

## 8. 絶滅に瀕したミヤコタナゴの保存 および増殖に関する研究（その1）

I. 調査研究の目的

II. ミヤコタナゴの保存のための細胞遺伝学的性質の解明

1. 染色体標本作製法
2. 分染法による分析
3. タナゴ類の核型

III. ミヤコタナゴの保存および増殖法の開発

1. 人工受精
2. 受精後の卵体変化
3. 精子の凍結保存
4. 雄性発生による保存

IV. むすび

謝 辞

文 献

宇都宮大学教育学部教授 小林仁道

宇都宮大学教育学部助手 上田高嘉



## I. 調査研究の目的

ミヤコタナゴは、昭和49年より天然記念物として国指定されている絶滅に瀕した魚種の一つである。人間は遠い昔より小動物を労る心を持ち続けてきた。絶滅に瀕した種に対して持つ人間の哀れむ気持ちには計り知れないものがある。ミヤコタナゴの保存および増殖への努力は、広く河川美化の重要性の認識に大きな効果があるものと考える。ミヤコタナゴの諸性質には不明な点が多く、細胞遺伝学的性質についての情報は極めて乏しい。

本研究は、ミヤコタナゴの細胞遺伝学的性質を明らかにするとともに、種の保存および増殖法の検討を行い、河川美化意識の向上に役立たせることを目的とする。

## II. ミヤコタナゴの保存のための細胞遺伝学的性質の解明

日本産のコイ科 (Cyprinidae) 、タナゴ亜科 (Rhodeinae) 類は、中村 (1969、1974) により次の4属15種・亜種に分類されている。

### Acheilognathus 属

A. cyanostigma (イチモンジタナゴ) 、 A. lanceolata (ヤリタナゴ) 、 A. limbata (アブラボテ) 、 A. longipinnis (イタセンバラ) 、 A. moriokae (タナゴ) 、 A. rhombea (カネヒラ) 、 A. tabira tabira (シロヒレタビラ) 、 A. tabira subsp. (アカヒレタビラ) 、 A. tabira subsp. (セボシタビラ) 。

### Rhodeus 属

R. atremius (カゼトゲタナゴ) 、 R. ocellatus ocellatus (タイリクバラタナゴ) 、 R. ocellatus smithii (ニッポンバラタナゴ) 、 R. suigensis (スイゲンゼニタナゴ) 。

### Tanakia 属

T. tanago (ミヤコタナゴ) 。

### Pseudoperilampus 属

P. typus (ゼニタナゴ) 。

この内これまでに入手できた、アブラボテ、タナゴ、タイリクバラタナゴおよびスイゲンゼニタナゴの核型を分析し、ミヤコタナゴとの比較を行なった。ミヤコタナゴは、文化庁の許可を得て、栃木県水産試験場より、雌雄各3個体の提供を受けた。アブラボテ (雌5個体、雄7個体) 、タナゴ (雌3個体、雄2個体) 、タイリクバラタナゴ (雌8個体、雄10個体) およびスイゲンゼニタナゴ (雌2個体、雄3個体) は、埼玉県漁業協同組合より購入した。

### 1. 染色体標本作製法

#### (1) 鰭短期培養法

ミヤコタナゴは貴重種であるので、殺傷を避けることが要求される。鰭の短期培養法により、

個体を生かしたまま良質の標本が得られた。

- ① 尾鰭を約5mm×5mmに切り取り、4-10°Cの次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素約1%）に10-20秒間浸し、殺菌した。
- ② 培養液（Eagle's MEM培地+10%牛胎仔血清+100IU/mlペニシリル+15mM HEPES、NaHCO<sub>3</sub>でpH 7.0に調整）で2回洗った。
- ③ 60cmのプラスティックペトリ皿（コーニング社）に取り出し、はさみで細片化した。
- ④ 培養液を5ml加えピペットで攪はんしてから、蓋をしてパラフィルムで封をし、18-20°Cで閉鎖系にて培養した。
- ⑤ 4-10日目に、コルヒチンあるいはTN-16を、最終濃度が各々0.15g/ml、0.3g/mlとなるように加え、3-6時間培養を続けた。
- ⑥ トリプシン溶液（0.15%トリプシン、0.3mM EDTA・2Na）で室温にて2-5分間処理後、ピペットで攪はんして細胞を遠心管に集めた。
- ⑦ 1,000rpmで5分間遠心後上澄を捨て、0.5%KCl水溶液を約5ml加えピペットで攪はん後、15分間室温で低張処理を行なった。
- ⑧ 1,000rpmで5分間遠心後上澄を捨て、固定液A（エタノール：酢酸=3:1）を約2mlを加え、穏やかに攪はん後5分間室温にて静置した。
- ⑨ 1,000rpmで5分間遠心後上澄を捨て、固定液B（エタノール：酢酸=1:1）を少量加え、穏やかに攪はん後、きれいに拭いたスライドグラス上に1滴落とした。
- ⑩ 自然乾燥後、pH5.8のSörensen緩衝液で4%にしたギムザ液で5-10分間染色した。
- ⑪ 光学顕微鏡下で700-1,000倍にして観察を行なった。
- ⑫ 良質の分裂中期像をミニコピーフィルムで写真撮影を行い、焼付し、詳細な分析を行なった。

## (2) 腎臓直接法

- ① 腎臓を取り出し、C-培養液（培養液+0.001%コルヒチン）で洗った。
- ② 35mmプラスティックペトリ皿（コーニング社）に移し、はさみで細片化した。
- ③ C-培養液を約2ml加え、軽くピペットで攪はんした後、蓋をしてパラフィルムで封をし、室温にて2-3時間静置した。
- ④ ピペットで軽く攪はんの後、遠心管に移した。
- ⑤ 後の操作は上記(1)の⑦-⑫と同様に行なった。

## 2. 分染法による分析

### (1) 銀染色法

銀染色法により染色体上の仁形成部位（Ag-NORs）を特異的に染め分けることができるが、Howell and Black (1980) の方法に従って行なった。

- ① ギムザで染色されたプレパラート（スライドグラス）を70°Cに温められたホットプレート上に置いた。
- ② 現像液（ゼラチン粉末2gを蒸留水100mlに溶解し、ぎ酸を1ml加えた）を2滴および硝酸

銀溶液（硝酸銀4 gを蒸留水8 mlに溶解）を4滴ピペットで落とし、カバーガラスをかけた。

③ 約90秒後、液が金色に変化した時点に水洗いし、自然乾燥させた。

## (2) C-バンド染色法

- ① 染色前のプレパラートを0.2Nの塩酸に室温で1時間浸した後、水洗いした。
- ② 乾燥後5%の水酸化バリウム水溶液で90秒間処理し、充分水洗いの後乾燥させた。
- ③ 60°Cの2×SSC(0.3M食塩+0.03Mクエン酸ナトリウム)で1時間処理した後、水洗いした。
- ④ pH 7.0のSörensenの緩衝液で6%にしたギムザ液で15分間染色した。

## 3. タナゴ類の核型

### (1) ミヤコタナゴ

染色体数は雌雄共に $2n=48$ で、メタセントリック(M)およびサブメタセントリック染色体(SM)が28本、サブテロセントリック(ST)およびアクロセントリック染色体(A)が20本であった。ST・Aの3番染色体対には付随体が存在したが、その付随体部にAg-NORsが認められた。5個体についてはST・Aの3番染色体にのみAg-NORsが観察されたが、1個体の雄にはその染色体対の他に1本のSTあるいはAにもAg-NORsが認められた。

### (2) アブラボテ

染色体数は雌雄共に $2n=48$ で、MおよびSMが28本、STおよびAが20本であった。しかし、雄には大形のMが必ず1本存在したが、雌には全く観察されなかった。性染色体の可能性が考えられるが、これまでの報告では雌雄同じ核型で、大形のMも観察されていない(小島ら 1973、Takai and Ojima 1988)。これらのことから、アブラボテが性染色体分化の途上にある、あるいはアブラボテには性に関係のない染色体多型が存在する等の推測が可能であろう。ST・Aの3番染色体対には付随体が存在し、その付随体部にAg-NORsが認められた。11個体についてはST・Aの3番染色体にのみAg-NORsが観察されたが、1個体の雌には3番染色体の他に1本のSTあるいはAにもAg-NORsが認められた。

### (3) タナゴ

染色体数は雌雄共に $2n=44$ で、MおよびSMが28本、STおよびAが16本であった。ST・Aの7番染色体対には付随体が存在したが、その付随体部にAg-NORsが認められた。

C-バンド染色を試みたが、動原体部に濃染が認められただけで特に著しい特徴をもったバンドは観察されなかった。

### (4) タイリクバラタナゴ

染色体数は雌雄共に $2n=48$ で、MおよびSMが28本、STおよびAが20本であった。ST・Aの最も小さな染色体対には付随体が存在したが、その付随体部にAg-NORsが認められた。

### (5) スイゲンゼニタナゴ

染色体数は雌雄共に $2n=46$ で、MおよびSMが4本、STおよびAが42本であった。ST・Aの16番染色体対には付随体が存在したが、その付随体部にAg-NORsが認められた。

### (6) タナゴ類の核型

タナゴおよびスイゲンゼニタナゴは染色体数および染色体構成がミヤコタナゴとは異なり、識別が容易であった。タイリクバラタナゴとミヤコタナゴは染色体数および染色体構成においては一致したが、Ag-NORsをもつ染色体がミヤコタナゴではS T・Aの3番であったのに対しタイリクバラタナゴでは最も小さな染色体であり、識別が可能であった。しかし、アブラボテとミヤコタナゴは極めて類似した核型をもち、識別するのは困難であった。今後新たな分染法を適用し、さらに詳細な分析によるミヤコタナゴの特徴付けを行なっておく必要がある。さらに、今回入手できたタナゴ類は5種だけで、他魚種についてもその詳細な核型を明らかにしておきたい。

アブラボテ雄に不対の大型Mが観察されたことは興味深い。性染色体分化機構解明につながる可能性もあり、今後減数分裂の観察等を行い、さらに検討を加えたい。

ミヤコタナゴおよびアブラボテにAg-NORsの多型が観察されたことも興味深い。仁形成部位は繰り返しの塩基配列により構成されていると考えられ、多少の変異が個体の生死に与える影響は小さいものと想像され、変異しやすい部位との推定は可能であろう。

事実、ホ乳類および魚類などで近縁種間および種内に染色体上の仁形成部位の位置および大きさの多型が認められている。しかし、これまでのタナゴ類の報告では仁形成部位はいずれも1対の染色体以外には観察されていない (Takai and Ojima 1988)。ミヤコタナゴは栃木県水産試験場で試験飼育されている個体で、アブラボテは養殖魚であった。染色体上の仁形成部位の多型が閉鎖的な環境で飼育されていることに原因するのかもしれない。

### III. ミヤコタナゴの保存および増殖法の開発

#### 1. 人工受精

人工受精は人工的な保存および増殖には欠かせない方法である。タイリクバラタナゴを用いて方法の検討を行い、安定した方法を確立することができた。ミヤコタナゴについても全く同様の方法で良好な結果が得られた。

##### (1) 配偶子の保存液

タナゴ類の精子は、水温18–19°Cのとき7分で活性が衰え、卵は30分でほぼ受精能力を失う (Suzuki 1959)。これらの時間は、人工受精の一連の操作に要する時間を考えると、十分なものである。しかし、配偶子に操作を加える場合、*in vitro*で活性をできるだけ長く保たせる保存液の検討が必要である。

##### (a) 未受精卵の保存液

保存液は塩類組成に加え、pHも重要な要素と考えられるが、魚類未受精卵の保存液に関する知見は乏しい。井戸本と上野 (1987) により調整されたタイリクバラタナゴ未受精卵用保存液中では、26–28°Cで約2時間の保存でも受精能力を保持していたという。今回この保存液を使用したが、26°Cで1時間内での保存では、受精率およびふ化率にほとんど影響はなかった。

##### (b) 精子の保存液

コイ科魚類およびサケ科魚類で精しょうのイオン組成に基づいて精子の運動制御因子について

て明らかにされている（森田と石田 1983）。これをもとに、多くの研究者により調整された各種の人工精しょうが魚類染色体操作の研究に用いられている。タイリクバラタナゴの精しょうについても井戸本と上野（1987）により調整された。今回この保存液を用いたが、26°Cで数時間内での保存では受精率およびふ化率にはほとんど影響はなかった。

## (2) 人工受精法

- ① 産卵管の伸張した雌を取り上げ、ペトリ皿に未受精卵用保存液（6.80 g の NaCl、0.40 g の KC1、0.20 g の CaCl<sub>2</sub>、0.20 g の MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O および 3.57 g の H E P E S を 1,000ml の蒸留水に溶解し、NaOH で pH8.2 に調整）を 90mm のプラスティックペトリ皿内に満たし、産卵管の先端を液中に入れ、腹部を軽く圧して採卵した。
- ② 婚姻色が現われた雄を取り上げ、生殖孔にガラス毛細管の先端を当て、腹部を軽く圧して毛細管内に採精した。採精後すぐに精子用保存液（5.61 g の NaCl、5.22 g の KC1、0.22 g の CaCl<sub>2</sub>、0.20 g の MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O および 3.57 g の H E P E S を 1,000ml の蒸留水に溶解し、NaOH で pH8.2 に調整）で約 10 倍に希釈し、35mm のプラスティックペトリ皿内に保存した。スライドグラス上に 1 滴取り、少量の水を加え、精子の運動能力を確認した。
- ③ 卵が軽く浸るまで未受精卵用保存液を捨ててから媒精し、ペトリ皿を軽く動かして精子が全体に行き渡るようにした後、少量の水を加えて吸水させた。この時点を受精ゼロタイムとした。卵の周辺の精子の運動を顕微鏡下で確認した。
- ④ 数分後、数回水を取り替え精子を洗い落とした。90mm のペトリ皿に水を満たし、直射日光の当たらない場所に静置した。1 枚のペトリ皿に入れる卵の数は 20 個以内とした。
- ⑤ 液の温度はいずれも約 26°C であった。

## 2. 受精後の卵体変化

### (1) タイリクバラタナゴ

未受精卵は洋梨形をしており、その縦の長さは約 3 mm であった。受精後、卵膜は卵体細胞質から離れ、時間とともに卵体が下方に落ち、囲卵腔が広がっていった。卵門は卵体細胞質と細い管でつながっていたが、やがて細い管は観察されなくなった。卵体は未受精卵時の約 3/4 程度の長さまで縮み、受精後 80 分前後に第 1 卵割が確認された。続いて、4 細胞期から細胞の増えていく様子が観察された。受精後 2 日目にはふ化仔魚が観察された。卵黄の背面に棒状にのっているような形態を示した。卵黄には前部の側面に 1 対、腹面に 1 個の突起をもっていた。

生長とともに卵黄は吸収されていった。ふ化後 14 日目（26°C 前後で飼育）から、卵黄をまだ少し抱えていたが、餌を与えはじめた。餌は熱帶魚用飼料のテトラミン（テトラ社）を細かくくだき粉末状にしたものを与えた。成魚までテトラミンだけで、他の飼料は必要とはしなかった。

### (2) ミヤコタナゴ

ミヤコタナゴの未受精卵も同じく洋梨形を示すが、その縦の長さは約 2 mm でタイリクバラタナゴより短かった。受精後多少の囲卵腔の広がりは観察されたが、タイリクバラタナゴのような卵割等著しい変化は観察されなかった。

ふ化後の飼育はタイリクバラタナゴと同様の方法で容易に行なえた。現在ふ化後約6ヶ月になるが、順調に生育している。

### 3. 精子の凍結保存

精子を長期間保存することができれば、遺伝子は残されることになる。また、次の項に上げる雄性発生を用いて、保存精子から個体がえられる可能性もある。これまでにタナゴ精子の凍結保存の報告はないが、同じコイ科のコイ *Cyprinus carpio*での報告があり (Moczarski 1977, Kurokura et al. 1984)、それらを参考に精子の凍結保存の検討を行なった。精液採取に多数の個体を必要としたことから、タイリクバラタナゴを用いて試験的に行なった。

タイリクバラタナゴは埼玉県漁業協同組合より購入したものを用いた。1個体から採取できる精液の量は少なく、コイでおこなわれた方法を応用しようとすれば、多数の個体から精液を採取し混合して行なわなければならない。そこで、多数の個体からの精液を混合して保存する方法と、精巣を取り出し精子以外の精巣内細胞も含めて保存する方法の二つの方法で試みた。

#### (1) 多数の個体からの精液を混合する方法

- ① 50個体以上のタイリクバラタナゴより精液を採取し、精液 : DMSO (ジメチルスルホキシド) : 希釀液 (5.61 g の NaCl、5.22 g の KC1、0.22 g の CaCl<sub>2</sub>、0.20 g の MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O および 3.57 g の HEPES を 1,000 ml の蒸留水に溶解し、NaOH で pH 8.0 調整) = 20 : 12 : 68 の割合で混合し、ストロー精液管（牛の人工受精用、0.5 ml、富士平工業）中に約 0.1 ml 入れ、ストローの両側を封じた。
- ② 冷蔵庫 (4 °C) に約 20 分間静置後、ストローを液体窒素の液面から約 40 mm 離して水平に静置した。
- ③ ストローを液体窒素中に保存した。
- ④ 30 日後、35 °C の 100 mM の NaHCO<sub>3</sub> で溶かし、すばやく 50 個の卵に媒精した。  
2 日後、8 個体のふ化仔魚が確認された。

#### (2) 精巣を取り出して行なう方法

- ① 10 個体のタイリクバラタナゴから精巣を取り出し、希釀液で 2 回洗った。
- ② プラスティックペトリ皿内に移し、はさみで刻んだ。
- ③ 希釀液を約 100 μl 加え、マイクロピペットで穩やかに攪はんの後、マイクロチューブに移し、約 5 分間室温にて静置した。
- ④ 上澄 88 μl を別のマイクロチューブに移し、12 μl の DMSO を加え、マイクロピペットで穩やかに攪はんの後ストローの中に入れ、ストローの両側を封じた。
- ⑤ 後の操作は上述(1)の②-④と同様に行なった。  
2 日後、2 個体のふ化仔魚が確認された。

### 4. 雄性発生による保存

バイオテクノロジーによって精核だけによる個体の発生が可能となっている。卵核を γ 線等で遺伝

的に不活性化しておき、卵を借腹として用い、それに精子を掛け第1卵割を阻止することで、雄性発生2倍体がサケ科魚類等いくらかの魚種で報告されている。最近開発された精子融合法によって、2精子をポリエチレングリコール、高カルシウムあるいは電気的処理で融合させ、借腹卵に掛けば、第1卵割阻止なしに雄性発生2倍体が得られる可能性もある。雄性発生の方法が確立し、精子の保存がなされれば、常にミヤコタナゴの保存および増殖が期待される。

そこで、入手が容易なタイリクバラタナゴの卵を借腹の候補として取り上げ、遺伝的不活性化条件および第1卵割阻止条件、また2精子融合条件の検討を行なった。タイリクバラタナゴは埼玉県漁業協同組合より購入した個体を用いた。各処理条件の検討は、生じた仔魚の外部形態に加え染色体分析に基づいて行なったが、まず仔魚からの染色体標本作製法について述べる。

#### (1) 仔魚の染色体標本作製法

- ① ふ化直後から泳ぎだすまでの仔魚から卵黄を除き、C-培養液に1時間浸した。
- ② 0.5%のKCl水溶液に移し、室温で15分間低張処理を行なった。
- ③ 固定液Aに移し、室温で約10分間固定した。
- ④ 35mmプラスティックペトリ皿に移し、2ml用の駒込ピペットで固定液Bを3滴加えて、替刃メス（フェザー社、No.11）で細かく刻んだ。
- ⑤ 駒込ピペットで固定液Bを3滴加え、スポットを付けたマイクロピペット用チップで穩やかに攪はんして細胞塊をくずし、マイクロチューブ（1.5mlキャップ付、岩城硝子社）に移した。この状態でキャップをし、-20°Cに保てば、1年以上の保存が可能である。
- ⑥ きれいに拭いたスライドグラス上に1滴落とした。
- ⑦ 後の操作はⅡの1の(1)の⑩-⑫と同様に行なった。

#### (2) 精子の遺伝的不活性化

紫外線による卵の遺伝的不活性化条件の見当を付けるために、先だって精子の遺伝的不活性化条件の検討を行なった。

- ① 埼玉県漁業協同組合より購入したタイリクバラタナゴの精液を採取し、精子用保存液で約100倍に希釈した。軽く攪はん後、50μlをカバーガラス（24mm×40mm）上にむらなく広げた。
- ② 殺菌灯（東芝製G L-15紫外線ランプ）から30cm離し、5、10、15、20、25、30、35、40、45および60秒間照射した。このときの線量はそれぞれ200、400、600、800、1,000、1,200、1,400、1,600、1,800および2,400erg/mm<sup>2</sup>であった。
- ③ それぞれ正常卵に媒精した。各群10個ずつで試験した。

線量の増加に伴う受精率の低下は認められず、精子への2,400erg/mm<sup>2</sup>までの紫外線線量は受精率には影響を及ぼさないと考えられる。ふ化率は線量の増加に伴って低下し、再び回復する、いわゆるHertwig効果が認められた。このことは、個々の精子に照射された線量が均一であったことを裏付け、紫外線により精核が効果的に破壊されたものと考えられる。ふ化仔魚の染色体を調べると、600erg/mm<sup>2</sup>まではn=48で正常な2倍体と同じであった。1,200erg/mm<sup>2</sup>以上の線量では全てn=24の半数体であった。800および1,000erg/mm<sup>2</sup>では、24本の染色体に加え不完全に精核が破壊されたために生じたと考えられる余剰の染色体あるいは染色体断片

を含んだ24+の染色体数を持った個体が認められた。800erg/mm<sup>2</sup> 照射の4個体中1個体および1,000erg/mm<sup>2</sup> 照射の5個体中3個体は丁度24本の染色体数であった。以上の結果から、1,200erg/mm<sup>2</sup> から 2,400erg/mm<sup>2</sup> の線量では、受精率およびふ化率に影響を与えることなく精核の破壊が効果的になされたものと考えられる。

### (3) 卵の遺伝的不活性化

これまで、ニジマス Oncorhynchus mykiss (以前の Salmo gairdneri) 等の卵の遺伝的不活性化にはγ線やX線が使われてきたが、設備および安全性の点で問題も多い。幸い、タイリクバラタナゴの未受精卵は球形ではなく、卵核の位置がはっきりしているので、透過性の低い紫外線でも遺伝的不活性化が可能であるという報告がなされている(井戸本と上野 1987)。その方法および精子の遺伝的不活性化条件を参考にして検討を行なった。

- ① 埼玉県漁業協同組合より購入したタイリクバラタナゴを用いて、動物極の先端に紫外線が効果的に当たるように、厚さ3mmのプラスティック板に直径1.5mmの穴をあけ、未受精卵用保存液を満たし、未受精卵を動物極が上になるようにいれた。液量は卵の先端までとした。
- ② 殺菌灯から30cm離し、5、10、15、20、25、30、35および40秒間照射した。このときの線量は、それぞれ 200、400、600、800、1,000、1,200、1,400、および 1,600erg/mm<sup>2</sup> であった。
- ③ それぞれの群の卵に正常精子を掛けた。各群10個ずつで試験した。

精子への照射と同様に、線量の増加に伴う受精率の低下は認められなかった。精子への照射と同様に Hertwig効果が認められ、紫外線により卵核が効果的に破壊されたものと考えられる。しかし、精子に照射したときと異なり、1,400erg/mm<sup>2</sup> 以上の照射で著しいふ化率の低下が認められた。井戸本と上野(1987)も同様の観察をし、発生過程で必要なミトコンドリア等細胞質成分が紫外線の影響を受け変性したためではないかと推論している。ふ化魚の染色体は、精子への照射と同様、600erg/mm<sup>2</sup> までは全個体が2n=48で、1,200erg/mm<sup>2</sup> では全個体がn=24であった。800erg/mm<sup>2</sup> と 1,000erg/mm<sup>2</sup> では、余剰の染色体あるいは染色体断片が観察された。800erg/mm<sup>2</sup> 照射の4個体中1個体および1,000erg/mm<sup>2</sup> 照射の6個体中2個体は24本丁度の染色体数であった。以上の結果から、未受精卵の核の破壊にも紫外線が有効であると考えられるが、正常な発生能を保持させながら効果的に卵核の破壊を行なう紫外線の線量が狭く限定されていると考えられる。

### (4) 第1卵割阻止

- ① 埼玉県漁業協同組合より購入したタイリクバラタナゴを用いたが、80分前後に第1卵割が観察されるので、受精後60、70、80、90および100分に5°Cの水に40分間浸した(26°C⇒5°C⇒26°C)。

各群とも20個ずつの卵で試験を行なったが、ふ化した個体数は、60、70および100分後に処理した群で6個体、80および90分後に処理した群で4個体であった。それぞれの群でふ化仔魚1個体ずつ染色体を調べたところ、70分後に処理した1個体が96本の染色体をもつ4倍性であったが、他の個体は全て2n=48であった。残った仔魚は、その後混合飼育し、ふ化後約4ケ

月に生き残った10個体の稚魚について腎臓およびえらの細胞より染色体を観察したが、いずれも $2n=48$ の2倍体であった。第1卵割阻止がなされた4倍性個体は、70分後に処理した群の中に1個体認められただけで、生き残って稚魚期に達した個体の中には認められなかった。今後処理方法の検討が要求される。これまでの報告でも、ニジマスで4倍体が得られているが、3倍体に比べて誘導率が極めて低い(Thorgaard et al. 1981, Chourrout 1982)。この理由として上野(1989)は、成熟分裂と第1卵割の細胞上の相違(中心体の有無、微小管の発達状態、分裂溝の位置決定時期)を指摘し、より強度な処理方法の開発の必要性を述べている。

#### (5) 精子融合

細胞融合剤として一般的なポリエチレングリコール(P EG)で処理した精子と正常卵とを受精させた結果、ニジマスで2精核3倍体が得られた。この現象は、P EGが精子同士の接着あるいは融合を誘導し、接着あるいは融合した2精子が同時に卵門を通過して、2精核が卵核と接合するものと考えられている(Ueda et al. 1986)。もし、2精子受精を高率に誘導することができれば、雄性発生2倍体作出への応用が考えられる。また、高pH・高カルシウム処理が精子同士の接着あるいは融合に有効であることが報告され、P EG処理同様に2精子受精が誘導される可能性も得られている(Ueda et al. 1988)。

##### (a) P EGおよび高pH・高カルシウム処理による方法

ニジマスで報告された方法を埼玉県漁業協同組合より購入したタイリクバラタナゴの精子に試みた。

- ① 10個体より精液を採取し、1本の遠心管(直径16mm)に移した。
- ② 2000rpmで3分間遠心し、遠心管の底面に精子を凝集した状態で薄層に広げた。
- ③ 上澄を捨て、P EG液[10gのP EG4000を10mlのA液(0.75gのNaCl、0.22gのKClおよび0.47gのHEPESを100mlの蒸留水に溶解し、NaOHでpH10に調整)に溶解]を1ml加え室温で1分間静置した後、2mlのA液を加え室温で2分間静置した。
- ④ 高pH・高カルシウム処理は、P EG液を加える代わりに高pH・高カルシウム液(0.75gのNaCl、0.22gのKClおよび1.11gのCaCl<sub>2</sub>を100mlの蒸留水に溶解し、NaOHでpH10に調整)を約2ml加え室温で20分間の処理を行なった。
- ⑤ いずれの処理も、処理後上澄を捨てA液で2回洗浄した後、精子をA液に浮遊させた。
- ⑥ 細胞懸濁液をスライドグラス上に取り、位相差顕微鏡下で精子を観察した。

いずれの方法でも、接着あるいは融合した精子は観察されなかった。同じ魚類でも種が変われば精子同士の接着あるいは融合条件が異なるのか、タイリクバラタナゴの場合精液量が少なく、遠心後の精子の状態がP EG処理あるいは高pH・高カルシウム処理により接着あるいは融合される条件を備えていない可能性もある。少量の精液でも可能な方法の開発の必要性が暗示される。

##### (b) 卵と精子を混合した状態で処理を加える方法

高カルシウム処理時期と生残率との関係を調べた報告があり、卵と精子を混合した状態で高カルシウム処理を行い、その後吸水させた群では対照群と同程度の生残率が得られることがわかつ

ている（上田 1989）。この混合した状態での高カルシウムの精子融合効果については検討されていない。もし、混合した状態での処理で2精子受精を誘導することができれば、少量の精液でも可能となり、タナゴ類にも有効な方法と考えられる。この混合した状態での高カルシウム処理効果について、サケ科魚類の一種であるサクラマス *Oncorhynchus masou* の精子を用いて検討した。

- ① 水産庁養殖研究所日光支所（栃木県）にて飼育中のサクラマス雌雄各1個体より、卵および精子を採取した。
- ② 卵と精子を混合した状態で、2種類の高pH・高カルシウム液〔B液（0.75gのNaCl、0.22gのKCl、1.11gのCaCl<sub>2</sub> および 0.375gのHEPESを100mlの蒸留水に溶解し、NaOHでpH10に調整－group II）およびC液（0.75gのNaCl、1.11gのCaCl<sub>2</sub> および 0.375gのHEPESを100mlの蒸留水に溶解し、NaOHでpH10に調整－group III）〕で12°Cにて20分間処理後吸水させた。
- ③ 染色体標本は、両親については鱈の短期培養法により、受精後8－12日目については短期培養法および直接法により作製し、通常のギムザ染色により染色体分析を行なった（Ueda 1986）。

両親の染色体数は2n=66で、MおよびSMが38本、STおよびAが28本であった。

通常の掛け合わせ（無処理群－group I）では、観察された10個体全て2n=66（38M・SM+28ST・A）で両親と同じ核型であった。処理した群には染色体数66本の個体の他に33本および99本の個体が認められた。染色体構成からみて、66本の個体は2倍体、33本は半数体、そして99本は3倍体と結論された。

いずれの処理液（BおよびC液）による処理でも3倍体が出現した。これら3倍体が、卵核、精核いずれのゲノムを二つ含むのかは明らかではない。高pH・高カルシウムに精子同士の接着あるいは融合作用があることから（Ueda et al. 1988）、混合した状態でも精子同士が接着あるいは融合され、2精子が卵門を通過し、2精子受精が誘導されたことも考えられる。また、高pH・高カルシウムにより卵膜が変化し、その結果卵が2精子の侵入を許したとも考えられる。あるいは、高pH・高カルシウムに第2極体放出阻止作用のあることが報告されており（Ueda et al. 1988）、処理により減数第2分裂に異常を来し、2卵核受精を誘導したことも否定できない。

B液で処理した群（group II）に半数体が出現した。半数体のゲノムが雌雄いずれの親に由来するのかは明らかでなく、出現の原因についても不明である。雄親由来であれば雄性発生が人为的に誘導できる可能性があり、さらに検討する必要がある。

いずれにしても、今後、両親に雑種を用いるなどして3倍体および半数体のゲノムの由来を明確にし、高pH・高カルシウムの作用についてより詳細な追求が要求される。また、卵と精子を混合した状態における高pH・高カルシウム処理のタナゴ類での効果についての検討も今後の課題である。

高カルシウムによる処理法は細胞への外来遺伝子導入の一般的な方法と類似していることから、精子あるいは卵へ外来遺伝子を導入してトランスジェニック魚が得られる可能性が指

摘された（上田 1988、1989）。実際、井上ら（1989）は、高カルシウム法と同様に一般的な細胞への外来遺伝子導入法である電気的パルス法により、ヒメダカ *Oryzias latipes* 受精卵へのニジマス成長ホルモン遺伝子の導入に成功している。

精子融合法はゲノム操作および遺伝子導入操作として有効な手段となりうる可能性がある。種の保存および増殖にも極めて効果的な方法と考えられ、今後の検討が期待される。

#### IV. むすび

核型分析で、ミヤコタナゴはタナゴ、タイリクバラタナゴおよびスイゲンゼニタナゴとは明らかに識別が可能であったが、アブラボテとは極めて類似し識別が困難であった。新たな分染法を適用し、さらに詳細な分析によるミヤコタナゴの特徴付けが今後の課題である。また、今回入手できなかった他のタナゴ類の分析も行なっていかねばならない。ア布拉ボテ雄に不対の染色体が認められ、性染色体の可能性が示唆されたことは成果といえよう。タナゴ類の性染色体分化機構の解明も一つの重要な課題である。

低率ながら精子の凍結保存が可能であり、卵の遺伝的不活性化も可能であることが示された。第1卵割阻止も、成功率が極めて低く方法の改良が要求されはするものの、可能性が示唆され、雄性発生によるミヤコタナゴの保存の可能性が示された。精子の融合はニジマスで報告された方法ではうまくいかず、サクラマスで試みた卵と精子を混合した状態における高カルシウムあるいは電気的刺激処理によるゲノム操作のタナゴ類での可能性検討が今後の課題である。

ともあれ、人工受精が容易で飼育も簡単なことから、人工的生産はさほど困難なことはなく、人工的にはミヤコタナゴの種の保存および増殖は可能であると考えられる。また、11月現在、18–20°Cに保ち昼夜20Wの蛍光灯を付けた60cm水槽内で飼育を続けているが、産卵期が3–7月とされているにもかかわらず、採卵することができ、条件次第では年中産卵させることができるのでないかと考えている。

ミヤコタナゴおよびア布拉ボテにAg-NORsの多型が認められ、閉鎖的な環境での飼育が変異の増加をもたらす可能性のあることが暗示された。水槽内での人工的維持が本来の種の維持とは性格を異にしていると考えることもできる。このことは、本来の種の維持を考えるならば、自然繁殖の推進を行なう必要のあることを指摘するもので、自然環境の整備が大きな課題となってくる。ミヤコタナゴはマツカサ貝という二枚貝に卵を産みつけるが、ミヤコタナゴの減少はその貝が生息できる環境が失われてきていることによると指摘する向きもある。両者が生息できる環境要因として河川の構造的な問題と水質の問題が上げられる。栃木県内の河川も農薬等化学物質によって水質の汚染がすんでいる。自然繁殖をすすめるに当たり、農薬等化学物質がミヤコタナゴおよびマツカサ貝に及ぼす影響について明らかにしておくこともミヤコタナゴの保存および増殖において極めて重要な課題である。河川汚染度の指標としても大きな問題をもってくる。人間は遠い昔より小動物を労る心を持ち続けてきた中に人間を存続させていきたい願いを内在してきた。絶滅に瀕した種を救おうとする努力は必ずや河川美化意識の向上に結付くものと信じる。

## 謝　　辞

天然記念物ミヤコタナゴの使用に際しては文化庁および宇都宮市教育委員会の御協力をいただきました。タナゴ類の飼育管理および染色体操作方法について近畿大学農学部水産学科上野紘一助教授より御助言いただきました。ミヤコタナゴは栃木県水産試験場村山忠場長、鈴木正臣部長および沢田守伸主任より試験飼育中の個体を御提供いただきました。アブラボテ、タナゴ、タイリクバラタナゴおよびスイゲンゼニタナゴ入手するに当たり埼玉県水産試験場大越徹夫主任研究員に御協力いただきました。サクラマスは水産庁養殖研究所日光支所丸山為三支所長より御提供いただきました。この調査研究は財団法人河川環境管理財団の助成金に依り行いました。ここに厚く御礼申し上げます。

## 文　　献

- (1) Chourrout, D. (1982) : Reprod. Nutr. Develop., 22, 569-574.
- (2) 井戸本純一・上野紘一 (1987) : 日本水産学会昭和62年度秋季大会講演要旨集, 152.
- (3) 井上広滋・山下伸也・秦淳一郎・可部野昌子・朝比奈美智・長久英三・藤田孝夫 (1989) : 日本水産学会平成元年度春季大会講演要旨集, 116.
- (4) Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M. and Iwahashi, M. (1984) : Aquaculture, 37, 267-273.
- (5) Moczarski, M. (1977) : Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol., 25, 187-190.
- (6) 森沢正昭・石田克美 (1987) : 回遊魚の生物学, 学会出版物センター, 123-138.
- (7) 中村守純 (1969) : 日本のコイ科魚類, 日本産コイ科魚類の生活史に関する研究, 資源科学研究所, 5-99, 112-142, 226-286.
- (8) 中村守純 (1974) : 原色淡水魚類検索図鑑, 北隆館, 260.
- (9) 小島吉雄・上野紘一・林真 (1973) : 動雜, 82, 171-177.
- (10) 鈴木亮 (1959) : 動雜, 68, 29-33.
- (11) Suzuki, R. (1959) : Embryologia, 4, 359-367.
- (12) Takai, A. and Ojima, Y. (1988) : Proc. Japan Acad., 64B, 229-232.
- (13) Thorgaard, G.H., Jazwin, M. E. and Stier, A. R. (1982) : Trans. Am. Fish. Soc., 110, 546-550.
- (14) Ueda, T. (1986) : Bull. Fac. Educ. Utsunomiya Univ., 36, 81-85.
- (15) 上田高嘉 (1988) : フーズバイオテクノロジー事典, 産業調査会, 471-472.
- (16) 上田高嘉 (1989) : 水産増養殖と染色体操作, 恒星社厚生閣, 95-103.
- (17) Ueda, T., Kobayashi, M. and Sato, R. (1986) : Proc. Japan Acad., 62B, 161-164.
- (18) Ueda, T., Sato, R. and Kobayashi, J. (1988) : Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 2045.
- (19) 上野紘一 (1989) : 水産増養殖と染色体操作, 恒星社厚生閣, 70-81.