マアナゴの催熟および排卵誘発のための 効果的なホルモン投与方法の検討

堀江 則行,* 山田 祥朗, 岡村 明浩, 田中 悟,
宇藤 朋子, 三河 直美, 赤澤 敦司, 岡 英夫

(2002 年 6 月 11 日受付, 2002 年 11 月 13 日受理)

㈱いらご研究所

Effective hormonal treatments for induction of ovarian maturation
and ovulation in the common Japanese conger *Conger myriaster*

NORIYUKI HORIE,* YOSHIAKI YAMADA, AKIHIRO OKAMURA, SATORU TANAKA,
TOMOKO UTOH, NAOMI MIKAWA, ATSUSHI AKAZAWA AND HIDEO P. OKA

IRAGO Institute, 377 Ehima-Shinden, Atsumi, Aichi 441-3605, Japan

We sought effective hormonal treatments to induce ovarian maturation and ovulation in the common Japanese conger *Conger myriaster* by using females cultured for 1.5 years from elver. Effective treatments were human chorionic gonadotropin (HCG; 100 IU kg⁻¹ body weight every 2 weeks) in combination with one of three maturation-inducing steroids* (2 mg kg⁻¹ body weight). Of these treatments, the combination of HCG and 20 β -S seemed to be the most effective. In all fish treated with this combination that survived the experiment, the oocytes developed to the migratory nucleus stage. The survival rate of the HCG-treated females was 79%, and buoyant eggs were obtained from 42% of the females injected with 20 β -S. The fertilization rate (no. eggs fertilized/total no. eggs ovulated) was 61% $\pm$ 30%. Furthermore, handling stress seemed to affect the egg quality of *C. myriaster*, because fertilized eggs were not obtained from females that had been handled more than 12 times.

*Maturation-inducing steroids used: 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β -S), 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), and 17 α -hydroxy-4-pregnen-3,20-dione (17 α P).

キーワード：マアナゴ，催熟，排卵，生殖腺刺激ホルモン，卵成熟誘起ステロイド

著者らは先に稚魚から養成したマアナゴ *Conger myriaster* にホルモンを投与して催熟し，排卵誘発に成功したことを報告した。¹⁾ その後さらに排出卵を媒精して孵化仔魚を得た。²⁾ しかし実験に供した雌魚尾数に対して受精卵の得られた例は少なかった。すなわち 1999 年に初めて受精卵が得られたのは雌魚 20 尾を催熟したうち 1 尾だけであった。¹⁾ 受精の成功例が少ない原因としては水温など受精環境の不適が考えられるが，²⁾ 一方催熟方法に起因して卵質^{3,4)} に問題があった可能性もある。ニホンウナギ *Anguilla japonica* では催熟方法の違いによって孵化率に差が出ており，⁵⁾ 催熟方法の違いが卵質^{3,4)} に影響を及ぼしたと考えられる。またトラフグ *Takifugu rubripes*⁶⁾ や ブリ *Seriola quinqueradiata*⁷⁾ では，排卵誘発に使用したホルモンの種類とその投与方法

によって，親魚から受精卵の得られる確率，受精率や孵化率が影響を受けていた。養成マアナゴはホルモン投与なしで第二次卵黄球期に到達するものの，そこから排卵誘発まで現状ではホルモン投与が必要である¹⁾ ことから，催熟方法の違いによって卵質が何らかの影響を受ける可能性がある。ウナギ目魚類と同じく分離浮性卵を排出するマツカワ *Verasper moseri* の成熟卵では卵黄物質の分解によって遊離アミノ酸を生成することで，卵の浮遊性の獲得と仔魚への栄養分の賦与を同時に行っている。⁸⁾ 従ってウナギ目魚類でも卵の浮沈はその卵の栄養状態を反映していると考えられる。マアナゴでは後述するように卵が全て沈下する事例が見られ，媒精以前から問題を有している。沈下卵は全て卵質に問題のある不良卵であると言える。^{3,4,9)} 従ってマアナゴの採卵において

* Tel : 81-531-37-1680. Fax : 81-531-34-3111. Email : horie@irago.co.jp

は、排卵および媒精後に判明する卵質を重要視するだけでなく、媒精前の問題として浮上卵を排出する親魚の確率（浮上卵排出率）を評価する必要がある。卵質には様々な指標があるが、^{3,4,8)}「良質卵とは受精率も孵化率も高く、孵化後の生残率も高い」という理解^{3,4,10)}に基づけば受精率と孵化率を指標とすべきであろう。本研究では直接孵化率を求められなかった（後述）が、シマアジ *Pseudocaranx dentex*¹¹⁾ や養成トラフグ⁶⁾ では受精率と孵化率の間に高い正の相関が見られたことから、本研究では受精率を卵質の指標とした。

これまでの報告^{1,2)} では生殖腺の催熟および排卵誘発を行うために、いずれもヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモンの 100 IU/kg 体重 (BW)/隔週投与と 17 α ,20 β ,21-トリヒドロキシ-4-プレグネン-3-オンの 2 mg/kg BW 投与の組合せのみを用いてきた。この他に効果的な方法があるかどうか、その吟味はまだなされていなかった。¹⁾ そこで本研究では親魚の浮上卵排出率と排出卵の受精率を指標として投与ホルモンの種類、投与量、投与間隔およびハンドリングについて吟味し、成熟および排卵に現段階で効果的な投与ホルモンの組合せを得たので、ここに報告する。

材料と方法

供試魚 いらご研究所ではほぼ毎年秋に三河湾内で漁獲される体重約 20 g のマアナゴの稚魚を入手し、陸上水槽で冷凍イカナゴを餌料として飼育している。¹⁾ 飼育水は地下海水で年間の水温範囲は 9.6~20.6°C である。約 1 年半飼育すると、体重 120~1122 g に成長する。

マアナゴは雌雄で成長に差があり、この時点で体重 250 g 以下はほぼ全てが運動活性を有する精子を形成した雄魚¹²⁾ であり、250 g 以上のほぼ全ては卵母細胞が第一次~第二次卵黄球期まで成熟した雌魚^{1,13)} である。

本研究では 1998 年および 1999 年の 9 月に漁獲された体重約 20 g のマアナゴの稚魚を、前報¹⁾ と同じく陸上水槽内で約 1 年半養成後、体重 250 g 以上に育ったものを雌として供試した。これらの魚には前報¹⁾ 同様あらかじめ背鰭先端部左背筋内に電子式標識 (Destron Fearing Co., USA) を挿入し、個体識別した。これらを以下の実験に供した。

実験 1: 1998 年漁獲の養成魚 143 尾を実験に用いた。これらの魚の実験開始時における体重は 375~1122 g (平均 656 g) であった。133 尾には後に示すホルモンを投与し (Table 1), 2000 年 4 月 24 日から 8 月 10 日まで催熟を行った。対照として実験開始時と終了時に各 5 尾の卵巣を採取した。このうち実験開始時では対照魚の卵母細胞の直径 (卵径) は 363~404 μ m (第一次~第二次卵黄球期) であった。卵径測定および組織学的観察は前報¹⁾ および Utoh *et al.*¹³⁾ に準拠した。

実験 2: 1999 年漁獲の養成魚 153 尾を実験に用いた。これらの魚は実験開始時における体重が 394~942 g (平均 691 g) であった。133 尾には後に示すホルモンを投与し (Table 1), 2001 年 4 月 10 日から 8 月 16 日まで催熟した。対照として実験開始時と終了時に各 10 尾の卵巣を採取した。実験開始時の対照魚の卵径は 326~446 μ m (第一次~第二次卵黄球期) であった。

催熟中の飼育条件 催熟には屋内に設置した 10 m³

Table 1. Survival rate of fish used in the experiments and rate of fish with oocytes at the migratory nucleus stage

	Experimental group ^{*1}	Total no. of fish	No. of fish that survived	Survival rate (%) ^{*2}	No. of surviving fish with oocytes at the migratory nucleus stage	Rate of fish with oocytes at the migratory nucleus stage (%) ^{*3}	No. of fish injected with MIS ^{*4}
Experiment 1	HCG 100T	68	54	79	54	100	54
	HCG 300T	65	37	57	37 ^{*5}	100	36
Experiment 2	HCG 30t	22	16	73	4	25	0
	HCG 100t	23	19	83	19	100	19
	PT 20t	22	16	73	0	0	0
	HCG 30w	22	16	73	16	100	5
	HCG 100w	21	20	95	20	100	18
	PT 20w	23	17	74	15	88	7

^{*1} Naming convention for experimental groups is: gonadotropin used (HCG, human chorionic gonadotropin; PT, acetone-dried salmon pituitary); dose (for HCG, IU kg⁻¹ body weight; for PT, mg kg⁻¹ body weight); dose frequency (T, every 2 weeks [Experiment 1]; t, every 2 weeks during Experiment 2 {fish injected with saline during no-hormone weeks}; w, weekly during Experiment 2).

^{*2} No. of fish that survived/total no. of fish $\times$ 100%.

^{*3} No. of fish with oocytes at the migratory nucleus stage/no. of fish that survived $\times$ 100%.

^{*4} Maturation-inducing steroid; 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β -S), 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), or 17 α -hydroxy-4-pregnen-3,20-dione (17 α P) in the experiments.

^{*5} One of these fish ovulated spontaneously.

容積 FRP 水槽を用い、水温を 10.0~10.5°C に調節した海水（塩分濃度 30‰）を 0.5 m³/時の割合で供給した。催熟中は無給餌とした。

投与ホルモンの組合せ

1. 生殖腺刺激ホルモン 生殖腺刺激ホルモンとしてヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン（HCG，三共エール製薬）またはシロサケ *Oncorhynchus keta* 脳下垂体アセトン乾燥品（PT，北海道網走産）を用いた。それらの投与量および投与間隔の組合せを意味する実験区名を Table 1 に示した。実験区名の中でホルモン略号の次の数値は投与量を示し，HCG の場合は国際単位（IU）であり，PT では重量（mg）である。実験区名末尾の文字は投与間隔を表し，T は実験 1 における隔週投与を，t および w は各々実験 2 における隔週投与と毎週投与を示す。催熟途上で後述の方法により卵巣内の卵母細胞の発達程度を判定した。卵母細胞が核移動期に到達し，さらに油球が融合を始めたと判定した時点で，前報¹⁾同様成熟の加速効果を期待して，次回の注射を繰り上げて行った（ブースター注射）。実験 2 の隔週投与の供試魚には，ホルモン投与と交互に生理食塩水を 0.5 ml/kgBW/隔週投与した。
2. 卵成熟誘起ステロイド ブースター注射を行った供試魚にはその翌日に下記の卵成熟誘起ステロイド（MIS）¹⁴⁾ 3 種のいずれかを投与した。すなわち 17 α ,20 β ,21-トリヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（20 β -S, Steraloids, Inc., USA），17 α ,20 β -ジヒドロキシ-

4-プレグネン-3-オン（DHP, SIGMA, USA），17 α -ヒドロキシ-4-プレグネン-3,20-ジオン（17 α P, SIGMA, USA）の 3 種で，いずれも 2 mg/kgBW の割合で投与した。なお 17 α P 投与に際しては立木¹⁵⁾に従い HCG を併用した。この 17 α P のみ HCG と組み合わせて投与したために他の MIS とは単独での排卵誘発効果を厳密に比較できないが，本研究では採卵上の実用性に関してのみ他の MIS と共に比較する。なお 17 α P と同時に注射する HCG の投与量は，生殖腺刺激ホルモンとして HCG を投与していた魚では催熟中と同様にし，一方 PT を投与していた魚では HCG100 IU/kgBW とした。これら MIS と各実験区の供試魚の組合せを Table 2 に示した。データの統計学的処理は *t* 検定法と Cochran-Cox 法によった。

成熟度の判定 生殖腺刺激ホルモンにより腹部が膨らむ等成熟進展の兆候が認められた供試魚では，前報¹⁾同様卵母細胞をカニキュレーションによって採取し，実体顕微鏡下で卵径の測定および形態観察を行い卵母細胞の発達程度を判定した。なお魚体保護のためカニキュレーションによる採取はブースター注射の時までとした。ニホンウナギでは排卵誘発時の卵径の大小によって排卵の成否が左右されているので，¹⁶⁾ 本研究ではこのブースター注射時の卵径に有意差が生じない範囲で実験区間の比較をすることとした。また原則として実験 1 のハンドリングは隔週，実験 2 では毎週であるが，カニキュレーションの必要が生じてからは実験 1 も毎週ハンドリングと

Table 2. Efficiency of ovulation of buoyant eggs for each hormonal treatment

Experimental group ^{*1}	No. of fish injected with MIS	Oocyte diameter at booster injection (μ m)	20 β -S			DHP			17 α P (+ HCG) ^{*2}		
			Ovulation rate (%) ^{*3}	Ovulation of buoyant eggs (%) ^{*4}	Efficiency ^{*5}	Ovulation rate (%)	Ovulation of buoyant eggs (%)	Efficiency	Ovulation rate (%)	Ovulation of buoyant eggs (%)	Efficiency
Experiment 1	HCG 100T	54	798~1023	93 (14/15)	47 (7/15)	37	80 (16/20)	30 (6/20)	24	84 (16/19)	26 (5/19)
		48 ^{*6}	854~999	92 (11/12)	42 (5/12)	33	84 (16/19)	32 (6/19)	25	82 (14/17)	29 (5/17)
	HCG 300T	36	775~992	38 (5/13)	0 (0/13)	0	60 (6/10)	20 (2/10)	11	69 (9/13)	46 (6/13)
		14 ^{*6}	859~992	40 (2/5)	0 (0/5)	0	100 (2/2)	0 (0/2)	0	86 (6/7)	57 (4/7)
Experiment 2	HCG 30t	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	HCG 100t	19	839~1040	100 (6/6)	33 (2/6)	27	71 (5/7)	29 (2/7)	24	83 (5/6)	17 (1/6)
	PT 20t	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	HCG 30w	5	943~1006	100 (2/2)	0 (0/2)	0	100 (2/2)	0 (0/2)	0	100 (1/1)	0 (0/1)
	HCG 100w	18	832~1072	50 (2/4)	50 (2/4)	48	80 (4/5)	0 (0/5)	0	78 (7/9)	11 (1/9)
	PT 20w	7	902~984	67 (2/3)	33 (1/3)	21	0 (0/2)	0 (0/2)	0	50 (1/2)	0 (0/2)

MIS, maturation-inducing steroid (20 β -S, 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one; DHP, 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one; 17 α P, 17 α -hydroxy-4-pregnen-3,20-dione); —, not done

^{*1} See footnote to Table 1 regarding naming convention.

^{*2} Fish initially injected with PT received HCG (100 IU kg⁻¹ body weight) in addition to and concurrently with 17 α P.

^{*3} No. of fish ovulated/no. of fish injected with MIS $\times$ 100%. Actual numbers of fish shown in parentheses.

^{*4} No. of fish that ovulated more than several hundred buoyant eggs/no. of fish injected with MIS $\times$ 100%.

^{*5} No. of fish that ovulated more than several hundred buoyant eggs/total no. of fish treated with the combination of hormones (i.e., survival rate [from Table 1] $\times$ rate of fish producing oocytes at the migratory nucleus stage [from Table 1] $\times$ rate of ovulation of buoyant eggs).

^{*6} Fish having oocytes smaller than 850 μ m in diameter or larger than 1000 μ m were omitted from this comparison.

なる。

排卵時の処置 MISを投与した魚を水温12.0～12.4℃の水槽に移した。投与後36時間から3時間おきに腹部の触診を行い、生殖孔からの排出卵の有無を確認した。排卵が確認された後、腹部を強く圧迫して直ちに採卵した。排出卵の管理には塩分濃度34‰の海水を用い、卵の浮上を確認した。数百個以上の浮上卵があれば「浮上卵排出」とした。

採卵の後直ちに人工授精を行った。養成した雄魚の腹部を軽く圧迫して精液約0.2 mLを採取し、精子の運動性を確認した。次に3尾分の精液を約200 mLの海水中で混合・分散させた後、これをやはり海水約1 L中に分散させた排出卵に静かに注ぎ攪拌することにより媒精した。^{1,2)} 卵割開始により受精を確認した。受精率は排出卵全体から30～50個の卵を観察し計算した。浮上卵率も同時に求めた。

結 果

卵母細胞が核移動期に到達するまでの所要期間 実験期間中の供試魚の生残率と卵巣中に核移動期の卵母細胞が認められた魚の出現率をTable 1に示した。またその魚の出現時期(週)を示したのがFig. 1A, 2Aおよび

3Aである。卵径や油球の状態がブースター注射に適した段階に達し、ブースター注射と排卵誘発(ブースター注射の翌日)を行った週を示したのがFig. 1B, 2Bおよび3Bである。排卵しなかった魚を排卵誘発から3日後に解剖したところ、全ての個体に成熟期¹³⁾の卵母細胞が認められた。従ってFig. 1B, 2Bおよび3Bは成熟期到達の週を示すものでもある。

実験1 (Fig. 1A, B) のHCG100T区では供試魚68尾のうちHCG5～6回投与(第10～13週)の後、生残していた54尾の卵母細胞が核移動期に達したので、それらに排卵誘発を施した。HCG300T区では供試魚65尾のうちHCGを4回投与(第8～9週)した後、生残37尾全てで卵母細胞が核移動期に達し、その中の1尾が自然に放卵した。残る36尾に排卵誘発を施した。HCG300T区はHCG100T区と比べて有意に核移動期到達時期および排卵誘発時期が早かった(共に $P < 0.001$)。対照魚5尾の実験終了時の卵径は325～484 μm (第二次卵黄球期)で、卵母細胞が核移動期に達したものはなかった。

実験2のうち、隔週投与の3実験区の結果をFig. 2A, Bに示す。HCG30t区では供試魚22尾のうち、実験終了時(HCG9回投与:第19週)に生残16尾中4

Fig. 1. Maturation of fish in Experiment 1. A, Rate of fish with oocytes at the migratory nucleus stage. B, Rate of fish progressing to the stage for injection of the maturation-inducing steroid (MIS). The injection of MIS and the identification of oocytes at the maturation stage occurred during the same week. Details regarding the experimental groups (e.g., HCG100T) and MIS treatment are described in Table 1. The mean $\pm$ 1 standard deviation of the number of weeks needed before fish developed mature oocytes and number of fish are shown in parentheses. *, Significant difference ($P < 0.001$, Cochran-Cox test). C, Cumulative rate of dead fish.

Fig. 2. Maturation of fish treated with gonadotropin every 2 weeks during Experiment 2. A, Rate of fish with oocytes at the migratory nucleus stage. *, Significant difference ($P < 0.001$, Cochran-Cox test). B, Rate of fish progressing to the stage for injection of the maturation-inducing steroid (MIS). The injection of MIS and the identification of oocytes at the maturation stage occurred during the same week. Details regarding the experimental groups (e.g., HCG100t) and MIS treatment are described in Table 1. The mean $\pm$ 1 standard deviation of the number of weeks needed before fish developed mature oocytes and number of fish are shown in parentheses. C, Cumulative rate of dead fish.

尾で卵母細胞が核移動期に達した。HCG100t区では、23尾の供試魚のうちHCGを4~8回投与(第9~16週)した後、生残19尾全てで卵母細胞が核移動期に達していたのでそれらに排卵誘発を施した。HCG100t区はHCG30t区と比べて有意に核移動期到達時期が早かった($P < 0.001$)。PT20t区では22尾を供試し、実験終了時までPTを9回投与(第19週)したが、生残16尾中卵母細胞が核移動期に達した個体は無かった。実験2のうち、毎週投与の3実験区の結果をFig. 3A, Bに示す。HCG30w区では、22尾の供試魚のうちHCGを14~18回投与(第15~19週)の後、生残16尾全てにおいて卵母細胞が核移動期に達した。しかしこの区では卵母細胞内の油球が融合して大きくなるのが遅く、実験終了時までには排卵誘発を施すことができたのは5尾であった。HCG100w区では、21尾の供試魚のうち、HCGを8~15回投与(第9~16週)の後に、生残した20尾全てにおいて卵母細胞が核移動期に達していた。しかしこのうち2尾の卵母細胞は油球が合一したり卵母細胞自体が崩壊するなど過熟の特徴¹⁷⁾が見られたので、残る18尾に排卵誘発を施した。PT20w区では、23尾の

供試魚のうち、PTを11~18回投与(第12~19週)の後に、生残した17尾中15尾において卵母細胞が核移動期に達していた。しかし卵母細胞の油球が融合して大きくなるのが遅く実験終了時までには排卵誘発を施すことができたのは7尾であった。HCG100w区はHCG30w区と比べて有意に核移動期到達時期および排卵誘発時期が早かった(共に $P < 0.001$)。HCG100w区はPT20w区と比べても有意に核移動期到達時期および排卵誘発時期が早かった(共に $P < 0.001$)。HCG100w区(Fig. 3)は同じ実験2のHCG100t区(Fig. 2)と比べて有意に核移動期到達時期および排卵誘発時期が早かった(各々 $P < 0.025$, $P < 0.005$)。また単位時間当たりのホルモン投与量が同じである実験2のHCG100t区(Fig. 2)と実験1のHCG100T区(Fig. 1)の間には、核移動期到達時期も排卵誘発時期も有意な差は認められなかった。対照区10尾は実験終了時まで死亡した魚は無かったものの核移動期に達した個体はなく、卵径は412~512 μm (第二次卵黄球期)であった。

累積死亡率 各実験区における供試魚の累積死亡率を週毎に示したのがFig. 1C, 2Cおよび3Cである。実験

Fig. 3. Maturation of fish treated with gonadotropin weekly during Experiment 2. A, Rate of fish with oocytes at the migratory nucleus stage. B, Rate of fish progressing to the stage for injection of the maturation-inducing steroid (MIS). The injection of MIS and the identification of oocytes at the maturation stage occurred during the same week. *, Significant difference ($P < 0.001$, t - or Cochran-Cox test). Details regarding the experimental groups (e.g., HCG30w) and MIS treatment are described in Table 1. The mean $\pm$ 1 standard deviation of the number of weeks needed before fish developed mature oocytes and number of fish are shown in parentheses. C, Cumulative rate of dead fish.

Table 3. Fertilization rate and number of fish that ovulated fertile eggs in each experimental group

	Experimental group ^{*1}	20 β -S		DHP		17 α P (+ HCG) ^{*2}	
		Fertilization rate (%) ^{*3}	Fish yielding fertile eggs ^{*4}	Fertilization rate (%)	Fish yielding fertile eggs	Fertilization rate (%)	Fish yielding fertile eggs
Experiment 1	HCG 100T	61 $\pm$ 30	7/14	62 $\pm$ 6	6/16	60 $\pm$ 12	5/16
	HCG 100T ^{*5}	60 $\pm$ 33	5/11	62 $\pm$ 6	6/16	60 $\pm$ 12	5/14
	HCG 300T	0	0/5	28 $\pm$ 32	2/6	21 $\pm$ 18	6/9
	HCG 300T ^{*5}	0	0/2	0	0/2	25 $\pm$ 21	4/6
Experiment 2	HCG 30t	—	—	—	—	—	—
	HCG 100t	10 (30) ^{*6}	1/6	0 (13)	0/5	0 (5)	0/5
	PT 20t	—	—	—	—	—	—
	HCG 30w	0 (0)	0/2	0 (0)	0/2	0 (0)	0/1
	HCG 100w	0 (10)	0/2	0 (0)	0/4	0 (9)	0/7
	PT 20w	0 (10)	0/2	—	—	0 (0)	0/1

MIS, maturation-inducing steroid (20 β -S, 17 α , 20 β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one; DHP, 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one; 17 α P, 17 α -hydroxy-4-pregnen-3,20-dione); —, not done

^{*1} See Table 1 for naming convention.

^{*2} Fish initially injected with PT received HCG (100 IU kg⁻¹ body weight) in addition to and concurrently with 17 α P.

^{*3} Mean $\pm$ 1 standard deviation. Value shown reflects total number of eggs ovulated.

^{*4} No. of fish that ovulated fertile eggs/total no. of fish that ovulated.

^{*5} Fish producing oocytes smaller than 850 μ m in diameter and larger than 1000 μ m were omitted.

^{*6} Mean rate (%) of buoyant oocytes produced (Experiment 2) is shown in parentheses; that of Experiment 1 was equal to the fertilization rate.

Fig. 4. Relationship between oocyte diameter at booster injection and ovulation success for each hormonal treatment during Experiment 1. Symbols correspond to individual fish. Open circle, fish ovulated eggs that were buoyant and fertile; solid circle, fish ovulated eggs that were nonbuoyant and sterile; X, fish failed to ovulate. Details regarding the experimental groups (e.g., HCG100T) and maturation-inducing steroid (MIS) treatments are described in Table 1. When comparing the rates of fish that ovulated buoyant eggs among MIS injection groups, we evaluated only those fishes whose oocyte diameters at booster injection were 850 μm to 1000 μm (dotted lines), to avoid any confounding effect of oocyte size.

1のHCG300T区では第8週に死亡魚が急増したが、HCG100T区では実験期間を通して漸増するという程度であった。実験2において、死亡魚はHCG100w区では少なかったが、他の実験区では第12週から第17週にかけて急増した。

排卵 Fig. 4には実験1で排卵誘発を施した各供試魚のブースター注射時の卵径をMIS毎に示した。HCG100T区とHCG300T区の間でブースター注射時の卵径に有意差が生じたため ($P < 0.025$)、浮上卵排出率を比較するのは有意差が認められない850~1000 μm の範囲で行うこととした。すなわちFig. 4で破線の内側に存在する卵群である。このためTable 2および3では排卵誘発を施した全個体のデータと共に、そのうち卵径850~1000 μm の個体のみのデータを併記した。従ってHCG100T区とHCG300T区との間で排卵誘発を施した魚のうち比較の対象となるのは各々48尾および14尾である (Table 2の注6)。

Fig. 5. Relationship between oocyte diameter at booster injection and ovulation success for each hormonal treatment during Experiment 2. Symbols correspond to individual fish. Open circle, fish ovulated eggs that were buoyant and fertile; open circle with X, fish ovulated eggs that were buoyant and sterile; solid circle, ovulated fish whose eggs were nonbuoyant and sterile; X, fish failed to ovulate. Details regarding the experimental groups (e.g., HCG100t) and maturation-inducing steroid (MIS) treatments are described in Table 1.

実験1, 2共MIS投与後42~49時間後に排卵が起こり、その約2/3は46~49時間後であった。実験1の排卵率 (Table 2の注3) はHCG100T区に組み合わせた3種のMIS投与群とHCG300T区に組み合わせた17 α P投与群およびDHP投与群で80%以上であった。浮上卵排出率 (Table 2の注4) はHCG300T区と組み合わせた17 α P投与群が57%と最も高く、次いでHCG100T区と組み合わせた20 β -S投与群が42%であった。実験1で浮上卵が排出されたのはHCG100T区では第10~12週で、HCG300T区では第8~9週であった。

Fig. 5には実験2で排卵誘発を施した各個体のブースター注射時の卵径をMIS投与群毎に示した。実験2の排卵率 (Table 2の注3) はPT20w区に組み合わせたDHP投与群が0であった以外はいずれも50%以上であった。浮上卵排出率 (Table 2の注4) の最も高いものはHCG100w区に組み合わせた20 β -S投与群で50%

であった。次いで HCG100t 区に組み合わせた 20β -S 投与群, PT20w 区に組み合わせた 20β -S 投与群が共に 33% であった。また HCG30w 区の排卵率は 3 種の MIS 投与群全てで 100% であったにもかかわらず, 浮上卵排出率は全て 0% であった。実験 2 で浮上卵が排出されたのは HCG100t 区では第 10~15 週であったが, HCG100w 区では第 11 週のみ, PT20w は第 17 週のみであった。

受精と孵化 排出された卵全てに対して人工授精を行った。受精率および受精卵を得た親魚の割合を Table 3 に示した。排卵後浮上しなかった卵は受精せず速やかに崩壊した。これは一腹の卵が全て浮上しなかった場合でも, 一部が浮上卵であっても同様であった。実験 1 で浮上卵は全て受精していたので浮上卵率と受精率は同じとなった。受精卵は HCG100T 区では第 10~12 週に排卵した魚からのみ得られ, また HCG300T 区では第 8~9 週で得られた。プースター注射時の卵径 850~1000 μm の範囲で比較すると, HCG100T 区では 3 種の MIS 投与群の受精率はいずれも平均 60% 以上で有意な差は認められなかった。HCG100T 区で受精卵を得た親魚の尾数は 20β -S 投与群が最も多く 11 尾中 5 尾であったが, DHP 投与群および $17\alpha\text{P}$ 投与群では各々 16 尾中 6 尾, 14 尾中 5 尾と大きな差はなかった。また同じ卵径 850~1000 μm の範囲で HCG300T 区は $17\alpha\text{P}$ 投与群のみ受

精が確認され, 受精率は HCG100T 区より低いものの受精卵を得た親魚は 6 尾中 4 尾と多かった。HCG300T 区は卵径 850 μm 未満において DHP 投与群でも受精が確認された。一方実験 2 では HCG100t 区に組み合わせた 20β -S 投与群のうち第 10 週に排卵した 1 尾からの卵が 4 細胞期まで卵割しただけで, それ以外の卵で受精は確認できなかった。

浮上卵を得た全親魚のハンドリング回数とカニュレーション回数を Fig. 6 に示した。この中で実験 1 の親魚はハンドリング回数 9 回以下, 実験 2 の親魚はハンドリング回数 11 回以上である。受精卵を得たのはハンドリング 11 回までの親魚からであり, それ以上のハンドリングを受けた魚から受精卵は得られなかった。実験 1 のうち HCG100T 区と HCG300T 区ではハンドリング回数に有意な差はなかった。カニュレーション回数に関して, 受精卵を得た親魚と得られなかった親魚とは有意な差は認められなかった。なお調温機器能力の関係で受精確認後は一部の産卵群を混合せざるを得なかったため, 孵化仔魚は得られたが尾数を親魚単位で計数できなかった。

考 察

ホルモン投与によるマアナゴの催熟と排卵誘発の問題点は, 排卵誘発は可能であるがほとんど受精に成功しないことである。精子は十分な運動能を有していることから, 受精しない原因は卵質^{3,4)}または水温⁴⁾や受精のタイミング^{16,18,19)}など受精条件に問題があると思われる。卵の浮遊性は卵質に大きく関わっていると考えられ,^{3,4,8,9)} 本研究で同一個体から排出された浮上しない卵(沈下卵)は受精しないが浮上卵には受精している卵がある (Table 3) ので, まず浮上卵を得ることが受精卵を得る必要条件である。しかし単に浮上していれば良いのではなく, 近藤ら¹⁰⁾はシロギス *Sillago japonica* で卵割開始前に測定した浮上卵率には正常孵化率との間に有意な相関が認められず卵質の指標として有効でないとしている。木村, 有薮²⁰⁾はイサキ *Parapristipoma trilineatum* で産卵 30 分後に測定した浮上卵率には孵化率と有意な相関が認められる場合もあるとしている。このように浮上卵率は卵質を評価するための安定した指標と見なせず, 本研究の卵割開始を条件にした受精率の方が卵質の指標として適当と思われる。ところが, 酒井ら²¹⁾はマダイ *Pagrus major* の卵質は親魚による個体差が大きく, 受精率と正常発生率の間に相関関係が認められないことを報告している。その考えられる原因として: (i) 年齢による卵質変動; (ii) 多回産卵のため前回排出卵の残留; (iii) 産卵行動の際排卵から産卵まで長時間を要することによる過熟現象^{21,22)}をあげている。過熟によると思われる受精率や孵化率の低下は他の魚種でも観察されてい

Fig. 6. Number of fish that ovulated buoyant eggs with respect to the number of episodes of cannulation. Symbols indicate different subpopulations of fish in the various experiments; details regarding treatment groups (e.g., HCG100T) are described in Table 1. Open circle, fish that ovulated buoyant and fertile eggs in HCG100T of Experiment 1 (large circle, 8 fish; medium circle, 3 fish; small circle, 1 fish); open square, fish that ovulated buoyant and fertile eggs in HCG300T of Experiment 1 (large square, 2 fish; small square, 1 fish); open diamond, fish that ovulated buoyant and fertile eggs in Experiment 2; diamond with X, fish that ovulated buoyant and sterile eggs during Experiment 2. Responses of fish to HCG100T and HCG300T did not differ significantly regarding the number of episodes of cannulation.

る。¹⁶⁻¹⁹⁾しかし本研究では：(i)年級は推定だがほぼ同じ¹⁾；(ii)現在1回産卵のみ¹⁾；(iii)人工授精中心のため排卵から受精まで3時間以内であるので、これらの問題は回避可能である。

成熟および排卵に効果的な投与ホルモンの組合せを選ぶ第一段階として、生残率、核移動期到達率、核移動期到達の早さに関して成績の低い実験区を足切りする。実験1のHCG100T区とHCG300T区は生残魚全てが核移動期に到達し、1尾の自然排卵を除いて排卵誘発を施すことができた。実験2のHCG100t区とHCG100w区は生残魚全てが核移動期に到達し、その時期も排卵誘発時期もHCG30t区、HCG30w区、PT20w区より早かった。HCG30t区、HCG30w区およびPT20w区でも核移動期の卵母細胞を持つ魚は現れているが、HCG100t区またはHCG100w区に比べるとかなり遅く、その出現率も低かった。その上死亡魚が増加し生残率は10%以上も低い。従って核移動期に到達しなかったPT20t区と共にこれらHCG30t区、HCG30w区、PT20w区の生殖腺刺激ホルモンの投与量はマアナゴの催熟には不十分であったと判断できよう。

実験1の結果を用い、供試魚から浮上卵が得られる確率を(供試魚の生残率)×(生残魚中で核移動期の卵母細胞が認められた魚の出現率)×(MIS投与後の浮上卵排出率)によって計算した(Table 2の注5)。その結果浮上卵の得られる確率が高かったのはHCG100T区に組み合わせた20 β -S投与群およびHCG300T区に組み合わせた17 α P投与群で、共に33%であった(ブースター注射時の卵径850~1000 μ mの範囲)。これら2組は浮上卵を得る確率の段階までは計算上差が無い。これらの次に確率が高いのは、HCG100T区とDHP投与群または17 α P投与群の組合せである。

実験1でブースター注射時の卵径850~1000 μ mの範囲において受精卵を得た親魚の確率および受精率を比較した。その結果、HCG100T区のMIS3種に大きな差はなく、受精卵を得た親魚の確率は5/11~5/14にあり、受精率は平均60~62%であった。HCG300T区の17 α P投与群はHCG100T区の3種のMIS投与群に比べて、受精卵を若干多くの親魚から得られるものの受精率は半分以下に過ぎなかった。ハンドリング回数およびカニューレ回수에有意差がなかったためハンドリングストレスの差は考え難く、ホルモン投与量のみが異なっていた。HCG300T区は他に早期に採卵できることしかメリットがなく、受精率に関してはホルモン投与量を多くしたことは逆効果となったようだ。

ここまでで判定すると、マアナゴにとってHCGの隔週当たりの至適投与量は30 IU/kgBWでも300 IU/kgBWでもなく、100 IU/kgBWの周辺と思われる。また浮上卵すなわち受精の可能性のある卵を得られる確率

および排出卵の受精率に関して、HCG100T区と組み合わせるなら、3種のMISはいずれも有効といえる。この中ではHCG100T区と20 β -S投与群の組合せが最も効果的な催熟・排卵誘発方法と考えられた。

次に実験2の結果から算出したTable 2の注5の値を各実験区においてMIS毎に比較すると、HCG100w区と20 β -S投与群の組合せが48%で本研究の最高値となった。ところが実験2の受精状況を見ると、媒精したほぼ全ての供試魚で受精卵が得られず実験1と異なった。卵の受精率および孵化率を著しく低下させる原因の一つとして卵の過熟化^{17,21,22)}が考えられるが、これは前述のように実験系から極力排除している(HCG100w区)。実験2で唯一受精卵を得た魚(HCG100t区、第10週排卵)の体重当たりホルモン総投与量は実験1のHCG100T区で最も早く受精卵を得た魚(第10週排卵)と同じであった。ハンドリング回数は11回で実験2のうち浮上卵を得た例では最少であったが、実験1で受精卵を得た魚のいずれよりも多かった。一方実験1で受精卵の得られたのは排卵する魚が現れはじめた早い時期に限られ、カニューレに伴うハンドリングが恒常的になる遅い時期には受精卵を得られなかった。実験1のHCG100T区と実験2のHCG100t区の間には実験区の投与ホルモンの違いや個々の成熟の速度による差が見られなかったため、実験2で受精卵がほとんど得られなかったのは毎週負荷されるハンドリングストレスなどが原因として考えられる。ホルモンの反復投与によるハンドリングストレスの問題は中田ら⁶⁾やHirose²³⁾が指摘しているが、受精率の低下や卵膜強度の低下などをもたらすとされ、これらは特に実験2で多く見られたものである。

本研究では、催熟および排卵誘発のためのホルモン投与方法についてこれまで以上に効果的な組合せは見つからなかったものの、MIS3種がみな有効であったので、今後同様の研究を行う場合に排卵誘発方法の選択肢が広がった。また本研究では、ハンドリングストレスが卵質に大きな影響を与えることが示唆されたので、ストレス軽減型の催熟方法の確立が必要となつてこよう。

謝 辞

本研究はいらご研究所業績No. 020である。

文 献

- 1) 堀江則行, 宇藤朋子, 山田祥朗, 岡村明浩, 張 寶, 三河直美, 田中 悟, 岡 英夫. ホルモン投与によるマアナゴの催熟と排卵誘発. 日本誌 2001; **67**: 842-849.
- 2) Horie N, Utoh T, Yamada Y, Okamura A, Zhang H, Mikawa N, Akazawa A, Tanaka S, Oka HP. Development of embryos and larvae in the common Japanese conger *Conger myriaster*. *Fish. Sci.* 2002; **68**: 972-983.

- 3) 清野通康. 産出卵の卵質評価—海産魚. 「魚類の成熟と産卵, 水産学シリーズ 6」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京. 1974: 113-119.
- 4) 岩井寿夫, 柏木正章. 発生と孵化管理. 「水族繁殖学」(隆島史夫, 羽生 功編), 緑書房, 東京. 1989: 195-237.
- 5) Sato N, Kawazoe I, Suzuki Y, Aida K. Adequate interval of sGTH administration to induce vitellogenesis, and induction of ovulation by simultaneous administration of sGTH and 17α -hydroxyprogesterone in the Japanese eel. *Fish. Sci.* 2000; **66**: 644-654.
- 6) 中田 久, 松山倫也, 池田義弘, 松浦修平. トラフグ養成親魚からの採卵技法の開発. 日水誌 1997; **63**: 728-733.
- 7) 中田 久, 今吉隆志, 荒川敏久, 松山倫也. 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. 九大農芸誌 2001; **55**: 169-177.
- 8) Matsubara T, Koya Y. Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.* 1997; **278**: 189-200.
- 9) Craik JCA, Harvey SM. The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 1987; **67**: 169-182.
- 10) 近藤茂則, 吉岡 基, 柏木正章. シロギス卵の卵質評価に関する研究. 日水誌 2001; **67**: 801-806.
- 11) 虫明敬一, 河野一利, 長谷川 泉. シマアジの採卵について—II. 栽培技研 1989; **18**: 15-24.
- 12) Okamura A, Motonobu T. Spermatozoa of *Conger myriaster* observed by electron microscopy. *Zool. Sci.* 1999; **16**: 927-933.
- 13) Utoh T, Horie N, Okamura A, Yamada Y, Tanaka S, Mikawa N, Akazawa A, Oka HP. Oogenesis in the common Japanese conger *Conger myriaster*. *Fish. Sci.* 2003; **69**: 181-188.
- 14) 香川浩彦, 朝比奈 潔. ステロイドホルモン. 「海産魚の産卵・成熟リズム, 水産学シリーズ 85」(廣瀬慶二編) 恒星社厚生閣, 東京. 1991: 50-64.
- 15) 立木宏幸. 養成親魚育成技術. 「ウナギの初期生活史と種苗生産の展望, 水産学シリーズ 107」(多部田 修編) 恒星社厚生閣, 東京. 1996: 85-94.
- 16) Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Hirose K. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 1996; **139**: 291-301.
- 17) 杉本良郎, 武内良雄, 山内皓平, 高橋裕哉. サケ脳下垂体投与によるウナギ (*Anguilla japonica*) 雌の成熟誘導と成熟卵の油球の状態について. 北大水産彙報 1976; **27**: 107-120.
- 18) 中田 久, 松山倫也, 原 洋一, 矢田武義, 松浦修平. 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 1998; **64**: 993-998.
- 19) 中田 久, 中尾貴尋, 荒川敏久, 松山倫也. 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 2001; **67**: 874-880.
- 20) 木村清志, 有瀧真人. イサキの種苗生産と仔稚魚の形態形成に関する基礎的研究—I, 水槽内自然産卵. 三重大水産研報 1985; **12**: 181-192.
- 21) 酒井 清, 野村 稔, 井上正昭, 城条義興, 武富正和. マダイ自然産出卵の卵質. 水産増殖 1985; **33**: 7-11.
- 22) 酒井 清. 産出卵の卵質評価—淡水魚. 「魚類の成熟と産卵, 水産学シリーズ 6」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京. 1974: 100-112.
- 23) Hirose K. Effects of repeated injections of human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation and egg qualities in the ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1980; **46**: 813-818.