

令和元年6月21日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14970

研究課題名(和文)水産上有用種を用いた氷冷採卵法の構築-雌親魚を氷水に浸すと放卵する-

研究課題名(英文)Development of novel egg collection method by immersing fish in icy water

研究代表者

吉崎 悟朗(Yoshizaki, Goro)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：70281003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：雌メダカを0℃で1分30秒間氷冷し、その後25℃の生理食塩水で蘇生した際に、63%の個体で放卵が確認された。また、得られた未受精卵を人工授精に供したところ、正常に発生し(孵化率；94.8%)、その発生速度に異常も認められなかった。なお、得られた次世代個体の外部形態も正常であった。以上のように、メダカ親魚を氷冷することで、効率的に未受精卵を得る技術の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、メダカは基礎医学や基礎生物学に加え、水産学分野においても重要なモデル動物として種々の実験に利用されている。本研究で開発した氷冷採卵法を用いることで、親魚に接触することなく高効率で未受精卵を採取することが可能となった。これにより各種実験系へと未受精卵を供給するための労力が大幅に簡略化された。また親魚に接触することなく未受精卵を採取できるため、親魚の産卵後の斃死がなく、貴重な親魚から未受精卵を得る際にも有効な方法になりうる。

研究成果の概要(英文)：By immersing matured female in icy water (0℃) for 90 sec and returning them into 25℃ isotonic salt solution, 63% of the treated fish released eggs spontaneously. By fertilizing the obtained eggs with sperm, the resulting offspring developed and hatched normally. Further the offspring showed normal external morphology and ploidy.

研究分野：水族発生工学

キーワード：氷冷 産卵誘発 メダカ 未受精卵

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

親魚を養殖池、あるいは生簀で飼育していると、成熟年齢に達しても自然産卵に至らない魚種は未だ数多く存在する。当然、これらの魚種の種苗生産には親魚から採卵、採精し、人工授精を行う必要がある。一方、養殖魚の選抜育種を進めるためには、有用形質を保持した雄個体と雌個体を特定し、1対1で交配することが望ましい。多くの海産魚種はグループ産卵を行うため、1対1交配ではその成功率は極めて低く、この場合も特定の雌雄親魚から搾出した卵と精子を人工授精するという方法が一般的である。サケマス類やコイ科魚類等の淡水魚は、元来スレに強いいため、採卵時に腹部を圧迫し、卵を搾り出すという操作で斃死することは稀であるが、多くの海産魚では卵の搾出操作により腹部にスレが生じ、これが原因でウロコが剥離したり、そこに病原体が感染するといった問題が頻発する。したがって、種苗生産の現場では、人工授精に用いる親魚は“使い捨て”にするものであるという観念が常識化している。しかし、上述したように有用形質を保持した個体や、成熟年齢に達した貴重な親魚を採卵に用いる場合は、これらの親個体を斃死させることなく、繰り返し使用することが強く望まれている。

2. 研究の目的

親魚から卵を得る操作は、種苗生産の最初のステップである。特に人為管理下では自然産卵を行わない種や、育種を目指した1対1交配を行う必要がある場合は、親魚から搾出法によって卵を得ることが必要となる。しかし上述したように卵を搾出した後の雌親魚はハンドリングストレスや、スレ、さらにはそれらに起因する感染症の罹患による斃死率が高く、結果として親魚を使い捨てにしなくてはならない事例が多い。申請者は、メダカをモデルに用い、成熟した雌親魚を氷冷した後、26の等張液中に移すと、これだけの操作で雌親魚が高頻度で放卵することを見出した。そこで本研究では、その放卵成功率を上昇させるための技術的改良を目指すとともに、メダカで開発、改良した方法論を各種有用海産魚や淡水魚種へと応用し、親魚を斃死させることなく採卵する技術の構築を目指した。

3. 研究の方法

本課題では、まず、氷冷採卵法のさらなる改良を目指して、メダカをモデルに用いて、最も適した氷冷時間、蘇生温度の詳細な探索を行った。この際には、用いた雌親個体のうち、何個体が放卵にいったか、個々の放卵個体が生み出した卵数はいくつか、さらにはこれらの雌親個体が生残するかを指標に用いた。これと同時に、本技法を他魚種へと応用可能かを検討した。これにはまず、温水性の淡水魚としてゼブラフィッシュを用いた。本種では氷冷状態では斃死に至ってしまうため、まず低温麻酔に適切な温度帯を検討した後に、その条件で低温採卵を試みた。また水産上有用種としては淡水魚ではアユを材料に氷冷採卵を試みた。一方、海産魚としてはニベを材料に用いた。従来用いてきたメダカとこれらの魚種は体サイズが極端に異なるため、体内の温度低下速度も大きく異なることが予想されるので、氷冷時間は“時間そのもの”ではなく氷冷麻酔状態に到達した段階を目安に設定した。また、その後の蘇生処理は通常の飼育に用いている温度に調整した等張液中(ニベでは23度、アユでは18度)で行った。

4. 研究成果

初年度はメダカを材料に用い氷冷採卵条件の至適化を試みた。産卵効率を至適化するために、蘇生用生理食塩水の温度(15、20、25、30)、氷冷水温(0、4)、さらに氷冷する時間(30秒、1分30秒、3分間)の条件検討を行った。各実験における雌メダカの生残率、放卵する個体の割合、一個体あたりの産卵数、さらに得られた未受精卵の受精率と孵化率を比較し、最も効率的に産卵を誘発することができる氷冷条件を決定した。最後に、本研究で至適化された条

件により得られた未受精卵にヒメダカ精子を人工授精し、得られた次世代の発生速度を解析した。さらに、これらの次世代個体のDNA量解析を行い、核相を調査した。

雌メダカの氷冷条件を至適化した結果、放卵する個体の割合が最も多かったのは、氷冷を0で1分30秒間行い、その後25度の生理食塩水で蘇生した区であった(放卵個体率; 63%)。また、得られた未受精卵を人工授精に供したところ、正常に発生し(孵化率; 94.8%)、その発生速度に異常も認められなかった。なお、得られた次世代個体の外部形態も正常であった。さらに、これら次世代個体の核相を血球のDNAをPIにより染色し、フローサイトメーターで定量したが、得られたピークは正常個体の2倍体の値と同一であり、本法により正常な卵が産出されており、その倍数化等の異常は認められないことが明らかとなった。以上のように、メダカ親魚を氷冷することで、効率的に未受精卵を得る技術の開発に成功した。

続いて、本技法の汎用性を確認するべく、コイ科のゼブラフィッシュを用いて研究を行った。冷却採卵の条件検討を行う第一段階として、まず低温麻酔の条件を検討した。水温26度で飼育したゼブラフィッシュを10度~20度の種々の水温の水槽へと移槽した結果、水温16度の水槽に移した際に、効率よく低温麻酔をかけられることが明らかとなった。またこれらのゼブラフィッシュを再び26度に戻した場合でも、斃死個体はほとんど出現しなかった。そこで、次に排卵が確認された雌のゼブラフィッシュを用いて放卵誘発実験を試みた。具体的には16度の水槽内で1分間、1分30秒間、2分間、それぞれ低温麻酔を施し、その後、急激に26度に戻すという操作を行ったが、いずれの条件においてもメダカで確認されたような放卵現象を確認することができなかった。なお、14度以下の水温で低温麻酔を施した場合、その蘇生率が大幅に低下し、斃死個体の出現頻度が急増したため、処理水温を下げるという刺激を加える実験については断念せざるをえなかった。

ゼブラフィッシュでの失敗を踏まえ、10度~20度といった低温での採卵は困難であり、メダカと同様に氷冷麻酔を施すことが可能な魚種を用いることが、本法を適用するための条件ではないかとの仮説の基、アユを用いてメダカ同様の氷冷処理を試みた。本実験では産卵期に自然排卵したアユ親魚(18度で飼育)を0度で1~3分間の様々な時間、氷冷処理を施し、その後急速に18度に戻す処理を行った。しかし、これらの処理により自ら卵を放卵する個体は全く見られなかった。なお、これら一連の氷冷処理に伴い、ゼブラフィッシュで見られたような処理個体の斃死は認められず、その後も特段に生残率が低下するような現象は見受けられなかった。

次に海産魚のニベを用いて同様に氷冷処理を試みた。本実験では雌親魚を14時間明期、10時間暗期、さらに26度で飼育することで自然排卵を誘起し、排卵が確認された個体を用いて氷冷処理を施した。これには0度の氷冷処理を1分から5分間の様々な期間行い、その後急激に26度の飼育水に戻す処理を施した。しかし、いずれの処理区においても放卵は認められず、氷冷処理の有効性は確認できなかった。また、これらの処理を施した雌親魚のかなりの個体が処理後24-28時間程度で斃死してしまったため、本処理方法は少なくともニベには不適であることが明らかとなった。

以上の結果から、氷冷採卵は少なくとも研究に用いた魚種の中ではメダカに特異的に適応可能な方法であり、残念ながらその汎用性は高くはないことが明らかとなった。しかし、水産分野への応用を前提としたさまざまな実験にメダカを用いる機会は近年増加しており、メダカの未受精卵を親魚の腹部を搾出することなく採取できる本法は水産分野においても基礎的な実験の際には有用な方法となりうるものと期待された。

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Nagasawa Kazue、Ishida Mariko、Octavera Anna、Kusano Kazunari、Kezuka Fumi、Kitano Takeshi、Yoshiura Yasutoshi、Yoshizaki Goro
Novel method for mass producing genetically sterile fish from surrogate broodstock via spermatogonial transplantation. Biology of Reproduction. 100, 535-546 (2018).
10.1093/biolre/ioy204 (査読有)

(2) Yoshizaki Goro、Yazawa Ryosuke

Application of surrogate broodstock technology in aquaculture. Fisheries Science. 85, 429-437 (2019). 10.1007/s12562-019-01299-y (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。