

多獲性浮魚類の再生産研究高度化に向けての生殖生理学的手法の適用

松山 倫也*

Application of Reproductive Physiology to the Advanced Study of Stock Productivity of Small Pelagic Fishes

Michiya MATSUYAMA*

Abstract Although research on small pelagic fish resources, such as sardine, jack mackerel, and chub mackerel, has been ongoing over the last century, the process of stock productivity is not sufficiently clear. To clarify the mechanism of biomass fluctuation for assessing and managing the stock of resource fishes, it is essential to understand the changes in biological factors or resource characteristics that accompany biomass fluctuations throughout the life cycle of the fish. Models of biomass fluctuation mechanisms, recruitment assessment, and acceptable biological catch (ABC) are affected by the accuracy of the different parameters used in these models. In other words, obtaining accurate information on the biological parameters of a resource species can provide effective criteria for resource management or rules for fishery effort management. Reproductive parameters are an essential element in the egg and larval production models used to estimate fish biomass, and are routinely obtained in wide-ranging surveys by research vessels independent of commercial fisheries. Unfortunately, the parameters obtained from a survey sample do not necessarily reflect the actual biological information for the target species due to the potential for bias in the survey techniques used.

Recent advances in the knowledge of reproductive physiology and techniques for seed production in finfish have made it possible to breed and raise small pelagic fish in captivity. Experiments conducted in the laboratory have the advantage of greater reproducibility, and the information obtained can generally be accepted within the given conditions. Combining survey data with experimental analyses should help to clarify the actual reproductive and spawning biology of wild stocks. In this review, I assess the validity of biological parameters obtained from captive experiments using chub mackerel as a model species, and discuss its application to other resource fish species.

Key words: small pelagic fish, resource management, biological parameter, reproductive physiology, captive stock, chub mackerel

はじめに

イワシ、アジ、サバ類などの多獲性小型浮魚類の資源変動機構の解明ならびに資源評価と管理は水産資源

学上の極めて大きな課題であり、そのためには、資源変動に伴う生活史全体を通じた生態あるいは資源生物学的特性の変化の把握が必要である。しかし、それら小型浮魚類に関する資源生物学的研究の歴史は100年に

2006年1月6日受理 (Accepted on January 6, 2006)

* 九州大学大学院農学研究院海洋生物学研究分野 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 (Laboratory of Marine Biology, Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581, Japan)

も及ぶが、未だ天然での再生産過程については、必ずしも良く分かっていない。魚類資源における個体群変動メカニズム、加入量予測、あるいは許容漁獲量などにおける精度の高いモデルの確立は、そのモデルを構築する各種パラメーターの精度に依存する。すなわち、正確な生物情報に基づいて初めて有効な資源管理基準や漁獲制御ルール作成が可能となる。繁殖に関する各種パラメーターも、卵稚仔調査から産卵親魚量を推定するモデルにおいては必須の情報で、一般に漁業から独立した調査船調査により得られている。しかし、野外調査より得られる情報は、調査法、採集法の制限からくるバイアスにより、対象種の正確な生物情報を必ずしも反映しているとは言い難い。

一方で、近年の種苗生産に関する理論と技術の発展により、小型浮魚類も飼育下で産卵させることができるようになってきた。飼育実験の有利さはその再現性の高さであり、得られた情報は設定された実験条件内において一般則となりえる。すなわち、野外調査の解析結果と飼育実験結果との摺り合わせによる仮説と検証のフィードバックを通じて、天然群の繁殖生態の実態が少しずつ明らかになってきた。ここでは一例としてマサバを取り上げ、飼育実験より得られる情報の有効性を生殖生理学的観点から紹介するとともに、他魚種への応用に関する情報も提供したい。

1. 飼育環境下での生殖障害

魚類の配偶子形成は、他の脊椎動物と同様に、脳-脳下垂体-生殖腺系で産生される各種ホルモンにより調節されて進行する。脳で統合された種々の環境情報および生理的情報は、間脳視床下部で産生される生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) などの神経ホルモンを介して脳下垂体へと伝えられ、脳下垂体では脳からの神経情報を生殖腺刺激ホルモン (GtH) として液性情報に変換して生殖腺へと伝達する。生殖腺では GtH の作用により、卵濾胞細胞やライデッヒ細胞などの体細胞で各種性ステロイドホルモンが合成され、これらの性ステロイドホルモンが雌雄配偶子の成長、成熟を調節する。マサバの雄では飼育環境においても精巣は成熟し、運動能を持つ多量の精子を生産できるが、雌では卵黄形成は進行するものの卵の成熟が起らない。これは、飼育下の雄では、脳 (Brain) - 脳下垂体 (Pituitary) - 生殖腺 (Gonad) における内分泌軸 (BPG axis) の情報伝達が滞りなく進行するのに対し、雌では卵が成熟するために必要なステロイドホルモン (卵成熟誘起ホルモン, MIH) の合成を促す GtH のサージ (一過性の大量分泌) が起らないことに因る。し

たがって、雌では排卵とそれに続く産卵も起らない。

近年、魚類においても他の脊椎動物と同様、2種類の GtH、即ち濾胞刺激ホルモン (FSH) および黄体形成ホルモン (LH) が存在することが明らかにされ、これまでに、サケ科魚類、コイ、マダイ、カツオ、メバチ、マミチヨグなどにおいてタンパク質レベルで2種類の GtH が単離されている。魚類における GtH の生理作用、特に FSH の機能についてはほとんど解明されていないのが現状であるが、サケ科魚やマダイでは、少なくとも卵の成熟促進に関与するのは LH であることがわかっている。また、マサバを含め、飼育下で卵黄形成は進行するものの成熟が起らない多くの魚種に対して、LH 様作用のあるヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (HCG) の投与により成熟が誘導されることから、多くの魚種では卵の成熟には LH が関与していることが推定される。

魚類の卵形成過程において主な役割を果たす性ステロイドホルモンは、卵黄形成促進のためのエストラジオール-17 (E2) と、卵成熟時に MIH として生成、作用するプロゲステロンである (松山と太田, 2000)。濾胞細胞で作られた E2 は肝臓に達し、肝細胞で卵黄の前駆タンパク質であるピテロゲニンの合成を促進する。ピテロゲニンは血流を通過して卵巣に達し、飲作用 (pinocytosis) により卵細胞内に取り込まれ卵黄タンパク質として蓄積される (松原, 2000)。

卵黄蓄積が終了したマサバ親魚に HCG を投与すると、各種ステロイド合成系代謝酵素活性の改変が起り、これまで E2 を合成していた濾胞細胞は MIH の合成を開始する。マサバの MIH はこれまで複数の魚種で同定された MIH と同じ 17,20 -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (17,20 -P) であった (Matsuyama *et al.*, 2005)。GtH は濾胞細胞における MIH の合成促進の他、卵細胞に作用して、卵細胞膜表面に MIH 受容体を形成させる作用をもつ。MIH 受容体は卵細胞膜上に局在するステロイドホルモン受容体で、MIH と結合することにより細胞内情報伝達系を介してその卵成熟誘起作用を発現する。

マサバ雌親魚に合成 GnRH (GnRH_a) を投与すると成熟、産卵が起る (後述) ので、飼育環境下でも脳下垂体内には十分量の GtH が合成されていることがわかる。したがって、GtH の放出は主に GnRH により制御されているので、飼育環境下のマサバ雌においては、脳により統合される環境情報が産卵環境として不適切と判断されたため、GnRH-GtH 間の情報の流れが停止しているものと考えられる。我々の飼育実験では、魚体を取り扱い易い 1 ~ 3 トン水槽を用い、そこに 20 ~ 30 尾程度収容して自然日長・水温で飼育するが、このような条件では通常雌の成熟は起らない。しかし、

飼育環境に長期間馴致させ、大型水槽で飼育すると、マサバは水槽内でも自然産卵を行う。最近村田ら(2005)は、受精卵から育てた3歳マサバ親魚の雌雄各50尾を50トン水槽に収容し、自然水温、12L12Dの日長条件下で2ヵ月にわたる自然産卵を報告した。これは、供試魚が飼育環境に慣れておりストレスが少なかったことに加え、マサバの産卵環境としてある程度の遊泳できる広さが必要であることを示している。したがって、成熟を停止させている環境因子がわかり、そのような環境因子を排除した条件で飼育すれば、マサバに限らずマアジやマイワシでも(あるいは他の魚種でも)、飼育下で自然産卵を誘導することは十分期待できる。

2. 卵成熟, 排卵のタイムコース

多くの魚類は産卵期をもち(生殖年周期), 産卵期中で繰り返し産卵を行う多回産卵魚では排卵(産卵)周期をもち。なお、排卵とは成熟した卵が濾胞細胞層から卵巣腔あるいは体腔に離脱する現象を示し、産卵とは排卵された卵が体外に受精のために産み出されることをいう。卵母細胞の卵黄形成から卵成熟, 排卵に至り産卵が繰り返される排卵(産卵)周期は種独自のもので、卵成熟, 排卵および産卵のタイムコースや時刻も魚種毎に異なっている。特に、卵成熟, 排卵および産卵のタイムコースは、資源対象種の産卵生態を反映するような野外調査法を構築する上で重要な情報となる。

マサバをモデルとして、その成熟, 排卵のタイムコースを明らかにする目的で、卵黄形成が終了している5

月上旬に、海面網生け簀で約半年間飼育された250尾の親魚(体重420~530g, 尾叉長280~330mm)を用い、以下の実験を行った(Shiraishi *et al.*, 2005)。麻酔した親魚の体各部を測定したのち、内径2mmのポリエチレン製カニューラを総排泄腔から卵巣に挿入し、卵細胞を採取した(Fig. 1a)。この時期の雄は腹部を軽くマッサージすると精液を排出するため簡単に識別できる。採取した卵細胞は少量の生理食塩水およびSera液に入れた。Sera液によって細胞質は透明化され、核を外から容易に観察できる(Fig. 2)。生理食塩水中の卵細胞のうち、大型卵20個の直径を測定するとともに、Sera液中の大型卵の核の有無を確認した。これは、卵の退行過程に入るとその形態的指標として核膜の消失が先行して起こるため、退行卵を持つ個体を識別するためである。このようにして、卵径600 μ m以上(それ以下であれば、卵黄形成が不十分)で、正常に発達している(卵の退行が始まっていない)卵をもつ雌親魚92尾が選別された。10尾を採集した後、残りの親魚の背筋部にHCG(500 IU/kg BW)を注射投与し(Fig. 1b)、投与後12, 18, 24, 30, 36, 42, および48時間目に9~13尾を取り上げた。この実験期間の水温は19~20 $^{\circ}$ Cであった。

HCG投与後12~24時間で卵細胞にMIH受容体が形成(MC)され、核の移動(GVM)は18~24時間で起こった(Fig. 3)。MIH受容体の形成は、核を取り囲むように配列する複数の大型油球の形成で判断でき、このような形態的特徴をもつ卵をマサバのMIHである17,20 β -Pとともに*in vitro*で培養すると、成熟し、吸

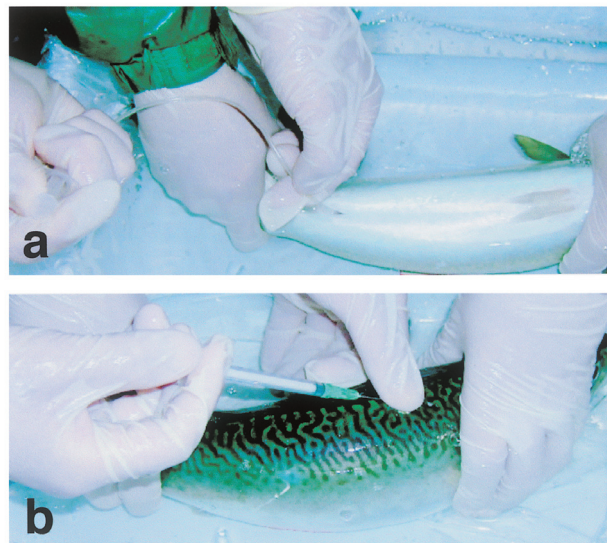


Fig. 1. Egg sampling by using a flexible catheter (a) and HCG injection to the dorsal muscle of the chub mackerel (b).

水、透明化が起こる (Matsuyama *et al.*, 2005)。核膜の消失 (卵核崩壊, GVBD) した個体は24時間目に出現し、30時間では全ての個体が吸水卵 (HY) を持っていた。36時間では全ての個体で排卵が起こっていた。同様の実験は、3年間にわたり数回行われたが、18~24時間で核移動、24時間でGVBD、30時間で吸水、36時間では排卵後、というタイムコースは同じで、きわめて再現性の高い実験系であることが確認された。このように、予め卵黄形成が不十分な個体あるいは逆行卵を持つ個体を除外し、適切な親魚のみを用いることにより、全ての供試魚を同調させて成熟、排卵させることができる。

この実験では雌のみを収容しているため、排卵しても産卵は行われない。HCG投与後、排卵は30~36時間

間に起こるので、36、42および48時間目に採集された個体は排卵後0~6、6~12および12~18時間に相当する。それらの個体から卵巣腔内に排卵された卵を搾出し、雄から採取した精液を用いて人工授精を行った。その結果、排卵直後 (0~6時間) の卵は高い受精率を示したが、排卵後の時間経過に伴い受精率は急激に減少し、排卵後12~18時間の卵では10.5%となった (Fig. 4)。これは、卵巣腔内での滞留時間の延長に伴い卵質が低下する「排卵後過熟」と呼ばれる現象で、トラフグ (中田ら, 1998) やブリ (中田ら, 2001) など養殖対象種でこれまでいくつか報告されている。排卵後過熟による卵質低下の細胞機構は現在のところ全く不明であるが、最近、ゼブラフィッシュをモデルとした実験から、第2減数分裂中期にある排卵卵の紡錘

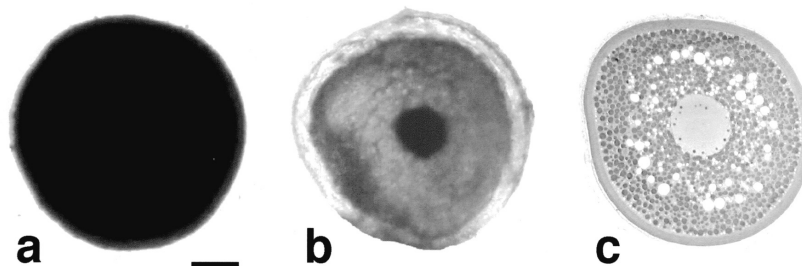


Fig. 2. Photomicrographs of fully-grown oocytes at late yolk stage of the chub mackerel. Figure a and b show the fresh oocyte preserved in Ringer's solution and fixed oocyte with clearing solution (Sera solution), respectively. Figure c shows the histological section. Scale bar = 100 μ m.

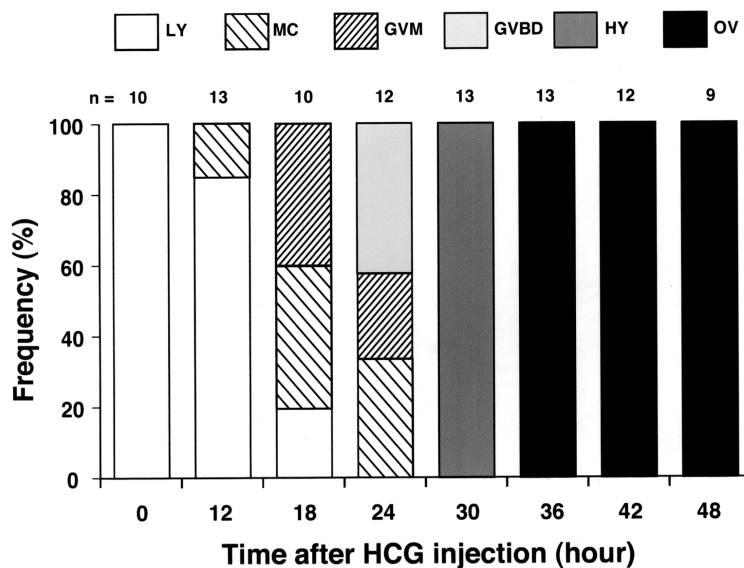


Fig. 3. Changes in developmental stages of the chub mackerel ovary after injection of human chorionic gonadotropin. Numbers over each column indicate sample size. LY, late yolk stage; MC, maturational competence stage; GVM, germinal vesicle migration stage; GVBD, germinal vesicle breakdown stage; HY, hydration stage; OV, ovulation stage.

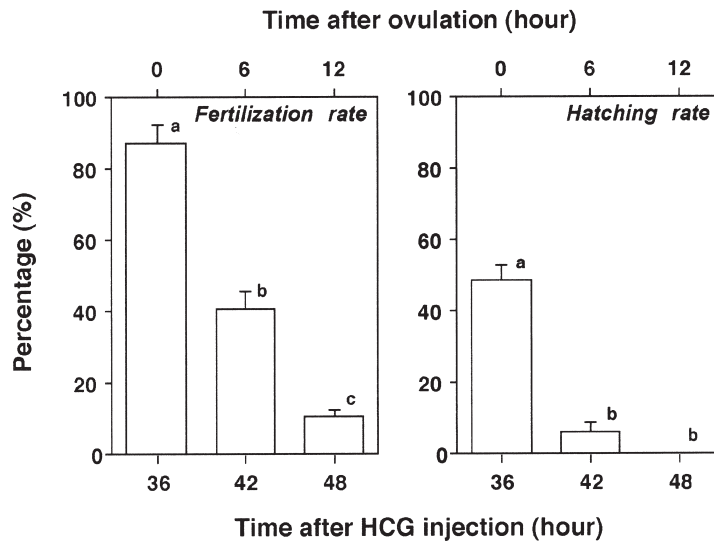


Fig. 4. Fertilization rates and hatching rates in the artificial insemination of ovulated eggs of chub mackerel at different times after ovulation. Different letters represent statistically different values ($P < 0.05$).

体を形成する紡錘系の異常化による、受精後の減数分裂の進行阻害が一要因であることが指摘されている(古屋ら, 2005)。いずれにしても、マサバで確認された排卵後過熟現象は、“マサバの産卵は排卵に引き続いて直ちに行われる”ことを意味している。ちなみに、GVBDからさらに短い時間間隔を設定して採集を行ったその後の実験から、排卵はHCG投与後、33時間前後に集中して起こることが明らかとなった(白石ら, 2004)。

3. 産卵時刻

以上の実験より、GtHの刺激があってからマサバの卵は30時間までに成熟して吸水卵となり、36時間までに排卵が起こり、排卵に引き続き産卵が起こることが明らかとなった。飼育実験で明らかにされた情報に基づき天然群の産卵生態を推定する場合、HCGで誘導したマサバの成熟、排卵のタイムコースが天然群のものと同様であるか、ということが問題になる。我々は、親魚の麻酔その他の作業手順の都合から、通常14:00頃にHCGを投与しており、その場合、排卵は約33時間後の23:00頃に集中して起こる。一方、伊豆諸島近海産マサバの産卵群を経時的に採集した調査(Yamada *et al.*, 1998)では、マサバの産卵は22:00~24:00に集中して起こることが報告されている。“マサバの産卵は排卵に引き続いて直ちに行われる”ので、飼育実験の排卵時刻と天然群の産卵時刻(すなわち排卵時刻)とが偶然にも一致していたことになる。そこで、次にHCGの投与を12時間ずらして02:00に投与する実験を行った。そ

の結果、排卵は11:00を中心とした30~36時間前後に起こった。さらに、脳下垂体中にもつマサバ自身のGtHで卵成熟を起こさせるために、GnRHa (Des-Gly¹⁰-[D-Ala⁶]-LHRH ethylamide, 400 μ g/kg BW)を14:00と02:00に投与した。その結果、排卵はいずれもGnRHa投与後、約35時間後に起こった(白石ら, 2004)。以上の結果は、1) GtHの刺激が起こった場合、その時刻に関係なく卵成熟は進行し、排卵は約33時間後に起こる、2) HCGによる卵の成熟、排卵のタイムコースはマサバ本来のGtHによるものとほぼ同じである、ことを意味している。さらに、天然群での産卵は一定の時間帯に集中して行われるので、3) 天然群の雌では、卵成熟のためのGtHの放出は同じ時間帯に起こり、その後の成熟、排卵も同調して進行する、ことが推定される。以上の結論に基づき、天然群で想定される成熟、産卵のシナリオをFig. 5に示した。

すなわち、卵黄形成が終了した雌では正午前後に脳下垂体からGtHが放出され、それにより、翌日の夜間22:00~24:00に産卵が行われるが、その間、翌日の午前中を中心に核移動期、午後から日没にかけてGVBDと吸水が進行し、20:00頃から排卵が始まる。この推定シナリオがどの程度正しいかは、昼間における効率的採集法の検討も含めて今後の詳細な野外調査を待たねばならない。

4. 排卵後濾胞

現在、漁獲統計に基づくABC(生物学的漁獲許容量)

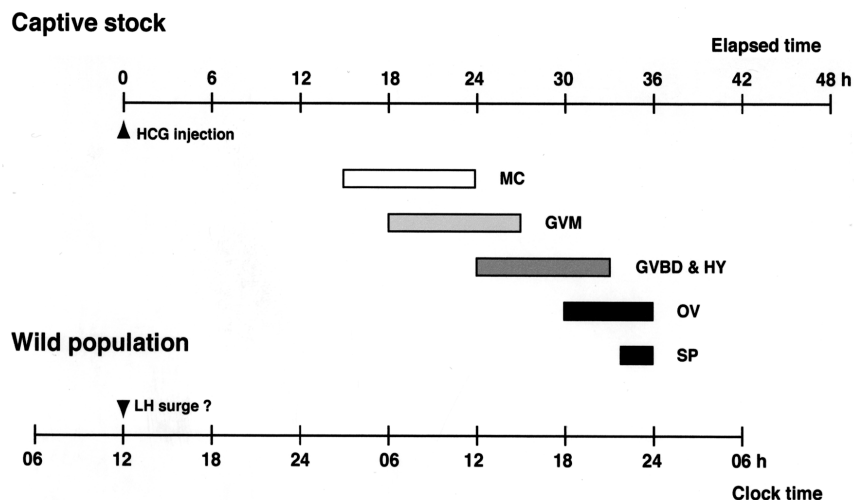


Fig. 5. Time course of the maturational process of chub mackerel oocytes after human chorionic gonadotropin (HCG) injection and the assumed scenario of maturational process in the wild population. MC, maturational competence; GVM, germinal vesicle migration; GVBD, germinal vesicle breakdown; HY, hydration; OV, ovulation; SP, spawning.

算出のための資源評価の主流はVPA（コホート解析）で、その際、年齢別漁獲尾数の情報が必要とされる。しかし、TAC（漁獲可能量）による資源・漁業管理が行われると、漁獲量は制限を受けるため資源量の指標となりにくくなり、漁獲情報の資源情報としての価値が低下する。したがって、今後は漁獲努力量によるチューニング手法の検討とともに、漁業と独立した、迅速かつ精度の高い資源量指標を提供できる直接推定法の役割がますます重要になると考えられる（大関，2000）。

Lasker（1985）の主導により推進されたDEPM（Daily Egg Production Method，一日当たり総産卵量による資源量推定法）は、産卵量からの資源量推定を可能にした手法である。そのSSB（産卵親魚量）を求める推定式で必要とされるパラメーターのうち、 S （産卵頻度）については魚種ごとに成熟段階の評価基準を作成する必要があり、パラメーター S の精度が推定値全体の精度に大きく影響する。一般に成熟段階は、卵巣の組織切片標本の観察による卵巣卵の発達ステージと排卵後濾胞の退行ステージにより判定される。したがって、卵巣卵の発達および排卵後濾胞の退行のタイムコースの詳細が明らかになればパラメーター S の精度は著しく向上し、結果としてSSBの推定値の精度向上に大きく貢献することになる。

我々のマサバの飼育実験系では、排卵からの時間が明確な排卵後濾胞を確実に採取できる。すなわち、選別した親魚にHCGを投与すると、全ての個体で33時間前後に集中して排卵が起こるので、排卵を確認後、一定時間間隔で採集していけばよい。卵が成熟し吸水が

起こると腹部が急激に大きく膨出するが、そのような個体を掬い上げ、腹部の軽いマッサージにより透明卵が体外に流出したときを排卵後0時間とする。このようにして、排卵後0, 6, 12, 18, 24, 48, 72時間の卵巣が得られ、水温19~20における排卵後の時間経過が明瞭な排卵後濾胞の組織切片標本が作製された（Fig. 6）。これまでに、マサバの排卵後濾胞の退行ステージに関しては北米西岸産マサバの報告（Dickerson *et al.*, 1992）があるが、排卵後濾胞の退行過程は水温の影響を受け変化することが示されており（Hettler and Fitzhugh, 1995）、同種でも産卵場の環境水温が異なるような場合は、系群ごとに排卵後濾胞の退行過程を調べることが望まれる。さらに、環境水温は排卵後濾胞の退行過程のみならず、卵黄形成、卵成熟、排卵までの時間、卵径、産卵量、産卵間隔、産卵回数などの各種繁殖パラメーターにも影響を及ぼすことも予想される。飼育系の有利さは、同じ養成履歴をもつ親魚を使うことにより、繁殖に係わるポテンシャルを揃え、ばらつきを最小限に抑えることができること、環境調節により種々の日長や水温条件での実験を同時期に、あるいは繰り返しできることにある。今後はマサバの産卵水温の範囲にある15~25で種々の成熟、産卵誘導を行い、上記各種繁殖パラメーターを明らかにしていく実験が展開されることが期待される。

産卵頻度 S の推定は排卵後濾胞の形態的特徴に基づき行われているが、これは、産卵履歴、すなわち、対象とする個体が何日前に産卵したのかを知る為の現在唯一の方法である。我々の実験系では、排卵からの時

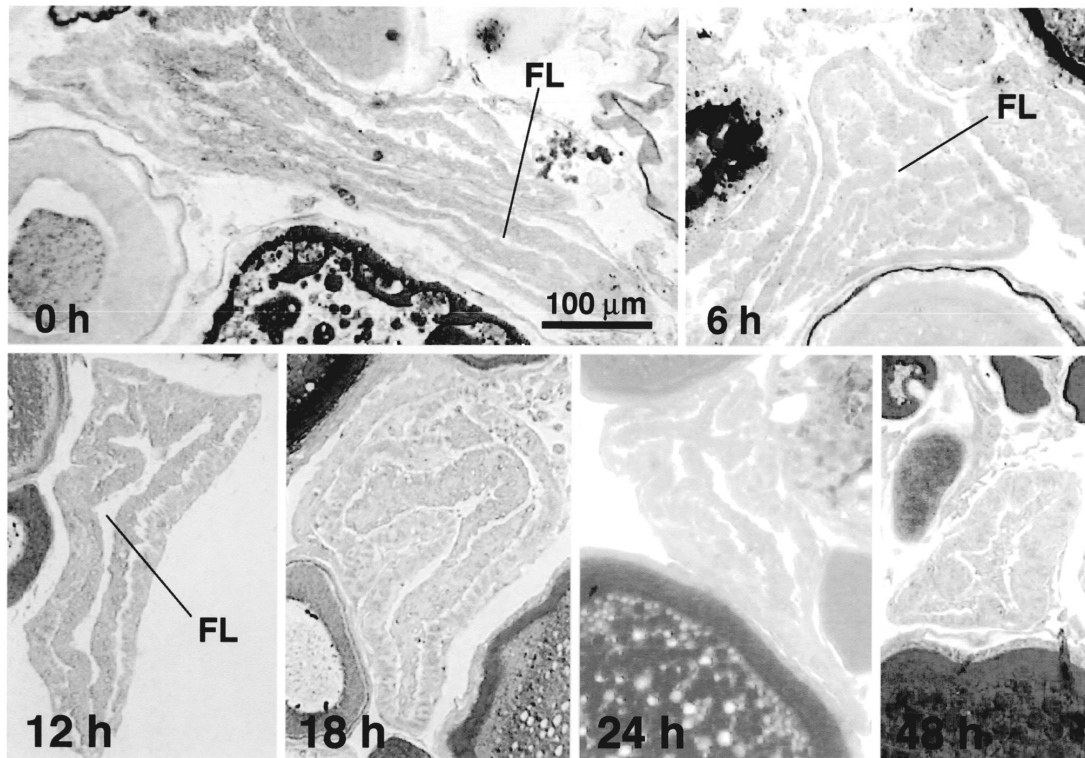


Fig. 6. Photomicrographs of postovulatory follicles of the chub mackerel collected at 0, 6, 12, 18, 24 and 48 hours after ovulation. FL, follicular lumen.

間が明確な卵巢組織を極めて生鮮な状態で大量に入手できるため、組織学用の標本は勿論のこと、各種 mRNA やタンパク質の採取、調整も可能となる。また、産卵未経験の養成親魚を用いるために、得られる排卵後濾胞は全て 1 回目の排卵後のもので、産卵盛期の天然魚のように退行過程の異なる排卵後濾胞が混在して見られることもない。マサバの排卵後濾胞は、排卵後 1 日以内であれば卵巢組織を生理食塩水のなかで軽く攪拌するだけで遊離し、肉眼で容易に判別できるので、均質な排卵後濾胞のみの大量採取が可能である。現在、我々はこのように採取、調整した排卵後濾胞を用い、排卵後の経過時間に伴って発現する各種タンパク質のプロテオーム解析を行っている。時間特異的なタンパク質が特定できれば、排卵後濾胞の機能解析のみならず、その抗体等を用いて、組織切片標本観察に替わる、より簡便で汎用性のある産卵履歴推定法が開発されることが期待される。

5. 天然群の産卵頻度と産卵間隔

飼育実験で明らかにされた卵巢卵の成熟タイムコースと排卵後濾胞の退行過程に基づき、マサバの産卵頻度 S を推定するための卵巢成熟度の評価基準を作成した。 S の推定に用いたのは、五島近海で 2001 年の産卵

期（3月下旬～5月中旬）に計 5 回、深夜から明け方（0:00～6:00）にかけて旋網によって漁獲されたマサバ雌親魚 137 尾である。

マサバは 22:00～24:00 に集中して産卵し、産卵は排卵に引き続いて起こるため（前述）、産卵直後の 0:00～6:00 に漁獲された場合、その個体は排卵後 0～6 時間の排卵後濾胞（0 day POF）を持つことになる。すなわち、0 day POF の形態的特徴を示す排卵後濾胞を持つ個体は、採集日の前日深夜に産卵したと考えられる。同様に、翌日の 0:00～6:00 に漁獲された個体は排卵後 24～30 時間の排卵後濾胞（1 day POF）を、翌々日の 0:00～6:00 に漁獲された場合は排卵後 48～54 時間の排卵後濾胞（2 days POF）を持つことになり、それぞれ、2 日前産卵および 3 日前産卵の個体であることを示している。また、卵成熟のタイムコースより、0:00～6:00 の漁獲時間帯に核移動期（GVM）の卵母細胞を持っていた個体は、当日の深夜に産卵する予定であったと推定される。

2001 年度の対馬暖流系群マサバ産卵群の採集日別産卵頻度を Fig. 7 に示す。3 月 26 日と 5 月 14 日には産卵が 4 日間毎日行われており、ほぼ全個体が 4 日間のいずれかの産卵に関与していた。一方、4 月 5 日には当日産卵予定の個体のみが少数出現しており、過去 3 日間における産卵活動が不活発であることを示していた。

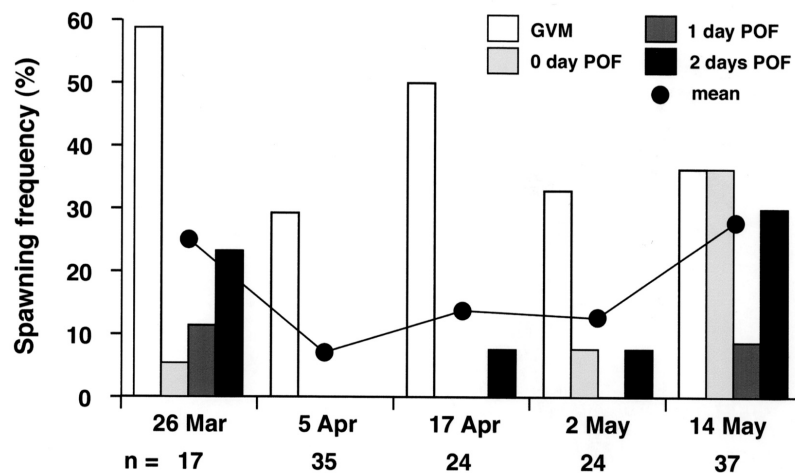


Fig. 7. Spawning frequencies of chub mackerel females in the spawning stock of the Tushima current subpopulation in 2001, which were estimated from percentages of females in the four spawning states. The spawning states of females were classified into the followings. GVM: <24 h prior to spawning; 0 day POF: <24 h after spawning; 1 day POF: 24-48 h after spawning; 2 days POF: >48 h after spawning. GVM, germinal vesicle migration oocytes; POF, postovulatory follicles.

4月17日と5月2日の産卵群では両者の中間の産卵状況を示した。産卵期における5回の採集を通じての平均産卵頻度は16.4%で、また、その逆数から求められる平均産卵間隔は6.1日となった(白石ら, 2003)。

産卵期の個体の卵巣組織は、卵巣卵の発達ステージと排卵後濾胞の組み合わせにより、Table 1 に示す9

つのパターンが観察された。137尾中58尾で産卵間隔が推定でき、それらのうち、産卵間隔4日以上が38尾、3日が14尾、2日が6尾で、毎日産卵を示す個体はいなかった。このように、2001年における対馬暖流系群マサバ産卵群では、産卵間隔が推定できる個体のうち4日以上の産卵間隔を示すものが過半数を占めるととも

Table 1. Numbers of chub mackerel females with combinations of the different states in the ovary

Spawning state present in ovary	Day interval between spawnings	Number of females
GVM	4	38
GVM + POF ₂	3	14
GVM + POF ₁	2	3
LY + POF ₀ + POF ₂	2	3
LY	unknown	30
LY + POF ₀	unknown	12
LY + POF ₁	unknown	2
LY + POF ₂	unknown	1
Oocytes prior to LY	unknown	34

GVM: <24 h prior to spawning

POF₀, 0 day POF: <24 h after spawning

POF₁, 1 day POF: 24-48 h after spawning

POF₂, 2 day POF: >48 h after spawning

Samples were collected from Tsushima current subpopulation in 2001.

GVM, cocytes at germinal vesicle migration stage; LY, oocytes at late yolk stage; POF, postovulatory follicles.

に、最短2日で産卵を行うことが明らかとなった。

このように、1) 漁獲の時刻、2) 排卵後濾胞の退行過程、および3) 卵成熟のタイムコースが明らかにされている場合、産卵に関与した個体の産卵日、個体の産卵間隔および個体群の平均産卵間隔あるいは産卵頻度を高い精度で推定することができる。以上の結果は一例に過ぎないが、特定の産卵群の追跡調査は無理であるとしても、特定の産卵海域において、採集回数や尾数を増やすとともに、漁海況との関係においての長期的モニターを行うことにより、マサバの産卵動態の詳細を明らかにできよう。

6. 飼育魚の産卵誘発

マサバの雌雄親魚にGnRH α を投与すると、翌日から産卵が継続して行われる。我々は、卵黄形成が終了したマサバ2歳魚を選別し、雌雄ともにGnRH α (400 μ g/kg BW)を投与し、雌雄それぞれ10尾、計20尾を3トン水槽に収容したものを2基準備した。餌には冷凍オキアミとブリ用配合飼料を飽食するまで毎日与えた。GnRH α 投与の翌日からすべての水槽で毎日産卵がみられ、産卵時刻は天然群と同様の22:00~24:00に集中しており、受精率、孵化率も良好であった。産卵は10日間継続して終了し、1回目の産卵量はそれぞれ22.8万粒および31.1万粒で、2回目以降はいずれの水槽でも5万粒以下であった。すなわちGnRH α の刺激により初回の産卵ではほとんどの雌親魚が産卵に参加するが、2回目以降の産卵では群としては毎日産卵が行われものの、産卵に関与した雌親魚は毎回1~数尾程度であったことが示唆された(白石ら, 2005)。この実験は産卵期のほぼ終わりに相当する6月下旬に行われたが、産卵初期に設定すればより長い産卵の継続が期待されるかもしれない。近年、マイクロサテライト(MS)マーカーを用いた親子判定がいくつかの魚種で試みられているが(Jones and Avise, 1997; Neff, 2001)、マサバの親子判定用MSマーカーを開発し、この実験系で用いることによって、各個体の産卵回数、産卵頻度が正確に推定できるようになる。先述した野外調査とこのような飼育実験との組み合わせにより、マサバの産卵生態、産卵動態、繁殖特性などの全貌が解明されることが期待される。

7. バッチ産卵数

バッチ産卵数(batch fecundity, F)とは1産卵期に複数回産卵する多回産卵魚の雌1尾が、1回の産卵で産み出す卵数のことで、通常、卵巢内の吸水卵を計

数することにより F を推定している(Hunter *et al.*, 1985)。しかし、多くの魚種は種特有の成熟・産卵リズムを持ち、吸水する時刻も決まっているので、漁法によっては吸水卵を持つ個体がほとんど得られない魚種もある。例えば、北部九州近海における旋網によるマサバ漁は深夜から明け方にかけて行われるが、漁獲物の中に吸水卵を持つ個体はほとんどみられない。これは、既に述べたようにマサバの卵成熟と吸水は日中~夜半にかけて進行することに因るものと考えられる。したがって、このような吸水卵を持つ個体が採集され難い種では F の算定は難しい。

HCG投与の実験からも明らかのように、卵黄形成卵は一旦成熟へのシグナルを受け取ると、核が移動を開始し、そのままGVBDを経て吸水卵となるので、核移動期の卵は F 算定のために使うことができると考えられる。したがって、通常の調査船調査で使用される10%ホルマリン等で固定された卵巢から核移動期の卵を識別できれば、 F 算定に使用できる対象個体の幅が大きく広がる。実際、長崎、福岡、下関などに水揚げされるマサバで、卵巢内に核移動期の卵をもつ個体は多く漁獲されている。しかし、固定された卵巢から核移動期の卵を選別することはそれほど容易ではない。Fig. 8にマサバの成熟、排卵に伴う卵径頻度分布を示す。卵黄形成が終了した卵巢では卵径600 μ m付近にモードを持つ卵群が形成されているが、これらの卵が核移動の後期になっても、卵径頻度分布上は卵黄形成卵と分離せず、卵径から明確に両者を区別することはできない。また、実体顕微鏡下で観察した場合、核移動後期の卵では中央に融合した油球が確認されるが、固定してから時間が経過した標本では油球を判別できないことが指摘されている(渡邊と斉藤, 2000)。このように、マサバではホルマリン固定された核移動期の卵はそのままでは F 算定には使用し難い。しかし、マサバに限らず、我が国の水研、水試、大学等における過去の多くの資源対象種の調査研究では、特別の目的をもった研究を除いて卵巢標本は多くの場合が10%ホルマリンで固定、保存されているものと考えられ、諸外国でも事情は同様であろう。吸水卵を持つ個体が漁獲され難い種では、ホルマリン固定後の核移動期卵の簡易識別法が開発されれば、今後の調査研究に大きく貢献するのみならず、これまで長期間保存されてきた卵巢標本も新たに対象となるので、例えば、資源種のバッチ産卵数の長期的変動解析においても、対象標本数が増加することにより、より高い精度で傾向を把握できるようになる。現在我々は、安息香酸ベンジル(発生学等で卵黄の多い両生類の卵を透明化する目的で使われる)を主体とした透徹剤と各種染色液を組み合わせた

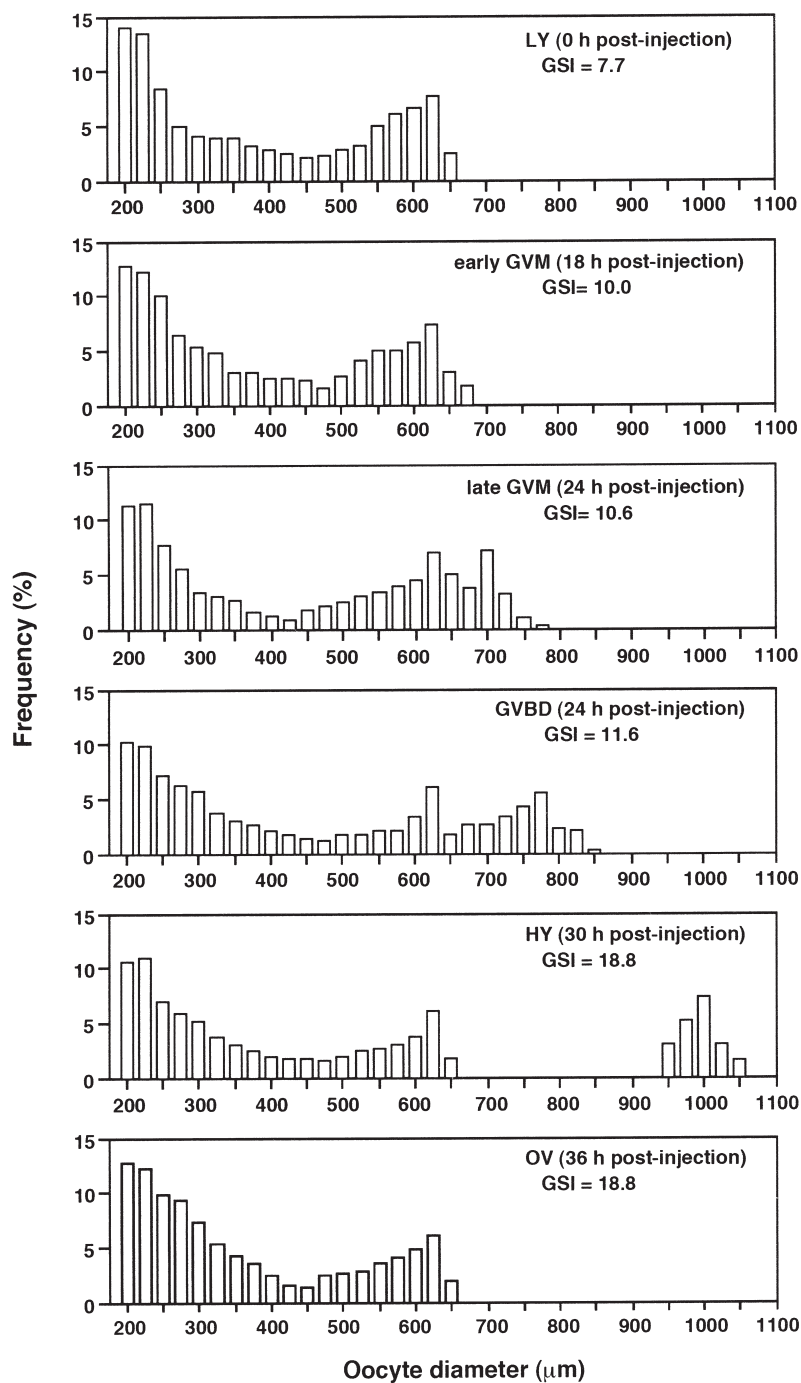


Fig. 8. Size-frequency distribution of oocytes (>250 μm diameter) in chub mackerel ovaries at different stages of maturation induced by HCG injection. Each panel presents data for one female. See Fig. 3 for developmental stage of ovary. GSI (gonadosomatic index) = $100\text{GW}/(\text{BW}-\text{GW})$, where GW, gonad weight; BW, body weight.

ホルマリン固定卵用の簡易核判別法を開発中である。
マニュアル化した後、公表したい。

8. 飼育実験系の今後の展開

マイワシ (松山ら, 1991) やマアジ (Yoda *et al.*, 2001) も基本的な取り扱い方を習得すれば, 当初考え

ていたほど飼育は難しくなく, また, カタクチイワシは飼育条件下でも活発に自然産卵を行う (Tsuruta, 1992)。一方, 主要浮魚資源の中では, サンマは神経質で取り扱いが難しく, マサバで用いた成熟, 産卵促進技法は適用できないが, 昇温処理により自然産卵することが明らかにされている (津崎, 2001)。したがって, 魚種毎にその産卵生態の特徴を活かした成熟・産卵実

験系の研究モデルの構築が必要で、それにより、野外調査のみからでは得ることのできなかった各魚種の繁殖に関する多くの生物情報を得ることができるようになる。

多獲性浮魚類の飼育実験系の展開のなかで今後期待されるのは、初期の減耗過程の定量的解析であると考えられる。仔魚の生き残りの良否が資源の水準を左右する、というHjørt (1914) の仮説以来、その仮説の検証と、初期生活史における死亡要因解明のために、現在に至るまで多くの研究者が初期減耗の問題に取り組んできた。現在では、仔稚魚から加入時までの成長速度がその間の累積生残率（あるいは累積減耗率）を通して年級群豊度を規定する (Houde, 1987), という考え方が多くの研究結果を通して支持されており、現在の加入量変動機構を解明するための初期生活史研究では、仔稚魚期の成長が生残過程を規定する仕組みに焦点が当てられ展開している。このような研究においても、人工種苗の大量供給により初めて可能となる、飢餓や被食を通して起こる初期の減耗（あるいは生残）過程の定量的解析は大きく貢献することが期待される。小型浮魚類の仔稚魚の飼育はそれほど難しくないが、初期減耗研究の定量解析においては、均質の実験動物の安定した供給が要求されるため、今後は餌料系列を含んだ飼育条件の整備が必要とされる。一方、仔稚魚の潜在的な生残能力に及ぼす卵質の影響、卵質に及ぼす親魚の影響、さらに親魚の成熟や産卵に及ぼす生物的・非生物的環境条件の影響など、卵質に関わる親魚の影響、すなわち "maternal effect" にも多くの関心が向けられてきている (森本, 1994)。このような要因も、安定した親魚および仔稚魚の飼育技術が確立することにより検討可能となる。

わが国の魚類生殖生理の基礎理論や養殖、栽培漁業に関する技術は世界においても最高水準にある。また、野外調査あるいは数値モデル分野においても最高水準の資源研究が展開されているものとする。今後は、野外調査、飼育実験および数値モデルを総合した大型プロジェクトの組織化が必要であり、それにより、わが国でこれまで欠けていたとされる加入量変動機構における独自の仮説の構築やその検証研究の展開が期待される。日本が資源研究においてブレークスルーとなる情報を世界に向けて発信できることを確信したい。

謝 辞

本稿は、2004年12月に川崎市で開催されたワークショップ「水産重要種の生殖機構と水温による影響」における講演内容を整理したものである。ワークショップを

企画、運営し、本稿を書く機会を与えて頂いた清水昭男博士、山下倫明博士をはじめとする（独）水産総合研究センター中央水産研究所の方々に厚くお礼申し上げます。

要 旨

多獲性小型浮魚類を対象とした資源評価のなかで、卵稚仔調査から産卵親魚量を推定するモデルにおいては繁殖に関する各種パラメーターは必須の情報で、一般に漁業から独立した調査船調査により得られている。しかし、野外調査により得られた情報は、調査法等のバイアスにより対象種の生物情報を正確に反映しているとは言い難い。一方で、近年、小型浮魚類を飼育下で産卵させることにより、種々の繁殖に関する情報が得られるようになってきた。本稿では一例としてマサバを取り上げ、管理対象種の再生産研究における生殖生理学の有効性とその活用の観点から、再現性のある飼育実験系の確立、野外調査と飼育実験の問題点ならびに利点、野外調査と飼育実験の適切な組み合わせによって初めて得られる繁殖情報について解説するとともに、他魚種への応用の可能性についても言及した。

キーワード：多獲性浮魚類，繁殖パラメーター，生殖生理学，飼育実験，野外調査，マサバ

文 献

- 中田 久, 松山倫也, 原 洋一, 矢田武義, 松浦修平, 1998: トラフグの人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係. 日水誌, **64**, 993-998.
- 中田 久, 中尾貴尋, 荒川敏久, 松山倫也, 2001: プリの人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係. 日水誌, **67**, 874-880.
- Dickerson T. L., Macewicz B. J., and Hunter J. R., 1992: Spawning frequency and batch fecundity of chub mackerel, *Scomber japonicus*, during 1985. *Cal. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep.*, **33**, 130-140.
- 古屋広和, Vu Van In, 山口明彦, 松山倫也, 2005: ゼブラフィッシュをモデルとした排卵後過熟現象の細胞学的解析. 平成17年度日本水産学会大会講演要旨集, 1334.
- Hettler W. F. and Fitzhugh G. R., 1995: Temperature influence on postovulatory follicle degeneration in Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*. *Fish. Bull.*, **93**, 568-572.

- Hjørt J., 1914: Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in the light of biological research. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer.*, **20**, 1-13.
- Houde E. D., 1987: Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish Soc. Symp.*, **3**, 17-29.
- Hunter J. R., Lo N. C. H., and Leong R. J. H., 1985: Batch fecundity in multiple spawning fishes. in "An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis mordax*." (ed R. Lasker), *NOAA Tech. Rep. NMFS*. **36**, 67-78.
- Jones A. G. and Avise J. C., 1997: Polygynandry in the dusky pipefish *Syngnathus floridae* revealed by microsatellite DNA markers. *Evolution*, **51**, 1611-1622.
- Lasker R., 1985: Introduction: an egg production method for anchovy biomass assessment. In : An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis mordax*. (ed R. Lasker), *NOAA Tech. Rep. NMFS*. **36**, 1-3.
- 松原孝博, 2000: 卵黄形成機構と卵黄の機能。「魚類の配偶子形成機構」. 月刊海洋, **32**, 107-112.
- 松山倫也, 石田泰蔵, 池浦 繁, 松井誠一, 田辺智唯, 北島 力, 松浦修平, 1991: LHRH-aによるマイワシの成熟, 排卵促進. 水産海洋研究. **55**, 301-306.
- 松山倫也, 太田耕平, 2000: 性ステロイドホルモン。「魚類の配偶子形成機構」. 月刊海洋, **32**, 81-89.
- Matsuyama M., Shiraishi T., Sundaray J. K., Rahman Md. A., Ohta K., and Yamaguchi A., 2005: Steroidogenesis in ovarian follicles of chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Zool. Sci.*, **22**, 101-110.
- 森本晴之, 1994: 卵質。「魚類の初期減耗研究」(田中克, 渡邊良朗編), 水産学シリーズ98, 恒星社厚生閣, 東京, pp.83-96.
- 村田 修, 山本真司, 石橋 亮, 岡 佑介, 米島久司, 家戸敬太郎, 宮下 盛, 熊井英水, 2005: マサバ養成親魚の自然産卵と卵発生および仔稚魚飼育. 水産増殖, **53**, 319-324.
- Neff B. D., 2001: Genetic paternity analysis and breeding success in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *J. Heredity*, **92**, 111-119.
- 大関芳沖, 2000: 卵稚仔調査法。「TAC管理下における直接推定法-その意義と課題」(浅野謙治編), 水産学シリーズ124, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 70-80.
- 白石哲朗, 加藤慶樹, 松山倫也, 2003: 対馬暖流系群マサバの産卵群における産卵頻度の推定. 平成14年度国際資源調査等推進対策事業日本近海シェアドストック管理調査委託事業報告書. 水産総合研究センター. 8-15.
- 白石哲朗, 吉野 泰, 北野 載, 古屋広和, 岡本久美子, 尾上静正, 山口明彦, 松山倫也, 2004: マサバのホルモン投与による成熟誘導と排卵後過熟現象より推定される天然群における成熟過程. 平成16年度水産海洋学会講演要旨集, 54.
- 白石哲朗, 入路光雄, 吉野泰, 北野載, 山口明彦, 岡本久美子, 尾上静正, 松山倫也, 2005: マサバの成熟, 産卵誘導系の確立と展開. 平成17年度水産海洋学会講演要旨集, 東広島. 114.
- Shiraishi K., Ohta K., Yamaguchi A., Yoda M., Chuda, H, and Matsuyama M., 2005: Reproductive parameters of the chub mackerel *Scomber japonicus* estimated from human chorionic gonadotropin-induced final oocyte maturation and ovulation in captivity. *Fish. Sci.* **71**, 531-542.
- Tsuruta Y., 1992: Reproduction in the Japanese anchovy (*Engraulis japonica*) as related to population fluctuation. *Bull. Nat. Res. Inst. Fish. Engine.* **13**, 129-168.
- 津崎 淳, 2001: サンマの飼育と展示. アクアマリンふくしま. 生き物情報.
http://www.marine.fks.ed.jp/scie_02.html
- 渡邊千夏子, 斉藤真美, 2000: バッチ産卵数の推定法の検討. 一日当たり総産卵量に基づくマサバ太平洋系群の資源量推定法に関する調査報告書. 中央水産研究所. 30-34.
- Yamada T., Aoki I., and Mitani I., 1998: Spawning time, spawning frequency and fecundity of Japanese chub mackerel, *Scomber japonicus* in the waters around the Izu islands, Japan. *Fish. Res.*, **38**, 83-89.
- Yoda M., Mizuta K., and Matsuyama M., 2001: Final oocyte maturation and ovulation of the jack mackerel, *Trachurus japonicus*, induced by HCG. Abstract of the 10th Annual Meeting of the North Pacific Marine Science Organization, Victoria, 185.