# 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にしてあります。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 540 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。
   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巣で、うすい黄色または白っぽければ精巣です。

   **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。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。（卵は肉眼で見てい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100μm）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い、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　4,320 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エアーに水でぬらしたティシューを入れ、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60分後に起こります。その後40分ずつ卵割が行われ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60分前、100分前、140分前、180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12時間ほどで孵化が始まります。受精後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。

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。キートセラスという珪藻です。
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　4,320 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。
3週間で稚ウニになります。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。

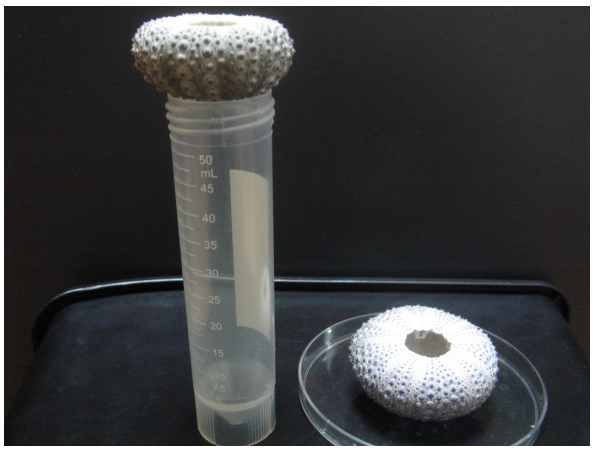

写真 1. 放卵・放精の方法

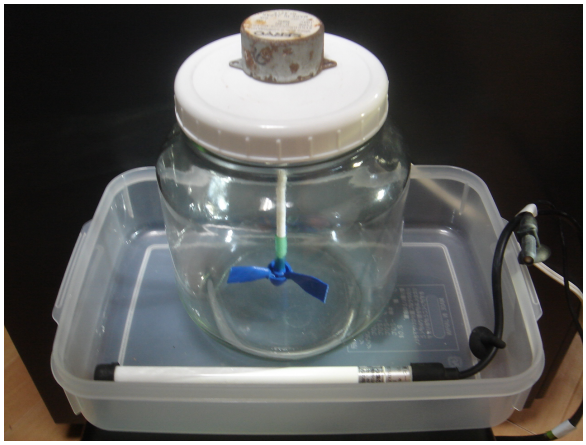

写真 2. 回転プロペラと保温器

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）

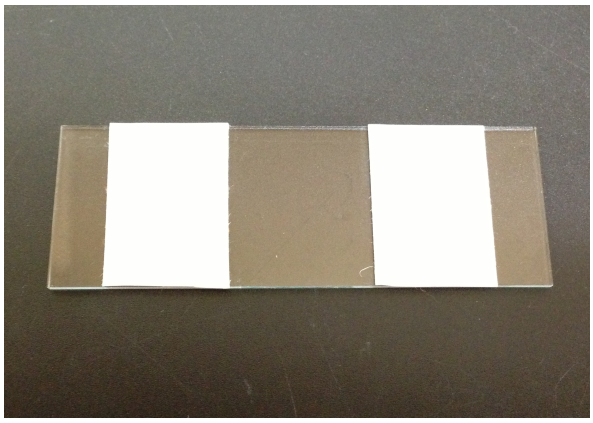

写真 5. 両側にビニールテープを貼る
ビニールテープの厚みは 200μm です

写真 6.
海水の水換え方法