マダカアワビ稚貝の殻表に形成される日周期的成長線の検証

對木 英 幹,^{1a*} 滝口 直 之,² 山 川 卓,¹ 青 木 一 郎¹

(2003 年 11 月 14 日受付, 2004 年 3 月 11 日受理)

¹東京大学大学院農学生命科学研究科, ²神奈川県水産総合研究所Validation of daily-formed growth increments on the shell surface
of the young giant abalone, *Haliotis madaka*HIDEMIKI TSUIKI,^{1*} NAOYUKI TAKIGUCHI,²
TAKASHI YAMAKAWA¹ AND ICHIRO AOKI¹¹Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, ²Kanagawa Prefectural Fisheries Research Institute, Miura, Kanagawa 238-0237, Japan

To validate the daily formation of growth increments on the shell surface of the giant abalone, *Haliotis madaka*, double time-reference marks were incorporated on the shells of the juvenile abalones reared in aquaria by immersing the abalones in alizarin complexone (ALC) solution at an interval of 14 days. Double fluorescent marks of ALC were observed on the cross section of the shells under fluorescent microscopy. The mean number of growth increments on the shell surface between the two marks was 13.7 ($N=21$, $S.D.=1.7$), which corresponds with the time interval in days between the two marks. Release-and-recapture experiments into the natural sea showed that the shell lengths at release estimated by counting growth increments from the edge toward the apex of the shell of recaptured juveniles were in accordance with the actual shell lengths at release. It was concluded that the growth increments on the shell surface of the abalone were formed daily.

キーワード：マダカアワビ, 殻, 成長線, 蛍光標識, ALC, 年輪

アワビ類は沿岸における重要な漁業対象種であり, その成長の把握は資源の増殖や管理において重要な意味を持つ。アワビ類の年齢と成長を調べる方法としては特定の季節に殻に形成される輪紋を年輪として用いるのが一般的である。¹⁻⁷⁾ しかし, 種によっては殻に年輪が形成されない場合や, 輪紋が年齢形質として使えない場合も報告されている。^{4,8-9)} また, 輪紋を年齢形質として使える場合でも, 輪紋の位置が判読方法によって異なる場合や, 輪紋が不明瞭なために判読に困難が生じる場合が報告されている。⁵⁻⁷⁾ 本邦に生息するマダカアワビ *Haliotis madaka* では, 判読された輪紋の形成が1年に1本^{2,10)} とする場合と2本⁵⁾ とする場合の2通りが報告されて混乱が生じており, 成長の推定にあたって年輪の形成時期の再確認を必要とされている。

一方で, サンゴの化石,¹¹⁾ 魚類の耳石,¹²⁻¹⁵⁾ 頭足類の平衡石¹⁶⁻¹⁹⁾ および貝の殻²⁰⁻²⁵⁾ および殻蓋²⁶⁾ では日周輪あるいは日周期的に形成される成長線の存在が報告され, 若齢期の日齢や成長の評価に用いられている。アワビ類でも日周期的に形成される成長線が確認できれば日齢や成長の評価を詳細に行うことが可能になると考えられるが, これまでにアワビ類における日周期的な成長線の形成を検討した例はない。そこで, 本研究では種苗生産されたマダカアワビの稚貝に蛍光色素 alizarin complexone (ALC) による2重標識を適用し, 飼育実験により殻表面の成長線の日周期的形成について検討を行った。また, 天然海域に標識放流され再捕された個体の成長線を計数して放流時点の殻長を逆算推定し, 実際の放流時点における殻長と比較することで成長線の日周期的

* Tel : 81-3-5841-5281. Fax : 81-3-5841-8165. Email : aam87070@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

^a 現所属：國立高雄海洋科技大學 (National Kaohsiung Marine University, No. 142, Hai jhuan Rd., Nanzih District, Kaohsiung, City 811, Taiwan)

形成についての検証を試みた。

材料と方法

蛍光標識による成長線の日周期的形成の検証 実験は神奈川県三浦市にある神奈川県水産総合研究所で行った。蛍光色素としてこれまでに幾つかの薬剤の使用が報告されているが,^{13-15,18,27-33)} 本研究では広く用いられている alizarin complexone (ALC)^{18,28,31-32)} を用いた。

殻に2重標識を行う実験群では、1回目の浸漬を2002年11月20日13:30から11月21日13:30にかけて行った。まず50L容積のプラスチック水槽に100ppmのALC(3-[N,N-Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-1,2-dihydroxyanthraquinone, C₁₉H₁₅NO₈, 同仁化学研究所)海水溶液10Lを作成した。ALCの溶解を促進させるため、溶液には0.1gのNaOHを加えた。神奈川県水産総合研究所で生産したマダカアワビ稚貝30個体(殻長15.7~25.9mm)に識別用の個体番号を記した耐水紙を接着剤で接着し、ALC溶液に浸漬した。浸漬中の水温は16℃に保ち、餌は与えず、通気を充分行なった。また、比較のためにALC染色を行わない対照群を設定した。対照群は実験群と同じ由来のマダカアワビ10個体(殻長17.4~22.5mm)で、個体番号を記した耐水紙を接着し、実験群と同じ時間、別の50L容積のプラスチック水槽に通常海水10Lを入れて止水飼育した。この間の水温は16℃に保ち、餌は与えず、通気を充分行なった。24時間経過後に両群を取り上げ、共に屋外に設置した230Lプラスチック水槽にて流水で給餌飼育した。この期間中の水温は15.1~19.1℃で、餌としてアラメ *Eisenia bicyclis* 等の葉片を適宜与えた。1回目の染色終了から14日目の2002年12月5日14:00から2002年12月6日14:00にかけて2回目の染色を、1回目と同様の方法で行った。その後、再び同様の手順により流水下で給餌飼育し、12月11日に両群を取り上げた。なお、*t*検定の結果、実験群と対照群の実験開始時の殻長には有意な差はなかった($p>0.05$)。

殻表の輪紋の観察には実験時に殻を破損しなかった実験群の21個体および対照群の7個体を用いた。ALC標識が殻の真珠層の断面に斜めの線として観察されたため、軟体部を分離した殻をエポキシ樹脂で固定した後に呼吸孔にそって切断し、carbosand waterproof paper(CC-600, RIKEN CORUNDUM CO., LTD)によって切断面を斜めに研磨したサンプルを作成した(Fig. 1)。それらを土地、今井³¹⁾および中村、柴田³²⁾の報告のに基づき、BおよびG励起フィルターを装着した蛍光顕微鏡(Nikon LABOPHOTO 2)で観察した。実験群についてはALC標識がより明瞭に観察されたG励起フィルターを用いて蛍光標識間の成長線を計数した。真珠層内の2本のALC標識が線の形で殻表に対して垂直方向に

Fig. 1 A shell of the juvenile giant abalone, *Haliotis madaka*, used in the fluorescent-marking experiment. To observe the ALC marks in the cross section of the shell, a part of the shell was cut and polished. The frame shows the observed area. Dotted lines show the shape of the abalone shell and the formation of daily growth increments according to its growth. Arrows show the growth direction of the shell.

観察されたため、2本のALC標識線がそれぞれ殻表と接する間の部分を2重標識区間とみなし、この区間に含まれる殻表の成長線数を計測した。

標識放流再捕個体による成長線の日周期的形成の検証 神奈川県水産総合研究所では、1999年に種苗生産したマダカアワビに個体識別番号を刻んだプラスチック標識を取り付けて城ヶ島地先(Fig. 2)に標識放流し、再捕個体を得ている。これらの再捕個体のうちで、1999年6月21日に放流され、372日後の2000年6月27日に回収された3個体を対象にして成長線を計数した(Table 1)。放流日数分の372本の成長線を殻の縁辺部から殻頂方向にさかのぼって判読し逆算推定した放流時の殻長(Fig. 3)と、放流時に測定された実際の殻長を比較した。また、上述の放流-再捕個体の季節成長について検討するため、噴水孔周辺に付着物がなく、月別成長の検討が可能であった個体番号1および2の2個体について成長線数を計測し、上述と同様の方法で1999年7月から2000年6月にかけての各月1日時点の殻長を逆算推定した。放流時点の殻長および月別成長の逆算推定を行うにあたり、読み取り誤差の影響を評価するため、各個体について3回繰り返した。

結 果

蛍光標識による成長線の日周期的形成の検証 蛍光標

Fig. 2 Location of the release-and-recapture experiment.

Table 1 Comparison of actual and estimated shell lengths at release of the recaptured juvenile giant abalone, *Haliotis madaka*, by the release-and-recapture experiment into the natural sea off Jyogashima, Kanagawa Prefecture, Japan. The shell length at release was estimated after specifying the shell area at release by counting 372 growth increments from the edge toward the apex of the shell, which were identical with the number of days elapsed in the sea. Estimation was repeated 3 times for each individual

Individual	Actual shell length at		Estimated shell length at release	
	Release (mm)	Recapture (mm)	Average (mm)	S.E.
1	43	82	41.9	0.22
2	43	79	40.1	0.32
3	42	93	43.2	0.17

識の適用時および以後の飼育過程において死亡した個体は、いずれの実験群でも見られなかった。飼育実験の開始から終了までの殻長の平均成長は実験群で 1.7 mm ($N=21$, $S.D.=0.5$ mm), 対照群で 1.9 mm ($N=7$, $S.D.=0.7$ mm) であり, t 検定の結果, 実験群と対照群の成長には有意な差は見られなかった ($p>0.05$)。河原, 大森³⁴⁾ は *Haliotis discus hannai* の殻体伸長過程を

Fig. 3 Method of estimating the shell length at release (dotted arrow) of the recaptured juvenile giant abalone, *Haliotis madaka*, by the release-and-recapture experiment. The shell area at release was estimated by counting 372 growth increments from the edge toward the apex of the shell (black arrow), which were identical with the number of days elapsed in the natural sea.

模式図で示し、殻端で外套膜からの分泌物で殻が形成されるのと同時に、殻が既に形成されている部分でも外套膜から溶存イオンが分泌されて殻の厚さが増すので、殻を断面から見た場合に新しく形成された殻体が殻の表面に対して斜めの線の形状を示すことを報告している。本研究においても、実験群の全個体の真珠層に明瞭な赤色の ALC 標識が 2 本の斜めの線として確認され、ALC が新しく形成された殻体に取り込まれ、殻に沈着したことが示唆された (Fig. 4a, b)。対照群の個体の殻では、実験群で見られたような赤色の蛍光線は観察されなかった。実験群のアワビにおいて計測された 2 重標識区間の平均成長線数は 13.7 本 (標準偏差 1.7 本, 観察個体数 21) で、飼育日数と一致していた (Fig. 4c)。

標識放流再捕個体による成長線の日周期的形成の検証
天然海域へ放流し再捕された個体において殻表の成長線の計数から逆算推定された放流時点の殻長と、実際の放流時点での殻長を Table 1 に示す。成長線の計測から逆算推定された放流時の殻長は放流時の実測値とほぼ一致していた。成長線の計数から逆算推定された再捕個体の成長の推移を Fig. 5 に示す。今回の研究に用いたサンプルからは明瞭な成長の季節変化を判断できず、年輪形成時期を検討することは出来なかった。

Fig. 4 Oblique view on the surface and the cross section of the shell of the juvenile giant abalone, *Haliotis madaka*, under fluorescent microscopy with B filter (a), and with G filter (b and c). Double ALC are observed as the two red slant lines on the cross section of the shell (arrows in a and b). Fourteen daily growth increments can be detected on the shell surface between the two crosslines of the inner ALC lines and the shell surface (c).

考 察

蛍光色素 ALC による 2 重標識を用いた飼育実験および天然海域への標識放流再捕個体の観察結果から、マダカアワビ殻表に形成される成長線は日周期的に形成されることが判断された。また、成長線を用いた日齢および成長の推定が可能であることも示された。

貝類における成長線の形成についてはこれまでに幾つかの報告がある。^{20-26,35-37} 潮間帯に生息する二枚貝では潮汐周期に伴う水面上への乾出を反映して 1 日 2 本の成長線が形成されることが報告されている。^{24,35-37} 一方、同じ 2 枚貝であっても、水深 10 m から 30 m に生息し、水面上への乾出がないトリガイ *Fulvia mutica* では成長線が日周期的に形成されることが報告されてい

Fig. 5 Monthly growth of recaptured giant abalone, *Haliotis madaka*. The mean and the standard error of shell length (mm) of every first day of the month from July 1999 to June 2000 were back-calculated by reading daily growth increments three times.

る。^{24,25} 巻貝では、生息場所や生活周期がマダカアワビと類似し、同じ腹足綱に属するサザエ *Turbo* (*Batillus*) *cornutus* の殻表^{20,23} およびマルサザエ *T. setosus* の殻蓋²⁶ においても成長線の日周期的形成が報告されている。本実験に用いたマダカアワビの主な生息水深はアワビ類の中でも深く、10 m から 30 m と考えられるので、¹ 水面上への乾出は考えられない。仮に潮汐の影響で成長線が 1 日 2 本形成されると考えた場合、1 日 1 本の成長線形成を前提にして逆算推定された標識放流個体の放流時点の殻長は実際の放流時点の殻長より大きな値になるはずである。しかし、実際には逆算推定された殻長と放流時に測定された殻長はほぼ同じ数値を示していた。以上のことからマダカアワビの成長線の形成周期は日周期であると判断される。

アワビ類の成長は漁場に分布する餌の質と量、生息密度および環境要因が原因で変化すると考えられる。このため、漁場や環境ごとの成長を詳細に評価する必要性が指摘されている。^{1,5} 井上、大場⁵ が指摘したように、アワビの成長を推定する方法としては、漁獲選択性の影響を受けず、漁場毎の成長の追跡が可能である年輪を用いた方法が有効と考えられるが、年輪を用いる方法では 1 年未満のタイムスケールで生じる成長変動を評価することは困難である。本研究においてマダカアワビの成長線の日周期的形成が実証されたことにより、漁場別、季節別或いは環境条件別の成長の追跡、或いは本研究では行えなかった高齢個体のサンプルを用いた年輪形成時期の検証をより詳細に行うことが可能になると考えられる。

今後の課題としては、本種の発育初期における成長線の形成開始時期や、マダカアワビ以外のアワビ類における成長線の日周期的形成、季節的な成長および年輪形成時期の検証等を行うことが考えられる。

謝 辞

本研究の実施に当たり、有益なご助言、ご協力をいただいた東京大学海洋研究所の塚本勝巳教授、河村知彦助教授、大矢眞知子技術専門員および岩手県水産試験場の西洞孝広主任専門研究員に厚く御礼申し上げます。また、実験にあたり多大なご協力をいただいた神奈川県水産総合研究所および東京大学海洋研究所行動生態研究室の皆様深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 猪野 峻. アワビとその増養殖. 日本水産資源保護協会. 東京. 1-107.
- 2) 高山活夫. 三重県産鮑の成長度について(1). 水研誌 1940; **35**: 99-100.
- 3) Sakai S. On the formation of annual ring on the shell of abalone, *Haliotis discus* var. *hannai* Ino. *Tohoku J. Agr. Res.* 1960; **11**: 239-244.
- 4) Poore GCB. Ecology of New Zealand abalones, *Haliotis* species (Mollusca: Gastropoda) 3. Growth. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 1972; **6**: 534-559.
- 5) 井上正昭, 大場忠道. アワビの年齢形質としての輪紋について. 神奈川水研報 1980; **1**: 107-113.
- 6) 米山純夫. 伊豆大島におけるメガイアワビの輪紋形成. 水産増殖 1991; **39**: 181-188.
- 7) Shepherd SA, Woodby D, Rumble JM, Avalos-Borja M: Microstructure, chlonology and growth of the pinto abalone, *Haliotis kamtschatkana*, in Alaska. *J. Shellfish Res.* 2000; **19**: 219-228.
- 8) Cox KW. California abalones, Family Haliotidae. *Fish Bull.* 1962; **118**: 1-113.
- 9) Leighton D, Boolootian RA. Diet and growth in the black abalone, *Haliotis cracherodii*. *Ecology* 1963; **44**: 227-238.
- 10) 藤井泰司, 中原民男, 小川嘉彦, 角田信孝. 沖合礁—山口県見島沖八里ヶ瀬—に生息するマダカの漁業生物学的特性. 水産増殖 1970; **18**: 69-80.
- 11) Wells JW. Coral growth and geochronometry. *Nature* 1963; **197**: 948-950.
- 12) Pannella G. Fish otoliths: daily growth layers and periodic patterns. *Science* 1971; **173**: 1124-1127.
- 13) Tsukamoto K. and T. Kajihara. Age determination of Ayu with otolith. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; **53**: 1985-1997.
- 14) Tsukamoto K. Otolith daily increments in the Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 1017-1021.
- 15) Tsukamoto K. and Y. Shima. Otolith daily increments in sandfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 1083-1087.
- 16) Hurley GV, Odense PH, O'Dor RK, Dawe EG. Strontium labelling for verifying daily growth increments in the statolith of the short-finned squid (*Illex illecebrosus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1985; **42**: 380-383.
- 17) Lipinski M. Methods for the validation of squid age from statoliths. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 1986; **66**: 505-526.
- 18) Nakamura Y, Sakurai Y. Validation of Daily Growth Increments in Statoliths of Japanese Common Squid *Todarodes pacificus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 2007-2011.
- 19) Uozumi Y, Ohara H. Age and growth of *Nototodarus sloanii* (Cephalopoda: Oegopsida) based on daily increment counts in statoliths. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 1469-1477.
- 20) 宇野 寛. サザエの増殖に関する基礎研究—特に生態と成長の周期性に関して—. 東水大特研 1962; **6**: 1-76.
- 21) 高橋克成. ホタテガイ貝殻の表面彫刻とその諸変化について. 青水増事業概要 1980; **9**: 11-18.
- 22) 和田浩爾. 「真珠：そのできる仕組みと見分け方」全国宝石学協会. 東京. 1982; 1-314.
- 23) 林 育夫. サザエ *Turbo* (*Batillus*) *cornutus* の被面子幼生と稚貝の貝殻形態. 貝類学雑誌 1983; **42**: 212-216.
- 24) Ohno T. Experimentelle Analysen zur Rhythmik des Schalenwachstums einiger Bivalven und ihre paläobiologische Bedeutung. *Paleontographica*. Abt. A 1985; **189**: 63-123.
- 25) 田 英軍, 清水 誠. トリガイの貝殻における成長線パターンと年齢査定. 日水誌 1997; **63**: 585-593.
- 26) Villiers L. Sire J-Y. Growth and determination of individual age of *Turbo setosus* (Prosobranchia Turbinidae), Hao atoll (Tuamotu, French Polynesia). Proceedings of the fifth international coral reef congress, Tahiti 1985; **5**: 165-170.
- 27) Tsukamoto K. Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1985; **51**: 903-911.
- 28) Tsukamoto K. Otolith tagging of Ayu embryo with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 1289-1295.
- 29) Gage JD. Skeletal growth zones as age-markers in the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Mar. Biol.* 1991; **110**: 217-218.
- 30) Pirker, JG, Schiel DR. Tetracycline as a fluorescent shellmarker in the abalone *Haliotis iris*. *Mar. Biol.* 1993; **116**: 81-86.
- 31) 土地敬洋, 今井利為. マダイ稚魚の組織と鱗へのアリザリン・コンプレクソンによる染色. 水産増殖 1993; **41**: 379-385.
- 32) 中村良成, 栗田 博. アリザリン・コンプレク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 1994; **23**: 53-60.
- 33) Day RW, Williams MC, Hawkes GP. A comparison of fluorochromes for marking abalone shells. *Mar. Freshwater Res.* 1995; **46**: 599-605.
- 34) 河原郁恵, 大森正昭. アワビの殻体形成過程と外套膜の微細構造について. 平成7年度東北ブロック増養殖研究連絡会議報告書, 水産庁東北水産研究所, 宮城. 1997; 58-63.
- 35) Evans JW. Tidal growth increments in the cockle *Clinocardium nuttalli*. *Science* 1972; **176**: 416-417.
- 36) Richardson CA, Crisp DJ, Runham NW, Gruffydd LD. The use of tidal growth band in the shell of *Cerastoderma edule* to measure seasonal growth rates under cool temperate and sub-arctic conditions. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 1980; **60**: 977-989.
- 37) Richardson CA, Crisp DJ, Runham NW. Factors influencing shell deposition during a tidal cycle in the intertidal bivalve *Cerastoderma edule*. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 1981; **61**: 465-476.