

成熟期のサケ親魚への高水温の影響に関する基礎的調査

藤原 真^{*1}, 隼野寛史¹, 宮腰靖之¹

¹北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場

Preliminary experiment of effects of high water temperature on maturation of adult chum salmon.

MAKOTO FUJIWARA^{*1}, HIROFUMI HAYANO¹ and YASUYUKI MIYAKOSHI¹

¹ Hokkaido Research Organization, Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, *Eniwa, Hokkaido, 061–1433, Japan*

To evaluate the effects of high water temperature on the final maturation of chum salmon (*Oncorhynchus keta*), 3 females and 3 males were kept in tanks at different temperatures (normal, 11°C; high, 20°C or 22°C), and cross-fertilization was conducted using the surviving mature fish. Females held at 20°C ovulated on the third day of holding, while all females held at 22°C died by the fifth day without ovulating. In the ovary of one of the dead females, morphological changes such as over-maturation (aggregations of yolk globule) were recognized. Eyed egg ratio and hatched fry ratio of eggs fertilized with males held at 20°C were lower than that of eggs fertilized with males held at 11°C. Also, survivals of eggs fertilized with females held at 20°C were lower until eyed-egg and the subsequent stages, indicating an influence upon egg quality that cannot be evaluated from the external appearance. These results suggest that water temperature higher than 20°C may affect the mortality of adult chum salmon, final maturation, and ovulation.

キーワード：高水温, サケ親魚, 成熟期

北海道の重要な漁業種であるサケ (*Oncorhynchus keta*) は, 1990年代以降来遊数の増加がみられ, 2004年には6,000万尾に達したものの, 近年, 来遊数の減少がみられ, 加えて地域間の格差も大きくなってきている (宮腰, 2014)。さらに最近ではサケの来遊時期である9月中の海水温が高くなる年がみられ, 2012年の9月中旬には北海道の大部分で20°Cを超えていた (宮腰, 2014)。特に日本海沿岸では北部の一部から南部にかけて24°C以上の海水温が記録され, 来遊時期の遅れや来遊数の減少がみられた。さらにサケを排卵まで管理する増殖事業現場においても影響がみられた。たとえば, 暑寒別川採卵場 (増毛町) では蓄養池へ河川水を導水しており, 蓄養期間中の平均水温は例年11°C前後であるが, 2012年は14°Cと高く, 9月中旬には21.5°C (日平均) を記録した。そのような中, 同採卵場では未排卵であるにもかかわらず, 過熟卵と同様な形態変化 (油球の集合) を示す卵成熟異常と思われる卵巣が確認され (情報提供: 留萌管内さけ・ます増殖事業協会), 他の採卵場でも同様な現象がみられたとの情報が寄

せられた。その結果, 2012年には9月下旬と10月上旬の事業卵を中心に発眼率, ふ化率の顕著な低下がみられ (北海道さけ・ます増殖事業協会, 2013), 増殖事業上極めて深刻な問題と考えられた。今後の地球温暖化に伴い, 来遊時期の気温や河川水温あるいは海水温の上昇が進んだ場合の成熟期のサケ親魚への高水温の影響を把握し, 影響を軽減する対策等を検討することは重要と考えられる。そこで本研究では成熟期のサケ親魚への高水温の影響を明らかにすることを目的とし, 室内実験を行ったところ, いくつかの知見が得られたので報告する。

材料および方法

親魚管理 円型水槽 (2トン) 2基を用い, 通常水温区 (11°C) と高水温区 (22°Cあるいは20°C) を設定した。止水条件下でろ過材を入れたヘッドタンクを設け, 単相ポンプにより循環し, エアレーションを行った。水温の制御は, 通常水温区は恒温水循環装置, 高水温区はステレ

ンスヒーターとデジタル温度コントローラーによりそれぞれ行った。また、水質の悪化を防ぐため、毎日、一部の水を交換した。1試験区あたり6尾(雌雄各3尾)を収容し、排卵時期を合わせるため、通常水温区へ収容後、3日目に高水温区へサケ親魚を収容した。試験Ⅰでは通常水温区(11℃)と高水温区(22℃)を設定し、前者は2014年9月19日、後者は2014年9月22日にそれぞれ雌雄各3尾を収容した。また、試験Ⅱでは通常水温区(11℃)と高水温区(20℃)を設定し、前者は2014年10月3日、後者は2014年10月6日にそれぞれ雌雄各3尾を収容した。なお、試験には千歳川捕獲場(日本海さけ・ます増殖事業協会)で捕獲されたサケ親魚を供した。500ℓタンクを用い、エアレーションしながら活魚輸送し、試験水槽へ収容した。収容後、90分間流水で馴致した後、注水を止めて水温制御を開始した。

試験期間中、水交換の前後で水温、溶存酸素量(DO)、電気伝導度(EC)、水素イオン濃度(pH)、アンモニア態窒素(NH₄-N)を測定した。なお、水温とDOはDOメータ(WTW社製Multi 3410)、pHは簡易水質試験器(東洋製作所製BTB)、ECはポータブル電気伝導度・塩分・水温計(YSI社製EC300型)、アンモニア態窒素はパックステスト(理化学研究所製)を用いて測定した。なお、パックステストは標準色と比色して濃度を判定するため、中間の色は測定目盛の大きい値とした。さらに、得られたNH₄-N濃度ならびに水温とpHの測定値からThurston *et al.* (1979)により非解離アンモニア(NH₃)濃度を求めた。また、自記水温計(Onset社製)を水槽に取り付け、水温変動を記録した。

交配試験 試験Ⅰ、試験Ⅱ共に通常水温区と高水温区で排卵および排精した雌雄各1尾をそれぞれ4通りの組合せで交配し(以下、組合せ交配とする)、これを3回繰り返すこととした(Fig.1)。サケ親魚への高水温の影響は、卵の外観および交配した卵の発眼率等により評価した。ま

た、採卵時に体腔液の量、温度、pH、精液の温度、pHを測定した。なお、体腔液、精液共に温度は棒状温度計、pHはSpear pH計(Oktan社製)を用いて測定した。通常水温区と高水温区の雌親魚から得た卵をそれぞれ2等分し、各試験区(通常水温区と高水温区)に収容した雄親魚の精子1ccをそれぞれ媒精した。媒精後の残りの精子はアイスボックスで保冷し(概ね11℃)、交配作業終了後、精子運動時間(旋回運動が停止するまで)、運動比率(1視野中の運動している精子の割合)、スパマトクリット(精液中の精子占有率)をそれぞれ測定した。精子運動時間の測定は1個体につき3回行い、その平均値を用いた。スパマトクリットは、精液をガラス毛细管(ERMA GLASS CAPILLARY)へ入れ、遠心分離器(KUBOTA社製KH-1200S)を用いて遠心分離(12000回転/min、5分間)した後、分離した精漿と精子の割合を計測することで精液中の精子占有率であるスパマトクリットを計算した。なお、スパマトクリットの測定は、1個体につき2回行い、その平均値を用いた。

媒精後、受精卵は約9℃のふ化用水で接水、吸水し、浮上まで管理した。発眼時に発眼率(発眼卵数/採卵数×100)、ふ化完了時にふ化率(ふ化尾数/採卵数×100)、浮上時に奇形率(奇形魚/ふ上尾数×100)をそれぞれ求めた。

結 果

親魚管理

水温 試験Ⅰの通常水温区(11℃)では平均11.9℃(範囲;9.5~13.2℃)、高水温区(22℃)では平均19.5℃(範囲;9.0~23.8℃)であった(Fig.2)。一方、試験Ⅱの通常水温区(11℃)では平均11.4℃(範囲;9.0~12.1℃)、高水温区(20℃)では平均17.9℃(範囲;8.9~22.2℃)であった。

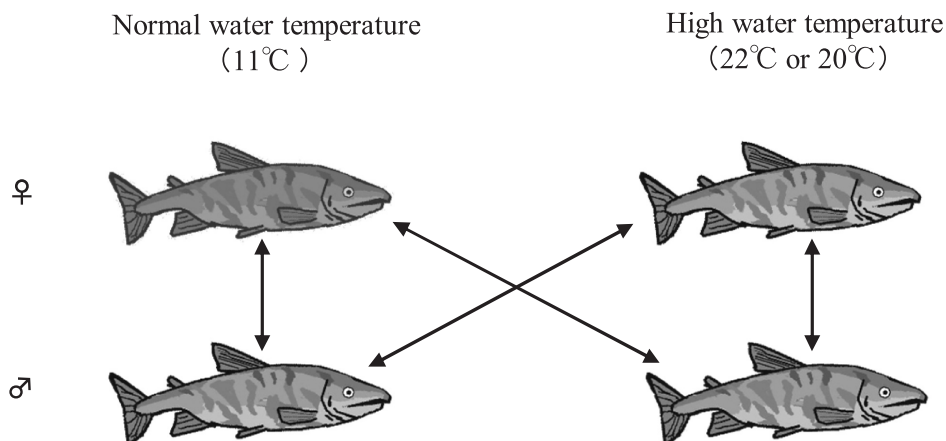


Fig.1 Outline of cross-fertilization for chum salmon to evaluate the effect of holding temperature on maturation.

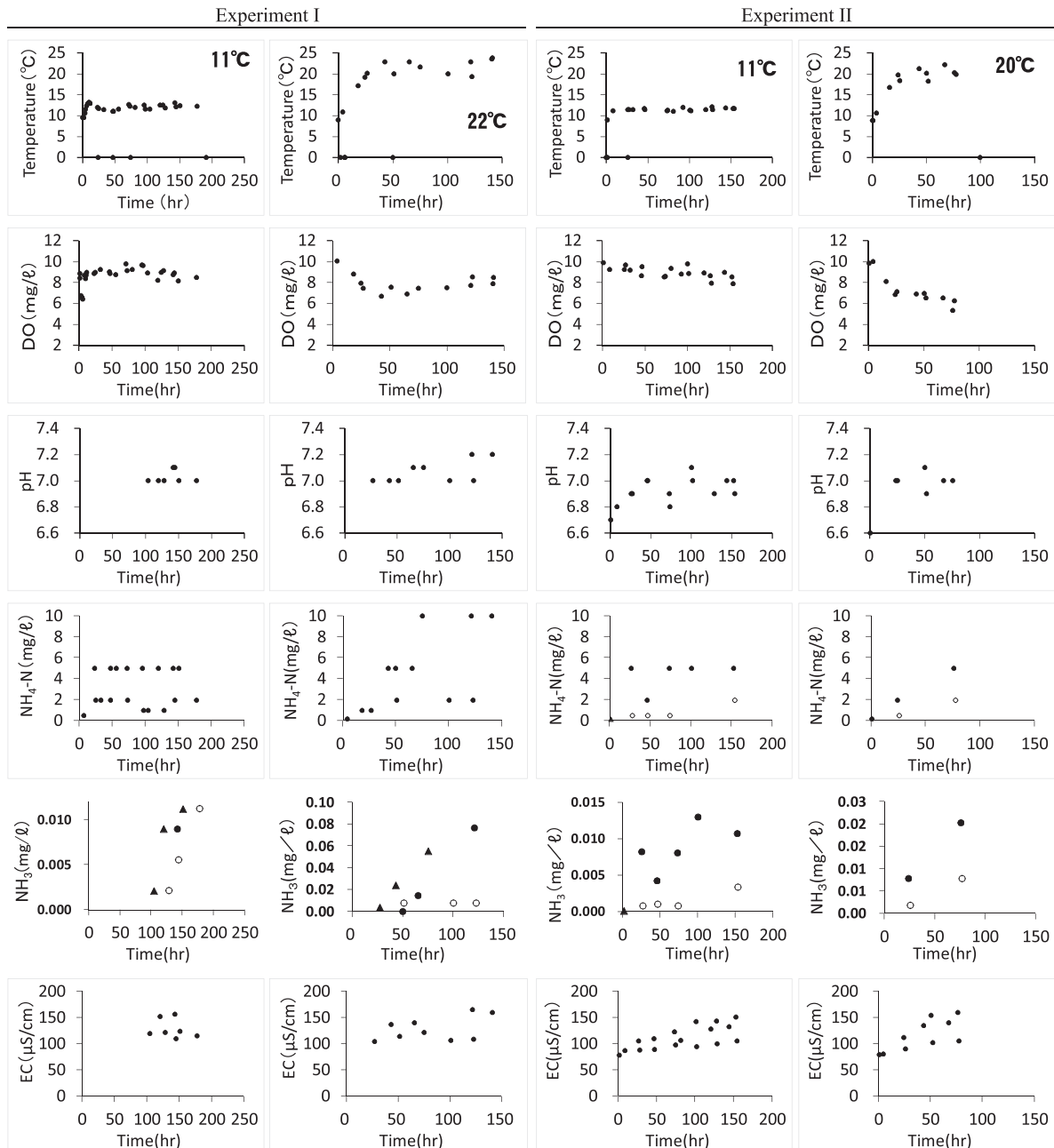


Fig.2 Water temperature, dissolved oxygen, pH, NH₄-N, NH₃, and electric conductivity during holding.

溶存酸素量 (DO) 試験 I の通常水温区 (11℃) では平均 8.7mg/l (範囲; 6.4~9.8mg/l), 高水温区 (22℃) では平均 7.9mg/l (範囲; 6.7~10.1mg/l), 試験 II の通常水温区 (11℃) では平均 9.0mg/l (範囲; 7.9~9.9mg/l), 高水温区 (20℃) では平均 7.3mg/l (範囲; 5.3~10.0mg/l) であった。

pH 試験 I の通常水温区 (11℃) では平均 7.0 (範囲; 7.0~7.1), 高水温区 (22℃) では平均 7.1 (範囲; 7.0~7.2), 試験 II の通常水温区 (11℃) では平均 6.9 (範囲; 6.7~7.1), 高水温区 (20℃) では平均 6.9 (範囲; 6.6~7.1) であった。

電気伝導度 (EC) 試験 I の通常水温区 (11℃) では平均 128.8μS/cm (範囲; 109.9~157.4μS/cm), 高水温区 (22℃) では平均 128.8μS/cm (範囲; 104.5~165.2μS/cm), 試験 II の通常水温区 (11℃) では平均 111.2μS/cm (範囲; 78.5~151.2μS/cm), 高水温区 (20℃) では平均 116.2μS/cm (範囲; 79.4~160.6μS/cm) であった。

アンモニア態窒素 (NH₄-N) 試験 I の通常水温区 (11℃) では平均 3.1mg/l (範囲; 0.5~5.0mg/l), 高水温区 (22℃) では平均 4.4mg/l (範囲; 0.2~10.0mg/l), 試験 II の通常水温区 (11℃) では平均 2.6mg/l (範囲; 0.2~5.0mg/l), 高水温区 (20℃) では平均 1.9mg/l (範囲; 0.2

～5.0mg/l)であった。

非解離性アンモニア (NH₃-N) 試験Ⅰの通常水温区 (11℃) では平均0.0072mg/l (範囲; 0.0021～0.0112mg/l), 高水温区 (22℃) では平均0.0248mg/l (範囲; 0.0040～0.0765mg/l), 試験Ⅱの通常水温区 (11℃) では平均0.0051mg/l (範囲; 0.0002～0.013mg/l), 高水温区 (20℃) では平均0.0094mg/l (範囲; 0.0018～0.0202mg/l)であった。

交配試験

試験Ⅰ 11℃に収容したサケ親魚6個体は, 収容後7日目の9月26日に成熟度判別により排卵・排精を確認した。一方, 22℃に収容した雌親魚3個体のうち, 1個体は収容した9月22日に水槽より逸脱し斃死したほか, 残り2個体は収容後5日目の9月27日に斃死したため, 組合せ交配は行わなかった。これら収容後5日目に斃死した2個体を開腹したところ, そのうちの1個体の卵巣において未排卵であるにもかかわらず, 油球の集合を特徴とする過熟卵と同様な形態変化が確認された (Fig.3)。一方, もう1個体の卵巣も未排卵であったが, このような形態変化は認め

られなかった。

試験Ⅱ 11℃に収容したサケ親魚6個体は, 収容後6日目の10月9日に成熟度判別により排卵・排精を確認した。一方, 20℃に収容した雌親魚は3個体中2個体, 雄親魚3個体は収容後3日目の10月9日に成熟度判別により排卵・排精を確認したことから, 翌日の10月10日に組合せ交配を2回行った。11℃に収容した雌親魚と雄親魚の交配から得られた卵の平均発眼率は96.6%, 平均孵化率は96.5%であったのに対して11℃に収容した雌親魚と20℃に収容した雄親魚の交配から得た卵の平均発眼率は68.1%, 平均孵化率は68.0%と低かった (Table 1)。一方, 20℃に収容した雌親魚と11℃に収容した雄親魚の交配から得た卵の平均発眼率は47.4%, 平均孵化率は44.2%, 20℃に収容した雌親魚と雄親魚との交配から得た卵の平均発眼率は41.4%, 平均孵化率は39.6%といずれも40%前後と低かった。発眼率および孵化率はばらつきが大きく, 発眼率が0.2～13.1%であった卵の未受精卵では過熟様卵 (油球が集合) が1%程度観察された (Fig.4)。一方, 発眼率が80%台であった未受精卵では外観上異常はないと判断されたが,

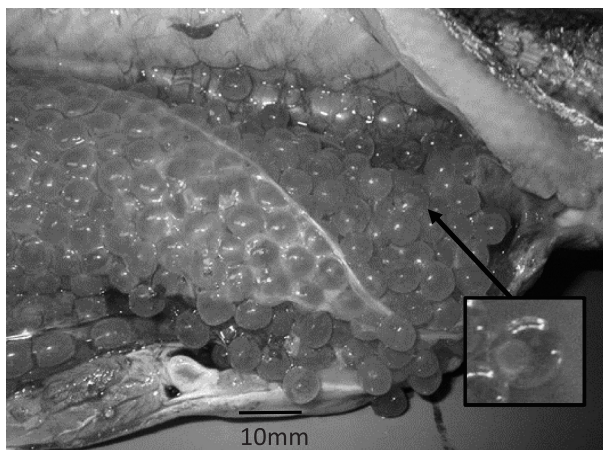


Fig.3 Ovary of female chum salmon died on the fifth day after holding.

Arrow indicates morphology change like over-maturation (aggregations of yolk globule).

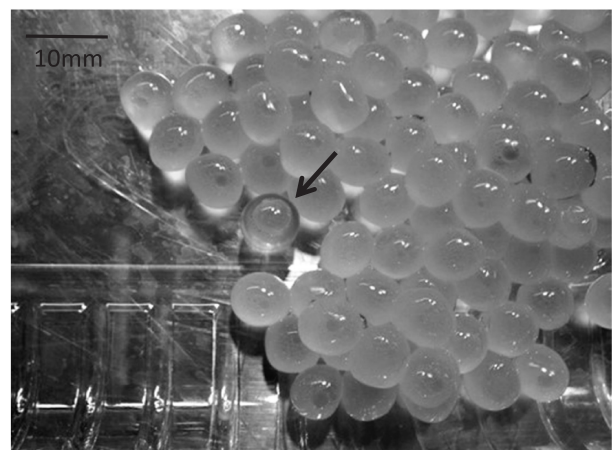


Fig.4 Eggs of females held at 20°C before fertilization.

Arrow indicates morphology change like over-maturation.

Table 1 Survival of chum salmon from fertilization to eyed-egg stage and hatching, and proportion of malformed fish at emergence for each experimental group

♀	♂	Eyed egg ratio (%) ^{*1}			Hatched fry ratio (%) ^{*2}			Malformed fish (%) ^{*3}		
		1	2	Ave.	1	2	Ave.	1	2	Ave.
11℃	11℃	97.1	96.2	96.6	96.8	96.1	96.5	0.2	0.0	0.1
	20℃	84.9	51.3	68.1	84.6	51.3	68.0	0.0	0.0	0.0
20℃	11℃	81.7	13.1	47.4	76.3	12.1	44.2	3.1	8.7	5.9
	20℃	82.6	0.2	41.4	78.9	0.2	39.6	1.5	0.0	0.8

*1: Eyed egg ratio(%) = Eyed eggs / total eggs × 100

*2: Hatched fry ratio(%) = Hatched fry / total eggs × 100

*3: Malformed fish(%) = malformed fish / emerged fish × 100

浮上時の奇形率をみると、11℃に収容した雌との交配では、平均奇形率が0~0.1%であったのに対して20℃に収容した雌との交配では0.8~5.9%と高かった (Table 1)。なお、奇形魚は、片眼欠損型が最も多く、次いで下顎欠損型、螺旋型の順に認められた (Fig.5)。

体腔液および精液の特性

体腔液 11℃に収容した雌親魚の体腔液の温度は13.1℃であったのに対して、20℃に収容した雌親魚のそれは16.4℃であった (Table 2)。体腔液の量は、11℃および20℃に収容した雌親魚で差は認められなかった (11℃; 39.8cc, 20℃; 34.0cc)。一方、pHは11℃に収容した雌親魚で7.6であったのに対して、20℃に収容した雌親魚では7.4と若干低い傾向が認められた。

精液 11℃に収容した雄親魚の精液の温度は13.3℃であったのに対して、20℃に収容した雄親魚のそれは17.0℃であった (Table 2)。pHは11℃に収容した雄親魚で7.5であったのに対して、20℃に収容した雄親魚では7.2と低い傾向が認められた。11℃に収容した雄親魚の精子の運動時間と運動比率はそれぞれ、27.9秒と80%であったのに対して、20℃に収容した雄親魚のそれは19.5秒と15.0%と20

℃に収容した群で著しく低い傾向が認められた。一方、スパマトクリットの値は、11℃および20℃に収容した雄親魚で差は認められなかった (11℃, 27.1%; 20℃, 31.0%)。

考 察

親魚管理 一般に水溶液中のアンモニアは非解離性アンモニアNH₃とアンモニウムイオンNH₄⁺の形態で存在するが、このうち、鰓のリポタンパク質膜を容易に透過することができるNH₃の毒性が高いことが知られている (Wuhrmann and Woker, 1948)。本研究で得られたNH₃濃度の最大値は、試験Ⅰの通常水温区では0.0112mg/l, 高水温区では0.0765mg/l, 試験Ⅱの通常水温区では0.013mg/l, 高水温区では0.0202mg/lであった。ニジマスを9~12か月飼育して得たNH₃の安全濃度は0.0125ppmと報告されており (Smith and Piper, 1975), 本研究で得られた最大値も試験Ⅰの高水温区 (22℃) を除くとほぼ同様な値であることからサケ親魚への影響はなかったものと考えられる。一方、ニジマス (57cm, 2,596g) を用いたアンモニアの急性毒性試験で得られた96時間半数致死濃度は0.163mg/l

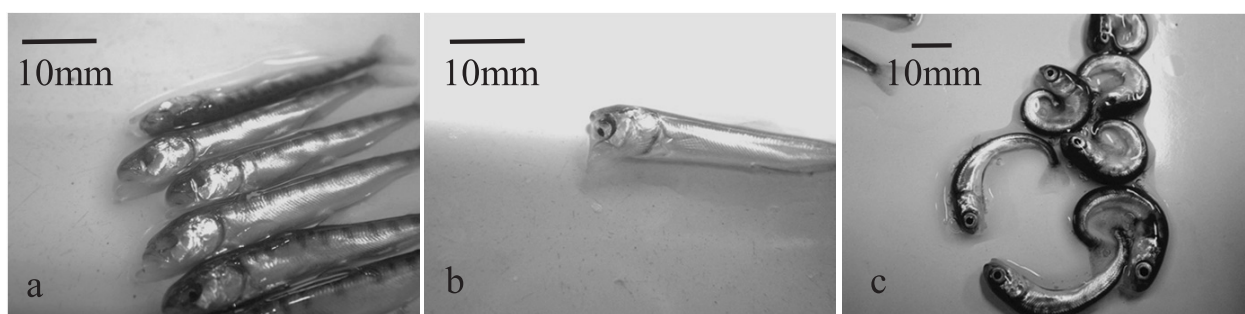


Fig.5 Photograph of malformed fish obtained by cross-fertilization with holding females at 20℃. a) one-eye deficiency type b) lower jaw deficiency type c) Spiral type

Table 2 Mean values measured in each trait of chum salmon

Traits	Treatment	
	11℃	20℃
Semen		
Temperature(℃)	13.3	17.0
Seminal fluid pH	7.5	7.2
Sperm mortality time(S)	27.9	19.5
Proportion of active sperm(%)	80.0	15.0
Spermatocrit(%)	27.1	31.0
Coelomic fluid		
Temperature(℃)	13.1	16.4
Ovarian fluid pH	7.6	7.4
Ovarian fluid volume(CC)	39.8	34.0

と報告されており (Thurston and Russo, 1983), 試験Ⅰの高水温区 (22℃) の0.0765 mg/lはこの値の約半分であるものの, 成熟期のサケ親魚への影響については不明である。

交配試験 20℃に収容した雌親魚は収容後3日目で排卵したのに対して22℃に収容した雌親魚は収容後5日目には排卵することなく, 全数斃死した。これら斃死魚のうちの1個体では卵巣が未排卵であるにもかかわらず, 過熟卵と同様な外見 (油球の集合) を示し, 2012年秋に暑寒別川採卵場 (増毛町) で確認された現象を再現することができた。サケの最大致死水温は23.7~23.8℃とされており (McCullough *et al.*, 2001), 本研究では高水温区 (22℃) において最大23.8℃が記録されていることから高水温が影響し, 斃死に至った可能性が考えられた。さらに, 排卵前の魚においては排卵あるいは精子形成への高水温の障害が報告されている (McCullough *et al.*, 2001)。本研究で観察された未排卵での過熟卵と同様な外見は, 最終成熟が完了したにもかかわらず, 高水温の影響により排卵されなかったためとも考えられるが, 最終成熟の細胞学的変化である胚泡崩壊 (GVBD; 清水, 2006) を確認していないことからこの点については不明である。通常水温区 (11℃) で飼育・採卵した卵を高水温区 (20℃) の雄を交配させた卵では通常水温区の雄を交配させた卵に比べ, 平均発眼率, 平均ふ化率の低下が認められ, 雄親魚への高水温の影響が示唆された。一方, 高水温区 (20℃) で飼育・採卵した卵に通常水温区の雄と高水温区 (20℃) の雄を交配させた卵の発眼率およびふ化率にはばらつきがみられ, 発眼率が80%台を示す個体が認められる一方で0.2~13.1%と極めて低い値を示す試験群もみられた。発眼率が80%台の試験群でも, 発眼後のふ化率の低下が大きく, さらに浮上稚魚の奇形率も高かったことから外観では分からない卵質への影響が認められた。広井ら (1988) は, 媒精後のサケ卵を18~20℃で接水, 洗浄, 吸水させ, 10℃のふ化用水で管理した場合, ふ出異常稚魚として螺旋形奇形魚が多く観察されたことを報告している。20℃でサケ親魚を飼育・採卵した本研究においても螺旋型奇形魚は認められたが, 片眼を欠いた奇形魚が最も多く観察されており, 媒精時の受精卵への高水温の影響と若干異なる結果が得られた。一方, 平均発眼率が0.2~13.1%と低い試験群では未受精卵において過熟様卵が全卵数の1%程度みられるなど高水温の影響は雄より雌で大きい傾向が認められた。

体腔液および精液の特性 ニジマスやマスノスケでは7.2から8.5の範囲内ではpHの上昇に伴い, 活動する精子の割合が上昇する (Ingermann *et al.*, 2002)。また, 精液のpHと精子運動時間, スパマトクリットとpH, 運動時間とス

パマトクリットの間それぞれ正の相関があり, パス解析したところ, 運動時間のみ発眼率と有意な相関がみられている (宮本ら, 2010)。さらに体腔液のpHは7.5から8.0までの間ではpHの上昇に伴い, 精子の活性が高まることが知られている (Perchec *et al.*, 1993)。本研究では高水温区 (20℃) に収容した雄の精子のpHおよび運動時間, 雌の体腔液のpHが通常水温区のそれより低い傾向が認められており, これらの要因も発眼率の低下に影響している可能性が示唆された。興味深いことに高水温区 (20℃) に収容した雄親魚の精子の運動比率は, 通常水温区に収容した雄親魚のそれより有意に低かったものの, 高水温区 (20℃) と通常水温区に収容した雌親魚との交配で得られた卵ではいずれも80%台の高い発眼率が得られており, 高水温の影響が雌親魚に比べ, 雄親魚ではそれほど大きくない可能性を示唆する結果が得られた。

本研究では止水条件下でサケ親魚を管理したが, 水交換作業あるいは管理中の飼育水の水質が少なからずサケ親魚へ影響する懸念があることから今後の課題として飼育実験系についての検討が必要と思われた。また, サケ親魚への高水温の影響には個体差が認められたことから今後, さらにデータを蓄積すると共に最終成熟の細胞学的評価およびそれに関与する血中ホルモン量等の内分泌学的評価も検討していく必要がある。

謝 辞

本研究を進めるにあたり, サケ親魚の提供と輸送に関して便宜を図って頂いた(一社)日本海さけ・ます増殖事業協会の職員一同に感謝申し上げます。また, サケ親魚の輸送, 管理に協力頂いたさけます・内水面水産試験場さけます資源部の諸氏に感謝申し上げます。本報告の原稿に対し有益なご助言を賜った北海道大学大学院水産科学研究院の井尻成保准教授に感謝申し上げます。

引用文献

- 広井 修, 浦和茂彦, 倉本 勉. 人工授精におけるサケ卵の受精水の適水温-1. 高水温の影響試験. さけ・ますふ化場研究報告1998; 42: 75-79.
- Ingermann RL, Bencic DC, Gould JG. Low seminal plasma buffering capacity corresponds to high pH sensitivity of sperm mortality in salmonids. *Fish Physiol. Biochem.* 2002; 24: 299-307.
- 公益社団法人北海道さけ・ます増殖事業協会. 平成24 (2012) 年度さけ・ます増殖事業成績書. 北海道さけ・ます増殖事業協会, 札幌, 2013.

- McCullough D, Spalding S, Sturdevant D, Hicks M. Summary of technical literature examining the physiological effects of temperature on salmonids. Issue Paper 5 prepared as part of U.S. EPA Region 10 Temperature Water Quality Criteria Guidance Development Project. EPA-910-D-01-005, U.S. Environmental Protection Agency, 2001; 1-114.
- 宮腰靖之. 北海道における最近のサケの資源動向. 北日本漁業 2014; **42**: 12-19.
- 宮本幸太, 高橋史久, 佐田 巖, 羅津三則, 小松信治, 桑木基靖, 徳田裕志, 吉田 昇, 伴 真俊. サケの発眼率とスパマトクリット, pHおよび精子運動時間との関係. 北海道立水産孵化場研究報告 2010; **64**: 17-22.
- Perchee G, Cosson J, Andre F, Billard R. Sperm motility of trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*). *J. Appl. Ichthyol.* 1993; **9**: 129-149.
- 清水昭男. 生殖生理に関する研究手法と水産重要魚種の再生産研究高度化への応用. 水産総合研究センター研究報告 2006; 別冊第4号: 51-62.
- Smith CE, Piper RG. Lesions associated with chronic exposure to ammonia. In : Ribelin WE, Gigaki H (eds). *The Pathology of Fishes*. Univ. Wis. Press, Madison. 1975; 497-514.
- Thurston RV, Russo RC, Emerson K. Aqueous ammonia equilibrium - tabulation of percent un-ionized ammonia. Ecological Research Series. EPA-600/3-79-091, U.S. Environmental Protection Agency, 1979; 1-123.
- Thurston RV, Russo RC. Acute toxicity of ammonia to rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1983; **112**: 696-704.
- Wuhrmann K, Woker H. Beitrage zur Toxikologie der Fische. II. Experimentelle Untersuchungen Über die Ammoniak und Blausaurevergiftung. *Schweiz. Z. Hydrol.* 1948; **11**: 210-244.