

# アユの全雌生産に関する検討

辻村明夫，堀江康浩，明楽公男

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面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。

そこでアユの全雌生産に必要な精子の遺伝的不活化条件の検討，低温処理による染色体の倍数化条件の検討および作出した雌性発生2倍体アユの飼育特性の検討を行った。

## 1 精子の遺伝的不活化条件の検討

精子への紫外線の照射量を均一にするために用いられる精液の希釈液は一定時間精子の運動を抑制するとともに受精能力を低下させないことが必要である。そこで2種類の精子希釈液を用い，その適合性を検討した。また，雌性発生誘起には染色体を完全に破壊され，かつ媒精時に運動性を有する精子が必要であり，そのための有効紫外線照射量を検討した。

## 材 料 お よ び 方 法

**精液希釈液の適合性** 供試精液は人工生産アユおよび海産系養成アユより実験毎に5尾程度から採取したものを混合して用い，また，精液希釈液は表1に示す2種類を使用した。

**1) 希釈液の保存時間** 希釈液AおよびBで精液を100倍希釈し，2℃の冷蔵庫で保存し，一定時間毎にその一部を顕微鏡下に取り出して運動の静止を確認した後，1滴の淡水を滴下し運動性を確認した。

表1 精液希釈液の組成

内 容 物	A <sup>1)</sup>	B <sup>2)*</sup>
NaCl (g)	7.5	7.61
KCl (〃)	0.48	0.84
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (〃)	—	0.34
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (〃)	—	0.13
NaHCO <sub>3</sub> (〃)	0.02	0.21
pH	6.9~7.0	7.8~7.9

蒸留水 1ℓ 当り

\* 文献2)を参考にし求めた。

2) 希釈精液の受精能力 希釈液 A, B で100倍希釈した精液 2 ml を 9 cm フラットシャーレに注入し, 15W 殺菌灯 1 基で 30cm 上方から 7,000erg/mm<sup>2</sup> の紫外線照射を行ったものおよび同量の無処理希釈精液を用い, 卵 0.5 g と媒精後, 16.0~17.0°C の流水中で管理し, 6 日目の生卵率を求めた。なお, 実験は 2 回行った。

3) 紫外線照射精液の保存時間 希釈液 A で100倍希釈した精液 2 ml を 9 cm フラットシャーレに注入し, 104, 49 および 36erg/mm<sup>2</sup> · sec の強度の紫外線を 3,000, 6,000, 9,000 および 12,000erg/mm<sup>2</sup> 照射した。精液は冷蔵庫で保存し, 一定時間毎にその一部を顕微鏡下に取り出して運動の静止を確認した後, 1 滴の淡水を滴下し運動性を確認した。

4) 50倍希釈精液の有効性 希釈液 B で50倍希釈した精液 2 ml ずつを 9 cm フラットシャーレ 2 個に注入し, 15W 殺菌灯 1 基で 30cm 上方から 7,000erg/mm<sup>2</sup> の紫外線照射を行った。そのうち 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 および 2.0 ml を用い, 卵 0.5 g と媒精後, 16.0~17.0°C の流水中で管理し, 8 日目の発眼率および半数体症候群出現率を求めた。

有効紫外線照射量 供試精液および卵は海産系養成アユから採取した。精液は 5 尾程度から採取したものを混合して用い, 希釈液 B で100倍希釈した。9 cm フラットシャーレに 2 ml ずつ注入し, 15W 殺菌灯を用い, 102 および 42erg/mm<sup>2</sup> · sec の強度の紫外線を 1,500, 3,000, 4,500, 6,000, 7,500, 9,000 および 12,000erg/mm<sup>2</sup> 照射した。これらの紫外線照射精液を卵 0.5 g と媒精し, 16.0~17.0°C の流水中で卵管理を行い, 発眼率および半数体症候群出現率を求めた。なお, 2 種類の紫外線強度の実験には別個体の精子および卵を用いた。

## 結果および考察

精液希釈液の適合性 1) 希釈液の保存時間 表 2 に希釈精液の保存時間と精子の運動性を示した。希釈液 A は 90 分まで, B は 180 分まで強い運動性が保持され, B では 24 時間後も運動性を有していた。このことから長時間保存には B が適すると思われるが, 実用的には 90 分以内に紫外線照射等は終了するので A, B とも精液希釈液として適合性があると思われる。

表 2 希釈精液の保存時間と精子の運動性

保存時間	0分	15分	30分	60分	90分	120分	180分	24時間
A	++	++	++	++	++	+	+	-
B	++	++	++	++	++	++	++	+

++: 強い運動性, +: 弱い運動性, -: 運動性なし

2) 希釈液の受精能力 表 3 に希釈精液別の生卵率を示した。2 回とも B が A より高い生

卵率を示し、特に無処理の生卵率は90%以上と高く、精液希釈液としてはBの方がより有効であると思われる。また、紫外線照射により生卵率はやや低くなる傾向がみられた。

表3 希釈精液別生卵率(%)

希釈液	1回目		2回目	
	無処理	紫外線処理	無処理	紫外線処理
A	88.1	63.5	77.1	77.6
B	93.6	75.9	96.5	88.0

### 3) 紫外線照射精液の保存時間

紫外線強度毎の精液の保存時間と精子の運動性を表4に示した。どの紫外線強度においても照射量が増加するに従い精液の保存時間は短くなった。また紫外線強度が49および36 $\text{erg}/\text{mm}^2 \cdot \text{sec}$ は104 $\text{erg}/\text{mm}^2 \cdot \text{sec}$ に比べ、高い照射量での保存時間が短くなり、弱い線量での長時間照射は強い線量での短時間照射より保存時間が短くなる傾向がみられた。全体的にみて6,000 $\text{erg}/\text{mm}^2$ の照射量では紫外線照射後20分以内に、9,000 $\text{erg}/\text{mm}^2$ 以上では10分以内に媒精する必要があると思われる。

表4 紫外線照射精液の保存時間と精子の運動性

紫外線強度 ( $\text{erg}/\text{mm}^2 \cdot \text{sec}$ )	照射線量 ( $\text{erg}/\text{mm}^2$ )	保存時間(分)			
		0	10	20	30
104	0	++	++	++	++
	3,000	++	++	++	++
	6,000	++	++	++	+
	9,000	++	++	+~++	+
	12,000	++	++	±	±
49	0	++	++	++	++
	3,000	++	++	++	++
	6,000	++	++	++	±
	9,000	++	++	+	-
	12,000	++	+	±	±
36	0	++	++	++	++
	3,000	++	++	++	++
	6,000	++	++	++	±
	9,000	++	+	±	-
	12,000	+	±	+	-

運動性：++ 70~100%，+ 30~70%，± 10~30%，- 0%

4) 50倍希釈精液の有効性 図1に希釈精液量と発眼率の関係を示した。卵1gに対する50倍希釈精液量0.1~4.0mlの間では発眼率73.0~80.1%で大差がなく、いずれも半数体症候群出現率は100%であった。このことから7,000 $\text{erg}/\text{mm}^2$ の紫外線照射では50倍希釈も有効であり、卵1gに対する希釈精液必要量も0.1ml以下でよいと思われたが、今後、最少必要量をさらに検討する必要がある。

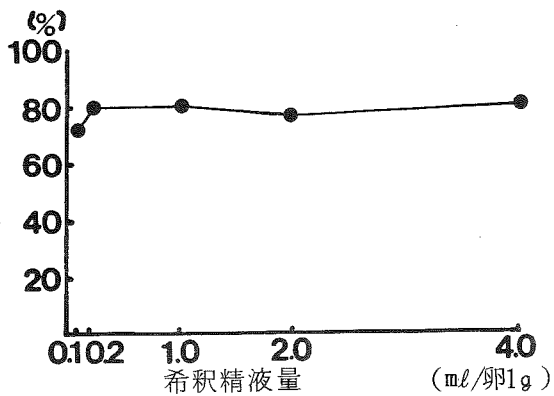


図1 50倍希釈精液量と発眼率の関係

●—●: 発眼率

### 有効紫外線照射量

図2に102および42  $\text{erg}/\text{mm}^2 \cdot \text{sec}$ 強度の紫外線による各照射量の発眼率および半数体症候群出現率を示した。半数体症候群出現率はいずれの紫外線強度においても1,500  $\text{erg}/\text{mm}^2$ では100%をやや下回り、精子の遺伝的不活化のためには3,000  $\text{erg}/\text{mm}^2$ 以上の照射量が必要であると思われる。発眼率は102  $\text{erg}/\text{mm}^2 \cdot \text{sec}$ の強度では6,000  $\text{erg}/\text{mm}^2$ 以上で良好となり、12,000  $\text{erg}/\text{mm}^2$ でも78.

6%と高率であった。また、42  $\text{erg}/\text{mm}^2 \cdot \text{sec}$ の強度では3,000~12,000  $\text{erg}/\text{mm}^2$ で88.3~94.2%とほぼ一定であった。精子の遺伝的不活化を確実にを行うためには精子が運動性を失わない範囲でより高い照射量を用いたほうが安全であると思われる。今回の実験では適正照射量を求めることはできなかったが、102  $\text{erg}/\text{mm}^2 \cdot \text{sec}$ の強度の例からみて6,000~12,000  $\text{erg}/\text{mm}^2$ の紫外線照射が適当と考えられる。

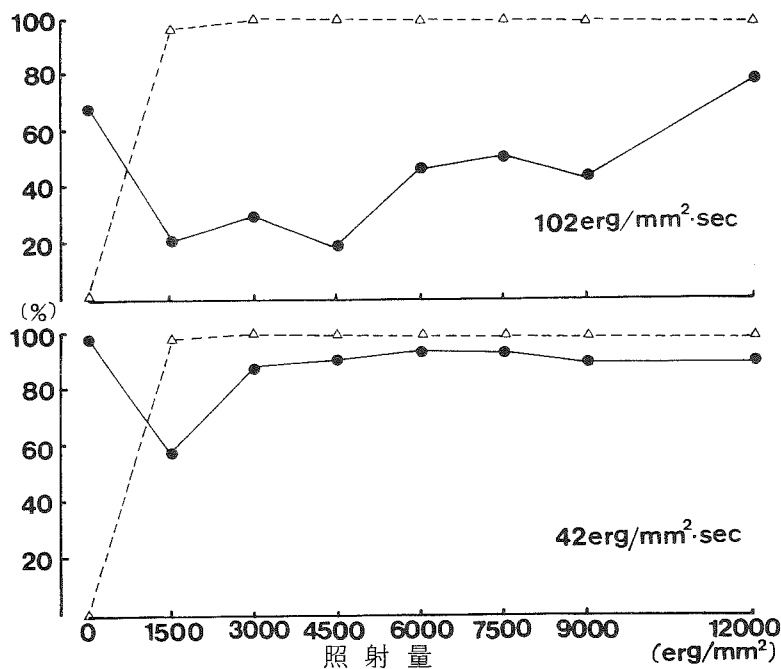


図2 各照射量の発眼率および半数体症候群出現率

●—●: 発眼率 △---△: 半数体症候群出現率

## 2 低温処理による染色体の倍数化条件の検討

遺伝的に不活化した精子で媒精した卵を正常に発生させるためには低温処理等により卵の染色体を倍化させる必要がある。低温処理による染色体の倍数化条件として処理を開始するまでの時間、処理の継続時間および処理温度等があげられるが、今回は処理を開始するまでの時間について検討した。また、アユ卵においても卵の過熟化にともない受精率が低下することが知られている<sup>3)</sup>。そこで卵の過熟が雌性発生2倍体の作出率に及ぼす影響についても検討し、参考のため室温下における卵の保存時間を調べた。

### 材 料 お よ び 方 法

**低温処理開始時間** 供試精液および卵は海産系養成アユから採取した。精液は数尾から採取したものを混合して用い、希釈液Bで100倍に希釈した。7,000erg/mm<sup>2</sup>の紫外線照射した希釈精液と無処理希釈精液2mlずつを同一個体から採取した卵0.5gずつを媒精し、2、4、6、8および10分後に1°C、60分間の低温処理を行った。媒精時の水温は16.1°Cで、低温処理後16.0~17.0°Cの流水中で管理し、5日目の卵の生残率を求めた。

**卵の過熟が雌性発生2倍体の作出率に及ぼす影響** 供試精液および卵は海産系養成アユから採取した。精液は数尾から採取したものを混合して用い、希釈液Bで100倍希釈した。2例の試験を行い、実体顕微鏡下で過熟のステージを判別<sup>3)</sup>した後、9,000erg/mm<sup>2</sup>の紫外線照射した希釈精液2mlで卵0.5gと媒精し、そのまま卵管理した半数体区と5~6分後に0.4~0.5°Cならびに0.7~1.2°Cで60分間処理した低温処理区を設けた。卵管理は16.0~17.0°Cの流水中で行い、8日目の卵の生残率を調べた。

**卵の保存時間** 海産系養成アユから採取した過熟ステージIの卵1gずつを9cmプラスチックシャーレに採り蓋をした後、室温下(17.4~19.0°C)で保存し、120分まで10分毎にその都度採取した0.1mlの精液を用いて媒精した。卵管理は16°Cの流水中で行い、6日目の卵の生残率を求めた。

### 結 果 お よ び 考 察

**低温処理開始時間** 図3に低温処理開始時間毎の卵の生残率を示した。紫外線処理精子で媒精したものは無処理精子で媒精したものに比べ生残率が劣った。いずれにおいても、最も高い生残率を示したのは媒精後6分後に低温処理した場合であり、紫外線照射精子で64.1%、無処理

精子で87.0%であった。このことから媒精水温が16°C程度では6分後に低温処理すればよいと思われる。

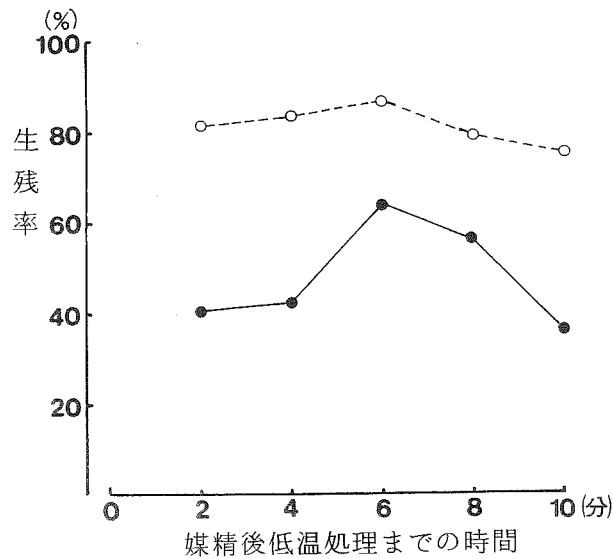


図3 媒精後低温処理までの時間毎の生残率の変化  
 ●—●: 紫外線処理精子  
 ○---○: 無処理精子

**卵の過熟が雌性発生2倍体作出率に及ぼす影響** 図4に卵の過熟化に伴う生残率の変化を示した。半数体区の生残率は受精時の卵の過熟の影響を表していると考えられるが、例1, 2とも過熟のステージが進むとともに低下する傾向がみられ、例1ではステージI~IIで80%以上あったものがステージIIIでは38.4%に低下した。このことから少なくともステージIIまでの卵と媒精する必要があると思われた。しかし、低温処理後の卵の生残率と過熟のステージとの間には必ずしも一定の傾向はみられず、今後、さらに卵質と低温耐性の関係を検討する必要があるだろう。

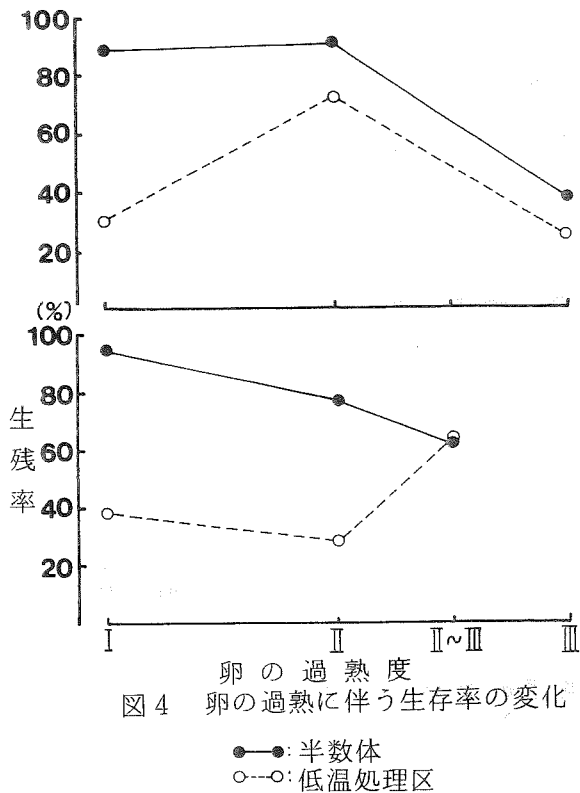


図4 卵の過熟に伴う生存率の変化  
 ●—●: 半数体  
 ○---○: 低温処理区

**卵の保存時間** 図5に卵の保存時間に伴う生残率の変化を示した。120分までの生残率はすべて90%以上となり、120分後でも96.0%と高率であった。このことから17~19℃程度の室温下でも2時間までは十分保存可能であると思われる。

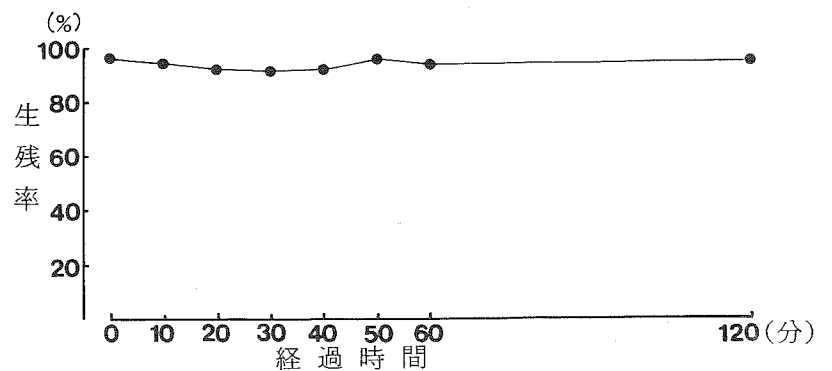


図5 室温下の卵の保存時間

### 3 雌性発生2倍体魚の作出と飼育特性

養成親魚を用いて雌性発生2倍体の作出を試み、作出魚の飼育特性を把握するため、ふ化仔魚の絶食半減日数を求めるとともに、全長11mm(ふ化後15日目)の仔魚を用いて成長試験を行った。

#### 材料および方法

**雌性発生2倍体魚の作出** 供試精液および卵は海産系養成アユから採取した。精液は数尾から採取したものを混合して用い、希釈液Bで100倍に希釈した。4個の9cmフラットシャーレに2mlずつ分注し、振とうしながら7,000~9,000erg/mm<sup>2</sup>の紫外線照射を行い過熟ステージI~IIの卵15.2~48.0g(卵数31,900~100,800粒)と媒精した。染色体の倍数化は媒精5~6分後に0.2~2.5℃、60分間の低温処理により行った。なお、一部の卵は半数体症候群出現率により紫外線照射の適否を判定するために低温処理は行わなかった。16.0~17.0℃の流水中で卵管理を行い、発眼率、半数体症候群出現率および一部のふ化仔魚の奇形率を調べた。

**ふ化仔魚の絶食半減日数** 供試魚は7,000~9,000erg/mm<sup>2</sup>の紫外線照射した精子で媒精後5~6分後に0.7~2.5℃、60分間の低温処理を行い作出した雌性発生2倍体ふ化仔魚を3群(A~C)および正常2倍体ふ化仔魚を1群用いた。アレン処方的人工海水(比重1.0050)を満たした2ℓビーカーに1群当り36~41尾ずつ放養した。水温は15.6~17.7℃で通気は行わなかった。

**仔魚期における成長実験 1) 試験期間** 昭和61年12月15日から62年3月18までの94日間。

**2) 試験区** 昭和61年11月12日に海産系養成親魚から採卵し、紫外線照射(9,000erg/mm<sup>2</sup>)による精子の遺伝的不活化と低温処理(媒精5~6分後より0.7~1.0℃で60分間処理)による第2極体の放出阻止によって作出した雌性発生2倍体アユ(雌性発生区)および通常どおり媒精した正常2倍体アユ(対照区)を用いた。なお、上記紫外線照射精子で媒精し、低温処理を行わな

かった卵のすべてに半数体症候群がみられ、雌性発生区の雌性発生誘起が推定された。両区ともふ化後15日目の仔魚を2,000尾ずつ用い、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た。

3) 飼育環境 飼育池は池水容量0.6m<sup>3</sup> (1×2 m) の屋内コンクリート池でアレンの人工海水 (比重1.0050~1.0065) を用い、換水率13~25回/日の循環濾過方式で飼育した。飼育水温は14.5~16.6°C (平均15.7°C) で最高照度は2,000luxであった。

4) 魚体側定 両区とも開始時に50尾、30・60日目に30尾および終了時に100尾について全長、体重を測定し、終了時には外観異常を調査した。へい死魚は37日目以降毎日取り上げ計数し、終了時には生残魚の全数を計数した。

### 結果および考察

雌性発生2倍体魚の作出 表5に13例の作出結果を示した。すべての例で低温処理を行わなかった卵の半数体症候群の出現率は100%で発眼率も79.1~96.1%(平均89.7%)と高く、7,000~9,000erg/mm<sup>2</sup>の紫外線照射は適当であったと考えられる。低温処理した卵の発眼率は0~91.4%(平均44.0%)とバラツキが多く、特に例2, 3, 7~9で極めて低かった。また、紫外線照射が適当と考えられたにもかかわらず、ふ化仔魚の奇形率は正常2倍体の0.4%に比べ雌性発生魚では12.5~54.9%と高く、さらに処理条件の検討が必要と思われる。今回の結果から養成親魚

表5 雌性発生2倍体作出結果

	照射線量 (erg/mm <sup>2</sup> )	低温処理まで の時間 (分)	低温処理 温度 (°C)	半数体 生残率 (%)	半数体症候 群出現率 (%)	低温処理卵 の生残率 (%)	ふ化仔魚 奇形率 (%)
1	9,000	5	0.7~1.0	93.5	100	88.3	54.9
2	9,000	5	0.7~1.0	88.6	100	1.3	—
3	8,000	6	0.7~1.0	94.2	100	3.9	—
4	9,000	6	0.7~1.0	83.2	100	45.5	—
5	7,000	5	1.3~2.5	96.1	100	91.4	31.6
6	7,000	6	0.6~1.5	87.7	100	71.8	—
7	9,000	5	0.6~1.0	90.4	100	0	—
8	9,000	6	0.6~0.7	79.1	100	0	—
9	8,000	5	0.2~1.0	93.3	100	0	—
10	7,000	6	1.0	85.0	100	54.1	—
11	7,000	5	0.7~0.9	94.3	100	71.9	46.3
12	9,000	6	1.0~1.5	94.7	100	88.0	—
13	7,000	6	0.3~0.6	86.2	100	56.2	12.5
平均	—	—	—	89.7	100	44.0	36.3
正常 2倍体	—	—	—	—	—	—	0.4



による雌性発生2倍体の作出も可能性であると思われたが、作出率を向上させるためには採卵適期を含めた低温処理に耐えうる卵質の検討が必要であろう。

**ふ化仔魚の絶食半減日数** 図6にふ化仔魚の絶食後の生残率を示した。供試魚はできるだけ正常なものを選んだが、A群で8尾、C群で5尾の奇形魚が含まれていた。絶食半減日数はA群で10.4日、B群で13.4日、C群で14.7日および正常2倍体で12.8日とバラツキはみられたが、雌性発生2倍体の絶食半減日数の低下はなく、正常2倍体と同様な絶食に対する耐性を有するものと思われる。

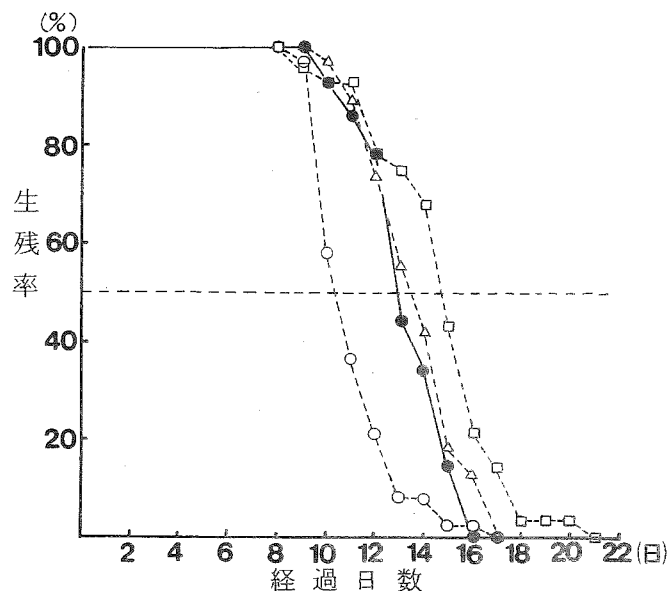


図6 正常2倍体および雌性発生2倍体アユふ化仔魚の絶食後の生残率

●—●: 正常2倍体      ○—○: 雌性発生2倍体A  
 ▲—▲: 雌性発生2倍体B      □—□: 雌性発生2倍体C

**仔魚期における成長実験 1) 生残** 図7に示すように生残率は終了時で雌性発生区が70.4%、また対照区で78.3%となり雌性発生区でやや劣るものの全長11mmサイズからの飼育としては良好であったと思われる。また、37日目以降終了時までの58日間のへい死尾数は雌性発生区で17尾、対照区で51尾と少なく、へい死は飼育初期に集中したものとされた。

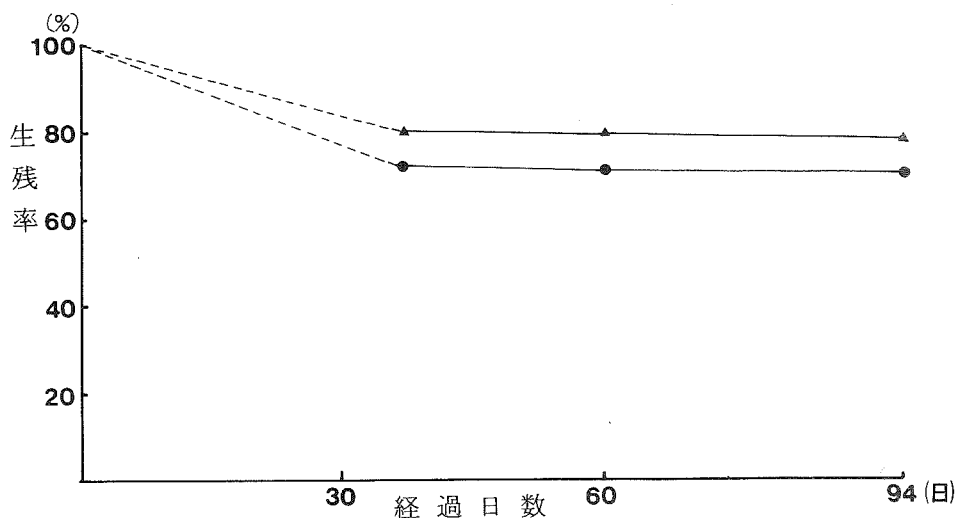


図7 生残率の推移

●—●: 雌性発生2倍体      ▲—▲: 正常2倍体

2) 成長 図8に示すように全長、体重とも60日目までは対照区が優れていたが、終了時では雌性発生区で全長52.2mm、体重756.1mg、また対照区で全長50.8mm、体重644.4mgとなり、雌性発生区でやや優れた。この原因として給餌量を両区で同一としたため生残率の高い対照区で飼料不足となり成長が延滞した可能性が考えられ、両区に本質的な成長の差はないものと思われる。

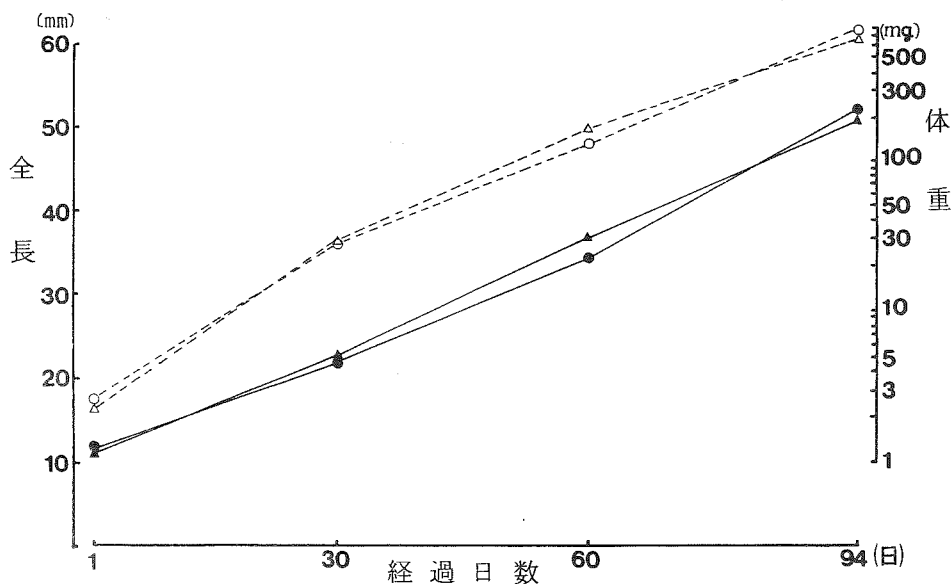


図8 成長の推移

雌性発生2倍体 ●—●: 全長 ○—○: 体重  
 正常2倍体 ▲—▲: " △—△: "

3) 体形異常 表6に示すように外観異常出現率は雌性発生区で10%、対照区で8%と低かった。部位別では両区を通じて咽峡突出、尾柄変形、体側湾および短軀と通常の種苗生産過程で出現する体形異常がみられたが、雌性発生区で片方の眼球が矮少化したものが4%みられ、今後、染色体操作との関連で検討する必要がある。

以上のことから、全長11mmからの仔魚期の飼育では生残、成長とも正常2倍体に比べ特に劣ることはないと思われる。

表6 終了時における外観異常出現率

区	雌性発生	対照
検査尾数(尾)	100	100
外観異常出現率(%)	10	8
外観部位別出現率(%)		
頭部短縮		
咽峡突出	1	
下顎不整合		
鰓蓋欠損		
背鰭欠損		
背鰭過形成		
尻鰭基底湾入		
尾柄変形	4	7
尾鰭發育不全		
胸鰭		
腹鰭		
腹鰭過形成		
体上下湾		
体側湾	1	
短軀		1
眼球矮少	4	

## 文 献

- 1) N. Taniguchi, A. Kijima, J. Fukai and Y. Inada: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 49-53(1986).
- 2) 森沢正昭: 遺伝, **38**, 18-23 (1984).
- 3) 日本水産学会編: 魚類の成熟と産卵, 水産学シリーズ6, 恒星社厚生閣, 東京, 1974.