

学 位 論 文 題 名

Biochemical and histological studies on egg quality  
in the Japanese eel (*Anguilla japonica*)

(ニホンウナギの卵質に関する生化学的および組織学的研究)

学位論文内容の要旨

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は、日本、中国、韓国の水産養殖業において非常に重要な魚種であるが、これまで天然の成熟親魚や成熟卵が発見されたことはない。また、人工種苗生産技術も確立していないため、養殖用のウナギ種苗はすべて天然のシラスウナギに依存している。ウナギは飼育環境下では生殖腺の発達が起こらないことから、これまで、他魚種の脳下垂体を未成熟雌ウナギに連続投与して性成熟を誘起する試みが行われてきた。現在では、サケ脳下垂体ホモゲネート (SPH) 投与により卵巣発達を促し、 $17\alpha, 20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) 投与により成熟卵を得るという方法が一般的となっている。しかし、受精率や仔魚の生存率は非常に低いのが現状である。最近、遂にシラスウナギまでの飼育が成功したが、養殖用人工種苗の供給にはいまだ多くの課題が残されている。中でも、人為催熟されたウナギから得られる卵の卵質改善が望まれている。

一般に、卵質には様々な要因が影響を与えていると言われており、遺伝的要因、環境条件、親魚の年齢や大きさ、卵の熟度、卵中の様々な栄養、化学成分など数多く指摘されている。特に、栄養分の中でもビタミンや脂質の研究は盛んに行われている。また、硬骨魚類を含む脊椎動物において、卵質と卵中の各種ホルモン量の関係も明らかにされつつある。中でも両棲類や魚類の変態に関わるとされる甲状腺ホルモン (サイロキシン; T4 およびトリヨードサイロニン; T3) は発生や孵化仔魚の生残に影響を与えることが知られ、稚仔魚の生残率向上作用が注目されている。人為催熟されたウナギでは、排卵直前の親魚の血中甲状腺ホルモン量が極めて低値を示すことが最近明らかにされ、甲状腺ホルモン不足が指摘されていた。

本研究では最初に、サケ脳下垂体投与により成熟誘導した雌ウナギ

の血中および卵巣中の甲状腺ホルモン量を測定した。その結果、卵巣の発達に伴い血中甲状腺ホルモン量が激減することが再確認されるとともに、卵巣中の甲状腺ホルモン量も減少し、得られた卵の甲状腺ホルモン量も他魚種よりも低いことが明らかになった。

そこで、ウナギ血中甲状腺ホルモン量を上昇させるため、甲状腺ホルモンの投与方法を検討した。注射、silastic capsule 投与及び cholesterol pellet 投与の比較検討を行った結果、血中甲状腺ホルモン量を一時的に増加させるには注射による方法が適当で、1週間程度高値に保つには cholesterol pellet を用いた投与方法が適当と考えられた。しかし、雌ウナギに対して、cholesterol pellet による甲状腺ホルモン投与を行ったが、明瞭な卵質改善はみられなかった。一方、注射による投与では、血中および卵中の甲状腺ホルモン量を有意に高めることができ、高い受精率を示す個体もみられた。しかし、卵中の甲状腺ホルモン量が高値を示しても必ずしも受精率が高くない個体もみられた。従って、甲状腺ホルモン投与は卵質改善に有効と考えられが、卵質悪化の原因は卵中の甲状腺ホルモン不足だけではないことが明らかになった。

そこで次に、これまで全く研究されていない卵中の性ステロイドホルモン量と卵質との関係を調べた。その結果、卵中の estradiol-17 $\beta$  および testosterone (T) 量は血中変化と同様に卵巣の発達に伴い増加した。卵中の性ステロイドホルモン量と卵質との相関関係はみられなかったが、血中 T 量が高いほど仔魚の無給餌生残率 (SAI) が低くなる傾向にあった。

以上の結果から、人為催熟されたウナギにおいては卵中のホルモン量と卵質には何らかの関係があると思われたが、それ以外に卵質に影響を与える大きな要因があるように思われた。そこで注目したのが卵の成熟度 (減数分裂進行度) と卵質との関連性である。一般に、硬骨魚類の卵成熟は脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GTH) の刺激により開始する。GTH は十分に成長した卵母細胞の卵濾胞細胞に作用し、卵成熟誘起ホルモン (MIH) を産生、分泌させる。MIH は卵母細胞質内に卵成熟促進因子 (MPF; cdc2 と cyclin B の複合体) を出現させ、この MPF が卵核胞崩壊 (GVBD) を起こさせ、卵成熟を直接誘導する。第1減数分裂前期で停止し、成長した卵母細胞はこの GVBD により減数分裂が再開する。崩壊によって核の内容物が卵細胞質中に拡散するとともに、染色体は凝縮し、やがて紡錘体が形成れ、第1極体が放出される。一方、別の経路で脱リン酸化された mitogen

-activated protein kinase (MAPK) は細胞分裂抑制因子として働き、MPF 活性を安定化、維持させることで、第2減数分裂中期で減数分裂が停止する。この時期には受精可能となり、第2減数分裂中期で停止した状態のまま排卵され、受精後、第2極体が放出される。このように卵成熟に伴い卵成熟関連因子の活性や染色体像の形態が大きく変化する。

本研究では、排卵された卵の減数分裂進行度（染色体の状態など）を組織学的に詳細に調べた。その結果、受精可能な第2減数分裂中期像が多く卵で観察されたが、それ以外にも、GVBDが起こっていない核移動期、GVBD後の染色体凝縮期、第1減数分裂前中期、第1減数分裂中期、第1減数分裂後期、第1極体放出期、第2減数分裂前中期など様々なステージが観察された。また、染色体（減数分裂）異常として、紡錘体が3つありそれぞれ重なっているように見えるもの、紡錘体の形が異常なもの、染色体が紡錘体から離れて存在するもの、2つの染色体像が観察されたものがあった。また、細胞質の過熟がみられる卵も観察された。

観察された染色体像を成熟段階別に分類し、受精率や孵化率との相関関係を見ると、第2減数分裂中期の染色体像の割合が多い卵は孵化率が高い傾向にあった。一方、第1減数分裂中期に至っていない、あるいは異常な染色体像や細胞質が過熟化した卵の割合が多くみられた卵では受精率は低値を示した。しかし、第2減数分裂中期の染色体像の割合が多い卵であっても孵化率が低値を示したものや、孵化率が高くても第2減数分裂中期の染色体像の割合が少ないものもあり、より検体数を増やす必要があると思われた。従って、排卵された卵の多くが第2減数分裂中期まで卵成熟が進んでいれば、受精率や孵化率が高くなると思われた。また、卵成熟の進行が不十分であったり、染色体異常や細胞質の過熟が受精率や孵化率の低下の原因であると思われた。

次に、MAPK、ヒキガエルの cyclin B, キンギョの cdc2 に対する抗体を用いた western blotting 法により、ウナギ卵中の卵成熟関連因子の検出を試み、これらと卵質との相関関係を調べた。Cyclin B 抗体では 52kDa と 50kDa の二つのバンドが検出され、受精率や孵化率が高い程、双方のバンドが濃い傾向にあった。また、cdc2 抗体により 37kDa と 35kDa の二つのバンドが検出され、受精率や孵化率が高い程、35kDa のバンドが濃い傾向にあった。しかし、MAPK 抗体により検出された約44kDa のバンドは受精率や孵化率の違いによる差は

認められなかった。

以上本研究において、人為催熟されたウナギでは、卵中の甲状腺ホルモンや性ステロイドホルモン量と卵質には何らかの関係があることを指摘した。さらに、卵中のホルモン量以外に卵質に影響を与える要因として、卵の成熟度（減数分裂進行度）があることを初めて明らかにした。排卵された卵には様々なステージが観察されるとともに、染色体（減数分裂）異常や細胞質過熟もみられ、受精率や孵化率の低下の大きな原因であることを示した。また、卵の減数分裂進行度は卵中の cdc2 および cyclin B の挙動に反映することから、これらは卵質の指標となることを示唆した。

## 学位論文審査の要旨

|    |     |    |    |
|----|-----|----|----|
| 主査 | 教授  | 山内 | 皓平 |
| 副査 | 教授  | 原  | 彰彦 |
| 副査 | 教授  | 荒井 | 克俊 |
| 副査 | 助教授 | 足立 | 伸次 |
| 副査 | 助教授 | 東藤 | 孝  |

### 学位論文題名

## Biochemical and histological studies on egg quality in the Japanese eel (*Anguilla japonica*)

(ニホンウナギの卵質に関する生化学的および組織学的研究)

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は我国の重要な養殖対象魚種であるが、養殖用のウナギ種苗はすべて天然のシラスウナギに依存している。最近、養殖研究所において、遂に数匹のシラスウナギまでの育成に成功したが、人為的に得られる卵の受精率や孵化仔魚の生存率は非常に低く、卵質改善が望まれている。一般に、卵質には、親魚の年齢や大きさ、遺伝的要因、環境条件、卵中の様々な栄養、化学成分、各種ホルモン量、卵の成熟度など様々な要因が影響を与えている。そこで本研究では、人為催熟されたニホンウナギの卵質改善を目的として、血中あるいは卵中の各種ホルモン量や排卵された卵の成熟度（減数分裂進行度）が卵質と関連性があるか否かを調べ、以下の興味ある知見を得た。

本研究では最初に、稚仔魚の生残率向上作用が注目されている甲状腺ホルモン（サイロキシシン；T4 およびトリヨードサイロニン；T3）量を測定した。その結果、血中および卵中の甲状腺ホルモン量は卵巣の発達に伴い減少し、他魚種よりも低値を示した。そこで、血中および卵中の甲状腺ホルモン量を上昇させるため、注射、silastic capsule および cholesterol pellet 投与の比較検討を行った。その結果、注射方法で甲状腺ホルモン量を効果的に高めることができ、高い受精率を示す個体がみられた。しかし、必ずしも受精率が高くない個体もみられた。そこで次に、これまで全く研究されていなかった卵中の性ステロイドホルモン量と卵質との関係を調べた。その結果、卵中の性ステロイドホルモン量と卵質との大きな相関関係は

みられなかったが、血中テストステロン量が高いほど仔魚の無給餌生存率が低くなる傾向にあった。

以上の結果から、人為催熟されたウナギにおいては卵中のホルモン量と卵質には何らかの関係があるが、それ以外に卵質に影響を与える大きな要因があるように思われた。そこで注目したのが卵の成熟度（減数分裂進行度）と卵質との関連性である。一般に、魚類においても卵成熟促進因子（MPF; cdc2 と cyclin B の複合体）が卵核胞崩壊（GVBD）を起こさせ、卵成熟を直接誘導する。第1減数分裂前期で停止し、成長した卵母細胞はこの GVBD により減数分裂が再開する。一方、別の経路で脱リン酸化された mitogen-activated protein kinase (MAPK) は細胞分裂抑制因子として働き、第2減数分裂中期で減数分裂が停止する。このように、卵成熟に伴い卵成熟関連因子の活性や染色体像の形態が大きく変化するが、本研究では、まず、排卵されたウナギ卵の減数分裂進行度（染色体の状態など）を組織学的に詳細に調べた。その結果、受精可能な第2減数分裂中期像が多く、多くの卵で観察されたが、それ以外にも様々なステージ、減数分裂異常、細胞質の過熟などが観察された。観察された染色体像を成熟段階別に分類し、受精率や孵化率との相関関係を見ると、第2減数分裂中期の染色体像の割合が多い卵は孵化率が高い傾向にあり、未成熟、染色体異常、細胞質の過熟の割合が多い卵は孵化率が低い傾向にあった。さらに、MAPK、ヒキガエルの cyclin B, キンギョの cdc2 に対する抗体を用いた western blotting 法により、ウナギ卵中の卵成熟関連因子の検出を試み、これらと卵質との相関関係を調べた。その結果、受精率や孵化率が高い程、cyclin B 抗体による 52kDa と 50kDa の二つのバンドと cdc2 抗体による 35kDa のバンドが濃い傾向にあった。しかし、MAPK 抗体により検出された約 44kDa のバンドは受精率や孵化率の違いによる差は認められなかった。従って、人為催熟により得られたウナギ卵においては、それらの多くが第2減数分裂中期まで卵成熟が進んでいれば、受精率や孵化率が高くなり、未成熟、染色体異常、細胞質の過熟が受精率や孵化率の低下の主な原因であると思われた。

上記のように、本研究では、ニホンウナギにおいて卵中の甲状腺ホルモンや性ステロイドホルモン量と卵質には何らかの関係があることを指摘した。さらに、卵中のホルモン量以外に卵質に影響を与える要因として、卵の成熟度があることを卵成熟関連因子の活性及び染色体像の形態の変動により初めて明らかにし、これらは卵質の指標となることを示唆した。これらの結果は、今後、ニホンウナギの人工種苗生産技術を確立するために極めて重要な知見を提供したものであるものとして高く評価され、本論文が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。