

## 海産無脊椎動物の受精・初期卵割過程の動画制作

中野 剛<sup>1</sup>, 荒川 美緒<sup>2</sup>, 清本 正人<sup>3</sup>, 並河 洋<sup>4</sup>, 出口 竜作<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 仙台市立仙台高等学校, <sup>2</sup> 宮城教育大学大学院 理科教育専修

<sup>3</sup> お茶の水女子大学 湾岸生物教育研究センター

<sup>4</sup> 国立科学博物館 動物研究部, <sup>5</sup> 宮城教育大学 理科教育講座

動物の発生過程を顕微鏡下で実際に観察することは、形態形成を理解する上で最も有力な方法である。しかし、授業などにおいて、ある発生段階にある卵や胚の観察は可能であっても、「変化」の観察は容易ではない。すなわち、各発生段階の卵や胚は、全て変化途中の状態であるため、経時的な変化を理解するためには、時間を短縮して観察する必要がある。本研究では、無料または安価な画像処理ソフトウェア (ImageJ や QuickTime 7 pro) を利用し、デジタルカメラによってインターバル撮影した連続画像から、時間を短縮した動画を制作する方法を検討した (静止画から動画へ)。また、デジタルビデオカメラによって撮影した動画の時間を短縮する方法についても検討した (動画から動画へ)。そして、実際に、3種の海産無脊椎動物 (タマクラゲ、バフンウニ、エラコ) を用いて、受精や初期卵割の過程の共通点と相違点を理解するための動画を制作した。

キーワード: インターバル撮影、ImageJ、QuickTime、受精、初期卵割

### 1. はじめに

中学校、高等学校では、生殖と発生に関する学習の中で、有性生殖によって遺伝的に新たな組み合わせの個体が誕生することを学ぶ。有性生殖の中でも、卵と精子による接合を受精といい、受精卵は卵割などの発生過程を経て新個体の体を形成していく。このような発生過程の学習の中では、ウニやカエルなどが例として扱われ、教科書には各発生段階の代表的な写真が掲載されている。しかし、実際の発生は連続的な現象であり、代表的な写真だけでその全体を表すことは難しい。授業の中で、生きたウニなどを用いた観察や実験が実践されている例もあり、発生過程を理解する上で有力な取り組みであると考えられるが、限られた時間内で、連続的な変化を観察することは難しい。

動物は発生過程において、胞胚期以降消化管の形成を始める。刺胞動物は、消化管の出入り口を

一つしかもたず、放射相称の体制をとる動物群である [1, 2]。刺胞動物タマクラゲは、フィールドにおいて、ポリプとストロン (走根) から成る群体を、巻貝のムシロガイの貝殻上に特異的に形成している [3]。有性生殖を行うクラゲは、群体にクラゲ芽として形成された後、遊離し、海へと放たれる。

進化的により高等な動物は、消化管の両端に開口部をもち、発生過程で生じる原口が肛門になる新口動物と、原口が口になる旧口動物とに分けられる。これらの動物は、左右相称の体制をとる [1]。新口動物に含まれる棘皮動物バフンウニは、日本沿岸の磯で普通に見られ、食用として、また受精や発生の生物教材としても良く知られた動物である。旧口動物に含まれる環形動物エラコは、東北地方沿岸部に生息し、岸壁などで固着生活をしている。東北地方では釣りエサとして知られ、養殖も行われている。

パブリックドメインの画像処理ソフトウェアである ImageJ は、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) で開発されたものであり、Windows 用、Mac 用、Linux 用が入手可能である [4]。このソフトウェアでは画像サイズの変更やコントラストの調整など、各種の画像処理を行うことが可能であるが、特に複数の画像をスタックとして扱えることが特徴である。スタックとして扱うことで、いわば“パラパラ漫画”のように、一度に多くの画像に対して、同じ処理を行うことができる。この“パラパラ漫画”は最終的に ImageJ から QuickTime 形式の動画として書き出すことも可能である。

QuickTime はアップル社により開発されたメディアプレイヤーである。QuickTime 自体においても、連続画像から動画を制作する機能が含まれているが、そのような操作を行うためには、有料 (3,400 円) の QuickTime 7 Pro を購入する必要がある。QuickTime 7 Pro には Windows 版と Mac 版が用意されており、アップル社のサイトから購入することができる [5]。

本研究では、このような無料、または安価なソフトウェアを利用し、顕微鏡観察における動画制作の方法を検討した。そして、タマクラゲ、バフンウニ、およびエラコを用いて、発生過程の中でも特に受精・初期卵割過程に焦点をあて、実際に動画を制作した。

## 2. 動画の制作

### 2.1 生物材料の準備

刺胞動物タマクラゲは、宮城教育大学の研究室内で維持している個体を用いた。濾過海水を満たした直径 6 cm、高さ 3 cm のプラスチック容器にクラゲを 5 個体ずつ入れ、23°C で飼育した。このようなクラゲを、暗状態から明状態に移すことで、配偶子の放出を誘起した [3]。

バフンウニは、青森県青森市にある東北大学大学院生命科学研究所附属浅虫海洋生物学教育研究センターから入手した。個体入手後、0.5 M KCl を体腔内に注射器で注入することで、人工的に生

殖巣を収縮させ、配偶子を放出させた [6]。

エラコは、宮城県牡鹿郡女川町にある釣具店から購入した。配偶子を得るために、ピンセットで体壁を軽く傷つけ、しみ出た配偶子を集めた。このようにして得た卵細胞は、受精に適さない未熟な状態であるため、8-bromo-cyclic AMP を含む海水 (pH 9) に浸すことで成熟を誘起した [7]。

### 2.2 連続画像の撮影 (インターバル撮影)

受精・初期卵割過程の撮影は、顕微鏡用デジタルカメラ (DS-Fil-L2、Nikon) を備え付けた倒立顕微鏡 (Eclipse Ti、Nikon) を用いて行った。このデジタルカメラに内蔵されたインターバル撮影機能を用いて、10 ~ 60 秒の間隔で連続的に画像を取得した。取得した画像の編集にはアップル社の MacBook を用いた。撮影間隔をより短くした方が、後に良好な動画となるが、それに伴い扱うファイルサイズも大きくなるため、事前に予定する撮影枚数と、保存するメディアの容量を検討しておく必要がある。

本研究では、顕微鏡専用のデジタルカメラを用いたが、インターバル撮影機能を有し、かつ顕微鏡を通した像に焦点の合うデジタルカメラであれば、同様の方法での撮影が可能である。ただし、そのためにはデジタルカメラと顕微鏡を固定する方法 (アダプタの使用など) を検討しなければならない。

インターバル撮影の利点は、撮影枚数や保存するメディアの容量を調節することで、数日間わたる連続撮影も可能なことである。長時間撮影する場合、卵や胚などの観察物が移動し、視野から外れることが問題になる。この原因としては、(1) 媒精後、精子により観察物が動かされること、(2) 受精膜形成や形態形成運動により観察物自体が移動すること、(3) 周りの器械類などの影響により振動が起こること、(4) 光源からの熱により水の対流が起こること、などが考えられる。このような問題に対しては、媒精後海水を入れ換えることや十分に濾過された海水を用いること、制震性の良い場所で撮影を行うこと、可能な限り光量

を下げることなどの対策が考えられる。また、卵や胚を動かないように固定する方法も考えられる。ホームセンターなどでは、様々な厚み(80~160  $\mu$ m)の両面テープが売られており、この両面テープでカバーガラスを貼り合わせたものに卵や胚を挟み込むことで、固定が可能になる。ただし、加わる圧力が強いと正常発生しない場合があるため、胚に適した厚みの両面テープを使用する必要がある。

### 2.3 動画の撮影

ウニの受精時に観察される受精膜形成のような比較的早い反応は、実際に観察を行った場合にも、その変化が良く分かる現象である。しかし、この変化の全容をつかむには、5分間程度の観察が必要である。生徒に観察を行わせる場合には、実際の変化にどの程度の時間がかかるのか理解させることも重要であるが、50分間程度の授業内で補助的な役割として用いる場合には、5分間の動画はやや長いものとなる。むしろ授業内であれば変化を強調するために、1分間程度に短縮したものの方が、分かりやすく、さらに時間的にも扱いやすい。

このような比較的早い変化は、10秒間隔のインターバル撮影では追いきれないため、デジタルビデオカメラ(HDR-XR520, Sony)を用いた撮影についても検討した。デジタルビデオカメラと倒立顕微鏡をビデオカメラアダプタ(MA-HDS, 美館イメージング)を介して接続し、直接動画を撮影した。この動画は、MacBook内に標準搭載されている動画編集ソフトウェアiMovieを用いて取り込んだ。iMovieでは、動画の再生速度を変えて編集することが可能であり、QuickTime形式で書き出すこともできる。

### 2.4 ImageJによる動画制作

画像処理ソフトウェアImageJ(Mac OS X版)はアメリカ国立衛生研究所の配布サイトから入手した[4]。

ImageJを起動後、連続画像をスタックとして

開くため、「File」メニューから「Import」-「Image Sequence」を選び、目的とする連続画像を開いた。この時、特に条件を付けずに画像を開くと、ファイルサイズが大きくなるため、条件として「Use virtual stack」にチェックを入れることで仮想的にスタックを開いた。スタックを開いた後、「File」メニューから「Save as」-「QuickTime Movie」を選び、動画を制作した。この時、1秒間に表示する画像数(フレームレート)を指定することが可能であり、フレームレートが大きい程、時間的により短縮された動画となる。

ImageJには、動画制作の他に多くの画像編集機能が備わっている。例えば、顕微鏡を通して観察したものの中には、必ずしも色情報が重要ではない場合がある。この場合、色情報を捨て、グレースケールにした方がファイルサイズも小さく、扱いやすくなる。今回制作した動画は、いずれも「Image」メニューから「Type」-「8-bit」を選ぶことでグレースケールに変更した。また、画像コントラストの調整は、「Image」メニューから「Adjust」-「Brightness/Contrast」を選ぶことで行った。さらに、目的とする領域を選択ツールで選択した後、「Image」メニューから「Scale」を選ぶことで、その領域のみを切り出すこともできる。

決められた間隔によって撮影された連続画像からは、実際の経過時間を知ることができる。ImageJでは、スタックの各画像内に経過時間を挿入することも可能である。その場合には、「Image」メニューから「Stacks」-「Label」を選び、必要情報を入力する。経過時間の挿入により、短縮された動画と実際の時間の関係を示すことができる。

### 2.5 QuickTime 7 Proによる動画制作

有料版であるQuickTime 7 Proは、アップル社のホームページから購入した[5]。

連続画像から動画を制作するため、「ファイル」メニューから「イメージシーケンスを開く」を選び、目的とする連続画像を開いた。開かれた

連続画像は、「ファイル」メニューから「書き出す」を選ぶことで動画に変換できる。この時、ImageJと同様に、フレームレートを指定することが可能であった。

QuickTime 7 proでは、動画制作の手順とは逆の、動画を連続画像に変換することも可能である。この場合、「ファイル」メニューから「書き出す」を選び、書き出し方法として「ムービーからイメージシーケンス」を選択する。この時、動画1秒間あたり何枚分の画像を作るかを設定できるため、動画から連続画像に変換し、これらを再び動画とする過程で、“コマ落とし”を行うこともできる。さらに、この方法は動画の一部を静止画として示したい場合にも有効である。

ImageJとQuickTime 7 proを比較した場合、ImageJは、画像のサイズ変更やコントラスト調整など、画像への細かい編集が可能であるという利点がある。一方、QuickTime 7 proは、細かい編集は不可能であるが、ImageJよりも処理速度が早いという利点がある。

### 3. 受精・初期卵割過程の撮影

#### 3.1 受精

タマクラゲ、バフンウニ、エラコの未受精卵の直径は、それぞれ100  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$ 、150  $\mu\text{m}$ 程度である(図1)。精子が侵入するのに適正な卵細胞の減数分裂段階は、動物により異なっており[8、9]、タマクラゲとウニは、減数分裂完了後の前核期に受精するタイプ、エラコは減数分裂途中の第一減数分裂中期に受精するタイプである。タマクラゲとバフンウニの卵には、受精前の段階において卵膜の上昇が見られないが、エラコの卵細胞には、既に卵膜の上昇が見られる(図1)。

タマクラゲの卵には卵膜などの外被構造が存在せず、受精後においても外見上目立った変化が見られないが、バフンウニの受精卵では受精膜の上昇が確認される(図2)。動画では、精子の侵入部位から受精膜が上昇を開始し、全体に広がっていくようすが明確に観察できる。また、卵の周り

に存在する余計な精子が取り除かれていく過程も分かり、物理的な多精防御機構の存在が理解できる。エラコの卵細胞は、未受精の段階から膜の上昇が認められるものの、受精後は更に膜が張っていくようすが観察される(図1、2)。エラコの卵細胞では減数分裂の途中(減数第一分裂中期)において受精が行われるため、受精後には第一極体、第二極体の放出が観察できる。極体放出の際、エラコの受精卵は動植軸方向にやや伸び、くびれ切るように極体を放出する。動画として見た場合には、このような変化がより分かりやすくなる。

#### 3.2 初期卵割

バフンウニの受精卵では、受精膜形成から5分以内に透明層が明瞭に観察されるようになる(図3)。タマクラゲ、バフンウニともに初期卵割は等割であるが、タマクラゲでは動物極側からの偏ったくびれによる、ハート形の時期を経る(図3)。また、等割タイプであるタマクラゲ、バフンウニに対し、エラコの2細胞期は大小の割球を生じる不等割タイプである(図4)。

以上のように、受精や初期卵割を含めた発生過程には、動物ごとに共通点もあれば相違点もある。このような共通性・多様性を理解することは、“生物”というものを理解する上でも、とても重要である。しかし、複数の動物の発生過程を授業中に観察して比較することは、材料の入手の困難さや、生殖シーズンの相違などの問題により、現実的には難しい。発生過程の動画を制作し、授業内で活用する意義は大きいと考えられる。

### 4. おわりに

近年、デジタルカメラの性能は飛躍的に向上し、高機能、高画素数のものが入手しやすくなった。中には、写真撮影の他に、高精細な動画撮影機能を有するものも発売されており、動画制作はより身近なものとなってきている。

生物を実際に扱う場合、まず初めに問題となるのはその入手方法である。今回用いたバフンウニ

は、東北大学大学院生命科学研究科附属浅虫海洋生物学教育研究センターから入手した。教育目的などで同センターへ申し込みを行う場合は、ホームページから使用申込書をダウンロードし、E-mailにより申請する[10]。また、お茶の水女子大学湾岸教育センターからも、ウニを中心とした生物材料の提供を受けることができる[11]。それぞれの場所により、生息する生物や生殖シーズンが異なるため、授業の目的や実施時期に合わせた利用が可能である。

生物現象は、本来多くの機構が複合的に働いて成り立っているものであるが、授業ではそれらの個々の機構が“分離”されて説明されることが多い。そのため、個々の現象の理解のみに終始してしまい、それらの関連性に注意が払われない場合がある。そのような場合に、動画を活用して全体の外観を見せることで、個々の学習内容を一連の現象として、関連性をもって理解させられるようになるのではないだろうか。

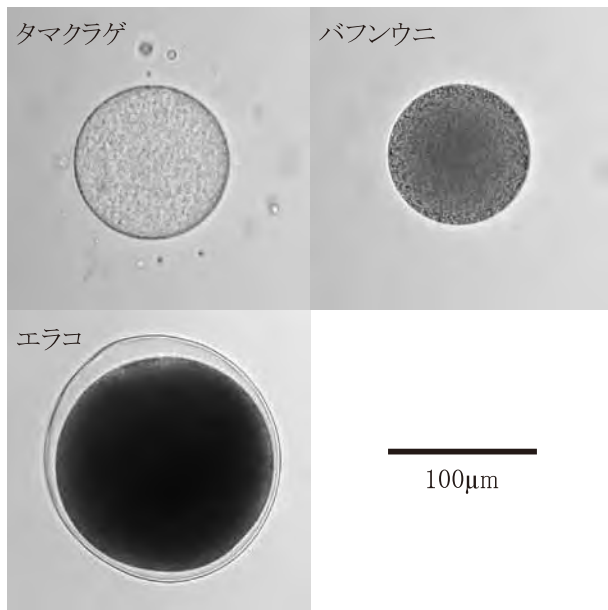


図1 未受精卵

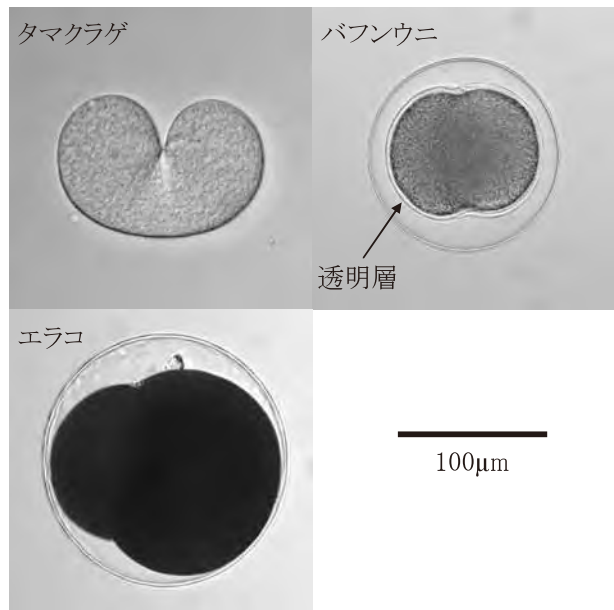


図3 卵割途中

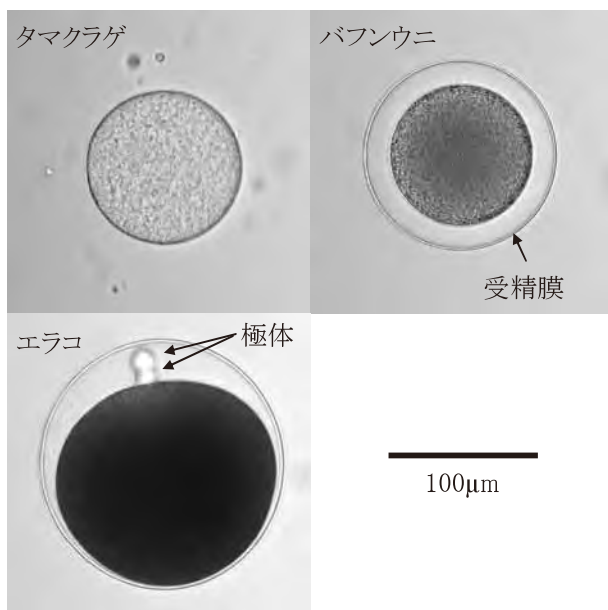


図2 受精卵

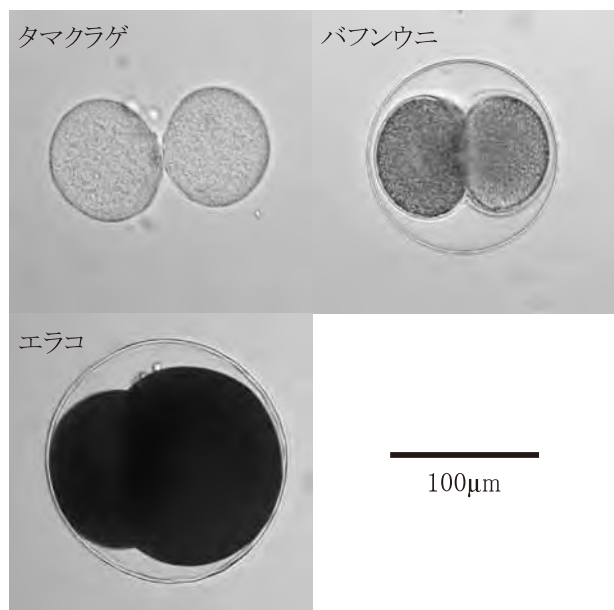


図4 2細胞期胚

## 謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金・新学術領域研究（動植物アロ認証、領域代表者：澤田均）および国立科学博物館館長支援経費（生物多様性学習教材開発 I 「海産無脊椎動物」）の助成を受けて行われたものである。

## 参考文献

- [1] Gilbert, S. F.: *Developmental Biology*, 7th ed., Sinauer Associates (2003).
- [2] 並河洋, 楚山勇: クラゲガイドブック, TBSブリタニカ (2000).
- [3] 出口竜作, 竹田典代, 伊藤順子: シャーレの中の小さなクラゲ “タマクラゲの採集・飼育の方法と生物教育への活用の可能性”, *生物教育*, 43 巻, pp. 16-24 (2002).
- [4] ImageJ: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- [5] QuickTime 7 pro: <http://www.apple.com/jp/quicktime/extending/>
- [6] 石川優, 沼宮内隆晴: 海産無脊椎動物の発生実験, 培風館 (1988).
- [7] 中野剛, 出口竜作: エラコの受精・発生観察, *生物の科学 遺伝*, 60 巻, pp. 78-81, エヌ・ティー・エス (2006).
- [8] スコット, F, ギルバート: 発生生物学 上, トッパン (1991).
- [9] 鈴木範男, 神谷津: シリーズ 21 世紀の動物科学 6 細胞の生物学, 培風館 (2007).
- [10] 東北大学大学院生命科学研究所附属浅虫海洋生物学教育研究センター: <http://www.biology.tohoku.ac.jp/asamushi/index.html>
- [11] お茶の水女子大学湾岸教育センター: <http://marine.bio.ocha.ac.jp/>