

# アマゴの全雌生産に関する研究—II

## 高温刺激による染色体倍数化条件の検討と雌性発生二倍体魚の作出

山本章造

Studies concerning Production of Gynogenetic Seedlings in Amago  
*Salmo (Oncorhynchus) masou macrostomus*—II Conditions to Induce  
Gynogenetic Diploids by Heat Shock and its Production

Syozo YAMAMOTO

前報<sup>1)</sup>の結果から、雌性発生を誘起する紫外線の適正な照射量が明らかになった。しかし、この雌性発生卵は、染色体が半数であるために、卵発生中にほとんどが死亡する<sup>2)</sup>。そこで、卵発生を正常に進め、雌性発生魚を作出するには、受精卵の染色体を倍数化する必要がある。

小野里<sup>3)</sup>は、サケ科魚類を材料にして、受精後第2極体放出前に加圧処理することによって、染色体が倍数化し、雌性発生二倍体魚が高率で得られることを報告している。しかし、加圧法は特殊な高圧器を必要とし、一度に処理できる卵の量が制限されるなどの問題がある。一方、より簡便な倍数化法として、ニジマス *Salmo (Salmo) mykiss* を用いて高温刺激による方法<sup>4, 5)</sup> が試みられている。この温度処理法は、現在のところ加圧法よりも倍数化率が劣るものの、高価な加圧器を必要とせず、温

水に浸漬するだけで、一度に大量の卵を処理できるなどの利点があり、実用的価値が高い。

そこで、アマゴ *Salmo (Oncorhynchus) masou macrostomus* を材料にして、高温刺激による染色体の倍数化条件を検討するとともに、雌性発生二倍体魚の作出を試みた。

温度処理条件は、処理時間、処理時期及び処理前の保存温度について検討した。その結果を報告する。

報告に先だち、供試親魚を提供していただいた新見市漁業協同組合養鱒場、石指明氏及び富村種苗センター城守敏郎氏に感謝する。

### 材 料 と 方 法

試験は7回実施し、複数親魚を用いた同一試験を数回

表1 試験別の材料と精子不活性化条件

試 験 番 号	1	2	3	4	5	6	7
試 験 月 日	10.21	10.23	10.25	10.31	11.4	11.5	11.7
雌							
尾 数	3	1	2	2	1	4	7
平均体重 (g)	500	270	343	465	301	331	294
採卵重量 (g)	98	70	135	237	96	424	345
雄							
種 類	アルビノ	普通	〃	〃	〃	〃	〃
尾 数	3	1	2	2	1	6	5
平均体重 (g)	400	340	310	312	310	87	85
不活性化条件							
希釈倍数	100	100	100	100	100	50	100
精子液の厚さ (mm)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4
照射量 (erg/mm <sup>2</sup> )			3,510~4,860				5,850~8,100

くり返した。材料と方法をまとめて表1に示した。材料は、新見市漁協養鱒場、富村種苗センター及び当水試魚病センターで養成した親魚を用いた。

染色体倍數化のための高温刺激は温度処理時間、処理時期及び処理前の保存温度について検討した。実験区の設定は、昭和61年度バイオテクノロジー連絡試験のとりきめ事項\*を参考にした。温度処理時間は試験1～4で検討し、媒精10分後に、30°Cの温水へ、5、10及び15分浸漬した。温度処理時期は試験1及び4で検討し、媒精5、10及び15分後に、30°Cの温水へ5分間浸漬した。処理前の保存温度は試験1で検討し、媒精後5及び10°Cの冷水中に10分間保存した後、30°Cの温水へ5及び10分間浸漬した。

温度処理に際しては、実験区ごとに一定数の卵をガーゼの袋に収容し、30°Cに調節した50 lの循環式ウォーターバスに浸漬した。処理後はいずれも10°Cの飼育水へ移し、卵管理した。

対照区として、無処理区、不活性化精子で受精だけをさせた不活性化処理区及び高温刺激(30°C、5分浸漬)だけを実施した温度処理区を設けた。

実験1では、雄にアマゴのアルビノを用い、雌性発生作出の指標になるかを検討した。

精子の不活性化は、前報<sup>1)</sup>で得られた結果から、試験1から5までは100倍に希釈した厚さ0.1mmの精液に、紫外線を90秒間照射した。その照射量は3,510～4,860 erg/mm<sup>2</sup>の範囲であった。試験6では精液の厚さを0.2mmにし、更に試験7では、厚さを0.4mmにするとともに紫外線照射量を5,850～8,100 erg/mm<sup>2</sup>に増加して精子の大量不活性化法を検討した。いずれも希釈精液を振とうしながら紫外線を照射した。試験1から7まで共通した高温刺激として、媒精10分後に30°Cの温水へ5分間浸漬し、雌性発生2倍体魚を作出するとともに、試験回次別の作出率のバラツキを検討した。

染色体倍數化の成否は、不活性化処理区の受精卵が半数体で死亡することによって判断し、試験結果は受精率、発眼率及びふ化率で検討した。

## 結 果

**温度処理時間と卵発生** 媒精10分後に、30°Cの温水へ5、10及び15分間浸漬した試験1～4の結果を表2～5に示した。

対照では4回の試験とも同様な結果であった。無処理

区の卵発生率はいずれも高く、ふ化率は84.8%以上で、使用した精子及び卵に、特に問題はなかった。また、不活性化処理対照区のふ化率はいずれも0%であったことから、雌性発生処理は完全に行われたと判断した。

試験1の受精率は、無処理対照区99.6%に対し、不活性化精子を使用した実験区は34.8%で低率であった。試験2～4でも受精率は低かった。

試験1の発眼率は5及び10分区が26.0及び31.8%であるのに対し、15分区は21.7%で若干低かった。15分区では処理1日後に死卵が多かった。他の試験も同様な傾向であった。

ふ化率は発眼率よりも著しく低下し、試験1の5分区は0.6%と低率になり、10及び15分区でも半減した。しかし、試験2及び4では5分区が15分区より高く、試験回次によって結果が相違した。

そこで、試験回次別の結果を比較するために各実験区の値を無処理対照区の値で除して指数化し、4回の試験結果をまとめて図1に示した。発眼指数の平均値は、処理時間が長くなるにつれて徐々に低下し、高温刺激が長くなると死卵が増加した。正常ふ化指数は5及び10分区では11でほとんど変わらないが、15分区では4.7で半減した。また、5分区で、試験回次別の結果に、バラツキが特に大きかった。

以上の結果、染色体を倍數化するための高温刺激は、媒精10分後に30°Cの温水へ、10分間浸漬することが最も有効であった。

**温度処理時期と卵発生** 媒精後の温度処理時期を検討した結果を表6に示した。2回の試験とも、発眼率は処理時期が5～15分の間でほとんど変わらず、29.4～38.4%の範囲であった。ふ化率は試験1では5分区で低いのに対し、試験4では15分区で低く、試験回次によって結果が相違した。媒精後の処理時間がこの範囲内では、卵発生率の差よりも試験回次による差の方が大きかった。

**高温刺激前の受精卵の保存温度と卵発生** 結果を表7に示した。処理前の保存温度と卵発生率との関係は、温度処理条件によって異なった。温度処理条件が30°C5分間の場合、10°Cよりも5°Cに保存した方が、発眼率、ふ化率、正常ふ化率ともに高かった。一方、30°C10分間処理では、処理前温度が5°Cと10°Cで卵発生率に差はなく、実験区間の差の方が大きかった。また、処理前温度にかかわらず、処理時間が5分間より10分間において、全体的に卵発生率が高い傾向にあった。

以上の結果、卵発生率は処理時間が10分間では、保存温度が5°Cと10°Cで変わらないが、5分間では5°Cの方

\*全国養鱒技術協試会 バイオテクノロジー連絡試験検討会

表2 温度処理時間と卵発生結果 (試験1)

	温度処理時間(分)			無処理 対照区	不活性化 処理対照区	温度処理 対照区
	5	10	15			
供試卵数	332	261	203	209	201	221
受精卵数	116	91	71	202	70	214
受精率(%)	34.8	34.8	34.8	96.6	34.8	96.6
発眼卵数	86	83	44	187	46	143
発眼率(%)	26.0	31.8	21.7	89.4	22.9	64.8
ふ化稚魚数	2	39	20	177	0	90
ふ化率(%)	0.6	15.0	9.9	84.8	0	40.7
正常ふ化稚魚数	2	36	14	173	0	81
正常ふ化率(%)	0.6	13.8	6.9	82.9	0	36.7

表3 温度処理時間と卵発生結果 (試験2)

	温度処理時間(分)			無処理 対照区	不活性化 処理対照区	温度処理 対照区
	5	10	15			
供試卵数	96	99	144	74	93	94
受精卵数	45	46	67	71	43	91
受精率(%)	46.7	46.7	46.7	96.4	46.7	96.4
発眼卵数	33	16	17	71	8	66
発眼率(%)	34.4	16.2	11.8	95.9	8.6	70.2
ふ化稚魚数	31	16	2	69	0	63
ふ化率(%)	32.3	16.2	1.4	93.2	0	67.0
正常ふ化稚魚数	27	12	1	66	0	61
正常ふ化率(%)	28.1	12.1	0.7	89.2	0	64.9

表4 温度処理時間と卵発生結果 (試験3)

	温度処理時間(分)			無処理 対照区	不活性化 処理対照区	温度処理 対照区
	5	10	15			
供試卵数	194	424	272	191	204	204
受精卵数	57	125	80	185	60	60
受精率(%)	29.4	29.4	29.4	96.8	29.4	29.4
発眼卵数	52	116	73	185	0	0
発眼率(%)	26.8	27.4	26.8	96.8	0	0
ふ化稚魚数	10	18	19	176	0	0
ふ化率(%)	5.2	4.2	7.0	92.1	0	0
正常ふ化稚魚数	5	14	18	176	0	0
正常ふ化率(%)	2.6	3.3	6.6	92.1	0	0

表5 温度処理時間と卵発生結果 (試験4)

	温度処理時間(分)			無処理 対照区	不活性化 処理対照区	温度処理 対照区
	5	10	15			
供試卵数	482	231	242	396	201	223
受精卵数	225	108	113	389	94	219
受精率(%)	46.7	46.7	46.7	98.3	46.7	98.3
発眼卵数	204	79	72	375	25	83
発眼率(%)	42.3	34.4	29.9	94.7	12.4	37.2
ふ化稚魚数	30	15	5	367	0	4
ふ化率(%)	6.2	6.3	2.2	92.7	0	1.8
正常ふ化稚魚数	29	15	5	367	0	3
正常ふ化率(%)	6.0	6.3	2.2	92.7	0	1.3

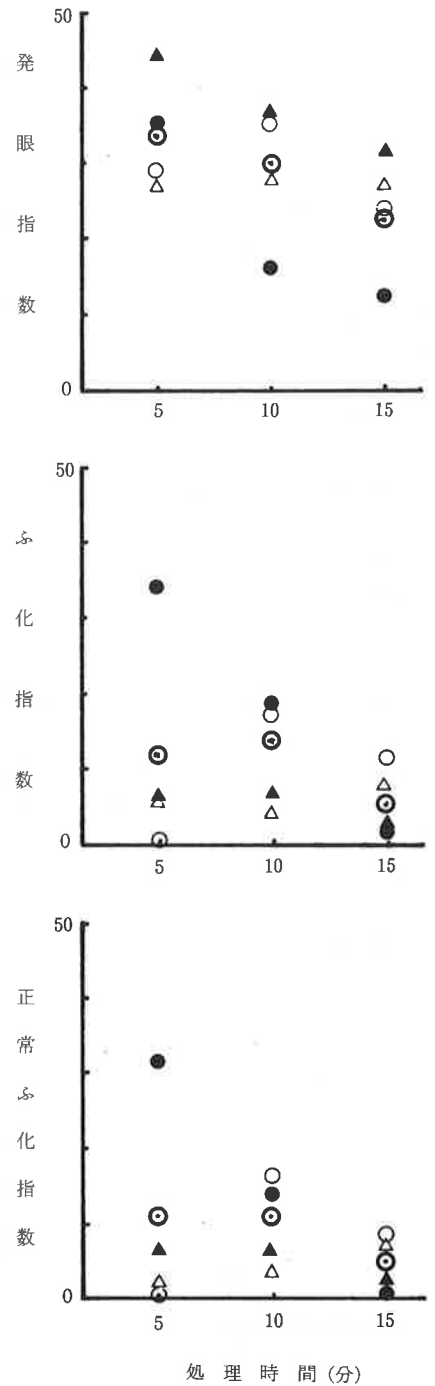


図1 温度処理時間別の指数

○: 試験1, ●: 試験2, △: 試験3, ▲: 試験4, ○: 平均

表6 媒精後の温度処理と卵発生結果

	試験1			試験4		
	媒精後の時間 (分)			媒精後の時間 (分)		
	5	10	15	5	10	15
供試卵数	197	261	223	482	221	224
受精卵数	69	91	78	225	103	105
受精率 (%)	34.8	34.8	34.8	46.7	46.7	46.7
発眼卵数	58	83	70	173	76	86
発眼率 (%)	29.4	31.8	31.4	36.0	34.4	38.4
ふ化稚魚数	17	39	34	35	14	3
ふ化率 (%)	8.6	15.0	15.2	7.3	6.3	1.3
正常ふ化稚魚数	16	36	31	29	14	3
正常ふ化率 (%)	8.1	13.8	13.9	6.1	6.3	1.3

表7 処理前の保存温度と卵発生結果 (試験1)

処理条件	処理前の保存温度 (°C)									
	5	5		10	5		5	10		
	30°C 5分			30°C 10分						
供試卵数	228	218	196	225	332	121	216	214	209	261
受精卵数	79	76	68	78	116	42	75	74	73	91
受精率 (%)	34.8	34.8	34.8	34.8	34.8	34.8	34.8	34.8	34.8	34.8
発眼卵数	59	46	48	67	86	36	45	65	65	83
発眼率 (%)	25.9	21.1	24.5	29.8	26.0	29.8	20.8	30.4	31.1	31.8
ふ化稚魚数	20	4	12	24	2	32	2	46	27	39
ふ化率 (%)	8.8	1.8	6.1	10.7	0.6	26.4	0.9	21.5	12.9	15.0
正常ふ化稚魚数	19	4	12	21	2	31	2	42	26	36
正常ふ化率 (%)	8.3	1.8	6.1	9.3	0.6	25.6	0.9	19.6	12.4	13.8

がすぐれた。

**雌性発生2倍体魚の作出** 媒精10分後に、30°C 5分間浸漬の温度処理条件で、試験を7回実施した結果を表8及び9にまとめて示した。不活性化処理区のふ化率はいずれも0%で、雌性発生処理が完全に行われたことから、ふ化稚魚はいずれも雌性発生2倍体魚とみなされた。

希釈精子液を0.1mmの厚さで照射した試験1～5までの無処理対照区の受精率はすべて90%以上であるのに対し、雌性発生処理区の受精率は50%以下と低率であった。この紫外線照射方法は精子の受精能力を低下させた。

発眼率は13.0～42.3%の範囲で、受精率よりやや低率であった。更に、ふ化率は0.6～32.3%の範囲で、試験回次によっては、発眼率に比べ著しく低下した。発眼率

とふ化率は必ずしも相関せず、発眼率は高くてもふ化率が低い結果もあり、試験回次間の結果に差が大きかった。発眼からふ化までの間、特に、ふ化直前に死卵が増加した。異常ふ化稚魚も少数出現したが、それらは体が曲ってはいるものの、目や頭部は大きく半数体症候群を示していなかった。

試験1では雄にアマゴのアルビノを使用した。無処理対照区でもアルビノは全く出現しなかった。アマゴのアルビノはニジマスと異なり劣性遺伝と考えられ、雌性発生の成否の指標になり得なかった。

希釈精子液の厚さを0.4mmにし、照射量を増加した試験7の1例では、受精率が67.2%で最も高かった。発眼率、ふ化率も高率で、正常ふ化率は30.2%であった。

表8 試験回次別の卵発生数

卵発生数		供試卵数	受精卵数	発眼卵数	ふ化稚魚数	正常ふ化数
実験区	回次					
1	E*	332	116	86	2	2
	I	209	202	187	177	173
	G	201	70	46	0	0
2	E	96	45	33	31	27
	I	74	71	71	69	66
	G	93	43	8	0	0
3	E	194	57	52	10	5
	I	191	184	184	176	176
	G	204	60	0	0	0
4	E	482	225	204	30	29
	I	396	389	375	367	367
	G	201	94	75	3	10
5	E 1	725	103	94	69	68
	E 2	87	81	79	74	71
	I	125	18	13	0	0
6	E 1	643	51	51	41	41
	E 2	724	70	113	46	44
	I	659	551	541	541	537
7	E 1	1,265	850	463	391	382
	E 2	632	283	99	79	62
	I	515	477	431	386	375
	G	139	63	14	0	0

\* E : 雌性発生処理区, I : 無処理対照区, G : 不活性化処理対照区

表9 試験回次別の卵発生率

卵発生率		受精率	発眼率	ふ化率	正常ふ化率
実験区	回次				
1	E	34.8	26.0	0.6	0.6
	I	96.6	89.4	84.8	82.9
	G	34.8	22.9	0	0
2	E	46.7	34.4	32.3	28.1
	I	96.4	95.9	93.2	89.2
	G	46.7	8.6	0	0
3	E	29.4	26.8	5.2	2.6
	I	96.8	96.8	92.1	92.1
	G	29.4	0	0	0
4	E	46.7	42.3	6.2	6.0
	I	98.3	94.7	92.7	92.7
	G	46.7	37.2	1.5	0.5
5	E	14.2	13.0	9.5	9.4
	I	93.1	90.8	85.1	81.6
	G	14.2	10.4	0	0
6	E 1	7.9	7.9	6.4	6.3
	E 2	9.7	9.7	6.3	6.1
	I	83.6	82.1	82.1	81.5
7	E 1	67.2	36.6	30.9	30.2
	E 2	44.8	15.6	12.5	9.8
	I	92.6	83.7	75.0	72.8
	G	44.8	10.1	0	0
平均	E	36.5	25.3	13.0	11.6
	I	83.4	80.1	70.0	73.9
	G	42.9	24.5	11.9	11.7

7回実施した雌性発生処理区の平均発眼率は23.6%、平均ふ化率は11.0%であった。この条件の不活性化及び高温刺激で、低率ながら、アマゴの雌性発生2倍体魚が作出されることが明らかになった。

## 考 察

厚さ0.1mmの100倍希釈精液に、紫外線を照射することによって不活性化した精子を用いた試験では、いずれも受精率が低かった。しかし、希釈精液の厚さを0.4mmにして、紫外線照射量を増加すると、67.2%と高くなった。また、無処理対照区の受精率は90%以上であったことから、処理区の受精率が低下したのは、紫外線の照射が、精子の受精能力を低下させたためと考えられた。精子の不活性化法は、大量処理法と合わせて、さらに検討が必要である。

染色体を倍数化するための高温刺激は、30°C、10分間浸漬の条件が最もすぐれた。5分間浸漬では、試験回次別のふ化率に差が大きく、染色体の倍数化が不十分であると考えられた。また、15分間浸漬では、処理1日後に死卵が増加して発眼率が低下したことから、高水温への長時間浸漬による物理的な刺激が、卵発生に直接に影響を与えたと考えられた。

温度処理時期については、試験した5～15分の範囲内で、卵発生率にほとんど差を生じなかった。温水性のドジョウ<sup>6)</sup> *Misgurnus anguillicaudatus*、アユ<sup>7)</sup> *Plecoglossus altivelis* などでは、媒精後数分のずれが、卵発生率に影響することが報告されている。しかし、冷水性のアマゴでは、卵発生が徐々に進行するために、第2極体が放出されるまでの時間が長く、この範囲内では卵発生率に差を生じなかったと考えられた。

雌性発生2倍体魚は、今回の試験の処理条件を作出できることが明らかになった。しかし、無処理対照区に比べ、処理区の発眼率、特に、ふ化率の低下が顕著であった。雌性発生では、雄由来の染色体が破壊され、雌由来の染色体だけで発生が進むために、染色体がホモ化して劣性遺伝子が発現し、致死性になることがある<sup>8)</sup>。また、精子の不活性化が不十分であると、雄由来の不完全遺伝子が卵及び稚魚の発育にまで作用して、悪い影響を及ぼす可能性が考えられる。これらのことが、雌性発生2倍体魚のふ化率などを低下させる要因になっていると考えられた。

しかし、ニジマスでは、加圧法で雌性発生2倍体魚がより高率で誘起されており<sup>3)</sup>、最近温度処理法でも加圧法に劣らない例も報告されてきている<sup>9)</sup>。これらのこと

は、温度処理法でも、条件をより詳細に検討することによって、雌性発生2倍体魚を高率で作出できる可能性があることを示唆している。今後、処理温度と時間や時期との関係などについて、更に詳細に検討する必要がある。

また、染色体の倍数化には、使用親魚の状態や排卵後の時期なども影響する<sup>10)</sup>ことが報告されており、これらについても検討が必要であろう。

## 要 約

1. アマゴの全雌生産を目的として、高温刺激による染色体の倍数化条件を検討し、雌性発生2倍体魚の作出を試みた。

2. 30°Cでの温度処理時間を10分間にするによって、雌性発生卵のふ化率が最も向上した。

3. 温度処理時期を、媒精後5～15分で検討した結果、この範囲内では雌性発生卵のふ化率に差がなかった。

4. 高温刺激前の保存温度について検討した結果、雌性発生卵のふ化率は、5°Cと10°Cで差はなかったが、温度処理時間の長さによって若干異なった。

5. 媒精10分後に30°C 5分間浸漬の温度処理条件で、試験を7回実施した結果、雌性発生2倍体魚を合計660尾作出した。

6. 試験回次によって結果に差が大きく、それらの平均の受精率は33.5%、発眼率は23.6%、正常ふ化率は11.0%であった。

7. 受精率、正常ふ化率ともに低率であったことから、精子の不活性化条件及び温度処理条件について、更に詳細な検討が必要であった。

## 文 献

- 1) 山本章造, 1987: アマゴの全雌生産に関する研究 - I 希釈精子の遺伝的不活性化条件の検討, 岡山水試報, 2, 62-65
- 2) 小野里 担, 1983: 魚類の人為倍数化とその利用, 水産育種, 8, 17-37
- 3) H. ONOZATO, 1984: Diploidization of gynogenetically activated Salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture*, 43, 91-97
- 4) D. CHOURROUT, 1980: Thermal induction of diploidy-gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout, *Reprod. Nutri. Develop.*, 20, 727-733
- 5) 高橋一孝, 1985: マス類の染色体操作による育種試験 - I ~温度ショックによるニジマス染色体の倍数化~, 昭和59年度事業報告, 13, 85-91, 山梨県魚苗センター
- 6) R. SUZUKI, T. NAKANISHI and T. OSHIRO, 1985: Survival, growth and sterility of induced triploids in the cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*, *Bull.*

- Jap. Soc. Sci. Fish., 51, 889-894
- 7) N. TANIGUCHI, A. KIJIMA, J. FUTAMI and Y. INADA, 1986: Conditions to induce triploid and gynogenetic diploid in ayu *Plecoglossus altivelis*, Bull. Jap. Soc. Sci. Fis., 51, 49-53
- 8) 鈴木 亮, 1985: 雌性発生技術でコピー魚を作る - 水産におけるバイオテクノロジー, 研究ジャーナル, 8, 6-10
- 9) 児島将男・岩橋正男, 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
- 10) 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年度事業報告, 14, 90-95, 山梨県魚苗センター