

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

青木 隆一郎¹

Sex discrimination of cultured greater amberjack *Seriola dumerili* using
steroid hormones

Ryuichiro Aoki¹

目次

序論	3
第1章 養殖カンパチの成長と生殖腺の発達	10
1-1. 成長	11
1-1-1. 材料および方法	11
1-1-2. 結果	13
1-1-3. 考察	15
1-2. 生殖腺の発達	16
1-2-1. 材料および方法	17
1-2-2. 結果	19
1-2-3. 考察	22
第2章 血漿中の E2 および 11-KT 濃度による性判別	34
2-1. 雌雄の E2 濃度の推移	34
2-1-1. 材料および方法	34
2-1-2. 結果	36
2-1-3. 考察	37
2-2. 雌雄の 11-KT 濃度の推移	40
2-2-1. 材料および方法	40
2-2-2. 結果	41

¹ 奄美事業場 (Amami Hatchery, Aquaculture Technology and Production Center, Kindai University., 195, Katen, Setouchi, Oshima, Kagoshima 894-1853)

2-2-3. 考察	43
2-3. E2 および 11-KT 濃度による性判別	45
2-3-1. 材料および方法	46
2-3-2. 結果	48
2-3-3. 考察	50
第3章 組織中の 11-KT 濃度による性判別	62
3-1. 最適部位の検討	62
3-1-1. 材料および方法	62
3-1-2. 結果	65
3-1-3. 考察	66
3-2. 雌雄の 11-KT 濃度の推移	67
3-2-1. 材料および方法	67
3-2-2. 結果	68
3-2-3. 考察	69
第4章 親魚候補選抜の実証	77
4-1. 生産現場における性判別の利用	77
4-1-1. 材料および方法	77
4-1-2. 結果	78
4-1-3. 考察	81
第5章 親魚選抜過程への提案	92
5-1. 親魚の選定	92
要約	96
Summary	100
文献	104
謝辞	115

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

序論

近年、世界の水産物需要が急激に増加している。水産物の消費量の増加の要因として、世界的な人口増加に伴う動物性タンパク質消費の増加がある。世界人口は1950年から2015年にかけて約25億人から約73億人まで増加し、それに伴い世界の魚介類消費量は1961年の2,748万トンから2013年の1億3,293万トンと、増加の一途をたどっている（農林水産省 水産白書 2017）。先進国では輸送や冷凍技術等の発達により食品流通の国際化が進んだことや、都市人口の増加を背景にスーパーマーケット等での食品購入が増えていること、また経済発展の進む新興国や途上国では芋類等の主食からタンパク質を多く含む肉、魚等へと食生活の移行が進んでいることなどが要因となっている（Food and Agriculture Organization of the United Nations 2014）。さらに、日本食ブームや健康志向の高まりも水産物の消費を後押ししているものと考えられる。これらを背景に、世界の一人あたりの年間水産物供給量は1961年（9.0 kg/年）から2013年（19.0 kg/年）の約50年間で2倍以上に増加した（農林水産省 水産白書 2018）。

世界の漁船漁業生産量は1960年に3,476万トン/年（内水面・海面）であったものが1990年には8,593万トン/年（内水面・海面）と約2.5倍に増加し、人口増加に伴う世界の水産物需要を支えていた。しかし2017年では9,364万トン/年（内水面・海面）と90年代以降は頭打ちとなっている（農林水産省 水産白書 2018）。2016年の資源状況を見ると、過剰利用または枯渇資源状態の資源と満限利用の状態にある資源が85%を占め、漁獲が可能な資源は15%と需要の増加を満たすことができなくなった（Food and Agriculture Organization year book 2016）。これらを背景に、水産物需要の伸びは養殖が支える傾向にある。

世界の養殖生産量は1960年から2017年では211万トン/年（内水面・海面）か

ら 1 億 1,195 万トン/年 (内水面・海面) と約 53 倍に増加している。これは天然水域で水産物を漁獲する漁船漁業を含めた総生産量の 9,364 万 t/年を上回っている (農林水産省 水産白書 2018)。我が国においても、漁業生産全体のうち養殖生産、特に海面養殖生産量の占める割合が年々増加している。近年では、遠洋漁業や沿岸漁業による漁獲量の大幅な低下の影響もあり、海面漁業全体が 3,258 万 t/年であるのに対し、海面養殖 (魚類, 貝類, 藻類) による生産量は 986 万 t/年と、海面漁業全体の 23.2%にまで増加した (農林水産省 水産白書 2018)。このような背景を考慮すると、今後養殖の重要性はますます高まっていくものと予想される。

現在、世界ではブリ属魚類として、ブリ *Seriola quinqueradiata*, カンパチ *S. dumerili*, ヒラマサ *S. lalandi*, ヒレナガカンパチ *S. rivoliana*, 和名記載の無い東大西洋域に生息する *S. carpenteri*, 西部大西洋域に生息する *S. fasciata*, インド太平洋域に生息する *S. hippos*, 東太平洋域に生息する *S. peruana*, 西部大西洋域に生息する *S. zonata*, の 9 種が確認されている。世界的に養殖生産の需要が高まる中、現在では複数の国でブリ属魚類養殖の重要性が認識されている。アメリカ, メキシコ, オーストラリア, チリ, デンマークおよび地中海諸国では、高度な沖合養殖および陸上養殖の研究開発が行われている。また、人工種苗を用いた商業生産に取り組むなどの体制が整いつつある (尾崎・奥澤 2017)。

我が国においては、ブリ *S. quinqueradiata*, カンパチ *S. dumerili* およびヒラマサ *S. lalandi* の 3 種が養殖対象である。特にブリおよびカンパチは養殖生産量が多く、2017 年の養殖生産量 1 位がブリで 98,266 t, カンパチは 3 位で 35,646 t である (農林水産省漁業・養殖業生産統計 2017)。東京都卸売市場 (豊洲・足立・太田市場) の取引価格 (年間平均卸価格 2018 年 1 月-12 月) は、ブリ (ハマチ) (養殖) 1,187 円/kg, ヒラマサ (養殖) 871 円/kg であるのに対し、カンパチ (養殖) では 1,499 円/kg

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

と高値で取引される。カンパチの市場取引価格が高い理由として、流通量（養殖、天然）の違いが挙げられる。海面養殖生産量はブリがカンパチの約3倍生産されている。天然個体に関してブリは定置網が主体の漁獲方法であるため多獲されるのに対し、カンパチは釣りが主な漁獲方法であるため漁獲量が少ないことなどが挙げられる。そのため流通量が多いブリに対し、カンパチの市場価格は高い。また、天然・養殖に関わらずカンパチはブリと比べて血合の変色が遅いため日持ちが良く、ブリでは販売可能期間が2日程度であるのに対して、カンパチでは5-7日と長く、流通においても優れた点がある。

我が国における2017年のカンパチ養殖生産量は、国内では鹿児島県が18,644 tと最も多く、次いで愛媛県が4,733 t、宮崎県が2,453 t、大分が2,451 tと、九州と四国が主要な産地である（農林水産省漁業・養殖業生産統計2017）。しかし現在、カンパチ養殖に用いられる種苗は、そのほとんどを中国から輸入された天然の稚魚に依存している。中国産の輸入天然種苗は全体の約85%を占めており、国産の人工種苗はわずか約15%である（高橋2017）。輸入天然種苗を利用した養殖では、輸送コスト等による種苗価格の高騰、漁獲量の増減に伴う供給量の不安定さ、さらには病原体の持ち込みなど多くの問題がある（高橋2017）。そこで近年、人工種苗に注目が集まっているが、人工種苗の大量生産技術はまだ開発途上であり、特に種苗生産の第一段階である良質な受精卵の大量確保が課題となっている（高橋2017）。現在、種苗生産用の採卵には海上網生簀で養成した4歳以上の親魚（尾叉長80 cm以上、体重5 kg以上）を使用し、日長や水温の調節を行うために、一定期間を陸上水槽へ移動させて行っている。しかし、陸上水槽へ収容した全ての雌が産卵するわけではないことから、通常は受精卵を十分量確保するために雌比率の多い親魚構成にする。このように性比をコントロールするには、親魚を陸上水槽に収容するまで

に正確な性判別を行なっておく必要がある (竹村ら 1996)。

現在、最も使用されているブリ属親魚に対する性判別の方法は、腹部圧迫法やカニューレション法である。触診法では腹部を圧迫して排精すれば雄、排精が確認できなければ雌と判別する。カニューレション法はカニューレションチューブにより生殖腺組織から卵細胞や精子を採取することで性判別を行う。両手法は簡便な方法ではあるが、その精度には課題がある。触診法において、カンパチは大型になると腹部や総排泄腔周辺の筋肉が分厚くなり硬くなることから、排精を確認するための圧迫自体が困難である。仮に腹部を圧迫できたとしても、排精しない未熟な雄を誤って雌と判別してしまうことがある。カニューレション法は、カニューレションチューブを挿入するため、手技が伴わない場合、生殖腺組織の損傷や手間取ることによる魚体へのストレス負荷が懸念され、その後の産卵や卵質に悪影響を及ぼす可能性がある。また未成熟である場合は卵細胞や精子が採取できないため性判別はできない。また、その他の性判別法として超音波検査法がある。超音波検査法は医療用超音波診断装置を用いて生殖腺の超音波断層撮影を行い、その画像を確認することで精巣と卵巣組織との差異からリアルタイムで性判別しようとするものである (Esmailnia et al. 2019)。しかし、超音波検査法では生殖腺の発達している個体を熟練者が確認した場合においても画像による明確な生殖腺の判断が困難であるため、確実な診断は難しく、未成熟魚の性判別はほぼ不可能である。また、診断装置の使用と画像確認を複数人で行う必要があり、診断に労力と時間がかかるなどの問題もある。別の方法として、最近報告された遺伝学的手法によるカンパチの性判別方法がある (Koyama et al. 2019)。遺伝学的手法は、鰭などの組織から抽出した DNA を用いて目的領域を PCR (polymerase chain reaction) 法により増幅した後、制限酵素によって切断された DNA 断片の長さが雌雄間で異なることを利用し

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

た PCR-RFLP 法 (Restriction Fragment Length Polymorphism : 制限酵素断片長多型) であり, 遺伝的な性を判別するものである。遺伝学的手法はステロイド産生酵素の 17β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 1 (Hsd17b1) をコードする遺伝子のミスセンス SNP (Single Nucleotide Polymorphism : 一塩基多型) がブリ類の ZZ/ZW 型性決定と関連していることに基づくものである (Koyama et al. 2019)。しかし, 遺伝学的性判別のみでは, 性転換が起こった場合や雌雄同体の場合に誤判別をする可能性がある。既報において, ペヘレイでは飼育水温が 17°C で全個体が雌化するが, 水温に依存して雄の比率が高まり, 24°C では 50-70% が雄化し, 29°C では全個体が雄化する現象が報告されている (Strüssmann et al. 1998)。またヒラメでは通常は遺伝的な性決定に従うが, 温度の影響も受け (温度感受性型性決定), 20°C 以下では雌が多いが, 高水温では雄化する現象が報告されている (Kitano et al. 1999; 山本 1999)。このように, 魚類の性は環境条件に大きく影響される。さらに魚類では雌雄同体型の生殖腺は, 350-400 種で確認されている (中園・桑村 1987)。これまでにブリ属魚類における雌雄同体の報告はないが, 本研究においてサンプリングしたカンパチの一部に雌雄同体個体が確認されている (第 4 章) ことから, 遺伝的手法のみによる性判別では不十分であるといえる。このように性判別には様々な方法があるが, 各手法にはメリット・デメリットが存在する。

実際の種苗生産現場では, 対象魚が未熟である時期に性判別を行い, 高成長や抗病性などの望ましい形質を持つ個体をその中から親魚として利用することが理想である。つまり, 未熟な時期からの性判別が可能となれば, 親魚候補の養成尾数を減らすことが可能になるため, 大幅な維持管理コストと労力の低減につながる。

本研究では雌雄間に明確な差を見出すことができ, かつ性転換などが起こった場合でも機能的な性を正確に判別することができる手法を開発するために性ステ

ロイドホルモンに着目した。性ステロイドホルモンの分泌量は成熟段階および雌雄間で異なる。そのため、分泌される性ステロイドホルモンの濃度差を利用した性別の可能性が考えられる。カンモンハタ *Epinephelus merra* やブルーバンデッドゴビー *Lythrypnus dalli*, シナモンクマノミ *Amphiprion melanopus* を含む様々な魚種では、雌雄のホルモン濃度に差があることが報告されている (Nakamura et al. 2007; Godwin 2010; Lorenzi et al. 2012)。17 β -estradiol (以下, E2 と略記) および 11-ketotestosterone (以下, 11-KT と略記) は、魚類においてそれぞれ重要なエストロゲンおよびアンドロゲンである。E2 は魚類の様々な生殖現象に重要な役割を果たすエストロゲンである (Lubzens et al. 2010)。E2 は肝臓に作用して卵黄タンパク質前駆体であるビテロゲニン (Vtg) および卵膜タンパク質前駆体であるコリオゲニン (Chg) の産生と分泌を誘導する主要な雌性ホルモンである (Hara et al. 2016)。言い換えれば, E2 は雌において卵形成過程を調節する。11-KT は硬骨魚に特有のアンドロゲンである。11-KT は精巣で合成される雄特有の酸化型テストステロンであり、テストステロンよりも強い活性があると考えられている (玄ら 2008)。硬骨魚において, 11-KT は精原細胞から精子形成に至る全ての過程 (Miura et al. 1991b), 雄の二次性徴 (Borg 1994; Baroiller et al. 1998) および脳と生殖腺の発達と機能 (Reinboth 1975; Grober et al. 1991) への関与が報告されている。レッドドラム *Sciaenops ocellatus* L. (Kucherka et al. 2006) において, 雄では 11-KT の濃度が雌よりも高く, 雌では E2 濃度が雄よりも高い値を示すことが報告されている。また, 三重県のマダイ *Pagrus major* では産卵盛期 (5月) に他の時期よりも雄では 11-KT 濃度, 雌では E2 濃度が高くなるという季節的な推移が確認されている (大池ら 1988a; 大池ら 1988b)。

そこで本研究では, 人工種苗を安定的に生産する上で必要となる親魚を養成す

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

る過程, すなわち未成魚から成魚期における確実な性判別法を開発することを目的として, 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 E2 および 11-KT 濃度を利用した性判別法について検討した。

第1章 養殖カンパチの成長と生殖腺の発達

「カンパチ種苗量産」のためには、養成親魚からの採卵技術および仔稚魚飼育技術の開発は欠かすことの出来ない重要な課題である。採卵では、漁獲した天然種苗または養成親魚から人為的に採卵して飼育管理した人工種苗を海面の網生簀に収容し、数年間養成したものを親魚として利用する。近畿大学水産研究所では 1969 年に養成した 3-4 歳魚の親魚に生殖腺刺激ホルモンを注射投与して得られた卵を用いて種苗サイズにまで成長させることに成功している (宮下・熊井 2000)。また、各都県の水産試験場や社団法人日本栽培漁業協会 (以下、日栽協) も積極的にカンパチの種苗生産研究を実施し、1988 年には当時の日栽協八重山事業場において養成親魚からの自然産卵に成功して卵発生および仔稚魚の形態について報告された (升間ら 1990)。その後日栽協は、1997 年にブリの飼育手法を参考にした飼育初期の通気方法の改良や配合飼料への早期餌付け、共食いの起こる時期にブリで開発された夜間小割網での選別を取り入れるなどの試験を行い、平均全長 29 mm の種苗を 12 万尾生産することに成功した (日本栽培漁業協会 2003; 塩澤ら 2003)。しかし、その後もカンパチの人工種苗生産尾数は全国で 70 万尾程度に留まり、毎年 500 万尾から 550 万尾程度の需要量には程遠く、安定した種苗量産に至っていないのが現状である (虫明ら 2019)。その一因として、毎年安定して大量の卵を確保することができていないという点があり、採卵技術にも問題が残されている。そこで本章では、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、カンパチ親魚の成長 (1-1) および成長に伴う生殖腺の発達 (1-2) について調査した。

1-1. 成長

本種は、最大で全長 180-190 cm, 体重 80 kg に達する大型種である。天然個体においては雌雄間で成長が異なり、雌が雄よりも速く成長し、最大到達サイズも雌の方が大きいことが報告されている (Harris et al. 2007)。また, Smith et al. (2014) によると総排泄腔の形状が雌雄で異なる。一方で養殖カンパチにおいては体長, 体重や外見的特徴による雌雄の差異は報告されておらず, 生産現場での聞き取りにおいても雌雄の見分けがつかないとのことである。種苗生産において性判別を行う上で重要なのは, 簡便かつ熟練経験を必要としない汎用性の高い方法である。現在, 生産現場では高成長の形質を持った魚を次世代の種苗として確保したいという希望から, 体サイズの大きい個体を親魚候補として選抜して腹部圧迫 (排精の有無) による性判別を実施している。しかし Harris et al. (2007) の報告とは異なり, 体サイズの大きい個体を選抜しているにも関わらず親魚候補の群れは, 雄個体の方が多いという結果となっている。そこで, 本節では養殖カンパチの雌雄の成長 (尾叉長, 体重および肥満度) を比較して体サイズによる性判別が可能であるかを調査した。

1-1-1. 材料および方法

(a) 供試魚

生産現場では 2 歳魚の時点で高成長な個体を選別し, 親魚候補としている。本研究では, より早期に高成長個体の選抜を行うことを考慮し, 1 歳魚も供試魚とした。供試魚として 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) を使用した。2015 年産個体群は 6 歳および 7 歳, 2016 年産個体群は 5 歳および 6 歳の親魚から採卵して飼育されたものである。どちらの年産群も近畿大学水産研究所すさみ分室の陸上水槽において, 完全養殖カンパチ親魚から得ら

れた受精卵から 40 日齢まで飼育された。孵化後 3-18 日までシオミズツボムシ *Brachionus plicatilis* sp. Complex, 15-40 日までアルテミア *Artemia salina*, 18 日以降は市販の配合飼料がそれぞれ給餌された。その後は近畿大学水産養殖種苗センター白浜事業場 (33°41'29.4"N; 135°21'30.0"E) の海上網生簀 (縦×横×深さ, 7 m×7 m×4 m および 7 m×7 m×5 m) で養成された。海上網生簀での飼育期間中は, 成長に合わせて市販のブリ用 EP (丸紅日清飼料株式会社) が給餌された。飼育期間中にブリハダムシ *Benedenia seriolae* あるいはネオベネデニア *Neobenedenia girellae* の寄生が確認された場合は, マリンサワー (株式会社片山化学工業研究所) を使用した薬浴による駆虫が行われた。

(b) サンプルング

本研究には 2015 年および 2016 年産のカンパチ 1, 2 および 3 歳魚を計 134 尾 (雌 55 尾, 雄 79 尾) を使用した (Table 1)。1 歳魚は 6 月 (孵化後 412 日), 9 月 (孵化後 504 日), 11 月 (孵化後 566 日), 2 月 (孵化後 648 日) および 4 月 (孵化後 710 日) にサンプルングを行った。2 歳魚は 6 月 (孵化後 779 日), 9 月 (孵化後 870 日), 11 月 (孵化後 933 日) 2 月 (孵化後 1017 日) および 4 月 (孵化後 1087 日), 3 歳魚は 6 月 (孵化後 1150 日) にそれぞれサンプルングを行った。

(c) 測定項目 (水温, 尾叉長, 体重および肥満度)

デジタル水質メーター (YSI ProODO, ワイエスアイ・ナノテック株式会社) を用い, 海上生簀 (縦×横×深さ, 7 m×7 m×4 m および 7 m×7 m×5 m) の水深 3 m の水温を測定した。

カンパチを網生簀から取りあげ, 頭部に打撃を加えて気絶させてから, 尾叉長

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

(Fork length : FL) および体重 (Body weight : BW) を測定して氷水 (約 8°C) 中で保存した。供試魚の性別は開腹して摘出した生殖腺を直接目視で確認することで判別した。肥満度 (Condition factor : CF) は次式により計算した。

$$\text{肥満度 (CF)} = \frac{\text{BW}}{\text{FL}^3} \times 1000$$

BW : Body weight (g), FL : Fork length (cm)

(d) 統計処理

Welch's *T* test によって各サンプリング日の魚体測定結果 (FL, BW および CF) を雌雄間で有意差検定した。統計解析は, R ver. 3.5.1 によって行い, 5%の水準で検定を行った場合, *P* 値が 0.05 未満ならば有意差ありとした。

1-1-2. 結果

(a) 水温

サンプリング期間中におけるカンパチ養成網生簀付近の水深 3m 層の水温変動を Fig. 1 に示した。供試魚を養成した生簀周辺の最低水温は 2018 年 2 月の $11.7 \pm 0.8^\circ\text{C}$, 最高水温は 2017 年 8 月の $29.4 \pm 0.6^\circ\text{C}$ であり, 年間の平均水温は $19.8 \pm 5.8^\circ\text{C}$ であった (Fig. 1)。

(b) 尾叉長

今回サンプリングした孵化後 412 日から孵化後 1150 日の 1 歳魚, 2 歳魚および 3 歳魚の尾叉長を Fig. 2 に示した。

1 歳魚の尾叉長は, 雌が 39.2 ± 1.3 – 52.2 ± 3.3 cm, 雄は 39.1 ± 1.4 – 54.4 ± 1.1 cm の範囲であり, 2 歳魚および 3 歳魚の尾叉長は, 雌が 55.5 ± 2.1 – 65.1 ± 1.5 cm, 雄

が $56.1 \pm 0.6 \text{ cm}$ – $67.2 \pm 2.9 \text{ cm}$ の範囲であった (Fig. 2)。サンプリング期間における雌雄の平均尾叉長の差は 0.1 – 3 cm の範囲内であり、最も差が小さかったのは、孵化後 412 日の雌 $39.2 \pm 1.3 \text{ cm}$, 雄 $39.1 \pm 1.4 \text{ cm}$, 最も差が大きかったのは、孵化後 1087 日の雌 $64.4 \pm 2.6 \text{ cm}$, 雄 $61.4 \pm 1.5 \text{ cm}$ であった。期間を通して、サンプリングした魚の尾叉長には雌雄間で有意な差はなかった ($P > 0.05$) (Fig. 2)。

(c) 体重

サンプリングした孵化後 412 日から孵化後 1150 日の 1 歳魚, 2 歳魚および 3 歳魚の体重を Fig. 3 に示した。

1 歳魚の体重は、雌が $1.2 \pm 0.1 \text{ kg}$ – $2.9 \pm 0.5 \text{ kg}$, 雄は $1.1 \pm 0.1 \text{ kg}$ – $3.3 \pm 0.4 \text{ kg}$ の範囲であり、2 歳魚および 3 歳魚の体重は、雌が $3.4 \pm 0.3 \text{ kg}$ – $5.3 \pm 0.3 \text{ kg}$, 雄が $3.4 \pm 0.2 \text{ kg}$ – $5.6 \pm 0.7 \text{ kg}$ の範囲であった (Fig. 3)。サンプリング期間における雌雄の平均体重の差は 0 – 0.8 kg の範囲内で、最も差が小さかったのは、孵化後 779 日の雌 $3.4 \pm 0.3 \text{ kg}$, 雄 $3.4 \pm 0.2 \text{ kg}$, 最も差が大きかったのは、孵化後 1087 日の雌 $5.1 \pm 0.5 \text{ kg}$, 雄 $4.3 \pm 0.3 \text{ kg}$ であった。期間を通して、サンプリングした魚の体重には雌雄間で尾叉長と同様に有意な差はなかった ($P > 0.05$) (Fig. 3)。

(d) 肥満度

サンプリングした孵化後 412 日から孵化後 1150 日の 1 歳魚, 2 歳魚および 3 歳魚の肥満度を Fig. 4 に示した。

1 歳魚の肥満度は、雌が 16.2 ± 0.3 – 20.5 ± 1.4 , 雄は 16.0 ± 1.1 – 20.1 ± 1.3 の範囲であり、2 歳魚および 3 歳魚の肥満度は、雌が 15.6 ± 1.8 – 20.0 ± 0.9 , 雄が 16.3 ± 0.2 – 19.4 ± 1.1 の範囲であった (Fig. 4)。サンプリング期間における雌雄の平均肥満度の

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

差は 0.1–0.8 の範囲内であった。最も差が小さかったのは、孵化後 933 日の雌 16.8 ± 1.8 , 雄 16.9 ± 2.3 , 最も差が大きかったのは、孵化後 1150 日の雌 19.4 ± 1.6 , 雄 18.6 ± 0.3 であった。期間を通して、サンプリングした魚の肥満度に雌雄間で有意な差はなかった ($P>0.05$) (Fig. 4)。

1-1-3. 考察

雌雄間の尾叉長, 体重および肥満度において, いずれも有意な差を確認することが出来なかった。Harris et al. (2007) は大西洋の天然カンパチでは雌雄の成長が異なり, 雌の成長が雄より速く, また最大到達サイズも雌の方が大きいことを報告しているが, 雌雄の尾叉長に有意差が出るのは大きさが 80 cm 以上になる 3 歳魚以降であった。本研究で使用したカンパチでは, 孵化後 412, 504, 648, 870 および 1087 日において雌の尾叉長の平均値は雄よりも高かったが, いずれも有意な差ではなかった ($P>0.05$) (Fig. 2)。本研究で使用した 3 歳魚 (孵化後 1150 日) の個体でも尾叉長は雌で 65.1 ± 1.5 cm, 雄で 67.2 ± 2.9 cm であり, これは Harris et al. (2007) の供試魚 (大西洋アメリカ沿岸にて漁獲) よりも小さく, 80 cm を超えるのは早くても 4 歳魚以降になると考えられ, そこで初めて雌雄における有意な差がでる可能性があるかと推測された。体重および肥満度も満 3 歳魚 (孵化後 1150 日) までは尾叉長と同様, 雌雄間で有意な差はなかった。

また, 尾叉長は養成している海域の水温や給餌量の影響を大きく受けるだけでなく, 群によっても違いがあることが近縁種のブリで報告されている (久保田ら 2018)。久保田ら (2018) はブリにおいて東シナ海, 太平洋中部の群と日本海, 太平洋北部の群を比較した場合, 東シナ海, 太平洋中部の群の方が高成長を示すと報告している。このことから, カンパチでも環境要因, 管理方法, 系統群など複数要因

によって変化する可能性のある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。

近畿大学水産養殖種苗センターの生産現場では親魚に用いる個体の性判別を満2歳(孵化後730日)頃に行っている。これは、魚体サイズが大きすぎず扱いやすいので作業効率が良く、個体間での成長差が現れ高成長の個体を容易に選抜することが可能であるタイミングであるとともに、出荷前に出荷用と親魚候補を分けるためである。そのため、80 cm以上で尾叉長に雌雄間で有意差が表れたとしても親魚候補の選抜時期としては遅い。また、魚体サイズが大きく成長しているため、作業効率が悪くなるだけでなく、給餌コストや人件費などの維持・管理費が余分にかかるなどの問題がある。以上のことを踏まえ、尾叉長、体重あるいは肥満度による性判別は困難かつ実用的でないことが示された。

1-2. 生殖腺の発達

種苗生産では安定的に良質卵を必要量確保することが重要である。マダイやヒラメなどの魚種では水槽内での自然産卵により採卵が可能である(松浦ら1988; 平本・小林1979)がブリ、マハタ、トラフグのような魚種では、成熟・産卵を誘発するために水温および日長制御、ホルモン投与など的人為的な操作を必要とする(鈴木・竹村1996; 日本栽培漁業協会1999; 虫明ら2003; 中田ら2018)。

カンパチの採卵に関しては、海上生簀では水温制御や日長制御を行うのは困難である。また、4歳以上(80 cm以上)の魚を親魚として利用するため、船上でのホルモン投与など的人為的な成熟促進を行うことは、魚体へのストレス負荷や作業効率の点からも難しい。一方、陸上水槽での飼育を行う場合、カンパチは大型かつ高速で遊泳することから収容尾数が制限される。そのため、現状では陸揚げするま

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

で海上生簀で養成し、採卵する約3ヶ月前に採卵用親魚を選抜・陸揚げしてから水温および日長制御を行うことで成熟・産卵を誘発する。陸揚げまでは海上生簀で養成するため、養成海域の環境の違いによってその成熟、産卵時期が変化することから、海域ごとに成熟に関する知見を得る必要がある。

そこで本節では、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。

1-2-1. 材料および方法

(a) 供試魚およびサンプリング

1-1と同じ供試魚を使用し、サンプリング方法も同様とした (Table 1)。

(b) 測定項目 (生殖腺体指数)

生殖腺は, Corriero et al. (2007) の方法に従って採取し, 重量を測定後, 4°Cで一時的保存した。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。

生殖腺体指数 (Gonadosomatic index : GSI) は次式により算出した。

$$\text{生殖腺体指数 (GSI)} = \frac{\text{GW} \times 100}{\text{BW}}$$

GW : Gonad weight (g), BW : Body weight (g)

(c) 組織学的観察

生殖腺は, 脂肪や筋肉などをトリミングした後, ブアン溶液 (ピクリン酸飽和水溶液 : ホルマリン : 酢酸 = 15 : 5 : 1) 中で約1時間仮固定した。仮固定した生殖腺を厚さ 1 cm 程度にスライスし, 新たに調製したブアン溶液に浸漬して振盪機

(MTS 2/4, IKA ジャパン株式会社, 日本) を用いて 24 時間振盪させた。その後, 70% エタノールに置換して保存した。生殖腺はエタノール系列で脱水し, Fast Solve (株式会社ファルマ, 日本) で透徹後, パラフィン包埋して厚さ 4 μm の組織切片を製作した。組織学的観察は, 常法に従いヘマトキシリン-エオシン二重染色を施してデジタル光学顕微鏡 (VHX-7000, 株式会社キーエンス, 日本) で観察した。

卵巣 : 卵巣は卵巣内で最も発達の進んだ卵母細胞の発達段階を Higuchi et al. (2016) および 小林ら (2002) を指標に次の 4 段階で判定した。

周辺仁期 (Perinucleolar stage, PN) :

第一次成長期の卵母細胞のみが認められる。

卵黄胞期 (Yolk vesicle stage, YV) :

第二次成長期の初期で, 細胞質の周辺に卵黄胞が散在する状態が認められる。

卵黄球期初期 (Primary yolk stage, PY) :

卵黄蓄積が開始, 進行し, 卵黄球が細胞質周辺部および核周辺までみられる。

卵黄球期後期 (Tertiary yolk stage, TY) :

卵黄蓄積がほぼ完了, 卵成熟直前の第三次卵黄球期の卵母細胞が認められる。

精巣 : 精巣は三浦・三浦 (2016), 樋口 (2016) および Kobayashi et al. (2011) を指標に次の 4 段階で判定した。

ステージ I :

精巣内は主に A 型精原細胞, または B 型精原細胞が認められる。

ステージ II :

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

精子形成の初期段階で、減数分裂過程にある精母細胞のシストが認められる。

ステージⅢ：

精細胞が巢内を優占し、一部に成熟した精子が認められる。

ステージⅣ：

精巢内は成熟した精子によって満たされている。

(d) 統計処理

Welch's *T* test を使用して各サンプリング日の雌雄間で生殖腺体指数 (GSI) を有意差検定した。統計解析は、R ver. 3.5.1 によって行い、5%の水準で検定を行った場合、*P* 値が 0.05 未満ならば有意差ありとした。

1-2-2. 結果

(a) GSI

1 歳魚の雌の GSI は孵化後 412 日では 0.11 ± 0.03 、孵化後 504 日では 0.18 ± 0.004 、孵化後 566 日では 0.22 ± 0.04 、孵化後 648 日では 0.31 ± 0.05 、孵化後 710 日で 0.40 ± 0.06 であった (Fig. 5)。特に、GSI は孵化後 412 日から孵化後 779 日にかけて 5 倍程度に増加した。2 歳魚以降では、孵化後 779 日では 0.53 ± 0.20 、孵化後 870 日では 0.39 ± 0.09 、孵化後 933 日では 0.39 ± 0.06 、孵化後 1017 日では 0.48 ± 0.08 、孵化後 1087 日で 0.64 ± 0.19 、孵化後 1150 日で 0.46 ± 0.06 であった (Fig. 5)。GSI は孵化後 779 日 (6 月) から孵化後 870 日 (9 月) にかけて減少したが、孵化後 1087 日 (4 月) にかけては増加する傾向を示した。

1 歳魚の雄の GSI は孵化後 412 日では 0.04 ± 0.01 、孵化後 504 日では 0.04 ± 0.01 、孵化後 566 日では 0.05 ± 0.01 、孵化後 648 日では 0.06 ± 0.01 であり、この日齢まで

は0.1以下の低い値を示した (Fig. 5)。その後、孵化後710日(4月)では 0.25 ± 0.18 と増加する傾向を示した (Fig. 5)。孵化後710日から孵化後870日にかけては減少傾向が見られた。2歳魚以降では、孵化後779日では 0.16 ± 0.09 、孵化後870日では 0.07 ± 0.04 、孵化後933日では 0.08 ± 0.01 、孵化後1017日では 0.06 ± 0.01 であり、孵化後870日から1017日において0.1以下の低い値を示した (Fig. 5)。その後、孵化後1087日で 0.38 ± 0.23 、孵化後1150日で 0.53 ± 0.45 と増加傾向を示した。

(b) 雌雄間の GSI の比較

雌雄の GSI を比較すると、孵化後1150日(6月)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、孵化後412日から孵化後648日および孵化後779日から孵化後1017日では雌の GSI が雄よりも有意に高かった。サンプリング期間を通してみると、孵化後710日と孵化後1087日のいずれも4月に雄の GSI が高くなり、雌との有意差は確認できなかった (Fig. 5)。

(c) 卵巣の組織学的観察

1歳魚の孵化後412日では全個体の生殖腺は周辺仁期の状態の卵母細胞が卵巣内を優占していた。核内では核膜周辺に球形の仁が数個分布する状態の細胞と、仁が確認出来ない細胞が確認された (Fig. 6a)。孵化後504日では4尾全ての個体の生殖腺に、周辺仁期の卵母細胞が確認された (Fig. 6b)。孵化後566日では7尾中6尾では、周辺仁期の状態、1尾で卵黄胞期の細胞が観察された (Fig. 6c)。孵化後648日 (Fig. 6d)の5尾全ておよび孵化後710日 (Fig. 6e)の6尾全てで周辺仁期の細胞が優占していた。

2歳魚の孵化後779日ではそれぞれ5尾中4尾において、周辺仁期後期の細胞が

優占しており, 1尾は卵黄胞期であった (Fig. 6f)。孵化後 870 日では 5尾全ての個体で周辺仁期前期への退行が観察された (Fig. 6g)。孵化後 933 日の 5尾と 1017 日の 3尾では, 周辺仁期前期が優占していることが確認出来た (Fig. 6h, i)。孵化後 1087 日では 3尾中 2尾で卵黄胞期の状態の細胞が認められた (Fig. 6j)。孵化後 1150 日では, 4尾中 2尾で卵黄胞期であることを確認した (Fig. 6k)。

(d) 精巣の組織学的観察

1歳魚では, 孵化後 412 日に全個体の精巣で精原細胞が巣内を優占しており, 数尾の魚において精子が認められた (Fig. 7a)。孵化後 504 日に 11尾中 9尾の精巣にシスト状の精母細胞と精子が観察された (Fig. 7b)。孵化後 566 日では 8尾中 7尾の精巣で精母細胞と精細胞および精子が観察され, 精原細胞は確認できなかった (Fig. 7c)。孵化後 648 日の魚ではほとんどの個体では A型精原細胞を形成しており, 一部に B型精原細胞が確認でき, 精子形成後の退行段階であった (Fig. 7d)。孵化後 710 日においては, 精巣に主に精母細胞が巣内を優占しており, 一部に精子が観察された (Fig. 7e)。

2歳魚の孵化後 779 日では全個体で精巣に精細胞が優占しており, 一部に精子が確認された (Fig. 7f)。孵化後 870 日では 5尾全ての精巣に精細胞と精子が観察された (Fig. 7g)。孵化後 933 日では精子が輸精管へ排精されており, 一部に精細胞が確認された (Fig. 7h)。孵化後 1017 日では A型精原細胞が精巣内を優占しており, 一部に精母細胞が確認できた (Fig. 7i)。孵化後 1087 日では精巣内は精母細胞が優占し, 一部に精子が確認された (Fig. 7j)。孵化後 1150 日では全ての個体で精巣内を精子が優占しており, 輸精管へ排精が確認された (Fig. 7k)。

1-2-3. 考察

本種の天然海域での産卵期を稚魚の来遊動向、来遊個体の全長および耳石日輪解析から推察した報告がある。Hasegawa et al. (2017) によると、台湾西部の澎湖諸島近海で集群している個体の孵化は4-6月と推測された。また、海南島近海では11月から翌3月頃に2-3 cmの個体が採捕されることから、より早期に産卵している個体群が存在することも報告されている(山下 2013)。天然個体の生殖腺の発達に関しては、大西洋海域の群において、産卵盛期およびGSI値のピークは4月と5月であることを報告している(Harris et al. 2007)。一方、養殖環境下における親魚では、自然条件の飼育下において1月に卵黄蓄積を開始し、4月から6月にかけて産卵盛期を迎えることが組織学的に明らかにされている(浜田・征矢野 2009)。

今回の生殖腺調査によると、雌の場合、最も高いGSIのピークは2歳魚の4月(孵化後1087日, 2歳9ヶ月)の 0.64 ± 0.19 であり、この時にそれまでの周辺仁期ではなく、卵黄胞期の卵が確認された。しかし、3歳魚6月(孵化後1150日, 3歳1ヶ月)にはGSIは 0.46 ± 0.06 に減少しており、組織学的にも周辺仁期の卵しか確認できなかったことから、3歳魚では産卵しない可能性が示唆された。雄ではGSIは2歳魚の2月から4月にかけて増加し、3歳魚になった6月に 0.53 ± 0.45 と最も高い値を示した。カンパチの採卵に適した水温は東京都小笠原水産センターで21.2-25.9℃、独立行政法人水産総合研究センター古満目栽培漁業センターで19.6-24.9℃、近畿大学水産養殖種苗センターすさみ事業場で21.9-25.4℃であり、概ね20-26℃の範囲であることが報告されている(高岡 2005)。今回使用した供試魚を養成している生簀周辺では、4月が $17.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$ 、5月が $19.4 \pm 1.4^\circ\text{C}$ 、6月が $23.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$ 、7月が $26.8 \pm 2.0^\circ\text{C}$ であった(Fig. 1)。水温とGSIの変化から判断すると、田辺湾での産卵期は5月から6月頃と推測される。

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

Harris et al. (2007) は、年間の平均水温が 20℃を上回るアメリカ大西洋沿岸域において漁獲されたカンパチでは、50%の個体が成熟する尾叉長は雌で 73.3 cm, 雄で 64.4 cm であることを報告している。また、地中海南部のペラージェ諸島周辺で漁獲されたカンパチの雌と雄では体長が約 113 cm と 109 cm で 50%の個体が成熟することが報告されている (Marino et al. 1995)。本研究の供試魚は 3 歳 1 ヶ月 (孵化後 1150 日)において雌が 65.1 ± 1.5 cm, 雄が 67.2 ± 2.9 cm と上述の大西洋あるいは地中海の成熟サイズよりも特に雌では小型であったことから、生殖腺の発達が進んでいなかったと考えられる。魚類は、成長して成熟可能な大きさになり、その後成熟に好適な環境条件の下で初回成熟を迎える (奥澤 2006)。魚類の成熟を制御する最も主要な環境条件は水温であるが、一部の魚種では日長条件も成熟に密接に関係している。また、生殖概年周期などの内的因子も直接的に、あるいは日長や水温などの環境条件を介して間接的に成熟にかかわっていると考えられる (清水 2010)。その成熟機構は、水温や日長などの情報が脳で感知され、視床下部の GnRH ニューロンに伝達、GTH 産生細胞に作用することで性ステロイドホルモンが生殖腺の発達を促進する。未熟な個体では上記の性ステロイドホルモン産生機構または GnRH 受容体などが未発達であるため成熟が進まない (奥澤 2006)。

成長 (体サイズ) と成熟には密接な関係があり、魚類において成熟して子孫を残すためには多大なエネルギーを必要とすることから、十分に成長して成熟に必要なエネルギーおよび栄養素を蓄積した個体において生殖腺が発達する。その一連の流れとしては、余剰エネルギーが脂肪として蓄積され、脂肪細胞において食欲の抑制とエネルギー代謝の調節に関わるレプチンと呼ばれるタンパク質ホルモンが合成される。レプチンは脂肪組織より分泌されるホルモンであり、遺伝性肥満マウスの病因遺伝子として同定された (Zhang et al. 1994)。このレプチンが視床下部の生

殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin Releasing Hormone : GnRH) 産生神経細胞に情報を与え、性ステロイドホルモンを分泌させて生殖腺を発達させる。魚類では、哺乳類のレプチンを使った *in vitro* 実験で、ヨーロッパスズキ *Dicentrarchus labrax* の脳下垂体に対する黄体形成ホルモン (Luteinizing Hormone : LH) の分泌促進作用 (Peyon et al. 2001) や、ニジマス *Onchorynchus mykiss* の脳下垂体での濾胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone : FSH) および LH の分泌促進作用 (Weil et al. 2003) が報告され、レプチンが生殖内分泌系を直接制御することが示唆されている。原田ら (1969) によるとカンパチの好適飼育水温は 20–31°C である。本研究の供試魚を養成している生簀周辺では、5 月から 10 月の期間は平均水温が 20°C を上回っているものの、1 月から 4 月、11 月から 12 月の計 6 ヶ月の期間は平均水温がカンパチの好適水温の下限である 20°C を下回っていた (Fig. 1)。高岡ら (2005) は、カンパチは低水温期には日間給餌率が低下し、20°C 以下ではほとんど成長せず、飼料効率も顕著に低下したと報告している。このことから、本研究で使用した供試魚が他の海域の個体群と比較して生殖腺の発達が遅いことは、体サイズが小型であったことに起因する成熟機構の未発達による可能性が推測された。また、本実験の供試魚を養成した田辺湾はカンパチの養成には水温が低い環境であるため、3 歳魚では産卵に至るサイズまで成長しなかったと考えられた。

本研究で調査した養成魚は、雌では成熟している、3 歳の 6 月においても産卵に至る個体は確認できず、生殖腺の発達も未熟な状態であった。しかし、雄では生殖腺に精子を確認することができ、精巣から精液が流れ出る個体がしばしば観察された。このことは供試魚の雌個体の成熟度が低いことを示している。群れの成熟度を上げることは、安定的な受精卵の確保に直結するため極めて重要である。個体の中でも成熟にばらつきがあったことは、早熟の個体を選抜することができる可能

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

性を示している。しかし、養殖魚では早熟はむしろ成熟・産卵に伴う体重減少と肉質劣化を引き起こすという問題がある。そのため、一概に早熟個体を親魚として選抜することが良いとは言い難い。親魚選抜の時期と方法については今後さらに詳細な検討が必要である。

Table 1 Number of male and female, sampling date, year-class, age fish and days after hatching of the sampled *Seriola dumerili*

Sampling date	Year class	Age	Days after hatching	Sex	n
Jun 21, 2017		1 year 1 months	412	Female	8
				Male	7
Sep 21, 2017		1 years 3 months	504	Female	4
				Male	11
Nov 22, 2017	2016 class	1 years 5 months	566	Female	7
				Male	8
Feb 12, 2018		1 years 7 months	648	Female	5
				Male	10
Apr 15, 2018		1 years 9 months	710	Female	6
				Male	5
Jun 23, 2017		2 years 1 months	779	Female	5
				Male	8
Sep 22, 2017		2 years 3 months	870	Female	5
				Male	5
Nov 24, 2017	2015 class	2 years 5 months	933	Female	5
				Male	5
Feb 16, 2018		2 years 7 months	1017	Female	3
				Male	12
Apr 27, 2018		2 years 9 months	1087	Female	3
				Male	4
Jun 29, 2018		3 years 1 months	1150	Female	4
				Male	4

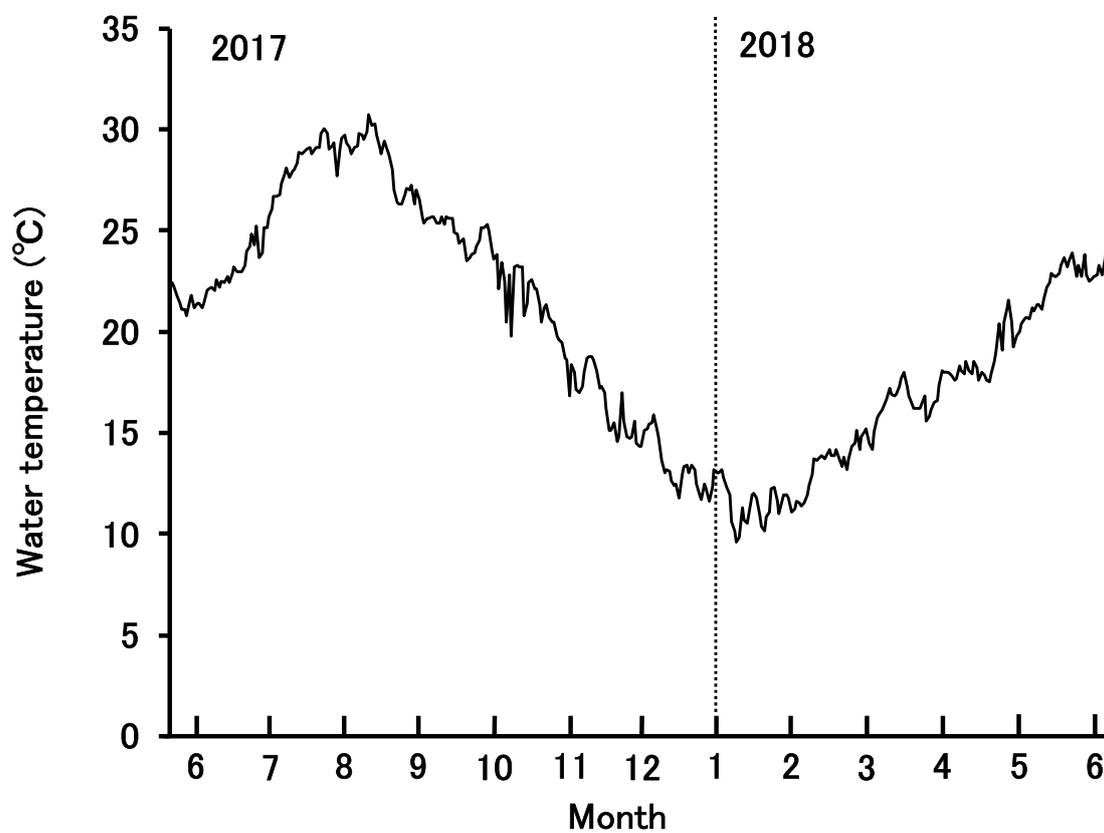


Fig. 1 Changes in the water temperature in 3 m depth of the sea net-cages in Tanabe bay during sampling period.

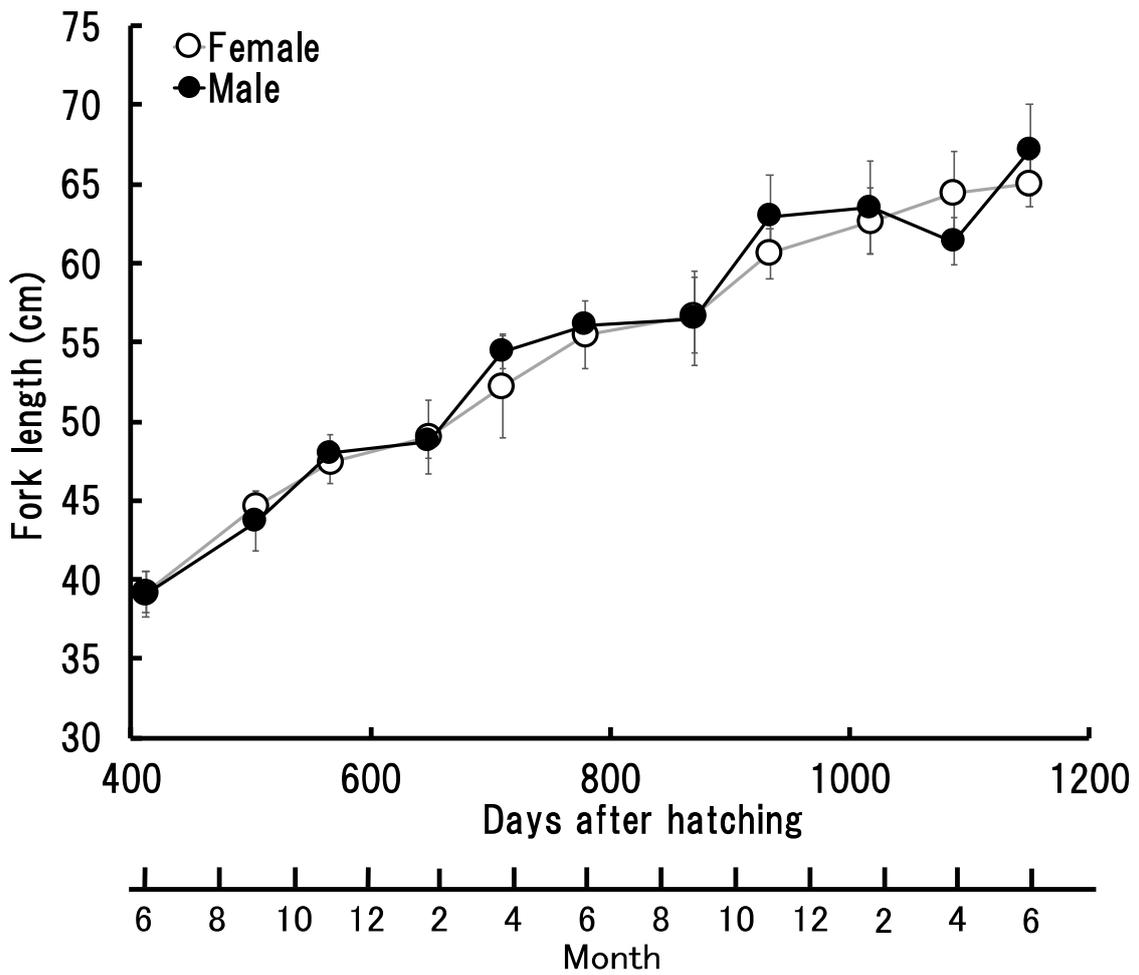


Fig. 2 Fork length of the sampled 1, 2 and 3-year-old male and female *Seriola dumerili*. Symbols: ○, female; ●, male.

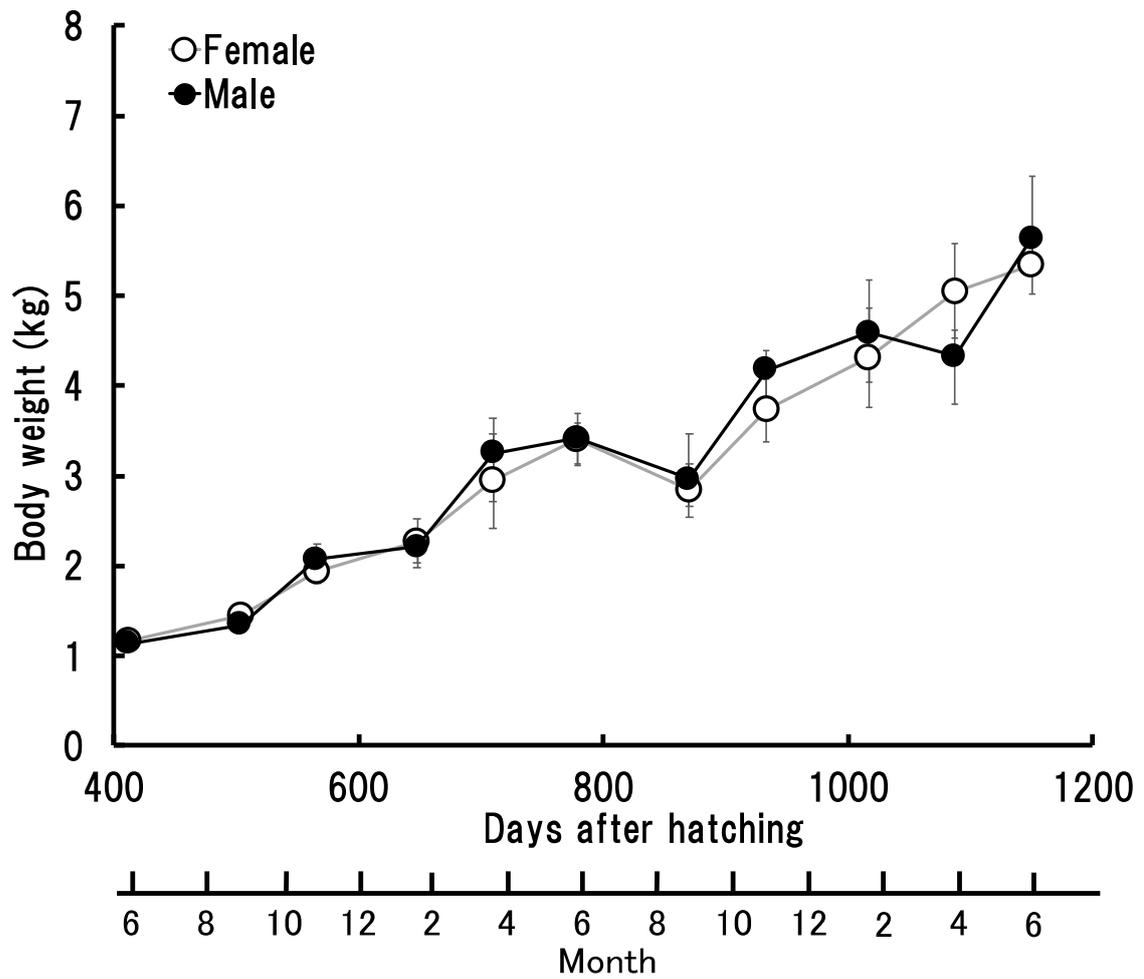


Fig. 3 Body weight of the sampled 1, 2 and 3-year-old male and female *Seriola dumerili*. Symbols: ○, female; ●, male.

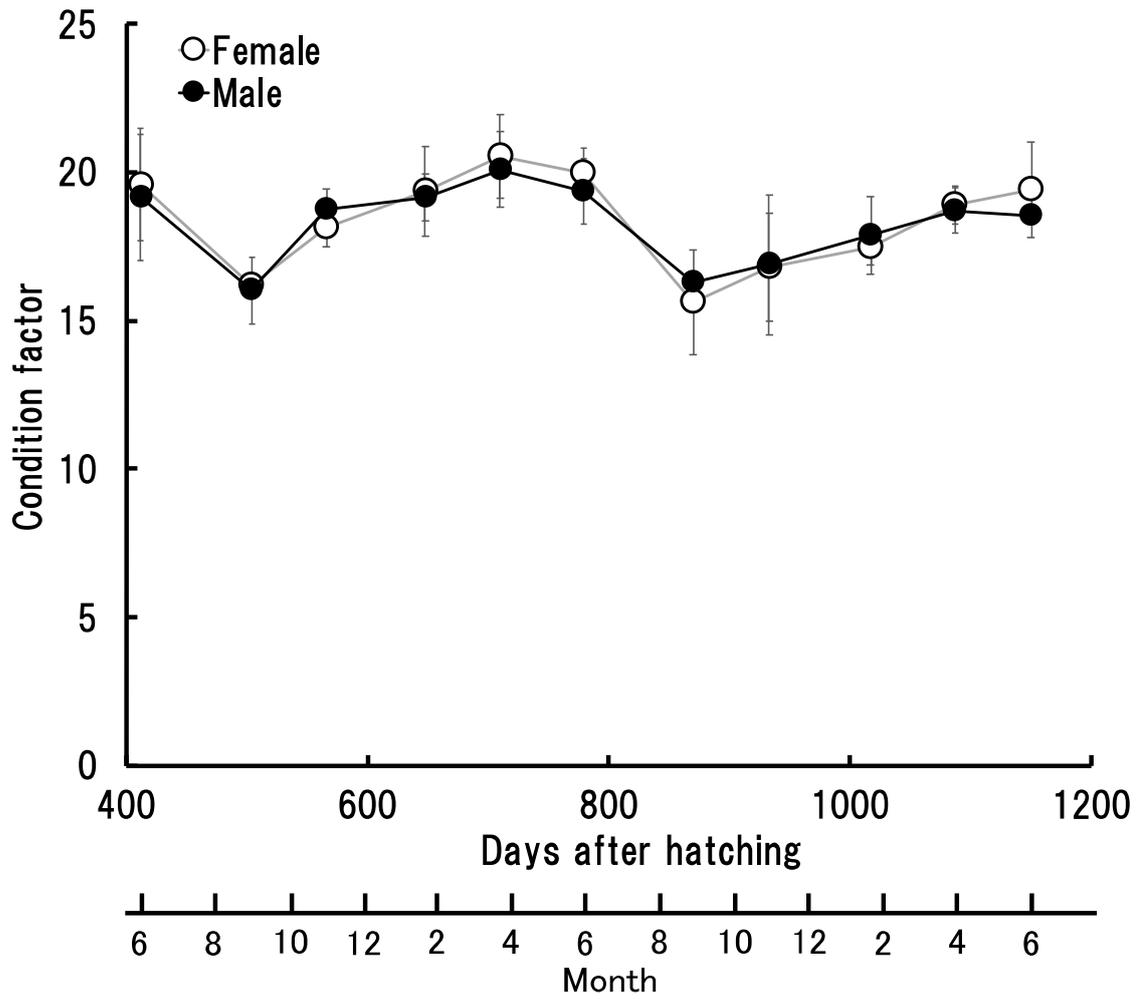


Fig. 4 Condition factor of the sampled 1, 2 and 3-year-old male and female *Seriola dumerili*. Symbols: ○, female; ●, male.

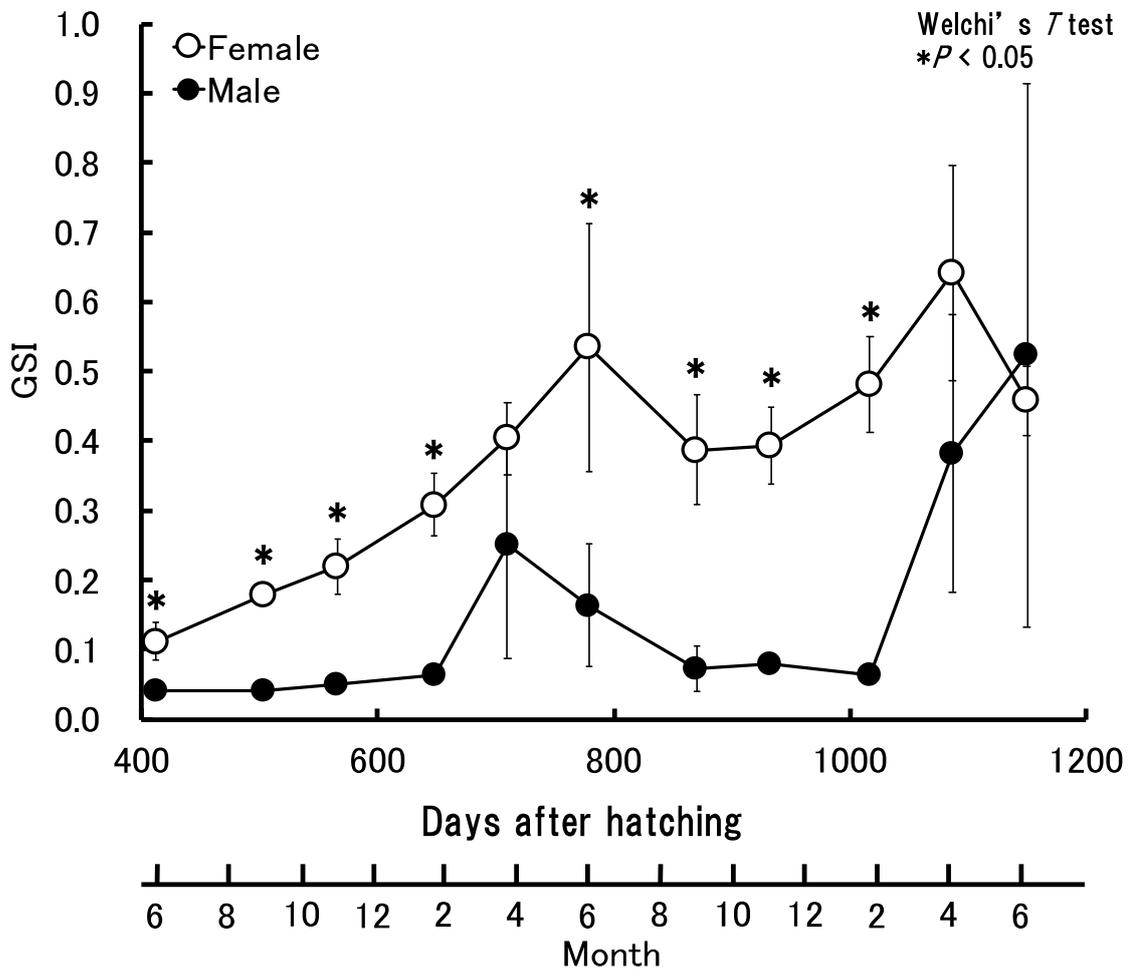


Fig. 5 GSI of the sampled 1, 2 and 3-year-old male and female *Seriola dumerili*. Symbols:

○, female; ●, male.

* Significant differences between males and females (Welch's *t* test, *p* < 0.05).

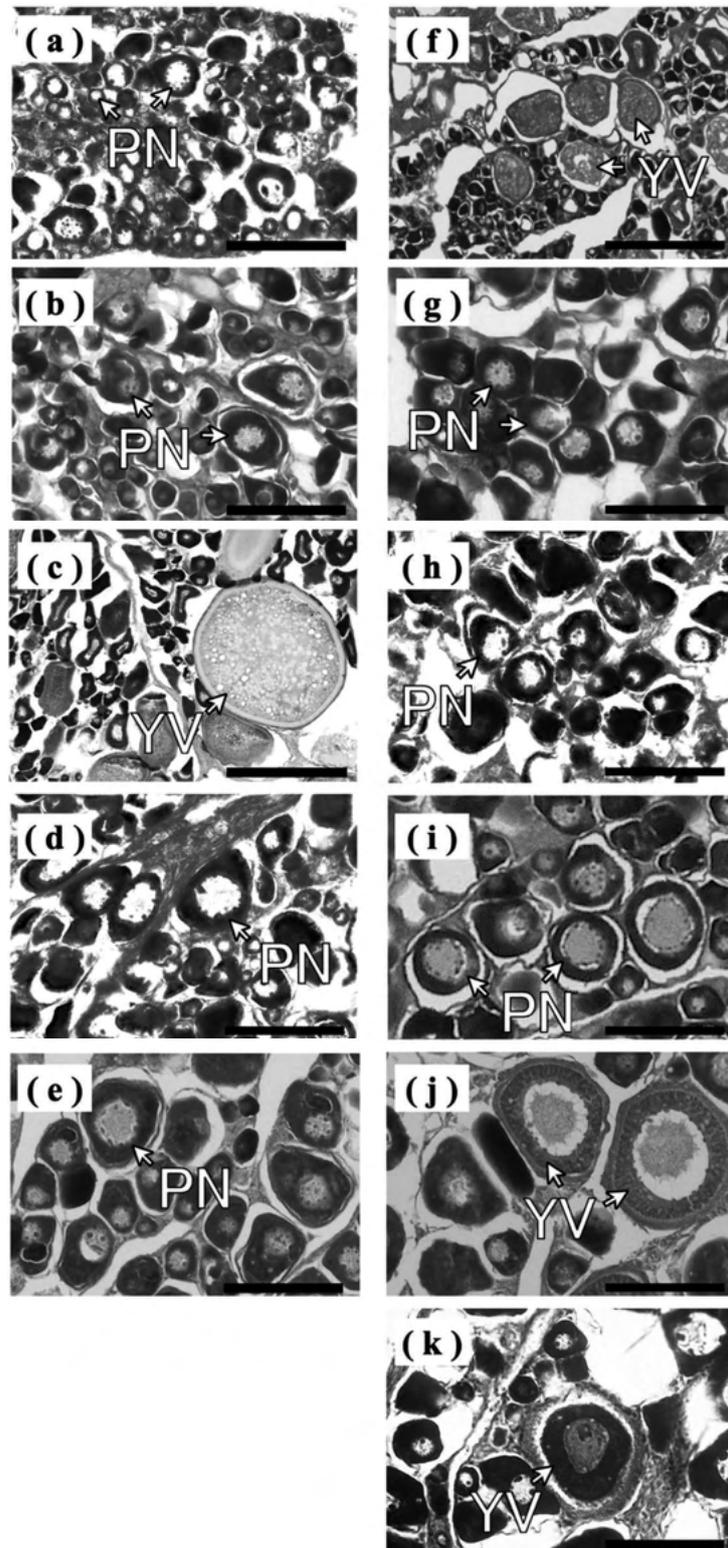


Fig. 6 Histological sections of ovaries of *Seriola dumerili* at 412 (a), 504 (b), 566 (c), 648 (d), 710 (e), 779 (f), 870 (g), 933 (h), 1017 (i), 1087 (j) and 1150 (k) days old. PN: perinucleolar oocyte; YV: yolk vesicle oocyte. Scale bar: 100 μ m

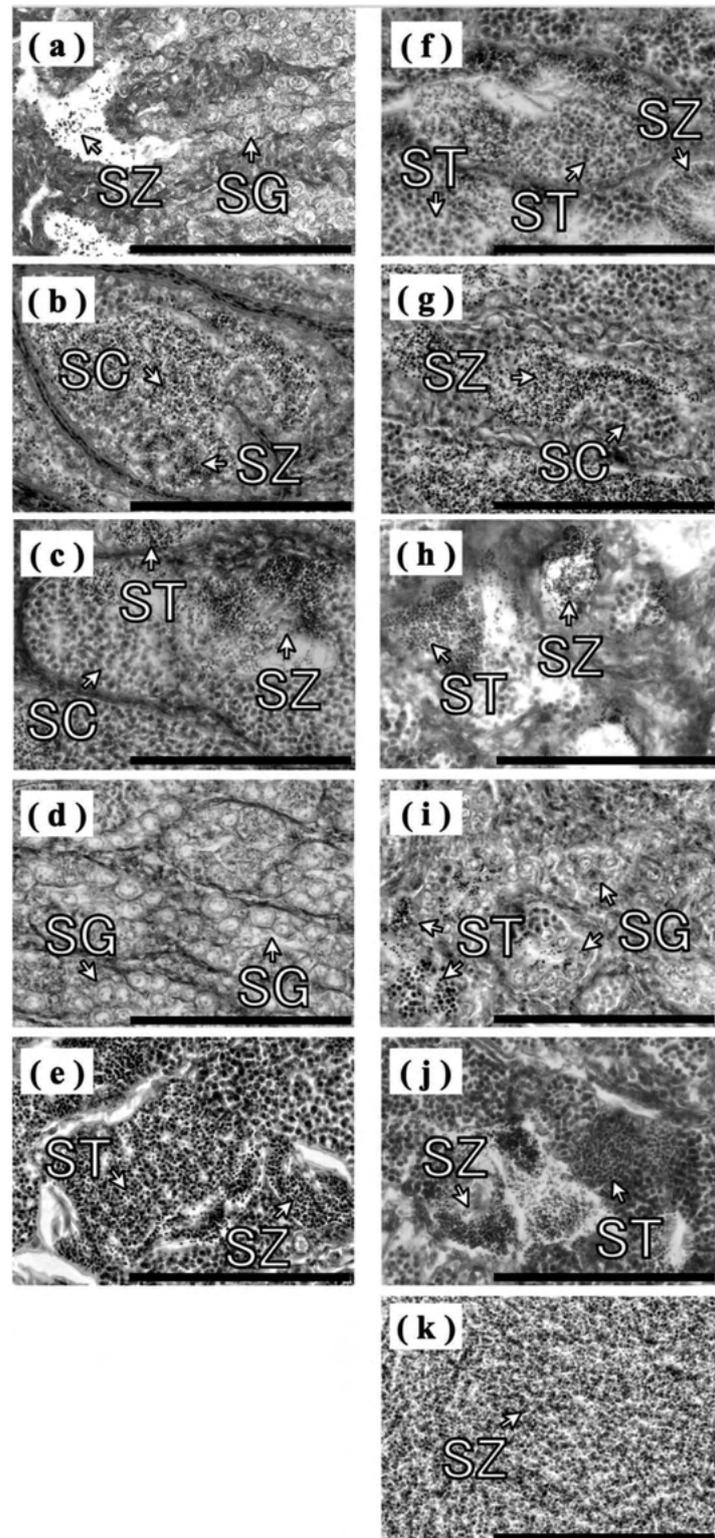


Fig. 7 Histological sections of testes of *Seriola dumerili* at 412 (a), 504 (b), 566 (c), 648 (d), 710 (e), 779 (f), 870 (g), 933 (h), 1017 (i), 1087 (j) and 1150 (k) days old. SG: spermatogonia; SC: spermatocytes; ST: spermatids; SZ: spermatozoa. Scale bar: 100 μ m

第2章 血漿中の E2 および 11-KT 濃度による性判別

前章で養殖カンパチ 1,2 および 3 歳魚の尾叉長, 体重および肥満度には雌雄間で明確な差が見られず, これらの性判別への利用は難しいことを示した。これまで, 種苗生産現場では性判別を行う際に 2 歳 (730 日齢) 以降では腹部圧迫法を, 3 歳 (1095 日齢) 以降には腹部圧迫法とカニューレシヨン法がよく用いられているが, その判別精度が低いことが課題となっている。また, 2 歳よりもより若齢であるときに精度の高い性判別ができれば, 養殖カンパチの親魚候補の絞り込みがより早期にできるため, 親魚養成にかかる管理費や飼育労力の低減などに繋がる。

そこで, 本章では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。

2-1. 雌雄の E2 濃度の推移

魚類では分泌された性ステロイドホルモンが生殖器官において配偶子の形成や成熟を促す。既報において, E2 は雌では卵黄形成を促進し, 雄では精原細胞の再生分裂の制御に関与していることが示されている (小林ら 2013; 伊藤・高橋 2016)。そこで 2-1 では, 養殖カンパチの 1, 2 および 3 歳魚において, 雌雄の血漿中に含まれている E2 濃度の推移を調査した。

2-1-1. 材料および方法

(a) 供試魚およびサンプリング

供試魚は, 第 1 章と同じ 2015 年および 2016 年産のカンパチ 1,2 および 3 歳魚を計 134 尾 (雌 55 尾, 雄 79 尾) 使用した (Table 1)。

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

サンプリング方法は第 1 章と同様であり、供試魚を網生簀から取りあげ、頭部に打撃を加えて気絶させてから魚体測定と採血を行ない、氷水 (約 8°C) で冷した。ヘパリン処理をした注射器を用いて尾柄部腹側の血管から採血した。採取した血液は 1.5 ml チューブ (ビオラモマイクロチューブ 1.5 ml, アズワン株式会社) 2 本に分取し、4°C で約 1 時間静置した後に、遠心分離機 (Model 6200, 久保田商事株式会社) を使用して 3000 rpm (825 ×g) で 15 分間遠心分離して血球と血漿に分離した。採取した血漿は分析まで -20°C で凍結保存した。血漿の採取・保存方法は竹村ら (1996) を参考にして行った。供試魚は開腹後、生殖腺を摘出して雌雄判別した。

(b) 血漿中の E2 濃度の測定

E2 濃度は、市販の酵素免疫測定法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, 以下 ELISA と略記) キット (ケイマンケミカル社) を用いてキットに添付されたマニュアルに従って測定をした。濃度測定にはマイクロプレートリーダー (Chromate 4300, アズマックス株式会社) を使用し、405nm の吸光度を測定した。各サンプルの測定にはマイクロプレート上で 3 ウェルを使用した。この ELISA キットの E2 濃度の検出限界は 15 pg / ml である。

(c) 統計処理

Mann-Whitney *U* test を使用して E2 濃度および 11-KT 濃度を連続した 2 回のサンプリング間で有意差検定した。統計解析は、R ver. 3.5.1 によって行い、*P* 値が 0.05 未満ならば有意差ありとした。

2-1-2. 結果

(a) 雌の E2 濃度の推移

雌の E2 濃度は、1 歳魚において孵化後 412 日では 16.2 ± 6.5 pg/ml, 孵化後 504 日では 43.0 ± 8.0 pg/ml, 孵化後 566 日では 87.6 ± 28.3 pg/ml, 孵化後 648 日では 73.3 ± 45.5 pg/ml, 孵化後 710 日で 218.2 ± 243.6 pg/ml であり、2 歳魚では、孵化後 779 日では 169.9 ± 114.5 pg/ml, 孵化後 870 日では 107.8 ± 60.9 pg/ml, 孵化後 933 日では 179.5 ± 40.4 pg/ml, 孵化後 1017 日では 166.6 ± 102.3 pg/ml, 孵化後 1087 日では 2049.4 ± 2261.9 pg/ml, 3 歳魚では孵化後 1150 日で 121.6 ± 57.2 pg/ml であった (Fig. 8)。

このように、雌の E2 濃度は 1 歳魚において孵化後 412 日から孵化後 648 日では、100 pg/ml 以下の値で推移し、孵化後 412 日から孵化後 504 日および孵化後 504 日から孵化後 566 日では血漿中の E2 濃度は有意に増加していた ($P < 0.05$)。孵化後 566 日から孵化後 1087 日までの期間には有意な増加や減少は認められなかったが、孵化後 1017 日から孵化後 1087 日にかけては 166.6 ± 102.3 pg/ml から 2049.4 ± 2261.9 pg/ml と平均値は約 12 倍に上昇し、その後孵化後 1150 日にかけて 121.6 ± 57.2 pg/ml まで有意に減少した (Fig. 8)。本研究で調査した雌の E2 濃度は 1 歳魚と 2 歳魚のどちらにおいても 4 月に増加する傾向があり、特に 2 歳魚では高い値を示した。

(b) 雄の E2 濃度の推移

雄の E2 濃度は、1 歳魚において孵化後 412 日が 21.5 ± 12.2 pg/ml, 孵化後 504 日では 26.3 ± 11.9 pg/ml, 孵化後 566 日では 39.5 ± 12.1 pg/ml, 孵化後 648 日に 17.2 ± 5.8 pg/ml, 孵化後 710 日において 15.0 ± 5.9 pg/ml であり、2 歳魚では孵化後 779 日

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

に 57.6 ± 23.1 pg/ml, 孵化後 870 日では 43.4 ± 11.3 pg/ml, 孵化後 933 日では 41.6 ± 14.9 pg/ml, 孵化後 1017 日では 17.5 ± 5.9 pg/ml, 孵化後 1087 日では 133.8 ± 66.7 pg/ml, 3 歳魚の孵化後 1150 日では 52.8 ± 4.8 pg/ml であった (Fig. 8)。

孵化後 412 日から孵化後 504 日では有意な差を認められなかったが, 孵化後 504 日から孵化後 566 日では雄の血漿 E2 濃度は有意に増加し ($P < 0.05$), 孵化後 566 日から孵化後 648 日にかけて有意に減少した ($P < 0.05$)。孵化後 648 日から孵化後 710 日では有意な変化は認められなかったが, 孵化後 710 日から孵化後 779 日にかけては約 4 倍の有意な増加を示した ($P < 0.05$)。孵化後 870 日から孵化後 933 日までには有意な濃度変化は認められず約 40 pg/ml で推移した。孵化後 933 日から孵化後 1017 日にかけて有意に減少した後, 孵化後 1017 日から孵化後 1087 日において約 7.6 倍の有意な増加を示した ($P < 0.05$)。その後孵化後 1150 日にかけて有意に減少した ($P < 0.05$) (Fig. 8)。

2-1-3. 考察

本研究のカンパチの雌では, 血漿中の E2 の濃度は 2 歳魚の 4 月において他の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 (Fig. 8)。魚類の雌において血漿中の E2 の濃度は産卵期にかけて上昇し, その後に低下するという推移がマダイ *Pagrus major* (大池ら 1988a), クロマグロ *Tunnus orientalis* (Susca et al. 2001), アユ *Plecoglossus altivelis* (吉田 2002), ブリ *Seriola quinqueradiata* (Miura and Miura, 2014) などで明らかとなっている。また, イタリアのペラージェ諸島にて漁獲された天然および漁獲後に蓄養された雌のカンパチ (尾叉長 87-117 cm, 体重 8-22 kg) では, E2 濃度は 4 月下旬から 5 月上旬に低濃度で推移した後, 5 月下旬から 6 月上旬にかけて濃度が上昇し, 当該海域での産卵期である 6 月から 7 月下旬にか

けて濃度が低下することが報告されている (Zupa et al. 2017)。時期には若干のずれはあるがこの変動パターンは本研究と類似している。また、この報告では天然採捕の個体は5月下旬から6月上旬で血漿中のE2濃度が約6 ng/ml、蓄養個体では約2 ng/mlと1/3程度であり、天然個体よりも蓄養個体の方が低いE2濃度を示すことも報告している。この研究では本研究の供試魚よりも大型の個体かつ卵巣も卵黄球期の卵母細胞が優先しており、周辺仁期の状態の卵が優先していた本研究の供試魚と比較して天然と蓄養の両方でE2濃度が高い値を示した。本研究で使用したカンパチのE2濃度が低濃度であった理由として、魚体サイズが本研究の方が小さかったことや養殖魚であったことが影響した可能性も推測される。カンパチは熱帯性に近い海域に分布する魚種であり、本研究の供試魚を養成していた和歌山県は生息海域としては北限に近い環境であったことも影響したと考えられる。

養殖カンパチ雌の産卵期における血漿中のE2濃度の急激な上昇は、前章で示したGSIの増大とよく一致した (Fig. 5, 8)。E2濃度の上昇と雌のGSIの増大はマダイ *Pagrus major* (大池ら 1988a)、ブリ *Seriola quinqueradiata* (Miura and Miura, 2014) など複数の魚種で報告されている。Miura and Miura (2014) が対象とした養殖ブリの雌ではE2濃度の高い群の方で卵巣が発達していたことも報告している。本研究で使用したカンパチ雌の生殖腺組織は、E2濃度が最も高い値を示した2歳魚の4月において周辺仁期の卵母細胞が優占していた卵巣内に一部の個体で卵黄胞期の細胞が確認され、未熟ではあるが卵母細胞の成熟が進んでいた (Fig. 6)。これは血漿中のE2濃度が上昇して肝臓に作用し、卵黄タンパク質前駆体であるビテロゲニンの合成を促進することで卵母細胞の卵黄形成が進行したことによるものだと考えられる (小林ら 2013)。

一方、脊椎動物においてエストロゲンは雌性ホルモンであることは広く知られ

ている。しかし、ゼブラフィンチ *Poephila guttata* (Schlinger et al. 1992), ヨーロッパトノサマガエル *Rana esculenta* (Minucci et al. 1997) およびアブラツノザメ *Squalus acanthias* (Betka and Callard 1998) の雄においてもその存在が確認されており, エストロゲン受容体がニジマス *Oncorhynchus mykiss* およびナイルティラピア *Oreochromis niloticus* の精巣において発現していることが報告されている (Guiguen Y et al. 1999)。本研究においてもカンパチ雄の血漿中から E2 が検出された (Fig. 8)。カンパチ雄における血漿中の E2 濃度は雌に比べて低かったものの, 雌と同様に産卵期前にあたる 2 歳魚の 4 月にかけて 2 月から急激に増加する傾向を示した。この血漿中の E2 濃度の急激な上昇がみられた時期に, 雄においても雌と同様に GSI が増加する傾向がみられた (Fig. 5, 8)。また E2 濃度が高い値を示した 2 歳魚の 4 月における生殖腺組織の状態は, 精巣内に精母細胞が優占している状態であり, 一部に精子を確認することができた (Fig. 7)。カンパチ雄の E2 濃度に関する報告はないが, 近縁種である養殖ブリの雄では産卵期の 4 月から 5 月にかけて E2 濃度が上昇し, その時期に GSI も増大することが報告されており, この結果は本研究と一致する (Miura and Miura, 2014)。Miura et al. (1991a) および Miura et al. (1991b) はウナギ *Anguilla japonica* の雄を対象とした *in vitro* および *in vivo* の実験において E2 が精原細胞の有糸分裂を誘発し, その後の精原細胞の分裂から精子形成までを 11-KT が誘導することを示している。本研究において 2 歳魚の 4 月に血漿 E2 濃度の急激な上昇と GSI の増加傾向がみられたことから, Miura et al. (1991a), Miura et al. (1991b) および Miura and Miura (2014) で示されたブリやウナギと同様, 養殖カンパチの雄個体でも E2 が精巣の成熟に関与していることが推測される。

2-2. 雌雄の 11-KT 濃度の推移

ステロイドホルモンの一種であるアンドロゲンは、雄性ホルモンとして、雄の成熟のみならず雌の成熟にも重要な役割を果たす(Mooradian et al. 1987; Quigley et al. 1995; Wang et al. 2009)。アンドロゲン作用の大部分は、核内受容体スーパーファミリーに属するアンドロゲン受容体 (AR) を介して行われる。その中でもテストステロンは最も重要なアンドロゲンであり、主に生殖腺や副腎で合成されるが、分泌後に標的組織で様々な酵素により変換され、活性化・不活性化する。11-KT はベニザケの血漿から単離されたアンドロゲンであり (Idler et al. 1960)、魚類の生殖腺において、11 β -水酸化酵素 (CYP11B) および 11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素 2 型 (HSD11B2) により、テストステロンから合成されることが報告されている (Fernandino et al. 2012)。11-KT は雌では卵形成への関与が示されているがその詳細は解明されていない。一方、雄においては血漿中に高濃度で存在し、精原細胞の増殖から精子変態に至る一連の過程に必須である (三浦・三浦 2016)。そこで 2-2 では、養殖カンパチの 1, 2 および 3 歳魚において雌雄の血漿中に含まれる 11-KT 濃度の推移を調査した。

2-2-1. 材料および方法

(a) 供試魚およびサンプリング

本研究には第 1 章と同じ、2015 年および 2016 年産のカンパチ 1, 2 および 3 歳魚を計 134 尾 (雌 55 尾, 雄 79 尾) 使用した。サンプリングの方法は 2-1-1 と同様である。

(b) 血漿中の 11-KT 濃度の測定

11-KT 濃度は、市販の酵素免疫測定法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, 以下 ELISA と略記) キット (ケイマンケミカル社) を用いてキットに添付されたマニュアルに従い測定した。濃度測定にはマイクロプレートリーダー (Chromate 4300, アズマックス株式会社) を使用し、405nm の吸光度を測定した。各サンプルの測定にはマイクロプレート上で 3 ウェルを使用した。この ELISA キットの 11-KT 濃度の検出感度は 1.3 pg / ml である。

2-2-2. 結果

(a) 雌の 11-KT 濃度の推移

雌の 11-KT 濃度は、1 歳魚において孵化後 412 日では 8.2 ± 3.0 pg/ml, 孵化後 504 日では 30.0 ± 7.9 pg/ml, 孵化後 566 日では 11.9 ± 4.5 pg/ml, 孵化後 648 日では 15.3 ± 5.8 pg/ml, 孵化後 710 日で 19.0 ± 8.9 pg/ml, 2 歳魚の孵化後 779 日では 7.1 ± 3.3 pg/ml, 孵化後 870 日では 25.9 ± 19.0 pg/ml, 孵化後 933 日では 11.8 ± 2.2 pg/ml, 孵化後 1017 日では 17.9 ± 1.9 pg/ml, 孵化後 1087 日では 15.6 ± 5.5 pg/ml であり, 3 歳魚の孵化後 1150 日では 4.0 ± 0.9 pg/ml であった(Fig. 9)。

孵化後 412 日から孵化後 504 日にかけて雌の平均血漿 11-KT 濃度は有意に増加し ($P<0.05$), 孵化後 504 日から孵化後 566 日にかけては有意に減少した ($P<0.05$)。その後の孵化後 566 日から孵化後 648 日および孵化後 648 日から孵化後 710 日の間にはいずれも有意な変化はなかったが増加傾向を示し, 孵化後 710 日から孵化後 779 日にかけて有意に減少した ($P<0.05$)。孵化後 779 日から孵化後 870 日にかけては有意に増加した ($P<0.05$)。孵化後 870 日から孵化後 933 日では有意な濃度変化は認められず, 孵化後 933 日から孵化後 1017 日にかけては有意に増加した

($P<0.05$)。その後、孵化後 1017 日から孵化後 1087 日にかけては有意な変化を示さず、孵化後 1150 日にかけて有意に低下した (Fig. 9)。

(b) 雄の 11-KT 濃度の推移

雄の 11-KT 濃度は、1 歳魚において孵化後 412 日が 38.4 ± 22.5 pg/ml、孵化後 504 日では 169.9 ± 59.0 pg/ml、孵化後 566 日では 243.2 ± 112.3 pg/ml、孵化後 648 日では 85.8 ± 22.0 pg/ml、孵化後 710 日で 2272.0 ± 813.1 pg/ml、2 歳魚において、孵化後 779 日で 436.0 ± 245.8 pg/ml、孵化後 870 日では、 450.6 ± 211.4 pg/ml、孵化後 933 日では 458.2 ± 220.2 pg/ml、孵化後 1017 日では 226.1 ± 127.4 pg/ml、孵化後 1087 日では 3171.0 ± 1411.7 pg/ml、3 歳魚では孵化後 1150 日で 500.8 ± 332.4 pg/ml であった (Fig. 9)。

孵化後 412 日から孵化後 504 日にかけて平均血漿 11-KT 濃度は約 4 倍に有意に増加し ($P<0.05$)、孵化後 504 日から孵化後 566 日にかけては有意な変化はなかった。孵化後 566 日から孵化後 648 日にかけて約 6 割の有意に減少した後 ($P<0.05$)、孵化後 648 日から孵化後 710 日にかけて約 26 倍もの急激な上昇を示した ($P<0.05$)。その後、孵化後 710 日から孵化後 779 日にかけては約 8 割の急激な減少を示した ($P<0.05$)。その後、孵化後 779 日から孵化後 933 日にかけては有意な変化は認められず、450 pg/ml 前後の濃度で推移した。孵化後 933 日から孵化後 1017 日にかけて有意に減少後、孵化後 1017 日から孵化後 1087 日にかけては約 14 倍と再び顕著に増加した ($P<0.05$)。その後、孵化後 1150 日にかけて約 8 割の急激な減少を示した ($P<0.05$) (Fig. 9)。

2-2-3. 考察

本研究ではカンパチの雄における血漿中の 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 (Fig. 9)。三重県で養殖された 3 歳の雄のマダイ *Pagrus major* (大池 1988b) では 4 月から 5 月にかけて 11-KT 濃度が約 500-1000 pg/ml と他の月と比較して高い値を示し, この時の精巣は精子で満たされていたことが示されている。スペインのカステリオンで孵化後 4 ヶ月から 2 年間にわたり養殖されたヨーロッパスズキ *Dicentrarchus labrax* (Rodriguez et al. 2000) の雄では産卵期の 11 月から 12 月にかけて 11-KT 濃度が 10 ng/ml から 30 ng/ml へ顕著に増加し, 1 月まで同程度の濃度で推移した後に 2 月にかけて 10 ng/ml まで低下する推移を示した。アメリカのテキサスで養殖された 1 歳 6 ヶ月レッドドラム *Sciaenops ocellatus* (Kucheraka et al. 2006) の雄では, 産卵期の 11 月に 11-KT 濃度が 1 ng/ml 以上の値を示して 1.19 ng/ml の個体の精巣は精子が優占していること, 11-KT 濃度が 0.44 ng/ml の個体では精子を確認することはできず精細胞が優占して精原細胞と二次精母細胞も確認されること, 0.65 ng/ml の個体では一次精母細胞が優占しているが一部に精子を確認することができたことを報告している。上記の多くの魚類で産卵期の雄個体では 11-KT の濃度が上昇し, その後に低下することが報告されている。一方, イタリアのペラージェ諸島にて漁獲された天然の雄のカンパチ (尾叉長 90-117 cm, 体重 9-20 kg) では, GSI および 11-KT の濃度は 4 月下旬から 5 月上旬に低濃度で推移した後, 5 月下旬から 6 月上旬にかけて濃度が上昇し, 当該海域での産卵期である 6 月から 7 月下旬にかけて濃度が低下することが報告されている (Zupa et al. 2017)。時期には若干のずれはあるが多くの魚類や一部の海域のカンパチと本研究における雄の 11-KT 濃度の変動パターンは類似していた。この血漿中の 11-KT 濃度の急激な上昇は, 前

章で示した GSI の増大とよく一致した (Fig. 5, 9)。また 11-KT の濃度が高い値を示した 1 および 2 歳魚の 4 月における精巣組織では、いずれも精細胞が巢内を優占しており、一部に精子が観察できる状態であった (Fig. 7, 9)。この時のカンパチの 11-KT 濃度はどちらも 1000 pg/ml を超えており、マダイ (大池 1988b) やレッドドラム (Kucheraka et al. 2006) における 11-KT 濃度と精巣の状態と類似していた。Zupa et al. (2017) は、3 歳以上のカンパチにおいて 11-KT の濃度が上昇する時期の精巣には精原細胞から精子までの全ての段階の細胞が存在して活発に精子形成を行っていたが、11-KT の濃度が低下した産卵期では精巣内が精子で満たされていたと報告している。1 歳魚の 4 月は精巣に主に精母細胞が巢内を優占しており、一部に精子が観察された (Fig. 7)。2 歳魚 6 月の孵化後 779 日ではそれぞれ全個体で精巣に精細胞が優占しており、一部に精子が確認された (Fig. 7)。本研究の養殖カンパチの雄では、1 歳魚の 4 月 (孵化後 710 日) から 2 歳魚の 6 月 (孵化後 779 日) にかけて 11-KT の濃度は有意に低下した ($P < 0.05$) (Fig. 7, 9)。これは、6 月の生殖腺は精細胞が優先しているものの精子形成まで発達していた個体が多かった可能性や、本研究における組織観察では詳細な変化をみることはできていないが GSI が低下傾向にあったことから精巣の成熟そのものが進まなかった可能性が考えられた。一方、11-KT の濃度が低下した 3 歳魚の 6 月では精巣内が精子で満たされており、Zupa et al. (2017) の報告と一致した (Fig. 7)。このことから、養殖カンパチにおいて初回成熟が起こる 2 歳魚以降で 11-KT の濃度と精巣内の生殖細胞の発達が一致し始めるのではないかと推測される。

一方、雌の 11-KT 濃度に関する既報は少ないが、Lokman et al. (2002) は様々な魚種で雌の血漿中に 11-KT が含まれており、雌の 11-KT の濃度は雄よりも低濃度であることを報告している。これは本研究の養殖カンパチにおいても雌個体では低濃

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

度であったことと一致する (Fig. 9)。雌の血漿中に含まれる 11-KT の濃度は低いものの、Sudo et al. (2012) はウナギでは雌においても卵巣組織にアンドロゲン受容体が存在し、雌の卵黄形成の開始時および油球期後期以降の卵巣の発達から卵黄形成初期に至るまでの過程に 11-KT が関与していることを報告している。また、本研究で使用した養殖カンパチの雌の卵巣は卵黄形成期より未発達な周辺仁期の状態であったが、血漿中に 11-KT が確認できたことから、養殖カンパチの雌では卵黄形成の開始以前から 11-KT が卵成熟に関わっている可能性が推測された。また、養殖カンパチの雌において 11-KT の濃度を調査した報告はないが、近縁種であるブリの養殖個体の雌では産卵期である 4 月から 5 月にかけて 11-KT の濃度が高くなり、この時期に GSI も増大している (Miura and Miura, 2014)。Miura and Miura, (2014) が用いた雌の養殖ブリでは、卵黄蓄積まで発達している個体群の方が未熟な卵母細胞のみである個体群よりも 11-KT の濃度が高い値を示すことが報告されている。この報告における養殖ブリの雌ではピーク時において 11-KT の濃度は 400-500 pg/ml 程度まで上昇していたが、本研究の養殖カンパチの雌では、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 (Fig. 9)。本研究で使用した養殖カンパチの雌の卵巣を組織学的に観察したところ、一部卵黄胞期の細胞が確認できたが、サンプリングを行ったほぼすべての時期において周辺仁期の未熟な細胞が卵巣内を優占していたことから、卵巣の成熟が進んでいなかったためにブリよりも雌の 11-KT 濃度が低かった可能性がある (Fig. 6)。

2-3. E2 および 11-KT 濃度による性判別

2-3 では、2-1 および 2-2 において測定した血漿 E2 および 11-KT の濃度を雌雄間で比較するとともに、それら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、性判別の基準となる E2 および 11-KT 濃度を算出し、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となるかについても併せて検討した。

2-3-1. 材料および方法

(a) 供試魚およびサンプリング

本研究には第 1 章と同じ、2015 年および 2016 年産のカンパチ 1, 2 および 3 歳魚を計 134 尾 (雌 55 尾, 雄 79 尾) を使用し、サンプリング方法も同様とした。

(b) ホルモン濃度による性判別用基準値の算出と評価

受信者動作特性曲線 (Receiver Operating Characteristic curve, 以下 ROC と略記) を用いた分析を行った (Fawcett 2006)。本研究ではホルモン濃度をもとに TP (True Positive, 真陽性): 雌または雄を正しく判別した場合の個体数, FP (False Positive, 偽陽性): 雌または雄を誤って判別した場合の個体数, の 2 種類に分類した。X 軸は特異度 (Specificity) と表記し, FP の割合を示しており, Y 軸は感度 (Sensitivity) と表記し, TP の割合を示している。FP の割合と TP の割合は以下の式で算出した。

$$\text{FP score} = \text{基準値以上に含まれる偽陽性個体} / \text{全ての偽陽性個体}$$

$$\text{TP score} = \text{基準値以上に含まれる真陽性個体} / \text{全ての真陽性個体}$$

ROC 曲線は、判別基準とするホルモン濃度を最低濃度から最大濃度まで実際の測定濃度に当てはめた場合の FP と TP の割合を連続的にプロットしてつなぎ合わせて作成したものである。ROC 曲線作成を行うにあたり、例を示す (Fig. 10)。ROC

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

曲線では, FP が 0%, TP が 100%の場合が最も判別率の高い点 (0.000, 1.000) であるため, ROC 曲線において最もこの点に近くプロットされた点が最も高い判別率を示し, この点をカットオフ値と呼ぶ。括弧内の数値はカットオフ値の FP (左) および TP (右) を示す。ROC 曲線を作成することで求めることができるカットオフ値を用い, 性判別を行う際のホルモン濃度の基準値とした (Fig. 10)。この基準値による性判別が E2 および 11-KT においてそれぞれがどの程度の判別率を示すのかを, 生殖腺の観察によって確認した実際の性別と比較して判別率を以下の式で算出した。

$$\text{判別率 (\%)} = [(\text{正しく識別された数}) / (\text{各性の実際の数}) \times 100]$$

また, Akobeng (2006) および Fawcett (2006)による曲線下面積 (area under the curve, 以下 AUC と略記) に基づいて, 得られた基準値の精度を確認した。AUC の算出には区分求積法で発生する誤差をより小さくするため, 数値積分の方法である台形公式を用いた (Bradley 1997)。ROC 曲線の AUC は最も精度が高い場合は 1 となり, 最も精度が悪い場合に 0.5 となる。既報研究および University of Nebraska Medical Center (Interpreting Diagnostic Tests の The Area Under an ROC Curve, <http://gim.unmc.edu/dxtests/roc3.htm>) に基づき AUC 値が 1.0 -0.9 の場合を高精度, 0.9-0.7 を中精度, 0.7-0.5 を低精度とした (Rice and Harris 2005)。ROC 曲線の作成およびそれに伴う AUC と基準値であるカットオフ値は, 統計解析ソフトである EZR バージョン 1.41 を使用して算出した。

(c) 統計処理

Mann-Whitney *U* test を使用して日齢ごとの E2 濃度および 11-KT 濃度を雌雄間で有意差検定した。統計解析は R ver. 3.5.1 によって行い、*P* 値が 0.05 未満ならば有意差ありとした。

2-3-2. 結果

(a) 雌雄の E2 濃度の比較

血漿 E2 濃度は、孵化後 412 日 (1 歳 1 ヶ月) および孵化後 870 日 (2 歳 3 ヶ月) 以外のサンプリングでは雌の方が雄よりも有意に高い値を示した ($P < 0.05$) (Fig. 10)。雌雄間で最も濃度差が大きかったのは、孵化後 1087 日 (2 歳 9 ヶ月) で 1915.6 pg/ml であり、最も濃度差が小さかったのは孵化後 412 日 (1 歳 1 ヶ月) の 5.26 pg/ml であった。

(b) 雌雄の 11-KT 濃度の比較

雄の血漿 11 KT 濃度は、孵化後 412 日から孵化後 1150 日の全サンプリングにおいて雌よりも有意に高い値を示した (Fig. 12)。雌雄の濃度差が最も小さかった孵化後 412 日であっても雄の 11-KT の平均濃度 (38.4 ± 22.5 pg / ml) は、雌の平均濃度 (8.2 ± 3.0 pg / ml) の約 5 倍の濃度であった。1 歳魚 11 月から孵化後 1150 日の雌雄間で血漿中の 11-KT 濃度に 4.7-203.7 倍の差が確認された (Fig. 12)。雌雄間で最も濃度差が大きかったのは、孵化後 1087 日 (2 歳 9 ヶ月) で 3155.6 pg/ml であった。

(c) E2 濃度による性判別用基準値の算出と評価

性判別に有効な血漿中 E2 濃度を、ROC 曲線を使用して算出した結果、血漿中の

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

E2 濃度が 66.8 pg / ml の場合に最も高い精度で雌雄の性判別を行うことが示され、E2 の濃度が 66.8 pg/ml 以上を雌と判別し、E2 濃度がこの基準値を下回る個体を雄と判別した (Fig. 13)。E2 濃度を基準とした場合の Area under the curve (AUC) は 0.81 であり、中精度であった。この基準値を用いた性判別結果、実際の生殖腺観察によって確認した性判別結果および判別率を Table 2 に示した。孵化後 412 日の E2 濃度に基づいて、7 尾の雄はすべて雄として正しく判別することが出来たが、8 尾の雌は全て雄と判断され、判別率は 46.7% であった。また、孵化後 504 日においても 11 尾の雄はすべて正しく判別することが出来たが、4 尾の雌は全て雄と判断された。E2 濃度に基づく性判別の精度は成長に伴って E2 濃度が上昇するにつれて高くなる傾向がみられたが、孵化後 566 日では雌 7 尾のうちの 2 尾を誤判別し、孵化後 779 日では 8 尾の雄のうち 3 尾を誤判別した。孵化後 1087 日では 3 尾の雌はすべて正しく判別することが出来たが、雄の E2 濃度が高く 4 尾の雄は全て雌と判断された。全個体を対象とした判別率の平均値は 79.8% であった (Table 2)。

(d) 11-KT 濃度による性判別用基準値の算出と評価

性判別のための最適な血漿 11-KT 濃度を E2 と同様に ROC 曲線を使用して算出した結果、57.6 pg / ml の場合に最も高い精度で雌雄の性判別を行うことが示され、11-KT 濃度が 57.6 pg / ml 以上を雄と判別し、11-KT 濃度がこの基準値を下回る個体を雌と判別した。11-KT 濃度を基準とした場合の Area under the curve (AUC) は 0.99 であり、高精度を示した。この基準値を用いた性判別結果、実際の生殖腺観察によって確認した性判別結果および判別率を Table 3 に示した。孵化後 412 日では、8 尾の雌はすべて雌として正しく判別することが出来たが、7 尾の雄の中の 5 尾は雌と判別され、判別率は 66.6% であった。しかし、孵化後 504 日以降から孵化後 1150

日までは常に 100%の判別率を示し、全個体を対象とした判別率の平均値は 97.0%であった (Table 3)。

2-3-3. 考察

本研究では2種類の代表的な性ステロイドホルモンである E2 および 11-KT をカンパチの性判別の指標として使用し、血漿中の 11-KT 濃度がカンパチの性判別に有用であることを実証した。ホルモンに基づく性判別法は、他魚種、特に従来 of 腹部圧迫法などが使用できない種で有用であることが示されており、魚体重が 0.6 から 1.1 kg のピラルクー *Arapaima gigas* の幼魚において、11-KT と E2 との濃度比を使用した性判別により 100%の判別精度であったことが報告されている (Chu-Koo et al. 2009)。Ceapa et al. (2002) では E2 と 11KT との濃度比、E2 とテストステロン (T) との濃度比およびビテロゲニン (VTG) の濃度を使用することでホシチョウザメ *Acipenser stellatus* (6 から 11 歳魚) の性判別に成功したことを報告している。同様に、E2 および T の濃度は、E2 と T との濃度比とともに、未熟な 2 から 5 歳のオオチョウザメ *Huso huso* の性判別に使用されている (Nazeri et al. 2014)。

1, 2 および 3 歳魚の養殖カンパチの血漿 E2 濃度に基づいて、本研究で得られた基準値 66.8 pg/ml 以上を雌と判別した結果、全個体の 79.8%の性別を判定することができた (Table 2)。しかし、E2 では判別率が 100%になるのは孵化後 933 日からであり、孵化後 933 日以降も 1087 日において判別率が 42.8%と大きく下がるなど、正確な性判別ができないことが多かった。一方、11-KT 濃度を指標にして 57.6 pg/ml 以上を雄と判別した結果、全個体の 97.0%の性別を判定することができた (Table 3)。雌雄間で血漿 11-KT 濃度に有意な差はあったものの、濃度そのものが雌雄ともに低かった孵化後 412 日の時点では 66.6%の判別率であったが、孵化後 504 日以降で

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

は全個体の雌雄を正確に判別することができた (Table 3)。従ってカンパチの性判別には血漿 E2 濃度よりも 11-KT 濃度の方が適していることが示唆された。このように血漿 11-KT 濃度を測定することにより、カンパチの性別を実際の生産現場で行う満 2 歳 (孵化後 730 日) よりも早い時期に高い精度で判別可能であることが示された。

本研究において、11-KT 濃度に基づいた場合には孵化後 412 日では判別率が最も低い値を示した (Table 3)。これは、11-KT の分泌動態の違いによるものであると推測できる。11-KT は精巣において精原細胞の分裂から精子形成までの一連の流れに関与している (Miura et al. 1991c)。一方、雌の卵黄形成の開始時および油球期後期以降の卵巣の発達から卵黄形成初期に至るまでの過程に 11-KT が関与することが雌のウナギで報告されている (Sudo et al. 2012)。しかし、魚類の雌における 11-KT の分泌期間は限られており、雄と比較して分泌量は少ない。本研究においてカンパチ 1 歳魚 (孵化後 412 日) で性判別の精度が低かった理由は、若齢では雄が未熟であったために 11-KT の分泌量が少なく、雌との濃度差が小さかったことであると考えられる。また、ROC 曲線による基準値の算出に全個体のデータを使用したため、基準値が高く設定されたことも影響したと考えられた。

本章で行った採血は従来の腹部圧迫法などと同様に魚体に負担をかけるため、実際の生産現場で用いるには魚体へのストレスの影響や作業効率なども考慮する必要がある。魚体に負荷をかけないという点では、Smith et al. (2014) によるカンパチの総排泄腔の開口部の形態学的差異に基づいた性判別法が画期的であり、性判別率は 99.6% と高い。しかし、尾叉長 53.4 から 141.2 cm と比較的大型のカンパチを用いて総排泄腔の形状のわずかな違いを区別しているため、わが国の養殖カンパチの生産現場で使用するにはサイズが異なる上に豊富な経験が必要となり、実用

的ではないと考えられる。

実際、採血を行う場合には魚体にかなりのストレスをかける。また、1尾ずつ採血を行うことは現場で多大な労力を伴い作業効率においても問題がある。そこで魚体への負荷を軽減可能なより生産現場に適用し易い方法として、血液以外の組織からの性ステロイドホルモンの抽出および性判別が可能であるかについて3章で検討する。

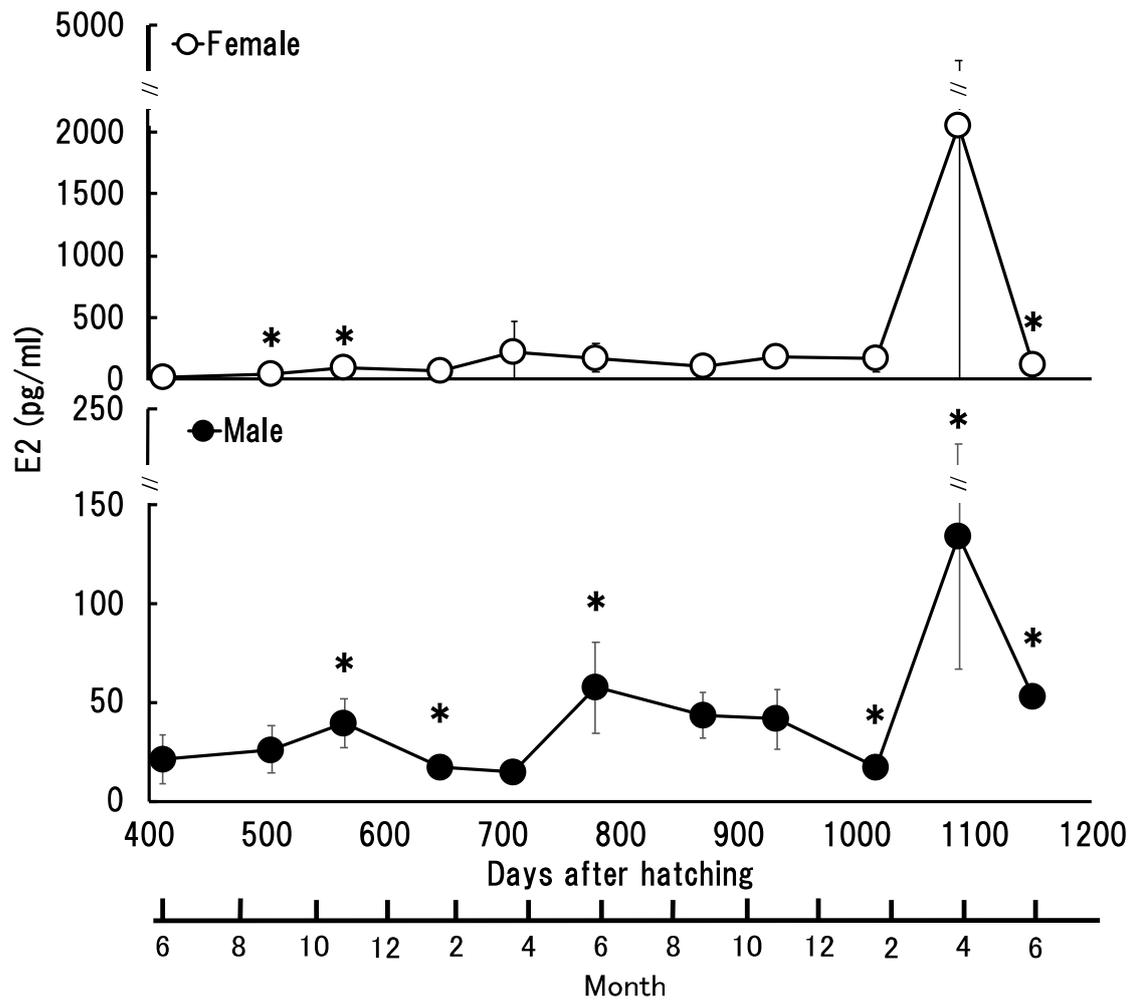


Fig. 8 Plasma E2 concentration of the sampled 1, 2 and 3-year-old male and female *Seriola dumerili*. Symbols: ○, female; ●, male.

* Statistical significance between plasma E2 concentrations in each sampling and the previous sampling (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)

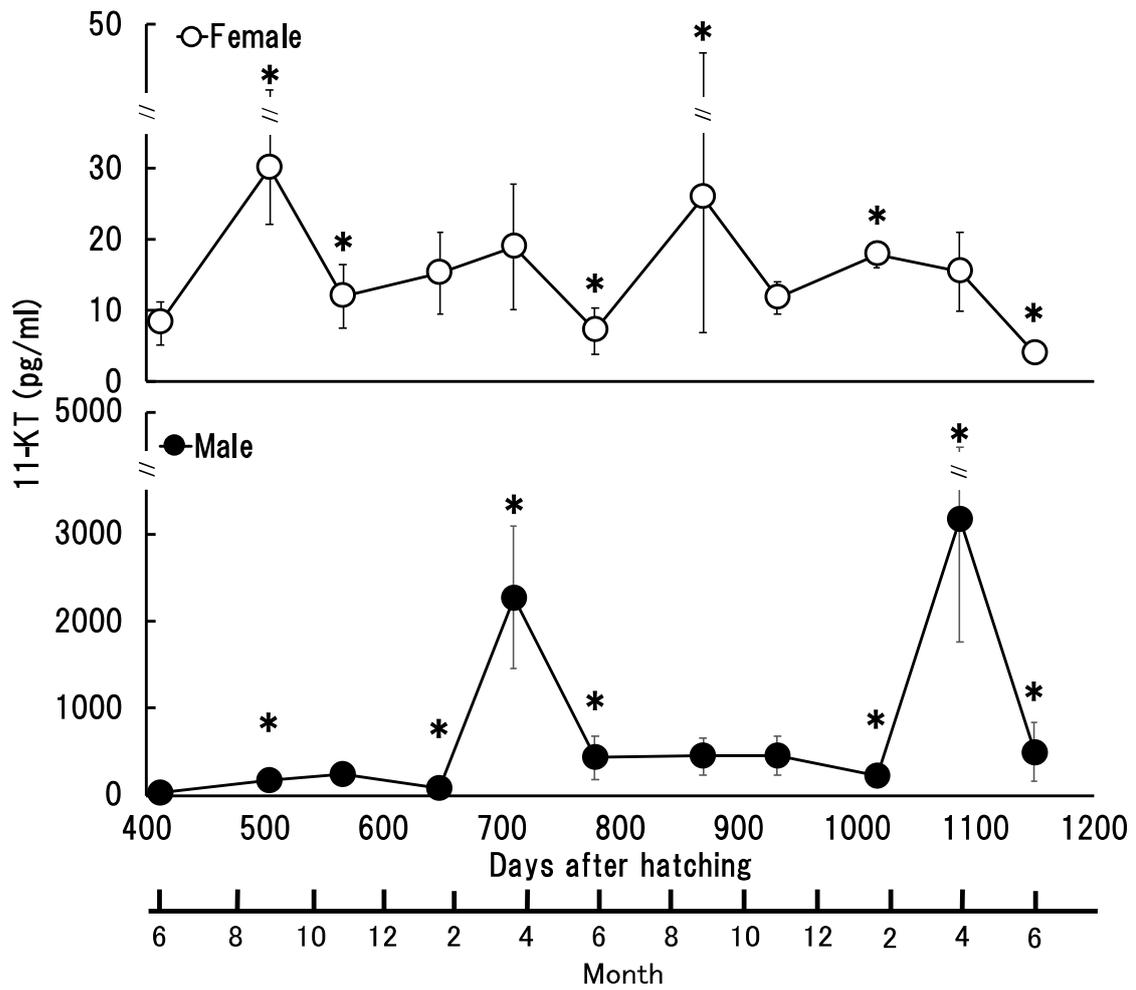


Fig. 9 Plasma 11-KT concentration of the sampled 1, 2 and 3-year-old male and female *Seriola dumerili*. Symbols: ○, female; ●, male.

* Statistical significance between plasma 11-KT concentrations in each sampling and the previous sampling (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)

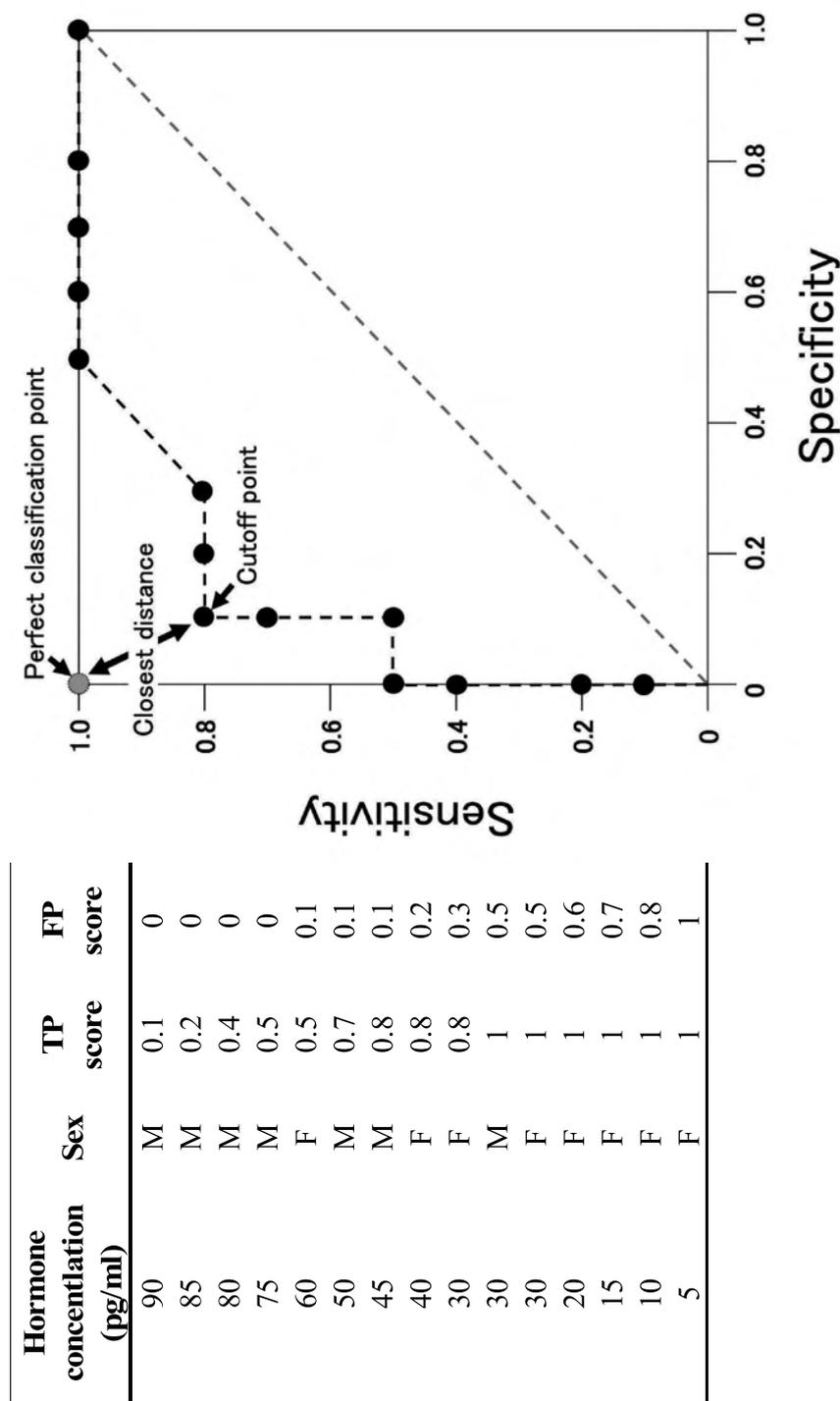


Fig. 10 Example of Receiver operative characteristic (ROC) curve for prediction of sex in *Seriola dumerili* based on sex steroid hormone concentrations. The X- and Y-axis refers to false positive (FP) and true positive (TP) values, respectively. ROC was performed based on the sample data shown on the left. M: Male by gonad observation results. F: Female by gonad observation results. Symbols: ●, FP and TP score (FP, TP) for each hormone concentration.

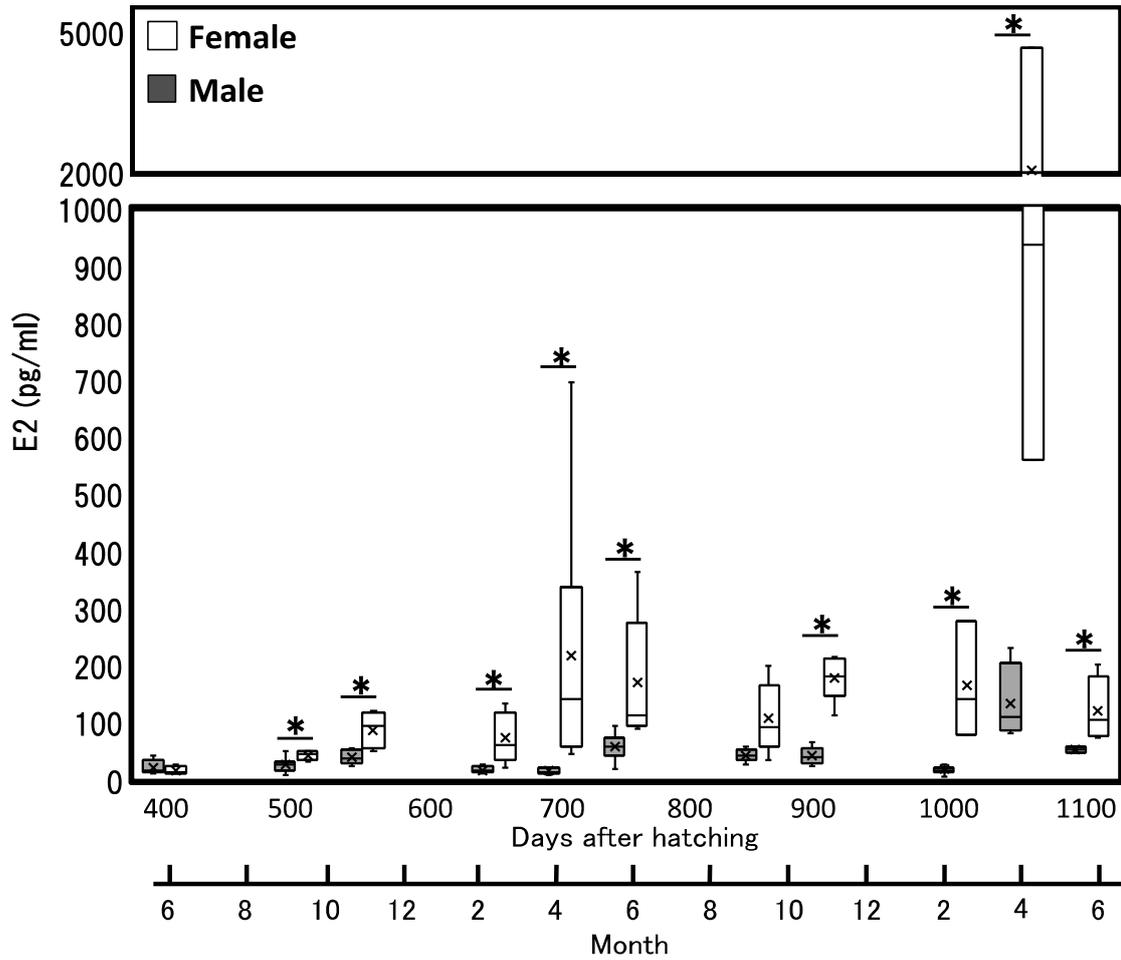


Fig. 11 Plasma E2 concentrations of the sampled 1, 2 and 3-year-old male (shaded boxes) and female (open boxes) *Seriola dumerili*. Each box represents the 25% and 75% quartiles; crosses in boxes represent the average, and the line in the box represents the median. The upper and lower bars represent the maximum and minimum values, respectively. The age of sampled fish (days after hatching) and sampling month are indicated on the horizontal axis.

* Statistical significance between sexes (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)

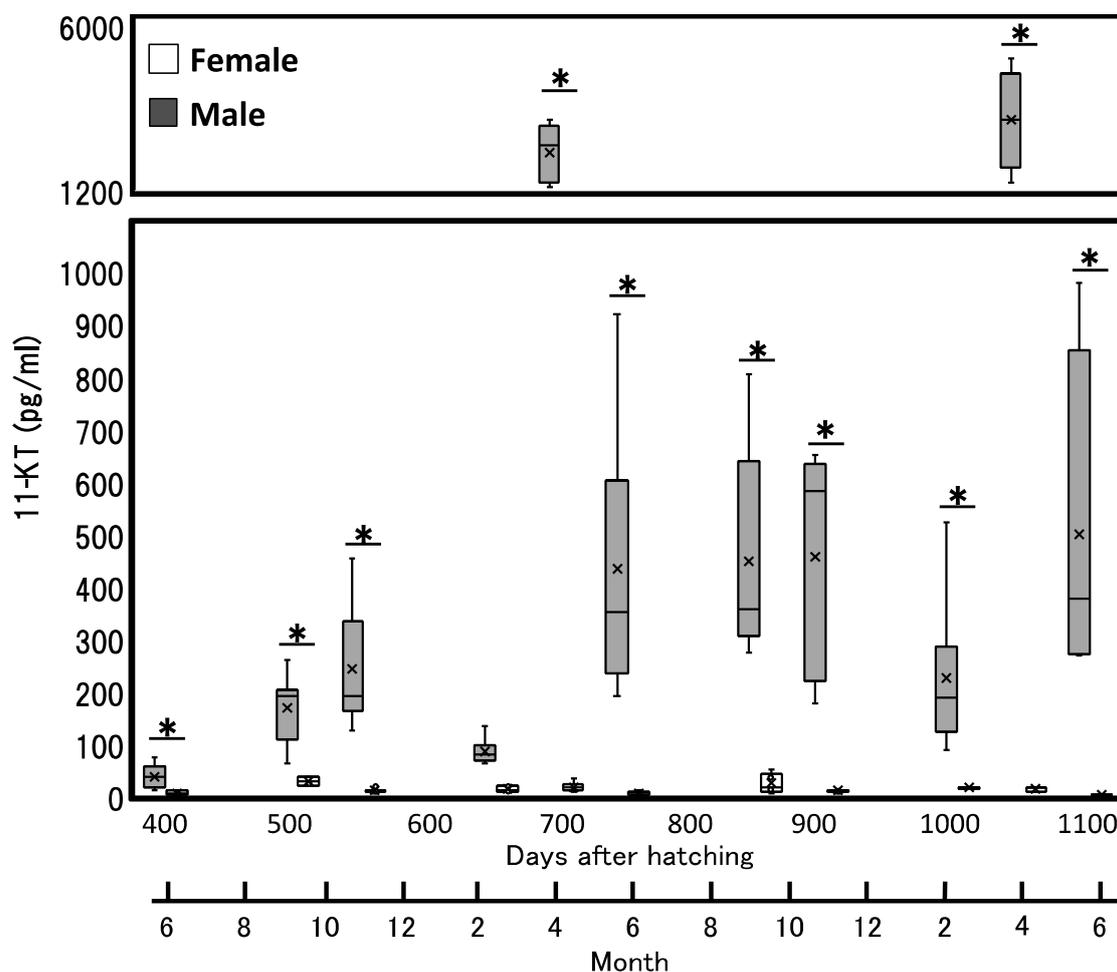


Fig. 12 Plasma 11-KT concentrations of the sampled 1, 2 and 3-year-old male (shaded boxes) and female (open boxes) *Seriola dumerili*. Each box represents the 25% and 75% quartiles; crosses in boxes represent the average, and the line in the box represents the median. The upper and lower bars represent the maximum and minimum values, respectively. The age of sampled fish (days after hatching) and sampling month are indicated on the horizontal axis.

* Statistical significance between sexes (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)

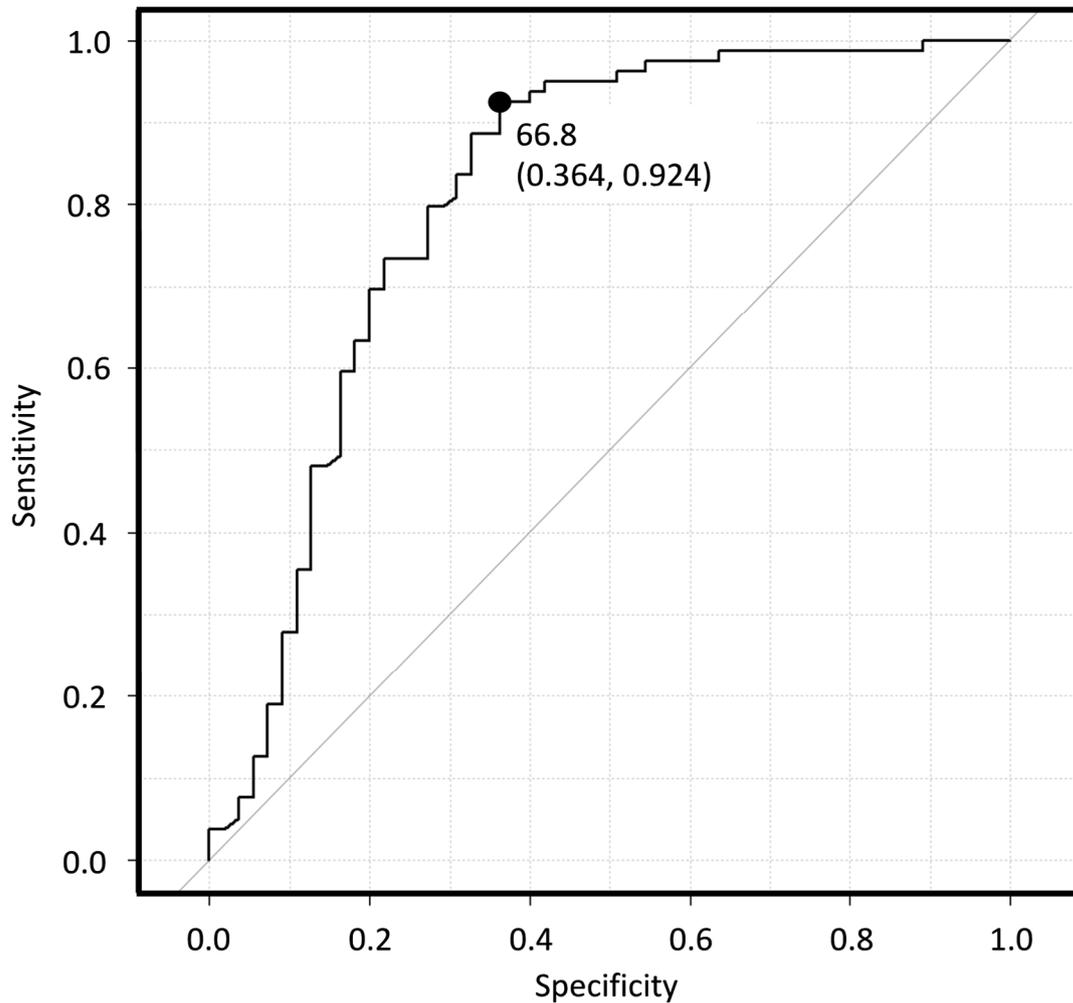


Fig. 13 Receiver operative characteristic (ROC) curve for prediction of sex in 1, 2 and 3-year-old *Seriola dumerili* based on plasma E2 concentrations. The X- and Y-axis refers to false positive (FP) and true positive (TP) values, respectively. The E2 concentration of 66.8 pg / ml provided the lowest FP and the highest value of TP 0.364 and 0.924, respectively indicating the most reliable cutoff threshold for predicting the sex. AUC (area under the curve) of plasma E2 is 0.810.

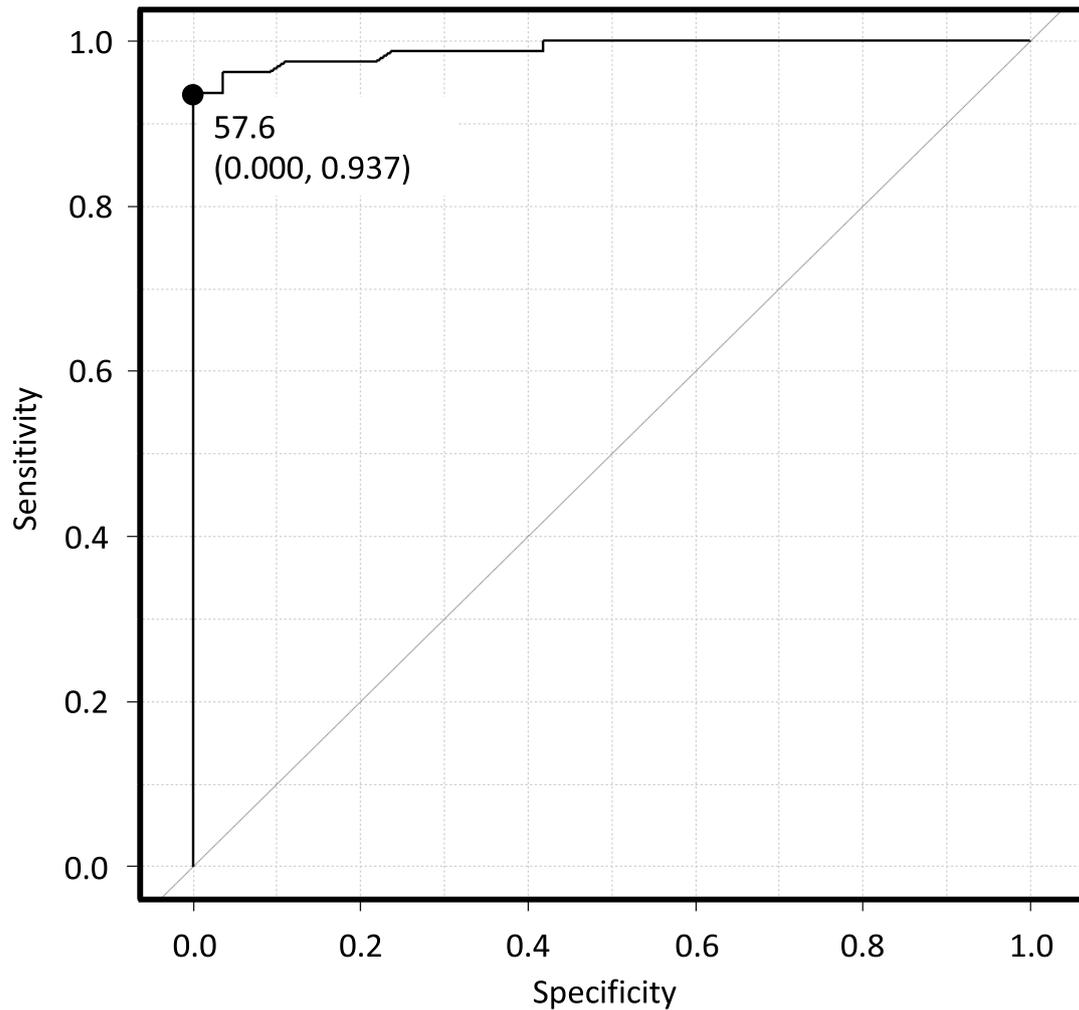


Fig. 14 Receiver operative characteristic (ROC) curve for prediction of sex in 1, 2 and 3-year-old *Seriola dumerili* based on plasma 11-KT concentrations. The X- and Y-axis refers to false positive (FP) and true positive (TP) values, respectively. The 11-KT concentration of 57.6 pg / ml provided the lowest FP and the highest value of TP 0.000 and 0.937, respectively indicating the most reliable cutoff threshold for predicting the sex. AUC (Area Under the Curve) of plasma 11-KT is 0.989.

Table 2 Number of male and female individuals sexed by gonad examination (Gonad) and by plasma concentrations of E2 (threshold 66.8 pg / ml) with accuracy levels at each sampling time

Days after hatching	n	sex	Gonad	Plasma concentrations of E2		
				Number	Accuracy rate	Total accuracy rate
412	15	Male	7	15	100.0%	46.7%
		Female	8	0	0.0%	
504	15	Male	11	15	100.0%	73.3%
		Female	4	0	0.0%	
566	15	Male	8	10	100.0%	86.7%
		Female	7	5	71.4%	
648	15	Male	10	13	100.0%	80.0%
		Female	5	2	40.0%	
710	11	Male	5	7	100.0%	81.8%
		Female	6	4	66.7%	
779	13	Male	8	5	62.5%	76.9%
		Female	5	8	100.0%	
870	10	Male	5	6	100.0%	90.0%
		Female	5	4	80.0%	
933	10	Male	5	5	100.0%	100.0%
		Female	5	5	100.0%	
1017	15	Male	12	12	100.0%	100.0%
		Female	3	3	100.0%	
1087	7	Male	4	0	0.0%	42.8%
		Female	3	7	100.0%	
1150	8	Male	4	4	100.0%	100.0%
		Female	4	4	100.0%	
Total	134	Male	79	92	100.0%	79.8%
		Female	55	42	68.9%	

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

Table 3 Number of male and female individuals sexed by gonad examination (Gonad) and by plasma concentrations of 11-KT (threshold 57.6 pg / ml) with accuracy levels at each sampling time

Days after hatching	n	sex	Gonad	Plasma concentrations of 11-KT		
				Number	Accuracy rate	Total accuracy rate
412	15	Male	7	2	28.6%	66.6%
		Female	8	13	100.0%	
504	15	Male	11	11	100.0%	100.0%
		Female	4	4	100.0%	
566	15	Male	8	8	100.0%	100.0%
		Female	7	7	100.0%	
648	15	Male	10	10	100.0%	100.0%
		Female	5	5	100.0%	
710	11	Male	5	5	100.0%	100.0%
		Female	6	6	100.0%	
779	13	Male	8	8	100.0%	100.0%
		Female	5	5	100.0%	
870	10	Male	5	5	100.0%	100.0%
		Female	5	5	100.0%	
933	10	Male	5	5	100.0%	100.0%
		Female	5	5	100.0%	
1017	15	Male	12	12	100.0%	100.0%
		Female	3	3	100.0%	
1087	7	Male	4	4	100.0%	100.0%
		Female	3	3	100.0%	
1150	8	Male	4	4	100.0%	100.0%
		Female	4	4	100.0%	
Total	134	Male	79	74	93.5%	97.0%
		Female	55	60	100.0%	

第3章 組織中の 11-KT 濃度による性判別

前章で養殖カンパチ 1, 2 および 3 歳魚の血漿中に含まれる性ステロイドホルモンである E2 および 11-KT 濃度には季節的な変動が確認された。また、雌雄間で E2 と 11-KT の血中濃度に差があり、特に 11-KT の濃度を測定することで性判別が可能であることを示した。しかし、血漿を採取するためには採血が必要であり、採血時にカンパチは激しく暴れるため、作業には危険を伴う。また、全ての親魚候補から採血を行うことは労力および時間がかかるため作業効率の点からも生産現場において実際に利用することは難しいと考えられる。

そこで、本章では採血が不要で、なおかつ血漿を用いた場合と同等の高い精度で性判別できる方法を開発することを目的とし、容易に採取できる鱭組織および体表粘液を用いた 11-KT 濃度による性判別について検討した。

3-1. 最適部位の検討

魚類では各鱭の基部に毛細血管が分岐しており (Iwamizu and Itazawa 1989), 血管中に放出される性ステロイドはこれらの組織中の毛細血管にも含まれると考えられる。また血漿以外に体表粘液にも性ステロイドホルモンは含まれることから (竹村ら 1996), これらの組織を用いると血液を採取するよりも簡便に性判別できる可能性がある。

そこで 3-1 では養殖カンパチの 2 歳魚を供試魚として、組織中の 11-KT 濃度を測定可能であるかを検討すると共に、サンプリングと解析までの処理に要する時間を比較することで作業効率の観点から測定に最適な組織について検討した。

3-1-1. 材料および方法

(a) 供試魚およびサンプリング

供試魚には 2015 年産のカンパチ 2 歳魚雌雄各 5 尾を使用した。サンプリングは 2018

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

年の6月に第1章および第2章と同様に行った。血漿中の11-KT濃度と組織中の11-KT濃度を比較するため採血もあわせて行った。採血および血漿の採取は第2章と同じ方法で行い、採取した血漿は分析まで -20°C で凍結保存した。供試魚を開腹後、生殖腺を採取し外観から雌雄を判別した。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。各鰭(胸鰭、背鰭、腹鰭、臀鰭および尾鰭)のサンプルは、供試魚を即殺後に解剖バサミを用いて約900 mg採取し、各鰭の表面に付着している粘液を流水で洗浄してプラスチックバッグ(ユニパック MARK-G, 株式会社生産日本社)に入れ、 -20°C で分析まで凍結保存した。体表粘液は1.5 ml チューブ(ビオラモマイクロチューブ 1.5 ml, アズワン株式会社)を用いて体表を10回擦ることで約1 mlを採取し、 -20°C で分析まで凍結保存した。

(b) 11-KTの抽出前処理(血漿, 胸鰭, 背鰭, 腹鰭, 臀鰭, 尾鰭および粘液)

血液からの血漿採取は2章と同様に処理を行った。採取した鰭を秤量後に解剖バサミで細断し、16 ml チューブ(2ポジションキャップ付きチューブ 16 ml, EVERGREEN)に入れ、3 ml のEIAバッファーに懸濁した。細断した鰭をポリトロンホモジナイザー(PT-1200, KINEMATICA)を使用して氷冷しながら25,000 rpmで2分間ホモジナイズして液状にした。その後、遠心分離機(Model 6200, 久保田商事株式会社)を使用して 4°C , 6000 rpm($4000\times g$)で15分間遠心分離し、上澄みを分析まで -20°C で凍結保存した。粘液についてはホモジナイズしなかった。

(c) 作業効率の比較

作業効率を比較するためには、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する必要がある。そこで組織の採取およびポリトロンホモジナイザーを使用して液状にするまでの時間を測定した。ポリトロンホモジナイザ

ーによるホモジナイズの時間は血漿と粘液を除く全ての組織で一律 2 分とした (Table 4)。

(d) 各組織の 11-KT 濃度の測定

11-KT 濃度は、市販の酵素免疫測定法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, 以下 ELISA と略記) キット (ケイマンケミカル社) を用いてキットに添付されたマニュアルに従い測定した。粘液の性ステロイドホルモン抽出は血漿と同様に行った。マニュアルでは 50 μ l の試料を測定に用いるため、血漿 50 μ l と等量になるように各鱗 50 mg 相当量の懸濁液からの抽出を行った。秤量した各鱗を 3 ml の EIA バッファーに懸濁した。組織 50 mg 相当の懸濁液を分取し、酢酸エチル/ヘキサン溶液で抽出した。その後、窒素気流下で有機溶媒を蒸発させ、乾燥沈殿物を 150 μ l の EIA バッファー (EIA 緩衝液, ケイマンケミカル) で再懸濁した。各サンプルの測定にはマイクロプレート上で 3 ウェルを使用した (各 50 μ l)。解析は 50 mg の各鱗が懸濁している 150 μ l の再懸濁溶液から 50 μ l を各ウェルに分注している。そのため、この 50 μ l 溶液中には各鱗 50 mg の 1/3 量にあたる 16.7 mg 相当量の組織が含まれている。そのため、測定値を Cayman Chemical 社の公式ソフトウェアである My Assays (<https://www.myassays.com>) にて 3 倍量で計算することで組織 50 mg の値とした。濃度測定にはマイクロプレートリーダー (Chromate 4300, アズマックス株式会社) を使用し、405 nm の吸光度を測定した。各サンプルの測定にはマイクロプレート上で 3 ウェルを使用した。この ELISA キットの 11-KT 濃度の検出感度は 1.3 pg/g である。

(e) 統計処理

Mann-Whitney *U* test を使用して組織ごとの 11-KT 濃度を雌雄間で比較した。統計分析は, R ver. 3.5.1 によって行い, 5%の水準で検定を行った場合, *P* 値が 0.05 以下ならば有

意差ありとした。

3-1-2. 結果

(a) 作業効率の比較

各組織を採取した結果、当初最も簡単であると考えていた粘液の採取が最も困難であった。これは性判別を正確に行うためには個体毎の粘液が混ざらないようにする必要があり、1尾ごとにサンプリング場所を流水で流すなどの作業を行ったためである。また、暴れるカンパチを押さえつけながらの粘液採取は大変困難であった。そのため多くの尾数を性判別するのは作業効率上、非現実的であった。粘液のサンプルの処理に関しては、鰭と異なりホモジナイズの前に解剖バサミでの細断の必要がないため性ステロイドホルモン抽出までの前処理にかかる時間は短かった。しかし、サンプリング場所の流水作業などを含めると1mlの粘液を採取するために約5分の作業時間が必要であった (Table 4)

各鰭に関しては、背鰭、腹鰭および臀鰭は第一棘が堅牢であり、採取が困難だけでなく、その後のホモジナイズにおいても破碎しきれないなどの問題が確認された。背鰭と臀鰭は同程度の棘の硬さであったが、背鰭の方が鰭の面積が広く、必要量の採取が容易であったため、作業時間は背鰭の方が短時間であった (Table 4)。腹鰭は背鰭および臀鰭と比較して、第一および第二棘が明らかに硬く、解剖バサミで細断することも容易ではなかった。そのため作業時間が8分と、最も長かった (Table 4)。尾鰭は面積も大きく、採取は容易であるものの組織が硬いことから細断には背鰭および臀鰭と同程度の作業時間がかかり、ボルテックス後も組織の断片が残留した (Table 4)。尾鰭は遊泳に使用する主要な部位であるため、採取後の魚体への影響も懸念された。一方、胸鰭は軟条で形成されているため採取が容易であり、作業時間は細断にかかった約3分とホモジナイズを行う2分の合計5分であり、全ての鰭部位の中で最も短い作業時間であった (Table

4)。胸鰭はサンプル処理時のホモジナイズにおいても他の鰭部位と比較して容易に破砕可能であった。なお、胸鰭は採取後においても約3ヶ月後には採取前とあまり変わらない状態まで再生していることが確認された。

(b) 各組織の 11-KT 濃度による性判別

血漿中および各組織中の 11-KT の濃度を (Table 4 および Fig. 15) に示した。血漿を含むすべての組織において雌雄の 11-KT 濃度に有意な差を確認することができた ($P<0.05$)(Fig. 14)。

3-1-3. 考察

本研究により胸鰭、背鰭、腹鰭、臀鰭、尾鰭および粘液からの 11-KT 濃度測定について比較し、試料採取の簡便さおよび作業効率を考慮した結果、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が示された (Table 4 および Fig. 14)。魚類において背鰭、腹鰭、臀鰭は担鰭骨が支持する棘条が各鰭を構成しているのに対し、胸鰭は柔軟性を高めるために分節し鰭膜との接触面を広げるように分岐する軟条で構成されている (都木ら 2017)。この構造の違いから胸鰭は採取および 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。本研究において血漿以外の組織および粘液中に含まれる 11-KT の濃度には雌雄間で有意な差があり、性判別への利用の可能性が考えられた。また、先に述べたように胸鰭は半分以上切除した場合も再生することから、切除された魚も加工せずに鮮魚として販売することが可能である。実際に、本実験で使用したカンパチはサンプリング後も問題なく販売することができ、販売価格も通常の販売価格で取引された。

3-2. 雌雄の 11-KT 濃度の推移

魚類では分泌された性ステロイドホルモンが生殖腺において配偶子の形成や成熟を促すことは第 2 章で述べた。また 3-1 において組織中の 11-KT 濃度にも血漿と同様に雌雄差があり、各組織の中でも作業効率の観点から胸鰭が最適部位であることを示した。

そこで 3-2 では、養殖カンパチの 1, 2 および 3 歳魚において、血漿中の 11-KT 濃度と胸鰭中の 11-KT 濃度との相関を確認し、胸鰭に含まれる 11-KT 濃度に基づいて性判別が可能であるかについて検討した。

3-2-1. 材料および方法

(a) 供試魚およびサンプリング

本研究には第 1 章と同じ、2015 年および 2016 年産のカンパチ 1, 2 および 3 歳魚を計 134 尾 (雌 55 尾, 雄 79 尾) 使用した。サンプリングの方法は 2-1-1 および 3-1-1 と同様である。

(b) 胸鰭中の 11-KT 濃度の測定

胸鰭中の 11-KT 濃度の測定は 3-1 と同様に行った。

(c) ホルモン濃度による性判別用基準値の算出と評価

受信者動作特性曲線 (Receiver Operating Characteristic curve, 以下 ROC と略記) を用い、2-3 と同様に分析を行った (Fawcett 2006)。2-3 と同様、ROC 曲線を作成することで求めることができるカットオフ値を用いて性判別を行って判別率を算出し、AUC も算出した。

(d) 統計処理

Mann-Whitney *U* test を使用して日齢ごとの雌雄間の 11-KT 濃度を比較した。統計分析は, R ver. 3.5.1 によって行った。Spearman's rank correlation を使用して血漿と胸鰭に含まれる 11-KT 濃度に相関があるかを比較した。統計分析は, EZR バージョン 1.41 によって行い, 5%の水準で検定を行った場合, *P* 値が 0.05 以下ならば有意差ありとした。

3-2-2. 結果

(a) 血漿中 11-KT 濃度と胸鰭中 11-KT 濃度の相関

胸鰭中の 11-KT 濃度が血漿中の 11-KT 濃度と比例関係にあるのかを確認したところ, $R^2=0.8554$ と有意な正の相関を示すことが確認できた ($P<0.05$)(Fig. 16)。

(b) 雌雄の 11-KT 濃度の比較

雄の胸鰭中の 11 KT 濃度は, 孵化後 412 日から孵化後 1150 日の全サンプリングにおいて雌よりも有意に高い値を示した (Fig. 17)。雌雄の濃度差が最も小さかった孵化後 412 日では雄の 11-KT の平均濃度 (9.5 ± 1.8 pg / g) と雌の平均濃度 (7.4 ± 1.8 pg / g) 濃度との差はわずかであった (Fig. 17)。雌雄間で最も濃度差が大きかったのは, 孵化後 1087 日 (2 歳 9 ヶ月) でその差は 444.1 pg/g であった。全サンプリング期間を通した雌雄の 11-KT 濃度は雄が平均で 13.7 倍高い値を示した (Fig. 17)。

(c) 11-KT 濃度による性判別用基準値の算出と評価

性判別のための最適な胸鰭 11-KT 濃度は, ROC 曲線を使用して算出した結果, 12.7 pg / g の場合に最も高い精度で性判別できることが示された (Fig. 18)。11-KT 濃度が 12.7 pg / g 以上を雄と判別し, 11-KT 濃度がこの基準値を下回る個体を雌と判別した。11-KT 濃度を基準とした場合の Area under the curve (AUC) は 0.98 であり, 高い精度であった

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

(Fig. 18)。この基準値を用いた性判別結果、実際の生殖腺観察によって確認した性判別結果および判別率を Table 5 に示した。孵化後 412 日では、8 尾の雌はすべて雌として正しく判別することが出来たが、7 尾の雄の中の 6 尾は雌と判別され、判別率は 57.1% であった。しかし、孵化後 504 日以降から孵化後 1150 日までは常に 90%以上の高い判別率を示し、全個体を対象とした判別率の平均値は 93.6%であった (Table 5)。

3-2-3. 考察

第 2 章および本章において 11-KT をカンパチの性判別の指標として利用可能であることが示された。本研究により、血漿よりも採取が容易である胸鰭中に含まれる 11-KT の濃度がカンパチの性判別に有用であることを実証した。ホルモンに基づく性判別法は、他魚種、特に従来腹部圧迫法などが使用できない種で有用であることが証明されていることは第 2 章で述べた。また、粘液中の性ステロイドホルモンを対象としている報告 (竹村ら 1996; Schultz et al. 2005) が一部あるが、それらの多くは血漿中に含まれる性ステロイドホルモンを測定することによる性判別手法 (Kucheraka et al. 2006; Nazeri et al. 2014) である。今回性判別に用いた胸鰭を利用した性判別法は報告が無く、新規の手法である。

本研究により、1, 2 および 3 歳魚の養殖カンパチの雄と雌の胸鰭中の 11-KT の濃度は、血漿中の 11-KT 濃度と有意な高い正の相関があることが示された ($R^2=0.8554$) ($P<0.05$)。これは血中に放出される 11-KT が毛細血管経路で検出されたことを反映したものであると考えられた。また、胸鰭中の 11-KT 濃度は血漿と比較して雌では約 2 分の 1、雄では約 7 分の 1 程度の検出濃度であることが明らかとなった (Fig. 12, 17)。検出濃度は低濃度であったものの、平均 93.6%の判別率と血漿と同様の高い判別率が示された (Table 5)。血漿中の 11-KT 濃度と胸鰭の 11-KT 濃度が比例関係にあることから、血漿と同様 (Table 3) に孵化後 412 日の時点が最も低い判別率 57.1%で、孵化

後 504 日以降ではすべての日齢で 90%の判別率を示した (Table 5)。これより胸鰭中の 11-KT 濃度を用いた性判別法においても血漿と同様に従来の 2 歳 (孵化後 730 日) よりも早い時点で精度の高い性判別が可能であることが示された。この結果より、血漿より胸鰭中の 11-KT を対象とした方が魚体負荷の低減、作業効率の向上が可能であることが明らかとなった。また、既存の腹部圧迫法よりも正確な判別が可能であることも示された (Table 5)。

Table 4 Number of fish sample, working time, 11-KT concentration of the 2-year-old *Seriola dumerili*

Tissues	Sex and number of sample fish	Working time* (minutes/sample)	11-KT Concentration (pg/ml or g)
Plasma	Male 5	7	381.1 ± 198.4
	Female 5		21.1 ± 3.3
Pectral fin	Male 5	5	91.0 ± 47.7
	Female 5		3.3 ± 0.6
Dosal fin	Male 5	6	200.1 ± 143.8
	Female 5		5.8 ± 4.4
Pelvic fin	Male 5	8	85.6 ± 40.8
	Female 5		4.2 ± 4.0
Anal fin	Male 5	7	200.5 ± 178.0
	Female 5		5.0 ± 4.1
Caudal fin	Male 5	7	41.3 ± 27.7
	Female 5		4.2 ± 3.8
Body surface mucus	Male 5	5	55.8 ± 24.3
	Female 5		12.4 ± 0.9

* Time required for tissue sampling and homogenization.

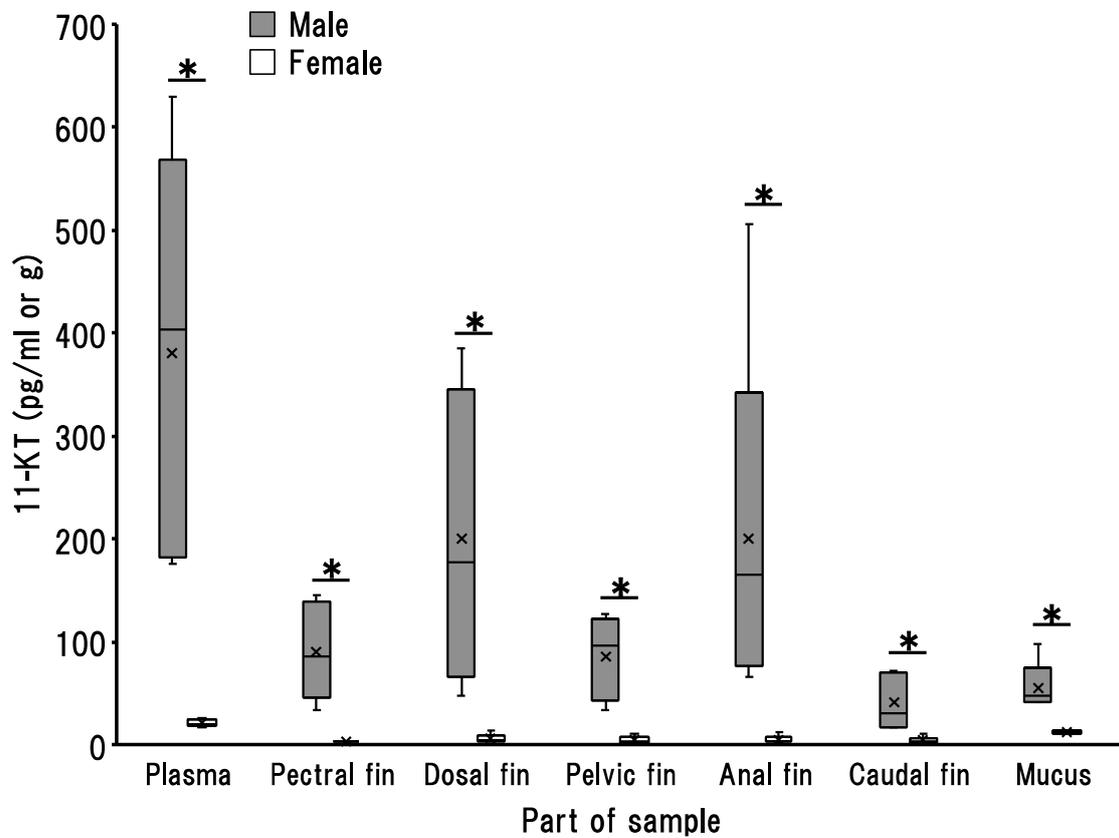


Fig. 15 Plasma, fins and body surface mucus 11-KT concentrations of the 2-year-old male (shaded boxes) and female (open boxes) *Seriola dumerili*. Each box represents the 25% and 75% quartiles; crosses in boxes represent the average, and the line in the box represents the median. The upper and lower bars represent the maximum and minimum values, respectively. The age of sampled fish (days after hatching) and sampling month are indicated on the horizontal axis.

* Statistical significance between sexes (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)

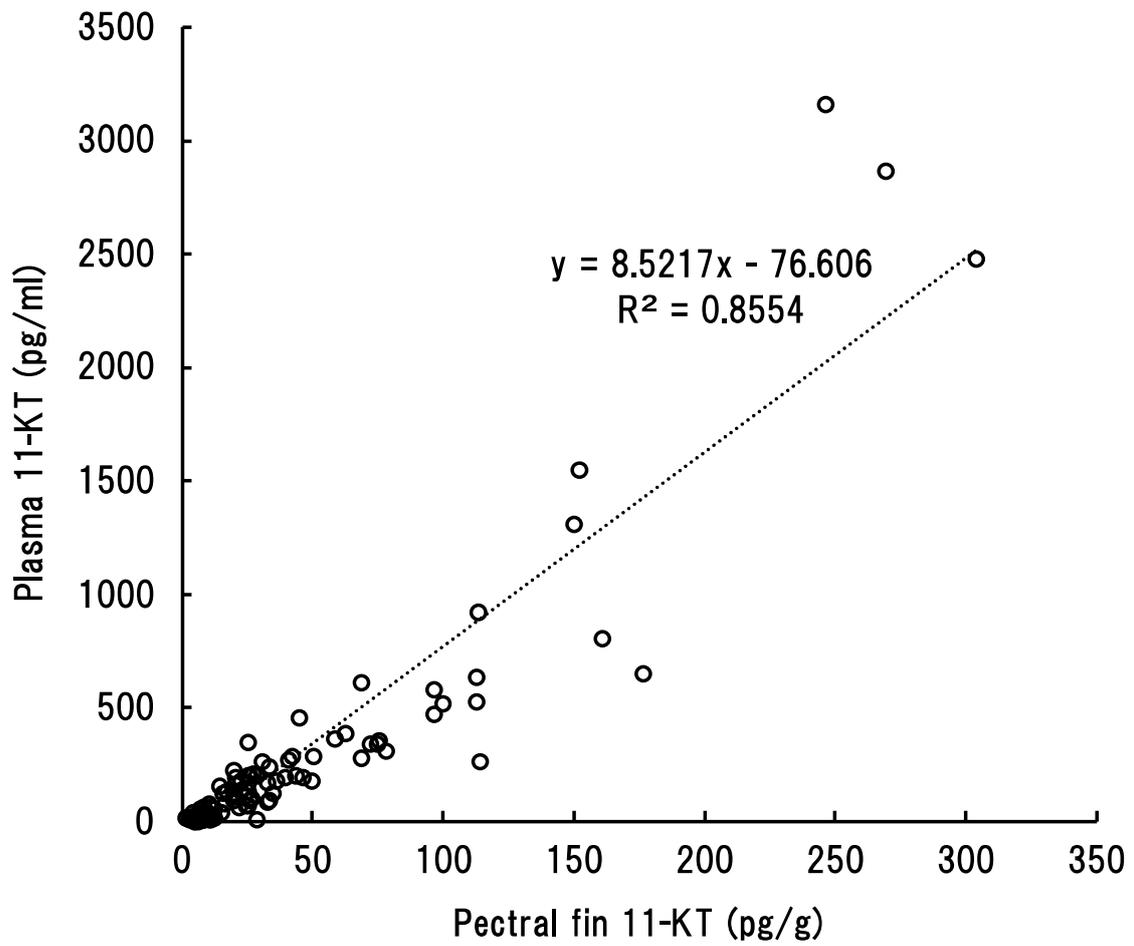


Fig. 16 Relationship between plasma and pectral fin 11-KT concentrations of the sampled 1, 2 and 3-year-old *Seriola dumerili*.

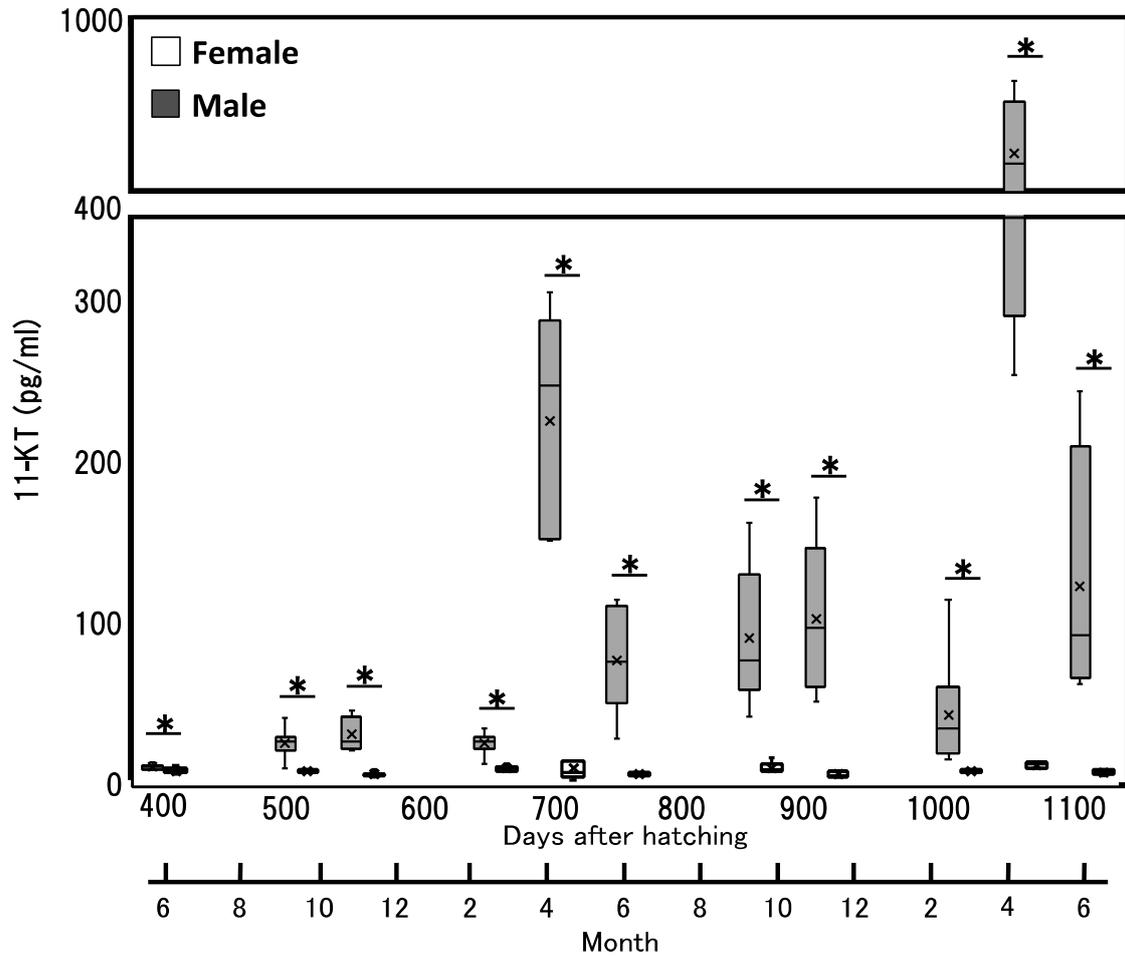


Fig. 17 Pectoral fin 11-KT concentrations of the sampled 1, 2 and 3-year-old male (shaded boxes) and female (open boxes) *Seriola dumerili*. Each box represents the 25% and 75% quartiles; crosses in boxes represent the average, and the line in the box represents the median. The upper and lower bars represent the maximum and minimum values, respectively. The age of sampled fish (days after hatching) and sampling month are indicated on the horizontal axis. * Statistical significance between sexes (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)

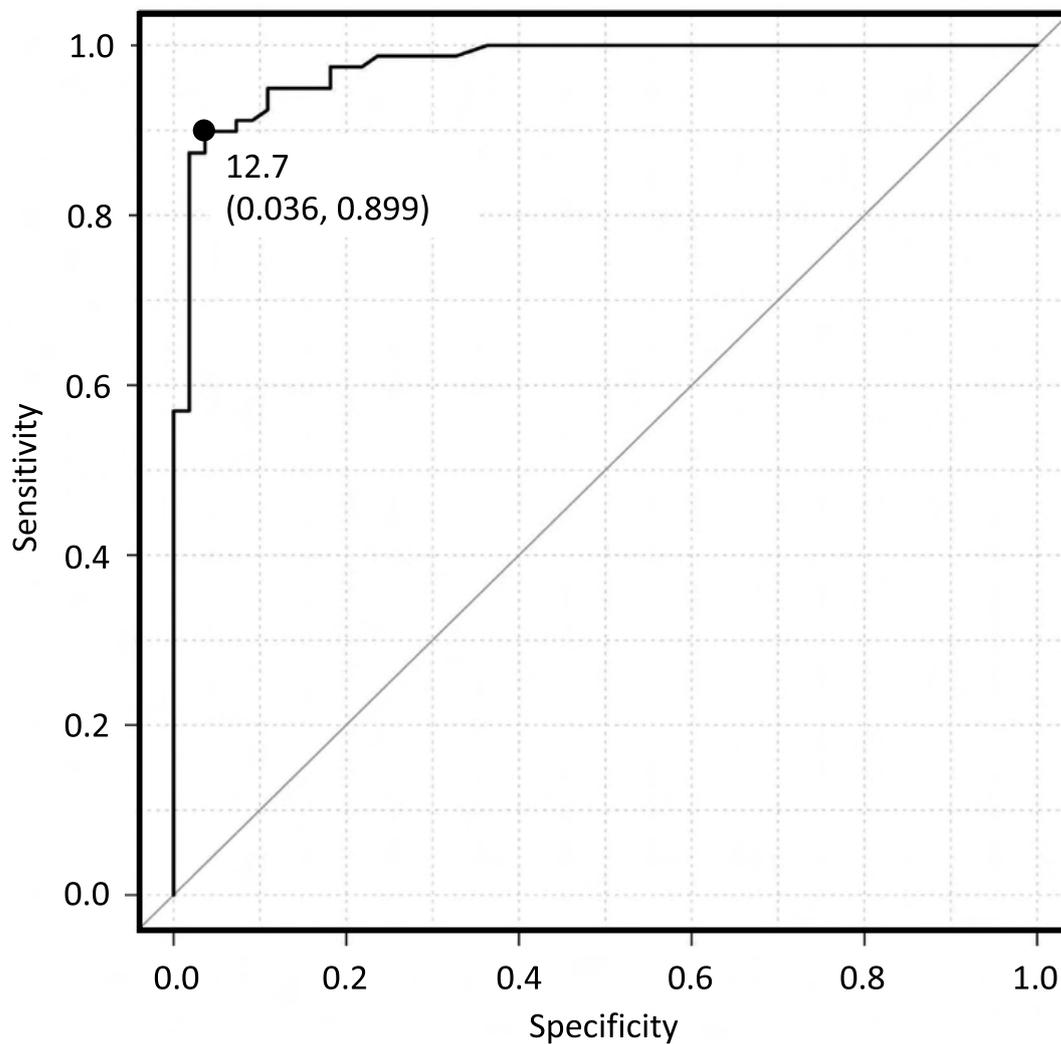


Fig. 18 Receiver operative characteristic (ROC) curve for prediction of sex in 1, 2 and 3-year-old *Seriola dumerili* based on the pectoral fin 11-KT concentrations. The X- and Y-axis refers to false positive (FP) and true positive (TP) values, respectively. The 11-KT concentration of 12.7 pg / ml provided the lowest FP and the highest value of TP 0.036 and 0.899, respectively, indicating the most reliable cutoff threshold for predicting the sex. AUC (Area Under the Curve) of plasma 11-KT is 0.98.

Table 5 Number of male and female individuals sexed by gonad examination (Gonad) and by pectoral fin concentrations of 11-KT (threshold 12.7 pg / ml) with accuracy levels at each sampling time

Days after hatching	n	sex	Gonad	Plasma concentrations of 11-KT	
				Number	Accuracy rate
412	15	Male	7	1	14.3%
		Female	8	14	100.0%
504	15	Male	11	10	90.9%
		Female	4	5	100.0%
566	15	Male	8	8	100.0%
		Female	7	7	100.0%
648	15	Male	10	9	90.0%
		Female	5	6	100.0%
710	11	Male	5	6	100.0%
		Female	6	5	83.3%
779	13	Male	8	8	100.0%
		Female	5	5	100.0%
870	10	Male	5	6	100.0%
		Female	5	4	80.0%
933	10	Male	5	5	100.0%
		Female	5	5	100.0%
1017	15	Male	12	12	100.0%
		Female	3	3	100.0%
1087	7	Male	4	4	100.0%
		Female	3	3	100.0%
1150	8	Male	4	4	100.0%
		Female	4	4	100.0%
Total	134	Male	79	73	90.5%
		Female	55	61	96.7%
					93.6%

第4章 親魚候補選抜の実証

前章において、本学水産研究所白浜実験場（和歌山県田辺湾）で養殖したカンパチ 1, 2 および 3 歳魚の胸鰭中に含まれる性ステロイドホルモンである 11-KT は雌雄において濃度に差があり、この濃度差を比較することで 93.6% の高い確率で雌雄を判別可能であることを明らかにした。我が国においてカンパチは、九州を中心に京都から鹿児島までの複数の地域（1 府 12 県）において種苗生産あるいは養殖が行われている（農林水産省漁業・養殖業生産統計 2017）。養殖カンパチの成長は水温などの影響により海域によって異なることが報告されており（高岡ら 2005）、異なる海域でも本手法を用いた精度の高い性判別が可能であるかを調べる必要がある。また作業効率などを踏まえ、本手法が生産現場で利用可能かなどの汎用性を調査した。

4-1. 生産現場における性判別の利用

本章では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において白浜飼育群の基準値を用いて 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。

4-1-1. 材料および方法

(a) 供試魚

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）を使用した（Table 6）。2015 年産個体群は 4 歳（2011 年産）および 5 歳（2010 年産）の親魚から採卵して飼育されたものである。採卵は近畿大学水産研究所すさみ分室にて行われ、その後、本学水産研究所奄美実験場の陸上水槽において 40 日齢まで飼育された。孵化後 3-18 日までシオミズツボウムシ *Brachionus plicatilis* sp. Complex, 15-40 日までアルテミア *Artemia salina*, 18 日以降は市販の配合飼料がそれぞれ給餌された。その後は奄美実験

場 (28°13'30.0"N; 129°12'57.4"E) の海上網生簀 (縦×横×深さ, 5.6 m×5.6 m×4 m および 11.8 m×11.8 m×4 m) で養成された。海上網生簀での飼育期間中は, 成長に合わせて市販のカンパチ用 EP (丸紅日清飼料株式会社) が給餌された。飼育期間中にブリハダムシ *Benedenia seriolae* あるいはネオベネデニア *Neobenedenia girellae* の寄生が確認された場合は, マリンサワー (株式会社片山化学工業研究所) を使用した薬浴による駆虫が行われた。

(b) サンプルングおよび測定項目

サンプルングは 3-2 と同様の方法で行った。測定項目は 1-1-1 および 1-2-1 と同様とした。水温は海上網生簀 (縦×横×深さ, 5.6 m×5.6 m×4 m および 11.8 m×11.8 m×4 m) の水深 3 m の水温を測定した。本研究でサンプルングを行った孵化後 770 日の供試魚については胸鰭中の 11-KT 濃度による性判別のみを行った。なお, 参考データとして第 1 章で測定した和歌山県田辺湾の養殖カンパチの測定結果も示した。

(c) 胸鰭中の 11-KT 濃度の測定

胸鰭中の 11-KT 濃度の測定は 3-1 と同様に行った。

(d) 統計処理

Mann-Whitney *U* test を使用して日齢ごとの 11-KT 濃度を雌雄間で有意差検定した。統計分析は, R ver. 3.5.1 によって行い, 5%の水準で検定を行った場合, *P* 値が 0.05 以下ならば有意差ありとした。

4-1-2. 結果

(a) 水温

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

サンプリング期間中における奄美大島花天湾および同期間の和歌山県田辺湾におけるカンパチ養成網生簀付近の水深 3m 層の水温変動を Fig. 19 に示した。花天湾の生簀周辺の最低水温は 2018 年 2 月の $20.2 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、最高水温は 2017 年 8 月の $29.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ であり、年間の平均水温は $24.8 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ であった (Fig. 18)。和歌山県田辺湾の最低水温は 2018 年 2 月の $11.7 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ 、最高水温は 2017 年 8 月の $29.4 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ であり、年間の平均水温は $19.8 \pm 5.8^{\circ}\text{C}$ であった (Fig. 18)。最高水温は花天湾と田辺湾では同程度であったが、最低水温は花天湾の方が 8.5°C 高く、年間の平均水温も約 5°C 高かった (Fig. 18)。

(b) 尾叉長

今回サンプリングした孵化後 770 日から孵化後 1084 日の奄美大島養成群と孵化後 779 日から孵化後 1087 日の白浜養成群の 2 歳魚の尾叉長を Fig. 19 に示した。2 歳魚の尾叉長は、奄美大島が $62.8 \pm 3.1 \text{ cm}$ – $70.0 \pm 2.2 \text{ cm}$ 、白浜が $55.9 \pm 1.3 \text{ cm}$ – $62.7 \pm 2.5 \text{ cm}$ の範囲であった (Fig. 19)。サンプリング期間における奄美大島と白浜のカンパチの平均尾叉長の差は 6.9 – 9.7 cm の範囲内であった。サンプリング期間の 2 歳魚では奄美大島の個体群の方が白浜の個体群よりも常に 6 cm 以上高い値を示した (Fig. 19)。

(c) 体重

今回サンプリングした孵化後 770 日から孵化後 1084 日の奄美大島養成群と孵化後 779 日から孵化後 1087 日の白浜養成群の 2 歳魚の体重を Fig. 20 に示した。2 歳魚の体重は、奄美大島養成群が $4.3 \pm 0.5 \text{ kg}$ – $6.6 \pm 0.4 \text{ kg}$ 、白浜養成群が $2.9 \pm 0.4 \text{ kg}$ – $4.6 \pm 0.5 \text{ kg}$ の範囲であった (Fig. 20)。サンプリング期間における奄美大島と白浜のカンパチの平均体重の差は 0.9 – 2.1 kg の範囲内であり、奄美大島の個体群の方が白浜の個体群よりも常に重かった (Fig. 20)。

(d) 肥満度

今回サンプリングした孵化後 770 日から孵化後 1084 日の奄美大島養成群と孵化後 779 日から孵化後 1087 日の白浜養成群の 2 歳魚の肥満度を Fig. 22 に示した。2 歳魚の肥満度は、奄美大島養成群が 15.79 ± 0.81 – 18.91 ± 0.99 、白浜養成群が 15.95 ± 1.25 – 19.60 ± 1.02 の範囲であった (Fig. 22)。サンプリング期間における奄美大島と白浜のカンパチの平均肥満度の差は 0.02 – 2.39 の範囲内であった。サンプリング期間の 2 歳魚では 4 月と 6 月において白浜の個体群の方が奄美大島の個体群よりも高い値を示したが、それ以外の月では奄美大島と白浜の個体の間に顕著な差はなかった (Fig. 22)。

(e) GSI

今回サンプリングした孵化後 770 日から孵化後 1084 日の奄美大島養成群と孵化後 779 日から孵化後 1087 日の白浜養成群の 2 歳魚の GSI を Fig. 23 に示した。2 歳魚の GSI は、奄美大島養成群の雌が 0.24 ± 0.06 – 1.31 ± 0.37 、雄が 0.11 ± 0.03 – 0.61 ± 0.37 であり、白浜養成群の雌が 0.39 ± 0.08 – 0.64 ± 0.15 、雄が 0.06 ± 0.01 – 0.53 ± 0.39 の範囲であった (Fig. 23)。サンプリング期間における奄美大島と白浜のカンパチの平均肥満度の差は 0.05 – 0.51 の範囲内であった。サンプリング期間における 2 歳魚の雌では 9 月において奄美大島の個体群の方が白浜の個体群よりも低い値を示したが、それ以外の月では奄美大島の個体群の方が白浜の個体群よりも常に高い値であった (Fig. 23)。また、2 歳魚の雄では 6-11 月では奄美大島の個体群の方が白浜の個体群よりも低い値を示したが、それ以外の月では奄美大島の個体群の方が白浜の個体群よりも高い値であった (Fig. 23)。

(f) 雌雄の 11-KT 濃度の比較

奄美大島の親魚候補における調査期間中の雄の胸鰭中の 11 KT 濃度は、いずれも雌よ

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

りも有意に高い値を示した ($P<0.05$) (Fig. 24)。雄の平均 11-KT 濃度は 148.2 ± 118.1 pg/g, 雌は 12.1 ± 18.3 pg/g であり, 約 12 倍の濃度差があった。雄では最低値が 45.1 pg/g, 最高値が 626.9 pg/g, 雌では最低値が 2.2 pg/g, 最高値が 108.6 pg/g であり, 濃度差は雄の方が雌よりも大きかった (Fig. 24)。

(g) 11-KT 濃度による性判別用基準値を利用した評価

性判別のための最適な胸鰭中の 11-KT 濃度には 3-3 で ROC 曲線を使用して算出した基準値 (12.7 pg/g) を用いた (Fig. 18)。11-KT 濃度を基準とした場合の Area under the curve (AUC) は 0.95 であり, 高い精度であった。この基準値を用いた性判別結果と実際の生殖腺観察によって確認した性判別結果および判別率を Table 7 に示した。孵化後 770 日では, 48 尾の雄はすべて雄として正しく判別することが出来たが, 18 尾の雌の中の 3 尾は雄と判別され, 判別率は 83.3%であった。しかし, 孵化後 771 日以降から孵化後 1084 日までは常に 100%の高い判別率を示し, 全個体を対象とした判別率の平均値は 98.6%であった (Table 7)。

4-1-3. 考察

本章で行った胸鰭を利用した性判別は従来の腹部圧迫法や採血後のホルモン濃度測定などと異なり, 魚体にかかる負担が小さく, 実際の生産現場で用いることが十分に可能であると考えられる。さらに, 奄美大島花天湾においても和歌山県田辺湾と同様に胸鰭の 11-KT 濃度を利用した性判別が可能であることが明らかとなった。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, 年間平均水温は $24.8 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ であった (Fig. 18)。原田ら (1969) はカンパチの成長好適水温は 20°C - 31°C であると報告しており, 本研究で対象とした 2 歳魚の養殖カンパチも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い値を示した (Fig. 20, 21)。一方, GSI に関し

では2月においてのみ差を確認することができたが、個体ごとのばらつきが大きくそれ以外の月では顕著な差は認めなかった (Fig. 23)。Miura and Miura (2014) の報告では、養殖ブリの1から2歳魚を対象として制限給餌と飽食給餌を行った群の11-KT濃度を比較している。この報告で使用した供試魚では尾叉長、体重およびGSIに関し、飽食給餌区の方が高い値を示した。しかし、両区ともに雌では最も高い値で400-500 pg/ml、雄ではその5-6倍に当たる約2500 pg/mlの11-KT濃度が検出されている。このことから、成長や生殖腺の発達状態が大きく異なる場合においても、雌雄の11-KT濃度差は大きいままであることが示された。本研究においても、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胸鰭の11-KT濃度に有意な雌雄差があり、その濃度差により98.6%の高い判別率で性判別が可能であった。しかし、孵化後770日の個体では18尾の雌個体のうちの3個体を雄と誤判定した。先に示したように雌雄の組織中に含まれる11-KT濃度は異なるが、個体ごとにもその含有量は大きく異なる。特に孵化後770日のサンプリング尾数が雌18尾と雌雄合わせて10尾程度であったそれ以外のサンプリング尾数よりも多く、11-KT濃度が高い3個体の雌(12.8 pg/g, 62.9 pg/g および 108.6 pg/g) が含まれていた。第3章で田辺湾での養殖したカンパチを基に設定した基準値(12.7 pg/g)では奄美大島の個体群に対しては小さすぎた可能性がある。雄の最低11-KT濃度は45.1 pg/gであったことを考えると、基準値をもう少し上げて良く、そうすることで少なくとも11-KT濃度が12.8 pg/gであった個体の誤判定は防ぐことができた。このように濃度が重複する個体も存在したが、多くは明確に濃度差を示していることから、奄美大島で養殖したカンパチにおいても胸鰭の11-KT濃度による性判別は可能であると考えられた。

胸鰭を採取する際には一度取りあげなければいけないことから、採血よりもかかる時間的な負荷は少ないが、親魚にストレスがかかることは否めない。しかし、満2歳頃の早期に胸鰭の採取を行うことで、産卵用の親魚として利用する満4歳以降では産卵に

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

対する胸鰭採取による影響はほとんどなくなっていると考えられる。

本研究で使用する ELISA 法は、時間および労力がかかり、数種の測定機器を必要とするが、腹部圧迫法やカニューレーション法とは異なり胸鰭の採取さえ行えばそれ以降は一人での操作が可能で、市販のホルモン測定キットを使用する比較的単純な手法である。しかし、現状ではリアルタイムでの性判別ができないため、11-KT の濃度を測定するまでの間は ID タグを打注するなどして個体識別しなければならない。そのため多数の魚のホルモン濃度の測定には向いていない。また ID タグを打注した場合、選抜から除外された個体を出荷する際にタグを回収しなければならず、食品とした場合に異物混入のリスクがある。今後、生産現場で簡便かつリアルタイムでのホルモンを検出することができる検査キットの開発などにより、さらなる効率化が求められる。

Table 6 Sampling date, age, days after hatching and number of male and female of the sampled 2015-year class *Seriola dumerili*

Sampling date	Age	Days after hatching	Sex	n
Jun 14, 2017	2 years 1 months	770	Female	18
			Male	48
Jun 15, 2017	2 years 1 months	771	Female	4
			Male	6
Sep 4, 2017	2 years 3 months	852	Female	5
			Male	6
Nov 28, 2017	2 years 5 months	937	Female	5
			Male	5
Feb 23, 2018	2 years 8 months	1024	Female	3
			Male	6
Apr 24, 2018	2 years 9 months	1084	Female	4
			Male	5

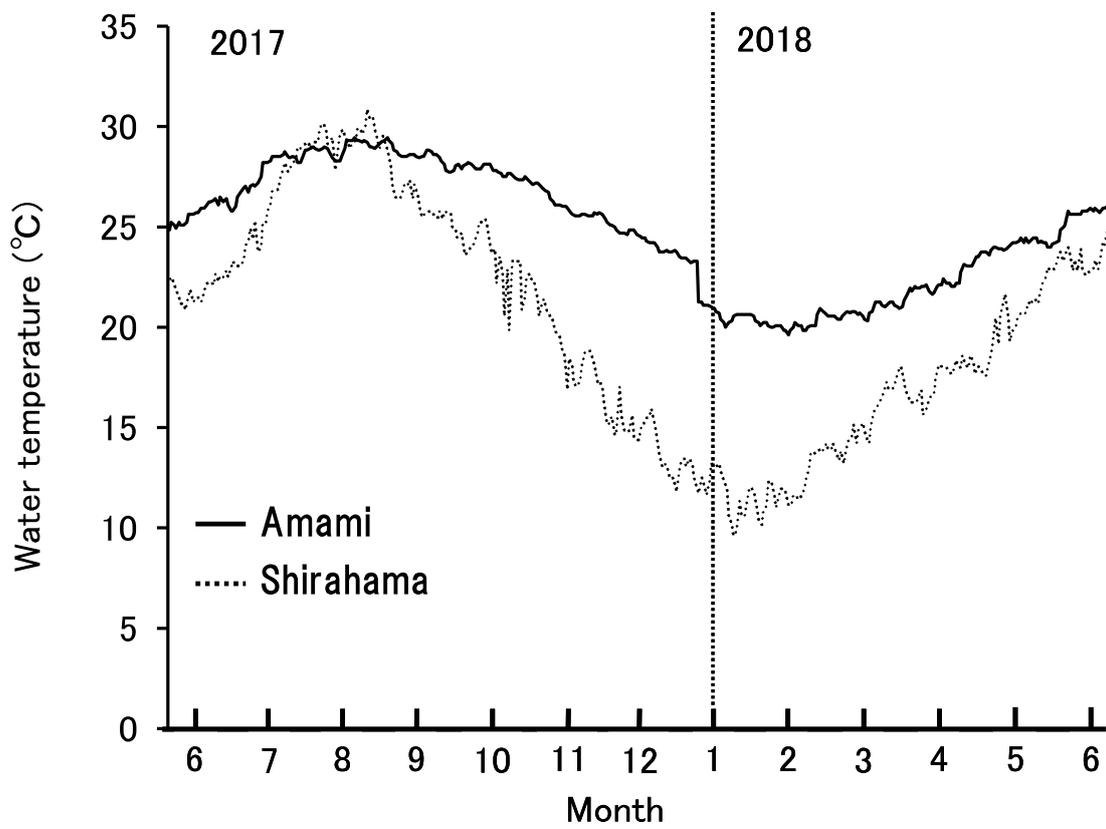


Fig. 19 Changes in the water temperature in 3 m depth of the sea net-cages in Keten bay (Amami) and Tanabe bay (Shirahama) during sampling period.

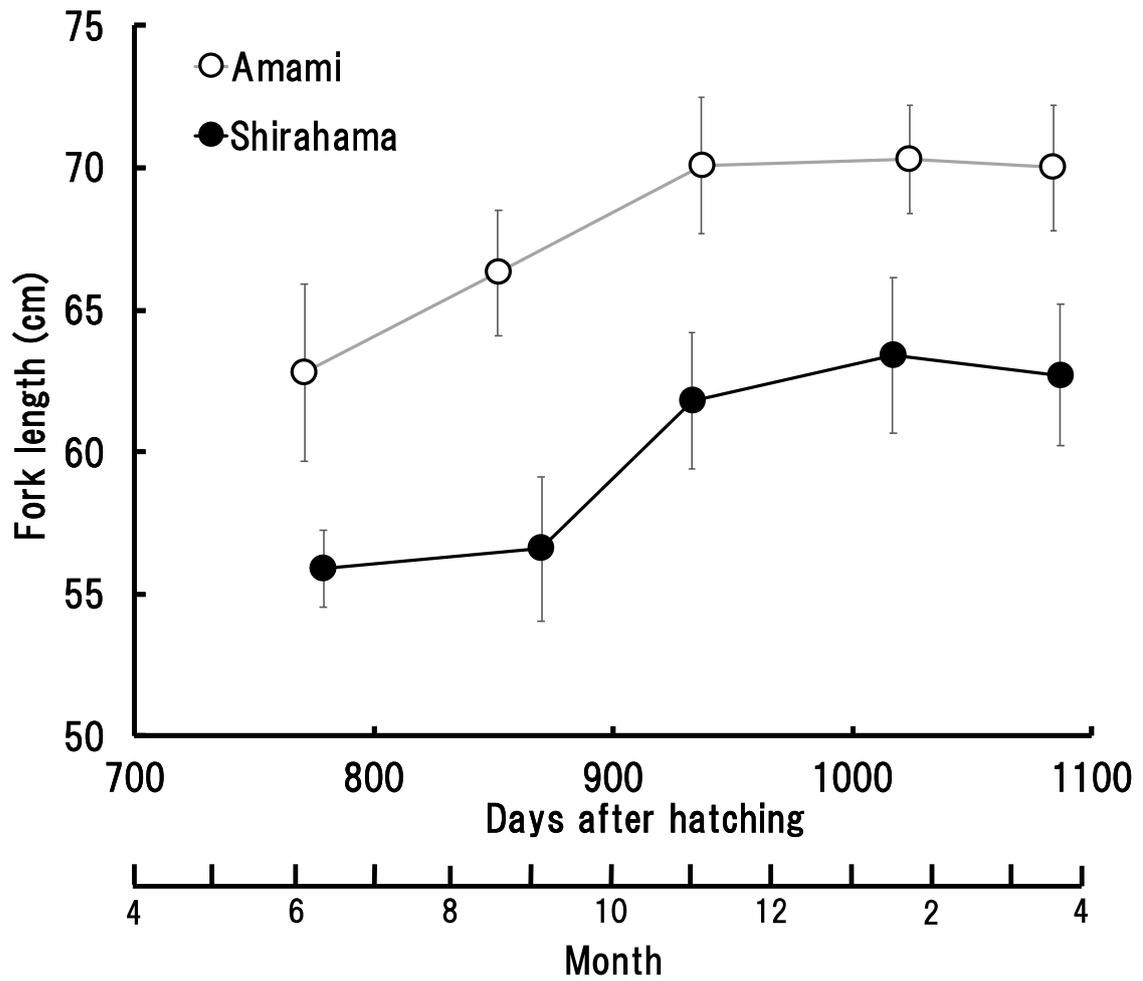


Fig. 20 Fork length of the sampled 2-year-old *Seriola dumerili*.

Symbols: ○, Amami; ●, Shirahama.

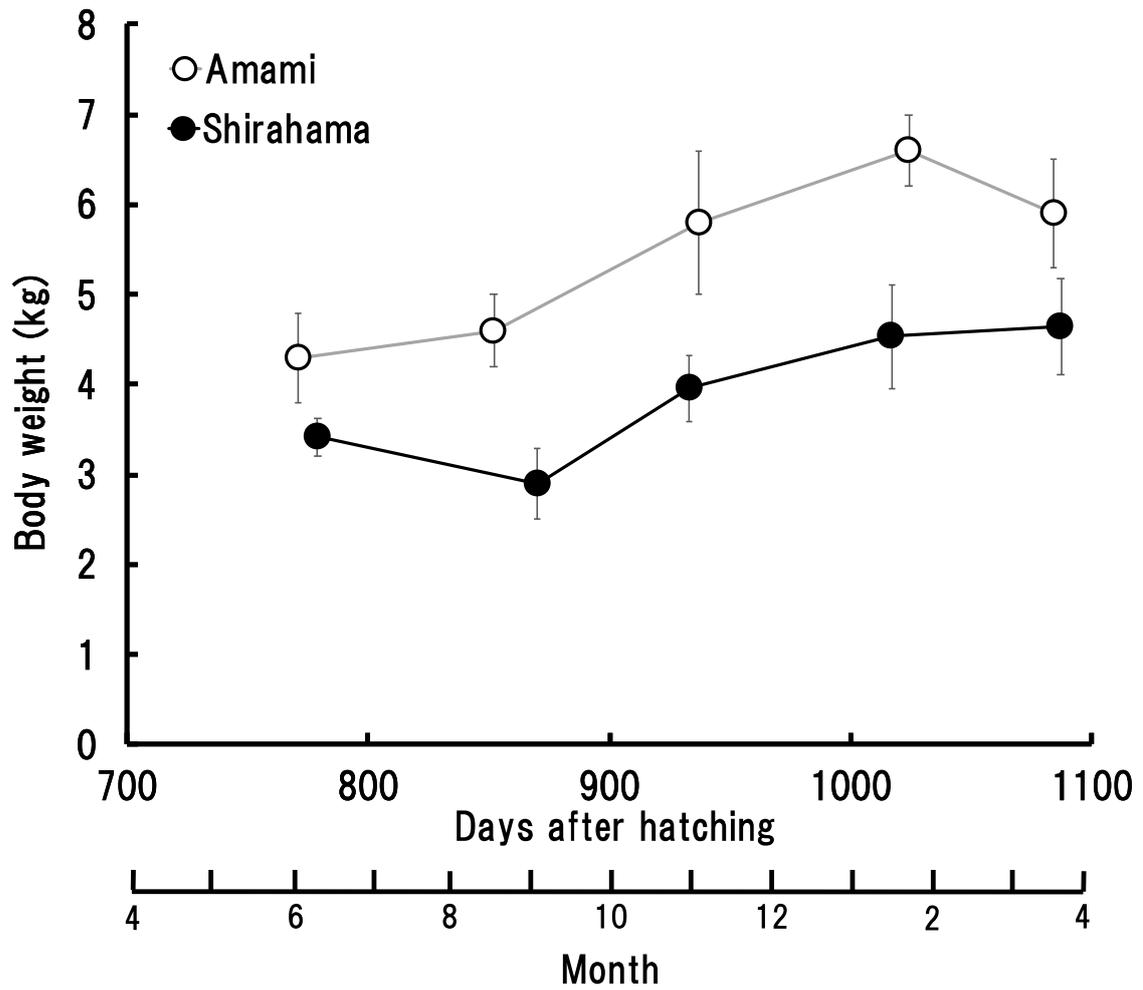


Fig. 21 Body weight of the sampled 2-year-old *Seriola dumerili*.

Symbols: ○, Amami; ●, Shirahama.

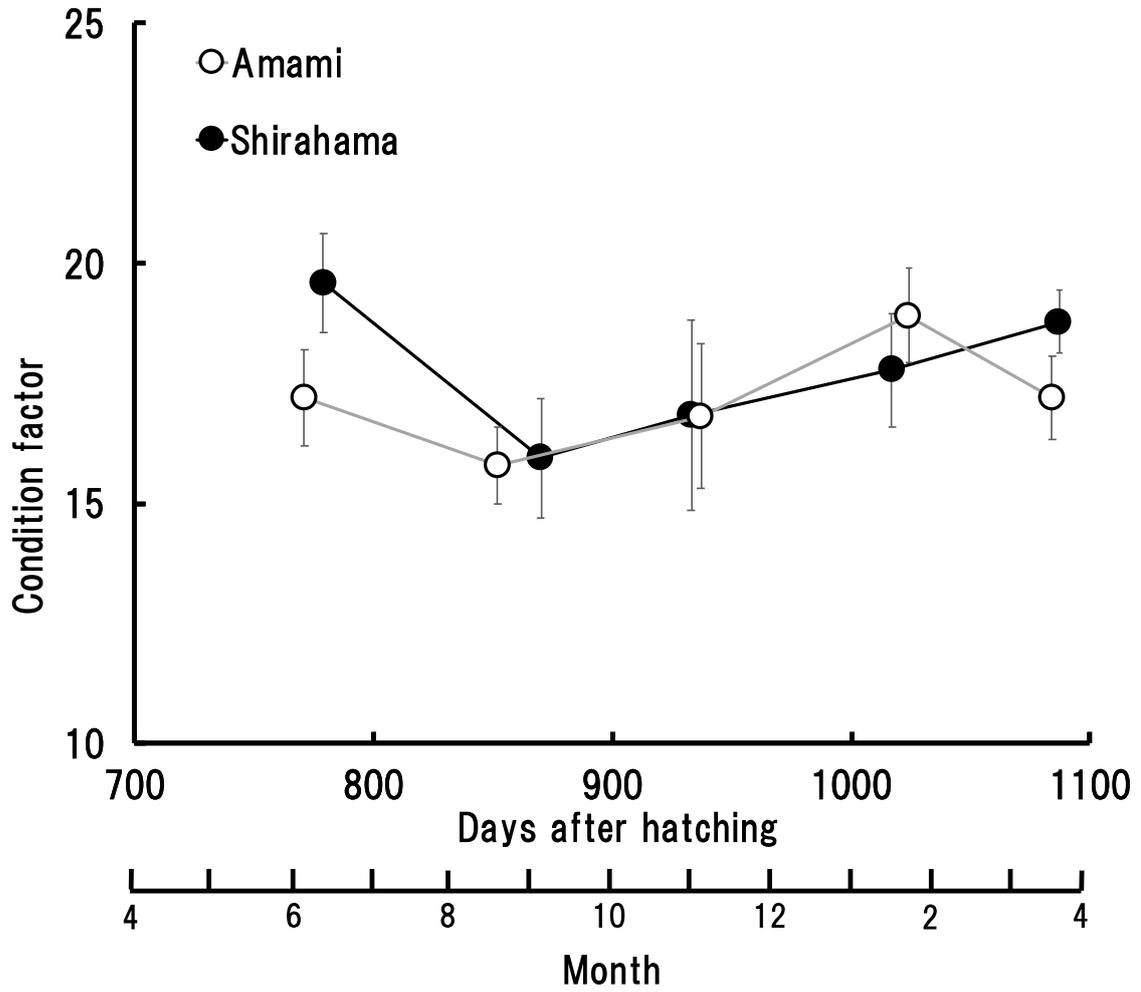


Fig. 22 Condition factor of the sampled 2-year-old *Seriola dumerili*.

Symbols: ○, Amami; ●, Shirahama.

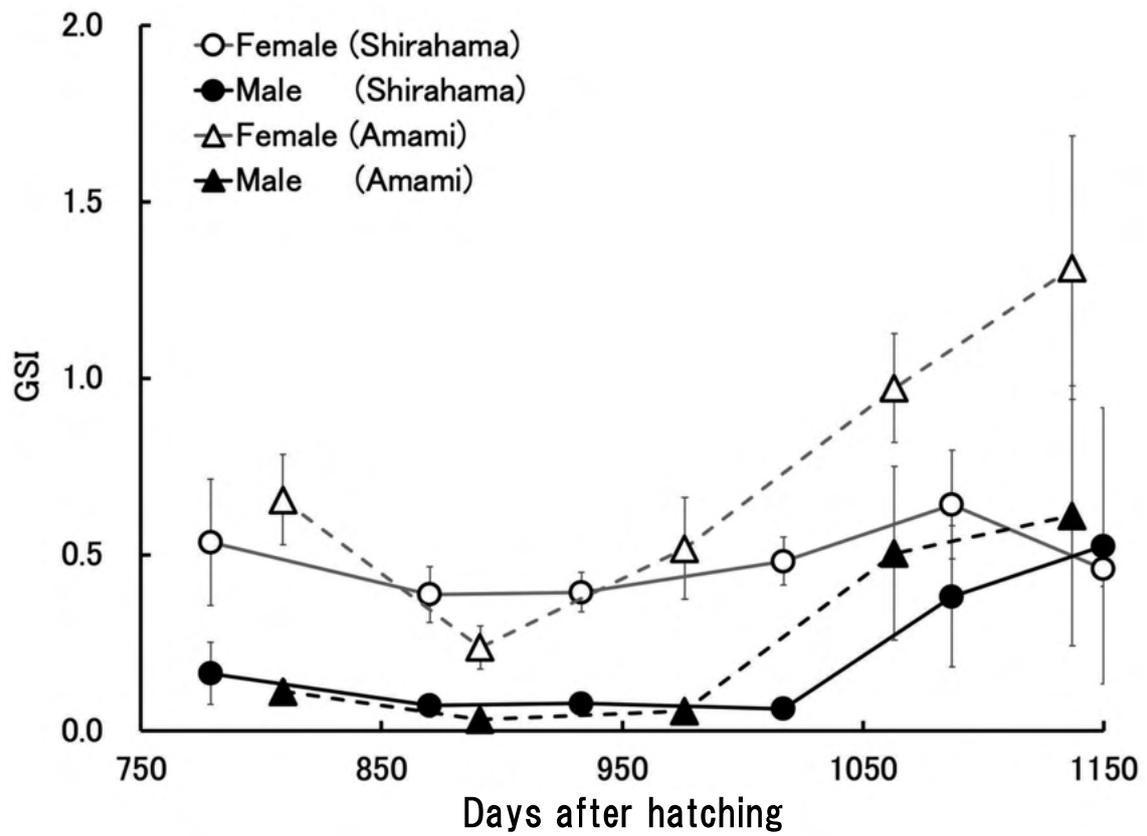


Fig. 23 GSI of the sampled 2-year-old *Seriola dumerili*.

Symbols: ○, Female Shirahama; ●, Male Shirahama; △, Female Amami; ▲, Male Amami.

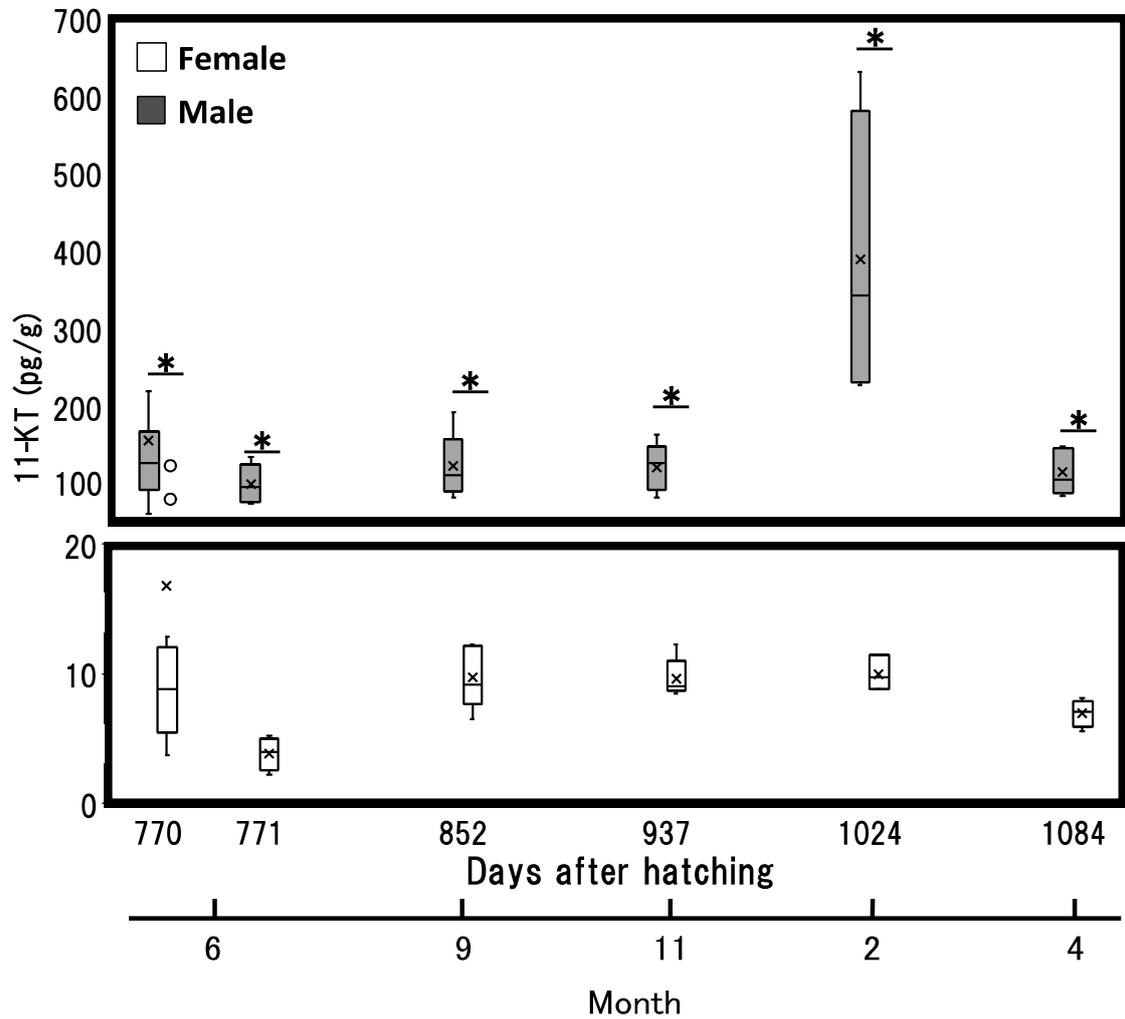


Fig. 24 Pectoral fin 11-KT concentrations of the sampled 2-year-old male (shaded boxes) and female (open boxes) *Seriola dumerili*. Each box represents the 25% and 75% quartiles; crosses in boxes represent the average, white symbol is singular point and the line in the box represents the median. The upper and lower bars represent the maximum and minimum values, respectively. The age of sampled fish (days after hatching) and sampling month are indicated on the horizontal axis.

* Statistical significance between sexes (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

第5章 親魚選抜過程への提案

村田 (1998) および家戸 (2002) は、本学水産研究所において30年間以上に亘るマダイ *Pagrus major* の選抜育種を行い、大型で形態や体色の優れた個体を選抜した結果、3-5世代目から成長が顕著に速くなり、商品として利用される1 kgに到達するまでの期間が短縮されたことを報告し、高成長系統の作出に成功している。また、Donaldson and Olson (1955) はニジマス *Oncorhynchus mykiss* において選抜育種を行った結果、早期に成熟し、産卵量も増加したことを報告している。また、近年では全ゲノム解析によって得られる情報を利用することで養殖魚の品種改良が高度化されている。しかし、これらの品種改良を行うには対象とする養殖魚を安定的に飼育管理および生産できることが前提となる。カンパチにおいては、安定的な採卵ができないことが大きな課題である。本学水産研究所においてカンパチではマダイのような高成長系統の作出には至っていない。本手法を用いて希望の雌雄比を構成し、受精卵の安定確保を行うことで安定的な種苗生産が可能となれば、今後、選抜育種や全ゲノム解析によって得られる情報を利用した高成長系統の作出が可能になると考えられる。

本章では、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中の11-KTの濃度による性判別を利用した親魚選抜の過程を、本学水産研究所における既存の性判別による親魚選抜の過程と比較しながら述べる。

5-1. 親魚の選定

本研究の結果を踏まえ、従来の親魚候補選抜の流れ (Fig. 25, 左) と新規に提案する親魚候補選抜の流れ (Fig. 25, 右)を Fig. 25 に示した。従来、本学水産養殖種苗センターでは、まず養殖カンパチ *Seriola dumerili* の親魚候補は数千尾が出荷用のカンパチとして海上生簀で養成される。その後、成長優良個体の選別と同時に満2歳魚 (孵化後730日) 以降に腹部圧迫法により、排精を確認することができれば「雄」、排精を確認

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

することができなければ「雌」として性判別する。性判別後に再度、海上生簀で養成を行う。しかし、精子が形成されておらず排精を確認することができない未成熟な雄を誤って「雌」と判別してしまうため、この方法により親魚候補を性判別すると雄の多い親魚候補群が構成されてしまう。このように既存の判別法では誤判別の可能性を考慮しなければならず、現状では約 20-40 尾の陸揚げに対し、必然的に保有する親魚候補群の尾数が 150-200 尾と多くなっていた。また親魚候補に誤判別個体が含まれているため、陸揚げした親魚の雌雄比が偏る可能性があり、雄が多くなった場合には十分量の受精卵を確保することができなかった。また、親魚として必要な尾数よりも遥かに多い親魚候補を産卵用に陸揚げする 4 歳魚まで飼育する必要があり、多大な維持管理費用がかかっていた。また、親魚として利用されなかった余剰個体は、通常出荷される 3-4 kg よりも体サイズが大きくなっており、5 kg を超えると販売価格が低下するという問題もあった。誤判別を考慮する必要がなければ、4 歳魚までの斃死のリスクのみを考慮すれば良いため、保有尾数を減らすことに伴う維持管理費の削減だけでなく余剰個体を削減することができる。

新たに提案する親魚選抜の流れにおいても出荷用カンパチの保有尾数は従来と同様である。この親魚候補が 1 歳 3 ヶ月（孵化後 504 日）になると田辺湾の養成個体群で 90%以上の判別率での性判別が可能となる。本研究で新規に開発した雌雄の胸鰭 11-KT 濃度を比較した性判別率は和歌山県田辺湾の養成個体で 93.6% (Table 5), 奄美大島花天湾の養成個体で 98.6% (Table 7) の高い値を示した。本研究で使用した奄美大島の 2015 年産の親魚候補群 115 尾のうち約 22%にあたる 25 尾が管理期間中に死亡したことから、採卵に最低必要である陸揚げ用の親魚 (10 尾/50 t) の 2 割増の尾数 (12 尾) を維持管理すれば良いことになる。しかし、これは最低限必要な尾数である。実際の本学水産養殖種苗センター奄美事業場を参考に考えると、陸揚げ水槽は 50 t 水槽が 2 基あり、春と秋の年 2 回の採卵している。これらを踏まえると、親魚候補として保有すべき尾数は必要

尾数の2割増の48尾となる。約50尾を維持管理すれば良いため、従来よりも226日早期かつ既存の親魚候補の維持管理尾数の24-30%の尾数まで削減が可能になる。約50尾を親魚として利用する4歳魚まで飼育管理を行い、希望の雌雄比を構成して陸揚げ水槽へ移動するため、従来のように雌雄比が偏ることがなくなる。雌が多い親魚構成をすることで、従来よりも多く受精卵を確保することが可能となる。図で示した流れはあくまで想定したものであるため実際に適用するには様々な改善が必要となることが予想される。従って、今後さらなる効率的な性判別法の開発およびその手法を最大限に活かすことが可能な流れを考えることで生産効率の向上の一助となればと考える。

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

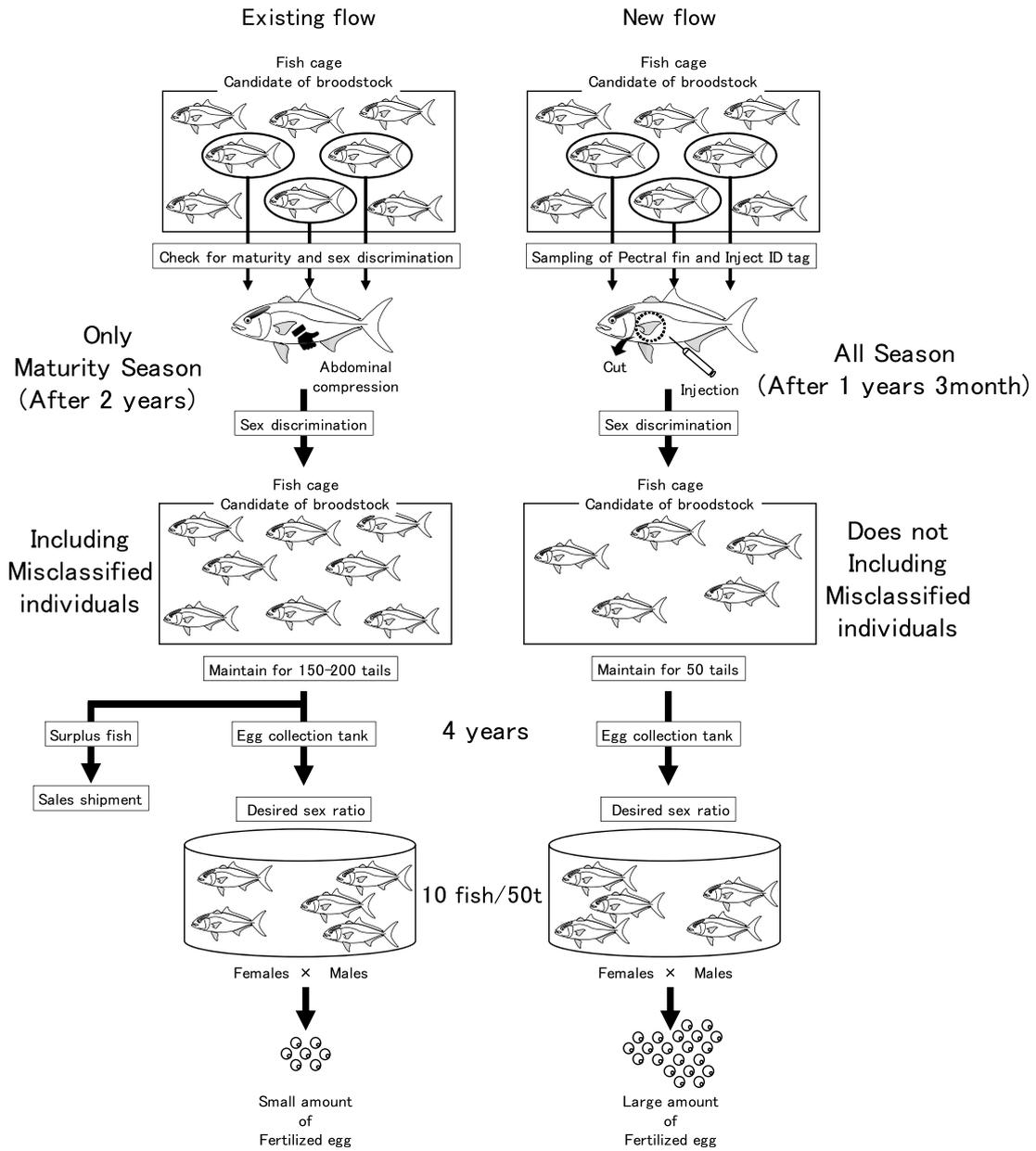


Fig. 25 Broodstock management process of *Seriola dumerili*. The flow on the left shows existing flow and the right shows the proposal flow using sex discrimination based on the pectoral fin 11-KT concentration.

要約

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。

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

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℃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

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

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。(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考えられた。

Summary

Owing to the recent growing global demands for fish products, farming of *Seriola* spp. is becoming an important aquaculture sector in the various regions. Among *Seriola* fish, greater amberjack *Seriola dumerili* is recognized as a valuable culture target due to its relatively long shelf life. In Japan, *S. dumerili* farming is the third largest finfish aquaculture industry with the production next to Yellowtail *Seriola quinqueradiata* and Red Sea Bream *Pagrus major*. Mass production technology of artificial *S. dumerili* seedlings, however, is still under development and the present farming relies on wild seedlings. Currently, about 85% of *S. dumerili* seedlings are imported from China. One major issue for the hatchery production of *S. dumerili* is the lack of suitable method to provide large quantity of high-quality eggs. In order to secure the stable supply of such eggs, bloodstock management, particularly accurate sex determination of individual blood fish, is necessary. The present study focused on sex steroid hormones as a reliable sex indicator and aimed to develop a new, accurate, and practical sex determination method. Plasma and tissue concentration of 17 β -estradiol (E2) and 11-ketotestosteronein (11-KT) were measured for 1 to 3-year-old (yo) farmed *S. dumerili* and the accuracy of this new sex determination method was evaluated.

Chapter 1

This chapter investigated the gonadal development and associated fish growth in *S. dumerili* bloodstock candidates aiming to obtain the basic knowledge towards the improvement of stable egg collection technology.

- I. To assess the feasibility of sex discrimination solely based on fish growth, male and female growth rates were compared in a total of 134 fish (55 females, 79 males) of 1 to 3 yo *S. dumerili*. The sex of individual fish was confirmed directly by the visual inspection of gonads. No sex difference was detected for fork length, body weight and condition factor, indicating the fish size alone cannot be a reliable indicator for sexing *S. dumerili*.
- II. The maturation and spawning season may vary depending on the environmental conditions of a culturing area. A study was conducted to understand the maturation status of 1 to 3 yo *S. dumerili* cultured in Tanabe Bay, Wakayama Prefecture. The gonadal development was assessed via gross appearance and histological observation. The gonadal somatic index (GSI) was consistently higher in males than females, except for the fish at 1150 days after hatching, and it peaked in April in both sexes, just before

the spawning period. In histological analysis, spermatids became dominant in the testes of two yo fish, and sperm were confirmed in some cases. On the other hand, only perinucleolar oocyte stage were observed in ovary even in June of the 3 yo females, considered they were immature. These results indicated that in Tanabe Bay, female *S. dumerili* unlikely spawn at the age of 3 years old.

Chapter 2

In order to develop a reliable sex determination method which can even be used in premature fish, plasma concentrations of E2 and 11-KT hormones were measured in young *S. dumerili*.

- I. Changes in plasma E2 concentration were investigated in 1 to 3 yo *S. dumerili*. The E2 levels in females tended to increase in April in both 1 and 2 yo fish. The E2 levels in males were consistently lower than female except for June of 1 yo and September of 2 yo fish. In contrast to females, however, the E2 values in 2 yo males showed significant increase in April.
- II. Changes in plasma 11-KT concentrations were investigated in 1,2, and 3 yo of cultured *S. dumerili*. In 1 and 2 yo males, the 11-KT level showed considerable seasonal fluctuation; significantly increased from February to April and then decreased by June. In contrast, the 11-KT level in females remained relatively stable and low throughout the study period, at about 30 pg/ml. The male 11-KT levels were significantly higher than females in all samples, regardless of the season and fish age.
- III. The possibility of sex discrimination based on the plasma E2 and 11-KT concentrations was investigated. The study also focused on the selection of the suitable index hormone with higher accuracy and the determination of the minimum fish age for which this sex determination method can be applied. The reference E2 and 11-KT values for sex determination were determined using the receiver operating characteristic curve (ROC) and the accuracy of these reference values was evaluated by comparing with the actual sex of the individual fish confirmed by the gonadal analysis. Although the accuracy of E2-based sex discrimination increased with fish growth, the overall discrimination rate was 79.8%. On the other hand, the 11-KT-based sex discrimination demonstrated 100% accuracy in the fish with the age between 504 and 1150 days old. These results indicate that the plasma 11-KT is a reliable and useful sex determination index for *S. dumerili*.

Chapter 3

Usefulness of plasma 11-KT in sex determination in *S. dumerili* was shown in the previous chapter. However, blood sampling induces considerable stress to fish and requires

large efforts and techniques for the personnel at a farming site. This chapter aims to develop a hormone-based sexing method which does not require blood collection, but with similar reliability. A study was carried out to evaluate the feasibility of 11-KT-based sexing using fin and mucus samples instead of blood.

- I. The 11-KT concentrations in pectoral fin, dorsal fin, pelvic fin, anal fin, caudal fin, and mucus were compared with that in the plasma in five male and female 2 yo *S. dumerili*. There were significant sex differences in 11-KT values in all tissue samples. In addition, the time required for sampling and subsequent hormone extraction process from pectoral fins achieved shortest result among all samples. These results indicate that the pectoral fin is considered the most suitable body part to measure 11-KT for sex determination.
- II. The feasibility and practicality of sex determination based on 11-KT concentration in pectoral fin was assessed by determining the relationship of the 11-KT values between pectoral fin and plasma, as well as with actual sex in 1 to 3 yo cultured *S. dumerili*. The 11-KT concentrations in pectoral fin and plasma were highly and positively correlated to each other in both males and females. Furthermore, based on ROC curve, the overall average accuracy rate of the pectoral fin 11-KT sex discrimination method was 93.6%. These results showed that the 11-KT from pectoral fin is a less-stressful, highly-efficient, and reliable sex determination index which can be practically used for actual bloodstock management.

Chapter 4

The growth and maturation of *S. dumerili* may vary between areas differing in temperature and other factors. The present chapter investigated whether the pectoral fin 11-KT sexing method can be applied for *S. dumerili* reared in a subtropical Keten Bay (Amami, Kagoshima prefecture) where the water temperature is considerably higher than Tanabe Bay.

Using a total of 115 individuals of 2 yo *S. dumerili* (39 females and 76 males), accuracy of the pectoral fin 11-KT sexing method was calculated based on the reference index value obtained from the fish reared in Tanabe Bay. The average annual water temperature of Keten Bay was over 5°C higher than that of Tanabe Bay and the 2 yo fish raised in the former area were larger than those from the latter area. Despite the size difference, there was a significant sex difference in pectoral fin 11-KT level and the high sexing accuracy rate of 98.6% could be achieved. This shows that the sex determination using the 11-KT in the pectoral fin can also be used for *S. dumerili* reared in different geographical regions.

Chapter 5

Based on the findings in this study, proposed bloodstock selection process using the

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

newly developed pectoral fin 11-KT sexing method is as follows; 1) Mass cultivation, possibly thousands, of *S. dumerili* in sea cages which includes both harvesting fish and bloodstock candidates. 2) Conducting tagging and collection of the pectoral fin when the fish are at the age of one year and three months old (504 days after hatching) or older, and measuring the 11-KT to determine the sex of individuals. 3) Selecting bloodstock candidates with desired sex ratio and raising them in a sea cage until they become 4 yo. 4) Transferring actual bloodstock with high female to male ratio to a spawning tank and obtaining fertilized eggs.

This method may enable bloodstock management at early age with accurate sex ratio without unnecessary rearing of unwanted candidate fish. This in turn, reduces fish management cost and secures stable supply of fertilized eggs.

文献

Akobeng AK (2006) Understanding diagnostic tests 3: receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr* 96: 644-647.

Betka M, Callard GV (1998) Negative feedback control of the spermatogenic progression by testicular oestrogen synthesis: insights from the shark testis model. *APMIS* 106: 252-258.

Baroiller JF, Guiguen Y, Iseki K, Fostier A (1998) Physiological role of androgens on gonadal sex differentiation in two teleost fish, *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis niloticus*. *J Exp Zool* 281:506-507.

Borg B (1994) Androgens in teleost fishes. *Comp Biochem Physiol* 109C: 219-245.

Bradley A P (1997) The Use of the Area Under the ROC Curve in the evaluation of machine learning algorithms. *Pattern Recognition* 30: pp. 1145-1159.

Ceapa C, Williot P, Le Menn F, Davail-Cuisset B (2002) Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus Pallas*) during spawning migration in the Danube River. *J Appl Ichthyol* 18: 391-396.

Chu-Koo F, Dugue R, Alvan Aguilar M, Casanova Daza A, Alcantara Bocanegra F, Chavez Veintemilla C, Duponchelle F, Renno J F, Tello S, Nunez J (2009) Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17beta-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiol Biochem*. 35: 125-136.

中田久, N L Shein, 水野かおり, 宮木康夫, 征矢野清 (2018) マハタの人工授精における排卵経過時間と受精率との関係, *Nippon Suisan Gakkaisi* 84: 384-392.

- Corriero A, Medina A, Mylonas C C, Abascal F J, Deflorio M, Aragón L, Bridges C R, Santamaria N, Heinisch G, Vassallo-Agius R, Belmonte A, Fauvel C, García A, Gordin H, De Metrio G, (2007) Histological study of the effects of treatment with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH_a) on the reproductive maturation of captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture* 272: 675-686.
- Donaldson L R and Olson P R (1955) Development of rainbow trout brood stock by selective breeding. *Trans Amer Fish Soc* 85: 93-101.
- Esmailnia R, M R Ghomi, M Sohrabnezhad (2019) Early sex identification of 8 - month cultured beluga sturgeon (*Huso huso*) using ultrasonography, small surgery and plasma steroid hormones. *J Appl Ichthyol* 35: 420-426.
- Fawcett T (2006) An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* 27: 861-874.
- Fernandino J I, Hattori R S, Kishii A, Strüssmann C A, Somoza G M (2012) The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature induced masculinization: The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology* 153: 6003-6011.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture, 46 –p - <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf> (Last retrieved: 12 November 2019).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016) Fishery and Aquaculture Statistics, <http://www.fao.org/3/i9942t/I9942T.pdf> (Last retrieved: 12 November 2019).

- 玄浩一郎, 奥宏海, 松原孝博 (2008) 魚類における雄性ホルモンの産生ならびに受容機構, 水研センター研報. 26: 123-128.
- Godwin J (2010) Neuroendocrinology of Sexual Plasticity in Teleost Fishes. *Front Neuroendocrinol* 31: 203-216.
- Grober MS, Jackson IM, Bass AH (1991) Gonadal steroids affect LHRH preoptic cell number in a sex/role changing fish. *J Neurobiol* 22: 734-741.
- Guiguen Y, Baroiller J F, Ricordel M J, Iseki K, Mcmeel O M, Martin S A M, Fostier A (1999) Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol Reprod Dev* 54: 154-162.
- 浜田和久, 征矢野清 (2009) カンパチ親魚の生殖周期の把握と早期採卵. 養殖 (2009年12月号), 46: 25-27.
- Hara A, Hiramatsu N, Fujita T (2016) Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. *Fish Sci* 82: 187-202.
- 原田輝雄 (1969) カンパチ. 養魚講座4ハマチ・カンパチ, 緑書房, 東京, pp. 1-15.
- Harris P J, D M Wyansky, D B White, P P Mikell, P B Eyo (2007) Age, growth, and reproduction of greater amberjack off the southeastern U.S. Atlantic coast. *Trans Amer Fish Soc* 136:1534-1545.
- Hasegawa T, Yen H M, Chen J R, Kuo C L, Kawabe R, Sakakura Y (2017) Collection and aging of greater amberjack *Seriola dumerili* larvae and juveniles around the Penghu Island, Taiwan. *Ichthyol Res.* 64: 145-150.
- 樋口健太郎 (2016) ブリの配偶子形成および産卵に及ぼす制限給餌の影響とその内分泌メカニズムに関する研究, 博士論文, 長崎大学, 長崎.

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

Higuchi K, Gen K, Izumida D, Kazeto Y, Hotta T, Takashi T, Aono H, Soyano K (2016)

Changes in gene expression and cellular localization of insulin-like growth factors 1 and 2 in the ovaries during ovarian development of the yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Gen Comp Endocrinol. 232: 86-95.

平本義春, 小林啓二 (1979) ヒラメの種苗生産に関する研究-I, 室内水槽における自然産卵について, 水産増殖 26: 152-158.

Idler D R, Schmidt P J, Ronald A P (1960) Isolation and identification of 11-ketotestosterone in salmon plasma. Can J Biochem Physiol 38, 1053-1058.

Iwamizu M, Itazawa Y (1989) Gross anatomy of the vascular system and the lateral musculature of the yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Carangidae). Jap J Ichthyol. 36: 232-251.

伊藤道彦, 高橋明義 (2016) 魚類生殖腺の成熟. ホルモンから見た生命現象と進化シリーズIII 成長・成熟・性決定 (伊藤道彦, 高橋明義編) 裳華房, 東京, pp. 3-4.

家戸敬太郎 (2002) マダイの品種改良に関する研究. 近大水研報 8: 173-259.

Kitano T, Takamune K, Kobayashi T, Nagahama Y, Abe S I, (1999) Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. J Mol Endocrinol 23: 167-176.

Kobayashi Y, Nozu R, Nakamura M (2011) Role of estrogen in spermatogenesis in initial phase males of the three-spot wrasse (*Halichoeres trimaculatus*): effect of aromatase inhibitor on the testis. Dev Dynam 240: 116-121.

- 小林牧人, 大久保範聡, 足立伸次 (2002) 生殖. 魚類生理学の基礎 (会田勝美・金子豊二編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 155-184.
- 小林牧人, 大久保範聡, 足立伸次 (2013) 生殖. 増補改訂版魚類生理学の基礎 (会田勝美・金子豊二編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 160-165, 167.
- Koyama T, Nakamoto M, Morishima K, Toyoda A, Kikuchi K, Sakamoto T (2019) A SNP in a Steroidogenic Enzyme Is Associated with Phenotypic Sex in *Seriola* Fishes. *Current Biology* 29: 1901-1909.
- Kucherka WD, Thomas P, Khan IA (2006) Sex differences in circulating steroid hormone levels in red drum, *Sciaenops ocellatus* L. *Aquac Res* 37:1464-1472.
- 久保田洋, 古川誠志郎 (2018) 平成 29 年度我が国周辺水域の漁業資源評価 (水産庁増殖推進部・水産研究・教育機構), 1226-1299.
- Lokman M, Harris B, Kusakabe M, Kime D E, Schulz R W, Adachi S, Young G (2002) 11-Oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *Gen Comp Endocrinol* 129: 1-12.
- Lorenzi V, Earley RL, Grober MS (2012) Differential responses of brain, gonad and muscle steroid levels to changes in social status and sex in a sequential and bidirectional hermaphroditic fish. *PLoS ONE* 7: e51158.
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J (2010) Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 165: 367-389.
- Marino G, Mandich A, Massari A, Andaloro F, Porrello S, Finioia M G, Cevasco F (1995) Aspects of reproductive biology of the Mediterranean amberjack (*Seriola dumerilii* Risso) during spawning period. *J Appl Ichthyol* 11: 9-24.

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

- 升間主計, 兼松正衛, 照屋和久 (1990) カンパチの卵発生と仔稚魚の形態. 魚類学雑誌, 37:164-169.
- 松浦修平, 古市政幸, 山克彦, 松山倫也 (1988) マダイ 1 尾 による毎日産卵の確認とその卵質. 水産増殖 36: 33-39.
- Minucci S, D Matteo L, Chieffi P, Pierantoni R, Fasano S (1997) 17 beta-estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta*. J Exp Zool 278: 93-100.
- Miura T, Yamauchi K, Nagahama Y, Takahashi H (1991a) Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. Zool Sci 8: 63-73.
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1991b) Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Dev Biol 146: 258-262.
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1991c) Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proc Natl Acad Sci USA 88: 5774-5778.
- Miura T, Miura C (2014) Controlled feeding alleviates the reduced growth associated with spawning in farmed yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Aquaculture 424-425: 10-17.
- 三浦猛, 三浦智恵美 (2016) 魚類生殖腺の成熟. ホルモンから見た生命現象と進化シリーズIII 成長・成熟・性決定 (伊藤道彦, 高橋明義編) 裳華房, 東京, pp. 59-64, 69.

- 宮下盛, 熊井英水 (2000) 適地選定から出荷・販売まで, カンパチ, 海産魚の養殖 (熊井英水編), 湊文社, 東京, pp. 78-88.
- 村田修 (1998) 海水養殖魚の品種改良に関する研究. 近大水研報 6: 1-101.
- 虫明敬一, 本藤靖, 崎山一孝, 浜田和久, 堀田卓朗, 吉田一範 (2003) 日本栽培漁業協会における親魚養成技術開発の現状と今後の課題(総説). 栽培技研 30: 79-100.
- 虫明敬一編 (2019) ブリ類の科学, 朝倉書店, 東京, pp. 78-88.
- Mooradian A D, Morley K E, Korenman S G (1987) Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 8: 1-28.
- Nazeri S, Amiri B M, Nazeri M R, Mirvaghefi A R (2014) Sexing of farmed immature beluga (*Huso huso*) using steroid hormone levels as indicators *Comp Clin Pathol* 23: 631-635.
- 日本栽培漁業協会 (1999) ブリ親魚養成技術開発, 栽培漁業技術シリーズ No. 5, 日本栽培漁業協会, 東京, pp. 69.
- 日本栽培漁業協会 (2003) カンパチ種苗生産技術開発. 日本栽培漁業協会 40 年史, 日裁協, 東京, pp. 60-61.
- Nakamura M, Alam M A, Kobayashi Y, Bhandari R K (2007) Role of sex hormones in sex change of grouper. *J Mar Sci Technol* 15 (SPEC. ISS.): 23-27.
- 中園明信・桑村哲生編 (1987) 魚類の性転換, 東海大学出版会, 神奈川.
- 農林水産省, 平成 29 年度水産白書, 農林統計協会, 東京,
<https://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/29hakusyo/attach/pdf/syusei/index-13.pdf> (2019 年 12 月 6 日ダウンロード).

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

農林水産省，平成 29 年度漁業・養殖業生産統計調査，東京，

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/ (2019 年 12 月 6 日ダウンロード).

農林水産省，平成 30 年度水産白書，農林統計協会，東京，

http://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/h30/attach/pdf/30suisan_sankouzuhyou.pdf (2019 年 12 月 6 日ダウンロード).

奥澤公一 (2006) 魚類の初回成熟，水研センター研報別冊 75-85.

大池一臣，足立伸次，長浜嘉孝 (1988a) マダイ雌の性成熟に伴う血中ステロイドホルモン量の変動. 日水誌 54: 585-591.

大池一臣，足立伸次，長浜嘉孝 (1988b) マダイ雄の性成熟に伴う血中ステロイドホルモン量の変動. 日水誌 54: 593-597.

尾崎照遵，奥澤公一 (2017) 世界の養殖業，緑書房，東京，pp. 99-105.

Peyon P, S Zanuy, M Carrillo (2001) Action of leptin on in vitro luteinizing hormone release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Biol Reprod 65: 1573-1578.

Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, Elawady MK, Wilson EM, French FS (1995) Androgen receptor defects: Historical, clinical and molecular perspectives. Endocr Rev, 16: 271-321.

Reinboth R (1975) In vitro studies on steroid metabolism of testicular tissue in ambisexual teleost fish. J Steroid Biochem 6: 341-344.

Rice M E, Harris G T (2005) Comparing effect sizes in follow-up studies: ROC area, Cohen's d, and r. Law and Human Behavior 29: 5, DOI: 10.1007/s10979-005-6832-

- Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera L A, Soubrier M A, Mañanós E, Holland M C H, Zohar Y, Zanuy S (2000) Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen Comp endocrinol* 120: 67-74.
- 塩澤聡, 竹内宏行, 廣川潤 (2003) カンパチ種苗生産方法の改良. 栽培技研, 31: 11-18.
- Schlinger B A, Arnold A P (1992) Circulating estrogens in a male songbird originate in the brain. *Proc Natl Acad Sci* 89: 7650-7653.
- Schultz D R, Perez N, Tan C K, Mendez A J, Capo T R, Snodgrass D, Prince E D, Serafy J E (2005) Concurrent levels of 11-ketotestosterone in fish surface mucus, muscle tissue and blood. *J Appl Ichthyol* 21, 394-398.
- 清水昭男 (2010) 環境条件による魚類生殖腺周期の制御機構. *水産海洋研究* 74: 58-65.
- Smith G H, Murie D J, Parkyn D C (2014) Nonlethal sex determination of the greater amberjack, with direct application to sex ratio analysis of the Gulf of Mexico stock. *Mar Coast Fish* 6: 200-210.
- Strüssmann C A, Saito T, Takashima F, (1998) Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonia hatcheri*. *Comp Biochem Physiol*, 119: 637-644.
- Susca V, Corriero A, Bridges C R, Metrio G D (2001) Study of the sexual maturity of female bluefin tuna: purification and partial characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Fish Biol* 58: 815-831.

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

Sudo R, Tosaka R, Ijiri S, Adachi S, Aoyama J, Tsukamoto K (2012) 11-ketotestosterone synchronously induces oocyte development and silvering-related changes in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Zool Sci* 29: 254-259.

鈴木廉仁, 竹村明洋 (1996) トラフグ天然親魚における成熟促進のためのホルモン投与方法の比較. *水産増殖* 44: 85-90.

都木靖彰, 今井央, 白井滋 (2017) 魚類学. (矢部衛, 桑村哲生, 都木靖彰編) 恒星社厚生閣, 東京, pp. 34-54.

高橋範行 (2017) 近畿大学によるカンパチ人工種苗の生産と販売. *アクアネット* 2: 34-37.

高岡治 (2005) カンパチ. *水産増養殖システム 1 海水魚* (熊井英水編), 恒星社厚生閣, pp. 31-43.

竹村明洋, 兼松正衛, 岡雅一 (1996) 体表粘液を利用したカンパチの早期雌雄判別の可能性. *日水誌* 62: 62-67.

University of Nebraska Medical Center. Interpreting diagnostic tests, the area under an ROC curve, <http://gim.unmc.edu/dxtests/roc3.htm> (2019年12月22日ダウンロード).

Wang R S, Yeh S, Tzeng C R, Chang C (2009) Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev*; 30: 119 - 32; PMID:19176467; <http://dx.doi.org/10.1210/er.2008-0025>

Weil C, P Y Le Bail, N Sabin, F. Le Gac. (2003) In vitro action of leptin on FSH and LH production in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) at different stages of the sexual cycle. *Gen Comp Endocrinol* 130: 2-12.

山本栄一 (1999) ヒラメの全雌およびクローン魚作出技術開発に関する研究. 日水誌 64: 638-641.

山下亜純 (2013) 中国から日本へのカンパチ稚魚の流通 (採捕・育成から輸入・流通まで). 養殖ビジネス, 50: 10-12.

吉田大作 (2002) アユの性成熟および産卵に関する生理学的研究, 博士論文, 長崎大学, 長崎.

Zhang Y, R Proenca, M Maffei, M Barone, L Leopold, J M Friedman (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-432.

Zupa R, Rodriguez C, Mylonas C C, Rosenfeld H, Fakriadis I, Papadaki M, Pérez J A, Pousis C, Basilone G, Corriero A (2017) Comparative study of reproductive development in wild and captive-reared greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). Plos One 12: e0169645. doi:10.1371/journal.pone.0169645

謝辞

本研究を行うにあたり、研究計画、その遂行および論文の作成に終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜り、また本稿の御校閲を頂いた近畿大学水産研究所白浜実験場長の家戸 敬太郎博士、白浜実験場長補佐の中田 久博士に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の実験において手技手法を丁寧に御指導して頂いただけでなく、多くの御助言を賜った鷺尾 洋平博士に深く感謝の意を表します。本論文において有益かつ貴重な御助言を賜った本学水産研究所の白樫 正博士に厚く御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、生殖腺の組織学的観察については近畿大学農学部的小林 靖尚博士に貴重な御助言をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。本研究を遂行するにあたり本学水産研究所所長の升間 主計博士には様々な御助言及び奄美大島での実験において多大な御協力、御支援をいただきました。謹んで感謝の意を表します。本論文の御校閲に労を取られ、有益かつ貴重な御助言を賜った本学水産研究所浦神実験場長の田中 秀樹博士、近畿大学農学部の太田 博巳博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり供試魚であるカンパチのサンプリングにおいて本学水産養殖種苗センターの高橋 範行白浜事業場長、宮野 茂一海上班長、中村 竜哉陸上班長、井上 勇すさみ事業場長補佐、岩城 菊代氏には多岐にわたり現場で御協力を頂いた。ここに厚く御礼を申し上げます。また供試魚の日々の飼育管理において本学水産研究所白浜実験場の山本 眞司場長代理、中務 寛技術係長、服部 亘宏技術員には貴重なご意見及び多大なる御協力を賜った。ここに御礼申し上げます。また、奄美大島でのサンプリングでは、中井 彰治成魚事業部副部長、勝田 芳樹氏、加藤 勝成氏、加納 秀八氏、清 栄作氏、島田 大貴氏、田畑 侑樹氏、森 大志氏に終始惜しみない協力をいただいた。ここに深く御礼申し上げます。