

博士（水産学） ホセファ タン・ファーミン

学位論文題名

Endocrinological studies on final maturation in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther)

(アジアナマズの最終成熟に関する内分泌学的研究)

学位論文内容の要旨

フィリピン在来の淡水魚である *Clarias macrocephalus* (Gunther) は、主にフィリピン、マレーシアおよびタイにおいて食用として利用されており、非常に需要が高い。しかし、その天然資源は近年減少傾向にある。その原因としては、1970年代以来、タイから導入された成長の早い *C. batrachus* により、在来種の *C. macrocephalus* の生息域が狭められたと考えられている。フィリピンでは、*C. macrocephalus* はその風味および食感において *C. batrachus* よりも好まれており、その天然資源回復のため、人為的な増養殖が試みられている。天然の *C. macrocephalus* の繁殖時期は3・10月の雨期の間であるが、飼育環境下では自発的な排卵はせず、雌の卵巣卵は一年中卵黄形成後期の状態で卵母細胞の発達が停止している。従って、卵母細胞の最終成熟および排卵の誘導はホルモン処理によって行われている。排卵された卵が得られると、雄から貯精嚢を取り出し、それを細断したものを受精に使用している。しかし、現在行われている方法は受精率が低く、雌の最終成熟および排卵の誘起および精子の調整法において多くの問題点がある。そこで本研究は、*C. macrocephalus* の効率の良い最終成熟誘導法および人工受精法を開発することを目的として1) 雌の卵巣の発達

と血中性ステロイドホルモンの周年変化の解析、2) ホルモン処理による最終成熟および排卵誘導の検討、3) ホルモン処理を行う最適な時期の検討、4) 雄の精巣の発達および血中ステロイドホルモンの周年変化の解析、5) 受精時の精子の調整方法の検討を行った。

まず、飼育下の雌の生殖腺体指数 (GSI)、卵径および抱卵数等の成熟度の指標と、血中ステロイドホルモン量の周年変化を調べた。その結果、GSI、卵径、抱卵数および血中テストステロン (T) 量ともに、1-4月の間が最も低値を示した。また、血中エストラジオール-17 β 量は1月に最も低く、12月に最も高値を示した。これらを総合して考慮すると、*C. macrocephalus* の雌は周年成熟リズムを持ち、1-3月は最終成熟および排卵を誘導するには最も不適切な時期であり、7-9月が最も適切な時期、4-6月および10-12月はそれらの中間的な時期であることが示唆された。*C. macrocephalus* の最終成熟誘起ステロイドホルモンであると考えられる 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) は年間を通して血中に検出されなかった。また、周日採血を行った場合でも、DHPは検出されなかった。従って、*C. macrocephalus* が飼育下で最終成熟を起こさない原因は、DHPが産生されないためであると考えられた。

次に、最終成熟を誘導するための黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ (LHRHa) およびピモザイド (ドーパミン拮抗剤) の複合投与によるホルモン処理の条件を検討した。LHRHa 0.01 から 0.10 μ g/g-体重およびピモザイド 1 μ g/g-体重の複合投与によって、それぞれ注射後12から15時間の間に最終成熟および排卵を誘導することができた。中でも、LHRHa を 0.05 μ g/g-体重処理で16-20時間後に搾出した卵を人工受精させた場合、受精率および孵化

率において最も良好な結果が得られた。

また、上記で最も良好な結果が得られた方法を用いて、様々な時期の個体の排卵を誘導すると、1・3月以外では、搾出される卵の数、受精後の孵化率およびその後の生存率において良好な結果が得られた。1・3月に排卵処理を行った場合では、卵質および稚魚の生存率が低下していた。従って、排卵処理は1・3月以外に行うことが適当であると結論された。ホルモン処理後、何れの時期の個体でも血中 DHP 量は上昇したが、1・3月にはその上昇値はその他の時期の個体に比べほぼ半分の量であった。この時期の個体が良好に最終成熟が誘導されないのは、卵黄形成を完了している卵母細胞数が少ないことおよび血中 DHP が十分に上昇しないことに起因していると考えられた。

次に、雄の精巣の発達および血中ステロイドホルモン量の周年変化を調べた結果、GSI は6月に最も高く、12、2および4月で最低であった。また、1年中精巣中には精原細胞、精母細胞、精細胞、および精子が観察されたが、1月のみ精子の減少が認められた。血中 11-ケトテストステロン量は1月に最低で、9月にピークを示した。T 量では大きな変動はみられなかった。従って、雄では1月を除いては、常に人工受精に使用可能な精子を得ることができることが明らかとなった。血中 DHP は検出されたが、その量は年間を通して極めて低値であった。

次に、受精時に使用する精液の運動活性を最大にするための人工精漿または精液の希釈液の検討を行った。まず、*C. macrocephalus* の精子運動の活性化は主に浸透圧の減少によって惹き起こされることを明らかにした。また、様々な希釈液を検討した結果、pH6.4 の低張の (200mOsm) 電解質液 (NaCl、CaCl₂、

KCl) および非電解質液 (マンニトール) または pH7.4-8.6 の等張の電解質液 (NaCl-KCl) で精液を希釈した場合、精子運動が著しく活性化されることを示した。次に、ナマズ人工精漿を用いた精液の希釈率が受精率に与える影響を調べた。その結果、精液を 1:100 の割合で人工精漿に希釈し、0.6%NaCl で精子運動を活性化し、5-10g の卵と受精させた場合に、89-94% の最も高い受精率が得られた。

以上の結果より、まず、*C. macrocephalus* のホルモン処理を行う最適の時期が示された。次に、雌の最終成熟および排卵を誘導するための簡便かつ効果的なホルモン処理法が示された。また、雄の精子運動を最大に活性化し、高い受精率が得られる精液の希釈法が示された。以上本研究により、*C. macrocephalus* の最終成熟の誘導法、その後の人工受精法の改良がされ、効率的種苗生産が可能となった。本成果はフィリピンにおける本種の増養殖に大きく貢献すると期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 山内 皓平
副査 教授 山崎 文雄
副査 助教授 上田 宏
副査 助教授 足立 伸次

学位論文題名

Endocrinological studies on final maturation in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther)

(アジアナマズの最終成熟に関する内分泌学的研究)

フィリピン在来の淡水魚である *Clarias macrocephalus* (Gunther) は、主にフィリピン、マレーシアおよびタイにおいて食用として利用されているが、その天然資源は近年減少傾向にある。現在、それらの資源回復のため、人為的な増養殖が試みられているものの、飼育環境下では自発的な排卵はしないため、卵母細胞の最終成熟および排卵の誘導はホルモン処理によって行われている。しかし、現在行われている方法は受精率が低く、雌の最終成熟および排卵の誘起および精子の調整法において多くの問題点がある。そこで本研究は、*C. macrocephalus* の効率の良い最終成熟誘導法および人工受精法を開発することを目的として、最終成熟の内分泌学的解析を行うとともに、それをもとに人工受精の方法を検討した。

まず、飼育下の雌の生殖腺体指数 (GSI)、卵径および抱卵数等の成熟度の指標と、血中ステロイドホルモン量の周年変化を調べた。*C. macrocephalus* の雌は周年成熟リズムを持ち、1-3月は最終成熟および排卵を誘導するには最も不適切な時期であり、7-9月が最も適切な時期であることが示唆された。*C. macrocephalus* の最終成熟誘起ステロイドホルモンであると考えられる $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) は年間を通して血中に検出されなかった。従って、*C. macrocephalus* が飼育下で最終成熟を起こ

さない原因は、DHPが産生されないためであると考えられた。

次に、最終成熟を誘導するための黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ (LHRHa) およびピモザイド (ドーパミン拮抗剤) の複合投与によるホルモン処理の条件を検討した。LHRHa 0.01から0.10 $\mu\text{g/g}$ ・体重およびピモザイド 1 $\mu\text{g/g}$ ・体重の複合投与によって、それぞれ注射後12から15時間の間に最終成熟および排卵を誘導することができ、搾出した卵を人工受精させた場合、受精率および孵化率において最も良好な結果が得られた。

また、上記で最も良好な結果が得られた方法を用いて、様々な時期の個体の排卵を誘導し、搾出される卵の数、受精後の孵化率およびその後の生存率を調べたところ、排卵処理は1-3月以外に行うことが適当であると結論された。ホルモン処理後、何れの時期の個体でも血中DHP量は上昇したが、卵黄形成を完了している卵母細胞数が少ないため、1-3月にはその上昇値はその他の時期の個体に比べほぼ半分の量であった。

次に、雄の精巢の発達および血中ステロイドホルモン量の周年変化を調べた結果、GSIは6月に最も高く、12、2および4月で低値であった。また、1年中精巢中には精子を含めた全ての生殖細胞が観察されたが、1月のみ精子の減少が認められた。血中11-ケトテストステロン量は1月に最低で、9月にピークを示した。一方、血中DHPは検出されたが、その量は年間を通して極めて低値であった。これらのことより、雄では1月を除いては、常に人工受精に使用可能な精子を得ることができることが明らかとなった。

最後に、受精時に使用する精液の運動活性を最大にするための人工精漿の検討を行い、pH6.4の低張 (200mOsm) 電解質液

(NaCl、CaCl₂、KCl) および非電解質液 (マンニトール) または pH7.4-8.6の等張の電解質液 (NaCl-KCl) で精液を希釈した場合、精子運動が著しく活性化されることを示した。次に、精液を1:100の割合で人工精漿に希釈し、0.6% NaClで精子運動を活性化し、5-10gの卵と受精させた場合に、89-94%の最も高い受精率が得られた。

上述のように本研究は *C. macrocephalus* の最終成熟に関する内分泌要因を解析し、これを基に雌の最終成熟および排卵を誘導するための簡便かつ効果的なホルモン処理法を提示した。また、雄の精子運動を最大に活性化し、高い受精率が得られる精液の希釈

法が示された。これらの結果は *C. macrocephalus* の効率的種苗生産を可能とし、フィリピンにおける本種の増養殖に大きく貢献したものと高く評価され、本論文が博士（水産学）の学位請求論文として相当の業績があると認定した。