

【研究報告】

ホルモン投与によるタマカイの産卵誘発技術の高度化 (おきなわ産ミーバイ養殖推進事業)

田村 裕*, 松崎遣大¹, 松田誠司, 鮫島翔太¹, 大嶺理紗子¹

Spawning induction methods using hormone-treatment of giant grouper *Epinephelus lanceolatus*

Yu Tamura*, Kenta Matsuzaki¹, Seiji Matsuda, Shota Samejima¹ and Risako Omine¹

タマカイの人工採卵において、既存の排卵誘導手法に加え、新たに合成生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンである GnRHa を使用した手法を実施し、2種類の排卵誘導手法(“hCG+GnRHa 混合注射”と“GnRHa コレステロールペレット”)について、採卵成績から実用性を確認した。既存の手法も加えた3種類のうち最も排卵個体率が高く斃死率が低いのは“hCG+GnRHa 混合注射”であった。ホルモン投与前の平均卵母細胞径と排卵個体率、得られた平均浮上卵量との関係から、hCG+GnRHa 混合注射では平均卵母細胞径が390~449 μm 、GnRHa コレステロールペレットでは400~439 μm の時に、排卵個体率50%以上、平均浮上卵量500g以上となり、雌の選定基準として用いることが効果的であることが分かった。“hCG+GnRHa 混合注射”では51時間後までに94.4%の個体で、GnRHa コレステロールペレットでは55時間後までに92.3%の個体で初回排卵が起こることが明らかになり、搾出を行う時間の目安とすることができる。また、初回排卵以降は、受精率、ふ化率が低下することが明らかとなったことから、受精卵が十分ある場合は、搾出は初回のみでよいことが示された。

タマカイ *Epinephelus lanceolatus* はインド太平洋に分布する大型のハタ科魚類で、亜熱帯地域に属する本県の特徴ある養殖対象種として有望であることから、これまでに産卵誘発技術および種苗生産技術の開発が行われてきた(山内ほか, 2012)。本種は国内で天然魚の採捕がほとんどないため、過去に県外から導入した原魚と沖縄県水産海洋技術センター石垣支所または県栽培漁業センターで養成した魚を用いて、安定的に種苗を供給する技術が必要である。

タマカイは飼育下で自然産卵せず、これまでの技術開発でヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を用いた排卵誘導と搾出および人工授精によって人工的に採卵することが可能となっている。しかしここ数年は人工採卵による排卵個体率が低下している。hCGは高分子の物質であるため、魚類の体内で抗体が産生され、徐々にホルモンの効果が低下する(Zohar and Mylonas, 2001)と考えられている。さらに、hCGは原材料をヒト尿に依存し、生産量が不安定であることから、産卵誘発技術の多様化が必要となっている。近年、ハタ科魚類の排卵誘導にはhCGの他、合成の生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が使用されるようになっており、ホルモンの効果が持続されるよう、コレステロール等の油脂と混合してペレットを作製し、腹腔や筋肉中に埋め込む方法が普及している(奥澤, 2021; 中田ほか, 2018)。そこで、タマカイにおいてもGnRHを使用した産卵誘発技術を開発するこ

ととした。また、ハタ類の養殖が盛んな台湾ではホルモン投与によってタマカイの水槽内での産卵行動を誘起させて受精卵を得る手法が確立されていることから(Ho et al., 1997)、本県でも産卵行動の誘起に有利な水深の深い(5m)大型水槽を2017年に整備し、水槽内産卵誘発試験を実施することとした。

材料及び方法

(1) 搾出および人工授精による人工採卵法

1) 供試魚と飼育条件、餌

供試魚には人工種苗と国内からの導入個体を用い、石垣支所200kL陸上水槽(10.5×6.3m、水深3.6m)で試験を実施した。

飼育海水には砂濾過海水を用い、溶存酸素が5.5mg/L以上となるよう、換水率を0.6~4.5回転/日に調製した。餌は冷凍魚(サバ/ムロアジ、比率1.2~5.8)を週1~2回、飽食量与えた。栄養添加剤として、ヘルシーミックス2、タウリン、アクエイト、アスタアップ(アスタキサンチン)、水を15:10:4:2:20に混合し、サバ1尾あたり18±2g、ムロアジ1尾あたり12±2gとなるように棒状に成型し、餌の魚の口または鰓から体内に差し込んで給餌した。産卵期中(5~10月)はこれにさらにDHAを10の割合で添加し、サバ1尾あたり19±2g、ムロアジ1尾あたり13±2gとなるように成型し

*E-mail: tamuray@pref.okinawa.lg.jp 石垣支所(現所属: 沖縄県八重山農林水産振興センター農林水産整備課)

¹現所属: 沖縄県農林水産部水産課

て、給餌した。水槽内の水温は、データロガー型水温計 HOB0 U22 Water Temp Pro v2 (Onset 社) を用いて 3 時間毎に測定した。

2) 計測と成熟度判定, 採精

ホルモン投与の 3~4 日前に供試魚の体長及び体重を測定し、肥満度を算出した。さらに、雌の生殖孔から外径 2.33mm, 内径 1.65mm, 長さ 17.5mm のポリエチレン細管を挿入し、注射器で陰圧をかけて採取 (以下、カニキュレーション) した卵母細胞 100 個の直径を万能投影機下で計測し、平均直径と直径 0.4mm 以上の割合から成熟度を判定し、ホルモン投与個体を決定した。雄及び性別不明個体は、腹部を圧迫して総排泄孔から精子が分泌されるか確認した。卵母細胞や精子は 15mL ポリプロピレン製遠沈管に採取し、クラッシュアイスを満たしたクーラーボックスで計測・顕微鏡観察まで保管した。人工授精に使用する精子を入れた遠沈管は、クラッシュアイスにさして、当日まで家庭用冷蔵庫 (0°C) で保管した。測定や成熟度判定は麻酔 (2-フェノキシエタノール, 300ppm) して行い、ハンドリングストレス軽減のため、鰓に麻酔液をかけ続けるようにした。また、2021 年以降は 1 回あたりの処理を 10 分以内に終えるようにした。

3) 雄の精子評価

①精子運動活性

精子 2μL をスライドグラス上に採り、顕微鏡 (Nikon ECLIPSE-90i 倍率 100) 視野下で精子が動いているかどうかを観察した。次に、砂濾過海水 300μL を滴下し、カバーグラスをかけ、直ちに顕微鏡視野下で精子の動きを観察し、運動活性を以下の 4 段階に分けて記録した。

- 3+ 50%以上が運動している
- 2+ 10~50%が運動している
- 1+ 10%未満が運動している
- 0 運動していない

②精子運動時間

運動活性を記録した試料について、約 10 分おきに顕微鏡視野下で観察し、運動時間を計測した。精子の運動時間は海水を滴下してから動いている精子が 10%以下になった時間の 1 つ前の観察時間までとした。スライドグラス内の海水が移動して、運動の判定が難しい場合は、周囲の精子と異なる方向に移動するものを動いていると判定した。位置が移動せず、その場で震えているものは停止とした。

③精子濃度

精子濃度を把握するため、精子をヘマトクリット管に封入し、ヘマトクリット遠心機 (3220, KUBOTA) を用いて 12,000rpm で 15 分間遠心分離後、精液中に占める精子の体積比 (以下スパマトクリット値) を測定した。

4) 雌の排卵誘導と採卵

雌個体の排卵誘導には、hCG であるゴナトロピン (5000 または 10000 単位, あすかアニマルヘルス(株)) または hCG ゲストロン (5000 単位, 共立製薬(株)) 及び合成生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンである GnRH α (des-Gly¹⁰, [D-Ala⁶]-LHRH ethylamide, (株)スクラム) を用いた。GnRH α については、魚の体内で長期間持続的に溶出させるために 2 種類の徐放性製剤 (コレステロールペレット, カカオバター) を調製した。投与方法は“hCG 注射” (2010~2019 年実施), “hCG+GnRH α 混合注射” (2018~2021 年実施), “GnRH α コレステロールペレット”, “GnRH α カカオバター” (ともに 2019~2021 年実施), “GnRH α メラノバター” (2021 年実施) の 5 種類である。“hCG 注射”は hCG を平均 600 IU/kg 体重, “hCG+GnRH α 混合注射”は hCG と GnRH α をそれぞれ平均 499 IU/kg 体重, 48μg/kg 体重, 生理食塩水に溶かし、背筋中に注射した。“GnRH α コレステロールペレット”は中田ほか (2012) の方法に従い、GnRH α を 20.0μg/mg 含む、直径 4mm×高さ 10mm, 78~189mg の円柱状のペレットを作製し、麻酔した供試魚の背側の前半部または腹腔の表皮にメスで切れ込みを入れて、GnRH α が平均 229μg/kg 体重となるよう、PIT タグインジェクター (10mL, ステンレス製ニードルの内径 4.1mm・長さ 50mm) で 1~2 個ずつ埋め込んだ。2 個体のみは、GnRH α を 72.2μg/mg 含む高濃度コレステロールペレットを 405~442μg/kg 体重となるように投与した。“GnRH α カカオバター”はカカオバターに GnRH α を 1000μg/mL または 10000~19100μg/mL 溶かし、供試魚の体重あたり 100~233μg/kg となるよう、麻酔した供試魚の背筋に注射した。“GnRH α メラノバター”はメラノバター (不二製油) に GnRH α を 1000μg/mL 溶かし、供試魚の体重あたり 200μg/kg となるよう、背筋に注射した。

ホルモン投与後 42~51 時間後に麻酔し、カニキュレーションと腹部圧迫により排卵の有無を確認した。腹部圧迫により、排卵された卵が生殖孔から流出した場合を排卵ありとした。この時、外径 13mm, 長さ 200mm のシリコンチューブを生殖孔に差し込んで、バケツに未受精卵を搾り出した。2020 年の後半からは、その後、卵巣腔内に人工卵巣腔液 AOF (蒸留水 20L に NaCl 187.2g, KCl 6.2g, CaCl₂ · 2H₂O 6.4g, D(+)-Glucose (C₆H₁₂O₆) 7.2g, HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S) 95.3g, MgCl₂ · 6H₂O 4.4g を溶解し、5N の NaOH 溶液で pH を約 7.5 に調整) を注入し、卵巣腔内に残った卵を液ごと搾出した。排卵していなかった場合は、平均 3 時間 25 分間隔で 2~5 回排卵の有無を確認した。

未受精卵は搾卵後ただちに 2L のメスシリンダーに 200mL ずつ分注し、洗卵液を 2L のラインまで注いだ。メスシリンダーの口を 1~2 枚のパラフィルムで塞ぎ、液が漏れないよう手で押さえながらゆっくり反転させ、卵が底に到達したら再び反転させて元の向きに戻した (図 1A)。これを 2 回繰り返したら、一旦上澄み液を捨て、再度洗卵液を 2L のラインまで注ぎ、同様の手順を繰り返した。2 回目の液を捨てた後、ホルモン投与日または搾卵日に採取した精子を砂濾過海水

1.8L にパスツールピペットで1〜2滴滴下し、ただちにかきまぜたものを注ぎ入れ、湿導法により人工授精した。精子は人工授精直前までクラッシュアイスを満たしたクーラーボックスで保管し、2個体分を混合して使用することもあった。精子液を入れたメスシリンダーは1〜2枚のパラフィルムで塞いで1回転させ、約15分静置して浮上卵を分離した。砂濾過海水をかけ流した観賞用魚ネット(13×11×9cm)に浮上卵のみを注ぎ入れ、水槽収容まで管理した。浮上卵はg粒数を計数し、浮上卵と沈下卵の重量から浮上卵の粒数と浮上卵率を算出した。

Ho et al., (1997) はタマカイの卵内発生時間は水温 28〜29℃の時、16細胞期が1時間23分後、ふ化が19時間36分後と報告している。そこで、受精卵の受精率は、砂濾過海水を入れた500mL ビーカーに受精卵約100個を入れ、室温(25.3〜30.3℃)で管理し、約1時間20〜30分後に8〜16細胞期に発生が進んだ卵の割合を計数した。ふ化率は、砂濾過海水を入れた1000mL ビーカーに受精卵約100個を入れ、親魚の飼育水と同じ温度(27.1〜30.8℃)の海水をかけ流したウォーターバスでふ化管理し、収容日夕方と翌朝に死卵を除去したのち、20〜24時間後にふ化した卵の割合を計数した。なお、本研究における浮上卵とは人工授精直後の浮上卵で、その後孵化までに卵内発生が停止する卵を多く含むため、自然産卵による採卵よりも一般的に孵化率は低くなる。

ホルモン処理した雌は翌日に再び麻酔し、卵巣腔内に人工卵巣腔液を注入して、体内に残留した卵をできる限り搾り出した。

洗卵によるウイルス除去効果を確かめるため、2021年9月16日に搾出し冷蔵庫で保存した未授精卵を用いて、9月17日に洗卵試験を行った。洗卵の方法は2Lメスシリンダーを用いる上記の方法と、卵と洗卵液を入れた2L塩ビ広口ビンに薬液タンクを傾けて注入するための台にのせ、ゆっくりと2回転させる方法(図1B)の2種類とした。前者の方法では1度に200gしか洗卵できないが、後者は最大1,600gを1度に洗卵できる省力的な手法である。洗卵前後の卵からDNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNAを抽出し、Taqman プローブを用いたリアルタイムPCR法(Durand and Lightner, 2002)による検査を実施して、マダイイリドウイルス遺伝子の定量を行った。

(2) ホルモン投与による水槽内産卵誘発

1) 供試魚と飼育条件

供試魚には人工種苗を用い、雄9尾、雌10尾(2020年度)および雄5尾と雌7〜8尾(2021年度)を石垣支所500kL陸上水槽(12.8×7.8m、水深5.3m)で試験を実施した。溶存酸素が5.5mg/L以上となるよう、換水率を0.4〜1.5回転/日に調製した。その他の照度以外の飼育条件は人工採卵法と同じとした。水槽の4隅と中央の架橋両側に500Wハロゲンライトを合計6基設置し、16L8Dの長日処理を行った。急激な照度変化による魚へのストレスを軽減するため、3段階に分けて点灯し、点灯時間は(北側)5:00〜8:00、18:00〜21:00、

(中央)5:10〜8:00、18:00〜20:50、(南側)5:20〜8:00、18:00〜20:40とした。

2) ホルモン投与

人工採卵法と同じ方法で雌の成熟度判定と雄の精子評価を行い、ホルモン投与個体を決定した。

ホルモンの使用量と投与方法はHo et al., (1997)に従い、2020年9月1日、雌3尾(112.9kg, 67.9kg, 51.2kg)にhCG 368.2〜398.6 IU/kg体重とGnRHa 39.1〜39.9μg/kg体重、雄3尾(135.6kg, 92.7kg, 81.6kg)に雌の約1/3量となるhCG 122.5〜132.7 IU/kg体重とGnRHa 12.9〜13.5μg/kg体重を生理食塩水約1〜2mLに溶解して背筋に注射した。2021年8月10日と9月6日にも、それぞれ雌1尾(55.7kg, 49.2kg)にhCG 350.1, 396.3 IU/kg体重とGnRHa 37.7, 42.7μg/kg体重、雄2尾(144.9kgと98.5kg, 138.5kgと91.1kg)にhCG 12.2〜12.4, 13.7〜14.3 IU/kg魚体重とGnRHa 116.8〜117.3, 131.7〜133.6μg/kg魚体重を投与した。

3) 行動観察・卵収容

ホルモン投与翌日の9時〜13時頃に試験群の行動を記録した。産卵行動の妨げとなることを防ぐため、できるだけ水面に観察者の姿が映らないよう姿勢を低くして観察した。産卵があった場合は、採卵槽に採卵ネット(テロンラッセル製、目合い0.72mm)を設置し、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、産卵行動から約10時間後の胚体形成期まで採卵ネット2個の中で管理し、1tパンライト水槽で浮上卵と沈下卵を分離した後、それぞれの重量を計量し、浮上卵を30t水槽2面に収容した。浮上卵の一部は産卵27〜33分後に回収し、人工採卵法と同じ方法で受精率、ふ化率を測定した。また、万能投影機を用いてg粒数を測定した。

ホルモン処理した雌は翌日に再び麻酔し、卵巣腔内に人工卵巣腔液を注入して、体内に残留した卵をできる限り搾り出した。その際、ホルモン処理した雄からは精子を採取した。

結 果

(1) 搾出および人工授精による人工採卵法

本事業の期間は2020年4月から2022年3月であるが、人工採卵法の結果の解析には2010年度からの試験結果を用いた。初回排卵時間と卵質(受精率、ふ化率)の結果の解析には2020年6〜8月、2021年5〜9月(水温27.9〜29.8℃)に実施した試験結果を用いた。

1) 雌親魚の排卵誘導

① ホルモンを用いた排卵誘導手法の採卵成績

2010〜2021年に実施した6種類のホルモン投与方法について、のべ試験個体数、平均体重、採卵成績(平均浮上卵量、平均浮上卵率、排卵個体率)、斃死率を表1にまとめた。排卵個体率は、強い圧迫により数10gの卵巣組織が剥がれて排出

されることがあるため、100g以上の卵が得られた場合を排卵として算出した。

タマカイの種苗生産に必要な最低限の卵量は、年間およそ1kg程度である。そこで年間2尾程度から採卵すると想定し、種苗量産に必要な採卵成績基準を平均浮上卵量500g以上、排卵個体率50%以上、かつホルモン投与魚の斃死率が30%以下とし、5種類の投与方法について検討したところ、hCG+GnRHa 生理食塩水、GnRHa コレステロールペレットの2手法が基準を満たしていた。3種類の排卵誘導手法のうち最も排卵個体率が高く、斃死率が低いのは“hCG+GnRHa 混合注射”であり、最も平均浮上卵量が多いのは“GnRHa コレステロールペレット”であった（表1）。

製剤中にGnRHaを72.2 μ g/mg以上含む高濃度コレステロールペレットと製剤中にGnRHaを1000 μ g/mg含むGnRHaメラノバターは、試験個体数が1～2尾と少ないが、斃死率が高い可能性が示唆された。また、GnRHa カカオバターは排卵個体率が低かった。

②ホルモン投与前の平均卵母細胞径と排卵個体率および平均浮上卵量との関係

これまでのhCG注射を用いた排卵誘導では、“直径500 μ m以上の卵母細胞の出現”がホルモン投与前の個体の選定基準とされている（今道ほか、2016）。しかし、新たな排卵誘導手法“hCG+GnRHa 混合注射”、“GnRHa コレステロールペレット”について検討したところ、最大卵母細胞径が500 μ m以上の場合には一定の採卵量を得られる個体の割合が少なく（図2）、既報の雌選定基準には当てはまらなかった。

そこで、ホルモン投与前の平均卵母細胞径と排卵個体率、得られた平均浮上卵量・平均浮上卵率との関係を図3に示した。“hCG+GnRHa 混合注射”では平均卵母細胞径が390～449 μ m、“GnRHa コレステロールペレット”では400～439 μ mの時に、排卵個体率50%以上、平均浮上卵量500g以上となった（表2）。

③初回排卵時間

“hCG+GnRHa 混合注射”、“GnRHa コレステロールペレット”において、ホルモン投与後から搾出により排卵を確認するまでの時間（初回排卵時間）を確認するとともに、効率的な搾出回数の検討に向けて、搾出時間と卵質の関係を調査した。“hCG+GnRHa 混合注射”では、ホルモン投与から49時間後までに50.0%、51時間後までに94.4%の個体で初回排卵が起こった。“GnRHa コレステロールペレット”では49時間後までに46.2%、51時間後までに61.5%の個体で初回排卵が起こり、初回排卵時間が長くなる傾向があった（図4）。

体重あたりの搾出量は搾出1回目で平均17.7g/kg、2回目で平均18.7g/kgであり、2回以上あるいは徐々に排卵可能していた可能性がある（図5）。

④搾出時間と受精率およびふ化率の関係

初回排卵時の受精率が10%未満の時（個体E、G）を除く

と、2手法ともに、初回排卵確認からの経過時間に対し、受精率が減少した（図6）。相対受精率は初回排卵確認からの経過時間に対し、“hCG+GnRHa 混合注射”、“GnRHa コレステロールペレット”ともに、負の相関を示した（ $r=-0.9464$, $r=-0.4355$ ）（図7）。

また、2手法ともに、初回排卵確認からの経過時間に対し、ふ化率が減少した（図6）。相対ふ化率は“hCG+GnRHa 混合注射”、“GnRHa コレステロールペレット”ともに、初回排卵からの経過時間に対して、負の相関を示した（ $r=-0.9793$, $r=-0.9406$ ）（図7）。

⑤洗卵によるウイルス除去効果

今回洗卵前後の卵からはマダイイリドウイルスは検出されなかった。

⑥卵母細胞径と排卵個体率の季節性

2020年から2021年に成熟度判定を行った個体の月別平均卵母細胞径を図7に示した。100個平均および上位30個平均卵母細胞径は6月から9月にかけてわずかに大きくなる傾向を示したが、期間を通して常にばらつきが大きかった。また、2010年から2021年に人工採卵を行った個体について、月別の排卵個体率と斃死率を図8に示した。5～10月の期間中では7～8月が最も排卵個体率が高く、60%を超えており、斃死率は9月に最も高くなった。

2) 精子評価

①スパマトクリット値の季節性、スパマトクリット値と魚体重および精子運動時間との関係

2019年8、10月、2020年7、8月、2021年5～9月に雄1～10尾のスパマトクリット値を計測した。測定不良、ホルモン投与後、3日以内の同一個体連続計測のデータは除いた。2021年5月から9月にかけてスパマトクリット値が上昇傾向を示す個体が多かったが、その傾向にあてはまらないものもいた（図10）。個体別年間平均スパマトクリット値と体重の間には明らかな相関関係はなかった（図11）。

一方、ホルモンを投与した個体の精子も含めて、スパマトクリット値と精子運動時間との関係を調査したところ、負の相関が見られた（図12）。

②冷蔵保存が精子運動時間とスパマトクリット値および受精率に与える影響

2021年8月、9月に、精子の採取当日と冷蔵保存3日後、5日後の精子性状の経時変化を調べたところ、平均精子運動時間は3日後までは変化がなく、5日後には減少していた。平均スパマトクリット値には変化はなかった（図13）。

採取当日と冷蔵保存2日後の精子の受精率は同程度であり（対応のある2標本T検定 $t=1.2639$, $df=4$, $p=0.2749$ ）（図14）、精子採取後少なくとも2日間は冷蔵保存が可能で、人工授精に使用可能であった。

③ホルモン投与による精子分泌への影響

2021年9月に、水槽内産卵誘発のためにホルモンを投与した雄2尾と投与していない雄3尾について、投与前と投与3日後における精子性状の変化を調べたところ、投与個体の平均スパマトクリット値は投与前に比べて有意に低くなった(対応のある2標本T検定, $p < 0.001$)。対照個体では変化はなかった。平均精子運動時間については、投与個体、対照個体ともに変化はなかった(図15)。

(2) ホルモン投与による水槽内産卵誘発

2020年9月3日、雌3尾にホルモン投与してから48.5時間後となる10時38分に、ホルモンを投与した中で最大の雄と中型および小型の雌合計2尾が(うち1尾はタグリーダーで個体判別し51.2kgの雌と判明)水面で並行遊泳する様子が観察され、その後採卵ネットの中に卵が確認された。浮上卵量2,607g、浮上卵率58.1%、受精率46.5%、ふ化率31.3%であった。産卵翌日の9月4日にホルモン投与した雌の卵巣腔内に残された残卵の搾出を行ったが、6日に大型の雌2尾が斃死した。

2021年は2回とも産卵は確認されなかった。

考 察

(1) 搾出および人工授精による人工採卵法

本研究では、既存の排卵誘導手法に加え、新たにGnRHaを使用した手法を実施し、2種類の排卵誘導手法(hCG+GnRHa混合注射とGnRHaコレステロールペレット)について、採卵成績から実用性を確認した。2021年にこれらの2手法によって得られた受精卵から種苗生産を行い、9185尾を取上げることができた。既存の手法も加えた3種類のうち最も排卵個体率が高く斃死率が低いのはhCG+GnRHa混合注射であった。GnRHaコレステロールペレットは排卵個体率や斃死率の点で既存の手法にやや劣るものの、平均浮上卵量は最も多かった。ホルモン投与前の平均卵母細胞径と排卵個体率、得られた平均浮上卵量との関係から、hCG+GnRHa混合注射では平均卵母細胞径が390~449 μ m、GnRHaコレステロールペレットでは400~439 μ mの時に、排卵個体率50%以上、平均浮上卵量500g以上となり、雌の選定基準として用いることが効果的であることが分かった。従って、通常はhCG+GnRHa混合注射を使用し、hCGの反復投与歴のある雌親魚に排卵誘導を行う際や、hCGの必要量が手に入らない時に、雌の選定基準に適合する個体にGnRHaコレステロールペレットを使用する、というような使い分けを行うことが可能となった。卵質の指標である浮上卵率については、hCG+GnRHa混合注射において50%を超えることが少なく(図3)、今回は雌の選定基準には含んでいないが、今後、卵質や種苗生産成績の評価方法についてさらに検討する必要がある。

タマカイはホルモンを投与すると48時間後に排卵が起こるとされているが、ホルモン投与後から搾出により排卵を確認するまでの時間(初回排卵時間)は個体差が大きく、さら

に、長時間にわたって何度も排卵が起こっている可能性があるため、これまで同日に何回も搾出を行っていた。タマカイ親魚は平均体重63.8kgと大型であり、ハンドリングは容易ではなく、搾出回数が増えると人的経費が増加することが課題であった。本研究により、“hCG+GnRHa混合注射”では51時間後までに94.4%の個体で、GnRHaコレステロールペレットでは55時間後までに92.3%の個体で初回排卵が起こることが明らかになり、搾出を行う時間の目安とすることができ。また、初回排卵以降は、受精率、ふ化率が低下することが明らかとなったことから、受精卵が十分ある場合は、搾出は初回のみでよいことが示された。ただし、受精卵量を確保するために2回以上搾出することもあり、その場合は死卵による水質の悪化を防ぐため、初回の搾出卵とは水槽を分けて収容するなどの対策が必要であると考えられる。

人工採卵の留意点として、産卵行動が起こらないため、卵巣腔内に排卵された卵は人工的に搾り出さなければ体内で腐敗し、親魚への悪影響が大きいためと考えられることから、これまで実施していたとおり、採卵の翌日以降に残卵を体内から出し切ることが重要である。

また、コレステロールペレットを埋め込む際、腹腔への埋め込みは内臓を傷つける可能性があることや、表皮裂傷の治癒が背筋部に比べて遅いことから、埋め込む場所は背筋部の方が適していると考えられる。

これまでに実施した人工採卵における排卵個体率と斃死率から、最適時期は7~8月であると考えられるが、一般的に水温が上昇するとともに種苗生産の難易度が高くなることから、できるだけ早い時期に実施することが望ましい。

本研究の結果からは、洗卵によるウイルス除去効果は確認できなかった。しかし、2019年に洗卵前と洗卵後の未受精卵6個体分および精子8個体分について、ウイルス性神経壊死症(VNN)とマダイイリドウイルスのPCR検査を行ったところ、83.3%の洗卵前未受精卵と50.0%の精子からマダイイリドウイルスの陽性反応が確認され、陽性反応が出た未受精卵のうち75%は洗卵後にも陽性反応が確認された(未報告)。このことから、現在保有しているタマカイ親魚の中にはマダイイリドウイルスキャリアが含まれている可能性があり、卵や精子の配偶子洗浄の方法やその効果については、さらに検討する必要がある。

本研究では、精子のスパマトクリット値には明瞭な季節性や体重との関係は確認されなかった。しかし、スパマトクリット値と精子運動時間には負の相関がみられたことから、精漿画分の増加と精子活性には何らかの関係があると考えられる。

精子の評価に用いた精子運動時間については、海水を滴下してから10分おきに顕微鏡視野下で観察し、動いている精子が目測で10%以下になった時間の1つ前の観察時間までの時間であり、観察者による差が生じる可能性があることから、今後は精子運動率などのより定量的な指標を検討する必要がある。

また、人工採卵の作業日程上の都合により、今回は精子の

採取当日と冷蔵保存2日後のみに受精率を確認しているが、精子性状(平均精子運動時間, 平均スバトクリット値)の変化から3日後までは人工採卵に使用できる可能性がある。

(2) ホルモン投与による水槽内産卵誘発

本研究では1回のみ水槽内産卵誘発に成功し、2607gの大量の浮上卵を得ることができたが、3日後に大型の雌2尾が死亡した。その際、観察された産卵行動は1回のみであり、雌2尾が行動に関係していたことから、産卵行動に参加できなかった雌は体内に残留した未受精卵が悪影響を及ぼした可能性がある。また、斃死した雌は112.9kgと67.9kgの大型個体で、卵巣が肥大して大量出血していた。大型の雌の場合は卵巣の過剰な発達自体が悪影響を及ぼす可能性もある。このことから、水槽内産卵誘発には60kg以下の小～中型の雌を用いる方がよく、同時にホルモン投与する雌の数も1～2尾程度がよいと考えられる。しかし、その条件で実施した2021年は2回とも失敗したことから、ホルモン投与を行う月齢や時間帯、観察の方法についても検討が必要であると考えられる。

今回、ホルモンを投与すると精漿画分が増えて精子がさらさらな状態になることが明らかになった。また、精液排出の様子から、単位時間あたりの精液分泌量が増えると予想されており、そのことは水槽内産卵行動において受精に有利に働くと推測される。

謝 辞

試験用装置の作成や人工採卵の作業を手伝って下さった沖縄県水産海洋技術センター石垣支所の皆様に厚くお礼を

申し上げる。本研究は沖縄振興特別推進交付金による「おきなわ産ミールバイ養殖推進事業」の一環として行われた。

文 献

- 中田 久, 征矢野清, 松山倫也, 宮木廉夫. コレステロールペレット固形製剤を用いたLHRHaの埋め込み投与によるマハタ親魚の成熟・排卵誘導法. 特許第 4899569 号, 2012.1.13.
- 中田 久, Shein N.L., 水野かおり, 宮木廉夫, 征矢野清, 2018: マハタの人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係. 日本水産学会誌 84(3), 384–392.
- Ho Y.S., Chen W.Y., Liao I.C., 1997: Experiments on the Artificial Propagation of Giant Grouper *Epinephelus lanceolatus*. J. Taiwan Fish. Res. 5(2), 129–139.
- 今道智也, 岸本和雄, 近藤 忍, 山内 岬. 2016: タマカイの採卵親魚選定基準. 平成 28 年度普及に移す技術の概要, 95–96.
- 奥澤公一, 2021: 養殖産業に貢献する繁殖生理学の研究史と将来展望. 養殖ビジネス 2021 年 9 月号, 56–61.
- Durand S.V. and Lightner D.V. 2002: Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. Journal of Fish Diseases 25, 381–389
- 山内 岬, 木村基文, 岸本和雄, 2012: タマカイ種苗生産における初期摂餌状況(大型ハタ類の採卵・種苗生産技術開発). 沖縄県水産海洋研究センター事業報告書 73, 23–27.
- Zohar Y., Mylonas C.C., 2001: Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture. 197, 99–136.



図1 未受精卵の洗卵
A: 従来法(メスリンダー), B: 省力手法(塩ビ広口ビンを薬液を傾けて注入する台にのせ、ひっくり返す)

表1 ホルモン投与方法別の採卵成績. 2010年から2021年の全データの平均.

投与方法	のべ 個体 数	平均 体重 (kg)	平均卵母細 胞径 (mm)	hCG平均 投与濃度 (IU/kg)	GnRHa平均 投与濃度 (μg/kg)	平均 浮上卵 量(g)	平均 浮上卵 率(%)	排卵個 体率 (%)	斃死率 (%)	評価
hCG注射	55	50.2	0.387	599.7		491.2	51.1	56.4	7.3	既存
hCG+GnRHa混合注射	21	68.7	0.410	499.0	47.6	698.5	39.1	81.0	0.0	実用化 可能
GnRHaコレステロール ペレット	20	60.5	0.409		229.5	810.0	48.0	50.0	15.0	実用化 可能
GnRHaコレステロール ペレット(高濃度)	2	63.4	0.406		423.3	118.5	63.2	50.0	50.0	
GnRHaカカオバター	5	62.5	0.415		190.8	126.0	29.0	20.0	20.0	
GnRHaメラノバター	1	98.6	0.420		200.0	1190.0	65.1	100.0	100.0	

1) 卵が 100g 以上採れた時を排卵とする。

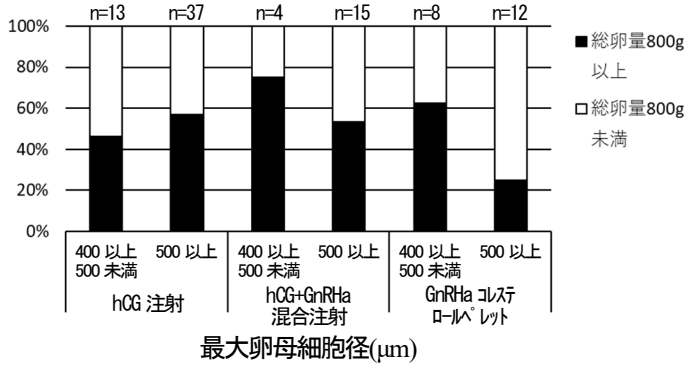
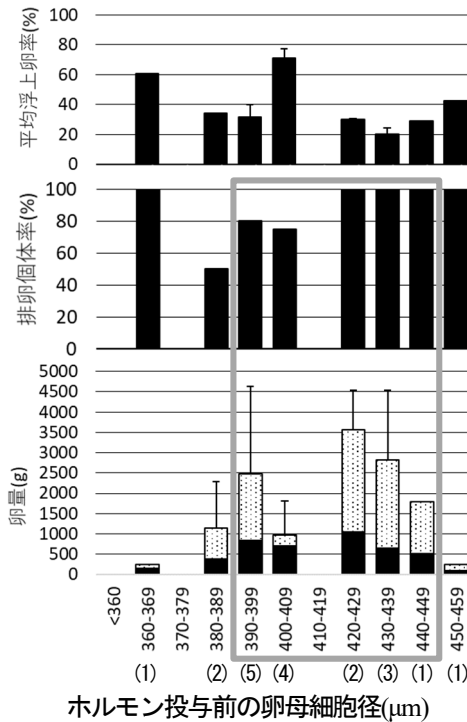


図 2 ホルモン投与前の最大卵母細胞径と 採卵量 800g 以上の個体の割合

(a) hCG+GnRHα 混合注射



(b) GnRHα コレステロールペレット

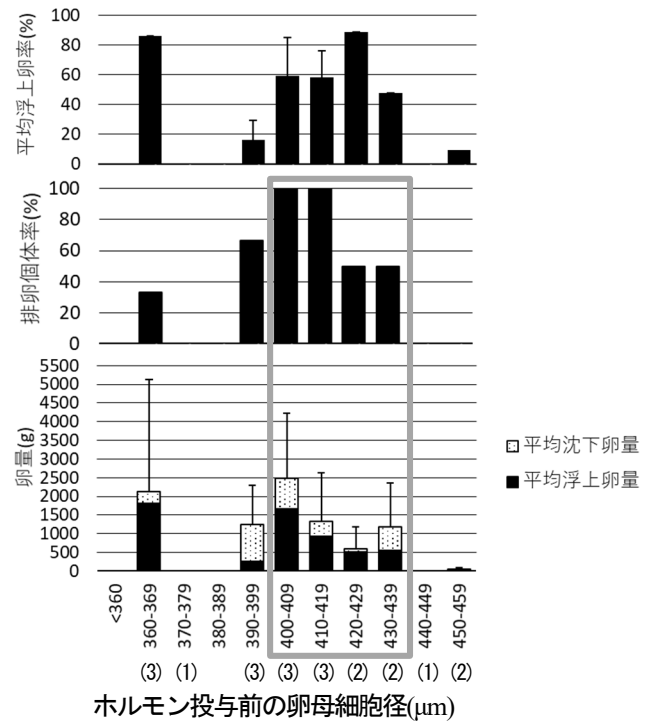


図 3 ホルモン投与前の平均卵母細胞径と採卵成績の関係

- 1) 卵量のバーは総卵量の標準偏差, 平均浮上卵率のバーは標準偏差, x 軸の()は個体数を示す。
- 2) 卵が 100g 以上取れた時を排卵とする。
- 3) 枠線内は排卵個体率 50%以上かつ, 平均浮上卵量 500g 以上

表 2 排卵隔誘導を行う雌の選定基準

ホルモン投与方法	卵母細胞 100 個の平均直径(μm)
hCG+GnRHα 混合注射	390~449μm
GnRHα コレステロールペレット	400~439μm

1) 卵が 100g 以上取れた時を排卵とし, 排卵個体率が 50%以上, かつ平均浮上卵量が 500g 以上のときの平均卵母細胞径を基準とした。

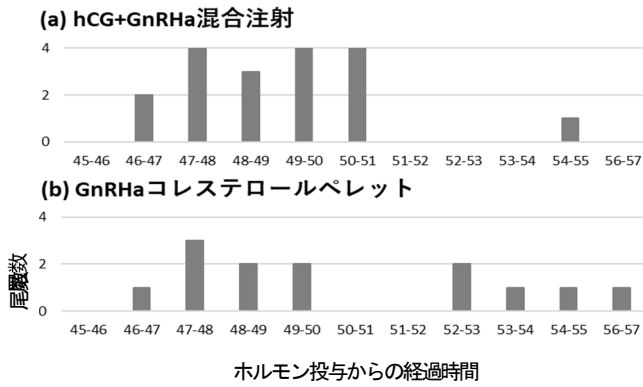


図4 初回排卵時間

1) ホルモン投与から42.3～57.1時間後までの間に搾出を行った。搾出回数は1～5回で、個体により異なる。浮上卵が1g以上とれた場合を初回排卵時間とした。

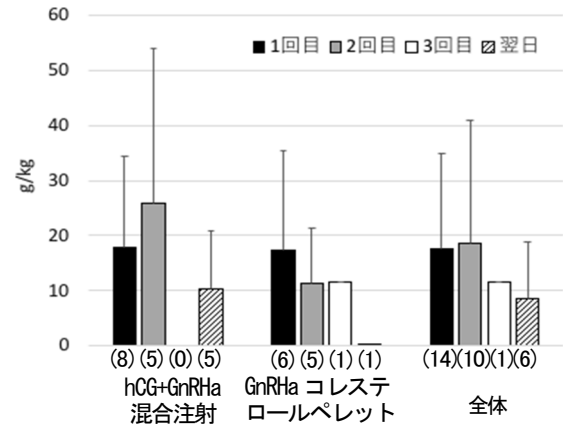
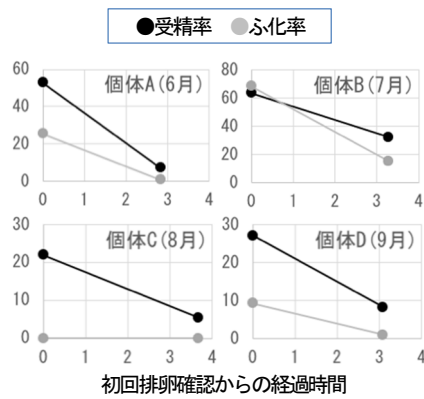


図5 搾卵回数と体重あたり搾出量

1) 搾出した回数ごとの体重あたり搾出量の平均。バーは標準偏差。()内は個体数。

2) 腹部を圧迫して搾出した後、卵巣腔内に人工卵巣腔液（雌の卵巣腔液を模した緩衝液）を注入し、卵巣腔内に残った卵を液ごと搾出した。

(a) hCG+GnRHa 混合注射



(b) GnRHa コレステロールペレット

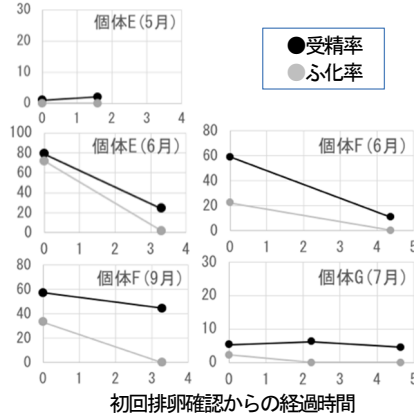
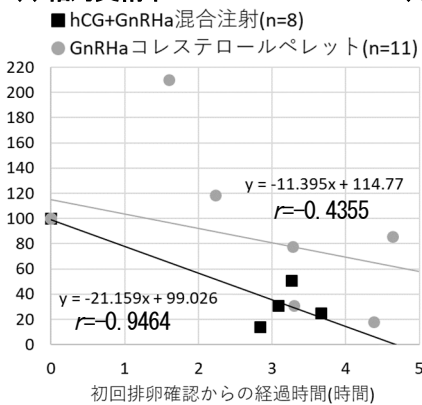


図6 初回排卵確認からの経過時間と受精率、ふ化率の関係

1) 海水を入れた500mL ビーカーに受精卵約100個を入れ、約1時間20～30分後に8～16細胞期に発生が進んだ卵の割合を受精率とした。

2) 海水を入れた1000mL ビーカーに受精卵約100個を入れ、20～24時間後にふ化した卵の割合をふ化率とした。

(a) 相対受精率



(b) 相対ふ化率

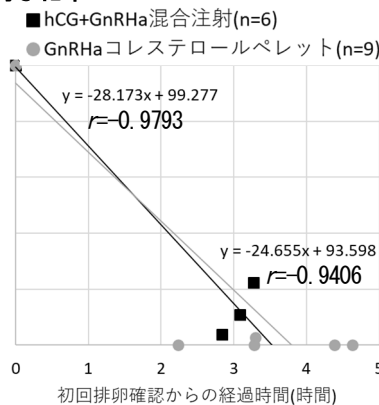


図7 初回排卵確認からの経過時間と相対受精率、相対ふ化率の相関

1) 初回排卵確認時を100とする。

2) r : ピアソンの積率相関係数

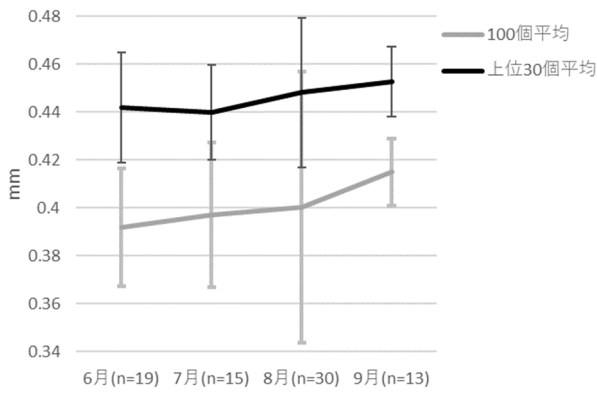


図8 成熟度判定個体の月別平均卵母細胞径(100個およびその上位30個)(2020年、2021年平均)

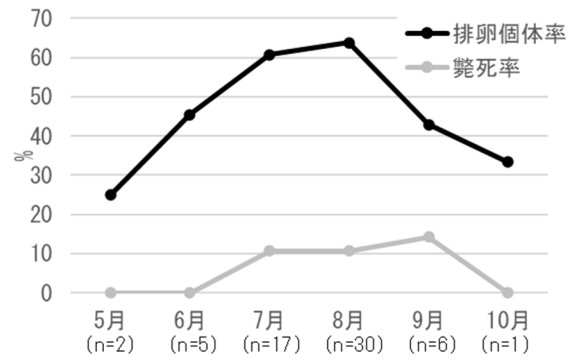


図9 月別排卵個体率・斃死率 (2010~2021年合算)

1) 排卵とは浮上卵 100g 以上得られたときとする

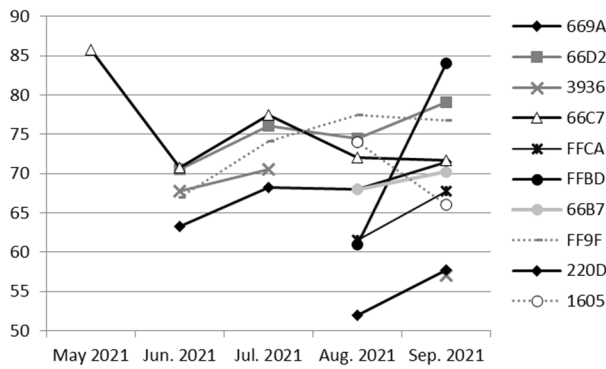


図10 個体別スパマトクリット値変動

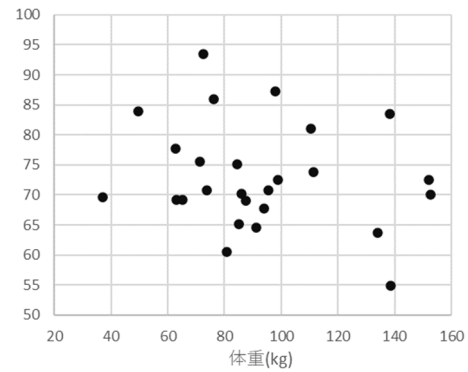


図11 個体別年間平均スパマトクリット値と体重の関係

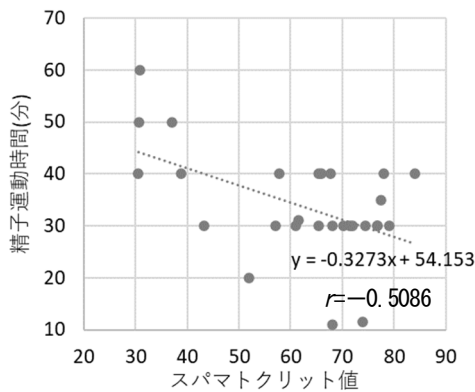
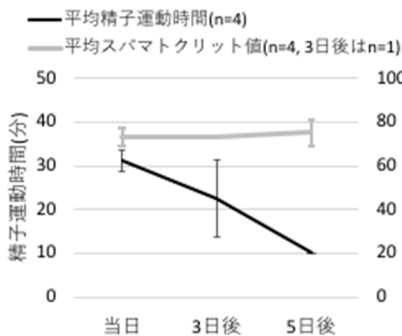


図12 スパマトクリット値と精子運動時間の関係

1) r : ピアソンの積率相関係数

2021年8月



2021年9月

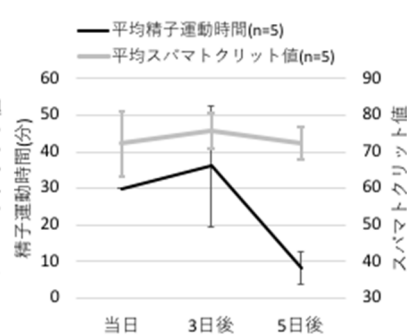


図13 冷蔵保存による精子運動時間とスパマトクリット値への影響

1) 反復測定一元配置分散分析を行ったところ、平均精子運動時間のみ、保存期間要因の効果が有意であったため、Holm法による多重比較を行ったが、有意差は確認できなかった。

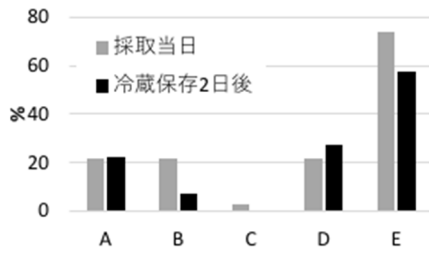


図14 採取当日と冷蔵保存2日後の精子の受精率

- 1) A～E：人工受精に使用した未授精卵を採取した雌の番号
- 2) 対応のある2標本T検定 $t = 1.2639$, $df = 4$, $p = 0.2749$

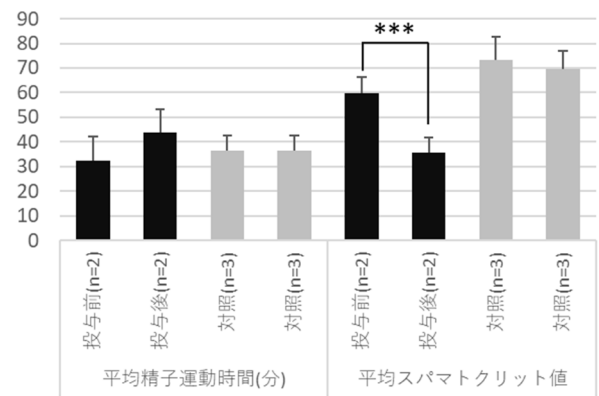


図15 精子運動時間とスパマトクリット値におけるホルモン投与の影響

- 1) 対応のある2標本T検定により，***は0.1%水準で有意差あり。バーは標準偏差。

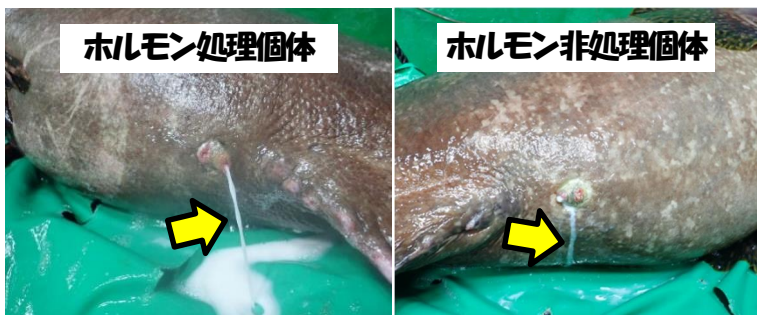


図16 ホルモン処理個体と非処理個体の精子の排出

【付録】																									
年度	回次	ID	体重 (kg)	カニニレーション 日	標準的な投与量			標準的な投与量			投与日	ホルモン投与方法	製剤中の ホルモン濃度	HCG投与量 (IU)	HCG投与濃度 (IU/kg)	GnRH投与量 (μg)	GnRH投与濃度 (μg/kg)	採卵日	初回採卵まで の時間	浮上卵(μ)	残卵(μ)	浮上卵率 (%)	受精率(%) *異常値	ふ化率(%) *異常値	備考
2010	1	452B6A778	38.8	2010/7/20	13.7	2.0	0.358	23.3	3.3	0.390	2010/7/20, 22	HCG注射2回		44000				2010/7/22	64	399	0	13.8			
2010	2	452C107A4C	34.0	2010/8/9	34.0	0.0	0.346	100.0	0.0	0.433	2010/8/9, 11	HCG注射2回		30000				2010/8/11	50	260	0	16.1			
2010	2	452C0D2E72	38.8	2010/8/9	57.0	0.0	0.390	100.0	0.0	0.435	2010/8/9	HCG注射		20000				2010/8/11	480	1185	0	28.8			
2010	2	452C063040	55.8	2010/8/9	63.0	2.0	0.398	100.0	6.7	0.461	2010/8/9	HCG注射		30000				2010/8/11	1079	905	0	54.4			
2011	1	452C2F4C4C	80.0	2011/7/22	67.3	1.9	0.403	100.0	3.3	0.426	2011/7/30	HCG注射		48000				2011/8/1	1525	115	1170	93.0			
2011	1	452C0A422B	71.8	2011/7/22	68.6	2.0	0.413	100.0	3.3	0.442	2011/7/30	HCG注射		4308				2011/8/1	200	365	140	35.4			
2011	1	452C063040	64.7	2011/7/22	69.0	0.0	0.410	100.0	0.0	0.441	2011/7/30	HCG注射		38820				2011/8/1	810	130	95	86.2			
2011	2	452C1E1078	81.3	2011/8/26	80.0	6.0	0.432	100.0	10.0	0.455	2011/8/29	HCG注射		50000				2011/8/31	770	1070	2105	41.8			
2011	2	452B7B326E	53.3	2011/8/26	96.0	2.0	0.441	100.0	3.3	0.460	2011/8/29	HCG注射		30000				2011/8/31	2320	605	2070	79.3			
2011	2	45C707A4C	38.2	2011/8/26	58.0	0.0	0.408	96.7	0.0	0.432	2011/8/29	HCG注射		25000				2011/8/31	145	65	505	69.0			
2011	2	452C0D2E72	44.1	2011/8/26	86.0	4.0	0.432	100.0	6.7	0.455	2011/8/29	HCG注射		25000				2011/8/31	155	79	130	66.2			
2012	1	452B6A778	38.9	2012/7/4	66.1	4.8	0.423	100.0	10.0	0.463	2012/7/18	HCG注射		25000				2012/7/20	0	0	0				
2012	1	452C1E1078	87.7	2012/7/4	67.7	1.6	0.408	100.0	3.3	0.446	2012/7/18	HCG注射		50000				2012/7/20	4	36	0	9.0			
2012	1	452C107A4C	41.3	2012/7/4	52.5	3.3	0.407	100.0	6.7	0.440	2012/7/18	HCG注射		25000				2012/7/20	0	0	0				
2012	2	412C77E04	32.8	2010/8/7	16.4	0.0	0.336	30.0	0.0	0.386	2012/8/7	HCG注射		20000				2012/8/9	0	0	0				
2012	2	411F0A4121	32.6	2010/8/7	5.1	0.0	0.279	10.0	0.0	0.355	2012/8/7	HCG注射		20000				2012/8/9	320	65	100	83.1			
2012	2	412D12D61	27.6	2010/8/7	5.7	0.0	0.345	10.0	0.0	0.378	2012/8/7	HCG注射		17000				2012/8/9	590	795	35	42.6			
2012	2	411A132C33	26.5	2010/8/7	37.3	0.0	0.374	63.3	0.0	0.419	2012/8/7	HCG注射		16000				2012/8/9	1050	530	265	66.5			
2013	1	411F0A4121	39.9	2013/8/5	51.0	1.0	0.376	100.0	3.3	0.467	2013/8/5	HCG注射		25000		626.6		2013/8/7	605	288	0	67.7			
2013	1	412D19387D	46.9	2013/8/5	49.0	0.0	0.371	100.0	0.0	0.457	2013/8/5	HCG注射		30000		639.7		2013/8/7	0	0	0				
2013	1	412D04322C	39.8	2013/8/5	19.0	0.0	0.337	63.3	0.0	0.416	2013/8/5	HCG注射		25000		628.1		2013/8/7	10	7	0	58.8			
2013	2	412C7A0104	32.9	2014/8/6							2014/8/6	HCG注射		20000		607.9		2014/8/8	0	0	0				
2013	2	412C77E04	34.5	2014/8/6	57.0	0.0	0.344	100.0	0.0	0.452	2014/8/6	HCG注射		20000		579.7		2014/8/8	0	0	0				
2013	2	411A15415D	37.8	2014/8/6							2014/8/6	HCG注射		25000		661.4		2014/8/8	0	0	0				
2013	2	412D12D61	30.2	2014/8/6	46.0	1.0	0.328	100.0	3.3	0.445	2014/8/6	HCG注射		20000		662.3		2014/8/8	215	736	0	22.6			
2013	2	411A132C33	28.9	2014/8/6	51.0	6.0	0.389	100.0	20.0	0.480	2014/8/6	HCG注射		17500		605.5		2014/8/8	721	433	0	62.5			
2013	3	501F476478	32.0	2014/9/2	26.0	1.0	0.359	86.7	3.3	0.435	2013/9/4	HCG注射		20000		625.0		2014/9/6	1	13	0	7.4			
2013	3	452C107A4C	44.4	2014/9/2	19.0	2.0	0.229	63.3	6.7	0.389	2013/9/4	HCG注射		27500		619.4		2014/9/6	0	0	0				
2013	3	452B6A778	38.6	2014/9/2	62.0	5.0	0.393	100.0	16.7	0.480	2013/9/4	HCG注射		25000		647.7		2014/9/6	0	0	0				
2013	3	411A233767	24.5	2014/8/30	0.0	0.0	0.116	0.0	0.0	0.137		HCG注射		15000		612.2		2014/9/6	0	0	0				
2014	1	412D19387D	54.7	2014/7/22	61.1	1.4	0.401	100.0	3.3	0.453	2014/7/23	HCG注射		35000		639.9		2014/7/25	202	1613	0	11.1			
2014	1	411F0A4121	47.7	2014/7/22	78.0	5.0	0.430	100.0	16.7	0.481	2014/7/23	HCG注射		30000		628.9		2014/7/25	711	927	0	43.4			
2014	1	411F05662	44.6	2014/7/22	48.0	4.0	0.387	100.0	13.3	0.461	2014/7/23	HCG注射		27500		616.6		2014/7/25	550	380	0	59.1			
2014	1	412D04322C	44.8	2014/7/22	59.0	2.0	0.392	100.0	6.7	0.456	2014/7/23	HCG注射		27500		613.8		2014/7/25	415	1699	0	19.6			
2014	2	452B7B326E	49.8	2014/8/4	81.0	7.0	0.436	100.0	23.3	0.493	2014/8/6	HCG注射		30000		602.4		2014/8/8	3030	1569	0	65.9			
2014	2	452C107A4C	53.3	2014/8/4	72.0	3.0	0.409	100.0	10.0	0.475	2014/8/6	HCG注射		30000		562.9		2014/8/8	90	116	0	43.7			
2014	2	501F476478	36.1	2014/8/4	58.0	5.0	0.372	100.0	16.7	0.477	2014/8/6	HCG注射		20000		554.0		2014/8/8	1095	358	0	75.4			
2014	3	411A132C33	31.3	2014/8/21	63.0	3.0	0.411	100.0	10.0	0.468	2014/8/25	HCG注射		20000		639.0		2014/8/27	0	0	0				
2014	3	412D12D61	33.0	2014/8/21	65.0	4.0	0.418	100.0	13.3	0.483	2014/8/25	HCG注射		20000		606.1		2014/8/27	885	408	198	68.4			
2015	1	412D12D61	49.6	2015/6/15	64.0	1.0	0.401	100.0	3.3	0.458	2015/6/16	HCG注射		30000		604.8		2015/6/18	0	0	0				
2015	2	452B7B326E	69.1	2015/7/13	85.0	5.0	0.439	100.0	16.7	0.483	2015/7/14	HCG注射		42900		615.1		2015/7/16	2239	622	0	78.3			
2015	2	452B6A778	45.4	2015/7/13	66.0	7.0	0.413	100.0	23.3	0.462	2015/7/14	HCG注射		27500		605.7		2015/7/16	0	0	0				
2015	3	411F0A4121	58.3	2015/8/11	81.0	3.0	0.429	100.0	10.0	0.474	2015/8/12	HCG注射		35000		600.3		2015/8/14	925	195	0	82.6			
2015	3	412D04322C	51.5	2015/8/11	81.0	4.0	0.422	100.0	13.3	0.479	2015/8/12	HCG注射		30000		582.5		2015/8/14	838	768	0	52.2			
2016	1	412D04322C	51.9	2016/7/26	78.0	6.0	0.426	100.0	20.0	0.477	2016/7/27	HCG注射		32000		616.6		2016/7/29	831	641	0	56.5			
2016	1	411F0A4121	64.1	2016/7/26	63.0	3.0	0.407	100.0	10.0	0.467		HCG注射		40000		624.0		2016/7/29	0	0	0				
2016	2	501F476478	39.1	2016/8/8	67.0	3.0	0.413	100.0	10.0	0.464	2016/8/10	HCG注射		24000		613.8		2016/8/12	0	0	0			1	
2016	3	411A132C33	61.4	2016/8/8	55.0	1.0	0.395	100.0	3.3	0.457	2016/8/16	HCG注射		43333		705.7		2016/8/18	113	900	0	11.2		1	
2017	1	412D04322C	57.5	2017/9/4							2017/9/5, 9/6	HCG注射		22000		382.6		2017/9/7	0	67	0	0.0		1	9/9観察
2017	1	411F05662	73.7	2017/9/4								HCG注射		30000		407.1		2017/9/7	0	0	0		1	11/5観察	

タマカイの産卵誘発技術の高度化

年度	回数	ID	体重 (kg)	カニエーション 日	卵巣の大きさ(卵巣の大きさ)			卵巣の大きさ(卵巣の大きさ)			投与日	ホルモン方法	製剤中の カルモン濃度	hCG少量 (IU)	hCG少量濃度 (IU/kg)	GrHh少量 (μg)	GrHh少量濃度 (μg/kg)	採明日	初回採卵まで の期間	浮上卵(μg)	皮下卵(μg)	浮上卵率 (%)	受卵率(%)	ふ化率(%)		備考																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
					最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)														最大径 (mm)	最大径 (mm)		最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)	最大径 (mm)