

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20380113
 研究課題名（和文） マサバをモデルとした卵数法による資源量直接推定法における
 問題点の克服と適用
 研究課題名（英文） Overcoming of problem in direct stock assessment by egg production
 method and its application in the chub mackerel as model species
 研究代表者
 松山 倫也（MATSUYAMA MICHIIYA）
 九州大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：00183955

研究成果の概要（和文）：

卵数法によるマサバの資源量推定法の精度向上を目的として、現在、実施上問題となっている課題を解決するための方法を開発するために以下の研究を実施した。1) ホルマリン固定卵巣標本を透明化する新規透徹剤の開発、2) 排卵後濾胞（POF）の簡易判別法の開発および天然群における産卵頻度の推定、3) 卵原細胞および卵母細胞の分裂周期の解析に基づく総産卵数決定様式の解明、および4) ミトコンドリアDNAを用いた母子判定に基づく各個体の産卵評価。

研究成果の概要（英文）：

To develop and establish the direct stock assessment by the Egg Production Method in chub mackerel, following studies have been performed. 1) Development of the new clearing solution for identification of the nucleus in the formalin-preserved oocyte, 2) Development of the simple method to identify the postovulatory follicles by using PAS staining, and estimation of the spawning frequency in the wild stock, 3) Analysis of the cell division cycles in oogonia and oocytes, and mode of the determination of total fecundity, and 4) Evaluation of spawning in individual female fish based on the mitochondrial DNA analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：卵数法，資源量推定，産卵数，産卵頻度，マサバ，

1. 研究開始当初の背景

現在、マサバ、マイワシなどの資源量推定はコホート解析（VPA）によって行われているが、TAC（漁獲可能量）制度による資源・漁業管理が行われると、漁獲情報の資源情報としての漁獲量の価値が低下し、結果としてVPAによる資源量推定値に大きな誤差が生じる。

VPA では、各種調査船調査によって得られる資源量指数や、主要漁業の有効努力量によって調整することにより最近年推定値の信頼性の向上に努めているが、絶対値の推定精度を向上させるには不十分であり、VPA 特有の問題を解決するには、VPA 以外の手法による資源量推定値との比較が必要である。産卵量か

ら資源量を直接推定する方法として開発されたDEPM (Daily Egg Production Method)、ある1日の産卵量を調査船による産卵量調査より推定し、1尾の雌が産む卵の数を、ある1日に産卵する雌の割合(産卵頻度: S)と雌1尾1回当たりの産卵数(BF)の積で表すことにより、産卵量から資源量を推定する方法である。我が国では太平洋系群マサバを対象として、その資源量推定にVPA以外の直接推定法としてDEPMが適用されたが、親魚のパラメータの精度に関する幾つかの問題点が指摘され、現在DEPMによるマサバの資源量推定は進行していない。

2. 研究の目的

本研究では、以下にあげるDEPMにおける種々の問題点を克服することにより、DEPMによるマサバの資源量推定法を確立することを目的とする。

- (1) ホルマリン固定卵巣標本の透明化法の開発
- (2) 排卵後濾胞(POF)の簡易判別法の開発
- (3) 総産卵数の決定様式の解明
- (4) 個体別産卵能力の推定

3. 研究の方法

- (1) ホルマリン固定卵巣標本の透明化法の開発

漁獲物にはバッチ産卵数(BF, 雌1個体産卵1回)推定のための透明卵をもつ個体は極めて少ないが、卵成熟過程に入った核移動期の卵をもつ個体は多い。ホルマリン個体された核移動期卵が識別できるような、各種有機溶媒と各種染色法の最適な組み合わせによる卵の透明化法を開発する。

- (2) 産卵頻度(S)の推定法

卵巣卵の発達段階と排卵後濾胞(POF)の形態に基づく精度の高い産卵頻度を推定するために、マサバの卵成熟、排卵、産卵のタイムコースならびにPOFの退縮過程を明かにする産卵誘導法、組織化学的手法を開発する。

- (3) 総産卵数の決定様式の解明

卵母細胞への継続的な卵原細胞からの加入があるかどうかを、細胞分裂のマーカーとなる5-ブromo-2'-デオキシウリジン(BrdU)を雌親魚に取り込ませ、定期採集することにより判定する。

- (4) 個体別産卵能力の推定

飼育下で連続産卵している産卵群から産出卵を採集し、卵および産卵終了後の雌親魚のミトコンドリアDNA解析による母子判定に基づき、個体別の産卵量を明かにする。

4. 研究成果

- (1) ホルマリン固定卵巣標本の透明化法の開発

ベンジルアルコールと安息香酸ベンジル

液を組み合わせた透徹剤(BA/BB溶液)を開発し、ギムザ法およびズダン法を併用することにより、ホルマリン固定卵巣標本を透明化し、核の有無や位置を検便に判定できるようになった。すなわち、組織切片標本を作製なしに卵母細胞の発達段階が判定できるようになるとともに、漁獲物のなかに成熟が完了した吸水卵をもつ個体が少なく、核移動期の卵をもつ個体の多いマサバやマアジなど多くの種のホルマリン固定卵巣を対象に、本法による透明化を施すことで、核移動期の卵に基づくBF算定が可能となった。手法は簡単であるが、極めて画期的な方法である。

- (2) 排卵後濾胞(POF)の簡易判別法の開発

Periodic acid & Schiff (PAS) 染色は濾胞細胞層の基底膜と卵細胞の卵膜外層を選択的に赤紫色に染色することを見出し、従来用いられてきたHE染色と比較してPAS染色を用いることにより、POFの判別が容易になるとともに、退行卵(atresia)との識別が容易になった。この染色法を用いて、排卵後一定間隔で採集した個体の卵巣を対象にしてPOFの退行過程の詳細な記述を行った。さらに、産卵期に採集した東シナ海産のマサバ雌親魚137尾を対象にして、卵巣卵の発達段階とPOFの退行過程に基づき産卵頻度を推定した。その結果、産卵期における5回の採集を通じての平均産卵頻度は16.4%となり、その逆数から求められる平均産卵間隔は6.1日となった。

- (3) 総産卵数の決定様式の解明

増殖する細胞を特異的に標識する5-ブromo-2'-デオキシウリジン(BrdU)をマサバ親魚に投与し、免疫組織化学的解析を行った。その結果、マサバの卵巣における生殖細胞の増殖は産卵期の前後を通して全ての時期に起こっていることが証明された。特に、産卵期間中に増殖する生殖細胞は卵黄形成初期の卵母細胞まで発達していたことから、マサバの総産卵数決定様式はdeterminant(産卵期前決定型)ではなくindeterminant(産卵期前非決定型)であることが明らかとなった。即ち、マサバの資源量推定においてAEPM(Annual Egg Production Method)は適用できないことが初めて証明された。

- (4) 個体別産卵能力の推定

満2歳の親魚(♀4尾, ♂4尾)にGnRH α (400 μ g/kg)を投与し、3トン水槽に収容した。産卵はGnRH α 投与の翌日から始まり、33日間にわたり25回観察された。このうち、前半の19日間における15回の産卵のうち、産卵数の多かった11回の産卵から得られた受精卵を対象にして、産卵日ごとに無作為抽出した30個の受精卵とメス親魚からDNAを抽出し、ミトコンドリアDNAのD-loop領域に含まれる700塩基を対象としたPCR-RFLP法による個体識別を行った。11回の産卵中、♀1~♀4が産卵した回数はそれぞれ4, 2, 4, 9回で、連日産

卵する個体も認められた。また、産卵期間中の総受精卵数478,300個に対する♀1~♀4の寄与率はそれぞれ、13, 6, 21, 60%であった。このように、マサバは連日産卵が可能であるが、同年齢、同サイズの親魚でも、再生産に関与する割合は個体により大きく異なることが明らかとなった。

以上、精密な飼育実験を組み合わせた本研究により開発された各種手法により、マサバの資源量推定にDEPMを適用する際に最も重要なパラメータとなるバッチ産卵数と産卵頻度を高い精度で明らかにすることができた。本法はマアジ、マイワシなど、他の小型浮魚類でも適応でき、今後、国内外の各研究機関における利用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計22件)

1. Selvaraj S, Kitano H, Fujinaga Y, Ohga H, Yoneda M, Yamaguchi A, Shimizu A, Matsuyama M. (2010) Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two Kiss genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages. Gen. Comp. Endocrinol., 169, 28-38. (有)
2. 栗田豊, 米田道夫, 松山倫也 (2010) 産卵親魚個体群の繁殖能力と加入量変動-母性効果研究の現状と今後の展開-. 水産海洋研究, 74 特集号, 1-3. (査読有)
3. 松山倫也 (2010) 産魚類の生殖周期の内分泌制御機構. 水産海洋研究, 74 特集号, 66-83. (査読有)
4. Selvaraj S, Kitano H, Fujinaga Y, Amano M, Takahashi A, Shimizu A, Yoneda M, Yamaguchi A, Matsuyama M. (2009) Immunological characterization and distribution of three GnRH forms in the brain and pituitary gland of chub mackerel (*Scomber japonicus*). Zool. Sci., 26, 828-839. (査読有)
5. Mendiola D, Yamashita Y, Matsuyama M, Masuda R, Okamoto K, Alvarez P, Tanaka M. (2009) Estimation of the daily food intake and gross growth efficiency of chub mackerel (*Scomber japonicas*) larvae under various temperatures. Aquaculture Science, 57, 291- 299. (査読有)
6. Shiraishi T, Ketkar SD, Katoh Y, Nyuji M, Yamaguchi A, and Matsuyama M. (2009) Spawning frequency of the Tsushima Current subpopulation of chub mackerel *Scomber japonicus* off Kyushu, Japan. Fisheries Science, 75, 649-655. (査読有)

7. Shiraishi T, Ketkar SD, Kitano H, Nyuji M, Yamaguchi A, and Matsuyama M. (2009) Time course of final oocyte maturation and ovulation in chub mackerel *Scomber japonicus* induced by hCG and GnRH α . Fisheries Science, 74, 764-769. (査読有)
8. 松山倫也 (2009) 水産重要魚種における配偶子形成の内分泌機構 -サバ等-. 日本水産学会誌, 75, 864-865. (査読無)
9. Shiraishi T, Okamoto K, Yoneda M, Sakai T, Ohshimo S, Onoe S, Yamaguchi A, Matsuyama M. (2008) Age validation, growth and annual reproductive cycle of chub mackerel, *Scomber japonicus*, off the waters of northern Kyushu and in the East China Sea. Fisheries Science, 74, 947-954. (査読有)
10. Mendiola D, Yamashita Y, Matsuyama M, Alvatez P, Tanaka M. (2008) *Scomber japonicus*, H. is a better candidate species for juvenile production activities than *Scomber scombrus*, L. Aquaculture Research, 39, 1122-1127. (査読有)
11. 松山倫也 (2008) 魚類の生殖生理学的研究と水産増養殖・資源管理への応用. 日本水産学会誌, 74, 371-374. (査読有)

[学会発表] (計49件)

1. Nyuji M, Fujisawa K, Kitano H, Yoda M, Yoneda M, Shimizu A, Yamaguchi A, Matsuyama M. Source and suitability of adult jack mackerel (*Trachurus japonicus*) for induction of maturation and spawning. UJNR Aquaculture Panel 39th Scientific Symposium "The Present and Future of the Aquaculture Industry", 63, 25, Oct, 2010. Kagoshima, Japan
2. Selvaraj S, Shiraishi T, Kitano H, Amano M, Nyuji M, Ohga H, Yamaguchi A, Yoneda M, Shimizu A, Matsuyama M. Captive reproduction of chub mackerel: experimental system and analysis of neuroendocrine hormones. UJNR Aquaculture Panel 39th Scientific Symposium "The Present and Future of the Aquaculture Industry", 64-66, 25, Oct, 2010. Kagoshima, Japan
3. Selvaraj S, Kitano H, Amano M, Yamaguchi A, Matsuyama M. Expression profiles of three GnRH forms in the brain and pituitary of chub mackerel (*Scomber japonicus*) during ovarian cycle in captivity. Global Conference on Aquaculture 2010 "Farming the Waters for People and Food", P-028, 23, Sept. 2010. Phuket, Thailand.

4. Nyuji M, Fujisawa K, Kitano H, Yamaguchi A, Yoneda M, Shimizu A, Matsuyama M. Induction of maturation and spawning of jack mackerel (*Trachurus japonicus*) temporarily reared in captivity using GnRH α . Global Conference on Aquaculture 2010 "Farming the Waters for People and Food", P-025, 25, Sept. 2010, Phuket, Thailand.
5. 入路光雄, 金子賢介, 北野 載, 山口明彦, 清水昭男, 松山倫也. 免疫組織化学的手法に基づく産卵周期におけるマサバ脳下垂体GtH産生細胞の変化. 日本水産増殖学会第9回大会, 11, 30, Oct. 2010, 唐津
6. 大賀浩史, 入路光雄, 北野載, S Selvaraj, 金子賢介, 清水昭男, 山口明彦, 松山倫也. 卵成熟誘起能とステロイド産生能から推定したマサバの2種生殖腺刺激ホルモン (GtH) の機能. 日本水産増殖学会第9回大会, 25, 30, Oct. 2010, 唐津
7. 松山倫也, 北野 載, 米田道夫, 白石哲朗, Selvaraj S, 入路光雄, 大賀浩史, 藤澤和輝, 川村耕平, 山口明彦, 清水昭男, 田中寛繁, 大下誠二. 小型浮魚3種の産卵誘導法の特徴. 2010年度水産海洋学会研究発表大会, 38, 20, Nov. 2010, 東京
8. 米田道夫, 北野 載, Selvaraj S, 入路光雄, 川村耕平, 松山倫也, 清水昭男. マサバ2歳魚の卵サイズの変化が仔魚の成長と生残に及ぼす影響. 2010年度水産海洋学会研究発表大会, 39, 20, Nov. 2010, 東京
9. 北野 載, 米田道夫, 川村耕平, 入路光雄, Sethu Selvaraj, 田中寛繁, 大下誠二, 清水昭男, 松山倫也. 水温がカタクチイワシの卵黄形成速度に及ぼす影響と産卵間隔との関係. 2010年度水産海洋学会研究発表大会, P05, 20, Nov. 2010, 東京
10. 高橋宏司, 益田玲爾, 松山倫也, 山下洋. 岩礁域への移行前後のマアジにおける異なる刺激に対する学習能力. 日本動物心理学会第70回大会, 27, Aug. 2010, 八王子
11. Sethu Selvaraj, 北野 載, 山口明彦, 米田道夫, 清水昭男, 松山倫也. マサバのKiSS遺伝子のクローニングおよび生殖周期におけるmRNAの発現量変化. 平成22年度日本水産学会春季大会, 311, 28, March 2010, 藤澤
12. 高橋宏司, 益田玲爾, 山下洋, 松山倫也. 浮標物を条件刺激としたマアジ仔稚魚の学習能力の個体発生. 平成22年度日本水産学会春季大会, 29 March 2010, 藤澤
13. 米田道夫, 清水昭男, 北野 載, 松山倫也, 田中寛繁, 大下誠二. カタクチイワシの初期生残に及ぼす母性効果. 水産海洋学会シンポジウム, 30, March 2010, 東京
14. Selvaraj S, Kitano H, Yamaguchi A, Matsuyama M. Identification of two kisspeptin genes in the chub mackerel, *Scomber japonicus*: molecular cloning and tissue distribution. 平成21年度日本水産学会九州支部大会, P. 7, 23, Jan. 2010, 長崎
15. 藤澤和輝, 北野 載, 米田道夫, 清水昭男, 山口明彦, 松山倫也. 飼育下におけるマアジの産卵生態. 2009年度水産海洋学会研究発表大会, 27, 18, Nov. 2009, 長崎
16. 米田道夫, 北野 載, S. Selvaraj, 松山倫也, 清水昭男. カタクチイワシの成熟・産卵に及ぼす水温と給餌量の影響. 2009年度水産海洋学会研究発表大会, P11, 18, Nov. 2009, 長崎
17. 北野 載, 米田道夫, Sethu Selvaraj, 田中寛繁, 大下誠二, 清水昭男, 山口明彦, 松山倫也. カタクチイワシ *Engraulis japonicus*は毎日産卵が可能か?. 2009年度水産海洋学会研究発表大会, 24, 18, Nov. 2009, 長崎
18. 北野 載, 金子賢介, Sethu Selvaraj, 藤永陽一郎, 松藤由佳, 米田道夫, 清水昭男, 山口明彦, 松山倫也. BrdU投与によるマサバの生殖細胞における増殖および卵黄蓄積速度の解析. 水産増殖学会第8回大会, 22, 31, Oct. 2009, 下関
19. 松藤由佳, 入路光雄, 金子賢介, 北野載, 山口明彦, 望岡典隆, 松山倫也. ミトコンドリアDNAを用いた母子判定に基づくマサバの産卵頻度. 水産増殖学会第8回大会, 23, 31, Oct. 2009, 下関
20. 北野 載, 米田道夫, Sethu Selvaraj, 田中寛繁, 大下誠二, 清水昭男, 山口明彦, 松山倫也. カタクチイワシの産卵時刻と配偶子の形成速度に及ぼす水温の影響. 平成21年度日本水産学会秋季大会, 229, 29, Oct. 2009, 盛岡
21. 松山倫也. 水産重要魚種における配偶子形成の内分泌機構. 海産魚類 (サバ等). 平成21年度日本水産学会春季大会シンポジウム「魚類の生殖機構—基礎と応用」, 31, March 2009, 東京
22. 金子賢介, 北野 載, 清水昭男, 米田道夫, 松藤由佳, S. Selvaraj, 藤永陽一郎, 山口明彦, 松山倫也. マサバの精製GtHによる各種卵濾胞のin vitroステロイド産生能. 平成21年度日本水産学会春季大会, 305, 28, March 2009, 東京
23. 米田道夫, 北野 載, S. Selvaraj, 松山倫也, 清水昭男. カタクチイワシの卵巣成熟・産卵に伴う卵巣重量の日周変動. 平成21年度日本水産学会春季大会, 457, 30, March 2009, 東京
24. Kaneko K, Nyuji M, Shiraishi T, Kitano H, Shimizu A, Yamaguchi A, Matsuyama M. Changes in the activities of two types of gonadotropin (GtH) cells during annual and spawning cycle in chub mackerel (*Scomber japonicus*). 5th World Fisheries

Congress, 3a12, 22, Oct. 2008, Yokohama, Japan

25. 松藤由佳, 金子賢介, 北野載, S. Selvaraj, 藤永陽一郎, 米田道夫, 清水昭男, 山口明彦, 松山倫也. hCGによる天然マアジの成熟・排卵誘導とそのタイムコース. 平成20年度水産海洋学会, 58, 13, Nov. 2008, 東京
26. 北野載, 金子賢介, S. Selvaraj, 藤永陽一郎, 松藤由佳, 米田道夫, 清水昭男, 山口明彦, 松山倫也. マサバの産卵数は産卵期前に決まっているか? -BrdUを用いた生殖細胞の増殖解析-. 平成20年度水産海洋学会, 59, 13, Nov. 2008, 東京
27. 米田道夫, 北野載, S. Selvaraj, 松山倫也, 清水昭男. 給餌条件の向上に伴うカタクチイワシの成長、成熟・産卵の応答. 平成20年度水産海洋学会, 60, 13, Nov. 2008, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://bbs1.agr.kyushu-u.ac.jp/asweb/suil/lmb.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 倫也 (MATSUYAMA MICHIIYA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：00183955

(2) 研究分担者

山口 明彦 (YAMAGUCHI AKIHIKO)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：10332842