

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06093

研究課題名(和文)ミヤコタナゴの産卵機構の解明と人工産卵基質の開発

研究課題名(英文) Determine the spawning mechanism and development of equipment for spawning of Bitterling, *Tanakia tanago*.

研究代表者

秋山 信彦 (Akiyama, Nobuhiko)

東海大学・海洋学部・教授

研究者番号：20256192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミヤコタナゴは生きた二枚貝の鰓に卵を産み付ける繁殖生態を持っている。そのために生息域外で保全するために二枚貝を必要とするが、二枚貝の飼育は極めて困難で、長期飼育や繁殖できない。そのために自然界から二枚貝を採集する必要があるが、二枚貝も自然界で数を減らしている。そこで、二枚貝を使わず人工的な産卵基質を作成し、そこに産卵させることで、ミヤコタナゴも繁殖し、二枚貝も数を減らさなくて済む。今回の研究で産卵させることができた産卵基質は、出入水角度を調整することで雄も放精し、産卵基質内で受精させることに成功した。さらにそれらの卵から孵化した仔魚を育成容器に収容することで稚魚に育てることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

絶滅危惧種は自然環境の著しい変化で何時絶滅してもおかしくない状況となっている。本研究では、生息域外で系統を保存するための研究の一環で、特異的な繁殖生態をもつタナゴ類を保全するための研究である。タナゴ類は二枚貝の鰓に産卵する特異的な繁殖生態を持っているが、二枚貝も自然界で数を減らしている。そこで、二枚貝を使わずタナゴ類を繁殖させるための人工的な産卵基質を作り、産卵させることで自然界の二枚貝に採集圧を欠けなくて済む。本研究ではミヤコタナゴを用いているが、研究成果を応用することでタナゴ類全体の生息域外保全に役立てることが可能である。

研究成果の概要(英文)：The Bitterling (*Tanakia tanago*) has a reproductive biology in which eggs are laid on the gills of live bivalves. Bivalve mollusks are needed for conservation outside of their habitat, but they are extremely difficult to keep and cannot be bred or raised for long periods of time. Bivalves cannot be bred or reproduced for long periods of time. For this reason, bivalves must be collected from the wild, but their numbers are also decreasing in the wild. Therefore, by creating an artificial spawning substrate without using bivalves and allowing them to spawn on it, the number of bitterling can reproduce and the number of bivalves does not need to be reduced. By adjusting the angle of the water flow in and out of the spawning substrate, males were also able to release sperm and fertilize the eggs in the substrate. Furthermore, we succeeded in raising the hatchlings that hatched from these eggs to fry by placing them in a growth container.

研究分野：水産増殖学

キーワード：ミヤコタナゴ 人工産卵基質 繁殖機構 生息域外保全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミヤコタナゴ *Tanakia tanago* はコイ科 Cyprinidae タナゴ亜科 Acheilognathinae に属する淡水魚である(中坊, 2004)。本種の産卵期は3月中旬から9月中旬とされている(Hatakeyama・Akiyama, 2007)。産卵期の雌は産卵管が伸長し、イシガイ科やカワシジユガイ科の生きた淡水二枚貝の出水管に産卵管を挿入して産卵を行う。産卵後、入水管付近に雄が放精することで、産卵された卵は二枚貝の鰓葉腔で受精し、孵化して卵黄を吸収し終えるまで二枚貝の鰓葉腔で過ごす生態を持つ(片野・森, 2005)。本種の生息地は茨城県を除いた関東地方の丘陵地と、それに続く平野部の細流や湖沼などの水域であったが、産業の発達に伴って池や用水路の改修工事、埋め立て等の要因により、産卵基質となる淡水二枚貝と共に著しく減少した(望月, 1997)。そのため、1991年には環境省のレッドデータリストに記載され、1994年には国内希少野生動物植物に指定された。水産試験場等の研究機関では種の保存を目的とした増殖が行われており、親魚から卵と精子を得て媒精する人工授精法と、生きた淡水二枚貝に産卵させる自然産卵法の二つの方法が用いられている(多紀, 1994)。しかし、人工授精法では親魚を人為的に選択するため、遺伝的多様性の低下を招く恐れがある。また、自然産卵法では淡水二枚貝の長期飼育や、繁殖が難しく、自然界からの採取に依存しているため天然個体を減少させる可能性がある。上記の理由から、遺伝的多様性の低下を最小限にとどめ、淡水二枚貝を使用しない飼育下での増殖方法として二枚貝の代替となる人工産卵基質を開発する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、人工産卵基質の採卵効率の向上を目的として、二枚貝の出水管の大きさと touching 成功率の関係、繁殖行動を誘導する人工産卵基質からの出水流速、産卵後放精を誘導できる出水構造、人工産卵基質の内部構造を検討した。

3. 研究の方法

人工産卵基質の作成方法: 人工産卵基質の作製方法としては、カワシジユガイの貝殻の右殻と左殻をそれぞれシリコン(信越化学工業株式会社製 KE-17)で型どり、シリコン型を作成した。作製したシリコン型に2液性の黒色ウレタン樹脂(エイチ・アンド・ケー株式会社製 HEI-CAST)を流し込んで二枚貝貝殻の内側にあたる面が平面(以下、平面部)の二枚貝の右殻と左殻を模したウレタン製基質を作製した。右殻側のウレタン製基質の平面部には、ルーターを用いて腹縁側に開口する溝(以下、入水管)と背縁側に開口して入水管に合流する溝(以下、出水管)を彫り、開口部分をそれぞれ入水管端部、出水管端部とした。入水管と出水管が合流した場所よりも内部に出水管から産卵された卵を受ける卵溜まりを彫り、卵溜まりの基底部には目合い0.5 mmのネットを貼った。次に、人工産卵基質へ送水するためのポンプを接続するシリコンチューブを繋げるために、卵溜まりから人工産卵基質基部に開口する溝を彫った。さらに、出水管にはポンプからの出水部となるガラス管を取り付ける溝と、ポンプを接続するためのシリコンチューブを繋げるために、出水部から人工産卵基質基部に開口する溝を彫り、内径4.3 mmのガラス管を加熱して曲げたもの(以下、出水部)を取り付けた。内部構造を彫った右殻側の基質の平面部に、厚さ1.0 mmの透明アクリル板を貼ったものを片面基質とした。内部構造を彫った右殻側の基質と加工していない左殻側の基質でエラストマーシートを挟み、輪ゴムで固定したものを両面基質とした。入水管と出水部から続く水管の基部に外径10.0 mm、内径7.1 mmのシリコンチューブを繋いで接着した。シリコンチューブを人工産卵基質へ送水するためのポンプとなる外部フィルター(エーハイム社製 クラシックフィルター2211)にコック付きホースジョイント(エーハイム社製 ダブルタップ)で連結し、出水管からの出水流速はホースジョイントのコックによりを調節して、実験水槽の水を人工産卵基質に循環させた(図1)。

出水流速の設定方法: 出水流速の設定方法は始めに、の式より出水管端部からの出水流速の目標値と出水管端部の断面積から人工産卵基質からの吐出流量を求めた。次に、求めた吐出流量とシリコンチューブの断面積からシリコンチューブ内の流速の設定値をの式により求めた。続いて、外部フィルターとの連結部分からメチレンブルーを流して実際のシリコンチューブ内の流速を測定した。この値がシリコンチューブ内の流速の設定値と一致するようにホースジョイントのコックによって調節した。

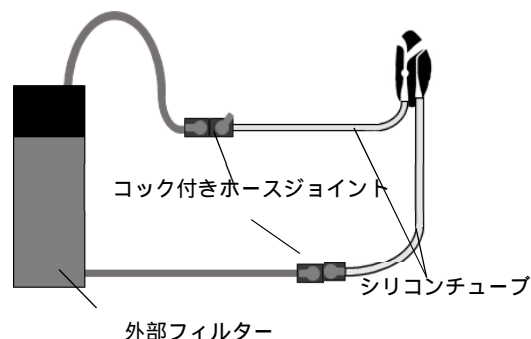


図1 外部フィルターに接続した人工産卵基質

$$Q=V_1 \times A_1 \dots \quad V_2=Q/A_2 \dots$$

Q : 吐出流量 (mm³/sec) V₁ : 出水管端部からの出水流速の目標値 (mm/sec)
 A₁ : 出水管端部の断面積 (mm²) V₂ : シリコンチューブ内の流速の設定値 (mm/sec)
 A₂ : シリコンチューブの断面積 (mm²)

カワシンジュガイの出水管の大きさと touching 成功率の関係

二枚貝の出水管開口幅および長径と touching の成功率との関係を調べるために、カワシンジュガイに対する touching 成功時と失敗時の出水管の開口幅および長径を測定した。実験水槽にミヤコタナゴの雄 1 個体、雌 5 個体を収容し、カワシンジュガイ 1 個体を殻の前端と後端を結んだ線と底砂面の挟み角度が約 90° になるように設置した。出水管の開口幅を計測するために最少読み取り値 1 mm のスケールをカワシンジュガイの出水管の横に設置した。実験開始まではトリカルネットでカワシンジュガイとスケールを覆っておき、ビデオカメラ(パナソニック社製 デジタルハイビジョンビデオカメラ HC-W590M)で撮影開始とともにトリカルネットを外した。カワシンジュガイの出水管が開いた状態での touching 後にカワシンジュガイを取り上げて開口器で開き、ミヤコタナゴの卵の有無を観察した。カワシンジュガイの出水管の開口幅と長径は撮影した動画を再生し、画面上の産卵管挿入直前の出水孔の幅と長径、スケールの 1mm の目盛りを最少読み取り値 0.01mm の電子ノギスで測定し、出水管の幅または長径 = 出水管の幅または長径の測定値 × (1/1mm の目盛りの測定値) によって測定値から実際の出水孔の幅と長径を算出した。2020 年 7 月 8 日から 10 月 10 日の期間に 30 回観察した。

人工産卵基質の出水構造と放精行動の関係：出水構造が雄の放精行動に与える影響を調べるために、産卵基質の出水管端部から出水部までの距離を変えたときの産卵後放精を比較した。実験水槽にミヤコタナゴの雄 4 個体、雌 40 個体を収容した。用いた人工産卵基質は出水部が出水管端部にある構造(以下、出水管端部出水型; 図 2-a)と、出水部が出水管端部から 13.4 mm 内部にある構造(以下、出水管中部出水型; 図 2-b)、出水部が出水管端部から 24.2 mm 内部の入水管と出水管の合流部分にある構造(以下、入水管交差出水型; 図 2-c)、出水部が出水管端部から 23.1 mm 内部にあり、出水部からの水流を出水管壁面に当てて出水管に沿って基質外に出水する構造(以下、出水管中部上方向出水型; 図 2-d)の 4 種類でいずれも片面基質とした。人工産卵基質の出水と底砂面の挟み角度が 50° になるようにプラスチック容器に固定し、容器の縁が水平になるように水準器を用いて調整して観察水槽内に設置し、出水流速を 70 mm/sec に設定した。その後、10~17 時の 7 時間をビデオカメラで撮影し、touching、skimming、の行動数を計数した。また、実験終了後に産卵基質内の卵を回収、計数し、卵割が見られた場合を受精卵とした。実験は 2019 年 7 月 17 日から 8 月 12 日の期間に、各人工産卵基質で 3 回ずつ繰り返し行い、人工産卵基質 1 つあたり計 21 時間の繁殖行動を観察した。

出水流速と繁殖行動の関係：人工産卵基質での繁殖行動の誘導に最適な出水流速を調べるために、人工産卵基質の出水部から異なる流速で出水したときの繁殖行動を比較した。実験水槽にミヤコタナゴの雄 5 個体、雌 20 個体を収容した。人工産卵基質は出水部の先端が入水管と出水管の合流部よりも出水管側であり、入水管と交差して出水する構造の両面人工産卵基質を用いた。出水管端部から出水部までの距離は 24.2 mm とした。実験水槽に人工産卵基質の上半分を底砂面から露出し、出水と底砂面の挟み角度が 50° になるように設置した。出水流速は 46、70、94、118、142 mm/sec と止水の 6 段階に設定した。その後、10~17 時の 7 時間をビデオカメラで撮影し、skimming、touching の行動数を計数した。そして、実験終了後に産卵基質内の卵を回収、計数し、卵割が見られた場合を受精卵とした。実験は 2021 年 3 月 29 日から 4 月 22 日の期間に各流速 3 回ずつ繰り返し行い、1 条件あたり計 21 時間の繁殖行動を観察した。

人工産卵基質の内部構造と繁殖行動の関係：本種の繁殖行動へのカワシンジュガイの内部構造を模した人工産卵基質の影響を検討するために、カワシンジュガイの鰓葉腔と鰓上腔を模した構造を持つ人工産卵基質と入水管の面積が異なる人工産卵基質に対する繁殖行動を観察した。さらに、人工産卵基質とカワシンジュガイの採卵効率を比較するために、生きたカワシンジュガイでも繁殖行動を観察した。カワシンジュガイの鰓葉腔を模して、目合い 2.0×1.4 mm のネットを孔が横 2 列、縦 14 列になるように切ったもの(以下、模造鰓)を鰓上腔の様な空間ができるように出水部と出水管端部の間に設置し、入水管面積が 27.0 mm² の構造(以下、入水管面積小・

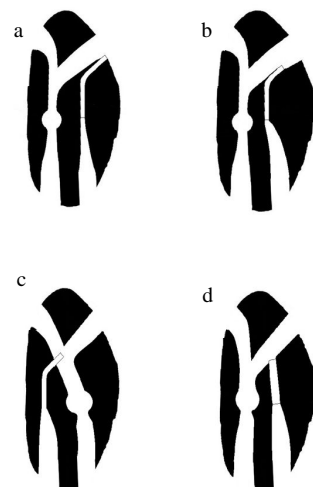


図 2 異なる出水構造の人工産卵基質

模造鰓有り基質)と、入水管面積が 73.2 mm² と入水管面積小・模造鰓有り基質よりも大きい構造(以下、入水管面積大・模造鰓有り基質)の両面基質を作成した。さらに、模造鰓が無く、入水管面積が 27.0 mm² の構造(以下、入水管面積小・模造鰓無し基質)の両面基質も作成した。実験水槽に人工産卵基質の上半分を底砂面から露出し、出水と底砂面の挟み角度が 50° になるように珪砂に埋め、設置した。出水管端部の流速は 96 mm/sec に設定した。人工産卵基質を数日設置し続けたところ、日中よりも夕方から朝までの間で産卵数が多かったことから、18~翌 9 時の 15 時間に産卵された卵を回収、計数し、卵割が見られた場合を受精卵とした。さらに、赤外線撮影が可能なビデオカメラ(パナソニック社製 デジタル 4K ビデオカメラ HC-VX992M)で撮影したところ、3~9 時に産卵行動が多く見られたことから、3~9 時の 6 時間を赤外線撮影して観察し、繁殖行動数を計数した。また、生きたカワシンジュガイでの観察は、18 時にカワシンジュガイの殻の前端と後端を結んだ線と底砂面の挟み角度が約 90° になるように設置し、翌 9 時に取り上げて鰓葉腔内の卵の数を計数した。人工産卵基質と同様にビデオカメラで撮影して観察し、繁殖行動数を計数した。実験は 2021 年 11 月 17~12 月 27 日の期間に各人工産卵基質およびカワシンジュガイでそれぞれ 3 回ずつ行い、1 条件あたり計 45 時間の産卵数と、計 18 時間の繁殖行動を観察した。

4. 研究成果

カワシンジュガイの出水管の大きさと touching 成功率の関係

カワシンジュガイへの touching を 30 回観察したところ、産卵に成功したのは 16 回であり、成功率は約 53%であった。失敗した touching は、腹縁側からの touching が 1 回のみで、13 回は背縁側からの touching であった。この 13 回の内 2 回は、産卵行動は成功していたが卵を見から見つけれなかった。11 回は出水管への産卵管の挿入に失敗した。このときのカワシンジュガイ出水管の開口幅の平均値±標準偏差は 1.0±0.3 mm であった。この内、touching に失敗したときの出水管の開口幅の平均値±標準偏差は 1.0±0.3 mm、成功した場合は 1.1±0.4 mm であり、有意差は見られなかった(t検定, p>0.05)。出水管の長径の平均値±標準偏差は 10.6±6.9 mm であった。この内、産卵失敗時の出水管長径の平均値は 9.7±7.3 mm、成功した場合は 11.5±6.4 mm と、有意差は見られなかった(t検定, p>0.05)。

人工産卵基質の出水構造と放精行動の関係

各基質に対する成功した touching と産卵後放精を観察したところ、21 時間の観察中に、出水管端部出水型の基質では、成功した touching が 5 回見られ、成功率は 4.6%であったが、産卵後放精は見られなかった。卵は 13 個得られたが、すべて未受精であった。

出水管中部出水型の基質では、成功した touching が 7 回見られ、成功率は 6.5%であった。産卵後放精は 6 回見られ、成功した touching に対して産卵後放精が見られなかった場合が 1 回あった。卵は 15 個得られ、そのうちの 13 個が受精していたが、2 個は未受精であった。

入水管交差出水型の基質では、成功した touching が 4 回見られ、成功率は 3.1%であった。産卵後放精は 7 回見られ、1 回の産卵に対して 1 回以上の放精が見られた。卵は 9 個得られ、すべて受精していた。

出水管中部上方向出水型の基質では成功した touching は 4 回であり、成功率は 3.2%であった。産卵後放精は 6 回見られ、1 回の産卵に対して 1 回以上の放精が見られた。卵は 8 個得られ、すべて受精していた。

出水流速と繁殖行動の関係

人工産卵基質から各流速で出水したときの繁殖行動を観察したところ、雄単独の head-down posture では、流速ごとの行動数に偏りが見られ(χ²適合度検定, p<0.05)、止水、46, 70, 142 mm/sec でそれぞれ 11, 22, 29, 85 回の行動が見られたのに対して、94, 118 mm/sec では 143, 145 回と多かった。

雌単独の head-down posture でも、流速ごとの行動数に偏りが見られ(χ²適合度検定, p<0.05)、止水、46, 118, 142 mm/sec ではそれぞれ 19, 44, 42, 46 回の行動が見られたのに対して、70, 94 mm/sec ではいずれも 147 回と多かった。

つがいでの head-down posture でも、流速ごとの行動数に偏りが見られ(χ²適合度検定, p<0.05)、止水、46, 70 mm/sec ではそれぞれ 11, 5, 14 回の行動が見られたのに対して 118, 142 mm/sec ではそれぞれ 108, 152 回見られ、94 mm/sec で 187 回と最も多かった。

touching についても、流速ごとの行動数に偏りが見られ(χ²適合度検定, p<0.05)、止水、46, 70 mm/sec では 4, 20, 36 回、94, 118, 142 mm/sec ではそれぞれ 98, 71, 58 回と 70 mm/sec 以下よりも行動数が多かった。成功した touching は 46, 70, 118, 142 mm/sec で見られ、それぞれ、5, 1, 3, 1 回であり、流速に対する一定の傾向は見られなかった(χ²適合度検定, p>0.05)。得られた卵は 6, 1, 4, 1 個であり、142 mm/sec で得られた卵は受精しておらず、

それ以外は受精していた。

skimming は、head-down posture や touching と比べて行動数が少なかった。慣らし放精は流速ごとの行動数に偏りが見られ (χ^2 適合度検定, $p < 0.05$), 94 mm/sec で 2 回, 止水, 142, 70, 46 mm/sec で 3, 4, 6, 7 回見られたのに対して, 118 mm/sec で 13 回と他の流速よりも多かった。また, 産卵後放精について, 成功した touching が見られた 46, 70, 118 mm/sec では 1 回の産卵あたり 1 回以上の産卵後放精が見られた。しかし, 142 mm/sec では産卵後放精が見られなかった産卵が 1 回あった。

人工産卵基質の内部構造と繁殖行動の関係

カワシンジュガイへの繁殖行動を 18 時間観察した結果, 雄単独, 雌単独, つがいでの head-down posture はそれぞれ 125, 118, 88 回であった。touching は 54 回見られ, その内 18 回が成功した。産卵後放精と慣らし放精はそれぞれ 22, 15 回見られた。卵は 45 時間で 102 個得られた。

入水管面積小・模造鰓有りの基質では, 18 時間観察した中での雄単独, 雌単独, つがいでの head-down posture はそれぞれ 105, 78, 355 回であった。touching は 167 回見られ, その内 12 回が成功した。産卵後放精と慣らし放精はそれぞれ, 13, 5 回見られた。卵は 45 時間で 37 個得られた。

入水管面積大・模造鰓有りの基質では, 18 時間観察した中での雄単独, 雌単独, つがいでの head-down posture はそれぞれ 63, 104, 204 回であった。touching は 134 回見られ, その内 12 回が成功した。産卵後放精と慣らし放精はそれぞれ, 12, 8 回見られた。卵は 45 時間で 45 個得られた。

模造鰓が無い入水管面積小・模造鰓無しの基質では, 18 時間観察した中での雄単独, 雌単独, つがいでの head-down posture はそれぞれ 32, 120, 77 回であった。touching は 73 回見られ, その内 5 回が成功した。産卵後放精と慣らし放精はそれぞれ, 5, 2 回見られた。卵は 45 時間で 10 個得られた。

雄, 雌単独, つがいでの head-down posture は産卵基質ごとに偏りが見られ (χ^2 適合度検定, $p < 0.05$), 雄, 雌単独での head-down posture はカワシンジュガイよりも人工産卵基質で少なく, つがいでの head-down posture は人工産卵基質の方が多かった。touching について, 失敗した touching は産卵基質ごとに偏りが見られ (χ^2 適合度検定, $p < 0.05$), 人工産卵基質の方が多かったが, 成功した touching の行動数には産卵基質ごとの偏りは見られなかった (χ^2 適合度検定, $p > 0.05$)。受精卵数は産卵基質ごとに偏りが見られ (χ^2 適合度検定, $p < 0.05$), カワシンジュガイよりも人工産卵基質で少なかった。skimming についても, 受精卵数は産卵基質ごとに偏りが見られ (χ^2 適合度検定, $p < 0.05$), 慣らし放精はカワシンジュガイよりも人工産卵基質で少なかった。いずれの産卵基質でも成功した touching に対して 1 回以上の産卵後放精が見られ, 得られた卵はすべて受精卵であった。また, 3 つの人工産卵基質のうち, 模造鰓のある 2 つの基質では雌単独での head-down posture 以外の繁殖行動が模造鰓の無い基質よりも多かった。

まとめ

以上の諸結果から, からミヤコタナゴの人工産卵基質としては, 産卵直後に産卵排出液の一部が基質外へと排出される構造とし, 出水部と出水管端部の間にカワシンジュガイの鰓葉腔と鰓上腔を模した構造を設置した人工産卵基質とすることで, より多くの産卵行動を誘導することが出来ると考える。また, 出水管端部での流速が 70 ~ 118 mm/sec となるように出水することでより多くの繁殖行動を誘導し, 採卵効率を向上させることができると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 犬木義文・白石悠・飯嶋香純・秋山信彦	4. 巻 70
2. 論文標題 ミヤコタナゴの二枚貝鰓葉腔への産卵機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 水産増殖	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯嶋香純・秋山信彦
2. 発表標題 ミヤコタナゴの人工産卵基質の開発
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 秋山信彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 成山堂書店	5. 総ページ数 318
3. 書名 水族育成学入門 第18章稀少魚の保全及び育成事例 ミヤコタナゴ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------