

池産サクラマスの3倍体作製条件の検討

誌名	北海道立水産孵化場研究報告 = Scientific reports of the Hokkaido Fish Hatchery
ISSN	02866536
著者	太田, 博巳 神力, 義仁 笠原, 昇
巻/号	45号
掲載ページ	p. 55-61
発行年月	1991年3月

池産サクラマスの3倍体作製条件の検討

太田 博巳*・神力 義仁*・笠原 昇*・新谷 康二*
小出 展久*・岡田 鳳二*

(1990年12月3日 受理)

Induction of Triploidy by Hydrostatic Pressure or Heat Shocks in Masu Salmon, *Oncorhynchus masou*

Hiromi Ohta*, Yoshihito Shinriki*, Noboru Kasahara*,
Kouji Araya*, Nobuhisa Koide*, and Houji Okada*

Abstract

Triploidy induction by application of a hydrostatic pressure or thermal shocks was attempted in masu salmon. The number of nucleoli in a cell was applied to the identification of the ploidy. Hydrostatic pressure of 700 or 750 kg·cm⁻² for 6 min from 10 to 20 min after fertilization (at 14°C) induced higher triploidy than those of 600 or 650 kg·cm⁻². The efficiency of this method was proved in the two times large-scale production (over 200,000 eggs, respectively) using a 800 ml pressure cell, which contains about 5,000 eggs, and an electromotive hydrostatic pressure (about 80% survival at the eyed-eggs stage and over 90% triploidy). Two steps heat-shocks (primary, 25°C-shock for 5 min after 5 min fertilization; secondary, consecutive 29°C-shock for 20 min) also achieved good results (81% survival and 95% triploidy).

近年、魚類において精子や卵の遺伝子を紫外線やγ線で破壊したり、受精直後の卵に物理的な刺激や化学物質を作用させて染色体のセット数を増減させる、いわゆる染色体操作技術が急速な進歩を遂げている (Thorgaard, 1983; 藤野, 1989)。この技術の水産増養殖事業への利用方法としては、単性発生による育種作業の短縮化 (Purdom, 1983; 小野里, 1983, 1987, 1989) や、異質倍数体による新型養殖魚種の開発 (荒井, 1989)、全雌3倍体化による不妊魚の作出 (小野里, 1983; 鈴木, 1989) 等があげられる。このうち全雌3倍体による不妊化は、サケ科魚類の養殖において寿命の長期化や成熟による肉質の劣化

の防除が期待できることなどから、大型魚の周年出荷体制確立のための大きな支援技術となると予想される。

この3倍体不妊魚の作製は、まず偽雄精子で受精させて全雌卵とし、次に受精後およそ1時間後に起こる第2極体の放出を阻害して全雌3倍体化する方法 (岡田, 1985) が一般的である。第2極体の放出阻止は、精子侵入時に第2減数分裂中期の状態にある卵の紡錘体を、圧力や温度ショックで破壊することにより起こる (Onozato, 1984; 尾城, 1987)。この処理方法の適否は3倍体化率 (処理卵の中で2倍体から3倍体に転換した割合) を左右するばかりで

* 北海道立水産孵化場 (Hokkaido Fish Hatchery, Kitakashiwagi-cho, Eniwa, Hokkaido 061-14, Japan)

なく、卵の生残率や奇形率にも影響を及ぼす。そのため、この3倍体不妊魚を事業規模で大量に作製するには、3倍体化率が高く、かつ処理による生残率の低下等の悪影響を最小限に留めるような処理方法をそれぞれの魚種において検討する必要がある。

著者らは、道立水産孵化場森支場で継代飼育中の池産サクラマス（新谷，1982；太田ら，1988）の効率的な3倍体作製条件について検討し、いくつかの知見を得たのでここに報告する。

材料および方法

試験は水産孵化場森支場において1989年9月12～14日，1990年9月11～12日に行った。媒精は、偽雄精子を用いて通常の乾導法（隆島，1982）で行い、接水温度は1989年が13.6～14.3℃，1990年は13.8～14.2℃であった。いずれの実験においても、同様の受精を行い、吸水後そのまま孵化槽に收容したものを対照群とした。

材料 森支場池産1+親魚を材料として用いた。1989年および1990年の供試親魚の4月から9月までの飼育水温をFig. 1に示した。雌親魚は事業規模試験を除き、各個体個別採卵を行った。実験用の個体には、卵の油球の形態（酒井，1974）から過熟と判断した個体は除外した。各実験には1個体から80粒以上を供し、正常発眼率（以後、発眼率と表記する）は全

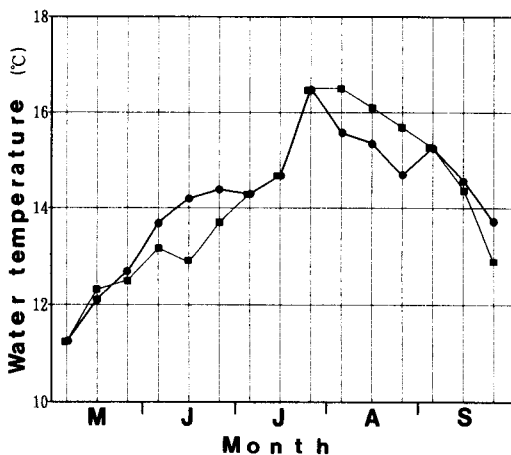


Fig. 1 Changes in temperature of rearing water of fish examined. ■—■, 1989; ●—●, 1990.

卵を計数して算出した。各試験に供した個体数は結果の項に記した。

水圧処理方法 水圧処理は電動製フレンチプレス（大岳製作所）を用い、与えた圧力強度は卵を收容するセルとプレス下台の間に荷重変換器（LCK-10TA, WGA-700, 共和電業）を挿入して計測した。加圧時間は設定圧力に達した時間からその圧力を解除するまでの時間として計測した。

温度処理方法 温度処理には水容量20lの恒温水槽（WB-K1, CU-80, 柴田科学）を用い、水温は絶えず温度計によりモニタリングした。試験卵は媒精、接水後任意の時間に各個体別に10cm角のザルに入れ、恒温水槽に浸漬した。できるだけ卵温が均一に上昇するよう、処理開始後2分以内に3～4回ザルを静かに持ち上げて水切り操作を行った。

倍数性の判定 倍数性の判定は、発眼卵又は孵出直後の仔魚を各実験個体から無作為に30粒（尾）以上を抽出し、核小体の個数による判定を行い3倍体化率を算出した。核小体標本はPhillips et al., (1986)

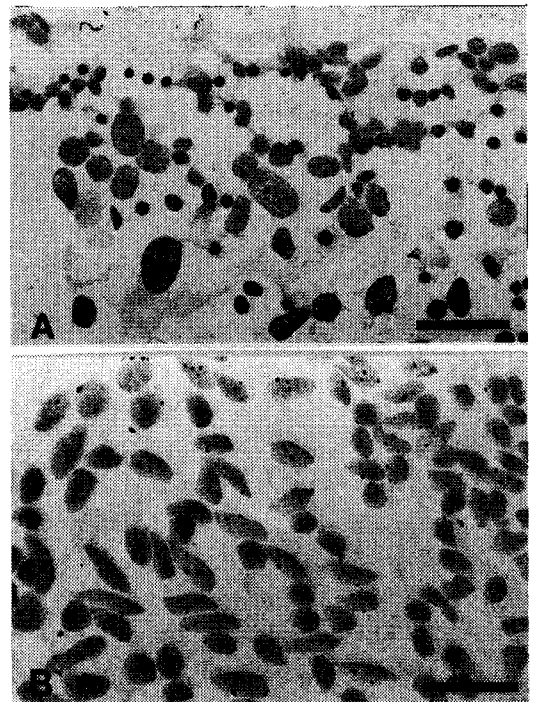


Fig. 2 Silver-stained cells from masu salmon embryos. A, diploid cells; B, triploid cells. Scales indicate 40 μ m.

の方法に準じて作成した。すなわち、リングル液中で胚または仔魚の脳の小片を取り出し、カルノア液（メチルアルコール3：酢酸1）で30分以上固定する。次に45%酢酸に10分以上浸漬した後、ピペティングにより細胞を破碎する。この溶液を一滴採り、50～60°Cに温めたスライドガラス上で風乾させる。この温めたスライドガラス上でゼラチン溶液（1%蟻酸溶液に2%のゼラチンを溶解）を2に対し硝酸銀溶液（10gを20mlの蒸留水で溶解）を1の割合で混合し、混合液が濃茶色になるまで染色し、それを水洗、乾燥後カバーガラスをかけて検鏡した。倍数性は各標本およそ100細胞以上を観察し、核小体の最大数（2個を2n、3個を3n）から判定した（Fig. 2）。

結果および考察

1. 水圧処理条件の検討

水圧処理の開始時刻と圧力強度が及ぼす発眼率、3倍体化率への影響について調べた。接水10分後または20分後に任意の圧力で6分間水圧処理を行った。試験に供した雌親魚は7尾で、処理卵の発眼率と3倍体化率をFig. 3に示した。

結果をみると、いずれの群でも発眼率は90%以上と高い値を示し、本実験の設定条件である接水（14°C）後10分から20分までの間での750気圧以下6分間の圧力処理では、卵の生残率に及ぼす影響は少ないものと考えられた。

3倍体化率は600気圧、650気圧では平均値はいずれも60%以下と低い値を示したのに対し、700気圧、750気圧では、85%以上と高く、特に700気圧では10分後で94.7%、20分後で95.0%と高い値を示した。それぞれの加圧強度において、処理開始時刻が接水後10分目と20分目との間には3倍体化率に有意な差は認められなかった。

各圧力における実験魚7個体の3倍体化率の個体別の値の幅をみると、600気圧では18.2～100%、650気圧では4.3～100%と極めて大きいものに対し、700気圧では80.0～100%、750気圧では58.3～96.3%と小さくなる傾向が認められた。低い圧力で3倍体化率の変異が大きいことの理由についてはさらに詳細な検討が必要であるが、紡錘糸の機能阻害を起こさせるのに必要な圧力値にかなり大きい個体差があること、

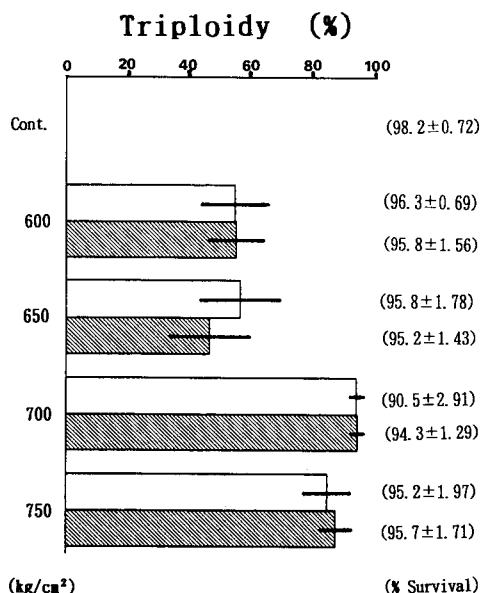


Fig. 3 Efficiency of 6 min shocks at four different hydrostatic pressure in inducing triploidy. Upper white bars, shocks applied 10 minutes after fertilization; lower oblique bars, shocks applied 20 minutes after fertilization. Values are means ± standard errors of 7 experiments. Figures in parentheses indicate percentage survival of embryos at the eyed stage (means ± standard errors).

またその閾値を越えた圧力ではほぼ全ての個体の卵の3倍体化が起こる可能性の高いことが示唆された。

2. 温度処理条件の検討

温度処理の開始時間、処理方法（接水温度から設定水温に直接移す……単一処理、設定水温に先立ち25°Cの水に5分間入れた後設定水温に移す……2段処理）の違い、設定水温の高さの3点について試験を行い、発眼率と3倍体化率に及ぼす影響を調べた。

(1) 処理開始時間

接水（14°C）し、10分後、20分後に27°Cまたは29°Cの温度で任意の時間単一処理を行った。3個体の雌を用いて試験を行い、発眼率と3倍体化率の平均値をFig. 4に示した。

10分後処理開始、20分後処理開始とも27°Cの処理では発眼率はいずれも90%以上と高い値を示したが、29°C処理では発眼率が低下する傾向をみせ、20分後処理開始29°C20分間処理群では81.3%に低下した。

3倍体化率をみると、27°C20分間処理を除きいずれも10分後処理開始の方が20分後処理開始に比べて高い値を示した。また、27°C処理と29°C処理とを比較すると、結果に変動はみられるが10分後処理開始では29°C処理開始の方が高い傾向を示した。

前項の結果から水圧処理では処理開始時間が接水10分後と20分後の間に3倍体化率の差が認められなかったが、温度処理ではこのように20分後で低下する傾向をみせた。この原因の一つとして、水圧処理では設定圧力に処理卵が達するまでの時間がほぼ10秒以内であるのに対し、水温処理では卵温が設定水温に達するまでに一定の時間を要することが考えられる。20分後に処理を開始しても、処理をする各卵の紡錘糸部位の温度が設定温度に達するまでにはかなりのタイムラグが存在することが予想され、第2極体の放出を阻害する適切な時期を逸する可能性が考えられる。今回の試験では処理開始時間の設定が

10分後と20分後のみであったので、今後さらに広い範囲で追試験を行う必要がある。

(2)処理方法

4個体の雌親魚を用いて試験を行った。単一処理群は、媒精後14°Cの水で接水し、10分後に29°Cで20分間または30分間の処理を行った。2段処理群は、同様に接水し5分後に25°Cで5分間処理し、次に29°Cで20分間または30分間の処理を行った。このようにして、最終設定温度を29°Cとしたときの単一処理と2段処理の違いによる発眼率と3倍体化率への影響について調べた。結果はFig.5に示した。

発眼率は単一処理、2段処理のいずれも20分間処理に比べて30分間処理の方が有意に低い値を示し、また同時間の処理では2段処理の方が単一処理に比べて高い傾向を示した。

3倍体化率をみると、単一処理では20分間処理が平均88.6%と高い値を示したのに対し、30分間では

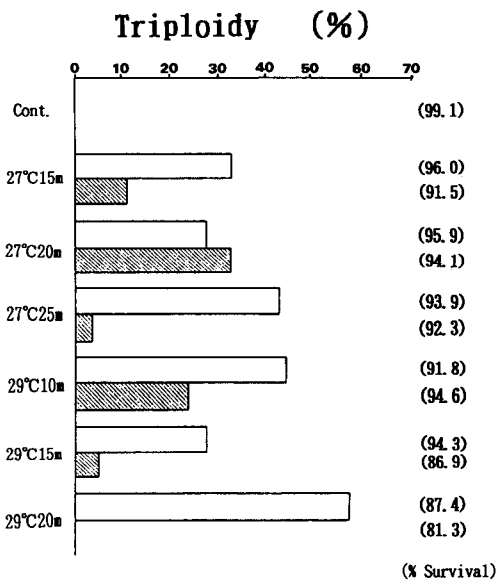


Fig. 4 Efficiency of single heat shock at two different temperatures in inducing triploidy. Upper white bars, shocks applied 10 minutes after fertilization; lower oblique bars, shocks applied 20 minutes after fertilization. Values are means of 3 experiments. Figures in parentheses are percentage survival of embryos at the eyed stage.

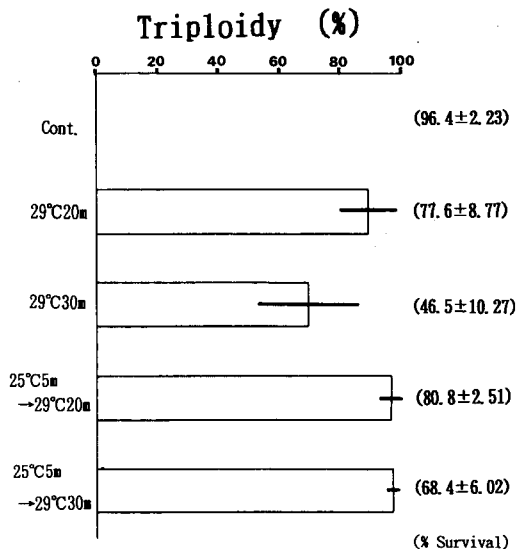


Fig. 5 Comparison between a single-heat shock treatment (insemination at 14°C, and 10 minutes later → 20 minutes or 30 minutes at 29°C) and a two steps-heat shocks treatment (insemination at 14°C, and 5 minutes later → 5 minutes at 25°C → 20 minutes or 30 minutes at 29°C) in inducing triploidy of masu salmon. Values are means ± standard errors of 4 experiments. Figures in parentheses indicate percentage survival of embryos at the eyed stage.

69.0%に低下した。一方、2 段処理では20分間処理、30分間処理のいずれも 95%以上の高い 3 倍体化率を示した。

本試験結果から池産サクラマスにおいては、単一

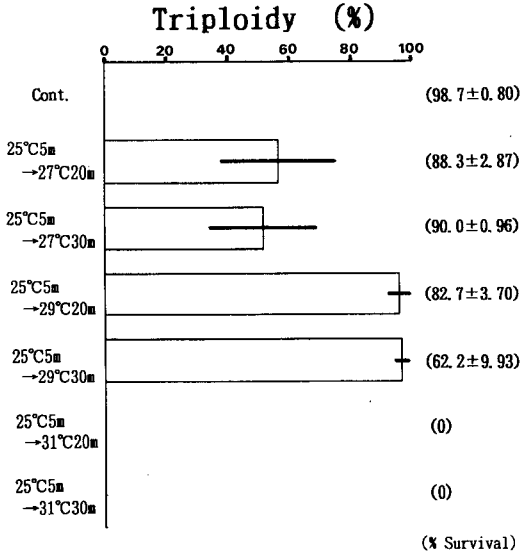


Fig. 6 Triploidy and survival of embryos at the eyed stage after treatment of various two steps-heat shocks. Each shock was preceded by 25°C-5 minutes pre-treatment commenced 5 minutes after fertilization at 14°C. Values are means ± standard errors of 4 experiments. Figures in parentheses indicate percentage survival of embryos at the eyed stage.

処理に比べて 2 段処理の方が発眼率、3 倍体化率ともに良好な値の得られることが明らかとなった。これは、2 段処理により卵温の急激な変化が回避されて卵の紡錘糸以外の構成要素、すなわち核や細胞質オルガネラ等へのダメージが緩和されるとともに、より確実に 29°C という設定温度に卵温が到達したことによる可能性が高いと考えられる。

(3)設定温度

14°C で接水し、前項と同様に 5 分後に 25°C で 5 分間の前処理を行った後、2 段目の処理温度を 27°C、29°C、31°C に設定して 20 分間、または 30 分間の処理を行った。実験は 4 個体を用いて行い、各処理群の発眼率と 3 倍体化率を Fig. 6 に示した。

発眼率は設定温度の上昇に伴って低下する傾向を示し、31°C 処理では 20 分間処理と 30 分間処理のいずれも発眼期まで生残した卵は認められなかった。

25°C 5 分間という前処理方法を変化させることにより、生残率はさらに変動することが予想されるが、少なくとも今回の結果からは温度処理の最終設定温度を 30°C 以下にすることが必要と考えられた。

3 倍体化率をみると、27°C 処理では 20 分間、30 分間ともに 60%以下の低値であったのに対し、29°C 処理では 20 分間、30 分間ともに 95%以上の高値を示した。31°C 処理は、発眼期まで生残した卵がなかったので 3 倍体化率を測定することができなかった。

この結果から明らかなように、接水 5 分後に 25°C で 5 分間前処理をし、次に 29°C で 20 分間という処理

Table 1 Large-scale production of triploid masu salmon by hydrostatic pressure using an electromotive Frenchpress and a 800 ml vessel

	Treatment date	
	12 Sep. 1989	11 and 12 Sep. 1990
Methods of treatment	750 kg/cm ² for 6min 15min after fertilization	750 kg/cm ² for 6min 11min after fertilization
Number of eggs treated	200,000	222,000
Percentage triploid (Number of embryos examined)	99.2% (236)	91.3% (121)
Percentage survival at eyed eggs	76.0%	84.1%

条件が、事業的規模での3倍体作出条件として有効と考えられた。

3. 水圧処理による事業規模での3倍体作製試験

これまでに行った予備的試験、並びに本試験の結果から池産サクラマスの水圧処理法による3倍体作製は、接水10～20分後に700気圧、750気圧で6分間の処理が適当と考えられた。そこで3倍体魚の大量作製を試験的に行い、これらの処理が養殖事業規模での作製条件として有効か否かという実証試験を行った。800 mlの大型セルにおよそ5000粒の受精卵を一度に入れ、接水15分後(1989年)または11分後(1990年)に750気圧で6分間の処理を繰り返し行い、処理卵の発眼率と3倍体化率を調べた。試験は1989年9月12日(供試卵数、200千粒)、1990年9月11～12日(同、222千粒)に行った。発眼率は、全卵数を検卵した後に重量法により求めた。結果はTable 1に示した。

発眼率は1989年が76.0%、1990年は84.1%であった。3倍体化率は両年も90%以上を示した。これらの結果から、接水10～20分後に750気圧で6分間という水圧処理条件が、十分に事業規模での3倍体不妊魚作製方法として有効であることが実証された。

今後、さらに本研究で好結果を得た2段の温度処理法による事業規模での3倍体作製試験を行うとともに、作出した3倍体魚の内水面、海面での養殖特性を明らかにしていく必要があろう。

要 約

森支場池産サクラマスの効率的な3倍体魚作製のための水圧処理条件、温度処理条件を検討し、以下の結果を得た。

1. 水圧処理の開始時刻と圧力強度について検討したところ、接水10分後、20分後に700気圧または750気圧で6分間の処理を行うと高い発眼率と3倍体化率の得られることが明らかとなった。
2. 前記処理方法が養殖事業規模での3倍体作製条件として適切か否かを調べるため、1989年、1990年に各20万粒以上の大量処理を行ったところ、高い発眼率と3倍体化率が得られ、この方法の有効性が実証された。
3. 種々の温度処理条件について検討したところ、

接水5分後に25°Cで5分間前処理し、次に29°Cで20分間の処理が、高い発眼率と3倍体化率を得るのに有効であった。

謝 辞

本研究を行うに当たり、核小体の銀染色方法について御指導頂いた水産庁養殖研究所小野里 坦博士に深謝の意を表す。また、核小体標本の作成には稲垣孝子氏に多大な御協力を頂いた。ここに記して感謝の意を表す。

文 献

- 荒井克俊(1989). 異質倍数体。水産増養殖と染色体操作(鈴木 亮 編)。恒星社厚生閣、東京、pp. 82-94。
- 新谷康二(1982). 池中養殖サクラマスによる種卵生産事業の現況。魚と水、20, 1-7。
- 藤野和男(1989). 染色体操作技法開発・研究の経緯。水産増養殖と染色体操作(鈴木 亮 編)。恒星社厚生閣、東京、pp. 9-20。
- 太田博巳・西村 明・佐々木義隆・民谷嘉治・北村隆也・今田和史(1988). 海中で飼育したサクラマスの成長について。北海道立水産孵化場研究報告、43, 77-80。
- 岡田鳳二(1985). ニジマスの人為的統御に関する研究。北海道立水産孵化場研究報告、40, 1-49。
- Onozato, H. (1984). Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture*, 43, 91-97.
- 小野里 担(1983). 魚類の人為倍数化とその利用。水産育種、8, 17-29。
- 小野里 担(1987). 染色体工学的手法による育種。回遊魚の生物学(森沢正昭・会田勝美・平野哲也 編)。学会出版センター、東京、pp. 235-251。
- 小野里 担(1989). 雄性発生。水産増養殖と染色体操作(鈴木 亮 編)。恒星社厚生閣、東京、pp. 60-69。
- 尾城 隆(1987). ドジョウの人為2倍体性雌性発生に関する細胞学的研究。日本水産学会誌、53, 933-939。
- Phillips, R. B., Zajicek, K. D., Ihssen, P. E., and Johnson, O. (1986). Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture*, 54, 313-319.
- Purdum, C. E. (1983). Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 33, 1088-1093.
- 酒井 清(1974). 産出卵の卵質評価、淡水魚。魚類の成熟と産卵、その基礎と応用(日本水産学会 編)。恒星

- 社厚生閣，東京，pp. 100-112.
- 鈴木 亮(1989). 染色体操作の原理と技術，魚類，水産増養殖と染色体操作(鈴木 亮 編). 恒星社厚生閣，東京，pp. 21-29.
- 隆島史夫(1982). 淡水養殖技術(野村 稔 編). 恒星社厚生閣，東京，pp. 104-121.
- Thorgaard, G. H. (1983). Chromosome set manipulation and sex control in fish. in "*Fish Physiology*" (W. S. Hoar, D. J. Randall, and E. M. Donaldson eds.), Vol. 9, Part B, Academic Press, New York, pp. 405-434.