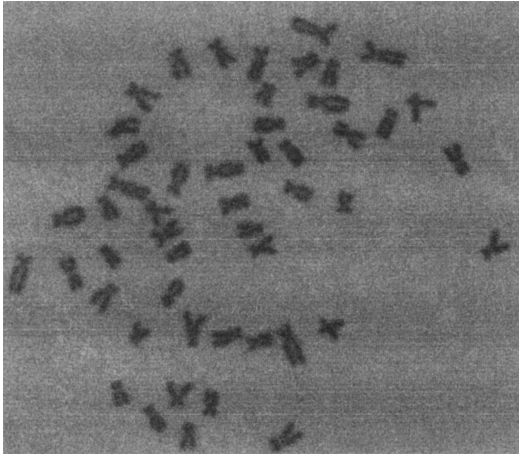


図6 ゼブラフィッシュ中期分裂像。

マイクロチューブに胚細胞を入れ、室温で約45分間静置し、コルヒチン処理を行う。

③培養液を取り除き、0.6%クエン酸ナトリウム水溶液を約0.5ml加え、マイクロピペット用チップで約2分間攪拌する。さらに同水溶液を同量加え、同様に攪拌することにより低張処理を行う。

④酢酸-エタノール(1:3)液を数滴加えてよく攪拌(仮固定)した後、1200rpmで7分間遠心分離(20℃)する。

⑤上澄みを捨て、酢酸-エタノール(1:3)液を約0.5ml加え、チップで穏やかに攪拌した後、1200rpmで7分間遠心分離(20℃)する。

⑥上澄みを捨て、酢酸-エタノール(1:1)液を約0.5ml加え、チップで穏やかに攪拌した後、1200rpmで7分間遠心分離(20℃)する。

⑦2~3滴分を残して上澄みを捨て、マイクロピペットで穏やかに攪拌した後、スライドガラスに1滴落とし、自然乾燥させる。

⑧スライドガラスが完全に乾燥した後、ゼーレンゼン燐酸緩衝液(pH 5.8)でおよそ2%に希釈したギムザ溶液で約5分間染色したのち、顕微鏡下で観察する。

この染色体標本は、細胞分裂のどの時期でも見ることが可能であるように誤解されることがあるようである。そのため、ヒトと魚類の染色体比較と並行して、教科書などでよくみかける染色体写真は、中期像であることや、間期ではこのような染色体の形をしておらず、折りたたまれてこのような形になる

ことなどを説明できるとよいと考えられる。

6. 細胞遺伝毒性試験への利用

近年、さまざまな化学物質が開発されているが、その毒性は分かっていないものがほとんどである。化学物質は目に見えないところで、空気や河川などに流れ込み、直接的または間接的に影響をもたらす。近年になり、短期間で目に見える毒性のほかに、遺伝毒性、つまり世代を越えての毒性について注目が集まるようになった。これらの化学物質の遺伝毒性についての主な評価は、哺乳類を用いた *in vitro* での染色体異常試験⁵⁾および *in vivo* での小核試験^{6, 7)}などが用いられてきた。魚類を用いた化学物質の毒性を試験する方法としては、死を指標とする方法、行動の変化をみる方法、呼吸量など生理変化を指標とする方法、細胞の形態をみる方法などがあるが、変異原試験に関する報告は極めて少なく、最近になってようやく行われるようになってきた⁸⁾。化学物質の水圏環境への影響を評価する場合、そこに生息する魚類を試験動物として用いることは、哺乳類を用いるより適していると考えられる。また、化学物質の中には、試験動物によって全く異なった影響を示すものがあり、哺乳類を用いた試験だけに頼る危険性も危惧されるため、それを補う意味においても、魚類を用いた試験を加えることは重要であるだろう。

そこで、これまで本研究室では、ゼブラフィッシュを用いた細胞遺伝毒性試験として鰓細胞などでの試験が行われていた⁹⁾。今回は新たに胚細胞を用いて染色体異常試験および小核試験を行ったのだが、鰓細胞に比べて細胞が観察しやすく、さらに鰓細胞より毒性(今回の試験では発がん性が確認されているマイトマイシンCを用いて検討した)に対する感度が良いことが確認された⁹⁾。今後胚細胞のデータを増やし、確固とした試験法として確立していくことが望まれる。

7. 結論

ア. 卵の透明度がよく、発生段階から孵化まで3日間という短期間で、その様子を容易に観察することができる。

イ. 材料の入手が容易である。

ウ. 飼育条件や卵の保管条件(水温27度前後)において、少々管理がしにくい面もあるが、ヒーターなどの利用を考えれば、飼育が可能である。

エ. 季節を問わず産卵が可能である。

オ. 自然産卵が容易であり、孵化、そして成魚になるまでが短いため、短期間で世代交代が観察できる。

以上ア～オの点から、ゼブラフィッシュは単元をつなぐための教材として、その価値は十分あると思われる。

8. 考察および教材としての活用法

高等学校学習指導要領¹⁰⁾をみると、生物Ⅰの内容の部分において、細胞、生殖と発生及び遺伝について観察、実験などを通して探究し、生物体の成り立ちと種族の維持の仕組みについて理解させ、生命の連続性についての見方や考え方を身に付けさせるとある。しかしさまざまな生物Ⅰの教科書を見る限り、生命の連続性をあまり感じるような文章や実験などは組み込まれていなかった。そこで、単元ごとのつながりを持たせ、生命の連続性について考えるきっかけになるであろう実験として、ゼブラフィッシュ卵を用いた観察実験を中心に入れた授業展開を提案する(図7)。

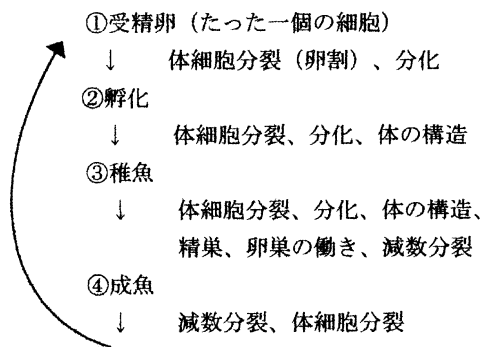


図7 ゼブラフィッシュを用いた授業展開提案。

1つの個体が生まれてから次の世代を残すまでを1つの大きな流れとして、その中でさまざまな単元に分かれているものを、つながりあるものとして教えていくことに意味があるのだと考える。体細胞分裂は一生を通じて行われているものであるし、減数分裂は限定的な分裂であることなど、大きいスケールでとらえていくと、単元を越えて生物を教えていくきっかけになるのだと思う。または、単元ごとに教えた後に、まとめとしてこのゼブラフィッシュを用いた卵の観察実験を行うと、より生命の連続性を感じることができるだろう。

謝辞

本研究を実施するために、ご尽力くださった、宇都宮大学教育学部4年生、宇都宮大学中村研究室の皆様、宇都宮大学教育学部卒業生の皆様に感謝申し上げます。

文献

- 1) 北海道立理科教育センター, 理科教育指導資料, 第31集(1999)
- 2) 福島県水産試験場, ホームページ
- 3) 北海道大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 系統進化学講座Ⅲ アフリカツメガエル研究 グループ, ホームページ
- 4) C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B.Ullmann, and T.F. Shilling, *Developmental Dynamics*, 203, 253-310 (1955)
- 5) M. Ishidate Jr. and S. Odashima, *Mutat. Res.*, 48, 337-354 (1977)
- 6) W. Schmid, *Mutat. Res.*, 31, 9-15 (1975)
- 7) M. Hayashi, R.R. Tice, J.T. Macgregor, D. Anderson, D.H. Blakey, M. Kirsh-Volders, F.B. Oleson, F. Pacchierotti, F. Romagna, H. Shimada, S. Sutou and B. Vannier, *Mutat. Res.*, 312, 293-304 (1994)
- 8) 上田高嘉, 高瀬圭子, 林真, 宇都宮大学教育学部紀要, 54Ⅱ, 5-15 (2004)
- 9) 稲葉貴世, 宇都宮大学大学院修士論文, 1-70 (2008)
- 10) 文部科学省, 高等学校学習指導要領 (2001)