

## 耳石横断薄層切片を用いた魚類の年齢査定の薦め

増田育司\*<sup>1</sup>, 野呂忠秀\*<sup>2</sup>

### Recommendation of Aging Fish with Transverse Sections of Otoliths

Yasuji Masuda\*<sup>1</sup> and Tadahide Noro\*<sup>2</sup>

*Keywords* : Aging , Fish, Transverse section, Otolith, Scale

#### Abstract

It is important to accumulate the information on age, growth, maturation, spawning, and survival to manage a fish stock properly. To know the age of fish, various hard structures such as scales, otoliths, vertebrae, opercular bones, fin rays have been used. Among these, scales have been frequently used for a long time, but it has gradually become apparent that scales apt to underestimate the actual age of fish, especially that of old one, as compared with the sections of otoliths. In this paper, we introduce our techniques to make sections of otoliths, and discuss the cause of the underestimation of age by scale or surface otolith readings, using the samples of a few fish species collected from the coastal waters of Kagoshima Prefecture, Japan.

有用水産資源を適切に管理するためには、その資源の生物学的特性、特に年齢と成長、および成熟と産卵に関する知見を得る必要がある。魚類の年齢査定には、体長の頻度分布から年齢組成を推定する体長組成法や、鱗、耳石、脊椎骨、鰓蓋骨、鰭条等の年齢形質上の輪紋数を読み取る年齢形質法が一般に用いられるが、前者については、高齢魚における年齢群の分離が必ずしも容易でない。一方後者については、鱗や耳石の表面上の輪紋数を用いるよりも、耳石の横断面上の輪紋数を用いる方が、より正確に魚類の年齢を査定できることが、カナダのBeamishを中心とする研究者らによって次第に明らかになってきた。<sup>1-4)</sup> 筆者らも、電子顕微鏡標本の作製に用いられるエポキシ樹脂包埋法を耳石横断薄層切片の作製に適用した結果、極めて明瞭な輪紋構造を観察することができ、得られた成果の一部を発表したが、<sup>5)</sup> その具体的な方法については述べていない。そこで本研究では、筆者らが日常用いている耳石横断薄層切片の作製法を紹介するとともに、鹿児島県の沿岸海域で漁獲された数種

の魚類を用いて、鱗や耳石の表面上の輪紋数を用いた年齢査定が抱える問題点を明らかにし、魚類の年齢査定に際しての留意点を提示したい。

#### 方 法

##### 耳石横断薄層切片作製法

本研究で用いた耳石横断薄層切片作製法を以下に紹介する。

##### 1) 耳石の摘出並びに保存

魚体から摘出した耳石は、水洗により付着物を取り除いた後、Fig.1-aに示すマルチウェルプレートのような容器に入れ、個体識別をして乾燥保存する。

##### 2) 包埋用のエポキシ樹脂の作製および耳石の包埋

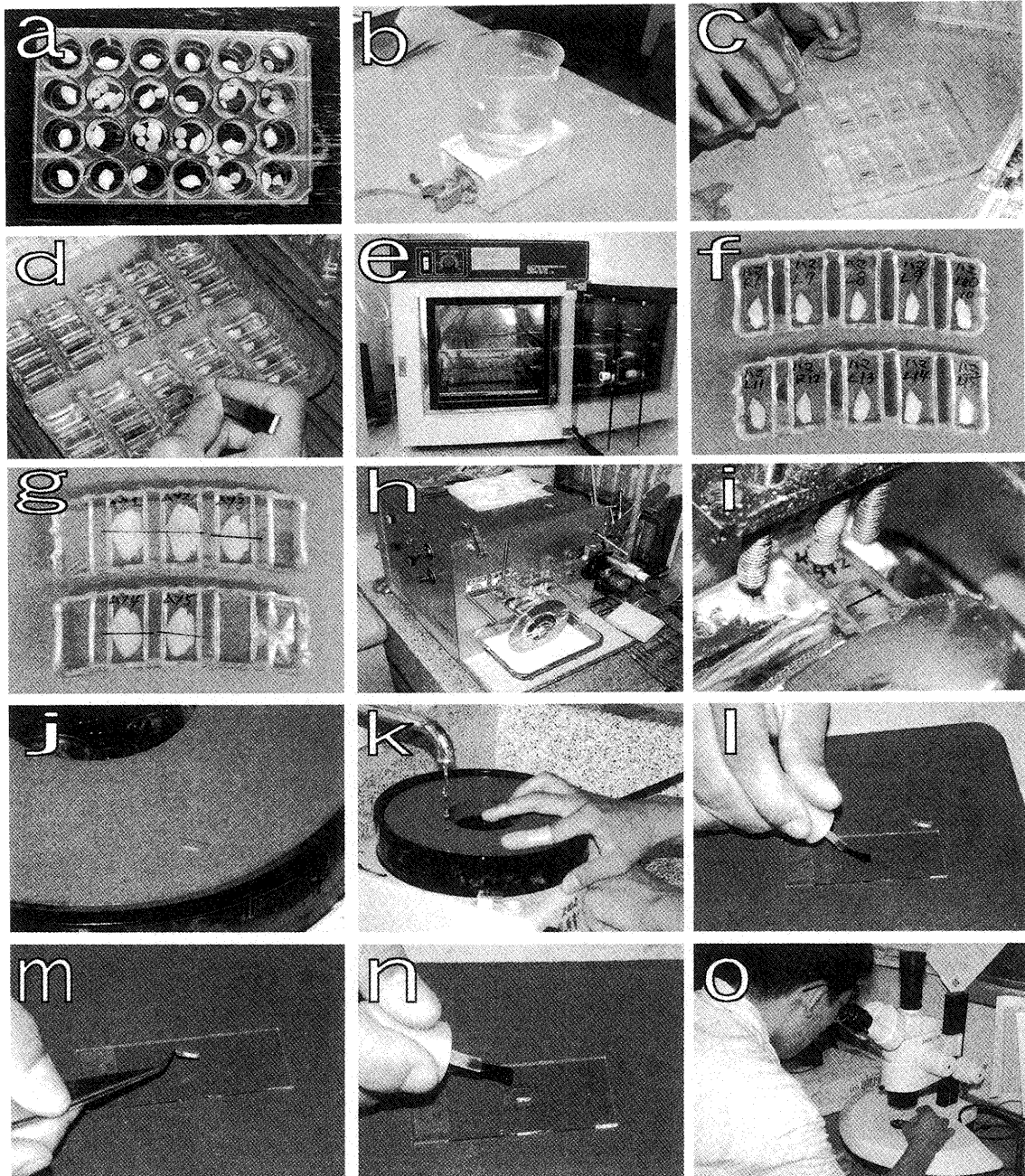
耳石の包埋にあたっては、電子顕微鏡標本の作製に用いられるエポキシ樹脂包埋法<sup>6)</sup>を用いた。試薬（発売元はいずれも応研商事株式会社）の処方は以下の通りである。

\*<sup>1</sup> 鹿児島大学水産学部資源育成科学講座 (Laboratory of Aquatic Resource Science, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 50-20 Shimoarata 4, Kagoshima, 890-0056 Japan)

\*<sup>2</sup> 鹿児島大学水産学部附属海洋資源環境教育研究センター (Education and Research Center for Marine Resources and Environment, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 50-20 Shimoarata 4, Kagoshima, 890-0056 Japan)

エポキシ樹脂としてEpok812を24ml, 硬化剤としてDDSA (dodecyl succinic anhydride) とMNA (methyl nadic anhydride) を11mlと16mlずつメスシリンダーで量り, ビーカーに移してマグネットスターラーで約30分間混合した後, 硬化反応加速剤としてDMP-30 (2,4,6-tri-dimethyl aminomethyl phenol) を1 ml加えてさらに

30分間混合した (Fig.1-b)。混合した樹脂をポリプロピレン製の容器に流し込み (Fig.1-c), 乾燥保存させてあった耳石をピンセットを用いて樹脂中に包埋した (Fig.1-d)。エポキシ樹脂に包埋した耳石は直ちに恒温器に入れ (Fig.1-e), 35℃で約8時間, 45℃で約12時間, 60~70℃で約48時間の順で加熱して樹脂を硬化させた。硬化した



**Fig. 1** Routine methods to make a section of otolith. a: dried otoliths in multiwell plate; b: mixing of epoxy resin; c: pouring epoxy resin in polypropylene container; d: embedding otoliths in epoxy resin; e: incubator used for hardening epoxy resin; f: hardened epoxy resin containing otoliths; g: drawing lines to cut the otolith transversely; h and i: cutting the otolith embedded in epoxy resin with diamond saw; j: setting the cut otolith on a grinding plate; k: grinding and polishing the cut otolith; l: coating a glass slide with transparent nail enamel; m: setting the polished otolith on the glass slide; n: coating the polished otolith with nail enamel; and o: observation of transverse section of otolith with binocular microscope.

樹脂は、常温に戻るまで放置した後、ポリプロピレン製の容器から取り出した (Fig.1-f)。

### 3) 横断薄層切片の作製

後述のように、耳石は横断薄層切片上の輪紋数が最も正確な年齢を表す。従って耳石の中心を通り、かつ耳石の長軸方向 (前部-後部方向) に対して直角な横断薄層切片を作製しなければならない。そのためにも、包埋された状態の耳石の中心を実体顕微鏡で確認しながら、耳石の長軸に対して直角に、かつ中心を通る線を油性ペンで書いた (Fig.1-g)。そして、この線に平行に前後1 mmずつずらして厚さ約2 mmになるように、マイクロカッター (マルトー株式会社製MC-201型) で樹脂を切断した (Fig.1-h, i)。切断後は、電動の刃物研磨機 (マキタ製作所製9820型) を用い、荒削り (厚さ約0.5 mm程度まで) にはGrit60MBのプレートを、仕上げ (厚さ約0.2mm程度まで) にはGrit1000MVのプレートを用いた (Fig.1-j, k)。研磨を終えた横断薄層切片は水分を拭き取り、スライドガラスに透明マニキュアを塗った後 (Fig.1-l)、直ちに薄層切片をピンセットで摘まんでスライドガラスとの間に空気が入らないように静かに載せ (Fig.1-m)、再度マニキュアを薄層切片上に塗り (Fig.1-n)、数時間乾燥させた後、検鏡に供した (Fig.1-o)。

## 結果および考察

### 耳石の一般的形状

Fig.2はマゴチ*Platycephalus indicus*の左側耳石の全景ならびに横断面の形状を模式的に示したものである。このように魚類の耳石は、通常、前部-後部方向に長く、背部-腹部方向に短い。また体内側 (proximal side) には、溝 (sulcus acusticus) を有する。

### 鱗と耳石横断薄層切片の比較

Fig.3と4は、鹿児島県の沿岸海域で漁獲されたマゴチ*P. indicus*とアカカマス*Sphyrna pinguis*について同一個体の鱗と耳石横断薄層切片の輪紋を比較したものである。まずマゴチ (Fig.3) について見ると、aの個体は鱗上では第1輪以降の輪紋が不明瞭であるが、同一個体の耳石横断薄層切片上では3輪が認められる。同様に、bのマゴチについても、鱗上では第2輪以降の輪紋が不明瞭で、輪紋の総数は特定できないが、同一個体の耳石横断切片は極めて明瞭な11個の輪紋を示す。アカカマスについては (Fig.4)、aの個体は鱗上では3輪しか見られないが、耳石横断薄層切片上では5輪が明瞭に見られる。同様にbの個体についても、鱗上では2輪しか見られないが、耳石上では6輪認められる。このように鱗上の輪紋は、マゴチで見られるように輪紋が不明瞭であったり、アカカマスで見られるように輪紋数が少なかったりするが、耳石横断薄層切片は鱗に比べて明らかに明瞭で、かつ多くの輪紋を示す。鱗による年齢査定が、耳石による年齢査定に比べ、魚類の年齢を過少に評価することは、既にwhite sucker *Catostomus commersoni*<sup>3)</sup> やスケトウダラ *Theragra chalcogramma*<sup>4)</sup> を始め多くの魚類で報告されている。Beamish and McFarlane<sup>7)</sup> はこの理由として、鱗はその縁辺域で活発に成長するが、魚体の成長が止まると鱗の成長も停止するのに反して、耳石はその体内側 (耳石溝側, Fig.2参照) に向かって成長し続け、結果として、耳石切片を用いた方が正確な年齢の読み取りが可能であると報告している。このように、耳石横断薄層切片は、1) 鱗に比べてより明瞭な輪紋を示すこと、2) 魚体の成長が鈍っても、鱗とは異なり、耳石は体内側に向かって成長し続けること、の2点から、魚類の年齢査定により適していると考えられる。年齢形質としての鱗の使用は、その輪紋が明瞭で、対象魚種の寿命が短い場

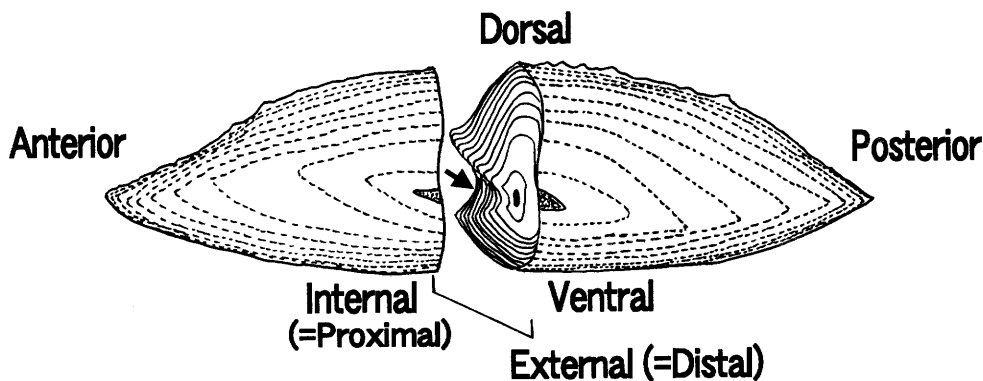


Fig. 2 Whole and transverse views of an otolith of bar-tailed flathead *Platycephalus indicus*. Arrow indicates the position of sulcus acusticus.

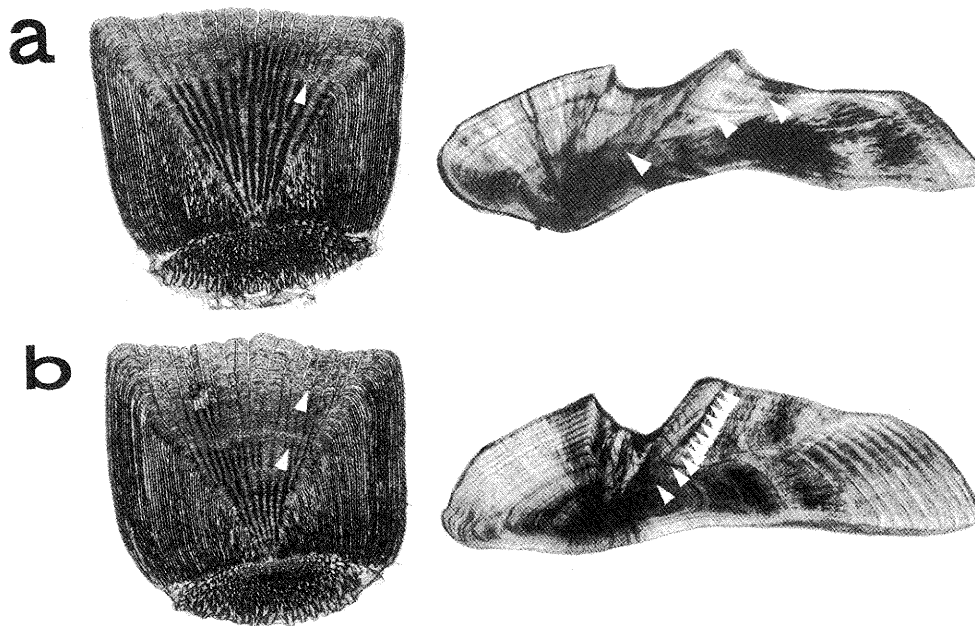


Fig. 3 Ring marks (open triangles) on scales and transverse sections of otoliths of the two bar-tailed flathead (*Platycephalus indicus*) specimens collected from the coastal waters of Kagoshima Prefecture, Japan. a: male, standard length (SL) =353mm, body weight (BW) = 426g; b: female, SL=475mm, BW=1037g.

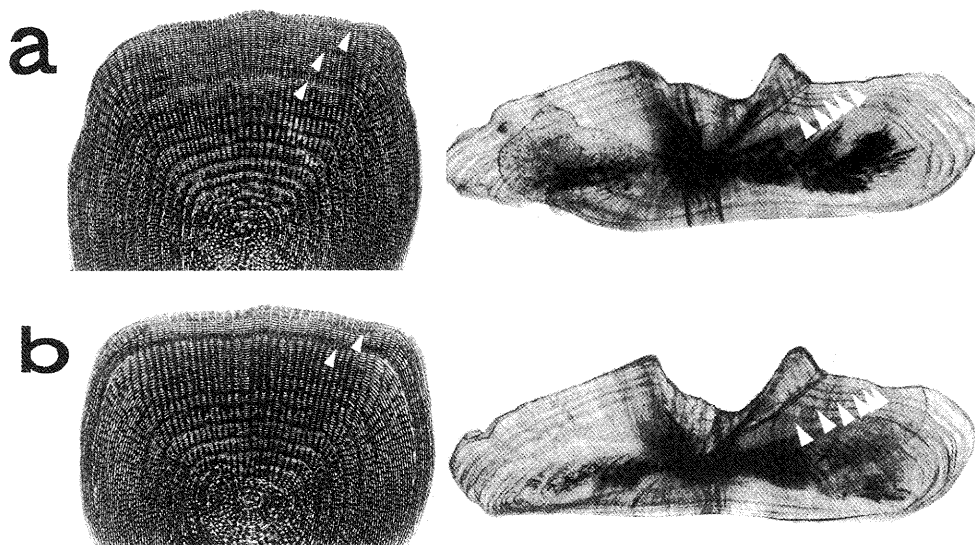


Fig. 4 Ring marks (open triangles) on scales and transverse sections of otoliths of the two brown barracuda (*Sphyraena pinguis*) specimens collected from the coastal waters of Kagoshima Prefecture, Japan. a: male, SL=283mm, BW=182g; b: male, SL=268mm, BW=165g.

合以外は控えるべきと思われる。

#### 耳石表面と耳石切片の比較

Beamish<sup>1)</sup>はPacific hake *Merluccius productus*の耳石の表面上と横断切片上の輪紋数を比べた結果、前者は後者よりも輪紋数を少なく読み取ることを報告した。これは高齢になると、耳石の長軸（前部-後部）や短軸（背

部-腹部）方向への成長は鈍るが、体内方向（耳石溝側）への成長は続くためであり（方向に関してはFig.2を参照）、未発表資料ではあるが、筆者らも南九州産のヒラメ *Paralichthys olivaceus*においても同様の結果を得ている。Fig.5は鹿児島県の沿岸海域で漁獲されたチダイ *Euvynnus japonica*、カサゴ *Sebastiscus marmoratus*、イサキ *Parapristipoma trilineatum*、およびマゴチ *P. indicus*の

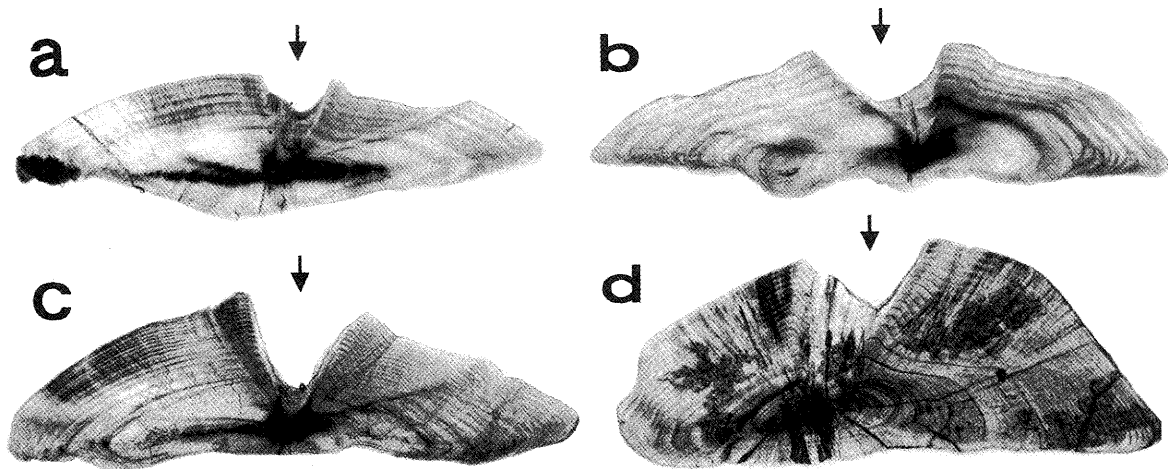


Fig. 5 Transverse sections of otoliths of the four fish specimens collected from the coastal waters of Kagoshima Prefecture, Japan. a: crimson sea bream, *Evynnis japonica*, female, SL=238 mm, BW=545 g; b: marbled rockfish, *Sebastiscus marmoratus*, female, SL=175 mm, BW=184 g; c: threeline grunt, *Parapristipoma trilineatum*, female, fork length=358 mm, BW=796 g; d: bar-tailed flathead, *Platycephalus indicus*, male, SL=443 mm, BW=1040 g. Arrows indicate the position of sulcus acusticus.

耳石横断薄層切片を示したものである。これを見ると、何れの魚種においても耳石の中心から体内側（耳石溝側，Fig.5の矢印側）への輪紋構造が明瞭であり，これは高齢な（すなわち輪紋数の多い）イサキ（Fig.5-c）やマゴチ（Fig.5-d）において特に顕著である。耳石を用いた年齢査定には，多くの場合，未だ表面読み取り法（すなわち，Fig.2に示した耳石の表面を前部-後部方向，あるいは背部-腹部方向に読み取る方法）が用いられている。年齢形質としての耳石表面の輪紋の読み取りは，前述の鱗の場合と同様に，対象魚種の寿命が短い（すなわち高齢魚が見られない）場合以外は控えるべきと思われる。また筆者らは，種々の魚類の耳石を切断した結果，縦断面よりも横断面において明瞭な輪紋構造を得ている。これは縦断すると多くの場合，耳石溝上を切断することになり，結果として横断面に比べて耳石の厚みの少ない切片を作製し，そのために明瞭な輪紋構造が得られないものと思われる。

#### 耳石横断薄層切片作製にあたっての留意点

本研究では，耳石を包埋する樹脂としてエポキシ樹脂を用いたが，使用する薬品には有害な物も含まれるので，吸入したり，皮膚に触れたりしないように注意する。また，硬化後に透明であれば（すなわち，耳石の中心部が確認でき，耳石の長軸に対して直角な目印線を引くことができれば（Fig.1-g参照）），エポキシ樹脂以外の樹脂でも差し支えない。また，混合したエポキシ樹脂を流し込むための容器としては，シリコン製の包埋板が市販さ

れているが，小型で比較的高価である。筆者らの研究室では，市販の冷凍食品の梱包に使われているポリプロピレン製の容器（Fig.1-c,d）を代用しており，これにより一度に多数の耳石の包埋が可能である。また，耳石の入ったエポキシ樹脂を切断するにあたり，市販の切断機を用いているが，数十万円と高価である。もし切断機が手元になければ，時間は数倍かかるが，研磨機で研磨し続けることで薄層切片の作製が可能である。研磨機は，市販の専用機はやはり高価であるが，筆者らが代用している電動刃物研磨機（Fig.1-j, k）は1台数万円と安価であり，極めて良好な結果を得ている。耳石の研磨には，ゴム製の指サック（Fig.1-k）を，研磨を終えた薄層切片のスライドガラスへの貼付には，速乾性の透明マニキュア（Fig.1-l, m, n）を用いると便利である。なお，データの信頼性を上げるために，輪紋の計数（Fig.1-o）は少なくとも2名の観察者がそれぞれ単独で行い，計数値が一致した個体のデータのみを解析に用いるのが望ましい。また本研究では触れなかったが，年齢形質法においては，解析に用いた形質上の輪紋が年に一本形成される，すなわち年輪であることを，縁辺成長率の経月変化や透明帯・不透明帯の月別出現状況等を通じて立証しなければならぬことは言うまでもない。

最後に，耳石横断薄層切片の作製に際して切断機を快く使用させていただいた鹿児島県水産試験場に厚くお礼申し上げる。

## 参考文献

- 1) Beamish R. J. (1979): Differences in the age of Pacific hake (*Merluccius productus*) using whole otoliths and sections of otoliths. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **36**, 141-151.
- 2) Beamish R. J. and D. E. Chilton (1982): Preliminary evaluation of a method to determine the age of sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**, 277-287.
- 3) Beamish R. J. and G. A. McFarlane (1983): The forgotten requirement for age validation in fisheries biology. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **112**, 735-743.
- 4) Beamish R. J. and G.A. McFarlane (1995): A discussion of the importance of aging errors, and an application to walleye pollock: the world's largest fishery. "Recent developments in fish otolith research" (ed. by D. H. Secor, J. M. Dean, and S. E. Campana). pp. 545-565, Univ. South Carolina Press, Columbia.
- 5) Masuda Y., T. Ozawa, S. Onoue, and T. Hamada (2000): Age and growth of the flathead, *Platycephalus indicus*, from the coastal waters of west Kyushu, Japan. *Fish. Res.*, **46**, 113-121.
- 6) 串田 弘 (1976): "超薄切片法", 増補訂正第2版, pp. 90-107 (文光堂, 東京)
- 7) Beamish R. J. and G. A. McFarlane (1987): Current trends in age determination methodology. "Age and growth of fish" (ed. by R. C. Summerfelt and G. E. Hall ). pp. 15-42, Iowa State Univ. Press, Ames.