アリザリン・コンプレクソンの経口投与によるヒラメ稚魚の耳石染色

高橋 庸一

(1994年1月21日受付)

Otolith Staining by Oral Administration of Alizarin Complexon for Juveniles of the Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*Yoh-ichi Takahashi^{*1, 2}

Otolith staining by alizarin complexon (ALC) was investigated to develop a new mass-marking method using oral administration in juveniles of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fishes of about 50 mm in total length (82 days after hatching) were accommodated in three 500 l tanks, and were supplied artificial diets treated with ALC solutions (ALC diet) for 15 days. ALC concentrations were 100, 500, and 1,000 mg/kg diet. Fishes were sampled every 5 days during the 15 days of ALC diets and then every month. Otoliths (sagittae) were photomicroscopically observed under G-exited UV light. A clear fluorescent mark was found on the peripheral zone of otoliths dissected immediately after ALC diet treatment, irrespective of the concentration. Otoliths taken from fishes with 1,000 mg-15 days treatment were most clearly stained. Fluorescent marks were not found in ctenoid scales on the ocular body side of the same fish. the fluorescent marks on the otoliths were evidently retained for 119 days of post-treatment at all three concentrations. These results indicate that otolith marking by oral ALC administration is effective and practical as a mass-tagging method in juveniles of Japanese flounder.

キーワード：ヒラメ、アリザリン染色、経口投与、耳石標識

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する方法として開発された。^{1, 2)} マダイ^{3, 4)} *Pagrus major* やヒラメ⁵⁻⁷⁾ *Paralichthys olivaceus* 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。¹⁾ しかし、染色時の問題点として、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、大量死の原因になりやすいこと、染色時の作業手順が煩雑で作業量が大いこと、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、^{4, 6)} 解決すべき点は多い。

そこで、これらの問題点のうち、まずALCの使用量を減少することと、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を染色する方法（以下、経口投与法）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。

実験方法

ALCの投与方法 ヒラメ稚魚へのALC経口投与は、市販の配合飼料にALCを吸着させて与える方法で行った。吸着させるALC（同仁化学研究所製）の量は、配合飼料（粒径3mmのペレット）1kg当たり100mg、500mg、および1,000mgの3段階を設定した（Table 1）。ALCを吸着させた配合（以下、ALC配合）の投餌期間は前もっては特に設定せず、5日ごと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投餌を続けた。

ALC配合は、以下の方法で作製した。まず、100 mlメスフラスコに約80 ml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ALC 500 mgを加え、スターラーで24時間攪拌して完全に溶解さ

^{*1} 日本栽培漁業協会小浜事業場 (Japan Sea-Farming Association, Obama Station, Obama, Fukui 917-01, Japan).

^{*2} 現住所: 日本栽培漁業協会八重山事業場 (Present address: Japan Sea-Farming Association, Yaeyama Station, Ishigaki, Okinawa 907-04, Japan).

Fig. 1. Comparison between ALC stained (right) and non-stained otoliths (left) in *Paralichthys olivaceus* juveniles under UV light.

Fishes were supplied ALC diets for 5, 10, or 15 days. Otolith diameter is 1.46 mm (5 days), 1.86 mm (10 days), and 2.04 mm (15 days). e: edge of non-stained otolith.

せた後、蒸留水を加えて調整し濃度 5 mg/ml の ALC 溶液とした。100 mg 区では、配合飼料 250 g に ALC 溶液 5 ml + 蒸留水 45 ml を加えて十分に混ぜ合わせ、2~3 時間風乾した後サンプル瓶に入れ冷蔵した。同様の方法で、500 mg 区では ALC 溶液 25 ml + 蒸留水 25 ml、1,000 mg 区では ALC 溶液 50 ml をそれぞれ 250 g の配合飼料に吸着させた。ALC 配合は、長期の保存は行わず、1 回の作製量は 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 30 l ポリカーボネイト水槽を用い、既往の方法 (ALC 80 ppm × 24 時間浸漬)⁵⁻⁷⁾ に準じてヒラメ稚魚数個体を染色した。

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、平均全長 48.3 mm、ふ化後 82 日目の稚魚を用いた。ALC 配合の投餌期間には、透明 500 l 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。ALC 配合の投餌を終了した個体は、20 m³ コンクリート水槽に設置した 1 m 角の小割網 3 面に収容し、飼育を続けた。これらの飼育には、ALC 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。

ALC 配合および配合飼料の 1 日当たりの投餌量は、残餌が出ない程度の投餌量である稚魚の魚体重の 2~3% を基準とし、⁹⁾ 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 ALC 配合の使用量と

Fig. 2. Comparison of stained extent of otoliths between oral administration method (A) and immersion method (B) in *Paralichthys olivaceus* juveniles.

Fishes were supplied ALC diets (1,000 mg/kg) for 15 days in A and were immersed in ALC solution (80 ppm) for 24 hours in B.

生残尾数から、1尾当たりの ALC 配合の投餌量と ALC 投与量を求めた (Table 1)。

耳石の観察 耳石の観察は、ALC 配合の投餌期間中は 5 日ごとに、投餌終了以降は 10 日ごとに 3 回、その後は 1 カ月ごとに行った。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 ALC 染色を施す前の個体から耳石を採取した。

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

ALC 配合の投餌により、耳石は周辺部が染色され、投餌 5 日目には ALC 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 (Fig. 1)。染色の度合い（以下、染色度）は ALC の投与量に比例し、

Fig. 3. Fluorescent marks on otoliths of *Paralichthys olivaceus* reared for 119 days of post-treatment under UV light (A-C).

Photograph D is of the same sample as C under normal light. Fishes were supplied ALC diets with 100 mg/kg in A, 500 mg/kg in B, and 1,000 mg/kg in C for 15 days and then reared with non-ALC diets for 119 days. Average diameter of otoliths is 5.68 mm.

Table 1. Growth and survival of *Paralichthys olivaceus* juveniles supplied ALC diets (100, 500, and 1,000 mg/kg), and amount of food and ALC supplied to fish for 15 days

Experiment	100 mg/kg	500 mg/kg	1,000 mg/kg
Initial No. of fish*	300	300	300
Final No. of fish	295	292	293
Mean TL $\pm$ S.D. (mm)	81.9 $\pm$ 9.8	76.4 $\pm$ 8.2	79.9 $\pm$ 9.2
Survival rate (%)	98.3	97.3	97.7
Amount of food given (g)			
Total	500	490	460
per fish	1.69	1.68	1.57
Amount of ALC dosed (mg)			
Total	50	245	460
per fish	0.17	0.84	1.57

* Mean TL $\pm$ S.D. (mm) = 48.3 $\pm$ 5.5.**Table 2.** Retention of the fluorescent mark on otoliths in *Paralichthys olivaceus* treated with ALC diets (100, 500, and 1,000 mg/kg) for 15 days

Days after hatching	Days after treatment	100 mg/kg	500 mg/kg	1,000 mg/kg	Mean TL±S.D. (mm)
		(Fish marked/Fish examined)			
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

1,000 mg 区でより明瞭であった。また個体によっては、染色された 5 本の微細輪紋が数えられた。耳石周辺の染色された部分の幅は、ALC の濃度と投餌日数の増加に伴って増大し、染色度は 500 mg 区の 15 日目と 1,000 mg 区の 10 日目が同程度であった。投餌 15 日目の 1,000 mg 区では、耳石周辺部はより鮮明に染色され、個体によっては投餌日数分の染色された輪紋が読み取れた。しかし、経口投与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 (Fig. 2)。なお、1,000 mg 区の 15 日目の個体で、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。

ALC 配合の投餌は、耳石の染色が十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 ALC 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、ALC 濃度が高い区ほど摂餌行動の鈍りが早かった。その結果、ALC 濃度が高いほど摂餌量がいくぶん低下する傾向が認められた (Table 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、ALC 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 ALC 総投与量は、100 mg 区の 0.17 mg に対して、500 mg 区で

0.84 mg (4.9 倍)、1,000 mg 区で 1.57 mg (9.2 倍) となり、ほぼ計画どおりの比率で投与できた (Table 1)。

ALC 配合の投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 日目でも調べたすべての個体で耳石の標識が確認できた (Table 2, Fig. 3)。100 mg 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。500 mg 区および 1,000 mg 区では、観察した全個体で染色部は明瞭に識別でき、特に 1,000 mg 区では、研磨した耳石で染色された微細輪紋を数えられる個体もあった (Fig. 3)。

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。⁸⁾ 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だけがスルメイカ *Todarodes pacificus* の平衡石で確認されており、¹⁰⁾ 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 50 mm

サイズのヒラメでは 500 mg/kg×15 日間、または 1,000 mg/kg×10 日間の処理で十分であると考えられる。しかし、100 mg/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化を進めるには、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、配合飼料を摂餌するサイズであれば、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、配合飼料に十分餌付いた平均全長 12.8 mm (ふ化後 35 日目) の着底前後の個体 (ステージ H~I¹¹⁾) に、20 mg/kg, 50 mg/kg, および 100 mg/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 (未発表)。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、標識時の稚魚の大きさ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複数の染色された輪紋が認められたが、ALC の投与終了以降では輪紋への染色は確認できなかった。また、染色された微細輪紋が日周輪に相当するかどうかは特定できなかった。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。⁸⁾ 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輪紋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輪紋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など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 50 mm の稚魚 10 万尾の耳石染色を行う場合を想定し、その軽減量を試算した。まず浸漬法 (ALC 80 ppm×24 時間) では、染色時の稚魚の収容密度は、全長 30 mm サイズでは 50,000 尾/m³、40 mm サイズでは 20,000 尾/m³ が基準とされている。⁹⁾ したがって、50 mm サイズの収容尾数を 10,000 尾/m³ と想定すると、10 万尾を染色するには 10 m³ の水量が必要であり、ALC の使用量は 800 g となる。一方、経口投与法では、1,000 mg 区の投餌結果 (Table 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 105 kg および 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投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。ただし、経口投与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 配合の作製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輪紋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輪紋を数多く作るかは、ALC の経費面、染色の作業面、および稚魚の育成面などへの影響を十分に考慮しながら、さらに検討を加えていきたい。

謝 辞

本稿の校閲を頂いた京都大学の田中 克教授、ならびに本稿をまとめるに当たり貴重なお意見を賜った福井県立大学の西田 睦助教授に心から感謝する。また、この試験の機会を与えられた、日裁協小浜事業場の加畑裕康場長、および飼育に協力頂いた職員の方々に深謝する。

文 献

- 1) K. Tukamoto: Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 903-911 (1985).
- 2) K. Tukamoto: Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1289-1295 (1988).
- 3) 桑田 博, 塚本勝己: アリザリン・コンプレクソンによるマダイ稚仔魚の耳石標識—I, 標識液の濃度と標識保有期間. 栽培技研, **16**, 93-104 (1987).
- 4) 桑田 博, 塚本勝己: アリザリン・コンプレクソンによるマダイ稚仔魚の耳石標識—II, 大量標識. 栽培技研, **17**, 115-128 (1989).
- 5) 関根信太郎, 今泉 均: IV-P-1 耳石染色による標識法の開発. 昭和 63 年度日本栽培漁業協会事業年報, 373-377 (1988).
- 6) 今泉 均: IV-P-1 耳石染色による標識法の開発. 平成元年度日本栽培漁業協会事業年報, 324-328 (1989).
- 7) 今泉 均: IV-P-1 耳石染色による標識法の開発. 平成 2 年度日本栽培漁業協会事業年報, 375-376 (1990).
- 8) 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, **41**, 379-385 (1993).
- 9) 高橋庸一: 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 (1990).
- 10) Y. Nakamura and Y. Sakurai: Validation of daily increments in statoliths of Japanese common squid *Todarodes pacificus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2007-2011 (1991).
- 11) 高橋庸一: 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 (1985).