

同居飼育によるヒラメ2系統の体形と リンホシスチス病に対する感受性の比較

長谷川 理・小林 一展

Comparison between two strains of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) produced by repeated gynogenesis on their body forms and resistance to Lymphocystis disease.

Osamu HASEGAWA*, Kazunobu KOBAYASHI**

はじめに

ヒラメは雌雄により成長が異なるために、養殖する上においては成長の優れた雌魚が好まれる。このため、本県では養殖生産の効率化を図るために1992年からヒラメの全雌化技術の開発に取り組んでいる。全雌化するためには性決定期に性ホルモン(β17メチルテストステロンなど)を飼育水に投与したり、餌料に添加して性転換する方法と、染色体操作による方法が考案されているが、前者は食品としての安全性が懸念されており、最近では染色体操作による全雌化が一般的に用いられている(田畑¹⁾, 山本²⁾)。

現在までに本県では、第二極体放出阻止法、第一卵割阻止法、及び性転換雄を用いた交配で作出した雌性発生魚を個体識別し、系統として継代飼育している。これらは継代を重ねるに従って各系統間に特徴的な形質が固定されつつある。

異なる系統群の生物特性を比較するには、それぞれの群を分離飼育する方法が一般的に用いられている。しかし分離飼育では餌量の投与量や飼育密度などの外部環境を全く同様に設定することは困難であるとともに、多くの試験区を設定する必要がある。本稿ではマイクロサテライトDNAマーカーを系統判別するための遺伝標識として利用することにより、継代飼育している2系統について受精卵から同居飼育し、系統間における体形、疾病に対する感受性の差異を相対的に比較することを試みたので報告する。

材料および方法

供試魚

供試魚には本県において染色体操作により作出した雌性発生魚のうちの2系統(A系統、B系統)を用いた。

A) A系統

以下のように雌性発生魚(第二極体放出阻止および第一卵割阻止による雌性発生)を継代飼育し、これらを親魚としてA系統の供試魚を作出した。

A系統雄親魚の由来

- (1*) 1992年4月 一世代目
通常交配により作出した1尾の親魚(既存養成魚I)から採卵し、第二極体放出阻止法により雌性発生魚を作出した。
- (2) 1996年4月 二世代目
一世代目のうちの1尾から、第一卵割阻止により雌性発生魚を作出した。
- (3) 1998年4月 三世代目
二世代目のうちの1尾から、第二極体放出阻止により雌性発生魚を作出し、これらの群の中に出現した性転換雄を本試験のA系統雄親魚とした。

A系統雌親魚の由来

- (4) 1996年3月 二世代目
上記(1)の姉妹魚(1992年4月 一世代目)から、第二極体放出阻止法により雌性発生魚を作出し、これらを本試験のA系統雌親魚とした。

A系統供試魚

- (5) 上記(3)と(4)の間において交配してA系統の供試魚を作出した。

b) B系統

以下のように雌性発生魚(第二極体放出阻止およびこれにより生じた性転換雄を同系統内の雌性発生魚との交配)を継代飼育し、これらを親魚としてB系統の供試魚を作出した。

B系統雄親魚の由来

- (6) 1992年5月 一世代目
通常発生により作出され、養成されていた1尾の親魚(既存養成魚II)から、第二極体放出阻止により雌性発生魚を作出した。
- (7) 1994年4月 二世代目
一世代目の中に出現した性転換雄と通常発生で作出した1尾の雌魚(既存養成魚III)

と交配して作出した。

(8) 1997年4月 三世代目

二世世代目のうちの1尾から、第二極体放出阻止により雌性発生魚を作出し、このなかで出現した性転換雄を本試験のB系統雄親魚とした。

B系統雌親魚の由来

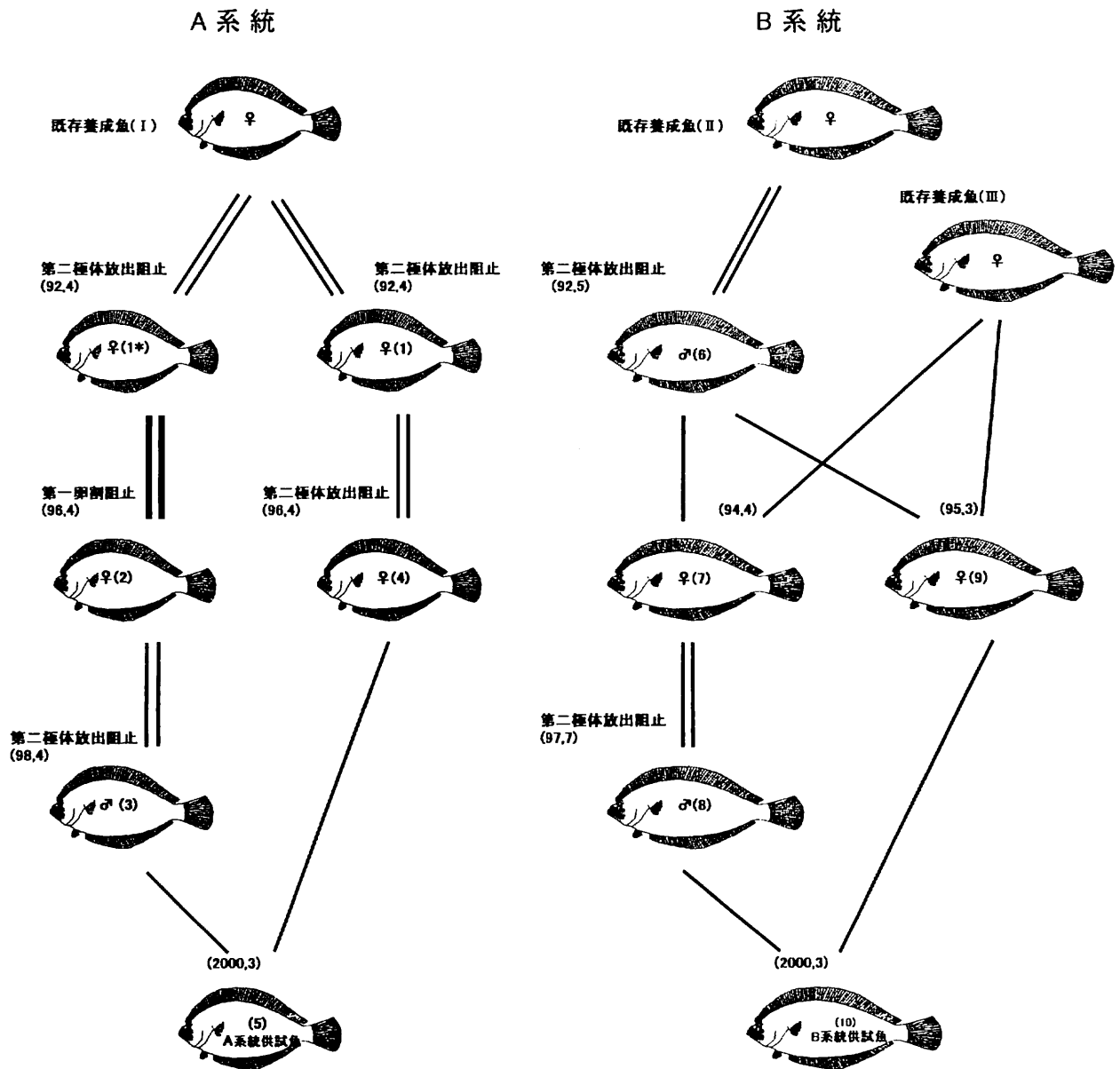
(9) 1995年3月 二世世代目

上記(7)と同様の親魚の組み合わせにより、

その翌年に雌性発生魚を作出し、これらを本試験のB系統雌親魚とした。

B系統供試魚

(10) 上記(8)と(9)の間で交配してB系統の供試魚を作出した。また、上記(1)~(10)の各親魚にはヒットタグ*を装着して個体識別を行った(図1)。(*は図1の魚体に付された番号を示す。)



魚体に付された番号は本文の「材料および方法」に記載されている供試魚の由来を示す

図1 A系統およびB系統供試魚の遺伝的由来

飼育方法

上記のA、B両系統のふ化仔魚（約5,000尾ずつ）を同一の水槽に混合して収容し、成長に応じて適宜にシオミズボウムシ、アルテミアノープリウス、配合飼料、冷凍イワシを与えて飼育を行った。（試験開始後3ヶ月まで500 l円形水槽、3~11ヶ月まで1 t円形水槽、11ヶ月以降は5トン角型水槽を使用した。各期間の収容密度は変態が終了する2ヶ月までに総計約1000尾/水槽に調整し、開始5ヶ月後に約300尾/水槽とした。）

系統判別

両系統の判別はMaria Raque³⁾に記されているヒラメ由来のマイクロサテライトDNAマーカーの中から両系統が容易に判別できるものを選定した。

試験開始後6ヶ月が経過した時点で同居飼育されている供試魚から0.2ccずつ採血し、これらから常法によりDNAを抽出し、TEバッファー（10mM Tris-HCl pH7.4, 2.5mM EDTA, pH8.0）に溶解し、これらをPCR法による系統判別のための鋳型試料とした。

プライマーにはpoli 121TFU（Fプライマー 5'ACT GCA TGC ATA ACC AAC AGT GTG T3'，Rプライマー 5'GGC TGA ATT ATT TGG AGC AGA AGG T3'）を用いて、Rプライマーに γ ³²P ATPをTaq Polymerase（Takara）を用いて標識した。

なお、上記のプライマーはPCRの反応条件は全量25.5 ml（10×PCR buffer 2.5 μ l、BSA 0.25 μ l、2.5mM dNTP Mixture 2.0 μ l、50ng/ μ l template DNA 1.0 μ l、10pmol/ μ l Fプライマー-0.07 μ l、10pmol/ μ l Rプライマー-1.25 μ l、5u/ μ l rTaq Polymerase 0.13 μ l、DW17.8 μ l）とし、GeneAmp PCR System 9600（Perkin Elmer社製）を用いて2分間の予備加熱後、95℃30秒間変性→65℃1分間アニーリング→72℃1分間による伸長反応を35サイクル実施後、最終伸長として72℃3分間反応させた。

反応産物を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動（1700V 2時間）により分離し、ゲルを乾燥後バイオイメージアナライザー（FUJIX BAS 1000）によりPCR産物を検出し、各個体の系統を親魚の泳動と比較して判別した。

反応産物を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動（1700V 2時間）により分離し、ゲルを乾燥後バイオイメージアナライザー（FUJIX BAS 1000）によりPCR産物を検出し、各個体の系統を親魚の泳動と比較して判別した。

採血からDNAマーカーによる系統判別が終了するまでの3日間は、個体ごとにプラスチック製網籠（19cm×10cm×10cm）に収容して飼育した。また、系統が確定したものには、各系統を識別するために無眼側の鰓蓋部に異なる色彩の可視蛍光イラストマーカー（Northwest Marine Technology社製）を装着して、再び混合飼育を継続した。

また、採血時に吻部や頭部などの外見的特徴から各個体の系統を推定し、マイクロサテライトDNAマーカーによる系統判別との整合性を比較した。

生物特性の把握

本研究では体形とウイルスに対する感受性を生物特性

として調べた。体形に関する形質として経時的に全長cm（TL）、体高cm（BH）、体重g（BW）を測定し（図2）、ウイルス病に対する感受性としてリンホシスチス病の発生状況を調査した。リンホシスチス病の発生状況の判断には症状の程度を発生した細胞塊のなかで最大の細胞塊の直径を4段階（発生無し-、5mm以下 +、5~20mm ++、20mm以上 +++）に分類して、罹病症状を判断するための指標とした。

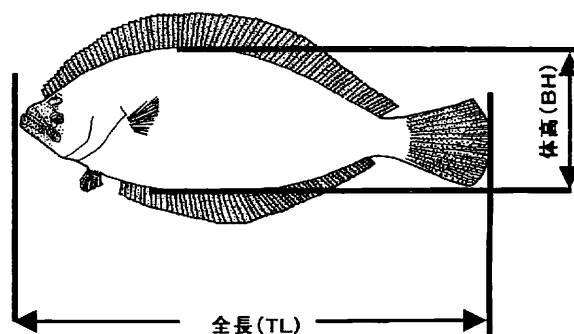


図2 体形形質の測定部位

結 果

マイクロサテライトDNAマーカーによる判別

マイクロサテライトDNAマーカー（poli 121 TFU）によるPCR産物の大きさは、2系統で明確に異なり（A系統140~150bp、B系統100~125bp）各検体の系統を確定することが出来た（図3）。

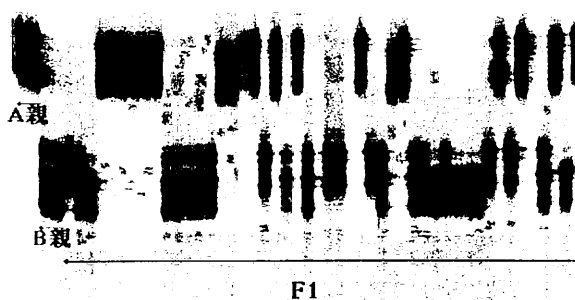


図3 マイクロサテライトDNAマーカー(Poli 121TFU)によるA系統およびB系統の判別

全長と体高

2系統の体形を相対的に比較するため、全長cm（TL）と体高cm（BH）との関係を示した（図4）。また、これらの値から系統ごとに以下のような回帰直線が得られた。

$$A \text{ 系統 } BH = 0.4011 \times TL - 1.1632 \quad (R^2 = 0.9856)$$

$$B \text{ 系統 } BH = 0.3582 \times TL - 0.60592 \quad (R^2 = 0.9696)$$

これら直線の回帰係数を共分散分析（ANCOVA）に

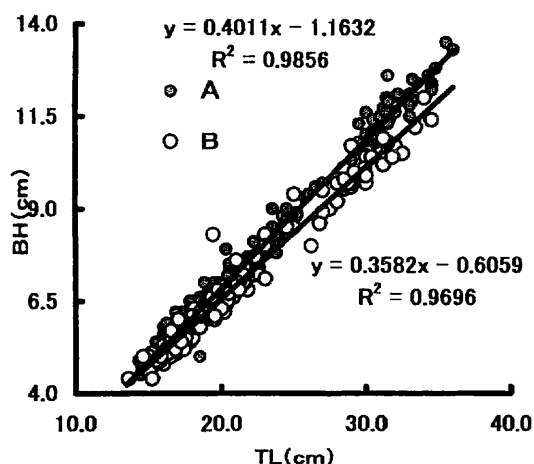


図4 A系統およびB系統における全長と体高の関係

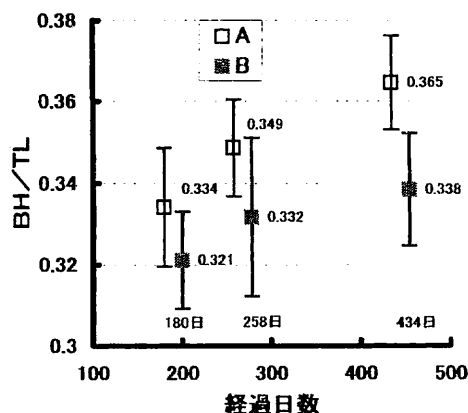


図5 A系統およびB系統における体形の経日変化

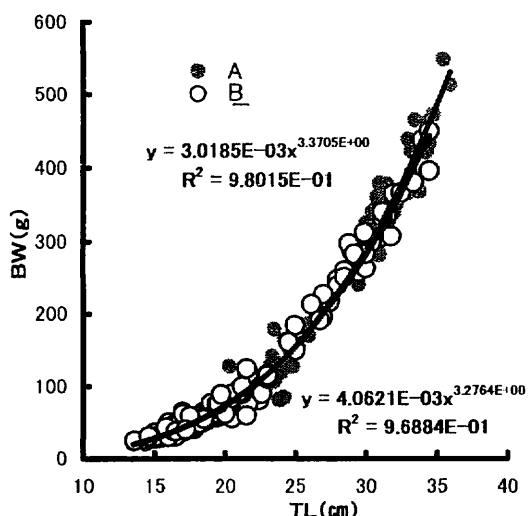


図6 A系統およびB系統における全長と体重の関係

より比較したところ、両者の傾きには差が認められた ($P < 0.01$)。また、体形的な特徴を把握するため全長 (TL) と体高 (BH) から (BH/TL) 値を求めて、両形質の経時変化の相違を検討したところ、飼育日数が経過するにつれて両系統ともに (BH/TL) 値は増加傾向を示したが、系統間においてはA系統のほうが各測定日ともに高く、434日目には両系統の特徴が一層はっきりと現われるようになった (図5)。

(BH/TL) 値から両系統の体形的特徴として、A系統は体高幅 (BH) が広い特徴を有するのに対して、B系統では体高幅がA系統よりも狭く、外見的に細長い特徴 (長形型) を呈する系統であることが確認された。

全長と体重

全長 (TL) と体重 (BW) から成長段階別 (ふ化後180日目、258日目、434日目) に両系統の肥満度 ($K = 1000 \times BW / BL^3$) を求めたところ、成長するに従ってA、B両系統ともに肥満度は増加したが、いずれの測定日ともに系統間での有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

また、両系統の全長と体重との関係から以下のようなアロメトリー式を求めたが、系統間における有意差 (ANCOVA, $P > 0.01$) は認められなかった (図6) (表1)。

$$\begin{aligned} \text{A系統} \quad BW &= 0.030185 \cdot BL^{3.3705} \quad (R^2 = 9.8015) \\ \text{B系統} \quad BW &= 0.040621 \cdot BL^{3.2764} \quad (R^2 = 9.6884) \end{aligned}$$

表1 A系統およびB系統の肥満度の経日変化

飼育日数	A系統	B系統
180	8.6806 ± 0.905	8.9225 ± 0.9127
258	9.6589 ± 1.703	9.3268 ± 1.54
434	11.020 ± 0.824	10.863 ± 0.7056
	Mean ± SD	

リンホシスチス病に対する感受性の相違

試験開始後258日目ではA系統におけるリンホシスチス病の発生は背鰭、尾鰭及び体表に米粒状 (3 mm以下) の微小な細胞塊が観察される程度の極めて軽度な症状 (+) の個体が生残魚の9%ほどで観察された。一方、この時点においてB系統からは一尾も本病が発症している個体は確認されなかった。その後、A系統では罹病魚はさらに増加するとともに、その発症の程度も2 cm以上に成長した巨大細胞塊が体表一面に散見される重篤な症状 (+++) の個体が数多く観察されるようになり、試験開始後434日目には、A系統における罹病率は生残魚の95%に達した。これに対してB系統では434日目において発生が確認された個体は5%に過ぎなかった (図7, 8)。また、258日目から434日目の間に死亡したB系統 (44検体) の中でも、本病の罹病魚は観察されなかった。(44検体中の一部の検体で細菌分離を試みた結果、エド

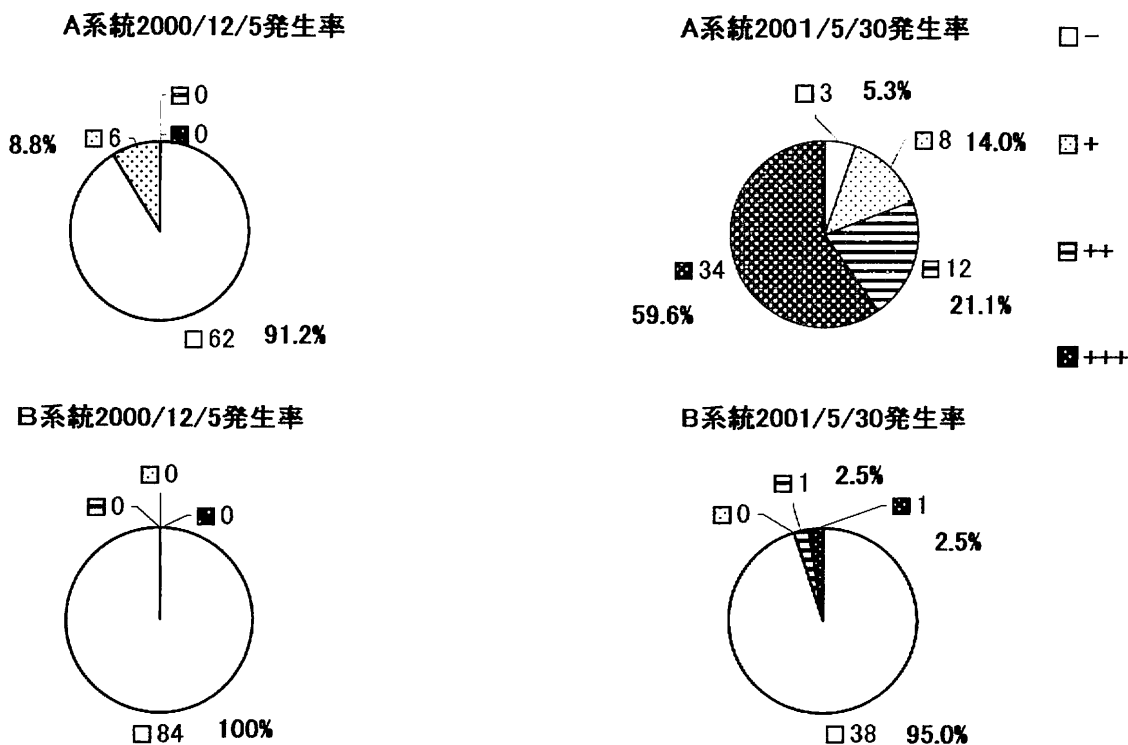


図7 リンホシスチス病の発生状況の変化



図8 リンホシスチス病の罹病魚（症状+++）

ワジェラタルダ菌が分離されるとともに、その他の斃死魚にも腹部の膨満、腸の突出、腹水の貯留などエドワジェラ症の特徴を有しているものが多数観察され、エドワジェラ症がこれら斃死の主要原因であることが推測された。）

一方、A系統における同期間の斃死魚11検体については、エドワジェラ症の症状を呈する個体も観察されたが、リンホシスチス病の細胞塊も同時に確認されており、これらは合併症によるものと推察された。また、頭部周辺に細胞塊が形成された場合には摂餌が困難となり、衰弱して斃死に至る罹病魚も観察された。

考 察

本試験ではA、B両系統を同居飼育することにより、全く同一な環境条件下において飼育しており、両者における体形の相違は親魚の遺伝的要因が大きく関係していることが考えられた。また、両系統の肉眼観察による系統の推定とマイクロサテライトDNAマーカーによる判別の整合性は93%合致しており、両系統は、外見からも容易に判別することができるほど体形に関して違いがあると言える。

本試験においては検体を固定せずに活かした状態で計測したために、容易に測定できる形質（全長、体高、体重）のみを取り扱った。肥満度については魚体の厚みが関与していることが想定されるが、B系統のほうが細長い体形を呈しているにも拘らずA系統と同様の肥満度を示しており、体形（BH/TL）と肥満度（k）の関係からB系統のほうが成長するにしたがって、肉厚になる傾向が強いことが示唆された。

また、本試験を開始する以前より、B系統においてはリンホシスチス病の発生が皆無であることが過去の飼育履歴から経験的に知られていたが、本試験の結果からも、リンホシスチス病に対する感受性が両系統で相違していることが改めて確認された。一般的にリンホシスチス病は斃死率の低い疾病として報告されているが（江草⁴⁾斃死率が低くとも、発病魚の外見は極めて醜悪となるため、市場での価値は皆無となり、経済的に甚大な被害が発生する場合がある。最近、ウイルス病の予防対策としてはワクチン接種が有効な方法として検討されており

(Nisida et al.⁹⁾), リンホシスチス病についても取り組まれている。その一方で、本試験のB系統のような耐病品種を開発していくことも疾病被害を軽減するための有効な手法に成り得ると考えられた。

本試験と同様にヒラメやマダイにおいて異なる系統群を仔魚から同居飼育して、一定期間飼育した後にアイソザイムの遺伝子型を利用することによって系統を判別し、各系統の体形、体色等の生物特性と親魚との関連性について報告されている(谷口他²⁷⁾)。

しかし、現在までに調べられているヒラメのアイソザイム型で、遺伝標識として利用できるものは肝臓のイソクエン酸脱水素酵素(ICDH)のみであり、同居飼育をするための親魚の組み合わせも限られ、比較したい系統間の親魚のアイソザイム型が同一型の場合には、試験を設定することができない。また、アイソザイムによる遺伝標識では判定時に即殺して分析するため、判定した個体をその後も継続して飼育することは困難である。一方、マイクロサテライトDNAマーカーによる判定では微量の血液や鱗の一部が得られれば判定できるため、魚体への影響が少なく本試験のように系統判別後も飼育試験を継続することができる(田畑他⁹⁾, 田畑²⁸⁾)。

現在までのところ、海産魚を含め養殖水産物においては、選抜育種による品種の開発はほとんどない。このため、水産分野においては飼料および飼育環境と成長、薬剤と疾病などに関する試験を行う場合には、供試魚の遺伝的背景が考慮されることは一般的に少ない。しかし、供試魚の遺伝的背景が異なることにより、同様の試験を設定しても遺伝要因の影響により再現性が得られにくいことも考えられる。成長や薬効などの結果をよりいっそう確かなものにするためには、遺伝的な要因も考慮に入れることが不可欠である。このためには供試魚の遺伝的由来が明確なものを使用しなければならない。本試験では本県で飼育している系統間を相対的に比較した結果を報告したが、今後、様々な試験を設定するうえにおいて、比較対象の規準となる系統を確保することは育種研究だけでなく、飼育環境、餌量、疾病などの試験を実施していくうえで重要な課題となるであろう。

本試験のA系統とB系統のように起源となる親魚を限定し(A系統1尾、B系統2尾)、これらをもとに雌性発生を繰り返し実施すれば、多くの遺伝子座が関係している体形などの量的形質についても短期間のうちに固定できることを確認した。このように染色体操作を用いながら選抜育種に取り組めば、品種開発の時間が大幅に短縮され、効率的に優良品種を作出することが可能になるものと考えられる。

また、両系統を用いてヒラメのDNAマーカー連鎖地図が作製されつつあり(Maria Raquel,³⁾、それを用いた量的形質の遺伝子座解析(QTL解析)やその結果を応用したマーカー選抜育種(MAS)が注目されつつあるが、それらを成功させるためには本研究で供試したA、

B両系統のような形質特性や遺伝的由来が明らかなものの存在が必要となる。このため、今後も両系統について更なる固定化を図りながら継代飼育し、その他の生物特性についても引き続き精査して、QTL解析やマーカー選抜育種へと応用していく予定である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、東京水産大学岡本信明教授には終始懇切にご指導いただくとともにご校閲いただき深く感謝いたします。試験魚の飼育管理について栽培技術部池田武男氏、金子栄一氏、熊谷民夫氏に多くの労を賜った。資料の取りまとめについて西元裕子氏、杉浦紀久衣氏、峯弥生氏、青木朱見氏にはご協力をいただいた。また、統計処理については海洋科学技術センター土田真二博士にご指導いただいた。

ここに厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 田畑 和男(1991): ヒラメの染色体操作に関する研究, 兵庫県水産試験場研究報告, 281-134.
- 2) 山本 栄一(1995): ヒラメの人為的性制御とクローン集団作出に関する研究, 鳥取県水産試験場報告, 34, 1-145.
- 3) Maria Raquel Moura Coimbra(1999): A Genetic Linkage Map of The Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Graduate School of Fisheries Tokyo University of Fisheries Doctoral Course of Aquatic Biosciences
- 4) 江草 周三(1988): 魚病学, pp404, 恒星社厚生閣, 東京.
- 5) Nisida, H. M. Yoshimizu, and Y. Ezura(1998): Fish Pathology, 33, 207-211.
- 6) 谷口 順彦・東 健作・榎田 晋(1984): マダイ人工種苗の脊椎異常発生率にみられた親間差, 日本水誌, 50(5), 787-792.
- 7) 谷口 順彦・松本 聖治・小松 章博・山中 弘雄(1995): 同一条件で飼育された由来の異なるマダイ5系統の質的および量的形質に見られた差異, 日本水誌, 61(5), 717-726.
- 8) 田畑 和男・五利江 重明・谷口 順彦(1986): アイソザイムマーカー遺伝子によるヒラメ雌性発生2倍体および3倍体誘導の確認, 水産育種, 11, 35-41.
- 9) 田畑 和男(1987): 同一水槽内飼育による雌性発生2倍体と正常発生ヒラメの成長比較, 日本水誌, 54(7), 1143-1147.
- 10) 田畑 和男(1991): ヒラメの白化現象の遺伝的要因の一考察, 水産増殖, 39(1), 29-35.