

# 海洋深層水を利用したヒラメ稚魚の耳石バーコード標識について

渡辺 健・小善 圭一・堀田 和夫  
(2001年3月25日受理)

**Thermally induced bar-code otolith markings  
in juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*,  
obtained by using pumped deep-sea water**

Ken WATANABE\*, Keiichi SHOZEN\* and Kazuo HOTTA\*

## Abstract

Bar-code otolith marking was thermally induced in hatchery-reared juveniles (2.5 to 90 mm in mean total length (TL)) of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, by repeatedly exposing them to a lower temperature by 5 or 10 °C during the summers from 1997 to 2000. The colder sea water was obtained by mixing higher temperature sea water with cold, pumped deep-sea water (2-3 °C) of Toyama Bay. Bar-code marks were discriminated on the otoliths of 100% of 90 mm (TL) juveniles and ca. 40-80 % of smaller fishes (from 50 to 70 mm in TL) which was exposed to lower temperatures by 10 °C. The successful patterns of cooling were obtained when 6-day coolings were repeated with an intermission of 3 days between exposures and when 2 or 4-day coolings were repeated with an intermission of 2 days. However, the markings were never found in juveniles of any size that experienced in lower temperatures by 5 °C. Bar-code marks of otolith of juveniles (90 mm in TL) were recognized clearly even after 12 months. Although some previous studies reported that lower temperature caused change in sex ratio (decrease of female) in *P. olivaceus*, no tendency was detected in the sex ratios in fishes (50 to 90 mm in TL) reared for 12 month after the bar-code marking treatment. This marking method can be applied to a mass of juvenile fish without damaging them and may be used to produce some variations of marks by changing patterns of temperature. Therefore, it will be one of the useful methods to discriminate hatchery-reared fish from wild fish in catches, if their otoliths (or head which includes otoliths) can be obtained from fish dealers.

Key words: deep-sea water, Japanese flounder, juvenile fish, otolith marking, *Paralichthys olivaceus*, sex ratio

魚類を放流し追跡調査を行う場合の耳石標識法の一つとして、魚を蛍光物質：ALC（アリザリン・コンプレクソン）溶液に浸漬して耳石日周輪に取り込ませる方法が試みられているが（桑田・塚本 1986, 1987, 小池ら 1990），ALCは高価であり，耳石にALCを取り込ませるためには稚仔魚を止水条件下に長時間収容しなければならず，溶存酸素の低下や水質の悪化による弊死を

---

\*富山県水産試験場 (Toyama Prefectural Fisheries Research Institute, 364, Takatsuka, Namerikawa, Toyama Pref. Japan)

招きやすいため、一般に普及していない。しかし、サケ科魚類では、飼育水温を一時的に下げることによって、耳石の日周輪の中に複数の障害輪をパターン化して挿入してバーコード状の障害輪（以下、バーコード標識という）を刻み込む標識方法が開発されている（Volk *et al.* 1990, 水産庁1996, 辻本・田子 1998）。この方法は、飼育水温の降下に必要十分な水量を確保することができれば、大量の稚仔魚に安全に標識を施すことが可能である。著者らは、この標識方法を応用し、富山県の重要な栽培漁業対象種ヒラメ *Paralichthys Olivaceus* の耳石（扁平石）にバーコード標識を形成させることが可能か否かを飼育試験により検討したので報告する。

## 材 料 と 方 法

**供試魚** 標識試験は1997～2000年の夏に実施し、供試魚は（財）富山県水産公社 栽培漁業センターにおいて放流用種苗として5月に生産されたヒラメ稚魚から、毎年時期を変えて平均全長（TL）の異なる魚をサンプリングして用いた。1997年はTL2.5mm（ふ化仔魚）～31mm（日令0～51日）の5段階、1998年は85mm（日令110日）、1999年は90mm（日令101日）、2000年は50～70mm（50～60mm：日令74日、70mm：同84日）の3段階を扱い、延べ10段階の稚魚について試験を行った（詳細は Table 1 を参照）。TL30mm以下の小型魚群では200～500尾、50mm以上の群では約50尾を各試験区に供した。ただし、2000年に用いた3段階の魚は同一生産群に属し、特に TL50mmないし60mmの魚は同時期に得られた成長のばらつきによるものである。このほか、1999年と2000年には約50尾の対照区を設け、以下に述べるような水温調節を一切行わずに表層海水で飼育を続けた。また、1999年12月には比較のために氷見漁港で水揚げされた天然ヒラメの当歳魚と1歳魚をサンプリングし、耳石検査に供した。

**水温調節による耳石への標識付け** 各供試魚は6～9月（主に7～8月）にFRP角型水槽（140 l容）に収容し、試験開始までの1週間程度、表層海水をかけ流して馴致飼育した。表層海水飼育期間の水温は20～26℃であった。

低温により耳石に障害輪を形成させるために、本研究では富山湾の水深321mから連続取水している、低温かつ清浄な海洋深層水（2～3℃）を用いた。水温を下げる場合は、飼育水槽（表層海水を流水）に海洋深層水を少しずつ増量しながら混合し、1～2時間で目的の水温、すなわち、表層海水よりも5℃または10℃低い水温に達するように調整した。逆に、水温を上げる時は、海洋深層水の注水を少しずつ減らすことにより、1～2時間で表層海水と同じ水温に達するように調整した。

標識付けは、低水温で1～6日、表層海水温に戻して2～3日飼育する操作（以下、昇降温という）を2～4回繰り返して行った。昇降温パターンはFig.1に示した5通りで、表層海水温を基準とし、TL2.5～24mmでは17～22℃から5℃、TL31mmでは23～25℃から5℃下げ、TL50mm以上では25～26℃から5℃もしくは10℃下げた。以下の本文及び図表では、低温・表層海水温・低温における飼育日数がそれぞれ4日・2日・4日であれば4-2-4と標記し、表層海水と混合冷却海水の水温差によって5℃昇降温または10℃昇降温と標記した。供試魚には昇降温中も配合餌料などを飽食量給餌したが、低温飼育期間には摂餌量がかなり低下した。

**耳石の処理と標識の確認** 耳石の検査は、昇降温を終了した後、2か月以上飼育した個体につ

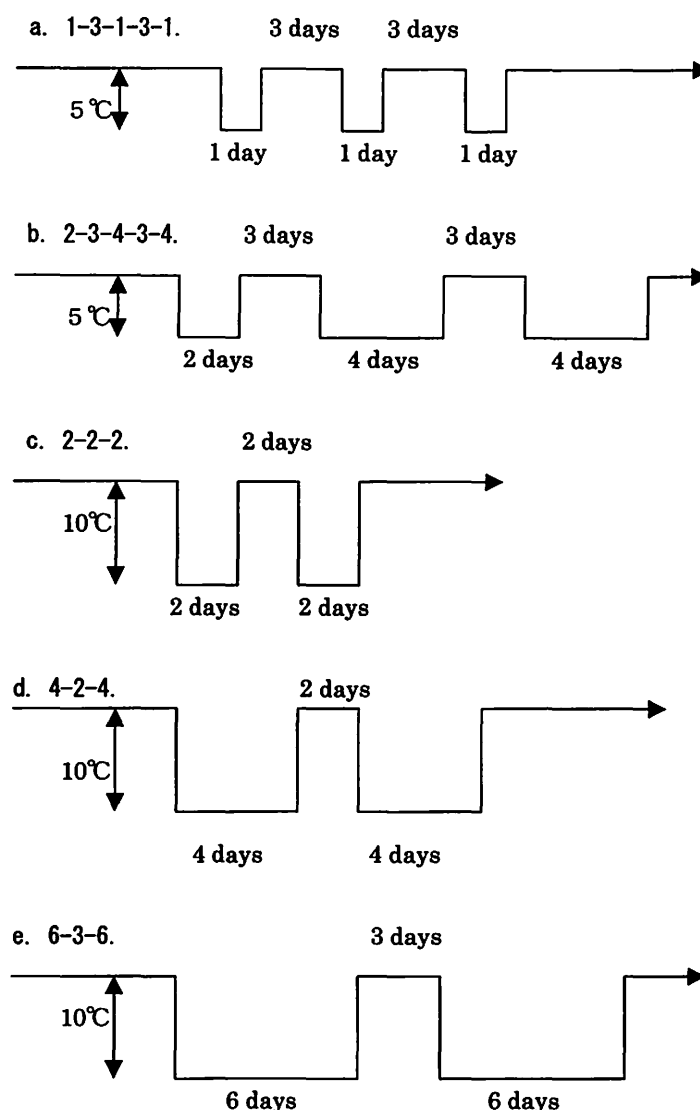


Fig.1 Diagrams of 5 patterns of repeated cooling (by adding pumped deep-sea water) used to induce bar-code rings in otoliths of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. For example, in the case of a, 1-day cooling (by 5°C) was repeated three times with 3-day intermissions. Hyphenated abbreviations (e.g., 1-3-1-3-1) were used in the text, figures and tables.

いて実施した。解剖して取り出した耳石（扁平石）は、凹面（魚体の側面側）を下にしてレーキサイトセメントでスライドグラスに固定し、サンドペーパー#800とラッピングフィルムを用いて凸面（魚体内面側）を研磨して、透過光光学顕微鏡（倍率10~40倍）で観察した。

形成されたバーコード標識の良否は、バーコードの間隔が十分に分離しているか（例えば、2本の標識付けを試みた際に2本の線が明瞭に識別できるか）、さらに、バーコード（環状）が耳石日周輪の何割を占めるか、の2点を基準とし、目測で判定した。すなわち、日周輪の輪郭に2本のバーコードが観察でき、日周輪の輪郭にバーコードの占める割合が50%以上であれば Good, 50%以下であれば Bad, 全く確認できない場合を No とした。

**雌雄比の確認** ヒラメ稚魚を一時的に低温環境下で飼育した場合に雌の割合が減少するとの報

告 (田畑 1991, 山本 1995) があるので, バーコード標識作業のための昇降温が性比に影響を及ぼすか否かを調べるために, 昇降温の終了後, 半年~1年間飼育を継続し, 解剖して生殖腺の摘出・検査により, 雌雄の確認を行った。

## 結 果

**体長別の標識形成状況** ヒラメ稚魚における体長別のバーコード標識の形成状況を Table 1 にまとめて示した。以下, 年次ごとに形成状況について述べる。

1997年は TL2.5~31mmの稚魚に 5℃, 1-3-1-3-1 (Fig.1-a) の昇降温パターンで標識付けを試みたが, TL 6 mmまでの稚魚は降温により斃死し, 15~31mmの稚魚は, 生残率が高かったものの, いずれもバーコード標識が形成されなかった。

1998年は TL85mmの稚魚に 5℃, 2-3-4-3-4 (Fig.1-b) の昇降温パターンで標識付けを試みたが, 前年同様, バーコード標識は形成されなかった。

1999年は TL90mmの稚魚を用い, 10℃, 6-3-6 (Fig.1-e) の昇降温で実施したところ, ほとんどの個体で耳石に明瞭な2本のバーコード標識 (Fig.2) を形成させることができた。バーコード標識が形成された耳石 (Fig.2) は, 同じ時期に調べた対照区の耳石 (Fig.3), 当歳 (推定7カ月) の天然ヒラメの耳石 (Fig.4) および1歳 (推定19カ月) の天然ヒラメの耳石 (Fig.5) とは容易に識別することができた。また, TL90mmの標識魚について, 約1年間継続飼育した後にバーコード標識の有無を調べた結果, 標識が明瞭に残っているのが確認できた (Fig.6)。なお, この時点では無研磨の状態でも目視で標識の存在を観察することができた (Fig.7)。

2000年は, 標識形成に要する期間の短縮, および, より小型のヒラメに対する標識付けを目的として, TL50~70mmの稚魚に, 10℃, 2-2-2 (Fig.1-c) および4-2-4 (Fig.1-d) の昇降温パターンで標識付けを試みたが, 2-2-2の昇降温パターンによって鮮明なバーコード標識が形成された個体 (good) は僅かであった (Table 2)。TL70mm以下の個体では, 耳石日周輪の間隔がもともと狭隘

Table 1. Bar-code ring formation on otoliths and survival rates of various sizes of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* by thermal induction.

	Mean total length (mm)										
	2.5	6	15	24	31	50	60	70	85	90	
Age (Days old)	0	16	22	36	51	74	74	84	110	101	
Survival rate (%)	0	0	90	90	92	100	100	100	93	100	
Quality of marks*	—	—	No	No	No	No to good**	No to good**	No to good**	No	Bad to good**	
Year of experiment	[ ←		1997			→ ] [ ←		2000		→ ] 1998 1999	
Conditions***	1-3-1-3-1 (5℃)			2-2-2&4-2-4 (10℃)				2-3-4-3-4 (5℃)		6-3-6 (10℃)	

\*Good: Each bar-code ring was separated, occupying more than 50% of the ring. Bad: bar-code rings were visible but not 'good' as above. No: Bar-code rings were not visible. \*\*See Table 2 for details. \*\*\*See Fig.1 for the explanation of marking conditions.

であり、バーコードが不透明帯部と重なるため、2-2-2の昇降温パターンで2本あるべき標識が重なって1本しか観察できない個体や、耳石の長径側の端（輪間隔が比較的広い領域）にしか観察できない個体が多かった。また、4-2-4の昇降温パターンでは、鮮明なバーコード標識が形成された個体数割合は2-2-2の昇降温パターンより増加したが、各群とも40%未満にとどまった（Table 2）。

**性比の確認** 昇降温試験供試魚を1年間飼育し、性比を調べた結果をTable 3に示した。1999年に実施したTL90mm、2000年に実施したTL50~70mmの各群とも、性比（雄の割合）は対照区の-12~+7%の範囲に留まっており、顕著な変化は認められなかった。

Table2. Quality of bar-code rings thermally induced on otoliths of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (50 to 90 mm in mean total length).

Mean total length (mm)	Age (Days old)	Condition*	Quality of bar-code rings			
			Good	Bad	No	Total
50	74	2-2-2	3 ** (8.1) ***	13 (35.1)	21 (56.8)	37 (100)
		4-2-4	18 (39.1)	16 (34.8)	12 (26.1)	46 (100)
60	74	2-2-2	2 ( 5.0)	17 (42.5)	21 (52.5)	40 (100)
		4-2-4	7 (15.6)	29 (64.4)	9 (20.0)	45 (100)
70	84	2-2-2	0 (0)	20 (46.5)	23 (53.5)	43 (100)
		4-2-4	7 (15.6)	25 (55.5)	13 (28.9)	45 (100)
90	101	6-3-6	24 (85.7)	4 (14.3)	0 (0)	28 (100)

\*See Fig.1 for the explanation of marking conditions. In all groups, water temperature was lowered by 10°C. \*\*Number of fish;\*\*\*Percentage(%).

Table3. Sex ratios in terms of percentage of male of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, 1 year after bar-code rings were thermally induced.

Mean total length (mm)	Age (Days old)	Percentage of male (%)			
		Control	2-2-2*	4-2-4*	6-3-6*
50	74	63 (32/51) **	64 (16/25)	60 (21/35)	—
60	74	63 (32/51)	60 (18/30)	53 (18/34)	—
70	84	63 (32/51)	56 (21/36)	70 (19/27)	—
90	101	54 (13/24)	—	—	42 (19/45)

\*See Fig.1 for the explanation of marking conditions. In all groups water temperature was lowered by 10°C. \*\*Number of male/Number of survived fish.

## 考 察

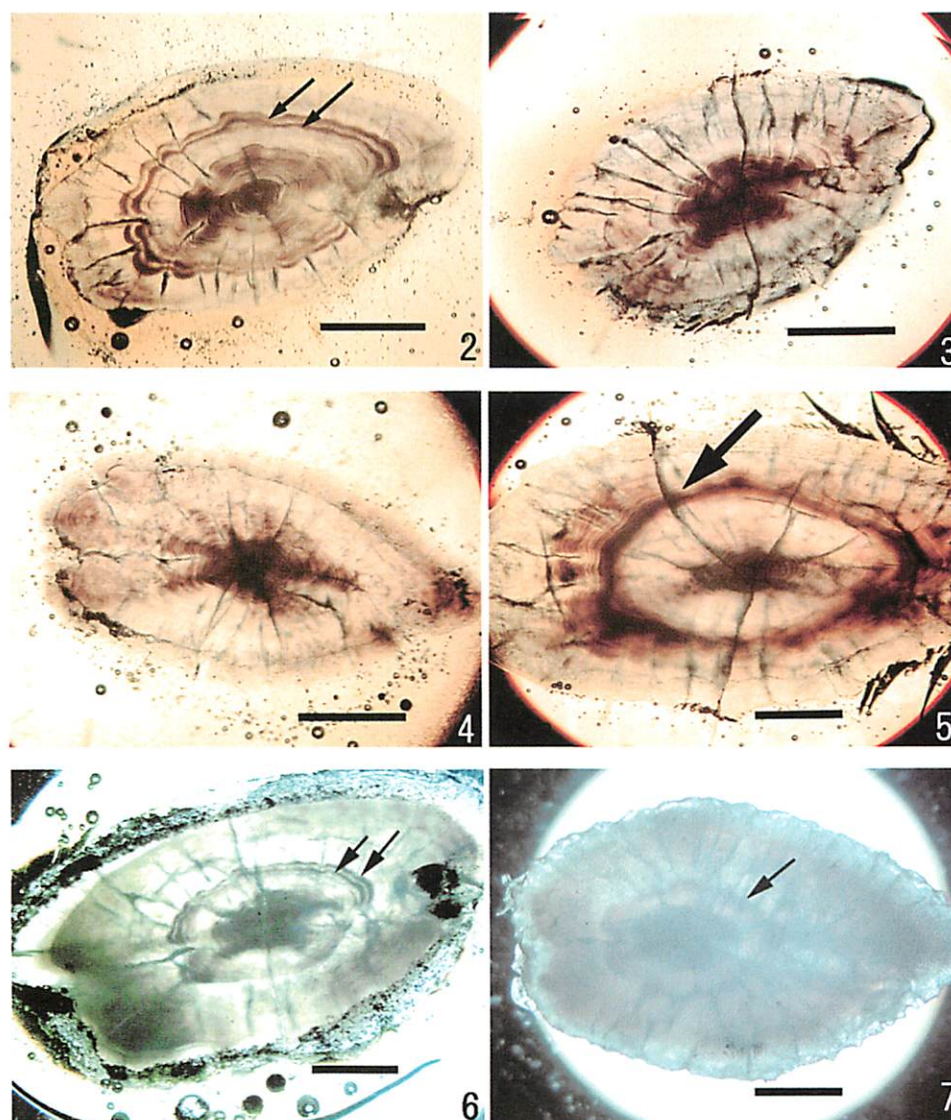
ヒラメ稚魚では、天然魚、人工飼育魚のいずれにおいても、ふ化直後から耳石の中心部に不透明帯（透過光で褐色に見える部分）が形成される（Figs.2-5）。今回の一連の実験により、明瞭なバーコード標識を形成させるには、不透明帯の形成が終息した後の TL90mm（日令100日）程度の個体を用い、降温時の飼育水温を通常飼育水温より10℃下げ、降温の間隔を3日以上にすれば良いことが判明した。また、TL70mm以下の個体にも標識付けは可能であるが、この場合には、標識パターンを確実に認識するために、低温期間と常温期間の両方を長く設定する必要があると考えられた。

耳石バーコード標識の確認作業（検鏡）において、誰もが人為的な標識と判断できるようにするためには、本報で示した Good, すなわち、十分な間隔を有するバーコードが耳石日周輪の半分以上を占めるように形成されていることが望ましい。耳石摘出から研磨・観察までの一連の作業は細かい作業となり、バーコード標識が部分的にしか形成されず不明瞭な場合には、研磨と検鏡を何度も繰り返すことになり、検鏡だけでも1検体当たり10分以上の時間を要してしまう。今回、10℃昇降温、6-3-6の条件で標識付けした TL90mm群のほとんどの個体で日周輪の輪郭全体で標識が明瞭に確認できたことから、当面はこの条件を活用すればよい。

バーコード標識は、特別な薬品等を必要とせず、飼育水温を変化させるだけで、しかも複数本のバーコードを形成させることが可能であるので、多数の魚に年級ごとに違ったパターンの標識を形成させることができる。また、魚体の大きさや日令が同じであれば、ほとんどの個体に同一形状のバーコード標識が形成されると考えられ、標識放流した群の耳石サンプルを保持（パターンを記録）していれば、再捕時の識別が容易となる。また、ALC標識では耳石の精密な研磨が必要であるのに対し、明瞭なバーコード標識が形成されれば、無研磨でも確認が可能である（Fig.7）。なお、今回は海洋深層水を利用して飼育水温を低下させたが、ヒラメの場合は塩分濃度の低い海水でも飼育が可能なので、低温の地下水を混合して飼育水温を下げることも可能であるし、飼育する魚が少数（数百～千尾程度）であれば、循環式の恒温水槽で水温をコントロールして標識付けを行うことも可能かもしれない。

ヒラメの稚魚期に15℃以下の低水温（もしくは25℃以上の高水温）で飼育を行うと雌が減少し、雄が増加することが報告されており（田畑1991, 山本1995）、さらに、雄ヒラメは雌ヒラメに比較して成長が劣ることも知られている。本研究で試みた標識付けのための水温操作では対照区と比較して雌雄比の差はあまり変わらなかった。したがって、少なくとも今回試した標識付けの条件では、放流魚として問題はないと思われる。

耳石標識による放流魚の追跡調査では、サンプルを大量に確保しなければならず、耳石を摘出しなければならないなど、ALC標識と共通の問題点もあることは否めない。しかし、今後、流通過程でヒラメの頭部（耳石を含む）を産地情報と併せて入手するルートを確立し、頭部の計測データ（相対成長の関係から体長を算出）とともに活用すれば、移動の追跡、放流効果の推定などの貴重な資料が得られるであろう。



Figs.2-7. Longitudinal views of otoliths of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* before (Fig.7) and after grinding for check (Figs.2-6). Bars=1mm. Fig.2: Bar-coded otolith of juvenile (TL90mm) reared for 2 months after the cooling treatment (6-3-6-by 10°C) shown in Fig.1-e. Arrows indicated the bar-code (check rings) formed by the thermal induction. Fig.3: Otolith of control (TL90mm) in comparison with Fig.2 checked at the same time. Fig.4: Otolith of wild juvenile fish (estimated to be 7 months old) collected at Himi in 2000 December. Fig.5: Otolith of wild adult estimated to be 19 months old. Arrow indicates an annual growth ring. Fig.6: Otolith of juvenile reared for 1 year after the thermal induction (6-3-6-by 10°C) at TL 90 mm. Arrows indicate the bar-code (check rings) formed by the thermal induction. Fig.7: Otolith in which bar-code (check rings) can be recognized from its external view (concave side) without grinding.

## 要 約

1997～2000年に、富山湾から取水している低温の海洋深層水（2～3℃）を活用してヒラメ稚魚（平均体長（TL）2.5～90mm）の飼育水温を5℃または10℃昇降温させ、耳石（扁平石）にバーコード標識（日周輪の中に複数の障害輪をパターン化して挿入したもの）を形成することが可

能かどうか検討した。バーコード標識は、10℃昇降温させた場合にのみ形成され、TL90mm（低温期間・常温期間・低温期間＝6日・3日・6日）では100%、50～70mm（同じく2日・2日・2日または4日・4日・4日）では40～80%の飼育魚で認めることができたが、5℃昇降温の場合にはどの体長の魚にも形成されなかった。TL90mmの稚魚に形成したバーコード標識は、1年経過後でも確認でき、個体によっては耳石表面を研磨しなくても標識の有無が認められた。ヒラメでは、稚魚期の低温暴露が性比の変化(雌の減少)を引き起こすことが知られているが、本実験では TL50～90mmについて調べた結果、低温暴露の反復による標識付けの1年後も顕著な傾向は認められなかった。この標識方法は、魚体に損傷を与えることなく、温度パターンを変えることにより複数の標識をつくることのできるため、多量の稚魚に処理を施すことが可能である。今後、ヒラメの流通過程において耳石（またはこれを含む頭部）を入手することができれば、放流魚の識別や移動を明らかにするうえで有用な手段となりうる。

## 文 献

- 小池利通・塚本勝巳・大矢真知子 1990. サクラマス稚魚の耳石標識法, 新潟内水試調査研報, 16: 45-49.
- 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存期間. 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.
- 西村明・畑山誠 1992. サクラマス仔稚魚における耳石日周輪形成, 北海道水産孵化場研報, 46: 9-16.
- 山本栄一 1995. ヒラメの人為的性統御とクローン集団作出に関する研究. 鳥取水試報告, 34: 1-145.
- 水産庁 北海道さけ・ますふ化場 1996. 平成6年度本州地域さけ・ますふ化放流事業成績書, 34-37.
- 水産庁 1988-1991. 放流技術開発事業報告書(ヒラメ班) 瀬戸内・九州海域.
- 田畑和男 1991. ヒラメの染色体操作に関する研究. 兵庫水試研報, 28: 1-134.
- 辻本良・田子泰彦 1998. 耳石バーコード標識のサクラマスへの適用, 富山水試研報, 10: 21-26.
- Tsukamoto, K. 1985. Mass-Marking of Ayu Eggs and Larvae by Tetracycline-Tagging of Otolith. Bull. Japan. Soc. Sc. Fish., 51, 903-911.
- Volk, E. C., S. L. Schroder and K. L. Fresh 1990. Inducement of unique otolith banding patterns as a practical means to mass-mark juvenile pacific salmon. Am. Fish. Soc. Symp. 7: 203-215.