ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 白化クローンの 変態期を中心とした黒色素胞発現過程

中村 藍子,^{1a} 鹿野 隆人,² 水田 章,^{3b} 青海 忠久^{1*}

(2004 年 10 月 14 日受付, 2005 年 2 月 7 日受理)

¹福井県立大学海洋生物資源学科,

²Great Lakes Institute for Environmental Research, University of Windsor,

³兵庫県淡路県民局洲本農林水産振興事務所

Melanophore development during metamorphosis in pseudo-albinic clone of
Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

AIKO NAKAMURA,^{1a} TAKAHITO SHIKANO,²

AKIRA MIZUTA,³ AND TADAHISA SEIKAI^{1*}

¹Department of Marine Biosciences, Fukui Prefectural University, Obama, Fukui 917-0003, Japan, ²Great Lakes Institute for Environmental Research, University of Windsor, 401 Sunset Avenue, Windsor, Ontario, N9B 3P4, Canada, ³Sumoto Agriculture, Forestry, Fisheries Office, Awaji District Administration Office Regional Development Department, Hyogo Prefectural Government, Sumoto, Hyogo 656-0021, Japan

A pseudo-albinic clone and control group of normal diploid in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were examined from the larval stage to juvenile stage through metamorphosis on the differentiation process of melanophores in relation with pseudo-albinism. On the ocular side of the control group, the larger melanophores maintained their density from the larval stage through metamorphosis, but the smaller ones rapidly increased from the climax of metamorphosis (H-stage). On the blind side, the larger melanophores maintained their density but the smaller ones did not appear through metamorphosis. In the pseudo-albinic clone, both nearly complete and partial pseudo-albinism appeared at high percentages. In completely pseudo-albinic juveniles, the distribution of melanophores on the ocular side was similar to that on the blind side in the normal group, whereas the ocular side of partial pseudo-albinic juveniles had 3 types of distribution. Therefore, it was suggested that the appearance of small melanophores played a fundamental role in normal pigmentation on the ocular side, and the failure of this process inhibited normal pigmentation.

キーワード：クローン，黒色素胞，白化，ヒラメ

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* などの異体類は、極端に側扁した体形をしており、眼の位置、体色、鱗の形態などに左右不相称性を示す。この左右不相称性は仔魚期後半の変態を通じて形成される。¹⁾ 異体類の人工種苗生産過程では、この左右不相称性に乱れを生じることが多く、白化や黒化（両面有色）などの体色異常個体や眼位異常個体の出現率が極めて高い場合がある。²⁾ 年間 5000 万尾を超える人工種苗が生産されているヒラメにおい

て、白化個体は養殖用種苗や放流用種苗として価値が低く、その発現機構と防除法の確立が求められてきた。³⁾

体色異常の発現機構と防除に関しては、主に仔魚期の餌料の側面からの研究が進められてきたが、体色発現を担う色素細胞の動向に関する研究は不可欠である。このことに関して、ヒラメの変態前には両体側で大型の黒色素胞が同様の密度と拡散状態で存在するが、変態完了期になると小型の黒色素胞が有眼側でのみ対数的に増加し

* Tel : 81-770-52-6300. Fax : 81-770-52-6003. Email : seikai@fpu.ac.jp

^a 現所属：株式会社エヌ・イー サポート (N E Support Co. Ltd., Himejima, Nishiyodogawa, Osaka 555-0033, Japan)

^b 現所属：兵庫県農林水産部漁港課 (Hyogo Pref., Agriculture, Forestry & Fisheries Department, Fishing Port Management Division, Kobe, Hyogo 650-8567, Japan)

始め, 有眼側に黒褐色の体色が発現する。一方, 白化個体では変態を完了しても有眼側で上記のような小型の黒色素胞が発現せず着色しないことが報告されている。⁴⁾

1980年代にヒラメの雌の成長が雄よりも早いことに注目して, 雌性化種苗の作出が試みられ, 1991年に初めて雌性発生による全雌クローン系が得られた。^{5,6)} これらのクローンをを用いたヒラメの量的形質に関する遺伝学的解析も行われ,⁶⁾ 餌料効果や物理・化学的環境の影響評価, 薬物の影響評価などのための実験魚としての有効性が期待されている。⁷⁾ この一連の研究の中で, 眼の移動や体色発現のメカニズムを解明する上で有効な実験動物となる可能性が高い逆位あるいは白化個体出現率の高いホモ型クローンが確立された。⁵⁾ 実験的にヒラメの白化個体を高頻度で発現させるためには, 仔魚期の特定の時期に甲状腺ホルモン処理を行うことやアラキドン酸を強化した生物餌料を与えることが有効であると報告されている。⁸⁻¹⁰⁾ しかし, 体色異常が発育過程における左右性の確立という形態形成に深く関わるなら,⁴⁾ 仔魚の形態形成過程に影響する可能性のある上記のような処理をなるべくさけて体色発現のしくみを研究するほうが望ましい。そこに, 特に餌料の質や給餌条件を変更することなく白化出現率を高めることのできるクローン利用の利点がある。

本研究では, 白化出現率の高いクローンを通常の親魚から得られたヒラメと比較することにより, 変態に伴う両体側の黒色素胞の発現過程を解析し, 体色発現および白化の関連について検討した。

材料および方法

供試魚 ヒラメ白化クローン仔稚魚と対照群として通常の親魚から自然産卵された受精卵から得られた仔稚魚を供試魚として用いた。白化クローン卵は, 2001年4月27日に兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センター(兵庫県明石市)において, 白化出現率の高いホモクローン雌親魚より搾出した。この卵をUV照射で不活性化したマダイ *Pagrus major* 精子を用いて雌性発生させ, 約6,000粒を4月28日に福井県立大学海洋生物資源学科堅海臨海研究施設(現海洋生物資源臨海研究センター, 福井県小浜市)に輸送した。対照群には, 隣接する福井県栽培漁業センターにおいて, 放流用の種苗生産に用いる通常の養成親魚より同年5月4日に自然産卵された受精卵約5,000粒を用いた。これらの受精卵は, 200 L ポリカーボネイト水槽に収容し, 孵化後10日目まで止水飼育した。孵化後10日目に約1000尾を100 L ポリカーボネイト水槽に移し, 砂ろ過海水をかけ流しにして流水飼育した。換水率は, 仔稚魚の成長に合わせ0.5~4回転/日まで適宜増加させた。水温は, 孵化後9日目までは500 Wの投げ込み式チタンヒー

ターを用いて約16°Cを維持するよう加温し, その後は自然水温とした。水温は, 15.5°Cから22.5°Cの範囲(平均水温は19.0°C)で, 両群に相違はなかった。

餌料には, S型ワムシ *Brachionus rotundiformis*, アルテミア *Artemia* sp. (ブラインシュリンプエッグス90, 北村株) ノープリウスおよび市販の配合飼料を用いた。S型ワムシは, 孵化後2日目から20日目までドコサユグレナ(秋田十條化成株)で栄養強化し, 1日1回15時頃に10個体/mLとなるよう与えた。ドコサユグレナで栄養強化したアルテミアノープリウスは, 孵化後12日目から20日目まではシオミズツボワムシと併用して, 仔魚1個体につき8個体から前日の20%増となるよう増加させ, 1日1回与えた。孵化後20日目からはアルテミアのみを1日2回(10および15時頃)与え, 変態完了以後は徐々に減少させた。市販の配合飼料(えづけーる, 中部飼料株)は, 孵化後30日目からアルテミアと並行して与えた。飼育水には, 孵化後2日目から20日目まで1日1回ナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* を100万 cell/mLとなるよう添加した。

孵化後18日目から36日目まで3日ごとにそれぞれの水槽から約50個体採集して, 4%パラフォルムアルデヒド(in 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.2)で固定し70%エタノール中に保存して供試魚とした。供試魚は, 南¹⁾および後藤ら⁸⁾に基づいて発育段階を区分した。

Pigment Indexの測定 正常着色過程と比較した白化クローンの着色過程を定量的に比較するため, 対照群および白化クローンのG-stage(21個体および11個体), H-stage(各9個体), I-stage(51個体および41個体)の個体において, 有眼側(頭部, 軀幹部および尾柄部), 頭部のみ, 体側部(軀幹部および尾柄部)のそれぞれについてPigment Index¹²⁾(以下PIとする)を以下の式で求め, 各群の発育段階毎の平均値を計算した。

$$PI = \left(\frac{\text{有眼側各部の体色発現部位面積}}{\text{有眼側各部の面積}} \right) \times 100$$

実体顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ(Nikon Coolpix 950, Nikon株)によって撮影した有眼側の画像から, 画像解析ソフト(Winroof Ver.3.40, 三谷商事株)で個体ごとに有眼側各部の面積とそれぞれの体色発現面積を算出した。なお, 背鰭屈筋および臀鰭屈筋の体表(いわゆる縁側)部位, 鰭(背鰭, 尻鰭, 尾鰭)は, 肉眼では白化の有無の判別が困難なため面積に含めなかった。

黒色素胞の大きさおよび密度の測定 対照群にも白化クローンにも, 変態完了後のI-stageでは白化個体が出現したが, 両群ともG-stageまでは有眼側に着色した個体が出現しなかった。そこで対照群および白化クローンのG-stageまでは無作為に抽出した標本を用い, 有眼側

に着色した個体が出現した H-stage 以降では対照群は有眼側すべてに着色した完全着色個体、白化クローンは完全白化個体を用いた。完全白化個体においても、有眼側の一部に必ず体色発現部位が存在し、厳密には部分白化であるが、¹³⁾ 本研究においては、眼の周辺から吻端を除き着色していない個体を完全白化個体とした。供試魚数は、通常群 35 個体 (E-stage ; 5 個体, F-stage ; 7 個体, G-stage ; 9 個体, H-stage ; 5 個体, I-stage ; 9 個体), 白化クローン 35 個体 (E-stage ; 5 個体, F-stage ; 12 個体, G-stage ; 8 個体, H-stage ; 2 個体, I-stage ; 9 個体) を用いた。対照群および白化クローンの供試魚体側部の任意の 3~5 箇所を、顕微鏡 (OPTIPHOT-2, Nikon 株) に接続したビデオカメラ (TN300, ELMO 株) を利用してモニター画面 (PVM-1444Q, SONY 株) に投影した。モニター上の視野 (56.8 mm²) あたりの黒色素胞数およびその画面上の全ての黒色素胞の長径と短径を測定した。実際長に換算後、1 mm² あたりの細胞数を細胞密度として求め、長径×短径を細胞の大きさとした。

黒色素胞の分布状態の観察 両群で、通常体色個体、部分白化個体、完全白化個体が出現した。孵化後 30 日目から 36 日目に出現し変態を完了した I-stage の稚魚から対照群 39 個体および白化クローン 34 個体を精査し、有眼側体側部における黒色素胞のサイズおよび凝集・拡散などの形態とそれらの分布様式の組み合わせから、類型化を試みた。

統計処理 有意差検定には、分散分析および Post hoc 検定を用い、有意水準はいずれも 5 % とした。

結 果

発育に伴う体色の発現と Pigment Index の変化 本研究に用いた白化クローンの変態完了後 (I-stage) の 41 個体において、完全白化個体および部分白化個体は合わせて 37 個体であり、白化個体出現率は 90.2% であった。同様の条件で並行して飼育した対照群の変態完了後 (I-stage) の 51 個体において、白化個体は 12 個体で出現率は 23.5% であった。

両群では、H-stage から有眼側の体色発現が始まった。それぞれの群の H および I-stage では、有眼側全体に着色していない完全白化個体と、部分的に着色している部分白化個体、および全体が着色している完全着色個体に肉眼で類別できた。体色発現過程を量的に把握するために、変態の進行に伴う PI の変化を求めた (Fig. 1)。対照群の PI は頭部と体側部はほぼ同様に着色が進行し、有眼側全体で G-stage では 0 % であったが、H-stage では 30 %、変態が完了する I-stage では 86 % となり、変態の進行に伴って急激に有眼側の体色発現が進行した。一方、白化クローンの PI は、有眼側全体で G-

Fig. 1 Developmental changes of Pigment Index (PI) on the ocular side through metamorphosis in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Ocular side (upper) includes head (middle), trunk and caudal part (lower). Closed bars and open bars show the PI of the control and pseudo-albinic clone, respectively. Statistic analyses of PI were done between the control and pseudo-albinic clone and each developmental stage at each body portion. Superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Post hoc test).

stage では 0 % であったが、H-stage で 17 %、I-stage において 34 % となった。さらに体側部の着色が遅延し、H-stage で頭部の PI は 43 % であったが、体側部のそれは 1 % 未満であった。さらに I-stage においても、頭部で 64 % であったのに対し、体側部では 17 % にとどまった。

発育に伴う黒色素胞の大きさ組成と密度の変化 対照群および白化クローンの有眼側と無眼側の体側部に発現したサイズ別の黒色素胞の密度の変化を Fig. 2 に示す。対照群の有眼側では、E-stage において 21 cells/mm² の密度で存在していた $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ 以下の小型の黒色素胞は G-stage でほとんど存在しなくなったが、H-stage になると急激に増加して 28 cells/mm² となり、I-stage ではさらに 160 cells/mm² となった。 $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ を超える大きさの黒色素胞密度は、発育段階が進んでもほとんど変化せず、いずれのサイズでも 10~20 cells/mm² であった。無眼側では、E-stage において 17 cells/mm² の密度で存在していた $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ 以下の小型の黒色素胞が、その後の発育に伴って減少し、有眼側とは異

Fig. 2 Developmental changes in size distribution of melanophores on the ocular side through metamorphosis in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Ocular side includes trunk and caudal part except head, edge of body and fins. Density of melanophores (less than $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) on the ocular side markedly increased on the ocular side at H and I stages in the control. Superscript letters indicate significant differences between the ocular and blind side of two groups within each developmental stage ($p < 0.05$, Post hoc test).

なり H-stage 以降ではほとんど観察されなくなった。 $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ を越える大型の黒色素胞密度は、有眼側と同様発育段階が進んでも変化しなかった (Fig. 2)。

一方、白化クローンの有眼側では、E-stage において 36 cells/mm^2 の密度で存在していた $0 \sim 5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ の小型の黒色素胞は、発育段階が進むにつれて減少し、H-stage 以降ではほとんど認められなくなった。このとき $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ を越える大型の黒色素胞密度は $5 \sim 10 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ の大きさでは 35 cells/mm^2 存在していたが、それを越えるサイズでは 30 cells/mm^2 未満で存在し、以後発育に伴って大きな変化は認められなかった (Fig. 2)。無眼側におけるこれらの黒色素胞の密度の推移

Fig. 3 Patterns of melanophores distribution on the ocular side of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in pseudo-albinic clone. Pseudo-albinic area showed three different patterns as follows: Type I (large size melanophores sparsely distributed and dispersed), and Type II (large size melanophores distributed and formed spots), Type III (large and small size melanophores densely distributed and aggregated). Normally pigmented area in partial pseudo-albinic fish and normally pigmented fish showed Type IV (large and small size melanophores distributed and dispersed).

は、有眼側とはほぼ同様で、両体側の値に有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。

黒色素胞の分布状態 対照群および白化クローンの H-stage 以後において、完全白化個体、部分白化個体および完全着色個体が出現した。白化クローンの着色部位および未着色部位を、分布している黒色素胞の大きさおよびその拡散状態により類型化した (Fig. 3)。これらは大型の黒色素胞のみがまばらに存在する典型的な白化部位 (Type-I)，対照群の完全着色個体の体表と類似した斑紋を形成しているが大型の黒色素胞のみが存在する白化部位 (Type-II)，および肉眼では典型的な白化部位に見えるが大型の黒色素胞に加えて凝集状態の小型の黒色素胞が高密度で存在する部位 (Type-III)，および対照群の完全着色個体の体表に認められる大型の黒色素胞に加えて多数の小型黒色素胞が拡散状態で存在する着色部位 (Type-IV) であった。

Type-I から IV の 4 タイプに類型化された部分の黒色素胞の大きさとその密度を Fig. 4 に示した。Type-I では、 $0 \sim 5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ の小型の黒色素胞はほとんど存在せず、 $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ を越える大型の黒色素胞がまばらに存在した。Type-II の部位は $30 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ を越える大型で濃い黒色素胞が拡散していることにより形成されていたが、小型の黒色素胞がほとんど存在せず、全体としての黒色素胞の密度は Type-I と同様であった。さらに、Type-III では $1.25 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ 以下の凝集した黒色素胞が高密度で存在していた。これに対し Type-IV では、

Fig. 4 Size distribution of melanophores on the ocular side of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles in pseudo-albinic clone, in combination with the distinctive patterns of melanophores as shown in Fig. 3.

Fig. 5 Developmental change of pigmentation types on the ocular side in larval and juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* through metamorphosis. Pigmentation types were classified as follows: **a** (Nearly complete pseudo-albinism), **b** (Partial pseudo-albinism, combination of melanophore distribution Types I and IV), **c** (Partial pseudo-albinism, those of II and IV), **d** (Partial pseudo-albinism, those of III and IV), **e** (Partial pseudo-albinism, those of I and III and IV), and **f** (normal pigmentation). Melanophore distribution types correspond to those in Figs. 3 and 4.

$1.25 \sim 2.50 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ を中心に $5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ 以下の小型の黒色素胞が拡散状態で多く存在していた。

また、対照群においても、上記のような黒色素胞の存在状態が異なる4タイプの部分が存在した。これら4タイプに類型化された部分の黒色素胞の大きさとその密度は、白化クローンと同様の分布を示した。対照群の部

分白化個体における着色部位は、完全着色個体のそれと類似した黒色素胞分布を示したが、黒色素胞密度が半分程度であった。

4タイプに類型化された黒色素胞分布状態は単独で出現することもあるが、多くはいくつかのタイプの複合型として以下の6通り出現した (Fig. 5)。

Type-I のみの **a**。正常な体色部位 (Type-IV) に加えて大型の黒色素胞のみが存在する白化部位 (Type-I) を持つ **b**。正常な体色部位 (Type-IV) に加えて大型の黒色素胞が斑紋様に見える白化部位 (Type-II) を持つ **c**。正常な体色部位 (Type-IV) に加えて大型の黒色素胞と収縮した小型の黒色素胞が高密度で存在する白化部位 (Type-III) を持つ **d**。正常な体色部位 (Type-IV) に加えて2種の白化部位 (Type-I および Type-III) を持つ **e**。および正常な体色部位 (Type-IV) のみを持つ **f** である。

両群共に、G-stage では **a** のみであったが、H-stage では対照群の 30.0%、白化クローンの 52.1% で着色部位を持つ個体が出現した。しかし、対照群の着色個体の全てが **f** であったのに対し、白化クローンの着色個体の全てが頭部のみに正常に着色し、体側部は Type-II を示す **c** であった。変態完了後の I-stage では、対照群および白化クローンにおいて、**a** の割合は減少し、対照群で 91.8%、白化クローンでは 78.3% の個体が体側部にいくつかの着色部分を持っていた。しかし **f** は、対照群で 75.0%、白化クローンで 9.8% であり、白化クローンは対照群に比べて着色が不完全であった。白化クローンでは H-stage に引き続き **c** が多く出現しており、**a** も 31.7% を占めていた。さらに両群で **b**, **d**, **e** など多様な白化個体が出現した。

考 察

黒色素胞の発現過程 変態を完了すると正常な体色を示すと期待された対照群では, 着色の程度を示す有眼側の PI が H-stage から増加し始め, I-stage で 92% となり, はほぼ全ての個体で有眼側が着色した。同時に黒色素胞密度も H-stage から有眼側で増加し始め, I-stage でさらに増加した。一方, 無眼側では, このような PI の増加も黒色素胞密度の増加も認められなかった。有眼側における H-stage 以降の黒色素胞の増加は $0 \sim 5 \times 10^3 \mu m^2$ の小型の黒色素胞によったが, 有眼側でも無眼側でも全ての発育段階を通じて $5 \sim 30 \times 10^3 \mu m^2$ の大きさの黒色素胞密度はほぼ等しかった。これらのことから, 変態期における有眼側の着色には $5 \times 10^3 \mu m^2$ 以下の小型の黒色素胞が急激に増加するためであることが再確認された。

ヒラメの黒色素胞は, 稚魚期に入ると有眼側にのみ発現する直径(長径)が約 $30 \mu m$ の小型の成体型黒色素胞と, 仔魚期から稚魚期前半にかけて両側に等しく存在する大型の直径が約 $70 \sim 90 \mu m$ の幼生型黒色素胞の存在が報告されており,⁴⁾ 直径×直径を細胞の大きさとする, 小型は約 $1 \times 10^3 \mu m^2$ で大型は約 $5 \sim 8 \times 10^3 \mu m^2$ となる。本研究で変態完了後に顕著な増加が見られたのは, $5 \times 10^3 \mu m^2$ 以下の黒色素胞であり, 上記の成体型黒色素胞に相当するがやや大型であった。また, 幼生型に相当すると考えられる仔魚期から発現していた大型の黒色素胞も, 大きさが $5 \sim 30 \times 10^3 \mu m^2$ にわたっており, 大きさの範囲が広く, より大型のものも存在した。この両型の黒色素胞のサイズの変異の原因を探るために, 変態完了後約 2 週間と考えられる体長約 30 mm の通常体色稚魚の黒色素胞の大きさを測定した。その結果, 小型の黒色素胞が約 $1 \sim 2 \times 10^3 \mu m^2$, 大型の黒色素胞は $8 \sim 15 \times 10^3 \mu m^2$ であり, 本研究で観察された値より小型であった。ヒラメの黒色素胞密度は成長に伴って急増し, しかも黒色素胞は皮膚表面からの同一深度平面上には重複して存在しないことが顕微鏡観察で確かめられた。メダカ *Oryzias latipes* を黒背地や白背地で飼育すると黒色素胞の拡散状態のみならず密度までもが変化することが知られている。¹⁴⁾ 本研究でも, Type-Ⅲの白化部位で $1.25 \times 10^3 \mu m^2$ 以下の小型の黒色素胞が多く存在し凝集状態を示した部位の黒色素胞密度は $515 \times \text{cells/mm}^2$ で, 通常の拡散状態の黒色素胞密度の約 3.4 倍の値となった。したがって, いずれの黒色素胞の大きさも, 生理的条件によってかなり変異する可能性があると考えられた。

白化クローンにおける体色と黒色素胞の発現過程 白化クローンにおいても, 発育段階が進むに伴い典型的な白化部位のみを持つ a の割合は低下し, 部分白化個体

および完全着色個体の割合が多くなった。しかし H-stage では, 完全着色個体が 30% 出現した対照群に対し, 白化クローンにおいては約 50% が頭部のみ着色した個体であった。I-stage では, 体側に着色部分を持つ個体の割合は, 対照群で約 90%, 白化クローンでは約 70% であったが, このうち完全着色個体は対照群で約 70%, 白化クローンでは約 10% と大きく異なった。H-stage の有眼側の PI は, 対照群では 30% に増加したが, 白化クローンでは 17% であった。このとき対照群の頭部および体側部の PI はいずれも 30% で, 白化クローンのそれは頭部では 43% で体側部ではわずか 0.5% であった。これらのことから, 白化クローンの着色は特に体側部において阻害されていることが明らかになった。

次に黒色素胞の発現過程を見ると, 白化クローンの完全白化個体では, 全ての発育段階を通じて $5 \sim 30 \times 10^3 \mu m^2$ の大きさの黒色素胞密度は有眼側および無眼側でほぼ等しかった。しかし, 有眼側でも無眼側と同様に変態の完了に伴う $5 \times 10^3 \mu m^2$ 以下の小型の黒色素胞の発現は認められなかった。さらに, この白化クローンの完全白化個体における黒色素胞の発現過程は, ブラジル産アルテミアを給餌して誘発した白化個体の黒色素胞発現過程⁴⁾ と類似していた。このように白化クローンの有眼側白化部位では, 対照群の無眼側と同様に $5 \times 10^3 \mu m^2$ 以下の小型の黒色素胞の発現が阻害されていることが明らかになった。

白化クローンで出現した部分白化個体の白化部位は, 対照群の部分白化個体の白化部位の黒色素胞の分布状態と類似していた。魚類は色素細胞の数や形態を変化させることにより, その体色を変化させる。¹⁵⁾ 色素細胞は, 色素顆粒が細胞全体に広く拡散しているときには, 皮膚はその色素の色を濃く現わし, 逆に細胞中心部に凝集すると, 皮膚面に対する色素顆粒の占める面積が減少してその色調が薄れる。¹⁶⁾ このような色素細胞の運動性による体色変化は比較的迅速に起こるもので生理学的体色変化と呼ばれる。¹⁵⁾ $2.5 \times 10^3 \mu m^2$ 以下の小型で強く収縮した黒色素胞が高密度で存在する部分 (Type-Ⅲ) は, 肉眼で見ると白化部位と変わらないが, 部分白化個体における着色部位と比較して黒色素胞密度が特に高く, さらに完全着色個体と比較してもやや高密度となっていた。この肉眼的には白化とみなせる Type-Ⅲの分布様式が今後どのような体色へと変化していくのかは興味深い。色素細胞の拡散または凝集状態の持続が, 色素量や細胞密度の増加または減少につながることから,¹⁴⁾ この部位に発現している黒色素胞は, 抑制的環境に置かれていることは明らかである。しかし, Type-Ⅲの黒色素胞が成長に伴って拡散すると体色を回復する可能性があるが, このとき密度が大きく変化することなく拡散すると, む

しろ通常の正常体色個体より体色が暗化する可能性も考えられる。種苗生産したヒラメ稚魚を飼育していると、成長に伴い白化個体の有眼側は着色が進行することが観察される。これらの着色が進行した個体の中に極端に体色が暗化した個体が認められることがあるのは、このことと関係があるのかもしれない。

以上のことから、対照群の有眼側において、H, I-stage に様々な大きさの黒色素胞の拡散および小型の黒色素胞の増殖・分化が起こり、体色が発現した。しかし白化クローンにおいては、これらの現象が部分的に阻害されたり、遅延したために対照群に比べてその体色が十分に発現せず、白化個体となったと考えられた。ただし、ヒラメ仔魚に与える生物餌料にアラキドン酸を添加して人為的に白化を起こした場合でも、脳下垂体の ACTH および MSH 産生細胞の体積は体色発現前の浮遊仔魚期から体色発現後の稚魚期にかけて対照区と有意差が認められないことが報告されている。^{9,10)} また、本研究において黒色素胞が収縮したために肉眼的に白化に見える Type-III の分布様式を含む白化個体の出現率はきわめて低かった。したがって、一般的に白化の発現には色素細胞の拡散阻害より、増殖分化の阻害がより大きな役割を果たしていると考えられた。

文 献

- 1) 南 卓志. ヒラメの初期生活史. 日水誌 1982; **48**: 1581-1588.
- 2) 有瀧真人. カレイ類の変態と形態異常. 月刊海洋 1995; **27**: 732-739.
- 3) 青海忠久. 体色発現機構. 「ヒラメの生物学と資源培養」(南 卓志・田中 克編) 恒星社厚生閣, 東京. 1997; 63-73.
- 4) Seikai T. Process of pigment cell differentiation in skin on the left and right sides of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, during metamorphosis. *Japan. J. Ichthyol.* 1992; **39**: 85-91.
- 5) 田畑和男. ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報 1991; **28**: 1-134.
- 6) 山本栄一. ヒラメの人為的性統御クローン集団作出に関する研究. 鳥取水試報告 1995; **34**: 1-145.
- 7) 山本栄一. バイオテクノロジー. 「ヒラメの生物学と資源培養」(南 卓志・田中 克編) 恒星社厚生閣, 東京. 1997; 83-95.
- 8) Yoo JH, Takeuchi T, Tagawa M, Seikai T. Effect of thyroid hormones on the stage-specific pigmentation of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Zool. Sci.* 2000; **17**: 1101-1106.
- 9) Estevez A, Kaneko T, Seikai T, Tagawa M, Tanaka M. ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachidonic acid-enriched live prey. *Aquaculture* 2001; **192**: 309-319.
- 10) Estevez A, Kaneko T, Seikai T, Doros R M, Tagawa M, Tanaka M. Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in relation to albinism. *Aquaculture* 2001; **202**: 131-143.
- 11) 後藤常夫, 首藤宏幸, 富山 実, 田中 克. 志々伎湾におけるヒラメ稚仔魚の着底時期. 日水誌 1989; **55**: 9-16.
- 12) Shelbourne JE. Population effects on the survival, growth and pigment of tank reared plaice larvae. In: Jones FRH. (ed) *Sea Fisheries Research*. Elek Science, London. 1974; 93-111.
- 13) Norman JR. *A systematic monograph of flatfish (heterosomata)*. i. Psettoidea, Bothidae, Pleuronectidae. *Bulletin of British Museum. Natural History*, London. 1934; 459.
- 14) Sugimoto M, Uchida N, Hatayama M. Apoptosis in skin pigment cells of the medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei), during long-term chromatic adaptation: the role of sympathetic innervation. *Cell Tissue Res.* 2000; **301**: 205-216.
- 15) Bagnara JT, Hadley ME. *Chromatophores and Color Change*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J. 1973; 202.
- 16) 大島範子, 杉本雅純. 魚類における色素細胞反応と体色変化. 「色素細胞」(松本二郎, 溝口昌子編), 慶應義塾大学出版会, 東京. 2001; 161-176.