

学 位 論 文 題 名

Manipulation of ovarian maturation and spawning  
of the Asian sea bass *Lates calcarifer* Bloch by  
luteinizing hormone-releasing hormone analogue.

（黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログによる  
アジア sea bass の成熟と産卵の制御）

学位論文内容の要旨

アジア sea bass *Lates calcarifer* は東南アジア、パプアニューギニアや北オーストラリアにおいて食用として利用されると共に、スポーツフィッシング対象魚としても利用されており、非常に需要が高い魚種である。しかし、その養殖用種苗は天然稚魚に依存している。そのため、本種の種苗の安定供給が急務とされており、人工種苗生産技術の確立が待ち望まれている。そこで本研究は、本種の効率の良い最終成熟および産卵誘導法を開発することを目的とし、黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ（LHRHa）を用いたホルモン投与法およびホルモン処理を行う最適な時期の検討を行った。

まず、ホルモン投与するにあたって、必要不可欠と思われる試験魚の飼育管理方法およびホルモンの取扱について検討を行った。最初に、各実験魚の鰓蓋に個体識別できるように標識を打ち込み、標識の欠落および生存率を調べた。その結果、標識の欠落および実験魚の死亡は認められなかった。次に、実験魚の卵巣の発達度合を把握しておく必要があるため、カニキュレーションによる生検法の検討を行った。その結果、この方法で採取した卵巣を5%ホルマリン液

にて固定後1時間以内に卵径の測定を行えば、簡便で多数の検体を処理できると判明した。最後に、ホルモンの取扱について検討を行った。溶解した LHRHa は冷却状態で90日間、室温保存下で30日間、さらにペレットにした状態で室温保存した場合で120日間、ホルモンの生物活性を損なうことなく保存できることが判明した。

次に、本種の産卵と月齢周期の関係および LHRHa 処理の産卵に及ぼす影響を調べた。本種の天然での産卵は6月から10月にかけて半月時の夜間、引潮時に行われていることが明らかになった。卵巣内の最大卵群のステージは半月時には卵黄形成終了の状態にあり、新月および満月時では卵黄形成期であった。さらに、卵黄形成を終了した卵を持つ親魚に LHRHa を投与した場合、天然条件下で観察されたような月齢と同調した産卵周期は示さず、月齢に関係無く産卵を誘起することができた。しかし、天然条件下およびホルモン処理したいずれの場合においても、産卵は夕刻の引潮時に観察された。

次に、ホルモン投与を行う際の投与量の検討を行った。様々なホルモン量(1, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{g/kg}$  体重)を投与した結果、10  $\mu\text{g/kg}$  体重以下の低濃度処理では有意な効果は認められなかったが、50  $\mu\text{g/kg}$  体重以上の高濃度処理では高い産卵誘発効果を有した。さらに、いずれのホルモン処理濃度においても、得られた卵は生存能力のある健全卵であった。

また、卵巣の発達段階が異なる親魚を用いて、ホルモン処理を行う最適な時期の検討を行った。その結果、最大卵群の卵径が 0.30-0.39 mm である未熟な卵母細胞を持つ親魚にホルモン処理を行っても産卵は誘起されなかったが、0.40-0.49 mm に達し、卵黄形成を終了した卵母細胞を持つ親魚ではホルモン投与による産卵が惹き起こされた。一方、0.50-0.55 mm の卵母細胞を持つ親魚で

は、ホルモン処理の有無に関係無く産卵が観察された。また、午前11時および午後5時の昼間にホルモン処理を行った場合、産卵は夜明け前後の時間帯に観察されたが、午後11時および午前5時の夜間にホルモン処理を行った場合、産卵は昼間に認められた。産卵数は昼間にホルモン処理を行った方が夜間に処理を行った場合に比べ多かった。

次に、ペレット状にした LHRHa を生体内に移植し、長期間にわたるホルモン処理の検討を行った。その結果、低濃度 (4.75-75  $\mu\text{g/kg}$  体重) 処理の場合、処理濃度に依存して産卵率が増大したが、高濃度 (150-300  $\mu\text{g/kg}$  体重) 処理では有意に産卵率が低下した。また、300  $\mu\text{g/kg}$  体重の高濃度で処理した場合受精率も低値を示したが、その他の処理濃度では受精率および孵化率に統計学的差異は認められなかった。さらに、ホルモン処理した全ての群での産卵数は殆ど同じであったが、最初に行われた産卵の産卵数が最も多くその後減少する傾向が認められた。これらのことから、長期間にわたるホルモン処理は産卵数および卵質に影響を及ぼすと推察された。

最後に、LHRHa と合成アンドロジェン (17 $\alpha$ -methyltestosterone, MT) の連続投与および複合投与により、本種の人工種苗生産を定期的に行うことができるか否かを検討した。ホルモン処理は、ペレット状にした各ホルモンを低濃度 (100  $\mu\text{g/kg}$  体重) で1ヵ月おきに移植するか、高濃度 (200  $\mu\text{g/kg}$  体重) で45日間隔で移植することにより行った。高濃度のホルモン処理においては、3月に1回 LHRHa を単独投与した群および MT との複合投与群で通常の産卵期前の4月に産卵を誘起することができた。一方、低濃度処理では、3回の LHRHa 単独投与および MT との複合投与を行うことによって、5月に産卵を誘起することができた。また、雄においては、2回の低濃度 MT の連続投与により4月

に成熟が誘起され、3回の連続投与では全てのホルモン処理群で5月に成熟が誘起されることが判明した。このことから、LHRHa および MT ペレットを用いたホルモン処理は、本種の早期成熟に効果的であることが示された。

以上の結果より、まず、本種の産卵リズムが月齢周期および潮の干満に同調していることが示された。次に、卵成熟および産卵を誘起するためのホルモン処理を行う最適な時期が示されると共に簡便かつ効果的なホルモン処理方法が示された。また、本研究により確立されたホルモン処理方法により、本種の早期成熟が可能となった。本成果はフィリピンにおける本種の増養殖に大きく貢献すると期待される。

# 学位論文審査の要旨

|    |     |       |
|----|-----|-------|
| 主査 | 教授  | 山内 皓平 |
| 副査 | 教授  | 山崎 文雄 |
| 副査 | 教授  | 麦谷 泰雄 |
| 副査 | 助教授 | 足立 伸次 |

## 学位論文題名

Manipulation of ovarian maturation and spawning  
of the Asian sea bass *Lates calcarifer* Bloch by  
luteinizing hormone-releasing hormone analogue.

(黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログによる

アジア sea bass の成熟と産卵の制御)

アジア sea bass (*Lates calcarifer*) はフィリピンを含む東南アジアや北オーストラリアにおいて食用として利用されるなど、非常に需要が高い魚種である。しかし、その養殖用種苗は天然稚魚に依存している。そのため、本種の種苗の安定供給が急務とされており、人工種苗生産技術の確立が待ち望まれている。

本研究では、アジア sea bass を用いて本種の効率の良い最終成熟および産卵誘導法を開発することを目的とし、黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ (LHRHa) を用いたホルモン投与方法およびホルモン処理を行う最適な時期の検討を行い、以下の興味ある結果を得た。

まず、本種の産卵と月齢周期の関係および LHRHa 処理の産卵に及ぼす影響を調べた。その結果、本種の天然での産卵は6月から10月にかけて半月時の夜間、引き潮時に行われることが明らかになった。また、卵黄形成を終了した卵を持つ親魚に LHRHa を投与した場合には、月齢に関係無く産卵を誘起することができた。さらに、天然条件下およびホルモン処理したいずれの場合においても、産卵は夕刻の引き潮時に行われることが判明した。

次に、ホルモン投与を行う際の投与量の検討を行った。様々なホルモン量を投与した結果、低濃度では有意な効果は認められなかったが、高濃度処理で高い産卵誘発効果が見られた。また、得られた卵は生存能力のある健全卵であった。

また、卵巣の発達段階が異なる親魚を用いて、ホルモン処理を行う最適な時期の検討を行った。その結果、未熟な卵母細胞を持つ親魚にホルモン処理を行っても産卵は誘起されなかったが、卵黄形成を終了した卵を持つ親魚にホルモン処理した場合に、高い産卵誘発効果が認められた。

また、ホルモン処理の時間帯を昼間と夜間に行い産卵行動を比較観察したところ、昼間にホルモン処理を行った場合、産卵は夜明け前後の時間帯に観察され、夜間にホルモン処理を行うと産卵は昼間に認められた。この際、産卵数は昼間にホルモン処理を行った方が夜間に行った場合に比べ多くなることが判った。

次に、ペレット状にした LHRHa を様々な濃度で生体内に移植し、長期間にわたるホルモン処理の検討を行った。その結果、低濃度で長期間処理した際に産卵誘発効果が認められると共に、受精率および孵化率も高かった。しかし、高濃度での長期処理は産卵率および受精率の低下を引き起こした。これらのことから、高濃度での長期間にわたるホルモン処理は産卵数および卵質に悪影響を及ぼすことが判明した。

最後に、LHRHa と合成アンドロジェンの連続投与および複合投与により、本種の人工種苗生産を定期的に行うことができるか否かを検討した。その結果、LHRHa と合成アンドロジェンとの複合投与により、雌雄ともに天然条件下で見られる産卵時期より早期に成熟が誘起された。このことから、本投与方法が本種の早期成熟に効果的であることが示された。

上述のように、本研究では、アジア sea bass の産卵リズムが月齢周期および潮の干満に同調していることを見い出し、卵成熟および産卵を誘発するためのホルモン処理を行う最適な時期が示されると共に簡便かつ効果的なホルモン処理方法が示された。これらの結果は、魚類の成熟および産卵を人為的に統御するための極めて重要な知見を提供したものとして高く評価され、審査員一同は、本研究の申請者が博士（水産学）の学位を授与される十分な資格を有すると判定した。