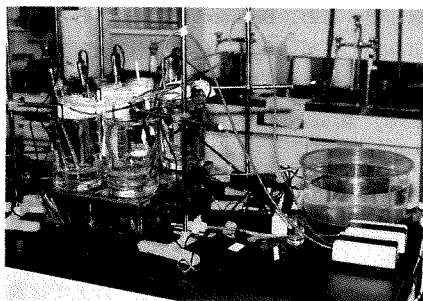


染色剤を用いた仔魚の 生死判別法について

林 邦 茂
株式会社関西総合環境センター
西 潔
株式会社海洋生態研究所
池 田 知 司
株式会社関西総合環境センター
垣 井 清 澄
関西電力株式会社
篠 田 正 俊



マダイ仔魚を用いた実験から、活性（健全・死亡）を判断する染色剤として、Mikacion (Brill. Red 8BS) が最適であることが明らかとなった。

マダイ、ハゼ科及びイソギンボ科仔魚を用いた一連の実験から、Mikacionの添加濃度は500~1,000 mg/lの範囲とし、染色時間は20分程度とするのが適当と考えられた。

外観上の活性度と染色パターンを比較した結果、次の判定基準を作成した。

- a. 健全個体：腸管が染色されるが、他の部位は染色されない。
- b. 軽度損傷個体：腸管が染色され、他の部位も染色される。
- c. 衰弱-死亡個体：腸管は染色されず、他の部位が染色される。

臨海発電所の復水器冷却水系統に連行される魚卵・稚仔が受ける損傷の程度を推定することは、発電所の周辺海域における魚類資源への影響を知る上で重要である。現在まで、魚卵・稚仔、特に稚仔魚の復水器通過による損傷の程度の推定法は、主に取水口及び放水口でネット採集した標本や外部形態や、運動性の有無を比較・観察することから推定されている (Marcy, 1975; Marcy, 1976; Evans, 1983)。しかし、この方法にはネット採集物から稚仔魚を分離するために長時間を要すること、また、この間に水質の悪化等が起こることなどの作業上の問題が多いとされている。そこで筆者らは4種の染色剤を用いて、採集してから短時間内に仔魚の生死判定を行う方法について検討したところ、Mikacion 染料を用いることにより、仔魚の生死の判定が可能となったので、その結果を報告する。

材料と方法

実験1. 染色剤の選定

生体染色の検討には、Methylen Blue Tetrahydrate, Neutral Red, Bismarck Brown (和光純薬工業製) 及び Mikacion, Brill. Red 8BS (日本化薬製)* の4種の染色剤を用いた。実験には関西電力(株)宮津エネルギー研究所で平成2年4月に採卵し育成した、全長4~5 mm のマダイ *Pagrus major* (Temminck et Schlegel) 仔魚を用いた。水温20°C で健全に育成した仔魚の5個体と、35°C に20分間接

* 三菱化成工業株式会社・日本化薬株式会社: Mikacion 染料解説書第4版

触させて死亡した仔魚の5個体をそれぞれ準備した。これらの仔魚を100 mg/lに調整した染色剤入りの濾過海水に10, 20, 30, 60分間及び120分間浸し、染色部位と着色状態を実体顕微鏡下で観察した。

実験2. Mikacionによる染色法の検討

実験1の結果から、4種の染色剤の中で最適と考えられたMicasionを用いて、以下の実験を行った。実験には全長4~5 mmのマダイ仔魚を用いた。20°Cで育成中の外観上健全な個体と、35°Cに調整した海水に20分間接触させ、死亡を確認した個体をそれぞれ5個体ずつ染色した。染色は50, 100, 200, 500, 1,000, 1,500 mg/l及び2,000 mg/lの濃度になるように調整した濾過海水に、それぞれ10, 20, 30, 60分間及び120分間放置して行い、実体顕微鏡下で染色部位と着色状態を観察した。

実験3. 染色状態の比較検討

(1) 活性度と染色状態の比較: 全長4~5 mmのマダイ仔魚を用い、20°Cで育成中の健全な個体と25, 30°C及び35°Cに20分間接触させた個体をそれぞれ5個体ずつ用いて、Mikacionが500, 1,000, 1,500 mg/l及び2,000 mg/lの濃度になるように調整した濾過海水に20分間放置後、各個体の外観上の活力と染色状態を実体顕微鏡下で観察した。

(2) 成長段階による染色状態の比較: 卵黄を有し、孵化直後で未開口の全長2~3 mmのマダイ仔魚と、全長8~10 mmの健全な個体を実験に用いた。外観上健全な個体と35°Cに20分間接触させ、死亡した個体をそれぞれ5個体ずつ用い、Mikacionが1,000 mg/lになるように調整した濾過海水に20分間放置した後、実体顕微鏡下で染色状態を観察した。

(3) 魚種による染色状態の比較: 宮津エネルギー研究所発電設備の取水路において、ネットの後端部に2lポリ瓶を装着したネット(口径30 cm, 測長130 cm, 網目315 µm)を用いて、取水流を利用した水平曳網によって採集された天然仔魚を用いて以下の試験を行った。平成2年5月27日に採集したハゼ科仔魚(全長5 mm前後)の外観上健全な個体を、Mikacionが1,000, 2,000 mg/l及び3,000 mg/lの濃度になるように調整した濾過海水に、それぞれ5個体ずつ20分間放置し、染色中に死亡する個体の有無と染色状態を観察した。

平成2年7月6~8日に採集したハゼ科仔魚(全長12~17 mm)及び平成2年9月6~8日に採集したイソギンポ科仔魚(全長2~3 mm)の、外観上健全な個体と衰弱した個体及び死亡個体をそれぞれ10個体以上について、Mikacionが1,000 mg/lになるように調整した濾過海水に20分間放置し、実体顕微鏡下で染色状態を観察した。

結果及び考察

1. 染色剤の選定

4種の染色剤を用いて行った染色状態の比較試験結果をTable 1に示した。Methylen Blueの場合、健全な個体は染色開始120分後でも染色されなかった。死亡個体では60分後から体表が部分的に薄く染色されはじめたが、時間の経過に伴って著しい変化は認められなかった。また、Methylen Blueでは、健全な個体と死亡個体で染色状態に相違が認められたが、薄くしか染色できなかった。

Neutral Redの場合、健全な個体では10分後より染色されはじめ、体側筋の表面、腸管、下顎などの部位が染色され、時間の経過に伴って、濃く染色される傾向が認められ、さらに60分後には体表全体に染色部位が広がる傾向を示した。死亡個体では10分後から体表全体が染色され、時間経過に伴って著しい変化は認められなかった。健全な個体と死亡個体の染色状態を比較すると、後者では腸管が染色されない特徴が見られるが、共に体表が全体的に染色される傾向が認められた。

Bismarck Brownの場合、健全な個体では10分後から体表全体が染色されたのに対し、死亡個体で腸管が染色されず、それ以外の体表面がほぼ一様に染色された。

Mikacionの場合、健全な個体では20分後から染色されはじめ、腸管だけが薄く染色された。死亡個体では10分後に尾部膜鱗が薄く染色され、時間の経過とともに下顎、頭部などが部分的に染色され、染色部位が広がる傾向を示したが、腸管は染色されず、健全な個体と死亡個体の染色状態に明らかな差異が認められた。

今回用いた4種の染色剤のうち、Neutral RedとBismarck Brownの場合、健全な個体では腸管が染色され、死亡個体では染色されない特徴が認められるものの、両者とも体表全体が染色される傾向を示し、生死の判定には使用し難いと判断した。一方、Methylen BlueとMikacionでは染色状態に差異が認められた。特にMikacionでは腸管の染色の有無が特徴的であること、あるいはMethylen Blueに比べ着色が明瞭なため、Mikacionが生体染色剤として最適と判断した。なお、Bismarck Brownの場合、健全な個体では60分後に仔魚の衰弱が観察され、120分後には全個体の死亡が確認された。他の染色剤ではこのような傾向は認められず、Bismarck Brownの毒性が他の染色剤に比べて強いと考えられた。

2. Mikacionによる染色法の検討

Mikacionを用いて染色濃度、染色時間を変化させた実験の結果をTable 2に示した。健全な個体の場合、50 mg/lでは全く染色されなかったが、100 mg/l以上では前

Table 1. Vital activity and staining patterns by four stains in larval *P. major*.

Stain	Vital Activity	Staining Time (min.)	Body Parts						
			head		belly		lateral muscle (surface)	fin	
			lower jaw	other part	intestine	skin		pectral fin	other part
Methylen Blue	healthy	10	—	—	—	—	—	—	—
		20	—	—	—	—	—	—	—
		20	—	—	—	—	—	—	—
		60	—	—	—	—	—	—	—
		120	—	—	—	—	—	—	—
	dead	10	—	—	—	—	—	—	—
		20	—	—	—	—	—	—	—
		20	—	—	—	—	—	—	—
		60	—	—	—	—	<±>	±	—
		120	—	—	—	±	±	±	—
Neutral Red	healthy	10	±	<±>	±	—	±	—	—
		20	+	<±>	+	—	+	—	—
		20	+	<+>	+	—	+	—	—
		60	+<#>	+<#>	#	+	+	+	+
		120	+<#>	+<#>	#	+	+<#>	+	+
	dead	10	+	+	—	+	+<#>	+	+
		20	+	+	—	+	<#>	+	+
		20	+	+	—	+	+<#>	+	+
		60	+	+	—	+	+<#>	+	+
		120	+	+	—	+	<#>	+	+
Bismarck Brown	healthy	10	+	+	+	+	+	+	±
		20	+	+	+	+	+	+	±
		20	+	+	+	+	+	+	±
		60	+	+	+	+	+	+	±
		120	+	+	+	+	+	+	±
	dead	10	+	+	—	+	+<#>	+	+
		20	+	+	—	+	+<#>	+	+
		20	+	+	—	+	+<#>	+	+
		60	+	+	—	+	+<#>	+	+
		120	+	+	—	+	+<#>	+	+
Mikacion	healthy	10	—	—	—	—	—	—	—
		20	—	—	±	—	—	—	—
		20	—	—	±	—	—	—	—
		60	—	—	±	—	—	—	<±>
		120	—	—	±	—	—	—	<±>
	dead	10	—	—	—	—	—	—	<±>
		20	—	—	—	—	—	±	<±>
		20	<±>	<±>	—	—	—	±	<±>
		60	<±>	<±>	—	—	—	±	<±>
		120	<±>	<±>	—	—	—	±	<±>

— : notstained, ± : faintly stained, + : stained, # : distinctly stained, < > : partially stained.

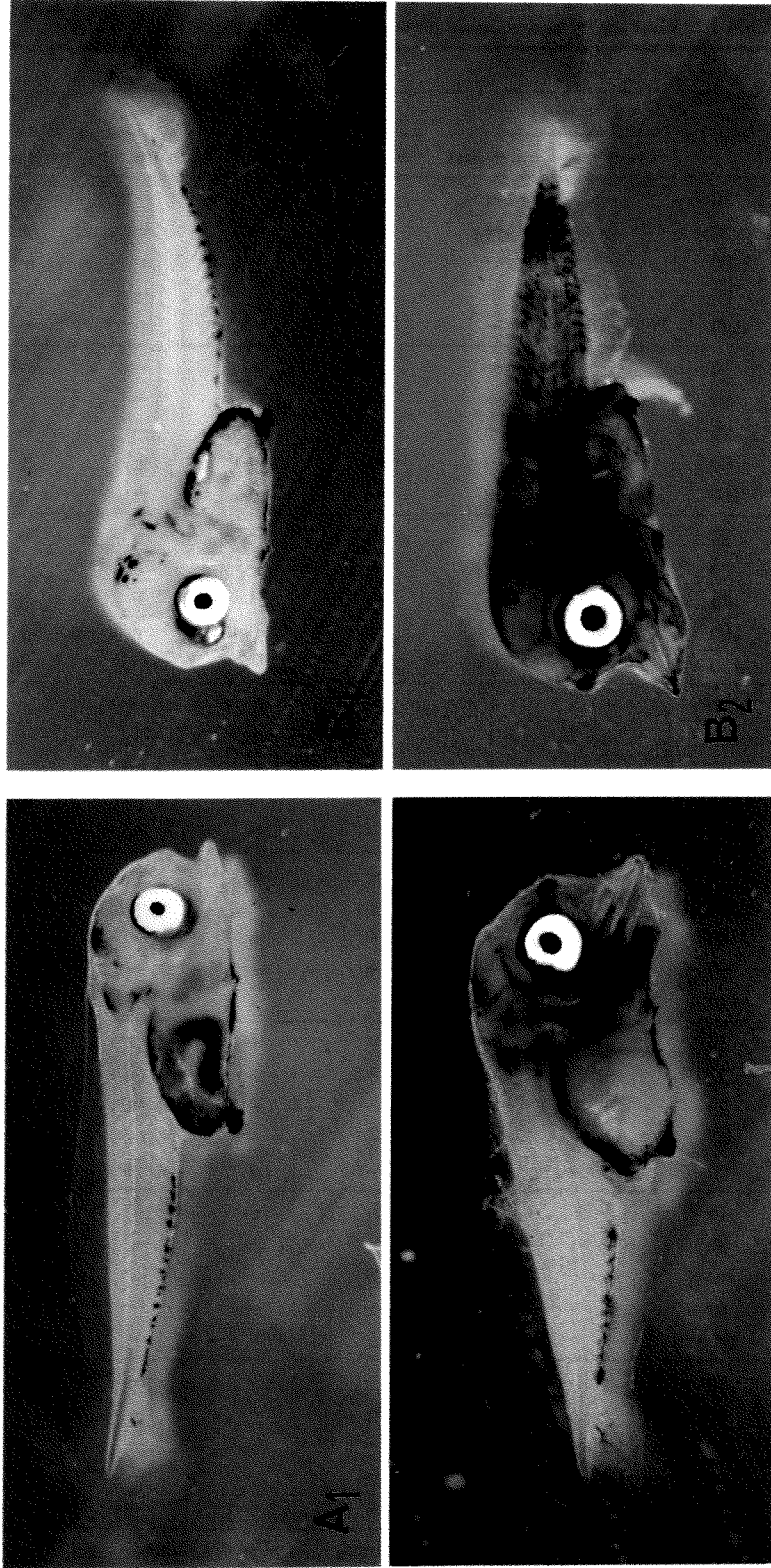


Fig. 1. Showing four examples of the larvae of sea-ream stained by Mikacion. A1 : healthy (1,000 mg/l, 30 mins), A2 : dead (1,000 mg/l, 30 mins), B1 : healthy (200 mg/l, 120 mins), B2 : dead (200 mg/l, 120 mins).

Table 2. Staining patterns observed on *P.major* at different concentrations of Mikacion.

Conc.	Vital Activity	Staining Time (min.)	Body Parts							
			head		belly		lateral muscle (surface)	fin		
			lower jaw	other part	intestine	skin		pectral fin	other part	
50 mg/l	healthy	10	-	-	-	-	-	-	-	-
		20	-	-	-	-	-	-	-	-
		30	-	-	-	-	-	-	-	-
		60	-	-	-	-	-	-	-	-
		120	-	-	-	-	-	-	-	-
	dead	10	-	-	-	-	-	±	<±>	
		20	-	-	-	-	-	±	±	
		30	-	-	-	-	-	±	±	
		60	-	-	-	-	-	±	±<±>	
		120	+	+	-	+	+	+	+	
100 mg/l	healthy	10	-	-	-	-	-	-	-	
		20	-	-	±	-	-	-	-	
		30	-	-	±	-	+	-	-	
		60	-	-	±	-	-	-	-	
		120	-	-	±	-	-	-	-	
	dead	10	-	-	-	-	-	-	±	
		20	-	-	-	-	-	±	<±>	
		30	±	<±>	-	-	-	±	<±>	
		60	±	<±>	-	-	-	±	<±>	
		120	±	<±>	-	-	-	±	<±>	
200 mg/l	healthy	10	-	-	±	-	-	-	-	
		20	-	-	±	-	-	-	-	
		30	-	-	±	-	-	-	-	
		60	-	-	±	-	-	-	-	
		120	-	-	±	-	-	-	-	
	dead	10	±	±	-	±	±	+	±<±>	
		20	±	±	-	±	±	+	±<±>	
		30	±	±	-	±	±	+	±<±>	
		60	+	+	-	+	+	+	+	
		120	#	#	-	#	#	#	#	
500 mg/l	healthy	10	-	-	±	-	-	-	-	
		20	-	-	+	-	-	-	-	
		30	-	-	+	-	-	-	-	
		60	-	-	+	-	-	-	-	
		120	-	-	+	-	-	-	-	
	dead	10	±	<+>	-	±	±<±>	+	±<+>	
		20	+	+	-	+	+	+	+	
		30	+	+<#>	-	+	+<#>	+	+<#>	
		60	+	+<#>	-	+	+<#>	+	+<#>	
		120	+	+<#>	-	+	+<#>	+	+<#>	

- : not stained, ± : faintly stained, + : stained, # : distinctly stained, < > : partially stained.

Table 2. (Continued.)

Conc.	Vital Activity	Staining Time (min.)	Body Parts							
			head		belly		lateral muscle (surface)	fin		
			lower jaw	other part	intestine	skin		pectral fin	other part	
1,000 mg/l	healthy	10	—	—	±	—	—	—	—	
		20	—	—	+	—	—	—	—	
		30	—	—	+	—	—	—	—	
		60	—	—	#	—	—	—	—	
		120	—	—	#	—	<±>	—	—	
	dead	10	±	±<+>	—	±	±<+>	±<+>	±	
		20	+	+	—	+	+	+	+	
		30	+	#	—	+	+<#>	+	+	
		60	+	#	—	+	+<#>	+	+	
		120	#	#	—	#	#	#	#	
1,500 mg/l	healthy	10	—	—	±	—	—	—	—	
		20	—	—	+	—	—	—	—	
		30	—	—	#	—	—	—	—	
		60	—	—	#	—	—	—	<±>	
	dead	10	±	+	—	±	±<+>	±	±	
		20	+	#	—	+	+<#>	+	+	
		30	+	#	—	+	+<#>	+	+	
		60	+	#	—	+	+<#>	+	+	
	2,000 mg/l	healthy	10	—	—	±	—	—	—	—
			20	—	—	#	—	—	—	—
30			±	—	#	—	—	—	<±>	
60			±	—	#	—	—	—	<±>	
dead		10	+	+	—	+	+<#>	+	+	
		20	+	#	—	+	+<#>	+	+	
		30	+	#	—	+	+<#>	+	+	
		60	+	#	—	+	+<#>	+	+	

— : not stained, ± : faintly stained, + : stained, # : distinctly stained, < > : partially stained.

の実験と同様、腸管のみが染色された。色調は 200 mg/l 以下では、染色時間に関係なく薄くしか染色されなかったが、500 mg/l 以上では20分間以上で濃く染色された。

死亡個体の場合、50, 100 mg/l では胸鰭から染色が始まり、時間の経過に伴って、体表全体への広がりを見せた。200 mg/l 以上では、最初の10分間からほぼ体表全体が染色されるのに対し、腸管は全く染色されず、健全な個体と明らかな差異が認められた。色調は 500 mg/l 以上の場合、20分以上染色すれば充分濃く着色された (Fig. 1)。

この実験に併せ、Mikacion の添加による毒性の有無を供試魚の遊泳能力から調べたが、2,000 mg/l で60分間の染色を行っても、仔魚の異常は外観上認められなかった。以上から、Mikacion を用いた場合、500 mg/l 以上の濃度で、20分間以上の染色が適当と考えられた。なお、染色後ホルマリン固定 (中性ホルマリンを用いて最終濃度を3%程度とした) した個体を48時間放置後に観察したが、退色は認められず、短時間であればホルマリン固定後の保存が可能であることが明らかとなった。

Table 3. Different vital levels created by heat stress and staining patterns by Mikacion in larval *P. major*.

Conc.	Heat Stress (MT.)	Vital Activity	Body Parts						
			head		belly		lateral muscle (surface)	fin	
			lower jaw	other part	intestine	skin		pectral fin	other part
500mg/l	20°C	healthy	—	—	+	—	—	—	—
	25°C	healthy	—	—	+	—	—	—	—
	30°C	healthy	—	—	±	—	—	—	—
	〃	dying* ¹	—	—	±	—	—	—	—
	〃	dying* ²	—	±	—	—	—	—	<±>
	35°C	dead	—	±	—	—	—	—	<±>
1,000 mg/l	20°C	healthy	—	—	+	—	—	—	—
	25°C	healthy	—	—	+	—	—	—	<±>
	30°C	dying* ¹	—	—	±	—	—	—	—
	〃	dying* ²	—	±	—	—	—	—	<±>
	35°C	dead	+	<+>	—	<+>	<+>	+	+
1,500 mg/l	20°C	healthy	—	—	+	—	—	—	—
	25°C	healthy	—	—	+	—	—	—	—
	30°C	dying* ³	±	—	—	—	—	—	—
	35°C	dead	+	<+>	—	<+>	<+>	+	+
2,000 mg/l	20°C	healthy	—	—	+	—	—	—	—
	25°C	healthy	—	—	+	—	—	—	—
	30°C	dying* ¹	—	—	± - +	—	—	—	—
	〃	dying* ²	+	—	—	—	—	—	—
35°C	dead	+	+	—	+	+	+	+	

*1: swimming unsteadily, *2: only the heart is beating, *3: The heart is beating, but hardly move, —: not stained, ±: faintly stained, +: stained, #: distinctly stained, < >: partially stained.

3. 染色状態の比較検討

(1) 活性度と染色状態の比較: 温度ショックを加え活性度を変化させたマダイ仔魚の染色状態の相違を Table 3 に示した。温度ショックを加えていない遊泳の活発なマダイ仔魚では、腸管のみが染色された。25°C に接触させた個体は、温度ショックを与えていない個体に比べて、遊泳力がやや劣るが、腸管のみが染色された。30°C に接触させた個体は遊泳が不安定となり、一部の個体では遊泳力を完全に失い、心臓のみを鼓動させている状態となった。遊泳が不安定な個体は腸管が薄く染色され、遊泳の活発な個体ほどそれが濃くなる傾向がみられた。また、心臓のみを鼓動させている個体では腸管は染色されず、下顎や尾部膜鱗、頭部などが薄く染色された。35°C に接触させた個体はすべて死亡しており、体表が全体的に薄く染色され、また体の前部(下顎から胸鱗にかけて腹部)が体の後部に比べて濃く染色された。以上から、これまでの結果と同様、外観上健全な個体では腸管のみが染色され、他の部位は染色され

ず、死亡個体あるいは回復困難と考えられる個体では体表が全体的に染色された。温度ショックにより運動性が衰えた個体では、衰弱が大きいと考えられる個体ほど腸管への染色が薄くなる傾向がみられたが、色調による衰弱の程度の判定は難しいと考えられた。

(2) 成長段階による染色状態の比較: 孵化直後の仔魚の染色部位を、これまでの実験から得た全長 4~5 mm の仔魚の染色特性と併せ、Table 4 に示した。孵化直後の仔魚の場合、外観上健全な個体は全く染色されず、死亡個体は体表が全体的に濃く染色された。

全長 8~10 mm の仔魚では健全な個体は消化管が部分的に染色され、死亡個体は体表が全体的に染色された。これらの染色状態は全長 4~5 mm の個体の結果に一致し、Mikacion による生体染色が、開口した全長 10 mm 以下の個体であれば、腸管と体表の染色の有無から生死の判定が可能と考えられた。一方、孵化直後の仔魚の場合は、未開口であったため、腸管内に Mikacion が取り込まれず、腸

Table 4. Staining patterns and vital activity of *P. major* at different developmental stage.

Stage	Vital Activity	Body Parts						
		head		belly		lateral muscle (surface)	fin	
		lower jaw	other part	intestine	skin		pectral fin	other part
Pre Larva (T.L. 2~3 mm)	healthy	-	-	-	-	-	-	-
	dead	+	+	-	+	+	+	+
Post Larva (T.L. 4~5 mm)	healthy	-	-	+	-	-	-	-
	dead	+	+	-	+	+	+	+
Post Larva (T.L. 8~10 mm)	healthy	-	-	<+>	-	-	-	-
	dead	+	±<+>	-	±	±<+>	±	±

- : not stained, ± : faintly stained, + : stained, < > : partially stained.

Table 5. Vital activity and staining patterns by Mikacion in gobiid larvae.

Conc.	Vital Activity (After Staining)	Body Parts						
		head		belly		lateral muscle (surface)	fin	
		lower jaw	other part	intestine	skin		pectral fin	other part
1,000mg/l	healthy	+	-	+	-	-	-	-
	healthy	+	-	+	-	-	-	-
	healthy	+	-	+	-	-	-	-
	healthy	+	-	+	-	-	-	-
	healthy	+	-	+	-	-	-	-
2,000 mg/l	healthy	+	-	+	-	-	-	-
	dying	+	-	+	+	<+>	-	-
	dying	+	-	+	-	<+>	-	-
	dying	+	-	+	-	<+>	-	-
	dying	+	-	+	-	<+>	-	-
3,000 mg/l	healthy	+	-	#	-	-	-	-
	healthy	+	-	#	-	-	-	-
	healthy	+	-	#	-	-	-	-
	dying	+	-	#	-	-	-	-
	dying	+	-	#	-	-	-	-

- : not stained, ± : faintly stained, + : stained, # : distinctly stained, < > : partially stained.

管が染色されなかったものと考えられ、体表の染色の有無により判定する必要があることが明らかとなった。

(3) 魚種による染色状態の比較

a. ハゼ科仔魚の適正染色濃度：取水口でネット採集した外観上健全なハゼ科仔魚の染色後の活性度と染色部位の比較を Table 5 に示した。1,000 mg/l では仔魚の遊泳に異常はみとめられなかったが、2,000 mg/l では5個体中4個体に、3,000 mg/l では2個体に遊泳異常が認められ、ハゼ科仔魚の場合、Mikacion 濃度が2,000 mg/l 以上では毒性を持つことが明らかとなった。マダイ仔魚の場合、

2,000mg/l でも異常は認められず、魚種あるいは個体の大きさによって、Mikacion に体する耐性が異なるものと考えられ、生体染色剤として用いるには、できるだけ低濃度で染色する必要があることが明らかとなった。

b. 取水口採集仔魚の染色状態：取水口でネット採集したハゼ科及びイソギンポ科仔魚の外観上の活性度と染色状態を比較し、Table 6 に示した。ハゼ科仔魚の場合、外観上健全な個体は9パターンに、衰弱個体は4パターンに、死亡個体は2パターンにそれぞれ区分できた。外観上健全な個体では、前述のマダイ仔魚の染色状態と比較すると、

Table 6. Vital activity and staining patterns by Mikacion in larval fish collected by a plankton net.

Species	Vital Activity	Body Parts				Number	Pattern (No.)	
		intestine	lateral body	others				
				snout	fin			
Gobiidae (T.L. 12~17 mm)	healthy	+	-	-	-	11	1	
		+	-	+	+	19	3	
		+	+	-	+	2	4	
		+	+	+	+	3	5	
		-	-	+	-	1	6	
	dying	-	-	-	+	17	7	
		-	-	+	+	22	8	
		-	+	+	+	9	9	
		-	-	-	+	7	10	
	dead	-	+	-	+	8	11	
		-	+	+	+	19	12	
		-	+	+	+	13	14	
	Blenniidae (T.L. 2~3 mm)	healthy	+	-	-	+	13	1
			-	-	-	+	1	2
		dying	-	+	-	+	7	4
-			+	+	+	2	5	
-			+	+	+	67	6	
dead		-	+	+	+			

+ : stained, - : not stained.

ハゼ科の場合、No. 1 のみがこれと一致した。No. 2~5 は腸管が染色され、マダイの場合と同じ特徴が認められるものの、他の部位も染色された。No. 6~9 は腸管は染色されず、その他の部位が染色された。衰弱-死亡個体では腸管は染色されず、他の部位が染色されるパターン (No. 10~15) を示した。外観上健全な個体に属した No. 7~9 と衰弱個体である No. 10~12 はほぼ同じ染色パターンを示し、両者の明確な区別はできなかった。また、衰弱個体である No. 13 と死亡個体である No. 14, 15 は染色部位やその広がり、あるいは濃さに相違がみられるものの、基本的には No. 6~12 の染色パターンと同じと考えられた。

この結果を整理するとハゼ科の染色パターンは以下の3グループに区別できた。

- 腸管が染色されるが、他の部位は染色されない (No. 1) : 外観上健全
- 腸管が染色され、他の部位も染色される (No. 2~5) : 外観上健全
- 腸管は染色されず、他の部位が染色される (No. 6~15) : 外観上健全-死亡個体

イソギンボ科の場合、外観上健全な個体は2タイプに、衰弱個体は3タイプに、死亡個体は1タイプに区分された。外観上健全な個体では、マダイの染色パターンに一致するものではなく、腸管と他の部位が共に染色されるパターン (No. 1) と、腸管が染色されず、他の部位が染色されるパターン (No. 2) が認められた。衰弱-死亡個体では腸管が染色されず、他の部位が染色されるパターン (No. 3~6) を示し、外観上健全な No. 2 のパターンと特に明確な区別はできなかった。

この結果を整理すると、イソギンボ科の染色パターンは以下の2グループに区分できた。

- 腸管が染色され、他の部位も染色される (No. 1) : 外観上健全
- 腸管は染色されず、他の部位が染色される (No. 2~6) : 外観上健全-死亡個体

取水口採集サンプルの活性度の判定を複雑にしている原因は、外観上健全な個体と衰弱-死亡個体を通して腸管が染色されず、他の部位が染色される個体が存在するためである。採卵し育成したマダイ仔魚による実験ではこのよう

なパターンは認められず、天然仔魚の特徴、あるいはネット採集時の擦れ等による複雑なストレスが関与している可能性が示唆された。そこで、外観上は健全であるが、腸管が染色されないパターンについては、間もなく衰弱、死亡する可能性がある個体として、衰弱-死亡個体に入れることとした。

以上から、天然海域ではネット採集された仔魚の活性度別の染色パターンを次のように類別した。

- (a) 腸管が染色されるが、他の部位は染色されない。: 健全個体
- (b) 腸管が染色され、他の部位も染色される。: 軽度損傷個体
- (c) 腸管は染色されず、他の部位が染色される。: 衰弱-死亡個体

4. 結果のとりまとめ

(1) 染色剤及び染色法について

Methylen Blue Tetrahydrate, Neutral Red, Bismarck Brown 及び Mikacion, Brill. Red 8BS の4種類の染色剤の比較実験から、仔魚の活性判定用の染色剤として Mikacion が最適であることが明らかとなった。

マダイ仔魚を用いた一連の染色実験から、明瞭な染色を行うには、Mikacion の添加濃度を 500 mg/l 以上とし、染色時間を20分以上とするのが適当であった。一方、ハゼ科仔魚の染色実験から、20分染色の場合、2,000 mg/l 以上で仔魚の衰弱が起り、高濃度では毒性が認められた。これらの結果から、Mikacion の添加濃度は 500~1,000 mg/l の範囲にするのが適当と判断した。マダイの実験では 2,000 mg/l で60分間の染色でも仔魚のへい死は認められず、魚種、あるいは成長段階によって感受性が異なる可能性が考えられ、魚種によって添加濃度を調整する必要がある。

Mikacion を用いて染色を行った後、ホルマリン固定し、48時間以上放置したが、退色は認められなかった。したがって、染色を行った後、直ちにホルマリン固定すれば、保存サンプルとして使用できるものと考えられた。

以上の結果をもとに、発電所取・放水口の染色法による仔魚の活性判定のための操作法を整理し、次に示した。

a. ネットの後端に 2l ポリ瓶を送致したプランクトンネットを用いて、一定時間のサンプリングを行った後、ポリ瓶の中に濃縮されたサンプル中の仔魚を活性判定用の標本として用いる。

b. ポリ瓶の中には通常、仔魚の他に大量の生物、デトライト等が含まれているため、採集終了後、直ちに濾過海水を用いて希釈を行い、また弱いエアレーションを行いながら、1時間程度放置し、仔魚の活性を安定させる。

c. Mikacion を濾過海水に溶解し、最終的に 1,000 mg/l になるようにサンプルに添加し、20分間放置する。添加濃度については魚種等によって感受性が異なる可能性があるため、事前にその海域の卓越種を用いて、適正濃度を確認すべきである。

d. サンプルをこし網で濾過し、濾過海水を用いて良く洗浄して、染色剤を洗い落とし、ビーカーに移す。

e. サンプルをビーカーからシャーレに分割し、実体顕微鏡下で仔魚を分離し、仔魚の染色状態と外部形態の損傷状態を観察し、活性度を判定する。短時間のうちに観察できない場合は、中性ホルマリンを用いて最終濃度が3%になるよう固定した後に観察する。なお、外部の損傷状態は参考資料とし、原則的には染色状態から活性の判定を行う。

(2) 活性の判定基準

採卵し育成したマダイ仔魚を用いて染色実験を行った結果、外観上健全な個体では、腸管が染色され、他の部位は染色されない特徴が認められた。衰弱、死亡個体では、腸管が染色されず、他の部位が部分的、あるいは広い範囲にわたって染色された。一方、取水口で採集した天然のハゼ科及びイソギンボ科仔魚では複雑な染色パターンが認められたが、マダイ仔魚の実験結果を基準とすると、以下のよう区分することが適当と考えられた。

a. 健全個体: 腸管が染色されるば、他の部位は染色されない。

b. 軽度損傷個体: 腸管が染色され、他の部位も染色される。

c. 衰弱-死亡個体: 腸管は染色されず、他の部位が染色される。ただし、他の部位が染色されない場合は、仔魚の成長段階を確認し、すでに開口している場合は衰弱-死亡個体に、未開口の場合は健全個体とする。

謝 辞

本論文に使用したデータは関西電力(株)環境部から委託研究として実施されたものの一部を使用しており、本研究の円滑な運営と、論文の公表に尽力していただいた、関西電力(株)の関係者各位に感謝の意を表す。(株)関西総合環境センター宮津エネルギー研究所の関係者の方々には多忙にもかかわらず、実験の実施に種々の便宜を計っていただいた。また、(株)海洋生態研究所、長井研究員には実験の助成をいただいた。ここに併せて感謝の意を表す。

文 献

- Evans, S.D. 1983. Assessment of the impact of the Maine Yankee cooling water intake structure. Pursuant to Section 316 (b) of Clean Water Act. Environmental Studies Department, Maine Yankee Atomic Power Company, Augusta, Maine, USA
- Marcy, B.C. Jr. 1975. Entrainment of organisms at power plants with emphasis of fishes-an overview, pp. 89-106. S.B. Saila (ed.), Fisheries and Energy Production: a Symposium. Lexington books, Lexington, Mass.
- Marcy, B.C. Jr. 1976. Planktonic fish eggs and larvae of the lower Connecticut River and the effects of the Connecticut Yankee Plant including entrainment, pp. 115-139. D. Merriman and L.M. Thorpe (eds.), The Connecticut River ecological study: The impact of a nuclear power plant. Washington, American Fisheries Society.

Synopsis

Evaluation of the Vital Activity of Marine Fish by a Staining Method

Kunishige HAYASHI, Kiyoshi NISHI, Tomoji IKEDA,
Kiyosumi KAKII and Masatosi SINODA

The experiments using different stains with the larvae of sea-bream indicated that the Mikacion (Brill, Red 8BS) was suitable for evaluating the vital activity of the larvae. Through a series of staining experiments with larvae of sea-bream, gobbids and blenniids, it was found that effective concentration of the Mikacion and staining time were 500-1,000 mg/l and around 20 mins, respectively.

Based upon the relationship between the vital activity and the staining patterns of the fish examined, the following criteria were proposed, healthy: intestine stained but the other parts not stained, slightly healthy: intestine stained some other parts also stained, dying or dead: intestine not stained but some other parts stained.