

東京湾産マコガレイの稚魚期における耳石日輪形成の検証

Validation of the daily otolith increment in juveniles of marbled sole *Pseudopleuronectes yokohamae* in Tokyo Bay, Japan

李 政勲¹・児玉 圭太^{2*}・堀口 敏宏²

Jeong-Hoon LEE¹, Keita KODAMA^{2*} and Toshihiro HORIGUCHI²

¹ 韓国国立水産科学院 水産資源研究センター

² 国立研究開発法人 国立環境研究所 環境リスク・健康領域

¹ Fisheries Resources Research Center, National Institute of Fisheries Science, Korea

² Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies

摘 要

東京湾産マコガレイの稚魚期における耳石礫石縁辺部の日輪形成を室内実験と東京湾における野外ケージ実験により検証した。両実験では人工孵化で得られた生後4か月の稚魚を用い、水温約18℃において7日間の実験を行った。室内実験では給餌を行う対照区と無給餌の飢餓区を設けた。実験の開始前と終了後にアリザリンコンプレクソン (ALC) により礫石縁辺部の蛍光標識を行い、標識間の輪紋数を計数した。実験終了後の飢餓区における平均体長と平均体重は、対照区及び野外ケージ実験区より有意に低かった。また、実験開始前後の ALC 標識間の平均輪紋数は、飢餓区では実験期間の経過日数7より有意に低かったが、対照区及び野外ケージ実験区では有意差は認められなかった。これらの結果より、飢餓状態においては体成長および礫石の輪紋形成がともに停滞するが、摂餌可能な環境条件で飢餓状態にない個体においては礫石縁辺部に一日あたり一本の日周輪が形成されることが明らかとなった。

キーワード：異体類、耳石、初期生活史、東京湾、齢査定

Key words : flatfish, otolith, early life history, Tokyo Bay, age determination

1. 緒言

東京湾においてマコガレイ *Pseudopleuronectes yokohamae* は底棲魚介類群集の優占種であり、小型底曳網漁業の主要対象種である (Lee *et al.*, 2009)。本種の資源量は1970年代後期から1980年代前期にかけて増加したが、以降は減少の一途を辿り (Kodama *et al.*, 2010)、2022年現在も回復の兆しがみられない。本種の資源量の停滞を引き起こすメカニズムを解明するためには、各生活史段階における生態学的特性(年齢と成長、繁殖特性、食性など)を把握した上で、どの生活史段階において著しい斃死が生じているか明らかにし、斃死要因を究明する必要がある。

一般に海産生物の資源量水準の決定においては生活史初期の生残の寄与が大きいことが知られている (Jennings *et al.*, 2001)。生活史初期の生残を調査する際には、日齢は孵化日や成長速度などを推定する上で重要なパラメータである。多くの魚類において、耳石の縁辺部に形成される輪紋の日周性を利用した日齢推定が行われてきた (Campana and Neilson,

1985; Rodríguez-Mendoza, 2006; Durham and Wilde, 2008)。一方、耳石の日輪形成は環境要因によって阻害される可能性もある。例えば、タイセイヨウサケ *Salmo salar* においては、水温や光周期の影響によって耳石縁辺部の1日あたり輪紋形成数が1.2から2.3の間で変動することが報告されている (Geffen, 1983)。したがって、耳石を用いた日齢推定を行う場合は、耳石縁辺部に形成される輪紋の日周性を事前に検証する必要がある。

Joh *et al.* (2005) は、函館湾で採集したマコガレイを収容したケージを同湾に6日間設置し、その期間に形成された輪紋数を計数することで耳石日輪形成の検証を行った。その結果、形成された輪紋数の平均値は5.7であり、実験期間から期待される輪紋数である6との差は小さいながらも有意差が認められている。この差が生じた要因として、供試稚魚が実験中に曝されたストレスの影響が示唆されている (Joh *et al.*, 2005)。いずれにせよ、東京湾産マコガレイの稚魚において耳石を用いて日齢を推定するためには、室内実験も併用して耳石輪紋の日周性を改めて検証する必要がある。本研究では、実験条件を一

受付：2022年8月16日、受理：2022年11月25日

* 〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2, E-mail: kodama.keita@nies.go.jp

定に制御した室内実験を併用して、自然環境下におけるマコガレイ稚魚の耳石日輪形成の検証を行った。また、ストレスが耳石日輪の形成に及ぼす影響を調査するため、飢餓状態におけるマコガレイ稚魚の耳石日輪形成についての検証も実施した。

2. 材料と方法

2.1 実験に供するマコガレイ稚魚

神奈川県栽培漁業協会(神奈川県三浦市)から、東京湾産マコガレイを人工授精させることによって得られた種苗生産用のマコガレイ稚魚 60 個体の提供を受けた。これらの稚魚は 2008 年 1 月に孵化し、神奈川県栽培漁業協会で 4 か月間育成されたものであり、平均体長及び標準偏差は 37.1 ± 4.4 mm であった。供試稚魚は 4 L のろ過海水を入れたポリスチレン製の実験用水槽(17 cm×17 cm×17 cm)に 1 基あたり 10 個体となるように収容し、エアレーションを行いながら実験開始まで 1 日間静置した。

実験期間中の水槽内の海水温は、東京湾における野外ケージ実験地点(次項参照)の水温(18.4℃)を再現するため、18.3℃～18.6℃に維持した(表 1)。水槽内の海水の溶存酸素濃度が低下しないよう、実験期間中はエアレーションを継続した。実験期間中に供試個体体重の 2% 相当の量の人工飼料(おとひめ EP-2, 日清丸紅飼料)を 1 日 1 回給餌した。

実験開始前日の 2008 年 5 月 21 日に実験開始時点の耳石縁辺部の輪紋を識別するため、アリザリンコンプレクソン(ALC, 和光純薬工業)による蛍光標識を行った。マコガレイ稚魚においては、ALC 濃度 50～100 mg/L の海水に 12 時間浸漬することにより耳石の蛍光標識が可能である(Joh *et al.*, 2005)。本研究では、供試用のマコガレイ稚魚 60 個体を ALC 濃度が 50 mg/L の海水を満たした 20L ポリスチレン製水槽に 15 時間浸漬し、耳石の蛍光標識を行った。耳石蛍光標識が完了した稚魚を前述の実験用水槽へ戻し、40 個体を室内実験、20 個体を野外実験に供した。

2.2 室内実験

マコガレイ稚魚の耳石日輪形成の検証を行うため、7 日間(2008 年 5 月 22 日～29 日)の室内実験を実施した。耳石縁辺部の ALC 標識処理(前項 2.1 参照)を行った 40 個体を 4 L のろ過海水を入れたポリスチレン製の実験用水槽(17 cm×17 cm×17 cm)4 基に 1 基あたり 10 個体となるように収容した。

飢餓状態が耳石日輪の形成に及ぼす影響を調べるため、異なる 2 つの給餌条件を設定した。対照給餌区(LC)：供試個体体重の 2% 相当の量の人工飼料(おとひめ EP-2)を 1 日 1 回給餌、及び飢餓区(LS)：7 日間の実験期間中は無給餌。各実験区について水槽 2 基を割り当て(対照給餌区 LC1 及び LC2; 飢餓区 LS1 及び LS2)、各水槽に 10 個体収容した。各水槽の海水は 1 日に 1.5 L 換水し、水槽底面に堆積した残餌や糞はサイフォンにより除去した。

7 日間の実験期間終了時における耳石縁辺部の輪紋を識別するため、実験開始時と同様に供試個体を ALC 濃度 50 mg/L の海水に 15 時間浸漬した。耳石縁辺部においては新規に形成された輪紋を視認することが困難で輪紋数を計数できない場合がある。よって、実験開始前後の耳石の ALC 標識部位を明瞭にして観察が容易となるように、両実験区(LC, LS)ともに実験終了後の ALC 標識後に対照給餌区(LC)と同じ給餌条件で 6 日間の追加飼育を行い、実験終了後の ALC 標識部位の外周部に無標識の輪紋を形成させた。

2.3 東京湾における野外ケージ実験

自然環境下における耳石日輪形成を検証するため、人工授精により得られたマコガレイ稚魚(前項 2.1 参照)を収容したケージを東京湾に設置し、7 日間(2008 年 5 月 22 日～29 日)の野外実験を実施した。設置場所は東京湾南西部の野島海岸の水深 1.7 m の地点である(北緯 35 度 19 分 50 秒, 東経 139 度 38 分 16 秒; 図 1)。使用したケージはチタン製フレーム(縦幅 1.0 m, 横幅 1.0 m 及び高さ 0.3 m)をナイロンメッシュ(目合 5.0 mm)で覆った構造である。供試個体は、前項 2.1 で述べた ALC 標識を行った稚魚

表 1 室内実験(対照区：LC1～2, 飢餓区 LS1～2)及び野外ケージ実験(F1～2)における生物・環境パラメータ。

	LC1	LC2	LS1	LS2	F1	F2
実験開始時個体数	10	10	10	10	10	10
実験終了時個体数	9	8	8	8	10	9
耳石摘出個体数	6	7	5	6	10	9
体長(mm)	37.5 ± 4.3	38.4 ± 4.6	33.4 ± 4.5	33.7 ± 4.2	40.4 ± 2.3	38.0 ± 2.7
体重(g)	0.90 ± 0.35	0.87 ± 0.32	0.58 ± 0.21	0.64 ± 0.23	1.05 ± 0.18	0.86 ± 0.16
水温(℃)	18.4 ± 0.2	18.3 ± 0.1	18.6 ± 0.1	18.6 ± 0.1	18.4	18.4
溶存酸素濃度(mg/L)	8.1 ± 0.4	8.2 ± 0.3	8.4 ± 0.3	8.3 ± 0.3	8.8	8.8

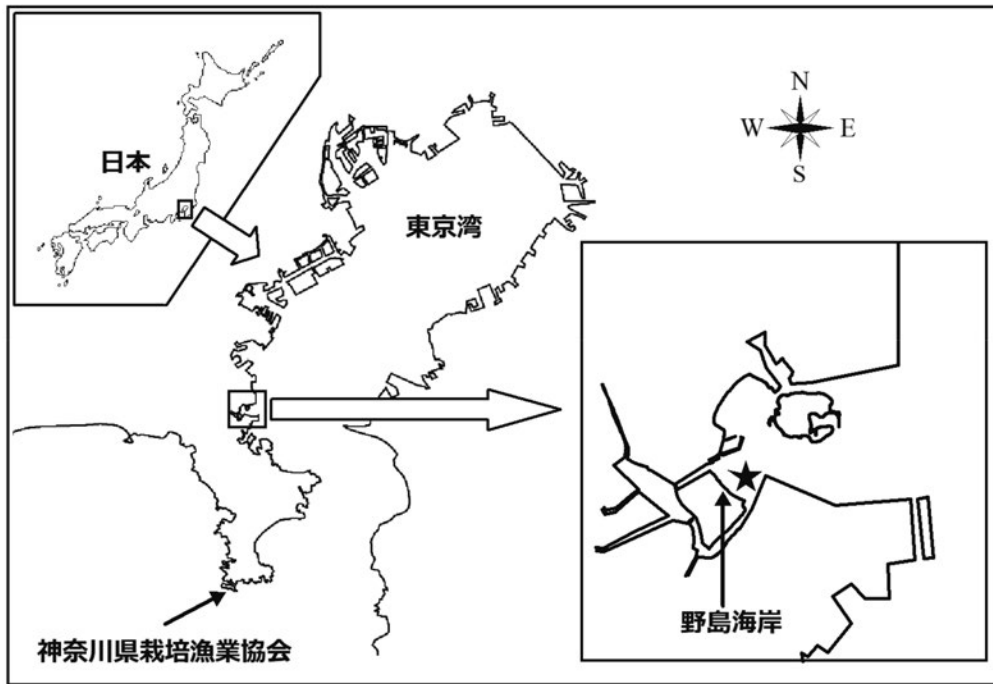


図1 東京湾における野外ケージ実験の実施位置(★).

20 個体であり、ケージ 1 基あたり 10 個体を収容し、計 2 基のケージを海底に設置した。ケージの海底固定、及び回収の作業は潜水士により実施された。ケージ内のマコガレイ稚魚が底面のメッシュを通して海底のベントスを摂餌できるようにケージ底面が海底に接するように設置した。実験開始時のケージ設置場所の底層における水温は 18.4℃、溶存酸素濃度は 8.8 mg/L であった。7 日間の実験終了後にケージ内の稚魚を回収し、神奈川県栽培漁業協会へ移送した。室内実験の供試個体と同様に、7 日間の実験期間終了時における耳石縁辺部の輪紋を識別するため ALC 標識を実施し、その後に対照給餌区 (LC) と同じ給餌条件で 6 日間の追加飼育を実施した (前項 2.2 参照)。

2.4 耳石試料の作製と観察

室内実験及び野外ケージ実験が完了した後に、供試個体を 70% エタノールで固定した。顕微鏡下において無眼側の礫石を摘出し、スライドガラス上でポリエステル樹脂に包埋した。作製した耳石試料は ALC 標識の蛍光強度減退を防ぐため、観察実施まで暗所で保管した。蛍光顕微鏡 (BX50, Olympus Optical Co. Ltd.) により、耳石試料の輪紋は透過光、及び ALC 標識は紫外線照射下 (励起フィルター 360-370 nm, 吸収フィルター 420-460 nm) において倍率 400 倍で観察した。実験開始時及び終了時に実施した ALC 標識の間の輪紋数を計数した。

2.5 統計解析

実験終了後における各実験区の間での平均体長及び平均体重の差を Tukey-Kramer 検定により調べた。供試個体の礫石における日輪形成を検証するため、

実験期間 (7 日間) において礫石外縁部に形成された輪紋数が 7 であることを帰無仮説として一群 t 検定を実施した。統計解析は KyPlot 5.0 (KyensLab Inc.) により実施した。

3. 結果と考察

7 日間の実験期間に斃死した個体数は室内実験では 1~2 個体、及び野外ケージ実験では 0~1 個体であった (表 1)。室内実験の生残個体において礫石を摘出する際に破損や逸失が生じたため、輪紋数を計測できる試料は対照区では 6~7 個体、飢餓区では 5~6 個体であった (表 1)。一方、野外ケージ実験においては生残した全個体 (9~10 個体) から礫石を摘出できた (表 1)。室内実験及び野外ケージ実験ともに、実験開始前後の ALC 標識は蛍光顕微鏡下における紫外線照射により明瞭に観察することができた (図 2a)。また、透過光により輪紋も認識可能であったため、観察した全ての試料について輪紋数の計数を実施した (図 2b~e)。礫石縁辺部の輪紋は対照区及び野外ケージ実験区では明瞭に認識可能で容易に計数できたが (図 2c, e)、飢餓区においては縁辺部の輪紋が中心方向に歪曲し、内側の輪紋と重複しており計数が困難な場合があった (図 2d)。

7 日間の実験終了後における平均体長及び平均体重について、飢餓区 (LS1, 33.4 cm, 0.58 g; LS2, 33.7 cm, 0.64 g) と野外ケージ実験区 F1 (40.4 cm, 1.05 g) の間で有意差が認められた (図 3a, b; Tukey-Kramer 検定, $P < 0.05$)。一方、飢餓区 (LS1, LS2) の平均体長と平均体重は対照区 (LC1, LC2) 及び野外実験区 F2 より

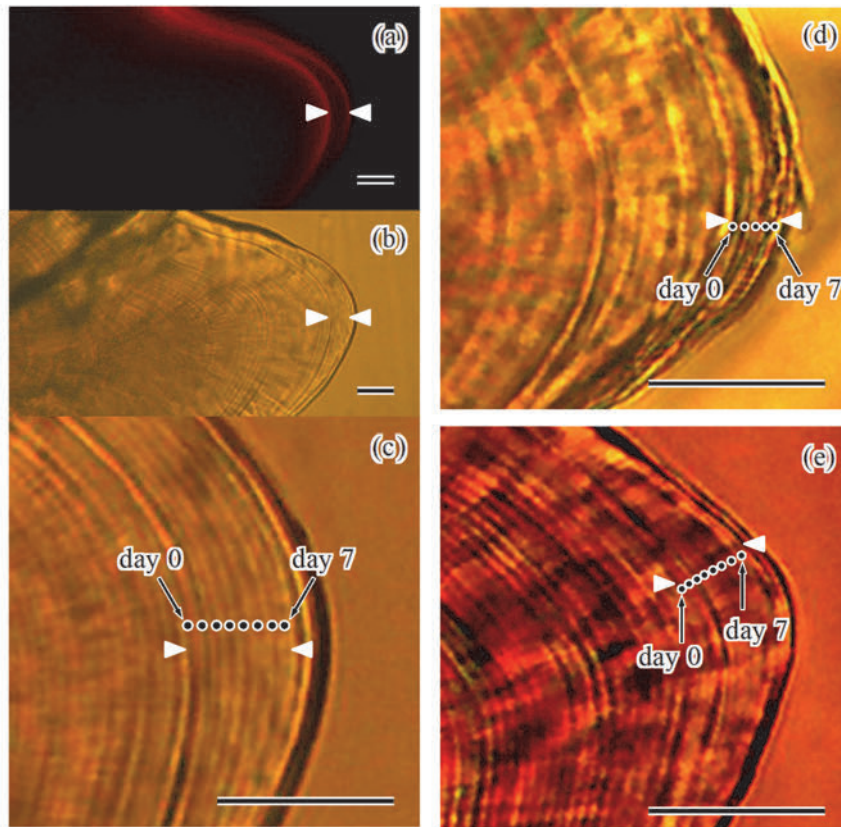


図2 東京湾産マコガレイ *Pseudopleuronectes yokohamae* の稚魚の無眼側礫石。左側と右側の矢印は実験開始前と終了後の礫石縁辺部を示す。(a) 蛍光顕微鏡下におけるアリザリンコンプレクソン (ALC) 標識観察像、(b-c) 室内実験対照区、(d) 室内実験飢餓区、(e) 野外ケージ実験区。バー：10 μm 。

低い傾向がみられたが、有意差は認められなかった(図 3a, b; Tukey-Kramer 検定, $P > 0.05$)。これらの結果は、飢餓状態において稚魚の体成長が抑制される可能性があるが、7 日間の実験期間では摂餌可能な実験区と飢餓状態の実験区との間で明らかな成長差は生じないことを示唆している。摂餌条件による体成長の差異を明確に検出するためには、7 日間より長い実験期間において検証を行う必要がある。

形成された礫石の平均輪紋数を図 3c に示した。実験開始前後の ALC 標識間の平均輪紋数は、対照区 (LC1, 6.7; LC2, 6.9) では、実験期間の経過日数 7 と有意差は認められなかった(図 3c; 一群 t 検定, $P > 0.05$)。一方、飢餓区における平均輪紋数 (LS1, 5.1; LS2, 5.0) は、実験期間の経過日数 7 より有意に低い値を示した(図 3c; 一群 t 検定, $P < 0.05$)。この室内実験結果より、飢餓状態にあるマコガレイ稚魚においては耳石輪紋形成が停滞することが示唆された。

一方、野外ケージ実験における実験開始前後の ALC 標識間の平均輪紋数は、F1 では 6.9、F2 では 7.0 であり、実験期間の経過日数 7 と有意差は認められなかった(図 3c; 一群 t 検定, $P > 0.05$)。室内実験の結果も考慮すると、今回の野外ケージ実験においては実験期間中に供試稚魚個体は摂餌を行っており、飢餓状態にはなかったものと推察される。

次に、室内実験において飢餓条件を設定して得ら

れた結果を踏まえ、野外において稚魚が飢餓状態に陥る可能性を以下に検討する。マコガレイ稚魚は自然環境下においてはマクロベントス(主に橈脚類、クーマ類、ヨコエビ類及び多毛類)を摂餌する(反田, 2008)。東京湾内湾部においては、夏季の底層の貧酸素化によりマクロベントス群集の豊度が減少し、特に、1 ml/L 未満の強い貧酸素が発生する湾奥部においてはマクロベントスが死滅し、9 月まで無生物状態となる(Kodama *et al.*, 2012)。東京湾において春に着底したマコガレイ稚魚は貧酸素水塊が発生するまでは湾北部に分布する(永山, 2005)。しかし、湾北部において貧酸素水塊が発生する夏季において、稚魚は貧酸素化せず底質中に餌となるマクロベントスが存在する湾南部に分布し、無生物域となる湾北部ではみられなくなる(永山, 2005)。このため、夏季の貧酸素水塊による湾北部の餌生物の減少は、東京湾南部に棲息するマコガレイ稚魚の飢餓を引き起こす要因とはならないと推察される。今回の野外ケージ実験を実施した野島沖を含む東京湾南西部においても、野外ケージ実験を実施した期間(2008 年 5 月 22 日~29 日)に貧酸素の発生は認められなかった(千葉県水産総合研究センター, 2008)。したがって、今回の実験においては、マクロベントスが貧酸素により死滅してマコガレイ稚魚が飢餓状態に陥り、耳石日輪の形成が阻害される可能性はほとんど

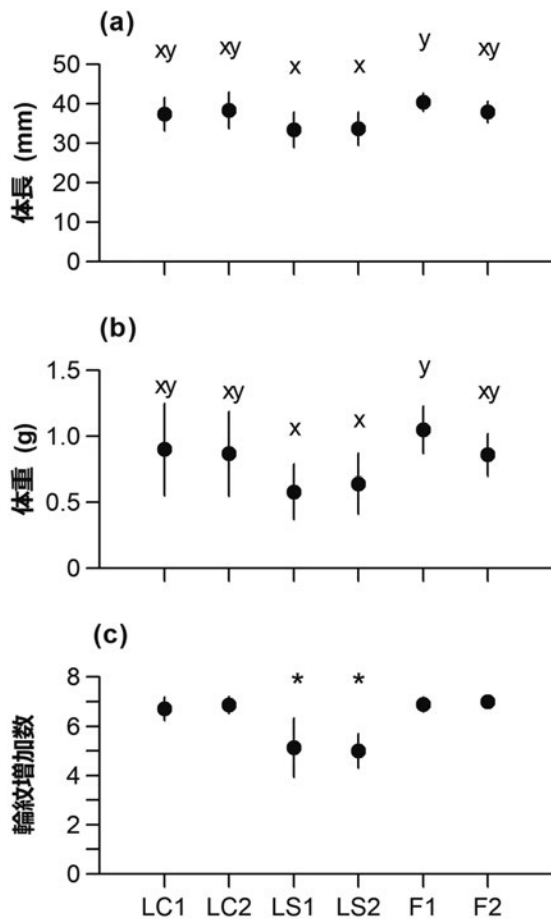


図3 7日間の室内実験及び野外ケージ実験終了後の平均体長、平均体重及び礫石縁辺部輪紋の増加数。LC:室内実験対照区, LS:室内実験飢餓区, F:野外ケージ実験区。垂直バーは標準偏差を示す。x, y:文字が異なる区間において有意に異なる(Tukey-Kramer検定, $P < 0.05$)。*:実験期間から期待される輪紋増加数7(破線)と有意に異なる区(一群のt検定, $P < 0.05$)。

なかったと考えられる。

今回の実験では、水温が約18℃の条件においてマコガレイ稚魚の耳石日輪形成を検討し、飢餓状態にない個体においては礫石縁辺部に一日あたり一本の日周輪が形成されることを明らかにした。一方、水温状況によって日周輪の形成に影響が生じる可能性もある。例えば、カタクチイワシ(未成魚及び成魚)において耳石微細輪紋の形成における日周性の有無を検証するための飼育実験が行われ、水温15℃以上では日周性が確認されたが、12℃以下では日周性が認められないことが報告されている(金ほか, 2010)。東京湾においてマコガレイ稚魚は主として3月に10 m以浅の浅海域に着底し、成長しながら夏季には40 m以深の沖合へ分布を拡大する(永山, 2005)。この時期における東京湾の底層水温は10℃(3月)から20℃(9月)の間で変動する(石井ほか, 2008)。よって、東京湾においてマコガレイ稚魚が経験する季節的な水温変動が耳石日輪の形成に影響を及ぼす可能性については、今後検証が必要である。

謝 辞

(公財)神奈川県栽培漁業協会より実験に供するマコガレイ稚魚試料をご提供頂くとともに、室内実験の実施に際して実験場所の提供や飼育方法の助言など多大なるご協力を頂いた。東京湾における野外実験で用いたケージの設置回収作業に際しては、神奈川県水産技術センターの工藤孝浩氏、潜水士の三富龍一氏と加藤智美氏、及び第2・第5早川丸の早川厚一郎氏にご尽力頂いた。ここに記して謝意を表す。

引用文献

- Campana, S. E. and Neilson, J. D. (1985) Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 1014-1032. <https://doi.org/10.1139/f85-127>
- 千葉県水産総合研究センター(2008)貧酸素水塊速報. https://2008www.pref.chiba.lg.jp/lab-suisan/suisan/suisan/suikaisokuhou/documents/2008hinnsannso_matome.pdf(2022年8月10日確認)
- Durham, B. W. and Wilde, G. R. (2008) Validation of daily growth increment formation in the otoliths of juvenile cyprinid fishes from the Brazos River, Texas. *North American Journal of Fisheries Management*, 28, 442-446. <https://doi.org/10.1577/M07-115.1>
- Geffen, A. J. (1983) The deposition of otolith rings in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., embryos. *Journal of Fish Biology*, 23, 467-474. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb02927.x>
- 石井光廣・長谷川健一・柿野 純(2008)千葉県データセットから見た東京湾における水質の長期変動. *水産海洋研究*, 72, 189-199. <http://www.jsfo.jp/archives/contents/pdf/72-3-189.pdf>(2022年8月10日確認)
- Jennings, S., Kaiser, M. J. and Reynolds, J. D. (2001) *Marine Fisheries Ecology*. Blackwell Science, London.
- Joh, M., Takatsu, T., Nakaya, M. and Higashitani, T. (2005) Otolith microstructure and daily increment validation of marbled sole (*Pseudopleuronectes yokohamae*). *Marine Biology*, 147, 59-69. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1545-x>
- 金 善庸・青木一郎・並木重伸・片山知史(2010)低水温下におけるカタクチイワシの日周輪形成. 平成22年度日本水産学会大会講演要旨集.
- Kodama, K., Oyama, M., Lee, J. H., Kume, G., Yamaguchi, A., Shibata, Y., Shiraiishi, H., Morita, M., Shimizu, M. and Horiguchi, T. (2010) Drastic and synchronous changes in megabenthic

community structure concurrent with environmental variations in a eutrophic coastal bay. *Progress in Oceanography*, 87, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2010.09.003>

Kodama, K., Lee, J. H., Oyama, M., Shiraishi, H. and Horiguchi, T. (2012) Disturbance of benthic macrofauna in relation to hypoxia and organic enrichment in a eutrophic coastal bay. *Marine Environmental Research*, 76, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.08.007>

Lee, J. H., Kodama, K., Oyama, M., Kume, G., Takao, Y., Shiraishi, H. and Horiguchi, T. (2009) Changes in growth of marbled sole *Pseudopleuronectes yokohamae* between high and low stock-size periods in Tokyo Bay, Japan. *Fisheries Science*, 75, 929–935. 2009. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0117-x>

永山聡司(2005)東京湾内湾におけるマコガレイ稚魚の分布について. 千葉県水産研究センター研究報告, 4, 17–34. <https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010712817.pdf>(2022年8月10日確認)

Rodríguez-Mendoza, R. P. (2006) Otoliths and their applications in fisheries science. *Ribastvo*, 64, 89–102. <https://hrcak.srce.hr/file/13710>(2022年8月10日確認)

反田 實(2008)兵庫県瀬戸内海におけるマコガレイの生態と漁業に関する研究. 兵庫県立農林水産技術総合センター研究報告, 40, 1–96. <https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010781803.pdf> (2022年8月10日確認)



李 政勲 / Jeong-Hoon LEE

韓国, 国立水産科学院水産資源研究センター海洋水産研究官。長崎大学大学院生産科学研究科環境科学専攻修了, 博士(学術)。専門は魚類生態学。主な水産資源を対象してバイオロギング手法を使った生態研究を進めている。



児玉 圭太 / Keita KODAMA

国立環境研究所 環境リスク・健康領域生態系影響評価研究室主幹研究員。東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻修了, 博士(農学)。専門は水産資源学, 沿岸生態学。東京湾の底棲魚介類の資源量に大きな年変動があることに着目し, 環境要因と関連付けた資源量変動機構の解明を目的として, 東京湾の底棲魚介類群集及び, その中の優占種であるシャコ, ハタテヌメリ, マコガレイ, ホシザメを主たる対象として研究を行っている。



堀口 敏宏 / Toshihiro HORIGUCHI

国立環境研究所 環境リスク・健康領域生態系影響評価研究室長。東京大学大学院農学系研究科水産学専攻博士課程修了, 博士(農学)。専門は海洋生態毒性学。大学院以降, 有機スズ化合物による巻貝類のインボセックスの実態と機構の解明に関する研究に従事。東京湾の環境の変化と底棲魚介類群集の変遷に係る研究にも携わる。東日本大震災及び福島原発事故後は, 放射能汚染とともに潮間帯の無脊椎動物及び沿岸の底棲魚介類の種組成, 密度や性成熟等の変化に関する調査研究にも取り組んでいる。