

アユ発眼卵に装着したALC標識の有効性と簡易検出法

鈴木邦弘^{*1}

発眼期の耳石にALC標識を装着したアユを約1年飼育し、標識の有効性の評価と標識の簡易な検出法を検討した。ALC標識の装着は、その後の生残と成長に影響を与えなかった。飼育魚の一部には礫石や扁平石の欠損及び扁平石の形状異常が認められ、扁平石におけるALC標識率は100%とならなかった。ただし、扁平石が正常であれば336日齢（標準体長174mm）であっても標識が保持され、かつ研磨などの事前処理なしに標識の検出が可能であった。また、標準体長40mmまでは耳石を摘出することなく外部からの標識の検出が可能であった。本研究の成果は、海産系アユの放流効果の検証や沿岸域での仔稚魚の生態調査への適用が期待できる。

キーワード：アユ, *Plecoglossus altivelis*, ALC, アリザリンコンプレクソン, 標識, 発眼卵, 耳石, 扁平石

アユ*Plecoglossus altivelis*は、内水面漁業にとって最重要魚種であるが、放流効果の低下と天然アユの減少により漁獲量の減少が続いている¹⁾。そのため、天然アユの再生産に着目して資源量を増やそうとする機運が高まり²⁾、放流においても、家魚化された継代魚ではなく、河川で採捕した天然魚を親魚とした種苗生産が試みられるようになった³⁾。

静岡県内においても、駿河湾や天竜川河口などで採捕され蓄養された海産稚アユ（海産系F0）⁴⁾の放流に加え、近年では海産稚アユを養成した親魚から生産した発眼卵（海産系F1）の埋設放流も行われている。しかしながら、本県の海産系アユの放流効果については、試験規模で実施された天竜川河口産稚アユの2事例⁵⁾を除いて報告がなく、事業規模での大量放流や発眼卵放流の効果検証には至っていない。これは、放流された海産系アユの天然アユとの識別が困難であることに起因する。

天然魚と遺伝的に同質である海産系アユは、DNAマーカーを用いた由来識別⁶⁾は困難であり、放流魚を天然魚と識別するための標識の装着が必要となる。外部標識の装着は、多大な労力がかかることから放流数が限られ、また卵や仔魚への装着は不可能である。一方、Tsukamoto^{7, 8)}がアユで開発したアリザリンコンプレクソン（ALC）等の蛍光物質による耳石標識法は、標識を卵や

仔魚に大量装着できる点が優れており、海産系アユの放流効果を確認する上で非常に有用な手法と考えられる。しかしながら、ALC標識したアユの標識率を長期間にわたってモニタリングした報告はない。また、検体からの耳石の摘出と標識の検出に多大な労力と時間が必要なことから、それらを軽減する簡易な標識検出法の開発が求められる⁷⁾。

そこで本研究では、発眼期にALC標識を装着したアユを約1年にわたり飼育し、その成長過程で定期的にサンプリングを行い、標識の有効性の評価とALC標識の簡易な検出法の検討を行った。

材料及び方法

標識作業

鹿児島県の鶴田ダム湖由来の人工系F12⁶⁾の発眼卵500万粒を、2009年10月4～5日に、Tsukamoto⁸⁾に従い、通気を行いながら100mg/LのALC（和光純薬工業株式会社製）溶液に24時間浸漬した。処理には、ALC25gを1N-NaOHで溶解させた後に1N-HClと地下水によりpH7.8に調整した250Lの溶液を用い、これに発眼卵を付着させたシュロ製のマットを沈め染色を施した。処理終了後は、マットを取り出し、14.5℃の地下水を掛け流した水槽において卵管理を継続した。

2017年3月24日受理

静岡県水産技術研究所富士養鱒場業績第49号

^{*1}静岡県水産技術研究所富士養鱒場

飼育及びサンプリング

卵管理を含む飼育の全ては、静岡県内水面漁業協同組合連合会あゆ種苗センター（静岡県裾野市）において行った。孵化2～3日前の2009年10月10日に、30m³の地下水を入れた100m³容量の飼育池にマットを移して、仔魚を孵化させた。孵化が完了した10月13日には、隣接した池に調整しておいた塩分濃度0.8%の人工海水を流しこみ、飼育水の塩分濃度を0.4%にまで上昇させた。飼育は、循環ろ過により行い、水温はボイラーとチラーにより18～19℃に調整した。飼育魚には、0～60日齢にシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp.complex を、40～70日齢にアルテミア *Artemia* sp. を給餌し、3日齢以降は配合飼料を併用した。飼育魚が稚魚期に移行した2010年1月（92日齢）には、地下水を注水して飼育水を淡水化させ、成熟を迎える2010年9月（336日齢）まで水温調整を継続しつつ地下水を注水しながら循環ろ過飼育を継続した。この間、分養を行うことで飼育池内の収容尾数を減らし、最終的な飼育尾数を約1万尾に調整した。

サンプリングは孵化直後の2009年10月から飼育魚が成熟した2010年9月まで、7月と8月を除き毎月1回行った。毎回、飼育魚をランダムにすくい取り、10～1月は99.5%エタノールで固定し常温で、2月以降は-30℃で冷凍して保存した。

検体処理

保存した標本から、10～2月と9月は各60尾を、3～6月は各20～30尾を任意に抽出し、脊索長または標準体長（以下、体長と総称する）を計測した。エタノール固定した標本は蒸留水中に移し替え柔らかくしてから、凍結した標本は流水中で解凍してからそれぞれ処理に供した。体長の計測にはノギスを用いたが、孵化直後の標本については、実体顕微鏡下でスケールとともに撮影した画像を印刷し計測した。なお、固定方法の違いによる体長収縮の補正は行わなかった。

ALC標識の確認は、日齢査定などの解析に多用される扁平石を主対象とした。ALC標識の確認作業には、落射型蛍光顕微鏡（Nikon社製OPTIPHOT-2）を使用し、励起光には緑色光（G励起）を用い、補助的に近紫外線（UV励起）と青色光（B励起）を用いた。照射部位は、(1) 頭部表面、(2) 口腔内部、(3) 扁平石表面の3か所とし、次の順番でALC標識の検出を行った。

- (1) 未処理の検体の頭部表面に励起光を照射
- (2) 検体を仰向けにした状態で下顎を除去して露出した神経頭蓋付近に励起光を照射

- (3) 神経頭蓋横の内耳小囊から摘出した扁平石表面に励起光を照射

標識の有無の確認は左側の扁平石で行い、標識が確認されない場合のみ右側の扁平石で確認を行った。なお、発眼期のALC標識処理では礫石と扁平石の2種類の耳石が染色されるが、両者は存在する位置や大きさが異なること⁹⁾により判別した。また、摘出した扁平石の形状を、井塚¹⁰⁾に従って、Aタイプ、Bタイプ、ABタイプの3種類に分類した。すなわち、Aタイプは表面が滑らかで外縁が比較的丸みを帯び光学顕微鏡下では茶褐色なもの、Bタイプは波状の起伏があって光学顕微鏡下では透明なもの、ABタイプはAタイプと同様の特徴を有する領域の周縁などにBタイプの特徴である透明な波状の起伏が形成されたものである（図1）。さらに、1日齢（10月）と31日齢（11月）の仔魚については、個体ごとに左右の礫石と扁平石の有無を確認し、その保有状況によるパターン分けを行うとともに、ALC標識の装着状況を確認した。



図1 扁平石の外部形状の3パターン¹⁰⁾
（鶴田ダム湖由来人工系F12種苗の123日齢の扁平石）

結 果

生残と成長

ALC標識魚の体長の推移を図2に示した。全期間を通して病気などによる異常なへい死は認められなかった。選別作業で大型個体を抜き取った影響で179日齢に成長率の見かけ上の低下が認められたが、336日齢には平均体長174mmとなった。成長速度は0.49mm/日であった。

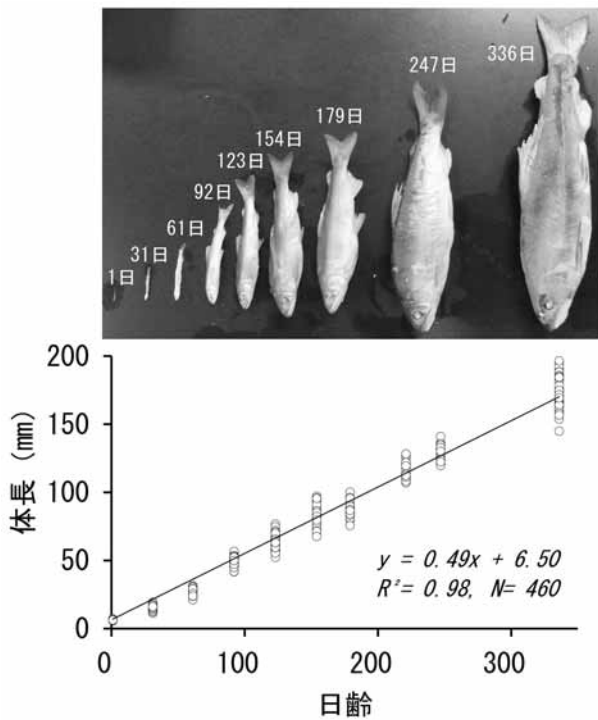


図2 ALC標識を施した鶴田ダム湖由来の人工系F12種苗の体長の推移

耳石欠損個体の出現

1日齢と31日齢の礫石及び扁平石の保有状況を表1に示した。保有状況は8パターンに分類された。1日齢では、4個の耳石全てを保有したのは60検体中50検体で、以下3個が3検体、2個が6検体、1個が1検体であった。一方、31日齢では、耳石を全て保有したのは60検体中57個体、3個が1検体、2個が2検体であり、耳石欠損個体の割合は低下した。ALC標識は観察された全ての礫石及び扁平石で確認できた。左右両方の扁平石を欠損した個体、すなわちパターン7及びパターン8の個体は、1日齢で4検体、31日齢で1検体であった。

表1 1日齢及び31日齢時の礫石と扁平石の保有状況

パターン	保有する耳石				出現数	
	左		右		1日齢	31日齢
	礫石	扁平石	礫石	扁平石	(N=60)	(N=60)
1	○	○	○	○	50	57
2	○	○		○	1	
3	○	○	○		1	1
4	○		○	○	1	
5			○	○	1	
6		○		○	2	1
7	○		○		3	1
8			○		1	

扁平石の欠損及び形状とALC標識率

扁平石の形状別出現状況とALC標識率の推移を表2に示した。左側扁平石の欠損は、1日齢に6検体、31日齢に1検体、92日齢に1検体、221日齢に1検体の合計9検体認められ、1日齢で多く確認された。また、左右両方の扁平石の欠損個体の出現は孵化直後に集中し、1日齢と31日齢のみに確認された。

表2 扁平石の形状別出現状況とALC標識率の推移

日齢	検体数	左側扁平石の形状				ALC標識	
		欠損			標識数/出現数	標識数*2	標識率(%)
		出現数*1	Aタイプ	ABタイプ			
1	60	6(4)	54/54	0/0	0/0	56(54)	93.3
31	60	1(1)	59/59	0/0	0/0	59(59)	98.3
61	60	0	56/56	1/1	3/3	60(60)	100
92	60	1(0)	54/54	3/3	0/2	59(57)	98.3
123	60	0	52/52	5/5	1/3	58(58)	96.7
154	30	0	24/24	4/4	0/2	29(28)	96.7
179	20	0	16/16	2/2	1/2	20(19)	100
221	20	1(0)	14/14	1/1	3/4	19(18)	95.0
247	30	0	27/27	2/2	1/1	30(30)	100
336	60	0	58/58	2/2	0/0	60(60)	100
合計	460	9(5)	414/414	20/20	9/17	450(443)	97.8

*1 括弧内は左右両方の扁平石を欠損している個体の出現数
*2 括弧内は左側の扁平石のみで確認した場合の標識数

左側扁平石の形状別出現数は、Aタイプが414検体、ABタイプが20検体、Bタイプが17検体であり、Aタイプが92%を占めた。日齢別には、1日齢と31日齢はAタイプのみが出現し、61日齢以後はABタイプとBタイプの出現割合が日齢の増加とともに高まる傾向にあったが、247日齢以後は減少した。扁平石の形状別にみたALC標識率は、AタイプとABタイプがそれぞれ100%であったのに対し、Bタイプは52.9% (9検体/17検体) と低く、標識の発光が不明瞭なものもあった。右側の扁平石を含めて算定したALC標識率は、扁平石の欠損の影響を受けて1日齢で93.3%と最も低く、その後は扁平石の形状異常の影響を受けて95.0~100%で推移した。

ALC標識の簡易検出法の検討

扁平石の欠損や形状異常によりALC標識が確認されなかった10検体を除く全450検体について、励起光の照射部位の違いによるALC標識の検出率の推移を図3に示した。頭部に照射した場合は、31日齢までは標識検出率

が100%であったが、61日齢以後は0%となった。体長別にみると、20mm未満までは100%だったが、20mm台で0%となった。口腔内部に照射した場合は、61日齢までは検出率が100%だったが、92日齢で80%、123日齢で21%、154日齢以後は0%となった。体長別では、40mm未満は100%だったが、40mm台から10mm間隔で84%、63%、12%、5%と低下し、80mm台で0%となった。扁平石表面に照射した場合は、日齢や体長に関係なく検出率は100%であった。なお、ALC標識は研磨等の事前処理をせずに検出が可能であった。

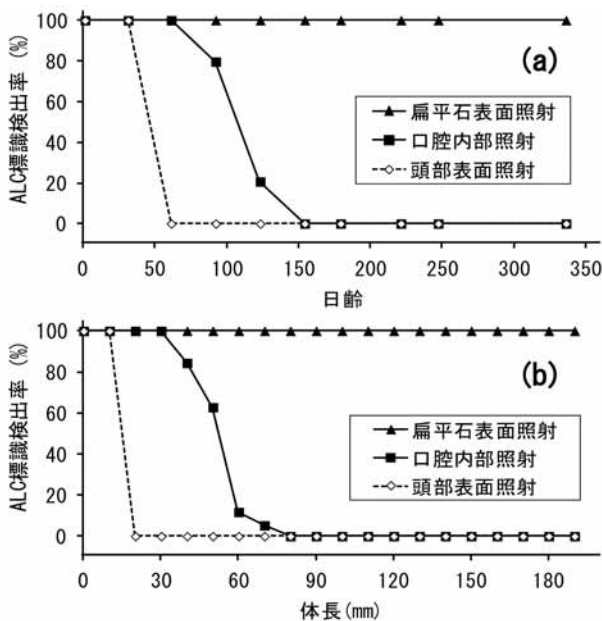


図3 照射部位の違いによるALC標識の検出率の推移
(a)日齢との関係 (b)体長との関係

考 察

発眼卵に対するALC浸漬処理の長期的影響

発眼卵に対するALC浸漬処理については、ワカサギ *Hypomesus nipponensis* では308日齢まで¹¹⁾、ニゴロブナ *Carassius auratus grandoculis* では孵化807日齢まで¹²⁾ 影響がないことが報告されているものの、アユではALCの長期的な影響が評価されたことはなかった。本研究では、ALC標識魚の飼育中に異常なへい死が認められなかったことに加えて、成長も既往知見（120～150日齢で体長40～60mm¹³⁾、成長速度0.35mm/日¹⁴⁾）を上回っていたことから、ALC浸漬処理（100mg/Lで24時間）は長期的にみてもアユの生残や成長に影響を及ぼさないと考えられた。

扁平石の欠損の影響

耳石は聴覚と平衡感覚に機能する硬組織であり¹⁵⁾、人工採苗により得た稚アユでは、扁平石の片側欠損と礫石

の著しい欠損が生じたこと¹⁰⁾が報告されている。本研究と並行して飼育した鶴田ダム湖由来の人工系F4の飼育においても、礫石や扁平石を保有していない孵化仔魚が、異常遊泳を呈した後に約1週間で死滅した（未発表）。これらのことから、本研究で確認された日齢の増加に伴う扁平石の欠損率の低下は、人工採苗により出現した扁平石欠損個体のうち左右両側の欠損個体が初期に死亡したことが原因と推察される。このことは、人工採苗に由来した発眼卵や仔魚の放流においても、放流後に扁平石の欠損率に応じた減耗が起きることを示唆するため、有効放流数はこの減耗を加味して算定する必要がある。具体的には、発眼卵放流では一部を孵化させて得られた仔魚を用いて、仔魚放流では放流魚の一部を抽出して、左右両側の扁平石欠損個体の出現率を算定し、それをもとに両側の扁平石を欠損しているアユの放流数を求め、それを全放流数から減ずることで有効な放流数を算定できる。

扁平石の形状異常の発生時期

井塚¹⁰⁾は、海産系アユと人工採苗アユの扁平石の形状を調査し、形状異常が人工採苗アユにのみ認められることを報告した。本研究においても人工採苗アユに同様の異常が確認されたが、1日齢と31日齢のアユの扁平石には異常は確認されず、61日齢以後221日齢にかけてその割合が増加する傾向にあった。ABタイプの扁平石のALC標識率が100%であったことは、発眼期には扁平石が正常に形成されていたことを意味しており、井塚¹⁰⁾が指摘するAタイプからBタイプへの形状変化が成育途中で起きたことを示唆する。対して、Bタイプの扁平石のALC標識率は52.9%（9検体/17検体）と低く、標識の発光が不明瞭な検体もあったことから、標識を装着した発眼期における扁平石の形成に何らかの異常があった可能性が考えられた。しかし、本研究結果では1日齢と31日齢においてBタイプの出現は確認されていない。これについては、Bタイプの扁平石は核周辺部に輪紋が形成される¹⁰⁾ことがあるため、Aタイプと誤認されていた可能性があるが、飼育初期のALC標識率は100%であることから、このような扁平石にはALC標識が装着されていたと考えられる。また、92日齢以降に出現した標識が確認されないBタイプの扁平石については、発眼期に耳石が形成されなかったか、形成されていても未発達などの理由により発見できなかった可能性があるが、この場合は、扁平石の欠損個体として有効放流数から除外されると考えられる。以上のことから、発眼卵や仔魚期の放流であれば、Bタイプの出現による標識率の補正は必要ないと考えられる。一方、人工採苗に由来したALC標識魚の稚魚期の放流では、Bタイ

ブが出現することにより標識率が低下することを考慮して、放流直前にALC標識率を確認する必要がある。

なお、扁平石の形状異常については、井塚¹⁰⁾が人工採苗したアユが主にBタイプの扁平石を有するようになることを示し、種苗判別の簡易指標とすることを提唱している。しかし、本研究では人工採苗したアユの扁平石にAタイプが高率に出現したことから、その適用には十分注意する必要があると考えられた。

ALC標識の簡易検出法の調査研究への応用

アユの発眼卵に装着したALC標識は、扁平石が正常であれば336日齢であっても全ての検体で標識が保持され、かつ研磨等の事前処理をせずに検出が可能であった。また、励起光を照射することにより、頭部表面では孵化後1か月後、体長20mmまで、下顎を外した状態では孵化後2か月後、体長40mmまで、扁平石を摘出せずにALC標識の検出が可能であった。体長20～40mmのアユは、11～2月頃に波打際に生息する仔稚魚期に相当する¹⁶⁾。海産系アユの研究において、この時期の生態解明は減耗過程の把握¹⁶⁾や遡上量予測¹⁷⁾の観点から重要であり、ALC標識放流を組み合わせた調査を行うことで仔魚の分散や移動範囲の特定などの有益な情報を得ることが可能となる。特に、11～12月に波打際に出現する仔アユは現存量が多く¹⁷⁾、標識確認のためには多量の標本処理が必要となることから、その労力削減に本研究で開発した簡易検出法が貢献するものと期待される。

一方で、遡上魚など稚魚期以降のアユには扁平石の摘出を必要としない標識検出法を適用できないが、扁平石を摘出すれば事前処理をすることなくALC標識の検出が可能であった。アユの孵化仔魚におけるテトラサイクリン (TC) 標識では、164日齢で耳石の研磨や弱酸でのエッチング処理が必要であり⁷⁾、マダイでは孵化仔魚におけるALC標識で標識後212日以上になると研磨作業が必要とされている¹⁸⁾。本研究で扁平石の事前処理を行わずに標識を検出できたのは、ALC標識がTC標識と比べて明瞭であり、かつアユの扁平石は成長しても肥厚しないこと⁷⁾によると推察される。このように、アユの耳石に装着したALC標識は確認が容易であることから、効果的な標識であると考えられ、発眼卵だけでなく蓄養した海産稚アユ (海産系F0) の放流効果調査などへの適用が期待できる。

近年、全国的に海産アユの資源が減少の一途を辿り、漁獲量の減少も続いている¹⁾。本研究で得られた成果を活用することで、本県の海産系アユの放流効果の検証や沿岸域での生態解明を進め、海産系アユの利活用と資源増大を模索していく必要がある。

謝 辞

静岡県内水面漁業協同組合連合会アユ種苗センター元場長の飯田泰氏には、ALC標識の装着とその後の飼育に協力頂いた。記して感謝申し上げる。

文 献

- 1) 内田和男 (2010) : アユ資源の増殖と管理, 日本水産学会誌, **76**(3), 416.
- 2) 古川彰・高橋勇夫 (2010) : アユを育てる川仕事, 築地書館, 東京, 265pp.
- 3) 余語滋 (2010) : 天然魚を目指したアユ種苗生産, 日本水産学会誌, **76**(3), 417～418.
- 4) 川嶋尚正・増元英人・田中寿臣 (1998) : 静岡県の稚アユの採捕量とその変動要因, 静岡県水産試験場研究報告, **33**, 1～4.
- 5) 静岡県水産試験場浜名湖分場 (1979) : あゆ種苗生産開発試験昭和52・53年度.15pp.
- 6) 川嶋尚正・鈴木邦弘 (2014) : 興津川に遡上する天然アユと鶴田ダム湖由来人工種苗の遺伝的特徴とその識別, 静岡県水産技術研究所研報, **46**, 79～84.
- 7) Tsukamoto K. (1985) : Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **51**(6), 903～911.
- 8) Tsukamoto K. (1988) : Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**(8), 1289～1295.
- 9) Tsukamoto K., Kajihara T. (1987) : Age determination of ayu with otolith, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**(11), 1985～1997.
- 10) 井塚隆 (2001) : 海産アユと人工採苗アユの耳石形態の差異について, 神奈川県水産総合研究所研究報告, **6**, 11～21.
- 11) 桐生透・内田和男 (1993) : アリザリンコンプレクソンによるワカサギの耳石標識. 山梨県魚苗センター事業報告書, 53～57.
- 12) 藤原公一 (1999) : 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, **47**(2), 221～228.
- 13) 吉澤和俱 (2005) : アユ. 水産増養殖システム2 淡水魚 (隆島史夫・村井衛編), 恒星社厚生閣, 東京, 83～101.
- 14) Fukuhara O., Fushimi T. (1986) : Development and early life history of the ayu reared in the

laboratory, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(1), 75~80.

- 15) 麦谷泰雄(1994) : 魚類の耳石情報解析に関する研究, 日本水産学会誌, 60(1), 7~11.
- 16) 塚本勝巳・望月賢二・大竹二雄・山崎幸夫(1989) : 河口水域におけるアユ仔稚魚の分布・回遊・成長, 水産土木, 25(2), 47~57.
- 17) 高橋勇夫・東健作(2006) : ここまでわかったアユの本ー変化する川と鮎, 天然アユはどこにいる?ー, 築地書館株式会社, 東京, 265pp.
- 18) 桑田博・塚本勝巳(1987) : 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(2), 93~104.

Evaluation of the effectiveness of a simple method of detecting the Alizarin complexone (ALC) mark attached to Ayu at the eyed-egg stage

Kunihiro Suzuki

Abstract In the present study, we bred Ayu (*Plecoglossus altivelis*) for one year, with an ALC mark attached to otoliths at the eyed-egg stage. We evaluated the effectiveness of the simple method of detecting of this mark. The ALC mark did not affect survival and growth. Loss of lapillus and sagitta, and shape abnormality of sagitta was confirmed in some of the breeding fish. Therefore, the ALC mark rate of the sagitta was not 100%. However, if a sagitta was normal, the mark was retained for 336 days (174 mm SL), and the detection of this mark was possible without subjecting the sagitta to further treatments, such as polishing. In addition, external detection the ALC mark was possible without extracting an otolith in Ayu with SL as small as 40 mm. These findings have potential applications in stocking effectiveness inspection and ecological investigations in juvenile Ayu inhabiting the coastal zone.

Key words: Ayu, *Plecoglossus altivelis*, alizarin complexone (ALC) mark, eyed-egg stage, otolith, sagitta