

メダカの繁殖条件に関する基礎的検討： 産卵行動における性比及び水温の役割

横 田 弘 文* 江 口 さやか**

Basic Study about the Breeding Condition in Medaka (*Oryzias latipes*):

Role of Sex Ratio and Water Temperature in the Spawning Behavior

YOKOTA Hirofumi* EGUCHI Sayaka**

Abstract

We studied the breeding conditions in medaka (*Oryzias latipes*), in order to establish a testing protocol for evaluating the reproductive toxicity of PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products). Medaka at about 60-day posthatch were cultured at groups with different sex ratios for 28 days, and the days of first spawning, duration of spawning, and fecundity of each group were investigated. It was found that medaka has the ability of reproduction at about 60-day posthatch under optimal environmental conditions, and the number of eggs per female increased with aging and reached its peak at around 160-day posthatch. When a few males lived with females in one aquarium, they often did not initiate mating behavior. Also, one male tended to mate up to three females at a time. Furthermore, in order to examine the effect of water temperature elevation on breeding in medaka, mating pairs (8 pairs/group) were cultured at 24°C or 28°C for 21 days, and the spawning activity was observed. All pairs which were cultured at 28°C spawned almost every day. On the other hand, one out of 8 pairs at 24°C did not spawn throughout the observation period, and the day of first spawning in another pair was extremely delayed, resulting in significant variability in the number of total eggs spawned by each pair. These results suggest that the pair-culture at 28°C is more appropriate for breeding of medaka.

キーワード：メダカ、繁殖、環境条件、生態毒性、試験法開発

Key words: Medaka, reproduction, environmental conditions, ecotoxicity,
development of testing methods

*本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科准教授

**本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科嘱託教学職員

連絡先：横田弘文 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
h-yokota@mail.kobe-c.ac.jp

1. 研究の背景及び目的

近年、医薬品や化粧品等のパーソナルケア製品 (Pharmaceutical and Personal Care Products; PPCPs) に含まれる化学物質が水環境中から検出され、水圏生態系への影響が懸念されている。PPCPs の中には様々な生理活性をもつ多種多様な物質があるが、中でも解熱鎮痛剤はその作用機序から水生生物、特に魚類の繁殖に影響を及ぼす可能性が示唆されている。しかしながら、PPCPs の影響を評価する試験法は未整備の状況であり、早急に試験法を開発し、解熱鎮痛剤を始めとする多種の PPCPs の生態毒性を評価していく必要がある¹⁾。

メダカ (*Oryzias latipes*) は我が国において化学物質の生態影響試験の奨励種となっており、工業化学物質や農薬の魚類に対する毒性を評価するために広く用いられている²⁾。しかし、その毒性試験法 (魚類急性毒性試験法) は単に化学物質の曝露による生死を判定するためのものであり、PPCPs のような極微量で生理活性を示す化学物質がメダカの繁殖にどのような影響を引き起こすかは評価できない。そこで、筆者らは PPCPs の生態毒性評価のためのメダカ繁殖試験法を開発する第一段階として、メダカの繁殖条件に関する基礎検討を実施した。

実験室内でのメダカは、至適環境条件下 (例えば水温25℃、光周期16時間明：8時間暗) であれば通常毎日繁殖し、産卵が観察される。一方で、雌雄各1尾をペアにすればすべてのペアで産卵がみられるというわけではなく、繁殖には雌雄の相性がある程度関与すると考えられている³⁾。また、メダカにおけるオスの性行動は、しばしばメスの好みにより受け入れられない場合があることも知られている⁴⁾。従って、このような問題を解決するには単ペアによる飼育でなく、同一水槽内に複数の雌雄を用いて飼育する方法も考えられるが、メダカの場合、複数のオスを入れて飼育するとオス間に闘争行動が起こり、それが繁殖行動へ影響を及ぼすことも報告されている。武内・真鍋⁵⁾はメダカの雌雄比を1：1、1：2、1：3、2：1そして3：1の5グループに分け、各グループの性行動を観察した結果、複数のオスと単数のメスのグループでは、オス同士の間でメスの争奪行動が起こることを報告している。同様に Grant *et al.*⁶⁾もメダカの性行動に関する実験で、雌雄比が1：1のグループよりも雌雄比が1：3のグループの方が、オスが繁殖に成功する割合のばらつきが大きくなり、また同時に、オス間の闘争行動が増加することを観察している。このように、メダカの繁殖行動における最適な雌雄比は現時点で明らかでなく、繁殖における産卵数のばらつきを少なくし、化学物質の曝露による産卵数減少を高精度に検出する試験法を確立する上においては、様々な雌雄比を用いて検証するほかない。本研究では、メダカを種々の雌雄比のグループで飼育し、その産卵開始日、1尾当たりの産卵数及び産卵継続期間について調査した。

メダカの繁殖に影響を及ぼす要因には、他に水温や日長といった環境条件も挙げられる。Koger *et al.*⁷⁾は水温を25℃の一定条件下で日長を16時間から8時間に減少させた場合と、日長を16時間の一定とし、水温を25℃から15℃に低下させた場合とのいずれにおいても産卵が休止し、メスの卵巣における卵形成が停止することを報告している。一般にメダカを用いた毒性試

験での環境条件としては光周期16時間明：8時間暗、水温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ が採用されており²⁾、この日長及び水温は繁殖に不適切ではないと思われる。しかしながら、野生のメダカを考えた場合、通常の繁殖期は4月から9月までの春～夏型であり⁸⁾、一般に長日型の魚の性成熟開始には日長よりも水温上昇が重要であるといわれている。よって、毒性試験の試験生物としてふ化直後から常に 24°C の一定水温で飼育され、暴露も水温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ で行われた場合、繁殖開始期における温度刺激を受けない状態であり、このことが産卵数のばらつきや産卵しないペアを生じさせている可能性が考えられる。また、野外で飼育されているメダカの繁殖最盛期である夏季の棲息水温はおそらく 25°C 以上と予想され、 24°C という試験水温はメダカの繁殖にとってまだ低く、最適ではないとも考えられる。Hirshfield⁹⁾はペアのメダカを 25°C 、 27°C 及び 29°C の異なる水温で飼育した場合、飼育水温の上昇と共にペア毎の産卵数は増加したことを報告している。よって、本研究では繁殖期における水温上昇の効果と繁殖に適切な水温を明らかにするため、ふ化後一定水温 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) で飼育された約60日令のメダカをペアリングし、そのままの水温で飼育したペアと、ペアリング直後に飼育水温を 28°C に上昇させて飼育したペアとの産卵数を21日間観察した。

2. 実験材料及び方法

2.1 実験生物

メダカは実験室内の一定環境条件（光周期；16時間明：8時間暗、水温； $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）で、受精卵からふ化後約60日令まで飼育した個体を用いた。すなわち、継代飼育されたメダカから受精卵を採取し、付着糸を取り除いた後に1.8L容円筒型ガラス容器（直径；15.0cm、深さ；17.5cm）へ移し、ふ化するまで培養した。培養期間中は脱塩素水道水を通水し、卵が密集しないように軽くエアレーションを行った。ふ化仔魚は10L容角型ガラス水槽へ移し、脱塩素水道水の流水条件下で飼育した。ふ化個体には1日に2回、ふ化後24時間以内のアルテミア幼生（*Artemia salina*）を与えた。ふ化個体はその後成長に応じて30L容水槽あるいは50L容水槽で飼育した。ふ化後約60日令の時点で、約250尾のメダカの二次性徴を観察し、その中から雌雄それぞれ必要な数を選別した。なお、選別した時点（ふ化後約60日令）では、雌メダカに継続した産卵は観察されなかった。

2.2 実験条件

2.2.1 雌雄比及び繁殖期間に関する検討

雌雄比についての検討はオス：メスの数が1：3、1：4、2：2、2：3、3：2及び3：1の比で実施した。選別したメダカを各雌雄比当たり4つのグループが設けられるように群分けした。群分けしたグループはそれぞれ1.8L容円筒形ガラス水槽（直径；15.0cm、深さ；17.5cm）に移し、脱塩素水道水の流水条件下で飼育した。飼育期間中は水温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、16時間明：8時間暗の光周期とした。水槽内の飼育水の換水率は1日12回とした。各個体には1日に2回の頻度で、ふ化後24時間以内のアルテミア幼生を十分な量（給餌1時間後若干のアルテミアが残る程度）与えた。飼育開始から28日間、毎日各グループの産卵数を計数した。その間に定期

的な産卵が確認されたグループ（オス：メスが1：3と1：4のグループ）については、さらに各供試魚のふ化後180日令までの120日間産卵数を毎日計数し、産卵が最大に達するふ化後日令及び産卵継続期間について調べた。

2.2.2 飼育水温に関する検討

選別したメダカはつがいにし、水温24℃で飼育する群と28℃で飼育する群それぞれ8ペアを設けた。各ペアを1.8L容円筒形ガラス水槽（直径；15.0cm、深さ；17.5cm）に移し、脱塩素水道水の流水条件下で21日間飼育した。水温はサーモミNDERにより調節し、28℃で飼育する群はペアリング後、約0.5℃／時間の割合で昇温した。飼育期間中の水温はそれぞれの設定温度に対して±1℃に維持し、光周期は16時間明：8時間暗、水槽内の飼育水の換水率は約1日12回とした。各個体には1日に2回、アルテミアのふ化幼生を飽食量与えた。飼育期間中は、毎日各グループの産卵数を計数した。

3. 結果

3.1 雌雄比及び繁殖期間に関する検討

3.1.1 最初の産卵が観察された日令

飼育水槽内にオスが1個体しかいない群（オス：メスが1：3及び1：4の群）では、それぞれ飼育を開始して4日後及び14日後に最初の産卵が観察された（Table 1）。しかし、複数のオスがいる群では、オス3：メス2の群を除き飼育開始から14日目までに産卵は観察されなかった（Table 1）。そして、飼育開始から28日目までに、オス：メスが1：3の群は4グループのすべてが産卵を開始し、オス：メスが1：4のグループでも4グループ中3グループで産卵がみられた。しかしながら、14日目までの結果と同様にオスが複数存在する群での産卵は、オス3：メス2の群の1グループ以外に観察されなかった（Table 2）。

Table 1. Days of first spawning in female medaka at groups with various sex ratios

Group Male: female	Days after	
	the initiation of breeding	hatching
1 : 3	4	64
1 : 4	14	74
2 : 3	—	—
2 : 2	—	—
3 : 2	13	73
3 : 1	—	—

— : No spawning

Table 2. Number of aquaria in which egg production was observed until 28-day after the initiation of breeding

Group Male: female	Number of aquaria (Percent)
1 : 3	4 (100)
1 : 4	3 (75)
2 : 3	0 (0)
2 : 2	0 (0)
3 : 2	1 (25)
3 : 1	0 (0)

3.1.2 産卵数の経日変化

産卵が継続して確認されたオス：メスが1：3及び1：4の2つの群について飼育開始120日後（ふ化後約180日令）までの産卵数を調査した結果、両群ともに飼育日数が経過するにつれて産卵数は徐々に増加していった（Fig. 1）。そして、産卵数が最も多かったのは飼育開始約100日後（ふ化後約160日令）付近であり、その後は徐々に減少していった。また、1水槽当たりの産卵数は概ねオス1：メス4の群に比べてオス1：メス3の群の方が多かった（Fig. 1）。

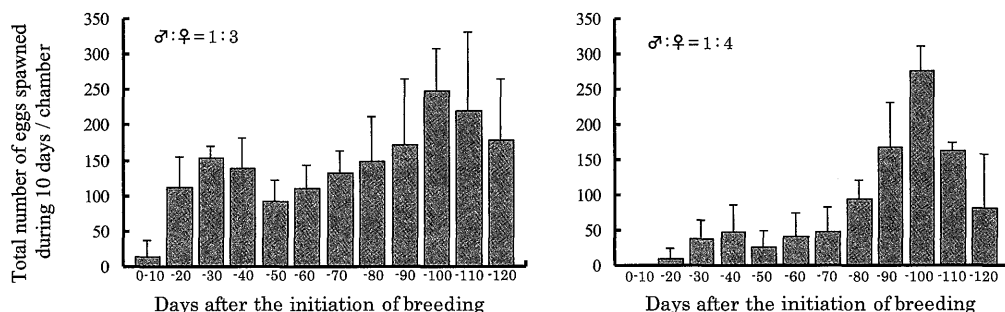


Figure 1. Mean number of eggs spawned every 10 days per chamber throughout the breeding period. The error bars represent the standard deviation of the mean ($N=4$).

3.2 飼育水温に関する検討

28℃で飼育したペアの産卵は、飼育開始から8日目までにすべてのペアで確認され、その後は調査終了日まで毎日観察された。一方、24℃で飼育した群では8ペア中6ペアが飼育開始から8日目までに産卵を開始したが、残り2ペアの内1ペア（Fig. 2, No. 3）の産卵開始日は13日目と遅れ、1ペア（Fig. 2, No. 8）は観察期間を通じて全く産卵しなかった。

各ペアにおける21日間の総産卵数は、24℃飼育群での平均総産卵数が317個、その標準偏差は173であったのに対して、28℃飼育群での平均総産卵数は416個、標準偏差は65であった。

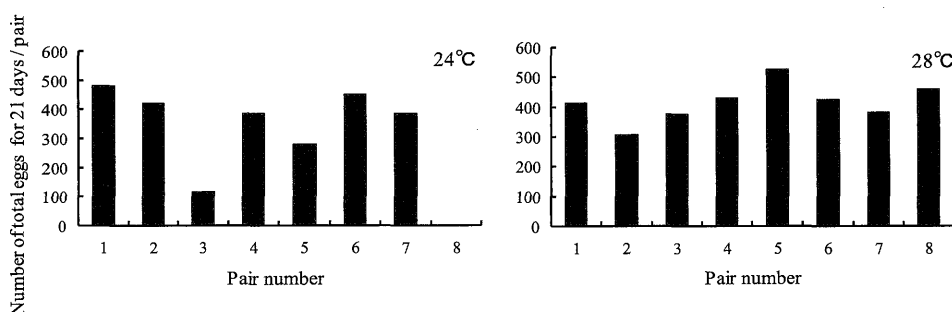


Figure 2. The effect of temperature on the fecundity of each medaka pair during 21-day spawning.

4. 考察

4.1 雌雄比及び繁殖期間に関する検討

本研究結果は、同一水槽内に複数のオスが存在することが、メダカの繁殖に影響を及ぼすことを改めて示した。前述のように、メダカの性行動におけるオス間の闘争行動は既に報告され

ており^{5,6)}、本研究で複数のオスが存在したグループにおいて産卵がみられなかった現象は、おそらく水槽内でのオス間のメスの奪い合いあるいは闘争行動が原因と推測される。一般に魚類の配偶様式は、一夫一妻 (monogamy)、一夫多妻 (polygyny)、一妻多夫 (polyandry)、乱婚 (promiscuity) に区分されることが多い¹⁰⁾。この点メダカについては十分明らかでないが、本研究における結果及び既知見から判断すると、Grant *et al.*⁶⁾が提案しているように基本的に一夫多妻であり、複数のオスが存在するとメスの奪い合いが起こる “scramble-competition polygyny” と考えられる。もちろん収容密度が高くなればオスのなわばりの消失等が起こり、雌雄比に関わらず性行動が営まれる可能性も考えられ、さらに雌雄比以外の種々の要因が複雑に関連するものと推測される。従って、広い意味でのメダカの繁殖様式を解明するには、種々の条件下での比較調査を行い、総合的に解釈する必要があるだろう。しかしながら、今回実施した繁殖についての検討は、通常行われているメダカを用いた毒性試験と同様の環境条件下で行っており、試験法開発における繁殖条件を調査することを目的とする限りでは、有益な結果が得られた。そして、その結果から少なくとも一般的なメダカの暴露試験に用いられる水槽（数L容ガラス水槽）並びに収容密度（魚体重量1.0g 当たり飼育水1 L 以下）においては、オスの数は1尾のみが適切であると判断された。

次に、オス1尾に対するメスの数に関しても本検討から有用な知見が得られた。本実験におけるオス1：メス3のグループとオス1：メス4のグループとの産卵数を比較した場合、飼育期間を通じてオス1：メス3のグループの方が多産であった。また、1度に産卵が観察されたメスの尾数は、両グループ共に3尾がほとんどであり、オス1：メス4のグループではメス4尾共が産卵することはなかった。この結果から、オスが1度に性行動し、放精できる能力はメス3尾までが限度であることが示唆された。従って、繁殖に適した雌雄比としては収容密度に関係なくオス1：メス3までが至適であると判断された。しかし一方、メダカの産卵数に関しては群居密度の影響が知られており、概して群居密度が増大するにつれ、メス1尾当たりの平均産卵数は低下する傾向にあると報告されている¹¹⁾。従って、本研究において観察されたオス1：メス4のグループとオス1：メス3のグループとの多産性の相違は、収容密度が要因である可能性も推測された。例えば、より大型の飼育水槽を用いることで本実験におけるオス1：メス4のグループの収容密度を下げた場合、一度に産卵するメスの数は変わらないが、メス1尾が産む卵の数が増加することも考えられる。以上のことから、実際の曝露条件下において最適な繁殖を維持するには、特にオス1尾に対してメスは3尾以下にすることが適切であると判断されたが、その収容密度に関してはオス1：メス1のペアも含めて今後より詳細に検討していく必要がある。

また、試験法を開発する上でのもう1つの課題は、繁殖に関する影響を調査する時期及び期間である。メダカがふ化後成熟し、繁殖を開始するまでの日数は、当然の事ながら飼育環境条件により大きく異なることが知られている。DeKoven *et al.*¹²⁾は餌料の違いがメダカの成長や繁殖等に及ぼす影響を調査し、ふ化後から市販の配合飼料を給餌した群はアルテミアの幼生を給餌した群に比べて成長が劣り、その結果、成熟遅延が起こることを報告している。また、メダカが繁殖を開始するには、20℃以上の水温⁷⁾及び11～12時間以上の照明¹³⁾が必要であること

も明らかとなっている。本研究ではメダカにとって最適な条件（水温；24℃、光周期；16時間明：8時間暗、餌料；アルテミアのふ化幼生）で飼育した。その結果、オス1：メス3のグループでは、飼育を開始してから数日以内（少なくともふ化後70日以内）に産卵が観察されたことから、受精卵から最適な環境条件で飼育したメダカはふ化後60日令ですでに生殖能力を備えていること、最適な雌雄比であれば産卵を開始することが明らかとなった。さらに、一定の環境条件下では飼育開始約100日後（ふ化後約160日令）付近が産卵の極大であり、その後は徐々に減少していくことも判明した。Egami³⁾の報告によれば、メダカのメス1尾が毎日継続して産卵する日数は最大でも約80日間であり、1回の繁殖期を通じて産卵する総数は平均1,000から2,000個であった。この実験では水温及び光周期等は自然条件下で行っているため、本研究結果と一概に比較はできないが、メスの産卵継続期間についてはほぼ一致しており、メダカのメスが1回の繁殖期を通して抱卵する卵数には、ある一定の限度が存在するのかも知れない。これらのことから、メダカを用いた毒性試験において繁殖への影響を調査する時期は、産卵が観察され始めるふ化後約60日令から産卵のピークを迎える前のふ化後約160日令までのある一定期間が適切であると考えられた。

4.2 飼育水温に関する検討

本研究結果は飼育水温がメダカの産卵に関して影響を及ぼすことを改めて示した。本研究で観察された飼育水温によるメダカの産卵への影響の1つは、1ペア当たりの産卵数であり、21日間の総産卵数の平均値について比較した場合では、28℃飼育群の方が24℃飼育群に比べておよそ100個多かった。Hirshfield⁹⁾はつがいにしたメダカの産卵数は飼育水温の上昇と共に増加することを報告しており、本実験結果はこれを支持するものであった。Koger *et al.*⁷⁾はメダカの生殖腺の発達に及ぼす飼育水温の影響を調べた結果、オスの精巣の発達は水温の影響を受けないが、メスの卵巣は水温の低下と共に閉鎖した多数の卵が多数観察され、これが産卵休止の原因であると推測している。メダカの卵巣の発達は温度依存であり、水温が高いほど卵巣重量が増加することが既に知られている⁸⁾。本研究で観察された28℃飼育群の多産性は、おそらく24℃の飼育水温から28℃への水温上昇により、メス卵巣がより発達したことによるものではないかと考えられた。従って、毒性試験において産卵への影響を評価する場合、正常個体の産卵数がより多いほど曝露個体との差を検出しやすいため、繁殖期における飼育水温は24℃よりも28℃が適切であるといえる。今回は28℃以上の水温での実験は行っておらず、正確な最適水温域については今後調査する必要があるが、28℃以上での飼育は飼育水中での微生物の増殖をより促進し、その結果被験物質の分解を早める恐れもある。また、水温維持に係る費用も増し、試験コストも上昇するため、化学物質の毒性試験法としての適用性を考えた場合、あまり極端な高水温は現実的でない。

本研究で観察されたもう1つの顕著な影響は、産卵開始時期及びそれに関連した群内におけるペア毎の産卵数の変動であった。28℃飼育群では8ペアすべてが飼育開始8日目までに産卵を開始したのに対して、24℃飼育群では産卵開始が遅延したペアや全く産卵しないペアが出現し、ペア毎の産卵数のばらつきを生じさせる要因となった。この産卵しないペアの出現は、

Egami³⁾の実験でも観察されており、これはペア間の相性、つまりメスがオスを受け入れるか否かが要因であるといわれている⁴⁾。本研究での28℃飼育群の少なくとも8ペアにおいては、すべて産卵したことから雌雄の相性に関する問題はみられなかった。これは飼育水温上昇による温度刺激が何らかの作用によってペアの相性の問題を生じさせなかったのか、また、その場合はどのような作用機序が関与しているのかについては全く不明であり、今後対象ペア数を増やして再検証していく必要があるが、28℃飼育群のペアの産卵数は大きく変動しておらず、前述した24℃飼育群に比べて多産であったことと合わせて考えると、飼育水温としては28℃へ昇温することが適しているといえる。

5. まとめ

メダカの繁殖における最適な雌雄比及び産卵継続期間を調査するため、ふ化後約60日令のメダカをオス：メスの尾数比が1：3、1：4、2：2、2：3、3：2及び3：1となるように群分けし、毒性試験と同様の環境条件下で28日間飼育した。その結果、メダカを受精卵から至適環境条件下で飼育した場合、1) ふ化後約60日令で繁殖能力が備わっており、メス1尾当たりの産卵数は日令とともに増えて行き、その最盛期はふ化後160日令付近であること、また、2) 同一水槽内に複数のオスが存在すると繁殖行動をとらない場合が多いこと、さらに、3) オスが一度に交尾できるメスの数は3尾までである可能性が高いことが明らかとなった。

さらに、メダカの繁殖における適切な飼育水温を調査するため、受精卵から24±1℃の一定水温で飼育されていたふ化後約60日令のメダカをつがいにし(8ペア/群)、継続して24±1℃の水温で飼育する群と、ペアリングした日に28±1℃へ昇温し、飼育する群とを設け、21日間産卵数を調査した。その結果、28℃で飼育した群はすべてのペアで継続した産卵が観察されたが、24℃で飼育した群では全く産卵しないペアが1ペア観察され、また、産卵数が他ペアに比べて非常に少ないペアも1ペア存在した。従って、水温28℃への昇温飼育の方がペア毎の産卵数のばらつきが少なく、メダカの繁殖において適切であることが示唆された。

参考文献

- 1) 木村博承. 環境中 PPCPs の生態影響への懸念についての現状と課題、日本環境化学会講演会予稿集 2009 ; 48 : 1-2.
- 2) 若林明子. 「化学物質と生態毒性 改訂版」丸善. 2003 ; 36-37.
- 3) Egami, N. Record of the number of eggs obtained from a single pair of *Oryzias latipes* kept in laboratory aquarium. *J. Fac. Sci. Tokyo Univ.* 1959 ; 8 : 521-538.
- 4) 岩松鷹司. 「メダカ学」サイエンティスト社. 1993 ; 291-294.
- 5) 武内哲郎・真鍋恵美. メダカ *Oryzias latipes* の性行動と個体間における生殖行動順位の計数的解析について、就実論業 1990 ; 20 : 1-32.
- 6) Grant, J.W.A., Bryant, M.J., Soon, C.E. Operational sex ratio, mediated by synchrony of female arrival, alters the variance of male mating success in Japanese medaka. *Anim. Behav.* 1995 ; 49 : 367-375.
- 7) Koger, C.S., Teh, S.J., Hinton, D.E. Variations of light and temperature regimes and resulting effects on reproductive parameters in medaka (*Oryzias latipes*). *Biol. Reprod.* 1999 ; 61 : 1287-1293.
- 8) 岩松鷹司. 「メダカ学」サイエンティスト社. 1993 ; 146.
- 9) Hirshfield, M. F. An experimental analysis of reproductive effort and cost in the Japanese medaka,

Oryzias latipes. *Ecology* 1980 ; 61 : 282-292.

- 10) 桑村哲生. 「1. 魚類の繁殖戦略入門」、魚類の繁殖戦略 1 (桑村哲生・中嶋康裕共編)海游舎. 1996 ; 26.
- 11) 川尻 稔. ヒメダカの繁殖率に及ぼす群居密度の影響、日本水産学会誌、1948 ; 15 : 166-172.
- 12) DeKoven, D.L., Núñez, J.M., Lester, S.M., Conklin, D.E., Marty, G.D., Parker, L.M., Hinton, D.E. A purified diet for medaka (*Oryzias latipes*): Refining a fish model for toxicological research. *Lab. Anim. Sci.* 1992 ; 42 : 180-189.
- 13) Yoshioka, H. On the effects of environmental factors upon the reproduction of fishes : I . Effects of short and long day-lengths on *Oryzias latipes* during spawning season. *Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ.* 1963 ; 14 : 137-151.

(原稿受理 2011年2月18日)