

ホルモン処理によるトラフグ養成親魚からの人工採卵 - I

岡本俊治*¹・堀木清貴*¹・松村貴晴*¹・三宅佳亮*²・高須雄二*¹

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

OKAMOTO Shunji*¹・HORIKI Kiyotaka*¹・MATSUMURA Takaharu*¹
・MIYAKE Yosiaki*²・TAKASU Yuuji*¹

Abstract

In order to supply the fertilized eggs for planned seed production, we have developed an effective method for the induction of ovarian maturation and ovulation in the cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* by hormone treatments. In 1997, three to five years old hatchery reared male and female brooders were used in the experiment. On the basis of hormone treatments, nineteen mature females (B.W. 1.5 to 2.7kg on April 1997) were divided into three groups, viz., HCG (500 IU/kg) group, SP (chum salmon pituitary extract:10mg/kg) group, and HCG+SP group. Out of nineteen females, fifteen fishes were induced for ovarian maturation and ovulation. Ovarian maturation and ovulation were observed in all examined females of the HCG and HCG+SP groups but in some of the SP group. Induction of ovarian maturation and ovulation was independent of the ages of various strata, therefore, eggs were successfully obtained from even three years old cultured tiger puffer. Ovulation occurred between 5 and 14 days following the hormone injection at 16°C water temperature. Out of fifteen females, seven fishes concentrated their ovulation between 5 and 6 days. Their ovarian eggs diameter were more than 930 μm, which were significantly larger than those of other female group. Fertilization rates were widely ranged from 0 to 92.7%, and were independent of the ages of various strata, the different hormone injections, the days required from hormone injection to ovulation, and the ovarian egg diameter. However, fertilization rate at 24 hours after just confirmation of ovulation was 17% (mean of seven females). These results suggested that the selection of female fish by ovarian egg diameter and the obtaining eggs immediately after ovulation were required to supply the good quality fertilized eggs in planned seed production.

キーワード；トラフグ、養成親魚、ホルモン処理、人工採卵

現在、トラフグ*Takifugu rubripes*の種苗生産は、全国の公的機関の他、民間においても盛んに行われている。しかし、種苗生産のもととなる受精卵については、

養殖向け種苗の需要増大や、資源減少から天然成熟親魚の入手が困難になっており、種苗生産現場からは受精卵の計画的な確保が求められている。このため、各研究機

*1 愛知県水産試験場漁業生産研究所

(Marine Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Toyohama, Minamitita, Aichi 470-3412, Japan)

*2 現所属 愛知県農業水産部水産振興室

(in present: Aichi Fisheries Promotion Division, Nagoya, Aichi 460-0001, Japan)

関においてトラフグ親魚のホルモン処理による採卵が試みられており、当愛知県水産試験場漁業生産研究所においても1991年から取り組んできた。その結果、ホルモン処理による採卵は可能となったが、良質な受精卵の安定的、計画的な確保には至っていない。そこでこの問題の解決を目的として、使用する養成親魚、ホルモンの種類や採卵法等について検討し、基礎的な知見を得たので報告する。

まず、親魚については、他研究機関において天然魚の短期養成¹³⁾や人工生産魚からの長期養成¹⁴⁾また養殖魚を1年程度養成¹⁵⁾する手法が検討されている。当研究所においても、これまでに天然魚の短期養成と人工生産魚の長期養成について検討し、その養成とホルモン処理による採卵には成功している。しかし、どの種類の親魚が有効であるかまでは検討していなかった。^{6,8)} 現在、天然親魚は資源の減少によってその確保が不安定であるため、計画的な供給が可能な人工生産魚から養成した親魚の方が、確保の点で有効と考えている。また、放流用種苗では、種苗の遺伝的多様性の点から素性の明らかな親魚を複数個体使用することが望ましく、この点からも人工生産魚から養成した親魚の採卵技術を確立する必要がある。従って、この養成親魚を使用し、年令別による成熟・排卵状況や採卵結果である受精率を調査し、採卵が可能な親魚の条件を検討した。

次に、ホルモン処理については、胎盤性性腺刺激ホルモンとシロサケ脳下垂体の混合投与が広く行われているが、近年合成生殖線刺激ホルモン放出ホルモン(LHRH-a)を使用した事例¹⁶⁾も報告されている。当研究所においても、これらのホルモンについて検討し、採卵には成功しているが、排卵誘発率が低く、また得られた卵の卵質も不安定であった。^{6,8)} 従って、この問題を解消するため、親魚への投与が簡易な胎盤性性腺刺激ホルモンとシロサケ脳下垂体を使用し、それぞれの成熟・排卵状況及びその受精率を調査し、その原因を検討した。

また、採卵法については、トラフグではホルモン投与から排卵までに数日を要し、その期間も3から12日¹⁷⁾と範囲が長いので、排卵日を予測できず、計画的な採卵が行えなかった。この日数は、ホルモン投与時の親魚の成熟状態が影響していると考えられる。従って、ホルモン投与時の卵巣卵の卵径を計測し、その卵径と日数との関係を調査し、当研究所での親魚の養成条件と併せ、計画的な採卵法を検討した。

更に、人工的な採卵・受精には、排卵後の時間経過に伴う受精能力の変化についても把握しておく必要がある。従って、排卵確認5、24時間後に再度採卵、受精

を行い、その受精率の変化を調査し、受精能力の高い良質卵の採卵法についても検討した。

材料及び方法

親魚と飼育養成

親魚は、当研究所で生産した人工種苗を3～5年間飼育、養成した3～5才魚を使用した。

親魚の飼育は、屋内10m²FRP製水槽を使用し、当研究所地先海水を砂ろ過し、約7回転/日の換水率で注水して行った。魚の収容密度は、1才時が7～8尾/m²、2才時が5～6尾/m²、3才以上の親魚が3～4尾/m²とした。飼育水温の年間変動は、10～28℃であった。給餌は、市販トラフグ用配合餌料(ふくちゃん、ヒガシマル社製)を春から秋期にかけてはほぼ毎日、冬期には週2回程度の飽食給餌を行った。また、採卵前の親魚には、1996年10月から1997年4月のホルモン投与時までモイストベレット(アジ類:エビ類:配合餌料=1:1:2)を給餌し、冬期には最低水温13℃となるような加温を行った。

親魚の雌雄判別は、カニューレによる生殖巣組織採取によって行った。採卵前の3月5日にテフロン製チューブ(内径1mm)を総排泄孔から挿入、組織を採取し、判別した。雌雄判別後は、雌雄を隔離して飼育した。

雌親魚は、年令によって3才魚、4才魚、4才以上年令不明魚(経歴不明な4～5才魚、以下4才以上魚と呼ぶ)の3群を設け、それぞれ4尾、8尾、7尾の計19尾を使用した。

ホルモン処理

ホルモンは、胎盤性性腺刺激ホルモン(ゴナトロピン、帝國臓器製薬社製、以下HCGと呼ぶ)とシロサケ脳下垂体(以下SPと呼ぶ)を使用した。HCGは1,000IU/ml、SPは磨砕し1mg/mlになるようにそれぞれ0.6%NaClで溶解した。投与量は、HCGは500IU/体重1kg、SPは10mg/体重1kgとした。投与は、親魚の腹腔内に胸鰭基部からの注射によって行った。排卵までに要した日数を把握するため、投与後は雌親魚を水温16℃の環境下で飼育した。

ホルモンは、HCGとSPそれぞれの単独投与と両者混合投与の3区を設け、成熟・排卵状況及び採卵結果を比較した(Table 1)。

ホルモン投与は、雌親魚には4月15、22、30日に行い、排卵が誘発されない個体には最初の投与から1週間後に再投与した。また、雄親魚には4月4日に排精を促すためHCGを雌親魚と同様に投与した。

初回ホルモン投与時には、成熟状態を把握するためカ

Table 1. Results of hormone injection on induction of ovarian maturation and ovulation in cultured tiger puffer

Female fish No.	Hormones	Age of female fish	Body weight (kg)	Date of hormone injection (1997)	Date of ovulation	Days after injection †1	Weight of eggs obtained (g)	Egg diameter(μm)		Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)	Comment
								ovarian eggs	ovulated eggs			
1	HCG	3	1.49	Apr. 22	Apr. 28	6	70	930	1,175	87.5	37.2	
2		4	2.55	Apr. 15, 22	Apr. 23	8(1)	280	966	1,151	65.2	35.2	
3		4	2.04	Apr. 22	Apr. 28	6	270	1,051	1,277	68.6	*2	
4		4 or more	2.33	Apr. 22, 29	May1	9(2)	200	983	1,183	1.4	0	
5		4 or more	2.15	Apr. 30, May7	May11	11(4)	200	905	1,117	87.3	46.1	
6	SP	3	1.68	Apr. 15, 22	Apr. 28	13(6)	50	*2	1,221	0	0	
7		3	1.52	Apr. 22, 29	May6	14(7)	95	859	1,116	86.4	51.2	
8		4	2.07	Apr. 15	Apr. 20	5	200	*2	1,179	92.0	70.6	
9		4	2.04	Apr. 22, 29	—	—	—	1,003	—	—	—	Not ovulated
10		4	1.94	Apr. 30, May7	—	—	—	981	—	—	—	Not ovulated
11		4 or more	2.66	Apr. 22, 29	—	—	—	941	—	—	—	Death May7
12		4 or more	2.40	Apr. 30	—	—	—	885	—	—	—	Death May4
13	HCG	3	1.64	Apr. 15, 22	Apr. 23	8(1)	170	659	1,103	36.4	0	
14	+SP	4	2.34	Apr. 15	Apr. 21	6	310	1,000	1,163	31.2	4.1	
15		4	2.00	Apr. 22	Apr. 28	6	135	974	1,215	20.6	2.8	
16		4	1.97	Apr. 30	May6	6	305	1,015	1,273	39.2	5.0	
17		4 or more	2.31	Apr. 15	Apr. 20	5	335	981	1,222	92.7	84.5	
18		4 or more	1.94	Apr. 15, 22	Apr. 25	10(3)	55	890	1,133	52.8	10.4	
19		4 or more	2.41	Apr. 30, May7	May10	10(3)	275	912	1,212	83.3	39.7	

*1 Numerals in parentheses indicate days after second injection.

*2 Not measured.

ニューレによる卵巣卵の採取を行い、その卵径を約30個計測した。

排卵確認と採卵

排卵の確認は、ホルモン投与翌日から午前9時と午後4時の1日2回、親魚の腹部を軽く圧迫し、放卵の有無によって行った。

排卵が確認された個体は、直ちに搾出法によって採卵した。卵は、採卵した雌親魚と異なる年令群の複数の雄親魚から採精し、精子の運動性を顕微鏡下で確認後、乾導法によって受精させた。また、採卵重量及び未受精卵の卵径を30個計測した。

受精の有無は、受精約4時間後の卵割の有無から判断した。受精率は、約100粒の卵を計測し、卵割した卵の割合から算出した。受精卵は、数回の洗卵の後、約1,000粒を水量4ℓのふ化器に収容した。20℃の恒温室内で、ふ化までに数回の換水を行い、エアレーションによる回転流中でふ化させ、その割合からふ化率を算出した。

排卵確認後の時間経過に伴う受精率の変化

Table 1の雌親魚No.1, 2, 3, 5, 7, 13, 14, 17の8個体について調査した。排卵確認時に親魚から一部を採卵、受精させ、その後No.14は5時間後、No.2, 13は5及び24時間後、No.1, 3, 5, 7, 17は24時間後に再度親魚から採卵、受精させ、受精率を算出した。

結 果

全体の採卵結果

試験した19尾の雌親魚の採卵結果をTable 1に示した。ホルモン投与時の魚体重は1.49~2.66kgであった。ホルモンを投与した結果、15尾に排卵が誘発され、2尾が排卵せず、また残り2尾は試験期間中に死亡した。ホルモン投与後の排卵までに要した日数は5~14日であり、採卵量は50~335gであった。この採卵量は、腹腔内に排卵された卵の一部しか採卵しなかった個体もあるため、その重量が採卵量より少なくなっている場合がある。卵径については、ホルモン投与時の卵巣卵は859~1,051 μm、排卵時の未受精卵は1,103~1,277 μmであった。受精率は0~92.7%、ふ化率は0~84.5%であった。ふ化率が受精率に比べ低くなっているのは、ふ化器への収容密度が高かったことなど人為的な原因があると考えられたため、以後の卵質に関する検討は受精率によって行った。

親魚の年令別排卵状況と受精率

3才魚群では、4尾中4尾が排卵し、その受精率は0~87.5%であった(Fig. 1)。4才魚群では、8尾中6尾が排卵し、その受精率は20.6~92.0%であった。4才以上魚群では、7尾中5尾が排卵し、その受精率は1.4~92.7%であった。このように、親魚の年令群と排卵状況や受精率との間に明らかな関係は見られなかった。

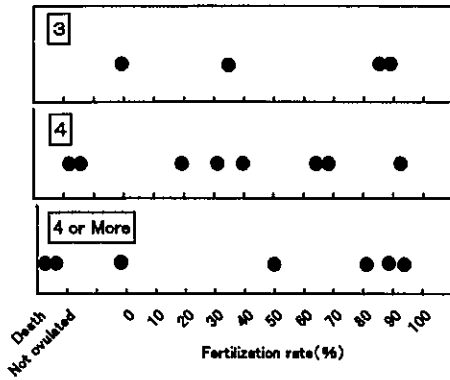


Fig. 1. Induction of ovulation and fertilization rate in experimental groups by ages of various strata of female fishes, in 3 years old (upper), 4 (middle) and 4 or more (lower). ● show individual.

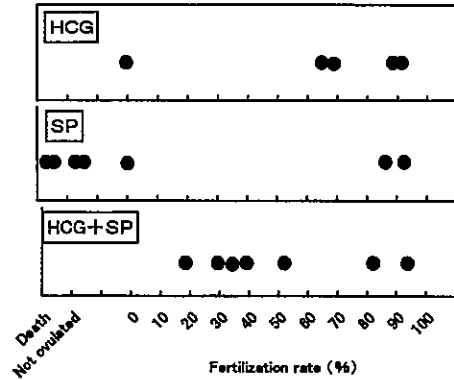


Fig. 3. Induction of ovulation and fertilization rate in experimental groups by hormone injection, in HCG (upper), SP (middle) and HCG + SP (lower). ● show individual.

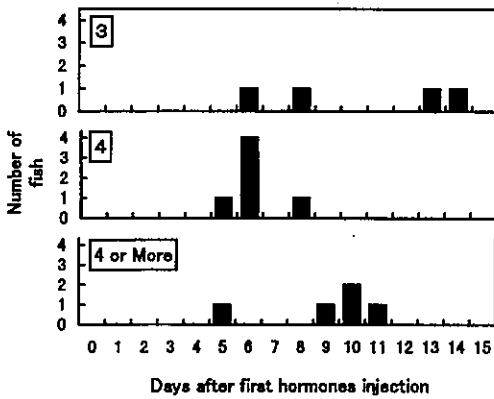


Fig. 2. Occurrences of ovulation in experimental groups by ages of various strata of female fish, in 3 years old (upper), 4 (middle) and 4 or more (lower).

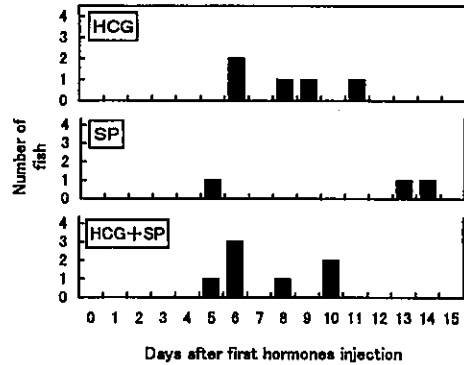


Fig. 4. Occurrences of ovulation in experimental groups by hormone injection, in HCG (upper), SP (middle) and HCG + SP (lower).

また、年齢群別の排卵までに要した日数をFig. 2に示した。3才魚では6~14日、4才魚では5~8日、4才以上魚では5~11日であった。4才魚群で6日目に集中した傾向が見られたが、年齢群と日数との間に明らかな関係は見られなかった。

ホルモンの投与方法別排卵状況と受精率

HCG単独区では、5尾中5尾が排卵し、その受精率は1.4~87.5%であった (Fig. 3)。SP単独区では、7尾中3尾が排卵し、その受精率は0~92.0%であった。混合区では、7尾中7尾が排卵し、その受精率は20.6~92.7%であった。使用したホルモンと受精率との間に明らかな関係は見られなかった。しかし、SP単独区でのみ排卵しなかった個体が2尾、期間中に死亡した個体が2尾あった。

また、ホルモンの投与方法別の排卵までに要した日数をFig. 4に示した。HCG単独区では6~11日、SP単独区では5~14日、混合区では5~10日であり、使用したホル

モンと日数との間に明らかな関係は見られなかった。ホルモン投与後排卵までに要した日数

試験したすべての個体について、ホルモン投与後排卵までに要した日数をFig. 5に、また日数とその受精率をFig. 6に示した。排卵は、投与後5~14日目に誘起されたが、排卵した15尾中5尾が6日目に集中した。しかし、日数と受精率との間に明らかな関係は見られなかった。

また、2回目のホルモン投与と排卵に要した日数や受精率との間に明らかな関係は見られなかった。

一方、排卵までに要した日数とホルモン投与時の卵径をFig. 7に示した。1回のホルモン投与によって、5、6日後に排卵した6尾の投与時の卵径は930~1,051 (平均997.8±47.1) μm、それ以降に2回目のホルモン投与を伴い排卵した7尾の卵径は659~983 (平均882±107.2) μmであり、この両者の平均値に有意差 (P<0.05) が認められた。

受精率と卵径

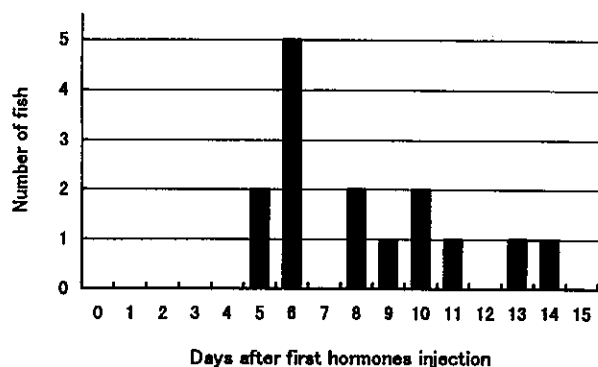


Fig. 5. Occurrences of ovulation after first hormone injection in all experimental female fishes.

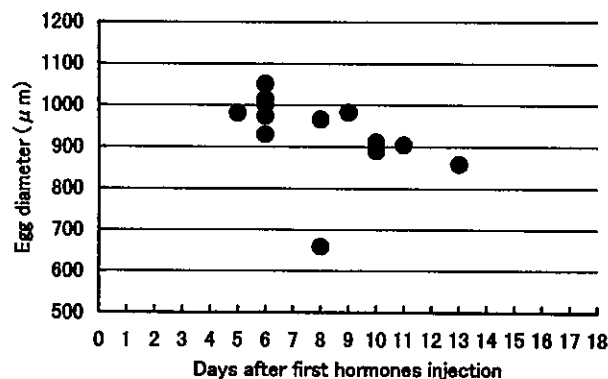


Fig. 7. Relationship between days required from first hormone injection to ovulation and ovarian egg diameter at first hormone injection.

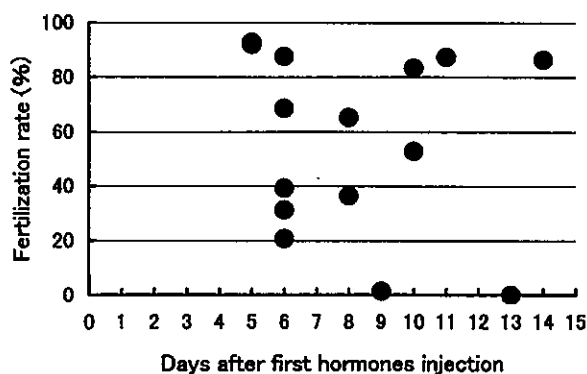


Fig. 6. Relationship between days required from first hormone injection to ovulation and fertilization rate.

ホルモン投与時の卵径とその受精率をFig. 8に、排卵時の未受精卵の卵径とその受精率をFig. 9に示した。両者とも受精率との間に明らかな関係は見られなかった。

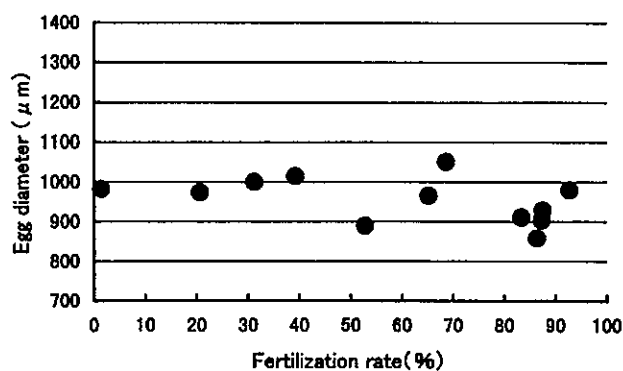


Fig. 8. Relationship between fertilization rate and ovarian egg diameter at first hormone injection.

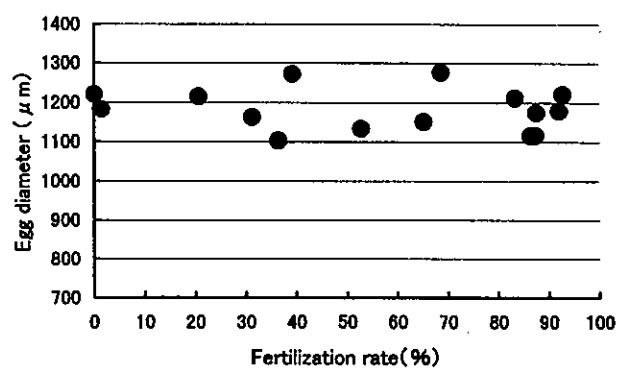


Fig. 9. Relationship between fertilization rate and ovulated egg diameter.

排卵確認後の時間経過に伴う受精能力の変化

排卵確認後の時間経過に伴う受精率の変化をTable 2に示した。排卵確認時の受精率は31.2~87.5%、5時間後は17.2~61.5%、24時間後は2.9~25.9%であった。また、排卵確認時の受精率に対するそれぞれの経過時間後の受精率の割合は、5時間後の採卵では55.1~94.3(平均73.2)%, 24時間後の採卵では3.3~39.7(平均17.0)%であった。

考 察

今回、種苗生産魚から養成したトラフグ親魚を使用し、HCGとSPのホルモン投与による人工採卵法を検討した。

養成した親魚へのホルモン投与によって、19尾中15尾に排卵を誘起させることができた。また、HCGを投与した試験区では、すべての親魚に成熟・排卵を誘起させることができた。この排卵を誘起させた割合は、これ

Table 2. Changes in fertilization rates with post-ovulation time

Female fish No.	Confirmation of ovulation (%)	5 hours after (%)	24 hours after (%)
1 4	31.2	17.2(55.1)	—
2	65.2	61.5(94.3)	25.9(39.7)
1 3	36.4	25.6(70.3)	3.3(9.1)
1	87.5	—	2.9(3.3)
5	87.3	—	5.4(6.2)
7	86.4	—	23.7(27.4)
1 7	83.3	—	20.6(24.7)
3	68.6	—	6.1(8.9)

* Numerals in parentheses indicate proportion of fertilization rate to that at confirmation of ovulation.

までに報告されたトラフグの各種ホルモン投与による採卵事例¹⁻¹⁰⁾ (以下他事例と呼ぶ)と比較して同等若しくは高かった。このことから、当研究所における種苗生産魚からの飼育、養成によって、採卵が可能で親魚を確保することができたと考えられた。

養成親魚の年齢については、3才魚の4尾すべてに採卵を誘起させることができ、採卵までに要した日数やその受精率が他の年齢群と変わらなかった。このことから、3才魚が親魚として使用可能であることを明らかにできた。

放流用種苗の生産には、生産した種苗の遺伝的多様性を考慮するため、できるだけ多くの親魚を確保、使用する必要がある。この点で若令魚を親魚に使用することができれば、飼育・養成の労力が軽減されることになり、種苗生産現場においてその意義は大きい。

また、今回は採卵した卵をすべて採卵しなかったため、1尾当たりの採卵可能数を検討できなかった。しかし、計画的な種苗生産には、1尾当たりの採卵可能数の把握は重要であり、3才魚での採卵可能数の調査を今後行っていく必要がある。

使用したホルモンについては、HCG単独、あるいはSPとの混合投与ですべての個体に採卵を誘起できた。この割合は他事例と比較して高く、採卵の誘起に効果的だったことが示された。一方、SP単独投与は7尾中3尾と誘起できた個体の割合が低く、効果的でなかった。SPについては採卵誘起効果を疑う報告⁵⁾もあり、これを裏付ける結果となった。

ホルモン投与後採卵までに要した日数については、親魚の年齢及び使用したホルモンの種類との間に明らかな関係が見られなかったため、試験したすべての個体につ

いて検討した。採卵は、投与後5～14日目と広範囲にわたったが、5、6日目の始めの2日間に7尾が集中した。採卵までに要する日数は、親魚の成熟状態に起因すると考えられるので、それらは1回のホルモン投与によって採卵が順調に誘起されたと推察された。松山ら⁹⁾は各種ホルモン投与時の成熟過程における卵径変化を調査し、ホルモン投与時の卵径把握が成熟の同調に重要であると報告している。このことから、1回のホルモン投与によって5、6日目に採卵した親魚群と、それ以後に2回目のホルモン投与によって採卵した親魚群について、投与時の卵径を比較した結果、両者に有意差($P < 0.05$)が認められた。従って、卵巣卵の卵径による親魚の選別によって、1回のホルモン投与により採卵を集中させることが可能であると考えられた。

養成トラフグにおけるホルモン投与時の卵径については、中田ら⁵⁾はLHRH-aとHCG・SPの投与による投与時卵径と採卵状況について報告している。しかし、今回のHCGとSPの投与における投与時の卵径と採卵率や要する日数との関係については知見が少なく、更に検討していく必要がある。

また、今回採卵が集中した5、6日目の日数についても、これまでに報告されている3～5日目^{1,3)}と若干の差があるため、親魚の卵径との関係や養成条件設定を含め、その原因について検討する必要がある。

得られた卵の受精率については、前述してきた親魚の年齢、使用したホルモン、採卵までに要した日数及びホルモン投与時の卵径との間に明らかな関係が見られなかった。また、採卵された未受精卵の卵径とも関係が見られなかった。最近、中田ら¹⁰⁾はLHRH-aを使用した養成トラフグの採卵において、採卵後の時間経過に伴う受精能力の変化について詳細に調査し、得られた卵の受精率は採卵までの経過時間に支配されることを示し、採卵後4時間以内の採卵によって平均70.5%以上の受精率をあげている。本研究においても、採卵確認24時間後には確認時受精率の平均17.0%しか有していなかったことから、採卵から採卵までの時間が受精率に大きく影響を与えていることが示された。今後、HCGとSPの1回投与による採卵においても同様な結果が得られるか、詳細な検討が必要である。

以上、本研究によってトラフグの人工採卵において、使用する親魚の種類、使用するホルモン、採卵法についての基礎的な知見が得られた。そして、計画的な採卵のための残された問題として、採卵日の予測と同調及び良質卵の確保が上げられた。採卵日の予測と同調には卵巣卵の卵径による親魚選別が有効で、また良質卵の確保に

は排卵直後の採卵が有効であると考えられた。従って、今後、これらの条件を更に詳細に検討することによって、トラフグ養成親魚からの安定的かつ計画的な人工採卵法が確立できると考えられた。

要 約

1997年にホルモン処理によるトラフグからの採卵を試みた。親魚は種苗生産魚から養成した3～5才魚を用い、HCG (500IU/kg) とSP (10mg/kg) の単独及び混合投与を行った結果、19尾中15尾で排卵を誘発できた。3才魚からの採卵が可能で、HCG単独とHCG・SPの混合投与が効果的であった。排卵はホルモン投与後5～6日目に多く認められ(15尾中7尾)、それらの投与時の卵巣卵の卵径は930 μ m以上であった。得られた卵の受精率は0～92.7%と大きく変動したが、親魚の年齢やホルモン投与方法、卵径とは無関係であった。また、排卵確認24時間後の受精率は、確認時の17.0%に低下した。従って、計画的な採卵には、卵径による親魚選別と排卵直後の採卵の必要性が示された。

謝 辞

本稿の執筆に当たり、貴重なご助言をいただいた九州大学農学部松山倫也助教授に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 宮木廉夫・立原一憲・蛭子亮制・塚島康生・松村靖治・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(4), 439-442.
- 2) 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(3), 323-329.
- 3) 鈴木康仁・竹村昭洋(1995)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(1), 85-90.
- 4) 松田宗之・山内達也・上口茂則・平田八郎(1993)トラフグ, *Takihugu rubripes*の完全養殖化の試み. 水産増殖, 41(3), 367-371.
- 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法の開発. 日水誌, 63(5), 728-733.
- 6) 長尾成人・山田智・菅沼光則(1993)短期養成したトラフグ親魚からの採卵. 愛知水試研報, 1, 55-58.
- 7) 長尾成人・大沢博(1994)LH-RHアナログを使用したトラフグ養成親魚からの採卵. 栽培技研, 23(1),

31-35.

- 8) 愛知県(1997)平成8年度放流技術開発事業報告書(中回遊種トラフグ), 4-6.
- 9) 松山倫也・中田久・池田義弘・田中宏之・松浦修平(1996)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(1), 67-73.
- 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(6), 993-998.

