

ニジマス四倍体との交雑による異質三倍体の作出

沢本良宏・傳田郁夫・小原昌和・細江 昭・河野成実・降幡 充

Production of the allotriploid by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*
tetraploid hybridization

Yoshihiro Sawamoto, Ikuo Denda, Masakazu Kohara,

Akira Hosoe, Narumi Kohno, Mitsuru Furihata

長野県水産試験場では 1992 年頃からニジマス四倍体を固定した系統として交配により維持している。

このニジマス四倍体を用いることにより他魚種との交配のみで異質三倍体を作出することが期待できる。また、交配のみでよいことからさまざまな魚種との交配実験が可能であり、新たな養殖品種開発のスピードアップが可能となる。

本試験は、ニジマス四倍体との交配により異質三倍体が作出されること、および作出された異質三倍体の特性について知見を得たので報告する。

材料と方法

異質三倍体の作出 ニジマス四倍体とイワナ *Salvelinus leucomaenis*、カワマス *Salvelinus fontinalis*、ブラウントラウト *Salmo trutta*、ヤマメ *Oncorhynchus masou*、サケ *Oncorhynchus keta*、およびコレゴヌス *Coregonus lavaretus maraena* との人為交配を行い異質三倍体の作出を試みた。また、比較のためニジマス二倍体とイワナ、カワマス、ブラウントラウトおよびヤマメとの人為交配、同種間の人為交配も行った。

なお、サケおよびコレゴヌスの交配実験はイワナ等の交配実験とは異なる試験とした。コレゴヌス受精卵は 7℃以上の水温では正常に発生しない事が知られていることから、試験に供した受精卵を 2 つに分け、8.0~10.6℃の湧水（試験 1）および 1~5℃の河川水（試験 2）を用いて飼育を行った。

これらの受精卵について発眼率、孵化率及び正常魚浮上率を調査した。サケおよびコレゴヌスの交配実験以外では受精率も調査した。

なお本試験では、発眼率=小眼を含む発眼卵数/供試卵数、孵化率=孵化仔魚数/供試卵数、正常魚浮上率=正常遊泳可能な浮上魚数/供試卵数で示した。

異質三倍体の確認 ニジマス四倍体雌に、ニジマス二倍体性転換雄、カワマス雄およびブラウントラウト雄を用いた人為交配で得られた子（以下それぞれをニジマス三倍体、ニジニジカワ、ニジニジブラとする）の倍数性を確認するために染色体数、赤血球長径および相対 DNA 量を測定した。

染色体数は、受精卵から積算水温約 100℃・日の卵から胚胎を取り出し、Yamazaki ら¹⁾の chopping method を用いて染色体標本を作成し、染色体数を計数した。また、赤血球長径と相対 DNA 量は染色体標本作成に供試した同一群の魚が約 10 g になった時点で各区 5 尾について測定した。個体ごとに採血し、直ちに血液塗抹標本を作成し、残った血液をカルノア液で固定し相対 DNA 量の測定に供試した。相対 DNA 量の測定にはニジマス二倍体 1 尾の DNA 量を基準 (=2) として他の供試個体の相対 DNA を測定した。また、比較のためニジマス四倍体親魚の赤血球直径と相対 DNA 量も測定した。

さらに、異質三倍体に両親の遺伝子が導入されているかをマイクロサテライト PCR 法²⁾を用いて確認した。供試した異質三倍体はニジニジカワ、ニジニジイワ（ニジマス四倍体雌とイワナ雄の交配により作出した子）を、対照魚としてニジマス四倍体、カワマスおよびイワナを用いた。

粗 DNA は尾鰭からキレックス法により抽出し、O. D. 260 値を測定して DNA 濃度を調整して用いた。

PCR 反応液は、Master mixture (Amplitaq Gold、

パーキンエルマー社製) 10 μ L、プライマー4 μ L、DNA抽出液6 μ L、合計20 μ Lとした。なお、用いたプライマー・ペアーはSfo-12 (B. Angers et. al. 1995)を用いた。

DNAの増幅はプレヒート95 $^{\circ}$ C-10分の後、熱変性94 $^{\circ}$ C-40秒、アニーリング60 $^{\circ}$ C-1分、伸長72 $^{\circ}$ C-1分を40サイクル行った。サーマルサイクラーはHB-SP-05型(HYBAID社製)を用いた。

増幅後のDNA産物は3.5%アガロースを用いて電気泳動を行い、DNA断片を検出した。

異質三倍体の特性

①卵の発生速度

供試魚には、ニジニジブラ、ニジマス三倍体、ニジマス四倍体およびブラウントラウトを用い、受精翌日から発眼日、孵化日、浮上日までの日平均水温を累積して積算水温を求めた。日平均水温は1時間ごとに水温を自動水温記録計により測定し、1日24回の測定値の平均とした。なお、試験期間中の日平均水温は5.6~11.3 $^{\circ}$ Cであった。

なお、発眼日は容易に検卵が可能になった日、孵化日は孵化尾数が最も多かった日、浮上日は孵化仔魚のおおむね1/3が浮上した日とした。

②妊性

供試魚は、ニジニジブラ、ニジニジカワおよびニジニジイワの3年魚を用いた。比較のため、全雌ニジマス四倍体、ブラウントラウト、カワマス、イワナ2年魚の成熟も調査した。調査は1998年12月22日に行い、二次性徴の状態により性別および成熟の有無を判定した。二次性徴の現れた成熟個体について精液または卵が搾出可能かどうかを判定した。

また、2001年11月8日に、1996~1998年産のニジニジブラの雄10尾および1998年産のブラウントラウト、ニジマス二倍体の雄各5尾を供試魚として、精子の作出の可否およびGSIを調べた。

③外観的特徴

供試魚は、前項「②妊性」調査と同群を用いた。

外観的特徴は斑紋について判定を行った。判定は虫食い状の斑紋の見られないもの(無斑型)、斑点が見られるもの(斑点型)、わずかに虫食い状の斑紋が見られるもの(中間型)、虫食い状の斑紋が見られるもの(虫食い型)の4つの型に分類した。

④成長・生残

試験区は1998年秋に作出したニジニジブラ、全雌ニジマス四倍体、全雌ニジマス三倍体、ブラウントラウトの4区とした。第I期は各区120尾を供試し、試験開始時の平均体重はニジニジブラ、全雌ニジマス四倍体および全雌ニジマス三倍体の3区は3.2g、ブラウントラウトは2.4gであった。試験は1999年

9月6日から2000年2月21日までの24週間行い、4、8、16、20および24週に総魚体重の測定と生残尾数の計数を行った。16週目に各区75尾、24週目に全個体の体重を測定した。給餌は1~2回/日、週5日とし、給餌量はライトリッツの給餌率に従い、1週間毎に補正した。飼育水槽は試験区毎に42 \times 35cm \cdot 水深20cmの水槽1個を用い、注水量は約150mL/分とした。飼育期間中の水温は5.6~15.7 $^{\circ}$ Cであった。

第II期は各区56~59尾を供試し、試験開始時の平均体重は約120gであった。試験は2000年8月7日から2001年2月18日までの28週間行い、4、8、16、20、24および28週に総魚体重の測定と生残尾数の計数を行った。16週および20週目に全個体の体重を測定した。給餌方法は第I期と同様に行った。飼育水槽は試験区毎に0.9 \times 3.0m(飼育部0.9 \times 2.0m)水深0.5mのFRP水槽1個を用い、注水量は約30L/分とした。飼育期間中の水温は8.0~16.0 $^{\circ}$ Cであった。

第III期は各区30尾を供試し、試験開始時の平均体重はニジニジブラ763.2g、全雌ニジマス四倍体668.3g、全雌ニジマス三倍体706.5g、ブラウントラウト464.1gであった。試験は2001年4月16日から2002年2月17日までの44週間行い、4週毎に総魚体重の測定と生残尾数の計数を行った。また、測定時に採卵可能な個体については卵搾出前後の体重を測定した。給餌方法は第I期と同様に行った。飼育水槽は試験区毎に0.9 \times 3.0m \cdot 水深0.5mのFRP水槽1個を用い、注水量は約30L/分とした。

⑤抗病性

感染試験によりIHNV、OMV、せつそう病原因菌*Aeromonas salmonicida*、レンサ球菌*Streptococcus iniae*に対する感受性を検討した。

IHNVの感染試験はニジニジブラ(平均体重1.6g)ニジマス二倍体(平均体重1.4g)およびブラウントラウト(平均体重1.0g)各区25尾を用い、10^{5.3}TCID₅₀/mlのIHNV(HV9612株)液に1時間浸漬した。感染後は21日間観察し、死亡魚の計数および死亡原因の確認を行った。給餌は適宜行い、水温は11.3~11.9 $^{\circ}$ Cであった。

OMVの感染試験はニジニジブラ(平均体重34.2g)20尾、ニジマス二倍体(平均体重16.7g)20尾およびブラウントラウト(平均体重21.6g)10尾を用い、10^{4.8}TCID₅₀/mlのOMV(OV0010株)液を腹腔内に0.1mL注射した。感染後は42日間観察し、死亡魚の計数および死亡原因の確認を行った。給餌は適宜行い、水温は9.6~13.3 $^{\circ}$ Cであった。

せつそう病原因菌の感染試験はニジニジブラ(平

均体重 23.8g) ニジマス二倍体 (平均体重 29.4g) およびブラウントラウト (平均体重 20.6g) 各区 10尾を用い、浸漬攻撃により行った。攻撃は 5.32%の食塩水に 2 分間浸漬し、飼育水で洗浄後直ちに 2.7×10^6 CFU/mL のせつそう病原菌 *A. Salmonicida* (02-007 株) 液に 10 分間浸漬した。感染後は 14 日間観察し、死亡魚の計数および死亡原因の確認を行った。給餌は適宜行い、水温は 15.2~16.8℃であった。

レンサ球菌の感染試験はニジニジブラ (平均体重 23.8g) ニジマス二倍体 (平均体重 36.3g) およびブラウントラウト (平均体重 24.4g) 各区 10尾を用い、注射攻撃によりおこなった。攻撃は 2.7×10^9 CFU/mL のレンサ球菌 *S. iniae* (02-011 株) 液を腹腔内に 0.1mL 注射した。感染後は 22 日間観察し、死亡魚の計数および死亡原因の確認を行った。給餌は適宜行い、水温は 12.2~17.9℃であった。

結果

異質三倍体の作出 ニジマス四倍体雌とカワマス、ブラウントラウト、イワナおよびヤマメ雄間の交配、ニジマス二倍体とニジマス四倍体間の交配および同種間の交配において正常魚が得られた (表 1)。しかし、ニジマス四倍体およびニジマス二倍体雄とカワマス、ブラウントラウト、イワナおよびヤマメ雌間の交配、ニジマス二倍体雌とカワマス、ブラウントラウト、イワナおよびヤマメ雄間の交配において正常魚は得られなかった。

ニジマス四倍体とサケとの交配では正常魚は得ら

表1 ニジマス四倍体とカワマス、ブラウントラウト、イワナおよびヤマメの交配試験

雌親魚	雄親魚	受精率 (%)	発眼率 (%)	孵化率 (%)	正常魚浮上率 (%)
ニジマス二倍体	ニジマス二倍体	98.9	90.6	87.9	85.2
ニジマス二倍体	ニジマス四倍体	42.7	37.3	35.6	35.6
ニジマス二倍体	カワマス	98.7	98.3	55.9	0
ニジマス二倍体	ブラウントラウト	84.9	92	66.4	0
ニジマス二倍体	イワナ	31.1	47.4	4.4	0
ニジマス二倍体	ヤマメ	96.2	97	96.4	0
ニジマス四倍体	ニジマス二倍体	59.9	62.7	55.9	55.9
ニジマス四倍体	ニジマス四倍体	32.4	35.4	30.3	23.2
ニジマス四倍体	カワマス	58.5	58.8	50.6	29.4
ニジマス四倍体	ブラウントラウト	63.6	58.3	43.6	31.4
ニジマス四倍体	イワナ	33.9	32	23.4	16.4
ニジマス四倍体	ヤマメ	61.5	60.2	57.7	56.9
イワナ	ニジマス二倍体	42.4	42	0	0
イワナ	ニジマス四倍体	0.8	0	0	0
イワナ	イワナ	93.8	91.7	76.1	68.9
カワマス	ニジマス二倍体	37.9	35.3	0	0
カワマス	ニジマス四倍体	0.5	1	0	0
カワマス	カワマス	87.6	27.5	17	16
ブラウントラウト	ニジマス二倍体	6.3	28.4	0	0
ブラウントラウト	ニジマス四倍体	0.5	0.8	0	0
ブラウントラウト	ブラウントラウト	84.9	86.6	37.5	55.6
ヤマメ	ニジマス二倍体	19.5	9.7	0	0
ヤマメ	ニジマス四倍体	0	0	0	0
ヤマメ	ヤマメ	未実施			

れなかった (表 2)。ニジマス四倍体雌とサケ雄、サケ雌とニジマス二倍体雄との交配では発眼期まで発生が進んだが、得られた発眼卵のほとんどは色素が沈着せず眼球が赤い異常発生卵であった。またニジマス四倍体雌とサケ雄との交配で色素が沈着した発眼卵が 9 個得られたが、すべて孵化数日後に死亡した。

ニジマス四倍体とコレゴヌスとの交配では発眼まで至らず、正常魚は得られなかった (表 3)。対照区としたニジマス四倍体同士とコレゴヌス同士は通常の飼育条件下において、正常な発眼率を示した。なお、ニジマス二倍体とコレゴヌスとの交配では発眼期まで発生が進まないことを確認している (未発表)。

異質三倍体の確認 ニジマス三倍体、ニジニジカワ、ニジニジブラの染色体数は 87 本、104 本および 100 本であった (図 1)。また、親魚に用いたニジマス四倍体の染色体数は 120 本であった (図 2)。

ニジマス三倍体の赤血球長径および相対 DNA 量の平均はそれぞれ 18.5 μ m、2.76 であり、親魚であるニジマス二倍体の 14.6 μ m、2.09 およびニジマス四倍体の 21.9 μ m、3.79 の中間の値を示した。ニジニジカワの赤血球長径および相対 DNA 量の平均はそれぞれ 20.0 μ m、3.40 であり、親魚であるカワマスの 15.4 μ m、2.42 およびニジマス四倍体の 21.9 μ m、3.79 の中間の値を示した。ニジニジブラの赤血球長径および相対 DNA 量の平均はそれぞれ 20.1 μ m、3.00 であり、親魚であるカワマスの 16.1 μ m、2.31 およびニジマス四倍体の 21.9 μ m、3.79 の中間の値を示した。

マイクロサテライト PCR 法の分析結果を図 4 に示した。ニジマス四倍体は 234 b p 付近、カワマスは 267 b p 付近、イワナは 213 b p および 234 b p 付近にバンドが見られた。ニジニジカワでは 267 b p 付近に

表2 ニジマス四倍体とサケとの交配試験

雌親魚	雄親魚	発眼率 (%)	孵化率 (%)	正常魚浮上率 (%)
ニジマス四倍体	ニジマス二倍体	47.3	43.0	40.8
ニジマス四倍体	ニジマス四倍体	21.2	18.3	13.8
ニジマス四倍体	サケ	14.7	0.0	0.0
サケ	ニジマス四倍体	0.0	0.0	0.0
サケ	ニジマス二倍体	3.5	0.0	0.0
サケ	サケ	22.7	18.3	17.7

表3 ニジマス四倍体とコレゴヌスとの交配試験

	雌親魚	雄親魚	発眼率 (%)
試験 1 (8.0~10.6℃飼育)	ニジマス四倍体	コレゴヌス	0
	コレゴヌス	ニジマス四倍体	0
	ニジマス四倍体	ニジマス四倍体	65.7
	コレゴヌス	コレゴヌス	0
試験 2 (1~5℃飼育)	ニジマス四倍体	コレゴヌス	0
	コレゴヌス	ニジマス四倍体	0
	ニジマス四倍体	ニジマス四倍体	80.4
	コレゴヌス	コレゴヌス	31.5



図1 ニジマス四倍体との交配で得られた子の染色体像



図2 ニジマス四倍体の染色体像



図4 マイクロサテライトPCR法による異質三倍体の確認

バンドが見られ、ニジニジイワにおいても 213 b p 付近にバンドが見られた。

異質三倍体の特性

①卵の発生速度

浮上までの各期の積算水温を表4に示した。
ニジニジブラの発眼までの積算水温は 248.4℃・日、

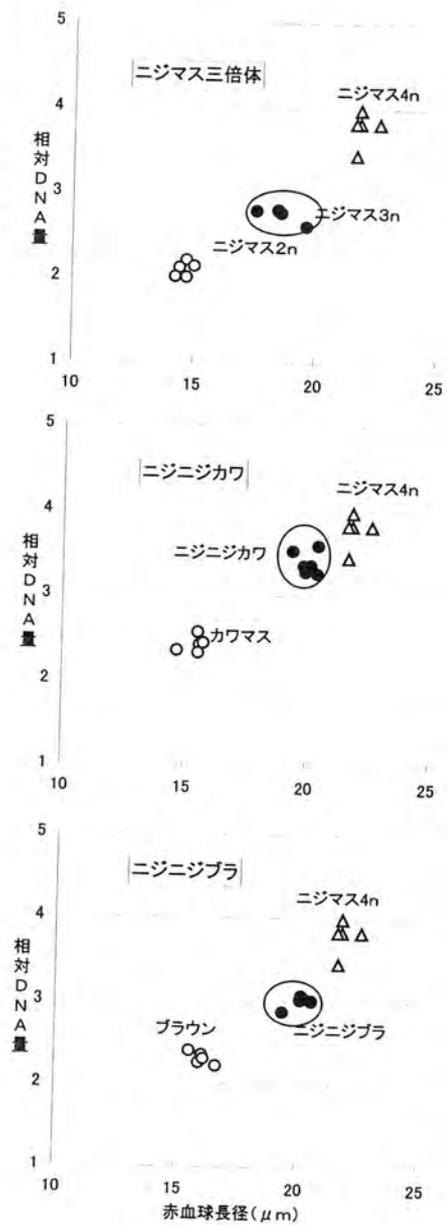


図3 ニジマス三倍体、ニジニジカワおよびニジニジブラの赤血球長径と相対DNA量

表4 受精後浮上までの積算水温 (°C・日)

試験区名	発眼	孵化	浮上
ニジニジブラ	248.4	337.0	554.0
ニジマス三倍体	248.4	337.0	529.8
ニジマス四倍体	248.4	337.0	529.8
ブラウントラウト	319.6	435.9	665.4

表5 異質三倍体3年魚の成熟

試験区	検査尾数	平均体重(g)	未成熟	雄*	雌*
ニジニジブラ	43	555.3	19	24 (0)	0 (0)
ニジニジカワ	20	459.9	16	4 (0)	0 (0)
ニジニジイワ	35	594.2	20	15 (0)	0 (0)
ニジマス四倍体	40	651.7	0	30 (26)	10 (10)
ブラウントラウト	41	240.0	0	22 (22)	19 (19)
カワマス	2	551.7	0	1 (0)	1 (1)
イワナ	16	258.6	1	4 (4)	11 (11)

*:二次性徴が出現した個体数。()内は精液または卵が搾出可能な個体数

表6 ニジニジブラ、ブラウントラウトおよびニジマス二倍体雄のGSI

魚種	個体	体重(g)	精子の搾出	生殖腺重量(g)	GSI
ニジニジブラ	1	1255.8	不可	16.38	1.30
	2	1093.6	不可	17.83	1.63
	3	772.6	不可	11.27	1.46
	4	973.8	不可	22.93	2.35
	5	1147.3	不可	35.29	3.08
	6	1040.0	不可	20.60	1.98
	7	1192.7	不可	16.50	1.38
	8	1112.6	不可	24.14	2.17
	9	882.7	不可	14.73	1.67
	10	1143.3	不可	24.62	2.15
	平均	1061.4		20.43	1.92
ブラウントラウト	1	372.3	可	7.71	2.07
	2	574.5	可	7.49	1.30
	3	585.4	可	9.94	1.70
	4	539.3	可	6.57	1.22
	5	497.5	可	6.51	1.31
	平均	513.8		7.64	1.52
ニジマス二倍体	1	852.1	可	24.60	2.89
	2	1172.4	可	25.08	2.14
	3	1722.4	可	69.41	4.03
	4	1272.8	可	62.48	4.91
	5	2069.0	可	88.22	4.26
	平均	1417.7		53.96	3.65

孵化までの積算水温は337.0°C・日であり、ニジマス四倍体、ニジマス三倍体と同じであった。しかし、浮上期はニジマス三倍体とニジマス四倍体から積算水温で24.2°C・日、日数で3日遅れた。ブラウントラウトは他の3区よりも発生が遅く、浮上は積算水温で約130°C・日(16日)遅くなった。

積算水温529.8°C・日ではニジマス三倍体とニジマス四倍体はさい嚢の吸収が終わって浮上した。ニジニジブラは一部浮上し始める個体がいるもののほとんどの個体でさい嚢の吸収が完全には終わってお

ず、ブラウントラウトはさい嚢がまだ大きかった。

②妊娠

1998年12月のニジニジブラ、ニジニジカワおよびニジニジイワの成熟状況調査結果を表5に示した。

調査時における異質三倍体3群の魚体重は親魚である4魚種の魚体重と比べても、十分成熟可能な大きさであった。しかし、異質三倍体は3群とも雌の成熟個体はなく、成熟雄または未成熟のいずれかであった。また、成熟雄であっても精液を搾出することは出来なかった。一方、異質三倍体の親魚であるニジマス四倍体、ブラウントラウトおよびカワマスでは未成熟魚が出現せず、すべて成熟雌もしくは成熟雄であり、精液や卵の搾出が可能であった。また、イワナでは1尾の未成熟魚が出現しただけで、この1尾以外は成熟雌もしくは成熟雄であり、精液や卵の搾出が可能であった。

2001年11月に二次性徴が現れたニジニジブラ、ブラウントラウト、ニジマス二倍体雄のGSI調査結果を表6に示した。供試したブラウントラウトおよびニジマス二倍体はすべて精液の搾出が可能であったが、ニジニジブラで精液の搾取が可能な個体はなかった。GSIはニジマスが3.65ともっとも大きく、ついでニジニジブラ1.92、ブラウントラウト1.52の順でニジニジブラがブラウントラウトを上回るGSIを示した。精巣の外観はニジマスおよびブラウントラウトでは白濁しているのに対して、ニジニジブラでは透明感のある白色であった。また、精巣の細片を人工精漿内で振とうすると、ブラウントラウト、ニジマスではいずれも運動性のある精子を含む懸濁液が確認できた。ニジニジブラでも白濁した液が得られたが、懸濁液に含まれる細胞は淡水に触れると膨潤・破裂し、精子は観察されなかった。

③外観的特徴

調査結果を図5に示した。また、それぞれの代表的な斑紋を図6に示した。ニジニジイワ成熟雄では90%以上が虫食い型であった。また、未成熟魚においても約40%が虫食い型であり、無斑型は50%、中間型は10%であった。ニジニジカワではニジニジイワよりも虫食い型の比率が高く成熟雄では100%、

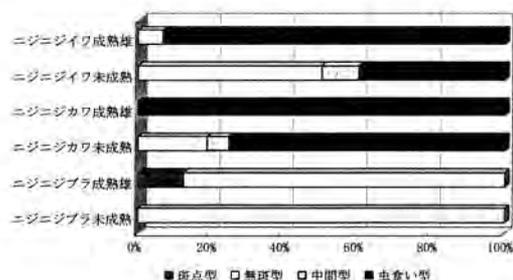


図5 異質三倍体の外部斑紋

無斑型 (ニジニジイワ ♀)



斑点型 (ニジニジブラ)



虫食い型 (ニジニジカワ)



図6 異質三倍体の斑紋

未成熟魚でも約80%が虫食い型であった。イワナ属 (*Salvelinus* 属) とニジマス四倍体雌との交配により作出された異質三倍体は虫食い型が多かった。一方、ニジニジブラでは虫食い型はまったく見られず、雄で斑点型が10%見られた他はすべて無斑型であった。また、未成熟魚はスマルト状態であった。

④成長・生残

I期～III期を通しての平均体重の推移を図7に、生残率の推移を図8に、飼育成績を表8に示した。試験終了時の平均体重ではニジニジブラ≧全雌ニジマス三倍体>全雌ニジマス四倍体>ブラウントラウトの順に大きかった。全雌ニジマス四倍体とブラウントラウトは成熟期に成長の停滞が見られた。ニジニジブラでも3年魚でわずかに成長の停滞が見られたが、二次性徴の現れた雄個体の影響であった。

試験終了時の生残率では全雌ニジマス三倍体≧全雌ニジマス四倍体>ニジニジブラ>ブラウントラウトの順に良かった。

ニジニジブラ、全雌ニジマス四倍体およびブラウントラウトは成熟期に水カビの寄生によって生残率が低下した。なお、ニジニジブラの死亡は雄型の個体のみであった。全雌ニジマス三倍体は第III期開始4週間後に5尾の死亡が見られ、直接の死亡原因は

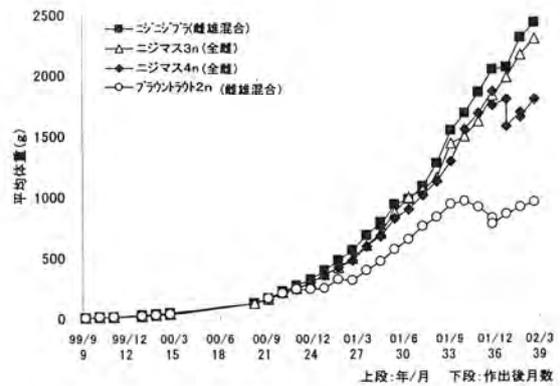


図7 ニジニジブラ比較飼育試験 平均体重の推移

'99.9~'00.2 1期: n = 120
'00.8~'01.2 2期: n = 56
'01.4~'02.3 3期: n = 30

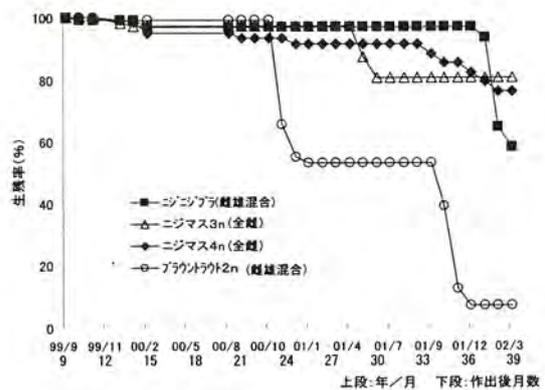


図8 ニジニジブラ比較飼育試験 生残率の推移

'99.9~'00.2 1期: n = 120
'00.8~'01.2 2期: n = 56
'01.4~'02.3 3期: n = 30

不明であったが、明らかに成熟に伴うものではなかった。ブラウントラウトは2年目の成熟期から死亡が見られ、3年目の成熟期後には10%以下の生残率であった。

第I期の成長倍率はニジニジブラ>ブラウントラウト>全雌ニジマス三倍体>全雌ニジマス四倍体の順に成績が良かった。第II期の成長倍率はニジニジブラ>全雌ニジマス三倍体>全雌ニジマス四倍体>ブラウントラウトの順に成績が良く、ブラウントラウトは成熟に伴う死亡により成績が低下した。第III期の成長倍率は全雌ニジマス三倍体>ニジニジブラ>全雌ニジマス四倍体>ブラウントラウトの順に成績が良く、ニジニジブラ、全雌ニジマス四倍体、ブラウントラウトは成熟に伴う死亡・成長停滞により飼育成績が低下した。

⑤抗病性

各病原体による攻撃試験の結果を表9に示した。

IHNV による攻撃試験でのニジニジブラの死亡率は64%で、ブラウントラウト20%とニジマス88%の中間の値を示し、ニジマスより有意に低かった。

OMV による攻撃試験では、ニジマスでは85%の死

表8 ニジニジブラの比較飼育試験における飼育成績

第Ⅰ期(1999/9/6~2000/2/21, 168日間)				
飼育期間	ニジニジブラ	ニジマス三倍体	ニジマス四倍体	ブラウントラウト
開始時(1999/9/6)				
重量(kg)	0.39	0.39	0.39	0.29
尾数	120	120	120	120
平均体重(g)	3.25	3.25	3.25	2.42
終了時(2000/2/21)				
重量(kg)	4.96	3.48	3.75	3.28
尾数	116	102	119	114
平均体重(g)	42.76	34.12	31.51	28.77
生残率(%)	96.7	85.0	99.2	95.0
増重量(kg)	4.57	3.09	3.36	2.99
給餌量(kg)	4.19	3.31	3.39	3.11
飼料効率(%)	109.1	93.4	99.1	96.1
日間成長率(%/day)	1.53	1.40	1.35	1.47
日間給餌率(%/day)	1.39	1.39	1.36	1.50
死亡尾数	1	16	3	0
死亡重量(g)	12.6	148.8	57.2	0
不明減耗	3	2	3	1
不明重量(g)	69.0	37.4	52.1	15.6
成長倍率	13.2	10.5	9.7	11.9
補正増重量(kg)	4.65	3.28	3.47	3.01
補正飼料効率(%)	111.0	99.0	102.3	96.6

第Ⅱ期(2000/8/7~2001/2/18, 196日間)				
飼育期間	ニジニジブラ	ニジマス三倍体	ニジマス四倍体	ブラウントラウト
開始時(2000/8/7)				
重量(kg)	6.88	7.07	7.03	6.83
尾数	56	59	56	56
平均体重(g)	122.9	119.8	125.5	122.0
終了時(2001/2/18)				
重量(kg)	28.62	29.04	23.32	9.42
尾数	51	59	49	30
平均体重(g)	561.2	492.2	475.9	314.0
生残率(%)	91.1	100.0	87.5	53.6
増重量(kg)	21.74	21.97	16.29	2.59
給餌量(kg)	27.02	27.22	24.05	15.20
飼料効率(%)	80.5	80.7	67.7	17.0
日間成長率(%/day)	0.77	0.72	0.68	0.48
日間給餌率(%/day)	0.94	0.89	0.95	0.96
死亡尾数	0	0	0	26
死亡重量(g)	0	0	0	7041.7
不明減耗尾数	0	0	2	0
不明重量(g)	0	0	601.5	0
処分尾数	5	0	5	0
処分重量(g)	1591.6		1650.7	
成長倍率	4.57	4.11	3.79	2.57
補正増重量(kg)	23.33	21.97	18.54	9.63
補正飼料効率(%)	86.3	80.7	77.1	63.4

第Ⅲ期(2001/4/16~2002/2/17, 308日間)				
飼育期間	ニジニジブラ	ニジマス三倍体	ニジマス四倍体	ブラウントラウト
開始時(2001/4/16)				
重量(kg)	22.90	21.20	20.05	13.92
尾数	30	30	30	30
平均体重(g)	763.3	706.7	668.3	464.0
終了時(2002/2/17)				
重量(kg)	48.52	55.13	44.88	3.80
尾数	20	24	25	4
平均体重(g)	2426.0	2297.1	1795.2	950.0
生残率(%)	66.7	80.0	83.3	13.3
増重量(kg)	25.62	33.93	24.83	-10.12
給餌量(kg)	112.28	94.18	95.75	41.42
飼料効率(%)	22.8	36.0	25.9	-24.4
日間成長率(%/day)	0.38	0.38	0.32	0.23
日間給餌率(%/day)	1.07	0.89	1.01	1.72
死亡尾数	10	5	5	28
死亡重量(kg)	22.19	4.44	7.69	16.82
不明減耗尾数	0	0	0	0
不明重量(kg)	0	0	0	0
処分尾数	0	1	0	0
処分重量(kg)	0	1.94	0	0
成長倍率	3.18	3.25	2.69	2.05
補正増重量(kg)	47.81	40.31	32.52	6.70
補正飼料効率(%)	42.6	42.8	34.0	16.2

表9 魚類病原体に対するニジニジブラ、ニジマス及びブラウントラウトの感受性

病原体	攻撃方法	攻撃量	供試尾数 (平均体重(g))	死亡率(%)		
				ニジニジブラ	ニジマス	ブラウントラウト
IHNV	浸漬	10 ^{5.5} TCID ₅₀ /mL 1h	25 (1.0~1.6)	84* **	98 ^b	20 ^c
OMV	注射	10 ^{3.5} TCID ₅₀ /尾	20 ^a (16.7~34.2)	0 ^a	85 ^b	0 ^a
<i>Aeromonas salmonicida</i>	浸漬	2.7 × 10 ⁶ CFU/mL 10min	10 (20.6~29.4)	30	20	60
<i>Streptococcus iniae</i>	注射	2.7 × 10 ⁵ CFU/尾	10 (24.4~36.3)	90	90	70

* :ブラウントラウトは10尾

** :異なる肩符号は有意差がある。(ab:P<0.05, abc:P<0.01)

亡があったのに対し、ニジニジブラ及びブラウントラウトともに死亡はなかった。

せっそう病原菌による攻撃試験でのニジニジブラの死亡率は30%で、ブラウントラウト60%とニジマス20%の中間の値を示したが、いずれとも有意差はなかった。

レンサ球菌による攻撃試験でのニジニジブラの死亡率は90%で、ニジマスの90%、ブラウントラウトの70%と有意差はなかった。

考察

ニジマス四倍体雌とイワナ、カワマス、ブラウントラウトおよびヤマメの二倍体雄との交配で正常に浮上し生存性のある雑種が得られた。しかし、ニジマス二倍体雌とイワナ、カワマス、ブラウントラウトおよびヤマメ雄の組み合わせではふ化期までは生残しているものの浮上期以後に生存性がある雑種は得られなかった。R. Suzuki et al. 4) 5) はニジマスとイワナ、カワマス、およびヤマメの組み合わせで生存性の雑種が得られたがニジマスとブラウントラウトの組み合わせでは生存性の雑種は得られなかったと報告している。また、生存性の雑種であっても3ヵ月後の生残率は10%未満であったと報告している。このようにニジマス二倍体との交配によって生存性の雑種を大量に作出することは通常は困難である。しかし、ニジマス四倍体を用いることによって大量の雑種を作出することが出来た。

ニジマス二倍体の染色体数は通常60~64本であり³⁾、長野水試で飼育しているニジマス四倍体の染色体数が120本であることから長野水試で飼育しているニジマス二倍体の染色体数は60本であると推定される。これらからニジマス三倍体の染色体数の期待値は90本であり、本試験で得られた染色体数87本と近似していた。

また、カワマスの染色体数は84本である³⁾ことからニジニジカワの染色体数の期待値は102本であり、観察値104本に近似していた。ブラウントラウトの染色体数は80本である³⁾ことから、ニジニジブラ

の染色体数の期待値は 100 本であり、観察値 100 本と一致していた。

マイクロサテライト PCR により得られた増幅産物のうちニジニジカワに見られた 267 bp 付近のバンドはカワマスに由来する遺伝子であると考えられた。同様に、ニジニジイワの 213 bp 付近のバンドはイワナに由来する遺伝子であると考えられた。

四倍体との交配により作出された生存性のある雑種は、染色体数、赤血球長径および相対 DNA 量が両親の中間値を示すこと、マイクロサテライト PCR 法によって両親の遺伝子の導入が確認されたことから異質三倍体であると結論した。

ニジマスの二倍体、三倍体および四倍体では染色体数、相対 DNA 量および赤血球長径と倍数性に相関性がある⁹⁾ことから、赤血球長径による倍数性の簡易判定が行われている。異質三倍体の染色体数、相対 DNA 量および赤血球長径は両親の中間値を示すことからニジマスと同様に赤血球長径による異質三倍体の簡易判定は妥当であると考えられる。

ニジマス二倍体雄とイワナ、カワマス、ブラウントラウトおよびヤマメの二倍体雌の交配で得られる雑種は致死性であったが、ニジマス四倍体雄との交配でも生存性の雑種は得られなかった。ニジマス二倍体雄を用いた交配よりも四倍体雄を用いた交配の受精率が低いことから、四倍体精子が二倍体精子よりもサイズが大きく卵門を通過出来なかったという物理的要因も考えられる。このため、事業規模で異質三倍体を作成するためには四倍体卵子を用いなければならない。

ニジマス三倍体雌は二次性徴が現れないが、ニジマス三倍体雄は二次性徴が現れる事が知られている。異質三倍体も同様に雌では二次性徴が現れず、雄では二次性徴が現れることが確認された。このような二次性徴が現れた異質三倍体雄は成熟に伴う成長停滞やミズカビ寄生による死亡によって生残率の低下を生じた。また、異質三倍体雄の精巣は GSI が上昇し精液を放出する可能性があることがわかった。今回の調査では観察数が少ないことから異質三倍体精子の受精能力についてはさらに検討が必要であろう。

商品として「見た目」は重要な要素であるが、ニジニジイワやニジニジカワに出現する虫食い型はやや価値が低いと判断され、成熟雄だけでなく未成熟魚においても出現比率が高く利用には課題が残る。無斑ニジマスであるホウライマスを用いて作出したニジイワ三倍体やニジアマ三倍体には斑紋が見られないことから、無斑のニジマス四倍体を利用出来れば虫食い型斑紋の抑制は可能であろう。一方、無斑型が多く出現するニジニジブラはこのまま商品として

十分流通可能と判断された。斑点型が雄のみに出現することから全雌化によりさらに改善が期待できる。

ニジニジブラの成長は全雌ニジマス三倍体と同等以上であった。一方、生残については第Ⅲ期の成熟期に雄個体に二次性徴が見られるようになり、ミズカビによる死亡によって生残率が低下した。しかし、この雄個体の影響を除けば、生残率においてもニジマス三倍体と同等の成績を期待できる。

異質三倍体は赤血球長径、相対 DNA 量や卵の発生速度などで両親の中間的形質を示すが、抗病性についても両親の中間的な感受性を示したことは興味深い。特に IHNV に対しては明らかに両親の中間の感受性を示している。また、OMV、せつそう病原菌、レンサ球菌に対しても似た傾向を示すといえる。現在、ニジマスの養殖現場ではこれら病原体は常在化し、常に発病の危険にさらされており、養魚経営に大きな打撃を及ぼしている。今回明らかになったニジニジブラの抗病性、特に IHNV、OMV に対する抵抗性は養殖経営上非常に有用な特性であると言える。

ニジマス四倍体雌を用いて人為交配により作出した異質三倍体のうちニジニジブラは成長・生残、外観、抗病性の点から新しい養殖品種として期待できる。ただし、雄の成熟が確認されたことから、品質維持や生産性、逸出した場合の生態系への影響等を考慮すると全雌化が必要である。

謝 辞

本試験における相対 DNA 量の測定、染色体標本の作製を始め、多大なる御助言・御協力をいただいた信州大学理学部小野里担教授および同研究室の学生諸兄の皆さんに厚く御礼を申し上げます。

要 約

1. ニジマス四倍体雌とイワナ、カワマス、ブラウントラウトおよびヤマメ雄との交配により異質三倍体を作成できた。
2. 異質三倍体の染色体数、相対 DNA 量は両親から推定される期待値と近似していた。また、両親の遺伝子が導入されていることが確認された。
3. 異質三倍体雄は二次性徴を示し、成熟に伴う生残率低下、成長停滞を示した。
4. ニジニジブラの成長・生残は全雌ニジマス三倍体と同等以上であった。
5. 異質三倍体の外観は必ずしも両親の中間的形質を示さなかったが、ニジニジブラは全雌化により実用可能と考えられた。

6. 交配で作出されたニジニジブラは IHNV に対してニジマスより抗病性が増した
7. 全雌ニジニジブラは新しい養殖品種として期待される。

文 献

- 1) F. Yamazaki, H. Onozato and K. Arai (1981) The chopping method for obtaining permanent chromosome preparation from embryos of teleost fishes. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 47, 963
- 2) B. Angers, L. Bernatchez, A. Angers & L. Desgroseillers (1995). Specific microsatellite loci for brook charr reveal strong population subdivision on a microgeographic scale. Journal of Fish Biology 47(Suppl. A), 177-185
- 3) 小島吉雄(1983) 魚類細胞遺伝学, 水交社
- 4) Suzuki R. and Y. Fukuda(1971) Survival potential of F1 hybrids among salmonid fishes. Bull. Freshw. Fish. Res. Lab., 21, 69-83
- 5) Suzuki R. and Y. Fukuda(1971) Growth and survival of F1 hybrids among salmonid fishes. Bull. Freshw. Fish. Res. Lab., 21, 117-138
- 6) 山本淳, 高橋康二, 実吉峯郎(1994) 四倍体ニジマスに関する魚類生物学的研究(抄録)平成5年度山梨県水産技術センター事業報告書, 20-24