

アリザリン・コンプレクソン (ALC) の経口投与による ヒラメ稚魚の耳石染色

高橋 庸一¹⁾

(日本栽培漁業協会小浜事業場)

緒 言

蛍光物質を用いた耳石の標識法は、種苗生産で得られた仔稚魚の耳石を、大量にかつ効率的に標識できる方法として開発された(TUKAMOTO 1985,1988)。マダイ(桑田・塚本 1987,1989)やヒラメ(日栽協 1988,1989,1990)では、アリザリン・コンプレクソン(以下、ALC)を用いた染色方法が実用化され、種苗の放流試験に応用されている。これらの染色方法は、いずれも蛍光物質を溶解させた飼育水中に仔稚魚を一定時間浸漬して耳石を染色する方法(以下、浸漬法)である。浸漬法では、一度に大量の標識付けが可能であり、卵や仔魚でも標識できること、また短時間で100%の標識成功率が期待でき、しかも標識の脱落がなく保有期間が長いなどの多くの利点がある(TUKAMOTO 1985)。しかし、染色時の問題として、止水条件下で染色を行うため仔稚魚へのストレスが大きく、大量斃死の原因になりやすいこと、染色のための作業手順が煩雑であること、さらに大量の種苗を標識するには多量のALCを要し、経費が膨大になることなどが挙げられ(桑田・塚本 1989; 土地・今井 1993)、解決すべき点は多い。

そこで、これらの問題点のうち、ALCの使用量を減少させることと、染色作業の手順を簡略化することに重点をおき、ALCを稚魚に直接摂餌させて、耳石の染色を図る方法(以下、経口投与方法)を検討した。その結果、経口投与によって効率良く耳石が染色できることが明らかになったので報告する。

材料と方法

1 ALCの投与方法

ヒラメ稚魚へのALC経口投与は、ALCを吸着させた市販の配合飼料(以下、ALC配合)を与える方法で行った。吸着させるALCの量は、配合飼料(粒径3mmのペレット)1kg当たり100, 500および1000mgの3段階を設定した(表1)。ALC配合の給餌期間は前もって特に設定せず、5日毎に耳石の染色状態を観察しながら、耳石が十分に染色されるまで給餌を続けた。

配合飼料へのALCの吸着方法は、以下の方法で行った。まず、100mlメスフラスコに約80mlの蒸留水を入れ、少量のNaH₂CO₃を加えてpHを弱アルカリに調整した。これにALC500mgを加え、スターラーで24時間攪拌して完全に溶解させた後、蒸留水を加えて調整し濃度5mg/mlのALC溶液とした。100mg区では、配合飼料250gにALC溶液5ml+蒸留水45mlを加えて十分に混ぜ合わせ、2~3時間

¹⁾ 現日本栽培漁業協会八重山事業場

風乾した後サンプル瓶に入れ冷蔵した。同様の方法で、500mg区ではA L C 溶液25ml+蒸留水25ml、1000mg区ではA L C 溶液50mlをそれぞれ250gの配合飼料に吸着させた。A L C 配合は、長期の保存は行わず、1回の製作量は1週間程度で使い切る量とした。

また、経口投与による染色と比較するため、浸漬法による耳石染色を行った。染色には30ℓポリカーボネイト水槽を用い、既往の方法(A L C 80ppm × 24時間浸漬)(日裁協 1988, 1989, 1990)に準じてヒラメ稚魚数個体を染色した。

2 飼育方法

供試魚は、1993年に行った種苗生産の過程で得られたもので、全長48.3mm、ふ化82日目の稚魚を用いた。A L C 配合の給餌期間には、透明500ℓポリカーボネイト水槽3面を飼育に用い、それぞれ300尾の稚魚を収容した。飼育水はろ過海水で約30回転/日の換水を行い、水温は自然水温(20℃前後)とした。A L C 配合の給餌を終了した個体は、20m³コンクリート水槽に設置した1m角の小割網3面に収容し、飼育を継続した。これらの飼育には、A L C を吸着させていない配合飼料を用い、飼育経過に伴う標識の保有状態を調べた。

A L C 配合および配合飼料の1日当たりの給餌量は、残餌が出ない程度の給餌量である稚魚の魚体重の2～3%を基準とし(高橋 1990)、これを成長に伴い4～2回/日に分けて与えた。なお、試験終了時にはA L C 配合の使用量と生残尾数から、1尾当たりのA L C 配合の給餌量とA L C 投与量を求めた(表1)。

3 耳石の観察

耳石の観察は、A L C 配合の給餌期間中は5日毎に、給餌終了後は10日毎に3回、その後は1か月毎に行った。1回当たりの調査尾数は、5尾または10尾とした。採集した個体は、全長を測定した後耳石(扁平石)を取り出し、70%エチルアルコールで保存した。また、染色の状態を比較するため、試験開始時にA L C 染色を施す前の個体から耳石を採集した。

耳石は、原則として有眼側のものを取り出したが、損傷または紛失した場合は無眼側の耳石を用いた。耳石の観察には、落射蛍光顕微鏡(G励起)を用いた。なお、耳石は研磨せずに観察したが、標識細部の識別が不明瞭な耳石は、オイルストーンで研磨後観察に供した。

結 果

A L C 配合の給餌により、耳石は周辺部が染色され、給餌5日目にはA L C 染色を施していない耳石と比較して、十分に判別可能な程度の染色が得られた(図版1)。染色の度合い(以下、染色度)はA L C 投与量に比例し、1000mg区でより明瞭であった。また個体によっては、5本の日周輪が数えられた。耳石周辺の染色された部分の幅は、A L C の濃度と給餌日数の増加に伴って増大し、染色度は500mg区の15日目と1000mg区の10日目が同程度であった。給餌15日目の1000mg区では、耳石周辺部はより鮮明に染色され、個体によっては給餌日数分の染色された日周輪が読み取れた。しかし、経口投与方法における染色度は、耳石全体が染色される浸漬法に比べて低かった(図版2)。なお、1000mg区の15日目の個体で、有眼側の櫛鱗を観察したが、A L C による染色は確認できなかった。

A L C 配合の給餌は、耳石の染色が充分であると判断した15日目で終了した。ヒラメ稚魚による A L C 配合の摂餌状態は、各実験区とも、毎日の最初の摂餌は活発であったが、A L C 濃度が高い区ほど摂餌行動の鈍りが早かった。その結果、A L C 濃度が高いほど摂餌量が幾分低下する傾向が認められた(表1)。しかし、各実験区間の試験終了時の成長に顕著な差異はなく(*t*検定, $P > 0.05$)、また生残率も各実験区とも97%以上と高く、今回の試験の範囲では、A L C の経口投与が稚魚の成長や生残に目立った悪影響を与えるという兆候は認められなかった。この間の、ヒラメ稚魚1尾当たりの A L C 総投与量は、100mg区の0.17mgに対して500mg区で0.84mg(4.9倍)、1000mg区で1.57mg(9.2倍)となり、ほぼ計画通りの比率で投与できた(表1)。

A L C 配合の給餌を終了した個体について、飼育経過に伴う耳石標識の保有状況を119日目まで観察したところ、各実験区とも119日目でも観察した全ての個体で耳石の標識が確認できた(表2、図版3)。100mg区では、標識の視認性は他の実験区より劣るが、耳石周辺の非染色部とは容易に区別できた。500mg区および1000mg区では、観察した全個体で染色部は明瞭に識別でき、特に1000mg区では、研磨した耳石で染色された日周輪を数えられる個体もあった(図版3)。

表1 濃度別の A L C 配合を与えたヒラメ稚魚の15日後の成長と生残

試 験 区	100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
収容尾数 ^{a)}	300	300	300
取揚げ尾数	295	292	293
平均全長(mm)	81.9±9.8 ^{b)}	76.4±8.2 ^{b)}	79.9±9.2 ^{b)}
生 残 率 (%)	98.3	97.3	97.7
総 給 餌 量 (g)	500	490	460
1尾当たり(g)	1.69	1.68	1.57
A L C 総投与量(mg)	50	245	460
1尾当たり(mg)	0.17	0.84	1.57

a) 実験開始時、全長(mm)=48.3±5.5 (平均±標準偏差)。

b) 標準偏差。

表2 A L C 配合を与えたヒラメ稚魚の耳石標識の保有状況

ふ化後日数	標識後日数	100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg	平均全長 ^{a)} (mm)
		(有標識尾数/観察尾数)			
106	10	10/10	10/10	10/10	100.5± 8.8
128	22	5/5	5/5	5/5	123.0± 8.2
137	31	5/5	5/5	5/5	135.6±14.2
169	63	—	5/5	5/5	182.9±14.6
199	92	—	5/5	5/5	217.6±20.9
226	119	10/10	10/10	10/10	226.5±18.9

a) 平均±標準偏差。

考 察

これまで、耳石を中心とした骨組織へのALC染色は、浸漬法でのみ確認されている(土地・今井1993)。経口投与による蛍光物質の取り込みは、テトラサイクリンによる染色がスルメイカの平衡石で確認されており(NAKAMURA and SAKURAI 1991)、ALCによる成功例はまだない。今回、筆者が行った経口投与法による耳石のALC染色は、既往の浸漬法に比べて染色の度合いは劣るものの、標識として判別が可能な程度の染色は得られることが判明した。経口投与による染色では、ALCの濃度と投与期間が長いほど、より鮮明な染色が得られたが、標識としては全長50mmサイズのヒラメでは500 mg/kg×15日間、または1000mg/kg×10日間の処理で充分であろう。しかし、100mg/kg×15日間の経口投与でも、十分に判別可能な程度の染色が得られており、より薄いALC濃度を長期間与える方法も標識方法の一つとして有効であることを示唆している。各ALC濃度において、耳石標識としての実用を進めるには、さらに長期の飼育を行い、標識の保有状況を把握して有効性を判断する必要がある。

経口投与法によるALC標識は、配合飼料を摂餌させるサイズであれば、今回用いたものよりさらに小型の個体への応用も可能であると考えられる。しかし、今回の試験の予備試験として、配合飼料に充分餌ついた平均全長12.8mm(ふ化後35日目)の着底前後(ステージH~I, 高橋 1985)に、20, 50および100mg/kgのALC配合を5日間投与する試験を行ったが、いずれの実験区でも耳石の染色は確認できなかった。* このことから、耳石の染色に適したALCの濃度と投与期間は、標識時の稚魚の成長によって異なる可能性が考えられ、経口投与法を様々なサイズのヒラメに応用するには、標識サイズに合わせた染色方法を開発することが必要である。

今回の試験では、ALCの投与日数に相応する日周輪の染色が認められ、ALCの投与終了以降には、染色された日周輪は確認できなかった。経口投与されたALCのヒラメ体内での残留状態や代謝経路については調査しなかったが、浸漬法で染色したマダイ稚魚では、染色終了時の消化管内には若干のALCが認められるものの、染色終了6時間後の個体ではほとんど観察されていない(土地・今井 1993)。このことから、ヒラメでも、ALCの体外への排泄はかなり速やかに行われるのではないかと推測され、ALCの投与日数と染色される日周輪数には密接な関係があると考えられる。経口投与法で特定の日周輪を選択的に染色できれば、染色方法の多様化や多重染色による日間成長の把握等への応用が期待される。

経口投与法開発の主な目的であるALC使用量の軽減について、全長50mmの稚魚10万尾の耳石染色を行う場合を想定し、その軽減量を考える。まず浸漬法(ALC 80ppm×24時間)では、染色時の稚魚の収容密度は、全長30mmサイズでは50000尾/m³、40mmサイズでは20000尾/m³が基準とされている(日栽協 1988)。従って、50mmサイズの収容尾数を10000尾/m³と想定すると、10万尾を染色するには10m³の水量が必要であり、ALCの使用量は800gとなる。一方、経口投与法では、1000mg区の給餌結果(表1)を基準に、稚魚10万尾に10日間与える配合飼料とALCの使用量を求めると、それぞれ105kgおよ

* 高橋 未発表。

び105 g になり，ALCの使用量は浸漬法の1/8程度に軽減できる。

このように，経口投与による耳石染色は，大量標識を行う上で大きな経費節減になり得る。また，染色作業の面でも通常の給餌作業を通じて行えるので，作業の効率性および染色作業に伴う稚魚へのストレスを軽減する上でも有効であろう。しかし，経口投与方法で大量標識を行うには，ALCを均一に吸着させた配合飼料を大量に必要とするため，ALC配合の製作面では煩雑さを生じる。ALC標識の方法として，より高濃度のALCを短期間与えて強く染色された日周輪を数少なくまたは多重に作るか，低濃度のALCを長期間与えて弱く染色された日周輪を数多く作るかは，ALCの経費面，染色の作業面および稚魚の成長面等への影響を十分に考慮しながら，さらに検討を加えていく必要がある。

文 献

- 桑田 博・塚本勝己 (1987) アリザリン・コンプレクソンによるマダイ仔稚魚の耳石標識—I，標識液の濃度と標識保有期間。栽培技研，16(2)，93-104。
- 桑田 博・塚本勝己 (1989) アリザリン・コンプレクソンによるマダイ仔稚魚の耳石標識-II，大量標識。栽培技研，17(2)，115-128。
- NAKAMURA, Y. and SAKURAI, Y. (1991) Validation of daily increments in statoliths of Japanese common squid *Todarodes pacificus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 2007-2011.
- 日本栽培漁業協会 (1988) 日本栽培漁業協会事業年報。昭和63年度，373-377。
- 日本栽培漁業協会 (1989) 日本栽培漁業協会事業年報。平成元年度，324-328。
- 日本栽培漁業協会 (1990) 日本栽培漁業協会事業年報。平成2年度，375-366。
- 高橋庸一 (1985) 人工飼育したヒラメ仔稚魚の成長に伴う形態と行動の変化。水産増殖，33，43-52。
- 高橋庸一 (1990) ヒラメ種苗生産における生物餌料の軽減と飼育作業の簡素化。水産増殖，38，23-33。
- 土地敬洋・今井利為 (1993) 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，41，379-385。
- TUKAMOTO, K (1985) Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish*, 51, 903-911.
- TUKAMOTO, K (1988) Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1289-1295.

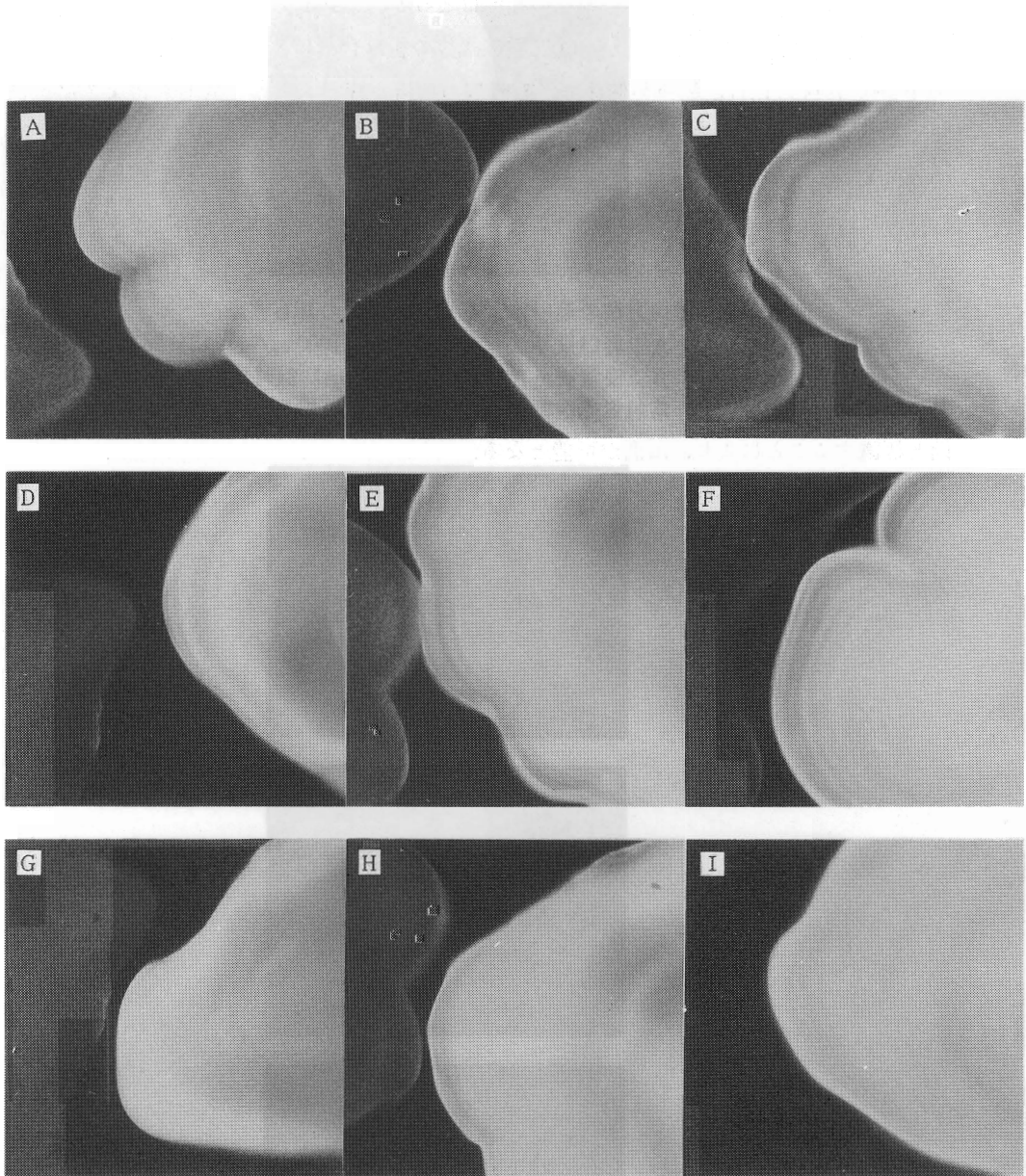
[質 疑 応 答]

- 宮崎 (富山栽セ) ①示したスライド写真のUV励起条件は，②使用した配合飼料のメーカーとタンパク濃度は。
- 加畑 (日栽協小浜) ①落射式蛍光顕微鏡でG励起。なお，フィルム感度はASA400。②使用した配合飼料は協和醸酵工業(株)の初期飼料，協和魚類用C-3000。蛋白濃度はわからない。

山川（東水大） ①耳石に対して、鱗への染色の程度はどうか。②ALC標識による生残率は、経口投与方法、浸漬法、無処理でどうか。③二重標識等の組み合わせはどうか。

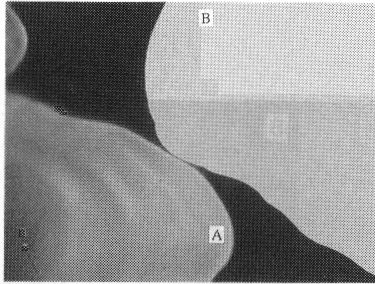
加畑 ①1000mg/kg区の15日間給餌の個体で、有眼側の櫛鱗を観察したが、ALCによる染色は確認できなかった。②無処理の対照区は設けなかったが、表1の通り、全ての試験区で生残が97%以上と良く、ALCの影響は少なかったと思われる。浸漬による比較も、今回は同一の条件では行っていないが、これまでの経験から、経口投与より影響が大きいと思われる。③ALCによる標識方法は、標識としては単純なため、今後、同一魚種によるALC標識の種苗放流が各地で行われると、再捕されたサンプルの仕分けが出来なくなる恐れがある。また、同一サイズで経歴の異なる種苗を同時に放流する場合、放流する日時の間隔が近い場合、サンプルの仕分けができない恐れがある。このため、ALCの標識付けの間隔をあげ、2～3回と標識することにより、識別が可能となる。

口答発表は加畑裕康が行った。

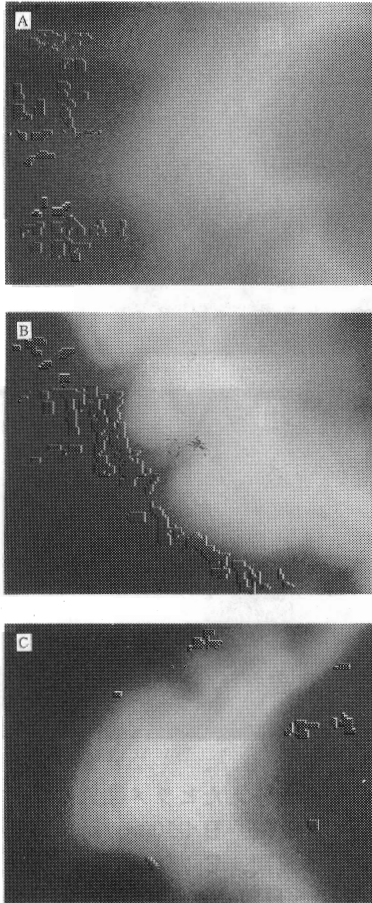


図版 1 濃度別のALC配合を与えたヒラメ稚魚の耳石標識.

A : 100mg/kg 5日間, B : 100mg/kg 10日間, C : 100mg/kg 15日間,
 D : 500mg/kg 5日間, E : 500mg/kg 10日間, F : 500mg/kg 15日間,
 G : 1000mg/kg 5日間, H : 1000mg/kg 10日間, I : 1000mg/kg 15日間,
 落射蛍光顕微鏡 (G励起) により撮影.



図版 2 標識方法の違いによるヒラメ稚魚の耳石標識.
 A: 経口投与方法-A L C 配合 (1000mg/kg) 15日間給餌
 B: 浸漬法-A L C 溶液 (80ppm) 24時間浸漬
 落射蛍光顕微鏡 (G 励起) により撮影.



図版 3 A L C 配合の給餌終了119日後のヒラメ稚魚の耳石標識.
 A: A L C 配合 (100mg/kg) 15日間給餌
 B: A L C 配合 (500mg/kg) 15日間給餌
 C: A L C 配合 (1000mg/kg) 15日間給餌
 落射蛍光顕微鏡 (G 励起) により撮影.