

ヤマメ、ニジマスの第一卵割阻止型雌性発生二倍体の作出条件(4) 温度二回処理の最適条件

小野 淳・工藤真弘・城 智聡

第一卵割阻止による倍数化により得られる雌性発生二倍体魚や四倍体魚を、クローン魚作出や三倍体大量生産技術に応用していくためには、これらを大量にかつ効率良く作出することが求められている。東京都水産試験場奥多摩分場においては、圧力処理による雌性発生魚作出の最適条件の検討を行っているが、作出率が低く、いまだに技術が確立していない。

一方、最近、第一卵割阻止を目的として温度処理を施した卵に、再度温度処理を施すと雌性発生二倍体魚の作出効率が向上することが報告されている¹⁾。そこで本実験では、奥多摩分場産のヤマメ・ニジマス卵に

ついて、条件を変えて温度二回処理を施し、第一卵割阻止型雌性発生二倍体魚の作出最適条件について検討したので報告する。

材料と方法

実験1 ヤマメ (第一回処理温度 35~50°C・h)

供試卵 1994年10月、奥多摩分場で飼育した1+年魚20尾より採卵し、ブラウントラウト不活化精子で受精した。

実験区と温度処理 実験区は表1のとおりで、一回目の温度処理を積算水温 35, 40, 45, 50°C・hに行い、

表1 ヤマメ温度2回処理による第一卵割阻止結果 (実験1)

一回目処理 時期 (°C・h)	第二回 処理時間	供試卵数	発眼胚数		正常発眼率 *1	奇形発眼率 *2	ふ化尾数	通算ふ化率 *3
			正常発眼胚数	奇形発眼胚数				
35	無処理	179	1	5	0.6%	3.4%	0	0.0%
	15分	191	5	18	2.6%	12.0%	3	1.6%
	30分	168	3	21	1.8%	14.3%	1	0.6%
	45分	181	2	17	1.1%	10.5%	0	0.0%
	60分	202	0	4	0.0%	2.0%	0	0.0%
40	無処理	194	3	32	1.5%	18.0%	2	1.0%
	15分	187	2	19	1.1%	11.2%	0	0.0%
	30分	174	0	16	0.0%	9.2%	0	0.0%
	45分	177	0	3	0.0%	1.7%	0	0.0%
	60分	243	0	5	0.0%	2.1%	0	0.0%
45	無処理	201	3	9	1.5%	6.0%	2	1.0%
	15分	190	0	7	0.0%	3.7%	0	0.0%
	30分	145	0	1	0.0%	0.7%	0	0.0%
	45分	178	0	1	0.0%	0.6%	0	0.0%
	60分	217	0	2	0.0%	0.9%	0	0.0%
50	無処理	166	0	14	0.0%	8.4%	0	0.0%
	15分	144	0	1	0.0%	0.7%	0	0.0%
	30分	180	0	1	0.0%	0.6%	0	0.0%
	45分	161	0	7	0.0%	4.3%	0	0.0%
	60分	145	0	4	0.0%	2.8%	0	0.0%
GC*4		643	0	123	0.0%	19.1%	0	0.0%
NC		827	549	3	66.4%	66.7%	482	58.3%

*1 正常発眼率: (正常発眼胚/供試卵数) × 100

*3 通算ふ化率: (ふ化尾数/供試卵数) × 100

*2 通算発眼率: (発眼胚数/供試卵数) × 100

*4 GC: 非倍数化処理区

これらの各区について15, 30, 45, 60分後に二回目の温度処理を行った。媒精後、第一回、二回の温度処理までの間、供試卵は12℃の恒温循環水槽に收容し、温度処理は一回目、二回目ともに28℃、15分間とした。なお、二回目処理終了後は水温10~13℃下で通常飼育を行った。対照区として非倍数化処理区（以下G.C.区）、通常交配区（以下N.C.区）を設定した。

実験2 ヤマメ（第一回処理温度30~40℃・h）

供試卵 1995年10月、奥多摩分場で飼育した1+年魚20尾より採卵し、ブラウントラウト不活化精子で受精した。

実験区と温度処理 実験区は表2のとおりで、1回目の温度処理を積算水温30, 32.5, 35, 37.5, 40℃・hに行い、これらの各区について15, 30, 45, 60分後に2回目の温度処理を行った。媒精後第一回、二回の温度処理までの恒温循環水槽の水温と二回目処理終了後の飼育方法、倍数化処理温度と時間は実験1と同じである。対照区として非倍数化処理区（以下G.C.区）、異種交配区（以下I.C.区）、通常交配区（以下N.C.区）を設定した。

実験3 ニジマス（第一回処理温度30~50℃・h）

供試卵 1993年2月、奥多摩分場で飼育した3+年

表2 ヤマメ温度2回処理による第一卵割阻止結果（実験2）

一回目処理 時期(℃・h)	第二回 処理時間	供試卵数	発眼胚数		正常発眼率 *1	奇形発眼率 *2	ふ化尾数	通算ふ化率 *3
			正常発眼胚数	奇形発眼胚数				
30	0分	484	11	25	2.3%	7.4%	3	0.6%
	15分	478	4	20	0.8%	5.0%	0	0.0%
	30分	340	1	6	0.3%	2.1%	0	0.0%
	45分	433	6	32	1.4%	8.8%	2	0.5%
	60分	578	2	16	0.3%	3.1%	2	0.3%
32.5	0分	416	5	24	1.2%	7.0%	0	0.0%
	15分	520	2	11	0.4%	2.5%	1	0.2%
	30分	446	2	15	0.4%	3.8%	2	0.4%
	45分	492	1	20	0.2%	4.3%	0	0.0%
	60分	243	4	12	1.6%	6.6%	2	0.8%
35	0分	486	1	5	0.2%	1.2%	1	0.2%
	15分	364	0	9	0.0%	2.5%	0	0.0%
	30分	370	0	10	0.0%	2.7%	0	0.0%
	45分	398	1	1	0.3%	0.5%	0	0.0%
	60分	379	0	3	0.0%	0.8%	0	0.0%
37.5	0分	387	0	9	0.0%	2.3%	0	0.0%
	15分	359	0	8	0.0%	2.2%	0	0.0%
	30分	370	0	2	0.0%	0.5%	0	0.0%
	45分	361	1	0	0.3%	0.3%	1	0.3%
	60分	425	1	4	0.2%	1.2%	1	0.2%
40	0分	519	2	38	0.4%	7.7%	1	0.2%
	15分	345	4	21	1.2%	7.2%	3	0.9%
	30分	406	0	4	0.0%	1.0%	0	0.0%
	45分	443	1	3	0.2%	0.9%	1	0.2%
	60分	442	2	2	0.5%	0.9%	0	0.0%
GC*4		274	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
IC*5		235	0	6	0.0%	2.6%	0	0.0%
NC		257	18	0	7.0%	7.0%	15	5.8%

*1 正常発眼率：(正常発眼胚/供試卵数)×100

*2 通算発眼率：(発眼胚数/供試卵数)×100

*3 通算ふ化率：(ふ化尾数/供試卵数)×100

*4 GC：非倍数化処理区

*5 IC：異種交配区（ヤマメ×ブラウントラウト）

魚5尾より採卵し、ホモ型アルビノニジマス不活化精子で受精した。

実験区と温度処理 一回目の温度処理を積算水温 35, 40, 45, 50℃・h に行い、これらの各区について 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 分後に二回目の温度処理を行った。媒精後第一回、二回の温度処理までの間、供試卵は7℃の恒温循環水槽に收容し、温度処理は28℃、15分間とした。なお、二回目処理終了後は水温4~6℃下で通常飼育を行った。対照区として非倍数化処理区（以下 G.C. 区）、異種交配区（以下 I.C. 区）を設定した。

実験4 ニジマス卵（第一回処理温度 30~40℃・h）

供試卵 1994年2月、奥多摩分場で飼育した3+年魚5尾より採卵し、ホモ型アルビノニジマス不活化精子で受精した。

実験区と温度処理 一回目の温度処理を積算水温 30, 35, 40℃・h に行い、これらの各区について 15, 30, 45, 60, 120 分後に二回目の温度処理を行った。媒精後第一回、二回の温度処理までの恒温循環水槽の水温と二回目処理終了後の飼育方法、倍数化処理温度と時間は実験3と同じである。対照区として非倍数化処理区（以下 G.C. 区）、異種交配区（以下 I.C. 区）、通常交配区（以下 N.C. 区）を設定した。

結 果

実験1 温度二回処理による第一卵割阻止結果を表1, 図1に示した。このうち一回目の処理を35℃・h に行った実験区で正常発眼胚およびふ化仔魚が得られた。しかし、40℃・h 区でわずかにふ化が認められたが、45, 50℃・h 区ではふ化個体はみられなかった。

二回目の処理時期と通算ふ化率の間には一定の関係が認められず、通算ふ化率が最も高かったのは一回目を35℃・h, 二回目をその15分後に行った区で、正常発眼率12.0%, 通算ふ化率1.6%であった。

実験2 温度二回処理による第一卵割阻止結果を表2, 図2に示した。このうち一回目の処理を30, 32.5℃・h に行った実験区では二回目の全処理区で正常発眼胚が確認された。また、実験1と異なり、35℃・h を除く全区にわずかながらふ化個体が認められたが、通算ふ化率は全区とも1%未満と極めて低かった。このうち最も通算ふ化率が高かったのは一回目を40℃・h, 二回目をその15分後に行った区で、正常発眼率7.2%, 通算ふ化率0.9%であった。全体的にみれば、一回目の処理時期が30, 32.5℃・h 区で通算ふ化率が平均0.28%と高かった。二回目についての通算ふ化率のピークは30℃・h で45分以降にあり、32.5℃・h では30分, 60分の両区に、40℃・h では15分区にあった。二回目の処理時期と通算ふ化率の間には一定の相関が

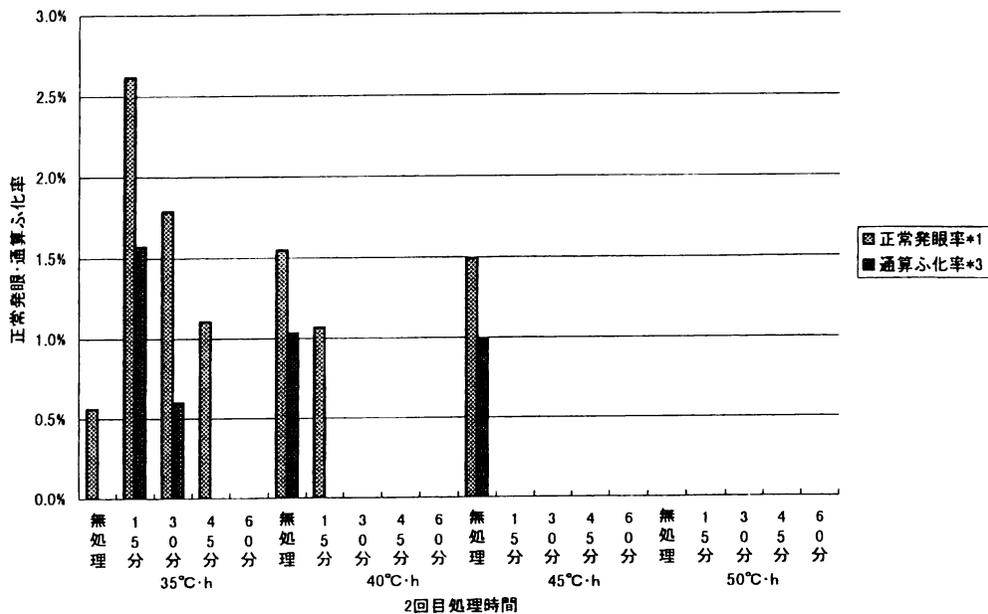


図1 ヤマメ温度2回処理による第一卵割阻止結果（実験1）

*1 正常発眼率：(正常発眼胚/供試卵数) × 100
 *2 通算ふ化率：(正常発眼胚/供試卵数) × 1100

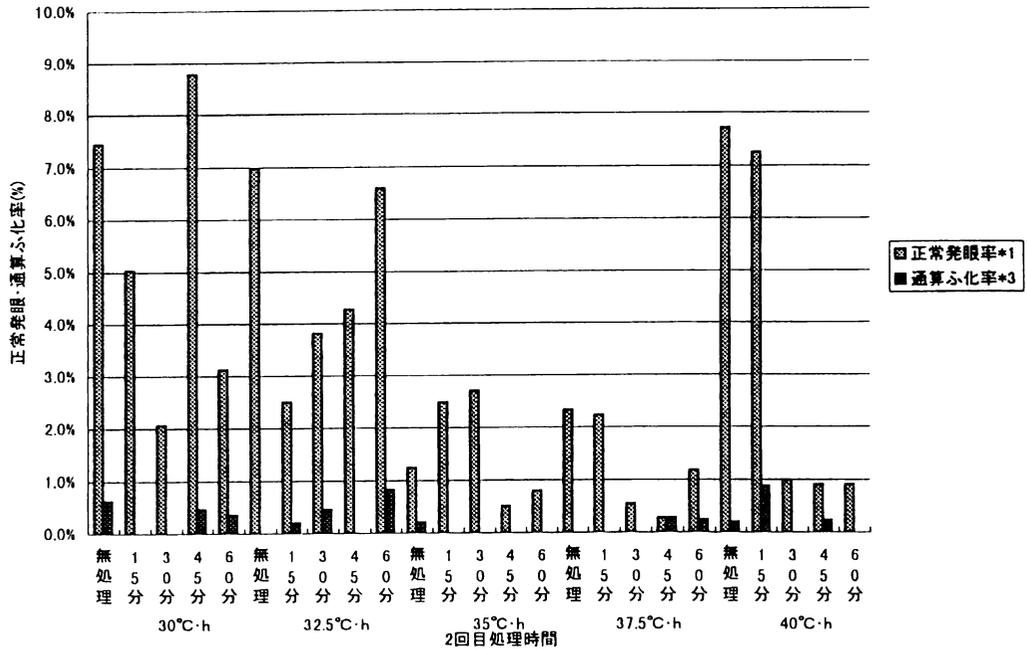


図2 ヤマメ温度2回処理による第一卵割阻止結果 (実験2)

*1 正常発眼率：(正常発眼胚/供試卵数) × 100

*2 通算ふ化率：(正常発眼胚/供試卵数) × 1100

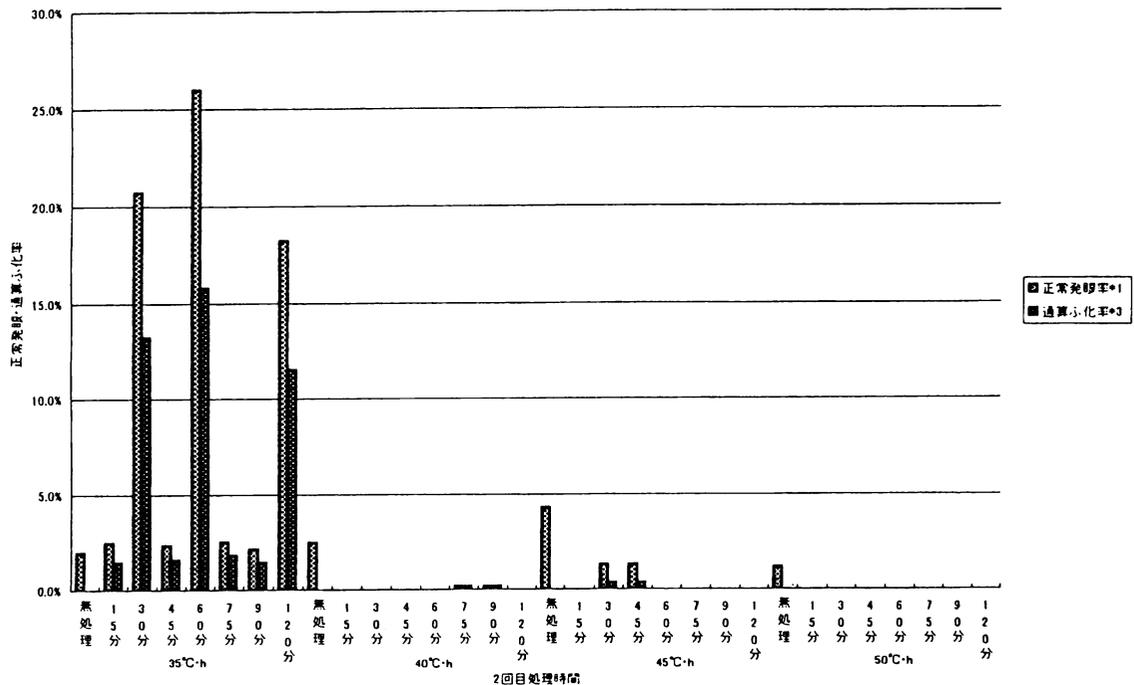


図3 ニジマス温度2回処理による第一卵割阻止結果 (実験3)

認められなかった。

実験3 温度二回処理による第一卵割阻止結果を表3, 図3に示した。このうちでは, 一回目の処理を35°C・hに行った実験区で通算ふ化率が最大15.8%と高かった。40および45°C・hの実験区でわずかにふ化が認められたが, 50°C・h区ではふ化個体がみられな

かった。また二回目の処理時期と生残率の間には一定の関係が認められず, 通常ふ化率のピークは30, 60, 120分後の三区に現れた。そのうち最も通算ふ化率が高かったのは一回目を35°C・h, 二回目をその60分後に行った区で, 正常発眼率26.0%, 通算ふ化率15.8%であった。

表3 ニジマス温度2回処理による第一卵割阻止結果（実験3）

一回目処理 時期 (℃・h)	第二回 処理時間	供試卵数	発眼胚数		正常発眼率 *1	通産発眼率 *2	ふ化尾数	通算ふ化率 *3
			正常発眼胚数	奇形発眼胚数				
35	無処理	203	4	10	2.0%	6.9%	0	0.0%
	15分	280	7	3	2.5%	3.6%	4	1.4%
	30分	280	58	7	20.7%	23.2%	37	13.2%
	45分	254	6	2	2.4%	3.1%	4	1.6%
	60分	285	74	11	26.0%	29.8%	45	15.8%
	75分	278	7	0	2.5%	2.5%	5	1.8%
	90分	278	6	1	2.2%	2.5%	4	1.4%
	120分	269	49	10	18.2%	21.9%	31	11.5%
	GC*4	429	0	155	0.0%	36.1%	0	0.0%
	IC*5	112	63	1	56.3%	57.1%	58	51.8%
40	無処理	564	14	22	2.5%	6.4%	0	0.0%
	15分	529	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	30分	580	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	45分	518	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	60分	487	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	75分	617	1	0	0.2%	0.2%	1	0.2%
	90分	583	1	0	0.2%	0.2%	1	0.2%
	120分	644	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	GC*4	397	0	159	0.0%	40.1%	0	0.0%
	IC*5	344	11	0	3.2%	3.2%	0	0.0%
45	無処理	256	11	39	4.3%	19.5%	0	0.0%
	15分	287	0	4	0.0%	1.4%	0	0.0%
	30分	305	4	7	1.3%	3.6%	1	0.3%
	45分	309	4	6	1.3%	3.2%	1	0.3%
	60分	316	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	75分	313	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	90分	320	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	120分	297	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	GC*4	207	10	62	4.8%	34.8%	3	1.4%
	IC*5	278	124	143	44.6%	96.0%	33	11.9%
50	無処理	256	3	10	1.2%	5.1%	0	0.0%
	15分	363	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	30分	266	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	45分	323	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	60分	350	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	75分	327	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	90分	300	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	120分	302	0	0	0.0%	0.0%	0	0.0%
	GC*4	197	163	0	82.7%	82.7%	160	81.2%
	IC*5	122	41	43	33.6%	68.9%	0	0.0%

*1 正常発眼率：(正常発眼胚/供試卵数) × 100

*2 通算発眼率：(発眼胚数/供試卵数) × 100

*3 通算ふ化率：(ふ化尾数/供試卵数) × 100

*4 GC：非倍数化処理区

*5 IC：異種交配区（ニジマス×ホモ型アルビノニジマス）得られた発眼胚はすべてアルビノ

実験4 第一卵割阻止結果を表4, 図4に示した。実験3と異なり一回目, 二回目の全ての処理区で正常発眼胚が確認され, 40℃・h-60分と120分を除く全ての区でふ化個体が認められた。このうち最も通算ふ化率が高かったのは一回目を30℃・h, 二回目をその45分後に行った区で, 正常発眼率11.8%, 通算ふ化率13.0%であった。全体的にみれば, 一回目の処理時期が30℃・h区で通算ふ化率が4.6~8.5% (平均4.45%)と高かったが, 二回目についての通算ふ化率のピークは30℃・hでは45分, 35℃・hでは15分, 40℃・hでは45分の三区に出現した。この結果, 第一回処理時の積算水温と第二回処理との関係は単峰または複数峰を形成していた。

考 察

ニジマスにおいて, 温度二回処理による作出で得られた生残魚は, アイソザイム分析によって第一卵割阻

止型雌性発生二倍体魚であることがすでに報告されている²⁾。今回の実験では, アイソザイム分析は実施しなかったが, ヤマメ・ニジマスともに検卵時の生残状況やその後のふ化仔魚の形態から, 媒精に用いたブラウントラウト, ホモ型アルビノニジマス精子の遺伝的不活化には成功し, 倍数化処理によって正常発生した個体は, ほぼ第一卵割阻止型雌性発生二倍体であるものと考えられた。

このうちニジマスについては, 温度二回処理により正常発眼率, ふ化率が, 二回の実験とも過去の奥多摩分場における圧力処理における結果と比較して良好な成績を得ることができた。しかし, ヤマメについては二回ともふ化率が極めて低い結果となり, 圧力処理と比較して良好な結果を得ることができなかった。この原因として, 対照(N.C.)区の発眼, ふ化成績が二回とも非常に悪く, 卵質が発眼・ふ化率に影響を与えたのではないかと考えられた。

表4 ニジマス温度2回処理による第一卵割阻止結果 (実験4)

一回目処理 時期(℃・h)	第二回 処理時間	供試卵数	発眼胚数		正常発眼率 *1	通算発眼率 *2	ふ化尾数	通算ふ化率 *3
			正常発眼胚数	奇形発眼胚数				
30	無処理	338	70	124	20.7%	57.4%	6	1.8%
	15分	343	26	50	7.6%	22.2%	16	4.7%
	30分	284	26	39	9.2%	22.9%	18	6.3%
	45分	390	46	76	11.8%	31.3%	33	8.5%
	60分	254	31	34	12.2%	25.6%	14	5.5%
	120分	326	46	71	14.1%	35.9%	15	4.6%
35	無処理	348	29	167	8.3%	56.3%	2	0.6%
	15分	326	29	21	8.9%	15.3%	19	5.8%
	30分	397	27	57	6.8%	21.2%	19	4.8%
	45分	319	34	47	10.7%	25.4%	12	3.8%
	60分	294	20	59	6.8%	26.9%	8	2.7%
	120分	350	13	40	3.7%	15.1%	3	0.9%
40	無処理	279	35	80	12.5%	41.2%	0	0.0%
	15分	172	9	18	5.2%	15.7%	2	1.2%
	30分	248	19	28	7.7%	19.0%	5	2.0%
	45分	226	21	41	9.3%	27.4%	9	4.0%
	60分	224	14	31	6.3%	20.1%	0	0.0%
	120分	326	1	7	0.3%	2.4%	0	0.0%
GC*4		269	47	154	17.5%	74.7%	0	0.0%
IC*5		385	342	10	88.8%	91.4%	334	86.8%
NC		290	242	19	83.4%	90.0%	239	82.4%

*1 正常発眼率: (正常発眼胚/供試卵数) × 100

*2 通算発眼率: (発眼胚数/供試卵数) × 100

*3 通算ふ化率: (ふ化尾数/供試卵数) × 100

*4 GC: 非倍数化処理区

*5 IC: 異種交配区 (ニジマス×ホモ型アルビノニジマス) 得られた発眼胚はすべてアルビノ

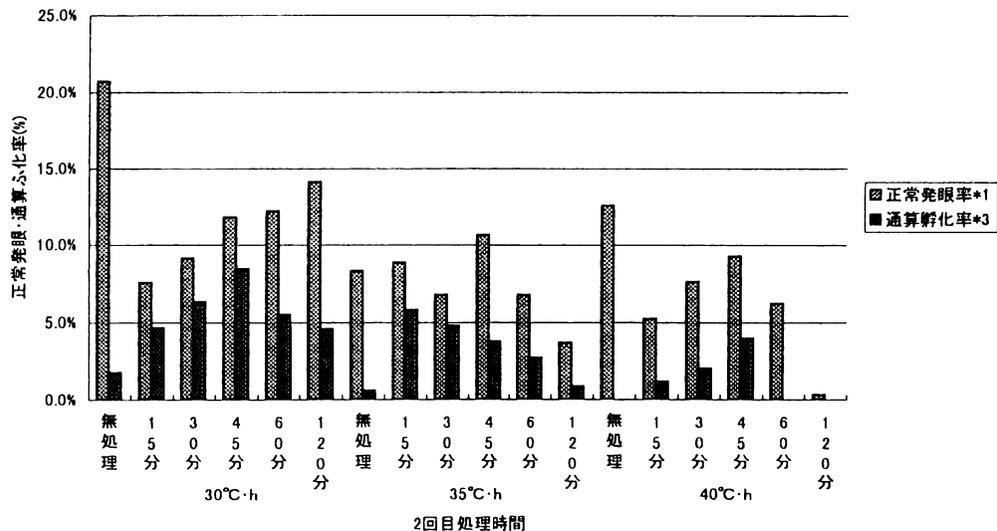


図2 ニジマス温度2回処理による第一卵割阻止結果 (実験4)

*1 正常発眼率：(正常発眼胚/供試卵数) × 100

*2 通算ふ化率：(正常発眼胚/供試卵数) × 1100

ヤマメ、ニジマスとも 30°C・h から 35°C・h の範囲で温度処理を施した場合、いずれも通算ふ化率が高い値を示すことから、第一回の処理適期はおよその範囲内にあるものと推察された。また、通常ふ化率からみた二回目の適正処理時期については、ヤマメでは第一回処理時の積算水温が高くなるほど早まっていく傾向がみられた。一方ニジマスでは、ふ化仔魚が認められたすべての処理積算水温で単峰または複数峰を形成しており、特に実験3においては 35°C・h で三つのピークを形成していた。

温度二回処理の有効性については、二回目の処理により分裂の再開を抑制するためとされている²⁾。これが原因であるとする、ニジマスでは飼育水温を 6°C にしたことによって卵の発生速度が遅くなり、一回目の処理後に紡錘体が再生する速度も遅くなり、二回目の処理効果のある時間帯までの間に余裕が生じる。そのため、発眼・ふ化率が向上し、二回目処理時にピークを形成したとも考えられる。加えて親魚間においても雌性発生の誘起率にばらつきがあることが報告されており³⁾、親魚間の卵の発生に遅速があると仮定するならば、実験3の複数のピークの形成は、プールされた親魚の卵発生速度のばらつきが反映されたものと推察される。

また、両魚種ともに第一回処理のみでもふ化仔魚を得ている。温度一回処理による第一卵割阻止法はすでに多くの事例があり、処理適期は様々であるが、ニジマスでは積算水温 40~50°C・h、ヤマメでは 40~60

°C・h の水温帯で高水温処理を施せば効率よく第一卵割が阻止されるとの報告がある⁴⁾。そのため、今回も温度一回処理によって第一卵割が阻止された可能性も否定できない。青森県水産試験場⁸⁾は、ニジマスにおいて温度一回処理が二回処理よりも発眼・浮上率が良好であったと報告しており、その理由として一回目の処理で倍数化されたものが二回目の処理を受けて逆に生残率を低下させてしまったとしている。今後は、温度一回処理についても検討を行い、あわせてそれが卵発生に与える影響についても解明していく必要がある。

文 献

- 1) 桑田知宣 (1993) ニジマスの第一卵割阻止における高温二回処理の効果. 平成5年度日本水産学会秋季大会講演要旨.
- 2) 岐阜県水産試験場 (1993) 染色体の倍数化技術の応用によるアユ・アマゴ等の品質改善研究. 平成4年度地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業報告書: 7-13.
- 3) 高橋一孝 (1986) マス類の染色体操作による育種試験-II, 雌性発生誘起における発眼率, 浮上率のバラツキについて. 昭和60年度山梨魚苗センター事業報告: 90-95.
- 4) 高橋一孝 (1986) マス類の染色体操作による育種試験-VII, 温度処理による第一卵割阻止の開始時期と時間. 昭和61年度山梨魚苗センター事業報告: 34-38.
- 5) 桑田知宣・臼田博・熊崎隆夫・都竹仁一 (1992) 染色体操作による有用魚類の品質改善研究-IV, ニジマスの卵割阻止最

適処理方法について. 岐阜水試研報, (37) : 1-7.

6) 第 16 回全国養鱒技術協議会 (1991) 平成 3 年度育種・バイオ
ク部会報告書 : 139-144.

7) 第 19 回全国養鱒技術協議会 (1994) 平成 5 年度育種・バイオ
ク部会報告書 : 203-208.

8) 青森県水産試験場 (1996) ニジマスの第一卵割阻止による雌
性発生のための高温 2 回処理における管理水温の違いにつ
いて. 平成 6 年度地域バイオテクノロジー実用化技術研究開
発促進事業報告書 : 8-9.