シナホリン投与による養殖ウナギの精巢催熟について

山本喜一郎・広井 修・平野 忠・森岡孝朗

(1972 年 5 月 22 日受理)

Artificial Maturation of Cultivated Male Japanese Eels
by Synahorin InjectionKiichiro YAMAMOTO*, Osamu HIROI**, Tadashi HIRANO***
and Takao MORIOKA*

Premature maturation was brought about in cultivated male Japanese eels by the injection of synahorin and the spermatogenesis of the fish was then studied cytologically. The results obtained were as follows:

1. The eels which were reared in sea water only showed on changes in testicular maturity in the early and late multiplication stages. Fish treated with synahorin, when transferred to sea water, exhibited a marked change in maturity and those injected with 200 or 300 ru synahorin showed marked secondary sex characters. Their testes, which arrived at the spermatocyte stage, after being treated four times with synahorin (each time with 100 ru), showed the appearance of spermatozoa in the lobule lumen, and after the sixth treatment with the hormone, the extrusion of sperm occurred in the fish. The spermatozoa obtained showed high motility in sea water.

2. The morphology of the germ cell during spermatogenesis has been described and it resembles that of *Anguilla vulgaris* already reported. Based on their histological characteristics, the testicular maturity of the eel has been divided into the following five stages. 1) early multiplication stage, 2) late multiplication stage, 3) spermatocyte stage, 4) sperm formation stage, 5) ripe stage.

近年わが国の養鰻業ではシラスウナギの不漁により慢性的な種苗不足をきたしており、そのためにウナギの人為催熟による人工種苗の生産が強く要望されている。

雄ウナギの人工催熟については、これまで TUZET and FONTAINE¹⁾ が *Anguilla vulgaris* で妊婦尿を、OLIVEREAU²⁾ は *Anguilla anguilla* で TSH を、また大上・飯塚^{3,4)}、日比谷⁵⁾、石田・石井⁶⁾らは日本産ウナギ (*Anguilla japonica*) でシナホリンを、それぞれ注射することにより成熟精子を得ることに成功している。しかしこれらの実験はいずれも天然ボク (下りウナギ) あるいは養ボクなどの高年令ウナギを材料として用いており、未熟な養殖ウナギを用いて人工催熟に成功した例はまだ報告されていない。

また上記の人工催熟の際の精巢成熟の組織学的観察は TUZET and FONTAINE¹⁾ の *Anguilla vulgaris* に就ての報告があるのみで、日本産ウナギについてはまだ行なわれておらず、日比谷⁵⁾の搾出された精子についての簡単な記載が認められるのみである。

著者らは未熟な日本産ウナギを海水に移行させると共に、シナホリンを注射し、その人為的成熟に成功したのでその結果を報告する。稿を進めるに先だち実験中種々援助を得た北大水産学部淡水増殖学講座高橋裕哉助教授、高野和則講師および同講座の職員、院生の各位に感謝の意を表する。

* 北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan)

** 北海道さけ・ます孵化場 (Hokkaido Salmon Hatchery, Sapporo, Japan)

*** 青森県水産増殖センター (Central Station of Fish Propagation, Aomori Pref., Hirauchi-machi, Higashisugaru-gun, Aomori Pref., Japan)

材料および方法

本研究には 1970 年 4 月 14 日函館市内の業者から購入した日本産ウナギ (*Anguilla japonica*) の雄 22 個体を用いた。それらの体重は 140-246 g, 体長は 45.4-57.5 cm であった。ウナギは容量約 50 l の水槽に 4 尾ずつ分けて収容し、実験期間中は自然光下で、水温を $19 \pm 2^\circ\text{C}$ に保ち給餌は行なわなかつた。ウナギは淡水から順次 1/3, 1/2, 3/4 海水に移して、それぞれ 1 週間馴致させた後、全海水に移し、さらに 6 週間飼育した。実験に用いた シナホリン (帝國臓器) は脳下垂体前葉 および 胎盤性の性腺刺激 ホルモンが 1:9 の割合に混合されているものである。1/2 海水に移す直前に第一回目のシナホリン注射を行ない、以後 1 週目毎に計 6 回注射した。各回とも予めウナギを 1/4000-1/5000 の濃度の MS 222 で麻酔した後、0.6% 食塩水 0.5 cc に溶かしたシナホリン 100 家兎単位を背部筋肉内に注射した。各回ともホルモンを投与した後 1 週間して実験群、対照群各 2 尾の精巢を採取して観察した。採取した精巢はブアン液、ツェンカーフォルモール液で固定し、脱水後、通常パラフィン法により包埋し、 6μ の切片とした。切片はデラフィールドのヘマトキシリンとエオシン、またはハイデンハイン鉄ヘマトキシリンとライトグリーンで染色し、組織学的観察を行なつた。精巢の成熟度は主として生殖細胞の精子形成過程の時期に基づいて判定したが、成熟が進み精子が形成された個体では HIROI and YAMAMOTO^{10,11)} に準じて、精子比率を以て成熟度をあらわした。すなわち後者の場合には無作為に選んだ各々 4 枚の切片を万能投影機を用いてトレーシングペーパーに転写し、精巢小葉内の生殖細胞の中で精子の占める部分の重量比を求め、これを百分率であらわし精子比率とした。

観 察 結 果

I. 精巢と生殖輸管の形態 本種の精巢は体腔の背側の鰓の両側に一葉ずつ懸垂されている細長い器官で、前方は肝臓の位置する部分に始まり、後部は肛門のさらに後方まで伸びている。左右両葉の長さはほぼ等しいが右側が幾分前方に位置している。未熟な精巢では半透明で、扁平で、小さな皺がある。成熟度が進むに従い精巢を形成する小葉片は長さも幅も増大し、また一方では不透明となり乳白色を呈するようになる。各葉には体腔壁に沿って縦に走る 1 本の輸精管がみられる。これらの輸精管は精巢の後方約 2/3 の付近で、それぞれ T 字型の太い管となつて下降し、最後は融合して 1 本の管となり、肛門の後方の泌尿生殖孔に開口する。成熟が進んだ精巢では輸精管から各小葉片の中へ輸精小管が入り込んでいる。成熟精子は小葉腔に集まり、輸精小管、輸精管を経て泌尿生殖孔より体外へ排出される。

II. 精子形成および精巢成熟度 ホルモン処理前の魚の精巢にみられる生殖細胞はすべて精原細胞であり (Fig. 1), 単独で存在するかまたは数個が集まり小群を形成し、精巢の大部分を占める結締組織の中に埋没している。これらの細胞は大部分休止期であるが中には分裂途上のものも認められる。細胞は大形で、円形または楕円形を呈し、その直径は $10-15 \mu$ で、大きな直径 $7-10 \mu$ の核と、これを取囲む薄い細胞質から成る。核はヘマトキシリンに濃染する 1 個の仁と核内に広く散在する染色質を有する (Fig. 7)。精原細胞の周囲に多くの場合後に包囊壁を形成すると推察される扁平な細胞層が観察される。小群をなして存在する精原細胞は一般に円形で、数が増すに従い小さくなる (Fig. 8)。このような生殖細胞を有する精巢の成熟度を前期増殖期とよぶことにした。

精原細胞は典型的な有糸分裂を繰り返す、数個から数十個の細胞よりなる包囊を形成する。この間に精原細胞の直径は減じ、 $7-9 \mu$ となり、また核も $5-7 \mu$ と小形となり核内には 2, 3 個の仁が認められる (Fig. 9)。精原細胞の増殖がさらに進み、その数が殖えるに従い包囊が次第に規則的に集まり小葉構造を示すようになる (Fig. 2)。一方小葉を囲む結締組織はその厚さを減ずる。この様な特徴を示す時期の精巢を後期増殖期とよぶことにする。

精原細胞はさらに活潑に増殖し、包囊が増大するに伴って、精巢小葉は大きくなり、円形を呈してくる。結締組織は小葉の間に薄くみられるだけになる。次いである包囊に第一次精母細胞が現われる様になる

(Figs. 3, 4)。精原細胞から第一次精母細胞への移行に伴って染色糸は複雑に入り組みヘマトキシリンに濃染されるようになる。やがて核内の仁は消失し、染色糸が核の一極に集つて対合が行なわれる (Figs. 10, 11)。その後染色糸は太く短くなつて再び核内に広がる (Fig. 12)。この間細胞の輪郭が不明瞭となるが核膜はなお明瞭に観察される。核径は約 5μ を示す。次いで核膜は消失し、染色体が赤道面にならんで第一次成熟分裂が行なわれる (Fig. 13)。分裂を終えると染色体は再びはぐれて核内に広がり、第二次精母細胞となる。第二次精母細胞は第一次精母細胞に比し、明らかに小さく、核径は約 3.5μ を示す (Fig. 14)。この時期の細胞は第一次精母細胞と比較して出現する頻度が遙かに低い。このことからこの時期は短かく、早急に第二次成熟分裂に移行するものと推察される。第二次成熟分裂も第一次成熟分裂と同じ過程を経て分裂が行なわれるが、しかしその分裂像の大きさは第一次成熟分裂のそれより明らかに小さい (Fig. 15)。このような精母細胞を有する時期の精巢を精母細胞期とよぶことにする (Fig. 4)。第二次成熟分裂が終ると染色体は再び核内に広がり精細胞となる。精細胞は更に小形となり核径も 2.5μ となる (Fig. 16)。その後精細胞は精子変態を開始し、核内の染色質が集合して染色塊を形成するようになる (Fig. 17)。この染色質塊は次第に染色性を増すと共に細長くなり精子頭部の形態をとる (Figs. 5, 18)。包囊形成期以後の精原細胞は精子変態の時期まで常に包囊内に含まれ、各包囊内の生殖細胞はすべて同じ発達段階を示す。一方、一つの精巢小葉内には様々の発達段階の包囊がみられる (Figs. 3, 4, 5) ことから精子形成は包囊単位で進行することを示している。

精子変態を終えた成熟精子は小葉腔に遊離し、精子塊を形成する (Fig. 6)。成熟精子の頭部は鎌形を呈し、精細胞とは明瞭に区別出来る。頭部の長さは 6μ 、幅は 1.5μ で、尾部は長く約 40μ にも達する (Figs. 19, 20)。小葉腔内に遊離した成熟精子は精巢の熟度が進むと共に徐々に殖えていくが、精巢小葉内にはなお種々の発生段階の生殖細胞が多数認められる (Fig. 6)。小葉内に成熟精子があらわれても初めの間は腹部をおしても精液は搾出されない。この様な状態の精巢を精子発現期とよぶ (Fig. 5)。しかしさらに成熟が進むと腹部を圧することにより精液が流出する。この時期の精子は海水中で活潑に運動する。この様な精巢を成熟期とよぶ (Fig. 6)。精子発現期と成熟期の精巢は精子比率を以つても判定することができる。

III. シナホリン投与の効果 実験開始時のウナギ (Group I) の精巢内にみられる生殖細胞はすべて休止期か分裂中の精原細胞であり、精巢の成熟度は前期増殖期かまたは後期増殖期を示していた (Text-fig. 1)。その後 1/3, 1/2, 3/4, 1/1 海水と海水移行を行つた対照群の精巢では何れも精原細胞しか認められず成熟度は全く変化がなかつた。ただこれらのウナギでは海水移行の過程で体表にかすかな銀化が認められた。

一方海水移行と並行してシナホリンを投与した実験群の精巢では Text-fig. 1 に示されるように、投与回数を増すに従つてその成熟度は著しく促進された。シナホリン 1 回投与した後 1 週間経たぬウナギ (Group III) の精巢の成熟度は対照群と同じく後期増殖期に属するが、対照群のそれより精巢小葉は大きく、またその中に含まれる精原細胞の数も多かつた。シナホリン 2 回または 3 回投与後のウナギ (Group IV または V) では精母細胞を含む包囊が認められ (Figs. 3, 4) 対照群の成熟度とは明らかな差が認められた。これらのウナギはまた外観上も著しい変化を示す。即ち対照群ではその胸鰭がほぼ透明であるのに対し、投与群の胸鰭は黒色色素が沈着し、黒色を呈する。それと共に体の背部、口吻、尾鰭も同様に黒色となる。またその腹部は対照群よりも著しく銀化を呈するようになった。これらの二次性徴はホルモン投与を重ねるに従い一層顕著となつた。シナホリン 4 回投与後のウナギ (Group VI) の精巢には成熟精子が現れ (Fig. 5) その精子比率は 0.9-16.6% であつた。これらのウナギでは腹部を押しても精子は搾出されず、精巢の成熟度は精子発現期に相当していた。なおこれら精巢内には精子の外に精原細胞から変態中の精細胞までのすべての発生段階の細胞が見られた。

シナホリン 6 回 (通算 600 家兎単位) 投与後のウナギ (Group VII) では腹部を圧することにより初めて精子が搾出された。搾出された精子は海水中で活潑な運動性を有することが確認され、この段階でウナギは機能的成熟に達していることを示した。これらのウナギの精巢小葉は多量の成熟精子によつて占められ、精子比率は 53.2% および 75.9% を示していたが、その外に同精巢内には精子形成途上のすべての生殖細胞

Text-fig. 1. Testicular maturation of eel induced by synahorin injection. Group I to VII indicate the fish groups which were injected with synahorin from 0 to 6 times respectively. The percentages of black bars in group VI and VII show the sperm ratio represented by the relative amount of spermatozoa to the total germinal elements.

が認められた (Fig. 6)。この時期のウナギの泌尿生殖孔の周縁は少しく膨張し、また泌尿生殖孔および肛門の開口する洞の周囲は黒色を呈していた。

考 察

本研究に用いた日本産 ウナギ では精巢中を前後に走る 輸精管とそれから T 字型に伸び泌尿生殖孔に開口する輸精管の存在が認められた。これまで Anguillidae では雌雄共に生殖輸管を欠くとされているが (GOODRICH⁷⁾), 少なくとも雄ウナギには輸精管が存在することが認められた。今後さらに組織学的観察を加えて、その形態を明確にすることが必要である。

本種の精子形成過程に伴う形態変化は TUZET and FONTAINE¹⁾ が下りウナギの *Anguilla vulgaris* で報告した結果とほぼ一致する。また精巢小葉内の包囊はそれぞれ精子形成の時期を異にするが、一つの包囊内の生殖細胞の精子形成は同時的に進むことが確認された。同様の事実はサケ科のニジマス⁸⁾, ヒメマス⁹⁾, サケ¹⁰⁾, サクラマス¹¹⁾ などでも知られている。日比谷⁵⁾ は本種の成熟精子の形態について電子顕微鏡的観察を行つてゐるが、その詳細についてはのべていない。今回の観察から精子変態の過程で円形の精細胞核は次第に細長くなり、先端の尖つたソラ豆状を呈し、最終的には鎌形の頭部を形成することが明らかにされた。この様な精子変態過程と成熟精子の形態的特徴は *Anguilla vulgaris*¹⁾ の場合とよく一致し、Anguillidae に共通した特徴とも考えられる。精子比率と機能的成熟との関聯はこれまで、ニジマス⁸⁾, サケ¹⁰⁾, サクラマス¹¹⁾ などで詳細に調べられており、これらでは精子比率が 90% 以上になつて始めて機能的成熟に達することが知られている。これに対し本実験でシナホリン投与により催熟されたウナギの精巢では、53.2% とかなり低い精子比率でも精液が搾出され、精子は機能的成熟に達していた。この相違は幼若なウナギをホル

モン処理によつて人為的に成熟を促した結果によるとも考えられるが、この点はさらに下りウナギの成熟魚の精子比率を明らかにすることにより正確に結論したい。

溯河性のサケ、マスでは溯上に伴つて雌雄共にその性成熟が進むことが知られている^{10,11)}。降河性のウナギにおいても下りウナギに於て既に精母細胞¹²⁾さらには精細胞を有するものもあり¹³⁾養殖ウナギと比べてその性成熟は遙かに進んでいることから、自然状態ではウナギの降河洄游と性成熟とが密接な関連を有するものと考えられる。しかし OLIVEREAU²⁾ は淡水中で下りウナギの雄に甲状腺刺激ホルモンを注射することにより、催熟に成功している。これに反し、本実験では海水に移行した無処理の対照群の精巣熟度は初めのものと全く変化を示さなかつた。それ故、性成熟と環境水の塩分濃度との関連性を知るには更に詳細な研究が必要と思われる。

大上・飯塚^{3,4)}および石田・石井⁶⁾らはシナホリンを使つて下りウナギまたは養ボクの雄の成熟促進試験を行つている。その結果、大上・飯塚^{3,4)}は 60 家兎単位 (10 家兎単位 6 回処理) および 240 家兎単位 (60 家兎単位 4 回処理) で、石田・石井⁶⁾は 40 家兎単位 (20 家兎単位 2 回処理) でそれぞれ排精を認めている。それに対し本研究の養殖ウナギでは 600 家兎単位で初めて排精した。この相違は材料魚の実験当初の成熟状態に著しい差があつた為と考えられる。従つて同じシナホリンを用いた場合は養殖ウナギよりも下りウナギまたは養ボクの方がより低単位の投与で成熟精子が得られることは確かである。しかし材料魚の入手の難易度を考慮すると、今後の実用化のためには養殖ウナギを用いる方法をさらに改善しておくことも必要と考えられる。

そのためにはシナホリンの外に雄の成熟促進に有効であるとされる妊婦尿¹⁾、TSH²⁾ プロラン¹⁴⁾ およびゴナトロピン等の単独または併用試験を行ない、より低単位の投与で、しかもより大きな精子比率が得られる方法を見出すことが望ましい。

要 約

日本産養殖ウナギの精巣の一般形態と、精巣成熟に対する海水移行およびシナホリン投与の影響を組織学的に調べ、次の結果を得た。

1. ウナギの精巣は体腔背部の左右に独立に存在する 1 対の細長い器官であり、それぞれは多数の半円形の小葉から成つている。また各葉から出て肛門後部の泌尿生殖孔に開口する輸精管が存在する。
 2. 精子形成が進むと共に、生殖細胞は精巣小葉内で包囊を形成する。小葉内の包囊はそれぞれ異なる段階の精子形成期を示すが、一つの包囊内の生殖細胞は同じ発生段階を示す。
 3. 精子形成の細胞学的特徴を記述した。
- また精子形成の時期に基づきウナギの精巣熟度を次の 5 期に分けた。(1) 前期増殖期、(2) 後期増殖期、(3) 精母細胞期、(4) 精子発現期、(5) 成熟期。精子発現期以後の時期については、精子比率を求めることにより、精密な成熟度を得ることが出来た。
4. 海水移行のみを行つた対照群の精巣の成熟度は全く変化がみられず、何れも前期または後期増殖期を示していた。
 5. 海水移行と同時に毎週 1 回行つたシナホリン投与は著しく精巣の成熟度を促進した。投与 2 回または 3 回 (200 または 300 家兎単位) で成熟度は精母細胞期に進み、同時にウナギの胸鰭、尾鰭、吻、体背部などが黒色を呈し二次性徴が発現した。投与 4 回 (400 家兎単位) で小葉内に精子が認められ、投与 6 回 (600 家兎単位) で精液が搾出され、排出された精子は機能的成熟に達していた。

文 献

- 1) O. TUZET and M. FONTAINE: *Arch. Zool. exp. et gale*, 78, 199-215, (1937).
- 2) M. OLIVEREAU: *C. R. Acad. Sci.*, 252, 3660-3662, (1961).
- 3) 大上皓久・飯塚三哉: 静岡水試報告, (昭 37), 65-67 (1962).
- 4) 大上皓久・飯塚三哉: 同誌, (昭 40), 140-142 (1965).

- 5) 日比谷 京: 養殖, **17**, 12-15 (1966).
- 6) 石田 修・石井俊雄: 水産増殖, **17**, 263-271 (1970).
- 7) E. S. GOODRICH: in "The physiology of fish" Vol. 1, p. 289, M. E. BROWN ed, Academic press (1957).
- 8) 大田 勲・山本喜一郎・高野和則・坂口任一: 本誌, **31**, 597-605 (1965).
- 9) R. ISHIDA, K. TAKAGI and S. ARITA: *Int. North Pacific Fish. Comm. Bull.*, **5**, 27-46 (1961).
- 10) O. HIROI and K. YAMAMOTO: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **19**, 173-184 (1968).
- 11) O. HIROI and K. YAMAMOTO: *ibid.*, **20**, 252-264 (1970).
- 12) 佐藤英雄・中村中六・日比谷 京: 本誌, **28**, 579-584 (1962).
- 13) 松井 魁: 農林省水. 講. 報告, **2**, 1-245 (1952).
- 14) B. SCHREIBER: *Ist. Lombond. Reud* **2**, 68. (松井¹³⁾より引用).

Explanation of Plates

PLATE I

Photomicrographs of the testes of the Japanese eels injected with synahorin. Figures 1 to 6 were taken from the preparations fixed with Bouin's solution and stained with Heidenhain's iron-hematoxylin and light green.

Fig. 1. Portion of the testis before synahorin injection. (early multiplication stage), $\times 460$.

Fig. 2. Portion of the testis before synahorin injection. (late multiplication stage), $\times 400$.

Figs. 3 and 4 Portions of the testis in the fish injected twice with synahorin. (spermatocyte stage), $\times 460$ and $\times 400$.

Fig. 5. Portion of the testis in the eel treated four times with synahorin. (sperm formation stage), $\times 400$.

Fig. 6. Portion of the testis in the eel treated six times with synahorin. (rip stage), $\times 400$.

PLATE II

Spermatogenesis of the cultured Japanese eel induced by the injection of synahorin. Fixation and staining are the same as those in the plate I. Except for figure 20, a phase contrast micrograph which was taken at about 1200 times, all other figures are of magnification at 1800 times.

Fig. 7. Primary spermatogonia in solitary state.

Fig. 8. Primary spermatogonia arranged in the form of cyst.

Fig. 9. Secondary spermatogonia in resting state.

Fig. 10. Primary spermatocytes in the pre-synaptic stage.

Fig. 11. Primary spermatocytes in the synaptic stage.

Fig. 12. Primary spermatocytes in the post-synaptic stage.

Fig. 13. Primary spermatocytes on the way of the first maturation division.

Fig. 14. Secondary spermatocytes in a resting stage.

Fig. 15. Secondary spermatocytes at the second maturation division.

Fig. 16. Spermatids.

Fig. 17. Spermatids in an early phase of spermiogenesis.

Fig. 18. Spermatids in a middle phase of spermiogenesis.

Fig. 19. Spermatozoa.

Fig. 20. Spermatozoa.

PLATE I

PLATE II