

トラフグおよびブリの親魚養成と  
採卵技術に関する研究

中 田 久

2002

## 目 次

緒 言 .....	30
第1章 トラフグの親魚養成と採卵技術の開発研究 .....	32
第1節 親魚養成および環境調節 .....	32
1-1 親魚の飼育管理と環境調節による卵黄形成促進 .....	32
1) 材料と方法 .....	33
2) 結果 .....	33
3) 考察 .....	34
第2節 雌親魚の成熟誘導 .....	35
2-1. 各種ホルモン投与方法による成熟促進と排卵誘導効果 .....	35
1) 材料と方法 .....	35
2) 結果 .....	36
3) 考察 .....	38
2-2. ホルモン投与方法の卵径が排卵時間、卵量および卵質に及ぼす影響 .....	40
1) 材料と方法 .....	41
2) 結果 .....	42
3) 考察 .....	44
2-3. LHRHa の投与量と排卵誘導効果 .....	46
1) 材料と方法 .....	46
2) 結果 .....	47
3) 考察 .....	47
2-4. 人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係 .....	48
1) 材料と方法 .....	49
2) 結果 .....	50
3) 考察 .....	51
第3節 雄親魚の成熟誘導 .....	53
3-1. ホルモン投与方法により排精された精子の運動能 .....	53
1) 材料と方法 .....	54
2) 結果 .....	55
3) 考察 .....	56
第4節 採卵マニュアルを用いた排卵誘導試験 .....	57
4-1. 採卵マニュアルの作成 .....	57
4-2. 1997年採卵試験 .....	61

1) 材料と方法 .....	61
2) 結果 .....	61
3) 考察 .....	62
第2章 ブリの親魚養成と採卵技術の開発研究 .....	63
第1節 親魚養成および環境調節 .....	63
1-1. 親魚の飼育管理と環境調節による卵黄形成促進 .....	63
1) 材料と方法 .....	63
2) 結果 .....	64
3) 考察 .....	64
第2節 雌親魚の成熟誘導 .....	65
2-1. 各種ホルモン投与方法による成熟促進と排卵誘導効果 .....	65
1) 材料と方法 .....	66
2) 結果 .....	69
3) 考察 .....	70
2-2. ホルモン投与時の卵径が排卵時間、卵量および卵質に及ぼす影響 .....	72
1) 材料と方法 .....	73
2) 結果 .....	74
3) 考察 .....	75
2-3. 人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係 .....	77
1) 材料と方法 .....	78
2) 結果 .....	80
3) 考察 .....	82
2-4. 養成2歳魚に対するHCG投与の排卵誘導効果 .....	83
1) 材料と方法 .....	84
2) 結果 .....	85
3) 考察 .....	85
第3章 トラフグおよびブリのホルモン処理採卵技術の普及指導とその成果 .....	86
謝 辞 .....	87
文 献 .....	87
要 約 .....	91
Summary .....	94

## 結 言

トラフグ *Takifugu rubripes* は、東シナ海、黄海、瀬戸内海、日本海から太平洋沿岸の各地に広く分布し、我が国ではふぐ料理の高級素材として珍重され、高価であることから延縄、一本釣り等漁業の対象として重要な漁獲対象魚種の一つとなっている。また、近年本種の養殖も盛んで、西日本各地を中心として1999年には全国で5,100トン（農林水産統計年報）の生産が行われている。漁業・養殖業生産統計年報（農林水産省統計情報部）によると、フグ類の養殖生産量は1989年には1,657トンであったものが1992年には4,000トンを越え、近年1996-1999年にかけては5,000トン以上の安定した生産量を維持している（Fig. 1）。長崎県においては、1999年の養殖生産量は1,676トンと全国1位（2位熊本県1,008トン、

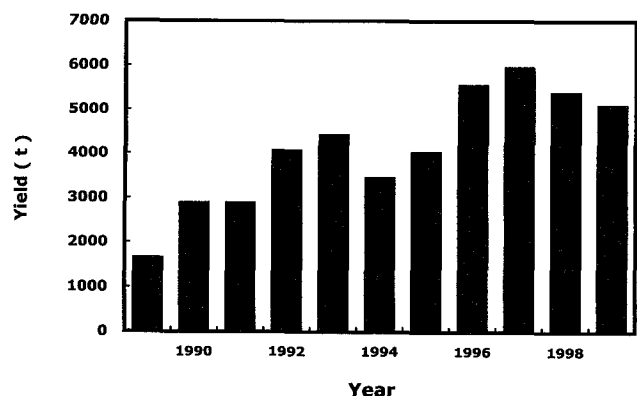


Fig. 1. Changes of the annual yield of cultured tiger puffer in Japan from 1989 to 1999.

3位愛媛県801トン）で、全体の約33%を占めている。近年では、天然魚の漁獲量の減少に伴い、養殖魚の需要がさらに高まってきており、安定した養殖技術の確立および養殖用人工種苗の安定確保が必要不可欠となってきた。

養殖技術に関しては、種苗導入から出荷可能なサイズになる時期まで、個体間の噛み合いや各種疾病

（寄生虫症、ウイルス性疾病等）によるへい死等で減耗がみられ、その生残率は他の養殖魚（マダイ、ブリ等）と比較して低い。そのため、トラフグ養殖による収益性は、歩留まり状況によって大きく左右されることから、減耗の原因となっている放養密度、餌料、歯の切除の影響、養殖生け簀の大きさ、給餌回数等の問題が検討され、トラフグ養殖法のマニュアル化が図られている（トラフグの養殖マニュアル。水産庁・全かん水・鹿児島県、1992）。

また、近年では養殖生産量の増加と共に、種苗生産の取り組みも盛んに行われ、全国栽培漁業種苗生産、入手・放流実績（水産庁、日本栽培漁業協会）によると、1985年には養殖用、放流用種苗あわせて3,285千尾であったものが1989-1998年にかけては15,000千尾程度の安定した生産量を維持し、さらに1999年で26,000千尾の人工種苗が生産されている（Fig. 2）。人工種苗の利用目的（養殖用または放流用）としては、養殖用種苗の生産量が放流用種苗の2-8倍で、養殖への供給を目的とした種苗生産が盛んに行われている。長崎県での1999年における養殖用の種苗生産量は4,937千尾と全国2位（1位熊本県5,061千尾、3位愛媛県3,400千尾）で、全体の約28%を占めている。しかし、近年、天然親魚の漁獲量の減少に伴い、種苗生産用受精卵の安定確保が困難となり、計画的な種苗生産に支障をきたしていた。

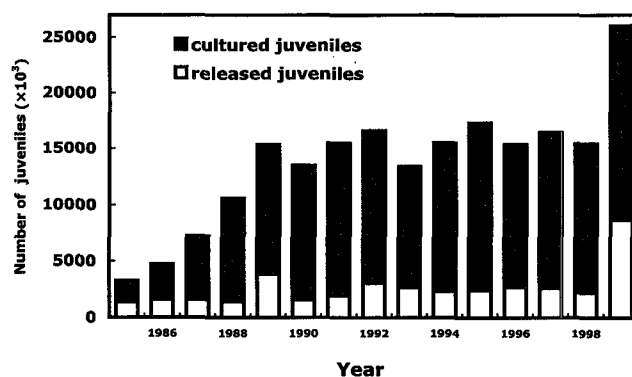


Fig. 2. Changes of the annual yield of tiger puffer juvenile produced by hatcheries in Japan from 1985 to 1999.

今後、安定した種苗生産を行うためには、天然親魚に依存しない養成親魚からのホルモン処理採卵技術の確立が必要不可欠である。

一方、ブリ *Seriola quinqueradiata* は、日本周辺を回遊している回遊魚で、漁業で約5万トンの水揚げがあり、養殖においても西日本各地で盛んに養殖され、その生産量は約14万トンに及んでいる。漁業・養殖業生産統計年報（農林水産省統計情報部）によると、ブリ類の養殖生産量は養殖対象魚の中でも常に第1位を占め、1989-1999年にかけて、いずれも14-17万トンの安定した生産量を維持している（Fig. 3）。長崎県での1999年における養殖生産量は

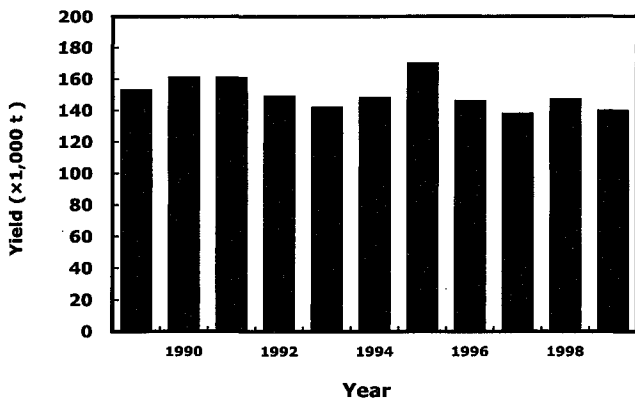


Fig. 3. Changes in the annual yield of cultured yellowtail in Japan from 1989 to 1999.

12,405トンと全国3位（1位鹿児島県44,534トン、2位愛媛県23,298トン）で、全体の約9%を占めている。しかしながら、ブリの養殖用種苗は現在においてもすべて天然種苗（モジャコ）に依存しており、このモジャコ資源は年による変動が大きく近年採捕量が減少傾向にあることから、今後計画的にブリ養殖を行うためには安定した種苗の確保が課題となってきた。

種苗生産の取り組みについては、全国栽培漁業種苗生産、入手・放流実績（水産庁、日本栽培漁業協会）によると、1985-1996年にかけて放流用種苗として399-2,618千尾の生産が日本栽培漁業協会によ

り実施された（Fig. 4）。1997-1999年にかけては、長崎水試等の生産により、養殖用種苗として初めて45-317千尾の生産が開始された。しかしながら、全国では養殖用種苗として天然種苗（モジャコ）を毎年20,000-40,000千尾も採捕し続けており、天然種苗の大量採捕が資源に与える影響を軽減させ、天然種苗に依存しない安定したブリ養殖を実現させるためには、人工種苗の安定供給を目的とした養成親魚によるホルモン処理採卵技術および仔稚魚の量産技術の開発が望まれる。

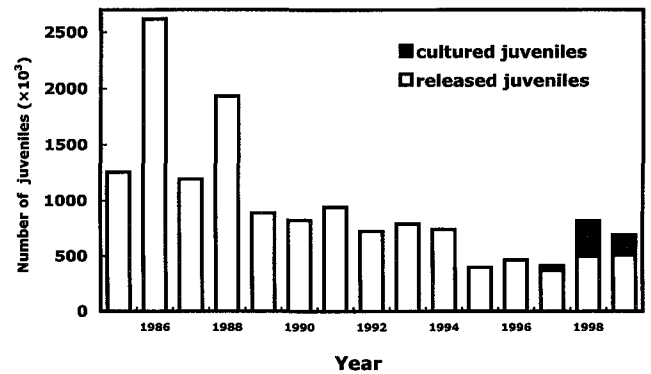


Fig. 4. Changes in the annual yield of yellowtail juvenile produced by hatcheries in Japan from 1985 to 1999.

以上のように、トラフグおよびブリの人工種苗を用いた安定的な養殖を実現するためには、本2魚種の種苗量産技術、特に養成親魚からのホルモン処理採卵技術を確立する必要がある。そこで、長崎水試では九州大学との共同研究により、「養成トラフグのホルモン処理による成熟促進と採卵技術の開発」事業（平成5-7年）および「魚介類種苗量産技術開発研究（対象魚種：ブリ）」事業（平成9-13年）に着手し、漁獲量に左右されない養成親魚を用いて、良質受精卵を確実に得るためのホルモン処理採卵技術を平成13年度までに確立させた。本研究では、トラフグおよびブリの親魚養成技術、人工授精によるホルモン処理採卵技術、および採卵マニュアルを用いた県内種苗生産機関への普及指導状況まで、一連の研究成果をとりまとめて報告する。

## 第1章 トラフグの親魚養成と採卵技術の開発研究

### 第1節 親魚養成および環境調節

#### 1-1. 親魚の飼育管理と環境調節による卵黄形成促進

養殖業が成立するための基本条件の一つとして、安定した種苗の供給は不可欠である。トラフグの養殖業者が種苗生産用受精卵を確保するに当たり、本研究が実施される以前は、一般に天然魚を用いた次の二つの方法により受精卵を得ていた。

- ① 産卵期の4-5月に、すでに排卵した天然親魚を探し求め、現地で卵の搾出および精液の採取を行い、人工授精により受精卵を得る。
- ② 成熟に達していない天然親魚を購入し、種苗生産施設に搬入した後、ホルモン投与によって成熟、排卵させ受精卵を得る。

しかし、このように天然親魚を用いる場合、漁獲直後でスレやストレスが少ない良質な個体を毎年安定して入手することは難しく、さらに漁獲直後に人工授精を直ちに行うことができるような成熟卵を持つ親魚を安定して確保することは一層困難である。1994-1996年の長崎県内の種苗生産業者からの聞き取り調査によると、産卵回遊してきた成熟卵を持つ親魚（魚体重7-10kg）を採卵用に用いた場合、その価格は浜値で100-250万円/尾（10-30万円/kg）の高値が付いた。しかし、このようにして高価な親魚を入手しても、各親魚の卵巣卵の状態は様々で、ホルモン処理の有無に関係なくその採卵成績は極めて不安定であった。

このように、天然親魚に依存する限り、安定した良質の受精卵の確保は期待できない。したがって不安定な天然親魚に依存しない養成親魚からの種苗生産に関する新しい技術の開発が望まれるようになった。すなわち、周年を通して飼育管理した素性が明確な親魚を用い、再現性のある新しいホルモン投与技術により成熟、排卵させ、人工授精卵を得る方法である。

さらに、養殖されたトラフグの出荷時期や出荷サイズをある程度自由に調節できれば、市場の需要に対する安定したトラフグの供給が可能となるであろう。そのためには産卵期以外の時期における採卵技術の開発が必要となってくる。長崎県近海におけるトラフグの産卵期は4-5月であるが、成熟を数ヶ月早め、採卵することができれば、長期にわたる採卵時期の実現が可能となる。本種の受精卵のふ化管理および仔稚魚の飼育管理に関する技術は既にほぼ確立されているので、親魚の早期における成熟促進と排卵誘導技術が開発できれば、本種の早期種苗の供給は実現できると考えられる。

トラフグと産卵期がほぼ同じであるマダイやヒラメでは水温および日長の調節による非産卵期の採卵が報告され（福所ら、1986；Matsuyama *et al.*, 1993；電源開発株式会社、1996）、すでに事業レベルでも実施されている。この場合、冬季に昇温および長日条件で飼育することにより卵黄形成が促進され、卵黄形成終了後、引き続き卵成熟が起り、自然産卵された受精卵が種苗生産用として利用されている。トラフグは飼育環境下では卵黄形成は進行するものの、卵成熟が起らないため産卵しない。しかし、マダイやヒラメで卵黄形成促進に有効であった冬季の昇温および長日条件での飼育が、本種の卵黄形成促進にも有効であれば、卵の最終成熟と排卵はホルモン投与により誘導できるので、本種においても水温および日長調節により、採卵時期の早期化が可能

となる。

本章では、トラフグ天然親魚に代わる養成親魚からの早期採卵技術を開発するにあたり、周年にわたる親魚養成ならびに水温および日長調節による卵黄形成促進に関する実験を行ったので、その結果を報告する。

### 1) 材料と方法

採卵用親魚として雌は3歳魚(1.5kg程度)から使用可能であるが、大型水槽で種苗の量産を行う際に必要な受精卵量等を考慮すると4歳魚以上(2kg以上)の方が望ましい。また、雄は2歳魚(1kg程度)から使用可能である。このことから、親魚として主に雌は3-4歳魚、雄は2-3歳魚を用い周年にわたり飼育管理した。

餌料として、サバ・オキアミ・イカ・配合飼料(はまちモイスト FUNE, 日清飼料)を1:1:1:3の割合で調整し、総合ビタミン剤(モア健康プラス BM, エーザイ)と強肝剤(アトモレート, 協和発酵)を添加強化したモイストペレットを作製し、週3回飽食量給餌した。また、12月以降は卵黄形成期間中の栄養状態を高く維持するため、これに加えてサバ・イカ(ビタミンEカプセル詰め込み)の切り身を週2回給餌した。肥満度(condition factor, CF)は以下の式で求めた。

$$CF = (BW:g) / (SL:cm)^3 \times 10^3。$$

親魚の観察および給餌管理が容易であること、疾病が発症した場合速やかに対処できること等の理由で、親魚の飼育管理は陸上水槽で行った。4月から9月までの期間は屋外30t円形水槽で飼育し、10月以降は環境調節による卵黄形成促進を行うため、室内50t円形水槽または30t角形水槽に収容した。寄生虫症が進行すると親魚が摂餌不良になるため、白点虫症およびヘテロボツリウム症対策として、1ヶ月に1回の定期的な薬浴(過酸化水素500ppm, 30

分)と水槽替えを行った。また、トラフグ特有の噛み合いを軽減させるため6月に歯切りを行い、互いの尾鰭等を傷つけないように注水および通気による飼育水槽内での一定方向の水流をつくった。

10月下旬から11月下旬にかけて水温を23℃から14℃まで徐々に下げ、10日間14℃で飼育し、その後17℃まで徐々に昇温し、ホルモン投与まで17℃を維持した。また、10月下旬から11月下旬までは短日条件(10L14D)で、12月からホルモン投与までの期間は長日条件(14L10D)で飼育した。

環境調節期間中は、雌親魚の卵巣卵径の成長状況を把握するため、定期サンプリングを行った。11-1月の期間は卵黄形成が開始されたばかりで、カニューレシオンによる卵採取がスムーズに行えないため、卵巣卵径の調査はサンプリング個体を開腹することにより行った。この間、月に1-3回の頻度で2-4尾の生殖腺調査を行った。2-4月の期間は環境調節により卵黄形成が促進されたことから、カニューレシオンによる卵採取がスムーズに行えた。卵巣卵調査個体はカニューレシオン後、再び、親魚養成を継続するか、もしくは各種ホルモン投与実験に供試した。この間、月に3回程度3-20尾の生殖腺調査を行った。

### 2) 結果

モイストペレットおよび生餌(サバ, イカ)を用いた給餌管理により、採卵予定時期(2-3月)までに親魚の肥満度は30-37になった(Fig. 5)。

昇温および長日条件における親魚の飼育期間中(11-4月)の卵巣卵径の変化を Fig. 6 に示した。卵巣卵径は11月に平均173μmで、卵黄形成前の無卵黄卵であった。12月では平均640μmを示し、卵黄形成の急激な進行が認められた。1月では平均657μm、2月上旬では平均775μmとなり、卵黄形成はさらに進行した。その後、2月下旬には卵黄形成がほぼ完了し、平均卵径は902μmとなった。

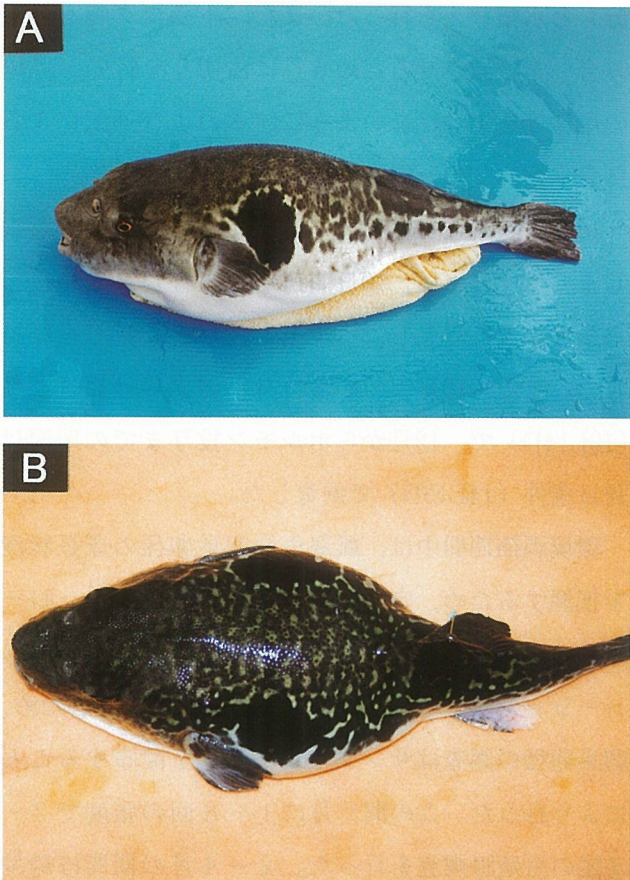


Fig. 5. Cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes*.  
 A ; Side view of female, four-year-old.  
 B ; Dorsal view of female, BW:2.60kg, TL:485mm.

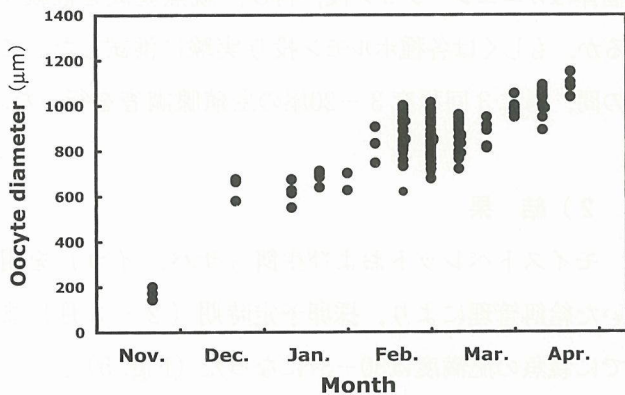


Fig. 6. Changes of oocyte diameter in cultured tiger puffer from November to April.

### 3) 考 察

トラフグ卵巣卵の発達様式は部分同時発生型で、産卵は1回である(松山ら, 1997)。天然親魚では卵黄形成の完了とともに卵の最終成熟が起こり、産卵が行われる。1999年の九州北西海域で行われた天然

親魚の成熟調査によると、卵黄形成が終了し産卵が始まるのが4月で、卵黄形成は2月から4月にかけて急速に進行していた(未発表資料)。本研究では10月から環境調節を行うことにより、2月下旬に卵黄形成がほぼ終了したので、通常より約2ヶ月早い産卵の早期化を実現できることになる。春から初夏にかけて産卵する魚種において生殖腺の発達を支配する環境要因は、多くの場合、長日化と温度上昇であることが知られている(朝比奈, 1989)が、本種においてもマダイやヒラメと同様に、冬季に昇温および長日条件で飼育することにより、卵黄形成の開始と進行を促進できることが明らかとなった。本研究で実施した方法では、2月下旬に卵黄形成が完了したが、今後、環境調節の開始時期をずらしたり、あるいは異なる温度および日長条件を組み合わせることにより、幅広い産卵の早期化が実現できる可能性がある。

卵黄形成中に親魚のストレスや栄養条件等により退行卵が生じた場合、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(LHRH)などのホルモン投与をして卵の最終成熟を誘導しても成熟は起こらない(2節2-1参照)。良質の受精卵を得るためには退行の起こらない卵巣卵の育成が必要で、そのためには、飼育期間中に親魚にストレスを与えず、卵黄形成が十分に進行するような餌料での飼育が不可欠である。本研究では、1993年の親魚に一部卵巣卵の退行が認められたものの、その後の養成期間中においては、全ての親魚で卵巣卵の退行は認められなかった。このことから、今回の餌料、疾病予防および水槽内環境等を含む飼育管理は適切であったと考えられる。本研究では、親魚の栄養状態の指標として肥満度を用いた。今回養成した親魚のその後の成熟促進と排卵誘導は問題なく行えたことから、親魚養成後期の肥満度30以上が良質な採卵用親魚としての一つの指標となり得よう。



以上、トラフグの周年にわたる飼育管理と冬季における環境調節を行うことにより、2月下旬以降、ホルモン投与が可能な卵径900 $\mu$ m以上の健全な採卵用親魚を確保できることが明らかとなった。

## 第2節 雌親魚の成熟誘導

### 2-1. 各種ホルモン投与法による成熟促進と排卵誘導効果

現在、我が国において、魚類の成熟・排卵促進には哺乳類の胎盤性生殖腺刺激ホルモン（HCG）やシロザケ脳下垂体（SP）が広く使用されている。長崎県においても、トラフグの人工種苗の供給を目的として、これらのホルモン剤を用いて天然親魚から成熟卵を得る試みが県（宮木ら，1992）や民間の施設でなされてきた。天然親魚を用いる場合、成熟卵を持つ漁獲直後の個体を使用される。しかし、ホルモン投与時の親魚の状態が様々で、採卵状況は決して安定した結果を示していない。HCGとSPの混合投与を行った1993-1995年の長崎県下トラフグ養殖業者からの聞き取り調査によると、得られた天然親魚からの成熟卵の受精率は0-90%以上と様々であるが、70%以上の受精率を示す良質卵は供試魚の2割以下からしか得られていない（中田，未発表）。したがって、良質の受精卵を安定して得るに当たり、この方法では再現性に期待できない。一方、近年のトラフグ天然魚の乱獲に伴い、種苗生産用親魚の確保が年々困難になって来つつある状況を反映して、養成親魚からHCGを用いて採卵する試みも行われている（松田ら，1993）が、ここでもそのふ化率の低さが問題となっており、養成親魚からの種苗生産に関する新しい技術の開発が望まれている。

近年、魚類の成熟促進に合成生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（LHRHa）が使用されている。投与

法としては、ホルモンの効果を持続させるコレステロールペレット（Crim *et al.*, 1983）を作製し、腹腔あるいは筋肉中に埋め込む方法が一般的である。LHRHa コレステロールペレットは当初、卵黄形成を完了した親魚の成熟、排卵誘起に用いられていたが、アユ（廣瀬・新井，1988）やマダイ（松山ら，1992）で未熟な親魚の卵黄形成にも有効であることが示されたので、トラフグの卵黄形成促進にも有効であろうと考えられた。1回の投与で卵黄形成および卵成熟が促進されれば、ハンドリングによる魚体へのストレスの軽減に加え、投与法の調整により、計画的採卵には不可欠である親魚の成熟、排卵の同期化や、産卵の早期化による出荷調整などが期待でき、むしろ素性が明確な養成親魚を用いることは利点と成り得よう。

そこで、本章では養成親魚に対する徐放的なLHRHaの投与効果を知るために、卵黄形成後期の雌魚にLHRHa コレステロールペレットあるいはLHRHa オスモティックポンプを投与し卵の発達を個体毎にモニターした。また、比較のために従来法としてHCG・SPの反復投与も行い、卵の発達を個体毎にモニターすることにより、各種ホルモン投与法の有効性を比較した。

#### 1) 材料と方法

材料には、民間の養殖業者が養成した養殖3歳魚（平均体重1.60kg）を用いた。1993年12月22日に購入して屋内100t水槽に移し、同日から1994年2月10日まで自然水温で、その後水温を17 $^{\circ}$ Cに保ち飼育した。室内に移して後は、1994年1月27日まで10L14Dの短日条件で、1月28日以降は14L10Dの長日条件で飼育した。餌料はサバ・イカナゴ・配合飼料（日清製粉）を1:1:2の割合で作製したモイストペレットと、オキアミとキビナゴの生餌を交互に毎日給餌した。

1994年3月11日(実験区1, 2, および4)と3月12日(実験区3, および対照区)に, タイゴン製カニューラ(内径2.0mm)により卵巣組織の一部を採取した。採取後, ホルモン投与を行い, 背鰭基部に標識を付け, 全個体を一つの10 t 角形水槽(17°C, 14L10D)に收容した。その後, 数日間隔で適宜カニューラにより卵巣組織を採取し, 卵径測定, および組織像の観察を行い投与効果を比較した。採取された卵は約10個の平均卵径を求めた。トラフグは部分同時発生型の卵巣卵発達様式を示し, 発達中の卵巣卵は同一の成熟段階にある1群の卵群より成る。卵巣卵はブアン液で固定した後, 樹脂包埋(Technovit 7000, Kulzer)し, 2 $\mu$ mの切片を作製し1%トリジンブルー染色を施した。排卵の有無は, ホルモン投与5日後から1日1回の腹部触診によって確認した。

実験区1: 雌4尾に対し LHRHa 400 $\mu$ g/kgのコレステロールペレットを投与した。使用した LHRHa は, des-Gly<sup>0</sup>[D-Ala<sup>6</sup>]-LHRH ethylamide (Sigma)である。LHRHa コレステロールペレットは Lee *et al.* (1986) に準じて作り, ペレット1個につき LHRHa を200 $\mu$ g含むような長さ6 mm, 直径2 mmの円柱状のものを準備した。ペレットからの LHRHa の放出量および放出期間は既に報告した (Matsuyama *et al.*, 1995)。LHRHa コレステロールペレットは, 親魚を麻酔(2-フェノキシエタノール約200ppm)した後, メスで背筋部表皮に切れ込みをつくり, 内径3 mmのステンレス製骨髄生検針を用いて背筋中に埋め込んだ。

実験区2: 雌3尾に対し, 実験区1と同様の LHRHa コレステロールペレットを背筋部に埋め込んだ。さらにペレット投与10日後から3日毎に生理食塩水に溶解した LHRHa を背筋部に注射投与した (LHRHa 400 $\mu$ g/kg)。

実験区3: 雌3尾に対し LHRHa が50 $\mu$ g/day/

fish 放出されるように調整されたオスモティックポンプ (Alzet model 2002, ALZA) を麻酔後腹腔内に埋め込んだ。LHRHa の放出は約2週間続く。

実験区4: 雌5尾に対し, HCG (帝国臓器, 500 IU/kg) とシロザケ乾燥脳下垂体 (SP) の生理的食塩水による磨砕物 (7mg/kg) を混合したもの (以下 HCG・SP と略記) を5日毎に背筋部に注射投与した。

対照区: 雌3尾に対して何も処理を施さず, 実験区1-4と同じ条件で飼育を行った。

## 2) 結果

ホルモン投与後の卵径変化および卵の成熟段階を Fig. 7 に示した。

実験区1: 供試魚4尾中2尾の卵巣卵が, ホルモン投与時に退行過程にあった。退行卵巣を持つ個体は他の実験区でも認められ, このような個体では, ホルモン投与法の如何を問わず成熟, 排卵は促進されず, 卵巣の退行が進行していった。したがって退行卵巣を持つ個体は実験区1の1尾を代表として Fig. 7 に示し, 他の退行卵巣を持つ個体の結果は省略した。

3尾の LHRHa コレステロールペレット投与時の平均卵径はそれぞれ, 859, 932および1,014 $\mu$ mで, 卵径859 $\mu$ mの個体が既に退行過程 (Fig. 8A) に, 残り2尾は卵黄形成後期 (Fig. 8B) にあった。ペレット投与時に退行過程にあった個体では, ペレット投与後8日目に一時卵径の増加は見られたが (1,019 $\mu$ m), 卵は退行状態のままで, その後退行の進行に伴い卵径も減少していった。一方, 卵径932および1,014 $\mu$ mの2個体では, ペレット投与後10日目の3月21日に排卵し, 排卵された成熟卵の卵径もそれぞれ1,139および1,150 $\mu$ mと増大していた。また, 卵径932 $\mu$ mの個体は, ペレット投与8日後の3月19日では卵核胞崩壊 (GVBD) 後の成熟状態 (Fig. 8C) にあった。

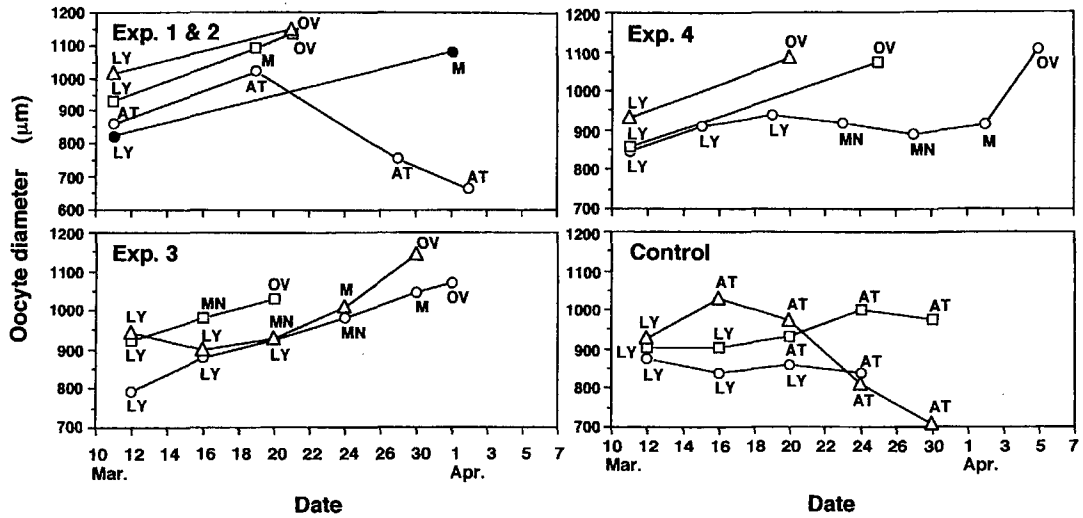


Fig. 7. Changes in developmental stages of oocyte and oocyte diameter in the cultured tiger puffer after hormonal administration in different ways. LY, late yolk stage; MN, migratory nucleus stage; M, mature stage; OV, ovulation; and AT, atretic oocyte. Experiment 1, Single implantation of LHRHa cholesterol pellet (LHRHa 400μg/kg). Experiment 2, Single implantation of LHRHa cholesterol pellet (LHRHa 400μg/kg) +10 days after pellet implantation, repeated injections of LHRHa (400μg/kg) at 3 days interval. Experiment 3, Single implantation of osmotic pump (LHRHa 50μg/kg/day). Experiment 4, Repeated injections of HCG (500IU/kg) combined with chum salmon pituitary homogenate (7mg/kg) at every 5 day. Solid circles represent the result of a fish of experiment 2.

実験区 2：初回のカニューレーションにより卵巣卵が採取できた個体は 3 尾中 1 尾のみで、卵径は 824μm、卵は卵黄形成後期にあった。ペレット投与 10 日後から 3 日間隔で計 4 回の LHRHa を注射することにより、20 日後に排卵が起こった。

実験区 3：3 尾のオスモティックポンプ投与時の平均卵径はそれぞれ 800, 923 および 944μm で、卵は全て卵黄形成後期にあった。卵径 800μm の個体は、ホルモン投与 12 日後に胚胞移動期 (Fig. 8D) となり、16 日後では GVBD 後の成熟卵で、18 日後の 3 月 30 日に排卵した。卵径 923μm の個体は、ホルモン投与 4 日後には既に胚胞移動期に達し、8 日後に排卵した。一方、卵径 944μm の個体は、ホルモン投与 4 日後に卵径の増大は見られたが卵黄形成後期で、8 日後に胚胞移動期、12 日後に成熟、そして 16 日後に排卵していた。

実験区 4：5 尾中 1 尾が退行過程にあり、他に 1 尾は初回ホルモン投与後 17 日目に死亡した (合計 4

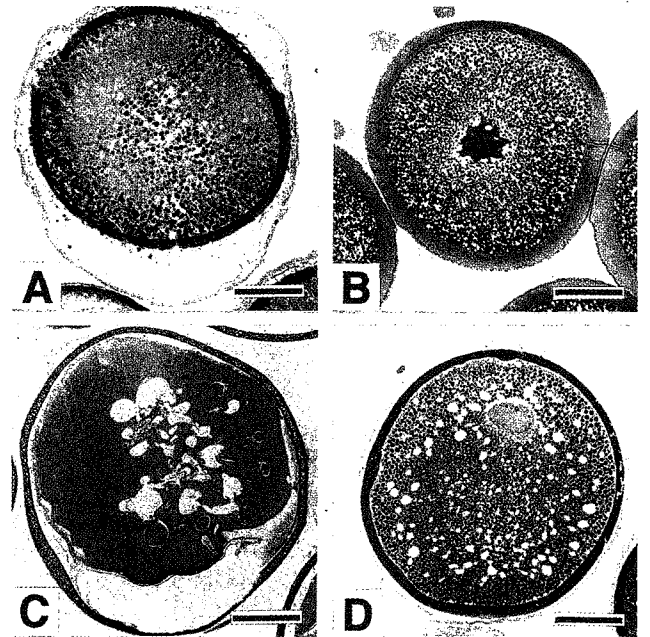


Fig. 8. Photomicrographs of the tiger puffer oocytes. A, Atretic oocyte sampled just prior to hormonal treatment. B, Oocyte at late yolk stage. C, Oocyte at mature stage after germinal vesicle breakdown. D, Oocyte at migratory nucleus stage. Scale bars represent 200μm.

回 HCG・SP を投与)。残り 3 尾の 3 月 11 日における卵径はそれぞれ 845, 860, および 932 $\mu\text{m}$  で、卵は全て卵黄形成後期にあった。卵径 845 $\mu\text{m}$  の個体は 5 回の HCG・SP 投与により初回投与後 23 日目に排卵した。卵径 860 $\mu\text{m}$  の個体は 3 回の HCG・SP 投与により初回投与後 14 日後に排卵した。また、卵径 932 $\mu\text{m}$  の個体は 2 回の HCG・SP 投与により初回投与後 9 日目に排卵した。

対照区：3 月 12 日における 3 尾の卵径はそれぞれ、874, 902, および 927 $\mu\text{m}$  で卵黄形成後期にあった。卵径 927 および 903 $\mu\text{m}$  の 2 個体では一時卵径の増大が見られたが、それぞれ 4 日後および 8 日後には退行過程に入っており、その後退行の進行とともに卵径も減少していった。また、卵径 874 $\mu\text{m}$  の個体も、12 日後には退行過程に入っていた。

Fig. 9 にホルモン投与時の卵径とホルモン投与から排卵に至るまでの日数の関係を示した。ホルモンの投与方法を考慮に入れず、投与時の卵径を 800–900 $\mu\text{m}$  のグループと 900 $\mu\text{m}$  以上のグループに分けた場合、前者では初回ホルモン投与から排卵までが平均 18.8 日、後者では平均 10.6 日となり、両者の平均値間には有意差が認められた (t-test,  $P < 0.01$ )。

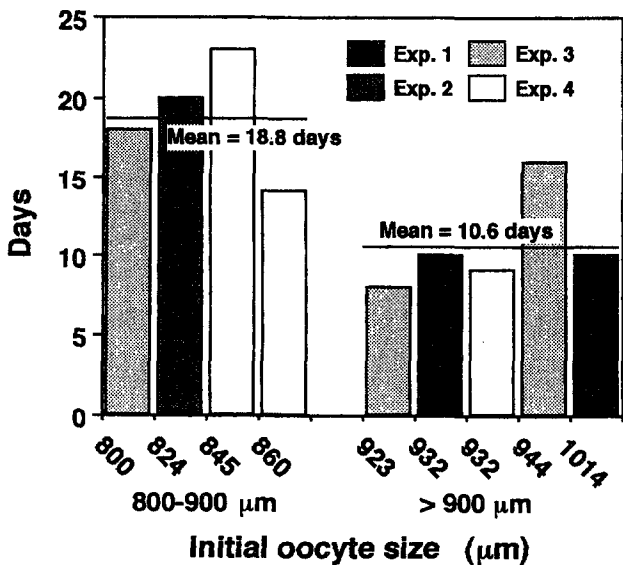


Fig. 9. The number of days required from first hormonal treatment to ovulation.

Fig. 10 にホルモン投与時の卵径に対する排卵時の成熟卵の卵径を示した。両者の間に有意な回帰式は認められなかったが ( $P > 0.05$ )、Kendall の順位相関検定では、ホルモン投与時の卵径が小さい個体ほど成熟卵も小さい傾向にあった ( $\tau = 0.62$ ,  $P < 0.01$ )。

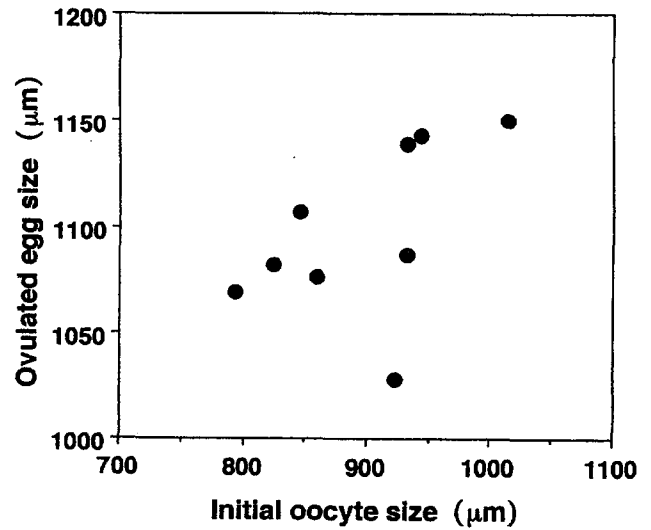


Fig. 10. The relationship between the initial oocyte size and the ovulated egg size.

### 3) 考察

各種ホルモン投与による養成トラフグに対する成熟促進効果を、卵巣組織をカニューラにより採取し、個体別にモニターすることにより明らかにした。

LHRHa を徐放的に放出させる剤形としてコレステロールペレットとオスモティックポンプを用いた。LHRHa は生理食塩水に溶解し直接注射投与した場合、体内での分解が速く、投与後数時間でその効力が失われる (Sherwood *et al.*, 1986) が、今回用いたような剤形として投与すると、長時間その効力は作用し続ける。材料の養成トラフグのホルモン投与時卵径は 800–1,014 $\mu\text{m}$  で、いずれも卵の最終成熟過程に入っていない卵黄形成後期の状態にあった。実験区 1 の親魚は、実験開始時に退行していた 1 尾を除き、卵黄形成、最終成熟、および排卵の促進効

果が認められた。1回のLHRHa コレステロールペレット投与により卵黄形成から排卵に至るまでの一連の過程が誘導できたことは、現行のHCG・SP反復投与法に代わるものとして期待される。今回、コレステロールペレット・LHRHa反復投与（実験区2）およびHCG・SP反復投与（実験区4）でも成熟、排卵促進ができたが、このような繰り返し投与による親魚に対するストレスは極めて大きく、ホルモン処理後の親魚の死亡の一因となっている。

LHRHaの放出量がコレステロールペレットと比較して高いオスモティックポンプ（実験区3）でも、コレステロールペレットと同等の成熟、排卵促進効果が得られた。オスモティックポンプは内包する薬剤を正確に一定量放出し続けるので、薬剤の投与効果が判定でき易い反面、取り扱い易さ、サイズ、価格などの面から実際の養殖現場での使用は現実的でない。コレステロールペレットは組織適合性も良く（松山ら，1992）、大型（直径7mm、長さ30mm）のオスモティックポンプと比べると親魚に与えるストレスが少なく済むので、次年度以降に同じ個体を繰り返し採卵用親魚として用いることも可能である。今回コレステロールペレットに含まれるLHRHaは400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ としたが、LHRHaの適正量の検討はできなかった。オスモティックポンプ投与と比較してその効果に差異は認められないので、400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上にする必要はない。ちなみに、冬季の未熟なマダイの成熟、産卵促進に有効なコレステロールペレットのLHRHa量は最低170 $\mu\text{g}/\text{kg}$ である（Matsuyama *et al.*, 1995）。LHRHaは安価ではなく（1996年現在Sigma社製で、25mgが約413\$）、また必要量以上の大量投与は内分泌系のバランスにとって好ましくないため、今後適正投与量の検討が必要であろう。

ホルモン投与時に卵径が800–900 $\mu\text{m}$ のグループでは、初回ホルモン投与から排卵まで平均18.8日か

かり、卵黄形成がほぼ完了している卵径900 $\mu\text{m}$ 以上のグループでは、排卵までの期間は平均10.6日であった（Fig. 9）。尾数が少ないため正確な推定はできないが、コレステロールペレット投与区（実験区1）の2尾は卵径900 $\mu\text{m}$ 以上で、ホルモン投与後10日で排卵を行っていることから、今後コレステロールペレットを採卵法に用いる場合、卵径900 $\mu\text{m}$ 以上の個体ではペレット投与後の10日前後が排卵の目安となる。また、実験区3のオスモティックポンプを投与した卵径800 $\mu\text{m}$ の個体を例にとると、卵黄形成の進行に8日、胚胞移動期（MN）に入るまでに12日を必要とし、排卵は18日目に起こっていた。一方、同じ実験区の卵径923 $\mu\text{m}$ の個体では、ホルモン投与後4日で胚胞移動期に入り、8日目には排卵していた。このように、卵黄の蓄積が十分でない個体では、卵黄形成完了までの期間が必要となり、卵径が800–900 $\mu\text{m}$ の場合、ホルモン投与後約20日を排卵の目安とすればよいかもしれない。今後、コレステロールペレット投与の実験尾数を増やし、ホルモン投与時の卵径と卵の発達との関係を明らかにすることが必要である。

いずれのホルモン投与法でも卵径800 $\mu\text{m}$ 以上の個体に対する成熟、排卵の促進効果が認められ、ホルモン投与時の卵径が小さい個体では成熟卵も小さい傾向にあった。今回、ホルモン投与法の違いによる受精率、ならびに成熟卵径と受精率の関係の検討は行っていない。受精率やふ化率、あるいは生残率を指標とする卵質が成熟卵径に影響されるならば、種苗生産上の大きな問題となるので、成熟卵径と卵質の関係は今後検討されねばならない事項である。

今回の実験において、ホルモン処理時に卵巣卵を調べた際、採卵用親魚の中に卵の退行が起こっている個体が認められ、それらはLHRHa、あるいはHCG・SPいずれの投与法を問わず、すべて成熟、排卵を誘起させることができなかった。一方、退行像

が認められなかった実験区1-4の8尾では、ホルモンの投与効果は様々であったが、全ての親魚で成熟、排卵が起こっていた。このことは、採卵用親魚の育成の重要性を示している。有効なホルモン投与方法であっても、親魚の状態が整っていないと、即ち、卵細胞が退行することなく卵黄の蓄積が正常に進行していないと、成熟卵を得ることはできない。餌料や疾病対策などを含んだ親魚の育成が、採卵技術を確立するに当たり重要な要素の一つになる。

ホルモン処理を行っていない対照区の親魚は、3尾とも摂餌を行っていたにもかかわらず、卵巣卵は4-12日後には退行過程に入っていた。即ち、卵黄形成が順調に進行しても、飼育環境下では卵の最終成熟を誘起する生殖腺刺激ホルモンの分泌が起こらず、比較的短期間のうちに卵の退行が始まることを示している。退行卵を持つ個体に対しては、どのようなホルモン処理を行っても成熟は誘起されないの、親魚を育成してからのホルモン投与のタイミングが安定した採卵にとって重要となる。育成後期における腹部触診とカニューレーションによる卵径測定とを効果的に組み合わせることにより、ホルモン投与のタイミングを図る必要がある。

本研究により、少例ではあるが、種々のホルモン投与方法を養成トラフグに施し個体毎に卵巣卵の発達をモニターすることにより、その効果と問題点が明らかとなった。今後は、十分に管理育成された養成親魚を用い、LHRHa コレステロールベレットを成熟・排卵促進剤として投与し、卵径に応じて排卵を同調させる技術を実用化させる必要がある。人工授精を行う場合、受精率は排卵されてからの時間と密接な関係を持つことがいくつかの魚種で知られている (Hirose *et al.*, 1979; Norberg *et al.*, 1991; Koya *et al.*, 1994) ので、排卵のタイミングを同調させる技術は今後の重要な課題となろう。

## 2-2. ホルモン投与時の卵径が排卵時間、卵量および卵質に及ぼす影響

近年のトラフグ天然魚の減少に伴って、種苗生産用親魚の確保が困難になってきている。そこで、天然魚に代わって入手が容易な養成魚からの採卵が試みられるようになった (松田ら, 1993) が、その受精率およびふ化率の低さが問題になっている。これまで、天然、養成を問わず、トラフグでも他の多くの魚種と同様に、視診や触診により成熟が間近いと判断された親魚に、哺乳類の生殖腺刺激ホルモン (HCG) やシロザケ脳下垂体 (SP) を1回ないし複数回投与し、成熟および排卵を誘導してきたが、得られた卵の卵質 (卵径、卵膜の厚さ等) にむらがあることから、良質の受精卵を安定して得るためには、この方法では問題があった。

我々は、安定的な受精卵の確保が困難なトラフグについて、親魚の入手が容易な養成魚から採卵し、実際の種苗生産に利用できる技術の開発を目的に研究を行い、養成親魚を用いた成熟、および排卵促進には、合成生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (LHRHa) を含むコレステロールベレットの1回投与が実際的かつ効果的であることを示した (松山ら, 1997)。LHRHa コレステロールベレットはホルモンの放出持続効果があり、成熟促進のみならず卵黄形成にも有効であるため (廣瀬・新井, 1988; 松山ら, 1992)、卵黄形成が終了していない個体であっても1回の投与で成熟および排卵が誘導された (松山ら, 1997)。さらに、ホルモン投与時の卵径の把握が個体間の同調を図る上で重要であることも示した (松山ら, 1997)。また、各個体の排卵日をさらに精度良く予測できれば、大幅な労力の削減と効率的な採卵作業が可能となる。特に、小型の親魚を用いる場合は採卵量が少ないので、種苗生産を大型水槽で行うには複数個体から同日に良質の受精卵を得るこ

とが必要になる。

本章では、各個体の排卵日予測等の採卵の効率化に焦点を絞り、カニューラにより卵径を把握した個体を用いて、LHRHa コレステロールペレットで成熟促進後、生殖腺刺激ホルモンを投与して排卵を誘導し、成熟卵を得る方法を検討した。

### 1) 材料と方法

**親魚** 1994年10月13日に養殖業者より3歳の養成トラフグを購入し、長崎県水産試験場増養殖研究所の30 t 屋外円形水槽（2面）に馴致した。1994年10月26日に屋内100 t 水槽に移し、同日から11月22日にかけて短日処理（10L14D）を施し、水温を23℃から14℃まで徐々に下げた。10日間その条件で飼育した後、1994年12月3日から1995年3月21日まで長日処理（14L10D）を施した。水温も20日間かけて17℃まで徐々に上げ、その後は3月21日まで17℃に保った。予備飼育および実験期間中は、サバ・イカナゴ・配合飼料（日清製粉、はまちモイスト FUNE）を1：1：2の割合で調製したモイストペレットと、オキアミ・キビナゴを1：1で混合した餌料を毎日交互に飽食量給餌した。

1995年3月10日に腹部触診により雌と判断された個体50尾を対象に、タイゴン製カニューラ（内径2.0 mm）により卵巣組織の一部を採取して、卵径測定および組織像の観察を行った。その結果、卵径760 $\mu$ m以上で、卵細胞に退行が認められない個体23尾（平均体重1.65kg）を実験に供試した。なお、供試個体23尾の卵巣卵は全て卵黄形成後期にあった。

**ホルモン剤およびコレステロールペレット** LHRHa は、des-Gly<sup>10</sup>[D-Ala<sup>6</sup>]-LHRH ethylamide (Sigma) を使用した。LHRHa コレステロールペレットは Lee *et al.* (1986) に準拠して、ペレット1個につき LHRHa を200 $\mu$ g含む長さ6 mm、直径2 mmの円柱状のものを調製した。ペレットからの LHRHa の放

出量および放出期間は既に報告した (Matsuyama *et al.*, 1995)。LHRHa コレステロールペレットは、親魚を2-フェノキシエタノール(約200ppm)で麻酔した後、メスで背筋部表皮に切れ込みを入れ、内径3 mmのステンレス製骨髓生検針を用いて背筋中に埋め込んだ。LHRHa の投与量は400 $\mu$ g/kgとした。SP (マルハ) は0.6% NaCl で磨碎し、HCG (帝国臓器) と混合して、先と同様に麻酔した後背筋部に注射した。HCG および SP の投与量は、それぞれ500IU/kgおよび7 mg/kgとした。

**ホルモン投与実験** 実験区として3区設けた。実験区 I では、卵径900 $\mu$ m以上の親魚8個体を使用し、3月21日に LHRHa コレステロールペレットを投与した後、人工授精の時期を同調させるために、3月31日に HCG・SP を投与し排卵誘導を行った。また、実験区 II では、卵径800-900 $\mu$ mの親魚10個体を使用し、実験区 I 同様、3月21日に LHRHa コレステロールペレットを投与した後、4月10日に HCG・SP で排卵誘導を行った。なお、コレステロールペレット (400 $\mu$ g/kg) やオスモティックポンプ(50 $\mu$ g/day/fish) などによる LHRHa の徐放的投与を行った場合、卵径900 $\mu$ m以上の個体で10日、卵径800-900 $\mu$ mの個体で20日が排卵の目安となる (松山ら, 1997) ことから実験区 I および II の排卵誘導は10日目、20日目に行った。実験区 III は、従来法として、卵径764-932 $\mu$ mの親魚5個体に対し、LHRHa コレステロールペレットの投与は行わず、5日毎に HCG・SP を反復投与した。

**卵径の測定** HCG・SP による排卵誘導の時期を判断するために、各実験区毎にモニター個体を3尾ずつ選び、ホルモン投与してから一定期間後にカニューラで卵巣卵を採取して卵径の変化を調べた。実験区 I および II において、HCG・SP 投与による排卵誘導は卵径が1 mm以上に達していることを目安にした。

**採卵および人工授精** 実験区 I および II では、

LHRHa コレステロールペレット投与後11日目 (HCG・SP 投与の翌日) から1日1回の腹部触診を行い、排卵の有無を調べた。排卵を確認した場合は、乾導法により人工授精を行った。人工授精用の精液は、養成した雄3歳魚15個体 (平均体重1.8kg) に対して、雌と同量の HCG・SP を予め1回注射して得たものを使用した。この操作で雄は約3週間にわたって多量の精液を排精する。人工授精に際しては、15個体中最も活発に排精する個体を選んで供した。実験区Ⅲでは、HCG・SP 投与後96時間から1日1回の腹部触診を行い、実験区Ⅰ、Ⅱと同様に人工授精を行った。

**受精卵の管理とふ化率** 受精卵は、0.5 t アルテミアふ化水槽でふ化するまで管理し、管理期間中は1日15-20回転の換水を行い、水槽の底に卵が滞留しないよう通気を行った。受精率は、人工授精4時間後の卵発生が2-4分割時 (水温17℃) に100粒程度検鏡し、算出した。ふ化率は、別途200粒を17℃のインキュベーター内の1 L 容器に收容して、1日に3回

の水換え (洗卵) を行い、その都度ふ化仔魚と死卵数を計数してふ化率を求めた。

**仔稚魚の飼育** 実験区Ⅱの個体から得た受精卵を長崎県水産試験場島原分場で飼育した。ふ化仔魚は30 t 水槽に收容し、餌料はシオミズツボムシ、アルテミア、配合飼料を成長にあわせて順次重複させて与えた。

## 2) 結果

**ホルモン投与後の卵径変化** Table 1 に LHRHa コレステロールペレットおよび HCG・SP 投与後の各実験区における卵径の変化を示した。

実験区Ⅰでは、LHRHa 投与後10日目にモニターした3個体中2個体の卵径が1 mm以上であったので、その日に HCG・SP 投与による排卵誘導を行った。

実験区Ⅱでは、卵径は LHRHa 投与後7日目で平均89μm増大し、3個体とも900μmを越えた。20日目では1個体 (No.15) が既に水槽内に放卵してお

Table 1. Increase of egg diameter after hormonal treatments in cultured tiger puffer

Experimental group	Fish No.	Egg diameter (μm)				
		Initial	5 days	7 days	10 days	20 days
Exp. I <sup>*1</sup>	4	922±21.5 <sup>*4</sup>			1,160±26.3	
	6	960±32.3			1,112±24.8	
	8	912±28.1			935±31.6	
Exp. II <sup>*2</sup>	15	876±34.5		978±24.3		- <sup>*5</sup>
	16	860±38.5		953±32.4		1,063±27.7
	18	829±22.9		900±27.0		1,006±28.1
Exp. III <sup>*3</sup>	20	859±37.9	947±28.4		1,144±36.7	
	22	765±31.9	919±32.7		1,085±37.8	
	23	764±30.1	853±38.3		878±29.8	

<sup>\*1</sup> At 10 days after a single implantation of LHRHa cholesterol pellet (400 μg/kg), a single injection of HCG (500 IU/kg) combined with salmon pituitary homogenate (7 mg/kg) was conducted.

<sup>\*2</sup> At 20 days after a single implantation of LHRHa cholesterol pellet (400 μg/kg), a single injection of HCG (500 IU/kg) combined with salmon pituitary homogenate (7 mg/kg) was conducted.

<sup>\*3</sup> Repeated injections of HCG (500 IU/kg) combined with salmon pituitary homogenate (7 mg/kg) were conducted at every 5 days.

<sup>\*4</sup> Mean ± SD (n=20).

<sup>\*5</sup> Ovarian eggs were not obtained because fish had already spawned eggs in the tank before biopsy.



り、残り2個体の卵径も1mm以上であったので、その日にHCG・SP投与による排卵誘導を行った。

実験区ⅢではHCG・SPの反復投与を行った5日目および10日目に、卵径はそれぞれ開始時より平均110 $\mu$ mおよび240 $\mu$ m増大した。

採卵結果 実験区Ⅰでは、8個体全てから成熟卵が得られ、その内6個体から受精卵が得られた(Table 2)。受精卵が得られなかった2個体は、夜間に水槽内で放卵していた。受精率は37.5-70.0% (平均55.1%)であった。また、受精卵の卵径は1,070-1,178 $\mu$ m (平均1,132 $\mu$ m)、採卵量は205-470g (平均331.3g)、そして孵化率は0-53.7% (平均32.9%)であった。

実験区Ⅱでは10個体全てから成熟卵が得られ、その内8個体から受精卵が得られた。受精率は16.9-91.0% (平均53.6%)であった。また、受精卵の卵径は1,091-1,188 $\mu$ m (平均1,139 $\mu$ m)、採卵量は160-

445g (平均306.5g)、そして孵化率は0-75.5% (平均28.7%)であった。

実験区Ⅲでは、5個体全てから成熟卵が得られたが、受精したのは2個体のみで、その受精率は12.6および42.6%であった。魚体No.19-23のHCG・SPの投与回数は、それぞれ2, 3, 4, 3, および4回(平均3.2回)であった。この従来法により得られた成熟卵は、実験区Ⅰ、およびⅡで得られた卵と比較して、卵膜が薄く、崩壊しやすかった。

受精卵の卵径には実験区ⅠおよびⅡの間で有意差は認められなかった(t-test,  $p \geq 0.05$ )。また、実験区ⅠおよびⅡでは、受精卵の卵径と受精率との間に相関関係は認められなかった。

実験区ⅠおよびⅡから得た受精率(X)とふ化率(Y)との関係をFig. 11に示した。両者は $Y = 1.0339X - 27.041$ の一次式で示され、高い正の相関が認められた( $r = 0.978$ ,  $p \leq 0.01$ )。

Table 2. Effects of hormonal treatments on inducing ovarian maturation and ovulation in cultured tiger puffer

Experimental group	Fish No.	Body weight (kg)	Oocyte diameter ( $\mu$ m)		Weight (g) of ovulated eggs	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)	
			Initial <sup>2</sup>	Final <sup>3</sup>				
Exp. I <sup>1</sup>	LHRHa+	1	1.67	941	1,149	470	46.7	34.8
	HCG・SP	2	1.60	949	- <sup>4</sup>	-	-	-
		3	1.82	931	1,127	360	50.0	36.0
	HCG・SP	4	1.28	922	-	-	-	-
		5	1.58	917	1,178	258	70.0	53.7
		6	1.98	960	1,127	205	37.5	0.0
		7	1.98	923	1,141	470	62.3	42.1
		8	1.61	912	1,070	225	64.2	30.9
Exp. II <sup>1</sup>	LHRHa+	9	1.94	829	1,132	300	30.1	0.0
		10	1.80	893	1,188	410	91.0	75.5
	HCG・SP	11	1.86	846	1,185	410	69.8	43.0
		12	1.70	895	1,099	320	43.6	18.3
		13	1.97	885	1,168	445	89.2	61.5
		14	1.32	882	-	-	-	-
		15	1.40	876	-	-	-	-
		16	1.59	860	1,142	240	55.3	31.3
		17	1.63	803	1,091	167	33.1	0.0
		18	1.42	829	1,107	160	16.7	0.0
Exp. III <sup>1</sup>	HCG・SP	19	1.47	932	1,084	150	0.0	0.0
		20	1.52	859	1,188	145	0.0	0.0
		21	1.51	764	1,038	273	12.6	0.0
		22	1.56	765	1,078	176	0.0	0.0
		23	1.72	764	1,147	341	42.6	25.1

<sup>1</sup> See Table 1 for operation of each experiment.

<sup>2</sup> Diameter of ovarian oocytes just prior to the hormonal treatment.

<sup>3</sup> Diameter of ovulated eggs.

<sup>4</sup> Ovulated egg in the ovarian cavity were not obtained because fish had already spawned eggs in the tank before stripping.

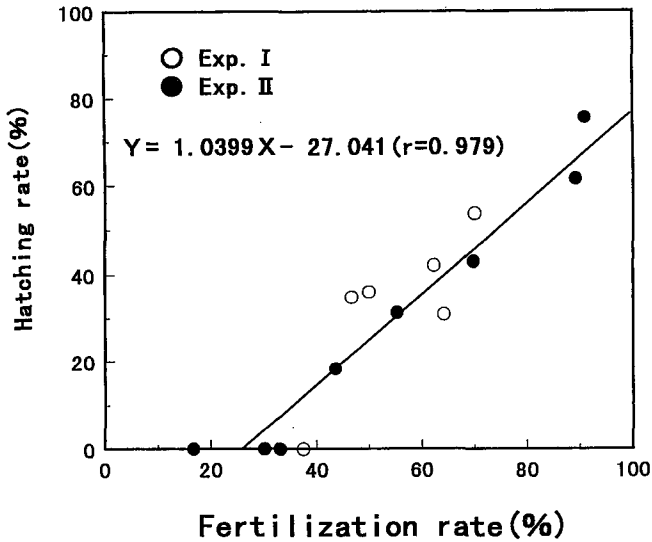


Fig. 11. Relationship between fertilization rate and hatching rates of eggs obtained from cultured tiger puffer by hormonal treatments.

**排卵までの時間** 卵径800 $\mu$ m以上の個体にLHRHa コレステロールペレット (LHRHa 400 $\mu$ g/kg) を投与し、卵の最終成熟促進を行った場合には排卵も続いて起こるが、実験区 I および II では排卵を同調させるために、それぞれ10日後および20日後に HCG・SP を投与した。実験区 I および II で HCG・SP を投与してから排卵が起こるまでの経過時間を Fig. 12 に

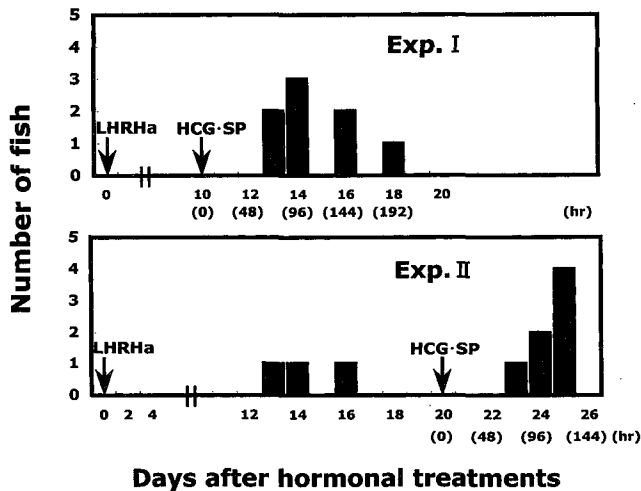


Fig. 12. Occurrences of ovulation in cultured tiger puffer after injection of HCG (500IU/kg) combined with salmon pituitary homogenate (7mg/kg), in Exp. I (upper) and in Exp. II (lower). Numerals in parentheses indicate time course (hours) after injection of HCG and salmon pituitary.

示した。

実験区 I では HCG・SP 投与後72-192時間で全個体が排卵し、ピークは投与後96時間であった。実験区 II では HCG・SP 投与後、72-120時間で7個体から排卵を確認した。残り3個体は HCG・SP 投与前に既に排卵していた。これらの結果より、LHRHa で卵の最終成熟促進を行った後に HCG・SP 処理で排卵を促進した場合には、処理後96時間から120時間に排卵の集中することが明らかになった。

**仔稚魚の飼育** 実験区 II の No.10 の個体から得た受精卵 (受精率91.0%) 410g を管理・飼育したところ、19.3万尾のふ化仔魚が得られ、全長20mm の時点で12万尾が生残した (生残率62.2%)。

### 3) 考 察

本実験条件下において、LHRHa コレステロールペレット (400 $\mu$ g/kg) を卵径800 $\mu$ m以上の養成トラフグ親魚に1回投与すると、成熟を100%誘起できることが明らかになった。さらに、卵径900 $\mu$ m以上 (実験区 I)、および卵径800-900 $\mu$ mの親魚 (実験区 II) へ、それぞれ LHRHa コレステロールペレット投与後10日および20日に、さらに HCG・SP 投与を行い、排卵を誘導したところ、HCG・SP 投与後96-120時間に集中して排卵の起こることが示された。このように、LHRHa コレステロールペレットを投与後、卵径に応じてある一定期間において HCG・SP を投与し排卵を誘導させる方法で、成熟卵が効率良く得られたことから、本採卵技法は養成トラフグに対して有効であることが示された。今回、親魚への GnRH 投与による成熟促進で卵径を1mmまで成長させ、その後 GTH 投与で排卵を誘導させた。その結果、実験区 I および II では、合わせて18個体中14個体から受精卵を得ることができた。これに対し、実験区 III では、5個体中2個体からしか受精卵は得られなかった。天然魚に HCG・SP の反復投与を行っ

た場合、11個体中5個体からしか受精卵は得られていない(宮木ら, 1992)。このことから、GTHの反復投与で強制的に排卵を促す方法より、LHRHa コレステロールペレットにより、卵の成熟を促進させた後、GTH投与による排卵誘導を行った方が、良質受精卵を得られる確率が高いと考えられた。

また、排卵は、HCG・SP投与後96-120時間に集中して起こった。天然魚でも、HCG・SP投与後95-109時間に排卵されることが報告されている(宮木ら, 1992)。したがって、GTH投与により排卵を誘導する場合は、投与96時間後から腹部の触診による排卵の確認を行えばよいと考えられた。

本研究では、LHRHaの投与量は先の報告(松山ら, 1997)を踏襲して400 $\mu$ g/kgのみとした。投与量により、卵の成長状況が異なる可能性があるため、今後さらにLHRHaの適正投与量について詳細に検討する必要がある。

また、本採卵技法では、親魚の選別および排卵の同調を図る上で、LHRHa コレステロールペレットおよびHCG・SP投与時の卵径の把握が必要となるが、方法としてはカニューラによるバイオペシーが最も簡便である。カニューレーションは魚体へのストレスの一因になるので、総排泄孔から卵巣内へのタイゴンチューブの挿入を迅速に行い、卵巣組織を手際よく吸引することが肝要である。このカニューレーション法を用いることで、ホルモン投与時の卵径の把握ができ、より効率的な採卵が可能になると考えられる。

今回の受精率とふ化率の平均値は実験区IおよびIIで、それぞれ55.1%と32.9%および53.6%と28.7%であった。これらの値は、HCGを用いて成熟、排卵促進した養成魚(松田ら, 1993)および天然魚(宮木ら, 1992)と比較して大きな差異はなかった。今回得られた採卵時の卵の卵径については、他の養成親魚(松田ら, 1993: 1,146-1,341 $\mu$ m, 平均1,220

$\mu$ m)や天然親魚(宮木ら, 1992: 1,230-1,380 $\mu$ m)と比較して小さかった。しかし、卵径と受精率との間に相関関係は認められなかったことから、受精率の向上は、卵と精子が出会うのに最も適切な生理状態の時媒精を行うこと、即ち媒精のタイミングに依存しているのかもしれない。一般に人工授精を行う場合には、受精率は排卵されてからの経過時間と関係することが知られている(Hirose *et al.*, 1979; Norberg *et al.*, 1991; Koya *et al.*, 1994)。今回、触診が1日1回で、各個体の排卵完了を明確に把握することができず、媒精したタイミングは個体により排卵完了直後から24時間近く経過したものまでであったと考えられる。今後、受精率に強く影響すると考えられる媒精タイミングが、効率よく良質卵を得るための重要な要素となつてこよう。

LHRHa コレステロールペレットの1回投与で、成熟が誘導できた意義は大きい。ホルモン投与による親魚へのストレスが最小限で済むため、ペレット投与後も摂餌し、卵の搾出後も斃死は認められなかった。したがって、次年度の採卵用親魚として再使用できる可能性が示された。一方、HCG・SPの反復投与は魚体に与えるストレスが大きく、試験期間中の斃死率もペレット投与魚に比較して高く、得られた成熟卵の受精率は極めて低かった。一般に、卵黄形成を完了していない親魚にGTHを反復投与して成熟促進を行った場合は、卵が小型・白濁化して受精率の低下することが種々の養殖対象魚で経験的に知られており、今回HCG・SPの反復投与により得られた卵の卵膜は脆く、ハンドリングによって容易に壊れたことから、低い受精率は媒精タイミングを逸したというより、むしろ低い卵質に起因すると考えられる。

本実験に供試した親魚の体重は1.3-2.0kg(平均1.65kg)であり、これまで採卵に使用された天然親魚(宮木ら, 1992: 3.3-7.6kg)や養成親魚(松田

ら、1993 : 1.8–2.5kg) と比較して小さかった。ホルモン投与前の親魚の栄養状態が良く、卵が健全に発達していれば体重 2 kg 以下の 3 歳魚でも採卵用親魚として十分に使用できることが示された。また、受精率とふ化率が最も高かった実験区ⅡのNo.10の個体(受精率91.0%, ふ化率75.5%)の受精卵を用い飼育試験を行った。受精卵410gから19.3万尾のふ化仔魚が得られ、全長20mmで12万尾(生残率62.2%)の良好な種苗生産ができた。このことから、GnRHとGTHの組み合わせ投与により得られた卵は、種苗生産用として利用可能であるということがわかった。

一方、人工授精用の精液は、雄15個体(平均体重1.8kg)に対して、HCG・SPを1回注射して得た。この操作によって精液を約3週間確保できた。その間の精液の運動精子比や運動時間に基づいた精子活性は落ちることはなかった。したがって、本実験で用いた方法で人工授精に供する活性のある精子は十分に供給できるものと考ええる。

以上、本研究により、養成トラフグ親魚から良質卵を効率良く採卵し、種苗生産に十分に利用可能な受精卵を得る方法が示された。つまり、カニューレシオン法による卵径測定後、卵径800 $\mu$ m以上の個体にLHRHa コレステロールペレットを埋め込み、その後10–20日目の卵径1mmを指標としてHCG・SP投与を行う方法で効率的に排卵を誘導することができた。また、排卵はHCG・SP投与後96–120時間に集中することが明らかとなった。本採卵技法を用いることにより、安定したトラフグの受精卵確保と人工種苗の供給が実現するものと考えられる。

### 2–3. LHRHa の投与量と排卵誘導効果

これまでLHRHa コレステロールペレットの投与実験では、LHRHa の投与量は400 $\mu$ g/kgのみであっ

た。しかし、LHRHa の投与量は、卵の発達や排卵の同調性等に影響を及ぼす可能性がある。そこで、本章ではLHRHa の適正投与量について検討した。

#### 1) 材料と方法

親魚は、養成3, 4歳魚を用い、採卵試験までの親魚養成や環境調節は前述のとおりである。使用した親魚とLHRHa の投与量をTable 3に示した。親魚には、腹部触診により雌と判断された個体を対象にカニューレシオンを行い、卵径が970–1,076 $\mu$ mの個体を使用した。これまでの実験において、排卵を個体間で同調させるためには、900 $\mu$ m以上の個体を使用した方が良いという結果が得られたため、本実験では卵径が900 $\mu$ m以上の個体を選別して使用した。

Table 3. Details of cultured tiger puffer used in the study on different doses of LHRHa implanted with cholesterol pellet in 1996

Fish No.	Total length (mm)	Body weight (kg)	oocyte diameter ( $\mu$ m)	Dose of LHRHa ( $\mu$ g/kg)
A-1	441	2.24	1,076	400
A-2	445	2.06	1,043	400
A-3	461	2.02	1,016	400
A-4	490	2.38	1,007	400
A-5	473	2.30	991	400
A-6	455	1.87	990	400
A-7	456	2.28	984	400
A-8	448	1.99	974	400
A-9	477	2.68	973	400
B-1	480	2.11	1,066	200
B-2	480	2.27	1,021	200
B-3	477	1.97	1,013	200
B-4	480	2.31	992	200
B-5	487	2.41	991	200
B-6	430	1.97	988	200
B-7	458	2.21	979	200
B-8	480	2.14	974	200
B-9	470	1.89	970	200

LHRHa は、A群9個体に対してLHRHa 400 $\mu$ g/kgを、またB群9個体に対してLHRHa 200 $\mu$ g/kgをコレステロールペレットにより投与した。排卵確認のため、LHRHa コレステロールペレット投与後3日目から1日2回(9:00, 16:00)腹部の触診を行い、排卵が確認された場合、媒精適期を逃さぬよう(第2節2–4参照)直ちに人工授精を行った。

媒精用の精液は、養成3歳魚雄個体10尾（平均体重2.13kg）に対して、予めHCG・SP投与を1回行い、排精を誘導しておいた個体のうち、雌の排卵時に最も活発に排精する個体を選んで使用した。採卵ができた個体については、卵径、採卵量、受精率、GSI、ふ化率を調査した。

## 2) 結果

排卵までの時間 LHRHa 400および200 $\mu$ g/kg投与後の排卵個体の出現状況を Fig. 13 に示した。

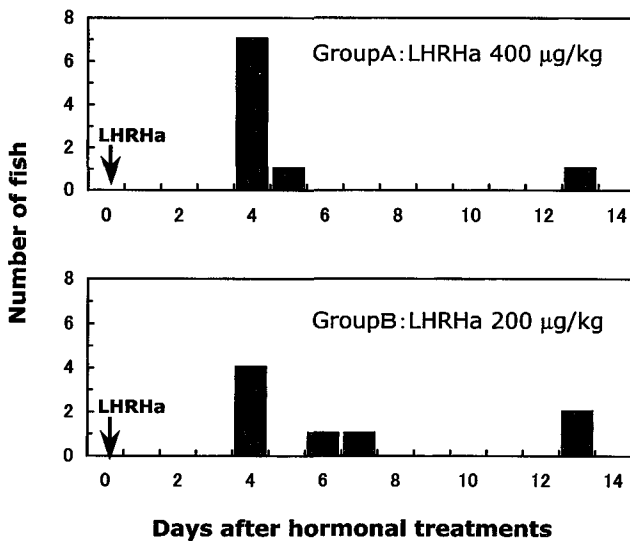


Fig. 13. Ovulation success in cultured tiger puffer after implantation of cholesterol pellet with two different doses of LHRHa in 1996.

LHRHa を400 $\mu$ g/kg投与した個体（以下A群）では、投与後4-5日目に1個体を除く8尾で排卵が認められた。特に、LHRHa 投与後4日目に7個体の排卵が集中していた。LHRHa を200 $\mu$ g/kg投与した個体（以下B群）では、投与後4日目から排卵がみられ、4日目に4個体、6、7日目にそれぞれ1個体、そして13日目に2個体が排卵した。

採卵結果 Table 4 に採卵結果を示した。A群では、9個体全てから受精卵が得られ、受精率は、57.7-100%（平均85.9%）であった。また、受精卵の卵径は1,249-1,328 $\mu$ m（平均1,281 $\mu$ m）で、採卵量

Table 4. Effects of two different doses of LHRHa implanted with cholesterol pellet on ovarian maturation, ovulation, and fertilization in 1996

Fish No.	Egg diameter ( $\mu$ m)	Weight of obtained eggs (g)	Fertilization rate (%)	GSI (%)	Hatching rate (%)
A-1 <sup>*1</sup>	1,305	715	95.3	33.8	84.9
A-2	1,249	540	57.7	28.3	42.9
A-3	1,328	530	76.0	29.6	58.3
A-4	1,295	655	96.6	29.8	86.1
A-5	1,251	375	98.2	24.0	62.4
A-6	1,307	515	85.5	31.2	78.0
A-7	1,283	720	100.0	33.7	86.7
A-8	1,263	440	63.5	25.4	53.7
A-9	1,251	860	100.0	33.9	87.2
B-1 <sup>*2</sup>	1,258	515	93.2	26.8	71.7
B-2	-	-	-	-	-
B-3	1,268	520	100.0	27.5	87.5
B-4	1,309	510	90.4	33.2	69.1
B-5	1,276	675	77.0	30.7	60.5
B-6	1,308	435	61.3	26.2	49.0
B-7	1,334	650	94.3	30.8	80.5
B-8	1,223	290	94.4	17.7	80.1
B-9	1,229	510	94.0	28.7	55.1

<sup>\*1</sup> Group A : Dose of LHRHa implanted with cholesterol pellet is 400  $\mu$ g/kg BW.

<sup>\*2</sup> Group B : Dose of LHRHa implanted with cholesterol pellet is 200  $\mu$ g/kg BW.

は375-860g（平均594g）と良好な結果が得られた。B群では、9個体中8個体から受精卵が得られ、受精率は61.3-100%（平均88.1%）であった。また、受精卵の卵径は1,223-1,334 $\mu$ m（平均1,276 $\mu$ m）で、採卵量は290-675g（平均513g）とここでも良好な結果が得られた。

## 3) 考察

A (LHRHa 400 $\mu$ g/kg), B (LHRHa 200 $\mu$ g/kg) 両群で、採卵量、受精率およびふ化率を比較した場合、明確な差は認められず、いずれの群からも良質受精卵を大量に得ることができた (Table 4)。しかし、LHRHa コレステロールペレット投与後の排卵個体の出現状況をみると、A群では9尾中7尾が投与後4日目に排卵しており、個体間での排卵の同調性が認められた (Fig. 13)。種苗の量産を行う場合、大量の受精卵を短期間に集中的に得ることが必要不可欠となることから、複数個体の成熟を同調させ、排卵を短期間に集中させるには、コレステロールペレットによる LHRHa の投与量は400 $\mu$ g/kgの方が良いと考えられた。また、本実験では第2節2-4の

結果に基づき、排卵の確認と媒精タイミングを考慮した人工授精を行った。A、B群における受精率が良好な理由として、この人工授精の際の媒精適期に留意したことも一因と考えられた。

また、今回の実験結果から、LHRHa コレステロールペレット (LHRHa 400, 200 $\mu$ g/kg) を卵巢卵径が900 $\mu$ m以上の個体に投与すると、18個体中17個体で排卵が認められ、HCG等による排卵誘導を行わなくてもよいことが示された。これは、卵黄形成が完了していれば、LHRHa投与のみで卵の最終成熟および排卵を誘導できることを示している。これまでは個体間での成熟を同調させるためにHCG・SP投与を行ったが、今後は卵黄形成が終了した親魚を選別することによりLHRHa投与のみで、個体間での同調した成熟と排卵の誘導が可能となると考えられる。

#### 2-4. 人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係

これまで、トラフグの種苗生産用受精卵は、排卵された成熟卵を持つ天然親魚から搾出するか、まだ成熟卵を持たない天然親魚に胎盤性生殖腺刺激ホルモン (HCG) を投与して成熟、排卵を誘起することにより得ていた (宮木ら, 1992)。しかし、近年のトラフグ天然魚の漁獲量の減少により、種苗生産用受精卵の確保が困難となり、養成親魚からの採卵技術の開発が急務となっていた。

我々は、平成5年度より養成親魚からの採卵技術の開発に着手し、合成生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (LHRHa) を含むコレステロールペレットを投与することにより、養成親魚から成熟卵をほぼ確実に得る方法を開発した (松山ら, 1997; 中田ら, 1997)。しかし、我々が行った養成トラフグ親魚を用いた2種類の実験から得られた平均受精率の結果は、

それぞれ55.1% (n=8) および53.6% (n=10) で、範囲は0-91.0%ときわめてばらつきが大きく (中田ら, 1997)、安定して高い受精率の卵を得るという点においてまだ問題が残った。

人工授精における受精率やふ化率を左右する要因の一つに、成熟卵の卵質のみでなく、媒精時に使用される精子の質が挙げられる。すなわち、人工授精において最大の効率を得るためには、媒精時に最もよく運動する精子を選択して使用する必要があると考えられる。我々は、HCGとシロザケ脳下垂体 (SP) の混合物 (以下、HCG・SPと略記) を、精巣が十分発達した雄親魚に1回投与することにより、排精が2日目までに始まること、1個体から長期にわたり、安定した運動能を示す精子が得られること、および、1個体から数時間間隔で連続的に採精しても、得られた精子の運動能は安定していること、などを明らかにした (中田ら, 1999: 第3節3-1)。このように、人工授精に使用する精子の確保は容易にでき、我々がこれまで人工授精に用いた精子の運動能は良好で、受精率のばらつきは精子の質に依るものではないと思われた。

一方、人工授精により得られた受精卵の受精率が、排卵されてからの経過時間 (卵巢腔内滞留時間) と密接な関係のあることが数種の魚種で知られている (Hirose *et al.*, 1979; Norberg *et al.*, 1991; Koya *et al.*, 1994; Linhart *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 1996)。また、ニジマス (野村ら, 1974a, 1974b) やコイ (鈴木, 1975) では、排卵された卵がそのまま卵巢腔に滞留すると、卵は過熟現象を起こし、受精率が低下することが確認されている。このことから、トラフグの人工授精における受精率のばらつき (中田ら, 1997) の要因として、排卵された成熟卵の媒精適期を逃している可能性が考えられた。

本研究では、トラフグ養成親魚を用いた人工授精

時の受精率の向上を目的として、LHRHa コレステロールペレット投与により成熟、排卵を促した雌親魚と、HCG・SP 投与により排精を促進した雄親魚を用いて、排卵後の経過時間と受精率との関係を調べ、人工授精を行う際の媒精適期の検討を行った。

### 1) 材料と方法

**親魚** 親魚には、養殖業者より購入した養殖トラフグ（3歳）を半年および1年間陸上水槽で飼育した養成親魚（3および4歳魚）を用いた。非産卵期の飼育は、長崎県水産試験場増養殖研究所の30 t 屋外円形水槽で行い、産卵期直前の1996年1月9日から3月の実験開始までは室内20 t 角型水槽で管理した。室内での親魚養成期間中、長日処理（14L10D）を行い、併せて水温を0.5℃/日の割合で上げ、17℃に維持した。餌料は、サバ・オキアミ・イカ・配合飼料（トラフグモイスト、日清製粉）を1:1:1:3の割合で調整したモイストペレットを週3回、サバ・イカの切り身を週2回それぞれ飽食量給餌した。

**ホルモン投与 雌**：試験開始直前にタイゴン製カニューレ（内径2 mm）で卵細胞を採取し、卵径測定を行った。その結果、卵径800 $\mu$ m以上の卵黄形成終了前後の個体10尾を供試魚として使用した。卵巢卵の成熟および排卵促進にはLHRHa コレステロールペレットを使用した。LHRHa は、des-Gly<sup>10</sup>[D-Ala<sup>6</sup>]-LHRH ethylamide (Sigma) を用い、ペレット1個につきLHRHa を200 $\mu$ g含む直径2 mm、長さ6 mmの円柱状のものを作製した。LHRHa コレステロールペレットの作製法および投与法は既報（中田ら、1997）に準拠した。

これまで行った成熟、排卵促進試験ではLHRHa の投与量が400 $\mu$ g/kgであったので（松山ら、1997；中田ら、1997）、今回は400 $\mu$ g/kg（6尾）および200 $\mu$ g/kg（4尾）の2段階を設け、異なる投与量の成熟促進に対する効果を比較した。LHRHa 200

$\mu$ g/kgを投与した4尾のうち3尾は、ペレット投与10日後になっても排卵しなかったため、HCG（500IU/kg、帝国臓器）とシロザケ乾燥脳下垂体（SP）の生理的食塩水による磨砕物（7 mg/kg）の混合物（HCG・SP）を背筋部に注射し、排卵を誘導した。Table 5 に供試魚の全長、体重、卵径、ホルモン投与量、および投与日を示した。供試魚10尾の平均全長、体重はそれぞれ455mmおよび2.10kgで、LHRHa コレステロールペレット投与直前の卵巢卵の卵径は821-986 $\mu$ mであった。

Table 5. Fish data used in the present study

Fish No.	Total length (mm)	Body weight (kg)	Oocyte diameter* ( $\mu$ m)	Dose of LHRHa ( $\mu$ g/kg)	Date of pellet implantation (1995)
1	480	2.52	957	400	12 March
2	461	2.31	950	400	12 -
3	470	2.19	944	400	12 -
4	441	1.93	943	400	12 -
5	456	2.02	936	400	6 -
6	467	2.23	891	400	6 -
7	435	2.07	986	200	19 -
8	443	1.95	918	200	19 -
9	450	1.88	830	200	19 -
10	448	1.94	821	200	19 -

\*Oocyte diameter at the time of pellet implantation.

**雄**：3月6日、3月12日および4月2日に、腹部を圧迫しても排精しない雄親魚5尾ずつを選び（計15尾、平均2.14kg）、HCG・SP を背筋部に注射した（HCG, 500IU/kg ; SP, 7 mg/kg）。ホルモン投与の翌日から毎日1回、10:00に腹部を軽く圧迫し排精の有無を調べた結果、全個体でホルモン投与後2日目までに排精が認められた。

**排卵の確認** LHRHa コレステロールペレット投与後2日目から1日2回、9:00と16:00に親魚の腹部の触診を行い、また定期的なカニューレション（LHRHa コレステロールペレット投与後4, 10, 14, 17日目）により、卵径が1,000 $\mu$ mを越えている個体については、その後4時間毎に腹部の膨張と硬化の確認を行った。腹部の膨張と硬化が確認された個体

では、さらに4時間毎に腹部の触診を行い、排卵を確認した。排卵は、腹部が膨張および硬化した後、腹部は膨張したまま再び柔らかくなることにより確認された。このような個体を水中から取り出し、腹部を軽くマッサージすると排卵された卵が生殖口から流出する。また別途、腹部の膨張および硬化が起こった1尾の個体(1.84kg)を即殺、卵巣を摘出し、卵巣組織をブアン液で固定した後、メタクリレート樹脂による組織切片を作製して顕微鏡観察した。

**媒精実験** 排卵が認められた場合、同一個体から排卵後、0, 2, 4, 8時間、以下4時間毎にそれぞれ卵を1,000粒程度搾出し、乾導法により人工授精を行った。媒精実験は卵の受精率が0%となるまで続けた。人工授精に使った精液は、HCG・SP投与により排精を促した雄個体のうち、各雌の排卵時に最も排精が活発な個体から媒精の度に採取した。また、雌1個体に対する連続的な媒精には、同一雄個体のものを使用した。したがって、雌10個体に対して使用した雄も10個体である。媒精した卵は洗卵を行い、30個の卵径を万能投影機により測定した後、受精率を調べるために1,000ml容器に収容し、17℃に設定したインキュベーター内で培養した。受精率は、受精4時間後、17℃で卵発生が2-4分割になる時期に100粒を検鏡し、その中の卵割開始個数の割合から算出した。

## 2) 結果

**成熟と排卵** 腹部が膨張および硬化した個体の卵巣卵は、卵成熟が完了して完全に透明化した吸水卵(hydrated eggs)であった。各個体におけるホルモン投与後の腹部の硬化(成熟完了=吸水, hydration)および排卵(ovulation)の状況をFig. 14に示した。

LHRHaを400 $\mu$ g/kg投与された個体6尾中5尾(Fig. 14, Fish 1-5)のペレット投与時の卵径は936-

957 $\mu$ mで、これらは全てペレット投与後5日目(96-120時間)に腹部の硬化が観察された。これらの個体の排卵は腹部の硬化(成熟完了)後、12-36時間以内に観察された。卵径891 $\mu$ mの個体(Fish 6)における腹部の硬化は6日目に起こり、排卵は腹部が硬化して24時間後に認められた。

LHRHaを200 $\mu$ g/kg投与された個体4尾中1尾(Fish 7)はペレット投与時の卵径が986 $\mu$ mと大きく、ペレット投与後5日目に腹部の硬化が観察され、排卵はその24時間後に起こった。残り3尾はペレット投与時の卵径も小さく(821-918 $\mu$ m)、ペレット投与後10日経過しても腹部の硬化が認められなかったため、12日(Fish 8)または14日目(Fish 9, 10)にHCG・SPを投与した。その結果2尾(Fish 8, 9)でHCG・SP投与後3日目(48-72時間)に腹部の硬化が認められ、ペレット投与時の卵径が最も小さかったFish 10の腹部の硬化はHCG・SPを投与して4日後(96時間)に起こった。これら3尾の排卵は、腹部が硬化して12-16時間後に認められた。

**受精率の変化** Fish 1-10の個体別にモニターした排卵後経過時間と受精率の関係をFig. 15に示した。本実験では、排卵確認を4時間間隔で行っているため、実際の排卵とその確認とは最長で4時間近くの開きが生じる可能性がある。排卵から4時間後の受精率の低下率(Fish 5, 8を除く)が個体間でまちまちなのは、このことが影響していると考えられた。また、Fig. 16に10個体の平均受精率の変化を示した。受精率は、排卵後4時間までが高く、排卵後0, 2, および4時間の10尾の平均受精率はそれぞれ74.9, 71.8および64.9%であった。排卵後8時間で受精率は減少を始め(平均受精率57.3%)、排卵後24時間で6尾で、32時間までに全個体で受精率は0%となった。排卵後経過時間(Y)と平均受精率(X)は

$$Y=0.004X^3-0.150X^2-1.338X+74.545$$



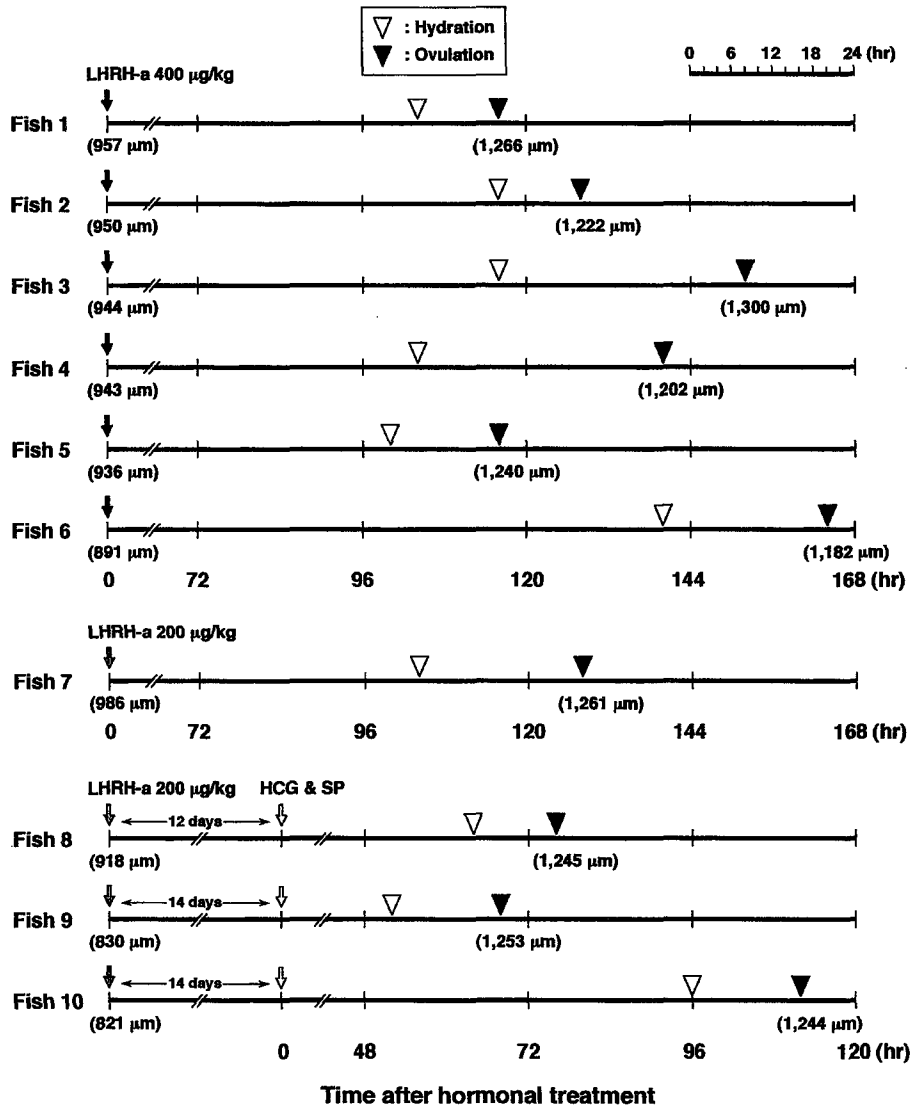


Fig. 14. Hydration and ovulation times of ten different tiger puffers after hormonal treatments. Numerals in the parentheses indicate egg diameters at the time of LHRHa cholesterol pellet implantation and ovulation. HCG & SP means single injection with HCG (500 IU/kg) and chum salmon pituitary homogenate (7 mg/kg) combined.

の3次式 (ただし  $0 \leq Y \leq 32$ ) で表され (Fig. 17), 極めて高い相関 ( $r=0.999$ ,  $p<0.001$ ) を示した。

### 3) 考 察

本研究により, トラフグ人工授精卵の受精率は, 卵が排卵されてからの経過時間, 即ち, 卵巣腔内滞留時間に依存していることが明らかとなった。排卵後4時間以内に媒精を行えば, 平均70.5%以上の高い受精率を示すが, その後受精率は急速に低下し,

排卵後24時間を経過するとほとんどの個体からの搾出卵は受精しないことが判明した。したがって, これまで天然, 養成親魚に限らずトラフグの人工授精において, 良質卵が安定して得られなかった主要な要因の一つに媒精適期を逃していたことが考えられる。いくつかの魚種でも排卵後の時間経過とともに受精率が低下することがこれまで知られている (Hirose *et al.*, 1979; Norberg *et al.*, 1991; Koya *et al.*, 1994; Linhart *et al.*, 1995; Ohta *et al.*,

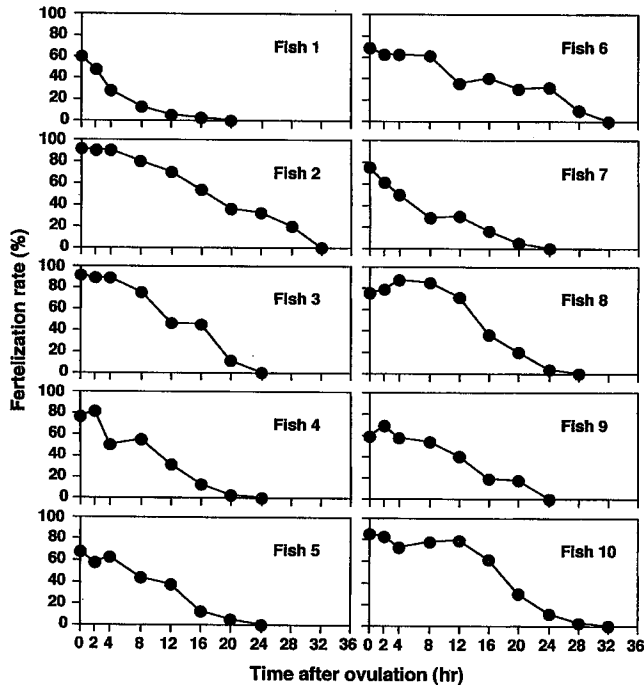


Fig. 15. Changes of fertilization rates with post-ovulation time in artificially inseminated tiger puffer. Eggs of all females were inseminated separately with milt continuously collected from their respective males.

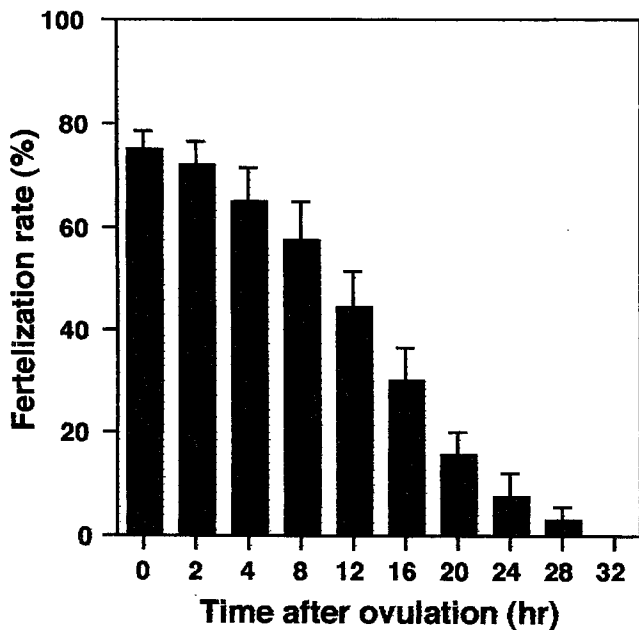


Fig. 16. Changes of fertilization rates and post-ovulation time in artificially inseminated tiger puffer eggs. Columns and vertical lines indicate the mean and SEM of ten different fish, respectively.

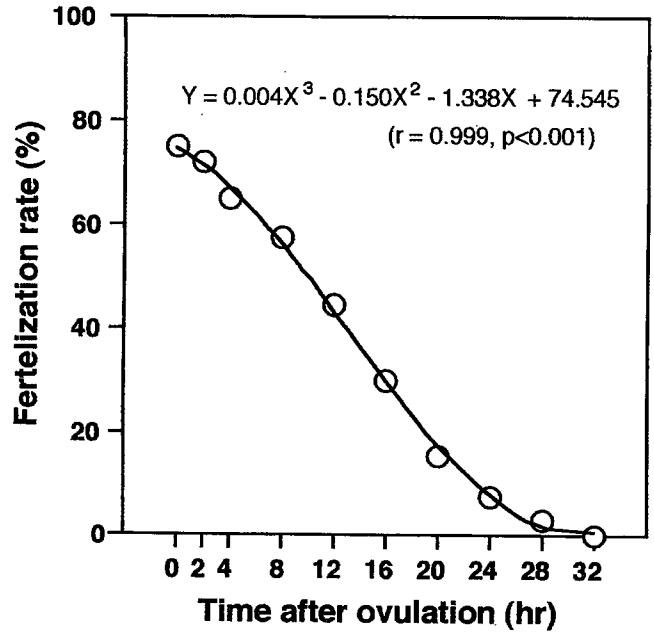


Fig. 17. Relationship between fertilization rates and post-ovulation time in artificially inseminated tiger puffer eggs.

1996)。しかし、受精率低下の組織学的、生理学的機構は全く知られていない。ごく最近、魚類の受精現象において、卵門における精子レセプターとしての、糖類（N-アセチルグルコサミン）を非還元末端に持つ糖タンパク質の存在が知られるようになってきた（島・伊東，1995）。排卵後の卵巣腔内滞留時における卵側の精子レセプターの挙動の解析が受精率低下機構解明の糸口となる可能性があり、今後検討すべき興味ある課題である。

前報（中田ら，1997）で受精率はふ化率と高い相関を示すことが報告されており、排卵後4時間以内に媒精を行った卵では、高いふ化率が期待できる。したがって、事業としてトラフグの人工授精を行う場合、いかに排卵時刻を確認するかが受精率を左右する決め手となる。一般に排卵を確認する場合、親魚を水槽外に取り出し、腹部を軽くマッサージし、体外に搾出される成熟卵の確認をもって排卵したとみなす。排卵を確認するため、この作業を連続的に繰り返す。

返すことは、親魚にとっては斃死につながる過度のストレスとなり、また、複数の親魚を取り扱う作業者には多大の労力となる。本研究において、トラフグでは成熟が完了すると、腹部の膨張と硬化が起こり、その後排卵が起こると腹部は膨張したまま柔らかくなることが確認された。このような現象は他の魚種においても一般的に認められると考えられるが、養殖対象魚の中でもトラフグのように、取り扱いやすい上、鱗が無く、かつ腹部の筋肉が薄いため直接卵巣の状態を触診で測ることのできる魚種では、触診による腹部の硬化の確認は、排卵予測に極めて有効かつ簡便な手法である。コレステロールペレット投与時の卵径やLHRHa量により各個体の成熟、排卵に要する時間は様々であったが、いずれの手法を施された個体でも、排卵は成熟の完了（腹部の硬化）が始まってから12-36時間（半日-1日半）以内に起こることが明らかとなった。腹部の硬化は、卵径930 $\mu$ m以上（936-957 $\mu$ m）の親魚にLHRHaを400 $\mu$ g/kg投与した場合、5日目（96-120時間）に集中して起こっているため、これらの数値が腹部の硬化確認の指標となろう。

投与LHRHa量は、LHRHa 400 $\mu$ g/kgおよびLHRHa 200 $\mu$ g/kgの2実験区を設け、その結果を比較した。今回ペレット投与時の卵径が両区で不揃いだったため投与量の効果の厳密な比較はできなかったが、LHRHa 400 $\mu$ g/kgのコレステロールペレットを卵径930 $\mu$ m以上の卵を持つ個体に投与した場合、排卵まで誘導され、排卵は投与後5、6日目に集中して起こっていたため、多くの個体の成熟を同調させ、排卵を短期間に集中させるホルモン量としてはLHRHa 400 $\mu$ g/kgが効果的であると考えられる。LHRHa コレステロールペレットの1回投与は卵黄形成促進効果も認められるので、比較的卵径の小さな親魚にはペレットを投与した後、HCG・SPで排卵を同調させ採卵する手法を前報（中田ら、1997）で

報告した。しかし、卵黄形成が終了し卵径が十分に増大した親魚へのコレステロールペレットの1回投与は、個体間の排卵同調に十分有効であることが確認できたので、今後、採卵事業を行う場合、それぞれの施設の目的に応じてホルモン投与法を使い分ける必要があると考えられる。例えば、早期採卵や卵径が900 $\mu$ mに達しない個体からの採卵を目的とするならば、コレステロールペレットを投与して卵黄形成を促進した後、HCG・SPで排卵を同調させる手法が有効であろう。いずれにしても、排卵時刻を確認することが良い採卵成績に直結することは言うまでもない。

我々の一連の研究（松山ら、1997；中田ら、1997、1998a）および本研究により、養成トラフグから良質卵を効率よく採卵する技法はほぼ確立されたと考えられる。今回の研究結果を含めたこれまでの成果に基づき、卵径が1mm前後に発達した個体9尾（平均体重2.17kg）にコレステロールペレット（LHRHa 400 $\mu$ g/kg）を1回投与したところ、排卵は9尾中7尾で投与後4日目に集中して起こり、排卵4時間以内に人工授精を行ったが、その平均受精率は88.1%であった。したがって、我々の開発した方法の有効性と再現性が確認されたと考えられる。以上の採卵技術は長崎県内の種苗生産業者において実際に利用され、成果を上げつつある。今後、さらに改良を加え、安定したトラフグ種苗生産技術の簡略化、マニュアル化を進め、技術の普及と生産コストの低減化を図っていきたい。

### 第3節 雄親魚の成熟誘導

#### 3-1. ホルモン投与により排精された精子の運動能

我々は平成5年度よりトラフグ養成親魚からの採卵技術の開発に着手し、合成生殖腺刺激ホルモン放

出ホルモン (LHRHa) を含むコレステロールペレットを投与することにより、養成親魚から成熟卵をほぼ確実に得る方法を開発した (松山ら, 1997; 中田ら, 1997)。しかし、その受精率は0-91.0%ときわめて幅が大きく、平均受精率も50%台であった (中田ら, 1997)。一般に人工授精により得られた受精卵の受精率は、排卵されてからの経過時間と密接な関係があることが数種の魚種で知られており (Hirose *et al.*, 1979; Norberg *et al.*, 1991; Koya *et al.*, 1994)、我々がトラフグで行った人工授精でも排卵された成熟卵の媒精適期を逃している可能性が考えられた。さらに、受精率は卵質のみでなく、精子の質にも依存すると考えられ、良質の成熟卵が得られ、媒精適期が適切であっても、媒精する精子の質により受精率は大きく左右されることが推察される。

飼育下の雄親魚は、雌と異なりホルモン剤の投与を行わなくても成熟し、排精にいたる。しかし、雌から採卵して人工授精を行う場合、媒精時に最もよく運動する一定量の精子が必要となり、雄においても雌の採卵時期に同調させた採精技術の開発が望まれる。

排精していない雄親魚に、哺乳類の胎盤性生殖腺刺激ホルモン (HCG) とシロザケ脳下垂体 (SP) の混合物 (以下HCG・SPと略記) を1回投与することにより排精は容易に誘導される (中田ら, 1997)。この方法により HCG・SP 投与後数日以内に、雄親魚より大量の精子を得ることができる。しかし、養殖事業の現場では、親魚購入の予算や飼育設備の容量などの点から、雌親魚の比率が雄の親魚数に比べて極めて高いのが一般的である。すなわち、雄の数に制限があり、少数の雄から繰り返し、採精せざるを得ない場合が多い。したがって、希望する時に、限られた数の雄から、媒精に必要な十分量の活性の高い精子を得る技術の開発が必要となってくる。本研究では、HCG・SP 投与を行い、排精を誘導した雄

親魚から搾出した精子の運動能を検討するに当たり、雌親魚の数に比べ雄親魚が少なく、少数の雄親魚から繰り返し採精する場合を想定した。すなわち、HCG・SP で排精を誘導した雄親魚から、長期間 (30日) にわたり毎日採精を繰り返す実験 (実験1) と、1日の間に2-4時間間隔で繰り返し採精する実験 (実験2) を組み、1尾の雄親魚が人工授精用の採精に使用できる期間、および採精のハンドリングに伴うストレスが精子の運動能に及ぼす影響を推定した。

### 1) 材料と方法

養殖業者より購入した養殖トラフグ3歳魚を、長崎県水産試験場増養殖研究所の30 t 屋外円形水槽で半年間陸上飼育し、1-3月は室内20 t 角形水槽に収容し、室内での親魚養成期間中、長日条件 (14L10D)、水温17℃で飼育した。餌料はサバ・オキアミ・イカ・配合飼料 (トラフグモイスト、日清製粉) を1:1:1:3の割合で調整したモイストペレットを週3回、サバ・イカの切り身を週2回それぞれ飽食量給餌した。

実験1 (長期実験): 産卵期の3月に、腹部を圧迫しても排精しない雄親魚5尾 (平均2.10kg) にHCG・SPを背筋部に注射した (HCG 500IU/kg, SP 7 mg/kg)。ホルモン投与の翌日から毎日1回、10:00時に腹部を軽く圧迫し排精の有無を調べた。排精が確認された個体については、毎日10:00時に精液を1ml採取し、精子の運動時間およびスパマトクリット値 (精液に占める精子の割合) を30日間にわたり調べた。運動時間については、17℃のろ過海水2mlを入れたスピッツ管 (10ml) の乾いた内壁に精液を5 $\mu$ l付け、試験管ミキサーにより海水と精液を攪拌してから、顕微鏡 (100倍率) の一定視野内における全ての精子の運動が停止するまでの時間を測定した。スパマトクリット値は、ヘマトクリット管に採った精液を12,000rpmで5分間遠心した後、測定した。

実験2 (短期実験)：腹部を圧迫しても排精しない雄親魚10尾 (平均2.22kg) にHCG・SPを背筋部に注射した。排精を確認した数日後、最初の精液採取時から2, 4, 8, 12, 16, 20および24時間後に各個体からそれぞれ精液を1mlずつ採取し、精子の運動時間およびスパマトクリット値を調べた。

## 2) 結果

雄5尾の、HCG・SP投与から30日間のスパマトクリット値および精子運動時間の変化を Fig. 18 および Fig. 19 に示した (実験1)。4尾がHCG・SP投与の翌日から排精しており、2日後には残りの1尾も排精を始めた。各個体とも排精直後のスパマトクリット値は比較的高かったが (62-81%)、続く約10日間は低い値を示す (30-59%) 粘度の低い精液が得られ、その後徐々に増加し、23日目には全個体が80%を越え、粘度の高い精液となった (Fig. 18)。一方、精子運動時間が経過日数およびスパマトクリット値に関係なく、30日間にわたり60秒前後で安定していた (Fig. 19)。

次に、排精している雄10尾から24時間以内に短期的に連続採精した結果を Fig. 20 および Fig. 21 に示した (実験2)。実験期間中のスパマトクリット値は29-83%と個体間で大きな幅が認められたが、同一

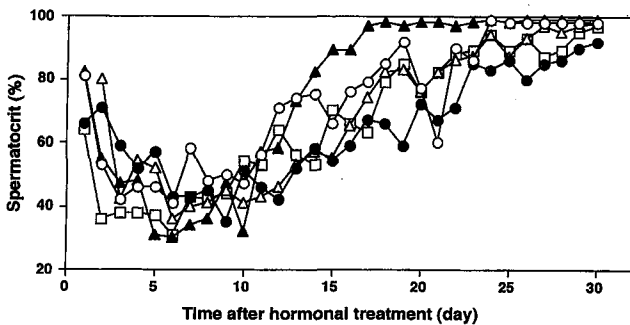


Fig. 18. Changes of spermatocrit in milt collected daily from five different tiger puffer male. Spermiation was induced by single injection with HCG (500IU/kg) and chum salmon pituitary (7mg/kg) combinedly. Spermatocrit(%)=(spermatozoan volume/milt volume)×100.

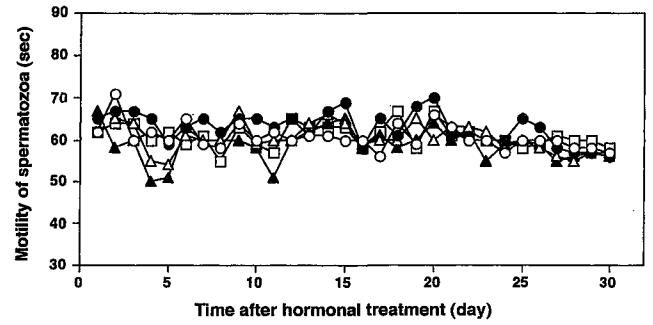


Fig. 19. Changes of spermatozoan motility in milt collected daily from five different tiger puffer male. Same fish samples and symbols used in Fig. 1 are also used here. Motility of spermatozoa is represented by the time until all spermatozoa cease their forward movement.

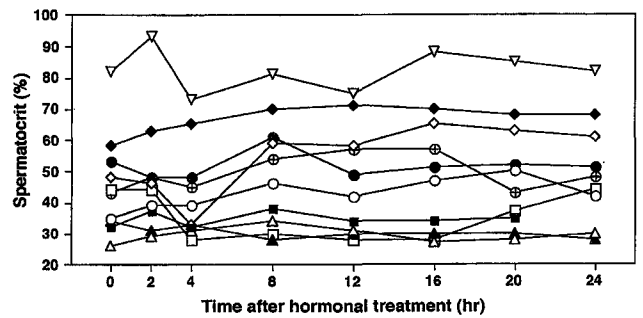


Fig. 20. Changes of spermatocrit in milt collected successively from spermiated 10 males at short time intervals; 2, 4, 8, 12, 16, 20, and 24 hours after first sampling (0 hour). Spermiation was induced by single injection with HCG (500IU/kg) and chum salmon pituitary (7mg/kg) combinedly.

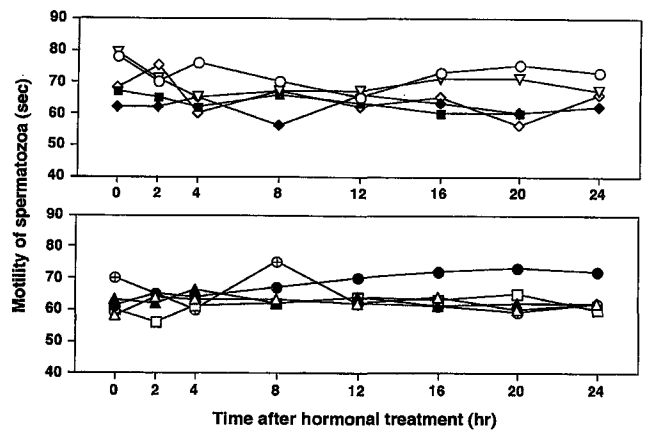


Fig. 21. Changes of spermatozoan motility in milt collected successively from spermiated 10 males at short time intervals; 2, 4, 8, 12, 16, 20, and 24 hours after first sampling (0 hour). Same fish samples and symbols used in Fig. 3 are also used here.

個体内では安定していた (Fig. 20)。また、運動時間はいずれの個体でも60-80秒で安定していた (Fig. 21)。

### 3) 考 察

本研究により、トラフグの雄親魚に HCG・SP を1回投与することで、投与後2日までに排精を誘導することができ、また、精子の運動性は30日にわたり安定していることが明らかとなった。さらに、短期的に精液を採取するという魚体にとっては大きなストレスの条件下でも、精子の運動性は安定していた。

排精時になるとスパマトクリット値が低下し (精液の液成分である精漿の占める比率が増加し)、それに伴って精子の運動能が上昇することがいくつかの魚種で知られている (Morisawa and Morisawa, 1988; Miura *et al.*, 1991; 太田, 1996)。例えば、HCG の反復投与により精子を得ているウナギでは、毎週1回 HCG を投与した場合、毎週 HCG の注射直後に運動能 (この場合、精子運動比) の上昇が起こり3日目までには低下した (太田, 1996)。さらにスパマトクリット値と精子の運動能は対応し、精子運動能の上昇と同期的にスパマトクリット値は低下した (太田, 1996)。この運動能の変化は HCG の体内濃度の増減に伴う精漿の pH の変化と、Kイオンを主としたイオン組成の変化により引き起こされることが示唆されている。また、サケ科魚では、精子の運動能の獲得は精漿の pH 値の上昇とそれに伴う精子内 c-AMP 濃度の増加により引き起こされることが知られている (Morisawa and Morisawa, 1988; Miura *et al.*, 1991)。本研究の長期実験 (実験1) においても、HCG 投与直後から約10日間、スパマトクリットの低下が認められ、その後上昇していった。しかし、スパマトクリットと、運動時間を指標とした精子運動能との間には何ら相関は認め

られず、精子の運動能は安定していた。

さらに、様々なスパマトクリット値を持つ個体からの短期的な連続採精実験 (実験2) においても、精子運動能はスパマトクリット値と関係なく安定した値を示していた。したがってトラフグでは、スパマトクリット値と精子の運動能とは一見無関係のように考えられる。マツカワ *Verasper moseri* でも、同一雌から得た成熟卵を使って、異なるスパマトクリットを示す (73.8-100%) 10尾の雄から得た精液の運動能を比較した結果、いずれも高い受精率を示し、スパマトクリット値と受精率の間には相関は認められなかった (Koya *et al.*, 1994)。したがって、精子の運動能とスパマトクリット値の相関性は魚種により異なると考えられる。しかし、ウナギやサケ科魚の例からも推定されるように、輸精管内の精子の液性環境である精漿の成分変化が精子の運動能獲得に作用していることは十分考えられ、トラフグにおける HCG・SP 投与後10日間程継続するスパマトクリット値の低下 (精漿の増加) が、精子の運動能にどのように影響しているかを今後詳細に調べる必要がある。今回精子の運動能の指標としたのは精子運動時間のみであり、運動速度や、精子の受精能と高い相関を示すことが知られている運動精子比 (Harvey and Kelly, 1984; Ohta *et al.*, 1995) は調べられていないので、運動速度、運動精子比に加え、受精能を比較し、精漿の成分変化との関係を明らかにする必要がある。

トラフグ雌はサケ、マス類と同じく、産卵期における排卵、産卵は1回のみで、卵巣卵の発達、成熟は同調する。このような種の雄では、雌の配偶子の発達に合わせ、精巣内の雄性生殖細胞は同調的に発達し、大量の精子が一度に産生される。排精が始まったトラフグ雄 (3年魚) の場合、腹部を圧迫し、精液を搾出すると、その量は一般に50ml以上ある (中田, 未発表資料)。したがって、今回 HCG・SP によ

り排精を促した同一雄親魚から反復して採精を行ったが、長期実験（実験1）および短期実験（実験2）のいずれにおいても、1回当たりの採精量は1mlであったので、どちらの実験においても、大量に産生され、精小葉内生殖腔や輸精管に貯蔵されている精液を繰り返し採取したものと考えられる。すなわち、トラフグ精巢では、大量の精子が同時期に生産、貯蔵され、これら貯蔵精子は1ヶ月もの長期にわたり運動性が低下せず、さらに数時間間隔で雄親魚から採精を繰り返しても、ハンドリングに伴う親魚のストレスによる精子の運動能の活性低下は認められないことが明らかとなった。このようなトラフグの精子の特性は、養成親魚から採卵し、計画的な人工授精を行う上で、極めて優れた利点を持つと言えよう。

我々は、養成雌親魚（3歳）から1kg前後の卵を採卵し、媒精する際、粘度の低い精液が多量に流出する雄2-3尾を選んで数mlずつ採取し、乾導法により媒精する。したがって、養殖事業として、我々が開発した手法（中田ら，1997）に基づき、たとえば3歳の養成雌親魚数十尾から2，3週間以内に何回かに分け、採卵を行う場合、人工授精用の雄親魚として10尾程度を準備し、初回の採卵直前にHCG・SPを1回投与するだけで、その時期に必要なとされる精子は十分供給されるものと考えられる。さらに、不定期に水揚げされる天然親魚を用いて現場で人工授精を行う際にも、排精状態の良好な雄が同時に捕獲されるとは限らないので、養成雄から容易に調整される精子の利用は効果的であろう。

#### 第4節 採卵マニュアルを用いた排卵誘導試験

##### 4-1. 採卵マニュアルの作成

これまで、トラフグの種苗生産用受精卵は、排卵された成熟卵を持つ天然親魚から搾出するか、まだ

成熟卵を持たない天然魚に哺乳類の生殖腺刺激ホルモン（HCG）などを投与することにより得られてきた（宮木ら，1992）。しかし、近年における漁獲量の減少に伴い天然親魚からの受精卵確保が困難となり、そのため養成親魚からの採卵技術の開発が急務となってきた。

筆者らは、1992年に宮木ら（1992）が行った天然魚に対する採卵実験にひきつづき、1993年に養成親魚からの採卵技術の開発研究に着手し、合成黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRHa）のコレステロールペレットを投与することにより、養成親魚から成熟卵を得る方法を開発した（松山ら，1997；中田ら，1993，1994，1995，1997，1998a，1998b）。

ここでは、親魚養成、LHRHa コレステロールペレットを用いた成熟誘導、人工授精時の排卵確認と媒精適期、媒精用精子等について、これまでの研究結果をとりまとめ、トラフグの種苗生産機関の方々から採卵方法の指針として利用できるように、マニュアルを作成した。本節では、既報採卵マニュアル（中田ら，1998c）に基づいて構成し、図表は前節までのものと重複するものは省いた。

#### I. 親魚養成について

##### ① 親魚用餌料と飼育管理

良質卵を得るためには、まず栄養状態の良い親魚を育成することが重要である。今回、使用した餌料と飼育の方法は以下の通りである。

餌料は、サバ：オキアミ：イカ：配合飼料を1：1：1：3の割合で調整したモイストペレットを週3回飽食量給餌し、加えて1月からは産卵期前の栄養状態が卵質を左右すると考えられたので、サバ・イカの切り身を併用給餌した。

1月からは、サバ・イカの切り身を週2回給餌した。このように、給餌管理を行えば、ホルモン処理を行う時期までに肥満度（ $(k = BW/SL^3) \times 10^3$ ）が

30以上の親魚を多数確保することができる。

親魚は周年陸上水槽で飼育することにより、十分な飼育管理が可能となる。飼育期間中は、1ヶ月に1回定期的な薬浴（過酸化水素500ppm, 30分）と水槽替えにより、白点虫症およびヘテロボツリウム症の予防を行う。また、年1回歯切りを行うと共に、飼育水槽中では一定方向の水流をつくり、トラフグ特有の噛み合いを軽減すると良い。

採卵用親魚として使用できたのは、雌は3歳魚から、雄は2歳魚からである。しかし、採卵量等を考慮すると雌は4歳魚以上（2.5kg以上）が望ましい。

## ② 加温および長日処理による成熟促進

1月初めから長日処理（14L10D）を施すと共に、飼育水温は徐々に昇温し（0.5℃/day）、17℃になってからはこの温度を採卵まで維持する。もっとも簡便な成熟促進方法（加温17℃一定、長日処理14L10D）により、親魚の生殖腺の発達を個体間で同調させ、2-3月までにホルモン投与が可能な卵巣卵を持つ個体を多数確保することができる。

## II. LHRHa コレステロールペレット投与による成熟誘導について

### ① 使用ホルモン剤と投与方法

親魚の成熟および排卵誘導用ホルモン剤として用いLHRHaは、des-Gly<sup>10</sup>[D-Ala<sup>6</sup>]-LHRH ethylamide (Sigma) である。投与方法はLHRHaを含むコレステロールペレットを作製し、トラフグの背筋部に内径3mmのステンレス製骨髓生検針を用いて埋め込む (Fig. 22)。LHRHa コレステロールペレットの作製は Lee *et al.* (1986) に準拠して、ペレット1個につきLHRHa 200μgを含む長さ6mm、直径2mmの円柱状のものを調整すると良い (Matsuyama *et al.*, 1995)。LHRHa コレステロールペレットは、ホルモンの放出持続効果があり、成熟促進だけでな



Fig. 22. Intramuscular implantation of LHRHa cholesterol pellet using a 3 mm troacher.

く、卵黄形成にも有効であるため (廣瀬ら, 1988 ; 松山ら, 1992), 卵黄形成が終了していない個体であっても1回の投与で成熟および排卵を誘導することができる (松山ら, 1997)。ただし、個体間の排卵をより同調させるためには、卵巣卵径1,000μmを目安にHCG (胎盤性生殖腺刺激ホルモン, 500IU/kg) とSP (シロザケ脳下垂体, 7mg/kg) の混合液 (HCG・SP) の注射により排卵誘導を行うと良い。

【実施上の留意点】LHRHa コレステロールペレットを投与する際には、親魚に与えるストレスを少なくするため、投与作業を短時間に行うことが望ましい。コレステロールペレットは親魚を2-フェノキシエタノール (約200ppm) で麻酔した後、骨髓生検針を用いて背筋中に埋め込むが、その際、メスで背筋部表皮に5mm程度の切れ込みを入れる。トラフグは表皮が厚いため生検針が入りにくく、事前に表皮



に切れ込みを入れることで埋め込み作業の時間が短縮され、親魚へのストレスを軽減することができる。

### ② LHRHa コレステロールペレット投与時の卵径

ホルモン投与を行う際、個体間のばらつきをなくし、効率よく再現性の高い採卵を実現させるためには、LHRHa コレステロールペレット投与時の卵巣卵径を把握しておくことが大切である。これまでの研究（中田ら，1997）から、卵径 $800\mu\text{m}$ 以上であれば採卵可能なことが分かっている。受精率等の比較では、卵径は、 $800\mu\text{m}$ でも $900\mu\text{m}$ でも大差はなく、どちらも良好な採卵結果が得られたが、排卵の同調性は $900\mu\text{m}$ の方が高かった。

養成3，4歳魚は、天然親魚に比べて小さく、1尾あたりの採卵量が少ないので、大量に種苗を生産する際には複数個体の排卵を同調させ、同日に採卵する必要がある。この点を考慮すると、LHRHa コレステロールペレット投与を行う親魚の選定にあたっては、 $900\mu\text{m}$ 以上の個体を使用することが望ましい。

【実施上の留意点】ホルモンの投与時期を決めるための卵径の把握は、タイゴン製チューブを卵巣内へ挿入するカニューレーション法により、容易にしかも安全に行うことができる（Fig. 23）。この方法により、卵巣卵径を指標とする親魚選別を行うことで、より効率的で再現性のある採卵が可能となる。



Fig. 23. Egg sampling by using a flexible catheter.

### ③ LHRHa の投与量

LHRHa の投与量については、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ と $400\mu\text{g}/\text{kg}$ で比較採卵試験を行った。その結果、両者ともLHRHa 投与後4日目から排卵個体が見られ、採卵成績は $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $400\mu\text{g}/\text{kg}$ で大差は認められず、両者とも良質の受精卵を得ることができた。しかし、 $400\mu\text{g}/\text{kg}$ の方がより短期間に集中して排卵が起こっており、短期間にまとまった量の受精卵を得る必要があることを考えると $400\mu\text{g}/\text{kg}$ の方が適当であろう。

### Ⅲ. 排卵確認と媒精適期について

受精率のばらつきをなくし、高い受精率の卵を得るためには、最適な卵搾出時期および媒精時期を把握しておくことが大切である。

人工授精による受精率は、排卵されてからの経過時間（卵巣腔内滞留時間）と密接に関係することが数種の魚種で知られており（Hirose, 1979; Norberg, 1991; Koya, 1994; Linhart, 1995）、ニジマス（Linhart, 1995; 野村, 1974a, 1974b）やコイ（鈴木, 1975）では、排卵された卵がそのまま卵巣腔に滞留すると、卵は過熟現象を起こすことが報告されている。従って、トラフグの人工授精においても、受精率のばらつきの要因として、排卵された成熟卵の媒精適期を逃している可能性が考えられる（中田ら, 1998b）。

実験は、卵径 $800\mu\text{m}$ 以上の親魚10個体を用い、LHRHa コレステロールペレットをLHRHa  $400\mu\text{g}/\text{kg}$ または $200\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量で埋め込んだ。排卵後の経過時間と受精率との関係を調べるため、媒精は排卵後0，2，4，8時間、以下4時間毎にそれぞれ卵を搾出し、人工授精を行った。Fig. 24 から明らかなように、受精率は排卵後4時間までが高く、排卵後8時間で減少を始め、排卵後24時間で6個体が、32時間では全個体が受精率0%となった。このことから、卵の受精能は排卵直後に最も高く、その

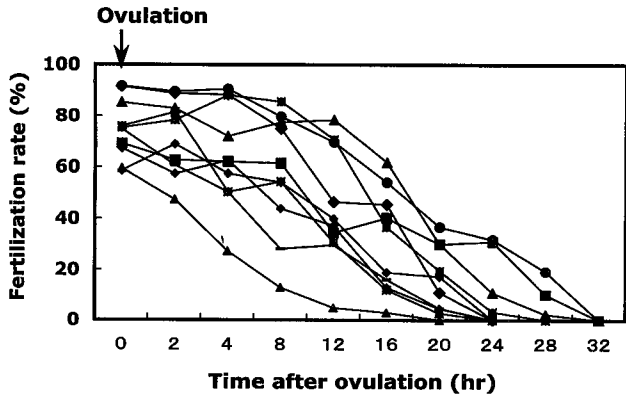


Fig. 24. Relationship between fertilization rate and post-ovulation time in artificially inseminated eggs of tiger puffer in 1996.

後時間の経過と共に低下し、32時間以上経過すると受精しないことが分かった。また、卵径の変化は Fig. 25 に示すとおり、排卵直後に最も大きく時間の経過と共に小さくなり、排卵された卵は卵巣内滞留時間が長くなるに従って卵径が小さくなり、卵膜も脆くなるといった過熟傾向が観察された。

これらのことから、卵の受精率は排卵されてからの経過時間、即ち、卵巣腔内滞留時間に影響されていることが明らかとなった。受精率は排卵後4時間以内に媒精を行えば平均70.5%以上の高い値を示すが、その後は急激に低下し、排卵後32時間の搾出卵は受精しなかった。したがって、これまで天然、養

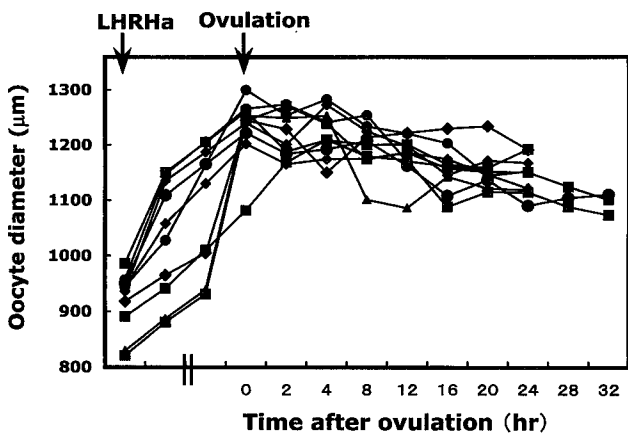


Fig. 25. Changes of oocyte diameter in different tiger puffer females after implantation of LHRHa cholesterol pellet (LHRHa 400 $\mu$ g/kg) in 1996.

成親魚を問わず人工授精において、良質卵が安定して得られなかった要因の一つに媒精適期を逃していた可能性が推察された。

【実施上の留意点】 以上のように、人工授精を行う際の媒精適期は排卵直後であり、安定して高受精率の卵を得るためには、排卵時期を個体毎に予測することが大切である。

本実験において、トラフグでは最終成熟が完了すると、腹部の硬化現象がみられ、その後腹部は膨張したまま柔らかくなり、排卵に至ることを確認している。今回、この腹部の硬化現象は、LHRHa コレステロールペレット投与後5、6日目に多くの個体で見られ、また、排卵は腹部の硬化から12-36時間後に起こった。トラフグは、鱗が無くかつ腹部の筋肉が薄いので直接卵巣の状態を触診で測ることができるので、触診による腹部の硬化の確認は、排卵予測（腹部の硬化から12-36時間経過後）に有効かつ簡便な方法であろう。

実際の腹部触診による成熟診断手法としては、次の4段階に分けられる。①卵黄形成後から最終成熟期までの期間（卵巣の形状は確認でき、まだ硬くない状態）、②最終成熟期（卵巣は卵の吸水により膨張し、腹部が硬化している状態）③最終成熟期から排卵までの期間（硬い状態から少しずつ柔らかくなっていく状態）④排卵完了時期（卵巣の形状が確認できない位、柔らかくなっている状態）。このことを念頭において腹部の触診を1日2回行うことにより排卵時期を予測することができる。媒精適期は排卵完了直後で、卵の受精能が高いこの時期に人工授精を行うことで、高い受精率が期待できる。

#### IV. 雄個体へのホルモン処理について

人工授精により採卵を行う場合、その受精率は卵質のみでなく、精子の質にも依存する。そこで、媒精時に最もよく運動する一定量の精子を雌の排卵時

期に同調させるための採精技術を確立し、得られた精子の運動性および使用可能な期間等を把握しておくことが必要である。

これまでの研究(中田ら, 1998a)から, HCG・SP (HCG 500IU/kg, SP 7mg/kg) 投与により雄個体は長期にわたって排精し, その精子は使用可能なことが分かっている。実験は, HCG・SP 投与により排精促進された複数の雄親魚から精液を採取し, そのスパマトクリット値(精液にしめる精子の体積比)および運動時間を30日間調査した。その結果, スパマトクリット値はHCG・SP投与直後は比較的高かったが(62-81%), 続く約10日間は低い値(30-59%)を示し, 粘度の低い精液が得られた。その後再び値は増加し, 23日目には全個体が80%を越え粘度の高い精液となった。一方, 精子の運動時間は, 経過日数およびスパマトクリット値に関係なく, 30日間にわたり60秒前後で安定していた。

以上の結果から, 精液はHCG・SPの1回投与により長期間(30日間以上)採取することができ, その運動性も維持されていることが明らかとなった。したがって, 媒精用の精液はHCG・SP投与により長期にわたって十分量確保できると考えられた。

#### 4-2. 1997年採卵試験

これまで, 親魚養成方法やLHRHa コレステロールペレット投与による成熟促進と排卵誘導技術, および人工授精時の排卵確認と媒精適期についての試験研究を行い, 養成親魚を用いたトラフグの安定的な採卵のための技術基盤はほぼ確立できたと考えられる。次に, これらの採卵技術の再現性を確認するための採卵試験を1997年に行った。

##### 1) 材料と方法

親魚は, 養成4, 5歳魚を用い, 親魚養成や環境

調節は前述のとおりである。LHRHa コレステロールペレット投与直前に供試魚の腹部触診を行い, 雌と判断された個体を対象としてカニューレーションにより卵巢組織を採取し, 卵巢卵径が900 $\mu$ m以上の16個体を選別した(採卵マニュアル:LHRHa コレステロールペレット投与時の卵径が900 $\mu$ m以上の個体で効率的に採卵可能)。

LHRHa の投与量は400 $\mu$ g/kgとした(採卵マニュアル:LHRHa 投与量は400 $\mu$ g/kgで効率的に採卵可能)。

LHRHa コレステロールペレット投与2日後から1日2回(9:00, 16:00)の触診を行い, 最終成熟による腹部の硬化を確認した。腹部の硬化後, 12-36時間後に排卵が開始されるので, それを目安に腹部触診により排卵を確認した。また, 排卵完了直後が卵の受精能が最も高いので, 排卵を確認後は, 直ちに人工授精を行った(採卵マニュアル:腹部の硬化を指標とした排卵時間の予測が重要。卵の受精率は卵巢腔内滞留時間と密接な関係があり, 排卵確認後は直ちに人工授精を行う必要がある。)

一方, 雌のLHRHa コレステロールペレット投与と同時期に雄親魚8個体に対し, HCG・SP投与を行い, 雌の排卵時に最も活発に排精する個体を複数選別し, 媒精用の精液を採取した(採卵マニュアル:媒精用の精液はHCG・SPの1回投与により, 大量に確保できる)。

##### 2) 結果

排卵までの時間 LHRHa コレステロールペレット(LHRHa 400 $\mu$ g/kg)投与後の排卵個体の出現状況をFig. 26に示した。排卵は, ペレット投与後2日目から確認され, 6日目までに全ての個体が排卵した。排卵が集中したのは4日目で, 5個体の排卵を確認した。本実験では, LHRHa コレステロールペレットの1回投与によって, 全ての個体の排卵

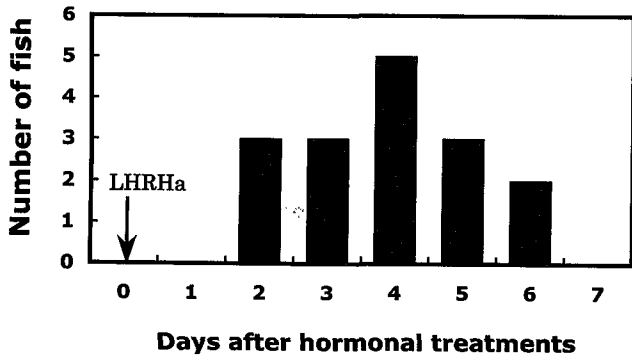


Fig. 26. Ovulation success in cultured tiger puffer after implantation of LHRHa cholesterol pellet (400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in 1997.

を誘導することができ、排卵時刻の指標となる最終成熟に伴う腹部の硬化現象は、全ての個体で排卵の12-36時間前に確認された。

**採卵結果** 採卵試験結果を Table 6 に示した。16 個体全てから受精卵が得られ、受精率は50.5-100% (平均87.7%) であった。また、受精卵の卵径は1,157-1,380 $\mu\text{m}$  (平均1,284 $\mu\text{m}$ ) で、採卵量は475-1,024g (平均767g) となり、良好な結果が得られた。特に、受精率は16個体中12個体で90%以上を示した。

Table 6. Effects of LHRHa cholesterol pellet (LHRHa 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) implantation on ovarian maturation, ovulation, and fertilization in cultured tiger puffer in 1997

Fish No.	Body weight (kg)	Oocyte diameter ( $\mu\text{m}$ )		Weight of obtained eggs (g)	Fertilization rate (%)
		Initial	Final		
1	2.50	948	1,178	605	57.9
2	2.32	963	1,157	475	54.0
3	2.78	966	1,239	672	93.3
4	2.74	982	1,300	627	97.0
5	2.56	987	1,234	697	76.0
6	2.70	993	1,265	640	96.4
7	2.72	1,002	1,251	940	97.4
8	2.54	1,053	1,293	664	100.0
9	2.84	1,035	1,316	840	97.3
10	2.80	1,036	1,304	975	96.8
11	2.60	1,041	1,362	864	97.4
12	2.72	1,048	1,310	969	95.5
13	2.38	1,057	1,331	789	99.0
14	2.08	1,065	1,277	736	50.5
15	3.06	1,082	1,380	1,024	99.0
16	2.28	1,091	1,343	749	95.0

### 3) 考 察

卵巣卵径が900 $\mu\text{m}$ 以上の個体に LHRHa コレステロールペレット (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を投与し、腹部の硬

化を目安に排卵を確認して、排卵確認後、直ちに人工授精を行うという方法で、良質受精卵を効率的に採卵することができ、本法の再現性が確認された。

排卵は、LHRHa コレステロールペレット投与後2-6日目に全ての個体で確認されたが、投与後2および3日目に排卵した個体は、全てペレット投与時の卵径が1,000 $\mu\text{m}$ を越えていた個体であった。このことから、卵径が1,000 $\mu\text{m}$ を越えている個体を対象に LHRHa コレステロールペレット投与を行うと、2および3日目に排卵を集中させることができることが明らかとなった。また、全ての個体で最終成熟に伴う腹部の硬化現象を排卵の12-36時間前に確認でき、腹部の硬化現象が、排卵が近づいている個体の把握およびその個体の排卵開始時間等を推定する指標になることが再確認された。

受精率が90%以上のものが16個体中12個体で認められた。それらの平均採卵量は813gであったが、複数尾の排卵日を同日に集中させることができたので、100 t 水槽規模で行われる種苗量産事業においても養成親魚からの受精卵で、必要量が十分確保できる見通しがついた。

長崎水試では、本研究で開発された技法に基づき、養成親魚から得られた受精卵を用いて種苗生産を行っている。その一例を挙げると、受精率91.0%、ふ化率75.5%の受精卵を用いた場合、受精卵410gから19.3万尾の孵化仔魚が得られ、全長20mmで12万尾(歩留まり、62.2%)の種苗を生産できた。

我々の一連の研究(松山ら, 1997; 中田ら, 1997, 1998a, 1998b) および本研究により、養成トラフグから良質卵を効率よく採卵する技法はほぼ確立されたと考えられる。今後は、この採卵技術を長崎県内種苗生産機関へ普及させ、天然親魚に依存しない安定的な種苗生産の実現を目指したい。

## 第2章 ブリの親魚養成と採卵技術の 開発研究

### 第1節 親魚養成および環境調節

#### 1-1. 親魚の飼育管理と環境調節による卵黄形成 促進

長崎県近海におけるブリの産卵期は4月下旬-5月上旬である。長崎県は鹿児島県や熊本県の北に位置するため、対馬海流に乗って北上する天然種苗(モジャコ)の採捕時期、すなわち養殖開始時期がこれらの県より遅れることから、生産した養殖魚の出荷時期が最終的に遅くなるハンディがあった。今後、人工種苗を養殖用として供給する場合、人工種苗に付加価値を付け、天然種苗との差別化を図ることが望まれるが、その一つとして、産卵期よりもできるだけ早い時期に採卵を行い、早期に大型種苗を供給する体制を確立することが要望されている。さらに、人工種苗用の採卵用親魚としては、天然魚と比較して履歴の明確な多数の親魚を容易に確保できる養成魚の方が、計画的な人工種苗の安定供給を図るうえで有利である。したがって、今後、ブリの養殖用人工種苗の安定供給を長崎県で実現していくには、養成親魚を用いた早期採卵技術の確立が必要となる。

ブリの産卵期はトラフグやマダイ、ヒラメとほぼ同時期であるので、これらの卵黄形成促進に有効であった冬季の昇温および長日条件での飼育が、ブリの卵黄形成促進においても有効であると考えられる。ブリはトラフグと同様、飼育環境下では卵黄形成は進行するものの、卵成熟が起こらないため産卵しない。しかし、本種の卵の最終成熟と排卵はホルモン投与により比較的容易に誘導できる(松山ら, 1996)ので、本種においても卵黄形成を終了する時期を早

期化できれば、採卵の早期化が可能となろう。

本章では、ブリ養成親魚からの早期採卵技術を開発するにあたり、周年にわたる親魚養成ならびに水温および日長調節による卵黄形成促進に関する実験を行ったので、その結果を報告する。

#### 1) 材料と方法

養殖業者から天然種苗(モジャコ当歳魚)を購入し、海面生け簀において3年半養成した3歳魚を親魚として使用した。

餌料として、サバ・オキアミ・イカ・配合飼料(はまちモイスト FUNE, 日清飼料)を2:1:1:4の割合で調整し、総合ビタミン剤(モア健康プラスBM, エーザイ), アスタキサンチンオイル(天然アスタ1200レッド, 日本ファインフーズ)およびフィードオイル(Aオイル, ツルーレシチン工業)を添加強化したモイストペレットを用い、週3回飽食量給餌した。また、採卵予定年度(3歳)の12月からホルモン投与までの期間は、親魚の卵黄形成期間中の栄養状態を高く維持し、卵質の向上を図るため、ビタミンE剤(ユベラニコチネート, エーザイ)およびビタミンCカプセルを詰め込んだイカの切り身も週3回併用給餌した。肥満度(condition factor, CF)は以下の式で求めた。

$$CF = (BW:g) / (FL:cm)^3 \times 10^3.$$

通常の飼育管理(当歳魚から採卵予定年度の11月または1月までの期間)は海面生け簀で行い、寄生虫(ハダ虫)除去対策として、1ヶ月に1回淡水浴と網替えを実施した。また、採卵予定年度の11月あるいは1月以降は、環境調節による卵黄形成促進のため陸上水槽(100または150 t水槽)に収容し、1.5ヶ月を目処に淡水浴と水槽替えを実施した。

4種の環境調節群(A-D実験群)を設け、卵巣卵の発達状況を比較した。

A群: 11月中旬に陸上水槽に収容し、12月1日以

降, 加温 (自然水温で19℃まで降下後, 19℃に維持) および長日 (16L8D) 条件で飼育。

B群: 11月中旬に陸上水槽に収容し, 12月1日以降, 加温 (自然水温で16℃まで降下後, 16℃に維持) および長日 (16L8D) 条件で飼育。

C群: 1月初旬に陸上水槽に収容し, 1月初旬以降, 加温 (0.5℃/dayで19℃まで昇温後, 19℃に維持) および長日 (16L8D) 条件で飼育。

D群: 海面生簀で自然水温, 自然日長条件下により飼育。

環境調節期間中は, 雌親魚の卵巣卵径の成長状況を把握するため, 定期サンプリングを行った。A-D実験群において, 卵巣卵の成熟状態が卵黄形成前から卵径500 $\mu\text{m}$ 程度までの個体では, カニューレーションによる卵採取がスムーズに行えないため, 卵巣卵径の調査はサンプリング個体を開腹することにより行った。この間, 月に1-3回の頻度で2-5尾の生殖腺調査を行った。卵巣卵径600 $\mu\text{m}$ 以上の個体では, カニューレーションによる卵採取がスムーズに行えた。卵巣卵調査個体はカニューレーション後, 再び, 親魚養成を継続するか, もしくは各種ホルモン投与実験に供試した。この間, 月に2-3回程度5-20尾の生殖腺調査を行った。

## 2) 結果

モイストペレットおよびイカの切り身を用いた給餌管理により, 採卵予定時期 (1-2月) までに, 親魚の肥満度は20-24になった。

各環境調節法による雌親魚 (A-D実験群) の卵巣卵の発達状況を Fig. 27 に示した。11月の試験開始時におけるA-D群の卵巣卵径はいずれも100-140 $\mu\text{m}$ で, すべて卵黄形成前の無卵黄卵であった。A群では, 1月上旬に卵径は300 $\mu\text{m}$ を越え卵黄形成が開始し, その後急速な卵黄形成の進行により1月31日には平均卵径が712 $\mu\text{m}$ となり, ほぼ卵黄形成は終

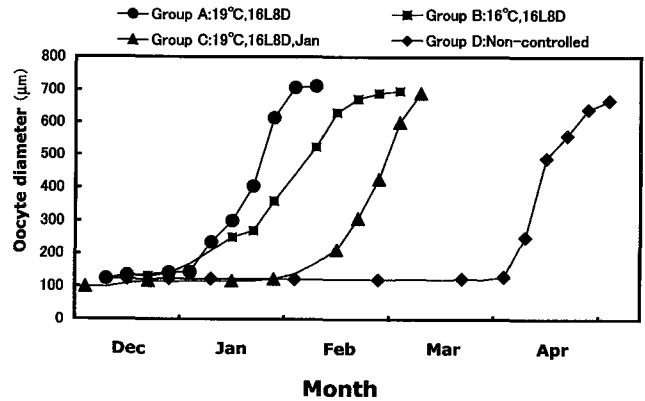


Fig. 27. Change in oocyte diameter of yellowtail by different water temperature and photoperiod control.

了していた。B群では, 1月中旬に卵黄形成が開まり, 2月20日には平均卵径は696 $\mu\text{m}$ に達した。C群では, 2月上旬に卵黄形成が開始し, 2月25日には平均卵径は690 $\mu\text{m}$ に達した。一方, 自然水温および自然日長条件下で飼育管理したD群では, 卵黄形成は3月下旬に始まり, 卵黄形成完了の目安となる700 $\mu\text{m}$ にまで達したのは4月下旬であった。

また, いずれの親魚においても, 卵黄形成中の卵巣卵の退行は認められなかった。

## 3) 考察

これまで, 本種の種苗生産については, 栽培漁業のための放流用種苗生産を目的として, 日本栽培漁業協会古満日事業場 (高知県) で環境調節による成熟の早期化が試みられており, 冬季の昇温および短日+長日条件が卵黄形成促進に有効であることが虫明らにより報告されている (Mushiake *et al.*, 1998)。この場合, 冬季の水温を19℃に保ち, 11月の短日条件 (8L16D) および12月以降は長日条件 (18L6D) にすることにより, 2月中旬に卵径が700 $\mu\text{m}$ に達した。しかし, 古満日事業場の親魚は, 環境調節前の11月中旬ですでに卵径は300 $\mu\text{m}$ を越え, 卵黄形成は開始している状態であった。通常, 西日本各地における自然条件下におけるブリの卵黄形成の開始時期

は、本実験のD群の結果と同じく、3月中一下旬である（未発表資料）。したがって、前年11月に卵黄形成が始まる古満目の親魚は特殊であり、虫明らの設定環境は、すでに卵黄形成が開始した親魚の卵黄形成の進行を促進したと考えられる。

本研究において、自然条件で飼育されたD群では、卵黄形成は3月下旬に始まり、卵黄形成が完了したのは4月下旬であった。一方、A群での卵黄形成は1月上旬に始まり、その完了は1月下旬であった。したがって、冬季の水温19℃、日長16L8Dという環境設定は、卵黄形成開始の誘導と、その後の卵黄形成の進行を促進しており、通常の産卵期に比べて約3ヶ月近く採卵期早めるのに有効であることが明らかとなった。

日長がA群と同じで水温を16℃一定としたB群では、卵黄形成の開始は1月中旬で終了は2月20日過ぎであった。すなわち、A群との温度差3℃が、卵黄形成の開始時の遅れと、その後の卵黄形成にかかる期間の延びに影響しているものと考えられた。

A群と同様の、水温19℃、日長16L8Dの環境設定を1月初旬より始めたC群では、その後の卵黄形成の開始および進行に要する期間はA群とほぼ同様に進行し、2月上旬に卵黄形成が開始し、2月下旬に卵黄形成はほぼ完了していた。

以上の結果より、冬季の昇温および長日条件による飼育は、ブリの卵黄形成促進に有効であり、環境条件の組み合わせや飼育開始時期をずらすことにより、幅広い産卵の早期化が実現できると考えられた。

本研究では、いずれの親魚においても、卵黄形成中の卵巣卵の退行は認められなかったことから、餌料、疾病予防および水槽内環境等を含む飼育管理が適切であったと考えられる。本研究では、親魚の栄養状態の指標としてトラフグと同様、肥満度を用いたが、退行卵が全く認められなかったことから、肥満度20以上が良質な採卵用親魚としての一つの指標

となると考えられる。

以上、ブリの周年にわたる飼育管理と冬季における環境調節を行うことにより、排卵誘導が可能な卵径700 $\mu$ m以上の親魚を2月以降の目的とする時期に確保できることが明らかとなった。

## 第2節 雌親魚の成熟誘導

### 2-1. 各種ホルモン投与方法による成熟促進と排卵誘導効果

我が国における養殖ブリの生産量は、養殖対象魚の中でも常に第一位を占め、ここ数年の年間生産量は14万トンに及ぶ。ブリは、西日本各地で盛んに養殖されているが、養殖用の種苗は現在においても、すべて天然種苗（モジャコ）に依存している。しかし、モジャコ資源は変動が大きく、特に近年の採捕量が減少傾向にあることから、今後計画的にブリ養殖を行うためには安定した種苗の確保が課題となってきた。そこで、長崎水試では養殖用として早期人工種苗を供給することを目的に、平成9年度からブリ親魚の早期における成熟促進とホルモン処理採卵技術の開発研究を実施している。

本種の採卵については、内田ら（1958）が長崎県男女群島女島で初めて人工授精に成功して以来、ホルモン処理を行わない自然産卵（古満目親魚養成前進基地、1978；有元ら、1987）や、ホルモン処理を用いた誘発産卵（榎田ら、1981；有元ら、1987；虫明ら、1995）および人工授精による採卵（榎田ら、1969；落合ら、1971；広沢、1972；虫明ら、1993、1995）について、多くの試験研究が試みられている。一方、採卵用親魚として養成魚と天然魚を比較した場合、養成魚の生殖腺が天然魚と比較して小さく、排卵量も少ないことが指摘されている（榎田・落合、1971；落合ら、1980）。しかし、計画的に安定して種

苗量産を行う場合、天然親魚よりも入手が容易でかつ多数の親魚が安定確保できる養成親魚からの採卵が望ましいと考えられる。

また、採卵法としては自然産卵法と人工授精による採卵法の二つの手法があるが、自然産卵を誘発する場合、10kg程度の親魚が産卵行動をおこすような飼育環境を作り出す必要があり、そのためには大型水槽（100kl水槽程度）の設備が必要となる。今後、ブリの人工種苗を各地の種苗生産場で行う場合、規格の異なる様々な施設設備条件下でも採卵可能な手法を開発することが重要である。したがって、採卵直前まで小型水槽で親魚養成が可能な人工授精による採卵技法の方が、より種苗生産現場に技術普及されやすいと考えられる。

従来、ブリのホルモン投与による排卵誘導にはHCG（ヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン）が用いられ、採卵が試みられている（落合・楳田，1971；楳田ら，1981；虫明ら，1993，1995）が、本方法が最も適切なホルモン投与方法であるかどうかはこれまで確認されていない。近年、魚類の成熟促進と排卵誘導に合成黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRHa）が用いられ、マコガレイ・マハゼ（会田ら，1978）やアユ（廣瀬ら，1988）、マダイ（松山ら，1992）、トラフグ（中田ら，1997）等に使用され、その成熟、排卵促進効果における有効性が確認されている。ブリについても、今後安定した早期採卵を計画的に行うためには、各種ホルモン投与方法による比較採卵試験を行い、排卵誘導技術を確立することが本種の効率的な採卵に繋がるであろう。

そこで、本研究ではブリの養成親魚を用いて、人工授精による良質受精卵を効率的に得ることを目的として、卵黄形成がほぼ終了した雌親魚を用いてホルモン投与による最適な排卵誘導方法を検討した。

## 1) 材料と方法

**親魚および親魚養成** 1994年および1995年5月に養殖業者から天然種苗（当歳魚）を購入し、長崎県水産試験場海面生け簀において3年間飼育管理した養成親魚（3歳魚）を親魚として用いた。通常の飼育管理は海面生け簀で行ったが、冬季には環境調節による親魚の成熟促進のため、陸上水槽に収容し飼育管理を行った。1998年（1994年産親魚使用）の試験では1997年11月13日に陸上水槽に収容し、12月1日から1998年1月31日（ホルモン投与）までの期間は、長日処理（16L8D：電照時間6：30-22：30）および加温処理（19℃一定：19℃まで自然水温降下後、19℃加温維持）を行った。また、1999年（1995年産親魚）の試験では、1998年10月29日に陸上水槽に収容し、12月1日から2月9日（ホルモン投与）までの期間は1998年試験と同様の長日処理、加温処理を行った。Table 7に供試魚の使用尾数、尾叉長、体重、肥満度、および卵巣卵径を示した。肥満度（condition factor, CF）は以下の式で求めた。

$$CF = (BW : g) / (FL : cm)^3 \times 10^3。$$

1998年試験での供試魚25個体（雌：19，雄：6）の平均尾叉長、体重、肥満度、卵巣卵径はそれぞれ718 mm，8.19kg，22.0，および712 $\mu$ mであった。また、1999年試験での供試魚32個体（雌：24，雄：8）の平均尾叉長、体重、肥満度、卵巣卵径はそれぞれ752 mm，10.11kg，23.7，および706 $\mu$ mであった。海面生け簀での通常飼育時の餌料はサバ・オキアミ・イカ・配合飼料（はまちモイスト FUNE，日清飼料）を2：1：1：4の割合で調整し、総合ビタミン剤（モア健康プラス BM，エーザイ），アスタキサンチンオイル（天然アスタ1200レッド，日本ファインフーズ）およびフィードオイル（Aオイル，ツルーレシチン工業）を添加強化したモイストペレットを用い、週3回飽食量給餌した。また、陸上水槽収容時からホルモン投与までの期間は、親魚の卵黄形成期間中



Table 7. Fish data used in the present study

Year	Experimental group	Sex	Number of fish	Fork length (mm)	Body weight (kg)	Condition factor	Oocyte diameter (μm)
1998	HCG injection	♀	6	715 ± 33.2*	8.26 ± 1.4	22.5 ± 1.3	723 ± 33.3
	HCG priming	♀	6	711 ± 11.2	8.35 ± 0.8	23.2 ± 1.7	715 ± 37.2
	LHRHa implantation	♀	7	728 ± 26.8	8.16 ± 1.2	21.0 ± 1.2	701 ± 38.1
	-	♂	6	716 ± 19.7	7.97 ± 1.3	21.6 ± 1.9	-
1999	HCG injection	♀	8	749 ± 27.7	10.1 ± 1.1	24.0 ± 1.0	713 ± 36.2
	HCG priming	♀	8	748 ± 22.7	9.73 ± 0.9	23.2 ± 1.7	705 ± 36.5
	LHRHa implantation	♀	8	765 ± 11.1	11.1 ± 1.0	24.9 ± 1.9	700 ± 35.4
	-	♂	8	747 ± 13.9	9.46 ± 0.9	22.7 ± 1.8	-

\*Mean ± SD

の栄養状態を高く維持し、卵質の向上を図るため、ビタミンE剤（ユベラニコチネート，エーザイ）およびビタミンCカプセルを詰め込んだイカの切り身も週3回併用給餌した。

**ホルモン剤および投与方法** 排卵誘導に使用したホルモン剤は、HCG (human chorionic gonadotropin : 帝国臓器製薬) とLHRHa (des-Gly<sup>10</sup>, [D-Ala<sup>6</sup>]-LHRH ethylamide : Sigma) の2種類である。ホルモンの投与方法は、HCGを用いた2手法とLHRHaを用いた1手法の合計3手法を試した。HCGの投与方法は、HCGの1回投与方法と2回投与方法（以下プライミング投与方法）で行った。HCGは0.6% NaCl溶液で溶解し、供試魚への注入量が2 ml/kgとなるように調整した。HCGの投与は親魚を麻酔（2-フェノキシエタノール，200ppm）した後、背筋部に注入する注射法で行った。HCGの1回投与方法は、最も安価で簡便な手法として種苗生産現場では従来魚類の排卵誘導に使用され、本種においても現在本手法が主流である。しかし、筆者らが試験したトラフグの排卵誘導（中田ら，1997）においては、得られた卵の卵質（受精率，ふ化率，卵膜の厚さ等）にむらがあり、良質の受精卵を安定して得るために

は再現性が低かった。本種の排卵誘導においてもその投与効果を確認し、他の投与方法と比較する必要がある。HCGプライミング投与方法は、採卵量の増大を目的として、1回目の投与で卵巣卵のホルモン感受性を高め、それから24時間後の本投与（2回目）によって、より大量の排卵卵を得る試みである。LHRHaの投与は、LHRHaコレステロールペレット埋め込み法で行った。LHRHaコレステロールペレットはLee *et al.* (1986) に準拠して、ペレット1個につきLHRHaを400 μg/kg含む長さ6 mm、直径2 mmの円柱状のものを作製した。LHRHaコレステロールペレットは、親魚を麻酔後、メスで背筋部表皮に切れ込みを入れ、テフロンチューブ（内径2 mm、外径3 mm）とステンレス棒（直径2 mm）で作製したペレット埋め込み器を用いて筋肉中に埋め込んだ。LHRHa投与方法は、卵質の向上を目的として、LHRHaにより親魚本来の生殖腺刺激ホルモン（GTH）の合成・分泌を促進することで、より自然な形で排卵が誘導され、良質卵を効率的に得ようとする試みである。

**排卵誘導試験** 試験区は3区設け、1998年および1999年の2回行った。Table 8に試験区の各種ホル

Table 8. Dose of hormone and date of hormone treatment in artificial insemination of yellowtail

Year	Experimental group	Sex	Number of fish	Dose of hormone			Date of hormone treatment
				First injection of HCG (IU/kg)	Second injection of HCG (IU/kg)*	LHRHa ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
1998	HCG injection	♀	6	500	-	-	31 Jan
	HCG priming	♀	6	100	500	-	31 Jan, 1 Feb
	LHRHa implantation	♀	7	-	-	200	31 Jan
	-	♂	6	500	-	-	31 Jan
1999	HCG injection	♀	8	500	-	-	9 Feb
	HCG priming	♀	8	50	500	-	9, 10 Feb
	LHRHa implantation	♀	8	-	-	400	9 Feb
	-	♂	8	500	-	-	9 Feb

\*Second injection of HCG was conducted at 24 hours after the first injection of HCG.

モン投与方法, 供試尾数, 各種ホルモンの投与量, およびホルモン投与日を示した。1998年は, HCG 1回投与方法で6個体, HCG プライミング法で6個体, LHRHa 投与方法で7個体の雌親魚を使用した。HCG 1回投与方法では HCG 500IU/kg, HCG プライミング法では100IU/kg+500IU/kg (24時間後), LHRHa 投与方法では LHRHa 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ をそれぞれ投与した。ホルモンの投与は1998年1月31日(プライミング法2回目: 2月1日)に行った。また, 媒精用の精液は, HCG 投与(500IU/kg)を行い排精を誘導した雄6個体より確保した。1999年は, HCG 1回投与方法, HCG プライミング法および LHRHa 投与方法でそれぞれ8個体の雌親魚を使用した。HCG 1回投与方法では HCG 500IU/kg, HCG プライミング法では50IU/kg+500IU/kg (24時間後), LHRHa 投与方法では LHRHa 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ をそれぞれ投与した。ホルモンの投与は1999年2月9日(プライミング法2回目: 2月10日)に行った。また, 媒精用の精液は, HCG投与(500IU/kg)を行い排精を誘導した雄8個体より確保した。

**排卵確認と人工授精** 排卵の確認は, 各種ホルモン投与後48時間目(HCG プライミング法では1回

目の投与から48時間目)から24時間毎に, 96時間目まで行った。親魚は麻酔(2-フェノキシエタノール, 200ppm)した後, 腹部の触診により排卵の有無を調べた。排卵が確認されなかった個体については, その時の卵巣卵の状態を把握するため, カニキュレーションによる卵巣卵採取を行った。排卵が確認された個体については, 腹部の圧迫による卵の搾出と開腹による卵巣の摘出および搾り残し卵の採取を行った。得られた卵は直ちに乾導法により人工授精を行った。媒精用の精液は, 1個体の搾出卵につき雄2個体から採取した精液により媒精した。

**浮上卵率, 受精率, ふ化率等の算出と卵径測定**  
人工授精により得られた卵は, 浮上卵と沈下卵に分離して容積法(700粒/ml)により, 浮上卵数, 沈下卵数, および浮上卵率を算出した。受精率は, 人工授精4時間後の16-32細胞期(水温19 $^{\circ}\text{C}$ )に, 浮上卵約100粒のうち発生が進んでいる個体の割合で算出した。ふ化率は, 浮上卵約200粒のうちふ化した個体の割合で算出した。卵のふ化管理は, 人工授精を行った個体別に約200粒の浮上卵を500ml ビーカーに収容し, 水温19-20 $^{\circ}\text{C}$ のウォーターバス, エアーストーンによる微通気条件下で行った。また, 排卵された卵

の卵径と油球径の測定を行うとともに、排卵後の生殖腺の重量を測定後、生殖腺指数 (gonadosomatic index, GSI) の算出を行い、最も発達している卵群の卵径を測定した。GSIは、以下の式により求めた。

$$GSI = (GW : g) / (BW : g) \times 10^2.$$

なお、種苗生産現場では得られた卵のうち油球の異常分割している個体の割合 (油球異常率) を調べ、卵質評価の1指標としているが、今回その油球異常率も個体毎に算出した。

## 2) 結 果

**排卵までの時間** 各ホルモン投与方法により排卵が誘導された個体の排卵時間と排卵個体数を Fig. 28 に示した。1998年試験において、HCG 1回投与方法では、投与48時間後に6個体中4個体が排卵した。HCG プライミング法では、プライミング投与 (1回目) から72時間後に6個体中4個体が排卵した。

LHRHa 投与方法では投与72時間後に7個体中6個体が排卵した。1999年試験において、HCG 1回投与方法では、投与48時間後に8個体すべてが排卵した。HCG プライミング法では、プライミング投与 (1回目) から48時間後に8個体すべてが排卵した。LHRHa 投与方法では投与48時間後に8個体中7個体が排卵した。

**各ホルモン投与方法による採卵結果** 1998年および1999年における採卵結果を Table 9 に示した。各ホルモン投与方法による排卵誘導個体は、1998年 HCG プライミング法および1999年 LHRHa 投与方法でそれぞれ1個体が排卵に至らなかったものの、その2個体を除く供試魚についてはすべて排卵が誘導された。1998年試験において、得られた卵の受精率とふ化率はそれぞれ、HCG 1回投与方法で80.2%と58.3%、HCG プライミング法で69.7%と40.6%、および LHRHa 投与方法で76.4%と51.1%であった。また、1999年試

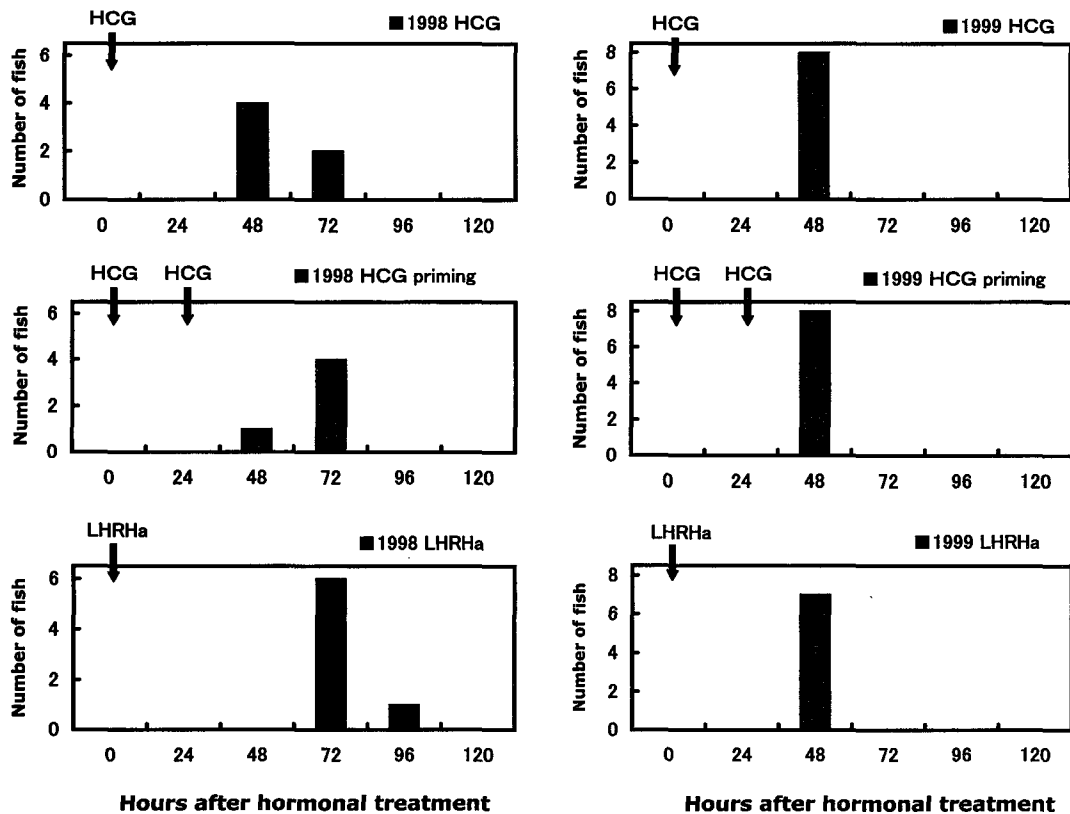


Fig. 28. Occurrence of ovulation in cultured yellowtail after different hormonal treatment in 1998 and 1999.

Table 9. Result of artificial insemination of the eggs from yellowtail with different hormonal treatment in 1998 and 1999

Year	Experimental group	Number of fish	Body weight (kg)	Number of eggs per fish ( $\times 10^3$ )			Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)
				Total eggs collected	Floating eggs	Fertilized eggs		
1998	HCG injection	6 <sup>*</sup> /6 <sup>**</sup>	8.52 ± 1.6 <sup>***</sup>	357±228	274±151	207±137	80.2	58.3
	HCG priming	5/6	8.60 ± 0.9	463±136	376±143	268±122	69.7	40.6
	LHRHa implantation	7/7	8.36 ± 1.3	159±78	141±74	109±64	76.4	51.1
1999	HCG injection	8/8	10.49 ± 1.1	528±330	522±329	498±313	95.7	57.0
	HCG priming	8/8	10.19 ± 0.9	576±256	517±240	435±249	84.3	41.4
	LHRHa implantation	7/8	11.40 ± 1.2	354±284	347±287	328±272	94.9	54.0

\* Number of fish induced spawning  
 \*\* Number of fish conducted  
 \*\*\* Mean ± SD

験における得られた卵の受精率とふ化率はそれぞれ、HCG 1回投与法で95.7%と57.0%、HCG プライミング法で84.3%と41.4%、およびLHRHa投与法で94.9%と54.0%であった。また、各ホルモン投与法により得られた卵の浮上卵率と採卵量について、Fig. 29に示した。1998年試験における浮上卵率はそれぞれ、HCG 1回投与法で76.8%、HCG プライミング法で81.2%、およびLHRHa投与法で88.7%であった。また、1999年試験における浮上卵率はそれ

ぞれ、HCG 1回投与法で98.9%、HCG プライミング法で89.8%、およびLHRHa投与法で98.0%であった。

Table 10に各ホルモン投与法により得られた卵の卵径、油球異常率、生殖腺残重量、およびGSIを示した。未排卵の卵径、生殖腺残重量、およびGSIにおいて、HCGを用いた2手法とLHRHa投与法とを比較すると、HCG投与法の方が未排卵卵径が小さく、生殖腺残重量が少なく、GSIが高い値を示していた。一方、LHRHa投与法は、採卵量は少ないものの、卵質の1指標である油球異常率がHCG投与法よりも低かった。

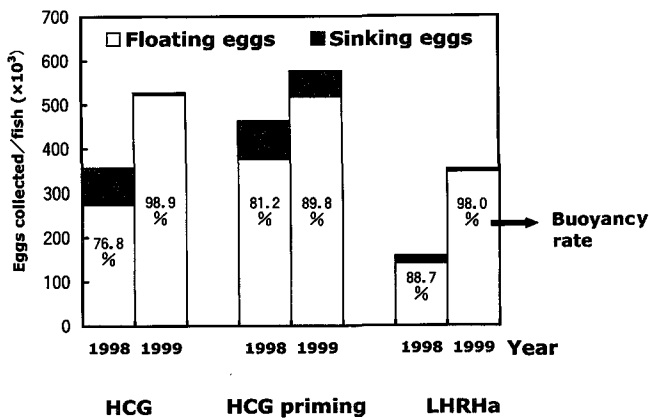


Fig. 29. Quality of Eggs obtained from cultured yellowtail with different hormonal treatment in 1998 and 1999.

### 3) 考察

今回の試験結果から、HCG 1回投与、HCG プライミング法およびLHRHa コレステロールペレット埋め込み法のいずれの方法においても、本種の排卵誘導が可能で、中でも採卵量の増大にはHCG プライミング法が、浮上卵率や卵質の向上にはLHRHa投与法が有効であることが示唆された。しかしなが

Table 10. Result of measurements in diameter of eggs and oil droplets form yellowtail with different hormonal treatment in 1998 and 1999

Year	Experimental group	Diameter ( $\mu\text{m}$ )			Occurrence rate of eggs with abnormal oil droplet (%)	Ovarian weight (g)	GSI
		Ovulated eggs	Ovarian oocytes**	Oil droplet			
1998	HCG injection	1,161 $\pm$ 27*	482 $\pm$ 32	320 $\pm$ 10	56.6	341	8.0
	HCG priming	1,157 $\pm$ 25	500 $\pm$ 41	319 $\pm$ 11	67.9	255	8.3
	LHRHa implantation	1,201 $\pm$ 35	613 $\pm$ 102	319 $\pm$ 7	19.9	399	6.7
1999	HCG injection	1,187 $\pm$ 55	562 $\pm$ 57	319 $\pm$ 13	54.0	314	8.0
	HCG priming	1,194 $\pm$ 26	578 $\pm$ 47	318 $\pm$ 15	58.7	328	8.9
	LHRHa implantation	1,195 $\pm$ 32	657 $\pm$ 26	321 $\pm$ 5	36.7	408	6.6

\*Mean  $\pm$  SD

\*\*Most advanced oocytes in the ovary

ら、採卵成績には大きな差が認められず、ホルモン投与時の作業効率や使用するホルモンの価格等を総合的に考慮すると、ブリにおける排卵誘導方法としては、HCG 1 回投与方法が最も簡便で有効な方法であると考えられた。

1998年試験では HCG 1 回投与方法に比べ、HCG プライミング法および LHRHa 投与方法の方が供試魚の排卵時間が24時間程度遅かった。これは、HCG プライミング法では2回目の投与が最終的な排卵を誘導していること、LHRHa 投与方法では LHRHa によるブリ本来の GTH の分泌により排卵誘導が行われたため、排卵に至るまでに若干時間がかかったものと考えられた。一方、1999年試験では、いずれのホルモン投与方法においても投与48時間後に排卵が集中していた。HCG プライミング法では、プライミング量（1回目）を1998年の100IU/kgから50IU/kgに低減したにもかかわらず、プライミング投与（1回目）後48時間で排卵が誘導されたことから、これらの供試魚のホルモン感受性は1998年度と比較して高かったことが窺われた。また、LHRHa 投与方法では LHRHa 投与量を1998年の200 $\mu\text{g}$ /kgから400 $\mu\text{g}$ /kgに増加したことにより、排卵に至るまでの時間

が短縮されたと考えられた。

沈下卵を含む1個体当たりの採卵量を比較すると、HCG プライミング投与方法は他の2手法よりも多くの排卵卵を得ることができた。これは、プライミング投与により多くの卵巣卵が感受性を獲得した結果、多くの卵巣卵の排卵が誘導でき、採卵量が増大したものと考えられた。しかしながら、沈下卵量が多かったことから、HCG の2回投与により予測した排卵時間が前後し、人工授精を行う際の媒精適期（排卵直後）を逃してしまった可能性や、2回の取り揚げと HCG 投与によるハンドリングによるストレスが浮上卵率に影響していると考えられた。また、LHRHa 投与方法では他の2手法と比べて採卵量が少なかった。浮上卵率は1998年および1999年とも高い値を示しているものの、多くの受精卵を得るという点で課題が残った。このことから、LHRHa 投与方法よりも HCG 投与方法の方がより多くの卵巣卵を排卵させるのに適したホルモン投与方法であるのかもしれない。

本種の HCG による排卵誘導について、その投与量は今回500IU/kgであった。虫明ら（1996）によると600IU/kgの投与量区で採卵量、浮上卵率とも高い結果が得られており、今回の投与量500IU/kg

は本種の排卵誘導において、適当な値であると考えられた。また、今回用いた供試魚の卵巣卵径は640—774 $\mu\text{m}$ であり、結果的に2個体（卵巣卵径661および672 $\mu\text{m}$ ）以外はすべての個体で排卵が誘導できた。今後、より効率的な採卵を目指す場合、このホルモン投与時卵径が排卵誘導に及ぼす影響を調査し、最適なホルモン投与時卵径を把握する必要がある。

人工授精により得られた卵の受精率は、排卵されたからの経過時間と密接な関係のあることが数種の魚種で知られている（野村ら, 1974a, 1974b; 鈴木, 1975; Hirose *et al.*, 1979; Norberg *et al.*, 1991; Koya *et al.*, 1994; Ohta *et al.*, 1996）。筆者ら（1998b）がトラフグで行った人工授精試験においても排卵後経過時間と共に受精率は低下し、排卵後24時間を経過した個体からの搾出卵は受精しなかった。したがって、ブリにおいても、人工授精により採卵を行う場合、ホルモン投与時の卵径や水温等を考慮して排卵時間を予測し、排卵が確認されたら直ちに人工授精を行うことで、高い受精率の卵を効率的に得ることができるかもしれない。

これまで長崎県における本種の早期採卵（採卵時期：2月初旬）を目的とした環境調節による成熟促進試験では、水温は19 $^{\circ}\text{C}$ 一定、日長は12月以降の長日処理（16L8D）が効果的なこと、また、環境調節による卵黄形成開始後、ホルモン投与による排卵誘導が可能な卵径（700 $\mu\text{m}$ ）にまで成長させるのに、約1ヶ月の親魚養成で催熟可能なこと等が確認されている（投稿準備中）。養殖用として人工種苗を供給する際、その後の成長と早期の生産物出荷を念頭においた場合、産卵期よりもできるだけ早い時期に採卵を行い、種苗を生産する必要がある。親魚養成時の環境調節と効率的な人工授精による採卵手法が確立されれば、早期人工種苗の安定供給が可能となるであろう。

今回の試験により、ブリの排卵誘導にはHCG 1

回投与が最も簡便で有効な手法であることが明らかとなった。今後は、環境調節による早期成熟促進方法や排卵誘導時の卵径と排卵時間の把握、および人工授精の際の媒精適期等に関する試験研究を重ね、親魚の早期における成熟促進とホルモン処理採卵技術を確立する必要がある。近い将来、養殖用として早期人工種苗を安定供給するための技術普及と体制づくりを実施し、天然種苗に依存しないブリの完全養殖化を実現させていきたい。

## 2-2. ホルモン投与時の卵径が排卵時間、卵量および卵質に及ぼす影響

我々はブリ *Seriola quinqueradiata* の養殖用人工種苗の安定供給を目的として、平成9年度からブリ親魚の早期における成熟促進とホルモン処理採卵技術の開発研究を行ってきた（中田ら, 2001a, 2001b）。その中で、ブリにおける各種ホルモン投与の排卵誘導効果を検討した結果、採卵量や卵質、およびホルモン投与時の作業性等を総合的に考慮した場合、HCG (human chorionic gonadotropin, ヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン) プライミング法やLHRHa (des-Gly<sup>10</sup>, [D-Ala<sup>6</sup>]-LHRH ethylamide) コレステロールペレット埋め込み法と比較して、HCG 1回投与が最も簡便で有効な排卵誘導方法であることを確認した（中田ら, 2001a）。また、人工授精を行った際の卵質（受精率、ふ化率等）は、卵が排卵されてからの経過時間、すなわち、卵巣腔内滞留時間に依存しており、排卵後6時間以内に人工授精を行えば高い確率で良質受精卵を確保できることを明らかにした（中田ら, 2001b）。これは、本種の種苗生産において良質受精卵の確保を安定化するためには、媒精適期を逃さずに人工授精することが必要で、そのためには排卵時刻の予測が不可欠であることを示している。さらに、ブリの研究に先立つトラ

フグの排卵誘導技術の開発過程において、我々は、ホルモン投与（この場合、LHRHa コレステロールペレットを使用）から排卵までの時間はホルモン投与時の卵径と密接に関係しており、ホルモン投与時の卵径を把握することで個体の排卵日を高い精度で予測できることを明らかにした（松山ら、1997；中田ら、1997）。したがって、ブリにおいても、ホルモン投与から排卵までの時間がホルモン投与時の卵径に依存しているなら、ホルモン投与時の卵径を把握することで個体の排卵日や排卵時刻の予測が可能となるであろう。

ブリの卵黄形成は卵径が700–800 $\mu\text{m}$ でほぼ完了し、通常我々は卵径が700 $\mu\text{m}$ 以上に達した個体を選別し、HCGの1回投与を行い成熟および排卵を誘導している。しかし、卵径700 $\mu\text{m}$ 以下の個体でもHCGの1回投与により排卵が誘導できれば、採卵用親魚の養成時間の短縮とそれに伴う採卵の早期化が期待され、経費軽減や出荷サイズの調整などに繋がる経済効果も少なくない。しかし、多くの魚種で、卵黄形成終了以前の個体にホルモン処理を行った場合、排卵が起こっても人工授精により得られた受精卵の卵量や卵質に問題の多いことを我々は経験的に知っている。したがって、HCG投与時の卵径が、得られる卵の卵量および卵質に及ぼす影響をブリで

解明し、また、実際に種苗生産用として利用可能な卵を得るための基礎データを収集することは、ブリの種苗生産事業を展開する上で極めて重要である。HCG投与時の卵径と卵量および卵質との関係が明らかになれば、親魚の卵径を調べることにより、排卵誘導可能な個体や大量の良質受精卵の確保が予想される個体の選別が可能となるであろう。

本研究では、ブリ養成親魚を用いた人工授精による採卵技術の向上を目的として、HCG投与時の卵径が排卵時間、卵量および卵質に及ぼす影響を調べた。

### 1) 材料と方法

**親魚養成** 実験には長崎県総合水産試験場でモジャコから養成した3歳魚（雌：33個体、雄：10個体）を使用した。Table 11に供試魚の魚体測定結果を示した。通常の飼育管理は海面生け簀で行い、試験開始前に環境調節による親魚の成熟促進のため、2000年11月28日に陸上水槽に収容し、同年12月1日からHCGを投与するまでの期間、長日処理（16L8D：電照時間6：30–22：30）および加温処理（19℃一定）を行った。親魚用餌料には、サバ・オキアミ・イカ・配合飼料（はまちモイスト FUNE, 日清飼料）を2：1：1：4の割合で調整し、総合ビタミン剤

Table 11. Fish used in the present study

Experimental group	Sex	Number of fish	Fork length (mm)	Body weight (kg)	Oocyte diameter ( $\mu\text{m}$ )	Date of HCG injection
650 - 700 $\mu\text{m}$	♀	11	718 $\pm$ 8.6*	8.76 $\pm$ 0.3	675 $\pm$ 4.3	31 Jan
Initial oocyte diameter: 700 - 750 $\mu\text{m}$	♀	13	733 $\pm$ 3.7	9.39 $\pm$ 0.2	726 $\pm$ 3.6	7 Feb
750 - 800 $\mu\text{m}$	♀	9	732 $\pm$ 6.4	9.34 $\pm$ 0.3	770 $\pm$ 5.5	13 Feb
	♂	10	726 $\pm$ 4.5	8.82 $\pm$ 0.2	-	31 Jan

\* Mean  $\pm$  SEM

(モア健康プラス BM, エーザイ), アスタキサンチンオイル (天然アスタ1200レッド, 日本ファインフーズ) およびフィードオイル (Aオイル, ツルーレシチン工業) を添加したモイストペレットとビタミンE剤 (ユベラニコチネート, エーザイ) およびビタミンCカプセルを詰め込んだイカの切り身を用い, 週3回飽食量を給餌した。

**供試魚の選別と HCG 投与** 2001年1月31日, 2月7日, および2月13日に, 供試魚に麻酔 (2-フェノキシエタノール, 200ppm) を施し, カニユーラにより卵巣卵を採取し大型卵30個の卵径を測定した。卵径測定結果に基づき, 650-700 $\mu$ mの個体11尾 (1月31日), 700-750 $\mu$ mの個体13尾 (2月7日), および750-800 $\mu$ mの個体9尾 (2月13日) を選別した (Table 11)。親魚の選別後, 同日に背筋部に HCG (500IU/kg BW, 帝国臓器製薬) を注射により投与した。また, 1月31日に排精が活発な雄10尾を選別し, 雌と同じく HCG (500IU/kg BW) を背筋に投与した。

**排卵確認と人工授精** 排卵の確認は, HCG 投与後36, 42, 48, および54時間目に供試魚を麻酔した後, カニユーレーションおよび腹部触診により行い, 生殖孔からの排卵された卵の流出が初めて確認された時間を排卵直後とした。排卵確認後, 腹部の圧迫により卵を搾出し, さらに開腹して卵巣を摘出した後, 搾り残し卵を採取した。得られた卵は, 1個体の搾出卵につき雄2尾から採取した精液を用い, 直ちに乾導法による人工授精を行った。

**浮上卵率, 受精率およびふ化率** 人工授精により得られた卵は洗卵した後, 容積法 (700粒/ml) により浮上卵と沈下卵を計数し浮上卵率を算出した。受精率は, 人工授精4時間後の16-32細胞期 (水温19 $^{\circ}$ C) に, 浮上卵約100粒のうち発生が進んでいる個体の割合で算出した。ふ化率は, 浮上卵約200粒のうちふ化した個体の割合で算出した。卵のふ化管理は,

親魚の個体別に約200粒の浮上卵を500ml ビーカーに收容し, 水温19-20 $^{\circ}$ Cのウォーターバス, エアーストーンによる微通気条件下で行った。グループ間の浮上卵率, 受精率およびふ化率は, 一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および Tukey-Kramer test で有意差を比較した。

## 2) 結果

**HCG 投与時の卵径と排卵時間との関係** 卵径のグループ別に, HCG 投与後の経過時間と排卵個体尾数との関係を示した (Fig. 30)。卵径750-800 $\mu$ mの9個体では, HCG 投与36時間目に1個体, 42時間目に6個体, および48時間目に2個体が排卵していた。卵径700-750 $\mu$ mの13個体では, HCG 投与42時間目に4個体, および48時間目に9個体で排卵が確認された。また, 卵径650-700 $\mu$ mの11個体では, HCG 投与48時間目に5個体, および54時間目に6個体で排卵が確認された。これらの結果から, 卵径が750-800 $\mu$ mの個体では HCG 投与42時間目に,

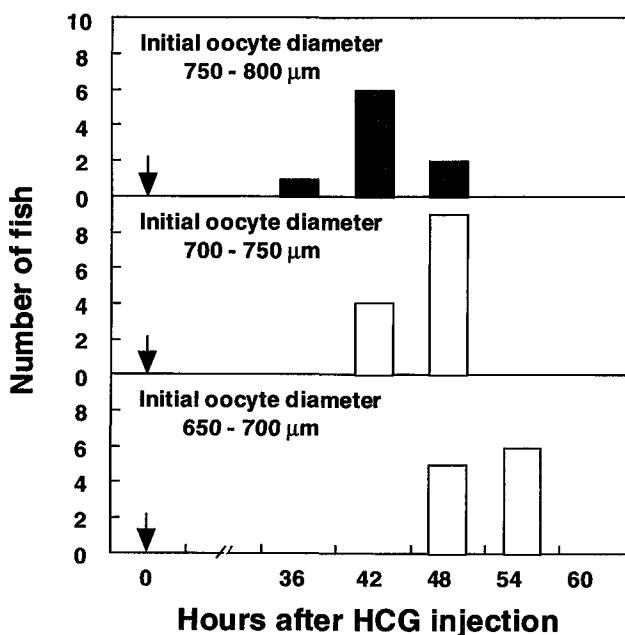


Fig. 30. Ovulation time (hr) after HCG injection in cultured yellowtail with different initial oocyte diameter ( $\mu$ m). Arrows indicate HCG injection (500IU/kg BW).



700-750 $\mu$ mの個体では、48時間目に排卵が集中し、卵径が650-700 $\mu$ mの個体では、排卵は48時間以降に起こることが明らかとなった。

Fig. 31 に全ての親魚 (N=33) を対象にして、HCG 投与時の卵径と排卵時間との関係を示した。卵径と排卵時刻には明瞭な負の相関が認められ ( $P < 0.001$ )、排卵時間 (T, hour) と卵径 (D,  $\mu$ m) の間は、

$$T = -0.082D + 105.99 \quad (R^2 = 0.51)$$

の式で表わされた。

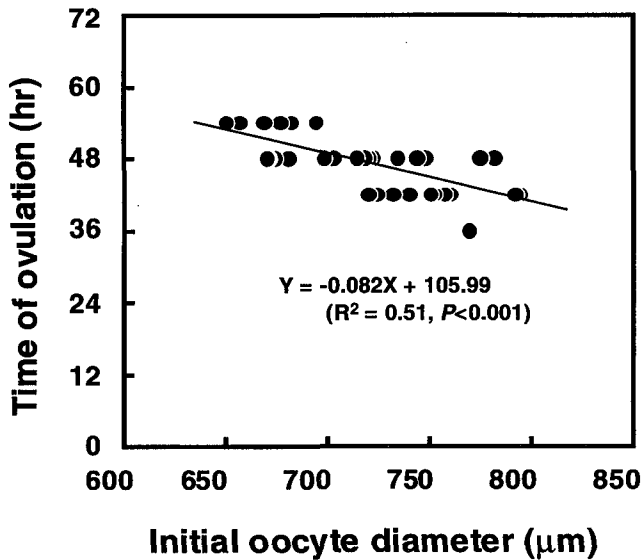


Fig. 31. Relationship between initial oocyte diameter ( $\mu$ m) at the time of HCG injection and ovulation time (hr) in artificial insemination in cultured yellowtail.

HCG 投与時の卵径が採卵量および卵質に及ぼす影響 Table 12 に、排卵直後の人工授精による採卵結果を卵径グループ別に示した。卵径700-750 $\mu$ m および750-800 $\mu$ mの個体からの総採卵数は1尾当たり52.8万粒であったが、卵径650-700 $\mu$ mの個体の卵数はそれらの約半分の25.5万粒となっていた。また、浮上卵率と受精率はいずれの卵径グループでも90%以上の高い値を示し、グループ間で差は認められなかった。一方、ふ化率は、卵径650-700 $\mu$ m, 700-750 $\mu$ mおよび750-800 $\mu$ mのグループ別にそれぞれ、51.7%, 61.0%および69.9%を示し、HCG 投与時の卵径が大きいほど高くなる傾向があり、卵径650-700 $\mu$ mおよび750-800 $\mu$ mのグループ間で有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。結果的に、グループ別の受精卵数は1尾当たりそれぞれ、23.4万粒、48.5万粒および48.4万粒となった。

### 3) 考 察

本研究により、ブリの排卵誘導における HCG 投与時の卵径と排卵までの時間には負の相関関係があり、HCG 投与直前に卵径を計測することで、排卵時刻をある時間範囲で正確に予測できることが明らかとなった。すなわち、卵径750-800 $\mu$ mの個体では HCG 投与後36-48時間目に排卵が起こり、42時

Table 12. Result of artificial insemination of eggs from yellowtail with different initial oocyte diameter in HCG injection.

Experimental group	Number of fish	Number of eggs per fish ( $\times 10^3$ )			Buoyancy rate (%)	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)
		Total eggs collected	Floating eggs	Fertilized eggs			
650 - 700 $\mu$ m	11	255 $\pm$ 53*	249 $\pm$ 54	234 $\pm$ 52	94.9 $\pm$ 1.8	93.6 $\pm$ 2.4	51.7 $\pm$ 4.6
Initial oocyte diameter: 700 - 750 $\mu$ m	13	528 $\pm$ 48	518 $\pm$ 48	485 $\pm$ 45	98.0 $\pm$ 0.4	94.0 $\pm$ 1.7	61.0 $\pm$ 3.3
750 - 800 $\mu$ m	9	528 $\pm$ 84	517 $\pm$ 84	484 $\pm$ 74	97.6 $\pm$ 0.7	94.7 $\pm$ 1.5	69.6 $\pm$ 4.8

\* Mean  $\pm$  SEM

間目に集中すること、また700–750 $\mu\text{m}$ の個体では42–48時間目に排卵が起こり、48時間目の方が排卵する個体が多いこと、一方、卵径650–700 $\mu\text{m}$ の個体では、排卵は48–54時間目に起こり、卵径700 $\mu\text{m}$ 以上の個体と比較して排卵が6–12時間遅れること、などが明らかとなった。

卵黄形成がほぼ終了した卵径700 $\mu\text{m}$ 以上の2グループでは、それぞれ1個体当たり52.8万粒の排卵した卵が得られたが、卵径650–700 $\mu\text{m}$ のグループではそれらの約半数の25.5万粒であった。これは、卵径650–700 $\mu\text{m}$ の個体における成熟卵数が、卵径700 $\mu\text{m}$ 以上の個体の約半数であったことを意味する。一般に硬骨魚の卵成熟において、脳下垂体から分泌された生殖腺刺激ホルモン (GTH) の作用により、卵黄形成が終了した卵を包む濾胞細胞で卵成熟誘起ホルモン (MIH) の合成が促進される傍ら、卵細胞の細胞膜では MIH 受容体の形成が誘導され、濾胞細胞より分泌された MIH が MIH 受容体と結合することにより卵成熟は進行すると考えられている (Patino *et al.*, 1990 ; 松山・太田, 2000)。本研究のような飼育環境下ではブリは成熟しないことから、最終成熟を促す脳下垂体からの GTH の分泌が起こらず、そのため MIH 合成および MIH 受容体の形成が行われていないことが窺われる。ちなみに、我々はすでに、ブリの MIH はサケ科魚類 (Nagahama *et al.*, 1985) やメダカ (Fukada *et al.*, 1994) と同じ 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 $\beta$ -P) であることを実証し (Rahman *et al.*, 2000, 2001), また、卵黄形成が終了した養成ブリに HCG を投与することにより、濾胞細胞による 17,20 $\beta$ -P の産生と、17,20 $\beta$ -P に特異的親和性を示す膜型ステロイド受容体の形成を卵の細胞膜分画で確認している (Rahman *et al.*, 2000 ; Ohta *et al.*, 2001)。我々は、飼育環境下にあるブリに卵成熟を誘起させるために外来の GTH である HCG を投与している

が、GTH に対する卵の感受性、すなわち GTH を投与することにより成熟する卵の能力は、卵黄形成終了前に獲得されることが数種の魚種における濾胞付き卵細胞を用いた *in vitro* 実験で報告されている (シロギス *Sillago japonica* (Kobayashi *et al.*, 1988), シロギスおよびトビヌメリ *Repomucenus beniteguri* (Zhu *et al.*, 1994), ササノハベラ *Pseudolabrus japonicus* (Matsuyama *et al.*, 1998))。このような卵黄形成終了前の卵を *in vitro* で HCG などの GTH と共に培養すると卵成熟が起こるが、MIH と共に培養しても成熟しない。すなわち GTH と共に培養した場合、MIH 合成と MIH 受容体形成が促され、その結果成熟するのに対し、MIH のみでは、MIH 受容体が形成されないため卵成熟が起こらないことによる。また、それより若い卵黄形成中の卵 (第二次卵黄球期、あるいは卵黄形成中期) では GTH と共に培養しても成熟は起こらない (Zhu *et al.*, 1994 ; Kobayashi *et al.*, 1988 ; Matsuyama *et al.*, 1998)。したがって、ブリの卵径650–700 $\mu\text{m}$ の卵は、GTH に対する感受性を獲得しつつある卵で、全ての卵が GTH 感受性を持っていないため、卵黄形成が終了したグループ (卵径700 $\mu\text{m}$ 以上) と比較して成熟卵数が少なくなったものと考えられた。

ブリの人工授精卵における卵質は排卵後の経過時間に依存するため (中田ら, 2001b) (第2節2–3)、今回、人工授精は全ての個体で排卵直後 (排卵後6時間以内) に行ったところ、浮上卵率、受精率を卵質の指標とした場合、HCG 投与時の卵径に関係なくいずれのグループでも卵質は安定した高い値を示した。一方、ふ化率は52–70%を示し、受精率と比較してやや低い値を示した。ブリの受精卵は水温19–20 $^{\circ}\text{C}$ で管理した場合60–70時間でふ化するが、受精後約50時間で沈降を始め、管理水槽の底面に密集する。密集した卵はほとんど死滅しふ化しないため、

沈降と密集を防止するような措置（たとえばエアレーションや注水による適度な水流）を施すことによりふ化率は向上する。今回のピーカーでのふ化試験によるふ化率は52-70%であったが、適度な水流による卵の攪拌をうまく行うことができれば、いずれの卵径グループから得られた受精卵であっても、ふ化管理技術の改善により今後80%を越えるふ化率が期待される。

本研究により、卵黄形成が終了していない卵径650-700 $\mu$ mの個体でも、成熟卵数こそ少ないものの、HCGの1回投与で100%の個体に成熟と排卵を誘導させることができ、また、媒精適期に人工授精することにより良質の受精卵が得られ、種苗生産用として十分利用可能であることが確認できた。卵径650-700 $\mu$ mの親魚が卵黄形成を終了するまで約1-2週間必要であることから、そのような個体を採卵用親魚として使用すれば、卵黄形成完了後の個体（卵径700-800 $\mu$ m）を用いる場合に比べ1-2週間程度早く採卵できることが期待される。さらに、我々は卵黄形成を開始した個体に対してコレステロールベレットなどによりGnRHの徐放投与を行うと、卵黄形成が促進され採卵時期が1-2週間程度短縮できることを確認している（未発表資料）。したがって、GnRHを徐放投与し、卵黄形成完了前にHCG投与を行うことで1ヶ月近い採卵の早期化を実現できるかもしれない。卵量の少なさは、多数の良質親魚を確保し成熟を同調させることにより容易に補完できよう。長崎県で種苗生産業者がブリの種苗生産を行う場合、事業規模からみて1業者につき受精卵が100-150万粒必要となると試算されるが、卵径700 $\mu$ m以下の卵黄形成完了前の個体を用いる場合、7尾前後の雌親魚を養成すれば、目的の受精卵は十分確保できると考えられる。

以上、本研究により、HCG投与の卵径を計測することで、排卵時間を予測でき、確実に良質受精卵

を確保できることが明らかとなった。今後、カンニューラによる採卵と卵径測定、腹部触診による排卵の確認法などの技術講習を通して現場への技術普及を図っていきたい。

### 2-3. 人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係

ブリ *Seriola quinqueradiata* の我が国における養殖生産量は、養殖対象魚の中でも常に第一位を占め、ここ数年の年間生産量は14万トンに及ぶ。ブリは、西日本各地で盛んに養殖されているが、養殖用の種苗は現在においても、すべて天然種苗（モジャコ）に依存している。しかし、モジャコ資源は変動が大きく、特に近年の採捕量が減少傾向にあることから、今後計画的にブリ養殖を行うためには安定した種苗の確保が課題となってきた。そこで、長崎水試では養殖用として早期人工種苗を供給することを目的に、平成9年度からブリ親魚の早期における成熟促進とホルモン処理採卵技術の開発研究（中田ら、1998, 1999, 2001a）を実施している。

本種の採卵については、内田ら（1958）が長崎県男女群島女島で初めて人工授精に成功して以来、ホルモン処理を行わない自然産卵（古満目親魚養成前進基地、1978；有元ら、1987）や、ホルモン処理を用いた誘発産卵（有元ら、1987；楳田ら、1969；虫明ら、1995）および人工授精による採卵（中田ら、2001a；虫明ら、1993, 1995, 1996；楳田ら、1969；落合・楳田、1971；広沢、1972；藤田ら、1977）について、多くの試験研究が試みられている。この中で、ホルモン処理を用いない採卵法（人工授精法、自然産卵法）では、産卵盛期（4-5月）でないと受精卵の確保が困難なことや、採卵予定日に計画的な排卵誘導が行えないこと等、課題が残る。また、ホルモン処理により自然産卵を誘発する場合、10kg

程度の親魚が産卵行動をおこすような飼育環境が必要で、そのためには大型水槽（100kl程度）の設備が必要となる。今後、ブリの人工種苗の生産を各地の種苗生産場で行う場合、規格の異なる様々な施設設備条件下でも採卵可能な手法を開発することが重要である。したがって、ホルモン投与から採卵までの期間、大型水槽を必要としない人工授精による採卵の方が、より種苗生産現場に技術普及されやすいと考えられる。さらに、採卵用親魚としては天然親魚よりも入手が容易でかつ多数の親魚が安定確保できる養成親魚の方が望ましい。特に産卵期よりも早期に採卵を行う場合、環境調節（水温、日長）による親魚養成が必要であり、その際人為環境下にすぐに馴致できる養成親魚の方が安定的な計画採卵により適していると考えられる。

人工授精における受精率やふ化率を左右する要因の一つに、排卵誘導に使用するホルモンの種類とその投与方法が挙げられる。従来、ブリのホルモン投与による排卵誘導にはHCG（ヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン）が用いられ、採卵が試みられている（椋田ら，1981；虫明ら，1993，1995，1996；落合・椋田，1971；広沢，1972）が、本方法が最も適切なホルモン投与方法であるかはこれまで確認されていなかった。そこで、筆者らは、ブリ養成親魚を用いて、HCG 1回投与方法、HCG プライミング法、およびLHRHa（luteinizing hormone-releasing hormone analogue）コレステロールペレット埋め込み法により排卵誘導を行い、人工授精による採卵試験を行った（中田ら，2001a）。その結果、採卵量や卵質、およびホルモン投与時の作業性等を総合的に考慮すると、本種における排卵誘導方法としてはHCG 1回投与が最も簡便で有効であることが確認された。

一方、人工授精により得られた受精卵の受精率は、排卵されてからの経過時間（卵巣腔内滞留時間）と密接な関係のあることが数種の魚種で知られており

（Hirose *et al.*, 1979；Norberg *et al.*, 1991；Koya *et al.*, 1994；Linhart *et al.*, 1995；Ohta *et al.*, 1996）また、ニジマス（野村ら，1974a，1974b）やコイ（鈴木，1975），トラフグ（中田ら，1998）では、排卵された卵がそのまま卵巣腔に滞留すると、卵は過熟現象を起こし受精率が低下することが確認されている。これらのことは、ブリの人工授精による採卵の際にも、媒精するタイミングにより受精率に大きなばらつきが生じる可能性があり、効率的に良質卵を確保するためには、排卵された成熟卵を最適な時間に媒精することの重要性を示唆している。

そこで、本研究ではブリ養成親魚を用いた人工授精時の受精率の向上を目的として、HCG投与により排卵、排精を誘導した親魚を用いて、排卵後の経過時間と受精率との関係を調べ、人工授精を行う際の媒精適期の検討を行った。

## 1) 材料と方法

**親魚および親魚養成** 養殖業者から購入した2歳魚（雌：4個体，雄：3個体）と当场でモジャコから養成した2歳魚（雌：7個体，雄：3個体）を親魚として用いた。通常の飼育管理は海面生け簀で行ったが、試験開始前には環境調節による親魚の成熟促進のため、陸上水槽に収容し飼育管理を行った。養殖業者から購入した養成親魚（以降、購入養成親魚）は、2000年1月5日に陸上水槽に収容し、1月5日から2000年3月8日（ホルモン投与）までの期間、長日処理（16L8D：電照時間6：30-22：30）および加温処理（19℃一定：0.5℃/dayで昇温後、19℃維持）を行った。また、水試でモジャコから養成した親魚（以降、水試養成親魚）は、2000年4月10日に陸上水槽に収容し、4月10日から4月21日（ホルモン投与）までの期間、長日処理（16L8D：電照時間6：30-22：30）および加温処理（19℃一定：0.5

℃/day で昇温後、19℃維持) を行った。海面生け簀での通常飼育時の餌料は、サバ・オキアミ・イカ・配合飼料 (はまちモイスト FUNE, 日清飼料) を 2 : 1 : 1 : 4 の割合で調整し、総合ビタミン剤 (モア健康プラス BM, エーザイ), アスタキサンチンオイル (天然アスタ1200レッド, 日本ファインフーズ) およびフィードオイル (Aオイル, ツルーレシチン工業) を添加したモイストペレットを用い、週 3 回飽食量給餌した。また、陸上水槽収容時からホルモン投与までの期間は、親魚の卵黄形成期間中の栄養状態を高く維持し、卵質の向上を図るため、ビタミンE剤 (ユベラニコチネート, エーザイ) およびビタミンCカプセルを詰め込んだイカの切り身も週 3 回併用給餌した。Table 13 に供試魚の尾叉長, 体重, 肥満度, 卵巣卵径, 成熟段階, およびホルモン投与日を示した。肥満度 (condition factor, CF) は以下の式で求めた。

$$CF = (BW : g) / (FL : cm)^3 \times 10^3。$$

供試魚 17 個体 (雌 : F 1 - 11, 雄 : M 1 - 6) の平

均尾叉長, 体重および肥満度はそれぞれ 670mm, 6.29kg, および 20.9 であった。また、雌個体は、ホルモン投与直前にカニューラにより卵巣卵を採取し、大型卵 30 個の卵径を測定した後、組織切片を作製し顕微鏡観察を行った。その結果、卵巣卵径は平均 721  $\mu$ m, 成熟段階はいずれも卵黄形成後期であった。

ホルモン投与 雌 : 購入養成親魚 (4 個体) では 2000 年 3 月 8 日に、水試養成親魚 (7 個体) では 2000 年 4 月 21 日にそれぞれ HCG (human chorionic gonadotropin : 帝国臓器製薬) 投与により、排卵を誘導した。HCG は 0.6% NaCl 溶液で溶解し、供試魚への注入量が 0.2ml/kg となるように調整して、麻酔 (2-フェノキシエタノール, 200ppm) した親魚の背筋部に注射して投与した。投与量はこれまでのブリの排卵誘導試験 (中田ら, 1998, 1999, 2001a) で有効性が確認された 500IU/kg とした。

雄 : 試験開始直前に腹部の触診を行い、排精の有無を確認した。その中で排精が良好な個体に対し、購入養成親魚 (3 個体) では 2000 年 3 月 8 日、水試

Table 13. Fish used in the present study

Sex	Fish No.	Fork length (mm)	Body weight (kg)	Condition factor	Oocyte diameter <sup>*1</sup> ( $\mu$ m)	Developmental stage of oocyte <sup>*2</sup> ( $\mu$ m)	Date of HCG injection (in 2000)
Female	F1	694	6.58	19.7	732	LY	8 Mar
	F2	660	5.44	18.9	726	LY	8 Mar
	F3	700	7.22	21.0	711	LY	8 Mar
	F4	697	6.88	20.3	745	LY	8 Mar
Male	M1	728	7.20	18.7	—	—	8 Mar
	M2	713	7.30	20.1	—	—	8 Mar
	M3	700	7.10	20.7	—	—	8 Mar
Female	F5	646	5.82	21.6	728	LY	21 Apr
	F6	654	6.24	22.3	735	LY	21 Apr
	F7	664	5.78	19.7	674	LY	21 Apr
	F8	640	5.76	22.0	756	LY	21 Apr
	F9	650	6.26	22.8	741	LY	21 Apr
	F10	644	6.10	22.8	701	LY	21 Apr
	F11	650	6.04	22.0	686	LY	21 Apr
Male	M4	641	5.30	20.1	—	—	21 Apr
	M5	660	6.14	21.4	—	—	21 Apr
	M6	641	5.72	21.7	—	—	21 Apr

\*1 Diameter of most advanced oocytes in the ovary at the time of HCG injection. Mean (n=30).

\*2 Developmental stage of the largest oocytes. LY, late yolk stage.

養成親魚（3個体）では2000年4月21日にそれぞれHCG（500IU/kg）投与を行い、さらに排精を促進した。

**排卵確認と人工授精** HCG投与後、24、36、42、48、54時間目に雌個体を麻酔（2-フェノキシエタノール、200ppm）した後、腹部の触診により排卵の有無を調べた。排卵時間の確認は、供試魚の腹部を圧迫し排卵された卵が生殖口から流出するか否かで行い、排卵卵が流出し始めた時間を排卵直後とした。排卵が確認された個体については、同一個体から排卵直後（0h）以降、6時間毎にそれぞれ卵を1,000粒前後搾出し、乾導法により人工授精を行った。媒精実験は、卵の受精率または浮上卵率がほぼ0%に近い値に低下するまで続けた。人工授精に用いた精液は媒精の度に採取し、媒精は雌1個体の搾出卵につき雄3個体からの精液（各0.2ml）を用いて行った。排卵が確認されなかった個体については、その時の卵巢卵の状態を把握するため、カニューレションにより卵巢卵を採取し、卵径を測定した。

**浮上卵率、受精率、ふ化率等の算出と卵径測定**  
人工授精により得られた卵（約1,000粒）は洗卵を行った後、浮上卵と沈下卵に分離してそれぞれの卵量を計数し、浮上卵率（浮上卵数/総卵数）を算出した。受精率は、人工授精4時間後の16-32細胞期（水温19℃）に、浮上卵約100粒のうち発生が進んでいる個体の割合で算出した。ふ化率は、浮上卵約200粒のうちふ化した個体の割合で算出した。卵のふ化管理は、人工授精を行った時間および個体別に約200粒の浮上卵を500mlビーカーに収容し、水温19-20℃のウォーターバス、エアーストーンによる微通気条件下で行った。

## 2) 結果

**HCG投与から排卵までの時間** 各個体におけるHCG投与後の排卵状況を Fig. 32 に示した。HCG

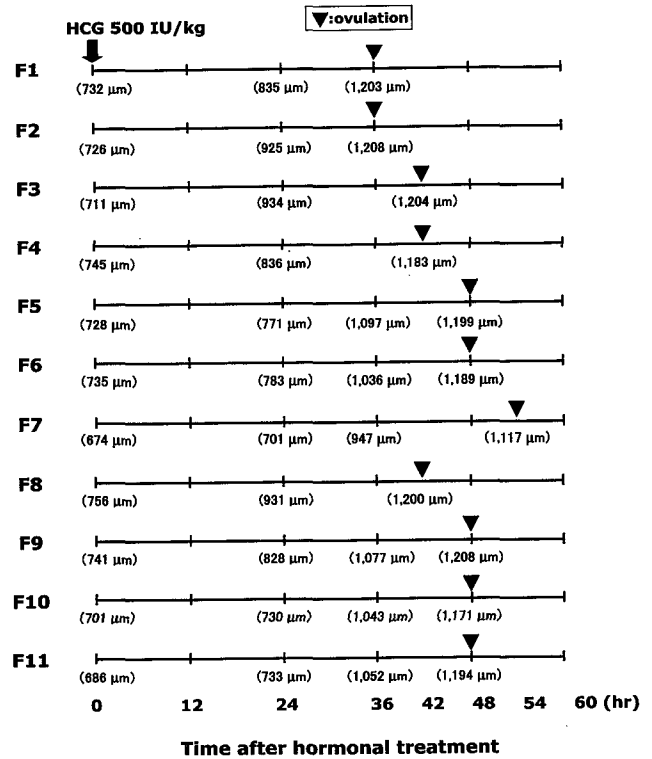


Fig. 32. Ovulation times of eleven different yellowtails after hormonal treatments. Numerals in the parentheses indicate egg diameters at the time of HCG injection, monitoring and ovulation.

（500IU/kg）投与後、最も早く排卵が確認できた時間は、36時間目（F1, 2）であった。その後、42時間目では3個体（F3, 4, 8）が、48時間目では5個体（F5, 6, 9, 10, 11）が、54時間目では残りの1個体（F7）が排卵した。特に、HCG投与後48時間目では11個体中5個体の排卵が集中した。また、今回使用した供試魚のHCG投与時卵径は、674-756μmであったが、これらのすべての個体について排卵を誘導することができた。

**HCG投与後の卵径の変化** 各個体におけるHCG投与後の卵径の変化を Fig. 33 に示した。排卵がHCG投与後36および42時間目に起こった個体（F1, 2, 3, 4, 8）では、HCG投与24から36時間にかけて急激な卵径の増大が認められた。また、排卵がHCG投与後48および54時間目に起こった個体（F5, 6, 7, 9, 10, 11）では、HCG投与24から42時間にかけて急激な卵径の増大が認められた。

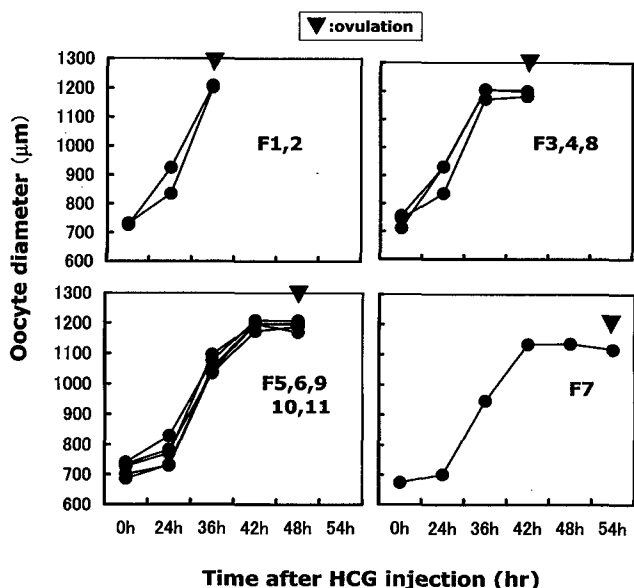


Fig. 33. Changes of oocyte diameter in eleven yellowtails after HCG injection.

浮上卵率, 受精率, ふ化率の変化 雌親魚の個体別にモニターした排卵後経過時間と浮上卵率の関係を Fig. 34 に示した。各個体の排卵直後の浮上卵率は平均89.0% (65.6–98.5%) と非常に高く, 6 時間

後においても平均73.0%と高い値を示した。しかし, その後, 浮上卵率は排卵後経過時間に伴い低下した。浮上卵率の低下が著しい個体 (F1, 5, 6, 7, 8, 9, 10) では, 排卵後12時間目には30%以下となった。浮上卵率低下の割合は各個体間で差は見られるものの, すべての個体で, 排卵後経過時間に伴い浮上卵率は低下した。

個体別にモニターした排卵後経過時間と受精率の関係を Fig. 35 に示した。各個体の排卵直後の受精率は平均92.5% (81.9–98.3%) と非常に高く, 6 時間後においても平均88.0%と高い値を示した。しかし, その後, 受精率は排卵後経過時間に伴い低下した。受精率の低下が著しい個体 (F1, 5, 9, 10) では, 排卵後18時間目には40%以下となった。浮上卵率と同様に, 受精率低下の割合は各個体間で差は見られるものの, すべての個体で, 排卵後経過時間に伴い受精率が低下するという現象が認められた。

また, Fig. 36 に11個体の平均浮上卵率, 平均受精

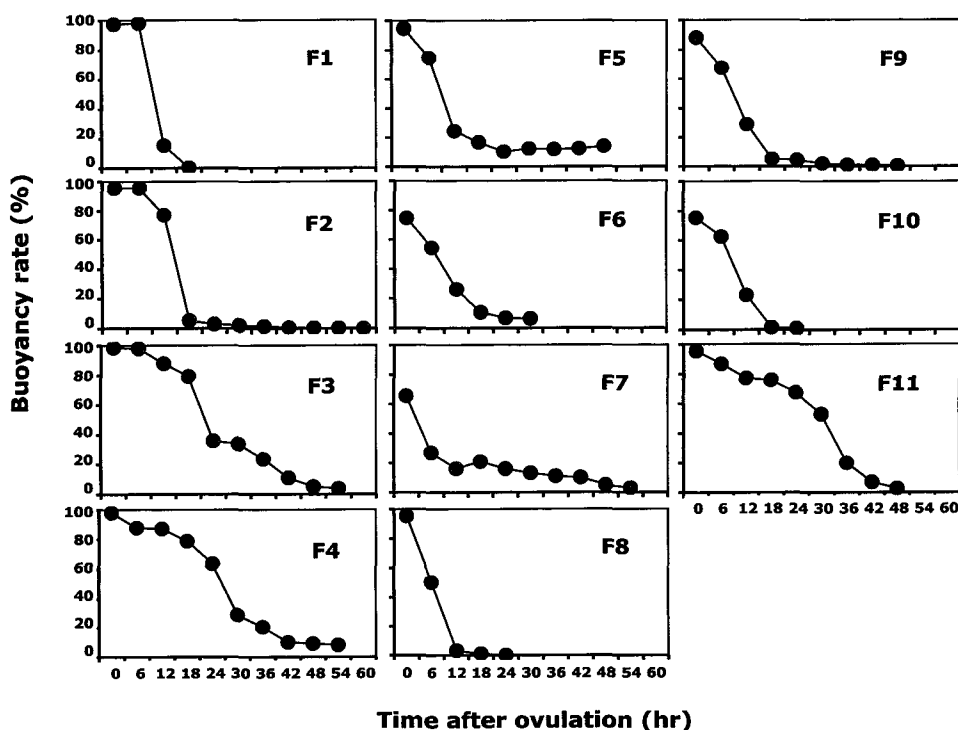


Fig. 34. Changes of buoyancy rates with post-ovulation time in artificially inseminated yellowtail. Eggs of all females were inseminated separately with milt continuously collected from their respective males.

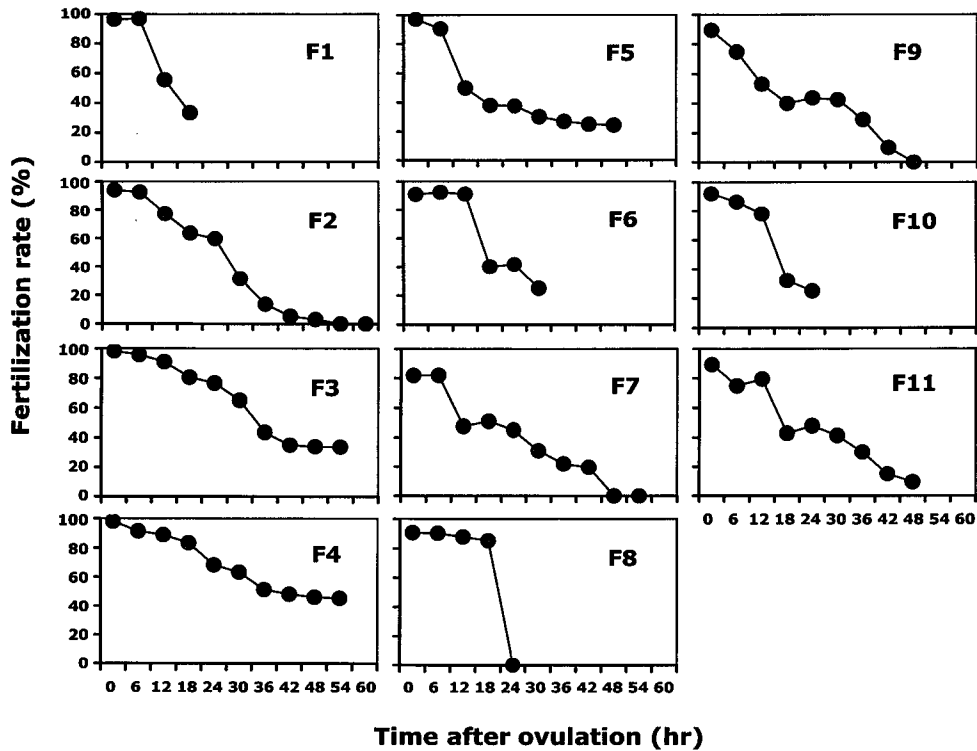


Fig. 35. Changes of fertilization rates with post-ovulation time in artificially inseminated yellowtail. Eggs of all females were inseminated separately with milt continuously collected from their respective males.

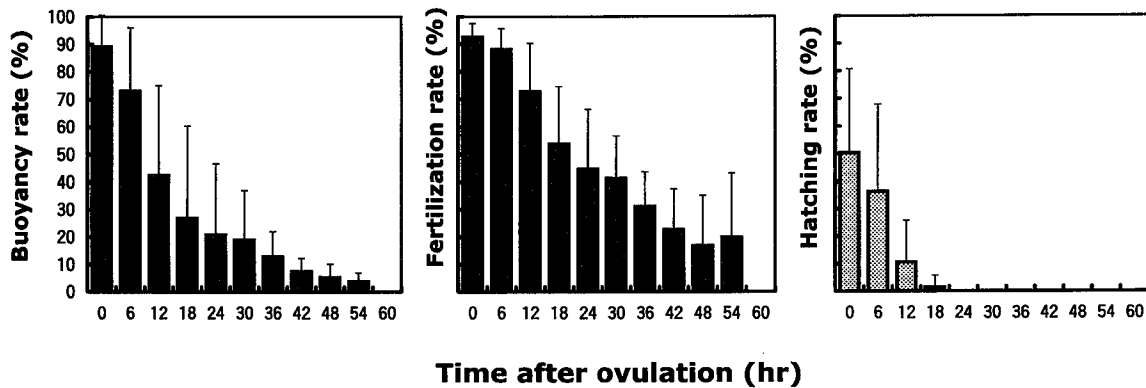


Fig. 36. Changes of buoyancy rates, fertilization rates and hatching rates with post-ovulation time in artificially inseminated yellowtail.

率および平均ふ化率の変化を示した。浮上卵率，受精率，ふ化率とも，排卵後6時間までが高く，その後経過時間とともにそれらの値は低下した。特に，浮上卵率，ふ化率は12時間目で急激に低下し，42.4%および11.0%の値を示した。このことから，排卵後12時間を経過すると，得られる卵の浮上卵率は50%以下で，その後ふ化する仔魚は10%程度しか存在しないことが明らかとなった。

### 3) 考 察

本研究により，ブリ人工授精卵の受精率は，卵が排卵されてからの経過時間，即ち，卵巣腔内滞留時間に依存していることが明らかとなった。即ち，排卵後6時間以内に媒精を行った場合，平均88.0%以上の高い受精率を示したが，その後受精率は急速に低下し，排卵後24時間を経過すると50%以下となった。ふ化率においても同様で，その値は排卵直後が



最も高く、その後経過時間に伴って低下した。実際の種苗生産現場で人工授精を行う際、浮上卵率、受精率およびふ化率を考慮すると、排卵直後に人工授精を行うことが望ましく、遅くとも6時間以内には行う必要があることが判明した。

このことから、事業としてブリの人工授精を行う場合、いかに排卵時刻を確認するかが受精率を左右する決め手となる。一般に排卵を確認する場合、親魚を水槽外に取り出し、腹部を軽くマッサージし、体外に搾出される成熟卵の確認をもって排卵したとみなす。排卵を確認するため、この作業を連続的に繰り返すことは、親魚にとっては斃死につながる過度のストレスとなり、また、複数の親魚を取り扱う作業には多大の労力となる。トラフグでは成熟が完了すると、腹部の膨張と硬化が起こり、その後排卵が起こると腹部は膨張したまま柔らかくなることが確認されている(中田ら, 1998b)。トラフグにおいては、排卵の12-36時間前に起こるこの成熟の完了(腹部の硬化)を指標とし、排卵時間を予測すればよい。しかし、ブリにおいては、トラフグのように腹部の筋肉が薄くないため、直接卵巣の状態を触診で測ることは不可能である。そこで、ブリの排卵予測においては、第2節2-2で述べたとおり、ホルモン投与時の卵径が一つの指標となるであろう。今回の実験では、Fig. 32のF7, 11のようにホルモン投与時の卵径が他の個体と比べて小さい場合(674および686 $\mu$ m)、排卵時間も54および48時間目と遅い傾向にあった。ホルモン投与時の卵径が大きいと排卵までの時間が短く、卵径が小さいと排卵までの時間が長いとすれば、それらを考慮して、人工授精の際の媒精適期を逃さないように、卵径の大きさと触診時間の設定を行えば、より高い確率で良質受精卵が得られるであろう。

以上、本研究により、ブリの人工授精における卵の受精率は、卵が排卵されてからの経過時間に依存

しており、排卵後6時間以内に人工授精を行えば、高い確率で良質受精卵を確保できることが明らかとなった。

#### 2-4. 養成2歳魚に対するHCG投与の排卵誘導効果

我々はブリ *Seriola quinqueradiata* の養殖用人工種苗の安定供給を目的として、平成9年度からブリ親魚の早期における成熟促進とホルモン処理採卵技術の開発研究を行ってきており、これまで、ブリの排卵誘導にはHCG (human chorionic gonadotropin, ヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン) の1回投与(500 IU/kg BW) が最も簡便で有効な排卵誘導方法であること(中田ら, 2001a)、排卵された卵には媒精適期があり、排卵後6時間以内に人工授精を行えば良質受精卵を確保できること(中田ら, 2001b)、HCG投与から排卵までの時間はHCG投与時の卵径に依存しており、卵径計測により排卵時期が予測できること(第2節2-2)、得られる卵量もHCG投与時の卵径に影響されること(第2節2-2)、などを明らかにした。これら一連の研究により、養成ブリ親魚から良質な受精卵を安定して大量に確保する技術的基盤はほぼ整えられたと考えられる。一方、これまでの試験研究にはすべて3歳の養成親魚(平均体重8-12kg)を用いてきたが、養成コストや採卵時の作業効率(親魚運搬、飼育管理、ホルモン処理など)を考慮すると、より低年齢で小型個体から採卵できる方が望ましい。親魚養成期間が短く、取り扱いの容易な養成2歳魚からも採卵が可能であれば、親魚の選択肢も広がり、ホルモン処理による採卵技術も種苗生産現場に普及しやすくなると考えられる。そこで、本研究では、ブリの人工授精による採卵技術開発の一環として、養成2歳魚に対するHCG投与の排卵誘導効果を3歳魚との比較を通して調べた。

1) 材料と方法

**親魚および親魚養成** 1999年8月に養殖業者から購入し、長崎水試で約7ヶ月間短期養成した2歳魚と、天然種苗(モジャコ)から3年半長期養成した3歳魚を親魚として用いた。親魚には磁気タグを装着し、個体識別を行った。通常の飼育管理は海面生け簀で行ったが、環境調節による卵黄形成促進のため、試験開始前に陸上水槽に收容し飼育管理した。3歳魚20個体(雌:15尾,雄5尾)と2歳魚20個体(雌:15尾,雄5尾)を2000年1月5日に100m<sup>3</sup>の陸上水槽に收容し、1月5日から長日(16L8D, 電照時間6:30-22:30)および加温(0.5℃/dayで昇温後,19℃に維持)条件下で飼育した。Table 14に供試魚の尾叉長,体重,卵巣卵径およびHCG投与日を示した。

**HCGによる排卵誘導** 採卵用親魚と同じ条件で飼育してある親魚を一定間隔で3尾ずつ取り上げ、卵巣卵を採取して卵の成長をモニターした。その結果,3歳魚は2月中旬には卵黄形成がほぼ終了する

卵径700μmに達していた。一方,2歳魚は3歳魚より卵黄形成の進行が1週間程度遅れていた。したがって,3歳魚は2000年2月21日に雌全個体(15尾)からカニューラにより卵巣卵を採取した後,大型卵30個の卵径を測定し,卵径が700-740μmにある個体7尾(Table 14, F8-14)を選別した。一方,2歳魚は3月2日に雌全個体(15尾)の卵径を調べ,卵径が700-740μmにある個体7尾(Table 14, F1-7)を選別した。卵径による親魚選別を行った翌日,雌親魚にHCG(500IU/kg BW, 帝国臓器製薬)(中田ら,2001a)を投与した。雄親魚は,雌親魚へのHCG投与前日,腹部の触診により排精状況を調べ,排精が良好な個体それぞれ4尾ずつ(Table 14, M1-4およびM5-8)を選別した後,HCG(500IU/kg BW)を投与した。

**排卵確認と人工授精** 排卵の確認は,供試魚をHCG投与後48時間目に取り上げ麻酔(2-フェノキシエタノール,200ppm)した後,腹部を圧迫し排卵された卵が生殖口から流出するか否かで行った。

Table 14. Fish data used in the present study

Age group	Sex	Fish No.	Fork length	Body weight	Oocyte diameter <sup>*1</sup>	Spermiation	Date of HCG injection (in 2000)		
			(mm)	(kg)	(mm)				
2 years old	Female	F1	713	7.40	736	-	3 Mar		
		F2	697	7.46	733	-	3 Mar		
		F3	690	7.40	728	-	3 Mar		
		F4	698	7.46	723	-	3 Mar		
		F5	690	6.22	714	-	3 Mar		
		F6	673	6.96	708	-	3 Mar		
		F7	665	6.66	705	-	3 Mar		
	Male	M1	682	7.24	-	+ <sup>*2</sup>	2 Mar		
		M2	684	6.72	-	+	2 Mar		
		M3	691	7.52	-	+	2 Mar		
		M4	687	6.62	-	+	2 Mar		
		3 years old	Female	F8	732	8.64	732	-	22 Feb
				F9	730	8.92	730	-	22 Feb
				F10	772	11.40	718	-	22 Feb
F11	758			9.74	714	-	22 Feb		
F12	754			10.56	711	-	22 Feb		
F13	788			11.28	703	-	22 Feb		
F14	720			8.42	702	-	22 Feb		
Male	M5		724	8.02	-	+	21 Feb		
	M6	770	10.22	-	+	21 Feb			
	M7	786	10.74	-	+	21 Feb			
	M8	750	9.72	-	+	21 Feb			

\*1 Oocyte diameter at the time of HCG injection.

\*2 Much volume of milt (over 10 ml) flew out when the abdomen was massaged.

排卵確認後、腹部の圧迫により卵を搾出した後、卵巣を摘出して搾り残し卵を採取した。得られた卵は直ちに乾導法により人工授精を行った。1個体の搾出卵につき雄2個体から採取した精液により媒精した。

浮上卵率、受精率、ふ化率 容積法 (700粒/ml) により浮上卵と沈下卵を計数した後、浮上卵率を算出した。受精率は、人工授精4時間後の16-32細胞期 (水温19℃) に、浮上卵約100粒のうち発生が進んでいる個体の割合で算出した。ふ化率は、浮上卵約200粒のうち、ふ化した個体の割合で算出した。

## 2) 結 果

2歳魚および3歳魚の採卵結果を Table 15 に示した。2歳魚では1個体 (F6) を除くすべての個体から、3歳魚ではすべての個体から受精卵を得ることができた。2歳魚6個体の平均採卵量は22.0万粒で、最も採卵量の多い個体 (F1) からは35.0万粒が得られた。一方、3歳魚7個体の平均採卵量は47.9万粒で、最も採卵量の多い個体 (F8) からは、77.4

万粒が得られた。3歳魚から得られた採卵量、浮上卵量および受精卵量は2歳魚の約2倍であった。また、2および3歳魚の平均浮上卵率、受精率およびふ化率は、それぞれ96.9%、86.4%、59.3%、および97.1%、88.5%、69.5%で、いずれにおいても有意差は認められなかった ( $P>0.05$ , t-test)。

## 3) 考 察

本研究により、HCG を1回投与し、48時間後に人工授精を行うことで養成2歳魚 (卵径700-740  $\mu\text{m}$ ) から良質受精卵を確保できることが明らかとなった。2歳魚からの採卵量は3歳魚の約半分であったが、浮上卵率、受精率およびふ化率を指標とした卵質は3歳魚と比べて遜色なく、2歳親魚は種苗生産用として十分利用可能であると判断された。

通常、ブリの養殖業では種苗 (モジャコ) を導入してから2年以内に出荷を行う場合が多い。今後、養成親魚からの採卵に基づいたブリの種苗生産を展開するに当たり、採卵用の親魚に3歳以上のものを用いた場合、種苗生産業者には1年半以上の親魚養

Table 15. Results of artificial insemination in the cultured yellowtail of 2 and 3 years old with HCG treatment

Age group	Fish No.	Number of eggs ( $\times 10^3$ )			Buoyancy rate (%)	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)
		Total eggs collected	Floating eggs	Fertilized eggs			
2 years old	F1	350	336	309	96.0	91.9	63.3
	F2	203	196	174	96.6	88.9	50.3
	F3	119	112	97	94.1	87.0	45.2
	F4	326	322	299	98.8	92.9	82.7
	F5	249	238	154	95.6	64.5	37.7
	F6	—	—	—	—	—	—
	F7	70	70	65	100.0	93.1	76.6
3 years old	F8	774	756	683	97.7	90.4	67.9
	F9	482	469	381	97.3	81.3	79.6
	F10	189	182	172	96.3	94.4	81.7
	F11	276	259	224	93.8	86.5	61.8
	F12	588	585	552	99.5	94.5	66.4
	F13	693	686	573	99.0	83.5	75.0
	F14	350	336	298	96.0	88.7	54.1

成管理が求められる。しかし、本研究により短期養成した2歳魚からも採卵できることが確認されたことから、養成コストの大幅な削減を伴う採卵用親魚の確保が実現できる見通しがついた。さらに、2歳魚は3歳魚と比較して2-3kg軽量であることから、親魚運搬や麻酔、ホルモン処理などを含む取り扱いにおける労力の軽減が期待される。一方、2歳魚からの採卵量は3歳魚の約半分であったが、親魚の個体間の成熟を同調させる技術（中田ら、2001a, 2001b, 2002b）はすでにあるので、多数の良質親魚を確保することにより、目的とする卵量を確保することは容易に可能となる。長崎県で種苗生産業者がブリの種苗生産を行う場合、事業規模からみて1業者につき受精卵が100-150万粒必要となると試算されるが、2歳魚を用いる場合、7尾前後の雌親魚を養成すれば、目的の受精卵は十分確保できると考えられる。

今回、加温（19℃一定）と長日（16L8D）条件により、1月5日から卵黄形成促進を図ったが、卵黄形成が終了するのに3歳魚の方が1週間程度早かった。卵黄形成を開始した個体に対してコレステロールペレットなどによりGnRHの徐放投与を行うと、卵黄形成が促進され採卵時期が1-2週間程度短縮できることから（未発表資料）、今後は環境調節と適切なホルモン投与方法を組み合わせ、養成2歳魚からの早期採卵技術を確立したい。

### 第3章 トラフグおよびブリのホルモン処理採卵技術の普及指導とその成果

筆者らの研究グループ（長崎水試、九州大学）は、平成5年度から「養成トラフグの成熟促進と採卵技術の開発」事業に着手し、親魚養成から雌雄親魚の成熟誘導に関する各種採卵技術は、ほぼ確立したと考える。平成9年度の採卵試験（採卵マニュアルを

用いた再現試験）結果からも、その再現性は確認できた。現在、このホルモン処理採卵技術は、長崎県内の種苗生産業者を対象にトラフグの採卵技術研修会（平成7年に第1, 2回, 平成8年に第3回）を開催し、その技術の普及指導に努めている。長崎県のトラフグ種苗生産量は全国でもトップレベルで、生産量全体の約28%を占めているが（平成11年度全国栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績. 水産庁, 日本栽培漁業協会）、その生産を行っている県内15種苗生産機関で、本研究のLHRHa コレステロールペレットを用いた採卵が実施されている。また、他県においても、日裁協をはじめ、山口県、三重県、愛知県等の試験研究機関および民間の種苗生産機関で本採卵法は利用され、近年では全国に本採卵法が普及している。

本研究により、養成トラフグ親魚から良質卵を効率良く採卵し、種苗生産に十分利用可能な受精卵を得る方法が示された意義は大きい。近い将来、親魚の供給が困難な天然魚に代わって、漁獲量に左右されない養成親魚からの採卵がさらに推進されるとともに、本採卵法を用いることにより、安定したトラフグ種苗の供給が実現するものと考えられる。今後この養成親魚を用いたホルモン処理採卵技術の普及指導を行い、安定した種苗生産を目指したトラフグの完全養殖化を実現させていきたい。

また、筆者らの研究グループ（長崎水試、九州大学）は、トラフグの採卵技術開発に引き続き、ブリについても平成9年度から「魚介類種苗量産技術開発研究（対象魚種：ブリ）」事業に着手し、平成13年度までに、養成親魚から安定して良質卵を得るための技術基盤は、ほぼ確立したと考える。この採卵技術についても、現在、長崎県内の種苗生産業者を対象に長崎県早期ブリ種苗生産技術研究会（平成11年に第1回, 平成12年に第2回, 平成13年に第3回）を開催し、公的機関および民間機関を問わず、技術普

及に努めている。

現在、ブリの養殖は西日本を中心に盛んに行われているが、その基となる種苗はすべて天然種苗（モジャコ）に依存している。今後、計画的に安定したブリ養殖を行うためには、安定した種苗の確保が必要不可欠となる。近い将来、天然種苗の漁獲量に左右されないブリ養殖を実現させるため、本研究により確立したブリの早期採卵技術を長崎県はもとより、全国に技術普及させていきたい。

## 謝 辞

本研究の全般にわたる指導と本論文の校閲を賜った九州大学大学院農学研究院松山倫也教授に深謝する。本論文の校閲の労をとられ、有益な御助言をいただいた同研究院中園明信教授ならびに松井誠一教授にお礼を申し上げる。

本研究の機会を与えて頂くとともに、ご指導を下さった元長崎県総合水産試験場場長四井敏雄博士、九州大学名誉教授松浦修平博士、研究を進めるにあたり有益な助言とご協力を頂いた長崎県総合水産試験場養殖技術開発指導センター矢田武義所長、同水試種苗量産技術開発センター池田義弘所長、長崎県庁栽培漁業課荒川敏久総括課長補佐、同課原 洋一主査、長崎県総合水産試験場種苗量産技術開発センター種苗量産科宮木廉夫博士に心からお礼申し上げます。

最後に、本研究は長崎県単独事業：H 5 - 7 年度「養成トラフグのホルモン処理による成熟促進と採卵技術の開発」、H 9 - 13 年度「魚介類種苗量産技術開発研究（対象魚種：ブリ）」、トラフグのホルモン処理による成熟促進と採卵技術の開発」文部省科学研究費補助金一般研究(C) (0766027)、および平成 7 年度長崎県先端技術開発協議会助成金によったことを記して、感謝の意を表する。

## 文 献

- 会田勝美・Robert S. IZUMO・佐藤英雄・日比谷京 (1978) 合成LH-放出ホルモンによるマコガレイおよびマハゼの排卵誘発について. 日水誌, 44 (5), 445-450.
- 有元 操・津崎鷹雄・宿輪 仁 (1987) ブリの親魚養成と自然産卵. 栽培技研, 16 (2), 63-79.
- 朝比奈 潔 (1989) 生殖周期とその調節. 水族繁殖学 (隆島史夫・羽生 功編) 緑書房, pp.103-131.
- 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, 728-733.
- 中田 久・松山倫也・原 洋一・矢田武義・松浦修平 (1998a) ホルモン投与により排精されたトラフグ精子の運動能. 九大農学研究院学芸誌, 53, 35-40.
- 中田 久・松山倫也・原 洋一・矢田武義・松浦修平 (1998b) 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.
- 中田 久・原 洋一・宮木廉夫・松山倫也 (1998c) LHRHa コレステロールベレットを用いた養成トラフグからの採卵について. 長崎水試研報, 24, 15-25.
- 中田 久・今吉隆志・荒川敏久・松山倫也 (2001a) ブリ養成親魚の排卵誘導におけるホルモン投与方法の検討. 九大農学研究院学芸誌, 55, 169-177.
- 中田 久・中尾貴尋・荒川敏久・松山倫也 (2001b) ブリ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, 67, 874-880.
- 中田 久・中尾貴尋・荒川敏久・松山倫也 (2002a) 養成ブリ 2 歳魚に対する HCG 投与の排卵誘導効果. 水産増殖, 投稿中.
- 中田 久・中尾貴尋・荒川敏久・松山倫也 (2002b)

- ブリの排卵誘導における HCG 投与時の卵径が排卵時間, 卵量および卵質に及ぼす影響. 日水誌, 投稿中.
- 中田 久・小島良治 (1993) 養成トラフグの成熟促進と採卵技術の開発. 長崎水試事報, 88-89.
- 中田 久・原 洋一 (1994) 養成トラフグの成熟促進と採卵技術の開発. 長崎水試事報, 87-89.
- 中田 久・原 洋一 (1995) 養成トラフグの成熟促進と採卵技術の開発. 長崎水試事報, 78-81.
- Crim, L.W., D.M.Evans, and B.H.Vickerly (1983) Manipulation of the seasonal reproductive cycle of the landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by LHRH analogues administered at various stages of gonadal development. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40, 61-67.
- 電源開発株式会社 (1996) ヒラメ親魚養成試験. 平成7年度温排水利用養殖試験報告書, 4-20.
- Fukada, S., N. Sakai, S. Adachi, and Y. Nagahama (1994) Steroidogenesis in the ovarian follicle of medaka (*Oryzias latipes*, a daily spawner) during oocyte maturation. *Develop., Growth Differ.*, 36, 81-88.
- 福所邦彦・藤村卓也・山本剛史 (1986) 加温循環式水槽によるマダイの親魚養成と早期採卵. 水産増殖, 34, 69-75.
- Harvey, B. and R.N.Kelly (1984) Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. *Aquaculture*, 36, 85-95.
- 広沢国昭 (1972) ブリの採卵について. 栽培技研, 1 (2), 17-24.
- Hirose, K., Y. Machida, and E.M. Donaldson (1979) Induced Ovulation of Japanese flounder (*Limanda yokohamae*) with human chorionic gonadotropin, with special reference to changes in quality of eggs related in the ovarian cavity after ovulation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 45, 31-36.
- 廣瀬慶二・新井 茂 (1988) LH-RH コレステロールペレットによるアユの成熟促進. 養殖研報, 13, 11-16.
- 古満目親魚養成前進基地 (1978) 陸上水槽におけるブリの自然産卵. 栽培技研, 7 (2), 51-54.
- Kobayashi, M., K.Aida, K.Furukawa, Y. K.Law, and I.Hanyu (1988) Development of sensitivity to maturation-inducing steroids in the oocytes of the daily spawning teleosts the kisu, *Sillago japonica*. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 72, 264-271.
- Koya, Y., T.Matsubara, and T.Nakagawa (1994) Efficient artificial fertilization method based on the ovulation cycle in barfin flounder *Verasper moseri*. *Fisheries Science*, 60 (5), 537-540.
- Lee, C.-S., C.S.Tamaru, and C.D.Kelley (1986) Technique for making chronic-release LHRHa and 17  $\alpha$  -methyltestosterone pellets for intramuscular implantation in fishes. *Aquaculture*, 59, 161-168.
- Linhart, O., S.Kudo, R.Billard, V.Slechta, E.V. Mikodina (1995) Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. *Aquaculture*, 129, 75-93.
- 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.
- 松山倫也・香川浩彦・竹内宏行・柏木正章・岩井寿夫・廣瀬慶二 (1992) 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・産卵促進効果. 水産増殖, 40 (2), 159-165.
- Matsuyama, M., M.Hamada, T.Ashitani, M.

- Kashiwagi, T., Iwai, K., Okuzawa, H., Tanaka, and H. Kagawa (1993) Development of LHRH-a copolymer pellet polymerized by ultraviolet and its application for maturation in red sea bream *Pagrus major* during the non-spawning season. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 1361-1369.
- Matsuyama, M., H. Takeuchi, M. Kashiwagi, K. Hirose, and H. Kagawa (1995) Induced gonadal development and spawning of immature red sea bream *Pagrus major* with LHRH administration indifferent ways during winter season. *Fisheries Science*, 61, 472-477.
- 松山倫也・香川浩彦・有元 操・丸山敬悟・広辻日出夫・柏木正章・劉鋭 (1996) 胎盤性生殖腺刺激ホルモン投与により誘起されたブリ卵巣卵の成熟過程. *水産増殖*, 44, 189-195.
- 松山倫也・中田 久・池田義弘・田中宏之・松浦修平 (1997) 各種ホルモン投与法により誘起された養成トラフグの成熟, 排卵課程. *水産増殖*, 45, 67-73.
- Matsuyama, M., S. Morita, T. Nasu, and M. Kashiwagi (1998) Daily spawning and development of sensitivity to gonadotropin and maturation-inducing steroid in the oocytes of the bambooleaf wrasse *Pseudolabrus japonicus*. *Env. Biol. Fish.*, 52, 281-290.
- 松山倫也・太田耕平 (2000) 性ステロイドホルモン. 魚類の配偶子形成機構. 水産における基礎と応用. (松山倫也, 小林牧人, 足立伸次編), 月刊海洋, 32, 81-89.
- Miura, T., K. Yanauchi, H. Takahashi and Y. Nagahama (1991) The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *J. Exp. Zool.*, 261, 359-363.
- 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, 439-442.
- Morisawa, S. and M. Morisawa (1988) Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. *J. Exp. Biol.*, 136, 13-22.
- 虫明敬一・新井 茂・松本 淳・新聞脩子・長谷川泉 (1993) モイストベレットで飼育した養殖ブリ2年魚の人工採卵. *日水誌*, 59 (10), 1721-1726.
- 虫明敬一・川野一利・Wisuthi Verakunpiriya・渡邊 武・長谷川 泉 (1995) 市販ソフトドライベレットを給餌したブリの採卵結果. *日水誌*, 61 (4), 540-546.
- 虫明敬一 (1996) シマアジおよびブリの親魚養成技術に関する研究. 特別研究報告9号, 日本栽培漁業協会, 東京, pp. 62.
- Mushiake, K., K. Kawano, T. Kobayashi and T. Yamasaki (1998) Advanced spawning in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, by manipulations of the photoperiod and water temperature. *Fisheries Sci.*, 64, 727-731.
- Nagahama, Y. and S. Adachi (1985) Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, *Oncorhynchus rhodurus*. *Dev., Biol.*, 109, 428-435.
- 野村 稔・酒井 清・隆島史夫 (1974a) ニジマス卵の過熟現象について—I “過熟卵” の形態ならびに出現時期. *日水誌*, 40, 977-984.
- 野村 稔・酒井 清・隆島史夫 (1974b) ニジマス卵の過熟現象について—II 過熟課程における発眼率, ふ化率および異常稚魚出現率の変化. *日水誌*, 41, 855-860.
- Norberg, B., V. Valkner, J. Huse, I. Karlson, and

- G.L.Grung (1991) Ovulatory rhythm and egg viability in the Atlantich alibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 97, 365-371.
- 落合 明・榎田 晋 (1971) ブリとくに養殖ブリの性成熟の状態と人工採卵.高知水試「ブリの種苗生産に関する研究」報告, I, 51-59.
- 落合 明・鍋島 浩・榎田 晋・長谷川 泉 (1980) 産卵期中のブリ生殖腺の成熟と体部粗脂肪の量的変化について. 日水誌, 46 (4), 407-412.
- Ohta, H., H.Shinma, and K.Hirose (1995) Relationship between fertility and motility of cryopreserved spermatozoa of the amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Fisheries Science*, 61, 886-887.
- Ohta, H., H.Kagawa, H.Tanaka, H.Okuzawa, K.Hirose (1996) Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy -4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 139, 291-301.
- 太田博巳 (1996) 雄の成熟促進技術. ウナギの初期生活史と種苗生産の展望 (多部田修編). 水産学シリーズ107, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 108-118.
- Ohta, K., M. A.Rhaman, H.Chuda, M.Yoshikuni, Y.Nagahama, and M.Matsuyama (2001) Maturation-inducing hormone and it's membrane receptor in ovaries of Japanese yellowtail, *Seriola quenqueradiata*. Proceedings of the International Commemorative Symposium, 70th Anniversary of JSFS, Yokohama, No. 111.
- Patino, R. and P.Thomas (1990) Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the Atlantic croaker: Evidence for two distinct stages of gonadotropic control of final oocyte maturation. *Biol. Reprod.*, 43, 818-827.
- Rhaman, M.A., K.Ohta, H.Chuda, M.Yoshikuni, Y.Nagahama, and M.Matsuyama (2000) Steroidogenesis and membrane receptor for  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in ovaries of yellowtail. Proceedings of the 4th Int. Symp. Fish Endocrinology, Seattle, pp.72.
- Rahman, M.A., K.Ohta, H.Chuda, S.Nakano, S.Maruyama, and M.Matsuyama (2001) Gonadotropin- induced steroidogenic shift towards maturation- inducing hormone in a marine carangids, *Seriola quinqueradiata* (Japanese yellowtail) during final oocyte maturation. *J. Fish Biol.*, 58, 462-474.
- Sherwood, N.M. and B.Harvey (1986) Topical absorption of Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 61, 13-19.
- 水産庁・全かん水・鹿児島県 (1992) 魚類養殖対策調査事業. トラフグの養殖マニュアル, 29pp.
- 鈴木 亮 (1975) コイの排卵後における卵巣腔内滞留時間と発生能力. 養殖研報, 1, 1-6.
- 多部田修 (1986) トラフグの分布と生態. 日本水産保護協会月報, 262, 11-21.
- 田川 勝 (1996) 東シナ海・黄海で実施した標識放流結果からみたトラフグの回遊生態. 西水研研報, 74, 73-83.
- 内田秀和 (1990) トラフグの資源生態に関する研究 2. 標識放流からみた筑前海産トラフグの分布と移動. 福岡水試研報, 16, 7-13.
- 内田恵太郎・道津喜衛・水戸 敏・中原官太郎 (1958) ブリの産卵および初期生活史. 九大農芸誌, 16 (3), 329-342.



楳田 晋・広沢国昭・落合 明 (1969) 高知県古満目漁場に来遊するブリ産卵群とシナホリンによる成熟促進について. 日水誌, 35 (5), 446-450.

楳田 晋・落合 明 (1971) 産卵前後における養成ブリの成熟について. 魚類学雑誌, 18 (4), 175-181.

楳田 晋・水内俊郎・落合 明・長谷川 泉 (1981) 催熟したブリ親魚の水槽内産卵について. 栽培技研, 10 (2), 127-131.

Zhu, Y., M.Kobayashi, K.Furukawa, and K.Aida (1994) Gonadotropin develops sensitivity to maturation-inducing steroids in the oocytes of the daily spawning teleost, tobinumeri-dragonet *Repomucenus beniteguri* and kisu *Sillago japonica*. *Fisheries Science*, 60, 541-545.

## 要 約

### トラフグおよびブリの親魚養成と採卵技術に関する研究

#### 1. 水温および日長調節によるトラフグ親魚の卵黄形成促進

通常のトラフグの産卵期 (4 - 5月) より早く採卵することを目的として, 環境調節による卵黄形成促進を行った。海面生け簀で飼育された親魚を10月に室内水槽に収容した。日長は, 短日条件 (10L14D) に設定し, 12月から翌年の採卵時期 (2月下旬) までは長日条件 (14L10D) に設定した。水温は10月下旬から11月下旬にかけて23℃から14℃に下げ, 10日間14℃を維持した後, 徐々に17℃まで昇温し, 2月下旬まで17℃一定で飼育した。その結果, 11月初旬の平均卵巣卵径は173 $\mu$ mであったが, 1月には657 $\mu$ mに達し, 2月下旬には平均902 $\mu$ mとなり,

卵黄形成はほぼ完了していた。このように, 冬季の環境調節により卵黄形成を促進でき, 2月下旬以降, ホルモン投与が可能な卵径900 $\mu$ m以上の親魚を確保できることが明らかとなった。

#### 2. 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, 排卵課程

養成トラフグにおいて, 各種ホルモン投与方法により誘起された最終成熟から排卵に至るまでの卵巣卵の発達状況変化を卵巣卵バイオプシーによりモニターした。LHRHa コレステロールペレット (LHRHa 400 $\mu$ g/kg) またはオスモティックポンプ (LHRHa 50 $\mu$ g/day/fish) の1回投与により, 卵黄蓄積が完了した卵巣卵を持つ養成3歳魚の成熟と排卵を誘導することができた。HCG (500IU/kg) とシロザケ脳下垂体 (SP) 磨砕物 (7 mg/kg) の混合液を5日毎に投与する方法においても, 卵成熟と排卵が誘起できた。全親魚のうち, 卵巣卵径800 - 900 $\mu$ mの個体のホルモン投与から排卵に至るまでの期間は, 平均18.8日となった。これに対して, 卵巣卵径900 $\mu$ m以上の個体の排卵に至るまでの期間は, 平均10.6日となった。ホルモン無処理個体の卵巣卵は未発達で, その後退行した。これらの結果から, LHRHa コレステロールペレットの1回投与はトラフグの成熟, 排卵誘導に効果的であることが示された。また, 卵巣卵バイオプシーによるホルモン投与時卵径の調査は, 個体間の産卵を同調を図る上で重要であることが示された。

#### 3. トラフグ養成親魚からの採卵技法の開発

養成トラフグからの採卵技術開発の一環として, LHRHa コレステロールペレットと生殖腺刺激ホルモン (HCG・SP) との組み合わせ投与により成熟卵を効率的に得る方法を開発した。卵径800 $\mu$ m以上の親魚へ LHRHa コレステロールペレット (400 $\mu$ g/

kg) を1回投与して100%の個体に卵成熟を誘起させた後、さらにHCG・SPを投与することによって、96-120時間後に排卵が集中して起こり、成熟卵を効率的に得ることができた。本法によりトラフグ養成親魚から良質受精卵を安定的に得ることが可能となった。

#### 4. 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

トラフグの人工授精を行う際の媒精適期を検討するため、排卵後経過時間と受精率との関係を調べた。卵黄形成がほぼ終了した雌親魚10尾にLHRHa (400 µg/kg) コレステロールペレットを投与し、成熟、排卵を誘導した。排卵は、卵の最終成熟後18-36時間に起こり、排卵後4時間以内の平均受精率は70.5%と高く、その後時間の経過と共に受精率は低下し、排卵36時間後に全個体で0%となった。このように、受精率は、排卵された卵の卵巣腔内滞留時間に依存しており、トラフグの人工授精で高い受精率の卵を得るためには、排卵の的確な予測を行い、排卵後短時間のうちに媒精することが必要なことが明らかとなった。

#### 5. ホルモン投与により排精されたトラフグ精子の運動能

十分に成熟した精巢を持つトラフグ3歳魚に、HCG (500IU/kg) とシロザケ脳下垂体磨砕物 (7 mg/kg) の混合液の1回投与後、1, 2日目には、排精を誘導することができた。実験1では、ホルモン投与後毎日5個体の雄から精液を採取し、スパマトクリット値と精子運動能(全ての精子がその前進運動を止めるまでの時間)を30日間調査した。スパマトクリット値は、最初の10日間は30-59%と低い値を維持し、その後徐々に増加し、23日後には80%を越えた。一方、精子の運動能は試験期間中60

秒前後で安定した値を示した。実験2において、精液は、排精している雄10個体から、最初のサンプリング後2, 4, 8, 12, 16, 20, そして24時間目の短時間間隔で、連続的にサンプリングした。スパマトクリット値は、29-83%と大きな幅が認められたが、個体間では試験期間中安定した値を維持していた。精子の運動時間も、60-80秒と安定していた。これらの結果から、HCG・SP混合液の1回投与は養成トラフグの排精を誘起、同調化させるのに有効であることが分かった。その様なホルモン処理を施した個体から採取した精液は、スパマトクリット値に関係なく安定した運動性を示し、このことは長期間にわたる人工授精に有効であると考えられた。

#### 6. 水温および日長調節によるブリ親魚の卵黄形成促進

環境調節(水温、日長)によりブリの卵黄形成促進を行うために、4つの環境調節方法(A-D実験群)を実施し、卵巣卵の成長を比較した。A群: 11月中旬に陸上水槽に収容し、12月1日以降、加温(19℃一定)および長日(16L8D)条件で飼育。B群: 11月中旬に陸上水槽に収容し、12月1日以降、加温(16℃一定)および長日(16L8D)条件で飼育。C群: 1月初旬に陸上水槽に収容し、加温(19℃一定)および長日(16L8D)条件で飼育。D群: 海面生け簀で自然水温、自然日長条件下で飼育。11月におけるA-D群の卵巣卵径はいずれも100-140µmの無卵黄卵であった。ブリの卵黄形成がほぼ終了する卵径700µmに達した時期は、それぞれ、1月31日(A群)、2月20日(B群)、2月25日(C群)および4月21日(D群)であった。このように、親魚の陸上水槽収容時期と、収容後の水温および日長条件を変えることにより、排卵誘導が可能な卵径700µm以上の親魚を2月以降の目的とする時期に確保できることが明らかとなった。

## 7. ブリ養成親魚の排卵誘導におけるホルモン投与法の検討

ブリ養成親魚からの人工授精による採卵技術開発の一環として、HCG 1回投与法、HCG プライミング法、およびLHRHa コレステロールペレット埋め込み法により排卵誘導を行い、最適なホルモン投与法を検討した。卵黄形成がほぼ終了した雌43個体を用い、各ホルモン投与法により排卵誘導を行った結果、HCG 1回投与法およびHCG プライミング法では、ホルモン投与後48時間目から排卵が確認され、その48時間目に大部分の個体の排卵が集中した。一方、LHRHa コレステロールペレット埋め込み法では、やや排卵時間が遅い傾向がみられた。各ホルモン投与法による排卵誘導の結果、採卵量の増大にはHCG プライミング法が、浮上卵率や卵質の向上にはLHRHa コレステロールペレット埋め込み法が有効であることが確認された。しかし、ホルモン投与時の作業性や多量に使用するホルモンの価格等を総合的に考慮すると、ブリにおける排卵誘導方法としては、HCG 1回投与法が最も簡便で有効であると考えられた。

## 8. ブリの排卵誘導におけるHCG投与時の卵径が排卵時間、卵量および卵質に及ぼす影響

ブリの人工授精による採卵技術の向上を目的として、HCG 投与時の卵径が排卵時間、卵量および卵質に及ぼす影響を調べた。卵径650–800 $\mu\text{m}$ の養成3歳雌魚33尾にHCG (500IU/kg BW) を投与して成熟および排卵を誘導した。その結果、HCG 投与時の卵径 (D,  $\mu\text{m}$ ) と排卵までの時間 (T, hour) には、 $T = -0.082D + 105.99$  ( $R^2 = 0.51$ ) の式で表わされる明確な負の相関関係が認められ、HCG 投与時に卵径を計測することで、排卵時刻をある時間範囲で正確に予測できることが明らかとなった。ま

た、卵量は卵径700–800 $\mu\text{m}$ の個体で約53万粒/尾の卵が得られ、650–700 $\mu\text{m}$ の個体ではその半数であった。しかし、排卵直後に人工授精を行えば、いずれの卵径グループでもHCG 投与時の卵径に関わらず良質な受精卵が得られ、種苗生産用受精卵として利用可能なことが明らかとなった。

## 9. ブリの人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係

ブリの人工授精を行う際の媒精適期を検討するため、排卵後経過時間と受精率との関係を調べた。卵黄形成がほぼ終了した雌親魚11個体にHCG (500IU/kg) を投与し、最終成熟および排卵を誘導した。排卵は、HCG 投与後36–54時間に起こり、排卵直後の平均受精率は92.5%と高く、その後時間の経過と共に受精率は低下し、排卵48時間後に16.7%となった。このように、受精率は、排卵された卵の卵巣腔内滞留時間に依存しており、ブリの人工授精で高い受精率の卵を得るためには、排卵の的確な予測を行い、排卵後短時間のうちに媒精する必要があることが明らかとなった。

## 10. 養成ブリ2歳魚に対するHCG投与の排卵誘導効果

年齢が若く小型の養成ブリ2歳魚から受精卵を得ることを目的として、成熟および排卵の誘導と、それに続く人工授精による採卵を試みた。卵巣卵バイオプシーにより卵巣卵径を測定し、卵黄形成を確かめた後、卵巣卵径が700–740 $\mu\text{m}$ の個体を選別した。HCG (500IU/kg) の1回投与により、1個体を除くすべての個体で48時間後に成熟および排卵を誘導することができた。排卵直後に人工授精を行うことで、1尾当たり18.3万粒の受精卵を得ることができた。

## Summary

### Studies on the Broodstock Management and Techniques for Inducing Maturation and Ovulation in Tiger Puffer, *Takifugu rubripes*, and Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*

#### 1. Acceleration of Vitellogenesis in Cultured Tiger Puffer, *Takifugu rubripes* by Controlling Daylength and Water Temperature

In this experiment, fish were transferred to the experimental indoor tanks in October. The daylength was kept at 10 hours (10L14D) during the period from October to November, while 14 hours (14L10D) from December to February. The water temperature was gradually dropped from 23 to 14°C during the period from late October to late November, kept at 14°C for 10 days, and thereafter raised to 17°C by degrees and finally kept at 17°C up to the end of the experiment. Consequently, the mean oocyte diameter of 173 $\mu$ m in early November grew up to 657 $\mu$ m in January, and in late February it came up to 902 $\mu$ m which corresponds to the size of completion of vitellogenesis. Thus, the environmental manipulations mentioned above have an effect for acceleration of vitellogenesis in cultured tiger puffer.

#### 2. Induction of Ovarian Maturation and Ovulation in Cultured Tiger Puffer *Takifugu rubripes* by Different Hormonal Treatments

The changes in ovarian development during final oocyte maturation and ovulation induced

by different hormonal treatments in cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* were monitored by ovarian biopsy. Single implantation of LHRHa (des-Gly<sup>10</sup>[D-Ala<sup>6</sup>]-LHRH ethylamide) cholesterol pellet (LHRHa 400 $\mu$ g/kg) or osmotic pump (LHRHa 50 $\mu$ g/day/fish for 2 weeks) successfully induced ovarian maturation and ovulation in three-year-old cultured tiger puffer with yolk-laden oocytes. Repeated injections of HCG (500IU/kg) combined with chum salmon pituitary (SP) homogenate (7mg/kg) every 5 days also induced ovarian maturation and ovulation. Overall, the mean time span from the beginning of hormonal treatment of fish with initial oocyte size between 800 and 900 $\mu$ m in diameter to ovulation was 18.8 days. In contrast, the mean time span in fish with initial oocyte size over 900 $\mu$ m in diameter was 10.6 days. Oocytes in the control fish receiving no hormones did not develop and became atretic. The results obtained indicate that a single implantation of LHRHa cholesterol pellet is efficient for inducing maturation and ovulation of cultured tiger puffer. Also, the monitoring of initial oocyte diameter by ovarian biopsy was found to be important for achieving synchronous spawning of several fish.

#### 3. Development of the Maturation- and Ovulation-induction Method in Cultured Tiger Puffer *Takifugu rubripes* by Hormonal Treatments

We developed an effective method for the induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by

hormonal treatments, in order to supply the fertilized eggs for seedling production. Ovarian biopsy just prior to the hormonal treatments revealed the oocyte diameter and developmental stages of the oocytes. A luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) cholesterol pellet ( $400\mu\text{g}/\text{kg}$ ) implantation successfully induced oocyte maturation for three-year-old cultured tiger puffer which had yolk accumulated ovaries. Thereafter single injection of HCG ( $500\text{IU}/\text{kg}$ ) combined with chum salmon pituitary (SP) homogenate ( $7\text{mg}/\text{kg}$ ) was applied to the fish to synchronize ovulation among fish. Ovulation mainly occurred between 96 and 120 hours after HCG+SP injection. Thus, a technique for obtaining eggs of high quality from the cultured tiger puffer was developed.

#### 4. Relationship between Post-ovulation Time and Fertilization Rate of eggs in Artificial Insemination of Tiger Puffer, *Takifugu rubripes*

This study was conducted to examine the relationship between post-ovulation time and fertilization rates of artificially inseminated eggs of tiger puffer *Takifugu rubripes*. After hormonal treatment using cholesterol pellet incorporating LHRHa ( $400\mu\text{g}/\text{kg}$ ), four-hour interval palpation was performed to check expansion and hardening of the abdomen due to hydration of oocyte which indicates the completion of final oocyte maturation. Ovulation occurred between 18 and 36 hours after confirming hydration. The fertilization rate of the eggs collected from ten fish decreased as the time increased, showing 70.5% (peak), 7.7% and

finally 0% within 4, 24 and 36 hours after ovulation, respectively. These results suggest that artificial fertilization of tiger puffer must be carried out immediately after ovulation in order to obtain good quality eggs.

#### 5. Sperm Motility of Tiger Puffer *Takifugu rubripes* during Spermiation Induced by Hormonal Treatment

One or two days after single injection with HCG ( $500\text{IU}/\text{kg}$ ) and chum salmon pituitary homogenate ( $7\text{mg}/\text{kg}$ ) combinedly, spermiation was successfully induced in three-year-old cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* with fully grown testis. In experiment 1, milt was sampled from five males every day after hormone injection, and spermatocrit and motility of spermatozoa (time until all spermatozoa cease their forward movement) were monitored for 30 days. Spermatocrit maintained low values (30-59%) for early 10 days, thereafter gradually increased and exceeded 80% after 23 days. In contrast, motility of spermatozoa showed stable values around 60 second during experimental period. In experiment 2, milt was sampled successively from spermated 10 males at short time intervals; 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 hours after first sampling (0 hour). Spermatocrit showed a wide range (29-83%), but individual spermatocrit maintained stable value during the experimental period. Motility of spermatozoa also maintained stable values between 60 and 80 second. The results obtained indicate that a single injection with HCG and chum salmon pituitary combinedly is efficient for inducing and synchronizing spermiation of

cultured tiger puffer. Milt stripped out the fish after such hormonal treatment showed stable motility instead of spermatocrit, and it may be useful for artificial fertilization over a long period of time.

#### 6. Acceleration of Vitellogenesis in Cultured Yellowtail, *Seriola quinqueradiata* by Controlling Daylength and Water Temperature

To accelerate the vitellogenesis of cultured yellowtail, four experiments with four experimental fish groups were performed at different environmental conditions. In experiment I (Group A), fish were transferred to the indoor tanks in mid November, daylength (DL) and water temperature (WT) were fixed at 19°C and 16L8D, respectively. In experiment II (Group B), fish were transferred in mid November, fixing DL and WT at 16OC and 16L8D, respectively. In experiment III (Group C), fish were transferred in early January, fixing DL and WT at 19°C and 16L8D, respectively. Fish Group D were reared under the natural DL and WT in the sea pen. At the start of experiments in mid November, the mean oocyte diameters in different four groups were the same, 100-140  $\mu$ m, being at pre-vitellogenic stage. The dates at which oocyte diameter of fish in four fish groups A, B, C and D grew up to 700 $\mu$ m corresponding to the size of completion of vitellogenesis were 31 Jan., 20 Feb., 25 Feb., and 21 Apr., respectively. Thus, acceleration of vitellogenesis in cultured yellowtail was enhanced by maintaining the long photoperiod and higher water temperature during the

winter, and we could obtain the fish with fully grown up oocyte at the time when we demand by applying combination of appropriate environmental manipulations.

#### 7. Hormonal Treatment for Induction of Oocyte Maturation and Ovulation in Cultured Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*

Induction of oocyte maturation and ovulation in Japanese yellowtail *Seriola quinqueradiata* is necessary for mass production of early juvenile used for sea-farming. Higher water temperature (19°C) and long photoperiod (16L8D) enhanced the earlier growth of gonads. After confirming the yolk accumulation by monitoring egg diameter through ovarian biopsy, three different ways of hormonal treatment were applied to induce oocyte maturation and ovulation in cultured four-year-old female fish. Egg quality, represented by the fertilization rate and hatching rate, in the first experimental group (single injection of HCG (500IU/kg)) showed the highest values among three different hormonal treatments. Moreover, in this group ovulation occurred at around 48 hours after the HCG injection. In the second experimental group (priming injection of HCG (100 or 50IU/kg) + one day after HCG injection (500IU/kg)), the largest quantity of ovulated eggs per fish was obtained, however, the egg quality was lowest among the three groups. Quality of the eggs from the third experimental group (single implantation of LHRHa cholesterol pellet, LHRHa 200 or 400 $\mu$ g/kg) was relatively high, but egg number per fish showed

the lowest level. Therefore, it is concluded that a single injection of HCG is the most simple and efficient method to induce oocyte maturation and ovulation for obtaining a large quantity of fertilized eggs with good quality in the cultured yellowtail.

#### 8. Effects of Oocyte Diameter on Ovulation Time, Quantity, and Quality of Eggs in Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, in inducing ovulation with HCG

Effects of initial oocyte diameter on ovulation time, quantity and quality of eggs in the cultured yellowtail in inducing ovulation with HCG injection were examined. After measuring the oocyte diameter through ovarian biopsy, all fish (N=33) were divided into three groups according to their oocyte diameter; 650-700 $\mu$ m, 700-750 $\mu$ m, and 750-800 $\mu$ m, and injected with HCG (500IU/kg). A single injection of HCG could induce oocyte maturation and ovulation in all the fish of three groups. The relationship between ovulation time (T, hour) and oocyte diameter (D,  $\mu$ m) was represented as follows;  $T = -0.082D + 105.99$  ( $R^2 = 0.51$ ), which has made it possible for us to make an estimate the ovulation time. Enough volume of eggs, ca 530 thousands eggs per fish, could be obtained from fish with initial oocyte diameter over 700 $\mu$ m, while only a half volume of eggs was collected from fish with 650-700 $\mu$ m in oocyte diameter. It has been clarified, however, that high quality of eggs could be obtained from all three groups regardless of initial oocyte diameter when the artificial insemination had been performed just after ovulation.

#### 9. Relationship between Post-ovulation Time and Fertilization Rate of Eggs in Artificial Insemination of Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*

This study examined the relationship between post-ovulation time and fertilization rates of artificially inseminated eggs of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Ovulation was induced by a single injection of HCG (500IU/kg) and occurred between 36 and 54 hours. The fertilization rates of the eggs collected from eleven fish decreased with time after ovulation from 92.5% (0 hour) to 16.7% (48 hours). The hatching rates of the eggs collected from the eleven fish also decreased, and they were 50.3% (peak), 10.6% and finally 0% at 0, 12 and 24 hours after ovulation, respectively. These results suggest that artificial fertilization of yellowtail must be carried out immediately after ovulation in order to obtain eggs of good quality.

#### 10. Effects of HCG Injection on Oocyte Maturation and Ovulation in Cultured Two-year-old Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*

In the present study, induction of maturation and ovulation and subsequent artificial insemination were tried in the cultured two-year-old brood stock of yellowtail, *Seriola quinqueradiata* to acquire fertilized eggs from young fish. After confirming the yolk accumulation by monitoring oocyte diameter through ovarian biopsy, fish with oocyte sizes between 700 and 740  $\mu$ m were selected. A single injection of HCG (500IU/kg BW) could induce oocyte maturation and ovulation after 48

hours in all the fish except one. Enough volume (183,000eggs/fish) of fertilized eggs were

obtained by the artificial insemination performed just after ovulation.