

アユの全雌生産に関する検討

辻村明夫, 堀江康浩, 畑下成穂

アユは本県の主要養殖魚種であるが、さらに消費の拡大を図るためには「子持ちアユ」等の付加価値の高い商品開発が必要である。現在の「子持ちアユ」の生産は雌雄選別作業の必要性や飼育池の有効利用からみても生産効率は必ずしも高くない。

近年、染色体操作は新しい水産育種技術として注目を浴び、全雌生産にも利用されつつあり、この技術の応用により「子持ちアユ」の生産の効率化が図られるものと思われる。

そこで前報^{1,2)}に引き続き、アユの全雌生産に必要な精子の遺伝的不活化条件、卵の染色体倍数化条件、作出した雌性発生2倍体の飼育特性およびホルモン処理による偽雄の作出条件の検討を行い、染色体操作の育種的利用の1つとしてクローン魚の作出を試みた。

1 精子の遺伝的不活化条件の検討

紫外線照射時における照射量別の50倍希釈精液量

染色体操作において多くの卵を処理するためには大量の精液を効率的に不活性化する必要がある。前報²⁾では $7,000 \text{ erg}/\text{mm}^2$ の紫外線照射時の希釈精液量について検討を加えたが、今回は紫外線照射量を変えた場合の希釈精液量を検討した。

材料および方法

親魚は人工生産魚を用い、精液は15尾から採取したものを混合して使用し、卵は1個体分を用いた。精液希釈液の組成は $\text{NaCl} 17.61 \text{ g}$, $\text{KCl} 1.49 \text{ g}/\text{l}$ とし、 NaHCO_3 で $\text{pH} 7.0$ に調整した。紫外線照射は15W殺菌灯で30cm上方から行い、照射量は照射時間を変えることにより調節した。

50倍に希釈した精液を9cmシャーレにそれぞれ3, 6, 9, 12および18mlずつ注入し、 $4,000$ および $7,000 \text{ erg}/\text{mm}^2$ の紫外線照射を行った。また、 $9,000 \text{ erg}/\text{mm}^2$ の紫外線照射のシャーレへの注入量は3および6mlとした。これらの精液1mlを卵0.5gと媒精し、また同一量の精液と卵で通常の媒精を行ったIC区を設けた。19.8~20.2℃の流水中で卵管理し、6日目の発眼率および半数体症候群出現率を求めた。

結果および考察

照射量別の50倍希釈精液量と発眼率の関係を図1に示した。半数体症候群の出現率はいずれの

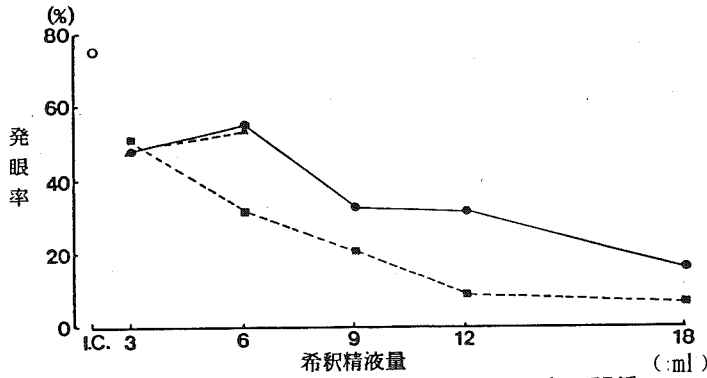


図1 照射量別の50倍希釈精液量と発眼率の関係。

○: I. C. 区 ●—●: 7,000 erg/mm²
■—■: 4,000 erg/mm² ▲—▲: 9,000 erg/mm²

場合も100%であった。発眼率は4,000 erg/mm²照射の3 mlで51%となり、6 ml以上では明らかに低下した。7,000 erg/mm²照射では6 mlまで48~56%と大差はなかったが、9 mlで33%と9 ml以上で低下した。9,000 erg/mm²照射では3, 6 mlとも7,000 erg/mm²照射と同様の発眼率を示した。

これらの発眼率の低下傾向からみて9 cmシャーレに注入する50倍希釈の精液量は4,000 erg/mm²照射で3 ml、7,000 erg/mm²照射で6 ml程度と思われ、7,000 erg/mm²照射は前報²⁾の量と一致した。9,000 erg/mm²照射は

実験の不手際から9 ml以上の場合を検討できなかったが、6 ml以上の注入が可能と思われ、今後、さらに検討する必要がある。

2 卵の染色体倍数化条件の検討

第2極体放出阻止法として低温処理および加圧処理が一般的に用いられている。当センターにおいても45, 60分間の低温処理を実施しているが作出率が低い場合が多い。そこで適正低温処理継続時間の検討を行うとともに第2極体放出阻止の効率化のため低温処理と加圧処理の比較を行った。

材料および方法

適正低温処理継続時間 供試卵は人工生産の通常2倍体魚(A, B)および極体放出阻止型雌性発生2倍体魚の第1代目(C, D)より採取した。供試精液は実験回毎に人工生産魚数尾から採取したものを混合し、100倍希釈した。7,000 erg/mm²の紫外線照射した希釈精液0.5 mlを1gの卵と媒精し、300~400粒ずつスライドグラスに附着させ、媒精6分後から0.9~1.0℃の水中で20, 30, 40, 50, 60分間の低温処理を行った。また、低温処理を行わない区(GC区

）および通常媒精区（IC区）を設けた。これらの卵を15.5～18.2℃の流水中で管理し、5日目の発眼率、正常ふ化率および奇形魚出現率（奇形魚数／ふ化尾数×100）を求めた。

また、ふ化仔魚の活力を測定するためにB群については20, 30, 40, 50, 60分区のふ化仔魚を、D群についてはIC, 20, 30, 40, 50, 60分区のふ化仔魚をアレン処方の希釈人工海水（比重1.0055）を満たした黒ビニール張りの500 mlビーカーに18～21尾ずつ放養した。15.5～18.0℃の流水中へビーカーを入れ、毎日、へい死魚を取り上げるにより生残状況を調べた。

低温処理と加圧処理の比較 供試精液および卵は人工生産魚より採取した。精液は2尾から採取したものを混合し100倍希釈した後、7,000 erg/cm²の紫外線照射を行った。卵は1個体から採取し、紫外線照射精液と媒精後、2枚のスライドガラスに300粒程度附着させ、低温処理用および加圧処理用とした。低温処理は媒精6分後から0.6～0.9℃の水中に45分間浸漬することにより、また加圧処理は媒精6分後に650kg/cm²・6分間の加圧を行った。この操作を7回実施した。これらの卵を15.5～18.2℃の流水中で管理し、正常ふ化率を求めた。

結果および考察

適正低温処理継続時間 低温処理継続時間と生残率の関係を図2に、低温処理継続時間と奇形魚出現率の関係を図3に示した。4例とも低温処理継続時間が長くなるに従い、発眼率および

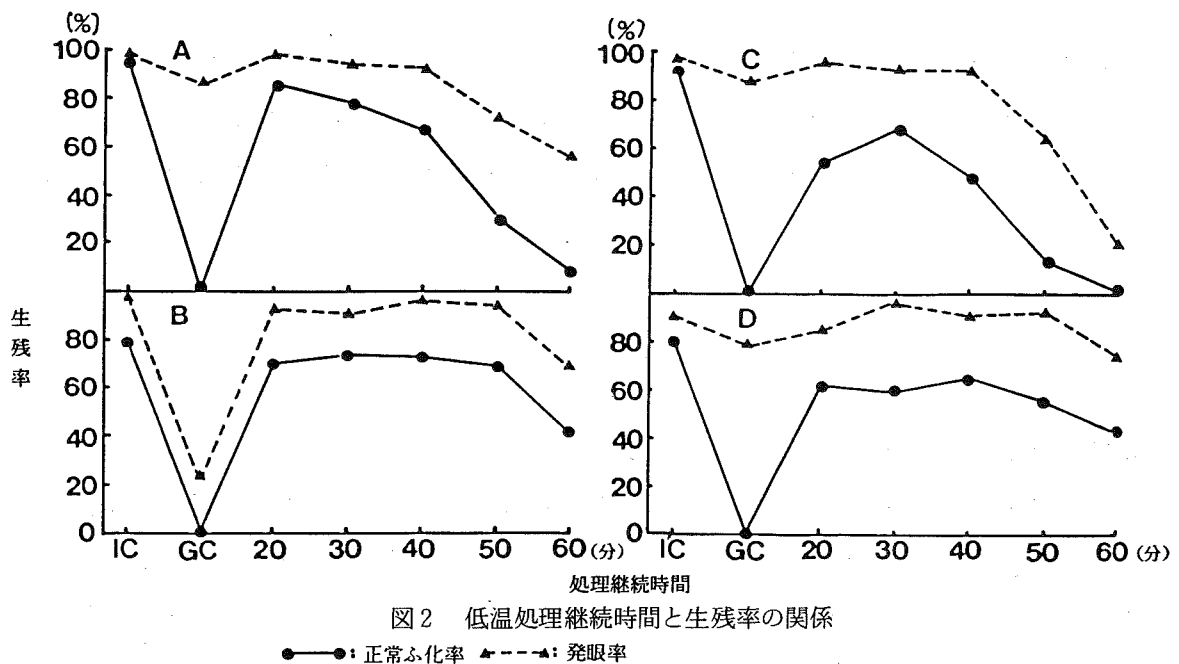


図2 低温処理継続時間と生残率の関係

●—●: 正常ふ化率 ▲---▲: 発眼率

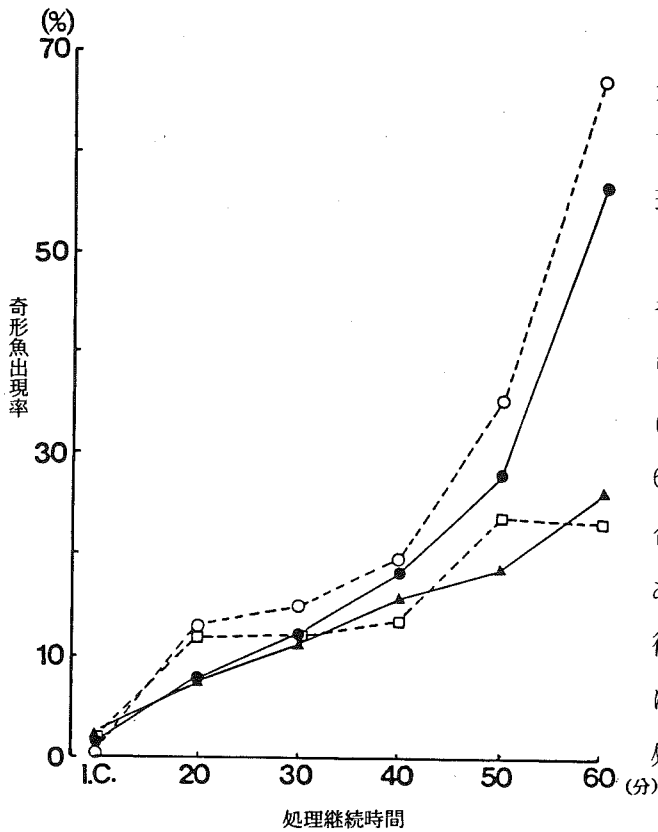


図3 低温処理継続時間と奇形魚出現率の関係

●—●: A ○---○: C
 ▲—▲: B □---□: D

正常ふ化率は低下し、奇形魚出現率は高くなった。しかし、A、Cのように処理時間の延長とともに急激に生残率が低下する場合とB、Dのように低下傾向がゆるやかな場合があり、卵により低温処理の感受性に差がみられた。処理時間は延長による正常ふ化率の低下は卵そのものの死亡のほかに奇形魚出現率の増加も原因であることが示された。いずれも低温処理時間の延長とともに奇形魚出現率は増加したが、40分までは漸増傾向を示し、50、60分にかけてA、Cのように著るしく増加する場合とB、Dのようにわずかな増加に留まる場合があった。いずれの例においても高い正常ふ化率が得られたのは20~40分間であり、それ以上では卵により急激な低下がみられることから、適正低温処理継続時間は20分から40分の間と考えられる。

また、C、Dは極体放出阻止型雌性発生2倍体魚1代目の卵を用いたが、両者とも適正低温処理継続時間内では高い正常ふ化率が得られたことから雌性発生魚の継代飼育の可能性が示された。今後、低温処理に対する感受性の差がどのような原因に

に基づくものかを調べるとともに、雌性発生魚の継代飼育の過程で低温処理に強い卵の固定化を検討する必要がある。

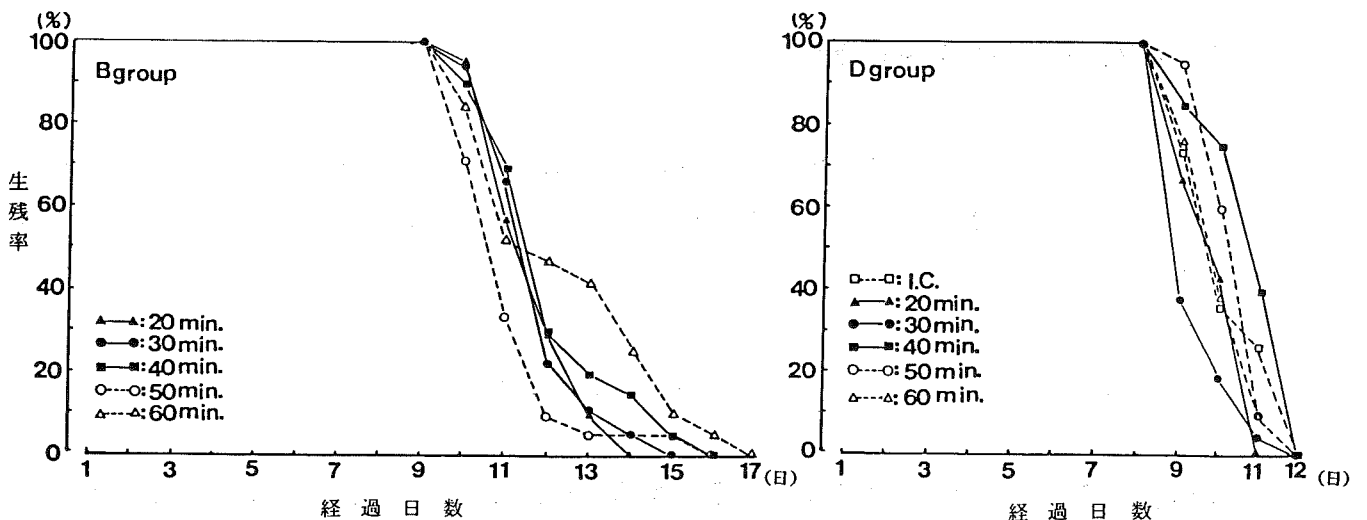


図4 BおよびD群の絶食下の生残状況

B, D群の絶食下における生残状況を図4に示した。B群では10日目よりへい死が始まり、17日目にはすべての魚がへい死したが、全数がへい死するまでの日数は低温処理が長いほど長くなる傾向がみられた。しかし、50%の魚が生残していた日数を図より読みとると、10.6~11.5日と大差がなかった。また、雌性発生2倍体2代目であるD群は9日目からへい死が始まり、20分区分で11日目、他の区では12日目にすべての魚がへい死した。50%の魚が生残していた日数は30分区分の8.8日を除くと9.7~10.7日と大差がなかった。これらのことから、低温処理継続時間とふ化仔魚の活力との間にはあまり密接な関係は認められないように思われる。しかし、BとD群の生残状況には、特に全数へい死するまでの日数で差がみられ、雌性発生2倍体2代目のふ化仔魚の活力は1代目に比べ、やや弱いものと思われる。今回の結果は1例のみのものであり、今後、さらに検討する必要がある。

低温処理と加圧処理の比較 正常ふ化率の比較を図5に示した。7例とも低温処理が加圧処理より高い正常ふ化率を示した。7例の低温処理区の平均は47.7%で加圧処理の24.4%の約2倍であった。また、低温処理の正常ふ化率が高い場合、加圧処理においても高い傾向がみられ、卵質が作出率に大きく影響していることもうかがわれた。今回の低温処理は45分間とやや長めであり、前述したように適正低温処理継続時間内ではさらに高い正常ふ化率が得られた可能性がある。これらから現状では第2極体放出阻止法としては加圧処理より低温処理を用いる方が有利と思われる。

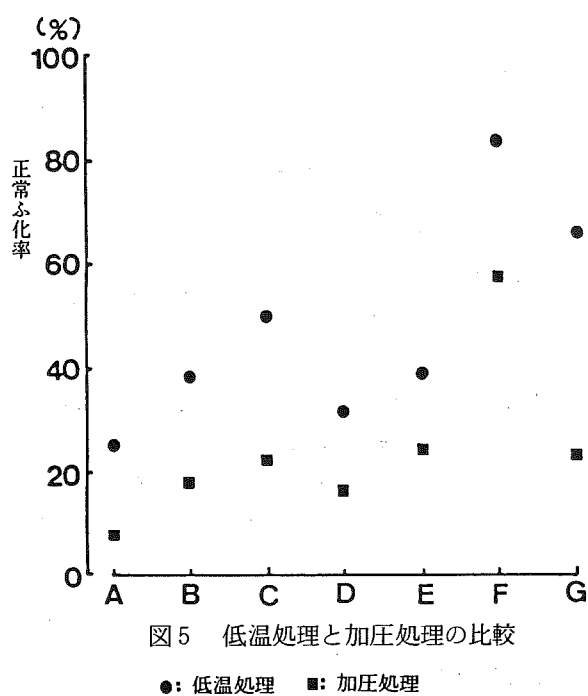


図5 低温処理と加圧処理の比較
●: 低温処理 ■: 加圧処理

3 雌性発生2倍体の飼育特性

養成親魚を用いて、前年度作出した極体放出阻止型雌発生2倍体および卵割阻止型雌性発生2倍体の稚魚からの成長・成熟状況を調べた。さらに2種類の雌性発生2倍体に標識を付け、個体レベルの成長を検討した。

材料および方法

極体放出阻止型雌性発生2倍体の成長と成熟 昭和62年9月21、22日に人工産養成親魚から採

卵採精し、紫外線照射（7,000～7,380 erg/mm²）による精子の遺伝的不活化と低温処理（媒精6分後より0.1～1.3℃で60分間）による染色体の倍数化により作出した雌性発生2倍体および正常精子で媒精した通常2倍体を用いた。供試サイズまでシオミズツボムシ、アルテミア幼生および配合飼料を給餌し養成した。

1) 試験—1（混合飼育）

(1) 試験期間：昭和63年5月11日から10月25日までの168日間。なお、成長試験は9月14日までの127日間とした。

(2) 供試魚および飼育方法：平均体重5.1gの雌性発生2倍体（G2N—A群）1,415尾を脂鰭切除により標識し、平均体重5.2gの通常2倍体（対照群）1,464尾と混合飼育した。飼育池は池水容量35m³（5×10m）のコンクリート池でアユ用配合飼料を給餌した。飼育期間中の水温は15.0～17.4℃であった。

(3) 魚体測定：開始時および成長試験終了時に全数を取り上げ、尾数と魚体重の測定を行い、中間測定は6月7日、7月21日、8月9日および10月13日に50尾程度取り上げ魚体重を測定した。成熟度指数は7月21日、8月9日、9月27日および10月13日に10～51尾取り上げ調査した。また、10月24、25日に雌性発生魚721尾、通常2倍体魚350尾を用いて排卵傾向を調査した。

2) 試験—2（分離飼育）

(1) 試験期間：昭和63年5月14日から7月19日までの67日間。（I期5月14日～6月13日、II期6月14日～7月19日）

(2) 供試魚および飼育方法：平均体重5.6gの雌性発生2倍体魚（G2N—A区）を301尾、通常2倍体魚（対照区）を299尾用い、池水容量3.5m³（2×5m）の飼育池2面に放養し、アユ用配合飼料を1日当り魚体重の2～3%を給餌した。飼育期間中の水温はI期15.7～16.9℃、II期15.5～17.2℃であった。

(3) 魚体測定：開始時、I期終了時およびII期終了時に全数を取り上げ、魚体重および尾数を測定した。

3) 試験—3（個体識別成長試験）

(1) 試験期間：昭和63年7月23日から8月31日までの40日間。

(2) 供試魚および飼育方法：平均体重24.1gの雌性発生2倍体魚（G2N—A群）を150尾および平均体重24.7gの通常2倍体魚（対照群）を149尾用い、池水容量3.5m³（2×5m）の飼育池に混養した。なお、開始時に個体識別のため、背鰭基部にアンカー型の番号入りのタグピンを付けた。アユ用配合飼料を1日当り魚体重の2～3%を給餌し飼育した。飼育期間中の水温は18.0～20.0℃であった。

(3) 体重の測定：開始時および終了時に全数取り上げ個体別に行った。

卵割阻止型雌性発生2倍体の成長と成熟 昭和62年11月5日に人工産養成親魚より採卵採精し、紫外線照射（8,400 erg/cm²）による精子の遺伝的不活化と加圧処理（卵を18.1℃の流水中へ80分間置き、650 kg/cm²で6分間）による染色体の倍数化により作出した卵割阻止型雌性発生2倍体魚および昭和62年11月16～18日に海産養成親魚より採精し、紫外線照射（7,560 erg/cm²）による精子の遺伝的不活化と低温処理（媒精6分後より0.1～0.9℃で60分間）による染色体の倍数化により作出した極体放出阻止型雌性発生2倍体魚ならびに同日に海産養成親魚から採卵採精し、正常精子で媒精した通常2倍体魚を用いた。供試サイズまでシオミズツボムシ、アルテミア幼生および配合飼料を給餌し養成した。

1) 試験—1（混合飼育）

(1) 試験期間：昭和63年6月23日から10月14日までの115日間。

(2) 供試魚および飼育方法：平均体重5.3gの卵割阻止型雌性発生2倍体魚（G2N—B群）1,246尾を脂鰭切除により標識し、また平均体重4.2gの極体放出阻止型雌性発生2倍体魚（G2N—A群）を腹鰭および尾鰭の上縁を切除することにより標識し、平均体重3.8gの通常2倍体魚（対照群）と混合飼育した。飼育池は池水容量35m³（5×10m）のコンクリート池でアユ用配合飼料を給餌し飼育した。飼育期間中の水温は15.7～17.4℃であった。

(3) 魚体測定：体重または体長の測定は開始時、63日目および終了時の115日目に23～99尾について行い、成熟度指数の調査は63日目および115日目に10～40尾について行った。

2) 試験—2（個体識別成長試験）

(1) 試験期間：昭和63年8月30日から10月7日の39日間。

(2) 供試魚および飼育方法：平均体重35.6gの卵割阻止型雌性2倍体魚（G2N—B群）を105尾、平均体重30.9gの極体放出阻止型雌性2倍体魚（G2N—A群）を92尾および平均体重30.9gの通常2倍体魚の雌（対照群）を67尾用い、池水容量3.5m³（2×5m）の飼育池に混養した。なお、開始時に個体識別のため、背鰭基部にアンカー型の番号入りタグピンを付けた。アユ用配合飼料を魚体重の2%程度給餌した。飼育期間中の水温は18.3～19.1℃であった。

(3) 体重の測定：開始時および終了時に全数取り上げ個体別に行った。

結果および考察

極体放出阻止型雌性2倍体魚の成長と成熟

1) 試験—1（混合飼育）

(1) 成長：成長試験の飼育結果を表1に、サンプリング魚の体重および変動係数の推移を図6に示した。試験開始直後に内臓真菌症の発生があり、G2N—A群でへい死魚が多かった。以後、

表 1 成長試験飼育結果

群	対 照	G 2N-A
開始時平均体重(g)	5.3	5.1
“ 尾 数	1 4 6 4	1 4 1 5
終了時平均体重(g)	5 3.2	4 2.1
“ 尾 数	1 2 9 7	1 2 1 5
へい死尾数	1 6	4 9
へい死率(%)	1.1	3.5
サンプル採取尾数	1 5 1	1 5 1
日間増重率(%)	1.8 3	1.6 8

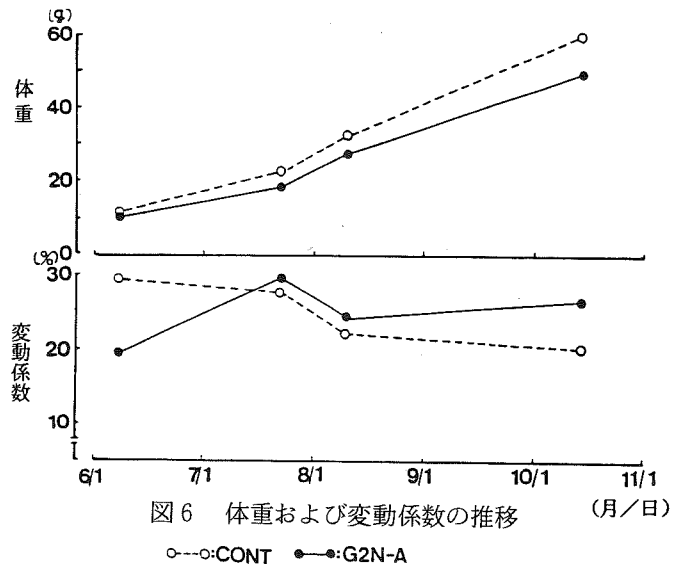


図 6 体重および変動係数の推移 (月/日)

○---○:CONT ●---●:G2N-A

両区ともへい死は少なく、へい死率は対照群で 1.1%、G 2N-A 群で 3.5%であった。日間増重率は対照群で 1.83%、G 2N-A 群で 1.68%となり、前者に比べ後者の増重率は 92%と成長

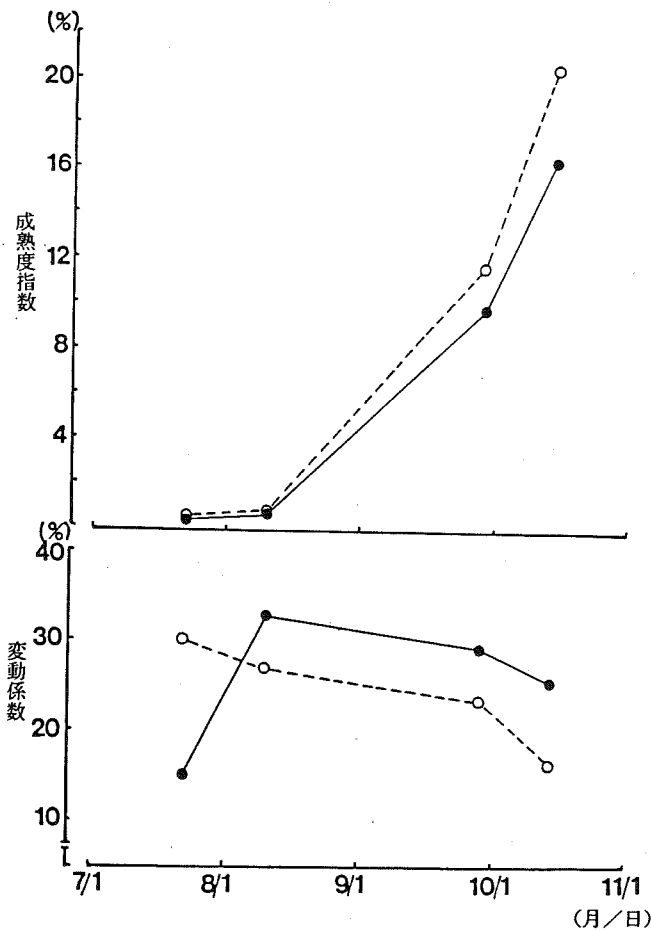


図 7 成熟度指数および変動係数の推移

○---○:CONT ●---●:G2N-A

が劣った。変動係数は 6 月 7 日を除き、G 2N-A 群で高く、飼育とともにその差は開く傾向がみられ、10 月 13 日には G 2N-A 群で 26.5%、対照群で 20.5%となった。今回の試験でも前報²⁾と同様、雌性発生魚で個体変異が大きい傾向を示した。

(2) 成熟度指数および変動係数の推移を図 7 に示した。成熟度指数の平均値は対照群で 7 月 21 日に 0.43%であったものが 8 月 9 日は 0.85%となり、以後、急速に増加し、10 月 13 日には 20.6%となった。G 2N-A 群は対照群と比べ、常に低い傾向にあり、10 月 13 日で 16.5%にとどまった。しかし、10 月 13 日の調査で G 2N-A 群に排卵がみられ、一部に成熟の進んだ個体がいることを示した。変動係数は 7 月 21 日を除き、G 2N-A 群で高く、飼育とともに変動係数そのものは低下したが、両者の差は開く傾向を示した。

また、採卵ピーク時における排卵傾向を図 8 に示した。10 月 24 日に対照群 350 尾、G 2N-A 群 721 尾を調査した結果、対照群では自然産卵した

ものが53%、排卵魚が13%、未排卵魚が34%であった。G2N-A群では自然産卵したものが37%、排卵魚が16%、未排卵魚が47%あり、G2N-A群で未排卵魚が多かった。また、10月25日に前日の未排卵魚を調査した結果、対照群では自然産卵魚が63%、排卵魚が24%、未排卵魚が13%であったのに対し、G2N-A群では自然産卵魚が31%、排卵魚が20%、未排卵魚が49%とやはり未排卵魚が多かった。10月24日の当初の尾数に対する10月25日の未排卵魚の割合は対照群でわずか4%であるのに対し、G2N-A群では23%に達した。このことは成熟度指数の変動係数からも裏付けられるようにG2N-A群では産卵時期が対照群より長期化することを示しており、前報²⁾と同様、第2極体放出阻止型雌性発生2倍体においてその特性の1つとして成熟過程の個体変異が大きくなることが示された。

2.) 試験-2 (分離飼育)

飼育結果を表2に示した。摂餌状況は対照区で活発であり、G2n-A区で劣った。へい死率は

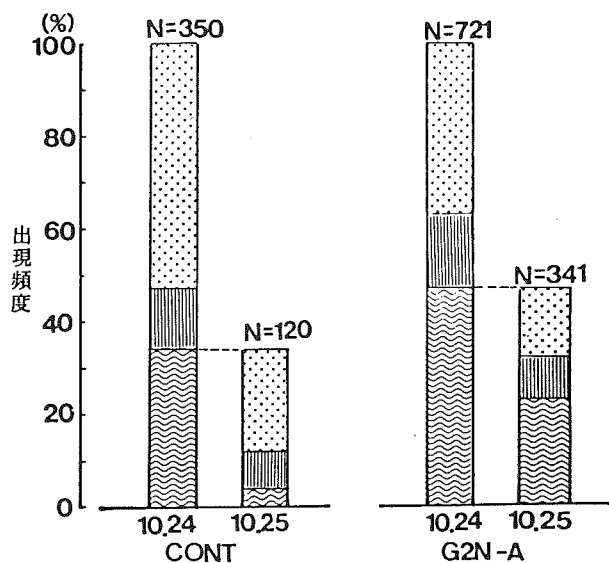


図8 採卵ピーク時における排卵傾向

□: 自然採卵 ▨: 排卵
▩: 未排卵

表2 分離飼育結果

区	I 期		II 期		全 期	
	対照区	G2N-A区	対照区	G2N-A区	対照区	G2N-A区
開始時平均体重(g)	6.1	5.6	11.1	10.5	6.1	5.6
” 尾 数	299	301	299	300	299	301
終了時平均体重(g)	11.1	10.5	22.9	21.0	22.9	21.0
” 尾 数	299	300	297	296	297	296
へい死率(%)	0	0.3	0.7	1.3	0.7	1.6
補正飼料効率(%)	100.1	99.3	86.6	78.1	90.3	83.7
補正日間給餌率(%)*	2.34	2.45	2.75	2.95	2.38	2.56
補正日間成長率(%)*	2.45	2.55	2.52	2.42	2.48	2.48

* 給餌日数 (I期25日間、II期29日間、全期54日間) による。

全期の対照区で0.7%、G2N-A区で1.6%とG2N-A区で高いもののへい死率は低かった。補正飼料効率はI、II期ともG2N-A区で劣り、全期で6.6%の差がみられた。日間成長率はI期ではG2N-A区がII期では対照区が優れ、全期では同値となった。これは日間給餌率がG2N-A区で高かったため、特にI期でG2N-Aの日間成長率が高くなったものと思われる。飼料効率からみて本質的にはG2N-A区は対照区に比べ、成長はやや劣るものと思われる。しかし、今回の分離飼育は実験—1に示した混合飼育の場合より、その成長差は小さく、摂餌状況からみて、混合飼育では活力の違いから雌性発生魚の成長は抑制される可能性があると思われる。また、図9に体重の分布を示した。終了時にG2N-A区はその長い分布型を示し、分離飼育においても雌性発生魚の成長の個体変異は大きくなることが示された。

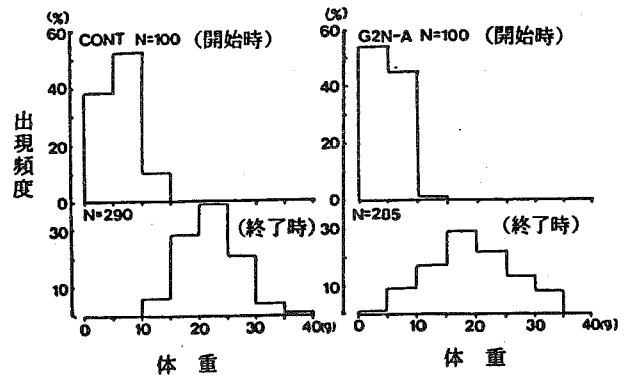


図9 分離飼育における体重の分布

3) 試験—3 (個体識別成長試験)

飼育結果を表3に示した。通常2倍体魚であ

表3 飼育結果

群	対 照			G2N-A
	♂	♀	♂ ♀	
開始時総重量(g)	1752.0	1906.5	3658.5	3548.1
終了時総重量(g)	3079.4	3244.7	6324.1	5567.5
へい死尾数(g)	2	5	7	11
へい死重量(g)	59.8	203.4	263.2	363.8
増正増重量(g)	1387.2	1541.6	2928.8	2383.2
総給餌量(g)	8446.0			
補正飼料効率(%)	62.9			
補正日間給餌率(%)	2.14			
測定尾数	68	67	135	134
開始時平均体重±SD(g)	24.41±4.16	25.03±4.03	24.87±3.61	24.05±4.92
変動係数(%)	17.0	16.1	14.5	20.5
終了時平均体重±SD(g)	45.41±7.07	45.19±7.14	45.30±7.08	39.81±9.17
変動係数(%)	15.6	15.8	15.6	23.0
平均増重量±SD(g)	20.70±5.28	20.16±5.06	20.43±5.16	15.46±5.93
変動係数(%)	25.5	25.1	25.3	38.4
平均日間成長率±SD(%)	15.2±0.28	14.9±0.29	15.1±0.29	12.5±0.34
変動係数(%)	18.4	19.5	19.2	27.2
増重倍率	1.86	1.81	1.82	1.66

る対照群の性比はほぼ1 : 1であり、成長に関する雌雄差は平均日間成長率および増重倍率で見ると雄でやや優れたがその差は小さかった。終了時の対照群の成熟度指数は雄で $3.63 \pm 1.89\%$ (N=10)、雌で $2.07 \pm 0.57\%$ (N=10)であり、この程度の成熟状態であれば雌性発生魚との成長比較試験に通常2倍体魚を雌雄混合のまま用いても問題はないものと思われる。

G2N-A群は対照群に比べ、成長は劣り、増重倍率で見ると対照群の91.2%の成長量にとどまった。平均体重の変動係数は開始時に比べ終了時には対照群の雌雄別で見ると低くなる傾向がみられたが、G2N-A群では増加した。また、平均増重量および平均日間成長率の変動係数もG2N-A群で顕著に高かった。対照群およびG2N-A群の体重の分布を図10に示したが、G2N-A群で成長の個体変異の拡大現象が認められた。

図11に開始時体重と増重量の関係を示した。両群とも開始時体重が大きいほど、増重量が大きくなる傾向を示し、特にG2N-A群でその傾向は強かった。今回の試験のような2%程度の低い給餌率

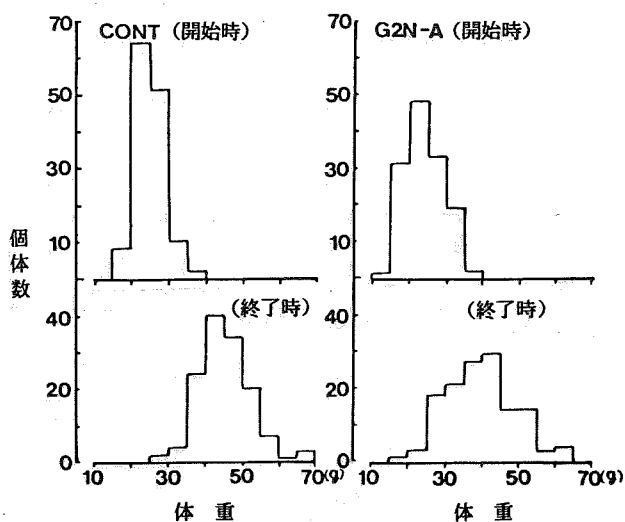


図10 体重の分布

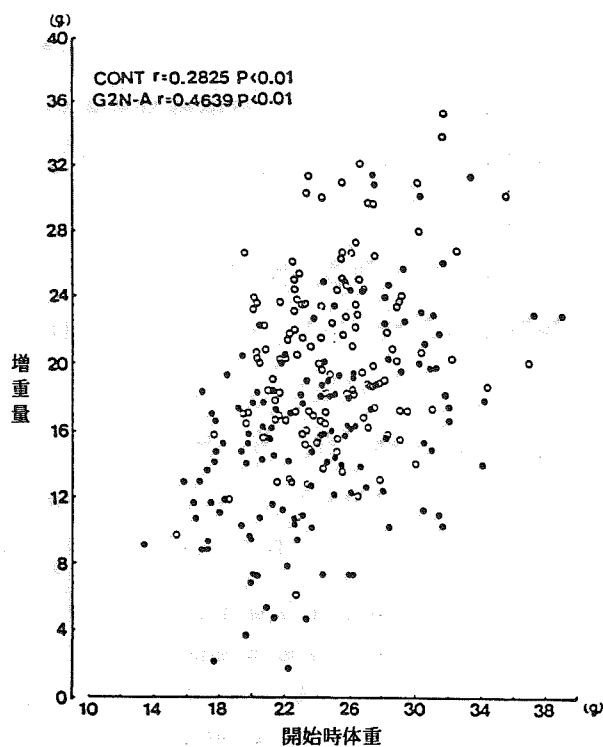


図11 開始時体重と増重量の関係
○CONT ●G2N-A

ではそれぞれの魚が自分の体重に見合った十分な摂餌ができず、特に大型魚ではこの傾向が強いため、その成長は抑制された可能性があり、対照群の相関係数は低い値にとどまったものと思われる。G2N-A群は対照区に比べ、開始時体重の小さいものは増重量も小さい傾向が明瞭であり、これらの低増重量個体の出現は遺伝子のホモ化による成長における有害劣性遺伝子の発現の可能性がある。また、これらの個体の存在が低い給餌率であるにもかかわらず、相関係数を高めた原因であるとも考えられる。

図12に開始時体重と日間成長率の関係を示した。対照群は負の相関関係がみられ、開始時体重

が小さいものほど日間成長率は高くなる傾向を示したが、G2N-A群では相関関係は認められな

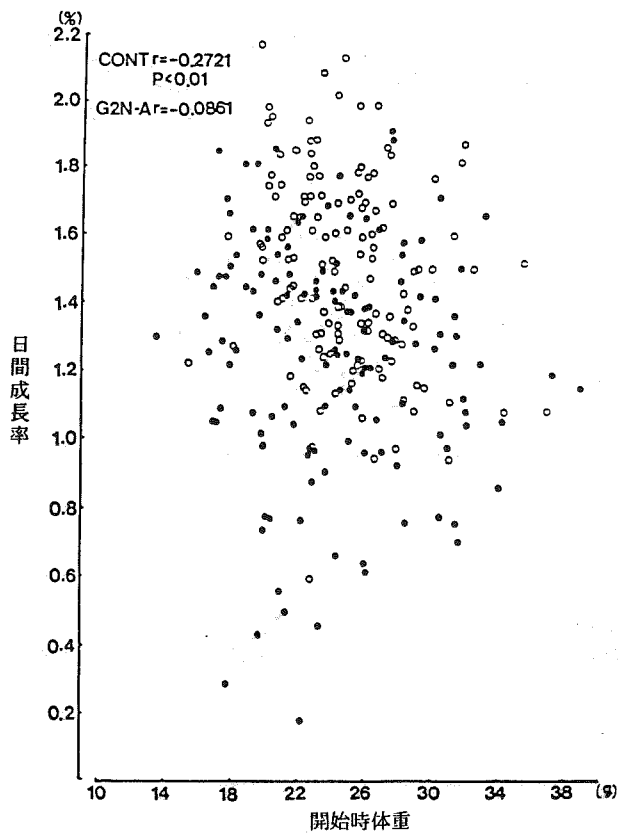


図12 開始時体重と日間成長率の関係

○:CONT ●:G2N-A

かった。前述したように制限給餌下では大型魚は十分に摂餌することができず個体維持に費やすエネルギーが大きいことから、小型魚の成長が相対的に高まるものと思われる。G2N-A群は座標面にバラツク傾向を示し、1%以下の日間成長率であった個体は対照群で5尾であったが、G2N-A群では29尾存在した。また、G2N-A群の低い成長率を示す個体は開始時体重の低いものが中心であったが、大型魚の部類に入る30g以上の魚にも若干みられた。日間成長率の最高値は対照区で2.18%であったが、G2N-A群では1.92%と劣った。しかし、開始時の体重別にみると、対照群の高成長率を示す個体と遜色のない成長を示す個体もいることから、今後の選抜効果は期待できると考えられる。これらのことからG2N-A群における低成長性および成長のバラツキの拡大は有害劣性遺伝子の発現によると思われる低成長個体の存在によるところが大きいと考えられる。また、これら

の魚の出現は成長の各段階で起こる可能性があり、雌性発生魚の継代のためには稚魚期のみの選抜だけでなく、多くの魚を用いて成熟期まで数回実施する必要があると思われる。今回の試験は給餌率が低いため、特に大型魚では十分な成長ができなかった可能性があり、今後、飽食給餌した場合の成長特性を検討する必要があるだろう。

卵割阻止型雌性発生2倍体の成長と成熟

1) 試験—1 (混合飼育)

(1) 成長：サンプリング結果を表4に、終了時の体重の分布を図13に示した。増重倍率で見ると対照群に比べ、2種類の雌性発生群は劣り、G2N-A群で70.3%、G2N-B群で76.6%の成長量にとどまった。体長および体重の変動係数は対照群に比べ、雌性発生群で常に高くなったが、G2N-A群・G2N-B群間では一定の傾向はみられなかった。分布の型も雌性発生群ではすその長いバラツキのある分布を示した。G2N-B群の75~80gの級に入る魚は他の群ではみられず、今後、育種の素材を考える場合重要であると思われる。

(2) 成熟：終了時の成熟度指数の分布を図14に示した。平均値で見ると63日目では対照群>G

表4 サンプルング結果

群			対 照		G2N-A		G2N-B	
			平均値	変動係数(%)	平均値	変動係数(%)	平均値	変動係数(%)
開始時	体	重(g)	3.8	—	4.3	29.1	4.7	32.8
63日目	体	重(g)♀	28.7	22.2	27.2	30.3	25.4	31.7
		♂	30.5	16.9	—	—	—	—
	成熟度指数(%)♀	1.20	25.0	1.02	51.0	0.60	45.0	
終了時	体	長(cm)♀	14.4	5.6	13.3	10.8	14.4	9.6
	体	重(g)♀	48.8	17.4	38.7	30.5	46.2	26.5
	成熟度指数(%)♀	16.3	23.7	16.7	41.6	12.6	44.2	
増重倍率*			12.8		9.0		9.8	

* 終了時体重 / 開始時体重

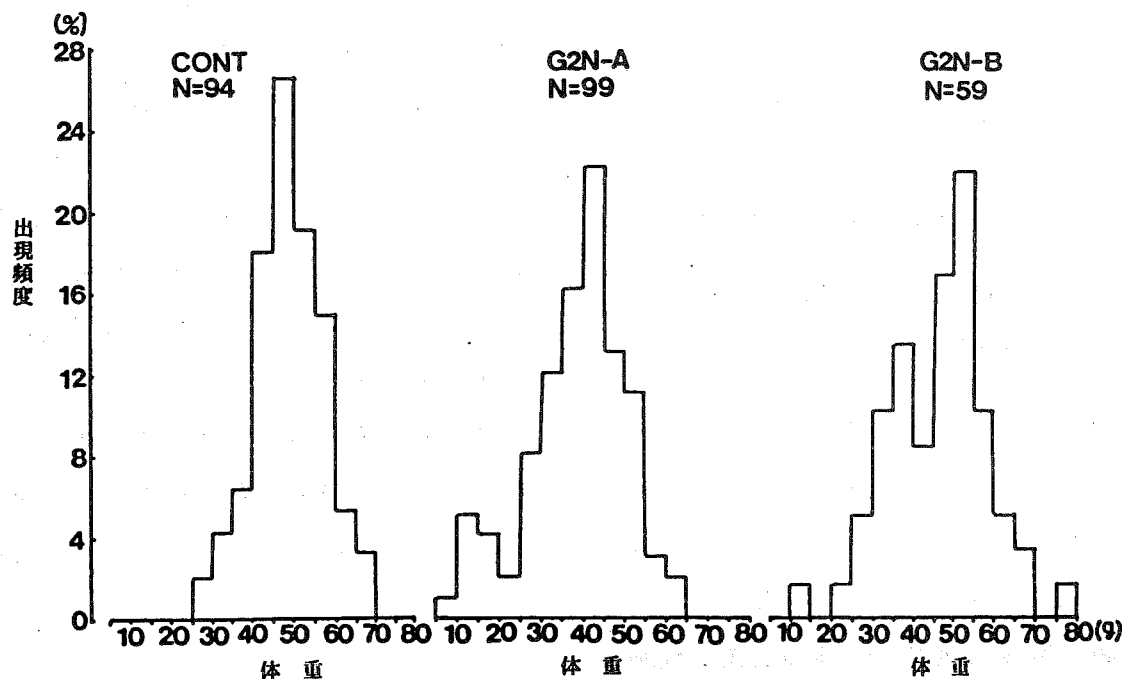


図13 終了時の体重の分布

2N-A群 > G2N-B群の順に成熟度数は高い値を示したが、終了時には対照群とG2N-A群はほぼ同様の状態となり、G2N-B群の成熟は遅れた。分布の型をみると平均値では対照群とG2N-A群はほぼ同様の成熟度指数であったにもかかわらず、G2N-A群では20~24%の級の個体がモードとなり、対照群より成熟の進んだ一群が存在することを示している。G2N-B群はバラツキの大きい分布型を示したが、特に成熟の進んだ個体は認められなかった。

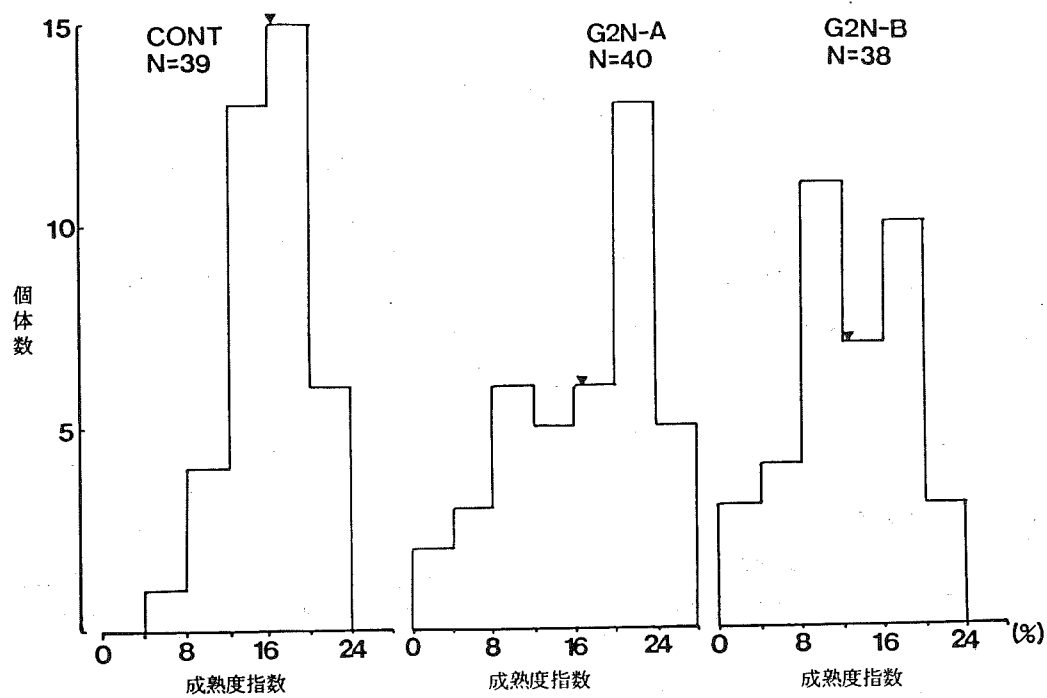


図14 終了時の成熟度指数の分布

▼: 平均値

2) 試験—2 (個体識別成長試験)

表5 飼育結果

群	対 照	G2N-A	G2N-B
開始時総重量 (g)	2028.2	2839.5	3707.3
終了時総重量 (g)	3164.9	4063.4	5032.5
へい死尾数	1	0	1
へい死重量 (g)	40.3	0	55.2
補正増重量 (g)	1177.0	1223.9	1380.4
総給餌量 (g)		5150	
補正飼料効率 (%)		73.4	
補正日間給餌率 (%)		0.92	
測定尾数	60	92	100
開始時平均体重±SD(g)	30.89±3.49	30.86±5.18	35.60±5.26
変動係数 (%)	11.2	16.8	14.8
終了時平均体重±SD(g)	47.87±4.93	44.17±7.56	49.52±7.91
変動係数 (%)	10.3	17.1	16.0
平均増重量±SD(g)	17.00±2.88	13.30±3.30	13.93±4.06
変動係数 (%)	16.9	24.8	29.1
平均日間成長率±SD(%)	1.13±0.18	0.93±0.16	0.84±0.20
変動係数 (%)	15.9	17.2	23.8
増重倍率	1.55	1.43	1.39

飼育結果を表5に示した。成長は日間成長率や増重倍率でみると対照群が最も良く、次いでG2N-A群となり、G2N-B群は最も劣った。対照群の増重倍率を100%とした場合、G2N-A群で92.2%、G2N-B群で90.0%となった。平均体重の変動係数は開始時に比べ、終了時には対照群で減少したが、G2N-A群およびG2N-B群では増加し、G2N-B群で増加割合は高かった。また、平均増重量および平均日間成長率の変動係数は対照群で最も低く、次いでG2N-A群となり、G2N-B群で最も高かった。また、図15に示した対照群および雌性発生魚群の体重の分布からも2種類の雌性発生群では対照群に比べ、成長のバラツキが大きいことが示された。

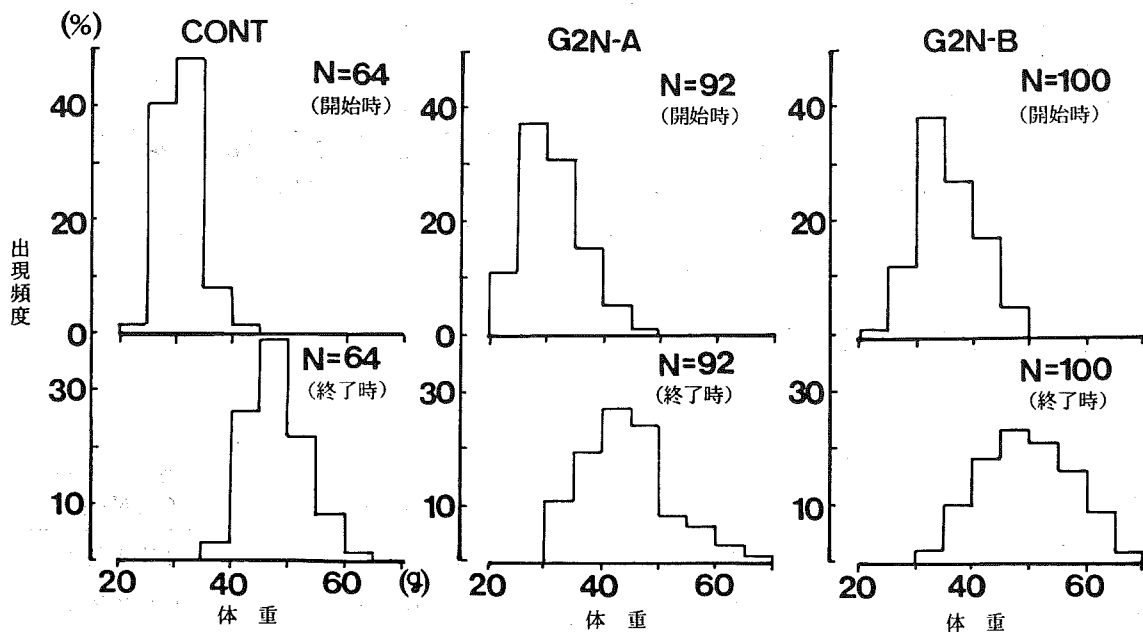


図15 体重の分布

これらのことからアユでもすでに報告³⁾されているように通常2倍体魚、極体放出阻止雌性2倍体魚、卵割阻止型雌性発生2倍体魚の順に成長に関する変異の拡大現象が示された。

開始時体重と日間成長率の関係を図16に示した。対照群では負の相関関係がみられ、開始時体重が小さいほど日間成長率は高くなる傾向を示したが、G2N-A群およびG2N-B群では相関関係はみられなかった。この試験においても給餌率が低いため、特に大型魚は十分に摂餌することができず、個体に費やすエネルギーが大きいことから、小型魚の

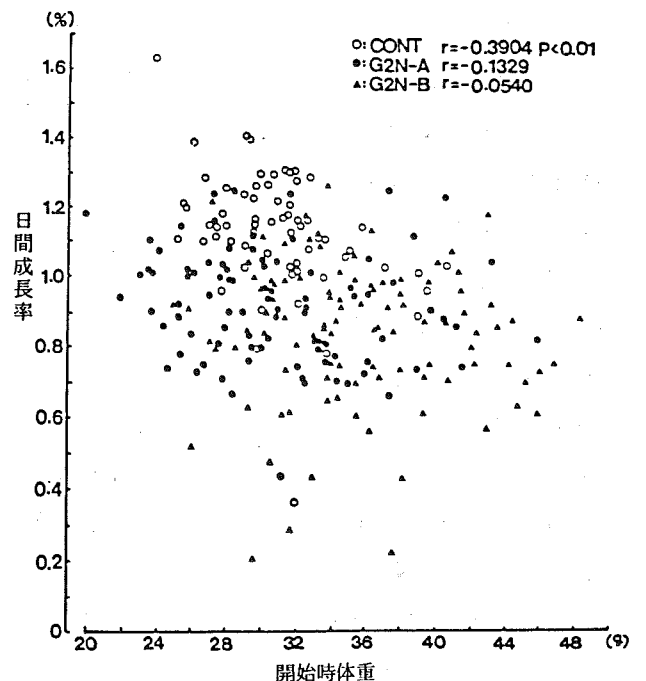


図16 開始時体重と日間成長率の関係

成長が相対的に高まり、負の相関関係を示したものと思われる。また、G2N-A群およびG2N-B群では遺伝子のホモ化の増加により成長に関する有害劣性遺伝子が発現したと思われる極端に成長率の低い個体がみられ、座標面にバラック分布となり、特にG2N-B群でこの傾向は顕著で相関関係が認められなかったものと思われる。この試験においても特に優れた成長を示す雌性発生魚は認められなかったが、極体放出阻止型の個体識別成長試験で述べたように体重別にみると対照群と同等以上の成長を示す個体も存在することから、今後、さらに多くの魚を用いて遺伝子のホモ化による高成長の獲得について検討するとともに、他の量的形質の変異拡大も検討する必要がある。

4 ホルモン処理による偽雌の作出

全雌魚を大量生産するためには、雌性発生2倍体魚をホルモン処理により、機能的雄な性転換し、通常雌と交配させる方法が効率的であると考えられている。前報²⁾の50~100 μ gレベルの濃度では雄性化は認められず、成長阻害や体型異常の増加がみられた。そこで、今回は低濃度のホルモン剤を長期に経口投与した場合の雄性化について検討した。

材料および方法

試験期間 昭和62年12月19日から昭和63年11月4日までの322日間行い、ホルモン処理期間は昭和62年12月19日から昭和63年5月24日までの160日間とした。

試験区 ホルモン剤は17-methyltestosterone (MT)を用い、エチルアルコールに溶解後、0.4 μ gおよび0.8 μ g/g飼料になるよう配合飼料に吸着・風乾した。試験開始後10日間毎の給餌量およびホルモン投与量を1,000尾当りに換算して表6に示した。給餌は1日量を5回に分けて与えた。

表6 配合飼料給餌量およびホルモン投与量 (1,000尾当り)

ふ化後日数	74~83	84~93	94~103	104~113	114~123	124~133	134~143	144~153
試験開始後日数	1~10	11~20	21~30	31~40	41~50	51~60	61~70	71~80
0.4 μ g 配合飼料給餌量 (g)	7.8	8.6	11.4	13.2	16.2	20.2	23.1	16.7
ホルモン投与量 (μ g)	3.1	3.4	4.6	5.3	6.5	8.1	9.2	6.7
0.8 μ g 配合飼料給餌量 (g)	7.4	8.0	10.5	12.1	14.5	17.0	19.4	14.1
ホルモン投与量 (μ g)	5.9	6.4	8.4	9.7	11.6	13.6	15.5	11.3
ふ化後日数	154~163	164~173	174~183	184~193	194~203	204~213	214~223	224~233
試験開始後日数	81~90	91~100	101~110	111~120	121~130	131~140	141~150	151~160
0.4 μ g 配合飼料給餌量 (g)	3.2.9	3.8.1	3.8.8	4.3.3	4.7.5	5.3.5	5.9.5	5.9.9
ホルモン投与量 (μ g)	1.3.2	1.5.2	1.5.5	1.7.3	1.9.0	2.1.4	2.3.8	2.4.0
0.8 μ g 配合飼料給餌量 (g)	2.7.7	3.2.1	3.2.9	3.7.2	4.1.6	4.7.2	5.2.8	5.3.1
ホルモン投与量 (μ g)	2.2.2	2.5.7	2.6.3	2.9.8	3.3.3	3.7.8	4.2.1	4.2.5

供試魚および飼育環境 ふ化後74日目、全長 29.1 ± 2.9 mmの雌性発生2倍体魚を $0.4 \mu\text{g}$ 区は752尾、 $0.8 \mu\text{g}$ 区は775尾用いた。飼育水槽は容量600 lの屋内コンクリート池でアレンの希釈人工海水（比重 $1.0050 \sim 1.0055$ ）を使用し、循環濾過方式で飼育した。2月25日から3月1日にかけて淡水馴致を行い、ホルモン投与終了まで同一池で飼育した。以後、魚体重の増加とともに飼育池を拡大し、11月4日まで飼育した。なお、ホルモン処理期間中の水温は $14.2 \sim 19.9$ °Cであった。

魚体測定および効果判定 ホルモン投与開始時および終了時に全数計数するとともに20~50尾ずつサンプリングして体重を測定し、へい死魚は毎日取り上げ計数した。また、 $0.8 \mu\text{g}$ は10月24日に、 $0.4 \mu\text{g}$ 区は11月4日に全数取り上げ雌雄を判定した。出現した偽雄様個体は通常2倍体の雌魚と交配を行い、発現率および正常ふ化率を求めた。

結果および考察

飼育結果 ホルモン投与終了時の生残率は $0.4 \mu\text{g}$ で58.1%、 $0.8 \mu\text{g}$ 区で69.3%であった。試験開始直後に細菌性疾病と思われるへい死魚がみられ、ホルモン処理期間中の全へい死魚のうち、両区とも約7割がこの時期にへい死した。薬浴を実施したところ、以後のへい死魚は減少したことからホルモン処理による生残率への影響はなかったものと思われる。ホルモン処理終了時の体重は $0.4 \mu\text{g}$ 区で6.2 g、 $0.8 \mu\text{g}$ 区で4.8 gであった。給餌量を両区で同一量としたため、生残尾数の多かった $0.8 \mu\text{g}$ 区の成長は遅れたものと思われる。

効果判定 性別判定結果を表7に示した。 $0.4 \mu\text{g}$ の出現率は雌が0.6%、雌雄同体が4.8%であり、 $0.8 \mu\text{g}$ 区では雌が0.2%、雌雄同体が0.5%となり、 $0.4 \mu\text{g}$ 区の出現率が高いものの、作出率として極めて低かった。これらの魚は典型的な雄魚の外観を示し、雄型の尻鰭を持っているものでも尻鰭に追星のみられない魚は雌であった。この尻鰭の追星の有無は偽雄を選別する際の1つの指標になると思われた。試験魚と同一起源の雌性発生2倍体魚を8月19日から10月13日までの間に140尾解剖し、その性別を調査した結果、雄や雌雄同体魚はみられず、すべて雌で

表7 性別判定結果

ホルモン処理濃度	雄		雌雄同体		雌	
	尾数	割合(%)	尾数	割合(%)	尾数	割合(%)
$0.4 \mu\text{g}$	2	0.6	15	4.8	295	94.6
$0.8 \mu\text{g}$	1	0.2	2	0.5	407	99.3

あった。また、1,052尾について外観から性別を判定した結果もすべて雌であった。このことから、今回、出現した雄および雌雄同体魚はホルモン処理による性転換と推測された。

アユの性分化の形態学的臨界期は水温15°Cで飼育した場合、ふ化後90日目(全長35mm)から同120日目(40mm)にかけて存在⁴⁾すると考えられている。今回のホルモン処理では臨界期以前から処理を開始したが、その作出率は極めて低く、さらに早い段階でのホルモン処理が必要と思われる。また、処理濃度は0.4 μg区で0.8 μg区より高い作出率を示すことから、さらに低濃度での検討が必要であると思われる。

偽雄様魚と通常2倍体雌魚の交配 結果を表8に示した。平均発眼率は0.4 μg区で44.8%、

表8 偽雄様魚と通常雌魚の交配結果

ホルモン 処理濃度	偽雄様魚 の個体No.	偽雄様魚 の性別	発眼率 (%)	正常ふ化率 (%)
0.4 μg	1	♂	60.6	55.6
	2	♀♂	93.0	88.0
	3	♀♂	81.5	77.8
	4	♀♂	0	—
	5	♀♂	10.0	測定せず
	6	♀♂	55.6	49.4
	7	♀♂	5.8	測定せず
	8	♀♂	52.1	45.6
	平均値	—	44.8	—
0.8 μg	1	♂	1.0	0
	2	♀♂	39.4	32.2
	平均値	—	20.2	—

0.8 μg区で20.2%と低かった。しかし、発眼時点から正常ふ化する割合は0.4 μg区で88~96%、0.8 μg区で82%と高く、奇形魚の出現も少なかった。搾出により精液を採取できなかったので精巣を切り刻み、浸出した精液により媒精を行ったが、これらの精子の運動性は不活発な場合が多かった。ニジマスにおいては精巣内精子の鞭毛運動は著るしく不活発で受精率は極めて低いが、pHの高い人工精漿内で培養することにより運動性が向上することが報告⁵⁾されている。アユについても偽雄は輸精管の欠如により搾出による精液の

採取はできないことが予想されるので効率的な媒精方法を検討する必要があると思われる。

現在、0.4 μg区 No.2 および 0.8 μg区 No.2 の仔魚の飼育を実施しており、その性別の判定により雌雄同体魚の精子の有効性を検討する予定である。

5 染色体操作の育種的利用

クローン魚の作出

卵割阻止型雌性発生2倍体は第1卵割に先だって複製された染色体を倍化するので個別にす

すべての遺伝子座で同祖接合型となり、これを親魚として再度、雌性発生を行うと親と遺伝的に完全に同一（クローン）の個体からなる集団が作出できることが知られている⁶⁾。クローンは育種素材としての活用および飼育環境因子の解明に今後、重要な意味をもつものと考えられるのでその作出を試みた。

材料および方法

昭和62年11月5日に継代7の海産系人工養成親魚より採卵し、 $8,400 \text{ erg}/\text{ml}$ の紫外線照射をした精液と媒精後、卵を 18.1°C の流水中へ80分間置き、 $650 \text{ kg}/\text{cm}^2$ で6分間加圧処理を行った。これにより得られた仔魚を飼育し、親魚とした。採卵を昭和63年11月4日および8日に行い、 $7,000 \text{ erg}/\text{ml}$ の紫外線照射した精液と媒精6分後に卵を $0.4 \sim 1.0^\circ\text{C}$ の水中に30分間浸漬することにより低温処理を行い、クローン魚を作出した。採卵は個体別に4回行い、1個体分の卵を2分し、一方はクローン作出に用い、他方は紫外線照射に用いたものと同一の精子で通常受精（対照区）を行った。これらの卵を $14.2 \sim 16.5^\circ\text{C}$ の流水中で管理し、9日目の発眼率および正常ふ化率を求めた。

結果および考察

クローン魚の作出結果を表9に示した。親魚により作出率に差がみられたが、過熱等の卵質の影響が大きいと思われた。対照区と大差のない作出率を示したクローンA・B群について飼育を実施しており、今後、飼育特性等を検討する予定である。

要 約

表9 クローン魚作出結果

群 名	作出日	発眼率(%)	正常ふ化率(%)
対 照 A	11/4	90.9	80.2
クローンA		83.3	70.1
対 照 B	11/8	66.9	49.2
クローンB		65.9	46.9
対 照 C	11/4	89.7	83.6
クローンC		43.4	29.5
対 照 D	11/8	35.0	22.8
クローンD		7.9	4.0

1) $4,000 \text{ erg}/\text{ml}$ の紫外線照射における9cmシャーレに注入する50倍希釈精液量は3ml、また、 $7,000 \text{ erg}/\text{ml}$ では6mlまで可能であると考えられた。

2) 適正な低温処理継続時間は $0.9 \sim 1.0^\circ\text{C}$ で20~40分間と考えられ、それ以上では奇形魚の出

現率が著るしく増加した。

3) 同一卵を用いた低温処理と加圧処理の比較では低温処理が常に優れた正常ふ化率を示した。

4) 極体放出阻止型雌性発生2倍体魚と通常2倍体魚の混合および分離飼育とも成長は雌性発生魚で劣ったが、混合飼育でより低成長を示し、通常魚による干渉の可能性が考えられた。また、成熟状況も雌性発生魚で個体変異の大きい傾向を示し、産卵時期の長期化が考えられた。

5) 極体放出阻止型雌性発生2倍体魚を用いた個体識別成長試験で通常魚に比べ、低成長を示す雌性発生魚が多くみられ、遺伝子のホモ化による有害劣性遺伝子の発現が考えられた。しかし、通常魚の高成長を示す個体と遜色のない成長率を示す個体もみられ、継代飼育の過程における選抜効果は期待できると考えられた。

6) 卵割阻止型および極体放出阻止型雌性発生2倍体魚を用いた個別成長試験では通常2倍体魚、極体放出阻止型雌性発生2倍体魚、卵割阻止型雌性発生2倍体魚の順に成長に関する変異の拡大現象が認められた。

7) ふ化後74日目の雌性発生2倍体魚を用いて、メチルテストステロンによる0.4および0.8 $\mu\text{g/g}$ 飼料の経口投与を160日間実施した結果、極めて低率であるが偽雄様の個体が出現したが多くは雌雄同体魚であった。

8) 卵割阻止型雌性発生2倍体魚を親魚とし、再度、低温処理による雌性発生を行うことによりクローン魚の作出を試みた。

文 献

- 1) 辻村明夫, 堀江康浩, 明楽公男: 昭和61年度和歌山県内水面漁業センター事業報告書, 69-79 (1988).
- 2) 辻村明夫, 堀江康浩, 畑下成穂: 昭和62年度和歌山県内水面漁業センター事業報告書, 76-91 (1989).
- 3) N. Taniguchi, S. Seki, J. Fukai and A. Kijima: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1483-1491 (1988).
- 4) 佐々木拓, 隆島史夫, 高橋昭夫: 水産増殖, **34**, 249-251 (1987).
- 5) 滋賀県醒井養鱒場: 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, 3-6 (1989).
- 6) 谷口順彦: 水産の研究, **25**, 36-40 (1986).