

ミナミメダカ受精卵の乾燥耐性

小林牧人 *・関加奈恵 **, 松尾智葉 *, 岩田恵理 ****

Resistance to desiccation of fertilized eggs of medaka, *Oryzias latipes*. KOBAYASHI Makito*, SEKI Kanae**, MATSUO Tomoha*, & IWATA Eri**** (*Department of Natural Sciences, International Christian University, 3-10-2 Osawa, Mitaka, Tokyo, 181-8585 Japan; **Department of Science and Engineering, Iwaki Meisei University, 5-5-1 Chuodai, Iino, Iwaki, Fukushima, 970-8101 Japan; ***Present address, Faculty of Veterinary Medicine, Okayama University of Science, 1-3 Ikoinooka, Imabari, Ehime, 794-8555 Japan)

Female medaka, *Oryzias latipes*, is known to deposit their eggs on substrates in shallow waters. However, there is a possibility that the eggs will be exposed to the air and dry when the surrounding water level falls. In the present study, we examined the resistance to desiccation of fertilized eggs of medaka. Each egg was placed in a plastic dish filled with water and subjected to one of the following three treatments for one or three days at different times after fertilization: 1) placed on a wet filter paper and exposed to the air (wet group), 2) placed on a dry dish (dry group), and 3) kept in water (control). Most eggs in the control and the wet group hatched, and all the eggs of the dry group died. The results of the wet group indicate that fertilized eggs of medaka have some resistance to desiccation.

Keywords

medaka, fertilized egg, resistance to desiccation, hatching rate
ミナミメダカ, 受精卵, 乾燥耐性, 孵化率

1 はじめに

メダカはダツ目の小型の淡水魚で、日本にはミナミメダカとキタノメダカの2種が生息する¹⁾。いずれの種も環境省により絶滅危惧Ⅱ類(VU)に指定されている²⁾。その結果、各地でメダカの保全活動の取り組みがなされるようになった³⁻⁶⁾。我々は保全のために必要な知見である繁殖生態の解明を試みている。その過程でミナミメダカの雌は、雄との産卵行動の後、水面近くの浅い水深の基質に卵を産み付けることをフィールドでの観察⁷⁻⁹⁾および飼育実験¹⁰⁾から明らかにした。卵を水面近くに産み付けるメリットとしては、捕食者からの回避、高水温、高溶存酸素濃度などの要因が考えられる。一方、デメリットとしては、水

位の低下により卵が空气中に露出し、乾燥する可能性が考えられる。実際我々はフィールド調査において、コケ植物に産み付けられたミナミメダカの受精卵が池の水位の低下により空气中に露出していることを観察した⁷⁾。空气中に露出した卵は、白濁した死卵もあれば、半透明で生卵と思われるものもみられた。これらの生卵と思われる卵は水位が上昇して水中に戻ると正常に孵化をするのかどうかという生態学的疑問から、本研究ではヒメダカおよび野生ミナミメダカの受精卵の乾燥耐性について調べた。

2 材料と方法

2・1 ヒメダカおよび野生ミナミメダカ

本研究ではヒメダカ(ミナミメダカの体色変異品種, *Oryzias latipes*)と野生ミナミメダカ(*O. latipes*)を用いた。ヒメダカは東京都三鷹市にあるペットショップから購入した。野生ミナミメダカは神戸女学院大学キャンパス内万葉池に生息する個体⁷⁾を横田弘文准

* 〒181-8585 東京都三鷹市大沢3-10-2 国際基督教大学 教養学部アーツ・サイエンス学科自然科学デパートメント

** 〒970-8551 福島県いわき市中央台飯野5-5-1 いわき明星大学科学技術学部科学技術学科

*** 現所属: 〒794-8555 愛媛県今治市いこいの丘1-3 岡山理科大学獣医学部獣医学科

教授より供与して頂いた。この池の野生ミナミメダカについては、遺伝子解析がなされていて、Takehana et al.¹¹⁾によるマイトタイプ分類ではB1aタイプであり、関西在来型の個体群であることが確認されている¹²⁾。実験に使用したメダカの全長は2.4～3.3 cmであった。

これらのメダカを性成熟させるために水温25℃、日長16時間明期(8時点灯)に設定したガラスストック水槽(40L)で飼育した(1水槽に雌雄各約5個体)。餌には市販の飼料(「テトラキリミン めだかのえさ」、テトラ社、横浜市、あるいは「めだかのえさ 産卵・繁殖用」、キョーリン社、姫路市)を1日3回適量与えた。ストック水槽内にはオオカナダモ(*Egeria densa*)を入れ、水質維持のために濾過フィルターを設置した。ヒメダカ、野生ミナミメダカともにこの飼育条件下で、ストック水槽内で季節を問わず産卵を行い、周年採卵が可能である。またこの飼育条件下で得られた受精卵は12～15日で孵化する。

2・2 受精卵の乾燥耐性実験

ストック水槽内で産卵し、腹部に卵塊を保持している雌を9時から13時の間に取り上げ、卵塊を採取した。実体顕微鏡下で卵を観察し、受精卵のみを実験に使用した。卵塊は乾いたペーパータオルの上で個別の

卵に分離した。同一個体の雌から得た複数個の受精卵は、プラスチックシャーレ(内径85mm)に1個ずつ、以下に示す3つの処理群にほぼ均等になるように分配した。

メダカの受精卵の乾燥耐性および発生過程における乾燥耐性の違いを調べるために3種類の処理を与えた。3種類の処理はそれぞれ以下のとおりである。1) 試験期間中、脱塩素水を満たしたシャーレに受精卵を入れる。(対照群、以下「水群」と略す)。2) 試験期間中の一定期間、シャーレ内に脱塩素水は入れず、脱塩素水で湿らせた濾紙(直径90mmのものを4分の1に切ったもの、ADVANTEC No.2、東洋濾紙株式会社、東京)を敷き、濾紙の上に受精卵を置く。受精卵の濾紙に接していない部分は空気に曝露される。処理期間以外の期間は、シャーレを脱塩素水で満たした(処理群、以下「湿群」と略す)。3) 試験期間中の一定期間、シャーレ内に脱塩素水は入れず、乾いたシャーレ内に受精卵を置く。受精卵全体が空気に曝露され、水分の補給はなくなる。処理期間以外の期間は、シャーレを脱塩素水で満たした(処理群、以下「乾群」と略す)。なお試験期間中はシャーレには蓋をして、水分の蒸発を防ぐために蓋の周りをパラフィルム(American National Can, Greenwich, CT.)で密封した。シャーレは25℃で静置した。これらの3つの処理を

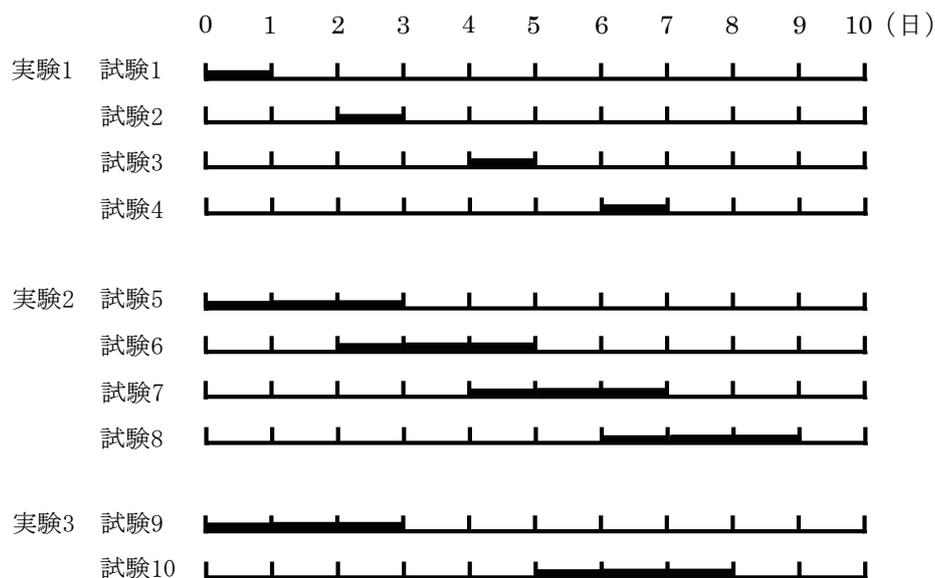


図1 実験1, 2および3におけるメダカ受精卵の処理時期(受精後の日数)と期間。

各試験の横軸の太い線の部分が処理時期および処理期間を示す。受精卵の乾燥耐性および発生過程における乾燥耐性の違いを調べるために、各試験において受精卵に以下の3とおりの処理を施した。1) 脱塩素水を満たしたシャーレの中に受精卵を入れる。2) シャーレに脱塩素水で湿らせた濾紙を敷き、その上に受精卵を置き受精卵を空気中に曝露する。3) 水のないシャーレに受精卵を入れ、受精卵を空気中に曝露する。これらの処理を受けた実験群をそれぞれ「水群」、「湿群」および「乾群」とする。なお処理のない期間中はシャーレは脱塩素水で満たされている。実験1と2はヒメダカの受精卵を用いた。実験3は野生ミナミメダカの受精卵を用いた。

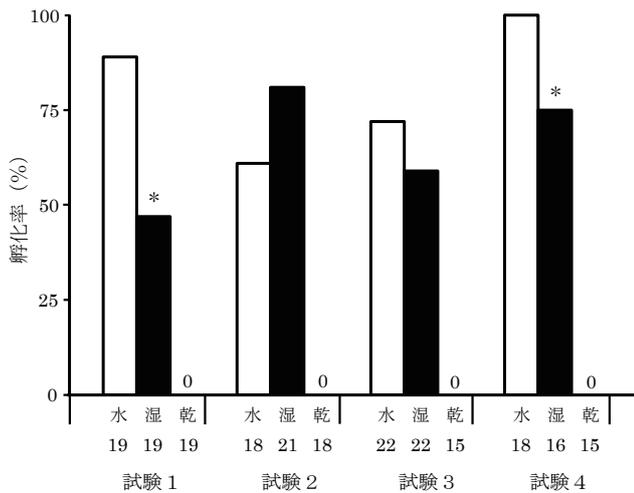


図2 実験1における試験1から試験4の各処理群の孵化率。
 図中の水、湿および乾はそれぞれ水群、湿群および乾群を示す。各群の下の数値は使用した卵数を示す。乾群の孵化率がすべて0であったため、水群と湿群間の孵化率の比較を行った。
 * , p<0.05.

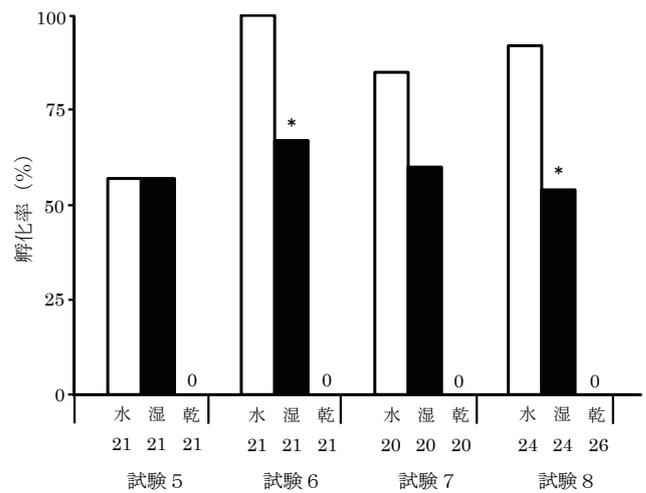


図3 実験2における試験5から試験8の各処理群の孵化率。
 図中の水、湿および乾はそれぞれ水群、湿群および乾群を示す。各群の下の数値は使用した卵数を示す。乾群の孵化率がすべて0であったため、水群と湿群間の孵化率の比較を行った。
 * , p<0.05.

1日ないし3日間、受精後の異なる時期に与えた(図1)。

実験1ではヒメダカを用いた。処理期間は1日間で、試験1では受精当日から、試験2では受精後2日から、試験3では受精後4日から、試験4では受精後6日から処理を行った(図1)。

実験2ではヒメダカを用いた。処理期間は3日間で、試験5では受精当日から、試験6では受精後2日から、試験7では受精後4日から、試験8では受精後6日から処理を行った(図1)。

実験3では、野生メダカを用いた。処理期間は3日間で、試験9では受精当日から、試験10では受精後5日から処理を行った(図1)。

試験開始後、31日まで受精卵を観察し、この日までに孵化しなかった卵は死卵とした。また孵化後2日間仔魚を観察し、この期間内に仔魚が斃死した場合あるいは孵化後の仔魚の形態が奇形の場合はそれらの卵を死卵として扱った。さらに孵化した受精卵については孵化までの日数を記録した。

すべての試験において乾群の受精卵は孵化しなかったため、各試験における孵化率は水群と湿群間で比較した。検定はFisherの正確確立検定を採用した。孵化日数については、水群と湿群の試験1から4、試験5から8、試験9と10のデータをそれぞれ合一して比較した。検定はStudent-t検定あるいはWelch-t検定を採用した。

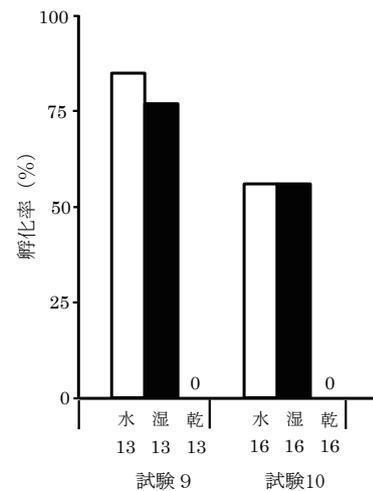


図4 実験3における試験9と試験10の各処理群の孵化率。
 図中の水、湿および乾はそれぞれ水群、湿群および乾群を示す。各群の下の数値は使用した卵数を示す。乾群の孵化率がすべて0であったため、水群と湿群間の孵化率の比較を行ったが有意な差はみられなかった。

3 結果

3.1 孵化率

実験1(試験1から4)における水群の孵化率は61~100%であった(図2)。一方湿群においては、孵化率は47~81%で、試験1および試験4において水群の孵化率より有意に低い値を示した。しかし湿

表1 実験1,2および3におけるメダカ受精卵の孵化日数.

	処理群	孵化日数 (平均値±標準誤差)	最短—最長 (日)	孵化卵数	合計卵数
実験 1 ^a	水群	13.7 ± 0.5	7-25	62	77
	湿群	15.1 ± 0.6	8-27	51	78
実験 2 ^b	水群	12.2 ± 0.4	8-27	72	86
	湿群	13.9 ± 0.6 *	7-28	51	86
実験 3 ^c	水群	18.8 ± 1.7	9-28	20	29
	湿群	13.2 ± 1.6 *	8-31	19	29

^a, 試験 1 から 4 の各群のデータを合一して比較.

^b, 試験 5 から 8 の各群のデータを合一して比較.

^c, 試験 9 と 10 の各群のデータを合一して比較.

* , p<0.05

群では 1 日間卵が空気に曝露されても、その後の水の補給により孵化する卵がみられた。1 日間乾燥状態におかれた乾群の卵は、水を補給してもすべて死卵となった。

実験 2 (試験 5 から 8) における水群の孵化率は 57 ~ 100% であった (図 3)。一方、湿群においては、孵化率は 54 ~ 67% で、試験 6 および試験 8 において水群の孵化率より有意に低い値を示した。しかし湿群では 3 日間卵が空気に曝露されても、その後の水の補給により孵化する卵がみられた。3 日間乾燥状態におかれた乾群の卵は、水を補給してもすべて死卵となった。

実験 3 の試験 9 と試験 10 において水群の孵化率はそれぞれ 85 と 56%、湿群の孵化率はそれぞれ 77 と 56% で、水群と湿群間の孵化率に有意な差は見られなかった (図 4)。乾群の卵はすべて死卵となった。

なお試験期間中の処理中に孵化する個体はみられなかった。

3・2 孵化日数

孵化日数はヒメダカでは湿群において水群より長くなる傾向が見られた。実験 2 において湿群の孵化日数は水群の孵化日数より有意に長かった。しかし野生ミナミメダカでは、逆に湿群の孵化日数が水群の孵化日数より有意に短かった (表 1)。

4 考察

本研究によりミナミメダカの受精卵は、その発生過程においてある程度の乾燥耐性をもつことが明らかとなった。実験 1, 2 および 3 において、完全に水の供給がなくなり、1 日間以上空気に曝露された乾群の卵では、その後水中に卵を戻してもすべての卵が斃

死した。しかし水分の供給のある湿群の卵では、3 日間空気に曝露されても、その後水中に戻すことによりある程度の比率で孵化がみられた。これは処理中に濾紙の水が卵の表面に浸みわたり、卵を生存可能にしたと考えられる。ただし、湿群の卵の孵化率は乾燥処理を行わない水群の孵化率よりは低い値を示した。本研究の湿群の結果は、ミナミメダカの雌が水面近くに卵を産み付け、一時的な水位の低下により卵が空気中に露出しても乾燥に耐える対応能力をもつことを示唆している。フィールドでの調査からミナミメダカの雌はコケやアオミドロなどの繊維性の構造を持つ植物に卵を産み付けることが明らかとなっている⁹⁾。それらの繊維性の植物に水分を保持する機能があるとすれば、空気中に曝露されたメダカの受精卵の生残率を維持するには好適であると考えられる。本研究では処理中に孵化する個体は湿群、乾群においてみられなかったが、空気中でも受精卵が孵化するのかどうかは不明である。

ヒメダカを用いた実験 1 および 2 において、試験 4 および試験 8 での湿群の孵化率が水群のそれより有意に低かったことから、発生が進むにつれて卵の乾燥耐性は低下する可能性が考えられる。しかし野生メダカを用いた実験 3 ではその傾向はみられなかった。

またヒメダカを用いた実験 1 および 2 では、卵を空気中に曝露することにより孵化日数が長くなる傾向がみられた。ヒメダカでは乾燥処理により卵の発生の進行が遅れたと考えられるが、逆に野生ミナミメダカでは湿群の孵化日数が水群のそれより短くなっていった。ヒメダカと野生メダカでの結果の違いについては、その理由は不明である。

魚類の受精卵の乾燥耐性については、カダヤシ目の数種の魚種において知られている¹³⁻¹⁵⁾。アフリカおよび南米にそれぞれ生息する *Nothobranchius* 属 およ

び *Austrolebias* 属では雨季に成魚が産卵し、受精卵は乾季（数ヶ月間）に湿った土の中で発生が進み、次の雨季に胚は孵化する。これらの魚の卵は、メダカの卵よりはるかに強い乾燥耐性を備えていると考えられる。また我々の予備実験では、キンギョ *Carassius auratus* およびギンブナ *Carassius* sp. の受精卵を受精1日後に1日間、メダカの実験と同様に「湿群」と「水群」に分けて処理をしたところ、受精後3-5日に「湿群」の卵は「水群」の卵と同程度の率で孵化がみられた（小林, 未発表）。

研究例数は少ないが、メダカに限らず淡水魚の受精卵はある程度の乾燥耐性をもって環境に適応しているのかもしれない。

本研究により、ミナミメダカの受精卵にはある程度の乾燥耐性があることが明らかとなった。ただしこの場合何らかの形で水の供給が必要である。水位の変動のある河川や人工的に水位を調節する水路などにおいてはメダカの受精卵が乾燥に曝される可能性がある。野生メダカの保全の観点からは、岸に卵への水分補給が可能な植生を維持することで、メダカの繁殖効率が上がると考えられる。

引用文献

- 1) Asai, T. Senou, H. & Hosoya, K. : Ichthyol. Explor. Freshwaters, 22, 289-299 (2011).
 - 2) 環境省：“環境省レッドリスト2019の公表について、別添資料2環境省レッドリスト2019” <http://www.env.go.jp/press/106383.html> (2019. 3. 21 閲覧).
 - 3) 坂本啓, 谷合祐一, 須藤篤史, 小畑千賀志, 花輪正一, 太田裕達, 高橋清孝：“田園の魚をとりもどせ”（高橋清孝編）, 98-104 (2009), (恒星社厚生閣).
 - 4) 端憲二, 皆川明子, 金尾滋史：海洋と生物, 35: 202-207 (2013).
 - 5) 棟方有宗, 北川忠生, 小林牧人：海洋と生物, 39: 107-112 (2017).
 - 6) 小林牧人, 上出櫻子, 岩田恵理：海洋と生物, 39, 113-119(2017).
 - 7) 小林牧人, 頼経知尚, 鈴木翔平, 清水彩美, 小井土美香, 川口優太郎, 早川洋一, 江口さやか, 横田弘文, 山本義和：日本水産学会誌, 78, 922-933 (2012). (本文中に電子付録データのURLが記載されているが、間違いがあり、以下に正しいURLを示す。 https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan/78/5/78_922/_article/-char/ja/)
 - 8) 岩田恵理, 坂本幸多朗, 大河内拓也, 佐々木秀明, 安田純, 小林牧人：自然環境科学研究, 28, 11-21 (2015).
 - 9) 上出櫻子, 土師百華, 北川忠生, 小林牧人：自然環境科学研究, 31, 1-7 (2018).
 - 10) 上出櫻子, 小南優, 小林牧人：自然環境科学研究, 30, 1-4 (2017).
 - 11) Takehana, Y., Nagai, N., Matsuda, M., Tsuchiya, K. & Sakaizumi, M.: Zool. Sci., 20, 1279-1291 (2003).
 - 12) 江口さやか, 石田紗也, 養田唯, 浦部文香, 山本義和, 横田弘文：神戸女学院大学論集, 59, 11-20 (2012).
 - 13) 山崎浩二：“世界のメダカガイド” (2010), (文一総合出版) .
 - 14) Blazek, R., Polacik, M., & Reichard, M.: EvoDevo, 4, 24(2013). doi:10.1186/2041-9139-4-24
 - 15) Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N.G., & Clivio, G.A.: WIREs Dev. Biol., 1, 595-602 (2012).
- 野生ミナミメダカを供与して下さった神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科横田弘文准教授に深く感謝致します。
- (2019年2月3日受付, 2019年4月5日受理)