

技術報告

サケの耳石温度標識パターンを増やすための 標識時間の短縮

宮内康行^{*1}・江田幸玄^{*2}・平間美信^{*3}・岡本康孝^{*1}・大貫 努^{*4}

Shortening of marking time to increase otolith thermal marking pattern of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) released from hatcheries

Yasuyuki MIYAUCHI, Yukiharu GOHDA, Yoshinobu HIRAMA,
Yasutaka OKAMOTO and Tsutomu OHNUKI

Thermal otolith marking is an effective tool to identify the origin of anadromous salmon released from hatcheries. The otolith is thermally marked by abrupt changes in water temperature (3–4 °C) during incubation. The marking time required for creating one ring is at least 24 h (cooling for 12 h and warming for 12 h). The number of available marking patterns is limited because the window of marking is less than two weeks for the eyed-egg stage. In order to increase otolith marking patterns, we conducted laboratory experiments to shorten the marking time. Our experiments confirmed that a clear marking ring was created within 12 h (cooling for 3 h and warming for 8 h at least) in the otolith of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) during the eyed-egg stage. By using this method, various marking patterns were created in the otolith of fish, even at hatcheries where the marking period was restricted because of relatively high water temperatures during incubation.

キーワード：サケ, 耳石標識, 標識パターン, 大量標識放流

2014年6月3日受付 2015年1月8日受理

さけ・ます類の資源管理や生態調査を行う際に、放流した国および河川等を明らかにするため、しばしば幼稚魚の標識放流が行われている。以前は幼稚魚の鰭切除(坂野 1960) やリボンタグなどを装着(真山 2005) する外部標識が主流であった。近年では卵管理時期に蛍光物質のアリザリン・コンプレクソンを用いて耳石に蛍光リングを付ける標識(工藤 2001) や、水温変化により耳石にバーコード状の黒いリングをつける耳石温度標識(以下、耳石標識)による大量標識放流が主流となっている

(浦和 2001)。

我が国では1999年春に耳石標識をつけたサケ *Oncorhynchus keta* 稚魚が石狩川支流の千歳川にはじめて放流された(川名 1999)。その後、耳石標識魚の放流数は徐々に増加し、2013年春には耳石標識を施したサケ稚魚が約2億3000万尾放流された(Tomida *et al.* 2013, Urawa *et al.* 2004)。放流効果(高橋 2010)などを把握するための様々な調査にも利用されている。

耳石標識は冷却装置を用いて通常水温(原水)を約4°C

*1 独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所さけます資源部天塩さけます事業所
〒098-2243 北海道中川群美深町西3条南4丁目1-1

Tesio Field Station, Salmon Resources Division, Hokkaido National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Institute, West 3
South 4-1-1, Bifuka, Hokkaido 098-2243, Japan
ymiyauch@affrc.go.jp

*2 独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所さけます資源部千歳さけます事業所

*3 水産庁増殖推進部栽培養殖課

*4 独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所さけます資源部

下げると耳石に黒いリングが形成される（浦和 2001）。このリングは光周期により 1 日 1 本形成される周期的な日周輪（Mugiya 1987）とは異なり、急激な魚体の生理状態の変化やなんらかのストレスを受けた時、耳石中に含まれるカルシウムとタンパク質層の厚さが変化し、非周期的なリングが形成されることを応用した標識技術である（浦和 2001, 麦谷 1996, Brothers 1990）。我が国では冷却する時間を 12 時間もしくは 24 時間としている。水温を冷却する時間が 12 時間の場合は細いリングが、24 時間の場合はそれよりも太いリングが形成される。これと 12 時間以上の通常水温で管理する時間を組み合わせ、バーコード状の標識パターンを作成している（浦和 2001）。

サケの人工ふ化放流事業の行程で、耳石標識を行うのは死卵を取り除く「検卵」の作業後から、卵からふ化する前に養魚池（仔魚管理池）へ移行する「散布」作業までの間である。例えば、ふ化管理水温が 8°C の場合、積算温度 320°C 過ぎ（受精から約 40 日）に検卵作業を行い、積算温度 450°C 以前（受精から約 56 日）には養魚池へ散布することから、標識作業を行える期間は約 16 日となる。また、検卵や散布作業の衝撃で生じるノイズや卵からふ化する時に表れる「ふ化リング」と標識したリングを見分けるため、標識前後には「安息日（通常水温での管理）」を 2 日設けることを基本としている。そのため、実際の標識期間は約 12 日前後である。ふ化管理水温が高温の場合は標識可能な期間も短くなり、例えば、水温が 12°C を越えるふ化場での標識可能日数は約 7 日前後である。辻本・田子（1998）や坂本ら（2009）はサクラマス *O. masou* のふ化後の仔魚にも水温変化を与えることで、耳石標識が可能であることを確認している。しかし、サケの種卵はサクラマスの種卵よりも大量に扱うため、標識装置の冷却能力を考慮すると、ふ化前の卵の発眼期に標識をつけることが望ましい。

耳石標識パターンの重複を避けるため、NPAFC（北太平洋河性魚類委員会）の標識作業グループ（2014）が国間の調整を行っている。日本から放流されるサケ稚魚に用いられる耳石標識パターンとして、最初は 2 本の太いリングもしくは細いリングを付け、その後に細いリングもしくは太いリングを組み合わせるルールとなっている（浦和 2001）。こうした調整作業を経て、2013 年現在、日本ではサケ、サクラマス、カラフトマス *O. gorboscha* およびベニザケ *O. nerka* の 4 魚種に 65 種類の耳石標識をつけて放流している（Tomida *et al.* 2013）。しかし、近年、耳石標識を用いた様々な研究開発（高橋 2009, Urawa 2009, Urawa 2004, 高橋 2010）が増加したことにより、耳石標識パターンが慢性的に不足して支障を来している。特に本州の比較的水温の高いふ化場では卵期の発生が早く、標識できる期間も短いため、利用可能な耳石標識パターンが限定されている。

本試験では、耳石標識にかかる時間を短縮して利用可

能な耳石標識パターンを増加させるため、認識可能な標識リングを形成することができる最短時間を検討した。

材料と方法

供試卵と冷却装置 試験には 2012 年 9 月 8 日、15 日、21 日と 12 月 7 日、12 日に千歳川に遡上したサケ親魚から採卵授精させた卵を用いた。受精卵は北海道区水産研究所千歳さけます事業所（以下、千歳事業所）のボックス型ふ化器に収容し、積算温度 320°C の時点で死亡した卵を除去するために検卵作業を実施し、48 時間の安息期間（通常水温での管理）を設けた後、試験に供した。耳石標識は千歳事業所に設置された水温冷却装置（TR-J150DCS, タカツ電機商会社製）を用いて行った。この装置は 1～99 時間毎の設定で水温調整した用水を毎分 50 L 供給することが可能である。千歳事業所で卵管理に用いている湧水の平均水温は 8.3°C（範囲 7.9～8.8°C）であり、冷却装置を用いておよそ 4°C に下げて標識試験を行った。試験には 1 群あたりおよそ 1,000 粒の卵をネットに入れ、ボックス型ふ化槽に収容して標識を行った。標識終了後、再び 48 時間の安息期間を設けてから仔魚管理へ移行した。試験期間中の水温変化は自記水温計（HOBO Pendant, ONSET 社製）を用いて 5 分毎に記録した。

最短の冷却時間 まず、標識リングの識別が可能な最短冷却時間を把握するため、冷却（約 4°C）時間が 1, 2, 3, 4, 6, 12（対照）時間の 6 区分を設定した。通常水温（約 8°C）での管理時間は従来通り 12 時間とした。本試験での冷却と通常水温の表記方法として、冷却水と通常水温での管理時間の後に C（冷却）か H（通常水温）を付記した。例えば、1 本のリングをつけるための組合せで 1 時間冷却と 12 時間通常水温の表記方法は「1C12H」となる。このサイクルを 4 回繰り返し、4 本リングの耳石標識を試みた。

通常水温での最短管理時間 識別可能な標識リング間の空白を形成する通常水温での最短の管理時間を把握するため、前述の試験で判断された最短の冷却時間から通常水温での管理時間を 1 時間ずつ増やし、最長で 11 時間までの試験区を設定した。この試験でも 4 本リングの耳石標識を試みた。また、4 本のリングが鮮明に確認できた試験区については 1 本目と 4 本目のリング間の距離を測定した。生物顕微鏡（ECLIPSE Ci-S, ニコンインステック社製）にデジタルカメラ（IK-HR2D, 東芝社製）を接続し、映像化したものを画像計測ソフトウェア（SENSIV MEASURE, 三谷商事社製）を用いて距離の測定を行った。

標識後の仔魚の生残率 今回、従来の耳石標識の間隔よ

り短い間隔での水温変化を発眼卵に与えたため、ふ化仔魚の生残に与える影響を検討した。試験に用いた同日採卵日（3区分）と別の採卵日（2区分）の受精卵に非標識群を設け、ふ化した仔魚が浮上（積算温度約950°C）するまでの生残率を標識群と比較した。標識群、無標識群ともにふ化した仔魚は粒径およそ2～5cmの玉砂利を敷き詰めたプラスチック製のザル（縦40cm、横28cm、高さ5cm）に収容し、湧水（約8°C）を供給して浮上期まで流水飼育した。生残率は最終的に浮上した稚魚の数を試験開始時の発眼卵の数で割って算出した。

耳石標識の評価方法 各試験区分が耳石標識として認識可能か判断するため、標本を作製し、表1に記した4段階の基準を用いて6名で評価した。標本は試験区毎に浮上したサケ稚魚から10尾を無作為に抽出し、耳石（扁平石）を取り出し、スライドグラスに樹脂を用いて貼り付け、耳石の核が明瞭に見えるまで研磨したものを作製した。また、評価については試験設定の先入観をなくすため、順番をランダムに並べたブラインドテストを用いた。生物顕微鏡の100～600倍で耳石標識の状態を観察し、1個体に対して、6名のうち2名が評価を行い、評価結果が異なる場合には良い方の評価結果を採用し、その割合を算出した。良い評価結果を採用した理由は、通常の耳石解析作業では見落としや誤認を防ぐため、複数人によるチェック体制をとっているためである。この評価結果の割合をもとに標識として認識可能な最短時間を判断した。

結 果

最短の冷却時間 試験を行った各区の通常水温は8.5～8.8°Cであり、冷却により4.1～4.5°C低下した（図1）。各試験区の浮上稚魚から取り出した耳石の4本リングを観察した結果（図2）、冷却1時間（1C12H）では形成

されたリングが薄く、標識の存在が確認できない（C）と評価されたものが43%であった（表2）。冷却2時間（2C12H）でCと評価されたものは0%となったが、標識パターンの識別は困難（B）と評価されたものは25%であった。冷却3時間以上の区では、標識パターンが鮮明（S）あるいは標識パターンが識別できる（A）とされた割合の合計が95%以上となった。以上のことから、標識パターンを識別できる最短の冷却時間は3時間と判断された。

通常水温での最短管理時間 本試験では冷却時間を3時間（3C）に固定し、通常水温での管理時間が3、4、5、6、

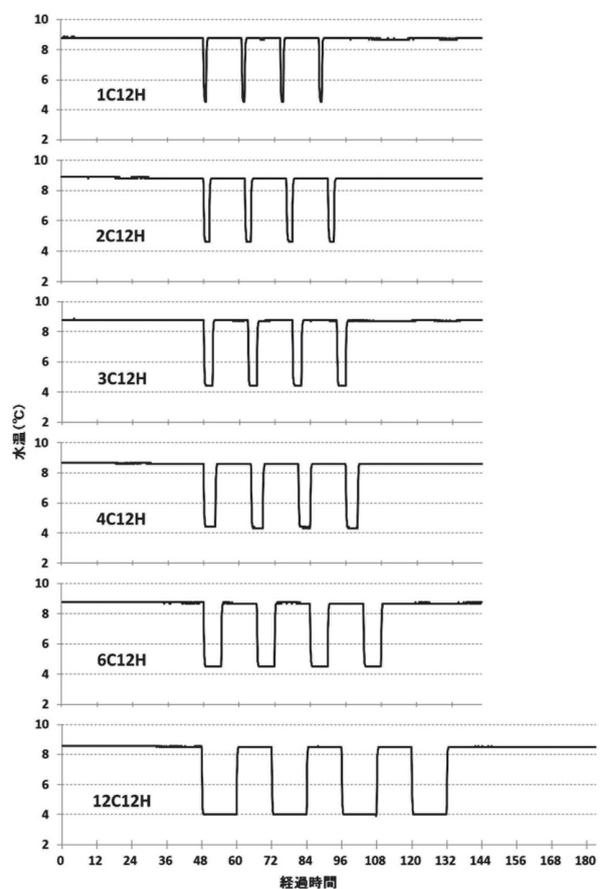


図1. 通常水管理時間を12時間とし冷却時間を1時間（1C12H）、2時間（2C12H）、3時間（3C12H）、4時間（4C12H）、6時間（6C12H）、12時間（12C12H；対照）とした各群の水温測定結果

表1. 耳石標識パターンの識別評価基準

基準	評価内容
S	標識パターンが鮮明に識別できる
A	標識パターンが識別できる
B	標識は確認できるが、標識パターンの識別は困難
C	標識の存在が確認できない

表2. 冷却時間を変えた耳石標識群6区の識別評価結果（%）

	1C12H	2C12H	3C12H	4C12H	6C12H	12C12H
S	0	24	60	46	94	97
A	3	51	35	49	6	3
B	53	25	5	5	0	0
C	43	0	0	0	0	0

評価基準は表1を参照

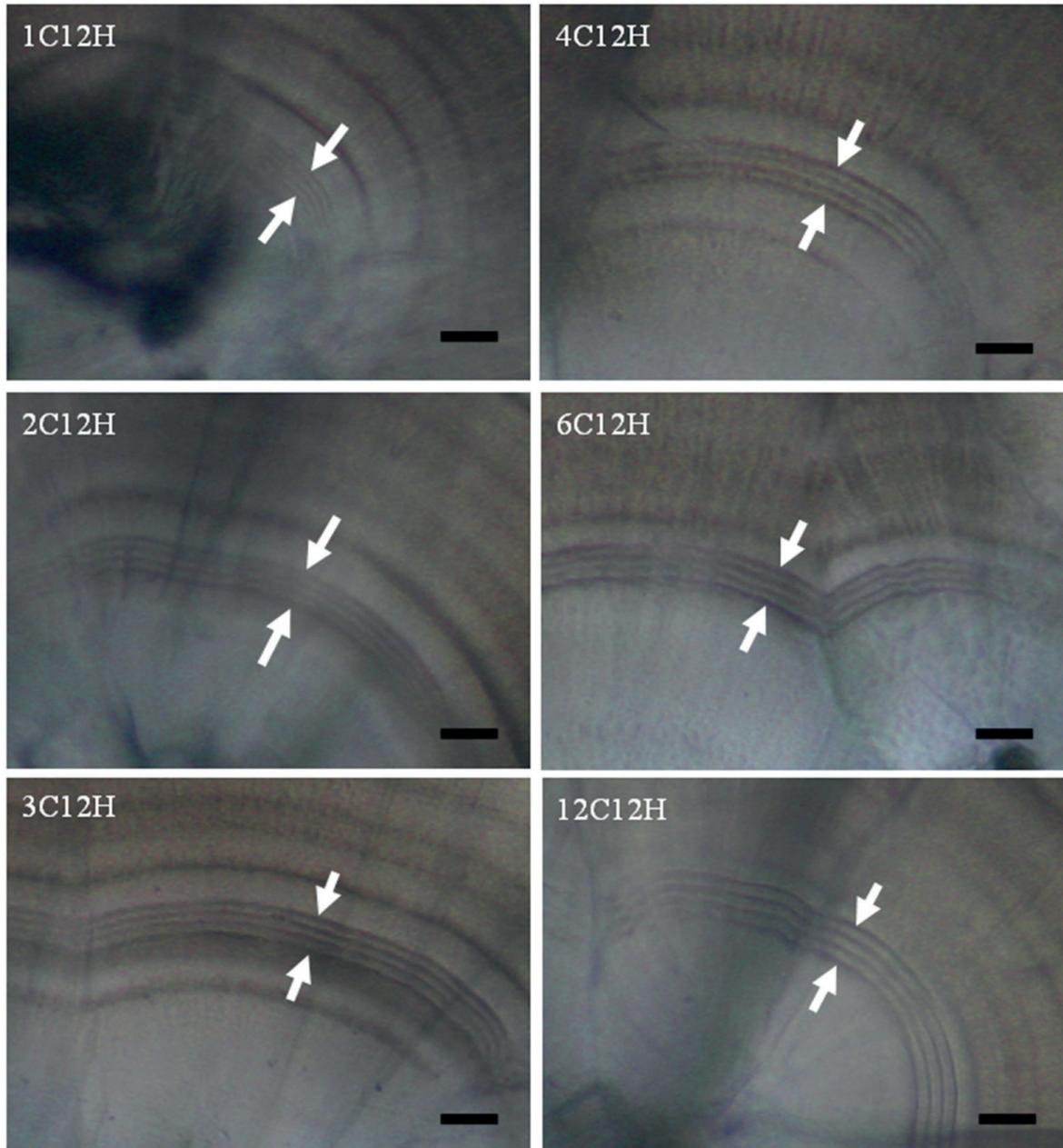


図2. 通常水管理時間を12時間とし冷却時間を1時間（1C12H）、2時間（2C12H）、3時間（3C12H）、4時間（4C12H）、6時間（6C12H）、12時間（12C12H；対照）としたサケ稚魚の耳石標識（4本リング）の画像比較
矢印は1本目と4本目のリングを示し、バーは10 μ mを示す

7, 8, 9, 10, 11時間の9区を設定し、前試験と同様に4本リングの耳石標識を試みた。各試験区の通常水温は8.1～8.5 $^{\circ}$ Cであり、冷却により4.0～4.3 $^{\circ}$ C低下した（図3）。各区の浮上稚魚から摘出した耳石を観察した結果（図4）、通常水温での管理時間が4時間以内では、リングの存在を確認することが難しく、ほとんどがBもしくはCと評価された（表3）。5～6時間ではAと評価された割合が22～59%と増えたが、BもしくはCと評価された割合の合計も41～78%と多かった。7時間ではSもしくはAと評価された割合の合計は71%となったが、Bと評価された割合も29%となった。一方、8時間以上

では、SもしくはAと評価された割合の合計が96～100%となった。

4本リング間の平均距離（ \pm 標準偏差）は8時間で4.27 \pm 0.31 μ m、9時間で4.60 \pm 0.29 μ m、10時間で5.24 \pm 0.43 μ mおよび11時間で5.37 \pm 0.40 μ mであった（図5）。なお、前試験で標識した従来から使用している12時間サイクル（12C12H）の4本リング間の距離は7.66 \pm 0.33 μ mであった。

標識群と非標識群の生残率 耳石標識試験を行った計14区の標識群における発眼卵から浮上までの平均生残

表 3. 冷却時間を3時間に固定し通常水管理時間を変えた耳石標識群9区の識別評価結果 (%)

	3C3H	3C4H	3C5H	3C6H	3C7H	3C8H	3C9H	3C10H	3C11H
S	0	0	0	0	21	85	85	97	65
A	3	9	59	22	50	15	15	3	31
B	30	51	32	42	29	0	0	0	4
C	67	39	9	36	0	0	0	0	0

評価基準は表1を参照

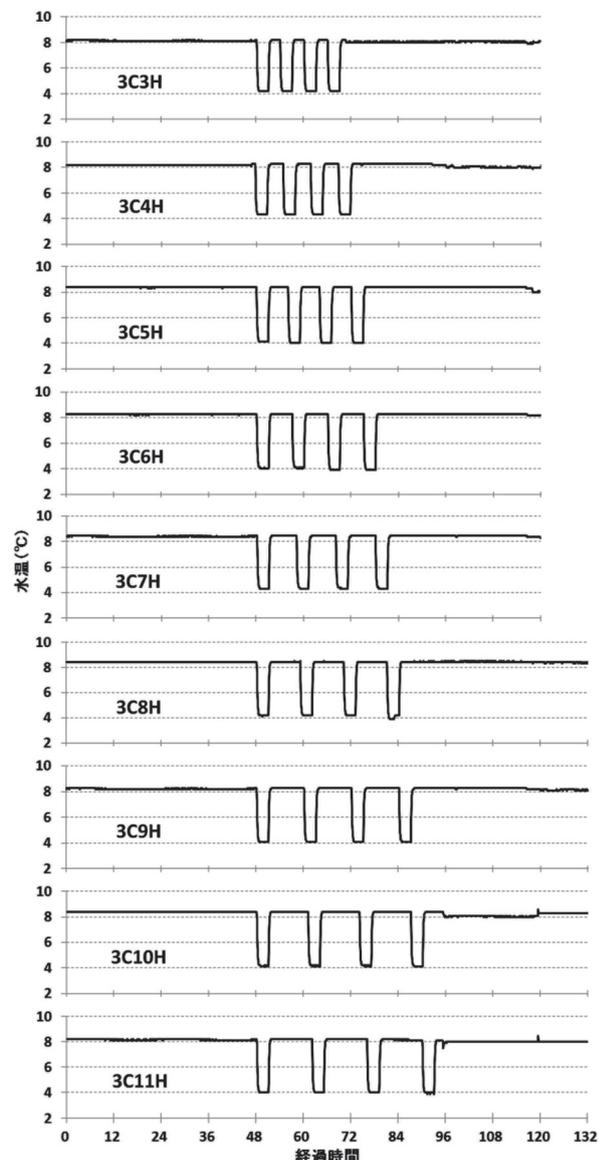


図 3. 冷却時間を3時間に固定し通常水管理時間を3時間(3C3H), 4時間(3C4H), 5時間(3C5H), 6時間(3C6H), 7時間(3C7H), 8時間(3C8H), 9時間(3C9H), 10時間(3C10H), 11時間(3C11H)とした各群の水温測定結果

率(±標準偏差)は $95.1 \pm 2.0\%$ であった(表4)。一方、非標識群5区の生残率は $95.9 \pm 3.1\%$ であり、両者の生残率に有意な差はみられなかった(U -test, $p > 0.05$)。

表 4. 各試験区毎の浮上期までの生残率

採卵月日	標識群		非標識群 生残率 (%)
	区分	生残率 (%)	
2012/9/8	1C12H	96.9	96.6
	2C12H	96.0	
	3C12H	95.4	
	4C12H	95.0	
	6C12H	94.1	
2012/9/15	—	—	90.5
2012/9/21	—	—	97.6
2012/12/7	3C3H	97.0	97.9
	3C4H	93.5	
	3C5H	95.1	
	3C6H	94.8	
	3C7H	91.8	
	3C8H	90.9	
2012/12/12	3C9H	95.4	96.8
	3C10H	97.7	
	3C11H	97.9	
平均値±標準偏差*		95.1 ± 2.0	95.9 ± 3.1

*標識群, 非標識群の生残率の平均値と標準偏差を求めた

考 察

さけ・ます類の耳石標識ではマスノスケの *tshawytscha* の受精卵を使い、冷却時間が1時間もしくは2時間でも標識可能であることが報告されている(Volk et al. 1999)。今回の試験で通常水温での管理時間を12時間に固定し、冷却時間を1時間と2時間で標識を試みた結果、標識として認識できるものも存在した。しかし、この場合は解析時の耳石研磨をより精細に行い、顕微鏡での確認にも十分な時間を費やす必要があるため、耳石解析を大量に行う作業行程の中では見落としの可能性が十分に考えられた。一方、3時間以上の冷却では耳石標識として認識可能と評価された(SもしくはA)割合が95%となった。標識の存在は確認できるが、標識パターンの識別は困難(B)と評価されたものも5%あるが、現在実施している2名の分析者による標識確認体制をとれば、判別が難しい標本に対してより精細な研磨を行い再度の見直しを行っていることから見落としは避けられると考えられた。以上のことから、識別可能なリングを標識する最短の冷却時間は3時間と判断した。

冷却3時間に対する通常水温での管理時間が3~7時間では形成された標識リングの間隔が狭く、標識として認識するのは困難であった。一方、8時間になるとほと

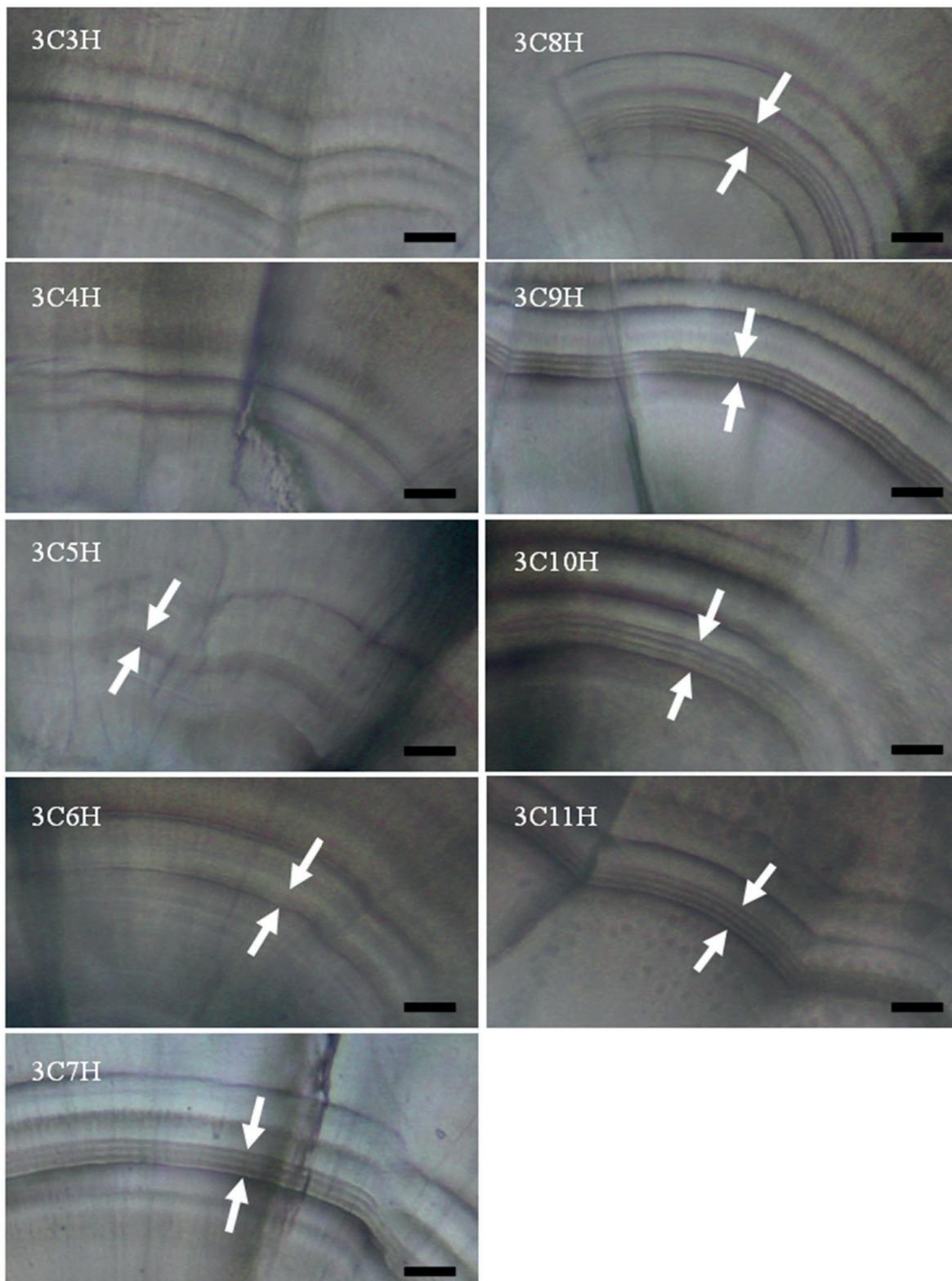


図4. 冷却時間を3時間に固定し通常水管理時間を3時間(3C3H), 4時間(3C4H), 5時間(3C5H), 6時間(3C6H), 7時間(3C7H), 8時間(3C8H), 9時間(3C9H), 10時間(3C10H), 11時間(3C11H)とした耳石標識群(4本リング)の画像比較
 矢印は1本目と4本目のリングを示し, バーは10 μ mを示す

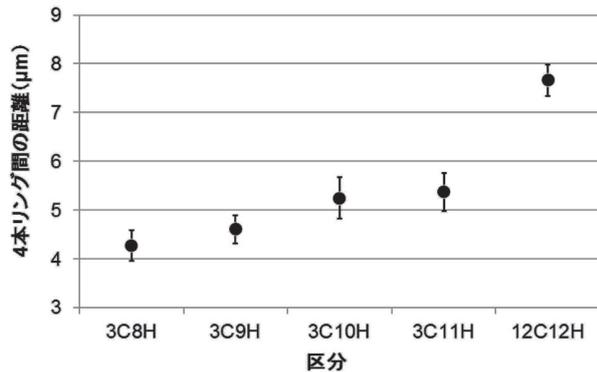


図5. 冷却時間を3時間に固定し通常水管理時間を8時間(3C8H), 9時間(3C9H), 10時間(3C10H), 11時間(3C11H)とした耳石標識群と冷却12時間・通常水管理時間12時間群における標識(4本リング)平均距離の比較。各区分10個体ずつ測定し、バーは標準偏差を示す。

んどが標識として認識可能であることから、通常水温での最短管理時間は8時間以上と判断した。

また、従来から使用している12時間間隔よりも短時間での水温変化を与えたため、ふ化後の仔魚の生残に影響を及ぼすことが懸念されたが、標識群と非標識群の生残率に有意な差は見られなかった。従って、短時間の標識が発眼卵やふ化仔魚に与える影響はないと判断した。

以上のことから、最短の冷却時間は3時間で、この冷却時間に対する最短の通常水温での管理時間は8時間以上であることが判った。我が国では従来の耳石標識作業は12時間の倍数の間隔で行っている。従って、今回の結果から冷却時間を3時間(3C)とした場合、通常水温での管理時間を9時間(9H)にすれば、合計12時間(3C9H)で1本のリングを標識でき、作業性の面からしても実用的であると考えられた。従来の標識は最短24時間で1本のリングを標識していたが、今回の標識間隔を導入すれば、同じ24時間で2本のリングが標識可能になる。加えて、標識期間の短縮も可能である。

一方、従来の12時間サイクル(12C12H)で標識した4本リングの標識距離は平均7.66 μm、今回の結果からふ化場で導入できると判断された冷却3時間と通常水9時間(3C9H)の4本リングの標識距離は平均4.60 μmであり、従来のものよりも約40%狭くなっている(図5)。従って、短時間の標識を調べる際は、従来よりも注意深い観察が要求される。今後、各種調査等で短時間の標識を利用する場合には、従来から使用している12時間もしくは24時間間隔標識と今回の標識を組み合わせることでさらに見落としの可能性はなくなると考えられる。

今後の実用化に向けて、今回の試験ではすべて浮上稚魚段階の耳石でしか確認していないため、これより成長した幼魚もしくは親魚の耳石でも短時間の標識が識別可能か検討する必要がある。さらに、短時間の標識が事業規模の数百万粒単位で大量標識の実施可能かどうかに加え、今回実施した試験の約8°Cの水温条件と異なる場所

でも実施可能か検討する必要がある。

謝 辞

本報告をとりまとめるにあたり、独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所浦和茂彦博士には有益なご助言を頂きました。また、本研究を行うにあたり、同千歳さけます事業所の契約職員の皆様には耳石解析作業にご協力いただきました。お礼申し上げます。

文 献

- Brothers, E. B (1990) Otolith marking. *American Fisheries Society Symposium*, 7, 183-202.
- 川名守彦(1999) 耳石大量標識に関する先進地調査. さけ・ます資源管理センターニュース, 3, 13.
- 工藤 智(2001) ALC 標識放流サケの幼魚期の成長とその母川回帰状況. 魚と水, 37, 31-40.
- 真山 紘(2005) サクラマス生態ノート パート2. さけ・ます資源管理センター技術情報, 171, 1-4.
- Mugiya, K (1987) Effects of Photoperiods on the Formation of Otolith Increments in the Embryonic and Larval Rainbow Trout *Salmo gairdneri*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1979-1984.
- 麦谷泰雄(1996) 硬骨魚類の耳石形成と履歴情報解析. 海洋生物の石灰化と硬組織(和田浩爾・小林巖雄編). 東海大学出版会, 東京. 285-298pp.
- NPAFC (2014) working Group on Salmon Marking <http://npafc.taglab.org>, 2014年8月12日
- 坂本 準・桑木基靖・江場岳史(2009) サクラマスの耳石バーコード標識パターン数を増やすための低水温飼育と昇温刺激を併用した標識方法. 水産技術, 2 (1), 25-30.
- 坂野栄市(1960) 北海道に於ける鮭稚魚の標識放流試験 昭和26年~34年. 北海道さけ・ますふ化場研究報告, 15, 17-38.
- 高橋史久(2009) これまでの耳石温度標識魚から得られた知見. SALMON 情報, 3, 6-7.
- 高橋史久(2010) これまでの耳石温度標識魚から得られた知見 その2(放流時期とサイズの検討). SALMON 情報, 4, 12-14.
- 辻本 良・田子泰彦(1998) 耳石バーコード標識のサクラマスへの適用. 富山県水産試験場報告, 10, 21-26.
- 浦和茂彦(2001) さけ・ます類の耳石標識: 技術と応用. さけ・ます資源管理センターニュース, 7, 3-11.
- Urawa, S., J. Seki, M. Kawana, T. Saito, P. A. Crane, L. Seeb, K. Gorbatenko, and M. Fukuwaka (2004) Juvenile chum salmon in the Okhotsk Sea: their origins estimated by genetic and otolith marks. *N. Pac. Anadr. Fish Comm. Tech. Rep.*, 5, 87-88.
- Urawa, S., S. Sato, P.A. Crane, B. Agler, R. Josephson, and T. Azumaya. (2009) Stock-specific ocean distribution and migration of chum salmon in the Bering Sea and North Pacific Ocean. *N. Pac. Anadr. Fish Comm. Bull.*, 5, 131-146.
- Volk, E. C., S. L. Schroder, and J. J. Grimm (1999) Otolith thermal marking. *Fish. Res.*, 43, 205-219.
- Y.Tomida, T. Ohnuki, N.Watanabe, Y.Miyauchi, Y.Okada, M. Iida, and S. Urawa. (2013) Releases of Otolith Marked Salmon from Japan between Fall of 2012 and spring of 2013. NPAFC Doc. 1484. 12 pp.