

タマカイ人為性転換雄と正常雌との交配による稚魚の大量生産技術の開発 (大型ハタ類の性転換・性成熟研究*1)

岸本和雄*2, 狩俣洋文*3, 木村基文, 中村 将*4

Seed Production of Giant Grouper Bred by Artificially-Sex-Changed Males with Normal Females

Kazuo KISHIMOTO*2, Hirofumi KARIMATA*3, Motofumi KIMURA
and Masaru NAKAMURA*4

陸上200kL水槽で飼育しているタマカイ親魚4個体に対して、2009年8月4日と10月13日に生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH_a) を40 μ g/kgの割合で投与した。ホルモン投与後に繁殖行動は観察できなかったが、投与5日後の8月9日に水槽内で産卵がみられ、未受精卵90g (平均卵径0.88mm) が得られた。また、ホルモン投与6日後の8月10日には、放精履歴の無い個体 (1240mmTL, 50.0kgBW, 雄化ホルモン処理履歴無し) から腹部圧迫により精子を採取することができた。以上の結果、GnRH_a のみの投与で産卵を誘導することができ、また、放精履歴のない個体から精子が採取できるようになったことから、成熟サイズに達した雌雄のタマカイ親魚の生殖腺を最終成熟に促す手段の一つとして、GnRH_a の単独投与は有効であると考えられた。今後も人工授精を含めたタマカイの種苗生産方法の確立が必要である。

12c

タマカイ (*Epinephelus lanceolatus*) は、太平洋及びインド洋の熱帯・亜熱帯海域に分布し、ハタ類の中でも特に大型になる種類である。また成長が早く (金城ほか, 2003)、美味であることから、沖縄県水産海洋研究センター石垣支所では、次期養殖対象種の一候補として、2001年11月から親魚の養成が開始された (多和田ほか, 2004; 仲盛ほか, 2005)。しかし大型種であるが故に、成熟した親魚を養成することが難しく、2004年から、ホルモン投与による人為的な性転換及び性成熟誘導が試みられてきた (狩俣ほか, 2006, 2007a, 2007b, 2008, 2009)。その結果、タマカイの性転換に関しては、アロマトーゼインヒビター (AI) 又はメチルテストステロン (MT) の投与による雄化 (狩俣ほか, 2007a, 2007b) が確認された。雌親魚の成熟に関しては、ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (以下「HCG」) と生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (以下「GnRH_a」) の同時投与 (狩俣ほか, 2007b) 又は GnRH_a の単独投与 (狩俣ほか, 2009) による産卵について成果が得られている。しかし、これまでに GnRH_a 等の投与で得られた卵は全て未受精卵であり、種苗生産試験の実施には至っておらず、さらに、ホルモン投与により雄化が確認できた個体は全て斃死している状況である。

現存する石垣支所陸上水槽群のタマカイ親魚のうち、これまでホルモン投与により雄化処理を進めてきたものは3

個体であり、2008年10月時点においてその雄化は確認されていないものの、その体重はそれぞれ32.4, 41.0, 41.2kgに達している (狩俣ほか, 2009)。Yuan et al (1997) の報告にあるタマカイ雄親魚の体重は34~120kgであり、石垣支所の3個体も雄として機能する大きさにまで成長してきている。これまでの性転換、性成熟処理の蓄積を考慮すると、雄化している可能性は高いと考えられた。雌親魚に関しては、狩俣ほか (2007, 2008) の試験により、個体判別はできていないものの採卵できていることから、雌個体がいることは確認済みである。以上のことから、石垣支所陸上親魚群において、成熟した雌雄のタマカイが存在する可能性は非常に高いと考えられた。

そこで本研究では、タマカイの次期養殖対象種としての可能性を検討するため、GnRH_a の単独投与による成熟誘導を行い、自然産卵又は人工授精による種苗生産技術開発試験を行うことを目的とした。なお、本研究は、新たな農林水産施策を推進する実用技術開発事業により、琉球大学との共同で行った。

材料及び方法

試験には、石垣支所陸上水槽200kL水槽 (9×9×2.5m) で飼育されている個体を用いた (表1)。通常の飼育管理について、タマカイ親魚10個体を、200kL水槽1面に収容

*1 新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業

*2 Email: kishimkz@pref.okinawa.lg.jp

*3 沖縄県水産課

*4 琉球大学熱帯生物圏研究センター

タマカイ人為性転換雄を用いた種苗生産

表1. タマカイ親魚の飼育履歴

個体識別番号	経歴（導入先・素性） 石垣支所での飼育開始年月	推定年齢 (2009年時点)	ホルモン処理履歴（処理年月・投与量/kg）				
			GnRH	HCG	GnRH+HCG	AI	MT+AI
44654A2A21 ※	沖裁セ・台湾2001年生産魚 2003年12月	8	2008.6(40µg) 2008.7(40µg)		2006.6(42µg+400IU) 2006.8(42µg+400IU) 2006.9(42µg+350IU) 2006.9(42µg+10000IU/a fish) 2007.8(42µg+400IU)		
452C155025 ※	奄美大島・台湾産（素性不明） 2001年11月	15	2008.6(40µg) 2008.7(40µg)	2005.8(500IU)	2005.9(12µg+115IU) 2006.6(14µg+133IU) 2006.8(14µg+133IU) 2006.9(42µg+350IU) 2006.9(42µg+10000IU/a fish) 2007.8(14µg+133IU)	2005.2(40mg) 2006.4(45mg)	
4465514C3D ※	沖裁セ・台湾2001年生産魚 2003年12月	8	2008.6(40µg) 2008.7(40µg)		2006.6(42µg+400IU) 2006.8(42µg+400IU) 2006.9(42µg+350IU) 2006.9(42µg+10000IU/a fish) 2007.8(14µg+133IU)		2007.5(135mg+2.7mg)
452C211605 ※	沖裁セ・台湾2001年生産魚 2003年12月	8			2007.8(42µg+400IU)		
452C1B2D62	沖裁セ・台湾2001年生産魚 2003年12月	8	2008.6(40µg) 2008.7(40µg)				
501F4C2C63	奄美大島・台湾産（素性不明） 2001年11月	15		2005.8(50IU)	2005.9(38µg+350IU) 2006.9(42µg+350IU) 2006.9(42µg+10000IU/a fish) 2007.8(42µg+400IU)		
501F470402	奄美大島・台湾産（素性不明） 2001年11月	15	2004.6(100µg) 2008.6(40µg) 2008.7(40µg)	2005.8(50IU)	2005.9(38µg+350IU)		
452B6A7178	奄美大島・台湾産（素性不明） 2001年11月	15	2008.6(40µg) 2008.7(40µg)	2005.8(500IU)	2005.9(38µg+350IU) 2006.6(42µg+400IU) 2006.8(42µg+400IU) 2006.9(42µg+350IU) 2006.9(42µg+10000IU/a fish) 2007.8(14µg+133IU)		2007.5(135mg+27mg)
501F476478	奄美大島・台湾産（素性不明） 2001年11月	15	2004.6(100µg) 2008.6(40µg) 2008.7(40µg)	2005.8(50IU)	2005.9(38µg+350IU)		

注1) 個体識別番号の※印は、今回の試験に使用した個体を示す。 注2) 沖裁セ：沖縄県栽培漁業センターの略

して飼育した。これらの親魚には、個体識別のため、磁気タグ (BIO MARK 社製) を背鰭前方の皮下に埋め込んだ。飼育海水には砂濾過海水を用い、換水率は約 0.6-1.1 回転/日に調整した。水槽替えは 2~3 ヶ月に一度行った。親魚の餌は、冷凍魚類 (グルクマ, ヤマトミズンなど) を、1~2 回/週、飽食量与えた。餌の表面には栄養添加剤 (ヘルシーミックス II : ビタミン E : 乾燥胆末を 20 : 1 : 1 に混合したもの) を付着させた。水槽内の水温は、データロガー型水温計 HOBO U22 Water Temp Pro v2 を用いて 6 時間又は 12 時間毎に測定した。ホルモン投与試験に先立ち、7 月 15 日と 10 月 13 日に親魚群の体長及び体重を測定し腹部を触診した。肥満度は次式により算出した (表 2)。

$$\text{肥満度} = \text{体重(g)} / \text{全長(mm)} \times 106$$

測定時の麻酔には、2-フェノキシエタノール (150ppm) を用いた。

ホルモン投与試験は、第 1 回試験を 2009 年 8 月 4 日から 10 日、第 2 回試験を 10 月 13 日から 16 日に実施した。ホルモン投与対象個体の選出について、親魚が大型で取り扱いが難しく、カニューレによる成熟判別ができなかったため、これまでのヤイトハタ等の飼育経験により、大型で肥満度の高い個体の成熟がより進んでいるという仮定のもと、過去のホルモン投与経歴を考慮し、雄化処理個体 1 個体、雌成熟促進処理個体 2 個体、ホルモン処理履歴はないが大型で肥満度の高い個体 1 個体の、計 4 個体を選んだ。2 回の試験とも同じ 4 個体を対象にホルモンを投与した。選出した試験魚 4 個体は、ホルモン投与後、他の 6 個体とは別の陸上水槽 200kL 水槽 1 面に収容した。親魚の成熟を誘導するホルモンには、GnRHa (SIGMA 社製, [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH) を用いた。GnRHa の投与は 8 月 4 日と 10 月 13 日に行い、投与量は 40 μ g/kg とし、背筋部に注射した。GnRHa の溶媒には、Yuan et al (1997) 及び狩俣 (2009) に従い、生理食塩水を用いた。ホルモン投与後、毎日 15 時以降に、繁殖行動の有無を確認した。体色変化や追尾行動が見られず落ち着いている場合は、親魚を刺激しないよう、すぐに観察を中止した。狩俣 (2009) の報告では、GnRHa 投与後、2 日または 3 日後に産卵が確認されている。そこで、自然産卵が見られなかった場合

に人工授精を行うため、GnRHa 投与後 2 日後と 3 日後に試験魚の腹部を圧迫して、精子と卵の採取を試みた。なお、第 1 回試験では、台風来襲のため、GnRHa 投与後 6 日後に実施した。精子と卵の採取の際には、同時に総排泄孔の観察も行った。採取された精子は光学顕微鏡 ($\times 400$) で観察した。自然産卵された浮上卵は、朝 9 時に、採卵水槽に設置した目合い 0.72mm のテトロンラッセル製ネットにより、オーバーフローした飼育水を濾して回収した。採卵した卵は、受精の有無を確認後、総重量を計量し、万能投影機を用いて卵径測定 (N=20) を行った。

結果

第 1 回目の GnRHa 投与後、試験魚は通常飼育時と同様、水槽壁面に静かに寄り添った状態で、人の気配を感じると逃げるなど、特に繁殖行動と思われる行動は観察できなかった。しかし、投与 5 日後の 8 月 9 日に未受精卵 90g が回収できた。平均卵径は 0.88mm であった。投与後 6 日目にあたる 8 月 10 日に試みた精子と卵の採取では、4 尾中 1 尾 (1240mmTL, 50kgBW, ID-452C155025) から精子が採取できた。この個体は 8 歳魚で、過去にホルモン処理履歴は無く、自然に性転換した雄であった。採取された精子を光学顕微鏡下で観察したところ、そのままの状態では精子の活動は見られず、海水を滴下すると活発に活動した。また 1 尾 (1318mmTL, 55.5kgBW, ID-44654A2A21) は総排泄孔が裂けていたことから、8 月 9 日に回収した未受精卵は、この個体が産卵したものと考えられたが、この時の腹部圧迫では卵は採取できなかった。残りの 2 尾からは精子も卵も採取できず、総排泄孔も通常どおりであった。2 回目の GnRHa 投与後、3 日目にあたる 10 月 16 日までに、繁殖行動は観察されず、自然産卵も見られなかった。10 月 15 日と 16 日に試みた精子と卵の採取では、いずれの個体からも採取できなかった。また、総排泄孔も、全ての個体において、GnRHa 投与前の状態から特に変化は見られなかった。2 回の試験期間中に斃死する個体は無かった。

表 2. タマカイ 親魚の体長, 体重, 肥満度及び触診結果

個体識別番号	7月15日測定				10月13日測定			
	全長 (mm)	体重 (kg)	肥満度	触診結果	全長 (mm)	体重 (kg)	肥満度	触診結果
44654A2A21 ※	1318	55.5	24.2	腹部やや柔らかい	1342	55.2	22.8	腹部やや柔らかい 総排泄孔が裂けている
452B7B326E	1293	45.4	21.0	特になし	1282	42.0	19.9	特になし
4465514C3D ※	1260	50.2	25.1	特になし	1272	48.8	23.7	特になし
452C155025 ※	1240	50.0	26.2	腹部柔らかい	1240	48.0	25.2	特になし
452C211605 ※	1235	49.6	26.3	特になし	1237	48.4	25.6	やや柔らかい
452C1B2D62	1215	43.4	24.2	特になし	1262	41.8	20.8	特になし
501F4C2C63	1160	41.0	26.3	特になし	1250	40.8	20.9	特になし
501F470402	1120	28.4	20.2	痩せている	1120	26.4	18.8	痩せている
452B6A7178	1117	36.0	25.8	特になし	1107	33.6	24.8	やや柔らかい
501F476478	1070	28.2	23.0	特になし	1075	26.8	21.6	特になし

注) 個体識別番号の※印は、今回の試験に使用した個体を示す。

考察

今回の試験では2回のホルモン投与を試み、未受精卵と自然に雄化した個体から精子が採取できたが、自然産卵及び人工授精には至らず、種苗生産試験は実施できなかった。

GnRHa 投与による雌親魚の成熟誘導について、狩俣ほか (2009) の報告に続き、その単独投与により、採卵に成功した。しかし、得られた卵は、総量が 90g と非常に少なく、またホルモン投与から採卵までに 5 日間かかった (表 3)。狩俣ほか (2009) の試験結果では、ホルモン投与から採卵までの期間は 2 日または 3 日、総卵量も 1139g と種苗生産規模の採卵量であった。Yuan et al (1997) は、GnRHa に HCG を併用してタマカイ雌親魚に投与しているが、その場合も投与後 40~48 時間で産卵すると報告しており、狩俣ほか (2009) と時間帯はほぼ同じである。得られた卵の卵径について、狩俣ほか (2009) は平均 0.81 mm と 0.89mm, Yuan et al (1997) は 0.80~0.89mm と報告している。今回の卵径は平均 0.88mm であることから、得られた卵の発達は十分であった。今回の総卵量の少なさと採卵までに長時間を要した原因について、カニューレションが実施できず、卵巣の組織観察を行っていないので推測に過ぎないが、ホルモン投与時の卵巣卵の発達状態が未熟すぎたのではないかと考えられた。Yuan et al (1997) は、投与しているホルモンの種類は違うが、ホルモン投与のタイミングを卵巣卵の卵径が 0.4 mm 以上となったときと報告している。今後、カニューレションの手法を検討し、卵巣の状態を継続して観察できるようにする必要がある。ホルモン投与の時期について、Yuan et al (1997) は、タマカイの繁殖期間を 5~10 月と報告している。今回の採卵できた第 1 回試験の実施は 8 月上旬と繁殖期間の中頃であるが、狩俣ほか (2009) の 1 回目の試験より約 40 日、2 回目より

約 10 日遅い。第 2 回試験は 10 月中旬で繁殖期間の終わり頃であった。10 月の試験では卵も精子も採取できず、また試験魚の肥満度も 8 月より低く (表 2)、親魚の状態が良くなかったことなどを考慮すると、今後の GnRHa 投与は、遅くとも 8 月までには実施することが望ましいと考えられた。以上のことから、今後の GnRHa 投与に関しては、繁殖期間に入る前の 4 月頃からカニューレションにより卵巣卵の状態を観察し、6 月~8 月を目途に、卵径の増大具合やその出現頻度分布などを把握した上で実施することが、十分な量の成熟卵を採取するために不可欠であると考えられた。

GnRHa 投与による雄親魚の成熟誘導について、今回の試験では、これまで放精履歴のない個体において、ホルモン投与後に精子が得られるようになった。この個体は過去に性成熟や雄化など一切のホルモン処理履歴が無い個体で、自然に性転換した個体であった。Yuan et al (1997) は、飼育個体中のタマカイ雄親魚は、繁殖期間中の 7~9 月で、水温が 28~30℃ に達している状態であれば、十分に成熟し精子が容易に採取できると報告している。第 1 回ホルモン投与前の体長測定日の平均水温は 28.9℃ であり、ホルモンを投与した日は 30.3℃ であった (図 1)。Yuan et al (1997) の例によれば、体長測定時点で精子が採取できてもよい状態であるが、今回は何らかの理由で成熟が不十分であったと考えられる。松山ほか (1997) が養殖トラフグで行った試験では、飼育環境下では雌親魚において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ない事例が確認されている。同じような状況が飼育中のタマカイ雄親魚にも起こっている可能性がある。飼育環境の改良や収容個体の選別などで改善されることも考えられるため、現状の飼育環境を再検討する必要がある。また、今回の雄個体が性転

表3. GnRHa投与によるタマカイの採卵結果

報告	ホルモン投与日	採卵日	総採卵量 (g)	受精状況	平均卵径 (mm)
狩俣ほか (2009)	2008/6/19	2008/6/22	1139	未受精	0.89
狩俣ほか (2009)	2008/7/25	2008/7/27	-	未受精	0.81
本報告	2009/8/4	2009/8/9	90	未受精	0.88

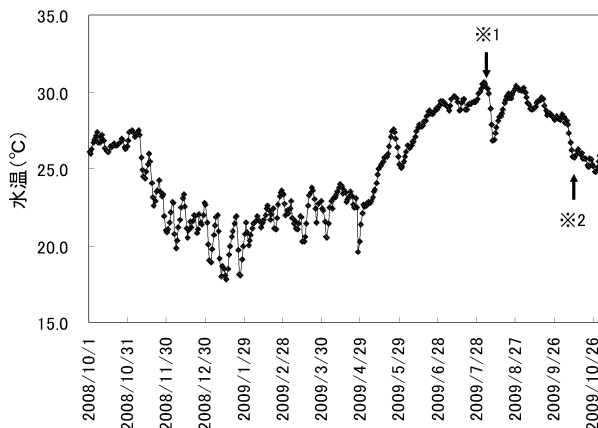


図1. タマカイ親魚の飼育水温

6 時間又は 12 時間毎の水温を 1 日平均して示した。
※1: 第 1 回ホルモン処理. ※2: 第 2 回ホルモン処理

表4. タマカイ雄個体の生体情報

報告	確認日	全長(mm)	体重(kg)	確認時の年齢	個体識別番号	確認方法
狩俣ほか(2009)	2008/5/15	1231	46.3	7	452C565037	死亡後の組織確認
狩俣ほか(2009)	2008/8/11	1228	43.0	7	452C10220D	腹部圧迫による放精
本報告	2009/8/10	1240	50.0	8	452C155025	腹部圧迫による放精

換してから間もなく、自然の状態ではまだ排精できる状態ではなかった可能性なども考えられる。いずれにせよ、今回のGnRHa投与が雄の最終成熟を促した可能性は高く、タマカイ雄親魚から精子を採取する方法として、GnRHaの単独投与が有効である可能性が示唆された。第2回試験時は、この雄個体にもGnRHaを投与したが、精子は採取できなかった。水温が26.2℃まで下がっていたことが主な原因と考えられるが、今後、安定して精子を採取するために、水温との関係やGnRHaの投与量などを検討する必要がある。雄への性転換について、今回の自然性転換は石垣支所での飼育記録上3例目であり(表4)、狩俣ほか(2009)の考察にあるとおり、タマカイの飼育環境下における自然性転換のサイズは全長1200mm、体重40kg以上であることが裏付けられた。2007年5月にAIとMTの同時投与による雄化処理履歴のある個体(識別番号4465514C3D)からは、今回精子は採取できなかった。今後観察を続ける必要があるが、現在すでに自然性転換サイズに達しており、雄化した場合のホルモン処理の効果判断は難しいと考えられる。

本試験により、タマカイ雌親魚においてはGnRHa単独投与による産卵誘導が可能なが再確認され、また雄親魚においてもGnRHa単独投与により最終成熟を促すことができる可能性が示唆された。タマカイの次期養殖対象種としての可能性を検討するために、今後も継続して、カニューレーションの実施によるホルモン投与タイミングの把握や投与量の検討など、技術の改良と安定化に努め、人工授精も含めた種苗生産技術の早期確立を図る必要がある。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、有益な助言をいただいた宮崎大学香川浩彦博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 金城清昭, 井上顕, 木村基文, 宮城美加代, 本永文彦, 鳩間用一, 濱川薫, 仲原英盛, 村本世利朝, 2003: タマカイの成長試験. 平成15・16年度沖縄県栽培漁業センター事業報告書, 56-58.
- 狩俣洋文, 木村基文, 2008: タマカイの親魚養成. 平成19年度沖縄県水産海洋研究センター事業報告書 69, 113-115.
- 狩俣洋文, 木村基文, 仲本光男, 2009: タマカイの親魚養成と小型魚の育成. 平成20年度沖縄県水産海洋研究センター事業報告書 70, 73-76.
- 狩俣洋文, 木村基文, 仲本光男, 呉屋秀夫, 2007b: タマカイの種苗生産技術開発試験. 平成18年度沖縄県水産試験場事業報告書, 197-200.
- 狩俣洋文, 仲盛 淳, 中村 将, 仲本光男, 呉屋秀夫, 石田 剣一, 2007a: タマカイの種苗生産技術開発試験. 平成17年度沖縄県水産試験場事業報告書, 196-199.
- 狩俣洋文, 仲盛 淳, 仲本光男, 呉屋秀夫, 福德 学, 2006: タマカイの種苗生産技術開発試験. 平成16年度沖縄県水産試験場事業報告書, 156-159.
- 仲盛 淳, 狩俣洋文, 仲本光男, 呉屋秀夫, 大浜幸司, 2005: タマカイ親魚養成(タマカイ種苗量産養殖技術開発試験). 平成15年度沖縄県水産試験場事業報告書, 173.
- 多和田真周, 仲盛 淳, 狩俣洋文, 仲本光男, 道清勇介, 2004: タマカイの親魚養成. 平成14年度沖縄県水産試験場事業報告書, 169.
- 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, 排卵過程. 水産増殖, 45, 67-73.
- Yuan-S.H., Wen-Y. C. and I C. L., 1997: Experiments on the Artificial Propagation of Giant Grouper *Epinephelus lanceolatus*. J.Taiwan Fish. Res. 5, 129-139.