

ウニ卵受精・飼育マニュアル

1. **ウニの保管方法** 当方からお送りしている箱のまま温度に注意して保管して頂ければ 3 日間は保管可能です。注意点は温度になりますので工夫をして 15~20℃で保管して下さい。新聞紙が乾燥しないようにお送りした箱のままか、ビニール袋に入れるなどして下さい。海水に戻す事はしないほうがいいでしょう。
2. **海水の作り方** まず水約9Lを用意します。人工海水10L分を溶かしてから正確に容量を10Lにする。当方の海水は PH を計り8.0にしております。PH は高めの方が受精しやすいです。30分以上バブリングをしてから使用して下さい。(別売品 A 550 円)
3. **雄・雌の分け方** 裏側の菅足の色を見る。黄色は雌、白は雄。と分別し、不明のものからKCLを打ちその個体の雌雄を判別してから次に反対の明確な雌雄を選別すると能率が良いです。ムラサキは判別が難しいです。
4. **放卵・放精の方法** ムラサキウニはトゲが長く扱いづらいので生殖穴近辺のトゲはハサミで平らに切り落としてください。バフンウニはとげ切り不要です。
ウニの下部には口があります。この口の周りのトゲをはさみで切除して、アリストテレスのランタンと呼ばれている部位をハサミとピンセットで除去します。
ウニ本体の内部の体腔液を振り払ってください。この時点で内部に5本の融合した生殖層が確認できる。この生殖層の色が濃いオレンジ色なら卵巢で、うすい黄色または白っぽければ精巢です。

メスの場合 50~200cc のフラスコ等に海水を口のすれすれまで入れ準備しておく。体腔液を振り払い、1/2 モルのKCLを1ccほど内部に注入します。生殖口を下にしてフラスコ等の上に置く。(写真 1.左)その後20分ぐらいで放卵は終わるはずですが。この海水にはKCLが残っているため海水を精置し、1~2回ほど海水を交換し洗浄します。(卵は肉眼で見えても球形であることが確認できます。この種の卵の直径は100 μ m)また、別売の抗生物質を 50 倍に希釈し 4~10 度で 3~5 日間は保管できます。

オスの場合 KCL注入後シャーレに逆さまにして置いておきます。濃度の高い白色の精子が得られます。これは卵と異なり、海水で洗浄する必要がありません。この状態をドライスパームと言ひ、蓋をして冷蔵庫などで 4℃で 3 日は十分受精能力を維持できます。(写真 1.右)
5. **精子の確認** スライドグラスに海水を1滴たらし、ドライスパームを針の先につけスライドグラスの海水に挿入しカバーグラスをかけます。対物レンズは×40、×20がベストですが、×40ですとカバーグラスとの距離が短いために破損が起こりやすいです。位相差顕微鏡は頭部から尾部まで明確に見えます。
6. **未受精卵の確認** スライドグラスは写真 5 の様にスライドグラスの両側にビニールテープを貼って使用するのも良いでしょう。今回カバーグラスは外しておきます。対物レンズは×20がよいでしょう。未受精卵を確認後ドライスパームを針の先につけ未受精卵海水に混入します。その後60秒ほどで受精膜が上昇し始めます。確認のため未受精卵サンプルを準備しておき、比較するのもいいでしょう。(ムラサキウニは受精膜があまり上がらないので未受精卵と比較することで受精膜が上がっている事が確認出来ます)
7. **抗生物質を使用した未受精卵保存方法** 海水洗浄後、海水 50ml に抗生物質 1ml を入れ(基本ファルコンチューブ 50ml)、そこに沈殿未受精卵 0.5ml ほど(約 50 万個)入れ 4℃で受精能力を 3 日保存できます。
8. **受精方法** 50~200cc のビーカーを2つ用意します。1つは海水を8分目まで入れそこに未受精卵を入れます。もう1つはドライスパームをガラス棒で壁面に3~5回なすりつけます。その後すぐに未受精卵ビーカーから献濁した卵を精子ビーカーに移します。精子ビーカーと未受精卵ビーカーを交互に献濁すること

を3～5回行います。この時が受精時になります。卵の濃度の問題ですが、5000 個/mlまでとします。(受精時の時刻を記録してください) 卵数計測は 0.1ml ピペットで卵の懸濁液をすくい蛍光灯で透かして卵数を数え1mlあたりの卵数を計算します。(1ml 卵沈殿=約 100 万個です) 卵沈殿 1ml で 1ℓ 海水が基準です。海水温度は二重水槽にして熱帯魚用ヒーターで15℃～25℃の間で一定に保ちます。(写真 2. 外側バットに水を多めでヒーターを入れ、内部に受精卵の入ったビーカーなどを入れる)

9. **回転モーターを使用した飼育方法** 1～5Lのビーカーを用意します。回転モーター使用注意点は、プロペラがビーカーに当たらないように軸をセットして下さい。モーターは30～60回転/分前後が最適でしょう。(30回転モーター/分 別売品C 5,500 円)(写真 2.)
10. **回転器具を使用しない飼育方法** シャーレを使用する。受精卵が底面にやや余裕のある一層配置にする。密度を低くしてください。海水の高さは 0.5cm 以上で蓋をして下さい。大きめのタッパーウェアに水でぬらしたティッシュを入れ、上記を入れフタをするのも飼育法の1つです。(写真 3.)
11. **卵割について** 水温によって異なりますが、15℃で第一卵割は90分後(ムラサキは60分後)に起こります。その後60分(ムラサキは40分)ずつで卵割が行われ3時間50分後(ムラサキは3時間後)に16細胞となります。この16細胞の時に細胞分化が初めて起こります。1番小さい小割球は将来プルテウスの骨になります。連続して実験時間が多くとれない場合は実験開始の90分前、140分前、180分前、240分前に受精をさせたビーカーを用意しておくのも便利です。
受精後24時間(ムラサキは12時間)ほどで孵化が始まります。受精後60～72時間後(ムラサキは24時間)には4腕のプルテウスとなります。
胞胚後期から胚の回転が始まります。この回転は胞胚中期が1番速い回転であり、その後プルテウスになるとその速度は低下します。この回転をビデオ撮りして計測するのも面白いのです。結果が出たら報告してください。(未発表)
12. **変態用のエサ** 2009年度からプルテウス幼生用のエサを販売しています。キートセラスと言う珪藻です。まずはセットの中のキートセラス原液がエサとなります。(別売品 B 4,400 円)
原液は長期間保存できませんので培養が必要となります。
変態はバフンウニですと4腕→6腕→8腕となりウニ原基ができ、水温によりますが 1 ヶ月半で(ムラサキで3週間)稚ウニになります。発生のスピードは海水温に依存します。15～25度の間を保って下さい。
この時の8腕プルテウス(写真 4.) 密度は10mlに2～3個体の低密度で飼う事がコツです。
13. **キートセラスの培養方法** フタ付きの密閉出来る容器に 590mlの海水+410ml の水+KW21 を約 0.5ml入れ、殺菌のため 80℃で約 20 分(※沸騰はさせないで下さい)。冷めたらメタ珪酸ナトリウム約 50mg(4ml)とキートセラス原液 1～10ml入れる。20～25℃前後で蛍光灯照明でエアーストーンを使用しバブリングを強めにして約 10 日で濃い茶緑色になります。
エサ(キートセラス)やりは2～3日に1回、顕微鏡でプルテウスの胃に茶褐色が確認できればOKです。
14. **プルテウスの海水換え** 3日に1回半量交換が目安です。ペットボトル等の底を切り取りキムワイプやろ紙で一方を覆い、飼育槽にそっと沈め入れ、ペットボトル内の海水を吸い取り交換する。(写真 6.)
15. **変態まで持ち込むコツ** 4腕プルテウスからは低密度で飼育する。(バフン・ムラサキは4腕期以降エサが必要)
例: 4 腕プルテウスまで 5000 個/10ml、6 腕プルテウスまで 500 個/10ml、8 腕プルテウスまで 50 個/10ml、変態時 2～3 個/10mlですが、変態時にワカメ(1cm 角)を入れると変態が上手くいく可能性大。

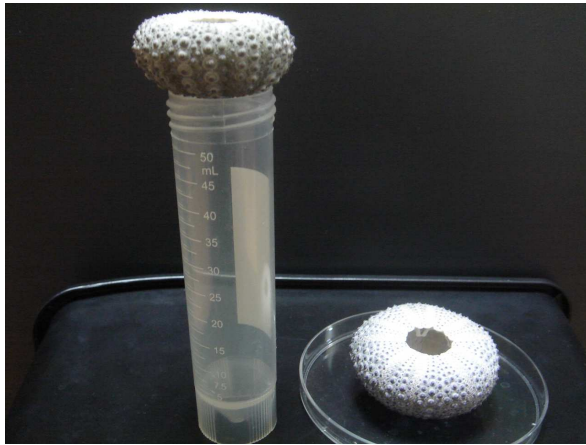


写真 1. 放卵・放精の方法

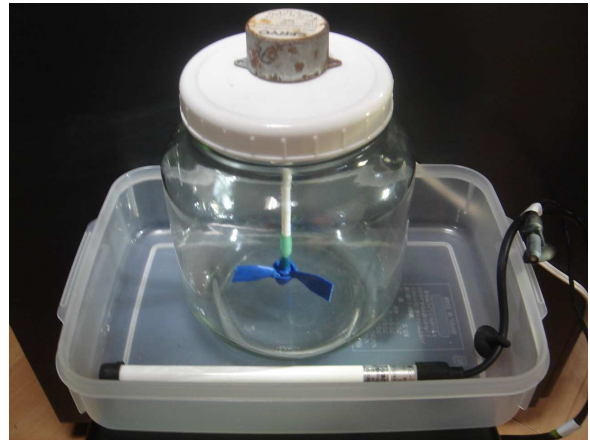


写真 2. 回転プロペラと保温器



写真 3. 回転器具を使用しない飼育方法



写真 4. 8腕プルテウス(ムラサキウニ)

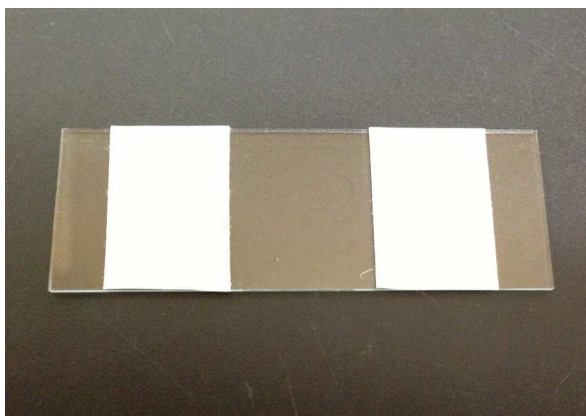


写真 5. 両側にビニールテープを貼る
ビニールテープの厚みは 200 μ m です



写真 6.
海水の水換え方法

-----実験の失敗事例-----

人工海水濃度の勘違い 5L の容器で 10L 分作成した。※別売の人工海水は 10L 用です。

1/2、1/5、1/10 に分別してもかまいませんが水量に注意して下さい。バブリングを最低 30 分はして下さい。

K C L を注入して放卵させた後そのまま卵を使用した

50ml ファルコンチューブで採卵したら最低 2 回は K C L を海水で洗い流して下さい。

(遠心分離器で卵を落とすか 20～30 分立てて置いておくと卵が沈殿します)

受精後の海水容量 受精卵全部を 100ml のビーカーで飼育した。

卵沈殿 1ml は約 100 万個の卵数です。1L のビーカーでは回転モーターを使用しても卵沈殿 1～2ml が限度です。モーターを使用しなかった場合は同容量で 0.5～1ml 程度です。

ウニが到着してからすぐに海水中に入れて飼育した

ウニは環境条件が急激に変化すると放精・放卵を起こします。海水に入れることはお勧めできません。

海水で濡らした新聞紙で包んだまま 15～20℃で工夫して保管して下さい。3 日間は保存可能です。保管状況がよければ 7 日間はもちます。

-----実験の注意点-----

スライドグラス上で受精させ経時的に観察したい

マニュアルの写真.5 の様にスライドグラスにビニールテープで縦に 2 本の橋を作りサンプルを少量にしてカバーグラスをかけます。ビニールテープの厚みは 200 ミクロンです。カバーグラスをかけ指で押さえながら両端をスコッチテープで留めるのも 1 つの方法です。海水の蒸発を防げば 30～60 分は連続観察は可能ですが、それ以上の時間は塩分濃度が徐々に上がるため観察はできません。

化学実験で使った容器を使用した

器具は生物用と他は完全に分けて使用して下さい。特にリチウムや亜鉛などのイオンは正常発生を妨げます。

マグネティックスターラーでゆっくり攪拌した

スターラーとビーカーの間で胚を潰してしまいます。できれば当方の提供する 30 回転/分モーターを使用して下さい。

未受精卵の中に核の様な物が多々見られる

ウニの卵は完全成熟分裂をしているものが普通ですが近年では個体によって成熟分裂を完全に完了していない為に卵の中央に大きな核が存在するものが見られます。その卵が多い場合はそのメスを使用するのをやめて下さい。(ヒトデの場合、卵は第一成熟分裂中期でストップしています。神経細胞抽出物で成熟します)

ウニが到着した時点で数個体が放精・放卵していた

それらの個体は死んでいる訳ではありません。またすべてを放出している訳ではありませんので、そのままマニュアルの手順通りに放精・放卵させて使用する事ができます。特に精子は保管出来ます。

8 腕プルテウスまでは飼育できたが変態しなかった

8 腕プルテウスまでは当方の方法でほぼ 100%成長しますが、ウニの変態の要因はまだ明確ではありません。ワカメの小片を入れる、スライドグラスにキートセラスを付着させた物を入れるなど報告はあります。