

異なる保存処理およびその後のホルマリン・エタノール固定がサケ幼稚魚の魚体サイズに及ぼす影響

春日井 潔

北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場 道東支場

The effects of different methods of preservation and fixation in formalin and ethanol upon body size of juvenile chum salmon

KIYOSHI KASUGAI

Hokkaido Research Organization, Doto Research Branch, Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Nakashibetsu, Hokkaido 086-1164, Japan

The effects of preservation (freezing & thawing, chilling, and chilling plus freezing & thawing) and fixation in formalin and ethanol upon body size (length and weight) of three different fish size groups of juvenile chum salmon *Oncorhynchus keta* were investigated. Body size decreased in most fish of all size groups after preservation, although body size increased in some fish after chilling. Body size after fixation decreased in most fish compared to those after preservation. Decreases in body size fixed after freezing & thawing and chilling plus freezing & thawing were larger than those fixed after chilling and death. Changes in body size with preservation and fixation were different among the three size groups.

キーワード：サケ幼稚魚，体重，体長，ホルマリン・エタノール固定，冷蔵，冷凍

日本においてはサケ属魚類（サケ *Oncorhynchus keta*, カラフトマス *O. gorbuscha*, サクラマス *O. masou*）の増殖方法として人工ふ化放流が重要な位置を占めているが、近年は放流効果を高めるため、種苗性の把握が必要とされている（水野, 2009）。種苗性を把握するための方法として、体長と体重から計算される肥満度は、簡便で現在もよく用いられる主要な指標である。一方、近年では肥満度のような形態学的な指標に加えて、生化学的な指標を用いるようになり、サケ属幼稚魚についても生化学的分析による栄養状態評価が確立され、一定の成果を挙げている（Misaka *et al.*, 2001; 三坂ら, 2004; Mizuno *et al.*, 2008）。また、自然界における餌生物を通じた栄養段階の解明に、従来の胃内容物組成の解析に加えて、安定同位体比による分析が用いられつつある（伊藤・掛川, 2008）。このような生化学分析に供するサンプルはホルマリン固定ができないため、生鮮、あるいは一旦冷蔵・冷凍保存し、分析前に魚体測定して分析に供する必要がある。

サケ属魚類の減耗は、放流後の河川や沿岸域で大きいことが知られていることから、その要因を明らかにするため

の調査が研究機関や増殖団体などにより行われている。これらの調査で採集された幼稚魚は、現場で魚体測定されることは少なく、標本の利用目的に応じて、冷蔵、冷凍、ホルマリン固定など様々な処理方法で保存される。固定後においてはサイズの変化が起こることが知られているが、生鮮時においても死後硬直などによるサイズの変化が知られている。魚類のホルマリンやアルコールなどの固定に伴う体サイズの変化は様々な魚類で報告されており、固定前の処理方法（Theilacker, 1980; Hunter, 1985; Jennings, 1991）、固定液の種類（Billy, 1982; Fowler and Smith, 1983; Hay, 1984; Glenn and Mathias, 1987; Kruse and Dalley, 1990; Morkert and Bergstedt, 1990; 大関ら, 1991; Hjørleifsson and Klein-MacPhee, 1992; Karjalainen, 1992; Theilacker and Porter, 1995; Shields and Carlson, 1996; Fisher *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2000; 安藤・宮腰, 2004; Joh *et al.*, 2003; Paradis *et al.*, 2007）、固定後の時間（牟田, 1951; 佐藤, 1972; Stobo, 1972; Lockwood, 1973; Lockwood and Daly, 1975; Takizawa *et al.*, 1994）、固定後の処理（小島, 1981）、体サイズ（Burgner, 1962; Farris, 1963; Engel, 1974; 福原, 1979;

Pepin *et al.*, 1998) やそれらの組み合わせによって変化が異なることが報告されている。また、冷蔵、氷蔵、冷凍・解凍に伴う体サイズの変化も様々な魚種で報告されているが、サケ属の幼稚魚を扱った報告は見あたらない (Lux, 1960; Halliday and Roscoe, 1969; Sayers, 1987; Treasurer, 1990; 夏目, 1995; Armstrong and Stewart, 1997; Blackwell *et al.*, 2003; 柳下ら, 2005; Chesnes *et al.*, 2009)。一方、冷蔵、冷凍・解凍の後にホルマリン固定した場合にはサケ属も含めて報告がなく、これらの処理による体サイズへの影響は不明である。また、固定後の体サイズを用いて生時の体サイズ推定を行う場合、これまで前処理の方法については検討されてこなかった。

本報告では、サケ幼稚魚の冷凍や冷蔵による体サイズの変化、さらにそれらの処理後の固定による体サイズの変化を明らかにした。また、異なる成長段階の魚を用いることで、体サイズの違いが冷凍・冷蔵や固定がもたらす変化に及ぼす影響を検討した。

試料および方法

処理方法 標本の生測定時の体長および体重の測定値に対する、冷凍・解凍、冷蔵、冷蔵+冷凍・解凍 (以下、保存処理) 後の測定値の変化、およびその後のホルマリン・エタノール固定後の測定値の変化を明らかにするために、次の4試験区を設定した; 試験区1: 冷凍・解凍による変化、試験区2: 冷蔵による変化、試験区3: 冷蔵と冷凍・解凍による変化、対照区: ホルマリン・エタノール固定のみ。なお、本研究におけるホルマリン・エタノール固定は、ホルマリン溶液に浸漬して標本を固定した後、硬組織の脱灰を

防ぐため、70%エタノール溶液に移し替えて保存するまでの過程とし (安藤・宮腰, 2004)、以後文章中では固定とのみ記す。

用いたサケ幼稚魚は、浮上した後、2008年1月20日からさけます・内水面水産試験場 道東支場において9.5℃の水温で飼育してきた。各試験区において1回の試験で40尾の測定を行った。標本への死後硬直による影響をできる限り同じにするため20尾ずつサケ幼稚魚に麻酔 (FA100, DSファーマアニマルヘルス, 大阪) をかけて殺した後、測定し、ただちに保存処理、または固定を行った。

試験区1の冷凍・解凍は、-20℃で1週間保存した後、5℃で24時間かけて解凍した。試験区2の冷蔵は、5℃で24時間行った。試験区3では試験区2と同様に冷蔵した後、試験区1と同様に冷凍・解凍を行った。冷蔵または冷凍する場合には、乾燥による収縮を防ぐため、キムタオル (日本製紙クレシア, 東京) 上に標本を20個体並べ、霧吹きで十分湿らせた状態でチャック付きポリ袋に入れ密封して保存した。各試験区において標本は、保存処理後もしくは死後に、常温で5%中性ホルマリンに4時間浸漬して固定し、軽く水洗した後70%エタノール (アマノールNR, 甘糟化学産業, 東京) に移し替え、測定まで常温で1週間保存した。標本は、保存時には殺した順に並べて区別し、固定時には順に糸で綴って1個体ずつ区別した。各試験区において、死後、保存処理後 (試験区3では冷蔵後と冷凍・解凍後)、および固定後に、体長として尾叉長をデジタルノギスを用いて0.01 mmまで、体重は電子天秤を用いて0.001 gまで測定した。

各試験は、体長の違いによる変化の違いをみるため、サイズを変えて3回行った (サイズグループ 1: 約43 mm, 2月

Table 1 Means and standard deviations of fork length and body weight of specimens for each experiment (40 specimens in each group).

Experiments	Size group	Fork length (mm)	Body weight (g)
1	1	42.98 ± 1.99 (38.15 — 47.53)	0.570 ± 0.089 (0.365 — 0.822)
	2	50.80 ± 2.96 (45.01 — 56.67)	1.029 ± 0.193 (0.675 — 1.479)
	3	67.81 ± 4.98 (58.78 — 79.37)	2.326 ± 0.579 (1.513 — 4.244)
2	1	42.96 ± 1.76 (38.11 — 45.95)	0.568 ± 0.080 (0.366 — 0.728)
	2	49.83 ± 2.75 (43.91 — 57.64)	0.954 ± 0.152 (0.657 — 1.322)
	3	68.41 ± 5.24 (57.23 — 80.43)	2.298 ± 0.500 (1.403 — 3.444)
3	1	42.60 ± 1.61 (38.93 — 46.23)	0.548 ± 0.072 (0.391 — 0.681)
	2	50.65 ± 2.70 (43.07 — 55.48)	1.003 ± 0.178 (0.515 — 1.403)
	3	69.12 ± 4.16 (60.39 — 79.41)	2.426 ± 0.443 (1.625 — 3.674)
Control	1	42.57 ± 2.22 (34.84 — 46.15)	0.539 ± 0.088 (0.277 — 0.718)
	2	49.73 ± 2.99 (42.24 — 54.30)	0.960 ± 0.174 (0.587 — 1.287)
	3	67.80 ± 4.20 (59.45 — 76.63)	2.221 ± 0.370 (1.500 — 3.054)

Experiment 1: Formalin and ethanol fixation after freezing and thawing; Experiment 2: Formalin and ethanol fixation after chilling; Experiment 3: Formalin and ethanol fixation after chilling plus freezing and thawing; Control: Formalin and ethanol fixation after death

1日測定, サイズグループ 2: 約50 mm, 2月20日測定, サイズグループ 3: 約70 mm, 4月2日測定; Table 1; 以降, サイズグループをSGと表記する)。各SGは体長においてほとんど重なりがなかった。

計算方法 処理前と比較した処理後の体長および体重の変化率 (Changing rate) を以下の式によって算出した。

$$\text{Changing rate (\%)} = (M_b - M_a) / M_a \times 100$$

M_a : 処理前の測定値, M_b : 処理後の測定値。aには生 (raw), 冷凍・解凍 (freeze), 冷蔵 (chill), 冷蔵+冷凍・解凍 (chill+freeze) が入る; bには冷凍・解凍 (freeze), 冷蔵 (chill), 冷蔵+冷凍・解凍 (chill+freeze), 固定 (fix) が入る。

変化率は比率であり, 正規分布を仮定できないので, non parametric検定である *Kruskal-Wallis test* でSG間の違いの有無を検討し, *Scheffé's test* で群間の事後比較を行った。有意水準は5%とした。

結果

試験区1 (冷凍・解凍後に固定) 体長では, 生測定値に対する冷凍・解凍後測定値の変化率はSG間で有意な差が認められ ($\chi^2 = 52.54, p < 0.0001$), 平均値はSG1がSG2およびSG3より2%程度大きな負の値を示し, 小さいサイズでは収縮が大きかった (Table 2)。一方, 冷凍・解凍後測定値に対する固定後測定値の変化率はSG間で差が認められなかった ($\chi^2 = 2.48, p = 0.29$)。生測定値に対する固定後測定値の変化率は, 生測定値に対する冷凍・解凍後測定値の変化率と同様にSG間で差が認められ ($\chi^2 = 48.99, p < 0.0001$), SG1がもっとも大きな負の値を示した。

体重では, 生測定値に対する冷凍・解凍後測定値の変化

率はSG間で有意な差が見られ ($\chi^2 = 38.74, p < 0.0001$), 平均値はSG1がSG2およびSG3より有意に大きな負の値を示し, 小さいサイズでは減少が大きかった (Table 2)。冷凍・解凍後測定値に対する固定後測定値の変化率においてもSG間に有意な差が見られた ($\chi^2 = 79.55, p < 0.0001$)。冷凍・解凍後測定値に対する固定後測定値の変化率の平均値は-15~-27%と生測定値に対する冷凍・解凍後測定値の変化率の2~4倍になり, SG3, SG1, SG2の順に絶対値が大きかった。生測定値に対する固定後測定値の変化率も冷凍・解凍後測定値に対する固定後測定値の変化率と同様にSG間で差が認められ ($\chi^2 = 66.44, p < 0.0001$), 平均値の大きさも同じ順番であった。

試験区2 (冷蔵後に固定) 冷蔵したサケ幼稚魚は死後24時間後では, 腹部の皮膚が溶け, 消化管が露出している個体もあった。

体長は, 冷蔵後においては, 生測定値に対する変化率が体長の小さな個体では正の値を示し, 体長が伸長した場合もあったが, 大部分の個体は負の値を示し, 収縮した (Table 3)。生測定値に対する冷蔵後測定値の変化率はSG間で有意な差が見られ ($\chi^2 = 92.85, p < 0.0001$), 変化率の平均は大きなサイズのSGほど負に大きな値を示した。冷蔵後測定値に対する固定後測定値の変化率は, 平均値がすべての群において負の値をとり, SG間で有意な差が認められたが ($\chi^2 = 16.62, p < 0.001$), 生測定値に対する冷蔵後測定値の変化率とは異なり, SG2が有意に他の2群より小さな絶対値をとった。生測定値に対する固定後測定値の変化率もSG間で有意な差が見られ ($\chi^2 = 75.28, p < 0.0001$), 大きなサイズのSGで大きな負の値を示した。

体重では, 生測定値に対する冷蔵後測定値の変化率は, 大型の個体では負の値を示した個体があったが, 小型の個

Table 2 Means and standard deviations (ranges) of changing rate in fork length and body weight after treatments in Experiment 1 (formalin and ethanol fixation after freezing and thawing). M_{raw} : measurements after death; M_{freeze} : measurements after freezing and thawing; M_{fix} : measurements after fixation

Changing rates	Size group	Fork length		Multiple comparisons	Body weight		Multiple comparisons
		Mean \pm SD	Range		Mean \pm SD	Range	
$M_{\text{raw}} - M_{\text{freeze}}$	1	-5.07 \pm 1.08	-7.15 — -2.87	b	-9.89 \pm 2.40	-15.91 — -5.56	b
	2	-2.93 \pm 0.89	-4.93 — -1.07	a	-7.32 \pm 2.06	-12.03 — -2.30	a
	3	-2.89 \pm 1.38	-6.38 — -0.39	a	-6.24 \pm 1.96	-10.66 — -2.43	a
$M_{\text{freeze}} - M_{\text{fix}}$	1	-3.56 \pm 1.33	-6.81 — -0.44	ns	-22.29 \pm 4.72	-32.27 — -12.20	b
	2	-3.15 \pm 1.05	-5.44 — -0.90	ns	-15.51 \pm 2.98	-22.69 — -9.98	a
	3	-3.32 \pm 1.15	-5.43 — -0.44	ns	-27.16 \pm 1.50	-31.34 — -24.54	c
$M_{\text{raw}} - M_{\text{fix}}$	1	-8.45 \pm 1.44	-10.81 — -5.15	b	-29.96 \pm 4.93	-39.47 — -18.42	b
	2	-5.99 \pm 1.03	-8.12 — -3.79	a	-21.69 \pm 3.30	-30.72 — -15.72	a
	3	-6.13 \pm 1.08	-8.57 — -4.41	a	-31.72 \pm 1.74	-35.43 — -27.38	b

Multiple comparisons followed by the same letter(s) did not differ significantly from each other. Letters indicate mean value, with the letter "a" indicating the largest mean value, "b" indicating next to "a," and "c" indicating the smallest mean value. ns: not significant.

Table 3 Means and standard deviations (ranges) of changing rate in fork length and body weight after treatments in Experiment 2 (formalin and ethanol fixation after chilling). M_{raw} : measurements after death; M_{chill} : measurements after chilling; M_{fix} : measurements after fixation

Changing rates	Size group	Fork length		Multiple comparisons	Body weight		Multiple comparisons
		Mean \pm SD	Range		Mean \pm SD	Range	
$M_{\text{raw}} - M_{\text{chill}}$	1	0.79 \pm 0.70	-0.56 — 2.90	a	4.10 \pm 1.54	0.83 — 7.47	a
	2	-1.43 \pm 0.92	-4.49 — 0.23	b	2.24 \pm 1.11	0.25 — 5.14	b
	3	-2.76 \pm 0.73	-4.11 — -0.96	c	0.95 \pm 0.68	-0.68 — 2.26	c
$M_{\text{chill}} - M_{\text{fix}}$	1	-1.82 \pm 0.76	-3.50 — 0.38	b	-10.55 \pm 4.76	-20.60 — -0.67	b
	2	-1.02 \pm 0.80	-2.86 — 0.97	a	-2.97 \pm 3.55	-10.23 — 1.86	a
	3	-1.67 \pm 1.04	-4.39 — 0.35	b	-4.09 \pm 3.08	-10.09 — 1.61	a
$M_{\text{raw}} - M_{\text{fix}}$	1	-1.05 \pm 1.02	-3.91 — 2.20	a	-6.87 \pm 5.40	-16.76 — 4.43	c
	2	-2.43 \pm 1.21	-5.55 — 0.26	b	-0.81 \pm 3.67	-8.32 — 4.22	a
	3	-4.39 \pm 1.06	-7.12 — -1.65	c	-3.17 \pm 3.22	-9.83 — 2.57	b

Multiple comparisons followed by the same letter(s) did not differ significantly from each other. Letters indicate mean value, with the letter “a” indicating the largest mean value, “b” indicating next to “a,” and “c” indicating the smallest mean value.

体では正の値を示した (Table 3)。生測定値に対する冷蔵後測定値の変化率は、SG間で有意な差が認められ ($\chi^2 = 69.42, p < 0.0001$)、サイズが小さなSGほど正の大きな平均値を示し、サイズが小さいほど変化の度合いが大きかった。一方、体重の冷蔵後測定値に対する固定後測定値の変化率は大部分が負の値を示したが、大きな個体では正の値を示す個体も見られた。体重の冷蔵後測定値に対する固定後

測定値の変化率はSG間で有意な差が認められ ($\chi^2 = 47.52, p < 0.0001$)、SG1が他の2群より有意に大きな負の値を示した。体重の生測定値に対する固定後測定値の変化率もSG間で有意な差が見られ ($\chi^2 = 28.24, p < 0.0001$)、平均値は3群とも負の値を示し、SG1、SG3、SG2の順に負に大きな値をとり、SG2がもっとも収縮が小さかった。

試験区3 (冷蔵+冷凍・解凍後に固定) 生測定値に対す

Table 4 Means and standard deviations (ranges) of changing rate in fork length and body weight after treatments in Experiment 3 (formalin and ethanol fixation after chilling plus freezing and thawing). M_{raw} : measurements after death; M_{chill} : measurements after chilling; M_{freeze} : measurements after freezing and thawing; $M_{\text{chill+freeze}}$: measurements after chilling plus freezing and thawing; M_{fix} : measurements after fixation

Changing rates	Size group	Fork length		Multiple comparisons	Body weight		Multiple comparisons
		Mean \pm SD	Range		Mean \pm SD	Range	
$M_{\text{raw}} - M_{\text{chill}}$	1	-0.73 \pm 0.69	-0.64 — 1.96	a	4.16 \pm 1.51	0.97 — 7.16	a
	2	-1.35 \pm 0.80	-3.32 — 0.94	b	1.15 \pm 0.63	-0.50 — 2.18	b
	3	-3.18 \pm 0.71	-4.71 — -1.80	c	1.13 \pm 0.55	0.30 — 2.28	b
$M_{\text{chill}} - M_{\text{freeze}}$	1	-4.05 \pm 1.56	-6.66 — 1.36	c	-14.59 \pm 3.34	-26.01 — -10.03	c
	2	-2.22 \pm 0.69	-3.80 — -0.72	b	-8.66 \pm 3.41	-19.49 — -1.70	b
	3	-1.03 \pm 0.75	-3.04 — 0.72	a	-3.21 \pm 2.07	-8.38 — 1.56	a
$M_{\text{raw}} - M_{\text{chill+freeze}}$	1	-3.35 \pm 1.58	-6.29 — 1.38	a	-11.03 \pm 3.69	-20.72 — -5.21	c
	2	-3.55 \pm 0.88	-5.78 — -1.71	a	-7.62 \pm 3.41	-18.24 — -1.48	b
	3	-4.18 \pm 0.55	-5.18 — -2.98	b	-2.12 \pm 1.90	-7.13 — 2.54	a
$M_{\text{chill+freeze}} - M_{\text{fix}}$	1	-3.27 \pm 1.62	-10.43 — -0.15	b	-18.88 \pm 5.85	-32.34 — -4.57	b
	2	-2.58 \pm 1.15	-5.36 — -0.38	b	-16.89 \pm 3.44	-22.57 — -10.72	ab
	3	-2.03 \pm 0.55	-3.52 — -1.18	a	-14.98 \pm 2.53	-20.25 — -10.33	a
$M_{\text{raw}} - M_{\text{fix}}$	1	-6.53 \pm 1.27	-9.19 — -4.19	ns	-27.81 \pm 6.26	-39.36 — -15.00	b
	2	-6.04 \pm 1.19	-8.20 — -3.03	ns	-23.28 \pm 3.17	-31.29 — -17.44	b
	3	-6.13 \pm 0.72	-8.28 — -4.67	ns	-16.82 \pm 1.78	-20.80 — -13.18	a

Multiple comparisons followed by the same letter(s) did not differ significantly from each other. Letters indicate mean value, with the letter “a” indicating the largest mean value, “b” indicating next to “a,” and “c” indicating the smallest mean value. ns: not significant.

る冷蔵後測定値の変化率は、体長、体重の双方とも試験区2の保存処理と同じなので省略した。

体長では、冷蔵後測定値に対する冷凍・解凍後測定値の変化率は、SG間で有意な差が認められ ($\chi^2 = 74.70, p < 0.0001$)、生測定値に対する冷蔵後測定値の変化率とは逆に、小さなSGで負の大きな値を示した (Table 4)。生測定値に対する冷蔵+冷凍・解凍後測定値の変化率は、ほとんどの個体が負の値を示した。生測定値に対する冷蔵+冷凍・解凍後測定値の変化率は、SG間で有意な差が認められ ($\chi^2 = 13.18, p < 0.01$)、SG3がSG1およびSG2より負に大きな値を示した。冷蔵+冷凍・解凍後測定値に対する固定後測定値の変化率は、SG間で有意な差が見られ ($\chi^2 = 24.46, p < 0.0001$)、SG3がSG1およびSG2より有意に小さな負の値を示した。生測定値に対する固定後測定値の変化率はSG間に有意な差が見られず ($\chi^2 = 2.83, p = 0.2429$)、サイズによる収縮の程度に違いはなかった。

体重では、冷蔵後測定値に対する冷凍・解凍後測定値の変化率は、SG間で有意な差が認められ ($\chi^2 = 88.31, p < 0.0001$)、体長と同様に小さなSGで負の大きな値を示した (Table 4)。生測定値に対する冷蔵+冷凍・解凍後測定値の変化率は、大型の個体で正の値を示した個体もあったが、大部分が負の値を示した。生測定値に対する冷蔵+冷凍・解凍後測定値の変化率は、SG間で有意な差が見られ ($\chi^2 = 76.27, p < 0.0001$)、変化率の平均値はSG1、SG2、SG3の順に負に大きな値をとり、小さなサイズほど体重の減少が著しかった。冷蔵+冷凍・解凍後測定値に対する固定後測定値の変化率は、SG間で有意な差が見られ ($\chi^2 = 12.32, p < 0.01$)、SG1がSG3より有意に大きな負の値を示したが、それ以外の組み合わせでは有意な違いはなかった。生測定値に対する固定後測定値の変化率は、すべての個体が負の値を示し、生測定時より10%以上も重量が減少した。生測定値に対する固定後測定値の変化率は、SG間で有意な差が見られ ($\chi^2 = 71.73, p < 0.0001$)、SG3がSG1およびSG2より有意に変化率が小さく、サイズが小さいほど収縮が大きかった。

対照区 (固定のみ) 体長は固定後にすべての個体で変化

率が負の値を示し、収縮した (Table 5)。体重ではSG1では大部分の個体が負の変化率を示したが、大型の個体では正の変化率を示した個体が多かった。

体長および体重の変化率は固定後においてSG間に有意な差が認められた (体長 $\chi^2 = 19.41, p < 0.0001$; 体重 $\chi^2 = 58.52, p < 0.0001$)。体長ではSG2がSG1およびSG3より、変化率が小さく、収縮が小さかった。一方、体重ではSG1がSG2およびSG3より有意に負の大きな値をとり、小さいサイズでは体重の減少が大きかった (Table 5)。

考 察

本試験の結果から、体長および体重は冷凍・解凍、冷蔵、冷蔵+冷凍・解凍による保存後またはホルマリン・エタノール固定後において、処理方法や魚体サイズの違いによって変化率が大きく異なることが明らかになった。

体長、体重の双方で、生測定値に対する固定後測定値の変化率は各保存処理後測定値の生測定値に対する変化率と保存処理後測定値に対する固定後測定値の変化率のおおよその和となっており、各保存処理および固定が体長および体重に及ぼす影響は相加的に働いていたと考えられた。

保存処理による影響

魚類の死後の筋肉に観察される変化として、死後硬直や解硬にともなう軟化が挙げられる (山中, 1991)。また、タンパク質の分子構造に変化が生じることによって起こる変性も知られている (西元, 1986)。本研究において、保存処理 (冷凍・解凍、冷蔵、冷蔵+冷凍・解凍) 後に起こった体長および体重の変化は、上記の現象が関与していると考えられる。

本研究において、冷蔵後では体長は小さい個体では伸長したのに対し、大きい個体では収縮した。一方、体重では冷蔵後にすべてのSGで平均値が増加した。魚肉は死後硬直の後に軟化し、軟化は筋原繊維の小片化などによるものと推察されている (関, 1991)。冷蔵後では自己消化が進

Table 5 Means and standard deviations (ranges) of changing rate in fork length and body weight after treatments in control (formalin and ethanol fixation after death). M_{raw} : measurements after death; M_{fix} measurements after fixation

Changing rates	Size group	Fork length		Multiple comparisons	Body weight		Multiple comparisons
		Mean \pm SD	Range		Mean \pm SD	Range	
$M_{\text{raw}} - M_{\text{fix}}$	1	-3.79 \pm 1.00	-5.49 — -1.14	b	-6.90 \pm 3.75	-13.84 — -0.37	b
	2	-2.86 \pm 0.80	-4.37 — -0.38	a	-0.31 \pm 3.15	-6.57 — 5.09	a
	3	-3.27 \pm 0.76	-4.75 — -1.01	b	0.99 \pm 3.45	-5.33 — 7.57	a

Multiple comparisons followed by the same letter(s) did not differ significantly from each other. Letters indicate mean value, with the letter "a" indicating the largest mean value, "b" indicating next to "a," and "c" indicating the smallest mean value.

んでいると思われる個体も見られており、小さな個体では冷蔵前の測定などによるハンドリングで魚体の温度が上がりやすく、筋肉の変化が早まると予想される。大きなサイズでは筋肉の軟化が小さいサイズより相対的に少なかったため、タンパク質の変性により体長が収縮したのに対し、小さいサイズでは筋肉の軟化が進んだため、体長が伸長したと思われた。筋肉の軟化に伴い筋原繊維の保水力は低下するが（関, 1991）、水分の再接触により筋原繊維に水分が再吸着する（関ら, 1985）。本研究では乾燥を防ぐために冷蔵前に霧吹きで充分湿らせたため、筋原繊維の小片化が進んだと思われる小さいサイズでは、水分の再吸着量が大きなサイズより相対的に大きくなったことにより、体重が増加したと思われた。

冷凍・解凍後（冷蔵後も含む）では、体長、体重はともに処理前の状態に比べて収縮または減少しており、小さな個体では大きな個体より収縮／減少が大きかった。冷凍・解凍にともなう魚類の筋肉の変化としては、解凍硬直やタンパク質の凍結変性が知られている（山中ら, 1978; 西元, 1986）。これらの変化は発生する機序が異なり、解凍硬直は死後硬直と同様に筋肉中のATP量が減少することにより筋繊維が伸展性を失い硬直し収縮するのに対し（山中ら, 1978）、タンパク質の凍結変性はタンパク質が凍結によって分子内の高次構造が不可逆的に変化する（新井, 2002）。本研究では、冷蔵し、自己消化が進んだと思われた場合においても冷凍・解凍後に収縮が見られたことから、死後硬直もしくは解凍硬直による収縮ではないと考えられる。そのため、本研究における冷凍・解凍後の体長の収縮や体重の減少は、冷凍変性による筋肉の収縮と筋肉内の水分が失われたことによる重量の減少によって引き起こされたと考えられた。

冷凍・解凍後の体長収縮は、冷蔵後では死後より小さかったことは、冷蔵中の筋肉の軟化とタンパク質の変性により、冷凍変性の程度が小さくなったことによると思われた。一方、冷凍・解凍後の体重減少は、小さいサイズにおいて冷蔵後が死後に比べて大きかった。この結果は、小さいサイズでは筋原繊維の小片化が進んだため、再吸着していた水分が冷凍・解凍により流出したのではないかと考えられた。

冷凍・解凍後ではタイセイヨウサケ *Salmo salar* やイエローパーチ *Perca flavescens* の幼稚魚やシスコ *Coregonus artedii* では体長の小さい個体が大きな個体より体長が収縮することが報告され（Engel, 1974; Armstrong and Stewart, 1997; Paradis *et al.*, 2007）、本研究の結果も一致した。他魚種の大型個体の冷凍・解凍後における体長収縮では体長による収縮程度の違いは報告されていない（Lux, 1960; Halliday and Roscoe, 1969; Sayers, 1987; Treasurer,

1990; 夏目, 1995; Blackwell *et al.*, 2003; 柳下ら, 2005; Chesnes *et al.*, 2009）。このような相違は魚種の違い以外に、成長段階の違いが影響している可能性がある。本研究で用いたサケ幼稚魚の体長範囲（40-70 mm）では、骨格が軟骨から硬骨に置き換わる時期に当たる（帰山, 1986）。また、サケ幼稚魚は体長50～80 mmに各体部分長比が安定するが、体高比では体長50 mmまで増加し、頭長比は体長38 mmから体長56 mmまで減少する（帰山, 1986）。このことは、浮上時から体長約50～56 mmにかけて躯幹部の増大が大きく、筋肉量の増加が著しいことを示唆している。SG1（体長約43 mm）からSG2（約50 mm）にかけては上記の躯幹部の増大が著しい時期に相当しているが、SG3（約70 mm）は各部分の体長比が安定する時期に相当する。タンパク質の凍結変性による筋肉の収縮程度は体長によって差がないかもしれないが、化骨の進行程度や躯幹部の増大程度によって収縮に差が生じたのかもしれない（Jennings, 1991）。ただし、保存にともなう体サイズの変化の原因は、実際の組織観察に基づいたものではない。今後は組織観察などを通して体サイズの変化の原因を明らかにする必要があるだろう。

保存処理後の固定による影響

体長および体重の双方とも、サケ幼稚魚は、サイズが異なっても、冷凍・解凍後または冷蔵+冷凍・解凍後に固定した場合に、冷蔵処理後に固定した場合もしくは固定のみの場合より収縮／減少が大きく、冷凍・解凍処理を経た後に固定した場合、サケ幼稚魚は体長、体重ともに大きく収縮／減少することが明らかになった。特に体重では冷凍・解凍を含む処理後に固定した場合は、減少が元の体重の20～30%に達する場合もあった。

ホルマリンはその中に含まれているホルムアルデヒドがタンパク質のアミノ基に結合し、架橋構造を形成することによりタンパク質の変性を起こし、収縮をもたらす。体長においては、固定前のいずれの保存方法によらず固定により保存後から収縮した。この結果は、筋肉のタンパク質の冷凍変性や軟化による筋原繊維の小片化があったとしても、固定によりさらに変性する余地があることを示している。

体重においては、保存後の固定では大部分で減少したが、冷蔵後に固定した場合やただ固定した場合では増加した場合があった。ホルマリンだけの固定においては、魚体にパラホルムアルデヒドが沈着することによって体重が増加することが示唆されている（白石ら, 1955）。一方、サケとカラフトマスホルマリン・エタノール固定（本研究における固定と同じ）した場合においては体重が減少することが報告されている（安藤・宮腰, 2004）。安藤・

宮腰 (2004) においては、ホルマリン固定後のエタノール固定期間が約70日と本研究における1週間より長い。エタノールは脱水作用があるため、長期間のエタノール固定が水分の減少を引き起こし、体重の減少をもたらしたものと思われた。一方、固定前の冷蔵処理の有無が違いをもたらした可能性もある。上述したように、冷蔵中に筋肉の筋原繊維が小片化している可能性があり、小片化したことによりパラホルムアルデヒドの沈着量が増加したのかもしれない。

冷凍・解凍後の固定では体重が大きな魚体サイズで非常に大きく減少した。同じ処理における体長では固定により顕著な収縮が認められていないので、体重の減少は筋肉全体の収縮にともなう減少とは異なる原因である可能性がある。サクラマスではスモルト化の進行にともない水分量が増加することが報告されている (永田, 1997)。サケ幼稚魚は体長50 mmくらいからグアニン色素が沈着し始め (帰山, 1986)、スモルト化が始まると思われる。サケ幼稚魚においてもサクラマスと同様にスモルト化の進行にともなう水分量が増加し、固定により大きく水分が失われたのかもしれない。ただし、冷蔵を経た場合にはこのような現象は観察されていないことから、別の要因が働いている可能性もある。この原因の探求には組織学的な観察が必要であると思われる。

変化率は、保存後の変化率が固定によってさらに低下していたが、体サイズによる違いや保存による違いは保存後と固定後では傾向がほぼ同じであった。このため、固定後の変化率は保存によって傾向が決定され、固定によってさらに増大していると考えられた。このことは固定前の処理が固定後の体サイズに非常に大きな影響を与えることを示しており、固定前のたどった経過が異なる標本の体サイズを比較するときには注意する必要がある。体長においては特に小さいサイズでは収縮が大きいので、一層の注意を要する。体重においては冷凍した後、重量の減少が著しく、変動の幅も非常に大きくなった。ホルマリン・エタノール固定のみの標本は全般的に固定に伴うサイズの変化が小さいので、可能であればこの方法を使用した方がよい。他方、冷凍・解凍を経た標本はサイズの変化が大きいため、測定値を使用する際には注意が必要である。

謝 辞

さけます・内水面水産試験場道東支場の伊藤清子氏には標本の測定を手伝っていただいた。さけます・内水面水産試験場の村上豊氏には試験魚を提供していただいた。2名の査読者と編集委員には建設的な意見を頂いた。ここに記して感謝します。

引用文献

- 安藤大成, 宮腰靖之. 固定方法の違いによるサケ・マス稚魚の体サイズ変化. 北海道立水産孵化場研究報告 2004 ; 58 : 17-32.
- 新井健一. 水産動物筋肉タンパク質の変性と制御. 日本水誌 2002 ; 68 : 137-143.
- Armstrong JD, Stewart DC. The effects of initial length and body curvature on shrinkage of juvenile Atlantic salmon during freezing. *J. Fish Biol.* 1997 ; 50 ; 903-905.
- Billy AJ. The effects of formalin and isopropyl alcohol on length and weight measurements of *Sarotherodon mossambicus* Trewavas. *J. Fish Biol.* 1982 ; 21 : 107-112.
- Blackwell BG, Hubers MJ, Losco RG. Postharvest length changes of angler-caught walleyes. *N. Am. J. Fish. Manag.* 2003 ; 23 : 770-778.
- Burgner, R. L. Studies of red salmon smolts from the Wood River Lakes, Alaska. In: Koo TS (ed). *Studies of Alaska Red Salmon*. University of Washington Press, Seattle, USA. 1962 ; 247-314.
- Chesnes TC, Waldner RE, Krahforst CS. Postmortem length changes in six Florida fish species stored on ice. *N. Am. J. Fish. Manag.* 2009 ; 29 : 1242-1252.
- Cunningham MK, Granberry WF Jr., Pope KL. Shrinkage of inland silverside larvae preserved in ethanol and formalin. *N. Am. J. Fish. Manag.* 2000 ; 20 : 816-818.
- Engel S. Effects of formalin and freezing on length, weight and condition factor of cisco and yellow perch. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1974 ; 103 : 136-138.
- Farris DA. Shrinkage of sardine (*Sardinops caerulea*) larvae upon preservation in buffered formalin. *Copeia* 1963 ; 1963 : 185-186.
- Fisher SJ, Anderson MR, Willis DW. Total length reduction in preserved yellow perch larvae. *N. Am. J. Fish. Manag.* 1998 ; 18 : 739-742.
- Fowler GM, Smith SJ. Length changes in silver hake (*Merluccius bilinearis*) larvae: effects of formalin, ethanol, and freezing. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 1983 ; 40 : 866-870.
- 福原 修. ホルマリン固定によるマダイ卵稚仔の収縮について. 水産増殖 1979 ; 27 : 129-136.
- Glenn CL, Mathias JA. Body shrinkage in young walleye, *Stizostedion vitreum*, preserved with AFA, formalin, ethanol and quick freezing. *Can. Field-Nat.* 1987 ; 101 : 408-414.
- Halliday RG, Roscoe B. The effects of icing and freezing on

- the length and weight of groundfish species. *Int. Comm. Northwest Atlantic Fish. Res. Doc.* 1969 ; 69 : 1-13.
- Hay DE. Weight loss and change of condition factor during fixation of Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, eggs and larvae. *J. Fish Biol.* 1984 ; 25 : 421-433.
- Hjörleifsson E, Klein-MacPhee G. Estimation of live standard length of winter flounder *Pleuronectes americanus* larvae from formalin-preserved, ethanol-preserved and frozen specimens. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1992 ; 82 : 13-19.
- Hunter JR. Preservation of northern anchovy in formaldehyde solution. *NOAA Tech. Rep. NMFS* 1985 ; 36 : 63-65.
- 伊藤絹子, 掛川 武. 河口汽水域を利用する魚類の食物源. 「安定同位体スコープで覗く海洋生物の生態-アサリからクジラまで (富永 修, 高井則之編)」 恒星社厚生閣, 東京. 2008 ; 70-84.
- Jennings S. The effects of capture, net retention and preservation upon lengths of larval and juvenile bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Biol.* 1991 ; 38 : 349-357.
- Joh M, Takatsu T, Nakaya M, Imura K, Higashitani T. Body-length shrinkage of marbled sole *Pseudopleuronectes yokohamae* larvae preserved in formalin and ethanol solutions. *Suisanzoshoku* 2003 ; 51 : 227-228.
- 婦山雅秀. サケ *Oncorhynchus keta* (Walbaum) の初期生活に関する生態学的研究. 北海道さけ・ますふ化場研究報告 1986 ; 40 : 31-92.
- Karjalainen J. Effects of different preservation methods on total length and weight of larval vendace (*Coregonus albula* (L.)). *Nordic J. Freshwater Res.* 1992 ; 67 : 88-90.
- 小島 博. ホルマリン固定したサクラマス幼魚標本に対する水洗の影響. 北海道立水産孵化場研究報告 1981 ; 36 : 75-81.
- Kruse GH, Dalley EL. Length changes in capelin, *Mallotus villosus* (Müller), larvae due to preservation in formalin and anhydrous alcohol. *J. Fish Biol.* 1990 ; 36 : 619-621.
- Lockwood SJ. Weight and length changes of 0-group plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after preservation in 4% neutral formalin. *J. Cons. int. Explor. Mer* 1973 ; 35 : 100-101.
- Lockwood SJ, Daly CB. Further observations on the effects of preservation in 4% neutral formalin on the length and weight of 0-group flatfish. *J. Cons. int. Explor. Mer* 1975 ; 36 : 170-175.
- Lux FE. Length shrinkage of yellowtail flounder between live and landed condition. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1960 ; 89 : 373-374.
- Misaka N, Koyama T, Mizuno S, Kasahara N. Analysis of glucose, triglyceride and RNA/DNA ratio to evaluate starvation in hatchery-reared and wild juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *NPAFC Tech. Rep.* 2001 ; 2 : 28-29.
- 三坂尚行, 水野伸也, 宮腰靖之, 竹内勝巳, 鷹見達也, 笠原昇. 飢餓中のサクラマス当歳魚の肝臓におけるトリグリセリドおよびグリコーゲン含量の変動. 日水誌 2004 ; 70 : 168-174.
- 水野伸也. 通し回遊性サケ目魚類の種苗生産技術向上に関する研究. 日水誌 2009 ; 75 : 644-647.
- Mizuno S, Misaka N, Teranishi T, Ando D, Koyama T, Araya K, Miyamoto M, Nagata M. Physiological effects of an iron citrate dietary supplement on chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry. *Aquaculture Sci.* 2008 ; 56 : 531-542.
- Morkert SB, Bergstedt RA. Shrinkage of sea lamprey larvae preserved in formalin. *N. Am. J. Fish. Manag.* 1990 ; 10 : 484-486.
- 牟田邦甫. マイワシのホルマリン固定による体長・体重の変化. 昭和24年度長崎県水産試験場事業報告 1951 ; 92-98.
- 永田光博. スモルト化時期におけるサクラマスの水分量およびカロリー量. 北海道立水産孵化場研究報告 1997 ; 51 : 1-9.
- 夏目雅史. 死後硬直による魚体長収縮. 北海道立水産試験場研究報告 1995 ; 47 : 1-6.
- 西元諄一. 低温貯蔵中における魚肉タンパク質変性と品質. 「魚の低温貯蔵と品質評価法 (小泉千秋編)」 恒星社厚生閣, 東京. 1986 ; 77-86.
- 大関芳沖, 渡辺良朗, 久慈康支, 高橋章策. サンマ仔稚魚の固定に伴う体長収縮. 東北区水産研究所研究報告 1991 ; 53 : 15-21.
- Paradis Y, Brodeur P, Mingelbier M, Magnan P. Length and weight reduction in larval and juvenile yellow perch preserved with dry ice, formalin, and ethanol. *N. Am. J. Fish. Manag.* 2007 ; 27 : 1004-1009.
- Pepin P, Dower JF, Leggett WC. Changes in the probability density function of larval fish body length following preservation. *Fish. Bull.* 1998 ; 96 : 633-640.
- 佐藤 茂. ホルマリン固定による体長体重の変化について. 神奈川県淡水魚増殖試験場報告 1972 ; 10 : 88-91.
- Sayers RE Jr. Effects of freezing in and out of water on length and weight of Lake Michigan bloaters. *N. Am. J.*

- Fish. Manag.* 1987; 7: 299-301.
- 関 伸夫. 解硬に伴う筋肉の性状変化. 「魚類の死後硬直 (山中英明編)」 恒星社厚生閣, 東京. 1991; 31-41.
- 関 伸夫・松原 久・柳沢大貴・新井健一. コイ筋原繊維の保水能の加熱による変化. 日水誌 1985; 51: 793-798.
- Shields PA, Carlson SR. Effects of formalin and alcohol preservation on lengths and weights of juvenile sockeye salmon. *Alaska Fish. Res. Bull.* 1996; 3: 81-93.
- 白石芳一, 北森良之介, 北森真栄. 諏訪湖産ワカサギの成長並びにその鱗に関する研究. 淡水区水産研究所研究報告 1955; 4: 17-32.
- Stobo WT. Effects of formalin on the length and weight of yellow perch. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1972; 101: 362-364.
- Takizawa K, Fujita Y, Ogushi Y, Matsuno S. Relative change in body length and weight in several fish larvae due to formalin fixation and preservation. *Fish. Sci.* 1994; 60: 355-359.
- Theilacker GH. Changes in body measurements of larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other fishes due to handling and preservation. *Fish. Bull.* 1980; 78: 685-692.
- Theilacker GH, Porter SM. Condition of larval walleye Pollock, *Theragra chalcogramma*, in the western Gulf of Alaska assessed with histological and shrinkage indices. *Fish. Bull.* 1995; 93: 333-344.
- Treasurer JW. Length and weight changes in perch, *Perca fluviatilis* L., and pike, *Esox lucius* L., following freezing. *J. Fish Biol.* 1990; 37: 499-500.
- 柳下直己, 岩尾敦志, 山崎 淳. 氷上保存および解凍によるアカガレイの体長収縮. 京都府立海洋センター研究報告 2005; 27: 1-4.