

寄稿

ホルマリン固定したマサバ卵巣標本における
核移動期卵の簡易識別法入路光雄^{1,2}, 松山倫也^{1†}Simple method for identification of oocytes at germinal vesicle migration
in the formalin-fixed ovary of chub mackerel *Scomber japonicus*Mitsuo NYUJI^{1,2} and Michiya MATSUYAMA^{1†}

Batch fecundity is generally estimated by counting the number of hydrated oocytes in the ovary based on their transparency and size. In the commercially caught chub mackerel, *Scomber japonicus*, little number of fish has hydrated oocytes due to the time lag between the occurrence of hydrated oocytes and catch. Though they often have oocytes at germinal vesicle migration (GVM) stage whose numbers are likely equal to batch fecundity, it is difficult to identify GVM oocytes in formalin-fixed ovary based on their appearance and size. The present study developed a simple method to identify the nucleus in the whole mount oocytes fixed in the 10% formalin solution by staining and clearing. After staining with the solution of Giemsa or Sudan black B, oocytes were immersed in a mixture of benzyl alcohol and benzyl benzoate (1: 2, by volume) to clear the cytoplasm filled with yolk. The Giemsa enhances the periphery of germinal vesicle (GV) and oil droplets, while Sudan black B strongly stained the GV. The clearing method developed in the present study may make it possible to estimate easily the batch fecundity of chub mackerel with GVM oocytes.

Key word: hydrated oocytes, batch fecundity, formalin-fixed ovary, germinal vesicle migration, clearing method, chub mackerel

はじめに

魚類資源変動の研究において、近年、親魚の繁殖特性の変化が卵質や産卵量および産卵時期の変化を通して加入量変動に影響するという考え方が重視されてきている(栗田ほか, 2010)。この加入への影響を考慮した個体群の繁殖特性は、個体群繁殖能力(SRP, stock reproductive potential)(Trippel, 1999, 2003; 栗田, 2010)と呼ばれる。従来、SRPの指標値として産卵親魚量(SSB, spawning stock biomass)が用いられてきたが、十分でないことが指摘されており(Marshall, 2009)、SSBに代わるSRPの指標がいくつか検討されてきた。その中で、個体群が当該産卵期に産卵する総量である個体群総産卵量(TEP, total egg production)がSRP

の量的な指標として注目されている(栗田, 2010)。個体群を構成する1個体の産卵数(realized fecundity)は、1回当たり産卵数であるバッチ産卵数(batch fecundity)と産卵回数を用いて推定される。

イワシ類やサバ類等、浮遊性卵を多回産卵する小型浮魚類の産卵親魚量推定に用いられているDaily Egg Production Method(DEPM, 1日当たり総産卵量による資源量推定法)は、産出された卵の数から親魚資源量を直接推定する卵数法の一つとして、1980年代に北米カタクチイワシ *Engraulis mordax*を対象に開発された(Hunter and Goldberg, 1980; Parker, 1980; Lasker, 1985)。DEPMは、すべてのパラメータを1日当たりとしたことと、1尾の雌が産む卵の数を、産卵頻度(spawning frequency)とバッチ産卵数の積で表すことにより、産卵量からの資源量推定を可能とした(渡邊, 2006)。DEPMによる親魚資源量推定は、産卵頻度とバッチ産卵数の両パラメータの精度に大きく依存する(Stratoudakis et al., 2006)ことから、資源量推定にDEPMを適用する際には、これらの精度向上が大きな課題となる。

このように、資源管理や加入量推定において最も基本的なパラメータの一つであるバッチ産卵数は、通常、卵巢内

2011年5月23日受付, 2011年7月19日受理

¹九州大学大学院農学研究院

Department of Bioresource Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan

²日本学術振興会特別研究員

Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS)

[†] rinya-m@agr.kyushu-u.ac.jp

の吸水卵母細胞（以降、卵母細胞は卵と表現する）を計数することにより求めている（Hunter et al., 1985; Murua et al., 2003）. 魚卵における吸水（HY, hydration）とは、卵の最終成熟（以降、卵成熟と表現する）時に起こる、卵黄タンパクの限定分解によって生じる卵内部の浸透圧上昇によって引き起こされる卵内への水の移動（松原, 2010）のことで、一般に、吸水に伴い卵体積の急激な増加と卵の透明化が進行する. 調査船調査や、漁獲物購入によって得た魚類の卵巣標本は、通常10%ホルマリン液で固定、保存されるが、固定後であっても吸水卵は透明状態が保持される. したがって、バッチ産卵数は、固定卵巣内の透明卵（=吸水卵）を計数すればよいが、吸水する時間帯が漁獲時間帯と異なるような魚種の場合、漁獲物から吸水卵をもつ個体を得ることが難しくなる.

マサバ *Scomber japonicus* では飼育実験により、卵成熟、排卵、産卵の時間帯が明らかにされている（Shiraishi et al., 2005, 2008a; 松山, 2006）. すなわち、ある日の夜に産卵をする個体では、夜明け前から正午過ぎにかけて卵成熟の開始となる核の移動（GVM, germinal vesicle migration）が起こり、その後、夕刻から夜にかけての比較的短い時間帯に、核膜が消失する卵核胞崩壊（GVBD, germinal vesicle breakdown）、吸水、排卵（OV, ovulation）が起こる. 排卵に引き続き、23:00を中心とする数時間の間に産卵（SP, spawning）が行われる（Fig. 1）. 天然群でも産卵時刻は22:00から24:00に集中することが報告されている（Yamada et al., 1998）が、マサバ漁は深夜から明け方にかけて行われるため、漁獲物の中に吸水卵をもつ個体は極めて少ない. 例えば、伊豆諸島海域で、たもすくい網により3-6月に漁獲された雌親魚271尾のうち、吸水卵をもつ個体は3尾のみで、一方、核移動期卵は16尾で認められた（渡邊ほか, 1999）. また、五島周辺海域の東シナ海で、まき網により3-5月に漁獲された雌親魚137尾では、吸水卵をもつ個体は1尾もおらず、56尾（40.6%）の個体が核移動期卵をもっていた（Shiraishi et al., 2008b）. このように、マサバでは漁獲時間帯と個体の吸水時間帯がずれているため（Fig. 1）、漁獲物から吸水卵をもつ個体を得ることが難しく、バッチ産卵数をパラメータとするDEPMによる資源量推定の導入を妨げる原因の一つとなっている.

1回の産卵で産み出される卵群が、成長の早い段階で未発達の卵から卵径組成上で分離すれば、吸水卵でなくてもそれら発達中の卵を計数することによりバッチ産卵数の算定は可能となる. 地中海産マイワシ *Sardina pilchardus sardina* では、発達する卵は第三次卵黄球期で卵径が完全に分離するので、バッチ産卵数算定には、吸水卵に加え、卵径に基づいて識別された第三次卵黄球期や核移動期の卵も用いられている（Ganias et al., 2004）. しかし、マサバやマイワシ *Sardinops melanostictus*、カタクチイワシ *Engraulis japonicus*、マアジ *Trachurus japonicus*、サンマ *Cololabis*

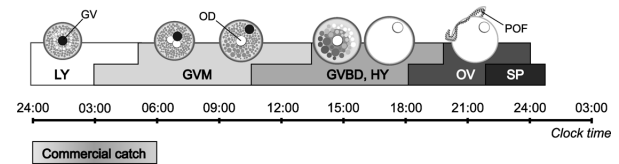


Figure 1. Time course of oocyte maturation and time zone of commercial catch in the chub mackerel *Scomber japonicus* in a day. Ovarian stages are shown at the bottom of oocytes: GVBD, germinal vesicle breakdown; GVM, germinal vesicle migration; HY hydration; LY, late yolk stage; OV, ovulation; SP, spawning. GV, germinal vesicle; OD, oil droplet; POF, postovulatory follicle.

saira など多くの魚種では、卵巣内に各種発達段階の卵が同時に存在するため、吸水卵以外では卵径に基づくバッチ産卵数の算定は不可能である.

卵黄形成が終了した卵では、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン（GtH, gonadotropic hormone）のシグナルを一旦受け取ると、核が移動を開始し、GVBDを経て吸水卵に至る一連の卵成熟過程が自動的に進行するので（松山, 2006）、核移動期の卵数は吸水卵数と同等とみなされる. したがって、核移動期卵は、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、マサバの核移動後期（late GVM）のホルマリン固定卵を顕微鏡観察した場合、卵の中央に融合した油球が確認されるが、固定してから時間が経過した標本では油球は判別できない（渡邊・斉藤, 2000）. また、核移動前期（early GVM）の卵では、油球の融合が十分でないため光が透過せず、計数されないためバッチ産卵数の過小評価につながる可能性が指摘されている（渡邊, 2006）. このように、核移動期卵を選別し、バッチ産卵数を推定する試みはあるものの、卵径が早い段階で分離する地中海産マイワシなどの種を除いて、ホルマリン固定卵巣標本から核移動期卵を確実に選別する方法はいまだ開発されていない.

このような背景に基づいて、我々は、漁獲物中に吸水卵をもつ個体が少なく、核移動期卵をもつ個体の出現率が高いマサバを対象にして、10%ホルマリン液で長期保存した卵巣標本を用いて、核移動期卵を識別する簡易法の開発を試みた. 本研究では、ベンジルアルコールと安息香酸ベンジルを主体とした透徹剤によりホルマリン固定卵を透明化することにより、各種染色法で染色した核膜を可視化することで、核移動期卵を容易に判別できたので報告する.

材料と方法

1. ホルマリン固定卵巣標本

材料に用いたマサバのホルマリン固定卵巣標本は、飼育下で成熟誘導実験を行ったマサバ親魚から得た（詳細はShiraishi et al., 2005 参照）. 満2歳の養成マサバ雌親魚から、ポリエチレン製カニューラ（内径2mm）を用いたバイオ

ブシー標本の検鏡により卵黄形成を終了した個体を選別し、背筋部にヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン (HCG, 500 IU/kg 体重) を投与することにより卵成熟を誘導した。HCG投与後36時間までの間に一定時間間隔で複数尾 (9–13尾) の親魚を取り上げ、種々の成熟段階にある卵巣を得た。卵巣は採取後、一部を海産魚用生理食塩水 (135 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaHCO₃, 0.5 mM NaH₂PO₄, pH 6.8) を用いた10%ホルマリン液で固定し、約5年間室温で保存したものを透明化法の検討に用いた。

2. 組織切片標本

卵巣の一部はブアン液で固定後、エタノールで段階的に脱水、メタクリレート樹脂 (Technovit 7100, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) 包埋した後、1%トルイジンブルーで染色した4 μmの組織切片標本作製し、光学顕微鏡で観察した。

3. ホルマリン固定卵の染色および透明化

ホルマリン固定した卵細胞内の核、油球、卵黄球等の構造物の染色性を調べるために、以下の色素、染色液を試みた。色素、染色液は、一般的な組織切片標本作製に使われており、特別な機器や手法を要しないものを選んだ。各色素、染色液の染色特性 (西村・清水, 1970; 高橋ほか, 1999) および今回用いた染色液の調整法を簡単に記す。

マイヤーのヘマトキシリン (Mayer's Haematoxylin): 好塩基性の組織を青紫色に染める一般染色剤で、細胞核などの染色に用いられる。蒸留水1000 mlに、ヘマトキシリン1g, ヨウ素酸カリウム0.2g, カリウムミョウバン50g, クエン酸1g, 抱水クロラール50gを溶解後、ろ紙でこして使用。

トルイジンブルー (Toluidine blue): ヘマトキシリン同様、細胞核が強く青色に染色される。蒸留水100 mlにトルイジンブルー1g, ホウ砂1gを溶解後、ろ紙でこして使用。

アルシアンブルー (Alcian blue): 酸性粘液多糖類を青色に染める。3%酢酸水100 mlにアルシアンブルー1gを溶解して使用。

ギムザ (Giemsa): 血球染色法の一つで、メチレンブルー (Methylene blue), アズールブルー (Azur blue), エオジン (Eosin) の混合物。市販品を使用。

酢酸オルセイン (Acetic orcein): 核の観察に汎用され、細胞核あるいは染色体が染色される。45%酢酸100 mlを熱し、オルセイン1gを溶解して使用。

ズダン III (Sudan III): 中性脂肪に溶解し鮮橙色に染色する。70%エタノール100 mlに、ズダン III 2gを溶解後、ろ紙でこして使用。

ズダン黒B (Sudan black B): 中性脂肪、脂肪酸、複合脂質 (コレステロール等) を黒紫色に染色する。調整法は後で記述。

個々に分離したホルマリン固定卵を各染色液で染色した後、卵の細胞質をベンジルアルコール (benzyl alcohol): 安息香酸ベンジル (benzyl benzoate) = 1:2液 (BA-BB液) を用いて透明化した。なお、BA-BB液は水溶液と混ざり合わないため、染色後の卵を段階的にエタノール脱水した後、BA-BB液に浸漬した。

結果

1. ホルマリン固定卵の外観および組織像

Fig. 2に、卵黄形成後期 (LY), 核移動期 (GVM), 卵核胞崩壊 (GVBD) および吸水 (HY) 期にある卵の、組織切片像およびホルマリン固定した実体顕微鏡の透過光観察像を示す。卵黄形成後期卵 (Fig. 2a) および核移動期卵 (Fig. 2b) は卵径がやや異なるものの、不透明で外観からは識別できない (Fig. 2e, 2f)。卵黄形成後期卵では、中心にある核の周囲を、多数の小さな油球が取り囲むが (Fig. 2a), 核移動期卵では、油球は卵の中心に集まって融合し、GVは動物極側へと移動する (Fig. 2b)。核膜消失直後のGVBD卵 (Fig. 2c) では卵黄球の融合と吸水の進行により卵径が増大するとともに、透明化してくる (Fig. 2g)。卵径が1 mm前後に達した吸水卵では卵黄は完全に融合し (Fig. 2d), 卵の透明化もさらに進む (Fig. 2h)。

2. ホルマリン固定卵の染色法と透明化法

10%ホルマリン液で固定後の不透明な卵 (Fig. 2e, 2f) を段階的にエタノールで脱水後、BA-BB液に浸漬することにより細胞質を透明化することができたが、核や油球など細胞内の構造物を明瞭に判別することはできなかった (Fig. 3a, 3d)。細胞内の構造物を識別するため、各種染色液で染色した後、BA-BB液に浸漬し、顕微鏡観察した。その結果、試みた各種染色法のなかで、ギムザおよびズダン黒Bで染色した標本が核の判別に最も適していた。以下にギムザおよびズダン黒Bによる染色とそれに続くBB-BA液による透明化の手順を示す。

A. ギムザ染色液を用いた方法

試薬類

リン酸緩衝液 (pH 6.8): 0.2 M NaH₂PO₄ 68.5 ml と 0.2 M Na₂HPO₄ 31.5 ml を混合し、蒸留水で全量を200 mlにする。

50倍希釈ギムザ染色液: ギムザ染色液 (Wako, Japan) をリン酸緩衝液 (pH 6.8) で50倍希釈する。

酢酸水溶液: 蒸留水50 mlにピペットで酢酸を1–2滴滴下する。

染色および透明化

1. 卵の分離: ホルマリン固定された卵巣片をガラスシャーレ上で柄つき針やピンセットを用いてほぐし (Fig. 4a), バイアル瓶 (15–30 ml 容量) に入れる。以下、透明化の前までの作業は全て、バイアル瓶の液を交換することにより進め、バイアル瓶はローテーターで常に攪拌する (Fig. 4b)。

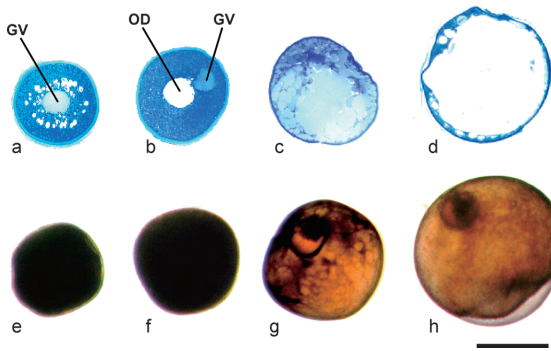


Figure 2. Photomicrographs of histological section (upper, a–d) and whole oocytes fixed with 10% formalin (lower, e–h) of the chub mackerel by simple transmitted light. (a) and (e), LY stage; (b) and (f), GVM stage; (c) and (g), GVBD stage; (d) and (h); HY oocyte. GV, germinal vesicle; OD, oil droplet. Bar=500 μ m.

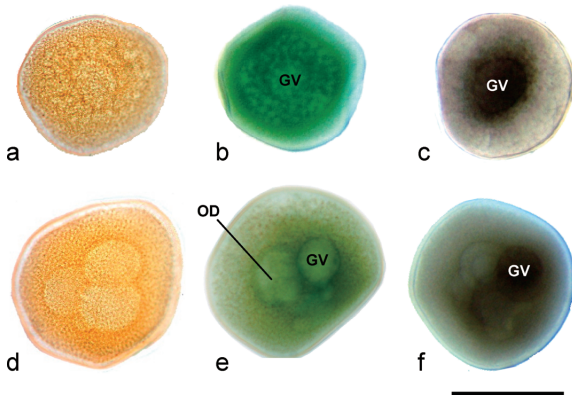


Figure 3. Photomicrographs of whole oocytes at LY stage (upper, a–c) and GVM stage (lower, d–f) of the chub mackerel by simple transmitted light. (a) and (d), cleared by a mixture of benzyl alcohol and benzyl benzoate (BA:BB solution). (b) and (e), stained with Giemsa followed by BA:BB clearing; (c) and (f), stained with Sudan black B followed by BA:BB clearing. GV, germinal vesicle; OD, oil droplet. Bar=500 μ m.

2. 脱水：70, 80, 90, 100%エタノール（各6時間）。
3. ギムザ染色：50倍希釈ギムザ染色液（2日）。
4. 洗浄：酢酸水溶液（3時間）。
5. 脱水：70, 80, 90, 100%エタノール（各3–6時間）。
6. 透明化：ベンジルアルコール（Benzyl alcohol）：安息香酸ベンジル（Benzyl benzoate）=1:2液（BA–BB液）（10–30分）。

ベンジルアルコールと安息香酸ベンジルは、ともに強い揮発臭をもつ有機溶媒で、芳香剤の原料として用いられる。BA–BB液はプラスチックを侵すため、ガラス製の瓶、ピペットなどで取り扱い、卵の浸漬にはガラス製の蓋つきシャーレなどを用いる（Fig. 4c）。浸漬の作業はドラフト

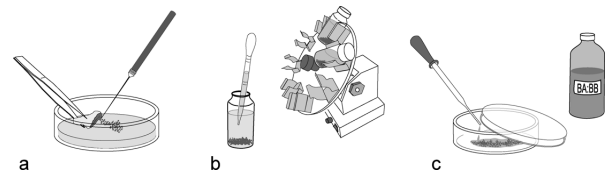


Figure 4. Separation, staining and clearing for formalin-fixed oocytes of chub mackerel. (a) Each oocytes from small pieces of formalin-fixed ovary is separated from each other using forceps or needle. (b) Oocytes are immersed with staining solution, ethanol and so on, in a vial. Oocytes in a vial are stirred on a rotator. (c) Dehydrated oocytes are moved into a glass plate with a lid and the extra solution is removed. The BA:BB solution is mounted using a glass pipette and oocytes are immersed for 10–30 min to clear cytoplasm. All procedures are performed at room temperature.

内などで行い、また、浸漬後の卵を観察する際は、蓋つきシャーレを通して実体顕微鏡で観察するなど、蒸気を吸わないように留意する。

B. ズダン黒B染色液を用いた方法

試薬類

ズダン黒B染色液：70%エタノール100 mlに、ズダン黒B（Sudan black B; Wako, Japan）粉末0.1 gを混和し、10分間沸騰して十分に溶解した後、室温で冷却し、ろ紙を通して沈殿を除く。

染色および透明化

- 1–2. は、ギムザ染色と同じ。
3. ズダン黒B染色：ズダン黒B染色液（2日）。
4. 洗浄：70%エタノール（6時間）。途中1–2回、70%エタノールを取り替える。
5. 脱水：70, 80, 90, 100%エタノール（各3–6時間）。
6. 透明化：BA–BB液（10–30分）。

いずれの染色法においても、ステップ4の洗浄で細胞質に残る余分な色素を除く必要がある。また、ステップ2の脱水を行わない場合、ステップ5の脱水で色素が抜けやすくなるので、ステップ2の脱水を推奨する。

3. 観察結果

ギムザ染色液で染色後、BA–BB液で透明化した卵では、実体顕微鏡による透過光のもと、核が観察された（Fig. 3b, 3e）。染色液の使用回数や染色時間、洗浄時間により観察像は多少異なるが、いずれも細胞質は緑色を基調とした色彩で染色され、輪郭の明瞭な核が認められた。また、卵黄形成卵（Fig. 3b）や核移動期卵（Fig. 3e）のいずれにおいても、それぞれ油球が観察された。

ズダン黒B染色液で染色後、BA–BB液で透明化した卵では、黒色に染色された核が明瞭に観察された。一方、ギムザ染色と比較して油球の輪郭は不明瞭で、明瞭な油球は観察されなかった（Fig. 3c, 3f）。

考 察

10%ホルマリンで固定し、約5年間室温で保存したマサバの卵巣標本から分離した卵は、BA-BB液（ベンジルアルコール：安息香酸ベンジル=1:2）に浸漬することにより容易に透明化することができた。BA-BB液は、卵黄の屈折率に対応して卵をほとんど透明にするため、発生学等で卵黄の多い両生類の卵の観察に用いられる透徹剤である（Dent and Klymkowsky, 1989; Gard and Kropf, 1993）。

BA-BB液への浸漬による透明化のみでは核などの細胞内構造物が識別できないため、いくつかの染色法による染色を試みた結果、ギムザ染色あるいはズダン黒B染色により核が明瞭に識別された。ギムザ染色は血液や骨髄塗抹標本の染色法として最も一般的に用いられ、好塩基性物質を紫色に、好酸性物質をピンク色に染める。ギムザ染色を施した後、透明化したマサバの卵では、縁辺が濃い緑色に染まっている核が明瞭に観察され（Fig. 3b, 3e）、核の染色法として適していることが確認された。また、薄い緑色の輪郭をもつ油球も確認でき（Fig. 3b, 3e）、核移動期卵では、数個あるいは単一の大きな油球が観察された。

ズダン黒Bに含まれるアゾ色素は、無極性かつ脂溶性で、組織内脂質に溶解し脂肪染色を行う。本研究で、明瞭に黒く観察されたマサバ卵の核は、リン脂質とスフィンゴ脂質の脂質二重層により構成される核膜がアゾ色素により染色されたものであろう（Fig. 3c, 3f）。一方、ズダン黒B染色法ではギムザ染色に比べ、明瞭な油球は観察されなかった。油球の判別が難しいため、特に核移動期卵では、ピンセットや針で卵を動かして核の位置を確認する必要がある。脂質である油球が染まらなかった理由は不明であるが、2回にわたる段階的エタノール脱水の影響かもしれない。一般に細胞内の脂質検出を目的としてズダン染色を行う場合、脂質の遊出を防ぐために凍結切片を作製するケースが多い。以上のように、核や油球の染色の特性に違いはあるが、BB-BA液浸漬による透明化を行うことで、ギムザ染色あるいはズダン黒B染色により、組織切片を作製することなく、そのままの状態、すなわち whole mount 標本の観察により核が確認できることが明らかになった。ただし、GtHによる卵成熟のシグナルを受けた卵では核の移動が始まるが、ごく初期の段階では同時に産卵される予定の同一バッチ内において、個々の細胞の応答の差により核移動を開始している卵と開始していない卵が混在する可能性がある。したがって、核移動のごく初期にある卵巣はバッチ産卵数の算定対象から除外するなど、留意する必要がある。

本研究で開発したホルマリン固定卵巣標本の透明化法を用いることで、マサバでは核移動期卵が容易に判別できるようになった。すなわち、核移動期卵をもつ個体を対象として、バッチ産卵数の正確な計数ができるようになるので、吸水卵をもつ個体の出現時間帯と漁獲時間帯とのずれに左右されず、より多くの標本がバッチ産卵数解析の対象とな

る。吸水時間帯と漁獲時間帯のずれの問題は、DEPMを適用した地中海産カタクチワシ *Engraulis encrasicolus* でも報告されており、22:00から6:00の間にまき網で漁獲された個体では吸水卵をもつものは全く得られていない（Palomera and Perterra, 1993）。本透明化法がマサバ以外の小型浮魚類にも応用できれば、今後複数の魚種でホルマリン固定した核移動期卵を容易に判別できるようになり、DEPMによる資源量推定の精度向上に貢献することが期待される。

本研究では開発にあたり、簡便性、迅速性を優先した。試薬類は研究機関であればどこでも簡単に入手でき、複雑な手順を要せず、所要時間が短いことなどを念頭に置いた。ホルマリン卵巣標本を染色、透明化し、観察するまで数日を必要とするが、液換えのみで済むこと、多量の標本を一度に取り扱えること、組織切片標本の作製なしに卵の発達ステージが判別できることなど、利便性、応用性は高いものと考えられる。マサバのホルマリン固定卵のみでの条件であるので、魚種により観察像の明瞭さが異なるものと思われる。他魚種で応用する場合、その魚種に合った条件に調整する必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、種々の情報を提供していただいた白石哲朗博士、山口明彦博士（九州大学農学研究院）に厚くお礼申し上げる。なお、本研究の一部は、科学研究費補助金基盤研究（B）（20380113）および農林水産省委託プロジェクト研究「魚種交替の予測・利用技術の開発」により実施した。

引用文献

- Dent, J. and M. W. Klymkowsky (1989) Wholemount analysis of cytoskeletal recognition and function during oogenesis and early embryogenesis in *Xenopus*. In: The cell biology of development, eds. H. Schatten and G. Schatten, Academic Press, San Diego, 63–103.
- Ganias, K., S. Somarakis, A. Machias and A. Theodorou (2004) Pattern of oocyte development and batch fecundity in the Mediterranean sardine. *Fish. Res.*, **67**, 13–23.
- Gard, D. L. and D. L. Kropf (1993) Confocal immunofluorescence microscopy of microtubules in oocytes, eggs, and embryos of algae and amphibians. In: Antibodies in Cell Biology, Methods in Cell Biology-37, eds. D. J. Asai, Purdue University, West Lafayette, Indiana, 147–169.
- Hunter, J. R. and S. R. Goldberg (1980) Spawning incidence and batch fecundity in northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.*, **77**, 641–652.
- Hunter, J. R., N. C. H. Lo and R. J. H. Leong (1985) Batch fecundity in multiple spawning fishes. In: An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis Mordax*, eds. R. Lasker, NOAA Tech. Rep. NMFS-36, National Marine Fisheries Service Scientific Publications Office, Seattle, 67–77.
- 栗田 豊 (2010) 産卵親魚個体群の繁殖能力の空間的变化が加入量に及ぼす影響。水産海洋研究, **74** (特集号), 4–18.

- 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.
- Lasker, R. (1985) Introduction: an egg production method for anchovy biomass assessment. In. An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis Mordax*, eds. R. Lasker, NOAA Tech. Rep. NMFS-36, National Marine Fisheries Service Scientific Publications Office, Seattle, 1-3.
- Marshall, C. T. (2009) Implementing information on stock reproductive potential in fisheries management: the motivation, challenges and opportunities. In. Fish Reproductive Biology: Implications for Assessment and Management, eds. T. Jakobsen, M. J. Fogarty, B. A. Megrey and E. Moksness, Wiley-Blackwell, Chichester, 395-420.
- 松原孝博 (2010) 海産真骨魚卵の浮遊性調節機構とその生態的役割. 水産海洋研究, **74** (特集号), 106-110.
- 松山倫也 (2006) 多獲性浮魚類の再生産研究高度化に向けての生殖生理学的手法の適用. 水産総合研究センター研究報告, 別冊**4**, 51-62.
- Murua, H., G. Kraus, F. Saborido-Rey, P. R. Witthames, A. Thorsen and S. Junquera (2003) Procedures to estimate fecundity of marine fish species in relation to their reproductive strategy. J. Northw. Atl. Fish. Sci., **33**, 33-54.
- 西村秀雄・清水信夫 (1970) 「新組織学」. 医学書院, 東京, 794 pp.
- Palomera, I. and J. P. Perterra (1993) Anchovy biomass estimate by the daily egg production method in 1990 in the western Mediterranean Sea. Sci. Mar., **57**, 243-251.
- Parker, K. (1980) A direct method for estimating northern anchovy, *Engraulis mordax*, spawning biomass. Fish. Bull., **78**, 541-544.
- Shiraishi, T., S.D. Ketkar, H. Kitano, M. Nyuji, A. Yamaguchi and M. Matsuyama (2008a) Time course of final maturation and ovulation in chub mackerel *Scomber japonicus* induced by hCG and GnRH α . Fish. Sci., **74**, 764-769.
- Shiraishi, T., K. Ohta, A. Yamaguchi, M. Yoda, H. Chuda and M. Matsuyama (2005) Reproductive parameters of the chub mackerel *Scomber japonicus* estimated from human chorionic gonadotropin-induced final oocyte maturation and ovulation in captivity. Fish. Sci., **71**, 531-542.
- Shiraishi, T., K. Okamoto, M. Yoneda, T. Sakai, S. Ohshimo, S. Onoe, A. Yamaguchi and M. Matsuyama (2008b) Age validation, growth and annual reproductive cycle of chub mackerel *Scomber japonicus* off the waters of northern Kyushu and in the East China Sea. Fish. Sci., **74**, 947-954.
- Stratoudakis, Y., M. Bernal, K. Ganiats and A. Uriarte (2006) The daily egg production method: recent advances, current applications and future challenges. Fish. Fish., **7**, 35-57.
- 高橋清之・岩信 造・佐々木政臣・若狭研一・戸田好信 (1999) 「病理組織染色ハンドブック」. 医学書院, 東京, 100 pp.
- Trippel, E. A. (1999) Estimation of stock reproductive potential: history and challenges for Canadian Atlantic gadoid stock assessments. J. Northw. Atl. Fish. Sci., **25**, 61-81.
- Trippel, E. A. (2003) Estimation of male reproductive success of marine fishes. J. Northw. Atl. Fish. Sci., **33**: 81-113.
- 渡邊千夏子 (2006) 資源学的立場からみたマサバ太平洋系群の生殖生態研究の現状と問題点. 水産総合研究センター研究報告, 別冊**4**, 101-111.
- 渡邊千夏子・花井孝之・日黒清美・荻野隆太・木村 量 (1999) 1日当たり総産卵量によるマサバの資源量推定. 日本水誌, **65**, 695-702.
- 渡邊千夏子・斎藤真美 (2000) バッチ産卵数の推定方法の検討. 一日当たり総産卵量に基づくマサバ太平洋系群の資源量推定法に関する調査報告書, 中央水産研究所, 30-34.
- Yamada, T., I. Aoki and I. Mitani (1998) Spawning time, spawning frequency and fecundity of Japanese chub mackerel, *Scomber japonicus* in the waters around the Izu Islands, Japan. Fish. Res., **38**, 83-89.