

胚の発生段階に基づくクロソイ親魚選別による出産さんの同調化

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者	中川, 雅弘 大河内, 裕之
巻/号	53巻4号
掲載ページ	p. 343-348
発行年月	2005年12月

胚の発生段階に基づくクロソイ親魚選別による出産の同調化

中川雅弘¹・大河内裕之¹

Examination of Embryonic Developmental Stage by Cannulation to Synchronize the Timing of Parturition in Black Rockfish *Sebastes schlegeli* Broodstock Females

Masahiro NAKAGAWA¹ and Hiroyuki OKOUCHI¹

Abstract: Black rockfish is viviparous and one of the important target fish species for aquaculture and stock enhancement in Japan and Korea. Because size differences in black rockfish larvae lead to increased cannibalism, preparation of a sufficient number of larvae with the same or similar daily age is necessary for efficient aquaculture. We developed a method to concentrate the parturition period of female broodstock by examining the developmental stage of embryos using cannulation and selecting females, which are predicted to have similar parturition dates. We set up two groups examined over a 3-year period: one for selected broodstock with cannulation of embryos and the other as unselected control groups. The parturition period of the selected group was significantly shorter than that of the control group and greater numbers of larvae with the same parturition date were obtained in the selected group over the 3 years of experiments. The differences between the predicted dates and the actual dates of parturition were 1–3 days for the day parturition began and 0–2 days for the day parturition ceased. These results indicate that selecting broodstock female on the basis of the inspection of the embryonic developmental stage using cannulation will enable us to obtain newly released larvae for systematic and efficient aquaculture.

Key words: *Sebastes schlegeli*; Black rockfish; Broodstock; Parturition

クロソイ *Sebastes schlegeli* は、主に日本および朝鮮半島沿岸に分布するメバル属の胎生魚である。本種は我が国の重要な沿岸漁業資源であり、メバル属の中では成長が速いこと（永沢 2001）、放流後の移動範囲が比較的狭い（Nakagawa et al. 2004）ことなどから、栽培漁業および養殖の対象種として種苗生産されている（水産庁・水産総合研究センター 2004）。また、本種は韓国でも、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* と並ぶ重要な養殖対象種である（Lim et al. 2004）。

効率的な種苗生産を行うには良質なふ化仔魚を集積的、かつ大量に確保する技術が必要である。ヒラメなどの多回産卵魚では、親魚養成技術の進歩により1日あたり100万尾以上のふ化仔魚を安定して得ることが可能となっている（日本栽培漁業協会 1994）。しかし、胎生魚であるクロソイは、出産が年1回で

あり（草刈 1995）、1尾あたりの産仔数も20万尾前後（清水・八幡 1991）と少なく、群としての同調性がない（Nakagawa and Hirose 2004）ため、集中的に大量の仔魚を得るのが難しい。さらに、仔魚を大量に得るために親魚の飼育密度を高めると死産が増加し（清水 1992）、大型水槽を用いて親魚数を増やすと、遊泳力のある仔魚を回収できないという問題が生じる。このことから、クロソイの種苗生産機関では、大量のふ化仔魚の安定確保が大きな課題となっている。さらに、近年では遺伝的多様性に配慮した放流種苗の生産も重要な課題の一つとなっている（北田 2000）。

本研究では、クロソイ親魚群の出産の同調性を高めるために、カニキュレーションによりクロソイ親魚から胚を採取し発生段階を調べて、出産日が互いに近いと判断された個体を選別した。選別親魚群と非選別親魚

2005年4月22日受付：2005年9月1日受理。

¹水産総合研究センター宮古栽培漁業センター（Miyako Station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency, 4-9-1, Sakiyama, Miyako 027-0097, Japan）。

群の出産日を比較し、出産の同調性に対する選別の効果を検証した。あわせて、胚の発生段階に基づいた親魚の出産期間の予測精度を検討した。

材料および方法

親魚の飼育条件と試験区の設定

試験は2001～2003年の3年間に各1回ずつ、計3回実施した。供試魚には、1989～1991年に(社)日本栽培漁業協会宮古事業場(現;水産総合研究センター宮古栽培漁業センター。以下、宮古センターという)で種苗生産されたクロソイ稚魚を10～12歳まで養成した雌成魚を用いた。宮古センターで飼育するクロソイ親魚は11月に交尾し、4月上旬の体内授精を経て5～6月に出産するという生殖周期を持つ(Mori et al. 2003)。これに合わせて、宮古センターでは交尾期を含む7月～2月には、雌雄を混合して大型水槽(RC100 kl)で飼育し、出産期を中心とした3～6月には、出産された仔魚を効率よく回収するため、雌のみを加温可能な小型水槽(FRP10 kl, 以下、出産水槽という)で飼育している。本試験でも同様のスケジュールで、3月上旬に供試魚を出産水槽2面に収容した。

本試験では、胚の発生段階に基づいて親魚を選別した「選別区」と、選別しない「対照区」の2区を設定した。出産水槽への収容尾数は、選別後の尾数を両区でほぼ同数に揃えるため、選別区では34～40尾、対照区では16～20尾とした。胚の観察は、前述したように親魚の受精時期は4月上旬であるため、すべての供試魚で受精が完了すると考えられる4月下旬(2001年4月24日、2002年4月25日および2003年4月24日)に実施した。生殖口からのカニキュレーションにより1尾あたり約30粒の卵巣卵を採取し、ろ過海水を入れたシャーレに移して実体顕微鏡下で胚を観察した。胚の発生段階は、草刈(1995)に従いステージ(以下、st.)1からst. 32に分類した。なお、本種の胚は卵巣内では均一に発生するため(Nakagawa and Hirose 2004)、得られたサンプルは卵巣全体の発生状況を代表している。

出産水槽の水温は、4月中旬まで自然水温(5.4～8.0℃)とし、選別を終えた4月下旬以降に昇温(0.3℃/日)を開始して13℃まで加温した。この水温管理は、宮古センターのクロソイ種苗生産試験で、5月上旬に仔魚を得るために毎年行っている方法であり(Nakagawa and Hirose 2004)、本試験でもこの昇温スケジュールに従った。出産水槽の飼育水温の範囲(平均)は、2001年が5.4～13.0(9.6)℃、2002年が6.4～13.0(9.7)℃、2003年が6.5～13.0(9.4)℃であり、年度間で顕著な差はなかった。

出産されたふ化仔魚は、水面付近を遊泳するため、出産水槽壁面の排水口からオーバーフローした海水とともに500 l水槽に集めて回収した。回収したふ化仔魚数は、出産日および水槽ごとに容積法で計数した。

出産の同調性の評価

出産の同調性は、各親魚群が出産の開始から終了までに要した日数 D を、収容した親魚数(選別区では選別後の尾数) N で除して得られる平均出産間隔 $T(=D/N)$ により評価した。

得られた T の3年間の平均値の差の有無を、Mann-Whitneyの U -testを用いて検定した。

出産期間の推定および的中率

草刈(1995)は、水温9.8℃における本種の胚の発生段階 $X(X=1, 2, 3\cdots 32)$ と出産までの所要日数 Y との間には $Y=-0.00142 X^3 + 48.0028$ の関係式で表されることを報告している。一方、本種の出産時期は水温によって変化する(清水・八幡 1991)ため、本研究では9.8℃の水温一定の条件下で推定された草刈(1995)の式を、積算水温の条件下の推定式に読み替え、変動する水温下での出産日の推定を試みた。即ち、その時点の胚の発生段階 X から出産までの所要日数 Y に9.8℃を乗じた水温 $PD^\circ(=9.8^\circ C \cdot Y)$ を、出産までに要する積算水温と仮定し、出産水槽の水温制御スケジュールに従った積算水温が PD° に達する日を出産日とした。なお、出産個体を水槽から取り揚げて確認する方法は、その後の出産に支障をきたすと予想される。そこで、出産日の個別確認を行わず、各群で最も出産が早い個体と遅い個体の出産予定日を出産期間とし、この期間中に出産した親魚数の割合(以下、的中率)から予測結果を評価した。なお、毎日の出産親魚数は、その日に得られた仔魚の数を、各群における1尾あたりの平均出産数(試験終了時に確定)で除して推定した。

結 果

胚の発生段階と選別結果

2001年の試験では、選別区の候補魚40尾のうち31尾に胚発生が認められ、それらの発生段階は胚盤形成期(st. 2)から開口期(st. 28)であった(Table 1)。残りの9尾は未受精卵を有していた。このうちst. 24～28の21尾を選別区の供試魚とした。対照区では20尾のうち19尾で胚発生が認められ、それらの発生段階は初期胞胚期(st. 10)から網膜色素沈着期(st. 25)であった。1尾は未受精卵を有していたが、すべての個体を対照区の供試魚とした。

Table 1. Developmental stage and the expected date of birth from the inspection of embryos in black rockfish from 2001 to 2003

Year	Selected				Control		
	Developmental stage	No. of fish	Expected* ¹ date of birth	Selection	Developmental stage	No. of fish	Expected* ¹ date of birth
2001	28	5	10 May	Using for experiment	25	3	16 May
	25	6	16 May		24	6	18 May
	24	10	18 May		21	1	23 May
	21	1	22 May	Eliminated	17	3	28 May
	17	3	26 May		15	3	30 May
	15	2	28 May		10	3	1 Jun.
	14	2	28 May		UE* ²	1	
	5	1	30 May				
	2	1	31 May				
	UE* ²	9					
Total		40			20		
2002	29	9	6 May	Using for experiment	28	3	9 May
	28	8	9 May		25	3	16 May
	25	4	16 May		24	3	18 May
	24	5	18 May	Eliminated	21	3	23 May
	21	2	23 May		17	1	27 May
	20	2	24 May		16	2	28 May
	17	2	27 May		UE* ²	1	
	16	1	27 May		NT* ³	3	
	15	3	29 May				
	UE* ²	2					
Total		38			19		
2003	29	1	6 May	Using for experiment	29	1	6 May
	28	9	9 May		28	1	9 May
	25	6	16 May		25	3	16 May
	24	4	18 May	Eliminated	24	1	18 May
	21	3	23 May		21	2	23 May
	20	1	24 May		20	1	24 May
	16	1	28 May		16	3	28 May
	15	2	27 May		2	1	31 May
	14	1	30 May	NT* ³	3		
	11	2	31 May				
UE* ²	3						
NT* ³	1						
Total		34			16		

*¹The expected date of birth from the inspection of embryos by a cannulation.*²UE: unfertilized egg.*³NT: Embryos were not collected by a cannulation.

2002年は、選別区の38尾のうち36尾で胚発生が認められ、それらの発生段階は胚体出現期(st. 15)から体表色素沈着期(st. 29)であった (Table 1)。2尾は未受精卵を有していた。このうち st. 25~29の21尾を選別区の供試魚とした。対照区では19尾のうち15尾で胚発生が認められ、それらの発生段階は頭側皺襞期(st. 16)から開口期(st. 28)であった。1尾は未受精卵を有し、残りの3尾はカニキュレーションで胚を採取することができなかったが、すべての個体を対照区の供試魚とした。

2003年は、選別区の34尾のうち30尾で胚発生が認められ、それらの発生段階は後期胞胚期(st. 11)から体

表皮色素沈着期(st. 29)であった (Table 1)。3尾は未受精卵を有し、1尾はカニキュレーションで胚を採取できなかった。このうち st. 24~29の20尾を選別区の供試魚とした。対照区では16尾のうち13尾で胚発生が認められ、それらの発生段階は胚盤形成期(st. 2)から体表色素沈着期(st. 29)であった。3尾はカニキュレーションで胚を採取することができなかったが、すべての個体を対照区の供試魚とした。

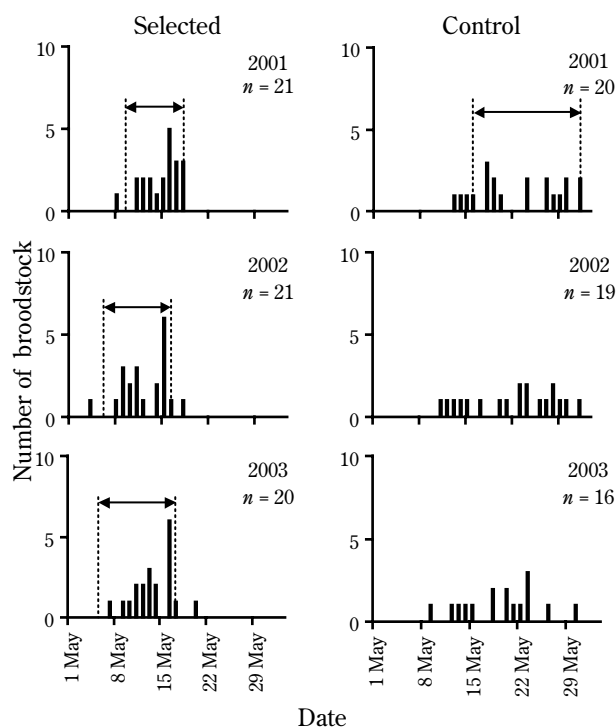
なお、すべての年度で、両試験区の供試魚の平均全長に有意差は認められなかった (Mann-Whitneyの *U*-test, $P > 0.05$; Table 2)。

Table 2. Total length, body weight, number of collected larvae, and period and interval of birth (T) of black rockfish broodstock females from 2001 to 2003

Year	Groups	Number of fish examined	Total length (cm) (Mean \pm SD)	Body weight (kg) (Mean \pm SD)	Number of collected larvae ($\times 10^4$)	Number of larvae per broodstock ($\times 10^4$)	Period of birth	Number of birth day	T *2
2001	Selected	21 *1	49.2 \pm 1.9	2.3 \pm 0.2	573.7	27.3	11	9	0.52
	Control	20	48.5 \pm 1.6	2.1 \pm 0.2	465.1	23.3	20	12	1.00
2002	Selected	21 *1	49.7 \pm 1.6	2.1 \pm 0.2	486.4	23.2	15	10	0.71
	Control	19	49.1 \pm 1.7	2.0 \pm 0.2	402.8	21.2	23	15	1.21
2003	Selected	20 *1	50.5 \pm 1.5	2.3 \pm 0.2	437.4	21.9	15	10	0.75
	Control	16	49.7 \pm 1.7	2.2 \pm 0.2	353.7	22.1	23	12	1.44

*1 Selected fish by the inspection of embryos using cannulation.

*2 Period of birth / Number of broodstock females.

**Fig. 1** Daily changes of the number of parturition in black rockfish females from 2001 to 2003. Arrows indicate the expected parturition period. Selected broodstock females by the observation of embryonic developmental stage were used for intensive parturition.

出産および同調性

出産結果の概要を Table 2 に示した。各年の試験で得られた総ふ化仔魚数は、選別区では437.4~573.7万尾、対照区では353.7~465.1万尾であった。親魚1尾あたりの平均ふ化仔魚数は、選別区では21.9~27.3万尾、対照区では21.2~23.3万尾であった。出産の開始から終了までに要した日数は、選別区では11~15日間、対照区では20~23日間であった。そのうち出産が確認されたのは、選別区では9~10日間、対照区では12~15日間であった。選別区は、対照区に比べて出産期間

Table 3. Expected and actual dates, and conformity ratio of birth in black rockfish broodstock females from 2001 to 2003

Year	Groups	Date of birth				Conformity ratio of birth *2 (%)
		Expected *1		Actual		
		Start	Finish	Start	Finish	
2001	Selected	10 May	18 May	8 May	18 May	76.2
	Control	16 May	1 Jun.	13 May	1 Jun.	85.0
2002	Selected	6 May	16 May	4 May	18 May	90.5
	Control	-	-	-	-	-
2003	Selected	6 May	18 May	7 May	20 May	95.0
	Control	-	-	-	-	-

*1 Expected date of birth from the inspection of embryos by cannulation.

*2 Conformity ratio of birth (%): The ratio of the broodstock females which gave birth within the predicted birth period.

が短縮され、かつ1日あたりに出産した親魚数も増加した (Fig. 1)。

なお、未受精卵の放出は、2001年および2002年の未選別区で各1例ずつ観察され、胚の発生段階調査で未受精卵を持っていた親魚数と一致した。選別区では、未受精卵を持つ親魚をあらかじめ除去できたため、卵の放出はまったく認められなかった。

各年の平均出産間隔 (T) は、選別区ではそれぞれ0.52, 0.71, 0.75 (平均0.66)、対照区ではそれぞれ1.00, 1.21, 1.44 (平均1.22) となった。選別区の T は対照区に比べて有意に低く ($P < 0.05$)、およそ1/2に短縮された (Table 2)。

出産期間の的中率

すべての供試魚から胚発生の卵巣卵を採取できた2001~2003年の選別区、および2001年の対照区について出産期間を推定した。2002年および2003年の対照区では、胚発生の卵巣卵が採取できない個体が3尾ずつ含まれるため、出産期間は推定できなかった。

各年、各群の出産期間の的中率は76.2~95.0%と非

常に高く、推定日と実際の出産日との差は出産開始日および終了日では、それぞれ1～3日、0～2日であり (Table 3; Fig. 1), 推定された出産期間は実際の期間とよく一致した。

考 察

選別の効果

現在行われている50 kl以上の大型水槽を用いたクロソイの種苗生産では、ふ化仔魚が集中的に得られないことに起因して、出産日の異なる仔魚をまとめて同一水槽に収容するのが一般的である。このような状況で種苗生産を行うと、飼育魚の大小差が拡大して共食が増加するために、生残率の低下や疾病の発生が問題となっている (清水・八幡 1991)。本試験で開発した親魚選別法により効率的にふ化仔魚が得られれば、飼育規模が大きくても短期間で仔魚を収容することが可能になる。宮古センターのクロソイ種苗生産試験では、毎年40～50尾の親魚を用いて、1水槽あたり50万尾のふ化仔魚の収容を目標とするが、1990～2000年に実施した延べ33回の飼育事例では収容に最大5日 (平均1.8日) を要した (Nakagawa and Hirose 2004)。しかし、本方法で親魚を選別した2001～2003年の8例では最大でも2日 (平均1.1日) に短縮された (中川・大河内 2003a, b, c)。さらに、胚の状態を観察することで、未受精卵を持つ親魚をあらかじめ除去できるため、飼育水槽への死卵の混入による水質悪化が防止できる利点も生じた。

本試験の選別区では、選別時の胚発生ステージは、2001年がst. 24～28、2002年がst. 25～29、2003年がst. 24～29と5～6ステージの幅が生じた (Table 1)。従って、より多くの親魚を選別して胚発生段階をより厳密に揃えると、群としての出産の同調性はさらに高まり、効率よくふ化仔魚が得られると考えられる。

予測精度の向上と異なる胚を持つ親魚の出産の同調

水温一定の条件下で求められた草刈 (1995) の推定式を、積算水温下での推定式に読みかえ、5～13℃の範囲で出産期間を予測した。その結果、予測期間と実測期間がほぼ一致し (Table 3), この推定式が変動する水温下でも有効であることを確認した。ただし、この一致は、試験期間中の平均水温 (2001年では9.6℃, 2002年は9.7℃, 2003年は9.4℃) が、草刈の条件水温の9.8℃に近かったためと考えられる。今後は、様々な水温帯で推定式の有効性を検証し、出産予測の精度を高める必要がある。

本研究では、出産日が互いに近い個体を選別して出産の同調化を図った。次の段階では、異なる胚を

持つ個体を水温制御により出産日を同調させる技術が必要と考えられる。ニシン *Clupea pallasii* では、異なる採卵日に得られた卵を水温制御によりふ化日を同調させている (大河内 未発表)。また、ガザミ *Portunus trituberculatus* でも異なる胚発生段階を持つ親ガニを個別に水温制御することで、ふ化を同調させることが可能となっている (浜崎ら 1992)。クロソイでは、正常な出産が見込める水温帯や水温勾配を明らかにし、前述した出産予測の精度向上を図ることで成熟段階の違う多くの親魚も同調させることが可能になると考えられる。なお、クロソイの胚発生は個体ごとにリズムがあり、発生が早い個体は毎年早く、遅い個体は毎年遅い傾向が認められている (Nakagawa and Hirose 2004)。従って、この傾向を把握して親魚をグループ化し、異なる水温下で管理することで成熟段階が違う親魚の出産を同調できる可能性がある。

遺伝的多様性への配慮

放流を前提とした栽培漁業では、放流種苗の遺伝的多様性への配慮が必要である (北田 2000)。本種の種苗生産では、宮古センターのような50 kl水槽を用いた規模でも1水槽の種苗生産に使用する雌親魚数は2～3尾、小規模な生産では1尾程度と非常に少なく、生産種苗の遺伝的組成が偏る危惧がある。これらは胎生魚の栽培漁業に共通する問題と考えられる。クロソイを含む胎生魚の出産の同調技術は、仔魚の大量確保だけにとどまらず、多くの雌由来の仔魚を一度に確保し、放流種苗の遺伝的多様性を向上させる上でも有効と考えられる。

要 約

散発的に行われるクロソイ親魚の出産の集中度を高めることを目的として選別試験を実施した。カニューレーションによって得られた胚の発生段階から、出産日が近いと判断された親魚を選別し、選別しなかった区と3年間にわたり出産状況を比較した。その結果、選別によって出産期間が短縮され、出産の同調が有意に高まった。カニューレーションを用いた親魚選別法により、集中的に多数のふ化仔魚を得ることが可能となり、種苗生産の効率化に寄与するものと期待される。また、胚の発生段階から予測された出産予定日と実際の出産期間がほぼ一致した。今後は異なる胚を持つ親魚の出産の同調技術に発展させ、高い遺伝的多様性を維持できる種苗生産技術に展開することが重要な課題である。

謝 辞

本論文のとりまとめにあたり、有益なご助言とご校閲を頂いた元社団法人日本栽培漁業協会参与の廣瀬慶二博士、京都大学フィールド科学教育研究センターの山下 洋教授、独立行政法人水産総合研究センターの福永辰廣栽培漁業部部长、宮古栽培漁業センター場長の有瀧真人博士に深謝する。また、長期間にわたる親魚の飼育および胚の採取にご協力頂いた独立行政法人水産総合研究センター宮古栽培漁業センター職員の熊谷厚志氏、山田徹生氏、藤浪祐一郎氏、非常勤職員の久保居英子氏、田代ふくみ氏、沼崎正明氏、菊地哲子氏および前川裕弥氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 浜崎活幸・福永恭平・丸山敬悟 (1992) ガザミのふ化までの所要日数と飼育水温の関係およびふ化日の同調化について. 栽培技研, **20**, 73-85.
- 北田修一 (2000) 栽培漁業研究の重要問題. 日水誌, **66**, 150-151.
- 草刈宗晴 (1995) クロソイの種苗生産に関する生殖生物学的研究. 北水試研報, **47**, 41-124.
- Lim, S. R., S. M. Choi, X. J. Wang, K. W. Kim, I. S. Shin, T. S. Min and S. C. Bai (2004) Effects of dehulled soybean meal as a fish meal replacer in diets for fingerling and growing Korean rockfish *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture*, **231**, 457-468.
- Mori, H., M. Nakagawa, K. Soyano and Y. Koya (2003) Annual reproductive cycle of black rockfish *Sebastes schlegeli*, in captivity. *Fish. Sci.*, **69**, 908-921.
- 永沢 亨 (2001) 日本海におけるメバル属魚類の初期生活史. 日水研報告, **51**, 1-132.
- 中川雅弘・大河内裕之 (2003a) 放流種苗の質的向上に関する技術の開発 (クロソイ) クロソイ種苗量産試験. 平成13年度日本栽培漁業協会事業年報, 東京, pp. 53-54.
- 中川雅弘・大河内裕之 (2003b) 放流種苗の質的向上に関する技術の開発 (クロソイ) クロソイ種苗量産試験. 平成14年度日本栽培漁業協会事業年報, 東京, pp. 53-55.
- 中川雅弘・大河内裕之 (2003c) 放流種苗の質的向上に関する技術の開発 (クロソイ) クロソイ種苗量産試験. 平成15年度日本栽培漁業協会事業年報, 東京, p. 30.
- Nakagawa, M. and K. Hirose (2004) Individually specific seasonal cycles of embryonic development in cultured broodstock females of the black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture*, **233**, 549-559.
- Nakagawa, M., H. Okouchi and J. Adachi (2004) Stocking effectiveness of black rockfish *Sebastes schlegeli* released in Yamada bay evaluated by a fish market census. In "Stock Enhancement and Sea Ranching" (ed. by K. M. Leber, S. Kitada, H. L. Blankenship and T. Svåsand), Blackwell, Oxford, pp. 501-511.
- 日本栽培漁業協会 (1994) 太平洋北区におけるヒラメ種苗生産技術集. 栽培漁業技術シリーズ, 1-11.
- 清水 健・八幡康一 (1991) 栽培漁業と新養成技術 クロソイの種苗生産. 水産の研究, **10**, 101-107.
- 清水 健 (1992) 成体の確保と採卵Eクロソイ. 平成2年度日本栽培漁業協会事業年報, 東京, p. 35.
- 水産庁・水産総合研究センター (2004) 平成14年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績 (全国). 431 pp.