



Title	第一卵割阻止処理によるサクラマスの子孫の四倍体誘起に伴う発生異常
Author(s)	阪尾, 寿々; 藤本, 貴史; 田中, 稔 他
Citation	日本水産学会誌, 69(5), 738-748 https://doi.org/10.2331/suisan.69.738
Issue Date	2003
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35174
Rights	本文データは学協会の許諾に基づきCiNiiから複製したものである
Type	journal article
File Information	arai-78.pdf



第一卵割阻止処理によるサクラマスの 四倍体誘起に伴う発生異常

阪尾寿々,^{1*} 藤本貴史,¹ 田中 稔,¹ 山羽悦郎,² 荒井克俊¹

(2002年11月11日受付, 2003年3月25日受理)

¹北海道大学大学院水産科学研究科育種生物学講座,

²北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所

Aberrant and arrested embryos from masu salmon eggs treated
for tetraploidization by inhibition of the first cleavage

SUZU SAKAO,^{1*} TAKAFUMI FUJIMOTO,¹ MINORU TANAKA,¹
ETSURO YAMAHA² AND KATSUTOSHI ARAI¹

¹Laboratory of Breeding Science, Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Minato, Hakodate, 041-8611, ²Nanae Fresh Water Laboratory, Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University, Sakuramachi, Nanae, Kamada, 041-1105, Japan

Although tetraploid is important for the mass production of sterile triploids by hybridizing with diploid, its survival capacity is extremely low. In this study, we aimed to identify the cause of such a high mortality of embryos treated with hydrostatic pressure shock (700 kg/cm², 7 min duration, 5-7 h after fertilization at 10°C) in masu salmon. In treated eggs, cleavage rates were delayed and aberrant cell divisions were observed during the early cleavage stage. Histological observation in the blastula stage revealed frequent occurrence of aberrant blastoderms including anuclear and/or small blastomeres. Ploidy analysis of eyed and hatching embryos revealed successful production of pure tetraploid individuals. However tetraploid survivors exhibited abnormal appearances. In the groups treated at 6.5 and 7 h, no embryonic body was observed at hatching stage. Judging from the results of each treated group, the optimum timing for the inhibition of first cleavage was 6 h after fertilization, when the eggs were cytologically staged as prometaphase to metaphase of the first cleavage. Aneuploids and mosaics were also detected in treated embryos by flow cytometry. These results suggest that abnormal cleavage and blastomeres mosaicism caused by the treatment at the first cleavage give rise to high mortality.

キーワード：サクラマス, 第一卵割阻止, 四倍体, 無核細胞, 倍数体, モザイク, 異数体

水産動物において, 染色体操作技術は, 優良形質固定, クローン作出等の育種のみならず単性・不妊集団作出等の性統御にも利用できることから, 多くの魚種で養殖の効率化を目指して技術開発と特性評価が行われてきた。¹⁻⁶⁾ 染色体操作は配偶子の遺伝的不活化と成熟分裂あるいは卵割の阻害によるゲノムセットの付加を原理とする。なかでも, 第二極体放出阻止による三倍体あるいは雌性発生二倍体は, 温度あるいは圧力処理により比較的容易に誘導されることから, 多くの成果が報告されている。¹⁻⁶⁾

一方, 第一卵割阻止によるゲノムセットの付加は, 一

般に成功率は著しく低い。しかし, この手法による完全ホモ接合雌性発生二倍体の作出は, メダカ,⁷⁾ ゼブラフィッシュ⁸⁾といった実験魚のみならず, ニジマス,⁹⁾ アマゴ,¹⁰⁾ ヒラメ,¹¹⁾ アユ,¹²⁾ コイ,¹³⁾ マダイ¹⁴⁾等の有用種においても既に達成され, 次世代における第二極体放出阻止型雌性発生の繰り返しによるクローン作出に不可欠な素材となってきた。ところが, 同様の処理でありながら, 正常受精卵から四倍体を作成することはさらに困難であり, 成体のサイズまで人為四倍体を育成した例は, ニジマス,^{15,16)} カラドジョウ¹⁷⁾等の数種に限られる。

* Tel : 81-138-40-5535. Fax : 81-138-40-5537. Email : suzu@fish.hokudai.ac.jp

第一卵割阻止処理の手法により、十分な数の四倍体が作出できない理由として、いくつかの要因が考えられてきた。細胞学的要因としては、紡錘体の再生異常,¹⁸⁾ 多極分裂,¹⁹⁾ 無核細胞の出現,¹⁸⁾ 核・細胞質比の変化,²⁾ 染色体の不分離等の異常による異数化²⁰⁻²²⁾が、そして遺伝学的要因としては、ホモ接合化による劣性有害遺伝子の発現²⁾がそれぞれ挙げられてきた。しかし、これらと生残率低下の関係は必ずしも明らかにされていない。第一卵割阻止処理を施した群の初期発生胚から稚魚の時期に確認できた四倍体が成熟期には消失し、処理群には二倍体と四倍体細胞を含むモザイク個体のみが認められること²³⁾は示唆的である。このことは、正四倍体は何らかの理由により正常な生育が困難であり、二倍体細胞を器官、組織に混在させた二倍体—四倍体モザイクがより生存しやすいことを暗示するとともに、四倍体自体の生物学的限界を示すものかもしれない。従って、四倍体の作出が困難である原因が、第一卵割阻止処理そのものにあるのか、誘起された四倍体自体の生物学的特性にあるのかについては目下明らかではない。これまで、染色体倍加処理を施した胚の細胞学的観察は、ニジマスの高温処理を用いた第二極体放出阻止型雌性発生二倍体の場合²⁴⁾に限られており、通常受精後、高水圧を用いた第一卵割阻止処理による四倍体誘起胚に関しては行われていない。

本研究では、サクラマス *Oncorhynchus masou* を材料とし、高水圧による第一卵割阻止処理により作出した四倍体候補の胚を細胞学的、形態学的に観察することにより、発生異常と細胞学的異常の間の関係を明確にするるとともに、四倍体誘起の成否に影響する原因について検討した。

材料および方法

供試魚 本研究では、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所と北海道立孵化場森支場で飼育されていたサクラマス *Oncorhynchus masou* の成熟個体より得た成熟卵および精子を実験に供した。前者の親魚より得た受精卵を A 群、後者より得られた受精卵を B 群とした。A 群では雌 11 個体と雄 3 個体、B 群では雌 6 個体と雄 3 個体に由来する卵と精子を混合して受精した。卵および精子は腹部圧搾によりそれぞれ個体ごとに採取した。卵はサケ科魚類用リングル液 (134.5 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 3.2 mM CaCl₂, 0.24 mM NaHCO₃, pH 未調整) で洗浄した後、乾導法により人工受精を行った。実験に供した受精卵は A, B 両群とも倍数化処理開始直前まで 10°C に保持した水槽内に収容した。

受精卵の高水圧処理 第一卵割阻止は、既報²⁵⁾に従い、フレンチプレス (大岳製作所, 東京) により 700

kg/cm², 7 分間の高水圧処理 (pressure shock: PS) を受精卵に施すことにより行った。媒精卵を接水させた時を受精 0 分とし、受精後 5 時間から 7 時間の間で 30 分毎に圧力処理を行った。それぞれの実験群は、PS5h, PS5.5h, PS6h, PS6.5h, PS7h と略記した。A 群の各処理群をサンプル採取用と死卵計測用に二分し、それぞれを小型のカゴに入れ 10°C の流水中で飼育した。B 群の各処理群はすべてサンプル採取用とした。

受精率 A, B 両群において、受精後 12 時間の対照胚をブアン氏液で固定し、卵膜除去後、卵割した胚数を計数した。全固定卵に対する卵割胚の割合を受精率とした。

生残率 A 群の死卵計測用サンプルから対照群と各処理群の死卵を毎日計数した。計数後、死卵は除去した。受精後 35 日目に、生残した全卵のうち未受精卵と生残胚数を計数した。これらの結果をもとに、受精から 35 日後までの生残率を算出し、生残曲線を作成した。

経時的な細胞数変化 B 群の対照胚については受精後 5 時間から 12 時間後まで、各処理群については処理直後から 12 時間後まで、それぞれ 30 分毎に約 50 個体をブアン氏液で約 24 時間固定し、その後 80% エタノールに置換した。固定卵は卵膜除去後、細胞数を確認し、適宜、次項の方法に従い、動植物極軸に垂直の切片を作成し、組織学的観察を行った。

細胞学的および組織学的観察 第一卵割阻止処理直前の細胞分裂周期を確認するため、A, B 両群について、受精後 5, 5.5, 6, 6.5, 7 時間の対照胚を各 10 個体ずつブアン氏液で固定した。また、胞胚期の内部構造を観察するため、A 群のサンプル採取用の胚を、受精後 77 時間にブアン氏液で固定した。これらの固定卵より胚盤を分離し、受精後 5 時間から 7 時間の対照胚については動植物極軸に対して垂直に、胞胚については動植物極軸に平行に切断し、それぞれ 8 μm のパラフィン切片とした。その後、ヘマトキシリン・エオシン二重染色を施し組織標本作製した。

倍数性の判定 高水圧処理の効果を調べるため、フローサイトメトリーにより胚細胞の核 DNA 量を測定し、倍数性を判定した。A 群の発眼期 (受精後 17 日目) と孵化期 (受精後 37 日目) の胚体から卵膜と卵黄を機械的に除去し試料とした。採取した胚は 1.5 ml 容のマイクロテストチューブ内で動物細胞分析用 DNA 試薬キット (High Resolution DNA Kit type T, Partec, Germany) の A 液 200 μl 中に入れ、20 分間静置した。その後、ピペットにより胚体をホモジェナイズして細胞を粉碎し、核を単離した。次に分離細胞を 50 μm のメッシュ (Cell Tricks 50 μm, Partec, Germany) で濾過し、濾液に B 液 [4-6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 染色液を含む] 1 ml を加えて 5 分間蛍光

Table 1 Cytological stages of nucleaved blastoderms developing from eggs treated with pressure shock at 5, 6 or 7 h after fertilization

Treatment timing	Time after fertilization	No. of eggs observed	1st cleavage* ¹					2nd cleavage* ¹		Multipolar division		Others * ²
			PR	PM	M	A	T	PR	PM	Tri-	Tetra-	
PS 5 h	5 : 30	6	4	1								1
	6 : 00	9	6	1	1							1
	6 : 30	7		1	1	2	1				2	
	7 : 00	13		1		9	1				2	
	7 : 30	16		1		9	2			1		3
	8 : 00	9		2		1	6					
	8 : 30	7		3		3	1					
	9 : 00	12		9			2					1
	9 : 30	19		9			6					4
	10 : 00	9		7		1						1
	10 : 30	16		13			1					2
	11 : 00	20		13	1							6
	11 : 30	15		9	1	2						3
	12 : 00	24		12	4	5					1	2
PS 6 h	6 : 30	6		1	4	1						
	7 : 00	9			5	3						1
	7 : 30	0										
	8 : 00	4			2	1						1
	8 : 30	14				5	8					1
	9 : 00	13				1	12					
	9 : 30	5					2				1	2
	10 : 00	6					2				1	3
	10 : 30	7		1			3					3
	11 : 00	4		1		1	2					
	11 : 30	1			1							
	12 : 00	3			1		2					
PS 7 h	7 : 30	8			2	5	1					
	8 : 00	7			3	1	2				1	
	8 : 30	0										
	9 : 00	26				7	18			1		
	9 : 30	25				7	17					1
	10 : 00	22				6	13					3
	10 : 30	25				17	6	1				1
	11 : 00	26				12	12					2
	11 : 30	24				11	11	2				
	12 : 00	18					4	7	2			5

*¹ PR; prophase, PM; prometaphase, M; metaphase, A; anaphase, T; telophase*² Abnormal embryos shown in Fig. 4G-J.

染色した後、フローサイトメーター（Ploidy Analyzer, Partec, Germany）による DNA 量測定に供した。対照群の二倍体胚の体細胞核の DNA 量を 100 (2C) として、相対値から処理胚の倍数性判定を行った。また、発眼期の胚体採取時に胚体の有無で胚体形成率を算出し、適宜、胚体の外部形態を実体顕微鏡（Olympus SZX-12）に装着したデジタルカメラ（Olympus Camedia c-3030）により撮影した。

結 果

受精率および生残率 A, B 両群の受精率は、それぞれ 93.9% (48/49), 100% (96/96) であった。Fig. 1 に示すように、A 群の対照胚の生残率は、受精後 10 日目まではほぼ 100% を示した。その後徐々に減少し始めたが、対照群が孵化を開始する 35 日目の生残率は 84.6% であった。一方、圧力処理群の生残率は、10 日目まではほぼ 100% を示したが、その後、急激な死亡を示した。

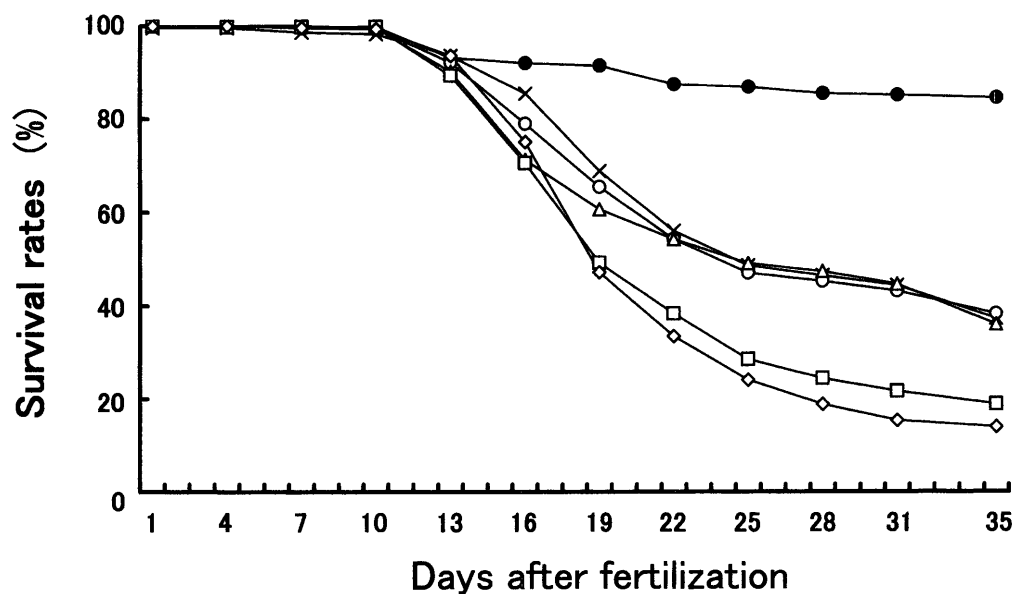


Fig. 1 Survival rates of the control and pressure-shock-treated groups.

●; Control, ×; PS5h, ○; PS5.5h, △; PS6h, □; PS6.5h, ◇; PS7h.

35日目の生残率は、PS5h, PS5.5h, PS6h群が約40% (それぞれ37.2%, 38.3%, 36.0%), PS6.5h, PS7h群では20%を下回った (それぞれ18.9%, 14.0%)。これ以降の生残率は示さなかったが、処理群には奇形胚が多く、ほとんどが孵化に至らなかった (「胚体形成率と外部形態」項を参照)。孵化できた胚も体軸の湾曲や水腫等の異常を生じ、浮上・摂餌開始以前にすべての個体が死亡した。

細胞分裂の進行 通常受精卵の細胞学的観察より、受精後5時間に雌性・雄性両前核の接合像 (Fig. 2A) と両前核が融合した前中期像 (Fig. 2B) が観察され、その後、染色体への展開 (Fig. 2C), 紡錘体の形成 (Fig. 2D) を経て、6時間より赤道面上に染色体が整列する中期像 (Fig. 2E), 6.5時間より染色体が両極に移動する後期像 (Fig. 2F), 7時間で娘核と卵割溝を形成する終期像 (Fig. 2G) が観察された。外部形態の観察では、受精後7.5時間に2細胞期, 10.5時間に4細胞期, 12時間に8細胞期の胚が確認された (Fig. 3)。

処理群の外部形態を観察したところ、各処理群において処理後約2-3時間に2細胞期の出現が認められた。しかし、受精後12時間まで、1あるいは2細胞期のステージのまま発生は停滞していた (Fig. 3)。処理胚の2細胞には、対照胚と同様に卵割面が中央に存在する胚も見られたが、やや中央からずれる胚 (Fig. 4A) や極端に偏った胚 (Fig. 4B) も見られた。PS5h群の受精後9時間の胚では、3細胞を示す異常卵割胚 (Fig. 4C) も4% (2/50) の率で見られた。このような胚を細胞学的に観察した結果、3つの中心体の方向に移動した娘核が

観察され、三極分裂が示された (Fig. 4D)。さらにPS5h, PS6h, およびPS7h群において、外部形態から1細胞期を呈する胚を観察したところ、細胞分裂は経時的に進行しているが、卵割溝が形成されずに第一卵割終期で停滞していたことが判った。三極、四極の多極分裂も見られ、PS6h群の受精後10時間の1細胞期胚において観察された四極分裂では、4つの中心体へ移動した娘核の大きさが異なっていた (Fig. 4E, F)。以上の他に、断片化した染色体が中心体と微小管の軌道上から逸脱した個体 (Fig. 4G) や中心体が存在せず染色体を包む染色体胞のみが存在した個体 (Fig. 4H), 両極への移動の過程で染色体の一部が赤道面上に取り残された個体 (Fig. 4I), 染色体が塊状化して片方の極へのみ移動した個体 (Fig. 4J) など、細胞分裂周期を分類できない異常分裂像も多く見られた (Table 1)。

胞胚の組織学的観察 受精後77時間の対照胚の胚盤は、上皮層に覆われ、大きさが均一の深層細胞に占められていた。上皮層細胞および深層細胞には、共にヘマトキシリンで濃染される均質な形態の核が認められた (Fig. 5A)。これと同様の内部構造を持つ胚盤は、処理胚においても見られた (Fig. 5B)。しかし処理群には、有核細胞と無核細胞の両者を有するモザイク胚 (Fig. 5C), 無核細胞のみからなる胚 (Fig. 5D), 構成細胞のサイズが不均一で、大型核を有する大型細胞と小型核を有する小型細胞からなるモザイク胚 (Fig. 5E), 有核細胞, 無核細胞, 大型細胞, 小型細胞の全てが混在する胚 (Fig. 5F) 等の発生異常胚が認められた。これらの異常胚の出現頻度は、53.1% (PS6h群) から71.4% (PS5h

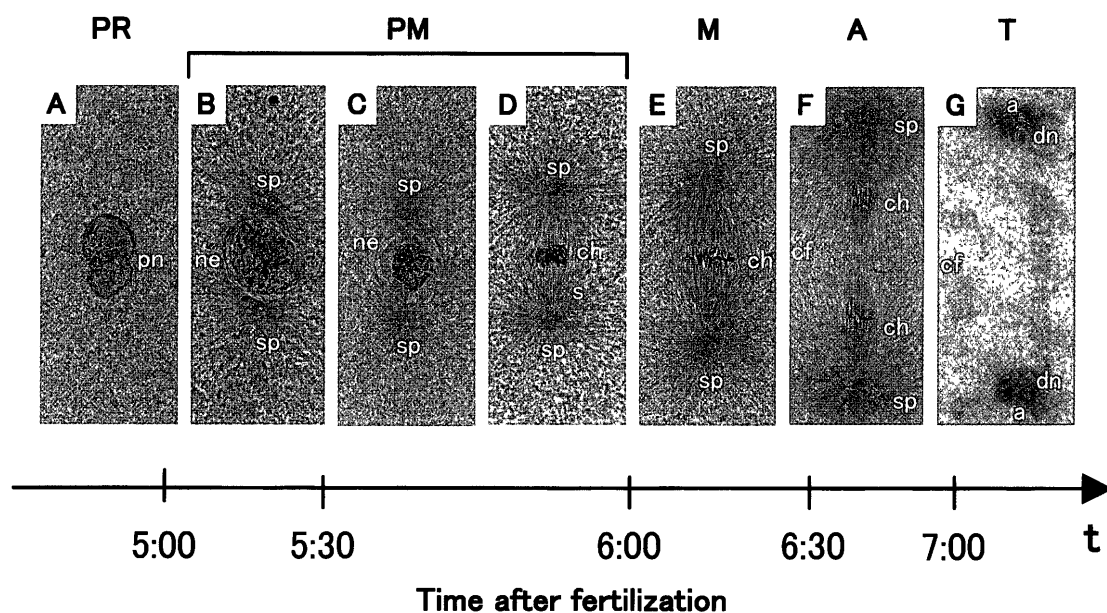


Fig. 2 First mitotic division and average initiation of cleavage in embryos of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) stored at 10°C. pn; pronuclei, sp; spindle pole, ne; nuclear envelope, s; spindle, ch; chromosome, a; aster, cf; cleavage furrow, dn; daughter nuclei.

Table 2 Frequencies of normal and abnormal blastoderms (77 h after fertilization) developed from control and pressure-shock-treated eggs at 5 to 7 h after fertilization.

Treatment	No. of eggs observed	Normal (%)	Mosaic including nucleated and anuclear blastomeres (%)	Anuclear blastula (%)	Mosaic including macromeres and micromeres (%)	Mosaic including nucleated, anuclear, macromeres and micromeres (%)
Cont.	26	24(92.3)	0	0	1(3.8)	1(3.8)
PS 5 h	28	8(28.6)	6(21.4)	8(28.6)	1(3.6)	5(17.9)
PS 5.5 h	28	9(32.1)	6(21.4)	9(32.1)	0	4(14.3)
PS 6 h	32	15(46.9)	3(9.4)	5(15.6)	3(9.4)	6(18.8)
PS 6.5 h	26	9(34.6)	7(26.9)	4(15.4)	1(3.8)	5(19.2)
PS 7 h	26	12(46.2)	4(15.4)	4(15.4)	2(7.7)	4(15.4)

群)であった (Table 2)。

胚体形成率と外部形態 対照群では、発眼期における胚体形成率は93.8%であった。孵化期対照胚の体節、心臓、血管、眼の形成は正常であった (Fig. 6A)。これに対して処理群の発眼期における胚体形成率は、PS5.5hが50.0%、PS6hが44.1%と対照群と比較して低い値を示した。特に受精後6.5h以降の処理群では、3.3%、0%と胚体が形成される率は低かった。処理胚は孵化期で形態的に正常と見られても、うっ血が見られたり (Fig. 6B)、体軸が湾曲する場合が多く (Fig. 6C)、頭部形成の不完全な胚 (Fig. 6D) も認められた。単眼 (Fig. 6E)、無眼 (Fig. 6F) が認められた異常胚では、体節、脳形成が不完全であった。

倍数性 対照群では、胚体形成をした個体の93.3%が二倍体 (Fig. 7A) で、残りは低二倍性 (1.3~1.8 n)

の異数体個体であった。孵化期では、すべての個体が二倍体であった (Table 3)。これに対して処理群の発眼期における倍数性は、目的とする四倍体 (Fig. 7B) となった個体に加えて、低四倍性 (3.2~3.8 n) (Fig. 7C) および高四倍性 (4.2~4.7 n) (Fig. 7D) の異数体個体や異なる倍数性細胞から構成されるモザイク個体 (Fig. 7E~H) が認められた。異数体では低四倍性個体が多く、モザイク個体の中では、四倍体細胞と低四倍性細胞から構成されるモザイク個体の出現率が比較的高かった。孵化期では、異数体個体とモザイク個体の出現率が低下し、四倍体の出現率が高かった (Table 3)。

考 察

今回実験に供したサクラマスは、A, B 両群において高い受精率が得られたこと、対照群の胚体形成率と正常

Table 3 Ploidy status of embryos developed from eggs with or without pressure shock (PS) treatment at eyed and hatching stage

Treatment	No. of eggs observed	Stage	Embryo-genesis (%)	Ploidy status determined by FCM (%)							
				Polyploid		Aneuploid			Mosaic		
				Diploid	Tetra-ploid	Hypo 2n ^{*3}	Hypo 4n ^{*4}	Hypo 4n ^{*5}	2n/4n	Hypo 4n/4n	Hypo 4n/Hyper 4n
Cont.	32	Eyed ^{*1}	30(93.8)	28(93.3)	0	2(6.7)	0	0	0	0	0
	—	Hatch ^{*2}	22	22(100)	0	0	0	0	0	0	0
PS 5 h	181	Eyed	30(16.0)	0	20(66.7)	0	1(3.3)	7(23.3)	0	1(3.3)	1(3.3)
	—	Hatch	9	0	9(100)	0	0	0	0	0	0
PS 5.5 h	60	Eyed	30(50.0)	0	15(50.0)	0	6(20.0)	6(20.0)	1(3.3)	1(3.3)	1(3.3)
	—	Hatch	9	0	7(77.8)	0	2(22.2)	0	0	0	0
PS 6 h	68	Eyed	30(44.1)	0	17(56.7)	0	11(36.7)	0	0	2(6.7)	0
	—	Hatch	16	0	14(87.5)	0	1(6.3)	1(6.3)	0	0	0
PS 6.5 h	304	Eyed	10(3.3)	0	2(20.0)	0	0	5(50.0)	1(10.0)	2(20.0)	0
	—	Hatch	0	—	—	—	—	—	—	—	—
PS 7 h	288	Eyed	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	Hatch	0	—	—	—	—	—	—	—	—

^{*1}; 17 days after fertilization, ^{*2}; 37 days after fertilization, ^{*3}; 1,3–1.8 n, ^{*4}; 3.2–3.8 n, ^{*5}; 4.2–4.7 n.

胚出現率が高かったことの二点から、卵と精子の質に問題はないものと考えられた。対照群がほとんど二倍体であったのに対し、受精後5時間から6時間の間の圧力処理群において、四倍体あるいは四倍体を含むモザイクが比較的高い頻度で出現したことから、第一卵割阻止の効果があったと判じられた。対照胚では、受精後5時間から6時間は第一卵割の前期から中期にあることから、この時期での処理により卵割が効果的に阻止され、四倍体が誘起されたことが示された。四倍体化のための卵割阻止の最適タイミングを、生残率、胞胚期の正常胚出現率、胚体形成率から判断すると、受精後6時間での処理が最適と考えられた。本研究では、四倍体誘起の適期は前中期から中期であることが判明した。これまで、前中期^{22,24,26)}あるいは中期^{13,27)}のいずれかが第一卵割阻止型雌性発生の適期と考えられていたが、本研究では、いずれの時期の処理においても四倍体化に有効であった。このような相違は、雌性発生半数体への第一卵割阻止処理と正常二倍体へのそれとの違いによるものか、複数個体からの配偶子をプールして実験に供したため、受精卵の間で発生速度に差が生じたためであったのかは本研究では不明であった。従って、染色体倍加に適した細胞分裂のタイミングをさらに詳細に解明するには、発生速度の同調した一腹仔に由来する卵群を材料とすることが必要と考えられた。また、今後、そのような卵群を用いることにより、処理群間で胞胚期の各異常胚の出現頻度、胚体形成率、倍数体の出現頻度に明確な差が認められる等、処理のタイミングと処理後の発生の関係について解明できる可能性があると考えられた。

処理群において、卵割を再開しない胚が多く見出され

た。1細胞期で卵割を停止する胚は、細胞質分裂に問題が生じていると考えられる。死卵が出現する前の胞胚期の時点で、観察に供した全ての胚が、対照胚とはほぼ等しい細胞数まで分裂していた。このことは、圧力処理胚が今回追跡した受精後12時間の段階で見かけ上1細胞期の状態にあるが、その後分裂を再開する可能性が高いことを示唆する。従って、このような処理後の卵割の停滞は、四倍体に起こる低生残率の原因ではないと考える。

各処理群の胞胚期胚では、25%~50%強が、無核あるいは有核・無核モザイク胚であった。無核細胞を含むこれらの胚は、核からの遺伝子発現がないため、mRNA合成やタンパク質合成ができずに死亡するものと考えられる。従って、このような無核胚の出現は、低生残率の原因の一つと考えられる。処理後の卵割において観察された、中心体と微小管の軌道上にない断片化した染色体像および全染色体が塊状化して片方の中心体へと移動する第一卵割後期像は、それぞれ無核胚、有核・無核モザイク胚の出現に繋がる異常分裂と考えられる。また、低率ではあるが大型核を有する大型細胞と小型核を有する小型細胞のモザイク胚が処理群に見られたことは、胚の外部形態で卵割面が中央から逸脱した2細胞期胚の大型細胞と小型細胞が、その後それぞれの細胞において分裂が進行したためと考えられる。また、γ線照射により遺伝的不活化した卵と精子による受精や受精卵への除核処理により人為的に作出した無核胚の場合、胚発生は胞胚期で停止することが知られているが、^{28,29)} 大細胞・小細胞モザイク胚には無核細胞が存在しないことから胞胚期以降の形態形成運動は進行し、倍数性モザイク胚に繋がると考えられる。従って本研究においては、

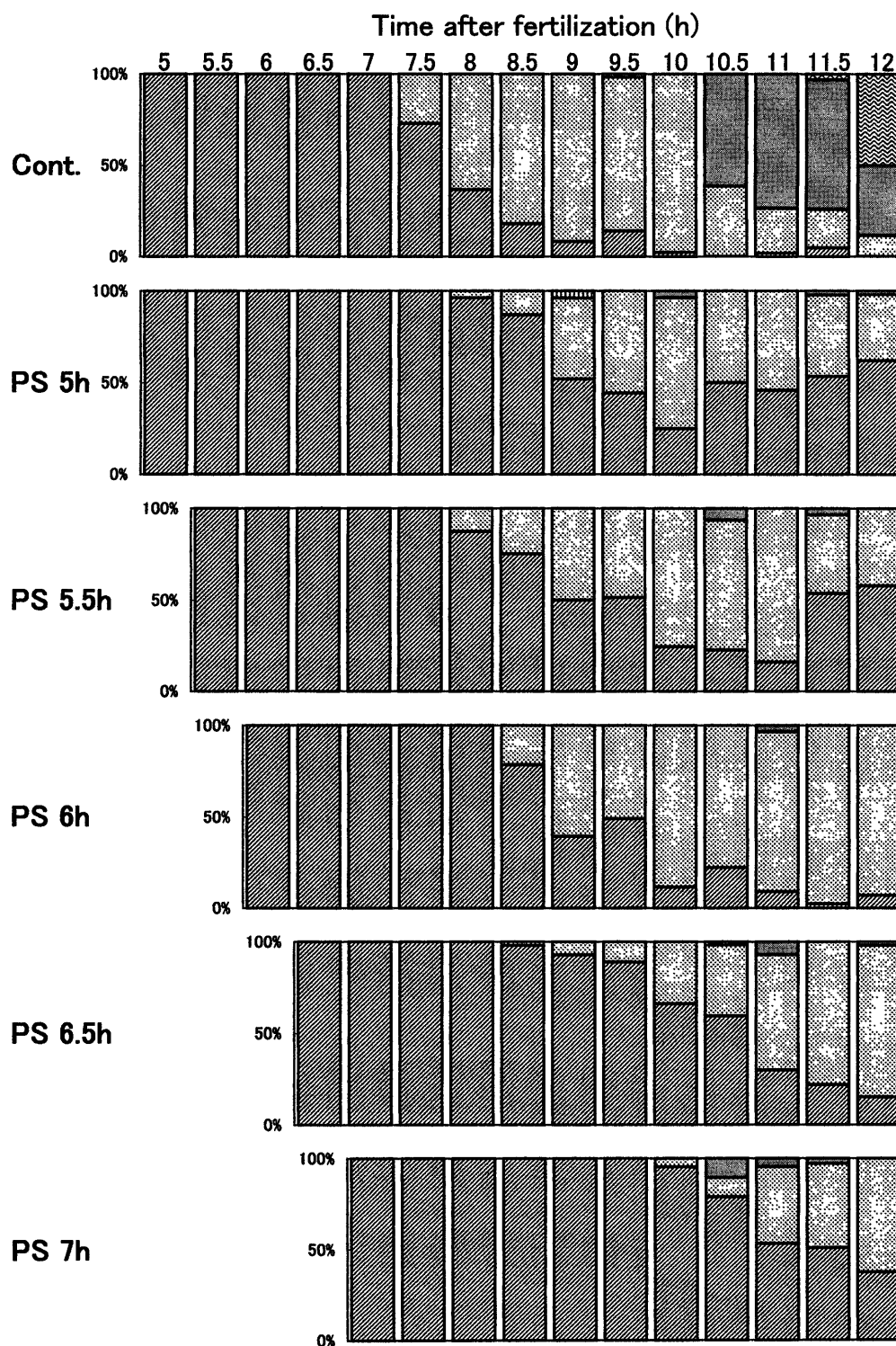


Fig. 3 Embryonic stages observed in control group 5 h to 12 h after fertilization and pressure-shock-treated groups just after pressure shock to 12 h after fertilization.

■; 1 cell, □; 2 cell, ▨; 3 cell, ▩; 4 cell, ▤; 8 cell.

これらの胚が明確な死亡の原因が否かは判断できない。今後は処理直後の細胞分裂に関して、長期に亘る細胞学的観察が必要であると思われる。

外部形態では、単眼胚や頭部欠損胚が多く見られた。キンギョでは、第二極体放出阻止処理卵に、多くの背腹軸形成異常胚が出現することが報告されている。³⁰⁾ この

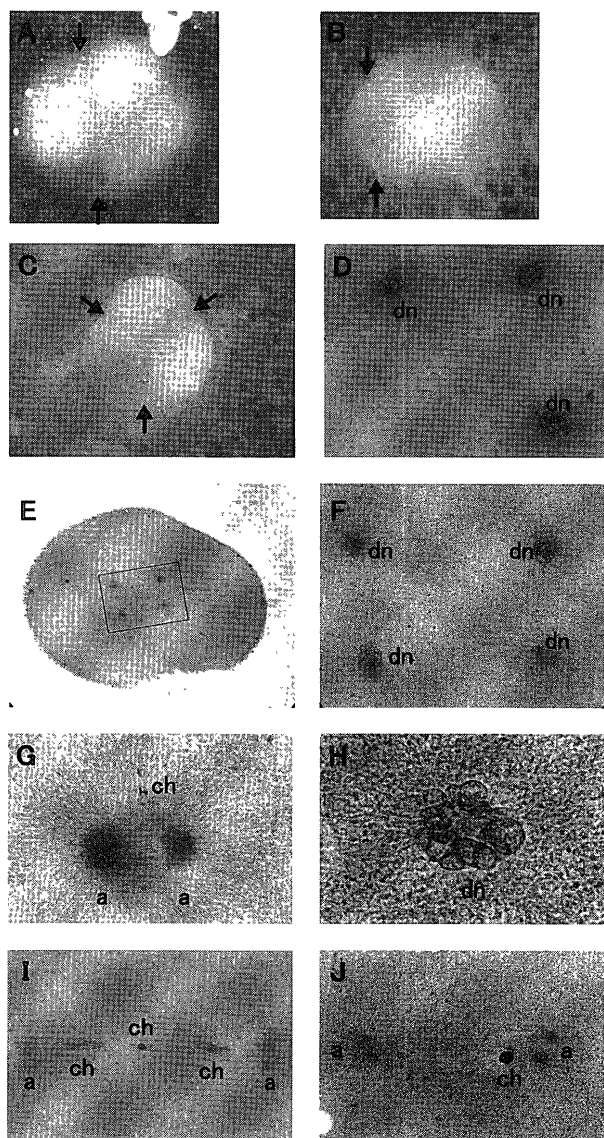


Fig. 4 Abnormal division observed in pressure-shock-treated eggs.

A, B; 2 cell stage at which cleavage furrow was a little (A) or extremely (B) shifted from the center of blastoderm respectively, C; 3 cell stage, D; Cytological observation of C, E; Tetrapolar division observed in 1 cell embryo (PS6h, 10 h after fertilization), F; Higher magnification of rectangle in E, G; Embryo observed two asters and chromosome fragment exists out of the orbit of microtubule, H; Embryo observed only daughter nucleus, I; Embryo observed chromosome lagging, J; Embryo observed chromosome nondisjunction. Arrows indicate cleavage furrow, dn; daughter nucleus, ch; chromosome, a, aster.

ような奇形は、圧力処理により、分裂装置のみならず、卵内の細胞骨格を形成する微小管が破壊された結果、植物極に位置していた背側決定因子が背側に移動しなくなるためと考えられている。³¹⁾ サクラマスの卵における背側決定の機構は明らかでないが、第一卵割阻止処理が、

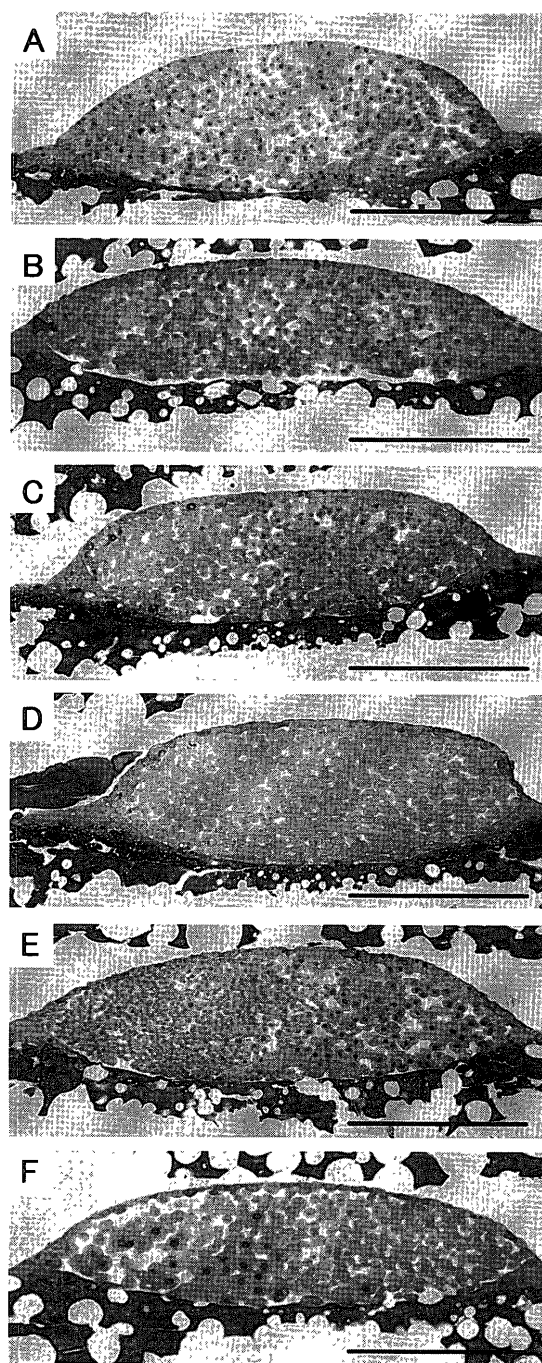


Fig. 5 Photomicrographs of control and pressure-shock-treated embryos at blastula stage (77 h after fertilization).

A; Control, B-F; Pressure-shock-treated embryos. B; Normal, C; Mosaic including nucleated and anuclear blastomeres, D; Anuclear blastula, E; Mosaic including macromeres and micromeres, F; Mosaic including nucleated, anuclear, macromeres and micromeres. Scale bars indicate 1 mm.

この機構を阻害したことが予想される。

外部形態と倍数性との関係については確認していないが、本研究において多くの倍数性モザイクおよび異数体

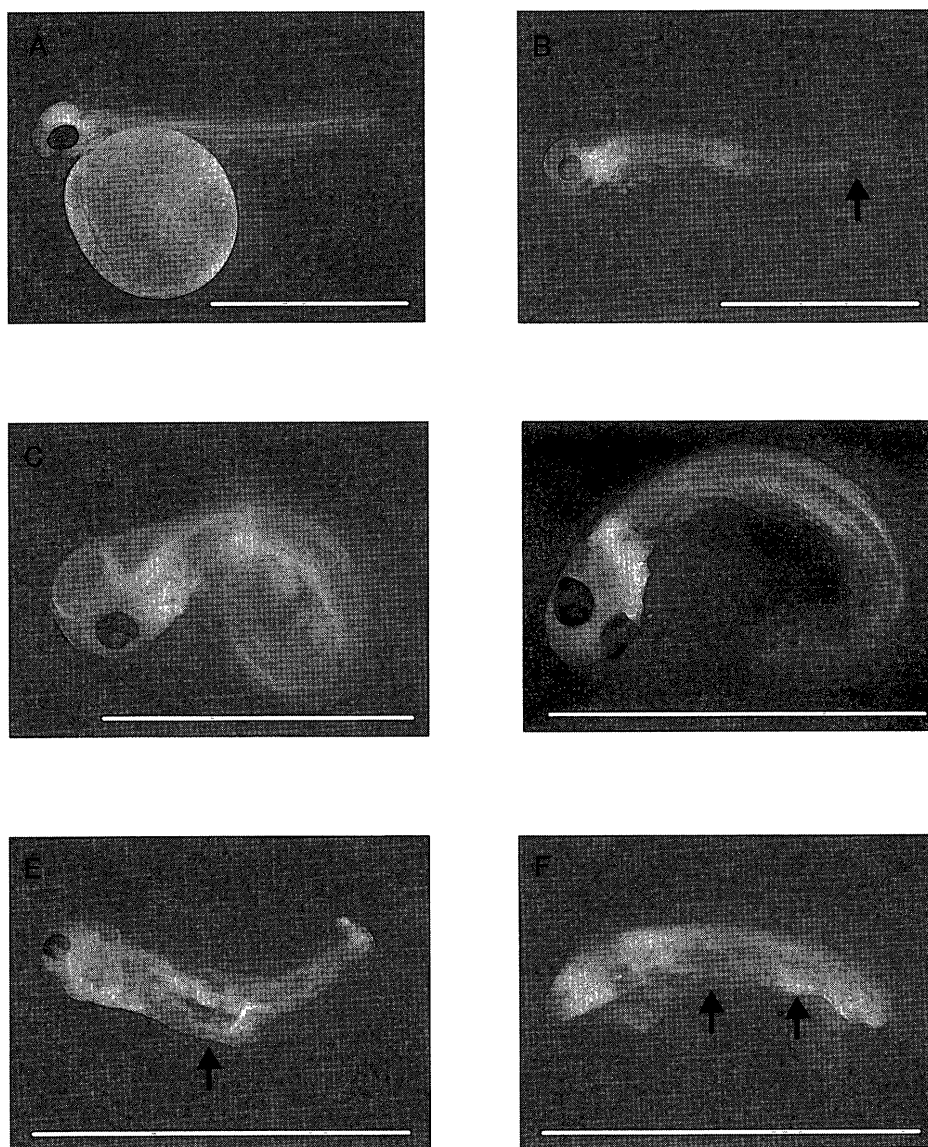


Fig. 6 External appearances of hatching stage embryos from pressure shock treatment (37 days after fertilization).

A; Normal diploid embryo, B-F; Pressure-shock-treated embryos. B; Congestion of blood, C; Body flexure, D; Cephalic defect, E; Cyclops, F; Truncated head. The chorion and the yolk sac were removed to observe the details of morphology. Arrows indicate congestion of blood. Scale bars indicate 5 mm.

の出現が認められた。発眼期におけるこれら異数体およびモザイク胚の出現は、非常に高率であるにもかかわらず、孵化期ではほとんど確認できなかった。従ってこのような異数体やモザイク胚は、これまでの報告²⁰⁻²²⁾と同様、細胞分裂に起因した発生異常のため、孵化前に死亡するものと考えられる。山木ら²³⁾は、第一卵割阻止処理群において、稚魚期に確認した四倍体が成熟期には消滅し、二倍体と四倍体細胞を含むモザイク個体のみが生残したことを報告した。このことから、最終的に初期死亡を越えて生残した個体は四倍体細胞を持つモザイクであり、一度誘起された四倍体細胞がその後のモザイク化により生残する可能性があることを示している。

本研究では、四倍性を確認した個体は浮上前に全て死亡したが、他の魚種ではこれまでに四倍体成魚が確認されていることから¹⁵⁻¹⁷⁾四倍体自体が半数体と同様に、本質的に致死性であるとは考えづらい。従って、魚類の四倍体の作出は、技術的に不可能な試みではないと思われるので、四倍体が極端に低い生残率を示す原因を追究することが今後の技術改善のため必要とされる。さらに、本研究において、発眼期および孵化期の倍数性判定により四倍体、異数体、モザイク個体が確認され、今後倍数性と外部形態の関係についての詳細な研究が必要であることが示された。

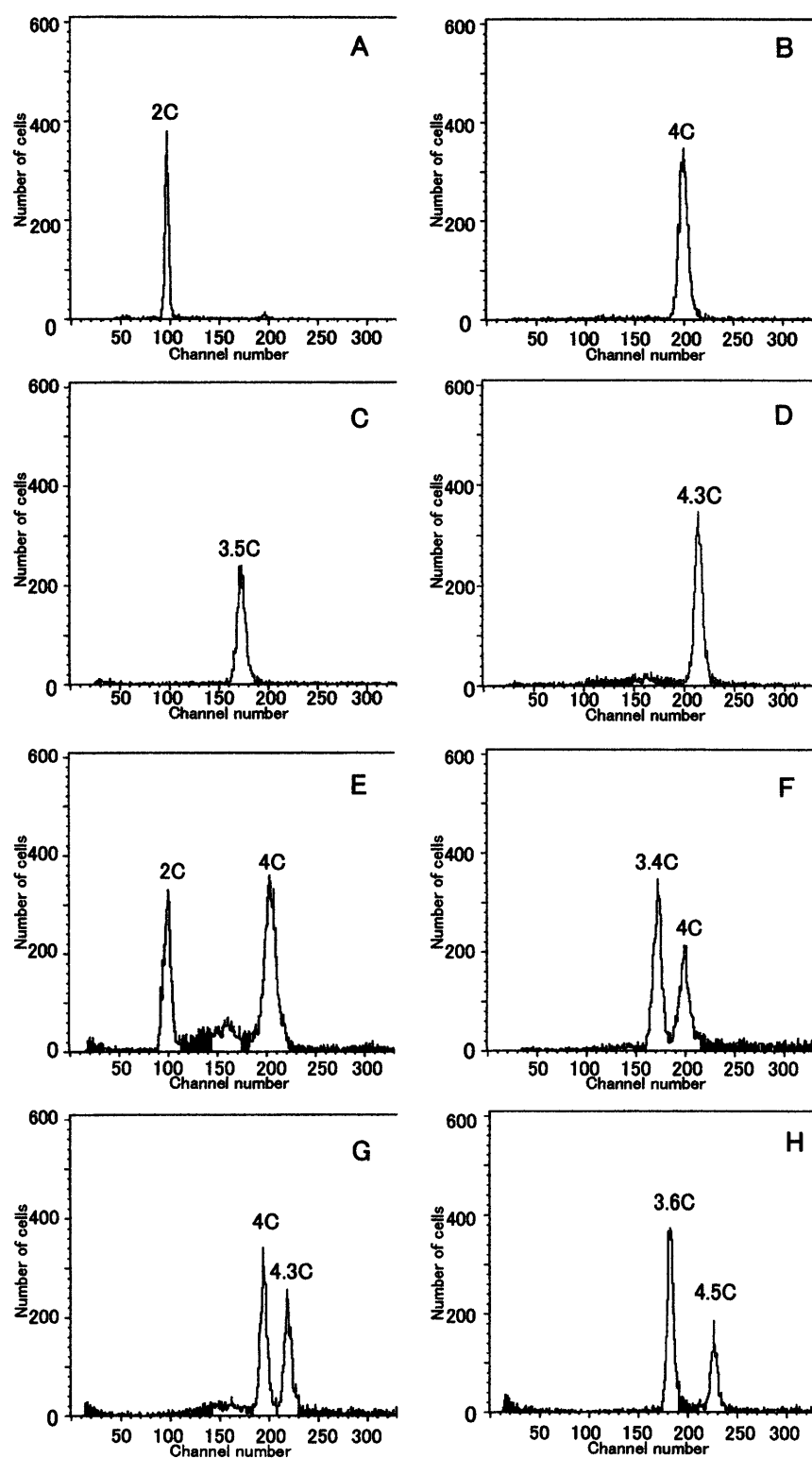


Fig. 7 Flow cytometric histograms for DNA content of eyed or hatched embryos.

A; Normal diploid embryo with 2C DNA content, B-H; Embryos treated with hydrostatic pressure. B; Tetraploid embryo with 4C DNA content, C; Hypotetraploid embryo with 3.5C DNA content, D; Hypertetraploid embryo with 4.3C DNA content, E; diploid/tetraploid mosaic embryo with both 2C and 4C DNA contents, F; Hypotetraploid/tetraploid mosaic embryo with both 3.4C and 4C DNA contents, G; Tetraploid and hypertetraploid mosaic embryos with both 4C and 4.3C DNA contents, H; Hypotetraploid/Hypertetraploid mosaic embryos with both 3.6C and 4.5C DNA contents.

謝 辞

本研究を進めるにあたり, サクラマスの方譲を快く承諾いただいた北海道立水産孵化場にお礼申し上げます。また, 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所の木村志津雄技官, 事務員の西田千賀子氏および大学院生に記して感謝の意を表します。本研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 (B) (2) (課題番号: 13460079) ならびに秋山記念生命科学振興財団の助成に拠った。

引用文献

- 1) 荒井克俊. 染色体操作「魚類のDNA」(青木 宙他編) 恒星社厚生閣, 東京. 1997; 32-62.
- 2) Pandian TJ, Koteeswaran R. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 1998; **384**: 167-243.
- 3) Pandian TJ, Venugopal T, Koteeswaran R. Problems and prospects of hormone, chromosome and gene manipulations in fish. *Curr. Sci.* 1999; **76**: 369-386.
- 4) Arai K. Chromosome manipulation in aquaculture: recent progress and perspective. *Suisanzoshoku* 2000; **48**: 295-303.
- 5) Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 2001; **197**: 205-228.
- 6) Felip A, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 2001; **111**: 175-195.
- 7) Naruse K, Ijiri K, Shima A, Egami N. The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* 1985; **236**: 335-341.
- 8) Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauffer D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 1981; **291**: 293-296.
- 9) Quillet E, Garcia P, Guyomard R. Analysis of the production of all homozygous lines of rainbow trout by gynogenesis. *J. Exp. Zool.* 1991; **257**: 367-374.
- 10) Kobayashi T, Ide A, Hiasa T, Fushiki S, Ueno K. Production of cloned Amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*. *Fish. Sci.* 1994; **60**: 275-281.
- 11) Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hiraime, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* 1999; **173**: 235-246.
- 12) Han HS, Taniguchi N, Tsujimura A. Production of clonal ayu by chromosome manipulation and conformation by isozyme marker and tissue grafting. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 832-835.
- 13) Komen J, Bongers AB, Richter CJJ, Van Muiswinkel WB, Huisman EA. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) II. The production of homozygous clones and F₁ hybrids. *Aquaculture* 1991; **92**: 127-142.
- 14) Kato K, Hayashi R, Yuasa D, Yamamoto S, Miyashita S, Murata O, Kumai H. Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation. *Aquaculture* 2002; **207**: 19-27.
- 15) Chourrout D, Chevassus B, Kreig F, Happe A, Burger G, Renard P. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid female-Potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.* 1986; **72**: 193-206.
- 16) Chourrout D, Nakayama I. Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout. *Theor. Appl. Genet.* 1987; **74**: 687-692.
- 17) Nam YK, Choi GC, Park DJ, Kim DS. Survival and growth of induced tetraploid mud loach. *Aquaculture International* 2001; **9**: 61-71.
- 18) 小野里坦. サケ科魚類のクローン作出とその問題点. 養殖研ニュース 1991; **21**: 9-16.
- 19) 上野紘一. 同質倍数体「水産増養殖と染色体操作」(鈴木亮編) 恒星社厚生閣, 東京. 1989; 70-81.
- 20) Diter A, Quillet E, Chourrout D. Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *J. Fish Biol.* 1993; **42**: 777-786.
- 21) Yamazaki F, Goodier J. Cytogenetic effects of hydrostatic pressure treatment to suppress the first cleavage of salmon embryos. *Aquaculture* 1993; **110**: 51-59.
- 22) Kobayashi T. Survival and cytological observations on early development of normal, hybrid, and gynogenetic embryos of amago salmon. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 33-36.
- 23) 山木 勝, 佐藤治平, 谷裏 興, 荒井克俊. 二倍体一四倍体モザイクアマゴの子孫. 日水試 1999; **65**: 1084-1089.
- 24) 小林 徹. 染色体操作を施したニジマス初期胚の核の行動における細胞学的観察. 日水試 1998; **64**: 782-791.
- 25) Onozato H. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture* 1984; **43**: 91-97.
- 26) 名古屋博之, 木本 巧, 小野里坦. 第2または第3卵割阻止による雌性発生キンギョ, *Carassius auratus*, の作出. 養殖研報 1990; **18**: 1-6.
- 27) Purdom CE, Thompson D, Lou YD. Genetic engineering in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, by the suppression of meiotic and mitotic metaphase. *J. Fish Biol.* 1985; **27**: 73-79.
- 28) Aoyagi K, Kojima Y, Saneyoshi M. Developmental capacity of non-nucleated embryos of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, induced by γ -irradiation. *Can. J. Zool.* 1993; **71**: 185-188.
- 29) Suzuki M, Yamaha E, Yamazaki F. Enucleation of visualized from dechorionated fertilized eggs in goldfish. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 474-475.
- 30) Yamaha E, Otani S, Minami A, Arai K. Dorso-ventral axis perturbation in goldfish embryos caused by heat- and pressure-shock treatments for chromosome manipulation. *Fish. Sci.* 2002; **68**: 313-319.
- 31) Mizuno T, Yamaha E, Yamazaki F. Localized axis determinant in the early cleavage embryo of the goldfish, *Carassius auratus*. *Dev. Genes. Evol.* 1997; **206**: 389-396.

日本水産学会誌掲載報文要旨

鹿児島湾産アカカマススの年齢、成長および年級群組成

増田育司，酒匂貴文，松下 剛，白石哲朗，
切通淳一郎，神村祐司，小澤貴和（鹿大水）

鹿児島湾産アカカマス 1631 尾の耳石横断薄層切片をもとに、本種の年齢と成長を検討した結果、縁辺成長率の経月変化および優勢ないし劣勢年級群の経年出現状況から、用いた耳石輪紋（不透明帯内縁）は年輪であることが立証された。6 月 1 日を誕生日と仮定して、輪紋数に応じて個体毎に年齢を割り振り、Bertalanffy の成長式を当てはめた結果、雄は $L_t = 304.6\{1 - \exp[-0.433(t + 3.385)]\}$ ，雌は $L_t = 337.5\{1 - \exp[-0.421(t + 2.972)]\}$ で表された。両式は有意に異なり、いずれの年齢においても雌は雄より大きい体サイズを示した。最高年齢は雄で 11 歳、雌で 8 歳であった。

日水誌，**69**(5)，709-716 (2003)

同一環境下で継代飼育されたアユ *Plecoglossus altivelis* 3 品種間における温度適応力の差異

岡部正也（高知内水漁セ），関 伸吾（高知大農），
西山 勝（高知宿毛漁指），桑原秀俊（高知水試），
佐伯 昭（高知内水漁セ），山岡耕作（高知大農）

由来の異なるアユ 3 品種 205～220 日齢魚を用い、異なる馴致温度に対する耐性温度を指標として温度適応力を比較した。耐性温度には品種間で明らかな差異が認められ、15～23℃に馴致した場合の臨界最高・最低温度の平均値は、海系 29.7～32.2℃，2.5～6.0℃，琵琶湖系 28.7～31.7℃，2.3～5.3℃，瀬戸川産人工陸封型 29.7～33.0℃，1.7～5.0℃ および初期致死温度から算出した温度耐忍領域は海系 481℃²，琵琶湖系 415℃²，瀬戸川産人工陸封型 517℃² となった。これら 3 品種は、孵化後同一環境下で飼育してきたことから、アユの温度適応力には品種差が存在することが示唆された。

日水誌，**69**(5)，717-725 (2003)

日本産アイナメ科魚類 7 種の mtDNA の PCR-RFLP 分析による種判別

柳本 卓（北水研）

日本周辺に分布するアイナメ科 7 種（アイナメ，クジメ，スジアイナメ，ウサギアイナメ，エゾアイナメ，ホッケ，及びキタノホッケ）の PCR-RFLP 分析による種判別法を検討した。成魚筋肉から DNA を抽出し、PCR 法にてミトコンドリア DNA の 12S rRNA-16Sr RNA コード領域を増幅して塩基配列分析を行った。7 種を判別できる制限酵素を検索し、PCR 産物を制限酵素消化し電気泳動を行った。*DdeI*，*DpnII*，*MspI* の 3 種類の酵素の切断型から得られたハプロタイプの違いから、7 魚種を遺伝子レベルで判別できることが示唆された。

日水誌，**69**(5)，726-732 (2003)

実験水槽におけるブルーギルによるモツゴの捕食

片野 修，中村智幸，山本祥一郎（中央水研）

水槽内でブルーギルに捕食されるモツゴの個体数および最大体長を調べた。初期標準体長が 2.5～7.9 cm の生きたモツゴ 15 個体と、標準体長 5.7～14.3 cm のブルーギル 1 個体を水槽に収容し、ブルーギルによるモツゴの捕食を 10 日間調べた。体長 5.7 cm の 1 個体を除くすべてのブルーギルがモツゴを捕食した。ブルーギルに捕食されたモツゴの最大体長および総重量はブルーギルの体長と相関し、1 個体のブルーギルは最大で 1 日あたり 5.8 g（ブルーギルの体重の 5.6%）のモツゴを捕食した。

日水誌，**69**(5)，733-737 (2003)

第一卵割阻止処理によるサクラマスの四倍体誘起に伴う発生異常

阪尾寿々，藤本貴史，田中 稔（北大院水），
山羽悦郎（北大フィールド科セ），荒井克俊（北大院水）

染色体操作において第一卵割阻止処理胚の生残率は極端に低いことが知られている。本研究では四倍体誘起個体が死亡する原因を細胞学的に解明することを目的とした。通常受精後 10℃の水温条件下で培養し、第一卵割を阻止する目的で受精後 5 時間から 7 時間に、700 kg/cm²，7 分間の圧力処理を施した。処理胚では、初期卵割期に分裂異常、胞胚期に無核細胞、発眼期に異数体およびモザイク個体の出現が認められた。これらの異常胚出現が四倍体誘起胚の生残率を低下させる原因であると考えられた。

日水誌，**69**(5)，728-748 (2003)

琵琶湖アユ沖すくい網漁業の漁船規模に階層性を考慮した場合の漁業管理に関する理論的研究

劉 穎，桜本和美，北原 武，鈴木直樹（東水大）

琵琶湖のアユ沖すくい網漁業を例とし、漁船規模に関し、馬力数の低い方から順に階層 1，階層 2 および階層 3 の 3 階層が存在する場合の漁業管理問題を理論的に検討し、純利益を非協力動的ゲーム問題の解として求めた。シミュレーションにより上記解の挙動を調べた結果、①初期資源尾数が低いときは階層 1 の純利益が多く、初期資源尾数の増加に伴いより高い階層の純利益が増加する、②推定された 10 年間の初期資源尾数に対する総純利益は階層 2 が最も多い、③階層 3 の漁業者数が増加するにしたがい、全体の純利益は減少する、等がわかった。

日水誌，**69**(5)，749-756 (2003)

人工種苗生産ブリ仔稚魚におけるタウリン含量の変化および天然稚魚との比較

松成宏之，竹内俊郎（東水大），村田裕子（中央水研），
高橋 誠，石橋矩久（日裁協），
中田 久，荒川敏久（長崎水試）

異なる餌料系列を用いた種苗生産過程におけるブリ仔稚魚お