

# 海産魚の種苗生産効率化を目指した 精原細胞移植技術の利用

Biotechnological applications of spermatogonial cell transplantation  
in economically important marine teleosts

竹内 裕<sup>1</sup>・樋口健太郎<sup>2</sup>・吉崎 悟朗<sup>2</sup>

Yutaka TAKEUCHI, Kentaro HIGUCHI and Goro YOSHIKAZAKI

## Abstract

Recently, we induced masu salmon *Oncorhynchus masou* broodstock to produce eggs and sperm of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, and succeeded in producing pure trout offspring populations through fertilization using these eggs and sperm. This is the first experimental case in which healthy offspring individuals have been obtained by fertilization with eggs and sperm produced in parents of a different species. This technology has various promising applications. For example, the bluefin tuna *Thunnus orientalis* takes 3-5 years to reach sexual maturity, which is difficult to achieve in captivity. Moreover, the body weight of mature bluefin tuna can reach several hundred kilograms. As a result, seed production for this species is expensive in terms of time, cost, labor and space. However, if bluefin tuna spermatogonia could be transplanted into the mackerel *Scomber japonicus*, which is a closely related species that reaches maturity in just 1-2 years at a body weight of < 500g, bluefin tuna gametes might be more easily and rapidly produced, even in a small fish tank. In this article, we introduce new developmental biotechnology techniques using fish germ cell transplantation and suggest the benefit of using clean and cold deep seawater as rearing water for surrogated broodstock.

**Key Words:** spermatogonia, germ cell transplantation, surrogated broodstock, bluefin tuna

## 1. はじめに

現在までに多くの魚種の種苗生産技術が確立しているが、クロマグロ *Thunnus orientalis* やブリ *Seriola quinqueradiata*, ウナギ *Anguilla japonica* のように、産業レベルで完全養殖を行うには未だ多くの課題が残されている魚種も少なくない。特に、これらのいずれの魚種においても、良質の受精卵を安定供給する技術が発展途上である。例えば、クロマグロは親魚が大型であるため、海上のイケスで養成することが必須であり、成熟誘導のために環境制

御（水温や日長制御）を行うことは現実的に非常に困難である。また、ブリやウナギにおいては、受精卵の質の安定性に問題が残されており、親魚養成から成熟誘導技術のさらなる改善が望まれている。我々は、最近、サケ科魚類を用いて生殖細胞の異種間移植系を確立し、“ヤマメにニジマスの配偶子を生産させる技術（代理親魚養殖）”を開発した（図1）（Takeuchi *et al.*, 2004; Okutsu *et al.*, 2007）。これにより、ドナー種よりも小型かつ若齢で成熟する宿主種（＝代理親）を利用して、省スペースで効率的にドナー種の種苗を生産可能であることが示され

<sup>1</sup>東京海洋大学 先端科学技術研究センター（〒294-0308 千葉県館山市坂田 670 東京海洋大学 館山ステーション（坂田））

<sup>2</sup>東京海洋大学 海洋科学部 海洋生物資源学科（〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7）

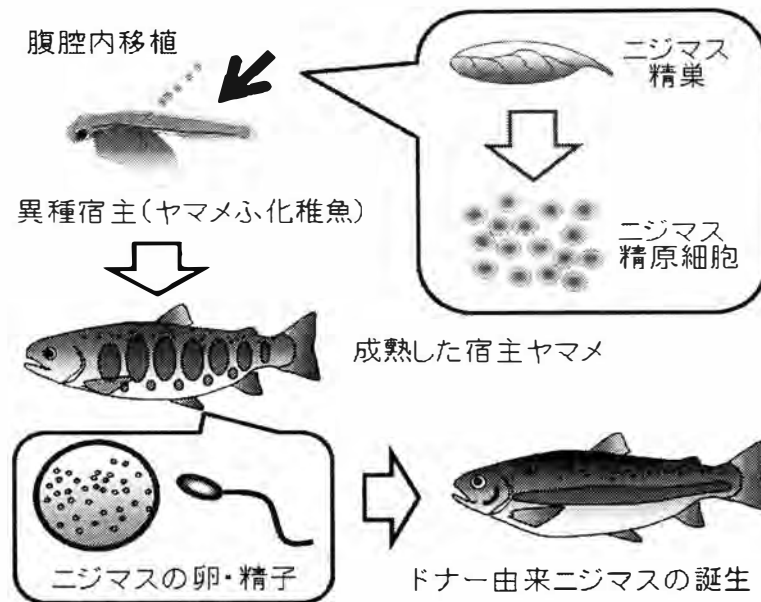


図1 サケ科魚類における精原細胞移植

た。本技術が、上述したような海産魚へ応用できれば、クロマグロを生むマサバ *Scomber japonicus*, ブリを生むマアジ *Trachurus japonicus*, ウナギを生むマアナゴ *Conger myriaster* などの生産も可能になると期待される。現在、我々は、マグロ類やブリ類など多くの水産上有用魚種と同タイプの分離浮遊卵を産卵する小型の海産魚としてニベ *Nibea mitsukurii* を用い、生殖細胞移植技術の開発を行っている。本稿では、海産魚における代理親魚養殖の確立に向けた戦略、現状および課題について概説する。

## 2. ドナー生殖細胞としての精巢細胞の利用

これまでの研究で、ニジマス精巢から単離した A 型細胞集団の中には、ヤマメ孵化稚魚の腹腔内へと移植された後に、宿主の生殖腺原基へ向かって自発的に移動し生着する能力を保持した細胞集団が存在することを見いだした (Okutsu *et al.*, 2006a; Yano *et al.*, 2008)。さらに、これらの細胞は宿主生殖腺内に生着後、増殖したのちに性的両能性を発揮して、宿主個体がオスのときは精子へ、メスのときは卵へと分化することも明らかとなっている (Okutsu *et al.*, 2006a)。また、宿主精巢内で生産

されたドナー由来精子数を測定したところ、ドナー精原細胞 1 個あたり平均 4000 万尾 (= 2 の 24 乗以上) の精子へと分化していた。通常のニジマス精子形成過程においては、A 型精原細胞 1 個あたり 512 尾 (= 2 の 9 乗) の精子しか生産しない (Loir, 1999)。したがって、宿主精巢内に生着したドナー精原細胞は、自己複製を行うことで新たなドナー由来 A 型精原細胞を生産したことが強く示唆された。以上の実験により、魚類の精巢内には自己複製能を有する生殖細胞、すなわち生殖幹細胞が存在することが証明され、これらの細胞をドナーに用いることが、宿主魚へ効率的にドナー由来配偶子を生産させるために必須であることが明らかとなった。しかし、これまでのところ、移植実験を行う前に生殖幹細胞を識別あるいは選択的に単離する方法は開発されていないため、移植に利用可能なドナー細胞を調整するためには、A 型精原細胞を多く含む精子形成開始以前の未熟な精巢を用いることが有効となる。ニジマスを用いた研究では、精巢細胞懸濁液中の A 型精原細胞の割合が 50% 以上になるように調整している (Okutsu *et al.*, 2006a)。海産魚の例では、精子形成を行っていない 3, 6, 16 ヶ月齢ニベの精巢を分散し、細胞懸濁液中の A 型精原細胞含有率を調査することで、3 ヶ月齢の精巢から A 型精原

細胞を24%と最も多く含む細胞懸濁液を調整し、これをドナー細胞として移植実験に用いている (Takeuchi *et al.*, 2009).

### 3. 海産仔稚魚への腹腔内細胞移植

魚類に限らず、動物の生殖腺原基は、初めは生殖細胞を持たない状態で形成される (Yoshizaki *et al.*, 2002). その後、別の部位で分化した始原生殖細胞が生殖腺原基へと移動し、そこに取り込まれて初めて生殖細胞と体細胞の両者を保持する完全な生殖腺原基が完成する。腹腔内に移植されたドナー生殖細胞も、一度腹膜上に接着したのち、内在性始原生殖細胞の移動ルート上を利用して宿主生殖腺へ到達すると考えられる (Takeuchi *et al.*, 2003; Okutsu *et al.*, 2006b). したがって、宿主体内において内在性始原生殖細胞が移動している時期を正確に把握し、腹腔内移植により始原生殖細胞の移動ルート上へドナー生殖細胞を生着させることが、移植成功のもう一つの鍵となる。そこで、海産仔稚魚を宿主として用いる際の移植適期を検討するため、組織学的な観察により始原生殖細胞移動期に該当した全長3, 4, 5, 6 mm のニベ仔魚を宿主に用い、顕微注入法による腹腔内細胞移植を行った (図2)。この結果、移植3週間後の宿主仔魚生残率は、移植時の全長が3, 4, 5, 6 mm のとき、それぞれ、3, 21, 39, 63%となった。また、生殖腺内にドナー細胞の生着が確認できた宿主個体の割合は、それぞれ50, 52, 10, 0%となった。さらに、宿主生殖腺内に生着したPKH26陽性細胞が生殖細胞マーカー (vasa) 陽性を示したことから、これらがドナー由来の生殖細胞であることを明らかにした。以上の結果、全長4 mm のニベ宿主を用いることで、生残率が比較的高くかつ高効率で宿主生殖腺にドナー生殖細胞を生着させることが可能となっている (Takeuchi *et al.*, 2009)。この結果は、これまでに代理親魚養殖に用いられてきたサケ科魚類に比較し、胚サイズが小さく、極めて未熟な状態でふ化する分離浮遊卵産型海産魚の仔稚魚に対しても精原細胞移植が応用できることを示している。

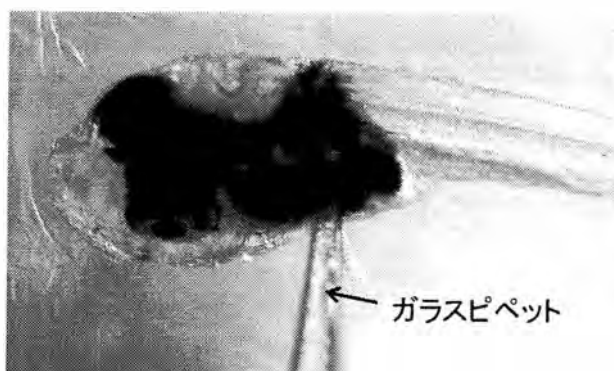


図2 ニベ仔魚 (全長4 mm) への腹腔内細胞移植

### 4. 終わりに

今後の最大の課題は、宿主生殖腺内でドナー生殖細胞に由来する機能的な配偶子が生産されているかを確認することである。そのため、分子生物学的指標を用いて、ニベ宿主生殖細胞との判別が可能かあるいはオオニベ *Argyrosomus japonicus* の精原細胞をドナーとして用いた異種間精原細胞移植を行っている。実際に、サケ科魚類における異種間精原細胞移植では、ドナー種と宿主種の各々の *vasa* 遺伝子内に存在する種特異的な遺伝子配列に対してPCRプライマーを設計し、宿主の精子ゲノムDNAを鋳型としたPCR反応を行い、宿主イワナ *Salvelinus leucomaenis* の精液中にドナー由来ニジマスの精子が生産されていることを確認している (奥津ら, 2008)。さらに、宿主生殖腺内においてドナー由来配偶子が生産される割合を向上させる方法として、3倍体処理により不妊化した宿主を用いる技術が開発されている。実際には、3倍体ヤマメを宿主に用い、2倍体ニジマス精原細胞をドナーとして移植を行ったとき、成熟した3倍体ヤマメはニジマス配偶子のみを生産することを確認している (Okutsu *et al.*, 2007)。海産魚においても、ニベを用いた3倍体作出条件の検討を行っており、その宿主としての利用が期待される。

本技術の産業面での利用を考えた際に期待されることは、種苗生産が極めて困難な魚種において人工種苗生産を可能にすることのみならず、その周年供給をも可能にすることにある。すなわち、代理親魚

技術によって作出した宿主魚（例：クロマグロ精原細胞を移植したマサバ）の体内では、宿主種（マサバ）の内分泌系支配によりドナー種（クロマグロ）由来の配偶子が生産されるため、陸上水槽内で宿主魚の成熟に適した環境を提供することで、目的の種苗を周年採卵することが可能になると期待される。しかしながら、クロマグロに比較してマサバは小型ではあるものの、その親魚養成には3~10 kLの水槽が必要であり、夏場の高水温期には産卵が停止する（山本, 2005）。このような規模の水槽を冷却することは技術的かつコスト的に困難であるが、低温性の海洋深層水を組み合わせることで、夏の高温で産卵が停止するマサバの産卵期を延長させ、クロマグロ受精卵を長期間供給することが可能になるかもしれない。既に、ハタハタ *Arctoscopus japonicus* では、海洋深層水を用いた水温制御によって、天然よりも2ヶ月早い時期に種苗生産が可能であることが示されている（森岡・堀田, 2005）。海産魚養殖では、一般に、夏場の高水温期にはイリドウイルス病などの疾病が発生しやすく、養殖業者は、この時期を避けて種苗を沖出しして池入れする、あるいは、疾病に罹りにくい体サイズにまで達した種苗を導入するなどの対策をとっている。その一方で、種苗業者は、種苗を長期間飼育しなくてはならない、あるいは、天然の産卵期よりも早期に種苗生産を開始しなくてはならないため、経済的・精神的負担となっている。したがって、代理親魚技術と海洋深層水を組み合わせることで、目的の時期に目的の大きさの種苗を計画的に生産することが可能となろう。その他にも、ウイルス・病原菌を持たないことを確認済みの代理親を清浄性の高い海洋深層水を利用した閉鎖循環水槽で親魚養成することで、ウイルス・病原菌フリーの種苗を生産することなども考えられ、種苗生産業界へ大きく貢献する新たな展開が期待される。

## 謝 辞

本研究の執行にあたり有益なご助言とご協力を頂きました。東京海洋大学水圏科学フィールド教育

研究センター館山ステーション（坂田）須之部友基准教授、技術職員 益子正和氏、石川尚仙氏、技術補佐員 宇部静氏、林修子氏、早川美香氏に深く感謝いたします。

## 文 献

- Loir M. (1999) Spermatogonia of rainbow trout: I. Morphological characterization, mitotic activity, and survival in primary cultures of testicular cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 422-433.
- 森岡泰三・堀田和夫 (2005) 海洋深層水を用いて飼育したハタハタ *Arctoscopus japonicus* 親魚の産卵とふ化制御. *海深研*, 6, 19-29.
- Okutsu T., K. Suzuki, Y. Takeuchi, T. Takeuchi and G. Yoshizaki (2006a) Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 2725-2729.
- Okutsu T., A. Yano, K. Nagasawa, S. Shikina, T. Kobayashi, Y. Takeuchi and G. Yoshizaki (2006b) Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation. *J. Reprod. Dev.*, 52, 685-693.
- Okutsu, T., S. Shikina, M. Kanno, Y. Takeuchi and G. Yoshizaki (2007) Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, 317, 1517.
- 奥津智之・小林輝正・竹内 裕・吉崎悟朗 (2008) 異種間生殖細胞移植実験における *vasa* 遺伝子の種特異的プライマーを利用したドナー由来生殖細胞および精子の検出法. *水産育種*, 37, 29-36.
- Takeuchi Y., G. Yoshizaki and T. Takeuchi (2003) Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.*, 69, 1142-1149.
- Takeuchi, Y., G. Yoshizaki and T. Takeuchi (2004) Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, 430, 629-630.
- Takeuchi, Y., K. Higuchi, T. Yatabe, M. Miwa and G. Yoshizaki (2009) Establishment of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*). *Biol. Reprod.*, published Jul 15 2009; PMID: 19605788.
- Yano, A., K. Suzuki and G. Yoshizaki (2008) Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout *vasa* regulatory regions. *Biol. Reprod.*, 78, 151-158.
- 山本眞司 (2005) マサバ. *水産増養殖システム1海水魚*

(熊井英水), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 291-310.  
Yoshizaki, G., Y. Takeuchi, T. Kobayashi, S. Ihara and  
T. Takeuchi (2002) Primordial germ cells: the blue

print for a piscine life. *Fish Physiol. Biochem.*, 26,  
3-12.

(2009年5月29日受付; 2009年6月22日受理)