

## 高温処理による雌雄混合三倍体ヤマメの作出

米沢純爾・長谷川敦子・吉野典子\*・渡辺裕之\*

不妊化による肉質の改善や魚体の大型化などを目的として三倍体魚の作出が行われている。アマゴやニジマスの倍数化法として高温処理が有効であることが報告されており<sup>1,3)</sup>、同じサケ科魚類であるヤマメについても、同様の方法により三倍体の作出が期待される。そこで高温処理によるヤマメの倍数化条件を明らかにするため、処理温度、処理時間、媒精後の吸水開始から高温処理開始までの時間が倍数化におよぼす影響を検討した。さらに高温処理条件のうち、これまで十分な検討が加えられていない吸水温度と媒精後の吸水開始から高温処理開始までの時間が倍数化におよぼす影響についても検討したので報告する。

### 材料と方法

**実験 1 処理温度、処理時間、処理開始時間が倍数化におよぼす影響** 1985年11月に東京都西多摩郡奥多摩町大沢養魚場産雌魚10尾と、東京都水産試験場奥多摩分場（以下、奥多摩分場と略記する）産雄魚5尾より採取した卵と精子を用いて実験を行った。処理温度と処理時間の組合せを25℃で5, 10, 15分間、30℃で2.5, 5, 10分間、35℃で1, 2, 4分間の9組とし、さらにこれらの各組について、媒精後の吸水開始から高温処理開始までの時間（以下、処理開始時間と略記）を5, 10, 15分間の3段階とすることにより計27区を設定した。この他に通常の媒精を行い対照区とした。

供試卵は十分に混合した後、媒精と吸水を行いふ化盆に各区約200粒ずつ分配した。高温処理は縦65×横35×水深20cmの塩ビ水槽で行い、温度制御には投込み式ヒーターを使用した。高温処理中の水温変動幅は25℃区が25.0~25.3℃、30℃区が29.5~30.0℃、35℃区が34.1~35.0℃で、吸水に使用した河川水の水温は10.5℃であった。ふ化から4~6ヶ月後にchopping method<sup>4)</sup>により染色体標本作製し、倍数化の有無

を判定した。

**実験 2 吸水温度と処理開始時間が倍数化におよぼす影響 (30℃・10分処理)** 1986年10月に奥多摩分場産の雌4尾と雄2尾より採取した卵と精子を用いて実験を行った。吸水温度を10, 13, 16℃の3段階、処理開始時間を4, 7, 10, 13, 16分の5段階とし、これらの組み合わせにより15区を設定した。高温処理は実験1の結果をもとに各区とも30℃で10分間行った。この他に通常の媒精を行い対照区とした。

供試卵は十分に混合した後、媒精と吸水を行い1区当たり200粒前後ずつに分配しステンレス製ザル容器に収容した。吸水温度の制御には大洋科学工業社製クールユニットCL-19と投込み式ヒーターを使用し、加温処理にはサクラ精機社製ウォーターバスユニットを用いた。実験中における吸水温度の変動幅は10℃区が9.4~10.1℃、13℃区が13.2~13.3℃、16℃区が16.5~16.6℃、高温処理水の変動幅は30.0~30.2℃であった。ふ化から4~5ヶ月後に各区30尾について核小体の分析<sup>5)</sup>を行い、倍数化の有無を判定した。

**実験 3 吸水温度と処理開始時間が倍数化におよぼす影響 (28℃・15分処理)** 1987年10月に奥多摩分場産雌魚8尾と雄魚3尾より採取した卵と精子を用いて実験を行った。吸水温度について9, 12, 15℃の3区を設け、各区について処理開始時間を2, 5, 10, 15, 20, 25分の6段階とすることにより計18区を設定した。高温処理は土屋ら<sup>6)</sup>の報告を参考にし、いずれも28℃で15分間行った。各吸水温度区について通常媒精を行い対照区とした。

供試卵は十分に混合した後、媒精と吸水を行い、1区当たり300粒前後ずつに分配しステンレス製ザル容器に収容した。吸水温度の制御および加温処理には、各々実験2で使用したものと同製品を用いた。実験中の各区における設定温度の変動幅は、吸水温度が9.0~

\* 日本大学農獣医学部

9.1℃, 11.8~12.5℃, 15.0~15.1℃, 高温処理水温が28.0~28.1℃であった。正常発眼卵について胚細胞の核小体数を各区30尾分析し倍数化の有無を判定した。

実験成績は一般に三倍体化率(三倍体尾数/倍数性確認尾数×100)で比較されるが、高温処理の影響で通算浮上率(浮上尾数/供試卵数×100)が著しく低くても三倍体化率が高い値を示す場合があり、三倍体の量を視野におく場合、三倍体化率のみで処理条件の適否を判断することは十分とはいえない。従ってここでは、三倍体化率に加え、供試卵に対する三倍体の作出割合、すなわち三倍体生産効率(三倍体化率×通算浮上率/100)を処理条件の適否を判断する基準の一つとして採用した。

## 結 果

**実験1** 結果を表1に示した。25℃処理区では染色体の中期分裂像が得られた検体は全て二倍体で、三倍体は確認できなかった。30℃処理区では処理開始時間が10分で、処理時間が5分と10分の2区で三倍体が出現した。特に処理時間が10分の場合に100%の三倍体化率が得られた。35℃処理区では三倍体を確認できなかった。図1に示したように処理水温が高いほど、また処理時間が長いほど補正通算浮上率(試験区通算浮上率/対照区通算浮上率×100)が低下する傾向がみられた。

表1 高温処理卵のふ化成績と三倍体化率(実験1)

処理水温(℃)	処理開始時間(分)	処理時間(分)	供試卵数(粒)	発眼率*2(%)	ふ化率*3(%)	浮上率(%)	通算*4浮上率(%)	三倍体*5化率(%)	三倍体*6生産効率(%)	補正三倍体*7生産効率(%)
25	5	5	285	93.7	96.3	94.9	85.6	0(3)	0	0
		10	236	94.9	92.0	96.1	83.9	0(3)	0	0
		15	168	91.1	90.2	92.0	75.6	0(7)	0	0
	10	5	210	90.5	93.2	93.2	78.6	- (0)	-	-
		10	224	91.5	87.8	90.6	72.8	0(8)	0	0
		15	236	88.6	83.7	88.0	65.3	0(1)	0	0
	15	5	229	92.1	94.3	96.0	83.4	0(4)	0	0
		10	201	94.5	88.4	91.7	76.6	0(4)	0	0
		15	252	88.1	68.9	92.2	56.0	0(2)	0	0
30	5	2.5	240	92.9	94.2	94.3	82.5	0(1)	0	0
		5	228	87.8	88.0	92.6	71.5	0(1)	0	0
		10	192	37.0	42.3	73.3	11.5	- (0)	-	-
	10	2.5	222	89.2	96.5	91.6	78.8	0(5)	0	0
		5	203	68.0	73.2	78.2	38.9	60(5)	23	25
		10	215	24.2	69.2	83.3	14.0	100(3)	14	16
	15	2.5	283	91.5	94.6	95.9	83.0	0(3)	0	0
		5	274	53.3	47.9	80.0	20.4	0(1)	0	0
		10	218	36.7	72.5	93.1	24.8	- (0)	-	-
35	5	1	161	70.8	85.1	91.8	55.3	0(2)	0	0
		2	216	35.2	65.8	84.0	19.4	- (0)	-	-
		4	228	0.9	0.0	-	0.0	- (0)	-	-
	10	1	200	90.0	89.4	95.7	77.0	0(2)	0	0
		2	167	51.5	67.4	84.5	29.3	0(1)	0	0
		4	241	0.0	-	-	0.0	- (0)	-	-
	15	1	275	82.2	85.0	95.3	66.5	- (0)	-	-
		2	228	40.4	70.7	84.6	24.1	- (0)	-	-
		4	301	1.3	75.0	0.0	0.0	- (0)	-	-
control			256	92.2	97.9	100.0	90.2			

\*1 吸水から高温処理開始までの時間      \*2 奇形発眼卵は含まない      \*3 奇形ふ化魚は含まない  
 \*4 通算浮上率=浮上尾数/供試卵数×100  
 \*5 三倍体化率=三倍体尾数/倍数性確認尾数×100, カッコ内の数値は中期分裂像が得られた尾数  
 \*6 三倍体生産効率=通算浮上率×三倍体化率/100  
 \*7 補正三倍体生産効率=通算浮上率/対照区通算浮上率×三倍体化率

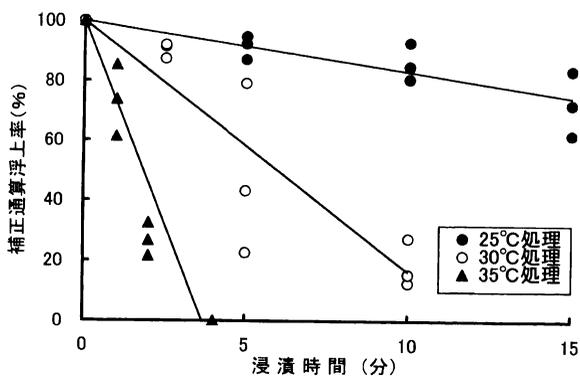


図1 高温処理がふ化成績におよぼす影響

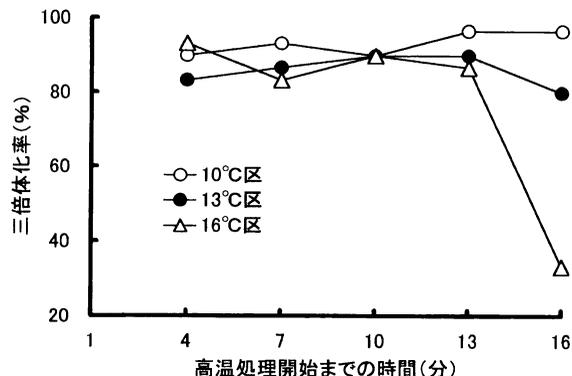


図2 吸水開始から高温処理開始までの時間と三倍体化率の関係

**実験2** 結果を表2および図2~3に示した。吸水水温10℃区では三倍体化率が全体的に高かったが、特に処理開始時間が13~16分の場合に96.7%の高率を示した。吸水水温13℃区では処理開始時間が10~13分の場合に三倍体化率が90.0%であったが、処理開始時間が16分の場合には三倍体化率がやや低下した。吸水水温16℃区では処理開始時間が4分の場合に三倍体化率が93.3%と最も高かったのに対し、16分の場合には33.3%と低い値を示した。また各吸水水温区とも処理開始時間が早いほど、通算浮上率が低下する傾向がみられた。このため三倍体生産効率が最も高い値を示したのは、吸水水温10℃区と13℃区では処理開始時間が16分、吸水水温16℃区では処理開始時間が10分の場合であった。

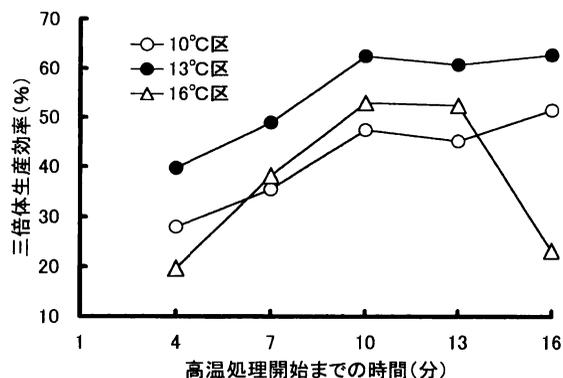


図3 吸水開始から高温処理開始までの時間と三倍体生産効率の関係

表2 高温処理卵のふ化成績と三倍体化率 (実験2)

処理水温 (℃)	処理開始時間 (分)	供試卵数 (粒)	発眼率 (%)	ふ化率 (%)	浮上率 (%)	通算浮上率 (%)	三倍体化率 (%)	三倍体生産効率 (%)	補正三倍体生産効率 (%)
10	4	164	42.7	81.4	89.5	31.1	90.0	28.0	30.6
	7	155	46.5	90.3	90.8	38.1	93.3	35.5	38.8
	10	235	63.0	97.3	86.1	52.8	90.0	47.5	51.9
	13	158	64.6	81.4	89.2	46.8	96.7	45.3	49.5
	16	277	59.9	94.0	94.9	53.4	96.7	51.6	56.3
13	4	130	74.6	85.6	74.7	47.7	83.3	39.7	43.3
	7	313	61.7	94.3	97.3	56.5	86.7	49.0	53.5
	10	283	75.3	96.7	95.6	69.6	90.0	62.6	68.3
	13	368	77.2	94.7	92.6	67.7	90.0	60.9	66.5
	16	401	84.3	95.0	98.1	78.6	80.0	62.9	68.7
16	4	194	34.5	76.1	80.4	21.1	93.3	19.7	21.5
	7	192	59.9	87.8	87.1	45.8	83.3	38.2	41.7
	10	168	72.0	87.6	93.4	58.9	90.0	53.0	57.9
	13	256	72.3	94.1	89.1	60.5	86.7	52.5	57.3
	16	205	84.4	95.4	86.7	69.8	33.3	23.2	25.3
control		490	93.5	99.6	98.5	91.6	-	-	-

**実験3** 結果を表3および図4~5に示した。吸水温9℃区では三倍体化率が全体的に高く、とくに処理開始時間が2~15分の場合に100%であった。吸水温12℃区と15℃区ではともに処理開始時間が2分の場合に三倍体化率が100%であったが、処理開始時間が遅くなるほど三倍体化率が低下する傾向がみられた。また実験2ほど顕著ではなかったが、処理開始時間が

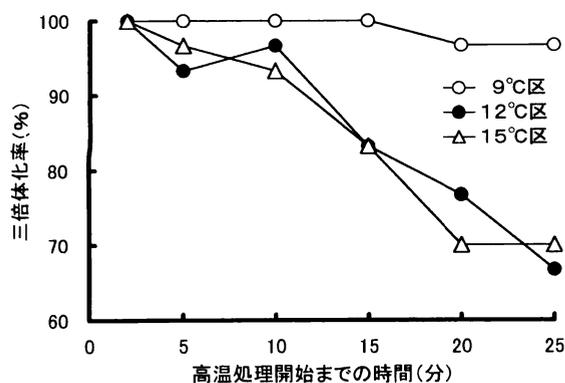


図4 吸水開始から高温処理開始までの時間と三倍体化率の関係

早い場合に通算浮上率が低下する現象がみられた。このため三倍体生産効率が最も高かったのは、吸水温9℃区では処理開始時間が15分、吸水温12℃区と15℃区では処理開始時間が10分の場合であった。なお、対照区の通算浮上率は吸水温9℃区で91.6%、12℃区で88.7%、15℃区で76.0%となっており、吸水温が高いほど低い値を示した。

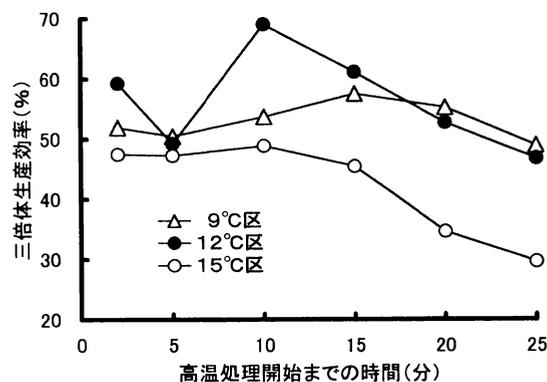


図5 吸水開始から高温処理開始までの時間と三倍体生産効率の関係

表3 高温処理卵のふ化成績と三倍体化率 (実験3)

吸水温 (℃)	処理開始時間 (分)	供試卵数 (粒)	受精率* (%)	発眼率 (%)	ふ化率 (%)	浮上率 (%)	三倍体化率 (%)	三倍体生産効率 (%)	補正三倍体生産効率 (%)
9	2	188	80.0	55.7	95.5	97.6	100.0	51.9	56.7
	5	250	86.7	62.8	96.9	90.2	100.0	50.5	55.1
	10	330	90.0	60.0	95.0	94.2	100.0	53.7	58.6
	15	338	80.0	63.0	97.9	93.2	100.0	57.5	62.8
	20	310	76.7	61.1	97.1	96.4	96.7	55.2	60.3
	25	382	83.3	54.5	97.9	94.7	96.7	48.9	53.4
	Cont.	353	93.3	92.9	99.7	99.0	-	-	-
12	2	170	76.7	64.3	98.9	93.3	100.0	59.3	66.9
	5	242	70.0	61.8	96.2	88.9	93.3	49.3	55.6
	10	366	76.7	75.9	98.4	95.6	96.7	69.0	77.8
	15	405	83.3	78.4	97.3	96.2	83.3	61.1	68.9
	20	461	80.0	72.9	98.7	95.5	76.7	52.7	59.4
	25	324	90.0	74.1	98.2	96.3	66.7	46.8	52.8
	Cont.	349	80.0	90.3	98.6	99.6	-	-	-
15	2	335	73.3	48.5	99.3	98.6	100.0	47.5	62.5
	5	300	80.0	50.0	100.0	97.8	96.7	47.3	62.2
	10	324	86.7	56.1	96.4	96.9	93.3	48.9	64.3
	15	312	76.7	57.1	98.8	96.9	83.3	45.5	59.9
	20	295	90.0	50.2	98.5	100.0	70.0	34.6	45.5
	25	257	70.0	45.8	99.0	93.2	70.0	29.6	38.9
	Cont.	317	83.3	77.0	98.6	100.0	-	-	-

\*: 供試卵より各区30粒を抽出し、2~8細胞期における卵割の有無より受精率を算出した。

## 考 察

実験1の結果から25℃処理区では三倍体が出現せず、25℃は処理温度として不相当と考えられた。35℃処理区では、処理時間が1～2分の場合には倍数性が確認された個体は全て二倍体であったこと、および4分の場合には発眼期以前に死亡する個体が多く、通算浮上率が0%であったことから、35℃も処理温度として不相当であると思われる。30℃処理区では処理時間が2.5分では三倍体を確認されなかったことから、2.5分は処理時間としては短いことが示唆された。従って100%の三倍体化率が得られた30℃・10分処理付近に処理条件の適値があると考えられた。

土屋ら<sup>6)</sup>はヤマメの三倍体作出条件として27℃・16～18分処理、あるいは28℃・13～15分処理が望ましいと述べている。また吉沢ら<sup>7)</sup>は27℃・16～20分処理で三倍体化率が100%であったと報告している。30℃・10分処理を行った実験2と、28℃・15分処理を行った実験3の結果を総合して検討すると、実験3で100%の三倍体化が得られ、また三倍体生産効率も69%の高率を示した区があったことから、ヤマメの高温処理条件のうち処理温度と処理時間については28℃・15分処理が適値と考えられ、土屋ら<sup>6)</sup>と吉沢ら<sup>7)</sup>の報告に沿った結果が得られた。

東京都下に散在する民間養魚場では、媒精卵の吸水に河川水を使用するものが多いと思われるが、河川により水温差があり、また同一河川でもヤマメの産卵初期と終期では水温差があるのが一般的である。今回の実験2および実験3の結果から、水温が9～10℃であれば吸水開始後16分以内に高温処理を開始することにより90～100%の高率で三倍体を作成できるが、水温が15～16℃の場合には吸水開始後15分以降に高温処理を始めると三倍体化率が低下することが判明した。従って、吸水に用いる水温が高い場合には高温処理を早めに開始することが望ましい。このことは吸水水温が高いと極体の放出が早く行われることを示唆しているものと考えられる。

三倍体種苗の生産にあたっては三倍体化率と三倍体生産効率とともに、できるだけ高い値になることが望ましい。100%の三倍体化率が得られた実験3につい

てみると、吸水水温9℃区では処理開始時間が15分の場合に三倍体化率が100%で、三倍体生産効率が最大の57.5%を示したことから、処理条件として最適と考えられる。吸水水温が15℃の場合は処理開始時間が2分の場合に三倍体化率が100%を示し、三倍体生産効率も最大値にほぼ近い値を示したことから、処理開始時間としては2分が適値と判断される。

一方、吸水水温12℃区では処理開始時間が2分の場合に三倍体化率が100%で三倍体生産効率が59.3%、処理開始時間が10分の場合には三倍体化率が96.7%で三倍体生産効率が69.0%であった。このような場合は処理開始時間の選定にあたって三倍体化率と三倍体生産効率のいずれを優先させるかという問題が生じる。今後は、吸水水温が12℃前後の場合についても、三倍体化率と三倍体生産効率とともに最大になるような高温処理技術の開発が望まれる。

## 文 献

- 1) 白田博 (1986) 染色体操作による有用魚種の品質改善研究－I, 温度処理による三倍体アマゴの作出と飼育. 岐阜水試研報., (31) : 15-19.
- 2) 小島将男・岩橋正雄 (1985) 温度ショックによるニジマス染色体の倍数化効果について. 新潟内水試研報., (12) : 39-44.
- 3) 本西晃・小原昌和・塩瀬淳也 (1986) ニジマス三倍体の作出. 昭和59年度長野水試事業報告.: 38.
- 4) Yamazaki, F., 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 (7) : 963.
- 5) Phillips, R. B., K. D. Zajicek, P. E. Ihssen, and O. Johnson (1986) Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture*, 54 : 313-319.
- 6) 土屋文人・小島将男・岩橋正雄 (1986) 温度刺激によるヤマメの染色体の倍数化について. 新潟内水試研報., (13) : 23-28.
- 7) 吉沢和俱・高橋麻次郎・林不二雄 (1987) 染色体操作による魚類の改良品種作出研究－I, ヤマメ, ニジマスの三倍体および雌性発生二倍体の誘導条件. 群馬農業研究, E水産 (3) : 1-9.