

個別飼育法によるニホンウナギの卵質判定

鶴沼辰哉*・野村和晴*

Evaluation of egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, by individual rearing method

Tatsuya UNUMA*, Kazuharu NOMURA*

Abstract To improve the quality of eel eggs, it is essential to determine correctly the parameters associated with egg quality such as the rates of fertilization, hatching and survival. The method for assessing these parameters needs to be easy and stable. We found that eel larvae hatched in small wells of tissue-culture microplates (one larva in one well) survived beyond the completion of yolk absorption without the need of removing dead larvae, changing the water or feeding. Using this individual rearing method, rates of fertilization, hatching and survival can be determined successively in the same individuals with minimum management.

Key words: eel, egg quality, hatching, survival, microplate

魚類の種苗生産にとって、質の良い卵を得ることはたいへん重要である。とくに、人為催熟で得られるウナギ卵の卵質は不安定であるため、種苗生産の実用化には、卵質を的確に判定したうえでその改善を図ることが必須である。一般に卵質は受精、ふ化のみならず、ふ化仔魚の生残にも影響を及ぼす。とくに摂餌開始までは必要な栄養を卵に依存するので、卵質の影響は大きい。これに対し、摂餌開始後には摂取する餌料の影響が大きくなるため、卵質の影響は相対的に小さくなると考えられる。このことから、我々は受精・ふ化成績に加えて摂餌開始期までの生残成績を卵質判定の重要項目ととらえ、「一定数の卵を人工受精したとき、摂餌開始ステージまで育つ仔魚の割合をできるだけ高めること」を卵質改善の目標と考えている。

ウナギの種苗生産に関する研究においては、これまで卵質判定には受精率とふ化率のみが用いられてきた(Ohta *et al.*, 1996など)。受精率・ふ化率が比較的容易に測定できるのに対し、ふ化仔魚の生残率を簡便に測定できる方法が確立されていなかったことが主な理

由であろう。そこで我々は、栽培プロ研第1期課題「ウナギの卵質評価手法の確立と改善技術に関する研究」(課題担当、鶴沼辰哉・野村和晴・古板博文・山本剛史：研究協力、近畿大学農学部 太田博巳)において、できるだけ労力をかけずに安定して受精率・ふ化率・生残率を測定する方法の開発に取り組んだ(Unuma *et al.*, 2004)。

ピーカーでの生残率測定

一般にマダイやヒラメ等の海産魚の初期生残率を測定するには、ピーカー、シャーレ、組織培養用マイクロプレート(6穴、12穴などウェルの大きなもの)などの容器に数十~数百尾のふ化仔魚を収容し、毎日1、2回死亡魚を除去して数える方法が用いられている。この方法では、水質を維持するためにもこまめに死亡魚を取り除く作業が欠かせない。我々もまずこの方法をウナギで試みたものの、①収容直後の死亡がしばしば認められる、②毎日2回死亡魚を除去しないと生残

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

* 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

が安定しない、③ふ化から摂餌開始期までマダイやヒラメの2倍の8日間を要するために労力がかかる、といった問題点が明らかになった。①および②の原因としては、①仔魚が収容時のハンドリングに対して敏感であること、②死亡魚が他の仔魚に及ぼす影響が大きいことなどが考えられた。したがって、①ふ化前から②1尾ずつ隔離して飼育すれば、これらの問題点を解決できるのではないかと予想された。そこで、マイクロプレートのウェルに受精卵を1個ずつ収容してふ化させ、摂餌開始期まで飼育する方法を試すことにした。

マイクロプレートでの個別飼育

まず、マイクロプレートのウェル数（飼育水の容量）が仔魚の生残に及ぼす影響を調べるために、24穴、48穴および96穴の3サイズのマイクロプレートにおける生残経過を比較した。ペニシリンGカリウム塩（100,000IU/L）およびストレプトマイシン硫酸塩（0.1g/L）を添加したろ過海水を24穴（4枚）、48穴（2枚）および96穴（1枚）プレートの各ウェルに2、1および0.25mLずつ分注し、受精8時間後（胚期）の卵を1個ずつ収容した。22°Cの湿箱に保管し、ふ化後も飼育水の交換と死亡魚の除去を行わず、全滅するまで毎日実顕微鏡下で生残を観察した（Fig. 1）。ふ化翌日までに多数の仔魚が死亡したものの、その後の生残は少なくともふ化8日後（摂餌開始期）まではどのプレートでも良好であった。ふ化9日後を過ぎるとウェル数の多い（飼育水の少ない）プレートから死亡が増え始め、19日後までに全個体が死亡した。飼育水が少ないほど早く全滅したことから、餓死のみならず水質

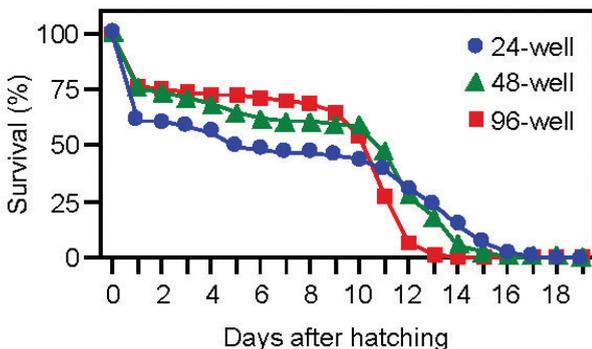


Fig. 1. Survival profiles of eel larvae in the 24-, 48-, and 96-well microplates (Modified from Unuma *et al.*, 2004). The survival rate was calculated as the percentage of the number of hatched larvae. Values represent the means \pm standard deviations of larvae from six females.

の悪化も死因になっていると考えられた。これらの結果から、マイクロプレートのウェル中で卵から摂餌開始期まで、換水も死亡魚の除去も行わずに飼育することが可能であることが明らかとなった。プレートサイズは96穴では摂餌開始期の直後から死亡が多くなることと、24穴では1枚のプレートに収容できる尾数が少ないことから、48穴が最も実用的と考えられたので、以後の実験には48穴プレートを用いることにした。

ふ化直後の浮上斃死

ふ化翌日までに多数が死亡する原因を明らかにするため、ウェル内でのふ化前後の様子を実顕微鏡下で観察した。卵は水面に浮かんでいるため、ふ化も水面で起こる。ふ化直後に速やかに水面から離れて潜ることができた仔魚はそのまま生き延びたが、水面に張り付いて逃れられなくなり数十分以内に死亡する仔魚もしばしば観察された。キジハタ (Yamaoka *et al.*, 2000) やハガツオ (Kaji *et al.*, 2003) では、摂餌開始期の仔魚が水面に張り付いて死ぬ現象が知られ、浮上斃死と呼ばれている。ウナギのふ化直後の斃死も、ステージこそ異なるものの浮上斃死に相当すると考えられた。この現象は水の表面張力を弱める物質、例えば卵白、ウシ血清アルブミン、ポリエチレングリコールなどを飼育水に添加することにより防ぐことが可能である (Kaji *et al.*, 2003; Tagawa *et al.*, 2004)。そこで、飼育水にポリエチレングリコールを添加してふ化直後の浮上斃死を防除できるか否かを検討した。

抗生物質を含むろ過海水にポリエチレングリコール6000（分子量約7000）を0、1、10 μ g/mLの濃度で溶解し、48穴プレートの各ウェルに1mLずつ分注した。受精後の卵を1粒ずつ収容し、ふ化率およびその後の生残率を比較した（Fig. 2）。ふ化率はどの濃度でも同程度であった（Fig. 2-A）。ふ化数を100としたときのふ化1日後の生残率は0 μ g/mL区では浮上斃死のため40%に低下したが、1および10 μ g/mL区では斃死はほとんど起こらなかった（Fig. 2-B）。ふ化1日後まで生き残った仔魚の数を100としたときのその後の生残経過は、どの濃度でも差はなかった（Fig. 2-C）。これらの結果から、ポリエチレングリコールの添加はふ化率や生残率に影響を及ぼすことなく、浮上斃死を防ぐのに有効であることが明らかとなった。なお、その後の研究で、ウシ血清アルブミンの添加によってもほぼ同様の効果が確かめられている（養殖研 鶴沼ら、未発表）。

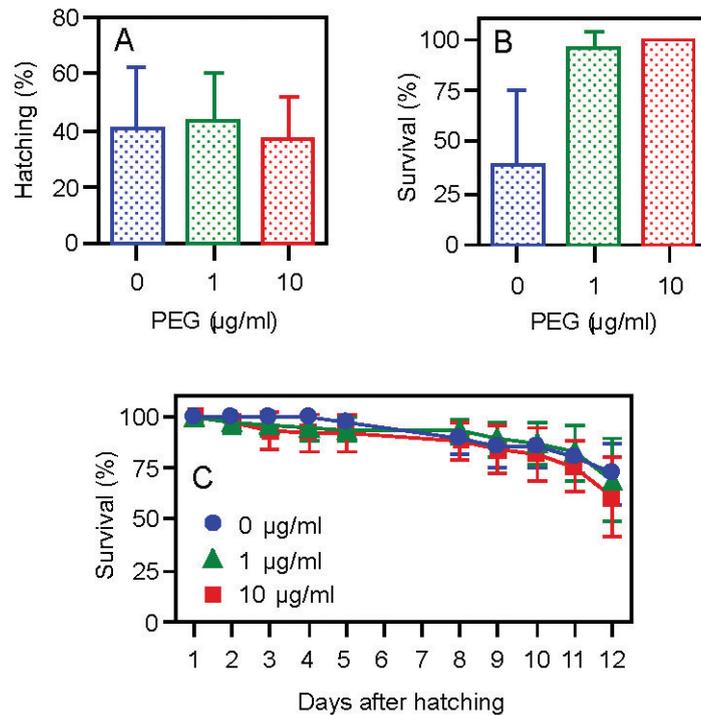


Fig. 2. Effects of polyethylene glycol (PEG) on hatching and larval survival of eel in the 48-well microplates (Modified from Unuma *et al.*, 2004). A) Hatching rate; B) Survival rate 1 day after hatching (DAH) as the percentage of the number of hatched larvae; C) Survival rate from 1 to 12 DAH as the percentage of the number of live larvae 1 DAH. Values represent the means \pm standard deviations of larvae from five females.

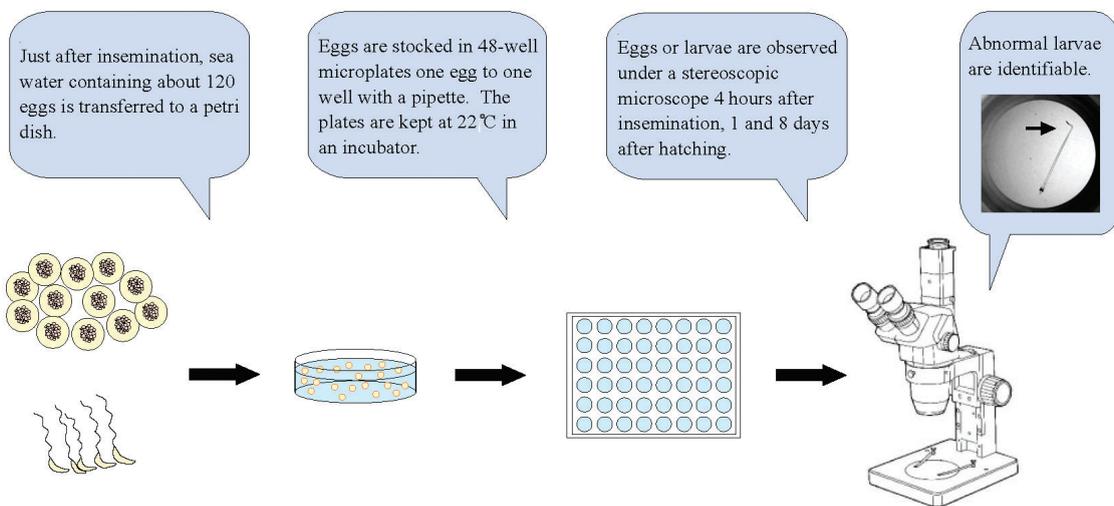


Fig. 3. Procedures for determining the rates of fertilization, hatching and survival in the Japanese eel by the individual rearing method.

同一サンプルによる受精率・ふ化率・生残率の測定

マイクロプレートでの個別飼育が摂餌開始までの生残率測定に非常に有効であることがわかったので、こ

の方法を応用して同一サンプルで受精率、ふ化率、生残率、形態異常率を測定する方法を考案した (Fig. 3)。採卵後、直ちに 2g (約4,000個) の卵を量り取り、人工精漿 (Ohta *et al.*, 1996) で100倍に希釈した精子

1 mLで媒精し、100mLの海水に懸濁する。よくかき混ぜながらカルスピペット（先端の太い駒込ピペット）で3 mL（約120個）を採取し、いったんシャーレに取って22°Cで保管する。シャーレ内の卵の総数が受精率・ふ化率などを計算する際の分母となる。ペニシリンGカリウム塩（100,000IU/L）、ストレプトマイシン硫酸塩（0.1g/L）およびポリエチレングリコール6000（1 μ g/mL）を含むろ過海水を調製し、48穴プレートの各ウェルに1 mLずつ分注する。媒精2時間後に先端部の内径が2 mm弱のガラス製ピペット（短いほうが使いやすく、アズワンAI-0956-130が良好）を用いてシャーレの卵をマイクロプレートのウェルに1個ずつ移し（このとき明らかに死卵とわかる白濁した卵は捨てる）、飼育水の蒸発を防ぐため湿箱に入れるなどして10日後まで22°Cのインキュベータで保管する。期間中は酸欠を防ぐため、1、2日おきに湿箱を開けて換気をしたほうが良い。媒精4時間後（桑実期）、3日後（ふ化1日後）、10日後（ふ化8日後、摂餌開始期）の計3回、実体顕微鏡下で観察し、媒精4時間後には正常卵割、異常卵割、未受精の3段階、3日後には正常魚、異常魚、死亡、未ふ化の4段階、10日後には正常魚、異常魚、死亡の3段階に分類する。これにより受精率、正常卵割率、ふ化率、生残率（3日後および10日後）、形態異常率（3日後および10日後）を算出できる。ただし、形態異常については、生きたままの観察なので微細な異常の判別は困難であり、目の欠損、体軀の曲がり等、比較的目に付きやすい異常の判別に留まる。最近、これまで正常と考えていた仔魚のなかにも、囲心腔の肥大や顎のめくれ等、子細に観察しないとわからない微

細な形態異常が多数含まれることがわかってきた（養殖研 黒川ら、未発表）ため、それらを容易に判別するための新たな方法を模索しているところである。

愛知県水産試験場内水面漁業研究所から分与された雌化ウナギを催熟し、16尾から得られた卵の卵質を上述の方法で判定した例を示す（Fig. 4）。このときには比較的良質な卵が得られ、人工授精に用いた卵数を100としたときの受精率、ふ化率、ふ化翌日の生残率、ふ化8日後の生残率の平均値は、それぞれ50.5%、35.2%、35.2%、31.4%であった。ただし、受精すら全くしないものからふ化8日後の生残率が80%に達するものまで、雌親魚ごとに値は大きくばらついた。また、データは示さないが親魚の由来が変わると平均値も大きく異なり、ときには何尾排卵してもまともな卵を得られないことすらある。今後は、このような雌親魚ごと、あるいは親魚の由来ごとの卵質のばらつきが何に起因するのかを明らかにし、それを改善していくことが肝要である。

まとめ

個別飼育を行えば、摂餌開始期までのウナギ仔魚の飼育も容易である。上述の方法は、ウナギの卵質判定の標準法として種苗生産技術開発に取り組む各県の水産試験場等にも採用していただき、研究機関相互の卵質データの比較が容易になった。また、マイクロプレートを用いた個別飼育は換水や死亡魚除去の必要がなく結果も安定しているため、他の魚種の卵質判定にも応用できるかもしれない。

本方法でやっかいな点があるとすれば、卵を1個

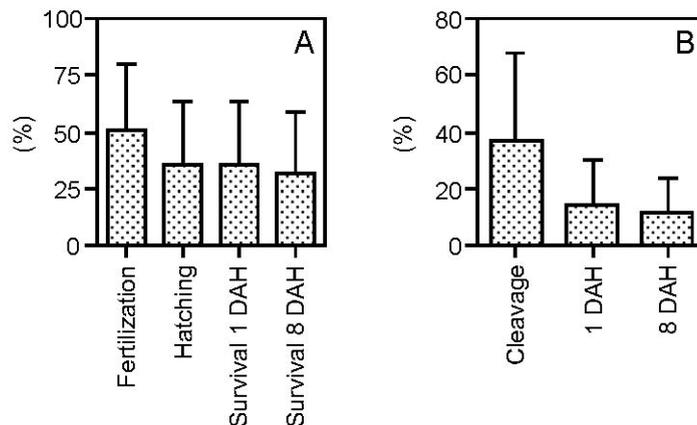


Fig. 4. Rates of fertilization, hatching, survival and abnormality of eel determined in the 48-well microplates (Unuma *et al.*, 2004). A) Fertilization, hatching and survival rates as the percentage of the number of eggs; B) Abnormality rate in cleavage and larvae. Values represent the means \pm standard deviations for eggs and larvae from 16 females (A) or 14–15 females (B).

1個ピペットでウェルに移す操作であろう。細かい作業の苦手な人にとっては、初めのうちは非常に面倒でストレスの溜まる作業だと感ずるかもしれない。しかし、何回か繰り返せばすぐに慣れるし、48穴プレート1枚分を収容するのに要する時間はせいぜい5、6分である。いったん収容してしまえば、その後の飼育も観察も極めて容易であり、その利点は大きい。

我々の担当課題「ウナギの卵質評価手法の確立と改善技術に関する研究」においては、本方法で雌親魚ごとに卵質を判定するいっぽうで、卵成分、卵比重などの卵の様々な性質について雌親魚ごとに分析し、卵質に影響を及ぼす要因を特定しようと試みた。その結果、未受精卵のビタミンE含量 (Furuita *et al.*, 2003)、未受精卵の比重 (Unuma *et al.*, 2005)、および胚や仔魚の倍数性 (Ohta *et al.*, 2003) と卵質との間に相関関係のあることを見出した。卵質に影響するこれらの要因を制御できるようになれば、卵質を改善できると考えている。なお、各実験の詳細についてはそれぞれの論文を参照されたい。

文 献

- Furuita H., Ohta H., Unuma T., Tanaka H., Kagawa H., Suzuki N., and Yamamoto T., 2003: Biochemical composition of eggs in relation to egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.*, **29**, 37-46.
- Kaji T., Kodama M., Arai H., Tanaka M., and Tagawa M., 2003: Prevention of surface death of marine fish larvae by the addition of egg white into rearing water. *Aquaculture*, **224**, 313-322.
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa K., 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.
- Ohta H., Higashimoto Y., Koga S., Unuma T., Nomura K., Tanaka H., Kagawa H., and Arai K., 2003: Occurrence of spontaneous polyploids from the eggs obtained by artificial induction of maturation in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 517-518.
- Tagawa M., Kaji T., Kinoshita M., and Tanaka M., 2004: Effect of stocking density and addition of proteins on larval survival in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **230**, 517-525.
- Unuma T., Kondo S., Tanaka H., Kagawa H., Nomura K., and Ohta H., 2004: Determination of the rates of fertilization, hatching and larval survival in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, using tissue culture microplates. *Aquaculture*, **241**, 345-356.
- Unuma T., Kondo S., Tanaka H., Kagawa H., Nomura K., and Ohta H., 2005: Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, **246**, 493-500.
- Yamaoka K., Nanbu T., Miyagawa M., Isshiki T., and Kusaka A., 2000: Water surface tension-related deaths in prelarval red-spotted grouper. *Aquaculture*, **189**, 165-176.