

低水温での親魚養成によるクニマスの卵質改善

青柳敏裕・岡崎 巧・吉崎悟朗*

2010年に西湖でクニマス *Oncorhynchus kawamurae* が発見されたことを受け、当所では域外保全と将来的な養殖対象種としての活用を図るため、クニマスの養殖技術の確立に向けた研究を行ってきた。これまでに、天然親魚から得られた養殖第一世代のクニマスは、忍野支所（以下、支所）の飼育環境下（水温 12.5°C）において概ね順調な成長を示すものの^{1,3)}、成熟個体の出現率が低いことに加えて卵質が極端に悪く、養殖第二世代以降の量産が課題となっている^{3,4)}。そこで、成熟に関与する環境要因として、親魚養成水温の影響を明らかにするため、支所の飼育水（地下水）を冷却して親魚養成を行い、成熟状況について検討した。なお、本研究は山梨県総合理工学研究機構研究課題の一環として実施した。

材料及び方法

供試魚及び飼育設備

西湖産天然親魚から作出した、養殖第一世代（2017年12月11-18日人工授精）の個体（約16か月齢）を供試魚とした。試験池は、屋内コンクリート池（L4.6m×W1.5m×D0.7m, A-8号池及びB-8号池）を使用した。予めB-8号池には循環式屋外空冷型クーラー（IWAKI, RXC-L3750AR-M）を設置した。クーラーの循環水量は約65L/minで、水質悪化を軽減するため補助的に地下水（12.5°C, 以下同じ）を20L/min注水し、半循環飼育とした。対照区をA-8号池として、地下水を40L/min注水し、かけ流し飼育とした。

B-8号池を冷却試験区（以下、冷却区）として、飼育水の冷却温度は当初8°Cとした。飼育中の各池の水温は水温ロガー（Tidbit v2, Onset社）により1時間間隔で計測した。上屋の採光部から自然光が差し込むため、自然日長が保たれているものとみなした。2019年4月1日、冷却区に130尾、対照区に129尾の供試魚を收容した。收容時の体サイズは、冷却区が体長137±16mm（平均±標準偏差, 以下同じ）、体重37.3±14.3g, 対照区が体長137±15mm, 体重37.7±14.2gであった。飼育には市販のマス用配合飼料を使用し、観賞魚用フードタイマーを併用して1日5回、残餌が出る程度の飽食量として週5日給餌した。2020年4月6日、対照区飼育魚112尾のうち30尾を抽出し、B-8号池を上下に仕切った下区画に收容して、2歳春以降の冷却飼育群とした（冷却区②）。試験開始時からの冷却群を冷却区①）。飼育温度別の成熟率の検討は年度別に行い、各年度期首の飼育数を母数とした。2020年度に富士河口湖町のクニマス展示館（以下、展示館）展示魚（供試魚と同由来）のうち複数の雌が成熟し、良質卵が得られた⁵⁾。そこで、2021年4月1日から冷却温度を展示館と同じ9°Cに変更して試験を継続した。

熟度鑑別

熟度鑑別は2019年10月7日から2022年2月20日までの2年4ヶ月の間、週1回の頻度で行った。二次性徴を呈した個体が認められた際は背鰭基部にアンカータグで標識し、個体識別した。排卵を確認した際には採卵及び人工授精を行い、運動性が良好な精子が十分量得られた際には精子の凍結保存を行った。

採卵・人工授精

熟度鑑別で排卵個体が認められた際は、まず搾出法により採卵し、その2日後に切開法により採卵した。同時に排精個体が認められた場合は精液を搾出して媒精した。採卵時に採精可能な雄がいなかった場合は、予め液体窒素中で凍結保存していた精子を用いた。精子の凍結保存と凍結精子を用いた人工授精は、Ciereszko *et al.*⁶⁾の方法に準じて行った。受精卵は発眼期まで地下水を掛け流して管理した。発眼期から浮上期までの間は、循環式冷却機で水温9°Cに設定した水槽中に地下水を微量注水して管理し、発眼卵数、孵化尾数、浮上尾数を計数した。

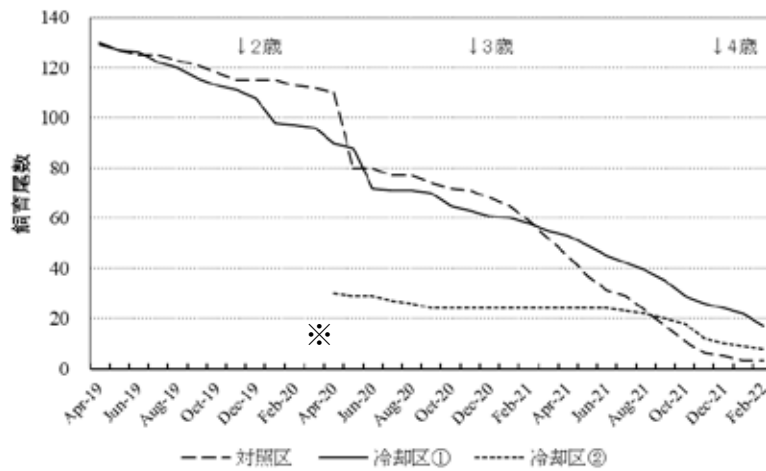
Aoyagi Toshihiro, Okazaki Takumi, Yoshizaki Goro *東京海洋大学

生殖腺の発達状況の検討

2020年4月から12月にかけて、供試魚がへい死した際に生殖腺をブアン固定し、70%エタノール液に移した組織を9℃で保管し、後日、東京海洋大学へ送付した。東京海洋大学では組織のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った後、生殖腺の発達状況を検討した。

結果

試験期間中の生残状況を図1に示す。これまでの親魚養成試験同様、3歳から4歳にかけて大半がへい死し、2022年2月20日の試験終了時の飼育尾数は対照区が2尾、冷却区が合計17尾であった。成熟以外のへい死について、へい死との関連が疑われる因子は、真菌症、窒素ガス病、腎石灰化症候群（以下、腎石灰症）、肝臓の腫瘍であった。



※：2020年4月、対照区から30尾を冷却池に移し冷却区②を設定

図1 低温親魚養成試験区の生残状況（2019年4月1日～2022年2月20日）

2019年4月1日から2022年2月20日までの各池の水温を図2に示す。期間中の平均水温（最低-最高，以下同じ）は、対照区は12.5℃（11.3-13.2）と原水に近い水温で、外気温の影響を受けていたが屋外池に比べて比較的安定していた。冷却区では、クーラー8℃設定の2020年度は8.0℃（7.8-8.4），9℃設定の2021年度は9.3℃（9.0-9.6）で、外気温に関わらずほぼ安定していた。

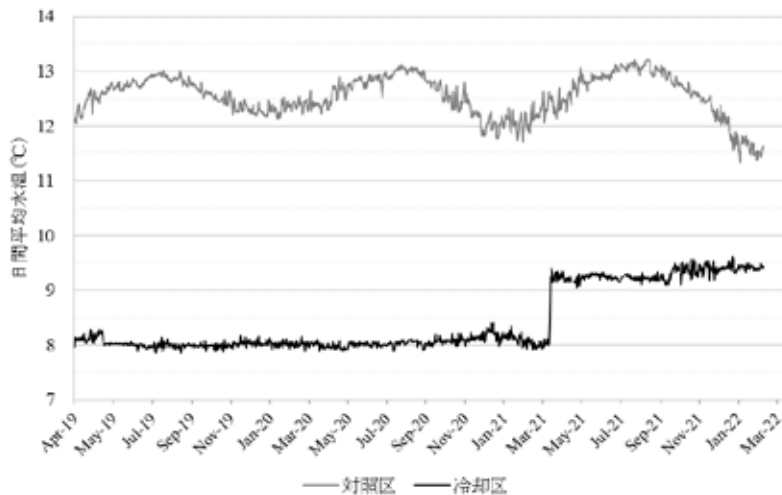


図2 低温親魚養成試験区の水温（2019年4月1日～2022年2月20日）

2020年度(3歳)にへい死した対照区の雄5尾及び雌2尾, 同じく冷却区の雄3尾及び雌2尾について, 生殖腺の組織像は全て未成熟な状態にあった。ただし, 対照区の雄1尾では精子形成が進んでいた(図3)。同じく対照区の雌1尾では, 卵巣内に一部退行途中様の形態を示す卵母細胞が混在していた(図4)。

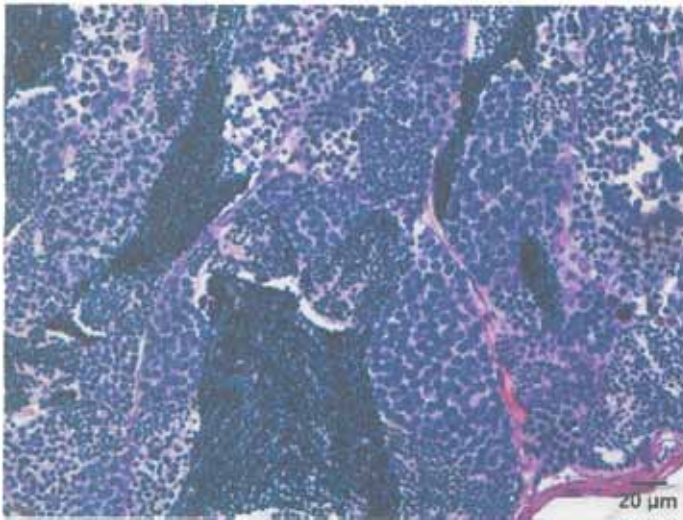


図3 精子形成の進行が認められた精巣(対照区, 12.5°C)

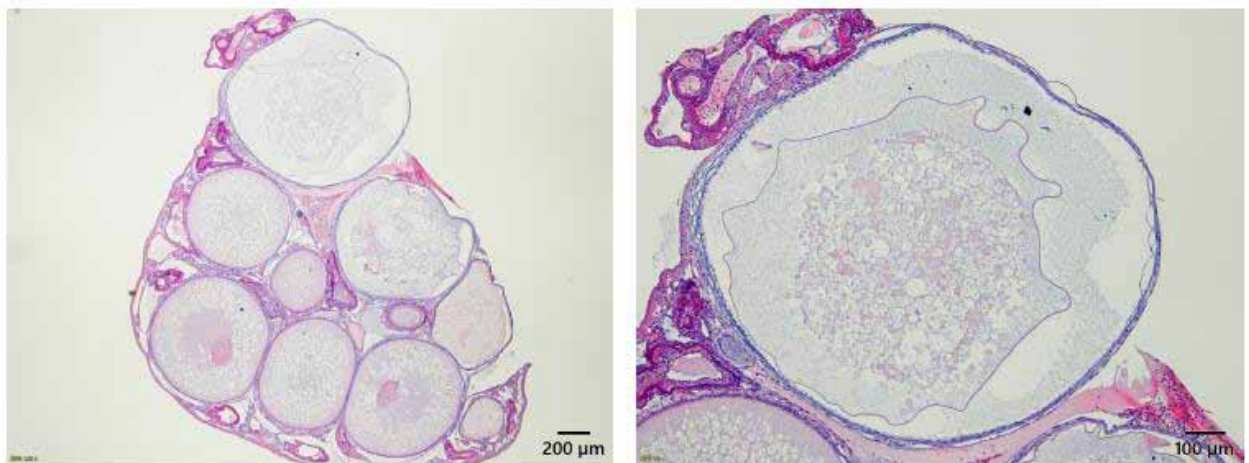


図4 退行途中様の形態を示す卵母細胞が認められた卵巣(対照区, 12.5°C)

低温親魚養成試験及び展示館における成熟魚(排卵または排精した個体)の出現状況を図5, 表1に示す。2020年度(3歳)は対照区が8.8%(雄5尾, 雌2尾), 冷却区は①②ともに0%, 展示館が34.8%(雄2尾, 雌6尾), 2021年度(4歳)は対照区が4.4%(雄2尾, 雌0尾), 冷却区①が13.2%(雄4尾, 雌3尾), 冷却区②が25.0%(雄6尾, 雌0尾), 展示館が14.3%(雄2尾, 雌0尾)であった。2020,2021年度の展示館, 2021年度の冷却区①②の成熟魚の出現率がいずれも10%を超え, 水温9°Cの池の成熟率が比較的高かった。なお, 対照区はこれまでの親魚養成試験(水温12.5°C)と同様に, 低調な結果となった。各区の成熟個体は年間を通じて散発的に出現したが, 10月から翌年2月の間が多く, 西湖での産卵期に近い範囲であった。

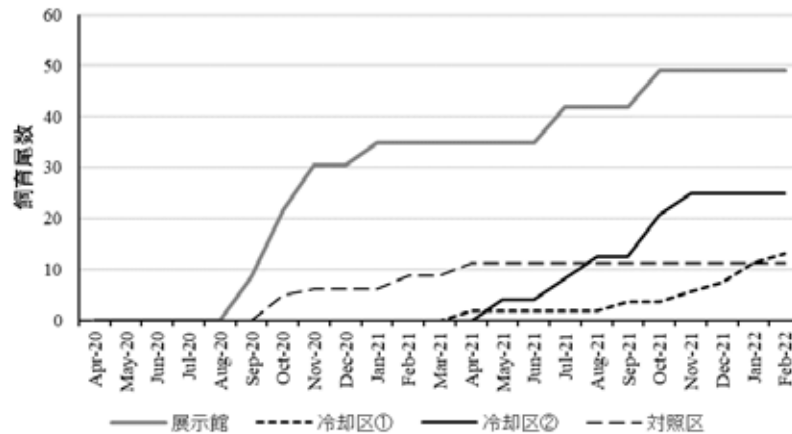


図5 低温親魚養成試験及び西湖クニマス展示館飼育魚の成熟状況

表1 低温親魚養成試験及び西湖クニマス展示館の年度別成熟状況

年度	年級	飼育場所	飼育水温	年度期首の飼育数	当該年度の成熟数	成熟魚の出現率(%)
2020	3	展示館	9.0	23	8	34.8
		冷却区①	8.0	90	0	0
		冷却区②	8.0	30	0	0
		対照区	12.5	80	7	8.8
2021	4	展示館	9.0	14	2	14.3
		冷却区①	9.0	53	7	13.2
		冷却区②	9.0	24	6	25.0
		対照区	12.5	45	2	4.4

展示館: 西湖クニマス展示館, 冷却区①: 1歳春から冷却開始群, 冷却区②: 2歳春から冷却開始群,

対照区: 支所地下水飼育群

低温親魚養成試験の採卵成績を表2に示す。2020年度(3歳)に排卵が確認されたのは対照区のみで、凍結精子を使い人工授精を実施した。いずれもこれまでの報告³⁾と同様、卵質が著しく悪く、発眼率が平均6.6%、ふ化率は平均0.1%と、ほとんど発生しなかった。2021年度(4歳)には冷却区で3尾の排卵が確認され、うち11月の1例では発眼率33.6%、ふ化率16.7%となり、支所における親魚養成試験では最もよい成績が得られた。冷却区の他の2例はいずれも重度の腎石灰症を呈しており、卵質が著しく悪く発眼率はいずれも0%であった。

表2 低温親魚養成試験の採卵成績

飼育場所	交配年月日	雌親魚ID	年級	雄親魚ID	年級	供試卵数	発眼卵数	発眼率	ふ化尾数	ふ化率	浮上尾数	浮上率	備考
クニマス館	2020.9.30	G077	3	G074,G075	3	333	221	66.4	83	24.9	64	19.2	
	2020.10.6	G080	3	G080	3	427	422	98.8	167	39.1	121	28.3	
	2020.10.6	G084	3	G074,G075	3	414	358	86.5	206	49.8	193	46.6	
	2020.10.21	G076	3	G074	3	341	196	57.5	192	56.3	192	56.3	
	2021.1.19	G086	3	凍結精子	3	760	606	79.7	532	70.0	413	54.3	
	合計または平均					2,275	1,803	77.8	1,180	48.0	983	41.0	
対照区	2021.1.25	C076	3	凍結精子	3	1,213	130	10.7	0	0	0	0	
	2021.2.8	C075	3	凍結精子	3	522	13	2.5	1	0.2	0	0	
	合計または平均					1,735	143	6.6	1	0.1	0	0	
冷却区	2021.11.1	G093	4	C078,C079,C080	4	884	297	33.6	148	16.7	142	16.1	
	2022.1.10	G008	4	C081	4	391	0	0	0	0	0	0	卵質悪
	2022.1.25	C082	4	凍結精子	4	79	0	0	0	0	0	0	卵質悪
	合計または平均					1,354	297	21.9	148	10.9	142	10.5	

クニマス館: 西湖クニマス展示館, 対照区: 忍野支所親魚養成試験対照区, 冷却区: 同冷却区

考 察

支所の飼育用水（12.5℃）でクニマスの親魚養成を行った場合、2-5歳にかけて散発的に成熟魚が現れるが累積成熟率は10%前後にとどまり、また雌の卵質が極端に悪く、ふ化率1%に満たないことが明らかとなっている⁴⁾。

今回、クニマスの生殖腺を組織学的に検討したところ、12.5℃で親魚養成された雄の1個体では精子形成が正常に進んでいることが推察されたとともに、雌の1個体では、発達途上の卵巣内で卵母細胞の一部が退行途中様の形態を示し、卵形成が正常に進んでいない可能性が示された。これまでの親魚養成試験において、12.5℃でも雄の成熟は認められるが雌の卵質が非常に悪い結果を支持するものであり、12.5℃における雌の成熟不調が、排卵前の卵形成の過程にあることが示唆された。

サケ科魚類の親魚養成時の水温は、卵質に影響を及ぼす重要な環境要因であり、クニマスに近縁のヒメマスでは、夏季の高水温（23℃）が卵の異常成熟を促すことが明らかになっている⁷⁾。洞爺湖での網生簀養殖試験では、7月に低水温（7-10℃）の千歳試験池にヒメマス成魚を移すと良好な卵が得られることが示されている⁷⁾。また、栃木県水産試験場では、最高水温が20℃と17℃になる2箇所の池でヒメマス3歳魚を飼育した場合、最高水温が20℃となる池では全ての個体が成熟しなかったこと、最高水温が17℃となる池についても、排卵した雌はごくわずかであったと報告している⁸⁾。さらに、秋田県水産振興センターでは、1歳半以降のヒメマスを、夏期の最高水温が23℃程度に達する河川水で飼育し、3歳魚の成熟状況を確認したところ、鑑別開始時の飼育個体数480尾に対し、雄については70尾以上の排精を確認したものの、排卵した雌は1尾のみで、人工授精を行ったものの卵質が著しく悪く、発眼率0.9%、ふ化率は0.8%と低率であったことを報告しており、その要因として高水温による内分泌への影響と推察している⁹⁾。

本試験では、ヒメマスの卵黄形成期にあたる夏より前から飼育水温を低下させることで、クニマスの卵質改善が図られるかを検討した。ヒメマスの池中養殖の適温が8-13℃とされること¹⁰⁾から、クニマスの親魚養成期の適温を8℃と仮定し、飼育水を冷却して親魚養成を行った。3歳を迎えた2020年度には、支所の冷却区で成熟魚は出現しなかったが、9℃の用水で飼育中の展示館で成熟した雌から良質卵が得られた。そこで、2021年度は冷却温度を9℃として親魚養成を継続した。その結果、1例ながら支所では過去最高となる採卵成績が得られた。良質な排卵個体が少なかったことについて、腎石灰症や肝臓の腫瘍など、2017年度産養殖第一世代の多くに、何らかの病変が認められることが影響していると推測された。しかし本試験により、卵黄形成期より前から飼育水温を低く保つことで、クニマスの卵質改善が期待できることが示された。今後、人工繁殖魚の継代を図る中で、卵質と成熟率の向上及び成熟時期の制御などについて、検討を重ねることとしたい。

要 約

1. 2017年度に西湖産天然親魚から作出した池産養成魚を用いて、親魚養成時の飼育水を冷却したときの卵質改善について検討した。
2. 2022年度(4歳)までの冷却試験区の累積成熟率は16.9%であり、西湖クニマス展示館での累積成熟率49.1%に次ぎ良好な結果が得られた。
3. 冷却試験区で2021年11月から翌1月にかけて3尾の雌が成熟し、11月に成熟した1尾の採卵成績は発眼率33.6%、ふ化率16.7%と、支所水温（12.5℃）での養成親魚の採卵成績に比べて良好な結果が得られた。
4. 卵黄形成期前から低水温で親魚養成を行うことで、雌の良好な成熟を促すことが期待できると考えられた。

文 献

- 1) 青柳敏裕・加地奈々・長谷川裕弥（2013）：クニマスの生態解明及び増養殖に関する研究. 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 8, 89-102.

- 2) 青柳敏裕・岡崎 巧・加地奈々・大浜秀規・長谷川裕弥・勘坂弘治・市田健介・吉崎悟朗 (2014) : クニマスの生態解明及び増養殖に関する研究 (第2報) . 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 9, 49-65.
- 3) 青柳敏裕・岡崎 巧・大浜秀規・三浦正之・谷沢弘将・小澤 諒・長谷川裕弥・吉澤一家・坪井潤一・勘坂弘治・市田健介・Lee Seungki・吉崎悟朗・松石 隆 (2015) : クニマスの生態解明及び増養殖に関する研究 (第3報) . 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 10, 43-65.
- 4) 岡崎 巧・平塚 匡・小澤 諒・加地奈々・三浦正之 (2019) : クニマス池産養成親魚 (3~6歳) の成熟と採卵 -2015~2017年度の結果-. 山梨県水産技術センター事業報告書, 46, 60-67.
- 5) 岡崎 巧・平塚 匡・青柳敏裕・渡辺安司 (2022) : 西湖クニマス展示館飼育魚の成熟と採卵. 山梨県水産技術センター事業報告書, 49, 39-43.
- 6) Ciereszko, A., Dietrich G. J., Nynca J., Dobosz S. and Zalewski T. (2014) : Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture.*, 420-421, 275-281.
- 7) 東 照雄 (2007) : 水温制御による安全かつ簡易なヒメマス全雌生産技術の開発. SALMON 情報, 1, 12-13.
- 8) 阿久津正浩・沢田守伸 (2006) : 地域特産マス類養殖技術開発試験ーニッコウイワナ, ヒメマス養殖技術の確立ー (平成12年度~) . 栃木県水産試験場研究報告, 49, 64-67.
- 9) 八木澤 優・高田芳博・珍田尚俊 (2017) : クニマス生態調査事業 (クニマス飼育環境整備事業) . 平成28年度秋田県水産振興センター業務報告書, 277-282.
- 10) 北村章二 (2005) : ヒメマス. 「水産増養殖システム2 淡水魚」 (隆島史夫・村井 衛編) . 恒星社厚生閣, 東京, 77-82.