

走査電子顕微鏡によるフグ科魚類の  
凍結保存精子の形態

A Scanning Microscopical Observation of the  
Cryopreserved Spermatozoa of the Swellfishes

宮木 廉夫,\*<sup>1</sup> 道津 喜衛

Kadoo MIYAKI and Yoshie DOTSU

Spermatozoa of five species of tetraodontid fishes of Japanese seas, consisting of two *Lagocephalus* species, two *Takifugu* species and an artificial inter-specific cross of *Takifugu*, were observed by a scanning electron microscope.

The spermatozoa observed in this study had been cryopreserved in liquid nitrogen for 177 to 299 days before the observations.

The head of a spermatozoon of Shirosabafugu, *Lagocephalus wheeleri* is nearly glove, measuring 1.42  $\mu\text{m}$  in length and 1.12  $\mu\text{m}$  in width and that of Kurosabafugu, *L. gloveri* is oval, 1.51  $\mu\text{m}$  and 0.95  $\mu\text{m}$ , respectively.

Those of Kusafugu, *Takifugu niphobles*, Torafugu, *T. rubripes* and the artificial cross between female *T. niphobles* and male *T. rubripes* are all ellipsoid measuring as 1.77~1.93  $\mu\text{m}$  in length and 0.75~0.82  $\mu\text{m}$  in width. The tail length of the spermatozoon of *L. wheeleri* is about 15 times the head length (1.42  $\mu\text{m}$ ) and that of *T. rubripes* is about 12 times the head length (1.93  $\mu\text{m}$ ).

The morphometric difference of the head of the spermatozoon between *Lagocephalus* and *Takifugu* partly explains the difficulty in artificial intergeneric cross reported.

The similarity of the spermatozoon heads among *Takifugu* species partly interprets the ease in artificial interspecific crosses in the genus and common occurrence of swellfishes which are supposed as interspecific crosses in nature, in the East China Sea and its adjacent seas.

**Key words** : フグ科魚類 swellfishes (Tetraodontidae) ; 凍結保存精子 cryopreserved spermatozoa ; 走査電子顕微鏡 a scanning electron microscopy ; 精子の形態 morphology of spermatozoa

東シナ海とその隣接海域には、自然交雑種と思われるフグ科魚類のいくつかがみられ、その中には魚市場へ入荷するほどにまとまってとれるものがある

ことを多部田<sup>1)</sup>、増田ほか\*<sup>2</sup>、道津<sup>2)</sup>が報告している。これは海産魚では稀な現象といえる。藤田<sup>3)</sup>はフグ科魚類3属7種を用いて属間および

\* 1 長崎市松ヶ枝町7-29 長崎県長崎水産業改良普及所。

\* 2 増田育司、高橋康弘、道津喜衛、宮木廉夫、多部田修、松浦啓一 (1986) : トラフグ属の自然交雑種について。昭和61年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 46頁。

種間の交雑実験を行ない, 種間では交雑が容易に成功したが, 属間では交雑卵に発生障害が起こり, ふ化仔魚を得るに到らなかったとしている。

宮木ほか<sup>4)</sup>, 道津ほか<sup>5)</sup>および道津<sup>2)</sup>は, トラフグ属の種間交雑を行ない, 交雑フグの飼育結果から自然交雑フグの起源を解明しようと試みてきた。その過程において1983~1987年に7種類のフグを用いて正逆交雑を含む20組の交雑実験を行なった。その中で8組については, 液体窒素 (-196℃) による凍結保存精子を用い, いずれも多数の正常な仔魚を得た。また, トラフグの凍結保存精子によるクサフグ卵との交雑仔魚を成熟するまで1年間飼育し, その交雑雄から採精して凍結保存した精子を用いてクサフグ雌と戻し交雑を行ない, 多数の正常なふ化仔魚を得た。

上述のようなフグ科魚類の自然および人為交雑の諸現象について, その発現機構の解明には, 生殖素の性状および産卵習性の比較検討がその一助となり得ると筆者らは考えている。本報告では, 走査型電子顕微鏡 (以下, 走査電顕と略す) で観察したフグ

科魚類の精子の外部形態について報告する。

### 材料および方法

次の2属4種およびクサフグ雌とトラフグ雄との人為交雑種について精子の観察を行なった。

サバフグ属 *Lagocephalus* Swinson

シロサバフグ *Lagocephalus wheeleri* Abe,  
Tabata et Kitahama

クロサバフグ *L. gloveri* Abe et Tabeta

トラフグ属 *Takifugu* Abe

クサフグ *Takifugu niphobles* (Jordan et  
Snyder)

トラフグ *T. rubripes* (Temminck et  
Schlegel)

これらの魚種からの採精状況を Table 1 に示した。走査電顕観察のための供試精子は, 観察材料を常時使用できることから凍結保存精子を用いた。凍結保存方法は宮木ほか<sup>4)</sup> による。

Table 1. The cryopreserved spermatozoa of the swellfishes observed

Species	Sampling stations	Date of Sampling	Cryopreserved period of spermatozoa in day	Mobility of spermatozoa *1
Shirosabafugu, <i>Lagocephalus wheeleri</i>	Tsuyoshi cho, Hirado	June 20, 1984	179	2
Kurosabafugu, <i>L. gloveri</i>	Ditto	June 21	177	3
Kusafugu, <i>Takifugu niphobles</i>	Tokitsu cho, near Nagasaki	May 12	217	4
Torafugu, <i>T. rubripes</i>	Nagasaki	April 26	229	4
<i>T. niphobles</i> ♀ × <i>T. rubripes</i> ♂ *2	Nomozaki cho, near Nagasaki	May 24	205	4

\*1 The spermatozoa, being put in sea water, were observed under microscope (X200) after given periods of cryopreservation in liquid nitrogen. The mobility are shown after Iriya (1973)

\*2 An artificial cross

なお, Table 1 に示した精子の活力度 Mobility of spermatozoa は, 解凍時の凍結精子に海水を加え, 200倍の光学顕微鏡下で運動状態を観察し, 入谷<sup>6)</sup>の基準に従って決定した。

精子の走査電顕観察標本は, 松尾, 吉越<sup>7)</sup>に従って次の方法で作製した。

解凍した精子試料の0.5mlを速沈管に収容した。この試料には精液と浸透圧調節剤である0.1M クエン酸ナトリウム溶液および抗凍結剤の10%ジメチルスルフォキシド (DMSO) がそれぞれ容量比で2:6.5:1.5の割合で含まれていた。試料に pH 7.4 の Sørensen 第1-第2リン酸ナトリウム緩衝液で

希釈した2.5%グルタル・アルデヒド溶液を試料の10倍量加えて1時間の前固定を施した。次に上記の緩衝液に、その100mlあたり8.5gのショ糖を加えて上記の固定液と等張にしたものを用いて試料を3回洗浄した。洗浄後、上記の緩衝液で希釈した2%四酸化オスミウム溶液で再固定を施した。これらの前固定および再固定は試料を入れた遠沈管を氷水の中に漬けて冷却しながら行なった。再固定後、試料を50, 70, 90, 100%のエノタル中に順次、それぞれに10分間漬けて脱水した。脱水後、酢酸イソアミルを仲介して、ドライアイスで臨界点乾燥を施し、金をスパッターコーティングした後に走査電顕(JEOL JSM T200)で観察した。なお、上記の洗浄、脱水および仲介剤処理の過程では、その都度試料の懸濁と遠心分離(1,000~2,000rpm, 5~10分間)を行なった。

### 結果および考察

観察したフグ類精子の走査電顕像をFig.1に示した。走査電顕像が得られた精子の中で正常な頭部形態を示していると思われる各魚種の精子10個について頭部の最大長と最大幅を走査電顕像上で測り、それらの平均値および標準偏差をもってTable 2に示した。

観察したフグ類の精子はいずれも先体と中片を欠き、頭部と尾部だけからなっていた。頭部の形態は、サバフグ属のシロサバフグでは球状に近い形(頭部長 $1.42\mu\text{m}$ ×頭部幅 $1.12\mu\text{m}$ )をなしていた(Fig.1, A)。これに対してクロサバフグでは卵形( $1.51\mu\text{m}$ × $0.95\mu\text{m}$ )をなし(B)、両種間で形態の差異が明らかであった。一方、トラフグ属では交雑種を含む3種類(C~E)で、頭部はいずれも楕円体( $1.77\sim 1.93\mu\text{m}$ × $0.75\sim 0.82\mu\text{m}$ )をなし、形態は類似していた。しかし、頭部長および頭部幅の平均値について3種類の間の差を統計学的に検討( $P < 0.05$ ,  $n = 10$ )した結果では、頭部長はトラフグとクサフグ、交雑種との間に差があり、頭部幅は各魚種間で差が認められた。しかし、精子頭部の測定値には田中<sup>8)</sup>がマガキ *Ostrea gigas* Thunberg の精子について述べているように、地方変異が現われることも考えられ、また今回は交雑種も含まれていることから、今後のより詳しい検討が必要である。

トラフグ属の2種と1交雑種の間で精子の頭部形態に大きな差異がなく、類似していることは、前述

Table 2. Measurements of the spermatozoa of the swellfishes based on the scanning electron micrographs

Species	Head length in $\mu\text{m}$ * <sup>1</sup>	Head width in $\mu\text{m}$ * <sup>2</sup>
Shirosabafugu, <i>Lagocephalus wheeleri</i>	$1.42 \pm 0.08$	$1.12 \pm 0.06$
Kurosabafugu, <i>L. gloveri</i>	$1.51 \pm 0.06$	$0.95 \pm 0.04$
Kusafugu, <i>Takifugu niphobles</i>	$1.77 \pm 0.14$	$0.82 \pm 0.05$
Torafugu, <i>T. rubripes</i>	$1.93 \pm 0.10$	$0.77 \pm 0.04$
<i>T. niphobles</i> ♀ × <i>T. rubripes</i> ♂* <sup>2</sup>	$1.82 \pm 0.11$	$0.75 \pm 0.04$

\*1 Measurements were carried out on ten spermatozoa of each species and shown in mean value and SD.

\*2 An artificial cross

のトラフグ属の人為交雑が容易にできて多数の正常な交雑仔魚が得られたこと、および交雑種の戻し交雑ができたという事実を説明する一助となると考えられる。また、同様にトラフグ属の自然交雑種と思われるものがしばしば出現することの一つの解釈にもなると思われるが、今後さらに多くの種類について比較検討が必要である。一方、サバフグ属とトラフグ属との間の精子頭部の形態に比較的大きな差異がみられたことは、藤田<sup>3)</sup>が報告しているクサフグ雌とサバフグ *Lagocephalus lunaris spadiceus* (Richardson) 雄との人為交雑卵に発生障害が生じたことを説明する1つの材料を提供するものと考えられる。

シロサバフグとクロサバフグとの間にみられた精子の頭部形態の差異は、それによる種の判別が可能なるものと考えられる。しかし、この両者間では自然交雑種と思われるものが報告されている<sup>1)</sup>。今後は、この交雑種を含めたサバフグ属の各種の精子形態について、さらに詳しく比較研究が必要である。その結果は、同属の種分類の確立にも役立つと思われる。

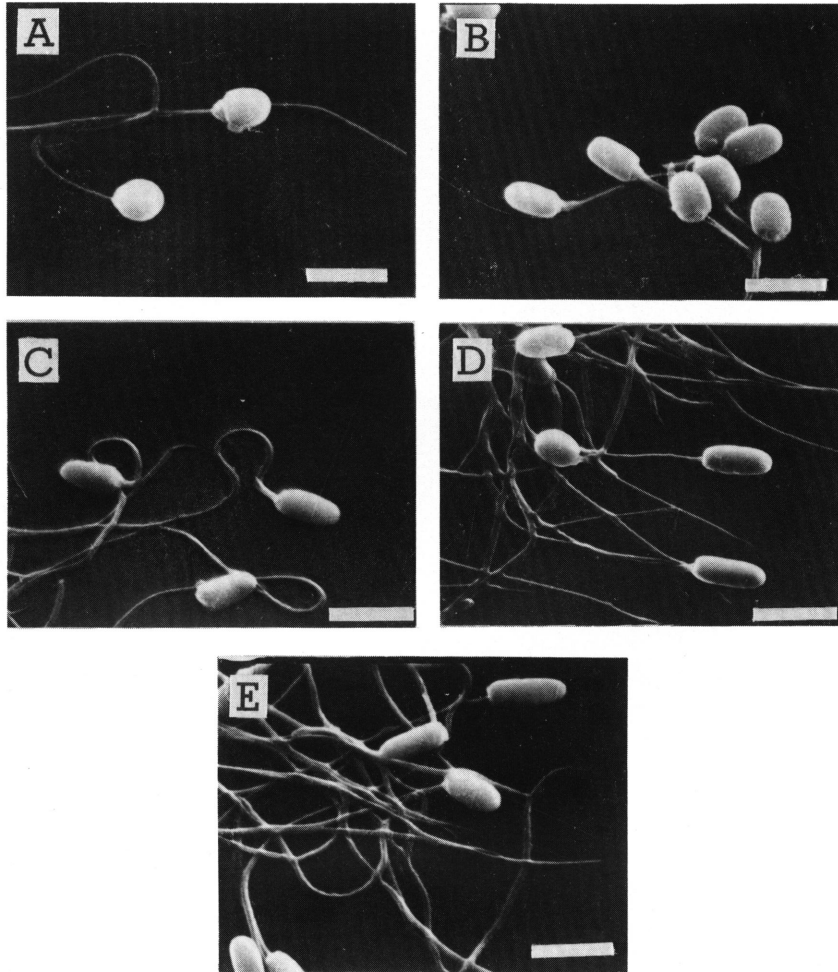


Fig. 1. Scanning electron micrographs of the spermatozoa of the swellfishes

A : Shirosabafugu, *Lagocephalus wheeleri*.

B : Kurosabafugu, *L. gloveri*.

C : Kusafugu, *Takifugu niphobles*.

D : Torafugu, *T. rubripes*.

E : Artificial cross between female Kusafugu, *T. niphobles* and male Torafugu, *T. rubripes*.

Each white bar shows 2  $\mu\text{m}$ .

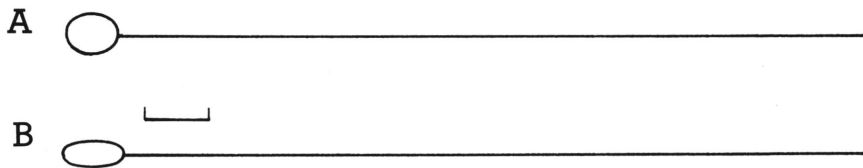


Fig. 2. Diagrammatic figures of spermatozoa of the swellfishes based on the scanning electron micrographs

A : Shirosabafugu, *Lagocephalus wheeleri*.

B : Torafugu, *Takifugu rubripes*.

The scale shows 2  $\mu\text{m}$ .

前記の走査電顕観察試料作製のための処置によって、精子頭部の形態は目立った変化はとげなかったと思われたが、ほとんどの精子で尾部が欠損していた。尾部がほぼ完全に残っていると思われたわずかな個体をもとに、シロサバフグとトラフグの精子の全形を模式的に Fig.2に示した。これによると、両種ともに頭部と比べて尾部が著しく長く、シロサバフグでは尾部長は頭部長 (1.42  $\mu\text{m}$ ) の約15倍、トラフグでは頭部長 (1.93  $\mu\text{m}$ ) の約12倍であった。このような形態の差異は海水中に放出された精子の運動に微妙な差を生ずると考えられる。

本研究における精子形態の観察は、走査型電顕による外部形態の観察にとどまった。今後は、透過型電顕を用いた内部形態の観察によるフグ類各種の精子の比較研究が望まれる。また、凍結精子を用いた走査電顕観察用試料作製の処置中における精子頭部の変形および尾部の欠損を防ぐ方法の開発が必要である。

## 謝 辞

走査電顕観察用の試料の作製について懇切なるご指導をいただいた本学部の吉越一馬助教授および松尾玲子教官に深謝する。

## 文 献

1) 多部田 修 (1985) : 自然交雑種, 昭和59年

度農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告, 東海とその隣接海域におけるフグ類の分類学的研究, 50-51頁。

- 2) 道津喜衛 (1986) : 昭和61年度科学研究費補助金 (一般 C) 研究成果報告書, フグ類の交配および交配種の育成による天然雑種の検索と有用交配種の検索, 1-15頁。
- 3) 藤田矢郎 (1967) : フグ科魚類数種の種間および属間交雑 (予報), ミチューリン生物学研究, 3(1), 5-11。
- 4) 宮木廉夫, 道津喜衛, 松清恵一 (1984) : 海産魚類の凍結保存精子を用いた交配と交配種の養殖に関する研究, 長崎先端技術開発協議会昭和58年度助成分先端技術研究成果報告書, 25-38頁。
- 5) 道津喜衛, 宮木廉夫, 松清恵一 (1985) : トラフグ属の種間人為交雑種の飼育・形態・生態, 昭和59年度農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告書, 東海とその隣接海域におけるフグ類の分類学的研究, 39-44頁。
- 6) 入谷 明 (1973) : 精液の性状とその検査, 新家畜繁殖講座, II, 51-80頁, 東京, 朝倉書店。
- 7) 松尾玲子, 吉越一馬 (1983) : 走査電子顕微鏡観察によるカンザシゴカイ類 *Hydroides* 属3種の精子の形態, 附着生物研究, 4(2), 23-25。
- 8) 田中彌太郎 (1954) : マガキ及びスミノエガキの精子について, 貝類学雑誌, 18(1), 30-34。