

ホルモン投与により排精されたトラフグ精子の運動能

中田, 久
長崎県総合水産試験場

松山, 倫也
九州大学農学部水産学第一講座

原, 洋一
長崎県対馬水産業普及センター

矢田, 武義
長崎県総合水産試験場

他

<https://doi.org/10.15017/23620>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 53 (1/4), pp.35-40, 1999-02. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

ホルモン投与により排精されたトラフグ精子の運動能

中田 久^{*1}・松山 倫也・原 洋^{*2}
矢田 武義^{*1}・松浦 修平

九州大学農学部水産学第一講座

(1998年6月10日受付, 1998年11月6日受理)

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

Hisashi CHUDA, Michiya MATSUYAMA, Youichi HARA,
Takeyoshi YADA and Shuhei MATSUURA

Laboratory of Marine Biology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒 言

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 (LHRH-a) 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1996, 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)、我々がトラフグで行った人工授精でも、排卵された完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、媒精時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。

飼育下のトラフグ雄親魚は、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。

排精していないトラフグ雄親魚に、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} 長崎県総合水産試験場

^{*2} 長崎県対馬水産業普及センター

材料および方法

養殖業者より購入した養殖トラフグ3年魚を、長崎県水産試験場増養殖研究所の30 t屋外形水槽で半年間陸上飼育し、1～3月は室内20 t角型水槽に収容し、室内での親魚養成期間中、長日条件 (14L,10D)、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。排精が認められた個体については、毎日10:00時に精液を1 ml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℃の濾過海水2 mlを入れたスピッツ管 (10 ml) の乾いた内壁に精液を5 μ 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) の一定視野内の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1 ml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。

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. 1およびFig. 2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%を超え、粘度の高い精液となった (Fig. 1)。一方、精子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 (Fig. 2)。

次に排精している雄10尾から24時間内に短期的に連続採精した結果をFig. 3およびFig. 4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、同一個体内で

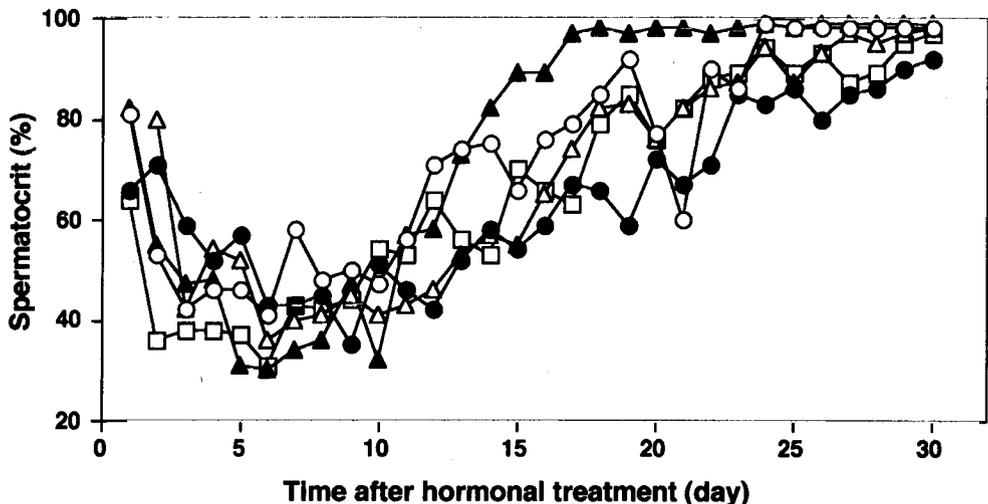


Fig. 1. Changes of spermatocrit in milt collected daily from five different tiger puffer male. Spermiation was induced by single injection with HCG (500 IU/kg) and chum salmon pituitary (7 mg/kg) combinedly. Spermatocrit (%) = (spermatozoan volume/milt volume) \times 100.

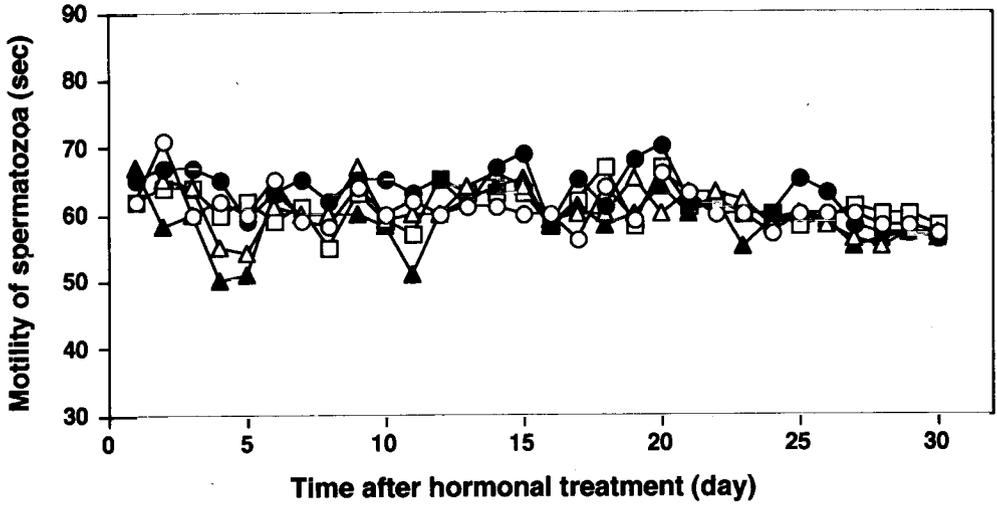


Fig. 2. Changes of spermatozoan motility in milt collected daily from five different tiger puffer male. Same fish samples and symbols used in Fig. 1 are also used here. Motility of spermatozoa is represented by the time until all spermatozoa cease their forward movement.

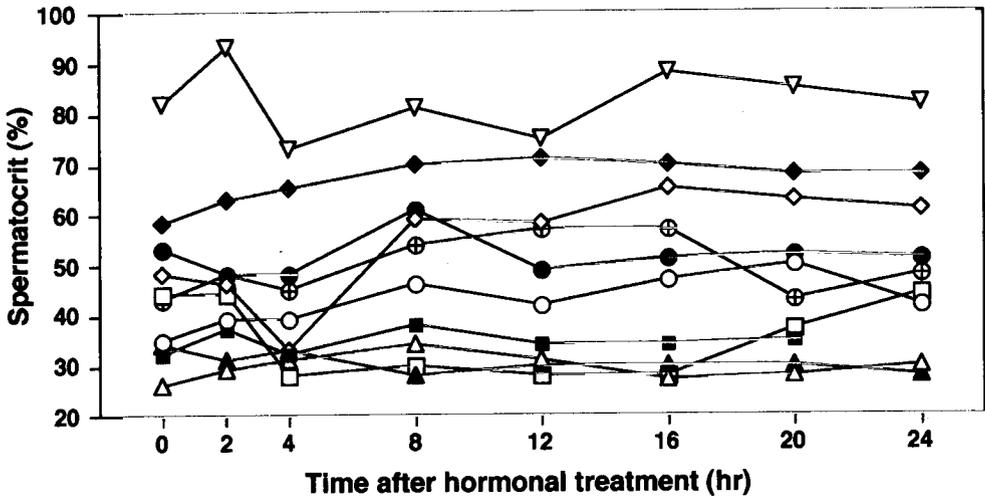


Fig. 3. Changes of spermatocrit in milt collected successively from spermiated 10 males at short time intervals; 2, 4, 8, 12, 16, 20, and 24 hours after first sampling (0 hour). Spermiation was induced by single injection with HCG (500 IU/kg) and chum salmon pituitary (7 mg/kg) combinedly.

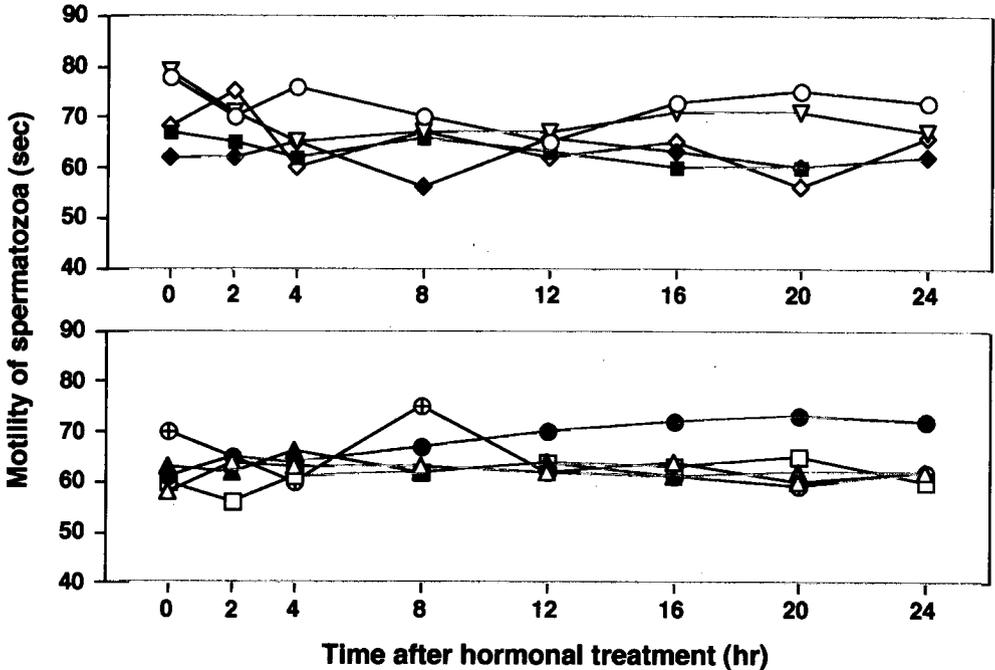


Fig. 4. Changes of spermatozoan motility in milt collected successively from spermiated 10 males at short time intervals; 2, 4, 8, 12, 16, 20, and 24 hours after first sampling (0 hour). Same fish samples and symbols used in Fig. 3 are also used here.

は安定していた (Fig. 3)。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. 4)。

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連続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)。たとえば、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受精能を比較した結果、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ろう。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、腹部を強く圧迫し、精液を搾出すると、その量は一般に50 ml 以上ある (中田ら、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1 ml であったので、どちらの実験においても、大量に産生され、精小葉内腔や輸精管に貯蔵されている精液を繰り返し採取していたものと考えられる。すなわち、トラフグ精巣では、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る。

我々は、養成雌親魚 (3歳) から1 kg 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 ずつ精液を採取し、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匹から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。

謝 辞

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金一般研究 (C) (0766027) により行った。

要 約

1) 養成トラフグからの採卵技術開発の一環として、ホルモン投与により排精を促した雄から精液を採取し、個体毎にスパマトクリットおよび精子運動時間の変化を調べた。

2) 精巣が十分発達した3歳の養成雄親魚に、HCG とシロザケ脳下垂体の混合物を1回投与することにより、5尾中4尾でホルモン投与の翌日から排精が認められた。

3) 30日間にわたり5尾から毎日採精を行った結果、スパマトクリット値は投与後約10日間は低い値を示し (30~59%)、その後徐々に増加し23日目には全個体が80%を超えた。一方、精子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。

4) 排精している雄10尾から一定時間間隔で短期的に連続採精した結果、実験期間中 (24時間) 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、同一個体内では安定していた。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。

文 献

- 松山倫也・中田 久・池田義弘・田中宏之・松浦修平 1996 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
- 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法の開発。日本水誌, 63 (5): 728-733
- Hirose, K., Y. Machida and E. M. Donaldson

- son 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
- Norberg, B., V. Valkner, J. Huse, I. Karlsen and G. L. Grung 1991 Ovulatory rhythm and egg viability in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, **97**: 365-371
- 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**: 537-540
- 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
- Miura, T., K. Yamauchi, 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
- 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
- Harvey, B. and R. N. Kelly 1984 Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. *Aquaculture*, **36**: 85-95
- 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

Summary

One or two days after single injection with HCG (500 IU/kg) and chum salmon pituitary homogenate (7 mg/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 spermiated 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.