

## アリザリン・コンプレクソンによるオニオコゼ卵の耳石標識

門村 和志, 安元 進

Marking of Otoliths by Alizarin Complexone in  
eggs of Devil Stinger *Inimicus japonicus*

Kazushi Kadomura, Susumu Yasumoto

キーワード：オニオコゼ，卵，耳石標識，ALC，初期減耗

オニオコゼ *Inimicus japonicus* は栽培漁業対象種として有望で、西日本を中心に多くの府県水試、栽培センターなどで種苗生産技術開発が実施されている。本種の種苗生産時の問題点として飼育初期の大 量減耗が知られており、飼育環境、細菌・ウイルス検査等で異常が見られないことから卵質に由来するものと推察されている。<sup>1, 5~8)</sup>

本種の種苗量産を目的として一度に数十万粒の採卵を行う場合、複数の雌が産卵に関与していることは孕卵数から考えて確実である。産卵に関与した親魚の生理状態は様々で個体毎に卵質は異なるものと予想されるが、そのような卵群を用いた飼育事例においても仔魚の大量減耗はごく短時間に劇的に発生しており初期減耗要因を卵質のみでは説明できない。

初期減耗に及ぼす卵質の影響を明らかにするために、異なる親魚由来の仔魚を混合飼育し、飼育環境が及ぼす影響を排除できる条件下で各々の生残率の変化を比較する場合、仔魚を識別するための標識が必要となる。個体を識別する手法としてマイクロサテライト等の多型性を利用したDNAマーカーは有効な標識であるが、検出には特殊な知識・技術を必要とすることから現段階では誰もが手軽に利用できる

方法とは言えない。一方、蛍光指示薬で耳石を染色する耳石標識法はすでに多くの魚種で放流種苗の標識手法として用いられており、より簡便で実用的な方法であると考えられる。Uchidaら<sup>2)</sup>は耳石標識を用いてアユの累代親魚群と天然親魚群由来のふ化仔魚を同一水槽で混合飼育し、両者の成長・生残の過程について検討している。

ALC（アリザリン・コンプレクソン）によるオニオコゼ仔稚魚の耳石標識についてはすでにいくつかの報告<sup>3, 4, 6, 9)</sup>があるが、卵の段階での標識装着については知見がない。本研究では種苗生産時の初期減耗要因の追求に耳石標識を利用するための予備試験として、卵の段階でALCによる耳石標識を装着する有効な処理条件について検討した。

実験は標識処理によるふ化率、生残率の低下がなく、かつ耳石に明瞭な蛍光標識が得られるALCの濃度と浸漬時間の組み合わせを探るため3回行った。

供試卵は、当水試で飼育中の天然親魚から2002年8月5日、8月8日、8月15日に自然産卵されたもので、2細胞期からふ化直前期までの様々なステージで使用した。なお実験水温は産卵時の自然水温に合わせ26°C一定とした。

ALC0.4 gを海水に溶解させ、そのpHを1 NのNaOH、HClで8.2~8.3に調整した後、ろ過海水を加え2 lにメスアップしALCを200mg/l含むALC原液

を作成した。各実験には、この原液をろ過海水で200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625mg/lの8段階に希釈したものを使用した。浸漬時間は、取り上げをふ化直前に統一し浸漬開始時の卵発生ステージを変えることにより0.5~24時間までの8段階を設定した。

標識装着は各濃度のALC溶液200mlに受精卵30粒を計数して収容し、無通気で26°Cに設定したインキュベータ内に静置して行った。

設定時間経過後、流水中で十分に卵を洗浄し、ろ過海水500mlを入れた別のビーカーに移し替えふ化率を求めた。ふ化仔魚はそのまま2日間無給餌で飼育し、生残率を求めた。2日目には生残している全個体について、スライドグラスで押し潰す方法で耳石標識を観察した。

標識の評価は落射蛍光顕微鏡（OLYMPUS BX50）を用い使用倍率は100または200倍でBおよびG励起フィルターを使用した。標識はALCによる蛍光の有無により評価し、発光強度は評価対象としなかった。

卵を通常の海水（Control）や各濃度のALC溶液へ浸漬した時のふ化率および日令2の生残率を浸漬時間別にFig. 1.に示す。

ふ化率は浸漬時間0.5~10時間かつALC濃度1.5~200mg/lの範囲では低下しなかったが、24時間浸漬した場合に低く、100および200mg/lで24時間浸漬した場合には0%であった。しかし、この回次の供試卵はControlのふ化率も25.0%と低く、また同じALC濃度でも6.5時間以内の浸漬ではふ化率の低下が見られていないことから、この結果により直ちに24時間浸漬した場合のふ化率の低下が標識処理の影響であるとは確定できない。

日令2における生残率もふ化率と同じ傾向で、浸漬時間0.5~10時間かつALC濃度1.5~200mg/lの範囲ではControlに比較して生残率の低下は見られな

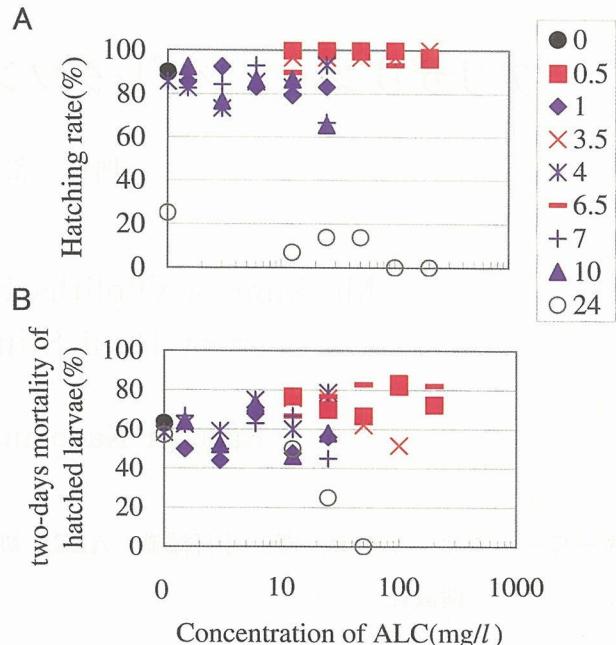


Fig. 1. Results of immersion marking of devil stinger eggs in ALC solution.

かった。しかし、ALC濃度50mg/lに24時間浸漬した場合にふ化仔魚は日令2までにすべて死、25mg/lに24時間浸漬した場合には生残率25.0%でControlの半分にまで低下しており、24時間浸漬する場合には生残率が低下する傾向が見られた。

日令2で耳石を観察したすべての個体でALCによる蛍光が確認され、標識率（観察個体数に対する標識の確認ができた個体の百分率）はいずれの条件でも100%であった。ALC濃度が低い条件でB励起による観察では蛍光が弱い場合があったが、G励起であれば明瞭な赤色蛍光を発し、Controlとは容易に識別可能であった。

なお、Controlの耳石にはALCによるオレンジまたは赤色蛍光と見間違うような自然蛍光は見られなかった。

以上の結果から、オニオコゼは卵の段階で耳石標識が可能であり、ALC濃度1.5~25mg/l、浸漬時間0.5~10時間の範囲ではふ化率および日令2までの生残率を低下させることなく100%の標識率で明瞭な耳石標識を装着できることが分かった。また本研究に

より明らかになったALC耳石標識の処理条件は、これまでに卵の耳石標識例が報告されているアユ<sup>10)</sup>、ハタハタ<sup>11)</sup>など4魚種<sup>12,13)</sup>と比較して低濃度、短時間であった（Table 1）。

Table 1. Comparison with the conditions of other fish

English name	Scientific name	Concentration of ALC(mg/l)	Treatment hour(hr)	Water temp(°C)
Ayu	<i>Plecoglossus altivelis</i>	50	27	16.0
Nigorobuna	<i>Carassius auratus grandoculis</i>	50	1.5	5.0, 10.0
Cresthead flounder	<i>Pleuronectes schrenki</i>	16	24	20.0
sandfish	<i>Arctoscopus japonicus</i>	400	24	8.0
devil stinger	<i>Inimicus japonicus</i>	1.5	1	26.0

一般に処理濃度は低いほど、浸漬時間は短いほど卵への影響は少ないと考えられる。標識可能な下限濃度および浸漬時間の組み合わせは今後の検討課題としている。またTsukamoto<sup>14)</sup>は耳石標識法について100%の標識率が期待でき、標識の脱落がなく、保有期間が長い、成長・生残に影響しないことを長所として挙げている。これまでに様々な魚種で耳石標識は成長・生残に影響しない<sup>13~15)</sup>ことが報告されておりオニオコゼでも同様に問題は生じないと予想されるが、今回は十分な飼育期間を設けていないため、卵のALC標識がオニオコゼの成長・生残に及ぼす影響については今後、あらためて確認する必要がある。

## 文 献

- 1) 陸谷一馬. オニオコゼの種苗生産に関する研究. 栽培技研. 1997; 26(1): 1-7.
- 2) Uchida K, Tsukamoto K, Ishii S, Ishida R & Kajihara T. Larval competition for food between wild and hatchery-reared ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel, in culture ponds. J. Fish Biol. 1989; 34: 399-407.

- 3) 清川智之・曾田一志・佐々木正. 島根県東部沿岸における放流オニオコゼ人工魚の再捕状況について. 栽培技研. 2000; 28(1): 17-23.
- 4) 大阪府水産試験場. オニオコゼ. 昭和63年度地域特産種増殖技術開発事業 魚類・甲殻類グループ総合報告書, 大阪府水産試験場ほか, 大阪, 1989; 大1-大47.
- 5) 大阪府水産試験場. オニオコゼ. 平成2年度地域特産種増殖技術開発事業 魚類・甲殻類グループ総合報告書, 大阪府水産試験場ほか, 大阪, 1991; 大1-大33.
- 6) 大阪府立水産試験場. オニオコゼ. 平成4年度地域特産種増殖技術開発事業 魚類・甲殻類グループ総合報告書, 大阪府立水産試験場ほか, 大阪, 1993; 大1-大29.
- 7) 愛媛県水産試験場, 愛媛県水産試験場東予分場. オニオコゼ. 平成2年度地域特産種増殖技術開発事業 魚類・甲殻類グループ総合報告書, 愛媛県水産試験場ほか, 愛媛, 1991; 愛1-愛38.
- 8) 愛媛県中予水産試験場, 愛媛県中予水産試験場東予分場. オニオコゼ. 平成3年度地域特産種増殖技術開発事業 魚類・甲殻類グループ総合報告書, 愛媛県水産試験場ほか, 愛媛, 1992; 愛1-愛53.
- 9) 愛媛県中予水産試験場, 愛媛県中予水産試験場東予分場. オニオコゼ. 平成4年度地域特産種増殖技術開発事業 魚類・甲殻類グループ総合報告書, 愛媛県中予水産試験場ほか, 愛媛, 1993; 愛1-愛52.
- 10) Tsukamoto K. Otolith Tagging of Ayu Embryo with Fluorescent Substances. Nippon Suisan Gakkaishi. 1988; 54(8): 1289-1295.
- 11) 長倉義智. ハタハタの種苗生産に関する調査研究. ハタハタの生物特性と種苗生産技術, 日本栽培漁業協会, 東京, 2002; 62-67.

- 12) 横山信一. 能取湖における人工受精卵の放流効果推定調査. 北海道立網走水産試験場事業報告書, 北海道立網走水産試験場, 北海道, 1995; 8-15.
- 13) 藤原公一. アリザリン・コンプレクソンを用いたニゴロブナ *Carassius auratus grandoculis* の耳石への標識装着条件. 水産増殖. 1999; 47(2): 221-228.
- 14) Tsukamoto K. Mass-Marking of Ayu Eggs and Larvae by Tetracycline-Tagging of Otoliths. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1985; 51(6): 903-911.
- 15) 桑田博・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. 1987; 16(2): 93-104.