

## 染色体操作による有用魚種の品質改善研究－VIII

性転換雄四倍体ニジマスの作出とその利用による全雌三倍体の作出について

桑田 知宣

### Studies on Genetic Improvement of Useful Fishes by Chromosome Manipulation -VIII

Induction of Sex Reversed Tetraploid Males of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* and Induction All Female Triploids by mating Sex Reversed Tetraploid Males and Diploid Females

Tomonori KUWADA

近年、染色体の倍数化技術を応用することによって全雌三倍体ニジマスの作出が可能となった<sup>1)</sup>。全雌三倍体ニジマスは不穏であり、成熟による成長の停滞、肉質の劣化が回避出来るため、実用化が図られ、現在養殖業者への普及が進められている。

多くの場合、三倍体は、温度処理または圧力処理による第二成熟分裂の阻止によって作出されているが、この方法には、倍数化処理に手間がかかる、倍数化に失敗した二倍体が混入する等の問題がある。二倍体の混入率は倍数化処理の条件を強くすることによって低く出来るが、処理条件が強いと発眼率が低下することから、三倍体の作出効率を考えるとある程度の二倍体の混入は止むを得ない。このため、現在実用化されている全雌三倍体ニジマスの種苗には数%の二倍体が混入している<sup>2, 3, 4)</sup>。

一方、ニジマスでは四倍体の作出も可能であり、四倍体には稔性があるので、二倍体との交配によって三倍体が作出出来る<sup>5, 6, 7)</sup>。そこで本試験では、性転換雄四倍体ニジマスを作出し、再生産特性について調査した。さらに四倍体と二倍体との交配による全雌三倍体ニジマスの作出及びその特性について検討した。

本研究は、地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業の一部として実施した。

### 材料及び方法

供試魚の作出経歴および調査の概略について第1図に示した。

#### 1. 性転換雄四倍体の作出

作出は1991年2月13日に行った。親魚には、当場飼育のニジマス性転換雄と経産（5年魚）のニジマス雌を1尾ずつ用いた。精液には精巢の懸濁液を用いた<sup>8, 9)</sup>。ニジマス性転換雄から摘出しハサミで細断した精巢を、pH 10に調整した人工精漿中<sup>8)</sup>で室温で2時間培養し、そ

の懸濁液を卵に媒精した。媒精後積算水温56~58°C・h（水温5.6°C）の受精卵に600~700kg/cm<sup>2</sup>の水圧処理を6分間加えて第一卵割の阻止<sup>10)</sup>を行い試験区とした。また、水圧未処理の卵を全雌二倍体区とした。

各区の発眼状況と正常魚の出現状況を調査した。発眼状況の調査では、眼杯の形成されている個体はすべて発眼卵として扱った。正常魚の出現状況の調査は、浮上時に行い、脊椎骨の湾曲を指標に正常魚を計数した。

性転換は雄性ホルモンを用い常法<sup>11)</sup>に従って行った。試験区の正常発生魚全てに浮上から60日間、17α-メチ

1991年2月

性転換雄

経産ニジマス雌1尾

第1卵割阻止

1993年12月調査  
雌100% (20/20)

発眼率、正常魚出現率調査

ホルモン処理による性転換

1994年2月

四倍体化率、成熟率等調査

10尾個別に精巣培養(pH10 5時間培養)

経産ニジマス3尾(混合)

温度処理 媒精15分後  
26°C、20分間浸漬

初期発生率、発眼率、正常魚出現率、  
三倍体化率調査

発眼率、正常魚出現率調査

体重、生殖腺重量調査

第1図 供試魚の作出経歴および調査の概略

ルテストステロンを0.5mg/kg・dietの割合で吸着させた飼料を給餌し性転換を行った。全雌二倍体区については、全雌の誘導を確認するため、性転換処理を行わずに飼育し、1993年12月に無作為に20尾を抽出し、開腹して性比を調査した。

## 2. 四倍体の確認と作出魚の再生産特性

1994年2月9日に試験区の魚が成熟したので、無作為に50尾抽出し、各個体について倍数性、体重、体長、生殖腺重量、性別、採精の可否を調査した。

倍数性は赤血球の大きさによって判定した<sup>8)</sup>。鰓の一部を切断し、全血をスライドグラスに塗沫、メチルアル

コールで固定後、ギムザ液で染色した標本を検鏡し、赤血球の大きさから倍数性を判定した。なお、赤血球が大小モザイク状の個体も見られたが、大型の赤血球が半数以上をしめた個体は四倍体と判定した。

採精の可否は腹部圧迫による精液の採取の可否を調査した。

## 3. 性転換雄四倍体と通常魚雌との交配およびその作出魚の特性

1994年2月9日に性転換雄四倍体と当場飼育ニジマスを交配し次世代の作出成績を調査した。

雄は性転換雄4倍体と判定された個体から無作為に10尾抽出して交配に用いた。卵は3尾の経産魚(4年魚)より採卵し混合して用いた。性転換雄四倍体の精液の採精量等は個体差が大きかったため、精液には、個体ごとに精巣を摘出し細断の後、pH10の人工精漿中に5時間培養した混濁液を用いた。交配は雄の個体別に行ない、それぞれ試験区1から10とした。媒精直前に活発に動く精子の割合を検鏡して調査し、充分量の精液を媒精に用いた。

全雌四倍体の作出を試みるために、性転換雄四倍体の精子を媒精した卵に媒精15分後(水温5°C)、温度処理(26°C, 20分)を行い温度処理区とした。温度処理区に用いた性転換雄四倍体の精液は試験区1、7、8と同じものを用い、それぞれ個体別に処理を行い、温度処理区1、7、8とした。また通常の雄より採精した精液を媒精した通常発生区を設けた。

媒精17時間後(積算水温85°C・h)に試験区と通常発生区の卵を無作為に38~55粒抽出してSERA液で固定し、肉眼で卵割の有無を確認し初期発生率を調査した。前調査と同様に各区の発眼状況、正常魚の出現状況を調査した。完全に卵黄吸収の終わった稚魚から無作為に20尾抽出し尾部切断により採血し、前調査と同様に標本を作成し三倍体化率を各区ごとに調査した。

試験区(試験区1~10の魚を混合し無作為に抽出した一部)と通常発生区を河川水で飼育し、1995年8月16日に各区より無作為に20尾抽出し、各個体の体重、生殖腺重量を測定した。

## 結 果

### 1. 性転換雄四倍体の作出

作出結果を第1表に示した。試験区では、浮上時で

第1表 作出結果

区	供試卵数	発眼率		正常魚出現率
		粒	%	
試験区	7979	8.5	6.6	
全雌二倍体区	4309	91.2	—	

発眼率、正常魚出現率は供試卵に対する割合

6.6%の正常魚が得られた。全雌二倍体区は全て雌であった。

## 2. 四倍体の確認と作出魚の再生産特性

四倍体と判定した個体の赤血球と二倍体と判定した個体のそれを第2、3図に示した。作出魚の四倍体化率は96% (48/50) と高率であった。

四倍体と判定された個体の再生産特性を第2表に示した。平均体重、平均体長はそれぞれ730 g、34.2cmであり当場で飼育している満3年魚としては小さかった。雄化率、成熟率はいずれも100%であった。採精可能個体率も85.4% (41/48) と高かった。

## 3. 性転換雄四倍体と通常魚雌との交配およびその作出魚の特性

三倍体と判定された作出魚の赤血球を第4図に示した。

第2表 性転換雄四倍体ニジマスの再生産成績

四倍体化率	96% (48/50)
雄化率	100% (48/48)
平均体重 (n=48)	730 ± 253 g
平均体長 (n=48)	34.2 ± 4 cm
成熟率	100% (48/48)
採精可能個体率	85.4% (41/48)
生殖腺重量 (n=10)	12.6 ± 6.8 g
G S I (n=10)	2.0 ± 0.7

交配結果を第3表に示した。試験区では全体的に初期発生率が低く、発眼率、正常魚出現率とも低率となった。作出率は各試験区ごとに異なり、作出率の高低と受精前の精液中の運動精子の割合との間には一定の傾向は認められなかった。試験区1、3、4、6、7、9のように初期発生から浮上まで大きな減耗がみられない例がある一方で、試験区2、5、10の結果のように初期発生から浮上までの間にさらに大きな減耗がみられる例もあった。作出魚の三倍体化率は、試験区5を除いて全て100%であった。

温度処理区は試験区よりさらに作出率が低かった。発眼から浮上にかけての減耗が大きいのは、発眼卵の大部分が半数体様の奇形胚であったためである。

作出魚の餌付け15か月における体重、生殖腺重量を第

第3表 性転換雄四倍体ニジマスと二倍体の交配結果

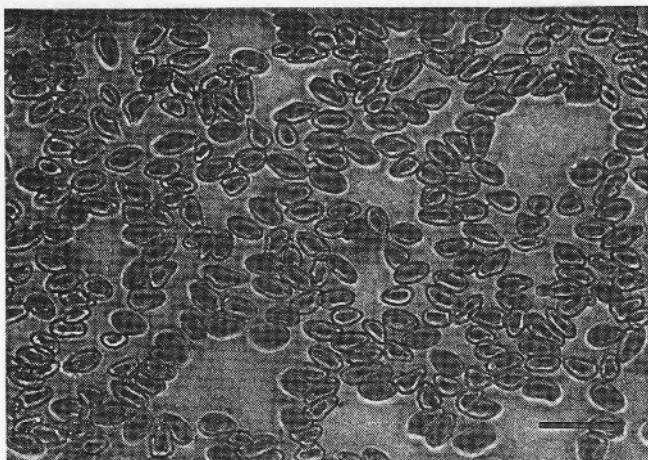
試験区	運動精子 の割合	供試卵数	初期発生率	発眼率		正常魚出現率	三倍体化率
				%	粒	%	%
1	60	533	38.2	38.8	35.1	100	
2	60	758	20.0	15.7	13.9	100	
3	60	651	31.1	29.0	26.6	100	
4	60	602	31.3	30.4	28.6	100	
5	20	521	29.8	22.3	17.7	95	
6	20	677	25.0	29.8	26.4	100	
7	30	714	32.7	34.5	31.9	100	
8	60	794	10.0	8.1	7.2	100	
9	60	465	41.8	41.1	38.3	100	
10	80	655	58.5	44.1	34.8	100	
I C	100	569	89.6	96.5	87.5	0	
1 H S	30	983	—	13.2	1.1	—	—
7 H S	10	857	—	6.4	1.5	—	—
8 H S	70	1345	—	10.0	0.4	—	—

初期発生率は、2細胞または4細胞になっている卵の供試卵に対する割合

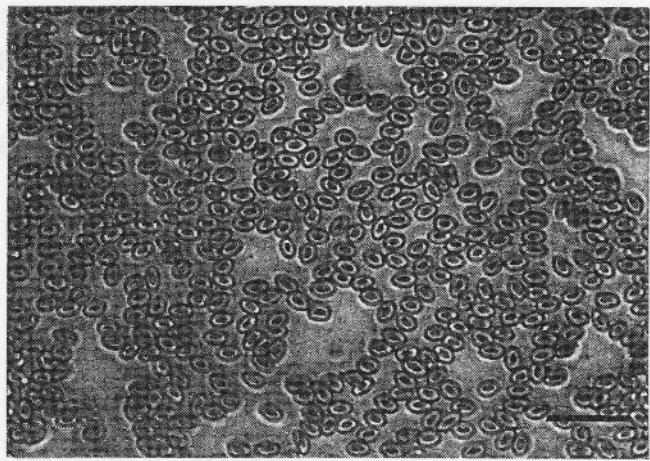
発眼率、正常魚出現率は、発眼卵と正常魚の供試卵に対する割合

三倍体化率は、三倍体魚の調査した魚に対する割合（各区20尾について調査）

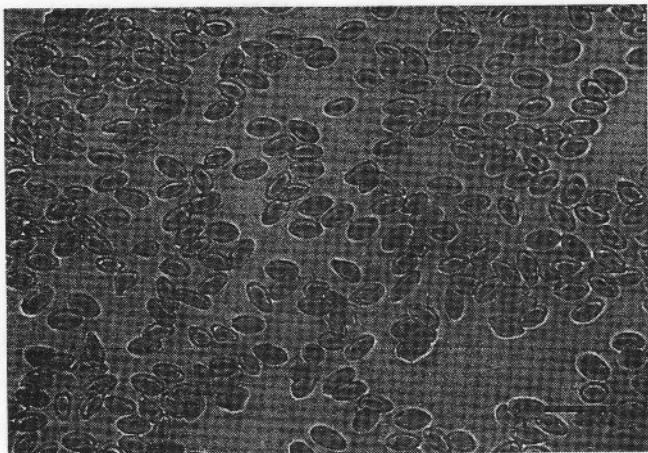
I Cは通常発生区、H Sは温度処理区、（媒精15分後に26°Cの温水に20分間浸漬）



第2図 四倍体と判定された個体の赤血球  
—は50 μm



第3図 二倍体と判定された個体の赤血球  
—は50 μm



第4図 三倍体と判定された個体の赤血球  
—は50 μm

4表に示した。試験区の個体は、生殖腺が糸状であり生殖腺重量が対照区のそれに比べて小さかった。

## 考 察

全雌二倍体区が全て雌であることより、親魚に用いた雄が性転換雄であったことが確認された。よって、試験区の魚は遺伝的には全て雌であると考えられ、試験区に出現した四倍体の雄は、性転換雄四倍体であると判断出来る。四倍体の雄と二倍体の雌を交配すると次世代は二倍体となるため、本試験で性転換雄四倍体と二倍体雌との交配で得られた魚は全雌三倍体であると考えられる。

本試験における性転換処理は、ニジマス二倍体雌を雄に性転換するための一般的な手法である<sup>1)</sup>。四倍体と判

第4表 性転換雄四倍体ニジマスと二倍体雌によって作出した全雌三倍体の餌付け15ヶ月後の体重と生殖腺重量

区	個体数	体 重	生殖腺重量	生殖腺			
				尾	g	g	重量比
試験区	20	165.9±67.8	0.05±0.03	0.03±0.01			
通常発生区	12	234±68.0	0.47±0.46	0.17±0.13			

値は平均値±標準偏差

生殖腺重量比=生殖腺重量÷体重×100

定された個体は全て雄であり、その全てが二次性徴を発現し、腹部圧迫によって高率で採精可能であったことより、四倍体に関しても二倍体と同様の方法で雌から雄への性転換が可能であることが示された。

ニジマスの四倍体雄と二倍体雌との交配による次世代の作出成績は低率であることが知られており<sup>5, 6, 7)</sup>、それは受精の段階から低いことが報告されている<sup>12)</sup>。性転換雄四倍体を雄親魚とした本試験の結果もこれらの報告と同様の結果となり、その利用に問題が残った。

塙本、伝田ら<sup>13)</sup>はニジマス四倍体雄の精子の大きさを調査し、四倍体の精子の体積は、楕円球で近似すると二倍体のその約2倍であり、四倍体の精子は、その大きさのため物理的に卵門を通過できることによって、かなりの頻度でその受精が阻害されると推論している。本試験において性転換雄四倍体と二倍体雌の作出成績が発生初期の段階から低かったのは、同様な理由によるものと考えられる。しかし、低率ではあっても四倍体雄と二倍体雌との交配で三倍体が得られることは、四倍体の精子の中に二倍体に受精可能な大きさ、形状のものがあ

ることを示している。本試験における全雌三倍体の正常魚出現率は、用いた性転換雄四倍体によってかなり異なっていた。用いた卵は同一であることより、それらの差は用いた性転換雄四倍体の精液の受精能の違いによるものと考えられる。作出には充分量の精液を用い、作出率と受精前の運動精子の割合とは無関係であることから、それらの差は二倍体の卵に受精可能な四倍体精子の割合の違いによって起こった可能性が考えられる。

ニジマス性転換雄四倍体と二倍体雌との交配によって得られた全雌三倍体の餌付け15か月後の生殖腺は、対照区のそれに比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に小さく、糸状であった。この傾向は、第二成熟分裂の阻止によって作られた全雌三倍体と同様である<sup>1)</sup>。今後、本試験で得られた全雌三倍体の不稔性について追跡調査をおこなう予定である。

田原らは、ニジマス四倍体雄と二倍体雌との交配によって得た次世代が、全て三倍体とならない場合もあると報告している<sup>5, 6, 7)</sup>。性転換雄四倍体を親魚とした本試験においても同様の例が1例観察された。しかし、全体的にみれば次世代の三倍体化率は、99.5%と高率であり、全雌三倍体の作出に性転換雄四倍体を利用するには有効であった。しかし、作出率が低いのは実用上問題がある。田原らはニジマス四倍体雌と二倍体雄を交配した場合の次世代の作出成績は、四倍体雄を用いた場合に比べて高いことを報告している<sup>7, 8)</sup>。したがって、全雌三倍体の作出には全雌四倍体の利用が好ましいのかもしれない。その場合問題となるのは、全雌四倍体の作出、継代と親魚としての適性であろう。本試験では、性転換雄四倍体の精子を二倍体の雌の卵に媒精し、温度処理を施すことによって第二成熟分裂の阻止を行い、全雌四倍体の継代を試みたが、その正常魚出現率は極めて低率であった。その原因是定かではないが、本試験で行った全雌四倍体の継代方法には作出率が非常に低いという問題が残った。しかし、四倍体雌と四倍体雄を交配すると比較的高率で四倍体が得られると報告されていることから<sup>12)</sup>、性転換雄四倍体と四倍体雌を交配すれば、全雌四倍体の作出については問題がないと思われる。

筆者はアマゴにおいて、水圧処理による第一卵割阻止によって全雌四倍体の作出を試み、0年魚の秋に赤血球の大きさによって四倍体と混在する二倍体を判別し、その後個体標識を行い飼育を行ったが、四倍体と判定された個体は、親魚となるまでに全てIHNで斃死し混在する二倍体に比べて生残が悪かった（未発表）。また、本試験に用いた性転換雄四倍体ニジマスは、1994年の春に

50尾以上生残していたが、その夏の異常渇水による高温とカラムナリス症の発症によって全滅し、当場飼育の同年令の通常ニジマスに比べて生残性が悪かった。このような事例を考えれば、今後はニジマス全雌四倍体の親魚としての適性を調査することが重要となろう。そして、親魚の養成上のリスクおよびコスト、作出作業にかかる手間、作出率、三倍体化率等を従来行われている第二成熟分裂阻止による方法と比較検討し、最も効率的な全雌三倍体作出手法を明らかにする必要があると思われる。

## 要 約

1. 性転換雄四倍体ニジマスを作出しその再生産特性を調査するとともに、それと二倍体雌を交配して全雌三倍体の作出を行った。
2. 二倍体ニジマスについて行われている雌から雄への性転換手法によって、四倍体の性転換も可能であり、性転換雄四倍体の成熟には大きな問題は認められなかった。
3. 性転換雄四倍体と二倍体雌との交配による次世代は高率で三倍体となったが、その作出率は全体的に低率で、その傾向は初期発生の段階すでに認められた。各親魚ごとの比較では、正常魚出現率で7.2～38.3%と親魚ごとにバラツキが認められたが、その値は、媒精した精液中の運動精子の割合とは無関係であった。
4. 性転換雄四倍体と二倍体雌によって作出された全雌三倍体の餌付け15か月後の生殖腺は、対照区のそれに比べて有意に小さく、糸状であった。

## 文 献

- 1) 岡田 鳳二, 1985 ; ニジマスの人の性統御に関する研究 北海道水産孵化場研報, 40, 1-49.
- 2) 田原 健成, 1989 ; ニジマス3倍体の作出条件 昭和62年度長野水試事報, 2.
- 3) 埼玉県試験場熊谷支場, 1989 ; マス類における3倍体魚の作出条件と全雌3倍体魚の養殖特性取りまとめ報告 平成元年度全国養鰐技術協議会資料, 246.
- 4) 青森県水産試験場, 1989 ; 不稔化技術の確立によるサケ・マス類の大型魚生産技術の開発研究 昭和63年度地域バイオテクノロジー研究開

発促進事業報告書.

- 5) 田原 健成・細江 昭, 1989; ニジマス4倍体を用いた3倍体の作出 昭和62年度長野水試事報, 5.
- 6) 田原 健成・細江 昭, 1990; ニジマス4倍体を用いた3倍体の作出-II 昭和63年度長野水試事報, 3.
- 7) 田原 健成・細江 昭・山本 聰 1990; ニジマス4倍体を用いた3倍体の作出-III 平成元年度長野水試事報, 3.
- 8) 高橋 一孝・猪田 利夫・森沢 正昭, 1987; ニジマス精子の簡便な保存方法 養殖 24 101-105.
- 9) 小林 徹, 1990; 性転換雄の精巣内精子に対する運動活性の向上について 昭和63年度滋賀県醒井養鱒場事報, 29-33.
- 10) 桑田 知宣・臼田 博・熊崎 隆夫・都竹 仁一, 1990; ニジマスの卵割阻止最適最適処理方法について 岐水試研報 37, 1-7.
- 11) 伝田 郁夫・本西 晃・築坂 正美, 1994; ニジマスの赤血球による四倍体判定について 平成6年度長野水試事報, 1.
- 12) 伝田 郁夫・小川 滋・塙木 洋一・井口 恵一郎 1994; ニジマスの人為4倍体と2倍体の交配により得られたF1の孵化成績 平成6年度日本水産学会春期大会講演要旨 329.
- 13) 塙木 洋一・伝田 郁夫・小川 滋・井口 恵一郎 1994; ニジマス人為四倍体精子・卵の形態 平成6年度日本水産学会春期大会講演要旨 330.