受賞者総説

ウナギの人工催熟技術と仔魚の飼育技術の開発に関する研究*1

(平成 11 年度日本水産学会賞技術賞受賞)

田中秀樹*2, 太田博巳*2, 香川浩彦*2

養殖研究所

わが国におけるウナギの種苗生産に関する研究は、1960 年代に東京大学で天然下りウナギを用いて成熟誘起が試みられたのが始まりであり、¹⁾以来 40 年が経過している。その後 1973 年に北海道大学で世界で初めての人工受精によるふ化仔魚が得られているが、²⁾いまだシラスウナギの生産には至っていない。この原因は、安定して多量の成熟卵や成熟精子を得られないこと、および、ふ化仔魚からシラスウナギまでの飼育が不可能なことにあった。そこで、我々は雌雄の成熟誘起技術の確立とふ化仔魚の飼育技術の開発を目的として研究を行った。

1. 雌の成熟誘起技術

大型養殖雌、もしくは稚魚期に雌性ホルモン (Estradiol-17 β) を飼料に混ぜて投与し雌化したウナギ³⁾を成熟誘起に使用した。これらに、山本ら²⁾が用いたシロサケ脳下垂体の抽出液を 20 mg/尾/週で 8~12 回、腹腔内に投与することにより卵径約 850 μ m の核移動期まで到達させることができた。また、海水に馴致した雌をそのまま 3 ヶ月間海水中で飼育すると、卵巣中には第一次卵黄球期に達している卵母細胞が出現することを見いだした。これは飼育のみで成熟が促進された初めての報告であり、成熟までに至る注射の回数も平均 8 回と海水馴致後すぐ注射をしたもの (平均 10 回) と比較して少なくすむことも明らかになった。⁴⁾

しかし、脳下垂体抽出液を投与し続けても最終成熟や排卵が誘起されることは稀であり、多くは卵核胞を有したまま細胞質の変質を起こす。たとえば成熟・排卵が誘起されても、受精率やふ化率は低い。したがって成熟・排卵誘起技術を改善し、受精率・ふ化率を向上させることが最も重要な問題点であった。この問題は卵成熟誘起ステロイド (17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one; DHP) を用いることにより解決することができた。このステロイドは長濱らによりサケ科魚で初めて同定され、⁵⁾ウナ

ギでもこのステロイドが卵成熟誘起ステロイドである可能性が示された。⁶⁾そこで、我々はまず、種々の発達段階の濾胞付き卵母細胞を生体外に取り出し、いつ、DHP に反応するようになるかを調べた。⁷⁾その結果、卵径 700~800 μ m になり核移動期 (細胞質周辺部が透明になり、油球が集合して大きくなり、核が周辺部に移動しているのが確認できる) に達して初めて DHP に反応し卵成熟が誘起されることが分かった。そこで、DHP を 2 μ g/g·BW になるように 50% エタノールに溶解して投与したところ、卵径 800~900 μ m の卵母細胞を有する個体はすべて成熟・排卵させることができた。次に、DHP 投与から排卵までに要する時間を明らかにするための実験を行った。⁸⁾DHP を午前 9 時に注射する群と午後 6 時に注射する群を設け、排卵時刻を調べるとともに受精率およびふ化率を比較検討した。その結果、DHP を午前 9 時に投与しても、午後 6 時に投与しても、投与 18 時間後を中心に成熟・排卵が誘起された。また、このときの受精率やふ化率は両方の処理群で差は認められなかった。このことから、DHP 投与の時刻を変えることによって排卵時刻を自由にコントロールでき、人工受精やその後の卵の管理が計画的に行えるようになった。さらに、DHP 処理によって得られた卵の卵質を評価するために、排卵後の時間経過に伴う受精率とふ化率の変化を調べた。⁹⁾排卵後 3, 6, 9 時間後に同一の個体から採卵し、人工受精を試みた結果、排卵後 6~9 時間を経過すると、受精率、ふ化率とも急激に低下した。このことから、排卵後なるべく早い時期に人工受精を行う必要があると考えられた (図 1)。

我々が開発した方法を用いると排卵はすべての個体で誘起される。また、平均受精率とふ化率はそれぞれ 50% と 40% であり、一尾の排卵する卵数が約 60 万粒であることを考えると、種苗生産上は十分であるように思える。しかし、排卵する個体により、受精率及びふ化率は 0% から 90% 以上と、非常に大きくばらつく。計

*1 Development of Techniques for Artificial Induction of Maturation and Rearing Larvae of Japanese Eel.

*2 Hideki Tanaka, Hiromi Ohta, and Hirohiko Kagawa (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-0193, Japan).

図1 ウナギの催熟方法。

画的に種苗を生産するためには今後この問題点を解決していかなければならない。本研究の結果から、排卵時刻が早いものほど受精率やふ化率が高くなることが判明した。このことがどのような生理的機構を反映したものであるかは不明であるが、今後この原因を明らかにすることにより、さらに安定した採卵ができる可能性を示している。

2. 雄の成熟誘起技術

養殖ウナギの雄は性的に極めて未熟な状態にあるが、これに家畜由来の生殖腺刺激ホルモン剤（シナホリン）を低濃度で反復投与すると排精が導かれ、¹⁰⁾ ヒトの絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）を高濃度でただ1回投与するだけでも成熟が導かれることが明らかにされている。¹¹⁾ また、海から河川に遡上して間もない幼若なクロコの時期に雄性ホルモンを投与しても、成熟し排精が導かれることも報告されている。¹²⁾ このように雄ウナギの精子形成を促進することは容易であるが、我々が雄ウナギの成熟促進に関する研究を始めた時点では、雄にホルモンをどの位投与すると、受精可能な精子がどの位採取できるのか、といった実際の種苗生産を行う上で不可欠と思われる情報は極めて少ない状況にあった。

そこで、まず従来行われてきたhCGの低濃度反復投与法によって、どのような品質の精子がどの程度採取可能かを明らかにする実験を行った。¹³⁾ hCGを1 IU/g・BWの濃度で週に1回、合計14回投与し、毎投与の翌日に採取可能な精液量と、精子の運動活性を測定した。その結果、6回の投与ではほぼ全ての雄が排精し、10回以上で1尾当たりおよそ1gの精液が採取可能となった。模擬海水で希釈して精子の運動能力をみると、排精直後は低く、これも投与回数の増加に伴って上昇した。これらの結果から、ウナギの種苗生産を行う場合、雌の排卵予想時期の10週以上前から雄のホルモン投与を開始する必要があることが分かった。

毎回のhCGの投与前後に、同じ個体から精液を少量

ずつ採取し、その運動活性を調べてみると、投与後24時間目をピークとして運動能力が急激に上昇し、その後3日目までには低下し、それが次の投与まで維持される、という周期的な変動を示すことが明らかとなった。¹⁴⁾ この現象は、hCGの体内濃度の増減に呼応して、輸精管内の精子を取り巻く環境、すなわち精漿の組成が変化し、それに伴い精子の運動能力が変動することを示唆したものと考えられた。そこで精漿のイオン組成を基に種々の人工精漿を作製し、生殖口から得た精子を培養したところ、人工精漿を構成するカリウム（K）と重炭酸のイオン濃度に応じて運動能力を獲得、あるいは喪失することが明らかとなった。¹⁵⁾ この結果から、もともと精子が有していた運動能力に関わらず、培養液のKと重炭酸イオン濃度を調整することにより、任意の運動能力を持つ精子に加工することも可能となった。ホルモン投与により成熟した雄は、20%程度の生殖腺体指数を示すが、この大型化した精巣中には、海水で希釈しても運動しない、未熟な精子が大量に存在する。この精巣精子を同様の人工精漿で培養すると、1時間で運動能力を獲得し、¹⁶⁾ 生殖口から採取した精子と同等の受精能力を有していた。¹⁷⁾ これにより、ホルモン投与で成熟させた雄がいれば、短時間に受精可能な精子を大量に作出することも可能となった。また、この人工精漿で精子を希釈し、冷蔵保存すると、ほぼ3週間は高い運動能力を維持することも明らかとなった。¹⁸⁾

以上の結果から、hCGの反復投与によって雄の精子形成と排精を促し、雌の排卵が予想される1時間以上前に生殖口、または精巣から精子を採取し、それを人工精漿で培養して運動能力を高め、冷蔵保存するという方法により、受精能力の高い精子を常備することが可能となった（図1）。

3. ふ化仔魚の飼育技術

1973年に北海道大学で世界初の人工ふ化に成功して以来、²⁾ 近年までの仔魚飼育の試みでは、卵の栄養を使い果たすふ化後2週間、全長7mm前後まで生存させるのが限界であった。^{19,20)} 即ち、外部栄養への移行が第一の大きな壁となっていた。前述のように、雌雄親魚の成熟誘起技術の高度化により良質のふ化仔魚が確実に生産できるようになったため、仔魚飼育研究の機会は格段に増えた。そこで、まず最初に海産魚の種苗生産には欠かすことの出来ない初期餌料であるワムシを、様々な発育段階の仔魚に繰り返し給餌することを試み、ふ化後13日目の仔魚がワムシを食べているのを初めて確認した。²¹⁾ その後の研究で、仔魚はふ化後7日目ごろから眼が機能的となるとともに、口が前方を向き、脾臓が発達して消化酵素の分泌が活発となるなど、摂餌可能な発育

段階に至ることが明らかになった。^{22,23)}しかし、再三の給餌試験にもかかわらず、ワムシを餌とした飼育では卵黄吸収完了後の成長や生存期間の延長といった給餌の効果は現れなかった。これは、この様な餌では成長に必要な栄養を持続的にとることができないためと考えられた。そこで、餌の候補を広い範囲から再検討したところ、餌料生物の栄養強化飼料として市販されているサメ卵凍結乾燥粉末を非常に良く食べることが分かった。その後、サメ卵粉末を濾過海水に懸濁させた液状飼料を用いてふ化仔魚を長期間飼育する方法について検討を重ね、容量5 lのアクリルボウル水槽で飼育する方法を開発した。この飼育法により、ふ化後9日目から水温22~23°Cで給餌を開始した飼育例では、13日目に無給餌の対照区が全滅したのに対して、給餌区は79%が生残り、従来の最長生存記録の18日目でも56%が生残っていた。無給餌区は平均全長7 mmに達しなかったが、給餌区では24日目には平均8.7 mmまで成長し、最高27日目まで生存した。²⁴⁾しかし、サメ卵粉末のみからなる餌ではふ化後20日を過ぎる頃から成長が鈍り、生残率も急激に低下して、ふ化後約1カ月間、全長10 mm程度まで成長させるのが限界で、その姿形は天然のレプトケファルスとはまだ大きな隔たりがあった。そこで、レプトケファルスまでの飼育を目指して餌の改良を中心にさらに研究を進めた。嗜好性の高いサメ卵凍結乾燥粉末を主成分とし、消化機能の十分発達していないプレレプトケファルスでも容易に吸収できるようにタンパク質を低分子にまで分解したオリゴペプチドを20%添加するとともにビタミン・ミネラルを強化し、これらの餌の材料をこれまでの濾過海水に代えてオキアミ抽出液に懸濁させた。また、飼育水温を従来の22~23°Cよりやや下げて21.5°C前後とし、1日4回だった給餌回数を5回とした。その結果、従来の飼育方法では成長が停滞したふ化後20日目以降も順調な成長が続き、30日で平均全長は10 mm、50日で15 mmを越え、100日目には20 mm以上となった。また、ふ化後30日、全長10 mmを越える頃から全長に対して体高が高くなり始め、その後、歯や鰭の発達、肛門前筋節数の増加などプレレプトケファルスからレプトケファルスへの形態変化も観察され、大きいものは全長30 mm以上にまで成長した(図2)。²⁵⁾

4. おわりに

40年に渡って行われてきたウナギの成熟制御技術の開発は、ここ数年来の研究により、かなりの確率で受精卵が得られるところまで到達した。これらの技術が確立できた背景には魚の繁殖生理学に関する基礎研究がこの20年ほどの間に急速に進歩し、これらの基礎研究があ

図2 ウナギ人工ふ化仔魚の給餌による成長。

上から、ふ化直後(全長3.6 mm)、ふ化後10日(6.9 mm)、30日(11.9 mm)、50日(15.9 mm)、100日(22.0 mm)、209日(31.0 mm)。

って初めて我々の研究が進歩したことを強調しておかなければならない。今後、水産研究が発展していくためには、現場対応の、応用技術に直結する研究はもちろんのこと、長期的視野に立った基礎研究の持続が重要になってくる。ウナギの研究を基礎研究と応用研究の有機的なつながりを示した一例として理解して頂けると幸いである。

レプトケファルス幼生までの人工飼育に成功したことによって、完全養殖の実現までに残された大きな壁はシラスウナギへの変態誘起のみとなった。水産研究の分野において長年にわたって夢とされてきたウナギの人工種苗生産は、もはや現実的目標として捉えるべき所まで近づいている。

文 献

- 1) 日比谷 京：ウナギの完熟採卵に成功。養殖，3(7)，12-15 (1966)。
- 2) K. Yamamoto and K. Yamauchi: Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature*, 251, 220-222 (1974)。
- 3) 立木宏幸，中川武芳，田村憲二，廣瀬慶二：ニホンウナギにおける estradiol-17 β の経口投与による雌化効果，成長および親魚養成。水産増殖，45，61-66 (1997)。
- 4) H. Kagawa, N. Iinuma, H. Tanaka, H. Ohta, and K. Okuzawa: Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.*, 64, 77-82 (1998)。
- 5) Y. Nagahama, M. Yoshikuni, M. Yamashita, T. Tokumoto, and Y. Katu: Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Current Topics in Develop. Biol.*, 30, 103-145 (1995)。
- 6) K. Yamauchi: Studies of gonadal steroids involved in final gonadal maturation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, a review. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, 75, 859-860 (1990)。
- 7) H. Kagawa, H. Tanaka, H. Ohta, K. Okuzawa, and K. Hirose: *In vitro* effects of 17 α -hydroxyprogesterone and 17,20 β -dihydroxy-4-pregene-3-one on final maturation of oocytes at various developmental stages in artificially ma-

- tured Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.*, **61**, 1012-1015 (1995).
- 8) H. Kagawa, H. Tanaka, H. Ohta, K. Okuzawa, and N. Iinuma: Induced ovulation by injection of 17,20 β -dihydroxy-4-pregene-3-one in the artificially matured Japanese eel, with special reference to ovulation time. *Fisheries Sci.*, **63**, 365-367 (1997).
 - 9) H. Ohta, H. Kagawa, H. Tanaka, H. Okuzawa, and K. Hirose: Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 β -dihydroxy-4-pregene-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, **139**, 291-301 (1996).
 - 10) 山本喜一郎, 広井 修, 平野 忠, 森岡孝朗: シナホリン投与による養殖ウナギの精巣催熟について. 日水誌, **38**, 1083-1090 (1972).
 - 11) T. Miura, K. Yamauchi, Y. Nagahama, and H. Takahashi: Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zool. Sci.*, **8**, 63-73 (1991).
 - 12) H. Ohta and K. Takano: Testicular maturation induced by methyltestosterone in elvers of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.*, **62**, 990-991 (1996).
 - 13) H. Ohta, H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa, and K. Hirose: Milt production in the Japanese eel *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. *Fisheries Sci.*, **62**, 44-49 (1996).
 - 14) H. Ohta, H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa, N. Iinuma, and K. Hirose: Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.*, **17**, 163-169 (1997).
 - 15) H. Ohta, H. Kagawa, H. Tanaka, and T. Unuma: *In vitro* control of Japanese eel spermatozoa motility by manipulation of the environmental ionic concentration. Proc. 6th Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish., Bergen, 1999, p. 415.
 - 16) H. Ohta, K. Ikeda, and T. Izawa: Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility *in vitro* by Japanese eel spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, **277**, 171-180 (1997).
 - 17) H. Ohta, H. Tanaka, H. Kagawa, K. Okuzawa, and N. Iinuma: Artificial fertilization using testicular spermatozoa in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.*, **63**, 393-396 (1997).
 - 18) H. Ohta and T. Izawa: Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, **142**, 107-118 (1996).
 - 19) K. Yamauchi, M. Nakamura, H. Takahashi, and K. Takano: Cultivation of larvae of Japanese eel. *Nature*, **263**, 412 (1976).
 - 20) 佐藤英雄: ウナギの完全飼育をめざす. 遺伝, **33**, 23-30 (1979).
 - 21) H. Tanaka, H. Kagawa, H. Ohta, K. Okuzawa, and K. Hirose: The first report of eel larvae ingesting rotifers. *Fisheries Sci.*, **61**, 171-172 (1995).
 - 22) T. Kurokawa, H. Kagawa, H. Ohta, H. Tanaka, K. Okuzawa, and K. Hirose: Development of digestive organs and feeding ability in larvae of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **52**, 1030-1036 (1995).
 - 23) T. Kurokawa, H. Tanaka, H. Kagawa, and H. Ohta: Absorption of protein molecules by the rectal cells in eel larvae *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.*, **62**, 832-833 (1996).
 - 24) 田中秀樹: 仔魚の飼育技術. 月刊海洋 号外, **18**, 106-112 (1999).
 - 25) 田中秀樹: ウナギ・レプトケファルス幼生の人工生産. ブレインテクノニュース, **75**, 12-16 (1999).