

直流・脈流によるゾーリムシの細胞賦活に 関する実験的研究

鷲塚 靖・井村 洋一

主 な 内 容

1. 緒言
2. 予備実験
 1. イネワラ培養基決定試験の摘要
 2. 季節を通じてのゾーリムシの培養試験の摘要
 3. 温度差によるゾーリムシの分裂と寿命
3. 直流・脈流によるゾーリムシの細胞賦活現象
 1. スライドガラス試験法 (SG試験法)
 2. ホールスライドガラス試験法 (HS試験法)
4. 考察
5. 引用文献
6. Summary

1. 緒 言

生命現象を支配している生物の寿命の問題は、人類の宿願的な課題の一つでもあり、又、科学の終局の目標になう一つとして考えても過言ではない。その解明の手がかりとして、医学・生物学・薬学・等、あらゆる自然科学の領域において、研究者達のたゆまぬ努力が払われて来たことは、ここに再筆するまでもない事実である。筆者等は、その一つの手がかりとして、「生物を一個の熱力学的閉鎖系とみなすなら、その老化現象や寿命の存在に介在するエントロピー増大の第2法則が何らかの形で介在する」という考えから、この研究を進めて来た（井村・鷲塚、1965, 1966）。今、前報に続く段階を生細胞に展開させると、その意味づけは更に大きい。すなわち生物が有機蛋白体から単細胞生物に発展し、これより系統発生的な進化を遂げて来たとするれば、我々は一躍、多細胞生物を取りあげるより、構造と機能が簡単な単細胞生物に直視するのが研究の筋道であると考えた。その意味から、我々は、本研究に選出したゾーリムシが、単細胞生物の中でも比較的取扱い易く、又、Woodruff (1911), Calkins (1913), Sonneborn (1954), 等の

不死説、老化説をめぐる諸説と関係して、特に興味深い材料であると認めた。このような意味から、題意に関する以下の実験的研究を行なった。以下の報告は、鷲塚が1964, 1965年に日本応用動物昆虫学会大会で発表したもの、並びに鷲塚・井村が1965年、日本生物物理学会で講演したもの、更に、鷲塚・井村が1967年、日本応用動物昆虫学会大会に発表を予定しているもの、を取りまとめたものである。

2. 予備実験

ゾーリムシは系統分類学上、原生動物門繊毛虫類に属し、原形質に密生した繊毛で淡水中を遊泳する。原形質はヘチマ状の形をなし、内部に大核と数個の小核及び収縮胞を持つ。淡水中で遊泳バクテリアを捕食し、主に枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を好む。分裂は2分法で増殖し、自家受精 (Autogamy) も行う。これらのゾーリムシの飼育法は、クローバ (東京都立大学理学部生物学教室) や、レタス (Sonneborn, 1957), (京都大学理学部動物学教室, 三宅研究室), を用いた浸出液培養法等が明らかにされている。然るに我々は、これらの材料の入手の不便さと、実験室の器具整備状況並びに培養基造成の際の時間的労を要する困難さから、止むを得ず最も簡単なイネワラ浸出液を用いた飼育法でこの実験を行うことにした。そのため、予備実験的な培養基決定試験からこの実験を始めた。

1. イネワラ培養基決定試験の摘要

試験方法はイネワラを3cmの長さに切り、水50ccを夫々各試験管 (3cm×25cm) 当りに注入し、これにイネワラ1g, 2g, 4gを入れて煮沸する浸出液の区を設けた。各区はピーカーで大量に夫々30分づつ煮沸し、各試験管当り前記の定量により配分した。その後、試験管をパラフィン紙で蓋をし、そのまま室温 (18°C~25°C) に放置した。枯草菌はこの放置期間中に多数繁殖するので、放置後、2日、4日、8日、12日、16日、目に夫々、ゾーリムシ *Paramecium caudatum* (東京都立大学

理学部生物学教室より分譲を受けた系統), を各区平均10匹ずつ注入して, その後の飼育状況を調べた。

繰り返し実験は5回で, 集計は試験管をよく拡播した後, デッキグラス上にガラス管で吸い上げた溶液を1滴滴下(0.1cc)してゾーリムシの数を記録し, その分裂の動向を調べて, これらの平均値をとった。その結果を要約して述べると次のようになる。イネワラ重量が水50cc当り1gの割合の区が最もゾーリムシの生活に良く, イネワラ重量の多い区, すなわち, 浸出液の高濃度区ではゾーリムシの発育は余り好ましくないという結果を得た。又, 浸出液を短期間放置した場合と, 長期間放置した場合との間には, ゾーリムシの生活に著しい差は認められなかった。更に, これらの液のpH変化の検査においても, 特に著しい変化はみられず, このことからイネワラ浸出液による培養法は, 水50cc当りイネワラ1gを加えて30分煮沸し, その後数本のイネワラを加えて2日間放置し, 今後の実験に供することにした。

2. 季節を通じてのゾーリムシの培養試験の摘要

上記の培養試験法に従い季節を通じてのゾーリムシの培養を試みたところ, 以下のようにまとめられる。夏のような気温の高い時期において, ゾーリムシの分裂による増殖は活発であり, 逆に冬は分裂が不活発である。すなわち, 秋から冬にかけてゾーリムシの分裂による増殖は, 気温の低下に従い次第に減少し, そのため, 個体群の密度効果による影響がなくなり, ゾーリムシ個体群の寿命は長くなる。反対に, 夏はゾーリムシの分裂が活発なため, その個体群増加が著しく, そのため, 密度効果による生育阻害作用が起り, 個体群の寿命は短命である。これらをまとめたのが表1. であり, このことからゾーリムシの分裂と寿命を支配する要因は, 温度によって大きく影響されることが判明した。

Table 1. Longevity of *Paramecium* population at natural temperature.

Period	No. of individuals used	Longevity of population (days)	Temperature
6/X I ~ 7/X II	11	31	4°C ~ 17°C
18/X ~ 18/X I	8	31	11°C ~ 22°C
19/I X ~ 11/X	11	22	14°C ~ 22°C
9/V III ~ 23/V III	10	14	24°C ~ 29°C

3. 温度差によるゾーリムシの分裂と寿命

実験方法及び材料

前述のようにゾーリムシの分裂と寿命にたづさわる物理的要因は温度に大きく支配されているという事実からこれらを更に明確にするために, 以下の温度区を設けてゾーリムシの温度差による個体群消長を調べた。実験温度区は60°Cより0°Cまで5°C間隔の温度区(各区の誤差範囲は±1°C)を設定し, 前項で明らかにしたイネワラ浸出液を利用した枯草菌培養法で, この実験を行った。使用した試験管は3cm×25cmの大型試験管に培養液25cc(1試験管当り, 水25cc, 0.5gのイネワラより浸出したもの), を, 各試験管に配分した。供試個体数は平均60匹をデッキグラス上で数え, そのまま試験管内に挿入した。更に, 5cmに切ったイネワラ2本ずつをこれに加えた。調査は調査日に1滴当りのゾーリムシの数を記録すると共に, その生態観察も同時に行った。この実験の繰り返し数は区において異なり, 15~30回である。検鏡は双眼実体顕微鏡20倍を使用した。又, 実験については, その都度, 比較を試みるために, 室温条件下でのControl区を設けた。

実験結果

この実験より, 温度60°Cより45°Cまで, ゾーリムシは生活を営むことが不能であり, いずれも培養液の温度が45°Cを越えた場合, 30分以上, 生存は出来ず死滅する。この場合, 試験管内の液が透明化して, その死体の痕跡が認められない。これは明らかに熱死によるものでありこれに至る過程は, ゾーリムシの死後, 一時, 熱による萎縮死体が認められるが, その後, 溶解して液は透明になる。40°C区において, 夏は最高12時間及至18時間にわたって生存を続けるが, 冬に同様の実験を行っても, このような生存は認められず, 45°C区の場合と同じ結果になる。これはゾーリムシが冬と夏の場合において, 感温性が異なるためであろう。この区でのゾーリムシの死に至る過程は, 40°Cに放置して6時間位は行動は活発であるが, それを過ぎると死の直前にみられる横転運動(きりきり舞い)をはじめ, 分裂は全く起らない。以上のことから, ゾーリムシの生活温度圏は40°C附近がその最高限界であると思われる。表2は35°Cから以下の各温度区に放置したゾーリムシの個体群消長をまとめたものでありその数値は1滴当りの平均個体数を示している。

表2.の結果を要約すると次のようになる。すなわち, ゾーリムシの生活温度圏内では, 水温が高い程, 分裂が早く活発に起り, 温度が低くなるに従って遅く不活発になる。この結果を図示すると図1のようになり温度差に

Table 2. Population fluctuation in *Paramecium caudatum* by temperature.

Days Temp.	2	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	70	80	90	100	120	No. of individuals used
35°C	5.8	34.6	17.1	15.1	10.4	5.8	2.1	0.3	0.3	0.08									74.6
30°C	4.2	39.9	52.2	58.2	19.3	6.9	3.3	0.6	0.5	0.01	0.01								68.5
25°C	7.3	29.4	38.3	33.0	11.4	2.4	2.3	0.4	0.08	0.002	0.002	0.002							61.8
20°C	0.4	5.4	106.4	131.5	119.5	61.1	55.4	23.1	15.9	13.6	16.4	16.8	20.6	8.3	4.4				64.9
15°C	0.4	4.0	56.1	155.0	92.2	46.1	45.8	23.4	4.1	13.4	15.0	20.4	16.3	12.9	9.3				65.0
10°C	0	0.8	1.6	35.0	102.1	81.0	70.6	27.4	32.2	23.1	17.1	9.8	8.3	32.0	17.5				75.3
20°C ~8°C	0	0	0.3	0.3	2.0	1.4	1.6	1.0	13.7	3.6	4.7								59.8

Value; Mean no. of individuals / 0.1cc

よるゾーリムシ個体群消長の山の推移がみられる。この図に示す通り25°Cを境として水温がこの区より高い場合は個体群の山が低く、20°Cから10°Cの区はどれもその数値が高くなっており、又、分裂も遅くなっている。通観して分裂の活発な時は、ゾーリムシの行動も活発で

→あり、その後、個体群の激減するのは密度効果に起因している。図1, より、ゾーリムシの生活適温範囲を定めると10°Cから35°Cにあると結論出来る。次に、この実験の data よりゾーリムシの個体群の寿命を温度別にとり上げてみると表3のようになる。✓

Table 3. Longevity of *Paramecium caudatum* by temperature.

Temp.	Maximum longevity	Minimum longevity	Mean longevity	Standard deviation	Standard error
45°C	30 min.	—	—	—	—
40°C	12—18hrs.	(S. 5.5hrs. W. 3.5hrs.)	—	—	S: Summer W: Winter
35°C	46 days	15 days	29.85 days	12.25 days	4.62 days
30°C	53 "	31 "	40.02 "	6.56 "	2.32 "
25°C	54 "	36 "	43.14 "	7.81 "	2.94 "
20°C	115 "	45 "	91.6 "	26.13 "	8.24 "
15°C	110~"	65 "	—	—	—
10°C	105~"	74 "	—	—	—
2°C~8°C	70~"	70~"	—	—	—

→すなわち、高温区程、寿命は短く、低温区はその逆となっている。然し15°C以下の区では未だに結論が出ていないが、恐らく20°C以上の区より遙かに長い寿命を有することが推察される。

これは本実験では低温区が冬季を越して春季を迎えたため、本学の実験室においては継続実験が不可能になったためである。比較のために、以上のような恒温で生活を続けたゾーリムシ個体群と室温のような変温条件下で生活したものとを調べるために提示したのが、表4、である。

Table 4. Longevity of *Paramecium caudatum* at natural temperature.

Temperature	Maximum longevity	Minimum longevity
23°C~31°C	85 days	68 days
8°C~28°C	164 days~	103 "
8°C~26°C	142 " "	135 "
8°C~23°C	122 " "	122 days~
8°C~16°C	110 " "	110 " "
8°C~14°C	95 " "	95 "
8°C~12°C	80 " "	80 " "

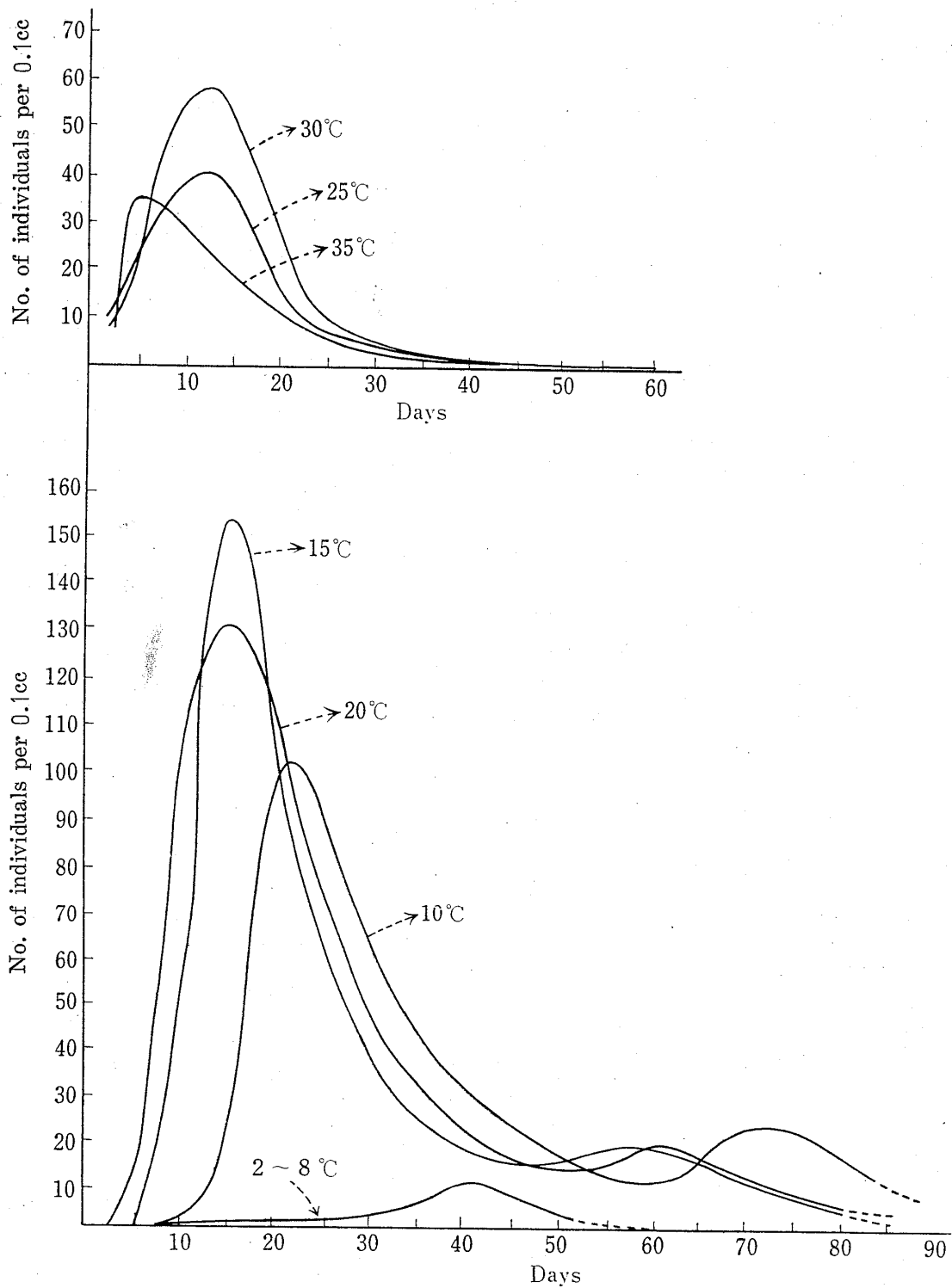


Fig. 1. Population fluctuation of *Paramecium caudatum* by temperature.

表4.で明らかなように変温条件で生活している方が、
 個体群の寿命は圧倒的に長く、又、温度範囲が23°Cから
 31°Cの区のものより、低温範囲の区の方が明らかに寿命
 が長いことを示している。以上の実験結果より、ゾーリ
 ムシの細胞分裂と個体群寿命の関係は温度により大きく

支配されることが明らかとなり、以下の実験は、ゾーリ
 ムシの適温区より推定して、25°Cを実験区と定めて実験
 を進めることにした。

3. 直流・脈流によるゾーリムシの細胞賦活現象

1. スライドガラス試験法 (SG試験法)

実験方法及び材料

以下の試験法はデッキグラスを用いて行うので、我々はこれをSG試験法と呼ぶことにした。すなわち、ストックメEDIUMより、ゾーリムシを培養液ごと別の試験管に移し、よく拡播した後、10ccピペットでこれを吸い上げ、図2.に示したU字管内に注入して、脈流(PC) 直流、(DC) 交流(AC)、の電気処理を行った。電流の強さは、PC 0.06mAより4mA、振動数、10kタイムスより400kタイムス、電圧、5vより250v、処理時間、17分、15分、30分、1時間、であり夫々、ゾーリムシの活性をあらかじめ検鏡によって調査の上、その活性状態に応じて任意に処理方法を定めた。又、このような室温で培養している自然疲労個体群とは別に、ゾーリムシのいる培養液20ccに、蒸溜水80ccを加えて薄めたものを3日間室温(10°C~17°C)に放置してつくり、(これを人工疲労と呼ぶ)、これも同様の電気処理を行った。処理後、検鏡しそのゾーリムシの数から推定して2cc又は4ccを定めて準備した新しい培養液25cc入りの試験管(3.0cm×25cm)に、注入した。

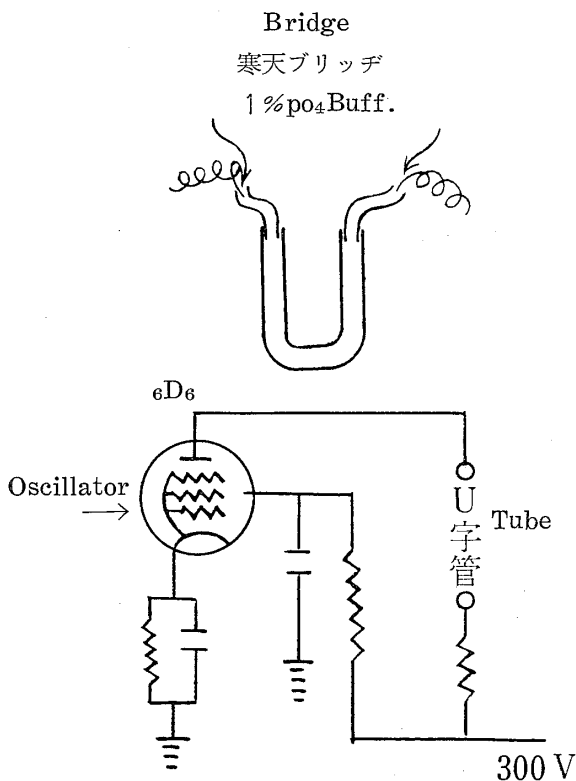


Fig.2. Apparatus on experiment.

その後、再びよく拡播して後、径の等しいガラス管で吸い上げ、デッキグラスの上に1滴ずつ3点滴下して、ゾーリムシの数を記録し、これを供試個体数とした。このような区を2本づつとり、同時に対照区(無処理区)もそれに合せて設け、繰り返し実験16乃至60回(表5、表6、表7、参照)行った。処理後、無処理区と共に25°Cから32°Cの条件下に放置し、24時間後に、よく拡播して、前記と同じ方法でゾーリムシの数を記録した。又、後述するこれらのゾーリムシの個体群消長は、処理後、毎日これと同じ方法でゾーリムシの数を記録したものである。

実験結果

ゾーリムシは電流を通じると負の走電性を示す。又、一般にゾーリムシの遊泳は健康な正常個体では繊毛によるポートレースのオールのようなしくみで運動し、体を横転させながら安定な遊泳方向をとるが、栄養が不足するとそのスピードを欠き、死の直前においては遊泳方向を定めない横転運動となり最後に死亡することは前にも述べた。これは高温40°C以上薬品処理(ホルマリン)、強度の電気処理、飢餓による死亡等、すべて共通の様相を表わすことが明らかとなった。電流を通じると、次のようなゾーリムシの行動上の反応差がみられる。

脈流における反応ではゾーリムシは陽極から陰極へ移動する際、遊泳物が流れるような遊泳方向をとり、僅かなジグザグ運動がみられる。電気処理直後は供試したゾーリムシの健康状態(疲労度)で多少異なるが、一般にControl区に比べて遊泳のスピードは早く活発なようだ。直流によるゾーリムシの反応は、陽極から陰極への移動の際、その遊泳方向は著しい波状のジグザグ運動を行う。但し電流の強さが特に強い場合U字管の底にたまって沈滞する。交流の場合、ゾーリムシはU字管内にランダムに分布し、電気処理が10分以上たつと、U字管の底に沈滞するようになり、不活発になることが多い。電気処理を1時間以上行くと実験個体群の半数以上が丸く萎縮して死亡するのがみられる。表5.は脈流処理によるゾーリムシの増殖率を示したものである。

脈流処理は、電流の強さ5v及至250v、振動数1秒当り10kタイムスから400kタイムス、アンペアは0.06mAから4mAで、実験総数60回を記録したものである。今ゾーリムシの増殖率を目安として、脈流処理(以下PCと称す)によるゾーリムシの増殖率と無処理区のそれとを比較すると次のようになる。すなわち、無処理区の増殖率を1とすると(PC増殖率÷無処理区増殖率= $\frac{E}{C}$) PC区の平均は1.3という数値になり、細胞賦活現象を示す。PCのE/Cの数値、1.3及びそれ以上の数値をと

Table 5. Pulsating current treatment to *Paramecium caudatum* (SG method)

PC	No. of individuals used	16	18	10	23	26	20	15	30	31	33	30
○	No. of individuals after 24hrs.	52	66	29	39	52	48	46	56	48	46	51
	Fission rate	3.2	3.6	2.9	1.6	2.0	2.4	3.0	1.8	1.5	1.3	1.7
CONTROL	No. of individuals used	15	14	15	20	22	13	13	33	21	12	23
○	No. of individuals after 24hrs.	42	51	30	39	41	19	19	40	40	31	48
	Fission rate	2.8	3.6	2.0	1.9	1.8	1.4	1.4	1.2	1.9	2.5	2.0
	E/C	1.1	1.0	1.4	0.8	1.1	1.7	2.1	1.5	0.7	0.5	0.8
PC	No. of individuals used	16	15	17	10	14	15	13	14	14	23	24
◎	No. of individuals after 24hrs.	68	57	45	24	28	55	17	37	38	53	47
	Fission rate	4.2	3.8	2.6	2.4	2.0	3.6	1.3	2.6	1.8	2.3	1.9
CONTROL	No. of individuals used	18	18	24	(9)	18	21	15	13	17	21	17
◎	No. of individuals after 24hrs.	51	53	33	(17)	27	44	23	24	25	40	39
	Fission rate	2.8	2.9	1.3	(1.9)	1.5	2.0	1.5	1.8	1.4	1.9	2.2
	E/c	1.5	1.3	2.0	1.7	1.3	1.8	0.8	1.4	1.2	1.2	0.8

○ : Stock medium ◎ : H₂O, 80cc+medium 20cc

Table 6. Direct current treatment to *Paramecium caudatum* (SG method)

DC	No. of individuals used	28	15	23	41	31	30	58	24	28	30	24	11	20	12	22	16	22	13
	No. of individuals after 24hrs.	62	33	19	55	70	71	100	93	86	102	73	14	47	31	44	30	32	35
	Fission rate	2.2	2.2	0.8	1.3	2.2	2.3	1.7	3.8	3.0	3.4	3.0	1.2	2.3	2.5	2.0	1.9	1.5	2.7
CONTROL	No. of individuals used	65	30	27	21	27	27	45	26	26	17	2.8	10	22	16	17	19	19	20
○	No. of individuals after 24hrs.	103	40	69	66	65	69	102	70	70	64	75	14	58	51	54	31	43	32
	Fission rate	1.5	1.3	2.5	3.1	2.4	2.5	2.2	2.6	2.6	3.7	2.6	1.4	2.6	3.1	3.2	1.6	2.3	1.6
	E/C	1.4	1.6	0.3	0.4	0.9	0.9	0.7	1.4	1.1	0.9	1.1	0.8	0.8	0.8	0.6	1.2	0.7	1.5
DC	No. of individuals used	15	13	17	16	24	19	15	18	15	21	15	14						
	No. of individuals after 24hrs.	27	16	21	21	37	40	31	39	39	33	32	33						
	Fission rate	1.8	1.2	1.2	1.3	1.5	2.1	2.0	2.1	2.6	1.5	2.1	2.3						
CONTROL	No. of individuals used	12	14	21	12	19	19	14	12	14	16	16	16						
◎	No. of individuals after 24hrs.	33	24	23	24	36	39	38	35	36	41	30	30						
	Fission rate	2.7	1.7	1.0	2.0	1.8	2.0	2.7	2.9	2.5	2.5	1.8	1.8						
	E/C	0.6	0.7	1.2	0.6	0.8	1.0	0.7	0.9	1.0	0.6	1.0	1.2						

○ : Stock medium ◎ : H₂O, 80cc+medium 20cc

る区は34区 (57%), 1.0から1.3までの区は14区 (23%), 1.0以下, すなわちPCがマイナスに作用したものは13区 (20%) となり, PC区が無処理を上まわる増殖率を示したものは全体の80%を占める結果を得た. 又, ゴ

ーリムシの自然疲労個体群を供試するより, 蒸溜水注入で疲労させた人工疲労個体群の方が疲労度をかなり均一化させるようで, 脈流処理によるゾーリムシの細胞賦活効果は顕著に出るようになった.

36	35	41	21	26	33	29	26	24	28	36	40	16	23	52	34	35	28	20	10	14	12	20	22
71	66	55	66	90	64	68	81	77	110	73	51	40	92	139	157	183	92	57	33	107	68	54	52
1.9	1.8	1.3	3.1	3.4	1.9	2.3	3.1	3.2	3.9	2.0	1.2	2.5	4.0	2.0	4.6	5.2	3.3	2.9	3.3	7.6	5.7	2.7	2.4
37	33	31	31	43	32	29	26	42	40	27	23	22	29	50	32	34	24	18	15	26	19	13	15
49	63	65	65	63	47	62	65	69	93	63	57	26	34	77	118	112	69	43	48	73	54	36	41
1.3	1.9	2.0	2.0	1.4	1.4	2.1	2.5	1.6	2.3	2.3	2.4	1.1	1.2	1.5	3.5	3.3	2.9	2.4	3.2	2.7	2.8	2.7	2.6
1.4	0.9	0.6	1.5	2.4	1.3	1.0	1.2	2.0	1.6	0.8	0.5	2.2	3.3	1.8	1.3	1.5	1.1	1.2	1.0	2.8	2.0	1.0	0.9
20	11	17	19	16	17	20	22	24	19	17	17	20	18										
32	37	47	51	38	44	37	39	76	76	64	60	63	72										
1.6	3.3	2.7	2.6	2.3	2.5	1.8	1.7	3.1	4.0	3.7	3.5	3.1	4.0										
26	21	20	20	18	22	16	19	35	13	13	18	18	15										
33	33	30	37	33	32	33	33	61	35	35	37	37	59										
1.2	1.5	1.5	1.8	1.8	1.4	2.0	2.0	1.7	2.6	2.6	2.0	2.0	3.9										
1.3	2.2	1.8	1.4	1.2	1.7	0.9	0.9	1.9	1.5	1.5	1.8	1.6	1.0										

$$\frac{E}{C} = \frac{\text{Fission rate in PC}}{\text{Fission rate in control}}$$

Table 7. Alternating current treatment to *Paramecium caudatum*. (SG method)

AC	No. of individuals used	23	15	10	21	15	19	10	11	14	16	15	16		22	28	30	25	
	No. of individuals after 24hrs.	56	35	36	39	38	39	23	29	41	35	28	19	⊙	⊙	88	90	57	89
	Fission rate	2.4	2.3	3.6	1.8	2.5	2.0	2.3	2.6	2.9	2.1	1.8	1.1			4.0	3.7	1.9	3.6
CONTROL	No. of individuals used	22	12	12	15	15	21	11	15	15	15	13	13		22	20	31	34	
	No. of individuals after 24hrs.	59	34	34	37	37	50	28	35	35	35	27	27	⊙	⊙	107	91	43	146
	Fission rate	2.6	2.9	2.9	2.4	2.4	2.3	2.5	2.3	2.3	2.3	2.0	2.0			4.9	4.5	1.4	4.3
E/C		0.9	0.7	1.2	0.7	1.0	0.8	0.9	1.2	1.2	0.9	0.9	2.0			0.8	0.8	1.3	0.8

○ : Stock medium

⊙ : H₂O. 80cc+medium. 20cc

$$\frac{E}{C} = \frac{\text{Fission rate in AC}}{\text{Fission rate in control}}$$

表6. は直流処理 (以下DCと称す) で同様の実験を行ったもので, ボルト数 100v から 150v, アンペア, 2.5mA から 0.3mA, 実験総数30回の調査である. 無処理区の増殖率を1とすると, DC区は平均0.8となり, 更に, 増殖率1.0以上のもの12区 (40%), 1.0から0.8のもの9区 (30%), 0.8以下の区, 9区 (30%), であり, DCの増殖率1.0以下の区をまとめると18区 (60%) となり, 直流による細胞賦活現象は, 余り期待出来ない結果を示している.

表7. は交流処理であり, (以下ACと称す) 振動数 1秒当り60乃至100k タイムス, ボルト数, 10v から 70

v 実験総数は16回である.

無処理区の増殖率1に対してAC区は平均0.8となりAC区の増殖率1.0以上の区は5区 (32%), 0.8から1.0に属するもの8区 (50%), 0.8以下は3区 (18%) であり, 増殖率1.0以下をまとめると11区 (68%) を示す. このことからAC処理はゾーリムシに阻害的に作用することが推定される. これは更に前記したように交流処理の際のゾーリムシの生態観察を通じても明らかであり, 阻害的に作用しているのではないかと考えた. 以上の三つの実験結果を更にわかりやすくしたのが, 図3, である. 夫々, 各図ごとに, 縦軸は脈流, 直流, 交流処

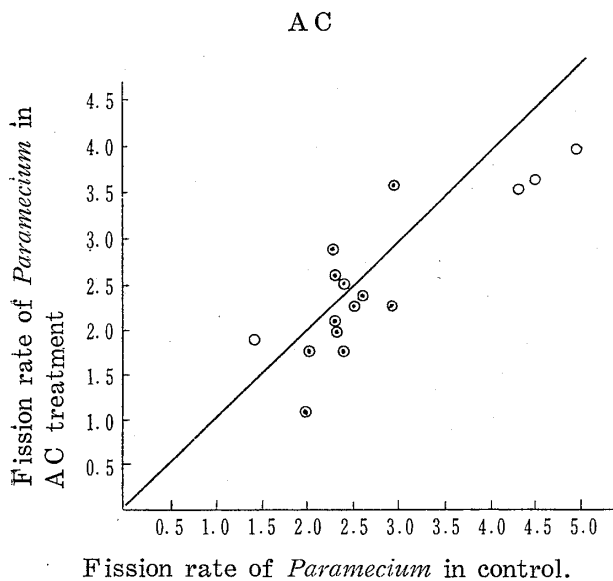
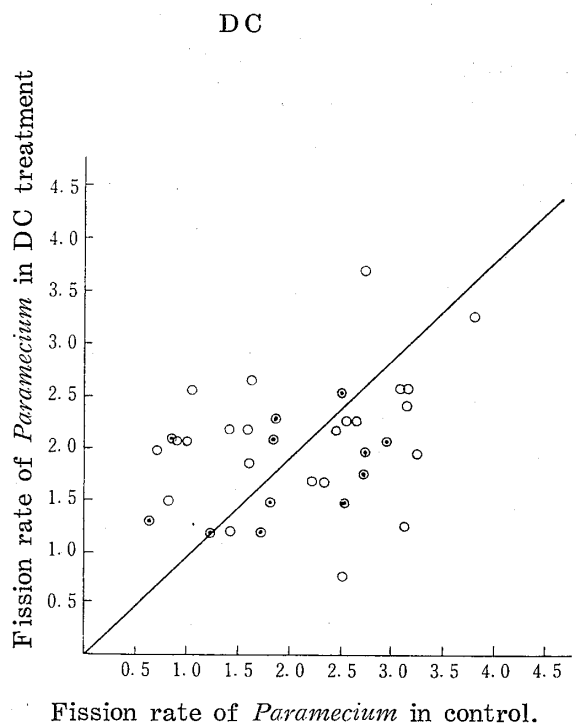
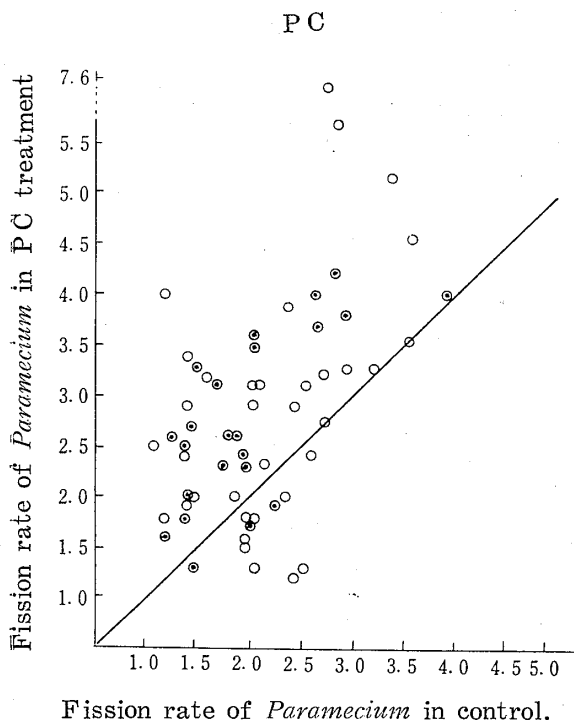


Fig. 3. Fission rate by PC, DC, and AC compared with control in *Paramecium caudatum* (SG method)

理でのゾーリムシの増殖率をとり、横軸は無処理区の増殖率をとった。図上の45°線は $\frac{E}{C}$ 値、1.0を示し、この線より上に位する点は、ゾーリムシの賦活効果があったことを示し、逆にこの線より下に位する点は、マイナスに作用したことを示している。図中、○点は自然疲労個体群での実験を示し、◎点は、蒸溜水注入で疲労させた人工個体群での実験を示している。図3のPC区をみれば明らかのように、全体の80%の点が45°線より上に位しており、その賦活現象が認められる。図3、のDC区では45°線を境に点の散在がみられるが、賦活効果よりやマイナスに作用する点(60%)の方が少し多い。A

C処理(図3.AC区)では、45°線以下の点が68%占めており、前述のようにゾーリムシに阻害的に作用しているのではないかと考えられる。

以上の結果よりPC処理はゾーリムシに対して、細胞賦活を誘起することは明らかであるが、その後、この処理を受けたゾーリムシ個体群は試験管内で、どのような増殖を続けながら、個体群消長を示してゆくかについて追跡した。図4、は、その結果を示したものである。調査した実験区は18区、そのうち最初の供試個体数が無処理区と、そろっている区のうち、標準型とみられる典型的な曲線を描いたものを選出すると図4、の4つの曲線

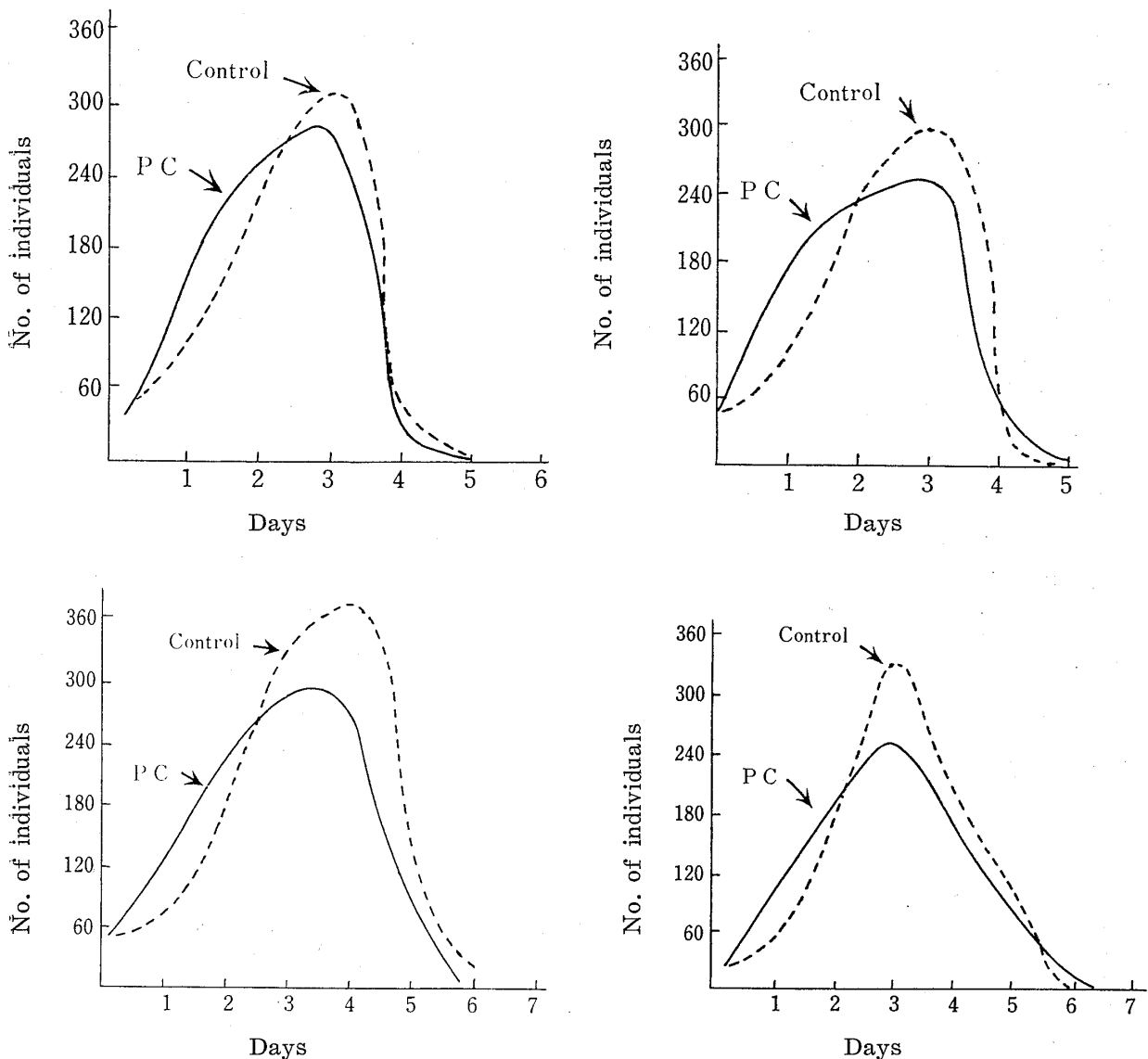


Fig. 4. Population fluctuation of *Paramecium caudatum* after P C treatment.

になる。

縦軸は3滴当りの個体数、横軸は処理後の経過日数を示し、室温条件は25°Cから30°Cの範囲で行った。

実線は脈流処理によるゾーリムシの個体群消長を示し点線は無処理区のそれを表わしている。この図の結果を要約すると次のようになる。P C区は曲線がピークに達する少し前まで、無処理区の曲線より上に位して、脈流処理によるゾーリムシの賦活現象があることを明白にしている。その後、曲線がピークに達する頃より試験管内でゾーリムシ個体群による密度効果が起りはじめ、そのため、無処理区との間に曲線のズレが生じて来る。両曲

線がピークに達してから以降は密度効果が生じ、個体群は激減の方向をとり、両区共に同一線上に合致するようになる。又、図4、で明らかなように、表5、から表7の調査で電気処理後、1日目でその効果を調べた理由はこの図にその差が出ていることから明瞭である。最後に図5、(DC) 図6、(AC)を参考までに掲げておく。すなわち直流処理の場合は曲線が無処理区と殆んど合致し、交流処理の場合は脈流とは逆のズレになっている。このことから、直流処理は無処理区とは著しい差はなく、交流処理はゾーリムシに、やや阻害的に作用するのではないかと結論される。

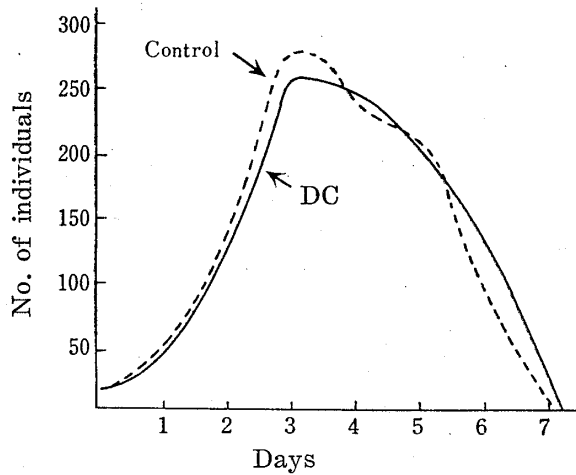


Fig. 5. Population fluctuation of *Paramecium caudatum* after direct current treatment.

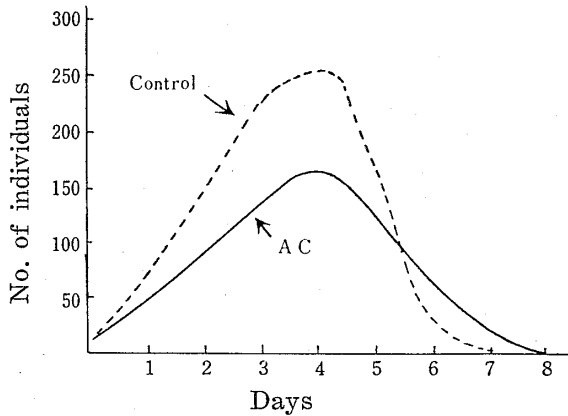
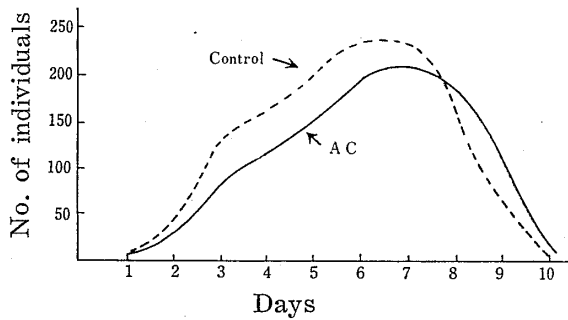


Fig. 6. Population fluctuation of *Paramecium caudatum* after alternating current treatment.

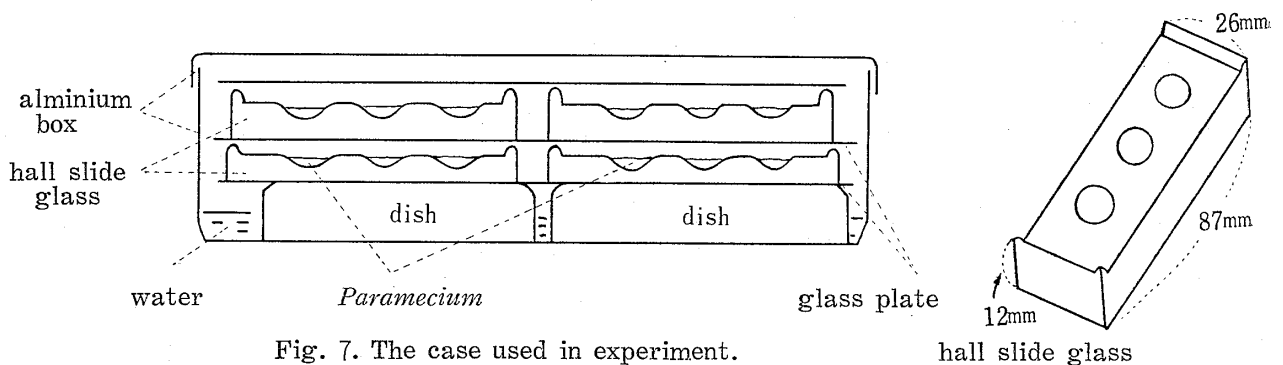


Fig. 7. The case used in experiment.

2. ホールスライドガラス試験法 (HS試験法)

実験方法および材料

我々は、SG試験法で得た結果から、更に、ゾーリムシ個体群の増殖に伴う密度効果等による data のフレを回避するために、ホールスライドを用いて以下の実験を行った。これをHS試験法と呼ぶ。これは内径 2.3cm 深さ 0.5cm のホールが三つあいた肉厚のスライドガラスで、京都大学理学部動物学教室の三宅研究室で使用している様式のものである。実験方法はあらかじめ用意したホールスライドガラス (1区劃, 5枚ずつ) に、新しい培養液 1cc を各ホールに満たし、更にゾーリムシを培養している培養基中、疲労度の進んでいるものを検鏡検査で選出した。これらのゾーリムシをSG試験法と同じ実験装置を用いて、夫々の電気処理 (PC, DC, AC) を行い、その後、ミクロスポイドで採取して、各ホールに1匹ずつ注入した。このような実験の繰り返しを1回に2区ずつ設けて、この実験を行った。この実験総数は93回である。実験に際しての電気処理中の室温は15°C乃至28°Cであり、その処理時間は20秒から30分の範囲で行った。PC, DCにおける電流の強さは、夫々1vから250vの範囲、アンペア、0.06より2.5mA, PCの振動数は1秒当り、10kから400kタイムスで、これは、ゾーリムシの疲労度を考慮に入れて、適宜、随意に調節して処理した。又、交流の場合は、1秒当り60乃至100kタイムス、ボルト数、10vから70vである。処理後、実験区、無処理区も一様に図7.の容器に入れて、これを25°Cの恒温槽に放置した。

調査はDG試験法で行ったように処理後24時間を基準として、増殖したゾーリムシの数を記録した。

実験結果

この実験の結果を表8から表10にまとめた。表8.によれば、実験総数93回のうち、E/Cの数値が1.3以上の区

は16区 (17.2%) , 1.3から1.0までの区は41区 (44%) 1.0を示すもの, 22区 (23.7%) , 1.0以下をとるものは14区 (15.0%) である. このことから, 無処理に比べてゾーリムシの細胞賦活現象があったと認められるもの, すなわち, E/C値, 1.0以上の区を集計すると, 57区 (61.3%) となり, SG試験法と同じ集計のしかたをとれば, E/C値, 1.0区の22区を加えて, 77区 (84%) となる. これはSG試験法で得た結果と同じ精度で, 細胞賦活現象が, 認められることが明らかになった. 然し, E/C値の実験総数の平均値を比較するとHS試験法では1.1となり, SG試験法の場合より, ややその数値が下まわっている.

表9.の直流処理では, 実験総数19回のうち, E/C値1.0以上の区は8区 (42.1%) , 1.0をとるもの8区 (42%) , 1.0以下の区は3区 (15.6%) となる. 更にSG

試験法との比較をみれば, 1.0及び1.0以上の区を合すると16区 (84%) となりSG試験法と多少異った数値を示している. だが, 表9.にあるように, 実験の精度はHS試験法の方が比較的安定していると云えるだろう. 又, 19回の実験総数のE/C平均値は1.0となり, SG試験法の0.8とやや異なるが, 細胞賦活効果は直流の場合余り期待出来ないと思われる.

表10.に示す交流処理では実験総数19回のE/C平均値は0.9であり, E/C値1.0以上の数値をとるもの3区 (15.6%) , 1.0のもの, 3区 (15.6%) , となり, 0.9のもの7区 (36.8%) , 0.9以下の区は6区 (31.6%) で0.9及び0.9以下の区を合すると13区 (68.4%) となり, SG試験法の結果とよく合致する. このことから交流処理は, やはりゾーリムシに阻害的に作用するのではないかという結論が考えられる.

Table 8. Plusating current treatment to *Paramecium caudatum*. (HS method)

PC	No. of individuals used	11	9	12	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
	No. of individuals after 24hrs.	22	18	23	24	32	45	33	44	19	26	24	29	22	22	30	36	32	32	24	27
	Fission rate	2.0	2.0	1.9	1.6	2.1	3.0	2.2	2.9	1.3	1.7	1.6	1.9	1.5	1.5	2.0	2.4	2.1	2.1	1.6	1.8
CONT ROL	No. of individuals used	11	9	12	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	19	14	17	18	24	36	23	52	18	23	31	30	18	19	23	23	39	26	24	23
	Fission rate	1.7	1.6	1.4	1.2	1.6	2.4	1.5	3.5	1.2	1.5	2.1	2.0	1.2	1.3	1.5	1.5	2.6	1.7	1.6	1.5
	E/C	1.2	1.3	1.4	1.3	1.3	1.3	1.4	0.8	1.1	1.1	0.8	1.0	1.2	1.2	1.3	1.6	0.8	1.2	1.0	1.2
PC	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	26	19	26	18	21	19	20	20	20	23	28	29	33	28	30	26	21	22	17	18
	Fission rate	1.7	1.3	1.7	1.2	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.5	1.9	1.9	2.2	1.9	2.0	1.7	1.4	1.5	1.1	1.2
CONT ROL	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	23	22	22	15	18	19	17	18	23	20	25	22	29	26	39	25	18	20	16	15
	Fission rate	1.5	1.5	1.5	1.0	1.2	1.3	1.1	1.2	1.5	1.3	1.7	1.5	1.9	1.7	2.6	1.7	1.2	1.3	1.1	1.0
	E/C	1.1	0.9	1.2	1.2	1.2	1.0	1.2	1.1	0.9	1.2	1.1	1.3	1.1	1.1	0.8	1.0	1.2	1.1	1.1	1.2
PC	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	22	20	21	29	25	20	20	20	20	19	19	17	16	16	19	18	20	18	19	19
	Fission rate	1.5	1.3	1.4	1.9	1.7	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.1	1.1	1.1	1.3	1.2	1.3	1.2	1.3	1.3
CONT ROL	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	18	23	21	26	30	21	18	18	20	16	15	16	17	16	17	19	21	17	18	18
	Fission rate	1.2	1.5	1.4	1.7	2.0	1.4	1.2	1.2	1.3	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.3	1.4	1.1	1.2	1.2
	E/C	1.2	0.9	1.0	1.2	0.8	0.9	1.1	1.1	1.0	1.2	1.3	1.1	0.9	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0

PC	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
	No. of individuals after 24hrs.	24	16	31	20	21	17	17	31	47	36	48	32	20	36	31	28	27	22	25	22
	Fission rate	1.6	1.1	2.1	1.3	1.4	1.1	1.1	2.1	3.1	2.6	3.2	2.1	1.3	2.4	2.1	1.9	1.8	1.5	1.7	1.5
CONT ROL	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	23	16	22	17	21	17	15	27	35	45	42	22	20	27	32	32	28	21	20	23
	Fission rate	1.5	1.1	1.5	1.1	1.4	1.1	1.0	1.8	2.3	3.0	2.8	1.5	1.3	1.8	2.1	2.1	1.9	1.4	1.3	1.5
	E/C	1.0	1.0	1.4	1.2	1.0	1.0	1.1	1.2	1.3	0.9	1.1	1.4	1.0	1.3	0.9	0.9	1.0	1.0	1.3	1.0
PC	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	23	20	19	16	16	27	28	22	20	18	20	16	15	15	15	15	15	15	15	15
	Fission rate	1.5	1.3	1.3	1.1	1.1	1.8	1.9	1.5	1.3	1.2	1.3	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
CONT ROL	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	20	20	20	15	16	23	22	21	17	20	18	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Fission rate	1.3	1.3	1.3	1.0	1.1	1.5	1.5	1.4	1.1	1.3	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	E/C	1.2	1.1	1.0	1.1	1.0	1.2	1.3	1.0	1.2	0.9	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.1	1.0	1.0

Table 9. Direct current treatment to *Paramecium caudatum*. (HS method)

DC	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	29	19	21	23	20	30	32	16	17	22	21	17	21	20	20	16	15	21	25	25
	Fission rate	1.9	1.3	1.4	1.5	1.3	2.0	2.1	1.1	1.1	1.5	1.4	1.1	1.4	1.3	1.3	1.1	1.0	1.4	1.7	1.7
CONT ROL	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	25	19	20	19	23	29	29	15	17	24	20	16	18	20	20	16	17	19	24	24
	Fission rate	1.7	1.3	1.3	1.3	1.5	1.9	1.9	1.0	1.1	1.6	1.3	1.1	1.2	1.3	1.3	1.1	1.1	1.3	1.6	1.6
	E/C	1.2	1.0	1.0	1.2	0.9	1.0	1.1	1.1	1.0	0.9	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0	0.9	1.1	1.0	1.0

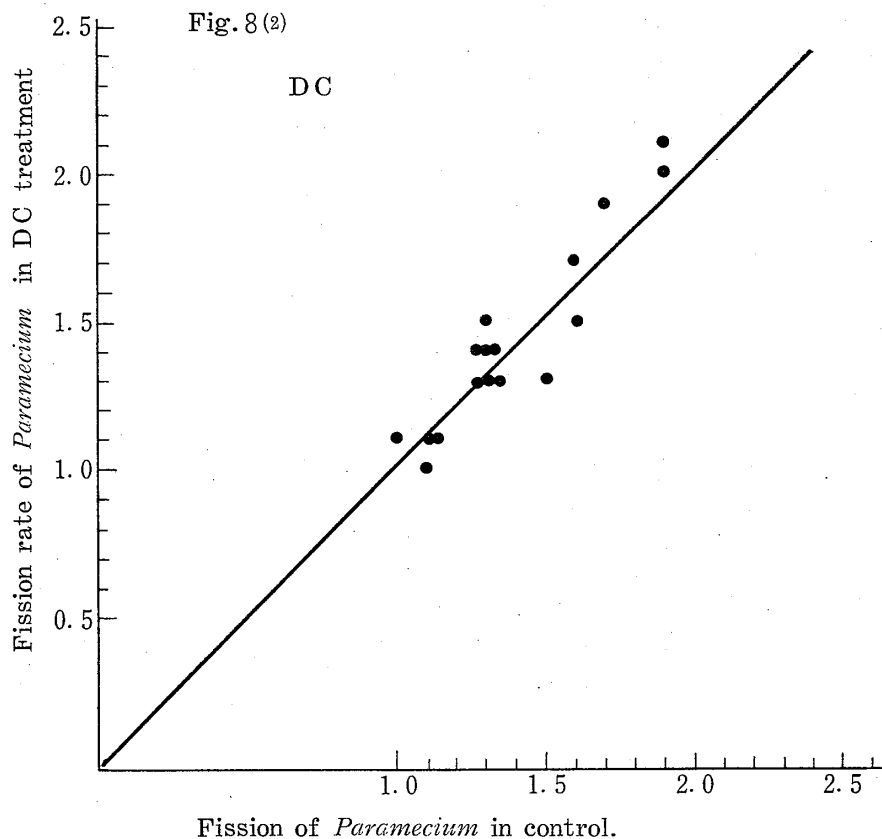
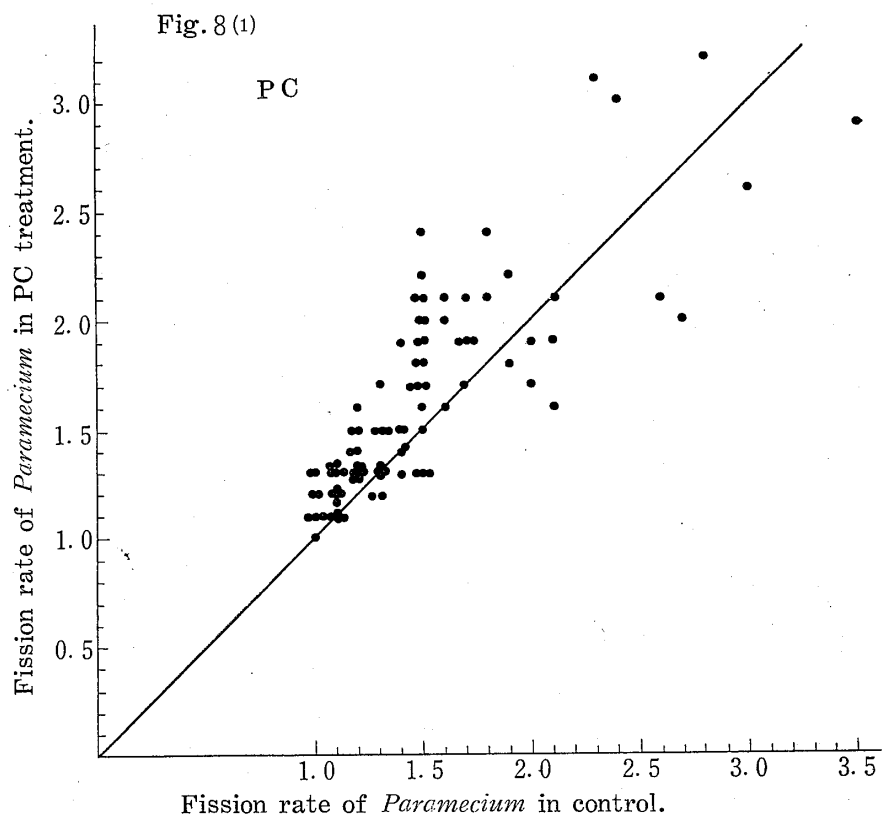
Table 10. Alternating current treatment to *Paramecium caudatum*. (HS method)

AC	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	46	56	17	17	22	17	21	22	23	20	22	15	17	16	16	15	17	20	19	19
	Fission rate	3.1	3.7	1.1	1.1	1.5	1.1	1.4	1.5	1.5	1.3	1.5	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	1.1	1.3	1.3	1.3
	No. of individuals used	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	No. of individuals after 24hrs.	50	59	17	20	23	22	20	24	21	25	29	19	18	22	18	15	15	23	25	25
	Fission rate	3.3	3.9	1.1	1.3	1.5	1.5	1.3	1.6	1.4	1.7	1.9	1.3	1.2	1.5	1.2	1.0	1.0	1.5	1.7	1.7
	E/C	0.9	1.0	1.0	0.9	0.9	0.8	1.1	0.9	1.1	0.8	0.8	0.8	0.9	0.7	0.9	1.0	1.1	0.9	0.8	0.8

以上を図示すると図8.のようになる。これはDG試験法の場合と同じ図示様式であり、従って図の説明は略することにした。通観して図上において同一点を占めているのが多いのはHS試験法の方が精度において安定していることを示している。

4. 考察

単細胞生物の不死説をめぐって、Moupas (1889) は各種の浸滴虫類を培養して観察した結果、ある一定の世代数(300乃至450世代)を経過すると、細胞分裂速度が低下したり、細胞の大きさが縮小したりしながら、最後は老衰のために死滅してしまうことを明らかにした。その後、Woodruff (1911) はゾーリムシの一種、*Paramecium aurelia* を用いて、13500世代の継続飼育実験からゾーリムシの不死説を強調した。又、Calkins (1913) 等は再びMoupas 等と同じ見解を実験的に明らかにし、栄養や培養環境を更新しても一時的に死を回避することは出来ても、それは一定の限度があることを報告している。同様の論議は最近になっても Sonneborn (1954) 等の仕事で老衰と若返りに対して、Autogamy (自家生殖) の問題が明らかにされている。だが井村・鷺塚 (1965, 1966) の立場は、前報でも明らかにしたように生細胞段階に展開させると興味深い可能性を示唆していた。先の、多くの研究者達が問題として来た「単細胞生物の寿命をめぐる問題」に対して、筆者等の理論を展開させ実験を行って来た結果、きわめて興味深



い結果を得たことは前記して来た通りである。

さて、温度差によるゾーリムシの分裂と寿命で提示した図1、及び図4、5、6、を論じるに際して我々は次のようなことを考える。一般に単細胞生物の寿命を論じる場合、これは多細胞生物の寿命表示と同様に考えることは困難である。故に一つの提案として、ここで提示された図をもとにして、電気処理区と対照区との寿命の比較を試みる際にはゾーリムシの個体群消長曲線で描れる面積を主体として取上げこれについてこの問題を取り上げるべきだと考えている。

次に、脈流・直流・交流の各処理実験について、ゾーリムシの反応結果を期待する場合、機械論的予測がきわめて困難であり、その期待に対する適合性が乏しいことが、全体の実験を通じて痛感される。すなわち、電流の振動数、ボルト、アンペア処理時間、等の調節と、ゾーリムシ実験個体群との供試に際しての適用性が、きわめて難しいことなどが挙げられる。これは一つの実験個体群で、ゾーリムシの個体変異が大きいかことや、同じ培養液内で同様の履歴を保持しながらも、その多様性の多いことなどが、図示した実験結果の各点の散在をみても明らかである。(図3、8.)

そのため、我々は実験の条件設定に出来る限りの配慮を払ってこの実験を行い、先の結果を得た。ここで得られたゾーリムシの脈流処理による細胞賦活現象は、Moupas等の説を否定してWoodruff (1911)等の単細胞生物不死説と同じ立場をとることを我々は提言する。

このような立場にたつと、「性の起源とその分化」という問題にその後、関係し、更に、接合の機構(三宅章雄, 1957, 1958)や細胞集合の問題も加えて興味深い。又、単細胞生物より多細胞生物へと系統的な進化が進むと、何故、寿命が生じて来るのかが、ここに大きな問題として、横たわっている。我々は、そのため、更に系統的に進んだ生物段階で、脈流による細胞賦活現象を実験的方法から解明してゆきたく考えている。最後に交流処理でのゾーリムシに対する阻害的作用は、今後も慎重な

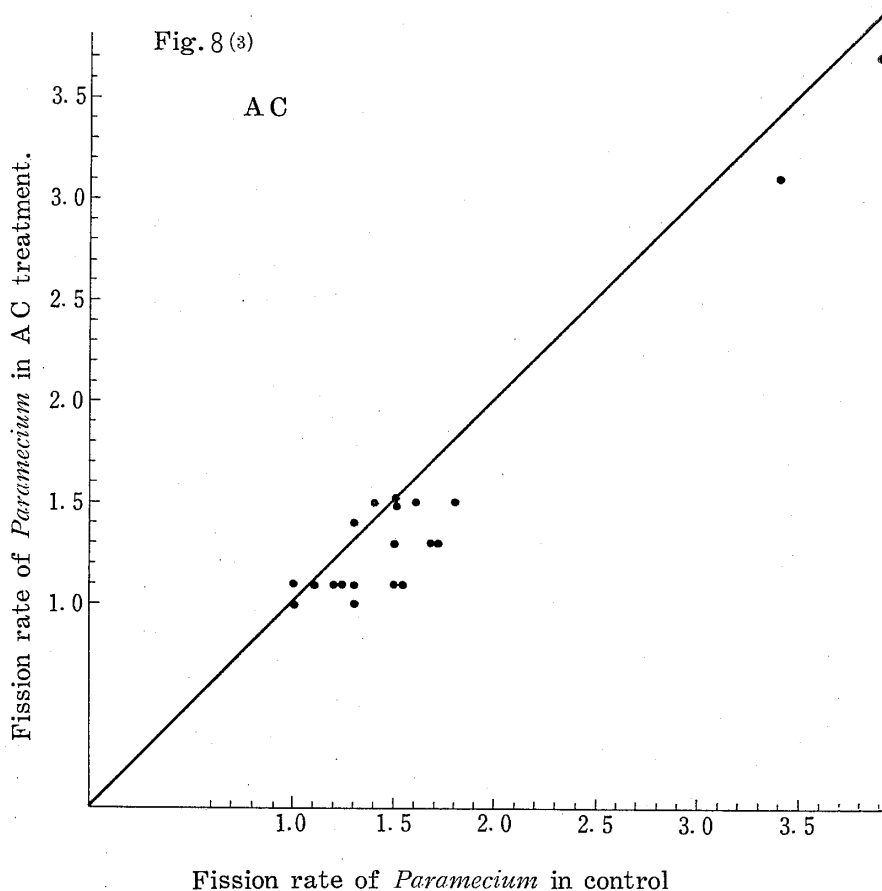


Fig. 8. Fission rate by PC, DC, and AC compared with control in *Paramecium caudatum*. (HS method)

研究による検証が繰り返され、しかる後、この利用性が期待され得るならば、害虫の物理的防除法等に連る実用性も、考えられるかも知れない。

謝 辞

本研究を進めるに当り常に御批判、御助言とお心暖き激励のお言葉を賜った京都大学農学部昆虫学研究室の内田俊郎教授をはじめ、研究上の御指導や実験器具の借与を賜った京都大学理学部動物学教室の三宅章雄博士、並びに実験材料のゾーリムシをお送り下さった東京都立大学理学部生物学教室の中村方子博士の各位に、ここに謹んで謝意を表する。

5. 引用文献

1. Calkins, G. N. & Gregory, Louise H. (1913) Variation in the progeny of a single exconjugant of *Paramecium caudatum*. J. Exptl. Zool 15. 467-525

2. 井村洋一・鷺塚靖 (1965)
直流 (脈流) 電場における両性電解質の収縮現象.
日本生物物理学会, 予稿集 No.4.33.
3. 井村洋一・鷺塚靖 (1966)
直流によるゼラチン水溶液の粘度低下とアミラーゼ
活性との関係
日本生物物理学会, 予稿集, No.5.33.
4. Miyake, A. (1957)
Aberrant conjugation induced by chemical
agents in amiconucleate *Paramecium*
caudatum. J. Insit. Polytch. Osaka city
Univ. Ser. D. (8). 1-10
5. Miyake, A. (1958)
Induction of conjugation by chemical agents
in *Paramecium caudatum*.
J. Inst. Polych. Osaka City Univ. Ser. D.
(9). 251-296
6. Moupas, E (1889)
La rajeunissement karyogamique chey les
ciliés. Arch. Zool. Exptl. et Gën. (2). 7,
149-517
7. Sonneborn. T. M. (1954)
The relation of autogamy to senescence
and rejuvenesce in *Paramecium aurelia*.
Protozool. 1(1), 38-53
8. 鷺塚靖 (1964)
ゾーリムシの分裂と寿命, 予報, 日本応用動物昆虫
学会大会要旨, 5.
9. 鷺塚靖 (1965a.)
温度差によるゾーリムシの分裂と寿命, 日本応用動
物昆虫学会大会要旨, 40.
10. 鷺塚靖・井村洋一 (1965b.)
直流 (脈流) 電場におけるゾーリムシの細胞賦活現
象, 日本生物物理学会予稿集, No.4.34
11. Woodruf L.L (1911)
Two thousand generations of *Paramecium*.
Arch. Protistenk. 21, 263-266

6. SUMMARY (P.58)

EXPERIMENTAL STUDIES IN CELL VITALITY OF *Paramecium caudatum* BY DIRECT CURRENT (Puls.current)

By Yasushi Washizuka & Hirokazu Imura

From a viewpoint to research on the longevity of an organism, the authors considered an organism to be a thermodynamical closed system. As far as we have this viewpoint, the longevity of an organism has relation to the second law of the thermodynamics on entropy increase and when this law is operated reversely, it is possible for the longevity of an organism to be unlimited.

Now suppose that a protein developed into a unicellular and the latter has completed a systematic evolution, the beginning of our study is *Paramecium caudatum*. This study follows the preceding report by Imura and Washizuka, "contraction phenomenon on protein by direct current (puls.current) (1965,1966)". *Paramecium caudatum* which we used as the material in our experiments has a connection with "the problem on the endless living theory of unicellular" by Woodruff (1911), Calkins (1913), and Sonneborn (1954).

Therefore *Paramecium caudatum* is very interesting to us. The experimental studies on *Paramecium caudatum* were done as follows.

I. In the pre-experiments

1. The test method by Inewara (rice plant hay) medium
2. The fission and the longevity of *Paramecium caudatum* at different temperatures

II. In the main experiments

Cell vitality phenomenon of *Paramecium caudatum* by direct current and pulsating current

1. Test method of slide glass (SG method)
2. Test method of hall slide glass (HS method)

The results of pre-experiments

- (1) *Paramecium caudatum* were cultivated in Inewara infussion.

Water (water 50cc/1g Inewara) was boiled for 30 minutes and after this several Inenwaras were added to the Inewara infussion. The opening of the test tube was covered with a piece of paraffine paper. This medium was flourished with food bacteria, *Bacillus subtilus*. We used this medium

in our experiments two days after it had been made.

- (2) At higher temperatures than 20°C, the fission of *Paramecium caudatum* was active.

On the contrary, at lower temperatures than 20°C, the fission rate is low. The shorter the population longevity becomes, the lower the temperature is and the longer the former becomes, the higher the latter is.

The experimental results of the main experiments are as follows.

- (3) In this experiment the difference between cell vitality phenomenon of *Paramecium caudatum* by pulsating current and that of *Paramecium caudatum* by direct current, was seen and also the phenomenon that alternating current treatment obstructs this species was made clear (Table 5-10). When the fission rate of control is 1, that rate of *Paramecium caudatum* by pulsating current treatment is 1.3 (mean) in SG method, and is 1.1 (mean) in HS method. On the other hand, by direct current treatment, it is 0.8 (mean) in SG method and is 1.0 (mean) in HS method.

The fission rate of *Paramecium caudatum* by alternating current is 0.8 (mean) in SG method and is 0.9 (mean) in HS method.

The results of these experiments are shown in Fig.3 and Fig.8 and they are summarized as follows.

When the fission rate of control is 1 and it is shown as 45° line, most of the points by pulsating current treatment are above the line (about 80%).

The points by direct current treatment are near the 45° line, and also the points by alternating current treatment are under the 45° line (about 68%). Judging from this phenomenon, alternating current treatment seems to work as an adverse effect to *Paramecium caudatum*.

Through above experiments, cell vitality phenomenon by pulsating current was made clear. So we want to research on these problems in more systematically evolved organisms.