

紫外線照射によるサケ目魚類4種の雌性発生誘起

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	小野里, 坦 山羽, 悦郎
巻/号	49巻5号
掲載ページ	p. 693-699
発行年月	1983年5月

紫外線照射によるサケ目魚類 4 種の雌性発生誘起

小野里 坦・山羽悦郎

(1982年9月3日受理)

Induction of Gynogenesis with Ultraviolet Rays in Four Species of Salmoniformes

Hiroshi ONOZATO* and Etsuro YAMAHA*

UV irradiation methods for inducing gynogenesis in Salmoniformes are described. Milt was diluted with seminal plasma of chum salmon in a volume ratio of about 1:100, and irradiated with a sterilizing lamp. In order to spread the diluted milt throughout the bottom of plastic Petri dish to a depth of 0.1 mm, the hydrophobic nature of the surface was turned hydrophilic using an ion spattering equipment. When milt was irradiated with doses varying from 80 to 14,400 ergs/mm² at the rate of 40 ergs/mm²/sec, the survival rates of embryos which had been inseminated with irradiated milt, showed a typical "Hertwig effect" in four species used in the present study, *Osmerus eperlanus mordax*, *Salvelinus leucomaenis*, *Salmo gairdneri* and *Oncorhynchus masou*. Fertilization rates were not affected by irradiation at doses ranging from 40 to 4,800 ergs/mm² but sperms lost their fertilizing ability completely at a dosage of 14,400 ergs/mm². The most harmful dosage was 600 ergs/mm², at which the survival rates were only 7.3 per cent in *O. eperlanus mordax* (3 days after insemination), 42.9 per cent in *S. leucomaenis* (29 days), 2.6 per cent in *S. gairdneri* (18 days) and 40.1 per cent in *O. masou* (25 days), while the survival rates of unirradiated groups were more than 90 per cent the same number of days after insemination respectively. Better survival rates were observed at higher doses. All embryos showed haploid syndromes at doses more than 2,400 ergs/mm² and their haploidy was confirmed by chromosome observations. It was elucidated that the inducing rates of gynogenesis using ultraviolet rays were comparable to those in irradiation of ionizing rays.

雌性発生が性の統御や純系の作成において、それに要する時間を著しく短縮するうえで有用であることはすでに指摘した。^{1,2)} 魚類の雌性発生誘起はその殆んどが、 γ 線やX線といった電離放射線を用いてなされてきた。³⁾ 電離放射線は透過力が優れているために多量の精液に均一な線量を照射することが可能である。しかし、安全性の面から大規模な施設を要するので、これらの放射線を利用できる地域は著しく限定される。電離放射線と同様紫外線によっても雌性発生が誘起されることは良く知られている。^{4,5)} 紫外線は簡単な装置で照射が可能なので手軽に扱うことができる。しかし、透過力が γ 線やX線と比較して極端に小さいため全ての精子に均一な線量を照射することが困難である。それ故これまで魚類で紫外線を用いて雌性発生を誘起した報告は非常に少ない。⁵⁻⁷⁾ 特に線量を段階的に変えることによって、初めて解析が可能となる Hertwig 効果についての研究は、著者らの知る限りメダカの報告⁸⁾を除いてはない。

紫外線を用いて雌性発生を誘起するためには精液を希

釈し、しかもこれを均一に薄くひき伸ばす必要がある。

サケ目魚類の精子は生理的塩類溶液中で活性化し短時間のうちに運動を停止してしまうため、これを希釈液として使用することができない。また、一般に卵径が大きいため他の魚種に比較して媒精のために多量の精液を必要とする。従ってサケ科魚類の雌性発生誘起に紫外線を利用する場合には、精液の希釈法を確立することと、比較的少量の希釈精液を一定の厚さで薄くひき伸ばす方法を確立することが当面の課題である。著者らは、これらの問題に対しほぼ満足できる方法を見出すことができたので、ここに紹介するとともに Hertwig 効果を指標にして雌性発生を誘起するための有効な線量についても検討をおこなったので、得られた結果について報告する。

材料および方法

供試魚 本実験に用いた魚種はキュウリウオ *Osmerus eperlanus mordax*, イワナ *Salvelinus leucomaenis*, ニジマス *Salmo gairdneri* およびサクラマス *Oncorhynchus*

* 北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

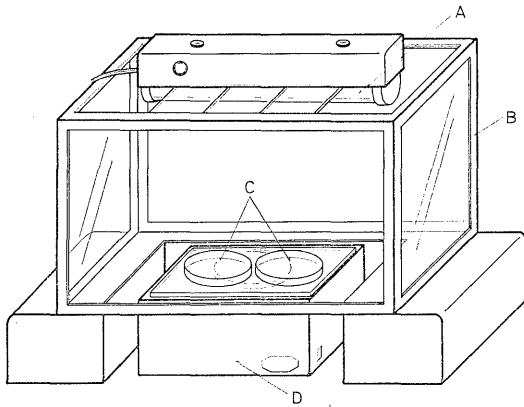


Fig. 1. Schematic diagram of the irradiation apparatus of ultraviolet ray. A; Ultraviolet lamp, B; Aquarium, C; Petri dish, D; Shaker.

masou の 4 種である。キュウリウオは北海道山越郡シラリカ川において産卵のために溯上してきた個体を投網により捕獲した。イワナおよびニジマスは北海道大学水産学部七飯養魚実習施設において飼育中の個体を用いた。イワナは新潟県魚野川産のもので、当施設で飼育 2 代目である。サクラマスは北海道立水産孵化場森支場で飼育中のものを用いた。

紫外線照射装置 Fig. 1 に示したように、ガラス水槽 (60×30×30 cm) を利用した。底面と前面を打ち抜き、水槽上面の中央部に紫外線ランプ (GL-15 東芝製) 1 灯をとりつけ、底には振盪器 (VS-2 サクラ精機製) をセットした。試料台からランプの中心までの高さは 30 cm とした。照射中は振盪器を作動させ、前面を暗幕で覆った。

線量測定 線量測定には U. V. Radiometer (UVR-254, Topcon 製) を使用した。

シャーレの親水化処理 照射時の希釈精液の容器として浅型の直径 9 cm のスチロール製シャーレ (極東製薬 KK 製) を用いた。本シャーレは表面が疎水性であるため、イオンパッタ装置 (JFC-1100 日本電子製) を用い、0.5 kV, 15-20 mA の条件で 5 分間親水化処理を行った。その後、希釈精液が表面張力により壁面に付着するのを防ぐため、脱脂綿でふいて隅を再び疎水性に戻した。

精液の希釈 希釈液としてサケの精漿を用いた。精液を 8,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して得られた精漿を -20°C で凍結保存し、適宜溶解して使用した。精液の希釈率はいずれの魚種についても 100 倍と一定にした。

精液の紫外線照射 0.5 ml の希釈精液をシャーレに採り、これを深さが 0.1 mm になるよう底面全面に拡げた。キュウリウオとニジマスについては照射台の中心に

1 個のシャーレを置いて、他の 2 種については中心点をさばんで左右に 2 個のシャーレを置いて照射した。照射時間は 2 秒から 405 秒間の範囲とした。それぞれの魚種の精液に対する照射時間は、Table 1 に示した。なお、非照射希釈精液で媒精した卵を対照とした。照射に先立ってエネルギー量を安定させるため 10 分以上の予備点灯を行なった。

媒精および媒精卵の培養 卵は搾出法により採取し、媒精は乾導法によった。キュウリウオの卵は水中に敷いたガラス繊維に付着させ、2 l 入りの小型水槽中で室温下で (9-15°C) 培養した。サケ科 3 種の卵は、水槽に浮かべた籠の中で水温 10°C 前後で培養した。

染色体標本の作成 キュウリウオは媒精後 3 日目の胚について、サケ科 3 種については媒精後 10-20 日目の胚について小刻法⁹⁾ により作成した。

結 果

点灯後時間経過にともなうエネルギーの変化 紫外線ランプを点灯し紫外線のエネルギーが飽和点に達した後、20 秒間、1 分間または 1 時間それぞれ消灯して再び点灯し、エネルギーが飽和点に達するまでの時間を比較した (Fig. 2)。20 秒間消灯した場合は点灯後わずか 20 秒間で飽和点 (40 ergs/mm²/sec) に達した。1 分間消灯した場合は点灯 2 秒後すでに 37 ergs/mm²/sec に達し、1 分後に飽和点に達した。一方、1 時間消灯の後点灯した場合は、点灯 2 秒後わずか 19 ergs/mm²/sec でその後時間経過とともに上昇し、4 分後に飽和点に達した。このとき点灯直後から 1 分間のエネルギー量は約 1,500 ergs/mm² で、飽和時の 1 分間のエネルギー量 2,400 ergs/mm² の約 60% に相当した。飽和時のエネルギーは電圧によって変動し、測定日によって 37~42 ergs/mm²/sec の間で変動した。

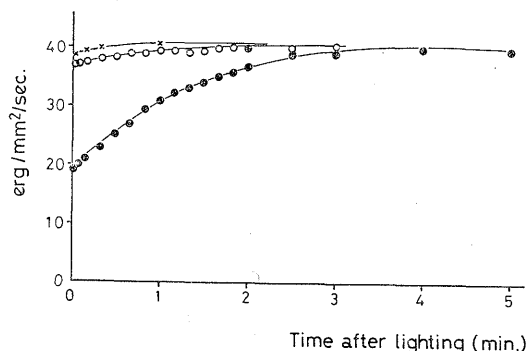


Fig. 2. Changes of the energy of the ultraviolet rays after lighting a lamp which had been put off for 20 seconds (x), one minute (O) or one hour (●).

Table 1. Fertilization rates and survival rates of eggs which were inseminated with milt exposed to UV rays

Exposure (sec)	<i>O. eperlanus mordax</i>		<i>S. leucomaenis</i>		<i>S. gairdneri</i>		<i>O. masou</i>									
	Fertilization* ¹ %	Survival* ² %	Fertilization* ³ %	Survival* ⁴ %	Fertilization* ³ %	Survival* ⁵ %	Fertilization* ³ %	Survival* ⁶ %								
0	18/20	90	322/359	89.7	34/36	94.4	70/73	95.9	25/25	100	132/134	98.5	5/5	100	309/320	96.6
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	30/33	90.9	45/48	93.8	—	—	—	—	—	—	—	—
5	20/20	100	331/374	88.5	—	—	—	—	24/25	96	161/200	80.5	—	—	—	—
8	—	—	—	—	32/34	94.1	46/52	88.5	—	—	—	—	—	—	—	—
15	18/20	90	28/383	7.3	30/34	88.2	33/77	42.9	25/25	100	4/155	2.6	5/5	100	65/162	40.1
30	—	—	—	—	30/34	88.2	45/61	73.8	—	—	—	—	—	—	—	—
45	16/20	80	217/334	65.0	—	—	—	—	25/25	100	79/143	55.2	—	—	—	—
60	—	—	—	—	32/34	94.1	67/70	95.7	—	—	—	—	—	—	—	—
90	17/20	85	356/431	82.6	—	—	—	—	24/24	100	74/119	62.2	—	—	—	—
120	—	—	—	—	31/34	91.2	71/75	94.7	—	—	—	—	—	—	—	—
135	5/20	25	5/384	1.3	—	—	—	—	24/25	96	104/154	67.5	—	—	—	—
240	—	—	—	—	1/34	2.9	53/54	98.1	—	—	—	—	—	—	—	—
360	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
405	0/20	0	1/389	0.3	—	—	—	—	0/26	0	92/107	86.0	—	—	167/176	94.9

*¹ Eggs were examined 10 hours after insemination.*² Eggs were examined 3 days after insemination.*³ Eggs were examined 12-15 hours after insemination.*⁴ Eggs were examined 29 days after insemination.*⁵ Eggs were examined 18 days after insemination.*⁶ Eggs were examined 25 days after insemination.

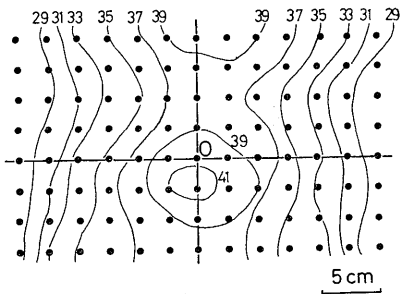


Fig. 3. Horizontal distributions of the energy of ultraviolet rays (ergs/mm²/sec) on the surface of the stand. Measuring points are shown by dots. O; Center of the stand.

照射台におけるエネルギーの水平分布 照射台の位置による紫外線エネルギーの違いを知るために、30 cm × 17.5 cm の範囲の 104 点におけるエネルギーを測定した (Fig. 3)。中心点におけるエネルギーは 40 ergs/mm²/sec で、中心から左右に離れるにつれエネルギーが減少し、中心から 10 cm 離れた位置では約 20% 低下し 33 ergs/mm²/sec であった。一方、前後方向の位置の違いによるエネルギーの変化は比較的小さかった。

照射線量と受精率 種々の線量を精子に照射したときの受精率を Table 1 に示した。120 秒間以内の照射では、いずれの魚種においても受精率に影響はみられなかった。しかし、キュウリウオでは 90 秒間照射までは 80% 以上の受精率を示していたものが、135 秒間照射では受精率は 25% まで低下した。一方、ニジマスでは 135 秒間照射によっても受精率に影響はみられなかった。しかし、360 秒間以上の照射では、いずれの魚種においても受精は起らなかった。

Hertwig 効果 精子に対する紫外線の照射時間を変えた時の生残率を Table 1 および Fig. 4 に示した。生残率を求めた時の媒精後の日数は魚種によってそれぞれ異なるが、生残率と照射時間との間に全種に共通した傾向が認められた。すなわち、対照群はいずれの種においても 90% 以上の高い生残率を示し、5 秒間以内の照射でも生残率は殆んど影響を受けないか、または受けてもわずかであったが、照射時間がさらに増加すると生残率は急激に低下し、15 秒間照射で生残率は著しく低下した。特にキュウリウオとニジマスでは、90% 以上の卵が死亡した。イワナとサクラマスについても 60% 近くの卵が死亡し、全照射群の中で最も生残率が低かった。照射時間をさらに増すと生残率は逆に回復し、60 秒～120 秒間照射では 60% 以上が生き残った。特にイワナでは、60 秒照射群の卵は媒精後 29 日目においても 95.7% が生き残り、対照群と殆んど変わらないまでに回復した。

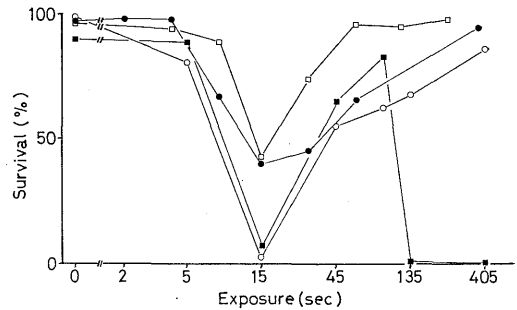


Fig. 4. Survival of eggs inseminated with irradiated milt. ■; *O. eperlanus mordax*, □; *S. leucomaenis*, ○; *S. gairdneri*, ●; *O. masou*.

30 秒間または 45 秒間照射では 15 秒照射群に比較するといずれの魚種においても明らかに生残率は回復しているものの、60-120 秒間照射群に比較すると、生残率はいずれも低かった。サケ科 3 種の未受精卵は実験期間中 86% 以上が生き残った。一方、キュウリウオの未受精卵はその殆んどが 24 時間以内に死亡した。キュウリウオの場合未受精卵を除くことが困難なため、未受精卵の多い群では死卵の出現とともに水質が急激に悪化した。そのため受精卵の殆んどが死亡した。30 秒以上の照射群に出現したサケ科 3 種の胚は、対照群が孵化を開始する前後から急激に死亡率が高まり、一部は孵化後間もなく、殆んど胚は孵化に至らず死亡した。

高線量域に出現した胚の形態と倍数性 30 秒間以上照射した群の胚のうち、対照群が孵化を開始した時期のものをイワナ、ニジマス、サクラマスの順で Pl. Figs. 2, 5, 8 に示した。これらの胚はいずれも同時期の対照群 (Pl. Figs. 1, 4, 7) と比較して、体は矮小かつ扁平で、小眼、小頭、体軸の彎曲等の典型的な半数体症候群を示した。これらの特徴に加え多くの胚で大型の耳胞が目立った。キュウリウオの対照群は媒精後 10 日目に孵化を開始した。45 秒間以上照射した群の胚もサケ科魚類と同様矮小で、卵黄の吸収程度が対照群に比較して著しく劣っていた。少なくとも 60 秒間以上照射した胚の染色体数は、イワナで 42 (Pl. Fig. 3)、ニジマスで 30 (Pl. Fig. 6)、サクラマスで 33 (Pl. Fig. 9) で、明らかな半数体胚となっており、これらの胚は雌性発生により生じたことを示していた。一方、キュウリウオでは染色体数 27 を示す核板が多数観察されたが、その他に 28 を示す核板も観察された。対照群の染色体数を決定するに足る十分な数の良好な核板を得ることができなかったため、いずれの染色体数が半数体であるかを決定するには至らなかった。

考 察

本研究に用いたサケ目魚類4種すべてにおいて、紫外線照射による明瞭な Hertwig 効果が認められた。すなわち、精子に対する照射線量が増加するにともない、それらの精子で媒精された胚の生残率は低下するが、ある線量を越すと生残率が逆に回復してくる現象である。Hertwig 効果は個々の精子に照射された線量が均一なときに初めて明瞭となって来る。キュウリウオとニジマスでは15秒間の照射を受けた精子で媒精した場合には殆んど卵が死亡し、照射時間を45秒間に増加すると生残率は55%以上まで回復した。サケの精子に γ 線を照射した場合、 $10^{3.5}$ – 10^4 rad という比較的狭い幅の線量域で生残率は最低を示し、それより線量が低くとも高くとも生残率は高くなる。²⁾ したがって、本実験の結果は精子の受けた紫外線線量の均一性が γ 線照射による均一性と比較して劣らないことを示している。受精した胚の最も低い生残率は4種とも15秒間照射時にみられ、魚種による差異は見られなかった。この時の線量は600 ergs/mm² に相当する。この値は、アカガエルの1種 *Rana pipiens*⁶⁾ で最も有害な線量248 ergs/mm²、メダカ *Oryzias latipes*⁶⁾ の270 ergs/mm² に比較すると2倍以上とかなり高い。このような差が種の違いによるものか、あるいは実験条件の違いによるものかは不明であり、今後同一実験条件のもとで多くの種を比較して見る必要がある。なお、キュウリウオにおいては、135秒間照射時に25%もの卵が受精していたにもかかわらず、その殆んどが3日目までに死亡した。その理由は未受精卵の死亡に伴う急激な水質の悪化が原因と考えられる。

本実験に用いたサケ科3種の染色体数は、イワナの近縁亜種アママスで $2n=84$ または 83 、ニジマスで $2n=60$ 、サクラマスで $2n=66$ であることが知られている。¹⁰⁾ 紫外線を60秒間以上照射した時の胚の染色体数はイワナで42、ニジマスで30、サクラマスで33であった。したがって、染色体数は2倍体の丁度半数に相当し、雌性発生によって生じた半数体であることを示している。これらの半数体胚はいずれも典型的な半数体症候群を示しており、サケ科魚類が4倍体性の魚類でありながら、すでに2倍体化しているとの考え²⁾ を支持している。また、照射線量2,400~4,800 ergs/mm² (照射時間1~2分間) で確実に雌性発生が誘起できることが判った。

集計した時期まで生き残った半数体胚の数は最高媒精卵の60~95%に達し、雌性発生の誘起率は γ 線と比較して決して低くはない。 γ 線やX線によって雌性発生を誘起するには10万 rad/h という高エネルギーでも1時間照射する必要がある。一方、紫外線によると、わずか1分間の照射で雌性発生が誘起され、このことも紫外線

のもつ長所といえる。

全ての精子に均一な紫外線線量が照射されるか否かは、希釈精液の精子密度、照射時の希釈精液の深さ、および希釈精液の振盪程度にかかっている。採取した精液は、その色調および粘度から個体間で精子密度に相当の差があると推察された。したがって、あらかじめ精子の密度を測定し精子密度が一定になるよう希釈されるべきであったが、本研究では精液の希釈率を便宜上100倍と一定にし、各希釈精液の密度については測定しなかった。したがって、希釈精液の精子密度と各精子の被照射線量の均一性との関係についてはここでは論議できない。しかし、本実験で用いた希釈率で、いずれの種においても受精率に影響を与えず、かつ明瞭な Hertwig 効果を認めることができたことから実用上は問題ないと考えられる。しかし、厳密な線量が要求される場合には精子密度を一定にする必要がある。次に、希釈精液を如何に薄くひきのばすことができるか否かは容器の親水性にかかわってくる。イオンスバタ装置を利用した親水処理はこの条件を十分満たし、シャーレを軽く傾けるだけで0.5 mlの希釈精液を底面(直径8 cm)全面に容易に拡げることができた。しかし、親水処理に手間を要するので親水性の材質を用いた容器の開発が望まれる。

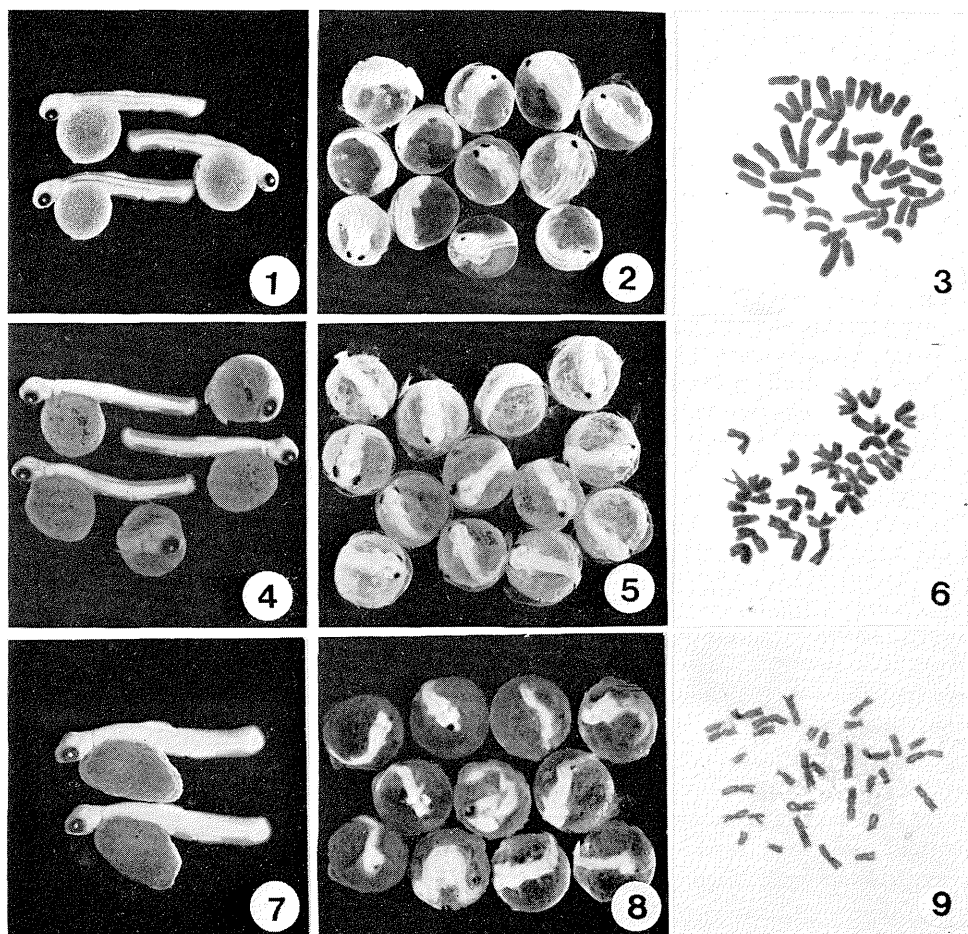
長時間ランプを消灯していた場合、点灯後エネルギーが飽和点に達するまでかなりの時間を要することが判った。また、試料台の位置によっても最大30%のエネルギーの差のあることが判った。したがって、線量の厳密性が要求される場合にはランプ点灯後エネルギーが飽和点に達するのを持って、一定の位置でしかもできるだけ狭い面積で照射する必要がある。照射時間はランプの点滅によらず、点灯したままカバーの開閉によって調節することが望ましい。しかし、雌性発生が誘起される線量は2,400~4,800 ergs/mm² と幅があるので、雌性発生の誘起を目的とした場合にはこのような配慮は必ずしも必要としない。ただし、照射にあたっては5分間以上の予備点灯をすることが望ましい。

なお、サケの精漿は、透明度、精子の活性化の抑制作用、精子の保存性などの点において精液の希釈液として理想的である。サケ精漿は、サケ目以外にもコイ科魚類やその他数魚種の精子に対しても使用可能であったが、この点に関しては別途報告の予定である。

最後に本稿の御校閲を頂いた北海道大学水産学部濱田啓吉教授ならびに山崎文雄助教授に厚くお礼申し上げる。また、材料の提供を頂いた北海道大学水産学部七飯養魚実習施設長久保達郎教授ならびに北海道立水産孵化場森交場職員各位および本実験に協力頂いた北海道大学環境科学研究科研究生西前章子氏に感謝の意を表す。

文 献

- 1) 小野里 坦: 水産育種, **6**, 11-18 (1981).
- 2) 小野里 坦: 日水誌, **48**, 1237-1244 (1982).
- 3) G. C. POGANY: *Develop. Biol.*, **26**, 336-345 (1971).
- 4) H. KAWAHARA: *Develop. Growth, and Differ.*, **20**, 227-236 (1978).
- 5) J. G. STANLEY: *Trans. Am. Fish. Soc.*, **105**, 10-16 (1976).
- 6) K. I. IJIRI and N. EGAMI: *Mut. Res.*, **69**, 241-248 (1980).
- 7) G. STREISINGER, C. WALKER, N. DOWER, D. KNAUBER, and F. SINGER: *Nature*, **291**, 293-296 (1981).
- 8) F. YAMAZAKI, H. ONOZATO, and K. ARAI: *Bull Jap. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 963 (1981).
- 9) G. C. POGANY: *Develop. Growth and Differ.*, **18**, 339-348 (1976).
- 10) 福岡秀雄: サケ・マス類の細胞学的研究, 北海道大学水産学研究科, 学位請求論文, 1973, pp. 13-19.



Explanation of plate

- Fig. 1. Newly hatched alevins of *S. leucomaenis* inseminated with normal milt. 42 days after insemination. $\times 2$.
- Fig. 2. 42 days old embryos of *S. leucomaenis* inseminated with milt irradiated for 60 seconds. $\times 2$.
- Fig. 3. Mitotic metaphase taken from an embryo of *S. leucomaenis* inseminated with milt irradiated for 60 seconds. Chromosome number is 42. $\times 800$.
- Fig. 4. Newly hatched alevins of *S. gairdneri* inseminated with normal milt. 39 days after insemination. $\times 2$.
- Fig. 5. 39 days old embryos of *S. gairdneri* inseminated with milt irradiated for 90 seconds. $\times 2$.
- Fig. 6. Mitotic metaphase taken from an embryo of *S. gairdneri* inseminated with milt irradiated for 90 seconds. Chromosome number is 30. $\times 800$.
- Fig. 7. Newly hatched alevins of *O. masou* inseminated with normal milt. 45 days after insemination. $\times 1.6$.
- Fig. 8. 45 days old embryos of *O. masou* inseminated with milt irradiated for 60 seconds. $\times 1.6$.
- Fig. 9. Mitotic metaphase taken from an embryo of *O. masou* inseminated with milt irradiated for 60 seconds. Chromosome number is 33. $\times 800$.