

ホルモン処理によるトラフグ養成親魚からの人工採卵 - II

堀木清貴・岡本俊治・松村貴晴・高須雄二

Induction of Ovarian Maturation and Ovulation in Cultured Tiger Puffer,
Takifugu rubripes by Hormonal Treatments - II

HORIKI Kiyotaka, OKAMOTO Shunji
MATUMURA Takaharu, TAKASU Yuji

Abstract

Some improvements of hormonal treatments for the induction of ovulation were tried in the cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Of the fishes cultured in our experimental culture tanks, twelve mature females were selected whose oocyte size were more than 925 μm in diameter. Single injection of human chorionic gonadotropin(500IU/kg)combined with chum salmon pituitary homogenate (10mg/kg)was made, and four-hour interval palpation was performed to check on ovulation. Ovulation was observed in all fish, and mainly occurred from 72 to 96 hours after the injection. Eggs of eight fishes which were obtained within 4 hours after ovulation, showed high fertilization rates of 66.1~98.8%. Thus, it would be concluded that ovulation period can be expected by female selection on the basis of oocyte size and eggs of high fertilization rate can be obtained by palpation of short time interval.

キーワード；トラフグ、養成親魚、ホルモン処理、人工採卵、排卵時間、受精率

現在、トラフグ、*Takifugu rubripes*の種苗生産は、産卵期に産卵場で漁獲された成熟親魚を用いて行われている場合が多い。しかし、近年、資源の減少等により成熟親魚の入手が困難になってきており、種苗生産のうえで、大きな問題になっている。このため、各研究機関では、親魚へのホルモン投与による人工採卵が試みられている。^{1,6)}

当研究所においても、平成3年度より親魚からの採卵技術の確立を目的に研究を行ってきた。これまでに、種苗生産魚からの飼育、養成によって採卵が可能な成熟親魚を確保することができ、胎盤性性腺刺激ホルモン(以下「HCG」と記す、帝国臓器製薬(株))とシロサケ脳下垂体(以下「SP」と記す)の混合投与、あるいはHCGの単独投与で排卵が誘発され3才魚からの採卵が可能となった。ホルモン投与から排卵までに要した時間は個体によ

り異なり、また、得られた卵の受精率も不安定であったが、ホルモン投与時の卵細胞の卵径が930 μm 以上の個体にHCGとSPを投与すると、排卵はホルモン投与6日後に集中することが確認された。⁹⁾ 即ち、ホルモン投与時の卵細胞の卵径の把握が雌親魚の排卵までの時間を同調させる上で重要であると考えられた。さらに、松山ら⁶⁾は卵径が900 μm に達したトラフグの卵細胞は、卵黄形成がほぼ完了していると報告している。これらのことから、本試験では、雌親魚の排卵までの時間の同調を図ることを目的として、卵黄形成が完了したと考えられる卵細胞の卵径が930 μm 程度に達した個体を選別し、ホルモン投与を行い、排卵までに要した時間を測定した。

一方、前報⁹⁾で、排卵後の時間の経過に伴い受精率は低下することを示した。また、中田ら¹⁰⁾は合成生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(以下LHRH-a)とHCGを用いて

排卵の誘発を行った場合、排卵後4時間以内に採卵、受精を行えば高い受精率の卵が得られると報告している。このことから、本試験では、排卵誘発に有効であり、投与方法がLHRH-aに比べ簡便なHCGとSPの混合投与においても、中田ら¹⁰⁾と同様の結果が得られるかどうか確認するため、排卵後4時間以内の採卵、受精を行い、その受精率を測定した。

材料及び方法

親魚養成

親魚は、天然親魚由来の受精卵を用い、当研究所で生産した種苗を3、4年間飼育、養成した魚を用いた。親魚の養成は、屋内10m³FRP水槽を用い、前報⁹⁾と同様の方法で行った。

親魚の雌雄判別は、1998年3月19~24日にポリエチレン製カニューレにより生殖巣組織の一部を採取して行った。

ホルモン投与

ホルモンは、HCGとSPを用い、前報⁹⁾と同様の方法で調整、投与した。投与量は、魚体重1kg当たりHCGは500IU、SPは10mgとした。

雌親魚

卵径の測定による親魚選別は、4月16日に行った。カニューレで卵細胞を採取し、約30粒の卵径を測定して平均卵径を算出した。翌日の17日午後1時に卵径が925 μ m以上の9尾を対象としてHCGとSPの混合投与を行った(第1回処理群)。また、卵径が925 μ m以下の個体は、4月23日に再び卵径を測定し、卵径が925 μ m以上

に達した3尾を対象として翌日の24日午後1時にHCGとSPの混合投与を行った(第2回処理群)。

雄親魚

4月6日に腹部を圧迫して放精の確認を行った。放精が確認されない個体には、雌親魚と同様にHCGを投与した。ホルモン投与1週間後の4月13日に放精を確認した個体のうち雌親魚と年齢が異なる2個体を選別して採精し、人工受精に用いた。

排卵の確認と人工受精及び受精率の算出

ホルモン投与した雌親魚は、投与2日後から1日3回、午前9時、午後1時、午後5時に水槽から取り上げ、腹部を軽く圧迫(以下「腹部触診」と記す)して放卵の有無を調べ、排卵を確認した。排卵した個体が出現した場合、残りの個体に対しての腹部触診は、その後4時間毎に行った。

排卵が確認された個体は、直ちに可能なかぎり卵を搾出し、採卵量を測定した。卵は、上に述べた雄親魚を用い、精子の運動性を確認した後、乾導法により人工受精を行った。

受精率は、人工受精の約4時間後に約100粒を検鏡し、卵割個数の割合から算出した。

結 果

供試魚の状態

ホルモン投与前の雌親魚の状態をTable 1に示した。第1回処理群では3才魚は4尾、4才魚は5尾、体重は1.46~2.01kg、卵径は925~983 μ mであった。また、第2回処理群では3才魚は1尾、4才魚は2尾、体重は

Table 1. Profiles of female fishes before hormone injection

Individual No.	Age	Body weight (kg)	Mean egg diameter (μ m)	Date of injection
First treatment group				
1	3	1.79	983	17 Apr
2	3	1.96	953	17 Apr
3	3	1.57	949	17 Apr
4	3	1.95	925	17 Apr
5	4	1.88	929	17 Apr
6	4	1.86	952	17 Apr
7	4	2.01	952	17 Apr
8	4	1.46	936	17 Apr
9	4	1.67	948	17 Apr
Second treatment group				
10	3	2.04	941	24 Apr
11	4	1.91	930	24 Apr
12	4	1.51	946	24 Apr

1.51~2.04kg, 卵径は930~946 μm であった。

ホルモン投与から排卵までに要した時間

雌親魚の排卵状況を Table 2 に示した。ホルモン投与により、供試したすべての個体に排卵を誘発することができた。第1回処理群で排卵した個体が出現したのは、ホルモン投与92時間後の4月21日午前9時の腹部触診で確認した3尾 (No. 3, 5, 7) であった。これら3尾について、腹部触診は、前日の午後5時から行っていないことから、得られた卵は、排卵後0~16時間経過していたと考えられた。

一方、第2回処理群で排卵した個体が出現したのは、ホルモン投与76時間後の4月27日午後5時の腹部触診で確認したNo.10であった。この個体は、午後1時の腹部

触診では排卵が確認されなかったことから、得られた卵は、排卵後0~4時間経過していたと考えられた。

ホルモン投与から排卵までに要した時間と排卵尾数を Fig. 1 に示した。排卵までに要した時間は、第1回処理群では76~140時間、第2回処理群では72~84時間であったと考えられた。また、排卵尾数は、第1回処理群ではホルモン投与76~92時間後、92~96時間後に各3尾、112~116時間後、116~120時間後、136~140時間後に各1尾、第2回処理群ではホルモン投与72~76時間後、76~80時間後、80~84時間後に各1尾であった。これらの結果をまとめると、排卵は、第1回処理群では供試魚9尾中6尾がホルモン投与76~96時間後の20時間内に確認され、この内、排卵後4時間以内に採卵した3尾

Table 2. Results of hormone injection on induction of ovarian maturation and ovulation in cultured tiger puffer

Individual No.	Date of ovulation	Hours after injection	Water temp ($^{\circ}\text{C}$)	weight of eggs obtained (g)	Fertilization rate (%)
First treatment group					
1	22 Apr	116-120	16.3-17.8	300	74.1
2	21 Apr	92-96	16.3-17.8	300	66.1
3	21 Apr	76-92	16.3-17.8	230	12.5
4*	23 Apr	136-140	16.3-18.0	—	—
5	21 Apr	76-92	16.3-17.9	440	95.7
6	21 Apr	92-96	16.3-17.7	370	95.6
7	21 Apr	76-92	16.3-17.8	350	93.4
8	21 Apr	92-96	16.3-17.6	280	94.1
9	22 Apr	112-116	16.3-17.8	335	70.6
Second treatment group					
10	27 Apr	72-76	18.1-18.7	245	94.7
11	27 Apr	80-84	18.1-18.4	300	93.5
12	28 Apr	76-80	18.1-18.8	175	98.8

* Natural spawning in the tank.

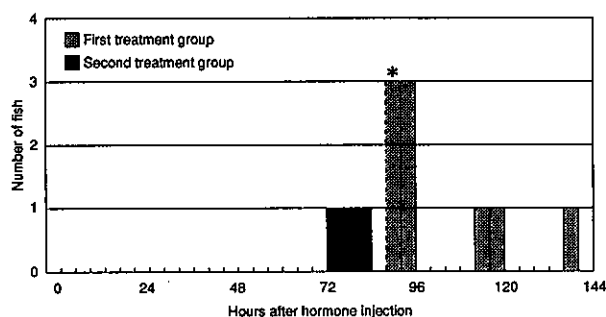


Fig. 1. Occurrences of ovulation in cultured tiger puffer after injection of HCG combined with SP

* These 3 individuals were considered to ovulate from 76 to 92 hours after injection.

は、投与92~96時間後の4時間以内に集中して確認されたことになった。また、第2回処理群ではホルモン投与72~84時間後の12時間以内に確認されたことになった。採卵量と受精率

雌親魚の採卵結果を表2に示した。No.4は、ホルモン処理136~140時間後に水槽底に放卵していたため採卵できなかった。1尾当たりの採卵量は、175~440gで平均302gであった。また、親魚の年令別の採卵量は、3才魚では230~300gで平均269g、4才魚では175~440gで平均321gであった。

受精率は、排卵から4時間以内に採卵できた8尾では

66.1~98.8%で平均85.9%であった。一方、排卵の時間が把握できず、排卵後0~16時間経過していたと考えられた3尾(No 3, 5, 7)では12.5, 95.7, 93.4%であった。

考 察

今回の試験では、ホルモン投与から排卵までに要した時間は、第1回処理群では76~140時間、第2回処理群では72~84時間であったと考えられた。一方、当研究所でこれまで行ってきたホルモン処理による人工採卵での排卵までに要した日数は、2~19日^{7,9)}であり、個体により大きく異なった。このことから、卵黄形成が完了したと考えられる個体を卵径により選別してホルモン投与を行うことにより、排卵誘発が順調に行われ、排卵までの時間が同調したと考えられた。

しかし、排卵が集中した時間は、第1回処理群ではホルモン投与92~96時間後、第2回処理群ではホルモン投与72~84時間後であった。また、前報⁹⁾の報告では排卵は、ホルモン投与6日後に集中した。本報と前報では、同じ方法でホルモン投与を行ったにもかかわらず、排卵が集中した時間はそれぞれ異なった。ホルモン処理時の卵細胞の卵径は、第1回処理群では925~983 μm 、第2回処理群では930~946 μm で、前報で排卵がホルモン投与6日後に集中した処理群では930~1,051 μm で、卵径に違いは見られず卵巣の成熟状態に差はなかったと考えられた。また、ホルモン投与時の体重は、第1回処理群では1.46~2.01kg、第2回処理群では1.51~2.04kg、前報で報告した処理群では1.49~2.34kgでほぼ同じであった。さらに、ホルモン投与までの養成法についても違いはないと考えられた。一方、ホルモン投与から排卵までの水温については、第1回処理群では16.3~18.0 $^{\circ}\text{C}$ 、第2回処理群では18.1~18.8 $^{\circ}\text{C}$ の範囲で変動した。また、前報で報告した処理群では16 $^{\circ}\text{C}$ であった。これらのことから、排卵までに要する時間は、水温が高いほど短くなる傾向があると考えられた。

ホルモン投与から排卵までの時間を精度良く予測できればさらに効率的な採卵作業が可能となるので、今後はホルモン投与後の飼育水温と排卵までに要する時間の関係を明らかにする必要がある。

受精率は、排卵後4時間以内に採卵、受精させた個体では66.1~98.8%で平均85.9%であった。当研究所でこれまでに養成親魚から得られた卵の受精率は0~92.7%^{7,9)}で平均48.1%であったことから、排卵の有無を4時間毎に調べ、採卵、受精させることにより、受精率は著しく向上し、安定したと考えられた。一方、排卵までの時

間を把握できなかった3尾(No 3, 5, 7)の受精率は12.5, 95.7, 93.4%であった。トラフグの人工受精における受精率は、排卵から採卵、受精までの時間に伴い低下する⁹⁾ことから、とくに受精率が低かった個体は、排卵後長時間経過していたと推測された。

今回得られた卵数は、トラフグ卵1gを約1,000粒^{7,8)}として換算すると、第1回処理群では6尾の親魚から20時間の間に約1,970,000粒、第2回処理群では3尾の親魚から12時間の間に約720,000粒の受精卵を得られたことになる。また、1尾当たりの平均採卵数は、3才魚(平均体重1.84kg)では269,000粒、4才魚(平均体重1.76kg)では321,000粒であった。

放流用種苗の生産では、種苗の遺伝的多様性を確保する必要がある。また、大規模な種苗生産現場では、労力の軽減を図るため短時間内に良質な受精卵を得る必要がある。本試験で用いたホルモン処理による人工採卵法により、複数の雌親魚から、同時に良質な受精卵を得られることが示され、これらの問題を解決する手法が確立されたと考えられる。

トラフグのホルモン処理による人工採卵法について、中田ら⁵⁾はLHRH-aの投与で成熟を促進した親魚にHCGを投与して排卵を誘発させる方法を報告している。また、松山ら⁶⁾はLHRH-aの1回投与により排卵を促進させる方法を報告している。

今回の結果により、魚類の排卵誘発に一般的に広く用いられており、その投与方法がLHRH-aに比べ簡便なHCGとSPの1回投与であっても、卵径による親魚選別と排卵直後の採卵、受精を行うことにより、計画的に受精率の高い卵を採卵できることが示された。

要 約

種苗生産魚から養成した雌親魚を用い、卵細胞の卵径が930 μm 程度に達した個体を選別してホルモン処理を行い、排卵直後の人工採卵を試みた。ホルモンは、HCG(500 IU/kg)とSP(10 mg/kg)を混合投与し、排卵の有無は、4時間毎の腹部触診により調べた。その結果、試験に用いた親魚12尾全てに排卵を誘発でき、その内、11尾より採卵できた。排卵は、ホルモン投与72~96時間後に集中して確認された。排卵後4時間以内に採卵、受精させた8尾の受精率は、66.1~98.8%であった。これらのことから、HCGとSPの1回投与であっても計画的に受精率の高い卵を採卵することが可能であると示された。

謝 辞

九州大学農学部松山倫也助教授には、本研究の実施にあたり御指導をいただいた。また、本稿の執筆にあたり貴重な御助言をいただいた。ここに深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 宮木廉夫・立原一憲・蛭子亮制・塚島康生・村松靖浩・藤田矢郎・林田豪介・多部田修(1992)ホルモン処理によるトラフグ天然親魚の成熟促進. 水産増殖, 40, 439-442.
- 2) 松田宗之・山内達也・上口茂則・平田八郎(1993)トラフグ, *Takifugu rubripes*の完全養殖化の試み. 水産増殖, 41, 367-371.
- 3) 韓慶男・吉松隆夫・松井誠一・吉村研治・古市政幸・北島力(1995)トラフグの親魚の由来とその卵質の比較. 水産増殖, 43, 323-329.
- 4) 鈴木康仁・竹村明洋(1996)トラフグ天然親魚における成熟促進のためのホルモン投与方法の比較. 水産増殖, 44, 85-90.
- 5) 中田久・松山倫也・池田義弘・松浦修平(1997)トラフグ養成親魚からの採卵技術の開発. 日水誌, 63, 728-733.
- 6) 松山倫也・中田久・池田義弘・田中宏之・松浦修平(1997)各種ホルモン投与方法により誘起された養成トラフグの成熟, 排卵過程. 水産増殖, 45, 67-73.
- 7) 愛知県(1997)平成7年度放流技術開発事業報告書(中回遊種トラフグ), 1-19.
- 8) 愛知県(1998)平成8年度放流技術開発事業報告書(中回遊種トラフグ), 1-25.
- 9) 岡本俊治・堀木清貴・松村貴晴・高須雄二(1999)トラフグ養成親魚からのホルモン処理による人工採卵-I. 愛知県水産試験場研究報告, 6, 31-37.
- 10) 中田久・松山倫也・原洋一・矢田武義・松浦修平(1998)トラフグの人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係. 日水誌, 64, 993-998.

