

野外調査と飼育実験を併用した魚類の繁殖特性研究

栗田 豊*

Procedures to Estimate Reproductive Traits of Fish by Combining Field Surveys and Tank Experiments

Yutaka KURITA*

Abstract Problems in examining reproductive traits of fish species by field surveys and the advantages of tank experiments were reviewed. Required tank experiments differ due to the maturation-spawning type of the studied fish. For asynchronously maturing species which spawn many batches in a spawning season, rate of degeneration of postovulatory follicles (POF) in relation to temperature, diel changes in both final maturation and spawning, and the stage of spawning are required to be clarified by tank experiments. While for group-synchronously maturing species which spawn one or several batches, oocyte growth rate and the duration of atresia both in relation to temperature are required to be clarified by tank experiments. Effects of ration size and feeding period on the number of spawning eggs are also important issues to be examined. While tank experiments are very useful methods, they have risks of producing biased results because of the artificial environment and food. Thus, field surveys and tank experiments should be concurrently carried out to allow comparison and validation of results.

Key words: reproductive traits, field survey, tank experiment, maturation pattern, spawning pattern

魚類の生活史特性は、変動する生物・非生物的環境の影響を受けて常に変動している。したがって生活史を研究するうえで、まず特性値を正確に評価すること、次に特性値を長期的に評価し変動要因を特定すること、さらに要因の影響を定量的に評価することが重要である。たとえば繁殖特性に関しては、産卵期、産卵場、産卵数、卵径、卵質などが、個体群動態に影響を及ぼす可能性がある、研究すべき重要な特性である。これらの特性値の正確な評価ならびに変動要因の解明は、野外調査によって行うのが基本である。しかし野外調査には様々なバイアスや情報の曖昧さが含まれるので、特性値の正確な評価すら十分には行えないことがある。これらの野外調査に付随する問題を補うために、飼育実験は非常に有力な手段である。飼育実験では、特定

の環境（例えば水温）のみを変化させてその影響を抽出できる、標本が経験した環境履歴が把握できる、計画的かつ安定的に標本を採集できる、同一個体の特性値の時系列変化が得られるなどの利点がある。これらの特徴は野外調査では得ることが極めて困難である。一方、飼育実験自体の人為的環境が魚に何らかの影響を及ぼすと考えられるので、得られた結果がそのまま野外における魚の生態に適用できるかどうかは不明である。このことから、生活史特性の研究は、野外調査と飼育実験の結果を常に対比させ、お互いを補い合いながら展開することが望ましい。本報告では、野外調査と飼育実験の相補的な併用の一つのあり方を示すために、繁殖特性およびその変動に関する野外調査の研究例および問題点を示し、問題解決のために必要な飼

2006年1月6日受理 (Accepted on January 6, 2006)

* 東北区水産研究所 〒985-0001 宮城県塩竈市新浜町3-27-5 (Tohoku National Fisheries Research Institute; Shinhamma 3-27-5, Shioigama, Miyagi 985-0001, JAPAN)

育実験の例を紹介した。

成熟・産卵様式

繁殖特性値の調査研究手法は、対象とする魚種の成熟・産卵様式によって異なる。例えば年1回産卵型の魚種においては、産卵期や産卵数は成熟開始前から産卵期にかけての長期間にわたる水温や餌料環境の影響を受ける可能性があるため、成熟開始前の適当な時期から成熟期間を通して一定間隔で卵母細胞径や孕卵数 (potential fecundity) を調べる必要がある。一方、一産卵期に多数回産卵する (バッチ産卵型) 魚種においては、産卵回数や産卵数は産卵期中の餌料環境や水温に大きく影響されると考えらる。この様な魚種の場合、バッチ産卵数 (1回の産卵における産卵数)、産卵頻度、環境などについて、産卵期中に頻りに調査を行う必要がある。したがって繁殖特性の研究ではまず、研究対象とする魚種の成熟・産卵様式を特定することが非常に重要である。

成熟・産卵様式は、一般的に、同期発達型 (synchronous)、卵群同期発達型 (group-synchronous)、非同期発達型 (asynchronous) (Marza, 1938; Wallace and Selman, 1981; 高野, 1989) に分類される。このうち同期発達型は多くのサケ属魚類のように一生に1回だけ産卵する型である。卵群同期発達型は卵黄を蓄積している卵母細胞群と卵黄を蓄積しない卵母細胞群 (翌年または次回の産卵期に成熟する) の少なくとも2つの明瞭な細胞群が認められ、一生に複数回産卵する型である。この型には1産卵期に1回産卵 (しかし生涯で複数回産卵) するタイプと、1産卵期に複数回産卵するタイプがある。非同期発達型は卵黄を蓄積している卵母細胞と蓄積していない卵母細胞の細胞径に明瞭なギャップが存在せず、産卵期中にも常時卵黄蓄積を開始する細胞が出現する型である。この型には比較的長期にわたり多数回産卵する魚種が含まれる。本論文では、研究手法の相違を考慮し、卵群同期発達型を1産卵期1回産卵型 (ニシン *Clupea harengus* など)、1産卵期複数回産卵型 (大西洋タラ *Gadus morhua*, スケトウダラ *Theragra chalcogramma* など) に区分した。これに非同期発達型 (1産卵期多数回産卵型, サンマ *Cololabis saira*, マサバ *Scomber japonicus*, カタクチイワシ *Engraulis japonica*, ヒラメ *Paralichthys olivaceus* など) を加えた3つの型について、成熟・産卵様式、および繁殖特性値に対する環境の影響の仕方を以下に述べる。

) 卵群同期発達型 - 1産卵期1回産卵型 (タイプ ; Fig. 1a)

成熟し産卵に至る卵母細胞が、卵黄を蓄積しない細胞 (pre-vitellogenic oocytes) から独立して成長する。成熟過程における水温、体重などが卵母細胞の成長速度に影響し (大西洋ニシン *Clupea harengus*, Ware and Tanasichuk, 1989), 産卵日は主に成熟開始時期、卵母細胞の成長速度、最終成熟 (核移動~吸水完了) を開始する卵母細胞径で決定される。大西洋ニシンでは成熟を開始した卵母細胞の一部が成熟過程で再吸収され、実際の産卵数は個体の栄養状態に応じて調節される (Kurita *et al.*, 2003)。

) 卵群同期発達型 - 1産卵期複数回産卵型 (タイプ ; Fig. 1b)

成熟し産卵に至る卵母細胞が、卵黄を蓄積しない細胞から独立してある程度成長し (卵黄蓄積卵母細胞, vitellogenic oocytes), さらにその一部が最終成熟に至り [吸水卵母細胞 hydrated oocytes ; ただし顕著な吸水が起こる魚種のみ] に適用できる用語, 清水 (2006) 参照] 産卵される。産卵は1産卵期に複数回認められる。成熟を開始して独立した卵母細胞群が形成された時以降に、卵黄を蓄積していない卵母細胞群から卵黄を蓄積している卵母細胞群への加入はない。つまり成熟初期に産卵数の最大値が決定する。卵群の卵母細胞成長速度は成熟過程における水温に影響される (大西洋タラ, Kjesbu, 1994) ため、産卵期は水温の影響を受けて変動する。また、産卵数は水温や栄養状態の影響を受けて変動する (大西洋タラ, Kjesbu *et al.*, 1998) さらに、バッチ産卵数、卵径、産卵間隔が産卵の進行に伴い変化する (大西洋タラ, Kjesbu *et al.*, 1991; 1996)。

) 非同期発達型 - 1産卵期多数回産卵型 (タイプ ; Fig. 1c)

産卵期中継続的に、卵黄を蓄積しない細胞から卵黄蓄積細胞への加入がある。卵黄を蓄積している細胞の一部が最終成熟に至り産卵する過程を繰り返す。産卵回数 (産卵間隔) およびバッチ産卵数から総産卵数を推定する。これらの特性値は産卵期中の水温や餌料環境 (カタクチイワシ, 靄田, 1992) によって変化する。また、産卵間隔の推定には、生殖日周期や排卵後濾胞 (postovulatory follicles; POF) の吸収過程などと水温の関係を把握する必要がある。

水産資源学における繁殖特性研究は、特性値を正確に評価する、特性値の変動要因を特定する、変動要因の影響を定量的に評価する、という順に高度化していく。以下に、繁殖特性研究を行う際の野外調査における問題点と、それを解決するために必要とされる飼育実験を、特性値を正確に評価することと、変動要因を特定しその影響を評価することに大別して述べる。前

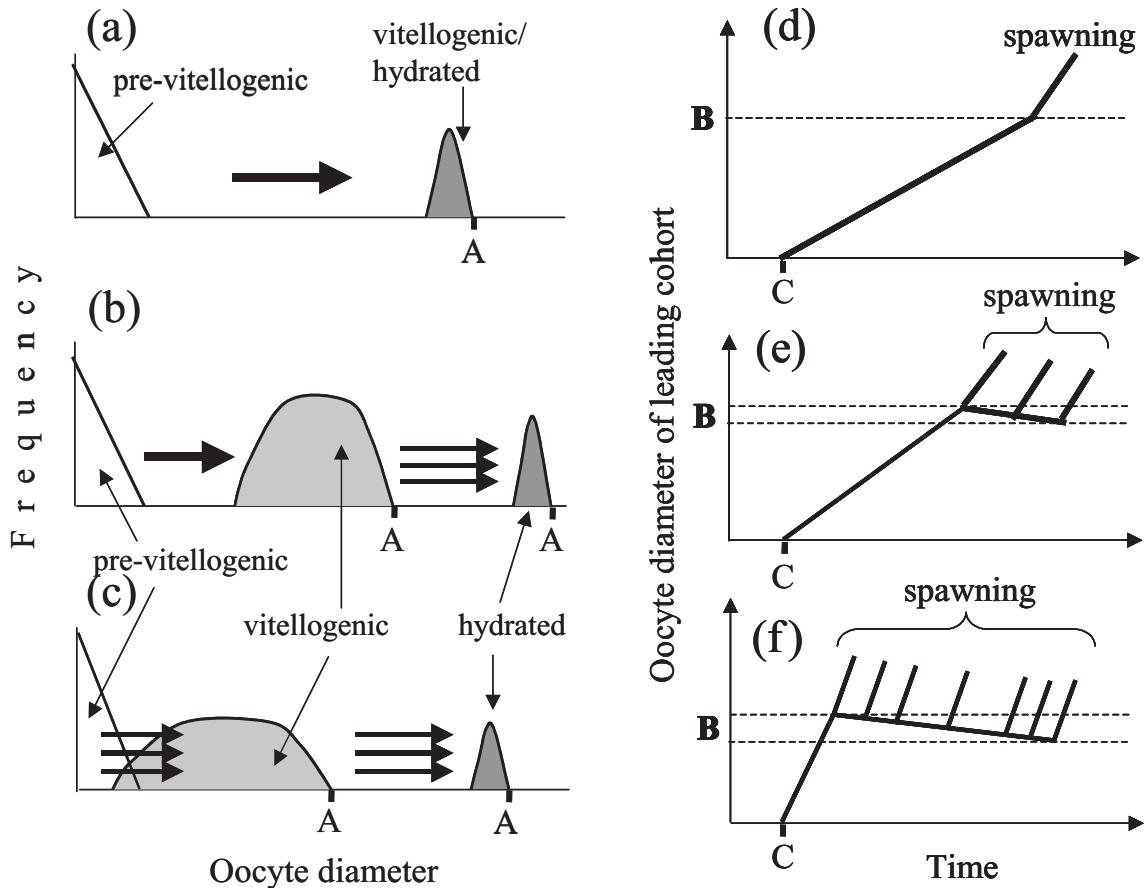


Fig. 1. Three patterns of oocyte maturation and spawning. (a) - (c) Size frequency of oocytes; (d) - (f) temporal changes in oocyte diameter in the leading cohorts. (a), (d) Group-synchronous and spawning a single batch in a spawning season; (b), (e), group-synchronous and spawning several batches in a spawning season; (c), (f), asynchronous and spawning many batches in a spawning season. A, diameter of oocytes in leading cohorts; B, diameter of oocytes at the beginning of final maturation; C, time at the beginning of oocyte maturation.

者は比較的短期間の飼育実験で遂行可能であるのに対して、後者は比較的長期間の飼育実験が必要である。

繁殖特性値を正確に評価するために行う野外調査の問題点と必要な飼育実験

1) 野外調査の設計をよく練る

繁殖特性の研究に限らず、個体群の生物特性を明らかにする際に個体群を代表するサンプリングを行うように注意を払うことは非常に重要である。繁殖特性に関していえば、産卵群と非産卵群の分布の違い、産卵群の中でも当日産卵群と当日非産卵群の分布や採集効率の違いを正確に把握する必要がある（例えばnorthern anchovy *Engraulis mordax*, Picquelle and Stauffer, 1985）。また、産卵時刻に何らかの偏りがある場合は、採集時刻を考慮する必要がある。さらに、上述のとおり、調査対象魚種の成熟・産卵様式によって調査時期

や頻度を変える必要もある。

2) 繁殖特性値を正確に評価するために必要な情報

a) 排卵後濾胞 (POF) の吸収過程と水温の関係

POF (Fig. 2) とは、卵母細胞を包んでいた濾胞組織 [ovarian follicle; 外側の莢膜細胞層 (thecal cell layer), 内側の顆粒膜細胞層 (granulosa cell layer), および両細胞層を隔てる基底膜 (basement membrane) からなる] が排卵によって空胞となった状態である。POFは個体の当該産卵期における産卵経験の有無の指標となる。Hunter and Goldberg (1980) が northern anchovy の産卵頻度 (単位時間あたりの産卵回数, 単位時間を1日とすることが多い) の推定に用いて以来、多くのパッチ産卵型の魚種で産卵頻度の指標として用いられている (northern anchovy, Hunter and Macewicz, 1985; マサバ, Dickerson *et al.*, 1992; Atlantic mackerel *Scomber scombrus*, Priede and Watson, 1993)。Hunter and Goldberg (1980) は

POFの退行過程が時間の経過とともに進行する性質を利用し、POFをその形態から、排卵当日、排卵後1日、排卵後2日以上経過の3タイプに区分した。排卵当日のPOFは複雑に褶曲しており、顆粒膜細胞の細胞壁および細胞内の核が明瞭である。これに対して排卵後1日のPOFは褶曲が少なくなり、顆粒膜細胞には空胞や核の濃縮が多く認められる。排卵後2日以上経過すると大きさが非常に小さくなり、顆粒膜細胞の細胞膜が認められず、空胞や濃縮した核のみが認められる。吸収の過程は多くの魚種で類似しているが、それぞれの状態の持続時間は魚種や環境水温によって異なる。産卵頻度の推定に用いる形質は、POFに限らずその持続時間および出現時刻（あるいは産卵時刻）を明らかにする必要がある（後述c）参照）。例えば、時刻の偏りなく採集した場合、ある形質の持続時間が1/2になれば、その形質が認められる確率も1/2になる。したがって産卵頻度の推定値は、用いる形質の持続時間に比例して変化する。POFの退行過程についてはいくつかの魚種で報告されているが、筆者の知る限りでは、同じ種について異なる水温で退行過程を調べた報告はない。産卵期の水温は、地域によって、また時期によって大きく変化するのが一般的である（羽生, 1991）ので、

POFの吸収過程と水温の関係を明らかにすることは、産卵頻度の推定を正確に行うために必要である。個体群の産卵が狭い時間範囲内で同期して起こる魚種では、野外において3～4時間間隔で24～48時間にわたり連続的に採集することでPOFの退行過程を明らかにできる（Pacific sardine *Sardinops sagax*, Goldberg *et al.*, 1984）。しかし、一般的に個体により産卵時刻がばらつくことや排卵から採集時までの経験水温が不明瞭であることを考慮すると、POFの吸収過程と水温の関係は飼育実験によって明らかにするのが適当である。飼育実験では同期して排卵した個体群から一定の時間間隔で数個体ずつ採集し、排卵後の経過時間とPOFの形態変化を対比させればよい。水温は天然海域で経験すると予想される最低水温、最高水温、その中間の水温の少なくとも3水温で行うことが望ましい。また、カニューレ（Fig. 3に示した細い管、カテーテル）を用いて同一個体の卵巣の一部の抽出（カニューレーション、カテーテライズ）を定期的に行えれば、数少ない個体で、しかも排卵時刻の個体差を考慮せずにPOFの形態変化を調査できる。ただしカニューレーションを行う場合は、ハンドリングによる魚体に対するストレスを最小限にとどめる配慮が必要である。

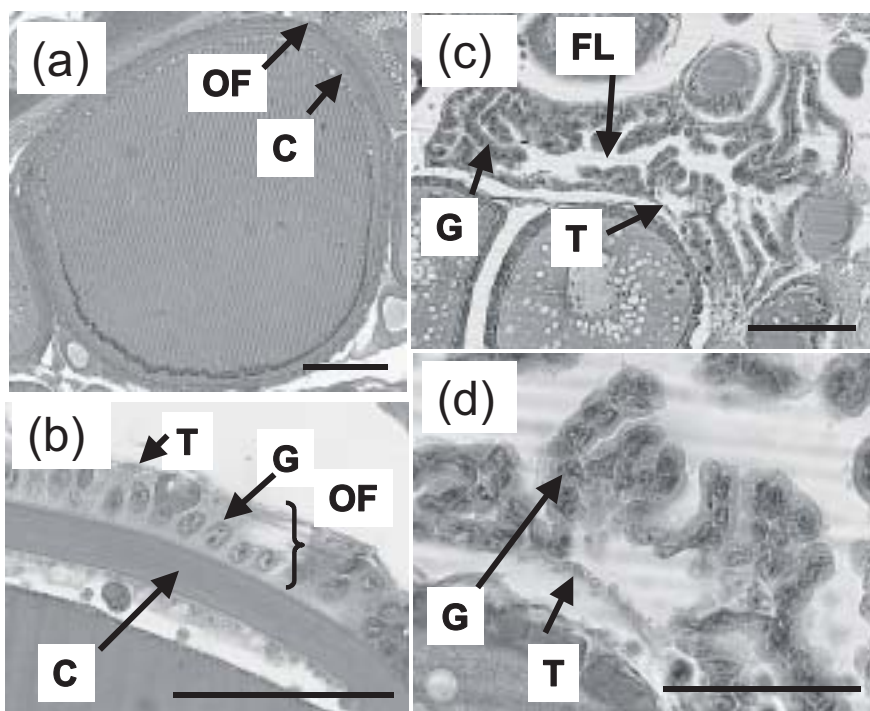


Fig. 2. Ovarian follicle and postovulatory follicle of Pacific saury *Cololabis saira*. (a) Hydrated oocyte surrounded by ovarian follicle (OF). C, chorion. (b) Magnified image of (a). Thecal cell layer (T) and granulosa cell layer (G) of ovarian follicle. (c) Newly evacuated postovulatory follicle. FL, follicular lumen. (d) Magnified image of (c). Cell walls of granulosa cells are evident and nuclei are prominent. Bars in (a) and (c), 200 μ m; in (b) and (d), 100 μ m.

b) 退行卵母細胞 (atresia) の吸収過程と水温の関係

近年いくつかの魚種で、卵黄を蓄積した卵母細胞の一部が、成熟過程および産卵期中に退行卵母細胞 (atresia, Fig. 4) となり産卵せずに再吸収されることが明らかになっている。例えば大西洋ニシン (成熟・産卵タイプ) では、卵黄を蓄積した卵母細胞の56%が、主に成熟過程の前半にatresiaとして吸収された (Kurita *et al.*, 2003)。また、North Sea sole *Solea solea* (成熟・産卵タイプ) では12.4%が (Witthames and Greer Walker, 1995)、Atlantic mackerel (成熟・産卵タイプ) では6~13%が (Greer walker *et al.*, 1994)、産卵期中にatresiaとして吸収された。上記成熟・産卵タイプのうち卵群同期発達型 (タイプ および) に属する魚種では、産卵前のある時点で計数した卵黄蓄積卵母細胞数 (potential fecundity) を当該産卵期における実際の産卵数 (realized fecundity) とみなすことが多い。しかしatresiaによる再吸収があれば、計数時の孕卵数と実際の産卵数は異なるので、実際の産卵数を推定するためにはatresiaによる再吸収が生じる時期および量を調べる必要がある。atresiaによる再吸収量を推定するためには、正常な卵母細胞に対するatresiaの割合とatresiaの持続時間 (寿命; 卵母細胞の退行の開始から卵黄が完全に吸収されるまでの時間, Fig. 4; Hunter and Macewicz, 1985; Witthames and Greer Walker, 1995) に関する情報が必要である。たとえatresiaの割合が少なくても、atresiaによる再吸収が何回転かすれば、再吸収される卵母細胞の総量は大きくなる。例えば出現割合が3%であっても5

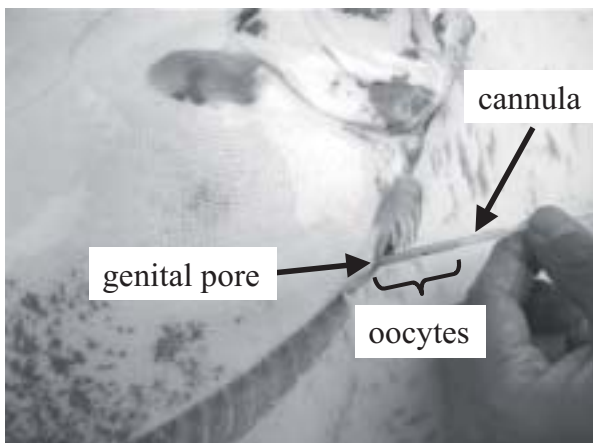


Fig. 3. Taking ovary biopsy samples with a cannula. Temporal changes in ovarian characteristics, for example, oocyte diameter, developmental stages, and degeneration process of both post ovulatory follicles and atresia, can be examined from the same individual.

回転すれば、当初の14% [$= 1 - (1 - 0.03)^5$] の卵母細胞が減少する。したがって見かけ上少なくとも、atresiaによる再吸収は実際の産卵量に大きな影響を及ぼす可能性がある。また、atresiaの割合の推定は組織切片の観察によるのが一般的であるが、大きさが異なる細胞を単純に計数すると、数量の比の推定値に偏りが生じるので注意が必要である (後述のstereological method参照)。atresiaの出現は一般的には個体間で同期しないので、出現開始日を野外採集標本から推定するのは不可能である。したがってatresiaの持続時間は飼育実験によって調べるのが適当である。これまで孕卵数の減少量と期間からatresiaの持続時間を推定した

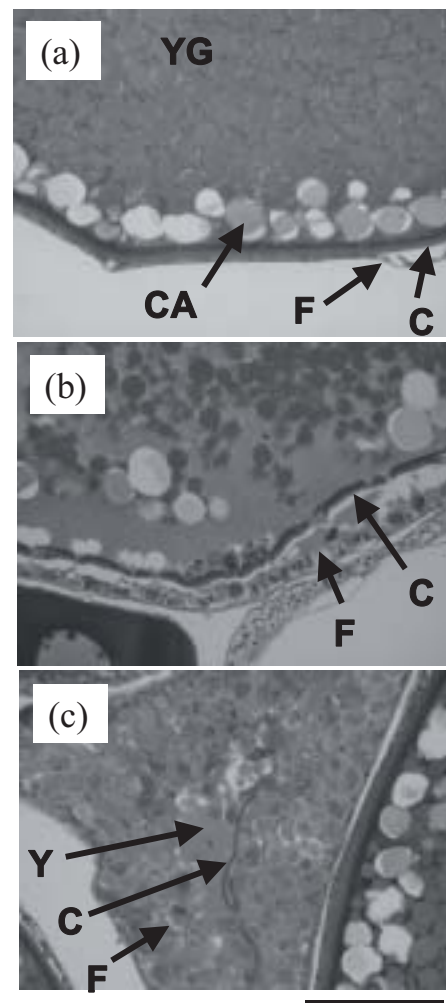


Fig. 4. Normal and atretic oocytes in vitellogenic stage of Atlantic herring *Clupea harengus*. (a) Normal vitellogenic oocyte. YG, yolk globule; CA, cortical alveoli; C, chorion; F, ovarian follicle. (b) A very early phase of atresia. Chorion (C) is fragmented, and follicle cells (F) become enlarged. (c) A late phase of atresia. Little yolk (Y) and chorion (C) remained, and surrounded by follicle cells (F). Bar; 100 μ m.

例はあるが (Kurita *et al.*, 2003), 飼育実験により直接調べた例は少ない。Hunter and Macewicz (1985) は northern anchovy を一定期間絶食することで atresia を生じさせ, 定期的な採集によって atresia の吸収過程を観察した。その結果, 卵黄を蓄積した卵母細胞が atresia となり卵黄が完全に吸収されるまでに 8 日間かかることを明らかにした。カニューレーションにより同一個体の atresia 持続時間を推定することも可能であろう。POF と同様, atresia も水温によって持続時間が大きく変化する可能性が高いので, 飼育実験を行う際は, 生息水域の最高, 最低, 中間の少なくとも 3 水温下で実験を行うことが望ましい。

c) 成熟・産卵過程の日周リズムと水温の関係

1 産卵期に複数回産卵する魚種, 特に非同期発達型の魚種で, 最終成熟 (核移動~吸水完了) および排卵に関連して明瞭な生殖日周期を示すことが報告されている (広瀬, 1991)。なお最終成熟とは第一減数分裂の途中で停止していた卵母細胞の減数分裂が再開し, 第二減数分裂中期に至るまでの期間であり, 外見的には卵黄球期の卵母細胞の核が移動し, 吸水に伴う透明化および核の崩壊を経て排卵に至る一連の過程に対応する (小林と足立, 2002; 清水, 2006)。生殖日周期に関する知見は, 産卵頻度の推定, 産卵頻度やバッチ産卵数を推定するための調査時刻の決定に必要である。多

くの魚種で用いられている産卵頻度 (間隔) の指標は POF および吸水卵母細胞である。しかしこれらの出現持続時間を正確に調べた例は少ない。

Matsuyama *et al.* (1988) は, 海上の生け簀に畜養した天然のマダイ *Pagrus major* を用いて成熟・産卵の日周リズムを明らかにした (Fig. 5 a)。マダイは 18~19 時に同期して産卵した。核の移動は 19 時から出現し始め, 7 時には核の崩壊が終了し, 卵母細胞が透明化した。また, 排卵は 13~16 時に起きた。したがって吸水卵母細胞は 4~7 時から 13~16 時の約 9 時間にわたり出現した。また, 13~22 時には POF は濾胞腔 (follicular lumen, Fig. 2) を有し顆粒膜細胞の構造も明瞭な状態であった (ステージ I)。1~10 時にはステージ I の POF は認められず, 最も新しい POF でも吸収が進み濾胞腔は閉鎖していた (ステージ II)。それ以降は吸収が進行し, 24 時間以内に結合組織との識別が困難な状態になった。この日周変化の知見を適用すると, 当日産卵する個体は, 少なくとも 4~7 時には核移動期以降の卵母細胞を, 7~22 時には吸水卵母細胞または排卵後間もないステージ I の POF を, それぞれ持っていることから識別可能である。つまりこれらの細胞の出現を指標とすれば, 4~22 時に採集した標本を用いて, 産卵頻度の推定を行えるであろう。また, 著者の経験では, POF の退行過程は連続的であり吸収

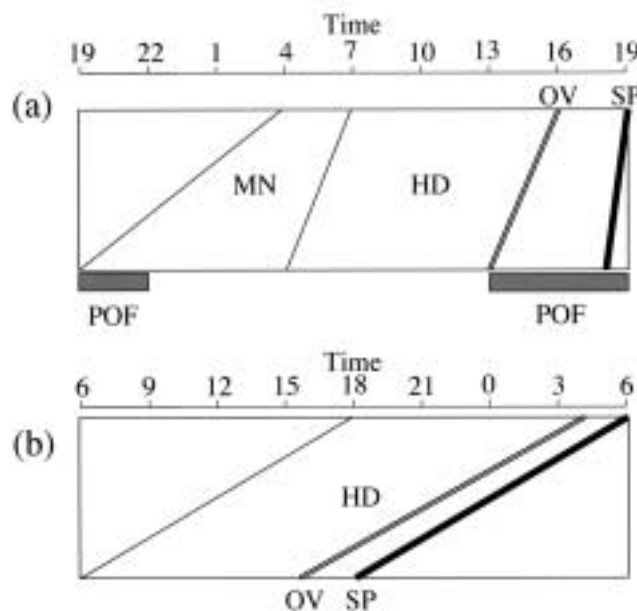


Fig. 5. Diel rhythm of final maturation and spawning in (a) red sea bream *Pagrus major* and (b) Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Red sea bream spawns synchronously at 18 - 19 h, while Japanese flounder spawns asynchronously during the night. As a result, hydrated oocytes of red sea bream appear in a specific period of time, while those of Japanese flounder appear almost over a 24 hour period. MN, oocytes at migratory nucleus stage; HD, hydrated oocytes; POF, postovulatory follicles at stage I (grey bars); OV, ovulation; SP, spawning.

段階の識別には多少の不明瞭さが含まれる。したがって採集時刻を7~13時に限って、吸水卵母細胞のみを産卵の指標にするか、または7~19時頃までに限って、吸水卵母細胞と排卵直後のステージのPOFを産卵の指標にすることで、より正確に産卵頻度を推定できるであろう。逆に言えば、もしも吸水卵母細胞（およびステージのPOF）のみを指標にして産卵頻度を推定する場合、7~13時（19時頃）以外の標本を含めて推定すると過小推定となる。このように、成熟日周期に関する情報は、精度の高い産卵頻度の推定、あるいは調査設計に不可欠である。

マダイの様に産卵時刻が個体群で同期している場合は、上述のように、吸水卵母細胞やPOFなど特定の形質の特定の時間帯における出現率を利用して、野外個体群の産卵頻度を推定することができる。しかし個体群で産卵時刻が同期していない場合は、生殖日周期およびある形質の持続時間が産卵間隔の推定値に直接影響する。例えばヒラメは飼育下で夕方から早朝にかけて幅広い時間帯で排卵・産卵する（栗田、未発表）。また、吸水卵母細胞の持続時間は水温15℃では約10時間である^{*1}。採集が終日まんべんなく行われれば、当日産卵する個体のうち吸水卵母細胞を持っている個体の出現確率は10/24（持続時間/24時間）である。しかし出現確率は時間帯によって変化する。例えば18~6時に産卵する場合、吸水卵母細胞は6~翌4時に出現する（Fig. 5b；排卵から産卵までの時間が明確になっていないので、ここでは2時間と仮定した）。18~6時に間に魚が均等に産卵すると仮定すると、吸水卵母細胞の出現確率は、4~6時が0、16~18時がほぼ1で最も高くなり、6~16時にかけては直線的に増加し、18~4時にかけては直線的に減少する。さらに産卵時刻の分布に偏りがあると、出現確率はその影響を受けて変化する。このような魚種の産卵頻度を推定する場合、まず産卵の指標となる形質の持続時間を明らかにすることが第一に求められる。さらに排卵時刻の頻度分布を明らかにできる場合は、その頻度分布から推定される特定の形質の出現確率と時刻の関係を予め把握した上で、採集時刻を決定し、形質の出現割合から産卵頻度を推定するのが最良の方法である。排卵時刻の頻度分布が不明の場合は、採集時刻が特定の時間帯に偏らない様にして、あるいは採集時刻の偏りを除去するようにデータを処理して、形質の出現割合から産卵

頻度を推定する方法が次善の方法である。どちらの場合でも、産卵頻度を求める際に、形質の出現割合を出現確率で補正する必要がある。つまり、

$$(\text{産卵頻度}) = (\text{形質の出現割合}) / (\text{形質の出現確率})$$

である。前述のマダイでは形質の出現確率で補正していない。これは特定の形質〔吸水卵母細胞（およびステージIのPOF）〕の出現確率が1となる時間帯〔7~13（19）時〕に採集した標本のみを用いる推定方法だったからである（Fig. 5a）。

さらに、産卵の進行に伴う水温や光周期の変化が、産卵に関わる形質の持続時間（例えばヒラメの吸水卵母細胞の持続時間と水温の関係^{*1}）や産卵時刻（羽生1991）を変化させることにも留意する必要がある。産卵時刻の個体間変動が大きい場合、野外調査によって特定の形質の持続時間を推定するのは非常に困難である。このような場合は、飼育実験によって産卵時刻や形質の持続時間と環境の関係に関する基礎情報を得ておくことが望ましい。成熟・産卵の日周変化を調べる目的で行う飼育実験でも、POFの項で述べたのと同様に、生殖日周期に個体間変動が見込まれる場合は、カニキュレーションによって同一個体の時系列変化を調べることは有力な方法である^{*1}。

d) 産卵動向を推定する手法の開発

野外調査についてまわる問題点の中で、個体群を代表する標本が採れているかどうかは非常に重要な問題である。このことは、個体群中の成熟個体の割合を推定する際にも当てはまる。冬に黒潮本流およびその周辺で採集される成熟サイズ以上のサンマはほぼ100%成熟している^{*2}。しかし冬のサンマの分布範囲は完全には特定されていない。もし採集域以外においても成熟サイズ以上で未成熟な個体がまとまって分布していれば、ほぼ100%と推定した成熟率は過大評価となる。このような推定誤差を極力減らすための情報の一つとして、個体の産卵動向（stage of spawning）が挙げられる。ここでいう産卵動向とは、ある個体とその個体の数ヶ月間にわたる産卵期の中で、これまでどれくらい産卵して、今後どれくらい産卵するかという産卵の進行状況の尺度であり、単純化して言えば産卵初期、盛期、末期などと表現できる。例えばある産卵場で調査をすると3ヶ月にわたりほぼ100%の成熟個体が採集できたとする（Fig. 6aおよびb）。最初の1ヶ月は全ての個体が産卵初期、次の1ヶ月は全て盛期、最

*1 栗田 豊, 藤浪祐一郎, 天野勝文, Pham K.X., 山森邦夫, 2005: 飼育下におけるヒラメの生殖日周期. 平成17年度日本水産学会大会講演要旨集, p.41.

*2 栗田 豊, 2001: サンマの産卵場および産卵量の季節変化. 第49回サンマ資源研究会議報告, 東北区水産研究所八戸支所, pp.203-205.

後の1ヵ月は全て末期であれば (Fig. 6 a), 調査期間中同じ個体群が調査対象となっていた可能性が高い。しかし、個体群の産卵期 (3ヵ月) 中の長い期間 (図では2ヵ月以上) で産卵初期の個体が採集された場合は、産卵期中に常に、新たに成熟を開始した個体が調査海域の外から移入してきたと推察される (Fig. 6 b)。また、産卵期中の長い期間 (図では2ヵ月以上) で産卵末期の個体が出現すれば、産卵を終了した個体は終了後ただちに調査海域から移出したと推察される (Fig. 6 b)。この場合、見かけ上の成熟率は100%であるが、実際は個体群の一部のみが産卵していたことになる。このように個体の産卵動向がわかると、産卵親魚の調査海域の利用状況や個体群全体の繁殖特性が推察できる。また、孕卵数、パッチ産卵数、卵径などの繁殖特性値は、産卵の進行に伴って変化することが知られている (大西洋タラ, Kjesbu *et al.*, 1991; 1996)。個体レベルの産卵期が個体間で同期していない場合、同時に採集された標本には、産卵初期の個体と末期の個体が混在する (Fig. 6 b)。したがって、野外採集した

標本を用いて産卵の進行に伴う特性値の変化を調べるためには、採集時期を基準にして調べるのではなく、個々の標本の産卵動向で基準化して比較する必要がある。

Kjesbu *et al.* (1990) は卵群同期発達型 - 1産卵期複数回産卵型である大西洋タラの産卵動向を、卵母細胞径分布を用いて推定する手法を開発した (Fig. 7)。卵群同期発達型 - 1産卵期複数回産卵型では、上述のように、当該産卵期に産卵可能となる卵母細胞群 (卵黄球期) がある程度の大きさまで成長し、それらのうち一部の細胞が最終成熟を経て産卵に至る過程を繰り返す (Fig. 1 b)。卵黄を蓄積した細胞群のうち小さな細胞はゆっくりと成長を続けることから、この細胞群の細胞径の標準偏差は、産卵の進行に伴って小さくなっていく (Fig. 7)。Kjesbu *et al.* (1990) は産卵履歴を把握している飼育個体を定期的に採集して、卵黄を蓄積した細胞群の径の標準偏差と産卵の進行度合い (portion of eggs spawned; 見込まれる総産卵数に対する調査時までの累積産卵数の割合) の関係を定式化した。さらにこの関係を適当に修正して、産卵期中に

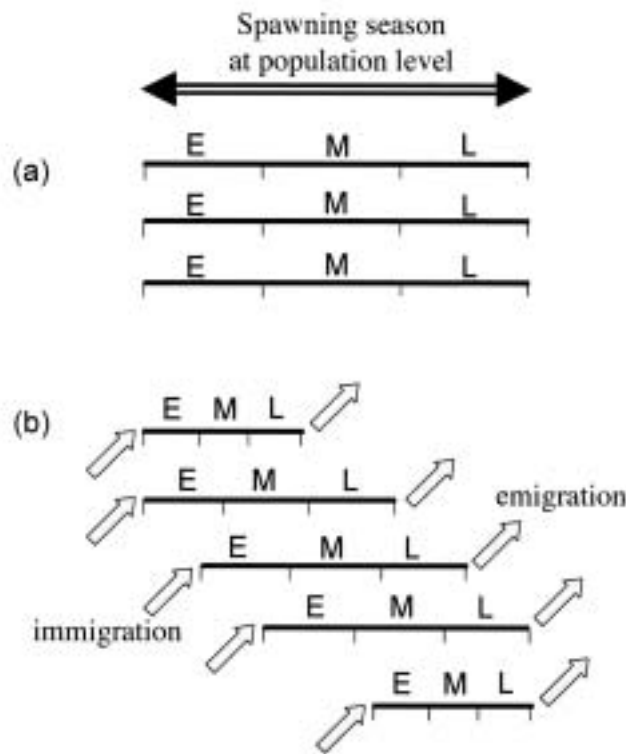


Fig. 6. Schematics showing possible relationships between spawning season at the population level and at an individual level in relation to the stage of spawning. (a) Spawning season of each individual corresponds to the spawning season at the population level. (b) Spawning season of some fish are shorter than that of the population. If spawning fish immigrate into the survey area just before spawning and emigrate just after spawning, 100 % of sampled fish appear as active spawners while the actual spawning fraction of the population is less than 100 %. E, early stage of spawning; M, middle stage of spawning; L, late stage of spawning.

採集した天然個体の産卵動向と採集時の孕卵数から産卵期中における総産卵数を推定した (Kjesbu *et al.*, 1998)。この手法は大西洋タラ以外でも、卵群同期発達型 - 1 産卵期複数回産卵型の魚種で適用可能かもしれない。しかし非同期発達型の魚種では、産卵期中に、常に卵黄蓄積卵母細胞の加入があるので、卵黄蓄積細胞群の細胞径の変化から産卵動向を推定するのは困難である。これに代わる方法の一つの可能性は、卵母細胞の発達段階組成から推定する方法である。卵母細胞の数は、卵原細胞の増殖速度と卵原細胞から卵母細胞へと変化する割合で決定する。また、成長期の卵母細胞は卵黄を蓄積しない周辺期以前、内生的な蓄積を開始する表層期 (または油球期)、肝臓で形成される卵黄を蓄積する卵黄球期に分けられる。これらの細胞数の比が、産卵の経過に伴って何らかの傾向を持って変化するとすれば、細胞数の比が産卵動向の指標になる可能性がある。もう一つの可能性は、脳下垂体で生産される 2 種類の生殖腺刺激ホルモン [濾胞刺激ホルモン (FSH), 黄体形成ホルモン (LH)] の分泌活性を調べる方法である。マミチヨグ *Fundulus heteroclitus* では成熟期から産卵期にかけて FSH を生産している細胞数が多く、産卵期から産卵終了後までは LH を生産している細胞数が多い (Shimizu *et al.*, 2003)。これら

の 2 種類の生殖腺刺激ホルモンは成熟に関連して異なる働きをしていると考えられる。これらを生産する細胞数の比が産卵の進行に伴いある傾向をもって変化すれば、その比を指標にして産卵動向を予測することができる。

産卵動向を予測する手法を開発するためには、用いる標本の当該産卵期における産卵履歴が既知である必要があるため、飼育実験が不可欠である。個体ごとの産卵動向は、個体および個体群の繁殖生態、さらにその変動機構を理解するうえで重要な基礎情報である。特に、繁殖特性に関して個体群の全体像を捉えにくい非同期発達型の魚種において、その重要性が高い。産卵動向を推定する手法が早期に開発されることが望まれる。

e) 成熟・産卵の開始および終了と水温および光周期の関係

卵原細胞の分裂時期、卵母細胞の形成時期、成熟開始時期、卵母細胞の成長速度、産卵開始時期、産卵終了時期などは水温または光周期、もしくはその両方の影響を強く受ける。これらの特性の変化は、産卵数に影響する。また産卵期の変動は個体群動態に影響する可能性がある (Kjesbu *et al.*, 1996; Hugget *et al.*, 2003; Kurita, 2006)。これらの特性の変動要因の解明は個体群動態研究に関わる繁殖特性研究の中で重要な

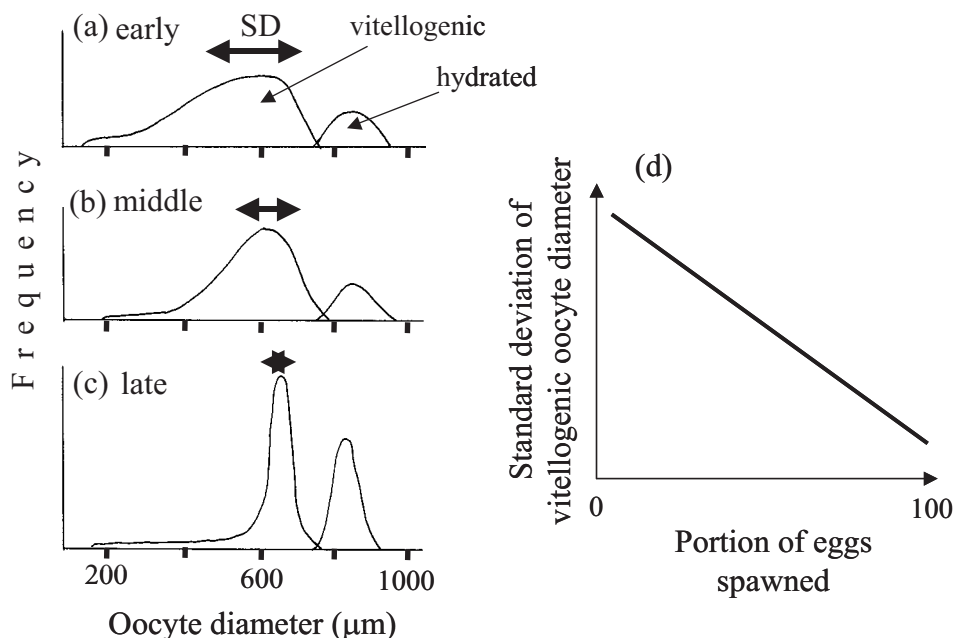


Fig. 7. A schematic showing the relationship between standard deviation (SD) of vitellogenic oocyte diameter and portion of eggs spawned (PES) which is defined as the number of eggs spawned in the current spawning season divided by the sum of number of eggs spawned and number of vitellogenic oocytes left in an ovary. (a) - (c) Temporal changes in oocyte diameter distribution and SD of vitellogenic oocyte diameter with the progress of spawning; (a) early, (b) middle, and (c) late stage of spawning. (d) Relationship between SD and PES.

課題であり、やはり飼育実験が不可欠である。

3) 作業の省力化につながる手法の開発

発達段階ごとに卵母細胞の数を計数したり細胞径を計測する際に、組織切片を用いることが多い。切片上で観察される細胞数の比は、対象となる細胞の大きさに逆比例する。例えば径の大きさが1:4である2種類の細胞が、ある切片上で2:1の数量割合で観察されたとする。この場合、実際の細胞数は径の逆数で補正した8:1である (Fig. 8)。また、組織切片の作成過程で細胞が収縮することがある。切片標本を用いて計数・計測する場合、これらのことを常に考慮する必要がある。計数上のバイアスを取り除く方法として、stereological methodがある (Emerson *et al.*, 1991; Andersen, 2003; Murua *et al.*, 2003)。これは断面を用いて立体物を計数する方法である。この方法を採用すると、細胞の大きさや形状の影響を受けずに正確に計数できる。しかし切片を作成したり画像を解析する手間がかかる。

数多くの細胞を調べる必要がある場合、または細胞径を測定する場合は、生または固定した卵母細胞をそのままの状態 (whole mount) で実体顕微鏡下で計数・計測する方法が有効である。画像解析ソフトを併用すると、この作業は飛躍的に省力化される (Thorsen and Kjesbu, 2001; Murua *et al.*, 2003)。ただし卵母細胞の場合は、外見と発達段階を一致させるため、最初に組織学的手法で両者の対応関係を明らかにしておく必要がある。また、初期のatresiaやPOFを、実体顕微鏡下の観察により識別あるいはステージングするのは容易ではない。これらを可能にするための手法、例えばatresiaやPOFの染色法、の開発が待たれる。

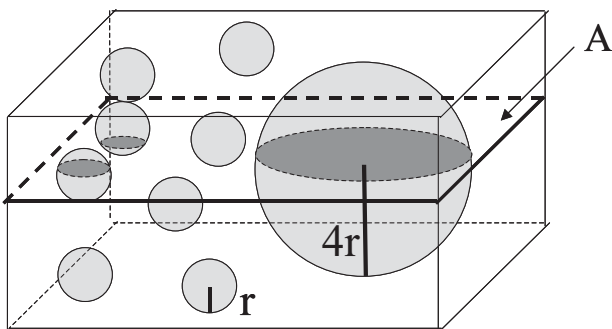


Fig. 8. Example of a potential error in estimating the number of two types of oocytes with different diameters. The probability of oocytes being sectioned in a cross section A (shown as heavily shaded ellipses) in an ovary is inversely proportional to the diameter of the oocytes.

繁殖特性値の変動要因を特定しその影響を定量評価するために行う野外調査の問題点と必要な飼育実験

繁殖特性値に影響を及ぼす要因の候補としては、水温、摂餌量、栄養状態、年齢、産卵履歴、遺伝的性質などが挙げられる。一方、影響される繁殖特性の候補として、成熟速度、産卵量、産卵頻度、産卵期の長さ、繁殖と成長のエネルギー配分などが挙げられる。これらの関係を飼育実験により定量的に明らかにするためには、数ヵ月 (成熟から産卵までの過程の変動評価) から数年 (過去の産卵や摂餌履歴の影響評価) にわたる中・長期的な実験を行う必要がある。

魚の繁殖特性値の変動を規定する主要な環境要因は餌料環境と水温である。これらは直接繁殖特性値に影響する場合もあれば、魚が経験してきた環境の蓄積結果として成長や栄養状態が変動し、それらが繁殖特性値に影響する場合もある。水温が直接影響する例としては、成熟速度 (太平洋ニシン, Ware and Tanasichuk, 1989; 大西洋タラ, Kjesbu, 1994)、産卵間隔 (カタクチイワシ, 靄田, 1992) など、摂餌量が直接影響する例としては産卵量や産卵間隔 (northern anchovy, Hunter and Macewicz, 1985; カタクチイワシ, 靄田, 1992) などが知られている。また成長が影響する例としては成熟体長や成熟年齢の変化 (マイワシ *Sardinops melanostictus*, 和田, 1988; Morimoto, 2003)、栄養状態が影響する例としては産卵量 (大西洋タラ, Kjesbu *et al.*, 1998; Lambert and Dutil, 2000; 大西洋ニシン, Kurita *et al.*, 2003) や成熟速度 (大西洋タラ, Kjesbu, 1994) などが知られている。これらの関係は、成熟・産卵期を通して異なる水温および摂餌量の条件下で飼育したグループ間で特性値を比較することにより評価することができるであろう。

摂餌量の影響の仕方は、栄養蓄積と再生産への投資に関する種特異的なスケジュールによって大きく異なる。例えば卵群同期発達型 (タイプ および) に代表される魚種では、比較的長期にわたって卵母細胞が成長して、1回または少数のバッチを産卵する。このような魚種では摂餌量が産卵量に影響を及ぼす時期は産卵期よりも前の成熟過程の時期である (capital spawner)。例えばニジマス *Oncorhynchus mykiss* では成熟初期 (表層胞期まで) の摂餌量が産卵量に影響し、その後産卵までの期間に摂餌量を変化させても産卵量への影響はほとんど認められない (Bromage *et al.*, 1992)。これに対して非同期発達型 (タイプ) に代表される、成熟期間が比較的短く、多数のバッチを産卵する魚種では、産卵期中の摂餌の可否が直接産卵量に影響する度合いが大きい (income spawner)。カタクチ

イワシでは産卵期中の餌の変化に対応して、餌の変化の2週間後には繁殖特性値が変化する(霧田, 1992)。また, nortehr anchovyでは、産卵期中に摂餌を停止させると6日後にはほとんどの個体が正常な卵黄蓄積細胞を持たなくなる。その後、卵黄蓄積細胞が全くなくなった個体に摂餌を再開させると、7日後には卵黄蓄積を再開する(Hunter and Macewicz, 1985)。摂餌時期および摂餌量が産卵数に及ぼす影響は、いくつかの時期に摂餌量を変化させ、産卵量に影響する時期を特定する飼育実験、また、摂餌量と産卵量を比較する飼育実験によって評価できる。

長期間にわたる飼育実験では、短期間の飼育実験以上に、飼育の人為的環境が結果に及ぼす影響に細心の注意を払う必要がある。例えば飼育に用いる餌の質が天然に比べて劣る可能性があること(Seikai *et al.*, 1997)、飼育水槽の形状や広さ、同種個体の密度、水質、照度、人影や物音、人工的な環境などが、直接またはストレスとして間接的に魚に影響する可能性がある。また、行動や運動量が天然とは異なる可能性が高い。したがって野外で生じている現象を正確に評価する努力を怠らないこと、飼育実験の結果と野外調査の結果を常に比較することが重要である。

まとめ

以上、繁殖特性研究のための野外調査における問題点と、それを補う飼育実験について述べた。繁殖特性研究に必要な飼育実験は魚種の成熟・産卵様式によって異なる。例えば比較的長期にわたって多数のバッチを産卵する魚種(非同期発達型)では、POF、成熟・産卵日周期、産卵動向に関する飼育実験が必要である。一方1回産卵や少数のバッチを産卵する魚種(卵群同期発達型)では、atresia、成熟速度などに関する飼育実験が必要である。また、どちらの成熟・産卵型の魚種でも、摂餌量や摂餌時期の変動が産卵量に及ぼす影響を評価することが重要な課題である。飼育実験を行う際には、飼育実験自体に様々なバイアスが入っていることを常に意識して、野外調査の結果と常に対比することが非常に重要である。野外調査と飼育実験を適正に併用して、野外個体群の繁殖特性値を高い精度で推定すること、および特性値の変動要因を特定しその影響を定量評価することは、資源変動機構の解明に必要な不可欠な課題である。

文 献

Andersen T.E., 2003: Unbiased stereological

estimation of cell numbers and volume fractions: the desector and the principles of point counting, in "Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of Warm- and Cold-Water Fish and Squids" (ed. by Kjesbu O.S., Hunter J.R., and Witthames P.R.) Institute of Marine Research, *Fisken og Havet*, **12**, 11-19.

Bromage N., Jones J., Randall C., Thrush M., Davies B., Springate J., Duston J., and Barker G., 1992: Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **100**, 141-166.

Dickerson T.L., Macewicz B., and Hunter J.R., 1992: Spawning frequency and batch fecundity of chub mackerel, *Scomber japonicus*, during 1985. *Cal. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep.*, **33**, 130-140.

Emerson L.S., Greer Walker M., and Witthames P.R., 1991: A stereological method for estimating fish fecundity. *J. Fish Biol.*, **36**, 721-730.

Goldberg S.R., Alarcon V.H., and Alheit J., 1984: Postovulatory follicle histology of the Pacific sardine, *Sardinops sagax*, from Peru. *Fish. Bull. U.S.*, **82**, 443-445.

Greer Walker M., Witthames P.R., and Bautista De Los Santos I., 1994: Is the fecundity of the Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*: Scombridae) determinate? *Sarsia*, **79**, 13-26.

羽生 功, 1991: 生殖周期, 「魚類生理学」(板沢靖男, 羽生 功編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.287-325.

広瀬慶二(編), 1991: 海産魚の産卵・成熟リズム(水産学シリーズ85), 恒星社厚生閣, 東京, pp.142.

Hugget J., Freon P., Mullon C., and Penven P., 2003: Modelling the transport success of anchovy *Engraulis encrasicolus* eggs and larvae in the southern Benguela: the effect of spatio-temporal spawning patterns. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **250**, 247-262.

Hunter J.R. and Goldberg S.R., 1980: Spawning incidence and batch fecundity in northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull. U.S.*, **77**, 641-652.

Hunter J.R. and Macewicz B.J., 1985: Rates of atresia in the ovary of captive and wild northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull. U.S.*, **83**, 119-136.

Kjesbu O.S., 1994: Time of start of spawning in

- Atlantic cod (*Gadus morhua*) females in relation to vitellogenic oocyte diameter, temperature, fish length and condition. *J. Fish Biol.* **45**, 719-735.
- Kjesbu O.S., Klungsoyr L., Kryvi H., Witthames P.R., and Greer Walker M., 1991: Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 2333-2343.
- Kjesbu O.S., Solemdal P., Bratland P., and Fonn M., 1996: Variation in annual egg production in individual captive Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**, 610-620.
- Kjesbu O.S., Witthames P.R., Solemdal P., and Greer Walker M., 1990: Ovulatory rhythm and a method to determine the stage of spawning in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **47**, 1185-1193.
- Kjesbu O.S., Witthames P.R., Solemdal P., and Greer Walker M., 1998: Temporal variations in the fecundity of Arcto-Norwegian cod (*Gadus morhua*) in response to natural changes in food and temperature. *J. Sea Res.* **40**, 303-321.
- 小林牧人, 足立伸次, 2002: 生殖, 「魚類生理学の基礎」(会田勝美編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.155-184.
- Kurita Y., Meier S., and Kjesbu O.S., 2003: Oocyte growth and fecundity regulation by atresia of Atlantic herring (*Clupea harengus*) in relation to body condition throughout the maturation cycle. *J. Sea Res.* **49**, 203-219.
- Kurita Y., 2006: Regional and interannual variations in spawning activity of Pacific saury, *Cololabis saira*, during northward migration in spring in the northwestern Pacific. *J. Fish Biol.*, in press.
- Lambert Y. and Dutil J.-D., 2000: Energetic consequences of reproduction in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning level of somatic energy reserves. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**, 815-825.
- Marza V.D., 1938: Histophysiologie de l'ovogenese. Hermann, Paris, 81 pp.
- Matsuyama M., Adachi S., Nagahama Y., and Matsuura S., 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.
- Morimoto H., 2003: Age and growth of Japanese sardine *Sardinops melanostictus* in Tosa Bay, south-western Japan during a period of declining stock size. *Fish. Sci.* **59**, 745-754.
- Murua H., Kraus G., Saborido-Rey F., Witthames P.R., Thorsen A., and Junquera S., 2003: Procedures to estimate fecundity of marine fish species in relation to their reproductive strategy. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.* **33**, 33-54.
- Picquelle S. and Stauffer G., 1985: Parameter estimation for an egg production method of northern anchovy biomass assessment, in "An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis mordax*" (ed. by Lasker R.), *NOAA Tech. Rep. NMFS* **36**, pp7-15.
- Priede I.G. and Watson J.J., 1993: An evaluation of the daily egg production method for estimating biomass of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Bull. Mar. Sci.* **53**, 891-911.
- Seikai T., Takeuchi T., and Park G.S., 1997: Comparison of growth, feed efficiency, and chemical composition of juvenile flounder fed live mysids and formula feed under laboratory conditions. *Fish. Sci.* **63**, 520-526.
- 清水昭男, 2006: 生殖生理に関する研究手法と水産重要魚種の再生産研究高度化への応用. 水研センター研報, 別冊第4号, 63-70.
- Shimizu A., Tanaka H., and Kagawa H., 2003: Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **132**, 35-45.
- 高野和則, 1989: 卵巣の構造と配偶子形成, 「水族繁殖学」(隆島史夫・羽生 功編), 緑書房, 東京, pp.1-34.
- Thorsen A. and Kjesbu O.S., 2001: A rapid method for estimation of oocyte size and potential fecundity in Atlantic cod using a computer-aided particle system. *J. Sea Res.* **46**, 295-308.
- 霧田義成, 1992: カタクチイワシの成熟・産卵と再生産力の調節に関する研究. 水工研報, **13**, 129-168.
- Wallace R. and Selman K., 1981: Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am.*

Zool., **21**: 325-343.

和田時夫, 1988: 道東海域におけるまき網対象マイワシ資源の来遊動態に関する研究. 北水研報, **52**, 1-138.

Ware D.M. and Tanasichuk R.W., 1989: Biological basis of maturation and spawning waves in Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Can. J.*

Fish. Aquat. Sci., **46**, 1776-1784.

Witthames P.R. and Greer Walker M., 1995: Determinacy of fecundity and oocyte atresia in sole (*Solea solea*) from the Channel, the North Sea and the Irish Sea. *Aquat. Living Resour.*, **8**, 91-109.