

## サケ・マス類の卵および精子の保存に関する研究— 1

サケ (*Oncorhynchus keta*) 未受精卵の保存について

高野 和 則,\* 広 井 修,\*\* 安 川 雅 夫\*\*  
末 武 敏 夫\*\*

Studies on the Retention of Gametes  
of Salmonid Fishes — 1.

On the Fertility of Chum Salmon Eggs after Storage

Kazunori TAKANO,\* Osamu HIROI,\*\* Masao YASUKAWA\*\*  
and Toshio SUETAKE\*\*

Eggs of the chum salmon (*Oncorhynchus keta*), captured in the Chitose River, Hokkaido, were stored in coelomic fluid or physiological saline, and examined their fertility by inseminating with fresh milt at various periods of storage.

1) Eggs stored in the coelomic fluid under darkness at 8 °C, showed fertilization rate over 90 % after 48 hours of storage. From 48 hours to 96 hours their fertilization rate declined slowly (76.8%), and dropped suddenly to less than 30% after 120 hours of storage, and to 10% at 168 hour retention. Under the same conditions mentioned above, eggs kept in the physiological saline for 24 hours showed fertility of 97.2%. After 48 hours of storage, however, fertilization rate dropped suddenly to about 4%, and remained low during the period between the retention of 48 hours and of 240 hours except for the case of 96 hours where it was 47.8%.

2) Fertilized eggs stored in the physiological saline, under daylight at 8 °C, declined rapidly to about 3% after 24 hours of storage. No fertilization was taken place in the egg kept for 72 hours. Between 24 and 192 hours of storage, the proportion of dead eggs increased gradually from about 25% to 70%.

3) Chum salmon eggs stored in the physiological saline, under darkness at high temperature (19 °C), lost their fertility completely for 24 hours. All the eggs stored beyond 72 hours under the same conditions died before insemination.

---

北海道さけ・ますふ化場研究業績 第233号

\*北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate)

\*\*水産庁北海道さけ・ますふ化場千歳支場 (Chitose Branch of Hokkaido Salmon Hatchery, Fishery Agency, Chitose)

## はじめに

成熟親魚から採取した配偶子が、未受精状態でどの位受精力を保持し得るかは生理学的、あるいは育種学的に興味深い問題として古くから注目され、特にサケ・マス類ではその増殖技術の向上改善のための研究と相まって今日まで多くの研究がなされている。

雌雄配偶子のうち、精子の保存に関する研究には近年著しい進歩が見られ、様々の手法を用いて、その保存期間は次第に長期に及びつつある (Blaxter, 1969参照)。これに対し、未受精卵の保存に関しては、これまでの研究のほとんどが体腔液による湿式保存法 (中野・野沢, 1925; 川尻, 1927; Barrett, 1951; Foerster, 1965; Withler & Humphreys, 1967) を用いており、この他では、わずかに等張塩類溶液に浸漬保存した結果についての知見 (Runnström, 1920; 山本, 1949; 岡田ら, 1956) が得られているのみで、保存法、保存条件の検討は極めて不十分である。

サケ・マス類で配偶子の的確な保存法を確立することは、単に長期保存のためのみならず、近年とみに著しい増養殖環境の劣悪化に伴う採卵、運搬上の諸制約、あるいは増養殖における雌雄親魚の成熟時期の不一致など、種苗生産上の問題解決にも資するところが多い。

この報告では、体腔液および生理的塩類溶液に保存したサケ未受精卵の受精力について調べ、併せて二、三の保存条件について検討した結果について述べる。

稿を進めるに先立ち、御指導と御助言を賜った北海道大学山本喜一郎教授に深謝の意を表す。また、実験に際して種々御配慮と激励を賜った北海道さけ・ますふ化場千歳支場秋庭鉄之支場長と場員各位および本研究に用いた材料の採集に多大の便宜を与えられた北海道さけ・ます増殖事業協会三原健夫会長、同西越捕獲場布施智常氏と場員各位に厚く御礼申し上げます。

## 材料および方法

サケ (*Oncorhynchus keta*) の熟卵は1972年11月13日に石狩川水系千歳川の北海道さけ・ます増殖事業協会西越捕獲場で捕られた3年魚1尾 (尾叉長 55.8cm, 体重 1,600g) から開腹法によって採集した。その卵数は、約 2,300粒、生卵の平均卵径は 6.8mm, 平均卵重は 0.17g であった。

未受精卵の保存液として体腔液と生理的塩類溶液の2種類を用いた。体腔液は上記の採卵に用いた個体から、以下に述べる方法で採取した。供試魚を捕獲槽から取上げた後、直ちに鰓を切断して除血した。魚は腹部を上向きに静置し、生殖孔とその周辺をよく拭った後、駒込ピペット (5ml) を正確に生殖孔に挿入して体腔液を可能な限り吸出した。採取された液は約 40ml で、やや粘性を帯び透明な薄飴色を呈していた。この方法で体腔液の大部分が採取され、採卵時に採取された残存液は、わずか 4ml 程度であった。生理的塩類溶液は山本 (1947) の方法に準じて作製した [1M NaCl, 1M KCl, 2/3 M CaCl<sub>2</sub> 各溶液を 100:2.8:3.4 の体積比に混合し、1/20 M NaHCO<sub>3</sub> で pH 7.0 に調整]。

供試卵は 1 群 60~70 粒 (生卵で約 10g) に分け、予め体腔液または生理的塩類溶液 5ml を入れた乾燥した共栓ガラス瓶 (200ml) に収容し、軽く栓をした。生理的塩類溶液に保存する卵は、卵に付着した体腔液を出来るだけ除去する目的で、予め生理的塩類溶液で 5 回洗った後に保存液に浸漬した。採卵から保存液へ収容する操作を完了するまでに約 1 時間を要し、この間の室温は 10±1℃ であった。この後、保存用の瓶は箱詰めして、さけ・ますふ化場千歳支場へ運搬し、以後の実験はすべて同場で行なった。

実験は保存条件を違えた次の 4 区に分けて行なった。

実験—1：体腔液中、暗黒状態で 8℃ に保存。

実験—2：生理的塩類溶液中、暗黒状態で 8℃ に保存。

実験—3：生理的塩類溶液中、屋外の自然光下で 8℃ に保存。

実験—4：生理的塩類溶液中、暗黒状態で 19℃ に保存。

各実験区共、所定の日数後に 1 瓶づつ取出し、保存液を去除して全卵を媒精した。吸水後、卵は 8℃ のふ化用水

サケ・マス類の卵および精子の保存に関する研究—1—

に収容した。なお、媒精に用いた精液は、西越捕獲場で毎日採取した新鮮なものを用い、更にその都度精子活性を確認した。保存期間が5日以上に亘るものには、4日目にそれぞれ同質、同温度の保存液を2.5mlづつ追加した。

保存卵の受精の成否を判別するために、広井ら(1973)の観察結果に基づいて、毎回媒精後20時間で全卵をBouin液で固定し、卵膜を除去して胚盤部を顕微鏡観察した。

結 果

1) 暗黒下, 8℃で体腔液に保存した場合(実験—1)

媒精後20時間で確認した白濁不透明な死卵は3日, 5日および6日間保存した群にのみ見られ, それぞれ6.2%, 3.0%および4.4%と極めて少なかった(表—1)。

Table 1. Percentage of fertility and mortality of chum salmon eggs stored under various experimental conditions

Experiment		Days stored									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Expt. 1 Coelomic fluid in darkness at 8°C	Number of eggs	67	71	65	69	67	68	70	69		
	% Mortality	0 (0)	0 (0)	6.2(4)	0 (0)	3.0(2)	4.4(3)	0 (0)	0 (0)		
	% Fertility	97.0(65)	95.8(68)	89.2(58)	76.8(53)	26.9(18)	26.5(18)	10.0(7)	10.1(7)		
Expt. 2 Physiol. saline in darkness at 8°C	Number of eggs	72	70	68	67	69	69	69	67	71	72
	% Mortality	1.4(1)	0 (0)	2.9(2)	1.5(1)	2.9(2)	1.4(1)	1.4(1)	0 (0)	0 (0)	4.2(3)
	% Fertility	97.2(70)	4.3(3)	2.9(2)	47.8(32)	1.4(1)	8.7(6)	2.9(2)	9.0(6)	12.7(9)	4.2(3)
Expt. 3 Physiol. saline under daylight at 8°C	Number of eggs	68	71	70	67	68	67	68	69		
	% Mortality	0 (0)	25.4(18)	32.9(23)	32.8(22)	35.2(24)	29.9(20)	45.6(31)	69.6(48)		
	% Fertility	2.9(2)	1.4(1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Expt. 4 Physiol. saline in darkness at 19°C	Number of eggs	65	68	66	67	69	65				
	% Mortality	40.0(26)	72.1(49)	100 (66)	100 (67)	100 (69)	100 (65)				
	% Fertility	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)				

Numerals in parentheses indicate number of eggs.

一方, 各群の受精率について見ると, 保存1日および2日後のもので, それぞれ97.0%, 95.8%で, 通常採卵時とほとんど変わらない結果を示した(表—1, 図—1)。その後も4日間保存群の76.8%まで比較的良好な状態を保つが, 5日後に26.9%と受精率は急に低くなり, 7日後にはすでに保存液がやや腐臭を発する様になって, 受精率も10%程度に減じた。なお, 実験期間中, 瓶を浸漬した流水の水温は8±0.2℃と, ほとんど変化がなかった。

2) 暗黒下, 8℃で生理的塩類溶液に保存した場合(実験—2)

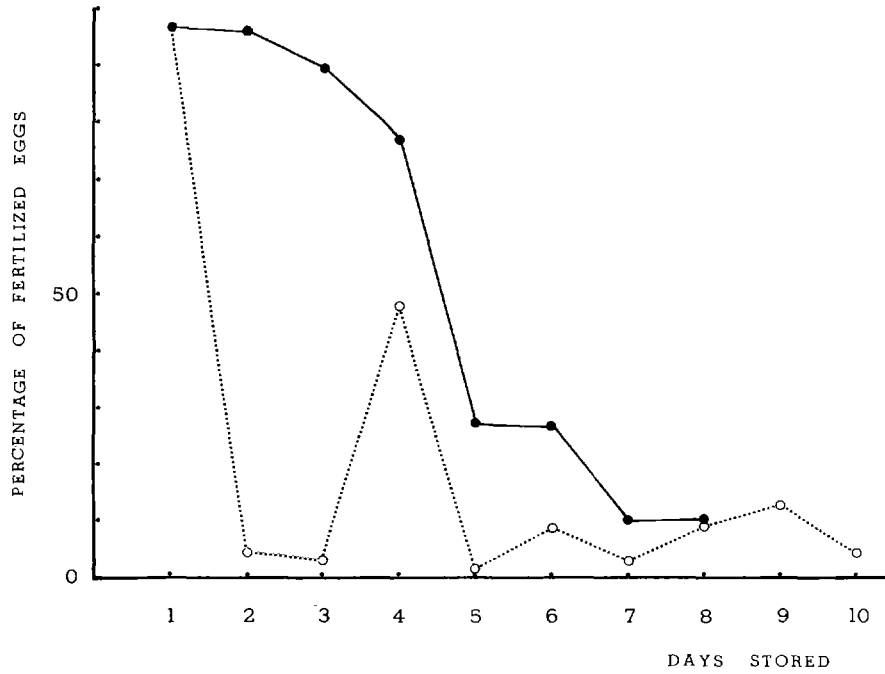
媒精20時間後に見られた死卵の発現状況は実験—1の場合とほぼ同様で, 4.2%を示した10日保存群が最高であり, いずれも極めて低い値を示した(表—1, 図—2)。

1日保存後の卵は97.2%と高い受精率を示したが, 2日後にはこれが4.3%と激減した。3日以降では, 4日後の卵群が47.8%と幾分受精力を保持していたものの, 他はすべて1.4~12.7%と極めて低い値を示した。しかし実験期間中, 受精率が0となることはなかった(表—1, 図—1)。保存温度の条件は実験—1と同様である。

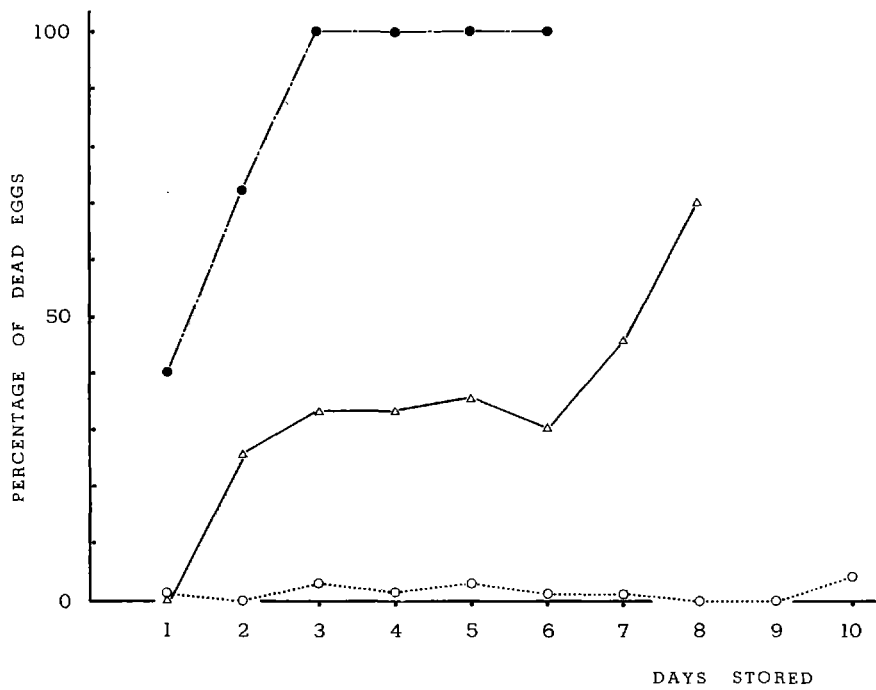
3) 自然光下, 8℃で生理的塩類溶液に保存した場合(実験—3)

未受精卵を収納した瓶は, ふ化室外の水路に静置し, 自然光に露した。実験期間中, 外気温は最低—7℃, 最高26℃で, 日間変動も著しかったが, 瓶を浸した流水の水温はほとんど変化なく, 8℃を保った。

1日保存後の卵群には死卵が全く認められなかったが, 受精卵も極めて少なく, 68粒中わずかに2粒のみであ



Text-fig. 1. Changes in fertilization rate of chum salmon eggs stored in coelomic fluid(●) or physiological saline(○) at 8°C.



Text-fig. 2. Percentage of dead eggs in physiological saline. The mark (●) shows the result obtained in darkness at 19°C, (○) at 8°C, and (△) in daylight at 8°C.

り、不受精卵がほとんどを占めた（表—1）。2日後のものでは死卵が25.4%現われ、残りはわずか1粒の受精卵を除いて、全て不受精卵であった。3日以降、死卵の出現率は経時的に増大し、8日後では69.6%を示した（図—2）。また、この間、受精卵は全く見られなかった。

#### 4) 暗黒下、19℃で生理的塩類溶液に保存した場合（実験—4）

保存瓶を浸漬した水槽水の温度は、実験期間を通じて19.0±1.5℃に保たれた。

この群では、1日後の卵ですでに受精力は全く失われ、以後6日間保存したものに至るまで受精卵は皆無であった（表—1）。しかも死卵の出現率は1日後で40%を占め、3日以上保存した卵には生卵が全く認められなかった（図—2）。

## 考 察

サケ・マス類の未受精卵の受精力保持についての研究は、これまでサクラマス、*Oncorhynchus masou*（中野・野沢, 1925; 川尻, 1927）、カラフトマス、*O. gorbuscha*（Withler & Humphreys, 1967; Withler & Morley, 1968）、ベニザケ、*O. nerka*（Foerster, 1965; Withler & Humphreys, 1967; Withler & Morley, 1968）、サケ、*O. keta*（Barrett, 1951; 岡田ら, 1956）など多くの種類について行なわれている。これらの結果は、それぞれの実験条件が異なることから、直接比較することは難しい。しかし、一般に受精力は保存期間が長期に亘るに従って低減し、また保存温度が高い程低率となることを示している。川尻（1927）は木崎湖産サクラマスについて、受精能力持続時間（T）と貯蔵温度（ $\theta$ ）の関係を  $Te^{a\theta} = C$ （ $a$ ,  $C$ はマス固有の常数）として表わしている。今、サケについて見ると、岡田ら（1956）は未受精卵を10.5℃に保存した結果、その受精率は5時間で77%、1日で35%、2日で28%と低減し、3日後にはすでに受精卵が得られなかった。一方、8℃で体腔液に浸漬保存した本研究の場合では、その受精率が2日まで95%以上、3日で約89%、4日で77%と漸減し、5日以降は30%以下に下がったが、岡田らの結果と比較すると受精力は遥かに良く持続された。さらにBarrett（1951）は同じサケ卵を2.5～5.8℃の低温で保存した結果、3日まで90%以上、4½日まで約80%、7日で30%以上の高い受精率を得ている。これらの結果を直接比較することにはやや難はあるが、サケにおいても未受精卵の受精力持続時間は保存温度が低い程長くなることを示す一つの証左となるであろう。

上記の研究は、未受精卵の保存液として全て体腔液を用いている。また、これらのほとんどが単に卵の乾燥を防ぐ程度に体腔液を加えた、いわゆる湿式保存法をとっている。保存期間が短い場合には、これらの方法と本実験で用いた浸漬法との間に大きな差異はないと思われるが、なお、通気性、乾燥などの点については検討を要する。今回の実験で7日後に体腔液が腐臭を発するようになったことは、保存液として無処理の体腔液を用いる方法の限界を示すと同時に、これが受精力保持期間と保存温度との関係を支配する要因の一つになっていることを示唆している。

体腔液に代る保存液として生理的塩類溶液を用いる方法は、古くRunnström（1920）が試み、*S. salvelinus*では未受精卵が3日間その受精力を変えないことを報告している。しかし、その後この方法は余り注目されず、わずかにサケで山本（1949）と岡田ら（1956）が実験しているに過ぎない。本研究で8℃の生理的塩類溶液に保存したサケ未受精卵は、前述の通り1日後に約97%と高い受精率を示したが、その後は4日に48%とやや高い値を示した以外はいずれもその受精率は極めて低かった。岡田ら（1956）は10.5℃のM/6平衡食塩水に未受精卵を保存した結果について報告している。それによると未受精卵は5時間後では新鮮な卵と変わらない受精率を示したが、1日後には26%、2日後で19%と低減した。しかし3日後に受精率は急に96%を示し、さらにその後の4日、5日には受精卵が皆無という極めて不安定な結果に終わった。これら2つの実験に共通する、生理的塩類溶液中での受精力の不安定な保持結果については、さらに綿密な検討を要する興味深い問題である。生理的塩類溶液中での保存後に多発した不受精卵は、媒精せずに水中に浸漬した不受精卵（岡田, 1954a, b）と同様、胚盤を形成していたことから、これらの卵は接水によって賦活された可能性がある。従って、生理的塩類溶液中の未受精卵は、保存中に少くとも媒精後の正常な受精現象を妨げる何らかの変化を引起したものと考えられる。

多くの魚類について、その卵門部で精子の凝着と賦活が行なわれる事実がよく知られている（Monroy, 1965参照）。Yanagimachi（1957）はニシンで卵門部に存在する精子賦活要素の生理学的特性について調べ、等張リソゲ

ル液 (pH 7.6) 中でも24時間でこの要素が破壊されることを示している。一方, Yoshida & Nomura (1972) はニジマス体腔液から Sephadex G-25によって精子活性化物質を分画抽出している。これらの事実は少なくとも体腔液中に含まれている、卵と精子の相互作用に積極的に関与する要因が生理的塩類溶液には欠如していたことを示唆している。従って、今後未受精卵の高い受精力を保持し、かつ長期保存を期するためには、これらの要因を解明しながら保存液の開発を進めねばならない。

生理的塩類溶液を用いて自然光下、8℃および暗黒下、19℃で未受精卵を保存した場合、何れも多数の不受受精卵を生じた。屋外保存のものに見られた不受受精卵では胚盤の形成が認められたのに対し、暗黒下、高温に保ったものでは胚盤形成が不完全であった。従って、前者では恐らく紫外線の影響による受精機構の障害が、また後者では高温による卵内質の変性が考えられるが、その作用機序についてはさらに検討を加えねばならない。いずれにしても、未受精卵の受精力保持を計る際には自然光と高温を可能な限り避ける必要があることは明らかである。

## 要 約

石狩川水系千歳川で捕獲したサケ (*Oncorhynchus keta*) の未受精卵を体腔液および生理的塩類溶液に浸漬保存して受精能力を調べ、併せて保存条件について検討を行なった。

1. 暗黒下、8℃で体腔液に保存した未受精卵は2日後まで90%以上の高い受精率を保持したが、その後4日まで受精率は漸減し、5日以降は30%以下に低減した。同条件下で生理的塩類溶液に保存した卵では、1日後にその受精率は97%を示したが、2日以降は、4日に48%とやや高い値を示したのみで、受精率は著しく低く、体腔液に比べて受精力の保持結果は極めて不安定であった。
2. 自然光下、8℃で生理的塩類溶液に保存した未受精卵は1日後にすでに約3%と著しく低い受精率を示し、3日以降、受精卵は全く得られなかった。逆に死卵は実験期間中、経時的に増加した。
3. 暗黒下、19℃の高温で生理的塩類溶液に保存した未受精卵は1日後で受精力を全く失って、3日以上経過したものには生卵が見られなかった。
4. 体腔液に保存した未受精卵の受精力持続期間と温度との関係および生理的塩類溶液に保存した場合に見られた受精力の不安定な保持結果について若干の考察を行なった。

## 文 献

- Barrett, I. 1951. Fertility of salmonoid eggs and sperm after storage. J. Fish. Res. Bd. Canada 8, 125-133.
- Blaxter, J. H. S. 1969. Development: eggs and larvae. p. 177-252. In Hoar, W. S. & D. J. Randall (ed.), Fish Physiology. III. 485p. Academic Press, New York & London.
- Foerster, R. E. 1965. Effect of retention of spermatozoa and ova of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in water and without addition of water, on fertility. J. Fish. Res. Bd. Canada 22, 1503-1521.
- 広井修・安川雅夫・末武敏夫・佐々木正三・富田竹雄・佐藤幸男 1973. 8℃の湧水におけるサケ (*Oncorhynchus keta*) 卵の発生について (予報). さけ・ますふ化場研報, 27.
- 川尻稔 1927. 鱒の卵及精子の貯蔵試験. 水講試報, 23, 31-34.
- Monroy, A. 1965. Chemistry and Physiology of Fertilization. (Translated from English by Nakano, E., 1968), 126p. Iwasaki Gakujutsu Shuppansha, Tokyo (In Japanese).
- 中野宗治・野沢鑑 1925. 鱒の卵及精子の活力試験. 水講試報, 21, 42-52.
- 岡田 篤 1954a. 鮭卵受精率の早期判定について. 北大農邦文紀要, 2, 200-203.
- 岡田 篤 1954b. 賦活された鮭未受精卵胚盤の形態変化について. 鮭試報, 9, 127-132.
- 岡田 篤・石川嘉郎・木村義一 1956. 鮭人工ふ化における不受精現象の研究 (第2報) 精子及び卵子の生存能力について. 鮭試報, 11, 7-17.
- Runnström, J. 1920. Über den osmotischen Druck und Membranfunktion bei den Lachsfischen. Acta zool., 1, 321-336. (山本, 1949より引用).

サケ・マス類の卵および精子の保存に関する研究—1

- Withler, F. C. & R. M. Humphreys 1967. Duration of fertility of ova and sperm of sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and pink (*O. gorbuscha*) salmon. J. Fish. Res. Bd. Canada 24, 1573-1578.
- Withler, F. C. & R. B. Morley 1968. Effects of chilled storage on viability of stored ova and sperm of sockeye and pink salmon. J. Fish. Res. Bd. Canada 25, 2695-2699.
- 山本喜一郎 1947. 淡水に接した鮭卵の受精力減衰の機構に就て. 孵試報, 2, 1-11.
- 山本喜一郎 1949. サケ及マスの卵の受精方法に就ての考察. 孵試報, 4, 33-46.
- Yanagimachi, R. 1957. Some properties of the sperm-activating factor in the micropyle area of the herring egg. Annot. Zool. Japon., 30, 114-119.
- Yoshida, T. & M. Nomura 1972. A substance enhancing sperm motility in the ovarian fluid of rainbow trout. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 38, 1073.