

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、より精度が高く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卵巣卵の成熟度及び崩壊度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」、④卵質を卵形・卵径で評価する「セロトニン海水浸漬法による卵形・卵径の測定」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

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、平成14年12月から平成15年4月までに久栗坂は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、生殖巣指数は生殖巣重量÷軟体部重量×100として求めた。

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、パラフィンで抱埋した。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。写された卵巣卵の発達段階の判定と総卵数・正常成熟卵・正常未熟卵・異常卵の計数を行い、1mm²当りの卵数として算出した。生殖巣の発達段階の判定は、森ら¹⁾の段階区分に準じて行なったが、成熟度については、濾胞内に未熟な卵が存在する場合であっても産卵が認められれば産卵期として判定した。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、ホタテガイの軟体部と1mm²当りの卵数との関係を調べるため、軟体部指数を算出した。軟体部指数については(軟体部重量-生殖巣重量)÷全重量×100として求めた。

(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と血球を採取した。血リンパはTBSで50倍に希

積し、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）の直説法で分析した。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。

(4) セロトニン海水浸漬法による卵径の測定

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、川内実験漁場の雌個体全てについて卵巣組織を8mm³切り出し、バイアル瓶中で5×10⁻⁶Mセロトニン海水に90分浸漬し卵を放卵させた後、1%中性ホルマリン及び1%グルタルアルデヒドで固定した。こうして得られた卵50個について、卵径の測定と異常卵の判定を行なった。

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2月4日にピークを示し、以後緩やかに低下して3月3日～3月24日に停滞した後、再び緩やかに低下した。川内実験漁場においては1月10日～2月19日に生殖巣指数が高いまま停滞し、その後2月19日に低下、3月7日から再び停滞し4月3日に再び緩やかに低下した。ホタテガイの産卵は、急激な水温の上昇により誘発されるが²⁾、久栗坂実験漁場においては2月10～11日、川内実験漁場においては2月25～26日の水温上昇が大規模な産卵のきっかけとなったと推定された。

(2) 卵巣組織観察

久栗坂実験漁場及び川内実験漁場の生殖巣の発達段階について、それぞれ図4及び図5に示した。

成熟度については、川内実験漁場の方が久栗坂実験漁場に比べて成熟は早く、未分化期及び分化初期の個体はサンプリング開始時には既に見られなくなっていた。なお、組織切片を観察した結果、調査期間中常に両漁場とも正常卵と異常卵が混在していた。

1mm²あたりの総卵数と異常卵数の関係、正常成熟卵、正常未熟卵についてそれぞれ図6、図7、図8に示した。

総卵数については、図6に示したように両漁場間に有意な差は見られなかったが、異常卵数については、川内実験漁場のほうが総じて高い値を示した。

正常成熟卵数については、川内実験漁場においては産卵期に向けて増加していき生殖巣指数とほぼ同じ傾向を示したが、久栗坂実験漁場においては産卵期を迎える前に減少に転じ、以後増減を繰り返した。

正常未熟卵数については、川内実験漁場においては正常成熟卵の増加に伴い未熟卵は減少し、常に減少傾向となったが、久栗坂実験漁場においては産卵後に一旦増加する傾向が見られた。

軟体部指数と1mm²当りの卵数の関係については図9及び図10に示した。

久栗坂実験漁場においては成熟の初期段階では総卵数と同じ傾向を示したが、それ以後は総卵数が増加すると軟体部指数は低下し、総卵数が減少すると軟体部指数は上昇した。また、大規模な産卵後も軟体部指数は増減を繰り返した。一方、川内実験漁場においては軟体部指数が低下すると異常卵が増加し、軟体部指数が上昇すると異常卵が減少した。久栗坂実験漁場と比較すると軟体部指数に大きな変化は見られず、大規模な産卵後は高めに推移した。

(3) ELISA法による卵黄蛋白の測定

久栗坂実験漁場及び川内実験漁場の血リンパ中の相対ビテリン濃度と異常卵数の変化について、図11及び図12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。いずれの漁場についても相対ビテリン濃度は時期によって変化したが、異常卵数と相対ビテリン濃度の変化は同じ傾向を示さず、むしろ正常成熟卵数の変化と同じ傾向を示した（図7）。また、いずれの漁場においても成熟の初期段階でビテリン濃度が高い値を示した。異常卵については川内実験漁場の方が総じて多かったが、平均相対ビテリン濃度については川内、久栗坂の間に有意な差は見られなかった。

(4) セロトニン海水浸漬法による卵径の測定

図13にセロトニン放出卵の正常卵率と生殖巣指数の変化について、図14にセロトニン放出卵の卵径と相対ビテリン濃度の変化について示した。

正常卵率は生殖腺の成熟に伴って上昇し、産卵があった後は一旦減少、再び上昇して2回目の産卵とともに減少するという傾向を示した。正常卵径については1月21日と2月4日に100 μm を越える値を示し、3月18日に最小値を示した後再び大きくなった。異常卵径についても同様であったが、正常卵と比べてその大きさにはばらつきが見られた。また、相対ビテリン濃度と卵径を比較すると、その時期的変化がほぼ一致した。

4. 考 察

従来、産卵期を推定するための手法としては、生殖巣指数のモニタリングが行なわれてきたが、生殖巣指数が十分に高くても採苗不振となった年があり^{3) 4)}、生殖巣指数から卵質を判断することはできなかった。更に、低温で長期間ホタテガイを飼育すると卵巣内の卵細胞が崩壊することが確認されていて、低水温が長期間続くと生殖巣指数は上昇しても卵細胞の成熟が進みすぎて、卵細胞の崩壊につながり、正常な卵細胞が少なくなっていくことが示唆されている⁵⁾。このため生殖巣を組織学的に観察することも行なってきたが、この判断には個人差があり、客観的な評価指標とするには十分ではなかった。そこで当該試験では生殖巣を組織学的手法に生化学的分析を加えて、数値化することで新たな評価指標とすることができないかを検討した。

生化学的手法としては卵黄蛋白の測定を検討した。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^{6) 7)}。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、低水温などの影響で異常卵となり、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る。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.al⁷⁾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、今回の調査の結果、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（図11、図12）。相対ビテリン濃度は異常卵数よりもむしろ正常成熟卵数の変化及び卵の成熟（卵径の増大）と同じ傾向を示した。更に、低水温の影響もなく未熟な卵細胞が多数存在する成熟の初期段階においてもビテリンが検出されたことは、ビテリン合成が助細胞以外の場所で行なわれ、血液で運ばれて卵細胞に取り込まれるという可能性を示唆している。従って、血リンパ中のビテリン濃度を測定することは卵崩壊によるものではなく、むしろ卵成熟の指標となる可能性がある。

卵細胞の崩壊の要因については、2つの漁場間に差が見られた。軟体部指数と卵数の比較から（図7、図8、図9、図10）、成熟初期の頃は久栗坂、川内ともに軟体部が減少していき、更に総卵数も減少させて卵細胞を成長させていた。しかし、産卵期間には久栗坂は産卵とともに軟体部を減少させて卵細胞を増加させるとともに、卵細胞を成長させていった。一方、川内は産卵期間中は軟体部を減少させたが卵細胞は増加させずに卵細胞を成長させることだけを行っていた。

従来、産卵期推定の指標とされてきた生殖巣指数については、川内実験漁場の方が全体的に高い値を示している（図2、図3）にもかかわらず、卵数には有意な差が見られなかった。更には川内実験漁場の方が高い異常卵数を示した。生殖巣指数は水温にも影響され、水温が低いほど生殖巣指数が高くなることが報告されている⁸⁾。しかし、低水温が長期間続くと正常な卵として産卵される卵数の減少または卵質の劣化によりその後の浮遊幼生の生残に大きな影響を与えることが示唆されている⁹⁾。川内が久栗坂より生殖巣指数が高く異常卵が多いのは、川内実験漁場が久栗坂実験漁場よりも水温が低かったことが影響したと考えられる。産卵以前の卵形成からすでに川内の方が久栗坂よりも異常卵が多いのは、水温による影響か、母貝そのものの影響かを検討する必要がある。

このように平成14年度の試験結果からは、ビテリン合成が助細胞以外で行なわれて血中を運ばれる可能性があること、卵細胞崩壊のメカニズムには過熟によるものと生産調整によるものとが考えられる。今後は組織学的観察や中腸腺等他器官の抽出液及び血球抽出液の分析、また過去の卵巢組織の観察などを行い、何を指標とするのか検討する必要がある。

引用文献

- 1) 森勝義ら (1977) : 岩手県唐丹湾における養殖ホタテガイ生殖巣の周年変化に関する組織学的研究. 日本水産学会誌, 43 (1), 1-8.
- 2) 山本護太郎 (1950) : 陸奥湾におけるホタテガイ増殖. 水産増殖叢書, 6, 77 p, 日本水産資源保護協会, 東京.
- 3) 平野忠ら (1982) : 昭和57年度ホタテガイ天然採苗予報調査. 青水増事業報告, 13, 83-98.
- 4) 伊藤義三 (2001) : 噴火湾における養殖ホタテガイの採苗不良. 北水試だより, 51, 1-5.
- 5) 小坂善信 (1997) : ホタテガイ優良品種作出試験-I. 青水増事業報告書, 26, 173-182.
- 6) Drange, G., and Le Penneec, M. (1989) : Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103, 339-348.
- 7) 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.
- 8) 小坂善信 (1994) : ホタテガイ優良品種作出試験-I. 青水増事業報告書, 23, 125-132.

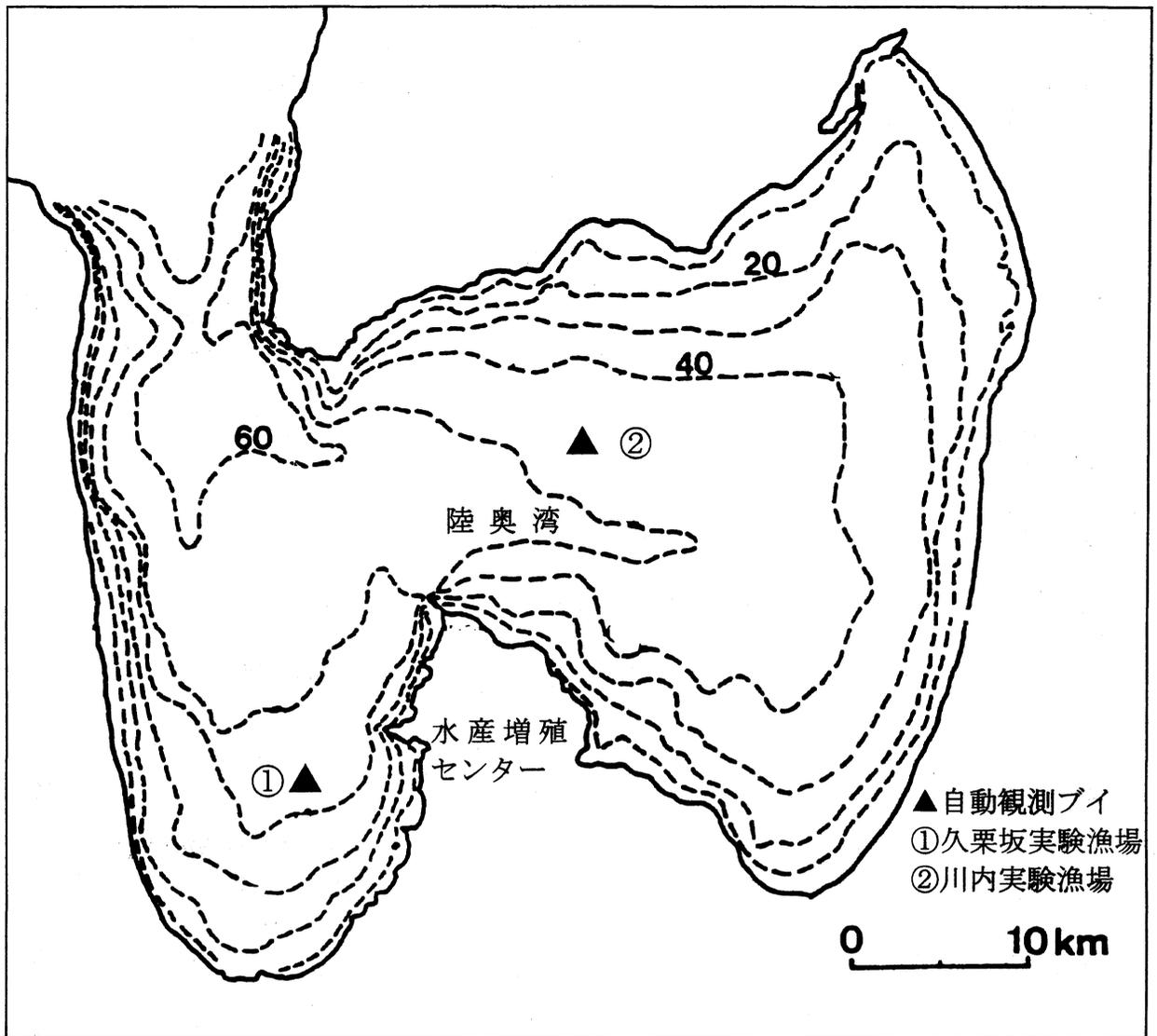


図1 サンプル採取地点と自動観測ブイの位置

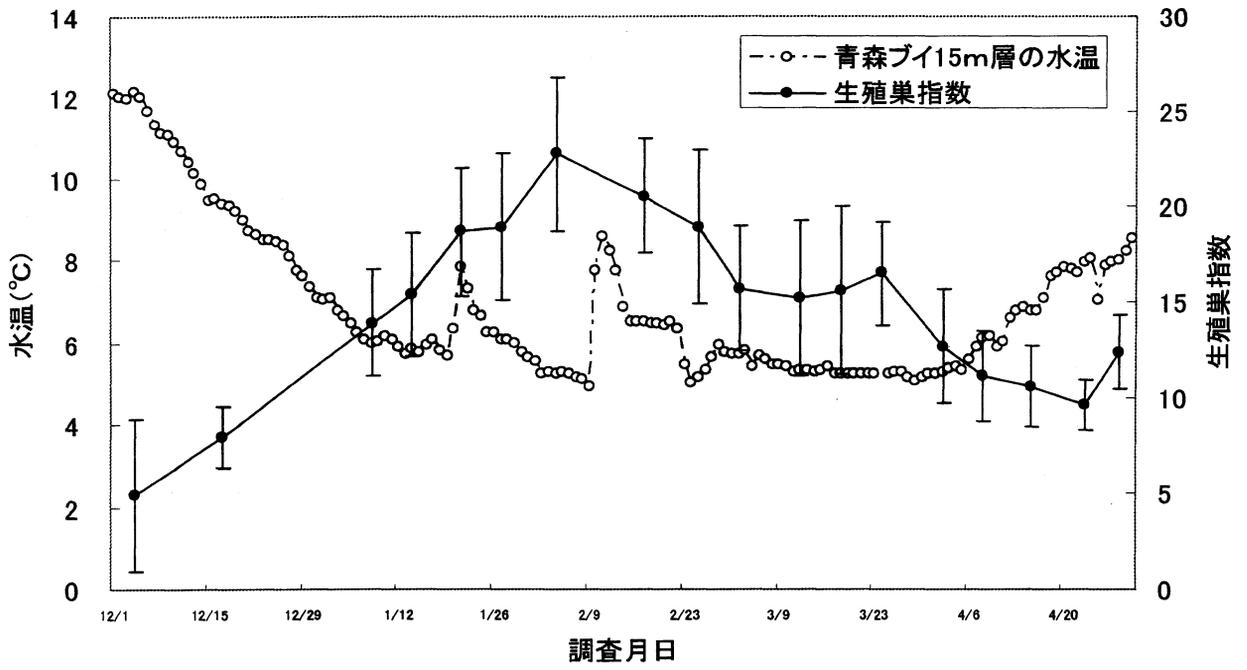


図2 久栗坂実験漁場における生殖巣指数の変化と水温の関係

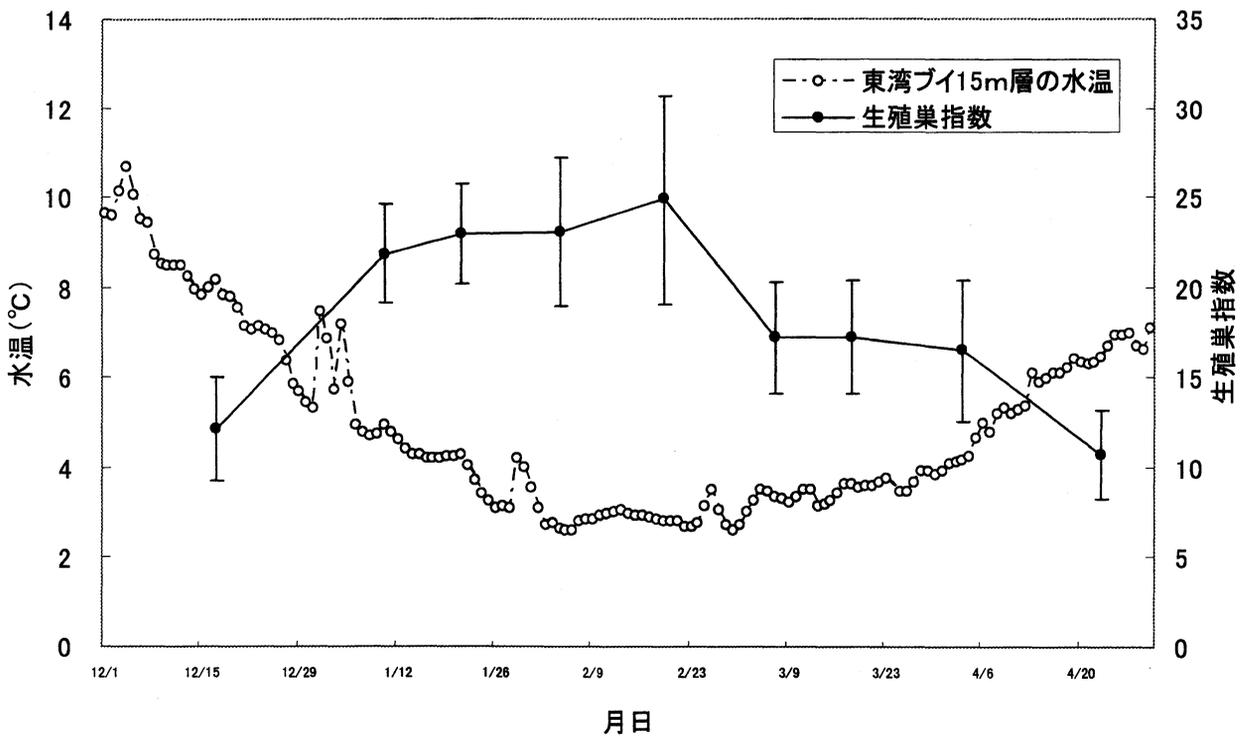


図3 川内実験漁場における生殖巣指数の変化と水温の関係

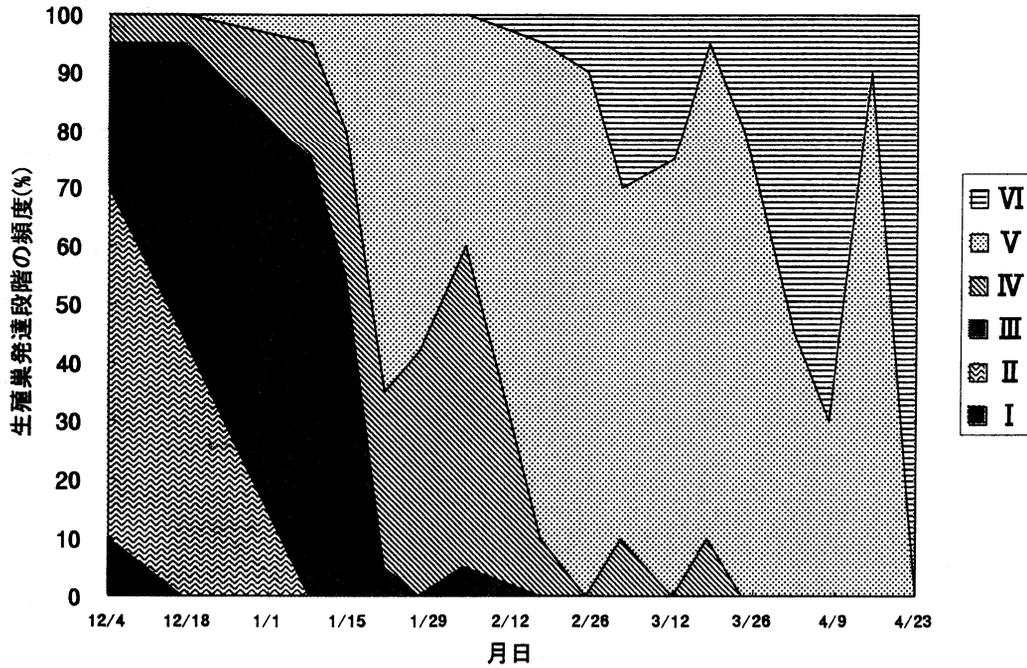


図4 久栗坂実験漁場における生殖巣発達段階の変化

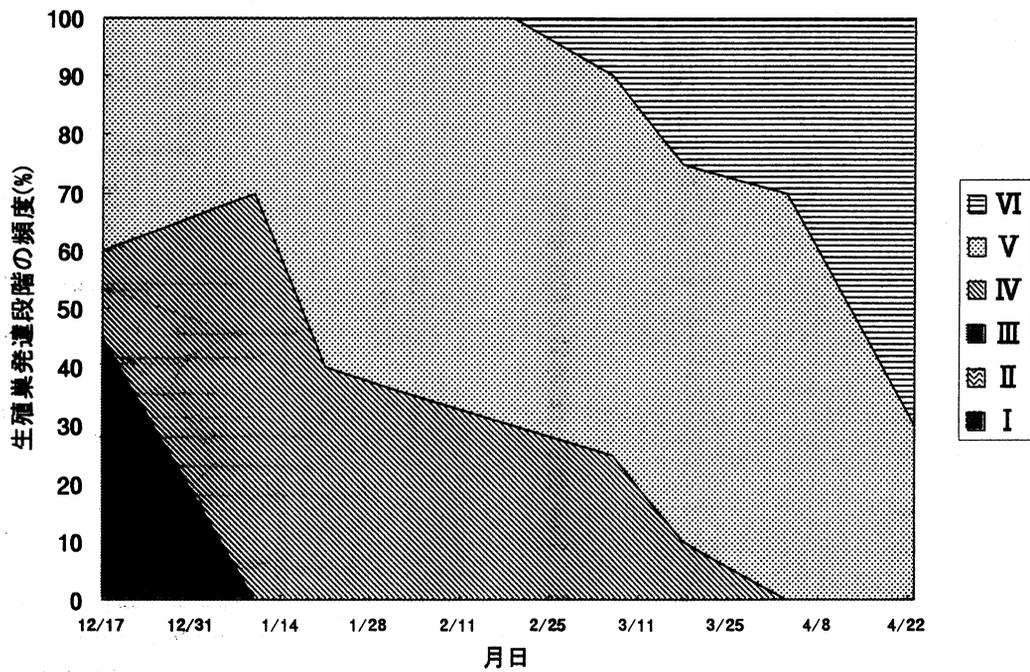


図5 川内実験漁場における生殖巣発達段階の変化

※成熟度の段階区分は次のとおり。

- | | | |
|----------|-----------|-----------|
| I : 未分化期 | II : 分化初期 | III : 成長期 |
| IV : 成熟期 | V : 産卵期 | VI : 退行期 |

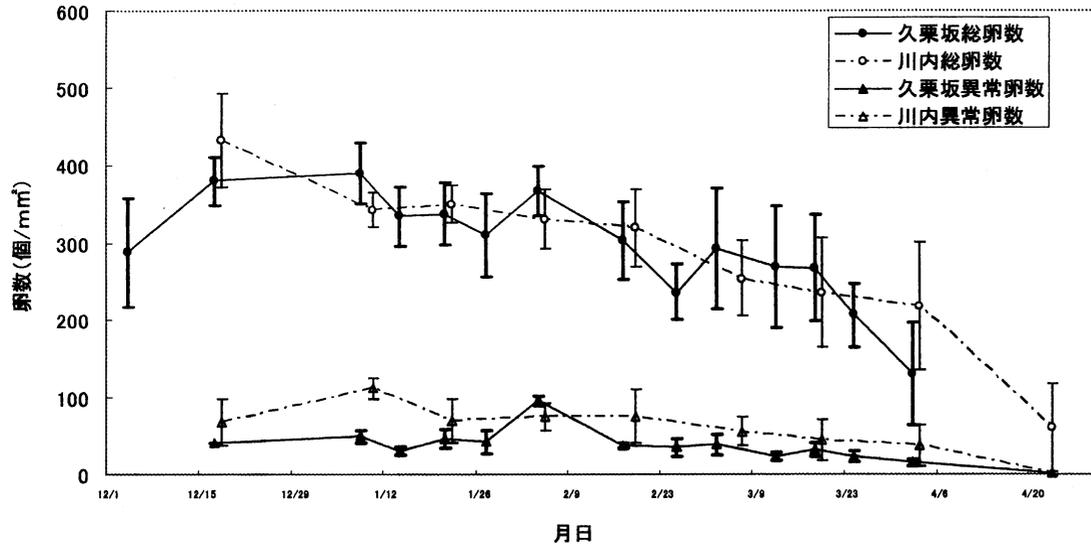


図6 1 mm²当りの総卵数と異常卵数

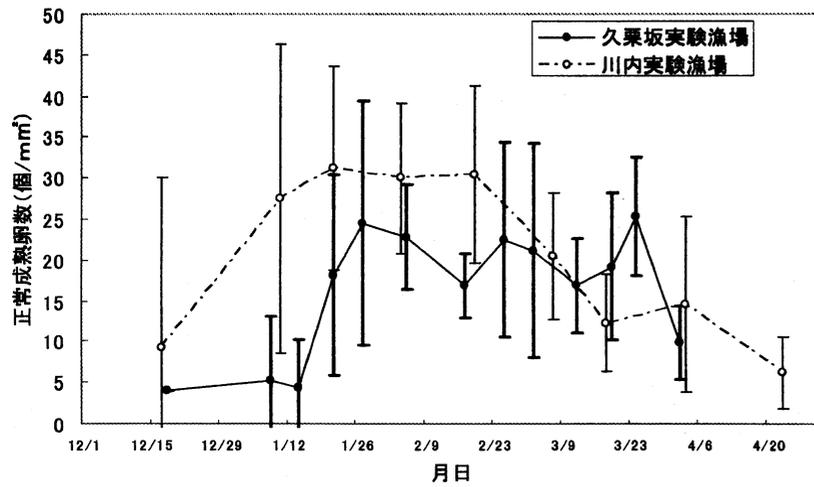


図7 1 mm²当りの正常成熟卵数

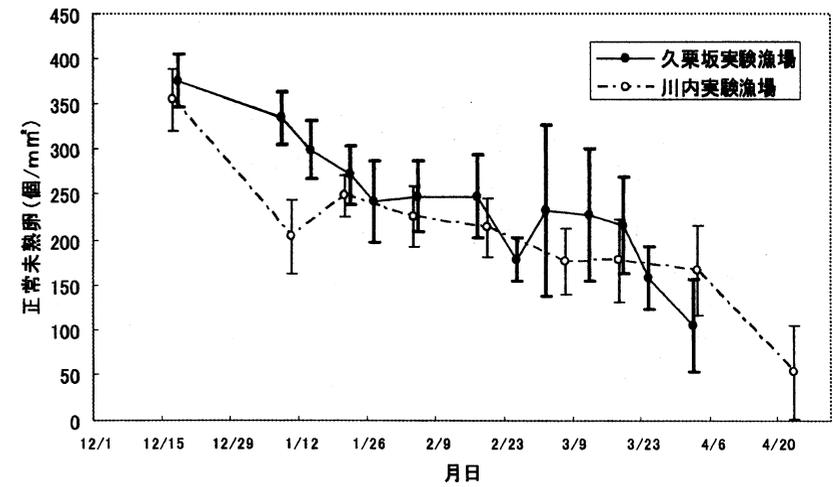


図8 1 mm²当りの正常未熟卵数

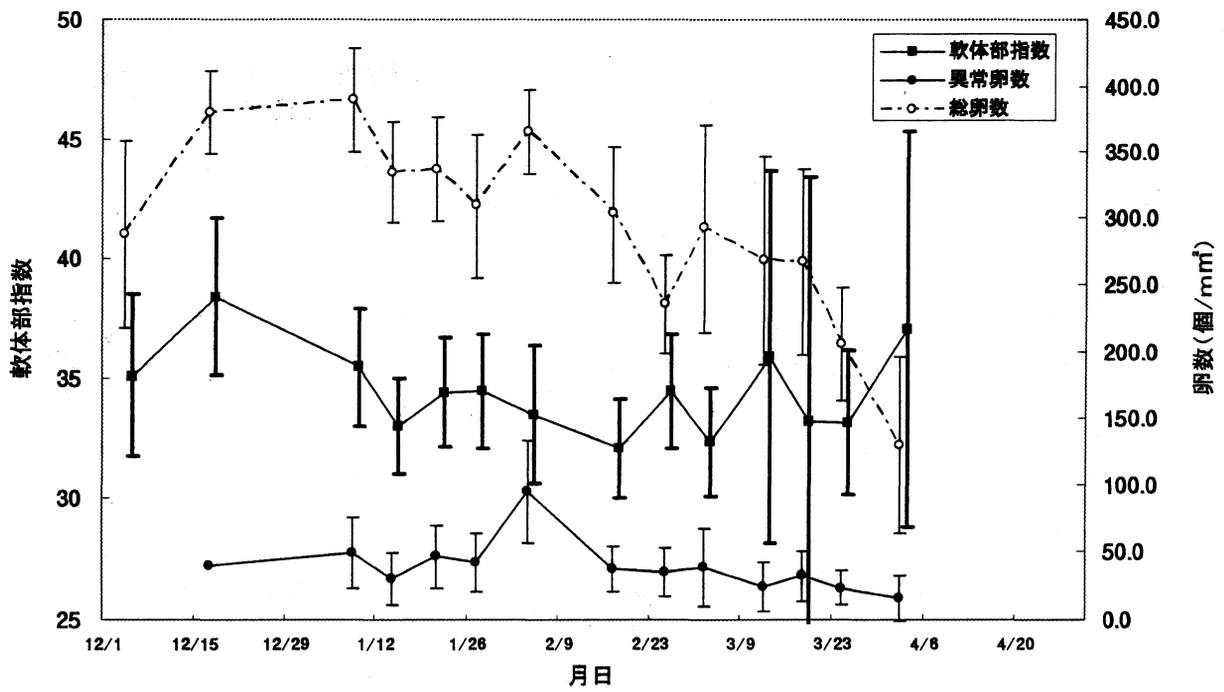


図9 久栗坂実験漁場における軟体部指数と1 mm²当りの卵数との関係

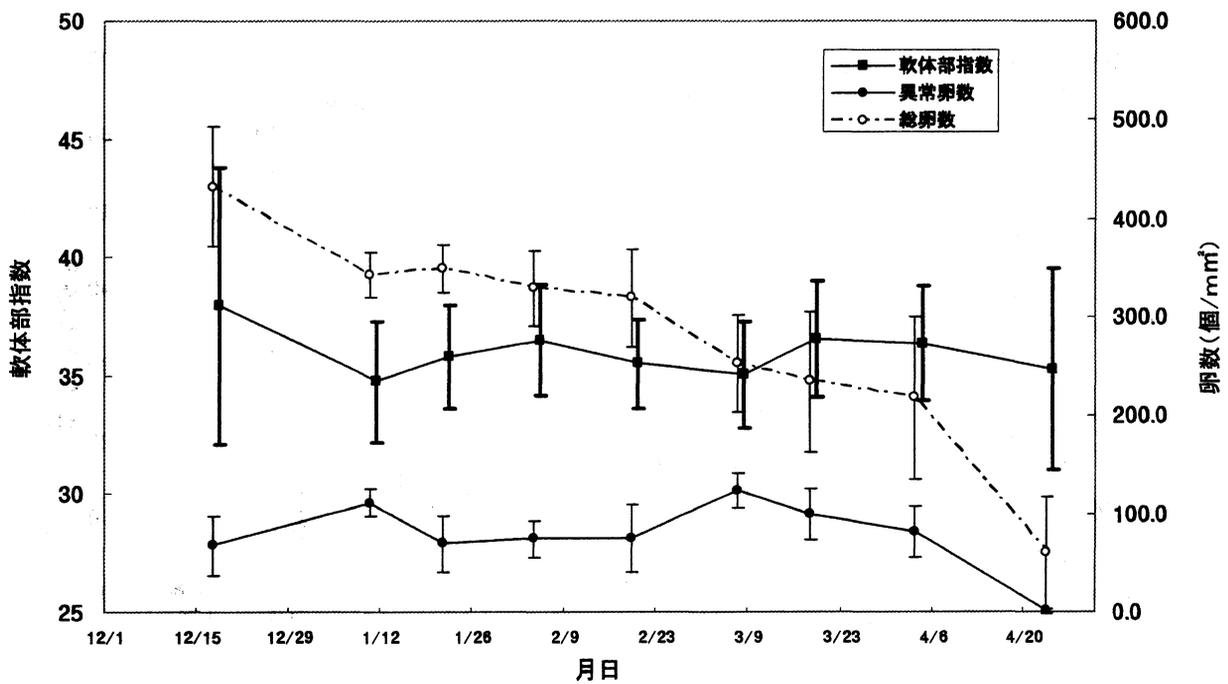


図10 川内実験漁場における軟体部指数と1 mm²当りの卵数との関係

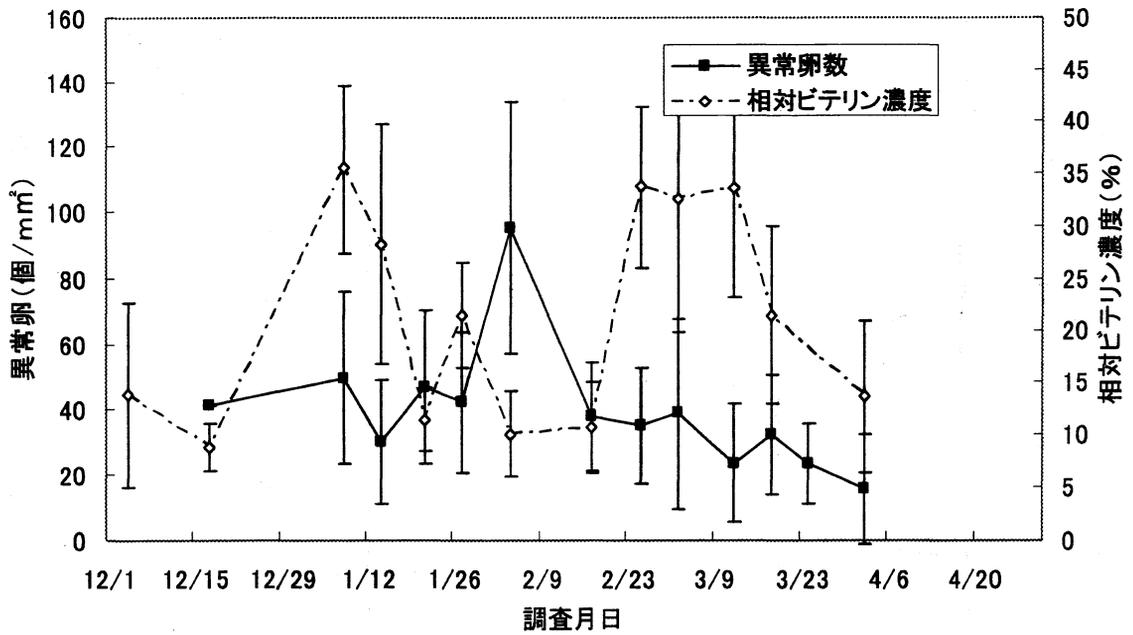


図11 久栗坂実験漁場における血リンパ中の相対ビテリン濃度と異常卵数の変化

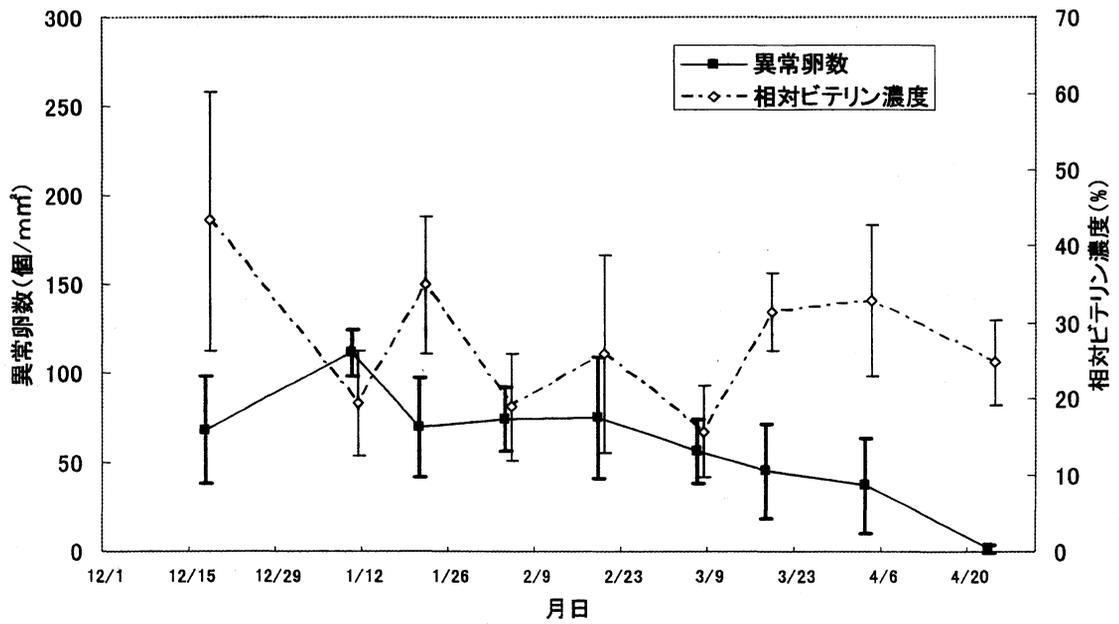


図12 川内実験漁場における血リンパ中の相対ビテリン濃度と異常卵数の変化

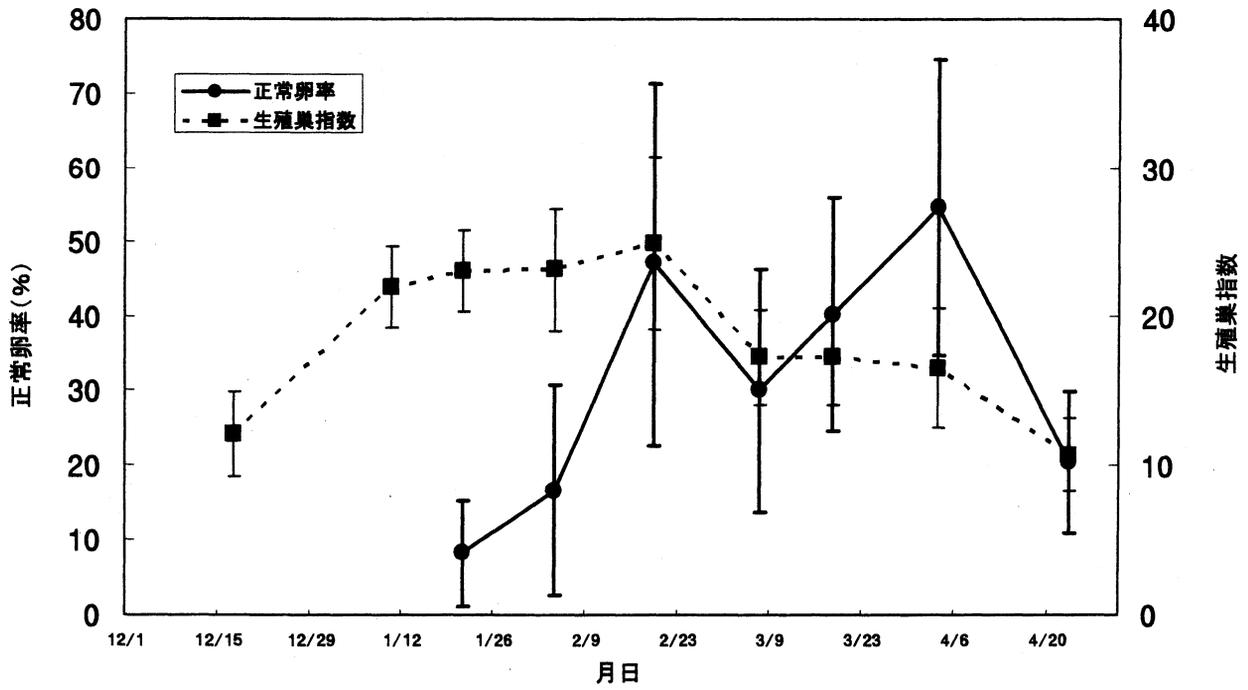


図13 セロトニン放出卵の正常卵率と生殖巣指数の関係

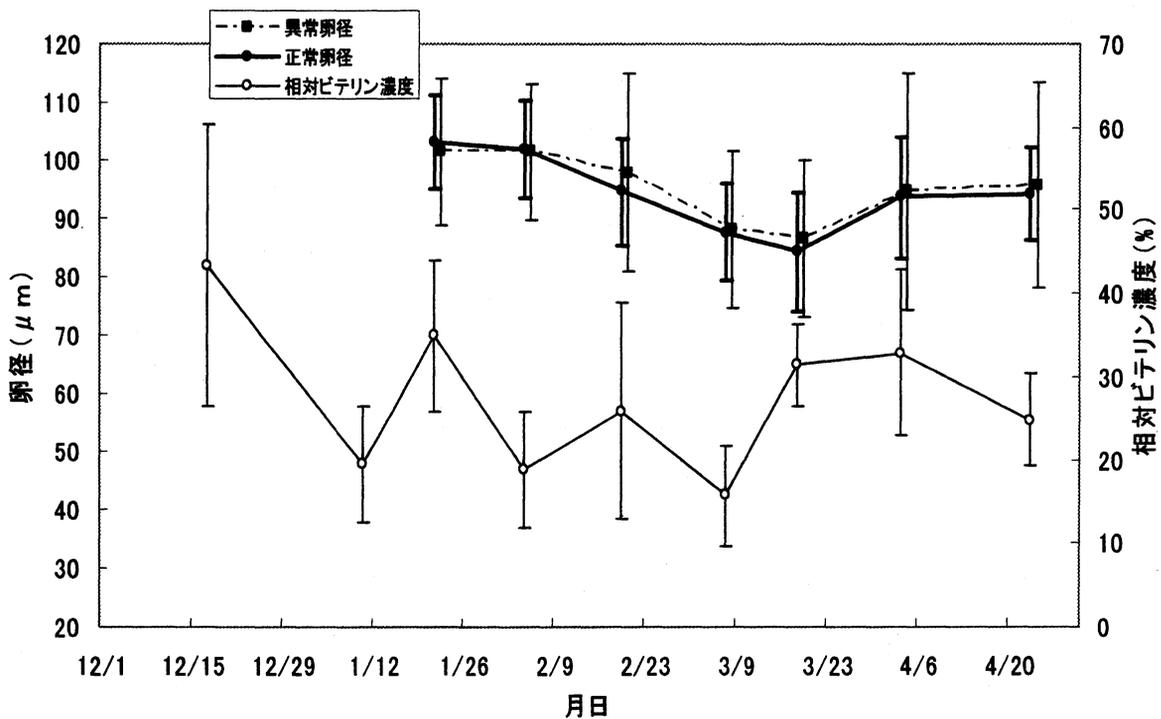


図14 セロトニン放出卵の卵径と血リンパ中のビテリン濃度の関係