

イカナゴ仔稚魚における耳石輪紋形成の日周性の確認

大美 博昭・日下部敬之・斉藤 真美*

Validation of the daily deposition of otolith increments in the Japanese sand lance larvae and juveniles

Hiroaki Omi, Takayuki Kusakabe and Mami Saito

イカナゴ *Ammodytes personatus* は東部瀬戸内海の大阪湾、播磨灘において船びき網漁業の重要漁獲物となっている。本種は当海域では12～1月にかけて産卵し、2月末から5月にかけて全長30～60mmに成長した稚魚が漁獲対象となる。それゆえ、イカナゴの漁獲量はその年の発生群の加入量によって大きく左右される。両海域ではイカナゴ資源の維持と漁業経営の安定を目指して、解禁日、終漁日、操業時間などを設定する資源管理型漁業が行われている。この中で解禁日の設定に当たっては、漁業者の代表船が試験操業を行い、その漁獲物の平均全長が解禁基準サイズに達していない場合は、推定される1日あたりの成長量を用いて基準サイズ到達日を算出し、解禁日としている。ここで用いられる1日あたりの成長量は、過去の漁獲物の平均全長推移を参考にし求められたもので、実際の成長量はこれまで明らかにされておらず、資源管理技術の向上にとっての障害となっている。管理効果をさらに向上させるためには、より正確なイカナゴ仔稚魚の成長解析が必要となってきている。

一般に仔稚魚の個体ごとの成長解析には、耳石に形成される微細輪紋が用いられる¹⁾が、その前提として輪紋形成の日周性および第1輪の形成時期が確認される必要がある。イカナゴ類では、北海などに生息する *Ammodytes marinus* で輪紋形成の日周性

が確認され、ふ化時から輪紋が形成されていることが報告されている²⁾。一方、日本産イカナゴについては、天然海域で採集したイカナゴ稚魚の扁平石の中心付近に明瞭な輪紋が存在し、その半径と飼育で得られたイカナゴふ化仔魚の扁平石の半径の大きさがほぼ一致することから、それがふ化時に形成された輪紋（ふ化輪）であることが示唆されている³⁾ものの、輪紋形成の日周性については未だ確認されていない^{3,4)}。日周性の検証には幾つかの方法がある⁵⁾が、本報ではある時点で耳石に標識を施し、その後の飼育日数と輪紋数を比較する方法および、卵からの飼育日数と輪紋数を比較する方法を用いて、イカナゴ仔稚魚の耳石輪紋形成の日周性およびふ化輪について検証を行った。

材料と方法

1. アリザリンコンプレキソン標識試験

1999年2月25日に船びき網により、生きた状態で漁獲されたイカナゴ稚魚を供試魚とした。イカナゴは水産試験場に搬送後、500ℓ 黒色ポリエチレン水槽に収容し、自然光、自然水温下で流水飼育を行った。餌にはアルテミア *Artemia* sp. ノープリウス（以下アルテミア）および配合飼料を用いた。1回目のアリザリンコンプレキソン（以下ALC）標識試験は、イカナゴが配合飼料に十分に馴れた飼育12

日目に行った。恒温室内で水温を11℃に保った30ℓポリエチレン水槽に100ppmALC溶液を入れ、イカナゴ稚魚を20尾収容し、12L：12Dの明暗条件下で24時間浸漬した。その後8日間飼育し、9日目に2回目の標識を1回目と同様に行った。イカナゴは2回目の標識後、5日間飼育したのち取り上げ、10%中性ホルマリンで固定後、速やかに95%エタノール中に移しかえ保存した。

ALC標識魚20尾のうち8個体（標準体長範囲43.8～55.6mm）について実体顕微鏡下で扁平石を取りだし、プレパラート上に封入後、蛍光顕微鏡下（G励起）でALC標識を確認し、適宜研磨を施して、光学顕微鏡（以下光顕）で標識間の輪紋数を計数した。耳石輪紋の計数は耳石解析装置（ラトック社製 APR/W）で行った。

2. 卵からの飼育（1回目）

三重県科学技術振興センター水産技術センターが飼育していた夏眠中の伊勢湾産イカナゴ親魚を、1996年10月18日に夏眠床⁶⁾とともに大阪府立水産試験場に搬送し、親魚が夏眠を終えて水中へ出てくるまで、自然光、自然水温下で流水飼育を行った。1997年1月6日に、成熟した親魚より雌雄各6個体（全長範囲；雄99～119mm，雌108～118mm）を選びだし、湿導法により人工授精を行った。イカナゴ卵は粘性沈着卵であるため、1個のシャーレ上に1対の親魚から採取した受精卵を付着させ、恒温室内で水温をほぼ12℃に保った200ℓ黒色ポリエチレン水槽に収容した。ふ化日を揃えるために、受精卵の大半がふ化した日の仔魚を残し、それ以外は水槽から取り除いた。仔魚の飼育は12L：12Dの明暗条件下でふ化後5日目までは止水、それ以後は流水（換水率50～100%/日）で行った。餌は、ふ化後37日目まではシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis*（以下ワムシ）を水槽内の密度が5個体/ml、38日目からはワムシ5個体/mlおよびアルテミア1～3個体/ml、44日目以降はアルテミア1～3個体/mlになるよう給餌し、ふ化後57日目で飼育を終了した。飼育期間中には4～10日の間隔で、1回あたり20尾以上の仔魚を採取し、10%中性ホルマリンで固定した後、背索屈曲前の個体は背索長を、背索屈曲後の個

体は標準体長（以下、体長）を万能投影機で測定し、すぐに95%エタノール中に移しかえて保存した。

3. 卵からの飼育（2回目）

親魚には、兵庫県立水産試験場（現、兵庫県水産技術センター）が1998年12月28日に播磨灘鹿ノ瀬海域で文鎮こぎと呼ばれる空釣り漁具⁷⁾により採集したイカナゴの中から、よく成熟した親魚を雌雄各9個体（全長範囲；雄134～162mm，雌138～155mm）選び出し、湿導法により人工授精を行い、受精卵をシャーレ上に付着させた。受精卵は、大阪府立水産試験場に搬送後、恒温室内で水温を12℃に保った200ℓ黒色ポリエチレン水槽に収容した。収容後4日目に徐々に水温を11℃まで下げた。1回目の飼育と同様にふ化日を揃え、12L：12Dの明暗条件下で仔魚の飼育を行った。ただし、餌はふ化後15日目までワムシ5～8個体/ml、16日目からワムシ8～10個体/mlおよびアルテミア0.1～0.3個体/ml、28日目からアルテミア0.1個体/mlとノルパックネット（口径45cm，目合100μm）で採集した天然動物プランクトンを0.03個体/mlになるよう給餌し、ふ化後61日目で飼育を終了した。飼育期間中には5～10日間隔で、1回あたり10～44尾の仔魚を採取した。採取した仔魚の処理については1回目の飼育と同様に行った。

4. 飼育仔魚の耳石輪紋の観察と計数

飼育日数と輪紋数の関係を求めるために、1回目の飼育におけるふ化後45～57日の22個体（体長範囲12.2～15.7mm）および2回目の飼育におけるふ化後41日～61日の30個体（体長範囲15.5～28.5mm）について、左右の扁平石を実体顕微鏡下で摘出し、プレパラート上に封入した後、原則として左眼側の扁平石について輪紋の計数を行った。イカナゴの耳石中心付近には光顕で判別できない輪紋がある³⁾ことから、プレパラート上に封入した耳石を耐水研磨紙（#1000，#2000），ラッピングフィルム（9.0μm），アルミナ懸濁液（0.3μm）で耳石核が表出するまで研磨し、0.5N塩酸で表面をエッチング、白金蒸着後、走査型電子顕微鏡（HITACHI社製 S4200，以下SEM）を用いて耳石の中心部を写真撮影することにより、光顕では輪紋の判別が不可能な部分について計数を行った。計数に際しては Tsukamoto

*et. al.*³⁾を参考に、耳石中心付近に存在する明瞭な輪紋をふ化輪とし、その位置をSEM写真での計数開始点とした。SEM写真での計数值とそれより外側の輪紋を光顕で計数した結果を足し合わせ輪紋数とした。なお、耳石輪紋の実際の計数、計測に当たっては写真および観察画像を耳石解析装置に取り込んで行った。

結 果

1. ALC標識間の輪紋数

観察した個体全てにおいて、2本のALC標識が確認された。標識間には、2回の染色間の飼育日数と同数の8本の輪紋が形成されていた(図1)。

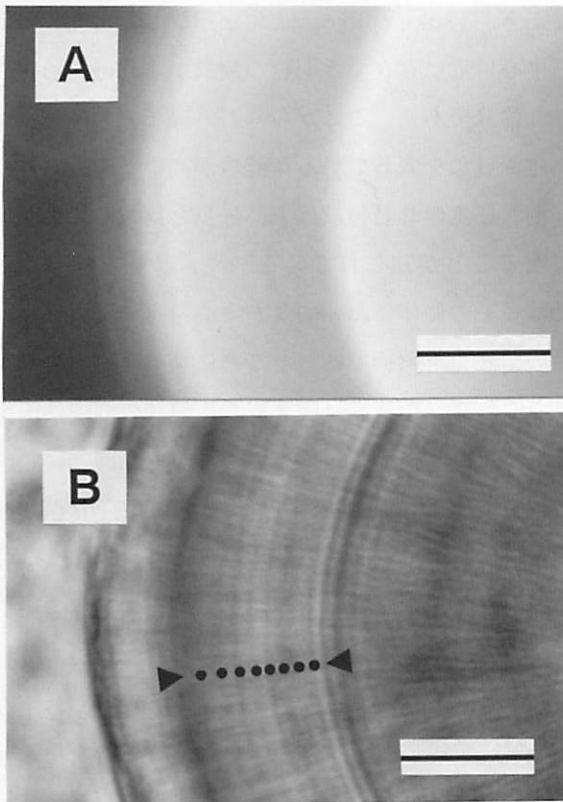


図1 ALC染色を8日の間において2回施したイカナゴ天然稚魚(標準体長46.1mm)の扁平石の顕微鏡写真。

A: 蛍光顕微鏡; B: 光学顕微鏡。
図中の横棒は20 μ mを示す。

2. 飼育仔魚の成長

1回目の飼育では受精後11日目からふ化が始まり、12日目に多くがふ化したため、12日目にふ化した個体を残した。ふ化仔魚の平均体長は 3.9 ± 0.2 mm (N=23, \pm 以下は標準偏差, 以下同じ)であり、飼育を終了したふ化後57日目には平均体長 12.7 ± 1.4 mm

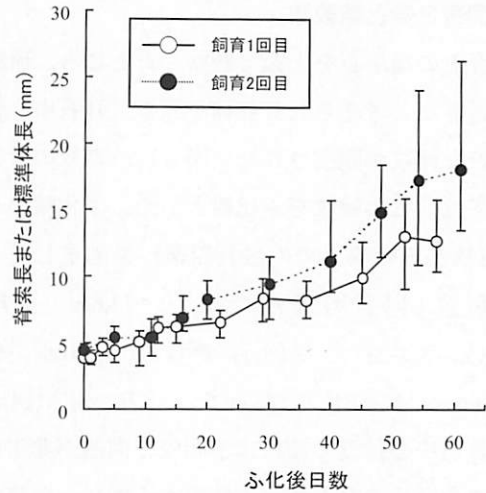


図2 卵から飼育を行ったイカナゴ仔魚の成長。
○: 1回目の飼育; ●: 2回目の飼育。
図中の縦棒は体長の範囲を示す。

(N=24)まで成長した。一方、2回目の飼育では受精後9日目からふ化が始まり、11日目に多くがふ化したため、11日目にふ化した個体を残した。ふ化仔魚の平均体長は 4.4 ± 0.3 mm (N=20)で、飼育を終了したふ化後61日目には平均体長 18.1 ± 4.1 mm (N=10)まで成長した(図2)。

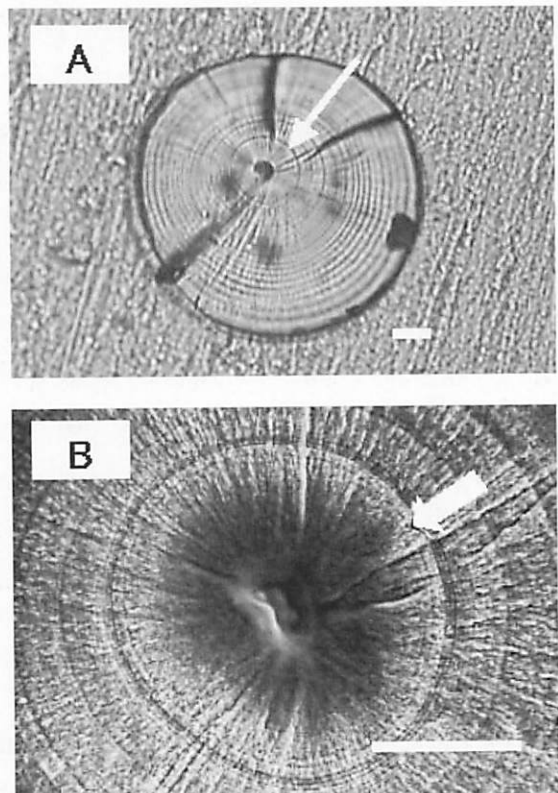


図3 卵から飼育を行ったイカナゴ仔魚(ふ化後52日, 標準体長15.9mm)の扁平石の顕微鏡写真
A: 光学顕微鏡; B: 電子顕微鏡。
図中の矢印はふ化輪と仮定した輪紋の位置を、横棒は10 μ mをそれぞれ示す。

3. 飼育日数と輪紋数

飼育魚の扁平石を光顕で観察したところ、研磨を施し過ぎたと考えられる個体を除き、耳石中心付近に明瞭な輪紋が観察された(図3)。輪紋の計数に際しては、この輪紋をふ化輪とした。ふ化輪の半径(耳石核から輪紋までの最長距離)を測定したところ、飼育1回目の仔魚では7.9~11.6 μm (平均9.7 \pm 1.0 μm , N=21), 2回目では5.5~11.6 μm (平均8.6 \pm 1.4 μm , N=24)であった。一方、SEM観察では、耳石中心付近の輪紋は不明瞭で間隔が非常に狭く、また多くの耳石ではふ化輪から約10 μm の範囲に中心から外縁に向かって放射状の粗い凹凸が多数存在し、耳石表面がささくれだつた状態になっており、この凹凸が輪紋よりも相対的に大きいために輪紋の読みとりが困難であった。そこで、この放射状の凹凸と比較して同心円状の輪紋の方がより明瞭に確認できた耳石だけを選び、輪紋の計数を行った。計数に供することができたのは観察した52個体中7個体であった。この7個体については輪紋数とふ化後日数は1~3本の差はみられたものの、ほぼ一致した(表1)。

表1 耳石中心付近の輪紋が判別可能であった個体における輪紋の計数結果

飼育 No	標準体長 (mm)	ふ化輪径 (μm)	ふ化後 日数	ふ化輪から耳石外 縁までの輪紋数
1	11.7	10.5	45	44
1	15.9	10.8	52	52
1	15.2	9.9	57	58
2	26.0	8.1	59	60
2	21.3	9.6	60	59
2	18.6	9.6	61	58
2	23.5	8.5	61	60

ふ化輪はTsukamoto *et al.*³⁾を参考に推定したもの

考 察

本研究では、2通りの方法を用いてイカナゴの耳石輪紋形成の日周性の検証を試みた。まず、耳石に標識を施す方法では、2本のALC標識間の輪紋数が計数を行った全ての個体において標識試験の間の飼育日数と一致した。この結果から、イカナゴ扁平

石における輪紋形成の日周性が確認された。一方、卵からの飼育を用いる方法は、輪紋形成の日周性を確認とふ化輪について検証した。Tsukamoto *et al.*³⁾では、イカナゴふ化仔魚の扁平石の半径は7.5~9.5 μm (平均8.5 μm)、天然海域で採集された稚魚の扁平石にみられた明瞭な輪紋の半径は6.3~11.3 μm (平均9.0 μm)と報告されており、今回、扁平石中心付近に観察された明瞭な輪紋も半径の大きさがほぼ一致した。この明瞭な輪紋は光顕観察ではほとんどの個体で確認できたものの、SEM観察において耳石中心付近の輪紋を判別できた個体はわずかであった。しかし、計数が可能であった個体については耳石外縁までの輪紋数とふ化後日数はほぼ一致したことから、Tsukamoto *et al.*³⁾が指摘したように扁平石中心付近に存在する明瞭な輪紋がふ化時に形成された輪紋であり、ここから耳石外縁までの輪紋数がふ化後日数を表している可能性が高いと考えられる。

飼育仔魚の耳石輪紋は天然仔魚と比較して不明瞭になることが知られている⁸⁻¹⁰⁾。今回、SEM観察では多くの個体において耳石中心付近の輪紋間隔は極めて狭く不明瞭であったことに加え、耳石表面はささくれ立った状態(図3)で、輪紋の判別が困難であった。イカナゴ天然稚魚の耳石を今回と同じ前処理を施してSEM観察を行っても、耳石中心付近の輪紋は明瞭で表面がささくれ立った状態にはならない(斉藤、未発表)ことから、耳石の処理方法ではなく、観察に供した飼育魚の耳石に問題があったことが考えられる。イカナゴ仔魚の飼育下における成長量は、伊勢湾産イカナゴを親魚としたふ化仔魚を水温10.1 $^{\circ}\text{C}$ で30日間飼育した結果では0.24mm/日¹¹⁾であった。今回の飼育におけるふ化後30日前後までの成長量は、1回目の飼育ではふ化後29日目で0.15mm/日、2回目の飼育ではふ化後30日目で0.17mm/日であった。特に1回目の飼育では同じ伊勢湾産イカナゴが親魚である山田¹¹⁾の結果と比較して低成長であったことが窺われる。Geffen⁵⁾も卵からの飼育で日周性の検証を行う場合の重要な点として、仔魚の高成長、高生残を達成する飼育環境を挙げており、今回の飼育はこの条件を十分に満たしている

とは言い難い。カレイ類の一種 *Pseudopleuronectes americanus* の稚魚を用いた飼育試験では成長速度がある一定の値を下回ると耳石輪紋を識別できなくなることが報告されており¹²⁾、本報告で耳石中心付近の輪紋の識別が困難であったことも低成長と関係があるのかもしれない。この点については、今後、追証する必要があると考えられる。

謝 辞

三重県科学技術振興センター水産研究部の山田浩且氏、兵庫県立農林水産技術総合センター但馬水産技術センターの玉木哲也氏、大阪府深日漁業協同組合の皆様には親魚の入手に際し、大変便宜を図っていただきました。また、大阪府漁業振興基金栽培漁業センターの皆様には餌の入手、飼育方法などにご助言、ご協力をいただきました。標本整理については大野照代氏、高瀬玲子氏、楠本純子氏に多大なご協力いただきました。京都大学大学院教授田中 克博士はじめ、本報告の御校閲の労と有益な助言を賜りました方々に、ここに深謝いたします。

文 献

- 1) Pannella, G. (1971) Fish otoliths: Daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 173, 1124-1127.
- 2) Wright, P. J. (1993) Otolith microstructure of the lesser sandeel, *Ammodytes marinus*. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 73, 245-148.
- 3) Tsukamoto, Y., Y. Yamada and H. Zenitani (2002) Microincrements of otoliths of the Japanese sand lance *Ammodytes personatus* during early life stages. *Fish Sci.*, 68, 1158-1160.
- 4) 山下 洋 (1983) 三陸大槌湾周辺海域におけるイカナゴの資源加入に関する初期生態の研究. 学位論文, 東京大学, 256pp.
- 5) Geffen, A. J. (1992) Validation of otolith increment deposition rate. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 117, 101-113.
- 6) 山田浩且・久野正博 (1999) 伊勢湾産イカナゴの成熟に及ぼす水温および光周期の影響. *水産海洋研究*, 63(3), 14-21.
- 7) 反田 實・岡本繁好 (1992) 瀬戸内海東部海域におけるイカナゴの資源変動—生態的視点から—, *水産海洋研究*, 56, 201-205.
- 8) Laroche, J. L., S. L. Richardson, and A. A. Rosenberg (1982) Age and growth of a pleuronectid, *Parophrtes vetulus*, during the pelagic larval period in oregon coastal waters. *Fish. Bull., U. S.*, 80, 93-104.
- 9) Tsuji, S. and T. Aoyama (1982) Daily growth increments observed in otoliths of the larvae of Japanese red sea bream *Pagrus major* (TEMMINCK et SCHELEGEL). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48, 1559-1562.
- 10) Campana, S. E. (1983) Microstructural growth patterns in the otoliths of larval and juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Can. J. Zool.*, 62, 1507-1512.
- 11) 山田浩且 (1998) 伊勢湾産イカナゴのふ化特性と外部栄養への転換. *日水誌*, 64, 440-446.
- 12) Sogard, S. M. (1991) Interpretation of otolith microstructure in juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) ontogenic development, daily increment validation and somatic growth relationships. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48, 1862-1871.