

低温飼育したホタテガイから得た卵の発生能

長内 健治・沼宮内隆晴・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、ホタテガイの産卵は3月から5月上旬までの間の急速な水温の上昇によって誘発され、この時期より遅れての水温上昇は産卵にさほど有効に影響しないと言われている(山本1964)。海水温の低い条件が産卵適期の後まで長時間続いた場合、卵巣は肥大したままの状態を維持するが、内に含まれる卵(卵母細胞)は過熟となって、正常な機能を持たなくなっている可能性が考えられた。昭和58年度の研究において、(1)低温水槽に置かれたホタテガイで卵巣の成熟状態が長時間持続されること、(2)水槽飼育の期間が長くなると卵巣の酸性ホスファターゼ活性が増加することをみた(長内他 1986)。そこで昭和59年度は、低温飼育貝の放卵の人工誘発を試み、放出された卵が正常な発生能を持つかどうか、酸性ホスファターゼ活性が卵の発生能低下の指標となるかどうかについて検討した。

材料と方法

材 料：青森県平内町清水川地先で垂下養殖していたホタテガイ(満3年貝)を昭和59年5月2日に採り、2群に分け、第一群は野外に垂下し、第二群は青森県水産増殖センターの冷却水槽(3~4℃)中に置いた。餌は与えなかった。5月22日及び6月21日に両群からそれぞれ4~5個体を取り、産卵誘発を試みた。5月2日から冷却水槽に置いた浦田産貝についても同様な実験を試みた。

産卵誘発：産卵の誘発にMatsutani・Nomura(1982)の方法を用いた。母貝の卵巣にセロトニン(硫酸クレアチニン塩、シグマ製)1mMを含む人工海水0.5mlを注入し、2~3時間後に放卵の有無を記録し、放出された卵を集めて一部は正常海水中で媒精して発生能を調べ、他は凍結して酸性ホスファターゼ活性の測定に用いた。精液は切り出した精巢から浸み出したものを希釈して用いた。媒精1.5~2.5時間後に卵割を、15~16時間後に遊泳囊胚を観察し、卵割率及び発生率を算出した。

酸性ホスファターゼ(AP)活性の測定：AP活性の測定にはワコー酸性ホスファターゼB-テスト・キットを用いた。凍結試料0.1g(5月22日の試料では0.025g)に0.3mlの蒸留水(酵素安定剤として20%酢酸3μlを添加してある)を加え、30分間置いた後、5,000rpmで10分間遠心分離し、上清を採って試験液(酵素液)とした。基準緩衝液(0.05Mクエン酸緩衝液、pH8、5mlにp-ニトロフェニールリン酸二ナトリウム12.3gを加えたもの)0.5mlに試験液0.04mlを加え、37℃に30分間置いた。次いで、0.05N NaOH 2mlを加えて反応を止め、日立ダブルビーム分光光度計

本報告は青森県水産増殖センターよりの受託研究「ホタテガイの卵機能と初期餌料に関する研究」(代表者 長内健治)の昭和59年度の成果の一部である。

200-20を用い、405nmにおける吸光度（p-ニトロフェノールによる）を測定、検量線からBesseyLowry単位（BL単位：1ℓの試験液が37℃で1時間基質に作用しp-ニトロフェノール1mMを生成する酵素のmM量）に換算した。なお、5月22日の測定では凍結試料が基準量の1/4であったので、実測された吸光度を4倍して換算した。

組織標本作製：放卵を誘発出来なかった貝の卵巢組織をみるため、6月21日の放卵誘発試験後の貝から卵巢を切り出し、Bouin液で固定した。固定した卵巢は中央部の横断面で縦（背腹）及び横（左右）の長さを計った後、小片とし、パラフィン法で切片にし、Delafieldのヘマキシリン・エオシン法で染色し、検鏡した。

結果と考察

低温飼育貝の放卵誘発

昭和59年5月2日、5月22日及び6月21日にセロトニン投与による放卵誘発を試みた。5月2日（対照貝のみ）及び5月22日の試験では野外飼育貝（対照）、低温飼育貝ともにほとんど総ての貝で放卵がみられた。6月21日には野外飼育では産卵盛期を過ぎていて、卵巢の萎縮したものが多く、放卵したものは2/5であった。冷却飼育貝は肥大した卵巢を持っていたが、放卵した個体は5/10で、卵の放出量も少なかった。この結果は低温条件に長く置かれた貝で放卵誘発刺激に対する反応性が低下することを示すものであろう。

放出された卵の発生能

放出された卵は球状で卵核胞が消失している。極体は形成されていないので第1成熟分裂の中期にあると思われる。放出された卵を正常海水中で媒精して発生の状況を観察した。

5月2日の野外飼育貝から得た卵で卵割率は平均70.1%（n=7、43.9~83.3%）、発生率（遊泳囊胚に発達したものは75.6%（n=5、64.4~88.7%）であった（表1）。卵割及び発生の異常なものも少なくなったが、正常に発生を進めたものは4日後にヴェリジャー幼生（D型幼生）に達した。

表1 ホタテガイの放卵誘発と卵の発生能および酸性ホスファターゼ活性（AP）

採取日	実験区分	個体番号	殻長	全重量	放卵1)	卵割2)	発生3)	AP活性
			cm	g		%	%	BL
59.5.2	対照 (清水川)	F502.-1	10.9	149	±			
		2	11.3	164	+	43.9		0.36
		3	10.3	141	+	74.7		
		4	10.7	161	+	73.1	64.4	1.12
		5	11.8	158	+	80.0	88.7	1.24
		6	11.7	183	-			
		7	11.0	148	+	83.3	88.1	
		8	11.1	153	+	72.9	73.6	0.96
		9	11.0	157	+	63.0	71.0	1.45
平	均		10.97	157.1		70.1	75.6	1.02

1) セロトニン注入3時間後

2) 媒精1.5~2.5時間後における卵割

3) 媒精後15~16時間における遊泳囊胚

表2 低温飼育貝の放卵誘発と卵の発生能およびAP活性

採取日	実験区分	個体番号	殻長 cm	全重量 g	放卵	卵割 %	AP活性
59.5.22	対照 (清水川 垂下養殖)	SF 522-1	10.4	131	±	78.8	BL
		2	10.1	123	+	74.0	2.95
		3	10.1	125	+	55.4	2.76
		4	9.7	123	+	64.0	1.78
		(10.1)	(125.5)		(68.1)	(2.50)	
	冷却 (清水川)	SC 522-1	10.8	156	-		
		2	10.6	149	+	13.0	1.69
		3	10.5	146	+	42.6	1.14
		4	9.7	96	+	37.0	1.25
		5	9.6	115	+	58.2	0.94
	(10.2)	(132.4)		(37.7)	(1.26)		
	冷却 (浦田)	UC 522-1	10.8	126	+	38.9	1.60
		2	10.8	146	+	0.9	0.86
		3	10.5	134	+	36.8	0.99
		4	10.4	126	+	21.3	1.84
5		11.0	144	+	37.7	2.21	
(10.7)	(135.2)		(27.1)	(1.50)			

()は平均

5月22日には、野外飼育貝(清水川産)が68.1% (n=4、55.4~78.8%)の高い卵割率を示したのに対し、冷却貝では清水川産貝で37.7% (n=4、13.0~58.22%)、浦田産貝で27.1% (n=5、0.9~38.9%)で、共に対照より低い卵割率を示した(表2)。

野外での産卵盛期の過ぎた6月21日には放卵した個体が少なかった。対照(清水川野外飼育貝)では比較的高い卵割率(25.0~64.7%)と発生率(36.3~56.2%)が得られたが、正常な遊泳幼生に発達したものは少なかった。冷却貝から得た卵では卵割率は著しく低く(0.9~9.8%)、遊泳囊胚に達したものはみられなかった(表3)。

以上の観察は、(1)野外養殖貝でも産卵盛期を過ぎてから放出された卵は受精能及び発生能が低下している、(2)冷却貝では卵巣が十分肥大しているにもかかわらず、放卵活性(放卵誘発刺激に対する反応)が低く、放出された卵の発生能も著しく低下していることを示している。

この結果は、天然条件下においても、低水温が長く続いた場合に、その後で産卵誘発刺激が与えられたとしても放卵率が低く、卵の発生能も低下している可能性を示唆するもので、産卵適期を過ぎて水温が上昇しても種苗の生産にさほど貢献出来ないとする主張(山本 1964)を支持するものである。ただし、本研究における冷却水槽飼育では餌を与えていないので、放卵活性及び卵の発生能低下が低温持続のみでなく、飢餓による影響をも受けているかも知れない。

表3 低温飼育員の放卵誘発と卵の発生能およびA P 活性 (Ⅱ)

採取日	実験区分	個体番号	殻長	全重量	卵巣肥大度	放卵	卵割	発生	A P 活性
59.6.21	対 照 (清水川) 垂下養殖	S F 621- 1	10.3	114	M	-			BL
		2	10.5	134	S	-			
		3	11.4	179	S	-			
		4	10.0	114	S	+	64.7	56.2	1.58
		5	9.7	121	M	+	25.0	36.3	1.92
			(10.4)	(132.4)			(44.9)	(46.2)	(1.75)
	冷 却 (清水川)	S C 621- 1	10.2	163	L	-			
		2	10.8	170	L	±	0.9	0	1.56
		3	9.4	115	L	-			
		4	9.9	126	L	+	1.4	0	1.88
		5	9.9	110	L	-			
			(10.0)	(136.8)			(1.2)		(1.72)
	冷 却 (浦 田)	U C 621- 1	11.3	166	M	-			
		2	9.9	156	M	+	9.8	0	1.58
		3	10.8	130	L	-			
4		10.1	131	L	+	7.5	0	1.66	
5		9.8	116	L	+	5.3	0		
		(10.4)	(139.8)			(7.5)		(1.62)	

() の数値は平均。卵巣肥大度：卵巣横断面でS 11~16mm×4~6mm, M 18~19mm×7~9mm, L 20~24mm×10~15mm。

表4 セロトニンによる放卵誘発と卵の発生能 (総括)

採取日	実験区分	放卵個体	卵割	発生	A P 活性
59.5.2	対照(清水川)	8 / 9	70.1 %	75.6 %	BL 1.02
59.5.22	対照(清水川)	4 / 4	68.1		2.50
	冷却(清水川)	4 / 5	37.7		1.26
	冷却(浦田)	4 / 5	27.1		1.50
59.6.21	対照(清水川)	2 / 5	44.9	46.2	1.75
	冷却(清水川)	2 / 5	1.2	0	1.72
	冷却(浦田)	3 / 5	7.5	0	1.62

A P : 酸性ホスファターゼ。

卵割、発生、A P 活性の数値は平均値。

未放卵貝の卵巣組織

6月21日の産卵誘発処理で所定時間内に放卵に到らなかった貝の卵巣組織を観察した。対照区の未放卵貝の2/3では卵巣が萎縮していて、生殖胞内に卵細胞をほとんど含んでいなかった。残りの1個体では卵巣は相当小さくなっていたが、なお生殖小胞中に卵母細胞が充満していた。

冷却区の未放卵貝では卵巣は肥大したままで、生殖小胞には成長した卵母細胞が充満し、卵核胞の消失した卵母細胞の見られたものや生殖輸管中に卵細胞を含むものもあった。これらの個体ではさらに時間が経てば放卵に到ったかも知れない。いずれにおいても、著しい退化像や異常を観察出来なかった。従って、冷却飼育貝の放卵活性の低下は卵母細胞の退化によるものではなく、産卵誘発刺激に対する反応性の低下によるものと思われる。

卵の酸性ホスファターゼ活性

卵の発生能の低下（過熟）が卵のA P活性と相関するかを調べるため、セロトニンによって放出された卵でA P活性を測定した。5月2日の対照区でA P活性は低く（平均1.02BL）、5月22日の対照区では幾分高い（平均2.50BL）。その他の対照区、実験区では平均値で1.26～1.75BLで、飼育期間の経過に伴った増加は認められない（表4）。

もし卵巣のA P活性が主に卵母細胞のA P活性によるものだとすれば、卵母細胞のみで測定された活性より低い値となるはずである。昭和58年度の測定で得られた野外垂下養殖貝の卵巣A P活性は今回得られた卵母細胞のA P活性に近いが、幾分低い（0.88～1.36BL）。しかし、水槽飼育した貝の卵巣A P活性は5、6月には著しく高かった（3.14～>5.4BL）。従って、この時期の水槽飼育貝の卵巣A P活性の増加は卵母細胞に由来するものではなく、卵母細胞以外の組織に由来するものと考えられる。この結果は、卵母細胞の減少した卵巣でも高いA P活性を示す（長内他 1983）こととも一致する。従って、水槽飼育を長期間継続した場合卵巣A P活性の増加は卵細胞の分解・吸収に関係するものかも知れない。卵細胞を包む組織のA P活性の増加が卵母細胞の過熟や発生能低下をもたらすものか、なお検討を必要とする。

要 約

低温下に長期間置かれたホタテガイの卵の発生能を調べるため、低温飼育貝でセロトニンによる産卵誘発を試み、放出された卵の発生を観察し、次の結果を得た。

- (1) 長期間低温飼育した貝では卵巣が肥大し、卵母細胞で充満しているのに、セロトニンによる放卵活性が低下する。
- (2) 野外養殖貝でも産卵盛期を過ぎた貝より得た卵の発生率は低く、低温に長期間置かれた貝の卵の発生率は著しく低い。
- (3) 卵の発生能低下と卵の酸性ホスファターゼ活性との間で相関を認めなかった。水槽飼育貝でみられる卵巣の酸性ホスファターゼ活性の増加は卵母細胞以外の組織によると推定される。
- (4) 上記の結果は、産卵適期を過ぎてからの産卵誘発刺激は種苗の生産にさほど貢献出来ないとする考えを支持する。

引用文献

- Matsutani, T. and T. Nomura (1982) Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Patinopecten yessoensis* (JAY). Mar. Biol. Letters, 3, 353-358.
- 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 (1983) ホタテガイの卵巣に及ぼす低水飼育の影響—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—, 青森県水産増殖センター事業報告, 15, 176-184.
- 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.