

二枚貝に卵寄託するカワヒガイの生殖腺発達過程と産卵管の形態

番 雅義・古屋康則

〒501–1193 岐阜市柳戸1–1 岐阜大学教育学部

(2020年3月27日受付；2020年7月9日改定；2020年7月10日受理；2020年8月20日J-STAGE 早期公開)

キーワード：卵形成，精子形成，生殖周期，産卵管，コイ科

魚類学雑誌
Japanese Journal of
Ichthyology

© The Ichthyological Society of Japan 2020

Masayoshi Ban and Yasunori Koya*. 2020. Gonadal development and ovipositor morphology in the oily gudgeon, *Sarcocheilichthys variegatus variegatus*. Japan. J. Ichthyol., 67(2): 179–193. DOI: 10.11369/jji.20-008.

Abstract Like bitterlings (Acheilognathinae), members of the genus *Sarcocheilichthys* (Gobioninae, Cyprinidae) spawn their eggs in freshwater bivalves, although their spawning method is somewhat different, the latter depositing their eggs instantaneously into the bivalve inhalent siphon. This study investigated annual changes in gonadal histology, and ovipositor morphology in the oily gudgeon, *Sarcocheilichthys variegatus variegatus*, so as to throw further light on the process of gonadal development in cyprinid fishes and the evolution of structures related to eggs deposition into bivalves. Gonadal development in both sexes was divided into gradual (September to February) and rapid phases (March). Oocyte development was of the group-synchronous type, based on the frequency distribution of oocyte diameters during the spawning period (April to July) indicating multiple spawning. After the spawning period (August), the gonads in both males and females were spent (degeneration of oocytes and termination of spermatogenesis). The ever present ovipositor, comprising thick proximal and thin distal portions, elongated to about 1.5 times normal length during the maturation period. The urinary duct, oviduct and intestinal duct, as seen in cross-section, were respectively arranged dorsoventrally, the urinary duct and oviduct becoming conjoined in the posterior proximal ovipositor portion, with the urogenital duct opening at the distal end of the ovipositor, an overall structure similar to that of Acheilognathinae. However, surface mucus cells on the ovipositor, as found in Acheilognathinae, were lacking, whereas a thick muscle layer surrounding the urogenital duct, and V-shaped dense connective tissue occupying the entire ovipositor ventral region were found only in oily gudgeon. The overall structural features may enable the instantaneous discharge of eggs into the bivalve inhalent siphon.

*Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Education, Gifu University, 1–1 Yanagido, Gifu 501–1193, Japan (e-mail: koya@gifu-u.ac.jp)

コイ科魚類は淡水魚で最大のグループであり、世界では367属3,006種が知られ (Nelson et al., 2016), 日本では66種・亜種 (7種は国外外来魚) が知られている (斉藤, 2018). コイ科魚類の生殖様式は全て卵生であるが、産卵の様式はばらまき型で仔を保護しない種が多いが (片野, 1999; 斉藤, 2018), モツゴ *Pseudorasbora parva* のように基質となる石や沈木などに卵を産みつけ

るもの (鹿野ほか, 2010) や、他の魚種の産卵床に卵を産み付けるもの (Yamane et al., 2016) さらにはタナゴ亜科魚類のように生きた二枚貝の中に産卵するという特異なものも存在する (長田, 1987).

産卵に生きた二枚貝を利用するという繁殖様式をとる種には、タナゴ亜科魚類とカマツカ亜科のヒガイ属魚類が知られている (斉藤, 2018). タ

ナゴ亜科はカマツカ亜科と姉妹群関係 (Stout et al., 2016), あるいはカマツカ亜科をはじめとする複数の亜科を含むクレードと姉妹群関係にある (Saitoh et al., 2011) とされている。カマツカ亜科には十数属 201 種が確認されており (Nelson et al., 2016), その中で二枚貝に産卵する性質はヒガイ属でのみ確認されている。これらのことは、生きた二枚貝に産卵するという性質が、タナゴ亜科とヒガイ属でそれぞれ独立に獲得され、進化させた形質であることを示している。したがって、タナゴ亜科とヒガイ属の生殖形質を比較することは、二枚貝への産卵に必要な形質の進化過程の違いを明らかにする上で重要であるばかりでなく、コイ科魚類の多様な産卵様式の進化の要因を推定するうえで有用な情報を提供すると考えられる。

生殖や産卵の生理・生態に関しては、タナゴ亜科に関する研究が先行している。タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* では、水温が上昇する春に生殖腺が急速に発達して産卵期が始まり、9月上旬に産卵期が終了するといった生殖周期をもつことが知られている (朝比奈ほか, 1980)。また、二枚貝への産卵方法に関しては、タナゴ亜科魚類は繁殖期になると産卵管を伸長させ (Shirai, 1962; Kitamura, 2005), これを二枚貝の出水管に挿入して産卵を行うことが知られている (長田, 1987)。タナゴ亜科魚類の産卵管の表面には粘液細胞が存在し、二枚貝に産卵管を挿入する際に効果的な役割を果たしていると考えられている (Khlopova and Kul'bachnyi, 2012)。また産卵時に卵を押し出す際に尿を利用していることや (Matsubara, 1994), 産卵期間中に産卵管長を変化させ、貝内の卵が密集しないように調整する (Kitamura, 2005) など、産卵の仕組みについての研究が進んでいる。一方、ヒガイ属魚類では、産卵管を二枚貝の入水管に挿入し産卵を行うことは知られているが (Hosoya, 1982), 生殖腺の発達過程を含めた生殖周期や産卵の方法と仕組み、産卵管の構造に関する報告はほとんどない。

以上のことから本研究では、ヒガイ属のカワヒガイ *Sarcocheilichthys variegatus variegates* に焦点を当て、生殖周期、産卵管の組織学的構造、および生殖周期に伴う産卵管長の変化の有無を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

実験魚 2010年6月から2011年4月まで、およ

び2013年2月から2014年1月に概ね月に1回、岐阜県内の長良川水系の複数の支流において、目合1–2 mmのタモ網を用いてカワヒガイを採集した。採集期間中の水温については、木曾川水系伊自良川の線船橋観測所の数値によると、最低が冬季(1–3月)で6.5°C, 最高が夏季(6–9月)で27.3°Cを記録している (国土交通省, 2020)。また、岐阜市の日長については、冬至で9時間46分、夏至で14時間34分である (国立天文台, 2020)。採取したサンプルはブアン氏液で固定した後、体長 (mm), 体重 (g), 雌については体外に出ている産卵管長 (mm) を測定した。今回用いたサンプルの体長の範囲は、雌では5.53–10.4 mm, 雄では5.75–11.1 mmであった。体計測の後、解剖して生殖腺をとり出し、重量 (g) を測定した。とり出した生殖腺と産卵管はそれぞれ70%エタノールで保存した。生殖腺体指数 (GSI) および産卵管長体指数 [OPI (ovipositor index): Kitamura et al, 2008] を以下の式で算出した。

$$\text{GSI} = \text{生殖腺重量} / \text{体重} \times 100 (\%)$$

$$\text{OPI} = \text{産卵管長 (mm)} / \text{体長 (mm)} \times 100 (\%)$$

GSIについては、1ヶ月を単位として月ごとにまとめて平均値を算出した。また、OPIについては、後述する個体の成熟度ごとにまとめて平均値を算出した。

組織学的観察 生殖腺および産卵管の一部を通常のパラフィン法により6 μmの組織切片とした。これにDelafieldのヘマトキシリン–エオシン染色を施し、光学顕微鏡観察に供した。卵巣の一部については表層胞 (卵黄胞) の識別のため、また、3月から8月までの各月1個体の産卵管については、粘液細胞の有無を確認するために、過ヨウ素酸シッフ反応 (PAS 反応) による糖染色を施した。また卵巣については卵母細胞の発達段階を分類し、各発達段階の卵母細胞の組成を計数した。産卵期の終盤の時期については、新たな卵発達の開始時期を特定するために、組織切片から卵母細胞の発達段階ごとの卵胞径を測定した。その際には、連続した切片を観察して、各卵胞の最大部分の断面を測定した。精巣については各個体の精巣の組織をデジタルカメラで275 μm×140 μmの範囲で撮影し、Image J (Schneider et al., 2012) を用いて視野内に存在する各生殖細胞の発達段階ごとの胞囊の総面積を測定し、その面積比から生殖細胞の存在比率を算出した。

卵母細胞径の測定 卵母細胞の発達様式を調べるために卵母細胞の直径の頻度分布を調べた。

2013年2月から8月までの各月2個体を対象とし、左右1対の卵巣の片側の卵巣内に含まれる発達中と考えられる卵母細胞(0.1 mm以上)をピンセットを用いて分離した。これを実体顕微鏡下におき、顕微鏡像を大型のモニター(横49.3 cm×縦36.7 cm)に映し、卵母細胞の直径をデジタルノギスを用いて測定した。

統計処理 数値は平均値±標準誤差として記した。統計検定として、分散分析(ANOVA)を行った後、Tukey-Kramer test(有意水準5%)により多重比較検定を行った。

結 果

雌雄のGSIの周年変化 GSIの周年変化をFig. 1に示した。雌のGSI(Fig. 1a)について1月には $8.0\pm 0.97\%$ であり、3月まで同程度の値で推移したが、4月には $12.4\pm 0.83\%$ にまで増加した。その後5月まで高い値($11.1\pm 1.08\%$)を維持したが、8月まで段階的に減少した。9月には $1.8\pm 0.18\%$ の最低値となり、その後12月($6.8\pm 0.92\%$)まで増加した。雄のGSI(Fig. 1b)は2月の $0.84\pm 0.11\%$ から3月の

$2.11\pm 0.21\%$ まで増加した後、9月の $0.46\pm 0.20\%$ まで段階的に減少した。11月には最低値($0.24\pm 0.06\%$)をとった。

卵母細胞径の周年変化 卵母細胞の直径の頻度分布を調べた結果をFig. 2に示した。直径が0.4 mm以下の卵母細胞はすべての個体で比較的高い頻度で存在する卵群(第1卵群)を形成していた。2月では最大卵径が1.45 mmであり、1.0–1.15 mmをピークとする第2の卵群がみられた。3月には最大卵径は2.05 mmに達した。4月には最大卵径が2.35 mmに達し、2月と3月にみられた第2卵群に加えて、小規模ではあるがさらに大型の第3の卵群(1.75–2.05 mm)が形成された。5月になると最大卵径は2.5 mmと年間を通して最大に達し、第1から第3までの卵群が認められ、その後7月まで卵母細胞径の割合に多少の増減はあるものの、ほぼ同様の組成を示した。8月になると最大卵径は1.9 mm以下となり第3の卵群は消滅し、明瞭な第1卵群と不明瞭な第2卵群のみとなった。

卵母細胞の発達段階 カワヒガイの卵巣の組織切片を観察し、本種の卵母細胞の発達段階をキンギョ *Carassius auratus* の卵母細胞の発達段階の分類(Yamamoto and Yamazaki, 1961)に準じて、以下の8段階に分けた。

周辺仁前期(Fig. 3a)：直径は40–70 μm である。細胞質は薄く、ヘマトキシリンに好染する。核内には核膜に沿って数個の仁が分布する。

周辺仁後期(Fig. 3b)：直径は60–200 μm である。細胞質のヘマトキシリンに対する染色性が周辺仁前期と比較してやや低下する。核と細胞質は周辺仁前期よりも増大し、ヘマトキシリンに一樣に染色する。仁は核膜に沿って存在するが、周辺仁前期より目立たなくなる。

表層胞期(Fig. 3c, d)：直径は110–310 μm である。細胞質中に空胞状の構造がみられ、これらはPAS反応に陽性を示したことから(Fig. 3c)、糖蛋白質が主成分である表層胞(卵黄胞)であることが確認された。表層胞は次第にその数と大きさを増していく。

第1次卵黄球期(Fig. 3e)：直径は300–1000 μm である。卵黄球が卵膜と核の間の細胞質に出現する。卵黄球は次第にその数を増し、細胞質の外側2/3を占めるようになる。卵膜の厚さは15–20 μm である。

第2次卵黄球期(Fig. 3f)：直径は625–1150 μm である。卵黄球の蓄積が進行し、細胞質全体を占めるようになる。卵膜の厚さは20 μm である。

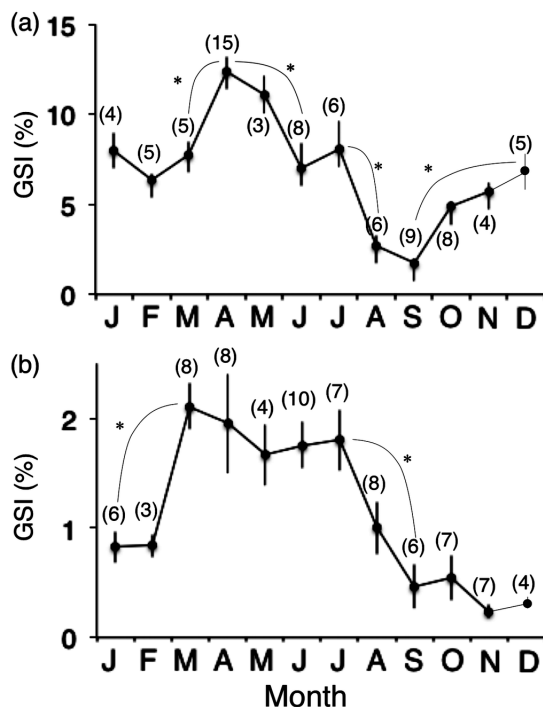


Fig. 1. Annual changes in female (a) and male (b) gonadosomatic index in oily gudgeon. Vertical bars indicate SEM. Numbers of fish in each month shown in parentheses. *Significant changes ($P < 0.05$).

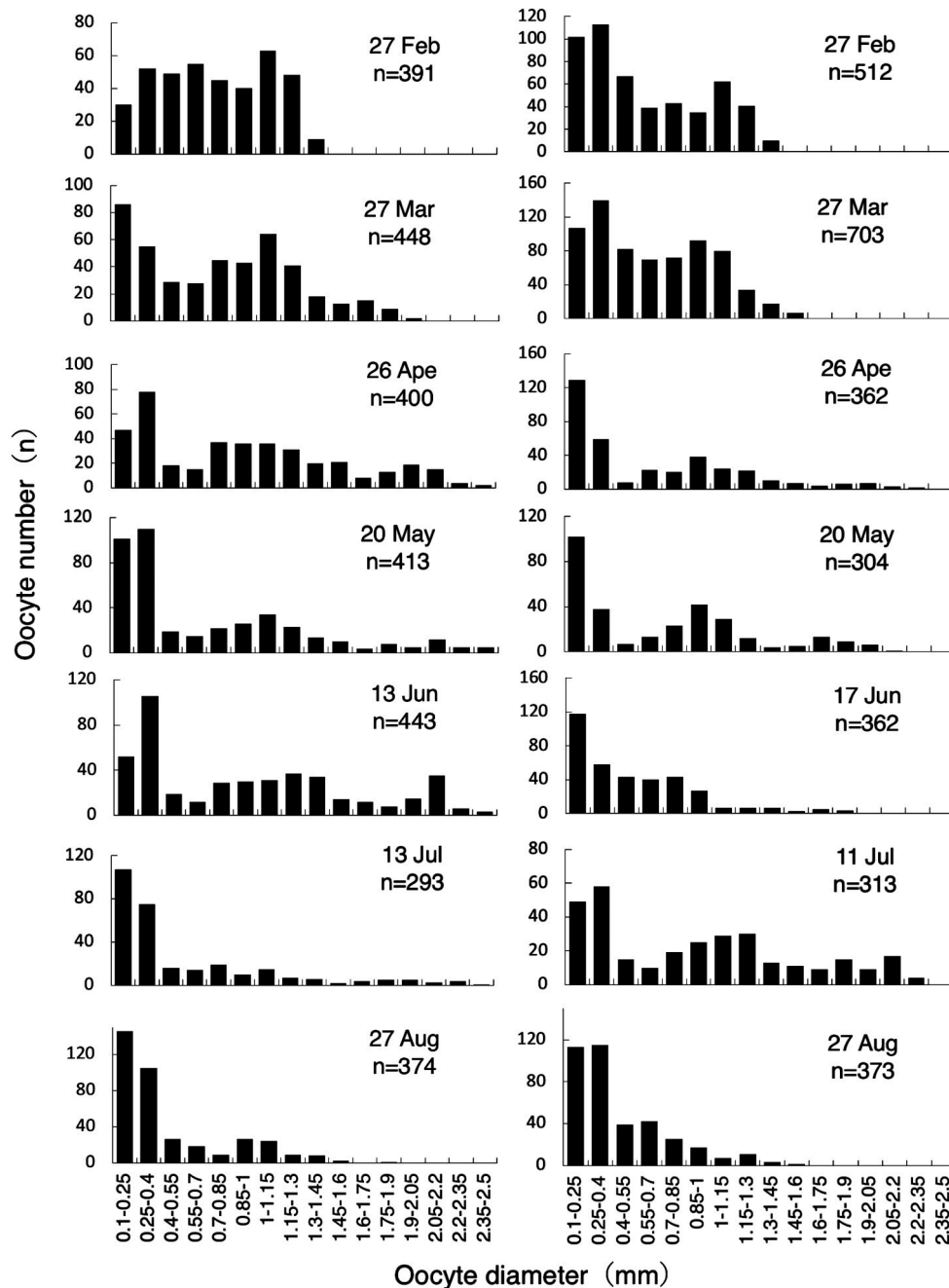


Fig. 2. Diameter frequencies of developing oocytes (fixed in Bouin's solution) in two female oily gudgeon in each month from February to August.

第3次卵黄球期 (Fig. 3g)：直径は850–1450 μm である。卵黄球の蓄積により細胞質の厚さが徐々に増して行き、卵径は増大を続ける。核の周辺から卵黄球が融合し始め、融合した卵黄成分はエオシンへの染色性を示すようになる。卵膜の厚さはやや増大し20–40 μm となる。

核移動期 (Fig. 3h)：直径は1375–1825 μm である。卵黄球の融合が進み、表層部を残して細胞質

全体がエオシンに染まるようになる。中央に位置していた核は動物極に移動し、細胞の外側に向かって凹んだ三日月型を呈する。動物極には卵門が観察される。卵門は直径53 μm の前庭部と直径3.2 μm 、長さ8.4 μm の卵門管からなる (Fig. 3i)。卵膜の厚さはやや薄くなり、10–20 μm であった。

以上の卵母細胞に加え、第2次卵黄球期の卵母細胞が退行・吸収される過程と考えられる退行卵

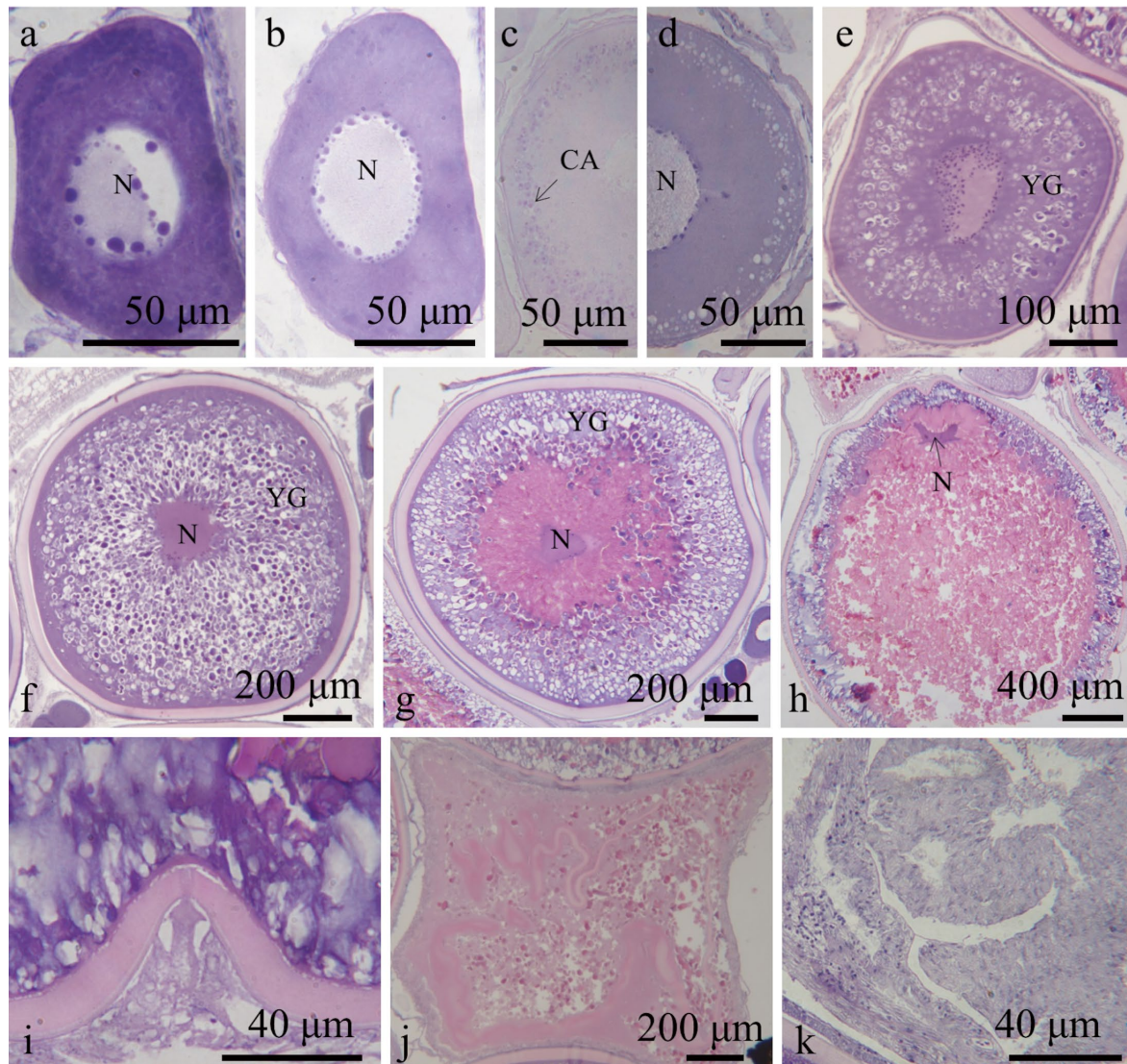


Fig. 3. Histological observations of oocytes in oily gudgeon. a, Early peri-nucleolus stage. b, Late peri-nucleolus stage. c, Cortical alveolus stage (PAS staining). d, Cortical alveolus stage. e, Primary yolk globule stage. f, Secondary yolk globule stage. g, Tertiary yolk globule stage. h, Migratory nucleus stage. i, Micropyle of migratory nucleus oocyte. j, Atretic oocyte. k, Post-ovulatory follicle. CA: cortical alveoli, N: germinal vesicle (nucleus), YG: yolk globules.

(Fig. 3j) や、肥大した顆粒膜細胞が集塊をなした排卵後濾胞 (Fig. 3k) がみられた。

卵巣卵組成の周年変化 各月の雌の3個体について、各発達段階の卵母細胞の数を計数し、その割合を調べた (Table 1)。排卵後濾胞と退行卵についてはその存在の有無のみを記した。

周辺仁前期から第1次卵黄球期の卵母細胞はすべての月で存在した。第2次卵黄球期の卵母細胞は8月と9月にはやや少なく、9月にはそれをまったくもたない個体も存在した。10月には第2次卵黄球期の卵母細胞が出現し、その割合は2月に

かけて増加した。2月には第3次卵黄球期の卵母細胞が1個体で出現し、その後、4月から7月の間には比較的高い割合 (最大で22%) ですべての個体に存在していた。4月から7月には核移動期の卵母細胞がみられ、この時期には排卵の経験の有無を示す排卵後濾胞が高い頻度で確認された。排卵後濾胞は9月までみられた。退行卵は4月から8月の間に見みられ、8月では全個体にみられた。

卵黄球の蓄積開始時期 第1次卵黄球期の卵母細胞がすべての月で確認されたことから、卵黄球

Table 1. Monthly changes at each stage of oocyte composition, and the existence of postovulatory and atretic follicles in oily gudgeon

Sampling date	*Stage								
	EPN	LPN	CA	PYG	SYG	TYG	MN	POF**	AF**
27 Feb 2013	18.6	30.5	9.3	8.5	33.1				
	30.6	18.9	7.2	6.3	36.				
	14.7	50.0	7.4	6.6	18.4	2.9			
27 Mar 2013	20.9	53.6	3.6	0.9	16.4	4.5			
	24.0	32.0	6.4	4.8	26.4	6.4			
	19.4	55.2	6.5	4.0	14.9				
16 Apr 2013	14.8	43.5	6.1	5.2	19.1	10.4	0.9		
	15.0	27.5	9.2	4.2	25.0	19.2			
26 Apr 2013	18.9	43.2	2.3	4.5	14.4	12.9	3.8	+	+
20 May 2013	11.3	41.7	6.1	4.3	16.5	17.4	2.6	+	
	18.4	44.1	0.7	2.2	12.5	22.1		+	
	4.9	73.8	4.9	3.3	7.4	4.9	0.8	+	+
13 Jun 2013	9.2	47.1	10.1	4.2	16.0	12.6	0.8	+	
	16.4	64.5	2.8	2.8	7.5	6.1		+	
	2.9	77.7	4.0	4.8	7.0	3.7		+	
8 Jul 2013	18.5	50.0	9.3	4.6	9.3	8.3		+	
	16.2	53.36	5.7	4.8	12.4	6.7	1.0	+	
11 Jul 2013	24.1	43.8	3.6	6.3	10.7	11.6		+	+
27 Aug 2013	26.0	65.0	7.0	1.0	1.0			+	+
	38.4	50.7	5.1	3.6	2.2			+	+
	27.9	64.0	1.5	3.7	2.9			+	+
9 Sep 2013	24.3	54.2	8.4	7.5	5.6			+	
18 Sep 2013	18.3	54.2	15.0	12.5				+	
	20.9	51.3	7.0	9.6	11.3				
28 Oct 2013	25.4	33.6	9.0	8.2	23.8				
	29.2	25.5	13.9	5.1	26.3				
	25.8	33.3	10.8	10.0	20.0				
21 Nov 2013	25.8	32.0	12.5	5.5	24.2				
	19.0	38.1	11.1	4.8	27.0				
	33.9	36.4	7.6	3.4	18.6				
24 Dec 2013	19.2	44.4	11.3	6.6	18.5				
	21.6	31.4	5.9	8.8	32.4				
	12.3	26.4	8.5	10.4	42.5				

*EPN-early peri-nucleolus stage, LPN-late peri-nucleolus stage, CA-cortical alveoli stage, PYG-primary yolk globule stage, SYG-secondary yolk globule stage, TYG-tertiary yolk globule stage, MN-migratory nucleus stage, POF-postovulatory follicle, AF-atretic follicle.

**Existence of postovulatory or atretic follicle indicated by +.

の蓄積の開始時期をより明確にするために、組織切片を基に7月から9月における第1次および第2次卵黄球期の卵母細胞の直径を測定し、ヒストグラムを作成した (Fig. 4)。7月では直径300–550 μm の第1次卵黄球期の卵母細胞と直径550–1000 μm の第2次卵黄球期の卵母細胞が確認された。このうち第2次卵黄球期の卵母細胞は、700 μm 以下の小型のものと750–800 μm をピークとする

大型の2群に分けられた (Fig. 4a)。8月には直径300–550 μm の第1次卵黄球期の卵母細胞と、直径550–850 μm の第2次卵黄球期の卵母細胞がみられ、7月でみられた大型の第2次卵黄球期の卵母細胞の割合が減少し、直径が900 μm を超える大きさの卵母細胞は確認されなかった (Fig. 4b)。9月になると直径200–650 μm の第1次卵黄球期の卵母細胞の割合が著しく増加する一方、第2次

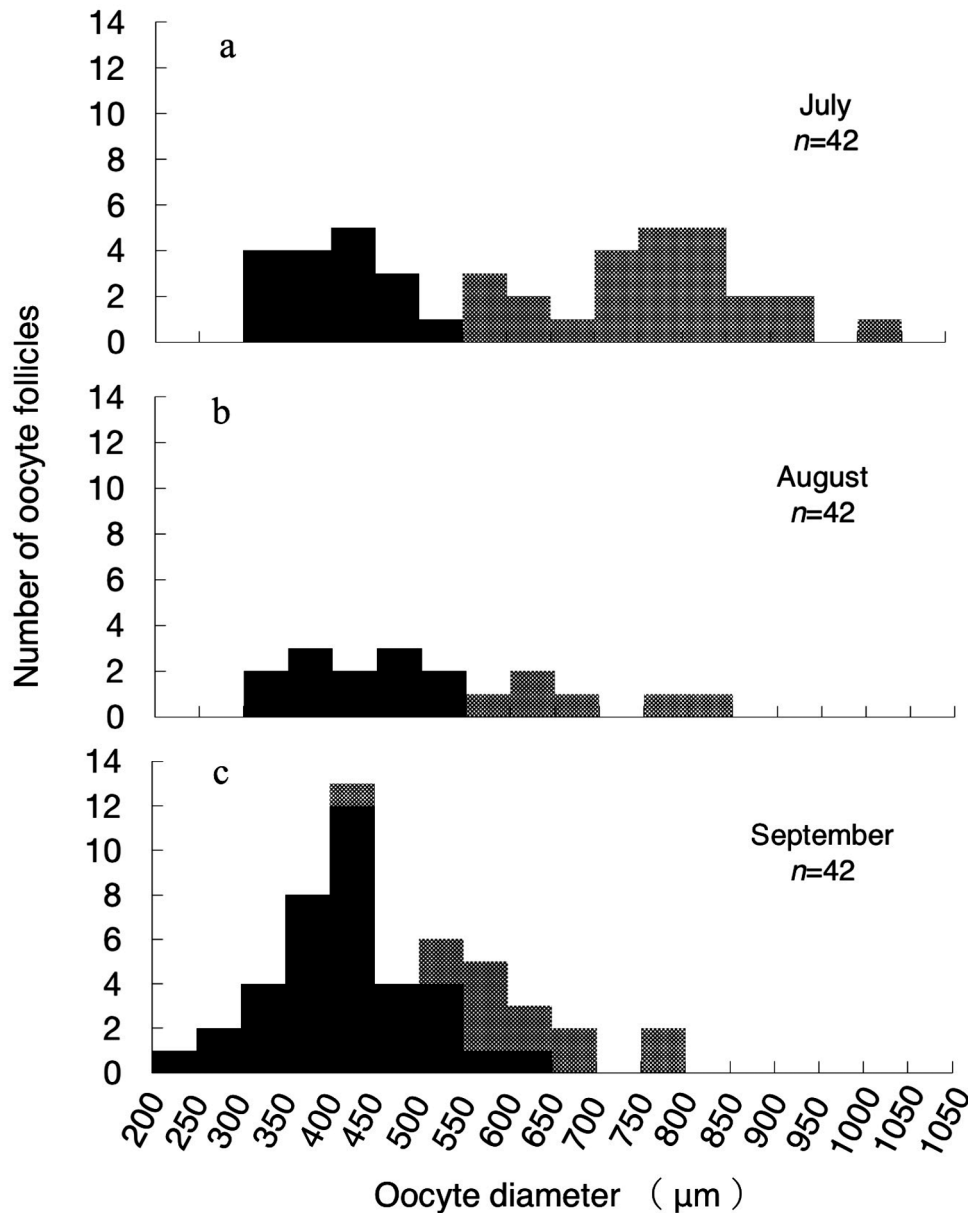


Fig. 4. Diameter frequencies of developing oocytes in one female oily gudgeon on July (a), August, (b) and September (c). Black and gray columns indicate primary and secondary yolk globule stage oocytes, respectively.

卵黄球期の卵母細胞の割合は特に大型の卵群で7月や8月と比べて著しく低下した (Fig. 4c).

卵巣の成熟度の周年変化 各月の卵母細胞の発達段階の組成, 排卵後濾胞の有無, および卵母細胞径の頻度分布の推移から, カワヒガイの雌の成熟度を以下の4期に分けた.

I) 卵黄形成前期 (Early vitellogenic : Fig. 5a) : 卵黄球の蓄積が開始し, 第2次卵黄球期以下の卵母細胞が現れる. 第1次卵黄球期と第2次卵黄球期の卵母細胞の割合を合わせると, 10%を超える.

II) 卵黄形成後期 (Late vitellogenic : Fig. 5b) :

卵黄球の蓄積が進行し, 第3次卵黄球までの卵母細胞がみられるが, 核移動期の卵母細胞は確認されない.

III) 成熟期 (Maturation : Fig. 5c) : 卵巣内には第3次卵黄球期までの卵母細胞に加えて, 核移動期の卵母細胞がみられるか, 核移動期の卵母細胞がみられない場合でも排卵後濾胞がみられる.

IV) 退縮期 (Spent : Fig. 5d) : 第3次卵黄球期の卵母細胞はなくなり, 第1次卵黄球期と第2次卵黄球期の卵母細胞がわずかにみられるがその割合は低く, 合わせても10%を超えない. 退行卵

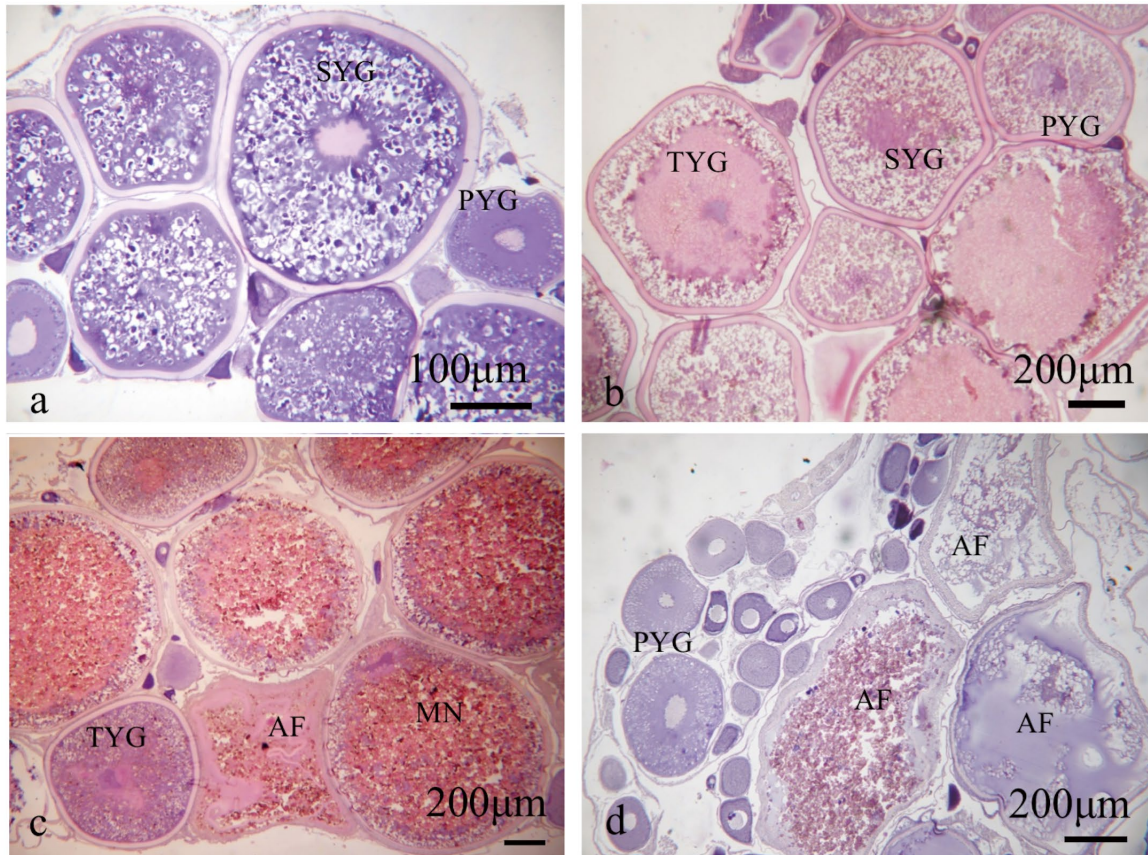


Fig. 5. Histological sections of ovary of oily gudgeon. a, October (early vitellogenic period). b, March (late vitellogenic period). c, April (maturation period). d, August (spent period). AF: atretic oocyte, MN: migratory nucleus stage oocyte, PYG: primary yolk globule stage oocyte, SYG: secondary yolk globule stage oocyte, TYG: tertiary yolk globule stage oocyte.

がみられる。

上記の分類に従い卵巣の成熟度の月別出現頻度を Table 2 に示した。2月には全ての個体が卵黄形成期であった。3月には1個体が卵黄形成前期であり、2個体が卵黄形成後期であった。4月になると1個体が卵黄形成後期であり、2個体が成熟期であった。5月から7月にはすべての個体が成熟期であり、8月になるとすべての個体が退縮期であった。9月から12月にはすべての個体が卵黄形成前期であった。

産卵管の組織学的観察 4月の産卵管は太く短い基部と細く長い端部に分けることができた (Fig. 6)。基部の横断像には背側から尿道 (Fig. 6b の U)、輸卵管 (Fig. 6b の O)、および腸管 (Fig. 6b の I) が順に配列していた。尿道と輸卵管は薄い壁を挟んで接しており、それらの周辺部はエオシンに好染する筋肉の層 (Fig. 6b の M) が厚く取り巻いていた。また腸管の内腔はひだ状の上皮組

織に裏打ちされ、外側はヘマトキシリンに薄染する粘膜下層に囲まれていた。産卵管基部の腹側には密性結合組織 (Fig. 6a の d) が産卵管基部の腹側半分を V 字状に取り囲み、さらに産卵管基部全体の周囲は疎性結合組織を含む表皮組織で包まれていた。産卵管の基部からやや後方では尿道と輸卵管が融合し、横断像では三叉状の構造を成す泌尿生殖輸管 (Fig. 6c の UG) を形成し、その周辺部を筋肉の層 (Fig. 6c の M) が厚く取り巻いていた。泌尿生殖輸管の腹側には腸管 (Fig. 6c の I) を支持するように密性結合組織 (Fig. 6b の DCT) が V 字状に取り囲んでいた。さらに後方になると背側には三日月型を呈する泌尿生殖輸管 (Fig. 6d の UG) が位置し、その周辺には血管 (Fig. 6d の BV) が発達した筋肉の束 (Fig. 6d の M) がみられた。腸管 (Fig. 6d の I) の周囲は疎性結合組織で囲まれ、さらにその腹側を前方から続く密性結合組織 (Fig. 6d の DCT) が支持していた。産

Table 2. Monthly changes in ovarian maturity in oily gudgeon

Maturity	Month											
	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
Early vitellogenic	3	1						3	3	3	3	
Late vitellogenic		2	1									
Maturation			2	3	3	3						
Spent							3					

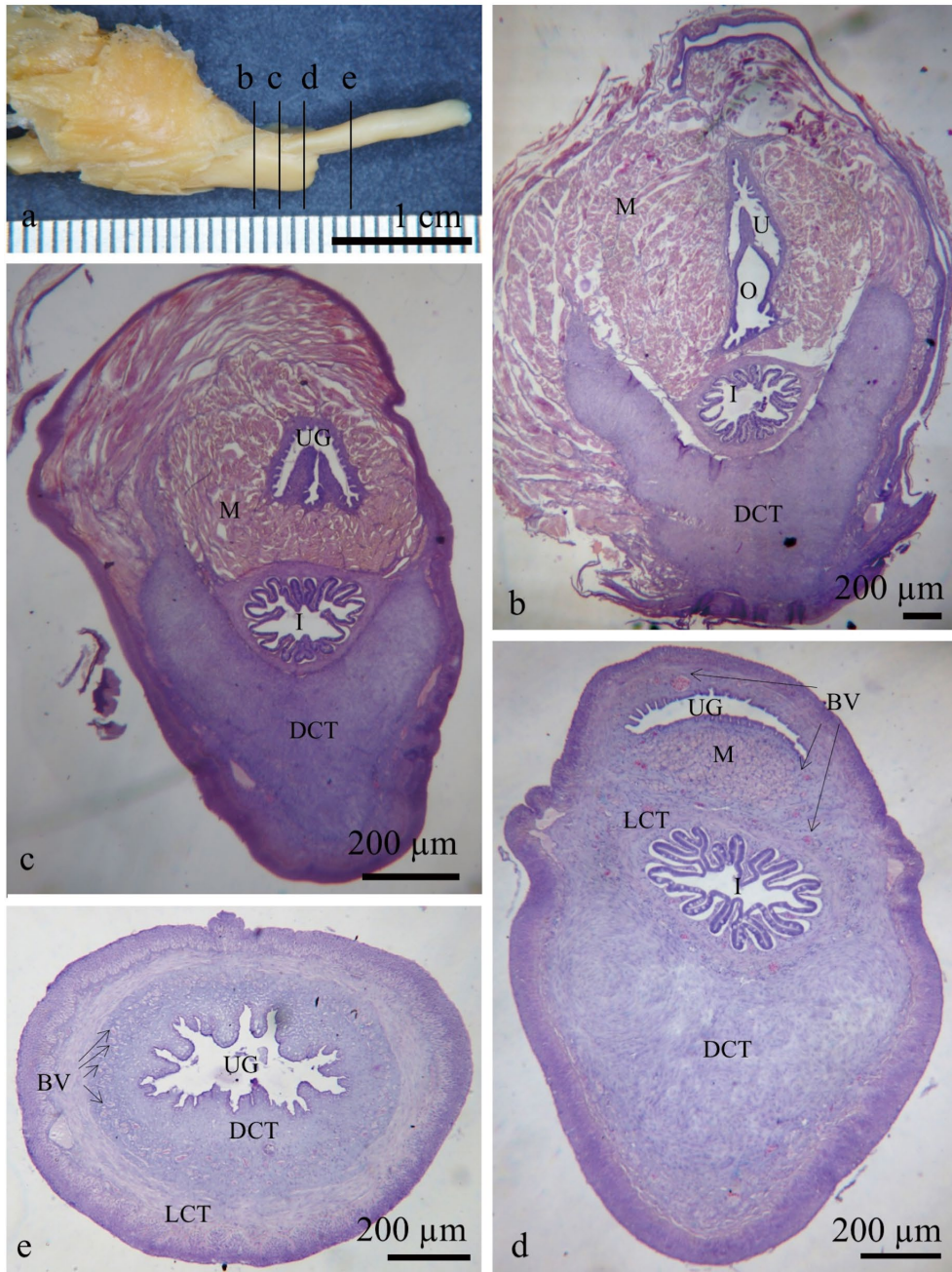


Fig. 6. Ovipositor of oily gudgeon. a, External appearance. Lines b–e correspond to cross sections of b–e, respectively. b, Cross section of basal part of proximal ovipositor. c, Cross section of middle portion of proximal ovipositor. d, Cross section of posterior proximal ovipositor. e, Cross section of distal ovipositor. BV: blood vessel, DCT: dense connective tissue, LCT: loose connective tissue, I: intestine, M: muscle, O: oviduct, U: urinary duct, UG: urogenital duct.

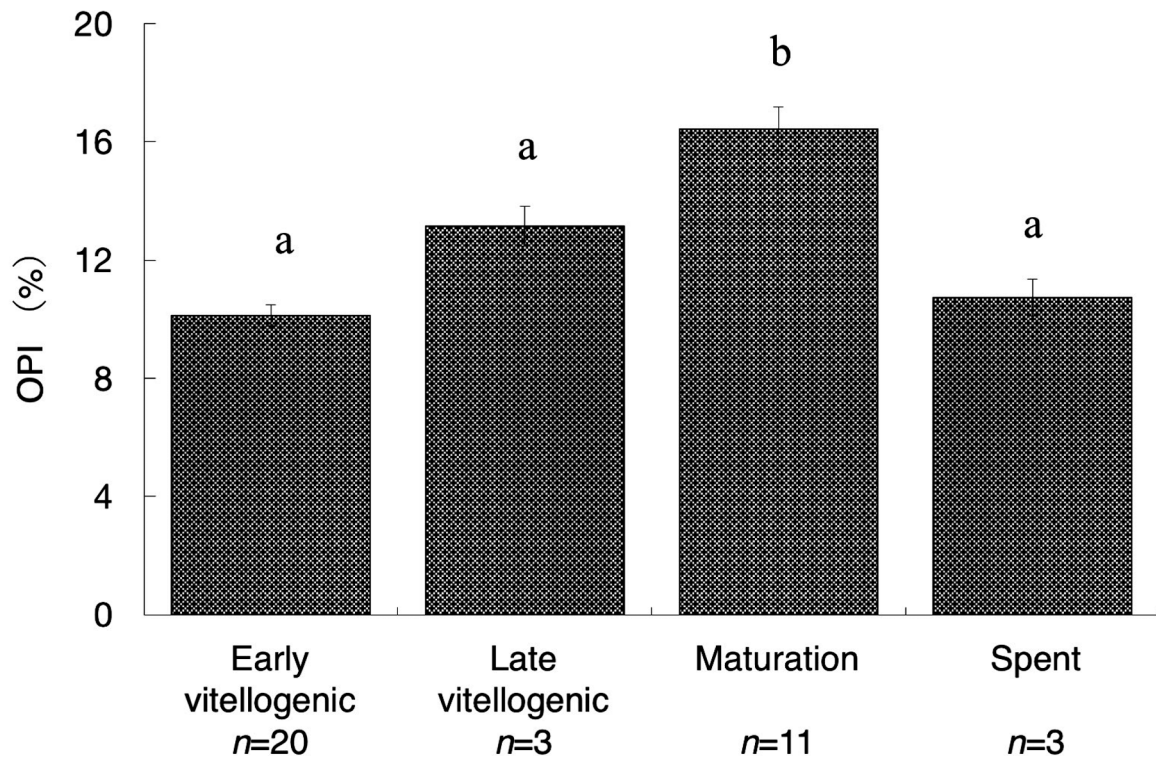


Fig. 7. Changes in ovipositor index [OPI=ovipositor length (mm)/standard length (mm) × 100 (%)] at each maturity stage of ovary of oily gudgeon. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) from each other.

卵管の端部は細く (Fig. 6e), その内部には筋肉組織は存在せず, 外側から表皮組織, 疎性結合組織 (Fig. 6e の LCT), 密性結合組織 (Fig. 6e の DCT) が中央の泌尿生殖輸管 (Fig. 6e の UG) を取り囲んでいた. 密性結合組織の周囲には血管 (Fig. 6e の BV) が著しく発達していた. 3月から8月までに各月1個体でPAS染色を施した産卵管には, PAS反応に陽性を示す部位はみられなかった.

産卵管長体指数の変化 雌の成熟度と産卵管長の関係を調べるため, 卵黄形成前期, 卵黄形成後期, 成熟期および退縮期の個体の産卵管長体指数 (OPI) を比べた (Fig. 7). OPIは, 卵黄形成前期 ($10.1 \pm 0.349\%$) から卵黄形成後期 ($13.2 \pm 0.682\%$) にかけて低く, 成熟期には $16.4 \pm 0.755\%$ と有意に高くなり, 退縮期には再び低い値 ($10.7 \pm 0.619\%$) になった.

精細胞の発達段階 カワヒガイの精子形成過程における生殖細胞の発達段階を精原細胞, 1次精母細胞, 2次精母細胞, 精細胞, および精子の5段階に分け, 各発達段階の生殖細胞が精巣内に占める割合, および輸精管内の精子の有無を調べた (Table 3). なお輸精管内の精子については, 輸精

管が確認できた場合に精子の存在の有無のみを調べた.

精原細胞はすべての月で確認され, 1次精母細胞は8月の2個体を除くすべての個体で確認された. 2月には精原細胞の割合は90%以上と高く, 1次精母細胞がわずかにみられた. 3月になると精原細胞の割合はどの個体でも減少し, 1次精母細胞に加えて2次精母細胞と精細胞が出現した. 4月から7月の間は, すべての個体で精原細胞から精子までのすべての段階の生殖細胞が確認された. 精子は最大で40%を占めた. また, この時期には輸精管内にも精子が確認された. 8月には1次精母細胞から精細胞までがみられない個体が1個体現れたが, 精子は全個体で確認され, 輸精管内にも精子がみられた. 9月から12月までは高い割合の精原細胞 (86.9–99.8%) と低い割合の1次精母細胞 (1.5–13.1%) のみとなり, 輸精管内にも精子は確認できなかった. 12月には1次精母細胞の割合にやや増加 (4.7–13.1%) がみられた.

雄の成熟度の周年変化 雄における各発達段階の生殖細胞の出現頻度に基づいて, 本種の雄の成熟度を次の4期に分けた.

I) 精子形成前期 (Early spermatogenesis : Fig.

Table 3. Monthly changes in male germ cells and existence of sperm in the spermatic duct in oily gudgeon

Sampling date	Stage of germ cell (%)*					
	SG	SCI	SCII	ST	SZ	spermatic duct**
27 Feb 2013	93.5	6.50				
	96.8	3.20				
	97.4	2.60				
28 Mar 2011	90.5	1.20	4.30	4.06		
29 Mar 2011	85.0	5.71	5.00	4.32		
27 Mar 2013	41.1	24.3	15.3	19.3		
16 Apr 2013	43.5	3.20	1.83	10.7	40.8	+
	60.4	8.05	7.16	14.5	9.80	
	66.8	6.02	4.91	8.81	13.4	+
20 May 2013	55.8	9.49	6.02	12.8	15.8	+
	61.3	5.75	6.68	7.40	18.9	+
	48.6	9.18	10.5	12.8	18.9	+
13 Jun 2013	66.6	8.47	3.57	6.49	14.9	+
	52.9	10.5	7.42	7.41	21.7	
18	44.4	6.34	3.07	11.7	34.5	+
11 Jul 2013	55.4	4.56	3.82	14.2	22.1	+
	40.7	11.4	4.08	19.6	24.2	+
	36.9	7.65	4.09	10.6	40.8	+
19 Aug 2010	35.8	4.80	6.37	13.60	39.4	+
27 Aug 2013	88.8				11.2	+
	97.8				2.18	+
18 Sep 2013	98.5	1.50				
	88.6	11.4				
30 Sep 2013	98.1	1.90				
1 Oct 2013	96.9	3.10				
21 Oct 2013	94.1	5.9				
28 Oct 2013	96.7	3.25				
11 Nov 2013	98.2	1.80				
21 Nov 2013	97.7	2.34				
	99.8	0.18				
24 Dec 2013	90.0	9.95				
	86.9	13.1				
	95.3	4.66				

*SG-spermatogonia, SCI-primary spermatocytes, SCII-secondary spermatocytes, ST-spermatids, SZ-sperm.

** Existence of sperm in spermatic duct indicated by +.

8a)：精巣内には高い割合の精原細胞に加え，減数分裂を開始した1次精母細胞がごくわずかみられる。

II) 精子形成後期 (Late spermatogenesis : Fig. 8b)：精巣内には精原細胞や1次および2次精母細胞に加え，減数分裂を終えた精細胞がみられる。

III) 機能的繁殖期 (Functional maturation : Fig. 8c)：精巣内には各発達段階の生殖細胞に加え，精小嚢内腔に精子が現れる。輸精管内にも精子がみられる。

IV) 休止期 (Resting : Fig. 8d)：精巣内の生殖細胞としては精原細胞がみられるほか，精小嚢内腔や輸精管には残留した精子がみられる。

上記の分類に従い，精巣の各成熟度の月別個体数を Table 4 に示した。9月から12月および2月にはすべての個体が精子形成前期であり，3月にはすべての個体が精子形成後期であった。また4月から7月にはすべての個体が機能的繁殖期であった。8月には1個体のみが機能的繁殖期で，残り2個体は休止期であった。

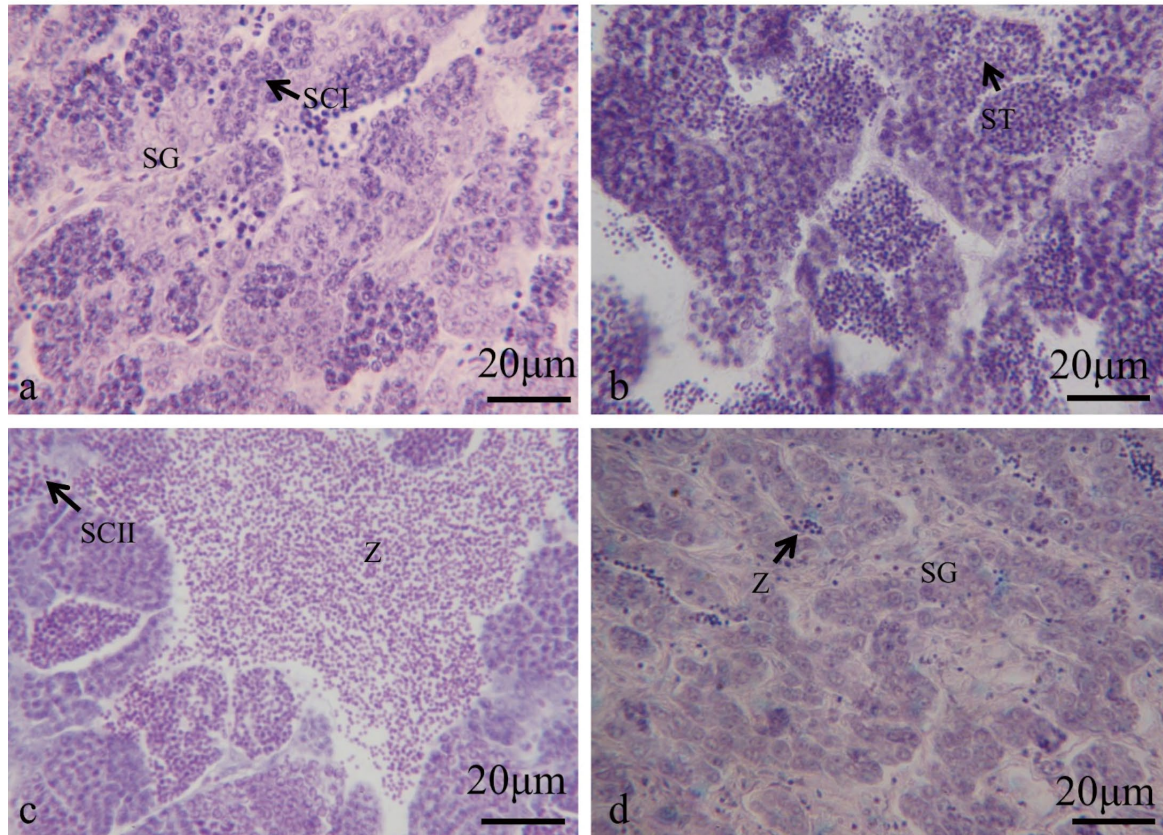


Fig. 8. Histological sections of testis of oily gudgeon. a, September (early spermatogenic period). b, March (late spermatogenic period). c, April (functional maturation period). d, August (spent period). SCI: primary spermatocytes, SCII: secondary spermatocytes, SG: spermatogonia, ST: spermatids, Z: spermatozoa.

Table 4. Monthly changes in testicular maturity in oily gudgeon

Maturity	Month											
	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
Early spermatogenic	3							3	3	3	3	
Late spermatogenic		3										
Functional maturation			3	3	3	3	1					
Resting							2					

考 察

雌の GSI は 4 月から 7 月にかけて高い値を維持した。またこの時期には、卵巢の成熟度が成熟・繁殖期の状態にある個体で占められた。このことから岐阜県の長良川水系に生息するカワヒガイの雌は 4 月から 7 月の間が繁殖可能な状態にあると考えられる。8 月には雌の GSI が減少し、卵巢内には退行卵が多くみられ、第 1 次および第 2 次卵黄球期の卵母細胞がごくわずかしみられなかった。このことから、8 月には繁殖を終え、産み残

した卵母細胞の退行が始まると考えられた。8 月の個体の卵巢内には第 1 次および第 2 次卵黄球期の卵母細胞がわずかにみられたが、9 月にはより卵母細胞径が小さい第 1 次卵黄球期の卵母細胞の割合が増加した。このことは、本種の繁殖に向けた卵黄形成が 9 月には始まっていることを示している。本種の GSI は 9 月以降 12 月まで継続して増加傾向にあり、その後 1 月から 3 月までは変化せず、3 月以降に再び増加した。GSI の変化に同調して、第 1 次および第 2 次卵黄球期の卵母細胞の割合は 9 月から 12 月まで緩やかに増加し、2 月以降には第 3 次卵黄球期の卵母細胞が出現した。このこと

から、9月に開始した卵黄形成は秋の間に少しずつ進行し、冬には停止した状態となり、春に再開するという、2段階の発達を行うことが示唆される。

雄のGSIは4月から7月にかけて高い値を維持した。またこの時期は輸精管内に精子が確認されたことから、カワヒガイの雄は4月から7月の間が繁殖可能な状態にあると考えられ、雌の繁殖可能な時期と一致した。8月には雄のGSIが前の月の半分以下ほどに減少し、精子の存在比率も低下したことから、繁殖が終了したことが示唆される。一方、8月には精巣内および輸精管内に依然として精子が確認された。これらの精子は繁殖に使われなかった残留精子であると考えられ、8月から精子の吸収が生じていることが示唆される。9月にはGSIは年間を通して最低値を示し、精巣内にも輸精管内にも精子はみられず、精子の吸収は完了したと考えられた。また、この時期から1次精母細胞が出現し始め、本種の繁殖に向けた精子形成が9月にはすでに始まっていることが示された。その後2月までGSIは低い値で推移した後、3月には急激に増加した。GSIの変化に同調するように2月までは精巣内の生殖細胞は1次精母細胞までで停滞し、3月から2次精母細胞と精原細胞が出現し、精子形成が再開したことが示された。これらのことから9月に開始した精子形成は冬までの比較的長い期間少しずつ進行し、水温が上昇する春には短期間で活発な精子形成を行うという、2段階の発達を行うことが示唆される。

本研究によりカワヒガイの配偶子形成過程は雌雄ともに秋から冬までの緩やかな発達と春の急激な発達の2段階に分けられることが示唆された。コイ科のアカヒレタビラ *Acheilognathus tabira erythropterus* の雄(清水・羽生, 1981)やモツゴの雌雄(Asahina et al, 1990), ウシモツゴ *Pseudorasbora pugnax* の雌雄(大仲ほか, 2009), ホンモロコ *Gnathopogon caerulescens* の雌雄(奥沢ほか, 1986)についても同様に2段階の生殖腺発達が報告されている。一方で、アカヒレタビラの雌(清水・羽生, 1981), カワバタモロコ *Hemigrammocypris neglectus* の雌(Onikura et al., 2010), タイリクバラタナゴの雌雄(朝比奈ほか, 1980), ミヤコタナゴ *Tanakia tanago* (Hatakeyama and Akiyama, 2007) などでは、配偶子形成は水温が上昇する春に開始して、短期間で産卵期に入るものも知られている。コイ科魚類の中でも配偶子形成の開始時期を含めた生殖周期には多様性がみられるようである。

清水(2006)は魚類の季節ごとの産卵期を、春(～初夏)産卵型、春夏産卵型、夏産卵型、秋産卵型、春秋産卵型、冬～春産卵型、周年産卵型の7つの型に分類している。本研究により、カワヒガイは春(～初夏)産卵型であることが示唆された。春(～初夏)型である魚類にはキンギョ(Yamamoto and Yamazaki, 1961), ホンモロコ(奥沢ほか, 1986), アカヒレタビラ(清水・羽生, 1981), モツゴ(Asahina et al. 1990), ウシモツゴ(大仲ほか, 2009), *Acheilognathus majusculus* (Lim and Lee, 2017), *Squalius cephalus* (Ünver and Saraydin, 2012), *Leuciscus cephalus* (Guerriero et al., 2005; Guerriero, 2007) 等のコイ科魚類が知られており、コイ科に典型的な産卵型であるといえる。アカヒレタビラでは春の水温上昇が産卵期開始の要因であるとされ(Shimizu and Hanyu, 1982), 春夏産卵型ではあるが同じコイ科タナゴ亜科のタイリクバラタナゴでも同様の報告がされている(朝比奈ほか, 1980)。また、ホンモロコについては産卵期の終了要因として盛夏に上昇する水温が考えられている(奥沢ほか, 1986)。カワヒガイにおいても春の水温上昇が産卵期の開始要因となり、夏の高水温が産卵期の終了に関わっている可能性がある。

魚類の卵発達の型は、すべての卵母細胞が同調して発達する「同期発達型」、卵巣内に発達段階が明瞭に異なる2つ以上の卵群が認められる「卵群同期発達型」、および卵巣内にすべての発達段階の卵母細胞が存在し、明瞭な卵群を欠く「非同期発達型」の3つに大別される(Marza, 1938; Wallace and Selman, 1981; deVlaming, 1983)。本研究では、4月から7月までの繁殖期の個体で、周辺前期および後期からなる第1卵群、第1次および第2次卵黄球期からなる第2卵群、および第3次卵黄球期から核移動期に相当する第3卵群といった卵群が確認できた。したがって、カワヒガイは、卵黄形成中の卵群から順次卵成熟・産卵に向かう卵群が分離して発達する、卵群同期発達型に属するといえる。また、本研究では4月から7月にかけて第3次卵黄球期の卵母細胞や核移動期の卵母細胞とともに排卵後濾胞をもつ個体が複数確認されたことから、本種が1回の産卵期に複数回産卵すること(中村, 1969)が卵巣組織の観察からも裏付けられた。

本研究により、カワヒガイの産卵管は太く短い基部と細く長い端部の2部分けられた。基部には背側から尿道、輸卵管、および腸が縦走し、基

部の途中で尿道と輸卵管が合一して泌尿生殖輸管となり、基部の後端で腸管が肛門として開口することが示された。端部には泌尿生殖輸管のみが縦走し、端部の後端で泌尿生殖口が開口していた。タナゴ亜科の *Rhodeus amarus* の産卵管も conical organ とよばれる基部から細長い産卵管が伸長していることが、またタイリクバラタナゴについては基部に相当する部分には尿道、輸卵管、および腸管が通っていることが知られており (Shirai, 1964), カワヒガイの産卵管の基部の内部構造とよく似ているといえる。輸卵管および尿道には発達した筋肉の層が厚く取り巻き、さらに基部では腹側を、端部では泌尿生殖輸管の周囲を密性結合組織が支持していたことから、後述するように、この筋肉および密性結合組織による産卵管の強靭性が、産卵の際に卵を素早く、強く押し出す役割を担うと考えられる。

タナゴ亜科魚類では *Rhodeus amarus*, *Rhodeus amurensis*, および *Acheilognathus asmussii* の3種において産卵管の表皮側に粘液細胞をもち、粘液細胞から出される分泌物が産卵管を二枚貝の出水管に挿入する際に効果的な役割をしていると考えられている (Khlopova and Kul'bachnyi, 2012)。一方、カワヒガイでは産卵管の表面に粘液細胞の存在を示す PAS 陽性の細胞はみられなかった。これはタナゴ亜科魚類が異物に対して敏感でない出水管から産卵管を挿入するのに対し、カワヒガイでは異物に対して敏感な入水管から産卵管を挿入することに関係しているのかもしれない。すなわち、異物に鈍感な出水管に産卵管を挿入する際には、多少の異物(粘液)が分泌されても貝には感知されず、むしろ粘液の分泌で産卵管の挿入をスムーズにする効果が期待できるが、異物に敏感な入水管に産卵管を挿入するには、挿入のスムーズさよりもむしろ貝に感知される前に素早く挿入・産卵を行うことが重要であると考えられる。実際に、ヒガイ属魚類は産卵管を 0.05–0.10 秒という非常に短い時間に挿入し、産卵管が殻に挟まれることなく産卵を行うことが知られている [小宮竹史・森坂匡通, 日本生態学会第 57 回全国大会 (2010 年 3 月, 東京) 講演要旨: <http://www.esj.ne.jp/meeting/abst/57/P2-313.html>]. 今回の結果からカワヒガイは産卵管の挿入をスムーズにするための分泌物を出すのではなく、産卵管の基部の輸卵管および泌尿生殖輸管の周辺に筋肉を発達させ、密性結合組織により産卵管に強靭性をもたせることにより、瞬発的な産卵を可能にしていることが考えられる。

カワヒガイの産卵管の長さは卵巣の成熟状態に応じて変化することが示され、産卵期になると産卵管が著しく伸長することが示された。タナゴ亜科のタイリクバラタナゴでも成熟した個体は産卵期以外の時期は産卵管長が短く、産卵期になると産卵管を伸長することが知られている (Shirai, 1962; Kitamura, 2005)。またタイリクバラタナゴが産卵期間中に産卵管長を周期的に伸縮させることも知られている (Shirai, 1962; Kitamura, 2005)。これには、貝内での卵の産みつけ位置を産卵期中に変化させるという適応的な意義 (Kitamura, 2005) のほか、産卵期中の卵成熟・排卵に伴う血中の生殖腺刺激ホルモンや卵成熟誘起ホルモンなどの周期的な変化が関係していると考えられている (Asahina et al, 1983)。カワヒガイにおいても産卵期中に複数回の産卵を行うことから、ホルモンの刺激により産卵管が産卵期間中に伸縮する可能性が十分に考えられる。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費 (No. 22510245) の助成を受けた。

引用文献

- 朝比奈 潔・岩下いくお・羽生 功・日比谷 京. 1980. タイリクバラタナゴの生殖年周期. 日本水産学会誌, 46: 299–305.
- Asahina, K., I. Hanyu, K. Aida, H. Nishida and M. Kobayashi. 1983. Effects of hypophyseal, placental, hypophysiotropic, and steroid hormones on ovipositor elongation and ovulation in the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. Gen. Comp. Endocrinol., 52: 426–437.
- Asahina, K., H. Hirose and T. Hibiya. 1990. Annual reproductive cycle of the topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva* in the Tama River. Nippon Suisan Gakkaishi, 56: 243–247.
- deVlaming, V. 1983. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts. Pages 176–199 in J. C. Rankin, T. J. Pitcher and R. Duggan eds. Control processes in fish physiology. Croom Helm, London.
- Guerrero, G. 2007. Seasonal steroids variations and maturity stages in the female chub, *Leuciscus cephalus* L. (Pisces, Cyprinidae). Ital. J. Zool., 74: 317–324.
- Guerrero, G., R. Ferro and G. Ciarcia. 2005. Correlations between plasma levels of sex steroids and spermatogenesis during the sexual cycle of the chub, *Leuciscus cephalus* L. (Pisces: Cyprinidae). Zool. Stud.,

- 44: 228–233.
- Hatakeyama, H. and N. Akiyama. 2007. Annual reproductive cycle of a bitterling, *Tanakia tanago*, reared in an outdoor tank. *Zool. Sci.*, 24: 614–622.
- Hosoya, K. 1982. Classification of the cyprinid genus *Sarcocheilichthys* from Japan, with description of a new species. *Jpn. J. Ichthyol.*, 29: 127–138.
- 鹿野雄一・北村 淳・河村功一. 2010. 絶滅危惧種のウシモツゴの繁殖生態と保全策, および近縁種モツゴとの比較. *魚類学雑誌*, 57: 43–50.
- 片野 修. 1999. カワムツの夏—ある雑魚の生態. 京都大学学術出版会, 京都. 230 pp.
- Khlopova, A. V. and S. Kul'bachnyi. 2012. Histological structure of the female gonads and ovipositor of the European bitterling, *Rhodeus amarus* (Bloch, 1782). *Acta Zool.*, 94: 355–363.
- Kitamura, J. 2005. Seasonal change in the spatial utilization of host mussels in relation to ovipositor length by female rosy bitterling *Rhodeus ocellatus kurumeus*. *J. Fish Biol.*, 68: 594–607.
- Kitamura, J., T. Abe and J. Nakajima. 2008. The reproductive ecology of two subspecies of the bitterling *Rhodeus atremius*. *Ichthyol. Res.*, 56: 156–161.
- 国土交通省. 2020. 水文水質データベース: <http://www1.river.go.jp> (参照 2020-6-16)
- 国立天文台. 2020. 暦計算室, 各地のこよみ, 岐阜 (岐阜県) のこよみ: <https://eco.mtk.nao.ac.jp/koyomi/dni/dni22.html> (参照 2020-6-16)
- Lim, J.-Y. and W.-K. Lee. 2017. Annual reproductive cycle of *Acheilognathus majusculus*, a Korean endemic species. *Dev. Reprod.*, 21: 297–305.
- Marza, V. D. 1938. *Histphysiologie de l'ovogenese*. Hermann, Paris. 81 pp.
- Matsubara, T. 1994. Role of urine in the spawning of female rose bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 13: 399–405.
- 長田芳和. 1987. タナゴ類の分類と系統. 水野信彦・後藤 晃 (編), pp. 41–51. 日本の淡水魚類—その変異・分布・種分化をめぐる. 東海大学出版会, 東京.
- 中村守純. 1969. 日本のコイ科魚類 (日本産コイ科魚類の生活史に関する研究). 財団法人資料科学研究所, 東京. xiv + 455 pp.
- Nelson, J. S., T. C. Grande and M. V. H. Wilson. 2016. *Fishes of the world*, 5th edition. John Wiley & Sons, New Jersey. Xli + 707 pp.
- 奥沢公一・古川 清・会田勝美・羽生 功. 1986. ホンモノコ *Gnathopogon elongates caeruleascens* の生殖周期. *日本水産学会誌*, 52: 1957–1966.
- 大仲和樹・前田時和・北野 忠・古屋康則. 2009. 絶滅危惧種ウシモツゴ *Pseudorasbora pumila* subsp. sensu Nakamura (1963) の生殖周期. *魚類学雑誌*, 56: 47–58.
- Onikura, N., J. Nakajima, H. Kouno, Y. Sugimoto and J. Kaneto. 2010. Maturation and growth in the wild population of *Hemigrammocyppris rasborella*. *Aquacult. Sci.*, 58: 297–298.
- 齊藤憲治. 2018. ニシン・骨鰈類の系統進化. 日本魚類学会 (編). pp. 64–67. *魚類学の百科事典*. 丸善, 東京.
- Saitoh, K., T. Sado, M. H. Doosey, J. L. Bart Jr, J. G. Inoue, M. Nishida, R. L. Mayden and M. Miya. 2011. Evidence from mitochondrial genomics supports the lower Mesozoic of South Asia as the time and place of basal divergence of cypriniformes fishes (Actinopterygii: Ostariophysi). *Zool. J. Lin. Soc.*, 161: 633–662.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9: 671–675.
- 清水昭男. 2006. 魚類の生殖周期と水温等環境条件との関係. *水研センター研報*, 4: 1–12.
- 清水昭男・羽生 功. 1981. 春産卵魚アカヒレタビラの生殖周期. *日本水産学会誌*, 52: 333–339.
- Shimizu, A. and I. Hanyu. 1982. Environmental regulation of annual reproductive cycle in a spring-spawning bitterling *Acheilognathus tabira*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 48: 1583–1568.
- Shirai, K. 1962. Correlation between the grown of the ovipositor and ovarian conditions in the bitterling, *Rhodeus ocellatus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 13: 137–151.
- Shirai, K. 1964. Histological study on the ovipositor of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 14: 193–197.
- Stout, C. C., M. Tan, A. R. Lemmon, E. M. Lemmon and J. W. Armbruster. 2016. Resolving Cypriniformes relationships using an anchored enrichment approach. *BMC Evol. Biol.*, 16: 244.
- Ünver, B. and S. Ü. Saraydın. 2012. Macroscopical and histological analysis of gonadal development of *Squalius sephalus* (L., 1758) in Tödürge Lake, Turkey. *Pak. Vet. J.*, 32: 55–59.
- Wallace, R. A. and K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.*, 21: 325–343.
- Yamamoto, K. and F. Yamazaki. 1961. Rhythm of development in the oocyte of the gold-fish, *Carassius auratus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 12: 93–11.
- Yamane, H., Y. Nagata and K. Watanabe. 2016. Exploitation of the eggs of nest associates by the host fish *Pseudobagrus nudiceps*. *Ichthyol. Res.*, 63: 23–30.