

## トラフグ天然親魚における成熟促進のためのホルモン投与方法の比較

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者	鈴木, 康仁 竹村, 明洋
巻/号	44巻1号
掲載ページ	p. 85-90
発行年月	1996年3月

## トラフグ天然親魚における成熟促進のための ホルモン投与方法の比較

鈴木康仁<sup>1)</sup>・\*<sup>1</sup>・竹村明洋<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>福井県栽培漁業センター, (<sup>2)</sup>琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底実験所)

### Comparison of Hormonal Treatments for Induction of Oocyte Maturation and Ovulation in the Tiger Puffer, *Takifugu rubripes*

Yasuhito SUZUKI and Akihiro TAKEMURA

#### Abstract

Single or combined hormone treatments were made in the tiger puffer, *Takifugu rubripes*, in order to compare their effects on induction of oocyte maturation and ovulation. Fifteen mature females (2.5 to 7.8 kg), which were caught with fixed nets around the coast of Fukui Prefecture between April 26 and May 10, 1993, were divided into four experimental groups: human chorionic gonadotropin (HCG) group (200 IU/kg HCG at day 0 and 1000 IU/kg at day 3), HCG + chum salmon pituitary extract (HCG + SP) group (500 IU/kg HCG and 10 mg/kg SP at day 0), LHRHa (LHRH) group (0.7 to 1.0 mg/kg LHRH at day 0), and control (1 ml/kg saline). Oocyte maturation and ovulation were observed in all the surviving fish of the HCG and HCG + SP groups and part of the LHRH group. No ovulatory effect was observed in the control group. These results suggest that HCG and SP were both effective for induction of ovulation of this fish. Number and diameter of eggs from the successfully ovulated fish ranged from 279,000 to 792,000 and from 1.21 to 1.30 mm, respectively. Large differences in hatching rate (0 to 83 %) were recognized among batches.

トラフグ, *Takifugu rubripes* の種苗生産は、現在のところ漁獲時に完熟卵を持つ天然親魚を使って行われていることが多い。近年の本種の資源減少により、天然からこのような親魚を得ることが非常に困難となっており、良質種苗を安定的に確保するうえで大きな問

題となっている。

胎盤性性腺刺激ホルモンやシロサケ脳下垂体抽出物などのホルモン処理による本種の成熟促進は、これまでも天然親魚<sup>1)</sup>や養成親魚<sup>2)</sup>・\*<sup>2</sup>・\*<sup>3</sup>を用いて試みられ、種苗確保の見通しが立ちつつある。しかしながら現段

受領日：1995(H7)年5月30日

索引語：トラフグ/ホルモン処理/成熟/排卵

連絡先：〒914 福井県敦賀市浦底23 福井県水産試験場 鈴木康仁

Address : Y. SUZUKI, Fukui Prefectural Fisheries Experimental Station, 23 Urasoko, Tsuruga, Fukui 914, Japan

\*<sup>1</sup> 現在は福井県水産試験場

\*<sup>2</sup> 古川 清・松居 隆・会田勝美・河野迪子・佐藤英雄・山森邦夫・福田英希・大石 剛 (1992) : トラフグの性成熟に関する研究-I. 養成親魚からの採卵. 平成5年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 148.

\*<sup>3</sup> 村田 修・那須俊朗・宮下 盛・小田誠二・横山達男・山本真司・熊井英水 (1994) : トラフグの親魚養成と早期採卵. 平成6年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 110.

階では受精率や孵化率などになお大きなばらつきが見られる。良質卵を安定的に得るためには、用いるホルモンの種類、その効果的な投与方法、さらには地域的な成熟度の違いに対応した投与時期の検討など、今後解決すべき技術上の多くの問題が残されている。本試験では、福井県沿岸に來遊したトラフグ天然親魚に、人為的に卵成熟と排卵を促すことを目的に、数種のホルモンの投与方法を比較検討した。

### 材料および方法

**供試魚** 本試験に用いたトラフグは、1993年4月26日から5月10日までに福井県沿岸の定置網で漁獲された天然魚18尾（雌15尾、雄3尾）であった。これらは漁獲後ただちに1トン水槽付の自動車で、福井県小浜市にある福井県栽培漁業センターに搬入し、20トンFRP水槽に3から5尾ずつ収容した。試験期間中、給餌は行わなかった。

**ホルモン投与** 使用したホルモンは、胎盤性性腺刺激ホルモン（HCG、三共ゾーキ）、シロサケ脳下垂体（SP、大洋漁業）、及び合成LHRH（Sigma）であった。HCGは0.6% NaCl液に直接溶かした。SPは0.6% NaCl液中でホモゲナイズした抽出液であった。また、LHRHは会田ら<sup>3)</sup>の方法に準じ、0.6% NaClに溶かした後、等量のプロイント完全アジュバント（ナカライテスク）と混合して乳化した。

試験前に供試魚の雌を無作為に4区に分けた。すなわち、HCG単独投与区（HCG区）として5尾、HCGとSP複合投与区（HCG+SP区）として5尾、LHRH投与区（LHRH区）として3尾、そして対照区として2尾であった。投与方法は、HCG区ではHCGを試験開始時に200 IU/kgと3日後に1000 IU/kg、HCG+SP区では試験開始時にHCGを500 IU/kgとSPを10 mg/kg、LHRH区では試験開始時にLHRHを0.77-1.0 mg/kg、そして対照区では0.6% NaCl液を1 ml/kgの割合でそれぞれ背筋部に注射した。投与は5月10、12、もしくは13日に行った。漁獲からホルモン投与までの期間は個体によって異なり、0から15日間とした。

試験期間に排卵まで至らなかった個体に対してHCGを投与した。その濃度は対照区の個体については最初200 IU/kg、そして3日後に1000 IU/kg、またLHRH区の個体については1000 IU/kgの1回投与とした。

**成熟状態の判定** 卵巣卵の成熟状態を確認するため、ホルモン投与前と試験終了後にカテーテリングに

より卵巣卵の一部を採取した。採取した卵母細胞は、万能投影機で20倍に拡大して直径を計測した。一部の卵母細胞は透明化（エタノール：ホルマリン：酢酸=75：20：5）し、卵核胞の位置を光学および実体顕微鏡で観察した。

**受精及び卵管理** 排卵の確認は、ホルモン投与翌日から毎日行った。排卵は腹部を圧迫することにより、容易に卵が排出されることで判定した。排卵個体からは卵を採取して媒精し、孵化時まで200または500ℓのアルテミア孵化水槽に収容した。

### 結果

**ホルモン投与前の供試魚の状態** 本試験に用いた雌魚の体重は2.51 kg（No 4）から7.80 kg（No 12）の範囲にあった（Table 1）。カテーテリングによって全供試魚のホルモン投与前の卵巣状態を調べた結果、ほとんどの個体の卵母細胞において卵核胞は中央部付近に位置していた（Fig. 1 A）。しかし、HCG+SP区の中の1尾（No 9）の卵母細胞では卵核胞がすでに崩壊し、最終成熟期に達していた（Fig. 1 C）。卵母細胞の直径は卵核胞がその中央に位置しているものでは $0.87 \pm 0.04$  mm（No 13）から $1.06 \pm 0.05$  mm（No 8）の範囲にあった。これに対し、最終成熟期に入っていた卵母細胞（No 9）の卵径は $1.19 \pm 0.03$  mmで、他の個体のそれより有意（ $p < 0.01$ ）に大きかった。

**ホルモン投与による排卵の誘導** ホルモン投与の結果をTable 2に示した。試験期間中の水温は、14.3から16.8℃の範囲で変動した。HCG区の2尾（No 2およびNo 3）とLHRH区の1尾（No 12）は、試験期間中に死亡または衰弱が著しく、試験の遂行が困難であると判断されたため、試験途中で飼育槽から取り上げてそれぞれの卵巣状態を調べた。これらの魚の卵巣卵では卵核胞が中央部から周辺部へ移動し、いわゆる、核移動期にあるか（Fig. 1 B, No 2およびNo 12）、すでに卵核胞が崩壊し成熟期（Fig. 1 C）に達していた（No 3）。

排卵は、LHRH区の1尾（No 13）と対照区（No 14およびNo 15）を除く全ての個体で誘起することができた。ホルモン投与試験開始から排卵までの所要日数は、試験開始時に卵母細胞がすでに最終成熟期に達していたHCG+SP区の1尾（No 9）では2日と非常に早かった。その他の個体については、HCG区で7日、HCG+SP区で5から6日、そしてLHRH区の1尾（No 11）で6から7日で、HCG+SP区が他の2区より

**Table 1.** Experimental conditions before hormone injections

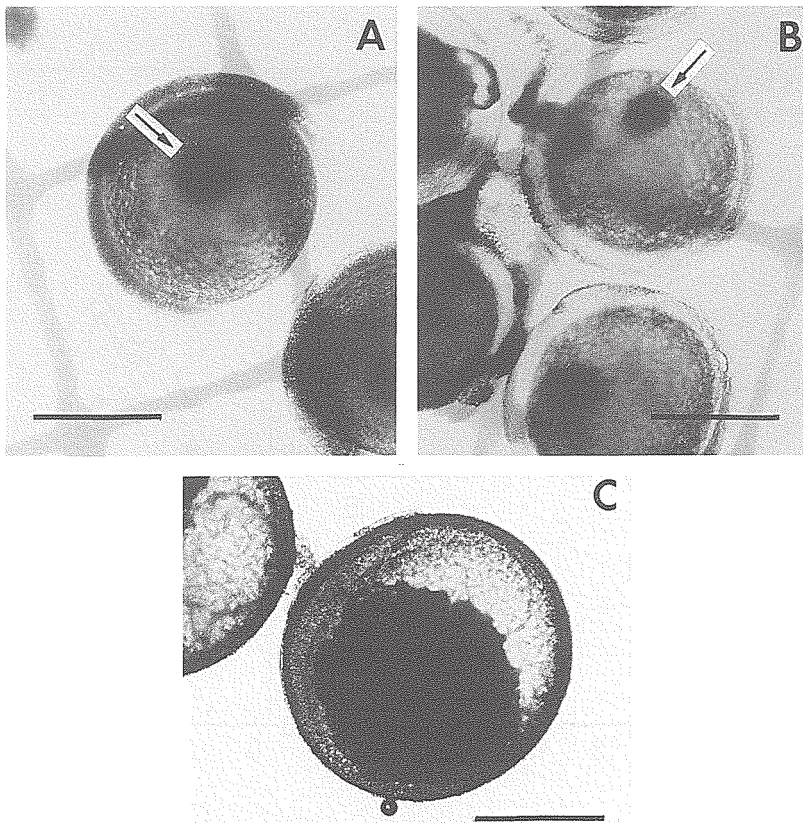
Hormones	Individual No.	Body weight (kg)	Mean egg diameter (mm)	Date of injection	Days after capture
HCG *1	1*4	2.91	1.02	10 May	13
	2	3.68	1.01	10 May	2
	3	3.53	1.00	10 May	0
	4	2.51	1.01	13 May	15
	5	2.63	1.03	13 May	5
HCG + SP *2	6	2.64	1.04	10 May	3
	7	2.89	0.99	10 May	14
	8	4.02	1.06	10 May	13
	9*4	5.65	1.19	10 May	0
	10	3.27	0.99	10 May	13
LHRH *3	11	3.01	—	12 May	15
	12	7.80	0.89	12 May	2
	13	3.07	0.87	12 May	14
Control	14	3.23	1.01	10 May	2
	15	2.56	0.97	12 May	14

\*1 HCG was injected at 200 IU/kg at day 0 and 1000 IU/kg at day 3, respectively.

\*2 HCG (500 IU/kg) and chum salmon pituitary homogenate (10 mg/kg) were injected at day 0.

\*3 LHRH (0.77 to 1.0 mg/kg) was injected at day 0.

\*4 Germinal vesicles were not observed at day 0.



**Fig. 1.** Morphological changes in oocytes of tiger puffers, *Takifugu rubripes*, during hormone treatment. A: vitellogenic stage, B: migratory nucleus stage, C: maturation stage. Arrows show germinal vesicle. Bar = 500  $\mu$ m.

り若干早い傾向にあった。それぞれの試験区で排卵までの所要日数の個体によるばらつきはほとんどみられなかった。

排卵まで至った全ての個体では、ホルモン投与後体重が急激に増加した (Fig. 2)。これに対して試験期

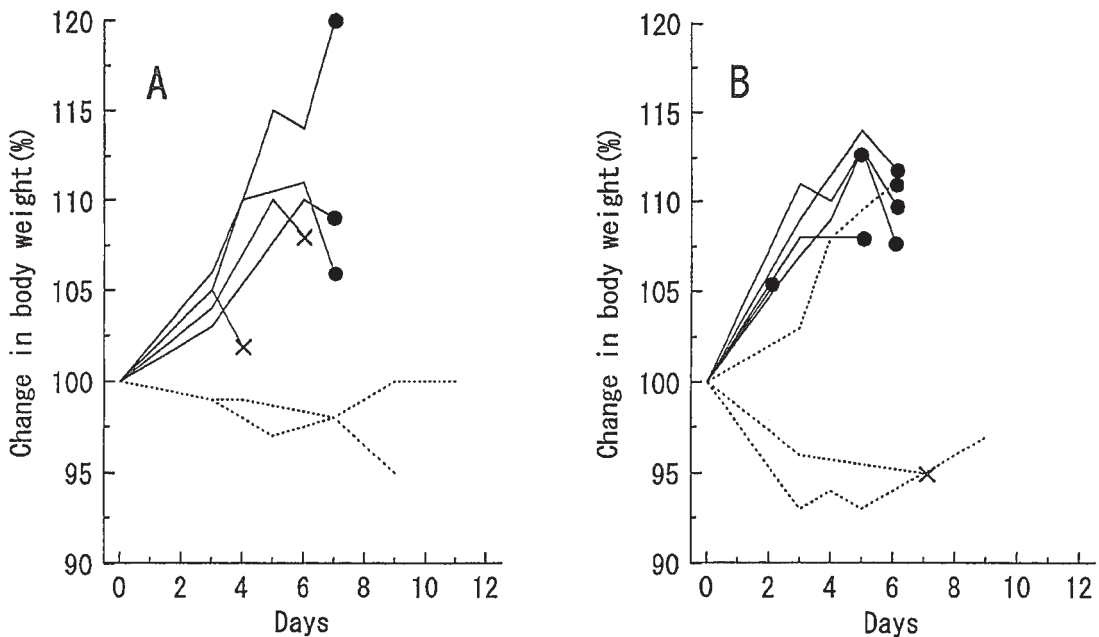
間中に排卵しなかった LHRH 区の 1 尾 (No 13) と対照区の 2 尾 (No 14 および No 15) では、試験開始後体重が徐々に減少した。これらの個体の卵巣卵を試験終了時に採取して成熟状態を調べたところ、LHRH 区 (No 13) では卵核胞が卵膜近くまで達していた。

**Table 2.** Results of hormone injections on induction of ovarian maturation and ovulation of *T. rubripes*\*<sup>1</sup>

Hormones* <sup>2</sup>	Individual No.* <sup>2</sup>	Days after first injection	Egg number obtained ( $\times 10^3$ )	Mean egg diameter (mm)	Hatching rate (%)	Comment
HCG	1	7	695	1.24	20.3	
	2	—	—	—	—	Death
	3	—	—	—	—	Death
	4	7	476	1.23	74.4	
	5	7	467	1.27	70.0	
HCG + SP	6	5	279	1.24	83.2	
	7	6	523	1.26	0.04	
	8	5-6	795	1.24	50.6	
	9	2	567	1.30	40.2	
	10	5-6	792	1.22	0	
LHRH	11	6-7	472	1.21	53.4	
	12	—	—	—	—	Prostration
Control	13	—	—	—	—	Not ovulated
	14	—	—	—	—	Not ovulated
	15	—	—	—	—	Not ovulated

\*<sup>1</sup> Results for 15 days.

\*<sup>2</sup> Same as shown in Table 1.



**Fig. 2.** Changes in body weight of tiger puffers, *Takifugu rubripes*, after hormone treatment. A: HCG (—) and control (---) groups, B: HCG + SP (—) and LHRH (---) groups. ● and × show ovulated fish and dead/prostrated fish, respectively.

Table 3. Effects of additional HCG treatment on induction of ovulation

Individual No. * <sup>1</sup>	Mean egg diameter (mm)	Days after injection	Number of eggs obtained ( $\times 10^3$ )	Hatching rate (%)
13	0.93	6	—* <sup>2</sup>	15.6
14	0.96	8	507	7.5
15	0.99	6	396	10.1

\*<sup>1</sup> Same as shown in Table 1.

\*<sup>2</sup> Could not count, because this fish spawned in the tank.

一方、対照区の2個体 (No 14およびNo 15) では、卵核胞が卵母細胞の中央に位置し、試験開始時と変わらなかった。また、これらの卵母細胞の卵径はそれぞれ  $0.93 \pm 0.05$  mm から  $0.99 \pm 0.07$  mm の範囲にあり、個体間に有意差は認められなかった。

HCG をこれらの個体に投与した結果、投与から6もしくは8日目に排卵が確認された (Table 3)。

排卵個体における卵数、卵径、および孵化率 ホルモン投与魚で試験期間中に排卵まで至った個体から得られた卵数は、1個体当たり279,000 (No 6) から795,000粒 (No 8) であった。卵径は  $1.21 \pm 0.04$  (No 11) から  $1.30 \pm 0.05$  mm (No 9) であった。孵化率は0 (No 10) から83.2% (No 6) と個体により大きく異なった (Table 2)。

試験終了後にHCG投与を行った個体から得られた卵数は、確認できなかった1個体 (No 13) を除き507,000粒 (No 14) と396,000粒 (No 15) であった。卵径は0.93から0.99 mm, そして孵化率は7.5から15.6%であった (Table 3)。

## 考 察

本試験において、投与したホルモンの効果は排卵の有無、体重の変化、卵径の変化、さらに透明化した卵母細胞内の卵核胞の位置に着目して行った。その結果、試験期間内に対照区の2個体の卵径に有意差は認められず、また、卵核胞の位置にも変化はなかった。このことは、天然親魚を陸上水槽で蕃養しても、少なくとも短期間のうちに成熟は進行しないことを示唆している。

ホルモンを投与した区の間で卵母細胞の最終成熟と排卵の誘導効果を比較したところ、HCG区とHCG+SP区の両方で良好な結果が得られた。すなわち、今回用いたホルモン処理方法で、両区のすべての魚に体重の増加と卵母細胞における卵核胞の中心部から周辺部への移動が確認され、さらに、HCG区の死亡した2個体を除き排卵も誘導できた。卵母細胞の最終成熟や排卵を誘導できたすべての個体で体重の増加が顕著

なことから、トラフグでは体重の変化をホルモン投与効果の指標の一つとして利用することができると思われる。ホルモン投与から排卵までに要した日数は、HCG区で7日、HCG+SP区で5ないし6日で、排卵誘導に関しては後者の方が1ないし2日早かった。各試験区では排卵誘導日数にほとんどばらつきがなかったが、これは個体差ではなく、ホルモン処理方法に起因すると思われる。宮木ら<sup>1)</sup>は、長崎県でHCGとSPの複合投与によってトラフグ天然親魚から成熟卵を得ている。この場合、ホルモン処理は3月から4月にかけて行われ、排卵を誘導するまでに水温  $14.8 \sim 18.0^\circ\text{C}$  で95~109時間を要している。試験期間中の水温は、本試験とほぼ同じであるにもかかわらず、両試験の結果には排卵誘起までに要する時間に差がみられた。これは、回遊してくる魚の系統による成熟度が異なっていることに基づいているのかもしれない。

LHRH処理を施した3尾のうち、1尾のみ排卵を誘導することができた。しかし、残りの2尾については卵母細胞の最終成熟を促すことはできたが、排卵を誘導するには至らなかった。この結果から、今回用いたLHRH投与方法がトラフグの排卵誘起には適切ではなかったものと推察される。一般にLHRH投与は魚類の成熟、排卵や産卵の誘起に有効であり、これまでLHRHをコレステロールに埋め込む方法がアユ<sup>4)</sup>、マダイ<sup>5,6)</sup>、ムシガレイ<sup>7)</sup>などで、また本試験と同じようにアジュバントとともに投与する方法は、マコガレイやマハゼ<sup>3)</sup>において試みられ、いずれの場合も良好な結果が得られている。他魚種に比べて、トラフグではホルモン投与によって排卵を誘起するのにかなりの時間を必要とすることが明らかとなったことから、今回用いた投与方法では、このホルモンの効果を排卵まで持続させることができなかったのであろう。今後は、このホルモンの効果をより長く持続させる投与方法や、HCGやSPとの複合投与を検討する必要があるだろう。

ホルモン処理によって得られた卵を媒精した結果、孵化率に大きなばらつきがみられた。このばらつきは

試験区とは関係なく、ホルモン投与方法の違いに起因するものではないと思われる。また、漁獲からホルモン投与までの期間が各個体とも0から15日までのばらつきがあったが、これとも明らかな関係は認められなかった。宮木ら<sup>1)</sup>もホルモン処理した天然トラフグ親魚から得た卵の孵化率に個体差を認め、これは採卵のタイミングや飼育方法に因ることを指摘している。この点に関して、魚の運搬、麻酔処理、ハンドリング、もしくは注射自体のような親魚に与えるストレスも卵質を介して孵化率を左右する要因として考えられている<sup>8)</sup>。本試験では、試験期間に排卵を誘起できなかった個体に再度 HCG を投与した。いずれの魚にもホルモン投与後6から8日目に排卵を誘導することができたが、孵化率は15%以下と低かった。このような魚では水槽飼育期間が1か月にも及び、しかも排卵確認のためのハンドリングの回数も多かったため、親魚が過度のストレス状態にあったものと考えられる。今後は、本試験で得られた知見をもとにして、親魚に与えるストレスを極力抑え、さらに効率の良い投与方法を検討していく予定である。

## 謝 辞

校閲の労を賜った琉球大学熱帯生物圏研究センター高野和則教授と福井県栽培漁業センター安田徹所長、および本試験の遂行に当たり様々なご支援をいただいた福井県栽培漁業センターの皆様へ感謝いたします。

## 要 約

福井県沿岸で漁獲されたトラフグ親魚に胎盤性性腺刺激ホルモン (HCG)、シロサケ脳下垂体抽出物 (SP)、および合成 LHRH を背筋部に注射し、卵母細胞の最終成熟と排卵誘導の効果を比較した。試験区と用いた尾数は、それぞれ HCG 区 (HCG 区を試験開始時に 200 IU/kg, 3 日目に 1000 IU/kg) として 5 尾, HCG + SP 区 (HCG 500 IU/kg + SP 10 mg/kg) として 5 尾, LHRH 区 (LHRH を 0.77–1.0 mg/kg) として 3 尾, そして対照区 (生理食塩水を 1 ml/kg) として 2 尾であった。排卵は HCG 区 (死亡個体を除く) と HCG + SP 区のすべての個体、そして LHRH 区の 1 尾に誘導

できた。排卵までの日数は HCG 区で 7 日, HCG + SP 区で 5 から 6 日, そして LHRH 区で 6 から 7 日であった。試験期間内に排卵しなかった個体 (LHRH 区の 1 尾と対照区の 2 尾) に HCG を再度投与した結果、注射後 6 から 8 日目に排卵を誘導できた。

以上の結果から、HCG もしくは SP の投与が本種の排卵誘導に有効であることが判明した。採卵数は 279,000 から 792,000 粒、そして孵化率は 0 から 83% と個体差が著しかったが、ホルモン処理方法との関係は明らかではなかった。

## 文 献

- 1) 宮木康夫・立原一憲・蛭子亮制・塚島康生・松村靖治・藤田矢郎・林田豪介・多部田修 (1992): ホルモン処理によるトラフグ天然親魚の成熟促進. 水産増殖, 40(4), 439-442.
- 2) 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(3), 367-371.
- 3) 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.
- 4) 廣瀬慶二・新井 茂 (1988): LH-RH コレステロールベレットによるアユの成熟促進. 養殖研報, (13), 11-16.
- 5) 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 コレステロールベ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.
- 6) 山内達也・松田宗之・平田八郎 (1993): マダイの催熟, 産卵および孵化に及ぼす LHRH-a コレステロールベレットと加温・電照の効果. 水産増殖, 41(4), 485-489.
- 7) 奥村重信・栄 健次 (1993): ムシガレイにおける LHRH-a コレステロールベレットの成熟効果. 水産増殖, 44(1), 13-18.
- 8) 日本水産学会編 (1982): 魚介類の成熟・産卵の制御. 恒星社厚生閣, 東京, p. 57.