

LHRH-a によるマイワシの成熟、排卵促進

松山倫也*・石田泰蔵**・池浦 繁**・松井誠一**
田辺智唯**・北島 力**・松浦修平**

Induced Oocyte Maturation and Ovulation of the Japanese Sardine, *Sardinops melanostictus*, by LHRH-a

Michiya MATSUYAMA*, Taizou ISHIDA**, Shigeru IKEURA**, Seiichi MATSUI**
Toshiyuki TANABE**, Chikara KITAJIMA** and Shuhei MATSUURA**

Abstract

The technique using the postovulatory follicle (POF) as a means of estimating incidences of spawning in multiple spawning fishes is quite useful for biomass assessment when using the "Egg Production Method". For biomass assessment in Japanese sardine *Sardinops melanostictus*, it is necessary to induce spawning of the sardine under laboratory conditions in order to note the histological conditions of POF on a time series basis. In the present study, maturation and ovulation were induced in Japanese sardine with vitellogenic oocytes by using luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRH-a), des-Gly¹⁰ [D-Ala⁶] LHRH ethylamide (50 μg/fish), and in combination with human chorionic gonadotropin (HCG, 100 IU/fish). A single injection of LHRH-a induced maturation in one of six fish. Furthermore, two fish of six treated with two different injections ovulated. The first on LHRH-a and the second 48 hours later on HCG. The POF after 11-19 hr after spawning showed the beginning of a breakdown in organization. Many granulosa cells had irregular shapes, vacuoles, and pyknotic nuclei.

1. はじめに

1産卵期に繰り返し産卵を行う、いわゆる多回産卵魚の産卵頻度を解明することは、その魚種の繁殖生態を理解するための基本事項であり、特に、総産卵量により資源量推定を行っている northern anchovy *Engraulis mordax* などの魚種では、産卵頻度とバッチ産卵数 (batch fecundity, 1回に産出される卵数) の両方の推定に基づいて、初めて資源量評価が可能となる (HUNTER and MEICEWICZ, 1985)。我が国においては、この“総産卵量による浮魚類の資源量推定法 (Egg Production Method)”をそのままマイワシ *Sardinops melanostictus* などに適用するには問題があることが指摘されているが (渡辺, 1988), 産卵頻度やバッチ産卵数は、マイワシの資源量推定を行うに当たって、明らかにせねばな

らない重要なパラメータの一つである。

多回産卵魚の産卵頻度の推定には、現在のところ二つの方法が最も有効である。一つは、最終成熟が起こり吸水し、透明化した卵 (吸水卵; hydrated egg) を持つ卵巣の出現頻度に基づく方法 (HUNTER and GOLDBERG, 1980) で、他の一つは、排卵後の経過時間によって分類された排卵後濾胞 (postovulatory follicle; POF) の組織学的形態による推定法 (HUNTER and MEICEWICZ, 1985) である。我々は後者の方法に基づくマイワシの産卵頻度の推定法を検討しているが、POFの時間経過に伴う形態の変化を明らかにするためには、飼育環境下において自然産卵を行わせることが必要である。

過去数年間、国内の数ヵ所においてマイワシに水槽内自然産卵を行なわせる試みが続けられてきたが、未だいづれにおいても成功していない。1年間水槽で飼育したマイワシ雄では、精巣は正常に発達し排精も認められるが (MATSUYAMA *et al.*, 1991a), 雌魚では、卵巣卵での卵黄蓄積は完了するものの、卵核胞の崩壊を指標とする卵の最終成熟が起こらず、結果的に排卵も起こらない。

1991年8月2日受理

* 三重大学生物資源学部 Faculty of Bioresources, Mie University, Kamihama, Tsu 514, Japan.

** 九州大学農学部 Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan.

その原因として、飼育下では卵黄蓄積完了後に生殖腺刺激ホルモン (gonadotropin; GTH) が脳下垂体から分泌されていないことが示唆されている (MATSUYAMA *et al.*, 1991b)。現在のところ、マイワシ産卵場の物理的および化学的環境は調査されているが、マイワシの産卵に影響を与える生物学的要因を含めた環境要因はほとんど知られておらず、水槽内で自然産卵を行わせることが困難な現状では、ホルモン投与により人為的に成熟、排卵を促進させ、それにより形成された排卵後濾胞を観察する方法が実際的である。

本研究はマイワシの成熟、排卵を人為的に促進させるための予備実験として、漁獲したマイワシ成魚に、天然の黄体形成ホルモン放出ホルモン (luteinizing hormone-releasing hormone; LHRH) より生理活性の高い LHRH-a (LHRH analogue) の単独投与、およびヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin; HCG) との組み合わせ投与を行い、その成熟、排卵に対する効果を調べたものである。本実験により、少数であるが成熟および排卵を行った雌魚が得られ、経過時間が明らかな排卵後濾胞が観察されたので、その結果を報告する。

2. 材料および方法

供試魚は1990年2月22日、福岡県志賀島の定置網で捕らえられたマイワシの成魚で、その内約400尾を、九州大学附属水産実験所 (福岡県津屋崎町) のコンクリート製円形の流水式3t水槽に、また600尾をコンクリート製円形の流水式20t水槽に収容し、自然日長、自然水温下 (11~13°C) で約2週間馴致した。餌は1日2回、マジ用ベレットを残さぬ程度に与えた。3月5日に供試魚を3t水槽より取り出し二つの実験群と一つの対照群に分け、MS222 (100ppm) で麻酔し、所定量のホルモンを15時に投与した後、実験群毎に0.5t円形パンライト水槽に収容し、流水下、自然日長、自然水温で飼育した。実験群は各6尾ずつ、対照群は8尾、計20尾 (体重70-120g) を用いた。水槽の排水孔にネットを設置し、毎日9時と19時の2回、産卵の有無を確認した。

使用したホルモンは des-Gly¹⁰ [D-Ala⁶] LHRH ethylamide (LHRH ethylamide, Sigma) と HCG (ゴナトロピン, 帝国臓器) で、両者とも0.6% NaCl に溶かし、それぞれ50μg/0.1ml・尾 (LHRH-a), 100 IU/0.1ml・尾 (HCG) を背部筋肉内に下記の方法で注射した。すなわち、LHRH-a の1回投与 (実験区 I), および LHRH-a 投与の2日後 HCG 投与 (実験区 II) の2区

で行い、対照群には0.6% NaCl を1回投与した。

初回のホルモン投与から3日後の3月8日9時に実験区 II で産出卵が確認されたので、3月8日の15時に実験区および対照区の水槽内の全個体を取り上げ、生殖腺を固定し成熟状態を調査した。また、ホルモン投与前の供試魚の成熟状態を調べるために、3月5日に20t水槽から無処理の親魚10尾を取り上げ、生殖腺を固定した。卵巣は重量測定後、10%中性ホルマリンで固定し、一部をパラフィン包埋した後、4μmの切片を作製してヘマトキシリン・エオシンの二重染色を行い検鏡した。マイワシ卵巣の成熟段階区分は MATSUYAMA *et al.* (1991b) に従った。卵巣の残りの部分は、成熟卵 (吸水卵) を持つ卵巣では、重量法により成熟卵数を算定し、同時に卵径頻度分布を調べた。

3. 結果

(1) 供試魚の成熟状態

3月5日に20t水槽から取り上げた10尾中5尾が雌で、それらの卵巣成熟度を Table 1 に示す。卵巣成熟度は、卵巣内で最も発達した卵群の成熟度で表した。5尾中3尾で第二次卵黄球期 (secondary yolk stage, SY) の卵がみられ、残りの2尾の卵巣卵は卵黄形成初期 (第一次卵黄球期; primary yolk stage, PY) であった。

Table 1. Maturity stage of ovary and gonadosomatic index (GSI) in untreated females sacrificed on March 5, 1990.

Fish No.	GSI	Maturity stage ^{*1}	POF ^{*2}
1	4.85	SY	-
2	3.95	SY	-
3	2.62	SY	-
4	1.61	PY	-
5	1.31	PY	-

*1 PY, primary yolk stage; SY, secondary yolk stage. Refer to the histological description on oogenesis of Japanese sardine (MATSUYAMA *et al.*, 1991b) for the ovarian maturity stage.

*2 Postovulatory follicles (POF) absent (-) in the ovary.

(2) ホルモンの投与効果

実験区 I では、6尾の雌の内1尾 (Table 2, Fish No. I-1) の卵巣卵が透明化していたが、POF は認められず、成熟卵は排卵されないまま退行が始まっており、

また他の卵黄蓄積卵も退行過程にあった。残り5尾の卵巣卵は全てPYであった (Table 2)。

Table 2. Effect of injections of LHRH-a and / or HCG on maturation and ovulation in Japanese sardine.

Group	Fish No.	GSI	Maturity stage	POF* ¹
Experimental I (LHRH-a)	1	6.15	Mature* ²	-
	2	1.62	PY	-
	3	1.38	PY	-
	4	0.98	PY	-
	5	0.93	PY	-
	6	0.74	PY	-
Experimental II (LHRH-a+HCG)	1	3.13	Spawned* ³	+
	2	3.88	Ovulating* ⁴	+
	3	3.01	SY	+
	4	1.86	PY	-
	5	1.59	PY	-
	6	1.22	PY	-
Saline control (0.6% NaCl)	1	5.92	SY	-
	2	2.36	SY	-
	3	2.29	SY	-
	4	1.60	PY	-
	5	1.55	PY	-
	6	1.55	PY	-
	7	1.49	PY	-
	8	1.30	PY	-

*¹ Postovulatory follicles (POF) present (+) or absent (-) in the ovary.

*² Mature ovary contains hydrated oocytes.

*³ Ovulated oocytes have been spawned already and many POF present.

*⁴ A part of hydrated first batch eggs was ovulated in the ovarian cavity and some newly formed POF present.

実験区IIでは、6尾の内2尾 (Fish No. II-1, II-2) の卵巣組織内に排卵後濾胞 (POF) が認められた。II-1の卵巣腔内には透明卵は無く、産卵後であることを示していた。一方、II-2では卵巣腔内に排卵された透明卵が少数認められ、卵巣組織内にも未排卵の成熟卵が存在していたが、この未排卵の成熟卵および卵黄蓄積卵は全て退行過程にあった。残りの4尾中1尾はSYで、3尾がPYであった (Table 2)。

(3) 排卵後濾胞の形態

個体II-1のPOFは明瞭な濾胞腔 (follicular lumen) を持ち、濾胞の細胞層は複雑に褶曲したループ状を呈していた (Fig. 1)。内腔に向かって存在する顆粒膜細胞

(granulosa cells) は、排卵前に比べて著しく肥厚し、不規則な配列をしていた。また、正常な細胞膜を維持しているものは少なく、多くの細胞質内に大小様々な空胞状の小体が存在していた。核は細胞の基底部寄りにみられたが、その一部は核の濃縮がみられた。毛細血管を持つ莢膜細胞層 (thecal layer) は排卵前に比べ厚さを増し、顆粒膜細胞層から剥離して顆粒膜細胞層を取り囲んでいた (Fig. 2)。

個体II-2のPOFは、基本的にはII-1と同様の構造を示したが、II-1と比較して、顆粒膜細胞層がまだ一層に整然と配列していること、空胞が比較的少ないこと、濃縮した核がみられないことが特徴的であった。

(4) 産出卵の性状

実験区IIで得られた産出卵は約24,000個であったが、胚発生は進んでおらず、全て未受精卵であった。また、これらの卵に、成熟雄から搾出した精液で媒精を行ったが、受精は起こらなかった。

(5) 成熟個体および産卵個体の卵径頻度分布

成熟卵巣 (Fish No. I-1)、および産卵後の卵巣 (Fish No. II-1) における卵径頻度分布をFig. 3に示す。

成熟卵巣では成熟卵は0.83mmにモードをもつ卵群を形成し、0.53mmと0.35mmにモードをもつ卵群はそれぞれSYとPYにあった。また、成熟卵数は3,370個であった。

産卵後の卵巣では、0.55mmに少数のSY卵によるモードの形成がみられたが、大部分の卵巣卵は0.33mmにモードをもつPY卵であった。

4. 考 察

本実験において、LHRH-aの単独投与区 (I区) で成熟個体が6尾中1尾に、LHRH-a+HCG投与区 (II区) で排卵個体が6尾中2尾に認められた。しかし、コントロールでは成熟個体は得られなかった。LHRHやHCGを用いた排卵促進において、ホルモン投与直前の親魚の成熟状態は極めて重要な要素であり、一般に卵巣卵の卵黄蓄積が完了した段階に達していることが前提となる。本実験では、ホルモン投与直前の親魚の成熟状態は卵黄形成初期から中期 (ステージPY, SY) にあり (Table 1)、ホルモン投与時において卵黄蓄積が完了した好条件の個体は少なかったことが考えられ、これが、成熟あるいは排卵した個体が少なかったことの原因の一つであろう。

本実験においてLHRH-aがマイワシの成熟促進に有効であることが示されたが、排卵が認められたのはHCG



Fig. 1. Photomicrograph of Japanese sardine postovulatory follicle (Fish No. II-1), showing convoluted morphology. 11-19 hr after spawning.

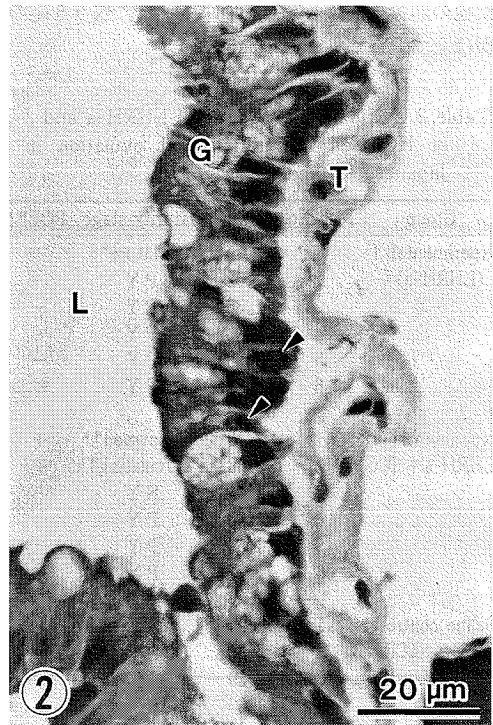


Fig. 2. Photomicrograph of a portion of postovulatory follicle in Fig. 1. Note hypertrophied granulosa cells irregularly arranged with pycnotic nuclei (arrowheads). G : granulosa cell layer, T : theca cell layer, and L : follicular lumen.

を再投与したⅡ区のみであった。これは、LHRH-aの魚体内における持続性と関係があると考えられる。CRIM *et al.* (1988) は本実験で使用したものと同一LHRH-aを生理食塩水に溶解し、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* に腹腔内投与したが、血中のLHRH-aの濃度は投与後1時間以内に最高値に達し、投与後11時間で検出されなくなり、持続効果がないことが明らかになっている。したがって、ホルモン投与に適した成熟状態の親魚にLHRH-aの持続的な投与がなされれば、マイワシ本来のGTHの作用により卵成熟が起こった後、排卵がなされることが期待される。さらにマイワシは、その卵巣卵の組成から多回産卵を行うことが予想されているので(MATSUURA *et al.*, 1991)、水槽内で多回産卵を誘導するには、出来るだけストレスを与えないために、1回のホルモン投与で長期的にその効果が維持されることが望ましい。そのためには、今後、徐放効果のあるコレステロールベレットなどの剤形にして、筋肉内に埋め込むなどの方法をとることが望まれる。既に sea bass *Lates*

calcarifer では、LHRH-aのコレステロールベレット投与により、水槽内における同一親魚の多回産卵に成功している(ALMENDRAS *et al.*, 1988)。

POFはⅡ区の2尾で認められたが、産卵を行ったのは1尾(Fish No. II-1)のみであった。LHRH-aの投与後48時間目にHCGを投与したが、産卵が3月7日の24時を中心に関前後4時間の間に行われたと仮定すると、LHRH-a投与後53-61時間後に産卵を行ったことになる。産卵を確認した3月8日の午後3時に個体Ⅱ-1の卵巣は固定されたので、そのPOFは産卵後11-19時間経過したものと考えられる。マイワシとごく近縁で、産卵水温もほぼ同じである Pacific sardine *Sardinops sagax* のPOFの形態変化がGOLDBERG *et al.* (1984) によって報告されている。彼らは海上で産卵群を一定時間間隔で継続的に採集することにより、POFの退行過程を調べた。

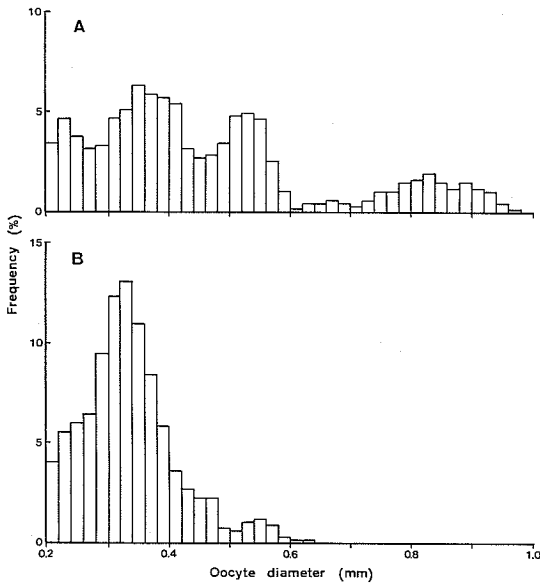


Fig. 3. Frequency distribution of oocyte diameter of the ovaries from mature fish (Fig. 3-A, Fish No. I-1) and from fish just after spawning (Fig. 3-B, Fish No. II-1).

本実験で得られた個体 II-1 の POF の組織形態は、Pacific sardine の産卵後 7-30 時間のそれとほぼ同様であった。即ち、顆粒膜細胞は未だ 1 層に配列しているが形態は不規則で、空胞状の小体と濃縮した核を持つ、という退行の始まりの組織像を示した。Pacific sardine では POF が卵巣内に留まる時間は、northern anchovy (HUNTER and MEICEWICZ, 1985) および Peruvian anchovy *Engraulis ringens* (ALHEIT *et al.*, 1984) と同様に、排卵後 48 時間以内であるという (GOLDBERG *et al.*, 1984)。これらの種より産卵頻度の多い種、即ち産卵期に毎日産卵を行うようなマダイ *Pagrus major* (MATSUYAMA *et al.*, 1988) やシロギス *Sillago japonica* (MATSUYAMA *et al.*, 1990) などでは POF の吸収も早く、24 時間以内に消滅する。マイワシの POF の退行過程の組織像および退行速度は Pacific sardine のそれに類似するものと推定されるが、POF の退行は産卵頻度や水温等の内的、外的要因に密接な関係を持つ種独自の代謝サイクルの中で進行すると考えられるので、POF の退行速度は種ごとに明らかにする必要がある、マイワシにおいても早急に POF の退行過程が解明されることが望まれる。

産卵直後の卵巣内での最大卵径卵群のモードは、0.55 mm (ステージ SY) にあったが (Fig. 3-B)、その卵数はごく少なく、次回の産卵が行われるならば、0.33 mm にモードをもつ PY 卵から卵黄蓄積を完了する卵群が発達してくるものと考えられる。九州西岸のマイワシを対象にしたフィールド調査でも、新しく形成された POF が認められる卵巣内の卵黄蓄積卵は PY 卵であり (MATSUURA *et al.*, 1991)、今回の実験と一致した結果を示した。また、退行が著しい POF を持つ卵巣内の最大卵径卵群では卵黄蓄積はほぼ終了しており (第三次卵黄球期; tertiary yolk stage, TY) (MATSUURA *et al.*, 1991)、次回の産卵に近いことを示していた。したがって、マイワシ POF の退行速度が Pacific sardine とほぼ同様であると仮定すれば、産卵後の卵巣内における PY 卵から TY 卵への卵黄蓄積は数日以内に完了すると考えられる。

九州西岸のマイワシにおけるバッチ産卵数は、2 歳魚 (平均体長 185 mm)、3 歳魚 (205 mm)、および 4 歳魚 (220 mm) でそれぞれ、平均 27,700 個、30,400 個、および 38,400 個であった (MATSUURA *et al.*, 1991)。今回産卵した雌 (体長 229 mm) の産卵数は 24,000 個で、天然魚の産卵数に近いものである。しかし、全て未受精卵であり、これは、正常な配偶行動が行われなかったか、あるいは、卵質自体に問題があったのであろう。また、成熟個体 (Fish No. I-1) の成熟卵数も 3,370 個と、天然魚のそれと比較して著しく少ない。ホルモンによる催熟によって得られた卵は、卵質の低下や卵数の減少をしばしば伴うことが多くの魚種で報告されている。

今回の予備実験により、LHRH-a はマイワシの成熟促進に有効であることが証明され、経過時間が明らかな排卵後濾胞の形態観察が初めて行われたが、供試個体数が少なく、またホルモンによる産卵誘導を行うに必ずしも適切な成熟状態にはなかった。今後、雄も含め、水槽内で正常な多回産卵を誘導すべく、飼育環境の整備、供試魚の成熟状態の調整、ホルモンの投与方法等に改良を加え、マイワシの産卵頻度、POF の退行過程を明らかにしてゆきたい。

5. 謝 辞

本実験を遂行するにあたり、マイワシの採集および飼育に御協力いただいた九州大学農学部附属水産実験所の古川哲二、天野文夫両技官に厚くお礼申し上げます。

文 献

- ALHEIT, J., V. H. ALARCON and B. J. MACEWICZ (1984) Spawning frequency and sex ratio in the Peruvian anchovy, *Engraulis ringens*. Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep., 25, 43-52.
- ALMENDRAS, J. M., C. DUENAS, J. NACARIO, N. M. SHERWOOD and L. W. CRIM (1988) Sustained hormone release. III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in sea bass, *Lates calcarifer*. Aquaculture, 74, 97-111.
- CRIM, L. W., N. M. SHERWOOD and C. E. WILSON (1988) Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRH-a) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. Aquaculture, 74, 87-95.
- GOLDBERG, S. R., V. H. ALARCON and J. ALHEIT (1984) Postovulatory follicle histology of the Pacific sardine, *Sardinops sagax*, from Peru. Fish. Bull., U. S., 82, 443-445.
- HUNTER, J. R. and S. R. GOLDBERG (1980) Spawning incidence and batch fecundity in northern anchovy, *Engraulis mordax*. Fish Bull., U. S., 77, 641-652.
- HUNTER, J. R. and B. J. MACEWICZ (1985) Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. In, An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: Application to the northern anchovy, *Engraulis mordax*, ed. R. LASKER, U. S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS, 36, 79-94.
- MATSUURA, S., M. MATSUYAMA, T. OTSUKA, K. TAKESHITA, T. MITANI and N. OGAWA (1991) Histological maturity scales, maturation and spawning in Khushu-subpopulation sardine, *Sardinops melanostictus*. In, Proceedings of the International Symposium on the Variability of Pelagic Fish Populations and their Environment, Sendai, eds. T. KAWASAKI, A. TANIGUCHI, S. TANAKA and Y. TOBA, 221-228.
- MATSUYAMA, M., S. ADACHI, Y. NAGAHAMA, C. KITAJIMA and S. MATSUURA (1991 a) Testicular development and serum levels of gonadal steroids during the annual reproductive cycle of Japanese sardine. Japan. J. Ichthyol., 37, 381-390.
- MATSUYAMA, M., S. ADACHI, Y. NAGAHAMA, C. KITAJIMA and S. MATSUURA (1991 b) Annual reproductive cycle of the captive female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*: relationship to ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones. Mar. Biol., 108, 21-29.
- MATSUYAMA, M., S. ADACHI, Y. NAGAHAMA, K. MARUYAMA and S. MATSUURA (1990) Diurnal rhythm of serum steroid hormone levels in the Japanese whiting, *Sillago japonica*, a daily-spawning teleost. Fish Physiol. Biochem., 8, 329-338.
- MATSUYAMA, M., S. ADACHI, Y. NAGAHAMA and S. MATSUURA (1988) Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *Pagrus major*, during the spawning season. Aquaculture, 73, 357-372.
- 渡辺良朗 (1988) Egg Production Methodの優れた点と適用上の問題点. 海洋と生物, 54, 22.