

II-3. 魚類の卵稚仔に及ぼす影響調査法

重油流出事故における水生生物への影響は、直接汚染物質により魚介類の死亡を招く短期的影響以外にも、卵・仔稚魚などの死亡により、個体群の減少を招いたり、形態異常の発現による活性の低下などの致命的に近い間接的、長期的影響の可能性がある。これらの致命的に近い間接的影響の程度を把握するために、魚卵や仔稚魚を現場で採集し、観察する方法が有効であると思われるので、その方法について解説する。

海洋生物の多くは、その生活史の初期に卵や稚仔としてある期間を過ごし、発育しながら成魚になる。生活史の初期は、体や器官の発達の程度が未熟で、外部の環境変化に対してきわめて弱い期間である。

この時期には、海洋中の化学汚染物質の影響を受けることも多く、死亡要因となることもある。これまでに、海洋中への流出油の生物への影響、とくに漁獲対象種への影響については、数多くの調査結果が報告されている。

1967年に起きたトリー・キャニオン号の事故現場では、イワシ (*Sardina pilchardus*) の卵の50%から90%が死亡したと推定された (Smith, 1968)。

近年では、1989年にアラスカ州で起きたエクソン・バルディース号の座礁事故による原油流出の水産生物への影響が調べられた。この中で、ニシンの卵や仔魚の発生、発育への影響が調査され、卵の孵化率や正常仔魚の割合の低下などが起ることが報告されている (Brown *et al.*, 1996; Hose *et al.*, 1996)。

3.1 重油成分が魚卵の発生過程に与える影響

魚卵の発生が環境中の有害物質の影響を受けることにより、卵分割や胚体の形成に異常を来すことが知られている。重油成分も卵発生に悪影響を及ぼすことが知られている。魚卵を用いて重油の影響の把握する方法は、簡便に浮遊性の魚卵が採集できることや卵分割の状況や、胚体の観察が容易であることなどの利点がある。

魚卵を用いてその孵化率を指標に汚染海域と非汚染海域を比較する方法や、染色体の異常を観察する方法などもあるが、ここでは、簡便性を優先させて、実体顕微鏡下で観察できる魚卵の卵分割の異常、胚体形成の異常の観察による影響の程度の把握方法を紹介する。

1) 調査の設計と採集

(1) 計画

重油流出が起り、拡散が予想される海域を広くカバーできるように採集点を設けるとともに対照海域を選定し、それらの海域においても同様のサンプルを採集することが重要である。汚染が予測される海域においては、

汚染の程度を把握できるように、できるだけ多くの定点を設けることが要求される。また、一回限りの採集ではなく、一定期間ごとの採集ができることが望ましい。

(2) 採集方法

通常の魚卵採集法 (中央水産研究所編 (1992), 「浮魚類卵・稚仔採集調査マニュアル」, を参照) に準ずるが、採集用稚魚網による物理的損傷を防ぐために、曳き網速度は2ノット前後とし、長時間の曳き網は避ける。2ノット10分の採集を行った場合には、ネットによる損傷は見られないのが一般的である。卵の分布密度にもよるが、通常は、表層を10分間曳網する。海面に集積物や漂流物などが多く、稚魚網が正常に曳けない時には適宜曳き網時間を短縮する。定点当たりの卵の分布量を調べたい場合には、濾水計を装着し、単位濾水量当たりに換算し、標準化する。稚魚網の網目は、卵が逸出しないものを用いる。通常は GG54 (網目幅 0.33 mm) を使用する。

2) 試料の処理および観察方法

(1) サンプルの固定と処理

採集した卵・仔稚魚は、その場で固定をして実験室における観察に供する。固定には、通常、5%ないし10%中性海水ホルマリンを用いる。卵だけを対象とする場合には5%で十分であるが、仔稚魚や他の混獲物が多い場合には多少濃い目の溶液で固定する必要がある。船上では10%固定液とし、実験室で選別した後に新しい5%固定液で再固定するとよい。

中性ホルマリン原液の作り方は、ホルマリン原液に過剰の四ほう酸ナトリウムを加え、約3か月間放置する。固定には、この上澄みを原液として、海水により5%または10%に希釈したものを固定液とする。

船上で固定した標本は、実験室でなるべく早く選別し、混入物を取り除き、観察に供する。

(2) 種の同定

魚卵、仔稚魚の魚種の同定には、日本産稚魚図鑑 (沖山宗雄編, 1988) が有効である。とくに、魚卵については、本書に検索方法が収録されている。異常卵の出現頻度は、種毎に集計することを基本とするが、卵を種のレベルにまで同定することは極めて難しいので、種不明卵は卵径別に無油球卵、単脂卵、多脂卵に区分する。

(3) 発生異常の観察

卵発生の異常: 卵発生に与える汚染物質の影響については、発生のごく初期における卵割の異常、油球の分裂、発生中期以降における「胚体」の形成異常、卵黄の変形などを観察し、その出現率により海域における生物への影響の程度の指標とする方法がある。これまでに、大西洋

ニシン (*Clupea harengus*), 大西洋マダラ (*Gadus morhua*), ワカサギ類 (*Hypomesus pretiosus*) などを対象種にして、モニタリングが行われている。

卵発生における異常の種類と頻度は、発生段階別に集計する必要がある。

- ① 受精から「32細胞期」の期間：油球の分裂、卵黄の変形、卵割の異常
- ② 「桑実期」から「胞はい」の期間：油球の分裂、卵黄の変形
- ③ 「はい体形成」以降「孵化」まで：油球の分裂、卵黄の変形、はい体の変形及び異常（頭部のないはい体の形成など）（図 II.3.1 参照；岩井，1990）

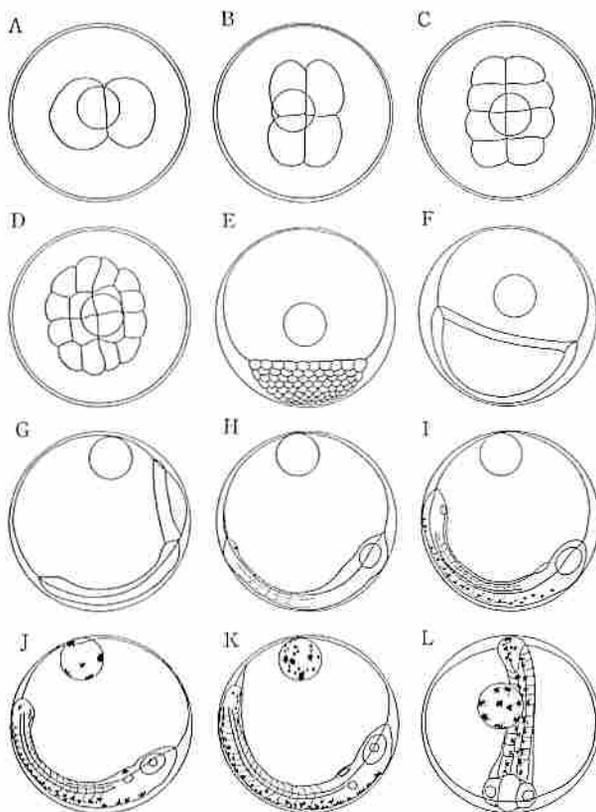


図 II.3.1 魚卵の発生段階。(岩井，1990)
 A：2細胞期 B：4細胞期 C：8細胞期 D：16細胞期 E：胞はい（桑実期） F：胞はい G：はい体形成 H：4体節期 I：10体節期 J：16体節期 K：20体節期

3.2 重油成分が仔稚魚の発育に及ぼす影響

魚類の初期発育期もまた卵期と同じように、さらにはより敏感に環境中の有害物質の影響を受け、形態形成上の異常を顕在化させる場合がある。これまでに、重油成分の影響を受け、仔稚魚の発育が阻害された事例はニシン、大西洋ニシン、ツノガレイの一種 (*Pleuronectes platessus*) についての報告がある。

1) 採集方法

卵の採集に準ずる。

2) 試料の処理および観察方法

(1) 試料の固定および保存

卵の固定も卵の場合と同じように、船上ですばやく10%海水ホルマリンで固定する。仔魚はきわめて破損しやすく、また、混入物や仔魚どおしがからまって曲がって固定されるおそれがあるのででいねいに扱い、保存瓶中の仔魚が過密にならないようにホルマリン溶液をたっぷり入れる。また、実験室に持ち帰った直後に、素早く選別し、固定液を新しいものに換えておく。

(2) 形態異常の観察

海中の油成分の影響により、仔稚魚の形態に異常が認められた事例をいくつか例示してみると、膜鱗の変形、脊索の異常、卵黄の変形、眼球の形態異常などがある。孵化直後の仔魚であれば、固定標本を用いてこれらの形質について、実顕顕微鏡下で直接に観察を行う。

- ① 孵化直後の仔魚の形態異常：孵化直後の仔魚の形態異常としては、はい体の変形及び部分的欠損、卵黄の変形、膜鱗の変形、眼球の変形などである。
- ② 仔稚魚の形態異常：発育が進んだ仔稚魚の場合も基本的には (a) と同じであるが、発育が進み、新しい形質が発現してくるので、異常の観察できる部位も増加する。とくに、重要なのは、骨格の異常である。
- ③ 骨格異常の観察：仔稚魚期には骨格が形成されるが、環境中の油成分の影響で、形成阻害が起こることが多くの事例によって示されている。骨格の形成異常の観察を行うためには、仔稚魚の標本を染色して観察を行う。

仔稚魚の染色は、仔稚魚の骨格が形成途上にあることが多いので、骨格異常の観察のためには以下の操作により軟骨と硬骨の二重染色を施す。

- a 固定：ホルマリン固定した標本を用いる。
- b 水洗：一昼夜、大きい稚魚では2~3日間の水洗を行う。
- c 脱水：95%エタノールと蒸留水の等量液に浸漬して一日間放置し、次に無水エタノールまたは95%エタノールに一日間浸漬する。
- d 軟骨染色：無水エタノール 70 ml, 99%水酢酸 30 ml, アルシアンブルー (Alcian blue 8GN, または 8GX) 20 ml の混合液に浸漬する。およそ24時間以内。軟骨の染まり具合を見ながら染まったのを確認して次の行程に移る。
- e 中性化：飽和ホウ酸ナトリウム溶液に12時間浸漬する。
- f 組織の透明化：飽和ホウ酸ナトリウム 30 ml, 蒸

- 留水 70 ml, トリプシン 1 g の混合液に浸漬し, 軟骨が鮮明に見え, 筋肉が脱色のを待つ。約一昼夜。
- g 硬骨染色: 0.5%水酸化カリウム溶液にアリザリンレッド溶液を十分に滴下し, この液に仔稚魚を浸漬する。硬骨が赤化するまで待つ。仔魚では数時間で完成。染色が過度にならないように注意する。アリザリン溶液は, 水酢酸 5 ml, 純グリセリン 10 ml, 抱水クロラール 1%液 60 ml の混合液をウォーターバスの中で温めながら, アリザリンレッド S を溶かす。
- h 保存: 0.5%水酸化カリウム液とグリセリンの混合比が 3:1, 1:1, 1:3 の液に順次移し, 最後は少量のチモールを加えた純グリセリン中に保存して観察に供する。

(3) 仔稚魚の骨格の形態異常の観察

仔稚魚の骨格の形態異常の発現は, 頭部, 脊椎骨, 尾部などで顕著である。頭部では, 眼球の変形, 顎の変形などがみられる。脊椎骨は椎体の変形や癒合による脊椎の湾曲, 尾部では, 尾部骨格の変形などがみられる。これらの部位における異常の発現頻度を観察する。

引用文献

Brown, E. D., B. L. Norcross and J. W. Short, 1996. An

- introduction to studies on the effects of the Exxon Valdez oil spill on early life history stages of Pacific herring, *Clupea pallasii*, in Prince William Sound, Alaska. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **53**, 2337-2342.
- 中央水産研究所, 1992. 浮魚類卵・稚仔採集調査マニュアル, 51 pp.
- Hose, J. E., M. D. McGurk, G. D. Marty, E. D. Brown and T. T. Baker, 1996. Sublethal effects of the Exxon Valdez oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989-1991. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **53**, 2355-2365.
- 岩井 保, 1990. 魚学概論 第二版, 恒星社厚生閣, 183 pp.
- Mironov, O. G., 1967. Effects of low concentrations of crude oil and petroleum products on the developing eggs of the Black Sea turbot. *Vopr. Ikhtiol.*, **7**(3), 577-580. (in Russian).
- 沖山宗雄編, 1988. 日本産稚魚図鑑, 東海大学出版会, 1154 pp.
- Smith, J. E., (ed.) 1968. "Torrey Canyon" pollution and marine life" Cambridge University Press, Cambridge. (邦訳:「トレー・キャニオン号海難による海洋汚染と生物環境」, 日高海洋科学振興財団, 1973年)
- von Westernhagen, H., 1988. Sublethal effects of pollution on fish eggs and larvae. In "Fish physiology, the physiology of developing fish. Vol. 11A. Eggs and larvae. Edited by W.S.Hoar and D. J. Randall. Academic Press, New York. pp. 253-346.

<南 卓志>