



Title	人工光周期下におけるメダカの生殖日周期
Author(s)	高野, 和則; TAKANO, Kazunori; 春日, 清一 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 24(3), 91-99
Issue Date	1974-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23495">https://hdl.handle.net/2115/23495</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	24(3)_P91-99.pdf



人工光周期下におけるメダカの生殖日周期

高野 和則\*・春日 清一\*・佐藤 茂\*\*

Daily Reproductive Cycle of the Medaka, *Oryzias latipes*  
under Artificial Photoperiod

Kazunori TAKANO\*, Seiichi KASUGA\* and Shigeru SATO\*\*

Abstract

A daily reproductive cycle of the medaka, *Oryzias latipes* under constant temperature ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and artificially controlled light conditions (12 hr light, 12 hr dark) was examined.

1. Female fish, which had been reared with a male, each in a compartment of glass aquaria, under natural daylight conditions or artificial light cycle (6.00 a.m. to 20.00 p.m.), was exposed to a phase-shifted light cycle. Under new photoperiods whose lighting phases were turned on at 8.00 a.m., 12.00 a.m., and 20.00 p.m. respectively, the fish adapted to the new conditions gradually and spawning of nearly 90 per cent individuals was confined to the first one hour of the light period on 7th day.

2. In the ovary of the fish obtained immediately after lighting, the most advanced oocyte group, except ovulated eggs, was ascertained histologically to be in the early phase of tertiary yolk stage. Between 4 hours and 12 hours after lighting, these oocytes grew with active accumulation of yolk globules. Oocytes in the pre-maturation and maturation stages could be found in the ovaries examined 16 hours and 20 hours after lighting respectively. A number of oocytes began to be isolated from ones at secondary yolk stage 4 hours after lighting, and gradually became a distinct group of oocytes.

3. Ovulation began to take place about two hours before lighting.

4. During the course of oocyte development, the chorion which surrounded the oocyte gradually increased in thickness. Twelve hours after lighting, the chorion showed a maximum thickness, and then decreased in thickness. The thickness of chorion could be employed as an useful index to identify the oocyte group.

緒 言

繁殖期のメダカの雌は、自然条件下でほとんど毎朝、規則的に産卵する。このようなメダカの産卵周期は光の日周期性によって支配されており、従って人為的に光周期を変えることによって、この産卵周期も変えられることが実験的に明らかにされている<sup>1)2)</sup>。一方、自然条件下で飼われたメダカでは、その卵巣卵が24時間周期でかなり明瞭な卵群発達のリズムを見せることが知られている<sup>3)</sup>。これに対して人工光周期に順応した魚では、卵巣卵の発達、排卵、産卵など一連の生殖現象がどのような周期性を示すかについての知見は必ずしも十分とはいえない。

\* 北海道大学水産学部淡水増殖学講座

(Laboratory of Fresh-Water Fish-Culture, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

\*\* 神奈川県水産試験場

(Kanagawa Prefectural Fisheries Experimental Station, Sagami-hara)

この報告では、魚類の生殖機構、特にその周期性を解明するための実験モデルとして、メダカを用いる場合に必要な基礎的知見を得ることを目的として、一定水温の人工光周期に順応した本種の生殖日周期について観察した結果を述べる。

稿を進めるに先立って、原稿の御校閲と御助言を賜った北海道大学山本喜一郎教授に深謝する。

### 材 料 お よ び 方 法

実験には函館市湯の川で採集した野生メダカ *Oryzias latipes* を用いた。材料魚は10月初旬までは屋外池で飼育し、実験開始に先立って自然光下、水温約25°Cの水槽へ移した。10月中旬以降は、予め材料魚の産卵を誘発するために、水温約25°C、6.00時から20.00時を明期とする人工光下でメダカを飼育した。実験はすべて暗室で行った。人工光源として、水面上約70cmに適当な間隔で設置した100W白熱電球を用いて12時間明期、12時間暗期の光周期を保ち、水温は $25\pm 1^\circ\text{C}$ と一定にした。底面濾過式の循環水槽を1分画14×27×20cmに網で仕切り、それぞれ雌雄1対のメダカを收容した。実験開始前に、予めこれらの雌が毎日産卵していることを確認した。

人工光周期に順応したメダカの卵巣の発達リズムを組織学的に調べるために、明期開始時から4時間間隔で無作為に雌を3個体づつ殺し、卵巣をブアン液で固定した。標本は通常パラフィン法で10 $\mu$ の切片とした後、デラフィロド・ヘマトキシリンとエオシンの2重染色を施して観察に供した。

### 結 果

#### 人工光周期下におけるメダカの産卵

明期、暗期各12時間の人工光周期に、自然条件または明期開始時の異なる人工光周期下で飼育されていたメダカを移した場合の産卵時刻の推移を見るために、以下の観察を行った。

- 1) 自然条件下から8.00時明期開始の光周期下に移した場合
- 2) 自然条件または6.00時明期開始の光周期下から12.00時明期開始に移した場合
- 3) 6.00時明期開始の光周期下から20.00時明期開始に移した場合

その結果、1)では実験に用いた20対中、明期開始後に産卵した個体は1日目に僅か35%であったが、以後次第にその数を増し、6日目以降は全ての対が点灯後に産卵行動をとるようになった。これとは逆に、明期の間に産卵が確認出来なかった個体および暗期中にすでに産卵を終えていた個体は、5日目まで次第にその数を減じ、6日目には全く見られなくなった。2)では自然条件下から移した10対のうち、新しい光周期の開始後1日目には、明期に入ってから産卵した雌は50%であったが、以後順次その数を増して5日目には100%となった。6日目からはその数が幾分減じたが、暗期の間に産卵した個体は認められなかった。一方、6.00時明期開始の光周期から移した14対もほぼ同様の経過をたどり、5日目にはほとんどの対が点灯後に産卵行動をとるようになった。3)では6.00時明期開始の光周期下で飼育されていた7対は、新しい光周期の下で4日目まで暗期に産卵をする雌が見られたが、5日目からは非産卵個体を除く全ての雌が明期開始後に産卵するようになった。

以上のように、それぞれ明期開始時の異なる3例の何れにおいても、メダカはほぼ同様な順応経過を示し、その産卵時刻を新しい明期開始時に同調させるようになった。図-1にこれらの観察結果を総括して示した。この図からも明らかのように、産卵を確認出来なかった雌は日を追って減少し、7日目では僅かに51個体中2個体のみとなった。一方、暗期の間にすでに産卵していた個体は、3日目を最高にして以後減少し、7日目には全く見られなくなった。また、1,2日目に見られた明期開始後の産卵時刻の分散も、経目的に点灯直後に集中するようになり、7日目には約90%の個体が明期開始後1時間以内に産卵行動をとるようになった。

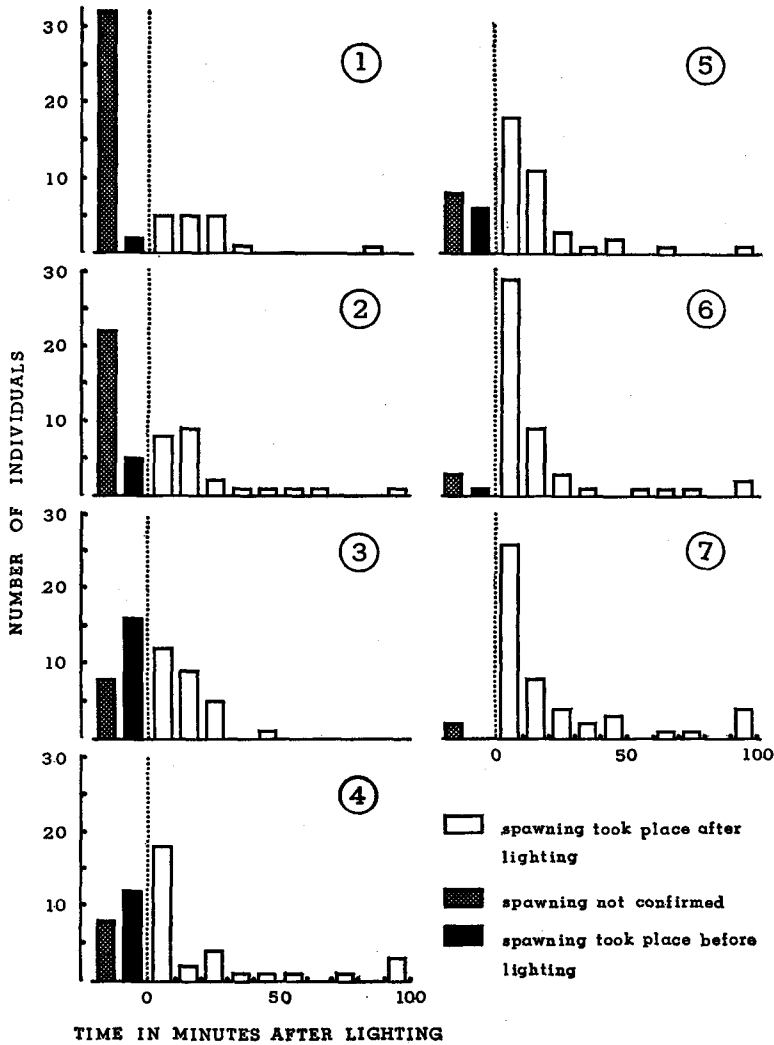


Fig. 1. Changes in the spawning time of fish shifted to new artificial photoperiod. Numerals in circles show days after the beginning of the new light cycle.

#### 人工光周期下における卵巣卵の発達リズム

人工光周期に産卵時刻を同調させたメダカの卵巣卵発達リズムを知るために、9.00時に明期が始まる、明期、暗期各12時間の光周期下で魚を飼育し、明期開始時から4時間間隔でその卵巣卵組成を組織学的に調べた。卵形成過程の組織学的区分は Yamamoto & Yoshioka<sup>4)</sup> に準じて行ったが、同一卵黄期に属しながらその発達度から2群に識別される場合には、これを便宜的に2期に細分して示した。また、胚胞の形態的特徴に基いて前成熟期と成熟期を区分した。このようにして24時間周期の間に採取した12個体について、第1次卵黄期から完熟卵に至る全卵巣卵の組成を調べた結果が表-1である。

Table 1. Changes of stage composition

Time after lighting	Total no. of oocytes examined	Primary yolk stage	Secondary yolk stage	
			Early	Late
4 hrs	80	39	21	
	216	130	45	
8	309	179	51	32
	251	121	52	19
12	261	137	58	25
	315	162	60	40
16	230	141	51	34
	259	138	43	35
20	170	80	34	11
	210	103	49	
24(0)	254	129	49	
	263	150	37	

0時間: 前回の産卵後約24時間を経たもので、卵巣腔には排卵された完熟卵を有し、外的条件を整えば直ちに産卵し得る状態にある。完熟卵を除いて最も発達した卵母細胞は第3次卵黄期の初期にある。核は卵門付近に位置し、鋸歯状の輪郭を有する。仁は核膜近くにあつてヘマトキシリンに濃染する。卵黄は中央に一塊をなし、油球はこの卵黄塊の周辺に位置するようになる。これに次ぐ卵群は典型的な第2次卵黄期にあり、核はやゝ卵門寄りに位置している(図2-A)。

4時間: すでに産卵を終っており、第1群の卵巣卵は第3次卵黄期、第2群は第2次卵黄期で、0時間のものと大きな差は認められない(図2-B)。

8時間: 第1群の卵巣卵では、卵黄蓄積が急速に進んで中央の卵黄塊は更に大きくなり、油球の多くは卵黄塊の周辺に並ぶ。卵黄塊をとり囲む細胞質中には、まだ多くの不規則な形状の卵黄小塊が散在し、卵黄形成がなお活潑に進行していることを示唆している。核は卵門近傍にあつて、扁平で不規則な輪郭を有している。第2卵群はまだ第2次卵黄期にあるが、一部の個体ではその卵膜からも識別されるように、2群に分離し始めている(図2-C)。

12時間: 早いものでは第1卵群は第3次卵黄期の末期、つまり卵黄蓄積を終了する段階に達している。核はほとんど動物極の卵膜に接して存在している。この時期になると、次の卵群を構成していた第2次卵黄期の卵の一部が成長し、ほぼ独立した第2卵群として認められるようになる(図2-D)。

16時間: 第1卵群は前成熟期に入っている。すなわち、核膜は次第に不明瞭となり、卵門付近の細胞質がエオシンに好染する微小顆粒状を呈することで核の位置が判別出来る。仁は解体しつつある(図2-F, G)。卵黄蓄積はほとんど完了しており、完全に1個の塊状をなし、周辺細胞質中には球形の微小顆粒を僅かに残すのみとなる。第2卵群はこの時期に更に明瞭となり、卵黄の蓄積量と卵膜の厚さからも第3群とは明らかに識別される(図2-E)。

20時間: 第1卵群は成熟期に達している。しばしばその卵門付近の表層細胞質中に、成熟分裂中期の像が認められる(図2-I, J)。第2卵群はすでに第2次卵黄期から第3次卵黄期に進んでいる(図2-H)。

#### 人工光周期下における排卵時間

前述の明期開始時を異にする実験条件下で、合計34個体の雌について排卵時間を調べた。明期開始時からさかのぼって1時間ごとに雌をとり上げ、腹部を切開して肉眼的に排卵の有無を確かめた。その結果は表-2に示す通りで、点灯4および3時間前には排卵個体が全く見られず、2時間前に初めて11

*in ovarian eggs during a daily cycle.*

Tertiary yolk stage		Pre-maturation stage	Maturation stage	Ripe egg stage	No. of eggs at preceding oviposition
Early	Late				
20	53	54 43	45 31	28 41	47
41					30
47					49
59					49
41					59
					56
					17
					42
27					47
48					29
35	33				
	27				

Table 2. *Time of ovulation during a daily cycle under artificial photoperiod.*

Hours before lighting	Number of fish used	Number of fish	
		ovulated	unovulated
4	12	0	12
3	5	0	5
2	11	3	8
1	3	2	1
0	3	3	0

個体中3個体で排卵が起っていることが確かめられた。また、点灯直前には3個体の全てが排卵を完了していた。

#### 卵巣卵の発達と卵膜の変化

24時間人工光周期下での卵巣卵の発達に伴って、卵径の増大と共に卵膜の厚さが顕著な変化を見せる。図-3は先の卵巣卵組成を調べた各個体から、無作為に選んだ80~315個の大形卵について卵膜の厚さを計測し、これを経時的に表したものである。図から明らかなように、明期開始後4時間から8時間に第1卵群の卵膜は顕著にその厚さを増して12時間で最大となり、22 $\mu$ 前後に達する。その後卵膜はむしろ厚さを減じる傾向を示し、排卵された卵では16 $\mu$ 前後となる。また、8時間後に見られた第2卵群の分離は、卵膜の厚さからもその傾向がうかがわれ、その後これらの卵群の独立と発達の経過とよく一致した変化を示している。このように、卵膜の厚さは卵群を識別する上でよい指標となる。

#### 考 察

自然条件下で、メダカの雌はほとんど毎日1.00時~4.00時に排卵し、4.00時~7.00時に産卵することが知られている<sup>3)</sup>。Robinson & Rugh<sup>2)</sup>は、このような魚を昼夜逆転した人工光周期下におくと、これに伴って産卵時刻が変ることを報告している。さらにEgami<sup>1)</sup>はメダカの産卵に及ぼす人工

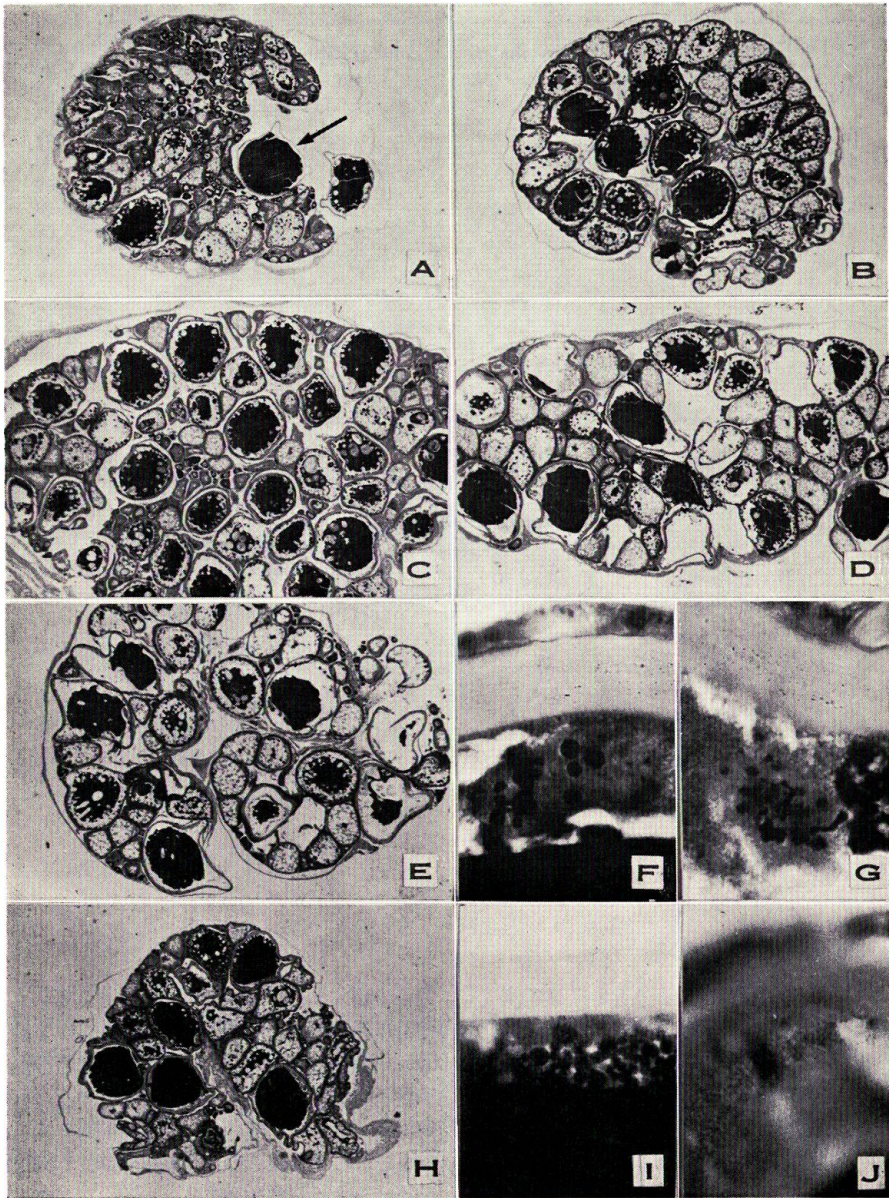


Fig. 2. Parts of the ovaries of examined fish. A, the ovary of fish immediately after lighting (0 hour), containing ovulated eggs (arrow) in the lumen; B, the ovary of the fish 4 hours after lighting; C, the ovary of the fish 8 hours after lighting; D, the ovary of the fish 12 hours after lighting; E, the ovary of the fish 16 hours after lighting; F and G, nuclei in the pre-maturation stage oocytes, from the same preparation as E; H, the ovary of the fish 20 hours after lighting; I and J, figures of maturation division in metaphase, from the same preparation as H. Figs. A, B, C, D, E, and H,  $\times 12$ ; F, G, I, and J,  $\times 565$ .

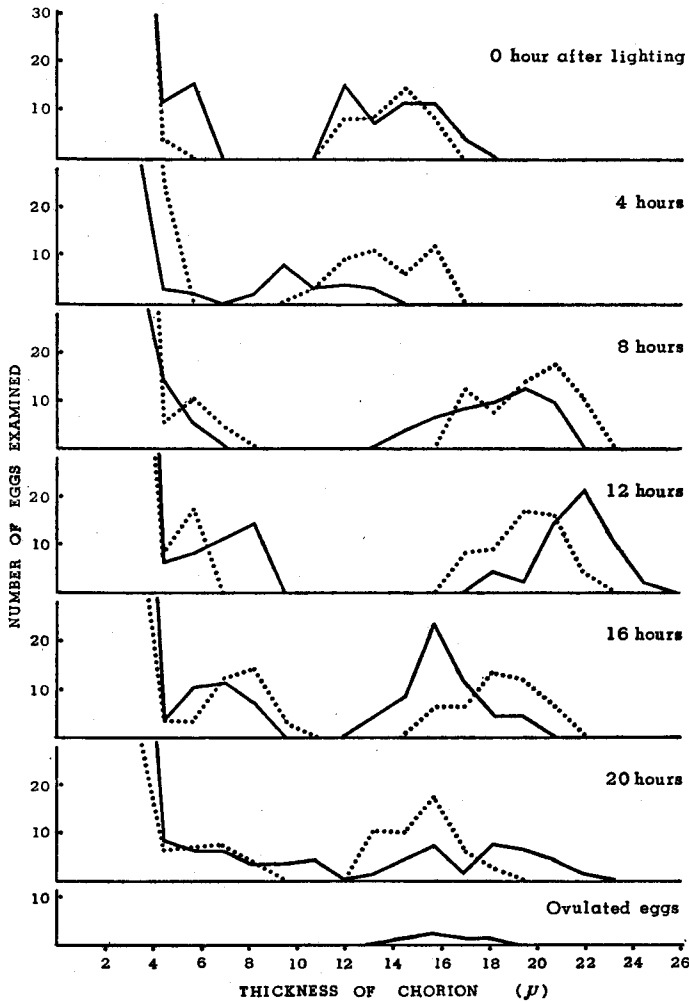


Fig. 3. Changes in thickness of chorion of the ovarian oocytes during a daily cycle. With the exception of ovulated eggs, two individuals were examined at each time.

光周期の影響について詳しく調べ、新しい光周期に移された魚は4~5日は暗期中に産卵するが、その後は人工的な明期開始直後に産卵行動をとるようになる」と述べている。今回の観察で、明期がそれぞれ8.00時、12.00時および20.00時に始まる24時間光周期（明期、暗期各12時間）に移されたメダカは、何れも5~7日で新しい光周期に順応し、ほとんどの個体が明期開始後1時間以内に産卵するようになった。これらの実験結果は、光の日周期性が産卵時刻を決める重要な要因であることを示している。

一方、このように人為的に変えられたメダカの産卵周期において、卵形成と排卵のリズムが同じように環境条件に同調しているかどうかは興味深い問題である。すでに Hirose<sup>6)</sup>, Yamauchi & Yamamoto<sup>6)</sup> は、主として卵径組成に基いて、人工光周期下で本種が卵発達の日周期性を示すことを報告し

ているが、組織学的にこれを詳しく検討した例はまだ見られない。この観察では、前述のように人工光周期に順応し、明期開始直後に規則的に産卵を繰り返す個体を対象に、その卵巣卵の発達リズムを調べた。その結果、明期開始時(0時間)に第3次卵黄期の初期にある卵母細胞の1群が、8時間後には急速に卵黄を蓄積して卵径を増し、12時間にはほぼ卵黄蓄積を終了する第3次卵黄期の末期に達することが確かめられた。さらに16時間ではこれらの第1卵群は前成熟期に達しており、卵黄形成を完了して胚胞崩壊の徴候が見られ、20時間には成熟期に入って、しばしば成熟分裂像が観察される。この間、12時間後から第2次卵黄期の一部の卵が成長し始め、以後次第に発達して明瞭な独立卵群として認められるようになる。Iwamatsu<sup>7)</sup>はメダカの卵巣卵の成熟に関する実験で、産卵前7時間以降の卵成熟について詳細な観察を行っており、胚胞崩壊が産卵前6~5時間に起るとしている。また、Yamauchi & Yamamoto<sup>9)</sup>も外見的観察に基づいては同様の見解を示している。今回の観察結果では、この胚胞崩壊の徴候が上記の報告よりもさらに約2時間早く見られた。この差が実験条件の違いによるものかどうか定かではないが、組織学的にも胚胞崩壊の開始時を明確に規定することは難かしいと思われる。一方、人工光周期下での排卵時間についてもこれまで十分には確認されていないが、少なくとも今回の実験条件下では、明期開始前2時間前後から起ることが明示された。何れにしても以上の結果から、水温一定の人工光周期下では、メダカの卵巣卵の発達および排卵が極めて規則的に起っていることが明らかにされた。

人工光周期下でメダカの卵巣卵は明瞭な発達リズムを示す。組織標本では一般に卵が複雑な形状を呈することから、この卵巣卵の発達過程、特に12時間以降完熟卵までの変化を卵径で表示することは難かしい。今、計測可能な範囲でこれを見ると、4時間後まで第1卵群の平均卵径は745~688 $\mu$ を示す。その後12時間で829 $\mu$ 、16時間では924 $\mu$ と卵径は急速に増大する。一方、この間に卵膜も顕著な変化を示し、明期開始4時間後から、卵黄蓄積がほぼ頂点に達する12時間後まで、卵膜は急速にその厚さを増す。しかし、その後卵径はなお増大し続けるにもかかわらず、卵膜の厚さはむしろ減少の傾向を示す。Hirose<sup>9)</sup>は本種の卵巣卵の濾胞細胞の電子顕微鏡的研究において、卵膜の厚さが17.00時に最高(約25 $\mu$ )に達し、その後排卵間近い24.00時にもその値は変わらないとしている。一方、いわゆる放散線がすでに消失した成熟卵で、Yamamoto, M.<sup>10)</sup>はその厚さが約15 $\mu$ と、今回の観察とは同様な値を得ている。もちろん卵膜の厚さは、魚の生理条件あるいは固定条件などで異なる可能性があるが、その質的变化を含めて魚卵の発生過程にも密接な関連を有することから、増殖学的にも興味深い問題である。少なくとも今回の観察結果は、卵膜の厚さが卵母細胞の発達、特に卵群の識別に有用な指標となることを示している。

卵巣卵の成熟に関する研究に用いる材料魚の成熟段階を的確にとらえるために、これまでも様々な方法が試みられている<sup>9)11)</sup>が、少なくとも一定水温の人工光周期下で、規則的に明期開始直ちに産卵する個体を用いれば、この目的はかなりの精度で達せられよう。また、人工光周期の明暗の配分については、明期の期間が暗期のそれを上廻るように<sup>11)12)</sup>(例えば14時間明期、10時間暗期の組合せ)配慮することによって、長期間実験材料を確保することが可能になる。

## 要 約

一定水温(25±1°C)の人工光周期(明期、暗期各12時間)下におけるメダカの生殖日周期について観察した。

1. 自然条件または人工光周期(6.00時明期開始、明期14時間、暗期10時間)下で飼育されていたメダカを、8.00時、12.00時、20.00時にそれぞれ明期が始まる人工光周期に移した結果、魚は経日的に新しい環境に順応し、7日目には約90%の個体が明期開始後1時間以内に産卵するようになった。
2. 明期開始時(0時間)に第3次卵黄期の初期にある卵群は、4時間から12時間後まで急速に卵黄を蓄積し、成長する。16時間後には前成熟期に、さらに20時間後には成熟期に達する。次の卵群は

- 8時間後に第2次卵黄期の卵母細胞から分離し始め、その後経時的に明瞭な独立した第2卵群として発達する。
3. 排卵は明期開始前2時間前後から起る。
4. 卵巣卵の発達に伴い、卵膜は次第に肥厚して12時間後に最大となり、その後は厚さをやゝ減じる。これらの卵膜の厚さは卵群の識別に有効な指標となる。

#### 文 献

- 1) Egami, N. (1954). Effect of artificial photoperiodicity on time of oviposition in the fish, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Japon.* **27**, 57-62.
- 2) Robinson, E.J. and Rugh, R. (1943). The reproductive processes of the fish, *Oryzias latipes*. *Biol. Bull.* **84**, 115-125.
- 3) Egami, N. (1959). Effects of exposure to low temperature on the time of oviposition and the growth of the oocytes in the fish, *Oryzias latipes*. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo*, **IV**, **8**, 539-548.
- 4) Yamamoto, K. and Yoshioka, H. (1964). Rhythm of development in the oocyte of the medaka, *Oryzias latipes*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **15**, 5-19.
- 5) Hirose, K. (1971). Biological study on ovulation *in vitro* of fish-I. Effects of pituitary and chorionic gonadotropins on ovulation *in vitro* of Medaka, *Oryzias latipes*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **37**, 585-591.
- 6) Yamauchi, K. and Yamamoto, K. (1973). *In vitro* maturation of the oocytes in the medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Japon.* (in press).
- 7) Iwamatsu, T. (1965). On fertilizability of pre-ovulation eggs in the medaka, *Oryzias latipes*. *Embryologia* **8**, 327-336.
- 8) Iwamatsu, T. (1967). On acquisition of developmental capacity in oocytes of the medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Japon.* **40**, 6-19.
- 9) Hirose, K. (1972). The ultrastructure of the ovarian follicle of Medaka, *Oryzias latipes*. *Z. Zellforsch.* **123**, 316-329.
- 10) Yamamoto, M. (1963). Electron microscopy of fish development II. Oocyte-follicle cell relationship and formation of chorion in *Oryzias latipes*. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo*, **IV**, **10**, 123-126.
- 11) Yoshioka, H. (1962). On the effects of environmental factors upon the reproduction of fishes 1. The effects of day-length on the reproduction of the Japanese killifish, *Oryzias latipes*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **13**, 123-136.
- 12) Yoshioka, H. (1963). On the effects of environmental factors upon the reproduction of fishes 2. Effects of short and long day-length on *Oryzias latipes* during spawning season. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **14**, 137-151.