

魚類の生体外卵生産に関する研究

学位論文内容の要旨

魚類養殖において、種苗生産用の親魚を成熟させ、受精率、孵化率および生残率が高い良質卵を得ることは極めて重要である。養殖対象魚種の中には、飼育環境下では成熟および産卵しない魚種も多く、人為的に成熟および産卵を誘導するための各種ホルモン投与が行われている。しかし、ホルモン投与により得られた卵の質は不安定であることが多く、卵質の悪化の原因究明が求められている。

これまで卵質悪化機構の解析は個体を対象にした生体内実験が多く、生体外実験系を用いた卵質悪化機構の解析は全く行われていない。生体外実験系は、卵質悪化の機構解析に有用なだけでなく、革新的卵生産技術開発にも繋がる。そこで本研究では、我が国の重要な養殖対象種であるニホンウナギ (*Anguilla japonica*) および新たな養殖対象種のチョウザメを用いて生体外卵生産技術の確立を目的として以下の実験を行った。

まず、生体外で排卵誘導後、排卵された卵の卵質悪化を防ぎ、未受精卵の受精能を維持可能な人工生殖腔液の作製を目的として、キンギョ (*Carassius auratus*)、サクラマス (*Oncorhynchus masou*)、シロサケ (*Oncorhynchus keta*) およびニホンウナギを用いて、自身の生殖腔 (卵巢腔または体腔) 液または人工生殖腔 (卵巢腔または体腔) 液中での未受精卵の生体外保存を行った。キンギョ未受精卵をキンギョ卵巢腔液と人工卵巢腔液に入れて一定時間保存した後、人工授精を行った結果、キンギョ卵巢腔液では、生体外で9時間保存しても仔魚が得られた場合もあった。孵化率は時間経過に伴い低下した。一方、人工卵巢腔液に入れた未受精卵では、受精卵は得られなかった。未受精卵の形態観察をした結果、人工卵巢腔液に入れた未受精卵は囲卵腔形成が開始し、卵の付活が起こった。一方、他魚種の体腔液で未受精卵を保存した結果、卵の付活は起きなかったが、人工授精を行っても受精卵は得られなかった。シロサケおよびサクラマスにおいては、自身の体腔液と人工体腔液を用いて一定期間未受精卵を保存した結果、6日後では、自身の体腔液で保存し

た方が人工体腔液と比較して有意に受精率は高かった。しかし、人工体腔液でも3日間はある程度の受精能を維持できた。ニホンウナギでは、人工体腔液や他魚種の体腔液でも排卵後2時間までは受精能を失うことなく保存できた。

次に、ニホンウナギの生体外卵生産技術の確立を試みた。ニホンウナギは飼育環境下では性成熟しないため、サケ脳下垂体抽出物 (SPE) を毎週1回連続投与することにより卵黄形成を促進し、卵黄形成完了後、SPEのプライミングと最終成熟誘起ステロイドである $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) 投与により最終成熟および排卵を誘導している。まず、プライミング注射後の卵巣を生体外に摘出し、DHPと共に培養することで最終成熟および排卵を誘導し、得られた卵の人工授精を行った。培養条件の検討として、培養液にウシ血清アルブミン (BSA) を0、0.5または1%添加する群を設けた。また、人工授精のタイミングの検討として、実験1では、プロスタグランジン (PG) 添加3および6時間後に排卵された卵を集め、人工授精を行った。実験2では、DHPのみで排卵した卵 (DHP誘導卵) とPG添加により排卵した卵 (PG誘導卵) を集め人工授精を行った。まず、BSAが卵質に及ぼす影響を検討した結果、培養液中へのBSA添加では卵質の維持には影響せず、逆にその濃度依存的に孵化率が低下した。人工授精のタイミングは、PG添加3および6時間後に排卵された卵では孵化率が極めて低かった。DHP誘導卵とPG誘導卵では、DHP誘導卵で最も高い孵化率が得られ、排卵後直ちに人工授精を行う必要性が生体外でも改めて示された。また、プライミング注射後の卵巣を4°Cまたは20°Cで1日間保存後、DHPを添加して最終成熟および排卵を誘起し、得られた卵の人工授精を行った結果、4°C群が20°C群に比べ高い孵化率を示す卵が得られる傾向が認められた。実験を通して得られた仔魚は、生体内で最終成熟および排卵誘導して得た卵と同様の発生過程を示した。以上の結果より、ニホンウナギにおいて生体外培養系を用いて最終成熟および排卵誘導した卵から初めて仔魚を得ることに成功した。しかし、生体内の排卵誘導の場合と同様に、用いた親魚ごとに卵質は一定しなかったことから、続く実験では、卵黄形成完了後、プライミング注射を行う前に卵巣を摘出し、生体外で最終成熟および排卵が獲得可能か検討した。

プライミング前の卵巣をSPE、ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (hCG)、組換えニホンウナギ生殖腺刺激ホルモン (rGTH) を用いて前培養を行い、その後DHPの添加により最終成熟および排卵誘導し、得られた卵の人工授精を行った。その結果、hCG (50 IU/ml)

または SPE (250 $\mu\text{g/ml}$) で 24 時間前培養し、その後 DHP を添加して最終成熟および排卵誘導することで、実験期間を通して比較的高い孵化率が得られた。rGTH で前培養した場合では、低濃度での検討しか行えなかったため、十分な評価が行えなかった。これらのことから、hCG 50 IU/ml および SPE 250 $\mu\text{g/ml}$ が生体外で前培養を行う時の有効濃度であると推察された。また、GTH 前培養後と DHP 添加により排卵された卵の観察を行った結果、孵化率が低い個体において、前培養 12 時間後に個々の油球が小さい未熟な状態であった卵が、時間経過に伴い油球の融合が進行し、前培養 48 時間後では過熟になった卵が観察された。以上より、同一個体を用いて時間経過に伴う卵の詳細な変化が追跡可能となった。

最後に、チョウザメの卵巢を用いた生体外培養系の確立を試みた。チョウザメ類は、飼育環境下では自然産卵しないため、ホルモン投与により排精および排卵を誘起しているが、種苗の安定供給には至っていない。これまでチョウザメでは、生体外実験系を用いて卵核胞崩壊 (GVBD) に関する研究が行われてきたが、GVBD 以降の排卵誘導を行った報告はない。さらに、チョウザメは卵母細胞が最終成熟能を有した状態で数ヶ月間維持され、同一個体から繰り返し卵巢片の摘出が可能である。そこで、生体外培養系確立のため、培養液の検討を行った。その結果、L-15 培養液が有効であることが示された。次に、排卵誘導の方法を検討した結果、排卵は 17α -ヒドロキシプロゲステロン (17α -OHP) の単独または 17α -OHP と SPE の複合添加によって誘起された。得られた卵を用いて人工授精を行った結果、 17α -OHP と SPE の複合添加群で得られた卵のみで受精卵および仔魚が得られた。以上より、チョウザメもウナギ同様に生体外で最終成熟および排卵誘導し、得られた卵を人工授精して孵化仔魚を得ることに成功した。

以上本研究において、ニホンウナギおよびチョウザメを用いて卵黄形成完了後の卵巢を生体外に摘出し、最終成熟および排卵誘導後に得られた卵を用いた人工授精を行い、孵化および発生可能な卵を得る技術を確認することに成功した。ニホンウナギを用いた一連の実験では、卵黄形成から最終成熟および排卵、そして人工授精後に仔魚が得られたことから、卵黄形成完了後の最終成熟の全ての過程を生体外培養系で誘導することが可能となった。一方、チョウザメでは、生体外で最終成熟および排卵誘導が可能となり、長期間にわたり同一個体から仔魚を得ることが可能となった。本研究の結果は、生体外培養系を用いた卵質悪化機構の解析および新たな種苗生産技術として極めて有用である。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	足 立 伸 次
副 査	教 授	原 彰 彦
副 査	准教授	井 尻 成 保
副 査	准教授	東 藤 孝
副 査	助 教	平 松 尚 志

学 位 論 文 題 名

魚類の生体外卵生産に関する研究

本研究では、我が国の重要な養殖対象種であるニホンウナギ (*Anguilla japonica*) および新たな養殖対象種のチョウザメを用いて生体外卵生産技術の確立を目的として以下の実験を行った。

まず、生体外で排卵誘導後、排卵された卵の卵質悪化を防ぎ、未受精卵の受精能を維持可能な人工体腔液の作製を目的として、キンギョ (*Carassius auratus*)、サクラマス (*Oncorhynchus masou*)、シロサケ (*Oncorhynchus keta*) およびニホンウナギを用いて、自身の生殖腔 (卵巣腔または体腔) 液または人工生殖腔 (卵巣腔または体腔) 液を用いて一定期間未受精卵の生体外保存を行った。その結果、キンギョにおいては人工卵巣腔液では未受精卵の保存はできなかったが、シロサケおよびサクラマスにおいては、人工体腔液でも3日間はある程度の受精能を維持した。また、ニホンウナギにおいては、人工体腔液や他魚種の体腔液でも排卵後2時間までは受精能を失うことなく保存できた。

次に、ニホンウナギの生体外培養系の確立を行なった。ニホンウナギは飼育環境下では性成熟しないため、サケ脳下垂体抽出物 (SPE) を毎週1回連続投与することにより卵黄形成を促進し、卵黄形成完了後、SPE のプライミングと最終成熟誘起ステロイドである $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) 投与により最終成熟および排卵を誘導している。最初に、プライミング注射後の卵巣を生体外に摘出し、DHP と共に培養することで最終成熟および排卵を誘導し、得られた卵の人工授精を行なった。まず、培養液の検討と

して培養液にウシ血清アルブミン (BSA) を 0、0.5、1%の濃度で添加し、BSA が卵質に及ぼす影響を検討した結果、培養液中への BSA 添加では卵質の維持に影響はみられなかった。次に、受精時間の検討を行なった結果、DHP のみで排卵された卵を人工授精に用いることで高い孵化率が得られた。また、プライミング注射後の卵巢を 4°C または 20°C で 1 日間保存後、DHP を添加して最終成熟および排卵を誘起し、得られた卵の人工授精を行なった結果、4°C 群が 20°C 群に比べ高い孵化率を示す卵が得られる傾向がみられた。受精卵を経時的に観察した結果、得られた孵化仔魚は無給餌下で、最長孵化後 14 日目まで生存した。以上の結果より、ニホンウナギにおいて生体外培養系を用いて最終成熟および排卵を誘導した卵から初めて孵化仔魚を得ることに成功した。

しかし、生体内の排卵誘導の場合と同様に、用いた親魚ごとに卵質は一定しなかったことから、続く実験では、卵黄形成完了後、プライミング注射を行なう前に卵巢を摘出し、生体外で最終成熟および排卵誘導が可能か検討した。その結果、ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (hCG) または SPE で 24 時間前培養し、その後 DHP を添加して最終成熟および排卵誘導し得られた卵の人工授精を行なうことで、実験期間を通して比較的高い孵化率が得られた。以上のように、同一個体を用いて時間経過に伴う卵の詳細な変化が追跡可能となった。

最後に、チョウザメの生体外培養系の確立のため、培養液および排卵誘導方法の検討を行った。その結果、培養液は L15 が有効であった。卵成熟および排卵は、 17α -ヒドロキシprogesterone (17α OHP) と SPE の単独または 17α OHP と SPE の複合添加によって誘起された。得られた卵を用いて人工授精を行なった結果、 17α OHP と SPE の複合添加群のみで受精卵および孵化仔魚が得られ、孵化仔魚は正常に成長した。以上より、チョウザメもウナギ同様に生体外で最終成熟および排卵誘導し、得られた卵を人工授精して孵化仔魚を得ることに成功した。

以上本研究において、ニホンウナギおよびチョウザメを用いて卵黄形成完了後の卵巢を生体外に摘出し、最終成熟および排卵誘導後に得られた卵を用いた人工授精を行い、孵化および発生可能な卵を得る技術を確立することに成功した。ニホンウナギを用いた一連の実験では、卵黄形成から最終成熟および排卵、そして人工授精後に仔魚が得られたことから、卵黄形成完了後の最終成熟の全ての過程を生体外培養系で誘導することが可能となった。一方、チョウザメでは、生体外で最終成熟および排卵誘導が可能となり、長期間にわ

たり同一個体から仔魚を得ることが可能となった。本研究の結果は、生体外培養系を用いた卵質悪化機構の解析および新たな種苗生産技術開発に極めて有用な知見であり、審査員一同は申請者が博士（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。