

# アマゴの全雌生産に関する研究—I 希釈精子の遺伝的不活性化条件の検討

山本章造

Studies concerning Production of Gynogenetic Seedlings in Amago  
*Salmo (Oncorhynchus) masou macrostomus* - I Conditions of Ultraviolet  
Ray Doses to Inactivate Diluted Sperm Genetically

Syozo YAMAMOTO

アマゴ *Salmo (Oncorhynchus) masou macrostomus* は雌雄で性成熟が異なる。雄の一部は一年で成熟し、二次性徴が顕著に現われ商品価値が低下し、病気に対しても弱くなる。一方、雌は成熟に2年を要し、二次性徴が弱くて出荷時期が制約されない。それらのために、アマゴの養殖においては雌の生産が有利である。更に、全雌の種苗が生産されると、出荷時の選別の手間が解消され、雌親魚の確保が容易になるなど、養殖経営の効率が高まる。

近年、サケ科魚類において、紫外線を用いた染色体操作によって、人為雌性発生の技術が開発<sup>1)</sup>され、ニジマス *Salmo (Salmo) mykiss* の全雌生産に一部実用化されている。

そこで、近縁種であるアマゴを用いて、紫外線の照射強度や照射量など、精子の遺伝的不活性化条件について検討し、雌性発生魚の作出を試みた。その結果を報告する。

報告に先だち、採卵等に御協力いただいた富村種苗センター 城守敏郎氏に深謝する。

## 試験1 希釈精子の活力と保存条件

精子の遺伝子であるDNAを不活性化する際、精子に紫外線を均一に照射するために、人工精漿によって希釈する必要がある。ところが、希釈精子の活力は保存中に劣化することが懸念されるので、まず、希釈精子の活力と保存条件との関係について検討した。

## 材料と方法

供試材料は、当水試魚病指導センターで養成した2年魚雄の精子を用いた。採精直後に、ニジマスの人工精

漿<sup>3)</sup>で100倍に希釈した後、空気との接触を防ぐために、1 mlのシリンジに注入し、5, 10, 15及び25°Cの恒温器に保存した。

その後、経時的に10°Cの等調液と混合して精子の活力を観察した。対照としては、10°Cに保存した原液の精子を用いた。

精子の活力は、1. 活動性：動いている精子の割合 (-: 0, +: 1~19, ++: 20~79, +++: 80~100%), 2. 運動性：運動方向(前進, 回転, 制止), 3. 運動時間：接水後運動性が消失するまでの時間、で表現した。

## 結果と考察

保存精子と等調液を経時的に混合し、その時の精子活力の変化を図1に示した。採精48時間後まで、原液の精子は高い活動性を保持したが、希釈精子の活動性は経時的に低下した。また、希釈精子の活動性は保存温度によって異なり、10°Cに保存すると2時間後まで原液に比べ劣らず、それ以後、徐々に低下した。25°Cに保存すると、1時間後にはすでに80%以上が活動性を示さず、劣化した。5及び15°Cに保存すると、その中間の値を示した。

一般に、正常な精子は前進運動をするが、異常になると前進運動が回転運動に変わり、まもなく運動性を消失する。原液の精子は、24時間保存後も正常の前進運動のみをしたが、希釈精子の前進運動は2時間までで、5時間後には回転運動が現われ、24時間後には回転運動の率が高くなった。回転運動をする精子が増加すると、受精能力に影響すると考えられた。

原液精子の運動時間は、採精直後80~90秒であり、その後24時間まで60秒前後を保った。一方、希釈精子の運動時間は原液に比べるといづれも短く、10°Cに保存した

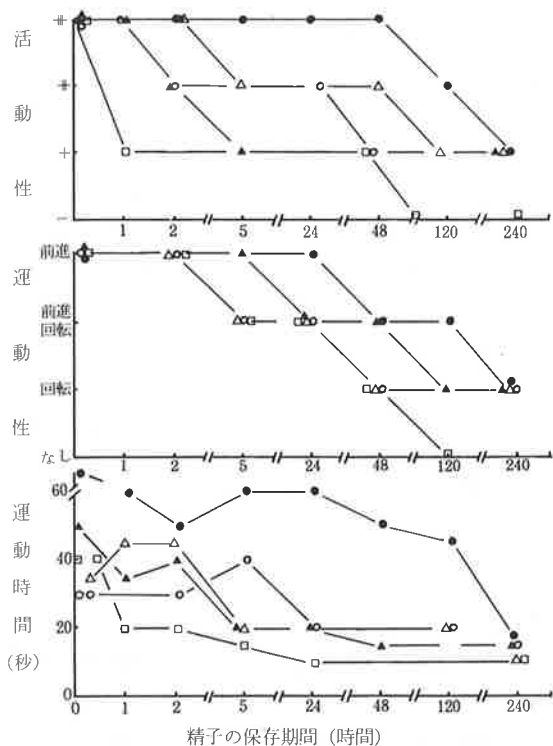


図1 精子の保存と活力の関係

● : 原液, ○ : 希釈5%, △ : 希釈10%,  
▲ : 希釈15%, □ : 希釈25%

希釈精子のみ2時間後まで40秒以上を維持し、最も長かった。

以上の結果、希釈精子は10℃に保存すると最も長く活力を保持し、希釈後2時間までは原液と比べあまり劣らず、受精能力を保った。

しかし、希釈精子の活力は2時間以後原液に比べすみやかに劣化した。精子媒液のpHが生残率に影響<sup>4)</sup>し、精子の運動性は媒液中のカリウムやカルシウムイオンの濃度によって変化する<sup>5)</sup>ことが知られている。希釈に用いた人工精漿は精子の活力を劣化させたので、その組成などについて、更に検討する必要がある。

## 試験2 紫外線照射条件の検討

精子への紫外線照射装置は小野里<sup>1)</sup>を参考にして作製したが、恒温器や殺菌ランプを改良した。したがって、この装置での紫外線の強度を明らかにしておく必要がある。また、紫外線の強度は温度によって変化するので、温度との関係についても検討を加えた。

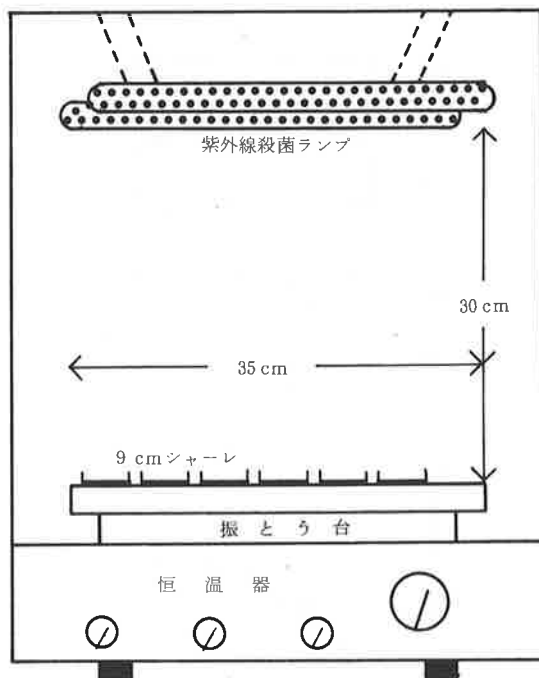


図2 紫外線照射装置

## 材料と方法

希釈精子を不活性化するための紫外線照射装置を図2に示した。低温送風式の恒温器(ヤマト社製、IL82型)内の上部に、15W紫外線殺菌ランプ(日立製)2本をとりつけ、30 cm下方に振とう器(サーモックス社製、XY-11型)を設置した。この状態で、振とう器上の紫外線強度の分布と温度による変化を調べた。紫外線の強度は、紫外線強度計(東京光学機械社製、UVR-254)で測定した。

## 結果と考察

殺菌ランプを点灯してから30分後に、振とう器上の紫外線強度の分布を調べ、図3に示した。強度は290~540  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の範囲で、照射位置によって差があった。したがって、以後の試験では、390  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 以上の位置に希釈精液を設置して、紫外線を照射した。

次に、恒温器内の温度と紫外線強度との関係を調べて図4に示した。強度は照射時の温度によって影響を受け、0~15℃の範囲では、温度の上昇とともに強くなり、20℃以上ではほぼ安定した。したがって、精子の不活性化に際しては器内温を一定に保つ必要があり、以後の

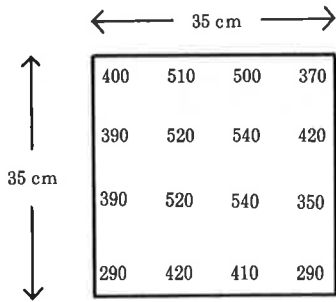


図3 紫外線の照射位置と強度  $\mu W/cm^2$

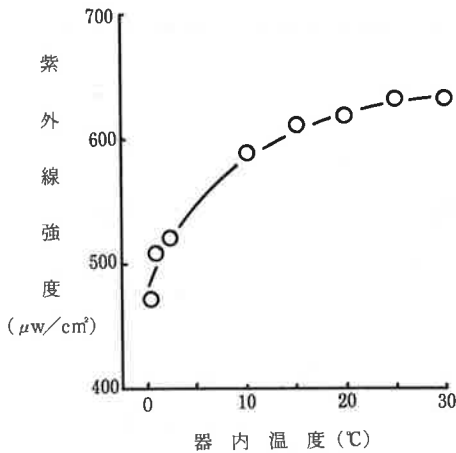


図4 紫外線強度と温度との関係

試験では恒温器を10°Cにして照射した。

**試験3 精子遺伝子の不活性化のための紫外線照射量の検討**

雌性発生の誘起には、精子の受精能力を保ちながら遺伝子を完全に破壊する必要がある。そのための紫外線の適正な照射量を卵発生との関係から検討した。

**材料と方法**

供試親魚は当水試魚病指導センターで育成した2年魚雌2尾と富村の養鱒場で養成した1年魚雄5尾を用いた。雌の体重は237及び366gで、採卵重量は合計148g、約1,500粒であった。雄は平均体重64.8gで、1年魚のため1尾当たりの放精量は少なかった。

精子は前述の人工精漿で100倍に希釈して使用した。

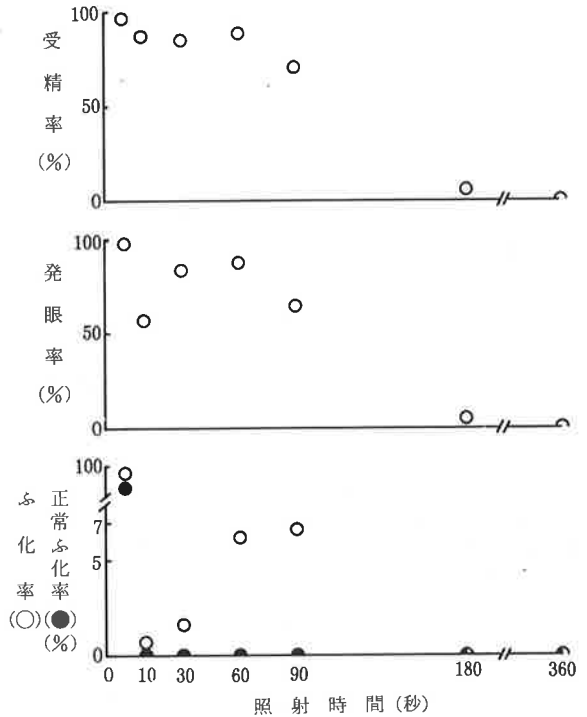


図5 紫外線照射時間と卵発生率との関係

直径9cmのガラス製シャーレの内縁をパラフィンで5mm幅にふちどり、疎水化した。このシャーレに0.5mlの希釈精液を入れ、底面全体に広げて0.1mmの厚さにし、振とうしながら紫外線を照射した。

照射時間は、10、30、60、90、180及び360秒の6段階にし、対照としては非照射希釈精液を用いた。

採卵は切開法で行い、採卵重量を測定後7等分した。この等分した卵と照射量の異なる精液とを混合して媒精した後、ふ化槽に収容して卵発生を観察した。媒精及び収容時の水温は10.0°Cであった。

結果は、供試卵数に対する受精率、発眼率及びふ化率で検討した。

**結果と考察**

結果を図5に示した。対照区の受精率、発眼率はともに98%、正常ふ化率も95%以上で試験に使用した精子及び卵に問題はなかった。

紫外線照射での受精率は、照射時間60秒までは90%前後であったが、90秒では66.4%、180秒では3.8%と低率になった。照射精子を観察すると、照射時間が長くなるにつれて精子の活力が低下し、180秒以上の照射量では、

ほとんどの精子が回転運動をし、運動時間も10秒前後に短くなった。小野里<sup>1)</sup>はニジマスで135秒までは受精率に影響しないとしており、若干差があった。受精率の低下は、魚種の相違もあるが、希釈に使用した精漿が異なること、照射時の低温送風の差などが、精子の受精能力に影響したと考えられた。

発眼率は、照射時間が30及び60秒では80%以上であったが、10秒では60%前後でやや低率であった。紫外線の照射量が10秒間では精子核の遺伝子が十分に破壊されないことに起因する Hertwig 効果<sup>6)</sup>によると考えられた。

ふ化率は照射時間が10秒では0.5%と低率であったが、その後90秒まで徐々に高くなり、60秒、6.8%、90秒、7.0%であった。いずれの照射時間でも発眼からふ化までの間に死卵が増加し、特に、10~30秒では多く、Hertwig 効果によるものであった。Hertwig 効果が現われた10~30秒の紫外線照射量は480~1,440erg/mm<sup>2</sup>に相当し、他のサケ科魚類<sup>1)</sup>とほぼ等しい照射量であった。

30秒以上照射した実験での発眼卵胚及びふ化稚魚は、いずれも発育が劣り、胚体は赤味が少なく弯曲し、小眼小頭で、典型的な半数体症候群<sup>7)</sup>の症状を呈した。これらのふ化稚魚は2日以内にすべて死亡した。すなわち、これらはすべて雌由来の遺伝子だけで発生が進んだ雌性発生魚であると考えられた。

以上の結果、紫外線照射時間が60~90秒、照射量が2,340~4,860erg/mm<sup>2</sup>の範囲でアマゴの雌性発生率が高くなった。アマゴの雌性発生における紫外線の照射量は、希釈精液の厚さが0.1mmでは、この範囲が適正であると考えられた。

## 要 約

1. アマゴの雌性発生を誘起するための精子の遺伝的不活性化条件について検討した。
2. 人工精漿で希釈した精子は、10°Cに保存すると、2時間後まで活力を維持するが、その後徐々に低下した。
3. 紫外線の照射は、温度10°C、強度390~540 μW/cm<sup>2</sup>の条件で実施した。
4. 精子の遺伝的不活性化のための紫外線照射条件は、照射時間60~90秒、照射量2,340~4,860erg/mm<sup>2</sup>が適正であった。
5. アマゴの Hertwig 効果は、照射量が480~1,440 erg/mm<sup>2</sup>で現われた。
6. アマゴの半数体症候群の症状は、小眼小頭、胚体は小さく弯曲し、赤味が少なかった。

## 文 献

- 1) 小野里坦・山羽悦郎, 1983: 紫外線照射によるサケ目魚類4種の雌性発生誘起, 日本誌, **49**, 693-699
- 2) 小野里 坦, 1987: 21世紀の養殖を科学する ⑨ バイテク応用技術-I, 養殖, **24**, 22-23
- 3) 高橋一考, 1985: マス類の染色体操作による育種試験-I, ~温度ショックによるニジマス染色体の倍数比~, 昭和59年度事業報告, **13**, 84-91, 山梨県魚苗センター
- 4) 大越徹夫・山内剛宏・大渡斉・大友芳成・福田一衛, 1986: 精子媒液のpHならびに紫外線照射が精子の生残に及ぼす影響について, 埼玉水試研報, **45**, 100-105
- 5) 森沢正昭, 1984: サケ精子の運動開始, 遺伝, **38**, 60-65
- 6) 小野里 坦, 1982: r線照射によるサケの Hertwig 効果と雌性発生誘起, 日本誌, **48**, 1237-1244
- 7) K. ARAI, H. ONOZATO, and F. YAMAZAKI, 1979: Artificial androgenesis induced with gamma irradiation in masu salmon, *Oncorhynchus masou*, Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., **30**, 181-186