増殖ステージが異なるシオミズツボワムシの ヒラメ仔魚に対する餌料価値

友田 努,^{1*} 小磯雅彦,¹ 桑田 博,¹ 陳 昭能,² 竹内俊郎²

(2004年10月15日受付, 2005年1月4日受理)

¹水産総合研究センター能登島栽培漁業センター, ²東京海洋大学海洋生物資源学科

Dietary value of marine rotifer *Brachionus plicatilis* at different population growth stages for larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

TSUTOMU TOMODA,^{1*} MASAHIKO KOISO,¹ HIROSHI KUWADA,¹
JAU-NENG CHEN² AND TOSHIO TAKEUCHI²

¹Notojima Station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency, Notojima, Ishikawa 926-0216, ²Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477, Japan

This study assessed the dietary value of rotifers at different population growth stages for larvae of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Rotifer cultures were prepared daily and continued for up to eight days. Rotifers were taken out on the 2nd, 4th and 8th day from the batch culture and equally enriched with freshwater *Chlorella* containing *n*-3 HUFA oil. The flounder larvae were reared in 500-L tanks for 16 days and supplied with different rotifers as above-mentioned. Population after 17-hr enrichment, which reflected their initial physiological status (low daily growth rate and egg rate), decreased in the 8th day rotifer. Feeding group moreover, the flounder larvae fed on those rotifers significantly showed the lowest growth and morphological development on the 16th day after hatching. Despite no marked difference in essential fatty acid (EFA) levels in rotifers among all groups, the EPA and *n*-3 HUFA contents in flounder larvae were significantly the lowest in the 8th day rotifer feeding group. These results show that the dietary value of rotifers was poor after the logarithmic growth phase of batch culture, in spite of enrichment with *n*-3 HUFA, similar to the results of larviculture of red seabream.

キーワード：仔魚, 餌料価値, 増殖ステージ, ヒラメ, ワムシ

近年, 多数の海産魚に関する栄養学的な研究¹⁻⁴⁾により, シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下, ワムシ) およびアルテミア *Artemia nauplii* 中の高度不飽和脂肪酸 (*n*-3 HUFA) が仔魚の成長, 生残および活力に大きな影響を及ぼすことが明らかにされてきた。その中でも, ドコサヘキサエン酸 (DHA) 含量の多寡が仔稚魚の健苗性に大きな影響を及ぼすことがいくつか報告されており,^{1,3,5-8)} これらが原因となり, 生産した種苗に形態異常や体色異常が大量出現する場合があることも明らかになってきた。^{3,9-11)}

一般的に普及しているワムシ培養法の一つである植え継ぎ培養において, 通常は対数増殖期を過ぎたものを定常期に収穫していることが多く, その場合, ワムシの生

理的活性や餌料としての質の低下は避けられないことが指摘されている。¹²⁾ これまで数種類の魚類および甲殻類についてワムシの栄養強化に関する様々な研究^{11,13-15)}が行われたが, 栄養強化に用いるワムシの“質”についての研究はほとんどない。先に, 筆者ら¹⁶⁾はマダイ仔魚を供試した飼育実験により, 増殖停滞期またはその直前に収穫されたワムシを栄養強化しても, 餌料としての質は劣ることを明らかにした。本研究では, 前報¹⁶⁾の結果が他の魚種においても同様かどうかを検証するため, 全国規模で大量生産されているヒラメ *Paralichthys olivaceus* を供試し, 同様の飼育実験を行った。それら実験結果と合わせて, ワムシおよびヒラメ仔魚の成分分析により, ワムシの“質”の差がヒラメ仔魚の成長, 発

育および生残に及ぼす影響を検討した。

方 法

ワムシの培養 異なる増殖ステージのワムシを準備するために、500 L ポリカーボネイト水槽 9 面を用いてワムシ（小浜株、平均背甲長 256.2 μm ）の植え継ぎ培養を行った。植え継ぎ培養の元種には 25 kL 水槽の粗放連続培養から毎日収穫されるワムシを用いた。培養開始から 2, 4 および 8 日目の異なる三段階の増殖ステージのワムシを供試し、これらを 1 日 2 回（朝夕）の栄養強化に用いた。培養水には、砂濾過海水と淡水を混合した 60% 稀釈海水を用いた。培養開始時の接種密度は 300 個体/mL とした。水温管理は 500 W チタンヒーターを用いて 20°C に調温し、通気は内径 17 mm × 長さ 70 cm の散気管（ユニホース, 株式会社ユニホース）で行った。餌料には、市販の濃縮淡水クロレラ（生クロレラ V₁₂, クロレラ工業）を用い、ワムシ 1 億個体当たり 500 mL を 1 日 2 回に分けて給餌した。各培養水槽には 50 × 50 cm の合成樹脂製マット（サラロック OM-150 厚さ 50 mm, 旭化成）1 枚を敷設し、さらに 60 × 100 cm ナイロン製マット（バイリーンマット KS-185N, 九州バイリーン）1 枚を垂下し、死亡個体、残餌および糞など懸濁物質の除去を行った。なお、培養期間中は培養水の交換を行わなかった。

ワムシの栄養強化 栄養強化には 100 L ポリカーボネイト水槽 6 面を用い、培養水には砂濾過海水と淡水を混合した 80% 稀釈海水を用いた。栄養強化剤としてマイクロカプセル化された油脂を含有した濃縮淡水クロレラ（生クロレラ ω 3, クロレラ工業）を 200 mL/億個体の割合で給餌した。強化開始時の接種密度は 300 個体/mL とした。ワムシは、給餌する当日の朝から夕方まで 6 時間強化するもの（夕方給餌用）と夕方から翌朝まで 17 時間強化するもの（朝給餌用）の 2 種類を準備した。水温管理は 20°C に調温した 2 kL ウォーターバス水槽内で行い、各強化水槽には 25 × 50 cm の合成樹脂製マット 1 枚を敷設し、懸濁物質の除去を行った。

実験区の設定 実験区には、増殖初期、盛期、停滞期に対応する培養日数 2, 4, 8 日目のワムシ、およびそれら三段階の増殖ステージのワムシをそれぞれ給餌するヒラメ仔魚飼育群として I, II, III 区の計 3 区を設けた。各実験区とも 3 水槽、合計 9 水槽を設けた。なお、ワムシの給餌効果のみを比較するために、実験期間をワムシ単独給餌での飼育が可能なふ化から 16 日齢までとした。

供試魚と飼育方法 平成 15 年 5 月 26 日に富山県農林水産公社水見栽培漁業センター（富山県水見市姿 15-1）で採卵されたヒラメ卵（受精率 94.8%, 1,512 粒/g）を飼育実験に用いた。搬入時における受精卵のステージ

Table 1 Experimental design for feeding trial of larval Japanese flounder

	Condition
Tank volume (L)	500
Initial fish size at 0 D.A.H.* ¹ (BL : mm)	2.19 ± 0.06
Number of fish (× 10 ⁴)	1.1
Feeding frequency (times/day)	2
Experimental period (days)	16
Water temperature (°C)	17–19
Water exchanging ratio (round/day)	1.0–1.2
Air supply (mL/min)	500
Density of <i>Chlorella</i> * ² (× 10 ⁴ cells/mL)	50–100
Density of rotifer (ind./mL)	5–12
Feeding period (D.A.H.* ³)	3–16

*¹ Mean ± S.D. ($n=50$).

*² Super Fresh Chlorella V-12 (Chlorella industry Co.Ltd.).

*³ Days after hatching.

組成は、囊胚期 79.5%, 胞胚期 15.8%, 桑実期 4.4% および胚体形成期 0.3% であり、ほぼ発生段階が揃っていた。搬入した卵は死卵を除去した後、ふ化率 80% を見込んだ数量 12,200 粒 (8.5 g) を電子天秤 (FY-3000, エー・アンド・デイ) で計量し、500 L の飼育水槽内に収容した。ヒラメ仔魚の飼育条件を Table 1 に示した。飼育には 500 L 円型ポリカーボネイト水槽を用いた。飼育開始時の収容密度は、ふ化仔魚（体長 2.19 ± 0.06 mm）で 2.2 万尾/kL 前後とした。飼育用水は、外部から混入する懸濁物質や原生動物を除去するため、0.5 μm カートリッジフィルター (TCW-0.5N-PPDE, ADVATEC) で濾過し、海水用流水殺菌装置 (フロンライザ 2DL-B, 千代田工販) で紫外線照射した海水を用いた。飼育水温は、外気による水温上昇を抑制するため、2.2 kw 小型冷却器 (TC-2200E, 山一製作所) を用いて冷却海水を作成し、掛け流し方式により 17~19°C に調温した。ヒラメ仔魚を安静状態に保ち、飼育水中におけるワムシの飢餓を防止するため、卵収容時から毎日、濃縮淡水クロレラ（スーパー生クロレラ V₁₂, クロレラ工業）を添加した。飼育水中の細胞濃度が 50~100 万 cells/mL となるように 1 日 2 回 (9, 16 時) 添加した。ワムシの給餌は全仔魚が開口した 3 日齢の午前から開始し、飼育水中のワムシ密度が 5~12 個体/mL となるように 1 日 2 回 (9, 16 時) 給餌した。給餌量は、ヒラメ仔魚の成長に応じて適宜増した。換水率は、卵収容時から 2 日齢までは 100%/日、以降は 120%/日とした。通気はエアーストーン 1 個（直径 31 × 長さ 51 mm）を用いて行い、卵収容から取り揚げ時まで一貫して弱通気 (500 mL/分) とした。底掃除は、ヒラメ仔魚の吸い出しによる減耗をなくすため、取り揚げ時まで全く行わなかった。

ワムシの観察 栄養強化に用いたワムシについては、ワムシ個体数、日間増殖率および総卵率を調査した。日間増殖率の算出方法は小磯ら¹⁷⁾に準じ、総卵率は培養水 1 mL 中の卵数をワムシ個体数で除して求めた。栄養強化後のワムシについては、6 および 17 時間強化後のワムシ個体数、総卵率および回収率を調査した。回収率の算出は次式に従い、栄養強化時間に伴うワムシ個体数の増減割合 (%) で示した。

$$\text{回収率}(\%) : R_t = (N_t - N_0) / N_0 \times 100$$

ただし、 N_0 : 栄養強化開始時の接種密度 300 個体/mL、 N_t : 強化後回収できたワムシ個体数、 t : 強化時間を示す。なお、調査にはヒラメ仔魚に給餌するワムシを毎日供試した。計数には、時計皿を用い培養水 0.5 mL をルゴール液 (ヨード 3 g・ヨウ化カリウム 5 g・0.7% NaCl 溶液 100 mL) で固定した後、実体顕微鏡下で行った。計数は 2 回繰り返した。

環境調査 毎日 9 時に各水槽内の水温、pH、酸素飽和度を調査した。調査手法は前報¹⁶⁾に準じた。なお、クロレラ濃度は 8 時、ワムシ密度は 7 時と 15 時の 2 回計数した。クロレラ濃度はトーマ氏血球計算盤、ワムシ密度は時計皿を用い飼育水 10 mL をルゴール液で固定して計数を行った。計数は 2 回繰り返した。

ヒラメ仔魚の観察 観察用サンプルとして、各水槽より 8 および 16 日齢の仔魚を無作為抽出した。抽出したサンプルは MS222 (三共株式会社) で軽く麻酔後、5 % ホルマリン海水で固定し、翌日 50 尾について体長測定および発育段階の観察を行った。発育段階の区分は、南¹⁸⁾に準じた。

生残尾数の推定 各水槽ともふ化時には透明アクリル樹脂管 (φ50 mm×長さ 1.0 m) を用い、夜間の柱状サンプリングを行った。1 水槽当り 8 定点から採水し (約 10 L : 総水量の 1/50)、計数値から容量法により生残尾数を推定した。なお、16 日齢にはテトロンラッセル (目合 0.72 mm) のタモ網を用い全数取り揚げて一定量計数し、重量法で推定した。

ワムシおよびヒラメ仔魚の成分分析 ワムシサンプルは異なる増殖ステージごとに、6、17 時間栄養強化したものを試験開始時から終了時にかけてそれぞれ 3 回採取した。仔魚サンプルは給餌開始前日 (2 日齢) には事前に準備した予備水槽より、試験終了時 (16 日齢) は各飼育水槽より 1 サンプルずつ採取した。各サンプルとも湿重量で 30 g 前後を採取し、淡水で約 1 分間洗浄した後、水分を十分に切りビニール袋に入れて -80°C で凍結保存した。後日、一般組成および総脂質中の脂肪酸組成を分析した。分析方法は既報^{2,8,19)}に準じた。

統計処理 比較するデータは全て平均値±標準偏差で表記した。原則として、比較する群全てに正規性 (χ^2 適合度検定)、かつ等分散性 (Bartlett 検定) が認めら

れた場合は一元配置分散分析 (One-way ANOVA)、そうでない場合は Kruskal-Wallis 検定を用いて、平均値の差を検定した。なお、総卵率や生残率などの比率データについては、逆正弦変換後の値を比較した。平均値に有意差が認められた場合は多重比較法 (Scheffe's F 法、有意水準 5 %) により各区間の比較を行った。本文中において有意差がない場合には“=”で、有意差が認められる場合には方向性を“>”で示した。なお、仔魚の発育段階の比較には独立多試料 χ^2 検定を用い、有意差が認められた場合は post hoc 寄与率により各区間の傾向を判定した。

結 果

栄養強化に用いたワムシの状態 植え継ぎ培養の期間中、平均のワムシ個体数は 322 個体/mL (培養開始時) から 4,900 個体/mL (8 日目) まで対数増殖を示した。一方、日間増殖率は培養 3 日目で最高値 57.3 % に達したが、それ以降は下降に転じ 8 日目には最低値 21.1 % となった。培養期間中において、2 日目 (50.5 %) から 5 日目 (50.1 %) までの間が、対数増殖期に当たると考えられた。Table 2 に栄養強化に用いた植え継ぎ培養ワムシの状態を示した。日間増殖率および総卵率には顕著な差が認められ (ともに $p < 0.0001$)、日間増殖率は I 区 > II 区 > III 区、総卵率は I 区 > II 区 > III 区となった。

飼育状況 Table 3 にヒラメ飼育水槽内の環境を示した。全区とも飼育環境に差がなく、ほぼ同一条件で飼育することができた。水質および餌料密度とも安定して計画目標値を維持することができ、成長および生残へ影響を及ぼすような環境変化も見られなかった。また、ふ化後 5 日齢におけるワムシ摂餌率は全水槽とも 100 % ($n = 20$) となり、後の仔魚の摂餌状況にも全く差がなかった。

栄養強化後のワムシの状態 Table 4 に 6 および 17 時間強化後のワムシの状態を示した。6 時間強化ではワムシ個体数は全区とも同様に減少し、差は見られなかった。しかし、総卵率は強化前の生理状態の影響により、顕著な差が認められ ($p < 0.0001$)、I 区 > II 区 > III 区となった。17 時間強化では 6 時間後の総卵率を反映し

Table 2 Initial conditions of rotifers used for enrichment

Group	Duration of culture	Density of rotifer (ind./mL)	Daily growth rate (%)	Egg rate (%)
I	2 days	620.4 ± 142.1	50.5 ± 16.3 ^a	77.2 ± 19.0 ^a
II	4 days	1,442.7 ± 268.4	55.9 ± 20.8 ^a	56.4 ± 14.3 ^b
III	8 days	4,900.0 ± 1,377.1	21.1 ± 14.8 ^b	31.7 ± 9.6 ^c

Values are mean ± S.D. ($n = 18-24$).

^{a,b,c} Values within a column with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$. ($a > b > c$).

Table 3 Environmental conditions in rearing tanks of larval Japanese flounder

Group	Water temperature (°C)	pH	Oxygen saturation (%)	Density of <i>Chlorella</i> ^{*1} ($\times 10^4$ cells/mL)	Density of rotifer	
					at 7 : 00 (ind./mL)	at 15 : 00 (ind./mL)
I	17.9 (16.6–19.1)	8.03 (7.90–8.13)	90.9 (82.0–97.1)	39.4 (27.1–50.0)	4.3 (2.9–6.3)	3.8 (2.9–4.5)
II	17.9 (16.6–19.0)	8.02 (7.90–8.13)	90.8 (81.9–97.3)	32.3 (14.6–52.1)	4.0 (3.2–5.4)	3.4 (2.3–4.8)
III	17.9 (16.6–19.0)	8.03 (7.90–8.13)	91.0 (82.5–97.1)	36.9 (20.9–52.1)	3.4 (2.8–4.4)	3.3 (2.2–3.8)

^{*1} Super Fresh Chlorella V-12, condensed up to 150×10^8 cells/mL (Chlorella industry Co.Ltd.).

Table 4 Conditions of enriched rotifers for 6 and 17 hrs

Duration of enrichment	Group	Density of rotifer (ind./mL)	Egg rate (%)	Recovery ^{*1} (%)
6 hrs	I	253.5 $\pm$ 23.3	79.0 $\pm$ 15.5 ^a	–15.5 $\pm$ 7.8
	II	252.4 $\pm$ 24.6	61.4 $\pm$ 9.6 ^b	–15.9 $\pm$ 8.2
	III	248.4 $\pm$ 37.1	35.5 $\pm$ 10.4 ^c	–17.2 $\pm$ 12.4
17 hrs	I	373.0 $\pm$ 59.5 ^a	58.3 $\pm$ 14.3 ^a	24.3 $\pm$ 19.8
	II	324.3 $\pm$ 27.4 ^b	52.8 $\pm$ 8.8	8.1 $\pm$ 9.1
	III	289.7 $\pm$ 44.2 ^b	46.5 $\pm$ 12.7 ^b	–3.4 $\pm$ 14.7

Values are mean $\pm$ S.D. ($n = 13$ – 15).

^{a,b,c} Values within a column of each enrichment time with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$. ($a > b > c$).

^{*1} Recovery (%) = (Population growth during enrichment/initial density of rotifer) $\times 100$.

た個体増殖により, ワムシ個体数に顕著な差が認められ ($p < 0.0005$), I 区 $>$ II 区 $\approx$ III 区となった。また, 総卵率にも差が認められ ($p < 0.05$), I 区 $>$ III 区となった。なお, 回収率を比較すると I 区 24.3%, II 区 8.1%, III 区 –3.4% となり, III 区は強化開始時の接種密度よりも低くなった。

ヒラメ仔魚の成長 Fig. 1 にヒラメ仔魚の成長過程を示した。8 日齢では平均体長 4.29–4.33 mm となり, 各区間で差は見られなかった。しかし, 16 日齢では顕著な差が認められた ($p < 0.0005$)。平均全長は I 区 $\approx$ II 区 $>$ III 区となり, 培養日数が短く生理活性の高いワムシを給餌した I, II 区 (7.34, 7.32 mm) は生理活性の低い III 区 (7.12 mm) よりも優れた。

ヒラメ仔魚の発育 Fig. 2 にヒラメ仔魚の発育過程を示した。発育段階の組成については成長と同様に 8 日齢では差が見られなかった。しかし, 16 日齢では顕著な差が認められた ($p < 0.0001$)。ステージ E の出現率は I 区 $\approx$ II 区 $>$ III 区となり, 生理活性の高いワムシを給餌した I, II 区 (85.3, 86.7%) が生理活性の低い III 区 (64.0%) よりも優れた。

ふ化および生残 Table 5 にヒラメのふ化および生残状況を示した。各区間のふ化率および 16 日齢の生残率に有意差は認められなかった。全区ともふ化率は 90%

Fig. 1 Comparison of growth in body length of larval Japanese flounder supplied with enriched rotifers at different population growth stages. Different letters represent significant differences among groups (Kruskal-Wallis test, Scheffe's F test, $a > b$). Vertical bar indicates the standard deviation of the mean ($n = 124$ – 150).

前後 (87.6–91.1%) となり, 産卵後期の卵としては良好であった。また, 16 日齢の生残率は 85% 前後 (84.5–88.2%) となり, 通常の飼育事例と比べても良好な成績であった。

ワムシの成分組成 Table 6 に 6 および 17 時間強化後のワムシ中の EPA, DHA および $n-3$ HUFA 含量を示した。EPA または DHA 含量はヒラメ仔魚に対して必要とされる 1.0–1.6% (乾燥重量比)^{20–22)} の範囲を充たしていた。3 区間のワムシを栄養強化時間ごとに比較したところ, 6 および 17 時間強化とも有意差は認めら

Fig. 2 Comparison of morphological development of larval Japanese flounder supplied with enriched rotifers at different population growth stages.

Table 5 Survival rates during the 16-days feeding trial of larval Japanese flounder

Group	Initial (0 D.A.H.)*		Final (16 D.A.H.)*	
	No. of fish (ind.)	Hatching rate (%)	No. of fish (ind.)	Survival rate (%)
I	10,939 ± 1,085	89.7 ± 8.9	9,279 ± 1,623	84.5 ± 6.8
II	11,110 ± 1,022	91.1 ± 8.4	9,729 ± 281	88.2 ± 10.6
III	10,681 ± 1,388	87.6 ± 11.4	9,016 ± 1,172	84.9 ± 13.5

Results are means of triplicate experiments (Mean ± S.D.).

* Days after hatching.

Table 6 Fatty acid contents in enriched rotifers for 6 and 17 hrs (dry matter basis)

Group	Duration of enrichment	EPA (g/100 g)	DHA (g/100 g)	Σn-3HUFA (g/100 g)
I	6 hrs	0.70 ± 0.11	0.84 ± 0.19	2.01 ± 0.35
	17 hrs	1.00 ± 0.31	0.99 ± 0.48	2.55 ± 0.94
II	6 hrs	0.67 ± 0.22	0.73 ± 0.28	1.88 ± 0.58
	17 hrs	1.35 ± 0.34	1.46 ± 0.45	3.53 ± 0.90
III	6 hrs	0.67 ± 0.11	0.86 ± 0.26	2.05 ± 0.44
	17 hrs	0.80 ± 0.28	0.83 ± 0.36	2.15 ± 0.74

Results are means of triplicate experiments (Mean ± S.D.).

* An asterisk within a column of each group represents a significant difference at $p < 0.05$.

Fig. 3 Comparison of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), $n-3$ HUFA contents and $18:1/n-3$ HUFA ratio in Japanese flounder larvae supplied with enriched rotifers at different population growth stages (dry matter basis). Different letters represent significant differences among groups (Kruskal-Wallis test, Scheffe's F test, $a > b > c$). Vertical bar indicates the standard deviation of the mean ($n = 3$ for each group).

れなかった。一方、時間経過に伴う栄養強化の効果を実験区ごとに比較したところ、II区は6時間と比べ17時間強化ではEPA, DHA および $n-3$ HUFA 含量が有意に高くなった ($p < 0.05$, paired t test)。なお、I区では時間経過に伴う増加傾向が見られたが、有意差は認められず、III区では栄養強化の効果がほとんど見られなかった。

ヒラメ仔魚の成分組成 Fig. 3にヒラメ仔魚体内のEPA, DHA, $n-3$ HUFA 含量および $18:1/n-3$ HUFA 比を示した。全区ともEPA, DHA, $n-3$ HUFA 含量は飼育経過に伴い大幅に減少した。16日齢仔魚体内のEPA および $n-3$ HUFA 含量には顕著な差が認められた ($p < 0.0001$ および $p < 0.05$)。EPA 含量はII区 > I区 > III区、 $n-3$ HUFA 含量はII区 > III区となり、生理活性の

低いワムシを給餌したⅢ区が最も低かった。一方, DHA 含量および 18 : 1/*n*-3 HUFA 比についてはⅡ区がⅠ区より, Ⅰ区がⅢ区より若干高い傾向であった。また, 飼育開始時の体成分組成に近いのもⅡ, Ⅰ, Ⅲ区の順となった。

考 察

卵や親世代の培養環境の影響, すなわち増殖阻害要因が次世代の仔虫にまで作用することはこれまでも報告されており,²³⁻²⁵⁾ 特に, 小磯・日野¹²⁾は, 増殖が停滞したワムシは餌料の質という観点から問題があり, 期待通りの栄養強化成績を得ることが困難であると指摘している。またかねてより, 魚油のメチルエステルを濃縮した強化用油脂を使用してワムシの二次培養を行った場合, ワムシの活力等の条件によっては処理中に大量斃死が起こることも報告されている。⁹⁾

種苗生産を行う上での大きな課題となっている仔魚期の大量減耗は, 卵黄吸収が完了する時期に起こる栄養不足が一要因と考えられており,^{26,27)} 渡辺²⁸⁾は仔魚と成魚では栄養素の消化吸收機構が異なり, 多くの魚種でふ化後数十日まで胃腺の働きなして餌料を腸により消化吸收することを報告している。ヒラメではステージ D 以降, 胃の分化²⁹⁾や摂餌機能の向上^{30,31)}が見られ, この時期に摂取する生物餌料からのエネルギーは仔魚にとって後の形態変化に重要な役割を果たすと考えられている。特に, 色素異常の原因は, すでに初期の発育段階における餌料の質の問題にあり, 中でもステージ D (全長約 8 mm) が最も感受性が高いことも報告されている。³²⁾ これらのことから, 初期餌料として与えるワムシの質の重要性が容易に推察される。

本試験では, 栄養強化前および強化後ともに生理活性が高いワムシはⅠ, Ⅱ, Ⅲ区の順となり, 培養日数の経過に伴い段階的に劣った。特に, 培養日数の長いⅢ区は栄養強化前の低い生理活性を反映し, ワムシ個体数が強化開始時の接種密度よりも低くなった。さらに, そのⅢ区のワムシを摂餌したヒラメ仔魚の成長と発育も有意に劣った。この事象は, 種苗生産現場でしばしば観察される不調事例, すなわち培養不調のワムシを栄養強化しても強化中に個体数が減少し,⁹⁾ そのようなワムシを給餌すると種苗生産成績が劣ることを裏付けているものと考えられる。また, 時間経過に伴うワムシ栄養強化の効果を実験区ごとに比較したところ, Ⅱ区は時間経過に伴い EPA, DHA および *n*-3 HUFA 含量が有意に高くなり, Ⅰ区は若干の増加傾向のみ, Ⅲ区は栄養強化の効果がほとんど見られなかった。さらに, 魚体中でも EPA および *n*-3 HUFA 含量に有意差が認められ, Ⅱ区が最も高く, 次いでⅠ区となり, Ⅲ区が最も低かった。最も生理活性の高いⅠ区のワムシでⅡ区よりも栄養強化レベルが

増加しなかった原因として, 植え継ぎによるハンドリングの影響, 高い総卵率の影響 (卵は栄養強化されない) および, 若齢ワムシの割合が高いことが考えられる。特に, ふ化直後の仔虫には無摂餌個体が多く, アルテミア³³⁾と同様に摂餌器官である繊毛冠の運動活性が低いことが考えられている。³⁴⁾ また, 培養日数の長いⅢ区で栄養強化の効果がほとんど見られなかった原因についても, 小磯ら³⁴⁾が示すように摂餌能力が低下した高齢ワムシの割合が高いことが挙げられる。これらのことは, 必須脂肪酸充足度の指標の一つとされる 18 : 1/*n*-3 HUFA 比^{3,5,6,8,35-37)}がⅡ区のワムシを摂餌したヒラメ仔魚体内で高くなったことにも反映されていると考えられる。以上, 本試験においてヒラメ仔魚の成長と発育および体成分組成はマダイ仔魚¹⁶⁾と同様, 飼育に用いたワムシの生理活性を非常に良く反映した結果となり, 植え継ぎ培養の対数増殖期を過ぎたワムシを栄養強化しても餌料としての質は劣ることが明らかになった。なお, 成長, 発育および生残ともⅠ, Ⅱ区間で差が見られなかったことから, 現状においては対数増殖期のワムシを用いることが, これら海産魚の種苗生産を行う上での必須条件と考えられる。

一方, 本試験で用いたワムシ中の EPA または DHA 含量はヒラメ仔魚に対して必要とされる要求量²⁰⁻²²⁾を充たしていたにも関わらず, 培養日数の長いⅢ区のワムシを摂餌したヒラメ仔魚の成長と発育が有意に劣った。この原因として, Furuita *et al.*³⁸⁾が示すようにヒラメ仔魚の成長は EPA, DHA に関わらず餌料中の *n*-3 HUFA 含量の増加とともに改善されること, あるいは Watanabe⁷⁾や石崎ら³⁹⁾が指摘するように餌料中の *n*-3 HUFA の組成比, または脂肪酸以外の栄養素 (EAA, Vitamin 等) に起因している可能性も考えられる。すなわち, これらのことは環境抵抗の影響により生理活性の低下したワムシが栄養強化中, 正常に栄養素を摂取できないことを示しているものと考えられる。これは, 植え継ぎ培養法に固有する大きな問題であり, 種苗生産成績の良否との関連性もさらに追求すべき課題であろう。この点に関しては, ワムシの培養結果と対象魚種の飼育結果, 両者の成分分析結果を照合して, さらなる検討が必要である。なお, 本試験では生残率に有意な差が認められなかったが, このようなワムシ摂餌期における成長阻害因子はその後の発育段階に至って初めて形態異常の発現に影響を及ぼし, 生残率の低下につながるのではないかと考えられる。したがって, 栄養強化に用いるワムシの生理活性, いわゆる“質”の差がヒラメ稚魚期の色素発現と骨格形成に及ぼす影響についても今後検討していきたい。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、ヒラメ卵を提供していただいた富山県農林水産公社水見栽培漁業センターの角祐二所長、並びに横越淳技師に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 金沢昭夫. 水産動物における高度不飽和脂肪酸およびリン脂質の生理効果. 「水産脂質—その特性と生理活性」(藤本健四郎編) 恒星社厚生閣, 東京. 1983; 69-79.
- 2) Izquierdo MS, Watanabe T, Takeuchi T, Arakawa T, Kitajima C. Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acid. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 859-867.
- 3) Watanabe T, Izquierdo MS, Takeuchi T, Satoh S, Kitajima C. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 1635-1640.
- 4) 竹内俊郎. 魚類における必須脂肪酸要求の多様性. 化学と生物 1991; **29**: 571-580.
- 5) Watanabe T, Arakawa T, Takeuchi T, Satoh S. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in juvenile striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 1989-1995.
- 6) Takeuchi T, Toyota M, Satoh S, Watanabe T. Requirement of juvenile red seabream *Pagrus major* for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 1263-1269.
- 7) Watanabe T. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacult. Soc.* 1993; **24**: 152-161.
- 8) Furuita H, Takeuchi T, Toyota M, Watanabe T. EPA and DHA requirement in early juvenile red sea bream using the HUFA enriched *Artemia* nauplii. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 246-251.
- 9) 北島 力. 生物餌料. 「養魚飼料—基礎と応用」(米康夫編) 恒星社厚生閣, 東京. 1985; 75-88.
- 10) Kanazawa A. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish. *J. World Aquacult. Soc.* 1993; **24**: 162-166.
- 11) 竹内俊郎, 鄭 鋒, 與世田兼三, 廣川 潤, 渡邊 武. DHA 強化ワムシのマダラ仔魚に対する栄養価. 日水誌 1994; **60**: 641-652.
- 12) 小磯雅彦, 日野明德. シオミズツボワムシの大量培養における増殖停滞の機構に関する研究. 水産増殖 2002; **50**: 197-204.
- 13) 浜崎活幸, 竹内俊郎, 関谷幸生. 数種餌料で培養したワムシのガザミ幼生に対する餌料価値. 日水誌 1998; **64**: 841-846.
- 14) 竹内俊郎, 石崎靖朗, 渡邊 武, 今泉圭之輔, 清水 健. DHA 含量が異なるワムシを摂餌したブリ仔稚魚のアルテミア摂餌期における DHA 要求. 日水誌 1998; **64**: 270-275.
- 15) 鄭 鋒, 竹内俊郎, 與世田兼三, 廣川 潤, 渡邊 武. 種苗生産過程におけるマダラ仔稚魚の体脂肪酸組成の変化. 日水誌 1995; **61**: 756-761.
- 16) 友田 努, 小磯雅彦, 桑田 博, 陳 昭能, 竹内俊郎. 増殖ステージが異なるシオミズツボワムシのマダイ仔魚に対する餌料価値. 日水誌 2004; **70**: 573-582.
- 17) 小磯雅彦, 日野明德. 培養水の塩分がシオミズツボワムシの増殖, 培養コスト, 栄養強化に及ぼす影響. 水産増殖 2001; **49**: 41-46.
- 18) 南卓志. ヒラメの初期生活史. 日水誌 1982; **48**: 1581-1588.
- 19) Watanabe T, Takeuchi T, Arakawa T, Imaizumi K, Sekiya S, Kitajima C. Requirement of juvenile striped jack *Longirostris delicatissimus* for n-3 highly unsaturated fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 1111-1117.
- 20) 竹内俊郎. 健苗育成と栄養要求. 「ヒラメの生物学と資源培養」(南卓志・田中克編) 恒星社厚生閣, 東京. 1997; 96-106.
- 21) 竹内俊郎. ヒラメ仔稚魚の栄養要求. 栽培漁業技術研修事業, 基礎理論コーステキスト集コーステキスト集 XII—仔稚魚期の発育シリーズ, 日本栽培漁業協会, 東京. 1998; 1-23.
- 22) 竹内俊郎. 栄養要求に関する基礎理論. 栽培漁業技術体系化事業, 基礎理論コーステキスト集 XIV—魚介類幼生の栄養要求と餌料の栄養強化, 日本栽培漁業協会, 東京. 2001; 1-32.
- 23) Hirayama K, Kusano T. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture—II. Influence of water temperature on population growth of rotifer. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1972; **38**: 1357-1363.
- 24) Galkovskaya GA. Planktonic rotifers and temperature. *Hydrobiologia* 1987; **147**: 307-317.
- 25) Gallardo WG, Hagiwara A, Tomita Y, Snell TW. Effect of growth hormone and γ -aminobutyric acid on *Brachionus plicatilis* (Rotifera) reproduction at low food or high ammonia levels. *J. Exp. Mar. Biol.* 1999; **240**: 179-191.
- 26) Kohno H, Duray M, Gallego A, Taki Y. Survival of larval milkfish, *Chanos chanos*, during changeover from endogenous to exogenous energy sources. In: Hirano R, Hanyu I (eds) *The second Asian fisheries forum. Asian Fisheries Society, Manila*. 1990; 437-440.
- 27) Laurence GC. Influence of temperature on energy utilization of embryonic and prolarval tautog, *Tautoga onitis*. *J. Fish. Res. Board Can.* 1972; **30**: 435-442.
- 28) 渡辺良朗. 仔魚の消化吸収機構. 「養魚飼料—基礎と応用」(米康夫編) 恒星社厚生閣, 東京. 1985; 89-98.
- 29) 安永義暢. ヒラメ稚仔消化器官の発達について. 東海水研報 1972; **69**: 75-89.
- 30) 桑原昭彦, 鈴木重喜. ヒラメ仔魚の鉛直分布と食性. 日水誌 1982; **48**: 1375-1381.
- 31) 高橋庸一. 人工飼育したヒラメ仔稚魚の成長に伴う形態と行動の変化. 水産増殖 1985; **31**: 43-52.
- 32) Seikai T, Shimozaaki M, Watanabe T. Estimation of larval stage determining the appearance of albinism in hatchery-reared juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; **53**: 1107-1114.
- 33) 二村義八朗. Brine shrimp の生態. 日水誌 1967; **33**: 690-702.
- 34) 小磯雅彦, 日野明德. ワムシの活力判定と個体群の増殖予測に関する研究. 水産増殖 1999; **47**: 249-256.
- 35) 米 康夫. 海水魚の必須脂肪酸と脂質の栄養価. 「養魚と飼料脂質」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京. 1978; 43-59.
- 36) Fujii M, Nakayama H, Yone Y. Effect of ω 3 fatty acids on growth, feed efficiency and fatty acid composition of red sea bream (*Chrysophrys major*). *Rep. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ.* 1976; **3**: 65-86.
- 37) Furuita H, Takeuchi T, Watanabe T, Fujimoto H, Sekiya S, Imaizumi K. Requirements of larval yellowtail for eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and n-3 high-

- ly unsaturated fatty acid. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 372-379.
- 38) Furuita H, Konishi K, Takeuchi T. Effect of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in *Artemia* nauplii on growth, survival and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 1999; **170**: 59-69.
- 39) 石崎靖朗, 竹内俊郎, 清水 健, 有元 操, 渡邊 武. アルテミア給餌期のブリ仔稚魚の活力に対する EPA の DHA 代替効果. 日水誌 1997; **63**: 765-772.