

アリザリン・コンプレクソン内包腸溶性マイクロカプセルの
経口投与によるヒラメ種苗の耳石標識

一色 竜也*・片山 知史**

Otolith staining by oral administration of alizarin complexone with enteric-coated
microcapsules for juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Tatsuya ISSHIKI, and Satoshi KATAYAMA

Abstract

Otolith staining by oral administration of microcapsulated alizarin complexone (MALC) was examined as a fluorescent dye for juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to develop a new mass-marking method. Three diet regimes MALC mixed with compound feed (MALC diet), ALC solution directly mixed with the compound feed (DALC diet) and ALC free (control diet) were employed for rearing experiments. Ten juveniles (TL 43.5-61.7mm) were used for each regime and reared for ten days. Fluorescent marks of ALC were observed at the rate of 30%-40% of individuals reared with the MALC diet, obviously lower than 90%-100% of reared with DALC diet. Beside that, fish feeding MALC diet showed less growth rate than those feeding DALC diet, suggesting that more improvements are needed in the MALC production for stable otolith staining.

はじめに

ヒラメは本県沿岸漁業の重要な漁業対象種であり、1987年から種苗放流事業が継続して行われてきた。その結果、年間の漁獲尾数のうち種苗放流魚が占める割合は14.0~38.9%(1992~2002年)と推定されており、放流効果が明らかにされてきた¹⁾。放流事業をより効率的に推進するため、効果の把握は今後も必要不可欠である。特に現在、種苗放流事業は受益者負担が求められており、効果把握の重要性は高まっている。

放流効果の把握には、漁獲されたヒラメが放流魚であるかどうかを識別する必要がある。これまでその識別は、人工種苗放流魚に多く見られる有眼側の白化や無眼側における黒化等、体色異常の有無を確認することで行われてきた。しかし、現在では種苗生産技術の向上に伴って、体色異常魚の出現がある程度抑えられつつあるとともに、こうした魚は市場価値が低いことから、放流前に取り除かれるようになってきた。このため相対的に放流魚の識別率は低下していくと予想され、放流効果が過少評価される危険性が生じている。放流効果を正確に把握するためには、体色異常に拠らない標識技術の確立が求められている。

魚類への標識方法としてタグ標識²⁾や鱗抜去³⁾といった外部標識が挙げられ、これらは標識魚の発見が容易ではあるが、数万~数十万尾単位で生産される種苗への装着

は多大な労力が必要となる。また、脱落や稚魚への装着が困難である等の制約も受ける。これに対し内部標識として、アリザリン・コンプレクソン($C_{19}H_{15}NO_8$ 以下、ALC)やテトラサイクリンによる魚体内部の硬組織への蛍光標識法が開発され⁴⁾⁵⁾、種苗をはじめあらゆるサイズの魚体に、大量かつ効率的に標識できるようになった。本県では鱗からのALC標識検出法が確立され⁶⁾⁷⁾、1尾当たり数枚の鱗が入手できれば、市場調査による詳細な追跡が可能である。

ALC標識の装着には一般に浸漬法が用いられる。これは長時間、止水条件下でALC溶液に種苗を漬浸することで行われ、種苗に与えるストレスも大きく、大量斃死を招く恐れがある。これを防ぐため密度・水温・溶存酸素等の調節といった飼育管理が必要となり⁸⁾、数十万単位といった大量の種苗を安定して標識するには、多大な労力と専用の設備が必要になる。高橋⁹⁾はALCを配合餌料に直接吸着させ、ヒラメ種苗に与えたところ、耳石への標識が可能であることを報告している。こうした経口標識が実用化できれば、通常の給餌作業の中にその作業を組み込むことができ、ALCの標識装着作業は従来の浸漬法に比べ、飛躍的に労力が軽減されると考えられる。しかし、同方法によるALCの餌への配合は、設定した濃度でALCを溶液化し、餌料へ吸着させるといった作業が必要となる。ALC溶液を粉末固形化できれば、

2007. 1. 29 受理 神水セ業績No.06-23

脚注* 資源環境部

** 水産総合研究センター 中央水産研究所 浅海増殖部 〒238-0316 横須賀市長井6-31-1

添加ビタミン剤を餌料へ配合するなど同じような手間しかかからず、その労力はさらに軽減されると思われる。

本県では、アユの冷水病対策として、同ワクチン内包の腸溶性マイクロカプセルが開発され、経口投与が行われている¹⁰⁾。同カプセルは粉末固形であり、中に液体のアユ冷水病ワクチンが内包されている。同カプセルにALC溶液を内包させれば、経口標識用の粉末固形状のALCを得ることができると考えられる。

本研究ではALC内包の腸溶性マイクロカプセルの作成と、これによるヒラメ種苗の経口標識法の可能性について検討した。

材料及び方法

1 ヒラメ種苗の胃及び腸管内におけるpH測定

腸溶性マイクロカプセルは酸性の溶液中で不溶、アルカリ性で崩壊する性質を持つ。この特性によって一般的には酸性の胃内で溶けず、腸管内で溶け、内包物質が展開される仕組みになっている¹⁰⁾。ヒラメ種苗にこの腸溶性が機能するかどうかを明らかにするため、胃及び腸管内のpHの測定を行った。供

試魚は2005年8月に当水技センターで種苗生産の過程で得られた平均全長88.8mm(71.3~98.7mm)の種苗、計33尾を用いた。これらをサンプリング後すぐに、胃及び腸管を摘出して内部を開き、接触型のpHセンサー(HORIBA 6261-10C)を用いて胃壁面及び中腸壁面¹¹⁾に直接当ててpH測定を行った。

2 ALC内包マイクロカプセルの作成

アユ冷水病ワクチンに用いられている腸溶性マイクロカプセル¹⁰⁾に3種類の濃度(2mg/ml、10mg/ml、20mg/ml)のALC溶液の内包を試みた。各濃度の調整は、まずALC20mg/ml溶液を100ml作成し、同溶液5ml、25mlを各50mlになるよう蒸留水で希釈して、各々2mg/ml溶液、10mg/ml溶液を得た。これら溶液からFig. 1に従ってマイクロカプセルを作成した。なお、同工程は藤野・永井¹²⁾の方法を一部改変したものである¹⁰⁾。

3 経口投与試験

(1) 試験区の設定

ALC餌の投与試験は、2006年2月10日から10日間行った。市販の配合餌料にALC内包腸溶性マイ

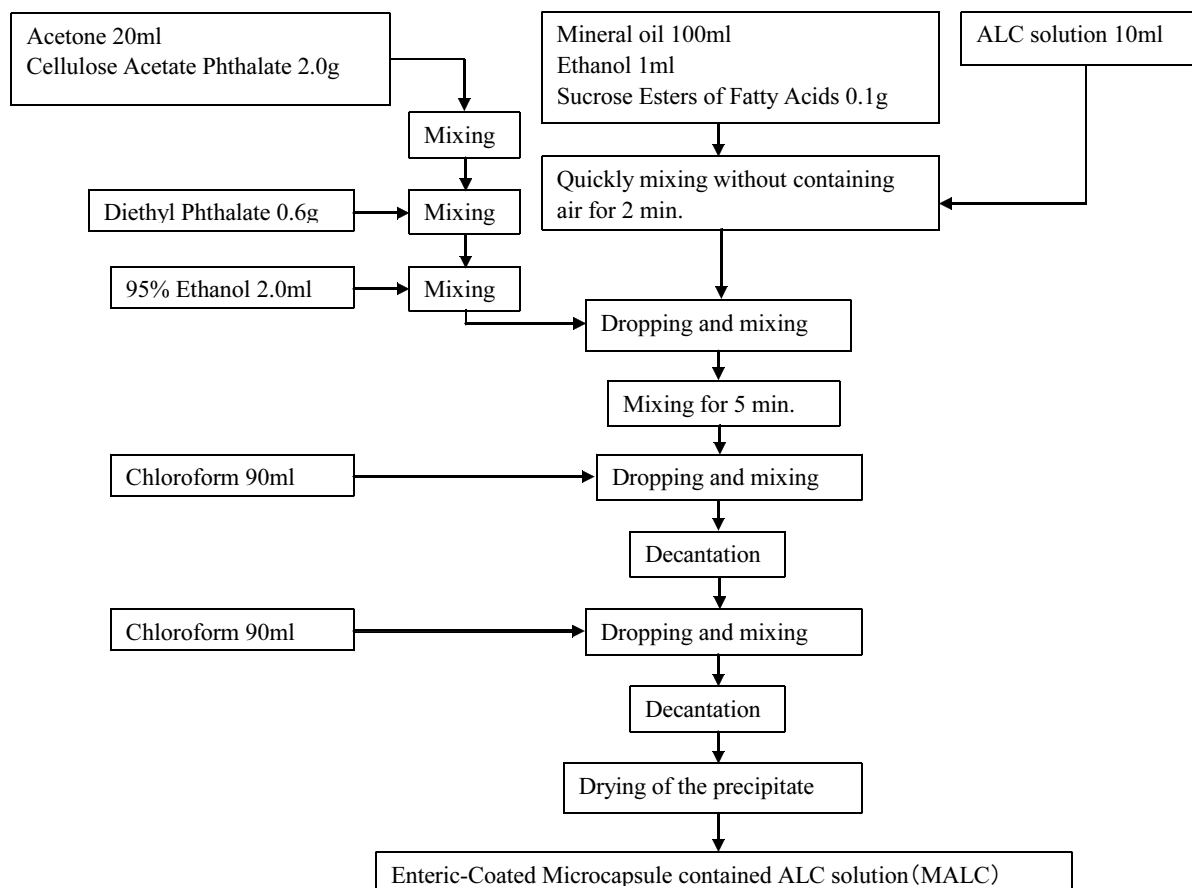


Fig. 1 Preparation process of microcapsulesated ALC (enteric capsule)

クカプセル（以下、MALC）を加えたMALC餌料、高橋⁹⁾と同様にALC溶液を直接吸着させた餌料（以下、DALC餌料）及びALCを含まない対照区餌料の3餌料について、3処理を各3区（～区）ずつ、計9試験区を設けた。各試験区の水槽は50Lのプラスチック水槽で、供試魚を10尾ずつ収容した。供試魚は（株）日清マリンテックから購入した平均全長53.9mm（43.5～61.7mm）平均体重1.7gの種苗120尾から無作為に抽出した90尾を用いた。

なお、これら試験を始める10日前に供試魚を試験区に収容し、馴致のための予備飼育を行った。

(2) 餌の作成

高橋⁹⁾によると餌料1kgあたりALC1,000mgを吸着させた餌を10日間ヒラメ稚魚に与えたところ、耳石に明瞭な標識が認められたとしている。そこで、MALC餌料、DALC餌料ともこの比率以上になるようにALCの配合を行うこととした。餌の投餌量は魚体重（平均1.7g）の3%程度、1日1区画当たり0.51gとした。このため実験期間中に必要な餌の量は1処理区（計3区画）当たり15.3gである。

MALCをFig. 1の手順で作成したところ、20mg/mlのALC溶液50mlからMALCを6.97g得た。ただし、本過程でマイクロカプセルに内包されたALC量は不明であるため、ここでは投入されたALC1000mgの内1/10がMALCとして内包されると仮定した。すなわちMALC6.97gに含まれるALC量は100mgと推定し、配合飼料15.3gに必要なMALCは1.07gであると設定した。

餌料への配合方法は、確実に供試魚へ取り込ませるため混ぜ込む方式とした。MALC餌料は、まず配合飼料（クランブル）15.3gに所定の割合でMALCを配合した。これを蒸留水で練り、10mlシリンジで押し出して乾燥させ、粒状に細断して作成した。DALC餌料は、20mg/mlのALC溶液0.765mlを同じ銘柄の配合飼料15.3gに混ぜた。MALC餌料と同様にこれを蒸留水で練り、10mlシリンジで押し出して乾燥させ、粒状に細断して作成した。対照区の餌料は同じ銘柄の配合飼料を蒸留水のみで練り、他2餌料と同様に10mlシリンジで押し出して乾燥させ、粒状に細断して作成した。

(3) 飼育及び耳石の観察

経口投与を行った10日間、各区の給餌は食べ残しが無いように1日2～4回、成長や摂餌状況に合わせて調整した。飼育水はろ過海水で約3.5回転/時の換水を行い、水温は自然海水温（10.3～13.1℃）とした。

ALCを含んだ餌の投与が、ヒラメの成長に与える影響を明らかにするため、投餌試験の開始の前

日と終了1日後に各区供試魚の全長を測定した。ただし、実験前後で個体を識別することは困難なので、処理間の成長比較には平均成長率を用いた。同値は試験前後の平均全長の差を試験前の平均全長で割って求めた。

投餌試験後も16日間、配合飼料（EP 粒状2mm）を与え継続飼育を行い、耳石縁辺部に無標識部位を形成させ、ALC標識部位と縁辺部とのコントラストの明瞭化を図った。その後、各試験魚の耳石を摘出し、落射蛍光顕微鏡（G励起）下でALC標識の発色状況を確認した。その度合いとして、「全く確認できず（-）」、「確認はできるが標識としては不明瞭（+）」、「標識として判別可能（++）」、「標識として十分に判別可能（+++）」の4段階を設定した。全個体に対する「標識として判別可能」以上（+++と++）の個体が占める割合を標識率とした。

(4) ALC溶液の標識力持続試験

薬品メーカーによると、ALC溶液は作成直後から時間経過とともに標識力が低下する。このため、遮光及び冷蔵（4℃）状態で1週間内に使い切ることが推奨されている。そこで標識力の保持を確認するため、2006年2月10日から経口投与試験と並行して、10Lのプラスチック容器に同10尾ずつ3試験区設定し、同溶液作成後1日目、5日目、10日目にそれぞれ浸漬法（ALC80ppm 24時間浸漬）による標識を行った。供試魚は、投餌試験と同じ由来である（株）日清マリンテックから購入した120尾のうちの30尾である。標識後16日間配合飼料（EP 粒径2mm）で飼育した後、耳石を摘出した。経口投与試験魚と同様に落射蛍光顕微鏡（G励起）下で、ALC標識を4段階（-～+++）の発色度合いを用いて識別を行った。

結果

1 ヒラメ種苗の胃及び腸管内におけるpH測定

ヒラメ種苗の胃及び腸管を摘出したところ、胃に内容物が認められる個体があった。胃内容物の有無で分け、全長と体重、胃と腸管内のpH、それぞれの平均値を計算しTable 1、2に示した。なお、腸管においては一部測定不能の個体があった。胃内容物の認められた個体のpHは平均5.5であり、無かつ

Table 1 pH value in stomach with contents and vacuous stomach of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) juveniles.

	Stomach with contents	Vacuuous stomach
Sample size	8	25
Mean TL (mm)	85.1	90.0
Mean BW (g)	5.4	6.2
Mean pH	5.5	6.3
pH range	5.1-6.2	6.0-6.5

Table 2 pH value in intestine with contents and vacuous intestine of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*).

	Intestine with contents	Vacuuous intestine
Sample size	8	19
Mean TL (mm)	85.1	90.0
Mean BW(g)	5.4	6.2
Mean pH	6.2	6.3
pH range	6.1-6.5	6.2-6.5

た個体の6.3より強い酸性を示した (F検定 $p < 0.05$)。一方、腸管内のpHは胃に内容物がある場合は平均6.2、無い場合は6.3とほぼ同等であり有意差は認められなかった (F検定 $p > 0.05$)。胃内容物の無い場合は、胃、腸管内ともpHは平均6.3と同値であったが、胃内容物の有る場合、胃は平均5.5、腸管内は6.2であり胃は腸より強い酸性を示した (F検定 $p < 0.05$)。

2 ALC内包マイクロカプセルの作成

3種類の濃度 (2 mg/ml、10mg/ml、20mg/ml)ともALC溶液を内包したマイクロカプセルの作成が可能であった (Fig. 2)。これら3種の濃度間に、マイクロカプセル化の出来具合に違いは見られなかった。

どの濃度においても、作成されたマイクロカプセルの形状は一定の球形ではなく、歪な形をしたものや複数のカプセルが大きな団塊となっている状態のものもみられた。

3 経口投与試験

実験期間中、MALC餌料区と対照区の各1区で、各1尾、計2尾の個体が死亡した。実験後の平均全長はこれらを除いて計算し、平均成長率をTable 3に示した。各餌料区の平均値をみるとDALC餌料区が0.06で最も成長率が高く、MALC餌料区の

区が0.03で最も低かった。各餌料区 (、)間の平均成長率には、いずれも有意差が認められなかった (One-way ANOVA, $p > 0.05$)。そこで、各餌料区の全個体の成長率をまとめ、餌料区間で比較した。その結果、平均成長率に有意差がみとめられた (One-way ANOVA, $p < 0.05$)。どの区の間には差があるのかを調べるために、多重比較 (TukeyのHSD検定)を行った。5%水準で、DALC餌料区はコントロール区と有意差が認められなかったが、MALC餌料区とそれら2区との間の差が有意であり、MALC餌料区における成長速度が低いことが示された。

MALC餌料区及びDALC餌料区において、耳石上に標識として十分に判別な個体が得られた (Fig. 3)。これらは、耳石中心部側から無標識の部分と標識された部分、無標識の縁辺部が識別された。ただし、こうした耳石を持つ個体は全てではなく、その発光度合い毎に個体数をカウントしTable 4に示した。DALC餌料区の標識率は0.9~1.0とほぼ全個体であったのに対し、MALC餌料区は0.33~0.40と半数以下であり標識として判別が困難な個体が多かった。

ALC作成後1日目、5日目、10日目にそれぞれ浸漬法で標識した個体は、全ての耳石にALC標識が確認され、10日間はALCの標識力に低下は認められなかった。また、その発光度合いは経口投与試験での場合に比べ、遥かに明瞭であった。

考 察

ALCの経口投与による耳石への標識は、ヒラメ⁹⁾、トラフグ¹³⁾で可能であることが確認されている。今回の試験でも、DALC餌料の経口投与によるヒラメ耳石への標識が検証された。さらに、MALC餌料区でも耳石に標識が認められた個体が得られた。しかし、DALC

Table 3 Growth for 10 days of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) juveniles reared in diets regimes.

ALC diets		Initial TL range (mm)	Final TL range (mm)	Mean growth rate	ANOVA
MALC diet	I	48.0-59.4 (54.0)	51.1-60.9 (55.7)	0.03	F=13.857 P<0.05
	II	46.9-56.9 (51.9)	46.4-59.2 (53.2)	0.02	
	III	43.5-59.8 (52.2)	46.8-60.4 (53.5)	0.02	
	Mean			0.03	
DALC diet	I	46.6-61.6 (52.5)	49.9-69.0 (55.5)	0.06	
	II	49.5-61.6 (55.4)	53.5-64.8 (58.6)	0.05	
	III	46.9-58.6 (53.1)	51.1-65.0 (57.2)	0.07	
	Mean			0.06	
Control	I	45.5-57.5 (52.4)	49.9-69.0 (55.5)	0.06	
	II	44.8-61.0 (53.9)	45.8-65.3 (56.1)	0.04	
	III	44.6-61.7 (55.5)	46.5-65.3 (58.2)	0.05	
	Mean			0.05	

MALC diet: Microcapsulated ALC mixed with compound feed

DALC diet: ALC solution directly mixed with the compound feed

Control: ALC free compound feed



Fig. 2 Microcapsulated ALC (enteric capsule) (1000mg/l)

餌料区に比べMALC餌料区の標識率は低く、魚体の平均成長率も対照区、DALC餌料区に比べ低かった。ただし成長率に関しては、対照区をみても本県における同サイズ種苗の通常の飼育事例に比べ、著しく低い結果となった。これは通常の飼育水温が19.5~22.5 である¹⁾のに対し、本試験では10.3~13.1 と低く、種苗の成長が抑制されたものと考えられる。そのため、これら餌料間の成長差については再試験が必要であると思われる。

DALC餌料はこうした低成長状況においても、標識率は0.9~1.0と良好であった。このため標識として実用に耐えうるレベルといえる。同餌料を実際の種苗生産過程で用いるとすると、仮に全長50~60mm、体重2gの種苗10万尾に標識を装着する場合、1日あたり体重の3%の餌を与えると、10日間で必要な餌の量は60kgである。今回と同じ濃度(1,000mg/kg)でDALC餌料を作成するには、60kgといった大量の餌に60gのALC溶液を均

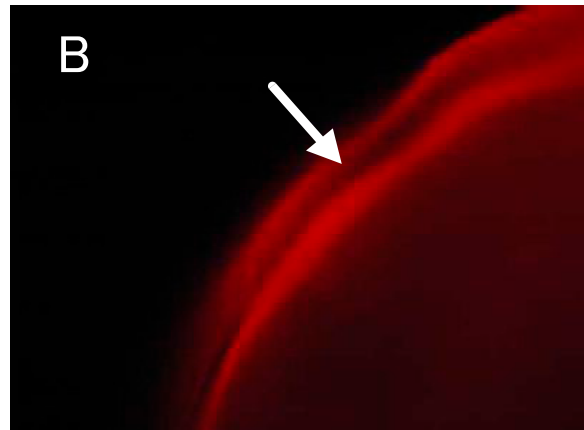
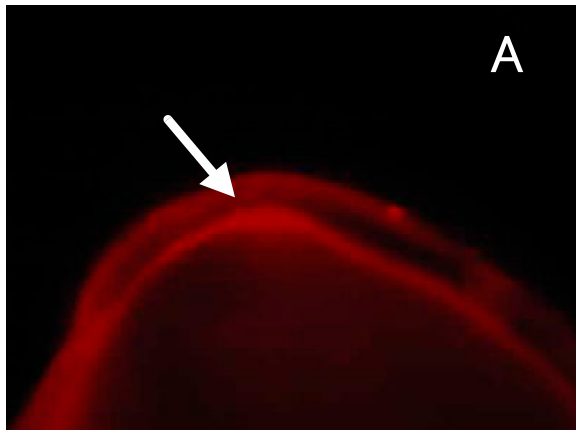


Fig. 3 Whole otolith of Japanese flounder fluorescent (*Paralichthys olivaceus*) observed under UV light. Otolith from fish reared with MALC diet (A) and DALC diet (B). Arrows indicate ALC marks.

Table 4 Scores of ALC mark radiation under UV light in otolith of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) reared each regime.

		ALC mark radiation				Marking rate ("+++" and "++")
		+++	++	+	-	
MALC diets	I	0	4	4	2	0.40
	II	1	2	4	2	0.33
	III	2	2	4	2	0.40
DALC diets	I	8	1	1	0	0.90
	II	9	1	0	0	1.00
	III	8	1	0	1	0.90

+++ : strong radiation as marking; ++ : good radiation as marking; + : feeble radiation; - : no marking section

等に吸着させる必要がある。ALCの標識力は時間とともに低下すると言われており、DALC餌料の作成は投与直前に行う必要がある。今回の試験では、10日間はALC溶液の標識力が保持されることが確認されたので、標識を行う前日に10日分の餌を用意すれば良いと思われた。

ALCの時間的な標識力の低下は、外光の影響や外気との接触といった外的要因、アルカリで水に溶かすといった内的要因が考えられる。この点、マイクロカプセルへの内包は、ALC溶液の外的要因からの遮断に寄与すると考えられる。標識力の時間的な制約がある程度緩和できれば、MALCをあらかじめ作り置きして、作業を分散させることができる。ただし、MALCのみならず、DALC、ALC溶液そのものの標識保持能力は未だ検証されていない。このため、これらの標識持続時間等を今後明らかにする必要がある。

MALC餌料区の標識率は0.3~0.4程度であり、DALC餌料区より低かった。標識に求められる性能は、対象とする種苗群にほぼ全数装着されることであり、同餌料区の標識率では不十分である。標識率が低かった理由として、マイクロカプセルに内包されたALC量が十分でなかったこと、MALCが腸管内で十分崩壊せずALCが展開できなかったことが挙げられる。に関しては、今回、投入量の1/10程度がマイクロカプセルに内包されると仮定し、同溶液の濃度や量を決定した。しかし、内包の途上で、一部のマイクロカプセルが大きな団塊を形成してしまったため、想定した量のALCが内包できなかったと考えられる。マイクロカプセルの団塊化の原因は、その製造工程の不安定さにあり、その径は作成時の攪拌速度や皮膜形成条件によって微妙に変化する¹²⁾。特にクロロホルムによって膜を硬化させる際、その注入の仕方によって、膜が融合しマイクロカプセルの大きな団塊が形成されることが多かった。また、デカンテーションでマイクロカプセルを回収する際に、上澄みに懸濁するマイクロカプセルの回収がほとんど不可能であった。ALCの実際の内包量は不明であり、MALCの収量の安定化や崩壊率の算定を行うには、まず内包量の測定方法の確立が必要である。

について考察すると、今回用いたマイクロカプセルはアルカリで崩壊する性質のものであるため、腸管内のpHがその条件を満たしている必要がある。MALCは餌に混ぜて投与されるので、胃内容物のある場合のpH、平均6.2程度が、腸管内でMALCが晒されるpHであると考えられる。藤野・永井¹²⁾は同様のマイクロカプセルを使って崩壊試験を実施し、その崩壊率がpH1.2で全体の0.3%、pH6.8で2.6%であるとしている。当マイクロカプセルは酸性側で崩壊しにくいいため、pH6.8の場合より腸管内pH6.2における崩壊率の方が低いと思われる。すなわち展開されたALC量は投与時の2.6%以下であったと推測される。

今回用いたマイクロカプセルは胃で溶けない性質を有する。この性質が胃液による内包物の変性を防ぐため、ワクチン等の用途に適している。しかし、ALCはpH5程度の酸性で変性することはなく、pH6~9で調整した溶液より、pH5で調整した方がハタハタの耳石に明瞭かつ濃く標識されたとの報告がある¹⁴⁾。すなわちALCを経口標識するために必要なマイクロカプセルの性能は、胃で溶けないことよりも、消化管内で確実に崩壊することが求められる。ただし、消化管のどの部分でALCが吸収されているかは不明であり、体内への取り込みをより確実にするには、栄養を吸収する可能性のある器官全体にALCを行き渡らせる必要がある。消化管の中で腸は栄養を吸収する代表的な器官ではあるが、ヒラメの消化管には胃と腸の間に幽門垂¹¹⁾があり、この器官も栄養を吸収する機能を備えているといわれている¹⁵⁾。したがって、幽門垂の手前にある胃で崩壊する胃溶性マイクロカプセルの開発ができれば、ALCによる経口標識をより確実に装着できると思われる。

本試験では確実にMALCを配合するため、餌に練りこんだが、実際の種苗生産過程で大量の餌に配合するには不向きな方法である。添加ビタミン剤のように餌への配合が容易であれば、標識装着に費やす労力はさらに軽減されると思われる。同技術の開発が望まれる。

DALC餌料と同等の標識率、収量の安定化、さらに餌への配合技術が確立されれば、経口標識はさまざまな課題に答えることができる。例えば、配合量を様々に変えることで、染色の度合いを可変し、標識の種類を容易に増やすことが可能となる。多種多様な標識設定が可能となれば、種苗ロット毎、放流時期別や放流地点毎の成長や生残の比較や回遊範囲等、放流技術開発に必要な課題の解明に大きく寄与することが期待される。

摘要

- ・ヒラメ種苗の胃のpHは胃内容物の有る場合は平均5.5(5.1~6.2)、無い場合は6.3(6.0~6.5)であった。
- ・腸管は胃内容物の有る無しで差は認められず、そのpHは平均6.3(6.1~6.5)であった。
- ・3種類の濃度(2mg/ml、10mg/ml、20mg/ml)ともALCを内包したマイクロカプセルの作成が可能であった。
- ・MALC餌料区及びDALC餌料区において、耳石上に標識として十分に判別可能な個体が得られた。
- ・MALC餌料区はDALC餌料区に比べ標識率(標識として判別できる個体の割合)が少なかった。
- ・ALC溶液は作成後、10日間は標識力を保持していた。

謝辞

マイクロカプセルの製造方法について指導いただいた

内水面試験場の原日出男氏、乳化剤(DKエステルF-10)をご提供いただいた第一工業製薬(株)の吉田靖氏、多くの有益な情報をいただいた神奈川県内水面振興会の手代木享介氏、ニチモウ(株)の宇田川純一氏、(株)ケミテックの矢部 誠氏に厚く御礼申し上げます。ヒラメ試験区の設置ならびに飼育に協力をいただいた山田敦氏、濱田信行氏を始め栽培技術部の方々、測定データの整理、耳石標本の作製にご助力いただいたに山口利恵氏、北村美香子氏に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 神奈川県 (2003) : 資源増大技術開発事業報告書 広域型中・底層性種グループ(ヒラメ), 神奈川県 1-13.
- 2) 増村和彦・佐藤正明(1974) : マダいの標識方法について. 栽培技研, 3(1), 1-7.
- 3) 北川 衛・山口光明・萩野節雄(1983) : マダいの腹鰭抜去による標識放流について, 栽培技研, 12(1), 5-9.
- 4) 栗田 博・塚本勝巳 (1987) : アニザリン・コンプレクソンによるマダイ稚仔魚の耳石標識 - . 栽培技研, 16(2), 93-107.
- 5) Tsukamoto K. (1985) : Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline tagging of otoliths. Bull. Japan. Sci. Fish., 51(6), 903-911.
- 6) 土地敬洋・今井利為 (1993) : マダイ稚魚の組織と鱗へのアニザリン・コンプレクソンによる染色. 水産増殖, 41, 379-385.
- 7) 中村良成・栗田 博 (1994) : アリザニン・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(1), 53-60.
- 8) 栗田 博・塚本勝巳 (1989) : アニザリン・コンプレクソンによるマダイ稚仔魚の耳石標識 - . 栽培技研, 17(2), 115-128.
- 9) 高橋庸一 (1994) : アリザリン・コンプレクソンの経口投与によるヒラメ稚魚の耳石染色. 栽培技研, 60(5), 611-615.
- 10) 原 日出男 (2001) : アユ冷水病の経口ワクチンの研究 - , 神水研報, 6, 109-112.
- 11) 落合 明編著(1996) : 魚類解剖大図鑑<図版編>, 緑書房, 東京, 257.
- 12) 藤野裕弘・永井 彰 (1992) : 魚類腸溶性マイクロカプセルの試作, 東海大学紀要教養学部, 23, 275-284.
- 13) 松村清治 (2005) : アリザリンコンプレクソン並びにテトラサイクリンによるトラフグ *Takifugu raubripes* 卵および仔稚魚の耳石標識, 日水誌, 71(3), 307-317.
- 14) 友田 努・桑田 博 (2006) : pH 調整したアリザリン・コンプレクソン溶液の希釈によるハタハタ稚魚の耳石標識(短報), 日水誌, 72(1), 76-78.
- 15) 松原喜代松・落合 明・岩井 保 (1979) : 新版魚類学(上), 恒星社厚生閣, 東京, 62.