

## 三倍体アルビノニジマスを代理親とした晩熟系ニジマスの生殖細胞移植

小松史弥, 下村雄志, 原 徹, 山藤 匠, 後藤功一, 市田健介<sup>1</sup>

Germ cell transplantation of the late-maturing rainbow trout into a triploid albino rainbow trout as a surrogate broodstock

FUMIYA KOMATSU, YUSHI SHIMOMURA, TORU HARA, TAKUMI YAMATO, KOICHI GOTO AND KENSUKE ICHIDA

諸世界的なサーモン需要の高まりにより、いわゆる「ご当地サーモン」に対しても高い注目が集まっている(森ほか, 2017)。ご当地サーモンは、大型に成長し、成熟しないため肉質が下がらない(小林, 1992)全雌三倍体のニジマス *Oncorhynchus mykiss* を使用している例が多くみられる(渡邊・尾田, 2016)。しかし、全雌三倍体ニジマスはIHN(伝染性造血器壊死症)に弱いため、岐阜県内の養殖業者からは三倍体魚ではなく、成熟しにくく大型になる通常のニジマスの系統が求められている。こうした背景から、岐阜県では、通常3年で成熟するニジマスから出現した5年で初めて成熟する系統を晩熟系ニジマスと定義し、その選抜育種に取り組んでいる。この晩熟系ニジマスは成熟に伴う肉質の低下が起こりにくく、味の良い大型魚を生産しやすい。一方で、成熟までに時間がかかるため種卵生産サイクルが長期化するというデメリットがある。

魚類における生殖細胞移植は「ある魚に、違う種類の魚の卵や精子を生産させる」ことが可能であり(吉崎, 2006, 2010; 竹内, 2012)、代理親魚技術と命名されている。サケ科魚類の例としては、ヤマメ *Oncorhynchus masou masou* にニジマスを生ませる研究が知られている(Takeuchi et al., 2004; 吉崎, 2006, 2015)ほか、生殖細胞移植を行う際に三倍体の不妊宿主を利用することで、移植した生殖細胞由来の次世代の作出効率を飛躍的に上昇させることができる(Okutsu et al., 2007; 吉崎, 2010)。また、生殖細胞を提供する個体(ドナー)と移植される代理親(レシピエント)の体色が異なれば、生まれてきた子が移植した生殖細胞由来なのか、あるいは移植操作を施した宿主由来なのかを、目視で容易に確認することができる。

そこで、本研究は不妊の三倍体アルビノニジマス仔魚に晩熟系ニジマスの生殖細胞を移植して、晩熟系ニジマスの生産サイクルを短期化することを目的とした。

キーワード: 晩熟系ニジマス、生殖細胞移植、代理親魚技術、三倍体アルビノニジマス、ドナー、レシピエント

### 材料と方法

#### 供試魚

1. 移植する生殖細胞を提供する晩熟系ニジマス(ドナー)  
細胞移植の手順を図に示した。移植する生殖細胞を提供する晩熟系ニジマス(以下ドナーとする)の生殖細胞の着生には、未発達の状態にある精原・卵原細胞が必要であり、移植に適する生殖腺を持つドナーを選別する必要がある。Yoshizaki et al. (2010) において、9カ月齢のドナーから抽出

した卵原細胞が利用可能であったことから、4月に孵化した晩熟系ニジマス(以下ドナーとする)を9カ月目となる翌年1月まで飼育してドナーとした。

2. 代理親として生殖細胞を移植される三倍体アルビノニジマス(レシピエント)

2020年、2021年および2022年は、東京海洋大学大泉ステーションにおいて作出した三倍体アルビノニジマス(以下レシピエントとする)として使用した。ニジマスにおけるアルビノ形質は顕性遺伝を示し、アルビノ個体

<sup>1</sup> 東京海洋大学

の発眼卵の目の色は赤色になることから、次世代魚の発眼卵が得られた際に目の色を確認することで、ドナーとレシピエントのどちらに由来するか鑑別した。

### レシピエントの供試数

2020 年は東京海洋大学大泉ステーションにおいて移植作業を行い、晩熟系ニジマスの精原細胞を移植した 250 尾および卵原細胞を移植した 250 尾のレシピエントを、大泉ステーションから下呂支所に輸送し飼育した。2021 年および 2022 年は大泉ステーションで作出した三倍体アルビノニジマスの発眼卵を下呂支所に輸送し、孵化した仔魚をレシピエントとした。輸送した発眼卵は、2021 年が約 1,300 粒、2022 年が約 2,400 粒であった。いずれの年の発眼卵も、3℃前後の低温で管理し、発眼から 10 日間から 15 日間でふ化するように調整した。

### 細胞移植の方法

#### 1. 生殖細胞の調製

PBS(+pH8.2、トリプシン、FBS および DNase で調製した分散溶液で生殖細胞を分散させた後、精原細胞は tantore ナイロンメッシュ 40 μm フィルターを、卵原細胞は pluriStrainer 20 μm フィルターを用いて細胞塊等を除去した。濾過後にそれぞれを 5%FBS 添加 MEM Hanks 液体培地に懸濁し、ドナーの生殖細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液作製に使用したドナーの個体数を第 1 表に示した。生殖細胞懸濁液の有効移植期間は 2 日間であるため、原則として生殖細胞懸濁液はふ化に合わせ 1 日おきに作成した。

#### 2. 生殖細胞の移植

生殖細胞移植には、マニピュレーター (NARISHIGE NP-1R) とマイクロインジェクター (NARISHIGE IM-9B) およびガラス製のキャピラリー管 (株式会社成茂科学器械研究所、G-1) を加工して作製した針を用いた。作製した生殖細胞懸濁液を孵化後 2 日以内の仔魚の腹腔に移植した。生殖細胞の計数にはデイスボ血球計算盤 (DHC-N01) を使い、移植する生殖細胞数はレシピエント 1 尾あたり 1.5~3.9 万個とした。

#### 3. レシピエントの成熟と受精 (次世代魚の作出)

2020 年および 2021 年に移植したレシピエントについては、排卵・排精が確認された場合は採卵および採精を行い、次世代の作出を試みた。また 2021 年および 2022 年に移植したレ

シピエントについては、2023 年 12 月に解剖を行い、成熟状況を確認した。

本研究では排卵・排精がみられない個体であっても、開腹して成熟期の卵または全体が乳白色をした精巣が確認された場合も成熟個体とした。なお、2023 年 12 月の解剖時に排卵・排精が確認されても、それらの卵・精子を用いた受精は行わなかった。

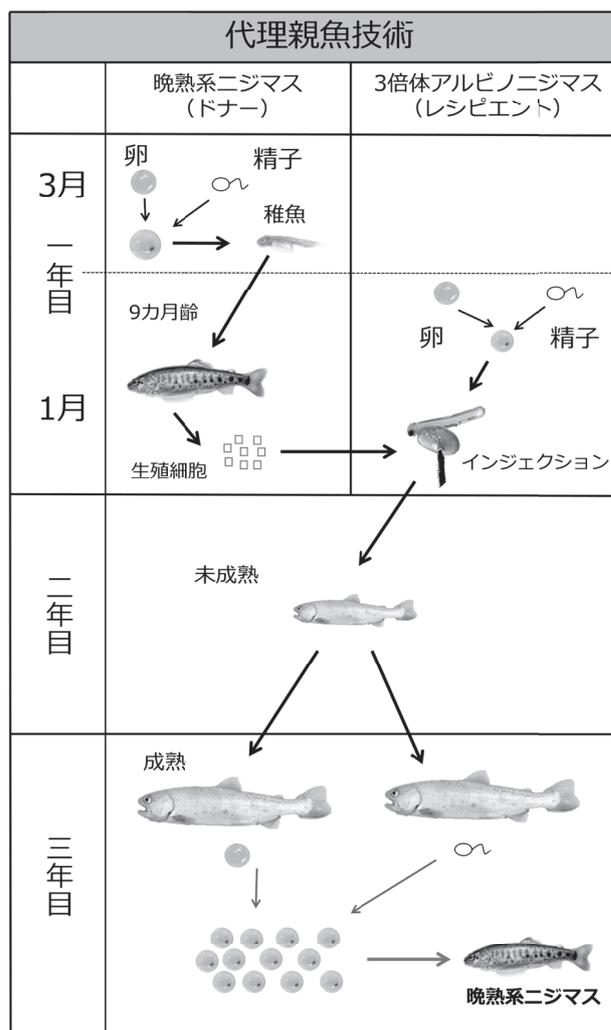


図 代理親魚技術を使用して晩熟系ニジマスを作成するまでの手順

第1表 細胞懸濁液作成に使用したドナーの個体数

年月日	2021						
	1月20日	1月22日	1月24日	1月26日	1月28日	1月31日	
雄	6	6	6	14	13	11	
雌	4	4	4	6	7	10	
年月日	2022						
	1月24日	1月25日	1月27日	1月30日	1月31日	2月2日	2月4日
雄	11	12	12	12	12	12	12
雌	9	8	8	8	8	8	8

## 結 果

### 生殖細胞移植

2021年は精原細胞を移植したレシピエントは600尾、卵原細胞を移植したレシピエントは567尾であった。2022年度は精原細胞を移植したレシピエントは672尾、卵原細胞を移植したレシピエントは685尾であった。

### レシピエントの生存率

2023年12月4日において、2021年に精原細胞を移植したレシピエントは60尾、卵原細胞を移植したレシピエントは38尾が生存しており、2022年に精原細胞を移植したレシピエントは50尾、卵原細胞を移植したレシピエントは177尾が生存していた(第2表)。

### レシピエントの成熟状況

2022年12月において、2020年に精原細胞を移植したレシピエント雌3尾で排卵が、精原細胞を移植したレシピエント雄23尾で排精が確認されたことから、精原細胞を移植したレシピエント雌3尾から9,099粒の卵を、精原細胞を移植したレシピエント雄23尾から精子を搾出し、それらを受精させたところ、目の色が黒い271粒の発眼卵が得られた。なお、卵原細胞を移植したレシピエントについては排卵・排精する個体がいなかったため、受精を行うことはできなかった。

2023年12月において、2021年に精原細胞を移植したレシピエント雌2尾で排卵が、卵原細胞を移植したレシピエント雄

1尾で排精が確認されたことから、精原細胞を移植したレシピエント雌2尾から卵約2,500粒を、卵原細胞を移植したレシピエント雄1尾から精子を搾出し、それらを受精させたが発眼することなく全滅した。なお、精原細胞を移植したレシピエント雄で排精した個体と卵原細胞を移植したレシピエント雌で排卵した個体はいなかった。

2021年に移植を行ったレシピエントについては精原細胞を移植したレシピエントのうち雄29尾が成熟していたが、そのうち採精可能な雄は16尾であった。また、雌は10尾が成熟していた。卵原細胞を移植したレシピエントは雄14尾が成熟していたが、そのうち採精可能な雄は2尾であった。また雌4尾が成熟していた。

2022年に移植を行ったレシピエントについては精原細胞を移植したレシピエントのうち雄15尾が成熟していて、採精可能な雄は10尾であった。また雌11尾が成熟していた。卵原細胞を移植したレシピエントのうち雄28尾が成熟していて、全ての雄が採精可能であった。また雌4尾が成熟していた(第3表)。成熟率は2021年に精原細胞を移植した個体群は65%、卵原細胞を移植した個体群は47%、2022年に精原細胞を移植した個体群は52%、2022年に卵原細胞を移植した個体群は18%であった。開腹して成熟期の卵または全体が乳白色をした精巣が確認できても、排卵・排精を行わない個体が複数確認された。

第2表 移植した細胞ごとのレシピエントの生存数と生存率

年	精原細胞移植	生存数	生存率	卵原細胞移植	生存数	生存率
	個体数(尾)	(尾)	(%)	個体数(尾)	(尾)	(%)
2021	600	60	10.0	567	38	6.7
2022	672	50	7.4	685	177	25.8

第3表 生殖細胞移植年別のレシピエント成熟状況

年	精原細胞				卵原細胞			
	雄		雌		雄		雌	
	未成熟	成熟	未成熟	成熟	未成熟	成熟	未成熟	成熟
2021	18	29	3	10	15	14	5	4
2022	14	15	10	11	65	28	80	4

## 考 察

本研究においてレシピエントが成熟することが確認された。また、レシピエントから得られた卵および精子で受精することにより目の色からドナー由来の発眼卵が得られることが確認できた。さらに、開腹した結果、成熟期の卵または全体が乳白色をした精巣が確認された個体が複数存在していたことから、飼育を継続していればやがて排卵・排精に至り、採卵・採精が可能な個体が増加したことが予想される。一方で成熟していても排卵・排精に問題が発生していたため、採卵・採精ができなかった可能性も考えられるが、本研究では明らかにすることはできなかった。

東京海洋大学大泉ステーションは水温が安定した湧水を利用して飼育している。一方で、下呂支所は水温の変動が大きい河川水を飼育水として利用している。本研究において2022年に得られた卵9,099粒のうち発眼卵は271粒で、発眼率は3.0%であり、2023年に得られた卵の発眼率は0%であった。発眼率が低くなった原因として、レシピエントが東京海洋大学大泉と下呂支所の飼育環境の違いに適応できておらず、卵や精子の成熟に問題が発生したことが考えられたが、本研究では明らかにすることはできなかった。また、レシピエントの生存率は低く、最も高くても2022年に卵原細胞を移植した群の25.8%であった。なお、2022年の精原細胞を移植したレシピエントについては、事故のため200尾程度死亡したため、特に生存率が低くなった。

晩熟系ニジマスは成熟するまで5年以上かかるため、成熟に伴う肉質の変化が起こりにくいというメリットがある反面、再生産に時間がかかるというデメリットを伴うが、本研究から生殖細胞の移植技術により、晩熟系ニジマスの生産サイクルの短期化の可能性が示された。その一方で産業化を目指すうえで発眼率の低さやレシピエントの生存率の低さが課題として残った。

## 要 約

1. 三倍体アルビノニジマスを代理親として晩熟系ニジマスの生殖細胞の移植を行い、生産サイクルの短期化について

検討した。

2. 晩熟系ニジマスの精巣から精原細胞、卵巣から卵原細胞の細胞懸濁液を作成し、マニピュレーターとマイクロインジェクターを使用して三倍体アルビノニジマスの孵化仔魚に移植した。
3. 生殖細胞を移植した三倍体アルビノニジマスの生存率は低かったが、生存した個体の約半数は成熟した。
4. 生殖細胞を移植した三倍体アルビノニジマスの成熟個体から採卵・採精して受精したところ、受精卵の生存率は低かったが、晩熟系ニジマス由来の孵化仔魚を得ることができ、生殖細胞移植による晩熟系ニジマスの生産サイクル短期化の可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究は東京海洋大学の吉崎悟朗教授および東京海洋大学大泉ステーション在籍の水谷波南香氏、天野雄一氏をはじめとする学生の皆様の協力を得て実施した。ここに記して各位に感謝する。

## 文 献

- 小林 徹. 1992. 長期混合飼育下での人為三倍体ニジマスの成長, 生残および生殖周期. 水産増殖, 40: 57-70.
- 森 優輝・竹ノ内徳人・原田幸子・三浦智恵美・三浦 猛・太田史・浦崎慎太郎・岡田孝洋. 2017. 愛媛県における「ご当地サーモン創出」と地域水産業の活性化. 地域漁業研究, 57(2): 27-39.
- Okutsu, T., S. Shikina, M. Kanno, Y. Takeuchi and G. Yoshizaki. 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. Science, 317: 1517.
- 竹内 裕. 2012. 精原細胞の異種間移植法を用いた水産有用海産魚類における代理親魚技術の確立. 日本水産学会誌, 78: 673-676.
- Takeuchi, Y., G. Yoshizaki and T. Takeuchi. 2004. Surrogate broodstock produces salmonids. Nature, 430: 629-630.

渡邊長生・尾田紀夫. 2016. ヤシオマスの高品質化に関する研究. 栃木県水産試験場研究報告, 59: 5-11.

吉崎悟朗. 2006. サケ・マス類における生殖細胞移植技術を用いた発生工学の現状. 日本水産学会誌, 72: 954-955.

吉崎悟朗. 2010. 魚類生殖細胞の特性とそれを利用した代理親魚技法. 科学と生物, 48: 680-687.

吉崎悟朗. 2015. 代理親魚技術の構築とその応用に関する研究. 日本水産学会, 81: 383-388.

Yoshizaki, G., M. Ichikawa, M. Hayashi, Y. Iwasaki, M. Miwa and S. Shikina. 2010. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*, 137: 1227-1230.