

# キンギョの雌性発生二代目の作出と形質の遺伝について

宮本淳司・岩田靖宏・小寺和郎

## 目 的

雌性発生技術を育種や増養殖に利用するとき、継代しようとする個体が正常に性成熟すること、更に雌性発生により親のもつ形質が継代されることが必要となる。

養殖コイ等では人為的な雌性発生による個体の継代が行われ、既に数世代得られていると言われているが、キンギョでは、まだあまり行われていない。このため、1986年に当指導所において低温処理による第二成熟分裂阻止型（第二極体放出阻止型）の雌性発生により得られた個体（リュウキン）を用いて雌性発生魚の成熟や卵の発生能力、雌性発生二代目のふ化率、親の形質（体色、尾型）の遺伝等を調査した。

## 材料および方法

供試親魚は1986年5月に低温処理による第二成熟分裂阻止型により得た雌性発生魚で、1988年5月に胎盤性性腺刺激ホルモンのゴナトロピン（帝国臓器製）を体重1gあたり10～15単位腹腔注射し、25℃に加温した水槽で飼育し、排卵を誘発させた。供試魚から得られた卵は一腹を二分し、一方は紫外線（75erg/mm<sup>2</sup>・sec×120秒）により不活化したドジョウ精子を水温20℃で媒精し、媒精7.5分後に低温処理を行い20℃の水槽中に戻すことにより雌性発生させ（雌性発生区）、もう一方は供試親魚と同品種でなるべく同じ斑紋の雄の精子で媒精した（対照区）。それぞれの区は処理後、常温でふ化させ、ふ化率、正常ふ化率等を求めた。

得られた稚魚はプラスチックコンテナ、F

R P水槽、土池等で175～187日間飼育後、斑紋と尾鱗（尾型）の出現状況を調査した。

斑紋については、全数を取り揚げ緋盤量を左右両側から目測によって求め、尾型については三つ尾、不正尾、フナ尾に分類した。

## 結果および考察

### 1. 雌性発生魚の成熟と雌性発生第二代魚の作出

#### (1) 雌性発生魚の成熟と採卵

雌性発生魚はほとんどの個体が成熟し、卵を得ることができた（表1）。

#### (2) 卵の発生能力

卵の発生能力は、対照区のふ化率が平均32.1%（4.1～63.4%）で、一般のキンギョのふ化率の約6～7割程度と劣っていた（表1）。

#### (3) 雌性発生の誘発

雌性発生二代目魚のふ化率は平均7.0%（0.03～28.3%）で、そのうち正常ふ化したものは、平均3.1%（0.01～16.8%）と低かった。また、2週間後の生残率は平均79.1%（47.5～100%）で、対照区が生残率の平均62.5%（28.7～100%）よりやや高い結果となった（表1）。しかし、雌性発生第一代を作出するときと同様、個体によって誘発率に差が見られるので、系統を維持して行くためには、さらに雌性発生を安定させるための処理条件等の検討が必要と考えられた。

### 2. 雌性発生第二代魚の形質の遺伝

#### (1) 体色の遺伝

表1 各試験区におけるふ化率および生残率

供試親魚	体色	体重(g)	供試卵数	ふ化尾数	ふ化率(%)	正常ふ化尾数	正常ふ化率(%)	2週間後の生残尾数	2週間後の生残率(%)	※2 飼育日数
880507A 雌性発生 通常受精	赤無地	65	5,650 788	2 32	0.03 4.1	1 15	0.02 1.9	1 7	100.0 46.7	— —
880507B 雌性発生 通常受精	更紗	90	3,313 662	206 191	6.2 28.9	34 150	1.0 22.7	※1 43	— 28.7	— —
880507C 雌性発生 通常受精	更紗	125	10,091 893	14 195	0.1 21.8	1 166	0.01 18.6	1 90	100.0 54.2	— —
880510A 雌性発生 通常受精	更紗	90	597 402	54 45	9.0 11.2	14 39	2.3 9.7	10 ※1	71.4 —	— —
880510B 雌性発生 通常受精	赤無地	85	3,015 943	33 490	1.1 52.0	7 293	0.2 31.1	7 ※1	100.0 —	— —
880510C 雌性発生 通常受精	赤無地	120	654 337	185 181	28.3 53.7	110 170	16.8 50.4	83 170	75.5 100.0	183 182
880513A 雌性発生 通常受精	更紗	145	4,256 401	370 95	8.7 23.7	150 72	3.5 18.0	73 70	48.7 97.2	180 183
880513B 雌性発生 通常受精	更紗	135	646 243	54 44	8.4 18.1	23 29	3.6 11.9	20 ※1	87.0 —	187 —
880517A 雌性発生 通常受精	更紗	115	5,631 1,138	181 721	3.2 63.4	76 230	1.3 22.8	62 180	81.6 69.2	175 179
880517B 雌性発生 通常受精	白無地	215	17,797 1,993	935 885	5.3 44.4	358 170	2.0 8.5	170 70	47.5 41.2	176 179
平均		118.5	5,165 780	203.5 287.9	7.0 32.1	77.4 136.4	3.1 19.6	46.7 90.0	79.1 62.5	180.2 180.6

化率：ふ化尾数÷供試卵数×100  
 正常ふ化率：ふ化後4～5日目に、肉眼で異常の認められない個体を計数した。  
 正常ふ化率(%)：正常ふ化尾数÷供試卵数×100  
 2週間後の生残率：ふ化14日目に尾数を計数  
 2週間後の生残率(%)：2週間後の生残尾数÷正常ふ化尾数×100  
 平均：項目の総計÷項目中に数字を記載した試験区数  
 ※1 事故によるへい死  
 ※2 体色、尾型の出現をため飼育した試験区のみ記載

#### ア. 赤無地の遺伝

赤無地親魚からの雌性発生魚には赤無地魚がかなり高率で出現すると思われたが、赤無地、更には90%以上赤地の子も全く見られなかった。しかし、対照区では赤無地が約15%出現し、90%以上赤地の子も合わせると約45%となった(図1)。これは、雌性発生により得られた赤無地魚ではあるが、赤くなる因子のホモ化があまり進んでいないためか、あるいは褪色(色変わり)が遅い形質で、本来赤くなるものがまだ褪色していない可能性も考えられた。

#### イ. 白無地の遺伝

白無地魚では、目的とする白無地魚は雌性発生区、対照区とも出現率は低く、雌性発生区では更紗模様の出現が多く、対照区では赤無地が約30%と最も多く出現した(図2)。

両区とも白無地魚の出現が低かった理由として、供試した親魚の目の周囲が僅かに赤く、赤くなる因子を持っていたと考えられること。さらに対照区の雄は白無地魚ではあるが赤くなる因子を持っていたことが考えられた。

#### ウ. 更紗の遺伝

更紗を親魚に用いたときには、雌性発生区、対照区いずれも更紗の魚が最も多く出現した(図3, 4, 5)。

更紗になる遺伝子が存在するかどうかはまだよく判っていない。ニシキゴイの紅白は、赤無地と白無地の雑種と言われているので、キンギョの更紗模様についても同様なことが考えられる。しかし、今回の結果のみでは判断は出来ないため、今後さらに検討する必要があると思われた。

#### エ. 褪色性の遺伝

図1では雌性発生区、対照区の褪色が遅く、図3では雌性発生の褪色が遅かった。そのほかの区では、雌性発生区、対照区とも褪色性には差がなかった。供試親魚は供試した時点では既に褪色していたので、この親魚の褪色性については確認していないが、一般に褪色性の遅れる形質は、遺伝するとも言われており、今回の図1で顕著であったことから、この形質が第二成熟分裂阻止型の雌性発生で、分離された可能性も考えられた。

#### (2) 尾型の遺伝

供試親魚はいずれも三つ尾であったが、得られた子の三つ尾の出現率はどの試験区も雌性発生区よりも対照区のほうが高かった(図6)が、図6-A, Bのように雌性発生区と対照区でほとんど差のないものも見られた。

これらのことから、雌性発生第一代では、ホモ化が飛躍的に進むとは考えられないが、形質によっては雌性発生を継代することにより純系分離も可能であると考えられた。

以上、第二成熟分裂阻止型の雌性発生第二代について若干の知見を得たが、今後は継代による卵の発生能力の低下、誘発率の個体による差など、発生初期の問題に加え、雌性発生による形質の固定の進みかた、また通常交配と比較しての固定効率の差などについて、さらに検討する必要がある。

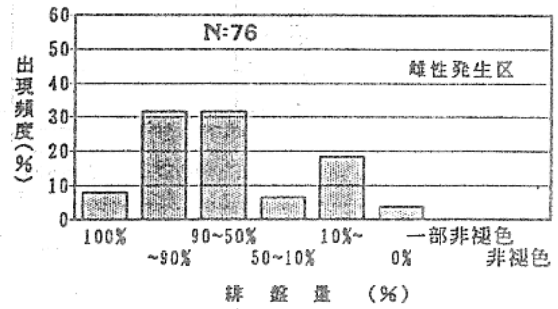
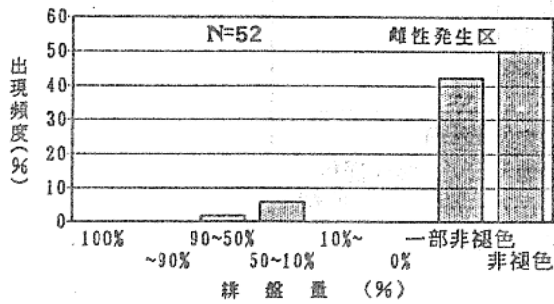


図1 赤無地キンギョ(リュウキン)の雌性発生区(雌性発生第二代)と対照区の斑紋の出現の違い(880510C)

図2 白無地キンギョ(リュウキン)の雌性発生区(雌性発生第二代)と対照区の斑紋の出現の違い(880517B)

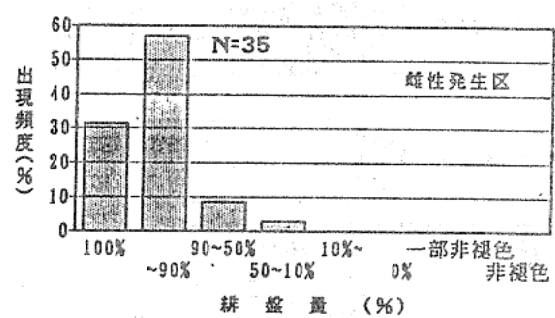
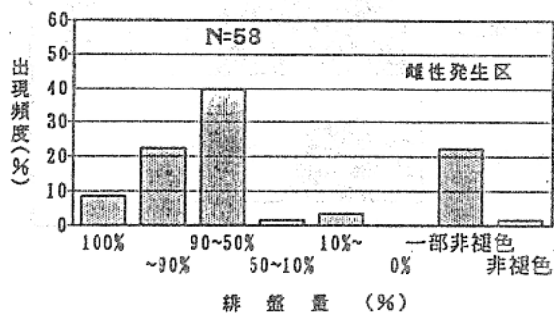


図3 更紗キンギョ(リュウキン)の雌性発生区(雌性発生第二代)と対照区の斑紋の出現の違い(880513A)

図4 更紗キンギョ(リュウキン)の雌性発生区(雌性発生第二代)と対照区の斑紋の出現の違い(880517A)

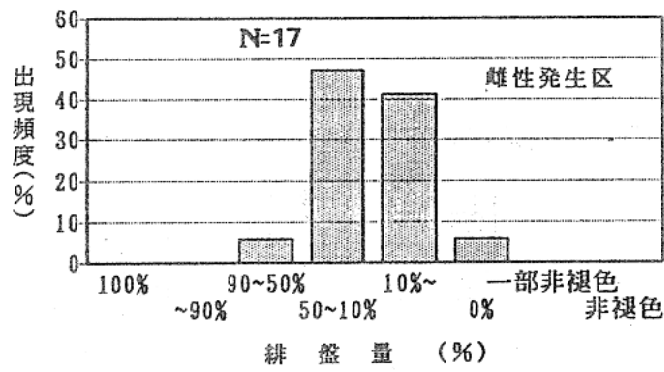


図5, 更紗キンギョ (リュウキン) の雌性発生区 (雌性発生第二代) の斑紋の出現 (88013B)

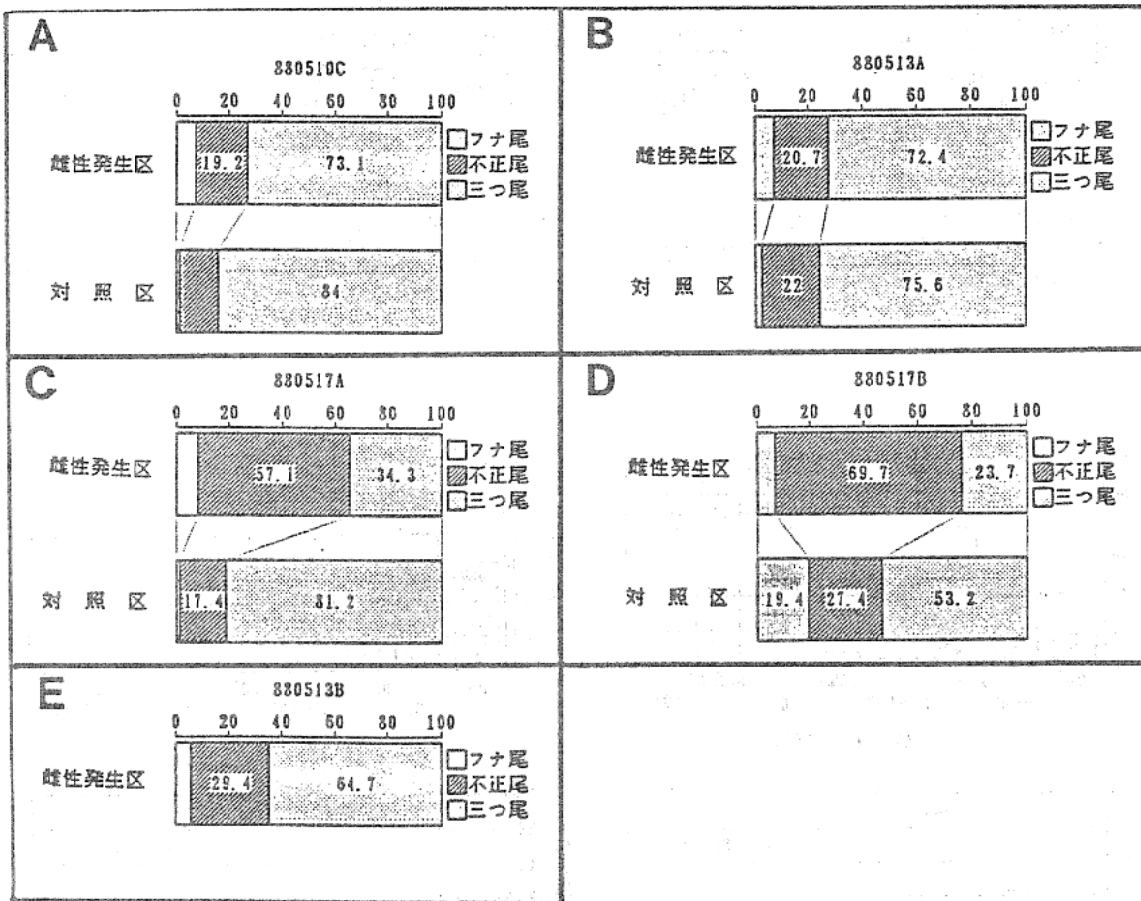


図6, 雌性発生区と对照区の尾型の出現頻度の比較 (ただし, E試験区は雌性発生区のみ)

## (4) 冷水魚増養殖技術試験

### マス類の白血球について

本田是人・服部克也・峯島史明

#### 目 的

魚類においても病原微生物の侵入に対し、白血球が生体防御に重要な役割を果していると考えられている。魚類の白血球は池田ら<sup>(1)</sup>によるとリンパ球、顆粒球(好中球, 好酸球, 好塩基球)及び単核球に類別されている。

顆粒球, 単核球が病原微生物を貪食し, 殺菌するのに対し, リンパ球では, 抗体産生能を有する他, ウィルス感染細胞や腫瘍細胞を破壊する等, 細胞性免疫機能を有するとされている。

マス類では, 白血球数及びその形態について種々報告されている。抗病性を比較検討する基礎段階として, ニジマスの二倍体魚と三倍体魚の平常時の白血球数を算定するとともに, 白血球の分類を行い組成比を比較した。

また, イワナ, ニジマスの細胞性免疫を検討する予備実験として, 各種の魚類由来株化細胞を用い, ナチュラルキラー細胞活性(NK活性)について検討した。

#### 材料および方法

供試魚は, 昭和63年3月に温度処理によって作出したニジマス三倍体魚と, 同時に作出したニジマス(ホウライマス)二倍体魚を用いた。

尾柄部切断により採血し, 流出する血液をスライドガラスに直接塗布し, メイ・ギムザ染色により血液塗沫標本を作成した。また, トーマ法により赤血球数を計数した。白血球数は, 血液塗沫標本で赤血球5,000個に対する白血球比を求めた後, 赤血球数より算出した。白血球の分類は, 池田ら<sup>(1)</sup>に従いリンパ球, 好中球, 単核球とした。血液塗沫標本で200個を分類し, 総白血球数より各白血球数を算出した。

NK活性の検討には, ニジマスとイワナのO<sup>+</sup>年魚を用いた。

類リンパ球は両者とも血液と脾臓から分離した。ヘパリン処理した注射器により尾柄部から約1ml採血した。等量のPBSを加え, 混和した後, 希釈血液と等量のフィコール液に重層し, 室温で2,000回転, 30分間遠心分離を行った。中層に分離された類リンパ球はMEM-10で3回洗浄し, 実験に供した。脾臓は, 十分に脱血させた後, 無菌的に摘出した。BSS中で2分割した後, 金属メッシュ上でゴム栓で脾臓を押しつぶし, 脾細胞を遊出させた。混入する赤血球をトリス-NH<sub>4</sub>Clで溶解させた後, 同様に洗浄し類リンパ球を得た。

トリパンプルー法により生細胞を10<sup>7</sup>cell/mlに調整し, RTG-2, FHM, BF-2, EPCの各株化細胞に加え, 15℃で24時間培養後, 細胞の剥離によりNK活性を判定した。

#### 結 果

白血球の計数及び分類は継続実施中である。また, ニジマス, イワナの類リンパ球のNK活性は表1に示したとおり, 顕微鏡法による4種の魚類由来株化細胞では見られなかった。

表1 ニジマス, イワナから分離した類リンパ球の魚類由来株化細胞に対するNK活性

魚 種	部位	RTG-2	FHM	BF-2	EPC
ニジマス	血液	—	—	—	—
	脾臓	—	—	—	—
イワナ	血液	—	—	—	—
	脾臓	—	—	—	—

文 献 (1)魚類血液図鑑, 緑書房刊

# ニジマス・アマゴ・イワナ間での 異質三倍体魚の作出について

服部克也・本田是人・峯島史明

## 目 的

優良品種を固定するために、育種や染色体操作の育種への応用等の技法が考えられている。しかしながら、遺伝子と発現形質の関係を把握することが、遺伝子の固定、ひいては品種の固定のために必要と思われる。

そこで、発現してくる形質が異なるため、比較検討が可能と思われる交雑種について検討を加え、さらにゲノムの比率を変化させることで、発現してくる形質が変化するのかについて検討するために異質三倍体魚を作出した。

## 材料および方法

### (A) 雌親魚がニジマスの場合

雌親魚には、排卵後4日以内と思われる個体を用い、1実験に2～3尾の卵を混合して供試した。実験区は次のとおり設定した。

実験区	処理操作
CNN…対 照 区	〈×ニジマス(♂)〉
CNI…対 照 区	〈×イワナ(♂)〉
CNA…対 照 区	〈×アマゴ(♂)〉
TNN…三 倍 体 区	〈×ニジマス(♂)⇒温度処理〉
TNI…異質三倍体区	〈×イワナ(♂)⇒温度処理〉
TNA…異質三倍体区	〈×アマゴ(♂)⇒温度処理〉

温度処理の方法は、媒精3分後に吸水、吸水10分後に、26℃の温水に20分間浸漬した。なお、洗卵等に使用した生理食塩水、淡水は10℃に水温を調整した。

実験は、昭和63年11月に2回(I, II)実施した。供試魚は、ニジマス雌、雄魚及びイワナ雄魚が1<sup>+</sup>年魚、アマゴ雄魚0<sup>+</sup>年魚であった。

### (B) 雌親魚がアマゴの場合

処理操作等は、(A)と同様である。雌親魚については、排卵後4日以内と思われるものを、1実験に2～3尾を供試した。実験区については、次のとおり設定した。

実験区	処理操作
CAA…対 照 区	〈×アマゴ(♂)〉
CAI…対 照 区	〈×イワナ(♂)〉
CAN…対 照 区	〈×ニジマス(♂)〉
TAA…三 倍 体 区	〈×アマゴ(♂)⇒温度処理〉
TAI…異質三倍体区	〈×イワナ(♂)⇒温度処理〉
TAN…異質三倍体区	〈×ニジマス(♂)⇒温度処理〉

実験は、昭和63年11月に2回(I, II)実施した。供試魚は全て1<sup>+</sup>年魚であった。

### (C) 雌親魚がイワナの場合

処理操作については、(A)と同様である。雌親魚については、排卵後4日以内と思われるものを、1実験に2～4尾を供試した。また、実験区は次のとおり設定した。

実験区	処理操作
CII…対 照 区	〈×イワナ(♂)〉
CIA…対 照 区	〈×アマゴ(♂)〉
CIN…対 照 区	〈×ニジマス(♂)〉
TII…三 倍 体 区	〈×イワナ(♂)⇒温度処理〉
TIA…異質三倍体区	〈×アマゴ(♂)⇒温度処理〉
TIN…異質三倍体区	〈×ニジマス(♂)⇒温度処理〉

実験は、昭和63年11月に3回(I, II, III)実施した。供試魚は全て1<sup>+</sup>年魚であった。

## 結 果

- (A) 各区の補正発眼率、補正正常魚出現率については、表1に示した。
- (B) 各区の補正発眼率、補正正常魚出現率については、表2に示した。
- (C) 各区の補正発眼率、補正正常魚出現率については、表3に示した。

なお、検卵は、積算水温で (A)240℃, (B)300℃, (C)370℃, フ化仔魚検定は (A)500~550℃, (B)650~700℃, (C)800~880℃で行った。また、倍数化の確認は、フ化仔魚検定時に、各区30尾について血液塗沫標本を作成し、赤血球長径値により判断した。

(A), (B), (C)から、異質三倍体化が可能な組合せとしては、ニジマス(♀)×イワナ(♂), ニジマス(♀)×アマゴ(♂), イワナ(♀)×アマゴ(♂), アマゴ(♀)×イワナ(♂)の4つであり、これは、滋賀県醒井養鱒場において発表されたものと同様な結果となった。

得られた異質三倍体魚のうち、イワナ(♀)×

アマゴ(♂), アマゴ(♀)×イワナ(♂)では、ゲノムの比による形質発現の変化を検討出来ると思われる。今後飼育を行い、交雑種を含めて実験を行う予定である。

また、ニジマス(♀)としてホウライマスを用いたので、ニジマス(♀)×アマゴ(♂), ニジマス(♀)×イワナ(♂)の異質三倍体魚で、無斑遺伝子の発現を観察する予定である。

## 文 献

- 1) 滋賀県醒井養鱒場：昭和61年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書

表1 雌親魚がニジマスの場合

	補正発眼率 (%)		補正正常魚出現率 (%)		倍数化率 (%)	
	I	II	I	II	I	II
CNI	88.2	99.6	0.4	1.2	—	—
CNA	84.1	130.1	1.0	0	—	—
TNN	49.3	103.2	48.8	99.6	100	93.3
TNI	72.4	113.2	70.5	98.7	100	100
TNA	76.1	99.8	76.5	100	100	100

表2 雌親魚がアマゴの場合

	補正発眼率 (%)		補正正常魚出現率 (%)		倍数化率 (%)	
	I	II	I	II	I	II
CAI	53.8	66.8	19.7	40.5	—	—
CAN	0	0	0	0	—	—
TAA	87.2	95.2	85.8	92.9	100	83.3
TAI	74.1	69.1	68.0	62.0	検定中	検定中
TAN	2.2	25.3	0	0	—	—

表3 雌親魚がイワナの場合

	補正発眼率 (%)			補正正常魚出現率 (%)			倍数化率 (%)		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
CIA	90.8	94.8	85.3	84.4	96.7	85.6	—	—	—
CIN	0	0	0	0	0	0	—	—	—
III	36.8	47.4	74.1	20.5	22.8	28.0	93.3	93.3	23.3
TIA	43.4	43.9	68.4	31.9	35.1	48.9	100	76.7	16.7
TIN	10.6	7.1	4.8	0	0	0	—	—	—



# イワナ(♀)×アマゴ(♂)で得られた交雑種における 形質発現について - I

## - 外部形態及びアイソザイム -

服部克也・本田是人・峯島史明

### 目 的

遺伝子と形質の関係を把握することは、染色体操作を含めた育種による優良品種の作出を効果的に行うためには不可欠である。しかしながら、優良形質と遺伝子の関係は複雑であり、多くは統計的手法を用いて解析する必要がある。

このように一面的には把握がたい形質と遺伝子の関係を、異質三倍体や交雑種を作出し、これを比較検討することで推測する予定であるが、予備試験として交雑種(イワナ(♀)×アマゴ(♂))における形質発現(外部形態、アイソザイム)について検討を試みた。

### 材料および方法

昭和62年11月に実施したアマゴの精子によるイワナの雌性発生誘導試験で、対照区-Ⅱにて作出した交雑種(イワナ(♀)×アマゴ(♂))と同試験の対照区-Ⅰ(イワナ(♀)×イワナ(♂))で得られたイワナ、同時期に作出したアマゴを供試魚とした。

供試魚の体重は、交雑種( $\overline{BW}=96 \pm 48 \text{ g}$ )、イワナ( $\overline{BW}=157 \pm 26 \text{ g}$ )、アマゴ( $\overline{BW}=125 \pm$

79)であった。

外部形態については、体長、体重、頭長、体高等の測定及び、斑紋形成の観察を行った。斑紋の観察は、スモルト化していない個体について行い、斑紋の形、色の濃淡を比較した。

アイソザイムについては、水平式デンブングル電気泳動法を用いて検出した。ゲル緩衝液、電極槽緩衝液にはC-APM(pH7.0)を用い、ゲル濃度は12.5%とした。

泳動条件、染色法等については、前報<sup>1)</sup>と同様とした。また、供試魚は、免疫機能の比較のため採血を行った後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、筋肉、肝臓の解凍ドリップを粗酵素液として用いた。

検出を試みた酵素は、LDH, MDH, IDH, PGM,  $\alpha$ -GPDH, GPI, EST, AAT, 6PGD, G6PDH等であった。これらのうち、明瞭なバンドが得られたものについては、遺伝子座及び対立遺伝子の遺伝子型の推定を行った。

なお、遺伝子座等の推定では、高知大学農学部 栽培漁業学科 谷口順彦教授に御指導を賜わった。

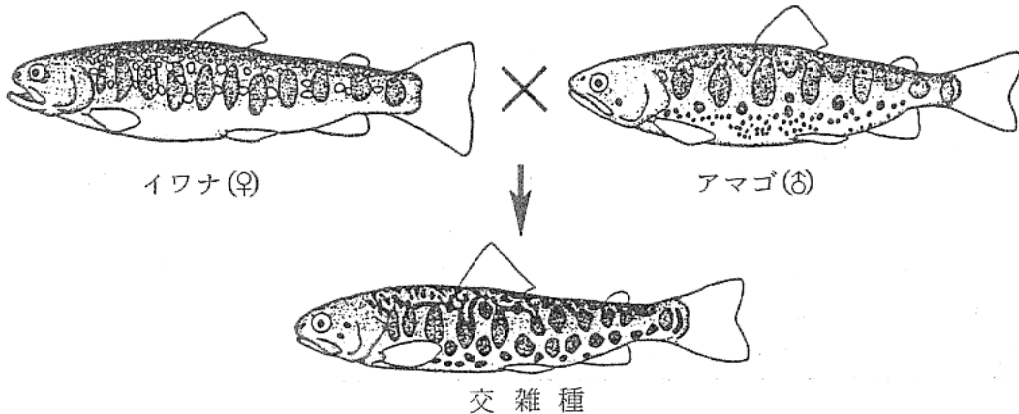


図1 イワナ、アマゴ及び交雑種における斑紋形成

結 果

現在のところ継続試験中であるが、得られたデータのうち、斑紋については、図1に、アイソザイムについては、MDHと $\alpha$ -GPDHにおける泳動像と遺伝子座の推定を図2に示した。

文 献

- 1) 昭和62年度愛知県水産試験場業務報告  
P. 46~47

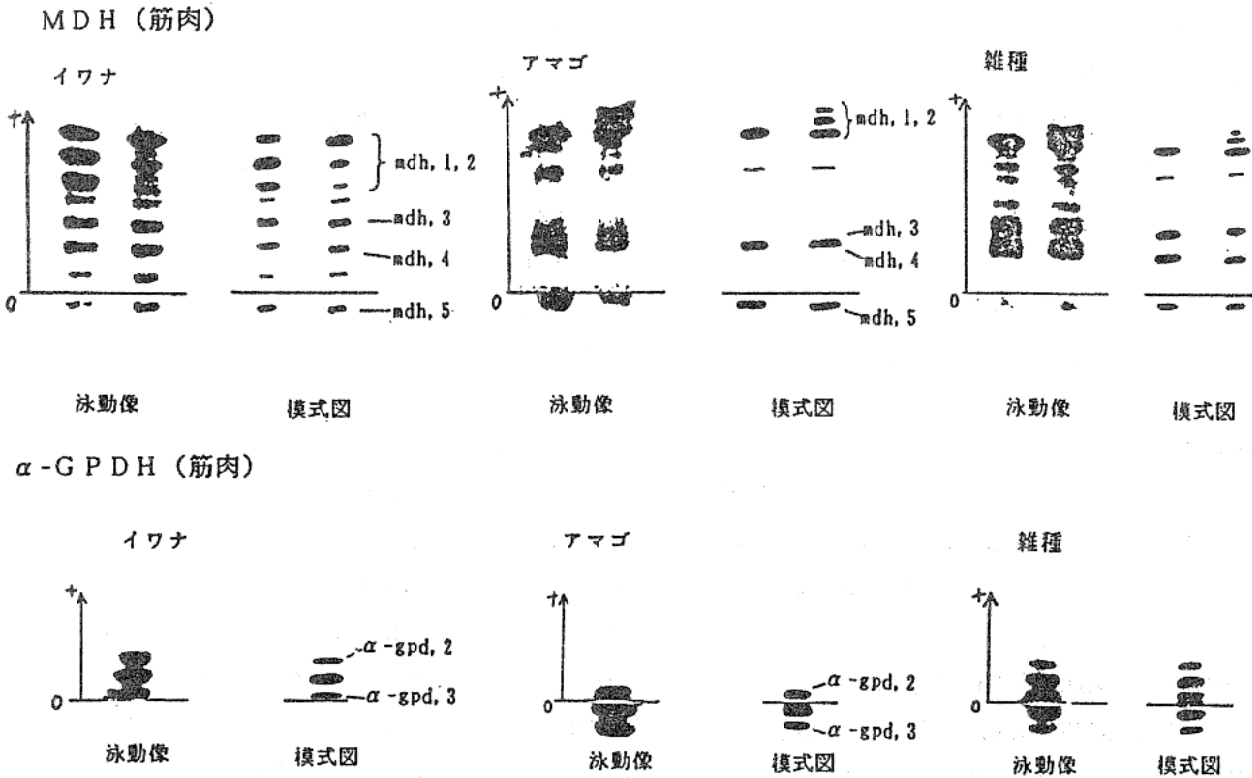


図2 イワナ、アマゴ、交雑種にみられた泳動像及び遺伝子座の推定

# イワナ(♀)×アマゴ(♂)で得られた交雑種 における形質発現について - II

## - 代替経路の補体活性 -

本田是人・服部克也・峯島史明

### 目 的

補体系の代替経路を前年度に引き続き、イワナ、アマゴで検討するとともに、その交雑種についても行い、比較した。

### 材料および方法

昭和62年11月に作出した交雑種を供試魚とし、イワナ、アマゴについては、1<sup>+</sup>年魚を用いた。

採血、血清の分離、EGTAゼラチンペロナル緩衝液(EGTA-GVB)及びEDTAゼラチンペロナル緩衝液(EDTA-GVB)の調整は前報(昭和62年度愛知県水産試験場業務報告)と同様とし、標的細胞はウサギ赤血球(RaRBC)を用いた。

代替経路の補体活性の至適温度条件を検討するため、EGTA-GVBで希釈した血清とRaRBCを4~30℃で60分間反応させた。反応終了後、EDTA-GVBを加え反応を止めた。活性の測定は前報と同様とし、RaRBC  $4 \times 10^7$

cellの50%溶血血清量を1unitとした。

イワナ、アマゴ及び交雑種の代替経路の補体活性は、至適温度条件より20℃とし、60分間反応させた。

### 結 果

反応温度別の代替経路の補体活性を図1に示した。イワナ、アマゴ及び交雑種とも15~20℃で高値を示したが、いずれも20℃で最も高い活性が見られた。4℃の反応では、アマゴで活性の低下が著しいのに対し、イワナでは顕著でなかった。また、交雑種では、その中間値を示す傾向にあった。30℃では、いずれも活性の低下が顕著に見られた。

至適反応温度条件である20℃での代替経路の補体活性を、図2に示した。アマゴ(8尾)が最も高く、イワナ(7尾)及び交雑種(7尾)に差は見られなかった。

低温反応での活性の差及び熱安定性等については、継続実施中であり、知見の蓄積が必要と思われる。

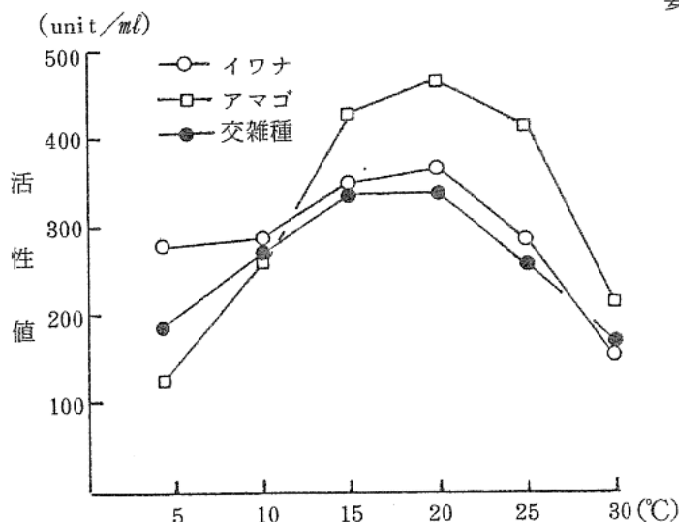


図1 反応温度別の代替経路の補体活性

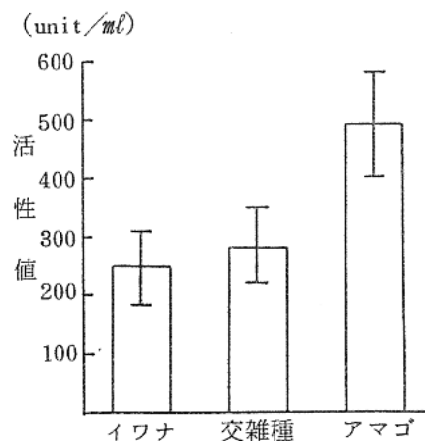


図2 至適温度条件での代替経路の補体活性

# ニジマスにおける二倍体魚，三倍体魚の塩分適応性について

服部克也・本田是人・峯島史明

## 目的

ニジマスを始めとする三倍体魚では，その生物的特性について多くの研究がなされており，三倍体魚が，その血液性状から二倍体に比して酸欠に弱いことや，二倍体に比して摂餌能力が劣る等が報告されている。また，三倍体の雌は不稔であり，大型化すると言われている。そこで，不稔，大型化する特性を生かし，商品性を高めるために，海面養殖を行うということが考えられる。しかし，三倍体魚の塩分適応性については，充分解明されていないとは言えず，また，生物的特性を二倍体と比較する目的のために，本試験を実施した。

## 材料および方法

供試魚は，昭和63年3月に作出したニジマス三倍体魚と，同時期に作出した二倍体魚を用いた。塩分適応性の能力については，血清中のクロライド値を測定して判断した。クロライドの測定は，簡易測定キット（クロライドテスト ワコー）を使用した。

実験は，(1)平常値及びハンドリングの影響の比較，(2)塩水中での比較，について実施した。  
 (1)二倍体魚，三倍体魚，それぞれ60尾を200ℓ水槽に収容し，I～Ⅵに区切った時間帯に，各区5尾づつを，尾柄部切断によって採血した。三倍体魚の確認は，採血時に，赤血球長径値により判断した。なお，ⅢとⅣの間で，全尾について1分間の空中曝露を行った。  
 (2)-(A) 3/4海水（人工海水）に浸漬し，1，4，7，24時間後に採血した。  
 (2)-(B) 海水馴致と同様の方法で行い，馴致中の各段階で，4回の採血を行った。

## 結果

(1)得られた結果を，図1に示した。両者には顕著な差は認められなかった。  
 (2)(A)，(B)とも現在継続試験中であるが，クロライド値で見ると，両者には顕著な差は認められていない。今後，血糖値，ヘマトクリット値についても検討する予定である。

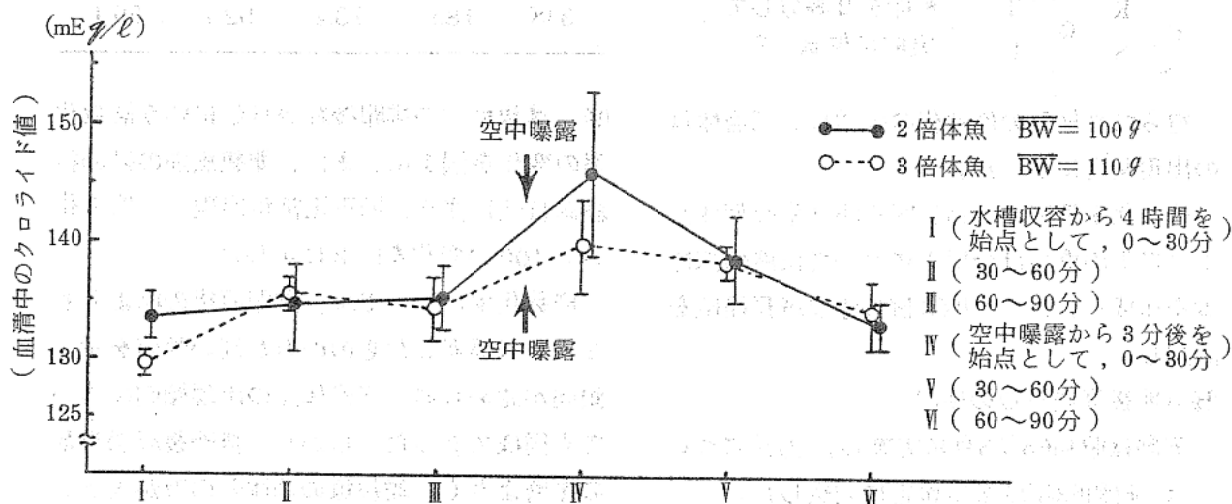


図1 ハンドリングによる血清中のクロライド値の変動

# ニジマスの染色体倍数化に及ぼす処理法、 排卵後経過日数の影響について

服部克也・本田是人・峯島史明

## 目 的

ニジマスの染色体操作では、ロットによる発眼率、正常魚出現率、倍数化率等でのバラツキが認められる。このバラツキをもたらす要因として考えられるもののうち、温度処理法の差異、排卵後経過日数の影響について検討を試みた。

## 材料および方法

### (A) 温度処理法の検討

実験は昭和62年11～12月に実施し、方法については、昭和62年度業務報告に記載した。なお、実験区と温度処理法については次のとおりである。

実験区	温度処理法
1区	26℃の温水に20分間浸漬
2区	28℃の温水に10分間浸漬
3区	30℃の温水に5分間浸漬
4区	対照区(無処理)

また、雌親魚(P, Q)と雄親魚(R, S, T, U)の組合せは、次のとおりである。

$$\begin{array}{cc}
 * / R & * / T \\
 P \backslash S & Q \backslash U \\
 * & *
 \end{array}
 \quad (* \text{卵を2等分して、実験に供試した。})$$

得られた仔魚の倍数化の確認は、三倍体魚の出現割合によった。

倍数化率算出のため各区60尾(生存個体がそれ以下の場合は全尾)について血液塗沫標本を作成し、1尾当り60個の赤血球長径値を計測した。

### (B) 排卵後経過日数の検討

実験は昭和63年3月に実施し、方法については、昭和62年度業務報告に記載した。

倍数化処理には温度処理法(30℃の温水に

5分間浸漬)を用い、排卵後1～3日以内の雌魚5尾(A, B, C, D, E)について実験を行った。採卵は、同一個体について24時毎に3～4回行い、第1回目をI、以降II, III, IVとした。

得られた仔魚は、倍数化率算出のため(A)と同様に血液塗沫標本を作成し、赤血球長径値を計測した。

## 結果および考察

(A) 検討した3つの温度処理法について、三倍体魚の出現傾向を知る指標として補正正常魚出現率\*に倍数化率を乗じた数値を算出し、これを表1に示した。

この数値を用いて、3つの温度処理法に差異が認められるかを分散分析法によって検討したところ、5%水準で有意な差は認められなかった。

表1 各区における  
補正正常魚出現率×倍数化率/100

	P-R	P-S	Q-T	Q-U
1区	100.9	82.8	55.6	66.8
2区	81.2	72.3	56.6	59.1
3区	18.9	73.4	52.1	59.1

(B) 雌親魚別の排卵後経過日数に伴う倍数化率の変化を図1に、また、雌親魚別の排卵後経過日数に伴う、補正正常魚出現率×倍数化率/100の変化を図2に示した。

倍数化率については、排卵直後の卵よりも2～4日経過したものの方が高い数値を示す傾向が認められ、三倍体魚の出現傾向についても同様であった。しかし、排卵後経過日数の影響よりも、雌親魚の個体差の方が大きいことも認められた。

(A), (B)からニジマスにおいては、温度処理法や、排卵後経過日数による染色体操作への影響よりも、供試した雌親魚の個体差がロットのバラツキをもたらしている可能性が考えられた。

※ 試験区の正常魚出現率を、対照区のそれ  
で除した数値を示す。

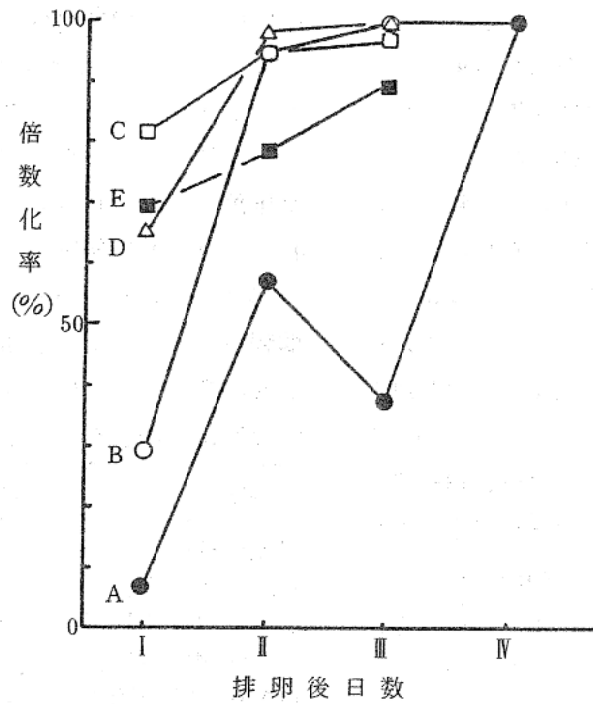


図1 雌親魚 (A, B, C, D, E) 別の排卵後経過日数に伴う倍数化率の変化

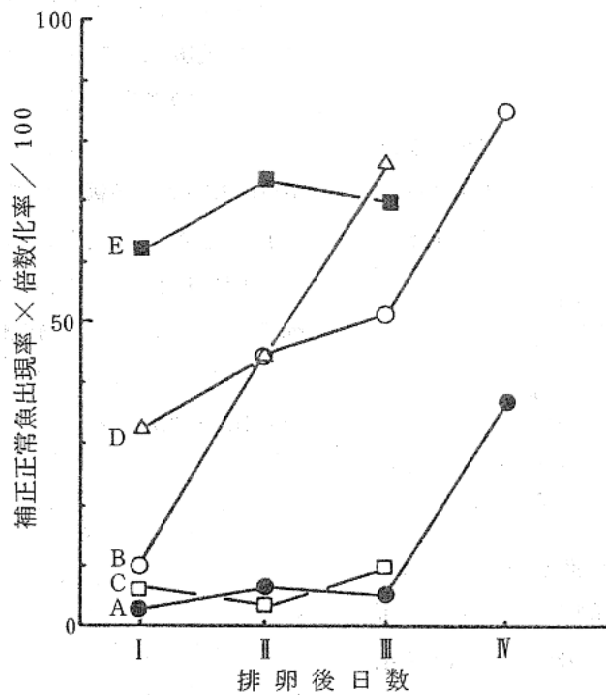


図2 雌親魚 (A, B, C, D, E) 別の排卵後経過日数に伴う  
補正正常魚出現率×倍数化率 / 100 の変化

# ニジマス・アマゴ・イワナの雌性発生誘導 での他属雄(精子)の利用について

服部克也・本田是人・峯島史明

## 目 的

雌性発生を利用した育種を考える場合には、目的とする個体が確実に雌性発生により誘導されたものを識別する必要がある。

ニジマスにおいては、アルビノや無斑(ホウライマス)という標識遺伝子を利用して、雌性発生の確認をしている。しかしながら、これらの遺伝子は完全優性であり、ホモかヘテロかが外見上では判断出来ず、用いた雄親魚がヘテロの場合には100%信用出来ないことになる。加えて、アルビノや無斑の遺伝子を持つ魚についての雌性発生には利用出来ない。

また、アマゴやイワナでは、この様な標識遺伝子の存在は知られていないため、雄側の遺伝子の関与の確認が可能と思われる他属の雄(精子)利用の雌性発生について検討を試みた。

## 材料および方法

### (A)ニジマスの雌性発生

雌親魚については、排卵後4日以内と思われる個体を用い、1実験に2尾の卵を混合して供試した。実験区は次のように設定した。

実験区	処理操作
CNN…対 照 区	〈×ニジマス(♂)〉
CNI…対 照 区	〈×イワナ(♂)〉
CNA…対 照 区	〈×アマゴ(♂)〉
GNI…雌性発生区	〈×イワナ(♂)UV⇒温度処理〉
GNA…雌性発生区	〈×アマゴ(♂)UV⇒温度処理〉

雌性発生の誘導では、精液を森沢の人工精漿(pH 8.1)にて100倍に希釈したものを、直径90mmのガラスシャーレに分注し、6,000 erg/mmの紫外線を照射した。そして、媒精3分後に吸水、吸水10分後に26℃の温水に20分間浸漬する温度処理を施した。また、洗卵等

に使用した生理食塩水、淡水は10℃に水温を調整した。なお、実験は昭和63年11月に2回(I, II)実施した。また、供試魚は、ニジマス雄、雌魚及びイワナ雄魚が1<sup>+</sup>年魚、アマゴ雄魚が0<sup>+</sup>年魚であった。

### (B)アマゴの雌性発生

処理操作等については、(A)と同様であった。雌親魚については、排卵後4日以内と思われるものを、1実験に3~4尾供試した。なお、実験区は次のように設定した。

実験区	処理操作
CAA…対 照 区	〈×アマゴ(♂)〉
CAI…対 照 区	〈×イワナ(♂)〉
CAN…対 照 区	〈×ニジマス(♂)〉
GAI…雌性発生区	〈×イワナ(♂)UV⇒温度処理〉
GAN…雌性発生区	〈×ニジマス(♂)UV⇒温度処理〉

実験は、昭和63年11月に2回(I, II)実施した。供試魚は全て1<sup>+</sup>年魚であった。

### (C)イワナの雌性発生

イワナについては、前年度に実験を実施し、昭和62年度業務報告にて報告したが、本年度においても、追試ということで実施した。

処理操作については、(A)と同様であった。雌親魚については、排卵後4日以内と思われるものを、1実験に2~3尾供試した。なお、実験区は次のように設定した。

実験区	処理操作
CII…対 照 区	〈×イワナ(♂)〉
CIA…対 照 区	〈×アマゴ(♂)〉
CIN…対 照 区	〈×ニジマス(♂)〉
GIA…雌性発生区	〈×アマゴ(♂)UV⇒温度処理〉
GIN…雌性発生区	〈×ニジマス(♂)UV⇒温度処理〉

実験は、昭和63年11月に2回(I, II)実施した。供試魚は全て1<sup>+</sup>年魚であった。

結果および考察

(A)ニジマスの雌性発生

各区における補正発眼率及び補正正常魚出現率を表1に示した。なお、検卵は積算水温で240℃、フ化仔魚の検定は540℃で行った。

表1 ニジマス雌性発生の結果

	補正発眼率(%)		補正正常魚出現率(%)	
	I	II	I	II
CNI	87.7	54.3	0	1.4
CNA	246.5	89.7	0.8	1.4
GNI	145.3	34.2	140.6	23.4
GNA	85.9	35.3	80.9	31.0

これらの結果から、ニジマスにおいては、イワナ、アマゴとの間で交雑種が発生しないものと考えられ、雌性発生区で正常フ化仔魚が出現していることから、イワナ精子、アマゴ精子を用いれば、雌性発生の誘導及び確認が可能と思われる。しかし、産卵期がオーバーラップし、雄の成熟による減耗の少ないイワナ雄を用いることが良いと思われる。

(B)アマゴの雌性発生

各区における補正発眼率及び補正正常魚出現率を表2に示した。なお、検卵は積算水温で280℃、フ化仔魚の検定は650～720℃で行った。

表2 アマゴ雌性発生の結果

	補正発眼率(%)		補正正常魚出現率(%)	
	I	II	I	II
CAI	8.9	32.1	0.6	23.6
CAN	0	0	0	0
GAI	10.5	75.0	8.6	71.7
GAN	14.2	69.4	13.2	65.8

これらの結果から、アマゴはニジマス雄との間で交雑種が発生せず、雌性発生区においては、正常魚が出現しており、ニジマスの精子を用いれば、雌性発生の誘導及び確認が可能と考えられる。

(C)イワナの雌性発生

各区における補正発眼率及び補正正常魚出現率を表3に示した。なお、検卵は積算水温で320℃、フ化仔魚の検定は800℃で行った。

表3 イワナ雌性発生の結果

	補正発眼率(%)		補正正常魚出現率(%)	
	I	II	I	II
CIA	103.0	92.6	104	89.1
CIN	0	0	0	0
GIA	18.3	30.5	6.6	22.0
GIN	25.0	45.7	11.4	32.7

前年度に行った実験と同様に、今回のものでも、イワナはニジマス雄との間に交雑種が発生せず、雌性発生区においては正常魚が出現していることから、ニジマスの精子を用いれば、雌性発生の誘導及び確認が可能と考えられる。

〈ニジマスの性転換雄魚の作出について〉

(A)で得られた結果から、ニジマスとイワナを混養飼育し、これに昭和62年度事業報告にて報告した電照方法で成熟抑制したものを供試魚として、平成元年3月にニジマスの雌性発生をイワナ精子を用いて誘導した。

平成元年4月現在では、フ化管理中であるが、2回行った実験での雌性発生区における補正発眼率は、61.1%及び28.0%であった。

雌性発生区で得られた仔魚について、17- $\alpha$ -Methyltestosterone (Sigma社)含有の飼料(濃度0.5ppm及び1ppm)を餌付けから8週間連続投与する予定である。



# イワナ白血球からのゲノムDNA の抽出について

服部克也・本田是人・峯島史明

## 目 的

医学・農学等の先端分野にて既に行われている遺伝子操作(DNAの組換え等)を、将来的には水産分野へ導入することが必要となると考えられている。

水産分野においても、現在可能となったサケ成長ホルモンの大腸菌による産生から、マイクロインジェクションによる優良品種の作出、遺伝子組込みワクチン、遺伝子畜産業での利用等への応用の可能性も皆無ではない。

しかしながら、現在までのところ充分なデータの集積や技術の修得がなされているとは言えない。

そこで、本試験では、基本的処理操作として、イワナの白血球よりゲノムDNAの抽出を試みたので、途中経過ではあるが、ここに報告する。

なお、愛知県水産試験場においては、組換えDNA安全委員会の設置がなされていないため、組換え体の作出、保存等は一切行っていない。

## 材料および方法

供試魚は、当场で飼育しているイワナ20年魚を用いた。血液は、ヘパリン処理を施した注射器にて、尾柄部から採取した。

得られた血液にPBSを同量加え、よく混和した。遠心管に、血液・PBS混液と同量程度のフィコール(ORGANON TEKNIKA CORP.製)を満たし、界面を乱さないようにして混液を重層した。その後、5,000rpm, 30分間(50mlの遠心管の場合)の遠心分離を行った。

遠心後は、図1に示したように白血球が分離された。この白血球層を注射器にて採取し、PBSにて2回洗浄した。

得られた白血球を、シリコンコーティング

し、オートクレーブ

を施したガラス棒

で潰した。その後

の操作は、ヒト細

胞および組織より

の高分子DNAの

抽出りに従って行

った。また、試薬

等の作成方法につ

いては組換えDNA

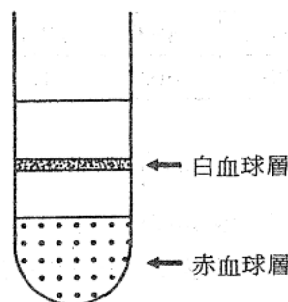


図1 フィコールによる  
白血球の分離

実験<sup>2)</sup>を参考とした。

なお、本試験を行うに際し、遺伝子操作の基本的技術を、岐阜大学 農学部 堀津浩章教授に御指導を賜わった。

## 結 果

現在までのところ、コールドエタノールによるDNAの抽出に成功しておらず、肉眼的にDNAを確認出来ない段階である。

今後は、処理操作技術の見直し、ヒトの白血球での方法を改良する等を行い、得られたDNAについて制限酵素による切断を行う予定である。

## 文 献

- 1) 高木康敬; 遺伝子操作マニュアル, 講談社
- 2) J. R. DILLON・A. NASIM・E. R. NES-TMANN編; 組換えDNA実験, 東京化学同人