

クロダイの種苗生産に関する基礎的研究-I.

生殖腺刺激ホルモン投与による成熟および
産卵の促進について

笠原 正五郎

(広大水畜産学部水産学科)

日比谷 京

(東大農学部水産学科)

Fundamental Studies on Techniques of Mass-Production of Fry of the Black Porgy, *Mylio macrocephalus* —I.

On the Spawning Induced by Injection of a Preparation of
Mammalian Gonadotropic Hormones

Shogoro KASAHARA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University, Fukuyama

and

Takashi HIBIYA

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture,
University of Tokyo

(Tables 1-3; Plate 1)

近年、我が国では海産魚類の増養殖事業が活発に行なわれつつあるが、天然産種苗の供給が不安定なところからそれらの人為的種苗生産が強く要請されており、そのためには孵化仔魚の飼育技術の確立とともに採卵用親魚の確保が重要な課題となってきた。

クロダイ *Mylio macrocephalus* も沿岸養殖の対象として重要魚種の一つであり¹⁾、既にその人工受精による孵化仔魚の飼育も可能になった²⁾。産卵期におけるその雄親魚は、殆どすべての個体が放精可能なのでその入手にはまず問題ないと云えるが、漁獲魚のうちから完熟卵をもつ雌魚の得られる機会は極めて乏しく、また、漁獲直後に現場で人工受精を行なわない限り、高い受精率を期待できない場合が多い*。従って大量の孵化仔魚を得て種苗生産を行なうためには、より確実にして容易な条件のもとに十分な量の完熟卵を得ることが先ず必要なことと思われる。筆者らはそのため養魚池で飼育されたクロダイ雌魚に生殖腺刺激ホルモンの投与を試み、その成熟促進ならびに産卵誘発について二三の成果を得たのでここに報告する。なお、その後、平野、佐藤らとともに本方法について更に検討を加え、それを基本的手段として本種の種苗生産に関する多面的研究を行なっているが³⁾⁴⁾、ここでは初期に行なったホルモン剤投与結果(1962年)についてのみ先ず報告しておきたい。報告に先立ち、貴重な助言を賜った東大大島泰雄教授に感謝し、実験材料の供与其他種々の便宜を与えられた渥美養魚株式会社(愛知県渥美町)ならびに同社専務木村隼氏に厚くお礼申し上げる。

* このことは、マダイ、フグその他種々の海産魚の場合にも既に多くの研究者により指摘されているところであり、FOSTER⁵⁾のいう“laboratory diuresis”と大いに関係があるように考えている。

材料および方法

実験材料としたクロダイ親魚は、渥美養魚株式会社の鹹水養魚池において稚魚期から粗放的に養殖されていたものを釣獲し、主として満3年魚および満4年魚を使用した。それらのうち、雄魚は天然のものと同様に産卵期（東海地方では一般に4月下旬～6月中旬）には大半のものが放精し得ることが既に判っているので、ホルモン剤の投与は専ら雌魚の成熟および産卵の促進を目的として試みた。使用したホルモン剤は商品名シナホリンであり*、1尾に対し1回の投与量2～20RUを0.5～1.0mlになるよう生理的食塩水に溶かしたものを、魚の背側筋肉に注射した。また、供試魚の一部に対してはDiethylstilbestrol (DES) の併用を試みたほか、対照魚に対しては生理的食塩水のみを注射を施こした。なお、いずれの場合も魚は注射時に容易に静止状態を保つので麻酔処理は行なわなかった。

実験は、産卵期前の卵巣の未だ成熟していない個体を飼育しながら1ヶ月余にわたり数回の注射を重ねた場合と、産卵期において既にかなり良く卵巣の成熟したと考えられる個体について、1回（一部は2回）の注射を行なった場合の二部に分けられるが、いずれの場合も注射後は雄魚とともにコンクリート水槽（3.3～13.2m³）に収容し、その刺激による水槽内での産卵誘発を試みた。

結 果

1. 未成熟個体への多回投与

4月中旬、前記養魚池の用水路中に設けた網生簀3箇（いずれも3.6m²×0.9m）に雌魚を10尾ずつ収容し、それぞれシナホリン注射区、シナホリン+DES注射区ならびに対照区とし、ほかに交配用の雄魚を同様に設置した網生簀に数十尾収容した。収容時における雌魚はいずれも腹部の膨出は特にみられず、卵巣は全く成熟していないものと認められた。それらに対しては、雄魚も含めその後の1ヶ月余の飼育期間中、主としてアジ、カタクチイワシの挽肉を投餌したが、以前から飼育環境に慣れているため収容した網生簀内でもさかんに摂餌し、また所謂すれ症状の生起も殆どみることなく経過することができた。各注射区の雌魚に対してはTable 1の欄外に示したように、はじめは10日間、後には5～7日間の

Table 1. Development of ovaries of the semimature female promoted by injections of "Synahorin"

Date of observ.	Sampled female	Body length (cm)	Body weight (g)	Ovary weight (g)	O.w./B.w. (%)	Age (full years)	Injection**	
							Frequency	Total dosage (RU)
May 1st	treated	21.4	320	28.1	8.8	3	1	2
	control	22.4	337	9.4	2.8	3	—	—
May 11th	treated	22.5	361	57.3	15.9	3	2	22
	control	22.7	333	7.2	2.2	3	—	—
June 2nd	treated*	22.5	300	41.2	13.7	3	7	108
	treated*	23.5	360	51.7	14.2	3	7	108

* They died on the evening of June 1st.

** Date of injection (Dose): April 21st (2RU), May 1st (20RU), May 11th (20RU), May 17th (20RU), May 23rd (20RU), May 28th (20RU), June 1st (6RU).

* Synahorin: ウシの脳下垂体およびヒトの胎盤を原料にした生殖腺刺激ホルモン剤（帝国臓器KK）。RUは家兎単位を意味する。

間隔で各投与量の注射を行なった。その間、ホルモン剤投与の効果をみるため、第2回および第3回注射時に各区より1尾ずつをとりあげそれらの卵巣の成熟状態について比較してみたところ、Table 1 ならびに Plate 1 (A~D) に示すような結果が得られた。すなわち、シナリホン 2RU の投与により既に卵巣重量の増加が目立つようになり、更に 20RU の投与を重ねたものではその急速な発達がみられ、組織切片についてみると、投与個体の卵母細胞には周辺二期以前のものは少なくなり、卵黄球期あるいは胚胞移動期のものが多くなっているのに対し、対照魚のそれには未だ周辺二期以前のものが非常に多くを占めており、両者の間にはその成熟度に著しい差を生じていることが認められる。因みに、前後7回注射した個体(水槽収容後も注射、未産卵のまま斃死)では既に排卵過程にあったことが認められる(Pl. 1, E)。なお、DES の併用投与の結果については更に資料を求めた上改めて報告したいのでここでは省略する。

以上の結果は、実験開始時の雌魚の熟度など個体差の問題もあるので、これからシナホリンの催熟効果やそれに関連して FSH あるいは LH 成分の個別的効果等につたて定量的に比較検討することはできないが、シナホリン投与個体の多くが対照魚にくらべ卵巣の著しい発達を示したことは明らかである。そこで、5月17日の第4回注射後に各雌魚の腹部をおして一部の卵を採り、沬胞膜の存否や卵黄の状態などから完全またはそれに近い状態にあることを確かめて、供試魚中最も熟度の進んでいると認められた2尾(ともに満4年魚)をとりあげ、それぞれに雄魚2尾ずつを配して水槽中に収容し、その産卵の

Table 2. Inducement of spawning by mating with male after injections made several times through a long rearing period.

Individual No.	Spawned female			Unspawned female*	
	1	2	3	4	5
Body length (cm)	25.1	25.0	22.4	23.5	22.6
Body weight (g)	440	475	343	403	382
Age (full years)	4	4	3	4	3
Frequency of injection	4	4	6	7	7
Total dosage (RU)	62	62	102	108	108
Date of mating**	May 17th	May 17th	May 23rd	May 23rd	May 23rd
Date of spawning	May 19th	May 23rd	May 28th	—	—
Number of laid eggs (×1000)	60~100	100	10~20	—	—
Hatching rate*** (%)	91.5	96.4	(poor)	—	—

* In addition to them, two females died (in Table 1).

** About one month or a little over after 1st injection.

*** Observations by sampling of 1000 eggs.

誘発を図った。次いで5月23日、残り5尾(1尾は満4年、4尾は満3年。別に1尾は解剖供試した)に第5回目の注射を施したのち、同様に雄魚を配して水槽に移した。それらの結果は Table 2 に示したように、5月17日水槽収容の2尾では5月19日および5月23日にそれぞれ1尾の産卵が行なわれ、水槽水全面に浮游した卵の受精率、孵化率はともに極めて良好な結果を示し(孵化率、92~96%)、多数の孵化仔魚を得ることができた。しかし、5月23日収容の5尾はその度数日を経過しても産卵するものが

みられなかったので、更に5月28日に第6回(20RU)、6月1日に第7回(6RU)の注射を施した。その結果は、6月1日夕刻に水質悪化などのため2尾(満3年魚)を斃死させたこともあって、結局、5月28日に6回注射魚のうちの1尾(満3年魚)が少量の卵を産出したにとどまり、その孵化率も著しく低かった。一方、その時期における各対照魚の卵巣卵はかなり成熟してきているが完熟には至らない状態にあることが認められ、それらのうち5月26日に4尾(2尾ずつ満4年および満3年)を、6月1日に残り3尾(1尾は満4年、2尾は満3年)をとりあげ、それぞれ投与魚の場合と同様に雄魚と組み合わせ水槽に収容してみたが、その後6月18日に至る観察期間中に産卵は全くみられなかった。時期的にみてそれらの当該年度産卵期における産卵は不能なものと認められた。

2. 卵巣の発達した個体への投与

次に、本種の産卵盛期から末期に当たる5月19日から6月23日に至る期間に、延べ13日間にわたり前記養魚池から更に合計35尾の雌魚を釣獲し、それらのうち、外見上卵巣の発達の特に著しいと認められた5尾は対照として置き、他の30尾については釣獲の都度シナホリンの注射(投与量、毎尾20RU)を行ない、いずれも直ちに雄魚とともに水槽に収容し産卵するか否かを観察した。但し3尾は注射後10日蓄養し、更に2回目(投与量は同じく20RU)の注射を行なってから雄魚を配した。それらの結果はTable 3に一括して示したとおりで、40RU投与魚(2回注射)のうちの1尾に順調な産卵がみられた

Table 3. Inducement of spawning by injecting once or twice in the spawning season.

Injection (Total dosage)	Years of Age	Numb. of treated females	Numb. of spawned females	Abundance of laid eggs*			Hatching rate (%)		
				1	m	s	>60	50~10	0**
twice (40RU)	4	2	2	1	1	0	2	0	0
	3	1	1	0	0	1	0	1	0
once (20RU)	4	} 27	3 + 4	0	2	1 + 4	2	1	4
	3		1 + 3	0	0	1 + 3	0	1	3
control	4	} 5	0 + 2	0	0	2	0	0	2
	3		0	0	0	0	0	0	

* Grade of abundance. 1: 50,—100,000 eggs, m: 10,—30,000 eggs, s: 5,—10,000 eggs.

** Most of the eggs spawned by the females represented by Gothic figures were unfertilized.

ほか、同じく40RU投与の他の1尾ならびに20RU投与魚(1回注射)27尾のうちの2尾において比較的良好な産卵結果が得られ、更に40RU投与の残り1尾および20RU投与のうちの2尾についても、産卵数が少なく孵化率も極めて低くはあったがそれぞれ産卵がみられた。これらに対し、対照とした5尾ではそのうちの2尾が水槽に収容後間もなく少量の卵を産出したが、孵化仔魚を得ることは全くできなかった。而してこのような現象は20RU投与魚のうちの7尾についてもみられたものであるが、これらの場合に浮遊卵の抽出調査を行なったところ、正常な卵内発生を示しているものが全くなかったことから正常な受精卵は得られなかったと認められる。したがって、それらは水槽収容に当たり魚体に加えられた種々の衝撃によって誘起された異常放卵であったように考えられる。

以上の結果は、前項における実験の場合と同様に釣獲時の雌魚の成熟度に個体差があり、それがホルモン投与効果の表われ方かなり変異を生ぜしめたことを示していると考えられるが、これらを通じ、産卵期における未産卵雌魚に対するシナホリンの成熟ないし排卵促進効果を認めることができ、特に高年令魚については本方法による産卵誘起の成功が十分期待されてよいと思われる。

論 議

以上の実験は、クロダイ雌魚の成熟・産卵が、哺乳類起原の生殖腺刺激ホルモン剤であるシナホリンによって促進され得るか否かを明らかにするために行なわれたものであるが、その結果、卵巣重量や組織切片などについての対照魚との比較からみて、本剤の投与はその卵巣卵の成熟あるいは排卵、産卵を促進する効果を有するものと考えられ、特に満3年魚より満4年魚において顕著な効果が認められた。これはクロダイの特異な性転換現象⁶⁾⁷⁾にも関連した当然の結果と思われる。而してシナホリンの投与により良好な産卵個体の得られたことは、本剤の効果として予期以上の成果であり、一面では哺乳動物の脳下垂体ホルモンおよび胎盤性ホルモンが、魚類の催熟、産卵誘発に効果のあることを示したものとして大いに注目してよいところであろう^{8)~12)}。しかし、これらの成績からホルモン剤の適当な投与量、投与間隔など、ホルモン投与技法上の細部¹³⁾¹⁴⁾にわたって吟味することは困難であり、また、天然漁獲魚の場合の反応については全く未知でもあるので、以上の結果に基づき今後更に多くの実験的検討を積重ねることにより、本投与技術の確立を図りたいと思う。

次に、シナホリンを投与した雌魚は、雄魚とともに水槽に収容することにより水槽内での自然産卵をみたが、これは本魚の受精卵採取における全く新しい試みであり、その実用性についても考えてみる価値があるように思われる。一方、産卵期の成熟魚にシナホリンを投与した場合の排卵生起の時間などについても改めて究明し、人工受精を行なうための適確な時期¹⁵⁾を知ることも必要であろう。

なお、水槽内での産卵時刻が殆ど夜間に限られており、それも日没後数時間のうちに行なわれるものが多かったことは、ホルモン投与や交配後の経過時間との関係もあるかもしれないが、むしろ本種の産卵生態の一面を示しているものではないかと考えられる。

摘 要

鹹水養魚池で粗放的に養殖されたクロダイ雌魚に、生殖腺刺激ホルモンとしてシナホリンを注射したのち、雄魚とともに水槽に収容して、下記のような結果を得た。

- 1) 産卵期に入る前の未熟期から約1ヶ月間にわたり、4回の注射により全量62RUを投与した満4年魚において良好な産卵結果が得られたほか、満3年魚においても産卵がみられた。
- 2) 産卵期における未成熟魚に1回(20RU)または2回(40RU)の注射により、満4年魚に産卵個体が多くみられた。

文 献

- 1) 笠原正五郎・大島泰雄：水産増殖，7，41~47 (1960)
- 2) 笠原正五郎・平野礼次郎・大島泰雄：日水誌，26，239~244 (1960)
- 3) 平野礼次郎・笠原正五郎・日比谷 京：日水学会秋大会(口頭)，(1963)
- 4) 平野礼次郎・佐藤英雄・笠原正五郎・日比谷 京：日水学会秋大会(口頭)，(1964)
- 5) FOSTER, R. P.: J. Cell. Comp. Physiol., 42, 487~510 (1953)
- 6) KINOSHITA, Y: J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B. Div. 1, 7, 25~37 (1939)
- 7) 大島康雄：日水誌，10，249~255 (1942)
- 8) 川村智次郎・大塚外次：魚類学雑誌，1，157~165 (1950)
- 9) VIVIEN, J. H.: Bull. Biol. Fr. Belg., 75, 257~309 (1941)
- 10) TSCHEHOVITCH, G.: Arch. Sci. Biol., 4, 27~35 (1952)
- 11) WITSCHI, E.: Mem. Soc. Endocr., 4, 149~165 (1955)
- 12) HICKLING, C. F.: IPFC/C66/TECH 5, 1~9 (1966)
- 13) 山本喜一郎：細胞化学シンボ，8，119~134 (1958)

- 14) 日比谷京：水産増殖，**12**，239～259 (1965)
 15) KAZANSKII, B. N.: Dokl. Akad. Nauk. USSR, **80**, 227～280 (1951)

SUMMARY

Using the adults of 3 or 4 years of age of black porgy which were cultured extensively in the brackish-water fishponds, some trials were made in the artificial inducement of spawning of the fish. Female fish were mated with males in small concrete tanks after intramuscular injections of saline solution of "Synahorin" (mammalian gonadotropin preparation), and the results obtained were as follows.

- 1) Development of the ovaries of every semimature female recipient fish was evidently hastened by injections prior to the spawning season or early in that.
- 2) Then, two out of three females of 4 years of age successfully spawned after 62 RU in total dosage was respectively given by means of injecting in four doses during about one month, while partial spawning occurred in only one out of four females of 3 years with the above and additional injections.
- 3) In the spawning season, as the results of injections of respective dosage of 20 RU (once) or 40 RU (twice) into many females which were ripening but had not yet spawned, some of them mostly in females of 4 years of age could be induced to spawn.

EXPLANATION OF PLATE 1

Showing the difference of ovarian development between the injected female and the control.

Photo. A The ovaries sampled on May 1st, 10 days after first injection of Synahorin of 2 RU.

left: control, ovary weight 9.4g
 right: injected one, ovary weight 28.1g
 (middle: injected with Synahorin and DES)

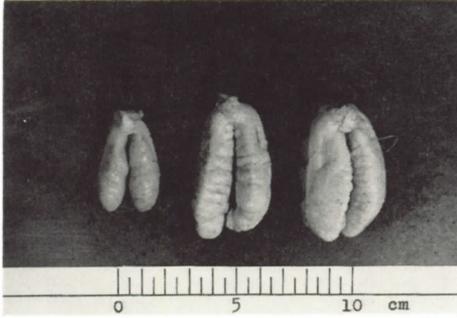
Photo. B The ovaries sampled on May 11th, 10 days after second injection of Synahorin of 20 RU.

left: control, ovary weight 7.2g
 right: injected one, ovary weight 57.3g
 (middle: injected with Synahorin and DES)

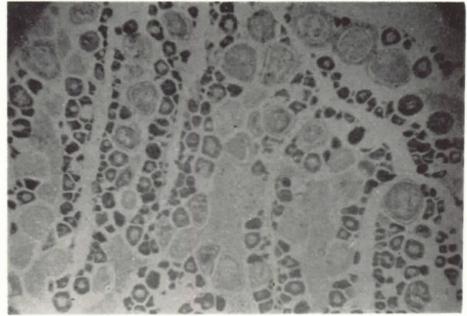
Photo. C A section of the ovary of a control female (left in Photo. B).

Photo. D A section of the ovary of an injected female (right in Photo. B).

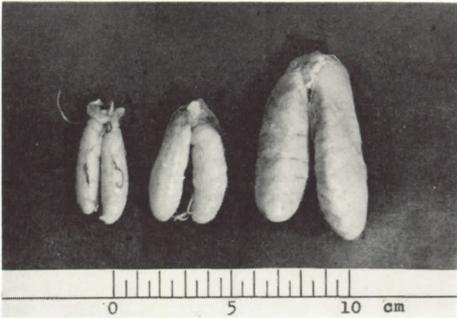
Photo. E The ovaries obtained on June 2nd, after injections of Synahorin of 108 RU in total dosage by seven times through more than one month.



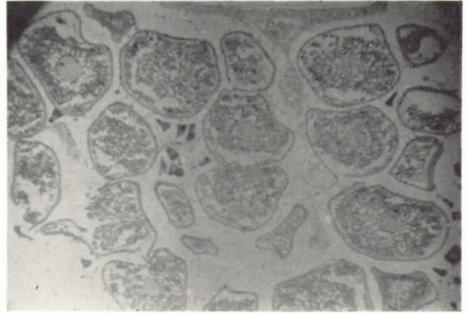
A



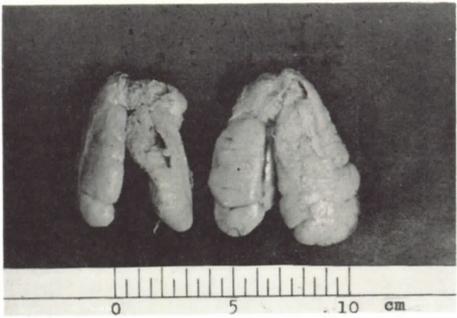
C



B



D



E