

ウナギの卵成熟・排卵および卵質に及ぼす要因の解明

香川浩彦*

Studies on factors affected in induced oocyte maturation, ovulation and egg quality in Japanese eel

Hirohiko KAGAWA*

Abstract For stable production of eel seedlings, it is necessary to obtain good quality eggs from matured female eel. Ovulated eggs have been able to obtain easily by the progress of techniques for induction of maturation. However, egg quality, such as fertility and hatchability, is low and often fluctuated among females used. The present *in vitro* study shows that oocyte maturation and ovulation are induced by maturation-inducing steroid in shorter incubation period when larger oocytes are incubated at higher temperature.

In vivo experiments reveal that oocyte maturation and ovulation in female eels possessing larger oocytes are induced by hormonal treatments in shorter period and relatively good quality ovulated eggs are obtained from the female.

Key words: eel, induced maturation, oocyte diameter, temperature, egg quality

ウナギは飼育下では性的に未熟なままで産卵を行わないことや自然界で未だに成熟したウナギや産卵行動が観察されていないことなどから、繁殖生態や繁殖生理学の分野において非常に謎の多い魚である(香川, 2001)。これまでの調査から、天然の雌ウナギは10月~12月にかけて成熟を開始するものの卵母細胞は卵黄形成初期までにしか達せず、雄では精子形成はほとんど開始しないまま降河し、それぞれ産卵場に向かうと考えられている**。一方、養殖ウナギでも性的に未熟なままであるが、海水飼育することによって天然ウナギ同様、雌ウナギが卵黄形成初期に達することが判明した(Kagawa *et al.* 1998, Fig. 1)。しかし、天然および養殖の雌ウナギの飼育を継続しても、それ以上に性成熟が進行することはない。従って、ウナギの種苗生産を行うためには人為的に受精可能な卵子や精子を得る必要がある。これまで養殖用の種苗生産技術の開発において、性的に未熟な状態の魚から受精卵を得よ

うとする試みは、技術的な難しさと煩わしさからウナギ以外にほとんど行われていないのが現状で、その技術開発は長く困難な道のりであった。

ウナギの人為的な成熟誘起技術の開発は1960年代から行われ、1970年代には北海道大学で、サケ脳下垂体抽出液を連続注射して成熟した雌ウナギから、世界で初めて受精卵やふ化仔魚が得られた(Yamamoto and Yamauchi, 1974)。その後、いくつかの県の水産試験場や大学などで同様の試みがなされ、一様に受精卵やふ化仔魚が得られるようになった。しかし、一方で、サケ脳下垂体抽出液を連続注射することにより、ほとんどの雌ウナギが卵黄形成を開始し卵径を増大させるものの、最終的に受精可能な卵子を得る確立は非常に低く、また、いつ受精可能な卵子が得られるかは雌ウナギ任せで、計画的に受精卵を生産することはできなかった。したがって、ふ化仔魚の飼育技術を開発しウナギの種苗生産技術を確立するためには、計画的に効

2005年11月15日受理 (Received: November 15, 2005)

* 宮崎大学農学部 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan)

**平成15年度ウナギ資源増大対策委託事業報告書, 日本水産資源保護協会

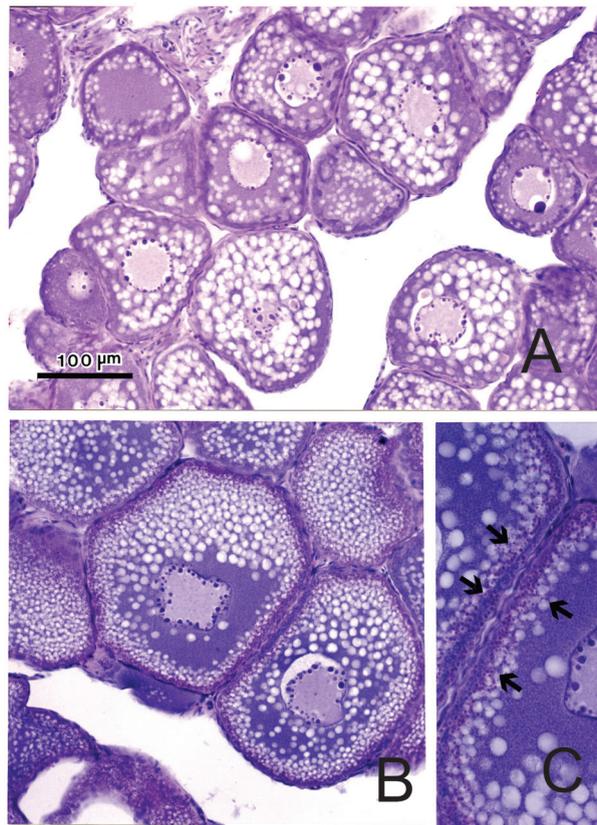


Fig. 1. Microphotographs of oocytes of female Japanese eel.

A: Oocytes at the oil stage observed in eel just prior to seawater acclimation, B: Oocytes at the primary yolk globule stage observed in eel 3 months after seawater acclimation. Yolk granules are observed in the periphery of the oocytes (C). (Modified from Kagawa *et al.*, 1998).

率よく受精卵を得るためのさらなる人為成熟誘導技術の開発が必要と考えられた。そこで、我々はサケ脳下垂体抽出液と卵成熟誘起ステロイドを用いて成熟を誘起する方法を開発することを目的に研究を行った。これまで通り、サケ脳下垂体抽出液を毎週1回注射して卵黄形成を誘導した。その後、卵黄形成を終了したと思われる雌ウナギ（卵径750 μm 程度の卵径を有する雌ウナギ）に、再度サケ脳下垂体抽出液を注射した24時間後にウナギの卵成熟誘起ステロイドである17, 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) を注射し、注射後18時間を中心に、ほぼ100%の成熟・排卵を誘導できることを明らかにした（香川, 1996; Ohta *et al.*, 1996）。この結果から、これまでの雌ウナギ任せであった成熟・排卵を計画的に誘導し、確実に受精可能な卵子を得ることが可能になった。しかし、この成熟誘導技術で得られた受精卵の受精率およびふ化率は低いこと、さらに用いる雌ウナギ

により、まったくふ化しないものから90%以上のふ化率を有するものまで非常に変動が大きく、計画的で効率的に受精卵を得るためにはさらなる技術の開発が必要であると考えられた。

一方、ウナギの繁殖生態に関する研究は知見が少ないことから、これまで人為成熟誘導技術を開発する上でウナギの成熟や産卵に及ぼす環境因子、特に水温の影響についてはあまり考慮されていない。魚類の成熟には水温や日長が重要な役割を果たしていることは明らかであり、ウナギでもこれらの環境因子が成熟の誘導や産卵に重要な役割を果たしていることは容易に想像がつく。そこで、本研究では効率的で計画的に良質な受精卵を得ることやウナギの繁殖生態、特に繁殖に及ぼす水温の影響を明らかにすることを目的に、人為的な成熟誘起に及ぼす水温や卵母細胞の卵径の影響について検討した。

人為成熟誘導に及ぼす水温の影響

河川に生息するウナギは10月ころから卵黄形成を開始し、12月ころには最も成熟が進んだ個体では第二次卵黄球期卵母細胞を有することが明らかにされている (Table 1)**。このころの河川水の水温は9月上旬から10月下旬にかけて30℃から20℃にまで急激に低下し、12月には15℃まで低下する。また、日長は9月下旬の秋分から12月下旬の冬至まで徐々に短日化する。また、最近の研究では、三河湾で10~12月にかけて卵黄形成中の雌ウナギが出現することや12月の海水温は15℃程度であることが報告されている (Uto *et al.*, 2004)。このようなことから、水温低下や短日化がウナギの性成熟開始の引き金を引くことによって卵黄形成が誘導されて成熟が進行し、そのまま海へ下ることが予想される。これまでの、雌ウナギの人為的な成熟誘導時の飼育水温はどの研究を見ても、20℃の一定水温で行われており、成熟誘導時の水温について詳細な研究はなされていない。天然の雌ウナギが上述したような環境下で成熟を開始し成熟が進行することを考えると、人為的な成熟誘導時にも天然と同じような環境下で成熟誘導することにより、良質卵を得ることができるのではないかと思われた。そこで、まず人為的な成熟誘導に及ぼす水温の影響について検討した。

卵黄形成への影響： 養殖雌ウナギ (平均体重約 800 g) を水温の異なる以下の水槽 4 群に分け、毎週 1 回、月曜日にサケ脳下垂体抽出液 (20mg/尾) を注射した。処理群は①水温 15℃一定で飼育 (15, 15)。②水温 20℃で 4 週間飼育し、その後 15℃で飼育 (20, 15)。③水温 20℃一定で飼育 (20, 20)。④水温 15℃で 4 週

間飼育し、その後 20℃で飼育 (15, 20) である。その結果、卵黄形成が終了して成熟誘起が可能となる卵径 800 μ m に達するまでの注射回数は水温が高いほど (20℃一定で飼育した群) 少なく、水温が低いほど (15℃一定で飼育した群) 多くなった。このことから、水温が低下すると卵黄形成の進行は遅くなることが判明した。これまでの研究から、天然のウナギの産卵期は6月から8月であると推測されており (塚本, 2001)、それが事実だとすると、上述したようにウナギは12月に降河し半年以上もかけて産卵場に達することになる。12月に降河したウナギの卵母細胞が第二次卵黄球期に達していることを考えると、これ以降の卵母細胞の発達は非常にゆっくり進行するものと考えられる。このことと本実験の結果を考え合わせると、降河したウナギは水温の比較的低い深海を移動して産卵場に向かうことが推定される。

卵成熟・排卵への影響： 卵黄形成を終了して、卵径が 800 μ m を越えた個体に、サケ脳下垂体抽出液 (20mg/尾) を午後 6 時に注射し、24 時間後に卵成熟誘起ステロイド (DHP) を 2 μ g/g・体重になるように 50% エタノールに溶解して注射し、水槽の水温を 20℃に設定した。DHP 注射後15時間目と18時間目に腹部を圧迫して排卵の有無を確認し、排卵個体から卵を搾出し人工授精をして、受精率・ふ化率を求めた。その結果、天然の水温変化を模倣した20℃:15℃飼育群の受精率やふ化率が最も高く、平均でそれぞれ約70%および約40%に達し、20℃一定水温で飼育したこれまでの方法と比較して非常に高い値となった (Fig. 2)。このことから、卵質の良い卵を得るためには、このような飼育水温で飼育することが望ましいものと思われた。

Table 1. Sexual maturation of wild Japanese eel and environmental factors

	Sep	Oct	Nov	Dec
WT	30℃~25℃	25℃~20℃	20℃~15℃	15℃~10℃
PP	Autumn equinox	<short photoperiod>		winter solstice
Develop- mental stage ♀	Oil stage		PYG	SYG
GSI	1 <		1 - 2	2 - 5
Develop- mental stage ♂	Spermatogonia		Spermatocyte	
GSI		1 <		

WT:water temperature, PP:photoperiod, PYG:primary yolk globule stage
SYG:secondary yolk globule stage

** 平成15年度ウナギ資源増大対策委託事業報告書, 日本水産資源保護協会

成熟・排卵誘導時の卵径の影響：しかし、一方で、サケ脳下垂体抽出液注射時やDHP注射時の卵径を測定すると、各処理群間でそれぞれ異なっており、必ずしも同じ条件で成熟・排卵処理を行っていないことが判明した。このことから、上述したような飼育水温の影響で受精率・ふ化率に差が出たのではなく、むしろ、このような成熟・排卵処理時の卵径の違いが排卵された卵の卵質の違いに関与している可能性が考えられた。すなわち、最も受精率・ふ化率の良かった15°C：20°C飼育群のサケ脳下垂体抽出液注射時は約860 μm 、DHP注射時は約920 μm であったのに対し、その他の群は15°C：15°C飼育群以外はDHP処理時に900 μm 以下であった。15°C：15°C飼育群はサケ脳下垂体抽出液注射時ですでに卵径約890 μm に達していた。このような卵径や卵径増加の経緯が異なることが卵質に影響したのではないかと考えられた。さらに、これらの飼育群に同じ成熟・排卵誘起処理を行った結果、受精率・ふ化率が最も高かった20°C：15°C飼育群では、ほとんどの個体がDHP処理後15時間目で排卵しており他の処理群と比べて非常に高い割合であることが判明した。以前の我々の報告 (Ohta *et al.*, 1996) でも、DHP処理後から排卵までの時間が短い個体が受精率・ふ化率が良いという結果が得られており、今回の結果もそのことを裏づける結果となった。このことから、卵質の良い卵を得るためには、DHP処理から排卵までの時間を短くすることが重要であること、それには、これまで基準として使用されてきたサケ脳下垂体抽出液注射時の卵径750 μm 、DHP注射時の卵径850 μm という

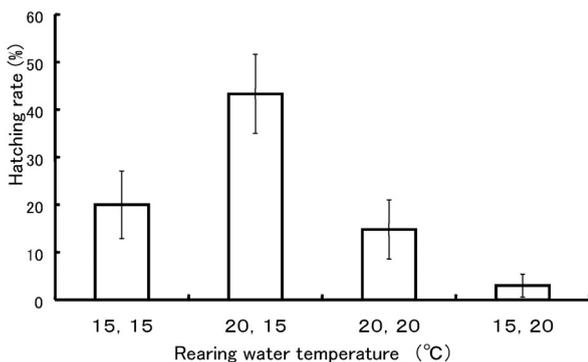


Fig. 2. Effects of rearing water temperature of female Japanese eels on hatching rates of fertilized eggs. 15,15: Fish were reared at constant water temperature (15°C). 20,15: Fish were reared at 15°C after rearing at 20°C for four weeks. 20,20: Fish were reared at constant water temperature (20°C). 15,20: Fish were reared at 20°C after rearing at 15°C for four weeks.

卵径の卵母細胞よりも大きな卵径の卵母細胞を有する個体に成熟・排卵処理を行うことにより、排卵までの時間が短くなり、受精率・ふ化率が高くなるものと考えられた。そこで、この仮説を証明するために以下のような生体外培養法を用いた実験を行った。

生体外培養法を用いた成熟・排卵

卵径と成熟・排卵までの時間の関係：実際に卵径と成熟や排卵までの時間がどのような関係になっているのだろうか。このことを明らかにする目的で、生体外培養法を用いて研究を行った。養殖雌ウナギ (平均体重約800 g) にサケ脳下垂体抽出液を毎週1回、20mg/尾投与し卵黄形成を誘導した個体からカニューーラにより卵濾胞付き卵母細胞を生体外に採りだし実験に供した。実体顕微鏡下で単離した卵径800 μm から960 μm の卵濾胞付き卵母細胞20~30個をDHPを含むL-15培養液1 mL中で20°Cで培養し、3時間おきに24時間目まで卵成熟 (GVBD) および排卵した卵の割合を求めた。その結果、DHPにより生体外で成熟と排卵が誘導され、その排卵には内因性のプロスタグランジンが関与していることが明らかとなった (Kagawa *et al.*, 2003)。また、DHPによるGVBDおよび排卵の時刻は培養開始時の卵径に依存し、卵径が大きいものほど早くGVBDおよび排卵が誘起された。これら生体外培養法を用いた実験結果から、生体内でもDHP処理により同様の現象が起きていることが推察され、卵径が大きい個体ほど成熟・排卵が早くなるものと考えられた。

成熟・排卵に及ぼす水温の影響：これまでの生体内及び生体外の実験結果から、DHPで誘導されるウナギの卵成熟や排卵は、DHP処理を行う時点の卵径が大きいものほど早く起こることや、DHP処理から排卵までの時間が短いほど受精率・ふ化率のよい卵を得ることができることが明らかとなった。一方、これまでの実験から飼育水温が高いほど卵黄形成が促進され、低いほど卵黄形成が遅くなった。従って、飼育水温は、卵黄形成ばかりではなく、卵成熟・排卵までの時間にも影響を及ぼす可能性が考えられることから、水温が成熟・排卵に及ぼす影響について検討した。卵径850~880 μm の濾胞付き卵母細胞20~30個をDHP100ng/mLを含むL-15培養液中で培養温度15, 20, 25, 30°Cで培養し、培養後15時間目にGVBDと排卵の割合を求めた (Fig. 3)。その結果、GVBDは水温20°Cおよび25°Cでは15時間目にはほぼ完了していたが、15°Cではわずかに誘起されず、30°Cでは誘起されなかった。排卵は培養温度20°C, 25°Cおよび30°Cではほぼ完了していたが、15°Cでは排卵は認められなかった。このことから、卵

成熟・排卵の適水温は20～25℃であると判断された。また、排卵は卵成熟が誘導されなかった30℃でも誘導されたが、卵成熟が誘導された15℃ではまったく誘導されなかった。このことから、排卵の適水温は成熟の適水温よりも高い20℃から30℃までの間に存在する可能性も考えられた。これまで、自然界でウナギの産卵を観察した報告は全くなく、ウナギがどのような水温の海域で産卵しているかは不明である。本研究の結果から、15℃では卵成熟や排卵誘導は著しく阻害されることから、このような低水温海域では産卵をしていない可能性がある。受精卵のふ化に及ぼす影響を調べた結果、19℃ではほとんどふ化が起こらなかったこと（飯沼ら、未発表）からも産卵やふ化は20℃以上の水温の海域で行われていることが示唆される。また、卵成熟よりも排卵の適水温の方が高い可能性が考えられたことから、比較的水温の低い（20℃～25℃）海域で成熟が進行し、さらに高い温度（25～30℃）の水域で排卵・産卵することも考えられる。

これまでの生体内や生体外の実験結果を総合すると、ウナギは20～15℃になると卵黄形成を開始するものの、降河後は15℃以下（水深約700～800m以深）の水温海域を産卵場に向かい、ゆっくりと卵黄形成が進行する。産卵場では比較的低い温度（20℃～25℃、水深約100～200m）で卵成熟を起こし、産卵はさらに25℃～30℃（水深約100m以浅）で行われている可能性が考えられる。そこで、人為的な卵成熟・排卵誘導時にもこのような温度で飼育したときに卵質がどのような影響を受けるのかについて検討した。

卵成熟・排卵時の飼育水温が受精率・ふ化率に与える影響：このことを確かめるために、サケ脳下垂体抽出液の注射により卵径850～900 μmに達しDHPを注射し

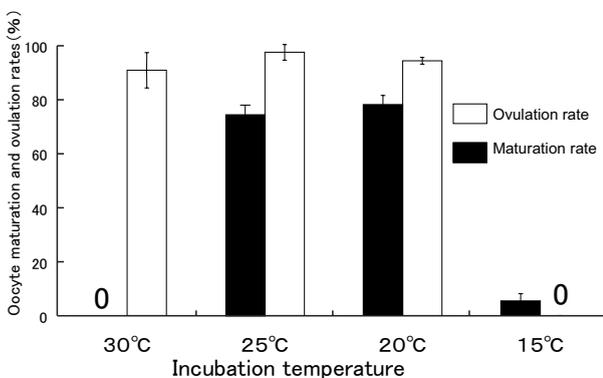


Fig. 3. Effects of temperature on *in vitro* oocyte maturation and ovulation in Japanese eel

た雌ウナギを2群に分け、1群は水温20℃一定で飼育し、もう1群はDHP注射後6時間目に水温を20℃から25℃に上げて飼育した。DHP注射後、12、14、16時間目に腹部を圧迫して排卵の有無を確認し、排卵個体から卵を搾出し人工授精をして、受精率・ふ化率を求めた。その結果、最終成熟誘起時の飼育水温を20℃に保った群では14～16時間目に排卵したが、DHP投与後6時間目に25℃に上げた群では12～14時間目に排卵し、生体外培養の結果と同様に水温を上昇させることによって排卵時刻を早めることができることが判明した。しかし、20℃から25℃で飼育した個体の平均受精率および孵化率は20℃のそれらと比較し低くなった。この結果は、排卵までの時間が早いほど受精率・ふ化率が高くなることと矛盾する。おそらく、25℃で排卵を誘導された個体の卵質は飼育水温が高いために排卵後の時間経過とともに急激に卵質が低下したのではないかと推察される。今後、このようなことが実際に起こる可能性があるのかどうかについて、排卵された卵の卵質に及ぼす水温の影響について検討が必要である。

おわりに

本研究の結果、卵黄形成から成熟・排卵誘導までの飼育水温や成熟・排卵時の卵径を調節することにより、排卵までの時間が早まり、卵質が改善されることが判明した（Kagawa, 2003）。新たに改良された雌ウナギの成熟誘起方法は Fig. 4 に示すとおりである。水温20℃から15℃で飼育しサケ脳下垂体注射により卵母細胞の卵径が約850 μmに達した雌ウナギに再度サケ脳下垂体を注射し、24時間後に卵径が約900 μm以上に達した個体にDHPを注射することにより、受精率50%、ふ化

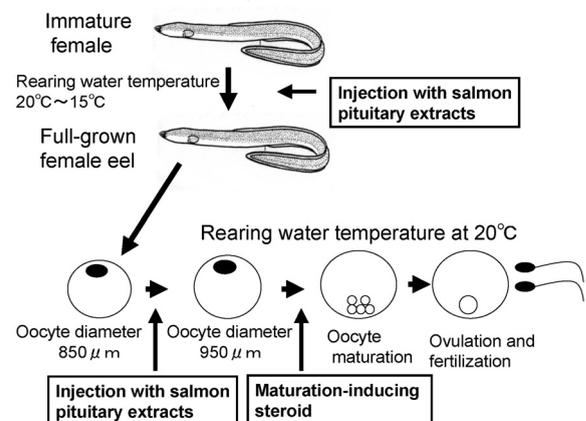


Fig. 4. Improved methods for induced maturation of female Japanese eel

率40%程度の卵質の卵が得られるようになった。しかし、個体間のばらつきは存在し、今後効率的で安定した種苗生産を行うためには、卵質の個体間のばらつきの原因を明らかにし、それをなくす対策を立てることが重要であると考えられる。

文 献

- 香川浩彦, 1996: 雌の成熟促進技術, 「ウナギの初期生活史と種苗生産の展望」(多部田修 編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.95-107.
- 香川浩彦, 2001: ウナギの繁殖生理学. 海洋と生物, **23**, 130-136.
- Kagawa H., 2003: Artificial induction of oocyte maturation and ovulation, in "Eel Biology" (ed. by Aida K., Tsukamoto K., and Yamauchi K.), Springer-Verlag, Tokyo, pp.401-414.
- Kagawa H., Inuma N., Tanaka H., Ohta H., and Okuzawa K., 1998: Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.*, **64**, 77-82.
- Kagawa H., Tanaka H., Unuma T., Ohta H., Gen K., and Okuzawa K., 2003: Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.*, **69**, 234-241.
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa H., and Hirose K., 1996: Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, **139**, 291-301.
- 塚本勝巳, 2001: ウナギの産卵生態. 海洋と生物, **23**, 123-129.
- Uto T., Mikawa N., Okamura A., Yamada Y., Tanaka S., Horie N., Akazawa A., and Oka H. P., 2004: Ovarian morphology of the Japanese eel in Mikawa Bay. *J. Fish Biol.*, **64**, 502-513.
- Yamamoto K. and Yamauchi K., 1974: Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature*, **251**, 220-222.