

マボヤ胚の培養手順

武田 尚也

1. はじめに

マボヤの発生を毒性試験という形で観察する機会を得た。毒性試験についての論文は、培養手順の詳細は省略されており、また、正常な発生を観察するための一般的な培養手順とは異なる特殊な条件下である。すなわち、通常の発生観察ではそれなりに大容量の水槽を用い、エアレーションや換水をすることができ、多くの操作は定性的であっても問題はない。一方で、毒性試験では厳密に濃度調整をした試験区を多数用意するために、多数の小型容器を用いることとなり、エアレーションや換水ができず、すべての操作が定量的でなければならない。よって、発生観察の手法をそのまま用いることはできない。このため、当該実験に最も適合する作業手順書がなく、ふさわしい培養手法を考えながらの作業が求められた。本稿では、試験中の試行錯誤の経験に基づき、あまり記述されることのない培養手順の詳細について紹介する。

2. 材料

マボヤ (*Halocynthia roretzi*)。

1月上旬に宮城県産の養殖個体を購入し、当日使用または数日生簀で蓄養してから使用。

3. 手順

3.1 成体の状態確認、運搬および保管

購入したマボヤ成体を5個体ほど切り開き、生殖巣を確認する。被囊とよばれる外皮の下に黄色透明の筋肉が、筋肉の下に生殖巣がある。マボヤは雌雄同体であり、生殖巣は褐色の卵巣の表面に白色の精巣が縞状に配置した構造をしている。成熟した生殖巣は十分に

肥厚しており、精巣の縞が太く卵巣を覆い、切り口から白濁した精子が漏れる。産卵後の個体は生殖巣が縮み、精巣と卵巣が透ける。産卵が望めそうな個体を多めに用意する。

マボヤ成体を持ち運ぶ際は、蓋付きの樽などに海水を入れずにマボヤを入れ、新聞で覆い、保冷剤を置いて蓋をする。実験施設到着後、すみやかに3.2の放卵放精用生簀にマボヤ成体を投入しなければならないため、あらかじめ生簀を用意しておく。

3.2 温度刺激による放卵放精誘発

放卵・放精誘発を行う部屋は消灯し、できるかぎり騒音振動がない状態にする。オーバーフローした海水が塩ビ管などを通して1箇所から排出される仕組みの水槽を用意する。これを放卵放精用水槽とし、海水を満たしてマボヤ成体を入れ、海水を低速でかけ流しにする。初期水温から2~3°C上昇させる温度刺激を与えることで放卵放精誘発を行う。筆者が参加した試験では初期水温が9.7°Cであったため、13°Cまで上昇させることにした。以下はこの場合について記述する。放卵放精用水槽にマボヤ成体に接触しないようにヒーターを沈め、15~30分程度を目安に水温を13°Cまで上昇させ、10~20分間13°Cで保持する。産卵した場合、3.3に進む。反応がなかった場合、ヒーターを切って15~30分程度を目安に水温を10°Cまで低下させた後、また同様の手順で水温を上昇させる。水温を上昇させる直前に、2個体分程度の生殖巣を潰し、溶かして放卵放精用水槽に入れてもよい。3~4回繰り返して反応がみられない際は、日を改めて再度試みるか、新しいマボヤ成体の入手を行う。なお、放置している間

に放卵放精する場合もあるので、3.3に従い受精卵が流されないようにする。

3.3 受精卵採取

マボヤ成体の放卵放精の際には、一文字形に閉じられた出水口から卵と精子が黄色の粒混じりの白濁液として噴出した後、放卵放精用水槽の中で受精し、受精卵は水流に乗って取水パイプから出てくる。放卵放精を確認したら、取水パイプの下にバットを置き、バットの上に110 μm メッシュを貼った漉し器を置いて取水を受けるようにして、受精卵を採取する。なお、マボヤの受精卵は卵膜を含めると直径400~480 μm であるため、漉し器の目合は200 μm 以下であれば任意のものでよい。放卵放精が終了、または十分量の受精卵が漉し器に溜まった後、500 μm 程度のメッシュを貼った漉し器を用いてゴミを取り除き、ピーカーに受精卵を集める。受精卵を10L程度の水槽に入れ、海水を加えて水量を1L程度にする。受精卵は海水より重く底に沈むため、積み重なって酸欠にならないよう、10L水槽底面を1層で覆うような量を上限として受精卵を入れる。

3.4 培養溶液および容器

暴露試験時の培養に用いる溶液は、筆者が参加した試験ではマボヤ成体を入れた海水の初期水温に合わせて10°Cのものを用いたが、15°Cまでは温度条件を上昇させても構わない。温度条件については4.1で後述する。なお、ろ過海水は酸素濃度が低くなっているため、容器を十分攪拌し（10L容器に7割入れて2分間など）酸素を溶け込ませてから使う。培養容器は、胚が積み重なって酸欠にならないように、底面積が大きいものを用いるか、振盪機上に置くなどの工夫をしたものを使用する。

3.5 受精卵の状態確認

10L水槽中の受精卵を一部採取、検鏡して状態を確認する。正常なマボヤ受精卵は、卵膜を含めると直径400~480 μm 、卵膜表面は無色透明で顆粒状のろ胞細胞で覆われ、囀卵腔は大きく、中心にある胚は黄褐色の球形である。マボヤ未受精卵は第一減数分裂中期の状態にあり、受精すると第一および第二極体を放出す

るが、胚の大きさに比べ極体は非常に小さく、また未受精卵の囀卵腔は受精卵と同様に大きい。このため、未受精卵と受精卵を見分ける時期は、明確に胚の形状が変わる2細胞期以降が適切である。受精卵のほとんどが2細胞期以降の分裂期にあれば、3.6へ進む。それ以外の場合は30分後に再び一部採取、検鏡し、ほとんどが2細胞期以降の分裂期にあれば3.6に、そうでなければ新たな受精卵または新たなマボヤ成体を用いて手順をやり直す。

3.6 受精率の算出

検鏡計数により、正常な分裂期にある受精卵の割合を算出することで受精率を調べる。10L水槽内をよく攪拌した後、口径の大きいスポイトを用いてサンプリングする。検鏡計数時は、枠付きの1mm方眼入りスライドガラスとカウンターを用い、100倍以下の低倍率で検鏡すると作業がしやすい。カバーガラスをかける必要はない。100~1,000個程度の受精卵を計数することが望ましい。

3.7 胚発生時の暴露試験

胚発生時の暴露試験の場合、次の処理を行う。10L水槽をよく攪拌し、口径の大きいピペットを用いて3ml程度分取し、検鏡計数して10L水槽中の受精卵の個数を求める。10L水槽中の受精卵をピーカーなどに移し、漉し器や沈殿を用いて適宜濃縮する。ピーカー内を十分攪拌し、各試験区の培養液に口径の大きいピペットを用いて必要量の受精卵を添加する。加える受精卵が多いほど検鏡計数がしやすくなるが、採取できた受精卵数と培養液の総量、また卵の密度との兼ね合いを考える必要があり、1mlあたり50~100個程度が無難である。

3.8 観察

受精卵採取時を受精時とし、以降、必要に応じて観察を行う。胚の観察は受精率の算出と同様にして、1試験区につき3回以上の計数を行い、1回につき100個程度の胚を数えることが望ましい。筆者が参加した試験では10°C培養において受精から48時間後を検鏡計数のタイミングとし、正常個体と異常個体の割合を算出

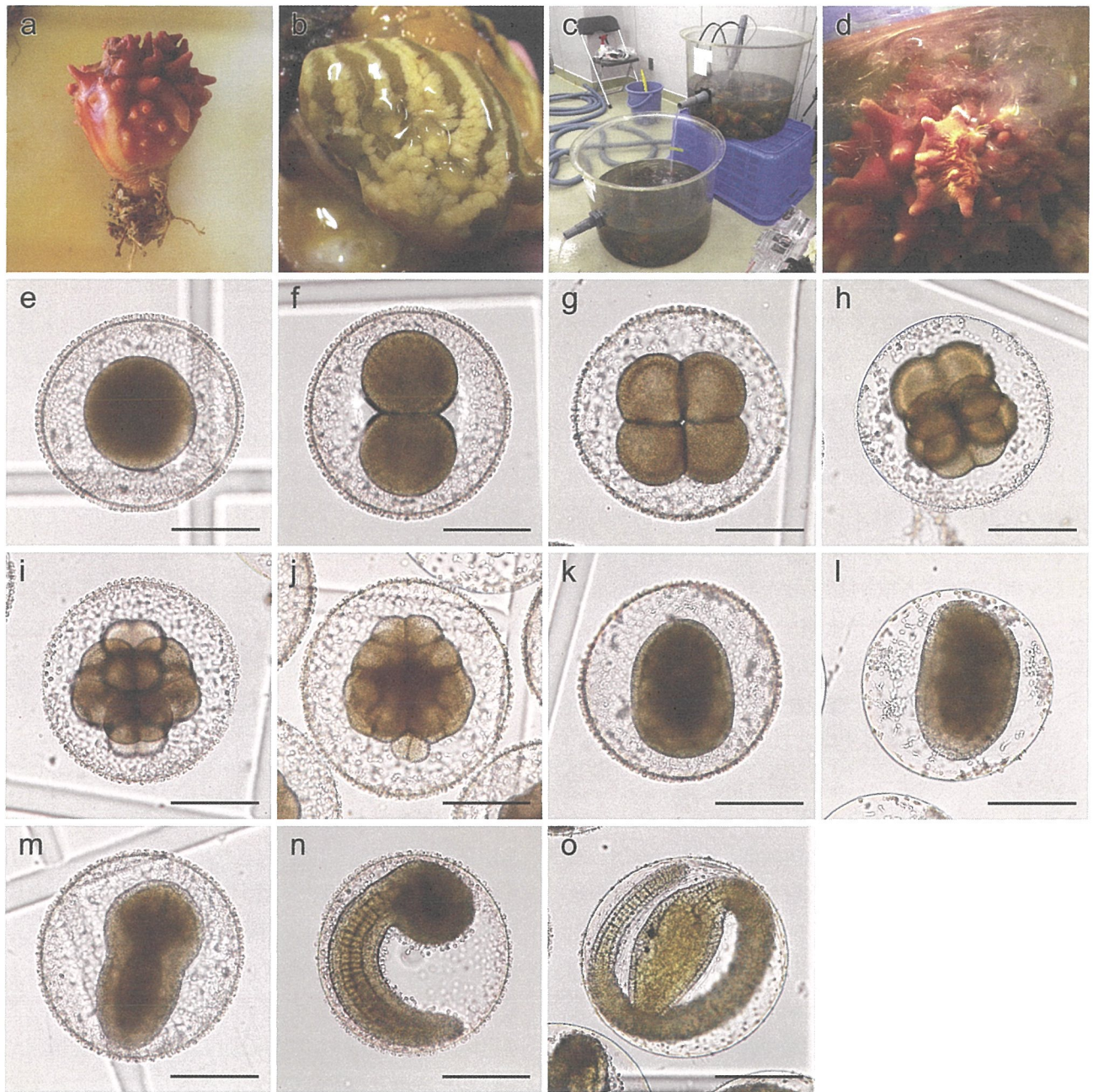


図1 マボヤ (*Halocynthia roretzi*)。a: 成体, b: 生殖巣, c: 放卵放精用水槽, d: 放卵・放精の様子, e: 受精卵, f: 2細胞期, g: 4細胞期, h: 8細胞期, i: 16細胞期, j: 32細胞期, k: 後期囊胚, l: 神経胚, m: 初期尾芽胚, n: 中期尾芽胚, o: 孵化直前, p: 孵化幼生, q: 尾部取り込み中の幼生, r: 付着幼生, s: 正常な孵化幼生, t: 異常な孵化幼生, u: 正常な付着幼生, v: 異常な付着幼生。スケールはすべて200 μ m。

した。この段階ではオタマジヤクシ型幼生が孵化しており、付着期の暴露試験を行う場合の事前観察としても適している。なお、4時間で4細胞期から8細胞期、5時間で16細胞期から32細胞期、19時間で後期囊胚から神経胚、25時間で尾芽胚、29時間で尾部が伸長した胚、44時間で孵化前のオタマジヤクシ型幼生まで発生が進んだ。マボヤの卵割様式は等割であるが、異

常胚であっても割球の大きさが揃っている場合が多く、発生初期の正常異常は見分けにくい。発生後期においてよく観察された異常としては、割球の分離および尾部の屈曲があげられる。割球の分離は、4細胞期時の割球のうち2細胞の発生が止まり、残り2細胞が小型の神経胚や尾芽胚のように発生したものである。尾部の屈曲は、尾部が「猫の鍵尻尾」のように1~3箇所屈

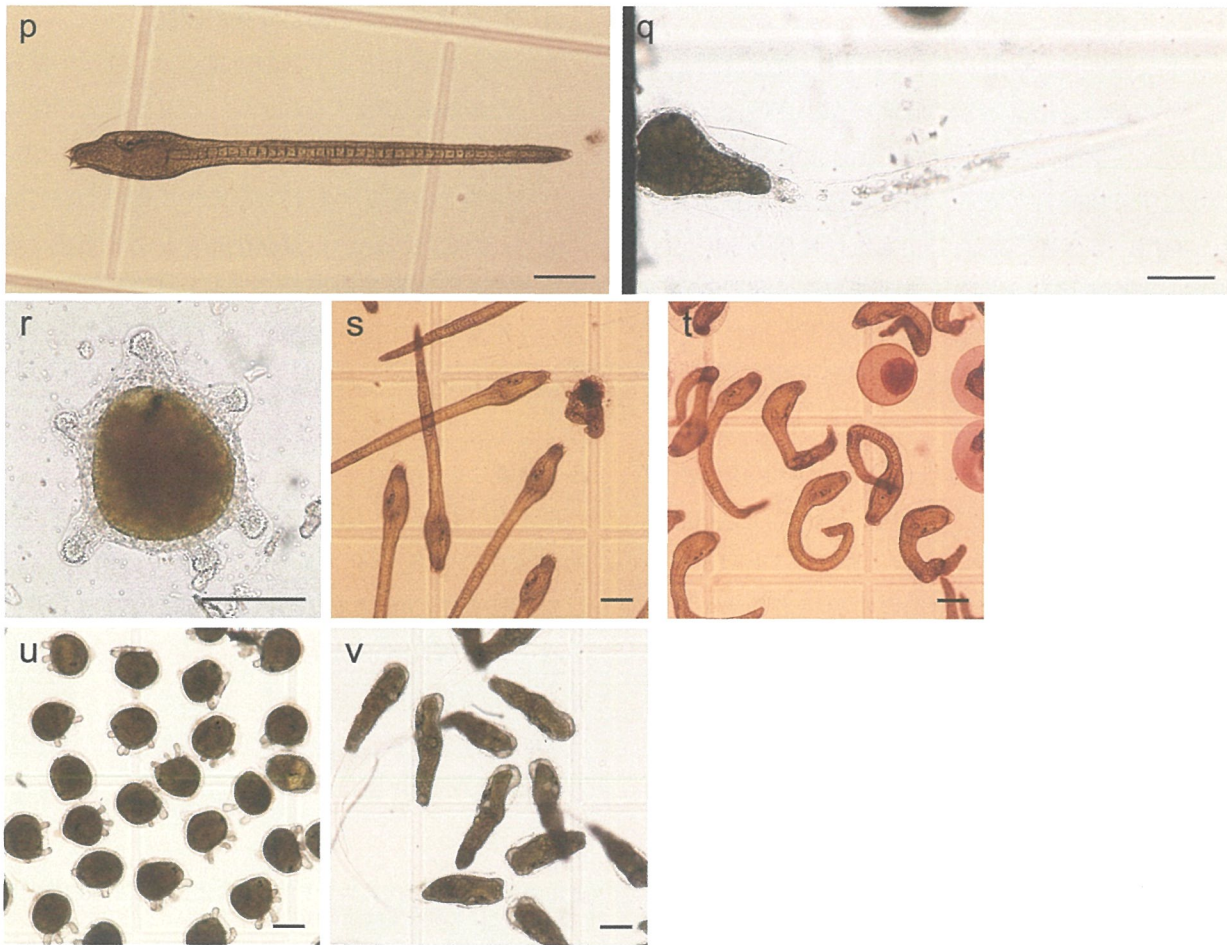


図1 (続き)

曲したもので、運動性があり孵化するものも多い。

3.9 ルゴール・エオシン液

孵化したオタマジャクシ型幼生は尾部を振って活発に遊泳するので、生きたままでは正確な計数と観察ができない。35% MgCl₂ 水溶液を滴下して麻酔をかけるか、ホルマリンを滴下して固定すれば動きが止まるが、ルゴール・エオシン液を用いてもよい。ルゴール・エオシン液については武田 (2016) を参照。

3.10 付着期の暴露試験

付着期の暴露試験の場合、次の処理を行う。受精後24時間の時点で、10L水槽に海水を加え水量を4L程度にする。受精後48時間の時点で遊泳している正常なオタマジャクシ型幼生を適宜採取し、培養溶液で満たした小型シャーレに入れる。さらに48時間後、溶液を除去し、実体顕微鏡等を用いて容器に付着した幼生数

を計数する。小型シャーレに入れて24時間で尾部取り込み中の付着幼生、48時間で変態が完了した付着幼生まで成長する。

4. 考察

4.1 温度条件と発生速度

水質や胚の遺伝的性質以上に、培養時の温度条件が発生速度に強く影響するようである。筆者が参加した試験ではマボヤ受精卵を10°Cで培養した結果、受精後48時間で孵化したが、12°Cでは40時間、15°Cでは30時間で孵化する (団ら, 1988)。試験のスケジュールに合わせて培養温度を考慮、調整する必要がある。培養に必要となる広さの空間を最適な温度に設定できるよう準備しなければならない。また、培養液はあらかじめ過や調製、培養容器への分注などを終え、培養を開始する前に適切な温度にしておくことを注意すべきである。

4.2 培養密度と培養容器

マボヤ受精卵は、孵化するまでの48時間は沈殿している。このため、培養容器の底面積が小さいと、胚が重なりあって下部のものが酸欠になり、異常発生あるいは死亡する危険性がある。培養容器は底面積が大きいものを用いるべきであり、1 mlあたり受精卵50～100個程度の密度で培養するのが無難である。容器の底面積を大きくできない場合は、振盪機の上に培養容器を置くなどの方法で、胚を沈殿させず常に海水とガス交換が可能にする。

筆者が参加した試験では直径50 mmの100 ml広口瓶を用いて培養を行った。広口瓶1個につき5,000～10,000個の受精卵の培養が可能であり、これは1つの濃度区につき合計500個程度の胚を検鏡計数すれば十分であることと比べると一見して過大量だが、培養容器を小さくしすぎると添加する受精卵の個数がばらつきやすくなること、また試験終了後の培養液を水質測定用サンプルとして使用する都合から、当該容器を選択した。

4.3 改良点のまとめと今後の課題

本稿で記述した培養手法の改良点は、(1) 小型容器を用いた多数の試験区をエアレーションおよび換水なしで、厳密な濃度設定で培養可能にしたこと、(2) 定量性を重視し、略記されがちな操作手順について詳細に記述したこと、(3) 正常発生率を正しく算出するために必要となる検鏡計数の手法とタイミングを明示したことである。今後の課題としては、より確実な採卵方法の開発があげられる。

5. 謝辞

6日間にわたって試験の場を提供していただいた宮城県水産技術総合センターと、マボヤの用意、蓄養、試験の操作その他諸々について対応して下さった同センターの押野明夫氏ならびに国立研究開発法人産業総合研究所の内藤航氏、ともに試験を行った横浜国立大学の田井梨絵氏、千葉健太氏、西村悠氏に多大なるご協力をいただきました。改めてお礼申し上げます。

引用文献

- 武田尚也. 2016. キタムラサキウニ胚およびマガキ胚の培養手順. 株式会社日本海洋生物研究所2016年年報, 52-57.
団勝磨・関口晃一・安藤裕・渡辺浩. 1988. 無脊椎動物の発生・下. 培風館, 431-539.