

博士學位論文

論文要旨

人工繁殖を中心とした
希少淡水魚類の生息域外保存に関する実験的研究

平成 27 年 1 月 9 日

近畿大学大学院
農学研究科 環境管理学専攻

北川 哲郎

近年、我が国に生息する淡水魚類の多くが絶滅の危機に瀕しており、環境省版レッドリストにおいては、我が国の在来魚類の約半数となる 148 種・亜種までが絶滅危惧種に位置づけられている。生物を保護（Protection）する手段には、保護対象生物が生息する野外の生態系をそのまま保つ生息域内保全（*In situ Conservation*）と、対象生物を研究室に隔離して存在を維持する生息域外保存（*Ex situ Preservation*）の 2 つがある。希少生物の保護においては、生息域内保全が優先されるべきであるが、生態系はさまざまな要素が複雑に絡み合い限定要因の特定が困難であるため、効果的な保護の実現には生息域外保存による系統の維持が不可欠といえる。水族館などで実施される現行の希少淡水魚類の生息域外保存は、経験則に基づく系統飼育が主流で、繁殖効率の低下や近交弱勢など多くの問題点を抱えている。安定した生物保護の達成には、科学的根拠に基づく生息域外保存手法の確立が急務で、とりわけ実効性の高い定式化した人工繁殖技術が求められる。希少淡水魚類の人工繁殖における技術開発に向けた研究基盤として、水産増殖学分野においては、生息域外保存への活用が期待できる技術が実用に供されている。しかし、水産増殖技術を希少淡水魚の人工繁殖に転用した研究例は極めて少なく、技術開発ならびに手法の体系化は進められていない。本研究では、生息域外保存の体系化に向け、室内における技術開発に用いる実験動物として優れた条件を備える外来亜種タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* を材料として、希少淡水魚類の人工繁殖に関する技術開発を試みた。さらに、人工繁殖の煩雑さや産業価値の低さから研究が進められていない、あるいは希少種保護の観点から今後実験動物としての価値が見込まれる複数種を対象として繁殖特性調査を実施し、人工繁殖技術マニュアル構築にむけた基盤を築いた。

人工繁殖技術の開発

好適採卵親魚の選抜 搾出法による人工繁殖に適した採卵親魚を選抜するため、指標となり得る部位を検証した。検証には 5 形態・形質（体長、体重、産卵管長、臀鰭長、体高）ならびに形態情報から得られた 5 つの指数を用いた。検証の結果、産卵管長、OI（体長 / 産卵管長）、FU（体長 / 臀鰭長）、DU（体高 / 臀鰭長）と採卵数との間に強い正の相関が認められた（*cor2 test*, $p < 0.01$ ）。さらに、採卵数、孵化数、採卵数、孵化数と孵化率との間に強い正の相関が示されたほか（*cor2 test*, $p < 0.01$ ）、体高に関する 2 項目（体高比：体長 / 体高、DU）との間に負の相関が認められた（*cor2 test*, $p < 0.05$ ）。本実験により、産卵管長ならびに体高に着目することで搾出法に際する好適親魚が得られることが強く示唆された。

ホルモン投与による催熟 完全な人為環境下におけるタイリクバラタナゴの人工繁殖を目指し、ホルモン剤投与による人工催熟を試みた。本実験では、投与物として 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OHP ; 0.01 $\mu\text{g} / \text{g BW}$) とサケ脳下

垂体 (SPE ; 200 μg / g BW) を用いた。産卵管の伸長効果は両製剤に認められ (steel - dwass test, $p < 0.05$), さらに GSI にも増加傾向が認められた。生殖腺組織切片像には卵黄胞期から前成熟期にあたる卵巣卵が散在し, 一部に退行・吸収卵もみられた。卵は SPE 区のみから 83 粒が搾出され, うち 43 個体が孵化し, 17 個体が浮上期に達した。以上により, タイリクバラタナゴに対するホルモン剤の催熟効果が確認され, 人工繁殖技術としての実用性が示された。

長期薬浴による卵菌の抑制 淡水魚類の初期飼育時に頻出する卵菌 (水カビ病) を抑制するため, 長期薬浴による生残率の向上を試みた。本実験では, 曝気した水道水 (対照区), 0.5 %食塩水, 0.1 %食塩水, 1 ppm メチレンブルー水溶液中で, それぞれ約 120 尾の孵化仔魚を 20 日間飼育し, 生残率および卵菌の出現様式を検証した。飼育実験の結果, メチレンブルー添加区が最も高い生残率を示し, 卵菌抑制に有効であることが確かめられた (log rank test, $p < 0.01$)。食塩を添加した両区では, 卵菌は抑制された一方で生残率が改善せず, 本実験の濃度では卵菌の抑制効果以上に魚体への悪影響が大きいと判断された。

好適初期餌料系列の構築 人為環境下における好適な初期餌料系列の確立に向け, 環境要因による影響が少ない生理的機能に着目し, タンパク質分解酵素のトリプシンとキモトリプシン, 脂質分解酵素リパーゼ, 炭水化物分解酵素アミラーゼの各活性の初期変動を調査した。各消化酵素の活性は, 孵化後 5 日目には上昇を開始していた。さらに, アミラーゼ活性値の上昇率の変化から, 炭水化物吸収能力は孵化後約 30 日目までに急速に向上することが明らかとなった。アミラーゼ活性値の上昇率が変化した時期は消化管内容物および消化管伸長の変曲期と同期し, 消化酵素分析を用いた餌料転換期推定の有効性が示された。また, 本研究では摂餌物が酵素活性に与える影響は認められず, 飼育個体を用いた好適餌料の推定が可能であることが確かめられた。

繁殖特性調査

繁殖実験および飼育個体を用いた発育段階区分を実施し, 6 科・亜科 7 属 15 種・亜種 (タナゴ亜科 6 種, ダニオ亜科 1 種, ヒガイ亜科 1 種, カマツカ亜科 2 種, フクドジョウ亜科 4 種, ゴクラクギョ亜科 1 種 ; 3 未記載種を含む) の産卵行動ならびに初期成長に関する情報を集積した。本調査では, 対象とした種の基本的な繁殖手法を示すと同時に, モツゴ属 *Pseudorasbora* ならびにゼゼラ属 *Biwia* の近縁種間における繁殖基質の嗜好や繁殖行動の違い, タイワンキンギョ *Macropodus opercularis* の繁殖特性における地域差, ホトケドジョウ属の近縁種間に見られる初期成長特性の違いを明らかとした。今回得られた成果は, 人工繁殖技術の開発に際する基盤のみならず, 他分野に対する生態情報の提供や生息域内保全へのフィードバックに資すると期待できる。

研究業績一覧表

| 論文題目 | 著者 | 発表誌名 | 博士学位論文 内容との対比 |
|---|-------------------------------|---------------------------------|------------------|
| The current status of freshwater fishes in the Naka-ikemi Wetland, Fukui Prefecture, Japan | <u>Kitagawa, T.</u> , (ほか 6名) | Biogeography, 16, 71-78. (2014) | IV - iv |
| 飼育下における沖縄産タイワンキンギョの繁殖特性 | <u>北川哲郎</u> ・小田優花・細谷和海 | 近畿大学農学部紀要, 46, 31-36. (2013) | III - vi |
| 福井県中池見湿地におけるホトケドジョウの生息現況 | <u>北川哲郎</u> , (ほか 4名) | 魚類学雑誌, 60, 27-33. (2013) | IV - iv |
| バラタナゴのシャーレ式人工繁殖法における水カビ病の抑制技術 | <u>北川哲郎</u> ・細谷和海 | 水産増殖, 60, 139-141. (2012) | II - iii |
| 飼育下におけるタイワンキンギョの繁殖特性 | <u>北川哲郎</u> ・森下匠・根来 央・細谷和海 | 近畿大学農学部紀要, 44, 55-61. (2011) | III - vi |
| Suitable early food for rosy bitterling, <i>Rhodeus ocellatus</i> , estimated from digestive enzyme activities. | <u>Kitagawa T.</u> , (ほか 4名) | Aquaculture. (改訂中) | II - iv |
| ステロイドホルモンとサケ脳下垂体を用いたタイリクバラタナゴの催熟 | 小田優花・ <u>北川哲郎</u> ・細谷和海 | 水産増殖. (印刷中) | II - ii |
| 魚食性コイ科魚類ハスの初期発育特性 | 畑田賢吾・ <u>北川哲郎</u> ・小田優花・細谷和海 | 近畿大学農学部紀要, 48, (印刷中) | III - iii |

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| 公表年月日 | 出版物の種類及び名称 |
| 平成27年2月3日 | 博士学位論文 |
| 公表内容 | 人工繁殖を中心とした希少淡水魚類の 生息域外保存に関する実験的研究 |
| 全文・要約 | 要約 |

SUMMARY

Experimental study about the artificial breeding
technique on the *Ex situ* preservation for
Japanese endangered freshwater fishes

Tetsuro Kitagawa

Japanese freshwater fishes are depleted under the influence of impediments such as feeding damage and genetic pollution from alien species, as well as farmland consolidation in paddy fields and urbanization. Therefore, 167 species and/or subspecies of fishes are categorized as endangered in the latest Red List, Japan. This results in an urgent need for protective measures. Protection of threatened species can be successfully accomplished by the simultaneous pursuit of “*In situ* conservation” and “*Ex situ* preservation”. *In situ* conservation literally should be given priority in the protection of threatened species; however, *Ex situ* preservation as a means to avoid extinction, becomes very important in case habitats of the target species are severely threatened.

In this study, artificial breeding techniques of the endangered fishes are developed for the formulation of stock preservation method, with Chinese rosy bitterling *Rhodeus ocellatus ocellatus* as one of the experimental animals. Furthermore, these fishes can be easily collected for demonstration experiments because they are distributed all over the Japanese freshwaters, and cynically are regarded as suitable materials for the development of artificial breeding techniques. In addition, reproductive characteristics and initial growth pattern of some species are investigated as bases for the development of artificial breeding methods.

Technical development

Selection of spawner in the schale’s method Suitable spawner conditions during artificial breeding by the schale’s method were investigated using the correlation coefficient among the number of eggs, hatching rate, five morphological characters and five indexes. Higher correlation coefficients with the number of eggs were observed in characters; ovipositor length (OL), and three indexes; ovipositor index (OI: OL / standard length), fin unit (FU: OL / anal fin length) and depth unit (DU: OL / body depth). High correlation with the hatching rate was observed in three characters and one index: number of eggs, number of hatches, body depth to standard length, and DU. These results implied that ovipositor length and DU are the characters effect enough for the selection of spawner by the schale’s method.

Artificial maturation of bitterlings by using sex hormone Bitterlings generally have unique reproductive behaviors in that they always need live freshwater mussels as a spawning bed. Artificial breeding of the endangered bitterlings without host mussels has not been successful by empirical methods. A technique of artificial maturation was assayed for endangered bitterlings with sex hormone, under completely artificial environment. Salmon pituitary extract or 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OHP) were

injected into the abdominal cavity of female fishes in laboratory. Females with an ovipositor prolonged by the hormone injection, were stripped of their eggs after 24 h. Salmon pituitary extract or 17 α -OHP induced females to elongate the ovipositor and the gonad make (steel-dwass test, $p < 0.05$). However, the ovipositor that was induced to elongate by 17 α -OHP injection was regarded as an aberration. Incidentally eighty-three eggs were obtained from females into which Salmon pituitary extract had been injected; thereby, 17 larvae emerged. Oocytes in the pre-maturation stage and regressing eggs were observed in sections of the gonads. These results show that salmon pituitary extract is effective to induce ovulation.

Long-term sterilization Antimicrobial activity against water mould during artificial breeding by the schale's method was investigated using solutions: 0.1 % saline, 0.5% saline and 0.0001% methylene blue. Water mould proliferation was inhibited by all three solutions. The highest survival rate was recorded in methylene blue solution. However, the saline solutions did not contribute to the improvement of the survival rate by themselves. These results clarified that the sterilization in methylene blue solution was effective to controll water mould.

Suitable food estimated from the digestive enzyme activities The digestive enzyme activities were analyzed to obtain information about the artificial diet applicable for Japanese endangered bitterlings. Activities of trypsin, chymotrypsin, lipase, and amylase were detected at least five days after hatching. Feed-dependent changes were not observed in each enzyme activity. Amylase activity markedly increased at 10–30 days after hatching, whereas activities of other enzymes increased with time. The peak of amylase activity per body weight coincided with the change of gastrointestinal contents. Suitable feed by using digestive enzyme activities could be regarded as an objective scale to specify the composition of early food.

Reproductive characteristics and initial growth pattern

In captive environment, 15 species (6 species of Acheilognathinae, 1 species of Danioninae, 1 species of Sarcocheilichthyinae, 2 species of Gobioninae, 4 species of Noemacheilinae, and 1 species of Belontiidae) have been investigated so far. Ecological information were provided by breeding experiments and identification of developmental stages. The achievements of this paragraph would be contributed to *Ex situ* preservation as well as *In situ* conservation and even taxonomical studies in terms of biodiversity.