

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660160

研究課題名(和文) 魚類の固定卵巣標本透明化法の開発

研究課題名(英文) The development of transparent method of formalin-fixed ovary specimen of fish

研究代表者

松山 倫也 (Matsuyama, Michiya)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00183955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小型浮魚類のマイワシ、マアジ、マサバの3種のホルマリン固定卵巣標本を対象として、短期間で容易に卵を透明化する方法を開発するとともに、核移動期卵を対象にしたバッチ産卵数算定法を確立することを目的とする。

3種海産魚のホルマリン固定卵巣標本を、フルクトースを主成分としたSeeDB液で処理することにより、簡便に透明化する最適条件を明らかにした。さらにマアジ卵巣を標本として、透明化した核移動期卵を計測することにより、吸水卵を用いることなくバッチ産卵数を算定できた。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study is 1) to develop a method of clearing the formalin-fixed ovary specimens of small pelagic fish such as sardine, horse mackerel, and chub mackerel, and 2) to establish a method to estimate the batch fecundity of the fish using the transparent ovary specimens.

Formalin-fixed ovarian specimens of the three marine fish were treated with SeeDB solution mainly composed of fructose, and we revealed the optimum conditions for conveniently transparent. Further, measuring the number of nuclear migrating eggs in the ovarian samples of jack mackerel enabled to calculate the batch fecundity without using a hydrated eggs.

研究分野：魚類生理学

キーワード：小型浮魚 卵巣標本 バッチ産卵数 透明化 マサバ マイワシ マアジ

1. 研究開始当初の背景

バッチ産卵数とは、雌親魚による1回当たりの産卵数のことで、最終成熟過程に入り透明化が進行した吸水卵を計数して求めている。漁獲物から得られた卵巣標本は、通常10%ホルマリン液で固定、保存されるが、固定後でも吸水卵は透明で識別できるので、固定標本からバッチ産卵数を算定している。しかし、吸水の時間帯が漁獲時間帯と異なるような魚種の場合、漁獲物中に吸水卵をもつ個体は少なく、精度の高いバッチ産卵数の情報を得ることが難しい。

一方、最終成熟過程初期の核移動期の卵数は吸水卵数と同等とみなされ、核移動期卵を正確に判別できればバッチ産卵数算定に使うことができる。しかし、一般にホルマリン固定した核移動期の卵は不透明で、他の卵と区別できない。したがって固定卵巣標本を透明化し、核移動期卵を簡便に識別できれば、吸水卵をもつ個体の漁獲が少ない種でも、バッチ産卵数の算定が可能となる。また、簡易透明化法は核移動期卵の識別のみにとどまらず、卵径と核の状態から、組織切片標本作製することなく、卵の発達段階や退行状態を判定できることから、調査研究の現場における波及効果は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに BA-BB (ベンジルアルコール・安息香酸ベンジル) 液を用いた透明化法を開発した。しかし、BA-BB 液は有機溶媒の混合液のため、取り扱いに注意を要し、また処方後は卵径の収縮が起こる。そこで、本研究では、より簡便な透明化法を開発を目的とし、近年脳神経科学の分野で開発された、フルクトースを主成分とした水溶性の透明化試薬 (SeeDB) を用い、マイワシ、マアジ、マサバの卵巣標本の透明化を試みた。

3. 研究の方法

(1) 魚類固定卵巣標本の透明化法の開発

マイワシ、マアジ、マサバの卵巣を10%ホルマリン固定した。BA-BB 液あるいは SeeDB 液を用いて透明化した後、ズダン B 染色あるいはギムザ染色を施し、顕微鏡観察した。また、各卵巣標本は常法により組織切片を作製し、透明化後の標本と比較した。

(2) 透明化液を用いたバッチ産卵数の推定

マアジのホルマリン固定卵巣標本を材料として、透明化液により判別した核移動期卵を用いて、重量法によりバッチ産卵数 (BF) を以下の式で算定した。

$$BF = \frac{\text{組織片中の核移動期卵数}}{\text{組織片重量}} \times \text{卵巣重量}$$

4. 研究成果

(1) 魚類固定卵巣標本の透明化法の開発

SeeDB 液による透明化の工程を以下に記す。

1. 卵巣標本の採取

1.5ml フタつきチューブにホルマリン固定卵巣小片 (約 0.15g) を収容

2. 透明化

フルクトース液

20%, 40%, 60%wt/vol 各 4 時間

80%wt/vol 12 時間

100%wt/vol 12 時間

80.2%wt/wt 24 時間

以上は、室温でローテーターによる攪拌を行う。

3. 光学顕微鏡で観察

BA-BB 法と SeeDB 法を比較した結果を表 1 に示した。BA-BB 液と比較した場合、SeeDB 試薬では透明化の全工程が 3 日間かかるが、体積変化等の標本へのダメージが見られず、また、毒性やプラスチック溶解等もなく、取り扱いが容易であった。

表 1. BA-BB 法と SeeDB 法の比較

		BA-BB	SeeDB
透明化の所要時間		10 分	3 日
体積変化		収縮	なし
透明化後の視認性	核	油球	核
	油球	核	油球
染色特性	ズダン B	核	核
	ギムザ	核	核
取り扱い	毒性	あり	なし
	プラスチック溶解	あり	なし
	粘性	なし	あり

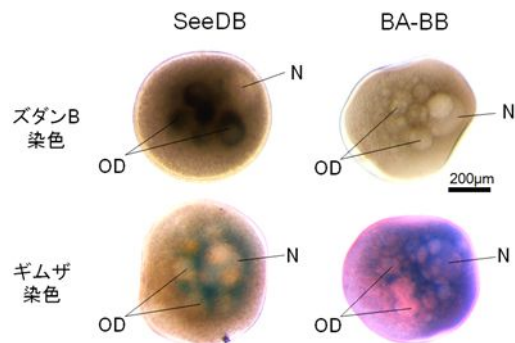


図 1. マアジ核移動期卵の BA-BB 法と SeeDB 法による透明化像. N, 核; OD, 油球

さらに、ズダン B 染色やギムザ染色で油球と核膜を染色することで (図 1), 卵母細胞の発達ステージが明瞭に確認できた。ギムザ染色の場合、核の縁辺が青緑色に染色され、ズダン黒 B では、特に油球が黒色に濃く染色

された。油球が染色されることで、油球の大きさや融合状態が分かり、容易に核移動期と判別できた。したがって、バッチ産卵数算定にはズダン B 染色液を使用した。

(2) 透明化液を用いたバッチ産卵数の推定  
予め組織切片の観察により核移動期卵をもつと判断されたマアジ 3 個体のホルマリン固定卵巣標本を用いて、SeeDB 液で組織片を透明化した(図 3)。核移動期卵を判別、計数し、BF を算定した結果、体長 258mm, 248mm, 247mm の個体の BF はそれぞれ、46,400 個、52,100 個、59300 個であった。

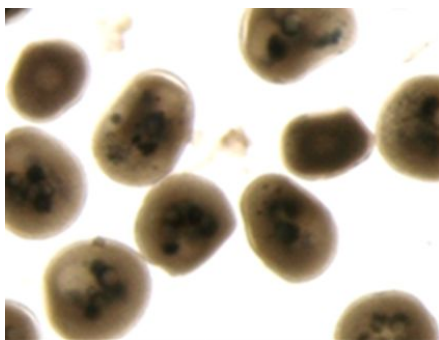


図 3. SeeDB 液で透明化し、ズダン B で染色したマアジの核移動期卵

以上、本研究により、マイワシ、マアジ、マサバ等の浮魚類のホルマリン固定標本卵巣を簡単、廉価、迅速に透明化できる手法が開発された。さらに、本法を用いてマアジの核移動期卵が識別でき、吸水卵が出現しない卵巣でも BF を算定できることを実証した。今後は対象種を各種浮魚、底魚に拡大し、本法の一般化、マニュアル化、普及化を図ることで、調査研究の現場における大きな波及効果が期待される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

松山倫也 . アジ、サバ、イワシの繁殖生態 . 九州大学システム生命科学府システム生命科学夏の学校 (招待講演), 2015 年 6 月 28 日, 九州大学・福岡市

松山倫也, 田口伸剛, 五十嵐修吾, 田和篤史, 米田道夫, 田中寛繁, 山口明彦, 北野 載, 長野直樹 . マイワシの産卵誘導実験系と仔稚魚の育成 . 2015 年度水産海洋学会研究発表大会, 2015 年 10 月 10 日, 釧路市観光国際交流センター・釧路市

杉原直樹, 入路光雄, 依田真里, 酒井猛, 北野 載, 山口明彦, 松山倫也 . ホルマリン固定卵の簡易透明化法 - マアジ卵を用いた BA-BB と SeeDB の比較 - . 2014 年度水産海洋学会研究発表大会, 2014 年 11 月 16 日, 水産総合研究センター中央水産研究所・横浜市

田口伸剛, 田和篤史, 山口明彦, 長野直樹, 北野載, 松山倫也 . 飼育下におけるマイワシの産卵誘導および孵化仔魚の成長過程 . 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014 年 9 月 20 日, 九州大学・福岡市

杉原直樹, 入路光雄, 依田真里, 酒井猛, 北野載, 山口明彦, 松山倫也 . ホルマリン固定したマアジ卵巣標本の簡易透明化法 . 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014 年 9 月 20 日, 九州大学・福岡市

〔図書〕(計 1 件)

Ganias K, Murua H, Claramunt G, Dominguez-Petit R, Gonçalves P, Juanes F, Keneddy J, Klibansky N, Korta M, Kurita Y, Lowerre-Barbieri S, Macchi G, Matsuyama M, Medina A, Nunes C, Plaza G, Rideout R, Somarakis S, Thorsen A, Uriarte A, Yoneda M., Chapater 4: Egg Production, In "HANDBOOK OF APPLIED FISHERIES REPRODUCTIVE BIOLOGY FOR STOCK ASSESSMENT AND MANAGEMENT" (R. Domínguez-Petit, et al., ed), Vigo, Spain. Digital CSIC. <http://hdl.handle.net/10261/87768>. 2015, 109 pp.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/sui1/lmb.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 倫也 (MATSUYAMA, Michiya)

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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：