

学 位 論 文 題 名

Studies on artificial propagation
and sex control in sturgeon

（チョウザメの人為繁殖および性統御に関する研究）

学位論文内容の要旨

チョウザメ類は経済価値の高い魚種であり、特に卵巣はキャビアと称され珍重されている。日本は世界第一位のキャビア輸入国で、1995 年には、キャビアとその代用品を合計 12,639t 輸入している。本グループは硬骨魚類の中では極めて原始的な一群である軟質上目（Chondrostei）に属し、分類学的にも貴重であるが、成熟に長期間を要し、人為的な環境改変が著しい大きな河川に依存して生息していることから、天然資源が激減している。1998 年からは全種がワシントン条約の規制対象となり、資源保護および養殖技術の開発が世界各国で進められている。日本においては、北海道の石狩川や天塩川にて約 100 年前までチョウザメ漁が行われていた記録があるが、近年、在来種は絶滅状態にある。一方、旧ソ連で養殖用に交配された、オオチョウザメ（*Huso huso*）の雌とコチョウザメ（*Acipenser ruthenus*）の雄の雑種ベステルが国内に導入されて以来、成長および成熟が比較的早い本種が新たな養殖対象種として注目されている。

チョウザメ類は飼育環境下では排卵しないことから、人為繁殖はホルモン投与による排卵誘発に依存している。そのため、ホルモン投与に適した親魚の選抜技術が重要とされ、その指標の一つとして生体外培養による卵成熟能の評価が有効とされてきた。しかし、殆どの研究は河川に産卵遡上した天然魚を対象としており、魚体が大きく成熟に長期間を要するチョウザメ類においては、飼育個体を対象とした研究事例は乏しい。成熟度の判定は、飼育魚の方が天然魚に比べて困難なうえ、ホルモン投与に供した親魚の成熟度が

その後の孵化率等にも影響すると考えられることから、より精度の高い成熟度評価手法の確立が要求されている。さらに水産養殖分野においては、キャビアの効率的生産を目的とした全雌種苗生産技術の確立が期待されている。そこで本研究では、チョウザメ類の効率的な人為繁殖技術と性統御技術の確立を目的として以下の実験を行った。

はじめに、日本における天然個体群の自然繁殖および人為繁殖の可能性を明らかにすることを目的として、北海道で稀に漁獲されるチョウザメ類に関して生殖腺の発達度を調査した。その結果、ダウリアチョウザメ (*H. dauricus*) とミカドチョウザメ (*A. mikadoi*) の他に、これまで日本において報告例が無いアムールチョウザメ (*A. schrenckii*) およびダウリアチョウザメとアムールチョウザメの雑種が北日本沿岸を回遊していることが確認された。しかし、河川における成熟個体および稚魚の捕獲例が皆無だったことから、かつて石狩川や天塩川で産卵したとされるミカドチョウザメの日本の産卵群は絶滅したと考えられた。一方、沿岸で漁獲されたミカドチョウザメを淡水に馴致して長期間飼育した結果、雌1尾が成熟したことから、漁獲個体の飼育による本種の人為繁殖の可能性が示された。

次に、排卵誘発に適した雌親魚の効率的な選抜技術を確立することを目的として、生体外培養による卵成熟能の評価を試みた。天然個体が入手困難なことから、以下の実験は全てベステルを用いた。ホルモン投与の前にバイオブシーにより摘出した卵母細胞を 17α -ヒドロキシプロゲステロン $0.1\ \mu\text{g/ml}$ 存在下で 40 時間培養し、卵核胞の崩壊 (GVBD) を観察した。その結果、GVBD が高い割合で観察される個体ほど、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン投与後の排卵までに要する時間が短く、排卵された卵の孵化率も高い傾向が認められた。従って、卵成熟能を指標とした成熟度評価は、ホルモン投与による排卵誘発の成功率を高めるだけでなく、排卵される卵の質を予測するにも有効であることが初めて示され、人為繁殖の際に高い孵化率を実現させることが可能となった。

さらに、人為繁殖により得られた稚魚の生殖腺の性分化過程を組織学的に観察し、生殖細胞の減数分裂への移行は孵化後 16 ヶ月まで確認できない

ものの、孵化後 6 ヶ月以降の個体では生殖腺表面の一部に見られる陥入部の有無により 2 型に分けられることを示した。この陥入部は、卵巢薄板構造に発達することから、孵化後 6 ヶ月には生殖腺の卵巢への形態的分化が始まる個体が出現すると推定された。これらの結果を基に、エストラジオール- 17β (E_2) および 17α -メチルテストステロン(MT)の経口投与が性分化に及ぼす影響を調べた。第 1 実験では、孵化後 14~31 ヶ月のベステル F_2 に、 E_2 および MT をそれぞれ 10 および 25 $\mu\text{g/g-diet}$ の濃度で投与したが、MT 投与群の性比に大きな偏りはなく、 E_2 投与群は殆どが雌に分化したものの、生残率が低く、約半数の個体は卵巢特有の薄板構造が観察されなかった。そこで、第 2 実験ではホルモンの投与期間および濃度を、それぞれ孵化後 6~18 ヶ月および 1 $\mu\text{g/g-diet}$ に変えたところ、 E_2 投与群の 97%が雌に、MT 投与群の 93%が雄に分化した。以上の結果から、チョウザメにおいても、適切な時期に適切な濃度で性ホルモンを投与することにより、性転換が誘導されることが示された。また、魚体が大きいことにより性分化期においても採血が可能なことから、内分泌攪乱物質関連の実験動物としてもチョウザメは有用と推察された。

最後に、性統御や性決定機構の解明に有効な染色体操作をベステルへ応用できるか検証するため、3 倍体および雌性発生 2 倍体の作出を試み、染色体操作個体の孵化率、生殖腺の発達および性比を調べた。その結果、他魚種と同様に紫外線照射により精子を遺伝的に不活性化できることが分かったが、照射量が同一であっても採精に用いた雄親魚により孵化率には大きな差が認められた。また、 15°C で管理された受精 15~20 分後の卵を、3 分間 34°C の温度ショックにより倍数化できることが分かった。対照群の孵化率が低い卵を用いた実験では、倍数化処理群の孵化率は非常に低く、対照群の中に僅かながら自然発生的な 3 倍体が確認された。さらに 3 年魚の卵巢を組織学的に観察した結果、対照 2 倍体と雌性発生 2 倍体では周辺仁期の卵母細胞が多数確認されたのに対して、3 倍体の卵形成は対合期以前の状態で遅滞したことから、3 倍体は不妊性を示すものと推察された。一方、性

比については、雌の割合が対照 2 倍体では 40.0～55.0%であったのに対して、3 倍体は 60.0～73.7%、雌性発生 2 倍体は 70.0～80.0%の割合で雌に偏った。従って、雌ヘテロ型 (ZW♀-ZZ♂) の性決定機構を持つと推察され、チョウザメにおいては、1 代の染色体操作のみでは全雌生産は不可能と考えられた。逆に、ミカドチョウザメの卵に遺伝的に不活性化したベステルの精子を受精させ、雌性発生 2 倍体を誘起することにより、雌雄のミカドチョウザメの次世代が得られることが示された。即ち、染色体操作の応用による、絶滅の危機に瀕した種の保存を目的とした人為繁殖（復活）の可能性が示唆された。

以上、チョウザメの人為繁殖および性統御に有用な技術を確立した。本研究の結果は、チョウザメ類の資源保護および増養殖の両面において、多大に貢献できるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	原	彰彦
副査	教授	荒井	克俊
副査	助教授	足立	伸次

学位論文題名

Studies on artificial propagation and sex control in sturgeon

(チョウザメの人為繁殖および性統御に関する研究)

チョウザメ類は経済価値の高い魚種であるが、成熟に長期間を要し、人為的な環境改変が著しい大きな河川に依存して生息していることから、天然資源が激減しており、資源保護および養殖技術の開発が世界各国で進められている。日本においては、近年、在来種は絶滅状態にある。一方、旧ソ連産のオオチョウザメの雌とコチョウザメの雄の雑種ベステルが国内に導入されて以来、成長および成熟が比較的早い本種が新たな養殖対象種として注目されている。

チョウザメ類は飼育環境下では排卵しないことから、人為繁殖はホルモン投与による排卵誘発に依存している。そのため、ホルモン投与に適した親魚の選抜技術が重要とされるが、殆どの研究は河川に産卵遡上した天然魚を対象としており、飼育個体を対象とした研究事例は乏しいことから、より精度の高い成熟度評価手法の確立が要求されている。さらに養殖分野においては、キャビアの効率的生産を目的とした全雌種苗生産技術の確立が期待されている。そこで本研究では、チョウザメ類の効率的な人為繁殖および性統御技術に関する研究を行った。

はじめに、日本における天然個体群の自然繁殖および人為繁殖の可能性を明らかにすることを目的として、北海道で稀に漁獲されるチョウザメ類に関して生殖腺の発達度を調査した。その結果、ダウリアチョウザメとミカドチョウザメの他に、これまで日本において報告例が無いアムールチョウザメおよびダウリアチョウザメとアムールチョウザメの雑種が北日本沿岸を回遊していることが確認された。しかし、河川における成熟個体および若齢個体の捕獲例が皆無だったことから、かつて北海道の石狩川等で産卵したとされる、ミカドチョウザメの日本の産卵群は絶滅したと考えられた。一方、沿岸で漁獲されたミカドチョウザメを長期間飼育した結果、雌 1 尾が成熟したことから、漁獲個体の飼育による人為繁殖の可能性が示された。

次に、排卵誘発に適した雌親魚の効率的な選抜技術を確立することを目的として、生体外培養による卵成熟能の評価を試みた。以下の実験は全てベステルを用いた。

ホルモン投与の前にバイオプシーにより摘出した卵母細胞を 17α -ヒドロキシプロゲステロン $0.1 \mu\text{g/ml}$ 存在下で 40 時間培養し、卵核胞の崩壊 (GVBD) を観察した。その結果、GVBD が高い割合で観察される個体ほど、排卵された卵の孵化率も高い傾向が認められた。従って、卵成熟能を指標とした成熟度評価は、ホルモン投与による排卵誘発の成功率を高めるだけでなく、排卵される卵質の予測にも有効であると示唆された。

さらに、稚魚の生殖腺の性分化過程を組織学的に観察し、生殖細胞の減数分裂への移行は孵化後 16 ヶ月まで確認できないものの、孵化後 6 ヶ月以降の個体では生殖腺表面の一部に見られる陥入部の有無により 2 型に分けられることを示した。この陥入部は、卵巢薄板構造に発達することから、孵化後 6 ヶ月には卵巢への形態的分化が始まる個体が出現すると推定された。これらの結果を基に、エストラジオール- 17β (E_2) および 17α -メチルテストステロン(MT)の経口投与が性分化に及ぼす影響を調べた。第 1 実験では、孵化後 14~31 ヶ月の稚魚に、 E_2 および MT をそれぞれ 10 および $25 \mu\text{g/g-diet}$ の濃度で投与したが、MT 投与群の性比に大きな偏りはなく、 E_2 投与群は殆どが雌に分化したものの、生残率が低く、約半数の個体は卵巢特有の薄板構造が観察されなかった。そこで、第 2 実験ではホルモンの投与期間および濃度を、それぞれ孵化後 3~18 ヶ月および $1 \mu\text{g/g-diet}$ に変えたところ、 E_2 投与群の 97%が雌に、MT 投与群の 93%が雄に分化した。以上の結果から、チョウザメにおいても、適切な時期に適切な濃度で性ホルモンを投与することにより、性転換が誘導されることが示された。

最後に、3 倍体および雌性発生 2 倍体の作出を試み、染色体操作個体の孵化率、生殖腺の発達および性比を調べた。その結果、他魚種と同様に紫外線照射により精子を遺伝的に不活性化できること、 15°C で管理された受精 15~20 分後の卵を、3 分間 34°C の温度ショックにより倍数化できることが分かった。さらに 3 年魚の卵巢を組織学的に観察した結果、対照 2 倍体と雌性発生 2 倍体では周辺仁期の卵母細胞が確認されたのに対して、3 倍体の卵形成は対合期以前の状態で遅滞したことから、3 倍体は不妊性を示すものと推察された。性比については、雌の割合が対照 2 倍体では 40.0~55.0%であったのに対して、3 倍体は 60.0~73.7%、雌性発生 2 倍体は 70.0~80.0%の割合で雌に偏った。従って、雌ヘテロ型 (ZW♀-ZZ♂) の性決定機構を持つと推察され、1 代の染色体操作のみでは全雌生産は不可能と考えられた。逆に、ミカドチョウザメの卵に遺伝的に不活性化したベステルの精子を受精させ、雌性発生 2 倍体を誘起することにより、雌雄のミカドチョウザメの次世代が得られることが示された。

上記のように、本研究では、チョウザメの人為繁殖および性統御に有用な技術を確立できた。これらの結果は、チョウザメ類の資源保護および増養殖の両面において、多大に貢献できるものとして高く評価され、本論文が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。