令和元年度水産学技術賞

ウナギ生殖腺刺激ホルモンを用いた人為催熟・採卵技術の高度化と
その応用に関する研究風 藤 行 紀,^{1*} 田 中 寿 臣²¹水産教育・研究機構 増養殖研究所, ²静岡県水産・海洋技術研究所 浜名湖分場Study on artificial induction of maturation and ovulation in Japanese eel using
the recombinant gonadotropins: application to the seed productionYUKINORI KAZETO^{1*} AND TOSHIOMI TANAKA²¹National Research Institute of Aquaculture, Japan Fisheries Research and Education Agency, Watarai, Mie 519-0423,²Hamanako Branch, Shizuoka Prefectural Research Institute of Fishery and Ocean, Hamamatsu, Shizuoka 431-0214, Japan

1. 背景

ウナギは、日本の水産養殖業において非常に重要であるが、養殖種苗用のシラスウナギは完全に天然に依存している。また、天然のシラスウナギの漁獲量は年ごとに大きく変動し、近年では大幅な減少傾向にある。そのため、その価格は大きく乱高下し、養鰻業者の経営上の大きな問題となっており、安定した人工種苗の供給が強く望まれている。しかし、本種は雌雄共に飼育環境下では殆ど成熟が進行しないため、人為的な成熟誘導（人為催熟）なしでは、人工種苗生産は不可能である。一般に魚類の人為催熟は、天然の産卵環境を参考にした環境操作、あるいは成熟を制御するホルモンの投与により行われる。ウナギの産卵場所は太平洋外洋域である西マリアナ海嶺付近であることは分かっているが、¹⁾同海域に達するまでの生活環境等、産卵生態の多くが不明であるため、適切な環境操作による人為催熟は非常に困難である。そのため、本種では主にホルモン投与による人為催熟・採卵が行われて来た。魚類の成熟には様々なホルモンや成長因子が関与しているが、脳の視床下部で産生される生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）、脳下垂体で産生される生殖腺刺激ホルモン（GTH）、その刺激により生殖腺で産生される性ステロイドホルモンが最も主要な因子である。なかでもGTHは、脊椎動物を通して成熟制御の中心的な役割を果たしている。ウナギの人為催熟にはウナギ自身のGTHを用いるのが適当と考えられるが、そもそも飼育下では脳下垂体に十分なGTHが蓄積されないためにウナギが成熟しないことが分かっており、催熟に必要となる大量のウナギGTHを

生物試料から調整することは不可能である。そのため、雌ウナギでは比較的容易に大量に入手が可能なシロサケの脳下垂体から調整した抽出液（SPE）等を、雄ウナギでは市販のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）を用いて人為催熟が試みられ、雌雄ともに成熟親魚を得ることが可能となっている。さらに、ホルモン投与の量、タイミング、水温など親魚の管理条件の検討を繰り返すことにより、ある程度の孵化仔魚を得ることが可能となった。²⁾しかし、異種ホルモンによる人為催熟では、雌では卵質が安定せず概ね低く、雄に関しても精子の質に個体間で大きな差があり受精に適さない場合も散見された。さらに雄では、十分な精液が得られる個体の割合が低い（30-40%）と言った問題も残されたままであった。このように異種ホルモンによるウナギの人為催熟・採卵では多くの問題が存在し、しかも更なる最適化も困難な状況にあり、抜本的な手法の再構築が必要であると考えられていた。

2. 組換えウナギ GTH 大量生産系の確立

GTHには濾胞刺激ホルモン（FSH）と黄体形成ホルモン（LH）の2種類が存在し、両者が協調的に働くことにより、正常な配偶子形成が誘導される。そこで先ず、ヒト腎臓293細胞を用いた一過性の組換えタンパク質発現系による、組換えウナギFSH（rFSH）およびLH（rLH）の発現を試みた。その結果、これら組換えGTH（rGTH）が比較的高いレベルで発現することを見出すと共に、これらrGTHを利用してFSHおよびLHの高感度な測定系を確立した。³⁾更に、rGTHに哺

* Tel : 81-596-58-6411. Fax : 81-596-58-6413. Email : kazeto@fra.affrc.go.jp

乳類の糖タンパク質中に存在する O-型糖鎖結合部位を付加すると、rGTH の生体内寿命が延長化すること、これに伴い成熟誘導能が高まることも明らかとなった。しかし、一過性の発現系では組換えタンパク質の発現手順が煩雑で且つコストが高いため、ウナギの人為催熟に十分な量の rGTH を安価に作製することが出来なかった。そこで、チャイニーズハムスターの卵巢細胞を用いた rFSH および rLH の恒常発現系の確立を試み、商業レベルでの大量生産系の構築に成功した。これら一連の技術は一般企業に移転され、現在ではウナギ rGTH は市販され、必要に応じて誰でも購入可能となっている。これら成果により、ウナギ rGTH を用いた配偶子形成制御メカニズムの研究および得られる基礎生物学的知見を応用した人為催熟・採卵の最適化の実験を繰り返し行うことが可能となった。

3. GTH のウナギ精子形成における役割

従来、雄ウナギの人為催熟は、市販品が安価に購入できると言う理由でヒト由来の GTH である hCG が用いられてきた。しかし、十分な量の精液を採取出来る個体の割合が低い、得られる精液に含まれる精漿の割合が低くスパマトクリット値が高い、精子の運動能が個体間で大きくばらつく等、解決すべき大きな問題点が多く存在した。そこで、rFSH および rLH の精子形成における作用を投与実験により調べ、hCG のものと比較した。rLH あるいは hCG 投与すると、精子形成の著しい進行に伴い精漿が急激に増大するのに対し、rFSH 投与では精漿の発達は誘導されるものの、大きさは hCG や rLH の場合に比べて半分以下に留まることが分かった。また、rLH を投与すると、全ての個体で、得られる精液の量は hCG および rFSH に比べ 5-10 倍と非常に多く、更にスパマトクリット値が有意に低いこと、精液に含まれる精子の運動率が高いことも明らかとなった。その後、様々な条件で投与実験を繰り返した結果、雄ウナギの人為催熟には rLH を単独で投与するのが最適であることが実証された。新しく確立したウナギ雄親魚の催熟方法では、全ての個体において従来法の hCG を用いた場合と比べ、運動活性の高い精子を含む粘性の低い精液を、安定して大量に得ることが可能となり、これまでの雄ウナギ催熟における主な問題点は全て解決された。

4. GTH のウナギ卵形成における役割

雌ウナギの人為催熟は、GTH を大量に含むと考えられる SPE の投与により行われてきた。しかし、サケ脳下垂体には GTH 以外の様々な内分泌因子が含まれており、実際にはどんな因子がどの程度の量で投与されているか、これら様々な因子が卵巢の発達にどのような影響を及ぼしているかは全く不明であった。そのためか、SPE

図1 rFSH により人為催熟した雌ウナギ

催熟では卵巢中の卵母細胞は同調して発達しない場合が多く、得られる卵には未熟なものから過熟なものまで様々な状態のものが含まれ、卵質が低いことが大半であった。そこで、rFSH、rLH および SPE を投与した場合の卵母細胞の発達過程を詳細に調べた。rFSH や SPE を投与すると 8-10 週間で採卵可能な核移動期に達するのに対し、rLH 投与では約半分の期間で同ステージに達し、高い成熟誘導能を示した。一方、rFSH 投与により催熟すると、卵巢の発達が著しく、核移動期以降、rLH や SPE に比べて、その大きさが 1.2-1.5 倍に達した (図 1)。また、この卵巢の肥大化は、同調して発達する第一卵群の卵母細胞の割合の増大に起因することも明らかとなった。更に、同一卵巢中にある核移動期の卵母細胞を観察すると、rFSH 投与群では、油球の大きさ (油球ステージ) の揃ったものが大半を占めていた。以上の結果は、rFSH 催熟では適切な排卵誘導法が確立できた場合には、従来よりも多くの、ステージの揃った卵を獲得出来る可能性を示しており、雌ウナギでは rFSH による人為催熟が最適であると考えられた。また、生体外および生体内の系を用いて、卵母細胞の最終成熟および排卵に関する実験を繰り返し行なったところ、これらは rLH によってのみ誘導されることが明らかとなった。これらのことは、ウナギ雌親魚では、rFSH を核移動期に達するまで投与した後 rLH 投与することで、最終成熟・排卵を誘導出来る可能性を強く示唆していた。

5. rGTH 等を用いた人工授精法によるウナギ採卵技術の高度化

上述の様に、rLH 催熟により、雄では全ての個体から確実に良質の精液を大量に得ることが可能となった。そのため、人工授精法の高度化では、安定して質の高い卵を得ることが可能となる、卵母細胞の最終成熟・排卵の誘導法の確立が重要な課題であった。また、人為催熟

は rFSH で、最終成熟・排卵は rLH で誘導するのが適切と考えられていたため、まず、最終成熟・排卵誘導に用いる rLH の投与量の検討を行なった。更に、従来の SPE を用いた採卵 (SPE 法) では排卵誘導に卵成熟誘起ステロイド (OHP あるいは DHP) を用いていたため、その必要性の有無も併せて検討した。その結果、rFSH の最後の投与から 2 日後に rLH を高濃度で投与し、更に 1 日後に OHP を投与すると最も効果的に排卵を誘導出来ることが明らかとなった。この方法で得られる卵は、油球ステージが均一で、且つその量は SPE 法の約 1.5 倍となり、上述の rFSH 催熟が卵母細胞の発達に及ぼす特徴と非常に良く一致した。しかし、この方法では、効率的に大量の卵は得られるものの、これらを rLH 催熟雄から得られた精液を用いた人工授精に供しても、卵質に関しては SPE 法と同等であった。そこで、卵質の更なる向上を目指して排卵誘導法の改良を試みた。すなわち、排卵誘導のために rLH を投与する代わりに、催熟過程でウナギ自身の脳下垂体に大量に蓄積される内因性の LH の放出促進を介して、最終成熟・排卵を誘導する方法の導入である。具体的には、GnRH アナログ (GnRHa) と LH 放出抑制作用を有するドーパミンの受容体のアンタゴニストであるピモジドを複合投与し、その 1 日後に OHP を投与 (GTH 法) した。この GTH 法により、最終成熟・排卵の誘導は更に安定し、OHP 処理 14–16 時間後に集中して、ほぼ全ての個体からの排卵誘導が可能となった。更に、孵化率、仔魚生残率等の各種卵質関連パラメーターも SPE 法に比べ高値を示し、卵質の最終評価指標として用いられている無給餌正常仔魚生残率が約 1.5 倍にまで向上した。この様に GTH 法では、新たに開発した rFSH 催熟法により

得られる卵量が、GnRHa とピモジドを用いた排卵誘導法により卵質が、それぞれ 1.5 倍となり、最終的には一尾の雌親魚から得られる正常孵化仔魚の獲得数は約 2 倍となった。

これら一連の研究により、難種苗生産種であるウナギから安定して、多量の良質卵の獲得が可能となり、同方法はウナギの種苗生産研究を行う各関係機関に普及されている。本研究は、対象種自身の GTH により人為催熟することで、異種ホルモンによる催熟と全く異なる配偶子形成が誘導され、それに伴い採卵成績が安定・向上する事が示された、世界で初めての事例である。また、生殖生理学的な基礎研究の積み重ねによる先進的な知見を、質の高い応用研究へと発展させた好例であり、本法の応用が異種ホルモンにより催熟・採卵している他の養殖対象種の卵質改善に資することが期待される。

文 献

- 1) Tsukamoto K, Chow S, Otake T, Kurogi H, Mochioka N, Miller MJ, Aoyama J, Kimura S, Watanabe S, Yoshinaga T, Shinoda A, Kuroki M, Oya M, Watanabe T, Hata K, Ijiri S, Kazeto Y, Nomura K, Tanaka H. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nat. Commun.* 2011; **2**: 179.
- 2) Kagawa H, Sakurai Y, Horiuchi R, Kazeto Y, Gen K, Imaizumi H, Masuda Y. Mechanism of oocyte maturation and ovulation and its application to seed production in the Japanese eel. *Fish. Physiol. Biochem.* 2013; **39**: 13–17.
- 3) Kazeto Y, Tanaka T, Suzuki H, Ozaki Y, Fukada H, Gen K. Development and validation of enzyme-linked immunosorbent assays specific for follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in Japanese eel. *Fish. Sci.* 2019; **85**: 829–837.