

ニワトリ卵殻膜を用いた半透性を示す実験

梶原 裕二・平野 冬果*

Experiments showing the semi-permeability of egg shell membranes

Yuji KAJIWARA and Fuyuka HIRANO*

Accepted November 9, 2007

抄録：細胞膜の半透性について，教科書には，顕微鏡を用いたユキノシタの原形質分離実験や赤血球の溶血現象が記載されている。他に，ニワトリ卵の卵殻膜の半透性を利用した演示実験があるが，定量的な実験ではない。ニワトリ卵が大きな細胞であることを利用し，無細胞性の卵殻膜が半透性をもつことを示す実験の開発を行った。本装置を用いると，顕微鏡を用いることなく，肉眼で半透性を確認することができた。特に，通常用いられるセロファンでなく，生体由来の卵殻膜の半透性を，溶液を変える，あるいは時間を変えるなどの操作により，ほぼ定量的に計測できる実験系を確立できたことは意義があると思われる。また，内卵殻膜，卵殻膜を用いた場合，ほぼ1時間で観察結果が得られることから，中学校や高校の理科や生物の1～2時間の実習で利用できることも実際の利用を考えた場合，都合が良いと思われる。

索引語：半透性，浸透圧，卵殻膜，生物教育

Abstract : The diffusion of water molecules through a selectively permeable membrane is important to cell functions. In the textbook of “Biology” of the high school, the osmosis is shown by both the plasmolysis using the leaves of *Saxifraga stolonifera* and the hemolysis of red blood cells. In the present experiments, semi-permeability was shown by the newly developed instruments using a chicken egg shell membrane. The isolated membranes on filter papers were put between two small plastic cups which has a hole on the upside. The distilled water was filled into one plastic cup and 0.4 M or 0.2 M sucrose solution was filled into the other plastic cup. The water quickly moved to the sucrose solution from the water alone by osmosis. The volume of moved water increased over time. Thus, this experiment was a good demonstration of the semi-permeability of the membrane for high school biology classes.

Key words : osmosis, semi-permeability, egg shell membrane, biological education

* 京都教育大学総合科学課程自然科学コース平成16年度卒業

1. はじめに

細胞膜は細胞の主要な構成成分であり、物質や情報の出入りは細胞膜を介して行われる。細胞膜の主成分はリン脂質の二重層によって構成されており、気体や小さな疎水性の分子は膜を透過でき、また、水分子はわずかに透過できるが、しかし、電荷を持たない大きな分子、イオンや電荷をもつ親水性分子は膜を透過できず、それらの移動にはポンプ、チャネル、輸送体が必要である¹⁾。このように細胞膜を介した物質の移動は物質により違いがあり、その半透性・選択透過性は生命活動に重要な役割をもつ。

しかし、この重要性に対して半透性を理解する実験教材の種類は多くはない。ユキノシタを用いた原形質分離実験^{2), 3), 4)}、アオミドロやいくつかの植物を用いた原形質分離実験⁵⁾があり、高等学校での探究活動実験として生物の教科書に記載されている⁴⁾。動物を材料にした実験としては、ニワトリ卵を塩酸や酢酸で溶解、水に浸して吸水させた後、ガラス管などをさして水を噴出させる実験⁵⁾や、卵殻内に小孔をあけ直接ストローを挿入した後、水に卵殻を入れる実験がある⁶⁾。また、赤血球の溶血現象が生物の教科書や図説に記載されている^{3), 4)}。

ニワトリ卵は安価で入手しやすく、哺乳類を含む有羊膜類の発生材料として広く用いられている⁷⁾。ニワトリ卵は比較的大きな構造をもつため、生物由来の膜成分を得る試料としても利用できれば用途は多いと思われる。そこで本実験では、大変身近な材料であり、卵殻膜という生物由来の膜を用いて半透性を定量的に調べる教材開発を行った。

2. 材料と方法

市販のニワトリ (*Gallus gallus*) の卵を用いた。また、対照の人工膜として市販のセロファン紙を用いた。用いた溶液は 0.0M, 0.2M, 0.4M スクロース (ナカライテスク) である。

用いた器具は、パストールピペット (コーニング社)、90 x 15 mm シャーレ (サンショー医株式会社)、眼科用小ハサミ、細ピンセット (No.5) である。

実験装置は次のように作成した。水道用塩化ビニル管 (C16)、2.4 x 10mm 皿木ネジ、輪ゴム、シリコンキャップ (日電理科硝子株式会社)、ろ紙、1ml 使い捨て注射筒 (テルモ社)、マニキュアを準備した。

塩化ビニル管 (C16) の側面にボール盤で径 9 mm の穴を開けた。管の開口部から水が漏れないように紙ヤスリで平らにした。管の上側面 4ヶ所に皿木ネジを取り付けた。1ml 注射筒の注射針取り付け部分をカッターで切り落とした。シリコンキャップの中央にナイフで直径 5mm の穴を開けシリンジ取り付け部とした。ろ紙を管上部の開口部に沿った形でドーナツ型に切り、両面をマニキュアでコーティングし防水した (図 1)。

卵殻膜は次のように取り出した。卵の鈍端と鋭端に割れ目を入れ、鋭端は卵殻・卵殻膜を取り除い



図 1 完成した実験器具

た。卵の内容物を除き、中を生理食塩水で洗った。卵殻をハサミで大きく割り、露出した卵殻膜を残りの卵殻から丁寧に剥がし取った。得られた卵殻膜は使用するまで生理食塩水に浸した。

卵殻膜は内外2層の膜でできている⁸⁾。内側の構成成分である内卵殻膜を次のように取り出した。卵の鈍端と鋭端に割れ目を入れ、鋭端は卵殻・卵殻膜を取り除いた。卵の内容物を除き、中を生理食塩水で洗った。鈍端の卵殻のみを丁寧に剥がし取った。露出した卵殻膜の気室を確認し(図2)、卵殻を縦におおよそ半分に割り、気室部分から内卵殻膜をゆっくりと外卵殻膜や卵殻から剥がし取った後(図3)、生理食塩水に浸した。



図2 気室部分に露出した内卵殻膜



図3 内卵殻膜のはがし方

装置の組み立ては以下のようにおこなった。セロファン、内卵殻膜、卵殻膜はドーナツ型のろ紙で挟んだ。ろ紙からはみ出た膜はハサミで切り取った。写真は内卵殻膜の場合である(図4)。ろ紙で挟んだ膜を管の開口部上面ではさんだ(図4)。管と管の結合部をマニキュアで覆った。ネジとネジの間を輪ゴムで巻きつけ、二つの管を密着させた(図5)。実験装置を水平な台の上に置き、蒸留水とスクロース溶液を同時にゆっくりと溢れるまで流し込んだ(図5)。注射筒を取り付けさらに溶液を流し入れた(図6)。溶液の移動量は注射筒の目盛りで経時的に読み取った。水が膜を介して一方へ流れ込むと両側の注射筒の水面の高さが変化する。減少した量と増加した量が等しい場合、膜を介して水の移動があったと考えられ、移動水量が等しくない場合、膜の破損や接着部からの漏れが考えられる。

実験は、セロファン、内卵殻膜、卵殻膜を用い、溶液は0.0Mと0.2Mスクロース、0.0Mと0.4Mスクロースの2種類の濃度差のものをを用いた。それぞれの実験群で、10例ずつ計測した。



図4 実験装置への膜の取り付け



図5 溶液を満たす



図6 注射筒を取り付け、溶液をさらに満たす

3. 結果と考察

－セロファンを用いた場合－

0.4M スクロースと蒸留水を用いた場合、4－5時間後には溶液が移動して注射筒から溢れた。0.2M スクロースの移動水量は約 0.08 ml/h であり、0.4M スクロースの移動水量約 0.17 ml/h に比べ、移動水量は 1/2 から 1/3 にまで少なかった。0.4M スクロースと 0.2M スクロースのいずれ実験でも、時間経過に比例して移動水量が増加した。グラフから明らかなように水の移動速度はほぼ一定で、定量的な実験が可能であることがわかった（図 7）。しかし、この装置での水の移動には 4 時間以上かかり、1－2 時間の実験時間内で結果が得られないため実際に用いるにはさらに工夫が必要と思われる。

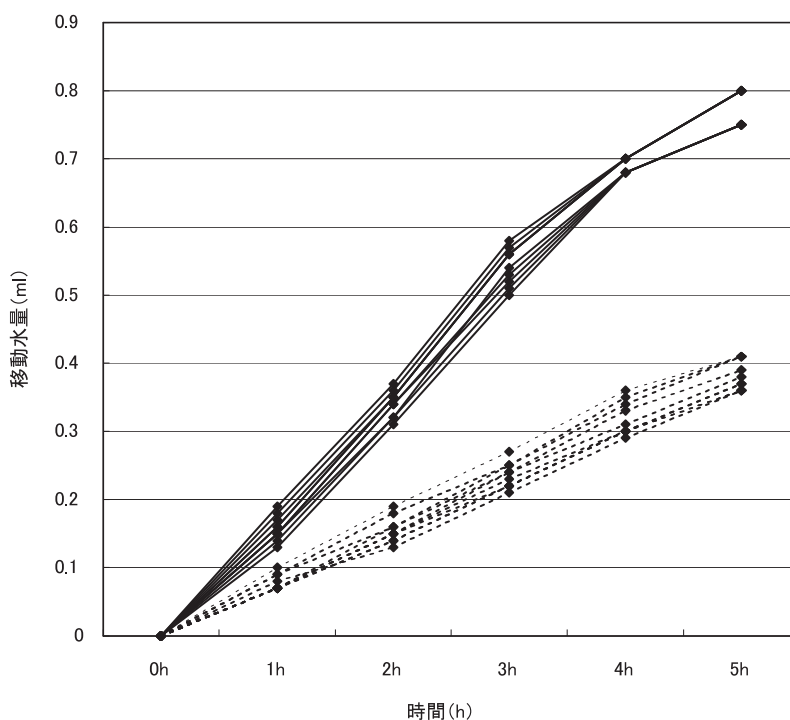


図7 セロファンを用いた場合の移動水量
(実線；0.0M-0.4M スクロース、点線；0.0M-0.2M スクロース)

－内卵殻膜を用いた場合－

セロファンを用いた場合に比べ溶液の移動が約 5 倍速く、0.4M スクロースの場合、40 – 50 分後にはシリンジから溶液が溢れた。セロファンの場合と同様に、移動水量は時間経過に比例して増加し、また濃度依存性もほぼ見られた。0.2M スクロースの移動水量は約 0.45 ml/h であり、0.4M スクロースの移動水量の約 1.1 ml/h に比べ、移動水量は 1/2 から 1/3 にまで少なかった。0.4M スクロースと 0.2M スクロースのいずれ実験でも、時間経過に比例して移動水量が増加し、それぞれの実験群でばらつきが少なくほぼ一定であった（図 8）。このように、内卵殻膜は非細胞性ではあるが、生物膜であり、人工膜であるセロファンと同様に、定量的な実験が可能であることがわかった。

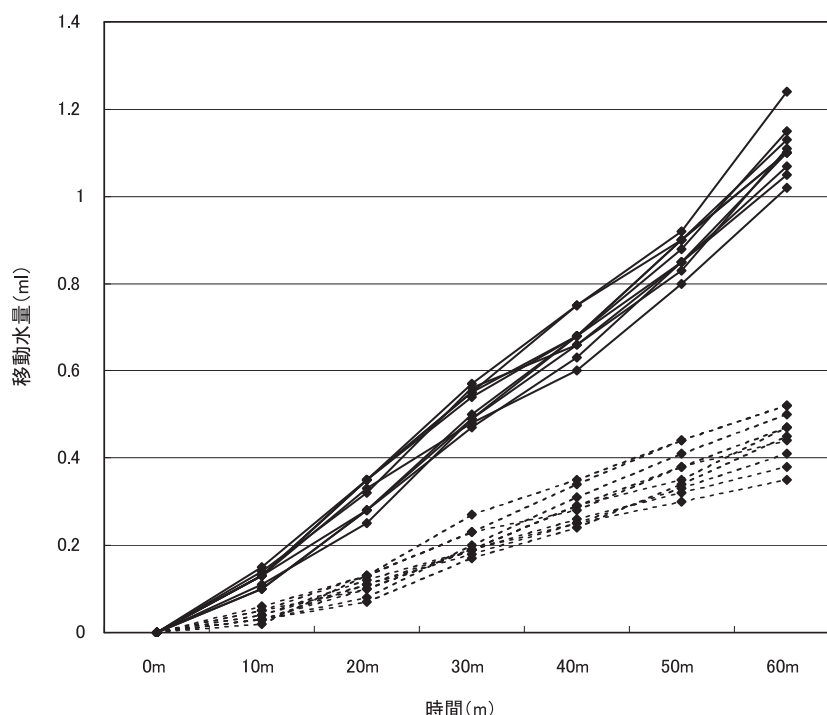


図 8 内卵殻膜を用いた場合の移動水量
(実線 ; 0.0M-0.4M スクロース、点線 ; 0.0M-0.2M スクロース)

－卵殻膜を用いた場合－

卵殻膜を用いた場合も、浸透圧の差により水の移動が生じた。セロファンや内卵殻膜の場合と異なり、いずれの溶液を使用した場合も、個々の実験例でデータに大きなばらつきがあった。しかし、個々の例では、時間経過に伴いほぼ直線的に増加したことから、水の移動は、膜を介しての浸透圧の差による移動と思われる。0.2M スクロースの移動水量は平均、約 0.20 ml/h であり、0.4M スクロースの移動水量は平均、約 0.57 ml/h であり、0.4M スクロース溶液と蒸留水を用いた場合に比べ 0.2M スクロース溶液を使用した場合の移動水量は減少した。また、移動速度はセロファンの約 3 倍速く、内卵殻膜に比べると移動水量は約 1/2 に減少した（図 9）。

実験に使用したセロファンは半透性（semi-permeable）という性質を利用した実験によく用いられる人工膜である。卵殻膜、内卵殻膜はともに無細胞性の生体膜である。本実験で卵殻膜、内卵殻膜がともに半透性をもつことが実証された。

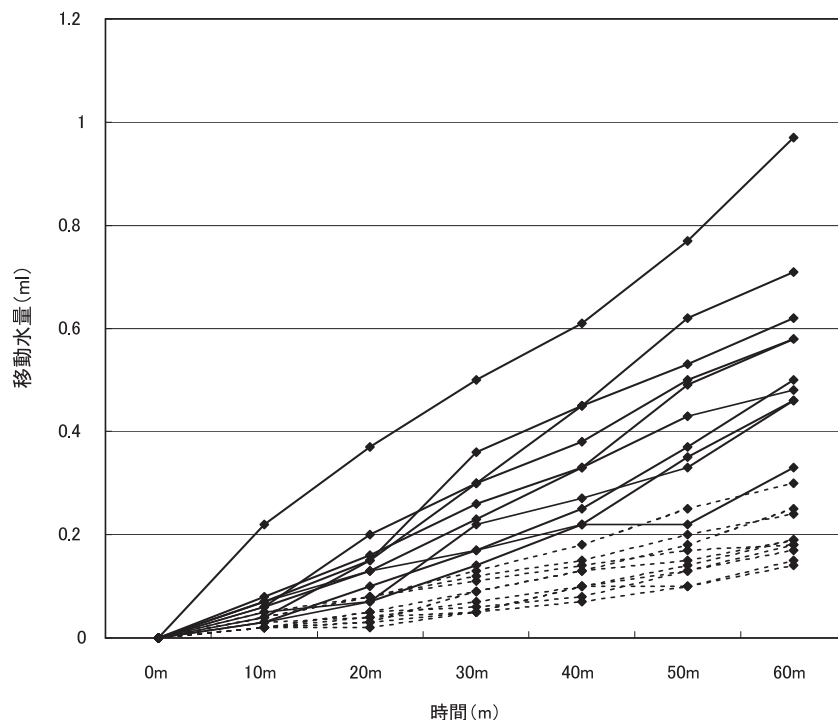


図9 卵殻膜を用いた場合の移動水量
(実線 ; 0.0M-0.4M スクロース、点線 ; 0.0M-0.2M スクロース)

実際に生物を実習の材料として用いる場合、入手しやすさは大変重要である。卵はスーパーなどで市販されている M サイズの無精卵を使用した。実験に用いる場合、卵膜を取るときには卵黄の大きい L サイズの無精卵を使用し、卵殻膜を用いるときは新鮮な卵は気室がほとんどないために古めの方よい。

卵殻膜、内卵殻膜は水の透過速度がセロファンにくらべ著しく速かった。これには卵殻膜、内卵殻膜の孔がセロファンの孔よりも大きい、数が多いなどの理由が考えられる。卵殻膜は厚さ $60 \sim 120 \mu\text{m}$ の膜であり内卵殻膜、外卵殻膜は水に不溶な糖タンパク質（コラーゲンなど）で構成される。内卵殻膜は薄く、外卵殻膜は厚く粗い⁸⁾。内卵殻膜のみの場合と比べ、卵殻膜の移動水量は減少する。理由として内卵殻膜、外卵殻膜の 2 層になることで水が透過しにくくなったものと考えられる。また卵殻膜はデータにばらつきが生じた。その原因として、内卵殻膜の厚さには卵による差がなく、外卵殻膜の厚さが卵によって差が大きいことが考えられる。また、外卵殻膜が卵殻と癒着しているために剥がしとるときに個々の卵殻膜の厚みに差が生じることも考えられる。また、内卵殻膜のデータはばらつきが少ないことの原因として、内卵殻膜は外卵殻膜とゆるく結合しているため、2 層を分離したときに比較的傷がつかないことも考えられる。

これまで生体膜の半透性を例示する実験はユキノシタの裏面表皮^{2), 3), 4)}、タマネギの上皮細胞など植物細胞⁵⁾、赤血球を用いた定量的な実験⁴⁾があり、また、卵殻膜を用いた定性的な実験も広く知られている^{5), 6)}。これらの実験に比べ、卵殻膜を用いた本実験方法は、顕微鏡を用いずに、肉眼で観察できる長所がある。特に、人工産物のセロファンでなく、生体由来の卵殻膜の半透性を、溶液を変える、あるいは時間を変えるなどの操作により、ほぼ定量的に示す実験系を確立できたことは意義があると思われる。非細胞生の生体膜を使った実験としてブタの膀胱を用いる例もあるが、本実験で用い

た卵は廉価で市販されているため、生物の実験材料として都合が良い。また、内卵殻膜、卵殻膜を用いた場合、ほぼ 1 時間で観察結果が得られることから、中学校や高校の理科や生物の 1 ～ 2 時間の実習で利用できることも実際の利用を考えた場合、都合が良いと思われる。

本報告のカラー図版は公開 WEB を参照されたい。

4. 引用文献

- 1) 野田晴彦, 丸山工作, 石川統, 須藤和夫, 山本啓一, 丸山敬, 三井恵津子 (訳) (1997) 分子細胞生物学第 3 版 (Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. and Darnell, J. (1995) Molecular cell biology 3rd Ed. Scientific American Books, Inc.), pp. 607-613. 東京化学同人 .
- 2) 宇津木和夫, 玉野井逸郎, 吉田治 共編 (1982) 生物の実験法 I —顕微鏡を主体とした実験—初版 12 刷, pp. 30-35. 培風館 .
- 3) 吉里勝利 (監修) (2004) 最新図説生物 (2004 年度用) . pp. 16-18. 第一学習社 .
- 4) 太田次郎, 本川達雄他 (2002) 高等学校生物 I (平成 16 年度用) . pp. 25-33. 啓林館 .
- 5) 岩波洋造, 森脇美武 (1995) 絵をみてできる生物実験 (第 10 刷) . pp. 56-63. 培風館 .
- 6) 田中一成 (1998) 卵核膜の半透性の即席演示実験 . 遺伝別冊 10 号 . p11. 裳華房 .
- 7) 岩本訓典, 梶原裕二 (2000) ニワトリ卵発生を観察するウインドウ法の教材化 . 生物教育 :41 (1), pp. 2-8.
- 8) 岡田節人 (編) (1989) 脊椎動物の発生 (上) . pp. 391-398. 培風館 .