

# 海産魚に対するオイゲノール製剤の麻酔効果と安全性

誌名	水産増殖
ISSN	03714217
著者名	石原,秀平 清,明広 楠田,理一 三柴,徹 中本,光則 村田,修 熊井,英水
発行元	水産増殖談話会
巻/号	68巻1号
掲載ページ	p. 79-88
発行年月	2020年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



資 料

海産魚に対するオイゲノール製剤の麻酔効果と安全性

石原秀平<sup>1,5,\*</sup>・清 明広<sup>1,6</sup>・楠田理一<sup>2,7</sup>・三柴 徹<sup>3</sup>・中本光則<sup>3</sup>・村田 修<sup>4,8</sup>・熊井英水<sup>4,9</sup>

Anesthetic effect and safety of eugenol formulation  
for juvenile marine fishes

Shuhei ISHIHARA<sup>1,5,\*</sup>, the late Akihiro SEI<sup>1,6</sup>, Riichi KUSUDA<sup>2,7</sup>, Tohru MISHIBA<sup>3</sup>,  
Mitsunori NAKAMOTO<sup>3</sup>, Osamu MURATA<sup>4,8</sup> and Hidemi KUMAI<sup>4,9</sup>

**Abstract:** “FA100” of eugenol formulation is the only fish anesthetic that obtained the manufacturing approval as veterinary drugs in Japan. Since vaccines are widespread in Japan, we examined anesthetic effect and safety of “FA100” prior to vaccination for juveniles of red sea bream (*Pagrus major*), yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), amberjack (*S. dumerili*), striped jack (*Pseudocaranx dentex*), rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and spotted knifejaw (*O. punctatus*). Although the test fish species and fish body weight are different, the concentration of 100 to 200 ppm of “FA100” is considered to be safe for vaccination work time of the test fish for anesthesia. However, more than 100 g in body weight of amberjack died without recovery from anesthesia. This study was recognized as a guide for the optimal anesthesia concentration and time for vaccinations in marine fishes in Japanese fish farms.

**Key words:** Marine fish; FA100; Eugenol formulation; Anesthetic effect and safety

---

2018年10月23日受付；2019年11月19日受理。

<sup>1</sup>田辺製薬株式会社営業統括部 (Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Animal Health & Food Chemical Products Development Section, 2-10 Dosho-machi, Chuo-ku, Osaka 541-8505, Japan).

<sup>2</sup>福山大学生命工学部海洋生物科学科 (Department of Marine Bio-science, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Fukuyama University, 1 sanzo, Gakuen-cho, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan).

<sup>3</sup>株式会社京都動物検査センター (Kyodoken Institute for Animal Science Research & Development, 585 Shimoitabashi, Fushimi-ku, Kyoto 612-8073, Japan).

<sup>4</sup>近畿大学水産研究所白浜実験場 (Shirahama Station, Aquaculture Research Institute, Fisheries Laboratory of Kinki University, 1-5 Shirahama, Nishimuro, Wakayama 649-2211, Japan).

<sup>5</sup>株式会社エス・ディ・ロジ品質管理部 (S. D. LOGI Co., Ltd., Quality Control Department, 1-2-1 Yasakadai, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0161, Japan).

<sup>6</sup>DSファーマアニマルヘルス株式会社 (DS Pharma Animal Health Co., Ltd., 5-7 Hommachi 2-chome, Chuo-ku, Osaka 541-0053, Japan).

<sup>7</sup>高知大学名誉教授 (80 Kera, Nankoku-shi, Kochi 781-5104, Japan).

<sup>8</sup>近畿大学名誉教授 (Shirahama Station, Aquaculture Research Institute, Fisheries Laboratory of Kinki University, 1-5 Shirahama, Nishimuro, Wakayama 649-2211, Japan).

<sup>9</sup>近畿大学名誉教授 (Uragami Station, Aquaculture Research Institute, Fisheries Laboratory of Kinki University, 468-3 Uragami, Nachi-katsuura, Higashimuro, Wakayama 649-5145, Japan).

\*連絡先 (Corresponding author): Tel, (+81) 78-793-9001; Fax, (+81) 78-793-9003; E-mail, s.ishihara@lg.sdcollabo.co.jp (S. Ishihara).

日本学術会議（2006）は、動物実験の適正な実施に向けたガイドラインの前文において、「わが国では、『動物の愛護及び管理に関する法律』（昭和48年法律第105号）および『実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準』（昭和55年総理府告示第6号）等に基づいて、実験動物の取扱いに関する具体的配慮の必要性が示されてきた。そのような状況の中で動物実験に関しては、科学研究の進歩を支える重要性に鑑み、法令ではなく行政指導によってその適正化が図られてきた」と記している。本ガイドラインの鎮痛処置、麻酔および術後管理の項では、実験動物の苦痛の軽減は、動物愛護のみならず、実験成績の信頼性や再現性を確保するうえで重要であるとし、研究の目的を損なうことのない鎮痛・麻酔方法を選ぶためには、必要に応じて医師、獣医師、薬剤師等の専門家に助言を求めるとしている。齋藤（2013）によると、麻酔法の種類の項で「要点の1つとして麻酔に求められるエンドポイントとして意識消失、鎮痛、筋弛緩、有害反射の抑制などがある。また、麻酔法は、意識を消失させる『全身麻酔法』と、脳以外の体の一部を麻酔する『局所麻酔法』の2種類に大別され、麻酔は疼痛によるストレスを緩和させて、体調回復に良い影響を与えることが知られており、多くの薬剤が使用されている」と述べられている。現在、欧米特に、ヨーロッパにおいて論文を投稿する際、安楽死を行っているかの証明書までが必要となっている。魚類においても、苦痛緩和に対する配慮が必要と考えるが、麻酔状態にある魚類の外見から苦痛を判断することができないために、短時間で確実に覚醒させ、もとの健康状態に戻す必要があるものと考えている。

わが国において、魚類および甲殻類を対象とした麻酔剤で動物用医薬品として製造承認を得ているのは、オイゲノール製剤の「FA100」（販売：DSファーマアニマルヘルス株式会社）のみである。本製品は1ml中にオイゲノール0.107gを含有しており、これまでは、養殖や栽培漁業の現場で、魚体重や体長などの測定、標識の装着など試験研究用として使用されることが多かった。さらに、近年では海面養殖魚の各種疾病に対するワクチンの注射法による投与が急速に普及し、魚類麻酔剤を使用する機会が増えている。

ワクチン注射投与の必須条件としては、注射対象となる各種魚類に対する麻酔効果や安全性およびヒトへの安全性を確認しておく必要がある。オイゲノールは、バジルやクローブ、ナツメグなどスパイスやハーブに含まれる植物香气成分として知られており、香料（食品添加物）等として使用されている。また、わが国の食品安全委員会はポジティブリスト制度導入に伴って、ヒトへの安全性の暫定基準が設定された農

薬、動物用医薬品および飼料添加物について、海外のリスク評価機関等で実施された評価結果を活用し、順次食品健康影響評価を行っている。オイゲノールもその対象となり、FAO/WHO 合同添加物専門家会議と最新の評価を行っている欧州食品安全委員会の評価書が翻訳され、評価に必要な情報について整理し、取り纏められており、上述の最新評価によって、国際的観点からオイゲノールは、ヒトへの安全性について問題ないとされている。（内閣府食品安全委員会事務局平成23年度食品安全確保調査2012）。魚類に対するオイゲノールの麻酔効果に関する研究について、海外ではJavahery et al. (2012) の総説に示されたとおり、オイゲノールおよびイソオイゲノールを主成分とするクローブ油を用いた数多くの研究報告がある。一方、わが国の主要な海産養殖魚類に対するオイゲノールに関する研究は、渡辺ら（2006）の報告はあるが少ない。

そこで、本研究では海産養殖魚へのワクチンの注射投与を想定して、ワクチン注射の対象となるマダイ *Pagrus major*、ブリ *Seriola quinqueradiata*、カンパチ *S. dumerili*、シマアジ *Pseudocaranx dentex*、イシダイ *Oplegnathus fasciatus* およびイシガキダイ *O. punctatus* に対する「FA100」の麻酔効果と最適濃度および安全性について検討したので報告する。

## 材料および方法

### 供試魚

本研究には、近畿大学養殖種苗センター白浜事業所で生産された人工孵化マダイ、ブリ、カンパチ、シマアジ、イシダイおよびイシガキダイを供試した。本研究は人工孵化した異なる供試魚のサイズを得るために、2000年4月12日から同年5月10日および同年6月26日から同年7月6日の2回の期間に分けて行った。マダイ、ブリ、カンパチならびにシマアジについては、ワクチン注射時期の最小と最大サイズを想定して魚体重の異なる試験区を設定した。さらに、カンパチについては、海外から種苗を入手する割合が高いことから他の魚種よりも体重の重い魚を試験に供して、麻酔効果と安全性について検討した。異なる体重の供試魚で実験を実施したのはマダイ（5.9g, 45.5g）、ブリ（6.3g, 41.4g）、カンパチ（15.7g, 117.7g）およびシマアジ（14.6g, 43.1g）の4種であった。イシダイ（32.7g）とイシガキダイ（13.7g）は1つの体サイズのみで実験を行った。

いずれの供試魚もFRP製1,000l水槽に収容し、汲み上げ濾過した海水をかけ流し式で1週間の予備飼育を行った。予備飼育期間中は、1日1回、市販の配合飼料（おとひめEP、日清飼料株式会社）を飽食させ

て摂餌、遊泳状況など健康状態に異常のないことを確認するとともに、試験開始24時間前から無給餌とした。また、飼育海水中に施設にて発生させたエアポンプからエアホースを引いて、各水槽に溶存酸素濃度が飽和となるようにエアストーンを入れて飼育した。

## 試験方法

### 1. 麻酔方法

試験には50 l 容量のポリカーボネイト製の透明円形水槽（以下、ポリカーボネイト製水槽）を用いた。その中に汲み上げ濾過した25 l の海水を入れ（117 g のカンパチのみ80 l 容量の水槽に40 l）、「FA100」を50, 100, 200および500 ppm となるようメスシリンダーで計量して均一に希釈した。マダイ、ブリ、イシダイおよびイシガキダイは30尾、カンパチは10～30尾、シマアジは15～30尾を、それぞれ異なる希釈濃度の「FA100」に浸漬し、浅麻酔および深麻酔の効果が現れるまでの時間を測定した。なお、動物愛護の観点から供試尾数に差を設け、死亡が確実と思われる濃度・処置時間の群については減数した。

浅麻酔は、注射処置が可能な程度（手で持ち上げて保持しても動かない）、深麻酔は、電子天秤で体重測定が可能な程度の麻酔状態とした。なお、麻酔確認時間は15分間とし、それまでに麻酔効果の認められなかった供試魚は効果なしと判定した。

浅麻酔および深麻酔効果の発現した供試魚は、麻酔時間を記録し、汲み上げ濾過した海水を入れたポリカーボネイト製水槽に移して、覚醒までの時間を記録した。覚醒は正常な遊泳行動が認められることとし、覚醒個体から順次取り上げ、汲み上げ濾過した海水を入れたポリカーボネイト製水槽に収容した。また、15分経過後に鰓蓋および口による呼吸運動が認められない供試魚を死亡魚とした。なお、平均麻酔・覚醒所要時間を求めるために、計測時間を秒で換算した数値を60で除して小数点第3位を四捨五入し、小数点第2位までの数字で表現した（例：1分20秒の場合は1.33分）。

麻酔処置用・覚醒用・覚醒後の水槽には、施設にて発生させたエアポンプからエアホースを引いて、各水槽にエアストーンを1個入れ、十分なエアレーションを行って、ほぼ飽和状態の溶存酸素量を維持した。また、水温は各試験の都度測定し、マダイでは5.9 g, 45.5 g でそれぞれ22℃および16℃、ブリでは16.3 g, 41.4 g でそれぞれ16℃および20℃、カンパチでは15.7 g, 117.7 g でそれぞれ25℃および22℃、シマアジでは14.6 g, 43.1 g でそれぞれ22℃および24℃、イシダイでは26℃、イシガキダイでは22℃であった。

### 2. 安全性の判定

各魚種ともに深麻酔の効果が認められた最長の浸漬時間の約2倍の時間を2倍深麻酔とし、それぞれの濃

**Table 1.** Anesthetic effect and safety test results of “FA100” for red sea bream (*Pagrus major*)

Body weight	Temperature	Concentration (ppm)	Depth of anesthesia	Number of fish	Anesthesia (minutes)	Arousal (minutes)	Inefficacy (No. of fish)	Efficacy rate	Death (No. of fish)	Mortality
5.9 g	22℃	50	Light	30	4.88	1.69	4	87%	0	0%
			Deep	30	8.50	1.17	18	40%	0	0%
			Double deep	no-test						
		100	Light	30	2.33	1.23	0	100%	0	0%
			Deep	30	3.27	1.43	0	100%	0	0%
			Double deep	30	10.00	3.33	0	100%	0	0%
		200	Light	30	0.67	1.63	0	100%	0	0%
			Deep	30	1.62	2.30	0	100%	0	0%
			Double deep	30	4.00	2.60	0	100%	0	0%
		500	Light	30	0.61	2.63	0	100%	0	0%
			Deep	30	1.20	4.89	0	100%	7	23%
			Double deep	15	2.00	5.50	0	100%	11	73%
		Double deep	15	3.00	5.67	0	100%	12	80%	
45.5 g	16℃	50	Light	30	5.60	1.00	0	100%	0	0%
			Deep	30	13.50	1.00	28	7%	0	0%
			Double deep	no-test						
		100	Light	30	2.37	1.43	0	100%	0	0%
			Deep	30	5.69	2.55	0	100%	0	0%
			Double deep	30	15.00	4.87	0	100%	0	0%
		200	Light	30	1.35	2.20	0	100%	0	0%
			Deep	30	2.03	2.67	0	100%	0	0%
			Double deep	30	6.00	3.70	0	100%	0	0%
		500	Light	30	0.83	4.23	0	100%	0	0%
			Deep	30	1.17	5.64	0	100%	5	17%
			Double deep	30	2.33	9.79	0	100%	16	53%

度の麻酔液に供試魚を浸漬して、汲み上げ濾過した海水を入れたポリカーボネイト製水槽に魚体を入れ、各麻酔濃度における各魚種の安全性を確認した。試験は浸漬時間が異なるのみで、上記と全て同じ条件および方法で行った。

## 結 果

### 1. マダイ

マダイにおける試験結果を Table 1 に示した。

マダイ（体重5.9 g）の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で4.88～0.61分であり、50 ppm で30尾中4尾（13%）に麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.23～2.63分であった。また、麻酔の効果が認められなかった4尾について剖検を行ったところ、いずれも胃内容物は認められず、性は判別できなかった。以下の試験で麻酔効果の認められなかった魚体についても同様に剖検を行ったが、上記と同じ結果であった。

深麻酔までの所要時間は8.50～1.20分であり、50 ppm で30尾中18尾（60%）に麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.17～4.89分であり、500 ppm で30尾中7尾（23%）が死亡した。

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で10.00分、200 ppm で4.00分、500 ppm で2.00分および3.00分とし

た。覚醒所要時間は2.60～5.67分であり、500 ppm、2.00分の麻酔で15尾中11尾（73%）、3.00分の麻酔で15尾中12尾（80%）が死亡した。

マダイ（体重45.5 g）の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で5.60～0.83分であり、覚醒所要時間は1.00～4.23分であった。

深麻酔までの所要時間は13.50～1.17分であり、50 ppm で30尾中28尾（93%）に麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.00～5.64分であり、500 ppm で30尾中5尾（17%）が死亡した。

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で15.00分、200 ppm で6.00分、500 ppm で2.33分とした。覚醒所要時間は3.70～9.79分であり、500 ppm で30尾中16尾（53%）が死亡した。

### 2. ブリ

ブリにおける試験結果を Table 2 に示した。

ブリ（体重16.3 g）の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で6.45～0.83分であり、50 ppm で30尾全てに麻酔効果が認められた。覚醒所要時間は1.31～3.27分であった。

深麻酔までの所要時間は2.47～1.17分であり、50 ppm では30尾全てに麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.33～6.21分であり、500 ppm で30尾中2尾（7%）が死亡した。

Table 2. Anesthetic effect and safety test results of "FA100" for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)

Body weight	Temperature	Concentration (ppm)	Depth of anesthesia	Number of fish	Anesthesia (minutes)	Arousal (minutes)	Inefficacy (No. of fish)	Efficacy rate	Death (No. of fish)	Mortality
16.3 g	16°C	50	Light	30	6.45	1.31	0	100%	0	0%
			Deep	30			30	0%	0	0%
			Double deep	no-test						
		100	Light	30	1.73	1.37	0	100%	0	0%
			Deep	30	2.47	1.33	0	100%	0	0%
			Double deep	30	7.00	4.93	0	100%	0	0%
		200	Light	30	0.90	2.33	0	100%	0	0%
			Deep	30	1.37	3.23	0	100%	0	0%
			Double deep	30	4.00	6.79	0	100%	1	3%
		500	Light	30	0.83	3.27	0	100%	0	0%
			Deep	30	1.17	6.21	0	100%	2	7%
			Double deep	30	2.33	12.00	0	100%	27	90%
41.4 g	20°C	50	Light	30	6.83	1.76	1	97%	0	0%
			Deep	30			30	0%	0	0%
			Double deep	no-test						
		100	Light	30	1.87	1.17	0	100%	0	0%
			Deep	30	2.87	1.63	0	100%	0	0%
			Double deep	30	10.00	4.80	0	100%	0	0%
		200	Light	30	0.82	2.23	0	100%	0	0%
			Deep	30	1.18	2.63	0	100%	0	0%
			Double deep	30	3.00	4.50	0	100%	0	0%
		500	Light	30	0.50	3.00	0	100%	0	0%
			Deep	30	0.75	3.27	0	100%	1	3%
			Double deep	30	1.50	8.14	0	100%	16	53%

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で7.00分, 200 ppm で4.00分, 500 ppm で2.33分とした。覚醒所要時間は4.93～12.00分であり, 200 ppm で30尾中1尾(3%), 500 ppm で30尾中27尾(90%)が死亡した。

ブリ(体重41.4 g)の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で6.83～0.50分であり, 覚醒所要時間は1.17～3.00分であった。

深麻酔までの所要時間は2.87～0.75分であり, 50 ppm では30尾全てに麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.63～3.27分であり, 500 ppm で30尾中1尾(3%)が死亡した。

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で10.00分, 200 ppm で3.00分, 500 ppm で1.50分とした。覚醒所要時間は4.50～8.14分であり, 500 ppm で30尾中16尾(53%)が死亡した。

### 3. カンパチ

カンパチにおける試験結果を Table 3 に示した。

カンパチ(体重15.7 g)の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で8.56～0.33分であり, 50 ppm で30尾中3尾(10%)に麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.00～2.00分であった。

深麻酔までの所要時間は2.03～0.67分であり, 50 ppm で30尾中, 全てに麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.53～4.53分であった。

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で6.00分, 200 ppm で2.00分, 500 ppm で1.33分とした。覚醒所要時間は2.13～4.65分であり, 本試験においては, 1尾の死亡も認められなかった。

カンパチ(体重117.7 g)の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で5.00～0.75分であり, 50 ppm で30尾中27尾(90%)に麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.00～4.60分であり, 500 ppm で15尾中5尾(33%)が死亡した。

深麻酔までの所要時間は5.03～1.00分であり, 50 ppm で30尾中, 全てに麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は3.20～5.67分であり, 200 ppm で29尾中5尾(17%), 500 ppm で10尾中1尾(10%)が死亡した。

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で12.00分, 200 ppm で3.00分, 500 ppm で1.50分とした。覚醒所要時間は4.57～8.50分であり, 100 ppm で30尾中2尾(7%), 200 ppm で10尾中3尾(30%), 500 ppm で10尾中8尾(80%)が死亡した。

### 4. シマアジ

シマアジにおける試験結果を Table 4 に示した。

シマアジ(体重14.6 g)の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で8.20～0.75分であり, 50 ppm で30尾中25尾(83%)に麻酔効果が認められなかった。覚醒

Table 3. Anesthetic effect and safety test results of "FA100" for amberjack (*Seriola dumerili*)

Body weight	Temperature	Concentration (ppm)	Depth of anesthesia	Number of fish	Anesthesia (minutes)	Arousal (minutes)	Inefficacy (No. of fish)	Efficacy rate	Death (No. of fish)	Mortality
15.7 g	25°C	50	Light	30	8.56	1.00	3	90%	0	0%
			Deep	30			30	0%	0	0%
			Double deep	no-test						
		100	Light	30	1.50	1.00	0	100%	0	0%
			Deep	30	2.03	1.53	0	100%	0	0%
			Double deep	30	6.00	2.13	0	100%	0	0%
		200	Light	30	0.67	1.40	0	100%	0	0%
			Deep	30	1.00	2.00	0	100%	0	0%
			Double deep	30	2.00	2.33	0	100%	0	0%
		500	Light	30	0.33	2.00	0	100%	0	0%
			Deep	30	0.67	4.53	0	100%	0	0%
			Double deep	30	1.33	4.65	0	100%	0	0%
117.7 g	22°C	50	Light	30	5.00	1.00	27	10%	0	0%
			Deep	30			30	0%	0	0%
			Double deep	no-test						
		100	Light	30	2.50	2.07	0	100%	0	0%
			Deep	30	5.03	3.20	0	100%	0	0%
			Double deep	30	12.00	4.57	0	100%	2	7%
		200	Light	28	1.25	2.79	0	100%	0	0%
			Deep	29	1.75	4.13	0	100%	5	17%
			Double deep	10	3.00	9.86	0	100%	3	30%
		500	Light	15	0.75	4.60	0	100%	5	33%
			Deep	10	1.00	5.67	0	100%	1	10%
			Double deep	10	1.50	8.50	0	100%	8	80%

所要時間は1.67～2.56分であり、500 ppm で30尾中5尾（17%）が死亡した。

深麻酔までの所要時間は3.47～2.02分であり、50 ppm で30尾中、全てに麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は2.27～7.62分であり、500 ppm で30尾中14尾（47%）が死亡した。

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で10.00分、200 ppm で6.00分、500 ppm で3.00分とした。覚醒所要時間は2.27～7.62分であり、500 ppm で15尾中、全てが死亡した。

シマアジ（体重43.1 g）の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で2.00～0.50分であり、50 ppm で15尾

中、全てに麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.73～2.27分であった。

深麻酔までの所要時間は4.33～0.83分であった。覚醒所要時間は1.80～3.08分であり、500 ppm で15尾中2尾（13%）が死亡した。

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で10.00分、200 ppm で5.00分、500 ppm で1.67分とした。覚醒所要時間は2.67～8.00分であり、500 ppm で15尾中11尾（73%）が死亡した。

## 5. イシダイ

イシダイにおける試験結果を Table 5 に示した。

**Table 4.** Anesthetic effect and safety test results of “FA100” for striped jack (*Pseudocaranx dentex*)

Body weight	Temperature	Concentration (ppm)	Depth of anesthesia	Number of fish	Anesthesia (minutes)	Arousal (minutes)	Inefficacy (No. of fish)	Efficacy rate	Death (No. of fish)	Mortality
14.6 g	22°C	50	Light	30	8.20	1.80	25	17%	0	0%
			Deep	30				0%	0	0%
			Double deep	no-test						
		100	Light	30	2.50	1.67	0	100%	0	0%
			Deep	30	3.47	2.30	0	100%	0	0%
			Double deep	30	10.00	2.77	0	100%	0	0%
		200	Light	30	2.00	2.07	0	100%	0	0%
			Deep	30	2.67	2.27	0	100%	0	0%
			Double deep	30	6.00	4.03	0	100%	0	0%
		500	Light	30	0.75	2.56	0	100%	5	17%
			Deep	30	2.02	7.62	0	100%	14	47%
			Double deep	15	3.00		0	100%	15	100%
43.1 g	24°C	50	Light	15			15	0%	0	0%
			Deep	no-test						
			Double deep	no-test						
		100	Light	15	2.00	1.73	0	100%	0	0%
			Deep	15	4.33	1.80	0	100%	0	0%
			Double deep	15	10.00	2.67	0	100%	0	0%
		200	Light	15	1.67	2.00	0	100%	0	0%
			Deep	15	2.23	2.40	0	100%	0	0%
			Double deep	15	5.00	4.40	0	100%	0	0%
		500	Light	15	0.50	2.27	0	100%	0	0%
			Deep	15	0.83	3.08	0	100%	2	13%
			Double deep	15	1.67	8.00	0	100%	11	73%

**Table 5.** Anesthetic effect and safety test results of “FA100” for rock bream (*Oplegnathus fasciatus*)

Body weight	Temperature	Concentration (ppm)	Depth of anesthesia	Number of fish	Anesthesia (minutes)	Arousal (minutes)	Inefficacy (No. of fish)	Efficacy rate	Death (No. of fish)	Mortality
32.7 g	26°C	50	Light	30	2.73	1.47	0	100%	0	0%
			Deep	30	3.80	1.96	5	83%	0	0%
			Double deep	no-test						
		100	Light	30	1.50	2.06	0	100%	0	0%
			Deep	30	3.50	2.33	0	100%	0	0%
			Double deep	30	10.00	2.97	0	100%	0	0%
		200	Light	30	0.50	2.43	0	100%	0	0%
			Deep	30	1.00	2.73	0	100%	0	0%
			Double deep	30	2.00	2.73	0	100%	0	0%
		500	Light	30	0.33	2.60	0	100%	0	0%
			Deep	30	0.50	3.00	0	100%	0	0%
			Double deep	30	1.00	4.79	0	100%	6	20%

イシダイ（体重32.7 g）の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で2.73～0.33分であり，覚醒所要時間は1.47～2.60分であった。

深麻酔までの所要時間は3.80～0.50分であり，50 ppm で30尾中5尾（17%）に麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.96～3.00分であった。

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で10.00分，200 ppm で2.00分，500 ppm で1.00分とした。覚醒所要時間は2.73～4.79分であり，500 ppmで30尾中6尾（20%）が死亡した。

## 6. イシガキダイ

イシガキダイにおける試験結果を Table 6 に示した。

イシガキダイ（体重13.7 g）の浅麻酔までの所要時間は50～500 ppm で5.27～0.50分であり，覚醒所要時間は1.00～2.93分であった。

深麻酔までの所要時間は8.43～0.67分であり，50 ppm で30尾中16尾（53%）に麻酔効果が認められなかった。覚醒所要時間は1.00～3.83分であった。

2倍深麻酔の処置時間は100 ppm で6.00分，200 ppm で4.00分，500 ppm で1.33分とした。覚醒所要時間は2.43～4.40分であった。本試験においては，1尾の死亡も認められなかった。

## 考 察

魚類の麻酔方法については，Iwama and Ackerman (1994) による16種類の化学物質，寒冷，炭酸ガスおよび電気麻酔の併せて19種類の麻酔手法についての総説があるが，本総説中の化学物質に「FA100」の（麻酔）成分であるオイゲノールは含まれていない。その理由としては，Iwama and Ackerman (1994) が寒冷，炭酸ガスおよび電気麻酔以外は化学物質に限定しており，海外では Javahery et al. (2012) の総説のとおり，

天然物由来のクローブ油を用いた研究報告がオイゲノールよりも多いのが一因と考えられる。また，これら16種類の化学物質はわが国において，魚類を対象とした動物用医薬品として使用が認められていない。その理由の1つとして，動物用医薬品としての承認を得るためには多額の経費がかかるという経済的な問題がある。なお，化学物質以外の麻酔方法として，わが国では，渡辺 (2007) がヒラメ稚魚，山本ら (2008) がサケ親魚に対する炭酸ガス麻酔，太田 (2012) がトラフグ稚魚の寒冷麻酔について報告している。

オイゲノールの魚類に対する麻酔効果については，遠藤ら (1972)，Ozaki (1975)，Hikasa et al. (1986)，渡辺ら (2006)，Jurandir et al. (2013)，Misawa et al. (2014) および肥塚 (2015) などの報告がある。Javahery et al. (2012) の総説によると，クローブ油には90～95%のオイゲノールおよびイソオイゲノールが含有されており，局所麻酔薬に分類されている。また，クローブ油は麻酔浴中に魚類の鰓および皮膚から浸透する (McFarland 1959; Hunn and Allen 1974; Ferreira et al. 1984)。鰓からクローブ油が入ると血流を介して全身に分布する (Summerfelt and Smith 1990; Hunn and Allen 1974)。クローブ油は親油性が高いため，鰓上皮に迅速に付着して浸透し，脂肪および脳などの体組織に吸収される (Summerfelt and Smith 1990)。さらに，オイゲノール [Javahery et al. (2012) はクローブ油と記載] は呼吸数を低下させる。その作用は，中枢神経系の抑制に関係する延髄の呼吸中枢阻害によるものであろうとしている (Hikasa et al. 1986)。一方，肥塚 (2015) はオイゲノールの麻酔作用について，その作用機序を分子レベルで明らかにするために，ゼブラフィッシュ *Danio rerio* を用い，N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) で中枢神経系の直接活性化あるいはカフェインによる強制的筋収縮で麻酔作用が認められたことから，オイゲノールは

**Table 6.** Anesthetic effect and safety test results of “FA100” for spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)

Body weight	Temperature	Concentration (ppm)	Depth of anesthesia	Number of fish	Anesthesia (minutes)	Arousal (minutes)	Inefficacy (No. of fish)	Efficacy rate	Death (No. of fish)	Mortality
13.7 g	22°C	50	Light	30	5.27	1.00	0	100%	0	0%
			Deep	30	8.43	1.00	16	47%	0	0%
			Double deep	no-test						
		100	Light	30	1.87	1.63	0	100%	0	0%
			Deep	30	2.53	1.30	0	100%	0	0%
			Double deep	30	6.00	2.43	0	100%	0	0%
		200	Light	30	1.17	1.90	0	100%	0	0%
			Deep	30	2.00	2.80	0	100%	0	0%
			Double deep	30	4.00	2.60	0	100%	0	0%
		500	Light	30	0.50	2.93	0	100%	0	0%
			Deep	30	0.67	3.83	0	100%	0	0%
			Double deep	30	1.33	4.40	0	100%	0	0%



筋での小胞体からのカルシウム放出以降のプロセスに作用することを報告している。また、オイゲノールは古くから歯科の分野において、歯髄鎮痛薬として使用されており、柴田ら（1994）はその薬理作用、特に鎮痛、血流増加、サブスタンス P 遊離作用に関する研究を行い、歯髄鎮痛作用には体内サブスタンス P の動態がこれら作用機構に関わっていることを報告している。このようにオイゲノールの麻酔あるいは鎮痛等に関する作用機序に関する研究はあるが、魚類に対する作用機序は明らかになっていない。

渡辺ら（2006）は、各種海産魚を対象とした 2-フェノキシエタノールとオイゲノールの比較研究において、本研究と同じ魚種（マダイ、ブリ、カンパチおよびシマアジ）でも実施している。そこで、試験条件（魚体重、水温および麻酔濃度）の類似したマダイおよびブリについて本研究結果と比較した。渡辺ら（2006）の麻酔期-II（横転した魚の鰓蓋運動が緩慢かつ不規則になる状態）に供試したマダイの魚体重および水温はそれぞれ 62.5 g、16.6℃、ブリは 29.8 g、19.1℃、本研究のマダイはそれぞれ 45.5 g、16℃、ブリは 41.4 g、20℃であった。また、両研究ともに溶存酸素量の記載はないが麻酔水槽、回復水槽に通気を、渡辺ら（2006）の研究では、回復水槽には通気に加えて流水を施していた。渡辺ら（2006）の麻酔期-II への麻酔到達時間は、200 ppm および 500 ppm で、マダイではそれぞれ 6.04 分と 2.00 分、ブリではそれぞれ 4.21 分と 1.10 分であった。一方、本研究の 2 倍深麻酔での麻酔到達時間は、200 ppm および 500 ppm で、マダイではそれぞれ 6.00 分と 2.33 分、ブリではそれぞれ 3.00 分と 1.50 分であり、渡辺ら（2006）の麻酔期-II と本研究の 2 倍深麻酔での麻酔到達時間はほぼ同じであった。また、覚醒時間について、渡辺ら（2006）の 200 ppm では、マダイが 7.36 分とブリが 12.27 分であったのに対して、本研究の 200 ppm ではマダイが 3.70 分

とブリが 4.50 分であり、渡辺ら（2006）の研究では本研究の 2 倍以上を要していた。また、500 ppm では、渡辺ら（2006）の研究ではマダイ、ブリともに全数が 30 分以内に覚醒しなかったのに対して、本研究ではマダイが 9.79 分（死亡率 53%）とブリが 8.14 分（死亡率 53%）であった。このように魚種、麻酔濃度、試験水温がほぼ同じであっても覚醒時間の異なる結果が得られた。両研究における覚醒の差は溶存酸素量、魚体重等によるものと考えられるが、魚類における麻酔の効果は魚種、魚体重、健康状態など供試魚に由来する要因や、麻酔時の水温、水質、溶存酸素量、麻酔時間など麻酔環境による影響を大きく受けることが示唆された。

下茂ら（2004）の総説では、角皆（1987）によると Weiss（1970）は塩分 35‰ の海水に 0℃ で 8.05 ml/l、20℃ で 5.17 ml/l の酸素が溶けることになっている。また、魚類の酸素消費量について、笠原（1966）は「魚類は一般に鰓呼吸を行い、鰓の極めてうすい表皮（鰓弁）をなす毛細血管壁を通して口腔から入れた水から酸素を摂取する。自然状態では最も好条件の時でもその飽和量は海水の場合 5～6 ml/l に過ぎず、水温上昇や気圧の変化により著しく変化する。また、魚類の酸素消費量は休息時の基礎消費量を最低として活動力の大きさに比例して増大する。呼吸量は水温に深い関係があり、Van't Hoff の温度と反応速度の法則  $Q = 2 \sim 3$  にしたがって、10℃ 上昇で酸素消費量が 2～3 倍に増加することが知られ、水温の上昇は水中溶存酸素量を減少させることになるので、水温との関係は養魚上特に注意すべきことである。さらに、小型魚類は大型魚類に比べ体重あたり酸素消費量の多いことが認められているが、魚種によりその酸素消費量はかなり相違がみられる」としている。板沢（1977, 2001）は、「酸素消費量の生物種による相違には、実際の運動量に拘らぬ本質的な原因があるとも考えられる。ま

Table 7. Optimum concentration of “FA100” at the time of injection vaccination

Species	Body weight	Temperature	Optimum anesthetic concentrations (ppm)
Red sea bream ( <i>Pagrus major</i> )	5.9 g	22℃	100 ~ 200
	45.5 g	16℃	100 ~ 200
Yellowtail ( <i>Seriola quinqueradiata</i> )	16.3 g	16℃	100 ~ 200
	41.4 g	20℃	100 ~ 200
Amberjack ( <i>Seriola dumerili</i> )	15.7 g	25℃	100 ~ 500
	117.7 g	22℃	100
Striped jack ( <i>Pseudocaranx dentex</i> )	14.6 g	22℃	100 ~ 200
	43.1 g	24℃	100 ~ 200
Rock bream ( <i>Oplegnathus fasciatus</i> )	32.7 g	26℃	50 ~ 200
Spotted knifejaw ( <i>Oplegnathus punctatus</i> )	13.7 g	22℃	50 ~ 500

た、性別によっても酸素消費量に差があったとした報告もある」としている。このように、水温によって溶存酸素量や魚類の酸素消費量は大きく変化する。また、上述の研究結果の比較から、麻酔処置時には、高水温や水温の上昇、溶存酸素量に十分な注意を払う必要があると考える。なお、本研究では剖検によって性が判別できなかったために、板沢 (1977, 2001) の報告とは比較できなかった。

乙竹 (2009) は、「麻酔処理にあたっての具体的な注意事項として、予め少数の供試魚を用いて麻酔液の至適濃度 (麻酔液に数分間浸漬後に作業を行っても、被接種魚が暴れない濃度) を検討しておく。麻酔液が濃すぎたり、麻酔液に浸漬する時間が長すぎると、麻酔が強くなりすぎて呼吸が停止し、回復せずに死亡する恐れがある。逆に、麻酔が弱すぎると、魚の予想外の動きにより注射部位がそれたり、注射針が曲がったり、場合によって自分自身、あるいは周囲の人への誤注射等の事故につながる。また、麻酔槽内の魚が過密になると酸欠等の事故を起こしやすいので、作業効率をあげるためには、麻酔槽の容量 (あるいは個数) に余裕をもたせなければならない。さらに、気温の高い時期には、作業中に麻酔液の温度が上昇し、事故を起こしやすくなるので、氷等を投入して液温を上昇させない等の工夫が必要である」としている。本研究において、魚種、魚体重、水温が同じであっても麻酔濃度・時間によって、麻酔到達時間や麻酔回復時間が異なること (麻酔効果が認められない場合や麻酔から覚醒しない場合もある)、魚種間で麻酔到達時間や麻酔回復時間に差のあることが判明した。また、上述の水温と溶存酸素の関係から鑑みて、乙竹 (2009) が示した予め少数の供試魚を用いて麻酔液の至適濃度を検討しておくことは、ワクチン注射投与時における重要な注意事項の1つであると考えられる。

本研究では、動物用医薬品として唯一、製造承認を得ている魚類および甲殻類の麻酔剤「FA100」につき、ワクチン注射を想定してマダイ、ブリ、カンパチ、シマアジ、イシダイおよびイシガキダイ稚魚に対する麻酔効果とこれら魚種に対する安全性について検討した。その結果、マダイ、ブリおよびシマアジでは500 ppmの浅麻酔で、死亡魚は認められなかったが、深麻酔あるいは2倍深麻酔で覚醒せずに死亡した供試魚が認められた。一方、50 ppmの浅麻酔では、一部の供試魚で麻酔効果が認められなかったことから、ワクチン注射においては、供試魚の安全性およびワクチン注射作業時間などを考慮して100～200 ppmが適正な麻酔濃度であることが分かった。しかし、水温が高い場合には、上述のとおり、麻酔液の溶存酸素量に十分な注意を払う必要がある。なお、本研究結果からワ

クチン注射において、各魚種における麻酔のもっとも適切な処理条件をTable 7にまとめた。

以上の結果から、ワクチン注射の場合には、ワクチン注射前には必ず24時間以上無給餌とし、供試魚や麻酔環境による影響を考慮し、実際の作業環境にて上述の研究成績を参考にして、最適な麻酔濃度、麻酔時間を事前に設定して作業することを推奨する。

## 要 約

わが国において唯一、動物用医薬品として製造承認を得ている魚類および甲殻類の麻酔剤であるオイゲノール製剤の「FA100」を用い、近年普及しているワクチンの注射を想定して、マダイ、ブリ、カンパチ、シマアジ、イシダイおよびイシガキダイ稚魚を対象魚とし、「FA100」の麻酔効果と魚に対する安全性について検討した。その結果、供試した魚種や魚体重は異なるが、供試魚の安全性およびワクチン注射の作業時間などを考慮して100～200 ppmの希釈が適正な麻酔濃度であることが分かった。ただし、カンパチで100 gを超える場合には、麻酔から回復することなく死亡する供試魚が多くなる傾向が認められたことから、ワクチン注射の場合には、実際の作業現場にて、本研究を参考にし、事前に最適な麻酔濃度、麻酔時間を設定して行う必要がある。

## 謝 辞

本論文を取り纏めるにあたり、有益なご助言とご校閲を頂いた高知大学大学院黒潮圏総合科学専攻の大嶋俊一郎博士に深く感謝する。また、貴重なご助言と供試魚を分与頂いた近畿大学水産研究所白浜実験場の熊井英水博士 (現：近畿大学名誉教授)、村田 修博士 (現：近畿大学名誉教授) に深謝する。さらに、本研究を遂行するにあたり、特に多大なるご協力をくださった<sup>故</sup>清 明広氏に著者一同から喪心より甚謝の意を表します。

## 文 献

- 遠藤俊夫・萩島健次・田中 久・大島 慧 (1972) 数種の淡水魚に対するオイゲノールの麻酔作用に関する研究. 日水誌, **38**, 761-767. [Endo, T., K. Ogishima, H. Tanaka and S. Ohsima (1972) Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) was found to exhibit an anesthetic effect on various fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **38**, 761-767 (in Japanese with English abstract).]
- Ferreira, J. T., H. G. Schoonbee and G. L. Smit (1984) The uptake of the anaesthetic benzocaine hydrochloride by

- the gills and skin of three freshwater fish species. *J. Fish. Biol.*, **25**, 35-41.
- 齋藤 茂編 (2013) 新麻酔科ガイドブック改訂第2版. 真興交易医書出版部, 東京, 413 pp.
- Hikasa, Y., K. Takase, T. Ogasawara and S. Ogasawara (1986) Anaesthesia and recovery with tricain methansulfonate, eugenol and thiopental sodium in carp, *Cyprinus carpio*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **48**, 341-351.
- Hunn, J. B. and J. L. Allen (1974) Movement of drugs across the gills of fishes. *Ann. Rev. Pharmacol.*, **14**, 47-55.
- 板沢靖男 (1977) 呼吸. 改訂増補 魚類生理 (川本信之編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 46-91.
- 板沢靖男 (2001) 魚類の呼吸と血液循環. 日水誌, **67**, 634-639. [Itazawa, Y. (2001) Respiration and blood circulation of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **67**, 634-639 (in Japanese with English abstract).]
- Iwama, G. K. and P. A. Ackerman (1994) Anaesthetics. In "Analytical techniques, biochemistry and molecular biology of fishes, vol. 3" (ed. by P. W. Hochachka and T. P. Mommsen), Elsevier Science B. V., The Netherlands, pp. 1-15.
- Javahery, S., H. Nokoubin and A. H. Moradlu (2012) Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiol. Biochem.*, **38**, 1545-1552.
- Jurandir, J. B. J., K. N. Fernando, L. de M. Giovanni, G. Silvano and A. J. Hilton (2013) Eugenol as an anesthetic for juvenile common snook. *Pesq. Agropec. Bras.*, **48**, 1140-1144.
- 笠原正五郎 (1966) 用語解説. 水産土木, **2**, 54-55.
- 肥塚崇男 (2015) 天然由来食品添加物オイゲノールの麻酔作用に関する研究. 公益財団法人日本食品化学研究振興財団 第21回研究成果報告書, 大阪, pp. 119-121 (in Japanese with English abstract).
- Misawa, A., S. Kada and M. Yoshida (2014) Comparison of the mode of action of three anesthetic agents, 2-phenoxyethanol, MS-222, and eugenol on goldfish. *Aquacult. Sci.*, **62**, 425-432.
- McFarland, W. N. (1959) A study of the effects of anesthetics on the behavior and physiology of fishes. *Publ. Inst. Marine Sci. Univ. Texas*, **6**, 23-55.
- 内閣府食品安全委員会事務局平成23年度食品安全確保調査 (2012) ポジティブリスト制度に伴う暫定基準の設定された農薬, 動物用医薬品及び飼料添加物に係る食品影響に関する調査報告書 オイゲノール, 株式会社三菱化学テクノロジーサーチ, <http://www.google.co.jp/url?sa=t&ct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB0QFjAAAhUKEwiGidPitfHHAhVJnJQKHQRGABg&url=http%3A%2F%2Fwww.fsc.go.jp%2Ffscis%2FattachedFile%2Fdownload%3FretreivalId%3Dcho20120030001%26fileId%3D004&usq=AFQjCNGj3gvNCOReKipSsExpp0EtD5d9Dw&bv m=bv.102537793,d.dGo>, 2019年10月13日閲覧
- 日本学術会議 (2006) 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン. [https://nsearch.cao.go.jp/cao/search.x?mode\\_ja\\_scl=ja\\_scl&page=1&ie=UTF-8&tmpl=ja&q=%E5%8B%95%E7%89%A9%E5%AE%9F%E9%A8%93%E3%81%AE%E9%81%A9%E6%AD%A3%E3%81%AA%E5%AE%9F%E6%96%BD%E3%81%AB%E5%90%91%E3%81%91%E3%81%9F%E3%82%AC%E3%82%A4%E3%83%89%E3%83%A9%E3%82%A4%E3%83%B3&x=23&y=9](https://nsearch.cao.go.jp/cao/search.x?mode_ja_scl=ja_scl&page=1&ie=UTF-8&tmpl=ja&q=%E5%8B%95%E7%89%A9%E5%AE%9F%E9%A8%93%E3%81%AE%E9%81%A9%E6%AD%A3%E3%81%AA%E5%AE%9F%E6%96%BD%E3%81%AB%E5%90%91%E3%81%91%E3%81%9F%E3%82%AC%E3%82%A4%E3%83%89%E3%83%A9%E3%82%A4%E3%83%B3&x=23&y=9), 2019年10月13日閲覧
- 太田健吾 (2012) トラフグ稚魚の寒冷麻酔効果. 水産技術, **4**, 73-75. [Ohota, K. (2012) Effect of cold anesthesia for ocellate puffer *Takifugu rubripes* juveniles. *Journal of Fisheries Technology*, **4**, 73-75 (in Japanese with English abstract).]
- 乙竹 充 (2009) ワクチンの投与方法. 水産用ワクチンハンドブック (中西照幸・乙竹 充編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 19-28.
- Ozaki, M. (1975) The effect of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **50**, 183-191.
- 柴田 学・大久保つや子・鶴田克彦・高橋 宏 (1994) フェノール性歯髄鎮痛薬のサブスタンス P を中心とした作用機序. 歯基礎誌, **36**, 49-59. [Shibata, M., T. Ohkubo, K. Tsuruda and H. Takahashi (1994) Mode of analgesic action of phenolic dental medicaments through substance P release. *Jpn. J. Oral. Biol.*, **36**, 49-59 (in Japanese with English abstract).]
- 下茂 繁・秋本 泰・高浜 洋 (2004) 海洋生物の水質環境耐性について: 総説. 海生研研報, **6**, 1-159. [Shimo, S., Y. Akimoto and H. Takahama (2004) Review of the water quality effects on marine organisms. *Rep. Mar. Ecol. Res. Inst.*, **6**, 1-159 (in Japanese with English abstract).]
- Summerfelt, R. C. and L. S. Smith (1990) Methods for fish biology. In "Anaesthesia, surgery and related techniques" (ed. by C. B. Schreck and P. B. Moyle), American Fisheries Society, Bethesda, pp. 213-272.
- 角皆静男 (1987) 溶存酸素. 海洋大事典, (和達清夫監修), 東京堂出版, 東京, pp. 477-478.
- 渡辺研一・高橋 誠・中川雅弘・太田健吾・佐藤 純・堀田卓郎 (2006) 主要海産魚に対する2-フェノキシエタノールの麻酔効果. 水産増殖, **54**, 255-263. [Watanabe, K., M. Takahashi, M. Nakagawa, K. Ohta, J. Satoh and T. Hotta (2006) Effectiveness of 2-phenoxyethanol anesthesia of fish cultured in Japan. *Aquacult. Sci.*, **54**, 255-263 (in Japanese with English abstract).]
- 渡辺研一 (2007) 炭酸ガス発泡剤のヒラメ稚魚に対する麻酔効果. 日水誌, **73**, 287-289. [Watanabe, K. (2007) Anesthesia of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles by effervescent CO<sub>2</sub>-evolving tablet. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **73**, 287-289 (in Japanese).]
- Weiss, R. F. (1970) The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep-Sea Res.*, **17**, 721-735.
- 山本岳男・渡邊研一・今井 智・大貫 努・飯田真也・細川隆良・中島 歩 (2008) サケ親魚に対する炭酸ガスの麻酔効果—ドライアイスとボンベを用いて—. SALMON 情報, **2**, 8-10.