

ホタテガイの卵巣に及ぼす低水温飼育の影響

—卵巣の成熟状態の持続と酸性 ホスファターゼ活性の増加—

長内 健治・沼宮内隆晴・平井 説郎・経塚啓一郎・倉石 立・篠崎 智行

(東北大学理学部附属臨海実験所)

陸奥湾においては、ホタテガイの生殖巣は秋から冬にかけての低水温期に発達し(山本 1943、Osanai *et al.* 1980)、3月から5月上旬までの間の急速な水温上昇(産卵臨界温度8.0~8.5℃)によって放卵が誘発されると言われている(山本 1964)。昭和57年にはホタテガイの生殖巣の発達が良好であったにもかかわらず、出現したラーバは少なかった。その原因は、3~4月に低水温が続き、水温上昇が遅れて産卵が十分に誘発されなかったためであろうと推定された。さらに、卵母細胞が放出されないまま卵巣内に留まり、卵巣が成熟期の状態を長期に渡って持続した時、卵は過熟となり、その後放出されたとしても正常に受精または発生出来ず、ラーバ出現の低下をもたらした可能性も考えられる。そこで、本研究では、低温状態に長期間置いた時、実際に放卵が抑制されるか、放卵を抑制された卵巣でどのような異常が起こるかを実験的に解析することを試みた。

材 料 と 方 法

青森県平内町土屋地先(逢坂創市氏施設)でパールネットで垂下養殖されていたホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の成員を次の4実験区に分けて飼育した。

- (1) 低温水槽飼育: 青森県水産増殖センターの低温水槽(実験期間中水温を3.1~4.1℃に保持)に置いた。餌は与えなかった。
- (2) 対照水槽飼育: 青森県水産増殖センターの水槽に濾過海水を流し、温度を制御せずに飼育した。餌は与えなかった。
- (3) 天然流水水槽飼育: 東北大学臨海実験所の水槽で濾過していない海水を掛け流して飼育した。海水中に含まれる餌が供給されたことになる。水温は調節しなかった。
- (4) 野外垂下養殖: 上記の水槽飼育と対比するため、土屋地先で垂下養殖(丸籠)しているものを調査した。

野外養殖具の調査は昭和57年12月22日より58年6月20日まで、実験飼育は昭和58年3月15日より6月20日まで実施した。この期間中に月1~2回、計測(殻長、全重量、軟体部重量、生殖巣重量)を行い、組織観察および酸性ホスファターゼ活性測定のための生殖巣片を採った。

実験区(1)、(2)および(4)の計測と試料採取及び水温記録は青森県水産増殖センターのスタッフが行った。(1)~(3)では雌5、雄5の計10個体、(4)では雌雄合せて30個体で計測した。実験期間の水温の変動は図1に示した。

本報告は昭和58年度に青森県水産増殖センターより受託した「ホタテガイの卵機能と初期飼料に関する研究」(代表者 長内健治)の成果の一部である。

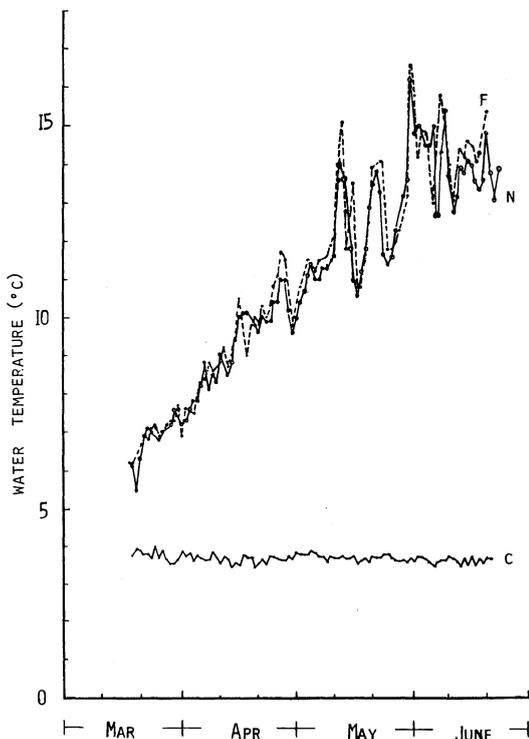
組織観察法：生殖巣片をBouin 氏液で固定し、パラフィン法で切片とし、Delafield 氏ヘマトキシリン・エオジンで染色して検鏡した。

酸性ホスファターゼ活性測定法：卵の過熱や退化の時に細胞のライソゾームが増加すると言われている (Masuda・Dan 1977)。そこで、ライソゾームの指標酵素として知られている酸性ホスファターゼの活性の測定を試みた。生殖巣片0.4gを0.4mlの蒸留水に入れ、ピンセットで破碎したのち、4.5 μ lの酵素安定剤(20%酢酸)を加え、30分間置いて、5000rpmで30分間遠心分離して上清を採り、試料(酸素液)とした。この上清の酵素活性をワコー酸性ホスファターゼB-テスト・キットを用いて測定した。基準緩衝液(0.05Mクエン酸緩衝液、PH. 8、5mlに対しp-ニトロフェニール磷酸二ナトリウム12.3mgを加えたもの)0.5mlに試料0.1mlを加え、37 $^{\circ}$ Cの恒温水槽中で30分間加温したのち、0.05N NaOH 5.0mlを加えた。基準緩衝液(試料を含まない)を30分間加温し、NaOHを加えてから試料0.1mlを添加したものを盲検用とし、これをレファレンスとして、日立ダブルビーム分光光度計200-20を用い、405nmにおける吸光度(p-ニトロフェニールによる)を測定し、検量線によってBessey-Lowry単位(BL単位：1lの試験液が37 $^{\circ}$ Cで1時間基質に作用し、p-ニトロフェニール1mMを生成する酵素量mM)に換算した。

結 果

1 生殖巣の発達概況

生殖巣重量および生殖巣指数(生殖巣重量 \times 100/軟体部重量)から生殖巣の発達状況の推移を推定した。



垂下養殖具。土屋地先で垂下養殖された貝の昭和57年末から昭和58年6月までの殻長、全重量、軟体部重量、生殖巣重量、生殖巣指数(雌雄合せて30個体の平均、但し3月22日は26個体)を図2に示す。生殖巣重量は12月以降急速に増加し、3月上旬に最高値を示し、以後減少し、5月下旬には12月の水準にもどった。生殖巣指数も同様に変化し、2月下旬~3月上旬に最高に達し、以後減少した。生殖巣重量及び生殖巣指数が減少し始めた後でも殻長、全重量、軟体部重量は増加しているので、生殖細胞の放出期にも成長を続けていると判断される。この生殖巣指数の経時的変化は例年とほぼ同様である。

図1 野外および水槽の水温変化(昭和58年3月19日~6月20日)。F:平内町茂浦の表層水温、N:対照水槽、C:冷却水槽。

図2 野外垂下養殖貝の殻長、全重量 (TW)、軟体部重量 (MW)、生殖巣重量 (GW)、生殖巣指数 (GI) の変化 (昭和57年12月~58年6月)

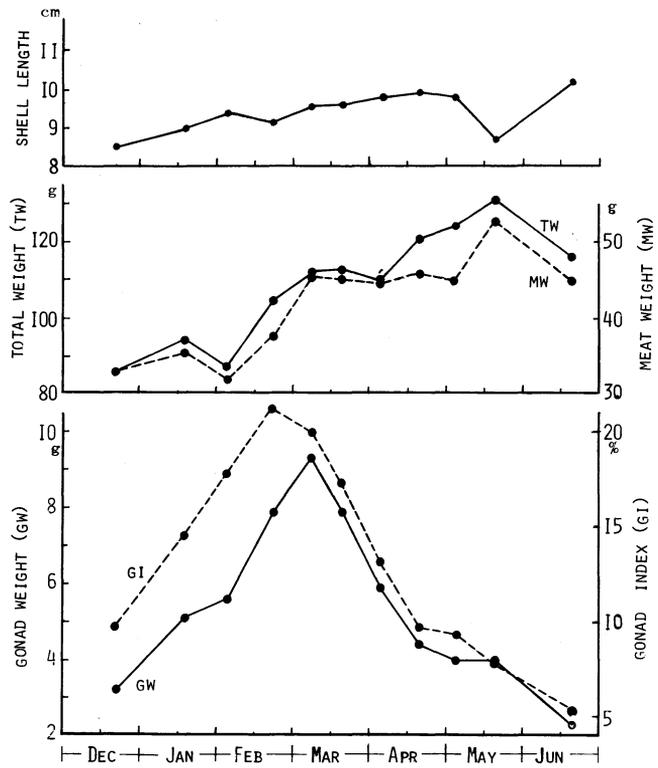
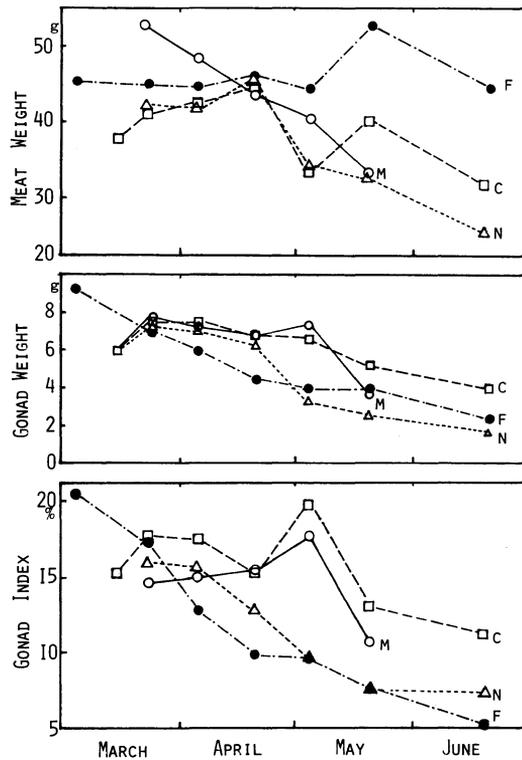


図3 軟体部重量、生殖巣重量、生殖巣指数の推移の比較 (昭和58年3月~6月)。

F: 野外養殖 C: 冷却水槽飼育
N: 対照水槽飼育 M: 天然流水水槽飼育



水槽飼育貝はそれぞれ10個体（雌5、雄5）を採って計測した。水槽飼育を開始した3月中旬には野外のものは放卵を開始していた。

冷却水槽飼育貝。低温に置かれた貝は全重量、軟体部重量の増加を示さなかった。生殖巣重量は徐々に減少するが、下降の程度は緩く、6月下旬に至っても最高時の半分程度の重量（約4g）を保っていた。生殖巣指数も高く、6月下旬でもさほど低下していなかった。低温に置かれることによって、生殖巣重量及び生殖巣指数の下降が抑えられると判断される。

対照水槽飼育貝。濾過海水を流した非冷却水槽飼育貝では殻長の増加はみられず、全重量及び軟体部重量は減少していた。実験終了時の軟体部重量は開始時の半分程度（42~46gから23gまで減少）で、この減量は生殖巣重量の減少（5~6g）をはるかに上廻るものである。

天然流水水槽飼育貝。天然流水を流した水槽においても、軟体部重量は減少した。しかし、生殖巣重量及び生殖巣指数は5月上旬までは高かった。

2 卵巣の組織観察

4月上旬から6月下旬にわたって採取した卵巣について組織学的観察を行い、各個体の卵巣の発達状態を調べた。発達段階の区分はOsanai (1975) 及び森・長内・佐藤 (1977) によった。本観察で認められた発達段階の区分は次の通りである。

第Ⅳ期（成熟期） 卵巣は黄赤色または紅色で、卵巣小胞内腔は十分成長した卵母細胞で充満している（図4a, f）。

第Ⅴ期（放出期） 卵巣小胞に空所がみられるが、なお、多くの卵母細胞が残っている（図4d, e）。

第Ⅵ期（放出未期） 大部分の卵巣小胞が空になり、小数の卵母細胞が残っている（図4b）。

第Ⅰ期（未分化または休止期） 生殖巣は萎縮し、小胞内に成長した卵母細胞は認められず、生殖小胞上皮にわずかに生殖原細胞または若い卵母細胞が見られる（図4c）。

表1 冷却および非冷却条件下におけるホタテガイ卵巣の発達状態

年月日	飼育条件	殻長 cm	全重量 g	軟体部重量 g	生殖巣重量 g	生殖巣指数 %	生殖巣発達段階				観察 個体数
							Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅰ	
58. 4. 5	冷却水槽	9.9	112.4	46.4	7.8	16.9	5	0	0	0	5
	対照水槽	9.5	99.0	39.2	6.8	17.1	5	0	0	0	5
	天然流水水槽	9.5		46.9	7.6	15.8	5	0	0	0	5
	野外垂下	9.9	115.4	46.0	5.1	11.1	4	1	0	0	5
58. 5. 4	冷却水槽	9.3	93.6	33.8	7.0	21.2	5	0	0	0	5
	対照水槽	8.9	105.0	34.0	3.3	9.6	0	3	2	0	5
	天然流水水槽	10.0		41.4	9.5	22.9	4	1	0	0	5
	野外垂下	9.8	123.6	43.4	4.3	10.4	1	2	2	0	5
58. 6. 20	冷却水槽	8.7	91.2	32.8	4.0	13.6	4	1	0	0	5
	対照水槽	9.3	87.6	21.4	1.7	8.9	1	1	2	1	5
	野外垂下	10.6	145.2	53.4	2.7	5.1	1	1	1	2	5

前記の基準による卵巣の発達状態を表1に総括した。4月上旬（4月4日または5日）には、野外養殖群では一部に放卵を行っているものもあったが、他の飼育群はすべて成熟期の卵巣を持っていた。

5月4日には低温飼育貝はすべて卵母細胞の充満した卵巣を持ち、天然流水群では大部分（4/5）が成熟期であった。これに対し、野外養殖群及び濾過海水非冷却飼育貝では卵の放出（または消失）が進んでいた。

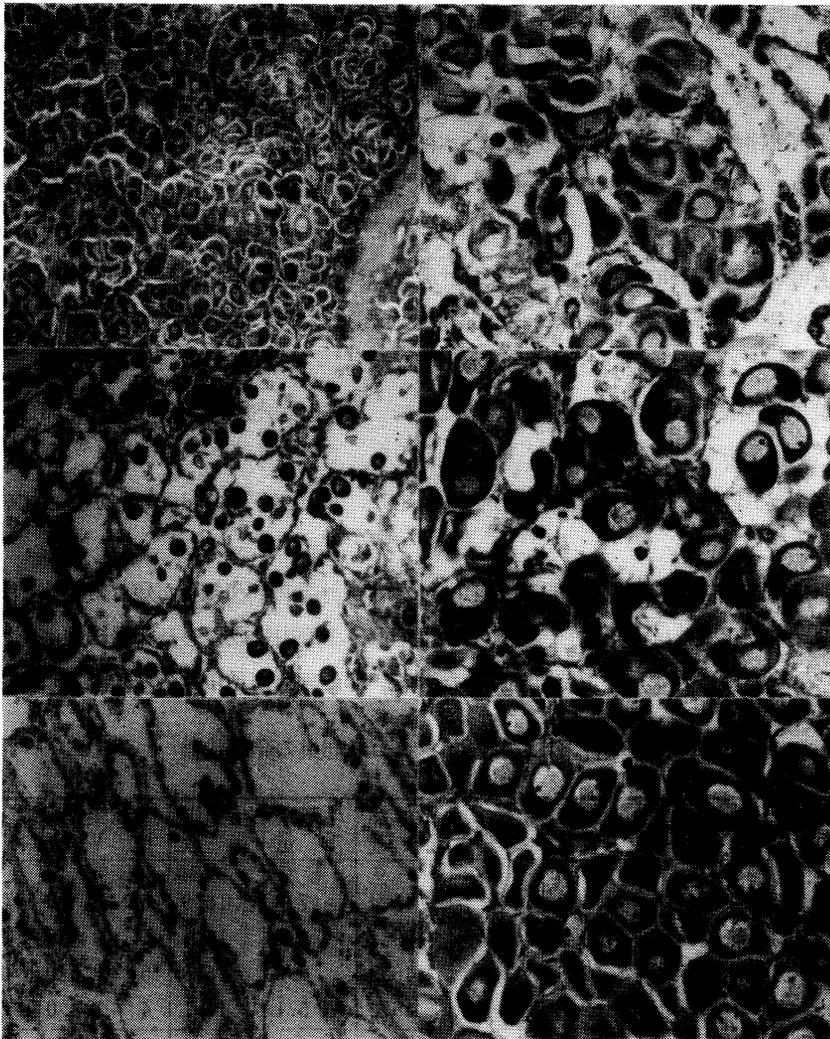


図4 卵巣組織の顕微鏡写真。a：成熟期（第Ⅳ期）昭和58年4月5日採取野外養殖貝。変形の著しい卵もみられる（矢印）。b：放出末期（第Ⅶ期）5月4日採取野外養殖貝。未放出の残存卵は退化している。c：放出の終わった休止期の卵巣。6月20日採取野外養殖貝。d：6月20日採取の対照水槽飼育貝。卵母細胞が多数残存し、この卵巣は高いAP活性（ $>6BL$ ）を示した。e：高いAP活性を示した冷却飼育貝の卵巣。f：6月20日採取の冷却飼育貝の卵巣。生殖小胞内にはなお卵母細胞が充満している。a～c $\times 45$ ，d～f $\times 113$ 。

6月20日には野外養殖及び対照水槽飼育貝で卵放出が進み、生殖小胞が空になったものが多い。しかし、なお発達した卵巣を持ったものもあった（各1/5）。冷却水槽飼育群ではなお卵母細胞の充満した卵巣を持っていた。

成熟期の卵巣中にしばしば著しく変形した卵母細胞がみられた。この細胞は卵核胞の消失していたものが多く、放卵直前の成熟卵または過熟卵と思われる。

3 卵巣の酸性ホスファターゼ活性

野外養殖貝については昭和58年3月31日から6月20日、水槽飼育貝については4月20・21日、5月4日及び6月20日に生殖巣の酸性ホスファターゼ活性（AP活性）を測定した。結果は表2に総括して示した。

野外垂下養殖貝

3月31日～4月5日のAP活性は卵巣で1.48～2.0BL、精巣で0.5～1.5BLであった。この時期は生殖巣重量がピークを越え、生殖巣は成熟期（第Ⅳ期）から放出初期（第Ⅴ期）の状態にあった。4月20日では放卵が進んで、卵巣は成熟期から放出末期（第Ⅵ期）であったと思われる。AP活性は0.35～1.15BL（平均0.88BL）で、4月5日より低かった。5月4日には放卵がさらに進行していて、一部（1/5）に成熟状態を保つ個体もあったが多くは放出中または末期の状態でAP活性は4月20日より幾分か高かった（0.5～2.1BL、平均1.09BL）。6月20日には一部に成熟状態を保つ卵巣を持つものもあるが、卵放出を終えたものが多く、生殖巣重量、生殖巣指数は共に小さかった。酵素活性は前月より幾分か高かった（1.1～1.5BL、平均1.36BL）。

表2 ホタテガイ卵巣の酸性ホスファターゼ（AP）活性

実験区分	測定日	個体数	殻長	全重量	軟体部重量	生殖巣			AP活性
						重量	指数	発達段階	
野外垂下	58. 3. 31	2	cm	g	g	g	%		BL 1.76
	4. 5	2			42.2	7.5	17.7	(Ⅳ)	1.50
	4. 20	5	10.12	122.6	46.8	4.5	9.62	(Ⅳ-Ⅵ)	0.88
	5. 4	5	9.78	123.8	43.2	4.3	10.6	Ⅳ-Ⅵ	1.09
	6. 20	5	10.56	135.2	53.4	2.66	5.08	Ⅳ-I	1.36
冷却水槽	58. 4. 20	5	10.12	118.4	44.4	6.26	14.0	(Ⅳ)	1.43
	5. 4	5	9.38	93.6	33.8	6.98	20.8	Ⅳ	3.14
	6. 20	5	9.54	99.2	32.8	4.38	13.62	Ⅳ-V	5.4
対照水槽	58. 4. 20	5	10.31	124.3	47.2	6.63	14.73	(Ⅳ-V)	2.16
	5. 4	7	8.9	105.4	34.4	3.4	9.6	V-Ⅵ	4.3
	6. 20	5	9.3	87.6	21.4	1.74	8.86	V-1	4.3
天然流水	58. 4. 21	5			39.28	5.6	14.74	(Ⅳ)	2.42
	5. 4	5	9.96	107.4	40.56	7.5	18.2	(Ⅳ-V)	4.8

() 内のローマ数字は他の個体の組織観察による推定

野外養殖員の卵巣のAP活性は卵放出期（4月20日）に最低値を示し、その前後ではこれより幾分高いが、全調査期間を通じて大きな変動を示さず、通常2BL以下であった。

冷却水槽飼育員

4月20日には、生殖巣重量、生殖巣指数は共に大きく、卵巣は成熟期であった。AP活性は0.85~2.25BL、平均1.43BLで野外養殖員より幾分高かった。5月4日でも卵巣は大きく、成熟状態を保持し、酵素活性は野外養殖員の約3倍であった。6月20日には生殖巣重量、生殖巣指数は5月4日より減少しているが、なお卵巣は大きく、成熟状態（第Ⅳ~Ⅴ期）を残していた。酵素活性は3.6~>6BL、平均5.4BLで著しく高かった。

冷却水槽飼育群では、野外養殖群で放卵が進行または完了した時期になっても、なお成熟状態の卵巣を保ち、AP活性は飼育期間の経過に伴って増加している。

対照水槽飼育員

4月20日には生殖巣重量と生殖巣指数は共に高く、卵巣は成熟期から放出初期と推定される。AP活性は野外養殖員の約2.5倍（1.6~3.25BL、平均2.16BL）であった。5月4日では、卵巣重量は相当減少し、生殖巣指数も低下していたが、酵素活性は高かった（2.1~>6BL、

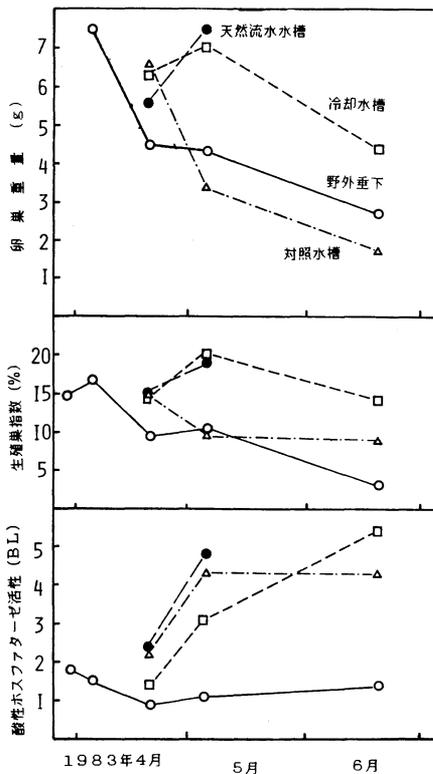


図5 卵巣の酸性ホスファターゼ活性の推移と卵巣重量・指数との対応

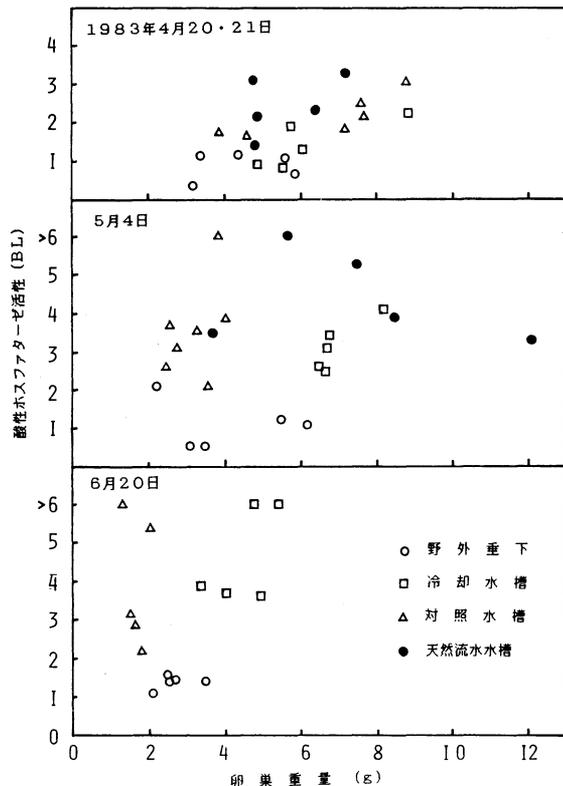


図6 卵巣の重量と酸性ホスファターゼ活性の関係。吸光度が大きく検量線で換算出来なかったものを>6BLとした。

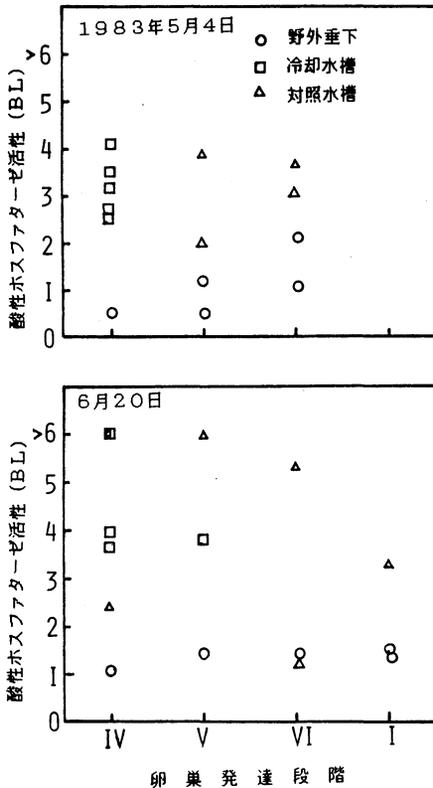


図7 卵巣の発達段階と酸性ホスファターゼ活性の関係

考 察

ホタテガイを低温に置き、4～6月おける水温上昇にあわないようにすると、卵巣は長期間に渡って成熟状態を維持する。一方、温度を制御しなかった水槽飼育貝では5～6月には卵巣が萎縮し、卵母細胞は卵巣から消失している。この結果は、臨界温度以上への急速な温度上昇が放卵を誘発するとする山本(1964)の主張を支持すると思われる。しかし、水槽飼育貝にみられる卵巣重量の低下が放卵によるものかどうかは疑問である。本実験ではホタテガイは無給餌または十分な餌の供給されない条件下に置かれていたため、卵巣の萎縮は飢餓に伴う組織分解の結果である可能性がある。水槽内での放卵は確認されていない。

水槽内で飼育を続けられた貝は、いずれの群においても野外養殖貝に比べ卵巣のAP活性は高くなっている。4月20・21日の測定では、水槽飼育貝、特に冷却群と対照群では生殖巣の大きいものほど酵素活性も高い傾向がみられた(図6)。これは卵巣の異常発達(成熟状態の長期に渡る持続)及び卵母細胞の成熟(過熟)とAP活性が相関することを示唆する。

卵巣のAP活性が卵細胞に局在するのか、卵母細胞以外の卵巣成分によるものかは明らかでない。Masuda・Dan(1977)は放出されずに卵巣に留まったウニ卵の退化時に強いAP活性を検出している。この場合、過熟卵のみならず、周りの accessory cells にも強い活性がみられる。本研究

平均4.3BL)。6月20日には、卵巣重量、生殖巣指数は共に小さく、卵巣は放出末期から休止期の状態で、卵巣小胞はほとんど空になっていたが、酵素活性は5月4日と同様に高かった(2.2～6BL、平均4.3BL)。

非冷却濾過流水水槽群では卵巣の大きい時期だけでなく、萎縮した後でも高いAP活性を示した。

天然流水飼育貝

4月21日には生殖巣重量、生殖巣指数は共に大きく、卵巣は成熟期であった。AP活性は幾分高く(1.35～3.3BL、平均2.42BL)、対照水槽群とほぼ同じ値であった。5月4日では生殖巣重量にばらつきが大きく(3.7～12.1g、平均7.5g)、生殖巣指数は高く、冷却水槽群に近かった。しかし、AP活性は高く(3.3～6BL、平均4.8BL)、対照水槽飼育群の値に近かった。

において、卵母細胞のほとんど消失した卵巣でも高い活性がみられたので、卵母細胞以外の成分にもAP活性が存在すると考えられる。

卵母細胞のAP活性が高まるか、この活性の高い組織に包まれた場合、卵母細胞は過熟状態を経て退化・崩壊するものと思われる。従って、AP活性の異常に高くなった卵巣から卵が放出されたとしても、その卵が正常な発生能を保っているかどうか疑わしい。6月20日にAP活性の異常に高い個体(>6BL)が冷却群で2個体、対照群で1個体みられた。これらの貝の卵巣で組織像の乱れや卵母細胞の退化が認められた。異常発達した卵巣から放出された卵が正常な受精能と発生能を持つか検討を要する。

対照水槽群では飼育期間が長くなるのに伴って生殖巣の重量と指数が減少するが、同時に軟体部重量の減少も著しく、6月20日には実験開始の50%程度に下っていた(図3)。この実験群は無給餌で水温も制御されていないので、水温上昇に伴って基礎代謝が増加し、貯蔵物質を多く消費したものと思われる。5月4日及び6月20日では卵巣重量が小さいにもかかわらずAP活性が高い(図6)。これはこの酵素活性の増加が組織分解とも関連することを示唆する。

要 約

昭和58年3月31日から6月20日に渡って野外垂下養殖及び室内水槽(冷却、濾過流水及び天然流水)飼育したホタテガイについて、卵巣の発達状況を調査し、酸性ホスファターゼ活性を測定した。

低温(3~4℃)で飼育された貝では卵巣の成熟状態が長期間保持された。非冷却飼育群でも生殖巣重量の減少は野外養殖貝に比べて遅れる。

卵巣の酸性ホスファターゼ活性は、野外養殖貝では低く、調査期間中大きな変動を示さないが、水槽飼育貝では著しく増加する。この酵素活性の増加は卵巣の異常発達(成熟状態の持続)及び飢餓による卵巣成分の退化に関連すると思われる。

文 献

Masuda, R. and J. C. Dan 1977 Studies on the annual reproductive cycle of the sea urchin and the acid phosphatase activity of relict ova. Biol. Bull., 153, 577-590.

森 勝義・長内健治・佐藤隆平 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. 日水誌, 43, 1-8.

Osanai, K. 1975 Seasonal gonad development and sex alteration in the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ., 15, 81-88.

Osanai, K., S. Hirai, M. Odashima and K. Kyojuka 1980 Sexual differentiation in the juveniles of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ, 16, 221-230.

山本護太郎 1943 ホタテガイ *Pecten (Patinopecten yessoensis* Jay) の生殖細胞形成並びに生殖時期. 日水誌, 12, 21-26.

山本護太郎 1964 陸奥湾におけるホタテガイ増殖. 日本水産資源保護協会, 東京.