

汚濁水中で飼育されたヒラメ耳石の日間成長量の低下

樋田 史郎・山田 敦

Decreases in the daily otolith growth increment width of flounder
(*Paralichthys olivaceus*) upon exposure to high turbidity conditions.*

Shiro TOIDA** , Atsushi YAMADA***

Abstract

Daily otolith growth increments were analyzed based on a rearing experiment, using a scanning electron microscope (SEM). The rearing experiment was conducted for about one month using 0 year old flounder (*Paralichthys olivaceus*) which were produced in the Prefectural sea farming center and were marked with alizarin complexon (ALC). The water quality in the artificially polluted tank was equivalent to that of central Tokyo Bay. It was confirmed that any incremental rings in the otolith were formed daily, by referring between the fluorescence micrograph of the otolith marked with ALC, and the SEM micrograph of that same otolith. Information on the daily growth increment width for every date was acquired, by width measurements of every band. In the control experiment (filtrated sea water), a significant negative correlation between temperature and width of daily growth increments was observed. Remarkable depression in daily growth increment width was observed under artificially polluted conditions. It is suggested that through analysis of otoliths, the past environmental conditions experienced by the fish may be inferred.

緒 言

1971年に魚類の耳石に日周輪があることが発見され (Pannella¹⁾)、1980年代に入って我が国でもマダイやカタクチイワシの稚仔魚を用いて日周輪の研究が開始された (Tsuji and Aoyama^{2,3)})。日周輪の研究は、従来は光学顕微鏡による観察が容易な稚仔魚に限られていたが、走査型電子顕微鏡を用いることで透過観察の困難な耳石や輪紋の微細な耳石についても耳石上の日周輪を観察できるようになった。魚類の耳石輪紋には、生育の過程における生理状態の履歴が記録されている可能性がある。魚類生育場所においておかれていた環境状態をさかのぼって評価することができれば、水質環境評価や、栽培漁業に多くの情報を付与することができる。すなわち、水質環境評価においては、従来の手法では大規模な汚染の発生等の目に見える変化がなければ評価困難であったが、これまでは見過ごされてきたようなレベルの環境汚染をさかのぼって検出可能になると考えられる。栽培種苗の放流においては、放流後の生育の良否について途中の経過を把握することが困難であったが、生育環境をさかのぼって評価することで放流効果を詳細に検証することができる。耳石に刻まれる輪紋の形成に影響を及ぼす要因については、光、水温及び餌等の外的要因が関わって

ることが知られている (Geffen⁴⁾, Campana・Neilson⁵⁾, Neilson・Geen⁶⁾, Campana⁷⁾)。走査型電子顕微鏡によるシロギス耳石についての検討では、耳石日周輪の形成形態が生育環境により異なることが明らかとなった (樋田, 未発表)。しかし、生理状態の履歴すなわち耳石の日周輪形成が、実際の生育場所における環境履歴を反映するか、そしてそれを日単位で読み取ることの可能性を検討した例はない。

本研究では、環境履歴の評価の基礎的な知見として、ヒラメを用いた飼育実験とそれに伴う耳石日周輪の解析をおこない、環境履歴評価手法の可能性について検討した。

材料と方法

飼育実験 飼育実験は、平成12年7月17日から9月1日まで、当所栽培漁業センターの飼育施設でおこなわれた。

供試魚は、平成12年4月21日に当所栽培漁業センターで孵化したヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 62尾を用いた。供試魚は、耳石輪紋の日周性を確認するためにALC標識 (中村・桑田⁸⁾) が施された。ALC標識は、6月15日のみの1回、6月15日及び6月20日の2回、ならびに6月15日及び6月28日の2回の合計3種類の標識パターンが設定され

た。これらの標識魚は、無作為に水槽に収容した。

飼育は、濾過海水の流水式にした100lパンライト水槽を2面使用し、供試魚をそれぞれ30尾ずつ無作為に収容しておこなった(Fig.1)。給餌は、自動給餌装置によりドライペレットを与えた。給餌量は、日間給餌率が3%程度となるように調節した。

水槽の1個を対照区とした。対照区においては、飼育期間中をとおして、換水率を200(回/日)、濾過海水注入流量を8.4(l/分)とし、十分なエアレーションをおこなった。水温の制御はおこなわず、飼育期間中は23.1~28.0℃で推移した。他方の水槽を汚濁環境区として、汚

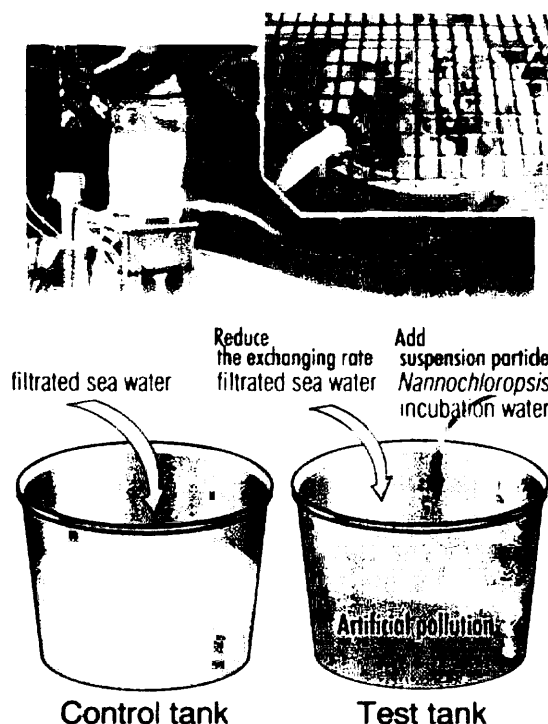


Fig.1 Appearance of rearing equipment, and setup of rearing experiment. Rearing equipment is shown in the photograph (above). Setup of the rearing experiment is also below.

濁条件を設定した。

汚濁条件 汚濁環境区では、懸濁粒子としてナンノクロロプシス(*Nannochloropsis oculata*)培養水を一定の比率で注入し、併せて水質悪化の要因として換水率の縮小をおこない、人為的な汚濁環境を作り出した。

ナンノクロロプシス培養水は、当所の栽培漁業センターにおいて、通常の種苗生産に必要な餌料として継続的に生産されているものを利用した。ナンノクロロプシスの培養は、連続的な注水と汲み上げをおこない、施肥は硫化アンモニウム:100(g/ton)、尿素:10(g/ton)、過リン酸石灰:7.5(g/ton)及びキレート剤:15(g/ton)を週2回添加した。

換水率及び培養水の注入率は、単位時間あたりの流量を適宜点検し調整をおこなった。

汚濁環境は、Table 1に示したとおり4つの期間に区分して設定した。7月17日にこの実験水槽に収容した後、対照区と同じ条件で飼育し、馴致期間とした。7月25日から8月7日を期間(1)とし、濾過海水に対する培養水の注入率を5%とした。期間(1)の換水条件は、対照区と同一に設定し、換水率を200(回/日)、濾過海水注入流量を8.4(l/分)とした。8月12日から8月27日までを期間(2)とし、濾過海水に対する培養水の注入率を10%とした。期間(2)の換水条件は、対照区と比べ悪化させるため、換水率を100(回/日)、濾過海水注入流量を4.2(l/分)とした。8月8日から8月11日の期間は、期間(2)の汚濁条件が安定するのに要した期間であり、移行期間とした。移行期間の汚濁条件は、一定していない。8月27日以降は、期間(2)よりもさらに強度の汚濁条件の設定を試みたが、設定条件の移行中に全数が斃死したため実験は終了とした。

水質評価 水質試料は、各飼育区から7月25日、8月4日、8月10日、8月12日、8月15日、8月22日、8月24日、8月27日及び8月28日の合計9回採水し、水質分析及びナンノクロロプシス懸濁濃度測定をおこなった。水質分析は、常法により、COD、NO_x-N、NO₂-N、NH₄-N及びPO₄-Pについて測定した(気象庁¹⁾)。懸濁濃度測定は、ノイバウエル血球計算盤を用いて、試水の単位容積あたりに観察される細胞数を計数した。

Table 1 Rearing and artificial pollution conditions.

Term	Control tank	Test tank			
	7/17~9/1	Acclimatization 7/17~7/24	Term(1) 7/25~8/7	Transition 8/8~8/11	Term(2) 8/12~8/27
exchange rate of filtrated sea water (times/day)	200	200	200	not stabilized	100
filtrated sea water flow (l/minute)	8.4	8.4	8.4	not stabilized	4.2
<i>Nannochloropsis</i> concentration (%)	0	0	5	not stabilized	10

標本観察 サンプリングを7月25日、8月12日、8月27日、8月29日及び9月1日の合計5回実施した。サンプリングでは、各飼育区から無作為に6尾から9尾採集した。採集した供試魚は、体長・体重の精密測定をおこなうとともに、解剖をおこない耳石を採取した。耳石の採取は、扁平石のみおこない、軟組織を剥離除去し、水洗の後自然乾燥させた。

耳石は走査型電子顕微鏡観察に供するため、耐水研磨紙(#2000)およびアルミナコンパウンド($0.3\mu\text{m}$)を用いて手で研磨し、断面を表出させた。研磨に際しては、金属製試料台($\phi 10\text{mm}$)にエポキシ接着剤で耳石を接着した。接着剤は蛍光観察時に自家蛍光を発生し、良好な像は得られないが、研磨作業の便宜を優先し文具として普通に入手できるものを用いた。研磨する深さは、実体顕微鏡で確認しながら、核と縁辺部が同時に観察されるまで研磨した。

研磨により表出する断面は、横断面(cross section, frontal section)、矢状断面(sagittal section)体表側及び体軸側、ならびに冠状断面(coronary section)の4種類が考えられる。解析に供する試料の観察に先立ち、いくつかの試料を観察し、解析に適する研磨方向を検討した。

断面を表出した試料は、試料台に接着したまま、蛍光顕微鏡観察及び走査型電子顕微鏡観察に供した。観察に際して、続く走査型電子顕微鏡用の試料作成のため、試料を汚染する可能性のある屈折率補正の処理はおこなわなかった。蛍光顕微鏡観察は、オリンパスPROVIS80Xシステムによりおこない(励起条件等は適宜組み合わせ)、ALC標識の位置を把握した。

走査型電子顕微鏡観察に供する試料は、上記の蛍光顕微鏡観察に供した試料にそれ以上の研磨を加えずに、直ちに引き続き走査型電子顕微鏡観察に必要な処理を施した。すなわち、常法により5% HClで15秒間エッチングを施し形態的コントラストを与え、白金スパタリングの導電処理を施した。この試料を、走査型電子顕微鏡(日本電子, JSM-5600LV)により500倍・20kVにて観察した。

観察で得られた走査型電子顕微鏡像は、PCワークステーション上で複数の視野を結合して観察に供した。蛍光顕微鏡像は、写真をスキャナーでとりこみ、電顕像と併せて画像処理をおこなえるように準備をした。

日周輪に関する検討 走査型電子顕微鏡では、ALC標識を観察することができない。走査型電子顕微鏡像上におけるALC標識の位置は、ワークステーション上で蛍光顕微鏡像を合成することで把握した。なお、この合成に際しては、特に光学顕微鏡について、対物レンズ倍率、中間倍率、フィルム面における倍率、印画紙上における倍率及びスキャナーの取り込み解像度を正確に管理した。コンピュータ上ではGUI操作(マウス等を使った再現性に問題がある操作)を全くおこなわずに、把握している倍率・解像度等の数値情報のみで双方の表示倍率を設定した。また、解析に際しては、解像度の情報を保持しているため、現実の試料上の長さを確実に再現している。

得られた走査型電子顕微鏡と蛍光顕微鏡の合成画像に

おいて、ALC標識の位置から縁辺部までの輪紋数を計数し、標識実施日から採集日までの日数と比較することで日周性の確認をおこなった。

形態計測は、精密作図ソフトウェア(マイクログラフィクス社製, iGrafx Designer)を用い、ワークステーションの画面上で輪紋間隔を計測した。輪紋間隔の計測は、同ソフトウェアにおいて、画面上で最大50,000倍まで拡大し、500倍で観察した電顕像の分解能に対して20倍の精度まで肉眼で読み取り、試料上における精度を $1/100\mu\text{m}$ とした。

計測結果から、採集日を示す縁辺部から中心部へ向かって輪紋数を計数し、飼育期間中に形成されたすべての日周輪について、形成日と輪紋間隔を測定した。日周輪形成日別の輪紋間隔から、飼育環境と輪紋形成の関係を検討した。

対照区においては、輪紋間隔について水温及び溶存酸素に関する回帰分析をおこなった。水温($^{\circ}\text{C}$)を独立変数とし、各個体ごとに10日間の移動平均を適用した輪紋間隔(μm)の形成日別平均値を従属変数とした。適合度は分散分析を適用し検定した。

解析に供した個体数は、汚濁環境区において8月29日採集の7個体及び8月27日採集の1個体の合計8個体、対照区において9月1日採集の4個体及び8月27日採集の4個体の合計8個体とした。また、日周性を確認した後の輪紋は、輪紋形成日をさかのぼって評価することで、経過時間ではなく暦日で取り扱うことができるので、これらの個体は採集日の区別をすることなく取り扱った。

結 果

飼育実験 飼育期間中の水温及び溶存酸素の推移をFig.2に示した。対照区の水温は $23.1\sim 27.2^{\circ}\text{C}$ の範囲(平

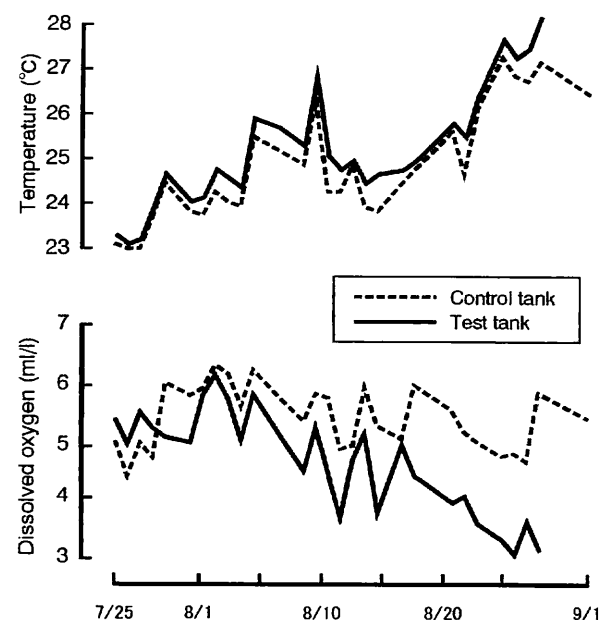


Fig.2 Changes in water temperature and dissolved oxygen concentration. The broken line shows the control tank and the solid line test tank.

均:24.9, 標準偏差:1.21)で、汚濁環境区の水温は23.1~28.0℃の範囲で推移した(平均:25.1, 標準偏差:1.29)。また、対照区の溶存酸素は4.38~6.23ml/lの範囲で推移した(平均:5.37, 標準偏差:0.520)。汚濁環境区の溶存酸素は3.08~6.07ml/lの範囲で推移した(平均:4.63, 標準偏差:0.851)。汚濁環境区における水温及び溶存酸素の値は、注入したナンノクロプシス培養水におけるそれらが著しく高いため、対照区におけるそれらよりも高くなる傾向が見られた。このため、汚濁環境区における溶存酸素については、エアレーションを随意に絞ることにより、溶存酸素量を随意に低下させた。

サンプリング時における体長及び体重をFig.3に示した。馴致期間終了直後において、汚濁環境区の体長は 108.7 ± 6.7 mm(平均値 \pm 標準偏差、以下同様)、体重は 22.08 ± 3.11 gであり、対照区の体長は 109.2 ± 8.0 mm、体重は 23.41 ± 4.51 gであり、差は見られなかった。期間(1)の終了後においては、汚濁環境区の体長は 131.3 ± 2.3 mm、体重は 41.89 ± 2.51 gであり、対照区の体長は 132.67 ± 4.4 mm、体重は 46.09 ± 9.31 gであり、差は見られなかった。期間(2)の終了時においては、汚濁環境区の体長は 134.7 ± 10.5 mm、体重は 50.79 ± 8.83 gであり、対照区の体長は 148.5 ± 5.8 mm、体重は 60.87 ± 8.60 gであり、汚濁環境区に成長の低下が見られた(10%水準で有意)。

水質評価 水質分析の結果をTable 2に示した。汚濁環境区におけるCOD、NO₃-N、NH₄-N及びPO₄-Pの平均値

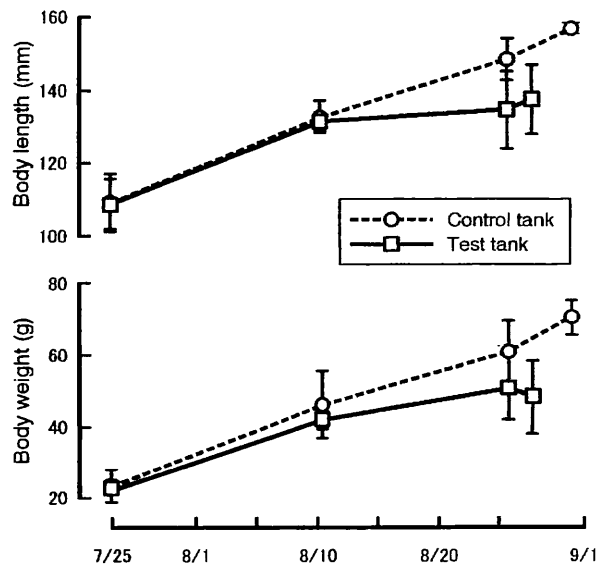


Fig.3 Changes in body length and body weight. The broken line shows the control tank and the solid line test tank. Points and vertical bars show the average and one standard deviation, respectively.

Table 2 The result of a water quality analysis

	Sample	Term(1)		Term(2)			The water quality of central Tokyo Bay (recently 15 years average)
		8/4	8/7	8/22	8/24	8/27	
COD (μ mol/l)	Test tank	3.40	2.23	2.99	3.82	4.45	3.05
	Control tank	1.06	0.55	0.73	0.72	0.97	
NO ₃ -N (μ mol/l)	Test tank	14.99	18.56	12.61	13.80	12.22	24.90
	Control tank	15.94	17.23	14.69	15.55	14.16	
NO ₂ -N (μ mol/l)	Test tank	0.58	0.83	5.20	5.40	5.89	4.95
	Control tank	0.20	0.20	0.27	0.25	0.24	
NH ₄ -N (μ mol/l)	Test tank	9.51	4.44	28.11	33.10	17.41	30.01
	Control tank	2.97	1.00	1.02	1.54	1.60	
PO ₄ -P (μ mol/l)	Test tank	0.93	0.80	1.30	1.61	1.57	1.52
	Control tank	0.46	0.47	0.40	0.44	0.39	
Nannochloropsis concentration (%)	Test tank	56.78	69.50	70.27	109.56	103.11	
	Control tank	1.00	3.50	0.50	0.50	1.11	

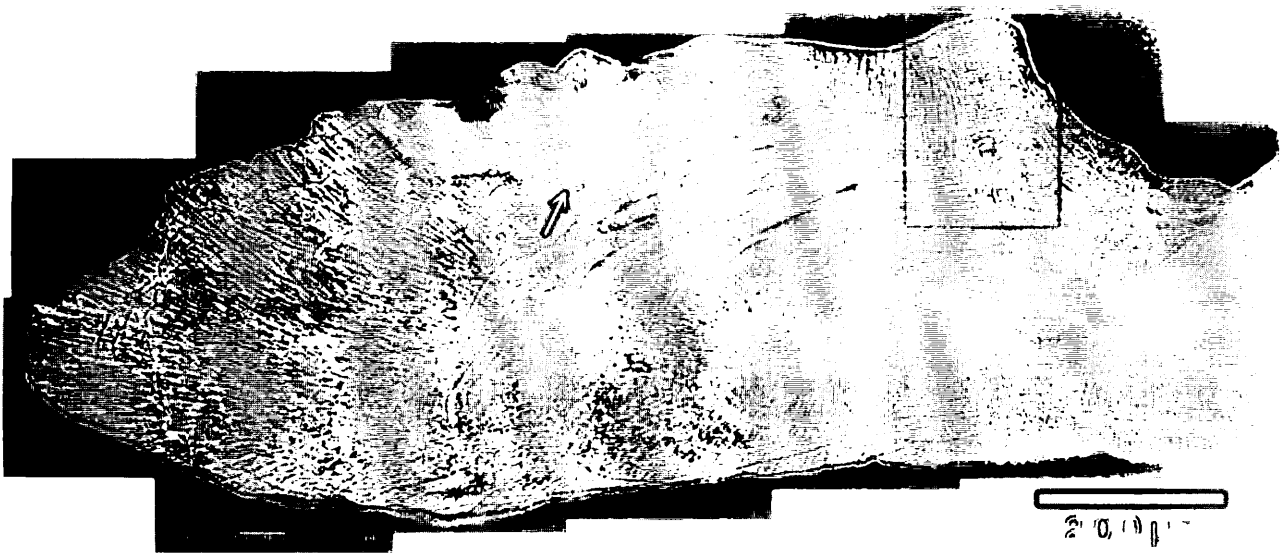


Fig.4 Scanning electron micrograph of the cross section of an sagitta. (Magnification in printing: x125 ; Observation conditions: x500, 20kV) Multiple visual fields were combined. The right frame shows the portion used for analysis. An example of discontinuous otolith growth increments is shown (arrow).

は、それぞれ、 $3.37 (\mu\text{mol/l})$ 、 $3.58 (\mu\text{mol/l})$ 、 $18.51 (\mu\text{mol/l})$ 及び $1.24 (\mu\text{mol/l})$ であり、対照区におけるそれら、 $0.81 (\mu\text{mol/l})$ 、 $0.23 (\mu\text{mol/l})$ 、 $1.63 (\mu\text{mol/l})$ 及び $0.43 (\mu\text{mol/l})$ と比べ顕著に高かった。NO₂-Nについては、汚濁環境区における平均値は $14.44 (\mu\text{mol/l})$ であり、対照区におけるそれは $15.51 (\mu\text{mol/l})$ であり、違いはみられなかった。

汚濁環境区と対照区との違いについてt検定をおこなったところ、期間(1)と期間(2)を通した平均値では、COD、NO₂-N、NH₄-N及びPO₄-Pについては、いずれも5%水準で有意だった。期間(1)だけについてみると、全ての項目で有意な差がなかった。期間(2)だけについてみると、NO₂-Nを含む全ての項目で有意差が検出された。

各種水質項目について最近15年間の神奈川県海域の測定値(神奈川県¹⁰⁾)と比較したところ、COD、NO₂-N、NH₄-N及びPO₄-Pについては、汚濁環境区におけるほとんどのサンプルの測定値は、東京湾中部の平均値と同等であった。

標本観察 耳石(扁平石)の長径(体軸方向の長さ)は約4mm、短径(体高方向の長さ)は約2mm、厚さ(体幅方向の長さ)は約0.4mmであった。

横断面の走査型電子顕微鏡像(観察倍率500倍)をFig.4に示した。

研磨方向の検討結果では、Fig.4(矢印)に見られる不定形、不明瞭あるいは不連続として特徴づけられる輪紋がいずれの研磨方向でも多く観察されたが、横断面においては、聴神経溝を挿む隆起構造の部分に明瞭な輪紋が特異的に見られた(Fig.4枠部分及びFig.5)。この部分の明瞭な輪紋特性は、観察した個体の全てに見られた。この結果から、本研究では、横断面の隆起構造部分を解析



Fig.5 Scanning electron micrograph of the portion of the sagitta used for analysis (cross section). (Magnification in printing: x500 ; Observation conditions: x500, 20kV)



Fig.6 Fluorescence micrograph (*) and scanning electron micrograph. (Magnification in printing: x125 ; Observation conditions of fluorescence micrograph: x10; Observation conditions of SEM: x500, 20kV) The position of the ALC marker was checked by aligning both.

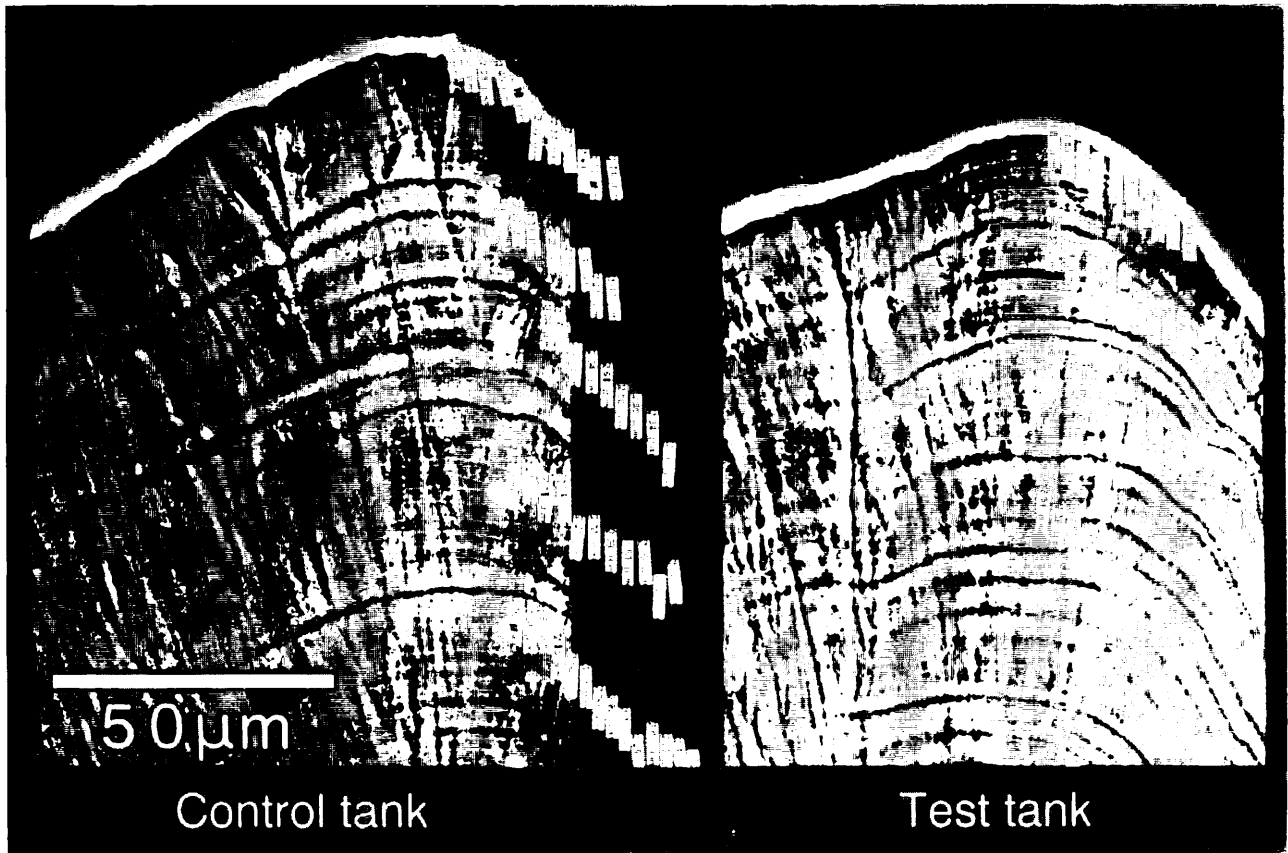


Fig.7 Analysis of daily otolith growth increment width.(Magnification in printing: x750) Width is narrow under polluted conditions.

に供することとした。

日周輪に関する検討 10倍の対物レンズで撮影した蛍光顕微鏡像をFig.6(*印)に示した。この図は、Fig.4で示

した電顕像の上に蛍光顕微鏡像を合成した様子を示している。

ALC標識の位置から縁辺部まで読み取った輪紋数は、

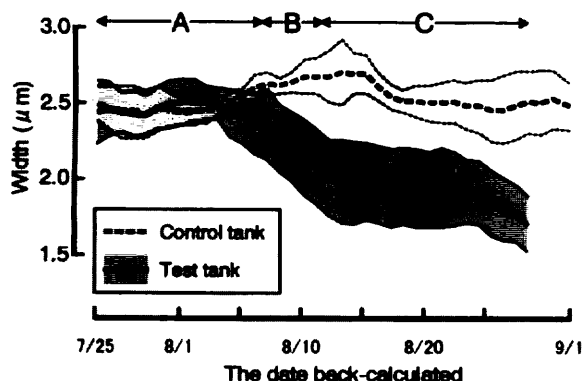


Fig.8 Change in daily otolith growth increment width for every date, back-calculated. The broken line shows the control, the solid line the test, and the gray area the width of a standard deviation. Width is narrow under polluted conditions. A: Term(1), B: Transition (condition was not stabilized), C: Term(2). 10-day running mean was applied.

いずれの個体も経過日数と輪紋数が一致した(8月27日採集個体の例では6月15日のALC標識位置から縁辺部まで73本)。この結果から、輪紋は日周輪であることが確認された。なお、コントラストが微妙なサブデイリーリングの存在も確認されたが、周囲のトーンが類似した像を読み取ることで、日周輪が判別された。

日周輪の読取り例と精密作図ソフトウェアによる解析の様子をFig.7に示した。1本1本の輪紋間隔を縁辺部からさかのぼって読み取った輪紋形成日ごとの輪紋間隔の推移をFig.8に示した。

対照区の輪紋間隔は、期間を通じて $2.43 \pm 0.52 \mu\text{m}$ から $2.57 \pm 0.45 \mu\text{m}$ の間で推移し、有意な変化が見られなかった。しかし、対照区における飼育水温(x)と輪紋間隔(y)の関係は、Fig.9に示したとおり、次式の直線回帰で示された(1%水準で有意)。

$$y = -0.0287x + 3.2365 \quad (R^2 = 0.663)$$

また、溶存酸素に関する輪紋間隔の回帰については、分散分析の結果、有意な結果は得られなかった。一方、

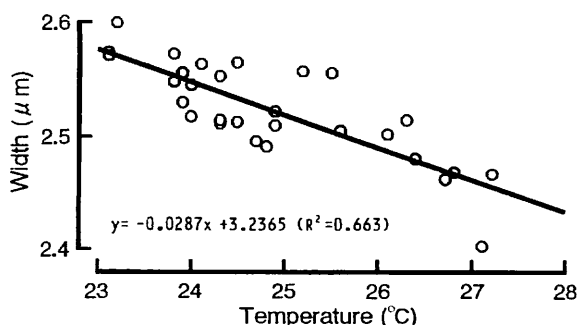


Fig.9 Relationship between water temperature and daily otolith growth increment width. Regression is shown in this figure. The correlation was significant.

汚濁環境区の輪紋間隔は、馴致期間: $2.39 \pm 0.38 \mu\text{m}$ 、期間(1): $2.34 \pm 0.45 \mu\text{m}$ 、移行期間: $2.01 \pm 0.41 \mu\text{m}$ 、期間(2): $1.85 \pm 0.35 \mu\text{m}$ と、汚濁の進展に伴って顕著に低下した。

考 察

耳石に日々刻まれる日周輪を解析することによって、魚体の過去の成長履歴など多くの情報が得られる。

耳石日周輪から読み取ることでできる最初の情報は、その本数である。日周輪の本数を計数することによって、その個体の日齢及びふ化日を推定することができる。従来は、鱗や耳石について光学顕微鏡によって年輪を読み、年齢査定がおこなわれるに留まっていた。年齢査定は、資源評価に重要な年級群の判別が正確にできるため、それでも非常に価値のある情報であった。これに対して、耳石日周輪の解析は、その年級群の加入時期、ふ化日、魚体の成長速度の推定を可能とし、同一年級群内における集団構成の評価や、集団ごとの生育環境の評価が可能となる(Sogard・Able¹¹⁾、栗山他¹²⁾、Victor・Brothers¹³⁾、Jordan¹⁴⁾、Secor・Houde¹⁵⁾、Suyama *et al.*¹⁶⁾)。

日周輪に刻まれるより高次の情報は、輪紋形成時期別の輪紋間隔や元素構成である。日周輪の形成すなわち耳石の成長は、魚体の生理状態に影響を受けることが考えられる(Mugiya,¹⁷⁾)。魚体の生理状態は魚体が置かれている生育環境に影響を受けるため、その結果、耳石輪紋に環境履歴が記録されることが考えられる。耳石日周輪の輪紋幅を解析することによって、環境との関連についての知見は、水温やpHについて論じられている(Neilson・Geen¹⁸⁾、Geen *et al.*¹⁹⁾)。元素構成すなわち、ストロンチウムとカルシウムの関係から検討している知見としては、水温に関して影響が論じられている(Radtke²⁰⁾、Townsend *et al.*²⁰⁾、Tzeng²¹⁾)。

耳石に刻まれる環境履歴に関する研究としては、耳石輪紋の日周性をもって形成される要因について検討する例が多く、サブデイリーリングの発現等、輪紋形成の際に現れる徴候によって論じられている知見がある(Campana・Neilson²²⁾、Neilson *et al.*²³⁾)。

本研究は、耳石日周輪の輪紋幅を形成日ごとに把握することで、環境との関連を検討した。その結果、水温または汚濁水質によって、耳石日周輪の輪紋幅に影響を受けることを明らかにした。特に、水温については、対照区において日々の日周輪の形成幅が有意に逆相関していた。水温との詳細な相関関係を明らかにすれば、耳石日周輪の輪紋間隔の解析により、水温履歴を過去にさかのぼって日の時間尺度で把握できる可能性が示唆された。Radtke *et al.*²⁰⁾ は、飼育された Atlantic herring (*Clupea harengus*) において、耳石中のストロンチウム：カルシウムの比を電子マイクロプローブ技術を用いて検討し、ストロンチウムの割合が飼育水温と逆相関することを報じている。そして、同じ耳石について走査型電子顕微鏡による日周輪形成の解析を組み合わせることによって、個々の魚体の水温履歴を日の時間尺度で再現

できる可能性を示唆している。これに対して、本研究で得られた結果は、元素解析を必要とせず、形態観察に基づく解析のみで評価できる可能性を示した。

水温と耳石日周輪の形成との関係については、輪紋幅に関する検討に限らなければ、多くの研究があり、相関の正負については魚種により様々である(Neilson and Geen⁹⁾, Radtke⁹⁾, Townsend *et al.*²⁰⁾, Tzeng²¹⁾, Campana・Neilson²²⁾, Neilson *et al.*²⁰⁾, Geffen⁹⁾). Neilson *et al.*⁶⁾ は、マスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) について、真夏の高水温が餌料転換効率の低下に影響し、成長低下に寄与する可能性を論じており、本研究の結果も同様の可能性が考えられるかもしれない。

汚濁水質については、各種の汚濁因子を同定せず、本県海域の最も汚れた海域に似た水質を作り出すことで検討した。飼育実験の中では、期間を区切って強弱2段階の汚濁条件を設定した。耳石日周輪の輪紋間隔は、弱い汚濁条件下では対照区との違いが見られず、強い汚濁条件下では輪紋間隔が著しく小さくなった。

耳石日周輪に現れる影響の要因としては、今回の実験の中では、水温条件よりも汚濁環境条件の方がより大きな影響がみられた。強い汚濁環境における日周輪の輪紋幅の変化は、対照区及び馴致期間に対して顕著な違いを示しており、その違いは統計学的検定以前に明白であった。一方、水温の影響についての結果は、統計学的検討によって有意な結果が得られた程度であるが、経過した水温の変動は限られている。したがって、より現実的な条件下では、汚濁環境条件と水温条件のどちらが主要な要因であるかは確認できない。

耳石を用いた環境履歴評価手法は、基礎的知見としては可能性を示唆したが、実用化について論じる。

本報では、水質環境評価においては、東京湾中部と同等の水質環境で耳石日周輪の輪紋間隔に顕著な影響が見られた。この点から、十分な検出力が得られるのではないと思われる。しかし、本研究では、汚濁環境の因子を同定していない。因子としては、水温、溶存酸素、懸濁粒子及び化学的水質指標のみならず、摂餌障害等の副次的因子あるいは相乗効果の要因等が含まれる。この手法を発展させるには、影響を及ぼす因子をいくつか同定し、その影響を検証することが必要となろう。また、対照についての検討が必要となる。すなわち、複数の海域の比較であれば相互間の違いを論じることで済むが、環境評価に利用するには正常値の知見を得る必要がある。多くのサンプルを検討して情報を蓄積する必要がある。水温が輪紋間隔に影響しているため、水温変動のバイアスを除去することも必要である。本研究では水温に対して汚濁環境の影響が著しかったが、実際の海域では飼育実験期間中に見られなかったような大きな水温変動もありえるため、実際には大きな影響が予想される。このため水温との関係の知見を集積する必要があるとともに、海況情報を利用したバイアス除去技術の開発も必要と思われる。

再捕された栽培放流魚について解析し、放流魚が経験

した生育環境の推移をさかのぼって評価する際、その推移を魚類からみた適否の尺度で論じるのであれば、本研究で得られた知見をほぼそのまま適用することで必要な情報は得られるものと思われる。また、標識放流等を併用して、移動状況等をいくつかの既知の情報として参照すれば、詳細な放流効果の評価が可能になると考えられる。

本研究では、日周輪の輪紋解析に細心の注意を払い、日周輪の輪紋間隔を一本一本1/100 μ mの精度で測定したため、解析に非常に時間を要した。しかし、実用的には、そこまで精度を上げる必要はないと思われる。極端な例を想定すれば、成長が鈍化したのはいつ頃か、という問については、日周輪を一瞥し輪紋間隔が間隔が密になっている部分を指し示せば答えになる。現実味を帯びた例として、季節変化の解析を想定すれば、輪紋10本当りの幅を測定すれば、旬別の精度で評価が可能である。観察部位についてはヒラメに関しては、聴神経溝に隣接した部分の横断面を観察することで、安定した解析が可能になるとともに、面積が小さいため少ない視野の観察で済むであろう。

要 約

環境履歴を耳石から読み取ることが可能かを検証するため、飼育実験及び耳石の走査型電子顕微鏡観察による日周輪解析をおこなった。飼育実験は、当所栽培漁業センターで生産され、ALC標識が施されているヒラメ当歳魚を用い、汚濁環境を人為的に設定し、約1ヶ月間おこなった。設定された汚濁条件は東京湾中部と同等であることが水質分析により確認された。ALC標識が施された耳石について、蛍光顕微鏡像と走査電顕像を合成することで、耳石輪紋は日周輪であることが確認された。日周輪の輪紋間隔を1本ずつ測定し、輪紋形成日ごとの輪紋間隔を把握した。対照区の輪紋間隔は、水温に対して有意な逆相関がみられた。汚濁環境下において、輪紋間隔に顕著な低下が見られた。耳石の日周輪を読み取ることで、魚体が経験した環境履歴をさかのぼって評価することの可能性が示唆された。

謝 辞

本報をまとめるにあたり、懇切なご指導とご助言を下さいました三谷 勇専門研究員と海洋科学技術センターリンジー ドゥーガル博士に対し感謝の意を表します。飼育実験を実施するにあたり、ご協力くださった中村良成主査、濱田信行技能員に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Pannella, G. (1971): Fish otoliths: Daily growth layers and periodic patterns. *Science*, 173, 1124-1127.
- 2) Tsuji, S. and T. Aoyama (1982): Daily growth increments observed in otoliths of the larvae of Japanese Red sea bream *Pagrus major*. *Bull.*

- Japan. Soc. Sci. Fish., 48, 1559-1562.
- 3) Tsuji, S. and T. Aoyama (1984): Daily growth increments in otoliths of Japanese anchovy larvae *Engraulis japonica*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50, 1105-1108.
 - 4) Geffen, A.J. (1983): The deposition of otolith rings in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. embryos. J. Fish Biol. 23, 467-474.
 - 5) Campana, S.E. and J. D. Neilson (1985): Microstructure of fish otoliths. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42, 1014-1032.
 - 6) Neilson, J. D. and G. H. Geen (1985): Effects of feeding regimes and diel temperature cycles on otolith increment formation in juvenile Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. Fish. Bull., 83, 91-101.
 - 7) Campana, S.E. (1983): Feeding periodicity and the production of daily growth increments in otoliths of Steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and Starry flounder (*Platichthys stellatus*). Can. J. Zool., 61, 1591-1597.
 - 8) 中村良成・桑田博(1994): アリザリン・コンプレキソンによる稚魚への大量標識法における鱗からの標識検出法の検討. 栽培技研, 23(1),55-63.
 - 9) 気象庁 (1970): 海洋観測指針. 日本海洋学会, 東京.
 - 10) 神奈川県(1986-1994): 昭和60年度-平成5年度 漁海況予報事業結果報告書, 神奈川県水産試験場.
 - 11) Sogard, S.M. and K. W. Able (1990): Growth variation of newly settled winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) in new jersey estuaries as determined by otolith microstructure. 1. Int. Symp. on Flatfish Ecology., Texel Netherlands, 19-23 Nov 1990.
 - 12) 巢山 哲・桜井康憲・目黒敏美・島崎健二 (1992): 中部北太平洋におけるサンマ *Cololabis saria* の耳石日周輪に基づく年齢と成長の推定. 日水誌, 59, 1607-1614.
 - 13) Victor, B.C., and E. B. Brothers (1992): Age and growth of the fallfish *Semotilus corporalis* with daily otolith increments as a method of annulus verification. Can. J. Zool., 60, 2543-2550.
 - 14) Jordan, A.R. (1994): Age, growth and back-calculated birthdate distributions of larval jack mackerel, *Trachurus declivis* (pisces: carangidae), from eastern Tasmanian coastal waters. Aust. J. Mar. Freshwat. Res., 45, 19-33.
 - 15) Secor, D.H., and E. D. Houde (1995): Temperature effects on the timing of striped bass egg production, larval viability, and recruitment potential in the patuxentriver (Chesapeake bay). Estuaries, 3, 527-544.
 - 16) Suyama, S., Y. Sakurai, and K. Shimazaki (1996): Age and growth of pacific saury *Cololabis saira*(Brevoort) in the western north pacific ocean esimated from daily otolith growth increments.
 - 17) Mugiya, Y. (1986): Effects of calmodulin inhibitors and other metabolic modulators on in vitro otolith formation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Comp. Biochem. Physiol., 84A, 57-60.
 - 18) Geen, G. H., J. D. Neilson, and M. Bradford (1985): Effects of pH on the early development and growth and otolith microstructure of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. Can. J. Zool., 63, 22-27.
 - 19) Radtke, R.L. (1989): Strontium-calcium concentration ratios in fish otoliths as environmental indicators. Comp. Biochem. Physiol., 92a, 189-193.
 - 20) Townsend, D.W., R. L. Radtke, S. Corwin, D. A. Libby (1992): Strontium : calcium ratios in juvenile atlantic herring *Clupea harengus* L. otoliths as a function of water temperature. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 160, 131-140.
 - 21) Tzeng, W.N. (1994): Temperature effects on the incorporation of strontium in otolith of japanese eel *Anguilla japonica*. J. Fish Biol., 45, 1055-1066.
 - 22) Campana, S.E. and J. D. Neilson (1982): Daily growth increments in otoliths of starry flounder (*Platichthys stellatus*) and the influence of some environmental variables in their production. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39, 937-942.
 - 23) Neilson, J.D., G. H. Geen, and D. Bottom (1985): Estuarine growth of juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) as inferred from otolith microstructure. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42, 899-908.
 - 24) Radtke, R.L., D. W. Townsend,, S. D. Folsom, M. A. Morrison (1990): Strontium:calcium concentration ratios in otoliths of herring larvae as indicators of environmental histories. Environ. Biol. Fish., 27, 51-61.