

## アリザリン・コンプレクソンおよびテトラサイクリン塩酸塩によるアカウニの中間骨標識

渡邊 庄一\*

### Rotula Marking of Alizarin Complexone and Tetracycline Hydrochloride for Red Sea Urchin, *Pseudocentrotus depressus*

Shouichi Watanabe

Staining methods with alizarin complexone (ALC) and tetracycline hydrochloride (TC) were examined to form marks on the rotula of sea urchin. Marks were clearly formed by immersing sea urchin in 100ppm ALC solution for 2-5 hr and 50ppm TC solution for 1-5 hr or 100ppm TC solution for 0.5-5 hr.

The fluoresaent marks formed with ALC and TC were visible for 430 days. Either the growth or survival was not influenced by the staining treatment. The results of this experiments with ALC and TC represent that the rotula stining with ALC and TC is useful in sea urchin.

Key words : *Pseudocentrotus depressus* ; Rotula ; Marking condition ; Alizarin Complexone ; Tetracycline Hydrochloride

アカウニ *Pseudocentrotus depressus* は、長崎県における重要な栽培対象種で、長崎県では1982年に種苗生産と放流が開始され、近年は県下各地で合計100万個以上の放流が行われている。今後アカウニの栽培漁業を効果的に推進していくには、放流効果を明らかにするとともに、適正な放流手法の確立が急務である。しかしながら、放流個体が天然個体群に混入し、あるいは複数の放流手法による識別困難な複数の放流個体群が混在して、評価が難しいのが現状である。適正な放流サイズ、放流時期等の放流手法の確立には、放流群を識別することが必要である。

ウニ類では、これまで多くの標識<sup>1-6)</sup>が開発されている。この中で、アリザリンコンプレクソン（以

下、ALCとする）による中間骨標識は複数の標識を識別でき、小型種苗への装着が可能な点で都合がいい。<sup>6)</sup>しかし、アカウニのALC標識については、装着処理がウニの成長・生残へ及ぼす影響が明らかでない。また、ALCの処理単価を安くするための、薬剤使用量を低減することも重要である。

そこで、ALCにより中間骨に標識の処理方法や、それがウニの成長・生残に及ぼす影響を検討するとともに、代替え標識としてのテトラサイクリン塩酸塩（以下、TCとする）による処理方法とその成長・生残に及ぼす影響についても検討した。さらに、これらの検討で得られた知見をもとに多数の個体に標識を付ける作業手順を検討した。また、標識個体の

\*長崎県総合水産試験場 (Nagasaki Prefectural Institute Fisheries, 1551-4, Taira, Nagasaki, 851-2213, Japan).

試験放流と標識の読み取りによる放流個体の追跡を試みた。その結果、実用レベルで標識の有効性を検証したので、その概要についても併せて報告する。

## 材料と方法

実験の材料と方法をTable 1に示した。材料には、佐世保市水産センターで生産されたアカウニ種苗を用いた。実験Ⅰ～Ⅲでは、あらかじめ用意した下記のALCとTCの1000ppm原液を海水で希釈して処理液を作成した。ALC原液は、2%のNaOH海水溶液100mLに1gのALCを溶解させ、HClでpHを約8に調整したのち、海水を加えて1Lとした。TC原液は、海水1Lに1gのTCを溶解させて作成した。

実験Ⅳは、1.5tのFRP水槽中で、0.5tの海水に下記のALC原液またはTC原液を添加して処理液を作成した。ALC原液は、1Lの2%NaOH海水溶液に50gのALCを溶解させた後、HClでpHを約8に調整し、作成した。TC原液は、海水1Lに25gのTCを溶解させ、作成した。

実験Ⅰ：処理液濃度および処理時間 ALC, TCともに4処理濃度（5, 10, 50, 100ppm）と4処理時間（0.5, 1, 2, 5時間）の組み合わせによる32の実験区を設定し、標識の形成を検討した。各実験区とも、200mLの処理液にエアストーンで通気しつ

つアカウニ5個体（平均殻径10.8mm）を収容した。処理中の水温は、24.6～25.5℃であった。処理後は、各実験区の個体を約600mLの小型カゴ32個に収容し、ろ過海水を注水しながらアナアオサを給餌して飼育した。

飼育開始から7日後に、全個体の中間骨の標識を40倍の蛍光顕微鏡で観察した。標識形成の評価は、標識の明るさをもとに評価基準を定めた栗田ら<sup>7)</sup>に従い、「明瞭」、「やや明瞭」、「判別不可」の3段階に分けた。処理方法の良否の判定は、各実験区5個体のうち、すべて明瞭であれば「良」、1個体でも判別不可があれば「不可」、それ以外は「可」とした。

実験Ⅱ：標識処理がアカウニの成長および生残に及ぼす影響 各々2Lの、ALC100ppm処理区、TC100ppm処理区および海水処理区（コントロール）を設け、アカウニ50個体（平均殻径10.3mm）ずつを収容し、エアストーンで通気しつつ5時間の処理を施した。処理中の水温は、23.6～24.5℃であった。処理後は、各処理区からの個体をそれぞれ別の飼育用網カゴ（55×55×20cm）に収容し、ろ過海水を注水しながらアナアオサ等の海藻やアワビ用配合飼料を給餌して飼育した。飼育期間中の水温は12.0～28.5℃であった。

各処理から0, 17, 48, 80, 119, 154, 430日後に、ウニの生残数を確認し、全個体の殻径を測定した。成長差の検討には、等分散を仮定して、海水処理区

Table 1. Materials and treatments

	Date	Size of sea urchin* mean and S.D.(mm)	No. of individuals	Concentration(ppm)		Treatment time(hr)	Water temperature(°C)**	Period of rearing
				ALC	TC			
Exp. I	2002.10.11	10.8 (1.2)	5	5~100	5~100	0.5~5	24.6~25.5	7
Exp. II	2002.10.22	10.3 (1.6)	100	100	100	5	23.6~24.5	430
Exp. III-1	2002.10.22	10.6 (1.6)	50	100	50	1~2	23.6~24.5	48~430
Exp. III-2	2002.11.13	13.6 (1.8)	50	100	50	1~2	17.8~18.3	
Exp. III-3	2002.12.4	16.0 (2.2)	50	100	50	1~2	18.1~17.5	
Exp. IV-1	2002.10.18	11.0 (1.6)	10,000	—	50	1	24.5~25.0	6
	2002.11.18	15.1 (2.2)	7,000	—	50	1	18.8	5
	2002.12.5	18.7 (2.4)	4,000	—	50	1	18.0	33
Exp. IV-2	2003.3.3	11.7 (1.2)	3,000	100	—	2	15.0	10
Exp. IV-3	2003.5.2,2003.5.9	12.6 (1.5)	3,000	100	50	1~2	19.0~20.0	6~13

\*Diameter

\*\*Temperature during marking treatments

におけるアカウニのサイズとALC100ppm処理区およびTC100ppm処理区におけるアカウニのサイズを比較し、t-検定を行った。標識形成の評価は、処理430日後に、ALC区およびTC区から各30個体を抽出して、実験Iと同様の方法で行った。

**実験Ⅲ：多重標識** 装着処理をくり返すことで複数の標識をつけることができるかについて検討した。実験は、ALC処理を3回くり返す区とTC処理を3回くり返す区を設け、それぞれ2Lの処理液に50個体のアカウニを収容する処理を、2002年10月22日、11月13日および12月4日の3回実施した。処理時間と濃度は、ALCについては100ppmと2時間とし、TCについては50ppmと1時間とした。処理を行っていない間および処理後は、実験Ⅱと同様に飼育した。処理中の水温は、1回目：23.6～24.5℃、2回目：17.8～18.3℃、3回目：18.1～17.5℃、処理期間以外の水温は12.0～28.5℃であった。

標識形成の評価は、3回目の処理から5日後および387日後に実験Iと同様の方法で行った。

**実験Ⅳ：大量標識試験、試験放流および追跡調査** 佐世保市水産センターにおいて、0.5tのALC処理液またはTC処理液に、下記の要領でアカウニを投入し、止水で通気を行いながら、ALCについては100ppmで2時間、TCについては50ppmで1時間の処理を施した。処理後はろ過海水を注水し、放流まで飼育した。

2002年10月18日に、10,000個体（平均殻径11.0mm）に1回目のTC処理を行い、その中の3,000個体を10

月24日に放流した。同年11月20日に残りの7,000個体（平均殻径15.1mm）に2回目のTC処理を行い、その中の3,000個体を11月25日に放流した。同年12月5日に残りの4,000個体（平均殻径18.7mm）に3回目のTC処理を行い、2003年1月7日に放流した。2003年3月3日に別の3,000個（平均殻径11.7mm）にALC処理を行い、3月13日に放流した。同年5月2日にさらに別の3,000個体（平均殻径12.6mm）にALC処理を行い、同じ個体に5月9日にTC標識処理を行い、5月15日に放流した。放流は、いずれも平戸市地先の漁場に行った。放流に際し、各放流群の50個体について中間骨の標識を観察した。したがって、放流個体の正確な数は上記より50個体ずつ少ない。

2003年9月9日に、2人の潜水夫が放流漁場で90分間にわたり、アカウニの無作為採取を行った。採取したアカウニは、中間骨を蛍光顕微鏡で観察して標識の有無を調べた。放流個体の標識は鮮明で、標識個体かどうかの判別がつきにくい例は認められなかった。そこで無標識個体は全て天然群とみなし、標識が認められた個体を標識の種類と数により各放流群に区別した。

## 結 果

**実験Ⅰ：処理液の濃度と処理時間** ALCとTCの濃度と処理時間による標識形成の評価結果をTable 2に示した。Fig. 1は、100ppmのALCの濃度で2時間処理を行ったアカウニと50ppmのTCの濃度で1時

Table 2. Evaluation of the results of marking with various ALC and TC concentration

Treatment time(hr)	ALC concentration(ppm)				TC concentration(ppm)			
	100	50	10	5	100	50	10	5
5	○	△	△	×	○	○	△	△
2	○	△	△	×	○	○	△	△
1	△	△	△	×	○	○	△	×
0.5	×	×	×	×	○	△	×	×

○, clear; △, faint; ×, no mark

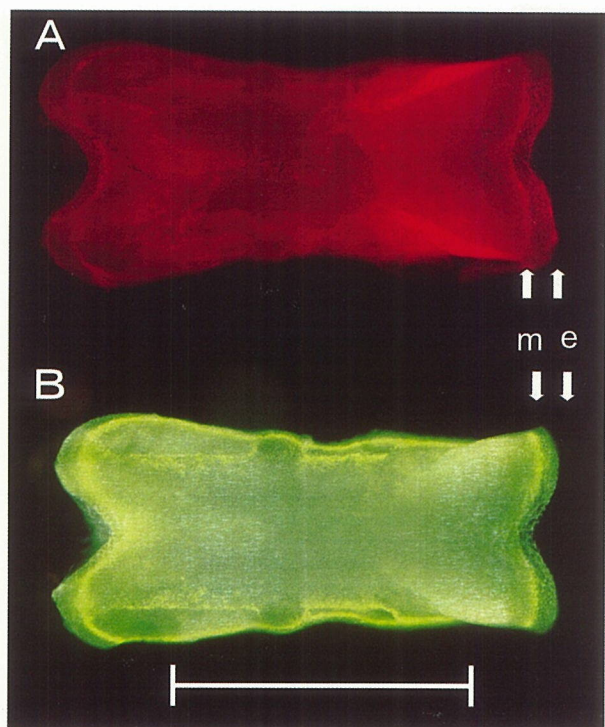


Fig. 1. Fluorescent marks under UV light on rotula of red sea urchin reared for 7 days after the staining treatment. A, ALC marking treatment (100ppm-2h). B, TC marking treatment (50ppm-1h). m, fluorescent mark; e, edge of rotula. Scale, 1mm.

間処理を行ったアカウニの、処理7日後の中間骨を蛍光顕微鏡で撮影したものである。ALCはG励起フィルター使用時に鮮赤色として発色し、TCはB励起フィルター使用時に鮮黄色として発色する。このような鮮明な標識が得られる処理濃度と時間は、ALCでは100ppmと2～5時間、TCでは100ppmと0.5～5時

間または50ppmと1～5時間であった。

実験Ⅱ：標識処理がアカウニの成長および生残に及ぼす影響 ALC処理群およびTC処理群の処理直後(0日)から430日後までの、平均殻径をコントロールのそれとともにTable 3に示した。ALC処理群、TC処理群ともにコントロールとの成長差は認められなかった(t検定,  $p < 0.05$ )。また、処理中および処理後の飼育中の生残率は、3群とも100%であった。

処理430日後に蛍光顕微鏡で認められた標識をFig. 2に示す。処理430日後はすべての個体にこのような明瞭な標識が確認された。

実験Ⅲ：多重標識 Fig. 3は、3回目の標識処理から5日後の中間骨を蛍光顕微鏡で撮影したものである。3回目の処理から5日後と387日後に、すべての供試個体について標識形成の確認を行い、いずれの個体もFig. 3に示すとおり明瞭な3重標識を認めた。

実験Ⅴ：大量標識試験、試験放流および追跡調査 放流を行った海域において放流117～320日後に潜水調査を行い、殻径11～67mmのアカウニ225個体を採取した。このなかの71個体は標識ウニで、その殻径は13～52mmであった。それらは、Table 4に示すとおり、標識の種類と数によって5放流群で構成されていることが分かった。

Table 3. Changes of the size (diameter) in the red sea urchin treated in ALC and TC solution and in sea water (control)

Date	Days after marking	Mean diameter(S.D.) (mm)		
		ALC	TC	Control
2002/10/22	0	10.3 (1.3)	10.2 (1.6)	10.4 (1.7)
2002/11/8	17	14.5 (2.2)	13.6 (1.9)	13.7 (1.9)
2002/12/9	48	17.5 (2.2)	17.2 (2.0)	17.6 (2.3)
2003/1/10	80	20.3 (2.2)	20.3 (2.5)	20.6 (2.4)
2003/2/18	119	24.9 (2.6)	24.5 (2.3)	24.7 (2.7)
2003/3/25	154	27.7 (2.9)	27.1 (3.0)	27.8 (4.1)
2003/12/26	430	37.3 (3.2)	36.7 (4.0)	37.4 (4.7)

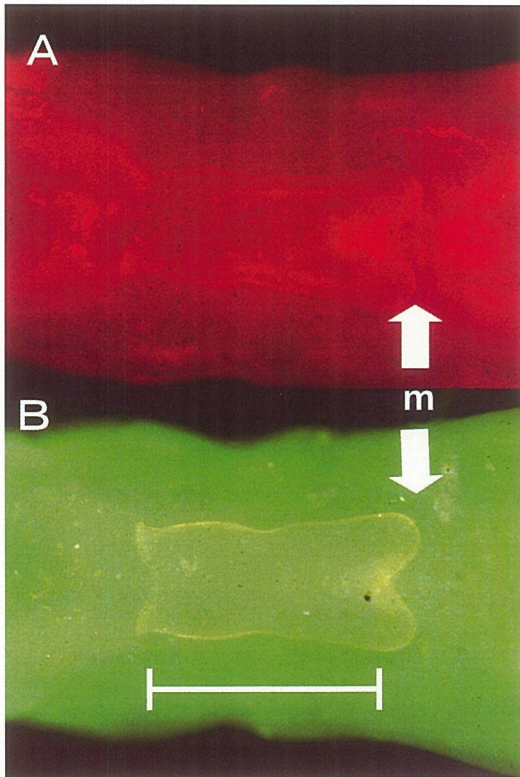


Fig. 2. Fluorescent marks under UV light on rotula of red sea urchin reared for 430 days after the staining treatment. A, ALC marking treatment (100ppm-2h). B, TC marking treatment (50ppm-1h). m, fluorescent. Scale, 1mm.

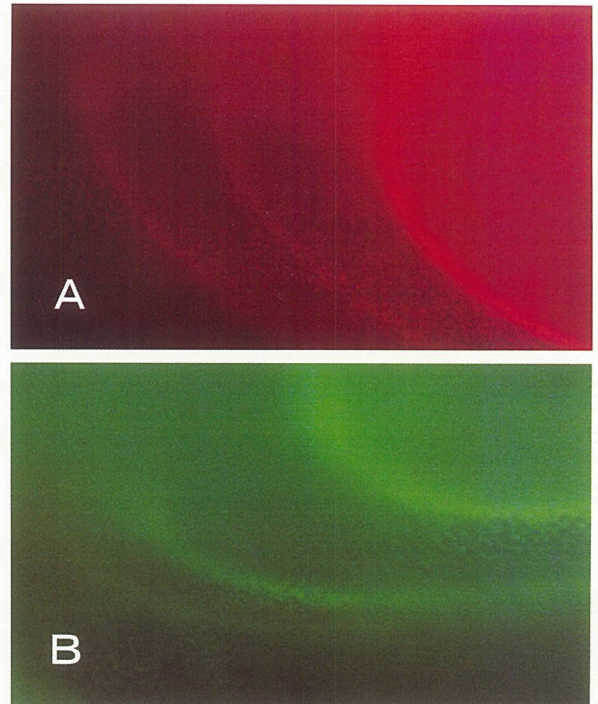


Fig. 3. Triple fluorescent marks under UV light on rotula of red sea urchin. A, ALC marking treatment (100ppm-2h). B, TC marking treatment (50ppm-1h). Rotula diameter is 2.7mm (A) and 2.8mm (B).

Table 4. Mark and recapture experiments in red sea urchin conducted at a seashore area of Hirado Island

Date of release	Number of individuals released	Mean diameter(S.D.) (mm)	Marking method	Number of recapture
2002.10.24	2,950	11.0 (1.6)	TC	5
2002.11.25	2,950	15.1 (2.2)	TC	23
2003. 1. 7	3,950	18.7 (2.4)	TC	29
2003. 3.13	2,950	11.7 (1.2)	ALC	14
2003. 5.15	2,950	12.6 (1.5)	ALC+TC	3

## 考 察

本研究の結果、アカウニにおける好適な標識の形成は、ALCでは100ppmと2～5時間、TCでは100ppmと0.5～5時間または50ppmと1～5時間で得られることが分かった。しかし、薬剤の経済的使用を計り、さらに、止水状態におけるアカウニへのストレス軽減のため、薬剤処理を可能な限り短時間にす

ることを考慮すれば、処理濃度と時間は、ALCでは100ppmと2時間、TCでは50ppmと1時間が適当と考えられる。懸念されたALC・TC処理の成長と生残に及ぼす影響については、少なくとも、ここで適正と判断した濃度と時間では、問題ないことが分かった。

ただし、ここで得た処理基準は、長崎県の主な放流サイズである殻径10～11mmについて検討したも

のである。福岡県<sup>6)</sup>では、平均殻径18.9mmのアカウニを本研究の2倍のALC濃度(200ppm)で処理している。本研究(実験Ⅳ)では、平均殻径11.0～18.7mmのアカウニを本研究の基準にもとずいて処理・放流し、117～320日後に各放流群を識別して、当基準がより広範囲なサイズにも適用できることを実証した。現在アカウニで実施されている放流サイズはほとんどこの範囲に含まれているが、今後、適正な放流サイズを確立するために、サイズ別の処理基準をさらに検討することが必要である。

本研究では、形成されたALCとTCの標識を、処理から430日後に確認した。キタムラサキウニでは、ALC標識が5年9ヵ月後に明瞭に確認されている。<sup>8)</sup>本研究では、1年余の期間しか確認を行っていないが、確認した標識が明瞭であったことから、さらに長期間にわたって標識として有効と考えられた。放流効果調査の可能性を広げるためには、長時間にわたる放流個体の追跡が望ましく、今後さらに検討することが必要である。

TC標識は、エゾバフンウニの殻板に用いられているが、<sup>3)</sup>本研究で中間骨標識としても利用できることが確認された。TC標識は、蛍光顕微鏡で観察するとALC標識とは異なる発色をする。したがって、キタムラサキウニ、アカウニやシラヒゲウニの中間骨で用いられている<sup>6)</sup>ALC標識をTC標識と組み合わせることにより、標識の種類を増やし、多数の放流群を区別することが可能になる。標識の組合せは、今後、アカウニの放流効果調査や最適な放流手法の開発に利用できると考えられる。

## 謝 辞

本研究のとりまとめに当たり、種々のご教示を頂いた長崎大学の田北徹名誉教授に厚くお礼申し上げます。また、標識実験に協力頂いた、佐世保市水産センターの職員各位および試験放流と追跡調査にご協力いただいた、平戸市水産課の職員、中野漁協の職員および漁業者の方々に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 川村一広, 林忠彦: エゾバフンウニの標識法について. 北水試月報, 21, 2-8 (1964).
- 2) 田嶋健一郎: プリリアンレッドによるエゾバフンウニの標識法. 北水試月報, 39, 81-87 (1982).
- 3) 瀧 襄: テトラサイクリンによるエゾバフンウニ殻板の標識方法. 北水試県報, 13, 19-29 (1971).
- 4) Hagen NT: Tagging sea urchins: a new technique for individual identification. Aquaculture, 136, 271-284 (1996).
- 5) 佐野稔, 關哲夫, 大森迪夫, 谷口和也: Coded Wire Tagを用いたキタムラサキウニへの標識技術. 日水誌, 67, 23-29 (2001).
- 6) 放流技術開発事業定着性グループ: 放流技術開発事業総括報告書, 岩手6-15, 山口10, 福岡16-17, 鹿児島41, 沖縄21-25 (2000).
- 7) 栗田博, 塚本勝巳: 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).
- 8) 遠藤敬: ALC標識を用いたキタムラサキウニの放流試験について. さいばい, 96, 11-17 (2001).