

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：28003

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658166

研究課題名(和文) 魚類の高水温飼育による不妊化技術開発

研究課題名(英文) Sterilization of fish by high temperature

研究代表者

中村 将(Nakamura, Masaru)

名桜大学・公立大学の部局等・研究員

研究者番号：10101734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ふ化後3日ティラピア稚魚を50-80日間高温(37度)により飼育し、その後、通常の温度(25-30度)で1年以上飼育した。雌の卵巣中の生殖細胞は全て消滅して不妊化していた。性ホルモンを合成する細胞は分化していたが性ホルモンの合成は不活発で雌の性行動を行なうことはなかった。雄も同様に精巣中には全く生殖細胞が観察されずに不妊化していたが、性ホルモンを作るライデヒ細胞は活発に性ホルモンを合成し、正常な雄の婚姻色と産卵床の形成、正常雌との交配をおこなった。しかし、全ての卵は受精することなしに死滅した。不妊化した雄を自然界に放流することで野生化したティラピアを激減させる技術を開発することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Juveniles of the Mozambique tilapia, were reared from 3 days after hatching at a high temperature (37 degree centigrade) for 50 days. The gonads of all individuals were sterile. Sterile females did not display sexual behavior or exhibit female nuptial coloration. Histological analysis revealed the absence of all stages of spermatogenic germ cells from the testes of the heat-treated males; however, structures within the layer of epithelial cells lining the efferent ducts were observed to be actively secreting sperm fluid into the ducts, as also seen in the mature testes of normal males. The sterilized males nonetheless displayed male nuptial coloration, actively dug spawning nests, and mated with normal mature females. However, females mated with these males initially brooded their eggs normally but released them prematurely at 4 to 5 days. All the released eggs were unfertilized, and all were dead.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産一般

キーワード：魚類 不妊化 生殖腺 卵巣 精巣 生殖細胞

### 1. 研究開始当初の背景

水産増養殖の観点より魚類では簡易な方法により不妊化する方法の技術開発が期待されている。不妊化することにより配偶子の成長、性行動などの成熟に使われるエネルギーを体成長のエネルギーへと変換することで不妊化魚は大きくなると期待されている。実際、サケ科魚類の雌三倍体は不妊化され性成熟が抑制されるために肉質が安定して成長も良い結果が得られている。我々の最近の予備的研究より性分化前のティラピアの稚魚を37以上の高温で長期に渡り飼育し、その後長い間飼育しても生殖細胞を完全に欠く不妊化した成魚になることを確認した。本研究では高水温飼育により不妊化する技術を確立することを目的とした。

### 2. 研究の目的

主に二種のティラピアを用いて不妊化に有効な期間の検討、不妊化魚の生殖腺の状態、性ホルモン産生量、不妊化した雄と雌の性行動の観察を行なった。

コイとグッピーを用いて高水温の生殖腺に及ぼす影響についても調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ナイル・ティラピアの全雌の稚魚を用いて産卵後の日数の異なる稚魚を用いてこう水温の長期の処理を行ない生殖腺への影響を調べた。モザンビーク・ティラピア稚魚を用いて高水温で不妊化させた。その後長期に渡り常温で飼育し、生殖腺の状態を組織学的、微細構造学および免疫組織化学的に観察した。血中の性ホルモン量を特定した。不妊化魚の雌雄の性行動について調べた。不妊化魚は性的に成熟したので雌と交配を行ない妊性を調べた。

コイとグッピーの稚魚および成魚を高水温かで飼育し組織学的に生殖腺の状態を調

べた。

### 4. 研究成果

偽雄 (XX) と正常雌 (XX) との交配により得たナイル・ティラピア全雌稚魚をふ化後9日の性分化前より水温27、32、35、37で30-45日間日間連続的に飼育した。処理終了後室温で飼育し、約6ヶ月目に生殖腺の組織学的解析を行なった。27、32、35で30、45日間飼育した全ての魚は正常な発達した卵巣を持っていた。37で30日間飼育した魚の10尾中2尾正常な卵巣で、6尾は退行する生殖細胞を持つ異常な卵巣であった。2尾は生殖細胞を完全に欠く糸状の生殖腺であった。37で45日継続した個体の生殖腺は糸状であった。全く生殖細胞は認められ無いが、卵巣腔が分化し、卵巣薄板が発達した卵巣構造が見られた。生殖細胞に特異的に発現する VASA の抗体で免疫染色を行なったが、陽性細胞は認められなかった。

ふ化後50日の性分化前の雌を37で45日間飼育し、その後5ヶ月常温で飼育した個体の生殖腺を調べた。常温で飼育した卵巣にはよく発達して卵黄形成期の卵母細胞が満たれていたのに対して、37処理群では、全ての個体の卵巣には生殖細胞は認められず、不妊となっていた。

ふ化後100日60日間37で処理し、5ヶ月間常温で飼育した個体の生殖腺は卵巣腔や顆粒膜細胞を持つが、生殖細胞を全く欠いていた。160日よりそれぞれ60日間37で処理し、3ヶ月常温で飼育した個体の生殖腺を調べた。その結果、全ての魚は、退行している卵母細胞や空砲を持ち小型で異常な卵巣を持っていた。

不妊化した個体のステロイド代謝酵素の P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD と P450<sub>arom</sub> の抗体に対して強い免疫陽性反応が見られたが、血中のエストラジオールと11-ケトテストステ

ロンとテストステロン量は成熟した雌の血中量と比べると有意に低かった。高温処理期間中の死亡率はどの群も20%以下であった。ただ、常温の飼育では著しく死亡率は低下した。

ふ化後3日のモザンビーク・ティラピア (*Sarotherodon mossambicus*) 稚魚を50日間高温(37±1)により飼育し、その後、通常の温度(25-30℃)で6ヶ月以上飼育した。精巢を構成する体細胞で性ホルモンを産生するライデッヒ細胞とセルトリ細胞を微細構造学的に観察した。ライデッヒ細胞は間質部位に細胞集塊として認められた。細胞質には小管状のクリステが発達したミトコンドリア、および発達した小胞体が認められた。アロマターゼを除くステロイド合成酵素の抗体での免疫組織化学的観察により強い反応が見られた。これらのことから、性ホルモンの産生が活発であることがうかがわれた。雄性ホルモンであるテストステロンおよび11-ケトテストステロンの血中濃度を測定した結果においても、常温飼育した正常な成熟雄と同じ高い値を示した。しかし、エストラジオール量は著しく低かった。このことから生殖細胞を全く欠くにも関わらず性ホルモンの合成・分泌が活発行なわれていることが明らかとなった。また、輸精管を裏打ちするセルトリ細胞の内腔に面する側には多数の薄い鞅だが発達し内腔に向かって液状物質(精漿)を分泌する像が観察された。不妊化雄はこの精漿により受精を試みるが精子が含まれていないために受精しないことが明らかとなった。この以上のことからモザンビーク・ティラピアにおいても雌雄共に高温飼育により完全に不妊化することが明らかになった。特に不妊化雄は正常に性行動を行ない常温飼育の正常雌と産卵するが、卵は全て死滅することを明らかにすることができた。不妊化した雄を自然界に放流するこ

とで野生化したティラピアを激減させる技術を開発することが出来た。これらの高温飼育による不妊化技術開発により本年度特許を取得した(特願2010-21552、魚類の飼育方法)。

高温で不妊化雄は高い性ホルモン産生能をもち性成熟するのに対して、雌は性ホルモンが著しく低く成熟しないのかについては不明であった。今後、視床下部-脳下垂体-生殖腺のフィードバック機構成立の機構を解明する良い材料となることが期待される。予備的な調査では、不妊化した雌の成長は、高温飼育下では抑制されているが、常温に戻して飼育すると成長が対照群と比べて有意に早まることが確かめられている。今後は、水産養殖場で有用な技術となることが示唆されている。このためには、大規模なスケールで全雌不妊化魚を作成して正常雌と成長比較を行なう必要がある。また、不妊化雄においてはフィールドに放流した個体が野生の正常雌と交配して産卵するかについて不明である。更には、不妊化雄の大量放流により野生個体群を劇的に減少させることが出来るかについて明らかにする必要がある。現在進行している外来種が在来種を駆逐している自然破壊を阻止する有効な技術となることが期待

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計2件)

Nakamura M 他3名 Sterilization of male tilapia by high temperature 17<sup>th</sup> International Congress of General Comparative Endocrinology. 2013, Barcelona

Nakamura M and Nozu R, Sexual behavior of sterilized male tilapia, 2013, The 10<sup>th</sup> International Meeting on Reproductive Biology in Aquatic Animals of East China Sea, Cheju

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中村 将 (NAKAMURA, Masaru)

名桜大学・公私立大学の部局等・研究員

研究者番号：10101734

### (2)研究分担者

平井 俊朗 (HIRAI, Toshiaki)

帝京科学大学・生命環境学部・教授

研究者番号：30238331