作成:2018年3月

## スルメイカ平衡石輪紋による日齢査定マニュアル

#### はじめに

スルメイカは TAC 対象種であり、我が国における重要水産資源である. 近年、スルメイカの資源量は減少傾向にあり(加賀ら 2017、久保田ら 2017)、この減少要因を解明することは資源評価精度向上および効果的な管理方策の策定に重要な課題である. スルメイカの寿命はおよそ 1 年と推定されており、主な産卵海域や産卵時期は広域で長期にわたる(加賀ら 2017、久保田ら 2017). このような資源状況・生物特性のもと、平衡石輪紋による日齢査定結果からふ化時期や成長を推定し、スルメイカ資源の動態解析に知見を提供することは、資源変動要因の解明に貢献するだけでなく、漁場形成・漁況予測技術の高度化にもつながると考えられる.

スルメイカ平衡石に観察される輪紋は、日周期的に形成されると実証されている(Nakamura and Sakurai 1991). このことに基づき、平衡石輪紋計数によるスルメイカの日齢査定が行われるようになり、輪紋計数による日齢査定マニュアル(邦文)は、これまでに 2 編刊行されている. それらは、『いか類、小型浮魚類日齢査定マニュアル』内の「平衡石によるいか類の日齢査定方法」(中村 2000)と『スルメイカの平衡石の採取および輪紋計数マニュアル』(坂口 2005)である.

それから 10 数年が経過し、その間にイカ類の日齢査定に関する多くの論文・報告が発表されているが、日齢査定の技術面での進展にとって重要と考えられる最近の報告を二つここに上げたい。一つは Arkhipkin and Shcherbich (2012) によるイカ類平衡石日齢査定に関する総説である。この総説では、平衡石によるイカ類の日齢査定に関する研究の 30 年間の進歩を振り返り、日齢査定で直面する様々な課題について解説がなされている。もう一つは、菅原ら(2013)によるスルメイカ幼体から成体までの日齢査定結果により、成長式の推定などを行った論文である。これはスルメイカの生活史の全体にわたる成長を示した成果であり、日齢査定の結果を取り扱う際の一つの判断基準として利用しうると考えられる。

以上の報告などを参考にしながら、上記 2 編のマニュアルとは異なる手法あるいは改良された手法をここに紹介することで、日齢査定技術の習得・改善の一助とすることを本書の目的とした。そして、そのことを通じて、日齢査定技術での統一的な手法に向けた情報共有、効果的なモニタリング体制の確立へと進み、イカ類の資源評価技術の進展につながることを目指している。

ここで紹介するこれまでのマニュアルとは異なる手法の主なものとして、①熱可塑性接着剤の使用による両面研磨法、②輪紋観察の障害となる要因(平衡石表面に付着した膜状物質、Occulting Crystals と呼ばれる結晶構造、平衡石に入るヒビ・割れ目)とその除去・軽減法、があげられる。これらの方法を含め、研磨標本の作製技法や輪紋計数法を以下に詳述することによって、本書の目的を達成したい。

また、稚仔や若齢個体からの平衡石の摘出・包埋ついて記述するとともに、稚仔については、プランクトンネット標本での外套背長推定の方法についても紹介した.

なお、本書で参照することが多い、坂口(2005)による上記マニュアルを「2005 年マニュアル」と、Arkhipkin and Shcherbich (2012)による総説を「2012 年総説」と、それぞれ便宜的に称してこれ以降、引用する.

蛇足ながら、日齢査定の実施環境(使用する接着剤、道具、機器等)は、それぞれの作業現場で異なると考えられるので、以下に詳述する内容は、一つの方法として捉えて頂きたい.

本マニュアルの作成は, 我が国周辺水産資源調査・評価等推進委託事業の一環として行われた.

# 目 次

1	E	計齢査別	定個体の入手・測定・保存 ············4		
	1-1	L 入手			
	1-2	2 測定	Ē		
	1-8	3 保存	<b>₹</b>		
2	<u> 기</u>	平衡石の形態と各部位の名称 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・			
	<u> </u>	2衡石	(外套背長およそ 13cm 以上の個体から) の摘出・包埋・固定・保管 ・・・・・・・・・・6		
	3-1 外		<b>賃背長サイズによる摘出方法の違い</b>		
	3-2	2 摘出	日のための道具・機器		
	3-3	3 平衡	<b>新石摘出の手順</b>		
	,	3-3-1	摘出での留意点		
	,	3-3-2	食道腔内の食道と軟組織の除去		
	,	3-3-3	平衡石の位置の確認と左右の確認		
	3-3-4		左右平衡石の間の切開		
	;	3-3-5	右平衡胞と平衡胞内の平衡石の確認		
	;	3-3-6	右平衡胞の切開と右平衡石の摘出		
	•	3-3-7	左平衡胞の切開と左平衡石の摘出		
	3-4	1 摘出	出後の平衡石の洗浄		
	,	3-4-1	水による洗浄		
	,	3-4-2	1%次亜塩素酸ナトリウム液による洗浄		
	,	3-4-3	水による洗浄		
	3-5	5 平衡	<b>写石のスライドグラスへの移動</b>		
	,	3-5-1	ラベル記入		
	,	3-5-2	平衡石のスライドグラスへの移動		
	3-6	3 平衡	あるの包埋・固定 の包埋・固定		
	,	3-6-1	平衡石の包埋・固定のための接着剤・道具・機器		
	,	3-6-2	平衡石の包埋・固定の手順		
	,	3-6-3	平衡石の観察		
	,	3-6-4	平衡石の保管		
4	긔	2衡石の	の固定角度調節と研磨 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16		
	4-1	L 研歴	善面および両面研磨の選択		
	4-2	2 平衡	<b>新石の固定角度調節</b>		

	4-3	平衡	ず石の研磨 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・			
	4-3	3-1	平衡石研磨のための道具			
	4-3	3-2	研磨標本の厚さと研磨前の確認			
	4-3	3-3	前部面の研磨			
	4-3	3-4	平衡石の反転			
	4-3	3-5	後部面の研磨			
5	平衡	有石矿	<b>ボ磨標本の観察・計測 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・</b>			
	5-1	観察	<ul><li>輪紋計数のための機器・ソフトウェア</li></ul>			
	5-2	平衡	ず石研磨標本観察・輪紋計数での機器・ソフトウェアの設定			
	5-3	平衡	有石最大半径の計測			
6	輪約	女の言	+数29			
	6-1	計数	<b>対画面の数と計数ピントの決め方</b>			
	6-2	核の	)決め方			
6-4 輪紋間隔 6-5 核周辺部		計数線の設定				
		輪紋	輪紋間隔の推移パターンの把握			
		核層	核周辺部の輪紋計数			
		暗音	『の輪紋計数			
	6-7	縁辺	2部の輪紋計数			
	6-8	計数	<b>対結果の取り扱い</b>			
7	所要	医時間	引について ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41			
8	スル	ンメイ	イカ若齢個体・稚仔からの平衡石摘出・包埋・輪紋計数 ・・・・・・・・・・・41			
	8-1	若歯	伶個体(外套背長 20-120mm 程度)での平衡石摘出・包埋・輪紋計数			
	8-2	稚仔	子(外套背長 2-10mm 程度)での外套背長推定・平衡石摘出・包埋・輪紋計数			
	8-2	2-1	外套背長推定			
	8-2	2-2	平衡石の摘出			
	8-2	2-3	平衡石の包埋・固定			
	8-2	2-4	検鏡・輪紋計数			
9	おれ		$\sim 42$			
10	) 文	献	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••			

執筆:国立研究開発法人 水産研究・教育機構 北海道区水産研究所資源管理部浮魚資源グループ 中村好和

#### 1 日齢査定個体の入手・測定・保存

### 1-1 入手

日齢査定の対象となるスルメイカは、漁船が漁獲し船上で氷蔵または冷凍され、水揚げされたものを入手することが多い.この場合、漁獲後速やかに氷蔵または冷凍されるので、査定個体の鮮度は良いことが多い.しかし、漁獲後常温で長時間放置されたような鮮度の悪い個体では、頭部や平衡胞が紫色を帯びることがあり、平衡胞内で膜の剥離が起き、平衡石の観察に支障をきたすことがある.このことから、できるだけ鮮度の良い個体を入手することが望ましい.

標本の入手に当たって、漁獲年月日と漁獲海域のデータは最低限必要であり、加えて漁法・漁具、漁獲位置(緯度経度)、その日の総漁獲量(尾数)、CPUE(釣機1台1時間当たり漁獲尾数)、表面水温などのデータを得ることに努める.

#### 1-2 測定

入手した個体は、なるべく早く形態的測定に掛ける.測定項目は、外套背長、体重、性別、成熟度を主な項目とし、さらに生殖巣重量、生殖関係の付属腺の長さ・重量、交接の有無、胃内容物などについても必要に応じて測定項目とする.

### 1-3 保存

測定終了後,外套背長およそ 13cm 以上の個体は,漏斗を持ち上げその基部に鋏を当て頸部を切断し,次に腕部を基部付近から切り離し,頭部のみとする(図 1-1, 1-2, 1-3). すぐに平衡石を摘出しない場合は,個体番号が判るようにして頭部を小型のポリエチレン袋に入れ凍結保存する.外套背長が小さい個体については,全身のまま凍結してもスペースをそれほど取らないので,全身凍結でも構わない.



図 1-1 頸部切断



図 1-2 腕部切断



図1-3 切り出した頭部

### 2 平衡石の形態と各部位の名称

平衡石の全体的な形態を、図 2 に示した。図 2-1 は左平衡石の前部面(凹面)が上向きになるように置いた状態、図 2-2 は同じ平衡石をひっくり返し後部面(凸面)が上向きになった状態、図 2-3 は同じ平衡石の側丘部を上向きにした状態である(何れも実体顕微鏡下)。前部面は中央付近がへこんだ形状であり、一方、後部面は出っ張った形状である。図 2-1 に、平衡石各部位の名称(核、背丘部、側丘部、翼、吻)を入れた。図 2-4 は、同じ平衡石の生物顕微鏡下の画像で、輪紋計数時の各部分の名称(核周辺部、暗部、縁辺部)を入れた。これら名称は、「2005 年マニュアル」における名称に従った。各部分の輪紋数による区分けは、項目 6-5 以降に記述した。



図 2-1 左平衡石の前部面(凹面)各部位名称 外套背長 251mm の個体からの平衡石, 平衡石長(背丘部先端-吻先端)1.1mm.



図 2-3 左平衡石の側丘部面 画像左側が前部面,右側が後部面, 上側が背丘部,下側が吻.



図 2-2 左平衡の後部面(凸面)図 2-1 と同じ平衡石を反転.

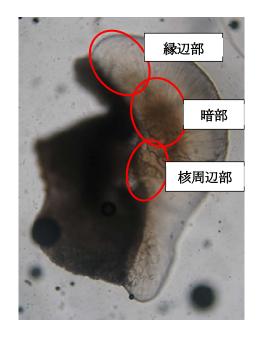


図 **2-4** 生物顕微鏡下の左平衡石 輪紋計数時の各部分の名称(核周辺部・ 暗部・縁辺部)

### 3 平衡石(外套背長およそ13cm以上の個体から)の摘出・包埋・固定・保管 3-1 外套背長サイズによる摘出方法の違い

外套背長サイズによって、平衡石の摘出方法が異なるので、この項目では、外套背長がおよそ 13 cm以上の個体についての平衡石摘出方法を示す。外套背長がそれより小さい個体からの平衡石摘出については、項目番号 8 に記述した。

### 3-2 摘出のための道具・機器

平衡石摘出のための道具・機器を図3-1,3-2に示した.

①のスライドグラスは、サイズ  $76 \times 26$ mm、厚さ 1.2-1.5mm、水縁磨である。マッペは持ち運び易いように、ほぼ半分に切断してある。

②のラベルのサイズは、 $12 \times 25 \text{mm}$  で、スライドグラスの幅に収まるもの選んでいる。スライドグラスとラベルの数は、左右の平衡石を分けてプレパラートを作るので、摘出個体数の 2 倍は必要である。

③のボールペンは、摩擦熱で筆跡を消すことができるタイプのものは不適である。包埋や研磨時にホットプレートに載せた時に記入したものが熱で消えてしまうためである。

④の水は、純水製造装置を経て、紫外線・活性炭・イオン交換・メンブレンフィルターによる不純物除去後の超純水を使用している。超純水の代わりに蒸留水・脱イオン水を使用することは可能と思われるが、水道水は不適である。水道水では、平衡石表面に析出物を生じる場合があるからである。洗浄瓶は、シャーレに水を入れるために使用する。

⑤のシャーレは、1番目と3番目のシャーレ(直径9cm 前後)に水を、2番目のシャーレ(直径約6cm)に 1%次亜塩素酸ナトリウム液を入れるために使う. 鮮度が悪い標本などから摘出した平衡石の表面に、膜状物質(図 4)が見られることがある. この膜状物質を除去するために、次亜塩素酸ナトリウム液に平衡石を浸ける方法があり (Morris, 1983)、本書ではそれを応用している. 次亜塩素酸ナトリウム液の作製に、それを含む市販の台所用漂白剤を希釈して利用することも可能と考えている.

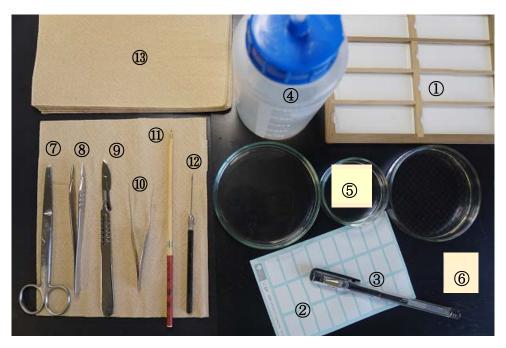


図 3-1 平衡石摘出のための道具

①スライドグラス・マッペ,②ラベル,③ボールペン,④水・洗浄瓶,⑤シャーレ3個:左から水,1%次亜塩素酸ナトリウム液,水,⑥黒ゴムマット,⑦鋏,⑧ピンセット,⑨メス,⑩プランクトン用ピンセット,⑪筆(面相筆・小),⑫有柄針,⑬紙タオル

- ⑥の黒ゴムマットは、シャーレ内の平衡石の見えやすさとシャーレの安定性を保つのに適している.
- ⑦の鋏は、漏斗など余分な組織が残っていた場合に使用する.
- ⑧のピンセットは、頭部に残った余分な組織を引きはがす時に使うためであり、腰のあるものの方が良い.
- ⑨のメスは、替え刃式で、頭部および平衡胞切開用に使う。 替刃番号は No.23 である.
- ⑩のプランクトン用ピンセットは、平衡石を掬い取るために主に使うが、平衡石をつまむ場合に圧力がなるべく掛からないことを期待して使用している.
- ⑪の筆(面相筆・小)は、平衡石の移動用として使用する.
- ②の有柄針は、筆先の平衡石を落とすために使用する.
- ⑬の紙タオルは、平衡石摘出時に頭部を包むために使用する。メスで平衡胞を切開する場合、深く切りすぎると眼胞を切ってしまい、その中の液体があふれ出すことがある。その場合の対処にも便利である。
- ⑭の照明拡大鏡(倍率2倍)は、必須ではないが、老眼の人などには助けになる.

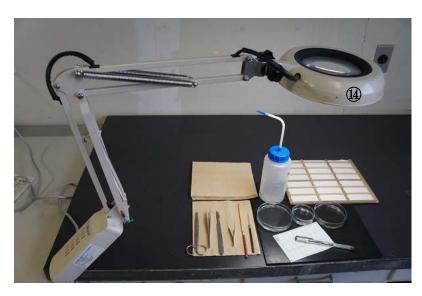


図 **3-2** 平衡石摘出のため の機器 (続き) ④照明拡大鏡

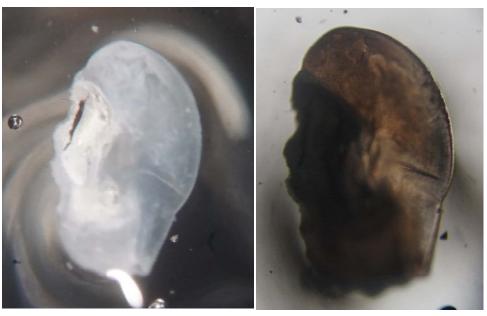


図 4 平衡石表面の膜状物質: 実体顕微鏡下(左)で白く, 生物顕微鏡下(右)で茶色く見える. (巻網漁獲物, 外套背長 224mm)

### 3-3 平衡石摘出の手順

### 3-3-1 摘出での留意点

平衡石摘出でのポイントは、①平衡石の存在を常に確認して摘出すること、②平衡石の核へのヒビ入りをできるだけ避けること、にある。①については、存在を確認せずに闇雲にやっても時間が掛かるし、平衡石に損傷を与えることになりかねない。平衡石の翼の部分は白色で、肉眼で平衡石の存在を知る手掛かりになる。しかし、翼の白色が見えにくい時もあるので、その時は慎重に摘出を進めなければならない。②については、核に大きなヒビ(図 5)が入ると、核の判別・長径の測定が困難になるので、平衡石に強い力を掛けないように心掛ける。

なお冷凍保存していた頭部から平衡石を摘出する場合は、平衡胞内の液が融けた状態にしてから摘出した方が良い. それは、平衡胞内の液が凍っている状態で、凍った液内の平衡石を液ごとピンセットで取り出すことはできるが、取り出す時にピンセットに弾かれ凍った液の塊りがどこかに飛んでいって紛失する恐れがあるからである.

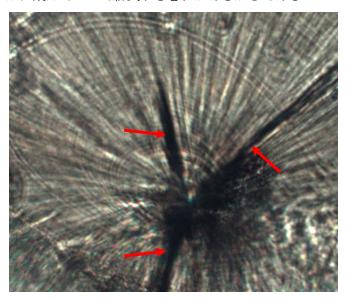


図 5 核へのヒビ入りが大きい状態 (赤矢印が入ったヒビを示す)

### 3-3-2 食道腔内の食道と軟組織の除去

頭部の腹側が上,胴体側が手前を向くように持ち,食道腔にある食道と軟組織をピンセットで取り除く(図 6).



図6 食道腔にある食道と軟組織の除去

### 3-3-3 平衡石の位置の確認と左右の確認

軟組織除去後,食道腔内を紙タオルで拭き,その奥に白く見える一対の平衡石を確認する(図 7). 食道腔の奥に,平衡石が一つしか見えないこと,一つも見えないことも時にはある. この状態での身体の左右を確認する. 身体の左右は,頭を上にして背側から見た時の左右に一致するので,図 7(写真の奥が頭側,下が背側)では左側が右平衡石,右側が左平衡石である.

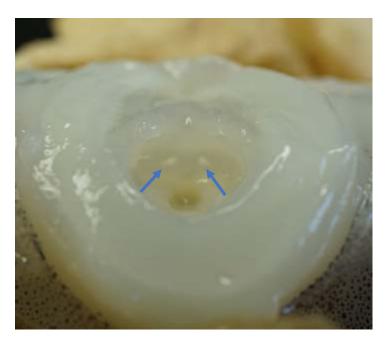


図7 食道腔の奥に見える一対の 平衡石

青矢印の先に左右の平衡石が白く見える.

#### 3-3-4 左右平衡石の間の切開

食道腔を覗きながら左右平衡石の間にメスを入れるように、頭部軟骨を切開する.平衡石が見えないときは、左右平衡胞を包む軟骨の膨らみの間に正中線を推定し、それに沿って切開する.深く切開した方が、左右の開きが大きくなり、その後の作業がし易い(図8).

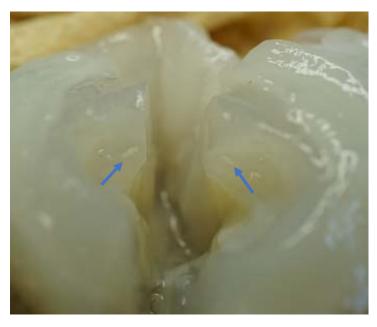


図 8 左右の平衡石の間を切開し た後の状態 (青矢印の先に左右の平衡石)

### 3-3-5 右平衡胞と平衡胞内の平衡石の確認

ここでは先に右平衡石を摘出する手順を示す。右平衡胞の位置とその中にある平衡石を確認する。平衡胞を囲む軟骨は、変形した扇のような形をしており、その位置は図9に示した。平衡石は、平衡胞の下側(背側)に白く見えることが多いが、見えない時もある。

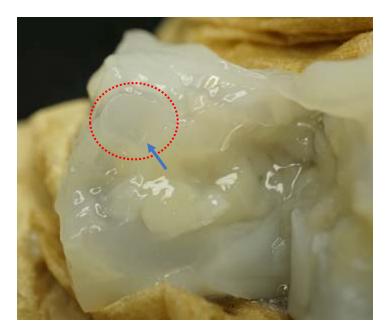


図9 右平衡胞(赤い円内)の位置

平衡胞は軟骨に囲まれている. 青矢印の先に薄っすらと平衡石 が見える.

#### 3-3-6 右平衡胞の切開と右平衡石の摘出

平衡胞の真ん中あたり(図 10)を水平的にメスで切開する(図 11). 深すぎると眼胞まで切り、中の液が溢れ出てしまうので注意する. 平衡石が見えている場合は、プランクトン用ピンセットの先で、平衡胞の下側にあることが多い平衡石を掬い上げ、平衡胞腕部側の切り口の上に置く(図 12). 次に、ピンセットの一方の先端を切り口外側に添え、もう一方の先端で平衡石を動かし外側の先端上に載せ、1番目のシャーレ内の水に入れる. この操作は、できるだけ平衡石をつかまず、力を掛けないことを意識した方法である. 摘出したものが平衡石ならば、シャーレの底に沈む.

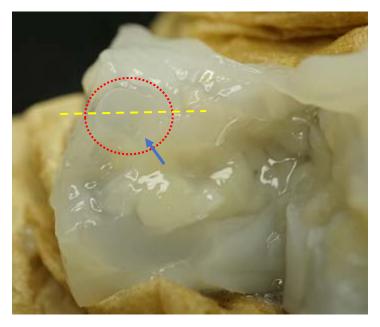


図10 右平衡胞の真ん中あたり

黄色点線あたりを切開する. (青矢印の先に平衡石)

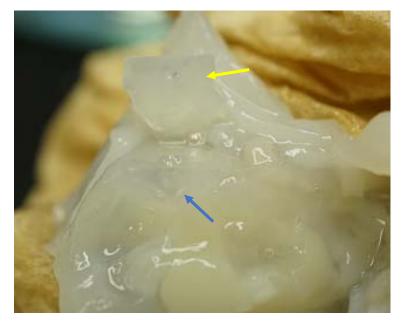


図 11 切開した右平衡胞 (青矢印の先に平衡石; 黄矢 印は切開した平衡胞軟骨の 上半分)

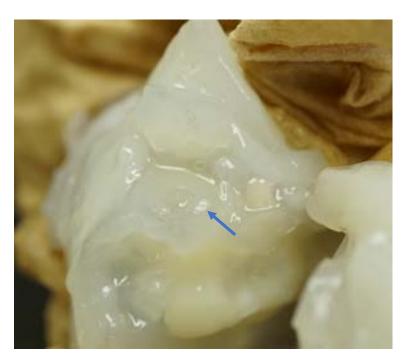


図 12 右平衡胞の腕部側切り口の上の平衡石(青矢印)

平衡胞の中には、突起などがあり (Dilly 1976)、平衡石を掬い上げようとしても突起等に引っ掛かりうまくいかないことがある。平衡胞の切り口の腕部側(右平衡胞では向かって右側、左平衡胞では左側)へ掬い上げるのが比較的引っかからずにいく。

平衡石が見えていない場合は、平衡胞内を探すことになる. 翼が見えづらい角度にあること、切開した平衡胞の上半分側にあること、時には切ったメスの上にあることもあるので、その辺りを探してみる. どうしても見つからない時は、「2005年マニュアル」にあるように、平衡胞を含む軟骨を切り出し、シャーレ内で振って平衡石を洗い落とす. 水に浸した軟骨を通して、平衡石を見つけやすくなることもある.

#### 3-3-7 左平衡胞の切開と左平衡石の摘出

右側の時と同様に、左平衡石を摘出したら、シャーレ内の右平衡石の位置を確認しながら、左平衡石の置く位置関係を定め、シャーレ内の水に入れる(図 13).



図13 シャーレ内の左右平衡石ここでは、左側が右平衡石.

### 3-4 摘出後の平衡石の洗浄

#### 3-4-1 水による洗浄

シャーレ内で、左右平衡石を筆先で軽く払い、水で洗う (数秒~10 秒前後). 右平衡石を筆先で軽く押さえ、毛に挟まったら、次のシャーレの 1%次亜塩素酸ナトリウム液に筆先を浸け、有柄針の針先で平衡石を落とす (図 14). 同様に、左平衡石も移す. この時も、左右の平衡石の位置関係に留意する.

この移動方法も、平衡石に力を掛けず核へのヒビ入り等をできるだけ防ぐあるいは小さく抑えるためである。プラクトン用ピンセット等でつまんで移動しても、核へのヒビ入り等が起きないあるいは小さいならば、この移動方法は不要である。

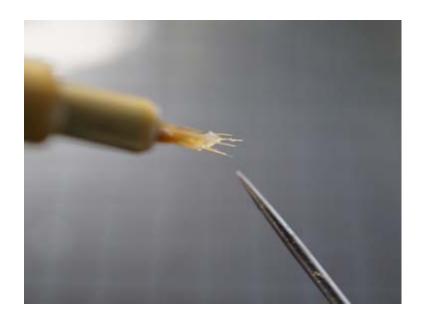


図 14 筆と有柄針による 平衡石の移動

#### 3-4-2 1%次亜塩素酸ナトリウム液による洗浄

左右平衡石は、1%次亜塩素酸ナトリウム液に、30 秒程度浸ける。その間、時々平衡石の周りの液を筆で軽くかき混ぜたり、シャーレを軽く揺すったりして、洗浄する。前と同様に、右・左の順で、平衡石を3番目のシャーレに移す。

#### 3-4-3 水による洗浄

シャーレを軽く揺することにより、平衡石を水で洗う(数秒~10秒前後).

#### 3-5 平衡石のスライドグラスへの移動

#### 3-5-1 ラベル記入

スライドグラスを 2 枚用意し、その端に個体番号等と平衡石の左右を記入したラベルをそれぞれ貼る.

#### 3-5-2 平衡石のスライドグラスへの移動

右平衡石を,筆先に取り,右平衡石ラベルを貼ったスライドグラスの中央部以外の場所に,有 柄針を使い置く.その後,平衡石が飛ばないように,筆先で少量の水をたらし,水滴内に平衡石 を収め(図 **15**),マッペに置く.同様に,左平衡石についてもスライドグラス内の水滴に入れる.

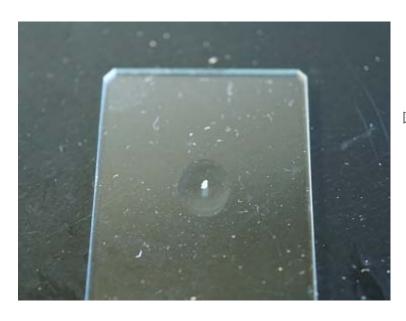


図 **15** スライドグラス上の 水滴内の平衡石

### 3-6 平衡石の包埋・固定

### 3-6-1 平衡石の包埋・固定のための接着剤・道具・機器

平衡石の包埋・固定のための接着剤・道具・機器を図 16-1, 16-2 に示した.

①の接着剤として、熱可塑性の接着ワックスを使用している。その融解点は 68℃、接着力は 25℃ で 32kg/cm である。安全性が高いことから、この接着剤を選定している。平衡石の包埋・固定の場合、接着剤は少量で十分なので、量の調節が容易な小片状にしてある。

以前は、透明性が高いエチレン酢酸ビニル樹脂系接着剤を使用していた。

- ②のミクロスパーテルは、接着剤小片を掬うために使用する.
- ③の微針・ピンバイスは、平衡石の移動・向きの調節のために使用する. 微針は、ステンレス製、無頭、太さ 0.18mm、長さ 17.5mm である.
- ④のホットプレートは、接着剤を加熱・融解させるために使用する. 融解後、平衡石の向きの調節・反転等を行う. プレート上に、スライドグラスの端とある一点(例えば、中央点)の位置を

決められるような目印を付けておく. この目印は、どの平衡石についてもスライドグラス上の最 終的な位置をほぼ一定にするためのものである.これによって、複数のプレパラートを検鏡する 際に、平衡石を視野に収める時間を短縮できる.

- ⑤の温度計は、ホットプレート上のスライドグラス表面の温度確認のために使用している.
- ⑥の実体顕微鏡は、接着剤中の平衡石の向き・位置の確認のために使用する.
- ⑦の生物顕微鏡は、接着剤中の平衡石のヒビ・割れ目・膜状物質・その他夾雑物の有無の確認、 並びに平衡石の向きの微調節のために使用する.

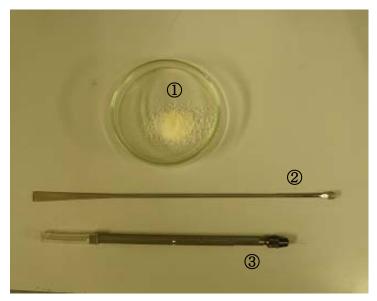


図 16-1 平衡石の包埋・固定のた めの接着剤・道具

- ①接着剤小片,
- ②ミクロスパーテル,
- ③微針・ピンバイス



図 16-2 平衡石の包埋・固定のための機器 ④ホットプレート, ⑤温度計, ⑥実体顕微鏡, ⑦生物顕微鏡

#### 3-6-2 平衡石の包埋・固定の手順

- (1) ホットプレートの電源を入れ、温度を85℃前後(接着剤による)にする.
- (2) マッペからスライドグラスを水平に保ちながら取り出す. 平衡石を入れた水滴が乾いていると平衡石が動きやすく, スライドグラスを傾けると滑り落ち平衡石を見失うことがあるので注意する. ミクロスパーテルで接着剤の小片を, 軽く1匙(量は平衡石の大きさにより調節) 掬い取り, 平衡石を載せてあるスライドグラスの中央付近に盛る.
- (3) スライドグラスをホットプレートのプレートに載せる.この時,スライドグラスの端がプレートから少し外に出るように置く(スライドグラスを再び持つ時に熱くないように).しばらくすると,接着剤が融けてくるので,ピンバイスの微針先端に融けた接着剤をごく少量付けた後,平衡石を微針先端にくっつけて,接着剤の融けた塊りの中に入れる.
- (4) そのスライドグラスを、実体顕微鏡下で観て、接着剤中の平衡石を確認後、前部面(凹面)が上を向くように、翼が顕微鏡視野の上側になるように微針で調節する(接着剤が硬化してきたら、適宜加熱する)。向きの調節が終わったスライドグラスをマッペに戻す。
- (5) 同様に、すべての摘出平衡石を接着剤に包埋・固定し、マッペに収める.

#### 3-6-3 平衡石の観察

- (1) 包埋・固定した平衡石のスライドグラスを生物顕微鏡で観察し、平衡石表面の膜状物質・核へのヒビ入り・その他夾雑物の有無、平衡石の形(寸詰まりの形など個体差あり)・欠落部分の有無を確認し、適宜メモに取る.
- (2) この時点で膜状物質が観察されても、研磨過程での加熱で、膜状物質が消失することが多い. これは、次亜塩素酸ナトリウム処理により膜状物質が完全に除去されなくても、除去されやすくなる効果を持つためと思われる。核に入ったヒビを消すことはできない.

#### 3-6-4 平衡石の保管

ここでは、左右平衡石の内、右側平衡石で研磨標本を作製し、左側は予備として保管することとする.すぐに研磨をしない平衡石のスライドグラスは、プレパラートボックスに入れ保管する.研磨しない平衡石をスライドグラスの接着剤に包埋せずに、小さな容器に入れ保存する方法もあるが、取り出す時に紛失や平衡石に力が掛かる恐れがあるので、多少スペースを取るが摘出した平衡石はスライドグラス上の接着剤に包埋・固定し、保管するのが良いと考えている.

#### 4 平衡石の固定角度調節と研磨

#### 4-1 研磨面および両面研磨の選択

平衡石の研磨面については三つの面、すなわち縦断的、横断的、平面的な研磨面が考えられるが、 核から平衡石縁辺までが研磨面に含まれ、その間の距離が長い方が輪紋の間隔が広くなり、計数し やすいと考えられることから、縦断的と平面的研磨の二つが選択される。さらに、研磨面の面積が 広く、輪紋が読みづらい場合に読みやすい部分に渡って計数することができる余地が大きいとみら れる平面的研磨が良いとして、ここではそれを選択している。

しかし、平面的研磨では、平衡石の核周辺部後半を主体に存在する Occulting Crystals (Dawe et al. 1985) と呼ばれる結晶構造があり、その構造が多く残っていると、輪紋の観察・計数に障害をきたす (図 17). この結晶構造の削り残しの影響は、外套背長 15cm ぐらいから出始める.

また、図 **2-4** で示したように平衡石には暗部という部分があり、暗部の濃い茶色が輪紋の観察・計数を阻害することがある。暗部の濃さも成長とともに増すようである。

以上のことから、外套背長 15cm ぐらいよりも大きい個体からの平衡石については、両面研磨を行い Occulting Crystals をできるだけ除去するとともに、暗部の濃さを弱める必要があると考えている。両面研磨後の平衡石の厚さについては後述する。外套背長がこれよりも小さい個体からの平衡石では、片面(前部面)研磨あるいは研磨無しでも輪紋観察・計数に支障がないことが多い。

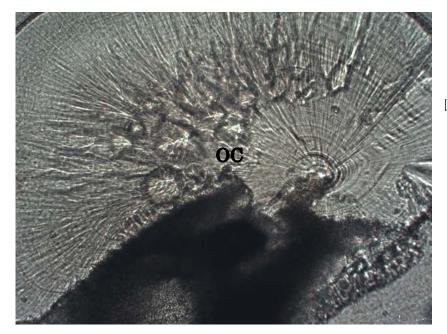


図 **17** Occulting Crystals (OC) と呼ばれる結晶構造の削り残しが多い状態

### 4-2 平衡石の固定角度調節

「2012 年総説」では、平衡石両面研磨標本の顕微鏡観察像を示し、観察時に下方からくる顕微鏡 透過光の方向と研磨標本内の輪紋の走行方向とが平行である方が、輪紋判読の点で良いとしている。 そこで、本書の平面的両面研磨では、このことを目指して平衡石の固定角度調節を行っている。

顕微鏡透過光の方向と輪紋の走行方向を判りやすくするために、縦断的研磨(側丘部と翼側からの両面研磨)後の画像を図 18 に示した. この画像で、核と背丘部先端を含む層(平面的両面研磨終了後の層)を想定し、透過光が画像下方からの垂直方向にあるとすると、層内の輪紋の走行方向は核から背丘部先端まで様々に変化し、多くの部分で透過光の方向との平行性を得られていない. そこで背丘部先端を少し下げる角度調節をすることにより、層内の輪紋の走行方向と透過光の方向との平行性をより多くの部分で確保できると考えた.

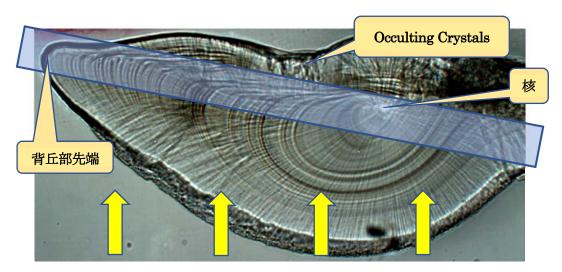


図 18 縦断的研磨画像による輪紋の走行方向(青四角は核と背丘部先端を含む想定した層、 黄矢印は透過光の方向をそれぞれ示す)

ここでは縦断的研磨画像を使い、平面的両面研磨の過程の概略を図 19 から 21 に示し、具体的な固定角度調節と両面研磨の方法は、以下の手順(1)以降に詳述する。図 19 の前部面研磨前では、背丘部先端を下げる角度調節後、Occulting Crystals をできるだけ、削り落とすことが目標になる。前部面研磨後、反転し(図 20)、後部面を研磨して両面研磨標本を得る(図 21)。

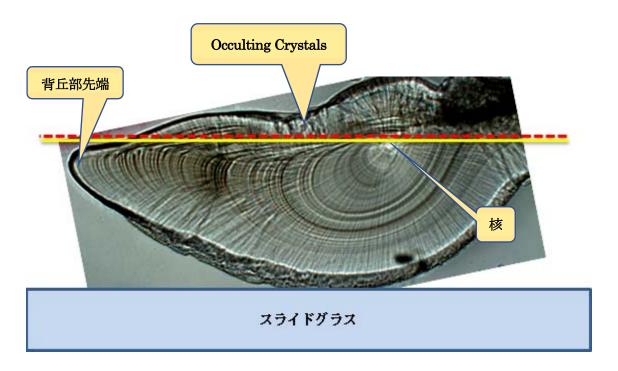


図 19 縦断的研磨画像による前部面研磨前の状態

赤線:前部面研磨終了予定位置(Occulting Crystals 除去が目標); 黄線:核近くの濃い輪紋の見え始めのピント面(背丘部では先端よりも少し内側にピントが合う)

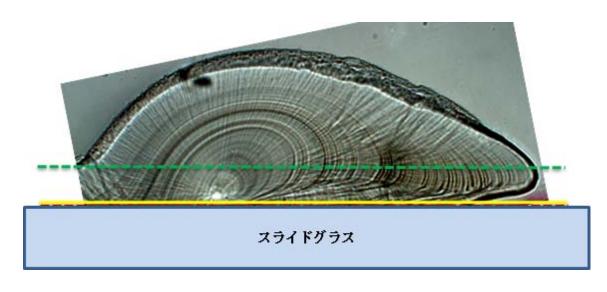


図 20 縦断的研磨画像による前部面研磨終了後に反転した状態

緑線:後部面研磨終了予定位置



### スライドグラス

図 21 縦断的研磨画像による後部面研磨終了後の状態

このように作製した両面研磨標本では、背丘部外縁付近の前部面・後部面の両方に、未研磨部分がある程度残る。これらの未研磨部分の存在が、背丘部外縁付近の輪紋の見え具合を阻害する要因となる場合もある。これら未研磨部分、特に前部面の未研磨部分を研磨するには、接着剤を加熱・軟化させ、背丘部先端を少し持ち上げ硬化後、研磨する方法が考えられるが、角度調節を再度行う手間や削ることで薄くなりコントラスト低下の懸念があり未着手である。

具体的な平衡石の固定角度調節法は、以下の手順による.

(1) ホットプレートで、平衡石を載せたスライドグラスを加熱し (85℃前後)、接着剤を軟化させる. 実体顕微鏡下で、微針・ピンバイスを使い、平衡石の側丘部と翼を通る面をできるだけ水平にする. その水平度合は、側丘部側面の見え具合で推測する. 次に、背丘部先端を下げ、吻が上がった状態にする (図 22).

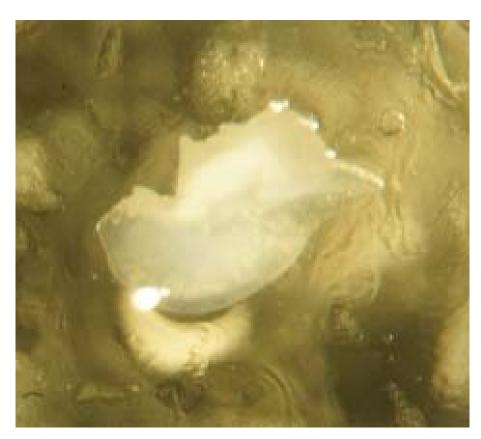


図 22 実体顕微鏡下での平衡石の角度調節

側丘部と翼とを水平 に、背丘部を下げ、 吻が上がった状態に する.

- (2) 生物顕微鏡で平衡石を観察し、その前部面表面からピント面を下げていき、核付近の濃い輪紋が見え始めることを確認する。核の輪郭は明瞭ではなく核自体の位置を特定するのは難しいので、核付近の濃い輪紋を目印として使う。この濃い輪紋が見え始めたピントの時に、背丘部外縁の少し内側にピントが合うように、背丘部先端を上げ下げして角度を調節する(図 23)。
- (3) この二つの部分(核付近の濃い輪紋と背丘部外縁少し内側部分)のピントが合っていない場合,背丘部先端が上がり過ぎなのか,下がり過ぎなのかをピントの合い具合から確認する.スライドグラスを加熱し接着剤を軟化させ,実体顕微鏡下で背丘部先端を下げたいときは先端部分を,上げたい時は吻を,それぞれ微針・ピンバイスで軽く押して角度調節する.生物顕微鏡で二つの部分のピントを確認し,それらが同時に合うまで角度調節を繰り返す.
- (4) 時々,核付近を覆うように不規則な結晶構造があり,核付近の濃い輪紋が見えない場合がある. その場合は、実体顕微鏡下で背丘部先端の下がり具合を目安として、とりあえず角度調節をしておく.その後、前部面研磨時に核付近の濃い輪紋が見えるようになったら角度を確認し、不適な角度なら調節し直す.なお後述するが、ある程度経験を積むと前部面研磨のもっと前の段階で、角度の適否を判断することができるようになる.

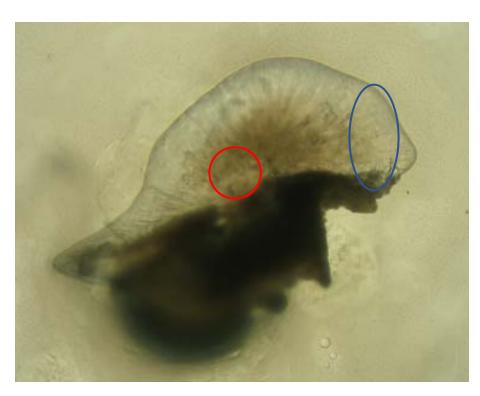


図 23 生物顕微鏡での平衡石の角度確認

核付近の濃い輪紋 (赤丸内)にピント を合わせる. その時 のピントは背丘部 外縁の少し内側 (青楕円内)に合う ように角度を調節す る.

### 4-3 平衡石の研磨

### 4-3-1 平衡石研磨のための道具

平衡石研磨のための道具を図24に示した.

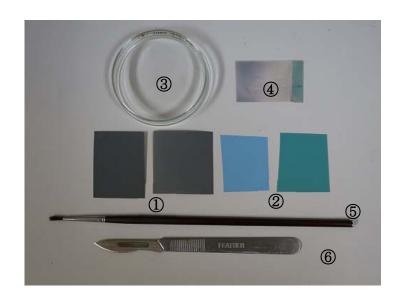


図 24 平衡石研磨のための道具

- ①耐水ペーパー (#1000, #2000), ②ラッピングフィルムシート (粒度  $9\mu$  (青),  $2\mu$  (緑)), ③シャーレ, ④シート小片, ⑤筆, ⑥メス, ⑦微針・ピンバイス, ⑧ホットプレート, ⑨温度計, ⑩実体顕微鏡, ⑪生物顕微鏡, (⑦~⑪は, 図 **16-1, 16-2** の道具・機器と同じ)
  - ①の耐水ペーパーの砥材は炭化ケイ素で、粒度は#1000と#2000である.
  - ②のラッピングフィルムシートの砥材は酸化アルミニウムで、粒度は  $9\mu$  (青)、 $2\mu$  (緑). シャーレのサイズに合わせて、数 cm 角に切ってある。粒度が  $0.3\mu$  のものなどがあるが、 $2\mu$  で研磨キズはほとんど残らない。
  - ③のシャーレは、フラットシャーレの蓋側(外径 70mm、高さ 15mm)で、平面部を上に(うつぶせに)して使う.
  - ④は、前部面研磨時に、研磨面の水平をできるだけ保つための補助として使うラッピングフィルムシート(使い終わったものを利用)の小片で、シートの厚さは75μm である.
  - ⑤の筆は、削りカスなどを払うために使う.
  - ⑥のメスは、接着剤をトリミングする時に使用する.
  - ⑦~⑪は、包埋・固定時の道具・機器(図 16-1, 16-2 を参照)と同じである.

#### 4-3-2 研磨標本の厚さと研磨前の確認

両面研磨標本の厚さについては、30-50μm が最も良いと、「2012 年総説」に示されている. 本書でも、この厚さを目標とした. 研磨標本の厚さは、生物顕微鏡の微動ハンドルの動き(ハンドルの目盛がどれくらい動いたか)から、およその厚さを以下のように推定した.

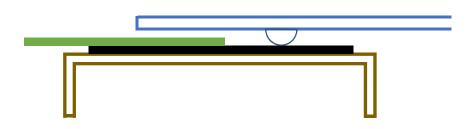
生物顕微鏡の仕様で、微動ハンドル1回転当たりの移動距離、微動目盛1目盛当たりの移動距離を知る(実例として、0.2mm/回転、2μm/目盛)。仮に実例通りとして、前部面研磨で研磨表面のピントから核までのピントの間に微動ハンドルが 10 目盛程度動いたとしたら、その間の厚さは 20μm 程度と推定できる。後部面研磨でも同様にし、両面研磨後のおよその厚さを推定できる。

研磨を始める前に、スライドグラスに固定されている平衡石の角度を改めて確認し、求めている角度にない場合は、再度調節する.

### 4-3-3 前部面の研磨

(1) 耐水ペーパー (#1000) の小片をうつぶせにしたシャーレの上に置き、その上に水平を保つためのシート小片を置く。平衡石を固定したスライドグラスを下向きに持ち、平衡石を包んだ接着剤を耐水ペーパーに当て、スライドグラスの先半分くらいは水平を保つシートに掛かるような状態を維持しながら(図 25)、軽く(スライドグラスに上からの力をほとんど掛けないで)5 秒程度、小さな円を描くように研磨する(図 26). 力を掛け過ぎると、研磨による割れ目が生じることがある(図 27)ので、注意する。この現象は、前部面研磨時に多い。入った割れ目を削り落とすことは難しい場合が多いので、それ以上拡大させないようにより軽く削る。

研磨のされ方を確認する時には、スライドグラスを縦あるいは横方向に動かし、接着材に入った研磨キズの方向で研磨のされ方を確認することができる.



#### 図 25 平衡石前部面研磨の模式図

茶がうつぶせにしたシャーレ, 黒が耐水ペーパー, 緑が水平を保つためのシート小片, 青がスライドグラスと平衡石を包埋した接着剤

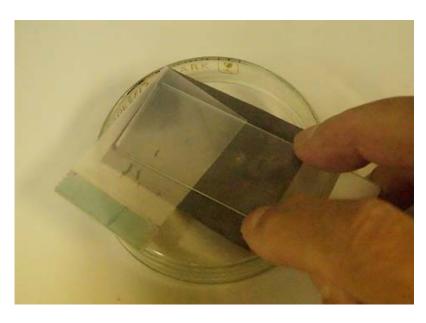


図 26 前部面の耐水ペーパー (#1000) による研磨

うつぶせにしたシャーレの上 に、耐水ペーパー、水平を保つ ためのシート小片、スライド グラスの順になる(実際は、も う一方の手で水平を保つシー トを押さえながら研磨する).



図27 前部面研磨時に見られる 研磨による割れ目(赤楕円内)

(2) 実体顕微鏡、生物顕微鏡で研磨面を観察し、平衡石まで達しているかを確認する。平衡石まで達していれば、その部分は金色掛かって見える。通常、最初に吻が削られていき、次に前部面の中央付近が削られ始める。平衡石部分の研磨面の拡がりが、前部面全体の 1/3~1/2 程度になるまで研磨する (図 28).

ある程度経験を積むと、この時点での研磨面の拡がり具合から、調節角度の適否が判断できる. 角度が不適の場合 (例えば、背丘部先端の下げが足りない場合) は、耐水ペーパー#2000 とラッピングフィルムシート (青) で研磨キズを減らした後、加熱し接着剤が流動化したら、実体顕微鏡下で背丘部先端を微針で軽く下げ、生物顕微鏡で角度を確認する.

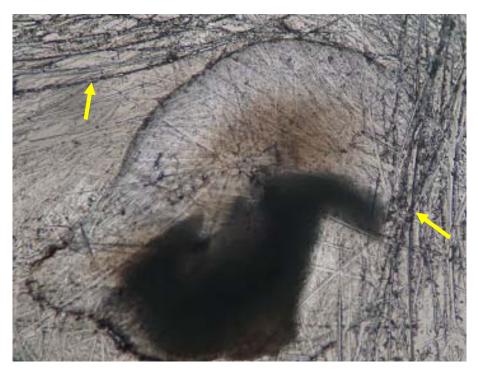


図 28 前部面の耐水 ペーパー (#1000) による研磨終了時 の画像

画像でははっきりしないが、平衡石部分の研磨面の拡がりは、前部面全体の1/3~1/2程度. 研磨表面に深い研磨キズ(黄矢印)がみられる. (3) 耐水ペーパー (#2000) による研磨と生物顕微鏡での検鏡を繰り返し、Occulting Crystals をできるだけ削り落とす。その際、研磨表面と核との距離を微動ハンドルの動きで確認しながら研磨する (図 29). 核を削り落とさずに、Occulting Crystals をすべて削ることは通常できないので、残っている Occulting Crystals の間から輪紋が見える範囲をできるだけ拡げることを目標とする。核付近の濃い輪紋が薄っすら透けて見えるくらいまで研磨する。



図 29 前部面の耐水 ペーパー (#2000) に よる研磨終了時の画 像

Occulting Crystals (赤楕円内) をでき るだけ削り落とす (研磨表面と核との 距離を確認しなが ら).

(4) ラッピングフィルムシート (青) で研磨し、研磨表面の研磨キズを浅くする (図 30).

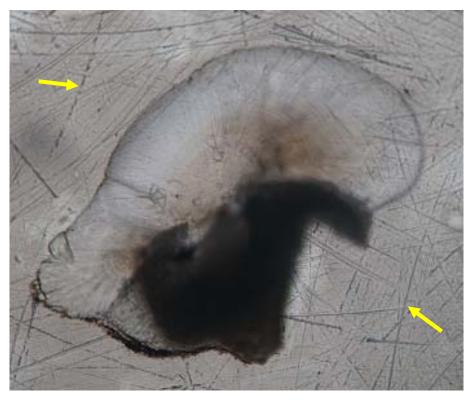


図 **30** 前部面のラッピ ングフィルムシート (粒度 9μ, 青)によ る研磨終了時の画像

研磨表面の研磨キズ (黄矢印)が浅くなっている. (5) ラッピングフィルムシート(緑)で仕上げの研磨をする.研磨キズがほとんど見えないくらいまで研磨する(図 31).研磨キズがほとんど無くなると,研磨面とラッピングフィルムシートとの間がヌルヌルと滑る感じ,空気が挟まっているような感じが得られる.研磨キズを全体的に無くす必要はなく,計数線設定予定域(図 33 参照)に研磨キズが無ければ良い.

前部面研磨終了時には、縁辺部長軸 (輪紋が最も凸になっている部分) の長さのおよそ 1/3~ 2/3 が未研磨の状態である場合が多い. ただし暗部と縁辺部の境界は明確ではないので、この割合はあくまでも目安である.



図 **31** 前部面のラッピングフィルムシート (粒度 2μ, 緑)による仕上げ研磨終了時の画像

研磨表面(平衡石部 分)に研磨キズは ほとんど見られない. 縁辺部長軸の長さ (青矢印)のおよ そ 1/3~2/3 が未研 磨部分長さ(赤矢 印).

#### 4-3-4 平衡石の反転

- (1) 前部面研磨が終了したスライドグラスをホットプレートで加熱し (85℃前後),接着剤が流動化したら、実体顕微鏡下で微針・ピンバイスを使い、平衡石を反転する.反転する前に、平衡石近くの接着剤を微針で払い、接着剤が少なくなった部分に平衡石を反転し載せる.これは、平衡石の下に余分な接着剤を入れないためである.平衡石の後部面を軽く微針で押し、接着剤を研磨面に行き渡らせる.
- (2) 反転した平衡石のスライドグラスをホットプレートに載せ、スライドグラスの端をプレート上の対応する目印に合わせ、中央点目印の上にくるように平衡石を移動する. 生物顕微鏡で、平衡石の下に気泡や夾雑物があるかを確認し、あれば再度加熱後、位置をずらし、それらが無くなれば中央点に戻す. 実体顕微鏡下で、平衡石の向きと角度(ここでは、側丘部を上に、翼を下に、平衡石長軸方向とスライドグラス長辺がほぼ平行になる角度に)調節する(図 32). この時、接眼ミクロメータを使うと角度調節の目安になる. 生物顕微鏡下で、計数線設定予定域を想定し、輪紋計数時の画面移動がなるべく横方向のみになる角度に微調整する(図 33).

これにより、①時間短縮:スライドグラス上の位置がほぼ一定なので、複数個体の輪紋計数時にモニタ上に平衡石を捉える時間が減る、②計数作業の安定性:計数線の設定や計数時の画面移動が、どの個体についてもほぼ同じように行うことができ計数作業が安定する.

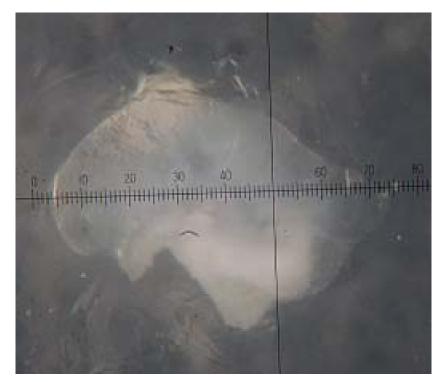


図 32 実体顕微鏡下での反転後の平衡石の向きの調節

側丘部を上に、翼を下に 平衡石長軸方向とスライド グラス長辺が平行になる ように調節する.接眼 ミクロメータを使うと 角度調節の目安になる.



図 **33** 生物顕微鏡下での反 転後の平衡石

計数線の設定予定域(青い部分)を想定して,角度を 微調節する.

### 4-3-5 後部面の研磨

(1) 耐水ペーパー (#1000) の小片をシャーレに置き、平衡石後部面を軽く研磨する.後部面研磨では、水平を保つためのシート小片は使わない.通常、後部面研磨では、平衡石を覆う接着剤は少ないので、研磨面はすぐに平衡石に達するので削りすぎに注意する.研磨と実体顕微鏡・生物顕微鏡での研磨度合の確認とを繰り返し、平衡石部分の研磨面の拡がりが後部面全体の1/2程度になるまで研磨する(図 34).

接着剤が多い場合は、メスで適宜トリミングを行い接着剤の面積を減らす.一度に大きくトリミングすると、切れ目が平衡石まで達してしまうことがあるので、少しずつトリミングしていく.

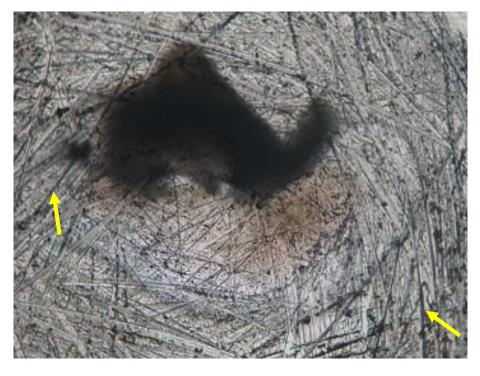


図 **34** 後部面の耐水 ペーパー (#1000) による研磨終了時 の画像

平衡石部分の研磨 面の拡がりは後部 面全体の 1/2 程度. 深い研磨キズ(黄 矢印)が全体にみ られる.

(2) 耐水ペーパー (#2000) による研磨と生物顕微鏡での検鏡を繰り返し、平衡石部分の研磨面の外縁が縁辺部外縁に迫るまで研磨する (図 35). 縁辺部縁辺まで、どれくらい迫れるかは、平衡石固定角度や平衡石縁辺部の形状などが関与しているので、一定ではない. ここで注意すべきは、削りすぎて核周辺部後半部輪紋が見えなくなってしまうことがあり、これを避けることである. また、縁辺部外縁を削り落とすことも、当然避けなければならない.

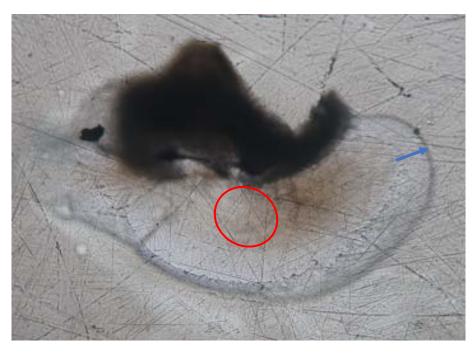


図 **35** 後部面の耐水 ペーパー (#2000) に よる研磨終了時の画像

縁辺部外縁までの 平衡石部分の研磨 面の迫り具合(青 矢印)と,核周辺 部後半の輪紋の見 え具合(赤円内) を確認しながら研 磨する. (3) ラッピングフィルムシート(青)で研磨し、研磨表面の研磨キズを浅くする(図 36).



図 **36** 後部面のラッピ ングフィルムシート (粒度 **9**µ, 青) によ る研磨終了時の画像

研磨表面の研磨キズ (黄矢印)が浅くな る.

(4) ラッピングフィルムシート(緑)で仕上げ研磨をする. 仕上げ研磨の前に, 再度接着剤のトリミング(特に, 背丘部先端近くまで)を行った方が, 研磨シートが効果的に背丘部に当たることになり, 研磨キズも入りにくくなる(図 37). 研磨キズがほとんど見えないくらいまで研磨する(図 38). 仕上げ研磨では, スライドグラスを持つ指に引っ掛かる感触があったら, 研磨シートから離さず場所をずらし, 滑らかな感触が得られるまで研磨と場所移動を繰り返す方法が良いと考えている. このため仕上げ研磨に少し時間が掛かることがある. 後部面研磨終了時には, 縁辺部長軸の長さのおよそ 1/6~1/8 が未研磨の状態にある場合が多い.



図37 接着剤トリミング後の状態

実際には、写真よりももっと 背丘部先端近くまでトリミング することが多い.

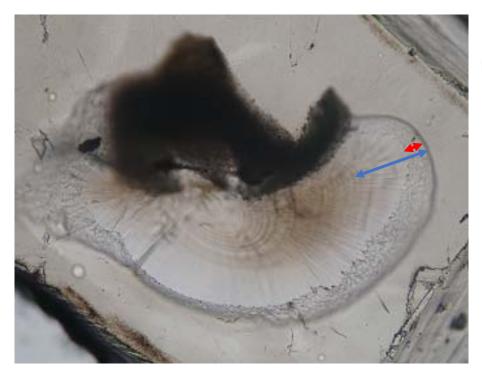


図 **38** 後部面のラッピ ングフィルムシート (粒度 **2**μ,緑)によ る仕上げ研磨終了時 の画像

研磨表面の研磨キズがほとんど見えない. 未研磨部分の長さは 縁辺部長軸の長さ (青矢印)のおよそ 1/6~1/8 (赤矢印)に なることが多い.

### 5 平衡石研磨標本の観察・計測

### 5-1 観察・輪紋計数のための機器・ソフトウェア

平衡石研磨標本の観察・輪紋計数のための機器・ソフトウェアを図 39 に示した.



図 **39** 平衡石研磨標本の観察・輪紋計数のための機器・ソフトウェア ①システム顕微鏡, ②CMOS カメラ USB3.0 (500 万画素), ③XY ステージコントローラー, ④パソコン・モニタ, ⑤ソフトウェア: 耳石日輪計測システム

#### 5-2 平衡石研磨標本観察・輪紋計数での機器・ソフトウェアの設定

顕微鏡の照明は、ケーラー照明とする、観察での対物レンズは、4倍(PlanApo)、10倍(PlanApo)、20倍(PlanFl)のレンズを使用することが多い、輪紋計数での対物レンズの倍率は、カメラ・ソフトウェア・モニタ上の最終倍率などの違いにより変わる、輪紋間隔は、通常、縁辺部外縁付近で最も狭くなり、1-2μm ぐらいになる(「2005年マニュアル」および図 41 による)、モニタ上の最終倍率が、1000倍だとする、その輪紋間隔は1-2mm になり、肉眼によるモニタ上の輪紋の判読・計数は困難ではない、従って、モニタ上の最終倍率が 1000倍以上になる対物レンズの倍率が、輪紋計数での使用倍率の一つの目安となる。それよりも高い倍率を使うと、一つのモニタ画面での計数範囲が狭くなり全体の計数画面の数が増えるので、計数画面の移動・連続性を確保する作業が増える、一方、倍率が高くなれば、輪紋間隔が拡大し、輪紋が判読しやすくなることもある。しかし、細かい輪紋が見えるようになり判読が難しくなる場合もある。輪紋計数時の倍率は、作業性、輪紋判読の難易・再現性などを考慮して決めることになる。本観察システムでは、モニタ上の倍率が約 1225倍になる状態(対物レンズ 10倍)で輪紋計数を行っている。

本書では、ソフトウェア「耳石日輪計測システム」を起動させ、モニタ上に映し出される平衡石について、計測・計数を行う方法について記述する。このソフトウェアには、画像のコントラストを上げる機能があり、輪紋判読の手助けになるので、適宜利用している。

また、ここでの観察機器システムには、XY ステージコントローラーが装備されているので、プレパラートの動きに応じて、計数線やフリーハンドによるマークが追随するので、計数画面を移動したときの繋ぎがやりやすい.

研磨標本の検鏡にあたり、カバーグラスは使用していない.後部面研磨面の研磨キズが目立つと きは、流動パラフィン等で、研磨面を覆うと傷が目立たなくなるので、状況に応じて使用する.

#### 5-3 平衡石最大半径の計測

平衡石研磨標本での長さの測定は必須ではないが、参考としてここに記述する.ここでは、平衡石最大半径を、核の中心から縁辺部外縁最遠点までの距離と定義し、ソフトウェアの長さ計測機能を使って測定する(対物レンズは4倍か10倍).ただし、平衡石の形に個体差があること、平衡石固定角度は個体間で同じではないことを考慮すると、計測した平衡石最大半径は平衡石のおよその大きさを示すものとして捉えるべきである.

#### 6 輪紋の計数

#### 6-1 計数画面の数と計数ピントの決め方

計数する輪紋は、核とした部分(6-2 参照)のすぐ外側の黒く見える輪紋から縁辺部外縁のすぐ内側の黒く見える輪紋(または外挿による輪紋)までである。図 2-4 に示した核周辺部・暗部・縁辺部の各部分を一画面として輪紋計数・画像保存を行い、1 個体につき輪紋計数画面は、通常三つとなった。

計数時のピントを決めるために、各部分について大部分の輪紋にピントが合う時の顕微鏡微動ハンドルの目盛値を記憶する.特に、核周辺部のピント合わせでは、核の上から下までピントを動かしその中間付近で、かつ明瞭な輪紋を目印にそれが外に広がりピントが合った状態を選んでいる.各部分での目盛値が大きく違わない時は、その値の中間的な値を観察ピントに設定し、核から縁辺部外縁までをなるべく同じピントで輪紋計数することにしている.これはピントを動かすと輪紋像も変化し、計数の連続性を確保する作業が必要だが、この作業をできるだけ減らしたいことによる.

目盛値が各部分で大きく違う場合は、核周辺部での値を計数開始時の計数ピントとし、以降の部分での計数ピントへと変化させていく、ピントを変化させる場合は、目印となる濃い輪紋などを拠り所として、計数の連続性を確保する.

平衡石の固定角度調節がうまくいった場合は、輪紋計数時のピントを、核から縁辺部外縁まで、全くあるいはほとんど変えずに輪紋計数することができる.

### 6-2 核の決め方

スルメイカ稚仔(外套背長 2-10mm, 87 個体)の平衡石観察で,核とみられる部分(最も内側の輪紋の内側にあるやや楕円形の部分,図 40)の長径の平均と標準偏差は,それぞれ  $18\mu$ m,  $0.7\mu$ m であった(中村,未発表).そこで研磨標本で核とみられる部分の長径を測り,それが  $17-19\mu$ m の範囲にあれば,その部分を核とした.その範囲外であれば,計測部分やピント合わせを再検討する.

この核の決め方では、「2005 年マニュアル」における核に関する記述とスルメイカ幼生の平衡石の写真を、さらに以前ふ化後数日のスルメイカ平衡石を観察した時の画像から、ふ化直後の核の長径は 20μm より少し小さいとみられたこともそれぞれ参考にした。

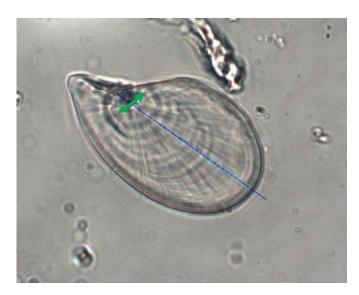


図 40 核の決め方

核とみられる部分の長径(緑矢印)が 17-19µm の範囲にあれば核とする. 核とした部分のすぐ外側の黒い輪紋 から計数を開始する(外套背長 3.4mm と推定された稚仔からの 平衡石での輪紋計数例).

### 6-3 計数線の設定

輪紋は、変形した同心円状に広がり、その広がりは背丘部方向で最も大きく、輪紋間隔も広くなる. 計数線は、最も輪紋間隔が広い部分(輪紋が外側に最も凸になっている部分)に設定するのが良いが、必ずしもその部分の輪紋が判読しやすいとは限らないので、その場合はその部分の近くで輪紋が判読しやすい場所に設定する. 核周辺部では、輪紋の広がりの中心軸が大きく湾曲するので、計数線は2、3本設定する方が良い. 他の部分では、1、2本の計測線で対応できる場合が多い.

#### 6-4 輪紋間隔の推移パターンの把握

使用しているソフトウェアでは、計数線と輪紋の交点をプロットすると輪紋数とともに輪紋間隔データも記録されていく。輪紋計数時に得られた輪紋間隔データに基づき、異なる海域で漁獲された標本について、最初の輪紋から順番に輪紋間隔の推移を図示した(図 41)。図中の輪紋間隔序数(輪紋 1 本目と 2 本目との間の間隔を 2 とする、以下同様)の増加に伴い輪紋間隔は、序数 2-50前後までは、5-6 $\mu$ m から 2-3 $\mu$ m へ減少し、序数 5-100前後までは、2-3 $\mu$ m から 3-4 $\mu$ m への増加傾向を、序数 100 以降は、3-4 $\mu$ m から 1-2 $\mu$ m への減少傾向を示した。ただし、計測線の設定場所は各個体で全く同じでは無いので、これらの値は測定誤差を含んだものである。

これらの輪紋間隔データは、対象の輪紋範囲が少し異なるが、「2005 年マニュアル」に記述された輪紋間隔と良く一致する、「2005 年マニュアル」では、核周辺部(核 $\sim$ 60 本目程度まで)の輪紋の間隔は、最初 3-6 $\mu$ m、その後  $2\mu$ m 程度;暗部(60 本目~130 本目程度まで)の輪紋間隔は 2-5 $\mu$ m 程度;縁辺部(約 130 本目~縁辺部外縁まで)の輪紋間隔は 1.2- $2.5\mu$ m、と記述されている.

輪紋間隔の推移パターンは、海域、生まれた年・月、個体等により変化するとみられるが、輪紋間隔の推移パターンの概略を把握しておくことは、輪紋計数に当たって有益になると考える。例えば、成長が進んだ個体で、縁辺部輪紋間隔が 3-4μm に増加することは、推移パターンからしても、平衡石への日々の沈着量の生理学的変化からみても、疑問を呈することになる。

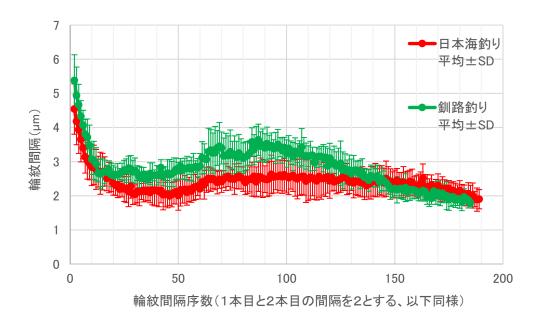


図 41 平衡石輪紋間隔の推移パターン

各標本の漁獲年月・個体数・外套背長範囲は、日本海釣りが2015年6月・15個体・16-19cm、 釧路釣りが2015年8月・8個体・19-26cm. 表示は各標本全個体平均値があるところまで.

### 6-5 核周辺部の輪紋計数

核周辺部(ここでは「2005 年マニュアル」に従い,核 $\sim 60$  本目くらいまでとした,以下同様)全体の輪紋計数画像の一例を図 42 に示した(以降の画像は,エチレン酢酸ビニル樹脂系接着剤で包埋研磨した標本による画像である).核へのヒビ入りや Occulting Crystals の残りが見られる.しかし,この程度の核へのヒビ入りならば,核とみられる部分の長径計測は可能である.

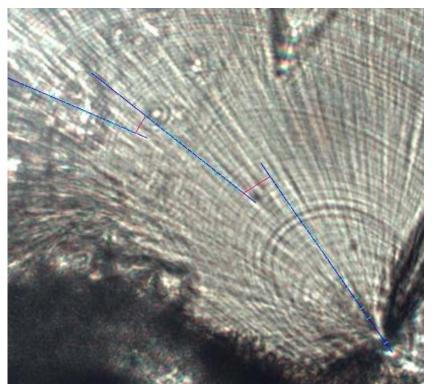


図 **42** 核周辺部全体の輪紋 計数

核へのヒビ入りや Occulting Crystals の残り はあるが、その影響は少な い (3 本の計数線のプロッ トは、それぞれ 1-20 本目、 20-40、40-60). 核とした部分の直ぐ外側の黒い輪紋を第 1 輪とし、以下、輪紋を計数していくが、最初の部分の輪紋は、ぼんやりとした太い輪紋像を示すことが多い(図 40 も参照)。このぼんやりとした太い輪紋を 1 本として計数する。この判読方法は、「2005 年マニュアル」での方法も参考にしている。

核周辺部前半(核 $\sim$ 30 本目くらいまで)では、最初ぼんやりとした太い輪紋があり、その後、比較的はっきりとした細い輪紋になる場合(図 43)が多く、これらの輪紋を1本ずつ読んでいく.

顕微鏡微動ハンドルの動き(ピントの変化)により、輪紋が二重になったり(図 44)、それらが集合したりする輪紋像(図 45)を示す個体が、時々観察される.

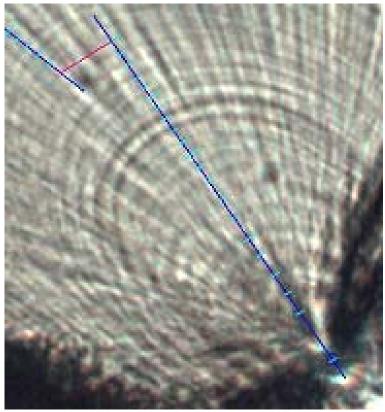


図 **43** 核周辺部前半の輪紋計数 (図 **42** の前半部分の拡大画像)

ぼんやりとした太い輪紋から始まり、その後、比較的はっきりとした細い輪紋が続く.

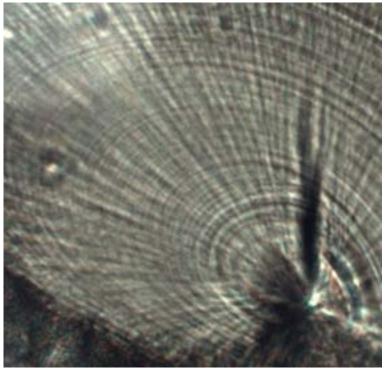


図 44 核周辺部前半の輪紋像の変化:ピントにより輪紋が二重になった状態

(図 42, 43 とは別の標本)

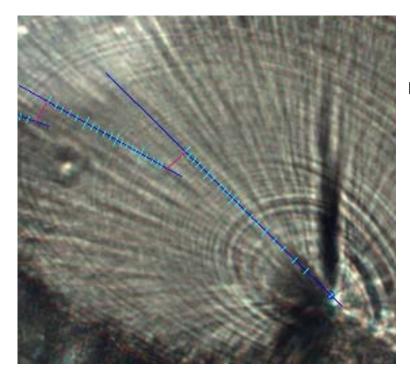


図 45 核周辺部前半の輪紋像: 変化:ピントにより輪紋が集合 した状態

図 44 の標本でピントを変え, 輪紋が集合したこの状態で輪紋 計数する.

そのような場合は、輪紋が集合するピントを選択し、集合した輪紋を計数している(図 45). 核周辺部後半(30 本目~60 本目くらいまで)では、比較的はっきりとした輪紋が続くことが多い(図 46). この部分の Occulting Crystals を完全に削り落とすことはできないので、計数線下の残った Occulting Crystals の間を通して見える輪紋、あるいは Occulting Crystals が薄くなって透けて見える輪紋を計数する.

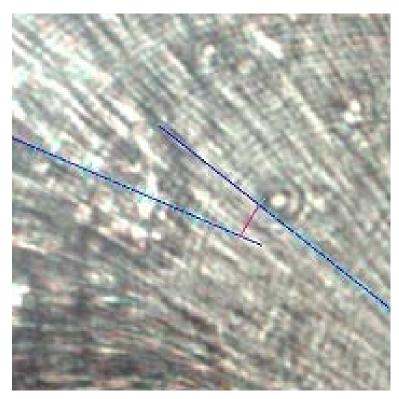


図 46 核周辺部後半の輪紋計数 (図 42 の後半部分の拡大画像)

残った Occulting Crystals の間を通して見える輪紋、あるいは Occulting Crystals が薄くなって透けて見える輪紋を計数する.

時々、残った Occulting Crystals が多く、計数線下の輪紋がよく見えない場合がある(図 47).

その場合は、計数線付近で見える輪紋を探し、その走り方や輪紋間隔、さらに見えない部分の前後の輪紋間隔などを参考に、目測で輪紋間隔を推定し計数していく。本書で使用しているソフトウェアにはよく見えない部分の輪紋を内挿する機能は無いが、輪紋間隔の推移図をリアルタイムで表示することができるので、目測で計数した部分の輪紋間隔とそれ以前の輪紋間隔との比較はできる。輪紋間隔の推移に突出した変化が見られないことを一つの目安にしている。

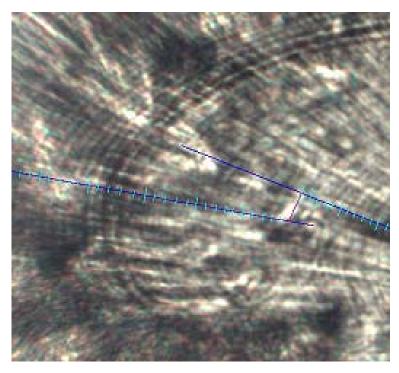


図 47 核周辺部後半の輪紋計数: Occulting Crystals の残りが多い ために輪紋がよく見えない状態 (画像の右半分の部分)

#### 6-6 暗部の輪紋計数

暗部(およそ 60 本目~130 本目程度まで)の輪紋計数像を図 48 に示した.暗部は,図 41 の輪紋間隔の推移パターンに見られるように,海域などにより輪紋間隔が大きく異なるという特徴を持つ部分と考えられる.図 48 は図 41 の釧路釣り標本個体からの暗部計数画像である.一方,図 49 は図 41 の日本海釣り標本個体からの暗部計数画像である.図 49 の輪紋はやや不明瞭であるが,両者での輪紋間隔の違いは見て取れる.輪紋間隔の海域等による違いについては,「2005 年マニュアル」で N タイプ(narrow,夏の日本海などに分布)・W タイプ(wide,太平洋や秋の日本海などに分布)として記述されており,本書でも同様の観察結果が得られている.

暗部での輪紋長軸方向は、段々湾曲していき翼に近づくようになるが、この長軸部分には黒い 影のようなものが散在し、輪紋の見えを阻害していることが多い。そこで暗部では計数線を長軸 部分から少し離れたところに設定することになる。それでも良く見えない場合は、計数線付近の 見える輪紋の走り方や前後の輪紋間隔を参考に計数プロットしていく。

核周辺部後半から暗部前半でも、ピントの変化に連動して集合し太い輪紋(図 50)に、拡散し細い輪紋(図 51)になるように見えることがある。このような輪紋の計数の仕方については、「2005年マニュアル」と「2012年総説」に従うことにする。すなわち「2005年マニュアル」(p.15、核周辺部)には、"ぼやっとした広い輪紋を拡大すると、その中に規則的な細かい輪紋も観察される。いずれもピントの変化に連動する場合は、原則として広い輪紋を計数する。"とある。一方「2012年総説」(p.1394)には、Correct focal plane に対して、slightly off-focus (incorrect) plane with optical effects showing additional 'sub-daily' increments that obstruct reading of the real daily growth increments とある。

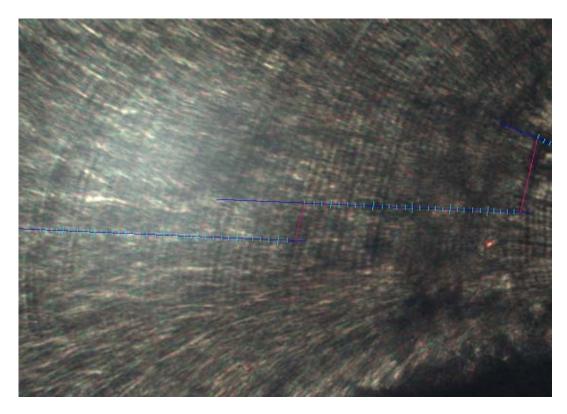


図 48 暗部の輪紋計数例:図 41 の釧路釣りの標本での画像 (暗部 2 本の計数線プロットは、それぞれ 60-88、88~124 本目)

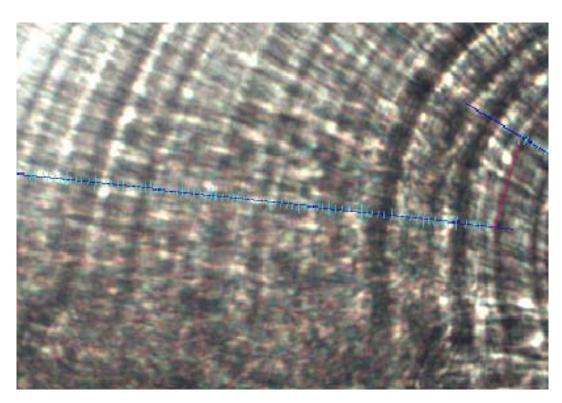


図 **49** 暗部の輪紋計数例:図 **41** の日本海釣りの標本での画像 (暗部の計数線プロットは **60~136** 本目)

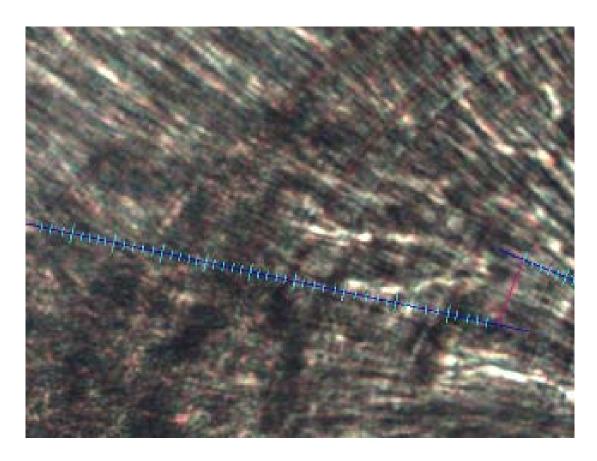


図 50 暗部でのピントの変化に連動して集合し太い輪紋になった状態で計数

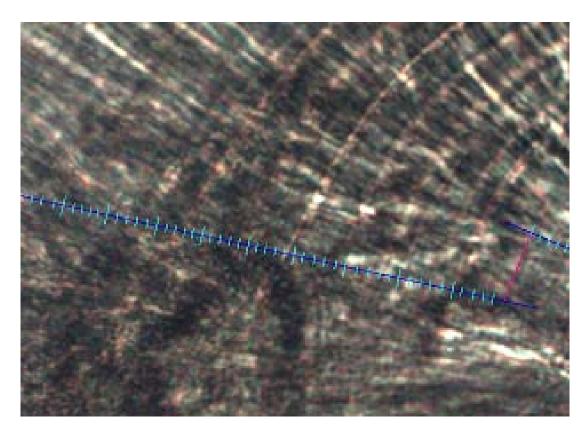


図 51 暗部でのピントの変化に連動して拡散し細い輪紋になった状態 (計数線プロットは集合した輪紋を計数した図 50 のまま)

暗部では、全体的に暗く輪紋ははっきり見えず、ぼんやりとした太い輪紋が所々に見える場合がある(図 **52**). このような場合、比較的見える輪紋からプロットし、不明瞭な部分は計数線の上側や下側の輪紋の有無・走り方、前後の輪紋間隔などを参考にしながらプロットしていく. その一例が図 **52** である. ぼんやりとした太い輪紋を1本と読んでいる時と2本と読んでいる時がある. このような場合の計数に自信はなかなか持てないが、計数の一例として掲載する.

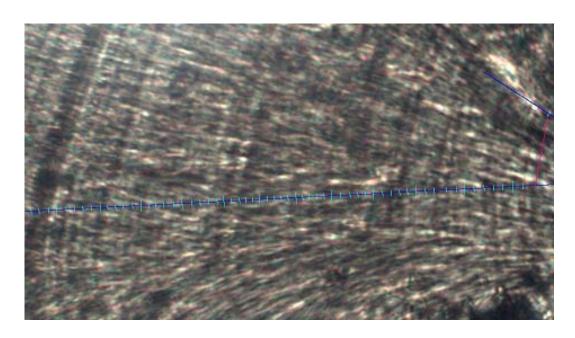


図 52 暗部のぼんやりとした太い輪紋が見られる状態での計数例 (暗部の計数線プロットは 63~123 本目)

### 6-7 縁辺部の輪紋計数

縁辺部 (およそ 130 本目~縁辺部外縁まで) 全体の画像を図 53 に示した. 計数線は、輪紋の見え具合により、長軸上あるいは長軸から少し離れたところに設定する. 外縁付近に、未研磨部分が観察される.

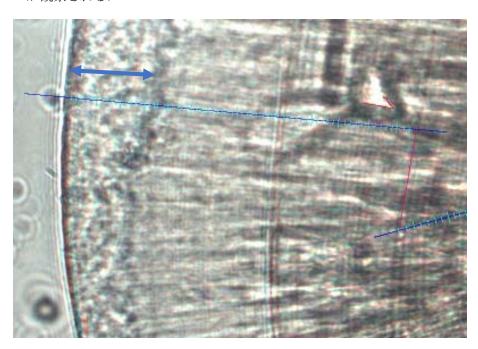


図 **53** 縁辺部全体の 輪紋計数

外縁付近に未研磨部 分(青矢印)あり (縁辺部の計数線 プロットは,142~ 211本目). 図 53 の縁辺部前半部分を拡大したものを、図 54 に示した. ここでは、細い輪紋が狭い輪紋間隔で連続することが多く、比較的読みやすい.

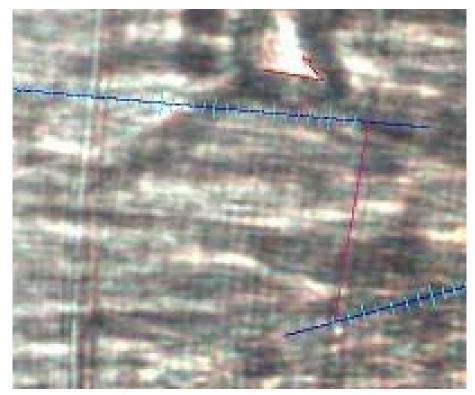


図 **54** 縁辺部 (図 **53**) 前半部分の拡大

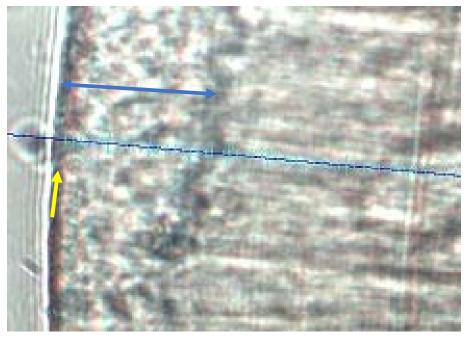


図 **55** 縁辺部 (図 **53**) 後半部分の拡大

黄矢印が焦点面外縁 を,青矢印は未研磨 部分をそれぞれ示す.

図 53 の縁辺部後半部分を拡大して、図 55 に示した.未研磨部分の輪紋は見えづらいことが多いが、計数線付近で部分的に見える輪紋を探し、その走り方や輪紋間隔、直近の輪紋間隔を参考に計数する. ほとんど見えない場合は、直近の輪紋間隔から内挿の場合と同様に目測で外挿している. 縁辺部をどこまで数えるかについては、図 55 では平衡石のほとんどの部分が白っぽく明るく見え、その部分の外縁がピントの変化とともに内外方向に動くのでそれを焦点面外縁とみなし、そのすぐ内側の輪紋までを計数している. 焦点面外縁と背丘部外縁とは必ずしも一致しない. 背丘部外縁のすぐ内側まで計数した時との差は、通常 1~2 本くらいである.

縁辺部後半では、時々(外套背長の大きい個体で多い)、ぼんやりとした太い輪紋が見られることがある(図 56)。この太い輪紋をそのまま計数すると、その輪紋間隔は  $3\mu m$  以上になることがあり、輪紋間隔の推移パターンから外れる。そこで、太い輪紋の間を上下にたどり細い輪紋があるかどうか、2 本の輪紋が合わさって太くなっていないか、輪紋間隔に急激な変化はみられないか等を参考にして計数していく。

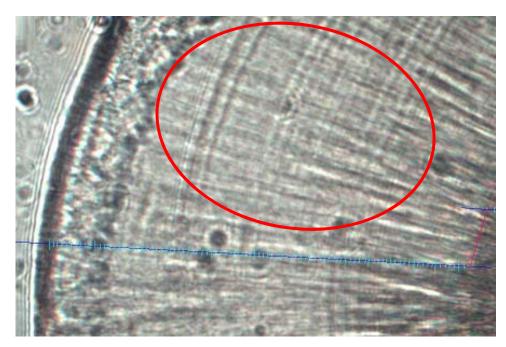


図 56 縁辺部後半 のぼんやりとし た太い輪紋(赤 楕円内に見られ る)

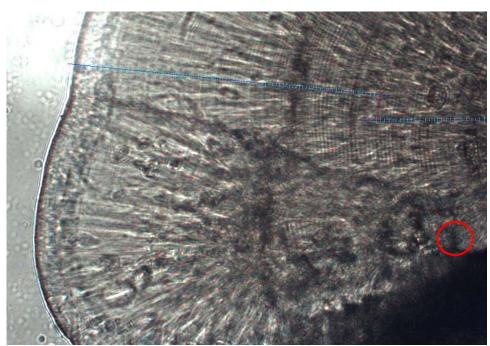


図 57 二次核(赤丸,二次核は明瞭ではない)とそこから広がる扇状部分の輪紋(この画像では扇状部分の輪紋計数は行っていない)

縁辺部には時々、二次核とそこから扇状に広がる輪紋が見られることがある(図 **57**). その扇状部分の輪紋は見やすいことがあるが、暗部からの計数を連続させるためには、目印となるはっきりとした輪紋があり、ピントを変えてもその輪紋を特定できることが必要である.

二次核から広がる輪紋の計数については、「2005年マニュアル」に記述されている.

### 6-8 計数結果の取り扱い

一つの研磨標本について、3回輪紋計数し、計数値の変動係数(標準偏差を平均で割ったもの)が5%以内であれば、その平均値(四捨五入)をその個体の日齢とした。変動係数が5%よりも大きい場合は、直近3回の計数値の変動係数が5%以内になるまで計数を続ける。

計数結果をどう捉え、どう評価するかを考えることは重要である。まず頭に浮かぶのは、この様にして得た日齢が正しい日齢であるどうかということである。しかし、これに対して自信を持って答えることは中々難しい。過去に飼育実験により輪紋形成の日周性が実証されているが、漁獲されたスルメイカの平衡石の核から縁辺部外縁までの輪紋は、それまでその個体が経験した環境の違いに起因するとみられる様々な輪紋像を呈する。様々な輪紋像に対応した信頼性の高い判読方法を確立する必要がある。この点から、飼育環境を変えて輪紋の性状や日周性を調べる実験は、日齢査定結果の信頼性を評価する際に有益な知見をもたらすものと考えられ、その実施が望まれる。

計数結果を検討する別角度からの方法として、複数の読み手による読み合わせという方法がある。 平衡石輪紋が核から縁辺部外縁まではっきりと見える、誰が読んでも同じ計数結果になるような研 磨標本を得ることは現状ではあまりない。ということは、読み手が変われば計数結果も変わること が予想され、読み合わせの必要性は高い。輪紋計数の経験をある程度積んだ者が複数いる場合(同 じ職場に居ない場合は、他機関との共同も含め)読み合わせは行うべきである。読み合わせをして 計数結果が違う場合、どこが違っていたかを確認し検討することは、輪紋判読方法の統一につなが り、得られた日齢の信頼性を検討する機会となる。

読み合わせもすぐにはできない場合の対処として,以下の方法を示す.

菅原ら(2013)は、日齢査定結果に基づいて、以下の式を最も適合した成長式としている:

 $L = 337 \exp \{-7.09 \exp (-0.0136 a)\}$ 

ここで, L は外套背長 (mm), a は日齢を表す.

この成長式を, a (日齢) について解くと, 以下のようになる:

 $a = \ln \{\ln (L/337)/-7.09\}/-0.0136$ 

この変形した式に、査定個体の外套背長(mm)を入力すると、上記成長式による日齢(四捨五入)が算出される.

この成長式日齢をある一つの基準として、計数結果を検討することはできる。その場合、査定結果をどのくらいの単位(日、旬、月)で利用するかを念頭に置いておく必要がある。ここでは、査定結果を月齢として利用する場合の取り扱いの一例をあげると、上述の成長式日齢と計数結果の平均値からの日齢との差が±30の範囲にあれば、その平均値日齢を査定個体の日齢とする。その差が±30よりも大きく、その差の原因について思い当たることがある場合、例えばピントが合わせづらい部分があった等の場合では、その部分のピントを変えて再計数を行う。また差の原因が輪紋の見づらい部分が多くあったためと思われる場合は、見づらい部分の輪紋を注意深く再計数する。そして再計数結果の平均値(変動係数は5%以内)を、上述の±30の範囲に入っても入らなくても、査定個体の日齢とする。

以上のような計数結果の取り扱いには、幾つかの留意すべき点がある。一つ目は、成長式日齢との差を小さくしようとする再計数になりがちであること、二つ目は、上記成長式は日本海で漁獲された個体を含まない標本に基づいて推定されているので、日本海で漁獲された個体の査定結果を必ずしも同じように適用できないということ、である。木所ら(1999)は、日本海におけるスルメイカの成長式を推定しているので、日本海で漁獲された個体の査定結果の検討に、その成長式を同様に利用することも考慮すべきである。いずれにしても、これらの点を踏まえつつ、成長式日齢を利用した計数結果の検討は、あくまでもある一つの基準によるものであり、それにあまり引きずられないようにすることが重要であると考えている。

### 7 所要時間について

これまで記述してきた平衡石の摘出から輪紋計数までのおよその所要時間について試算してみた. 今 10 個体の標本があるとして、摘出に約 80 分、包埋に約 30 分、固定角度調整・両面研磨に約 400 分(右側 10 個),輪紋計数に約 500 分(同 10 個)掛かるとすると合計で約 1,010 分となり、1 日 6 時間(360 分)作業した場合、3 日間(1,080 分)ぐらい掛かることになる.

#### 8 スルメイカ若齢個体・稚仔からの平衡石摘出・包埋・輪紋計数

#### 8-1 若齢個体(外套背長 20-120 mm程度)での平衡石摘出・包埋・輪紋計数

- (1) 平衡石の摘出では、頭部を切離した後、水を入れたシャーレの中に置き、実体顕微鏡下で(以下、(2)・(3)でも同様)平衡胞を包む軟骨の膨らみの間、正中線上をメスで切断する。普通のメスでは大きすぎる場合は、有柄針の針先を砥石で研ぎ刃状にして使う。
- (2) メスあるいは刃状にした針で、平衡胞(左右を確認)の中央付近を水平的に切り、平衡胞内の平衡石を通常の有柄針で掻き出して、シャーレの底に落とし、シャーレの端の方に置く. 同様に、もう一方の平衡石も摘出し、平衡石の左右を確認して並べて置く.
- (3) 大型個体の平衡石の筆と針による移動方法により、筆先に平衡石を絡め、用意したスライドグラスの上に置く、これを左右平衡石について行う。
- (4) 接着剤による包埋, 固定, 検鏡は, 上述の外套背長およそ 13cm 以上の個体からの平衡石の場合と同様に行う.
- (5) この外套背長サイズでは、研磨をしないでも輪紋が計数できる場合が多いが、輪紋が見づらい場合は、後部面研磨だけでも輪紋の見え具合は改善する.
- (6) 輪紋計数は、外套背長およそ 13cm 以上の個体での方法と同様に行う.

### 8-2 稚仔(外套背長 2-10mm 程度)での外套背長推定・平衡石摘出・包埋・輪紋計数

ここでは、プランクトンネット等で採集され、船上処理(中性ホルマリンで 6 時間固定後、55% アルコールで置換および保存)された個体についての作業工程を示す.

#### 8-2-1 外套背長推定

(1) 実体顕微鏡のいくつかのズーム倍率 (×40, 32, 20) で, 対物ミクロメータ 100 目盛 (1mm) に一致する接眼ミクロメータの目盛を調べ, 接眼ミクロメータ 1 目盛あたりの長さを事前に算出しておく.

算出例: ズーム倍率×40 で、対物 100 目盛(1000 $\mu$ m)が接眼 41 目盛と一致した場合、  $1000\div41=24.39\mu$ m/目盛

### (2) 計測·撮影

- ・スライドグラスの片端にラベル(サンプル名等を記入)を貼り、スライドグラスの左右を決める。 すなわちラベルは右側と決めたらこれを維持し、この後の左右平衡石の位置関係を決める際の基準とする.
- ・スライドグラスを裏返し、中央付近にサインペンで直径 5mm ぐらいの円を描く.
- ・スライドグラス表(おもて)面の中央部に純水等の水滴を駒込ピペット等で作る.
- ・ネットサンプルからピンセット等で仔イカを取り出し、その水滴の中に置く.
- ・実体顕微鏡のズーム倍率を、上述の1目盛あたりの長さを算出している倍率に合わせ、仔イカの頭幅を接眼ミクロメータで計測する。ズーム倍率と計測目盛数を記録する。
- ・撮影(コリメート法による):接眼レンズに、コンパクトデジタルカメラ(マクロモード、無限大に設定)のレンズを密着させ、頭幅測定した状態の仔イカを撮影する.

### (3) 推定外套背長の算出

・頭幅と外套背長との関係式(森, 2006)を以下に示す.

 $DML=0.047HW^2+1.339HW+2.68$ 

ここで、DML は外套背長、HW は頭幅で、ともに 0.1mm 単位.

- ・頭幅の算出:以下の式で, 0.1 mm単位で HW を算出する.
  - HW=計測目盛数×当該ズーム倍率での1目盛あたりの長さ÷10
- ・外套背長推定:算出した HW を上記関係式にいれ、DML を算出する.

#### 8-2-2 平衡石の摘出

- (1) 実体顕微鏡のズーム倍率を 12.5 倍前後にし、水滴内の仔イカの頭部と胴部を、有柄針(針の太さ約1mm,長さ 45mm)2本で切り離す.1本で胴体を押さえ、先端を刃状にしたもう1本で頭部のくびれ部分を切る.胴体は水滴から除去、漏斗も切り離し同じく除去する.
- (2) ズーム倍率を 20 倍前後にし、頭部腹面から平衡胞とその中の平衡石(光沢がある)を確認する.
- (3) 左側平衡胞を刃状の有柄針で切開し、ピンバイスに取り付けた微針で平衡石を掻き出す.平衡石は沈下する.
- (4) 沈下した左平衡石を水滴の下端に移動する. 移動には、同上の微針を使う.
- (5) 同様に、右平衡石も摘出し、左平衡石の右側に移動する.
- (6) 実体顕微鏡下で、平衡石の動きを確認しながら、平衡石と反対側の水滴の端に紙タオル等を付け、水を吸い取る. 頭部等を除去する. 左右平衡石を、その位置関係を保ちながら、スライドグラスの中央付近に透けて見える円内に微針で移動する.

#### 8-2-3 平衡石の包埋・固定

- (1) 平衡石を移動した円内に、接着剤の小片をミクロスパーテルで静かに盛る.
- (2) 加熱した(85℃前後)ホットプレートにスライドグラスを載せ、接着剤を軟化させる.
- (3) 実体顕微鏡および生物顕微鏡で、接着剤内に平衡石が二つあることを確認する.
- (4) 平衡石の向きを、できるだけ平面的になるように、接着剤を加熱・軟化させ、微針で向きを調節する.

#### 8-2-4 検鏡・輪紋計数

- (1) 平衡石を検鏡し、平衡石表面に膜状物質があり、輪紋の見え具合を阻害している場合は、ホットプレートによる加熱 (85℃前後、1 時間前後) で、膜状物質が薄くなる、あるいは消失することがあるので、試してみる、研磨はしない。
- (2) 輪紋計数は、外套背長サイズおよそ 13cm 以上の個体での方法と同様に行う.

#### 9 おわりに

私事で恐縮だが、著者は今から 5 年ほど前に、約 15 年振りにスルメイカの日齢査定に携わることになった。日齢査定の現場から離れていた間に、平衡石の輪紋計数マニュアルは刊行され、平衡石研磨標本の作製方法は改良され、日齢査定結果に基づく多くの研究報告がなされていた。それらのことを身につけるべく、研磨標本の作製方法や輪紋の計数方法について試行錯誤を繰り返してきた。本書は、現時点でたどり着いた方法を示したが、課題はまだまだある。例えば、暗部はその名の通り暗く輪紋は見えづらいことが多いが、このことを改善する方法を見出していない、また縁辺部外縁付近の外挿部分の長さは、その部分の輪紋間隔は狭いと推定される成長が進んだ個体ほど長くなることが多く、査定結果の信頼性を低下させる要因となっている。これらのことを含め、今後、日齢査定に関する課題が一つずつ克服されていくことを期待したい。

平衡石による日齢査定をこれから始めようとする人には、その方法が判り易いようにと、また経験者には査定技術の改良のヒントになればという思いで本書を執筆したが、ひとりよがりの、時に細かすぎる説明に陥っているところも多々あるかもしれない。読者のご賢察と寛容を願うばかりである.

本書の原稿を校閲して頂いた北海道立総合研究機構中央水産試験場資源管理部・坂口健司主査,北海道区水産研究所資源管理部・伊藤正木部長に対して心より謝意を表します.

本書の図 **41** で示されている日本海釣りの標本は、(国) 水産研究・教育機構の開発調査センターによる調査標本の一部を提供して頂いたものであり、ここにお礼申し上げる.

#### 10 文献

- Arkhipkin A.I. and Shcherbich Z.N., 2012: Thirty years' progress in age determination of squid using statoliths. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 92(6), 1389-1398.
- Dawe E.G., O'Dor R.K., Odense P.H., and Hurley G.V., 1985: Validation and application of an ageing technique for short-finned squid (*Illex illecebrosus*). J. Northw. Atl. Fish. Sci., Vol. 6, 107-116.
- Dilly P.N., 1976: The structure of some cephalopod statoliths. Cell Tiss. Res. 175, 147-163.
- 加賀俊樹,山下紀生,岡本 俊,船本鉄一郎,2017:平成28(2016)年度スルメイカ冬季発生系群の資源評価,平成28年度我が国周辺水域の漁業資源評価(魚種別系群別資源評価・TAC種)第1分冊,水産庁増殖推進部・国立研究開発法人水産研究・教育機構,pp.618-657.
- 木所英昭,和田洋藏,四方崇文,佐野勝雄,氏 良介,1999:平衡石の日周輪解析をもとにした1996年の日本海におけるスルメイカの成長.日水研報告,49,129-135.
- 久保田洋,後藤常夫,宮原寿恵,松倉隆一,高原英生,2017:平成28(2016)年度スルメイカ秋季発生系群の資源評価,平成28年度我が国周辺水域の漁業資源評価(魚種別系群別資源評価・TAC種)第1分冊,水産庁増殖推進部・国立研究開発法人水産研究・教育機構,pp.658-693.
- 森 賢,2006:スルメイカ冬季発生系群の初期生態と資源変更機構に関する研究,北海道大学,博士論文(平成18年3月).
- Morris C. C., 1983: Statolith development and age determination in the Ommastrephid squid *Illex illecebrosus* (Lesueur, 1821). Department of Biology, Memorial University of Newfoundland, Newfoundland, Master Thesis, p.33.
- Nakamura Y. and Sakurai Y., 1991: Validation of daily growth increments in statoliths of Japanese common squid *Todarodes pacificus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 2007-2011.
- 中村好和,2000:平衡石によるいか類の日齢査定方法.「特定水産資源評価技術開発調査成果集1いか類,小型浮魚類日齢査定マニュアル」,平成12年3月,(中央水産研究所水産研究官編),中央水産研究所,pp.1-17.
- 坂口健司, 2005: スルメイカの平衡石の採取および輪紋計数マニュアル, 北海道立釧路水産試験場, 60pp.
- 菅原美和子,山下紀生,坂口健司,佐藤 充,澤村正幸,安江尚孝,森 賢,福若雅章,2013:太 平洋を回遊するスルメイカ冬季発生系群の成長に及ぼす孵化時期と性差の影響.日水誌,79,823-831.