

## 染色体操作によるサケ科魚類の育種に関する研究—Ⅲ

ニジマス卵の温度二回処理による第一卵割阻止について  
(一回目処理開始時期、孵化用水の水温、系統差、処理強度の影響について)

桑田 知宣

Studies on Breeding of Salmonid Fishes by Chromo-some Manipulation — III

Suppression of First Cell Cleavage by Two Times Heat Shock Treatment in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Effect of first shock-treatment time, water temperature, differential strain and treating strength)

Tomonori KUWADA

卵割阻止型の雌性発生魚は完全ホモ型となり、雌性発生を再度繰り返すと次世代はクローンとなる。<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7</sup> このクローン作出法は2世代で純系を作出できるため、新しい育種法として期待されている。その場合、多くの優秀な親魚からより多くの卵割阻止型魚を作出し、選抜を加えるのが最も効果的である。しかし、卵割阻止は一般的に成功率が低く<sup>7, 8, 9, 10</sup>、卵割阻止型雌性発生魚を選抜が加えられるほど大量に作出することは困難であった。

前報において第一卵割阻止型雌性発生魚の作出効率の改善を目的として、大量処理が可能な温度処理法について、温度二回処理を試みたところ作出率の向上が図られた<sup>11</sup>。しかし、温度二回処理には、一回目の処理開始時期、孵化用水の水温、系統差(個体)、処理強度が影響を及ぼすと考えられるが、それらに関する検討はなされていない。そこで前述した各項目が温度二回処理の成否に及ぼす影響を調査した。

### 材料及び方法

#### 試験1 (一回目処理時期に関する検討)

試験は1993年1月25日に行った。卵は当场飼育の晩期産卵系ニジマスの3年魚3尾より採卵し混合して供試した。精子は同系の雄1尾より採取し、人工精漿<sup>12</sup>で100倍に希釈し、 $500 \mu W/cm^2 \cdot sec$ の紫外線を70~80秒照射して遺伝的に不活性化し供試した。媒精は等調液中で行い媒精2分後に孵化用水(水温7.3℃)に収容した。温度処理条件は、30℃の温水に5分間浸漬とした。

著者はニジマス雌性発生卵の卵割溝を異なる水温条件(5℃、12℃)で観察し、90%の卵が2細胞、4細胞になる積算水温を調査したところ、水温条件に係わらず、積算水温85℃・h、110℃・h付近であることを確認し

た(未発表)。このことから、初期発生はほぼ積算水温に従っていると考えられるため、本試験の処理開始時期の設定は積算水温に従って行った。

媒精後積算水温35℃・h、40℃・h及び45℃・hの時期にそれぞれ一回目の温度処理を行い、それぞれを試験区1、2及び3とした。各試験区について、一回目の処理開始30分から90分後までの間に再度同様の処理をそれぞれ15分間隔で行い、卵割阻止型雌性発生二回処理区(二回処理区)とした(以降、一回目の処理開始から二回目の処理開始までの時間を再処理開始時間とする)。一回のみ行った卵を卵割阻止型雌性発生一回処理区(一回処理区)、媒精11分後に温度処理を施した卵を極体放出阻止型雌性発生区、温度処理未処理の卵を雌性発生半数体区、通常精子を媒精し温度処理未処理の卵を通常発生区とした。

処理後卵を壺型孵化槽に収容し管理した。発眼状況の調査は、45日後（積算水温276°C・日）に行い、眼杯の形成されているものをすべて計数した。浮上状況の調査は、85日後（積算水温579°C・日）に行い、その時の生残魚をすべて浮上魚とし脊椎骨の湾曲を指標として外観上の正常魚と奇形魚を分けて集計した。

試験2（孵化用水の水温が再処理開始時間に及ぼす影響について）

#### 試験2-1

試験は1993年3月18日に行った。卵は当场飼育の晩期産卵系ニジマスの3年魚4尾より採卵し混合して用いた。精子の遺伝的不活性化、媒精作業、温度処理条件は試験1の条件に従い行った。媒精した卵を孵化用水（水温7°C）に収容した。媒精後積算水温35°C・hの時期に一回目の温度処理を行った。処理した卵を3等分し、水温3°C（試験区1）または11°C（試験区3）に調整した恒温槽及び孵化用水（試験区2）に収容した。各試験区について、一回目の処理開始15から120分後までの間に再度同様の処理をそれぞれ15分間隔で行った。二回目の処理を行った卵は孵化用水に戻した。一回のみ行った卵を卵割阻止型雌性発生一回処理区、媒精15分後に温度処理を施した卵を極体放出阻止型雌性発生区、温度処理未処理の卵を雌性発生半数体区とした。処理後、卵を壺型孵化槽に収容し管理した。発眼状況の調査は、眼杯の形成されているものを全て計数した。正常魚の出現状況の調査は、浮上時に脊椎骨の湾曲等を指標にして外観上の正常魚と奇形魚を分けて集計した。

#### 試験2-2

試験は1994年1月18日に行った。卵は当场飼育の晩期産卵系ニジマスの4年魚3尾より採卵し混合して用いた。精子の遺伝的不活性化、媒精作業、温度処理条件は試験1の条件に従い行った。媒精した卵は孵化用水（水温6.7°C）に収容した。媒精後積算水温35°C・hの時期に一回目の温度処理を行った。処理した卵を3等分し、水温3.3°C（試験区1）または13.5°C（試験区3）に調整した恒温槽及び孵化用水（試験区2）に収容した。各試験区について、一回目の処理開始15から120分後までの間に再度同様の処理をそれぞれ15分間隔で行った。二回目の処理を行った卵は孵化用水に戻した。媒精後積算水温40°C・hに温度処理（30°C、5分間または10分間）を行った卵を卵割阻止型雌性発生一回処理区、温度処理

未処理の卵を雌性発生半数体区、通常精子を受精し温度処理未処理の卵を通常発生区とした。処理後卵を壺型孵化槽に収容し管理した。発眼、正常魚の出現状況の調査は、試験2-1と同様にして行った。

#### 試験3（親魚による作出成績の差）

作出は1992年11月13日と1993年4月15日に行った。雌親魚には当场飼育の早期産卵系ニジマス3尾、晩期産卵系ニジマス2尾、他の養殖場より導入したニジマス2尾を用い、個体別に採卵し用いた。精子の遺伝的不活性化、媒精作業、温度処理条件は試験1の条件に従い行った。孵化用水の水温は1992年11月13日が12°C、1993年4月15日が9.5°Cであった。二回の温度処理を施した区を卵割阻止型雌性発生二回処理区（二回処理区）とした。一回目の処理は、1992年11月13日が積算水温42.2°C・h、1993年4月15日が積算水温35°C・hに行った。二回目の処理は、1992年11月13日が一回目の処理開始から30、45、60分後に、1993年4月15日が45、60、75分後に行った。一回のみ処理を行った卵を卵割阻止型雌性発生一回処理区（一回処理区）とし、1992年11月13日が積算水温42.2°C・hに、1993年4月15日が積算水温40°C・hに処理を行った。媒精11分後に温度処理を施した卵を極体放出阻止型雌性発生区、温度処理未処理の卵を雌性発生半数体区とした。発眼、浮上状況の調査は試験2と同様にして行った。

#### 試験4（適正な処理強度について）

試験3において最も良い結果を示した親魚より第二極体放出阻止型雌性発生魚を作出し、それらを親魚養成した。満3年の産卵期にそのうちの4尾より採卵し混合して試験に用いた。試験は1996年4月18日に行った。孵化用水の水温は8°Cであった。精子の遺伝的不活性化、媒精作業は試験1の条件に従い行った。

一回処理については、媒精後積算水温40°C・hの時に30°Cの温水に浸漬した。その際温水に浸漬する時間を3分から10分まで1分刻みで変化させ8区の卵割阻止型雌性発生一回処理区を設定した。

二回処理については、媒精後積算水温35°C・hの時に30°Cの温水に5分間浸漬し、その後再度同様の処理を45、60、75分後に行い3区の卵割阻止型雌性発生二回処理区を設定した。温度処理未処理の卵を雌性発生半数体区とした。発眼、浮上状況の調査は試験2と同様にして行った。

## 結 果

### 試験 1

作出成績を第 1 表に示した。各試験区の平均発眼率、平均正常魚出現率、及び発眼卵に対する正常魚の割合は、試験 1、2、3 の順で高かった。

各試験区の一処理区の正常魚出現率を比較すると媒精後積算水温 40°C・h の時期に処理を施した区で高い傾向が認められ、従来の温度一回処理による第一卵割阻止の最適処理開始時期の結果<sup>3)</sup>と一致した。従って二回処理の効果は、試験区 2 の一回処理区の正常魚出現率を基準として比較することにする。

試験区 1 では、全ての二回処理区の正常魚出現率は、試験区 2 の一回処理区のそれより有意に高かった。中でも再処理開始時間が 75 分の区の正常魚出現率が高く、試験区 2 の一回処理区の 9.7 倍であった。

試験区 2 では、再処理開始時間が 45 分の区以外の二回処理区の正常魚出現率が、一回処理区のそれより有意に高かった (P<0.05)。中でも再処理開始時間が 75 分及び 90 分の区の正常魚出現率が高く、試験区 2 の一回処理区の 2.5 倍であった。

試験区 3 では再処理開始時間が 60 分の二回処理区の正常魚出現率が、試験区 2 の一回処理区のそれより高かったが有意差はなかった。

### 試験 2

試験 2-1 の作出成績を第 2 表及び第 1 図に示した。試験 2-2 の作出成績を第 3 表及び第 2 図に示した。試験 2-1 の結果では、二回処理区の正常魚出現率は、いずれも卵割阻止型雌性発生一回処理区の正常魚出現率より高く、試験区 1 の再処理開始時間が 15 分及び 120 分の区以外の全ての区でその差は有意であった (P<0.05)。再処理開始時間に伴う正常魚出現率の変化について見ると、試験区 2 の正常魚出現率は、再処理開始時間 15 分から 60 分まで、9%代から約 12%へと緩やかに上昇し、再処理開始時間 60 分でピークを迎えた後、再処理開始時間 105 分まで徐々に低下し、その後上昇する 2 峰性の変化を示した。試験区 3 については、再処理開始時間 30 分に一回ピークがあり、その後再処理開始時間 90 分まで徐々に低下し、その後上昇する 2 峰性の変化を示した。試験区 2 の正常魚出現率の最初のピーク時間は、試験区 3 のそれに比べて遅れていた。一方、試験区 1 の正常魚出現率は、再処理開始時間 45 分にピークを迎えた後に若干低下するものの高い値を維持して再処理 90 分に再びピークを迎え、その後徐々に低下するという変化を示した。

試験 2-2 の結果では、試験区 1 の再処理開始時間 60 分から 120 分に二回目の処理を行った区、試験区 2 の再処理開始時間 45 から 120 分に二回目の処理を行った区、

第 1 表 作 出 成 績

試 験 区	一回目処理開始時期 °C・h	再処理開始時間 分	供試卵数 粒	発眼率 %	正常魚出現率 %	奇 形 率 %
1 二回処理区	3 5	30	691	67.6	8.8	40.2
		45	620	49.2	11.0	35.9
		60	542	56.1	13.3	35.7
		75	679	49.8	13.6	33.3
		90	654	37.6	6.9	32.8
					(52.1)	(10.6)
一回処理区			527	83.5	1.1	14.3
2 二回処理区	4 0	30	612	19.8	3.1	38.7
		45	586	12.1	1.4	27.3
		60	593	20.7	2.7	40.7
		75	629	38.6	3.5	50.0
		90	575	48.5	3.5	42.9
					(28.0)	(2.9)
一回処理区			579	86.7	1.4	52.9
3 二回処理区	4 5	30	659	10.6	0.8	50.0
		45	641	3.6	0.3	33.3
		60	633	18.6	1.9	40.0
		75	569	20.4	1.4	50.0
		90	655	15.1	0.6	42.9
					(13.5)	(1.0)
一回処理区			803	82.3	1.0	74.2
雌性発生半数体区			371	79.8	1.6	40.0
極体放出阻止型雌性発生区			923	45.5	11.2	5.5
通常発生区			846	96.2	82.6	2.0

発眼率 = 発眼卵数 / 供試卵数 × 100、正常魚出現率 = 正常浮上魚数 / 供試卵数 × 100、奇形率 = 奇形浮上魚数 / 浮上魚数 × 100  
( ) 内の数値は各試験区の一処理区の平均値

第2表 試験2-1の作出成績

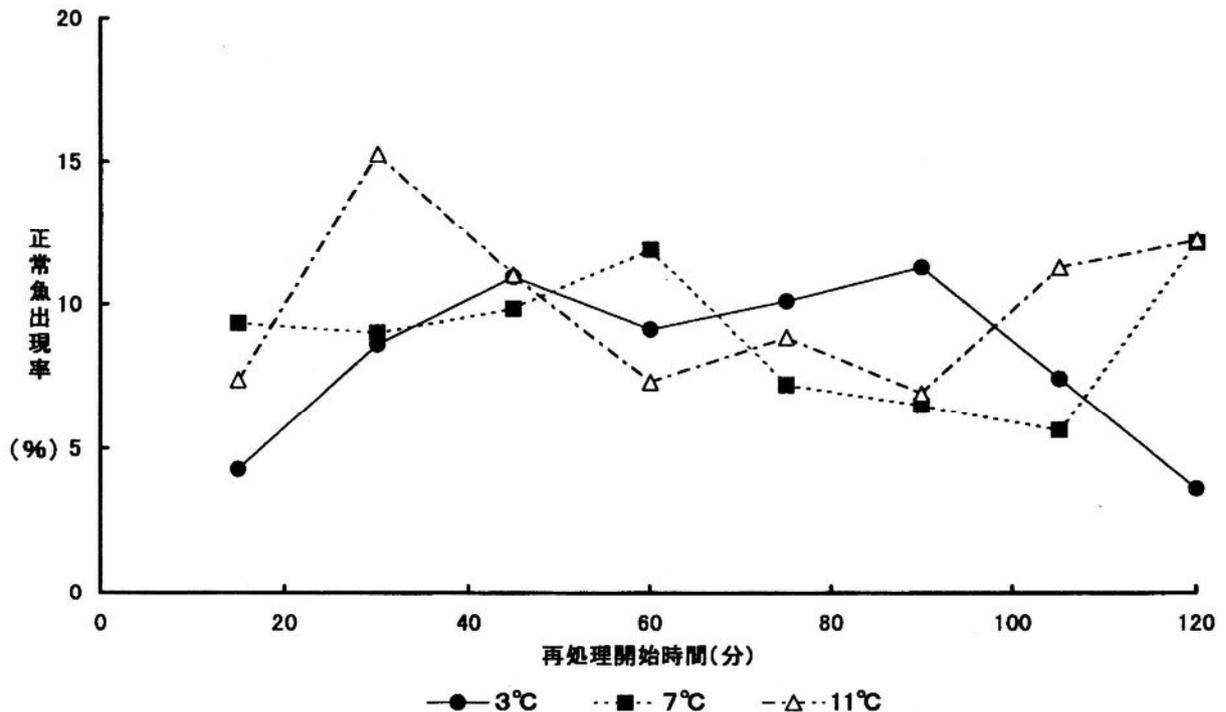
試験区	再処理開始時期 分    °C・h	収容水温	供試卵数 粒	発眼率	正常魚出現率	奇形率
				%	%	%
1	15 ( 0.5 )	3°C	819	19.29	4.27	28.57
	30 ( 1.25 )		696	31.90	8.62	11.76
	45 ( 2 )		547	28.88	10.97	9.09
	60 ( 2.75 )		568	29.75	9.15	10.34
	75 ( 3.5 )		612	30.07	10.13	16.22
	90 ( 4.25 )		450	30.44	11.33	16.39
	105 ( 5 )		845	23.31	7.46	14.86
120 ( 5.75 )	551	16.88	3.63	35.48		
2	15 ( 1.17 )	7°C	652	29.75	9.36	19.74
	30 ( 2.92 )		732	25.00	9.02	13.16
	45 ( 4.67 )		690	30.87	9.86	16.05
	60 ( 6.42 )		704	30.26	11.93	11.58
	75 ( 8.12 )		525	27.24	7.24	13.64
	90 ( 9.92 )		628	27.07	6.53	6.82
	105 ( 11.67 )		637	29.51	5.65	16.28
120 ( 13.42 )	794	37.66	12.22	19.17		
3	15 ( 1.83 )	11°C	717	23.85	7.39	11.67
	30 ( 4.58 )		452	29.42	15.27	13.75
	45 ( 7.33 )		661	29.35	11.04	9.88
	60 ( 10.08 )		600	30.00	7.33	15.38
	75 ( 12.84 )		675	32.00	8.89	13.04
	90 ( 15.58 )		648	27.78	6.94	23.73
	105 ( 18.33 )		970	34.23	11.34	9.09
120 ( 21.08 )	1073	32.71	12.30	11.41		
雌性発生半数体区			367	71.12	0.27	0.00
極体放出阻止型雌性発生区			763	29.88	21.63	1.20
卵割阻止型雌性発生一回処理区			850	61.76	3.18	27.03

発眼率 = 発眼卵数 / 供試卵数 × 100

正常魚出現率 = 正常浮上魚数 / 供試卵数 × 100

奇形率 = 奇形浮上数 / 浮上魚数 × 100

再処理開始時間の ( ) 内は一回目処理終了から二回目処理開始までの積算水温



第1図 再処理開始時間に伴う正常魚出現率の変化(試験2-1)  
再処理開始時間は一回目処理開始から二回目処理開始までの経過時間

第3表 試験2-2の作出成績

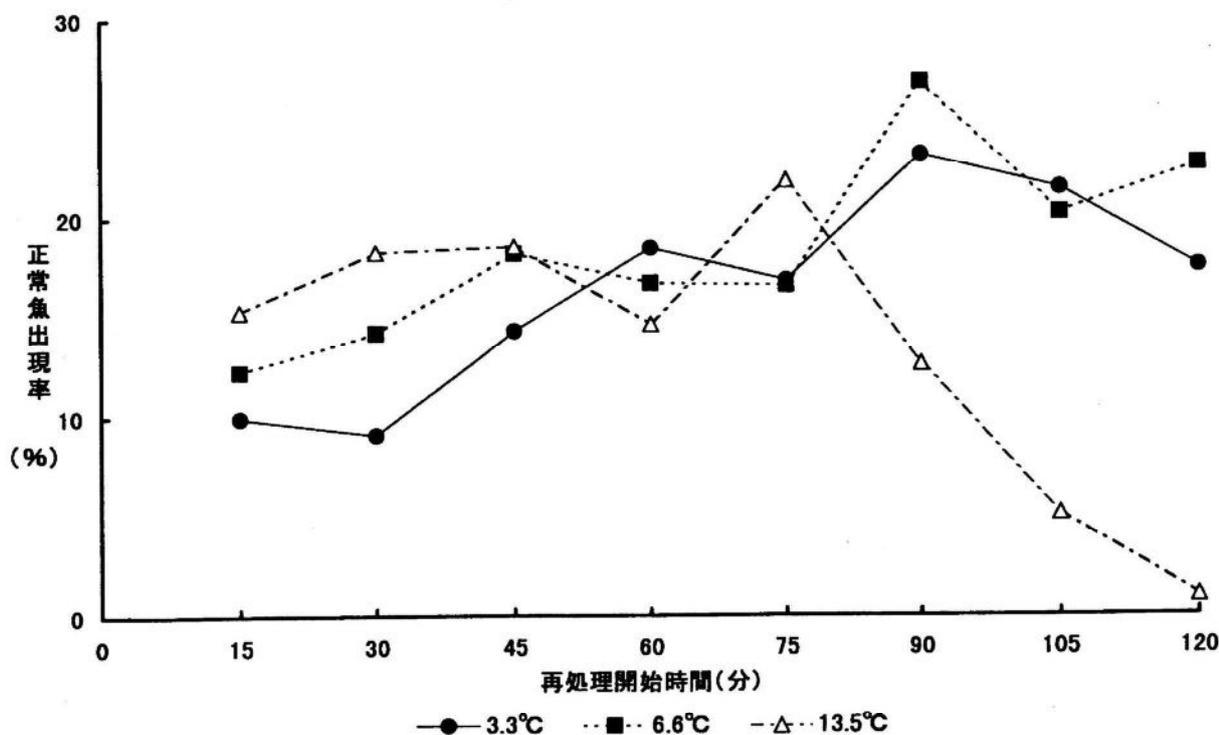
試験区	再処理開始時期 分 °C・h	収容水温	供試卵数 粒	発眼率 %	正常魚出現率 %	奇形率 %
1	15 (0.55)	3.3	594	41.08	9.93	28.92
	30 (1.38)		649	40.22	9.09	21.33
	45 (2.20)		691	54.99	14.33	22.05
	60 (3.03)		817	54.10	18.48	13.71
	75 (3.85)		712	53.93	16.85	18.92
	90 (4.68)		540	66.48	23.15	22.84
	105 (5.50)		536	51.49	21.46	14.81
120 (6.33)	718	48.47	17.55	20.75		
2	15 (1.12)	6.7	652	41.41	12.27	29.20
	30 (2.79)		703	46.94	14.22	19.35
	45 (4.46)		725	57.79	18.21	20.96
	60 (6.14)		682	61.73	16.72	25.97
	75 (7.82)		813	59.16	16.61	18.18
	90 (9.49)		698	67.48	26.79	20.76
	105 (11.17)		667	63.57	20.24	17.18
120 (12.84)	658	65.05	22.64	19.46		
3	15 (2.25)	13.5	699	53.93	15.31	23.57
	30 (5.53)		585	57.61	18.29	23.02
	45 (9.00)		662	54.68	18.58	16.89
	60 (12.38)		593	57.34	14.67	26.27
	75 (15.75)		590	57.63	21.86	18.87
	90 (19.13)		623	44.14	12.68	22.55
	105 (22.50)		658	65.05	5.17	29.17
120 (25.88)	409	10.76	0.98	33.33		
卵割阻止型雌性発生一回処理区	30°C、5分間処理		486	75.51	11.73	24.00
	30°C、10分間処理		653	17.76	1.84	40.00
雌性発生半数体区			473	75.48	1.27	0.00
通常発生区			471	97.45	95.12	0.67

発眼率 = 発眼卵数 / 供試卵数 × 100

正常魚出現率 = 正常浮上魚数 / 供試卵数 × 100

奇形率 = 奇形浮上数 / 浮上魚数 × 100

再処理開始時間の ( ) 内は一回目処理終了から二回目処理開始までの積算水温



第2図 再処理開始時間に伴う正常魚出現率の変化(試験2-2)  
再処理開始時間は一回目処理開始から二回目処理開始までの経過時間

試験区3の再処理開始時間30・45・75分に二回目の処理を行った区の正常魚出現率が卵割阻止型雌性発生一回処理区のそれに比べて有意に高かった。正常魚出現率のピークは、試験区3、試験区2＝試験区1の順に早かった。試験2-1、2-2の結果から、収容水温が11℃又は13.5℃と高い場合は、正常魚出現率のピークが早く生じる傾向が認められた。

### 試験3

作出成績を第4表に示した。作出成績は各腹ごとに異なっており、二回処理区の正常魚出現率が一回処理のそれより有意に高いもの ( $P < 0.05$ )、二回処理区の正常魚出現率が一回処理のそれより高いが統計的な有意差は認められないもの、一回処理区より二回処理区の正常魚出現率が低いものの3様の結果を示した。

二回処理が逆効果となった親魚No.3では、一回処理区の発眼率が34.9%とすでに低く、二回処理区の発眼率は3.1～9.2%とさらに大きく低下した。

二回処理区の正常魚出現率が最も高かった親魚No.6では、一回処理区の発眼率が70.9%であったのに対し、二回処理区の発眼率が64.6～68.6%と高く、二回の処理を行うことによる発眼率の低下が少なかった。

### 試験4

各区の正常魚出現率を第3図に示した。温度一回処理区の正常魚出現率は、7分間温水に浸漬した区で最も高かった。温度二回処理区の正常魚出現率は60分後に再度処理を施した区で最も高く、それは温度一回処理区の最も高い値より有意に高かった。

## 考 察

試験1の結果より、温度二回処理によってニジマスの第一卵割を阻止する場合は、その効果が一回目処理の処理開始時期によって大きく異なることが明らかになった。一回目処理の最適処理開始時期は、積算水温 $35^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$ であり、温度一回処理法の最適処理開始時期(積算水温 $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$ )より早いほうが良いことが示された。一回目の処理が早い試験区の正常魚出現率が高かった原因は、発眼率が高く、発眼卵に対する正常魚の出現割合が高かったためである。一方、各試験区の一回処理区の発眼卵に対する正常魚の割合には大きな差が認められない。著者は、積算水温 $35^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$ 区のそれが $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$ 区のそれより

低いという例を観察している<sup>13)</sup>。このように一回処理と二回処理では傾向が異なっていた。発眼卵に対する正常魚の出現割合には、倍数化率が反映されると考えられる。したがって、二回処理と一回処理では効率的に倍数化できる処理開始時期が異なると考えられる。

卵割阻止によってゲノムの倍加が成功するためには、次のDNA複製周期に移行するまでの間、細胞分裂を停止させる必要がある。従って、いったん分裂を停止させたとしても、次の分裂に移行するまでの間に分裂の再開が起きた場合には、卵割阻止は失敗となる。このため、分裂再開は、卵割阻止の失敗原因の1つであると考えられている<sup>14)</sup>。温度処理によって分裂が停止する範囲内であれば、遅くに処理を行った区程、分裂再開の影響を受けにくいと考えられるため、効率的に分裂を停止できるタイミングが、効率的に分裂を阻止できるタイミングであるとは限らない。一回処理では、後者は前者より遅い可能性がある。一方、二回処理の最適の一回目処理のタイミングは、分裂再開の影響を受けにくい分、分裂を効率的に停止出来るタイミングに近いと考えられる。このように分裂の再開を考慮すると、二回処理の一回目処理の最適処理時期は、一回処理の最適処理時期より早くなると考えられる。今後はこの推論を検証するために、細胞学的な観察を行うことによって、二回処理による分裂再開の抑制について確認する必要がある。

試験2の結果より、収容水温が高い場合には、正常魚出現率のピークが早く生じることが示された。著者は、卵割溝の形成を指標に卵割阻止処理卵の2細胞になる時間を調査し、未処理卵と比較した時の卵割の遅れが、低い水温( $5.4^{\circ}\text{C}$ )よりも、高い水温( $12^{\circ}\text{C}$ )で管理した時に小さくなることを確認したことから、収容水温は、処理後の分裂再開に影響を及ぼすと考えている(未発表)。従って、本試験で収容水温が高い場合に、正常魚出現率のピークが早く生じたのは、処理後の分裂再開が早かったためと考えられる。

この結果より、最適再処理開始時間は、収容水温によって変化すると考えられるため、水温に従って二回目の処理開始時期を変化させなくてはならない。しかし、水温変化に伴う処理時期の変化は試験によって異なっており、また、正常魚出現率の変化が二峰性を示したこともあり、更に検討が必要である。

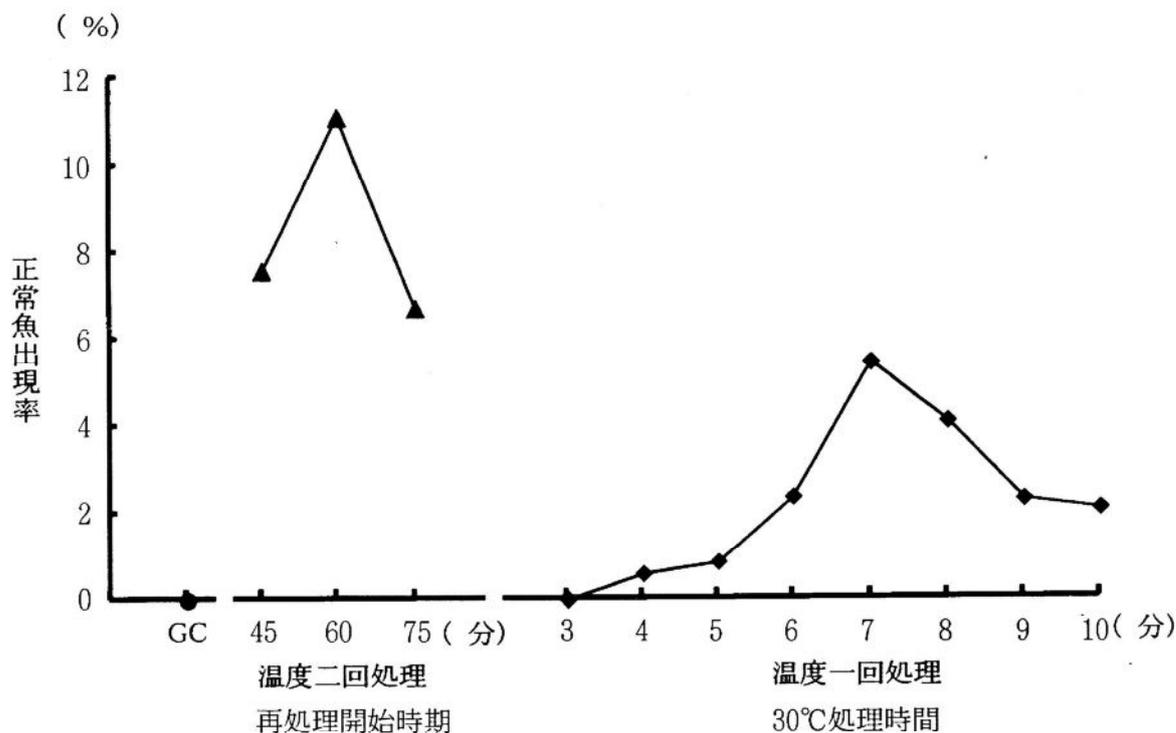
試験3の結果より、温度二回処理によって卵割阻止型雌性発生魚を作出する場合、その作出成績は各親魚によって異なることが明らかとなった。これは水圧処理における報告例<sup>15)</sup>と同様である。

第4表 作出成績

親魚 No.	系統	区	再処理開始時間	供試卵数	発眼率	正常魚出現率
			分	粒	%	%
1	早期系	二回処理区	30	776	64.6	2.4
			45	832	72.1	1.2
			60	635	77.3	0.3
		一回処理区		860	81.7	0.5
		極体放出阻止型 雌性発生区		769	71.2	42.6
2	早期系	二回処理区	30	901	40.0	0.4
			45	1246	55.9	0.7
			60	1105	18.7	0.4
		一回処理区		800	74.6	0.5
		極体放出阻止型 雌性発生区		1009	67.8	41.1
3	早期系	二回処理区	30	1042	3.1	0.2
			45	852	9.2	0
			60	1110	4.5	0
		一回処理区		853	34.9	1.3
		極体放出阻止型 雌性発生区		951	57.1	19.3
4	導入系	二回処理区	45	575	31.7	8.2
			60	656	19.2	2.7
			75	395	31.4	4.6
		一回処理区		689	76.1	0.9
		極体放出阻止型 雌性発生区		913	72.8	66.6
		雌性発生半数体区		424	71.9	0.2
5	導入系	二回処理区	45	601	5.2	0.8
			60	608	0.3	0.2
			75	451	5.3	0
		一回処理区		685	78.7	0.4
		極体放出阻止型 雌性発生区		839	77.2	54.4
		雌性発生半数体区		339	86.7	0.3
6	晚期系	二回処理区	45	778	68.5	36.4
			60	881	64.6	28.9
			75	641	68.6	31.8
		一回処理区		795	70.9	2.8
		極体放出阻止型 雌性発生区		979	67.5	48.3
		雌性発生半数体区		505	69.9	0.6
7	晚期系	二回処理区	45	683	24.7	1.8
			60	854	18.9	1.3
			75	771	31.8	1.2
		一回処理区		737	81.0	0.7
		極体放出阻止型 雌性発生区		882	80.5	70.5
		雌性発生半数体区		501	82.8	0

発眼率 = 発眼卵数 / 供試卵数 × 100

正常魚出現率 = 正常浮上魚数 / 供試卵数 × 100



第3図 温度一回処理と温度二回処理の正常魚出現率の比較  
GCは雌性発生半数体区

各親魚ごとに作出成績が異なったのは、特に二回目の処理を行った場合の発眼率、発眼卵に対する正常魚の割合が異なっていたためである。それらの値は、処理強度や一回目処理開始時期の影響によって変化するが、本試験では、処理強度は全て同じ、一回目処理開始時期は親魚Na.1～3と親魚Na.4～7でそれぞれ同じであった。それにもかかわらずこれらの差が生じたことから、卵の性質の違いがこの原因であると推察される。よって、各親魚の卵には、処理に対する耐性、卵の発生速度、倍数化の起こり易さに違いがあるという可能性が考えられる。特に処理に対する耐性が弱い場合には、親魚Na.3のように、二回処理を行った卵がほとんど発眼せず、二回処理が逆効果となる。従って、二回処理の処理強度は、親魚や系統によって変える必要があると考えられる。

試験4の結果において、一回処理区の30°C、7分区の正常魚出現率より二回処理区の再処理開始時間60分区の正常魚出現率が有意に高かったことより、二回処理は有効であると判断される。

試験結果から、試験4で供試した系統の一回処理の最適処理強度は30°C、7～8分と判断される。このことより、本試験の結果は、温度一回処理の最適処理強度の7割程度の強度（30°C、5分）で二回処理を行った場合、二回処理は有効であったと解釈することができる。二回

処理も適正な処理強度で処理しないと一回処理の作出成績に及ばないため<sup>11)</sup>、処理強度は二回処理の成否を左右する重要な要因である。本試験の結果からは二回処理の最適処理強度を特定できないが、少なくともそれが有効になるという点で、その処理強度を決める際の目安になるだろう。

以上のとおり、温度二回処理法を用いることによって効率的にニジマスの卵割阻止型雌性発生魚を得ることが出来る可能性が示された。本法は大量処理が可能であることから、育種への応用が期待される。

## 要 約

1. 温度二回処理による卵割阻止型雌性発生魚の作出について、一回目の処理開始時期、孵化用水の水温、親魚の違いが作出成績に及ぼす影響を調査した。また、温度二回処理の有効性を再確認するために温度一回処理の卵割阻止の最適処理強度を調査し、その作出結果を温度二回処理と比較した。
2. 一回目の処理時期を変化させて二回処理を行い、一回目の処理開始時期の差が二回処理による卵割阻止型雌性発生魚の作出率に及ぼす影響を調査した。二回処

理によって第一卵割を阻止する場合、一回目の処理時期によってその発眼率、正常魚出現率が大きく異なり、一回処理の最適処理開始時期（積算水温40°C・h）より早く（積算水温35°C・h）一回目の処理を行ったほうが良いことが明らかになった。

3. 一回目の処理から二回目の処理を開始するまでの間の卵の収容水温を変化させ、卵の収容水温が二回処理の最適再処理開始時間に及ぼす影響を調査した。収容水温が高い場合、正常魚出現率のピークが早く生じた。二回処理を行う場合には、収容水温によって再処理開始時間を変える必要がある。
4. 二回処理を行う場合の個体差の影響について調査した。二回処理の効果は、親魚によって大きく異なっていた。それは、各親魚によって発眼率、発眼卵に対する正常魚の割合が異なっていたためである。
5. 温度一回処理による最適処理強度を調査し、その区の正常浮上魚の出現率と30°C、5分処理による二回処理区のそれを比較した。温度二回処理区の正常魚出現率は、温度一回処理の最適処理区（30°C、7分）より有意に高く、二回処理は有効であった。

## 文 献

- 1) Hyon-Sob Han・Nobuhiko Taniguti・and Akio T sujimura, 1991 ; Production of Clonal Ayu by Chromo-some Manipulation and Confirmation by Isozyme Marker and Tissue Grafting. Nippon Suisan Gakkaishi 57,825-832
- 2) 小野里坦, 1992 ; 第一卵割阻害による純系化魚の遺伝的特性解明魚介類の雌性発生による育種技術の開発, 研究成果267, 57-60.
- 3) KOBAYASI,T.・A.IDE・T.HIASA・S.FUSIKI and K.UENO (1994) Production of Cloned Amago Salmon *Oncorhynchus rhodurus*. Fisheries Science, 60, 3, 275-281.
- 4) 山本栄一,1995 ; ヒラメの人為性統御とクローン集団作出に関する研究, 鳥取県水産試験場報告 34 1-145.
- 5) Kazuo Tabata and Akira Mizuta (1997) The Present Situation and Important Issue in Breeding by Chromosomal Set Manipulation in Hiramé *Paralichthys Olivaceus*

Bull.Nalt.Res.Inst.Aquacult.,Suppl.3 43-52.

- 6) 桑田知宣, 都竹仁一, 武藤義範, 中山一郎, 1995 ; クローンアマゴの特性について染色体操作によるサケ科魚類の育種に関する研究-I, 岐水試研報 NO.40, 19-33.
- 7) 小野里坦, 1987 ; ニジマスおよびサクラマスの第一卵割阻止による雌性発生2倍体, 昭和62年度日本水産学会春季大会要旨, 61
- 8) 田畑和男・五利江重昭, 1988 ; 第一卵割阻害によるヒラメの雌性発生2倍体の誘起と飼育特性, 日水誌, 11, 1867-1872.
- 9) 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年度山梨県魚苗センター事報, 34-38.
- 10) 小林 徹・伏木省三・八木久則・木村忠亮, 1987 ; マス類の人為倍数体利用による育種に関する研究 ニジマスの雌性発生における倍数化処理時期の検討, 昭和62年度滋賀醒井鱒業報, 39-47.
- 11) 桑田知宣,1998 ; ニジマスの温度二回処理による第一卵割阻止について染色体操作によるサケ科魚類の育種に関する研究-II, 岐阜水試研報 NO.43, 9-14.
- 12) 高橋一孝・猪田利夫・森沢正昭 (1987) ニジマス精子の簡便な保存法, 養殖, 24, 101-105.
- 13) 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種の品種改善研究-IV ニジマスの卵割阻止最適処理方法について, 岐水試研報 No.37, 1-7
- 14) 小野里坦, 1991 ; サケ科魚類のクローン作出とその問題点, 養殖研ニュース No.21, 9-16.
- 15) 小林徹,1991 ; マス類の人為倍数体利用による育種に関する研究ニジマスの雌性発生における倍数化処理時期の検討-II 平成元年度滋賀県醒井養鱒場業務報告, 36-41.