ウナギの人工種苗生産における採卵法が卵質に及ぼす影響 (搾出媒精法と自発産卵法の比較)

堀江 則行,^{1*} 宇藤 朋子,¹ 三河 直美,¹ 山田 祥朗,¹
岡村 明浩,¹ 田中 悟,¹ 塚本 勝巳^{1,2}

(2007 年 3 月 12 日受付, 2007 年 8 月 6 日受理)

¹ 磯いらいご研究所, ² 東京大学海洋研究所

Influence of artificial fertilization methods of the hormone-treated
Japanese eel *Anguilla japonica* upon the quality of eggs and larvae
(Comparison between stripping-insemination and spontaneous spawning methods)

NORIYUKI HORIE,^{1*} TOMOKO UTOH,¹ NAOMI MIKAWA,¹ YOSHIAKI YAMADA,¹
AKIHIRO OKAMURA,¹ SATORU TANAKA¹ AND KATSUMI TSUKAMOTO^{1,2}

¹IRAGO Institute, Tahara, Aichi 441-3605, ²Ocean Research Institute, The University of Tokyo, Nakano,
Tokyo 164-0014, Japan

To improve techniques for artificial seed production of the Japanese eel *Anguilla japonica*, we evaluated two types of artificial fertilization methods: i) the spontaneous spawning method of paired specimens and ii) the stripping-insemination method, by comparing the quality of eggs and larvae obtained. Females artificially matured by the injection of salmon pituitary extract were kept at 20°C before final treatment with 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. Afterwards, each female for i) the spontaneous spawning method was kept in an individual tank with three males and water temperature was raised to 22°C. For ii) the stripping-insemination method, ovulated fish kept at 20°C for about 15 hrs were stripped and eggs obtained were inseminated. Eggs and larvae obtained by i) the spontaneous spawning method ($n=12$) showed significantly higher fertility ($80 \pm 14\%$), hatching rate ($62 \pm 23\%$), survival rate at 5 days after hatching ($54 \pm 22\%$), and lower deformity at 5 days after hatching ($60 \pm 23\%$) than those obtained by ii) the stripping-insemination method ($n=14$, $41 \pm 32\%$, $31 \pm 29\%$, $27 \pm 25\%$, $79 \pm 19\%$, respectively). These results show that the spontaneous spawning method at 22°C is better than the stripping-insemination method at 20°C for the fish quality in artificial eel seed production.

キーワード：ウナギ，奇形率，自発産卵，受精率，人工種苗生産，孵化仔魚，孵化率，卵質

ウナギ *Anguilla* spp. は世界の重要な水産資源であり，我が国では年間 10 万 t 以上の消費がある。国内で消費されるウナギの 99% 以上は天然のシラスウナギを種苗として育てられた養殖魚である。しかし，その種苗として用いられるシラスウナギの資源量は年々減少しており，現在ではその採捕量は 1960～1970 年代の盛期の約 10% 前後で低迷している。¹⁾ このためシラスウナギ種苗の供給不足は価格の高騰を招き，養殖経営を圧迫している。また資源そのものの枯渇も懸念されるようになっている。²⁾ ウナギの人工種苗生産が実用化すれば，シラスウナギ種苗の安定供給が可能になる。そのため，約

40 年も前から人工種苗生産技術の開発研究がなされてきた。³⁾ 現在天然のシラスウナギ種苗を用いているウナギの養殖において廉価な人工種苗が豊富に供給できるようになれば，天然シラスウナギの漁獲圧が減り，ウナギ資源の保全につながる。

ウナギの人工種苗生産の研究の中で，初期の大きな成功は Fontaine *et al.*⁴⁾ が 1964 年にヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* の卵母細胞の成熟と排卵をさせたことである。ニホンウナギ *Anguilla japonica* の人工種苗生産技術の開発研究も歴史が古く，既に 1960 年には最初の試みがあった。³⁾ Yamamoto and Yamauchi⁵⁾ は，1974

年にサケ脳下垂体抽出液の注射によって催熟した雌と、ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモンの注射によって催熟した雄を用いて、初めて人工授精による孵化仔魚を得た。佐藤⁶⁾は1979年に雌雄のペアリングによる自発産卵法で得た卵由来の孵化仔魚を17日間生存させ、後期仔魚期まで発生させた。しかし、有効な仔魚餌料は発見できず、また採卵用親魚としての天然の下りウナギの確保の難しさが種苗生産研究の進展を阻んだ。その後、立木⁷⁾が1996年に雌性ホルモン（エストラジオール-17 β ）による性統御法⁸⁾を用いて、養殖ウナギから安定的に採卵用雌親魚を得る方法を確立した。1990年代後半の、Ohta *et al.*⁹⁻¹¹⁾やKagawa *et al.*¹²⁾の一連の研究によってホルモン催熟したウナギから確実に計画的に排卵・排精を誘導する方法が確立された。これらの研究によって、親魚の供給から採卵、採精までほぼ安定的に行うことができるようになった。2001年にはTanaka *et al.*¹³⁾がサメ卵を用いた餌による仔魚の給餌飼育を成功させ、2003年にシラスウナギを得た。¹⁴⁾ このように約40年かけてウナギの人工種苗生産の研究は一応の解決を見たが、卵や仔魚の歩留まりは他魚種に比べて悪く、シラスウナギに変態する前の、孵化後100日の生残率は約1%と著しく低い。¹⁵⁾ マダイ *Pagrus major* やヒラメ *Paralichthys olivaceus* は20年前には既に種苗生産技術が開発されており、孵化率は70%以上、その後種苗となるまでの生残率は50%以上を達成している。¹⁶⁻¹⁹⁾ これらに比べるとウナギ人工種苗生産の技術は依然として開発途上にあるといわざるを得ない。田中ら²⁰⁾は親魚養成法や人為催熟法を改善し、ウナギの卵や仔魚の質を高めるべきであるとしている。

これまで受精卵を得るのにOhta *et al.*^{9,10)}、Kagawa *et al.*¹²⁾をはじめとしてほとんど全ての研究において、水温条件を20℃一定とし、卵の搾出とそれに続く媒精によって採卵が行われてきた（搾出媒精法）。一方Satoh *et al.*²¹⁾はウナギ養殖のため大量の良質卵を得るには、人為催熟法を用いて成熟を促進した雌雄のウナギに、自発的に放卵・受精を行わせる自発産卵法によるべきだとしている。Satoh *et al.*²¹⁾は催熟した雌雄のニホンウナギ親魚を同一の水槽に収容し、18℃、20℃、22℃と三段階の昇温処理により産卵行動を誘導して自発産卵を成功させ、正常な孵化仔魚を得ている。搾出・媒精による人工授精は、精子の質や媒精量等授精条件を安定させられることや受精時刻を揃えられること、複数の交配が可能であることなど、育種の観点から有利な点が多い。一方自発産卵では、交配の組合せは固定されてしまうものの、産卵時のストレスはより少なく、得られる卵の質が良いものと期待される。しかし、推奨された上記水温条件²¹⁾で自発産卵を用いて、高い卵質の卵が得られたという数値の実績はなかった。従って本研究では、採卵法

そのものの優劣の判断に先立ち、まず現行の水温条件による搾出媒精法を基準にし、これと比較して上記水温条件²¹⁾で自発産卵法により高い卵質の卵が得られることを実証し、また将来の大量種苗生産技術へ繋げられるかを考察することとした。そこで本研究では高い卵質の卵を得ることを目的とした採卵法検討の端緒として、現行の水温条件による搾出媒精法（20℃一定）と自発産卵法（18℃→20℃→22℃）、および新規の簡便化した水温条件による自発産卵法（20℃→22℃）を用いた3実験区について、得られた卵・仔魚の受精率、孵化率、生残率、奇形率を比較することとした。

試料および方法

実験の概要 実験期間は2006年3月3日から同年6月19日までであった。以下の3つの実験区を設けた（Fig. 1）。搾出媒精区では、排卵した雌親魚から搾出によって採卵し、これを予め調製した保存精液⁹⁾によって媒精した。水温は実験期間を通じて20℃一定とした。次に自発産卵A区では、排卵直前の雌親魚1尾を排精中の雄親魚3尾とペアリングさせ自発的に放卵・受精（産卵）させた。5週から12週に及ぶ親魚の催熟期間の大部分は水温を18℃に保ち、ホルモン注射により排卵誘発を行う最終週の月曜日から木曜日までの3日間は20℃に上昇させた（Fig. 1）。その後、木曜日に雌雄をペアリングさせ、さらに22℃に上げた。自発産卵B区も自発産卵A区と同様に自発産卵を行うが、催熟中の水温は20℃一定で、ペアリング時に22℃に上昇させた。

供試魚 雌親魚は、2004年1月に愛知県田原市赤羽根で採捕したシラスウナギを、立木⁷⁾の方法によりエストラジオール-17 β （和光純薬工業株）を用いて雌化処理したものである。これをいらいご研究所で2年間養成したものを供試した。飼育水は淡水で年間の水温範囲は25～26℃とほぼ一定である。養鰻用配合飼料（日清丸紅飼料株）を給餌率1.5～2.0%で与えた。雄親魚には、体重250～350gの養殖魚を購入して充当した。これらを17日間20℃に水温馴致し、塩分濃度3.0%の海水に馴致した後、実験に供した。実験期間中は無給餌とした。催熟用雌雄親魚にはあらかじめ背鰭始部前方の左背側部筋肉内に電磁式標識（PITタグ、Destron Fearing Co. U.S.A.）を挿入し、個体識別した。この他、催熟用雌親魚とは別に用意した14尾を催熟開始時に解剖し、催熟前の成熟状態の代表値とした。

同じ催熟水温（20℃）とした、搾出媒精区と自発産卵B区のために雌親魚を35尾用意した。屋内に設置した10m³容積FRP水槽を飼育水槽とし、毎分5Lの海水（塩分濃度3.0%）を供給した。催熟開始後12週目までに卵母細胞径（卵径）が750 μ mに達した雌親魚

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental design in the study. Three experimental groups of females (1)–(3) that were kept under different water temperature regimes were used.

Following the conventional artificial maturation technique,^{9–12)} females of all three groups were injected with salmon pituitary extract (SPE, 40 mg/kgBW/week) every Monday for ca. 5–12 weeks.^{9,10)} Females whose body weight indices (= body weight / initial body weight $\times$ 100) exceeded 110% (closed arrow *1) were transferred to a 1000 L aquarium together (at 20°C), and maturity of their oocytes was examined by cannulation 2 days later (on Wednesday). Females whose oocyte diameters were over 750 μ m at the migratory nucleus stage were injected with additional SPE (closed arrow *2), and followed 24 h later (on Thursday) by DHP injection (2 mg/kgBW, open arrow *3). After DHP injection, from 15 h (closed arrow *4) to 18 h (closed arrow *5) ovulation was examined in the females.

(1) Stripping-insemination group. Females were kept in a 20°C tank and maturation was induced. After DHP injection, from 15 h (closed arrow *4) until 18 h (closed arrow *5) eggs were stripped from ovulated females and immediately inseminated with prepared sperm.^{9–12)}

(2) Spontaneous spawning group A. Females were kept in an 18°C tank, and injected weekly with SPE. Females whose body weight indices exceeded 110% were exposed to water at 20°C (closed arrow *1). After DHP injection on Thursday (open arrow *3) each female was moved to another 1000 L aquarium at 22°C with three males for pairing respectively. After DHP injection, eggs spawned into the aquarium until 18 h (closed arrow *5) were collected.

(3) Spontaneous spawning group B. Females were kept in a 20°C tank, and injected weekly with SPE. After DHP injection on Thursday (open arrow *3) each female was moved to another aquarium at 22°C with three males for pairing respectively. After DHP injection, eggs spawned into the aquarium until 18 h (closed arrow *5) were collected.

30尾を無作為に2区に分け、15尾ずつ分配した。催熟水温の異なる自発産卵A区には雌親魚を12尾用意した。このうち催熟開始後12週目までに卵径が750 μ mに達した雌親魚9尾を排卵誘発に供した。

雄親魚の催熟 雄魚は Ohta *et al.*¹¹⁾の方法に従い、水温20°Cで飼育し、ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン(HCG, 三共エール薬品株)を毎週魚体重1g当たり1IU投与した。腹部を軽く圧迫して生殖口から精液が滴下する程度の排精が見られた個体は、その精子の海水希釈15秒後の運動活性を光学顕微鏡下で確認した。運動活性50%以上の精子を排精した個体を自発産卵区2区のペアリングに供した。また搾出媒精区の媒精用に、排精個体から媒精の4日前に採精して Ohta *et al.*⁹⁾に従い希釈精液を調製した。媒精直前に海水希釈15秒後の運動活性を光学顕微鏡下で確認し、運動活性50%以上あるもの3尾分を等量に混合した。

雌親魚の催熟 1. 搾出媒精区：雌親魚にはサケ脳下垂体抽出液 (Salmon Pituitary Extract, 以下 SPE) を投与した。魚体重1kg当たり乾物換算40mgを毎週月

曜日に1回筋肉注射した。投与回数(催熟期間)は5～12回(5～12週)と、成熟の進行度によって個体毎に異なった。SPE投与時に毎回体重測定を行い、催熟開始体重の約110%になった雌親魚を、催熟の最終段階に到達した個体と判断した。これらを排卵誘発候補とし、水温20°C、容量1m³の小型水槽(排卵準備水槽)に隔離した(Fig. 1 図中*1)。この水槽には毎分3Lの海水(塩分濃度3.0%)を供給した。なおこの水槽には排卵誘発までの3日間互いにPITタグで識別可能な3つの実験区の親魚を一緒に収容したので、この間は3実験区共、同一の飼育条件となる。体重が催熟開始時の約110%に達した2日後(水曜日)、腹腔カニューレシオンを行って卵径を測定した(Fig. 1 図中*2)。卵径が750 μ mを越え核移動期に達した個体には、最終SPE注射を施した(水曜日)。さらにその24時間後(木曜日)、排卵誘発のため17 α , 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン(DHP, SIGMA)を魚体重1kg当たり2mg投与した(Fig. 1 図中*3)。¹²⁾ DHP投与時刻は木曜日の17:30に揃えた。DHP投与後15時間(Fig. 1 図中*4)

から排卵の有無を1時間毎に確認し、排卵した個体は腹部を圧迫して搾卵した。18時間 (Fig. 1 図中*5) で排卵確認を打ち切った。Kagawa *et al.*¹²⁾ が DHP 投与後15時間までの排卵例から高い卵質の卵を得たとしていることから、排卵時間帯を DHP 投与後15時間以前と以後に区分して扱った。

排卵親魚から搾出された卵2gを無作為に採集し、4日前に調製した希釈精液1mLを用いて媒精した。その後、Unuma *et al.*²²⁾ に従い、48穴マイクロプレート3枚を使用して卵を個別に収容し飼育・観察した。

2. 自発産卵A区: Satoh *et al.*²¹⁾ に基づき、3段階に昇温した。18℃でSPE投与した親魚の体重が催熟開始時の約110%に達した日 (Fig. 1 図中*1) に、排卵誘発候補として20℃の排卵準備水槽に収容した。最終SPE注射 (Fig. 1 図中*2) とDHP投与 (Fig. 1 図中*3) の要領は搾出媒精区と同様であるが、DHP投与の後、雌親魚を1尾ずつ円型黒色の産卵水槽 (容量1m³ パンライト、水位600mm) 内に収容した。この水槽には毎分3Lの海水 (塩分濃度3.0%) を供給し、1kWチタンヒーター (日東機材㈱) により水温22℃に調節した。排水口には排出卵の流出防止のため500μmの網を取り付けた。水槽内の対流のため少量の通気を行った。また前述の方法で催熟され運動活性50%以上の精子を排精するようになった雄親魚には、HCGと共に17α-ヒドロキシプロゲステロン (17α-P, SIGMA) を魚体重1g当たり2μg投与した。²³⁾ これらの魚を、雌1尾に対し雄3尾を一組として産卵水槽に収容した。これらの雄親魚はこの後産卵水槽から取り出される時も精液を放出していた。産卵水槽に直径100mm全長800mmの塩化ビニルパイプ1本をシュルターとして入れた。遮光のため蓋をした。雌魚へのDHP投与から18時間 (Fig. 1 図中*5) 以内に産出された全卵からサンプルを抽出するため、まず雌雄親魚を取り出した後、上記塩化ビニルパイプを用いて、沈下した卵が舞い上がり浮上卵と混和するまで水槽内を5回以上撹拌した。次に、卵が沈下しない程度まで水槽内の通気を強め、全卵が対流していることを確認してから、海水約2L分の卵を回収した。250μmの網を用いて洗卵しつつ海水を約200mLまで減らし、ここから120粒前後の卵を無作為に抽出した。洗卵の後、搾出媒精区と同様にマイクロプレートに収容し観察した。

3. 自発産卵B区: この実験区は自発産卵A区とはほぼ同様で、催熟の全期間を水温20℃で飼育する点のみが自発産卵A区と異なっている。DHP投与 (Fig. 1 図中*3) の後は自発産卵A区と同様に処理した。

卵質の指標 卵質の指標として、受精率、孵化率、生残率、奇形率を用いた。受精卵と孵化仔魚をマイクロプレートで培養する温度条件については、胞胚期 (受精後

約6時間) まで22℃で培養し、その後培養温度を27.5~28℃に上昇させると、奇形が少ないことが明らかとなっている。²⁴⁾ 本研究ではこの培養温度条件を採用した。各指標の計算方法は以下の通りである。

- 受精率 = $100 \times \text{マイクロプレート中の桑実胚まで発生した受精卵数} / \text{マイクロプレートに収容した全卵数}$ (1)

受精率(1)では、媒精4時間後桑実期まで発生が進んだものを受精卵と見なし、その割合を計算した。

- 孵化率 = $100 \times \text{マイクロプレート中の孵化仔魚数} / \text{マイクロプレートに収容した全卵数}$ (2)

上記培養温度条件では受精後およそ24時間で孵化するので、受精後28時間まで待って、その時点の孵化率(2)を調べた。

- 生残率 = $100 \times 28^\circ\text{C}$ 培養マイクロプレート中の孵化120時間後の生残仔魚数 / マイクロプレートに収容した全卵数 (3)

- 奇形率 = $100 \times 28^\circ\text{C}$ 培養マイクロプレート中の孵化120時間後の生残した形態異常仔魚数 / 28°C 培養マイクロプレート中の孵化120時間後の生残仔魚数 (4)

形態観察は孵化120時間後 (28℃培養で摂餌可能な形態に発生) の仔魚を5%ホルマリンにより固定後、実体顕微鏡で行った。奇形率(4)では①顎の湾曲②囲心腔肥大③脊索の屈曲等形態異常の認められた仔魚の割合を計算した (Fig. 2)。²⁴⁾ なお卵・仔魚管理中の生残の経過を追跡するため次の指標も調べた。

- 受精卵の孵化率 = $100 \times \text{マイクロプレート中の孵化仔魚数} / \text{マイクロプレート中の桑実胚まで発生した受精卵数}$ (5)

Fig. 2 Typical deformities of larvae of Japanese eel *Anguilla japonica* at 5 days after hatching. A, Normal larva; B, Deformed larva with locked jaw and pericardial oedema; C, Deformed larva with pericardial oedema; D, Deformed larva with notochordal bending at the tail part.

- 孵化後の生残率 = $100 \times 28^\circ\text{C}$ 培養マイクロプレート中の孵化 120 時間後の生残仔魚数/マイクロプレート中の孵化仔魚数 (6)

以上の卵質の指標を基に, 上記 3 実験区を比較して, 現行の水温条件による搾出媒精法と昇温を伴う自発産卵法で得られた卵に卵質の差があるか否かを検討した。また自発産卵 A 区・自発産卵 B 区を比較して, 催熟期間の大部分を 18°C と 20°C のいずれの水温で飼育するのがよいかを検討した。

統計処理 データの統計学的処理は t 検定法と Cochran-Cox 法によった。有意水準は $p < 0.05$ とした。有意差が認められた場合には確率を併記した。

結 果

催熟前の成熟状態 催熟用雌親魚と同じ飼育群 14 尾の全長は, $67.0 \sim 86.5 \text{ cm}$ の範囲で, 平均 $\pm$ 標準偏差 (以下同様) が $75.4 \pm 6.6 \text{ cm}$ であった。体重は $409 \sim 988 \text{ g}$ の範囲で, $652 \pm 194 \text{ g}$ であった。肥満度は $1.3 \sim 1.7$ の範囲で, 1.5 ± 0.1 であった。生殖腺指数 (= 生殖腺重量/体重 $\times 100$) の範囲が $0.7 \sim 1.4$ で, 1.0 ± 0.2 であった。また, 卵径は $149 \sim 225 \mu\text{m}$ の範囲で, $167 \pm 21 \mu\text{m}$ であった。卵巣組織を観察すると油球期のものが 13 尾, 第一次卵黄球期のものが 1 尾であった。

排卵 各実験区の排卵誘発処理した魚のうち, 搾出媒精区では 15 尾中 14 尾 (93%) が, 自発産卵 A 区では 9 尾全て (100%) が, また自発産卵 B 区では 15 尾中 12 尾 (80%) が排卵し, 概ねどの区でも高い確率で排卵した (Table 1)。各実験区の排卵した魚について最終 SPE 注射時の卵径は, 搾出媒精区, 自発産卵 A 区, 自発産卵 B 区の順に, $830 \pm 21 \mu\text{m}$, $830 \pm 43 \mu\text{m}$, $841 \pm 39 \mu\text{m}$ であった。および DHP 投与時の卵径は, 同じく, $916 \pm 15 \mu\text{m}$, $899 \pm 28 \mu\text{m}$, $906 \pm 25 \mu\text{m}$ であった。これらの卵径は各実験区間で有意差は認められなかった (Table 1)。また SPE 投与開始時体重を基準とした産卵

親魚の比体重は, 体重が催熟開始時の 110% を超えた日 (Fig. 1 図中*1) には搾出媒精区, 自発産卵 A 区, 自発産卵 B 区の順に $113 \pm 4\%$, $113 \pm 3\%$, $113 \pm 4\%$, 最終 SPE 注射日 (Fig. 1 図中*2) には $127 \pm 5\%$, $127 \pm 6\%$, $127 \pm 4\%$, そして DHP 投与日 (Fig. 1 図中*3) には $137 \pm 5\%$, $137 \pm 7\%$, $137 \pm 4\%$ であり, どの時期にも各実験区間に有意差はなかった (Table 1)。DHP 投与時の体重に対する排卵重量は搾出媒精区, 自発産卵 A 区, 自発産卵 B 区の順に $33 \pm 6\%$, $32 \pm 5\%$, $29 \pm 9\%$ と, 自発産卵 B 区が若干少なかったが, 区間に有意差は認められなかった (Table 1)。DHP 投与後排卵までの所要時間は自発産卵 A 区, 自発産卵 B 区に短い個体が多く, 15 時間以内に排卵した個体は, 各々排卵魚 9 尾中 7 尾 (78%) と 12 尾中 9 尾 (75%) であった (Table 2)。一方搾出媒精区では 15 時間以内に排卵した個体は 14 尾中わずか 5 尾 (36%) であった。

卵質 受精率は搾出媒精区, 自発産卵 A 区, 自発産卵 B 区の順に, $41 \pm 32\%$, $85 \pm 10\%$, $80 \pm 14\%$ であった (Table 2)。搾出媒精区と自発産卵 A 区の間 ($p < 0.005$), および搾出媒精区と自発産卵 B 区の間 ($p < 0.005$) に有意差が認められたが, 自発産卵 A 区と自発産卵 B 区の間には有意差は認められなかった。孵化率は搾出媒精区, 自発産卵 A 区, 自発産卵 B 区の順に, $31 \pm 29\%$, $63 \pm 29\%$, $62 \pm 23\%$ であった。搾出媒精区と自発産卵 A 区の間 ($p < 0.025$), および搾出媒精区と自発産卵 B 区の間 ($p < 0.005$) に有意差が認められたが, 自発産卵 A 区と自発産卵 B 区の間には有意差は認められなかった。生残率は搾出媒精区, 自発産卵 A 区, 自発産卵 B 区の順に, $27 \pm 25\%$, $55 \pm 27\%$, $54 \pm 22\%$ であった。搾出媒精区と自発産卵 A 区の間 ($p < 0.025$) および搾出媒精区と自発産卵 B 区の間 ($p < 0.01$) には有意差が認められたが, 自発産卵 A 区と自発産卵 B 区の間には有意差は認められなかった。奇形率は搾出媒精区, 自発産卵 A 区, 自発産卵 B 区の順に,

Table 1 Fishes ovulated in three experimental groups

Experimental group	No. of fish injected with DHP	No. of fish ovulated	Initial body weight (g) (mean $\pm$ SD)	Body weight at DHP injection/Initial body weight (%) (mean $\pm$ SD)	No. of SPE injection (mean $\pm$ SD)	Mean oocyte diameter*4 at additional SPE injection (μm) (mean $\pm$ SD)	Mean oocyte diameter*4 at DHP injection (μm) (mean $\pm$ SD)	Weight of ovulated eggs/Body weight at DHP injection (%) (mean $\pm$ SD)
Stripping-insemination group*1	15	14	610 ± 126	137 ± 5	8.9 ± 2.0	830 ± 21	916 ± 15	33 ± 6
Spontaneous spawning group A*2	9	9	604 ± 79	137 ± 7	9.2 ± 1.2	830 ± 43	899 ± 28	32 ± 5 *5
Spontaneous spawning group B*3	15	12	660 ± 156	137 ± 4	8.8 ± 1.5	841 ± 39	906 ± 25	29 ± 9 *5

*1 Stripping-insemination group, injected with salmon pituitary extract (SPE) at 20°C .

*2 Spontaneous spawning group A, injected with SPE at 18°C .

*3 Spontaneous spawning group B, injected with SPE at 20°C .

*4 Diameters were measured using 20 egg samples.

*5 Weight of spawned eggs (= Body weight at DHP injection - Body weight after spawning) / Body weight at DHP injection $\times 100$.

Table 2 Egg quality parameters in three experimental groups

Experimental group	No. of fish injected with DHP	No. of fish ovulated	Fertilization rate* ¹ (%) (mean $\pm$ SD)	Hatching rate* ² (%) (mean $\pm$ SD)	Survival rate at 5 DAH* ³ (%) (mean $\pm$ SD)	The rate of deformed larvae at 5 DAH* ⁴ (%) (mean $\pm$ SD)	Hatching rate of fertilized eggs* ⁵ (%) (mean $\pm$ SD)	Survival rate at 5 DAH, of hatched larvae* ⁶ (%) (mean $\pm$ SD)
All of ovulated fish								
Stripping-insemination group	15	14	41 $\pm$ 32	31 $\pm$ 29* ⁷	27 $\pm$ 25	79 $\pm$ 19	73 $\pm$ 22	87 $\pm$ 13
Spontaneous spawning group A	9	9	85 $\pm$ 10	63 $\pm$ 29* ⁸	55 $\pm$ 27	66 $\pm$ 16	73 $\pm$ 33	85 $\pm$ 12
Spontaneous spawning group B	15	12	80 $\pm$ 14	62 $\pm$ 23	54 $\pm$ 22	60 $\pm$ 23	76 $\pm$ 21	85 $\pm$ 10
Fish ovulated before 15 hrs of DHP injection								
Stripping-insemination group	15	5	60 $\pm$ 27	45 $\pm$ 30	40 $\pm$ 29	76 $\pm$ 29	71 $\pm$ 26	82 $\pm$ 18
Spontaneous spawning group A	9	7	84 $\pm$ 11	65 $\pm$ 30	56 $\pm$ 28	66 $\pm$ 18	75 $\pm$ 34	86 $\pm$ 14
Spontaneous spawning group B	15	9	82 $\pm$ 12	67 $\pm$ 22	57 $\pm$ 22	62 $\pm$ 22	80 $\pm$ 19	83 $\pm$ 11
Fish ovulated after 15 hrs of DHP injection								
Stripping-insemination group	15	9	31 $\pm$ 31	22 $\pm$ 26	19 $\pm$ 21	80 $\pm$ 11	75 $\pm$ 22	90 $\pm$ 10
Spontaneous spawning group A	9	2	90 $\pm$ 1	58 $\pm$ 34	50 $\pm$ 30	69 $\pm$ 11	66 $\pm$ 39	84 $\pm$ 4
Spontaneous spawning group B	15	3	75 $\pm$ 21	49 $\pm$ 24	44 $\pm$ 23	51 $\pm$ 26	65 $\pm$ 26	90 $\pm$ 3

*¹ Fertilization rate = 100 $\times$ Number of fertilized eggs / Initial number of eggs in micro plate.

*² Hatching rate = 100 $\times$ Number of hatched larvae / Initial number of eggs in micro plate.

*³ Survival rate at 5 DAH = 100 $\times$ Number of live larvae 5 days after hatching / Initial number of eggs in micro plate. The larvae incubated at 28°C develop to feed firstly at 5 days after hatching.

*⁴ Rate of deformed larvae at 5 DAH = 100 $\times$ Number of deformed live larvae / Number of live larvae 5 days after hatching in micro plate.

*⁵ Hatching rate of fertilized eggs = 100 $\times$ Number of hatched larvae / Number of fertilized eggs in micro plate.

*⁶ Survival rate at 5 DAH of hatched larvae = 100 $\times$ Number of live larvae 5 days after hatching / Number of hatched larvae in micro plate.

*⁷ Hatched larvae obtained from 13 females.

*⁸ Hatched larvae obtained from 8 females.

79 $\pm$ 19%, 66 $\pm$ 16%, 60 $\pm$ 23% であった。搾出媒精区と自発産卵 B 区の間 ($p < 0.025$) には有意差が認められたが、搾出媒精区と自発産卵 A 区の間、および自発産卵 A 区と自発産卵 B 区の間には有意差は認められなかった。

また受精卵中孵化率は搾出媒精区、自発産卵 A 区、自発産卵 B 区の順に、73 $\pm$ 22%, 73 $\pm$ 33%, 76 $\pm$ 21% で、各実験区間に有意差は認められなかった。孵化後生残率は搾出媒精区、自発産卵 A 区、自発産卵 B 区の順に、87 $\pm$ 13%, 85 $\pm$ 12%, 85 $\pm$ 10% であり、実験区間に有意差は認められなかった。

排卵時間帯別の卵質 続いて DHP 投与後 15 時間 (Fig. 1, *4) 以前の排卵例と 15 時間以後の排卵例に分けて、それぞれの卵質指標を算出し排卵時間帯間で比較した (Table 2)。搾出媒精区の 15 時間以前と 15 時間以後の排卵群において、受精率は 60 $\pm$ 27% と 31 $\pm$ 31%, 孵化率は 45 $\pm$ 30% と 22 $\pm$ 26%, 生残率は 40 $\pm$ 29% と 19 $\pm$ 21%, 奇形率は 76 $\pm$ 29% と 80 $\pm$ 11% であった。また、受精卵中孵化率は 71 $\pm$ 26% と 75 $\pm$ 22%, 孵化後生残率は 82 $\pm$ 18% と 90 $\pm$ 10% であった (Table 2)。搾出媒精区において、15 時間以前の排卵群の受精率、孵化率、生残率は 15 時間以後の排卵群より約 2 倍高い値を示したものの、有意差は認められなかった。奇形率、受精卵中孵化率、孵化後生残率は 15 時間前後で近い値を示し、有意差は認められなかった。

自発産卵 A 区において、DHP 投与から 15 時間前後

の受精率はそれぞれ 84 $\pm$ 11% と 90 $\pm$ 1%, 孵化率は 65 $\pm$ 30% と 58 $\pm$ 34%, 生残率は 56 $\pm$ 28% と 50 $\pm$ 30%, 奇形率は 66 $\pm$ 18% と 69 $\pm$ 11%, 受精卵中孵化率は 75 $\pm$ 34% と 66 $\pm$ 39%, 孵化後生残率は 86 $\pm$ 14% と 84 $\pm$ 4% であった。自発産卵 A 区においては 15 時間前後の全ての卵質指標で同様な値を示し、有意差は認められなかった。

また自発産卵 B 区において DHP 投与から 15 時間前後の受精率はそれぞれ、82 $\pm$ 12% と 75 $\pm$ 21%, 孵化率は 67 $\pm$ 22% と 49 $\pm$ 24%, 生残率は 57 $\pm$ 22% と 44 $\pm$ 23%, 奇形率は 62 $\pm$ 22% と 51 $\pm$ 26%, 受精卵中孵化率は 80 $\pm$ 19% と 65 $\pm$ 26%, 孵化後生残率は 83 $\pm$ 11% と 90 $\pm$ 3% であった。自発産卵 B 区においては、15 時間前後の孵化率、生残率、奇形率、受精卵中孵化率は差が 10% 以上あり、自発産卵 A 区の卵質指標に比べて差は大きかったが、有意差は認められなかった。このように自発産卵 A 区、自発産卵 B 区の卵質は DHP 投与から 15 時間前後で比較的近い値を示し、有意差も認められなかった。

次に DHP 投与から 15 時間以前の卵質を、搾出媒精区と自発産卵 A 区、および搾出媒精区と自発産卵 B 区の間で比較した。受精率は両方共有意差があったが (共に $p < 0.05$)、孵化率、生残率、奇形率、受精卵中孵化率および孵化後生残率について有意差は認められなかった (Table 2)。DHP 投与から 15 時間以後の卵質を、同様に搾出媒精区と自発産卵 A 区および搾出媒精区と

自発産卵 B 区の間で比較した。受精率（搾出媒精区と自発産卵 A 区： $p < 0.005$ ，搾出媒精区と自発産卵 B 区： $p < 0.05$ ）と奇形率（搾出媒精区と自発産卵 B 区： $p < 0.025$ ）では有意差が認められたが，孵化率，生残率，受精卵中孵化率および孵化後生残率について有意差はなかった。なお自発産卵 A 区と自発産卵 B 区の間には，DHP 投与から 15 時間以前においても，15 時間以後においても，相互に比較的近い値を示し，有意差は認められなかった。

考 察

本研究の 3 つの実験区で得られた卵の受精率，孵化率，生残率は，いずれも自発産卵 A 区と自発産卵 B 区が搾出媒精区に対して有意に高く約 2 倍の値を示した。また奇形率は，自発産卵 B 区が搾出媒精区に比べて有意に低く，平均値で約 19% の差があった。自発産卵 A 区も搾出媒精区に対して，有意差はなかったものの平均値で約 13% の低値をとった。DHP 投与 15 時間以内の排卵例について，本研究の搾出媒精区の受精率を，同方法で得られた卵について同じ式で計算した Kagawa *et al.*¹²⁾ の結果と比較したところ，近い値であり，有意差は認められなかった。また発生水温は異なるが孵化率も近い値であった。従って，本研究の搾出媒精区の結果が他の研究に比べて低値であったということではなく，比較のための基準となりうる。すなわち本研究の結果から，少なくとも現行の 20°C 一定の水温条件による搾出媒精法より，本研究の昇温を伴う自発産卵法の方が優れ，後者をより洗練させることで今後さらに卵や仔魚の質を向上させ得る可能性のあることが明らかとなった。

マイクロプレート収容全卵数を分母とした孵化率，生残率と異なり，受精卵中孵化率および孵化後生残率は 3 実験区とも近い値であり有意差は認められなかった（Table 2）。このことから，上記孵化率と生残率における差はそもそも受精率の差に由来するものと考えられた。従って，本研究における自発産卵の長所は高い受精率と比較的低い奇形率にあるといえる。

授精条件と卵質サンプルの安定化のための対策 搾出媒精法には精子の質や媒精量等授精条件や卵質サンプルの安定性について有利な点があり過去の研究でも採用されてきた。⁹⁻¹⁴⁾ まず①産卵行動に頼ること無く運動活性を有する精子を必要量供給可能である。②排卵した卵を確実にほぼ全量得られる。また受精後においても③搾出された全ての卵から無作為にサンプルを抽出するので卵全体の卵質の指標が得られる。これらに対して自発産卵で不利と見える点もあるので，対策を講じた。授精条件に関しては供給量と運動活性を保証するため，選抜された排精中の雄親魚を雌親魚 1 尾に対し 3 尾用意し，さ

らに雌親魚への DHP 投与と同時に雄親魚には HCG と 17 α -P を投与している。²³⁾ この 18 時間後も雄親魚は精液を放出しているため，本研究での産卵予定時間内には精子供給は続いていると考えられる。必要十分な授精条件の程度は不明であるが，授精条件が卵質の変動要因とならぬよう可能な範囲で対処した。排卵量に関しては，排卵した雌親魚数が自発産卵 B 区でやや少なかったが，DHP 投与時体重に対する排卵重量比は搾出媒精区と有意差が認められなかったため，問題ないであろう（Table 1）。自発産卵法では排出された卵は産卵水槽内で比重差によって偏在する場合があるが，1 m³ 程度の容積であれば手作業と通気によって攪拌可能である。さらに 2 L の海水と共に卵を回収し濃縮した後は，搾出媒精法と同様の操作でサンプルを抽出している。自発産卵法において卵質の数値の信頼性を維持するには産卵水槽からのサンプリングに留意しなければならない。産卵水槽の規模如何では放出卵全てを対象に濃縮することも検討する必要がある。

親魚の成熟 DHP 投与までの成熟状況を見ると，最終 SPE 注射日（Fig. 1, *2）と DHP 投与日（Fig. 1, *3）での 3 実験区の雌魚の卵径に有意差は無く，体重変化にも有意差が無かった（Table 1）。従って 3 実験区共，成熟に大きな差はない状態で DHP を投与され，最終成熟段階に入ったといえる。その後 15 時間（Fig. 1, *4）以前に排卵する個体は自発産卵 A 区と自発産卵 B 区で多く，共に排卵した親魚の約 3/4（自発産卵 A 区は 9 尾中 7 尾，自発産卵 B 区は 12 尾中 9 尾）であったのに，搾出媒精区では約 1/3（14 尾中 5 尾）と少なかった。これは自発産卵 A 区，自発産卵 B 区では DHP 投与後の水温が搾出媒精区に比べ 2°C 高かったためと考えられる。²⁵⁾

DHP 投与から排卵までの所要時間と卵質 搾出媒精法を採用した Ohta *et al.*⁹⁾ は DHP 投与後排卵までの時間が短い個体は受精率・孵化率が良いことを見ている。Kagawa *et al.*¹²⁾ は DHP 投与から 15 時間以前の受精率と孵化率が，15 時間以後のそれらより有意に高いことを示した。本研究でも搾出媒精区の DHP 投与から 15 時間以前の早期排卵群は，15 時間以後の排卵群に比べて，有意ではないものの約 2 倍高い受精率，孵化率，生残率を示した（Table 2）。搾出媒精区で早期排卵群の卵質が高い値を示したことは，Ohta *et al.*⁹⁾ および Kagawa *et al.*¹²⁾ と合致する。

自発産卵 B 区においては，孵化率，生残率，奇形率，受精卵中孵化率は 15 時間以前と以後の排卵群の差が 10% 以上あったものの，有意差は認められなかった。自発産卵の 2 区の卵質は，15 時間以前と 15 時間以後との間で搾出媒精区ほどの差はなかった。このことから自発産卵 A 区と自発産卵 B 区では 15 時間以前の早

期排卵個体の割合が搾出媒精区よりも多く、そのために全体の卵質が高いわけではなく、排卵時期によらず搾出媒精区よりも高い質の卵・仔魚が得られたためと考えられた。この差は特に受精率において顕著にみられ、15時間以後の値だけでなく、比較的高い受精率を示した15時間以前の値を比べても搾出媒精区より自発産卵2区の方が有意に高い値を示しており、昇温を伴う自発産卵法は、従来の採卵法である水温一定の搾出媒精法に対して卵質の向上が明らかである。

以上の比較結果を勘案すると、自発産卵A区と自発産卵B区における高い受精率は、Ohta *et al.*⁹⁾およびKagawa *et al.*¹²⁾が搾出媒精法でみたDHP投与から排卵までの所要時間の違いによる卵質の差だけでは説明できない。次節で述べる自発産卵の特徴により、本研究の自発産卵2区に高い卵質がもたらされていると考えられる。

自発産卵の特徴と卵質 自発産卵の特徴とは、親魚自身の生理的状态に従って自発的な排卵・放卵と受精までの一連の出来事が進行することである。自発産卵法では、成熟した雌雄親魚が同一水槽内にいて相互に影響し産卵行動に至る。²¹⁾ Boetius and Boetius²⁶⁾は成熟したヨーロッパウナギの雌親魚に対する雄親魚の性行動を観察している。雌親魚には、雄の性フェロモンや接触刺激、視覚刺激などが影響するものと考えられる。本研究の自発産卵A区と自発産卵B区では投与されたDHPや昇温による卵巣への直接的影響があろう。しかし、他にも何らかの雄魚の性行動や精液等の刺激があって雌魚の排卵や放卵が促され、各個体の最適のタイミングで受精が行われたものと推察される。

Satoh *et al.*²¹⁾は飼育水温を上昇させることが雌雄親魚の産卵行動を誘導するものと考えている。自発産卵にとって昇温は産卵行動の動因レベルを上昇させる外的要因として重要と考えられる。本研究の自発産卵A区と自発産卵B区ではDHP投与後20℃から22℃へ昇温したために産卵行動が誘導され、結果的に20℃一定に保たれた搾出媒精区よりも早い時間帯に排卵する個体が多く現れたものと考えられる。ただし、各々の雌雄親魚の組合せにおいて排卵や放卵が最適のタイミングで自発的に行われると推察されるので、中にはDHP投与後比較的遅く産卵が起こる場合もある。そのため自発産卵A区と自発産卵B区でDHP投与から15時間以後の排卵群の卵質も、15時間以前の排卵群同様に高くても矛盾はない。このため自発産卵では必ずしも早期排卵が高い卵質の絶対的な条件となっていないものと考えられた。

自発産卵には、自発的に体外へ放卵するという重要な要素がある。搾出媒精法と自発産卵法は、DHP投与から腹腔内への排卵までは同様の過程を経ていると考えられるが、排卵から放卵（搾卵）までの間の卵にとっての

環境は異なる。搾出媒精法では排卵後人間が手を加えて体外に卵を放出させることを前提としており、それまで卵は腹腔内に留まっている。仮に本研究の搾出媒精区でDHP投与から15時間以前の排卵があっても、雄魚の刺激や昇温による動因レベルの上昇がないため、卵は多くの場合放出されないであろう。腹腔内で卵が留まっていた場合、排卵後時間経過と共に卵質が低くなる。⁹⁾ 一方、自発産卵は人間の手による排卵の確認を行う必要がなく、親魚自身が自発的に排卵・放卵を実行するので、放出された卵は腹腔内の滞留による卵質の低下の可能性が少ない。早期排卵群でも本研究の搾出媒精区の卵質が自発産卵2区より低かったことの原因には（Table 2）、排出卵の腹腔内滞留に関与しているものと考えられる。トラフグ *Takifugu rubripes*,²⁷⁾ プリ *Seriola quinqueradiata*²⁸⁾でも排出卵の腹腔内滞留による受精率の低下が報告されている。

採卵者にとって搾出媒精法では、卵を搾る前に雌親魚が放卵して媒精不能となる危険は、確率が低いとはいえ避けられない。早期排卵に対応して予想外の放卵を防ぎつつ搾出と媒精を行うには排卵確認のハンドリング頻度を増やす必要があり、これは親魚へのストレスとなる場合もある。^{27,28)} さらに過剰なハンドリングで未熟な卵が放出される可能性もある。

このように自発産卵2区では、自発産卵法の雌雄親魚の「自発性」が最適のタイミングの排卵・産卵および放精を導き、受精が成立する環境にある。このため自発産卵2区で高い受精率が得られ、良質卵の産出につながっているものと考えられる。

搾出媒精法における排卵時間に対する昇温の影響 搾出媒精区ではDHP投与後排卵までの所要時間が卵質に影響することが見られ、Kagawa *et al.*¹²⁾やOhta *et al.*⁹⁾の実験結果と一致した。香川²⁵⁾はDHP投与後に水温を上昇させることによってこの排卵までの時間を短縮することができるとし、排卵が温度により強い影響を受けることを示している。香川²⁵⁾ではDHP投与後20℃から25℃へ上昇させた群で12～14時間目に排卵し、20℃一定の群にくらべ排卵が早まった。ただ受精率や孵化率などの卵質は低かったが、これは25℃の水温が高すぎたことによるものと考察している。本研究の自発産卵2区のDHP投与後の水温22℃は香川²⁵⁾に比べれば3℃低い、20℃一定の本研究の搾出媒精区よりも受精率、孵化率、生残率、奇形率において良い結果を得ており、まず適切な昇温幅であったと推察される。従って本研究の搾出媒精区でもDHP投与後22℃に昇温すれば早期排卵例を増やし、卵質も向上したものと推測される。今後、同一の水温条件下で各採卵法における卵質を比較することにより、搾出媒精法と自発産卵法の双方に有益な新しい情報ももたらされるであろう。

卵形成中の水温 前述のように自発産卵 A 区と自発産卵 B 区は SPE 投与期間の水温条件が違い 2°C の差がある。本研究では Satoh *et al.*²¹⁾ を基に自発産卵 A 区の催熟水温条件を 18°C に設定していたが、受精率、孵化率、生残率、奇形率で卵質を比較すれば 20°C の自発産卵 B 区と有意差はなく (Table 2), ほぼ両区同等であった。DHP 投与後 15 時間前後で区切ってこれらの指標を比較しても自発産卵 A 区と自発産卵 B 区では差がなかった。従って, SPE 投与期間の水温条件を Satoh *et al.*²¹⁾ による設定より 2°C 高くして, 20°C 一定としても卵質に変化はなかったと結論できる。すなわち本研究により DHP 投与後の昇温だけで自発産卵を誘導できることが明らかとなり, 自発産卵法の実用性が向上した。

結論 本研究は将来の大量種苗生産を標榜し, 卵質指標を評価の基準とした, 実践的な採卵方法の比較である。搾出媒精区と自発産卵 B 区の違いは DHP 投与後の採卵方法だけであるが, 卵質は大きく異なった。本研究における自発産卵は, ①雌雄親魚のペアリングと②その後の 2°C の昇温を特徴としている。その結果, 得られる卵・仔魚の受精率, 孵化率, 生残率, 奇形率などの卵質において現行の水温条件による搾出媒精法に比べて高い成績であった。このことから採卵法を検討することにより卵質を向上させ得る可能性が示された。もちろん搾出媒精法は水温条件を改変することで採卵成績が現行法より向上する可能性はあるが, 本研究の結果から, 自発産卵法は大量種苗生産へ通ずる技術として検討するに値するであろう。すなわち自発産卵法のメリットは①産卵行動が自発的に触発されて早期に排卵・放卵が起こること, ②親魚自身のタイミングにより放卵されるので「適正な」成熟度の良質卵が得られること, および③放卵後直ちに受精でき卵質低下を招かないことが挙げられる。ただ先述のように交配のペアは限定されてしまい, また直接環境中に放卵するため育種や生理学などの実験的研究の手法としては不利な点もある。

一方, 搾出媒精法は交配のペアを自由に選ぶことができ, また未受精卵の状態で採卵できるので各種の実験研究用に必要不可欠な手法といえる。ニホンウナギの人工種苗生産技術の開発研究には, 自発産卵法と搾出媒精法とを適宜使い分け, 活用することが肝要である。

謝 辞

本研究を実施するにあたり, 媒精方法と卵質評価方法に関して独立行政法人水産総合研究センターの養殖研究所生産技術部繁殖研究グループの田中秀樹グループ長ならびに日本海区水産研究所業務推進部の鶴沼辰哉氏に多くの御助言・御指導をいただいた。謹んで感謝申し上げます。なお本研究はいらご研究所業績 No. 032 である。

文 献

- 1) Tatsukawa K. Eel resources in East Asia. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (eds). Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo. 2003; 293-298.
- 2) 加藤雅也. 日本のウナギ資源の減少, 原因, 対策. 月刊海洋 1999; 号外 18: 174-177.
- 3) 日比谷 京. ウナギの完熟採卵に成功. 養殖 1966; 3: 12-15.
- 4) Fontaine M, Bertrand E, Lopez E, Callamand O. Sur la maturation des organes genitaux de l'Anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'émission spontanée des oeufs en aquarium. C. R. Acad. Sc. Paris 1964; 259: 2907-2910.
- 5) Yamamoto K, Yamauchi K. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature 1974; 251: 220-222.
- 6) 佐藤英雄. ウナギの完全飼育をめざす. 遺伝 1979; 33: 23-30.
- 7) 立木宏幸. 養成親魚育成技術. 「ウナギの初期生活史と種苗生産の展望, 水産学シリーズ 107」(多田 修編) 恒星社厚生閣, 東京. 1996; 85-94.
- 8) Chiba H, Iwatsuki K, Hayami K, Yamauchi K. Effects of dietary estradiol-17 β on feminization, growth and body composition in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). Comp. Biochem. Physiol. 1993; 106A: 367-371.
- 9) Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Hirose K. 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 1996; 139: 291-301.
- 10) Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Iinuma N, Hirose K. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish Physiol. Biochem. 1997; 17: 163-169.
- 11) Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Hirose K. Milt production in the Japanese eel *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. Fish. Sci. 1996; 62: 44-49.
- 12) Kagawa H, Tanaka H, Ohta H, Okuzawa K, Iinuma N. Induced ovulation by injection of 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the artificially matured Japanese eel, with special reference to ovulation time. Fish. Sci. 1997; 63: 365-367.
- 13) Tanaka H, Kagawa H, Ohta H. Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. Aquaculture 2001; 201: 51-60.
- 14) Tanaka H, Kagawa H, Ohta H, Unuma T, Nomura K. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. Fish Physiol. Biochem. 2003; 28: 493-497.
- 15) Tanaka H. Techniques for larval rearing. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (eds). Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo. 2003; 427-434.
- 16) 村上速雄. Ⅲ-1. 成体の確保と採卵. A マダイ. (1) 伯方島事業場. 日本栽培漁業協会事業年報・昭和 62 年度, ㈱日本栽培漁業協会, 東京. 1989: 15-16.
- 17) 松本 淳. Ⅲ-3. 種苗生産技術の開発. A マダイ. (1) 伯方島事業場. 日本栽培漁業協会事業年報・昭和 62 年度, ㈱日本栽培漁業協会, 東京. 1989: 132-135.
- 18) 渡辺研一. Ⅲ-1. 成体の確保と採卵. B ヒラメ. (1) 宮古事業場. 日本栽培漁業協会事業年報・昭和 62 年度, ㈱日本栽培漁業協会, 東京. 1989: 16.
- 19) 岩本明雄. Ⅲ-3. 種苗生産技術の開発. B ヒラメ. (1) 宮

- 古事業場. 日本栽培漁業協会事業年報・昭和62年度, 日本栽培漁業協会, 東京. 1989: 139-147.
- 20) 田中秀樹, 野村和晴, 山本剛史, 奥 宏海. ウナギ仔魚用飼料・飼育システムの開発—世界で初めてシラスウナギの人工生産に成功—. 水産総合研究センター研究報告, 2006; 別冊 5: 63-69.
- 21) Satoh H, Yamamori K, Hibiya T. Induced spawning of the Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; **58**: 825-832.
- 22) Unuma T, Kondo S, Tanaka H, Kagawa H, Nomura K, Ohta H. Determination of the rates of fertilization, hatching and larval survival in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, using tissue culture microplates. *Aquaculture* 2004; **241**: 345-356.
- 23) 山田 智, 小林隼人, 柳澤豊重, 中嶋康生, 岩田友三, 中川武芳. 2 成熟・産卵制御技術の確立. 平成10年度重要種苗対策調査委託事業報告書 (レプトケファレス育成技術開発事業), 愛知県水産試験場内水面漁業研究所, 愛知. 1999: 12-19.
- 24) Okamura A, Yamada Y, Horie N, Utoh T, Mikawa N, Tanaka S, Tsukamoto K. Effects of water temperature on the early development of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* in press.
- 25) 香川浩彦. ウナギの卵成熟・排卵および卵質に及ぼす要因の解明. 水産総合研究センター研究報告, 2006; 別冊 5: 39-44.
- 26) Boetius I, Boetius J. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1980; **1**: 1-28.
- 27) 中田 久, 松山倫也, 原 洋一, 矢田武義, 松浦修平. トラフグの人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係. 日水誌 1998; **64**: 993-998.
- 28) 中田 久, 中尾貴尋, 荒川敏久, 松山倫也. プリの人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係. 日水誌 2001; **67**: 874-880.