

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-67187

(P2011-67187A)

(43) 公開日 平成23年4月7日(2011.4.7)

(51) Int.Cl.
A01K 61/00 (2006.01)F1
A01K 61/00テーマコード(参考)
2B104

審査請求 未請求 請求項の数 4 書面 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2009-240858 (P2009-240858)
(22) 出願日 平成21年9月25日 (2009.9.25)

特許法第30条第1項適用申請有り 研究集会名: 2009 (平成21) 年度日本水産学会春季大会 主催者名: 社団法人日本水産学会 開催日: 2009年3月27日~3月31日

(71) 出願人 592167411
香川県
香川県高松市番町4丁目1番10号
(72) 発明者 棚野 元秀
香川県高松市屋島東町75番5号 香川県
水産試験場内
(72) 発明者 三木 勝洋
香川県高松市屋島東町75番5号 香川県
水産試験場内
Fターム(参考) 2B104 AA01 BA02

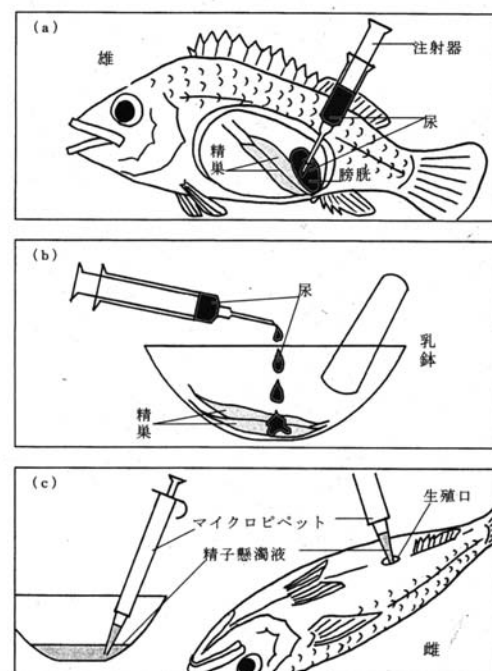
(54) 【発明の名称】 海水魚の体内受精魚の人工授精方法

(57) 【要約】

【課題】 海水魚の体内受精魚の人工的な受胎を可能にして、その結果、種苗生産の効率化が図れ、育種が可能となる人工授精方法を提供する。

【解決手段】 海水魚の体内受精魚において、精子を雌の生殖口に注入する。精子は雄から得た精巣と尿により精子懸濁液として注入する。さらに、異種間交配に使用する。精子の注入はマイクロピペットを用いて行う。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

海水魚の体内受精魚において、雌の生殖口への精子注入を特徴とする人工授精方法。

【請求項 2】

雌の生殖口へ注入する精子を、雄の尿で希釈した精子懸濁液とすることを特徴とする請求項 1 記載の人工授精方法。

【請求項 3】

異なる魚種間の交配で使用することを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の人工授精方法。

【請求項 4】

体内受精魚の人工授精において、雌の生殖口への精子注入に際して、マイクロピペットを用いることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、海水魚の体内受精魚の雌を、人工的手法により受胎させる方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

稚魚の生産技術、すなわち種苗生産技術は、栽培漁業や養殖業、および観賞魚取り扱い業の基礎となる技術であり、体外受精魚（以下、卵生魚と同義で使用）、体内受精魚（以下、卵胎生魚を含む胎生魚と同義で使用）を問わず、卵、或いは仔魚を、計画的に得ることは、種苗生産を効率的に行ううえで極めて重要である。

【0003】

さらに、魚類の養殖では、飼育しやすい魚、すなわち成長が速い、生き残りが多い等々の性質を持つ魚が望まれ、異種間交配を含む育種により、そのような魚を作出することが要望されている。

【0004】

ところで、魚類の卵、或いは仔魚を得るには、飼育する魚の自発的な産卵や交尾行動にまかせる方法と、人工授精による方法があり、体外受精魚は、両方法が都合により選択され、使用されている。

【0005】

ところが、体内受精魚の人工授精の方法は、淡水魚で開発されたものしか無いために、海水魚ではもっぱら自発的交尾行動にまかせる方法が用いられてきた。

【0006】

これまでに、体内受精魚で開発された人工授精方法は、淡水魚である *p o e c i l i d f i s h* に対して、生理食塩水で溶いた精子懸濁液を、雌の生殖口から注射器で注入する方法、或いは、その応用として、片方に注射針をつけたパイプの中にある懸濁液を、もう片方から口で吹くことによる注入を行う方法だけがあり、観賞魚の育種や、基礎的実験に、わずかに使われているだけである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】 「Science 112号」, 1950年, p722-723.

【非特許文献 2】 「Tropical Fish Hobbyist May 2001号」, 2001年, p108-116.

【非特許文献 3】 「Proceeding of The Royal Society B 271号」, 2004年, p2035-2042.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【0008】

体内受精魚は、淡水魚だけでなく、海水魚にも多い。海水魚の体内受精魚には、栽培漁業や養殖を目的に種苗生産される魚種も多いが、人工授精技術が開発されていないために、仔魚を得るには、飼育する魚の自発的交尾行動にまかせる方法しか無く、安定的な種苗生産が妨げられてきた。

【0009】

人工授精技術が無いために、人工授精によってのみ可能となる異種間の交配や、優れた性質を持つ個体を親にして子を得る育種といった、品種改良が行えなかった。

【0010】

また、上述の淡水魚で開発された技術では、注射器で注入する方法と、片方に注射針をつけたパイプの中にある精子懸濁液を、もう片方から口で吹くことによる注入を行う方法しかなく、短時間で安定的に一定量の精子懸濁液を注入することができなかった。

【0011】

本発明は、以上の問題点を解決し、海水魚の体内受精魚の効率的な人工授精を可能とし、その結果、安定的、計画的に種苗生産を行い、さらに異種間交配や育種による品種改良を可能とする方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、タケノコメバルの雄の尿を用いて作った精子懸濁液を、雌の生殖口に注入すると、雌が受胎することを見出し、この知見を基礎として本発明を完成させたものである。すなわち、タケノコメバルの雄は、交尾期になると雌に比べ大量の尿を膀胱に蓄えていることを見つけた。このことから雄の尿が交尾に関係しているものと推測し、雄から尿と精巢を取り出し、尿とともに精巢を潰して作った精子懸濁液を、マイクロピペットを用いて一定量ずつ雌の生殖口に注入すると、雌が高率に受胎することを見出した。さらにこの技術を、タケノコメバルとメバルの異種間の交配に使用したところ、生まれた子供はこれら2種間の中間形を示し、雑種となることを見出した。

【0013】

請求項1に係る人工授精方法は、海水魚の体内受精魚において、雌の生殖口への精子注入を特徴として構成されている。

【0014】

請求項2に係る人工授精方法は、請求項1記載の人工授精方法において、雌の生殖口へ注入する精子を、雄の尿で希釈した精子懸濁液とすることの特徴として構成されている。

【0015】

請求項3に係る人工授精方法は、請求項1又は2の人工授精方法において、異種間の交配に使用することの特徴として構成されている。

【0016】

請求項4に係る人工授精方法は、体内受精魚の精子注入に際して、マイクロピペットを使用することの特徴として構成されている。

【発明の効果】

【0017】

請求項1に係る人工授精方法によれば、海水魚の体内受精魚において、雌の生殖口への精子注入により、注入された雌は受胎する。

【0018】

請求項2に係る人工授精方法によれば、海水魚の体内受精魚において、雌の生殖口へ注入する精子を、雄の尿で希釈した精子懸濁液とすることによって、高率に雌の受胎を誘導できる。

【0019】

請求項3に係る人工授精方法によれば、品種改良などを目的として、同種間だけでなく、異種間の体内受精魚の交配が可能となる。

【0020】

請求項 4 に係る人工授精方法によれば、体内受精魚の精子注入に際して、マイクロピペットを用いることにより、一定量を正確に、短時間で、雌の生殖口に注入することができる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図 1】人工授精の実施手順を示す図である。（発明を実施するための形態）

【図 2】タケノコメバルとメバルの正逆交配種と両親種の写真。（試験 2）

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明の、海水魚の体内受精魚の人工授精を実施するための形態を、図 1 に示す。この人工授精方法においては、雌の生殖口へ精子を注入する。まず図 1（a）に示すように、雄を開腹し、精巣を取り出し、膀胱から注射器で尿を抜き取る。次に図 1（b）に示すように、乳鉢等で精巣を潰し、抜き取った尿を注いで希釈し、精子懸濁液を作製する。そして図 1（c）に示すように、マイクロピペットを用いて、精子懸濁液を雌の生殖口へ注入するものである。

10

【0023】

雌の生殖口へ精子を注入することによる受胎の有無は、試験 1 により確認される。

【0024】

また、雌の生殖口へ注入する精子を、雄の尿で希釈した精子懸濁液とすることによって、高率に雌の受胎を誘導できることは、試験 1 の結果（表 2）と、飼育する魚の自発的交尾行動にまかせる方法による雌の受胎結果（表 3）を、比較することにより確認される。

20

【実施例】

【0025】

〔試験 1〕

<方法>

あらかじめ雄と雌を分けておき、11月になって、図 1 に示した手順により人工授精した。人工授精の実施日 1 回あたり、タケノコメバルの雄は 5～10 尾を使用し、それらの精巣、尿を混ぜて精子懸濁液を作製した。できた精子懸濁液を、28～50 尾の雌のタケノコメバルの生殖口に、マイクロピペットを用いて、雌の大きさ等を考慮して決めた所定量（0.03ml 或いは 0.05ml）を注入した。受胎の有無は、後日に、産仔の確認、仔魚の搾り出しによる確認、或いは雌の解剖による確認により調べた。

30

【0026】

<実施状況>

実施状況を表 1 に示す。対照区とは、雄と雌を分離した後、受精作業を行わず、そのまま飼育を続けたものである。

【表 1】

タケノコメバルにおける人工授精の実施状況

	実施年	雄雌分離日	人工授精実施日	使用した雄の数	雌の数	
					人工授精区	対照区
1回目	2005	10月21日	11月18日	5	50	21
2回目	2007	11月8日	11月8日	10	50	21
3回目	2007	同上	11月15日	10	50	同上
4回目	2008	10月20日	11月15日	5	28	30
5回目	2008	同上	11月29日	5	39	同上

10

【0027】

<結果>

結果を表2に示す。

20

【表 2】

人工授精したタケノコメバルの受胎率

	受胎雌数		受胎率%	
	人工授精区	対照区	人工授精区	対照区
1回目	41	0	82.0	0
2回目	43	1	86.0	4.8
3回目	43	同上	86.0	同上
4回目	25	1	89.3	0
5回目	23	同上	59.0	同上
平均			80.5	1.6

30

(注)受胎率%は、 $100 \times \text{受胎雌数} / \text{雌の数}$

40

【0028】

<結論1>

表2より、対照区が0%から4.8%（平均1.6%）の受胎率であるのに対し、人工授精区は59.0%から89.3%（平均80.5%）と高い値を示したことから、人工授精を実施したこと、すなわち、精子の注入によって、雌が受胎したことが確認される。

【0029】

なお、2回目の対照区の受胎率が0%ではなく4.8%となったのは、2回目の雌雄分離日が他の実施回より遅かったために、すでに交尾した個体が居たためである。

【0030】

5回目の人工授精区の受胎率が、1回目から4回目の受胎率に比べて低いのは、人工授

50

精実施時期が最も遅く、生殖期の終末にあたるためである。

【0031】

表3には、飼育する魚の自発的交尾行動にまかせる方法による雌の受胎結果を示す。タケノコメバルを収容する海面の小割生簀網の大きさは4×4×深さ2mであった。

【表3】

自発的交尾行動にまかせる方法による雌の受胎率

年	収容数		雌	受胎雌数	受胎率%
	雄雌計	雄			
2000	24	15	9	5	55.6
2001	50	19	31	13	41.9
2002	102	44	58	20	34.5
2003	136	61	75	27	36.0
2004 a	68	32	36	3	8.3
b	105	44	61	3	4.9
2005 a	28	17	11	6	54.5
b	30	19	11	7	63.6
2006	77	38	39	16	41.0
平均					37.8

(注)受胎率%は、 $100 \times \text{受胎雌数} / \text{収容した雌数}$

【0032】

<結論2>

表3より、自発的交尾行動にまかせる方法による雌の受胎率は、4.9%から63.6%（平均37.8%）となっており、表2の試験1における結果：人工授精による受胎率59.0%から89.3%（平均80.5%）のほうが明らかに高い率を示した（マンホイットニーのU検定により有意水準1%で有意）。したがって、雌の生殖口へ注入する精子を、雄の尿で希釈した精子懸濁液とする人工授精の方法は、通常、飼育する魚の自発的交尾行動にまかせる方法より、高率に雌の受胎を誘導できることが確認される。

【0033】

本発明においては、雌の生殖口に精子を注入することが必要であるが、精巣を潰すことによって得た精子を含む粘性の強い液体を、雄の尿で希釈することによって、扱いやすい液体とすることができ、注入を容易にする。

【0034】

また、尿は一般的に親が健康であれば無菌であり、それで希釈して作製する精子懸濁液も清潔な環境に保ちやすい。

【0035】

次に、タケノコメバルとメバルの異種間の交配に、人工授精を使用した結果について説明する。

【0036】

[試験2]

<方法>

タケノコメバルとメバルの正逆交配、すなわち、雄親と雌親の種類が異なり、それぞれが雄、或いは雌となる交配に、図1で示した人工授精方法を使用した。タケノコメバルを雌親とした交配では、雌親10尾に対し、メバル雄3尾の尿及び精巣で作製した精子懸濁

液を、マイクロピペットで生殖口へ注入した。メバルを雌親とした交配では、雌親 3 尾に対し、タケノコメバル雄 3 尾、或いは 2 尾の尿及び精巣で作製した精子懸濁液をマイクロピペットで生殖口へ注入した。注入量は 0.03 ml 或いは 0.05 ml であった。人工授精の実施日は 11 月 17 日であった。後日、産仔の有無等によって受胎率を確認した。なお、産まれた仔魚は飼育し、1 歳魚の時点で両親の種と形態を比較した。

【0037】

<結果>

タケノコメバルを雌とする交配では、10 尾中 7 尾が受胎し（受胎率 70%）、メバルを雌とする交配では 3 尾中 1 尾が受胎した（受胎率 33%）。

【0038】

タケノコメバルとメバルの正逆交配により受胎した親が産んだ仔魚を飼育し、1 歳に成長した魚の写真を、両親となるタケノコメバル、メバルとともに図 2 に示す。タケノコメバルの雌親とメバルの雄親による交配種と、メバルの雌親とタケノコメバルの雄親による交配種は、ともに体高が高くメバルに近い体形であるが、体表の柄はタケノコメバルに近く、明らかに両親とは違う、中間形を示した。

【0039】

<結論 3>

タケノコメバルとメバルといった、異なる魚種間で、図 1 に示した人工授精技術を用いて交配種が生まれた。すなわち、交配種の作出に、本発明が有効であることが確認された。

【0040】

続いて、体内受精魚の雌の生殖口への精子注入に際して、マイクロピペットを用いることについて説明する。

【0041】

非特許文献 1 及び 2 で示された、雌の生殖口からの精子注入を注射器で行う方法、或いは、その応用として、片方に注射針をつけたパイプで注入を行う方法では、僅かな一定量を注入する事は難しく、注入量のバラツキを避けられない。また、注射針の先端部分が鋭利であり、親魚を傷つける可能性がある。

【0042】

マイクロピペットは、元来、微量な液体を、正確に、短時間で取り分ける器具であることから、僅かな一定量を注入する場合に最適である。また、簡単に交換可能である合成樹脂製のチップは、先端も滑らかであり、注入の際、親魚を傷つける可能性は低い。

【0043】

試験 1 の 1 回目において、50 尾の雌に精子懸濁液を注入し終えるまでの時間は、2 人の作業で、20 分であり、1 尾あたりに換算して 24 秒となり、極めて短時間で終了した。

【0044】

<結論 4>

体内受精魚における、精子注入に際し、マイクロピペットを用いることにより、安全に、極めて短時間に、注入できることが確認された。

【0045】

なお、マイクロピペットのチップは滅菌可能なものが多く、滅菌済みのものを使用し、雌一尾に注入する毎に交換すれば、衛生的な作業も可能となる。

【産業上の利用可能性】

【0046】

栽培漁業、養殖業、及び観賞魚の生産業における、種苗生産や品種の作出に利用できる。

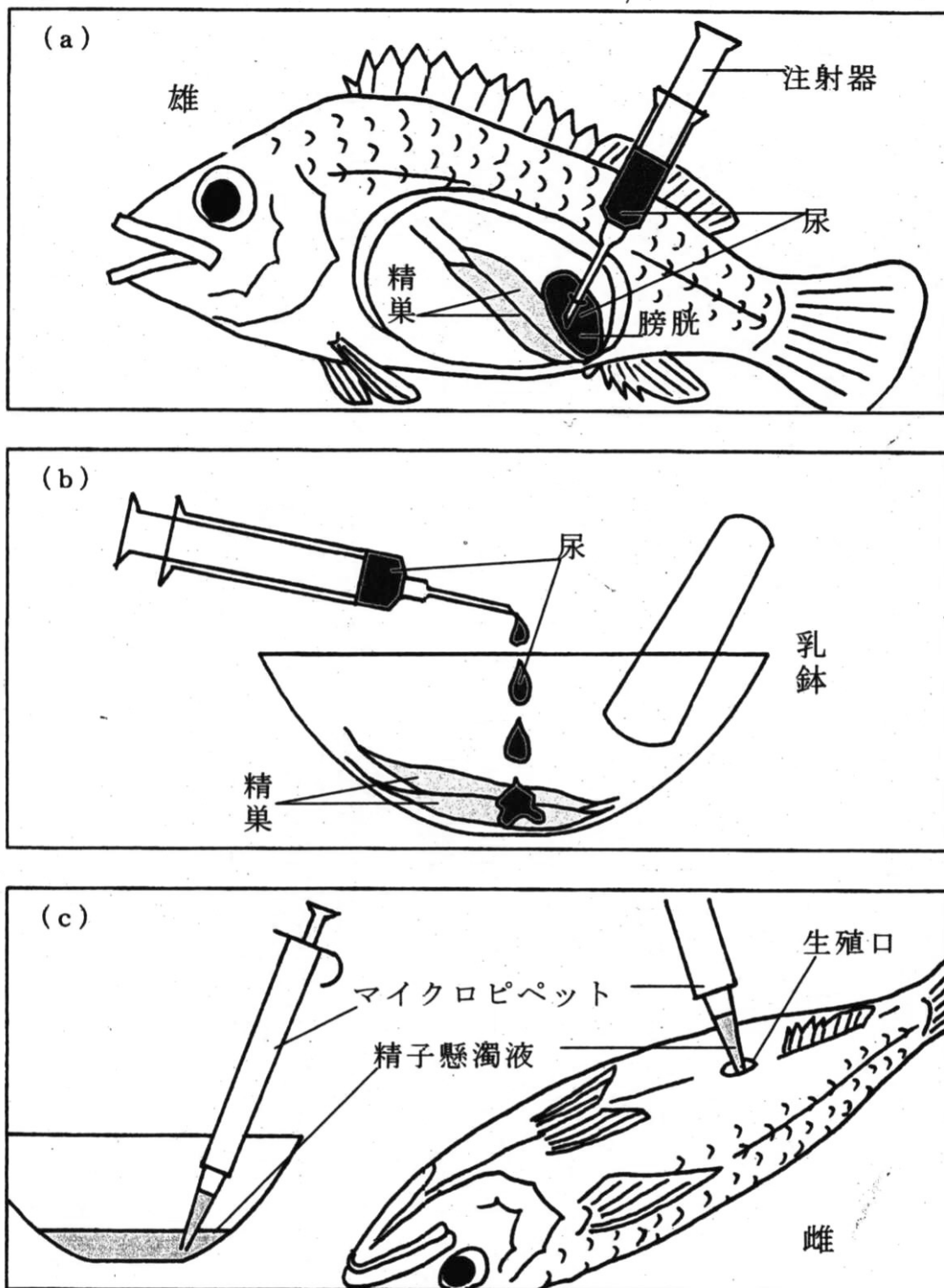
10

20

30

40

【図 1】

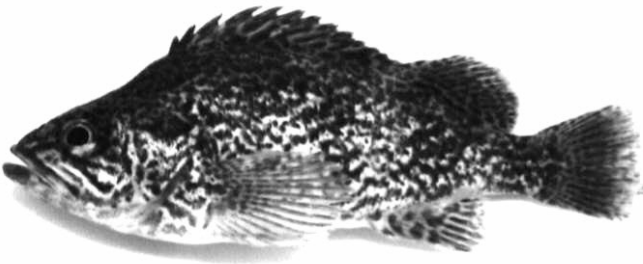


【図 2】

図面代用写真(カラー)



タケノコメバルの雌親と
メバルの雄親の交配種
(156mm)



メバルの雌親とタケノコ
メバルの雄親の交配種
(132mm)



タケノコメバル
(137mm)



メバル
(104mm)