

R-124-'89

環境科学研究用に開発したニホンウズラの 遺伝学的及び微生物学的特性

Studies on the Genetic and Microbiological Characteristics of the Japanese
Quail Exploited for the Research of Environmental Science

高橋 弘 編

Edited by Hiroshi TAKAHASHI

NIES

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立公害研究所

Research Report from the National Institute for Environmental Studies, Japan, No. 124, 1989

国立公害研究所研究報告 第124号

環境科学研究用に開発したニホンウズラの 遺伝学的及び微生物学的特性

Studies on the Genetic and Microbiological Characteristics of the Japanese
Quail Exploited for the Research of Environmental Science

高橋 弘 編

Edited by Hiroshi TAKAHASHI

技術部

Engineering Division

環境庁 国立公害研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

序

環境汚染を最初に告発した「沈黙の春」(Rachel Carson, "Silent Spring")は、ケネディ時代のアメリカ民衆と政府を動かし、国連を動かし、ヨーロッパ、日本に波及して公害防止と生態系の保全を再認識する緒になったことは、四分の一世紀を経た今日でもまだ記憶に新しい。その第8章“そして、鳥は鳴かず”の項には、殺虫剤を与えられたウズラの親鳥は外見は何でもないようだが、その卵はほとんどふ化しなかったこと、また、鳥類が環境汚染に鋭敏に反応していることを指摘し、春になっても鳥が鳴かない“沈黙の春”となってしまった、と記されている。

このように、鳥類は環境の変化に鋭敏に反応することは古来から経験的に知られていたが、これを実験的に証明することは困難であった。その理由の一つとしては、鳥類の実験動物化が遅れていることが挙げられ、マウス・ラットに代表されるほ乳類実験動物に匹敵する鳥類の実験動物の開発が強く要望されている。

ニホンウズラは、本邦原産の野生ウズラから家きん化され、食卵・食肉用として現在約850万羽が全国で飼育されている。しかし、実験動物として確立されているウズラ系統は少なく、その遺伝的・微生物的純化も遅れていた。国立公害研究所では、技術部経常研究として環境科学研究用実験動物の開発に着手し、昭和55年度に東北大学農学部より抗体産生能の高及び低選抜系(H₂及びL₂系)ウズラを導入して以来、昭和57年度から59年度までの科学技術庁振興調整費の助成も受け、上記ウズラの遺伝的・微生物的純化を推進することができた。

本研究では、H₂及びL₂系ウズラを35世代まで選抜することによって抗体産生の異なる系統に分系育種するとともに、それらの遺伝的・微生物的純化を骨格計測値の多変量解析、高精度分染法による染色体の分析、電気泳動法による生化学的標識遺伝子の分析、ホルムアルデヒドによる無菌ウズラの作出等、最新の手法により明らかにすることができた。また、鳥類のガス感受性を実験的に証明するために、二酸化窒素を各種実験動物に急性暴露し、ウズラは大気汚染ガスの生体影響研究用実験動物として極めて有用であることを明らかにすることができた。

環境科学は極めて幅広い領域にわたっており、学際的色彩が強い反面、現象を実験的に証明することが困難な場合が少なくない。環境汚染は今や地球的規模で起っており、それらを鋭敏に感知し、環境汚染の拡大を未然に防止できる方策の確立が早急に望まれている。

今回、環境科学研究用に開発したウズラは“生きている測定器”として、またヒトを代替する“生体影響解明用実験動物”として、今後、有用性が急速に広がっていくものと思われる。

関係者各位には、いろいろな方面に御利用して頂き、御高見を頂くことができれば望外の喜びである。

平成元年 3月

国立公害研究所 技術部
部長 須藤 隆一

目 次

Abstract	1
研究概要及び研究成果	3
高橋 弘	
I. ウズラにおけるニューカッスル病ウイルス不活化ワクチンに対する 抗体産生能の高及び低系への選抜育種	7
高橋慎司・清水 明・高橋 弘・水間 豊	
II. 骨格計測法によるウズラ選抜系の系統間識別	19
高橋慎司・清水 明・高橋 弘・後藤信男	
III. 無菌ウズラの作出と微生物学的モニタリング	27
山元昭二・伊藤勇三・高橋慎司・高橋 弘	
IV. 二酸化窒素急性暴露に対するウズラの感受性試験	35
高橋慎司・伊藤勇三・高橋 弘	
V. 高精度分染法 (HRB) によるウズラ染色体の異形性の観察	51
高嶋良弘・高橋慎司・高橋 弘・水間 豊	
VI. ウズラ 3 系統間でのタンパク質多型についての遺伝学的解析	57
小坂末蔵・高橋慎司・高橋 弘	
[Appendix]	
実験動物の染色体分染技術の開発	67
一家きん類の染色体分染法の確立一	
高嶋良弘・高橋慎司・高橋 弘・水間 豊	

CONTENTS

Abstract	1
Outline of Performed Researches and Prospects	3
Hiroshi TAKAHASHI	
I. Selective Breeding for High and Low Antibody Response to Inactivated Newcastle Disease Virus Vaccine in the Japanese Quail	7
Shinji TAKAHASHI, Akira SHIMIZU, Hiroshi TAKAHASHI and Yutaka MIZUMA	
II. Quail Strain Identification by Means of Discriminant Analysis Using Skeleton Measurement	19
Shinji TAKAHASHI, Akira SHIMIZU, Hiroshi TAKAHASHI and Nobuo GOTO	
III. Production of the Germ Free Quails and Their Microbiological Monitoring	27
Shoji YAMAMOTO, Yuzo ITO, Shinji TAKAHASHI and Hiroshi TAKAHASHI	
IV. NO ₂ Gas Sensitivity Test in the Japanese Quail by Acute Exposure	35
Shinji TAKAHASHI, Yuzo ITO and Hiroshi TAKAHASHI	
V. Polymorphism of Japanese Quail's Chromosomes Stained by the High Resolution Banding (HRB) Technique	51
Yoshihiro TAKASHIMA, Shinji TAKAHASHI, Hiroshi TAKAHASHI and Yutaka MIZUMA	
VI. Genetic Analysis of the Protein Polymorphism in 3 Strains of the Japanese Quail	57
Suezo KOSAKA, Shinji TAKAHASHI and Hiroshi TAKAHASHI	

[Appendix]

Chromosomal Analysis in the Experimental Animal by Means of Several Banding
Techniques 67

— Avian Chromosome Methodology —

Yoshihiro TAKASHIMA, Shinji TAKAHASHI, Hiroshi TAKAHASHI
and Yutaka MIZUMA

Abstract

In this report, the genetic and biological characteristics of the Japanese quail exploited for environmental science were described.

The report bases on the study on the breeding of experimental animals for environmental science research, which was carried out at 1980-1985 in the NIES, as well as on the study on the exploiting of experimental animals which was supported by the Science and Technology Agency, JAPAN, during 1982-1984. Hereupon, the latter was carried out in co-operation of the NIES, Tohoku University, and Yamagata University.

This report consists of 6 papers and 1 appendix. The first paper reports the breeding process of the Japanese quails exploited for environmental studies, and the other are concerned with the genetic and microbiological characteristics of the Japanese quails.

The outline of these papers are as follows :

1) The selective breeding for high (H_2) and low (L_2) antibody titres to inactivated Newcastle disease virus (NDV) vaccine was carried out over 35 generations using the Japanese quail. The antibody titres to inactivated NDV (NDV-HI titre) between H_2 and L_2 lines were significantly different from each other throughout 35 generations. The maximal divergence between these two lines was obtained in the 24th generation.

As this selection process proceeded, the reproductive ability declined. Even at the 35th generation, the inbreeding depression was not so severe that it might be possible to advance their genetic purification.

2) As the genetic monitoring of mouse strains, the discriminant analysis of the mandible was used recently. So, the modified discriminant analysis was applied for the identification of quail strains (H_2 and L_2 quails).

From the results of the classification, the probability of right discrimination was more than 97% in the lines (H_2 v.s. L_2 lines), and more than 92% in the generation (14-15th v.s. 18th). Since the age difference was also discriminated, the same age animals were needed for this analysis.

3) To establish the microbiological monitoring technique, the germ-free quails were needed at first. And it was possible to get them after only one exposure to formaldehyde at the hatching.

4) Experimental animals such as mice, hamsters and Japanese quails were exposed to nitrogen dioxide (NO_2). Among the 3 species, the Japanese quails showed the highest sensitivity to NO_2 (20ppm) acute exposure, and the sensitivity of hamsters was higher than that of mice.

When the strain difference of the Japanese quails was examined, all strains of the quails were very sensitive to NO_2 . So the Japanese quail will be a useful experimental animal to study the biological effect of NO_2 and to monitor the air pollutant gases in the environment.

5) Recently, the high resolution banding (HRB) technique has been exploited to examine the human chromosome. The modified HRB technique was applied to the genetic monitoring of the Japanese quail.

The chromosomes of the Japanese quail ($2n = 78$) was clearly defined including the micro-chromosomes by this method. And also, the polymorphism was detected in the 3rd, 4th and Z chromosomes by C-banding. These results showed that this HRB technique was very effective to monitor the genetic marker in the Japanese quail.

6) The biochemical genetic markers were monitored using the recent methods of electrophoresis in the Japanese quail. And the genetic differences in the H₂ and L₂ quails were detected in the bands of pre-albumin and esterase-D types. Since these differences were useful for discrimination of H₂ and L₂ quail, the genetic fixation will be possible in the selection process.

Based on these findings, it seems probable that discrimination in the genetic markers between H₂ and L₂ quails will lead to definite genetic fixation by further selection process.

The chromosomal analysis including the HRB technique in the experimental animal was also reported. See appendix.

Consequently, it was clarified that the H₂ and L₂ quails are one of the most useful experimental animals for the purpose of environmental research, as they could be used for gas sensitivity tests, chemical toxicity tests, disease susceptibility tests, and so on.

研究概要及び研究成果 Outline of Performed Researches and Prospects

高橋 弘¹

Hiroshi TAKAHASHI¹

はじめに

本報告書は、環境科学研究用に開発したニホンウズラの遺伝学的及び微生物学的特性の成果をまとめたものである。これに関連した研究課題としては、昭和55年度から60年度までの技術部経常研究「環境汚染物質の生体影響研究に適した実験動物の開発・改良に関する研究」と、昭和57年度から59年度までの科学技術庁振興調整費による研究「実験動物の開発等に関する研究」があり、後者においては東北大学及び山形大学と共同研究を行った。

研究は、6つの論文と1つの付録から構成されており、ウズラの実験動物としての開発・改良に関するものが1編、ウズラでの遺伝学的モニタリング技術の開発に関するものが3編、微生物学的純化に関するものが1編、環境汚染ガスに対する感受性試験に関するものが1編及び付録として染色体分染技術の開発に関するものが1編となっている。それらの論文の概要は以下のとおりである。

研究概要

1) ウズラを用いてニューカッスル病ウイルス (NDV) の不活化ワクチンに対する抗体産生能の高 (H_2) 及び低 (L_2) 系の分系育種を35世代にわたって行い、両系の遺伝的純化に成功した。 H_2 及び L_2 系の抗体産生能 (NDV-HI 抗体産生能) には毎世代高い有意差が認められ、選抜24世代目で最大に拡大した。なお、両系ウズラの繁殖能力は予想した程には低下せず、更なる遺伝的純化が期待できることが示唆された。

2) 遺伝学的モニタリング技術として、マウスでは下顎骨計測値の多変量解析が系統間判別に有効であるとされているが、この方法を変法してウズラに適用した。 H_2 及び L_2 系ウズラの判別分析の結果、系統間判別は97%以上の高い確率で可能であり、また選抜世代間でも92%以上の確率で正しく識別された。なお、今回の方法では加齢の影響を受けるため、改良が必要とされた。

3) SPF (Specific Pathogen Free) ウズラを開発する目的で、まず無菌ウズラの作出を試みた。

1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki
305 Japan.

その結果、ウズラ発育卵をホルムアルデヒドで効果的に1回くん蒸することにより無菌ウズラを得ることができた。

4) 大気汚染ガスの一つであるNO₂ (20ppm)を急性暴露し、各種実験動物でNO₂感受性を比較した。ウズラのNO₂感受性は著しく高く、次にハムスターが高かったが、マウスでは低いことより、明確な種間差のあることが分かった。また、ウズラ系統間でNO₂感受性を比較しても、系統間差はあるものの各系統とも著しく高いことが確認されたので、ウズラは環境汚染指標動物として、またNO₂の生体影響解明用実験動物として有用であることが示唆された。

5) 最近、ヒトの染色体識別のために開発された高精度分染法(HRB法)をウズラに適用し、ウズラ染色体(2n=78)を分染した結果、これまで同定できなかった小型染色体まで明りょうに識別することができた。また、C-バンド法によって常染色体のNo.3とNo.4及び性染色体Zに異形性が検出された。HRB法はウズラの遺伝学的モニタリングとして極めて有効であることが分かった。

6) 最新の電気泳動法をウズラに適用し、生化学的標識遺伝子のモニタリングを試みた結果、プレアルブミンとエステラーゼDとに有意な系統間差が認められた。これらの遺伝的変異は、特にH₂系とL₂系の遺伝的標識として有用であることが分かったので、両系での固定化を試みる。

なお、付録としては、5)で開発したHRB法を含め、これまでの実験動物での染色体分染技術の開発経過と具体的染色方法について解説した。

研究目的

本研究の目的は、1960年代頃から実験動物として注目されているウズラ(Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*)を、遺伝学的にも微生物学的にも純化し、環境科学研究用実験動物として供給することである。

現在、我が国には850万羽の産業用ウズラが飼育されており、食卵生産量は世界一となっているが、実験用動物としてのウズラの利用は最近になってからであり、その遺伝的純化は遅れている。ウズラは本邦原産の野生ウズラより家きん化され、小柄ながら体質が強健であり、性成熟に達するまで約6週齢と短いなど、マウス・ラットに匹敵する特性を有している。しかしながら、近交退化が起りやすく、兄妹交配による近交系の作出は困難とされている。

国立公害研究所では、環境科学研究に適した実験動物としてウズラ(H₂及びL₂系)を、1980年に東北大学より導入し、これまで遺伝的純化を行ってきた。H₂及びL₂系ウズラは、NDV-HI抗体産生能を指標として35世代以上にわたって選抜されており、近交系ウズラの作出が最も有望となっている系統である。また、H₂及びL₂系ウズラは、NDVに対する感染抵抗力が異なること、NO₂に対する感受性が異なること、残留化合物の毒性試験に有用なこと等が報告されており、実験動物としての有用性は、更に高まることが期待できる。

また、実験動物学的には微生物学的純化も重要である。今回の実験では、ホルムアルデヒドに

よるくん蒸を効果的に行うことで、H₂及びL₂系ウズラの無菌化・SPF化が可能であることが明らかとなり、実験動物としての価値が更に高まることが期待できる。

本研究ではウズラでの遺伝学的及び微生物学的モニタリング技術を開発するとともに、これらのモニタリング技術を環境科学研究用に開発・改良してきたH₂系及びL₂系ウズラに適用し、両系ウズラの遺伝的・微生物学的純化を明らかにしたので、ここにまとめて報告する。

研究組織

本研究には国立公害研究所技術部動物施設管理室、東北大学農学部畜産学科家畜育種学講座、山形大学農学部農学科畜産学講座、及び農林水産省家畜衛生試験場が参加した。

研究担当者の所属・氏名を以下に示した。

〔研究担当者〕

国立公害研究所技術部動物施設管理室

高橋 弘・高橋慎司・清水 明・山元昭二・伊藤勇三

東北大学農学部畜産学科家畜育種学講座

水間 豊・高嶋良弘

山形大学農学部農学科畜産学講座

小坂末蔵

農林水産省家畜衛生試験場

後藤信男

研究成果の発表

昭和55年度から63年度までに発表された研究成果を以下にまとめた。

〔口頭発表〕

高橋慎司・猪岡尚志・水間 豊：NDV-HI抗体産生能の高及び低選抜系ウズラにおけるNDV攻撃に対する抵抗力の比較。日本家禽学会春季大会，東京（1980）。

高橋慎司・猪岡尚志・水間 豊：ウズラにおけるNDV不活化ワクチンに対する抗体産生能の高及び低系への選抜結果の分析。日本家禽学会秋季大会，郡山（1980）。

高橋慎司・高橋 弘：NO₂ガス暴露に対するウズラの感受性試験。日本実験動物学会第29回談話会，筑波（1982）。

高嶋良弘・高橋 弘・高橋慎司・水間 豊：ニホンウズラのC-バンド及び高精度分染法による染色体の分析について。日本家禽学会春季大会，名古屋（1984）。

Takahashi,S., H.Takahashi, S.Inooka and Y.Mizuma : Selection for high and low titre to inactivated

Newcastle disease virus vaccine in Japanese quail. 17th World's Poultry Science Congr., Helsinki (1984).

高橋慎司・高橋 弘・後藤信男：骨格計測によるウズラ選抜系の系統間識別. 第31回日本実験動物学会, 東京 (1984).

高橋慎司・高橋 弘：NO₂ガス感受性のウズラ系統間比較. 第32回日本実験動物学会, 奈良 (1985).

高橋慎司・大橋 徹・高橋 弘・水間 豊：NDV-HI抗体産生能の高及び低選抜系ウズラの繁殖能力の推移. 第77回日本畜産学会, 筑波 (1986).

高橋慎司・大橋 徹・高橋 弘・水間 豊：NDV-HI抗体産生能の高及び低選抜系ウズラの28世代迄の分系結果. 日本家禽学会春季大会, 東京 (1986).

高橋慎司・朝戸秀誠・高橋 弘・水間 豊：NDV-HI抗体産生能の高及び低選抜系ウズラにおける羽装の突然変異について. 日本家禽学会春季大会, 岐阜 (1987).

高橋慎司・高橋 弘・水間 豊：NDV-HI抗体産生能の低選抜系に出現した羽装突然変異ウズラの抗体産生能と繁殖能力. 日本家禽学会春季大会, 東京 (1988).

[印刷発表]

Takahashi, S., S. Inooka and Y. Mizuma (1984) : Selective breeding for high and low antibody responses to inactivated Newcastle disease virus in Japanese quail. *Poult. Science.*, **63**, 595-599.

Takahashi, S., H. Takahashi, S. Inooka and Y. Mizuma (1985) : Breeding for antibody producibility to Newcastle disease virus and disease resistance in Japanese quail. *Ann. Agric. Fenn.*, **23/24**, 260.

Takashima, Y., H. Takahashi, S. Takahashi and Y. Mizuma (1985) : A microcomputer usage for the measurement of chromosomes and preparation of Karyotype. *Jpn. J. zootech. Sci.*, **56**, 725-735.

Takashima, Y., H. Takahashi, S. Takahashi and Y. Mizuma (1985) : High resolution G-banding chromosomes of Japanese quail. *Tohoku J. Agric. Res.*, **36**, 75-78.

高橋 弘・高橋慎司 (1984) : 生体影響評価試験に関する調査研究—鳥類食餌毒性試験. ウズラを用いたクロルデン毒性試験, 日本環境協会昭和58年度報告, 107-123.

高橋 弘・高橋慎司 (1985) : 生体影響評価試験に関する調査研究—鳥類食餌毒性試験. ウズラを用いたトリブチルスズオキシド毒性試験, 日本環境協会昭和59年度報告, 123-150.

Takahashi, S., A. Shimizu, H. Takahashi and Y. Mizuma (1988) : Selection for high and low titre to inactivated Newcastle disease virus in Japanese quail through 35 generations. 18th World's Poultry Congr. Proc., **18**, 499-501.

I ウズラにおけるニューカッスル病ウイルス
 不活化ワクチンに対する抗体産生能の
 高及び低系への選抜育種
**Selective Breeding for High and Low Antibody Response
to Inactivated Newcastle Disease Virus Vaccine
in the Japanese Quail**

高橋慎司¹・清水 明¹・高橋 弘¹・水間 豊²
Shinji TAKAHASHI¹, Akira SHIMIZU¹, Hiroshi TAKAHASHI¹
and Yutaka MIZUMA²

要 旨

ウズラ (Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*) を用いて、ニューカッスル病ウイルス (NDV) の不活化ワクチン (鳥類の法定伝染病の一種である NDV をホルマリンで不活化し感染力をなくしたものに水酸化アルミニウムを加え、ワクチン効果を高めたもので、今回は京都ピゲン社製のものをを用いた) に対する抗体産生能 (NDV-HI 抗体産生能と略す) の高 (H_2) 及び低 (L_2) 系の選抜を 35 世代にわたって行った。

H_2 系と L_2 系の NDV-HI 抗体産生能の差には、35 世代を通して有意性が認められ、特に、選抜 24 世代目で両系の差が最大となった (ここで NDV-HI 抗体価は、 H_2 系が $8.2 \log_2$ 、 L_2 系が $0.8 \log_2$ であった)。また、 H_2 系と L_2 系の分系過程を直線回帰式で比較すると、 L_2 系の選抜効果が H_2 系のそれよりも高かった。

この選抜の経過に伴い、 H_2 系と L_2 系の繁殖能力のうちでふ化率、産卵率、卵重は低下したが、一方、育成率は上昇した。この結果として、 H_2 系と L_2 系の総合的な繁殖能力は、予想されていた程には減衰しなかったので、更なる遺伝的純化が期待できる。

Abstract

The selective breeding for high (H_2) and low (L_2) antibody titre to inactivated Newcastle disease virus (NDV) vaccine was carried out over 35 generations using the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).

-
1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan.
 2. 昭和57~59年度 国立公害研究所 共同研究員 (東北大学農学部 〒980 仙台市提通雨宮1-1)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present Address: Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980 Japan.

The antibody titres to inactivated NDV (NDV-HI titre) of H_2 and L_2 lines were significantly different from each other throughout 35 generations. The maximal divergence between these two lines was obtained in the 24th generations, when the antibody titres were $8.2 \log_2$ in H_2 line and $0.8 \log_2$ in L_2 line. As this selection process proceeded, the reproductive traits such as hatchability, egg producibility, and egg weight declined, but the viability was improved. Since the total reproducibility in H_2 or L_2 line quails was not reduced so much as expected, the genetical purification will be advanced by the further selection of both H_2 and L_2 quails.

1 はじめに

動物における抗体産生能が遺伝的に支配されていることは、これまで多くの報告例から明らかにされている。

McDevitt と Benacerraf¹⁾は、これまでの抗体産生能の遺伝支配を、(a) 複合抗原 (Complex multidenterminant antigens) に対する抗体産生能の体質的な差異に関する報告例と、(b) 合成タンパク抗原 (Synthetic polypeptide antigens) に対する抗体産生能の遺伝的差異に関する報告例に大別し、(b) は免疫応答遺伝子 (Immune response genes, Ir-genes) の同定に有効であるが、(a) は遺伝子の関与が不明確であることを指摘した。

しかしながら、免疫応答と各種形質との具体的関連性を明らかにするためには、複合抗原に対する免疫応答性が極めて重要となってくる。例えば、抗体産生能と抗病性との関連性において、Biozziら²⁾は、羊赤血球 (Sheep red blood cell, SRBC) に対するマウスの抗体産生能は遺伝的に支配され、SRBC に対して高い抗体産生能を示すマウス選抜系はトリパノゾーマ症、住血胞子虫、狂犬病等に対して、この低選抜系より有意に抵抗力が高いことを認め、また Siegel と Gross³⁾も、ニワトリの SRBC に対する高応答系で同様の結果を報告している。また最近では、環境汚染物質がヒトの免疫応答力に及ぼす影響が問題となっており、ぜん息、スギ花粉症などは一種のアレルギー現象とも考えられてきている。

このように、免疫応答力と疾病などとの関連性を実験的に証明するためには、モデル動物の開発が重要となってくる。著者らは 1975 年より NDV 不活化ワクチンに対する抗体産生能の異なるウズラ (H_2 及び L_2 系) を導入し、これまで 35 世代にわたって遺伝的純化を行ってきた。これらのウズラは、抗体産生能が明らかに異なるばかりでなく、大気汚染ガス感受性試験、残留化合物毒性試験などにも有用であることが分かった^{4,5)}ので、これまでの開発経過について報告する。

2 方法

2.1 供試ウズラ

供試ウズラの由来を図 1 に示した。1969 年より東北大学農学部家畜種学講座で選抜してきた NDV 不活化ワクチンに対する抗体産生能の高 (H_1) 及び低 (L_1) 系を正逆交配し、雑種 F_1 を

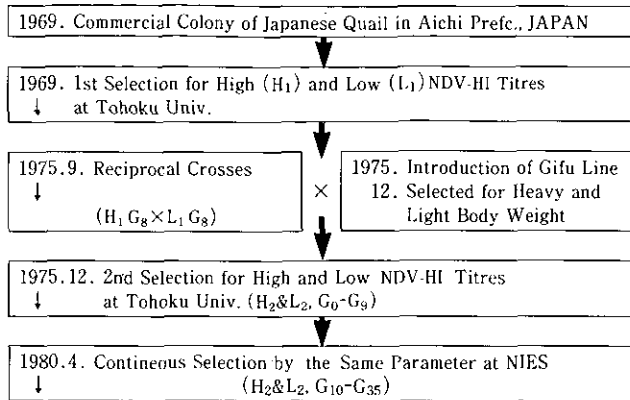


図 1 高及び低系の選抜経過

Fig. 1 Selective process of H₂ and L₂ lines

作成した。このF₁に岐阜大学より導入した体重選抜系を交配させ、三元雑種(計234羽)を得た。これを基礎集団として、第2回目の高(H₂)及び低(L₂)系の選抜が1975年より開始され、選抜9世代までは東北大学で、それ以降は国立公害研究所動物実験施設(以下、国公研と略す)で選抜が続行された。

2. 2 選抜方法

ウズラのふ化後4及び6週齢に、NDV不活化ワクチンを腹腔内に1羽当たり0.2ml(選抜15世代までは0.5ml)を接種し、7週齢にけい静脈より採血し、血清中のNDV-HI抗体力価をマイクロタイター法により測定した。抗体力価の表示は、常法に従い、最終希釈値の逆数をlog₂に変換して行った。親の選抜に際しては、NDV-HI価の家系内平均値を指標として先ず家系選抜し、次に家系内で更に高い又は低い個体を各々H₂系、L₂系に選抜した(家系内個体選抜)。また交配は、原則として、1羽の父親と1羽の母親を交配して計21組/系/世代を組み合わせた。なお、近交度の急激な上昇を避けるために循環交配(Rotational cross)を行った。

2. 3 飼育方法

ふ化時から10日齢までは、幼雛用専用育雛器(岡崎産業(株)社製を改良)で40~35℃に保温しながら飼育し、以後はブラケット型ケージ(日本クレア(株)社製、ラット用)で飼育した。保温は4週齢で廃止し、以後は温度:23±2℃、湿度:55±10%RH、換気回数:10~15回/hとした。なお、採卵する場合は、専用の採卵ケージ(岡崎産業(株)社製を改良)に1♂・1♀を収容した。飼料は、ふ化後4週齢まで幼雛用配合飼料(日本ノーサン(株)社製、粗タンパク:24.3%、粗脂肪:3.6%、粗繊維:3.3%、粗灰分:7.2%)を、それ以降は成雛用配合飼料(同社製、粗タンパ

ク：24.0%，粗脂肪：3.2%，粗繊維：3.2%，粗灰分：10.3%）を，不断給餌した。水は，水道水を自由飲水させた。照明は，ふ化時から7週齢までは24時間明とし，それ以降は14時間明10時間暗とした。

2. 4 繁殖能力の調査方法

選抜系の親の組み合わせは，原則として10週齢時に行い，交配後3日目から2週間にわたり毎日採卵した。種卵は卵重を測定し，貯卵器（13±1℃）に保存して，2週間分をまとめて入卵した（昭和孵卵器社製を使用，37℃恒温）。入卵後15日目に卵カゴに移し，ふ化した雛は19日分まで回収し個体識別用脚帯を付けた。入卵後20日目に割卵し，受精率，受精卵に対するふ化率，死ゴモリ率，中止率を調査した。また，ふ化後7週齢までの育成率を調査するとともに，Nordskog⁶⁾の示した適応度指数（産卵率×受精率×ふ化率×育成率）を求めた。

2. 5 統計処理方法

H₂系とL₂系とのNDV-HI抗体力価の比較は，平均値の差の検定（Studentのt-検定）で行った。また，選抜に伴う繁殖能力の推移（y）は，世代（x）に対する直線回帰式を求め，H₂系とL₂系とで比較した。なお，NDV-HI抗体産生能の遺伝率（heritability, h²）の推定は表型値の分散分析法より，近交係数の推定はFalconer⁷⁾の示した集団の有効な大きさより行った。

3 結果

3. 1 ウズラにおけるNDV-HI抗体産生能の高低への選抜結果

選抜35世代までの，NDV-HI抗体力価の平均値の推移を図2に示した。H₂系とL₂系の

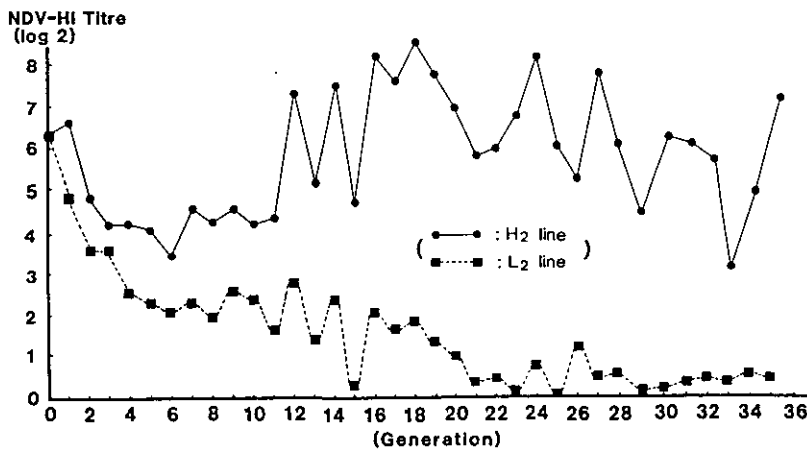


図 2 高及び低系の平均NDV-HI力価の比較

Fig. 2 Comparison of average NDV-HI titres in H₂ and L₂ lines

NDV-HI 抗体力価の平均値の差は、選抜第 1 世代から統計的に有意となり、35 世代を通して高い有意性が認められた。また、国公研に導入後は両系の平均値の差が急激に拡大し、24 世代目で最大値が得られた ($H_2: 8.2$, $L_2: 0.8$, 差: $7.4 \log_2$)。しかし、それ以降では L_2 系は低下するものの H_2 系の上昇は認められなかった。

H_2 系と L_2 系の分系過程を明らかにするために、選抜 35 世代までの世代数 (x) に対する NDV-HI 抗体力価の両系の平均値の差 (y) の直線回帰式を求め図 3 に示した。すなわち、 $y = 0.15x + 1.61$ ($r = 0.76^{**}$, $** P < 0.01$) が得られ、両選抜系の NDV-HI 抗体産生能の差は、35 世代を通して 1 世代平均で $0.15 \log_2$ ずつ有意に拡大したことが示された。

次に、 H_2 系と L_2 系の 35 世代を通しての分系過程を比較するために、世代 (x) に対する平均 NDV-HI 抗体力価 (y) の直線回帰式を求めると、 H_2 系では $y = 0.04x + 5.12$ ($r = 0.27$)、 L_2 系では $y = -0.11x + 3.53$ ($r = 0.85^{**}$) が得られた。すなわち、35 世代までの分系過程は、 H_2 系では直線的でなかった (世代による変動が大きいため回帰係数は有意とならなかった) が、 L_2 系では 1 世代当たりで $0.11 \log_2$ ずつ有意に平均 NDV-HI 価が低下したことが示された。

ところで、ウズラにおける NDV-HI 抗体産生能は、マウス²⁾、ニワトリ³⁾と同様に免疫応答遺伝子 (Ir-gene) によって支配されていることが上記の選抜結果より明らかとなったので、その遺伝率 (h^2) を以下に推定した。

表 1 に、NDV-HI 抗体産生能の遺伝率を基礎集団 (G_0) で推定した結果を示した。表型変動の分散分析により、両親からの遺伝率: $h^2_{S+D} = 0.12 \pm 0.50$ となり、低く推定された。また、両親 (28 組) の平均値への回帰により推定した結果では、 $h^2 = 0.23$ となり、いずれも遺伝率は低かった。なお、実現遺伝率 (Realized heritability, Rh^2) の推定は、世代による NDV-HI 抗体力価の変動が

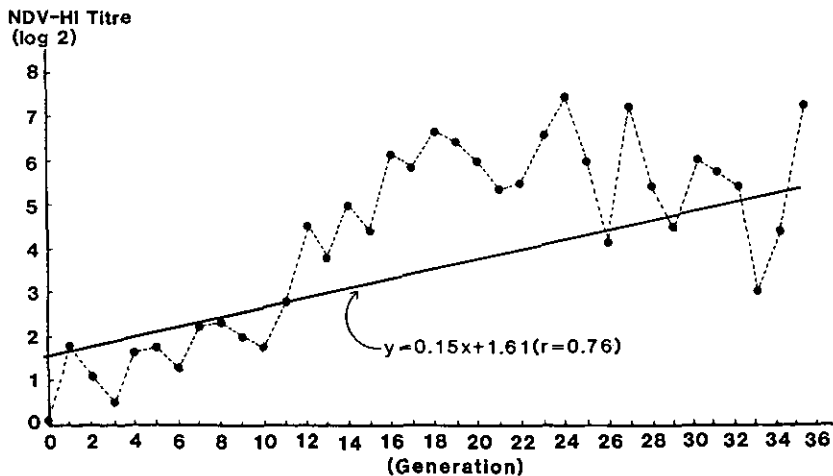


図 3 高及び低系の平均 NDV-HI 価の差の推移

Fig. 3 Development of average NDV-HI titres between H_2 and L_2 lines

表 1 分散分析表と遺伝率の推定
Table 1 Estimation of the heritability from co-variance analysis

変動要因	自由度	平均平方	分散の構成成分
父親間	13	19.44	$E^* + 3D^* + 6S^*$
父内母親間	14	4.63	$E + 3D$
兄妹間	56	10.07	E

遺伝率(h^2):

$$h^2_s = \frac{4S}{E+D+S} = 0.92$$

$$h^2_D = \frac{4D}{E+D+S} = -0.67$$

$$h^2_{s+D} = \frac{2(D+S)}{E+D+S} = 0.12$$

*)	E : Environment	(環境変動要因)
	D : Dam	(母間 ")
	S : Sire	(父間 ")

大きいために正確な推定は困難であった。

3. 2 ウズラでのNDV-HI抗体産生能の高低への選抜に伴う繁殖能力の推移

選抜35世代までのNDV不活化ワクチンに対する抗体産生能の高及び低系への選抜に伴う繁殖能力(卵重, 産卵率, 受精率, ふ化率, 育成率, 適応度指数)の推移を直線回帰式にして, 図4に示した。

H₂系及びL₂系とも選抜に伴って, 卵重, ふ化率, 産卵率は低下する傾向を示した(特に, 卵重とふ化率は有意に低下, $P < 0.01$)が, 一方, 育成率は有意に上昇した($P < 0.05$)。なお, 受精率ではH₂系は低下する傾向を示したものの, L₂系は低下しなかった。

これを, 総合的な繁殖能力を表す適応度指数で比較すると, H₂系: $y = -0.56x + 51.87$ ($r = 0.77^{**}$), L₂系: $y = -0.07x + 46.12$ ($r = 0.08$)となり, H₂系は低下するものの, L₂系は変化しなかった。

ところで, 卵重は選抜第2世代目にL₂系がH₂系より有意に重くなった。この傾向は選抜第4世代目以降, 32世代を除く毎世代で認められた。

3. 3 選抜に伴う諸形質の変化について

3. 3. 1 体重の変化

H₂系とL₂系の選抜第12・13・20世代での体重測定の結果を, 表2に示した。

L₂系のふ化時体重は, H₂系のそれよりも有意に重く, またふ化後4週齢以降にもL₂系がH₂

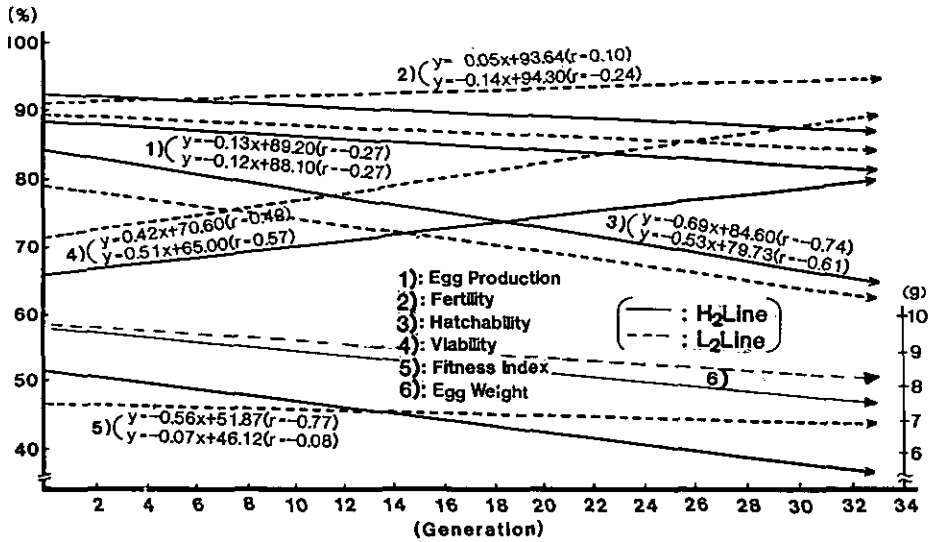


図 4 高及び低系の繁殖能力の直線回帰式

Fig. 4 Regression formulas of reproductive traits in H₂ and L₂ lines

表 2 高及び低系での体重の比較

Table 2 Comparison of body weight in H₂ and L₂ lines

Gene-ration	Line (n)	Average Body Weight from Hatch to 9 Week (g)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9WK	
MALE	G ₁₂	H ₂ (4)	6.1	16.6	35.2	57.9	80.1	96.4	101.7	111.9	110.8	108.7
		L ₂ (14)	7.2	16.8	36.9	61.1	83.7	100.3	103.8	114.2	108.3	110.9
		(L ₂ -H ₂)	1.1*	0.2	1.7	3.2	3.6	3.9	2.1	3.2	7.5	2.2
	G ₁₃	H ₂ (23)	6.6	16.4	33.4	55.9	77.5	90.8	90.2	96.8	97.6	99.2
		L ₂ (16)	7.7	16.8	33.9	57.9	81.8	93.8	101.6	108.2	108.5	111.5
		(L ₂ -H ₂)	1.1***	0.4	0.5	2.0	4.3	3.0	9.4***	11.4***	10.9***	12.3***
G ₂₀	H ₂ (17)	5.9	17.9	40.4	63.4	78.8	92.6	96.8	98.6	102.4	97.0	
	L ₂ (23)	6.4	18.6	40.5	65.0	79.0	97.9	102.9	105.2	110.8	109.6	
	(L ₂ -H ₂)	0.5**	0.7	0.1	1.6	0.2	5.3*	6.9**	6.6**	8.4	12.6***	
FEMALE	G ₁₂	H ₂ (9)	6.9	17.1	39.2	64.5	86.5	105.0	115.8	119.7	117.6	115.4
		L ₂ (10)	7.1	18.2	40.1	17.5	92.5	113.4	125.5	132.6	131.2	134.3
		(L ₂ -H ₂)	0.2	1.1	0.9	3.0*	6.0**	8.4*	9.7*	12.9*	13.6*	18.9*
	G ₁₃	H ₂ (22)	6.7	16.6	34.8	58.3	80.8	98.9	114.8	125.8	128.8	129.5
		L ₂ (12)	7.5	17.4	35.4	60.1	86.7	106.6	127.7	136.6	136.9	136.2
		(L ₂ -H ₂)	0.8***	0.8	0.6	1.8	5.9**	7.7**	12.9*	10.8***	8.1**	6.7
G ₂₀	H ₂ (18)	5.9	18.9	40.8	65.4	82.2	99.6	116.1	117.0	120.6	128.9	
	L ₂ (21)	6.8	20.7	43.8	69.5	85.2	107.5	128.4	125.1	130.9	141.5	
	(L ₂ -H ₂)	0.9***	1.8	3.0	4.1	3.0	7.9**	12.3***	8.1*	10.3**	12.6***	

*: P < .05, **: P < .01, ***: P < .001

表 3 YL 羽装型ウズラの分離数及び期待値に対する適合度

Table 3 Incidence of the "YL" mutant plumage among offspring from each mating

実験 No.	親の表現型 (遺伝子型)		交配数 (組)	ふ化数 (羽)	子の羽装 (期待比)		適合度検定	
	Sire ♂	Dam ♀			YL 色	野生色	χ^2	(P)
1	YL (y1 · y1)	× (+ · +)	4	25	0 : 25 (0) (1)		—	
2	YL (y1 · y1)	× (y1 · y1)	13	78	78 : 0 (1) (0)		—	
3	L ₂ (+ · y1)	× (+ · y1)	22	219	57 : 162 (1) (3)	.10	>.75	
4	L ₂ (+ · y1)	× (y1 · y1)	19	167	80 : 87 (1) (1)	.29	>.75	

系よりも有意に重くなることが分かった。

ふ化時体重と卵重との表型相関を求めたところ、H₂系：0.77**～0.80**，L₂系：0.82**～0.91**（選抜第11～13世代の親仔間）といずれも高い相関が得られ、H₂系とL₂系とのふ化時体重の差は卵重に起因することが分かった。

なお、成体重はH₂系♂：100～110g・♀：120～130gに対してL₂系♂：110～115g・♀：130～140gと、L₂系が♂・♀とも有意に重かった。

このように、ウズラでのNDV-HI抗体産生能の高及び低系への選抜に伴って、同じ基礎集団から出発したにもかかわらず、L₂系が体重大へH₂系が体重小へ分化したことが分かった。

3. 3. 2 羽装の変化

NDV-HI抗体産生能の選抜第22世代目において、L₂系1家系に羽装の突然変異（野生色の黄色化）が4羽出現した。

この羽装突然変異（YL型羽装と略す）の遺伝様式を検討した結果、常染色体上の劣性遺伝子に支配されていることが分かった（表3を参照）。また、YL型羽装とNDV-HI抗体産生能とは連鎖（Linkage）していないことが分かったので、選抜第30世代目からL₂系に積極的にYL羽装型を導入した結果、選抜第34世代目で100%に固定することができた。

YL羽装型は、ふ化時には全身が黄色であり野生型羽装と明確に区別することができる。また、成長に伴って淡黄色化するが、野生型羽装とは容易に識別することができることより、今回出現したYL型羽装遺伝子をL₂系の標識遺伝子（Genetic marker）として利用することができることが分かった。

4. 考 察

Scheibel⁸⁾は、雑系モルモットを用いてジフテリア毒素に対する抗体産生能の高及び低へ6世

代にわたり選抜し、両系の分系に成功したことを報告し、これが抗体産生能の遺伝的支配を最初に証明した例と言われている。

最近においては、マウスを中心として、免疫応答遺伝子 (I_r-genes) の研究が積極的に行われ、染色体地図が作製されるに至っているが、しかしながら、免疫応答が関与すると思われる抗体産生能と抗病性との関連、アレルギーと環境汚染物質との関連などを具体的に解明するには新しいモデル動物の開発が必要とされた。

著者ら⁹⁾は、ウズラを用いて NDV に対する抗体産生能の高及び低系を選抜し、選抜第 7・8・18 世代において NDV の感染実験を行い、抗体産生能と抗病性とに上記と同様の正の関連性を認めた。しかしながら、ウズラの免疫応答の遺伝的支配はマウスの場合とは以下の点で異なっていると思われる。

① 今回の選抜実験では、H₂ 系と L₂ 系との平均値の差が最大となったのは、選抜第 24 世代目であったが、Biozzi のマウスでは 14 世代目で既に最大値に達している。この理由の一つとしては、選抜指標の違いが考えられる。すなわち、今回の実験に選抜指標とした NDV-HI 抗体力価は SRBC-HA 抗体力価と異なり測定法が複雑である。これが、親の選抜の際に厳密性を欠いたことが考えられるのである。また H₂ 系でも NDV-HI 抗体力価がゼロのウズラが見られたが、この理由としては、NDV-HI 抗体産生に関与する各種修飾因子の影響が考えられる。例えば、微生物統御が改善されたと思われる選抜第 11 世代以降に分系が急激に進んだ事実がこれに当たると思われる。この点に関しては SPF ウズラを作成して微生物純化の影響等を詳しく検討する予定である。

② 今回の選抜実験での分系過程は、他の報告例よりも遅かった。例えば、Biozzi のマウスでは 9 世代で、また Siegel のニワトリでは 7 世代で分系したのに対して、H₂ 及び L₂ 系ウズラを分系するには 10 世代以上も必要としている。これは、ウズラの NDV-HI 抗体産生能の遺伝率が低いことによると思われる。ニワトリでの抗体産生能の遺伝率は 0.31 ± 0.60 (Pegler)¹⁰⁾、また Biozzi のマウスでは 0.20 ± 0.08 (Biozzi 氏)²⁾ と推定されたのに対して、今回のウズラでは 0.12 ± 0.50 と低く推定された。一般に複合抗原に対する遺伝的支配は Polygenic であり遺伝率も低く、人工タンパク抗原のそれほど単純ではないことが知られている。Biozzi 氏¹¹⁾は、SRBC 抗体産生能の高及び低系マウスの交雑試験と戻し交配の結果から、この抗体産生能は Polygenic な遺伝的支配を受けており、遺伝子座の数は 2~10 個と推定している。すなわち、McDevitt と Benacerraf¹⁾が指摘したように、自然界に存在する抗原 (複合抗原) は、如何に遺伝的解析が困難であり多大な労力と時間を費やさなければならないかを今回の選抜実験も示していることは確かである。

ところで、今回の選抜実験によって、NDV-HI 抗体産生能の高 (H₂) 及び低 (L₂) 系ウズラは 35 世代まで継代することができたが、繁殖能力はこれまで報告された程には低下しなかった。Kuwamura¹²⁾は、近交係数が 10% 増加するごとに、受精率は 9.1%、ふ化率は 11.6%、育成率は 7.4%、産卵率は 9.0%、卵重は 0.03g 低下することを報告している。一方、今回の選抜実験では、

近交係数 10% 当たりの低下は H_2 系・ L_2 系で受精率：3.2・1.5%，ふ化率：5.7・2.6%，育成率：-5.7・-4.8%，産卵率：0.7・-1.6%，卵重：0.39・0.31 g であった。すなわち、卵重を除いては予想された程には低下せず、育成率では逆に改善されたことが分かった。

また、これを選抜に伴う直線回帰式で示すと、直線の傾きがマイナスになったのはふ化率 (H_2 ：-0.69**・ L_2 ：-0.53**%/世代，** $P < 0.01$)、卵重 (H_2 ：-0.05**・ L_2 ：-0.04**g/世代) 及び産卵率 (H_2 ：-0.12・ L_2 ：-0.13%/世代) だけであり、受精率はほとんど変わらず (H_2 ：0.05・ L_2 ：-0.14%/世代)、育成率は逆にプラスとなった (H_2 ：0.51**・ L_2 ：0.42**%/世代，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$)。

今回の選抜実験で繁殖能力が予想に反して低下しなかった理由として、親の組み合わせに際して個体の遺伝構成を分析して循環交配 (Rotational cross) を行い近交度を急激に上昇させなかったことが挙げられる。ウズラの場合は、近親交配による退化現象が出現しやすく、兄妹交配の場合は 4 世代で繁殖が不可能になると報告されている¹³⁾。循環交配の場合は、近交係数の上昇が穏やかであるため繁殖能力の比較的良好な親が選抜される可能性が大きく、今回のような長期にわたる選抜実験には有効であったと思われる。なお、集団の有効な大きさより計算した近交係数の増加は、 H_2 系：1.61±0.35%/世代、 L_2 系：1.47±0.39%/世代であり、ゆえに 35 世代を通しての近交係数は H_2 系：56.4%、 L_2 系：51.4%と推定される (実際の近交係数の増加は選抜に伴って急激に増加してきており、マイクロコンピュータを利用した系統図からの算定方式を現在検討中である)。

また別の理由としては、選抜基礎集団の作成に用いたウズラは NDV-HI 抗体産生能又は体重を指標として長い世代にわたって既に選抜されてきた集団であり、これらの選抜過程において致死遺伝子が自然淘汰されて遺伝的荷重が減少していることが考えられる。ウズラの致死遺伝子は、9 個のうち家さん化する過程において 2～3 個が淘汰され 6～7 個に減少したと言われている¹⁴⁾。今回の選抜実験からは、 H_2 系と L_2 系ウズラの致死遺伝子は更に少なくなったことが予想されるので、最終的な致死遺伝子数を今後推定する予定である。

抗体産生能と繁殖能力との関連性についての具体的報告例は少ないが、産業的には極めて重要な問題である。これまでの報告例からは、抗体産生能を指標として抗病性系統の育種が可能であることが指摘されたが、抗体産生能と繁殖能力との関連性について報告した例は少ない。Scheibel⁸⁾は、雑系モルモットの分系育種の過程で高及び低選抜系とも産仔数が減少していくことを報告しているが、しかし、この場合はできる限り兄妹交配を行っていることより近交退化による影響と考えており、抗体産生能との関連性については何ら言及していない。今回の選抜実験の場合は、ふ化率及び卵重は選抜の経過に伴って有意に低下したが、これはヘテロシス効果の消失と近交退化の出現によると考えられる。一方、育成率は上昇したが、これは国公研に導入された以降に起きてきたことより、飼育条件 (特に幼雛期) が改善されたことによると考えられる。

このように、 H_2 及び L_2 系ウズラの繁殖能力は選抜の経過に伴って両系とも著しい低下は認め

られなかったため、ウズラの場合は抗体産生能と繁殖能力とは各々独立した形質と考えられる。この点に関して、著者ら¹⁵⁾は由来の異なる(財)日本生物科学研究所ウズラ6系統間でもNDV-HI抗体産生能と繁殖能力との関連性はなかったことを認めており、抗体産生能を指標とした選抜は繁殖能力に悪影響を及ぼさないとと思われる。

ところで、家きん産業上からは抗病性系統は経済形質も高いことが期待されている。しかしながら、今回の選抜結果からは抗病性系統であるH₂系は卵重及び体重が、L₂系のそれらよりも有意に軽かった。そこで、著者ら¹⁵⁾は体重の異なるウズラ系統間でNDV-HI抗体産生能を比較してみたが、体重の大小とNDV-HI抗体力価の高低には何ら相関は認められなかった。したがって、今回の選抜実験の結果、L₂系の卵重と体重が重くなったのは選抜に伴う二次効果と考えられる。すなわち、岐阜大学由来の体重大小系ウズラの遺伝子が副次的に関与した可能性があるため、今後別の集団で検討する予定である。

選抜第22世代目に出現した羽装突然変異(YL)ウズラは、選抜第34世代目でL₂系に100%固定することができた。YL羽装は、常染色体上の劣性遺伝に支配されており、この種の羽装は少なくとも日本では報告されておらず、新しい羽装突然変異である可能性が高い。L₂系にYL羽装が固定されたことにより、H₂系との区別がふ化時より可能となり、遺伝的コンタミネーションを防止するのに極めて有用となった。遺伝的標識(Genetic marker)としては、生化学的標識遺伝子(Biochemical marker genes)、及び染色体異形性(Chromosomal polymorphism)がH₂系とL₂系との識別に利用できることも指摘されている¹⁶⁾が、羽装突然変異遺伝子は肉眼で直接識別できることより、実際上では最も利用価値の高いマーカーと考えられる。

以上、ウズラにおけるNDV-HI抗体産生能の選抜結果と、選抜に伴う繁殖能力について述べたが、結論としては、①抗体産生能は遺伝的に支配されており抗病性系統を育種することが可能であること、また②抗体産生能と繁殖能力とは各々独立した形質である可能性の高いことが分かった。

そこで、産業上の観点からは、抗体産生能の高い形質と経済形質とを如何に連携させていくかが重要な課題となろう。すなわち、実験的にはH₂系には体重が大きく卵重が重い形質を組み込む(逆にL₂系には抗体産生能の高い形質のみを導入する)ことが可能か否かを試みるのが次の課題と思われる。

また、環境科学研究の観点からは、ウズラはほ乳類実験動物よりNO₂感受性が著しく高い(特にL₂系♀ウズラが高い)ことが指摘されていること¹⁷⁾、OECDガイドラインによるクロルデン及びTBTO毒性試験に有用であること^{18,19)}など、今後のH₂系及びL₂系ウズラの実験動物としての有用性が期待されている。

これらの研究課題を明確に証明するための実験動物として、H₂系とL₂系ウズラの遺伝的純化並びに微生物学的純化を更に高めていく予定である。

引用文献

- 1) McDevitt, H.O. and B. Benacerraf (1969): Genetic control of specific immune responses. *In*: Advance in immunology 11, Academic Press, New York, 31-74.
- 2) Biozzi, G., M. Siqueira, C. Stiffel, O. M. Ibanez, D. Mouton, and V. C. A. Ferreira (1980): Genetic selections for relevant immunological function. *In*: Progress in immunology IV, Feugereau, M and J. Daussert (eds.), Academic Press, New York, 432-457.
- 3) Siegel, P. B. and W. B. Gross (1980): Production and persistence of antibodies in chickens to sheep erythrocytes. I Directional selection. *Poul. Sci.*, **59**, 1-5.
- 4) 高橋慎司・高橋 弘 (1986): NO₂+O₃ガス複合暴露に対する感受性の種間比較. 第33回日本実験動物学会講演要旨集, 13.
- 5) 高橋 弘・高橋慎司 (1986): 第2章 OECD テストガイドライン 205—鳥類食餌毒性試験に関する考察及びコメント. 生態影響評価試験に関する調査研究, 日本環境協会昭和61年度報告, 45-56.
- 6) Nordskog, A.W. (1966): Evaluation of fitness index. *World's Poul. Sci. J.*, **22**, 207.
- 7) Falconer, D.S. (1960): Small populations. *In*: Introduction to quantitative genetics. Robert McLehose and Co. Ltd., Glasgow, 68-70.
- 8) Scheibel, I.F. (1943): Hereditary differences in the capacity of guinea-pigs for the production of diphtheria antitoxin. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **20**, 464-484.
- 9) Takahashi, S., S. Inooka, H. Takahashi and Y. Mizuma (1984): Selection for high and low titre to inactivated Newcastle disease virus vaccine in Japanese quail. 17th World's Poultry Congr. Proc. Abstr., 120-123.
- 10) Peleg, B.A., M. Soller, N. Ron, K. Hornstein, T. Bordy and E. Kalmer (1976): Familial differences in antibody response of broiler chicks to vaccination with attenuated and inactivated Newcastle disease virus vaccine. *Avian Dis.*, **20**, 661-668.
- 11) Biozzi, G., D. Mouton, A. M. Heuman, Y. Bouthiller, C. Stiffel and J. C. Mevel (1979): Genetic analysis of responsiveness to sheep erythrocytes in crosses between lines of mice selected for high or low antibody synthesis. *Immunology*, **36**, 427-438.
- 12) Kawahara, T. (1972): Inbreeding depression in Japanese quail. *Annu. Rep. Natl. Inst. Genet.*, **23**.
- 13) 近藤恭司編 (1968): 文部省科学研究費総合研究「ウズラの実験動物化に関する基礎的研究」研究報告集録. 昭和42/43年度. 5-20.
- 14) 河原忠孝 (1976): 実験用ウズラの由来と有用性. *実験動物*, **25**, 351-354.
- 15) 高橋慎司・大橋徹・高橋 弘・水間 豊 (1986): ウズラの NDV-HI 抗体産生能と繁殖能力・体重との系統間比較. 日本家禽学会春期大会講演要旨集. 23.
- 16) Takashima, Y., S. Takahashi, H. Takahashi and Y. Mizuma. (1985): High resolution G-banding chromosomes of Japanese quail. *Tohoku J. Agric. Res.*, **36**, 75-78.
- 17) 高橋慎司・高橋 弘 (1985): NO₂ ガス感受性のウズラ系統間比較. 第32回日本実験動物学会講演要旨集, 103.
- 18) 高橋 弘・高橋慎司 (1984): 鳥類食餌毒性試験—ウズラを用いたクロロデン毒性試験. 生体影響評価試験に関する調査研究, 日本環境協会昭和58年度報告. 107-123.
- 19) 高橋 弘・高橋慎司 (1985): 鳥類食餌毒性試験—ウズラを用いたトリブチルスズオキシド毒性試験. 生体影響評価試験に関する調査研究, 日本環境協会昭和59年度報告, 123-150.

II 骨格計測法によるウズラ選抜系の系統間識別 Quail Strain Identification by Means of Discriminant Analysis Using Skeleton Measurement

高橋慎司¹・清水 明¹・高橋 弘¹・後藤信男^{2,3}
Shinji TAKAHASHI¹, Akira SHIMIZU¹, Hiroshi TAKAHASHI¹
and Nobuo GOTO^{2,3}

要 旨

マウスの系統間識別に、下顎骨計測値の多変量解析が利用されているが、この方法を変法しウズラ(H₂系とL₂系)に適用した結果、以下のことが明らかにされた。

1)鳥類では下顎骨の形態がが乳類と比較して単純なために、下顎骨(5部位)に頭がい骨(3)・けい骨(1)・大たい骨(1)・鎖骨(2)・胸骨(6)の計6種18部位を多変量解析した結果、ウズラの系統間識別が可能となった。

2)ウズラ系統間で判別分析を行った結果、♂は97%、♀は100%の高い確率で識別することができた。

3)ウズラの選抜世代間で判別分析を行った結果、選抜14・15世代と選抜18世代とで♂は92%、♀は95%が正しく判別された。

4)選抜18世代において週齢間で判別分析を行った結果、8週齢と24週齢とで♂は80%、♀は83%が識別されたことにより、加齢の影響を受けることが分かった。

5)正準判別分析により系統・世代・週齢の位置関係を推定した結果、系統>世代>週齢の順で距離が離れて分布していることが分かった。

以上、これまでに報告されたマウスでの下顎骨の解析手法をウズラに適用することによって、ウズラ系統間の判別が高確率で可能であることが分かった。また、今回の方法は加齢又は世代の影響も受けることが指摘されたので、これらの影響を加味して系統間を判別する必要のあることが分かった。

-
1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan.
 2. 昭和57~59年度 国立公害研究所 共同研究員(農林水産省家畜衛生試験場 〒305 茨城県つくば市観音台3-1-1)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present Address: National Institute of Animal Health, Kannondai 3-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan.
 3. 現住所:神戸大学農学部 〒657 神戸市灘区六甲台1-1
Present Address: Faculty of Agriculture, Kobe University, Rokko, Kobe 657 Japan.

Abstract

Recently, mouse strains were identified by the discriminant analysis on values measured at the 13 sites of the mandible. In this study, the Japanese quail two strains (H_2 and L_2 strains) were also identified by the modified discriminant analysis as follows:

1) Since the mandible of avian species was more simple than that of mammalian species, the skeleton measurements of mandible (5 points), skull(3), femur(1), tibiotarsus(1), clavicle(2), sternum(6) were needed to analyze the Japanese quails of two strains.

2) From the results of the classification by means of discriminant function, the probability of right discrimination was 97% for male, and 100% for female in the H_2 and L_2 strains.

3) When this classification was applied to the distinction of selective generation in H_2 and L_2 quails, the right discrimination was also obtained in the probability of 92% for male, and of 95% for female.

4) In addition, the age difference of 8 and 24 weeks-old at the 18th generation was classified in the probability of 80% for male, and of 83% for female.

5) The positions of H_2 and L_2 strains on 2-dimensional plane as determined by canonical discriminant analysis were different from each another in order of the strain, generation, and age.

Therefore, the modified discriminant analysis was useful to distinguish the Japanese-quail strains, if the effects of generation and age were considered in the judgement.

1 はじめに

Festing¹⁾は、マウスの下顎骨の形状が遺伝的に支配されていることに着目し、この骨の計測値に判別分析を適応して系統(近交系)の同定が可能であると報告した。Gotoら²⁾は、近交系マウスの10系統の下顎骨13部位計測値に同じ解析を施し系統間識別に成功している。またKomedaとGoto³⁾は、糖尿病モデル動物であるNODマウスにGotoらの方法を応用し他の近交系マウス(9系統)との識別が可能であるばかりでなく、系統間の類縁関係をも明らかにしている。

このように、マウスでは系統の識別に下顎骨計測値の多変量解析が有効であることが明らかにされ、また他のほ乳類実験動物(ラット、モルモット、ウサギ等)への応用も試みられている。しかしながら、鳥類では下顎骨の形態がほ乳類よりは単純であるため、Gotoらの方法を直接適用することは不可能である。そこで、今回は同法を変法することにより、ウズラ系統間の判別が可能であるか否かを検討した。

2 方法

ウズラの骨格標本は次の手順で作成した。①エーテル麻酔でと殺し5~10分間ボイルする、②筋肉・内臓をできるだけ骨からはく離する、③骨を0.5%パバインに浸し37℃で2日間インキュベートする、④パバイン処理後に水洗し骨のみ回収する、⑤37℃で1日間乾燥する。

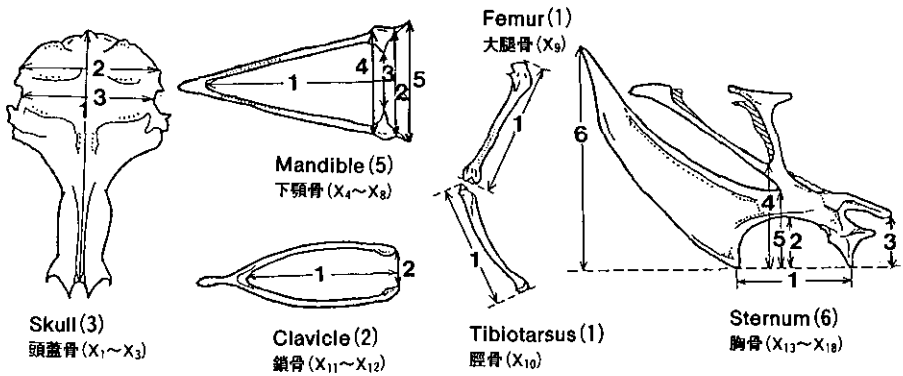


図 1 骨格計測の部位
Fig. 1 Sites of skeletal measurements

今回は、ウズラの骨格計測として、下顎骨(5)・頭がい骨(3)・けい骨(1)・大たい骨(1)・鎖骨(2)・胸骨(6)の計6種18部位(図1を参照)を、万能投影機(日本光学社製、5倍拡大)で計測した。計測値は、♂・♀別にコンピュータ処理し、それぞれ判別分析と正準判別分析を行った。

Gotoら²⁾の方法に従い、先ず系統間の判別を最大にするような次の判別関係を求めた。

$$Z_i = b_{i \cdot 0} + \sum_{j=1}^{18} b_{ij} X_j \quad (1)$$

ここで、 Z_i ($i=1,2$) は i 番目の系統用の判別値 (discriminant value), $b_{i \cdot 0}$ ($i=1,2$) は定数, b_{ij} ($i=1,2, j=1,2, \dots, 18$) は i 番目の系統用の判別関数における j 番目の変量 (計測部位) 用の判別係数 (discriminant coefficient) とした。

次に、ある個体の所属系統を定めるために次式を設定した。

$$P(i | X_1, X_2, \dots, X_{18}) = \frac{\exp(Z_i)}{\exp(Z_1) + \exp(Z_2)} \quad (2)$$

$(i=1, 2)$

ここで、左辺は測定値が X_1, X_2, \dots, X_{18} であるという条件下で、ある個体が i 番の系統に属する確率である。そして、この P が最大の i の番号を求め、その個体はその番号の系統に属すると定めた。正準判別分析 (次元の減少を伴う判別分析) は、多変量からなる多数の群がある時に群間の位置関係を明りょうに示すような軸すなわち正準変量を少数個抽出する方法である。抽出された正準変量からなる平面あるいは立体上に各群をプロットし、各群間の関係をみることができる²⁾。なお、コンピュータは農林水産省家畜衛生試験場の ACOS 800-II を用いた。

供試ウズラは、NDV-HI 抗体産生能の高 (H_2) 及び低 (L_2) 系で、選抜 14 と 15 世代の ♂ 22・♀ 16 (65・75 週齢), 選抜 18 世代の ♂ 41 (8・24 週齢)・♀ 41 の計 120 羽である。多変量解析は系統

間(H₂系とL₂系), 世代間(14・15世代と18世代), 及び週齢間(18世代の8週齢と24週齢)で行い, それぞれ♂・♀別に判別した。

3 結果

表1に, H₂系とL₂系ウズラの骨格計測値(計18部位)の平均を♂・♀別及び世代別(G_{14・15}とG₁₈)に示した。これを変動係数(Coefficient of variation)で比較すると, 頭がい骨・下顎骨・大たい骨・けい骨では変異が小さく, 胸骨・鎖骨では変異が大きいが分かった。

次に, これら18部位の骨格計測値を♂と♀に分けてコンピュータ入力し, 判別分析を行った結果を表2及び表3に示した。すなわち, 系統間で比較すると, ♂は63例中61例(97%)が, ♀は57例中57例(100%)が正しく判別された。なお, 世代別にして入力すれば, ♂・♀とも100%正しく系統が判別された。

次に, 世代間で比較すると, ♂:92%(58/63)・♀:95%(54/57)が正しく判別された。また, 18世代での週齢間の比較では, ♂:80%(33/41)・♀:83%(34/41)が正しく判別された。

ところで, 系統・世代・週齢の三者の位置関係を明らかにするために, Goto²⁾の方式による正準判別分析を行い, その結果を表4に示した。ここで第1正準変量(Z₁)と第2正準変量(Z₂)を累積した場合, 寄与率が♂で75%, ♀で81%となったので, Z₁-Z₂平面上に三者の位置関係を作図し, 図2に示した。系統間では, ♂・♀とも象限が違って分布していることより, H₂系とL₂系との区別は明確に識別することができた。また, 世代間でもH₂系♂を除き互に離れて分布していることより, 識別は容易であるが, 一方, 週齢間では比較的近い位置に分布しているため, 明確な識別は困難であった。

4 考察

実験動物の系統間識別として, 毛色, 生化学的遺伝標識, 組織適合性抗原等が適用されているが, 最近では骨格標本の多変量解析も有効であることが明らかにされてきた。特に, ほ乳類実験動物の下顎骨は, ①成長の比較的早い時期に形状が一定となり(マウスでは約50日齢)加齢の影響を受けにくいこと, ②形状が複雑な割にはへん平であるため計測が容易なことより, 英国ではマウス系統の遺伝的モニタリングに利用されている⁴⁾。

Gotoら²⁾は, マウスの下顎骨13部位のコンピュータ利用による多変量解析を開発し, マウスの系統間識別に極めて有効であったことを報告しているが, この方法はマウスのみならず他のほ乳類実験動物(ラット, モルモット, ウサギ等)にも, そのまま適用が可能であることが分かってきた。しかしながら, 鳥類では下顎骨の形態が図1で見られるごとくほ乳類と比較して単純なため, この方法を直接ウズラに適用することはできなかった。

今回は, ウズラ系統間(H₂系とL₂系)を識別するために, 下顎骨を含めた6種18部位を選択したが, その結果として高い確率でウズラ系統間の識別が可能であったことより, この方法の鳥

表 1 骨格測定部位の各群平均値

Table 1 Group means for skeletal measurement

(mm)

Sex	Group Line	Genera- tion(n)	Variables ; Skull			; Mandible				; Femur · Clavicle Tibiotarsus				; Sternum						
			X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈
Male	H ₂	G ₁₄ · 15(11)	22.06	15.52	14.77	22.68	14.54	6.25	15.24	16.52	37.06	45.77	21.25	10.21	21.36	6.27	13.46	19.43	13.71	24.74
		G ₁₈ (10)	22.32	15.38	14.63	22.67	14.75	5.83	15.07	16.13	36.77	45.10	21.19	9.14	21.52	6.48	13.58	19.28	13.44	26.64
		G ₁₈ (10)	21.78	15.38	14.75	22.53	14.75	6.02	15.09	16.29	36.49	44.94	21.14	9.98	21.14	6.35	13.58	18.93	13.09	24.96
		Ave.	22.0	15.4	14.7	22.6	14.7	6.0	15.1	16.3	36.8	45.3	21.2	9.8	21.3	6.4	13.5	19.2	13.4	25.4
	L ₂	G ₁₄ · 15(11)	22.43	15.68	14.90	22.31	14.75	5.73	15.11	16.34	37.18	45.41	21.75	11.82	21.62	5.46	13.45	16.76	14.21	22.48
		G ₁₈ (11)	21.78	15.76	14.88	22.08	14.73	6.04	15.20	16.30	36.79	45.26	21.90	10.00	21.00	5.47	13.70	17.50	12.31	21.18
G ₁₈ (10)		22.23	15.73	14.78	22.16	14.54	5.96	15.38	16.51	36.88	45.58	21.46	11.95	21.39	5.66	13.98	18.23	12.81	21.08	
	Ave.	22.1	15.7	14.8	22.2	14.7	5.9	15.2	16.4	37.0	45.4	21.7	11.2	21.3	5.5	13.6	17.5	13.1	21.9	
Female	H ₂	G ₁₄ · 15(11)	21.90	15.41	14.73	22.65	15.00	6.44	15.68	16.89	37.97	46.43	20.94	9.52	21.79	5.98	14.00	19.22	13.51	24.00
		G ₁₈ (11)	21.68	15.29	14.68	22.90	14.41	5.42	15.01	16.19	37.70	45.88	21.86	8.56	22.38	6.22	13.69	19.24	13.61	24.50
		G ₁₈ (10)	22.04	15.31	14.58	22.81	14.64	5.90	15.18	16.18	37.70	42.80	21.31	9.32	22.49	6.25	13.80	19.91	13.91	25.38
		Ave.	21.9	15.3	14.7	22.8	14.7	5.9	15.3	16.4	37.8	45.0	21.4	9.1	22.2	6.2	13.8	18.5	13.5	24.6
	L ₂	G ₁₄ · 15(5)	22.76	15.76	15.04	22.63	14.92	6.37	15.53	16.58	37.45	45.98	22.04	11.38	21.50	5.11	12.93	16.50	13.41	21.54
		G ₁₈ (10)	21.97	15.68	14.78	22.39	14.64	5.92	15.20	16.41	37.22	46.15	22.28	10.09	22.30	5.79	14.06	17.90	12.92	21.71
G ₁₈ (10)		22.15	15.48	14.47	22.42	14.36	5.68	14.90	16.04	37.23	46.43	21.70	11.04	21.73	6.03	14.12	18.60	12.82	22.14	
	Ave.	22.3	15.6	14.8	22.5	14.6	6.0	15.2	16.3	37.3	46.2	22.0	10.8	21.8	5.9	13.7	17.7	13.0	21.8	
	Mini.	21.68	15.29	14.63	22.08	14.54	5.42	14.90	16.04	36.49	42.80	20.94	8.56	21.00	5.41	12.93	16.50	12.31	21.18	
	Max.	22.76	15.76	15.04	22.90	15.00	6.44	15.68	16.89	37.97	46.43	22.28	11.95	22.49	6.48	14.12	19.43	14.21	26.64	
	All ave.	22.09	15.53	14.75	22.52	14.67	5.96	15.22	16.36	37.20	45.48	21.57	10.25	21.68	5.92	13.70	18.46	13.28	23.44	
Coefficient of variation		(%)	1.4	1.2	1.0	1.1	1.3	4.9	1.4	1.4	1.2	2.2	1.9	10.5	2.2	7.1	2.4	5.9	4.0	7.8

注) G₁₄ · 15は74 · 65週齢, G₁₈は8週齢(中段)と24週齢(下段)での測定値。

表 2 骨格計測値による判別分析結果のまとめ

Table 2 Summary of classification analysis on the skeletal measurement

Sex	Group No.	Line Generation (Age)	(n)	Classification ratio	Probability M±SD(%)	Misclassification ratio		
						Line	Generation	Age
Male	1	G _{14, 15} (74.65W)	(11)	11/11(100%)	58.8±33.7	0	0	—
	2 H ₂	G ₁₈ (8W)	(10)	7/10(70%)	57.3±35.2	0	1	3
	3	G ₁₈ (24W)	(10)	5/10(50%)	70.1±30.6	1	3	5
	4	G _{14, 15} (74.65W)	(11)	9/11(82%)	44.3±35.9	1	1	—
	5 L ₂	G ₁₈ (8W)	(11)	11/11(100%)	74.7±21.6	0	0	0
	6	G ₁₈ (24W)	(10)	10/10(100%)	69.8±27.2	0	0	0
Total				53/63(84%)		2/63	5/63	8/41
Female	1	G _{14, 15} (74.65W)	(11)	10/11(91%)	52.1±38.0	0	1	—
	2 H ₂	G ₁₈ (8W)	(11)	9/11(82%)	57.7±30.7	0	1	2
	3	G ₁₈ (24W)	(10)	8/10(80%)	71.2±32.1	0	0	2
	4	G _{14, 15} (74.65W)	(5)	4/5 (80%)	54.3±35.4	0	1	—
	5 L ₂	G ₁₈ (8W)	(10)	7/10(70%)	57.9±15.2	0	0	3
	6	G ₁₈ (24W)	(10)	10/10(100%)	70.2±30.1	0	0	0
Total				(120) 48/57(84%)		0/57	3/57	7/41

表 3 高及び低系での判別分析 (系統間・世代間・週齢間での誤判別の比較)

Table 3 Discriminant analysis between H₂ and L₂ lines different from the generation and the age

Sex	Group No.	Line Generation (Age)	(n)	Group No.					
				1	2	3	4	5	6
Male	1	H ₂ G ₁₄₋₁₅ (74・65wk)	(11)	11	0	0	0	0	0
	2	H ₂ G ₁₈ (8wk)	(10)	1 [▲]	7	2 ^X	0	0	0
	3	H ₂ G ₁₈ (24wk)	(10)	3	1 ^X	5	0	1 ^X	0
	4	L ₂ G ₁₄₋₁₅ (74・65wk)	(11)	1	0	0	9	1 [▲]	0
	5	L ₂ G ₁₈ (8wk)	(11)	0	0	0	0	11	0
	6	L ₂ G ₁₈ (24wk)	(10)	0	0	0	0	0	10
Female	1	H ₂ G ₁₄₋₁₅ (74・65wk)	(11)	10	1 ^X	0	0	0	0
	2	H ₂ G ₁₈ (8wk)	(11)	1 [▲]	9	1 ^X	0	0	0
	3	H ₂ G ₁₈ (24wk)	(10)	0	2 ^X	8	0	0	0
	4	L ₂ G ₁₄₋₁₅ (74・65wk)	(5)	0	0	0	4	1 [▲]	0
	5	L ₂ G ₁₈ (8wk)	(10)	0	0	0	0	7	3 ^X
	6	L ₂ G ₁₈ (24wk)	(10)	0	0	0	0	0	10

□: Line error (♂ 2/63), ▲: Generation error (♂ 6/63 ♀ 3/57), X: Age error (♂ 8/41, ♀ 7/41)

表 4 骨格計測値の正準判別分析における固有値と寄与率

Table 4 Eigenvalue and contribution ratio of canonical discriminant analysis in the skeletal measurement

Canonical variate	Sex	Eigenvalue	Contribution ratio	Cumulative contributin ratio
1st (Z_1)	♂	3.508	0.535	0.535
	♀	4.983	0.683	0.683
2nd (Z_2)	♂	1.402	0.214	0.749
	♀	0.918	0.126	0.809
3rd (Z_3)	♂	0.829	0.126	0.875
	♀	0.662	0.091	0.900

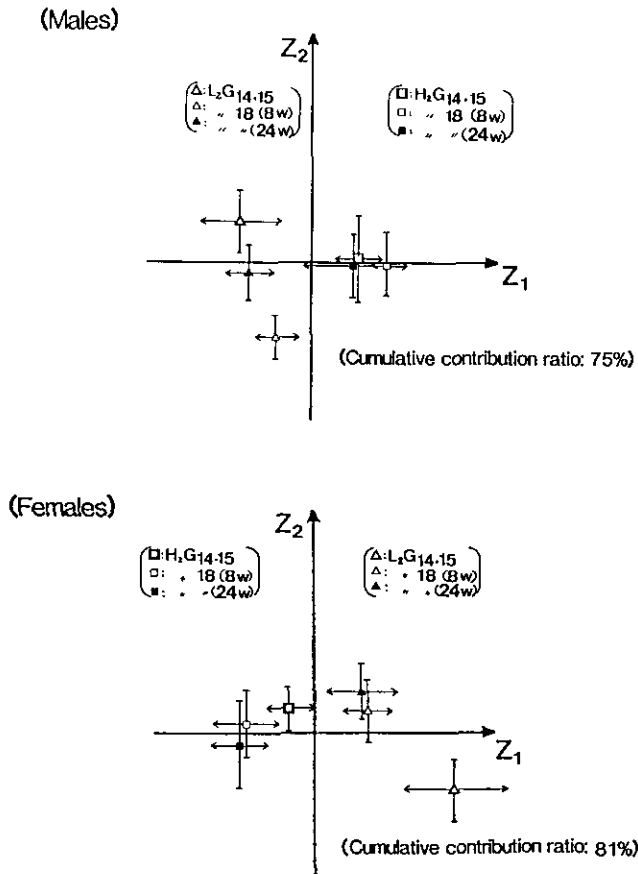


図 2 正準判別式による Z_1 - Z_2 平面上の高及び低系の位置

Fig. 2 Positions of $H_2 \cdot L_2$ lines of 2-dimensional plane Z_1 - Z_2 as determined by canonical discriminant analysis

類への適用も可能であることが分かった。Nishidaら⁵⁾は、日本在来鶏の品種分化を明らかにするためにニワトリ骨格の13種30部位を多変量解析(主成分分析)し、日本在来鶏9品種、赤色野鶏及び白色レゲホンの計11群の区分が明りょうにできることを報告した。しかし、Nishidaら⁵⁾の方法は骨格の種類も測定部位も多いため鳥類の遺伝的モニタリングとしては、今回の方法が適切であると思われる。しかしながら、マウスの1種13部位と比較すればウズラの場合は更なる簡便化が必要であることが指摘された⁶⁾。

ところで、今回のウズラの判別結果からは、系統間ばかりでなく世代間・週齢間でも識別されることが分かった。今回供試したウズラはH₂系とL₂系の選抜14・15世代と18世代であったが、選抜の経過によって体型が異なってきたことを示唆している。また、同一世代(18世代)の8週齢と24週齢でも8割が識別されたことは、加齢によって影響を受ける骨が含まれていることが考えられる。すなわち、頭骨は加齢による影響を受けにくいが胸骨等は影響を受けると言われており、これが週齢間の識別となったと考えられる。しかしながら、正準判別分析の結果からは、系統間は世代間・週齢間とは全く異なった象限に分布していることが示されたので、実際の系統間識別に与える影響は少なく、また世代別にして入力した結果では今回の方法で100%正しく系統が識別できることが分かった。

そこで、今後は加齢及び世代の影響が少ない部位等を選択しこの手法の精度の向上と簡便化を図っていくことが重要である。

引用文献

- 1) Festing, M. F. (1972): Mouse strain identification. *Nature*, **238**, 351-352.
- 2) Goto, N., K. Noguchi and K. Imamura (1979): Mouse strain identification by means of discriminant analysis using mandible measurement. *Natl. Inst. Anim. Health. Quart.*, **19**, 121-131.
- 3) Komeda, K. and N. Goto (1984): Mandible analysis of NOD and NON strains of mice. *Lab. Anim.*, **18**, 237-242.
- 4) Festing, M. F. (1974): Genetic reliability of commercially-bred laboratory mice. *Lab. Anim.*, **8**, 265-270.
- 5) Nishida, T., Y. Hayashi, T. Fujioka, I. Tsugiyama, and K. Mochizuki (1985): Osteometrical studies on the phylogenetic relationships of Japanese native fowls. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **47**, 25-37.
- 6) 高橋慎司・大橋 徹・後藤信男・高橋 弘 (1984): 骨格計測によるウズラ選抜系の系統間識別. 第31回日本実験動物学会講演要旨集, 66.

Ⅲ 無菌ウズラの作出と微生物学的モニタリング Production of the Germ Free Quails and Their Microbiological Monitoring

山元昭二¹・伊藤勇三¹・高橋慎司¹・高橋 弘¹
Shoji YAMAMOTO¹, Yuzo ITO¹, Shinji TAKAHASHI¹
and Hiroshi TAKAHASHI¹

要 旨

SPF ウズラを開発する目的で、卵殻表面の殺菌にホルムアルデヒドを用いてウズラの無菌化を試みた。その結果、ウズラ発育卵を無菌飼育装置へ搬入する際にホルムアルデヒドによるくん蒸を効果的に1回行うことによって無菌ウズラを作出できることが分かった。今回供試したウズラ卵のうち、選抜系ではふ化率が約18%と対照群(ふ化率約80%)に比べて低く、また雑種(ふ化率約52%)と比べても低かった。このことから選抜系ウズラの発育卵は雑種ウズラの発育卵に比べてホルムアルデヒドに対する耐性が弱いことが示唆された。無菌飼育装置内でふ化した雛の育成率及び活力は、選抜系及び雑種ウズラ双方とも12日齢の時点では良好であった。なお、同装置内で育成した選抜系ウズラの産卵は滅菌飼料給餌期間中の18週齢までは皆無であったが、その後非滅菌飼料に切り換えた7~10日目より産卵が認められ、次世代を得ることができた。

Abstract

To produce the Specific Pathogen Free Japanese quail, the germ-free procedures were carried out using formaldehyde. It was possible to get the germ-free quail after only one exposure to formaldehyde at the hatching.

When this procedure was applied to two populations of the Japanese quail for examining the hatchability, the selected quails showed lower hatchability (18%) than the control group (80%) and the hybrid quails (52%). Therefore, it may suggest that eggs from the selected quails were more susceptible to formaldehyde than those of the hybrid quails.

The viability of hatching quails housed in germ-free isolator was high until the 12th days of old in the both populations. Concerned with the selected quails, they were grown up

1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environment Studies. Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305
Japan.

at the 18 weeks of old in the germ-free condition, and up to that time, there was no egg production. However, the egg production was appeared after 7 to 10 days when the diet was changed to nonsterilized one.

1 はじめに

国立公害研究所(以下、国公研と略す)では、ニューカッスル病ウイルス不活化ワクチンに対する抗体産性能の高及び低系の選抜系ニホンウズラ(H₂及びL₂系ウズラ)を用いて、環境科学研究に適した実験用ウズラの開発を行っている。これらのウズラは微生物学的統御が、さほど厳重ではない環境下(コンベンショナル)で維持されているが、ウズラに特有な病原性の細菌やウイルス等による感染発症事故は今日まで皆無である。しかしながら、コクシジウム等の腸管内寄生原虫類の寄生が見られ、必ずしも微生物学的に清浄であるとは言い難い。また、国公研で行われる試験研究は、呼吸器系を対象としたNO₂・O₃等大気汚染物質の急性もしくは慢性のガス暴露実験が主体であり、実験精度や経済性の点からも実験期間中の感染事故は絶対に防がねばならない。

そこで、著者らは、厳密な微生物学的統御を必要とする実験にも対応できるウズラ、すなわちSPFウズラを開発することを目的としてウズラの無菌化を試みた。

家きん類の無菌化に関する報告としては、ニワトリ¹⁻⁴⁾やウズラ⁵⁻⁷⁾の例があるが、我々は、吉田ら⁶⁾及び神菌⁷⁾がウズラ発育卵の卵殻表面の殺菌にホルムアルデヒド(以下、ホルマリンガスと呼ぶ)を用いて無菌化を行った方法を参考に、無菌ウズラの作出を試みたので報告する。

2 方法

2.1 供試卵と無菌ウズラの作出・育成装置

ウズラ卵は国公研で維持している選抜系のH₂及びL₂系ウズラ並びにL₂系ウズラと(財)日本生物科学研究所由来WE系ウズラの雑種(F₁)から、産卵後1週間以内の正常卵(13℃で低温保存)を1回の実験につき50~100個供試した。ふ卵器(520W×390D×510H m/m)は塩化ベンザルコニウム系(300倍マイクロカット液)とグルコン酸クロルヘキシジン系(300倍ヒピテン液)の2種類の消毒液で内部を清拭消毒し、クリーンベンチに設置した。

無菌ウズラの作出・育成のための装置としてはハードタイプアイソレータ(硬質塩化ビニール製無菌動物飼育装置 1500W×600D×600H m/m)2台を使用し、うち1台は発育卵搬入時の卵殻表面の殺菌用とし、もう1台はふ化並び育成用とした。これらのアイソレータを温度調節(23~38℃までの範囲)が可能な動物飼育室に搬入設置し、アイソレータへ発育卵を搬入する1週間前から室温を38℃に保温した。アイソレータの組み立てやリークテスト並びに滅菌方法等についての基本的操作は前島らの方法^{8,9)}に準じた。

表 1 供試卵の由来並びにホルマリンガスくん蒸の有無とくん蒸時間
Table 1 Supplied eggs and their fumigation by formaldehyde

	供試卵	卵供試数	ホルマリンガスくん蒸の有無	
			入卵時	発育卵搬入時
第1回目実験	選抜系ウズラ***より採卵	50個	有	有(3時間)*
第2回目実験	選抜系ウズラより採卵	50個	有	有(3時間)
第3回目実験	選抜系ウズラより採卵	80個	無	有(4時間)
第4回目実験	選抜系ウズラより採卵	90個	無	有(4時間)
第5回目実験	選抜系と日生研由来のウズラの雑種***より採卵	100個	無	有(4時間)

* ホルマリンガスのくん蒸時間

** H₂ 及び L₂ 系の26世代

*** L₂ 系と WE 系の雑種(F₁)

2. 2 無菌ウズラの作出手順

供試卵の違いや入卵(ふ卵器に卵を搬入しふ卵を開始すること)時のホルマリンガスくん蒸の有無等により表1に示すように3通り計5回の無菌ウズラ作出実験を行った。各々についてふ化率・ふ化日数・育成率等を調査し、その成績を対照群(コンベンショナル飼育室で維持している通常の選抜系ウズラと雑種ウズラ)と比較した。なお、発育卵をアイソレータへ搬入する際のホルマリンガスくん蒸の濃度と作用時間は、予備試験の結果から吉田ら⁶⁾及び神蘭⁷⁾の方法とほぼ同様なものとなった。各々についての作出手順は以下のとおりである。

2. 2. 1 供試卵の消毒及び入卵

卵は表面の汚れをガーゼを使って水道水で軽く洗い、300倍ヒピテン液に約30秒間浸して消毒した後、滅菌水で軽く濯いだ。第1回目と第2回目の実験ではそれらの卵をふ卵器に納め、ふ卵器ごとホルマリンガスくん蒸(使用量は1m³当たり過マンガン酸カリウム20gにホルムアルデヒド37%溶液40mlを添加、ガスは発生と同時に速やかに排気した)を行いふ卵を開始した。第3回目から第5回目の実験ではこの入卵時の卵のホルマリンガスくん蒸は行わないでふ卵を開始した。

2. 2. 2 飼育器材の育成用アイソレータへの搬入

高圧蒸気滅菌機で滅菌済みの給餌器・給水器・下敷布(モルトプレン布)、無菌試験サンプリング用綿棒・シャーレ並びに飲水・幼雛用粉末飼料(日本ノーサン(株)社製ウズラチック)等を所定の無菌操作法⁹⁾に従って育成用アイソレータへ搬入した。なお、これらの器材の搬入作業は、発育卵搬入までに完了した。

2. 2. 3 検卵及び発育卵のアイソレータへの搬入

ふ卵開始後15～16日目にふ卵器より卵を取り出して検卵器で発育卵のみを選定し、その発育卵を38℃の300倍ヒビテン液に1分間浸して消毒し、さらに38℃の滅菌水で軽くすすいだ。乾燥後、殺菌用アイソレータに移して静置しアイソレータ内でホルマリンガスくん蒸(濃度については先の入卵時と同一)した。このくん蒸時間は第1回目と第2回目の実験では入卵時に1度短時間のホルマリンガスくん蒸をしているのでこのときには3時間とし、第3回目から第5回目の実験では初めてのホルマリンガスくん蒸となるので4時間とした。この間、ブローは停止し送気口と排気口はゴム栓で密封しておいた。

くん蒸終了後、ステリロック・スリーブを通して発育卵を育成用アイソレータに移して下敷布上に静置し雛がふ化するのを待った。

2. 2. 4 ふ化及び雛の育成

ふ化した雛は、ふ化当日より粉末飼料(4週齢までは幼雛用飼料を5週齢からは成鳥用飼料日本ノーサン(株)社製ウズラマッシュ)と飲水を自由摂取させた。また、ふ化初日から5日目には卵殻くずと死ごもり卵を取り出した。育成中は飼料・飲水を給餌器・給水器に補充する以外は放置した。飼育温度は1週齢までは38℃に保ち、2週齢に達するころまでに36℃とし、その後は徐々に温度を下げていき、5週齢から25℃で飼育した。照明は4週齢までは昼夜点灯(光量を落とし薄暗くなるよう配慮した)とし、それ以降は14時間明10時間暗とした。

2. 2. 5 無菌試験

第3回目から第5回目の実験では、ふ化初日から5日目に無菌試験¹⁰⁻¹²⁾のための試料の採取と培養を簡便法で(財)実験動物中央研究所方式^{11,12)}に準じて行った。すなわち、下敷き布上に排せつされた新鮮ふん便を採取し、チオグリコレート培地に接種した。また別にふん便をギムザ染色して鏡検した。さらに給水器内の飲水で湿らした綿棒でアイソレータ内壁と下敷き布をこすりそれをチオグリコレート培地(TGC)とポテトデキストロース寒天培地(PDA)に移植した。

2. 3 微生物学的モニタリング

第3回目と第5回目の実験では、ふ化後12日目に雛をアイソレータより全て搬出し、各々10羽をクリーンベンチ内で解剖し、血液並びに盲腸内容物を採取した。血液は血清分離後、血清反応(DID法:二次元免疫拡散法)によるウイルス学的検査5項目(鶏脳せき髄炎ウイルス、マレック病ウイルス、伝染性ファブリシウスのう病ウイルス、トリレオウイルス、トリアデノウイルス)を実施した。盲腸内容物は塗抹染色標本並びに懸滴無染色標本の顕微鏡検査によって、細菌・真菌・原虫等の検索を行った。

2. 4 繁殖実験

第4回目の実験でふ化した雛は、育成用アイソレータ内で29週齢までそのまま引き続き雌雄同居飼育（18週齢までは♂4・♀4で19週齢以降は♂2・♀4となった）し、期間内における産卵率や卵重等を測定し対照群と比較した。それらのウズラは、18週齢に到達しても産卵が皆無であったので、19週齢時に高圧蒸気滅菌飼料から非滅菌飼料に切り換えて（必然的にアイソレータ内の無菌的な微生物統御は解除された）以後の観察を続けた。また、産卵された卵はアイソレータ外へ搬出し、卵殻表面の洗浄・消毒は行わないで入卵した。ふ化した雛については、コンベンショナル飼育室で1週齢まで育成し、受精率・ふ化率・育成率等を調べて対照群と比較した。

3 結果

5回にわたる無菌ウズラ作出実験のふ化成績と無菌試験成績を表2に示した。第1回目の実験ではふ化は皆無であり、第2回目の実験ではアイソレータに移卵後5～6日目にウズラはふ化し、ふ化率は23.5%であった。しかしながらそれらの雛は活力が見られず、1～2日目には全例が死亡したため無菌試験は行えなかった。第3回目と第4回目の実験では移卵後1～3日目にウズラはふ化し、ふ化率は各々18.2%と17.8%であった。雛は双方とも12日齢の時点で全例が生存し、活力も良好であった。無菌試験における細菌等の検出は双方とも皆無であった。第5回目の作出実験も供試卵の違いを除いて、第3回目及び第4回目の実験と同様に行ったが、アイソレータに移卵後2～4日目にウズラはふ化し、ふ化率は52.3%であった。育成率は衰弱による死亡個体が5羽あったため89.1%となったが生存個体の活力は良好であり、無菌試験における細菌等の検出も皆無であった。またコンベンショナル飼育室で通常維持のウズラを対照群とし、そのふ化

表 2 無菌ウズラ作出実験のふ化及び無菌試験成績

Table 2 Hatchability of the germ-free quails and their microbiological examination

実験区分	ふ化率*	ふ化成績		無菌試験成績		
		ふ化日数	育成率**	染色鏡検	TGC	PDA
第1回目	0% (0/44)
選 第2回目	24% (4/17)	20～21日	0% (0/4)
抜 第3回目	18% (10/55)	17～19日	100% (10/10)	NEG***	NEG	NEG
系 第4回目	18% (8/45)	17～19日	100% (8/8)	NEG	NEG	NEG
対照群	80%	17～19日	95%
雛 第5回目	52% (46/88)	17～19日	89% (41/46)	NEG	NEG	NEG
種 対照群	63%	17～19日	95%

* 発育卵数に対するふ化数の比較

** ふ化数に対する12日齢時の生存数の比較

*** NEGATIVE (不検出)

成績も併せて表に示した(選抜系対照群:ふ化率79.9%,ふ化日数17~19日,育成率95%,雑種対照群:ふ化率63%,ふ化日数と育成率は選抜系対照群と同一)が,特にふ化率は選抜系及び雑種双方とも作出実験群の方が対照群に比べて低かった。その差は選抜系でより顕著であった。

第3回目と第5回目の実験で作出された無菌ウズラの12日齢時での微生物学的検査成績を表3に示した。血清反応では鶏脳せき髄炎ウイルス,マレック病ウイルス,伝染性ファブリシウスのう病ウイルス,トリレオウイルス,トリアデノウイルス等の不顕性感染が否定され,また鏡検では細菌・真菌・原虫類の検出は皆無であった。

第4回目実験で作出された選抜系ウズラの繁殖成績を表4に示した。体重はアイソレータから

表 3 ウズラの12日齢時での微生物学的検査成績

Table 3 Microbiological check in quail at 12 day old

検査法	検査項目	第3回目	第5回目
血清反応*	鶏脳せき髄炎ウイルス	NEG**	NEG
	マレック病ウイルス	NEG	NEG
	伝染性ファブリシウスのう病ウイルス	NEG	NEG
	トリレオウイルス	NEG	NEG
	トリアデノウイルス	NEG	NEG
鏡検***	細菌	NEG	NEG
	真菌	NEG	NEG
	原虫類	NEG	NEG

* DID法(二次元免疫拡散法)による血中抗体価測定(n=10羽×2回)

** NEGATIVE(不検出)

*** 盲腸内容物の塗抹染色標本並びに懸滴無染色標本(n=10羽×2回)

表 4 第4回目実験で作出された無菌ウズラの繁殖成績

Table 4 Reproductive traits of the germ-free quails obtained from the 4th experiment

測定項目	無菌ウズラ繁殖群*	対照群
体重**	♂90~100g ♀100~115g	♂100~115g ♀115~140g
産卵開始齢	20週齢	6~7週齢
産卵率	40%	87.4%
平均卵重	8.8g	9.2g
受精率	30.4%(31/102)	91.4%
ふ化率	71.0%(22/31)	79.9%
育成率***	100%(22/22)	95%
活力	良好	良好

* 18週齢までは♂4・♀4, 19週齢以降は♂2・♀4

** 無菌ウズラ繁殖群は29週齢時, 対照群は9週齢時の体重

*** 生後7日齢時での生存数

搬出直後の29週齢時の1回のみでの測定であるが、雄が平均95gで雌が平均107gであった。滅菌飼料給餌期間中は18週齢を過ぎても産卵せず、非滅菌飼料給餌（必然的にアイソレータ内の無菌的微生物統御は解除）に切り換えて約7～10日経た20週齢時より産卵を開始した。雌1羽1日当たりの産卵率は40%、卵重は 8.8 ± 0.5 gであった。産卵された卵はアイソレータより搬出し、そのふ化成績を調べた。結果は、受精率30.4%、ふ化率71%、育成率100%であった。対照群（コンベンショナル飼育室で通常維持）の繁殖及びそのふ化成績も併せて表に示した（平均体重：雄107g・雌127g、産卵率87.4%、卵重 9.2 ± 0.7 g、受精率91.4%、ふ化率79.7%）が、いずれも繁殖群の方が対照群に比べて低かった。また、産卵開始齢は繁殖群の方が高週齢となった。

4 考察

吉田ら⁶⁾は発育卵搬入時とふ化時の計2回、また神菌⁷⁾は入卵時・発育卵搬入時・ふ化時の計3回のホルマリリングスくん蒸を行い無菌ウズラを作出したと報告しているが、ふ化率についての記述はみられなかった。我々が選抜系卵に対して試みた入卵時と発育卵搬入時の計2回のホルマリリングスくん蒸を行った実験（第1回目と第2回目実験）ではふ化や育成例が皆無であり、無菌ウズラを作出できなかった。このことから入卵時と発育卵搬入時の計2回のホルマリリングスによる卵殻表面の殺菌は、選抜系卵に対しては不適當であると判断された。第3回目と第4回目の実験では幼雛が無菌であることが確認され（ふ化初日から5日目の時点）、発育卵搬入時の1回のホルマリリングスくん蒸だけで選抜系の無菌ウズラが作出し得た。ただし、ふ化率（約18%）が対照群（ふ化率約80%）に比べ著しく低くなっており、必ずしも満足のいくものではなかった。第5回目実験の雑種でのふ化率（約52%）は対照群（ふ化率63%）に比べ低かったが、第3回目及び第4回目実験の選抜系でのふ化率と比べると高かった。このことにより選抜系ウズラの発育卵は雑種ウズラの発育卵に比べてホルマリリングスに対する耐性が弱いことが示唆された。この一因としては選抜系ウズラの遺伝学的純化による近交退化が影響していると考えられるので、今後更に検討する必要がある。

第4回目実験で作出された選抜系ウズラ（ただし、無菌的な微生物統御は18週齢まで）の繁殖及びそのふ化成績の中で体重、産卵開始齢、産卵率、卵重、受精率、ふ化率は対照群に比べていずれも劣っていたが、ふ化した雛の育成率及び活力は対照群と同様に良好であった。なお、18週齢まで産卵しなかった理由としてはホルマリリングスによる影響や飼育環境並びに滅菌飼料の影響、ノーマルフローラ（正常細菌叢）の欠如等種々の原因が考えられるので、それらに関しては今後の検討が必要である。

引用文献

- 1) 赤澤喜三郎 (1942) : 鶏雛の無菌飼育に依る発育及び其の腸内菌叢. 千葉医学会雑誌, **20**, 1884-1920.
- 2) 河合正太郎・斎藤左文 (1954) : 家鶏雛の無菌飼育に関する研究. 千葉医学会雑誌, **30**, 750-765.
- 3) 金内長司・光岡知足・山本脩太郎・瀬賀利夫 (1966) : ニワトリの無菌飼育に関する研究-I 新しい飼育装置について. 日本獣医学雑誌, **28**, 1-9.
- 4) 金内長司・光岡知足・山本脩太郎・瀬賀利夫 (1966) : ニワトリの無菌飼育に関する研究-II 飼育成績について. 日本獣医学雑誌, **28**, 229-236.
- 5) Reyniers, J. A and M. R. Sacksteder (1960) : Raising Japanese Quail Under Germfree and Conventional Conditions and Their Use in Cancer Research. *J. Natl. Cancer Inst.*, **24**, 1405-1421.
- 6) 吉田 勉・平野敬子・神菌 稔・倉益茂実 (1969) : 無菌ウズラの栄養に関する研究 (第1報) - 成長及び飼料効率について. 栄養と食料, **22**, 208-212.
- 7) 神菌 稔 (1978) : ウズラ. 実験動物のための無菌動物技術, 前島一淑・柏崎 守・上村文雄編, 第1版, ソフトサイエンス社, 東京, 155-160.
- 8) 前島一淑 (1973) : 無菌動物の微生物学的統御に関する諸問題 - とくにアイソレータの構造と滅菌法方について. 実験動物, **22**, 223-226.
- 9) 前島一淑 (1978) : 無菌動物の微生物学的統御に関する諸問題. 実験動物のための無菌動物技術 第1版, 前島一淑・柏崎 守・上村文雄編, ソフトサイエンス社, 東京, 1-7.
- 10) 日本実験動物研究会・無菌試験の規準に関する委員会 (1972) : 無菌動物の無菌試験法について. 実験動物, **21**, 35-38.
- 11) 前島一淑 (1978) : 無菌試験. 実験動物のための無菌動物技術, 前島一淑・柏崎 守・上村文雄編, 第1版, ソフトサイエンス社, 東京, 171-179.
- 12) 前島一淑・野村達次 (1975) : 無菌マウスおよびラットの無菌試験に関する経験. 実験動物, **24**, 177.

IV 二酸化窒素急性暴露に対するウズラの感受性試験 NO₂ Gas Sensitivity Test in the Japanese Quail by Acute Exposure

高橋慎司¹・伊藤勇三¹・高橋 弘¹

Shinji TAKAHASHI¹, Yuzo ITO¹ and Hiroshi TAKAHASHI¹

要 旨

大気汚染ガスの一つである二酸化窒素(NO₂)を、各種実験動物(マウス、ハムスター、ウズラ)に急性暴露し、NO₂感受性を動物種間で比較した。

NO₂の20ppm暴露に対する感受性は、ウズラが最も高く(平均生存時間:約8~14時間)、次にハムスター(同:約50~72時間)で、マウスは低かった(72時間以上生存)。

次に、ウズラ系統間(計7系統)でNO₂感受性を同様にして比較した結果、系統間差はあるものの各系統ともNO₂感受性は高かった。また、ウズラのNO₂感受性には性差があり、♀が♂より高いNO₂感受性を示すことが分かった。また、ウズラのNO₂感受性は若齢(4~6週令)では低く、性成熟に伴って感受性が高くなることが分かった。なお、♂・♀ともNO₂に強い抵抗性を示す個体も存在することが示唆された。

このように、ウズラのNO₂感受性は他のほ乳類実験動物(マウス・ハムスター)より著しく高いことが分かったので、環境汚染ガスの指標動物として、またNO₂の生体影響解明の実験動物として、ウズラが有用であると思われる。

Abstract

Experimental animals such as mice, hamsters, and Japanese quails were exposed to nitrogen dioxide (NO₂), one of the air pollutant gases, to clarify the species difference of NO₂ sensitivity using the acute gas exposure chambers.

Among the 3 species, the Japanese quails showed highest sensitivity to NO₂ (20ppm) acute exposure (mean survival time is about 8-14h), and hamster was higher than mice. The strain difference of Japanese quails were found by NO₂ acute exposure, though it is not so clear as the species difference. And also, there were sex difference and age effects in the NO₂ sensitivity in the Japanese quail. That is, female quail was more sensitive to NO₂ acute exposure than male one, and young quail (4-6 weeks of age) was more resistant than the

1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki
305 Japan.

mature one.

Since the Japanese quail was very sensitive to NO₂, it will be a useful experimental animal to study the biological effect of NO₂ and monitor the air pollutant gases in environmental science.

1 はじめに

鳥類のガス感受性が高いことは、古くから経験的に知られており、例えば、欧米の鉱山ではカナリアを“生きたガス感知器”として使っていた¹⁾。しかしながら、実験的な証明はなされておらず、詳細は不明となっている。

国立公害研究所(以下、国公研と略す)では、環境科学研究用実験動物としてウズラ(Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*)の有用性を明らかにするために、現在、7系統のウズラを選抜・維持している。また、国公研には高性能ガス暴露チャンバーが設置されており、動物のガス感受性を実験的に証明できる条件が整っている。

そこで、今回は鳥類のガス感受性を明らかにするために鳥類の実験動物として注目されているウズラに、大気汚染ガスの一つであるNO₂を各種実験動物と共に暴露し、NO₂感受性を動物種間及び系統間で比較した。

2 方法

2.1 供試動物

ウズラは、東北大学農学部由来のH₂系とL₂系(ニューカッスル病ウイルス不活化ワクチンに対する抗体産生能の高(H₂)及び低(L₂)系)²⁾、及び(財)日本生物科学研究所(日生研, NIBS)由来のWE・YWE・AWE・AMRP・CN系³⁾の計7系を用いた。ハムスターは、静岡実験動物協同組合(静動協, Sic)由来で国公研で近交化しているSilian系(Golden hamster)を、マウスは東京大学医科学研究所由来の近交系で、国公研で維持しているC57BL/6NとCF#1を各々供試した。

2.2 ガス暴露方法

ガス暴露装置は、国公研備付のAC系暴露チャンバー⁴⁾を使用し、ウズラのLC₅₀値より推定した20ppmのNO₂(10ppm NO₂では死亡しなかったため)を24~240時間連続して暴露した。暴露中は、温度:25±1℃、湿度:55±10%R.H., 換気回数:90回/h, 照明:24時間明に設定した。

2.3 飼育方法

餌は、各々専用の餌を不断給与し(マウス・ハムスターは日本クレア(株)社製CE-2, ウズラは日本ノーサン(株)社製マッシュ), 水は、蒸留水と水道水(ウズラのみ)を自由飲水させた。暴露ケージは、各々専用のケージを使用した(マウス・ハムスターは網製ケージ, ウズラはブラケッ

ト型ケージに収容)。なお、死亡後は速やかにケージから取り出し、剖検した。

2. 4 感受性試験項目

ガス感受性の試験項目としては、以下の①～⑤とした。

① 生死数：ガス暴露終了までの生死数（死亡率又は生存率で表示）を、動物種間・系統間で比較した。

② 生存期間：ガス暴露開始から終了するまで、原則として1時間ごとに観察し、生存した時間を動物種・系統ごとに平均し、平均値±標準偏差値を求め、Studentのt検定を行った。

③ 体重減少率：ガス暴露直前の体重と終了又は死亡時の体重を次式により求め、②と同様に比較した。

$$\text{体重減少率} = \left(1 - \frac{\text{暴露終了又は死亡時体重}}{\text{暴露前体重}} \right) \times 100$$

④ 肺含水量：ガス暴露終了又は死亡時に、可及的速やかに肺を摘出し湿重量を測定した。その後、95℃で3日間恒温し、肺乾燥重量を測定した。肺含水量は次式より求め、②と同様に比較した。

$$\text{肺含水量} = \frac{\text{肺湿重量} - \text{肺乾燥重量}}{\text{肺湿重量}} \times 100$$

⑤ 臓器重量：ガス暴露終了又は死亡時に、可及的速やかに臓器（④の肺の他に、肝臓、腎臓、心臓、ひ臓）を摘出し、湿重量を測定した。また、比体重値（一部のみ）も求め、②と同様に比較した。

3 結果

3. 1 NO₂急性暴露に対する感受性の動物種間差

図1に、ウズラ・ハムスター・マウスにNO₂の20ppmを連続して10日間暴露した結果を示した。ウズラ（H₂系及びL₂系）とハムスターは、暴露した全例が死亡したが、マウスは1例（C57BL/6Nの♂）が死亡ただけで残りは10日間耐過した（死亡率4%）。これを平均生存時間（h, M±SD(n))で比較すると、ウズラは♂：13.8±10.3(6)・♀：7.8±8.0(6)、ハムスターは♂：49.8±24.4(3)・♀：72.2±10.4(4)、マウスはC57BL/6Nの♂：232.0±19.6(6)・♀：240.0以上(5)、CF#1は♂(7)・♀(9)とも240.0以上となった。

次に、ウズラとハムスターのNO₂感受性を確認するために20ppmのNO₂で追試をした結果、ウズラ（♂：145・♀：128、計273羽）は24時間以内に♂・♀とも72%が死亡し、ハムスター（♂：23・♀：22、計45匹）は72時間以内に♂：78%・♀：68%が死亡した。

このように、NO₂急性暴露(20ppm, 24~240h)に対する感受性は、動物種により著しく異なり、ウズラ>ハムスター>マウスの順で高かった。

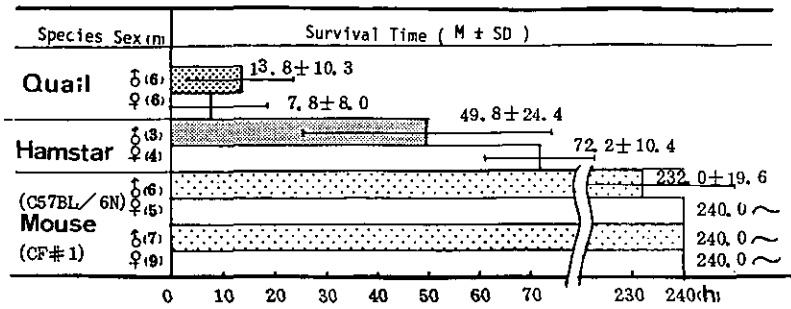


図 1 NO₂ ガス (20ppm, 10日間) 暴露に対する生存時間の種間差
 Fig. 1 Species difference of survival time to NO₂ (20ppm, 10 days) exposure

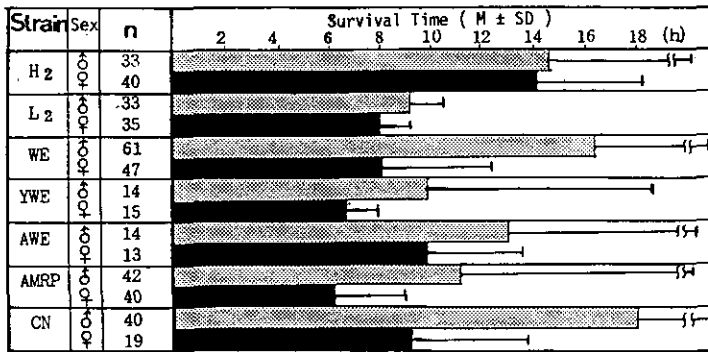


図 2 NO₂ (20ppm, 24 h) を暴露したウズラ 7 系統の平均生存時間
 Fig. 2 Average survival time of 7 strains of the Japanese quail after NO₂(20ppm, 24h)exposure

3. 2 NO₂ 急性暴露に対する感受性のウズラ系統間差

図 2 に、ウズラの 7 系統に NO₂ の 20 ppm を連続して 24 時間暴露した結果を示した。

ウズラ(♂:237・♀:209, 計446羽)の24時間以内の死亡率は♂:84%・♀:90%でNO₂感受性はこれまでと同様に高かったが、これを7系統間で比較すると、♂はAMRP>L₂>YWE=AWE>WE>H₂>CN, ♀はAMRP=YWE>WE>CN>AWE>L₂>H₂系の順で死亡率が高かった。これを、平均生存時間で比較しても♂・♀ともほぼ同様の順位(♂:L₂<YWE<AMRP<AWE<H₂<WE<CN, ♀:AMRP<YWE<L₂<WE<CN<AWE<H₂の順で平均生存時間が長い)となり、ウズラのNO₂感受性には系統間差があった。特に、H₂系は比較的NO₂低感受系であり、L₂系はNO₂高感受系であることが分かった。

3. 3 NO₂急性暴露に対するウズラの感受性の性差と個体差の出現

図1より、NO₂急性暴露に対するウズラの感受性には性差が認められ、♀が♂より高いことが示された。また、図2でのウズラ系統間での比較からも、♀が♂より各系統とも感受性が高く、特にL₂系の♀は最もNO₂感受性が高かった。なお、ウズラの中には♂・♀とも著しくNO₂に抵抗性を示す個体が存在することも分かったので、ウズラの個体差がどのようにして出現してくるのかを、抵抗性♂・♀の交配実験より明らかにする必要が指摘された。

3. 4 ウズラのNO₂感受性に及ぼす加齢の影響

図3に、4～50週齢のH₂及びL₂系ウズラ(♂:150・♀:150, 計300羽)にNO₂を急性暴露(20ppm, 24h)した結果を示した。

4～6週齢の若齢ウズラでは死亡率が低く(4週齢で♂・♀とも17%, 5・6週齢は0%), 10週齢以降の成ウズラでは死亡率が高く(♂:81~100%・♀:62~100%, 全体で93%), ウズラのNO₂感受性は加齢により影響を受けることが分かった。

3. 5 NO₂急性暴露後の臓器重量及び体重の変化

表1に、NO₂急性暴露後のウズラ、ハムスターの臓器重量の変化を示した。

肺湿重量は、暴露群が対照群よりも重くなっており、特に全例が死亡したウズラとハムスターでは有意性が認められた(P<0.01)。これを、肺含水量と比較すると、ウズラでは暴露群が対照群より約9%増加の82.6%となっており、ハムスターでは約6%の増加の83.4%であった。なお、肝臓・腎臓・心臓・ひ臓の湿重量に一定の傾向は認められなかった。

また、体重は、各動物種とも暴露群が対照群より減少する傾向があり、生存時間の長かったマウスとハムスターの体重減少率は10~25%となり有意性が認められた(P<0.01)。

3. 6 NO₂急性暴露ウズラの病理形態学的所見

図4(1)~(3)に、24~26週令のH₂及びL₂系ウズラ(♂:25・♀:23, 計48羽)にNO₂を急性

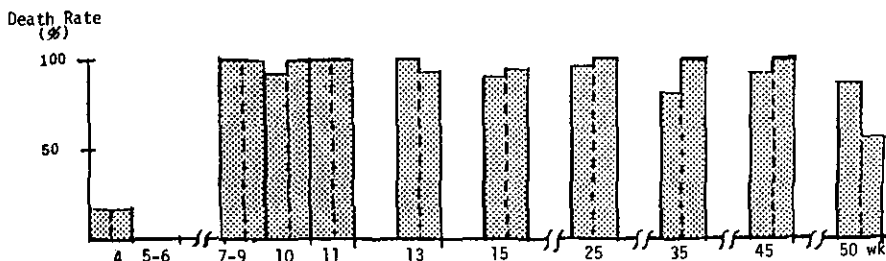


図3 NO₂ (20ppm, 24h) 暴露での4~50週齢ウズラの死亡率

Fig. 3 Comparison of death rates in the Japanese quails at 4 to 50 weeks of old after NO₂ (20ppm, 24h) exposure

表 1 NO₂ (20ppm) 暴露による死亡個体(ウズラ・ハムスター)の臓器重量
 Table 1 Organ weights of the Japanese quails and hamsters after NO₂ exposure (20ppm, 1,3 or 10 days)

ウズラ (H ₂ ・L ₂ 系)			(単位:g)					
実験区 (暴露期間)	性	暴露時 週齢	供試数 E:暴露群 C:対照群	肺	肝臓	腎臓	ひ臓	心臓
				Lung M ± S D	Liver M ± S D	Kidney M ± S D	Spleen M ± S D	Heart M ± S D
実験1 (10日間)	♂	13	E: 6	1.46 ± 0.18**	2.71 ± 0.08	1.05 ± 0.27	0.03 ± 0.01	1.18 ± 0.19*
			C: 6	1.08 ± 0.16	3.48 ± 0.84	1.13 ± 0.23	0.03 ± 0.01	0.95 ± 0.06
	♀	13	E: 6	1.64 ± 0.21**	5.15 ± 0.67	1.40 ± 0.31	0.05 ± 0.02	1.13 ± 0.13
			C: 6	1.13 ± 0.16	6.15 ± 0.66	1.79 ± 0.26	0.05 ± 0.02	1.04 ± 0.11
実験3 (1日間)	♂	4~50	E: 86	1.54 ± 0.23	3.03 ± 0.42	————	0.03 ± 0.00	1.02 ± 0.16
	♀	4~50	E: 77	1.62 ± 0.23	5.27 ± 1.16	————	0.04 ± 0.01	1.05 ± 0.18
ハムスター (Silian系)								
実験1 (10日間)	♂	21	E: 3	3.08 ± 0.38**	7.34 ± 1.94	1.45 ± 0.30	0.32 ± 0.18	0.54 ± 0.12
			C: 2	0.68 ± 0.00	5.16 ± 0.01	0.32 ± 0.14	0.31 ± 0.23	
	♀	42	E: 4	4.01 ± 0.53***	5.76 ± 0.86	1.37 ± 0.06	0.14 ± 0.03***	0.55 ± 0.06
			C: 4	0.94 ± 0.21	7.38 ± 1.68	1.56 ± 0.22	0.45 ± 0.08	
実験2 (3日間)	♂	15	E: 9	1.94 ± 0.12	5.87 ± 0.84	1.02 ± 0.08	0.07 ± 0.03	0.39 ± 0.03
		24	E: 9	2.24 ± 0.29***	6.60 ± 1.12***	1.11 ± 0.11*	0.08 ± 0.02***	0.43 ± 0.05
	♀	15	C: 9	0.99 ± 0.12	9.59 ± 1.46	1.24 ± 0.12	0.15 ± 0.02	0.39 ± 0.03
			E: 8	2.53 ± 0.54	8.82 ± 2.03	1.30 ± 0.18	0.22 ± 0.14	0.48 ± 0.08
		24	E: 6	2.96 ± 0.39***	11.07 ± 2.20	1.61 ± 0.33	0.19 ± 0.02	0.60 ± 0.06***
			C: 5	0.94 ± 0.09	9.82 ± 1.62	1.52 ± 0.22	0.33 ± 0.12	0.14 ± 0.05

*: P<0.05

** : P<0.01

*** : P<0.001 (E v.s. C)

暴露(20ppm, 72h)した際の肺の病理切片(ヘマトイオジン(H.E.)染色, 光学顕微鏡写真:40~100倍)を示した。

NO₂暴露群の肺では, 中気管支より旁気管支にかけて上皮の脱落が一部の個体で認められたが, その変化は比較的軽く, 空胞変性にとどまるものが大部分であった。しかしながら, 呼吸管(ほ乳類の肺胞に相当)では変化が強く, 旁気管支周囲に帯状の壊死が全例に認められた。

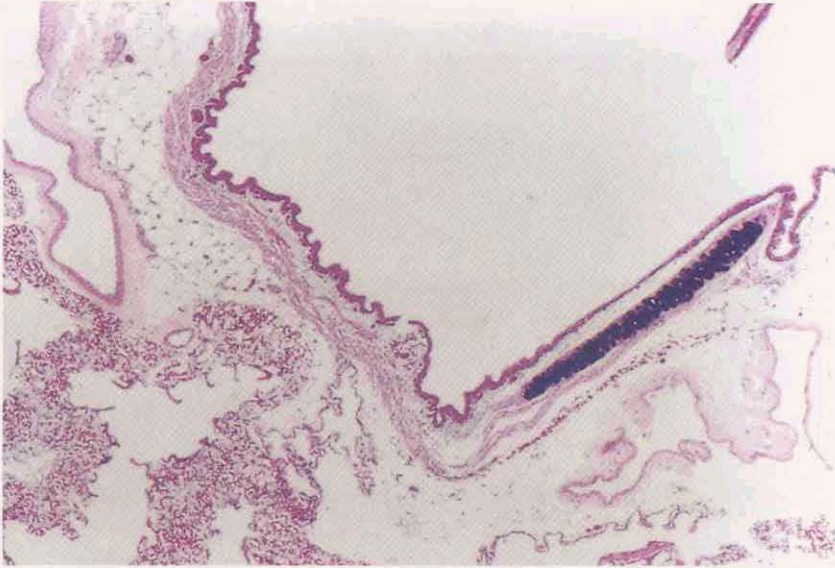
4 考 察

環境汚染ガスの一つであるNO₂の高濃度急性暴露に対する感受性は, 動物種及び系統間で異なっていることが知られている。竹中ら⁵⁾は, マウス, ラット, ハムスター, モルモットの4種15系統にNO₂を急性暴露し, 各々のLC₅₀値を比較した結果, ハムスターのNO₂感受性が最も高かった(Silian系, LC₅₀は♂:28・♀:22ppm)と報告している。

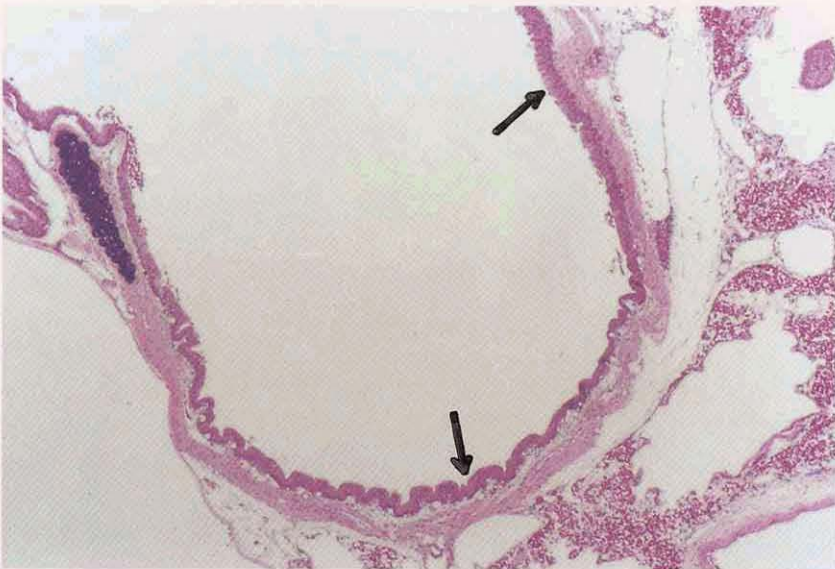
今回のNO₂急性暴露実験からも, ハムスターはマウス・ラットよりもNO₂感受性の高いことが示されたが, しかしながら, ウズラの場合はハムスター以上に高いNO₂感受性を持つことが分かった。ウズラのNO₂感受性が高い理由として, 肺の構造の違いが考えられる。すなわち, 鳥類はほ乳類と異なり気のうを持っていること, 肺胞の役割をする呼吸管は盲端ではなく末端同志が連絡していること等が知られている⁶⁾。しかしながら, ウズラの肺機能はほ乳類のそれよりも劣るためNO₂ガス感受性が高いと考えることはできない。なぜなら, 著者らはオゾン(O₃, 5~10ppm)をマウス, ラット, ハムスター, ウズラに暴露した結果, ウズラが最もO₃に対して抵抗力を示したからである⁷⁾。このことは, 動物のガス感受性は, ガスの種類により大きく異なっていることを示唆しており, 特にウズラではNO₂とO₃に対する毒性発現機序が全く異なっていることが考えられる。

次に, ウズラの7系統でのNO₂感受性を比較した結果では, マウスと同様⁵⁾に系統間で差のあることが分かった。しかしながら, マウスの場合は低感受系(C57BL/6, LC₅₀は♂:64・♀:67ppm)と高感受系(CF#1, LC₅₀は♂:36・♀:33ppm)とに明らかな系統間差が認められる⁵⁾のに対して, ウズラの場合は高感受系(L₂系, 平均生存時間♂・♀とも14h)と低感受系(H₂系, 平均生存時間は♂:9h・♀:8h)とにマウス系統間ほどの差異はなかった。この理由として, 今回の実験に供試したウズラの系統は, 鳥類の実験動物としては遺伝的純化の進んだ系統に位置付けられているものの, マウス系統と比較すれば個体変異が大きいことが考えられる。すなわち, ウズラではマウスほど明確な系統となっていないため, ガス暴露に対するウズラ系統内の感受性が均一でなかったことが考えられる。動物のNO₂感受性に種間差・系統間差が存在することは遺伝的要因が関与していることを示しており, 今後, ウズラ及びハムスターを用いて遺伝様式等の検討を加えNO₂感受性の遺伝支配を明らかにする予定である。

ところで, NO₂感受性は加齢によっても影響を受けることが知られている。Evansら⁸⁾は, Wistarラット♂のNO₂感受性は加齢とともに高まることを報告しているが, 今回のウズラの場合

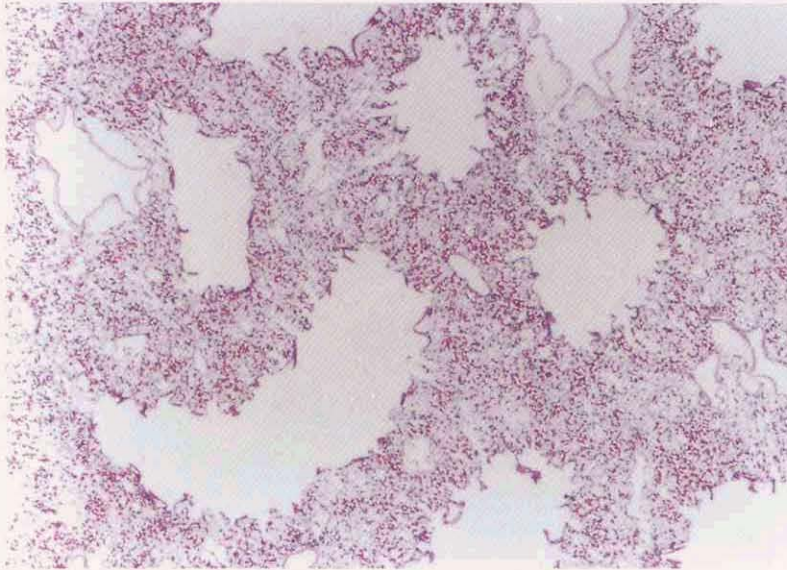


コントロールの主気管支周囲 (原倍率×40, H.E 染色)

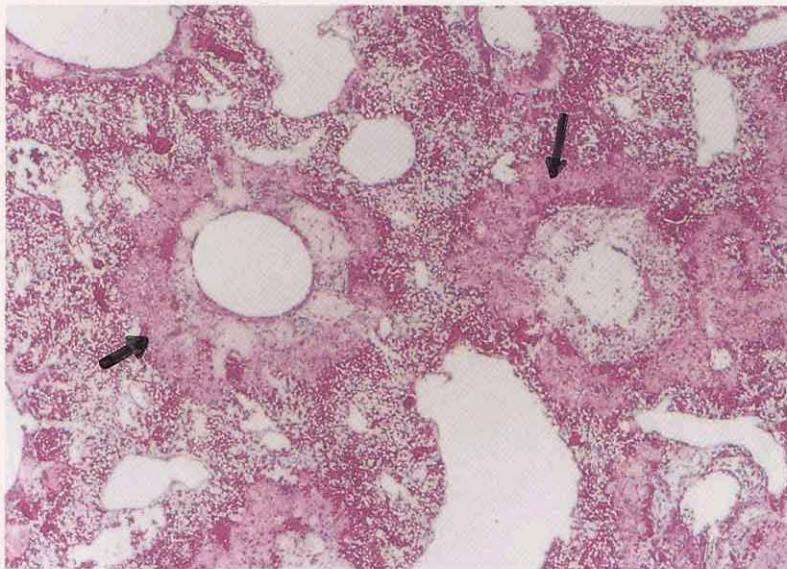


(原倍率×40, H.E 染色)

図 4 (1) NO₂ (20ppm, 3日間) 暴露ウズラの主気管支とその周辺の病理像
Fig. 4 (1) Change of stem-branchus and its surrounds after NO₂ exposure
(20ppm, 3 days)

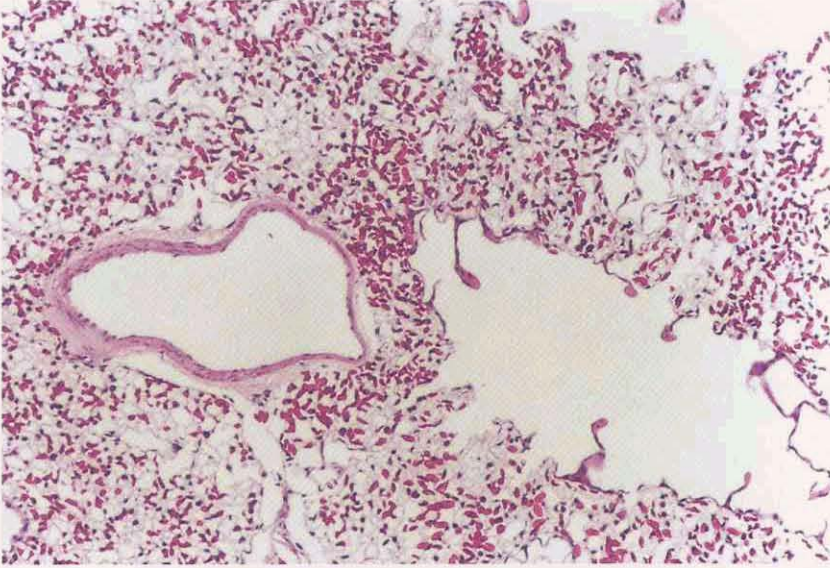


コントロールの傍気管支と呼吸管 (原倍率×40, H.E 染色)

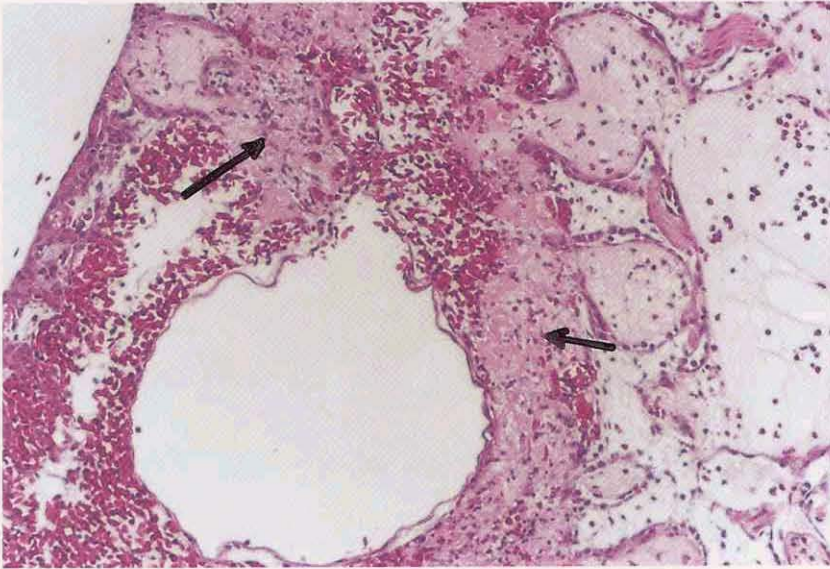


(原倍率×40, H.E 染色)

図 4 (2) NO₂ (20ppm, 3日間) 暴露ウズラの傍気管支と呼吸管の病理像
Fig. 4 (2) Change of parabranchial and respiratory tubules after NO₂ exposure
(20ppm, 3 days)



コントロールの旁気管支と呼吸管 (原倍率×100, H.E 染色)



(原倍率×100, H.E 染色)

図 4 (3) NO₂ (20ppm, 3日間) 暴露ウズラの旁気管支と呼吸管の病理像

Fig. 4 (3) Change of parabranchial and respiratory tubules after NO₂ exposure (20ppm, 3 days)

合も、加齢に伴ってNO₂ガス感受性は増加した。また、竹中ら⁵⁾は、ラット・ハムスター・モルモットの場合、NO₂感受性は♀が♂より明らかに高かったと報告している。今回のウズラの場合も、NO₂感受性は♀が♂よりも高い傾向を示した。すなわち、ウズラのNO₂感受性は性成熟に達した時点で急激に高まり、また♀が♂より高感受性を示すことより、性ホルモンがNO₂感受性に影響していることが考えられる。なお、NO₂感受性と性差の関連については、今後更に検討する。

NO₂急性暴露により、各動物とも体重が減少したが、生存時間の長かった動物種ほど体重減少率が大きかった。このことは、20 ppmのNO₂暴露条件下ではほとんどの動物は摂食しなかったことを示しており、これは暴露中の観察からも裏付けられている。しかしながら、暴露後約3日目よりマウスとハムスターの一部には摂食行動を行う動物もでてくることもあり、体重増減の個体による変異が大きくなった。これは一部のマウス及びハムスターにNO₂耐性が誘導されたと考えられる。また、極く少例ではあるがウズラの場合もNO₂に耐性を示す個体が出現することがあり、これらのNO₂耐性ウズラの♂と♀とを交配し、F₁のNO₂感受性を調査して、ウズラでのNO₂抵抗性機序を明らかにする予定である。

NO₂高濃度急性暴露により、各動物種とも肺湿量が増加する傾向が認められた。特にハムスターの場合は、暴露群の肺湿量は対照群の約2~4倍に増加しており、ウズラ(約1.5倍)・マウス(約1.5~2倍)と比較して著しかった。肺重量の増加の原因として肺含水量の増加が考えられる。すなわち、ウズラの場合は、暴露群が対照群より肺含水量が約9%増加しており、また、病理形態所見でも水腫とうっ血が主として観察されたことより、これが肺湿重増加の主な原因と考えられる。しかしながら、ハムスターの場合は肺含水量の増加が約6%に過ぎないことより、肺含水量の単なる増加ではなく肺全体が膨潤したことによることが示された。

このように、NO₂の標的器官である肺に対する影響機作はウズラとハムスターでは異なっていると思われる。この点に関して、竹中ら⁵⁾は、NO₂暴露後のハムスター肺の病理切片を作成し、肺胞腔内の水腫形成、I型肺胞上皮の変成、肺胞壁細胞の変成・壊死が進行し3日目で肺重量が最大に達することを認めている。すなわち、ハムスターの場合は、徐々に肺の水腫が形成されNO₂暴露後約3日目でピークに達すると思われるが、一方、ウズラの場合はNO₂暴露後急激に肺水腫が形成され、呼吸困難に陥り死亡すると考えられる。NO₂暴露後のウズラの肺では、全例に旁気管支周囲の呼吸管の壊死が認められており、病理所見の違いからもハムスターとウズラのNO₂標的箇所の違いが推定された^{9,10)}。

以上、NO₂急性暴露に対するウズラの感受性は、他動物種と比較して著しく高いことが明らかとなった。そこで、ウズラのNO₂高感受性を利用して、環境汚染ガスの指標動物として野外暴露する利用法等が考えられるとともに、NO₂の生体影響機作解明の実験動物として極めて有用であると思われる。今後、環境科学研究用実験動物としてウズラの改良を更に加える予定である。

謝 辞

本実験の実施にあたり、ガス・温湿度等チャンパー内実験環境の設定・維持には国公研技術部ガス専門官清水 明氏の協力を得た。また、動物の飼育・管理には国公研委託(株)アニマルケア及びラボス(株)の諸氏の協力を得た。ここに記し、深甚の謝意を表する。

引 用 文 献

- 1) 高橋 弘 (1977): 環境評価のための生物指標—指標動物—。遺伝, **15**, 34-36.
- 2) Takahashi, S., S. Inooka and Y. Mizuma (1984): Selective breeding for high and low antibody responses to inactivated Newcastle disease virus in Japanese quail. *Poult. Sci.*, **63**, 595-599.
- 3) 水谷 誠 (1982). 小淵沢15年の歩み. 日本生物科学研究所報告書, 東京. 80-88
- 4) 松本 茂・寺尾恵治・高橋慎司・高橋 弘・相賀一郎 (1980): 大気複合汚染ガス暴露チャンパーにおける二酸化窒素およびオゾンの濃度制御について. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 133-140.
- 5) 竹中参二・堀内博人・清水不二雄 (1979): 二酸化窒素急性暴露におけるゴールデンハムスターの高感受性. 国立公害研究所研究報告, 第8号, 7-25.
- 6) 加藤嘉太郎 (1978): 家畜解剖比較図説—45. 鶏の骨格, 養賢堂, 東京. 90-103.
- 7) 高橋慎司・高橋 弘 (1983): O₃ ガスに対するウズラの感受性試験. 第18回日本実験動物学会講演要旨集, 48.
- 8) Evans, M. J., L. J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. 2. Cell proliferation. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 366-376.
- 9) 伊藤勇三・高橋慎司・小沢広恭・高橋 弘・横瀬智之・小形岳三郎 (1988): 二酸化窒素とオゾンの複合急性暴露のウズラに及ぼす影響—病理形態学的所見と血液ガス等について. 科学技術庁国内留学報告書, 1-26.
- 10) 伊藤勇三・高橋慎司・高橋 弘・小形岳三郎 (1988): 二酸化窒素とオゾンの複合急性暴露のウズラに及ぼす影響—肺の病理形態学的所見—。第29回大気汚染学会講演要旨集, 422.

V 高精度分染法(HRB)によるウズラ染色体の異形性の観察 Polymorphism of Japanese Quail's Chromosomes Stained by the High Resolution Banding (HRB) Technique

高嶋良弘^{1,2}・高橋慎司³・高橋 弘³・水間 豊¹

Yoshihiro TAKASHIMA^{1,2}, Shinji TAKAHASHI³, Hiroshi TAKAHASHI³
and Yutaka MIZUMA¹

要 旨

最近、ヒトの染色体識別のために開発された高精度分染法(HRB)をウズラに適用し、ウズラ染色体を分染した結果、以下のことが分かった。

1)ウズラのリンパ球の培養温度を $39.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ と高めに設定することによって、良好な細胞分裂像を多数得ることができた。

2)ウズラの性染色体(Z, W)は、Zが第4, Wが第6~8番目の大きさであることが同定できた。また、WはC-バンド法で濃染されることより、性判定へ応用することができた。

3)HRB法により、これまで同定できなかったNo.25までの小型染色体を明りょうに識別することができた。また、これにトリプシン処理を加えると、新しいバンドが多数出現し、No.15までの同定が可能となった。

4)またC-バンド法により、常染色体のNo.3とNo.4及び性染色体Zに異形性が検出され、特にZの異形性は明りょうであり、遺伝的モニタリングに使えることが示唆された。

Abstract

Recently, the High resolution banding (HRB) technique has been exploited to examine the human chromosome abnormality. In this study, the HRB technique was applied to the study of chromosomes in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). The results are as follows:

1) The various early mitotic stage cells appeared after the incubation of the quails lymphocytes at $39.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, which was rather high temperature.

1. 昭和57~59年度 国立公害研究所 共同研究員 (東北大学農学部 〒980 仙台市堤通雨宮町1-1)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present Address: Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980 Japan.
2. 現住所: 帝京大学医学部 〒173 東京都板橋区加賀2-11-1
Present Address: School of Medicine, Teikyo University, Itabashi, Tokyo 173-Japan.
3. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan.

2) The sex chromosomes of Z and W ranked 4th and 6-8th in size. Since the W chromosome stained deeply by C-banding, the identification of quail's sex became easy.

3) The first 25 pairs of the larger microchromosomes could be identified on the basis of HRB technique. And also, the first 15 pairs of the chromosomes were clearly banded by the trypsin treatment.

4) The polymorphism was detected in the 3rd, 4th and Z chromosomes. Especially, that of Z chromosome by C-banding was so clear that it might be possible to use it for the genetic monitoring of the Japanese quail.

1 はじめに

ウズラの染色体($2n=78$)は、6対の大型染色体と23対の小型染色体より構成されている¹⁾が、通常の染色法では小型の染色体の同定は困難であり、また微細な染色体バンドの識別は不可能であった。

最近、ヒトの染色体識別のために開発された高精度分染法(High Resolution Banding Technique, 略してHRB法)は、細胞分裂の前期から後前期に染色体をG-バンド法で分染する新しい方法で、これまでより遥かに多くのバンドを識別できるようになった²⁾。

また、染色体には有害な影響を及ぼさない程度の変異(これを異形性といい、Polymorphismが慣例的に使われている)があり、単純なメンデル性遺伝に従うことが知られている。異形性は、従来より用いられている赤血球型、血清型、酵素型などの遺伝形質とともに親子鑑定、多胎仔の卵性診断等に利用され得る³⁾。

そこで、ウズラ染色体にHRB法により多数のBandingを行う技術を開発するとともに、染色体の異形性が実際の遺伝的モニタリングに適用できるか否かを検討した。

2 方法

2.1 ウズラのリンパ球の分離法

けい静脈より2~3 mlをヘパリン加血注射器で採取し、Conray 400-Ficoll(33.4% Conray 400を10容と9%Ficoll 24容混合)溶液3 mlを重層した。室温で1550rpm 30分間の遠心後、遠沈管のリンパ球層を吸い取り、リンパ球層をスピッツ管に移し、RPMI 1640培地にて3回遠沈洗浄し、リンパ球を分離した。

2.2 リンパ球の培養法

リンパ球を培養液(牛胎仔血清10%加MEM培地)に浮遊させ、PHA-P、(Phytohemagglutinin-P, Difco社製)を添加した。培養温度は、ウズラのリンパ球の場合はほ乳類より高めにする必要があり、 $39.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ とし、72時間行った。

2. 3 臭化エチジウム (Ethidium Bromide, EB) による高精度分染法⁴⁾

リンパ球の培養70時間目に、最終濃度10 $\mu\text{g/ml}$ のEBと0.05 $\mu\text{g/ml}$ のコルセミドを添加し、更に2時間培養した後、常法に従って0.075M KClで低張処理し、固定及び標本作成を行った。HRB法は、標本作成後3日目に20℃の0.04%トリプシン溶液中に30-45秒浸し、乾燥後に4%ギムザ液で5分間染色を行い、検鏡した。なお、C-バンド法は、Sumnerの方法⁵⁾を変法し、40℃に加温した5% Ba(OH)₂ · 8H₂O水溶液で60-90秒処理して実施した。

3 結果

ウズラの赤血球を、Conray 400-Ficoll法で除去してリンパ球のみを分離し、培養温度39.5 ± 0.5℃で培養することにより、多数の細胞分裂像が観察された。全血を用いての培養も可能であるが、鳥類の場合は赤血球が有核であるためリンパ球と混同しやすく、リンパ球のみを分離した方が好結果が得られた。

ウズラの性染色体は、♂でホモ型(ZZ)、♀でヘテロ型(ZW)の核型構成(ほ乳類とは逆)となっているが、染色体の計測の結果から、Z性染色体は第4番の大きさであった(図1と2を参照)。また、W性染色体は常染色体の6-8番目のものと同程度のサイズであることが分かった。

HRB法を用いると、前中期の細胞分裂像を示す細長い染色体が多数見いだされたが、EBの効果で染色体の凝縮が抑制されたため、No.25までの小型染色体の形態が明りょうとなった(図3)。なお、この標本に10-15秒間トリプシン処理を加えると、従来の方法では検出が不可能であった微小染色体にも数多くのバンドが認められ、No.15までの染色体の同定が可能となった。

ところで、C-バンド法(構成性異質ヘテロクロマチン染色法)でウズラ染色体を処理すると、



図 1 ニホンウズラのEB処理による分裂前中期核板

Fig. 1 EB treated chromosomes of the Japanese quail

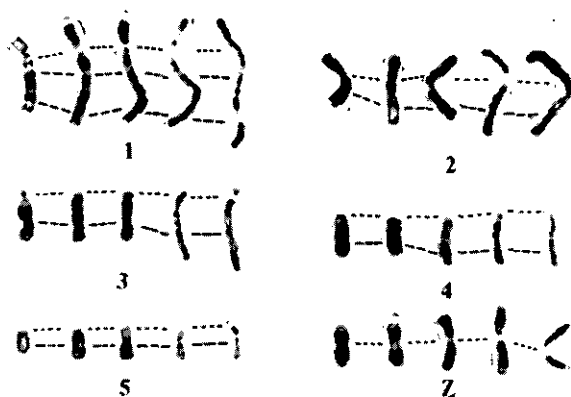


図 2 Z 性染色体及び大型染色体の高精度分染パターン
 Fig. 2 High resolution banding pattern of macrochromosomes including Z chromosomes

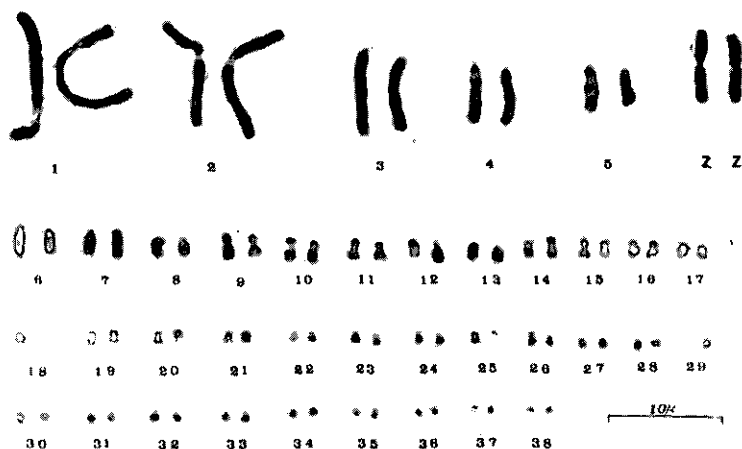


図 3 ニホンウズラの EB 処理核型(♂)
 Fig. 3 EB treated karyotype of the Japanese quail (♂)

従来の方法では区別が困難な W 染色体全体が濃染されることが分かり、性の判定が容易になった。また C-バンド法により、常染色体 No. 3 と No. 4 及び性染色体 (Z) に異質染色質の大きさと染色性に個体変異 (異形性) が検出された。

4 考 察

ほ乳類では、リンパ球の培養の際には 37°C で行うのが通常であるが、しかし、ウズラの場合

はこれより高めにすることが必要であり、今回は $39.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に培養温度を設定することによって、鮮明な細胞分裂像を多数得ることができた。

今回用いた HRB 法は、通常の染色体標本作成手順に EB を加えることにより、細胞分裂の前中期に当たる細長い染色体を高頻度で得ることが可能であり、しかも、トリプシン処理をすることにより多数のバンドが識別できた。これにより、ウズラの小型染色体群の中で今まで分別しえなかった 15 番目までの同定が可能であった。今後、ウズラの染色体異常の検出に HRB 法は極めて有効な方法と考えられる。

ウズラの W 性染色体は、小型染色体群に属しており、従来のギムザ液のみの染色法では同定が困難であったが、C-バンド法を用いると W 性染色体が特異的に濃染され、検出が容易となった。これまでの方法では、ウズラ発生初期胚での性判定が困難であったが、C-バンド法を用いると W 性染色体のみ濃染されることを利用することにより、正確な性判定が可能になった。また、C-バンド法により Z 性染色体に異形性が検出されたが、これは、Z 性染色体上の遺伝的標識 (Genetic marker) に利用できることを示唆しており、ウズラ個体ごとの遺伝的モニタリングとしての今後の応用が期待できる⁶⁾。

引用文献

- 1) Rytman, H. and Tegelström, H. (1981): G-banded karyotypes of three Galliformes species, domestic fowl, Quail and Turkey. *Hereditas*, **94**, 165-170.
- 2) Yunis, J. J. (1976): High resolution of human chromosomes. *Science*, **191**, 1268-1270.
- 3) 安積順一・塩谷寛 (1982): 法医学と染色体. *医学のあゆみ*, **121**, 814-820.
- 4) Ikeuchi, T. and Sasaki, M. (1979): Accumulation of early mitotic cells in ethidium bromide-treated human lymphocyte cultures. *Proc. Jpn. Acad.*, **55(B)**, 15-18.
- 5) Sumner, A. T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl. Cell Res.*, **75**, 304-306.
- 6) Takashima, Y., Takahashi, H., Takahashi, S. and Mizuma, Y. (1985): High resolution G-banding chromosomes of Japanese quail. *Tohoku J. Agric. Res.*, **36**, 75-78.

VI ウズラ 3 系統間でのタンパク質多型についての遺伝学的解析 Genetic Analysis of the Protein Polymorphism in 3 Strains of the Japanese Quail

小坂末蔵^{1,2}・高橋慎司³・高橋 弘³

Suezo KOSAKA^{1,2}, Shinji TAKAHASHI³ and Hiroshi TAKAHASHI³

要 旨

最新の電気泳動学的手法をウズラの3系統(H₂, L₂及びWE系)に適用し, 生化学的標識遺伝子のモニタリングを試みた。その結果として, 以下のことが分かった。

1) スラブディスク電気泳動法を改良することにより, ①プレアルブミン泳動域を5座に分別することができ, それらの出現頻度はウズラ系統間(H₂系とL₂系)で差異が認められた, ②すい臓可溶性タンパク質は30本以上のバンドに分離されたが, ウズラの系統間で差は認められなかった, ③血清及びすい臓のアミラーゼアインザイムは, 2座に分別することができたが, ウズラの系統間で差はなかった。

2) デンプンゲル電気泳動法を改良することにより, 赤血球内酵素エステラーゼD (Es-D)の鮮明な泳動像を得ることができた。Es-Dの多型は, 従来から知られている2種の遺伝子(Es-D¹とEs-D²)が認められ, ウズラの系統間(H₂系とL₂系)で遺伝子頻度が明確に異なっていた。

3) 等電点電気泳動法(IEF法)により, 血清トランスフェリン(Tf)を検出することができたが, ウズラの個体差は認められなかった。

Abstract

The biochemical genetic markers were monitored using the recent methods of electrophoresis in 3 strains (H₂, L₂, and WE strains) of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). The results are as follows:

1) By means of the improved slab disk electrophoresis, prealbumin was divided into 5

-
1. 昭和57~59年度 国立公害研究所 共同研究員 (山形大学農学部 〒997 山形県鶴岡市若葉町 1-22)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present Address: Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka, Yamagata 997 Japan.
 2. 現住所: 生物農学研究所 〒997 山形県鶴岡市稲生 2-16-6
Present Address: Inao 2-16-6, Tsuruoka, Yamagata 997 Japan.
 3. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番 2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan.

types, and the gene frequencies were significantly different from each other between H₂ and L₂ lines. The soluble protein extracted from pancreas was divided into more than 30 bands, however, the strain difference concerned with banding patterns was not found definitely. And also, there was no strain difference in amylase isozyme types, though it was typed to 2 loci.

2) Esterase-D in the erythrocytes was clearly divided into 2 genes by means of the improved starch gel electrophoresis. The gene frequencies were significantly different from each other between H₂ and L₂ strains.

3) Serum transferrin was detected between pH. 4 and 6 by means of isoelectric focusing. However, there was no genetic different patterns among these 3 strains.

1 はじめに

ウズラにおける生化学的標識遺伝子の開発は、Haley¹⁾による血清アルブミンの多型の報告以来、日本人を中心として積極的に行われている。これまでに、アルブミン・エステラーゼ・ヘモグロビン・トランスフェリン等の遺伝変異がウズラでも報告され²⁾、遺伝的標識(Genetic marker)として活用されている。

しかしながら、ウズラの生化学的標識遺伝子を Genetic marker として利用するためには、これまでの報告例で使われた遺伝子記号を統一するとともに、数多くのタンパク質・酵素等に関する集団遺伝学的調査を行う必要がある。また、最新の電気泳動学的手法を取り入れることによつて、新たな遺伝形質を見いだすことが重要である。

そこで、著者らはこれまでの電気泳動手法に改良を加えることにより、新しい生化学的標識遺伝子の検索を行うとともに、遺伝的背景の異なるウズラ系統間で実際に生化学的標識遺伝子のモニタリングを行い、これまでの報告例と比較検討した。

2 方法

供試ウズラは、国立公害研究所で選抜・維持している H₂, L₂, 及び(株)日本生物科学研究所由来の WE の 3 系とした。

ウズラの生化学的標識遺伝子の分析方法は以下の 1)~3)の方法により行つた。

2. 1 ウズラの血清タンパク及び臓器抽出液のポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE 法) による分析

すい臓に重量比 1/2 量の PBS(0.01M, pH7.2)を加えてホモジナイスし、遠心(3000 rpm, 10 分)した上清をすい臓抽出液とした。バッファー系として、トリス-硫酸濃縮バッファー(pH9.2), トリス-塩酸濃縮バッファー(pH8.9), トリス-塩酸分離ゲルバッファー(pH6.7), トリス-グリシンブリッジバッファー(pH8.3)を使用した。ゲル濃度は、10%, 12%, 14%の各濃度のゲル(140 ×

120×1 mm)を作製した。泳動は、血清又はすい臓抽出液の 6～7 μ l の試料を用い、定電流 20mA でトリス-硫酸(pH 9.2)の場合は 1 時間 20 分、トリス-塩酸(pH 8.9)の場合は 2 時間 30 分とした。次に 0.15% クーマシーブリリアントブルー R-250 (50%メタノール, 10%酢酸, 40%水)により 2 時間染色し、脱色液(20%メタノールと 7%酢酸, 73%水)で処理した。アミラーゼアインゾイムの検出には、血清 5 μ l 又はすい臓抽出液の 150 倍希釈液 5～6 μ l の試料を用い、濃縮バッファーとしてトリス-硫酸(pH 9.2)を使い、定電流 20mA で 1 時間 20 分の泳動後、1%可溶性デンブロン溶液に 30 分間浸漬し、37°C で 30 分間恒温してからヨード溶液で染色した。

2. 2 ウズラの赤血球内酵素エステラーゼ D (Es-D) のデンブロン電気泳動法による分析

ウズラ赤血球を洗浄後-20°C で凍結し、溶血させて行った。ゲル(110×110×1mm)は加水分解デンブロン(Connaught 社製)を、トリス-クエン酸バッファー(pH 7.6)に加熱溶解させ、12%のデンブロンゲルを作製した。

試料は、ろ紙片(2×3 mm)に試料をしみ込ませ、ゲルの陰極側に挿入した。泳動は、水酸化ナトリウム-ホウ酸バッファー(pH 8.7)で 140 V の定電圧で約 2 時間 30 分を行った。Es-D 反応液は、0.05M 酢酸バッファー(pH 5.2)に 4-メチルウンベリフェリル酢酸を 0.01%(W/V)の割合で溶解して作製した。Es-D のバンドの検出は、15～20 分間室温で反応させ、その後に紫外線(Long wave, 3650 Å)を照射することで行った。

2. 3 ウズラの血清トランスフェリン(Tf)の等電点電気泳動法による分析

試料の作製は、血清に 1 U/ml のノイラミナーゼ溶液(0.2M 酢酸バッファー, pH 5.0)を等量加え、37°C で一晩反応させて行った。ゲル(120×120×0.5 mm)は、29.1%アクリルアミド溶液の 1.4ml, 0.9%ビスアクリルアミド溶液の 1.4ml, セルパライト(pH 3～10:20%, pH 4～6:80%)の 0.5ml, 蒸留水 4.9ml, 及び 1%過硫酸アンモニウム 0.2ml を用いて作製した。試料はろ紙片(2×2 mm)にしみ込ませ、ゲルの陰極側に置き、10°C の冷却下にて 5 W の定電力で 4 時間泳動した。タンパク質の固定は 11%トリクロル酢酸で 30 分間行い、クーマシーブリリアントブルー R-250 で 2.1 と同様にして染色した。

3 結果

3. 1 PAGE 法による生化学的標識遺伝子のモニタリング

3. 1. 1 プレアルブミン(Pa)

従来の PAGE 法でのゲルバッファーであるトリス-塩酸(pH 8.9)から、トリス-硫酸(pH 9.2)に変えることにより、泳動時間の短縮、分離能の向上、及び泳動像の鮮明化がなされた。また、プレアルブミンの分離とゲル濃度(10, 12, 14%)との関連を比較した結果、12%のゲル濃度が最も高い分離能を示した。

上記のように改良したPAGE法により、ウズラ血清のプレアルブミンの電気泳動像を比較すると、プレアルブミンは5域に分離された(陽極側からPa-1~Pa-5と命名、図1を参照)。特に、Pa-1域に明白な1本のバンドが確認でき、プレアルブミンのAとO(ヌル)遺伝子(A_1 , O_1 と略す)が推定された。

ウズラ3系統間でPa-1域の $A_1 \cdot O_1$ 遺伝子の頻度を比較し、表1に示した。 A_1 の遺伝子頻度は L_2 系が H_2 系・WE系より多く、一方、 O_1 の遺伝子頻度は H_2 系・WE系が L_2 系より多く、 H_2 系・WE系と L_2 系で有意差を認めた。

Pa-2域とPa-3域では、各々2つの遺伝子($A_2 \cdot O_2$, $A_3 \cdot B_3$)が、Pa-4域とPa-5域では、各々3つの遺伝子($A_4 \cdot B_4 \cdot O_4$, $A_5 \cdot B_5 \cdot O_5$)が推定できたが、 H_2 系と L_2 系とに遺伝子頻度の差異は認められなかった。

3. 1. 2 すい臓可溶性タンパク質

すい臓可溶性タンパク質の多型については、30本以上のバンドとして観察されたが、系統間で差がなかった。

3. 1. 3 アミラーゼアイソザイム

今回改良したPAGE法により、従来の寒天又はデンブengel電気泳動法に比較して、泳動時間の短縮と泳動像の鮮明化が得られた。しかし、血清及びすい臓アミラーゼアイソザイムには個体変異は認められなかった。

3. 2 デンブengel電気泳動法による生化学的標識遺伝子のモニタリング

3. 2. 1 赤血球内酵素エステラーゼD (Es-D)

Es-Dの検出においては、本実験で新しく用いたバッファー系を使用することにより、従来のHopkinson法³⁾より鮮明な泳動像を得ることができた。

これまで、Es-D型は $Es-D^1$ と $Es-D^2$ の2つの遺伝子が推定されているが、今回の方法をウズラの3系統(H_2 , L_2 , WE系)に適用した結果、いずれも上記の2遺伝子が確認できた。

H_2 系と L_2 系でのEs-Dの遺伝子頻度を、3世代(G_{13} , G_{15} , G_{23})にわたって調査した結果を表2に示した。 H_2 系では $Es-D^1$ の遺伝子頻度が高く、 L_2 系では $Es-D^2$ の遺伝子頻度が高いという現象が、3世代を通して認められた。

3. 3 等電点電気泳動法(IEF法)による生化学的標識遺伝子のモニタリング

ウズラ血清のトランスフェリン(Tf)は、IEF法ではpH4~6の間に検出することができたが、個体差は認められなかった。また、ノイラミターゼ処理した場合は、無処理の血清と比較して等電点が上昇するものの、個体差は認められなかった。

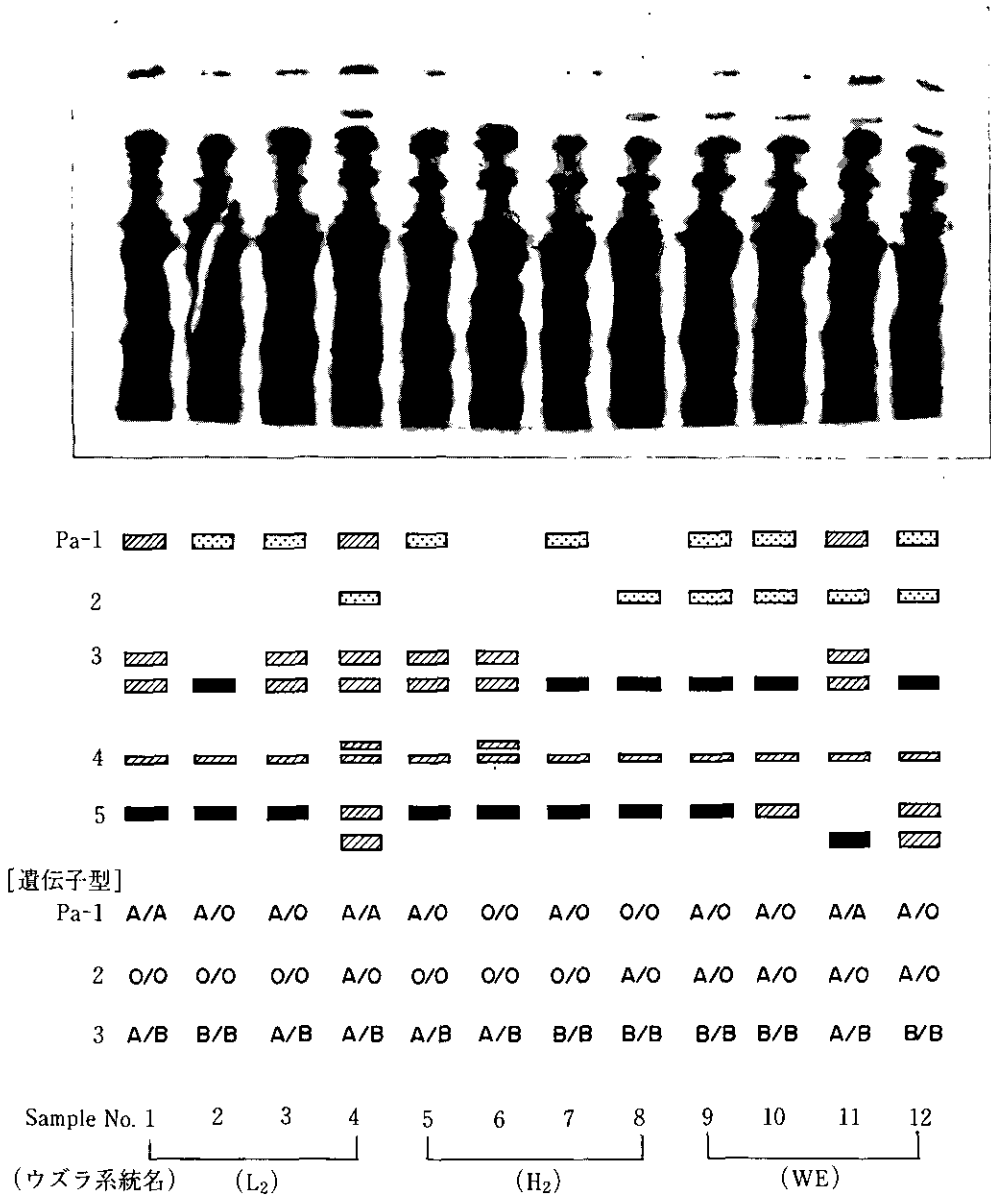


図 1 スラブディスク電気泳動法による血清プレアルブミンの泳動像
 Fig. 1 Electrophotogram of serum prealbumin in the Japanese quail by Slab-disc electrophoresis

表 1 プレアルブミン 1 域 (A₁及びO₁) 遺伝子頻度におけるウズラ系統間差

Table 1 Strain differences of pre-albumin 1 (A₁ and O₁) gene frequencies in the Japanese quail

Strain	No. of Samples	Genotypes			Gene frequencies	
		A ₁ /A ₁	A ₁ /O ₁	O ₁ /O ₁	qA ₁	qO ₁
H ₂	32	5	12	15	.34	.66
		(16)*	(37)	(47)	±.06	±.06
L ₂	24	12	11	1	.73	.27
		(50)	(46)	(4)	±.06	±.06
WE	31	4	11	16	.31	.69
		(13)	(35)	(52)	±.06	±.06

*() : %

表 2 赤血球内酵素エステラーゼ D (Es-D¹ 及び Es-D²) 遺伝子頻度におけるウズラ系統間差

Table 2 Strain differences of erythrocyte esterase-D (Es-D¹ and Es-D²) gene frequencies in the Japanese quail.

Strain	Generation	No. of Samples	Phenotypes			Gene frequencies	
			Es-D ¹	Es-D ²⁻¹	Es-D ²	Es-D ¹	Es-D ²
H ₂	G ₁₃	27	15	9	3	.72	.28
			(56)*	(33)	(11)	±.06	±.06
	G ₁₅	10	8	1	1	.85	.15
			(80)	(10)	(10)	±.08	±.08
	G ₂₃	26	14	12	0	.77	.23
			(54)	(46)	(0)	±.06	±.06
L ₂	G ₁₃	34	8	10	16	.38	.62
			(24)	(29)	(47)	±.06	±.06
	G ₁₅	10	0	2	8	.10	.90
			(0)	(20)	(80)	±.07	±.07
	G ₂₃	21	3	9	9	.36	.64
			(14)	(43)	(43)	±.07	±.07
WE	G ₃	28	14	5	9	.59	.41
			(50)	(18)	(32)	±.07	±.07

*() : %

4 考 察

Somes, Jr.⁴⁾は、ウズラの遺伝的標識(Genetic marker)について総説し、タンパク質座位 26 と、その他の形態生理代謝に関与する座位 46 を報告している。また、木村²⁾は、ウズラのタンパク

質多型についてこれまでの報告をまとめ、全部合わせて100余りの座位があると推定している。

タンパク質多型は、形質発現が安定していること、遺伝様式が比較的単純で表現型から直接に遺伝子型が読みとれることなどの理由で、最近では遺伝的モニタリングに積極的に利用されるようになった⁵⁾。ウズラでも多型形質が近年、積極的に検索されてきたが、マウス・ラットに比較すればかなり少なく、またニワトリと比較しても1/3程度にとどまっている²⁾。

ウズラは、鳥類の実験動物として世界的にも注目されるようになってきたが、遺伝的純化は遅れており、早急な対応が必要とされている。今回の遺伝学的モニタリングに使用したウズラ(H₂, L₂, WEの3系)は、遺伝的純化が最も進んでおり⁶⁾、ウズラでの生化学的標識遺伝子の分析に適当と考えられる。

今回の生化学的標識遺伝子の分析は、電気泳動学的手法のうちで①PAGE法、②デンブングル法、③IEF法を用いて行ったが、従来の方式を種々改良することにより、より鮮明な泳動像を得ることができた。すなわち、①ではバッファー系にトリス-硫酸を適用することによって、泳動時間の短縮、分離能の向上、泳動像の鮮明化が達成された。②では従来のHopkinson法³⁾のバッファーを水酸化ナトリウム-ホウ酸(pH8.7)に変えることにより、鮮明な泳動像が得られた。

このようにして改良した電気泳動学的手法をウズラの3系統間(H₂, L₂, WE系)のタンパク質多型の分析に適用したことにより、プレアルブミン域(Pa)とエステラーゼD(Es-D)に明らかな系統間差を見いだすことができた。

これまで、ウズラのプレアルブミンに関しては、LucotteとKaminski⁷⁾の報告があり、卵白及び血清プレアルブミンは共に4域に分けられるとしている。田名部⁸⁾は、水平式ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて、血清プレアルブミンの4域の内1域に易動度の差に基づく個体変異がみられるとし、さらに田名部⁹⁾は卵黄プレアルブミンでは6域に分別でき、その中の2域に個体変異を報告している。ところで、今回のウズラ血清プレアルブミンは5域に分別され(Pa-1~Pa-5)、従来の報告よりも1域多かった。またPa-1域においては明確な個体変異(A₁・O₁)が見いだされ、ウズラ系統間(H₂系とL₂系)の遺伝学的モニタリングに有効であることが分かった。今後は従来の血清プレアルブミンでの報告例と照合するとともに、Pa-1の遺伝様式を明らかにし、新しい遺伝標識として登録する必要がある。

次に、エステラーゼD(Es-D)はダイマー構成のタンパク質であり、複対立遺伝子により支配されることが報告されている^{10,11)}。木村¹²⁾は、Hopkinsonらの方法³⁾(デンブングル法)により、ウズラの浅胸骨と肝臓抽出物より3域(F₁, F₂, S)に分別できたことを報告している。一方、ウズラの赤血球抽出物からは、これまで2域(F,S)のみ報告されている(ManwellとBaker¹³⁾、橋口¹⁴⁾)。今回の場合も、ウズラ赤血球内のEs-D型は2つの遺伝子(Es-D¹, Es-D²)のみで、それ以外の多型は全く認められなかった。すなわち、ウズラの赤血球のEs-D型は、従来の報告通り2つの遺伝子により支配されていると思われる。なお、Es-D¹とEs-D²の頻度は、ウズラ系統間で明らかに差異のあることより、ウズラの遺伝学的モニタリングに有効であることが分かった。

ところで、すい臓可溶性タンパク質多型については、著者ら¹⁵⁾は、カモ属で遺伝変異を報告した。ウズラでは、Watanabe と Wakasugi¹⁶⁾がすい臓アミラーゼの遺伝変異(対立遺伝子 a, b)を報告しており、ウズラ 9 系統のうち 1 系統においてのみ変異型の遺伝子(b)の存在を認めたと報告している。木村ら¹²⁾は、岐阜大学のウズラ集団を調査し、野生型(a)が変異型(b)より頻度が高いこと(bの遺伝子頻度は0.071)を確認している。

今回はウズラのすい臓可溶性タンパク質は 30 本以上のシャープなバンドに分れたが、多型が推定される複雑なバンドパターンを示したので、遺伝支配は今後の交配実験により明らかにできると考える。また、今回のサンプルにおいてはアミラーゼの個体変異は、すい臓及び血清とも認められなかった。

IEF 法による血清トランスフェリン(Tf)の多型及びノイラミターゼ処理の効果を検討したが、特に系統間で差異は認められなかった。Itoら¹⁷⁾は、血清の Tf 型を 2 本(B, C)に分別しているが、今回は pH 4-6 の間に 2 本のバンドを同様に確認することができた。

このように、これらの遺伝形質は、ウズラの遺伝学的モニタリングに有効であることが分かった。特に、Pa-1 と Es-D は H₂系と L₂系の系統間識別に使えることが明らかとなったので、以後の選抜に際しては遺伝子のホモ化を進めるように計画交配し、遺伝的コンタミネーションの防止に利用する予定である。

また、生化学的標識遺伝子は、連鎖地図(Linkage map)を作製する際には、極めて有用な遺伝的標識(Genetic marker)となることより、今後、大規模なウズラ集団について、数多くの遺伝的多型を調査することが重要となってくると思われる。

引用文献

- 1) Haley, L. E.(1965) : Serum albumin polymorphism in quail and chicken-quail hybrids. *Genetics*, **51**, 983.
- 2) 木村正雄(1982) : ウズラのタンパク多型について. 日本家禽学会誌, **19**, 211-221.
- 3) Hopkinson, D. A., M. A. Mestriner, J. Cortner and H. Harris (1973) : Esterase D anew human Polymorphism. *Ann. hum. Genet.*, **37**, 119.
- 4) Somes, Jr., R.G. (1981) : International registry of poultry genetic stocks. Storrs Agric. Exp. Stn., Bull. 460, Univ. Connecticut. 97.
- 5) 若杉 昇・水谷 誠・伊藤慎一・加藤秀樹 (1983) : 1.3 ウズラの実験動物化. 実験動物の遺伝的コントロール, 近藤恭司監修, ソフトサイエンス社, 東京, 139-158.
- 6) 水谷 誠(1986) : 我が国で維持されているニホンウズラの系統. 第 3 の家畜, 農林水産省畜産局家畜生産課監修, 地球社, 東京, 71-72.
- 7) Lucotte, G. and M. Kaminski (1975) : Polymorphisme biochimique de la Caille domestique dans le cas d'une population de reproducteurs a' hautes performances. *Exp. Anim.*, **8**, 27.
- 8) 田名部尚子 (1980) : 各種家禽卵の性状ならびに成分の比較 6.ウズラ, ニワトリ, キンケイ, ハッカカン, アヒル, バリケンおよびハト卵白タンパク質のポリアクリルアミドグラジェント薄層ゲル電気泳動像の比較. 日本家禽学会誌, **17**, 249.

- 9) 田名部尚子・小川宣子・河原孝忠 (1981) : 各種家禽卵の性状ならびに成分の比較 8. ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) 卵黄タンパク質の個体変異. 日本家禽学会誌, **18**, 126.
- 10) 渡辺誠喜・芝田 猛・河原孝忠 (1977) : ニホンウズラにおけるエステラーゼ D・アイソザイムの変異. 日本家禽学会誌, **14**, 66.
- 11) 木村正雄・江村正一・河原孝忠・伊藤慎一・磯貝岩弘・佐藤 勇・石黒基嗣・大橋けい子 (1978) : ウズラの大脳エステラーゼ電気泳動像における個体変異. 日本家禽学会誌, **15**, 184.
- 12) 木村正雄・石黒基嗣・伊藤慎一・磯貝岩弘 (1980) : 電気泳動法によるウズラの酵素およびタンパク質の個体変異の検出について. 日本家禽学会誌, **17**, 312.
- 13) Manwell, C. and C. M. A. Baker (1969) : Hybrid proteins, heterosis and the origin of species I. Unusual variation of polychaete *Hyalinoecia* "nothing dehydrogenases" and of quail *Coturnix erythrocyte* enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**, 1007.
- 14) 橋口 勉・前田芳実・武富萬治郎 (1980) : ニホンウズラにおける赤血球エステラーゼアイソザイムの遺伝的変異. 動物学会誌, **89**, 49.
- 15) 矢萩 剛・佐藤和也・渡部 徹・森 慶二・小坂末蔵・高橋 弘・高橋慎司・荒井敢太・水間豊・斎藤 修 (1984) : カモ属の血清及びすい臓のアミラーゼの遺伝変異に関する研究. 日本畜産学会東北支部会報, **34**, 15-17.
- 16) Watanabe, T. and N. Wakasugi (1978) : Genetic variants of pancreatic α -amylase in the Japanese quail. *Jpn. J. Genet.*, **53**, 55.
- 17) Ito, S., H. Asano, H. Hanai, K. Ishikawa, M. Kimura and I. Isogai (1981) : Genetic control and population survey of transferrin in the Japanese quail. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, **12**, 145-147.

[Appendix]

実験動物の染色体分染技術の開発
—家きん類の染色体分染法の確立—

**Chromosomal Analysis in the Experimental Animal
by Means of Several Banding Techniques
—Avian Chromosome Methodology—**

高嶋良弘・高橋慎司・高橋 弘・水間 豊

Yoshihiro TAKASHIMA, Shinji TAKAHASHI, Hiroshi TAKAHASHI
and Yutaka MIZUMA

はじめに

実験動物は、遺伝的均一性や特性をもつ集団であり、系統維持や生産においてもそれらの特性を保持していかなければならない。例えば、同一の毛色をもつ2つの異なった系統が飼育中に遺伝的コンタミネーションを起こす人為的ミスはゼロとは言えないからである。もし遺伝的コンタミネーションが生じたら実験動物を用いた試験データはすべて無駄になる。さらには、実験に費やした年月、費用からも重大な問題である。それを防ぐため、実験動物の維持生産や供給の過程のチェックをするために遺伝的モニタリングが必要となる。

この実験動物の遺伝的モニタリングに使用される遺伝的マーカーは、簡単にかつ明確で短時間に検査でき、しかもできる限り費用の安いことが望まれる。現在、近交系マウスを対象として実施されている遺伝的モニタリングのための遺伝形質は質的形質と量的形質に大別される。メンデルの遺伝法則に従う質的形質として毛色、酵素アイソザイム、組織適合性抗原がある。一方、多くの遺伝子座位により支配されている量的形質として、産仔数、体重、下顎骨の形状等が利用されている。また、最近のその他の遺伝的モニタリングとして、ほ乳類でのミトコンドリアDNA切断型やDNAフィンガープリント法も利用されつつある。

このように、染色体を遺伝的モニタリングに利用する試みがなされるようになったが、鳥類の染色体の分染手法について詳細にまとめられている文献は、極めて少ない。

そこで、ウズラを含む家きん類の遺伝的モニタリングに使用される遺伝的標識 (Genetic marker) としての染色体の利用の可能性について述べると共に、鳥類の染色体の観察法について解説する。

1 染色体研究の進展

染色体とは、動植物細胞の有糸分裂の際に塩基性色素で濃く染る核内の紐状の物質で、一定の順序に配列する遺伝子群を含んでいる。ヒトの染色体が $2n=46$ で男性XY型、女性XX型であることが確定したのは、1956年(Tjio と Levan)であることを考えると、染色体の研究の進展は目覚ましいものがある。これらの進展には、コルヒチン法、低張液処理法、空気乾燥法、分染法などいくつかの技術的開発と改良が挙げられる。

1950年以降の染色体の観察は、細胞分裂の盛んな精巣の組織切片を用いて行われていたが、鮮明な分裂像を得ることが困難であった。ところが、組織培養技術の進歩、50年代のコルヒチン法、低張液処理法の開発・改良、60年代の末しょう血(白血球)を材料とした染色体の観察の進展、さらに70年代の種々の分染法による新しい核型分析技術の開発など、染色体の研究は近年、飛躍的に発展してきた。

医学の研究分野において、ヒトの染色体の細胞遺伝学(Cytogenetics)的研究が著しく発展してきており、単なる核型分析にとどまらず、例えば、染色体異常と疾患の関連、細胞の腫瘍化と染色体の特異的異常の関連、遺伝子のマッピング、染色体の分染機構、染色体の微細構造の解析、

霊長類の種の分化と核型進化の関連などの研究が行われている。

2 細胞分裂と細胞周期

染色体を顕微鏡で観察できるのは、細胞分裂期のみに限られている。これは、分裂の間期では染色体は糸状のクロマチン繊維となり、光学顕微鏡によって認めることができないためである。この物質が、分裂の前期から徐々に8000倍程度に凝縮し染色体の形態をとる。染色体の数やその形態が明りょうになるのは、細胞分裂の中期である。1つの細胞分裂から次の細胞分裂までの期間を1周期として、細胞は増えていく。細胞分裂の周期は16~24時間であるが、分裂期(M期: Mitotic phase)は1~2時間以内と比較的短い期間で終了する。そのため、染色体標本の作製に当たっては細胞分裂の盛んな細胞を材料として処理する必要がある。

体細胞の染色体を観察するためには、一般的に①組織の細胞培養、②骨髓細胞の採取、③末しょう血(白血球)の培養のいずれかの方法を用いる。染色体は、1組の性染色体(Sex Chromosome, ほ乳類では♂:XY・♀:XX, 鳥類では♂:ZZ・♀:ZW)と、残りの常染色体(Autosome)より構成される。一般には乳類のX染色体は比較的大きく、Y染色体は小型染色体の内の1本であることが多い。また、鳥類のZ染色体はX染色体と同じく大型であり、W染色体は小型染色体に属することが多い。

染色体は、その大きさと形の特徴を表すため、いくつかの指標が用いられている。染色体は両腕の比率(腕比: Arm ratio, L/S)あるいは個々の染色体に対する短腕の長さの比(着糸点指数: Centromere index)に基づいて5型に分類することができる。また、染色体の相対的長さは、X染色体1本を含む♀の半数体(n)の長さの総和に対する各染色体の百分率で表すことが多いし、核型が示す常染色体の腕の数を合計したものを基本腕数(NF: Nombre Fondamentale)といい、核型に生じた系統進化の説明にこのNF値がよく用いられる。

正常な個体の染色体数及び形態は、それを構成する体細胞のどの部分でも一定であり、品種間で異なることはない。ただし、家きん類を含む鳥類の染色体数については、数ミクロン以下のいわゆる小型染色体(Micro chromosome)が数多く存在し、現段階の光学顕微鏡下の観察では不明確である。細胞分裂の観察から得られる染色体の数及び形によって表される特徴を核型(Karyotype)といい、核型を調べることを核型分析と呼ぶ。染色体の並べ換えをする場合には、始めに常染色体と性染色体に大別し、染色体の型(大きさ、動原体の位置、付随体や二次くびれの有無)から相同染色体を1対ずつ同定して、イディオグラム(Idiogram)を作製する。

染色体の分類、記載法に関しては、国際会議(シカゴ会議:1966, パリ会議:1971・1975)で検討され、統一規約がある。また、いくつかの家畜(ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ネコ、ウサギ)については、1976年の国際会議(リーディング, 英国)で決められている。しかし、家きん類や家畜の近縁種の標準核型については、まだ国際的な統一がなされていない。家畜・家きんの種の染色体数及びその形態は一定しているが、相同染色体の同定や染色体異常の分析には通常の

ギムサ染色では不十分な場合が多く、詳細な分析には分染法を用いる。

3 染色体の異形性(正常変異)の染色体標識としての利用

染色体の特徴としては、染色体構成が各々の種によって固有であり、品種にかかわらずすべて同一の染色体構成を持つことが挙げられる。しかし、染色体を種々の染色法を用いて詳細に調べると、有害な影響を及ぼさない程度の染色体の個体差(正常変異)があることが分かってきた。これを染色体の異形性といい、その個体のすべての細胞の染色体に一様に観察され、染色体の長さ(例えば、ヒトのY染色体)や、染色体上のC-バンド陽性の位置や大きさ、あるいはQ-バンド法による染色体の強弱を指標として判定される。その異形性の染色部位の大きさは、連続的に変化している。

染色体の異形性は、慣例的には多型(Polymorphism)という語が用いられている。また、その異形性を持つ染色体を異形染色体又は変異染色体という。これらの変異性の染色体マーカーは、単純なメンデル性遺伝に従って遺伝することが知られており、従来より用いられている赤血球型、血清型、酵素型などの遺伝形質とともに多胎子の卵性診断、親子鑑定等に应用することが可能である。

C-分染法を行うと、相同染色体間に異質染色質の大きさに差異が認められる場合がある。例えば、マウスやラットの系統でC-バンドによる異質染色質(ヘテロクロマチン)量やN-バンドによる仁形成部位(NOR)による染色体マーカーが検出されている。これは、キメラ個体の作出の際に細胞の識別の分析手段として、従来の毛色や酵素型の方法に加え、染色体の異形性も有効であることを示している。

4 鳥類の染色体の特徴

現在、地球上には8600~8700種余りの鳥類が生存している。しかし、その核型が確認されている種は、500~560種(約6%)ほどである。一方、ほ乳類は約5000種のうち30%余りが既に調査済みである。すなわち、ほ乳類の研究に比べ、鳥類の核型の研究が遅れているのが現状である。

鳥類のDNA量は、ほ乳類より少なく、またその変異幅も魚類や両生類よりもかなり少ない。鳥類の細胞当たりの半数体(Haploid)のDNA量は、1.7~2.3 pgである。

鳥類の染色体は、比較的少数の大型染色体(Macrochromosome)と数多くの小型染色体(微小染色体: Microchromosome)より構成されている。大型染色体の長さを合計すると、全体の70~80%以上に及ぶが、この構成は、ほ虫類の核型構成とよく似ている。しかし、進化上、鳥類とは虫類で何故に微小染色体が多いのかは、全く不明である。また、微小染色体上にどのような遺伝子が、どの位あり、どのようにして生体の維持に関与しているのかも不明である。

鳥類の染色体数を正確に数えることはかなり困難である。それは、次のような点があるからである。①小型の染色体は極めて小さく、写真撮影しても鮮明に写らないことが多い、②小型の

染色体が大型の染色体の下に潜り込んだり、小型染色体の一部が飛び出す可能性が十分にある、③小型の染色体同志がくっついて見えて正確な染色体の同定ができないことがある、④小さな染色体以外の物質(染色液の沈殿物、シミ、ゴミなど)を染色体と誤認する可能性がある。

鳥類全体の染色体の一般的特徴として、染色体数の幅が狭い(鳥類のほとんどの種が $2n = 74-84$ であり $2n = 80$ が最も多い)。また、大型染色体と小型染色体をみると、16本(8対)の大型染色体と64本(32対)の小型染色体をもつ場合が多く、しかも、大型染色体と小型染色体の割合も変化の少ないことが知られている。さらに、この染色体を分染法によって分析しても、異種間の大型染色体のG-バンドパターン(トリプシン処理により染色体に出現する横しま模様)が類似していることが、一般的に確認されている。さらに、鳥類の染色体には、1億年以上にわたってG-バンドパターンが変化せずに保存されている例も報告されている。以上のことから、鳥類は、DNAや染色体の進化の面から考えると、非常に緩慢な進化をした均一な動物群であると言われている。

5 家きん類の染色体の観察法

家きん類の染色体の観察には、①胚、②骨髄、③末しょう血、④羽軸、⑤生殖腺、⑥組織などが材料とされている。ほ乳類の場合と異なる大きな特徴は、発生途中の胚が簡単に入手できること、鳥類特有の羽軸を用いて染色体の観察ができることである。

現在では、末しょう血(白血球)による培養法による観察が一般的となってきている。著者らは、この方法を改良し、家きん類の染色体観察を以下の要領で行っている。

5.1 リンパ球の分離法

末しょう血の培養には、全血で行う方法(微量血液培養法)と、リンパ球を分離して培養する方法とがある。鳥類の場合は、赤血球が有核であるので、全血よりもリンパ球を分離した方法が観察しやすい。

リンパ球を分離する方法には、カラム法、付着法、比重法などがある。ここで、組織培養によく用いられている比重遠沈法について述べる。

[材料]

コンレイ 400 (Conray 400) : 66.8W/V%

Ficoll (Pharmacia社)

[試料の作成]

- 1) あらかじめ66.8% Conray 400を等量の蒸留水で希釈し、33.4% Conray 400を作成する。
- 2) 9% Ficoll蒸留水を作成する。
- 3) 次のConray 400-Ficollを以下の比率で作成する。

33.4% Conray 400 : 10容

9% Ficoll : 24容

[手順]

- 1) 2～3 ml の末しょう血をヘパリン加注射筒にて採取する。
- 2) 血液を RPMI 1640 培地で 2 倍に希釈する。
- 3) Conray 400-Ficoll 溶液 3 ml の上層に 2) の血液を重層する。
- 4) 室温で 1550 rpm 30 分間遠沈する。
- 5) 遠沈管の上澄みの血しょう + RPMI 1640 培地を取り除く。
- 6) リンパ球層を取り出し、その層を新しいスピッツ管に移し、RPMI 1640 培地で 3 回洗う(遠心洗浄は最初は 1600 rpm 5 分間、後は 1200 rpm で 5 分間とする)。
- 7) 適当な濃度に希釈し、リンパ球を培養する。

5. 2 細胞分裂指数(Mitotic index)の向上条件について

鳥類の細胞分裂指数(Mitotic index)の向上条件については、数多くの要因を検討しなければならない。白血球の培養法については、PHA(Phytohemagglutinin, インゲン豆より抽出)、Con A、PWM(Poke Weed Mitogen)を抗原刺激物質として利用できる。しかし、PHA は非特異的に鳥類の赤血球に凝集反応を起こすため、白血球の分裂を阻害する。このため、Con A、PWM などを白血球の幼若化刺激物質として用いた方がよい。鳥類の種によって、最適の添加濃度が異なっていることが考えられる。また、仔牛血清はその品質が重要であり、販売している薬品メーカーやロットによっても細胞分裂の程度に変化を生ずる。

次に培養温度であるが、培養には一定の温度が必要であり、高すぎても低すぎても良好な結果は得られない。ほ乳類の細胞は 37℃ を中心として ± 1℃ くらいが理想的であるが、鳥類の場合は、これよりもやや高い 39℃ 前後にした方がよい。もちろん種によっては、これよりも異なった方がその細胞分裂の頻度が高いことも考えられる。

すなわち、それぞれの種の細胞周期の長さを検討し、最適な抗原刺激を含め培地・血清・培養温度などの条件を検討していく必要がある。

5. 3 さまざまな染色法による染色体の同定

染色体の大きさや形態だけから染色体の同定を行うことは、同じような形態の染色体が存在している場合が多くて困難である。そこで、さまざまな工夫がなされてきたが、その一つは、核型を構成する個々の染色体中の DNA 合成時期が異なることを利用して³H-チミジンの取り込みの部位と量から染色体を同定しようということであった。しかしこの方法は、実験操作が面倒であったため、実用には至っていない。もう一つの方法は、ここで紹介する分染法(Chromosome banding techniques)である。

細胞分裂中期の染色体を試薬で処理し、横軸方向に濃淡のしま模様(バンド)に染め分ける手法

を分染法と呼ぶ。これにより、単なる染色体番号の同定だけでなく、染色体の構造異常(Structural abnormal)や変異(Variant)の検出も可能となった。その技術的基本は1970年半ばまでに開発されたが、現在においてもさまざまな分染法の改良例が報告されている。

ここでは、最も代表的なQ-, G-, C-, R-バンドの各分染法について述べる。Qはキナクリン(Quinacrine), Gはギムザ(Giemsa), Cは構成性ヘテロクロマチン(Constitutive heterochromatin), Rは反転(Reverse)を意味している。なお、G-バンド分析を行った標本を脱色し、C-分染法等の他の分析を施すことも可能である。ただし、あまり収縮している染色体では、そのバンドの数が少なく詳細な分析ができないため、コルヒチン処理濃度を低くするか又はその処理時間を短縮し、細長い染色体で処理した方が良好な結果が得られる。

5. 3. 1 Q-バンド法

アクリジン系の蛍光色素に属するキナクリンマスタード(Quinacrine mustard)あるいはキナクリン二塩化水素(Quinacrine dihydrochloride)を用いて染色体を染色する方法をQ-染色法(Q-staining method)といい、蛍光顕微鏡下で出現する蛍光を発する部分をQ-バンドと呼ぶ。

Q-バンド法では、染色体は特有なバンドパターンを示し、相同染色体の同定だけでなく、部分識別のほか、異常染色体の分析や同定も可能である。霊長類のうちヒトとゴリラは、Y染色体が蛍光を強く発し、その同定が容易である。またY染色体は、静止期の核あるいは精子頭部においてもよく光る小体(Y-クロマチン)として認められる。しかしながら、家畜(ウシ、ラクダ、ブタ、ウマ、ロ、ウサギ)においてはそのような現象は確認されていない。

なお、Q-バンドの蛍光顕微鏡による撮影は、自動撮影装置の使えないことが多く(染色体のちらばり具合や周囲の核の有無で露出時間が大幅に異なることによる)、また紫外線を照射すると退色が早いので、適切なシャッター時間をつかむことが必要である。

〔使用溶液〕

- 1) マキルベン(MacIlvaine)緩衝液：クエン酸11.19gとリン酸二ナトリウム(12水塩)33.46gを蒸留水1lに溶かす。
- 2) キナクリンマスタード染色液(QM染色液)：キナクリンマスタードを、蒸留水に2.5mg/mlとなるように溶かし、1~3mlずつ分注して、凍結保存する。使用時に1)で50 μ g/mlになるように希釈する。

〔手順〕

標本の作成は、空気乾燥法でも火炎乾燥法でもどちらでもよいが、乾燥後1日くらい経過して染色を行った方がよい結果を得やすい。

- 1) マキルベン緩衝液に1分間浸す。
- 2) QM染色液で10~20分間室温で染色する。
- 3) 水道水で軽く洗う。

- 4) 約30秒間蒸留水に浸す。
- 5) マキルベン緩衝液で2回洗う。
- 6) そのままカバーガラスをかけ、余分な緩衝液を吸い取り、鏡検する。

5. 3. 2 G-バンド法

染色体標本を塩類溶液中で加温したり、トリプシンなどのタンパク質分解酵素で前処理して、ギムザ液(リン酸緩衝液で希釈で染色する分染法である。数多くの変法があるがASG(Acetic-Saline-Giemsa)法やトリプシン法が代表的なものである。トリプシン処理法は標本の乾燥度に応じてトリプシン濃度や処理時間を調整する必要がある。

G-バンドはQ-バンドと大略的に対応し、G-染色法で濃いバンドはQ-染色法でも強く光る。しかし、①Q-バンドよりバンドパターンがシャープであること、②Q-分染法とは異なり染色体の永久標本が得られること、③蛍光顕微鏡が必要でないこと、などからこの方法が一般的な分染法である。

〔使用溶液〕

- 1) トリプシン液：組織培養の際に使用する市販のトリプシン(1:250)の0.25%溶液を原液として、少量ずつ分注して凍結保存する。使用時に、リン酸緩衝液(pH6.8)で10倍に薄める。
- 2) ギムザ液：pH6.8のリン酸緩衝液(1/100M)で市販のギムザ原液(メルク社製)を5%に希釈して使用する。

〔手順〕

- 1) トリプシン液(20℃)に30~45秒間で浸す。
- 2) 水道水で軽く洗う。
- 3) 70%アルコールに数秒浸す。
- 4) ギムザ液に入れて5分間染色する。

〔留意点〕

トリプシンの液温が高いほど反応が進む。あらかじめ一定の温度にしておくと、反応が一定し、良好なG-バンド標本ができる。予備実験をし、30~45秒程度の処理時間で最適なバンドができるようにトリプシン濃度を調整する。

スライドの乾燥度によっても、処理時間が異なる。作成した標本は、室温に放置するよりも、37℃の恒温器に数日間入れておき、G-バンド処理した方が良い結果が得られる。また、風乾法と火炎法(引火乾燥法)で作成した標本は乾燥度が異なり、前者より後者のほうでトリプシン処理を長めにする必要がある。なお、過度なトリプシン処理は、染色体の周辺のみを染め、バンドが観察されなかったり、染色体を膨潤させてその形態に破壊を生じさせることがあるので注意が必要である。

5. 3. 3 C-バンド法(構成性異質ヘテロクロマチン染色法)

染色体標本をアルカリ溶液(NaOH又はBa(OH)₂)で前処理してから塩類溶液で加温し、ギムザ液で染色すると、構成性異質染色質(Constitutive heterochromatin)が特異的に濃染され、他の染色部位はほとんど染まらなくなる。

C-バンドは、多くの場合、動原体部位にあることが多く、個々の染色体の同定はこれのみでは困難であるため、あらかじめG-バンド法を行い続いてC-バンド法を施したほうがよい。

ところで、鳥類のC-バンドの場合は、ほ乳類に比較しBa(OH)₂の処理時間を短くし(1～3分間)、さらに処理温度を低くする(40℃)とうまく染色されることが多い。

〔使用溶液〕

- 1) 0.2NのHCl
- 2) 5%のBa(OH)₂・8H₂O
- 3) 2 XSSC 溶液(0.3MのNaCl, 0.03Mのクエン酸ソーダの水溶液)
- 4) 5%のギムザ液(原液を蒸留水で希釈)

〔手順〕

- 1) 0.2NのHClを室温で1時間浸す。
- 2) 軽く水洗した後、蒸留水で洗う。
- 3) Ba(OH)₂の水溶液に40℃で1～3分間浸す(この処理時間の長さによってC-バンドの現われ方が異ってくる)。
- 4) 水道水、ついで蒸留水で軽く洗う。
- 5) 2 XSSCで60℃1時間処理する。
- 6) 軽く水道水で洗う。
- 7) ギムザ液で5分間染色する。

〔留意点〕

ニホンウズラの染色体をC-バンド法で染色すると、W染色体は全体が濃染される。また、ウズラ・ニワトリともZ染色体の長腕末端部が濃く染まる。

なお、ウズラの染色体をC-バンド法で詳しく検討した結果、このクロマチン部位の染色される大きさに個体差(異形性)があり、遺伝的標識に使用できる可能性がある。

5. 3. 4 R-バンド法

R-バンド法とは、G-分染法と逆の分染パターンを示す方法で、染色体標本をpH6.5のリン酸緩衝液(87℃)に5分～2時間加温してからギムザ、アクリジンオレンジ(AO)などで染色すると現われる。

この染色方法は、染色体の末端部が良く染るので、この部分に関与する染色体異常の分析に都合が良い。以前は、再現性が必ずしも良くなかったが、最近ではBrdU(5-Bromodeoxy Uridine)の

前処理に続く AO 又は Hoechst 33258 染色を用いることにより、良好な標本が得られるようになった。検鏡後ギムザ染色し、永久標本を作成することもできる。

また R-バンドは、ミスラマイシンやクロモマイシン A₃ などの抗生物質と蛍光色素の二重染色でも検出される。これらの抗生物質が DNA 塩基中の G (グアニン)・C (シトシン) 対に特異的に結合するためである。

以下に BrdU-AO 法を述べる。

〔使用溶液〕

- 1) AO 液：1/30M リン酸緩衝液 (pH7.0) で AO (アクリジンオレンジ) 0.5~2.0 mg/100ml として使用。
- 2) マキルベン緩衝液

〔手順〕

- 1) 培養したリンパ球に固定する 6~8 時間前に、BrdU (最終濃度 100~200 $\mu\text{g/ml}$) を加える。また、固定 1~1.5 時間前にコルセミド溶液 (通常の濃度、0.05%) を加える。
- 2) 固定後、自然乾燥又は引火乾燥法により、標本を作成する。
- 3) AO 液で 10~20 分間染色する。
- 4) 流水で十分に洗う。
- 5) マキルベン緩衝液で軽く洗い、そのままカバーガラスをかける。
- 6) 余分な液を吸い取り、必要ならばマニキュア用ラッカーで周囲を封じて検鏡する

〔留意点〕

マキルベン緩衝液は、細菌が繁殖しやすいので、1 粒の結晶チモールを加えて冷蔵しておくとし長期の使用に耐える。BrdU の取り込みにより、染色体の長さが変化するので注意する。また、ほ乳類の Y 染色体及び後期複製 X 染色体は、この染色法により、極めてよく識別される。BrdU 処理時間を変えると G-バンドが観察できる。

5. 3. 5 N-バンド法

染色体上の仁形成部 (Nucleolar organizing region) を特異的に染め分ける方法として N-バンド法があり、最近、硝酸銀水溶液による銀染色 (Ag-As) 法や Ag-I 法が再現性の高い方法として利用されている。

〔使用溶液〕

- 1) Ag 液：50% W/V AgNO₃ 液
- 2) As 液：1) を 5 ml の蒸留水に溶かし、さらに NH₄OH (pH12~13) を加える。
- 3) 現像液：酢酸ナトリウムで中和した 3% ホルマリンを加え pH 5~6 とする。

〔手順〕

- 1) Ag 液をスライド上に滴下し、カバーガラスをかける。

- 2) 50~60℃で15分間ほど加温する。
- 3) 水洗いして乾燥する。
- 4) As液を4滴、現像液を4滴(両液とも氷冷しておく)滴下し、カバーガラスをかける。
- 5) 顕微鏡で染色の状況をチェックしながら、仁形成部が茶褐色になったところで反応を止め、ギムザ液で染色し、水洗・乾燥する。
- 6) 常法のアルコールシリーズで脱水後、キシロールに移す。
- 7) 乾燥後、封入し、検鏡する。

5. 3. 6 T-バンド法

染色体の末端部(Terminal)を染めるのにT-バンド法がある。

〔使用溶液〕

- 1) 1/10Mリン酸緩衝液(pH7.0)。
- 2) AO液：1/30Mリン酸緩衝液(pH7.0)で1mg/100mlに希釈。

〔手順〕

- 1) 〔使用溶液〕の1)の3mlに蒸留水94mlを加え、87℃に加温し、使用直前にギムザ原液3mlを加え、100mlとする。この溶液中にスライドを5~30分間浸して、染色する。
- 2) 水洗後に検鏡する。又は、アルコールで脱色後にAO液で蛍光染色して検鏡する(AO蛍光染色の方がギムザ染色よりコントラストが強くなる)。

5. 3. 7 SCE(Sister Chromatid Exchange, 姉妹染色分体交換)法

SCE法は、姉妹染色分体を染め分ける方法である。これは、細胞の増殖期にBrdUを加えると、DNA複製の過程で前駆物質として取り込まれるので、各染色体を構成する染色分体のうちBrdUを取り込んだ側と取り込まなかった側を染め分けることを利用するものである。

このため、変異原の作用で染色分体が切れて相互に入れ替わって再結合しても、その部位を染め分けによって識別することができる。この現象を姉妹染色分体交換(Sister chromatid exchange, 略してSCE)といい、この頻度を指標として放射線、化学物質、ウイルス感染等の環境変異原の影響を明確にすることができる。近年、ほ乳類だけでなく鳥類の胚細胞にも用いられるようになってきている。

姉妹染色分体の染め分けの原理は、次のとおりである。BrdUの存在下で2回分裂すると、1本の染色体を構成する2本の染色分体のうち、1本はBrdUを含まないDNA鎖(親由来)が残り、残り3本の染色分体はBrdUを含むDNA鎖となる。そこで、このDNA鎖中のBrdU含量の差を利用して分染する。すなわち、両方の鎖ともBrdUを取り込んだ方がギムザ染色で淡く、片方の鎖だけの場合は、普通に濃く染まる。これは、細胞分裂を2回させることが大切であり、BrdU添加のタイミングが重要となる。

〔使用溶液〕

- 1) ヘキスト (Hoechst) 33258 : 蒸留水で 1 mg/ml 液とし、褐色瓶に入れ、冷暗で保存する。
- 2) マクレバン緩衝液 (pH 8.2)
- 3) 2 XSSC 溶液
- 4) BrdU 溶液 : 蒸留水で 1 mg/ml とし、メンブランフィルターで滅菌後、褐色瓶に入れ、冷暗所で保存する。

〔手順〕

- 1) 培地 25ml に BrdU 溶液 (1 mg/ml) を 50 μ l 加え、2 μ g/ml の培地を作成し、培養を開始する。
- 2) 34時間後、10 μ l/ml のコロミセド液 10 μ l/ml を 50 μ l 添加し、軽く振って、2 時間培養を続ける。
- 3) 染色体標本を作成し、ヘキスト 33258 (1 mg/ml 液を蒸留水で 20 倍に希釈) で 15 分間染色後水洗いする。
- 4) マクレバン緩衝液 (pH 8.2) にスライドを浸し、乾かぬうちにカバーガラスで覆い、余分な水分を除いたあと、マニキュア用ラッカーで封ずる。
- 5) 60℃ に加温したホットプレート (パラフィン伸展器でも可) 上に載せ、5 cm の距離からブラックライト 4 本で 5 ~ 10 分間照射する。
- 6) カバーガラスを除き、水洗後 2.5% ギムザ液で 10 ~ 20 分間染色し、水洗、検鏡を行う。

〔留意点〕

蛍光灯の紫外線は、SCE の要因となるので培養瓶に光が当たらないように、周りをアルミ箔で覆う。また、培養操作中は蛍光灯を消す。ギムザ染色より AO 蛍光染色の方が強いコントラストを与える。

5. 3. 8 FPG (Fluorescence Plus Giemsa) 法

BrdU (最終濃度 50 ~ 100 mg/ml) を加えた培養液中で一定期間インキュベートすると、各染色体上でその時間内で DNA の複製を行っていた区間のみがチミジンの代替として BrdU を取り込む。そこで、AO やヘキスト 33258 で染色すると、BrdU を含む部分は蛍光が著しく弱く、また含まない部分は強く発光する。

日光又は紫外線を当てた後、2 XSSC 中でインキュベートし、ギムザ液で染色する。この分染法は、BrdU 中での培養時間がバンドの形成に重要となる。例えば、R-バンドを分析する場合は、標本作成の 7 時間前に BrdU (300 μ g/ml) を添加するとよい。

以下に Perry と Wolff (1974 : New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature, 251, 156-158) の方法を述べる。

〔使用溶液〕

- 1) ヘキスト33258：脱イオン水で $0.5\ \mu\text{g/ml}$ とする。
- 2) 2 XSSCを希釈する。
- 3) 3%ギムザ液：リン酸緩衝液でpH6.8とする。

〔手順〕

- 1) ヘキスト33258液で12分間染色する。
- 2) 水洗後カバーガラスをかけ24時間放置する。
- 3) カバーガラスを外し、 60°C に加温した2 XSSCに2時間浸す。
- 4) 水洗後、3%ギムザ液で30分間染色する。

5. 3. 9 高精度分染法(High resolution banding technique)

最近の新しい手法として、高精度分染法(High resolution banding technique、略してHRB法)が開発されている。いままでのG-バンド法は、比較的短縮の進んだ分裂中期の分析であるが、この方法は、まだ短縮の進んでいない分裂前期の染色体をG-バンド法で分染するもので、はるかに多くのバンドを識別することができ、従来の方法では同定不可能な微細なバンドの比較が可能となった。

従来は、染色体の収縮度に応じて、細胞分裂前期、前中期などと分類していた。しかし、高精度分染法では、半数の染色体(例えば、ヒトの場合は22本の常染色体とX又はYの性染色体)に認められるバンドの数の合計で表わす(300バンド期とか600バンド期と表現される)。

高精度分染法には、アメソプテリン同調培養法、BrdU同調培養法、臭化エチジウム法などがある。

以下に臭化エチジウム法について述べる。

〔使用溶液〕

- 1) 臭化エチジウム(EB: Ethidium Bromide)
- 2) 4%ギムザ液

〔手順〕

- 1) PHAを添加してリンパ球を70時間培養し、 $10\ \mu\text{g/ml}$ の臭化エチジウムと $0.05\ \mu\text{g/ml}$ のコルセミド溶液を数滴添加する。
- 2) さらに、2時間培養した後、通常の方法で染色体標本を作る。
- 3) ギムザ液で5分間染色する(軽くトリプシン前処理した後に染色したほうがよい)。

〔留意点〕

臭化エチジウムによる高精度分染法は、同調培養を必要としないので簡単である。EB処理により G_2 からM期にかけての染色体の凝縮が抑制されるので、前期、前中期の細胞の割合が相対的に増加する。この期間では染色体自体が長いので互いに重なることが多く、いかにうまく染色

体を広げるかが極めて重要である。例えば、Yunnisの場合は、スライドを30度傾け、ピペットの高さを75~90cmにして、スライドの長軸に対して直角になるように水平を保ちながら、3滴滴下している。また、スライドを冷エタノールで予め冷やしておいたり、高温多湿の中でスライドを乾燥させることがいいという報告もある。

なお、EBは発ガン物質であり、取り扱いに注意が必要である。

5. 3. 10 二重染色法(Double staining technique)

最近、特に進展した技術として、DNAと結合する色素の塩基対と特異的に結合する性質を利用した二重染色法がある。

キナクリンマスタード、ヘキスト33258、DAPIなどの蛍光色素あるいは蛍光性はないがDNA塩基対の特異性のある色素や抗生物質(A・T対特異性をもつジスタマイシンA、メチルグリーン、ネトロプシン、クレジルバイオレット、またG・C特異性をもつアクチノマイシンD)を併用することにより、染色体上のバンドをより強く染色させることができる。

5. 3. 11 G-からC-バンドへの連続染色法(Serial G-and C-band staining technique)

C-バンド法による相同染色体の同定は、困難である。そこで、初めにG-バンドを染色し、その後にC-バンドで染色した方が確実に同定できる。すなわち、スライドをG-バンド法で処理し、良好な核板について写真を撮り記録しておく。その後、50%酢酸にスライドを数秒間浸し、水洗後にC-バンド法を施すことによって、相同染色体の同定と異質染色質を連続的に観察できる。

5. 4 性染色体の同定

一般的によく知られている家きん類は、その性染色体の形態がよく知られているので、常染色体と性染色体の区別ができる。しかし、例えば、動物園からの鳥類の性鑑別の依頼などで初めて核型分析を行う種では、どれが性染色体であるか迷うことがある。

現在、鳥類の核型は500~550種余りが知られているが、もし雌雄の判明していない場合は、以下のように行うとよい。

これまでの鳥類の染色体の研究より、Z性染色体は大型(2~6番目の大きさ)であり、またW性染色体はそれより小型(6~10番目の大きさ)であることが知られている。そこで、まず染色体がヘテロ型かホモ型かを検討する。性染色体がホモ(ZZ)の構成では、すべての染色体が対応してしまうが、ヘテロ(ZW)であれば早であろうと推察できる。次に、これを確認するためには前述のC-バンド法でのW染色体の同定を行うこととなる。ただし、種によっては、必ずしも染色体が大型と小型に明りょうに分けられないこと、またZとWの性染色体に形態の差がないもの(ダチョウ、レア、ヒクイドリ、エミュー)があったり、C-バンド法を用いてもW性染色体がヘテロクロマチンの形態を示さないもの(キーウィ)があったりするので注意が必要である。

おわりに

染色体の分染法は、染色体の構造異常の検出に有効な手法である。しかしながら、現段階では最も解像力の高いと思われる高精度分染法を用いても、小部位の欠失や転座、重複、逆位などは、検出不可能なことが多いと予想される。

したがって、染色体検査をしてその核型に異常が認められなかった場合でも、“核型は正常である”と表現するより、“核型に異常が検出されない”と表した方がよいとされている。

現在、染色体分析におけるコンピュータの利用が急激に進み、染色体の長さの計測、大きさ順の並び換え、各染色体ごとの形態的特徴、グラフィック表示などを短時間で処理できるようになってきている。

このように、家きん類の遺伝学的モニタリングの手法の一つとして、染色体の異形性の分析は有効であると考えられる。またこのような染色体の分析は、今後ますます重要になっていくと思われるが、そのためには新しい分染技術の開発及び得られた情報の遺伝学的解析が更に必要となってくる。

国立公害研究所特別研究成果報告

- 第1号 陸水域の富栄養化に関する総合研究—霞ヶ浦を対象域として—昭和51年度.(1977)
第2号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究—昭和51/52年度 研究報告.(1978)

(改称)

国立公害研究所研究報告

- ※第3号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae).(1978)
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属9種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第4号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究—昭和52年度 中間報告.(1978)
- 第5号 芳香族炭化水素-窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究—昭和51, 52年度 研究報告.(1978)
- 第6号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅱ)—霞ヶ浦を中心として—昭和53年度.(1979)
- ※第7号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae(Diptera).(1979)
(日本産ユスリカ科20種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- ※第8号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究—昭和52, 53年度 研究報告.(1979)
- 第9号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究—昭和53年度 中間報告.(1979)
- 第10号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究—昭和51~53年度 特別研究報告.(1979)
- ※第11号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity.(1980)
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第12号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation.(1980)
(コンピュータ制御装置を利用したフレイムおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第13号 Studies on chironomid midges of the Tama River.(1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
(多摩川に発生するユスリカの研究
—第1報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係
—第2報 その一支流に見出された Chironominae亜科の20種について)
- 第14号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究—昭和53, 54年度 特別研究報告.(1980)
- ※第15号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究—昭和54年度 特別研究報告.(1980)
- 第16号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測.(1980)
- ※第17号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果—臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究—昭和53, 54年度 特別研究報告.(1980)
- 第18号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material.(1980)
(環境標準試料「リョウブ」の調整, 分析および保証値)
- ※第19号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅲ)—霞ヶ浦(西浦)の湖流—昭和53, 54年度.(1981)
- ※第20号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅳ)—霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響—昭和53, 54年度.(1981)
- 第21号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅴ)—霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価—昭和53, 54年度.(1981)
- 第22号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅵ)—霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量—昭和53, 54年度.(1981)
- 第23号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅶ)—湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究—昭和53, 54年度.(1981)
- 第24号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅷ)—富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究—昭和53, 54年度.(1981)
- 第25号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅸ)—Microcystis (藍藻類)の増殖特性—昭和53, 54年度.(1981)

- 第26号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(X)――藻類培養試験法によるAGPの測定――昭和53, 54年度.(1981)
- 第27号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(XI)――研究総括――昭和53, 54年度.(1981)
- 第28号 複合大気汚染の植物影響に関する研究――昭和54, 55年度 特別研究報告.(1981)
- ※第29号 Studies on chironomid midges of the Tama River.(1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
――第3報 夏期の調査で見出されたエリユスリカ亜科Orthoclaadiinae 各種の記載と、その分布の下水汚染度との関係について
――第4報 南浅川の冬期の調査で見出された各種の分布と記載)
- ※第30号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究――昭和54, 55年度 特別研究報告.(1982)
- ※第31号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究――昭和55年度 特別研究報告.(1981)
- 第32号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究――環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究1)――昭和54年度 特別研究中間報告.(1982)
- 第33号 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究――大気運動と大気拡散過程のシミュレーション――昭和55年度 特別研究報告.(1982)
- ※第34号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究――昭和55年度 特別研究報告.(1982)
- 第35号 環境面よりみた地域交通体系の評価に関する総合解析研究.(1982)
- ※第36号 環境試料による汚染の長期モニタリング手法に関する研究――昭和55, 56年度 特別研究報告.(1982)
- ※第37号 環境施策のシステム分析支援技術の開発に関する研究.(1982)
- 第38号 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material.(1982)
(環境標準試料「池底質」の調整, 分析及び保証値)
- ※第39号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究――昭和56年度 特別研究報告.(1982)
- 第40号 大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究――昭和56年度 特別研究報告.(1983)
- ※第41号 土壌環境の計測と評価に関する統計学的研究.(1983)
- ※第42号 底泥の物性及び流送特性に関する実験的研究.(1983)
- ※第43号 Studies on chironomid midges of the Tama River.(1983)
Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June with description of 15 new species.
Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from the main stream in the June survey.
Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
――第5報 本流に発生するユスリカ類の分布に関する6月の調査成績とユスリカ亜科に属する15新種等の記録
――第6報 多摩本流より6月に採集されたエリユスリカ亜科の各種について
――第7報 多摩本流より3月に採集されたユスリカ科の各種について)
- 第44号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究――環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究2)――昭和54年度 特別研究中間報告.(1983)
- 第45号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究――昭和53～55年度 特別研究総合報告.(1983)
- ※第46号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究――昭和54, 55年度 特別研究報告 第1分冊.(1983)
- ※第47号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究――昭和54, 55年度 特別研究報告 第2分冊.(1983)
- ※第48号 水質観測点の適正配置に関するシステム解析.(1983)
- 第49号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究――昭和57年度 特別研究報告.(1984)
- ※第50号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(I)――霞ヶ浦の流入負荷量の算定と評価――昭和55～57年度 特別研究報告.(1984)

- ※第51号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(II)―霞ヶ浦の物質循環とそれを支配する因子―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第52号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(III)―霞ヶ浦高浜入における隔離水界を利用した富栄養化防止手法の研究―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- 第53号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(IV)―霞ヶ浦の魚類及び甲かく類現存量の季節変化と富栄養化―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第54号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(V)―霞ヶ浦の富栄養化現象のモデル化―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- 第55号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(VI)―富栄養化防止対策―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- 第56号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(VII)―湯ノ湖における富栄養化とその防止対策―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第57号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(VIII)―総括報告―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- 第58号 環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究―昭和55～57年度 特別研究総合報告。(1984)
- 第59号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―光化学スモッグチャンバーによるオゾン生成機構の研究―大気中における有機化合物の光酸化反応機構の研究―昭和55～57年度 特別研究報告(第1分冊)。(1984)
- 第60号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―光化学エアロゾル生成機構の研究―昭和55～57年度 特別研究報告(第2分冊)。(1984)
- 第61号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究1)―昭和55～57年度 特別研究報告(第3分冊)。(1984)
- 第62号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究―昭和56～58年度 特別研究中間報告。(1984)
- ※第63号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究―昭和56年度 特別研究報告。(1984)
- ※第64号 複合大気汚染の植物影響に関する研究―昭和54～56年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※第65号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants―Part 1。(1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響―第1分冊)
- ※第66号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants―Part 2。(1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響―第2分冊)
- ※第67号 環境中の有害物質による人の慢性影響に関する基礎的研究―昭和54～56年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※第68号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究―昭和56～57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第69号 中禅寺湖の富栄養化現象に関する基礎的研究。(1984)
- ※第70号 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park。(1984)
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park.
(日光国立公園の湖沼のユスリカに関する研究
―第1部 日光国立公園の湖のユスリカの生態学的研究
―第2部 日光国立公園の湖沼に生息するユスリカ類の分類学的、生態学的研究)
- ※第71号 リモートセンシングによる残雪及び雪田植生の分布解析。(1984)
- 第72号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究2)―昭和55～57年度 特別研究報告(第4分冊)。(1985)
- ※第73号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―昭和55～57年度 特別研究総合報告。(1985)
- ※第74号 都市域及びその周辺自然环境に係る環境指標の開発に関する研究。環境指標―その考え方と作成方法―昭和59年度 特別研究報告。(1984)
- 第75号 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa。(1985)
(琵琶湖底泥中の元素に関する陸水学及び環境化学的研究)
- 第76号 A study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere。(1985)
(大気中モノテルペンの挙動に関する研究)
- 第77号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究―昭和58年度 特別研究報告。(1985)
- 第78号 生活環境保全に果たす生活者の役割の解明。(1985)
- 第79号 Studies on the method for long term environmental monitoring―Research report in 1980-1982。(1985)
(環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究)
- ※第80号 海域における赤潮発生のモデル化に関する研究―昭和57/58年度 特別研究報告。(1985)

- ※第81号 環境影響評価制度の政策効果に関する研究—地方公共団体の制度運用を中心として。(1985)
- ※第82号 植物の大気環境浄化機能に関する研究—昭和57~58年度 特別研究報告。(1985)
- 第83号 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
(日本の湖沼のユスリカの研究)
- ※第84号 重金属環境汚染による健康影響評価手法の開発に関する研究—昭和57~59年度 特別研究総合報告。(1985)
- 第85号 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectroscopic and thermochemical parameters. (1985)
(フリーラジカルの反応速度と分光学的及び熱力学的パラメーターに関する研究)
- 第86号 GC/MS スペクトルの検索システムに関する研究。(1986)
- 第87号 光化学二次汚染物質の分析とその細胞毒性に関する研究—昭和53~58年度 総合報告。(1986)
- ※第88号 都市域及びその周辺の自然環境等に係る環境指標の開発に関する研究Ⅱ。環境指標—応用例とシステム—昭和59年度 特別研究報告。(1986)
- 第89号 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing. (1986)
(LANDSATリモートセンシングによる霞ヶ浦の水質計測)
- 第90号 ナショナルトラスト運動にみる自然保護にむけての住民意識と行動—知床国立公園内100平方メートル運動と天神崎市民地主運動への参加者の分析を中心として。(1986)
- 第91号 Economic analysis of man's utilization of environmental resources in aquatic environments and national park regions. (1986)
(人間による環境資源利用の経済分析—水環境と国立公園地域を対象にして)
- 第92号 アオコの増殖及び分解に関する研究。(1986)
- ※第93号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究(I)—昭和58~59年度 特別研究総合報告第1分冊。(1986)
- ※第94号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究(Ⅱ)—昭和58~59年度 特別研究総合報告第2分冊。(1986)
- ※第95号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(I)—汚濁負荷の発生と流出・流達—昭和58~59年度 特別研究報告。(1986)
- ※第96号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(Ⅱ)—水草帯・河口域・池沼の生態系構造と機能—昭和58~59年度 特別研究報告。(1986)
- ※第97号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(Ⅲ)—水路及び土壌による水質の浄化—昭和58~59年度 特別研究報告。(1986)
- 第98号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(Ⅳ)—自然浄化機能を活用した処理技術の開発と応用—昭和58~59年度 特別研究報告。(1986)
- 第99号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究—昭和56~59年度 特別研究総合報告。(1986)
- 第100号 バックグラウンド地域における環境汚染物質の長期モニタリング手法の研究—特定汚染選択的検出法及び高感度分析技術の開発—昭和58~60年度 特別研究報告。(1986)
- 第101号 複合ガス状大気汚染物質の生体影響に関する実験的研究—昭和57~60年度 特別研究報告。(1986)
- 第102号 地球規模大気質変動に関する予備的研究。(1986)
- 第103号 環境調和型技術としての電気自動車の評価に関する基礎的研究。(1987)
- 第104号 Studies on chironomid midges in lakes of the Akan National Park. (1987)
(北海道阿寒国立公園の湖におけるユスリカ相の研究)
- 第105号 畑地土壌における水分と諸元素の動態。(1987)
- ※第106号 筑波研究学園都市における景観評価と景観体験に関する研究。(1987)
- 第107号 遠隔計測による環境動態の評価手法の開発に関する研究—昭和59~60年度 特別研究報告。(1987)
- ※第108号 植物の大気環境浄化機能に関する研究—昭和57~60年度 特別研究総合報告。(1987)
- 第109号 地域環境評価のための環境情報システムに関する研究。(1987)
- 第110号 海域における赤潮発生モデル化に関する研究—昭和59~60年度 特別研究総合報告。(1987)
- 第111号 Application of X-ray photoelectron spectroscopy to the study of silicate minerals. (1987)
(ケイ酸塩鉱物研究へのX線光電子分光法の応用)
- 第112号 光化学汚染大気中における有機エアロゾルに関する研究—有機エアロゾルの生成と挙動に関する研究—昭和58~61年度 特別研究報告。(1988)
- 第113号 光化学汚染大気中における有機エアロゾルに関する研究—昭和58~61年度 特別研究総合報告。(1988)
- 第114号 水界生態系に及ぼす有害汚染物質の影響評価に関する研究—昭和60~61年度 特別研究

- 報告。(1988)
- 第115号 複合ガス状大気汚染物質の生体影響に関する実験的研究—昭和57～61年度 特別研究総合報告。(1988)
- 第116号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(V)—汚濁負荷の発生と流出・流達—昭和58～61年度 特別研究報告。(1988)
- 第117号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(VI)—湖沼の生態系構造と自然浄化—昭和60～61年度 特別研究報告。(1988)
- 第118号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(VII)—自然浄化機能を活用した水路・土壌による浄化と処理技術の開発—昭和60～61年度 特別研究報告。(1988)
- 第119号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(VIII)—自然浄化システムの評価方法—昭和60～61年度 特別研究報告。(1988)
- 第120号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(IX) 昭和58～61年度 特別総合研究報告。(1988)
- 第121号 Studies on the chironomid midges of lakes in Southren Hokkaido. (1988)
(北海道南部の湖におけるユスリカ相の研究)
- 第122号 擬似ランダム変調CWライダーの開発とフィールド観測への応用。(1989)
- 第123号 バックグラウンド地域における環境汚染物質の長期モニタリング手法の研究(II)—離島及び山岳地における大気汚染成分濃度とその変動—昭和58～62年度 特別研究報告。(1989)
- 第124号 環境科学研究用に開発したニホンウズラの遺伝学的及び微生物学的特性。(1989)

※ 残部なし

Report of Special Research Project of the National Institute for Environmental Studies:

- No. 1* Man activity and aquatic environment—with special references to Lake Kasumigaura—Progress report in 1976. (1977)
- No. 2* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants—Progress report in 1976-1977. (1978)

Research Report from the National Institute for Environmental Studies[‡]:

- ※No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus*(Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system—Progress report in 1977. (1978)
- No. 5* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on cultured cells—Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6* Man activity and aquatic environment—with special references to Lake Kasumigaura—Progress report in 1977-1978. (1979)
- ※No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae(Diptera). (1979)
- ※No. 8* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants—Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system—Progress report in 1978. (1979)
- No. 10* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants—Progress report in 1976-1978. (1979)
- ※No. 11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No. 12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing comouter-controlled instrumentation. (1980)
- No. 13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
- No. 14* Studies on the effects of organic wastes on the soil ecosystem—Progress report in 1978-1979. (1980)
- ※No. 15* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants—Research report in 1979. (1980)
- No. 16* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- ※No. 17* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes—Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region—Progress report in 1978-1979. (1980)
- No. 18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- ※No. 19* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Lake current of Kasumigaura(Nishiura)—1978-1979. (1981)
- ※No. 20* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Geomorphological and hydrometeorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment—1978-1979. (1981)
- No. 21* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura—1978-1979. (1981)
- No. 22* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura—1978-1979. (1981)
- No. 23* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Applicability of trophic state indices for lakes—1978-1979. (1981)
- No. 24* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources—1978-1979. (1981)
- No. 25* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Growth characteristics of Blue-Green Algae, *Mycrocystis*—1978-1979. (1981)

[‡] Starting with Report No. 3, the series title was changed.

- No. 26* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—
Determination of argal growth potential by algal assay procedure—1978-1979.
(1981)
- No. 27* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Summary of
researches—1978-1979. (1981)
- No. 28* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Progress report in
1979-1980. (1981)
- ※No. 29 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthocladiinae recorded at the summer survey
and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
- ※No. 30* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment — Progress
report in 1979-1980. (1982)
- ※No. 31* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air
pollutants—Research report in 1980. (1981)
- No. 32* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen
oxides system—Progress report in 1979—Research on the photochemical
secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere
(Part 1). (1982)
- No. 33* Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the
coastal region—Simulation of atmospheric motions and diffusion processes —
Progress report in 1980. (1982)
- ※No. 34* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental
pollution—Research report in 1980. (1982)
- No. 35* Comprehensive evaluation of environmental impacts of road and traffic. (1982)
- ※No. 36* Studies on the method for long term environmental monitoring—Progress report
in 1980-1981. (1982)
- ※No. 37* Study on supporting technology for systems analysis of environmental policy
—The Evaluation Laboratory of Man-Environment Systems. (1982)
- No. 38 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference
material. (1982)
- ※No. 39* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental
pollution—Research report in 1981. (1983)
- No. 40* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air
pollutants—Research report in 1981. (1983)
- ※No. 41* Statistical studies on methods of measurement and evaluation of chemical
condition of soil—with special reference to heavy metals—. (1983)
- ※No. 42* Experimental studies on the physical properties of mud and the characteristics
of mud transportation. (1983)
- ※No. 43 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main
stream in June, with description of 15 new species.
Part 6. Description of species of the subfamily Orthocladiinae recovered from
the main stream in the June survey.
Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
- No. 44* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides
system—Progress report in 1979—Research on the photochemical secondary
pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 2). (1983)
- No. 45* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem—Outlines of
special research project—1978-1980. (1983)
- ※No. 46* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem—Research report
in 1979-1980, Part 1. (1983)
- ※No. 47* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem—Research report
in 1979-1980, Part 2. (1983)
- No. 48* Study on optimal allocation of water quality monitoring points. (1983)
- No. 49* The development and evaluation of remote measurement method for environmental
pollution—Research report in 1982. (1984)
- ※No. 50* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Estimation
of input loading of Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- ※No. 51* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—The func-
tion of the ecosystem and significance of sediment in nutrient cycle in Lake
Kasumigaura—1980-1982. (1984)

- ※No. 52* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Enclosure experiments for restoration of highly eutrophic shallow Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- No. 53* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Seasonal changes of the biomass of fishes and crustacia in Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- ※No. 54* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Modeling the eutrophication of Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- No. 55* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Measures for eutrophication control—1980-1982. (1984)
- No. 56* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Eutrophication in Lake Yunoko—1980-1982. (1984)
- ※No. 57* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Summary of researches—1980-1982. (1984)
- No. 58* Studies on the method for long term environmental monitoring — Outlines of special research project in 1980-1982. (1984)
- No. 59* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system — Photochemical ozone formation studied by the evacuable smog chamber—Atmospheric photooxidation mechanisms of selected organic compounds — Research report in 1980-1982, Part 1. (1984)
- No. 60* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Formation mechanisms of photochemical aerosol—Research report in 1980-1982, Part 2. (1984)
- No. 61* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system — Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere(Part 1) — Research report in 1980-1982, Part 3. (1984)
- No. 62* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems — Progress report in 1980-1983. (1984)
- ※No. 63* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment — Progress report in 1981. (1984)
- ※No. 64* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Final report in 1979-1981. (1984)
- ※No. 65 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 1. (1984)
- ※No. 66 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 2. (1984)
- ※No. 67* Studies on unfavourable effects on human body regarding to several toxic materials in the environment, using epidemiological and analytical techniques—Project research report in 1979-1981. (1984)
- ※No. 68* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil—Research report in 1981-1983. (1984)
- ※No. 69 Fundamental studies on the eutrophication of Lake Chuzenji — Basic research report. (1984)
- ※No. 70 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park. (1984)
- ※No. 71* Analysis on distributions of remnant snowpack and snow patch vegetation by remote sensing. (1984)
- No. 72* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere — Research report in 1980-1982. Part 4. (1985)
- ※No. 73* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Final report in 1980-1982. (1985)
- ※No. 74* A comprehensive study on the development of indices system for urban and suburban environmental quality—Environmental indices—Basic notion and formation. (1984)
- No. 75 *Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa.* (1985)
- No. 76 A study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
- No. 77* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution—Research report in 1983. (1985)
- No. 78* Study on residents' role in conserving the living environment. (1985)

- No. 79 Studies on the method for long term environmental monitoring—Research report in 1980-1982. (1985)
- No. 80* Modeling of red tide blooms in the coastal sea—Research report in 1982-1983. (1985)
- ※No. 81* A studies on effects of implementing environmental impact assessment procedure —With particular reference to implementation by local governments. (1985)
- ※No. 82* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants—Research report in 1982-1983. (1985)
- No. 83 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
- ※No. 84* A comprehensive study on the development of assessment techniques for health effects due to environmental heavy metal exposure—Final report in 1982-1984. (1985)
- No. 85 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectroscopic and thermochemical parameters. (1985)
- No. 86* A novel retrieval system for identifications of unknown mass spectra. (1986)
- No. 87* Analysis of the photochemical secondary pollutants and their toxicity on cultured cells—Research report in 1978-1983. (1986)
- No. 88* A comprehensive study on the development of indices systems for urban and suburban environmental quality II —Environmental indices—Applications and systems. (1986)
- No. 89 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing. (1986)
- No. 90* National trust movement in Japanese nature conservation — Trustworthy or illusion?(1986)
- No. 91 Economic analysis of man's utilization of environmental resources in aquatic environments and national park regions. (1986)
- No. 92* Studies on the growth and decomposition of water-bloom of Microcystis. (1986)
- ※No. 93* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil(I)—Research report and papers(Part 1) in 1983-1984. (1986)
- ※No. 94* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil(II)—Research report and papers(Part 2) in 1983-1984. (1986)
- ※No. 95* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(I)—Drainage and flowing down of pollutant load— Research report in 1983-1984. (1986)
- ※No. 96* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(II)—Structure and function of the ecosystems of littoral zone — Research report in 1983-1984. (1986)
- ※No. 97* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(III)—Self-purification in stream and soil—Research report in 1983-1984. (1986)
- No. 98* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(IV)—Development and application of wastewater treatment technologies utilizing self-purification ability—Research report in 1983-1984. (1986)
- No. 99* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems—Final report in 1981-1984. (1986)
- No. 100* Studies on the methods for long-term monitoring of environmental pollutants in the background regions—Development of highly sensitive and selective analytical methods for measurement of pollutants in the background regions—Progress report in 1983-1985. (1986)
- No. 101* Experimental studies on the effects of gaseous air pollutants in combination on animals. (1986)
- No. 102* A review on studies of the global scale air quality perturbation. (1986)
- No. 103* Technological assessment of electric vehicle from the environmental protection viewpoint. (1987)
- No. 104 Studies on chironomid midges in lakes of the Akan National Park. (1987)
Part I. Distribution of chironomid larvae in Lake Akan, Lake Panke and Lake Kussyaro.
Part II. Chironomid midges collected on the shore of lakes in the Akan National Park, Hokkaido(Diptera, Chironomidae)
- No. 105* Formulation of the dynamic behavior of water and solutes leaching through the field soil. (1987)
- ※No. 106* Appraised landscape and thier environmental value in Tsukuba Science City. (1987)

- No.107* Studies on remote sensing for spatial and temporal analysis of environment - Research report in 1984-1985. (1987)
- No.108* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants-Final report in 1982-1985. (1987)
- No.109* Studies on environmental information system for regional environmental evaluation. (1987)
- No.110* Modeling of red tide blooms in the coastal sea - Final report in 1984-1985. (1987)
- No.111 Application of X-ray photoelectron spectroscopy to the study of silicate minerals. (1987)
- No.112* Study on the organic aerosols in the photochemically polluted air - Studies on formation and behavior of organic aerosols - Research report in 1983-1986. (1988)
- No.113* Study on the organic aerosols in the photochemically Polluted air - Final report in 1983-1986. (1988)
- No.114* Studies on the assessment of the hazard of chemical substances to aquatic ecosystems - progress report in 1985-1986. (1988)
- No.115* Experimental studies on the effects of gaseous air pollutants in combination on animals - Final report in 1982-1986. (1988)
- No.116* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(V)-Drainage and flowing down of pollutant load- Rersearch report in 1983-1986. (1988)
- No.117* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(VI)-Lake restoration and ecosystems- Research report in 1983-1986. (1988)
- No.118* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(VII)-Use of self-purification in soil and stream, and development of biological waste water treatment technology- Research report in 1985-1986 (1988)
- No.119* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(VIII)-Evaluation methods of self-purification water treatment system - Research report in 1985-1986. (1988)
- No.120* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(IX)-Final report in 1983-1986. (1988)
- No.121 Studies on the chronomid midges of lakes in Southren Hokkaido. (1988)
- No.122* Development of pseudo-random modulation CW lidar and its application to field measurements. (1989)
- No.123* Studies on the methods for long-term monitoring of environmental pollutants in the background regions (H) - Atmospheric pollutants on the remote island and mountains: concentrations and variations- Research report for FY 1983-1987. (1989)
- No.124 Studies on the genetic and microbiological characteristics of the Japanese quail exploited for the research of environmental science. (1989)

* in Japanese
 ※ out of stock

編集委員会委員

委員長	後藤典弘	委員	笹野泰弘
副委員長	相馬光之	〃	相崎守弘
〃	三浦卓	〃	小林隆弘
委員	海野英明	〃	太田庸起子
〃	宇都宮陽二郎	〃	古川昭雄
〃	田村正行	〃	大政謙次
〃	藤井敏博	事務局	古田早苗

【昭和63年10月27日編集委員会受付】

【昭和63年11月28日編集委員会受理】

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

No.124

国立公害研究所研究報告 第124号
(R-124-'89)

平成元年3月30日発行

発行 環境庁 国立公害研究所

〒305 茨城県つくば市小野川16番2

印刷 株式会社 イセブ

〒305 茨城県つくば市天久保2-11-20

Published by the National Institute for Environmental Studies
Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan
March 1989