

雌性発生誘起における処理条件

宮本淳司・石井吉夫・小寺和郎

目的

昨年を引き続いて、第2極体放出阻止による雌性発生二倍体作出のための、処理条件と雌性発生に適した卵質についての検討を行った。

ア. 媒精から低温処理までの経過時間

方法

供試卵は、リュウキン2年魚(B.W.105g)に、ゴナトロピンを体重1gあたり10~20単位注射し、23~24℃に加温した水槽中に入れ、約12時間後に採卵したものである。

不活化精子は、ドジョウ精子をpH7に調整した淡水魚用リンゲル液で約100倍希釈し、直径9cmガラスシャーレに2ml入れ、75erg/mm².secで120秒間紫外線照射したものをを用いた。

媒精は水温20℃で行ない、媒精から2.5, 5.0, 7.5, 10.0分後に2.5℃、45分間の低温処理を行った。その後常温で通気、2~3回の換水により、ふ化させ、媒精11日目に、正常ふ化率(肉眼により、体形異常と認められた個体以外の尾数を供試卵数で除して求めた率)を求めた。

さらに、正常ふ化した稚魚をその後2週間飼育し、生残率(2週間後の生残尾数/供試卵数)を求めた。

また対照区として、キングヨ精子受精区(非処理区)を設け、ふ化率等を見た。

結果

媒精から処理までの経過時間とふ化率との関係を表1に示した。対照区の正常ふ化率が低く、あまり良い卵質と言えなかったが、媒精7.5分後の処理区が最も高い正常ふ化率を示した。

表1 媒精から低温処理までの経過時間とふ化率および生残率との関係

媒精から処理までの時間(分)	供試卵数	ふ化尾数*1	正常ふ化*2 尾数	正常ふ化*3 率(%)	2週間後の 生残率(%)
2.5	223	1	1	0.4	0
5.0	181	0	0	0	0
7.5	304	40	31	10.2	6.3
10.0	289	22	15	5.2	1.7
対照区	126	35	35	27.8	27.0

(品種：リュウキン，媒精水温20℃，2.5℃45分間低温処理)

- * 1 媒精後11日目に計数した尾数
- * 2 ふ化尾数から奇形尾数を除いたもの
- * 3 正常ふ化尾数÷供試卵数×100

イ. 低温処理の水溫、浸漬時間の検討

分経過後に表2に示す12通りの方法で媒精卵を処理した。

方法

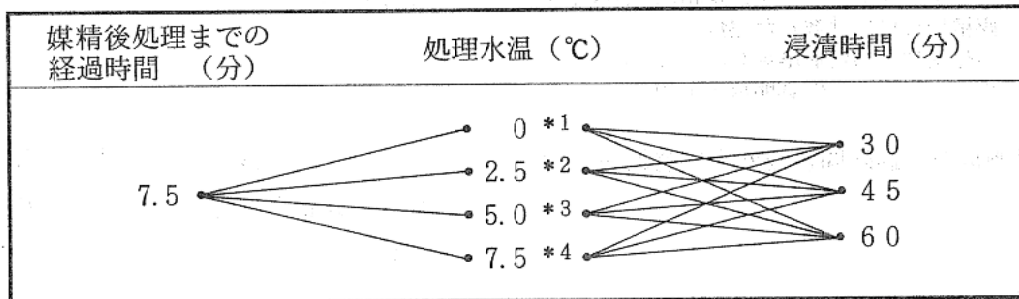
アと同様の方法で得た不活化精子を用い、供試卵は、リュウキン2年魚(B.W.135g) サンショクデメキン2年魚(B.W.155g) にゴナトロピンを体重1gあたり10~20単位を注射し、23~24℃に加温した水槽中に入れ、約11時間後に採卵したものである。

媒精は、水溫20℃で行い、媒精から7.5

結果

リュウキンでは、7.5℃の処理区を除き、全体的に高い誘起率を示し、なかでも0℃30分区が最も高い正常ふ化率(59.6%)を示した(表3)。一方、サンショクデメキンでは、同様な方法で行なったが、正常ふ化率は、低い値となった(表4)。

表2 不活化精子媒精卵の処理方法



- * 1 実測水溫は0.6~0.7℃
- * 2 実測水溫は1.6~2.5℃
- * 3 実測水溫は4.5~4.8℃
- * 4 実測水溫は6.4~7.2℃

表3 低温処理の水溫、浸漬時間とふ化率および生残率との関係

処理水溫(℃)	処理時間	供試卵数	ふ化尾数*1	正常ふ化尾数*2	正常ふ化率(%)*3	2週間後の生残率(%)
0	30	451	293	269	59.6	55.2
	45	522	285	238	45.6	40.2
	60	220	121	101	45.9	40.5
2.5	30	91	22	19	20.9	20.9
	45	148	54	42	28.4	23.6
	60	375	76	60	16.0	14.7
5.0	30	262	62	43	16.4	15.3
	45	397	168	150	37.8	32.5
	60	291	126	114	39.2	33.3
7.5	30	98	20	0	0	0
	45	143	13	1	0.7	0
	60	197	26	3	1.5	1.5
対照区	—	300	271	271	90.3	90.3

(品種：リュウキン、媒精水溫20℃、媒精から低温処理までの時間 7.5分)

- * 1 媒精10日目に計数した尾数
- * 2 ふ化尾数から奇形尾数を除いたもの
- * 3 正常ふ化尾数÷供試卵数×100

表4 低温処理の水溫、浸漬時間とふ化率および生残率との関係

処理水溫 (°C)	処理時間	供試卵数	ふ化尾数*1	正常ふ化尾数*2	正常ふ化率*3 (%)	2週間後の生残率(%)
0	30	400	9	5	1.3	1.3
	45	516	9	6	1.2	1.2
	60	141	0	0	0	0
2.5	30	241	0	0	0	0
	45	380	6	3	0.8	0.8
	60	270	8	3	1.1	1.1
5.0	30	573	1	1	0.2	0.2
	45	670	1	1	0.1	0.1
	60	513	5	2	0.4	0.4
7.5	30	1007	0	0	0	0
	45	427	0	0	0	0
	60	484	6	2	0.4	0.4
対照区	—	364	291	291	79.9	67.3

(品種：サンシヨクデメキン，媒精水溫20°C，媒精から低温処理までの時間 7.5分)

- * 1 媒精10日目に計数した尾数
- * 2 ふ化尾数から奇形尾数を除いたもの
- * 3 正常ふ化尾数÷供試卵数×100

ウ. 排卵後の経過時間と雌性発生誘起率の検討

方法

供試親魚は、クロデメキン2年魚(B.W.160g)，タンチョウ2年魚(B.W.150g)，およびサンシヨクデメキン2年魚(B.W.135g)で、ゴナトロピンを体重1gあたり10~20単位を注射し、25°Cに加温した水槽中に入れ、30分ごとに排卵の有無を調べた。排卵したものについて、直後から経時的に

搾卵し、アと同様の方法で得た不活化精子を用い、媒精7.5分後に水溫2.5°C，45分間の低温処理を行った。

結果

すべての供試親魚が、注射後7~9.5時間に排卵した。

排卵後の経過時間と雌性発生の誘起率は排卵後1時間経過まで上昇を示したが、それ以後では、さらに上昇するもの、低下するものが見られた。

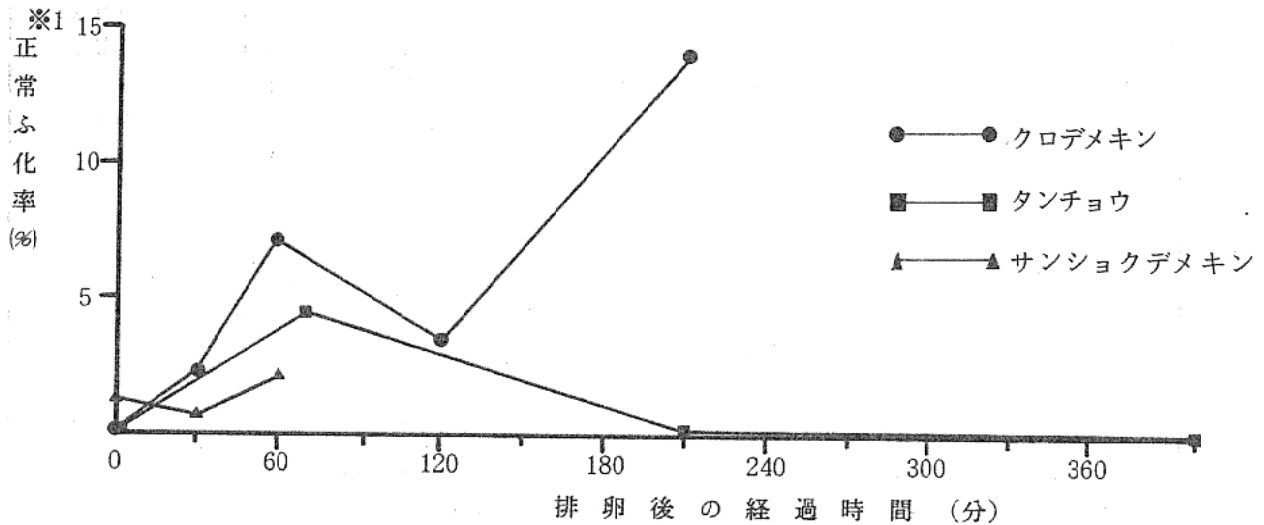


図1 雌性発生における排卵後の経過時間と正常ふ化率の関係

考察

低温処理による、極体放出阻止の雌性発生誘起の条件として、検討ア. イより媒精7.5分後に処理を開始し、処理水温は0～5℃で処理時間30～60分間が有効的と考えられ、処理水温の低いときは、浸漬時間を短く、処理水温の高いときには、処理時間を長くした方が、誘起率が高くなる傾向がうかがわれた。

しかし、検討イのサンショクデメキンの例のように同じ条件で行ったにもかかわらず、

誘起率は非常に低いこともあり、さらに検討ウの結果に見るように、排卵後の経過時間の違いによっても正常ふ化率に差が出るなど、再現性が乏しい。このように再現性の乏しい理由として、卵質の他、親の個体差、品種の違い、作業の不均一性等が考えられる。

今後、卵質、処理条件等に関する検討に加え、これら諸要因についても検討を行うことが、必要と考えられる。

雌性発生によるキンギョの育種効果

石井吉夫・宮本淳司・小寺和郎

目的

極体放出阻止による雌性発生が、キンギョの育種に有効な手段であるかを検討するため、従来から行われている同系交配と雌性発生による、子の斑紋出現率等の比較を行った。

方法

供試した親魚は、赤無地リュウキン、白無地デメキン、タンチョウの各2年魚で、一腹の卵により、雌性発生区と対照区(同系交配)を設定した。各試験区における供試親魚の詳細は、表1に示したとおりである。

雌性発生の誘起は先の報告と同様で、ドジョウ紫外線処理精子を用い、20℃媒精7.5分後に、2.5℃45分間の低温処理を行った。

各区の供試魚をほぼ同様の飼育管理で、134～171日間飼育後、斑紋の調査を行った。斑紋の調査は全数を取揚げ、赤無地魚と白無地魚の確認は肉眼で行い、いくらかでも緋盤を持つ個体については、左右側面からの写真により、およその緋盤量を求めた。タンチョウについては、眼球下水平接線より上部で、かつ、眼球と吻端の中間垂直線と鰓蓋後端垂直接線の間を頭頂部と定め、その部分の緋盤量も求めた(図1)。

表1 各試験区における供試親魚

試験区	供試親魚	
	雄	雌
赤無地リュウキン 雌性発生区 対照区	赤無地リュウキン3尾	赤無地リュウキン1尾
白無地デメキン(I) 雌性発生区 対照区(1) 対照区(2)	白無地デメキン(1)1尾 白無地デメキン(2)1尾	白無地デメキン1尾
白無地デメキン(II) 雌性発生区 対照区(1) 対照区(2)	白無地デメキン(1)1尾 白無地デメキン(2)1尾	白無地デメキン1尾
タンチョウ(I) 雌性発生区 対照区	タンチョウ3尾	タンチョウ1尾
タンチョウ(II) 雌性発生区 対照区	タンチョウ3尾	タンチョウ1尾

なお、赤無地リュウキンとは、ヒレ、眼球を除く体表すべてが赤色のリュウキン、白無地デメキンとは、眼球以外の体表すべてが白色のデメキンを指す。〔白無地デメキン(Ⅱ)の雌親魚のみは、眼球のまわりの一部に赤色の色素を有した個体を用いた。〕

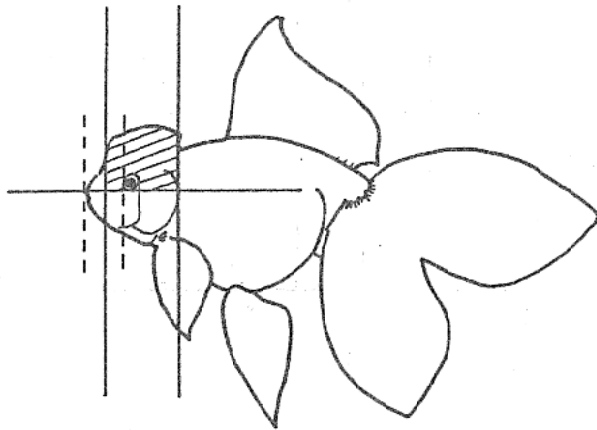


図1 タンチョウの頭頂部

結果と考察

各試験区におけるふ化率および生残率等を表2に示した。ふ化率は、いずれの試験区においても、雌性発生区の方が対照区より顕著に低く、異常魚の出現率も、雌性発生区の方が高くなっている。また、飼育期間中における生残率も、雌性発生区が劣っている。

赤無地リュウキンを親魚に用いた、雌性発生区と対照区の間取り揚げ時における体表の斑紋の違いを図2に示した。両者を比較すると、親と同じ赤無地魚の出現率は、雌性発生区が対照区の2倍以上になっている。一方、白色部を持つ魚の出現率は、逆に対照区が高くなっている。また、非褪色または一部非褪色、すなわち体表に黒色が残っている魚の出現率が、雌性発生区で顕著に高くなっている。このような非褪色性あるいは褪色の遅れる形質は、劣性遺伝子が関与することが知られており、供試した雌親魚がこの遺伝子を持っていたと考えられる。これら形質の出現は、雌性発生により、ホモ化が進んだためによると思われる。

表2 各試験区におけるふ化率および生残率

試験区	供試卵数	ふ化尾数	ふ化率(%)	正常*1 ふ化尾数	正常*2 ふ化率(%)	飼育尾数*3	取揚げ 尾数	生残率(%)	飼育日数
赤無地リュウキン 雌性発生区	3,195	1,270	39.7	1,040	32.6	1,040	751	72.2	146
対照区	300	271	90.3	271	90.3	271	210	77.5	151
白無地デメキン(Ⅰ) 雌性発生区	10,200	1,641	16.1	930	9.1	500	294	58.8	135
対照区(1)	792	724	91.4	707	89.3	500	358	71.6	143
対照区(2)	690	519	75.2	510	73.9	500	395	79.0	145
白無地デメキン(Ⅱ) 雌性発生区	11,800	60	0.5	43	0.4	43	24	55.8	149
対照区(1)	653	341	52.2	339	51.9	43	38	88.4	149
対照区(2)	530	124	23.4	119	22.5	43	30	69.8	149
タンチョウ(Ⅰ) 雌性発生区	7,500	422	5.6	366	4.9	366	243	66.4	156
対照区	414	157	37.9	154	37.2	154	143	92.9	170
タンチョウ(Ⅱ) 雌性発生区	7,400	265	3.6	236	3.2	236	169	71.6	168
対照区	413	157	38.0	155	37.5	155	125	80.6	171

*1 採卵後10~11日目に、肉眼で異常の認められない個体を計数して求めた。

*2 正常ふ化尾数/供試卵数

*3 正常ふ化魚のすべて、または無作為に淘汰して所定の尾数とした。

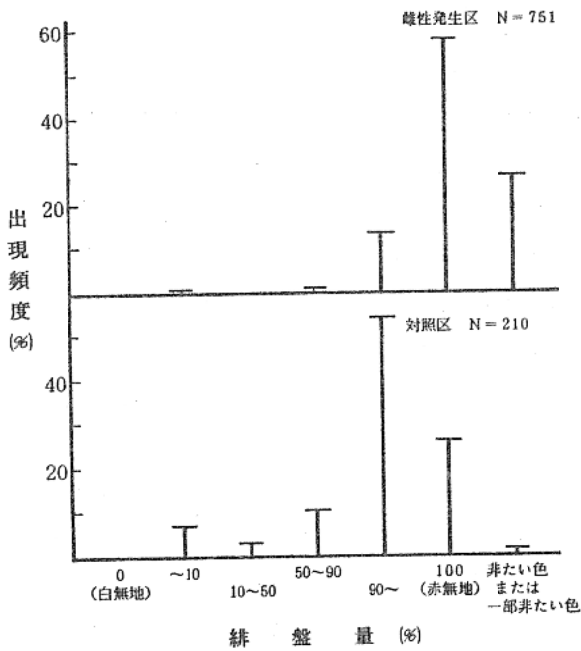


図2 赤無地リュウキンの雌性発生魚と対照魚の斑紋の違い

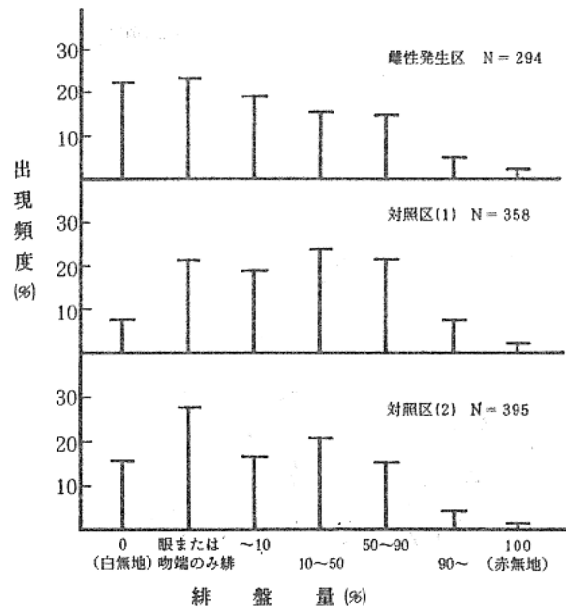


図3 白無地デメキン(I)の雌性発生魚と対照魚の斑紋の違い

白無地デメキンの場合を図3、図4に示した。図3の白無地デメキン(I)の結果では、赤無地リュウキンの結果と同様、雌性発生区で、親と同じ白無地の出現率が高く、赤色部分を持つ魚の出現率が低い傾向がみられた。また、非褪色魚はいずれの区も出現しなかった。白無地デメキン(II)の結果では、(I)とは逆に、雌性発生区で白無地の出現率が低く、赤無地魚の出現率が高くなっている。供試尾数が少ないこともあり、即断はできないが、(II)で供試した雌親魚が前述したように眼球のまわりの一部に赤色の色素を持っており、対照に用いた雄より赤色になる遺伝子を多く持っていたためと考えられる。また、非褪色および一部非褪色魚が雌性発生区にのみ出現しているのは、赤無地リュウキンの場合と同様な理由からであろう。

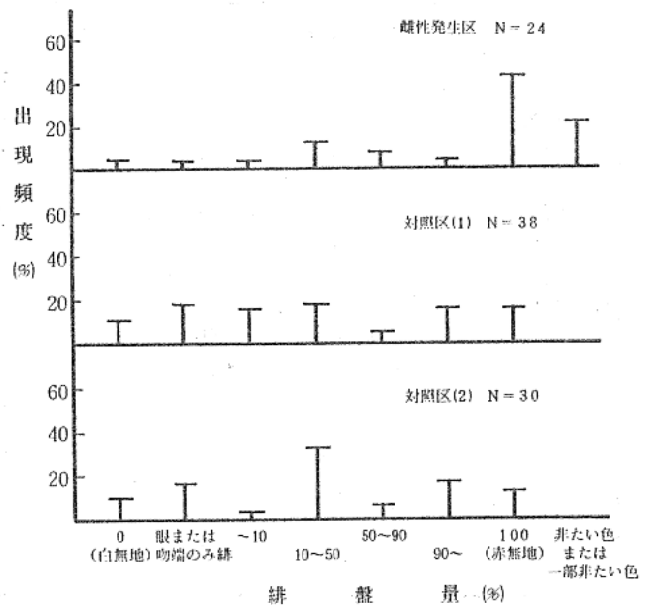


図4 白無地デメキン(II)の雌性発生魚と対照魚の斑紋の違い

タンチョウの各斑紋の出現率の違いを図5、図6に示した。タンチョウ(I)、(II)区いずれも雌性発生区の方が対照区よりタンチョウ(図中の※1)の出現率は低く、逆に白無地魚の出現率の高い傾向がみられた。これは先の二例と異なり、タンチョウという形質は、コイの紅白の場合と同様で、関与する遺伝子がヘテロになった場合に出現する可能性がある。

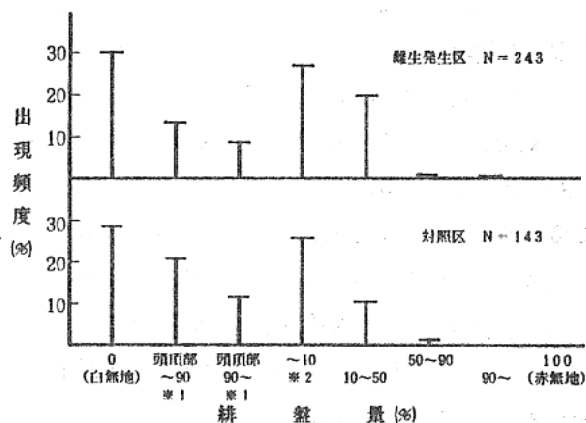


図5 タンチョウ(I)の雌性発生魚と対照魚の斑紋の違い

- ※1 頭頂部のみ緋があり、他は白
- ※2 0%および頭頂部のみ緋の個体は含まない

極体放出阻止による雌性発生では、交叉により、高率に遺伝子が組み換わる例が知られており、育種への有効性を疑問視する傾向もある。しかし、上述した結果から、今回の赤無地、白無地、非褪色性のように、形質によっては、雌性発生による育種効果が期待できる可能性も高い。ただし、表2で示したように、誘起率や生残率が低いことや、先に報告したように誘起率に再現性がないこと等、解決すべき問題も多い。

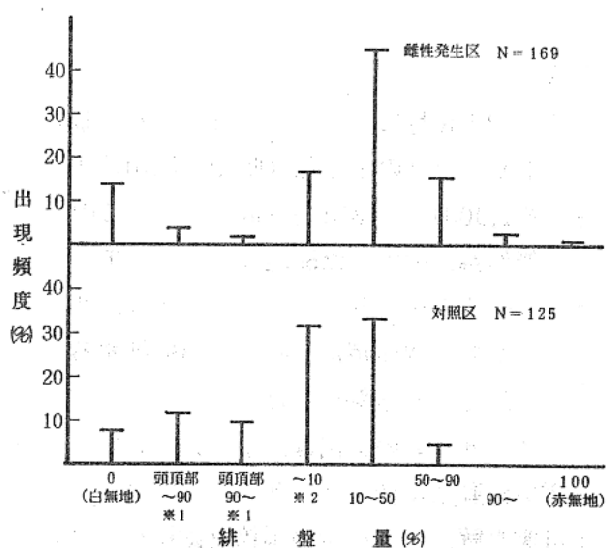


図6 タンチョウ(II)の雌性発生魚と対照魚の斑紋の違い

- ※1 頭頂部のみ緋があり、他は白
- ※2 0%および頭頂部のみ緋の個体は含まない

(4) 冷水魚増養殖技術試験

黒田湖へ放流したアマゴのアイソザイムについて

目的

黒田湖にて生息する大型のスマルトアマゴについて、その生態を調査する。今回は、放流による調査を行う際に、より多くの判断材料を得るため、放流群におけるアイソザイムの検出を試みた。

方法

昭和62年10月に、当場で飼育されているスマルト系アマゴの1年魚(昭和61年10月採卵)を、約1,000尾、黒田湖へ放流した。この際に、無作為に抽出した59尾について、アイソザイムの検出を試みた。なお、検体は、サララップで、個体毎に包み、検出に供するまで、 -30°C で凍結保存した。

アイソザイムの検出は、水平式デンブングル電気泳動法に依った。ゲルには、コンノート社製水解澱粉と市販の馬鈴薯澱粉を、7:5の比率で混ぜ合わせ、濃度は12.5%とした。電極槽の緩衝液としては、0.175M トリエタノールアミン-0.045M クエン酸、pH7.5(以下、C-TEAと略す)、アミノプロピルモルホリン-くえん酸、pH7.0¹⁾(C-APM)を用い、ゲル緩衝液には、電極槽のものを $1/16$ に希釈して用いた。泳動条件は、 $4\text{mA}/\text{cm}^2$ の定電流を4時間流した。

酵素の抽出に用いた部位は、筋肉と、肝臓で、その解凍ドリップを泳動に供した。

染色を試みた酵素は、MDH, IDH, AAT, PGM, SOD, ME, α -GPDH, SDH, EST, GPI, G6PDH, ADH であり、染色法は山階鳥類研究所で用いられているものに依った。

1) 高知大学 栽培漁業学科 水族生態学講座で使用されているもの。

服部克也

結果及び考察

検体としたアマゴの平均体長、平均体重は次の様であった。

$$\bar{BL} \pm SD = 14.2 \pm 1.3 \text{ (cm)}$$

$$\bar{BW} \pm SD = 49.4 \pm 13.4 \text{ (g)}$$

酵素と抽出部位、緩衝液の種類、変異の有無については、表1に示した。また、AAT、及びIDHに見られた泳動像を、図1に示した。

今回の試験で検出されたアイソザイムのうち、対立遺伝子に変異が認められたのは、PGMとMDHであった。(図2)ここで、仮に変異が認められた遺伝子座をpgm-4, mdh-1とする。PGM-4では、2対立遺伝子が考えられ、図2に示した様に遺伝子型を推定した。MDHについては、サケ・マス類では4倍体性遺伝をすることが知られており、mdh-1で見られた泳動像より、図2に示したごとく遺伝子型を推定した。

pgm-4, mdh-1の遺伝子型とその出現個体数は、次の様であった。

<pgm-4>	AA = 36 (尾)
	AB = 18
	BB = 5

<mdh-1>	AAAA = 39 (尾)
	AAAB = 20

これらより、pgm-4の遺伝子頻度は、 $A = 0.76$, $B = 0.24$ であり、mdh-1での遺伝子頻度は、 $A = 0.915$, $B = 0.085$ となった。

表1. 染色を試みた酵素について

酵 素	組 織	緩 衝 液	変 異
MDH	筋 肉	C-TEA	+
IDH	肝 臓	C-APM	-
AAT	肝 臓	C-APM	-
PGM	筋 肉	C-TEA	+
SOD	肝 臓	C-APM	-
ME	筋 肉	C-TEA	-
α -GPDH	肝 臓	C-APM	-
SDH	筋 肉	C-TEA	-
EST	肝 臓	C-APM	-
GPI	肝 臓	C-APM	-
G6PDH	肝 臓	C-APM	-
ADH	筋 肉	C-TEA	-

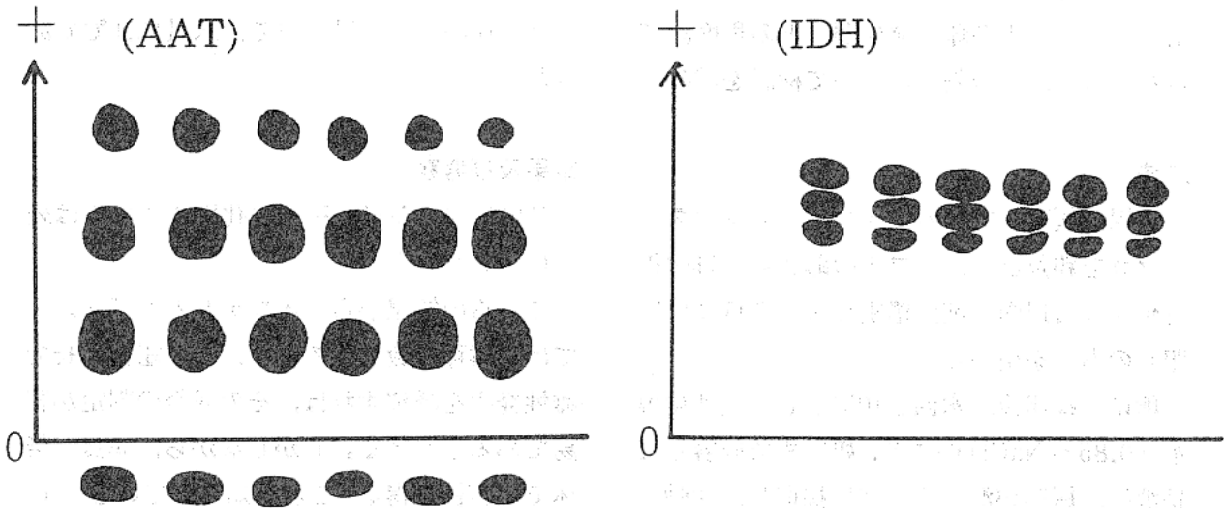


図1. AATとIDHに見られた泳動像

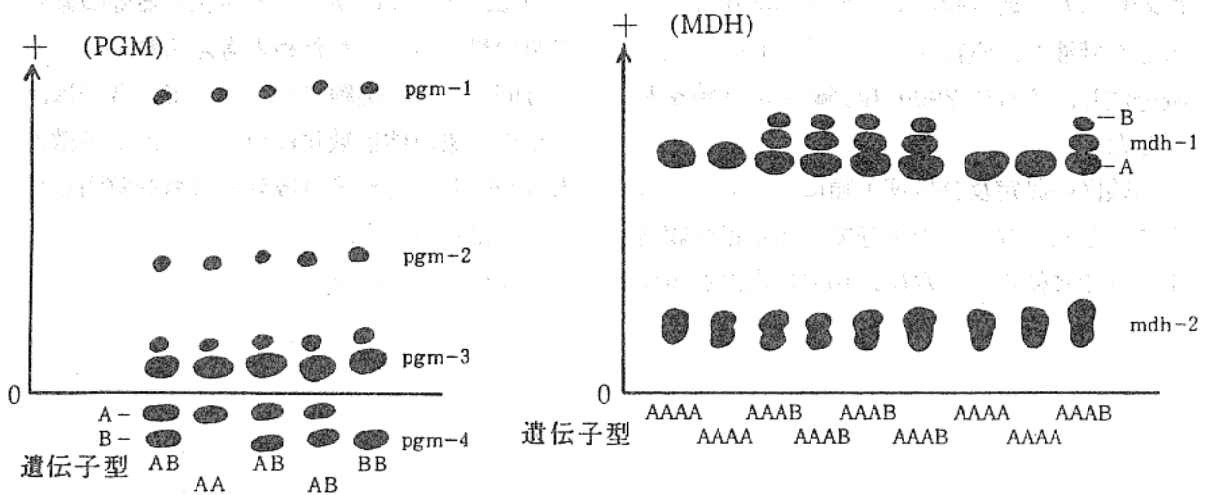


図2. PGMとMDHに見られた変質

イワナの雌性発生誘導での他魚種精子（アマゴ、ニジマス）の有効性について

服部克也・本田是人

目的

雌性発生を利用し、イワナの育種を行う時に、雌性発生が確実に成されることが必要である。その際に、精子側の遺伝子の影響が明らかになる、他魚種精子を使用することが望ましい。今回は、アマゴ、ニジマスの精子を用いて、イワナの雌性発生が、どの程度誘導されるのか、その効果について検討を試みた。

方法

当場で飼育している、イワナ、ニジマス、アマゴを親魚とし、イワナの雌親魚は排卵後日数が6日以内（前回鑑別日より6日後に採卵）のものを用いた。

卵は、採卵後、水温を10℃とした生理食塩水（0.85% NaCl）中にて、媒精まで収容した。精液は、尿等が混じらぬ様に採取し、活動性を顕微鏡下で確認し、アマゴとニジマスのものは、森沢の人工精漿（pH 7.8）にて100倍に希釈した。紫外線にての精子不活化は、希釈した精液を、直径90mmのシャーレへ、0.5 ml分注し、それに2900 erg/cm²の紫外線を照射した。

実験区の設定及び処理手順については、表1に示した。なお、吸水等でフ化水槽へ収容するまでに使用した水は、10℃に水温を調整

した。

A区、B区に使用したイワナ雌親魚の体長、体重は、次の様であった。

A区（1尾）BL=29.8cm, BW=495g

B区（1尾）BL=28.4cm, BW=440g
イワナ♂は、A、B区ともに同一個体を使用した。採卵時の室温11.6℃、水温12.1℃であった。

結果及び考察

各区における発眼率、フ化率については表2に示した。

これらの結果から、イワナ♀とニジマス♂では、雑種は致死性であり、この組合わせで雌性発生を誘導すれば、その成否の判定が容易であると言える。しかしながら、異質三倍体で生存性を得る¹⁾ことが知られているので、現在、仔魚を飼育し、観察を行っている。

また、B-ⅢがA-Ⅲよりも低い値となったのは、アマゴの精子を不活化する際の紫外線照射量が多かったためと考えられる。

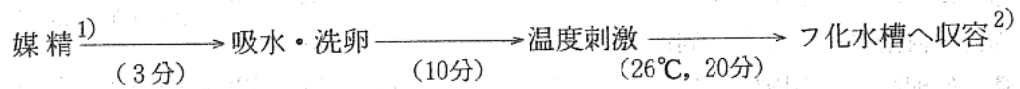
今回は、予備実験であったので、今後は、イワナの染色体倍数化について、温度刺激の水温や時間、排卵後日数等の影響を解明していかねばならない。

1) サケ♀ × イワナ♂

表1. 実験区と処理手順

実験区	A 区	B 区
I区 (対照区)	イワナ♀×イワナ♂	イワナ♀×イワナ♂
II区 (対照区)	イワナ♀×ニジマス♂	イワナ♀×アマゴ♂
III区 (雌性発生区)	イワナ♀×ニジマス♂ UV精子	イワナ♀×アマゴ♂ UV精子

<雌生発生の処理手順>



- 1) 10℃の生理食塩水中にて行った。
- 2) 刺激終了後は10℃の水へ、それからフ化水槽へ収容した。

表2. 各区における発眼率, フ化率

	発眼率 (%)	フ化率 (%)	供試卵数 (粒)
A - I	98.0	86.3	293
A - II	0	0	261
A - III	56.3	39.2	554
B - I	98.9	97.8	184
B - II	98.0	96.6	205
B - III	30.7	23.9	557

検卵 361℃, フ化仔魚検定 646℃ (いずれも積算温度)

スマルト系アマゴの染色体操作について

服部克也・本田是人

目的

アマゴにおける染色体操作の基本的処理条件を明らかにし、三倍体魚、雌性発生魚の効率的な作出を目指す。今回は、作出時の人為的な影響（処理操作の平均化）と、アイソザイムによる三倍体の確認について検討を試みた。

方法

当場で飼育されているスマルト系アマゴの1⁺魚を親魚として用いた。雌については、排卵後2日以内のものを、定期的に鑑別を行い選抜して使用した。

卵は、採卵後、10℃に水温を調整した生理食塩水(0.85% NaCl)中に、媒精まで収容した。

精液は、尿等が混じらぬ様に採取し、顕微鏡下で活動性を確認した。精液の希釈には、森沢の人工精漿 (pH 7.8) を用い、100倍に希釈した。以下、希釈精液を D-S、希釈しない精液を N-S と仮称する。

紫外線にての精子の不活化は D-S を直径90 mm のガラスシャーレに 0.5 ml 分注し、それに 3600 erg/cm² の紫外線を照射した。

実験区の設定及び処理手順については、表 1 に示した。なお、吸水・洗卵等に使用した水は、水温を10℃に調整した。

1区、2区に用いた UV 照射 D-S は、同一シャーレのものを分配して媒精した。

検卵は、積算水温が300℃前後の時に、フ化仔魚の検定は、650℃前後に行った。

供試した雌親魚及び雄親魚の組合わせと、体長・体重は次の様であった。

♀	BL(cm)	BW(g)	♂	BL(cm)	BW(g)
A	28.3	380	X	28.0	420
B	25.3	285	Y	23.2	230
C	22.0	230			
D	26.0	330	Z	27.0	330

また、採卵時の室温(R.T)、飼育水温(W.T)は次の様であった。

	R.T(℃)	W.T(℃)
A	14.6	13.5
B, C	22.0	14.6
D	19.2	13.8

アイソザイムの検出は、水平式デンブングル電気泳動法に依り、ゲル濃度 12.5% (コンノート社製加水分解澱粉：市販馬鈴薯澱粉 = 7 : 5) とした。電極槽緩衝液には、C-TEA (0.175M Triethanolamine-0.045M Citric acid, pH 7.5) を、ゲル緩衝液にはそれを 1/16 に希釈して用いた。泳動条件は、4mA/cm² の定電流を、4時間流した。酵素の染色法は、山階鳥類研究所で用いられているものに依った。

供試魚は、採卵・採精後、サランラップに包んで、-30℃にて泳動に供するまで凍結保存した。

結果及び考察

各区における発眼率、フ化率は表 2 に示した。これらの結果から、今回精子の不活化のために照射した紫外線の量が多すぎたため、精子の活力が消失し、雌性発生を誘導出来なかったと推定される。また、D-2 での成績が良くなったということもあり、今後課題

が残されている。

三倍体区では、比較的良い結果が得られ、第2極体放出阻止のための温度刺激としてはこの方法で可能と言える。また、得られた稚魚を餌付けしアイソザイムの検出が充分可能となるまで養成する予定であったが、内臓真菌症が餌付け後1週間で発生したため、その時点で取り上げ、血液塗沫標本作成後-30℃にて凍結した。

供試親魚のアイソザイムを検出したが、変異の認められたのは、筋肉におけるPGMのみであった。変異は、pgm-4と仮称する遺伝子座に存在し、供試親魚の遺伝子型は、次の様であった。

A (BB) — X (AB)
B (AB) — Y (AA)

これらの遺伝子型の組合せから、三倍体の確認が可能と思われる。A-4について泳動を行ったが、得られた泳動像は図1に示した。泳動した20個体の赤血球長径値と、泳動像より判断した遺伝子型は次の様であった。

No	赤血球長径(μ)	PGM-4の遺伝子型
1	18.5 ± 2.0	ABB
2	18.5 ± 2.0	BBB
3	18.3 ± 1.6	ABB

4	17.9 ± 1.9	ABB
5	17.5 ± 1.4	ABB
6	18.3 ± 1.7	ABB
7	17.8 ± 1.8	BBB
8	18.5 ± 1.9	ABB
9	17.8 ± 1.8	ABB
10	17.8 ± 1.8	ABB
11	18.4 ± 2.0	BBB
12	18.7 ± 2.4	BBB
13	17.8 ± 2.1	BBB
14	18.8 ± 1.5	BBB
15	18.1 ± 2.5	BBB
16	19.0 ± 2.2	ABB
17	18.7 ± 2.2	ABB
18	19.1 ± 1.7	ABB
19	18.7 ± 2.1	BBB
20	18.1 ± 1.9	BBB

なお、A-3(対照区)の赤血球長径値は、4尾計測したが、いずれも15.5 ± 1.5 μであった。よって、A-4の20尾は、赤血球長径値から推定すると、全て三倍体化されたと思われる。泳動像の一部のものも、量的比により三倍体の推定が可能と思われた。(ABBのもの)

表1. 実験区と処理手順

実験区	方法
1区(不活化確認区)	UV照射D-Sで媒精
2区(雌性発生区)	UV照射D-Sで媒精 → 温度刺激
3区(対照区)	N-Sで媒精
4区(三倍体区)	N-Sで媒精 → 温度刺激

<温度処理の手順>

媒精¹⁾ → 吸水・洗卵 → 温度刺激 → フ化槽へ収容²⁾
(3分) (10分) (28℃, 15分)

1) 10℃の生理食塩水中にて行った。

2) 刺激終了後は10℃の水へ、それからフ化槽へ収容した。

表2. 各区における発眼率, フ化率

	発眼率 (%)				フ化率 (%)				供試卵数 (粒)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1区	13.2	0	0	22.3	0	0	0	0	106	127	115	112
2区	4.3	5.3	1.7	43.3	2.7	4.0	1.3	36.8	254	227	298	261
3区	87.1	59.2	79.0	95.1	86.1	59.2	76.6	65.9	101	103	124	123
4区	61.2	57.9	/	/	54.3	56.7	/	/	219	171	/	/

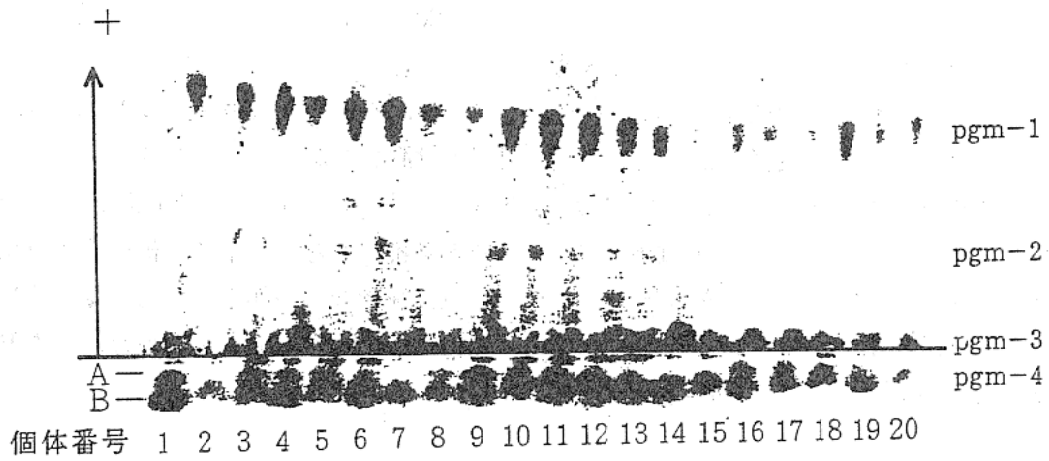


図1. A-4でみられたPGMの泳動像

ニジマスの染色体操作について

服部克也・本田是人

目的

ニジマスにおいて、全雌魚、全雌三倍体魚を、染色体操作により、効率的に作出するための処理条件を解明する。今回は、第2極体放出阻止における温度条件の解明と、排卵後経過日数と倍化率、偽雄作出について、養鱒技術協議会バイオテクノロジー連絡試験の方法に準じて、試験を行った。

方法

(A) 第2極体放出阻止における温度条件

供試魚は、当场で飼育されているニジマス（ホウライマスも含む）の1⁺魚で、雌については、排卵後2日以内のものを用いた。

卵は、採卵後、10℃に水温調整した生理食塩水中に収容し、媒精後の吸水、洗卵等も10℃に水温を調整した水で行い、温度刺激までの条件を一定とした。

精液は、尿等が混じらぬ様に採取し、顕微鏡下で活動性を確認した。媒精には、希釈しないで、そのままの精液を用いた。

温度刺激までの処理手順は、媒精後3分で吸水・洗卵、吸水後10分で温度刺激を行うというものであった。

温度刺激等の実験区については、表1に、供試魚の組合せと、体長・体重については表2に示した。

温度刺激を行った後は、10℃の水へ戻し、その後フ化水槽へ収容した。なお、採卵時の室温、水温は、Pの場合、室温11.5℃、水温10.8℃、Qの場合は、室温8.9℃、水温10.3℃であった。

検卵は、積算水温で260℃、フ化仔魚検定は、550～600℃で行った。得られた仔魚は、

倍化率算出のため、各区60尾について血液塗沫標本を作成し、赤血球長径を計測した。

(B) 排卵後経過日数と倍化率

供試雌親魚は、排卵後1日のもの3尾、排卵後3日以内のもの2尾を用いた。これらのもので、同一個体を24時間毎に3～4回採卵した。採卵時には、MS-222にて麻酔を施した。得られた卵は、対照区と温度刺激区（30℃、5分間）にほぼ2等分し、(A)と同様の前処理を施した。なお、温度刺激として、30℃、5分間を採用したのは、(A)において、卵に対する負担が大きいことが推測されたため、卵のエイジングによる影響が明確に現われると思われたためである。処理操作等は、(A)と同様であるが、精液は媒精のたびに採取した。

(C) 偽雄作出

供試雌親魚は、排卵後2日以内のものを用い、卵の前処理は、(A)と同様の方法で行った。精液は、尿が混じらぬ様に採取し、森沢の人工精漿（pH7.8）にて、100倍に希釈した。これを、直径90mmのガラスシャーレに3ml分注し、6,000erg/cm²の紫外線を照射した。雌性発生区における温度刺激は、30℃、5分間で、前処理等は(A)と同様であった。

実験区は、次の様であった。

- | | |
|-----------|-----------|
| 1区 対照区 | (希釈精液) |
| 2区 不活化確認区 | (3区と同じ精液) |
| 3区 雌性発生区 | (UV照射精液) |

この操作によって得られた雌性発生魚に、餌付け時より、17-メテルテストステロン含有の飼料（濃度0.5ppm）を、経口で8週間連続投与する。

結果

(A) 各区における発眼率，フ化率は，表3に示した。なお，倍化率については，算出中であり，割愛した。

(B) 採卵が3月下旬であったため，現在，フ化管理中である。フ化後は，各区60尾について，

血液塗沫標本を作成し，赤血球長径により，倍化率を算出する。

(C) (B)と同様，フ化管理中であるが，4月中旬より，ホルモン処理を施した飼料で，飼育を行う予定である。

表1. 実験区

	温度刺激等の条件
1 区	26℃ で 20分間
2 区	28℃ で 10分間
3 区	30℃ で 5分間
4 区	対 照 区

表2. 供試親魚の組合せと体長，体重

(♀)	BL(cm)	BW(g)	(♂)	BL(cm)	BW(g)
P	30.0	600	R	33.5	720
P	"	"	S	31.5	600
Q	33.5	680	T	29.8	560
Q	"	"	U	33.5	730

表3. 各区における発眼率，フ化率

	発 眼 率 (%)				フ 化 率 (%)				供 試 卵 数 (粒)			
	P-R	P-S	Q-T	Q-U	P-R	P-S	Q-T	Q-U	P-R	P-S	Q-T	Q-U
1区	66.3	59.8	68.3	79.5	56.4	59.3	58.5	57.1	202	194	205	219
2区	57.4	54.9	61.1	76.8	49.5	51.8	56.6	54.9	190	195	221	224
3区	30.3	53.3	42.0	65.9	15.9	52.3	36.7	50.5	208	195	226	214
4区	57.4	71.6	70.8	87.9	55.9	71.6	68.1	85.5	188	201	216	207

アマゴ、ニジマス血清の補体活性

本田 是人

目的

補体系の代替経路は、抗体の依存なしに働き、非特異的な免疫機能として生体防御に重要な役割を果している。魚類の健康度の指標として、従来より、血液性状及び血清諸成分の検討がなされているが抗病性との関連は明らかでない。そこで、ウサギ赤血球に対する反応条件に検討を加えるとともに、ニジマス、アマゴの活性値を測定し、抗病性指標の一助とした。

材料及び方法

1. 供試魚

当场飼育池の外見上健康とみられるニジマス9尾(149~256g)、アマゴ19尾(78~267g)及び水カビに罹病したアマゴ5尾(240~445g)を供した。尾柄部切断により採血し、4℃で2時間放置後、3,000rpmで10分間遠心し、血清を分離した。得られた血清は測定まで-30℃で凍結保存した。なお、採血当日は無給餌とした。

絶食による影響を調べるため、ニジマス50尾(148~249g)を用いた。10日間飽食量を給餌した後、1、4、8及び21日後に7~9尾取り上げ、同様に血清を得た。

また、ビタミン剤投与の効果を検討するためニジマス15尾(146~214g)を供した。7日間絶食後、8尾にL-アスコルビン酸を20mg/100g、対照として、0.85%NaClを腹腔内に接種した。24時間後、血清を得、測定に供した。

2. 補体活性の測定

ウサギ赤血球(RaRBC)は、pH7.5の0.01モルMg²⁺含0.01モルEGTAゼラチンペロナー

ル緩衝液(EGTA-GVB)で 2×10^8 cell/mlに調整した。

反応条件は、EGTA-GVBで希釈したニジマス血清を用い検討した。温度は2~37℃(反応時間60分)、時間については10~120分間(反応温度30℃)とした。反応終了後0.01モルEDTAゼラチンペロナル緩衝液(EDTA-GVB)を加え、3,000rpm5分間遠心後、その上清のO.D値とRaRBC100%溶血のO.D値より溶血率を求めた。

代替経路による補体活性の測定は、反応温度30℃、時間を60分間とし、RaRBC 4×10^7 cellの50%溶血血清量を1 unitとした。

結果及び考察

反応温度及び時間による溶血率を図1、2に示した。10℃から30℃まで0.9以上の溶血率を示した。しかし、32℃以上では急激に低下し、37℃では失活した。反応温度30℃での経時変化では、60分後に最高に達し、その後120分まではほぼ平行に推移した。また、血清をEDTA中で反応すると、活性は完全に阻害された。

ニジマス、アマゴの活性値を表1に示した。アマゴでは、パーで 208 ± 38 unit/ml、スモルトで 149 ± 23 unit/mlで、スモルトが低い傾向にあった。ニジマスは 186 ± 30 unit/mlであった。また、水カビ罹病アマゴでは、 16 ± 7 unit/mlと著しく低下していた。

絶食による変動を図3、表2に示した。絶食4日後に活性は75% (平均値)に低下し、以後21日まで漸減する傾向がみられた。一方、Hb量には変動はみられなかった。

ビタミンCを投与した結果、対照区の134

±23unit/ml に対し, 171 ± 28unit/mlと絶食により低下した活性が回復する傾向を示した。

今後, 病態時に至る活性の変動を調べ抗病性との関連を明らかにする必要がある。また,

ビタミン剤の免疫増強効果の判定には, その投与方法, 量を検討するとともに, 抗体産生能, 血球組成等を併せて検査する必要があると思われる。

表1. アマゴ, ニジマスの活性値

魚種	体重 (g)	体長 (cm)	肥満度	活性値 (unit/ml)
ニジマス	213 ± 32	24.6 ± 0.9	14.2 ± 1.3	193 ± 22
アマゴ (パー)	126 ± 27	20.7 ± 2.0	14.2 ± 1.7	208 ± 38
アマゴ (スモルト)	169 ± 63	23.2 ± 1.9	13.2 ± 2.1	149 ± 23
アマゴ (水カビ)	316 ± 51	28.3 ± 1.3	15.0 ± 1.5	16 ± 7

表2. 絶食による肥満度, Hbの変動

絶食日数 (日)	肥満度	Hb (mg/dl)
1	16.7 ± 2.1	6.8 ± 0.7
4	14.9 ± 0.4	7.0 ± 0.6
8	12.6 ± 1.2	6.6 ± 0.7
21	11.7 ± 1.4	6.5 ± 1.0

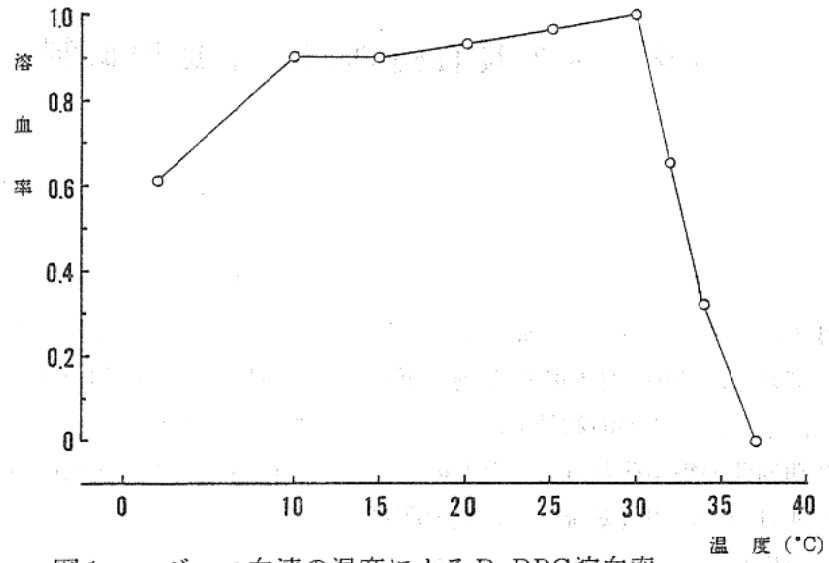


図1. ニジマス血清の温度によるRaRBC溶血率
(EGTAで40倍希釈血清 0.5 mlとRaRBC 0.2 mlを60分間反応)

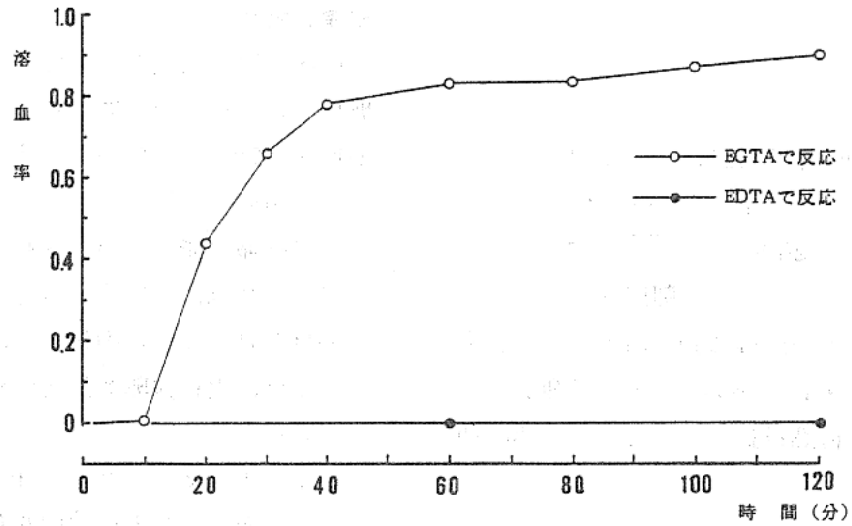


図2. ニジマス血清のRaRBC溶血経時的変動
(EGTAで60倍希釈血清を30°C反応)

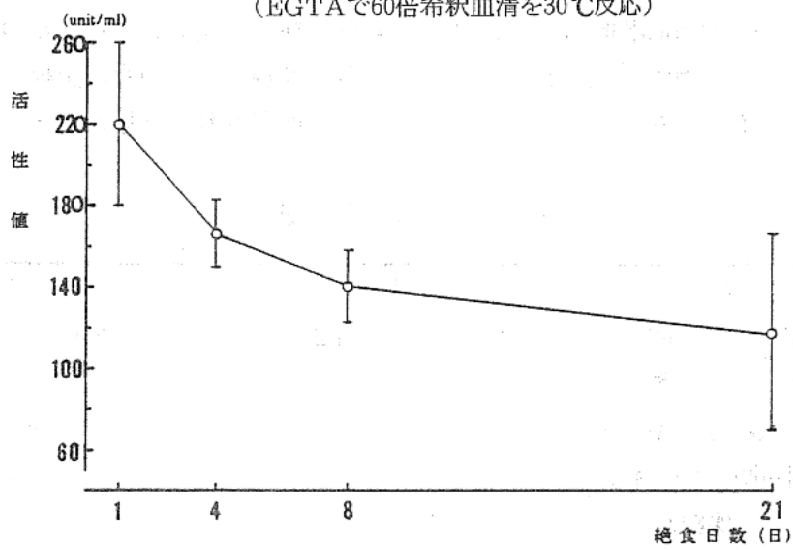


図3. 絶食による補体活性値の変動