

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22328

研究課題名（和文）高解像度超音波画像診断による迅速かつ非侵襲的な海産魚の早期性判定法

研究課題名（英文）Development of a noninvasive sexing method for marine fish by high-res  
ultrasonography

研究代表者

矢澤 良輔（Ryosuke, Yazawa）

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：70625863

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：生殖腺の形態により性別が判明しているマサバの超音波画像を集積し、生殖腺画像の特徴を解析することにより、満1歳以上のマサバにおいて、正答率95%以上で性別の判定が可能となった。しかし、若齢個体では超音波による判定は困難であったため、性特異的なSNPsを利用し性特異的に増幅可能なPCRプライマーセットを開発した。これらのプライマーを用いて様々な個体で性別判定PCRを行ったところ、プライマー1ではオス98.5%、メス100%、プライマー2ではオス100%、メス96.4%であった。以上の結果から、超音波画像診断および分子情報を用いた性判定により親魚集団中のメス親魚の割合を自由に制御することを実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において開発された技術により、生殖腺の形態の性的二型およびその発達度合いを指標に超音波画像診断が可能となった。さらに、成熟度合いに依存しない分子情報を用いた性判定についても可能となり、当初の目的であった親魚集団中のメス親魚の割合を自由に制御することを実現した。将来的には、これらの技術を複合的に用いることで、メス親魚の成熟度の判定について情報を蓄積し、良質な卵を産む親魚を判別する技術の開発についても期待される。近年サバの養殖が日本各地で盛んになっており、本研究の成果はただちに養殖現場で利用可能な技術であり、より高度なサバ養殖技術の発展に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：For an efficient and stable aquaculture production of mackerels, which have become important aquaculture target species in Japan, it is desirable to work with a female-biased broodstock and thus to be able to manage precisely their sex ratio. In the present research project, we developed a noninvasive sexing method for marine fish by high-res ultrasonography. By analysis of ultrasound images of gonads, it was possible to identify their sex in more than 95% accuracy. We have also developed PCR-based molecular sex identification method for both chub and blue mackerels using sex-specific single-nucleotide variations identified by pool-sequencing analyses. Results demonstrated by this method were robust and accurate in assessing the genotypic sex of both blue and chub mackerels. We therefore conclude that these methods could be applied for the efficient management of sex-ratios in both mackerel aquaculture populations and wild-caught animals for fisheries management.

研究分野：海産魚の繁殖生理学および発生工学

キーワード：性判定 マサバ 超音波 性特異的SNPs 養殖親魚

## 1. 研究開始当初の背景

海産養殖において大量かつ安定的に良質な人工種苗を生産するために、親魚の性別やその成熟度を把握しておく必要がある。種苗の生産数はメス親魚の尾数に依存し、媒精に必要なオス親魚数はメス親魚数に比べ少ない。加えて、飼育環境下ではメス親魚が成熟および産卵にまで至る個体の割合が低いことが問題となる。つまり、限られた飼育スペースの中で、給餌等の親魚養成にかかるコストや労力を削減し、量・質ともに安定した種苗生産を実現するためには、親魚群から性判定技術によりメス親魚を選抜し、メスの割合を高める必要がある。現在、明瞭な外見での性的二型を示さない海産養殖魚に対する性判定方法として、性特異的遺伝子を PCR により検出する方法、血中や体表粘液中の性ステロイドを ELISA 法により検出する方法、総排泄腔からポリエチレンチューブを用いて卵や精子を直接採取するカニューレション法等が存在する。しかし、PCR 法や ELISA 法では判定までに少なくとも数時間を要し、判定の結果を待ち、各個体に付与されたタグ等により該当個体を識別したうえで再度、メス親魚を選別する必要がある。また、カニューレションや採血は、多大なハンドリングストレスを親魚に与えることとなり、成熟の遅延や、最悪の場合、斃死による親魚の喪失が危惧される。加えて、カニューレション法や性ステロイドの検出は、個体の成熟に伴う雌雄差による性判定技術であるため、未熟な若魚での利用はできない。さらに、性特異的遺伝子の利用は現在のところ一部の種に限定されているうえ、環境依存性に性転換する可能性がある魚種では、表現形としての性別の判定については信頼度が低い。そこで申請者は超音波画像診断技術による魚類の性判定法に着目した。

そこで、迅速かつ非侵襲的に性判定が可能となる技術として、超音波画像診断に着目したものの、従来の装置は、その解像度が低く海産魚の性判定には利用不可能なうえ、ヒトや家畜の診断用であるために極めて高価であり、水産現場で広く使用可能な価格となっていない。そのため、超音波診断の水産での利用は卵が極端に大きいアトランティックサーモンやその卵が極めて高い価値を持つチョウザメといった、国外の大規模産業に限定されており、我が国での海産養殖現場での利用は全く無いのが現状である。本研究では、近年その養殖が日本各地で盛んに行われており、安定的な種苗生産技術の開発が求められているマサバをモデルとして、その解像度が格段に進歩した超音波画像診断装置を用いた性判定技術の開発を目指す。超音波画像診断装置の解像能は改善されたが、これを用いた海産魚の生殖腺の超音波画像データの蓄積は皆無である。特に未熟な生殖腺の本技術による判別については前例の無い挑戦的な研究である。本技術により、性別に関して生理学的な指標を全く示さない個体の性判定が可能となれば、小型で商業価値の低い幼若魚の時期にメス個体のみを集める等、従来の技術では不可能であった新しい発想での親魚養成を実現でき、極めて高い価値を持つ技術となると考えられた。

## 2. 研究の目的

前述のような背景から本研究では、非侵襲的かつリアルタイムに身体の断面像を得ることが可能である超音波画像診断を用いて、従来の性判定技術では実現できていない、1) 迅速：性判定と選別をリアルタイムで実施可能、2) 非侵襲的：ハンドリングストレスを伴わない非外科的な作業、3) 早期判定の実現を目的とした。これにより、海産養殖において安定的に良質な人工種苗を生産することを最終目標として、本研究で確立する性判定技術により、親魚集団中のメスの割合を高める技術開発を我が国の重要な養殖対象魚であるマサバにおいて構築する。

## 3. 研究の方法

組織学的解析で性別が可能な若魚から成熟および産卵が可能な成魚のマサバを供試魚として、超音波画像診断を実施した。まず、成熟親魚(カニューレション法により性判定が可能)を対象に超音波画像診断を実施する。性別が予め判別している雌雄の親魚を用い、画像診断に適した部位やプローブの接触方法等を検討した。さらに、成熟魚の解析結果により最適化した診断方法を、非成熟期の個体および様々な発達段階の若齢個体へ応用し、対象個体が未成熟であっても性判定が可能な条件を検討した。また、得られた画像データと組織学的な解析等の結果を照合することで、超音波画像中の生殖腺の形状や大きさから成熟度を判別する技術の確立も試みた。

また、本研究では、性特異的な SNPs を利用した PCR 法によるマサバおよびゴマサバの性別判別法の開発についても試みた。具体的には、千葉県産の天然マサバおよびゴマサバ雌雄各 30 個体について、生殖腺の形態で性別すると同時に、胸ビレから DNA を抽出し pool-seq を行なった。取得した塩基配列を de novo assembly により得られた参照配列にマッピングし、マサバおよびゴマサバの性特異的な SNPs を探索した。続いて性特異的 SNPs を検出する PCR 系を構築し、異なる産地のマサバおよびゴマサバについて、本法による性別判別が可能か検証した。

## 4. 研究成果

マサバ雌雄の超音波画像を集積するために、超音波画像装置で用いて様々な位置からマサバの画像撮影を行なった。そのうえで、撮影個体を解剖し、生殖腺の外部形態により雌雄を判別し

た。このような撮影を3ヶ月齢、非産卵期および産卵期の1歳魚のマサバでそれぞれ複数個体(10~30個体)で実施した。撮影した超音波画像と性別を対応させ、それぞれの発達段階における、雌雄の生殖腺の超音波画像の特徴を解析した。画像解析の結果、超音波画像診断のプロープを対象魚の総排泄腔より頭側の部位に腹側から接触させ、断面画像を得ることで、生殖腺の雌雄の形態学的特徴が捉えやすくなった(図1)。この方法で得た超音波画像において、非産卵期および産卵期の1歳魚では、画像中の生殖腺の形状、画像上の色の濃淡で精巢あるいは卵巣を判別できることが明らかとなった(図2)。しかし、非成熟、あるいは成熟の判別はある程度可能であったが、メス個体の成熟の進行具合についての判断は超音波画像の解析では困難であった。また、3ヶ月齢の生殖腺の発達段階が未熟な個体において、超音波画像の解析による性別の判断は困難であった。続いてこの診断方法を生きたマサバに応用するため、1歳魚を2フェノキシエタノールで麻酔のう

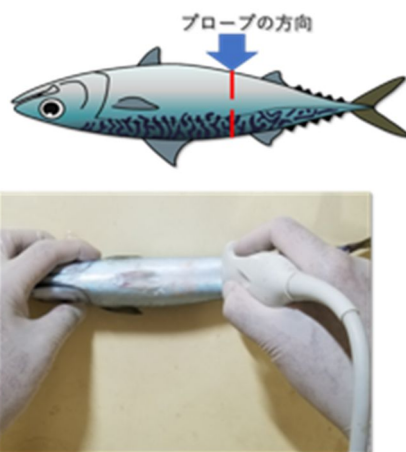


図1. 超音波画像診断の方法

え、超音波画像診断による性判定を実施した。その結果、前述の情報をもとに性判定が可能であった。また、麻酔および画像診断が原因で死亡する個体はいなかった。以上のように、超音波画像診断により、非侵襲的にリアルタイムでマサバ1歳魚以上の個体の性別の判定が可能となった。

超音波画像診断では、未成熟個体の性判別が困難であったことから、本研究ではさらに、性特異的な SNPs を利用した PCR 法によるマサバおよびゴマサバの性判別法の開発を試みた。雌雄各 30 個体における性別の pool-seq の結果をもとに、マサバおよびゴマサバの性と強い関連を示す SNPs を同定した。なお、マサバではメス特異的、ゴマサバではオス特異的 SNPs が主に同定されたことから、マサバでは雌ヘテロ型(ZW)、ゴマサバでは雄ヘテロ型(XY)の性決定様式であることが強く示唆された。これら性特異的 SNPs を検出する PCR 系を構築し(図3)、マサバ(n=208)およびゴマサバ(n=118)について性判別を行った。本 PCR による性判別結果と、生殖腺の形態観察結果を比較したところ、両者はマサバではオスで 98.9%、メスで 100%、ゴマサバではオスで 94.4%、メスで 96.9%の高い精度で一致した。本法はフィンクリップによるサンプリングのみで実施可能で魚体へのストレスが少ないうえ、判別精度も高いことから、サバ類親魚の性比管理に有用である。

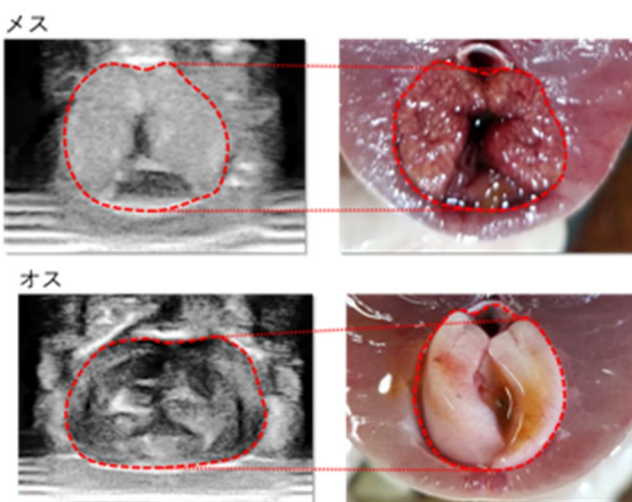


図2. 雌雄マサバの超音波画像

以上の様に、生殖腺の形態の性的二型およびその発達度合いを指標に超音波画像診断が可能となった。また、成熟度合いに依存しない分子情報を用いた性判定についても可能となり、当初の目的であった親魚集団中のメス親魚の割合を自由に制御することを実現した。今後は、これらの技術を複合的に用いることで、メス親魚の成熟度の判定について情報を蓄積し、良質な卵を産む親魚を判別する技術の開発を試みる。

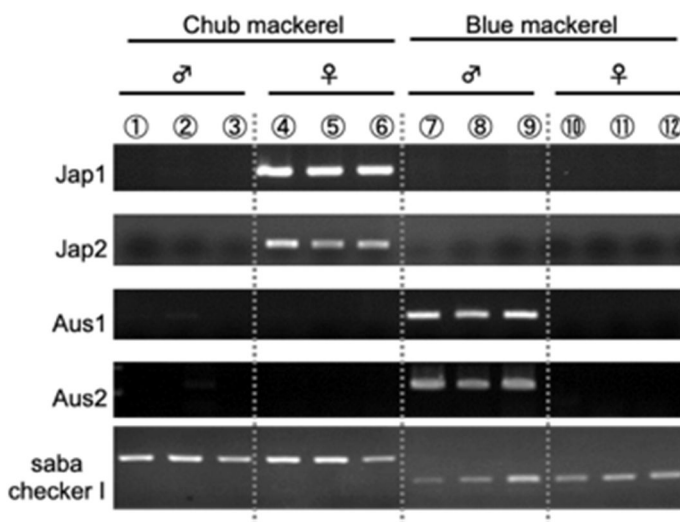


図3. サバにおける性判定 PCR の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawamura, W, Yazawa R, Tani R, Takeuchi Y, Morita T, Yoshikawa H, Yoshizaki G.	4. 巻 51
2. 論文標題 Development of a simple method for sperm cryopreservation of Scombridae fishes in outdoor environments.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquaculture Res	6. 最初と最後の頁 3376-3383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/are.14673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷 怜央人・矢澤 良輔・吉崎 悟朗・Yann Guiguen
2. 発表標題 マサバおよびゴマサバのPCR法による性判別
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------