

マダコの標識法に関する予備的研究—アリザリン・ コンプレクソンを用いた平衡石染色

坂口秀雄^{†1}, 浜野龍夫², 中園明信³

Preliminary Study on a Statolith Marking Method for *Octopus vulgaris* Using Alizarin Complexone

Hideo SAKAGUCHI^{†1}, Tatsuo HAMANO² and Akinobu NAKAZONO³

A staining method using alizarin complexone (ALC) was preliminarily studied for marking of the statoliths of *Octopus vulgaris*. Approximately 500 octopuses were captured in eastern Iyo-nada and immersed in 100 ppm ALC sea water for 20 h on July 2, 1997. Many, approximately half of them, died during this staining period probably due to oxygen deficiency. There was no marking on the skin, muscle, or the beaks after 5 days of the staining even when examined by microscopic observations with UV lighting. The statoliths were successfully stained. A purple colored portion appeared at the base of the statolith like oblique circular cone and it formed a purple ring with elapsed time. This ring was found to be visible up to 114 days after staining. The 265 survived octopuses were released into the wild on July 7, 1997 and 3 animals with marked statoliths were recaptured 11, 31, and 31 days after release. From these results we suggest that the ALC staining is an effective marking method for octopuses.

Key words: *Octopus vulgaris*, marking method, Iyo-nada, alizarin complexone, statolith

はじめに

標識放流は、生物の成長や移動・回遊などの生態情報を収集する手段として、あるいは系群構造や資源量などの情報を推定する手段として、多くの動物に応用されている(田中, 1985)。ミズダコ *Octopus dofleini* では、腕にナイロン線やステンレス線を用いてディスクタグを装着する方法により標識がおこなわれ、放流個体の成長と移動について成果が得られている(福田・山下, 1978; 佐藤, 1994)。一方、マダコでは、同様なタグを装着した場合、自力でタグを引き抜くことが確かめられており、使用することができない

(兵庫県, 1984; 土屋ほか, 1986)。これまでにマダコの標識で有効とされているのは、焼ごてを使用した焼印による方法とトリパンブルーやメチレンブルーによる入墨による方法である(井上ほか, 1951, 1952; 伊丹, 1964; 兵庫県, 1984; 土屋ほか, 1986)。しかしながら、これらの方法では可食部を染色または焼印するため、商品価値を損なう恐れがあるほか、焼印による標識では、焼印を大きくすると施術後の生存率が低くなり、小さくすると判別が不明瞭になる(伊丹, 1964)。さらに、作業には熟練や多くの労力を要するなど、問題点も多い。これらの理由により、マダコ *Octopus vulgaris* は水産学上重要な生物でありながら、標識放流が実施されたことは少なく、成長や移動などについては、体重組成や体長組成の経時的変化や水槽飼育結果から推定されているにすぎない(田中, 1959; 伊丹ほか, 1963; 畑中, 1979; 兵庫県, 1984)。

ところで、マダイ稚仔魚では、アリザリン・コンプレクソン (Alizarin complexone, $C_{19}H_{15}NO_8$, 以降 ALC と略称する) により耳石を染色し、標識とする方法が有効であることが確かめられており、その処理方法に関しても詳細に報告されている(桑田・塚本, 1987, 1989)。その後、ALC によって耳石以外に鱗や骨が染色されることがマダイ、ヒラ

2000年3月31日受付, 2000年6月8日受理

¹ 愛媛県八幡浜地方局水産課

Fisheries Section, Ehime Prefectural Yawatahama Office, Kitahama, Yawatahama, Ehime 796-0048, Japan

² 水産大学校生物生産学科

National Fisheries University, P. O. Box 3, Yoshimi, Shimonoseki 759-6595, Japan

³ 九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門

Laboratory of Marine Resources, Division of Animal and Marine Biore-source Science, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Hakozaki, Higashi, Fukuoka 812-8581, Japan

[†] hsakagti@lime.ocn.ne.jp

メを使った実験により確認されており、大量標識法としての利用が期待されている(土地・今井, 1993; 中村・桑田, 1994)。ALCはキレート滴定用の蛍光性金属指示薬で(久保ほか, 1987)、その溶液に生体を浸漬することによりカルシウムと結合し硬組織中に残留するため、蛍光の有無を観察することにより、標識として使用することができる(土地・今井, 1993; 中村・桑田, 1994)。

頭足類は、頭軟骨の腹側末端にある左右一対の平衡胞前部内壁にカルシウムを主成分とする平衡石を有しており(奥谷, 1981)、マダコのそれは斜円錐形で、底面の長径は成体のもので1mm程度である。ALC染色による標識では個体識別はできないが、この平衡石を魚類と同様な方法によりALCで染色することができれば、マダコの大量標識放流が可能となり、群としての成長、回遊や系群構造などを解明する手がかりを得ることができる。また、現在のところマダコの平衡石に輪紋が存在するという報告はみられないが、輪紋が確認された場合、ALC染色により日周期性等の検討が可能となり、マダコの生態的研究は飛躍的に進むであろう。さらに、マダコの種苗生産技術は現時点では確立されておらず、人工種苗放流はおこなわれていないが、将来人工種苗放流が可能となった場合には、ALC染色による標識手法は放流効果を推定する有効な手法となるであろう。そこで、著者らは、マダコの平衡石がALCにより染色されることを確認するとともに、試みとして平衡石をALCで染色したマダコの標識放流をおこない、成果を得たので報告する。

試料と方法

供試マダコ

愛媛県北条市にある北条市漁業協同組合の小型底びき網により、1997年6月に漁獲された体重約50~210gの小型マダコを使用した。マダコは愛媛県中予水産試験場内の100トン陸上コンクリート水槽で、海水容量を30トン程度に調整し、地先より取水した天然海水で流水飼育した。個体数が500個体程度になるまで、随時、搬入した。水槽内には、隠れ場となるようにコンクリートブロックを設置した。餌として、毎日、冷凍エビを給餌した。

標識方法

1997年7月1日に、30トンの飼育水を止水にし、酸素欠乏を防ぐために、エアレーションをおこなうと同時に、水中ポンプで吸い上げた水を、塩ビパイプにあけた多数の穴から落下させることにより、爆気をおこなった。つぎに、ALC水溶液を100ppmの濃度になるように水槽内に注いだ。ALC水溶液は、あらかじめ1N水酸化ナトリウム水溶液にALCを溶解し、0.1N塩酸でpHを7.8に調整しておいたものを使った。ALC水溶液投入後、無給餌のまま20時間放置し、流水飼育に切り替えた。なお、このときのALC濃度および浸漬時間は、マダイ稚魚を使った桑田・

塚本(1987)および土地・今井(1993)の報告を参考にした。

ALCの残留の有無は、蛍光顕微鏡(B励起フィルター使用)による蛍光の有無により確認することができる(桑田・塚本, 1987)。そこで、染色処理後、適宜、一部のマダコの表皮、筋肉部、顎板および平衡石を蛍光顕微鏡で観察した。

放流および再捕

上記のALC染色を試みた個体のうち、1997年7月7日に265個体を中予水産試験場池先に放流した(Fig. 1)。放流直前には体重を10g単位で測定した。その後、1997年7月18日から1998年4月6日にかけて、放流地点周辺で、小型底びき網により5回、たこつぼにより7回の試験操業をおこない、放流マダコの再捕を試みた(Table 2, Fig. 1)。小型底びき網は、1回に曳網速度2~3ktで3時間の操業をおこなった。たこつぼは、1回の操業で174個を使用し、数日間調査海域に設置後、引き揚げた。

平衡石の採取

捕獲したマダコは水産試験場に持ち帰り、数時間氷蔵後、体重を測定した。その後、解剖して、性別の確認をおこなうとともに、左右の平衡石を採取し、標識の有無を肉眼で確認した。

結果

染色直後には、ALCにより表皮が紫色に染まった個体が目視観察で確認されたが、染色後5日目には、そのような個体は確認できなかった。そこで、1個体をとりあげ、表皮、筋肉部および顎板(口器)を蛍光顕微鏡で観察してみたが、ALCによる染色はみられなかった。平衡石の染色状況について、染色後8日から114日までの間、水槽で飼育していた供試マダコ6個体について観察をおこなったところ、すべての個体で斜円錐形の平衡石の一部が紫色に染色されているのを肉眼で確認できた(Table 1)。染色直後には、平衡石底面部中程がリング状に最も濃く染色されており、次いで、底面に近い側面部が良く染色されていた。底面部の染色部は、日数が経過するに従い不鮮明になったが、側面の染色部は3ヵ月以上経過しても退色はみられなかった(Fig. 2)。染色後114日目に観察した個体は、染色から71日後の9月11日に産卵を開始し、卵がふ化後、10月24日に死亡した個体であった。

なお、ALC染色中に、供試マダコの約半数が死亡した。水槽中のマダコの密度が高い場所でもたまって死亡しており、密度の低い場所では、異常は認められなかった。

放流したマダコの最小個体は50g、最大個体は210g、平均は120gであった(Fig. 3)。放流後、小型底びき網による操業を5回、たこつぼによる操業を7回おこない、計221個体のマダコを漁獲し、全個体の平衡石を観察した。その結果、放流から11日目にたこつぼで漁獲された1個体(体重305g)、31日目にたこつぼで漁獲された2個体(体重

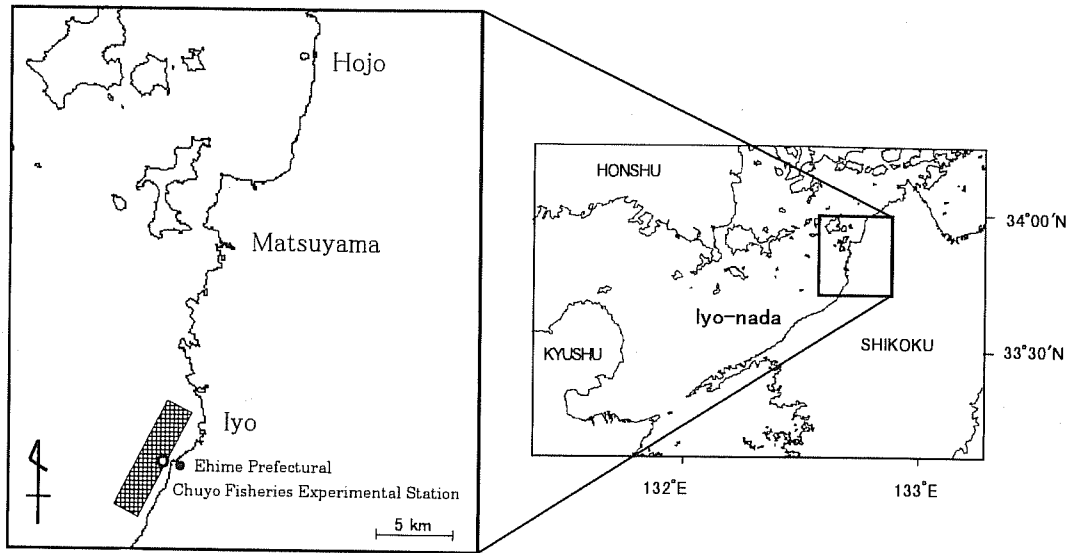


Figure 1. Map showing the study station in eastern Iyo-nada, Japan. The open circle shows the station where *Octopus vulgaris* with the statoliths stained by alizarin complexone were released. The octopuses used in the present study were caught by small beam-trawling around Hojo City. The meshed area shows the place where small beam-trawling and fishing with octopus-pots were carried out to recapture the released specimens.

Table 1. Marking conditions of the statolith of *Octopus vulgaris* which were reared for 20 h in 100 ppm ALC solution on July 2, 1997. Animals were maintained in an aquarium after staining.

Observation date	Days after staining	Body weight (g)	Purple ring* on statolith		Condition of specimens used
			left	right	
July 10	8	281	visible	visible	live
Sep. 3	63	777	visible	visible	live
Oct. 7	97	273	visible	visible	dead
Oct. 7	97	590	visible	visible	dead
Oct. 7	97	1013	visible	visible	dead
Oct. 24	114	481	visible	visible	died after spawning

* Stained with ALC.

369 g, 718 g) の計3個体の平衡石に明瞭な染色標識が認められ、標識個体と確認できた (Table 2, Fig. 2-B, D).

考 察

一般に魚類の耳石を ALC で染色した場合、成長にともない耳石全体にカルシウムが沈着していくため、染色後の経過日数が増すにつれて標識の確認が困難になる (土地・今井, 1993)。マダイ稚仔魚では、染色後3ヵ月以上経過した個体では耳石の研磨が必要であるとしている (桑田・塚本, 1987)。このため、標識魚の追跡が長引くにしたがい、標識を確認するために耳石を研磨する必要が生じ、非常に多くの労力を要することになる。ところで、マダコの平衡石は斜円錐形をしており、底面部にあたる部分が軟弱なこ

とから、この部分で成長が起きているものと考えられる (Fig. 2)。このため、染色直後には底面部が最も濃く染まるが、以降、その部分は硬化して標識が不鮮明になり、染色後97日目には外部からの観測では染色部を確認することはできなかった。しかしながら、平衡石の側面部では、染色後114日を経過しても標識は染色直後の濃度を維持しており (Table 1, Fig. 2)、確認のために平衡石を研磨する必要はなかった。また、染色後に水槽飼育した6個体すべての平衡石が鮮明に染色されていたことから、標識率は100%とみることができよう。

ところで、今回、ALC染色時に多数のマダコが死亡した。水槽内のマダコ密度の高い場所で死亡率が高かったことから、死亡原因は酸素欠乏であると考えられる。ALC

Table 2. Number of *Octopus vulgaris* captured during the investigative samplings, octopus-pots (P) and small beam-trawl (T) from July 18, 1997 to April 6, 1998. A total of 265 octopuses with statoliths stained by ALC were released on July 7, 1997 in eastern Iyo-nada, Japan.

Date	Sampling gear	Days after the release	No. of inds.		Body weight of recaptured octopus (g)
			Total catch	Recaptured	
July 18, 1997	P	11	10	1	305
July 24	T	17	12	0	—
Aug. 7	P	31	36	2	369, 718
Aug. 25	T	49	9	0	—
Sep. 5	P	60	23	0	—
Sep. 29	P	84	25	0	—
Oct. 14	P	99	28	0	—
Oct. 15	T	100	4	0	—
Nov. 19	T	135	2	0	—
Nov. 28	P	144	46	0	—
Mar. 31, 1998	T	267	7	0	—
Apr. 6	P	273	19	0	—
Total			221	3	

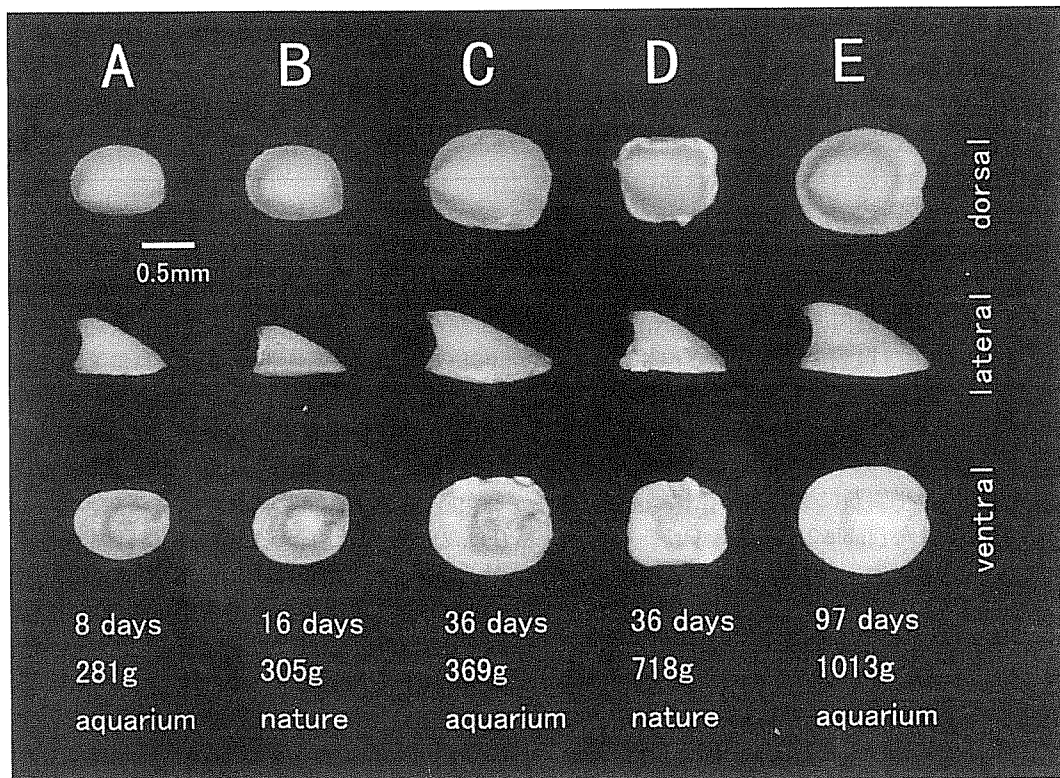


Figure 2. Dorsal, lateral and ventral views of statoliths of *Octopus vulgaris* stained by alizarin complexone (ALC). Number of days elapsed after staining, body weight at sampling, and sampling locations are given. Staining was carried out on July 2, 1997 and individuals B and D were released into the wild on July 7 and then recaptured. A, C, and E were reared in an aquarium. The purple-colored ring was formed by ALC. Right statolith: A-d, A-v, B-d, B-v, C-d, C-v, D-l, E-d and E-v. Left statolith: A-l, B-l, C-l, D-d, D-v and E-l.

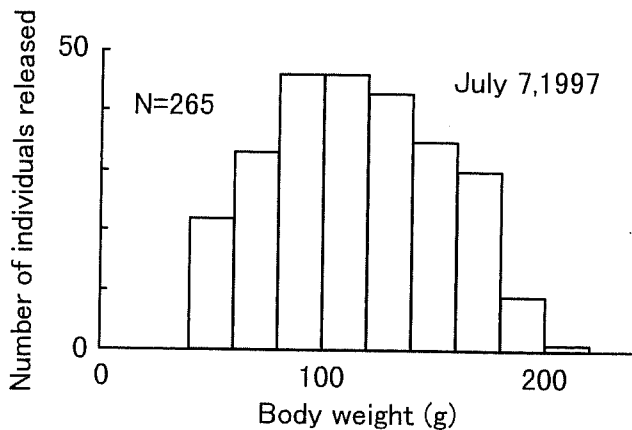


Figure 3. Size distribution of *Octopus vulgaris* when released in the eastern Iyo-nada, Japan on July 7, 1997 after 5 days of marking using alizarin complexone.

染色時には、飼育水を止水にする必要があり、酸素欠乏には十分注意を払う必要があることが報告されている(桑田・塚本, 1989)。今回の試験では、エアレーションと爆気による酸素補給を試みたが、飼育密度に対して酸素補給量が少なかったこと、および水槽内のマダコの生息密度に偏りがあったことにより、局所的な酸素欠乏が発生したと考えられる。したがって、マダコの飼育密度を抑え、分布をできる限り分散させることや酸素ガスを直接通気する方法により、酸素欠乏による死亡は改善できよう。

播磨灘における焼印による標識放流では、放流後1.5ヵ月で体重は約3倍に増加したと述べている(伊丹, 1964)。しかし、この標識放流には、本試験で使用したもの(平均体重120g)よりも大型のマダコ(平均体重341g)が使用されていることや、本試験における放流個体の再捕が3個体と少ないことから、結果をただちに比較することはできない。本試験の再捕尾数が少なかった要因としては、放流後約2ヵ月で産卵期に入ったことがあげられる。染色処理後、水槽で飼育していた個体のうち1個体が9月に産卵し、10月に死亡している。雌は成熟が進むにつれて産卵床に定着するようになるため、小型底びき網やつぼの漁獲効率が低下することが報告されており(Mangold-Wirz, 1963; 畑中, 1979)、産卵後には大部分のマダコは死亡すると考えられている(井上, 1969; 川本, 1978)。したがって、産卵期以降の再捕率は大きく減少することが予想され、本試験において再捕の可能性が高かったのは、放流以降9月までの約2ヵ月間であったと考えられる。そのほか、染色時の死亡率が高く、放流尾数が少なかったことや再捕努力量が十分ではなかった可能性なども再捕尾数が少なかった要因として考えられる。

Nakamura and Sakurai (1991) はスルメイカ *Todarodes pacificus* にテトラサイクリンとALCに浸漬した餌を与える方法による平衡石の染色を試み、テトラサイクリンによる場

合にのみ平衡石を染色することが可能であり、スルメイカの平衡石にみられる輪紋は日周輪であることを報告している。現在のところ、マダコについては平衡石の輪紋は確認されていないが、輪紋が確認された場合、一定期間を置いての二重染色により、輪紋数と染色間の日数から日周性の検討が可能となる。テトラサイクリンによる染色では、標識は蛍光顕微鏡で観察し、輪紋は光学顕微鏡で観察する必要がある。標識と輪紋を同時に観察することはできない。一方、ALCによる染色では、肉眼により標識が確認できることから、光学顕微鏡により標識と輪紋を同時に観察することが可能であろう。

ALCによる平衡石の染色は、外部から標識の有無を判断できないこと、個体識別ができないこと、試薬が高価であることなどの欠点はある。しかしながら、多数の試料を同時に処理できること、鮮明な標識を確実に施すことができること、標識が長期間保持され、確認に際して平衡石を研磨する必要がないことなどを考慮すると、タコ類にとって有効な標識手法であると言えよう。今後、この染色法を実用化するためには次の点を検討する必要がある。

染色条件

最適なALC濃度と染色時間を検討する必要がある。後述の酸素欠乏対策から高濃度のALC水溶液で短時間に染色することが望ましいと考えるが、ALC自身によって、マダコが死亡しないことを確認する必要もある。

酸素欠乏対策

水槽中のマダコ密度および溶存酸素量と死亡率の関係から最適処理密度を検討する必要がある。また、隠れ場となるブロックを設置した場合、ブロック周辺にマダコが集中し、死亡していたことから、隠れ場の有無、隠れ場の形状や配置なども検討する必要がある。

放流時期

マダコは寿命が短く、成熟後、死亡するため(井上, 1969; 川本, 1978)、群としての成長、回遊等を検討するためには、できる限り若齢個体を用いて標識放流をおこなうことが望ましく、最適放流サイズも含めた放流時期を検討する必要がある。

謝辞

放流用のマダコを収集していただいた北条市漁業協同組合の柿本捷治参事を始めとする職員の皆様ならびに平衡石の染色時およびマダコ放流時に協力していただいた愛媛県中予水産試験場の皆様に深謝する。

引用文献

- 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。
 福田敏光・山下 豊(1978) 宗谷海峡・礼利海域に分布するミズダコについて。北水試月報, 35, 1-24。
 畑中 寛(1979) アフリカ北西岸水域におけるマダコの漁業生物学

- 的研究. 遠洋水研研究報告, 17, 13-124.
- 兵庫県 (1984) 大規模増殖場造成事業調査結果報告書, 47 pp.
- 井上喜平治 (1969) タコの増殖. 水産増養殖叢書, 20, 日本水産資源保護協会編, 東京, 50 pp.
- 井上喜平治・浜口 章・伊井 明 (1951) マダコの兵水式標識試験. 昭和26年度兵庫水試事業報告, 50.
- 井上喜平治・浜口 章・伊井 明 (1952) マダコの標式放流予備試験. 昭和27年度兵庫水試事業報告, 123.
- 伊丹宏三 (1964) マダコの標識とその放流結果について. 水産増殖, 12, 119-125.
- 伊丹宏三・井沢康夫・前田三郎・中井昊三 (1963) マダコ稚仔の飼育について. 日本誌, 29, 514-520.
- 川本信之 (1978) 養魚学各論. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 685-692.
- 久保亮五・長倉三郎・井口洋夫・江沢 洋 編 (1987) 理化学辞典. 岩波書店, 東京, 1629 pp.
- 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, 93-104.
- 桑田 博・塚本勝巳 (1989) 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.
- Mangold-Wirz, K. (1963) Biologie des Cephalopodes benthiques et nektoniques de la Mer Catalane. Vie Milieu (Suppl.), 13, 1-285.
- Nakamura, Y. and Y. Sakurai (1991) Validation of daily growth increments in statoliths of Japanese common squid *Todarodes pacificus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 2007-2011.
- 中村良成・桑田 博 (1994) アリザリン・コンプレクソンによる稚魚への大量標識法における鱗からの標識検出法の検討. 栽培技研, 23, 53-60.
- 奥谷喬司 (1981) 頭足類の平衡石および顎板に関する研究. 海洋と生物, 16, 335-340.
- 佐藤恭成 (1994) ミズダコの生態と資源管理. 水産の研究, 13, 82-89.
- 田中二良 (1959) タコの増殖に関する基礎研究. 東京大学博士論文, 66 pp.
- 田中昌一 (1985) 水産資源学総論. 新水産学全集, 8, 恒星社厚生閣, 東京, 381 pp.
- 土屋久男・池田文雄・清水詢道 (1986) 東京湾のマダコ資源の研究—III. マダコの標識方法について. 神奈川水試研究報告, 7, 45-53.