ホルモンで成熟促進させたウナギの血液性状の変化

落合 明・小川 学・榎田 晋・谷口順彦

(1975 年 2 月 5 日受理)

Changes in Blood Properties of Maturing Japanese Eel,
Anguilla japonica, with Hormone InjectionAkira OCHIAI*, Manabu OGAWA*, Susumu UMEDA*,
and Nobuhiko TANIGUCHI*

To estimate possible changes in the blood of Japanese eel attributable to sex and maturity differences, hematocrit, hemoglobin content, erythrocyte count and plasma protein were examined quantitatively and electrophoretically for used eel samples with or without hormone injection. At present, maturity of the eel samples treated with hormone was divided into three stages, immature, maturing and mature, by ratios of the gonad and body weights. In male treated with gonadotropin there was no significant change in erythrocyte count and plasma protein from the immature stage to the mature, but gross changes occurred in hematocrit and hemoglobin content at the mature stage. In female treated with gonadotropin, estrogen or releasing hormone, hematocrit, hemoglobin content and erythrocyte count were reduced greatly with gonad maturation. Sexual maturation of the female eel with gonadotropin and estrogen seemed to be accompanied by profound changes in plasma protein, average values of which were 18.4, 16.7 and 7.9 in g/dl at the immature, maturing and mature stages, respectively. In female, starch gel electrophoretic pattern of plasma protein changed to a great extent with maturation.

ある種の魚類では他の脊椎動物と同様、産卵期に血液性状が雌雄により成熟度合によつてかなり変化することが知られている。このような変化は成熟の生理を知るうえで重要であるだけでなく、成熟が正常に進行しているかどうかを推定する一つの手がかりともなる。ところが、ウナギでは成熟にともなう血液性状の変化を調べた報告が非常に少なく、主として雌のそれについて DRILHON¹⁾、千葉県内湾水産試験場内水面分場、落合ほか²⁾などの報告がある程度である。そこで、著者らはホルモンなどを投与して人工的に成熟促進させた魚体につき、雌雄間または成熟度により血液性状がどのように変化するか調べたので、その結果を取りまとめてここに報告する。

本研究をすすめるにあつて、水族館の一部の使用を許可された高知市桂浜水族館の永国寿一・高谷将夫の両氏、魚体採捕に尽力下さった高知県中村市山崎武氏、およびホルモンなどの供与を受けた第一製薬株式会社高橋幸則氏に対して厚くお礼を申しあげる。

材 料 と 方 法

雄の養殖ウナギを 1973 年 10 月 16 日から 11 月 6 日まで海水に順化させ、それ以後 7~10 日ごとにシナホリン 50 RU を筋注して、1974 年 3 月 19 日から 4 月 8 日までの間に取りあげて魚体測定ならびに血液検査をした。用いた魚体は 11 尾でその全長は 43.4~52.2 cm である。このうち 6 尾は 9~10 回の注射で成熟が大いに進み、その大部分は完熟状態になったが、あとの 5 尾は 14~15 回注射してもあまり

* 高知大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kochi University, Nangoku, Japan)

成熟が促進されなかつた。

一方、雌は 1973 年 10 月 8 日四万十川の川口で採捕し、しばらく蓄養して同年 10 月 16 日から 7~10 日の間隔でホルモン処理をした。これらは計 27 尾ですべて下りウナギの状態にあり全長範囲は 63.2~83.4 cm であつた。そのうち 7 尾は 1 尾あたり 50 RU 単位のシナホリンと 0.25 mg の Dipropionic acid estradiol (DPE) (A 区) を、6 尾には同量の 2 種のホルモンのほかに抗プラスミン剤として 0.45 ml のトラネキサム酸を (B 区)、7 尾には同量のシナホリンと DPE のほかに releasing hormone の 1 種 DB-2521 (第一製薬製) 0.25 ml を (C 区)、残りの 7 尾は同量のシナホリンと DB-2521 (D 区) をそれぞれ 15~18 回注射した。

1974 年 3 月 19 日から 4 月 8 日の間に取りあげて卵巢を調べたところ A~C の実験区では成熟に近いものからほとんど成熟の効果がなかつたものまでいろいろあり、生殖腺指数は A 区で 3.7~62.6 平均 28.9, B 区で 2.1~64.0 平均 33.5, C 区で 2.6~69.0 平均 24.9 であつた。D 区では成熟があまり進まず生殖腺指数は 1.5~16.0 平均 8.4 であつた。雌雄とも生殖腺指数によつて成熟度を未熟、前成熟および成熟の 3 段階に分けた。雄ではこの指数が 1 以下を未熟、1~10 を前成熟、10 以上を成熟に、一方、雌では 10 以下を未熟、10~30 を前成熟、30 以上を成熟とした。この区分にしたがうと平均卵径は未熟で 0.55 mm 以下、前成熟で 0.56~0.80 mm、成熟で 0.8 mm 以上であつた。供試魚をこの区分によつて分けると、雄では未熟 5 尾、前成熟 1 尾、成熟 5 尾、雌では未熟 12 尾、前成熟 6 尾、成熟 9 尾であつた。なお、血液性状の対照区としてホルモン処理前に雄では体長範囲 46.0~48.5 cm の養殖ウナギ 2 尾、雌では体長 55.8~70.8 cm の範囲にある下りウナギ 5 尾の血液性状を調べた。また、血漿蛋白の電気泳動の対照区としては性の分化が不十分な状態にある養殖ウナギ 2 尾 (全長 46.0~48.5 cm) を供試し、7 月 30 日に採血した。

本実験はすべて地下浸透海水を開放式にした高知市桂浜水族館で無投餌の状態で行なつた。用いた水槽は 5 個でいずれも塩角型 1.2 m×0.8 m×1 m、水槽の上面を木板 および 黒色ビニールでおおい、可能な限り光線の投入を防いだ。実験中の水温は 16.5~25.2°C、標準比重 (δ_{15}) は 1.020~1.024 であつた。

供試魚を FA-100 で麻酔したのち尾柄を切断して採血した。ヘマトクリット値は毛細血管法で、血漿蛋白量は日立屈折蛋白計で測定した。血漿蛋白の電気泳動法は水平式デンブングル法によつた。緩衝液には支持体用に 0.2 M のホウ酸 pH 8.6、ブリッジ用に 0.3 M ホウ酸 -0.03 M 塩化ナトリウム pH 8.0 を用いた。泳動像から得た吸光度曲線図には原則として 5 つの安定した山が認められたので便宜上陽極側から第 1~5 分画とした。各分画の量比はデンストメータによつて画かれた積分曲線によつて算出した。

結 果

ヘマトクリット値・色素量・赤血球数 血液性状値は性により熟度によつて著しく変動することが判明した (Table 1)。ヘマトクリット値は雄では対照区で 30% 以上であり、未熟魚および前成熟魚ともにそれに近かつたが、成熟魚では個体間の変異が広く、2 個体を除いて 30% 以下であり、その平均値 (24.9%) は対照区 (35.7%) より 10.8% も低かつた。雌では対照区ですべて 30% 以上であつたのにホルモン処理魚ではすべて低く、未熟魚でも 2 個体を除いて 30% 以下で、平均値 (23.2%) は対照区 (33.6%) より 10.4% も低かつた。前成熟魚や成熟魚では一段と低くて個体間の変動幅も狭く、平均値はそれぞれ 12.7%、7.8% で対照区より 20.9%、25.8% も低かつた。

色素量は雄では対照区 (平均値 10.9 g/dl)、未熟魚 (9.5 g/dl)、前成熟魚とも 8 g/dl 以上であつたが、成熟魚ではすべて 9 g/dl 以下となり、その平均値は対照区の約 59% にあたる 6.0 g/dl であつた。一方、雌では対照区がすべて 6.9 g/dl 以上であつたのに対し、ホルモン処理区の魚は大部分が 7 g/dl 以下であり、平均値は対照区 (9.1 g/dl) に対して未熟魚 (5.4 g/dl) では約 50%、前成熟魚 (3.3 g/dl) で 36%、成熟魚 (2.0 g/dl) では 22% であつた。

赤血球数は雄では対照区、未熟魚、前成熟魚、成熟魚ともに平均値は 200 万/mm³ 以上であり、相互に

有意な差は認められなかった。ところが雌では対照区で平均値が 212 万/mm³ であるのにホルモン処理区は 2 個体を除いて 200 万/mm³ 以下であった。平均値は対照区に対して未熟魚(151 万/mm³)では 71%, 前成熟魚(86 万/mm³)で 41%, 成熟魚(60 万/mm³)では 28% となり熟度が進むほどこの値は減少していた。

血漿蛋白 電気泳動像の各分画量比は雌雄により成熟度によつてかなりの変化があつた (Table 2, Fig.

Table 1. Changes in hematological values of Japanese eel with or without hormone injection

Character	Control	Hormone injection		
		Immature	Maturing	Mature
Hematocrit (%)				
Male	35.5~35.9(35.7)	28.6~38.4(34.3)	31.9	12.8~34.7(24.9)
Female	30.3~38.3(33.6)	14.7~30.8(23.2)	7.3~16.9(12.7)	4.9~11.3(7.8)
Hemoglobin content (g/dl)				
Male	10.0~11.7(10.9)	8.0~10.5(9.5)	8.8	3.3~ 8.3(6.0)
Female	6.9~10.8(9.1)	3.5~ 7.6(5.4)	1.6~ 4.5(3.3)	1.0~ 3.1(2.0)
Erythrocyte count (10⁹/mm³)				
Male	2.16~2.36(2.26)	2.40~2.87(2.60)	2.06	1.13~3.00(2.23)
Female	1.78~2.91(2.12)	0.76~3.21(1.51)	0.60~1.27(0.86)	0.30~0.94(0.60)
Plasma protein (g/dl)				
Male	6.5~ 8.4(8.0)	5.3~ 6.4(5.8)	6.8	3.4~ 7.3(5.3)
Female* ¹	6.3~ 8.6(7.7)	4.8~ 7.1(6.1)	5.0~ 5.7(5.3)	—
Female* ²	6.3~ 8.6(7.7)	17.9~19.1(18.4)	13.3~18.6(16.7)	3.5~14.3(7.9)

*¹ The samples were treated with gonadotropin and releasing hormone.

*² The samples were treated with gonadotropin and estrogen.

Table 2. Plasma protein fractions of Japanese eel with or without hormone injection in relation to sex and maturity. Fractions of starch gel electrophoretic pattern expressed as percent of total protein.

Sex and maturity	No. of fish	Fraction number				
		1	2	3	4	5
Control	2	36.9 35.2~38.9	30.8 29.0~32.6	7.2 6.2~ 8.2	12.8 10.5~15.1	12.3 10.2~14.4
Hormone injection						
Male						
Immature	3	36.9 31.7~42.9	21.1 12.5~34.4	10.9 7.4~13.8	14.0 6.9~19.8	18.7 15.2~23.5
Mature	4	34.2 30.1~39.2	24.1 17.6~32.4	11.2 9.7~12.8	10.7 10.3~12.7	21.9 18.7~24.4
Female						
Immature	3	28.5 22.1~34.3	30.8 25.0~39.1	12.4 9.7~14.0	10.7 7.7~15.9	20.2 16.4~23.3
Maturing	2	21.1 16.3~25.8	31.2 30.9~31.4	9.9 8.2~11.6	12.7 10.3~15.1	24.3 24.1~24.4
Mature	4	12.6 4.2~23.5	36.9 34.6~40.7	18.7 8.7~26.9	14.0 8.5~16.7	18.3 14.5~23.5

1)。対照区では第1・2分画の量比がともに大きくて29%以上あり、平均値はそれぞれ36.9%, 30.8%であった。第4と第5の分画量比はいずれも15.1%以下で平均値は12%前後、第3分画量比は最も小さくて7%前後であった。ホルモン処理した雄では未熟と成熟とを問わず対照区と似た傾向にあったが、第2分画でやや小さく(未熟魚で21.1%, 成熟魚で24.1%), 第5分画で少し大きかった(未熟魚18.7%, 成熟魚21.9%)。ホルモン処理の雌では、未熟魚は対照区に比較して第1分画の量比が小さく(平均値28.5%), 第5分画量比が大きかった(平均値20.2%)。前成熟魚ではこの傾向が一層強まり、第1分画量比の平均値は21.1%, 第5分画のそれは24.3%であった。成熟魚では第1分画の量比が著しく小さく(平均12.6%), 第2分画(36.9%)と第3分画(18.7%)の量比はやや大きかった。つまり、雌では成熟とともに第1分画の量比が著しく減少し、第2分画量比はやや増加した。また、第5分画量比は未熟や前成熟に高まつて対照区の2倍にもなつたが、成熟魚ではやや減少して雄とあまり変わらなかった。

雄の対照区の血漿蛋白量はホルモン処理区よりやや多く平均値は8.0 g/dlであった。しかし、ホルモン処理区では未熟魚、前成熟魚、成熟魚間にそれほど大きな変化は認められなかつた(Table 1)。雌では対照区の平均値は7.7 g/dlで雄のそれとあまり変わらなかったが、ホルモン処理区では増減が著しく、また、実験区によつて大きな差異が認められた。つまり、シナホリンとreleasing hormoneを注射したD区では未熟魚・前成熟魚とも10 g/dl以下で、対照区と比較して未成熟魚で差はなく($F_0=4.70$, $F=5.32$, $\alpha=0.05$), 前成熟魚でやや低かつた($F_0=7.84$, $F=6.61$, $\alpha=0.05$)。しかし、その他の実験区では生殖腺指数と

Fig. 1. Starch gel electrophoretic pattern of plasma protein of Japanese eel. A, control fish; B, mature male treated with gonadotropin; C, mature female treated with gonadotropin and estrogen. Numbers indicate profile fractions.

Fig. 2. Relation between plasma protein and gonosomatic index of Japanese eel. Solid circles, specimens treated with gonadotropin and estrogen; open circles, specimens treated with gonadotropin and releasing hormone.

Table 3. Average plasma proteins (g/dl) of each fraction of starch gel electrophoretic pattern for Japanese eel with hormone injection

Sex and maturity	No. of fish	Fraction number				
		1	2	3	4	5
Male						
Immature	3	2.32	1.33	0.69	0.88	1.18
Mature	4	1.88	1.33	0.62	0.59	1.20
Female						
Immature	3	4.22	4.56	1.84	1.58	2.99
Maturing	2	3.17	4.68	1.49	1.91	3.65
Mature	4	1.22	3.58	1.81	1.36	1.78

血漿蛋白量とは負の相関が認められ (Fig. 2), 未熟魚や前成熟魚ではすべて 13 g/dl 以上で, それらの平均値は対照区の 2 倍以上もあつた。成熟魚は 14.3 g/dl 以下で未成熟魚や前成熟魚より著しく少なかったが対照魚 ($F_0=0.01$, $F=4.84$, $\alpha=0.05$) や成熟した雄 ($F_0=1.49$, $F=4.84$, $\alpha=0.05$) とはそれほど違わなかつた。

次に分画別の平均血漿蛋白量は, 成熟魚の第 1.5 分画を除いて, 各分画とも雌の方が多くて雄の 2~3 倍あつた (Table 3)。とくに, 第 2 分画は雌では未熟魚・成熟魚とも 1.33 g/dl, 雌では未熟魚 4.56 g/dl, 成熟魚 3.58 g/dl で著しい差異が認められた。また, 第 1 分画は量比ではいずれの熟度の魚体でも雌より雄が大きかつたが, 絶対量では未熟魚でかえつて雌の方が多かつた (雄 2.32 g/dl, 雌 4.22 g/dl)。

論 議

ヘマトクリット値・血色素量および赤血球数は健康状態や栄養などと深い連りがあるほか, 産卵期には脳下垂体の活動や性ホルモンなどの作用によつても大きく影響される (SLICHER)⁴⁾。自然産卵で雌雄間にヘマトクリット値, 赤血球数に差のあるときは雄の方が高いし, ホルモン投与で人工成熟させたフナ (SUMMERFELT, LEWIS and ULRICH)⁵⁾, *Salmo trutta* (SNIESZKO)⁶⁾, ボラ (PETERSON and SHEHADEH)⁷⁾ でも同様な結果が得られている。

ウナギではホルモン処理前には下りウナギの雌と未熟の養殖ウナギ雄との間でヘマトクリット値, 赤血球数および血色素量に大きな差が認められなかつた。しかしホルモン投与によつて成熟が進むと雌雄ともにヘマトクリット値や血色素量が低下し, しかもその傾向は雌で著しいことが判明した。千葉県内湾水産試験場内水面分場²⁾や著者ら³⁾の実験でもホルモン処理した雌ではヘマトクリット値や血色素量が対照魚のそれらの約 1/2, 赤血球数も著しく減少した。今回の実験でもよく成熟した雌ではヘマトクリット値, 赤血球数および血色素量が平均して正常値の 1/4 前後まで低下していることが判明した。実験期間中に全く餌を補給しなかつたことがその一因とも考えられる。しかし, 著者ら³⁾がホルモン処理魚と同じ状態で飼育したホルモン無処理の雌の下りウナギでも, ヘマトクリット値は 28.9~38.8%, 血色素量 6.8~13.1 g/dl であり, 今回の対照魚 (ホルモン処理前に採血した魚体) のそれらと変わらないこと, および養殖ウナギを 11~2 月の間絶食してもヘマトクリット値などが変わらなかつた SANO⁸⁾の報告などから, 単なる栄養不足が主因とは考えられない。雌では卵巣の肥大と卵黄物質形成のほか造血機能の低下・ホルモンの不均衡や衰弱などがある程度原因していると思われる。

血漿蛋白量も栄養状態や健康度合などによつて変化するほか成熟度によつても違うことが知られている。一般に硬骨魚類では多くても数 g/dl 以下であるのにウナギではこれよりも多い。とくに興味があるのは, D 区以外のホルモン処理の雌では未熟魚や前成熟魚でこの値が正常値の倍以上もあることである。千葉県内湾水産試験場内水面分場²⁾の報告でも生殖腺指数が 8.6 以上の 6 尾で 9.0~26.0 (平均 16.2) g/dl であり, 著者らの結果とよく一致している。 *Salvelinus fontinalis* の雌では血漿蛋白量が産卵初期に 5 g/dl 前後から 8 g/dl に急増したのち漸減し, 産卵後期に 5 g/dl あまりになることが知られている (Phillips ほか)。ウナギ

ではこの現象が顕著であり、とくに第2分画の蛋白量が4 g/dl 前後と異常に多いのは注目すべきである。

血漿蛋白組成は成熟によつて変化し、その実態が電気泳動帯の数や各分画の量比などによつて調べられている。斎藤¹⁰⁾はシロザメやアカエイの血漿蛋白で未成熟魚にアルブミン成分が多いが、胎児をもつた雌ではアルブミン成分が少なくなつてグロブリン成分が増加するとしているし、Thurston¹¹⁾もニジマスの完熟した雌では第10分画が全量の70%以上にもなるのに、未熟では13%をこえないことを指摘している。このような変化はestrogen投与した雌のベニザケ(Ho and VANSTON¹²⁾)、金魚(BAILEY¹³⁾)、ボラ(PETERSEN and SHEHADEH⁷⁾)、ヨーロッパウナギ(DRILHON¹⁾)などで確認されている。ヨーロッパウナギでは未熟の雌では不明りようであるが成熟した雌では明りようなグロブリン分画が見い出されている。AIDAら¹⁴⁾は成熟を始めた雌アユでは血漿蛋白デンプンゲル電気泳動像の第9・11分画量が増加し、これと期を同じくして血漿中に新たに2種の蛋白質(F_{m-a} , F_{m-b})が出現し、 F_{m-a} は高分子状態のまま卵巣卵にとりこまれて卵黄物質となる可能性があるとしている。

最後に、シナホリンとreleasing hormoneを筋注したD区では、血漿蛋白量が正常値またはそれよりも低かつたのは興味ある事実である。他の3実験区では生殖腺指数の平均値が24.9~33.5であつたのに、この実験区では8.4で相対的に促進効果が少なかつた。しかし、2個体では前成熟の状態になり、生殖腺指数が13.2~16.0、平均卵径0.7 mm 前後、最大卵径は1 mm 前後に達していた。生殖腺指数がこれと同じ値の他の実験区の魚体では平均卵径が0.5 mm 台、最大卵径が0.7 mm 前後であつたことを考えると、本実験区とestrogen投与区とは成熟の生理機構がやや違つているように思われる。

文 献

- 1) A. DRILHON: *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, **148**, 1218~1220 (1954).
- 2) 千葉県内湾水産試験場内水面分場: 種苗生産研究中間報告書(ウナギ). 1-27 (1972).
- 3) 落合 明・楳田 晋・小川 学: 本誌, **40**, 43-50 (1974).
- 4) A. M. SLICHER: *Bull. Bingham Oceanogr. Coll.*, **17**, 1-55 (1961).
- 5) R. C. SUMMERFELT, W. M. LEWIS and M. G. ULRICH: *Prog. Fish. Cult.* **29**, 13-20 (1967).
- 6) S. F. SNIESZKO: *Ibid.*, **23**, 114-119 (1961).
- 7) G. L. PETERSON and Z. H. SHEHADEH: *Comp. Biochem. Physiol.*, **38B**, 451-457 (1971).
- 8) T. SANO: *J. Tokyo Univ. Fish.*, **48**, 105-109 (1962).
- 9) A. M. PHILLIPS, H. A. PODOLIAK, H. A. POSTON, D. L. LIBINGSTON, H. E. BOOKE, E. A. PYLE, and G. L. HAMMER: *Fish. Res. Bull. N. Y.* **27**, 1-111 (1964).
- 10) 斎藤 要: 本誌, **22**, 773-777 (1957).
- 11) R. V. THURSTON: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **24**, 2169-2188 (1967).
- 12) F. C. W. HO and W. E. VANSTONE: *ibid.*, **18**, 859~864 (1961).
- 13) R. E. BAILEY: *J. exp. Zool.*, **136**, 455-469 (1957).
- 14) K. AIDA, P. V. NGAN and T. HIBIYA: This Bull., **39**, 1091-1106 (1973).