

胎盤性生殖腺刺激ホルモンによるマアジの成熟・排卵促進

依田真里^{*1}・水田浩二^{*2}・松山倫也^{*3}

Induction of Ovarian Maturation and Ovulation in Jack Mackerel *Trachurus japonicus* by Human Chorionic Gonadotropin

Mari YODA^{*1}, Koji MIZUTA^{*2} and Michiya MATSUYAMA^{*3}

Abstract This study examined final oocyte maturation and ovulation of jack mackerel (*Trachurus japonicus*) treated with human chorionic gonadotropin (HCG) in the laboratory. Female fish with fully yolk-accumulated oocytes were selected by ovarian biopsy, performed just before the experiment. Oocytes at the migratory nucleus stage first appeared 24 hours after HCG injection. Between 48 and 60 hours, ovulated eggs were observed. Final oocyte maturation and ovulation occurred within 36 hours and at around 48 hours after HCG treatment, respectively.

Key words: jack mackerel, maturation, ovulation, HCG

マアジの成熟雌魚では卵巣内に複数の発達段階の卵母細胞が同時に存在することが知られており、1産卵期に少なくとも2回以上は産卵すると推定されている(三淵ら, 1958; 山田, 1958)。このように産卵期間中に繰り返し産卵を行う魚種がどのくらいの頻度で産卵するかは、繁殖生態を明らかにする上で不可欠な情報である。産卵頻度の推定には、現在のところ二つの方法が有効であるとされている。一つは、卵巣が最終成熟段階に達した結果、透明化した卵巣卵(吸水卵)を持つ個体の出現頻度に基づく方法で、もう一つは排卵後濾胞を排卵後の経過時間にもなう組織学的形態の変化に基づいて分類し、産卵時刻や産卵日を推定する方法(Hunter and Macewicz, 1985a)である。吸水卵を持つ個体の出現頻度による方法では、比較的簡便に産卵頻度が推定できるという利点がある。しかし、吸水卵を持つ個体は時間帯によって出現が集中する可能性があることや、産卵直前の個体は他の個体とは異なる行動をとるために、採集効率に差異を生じる可能性

が指摘されており、採集時刻や使用する漁具によっては推定した産卵頻度に大きな偏りを生じるおそれがある。現在のところマアジの産卵時間帯は明らかになっておらず、漁具による採集親魚の偏りについても検討されていないため、吸水卵を持つ個体の出現頻度から産卵頻度を推定する場合には誤差がかなり大きくなる可能性がある。従ってマアジの産卵頻度をより正確に推定するためには、排卵後濾胞に基づく方法を検討する必要がある。排卵後濾胞に基づく産卵頻度の推定には、あらかじめ実験室内で産卵を行わせ、排卵後の経過時間がはっきりした排卵後濾胞の形態を組織学的に観察し、その退行過程を分類しておくことが必要である。養殖マアジについては、落合ら(1980, 1983)によって水槽内で人工産卵を行わせる試みがなされており、生殖腺が発達したマアジにヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン(HCG)の投与を行って、産卵が誘発されたことが報告されているが、バッチ産卵数やホルモン投与後の時間経過に伴う卵母細胞の成熟過程について

2005年12月9日 受理 (Received on December 9, 2005)

^{*1}西海区水産研究所 (Seikai National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, 1551-8, Taira, Nagasaki, 851-2213, Japan)

^{*2}長崎県総合水産試験場 (Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, 1551-4, Taira, Nagasaki, 851-2213, Japan)

^{*3}九州大学農学研究院動物資源科学部門海洋生物生産学 (Kyushu University, Department of Animal and Marine Bioresource Sciences, Faculty of Agriculture, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan)

は言及されていない。

実験室内において安定して産卵を誘起できるようになれば、将来、マアジの産卵頻度を推定する際に有効な情報になりうる。そこで、本研究では卵黄形成がほぼ終了した雌魚にHCGの投与を行い、時間経過とともに卵母細胞の成熟過程を把握すること、さらに得られた成熟雌魚については吸水卵を計数し、バッチ産卵数を求めることを目的とした。

長崎県野母崎沖のまき網で漁獲された尾又長255～350mmのマアジを2001年3月27日、2002年3月15日に長崎県総合水産試験場の室内水槽に搬入した。コンクリート製円形流水式6トン水槽に収容し、自然日長、自然水温下(2001年15.7℃、2002年15.3℃)で1日間馴致した。給餌は行なわなかった。フェノキシエタノール(100ppm)で麻酔し、カニューラにより生殖腺の一部を採取して性を判別した。雌については採取した卵母細胞の卵径を測定し、卵黄形成がほぼ完了したとみられる卵径500 μ m以上の卵母細胞を持つ雌親魚を選別した。実験に供したマアジは2001年は計41尾(体重260～565g)、2002年は68尾(体重200～575g)であった。さらに個体識別のために背筋部に磁気タグを挿入した後、HCG(200IU/尾)を背筋部に注射投与した。

2001年はホルモン投与から0、12、24、36および48時間後に試供魚を6～10尾ずつ取り上げ、2002年はホルモン投与から0、12、24、30、36、42、48、60、72時間後に試供魚を3～8尾ずつ取り上げて、卵巢の採取を行った。卵巢は重量測定後、一部は組織標本作製のためにブアン液で、残りは10%ホルマリン液で固定した。その後、メタクリル樹脂に包埋し、厚さ2～3 μ mの切片を作成してトルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡で観察した。卵巢成熟度は卵巢内で

最も発達した卵母細胞の成熟段階で表した。今回の研究では、卵黄形成前の卵母細胞で占められる前卵黄蓄積期(pre-vitellogenic stage)、卵黄形成がほぼ終了した第三次卵黄球期(tertiary yolk stage)、卵成熟が始まり、核が動物極へ移動中の胚胞移動期(migratory nucleus stage)および、核膜の消失が起こり、卵成熟が完了した吸水期(hydration stage)の計4段階の卵巢が認められた。卵成熟の完了した、即ち、第2減数分裂中期で細胞周期が停止した卵では、卵黄タンパクの限定分解に由来する浸透圧上昇に伴う吸水によって卵径が増大すると同時に、卵黄球の膜融合と透明化が進行する。本研究では、透明化が進行中の卵、あるいは透明化が完了した卵をすべて、吸水卵(hydrated egg)として取り扱った。吸水卵を持つ卵巢については、卵巢の一部分(400～600mg)を取り出し、吸水卵の数を数えて単位重量あたりの吸水卵数を求めたのち、卵巢全体の重量を乗じて一尾あたりのバッチ産卵数を算定した。また、卵巢の一部を取り出して200 μ m以上の卵母細胞について400個～600個の卵径を計測し、卵径頻度分布を調べた。卵巢の各部位(前・中・後)間で卵母細胞の成熟段階には違いが見られなかったため、卵巢の中央部から組織の一部を採取し、卵巢成熟度、卵径、吸水卵数の解析に使用した。

ホルモン投与後の時間経過に伴う卵巢成熟度の変化をTable 1, 2に示した。

HCG投与後0時間の標本では、2001年には7尾中4尾が第三次卵黄球期の段階にあったが、残る3尾は卵黄蓄積した卵母細胞の退行が進み、成熟段階が後退していた。HCG投与後24時間になると、胚胞移動期の個体が出現した。さらに、36時間後には吸水卵を持つ個体が出現した。卵巢腔内に吸水卵が排卵された個

Table 1. Changes in developmental stages of the largest oocytes in jack mackerel ovary after injection of HCG. Results for experiments conducted in 2001

Time after HCG injection (h)	Stage of the largest oocytes					n
	Prv	Ty	Mn	Hy	Ov	
0	3(3)	4(2)				7
12		6(6)				6
24		9(9)	1(1)			10
36	1(1)			7(7)		8
48	1(1)			4(3)	5(5)	10

Figures in parentheses indicate the number of fish which have ovaries with atretic oocytes. Prv, pre-vitellogenic stage; Ty, tertiary yolk stage; Mn, migratory nucleus stage; Hy, hydration stage; Ov, ovulation.

Table 2. Changes in developmental stages of the largest oocytes in jack mackerel ovary after injection of HCG. Results for experiments conducted in 2002

Time after HCG injection (h)	Stage of the largest oocytes					n
	Prv	Ty	Mn	Hy	Ov	
0		7(1)				7
12		8(5)				8
24		7(4)	1(1)			8
30		6(2)	2			8
36		5(2)		3		8
42		1	3(1)	4(3)		8
48		1(1)	1(1)	5(1)		7
60		4(1)	1	1(1)	2(2)	8
72					3(3)	3
84	1(1)				2(2)	3

Figures in parentheses indicate the number of fish which have ovaries with atretic oocytes. Prv, pre-vitellogenic stage ; Ty, tertiary yolk stage ; Mn, migratory nucleus stage ; Hy, hydration stage ; Ov, ovulation.

体は48時間後に観察された。2002年には HCG 投与後 0 時間の標本では 7 尾中 1 尾に退行卵を持つ個体が見られたものの、いずれも第三次卵黄球期の段階であった。HCG 投与後24時間では胚胞移動期の個体が出現し、36時間後には吸水卵を持つ個体が出現した。一方、HCG 投与後48時間では吸水卵を持つ個体は見られたものの、排卵はみられず、60時間後に排卵個体が観察された。

卵径組成の解析結果によると、吸水卵は900 μm にモードをもつ卵群を形成し、500~600 μm にモードをもつ卵群は第三次卵黄球期に相当していた。吸水卵を持つ個体は同時に第三次卵黄球期とみられる卵母細胞を有しており、マアジにおいては排卵前にすでに次の産卵にむけて卵黄蓄積をほぼ完了した第三次卵黄球期の卵母細胞が準備されていると考えられた。

一尾あたりの吸水卵数は29,000 \pm 22,000個（平均 \pm 標準偏差）であった。最近の知見ではマアジのバッチ産卵数は尾叉長220~260mm の2歳魚で21,000粒、230~290mm の3歳魚で約31,000粒との報告がある（西田, 2004）。本実験で求めたバッチ産卵数は最大で54,000粒（尾叉長291mm）、最小で4,500粒（尾叉長265mm）と個体によるばらつきが大きかった。西田（2004）はバッチ産卵数にどのくらいの幅があったのかについては言及しておらず、今回の結果との比較は難しい。HCG 投与によるバッチ産卵数への影響につ

いては今後の課題であろう。

ホルモンを用いた成熟促進において、ホルモン投与直前の親魚の成熟状態は極めて重要な要素であり、一般に卵巣卵の卵黄蓄積が完了した段階に達していることが前提となる。本実験では、開始に先立って卵巣卵の一部を採取し、卵黄形成がほぼ完了したと見られる卵径（500 μm ）に達した個体を選んで HCG の投与を行った。しかし、2001年に行った実験では HCG 投与時（0時間）ですでに卵母細胞の退行が進んだ個体が観察された。Shiraishi ら（2005）は HCG を用いてマサバの最終成熟を促進しているが、あらかじめ卵径のみでなく、胚胞（核）も確認する必要があると指摘している。卵黄形成中の卵母細胞中に胚胞が見えないということは、退行の初期段階を示し、このような個体に HCG を投与しても最終成熟は引き起こせないと報告している。今後は、卵径のみでなく、卵母細胞中の胚胞についても事前にチェックする必要があると思われる。

本実験では HCG 投与から36時間を経過すると吸水卵を持つ雌が出現し、2001年には48時間後に、2002年には60時間後に排卵する個体が見られた。落合ら（1980）は4月に3歳および4歳の養成マアジに HCG 投与を行い、投与後35~36時間後に産卵を開始したと報告している。また、養殖マアジから人工採卵して得た仔稚魚を水槽内で1年間飼育したマアジ1歳魚に、

5月にHCGを投与した際には、投与後32.5時間で産卵を開始したと報告している(落合ら 1983)。いずれも今回の実験に比べると、HCG投与から排卵に至るまでに要した時間は短い。落合ら(1980, 1983)が4月に実験を行なった際の水温は20~21℃、5月の水温は20~23℃と、本実験に比べると高かった。また、本実験においても2001年は3月下旬に、2002年は3月中旬に実験を行っており、2002年は2001年に比べて水温はやや低く、水温条件がHCG投与から排卵に至るまでの時間に影響を与えた可能性があるが、この検討は今後の課題である。

今回、卵黄蓄積が完了した500 μ m以上の卵母細胞を有するマアジを選別して、HCGを投与することにより最終成熟が誘起され、HCG投与後48~60時間で排卵することが明らかとなった。しかし、全個体が成熟を促進された訳ではなく、卵巣内に退行卵を持つ個体も多く観察された。これは、供試魚が捕獲直後の天然魚であり、長期間馴致された養成親魚でないため、個々の生理状態や栄養状態が異なることによると考えられた。飢餓状態は卵巣卵の再吸収を引き起こすことが知られている(Hunter and Macewicz, 1985b)。実験中、マアジは無給餌で飼育されていたことなども退行卵が多く出現する要因になったと考えられる。最近Shiraishiら(2005)は、養成したマサバを卵径と胚胞の有無で選抜することにより、供試魚の100%で成熟、排卵を誘導している。今後、マアジにおいても、養成親魚を用いた、再現性の高い成熟、排卵誘導の実験系が確立されることが期待される。

文 献

- Hunter, J. R. and B. J. Macewicz, 1985a: Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. *NOAA Tech. Rep. NMFS*, **36**, 79-94.
- Hunter, J. R. and B. J. Macewicz, 1985b: Rates of atresia in the ovary of captive and wild northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull. U. S.* **83**: 119-136.
- 三淵英弘, 岸本源治, 塩見元晶, 相川広秋, 1958: マアジの年齢, 成長および成熟, 対馬暖流開発調査報告 **4**, 133-144
- 山田鉄雄, 1958: アジに関する研究. 対馬暖流開発調査報告 **4**, 145-176.
- 中嶋純子, 1982: 西日本海域におけるマアジの成長と年齢について. *西水研研報* **57**, 47-57.
- 西田 宏, 2004: マアジの産卵特性. 「マアジの産卵と加入機構 - 東シナ海から日本沿岸へ -」(原一郎・東海正編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 11-18.
- 落合 明, 榎田 晋, 長谷川 泉, 陸谷一馬, 1980: マアジの採卵とふ化仔魚の成長について. *栽培技研* **9**, 47-52.
- 落合 明, 陸谷一馬, 榎田 晋, 1983: 養殖1歳マアジの成長, 成熟および人工採卵について. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 541-545.
- Shiraishi, T., K. Ohta, A. Yamaguchi, M. Yoda, H. Chuda, M. Matsuyama, 2005: Reproductive parameters of the chub mackerel, *Scomber japonicus*, estimated from hCG-induced final oocyte maturation and ovulation in captivity. *Fish. Sci.* **71**, 531-542.