

天然ホシガレイからの採卵 —HCG処理の効果—

山田 敏之, 宮木 廉夫, 荒川 敏久*¹

Induction of Ovulation in Wild Spotted Halibut *Verasper variegatus* — effect of HCG Treatment —

Toshiyuki Yamada, Kadoo Miyaki, and Toshihisa Arakawa*¹

In order to obtain sufficient fertilized eggs for seed production, we examined the effect of human chorionic gonadotropin (HCG) treatment on the induction of ovulation in wild spotted halibut (*Verasper variegatus*). The spotted halibut used in this study were caught in Tachibana Bay during the spawning season and half of the females were injected with 500IU/kg of HCG. The hormonal treatment and non-treatment groups were checked for ovulation at 24-hour intervals until 144 hours after treatment. In the treatment group, the number of eggs obtained increased after 72 hours, reached a maximum after 96 hours, and remained high until the end of the experiment. By contrast in the non-treatment group, the number of eggs obtained was highest initially and subsequently decreased gradually. The treatment group produced 7.8~25.6 times as many as the non-treatment group. These results suggest that the effect of HCG treatment on induction of ovulation in wild spotted halibut appears after 72 to 144 hours.

ホシガレイ *Verasper variegatus* はカレイ科マツカワ属の一種で、本邦では北海道以南の沿岸域に広く分布し、各地で刺網、底引網などにより漁獲されている。しかし、その漁獲量はきわめて少なく、高級魚として高値で取引されている。長崎県でも、橘湾および有明海沿岸域で12月下旬から翌年の5月にかけて、年間2トン程度が漁獲されているにすぎない¹⁾。

本種は本県沿岸域では8~10月以外のほぼ周年に渡って橘湾および有明海に出現する定着性の強い魚種と考えられる¹⁾ことから、本県に適した新たな栽培漁業対象種として期待されている。

現在、ホシガレイの種苗生産については、宮城県、

福島県、茨城県、神奈川県、愛媛県、長崎県および(社)日本栽培漁業協会の宮古、伯方島の両事業場等が取り組んでおり*²、いくつかの機関では数万尾の種苗が生産可能となっている。しかし、種苗生産の出発点となる採卵について排卵誘導技術が確立されておらず、大量の受精卵を安定的に得ることが困難な状況にある。

長崎県総合水産試験場(長崎水試)は、1997年からホシガレイ種苗生産技術開発に取り組んでいる。12月下旬~2月の産卵期に橘湾で成熟した個体がまとまって漁獲される²⁾³⁾ことから、これらの中から卵巣腔内に排卵卵を有する個体を選んで親魚として

*¹長崎県水産部栽培漁業課

*²ホシガレイ栽培漁業技術開発推進検討会報告書(平成14年8月) 日本栽培漁業協会

用いている。しかし、漁獲時に卵巣腔内に排卵卵を有する個体の割合は低く、得られた卵の浮上卵率および受精率も低いため、排卵を人為的に誘導する技術開発が課題となっている。そこで本研究では、親魚の排卵誘導技術を開発する目的で産卵期に漁獲された天然魚を用いてヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモンの投与効果を検討したのでその結果を報告する。

試料および方法

実験には、2001年1月5～9日に、長崎県橘湾で底刺網によって漁獲され、南高来郡南串山町の橘湾東部漁業協同組合南串山支所（以下、漁協とする）に水揚げされた天然魚（以下、親魚）を用いた。漁協に水揚げされた親魚は、2トン活魚車で約2時間かけて長崎市にある長崎水試に搬送した。搬入後、雌親魚全個体に対して個体識別のためのピットタグ^{*3}を皮下に埋め込み、全長と体重を測定した。また、この際、腹部の触診により排卵の有無を確認し、排卵が認められた個体については卵を搾出し卵巣腔内に貯留した排卵卵を取り除いた。このように、実験開始時の卵巣には排卵卵が存在しない状態とした。その後、カニューレシオンチューブにより卵巣内卵母細胞を採取し、その発達状態を調べた。このときに搾出した排卵卵は乾導法により人工授精を行った。以上の処理の後、親魚を無作為に試験区と対照区に分け、試験区にはヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン（HCG、帝国臓器製薬（株））を投与した。投与量は、魚体重1kg当り500IUとし、0.9%NaCl溶液に溶解し背筋部に注射した。

ホルモン投与後、全供試魚を水温14℃に設定した50kl楕円形水槽に収容し、ホルモン投与から24時間間隔で144時間後まで、供試魚すべての腹部を触診し

排卵の有無を確認した。排卵が確認された個体については卵を搾出し、個体別に乾導法により人工授精を行った。人工授精にあたっては、精子の質の違いが受精率に影響を及ぼすことを防ぐため、雄5～6個体から得られた精子を混合し媒精した。供試した雄は、雌と同じ時期に橘湾で漁獲された個体で、長崎水試搬入後、雌と同じ50kl楕円形水槽に収容していたものである。

人工授精を行った卵は、雌個体別に30lポリカーボネイト水槽に収容し浮上卵と沈下卵に分け、それぞれの重量を測定した。卵重量から卵数への換算は、これまでの種苗生産実験で得られた受精卵1gあたりの実測値（平均値）400粒（未発表）で算出した。排卵数を示す採卵数は浮上卵数と沈下卵数の和で、浮上卵率は浮上卵数を採卵数で除して求めた。受精率は、浮上卵約100粒に対する受精4時間後の発生卵の率とした。また、ホルモン投与後の経過時間ごとに供試魚に対する排卵個体の割合を求めた。これまで、ホシガレイの採卵では排卵卵が得られても、得られた卵のすべてが沈下する場合も多く認められるので、浮上卵を得ることができた個体の割合も求めた。これらは、それぞれ供試魚数に対する排卵個体数の率および浮上卵を得ることができた個体数の率とした。

実験開始時にカニューレシオンチューブにより採取した卵母細胞は、Bouin氏液で固定後、70%エタノール中で保存し、後日、山口他⁴⁾に従って、卵径200μm以上の卵を対象に卵径の測定を行った。測定卵数は1個体当たり150個とした。一部個体の卵巣卵についてはメタクリレート樹脂（Technovit, Kulzer）で包埋後2～3μmの組織切片を作製し1%トルイジンブルーで染色を施し光学顕微鏡下で成熟状況を観察した。

供試魚の全長、体重、試験開始時の卵巣卵径およ

*³BIOMARK INC.

び採卵数，浮上卵率，受精率の検定には，マンホイットニーのU検定を，排卵個体の割合および浮上卵を得ることができた個体の割合の検定にはフィッシャーの直接確率法を用いた。

結 果

供試魚のサイズおよび成熟状況 試験開始時に測定した供試魚の全長，体重，卵母細胞の卵径の平均値と，卵母細胞の発達段階を Table 1 に示す。全長および体重の平均値は，試験区が43.3cm，1,126g，対照区が，43.3cm，1,113gと両者に有意差は認められなかった。試験開始時の卵母細胞の卵径組成を Fig. 1 に，卵母細胞の組織像を Fig. 2 に示す。卵径組成のモードは800~900 μ mと試験区と対照区で一致した。平均卵径は，試験区が805 μ m，対照区が813 μ mであり両者に有意差は認められなかった。一方卵母細胞の組織像は，両区ともに，卵黄形成後期 (Fig. 2-A) および核移動前期 (Fig. 2-B) の卵が卓越しており，一部に成熟期 (Fig. 2-C) も認められた。以上のことから，試験開始時において試験区と対照区の間には，魚体サイズおよび卵母細胞の成熟段階には差は認められなかった。

排卵個体の割合 供試魚に対する排卵個体の割合の推移を Fig. 3 に示す。まず試験開始時の割合は，試験区が34.3%，対照区が23.9%であった。その後，

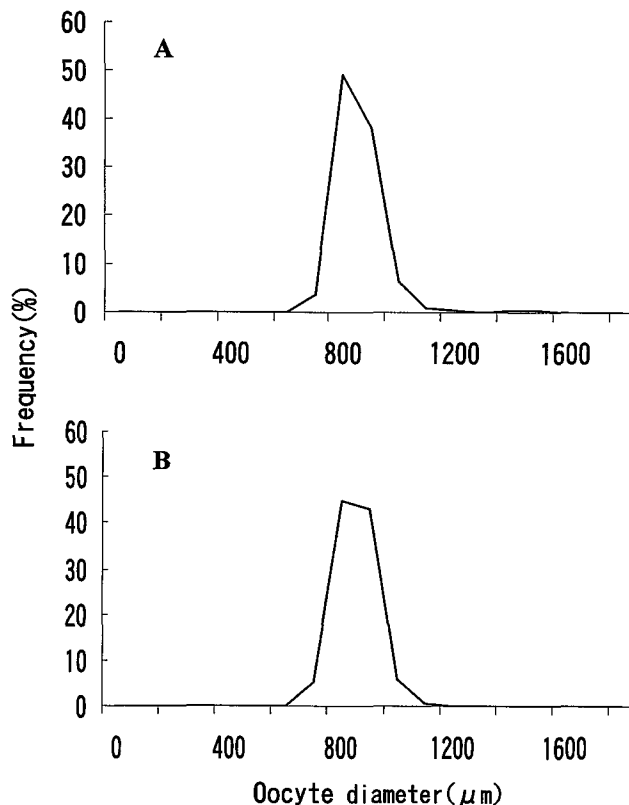


Fig. 1. Size-frequency distributions of oocyte diameter in spotted halibut ovaries just prior to hormonal treatment.

A : control, B : HCG injection.

Table 1. Summary of total length, body weight, oocyte diameter, developmental stage of oocyte

Experimental group	Sex	Number of fish	Total length (mean \pm SD) (cm)	Body weight (mean \pm SD) (g)	Oocyte diameter*1 (mean \pm SD) (μ m)	Developmental stage of oocyte*2
HCG*3 (500IU/kg) Injection	Female	35	43.3 \pm 4.3	1,126 \pm 353	805 \pm 81	LY*4, EGM*5, MS*6
Control	Female	46	43.3 \pm 2.9	1,113 \pm 225	813 \pm 98	LY, EGM, MS

*1 Diameter of oocytes in the ovary just prior to hormonal treatment. Mean \pm SE(n=150/fish)

*2 Developmental stage of oocytes just prior to hormonal treatment.

*3 human chorionic gonadotropin

*4 LY:late yolk stage

*5 EGM:early migratory nucleus stage

*6 MS:maturation stage

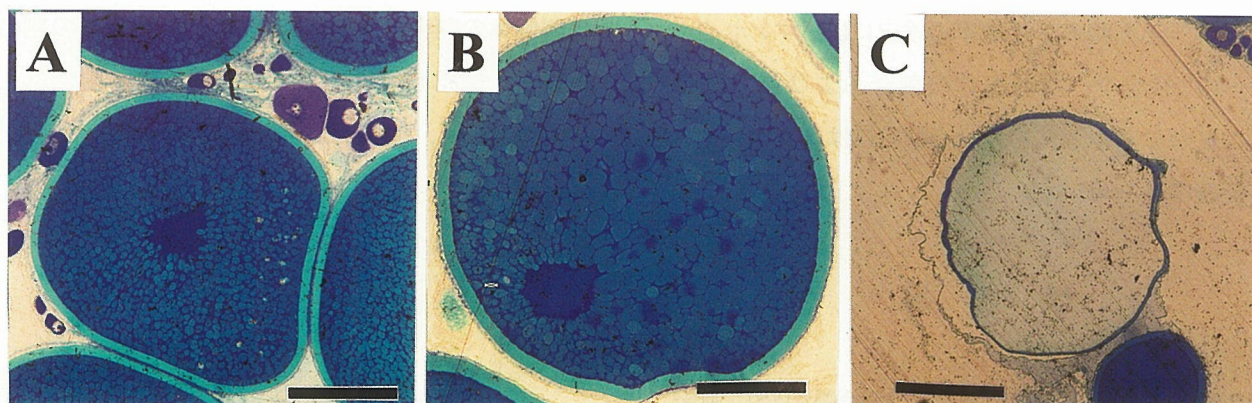


Fig. 2. Photomicrographs of histological section of spotted halibut oocytes just prior to hormonal treatment. A, late yolk stage. Scale bar=200 μ m ;B, early migratory nucleus stage. Bar=200 μ m; C, maturation stage. Bar=500 μ m

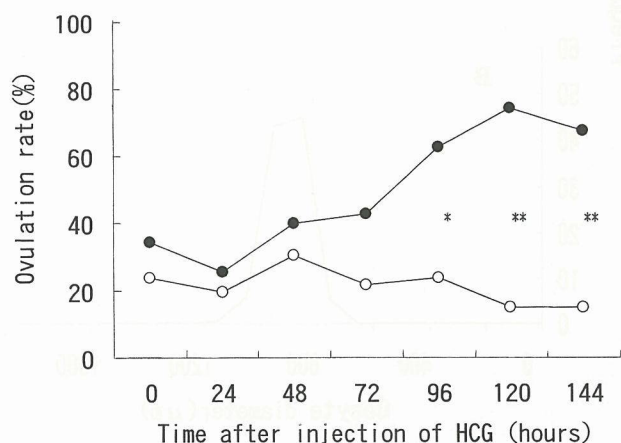


Fig. 3. Changes in ovulation rate after injection of HCG.

○ : control, ● : HCG injection.

Significant at * $P < 0.01$, ** $P < 0.0001$.

試験区では、時間の経過とともにその割合が増加し、120時間後に74.3%と最大値を、実験終了時の144時間後も67.6%と高い値を示した。一方、対照区は48時間後に30.4%となりやや増加するが、その後減少傾向を示し144時間後には15.2%となった。試験開始時から24時間毎に両区の割合を比較すると96時間後以降に有意差が認められるようになった(96時間： $P < 0.01$, 120, 144時間： $P < 0.0001$)。

次に浮上卵を得ることができた個体の割合の推移を Fig. 4 に示す。試験開始時には、試験区は34.3%、対照区は19.6%であった。試験区では、時間の経過とともに排卵個体の割合と同様に増加傾向を示し

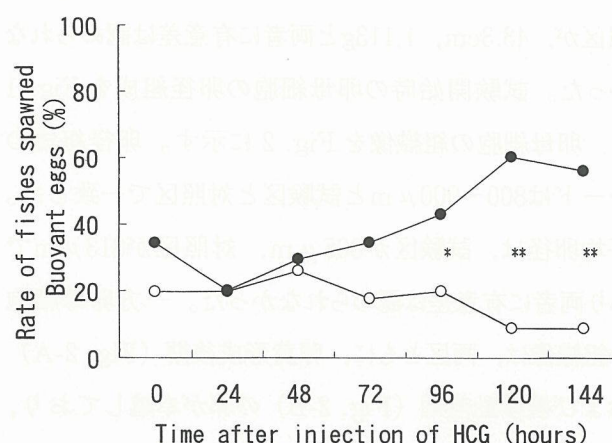


Fig. 4. Changes in rate of fish spawned buoyant eggs after injection of HCG.

○ : control, ● : HCG injection.

Significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$.

120時間後に60%と最大となり、試験終了時の144時間後も55.8%と高い値を示した。一方、対照区は、減少傾向を示し、144時間後には8.7%にまで低下した。採卵時間ごとに両者を比較すると排卵個体の割合と同様に96時間後から有意差が認められた(96時間： $P < 0.05$, 120, 144時間： $P < 0.0001$)。

採卵数 ホルモン投与後の経過時間に伴う24時間毎の個体当たり平均採卵数の変化を Fig. 5 に示す。試験区は、実験開始時に8,320粒/個体、24時間後に2,971粒/個体であったが、72時間から急激に増加し16,217粒/個体、96時間に30,571粒/個体と最大となり、その後も120時間で19,863粒/個体、144時間で10,741粒

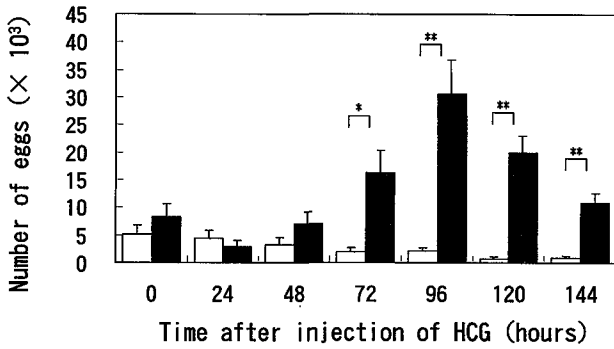


Fig. 5. Changes in number of eggs obtained after injection of HCG. (mean±SE).
□ : control, ■ : HCG injection.
Significant at * $P<0.01$, ** $P<0.0001$.

/個体と多くの卵を得ることができた。一方、対照区は、試験開始時に最も多い5,078粒/個体が得られたが、時間経過とともに採卵数は減少し、120時間後に774粒/個体、144時間後に948粒/個体であった。72～144時間後にかけて試験区の個体当たり平均採卵数は対照区の7.8～25.6倍で、試験期間を通じた総採卵数では5.1倍であった。統計的には、72時間後以降に両者の間に有意差が認められた（72時間： $P<0.01$ ，96,120及び144時間： $P<0.0001$ ）。

浮上卵率・受精率の変化 Fig. 6に浮上卵率の平均値を、Fig. 7に受精率の平均値の変化を示す。試験区の浮上卵率は、実験開始時で53%を示し、以後27～47%で推移したのに対し、対照区のそれは実験開始時で51%、以後35～63%で推移した。72時間後に

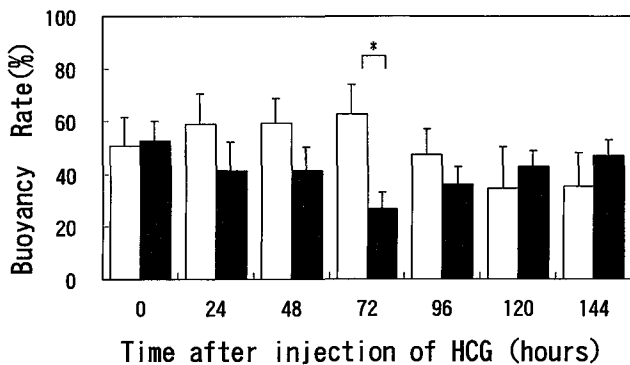


Fig. 6. Changes in buoyancy rate after injection of HCG. (mean±SE).
□ : control, ■ : HCG injection.
Significant at * $P<0.05$

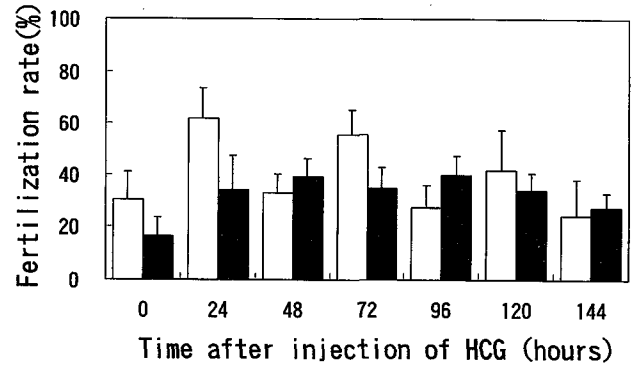


Fig. 7. Changes in fertilization rate of eggs after injection of HCG. (mean±SE).
□ : control, ■ : HCG injection.

対照区が試験区よりも有意に高い値を示したが、その他の時間では有意な差は認められなかった。

一方、受精率は、試験区が実験開始時で16%、以後27～40%で推移したのに対し、対照区は実験開始時で30%、以後24～62%で推移した。両者の受精率に実験開始時から144時間後まで有意な差は認められなかった。

考 察

本研究に使用した親魚の成熟段階は、排卵された卵を卵巣腔に有している個体が認められ、卵径200 μ m以上の大型卵群が、卵黄形成後期、核移動期および成熟期の卵で占められていたことから、山口他¹⁾の区分による「産卵期 (spawning)」にあたると思われる。

このような成熟段階の親魚に HCG を体重 1 kg 当たり 500IU 投与すると、排卵個体数は 96 時間後以降に増加が見られ 120 時間後に最大となり、採卵数は 72 時間後以降に増加し始め 96 時間で最大となった。以後実験終了時の 144 時間後まで対照区との間に有意差が認められた。このことから、ホシガレイでは、HCG を投与することにより排卵が誘導されること、また HCG による排卵の誘導までには 72 時間以上を要し、そのピークは 96 時間後から 120 時間後であることが明らかとなった。これまで、さまざまな魚種で

文 献

HCG 投与による排卵誘導が試みられ、成果をあげているが、本種においては、HCG 投与により排卵を誘導し、種苗生産に利用可能な受精卵が大量に得られたという報告はない。HCG 投与による排卵誘導を試みた例は数例あるが、正常な受精卵を得ることができておらず、HCG 投与が本種の排卵誘導に対して有効ではないとする報告もあった⁵⁻⁹⁾。しかし、これらの事例では、本研究と比較して2~10倍の高濃度投与を行っており、さらに高濃度の複数回投与も実施している。このことが両者の結果の差を生じさせる原因である可能性が高い。長崎水試も、1997年には 1)HCG 1,000IU/kg投与後24時間後に500IU/kg投与、2)HCG 1,000IU/kg投与後24時間後に1,000IU/kg投与、3)HCG1,500IU/kg 1回投与という、本研究に比較して高濃度および複数回投与の試験区を実施したが浮上卵を得ることができなかった¹⁰⁾。これらの報告と本研究の結果の比較から、投与量が過剰である場合には、正常な排卵が誘導されない可能性が示唆される。今後、HCG の適正投与量に関する検討も必要であろう。また、上述の事例ではホルモン投与時の卵母細胞の発達段階が調査されていないため、ホルモン投与のタイミングを誤っている可能性も考えられる。

今回の実験から、HCG 投与により、排卵が誘導され採卵量が増大することが明らかとなったが、浮上卵率及び受精率の向上は認められなかった。今後は、浮上卵率、受精率の向上をはかるために、上述のHCGの適正投与量の検討や合成黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRHa)の使用^{11) 12)}等のより適切なホルモン投与方法についても検討する必要がある。

謝 辞

本論文のご校閲を賜った長崎大学海洋資源教育研究センター征矢野清助教授に深く感謝する。

- 1) 村瀬慎司・森川晃：標識放流からみた有明海及び橘湾におけるホシガレイの移動，長崎県水産試験場研究報告（印刷中）。
- 2) 宮木廉夫・水田浩二・村瀬慎司，多辺田修：長崎県橘湾で産卵期に漁獲されるホシガレイについて，1998年度日本魚類学会年会講演要旨，46（1998）。
- 3) 宮木廉夫・荒川敏久・多辺田修：長崎県橘湾で産卵期に漁獲されるホシガレイ雄について，1999年度日本魚類学会年会講演要旨，9（1999）。
- 4) 山口園子・米田道夫・太田耕平・宮木廉夫・荒川敏久・松山倫也：長崎県橘湾産ホシガレイの成熟生態，九大農芸誌，55(2)，179-184（2001）。
- 5) 平成8年度福島県水産種苗研究所事業報告書：44-45（1997）。
- 6) 平成10年度福島県水産種苗研究所事業報告書：58-59（1997）。
- 7) 平成9年度神奈川県水産総合研究所業務概要：28-30（1998）。
- 8) 平成10年度神奈川県水産総合研究所業務概要：24-26（1999）。
- 9) 平成11年度神奈川県水産総合研究所業務概要：27-29（2000）。
- 10) 平成8年度長崎県水産試験場事業報告：109-111（1998）。
- 11) 松山倫也・香川浩彦・竹内宏行・柏木正章・岩井寿夫・廣瀬慶二：冬季におけるLHRH-a コレステロールペレットのマダイに対する成熟・促進効果，水産増殖，40，159-165（1992）。
- 12) 中田 久・松山倫也・池田義弘・松浦修平：トラフグ養成親魚からの採卵技法の開発，日水誌，63，728-733（1997）。