

学位論文審査結果の報告書

氏 名 青木 隆一郎

生 年 月 日 平成元年2月14日

本 籍 (国籍) 奈良県

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 第 242号

学位授与の条件 学位規程第5条該当
(博士の学位)

論 文 題 目

養殖カンパチにおける性ステロイドホルモン濃度による性判別法の開発

学位論文受理日 令和2年 1月 14日

学位論文審査終了日 令和2年 2月 4日

審 査 委 員

(主 査) 田中 秀樹



(副主査) 太田 博巳



(副主査) 家戸 敬太郎



(副 査) 中田 久



指 導 教 員

家戸 敬太郎



論文内容の要旨

序章

近年、世界的に養殖生産の需要が高まる中、複数の国でブリ属魚類養殖の重要性が認識されている。ブリ属魚類の中でもカンパチは、血合の変色が遅いため鮮魚流通に向いており、ブリよりも高値で取引されている。我が国のカンパチ養殖生産量はブリ、マダイに次いで3番目に多く、重要な養殖対象種であるが、カンパチ人工種苗の大量生産技術はまだ確立されておらず、中国産の輸入天然種苗が全体の約85%を占めている。カンパチの人工種苗生産における課題として良質卵の大量確保があるが、その為には、親魚候補群の性比を正確に管理する必要がある。そこで本研究では、生殖腺が未発達な時期でも雌雄差を示す性ステロイドホルモンに着目し、養殖カンパチ1歳魚から3歳魚までの血漿および組織中の 17β -estradiol (以下、E2と略記)および11-ketotestosterone (以下、11-KTと略記)濃度を利用した性判別法について検討した。

第1章

養殖カンパチの安定採卵技術を向上させるための基礎的知見を得ることを目標に、養殖カンパチ親魚の成長および成長に伴う生殖腺の発達について調査し、成長差による性判別の可能性について調べた。

1. 実際の種苗生産現場で行われる親魚の選抜(2歳時)より早期に高成長個体の選抜を行うことを考慮し、2015年および2016年産のカンパチ1歳魚から3歳魚134尾(雌55尾、雄79尾)を供試魚とした。性別は開腹して摘出した生殖腺を直接目視で確認した。各サンプルの尾叉長および体重を測定し、肥満度を算出した結果、雌雄間の尾叉長、体重および肥満度にはいずれも有意差はなかった。このことから、尾叉長や体重を性判別の基準として用いることは難しいと考えられた。
2. 和歌山県田辺湾で養成したカンパチ1歳魚から3歳魚の成熟状態を把握することを目的に生殖腺の発達を調べた。供試魚の性別は生殖腺の外観あるいは組織学的観察により判定した。また、生殖腺重量を測定して生殖腺体指数(GSI)を算出した。雌雄のGSIを比較すると、孵化後1150日を除くすべてのサンプリングにおいて雌の方が高い値を示しピークは雌雄共に産卵期直前の4月であった。組織学的に雄では、2歳魚から精巣に精細胞が優占しており、一部に精子が確認された。一方、雌では3歳魚の6月においても卵巣には周辺仁期の卵しか確認できない未熟な状態であり、田辺湾では3歳魚の雌は産卵しないと考えられた。

第2章

養殖カンパチの親魚選抜を早期に実施するため、若齢魚でも性判別ができる精度の高い方法を開発することを目的として、雌雄間で分泌量が異なることが予想される性ステロイドホルモン(E2および11-KT)の濃度差による性判別法について検討した。

1. 養殖カンパチの1、2および3歳魚を供試魚として、雌雄の血漿E2濃度の推移を調査した。雌における血漿E2濃度は1歳魚および2歳魚のどちらにおいても4月に増加する傾向があった。一方、雄における血漿中のE2濃度は雌に比べて低いが、2歳魚の4月にかけて急激に増加する傾向を示した。1歳魚の6月(孵化後412日)および2歳魚の9月(孵化後870日)を除く全てのサンプリングにおいて雌のE2濃度が雄よりも有意に高かった。
2. 養殖カンパチの1、2および3歳魚において雌雄の血漿11-KT濃度の推移を調査した。雄では、血漿中の11-KTの濃度は1歳魚および2歳魚の4月において2月と比較して有意に高い値を示し($P < 0.05$)、その後6月に低下した。一方、雌ではサンプリング期間を通して約30 pg/ml程度の低濃度で推移した。全てのサンプリングにおいて雄の血漿11-KT濃度が雌よりも有意に高かった。
3. 血漿E2および11-KTの濃度差に基づく性判別が可能であるかを検討した。また、判別精度が高い性ステロイドホルモンを選択するとともに、どの日齢から性判別が可能であるかも併せて検討し

た。受信者動作特性曲線（ROC曲線）を用いて性判別する際のホルモン濃度の基準値を決定し、この基準値による正確な性判別が可能かを調べた。血漿E2濃度に基づく性判別の精度は成長に伴うE2濃度の上昇につれて高くなったが、判別率の平均値は79.8%であった。一方、11-KT濃度に基づく性判別では、孵化後504日から孵化後1150日まで常に100%の判別率を示し、血漿11-KT濃度がE2濃度よりもカンパチの性判別に有用であることが示された。

第3章

血漿11-KT濃度を測定することで性判別が可能となったが、カンパチからの採血は魚体へのストレス負荷や作業負担が大きい。従って、採血なしで血漿と同等の高精度で性判別できる方法の開発を目的とし、採取が容易な鰭組織および体表粘液の11-KT濃度に基づく性判別法について検討した。

1. 供試魚には2015年産のカンパチ2歳魚雌雄各5尾を使用し、血漿11-KT濃度と組織11-KT濃度を比較した。対象とした組織は、胸鰭、背鰭、腹鰭、臀鰭、尾鰭および体表粘液である。血漿を含むすべての組織において雌雄間の11-KT濃度に有意な差があった。また、それぞれの部位についてサンプリングと解析までの処理に要する時間を数値化し評価した結果、胸鰭はその他の組織と比較して採取および11-KTの抽出に伴うホモジナイズなどの作業が容易であったため短時間でできた。従って、胸鰭が11-KTを用いた性判別に最も適した部位であることが示された。

2. 養殖カンパチの1, 2および3歳魚において、血漿11-KT濃度と胸鰭11-KT濃度との関係を調べるとともに、胸鰭11-KT濃度に基づく性判別が可能であるかを検討した。雌雄どちらも胸鰭中の11-KTの濃度は血漿中の11-KT濃度と有意な高い正の相関を示した($R^2=0.8554$) ($P<0.05$)。胸鰭11-KT濃度は血漿と比較して約10分の1程度と低かったものの、ROC曲線から算出した基準値を用いて性判別した結果、93.6%の高い判別率が得られた。これらの結果より、胸鰭11-KT濃度を用いることで魚体負荷が少なく作業効率の高い正確な判別が可能であることが示された。

第4章

養殖カンパチの成長および成熟は水温などの影響により海域によって異なる。従って、田辺湾よりも高い水温で養殖されている本学水産研究所奄美実験場（鹿児島県奄美大島）のカンパチ親魚候補群を対象とし、胸鰭11-KT濃度差を利用した性判別が可能であるかを検討した。

1. 供試魚として2015年産のカンパチ2歳魚115尾（雌39尾、雄76尾）を使用し、和歌山県田辺湾と同様に胸鰭11-KT濃度の基準値を利用した性判別を行い、判別率を算出した。奄美大島花天湾は和歌山県田辺湾と比較して年間の平均水温が5°C以上高く、2歳魚では奄美大島の個体群が白浜の個体群と比較して尾叉長および体重が高かった。しかし、田辺湾よりもサイズの大きな奄美大島の個体群においても胸鰭11-KT濃度に有意な雌雄差があり、その濃度差によって98.6%の高い判別率で性判別が可能であった。従って、胸鰭11-KTの濃度を利用した性判別は異なる海域である奄美大島の養殖カンパチにおいても利用可能であることが明らかとなった。

第5章

本研究により得られた知見をもとに、生産現場におけるカンパチ親魚候補を対象とした胸鰭11-KT濃度による性判別を利用した親魚選抜の過程は以下の通りに提案する。(1) 親魚候補を含む数千尾の出荷用養殖カンパチを海上網生簀で養成する。(2) 1歳3ヶ月（孵化後504日）以降の時期にIDタグを打注すると同時に胸鰭を採取して胸鰭11-KT濃度を測定し、性判別する。(3) 必要な尾数の雌雄を含む親魚候補を選抜して4歳まで海上網生簀で養成する。(6) 雌の比率が高い尾数構成で産卵用水槽に収容して産卵させる。

以上の方法を用いることにより、早期かつ正確な性判別を利用した親魚候補の維持管理が可能となり、管理経費が削減されて安定的な受精卵の確保ができるようになると考えられた。

論文審査結果の要旨

近年、世界的に養殖生産の需要が高まる中、複数の国でブリ属魚類養殖の重要性が認識されている。ブリ属魚類の中でもカンパチは、血合の変色が遅いため鮮魚流通に向いており、わが国ではブリよりも高値で取引されている。わが国のカンパチ養殖生産量はブリ、マダイに次いで3番目に多く、重要な養殖対象種であるが、その養殖用種苗は中国産の輸入天然種苗が全体の約85%を占めている。中国産の輸入天然種苗は、その価格が国産人工種苗の1.5~5倍と高いのでカンパチの養殖経営を大きく圧迫しているだけでなく、国内に存在しなかった疾病持ち込みのリスクが高いなど多くの問題を抱えている。従って、国産人工種苗を用いることが望ましいが、カンパチ人工種苗の大量生産技術はまだ確立されていない。カンパチの人工種苗生産における課題として良質卵の大量確保があるが、その為には親魚候補群の性比を正確に管理する必要がある。そこで本研究では、生殖腺が未発達な時期でも雌雄差を示す性ステロイドホルモンに着目し、養殖カンパチ1歳魚から3歳魚までの血漿および組織中の 17β -estradiol (以下、E2と略記)および11-ketotestosterone (以下、11-KTと略記)濃度を利用した性判別法について検討している。

第1章では、養殖カンパチの安定採卵技術を向上させるための基礎的知見を得ることを目標に、養殖カンパチの成長および成長に伴う生殖腺の発達について調査し、成長差による性判別の可能性について調べている。実際の種苗生産現場で行われる親魚の選抜(2歳時)より早期に高成長個体の選抜を行うことを考慮し、和歌山県田辺湾で養成したカンパチ1歳魚から3歳魚134尾の尾叉長および体重を測定し、肥満度を算出した結果、雌雄間の尾叉長、体重および肥満度にはいずれも有意差はなく、尾叉長や体重を性判別の基準として用いることは難しいことを示した。また、成熟状態を把握することを目的に生殖腺の発達を調べている。雌雄の生殖腺体指数(GSI)を比較すると、孵化後1150日を除くすべてのサンプリングにおいて雌の方が高い値を示しピークは雌雄共に産卵期直前の4月であった。組織学的に雄では、2歳魚から精巣に精細胞が優占しており、一部に精子が確認された。一方、雌では3歳魚の6月においても卵巣には周辺仁期の卵しか確認できない未熟な状態であり、田辺湾では3歳魚の雌は産卵しないことを明らかにした。

第2章では、養殖カンパチの親魚選抜を早期に実施するため、若齢魚でも性判別ができる精度の高い方法を開発することを目的として、雌雄間で分泌量が異なることが予想される性ステロイドホルモン(E2および11-KT)の濃度差による性判別法について検討している。養殖カンパチの1、2および3歳魚を供試魚として、雌雄の血漿E2濃度の推移を調査した。その結果、1歳魚の6月(孵化後412日)および2歳魚の9月(孵化後870日)を除く全てのサンプリングにおいて雌のE2濃度が雄よりも有意に高かった。次に養殖カンパチの1、2および3歳魚において雌雄の血漿11-KT濃度の推移を調査し、全てのサンプリングにおいて雄の血漿11-KT濃度が雌よりも有意に高いことを示した。

次に、血漿E2および11-KTの濃度差に基づく性判別が可能であるかを検討した結果、血漿E2濃度に基づく性判別の精度は成長に伴うE2濃度の上昇につれて高くなったが、判別率の平均値は79.8%であった。一方、11-KT濃度に基づく性判別では、孵化後504日から孵化後1150日まで常に100%の判別率を示し、血漿11-KT濃度がE2濃度よりもカンパチの性判別に有用であることを示した。

第3章では、採血は魚体へのストレス負荷や作業負担が大きいいため、採血せずに血漿と同等の高精度で性判別できる方法の開発を目的とし、採取が容易な鰭組織および体表粘液の11-KT濃度に基づく性判別法について検討している。カンパチ2歳魚雌雄各5尾を使用し、血漿11-KT濃度と胸鰭、背鰭、腹鰭、臀鰭、尾鰭および体表粘液の11-KT濃度とを比較した結果、血漿を含むすべての組織において雌雄間の11-KT濃度に有意な差があり、それぞれの部位についてサンプリングと解析までの処理に要する時間を数値化して評価した結果、胸鰭が11-KTを用いた性判別に最も適した部位であることを明らかにしている。さらに、養殖カンパチの1、2および3歳魚において、血漿11-KT濃度と胸鰭11-KT濃度との関係を調べるとともに、胸鰭11-KT濃度に基づく性判別が可能であるかを検討し、雌雄どちらも胸鰭中の11-KTの濃度は血漿中の11-KT濃度と有意な高い正の相関を示し、胸鰭11-KT濃度は血漿と比較して約10分の1程度と低かったものの性判別率は93.6%と高いことから、胸鰭11-KT濃度を用いることで魚体負荷が少なく作業効率の高い正確な判別が可能であることを示している。

第4章では、養殖カンパチの成長および成熟は水温などの影響により海域によって異なることか

ら、田辺湾よりも年間の平均水温が約5℃高い本学水産研究所奄美実験場（鹿児島県奄美大島）で養殖されているカンパチ親魚候補群を対象とし、本研究で開発した胸鰭11-KT濃度差を利用した性判別が可能であるかを検討している。供試魚として2015年産のカンパチ2歳魚115尾を使用して胸鰭11-KT濃度の基準値を利用した性判別を行い、判別率を算出した結果、奄美大島の個体群においても胸鰭11-KT濃度に有意な雌雄差があり、その濃度差によって98.6%の高い判別率で性判別が可能であることを示し、胸鰭11-KTの濃度を利用した性判別が異なる海域である奄美大島の養殖カンパチにおいても利用可能であることが明らかにした。

第5章では、本研究により得られた知見をもとに、生産現場におけるカンパチ親魚候補を対象とした胸鰭11-KT濃度による性判別を利用した新たな親魚選抜の過程を以下の通りに提案している。(1)親魚候補を含む数千尾の出荷用養殖カンパチを海上網生簀で養成する。(2)1歳3ヶ月（孵化後504日）以降の時期にIDタグを打注すると同時に胸鰭を採取して胸鰭11-KT濃度を測定し、性判別する。(3)必要な尾数の雌雄を含む親魚候補を選抜して4歳まで海上網生簀で養成する。(4)雌の比率が高い尾数構成で産卵用水槽に収容して産卵させる。以上の方法を用いることにより、早期かつ正確な性判別を利用した親魚候補の維持管理が可能となり、管理経費が削減されて安定的な受精卵の確保ができるようになると提案した。本研究の成果は、重要な養殖対象魚であるカンパチの人工種苗量産に大きく貢献することが期待できる。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、令和2年2月19日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。