

ホタテガイ卵質評価法開発試験

篠原 由香・小坂 善信・吉田 達・鹿内 満春

1. 目的

ホタテガイ種苗は全て天然採苗に依存しており、養殖漁業者からは採苗の早期予測と安定的な天然採苗が強く望まれている。これまでも、生殖巣指数のモニタリングにより産卵時期の推定は可能であったが、種苗の質的・量的評価や採苗不振の原因についての解明は難しい状況にあった。このようなことから、ホタテガイ卵巣卵の成熟度や卵質を現場で簡易に評価する手法を開発し、より高精度な早期の採苗予報技術を確立する必要がある。

そこで本試験では、①生殖巣指数調査、②卵巣卵の成熟及び崩壊を組織学的に評価するための「卵巣組織観察」、③卵巣卵の成熟に伴う生殖巣の生化学物質の動態を明らかにするための「ELISA法による卵黄蛋白の測定」を行なったので、その結果を報告する。

2. 材料及び方法

(1) 生殖巣指数調査

平成15年11月から平成16年5月まで、久栗坂実験漁場及び川内実験漁場（図1）で垂下養殖した2年貝を久栗坂は1週間毎、川内は2週間毎に採取した。採取したホタテガイは殻長、全重量、軟体部重量、生殖巣重量をそれぞれ30個体測定し、生殖巣指数を生殖巣重量÷軟体部重量×100として求めた。

また、環境の変化が生殖巣の成熟にどのような影響を与えるのかを調べるため、平成15年11月20日に久栗坂実験漁場から川内実験漁場へ一部の母貝を移動させ、平成16年1月から2週間ごとに30個体について同様な測定を行った。

水温のデータは、自動観測ブイ（青森ブイ、東湾ブイ、図1）で観測した水深15m層の水温を使用した。

(2) 卵巣組織観察

生殖巣指数調査で用いたホタテガイ20個体の生殖巣の中央部を切り出したものをブアン氏液で固定し、パラフィンで包埋した。これから厚さ7 μ mの横断組織切片を作成しエオシン・ヘマトキシリン二重染色法により染色し、そのうち2.2mm²をデジタルカメラで撮影した。このようにして写された卵巣卵については、総卵数・正常成熟卵・正常未熟卵・異常卵の計数を行った。卵数については1mm²当りの卵数として算出し、異常卵については未熟・成熟を問わず計数し、総卵数については濾胞上に並ぶ卵母細胞・未熟卵・成熟卵・崩壊卵の全てについて計数した合計の値で示した。また、ホタテガイの栄養状態と成熟との関係を調べるため、貝柱重量及び中腸腺重量についても測定した。

(3) ELISA法による卵黄蛋白の測定

生殖巣指数調査及び組織観察で用いたホタテガイのうち雌10個体の閉殻筋からそれぞれ1.5mlずつ採血し、4℃、3000rpmで15分間遠心分離し血リンパだけを採取した。血リンパはTBSで50倍に希釈し、これから連続2倍希釈系列を作ってELISA法（酵素免疫定量法）の直接法で分析した。なお、コントロー

ルとして卵巣抽出液を、ネガティブコントロールとしては雄の血リンパを用いた。

3. 結 果

(1) 生殖巣指数調査

久栗坂実験漁場及び川内実験漁場の生殖巣指数の変化と水温の関係について、図2及び図3に示した。両漁場の生殖巣指数を比較すると、川内実験漁場のほうが全体的に高い値を示した。久栗坂実験漁場においては1月30日にピークに達して2月10日まで停滞し、以後緩やかに低下して3月10日に再び増加、以後減少し3月30日から停滞して4月6日から減少した。川内実験漁場においては2月20日にピークに達した後減少した。また久栗坂実験漁場から移動させた母貝の生殖巣指数は、2月20日にピークに達した後一気に減少した。この移動させた母貝は久栗坂実験漁場の母貝と比べて生殖巣指数は高く、ピークに達した後は停滞することなく一気に減少しており、久栗坂実験漁場の母貝とは異なる傾向を示した。

(2) 卵巣組織観察

各漁場の1mm²あたりの総卵数、異常卵数、正常成熟卵数、正常未熟卵数とビテリンの関係を図4～6に示した。いずれの漁場においても総卵数は12月下旬にピークに達し、その後減少して行った。それぞれの卵数を比較すると、全期間を通じて正常未熟卵の総卵数に占める割合が最も多く、総卵数の増減と対応していた。時期別に見ると、12月中旬から産卵直前の2月上旬～中旬にかけてと、3月下旬以降に急激に減少した。異常卵は産卵期前の12月～1月に最も多く、その後徐々に減少していった。正常成熟卵の占める割合は最も小さく、産卵開始直前に多く、その後減少していった。

各漁場の生殖巣重量、貝柱重量と正常未熟卵数の変化を図7～9に示した。貝柱重量は久栗坂産の母貝のほうが大きかったが、ピーク時の生殖巣重量は母貝の大きさにかかわらず川内実験漁場で飼育した母貝は久栗坂実験漁場で飼育した母貝よりも重かった。いずれの漁場においても、産卵前まで生殖巣重量が増加していくにつれて正常未熟卵が急激に減少し、産卵開始から3月下旬までは久栗坂では生殖巣重量、正常未熟卵ともに増加し、3月下旬以降は生殖巣重量、正常未熟卵ともに急激に減少していった。一方、川内実験漁場では産卵開始後は生殖巣重量、正常未熟卵は減少するだけであった。特に3月下旬以降は急激に減少していった。

(3) ELISA法による卵黄蛋白の測定

各漁場の血リンパ中の相対ビテリン濃度と卵数の変化を、図4～6に示した。相対ビテリン濃度は、コントロールの最大値に対する割合で表した。久栗坂実験漁場においては産卵期前の異常卵数が最大のときに相対ビテリン濃度もピークを示し(図4)、川内実験漁場においては異常卵数が最大値を示した後、産卵後期にビテリンが高い値を示した(図5)。また、いずれの漁場においても産卵期間が過ぎてからビテリンが高くなるという傾向を示した。

各漁場の中腸腺重量と血リンパ中の相対ビテリン濃度の変化について図10～12に示した。中腸腺重量は久栗坂実験漁場においては産卵が終わると急激に増加し、久栗坂から川内に移動させた母貝についても産卵後は大きく増加する傾向にあったが、川内実験漁場の母貝については試験期間中緩やかな増加傾向にあった。いずれにおいても産卵後に相対ビテリン濃度が高くなると、中腸腺重量も増加するという傾向が見られた。そこで、中腸腺重量と血リンパ中の相対ビテリン濃度との関係を調べたところ、いずれの漁場においても正の相関関係が見られた(図13～15)。

4. 考 察

卵母細胞は、周囲のAuxiliary cell (助細胞) で合成されたビテリン (卵黄蛋白前駆体) を取り込みながら成長し、この助細胞は成長期の卵細胞にのみ接触していて成熟期には消滅することが報告されている^{1), 2)}。従って、ビテリンは正常な成熟状態では血中に漏出しないということが考えられた。このことから、異常卵となり卵が崩壊すればビテリンは血中に漏出することが推定され、このビテリンをELISA法 (酵素免疫定量法) により測定し、卵質評価の一手法となりえないかを検討した。

Osada *et. al*²⁾は、卵細胞中のビテリン含量について調べ、生殖巣指数の上昇とともにピークに達し産卵とともに減少するが、血リンパ中のビテリン濃度は常に低いレベルで季節変動は見られず、助細胞以外の組織で作られて血中を運ばれることはないと報告している。しかし、平成14年度の試験結果と同様、今回の調査の結果でも血リンパ中のビテリン濃度は時期によって変化することが観察された。相対ビテリン濃度の変化を見ると、産卵期前の12月～1月に高い値を示した (図4、5)。この時期は、まだ産卵も開始されていないのに総卵数が減少していったが、正常卵の増加以上に正常未熟卵の減少が著しかった。さらに血液中のビテリン濃度が増加したのは、未成熟卵を崩壊させて、総卵数を調整していることが考えられる。また、産卵後の卵数が減少していく時期にもビテリン濃度は高くなっているが、この時期も未熟卵を急激に崩壊させたためと考えられる。このように、血液中のビテリン濃度から組織切片上では判らない卵崩壊の程度を判断できるものと考えられる。さらに、産卵後のビテリン濃度が高くなる時期は、中腸腺重量と血中ビテリン濃度に正の相関関係がみられることから (図13～15)、崩壊した卵から出たビテリンはエネルギーとして中腸腺に貯蔵されている可能性がある。

卵細胞の成熟及び崩壊については、平成14年度の試験では2つの漁場間に差違が見られたため、本試験では11月下旬に久栗坂実験漁場から川内実験漁場へ一部の母貝を移動させ、環境の変化に伴う母貝の質、卵形成と崩壊の違いを観察した。生殖巣重量の変化を見ると、久栗坂実験漁場では産卵開始後に再度正常卵数・正常未熟卵数・総卵数を増加させ生殖巣重量も増加させたが (図4、7)、川内実験漁場では母貝の質に関係なく産卵開始後は生殖巣重量、卵数をいっきに減少させていった (図5～6、図8～9)。水温が高く産卵が早く始まる久栗坂実験漁場では卵形成・産卵を数回繰り返しているが、水温が低く産卵開始時期が遅い川内実験漁場では卵形成・産卵を繰り返さないでいっきに放卵が終わってしまうことが考えられる。また、両漁場とも3月下旬以降は卵崩壊が優先されること、産卵開始時期が早く卵形成が繰り返される久栗坂実験漁場のほうが多くの正常卵が放卵されていることが考えられる。

以上のことから、生産調整としての卵細胞の崩壊は産卵期前に起こること、産卵後期は生殖巣内の未熟卵は成熟することなく崩壊していくことがわかり、未熟卵の崩壊が始まる産卵後期の3月下旬以降の卵は採苗にあまり寄与しないことが考えられる。従って、採苗に寄与する産卵が起こるのは比較的短い期間であることが推察され、この間の生殖巣重量と水温等の統計的データ等とあわせると採苗予想に資することができる。

参 考 文 献

- 1) Drange, G., and Le Pennec, M. (1989) : Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* **103**, 339-348.
- 2) Osada, M. *et al.* (2003) : Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: control by estradiol-17 β and central nervous system. *Journal of Experimental Zoology*. **299A**, 172-179.

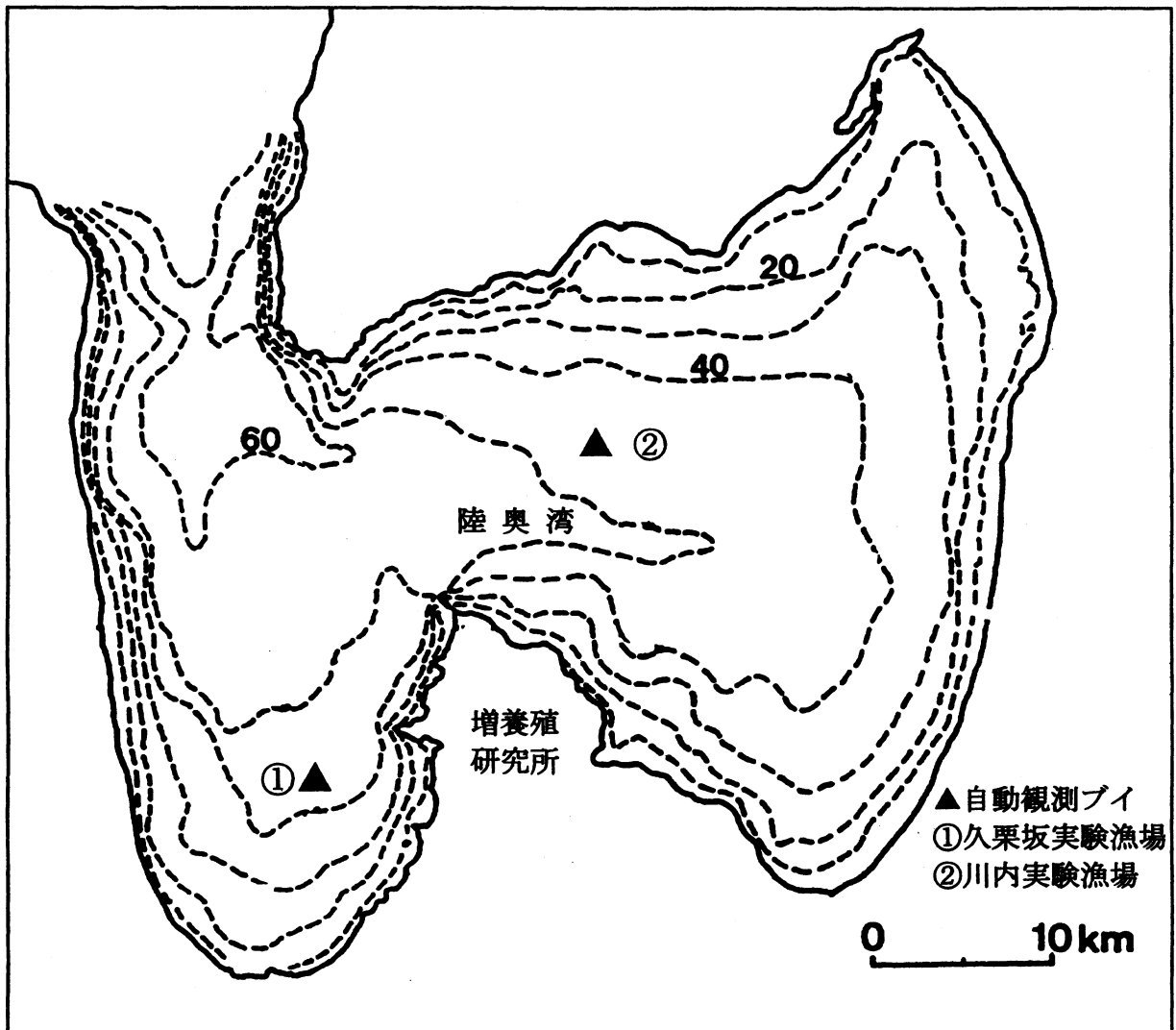


図1 サンプル採取地点と自動観測ブイの位置

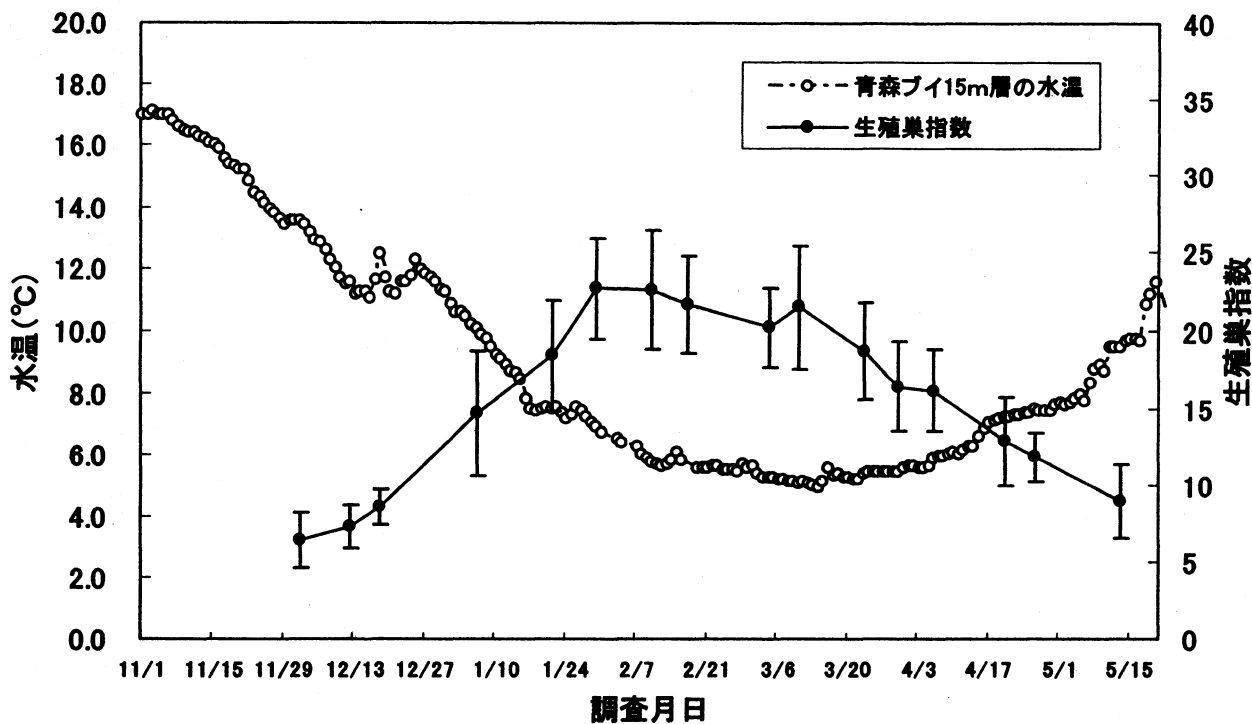
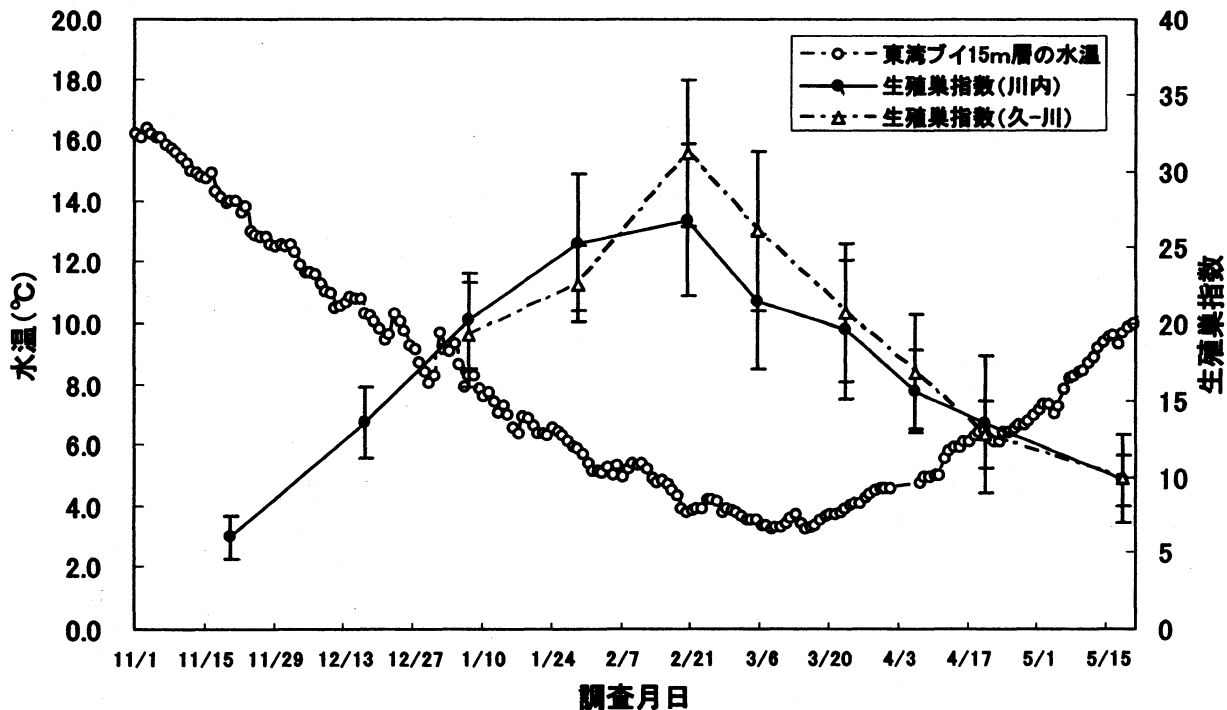


図2 久栗坂実験漁場における生殖巣指数の変化と水温の関係



※久-川：久栗坂実験漁場から川内実験漁場へ移動させた母貝

図3 川内実験漁場における生殖巣指数の変化と水温の関係

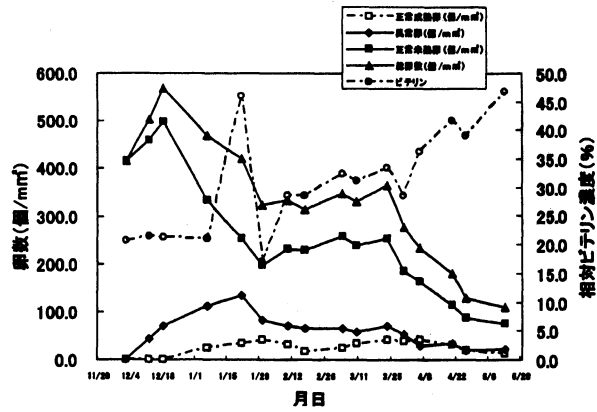


図4 久栗坂実験漁場における1mm²当りの卵数と相対ビテリン濃度の関係

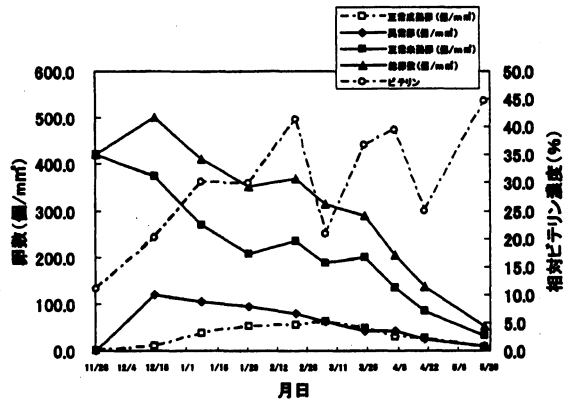


図5 川内実験漁場における1mm²当りの卵数と相対ビテリン濃度の関係

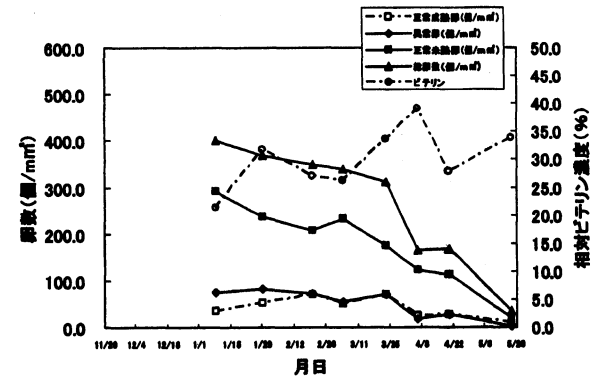


図6 久栗坂実験漁場から川内実験漁場へ移動させた母貝の1mm²当りの卵数と相対ビテリン濃度の関係

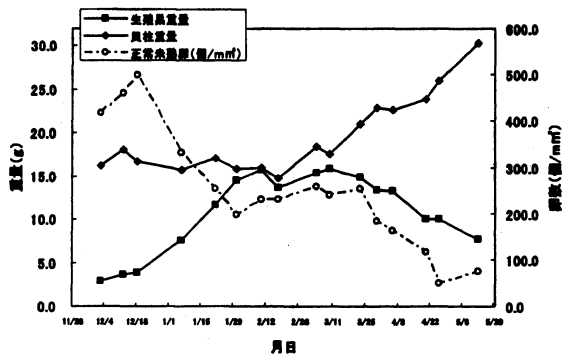


図7 久栗坂実験漁場における生殖巣重量、貝柱重量と1mm²当りの正常未熟卵数の変化

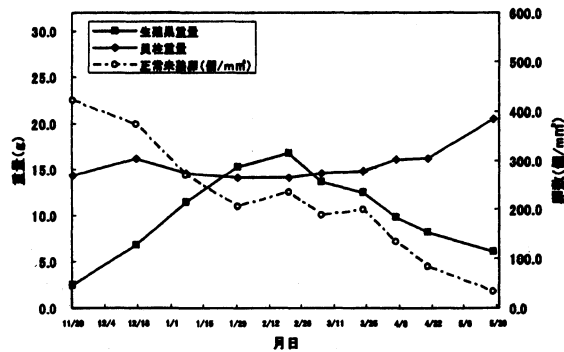


図8 川内実験漁場における生殖巣重量、貝柱重量と1mm²当りの正常未熟卵数の変化

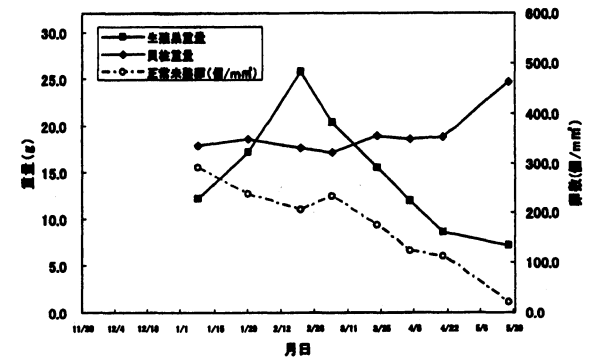


図9 久栗坂実験漁場から川内実験漁場へ移動させた母貝の生殖巣重量、貝柱重量と1mm²当りの正常未熟卵数の変化

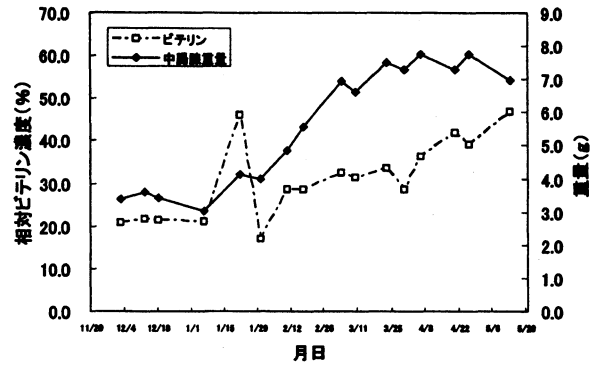


図10 久栗坂実験漁場における血中相対ビテリン濃度と中腸腺重量の変化

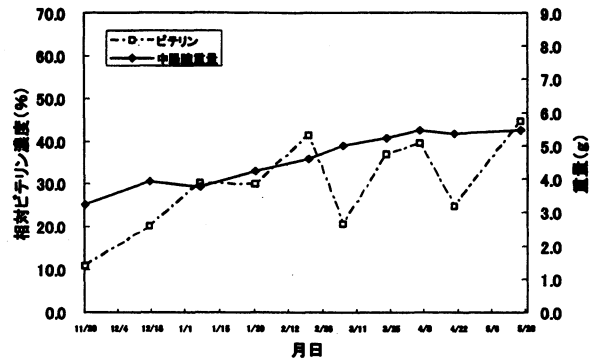


図11 川内実験漁場における血中相対ビテリン濃度と中腸腺重量の変化

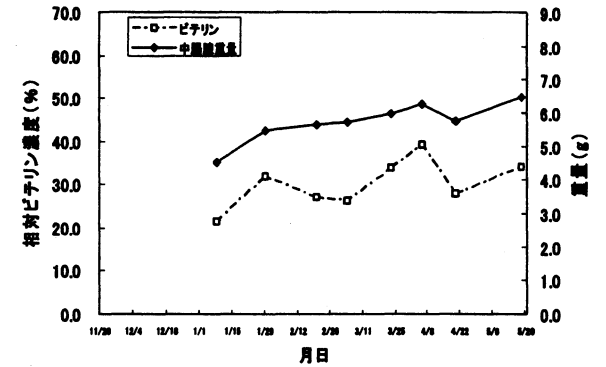


図12 久栗坂実験漁場から川内実験漁場へ移動させた母魚の血中相対ビテリン濃度と中腸腺重量の変化

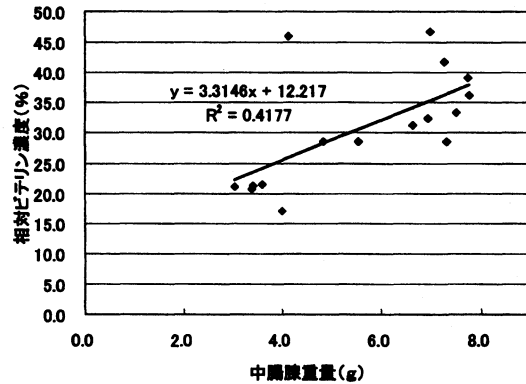


図13 久栗坂実験漁場における血中相対ビテリン濃度と中腸腺重量との関係

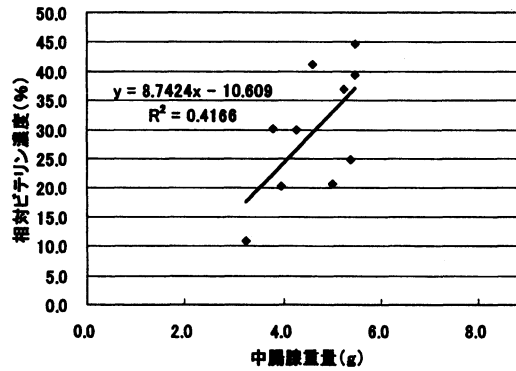


図14 川内実験漁場における血中相対ビテリン濃度と中腸腺重量との関係

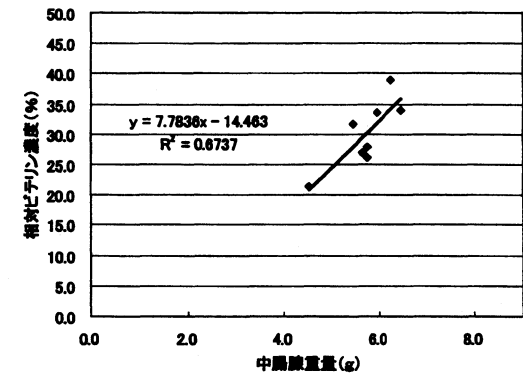


図15 久栗坂実験漁場から川内実験漁場へ移動させた母魚の血中相対ビテリン濃度と中腸腺重量との関係