ヒラメの白化個体出現に及ぼす変態期の餌料の影響

山本剛史, 福所邦彦, 岡内正典, 田中秀樹,
Warren D. Nagata, 青海忠久, 渡邊 武

(1991 年 6 月 24 日受付)

Effect of Various Foods during Metamorphosis on Albinism
in Juvenile of Flounder*¹Takeshi Yamamoto*² Kunihiro Fukusho,*³ Masanori Okauchi,*⁴
Hideki Tanaka,*⁵ Warren D. Nagata,*⁶ Tadahisa Seikai,*⁷
and Takeshi Watanabe*⁸

The dietary-related albinism in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* was investigated by offering several foods to the larvae during metamorphosis. Newly hatched larvae were reared on rotifer *Brachionus plicatilis* alone until they reached 6.8 mm in total length. Thereafter, the larvae were divided into 8 groups with duplicates and reared on rotifer, vitamin-enriched rotifer, *Artemia salina* nauplii, vitamin-enriched *Artemia* nauplii, fertilized eggs of red sea bream *Pagrus major* and micro formulated diet, singly or combined, until the juveniles reached developmental stage G (nearly 10 mm in TL), and then were reared on rotifer and *Artemia* nauplii until they had completely metamorphosed. The appearance of albinism was monitored among the juveniles accepting various foods. The occurrence of albinism was the highest in the juveniles fed on rotifer and/or *Artemia* (88-98%), the intermediate in the juveniles fed on the vitamin-enriched rotifer (74-76%) and on the micro formulated diet (54-60%), and the lowest in the juveniles fed on the eggs of the red sea bream (4-20%). The red sea bream egg was the best food for reducing the albinism which occurs in hatchery-reared flounder.

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 養殖は 1980 年以降急速に普及したが,¹⁾ 人工採苗したヒラメには、有眼側の一部またはほぼ全域の色素細胞を欠く、いわゆる白化と呼ばれる体色異常個体が多く出現する。白化個体は、養殖用種苗として低く評価されるのみならず、補食の対象となり易いために放流用種苗としても不適当であると考えられている。^{2),3)} このため、白化個体出現の原因を解明するために多くの研究がなされ、仔魚から稚魚への変態過

程の初期(全長約 8 mm)に給餌する餌料の質が白化個体の出現に強く影響していることが明らかにされた。^{4),5),*9} また、餌料に含まれるビタミン類、特に脂溶性ビタミン類が関与している可能性も指摘されている。^{*10,11} そこで、今回変態初期のヒラメ仔魚をビタミン強化した生物餌料およびマダイ *Pagrus major* の受精卵など各種の飼餌料を与えて飼育し、これらの飼餌料が白化個体の出現に及ぼす影響を検討した。

*1 本研究の概要については昭和 60 年度日本水産学会秋季大会で口頭発表した。

*2 水産庁養殖研究所玉城庁舎 (Tamaki Branch, National Research Institute of Aquaculture, Hiruta, Tamaki, Mie 519-04, Japan).

*3 水産庁養殖研究所日光支所 (Nikko Branch, National Research Institute of Aquaculture, Nikko, Tochigi 321-16, Japan).

*4 水産庁西海区水産研究所 (Seikai National Fisheries Research Institute, Kokubu, Nagasaki 850, Japan).

*5 水産庁養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan).

*6 カナダ太平洋生物研究所 (Pacific Biological Station, Nanaimo, B.C., Canada V9R 5K6).

*7 京都大学農学部附属水産実験所 (Fisheries Research Station, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Maizuru, Kyoto 625, Japan).

*8 東京水産大学水族栄養研究室 (Laboratory of Fish Nutrition, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108, Japan).

*9 京都大学農学部附属水産実験所, 東京水産大学: 昭和 58 年度健苗育成技術開発委託事業報告書, 1984, pp. 1-30.

*10 鹿児島大学水産学部: 昭和 59 年度健苗育成技術開発委託事業中間報告書, 1985, pp. 1-24.

*11 金沢昭夫, 手島新一, 越塩俊介, 永松孝之, 尾田 正: 昭和 62 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 169 (1987).

実験方法

供試魚 1985年4月10日に京都府立海洋センターで養成中のヒラメ親魚から自然産卵によって得た受精卵を同センターにおいて一晚管理した後、浮上卵を水産庁養殖研究所に輸送し、ふ化仔魚を20日齢まで飼育した後、供試した。実験に供するまでの間、ふ化仔魚は0.5 m³ 透明円型ポリカーボネイト水槽に收容し、テトラセルミス *Tetraselmis tetrahele* で培養した後、さらにナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* で24時間二次培養したL型のシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis hepatotomus* (以下ワムシと呼ぶ) を餌料として給餌し飼育した。実験開始時における供試魚の平均全長と標準偏差は 6.85 ± 0.63 mm であった。

実験区 ワムシおよびアルテミア幼生併用給餌区を対照区(1区)とし、次の7実験区を設けた。すなわち、2区: ワムシ単独給餌区, 3区: ビタミン強化ワムシ単独給餌区, 4区: アルテミア幼生単独給餌区, 5区: ビタミン強化アルテミア幼生単独給餌区, 6区: マダイ受精卵およびワムシ併用給餌区, 7区: 微粒子飼料およびアルテミア幼生併用給餌区, 8区: ビタミン強化ワムシおよびビタミン強化アルテミア幼生併用給餌区, である(Table 1)。また、各実験槽とも、大部分の実験魚の発育段階がG段階⁶⁾(約10 mm)以上に達した後(42~57日齢)は、変態が完了し体色が発現して実験を終了するまで(58~71日齢)ワムシおよびアルテミア幼生を併用給餌した(後期飼育)。なお、対照区と実験区とも各区2槽ずつを並設し、各水槽はa, bと名づけ区別した。

飼育条件 室内に100 lの透明円型ポリカーボネイト水槽16個を並べ飼育実験水槽とし、各槽に供試魚を1,000尾ずつ收容した。飼育水には15°Cに調温した砂濾過海水を用い、流水式で換水率を約3回転/日とした。なお、微粒子飼料給餌区(7-a, 7-b)では、水質の悪化を防ぐため点灯照明時のみ注水量を2倍とした(換水率は約4.5回転/日)。また、飼育実験期間中の水槽内平均水

Table 1. Dietary arrangement for larval flounder *Paralichthys olivaceus*

Tank No.	Foods
1-a,b	Rotifer + <i>Artemia</i> nauplii
2-a,b	Rotifer
3-a,b	Vitamin-enriched rotifer
4-a,b	<i>Artemia</i> nauplii
5-a,b	Vitamin-enriched <i>Artemia</i> nauplii
6-a,b	Eggs of red sea bream + Rotifer
7-a,b	Micro formulated diet + <i>Artemia</i> nauplii
8-a,b	Vitamin-enriched rotifer + Vitamin-enriched <i>Artemia</i> nauplii

Table 2. Composition of the micro formulated diet

Ingredient	g/100 g dry diet
Milk casein	26.0
Gelatin	10.0
Egg albumin	21.0
Dextrin	6.5
Amino acid mix*1	4.1
Mineral mix	5.0
Vitamin mix	6.0
Squid liver oil	5.0
Soybean oil	3.0
Soybean lecithin	3.0
Urso-desoxycholic acid	0.4
Glutathione	0.1
Indole acetic acid	7 μ g
Attractants*2	1.9
Zein	8.0

*1 Lysine·HCl, 1.8; arginine, 1.4; threonine, 0.8; methionine, 0.1 (g).

*2 Glycine, 0.5; alanine, 0.4; betaine, 0.3; taurine, 0.3; inosine, 0.2; IMP, 0.2 (g).

Table 3. Composition of the vitaminized pollock liver oil

Ingredient	g
Pollock liver oil	4
Vitamin E	1
Vitamin A acetate	0.08 (80,000 IU)
Vitamin D ₂	0.002 (80,000 IU)
Vitamin D ₃	0.002 (80,000 IU)

Table 4. Composition of the water-soluble vitamins

Ingredient	g
Vitamin B ₁	9
Vitamin B ₂	15
Vitamin B ₆	6
Vitamin B ₁₂	0.015
Vitamin C	750
Niacin	60
Ca-Pantothenate	15
Inositol	300
Biotin	0.9
Folic acid	2.25
PABA*1	7.5
Choline chloride	300
Vitamin K*2	7.5

*1 p-Amino benzoic acid.

*2 Fat-soluble vitamin.

温は、16.5~17.1°C (平均 16.86 ± 0.36 °C) で水槽間の差は小さかった。照明は蛍光灯により12時間点灯(8:00~20:00)を行い、飼育実験水槽水面の照度は300~650 lxであった。なお、各実験水槽内ではエアースト

Table 5. Growth and survival of the larval flounder for each experimental tank

Tank No.		1		2		3		4		5		6		7		8	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Water temp.	Mean	17.1	16.9	16.8	16.9	16.8	16.9	16.9	16.8	16.8	16.7	16.5	16.5	16.5	16.6	16.8	16.8
(°C)	S.D.	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4
Initial fish																	
Number										1,000							
TL (mm)	Mean									6.85							
	S.D.									0.63							
Age (days)										20							
Duration of experiment (days)		42	42	52	52	50	50	40	41	41	40	39	39	40	40	41	41
Number of fish sampled during exp.		212	216	209	245	252	242	176	168	184	171	195	195	188	189	180	190
Harvested fish																	
Number		552	625	110	421	560	438	499	188	694	406	442	487	507	508	494	659
TL (mm)	Mean	20.68	20.84	20.76	19.67	21.34	22.59	20.86	21.34	21.37	22.01	20.91	22.34	22.68	22.28	22.46	21.27
	S.D.	2.38	2.31	2.36	1.98	1.64	2.43	2.74	2.02	2.33	2.62	2.73	2.39	2.73	2.47	2.39	2.07
Age (days)		61	61	71	71	69	69	59	60	60	59	58	58	59	59	60	60
Survival rate (%)		70.1	79.7	13.9	55.8	74.9	57.8	60.6	22.6	85.0	49.0	54.9	60.5	62.4	62.6	60.2	81.4

ンを用い通気したが, その通気量は約 100 ml/分とした。

各種餌料の前処理およびビタミン強化方法 ワムシはテトラセルミで培養した後ナンノクロロプシスで24時間二次培養したものを, アルテミアは天津産の耐久卵をふ化槽に収容後 42~50 時間経過したふ化幼生を, 微粒子飼料は鹿児島大学水産学部金沢昭夫教授により作製されたもの (Table 2) をそれぞれ用いた。マダイ受精卵は, 養殖研究所の加温循環水槽内で市販配合飼料と冷凍オキアミを給餌して養成した満 3 年魚から自然産卵されたもので, 産卵・受精後少なくとも 12 時間を経過していた。ワムシおよびアルテミア幼生のビタミン強化は次のように行った。まず, 脂溶性ビタミン類を添加したスケトウダラ肝油 (Table 3) 5 g, 水溶性ビタミン混合物 (Table 4) 10 g, 卵黄 1 g に水を加えて 100 ml とし, 家庭用ミキサーで 2~3 分攪拌して乳化液を調製した。強化は 30 l 透明円型ポリカーボネイト水槽に, 海水 25 l を入れ, これに湿重量 30~40 g 程度の前述のアルテミア幼生またはワムシを収容し, 上記の乳化液 20 ml とパン酵母 5 g を加え, 4~21 時間培養した後, 採集し給餌した。

給餌量 各実験区への各種餌料の給餌量は, 青海の日間給餌量表*に基づいて決めたが, 各実験槽内の残餌量や全長測定の結果により, 適宜調節した。ただし, 7 区のアルテミア幼生の給餌量は, 翌朝水槽内に残らないようにし微粒子飼料を効果的に仔魚に摂取させるため, 給餌量表の 4 分の 1 とした。また, ワムシを単独給餌した 2 区および 3 区については, 他の実験区と比べ成長が著しく悪かったため, 実験開始後 18 日目 (39 日齢) より給餌量表の 1.5 倍量のワムシを与えた。6 区では, ヒラメ仔魚の平均全長が約 8 mm に達した後, マダイ卵を 1 日 1 水槽当たり約 1.0~1.5 g (約 2,000~3,000 粒) を給餌した。

給餌回数 ワムシまたはアルテミア幼生単独給餌区 (2~5 区) では 1 日の予定給餌量を 2~3 回に分けて与えた。ワムシおよびアルテミア幼生併用給餌区 (1 区および 8 区) では午前中まずワムシを与え, 午後にアルテミア幼生を与えた。マダイ卵およびワムシ併用給餌区 (6 区) では午前中にマダイ卵を与え, 午後にワムシを 1~2 回に分けて給餌した。微粒子飼料およびアルテミア幼生併用給餌区 (7 区) では, 午前中に微粒子飼料を 5 回に分けて与え, 午後に 1 回アルテミア幼生を与えた。

全長測定および体色異常個体の類型化 実験開始後 5 日目毎に各実験槽から約 30 尾の仔稚魚を採取し, MS-222 で麻酔後, 全長を測定し, 发育段階を観察した。実験終了後, 各実験槽からすべての生残魚を取り上げ, MS-222 で麻酔後 10% 中性ホルマリンで固定保存した。そして,

各区から固定標本を無作為に 200 個体以上抽出し, 青海の方法* (タイプ 1 が正常体色でタイプ 9 が完全白化) に従って体色異常個体の類型化を行った。なお, 各実験区の体色発現面積の割合を比較するため, Seikai の方法⁹⁾により, Pigment Index (以下 PI 値), すなわち, 生残魚の有眼側全面積に占める有色部位の面積の比率を算出した。

各種生物餌料の脂質含量, 脂肪酸組成および脂溶性ビタミン含量の定量 実験に用いた各種生物餌料は, 実験期間中 3 回分析用試料として採取し, 水道水で洗浄後, 分析に供するまで -20°C で凍結保存した。実験終了後, これらの試料を解凍し, 10,000 rpm で 5 分間遠心分離し水分を取り除いたものを分析に用いた。総脂質は Folch らの方法⁹⁾により抽出した。脂肪酸組成は, 抽出した総脂質を常法に従い, けん化して脂肪酸を遊離させ, これをボロントリフルオライドメタノールによりメチルエステルとした後, ガスクロマトグラフィー (島津製作所製, GC-7A, 水素炎イオン検出器付) により求めた。なお, 分析条件は渡辺らの方法⁹⁾に準じた。脂溶性ビタミンのうち, ビタミン A およびビタミン E は高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製, LC-3A) 法¹⁰⁾により定量した。ビタミン D の定量は日本食品分析センターに依頼した。なお, 水溶性ビタミンの定量は行わなかった。

結 果

白化個体の出現率 各実験槽毎に白化個体を類別し, その出現率および PI 値を Table 6 に示した。また, 各実験区間における正常および白化個体の出現率を比較するため, 便宜的に正常体色 (タイプ 1), 部分白化 (タイプ 2~タイプ 8) および完全白化 (タイプ 9) の 3 つの群に分け (Table 7), 必要に応じ Duncan の方法¹¹⁾で出現率について有意性検定を行い, その差を比較した。ワムシ給餌の 2 区とアルテミア幼生給餌の 4 区を比べると, 4 区に比べ 2 区では有意に部分白化個体が少なく, 完全白化個体が多く, PI 値も低かった (ともに $P < 0.01$)。また, ビタミン強化ワムシ給餌の 3 区およびビタミン強化アルテミア幼生給餌の 5 区を, 2 区および 4 区とそれぞれ比較すると, 3 区は 2 区に比べ, 正常体色個体が増加し ($P < 0.05$), 完全白化個体が減少し ($P < 0.01$), 有意差は認められなかったが部分白化個体が増加する傾向がみられ, PI 値は上昇した ($P < 0.01$)。一方, 5 区と 4 区の間には有意差はなかった。ワムシとアルテミア幼生併用給餌の 1 区は 4 区に比べ, 完全白化個体が増加し ($P < 0.01$), 正常体色および部分白化個体が減少する傾向がみられ, PI 値は有意に低かった ($P < 0.01$)。ビタミン強化

* 青海忠久: 昭和 60 年度健苗育成事業共通試験マニュアル (No. 3), 1985, pp. 1-15.

Table 6. Percentage of the colored type of individuals and pigment index. The colored types are classified after Seikai (1985*)

Tank No.	1		2		3		4		5		6		7		8	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Type 1 (normal)	2.3	1.5	10.0	5.5	23.9	26.3	11.5	10.8	7.8	14.1	80.4	96.4	45.7	39.9	11.5	13.7
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	10.3	11.6	6.4	18.9	38.2	30.4	44.2	40.9	32.2	41.3	6.7	2.4	29.4	21.5	33.7	36.1
5	0	0	0	0	0.8	0.4	0.5	1.1	0	0.5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0
7	23.0	22.8	18.2	18.9	19.1	9.8	21.2	22.0	27.5	30.0	6.7	1.2	1.5	3.9	23.0	25.1
8	34.3	34.5	30.9	25.3	14.3	24.1	2.9	15.6	12.5	8.5	2.7	0	8.7	10.3	17.4	11.0
9 (complete albinism)	30.0	29.6	34.5	31.3	3.4	8.9	9.7	9.7	20.0	5.2	3.6	0	14.7	24.5	14.4	14.1
Pigment index (%)**	23.6	23.8	32.1	25.7	65.8	61.1	58.3	56.7	45.9	61.8	89.0	99.0	76.7	63.4	50.5	54.4

*1 T. Seikai: Manual of the general feeding experiment for the healthy seed production project No. 3 (Fisheries Agency, 1985, p. 15, in Japanese).

*2 Percentage of the sum of normal pigmented area to the sum of total area on the ocular side of all surviving individuals (Seikai, 1985⁷⁾).

Table 7. Occurrence percentage of the three color-types and pigment index

Tank No.	1		2		3		4		5		6		7		8	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Normal	2.3	1.5	10.0	5.5	23.9	26.3	11.5	10.8	7.8	14.1	80.4	96.4	45.7	39.9	11.5	13.7
Partial albinism	67.7	68.9	55.5	63.2	72.7	64.7	78.8	79.5	72.2	80.7	16.0	3.6	39.6	35.6	74.1	72.2
Complete albinism	30.0	29.6	34.5	31.3	3.4	8.9	9.7	9.7	20.0	5.2	3.6	0	14.7	24.5	14.4	14.1
Pigment index (%)	23.6	23.8	32.1	25.7	65.8	61.1	58.3	56.7	45.9	61.8	89.0	99.0	76.7	63.4	50.5	54.4

Fig. 1. Mean growth of larval flounder for each experimental group.

○: Larvae in tanks 1 which were given rotifer and *Artemia* nauplii. □: Larvae in tanks 2 which were given rotifer. ■: Larvae in tanks 3 which were given vitamin-enriched rotifer. △: Larvae in tanks 4 which were given *Artemia* nauplii. ▲: Larvae in tanks 5 which were given vitamin-enriched *Artemia* nauplii. ●: Larvae in tanks 6 which were given eggs of red sea bream and rotifer. ▣: Larvae in tanks 7 which were given micro formulated diet and *Artemia* nauplii. ●: Larvae in tanks 8 which were given vitamin-enriched rotifer and vitamin-enriched *Artemia* nauplii.

ワムシおよびビタミン強化アルテミア幼生併用給餌の8区では、1区に比べ完全白化個体が減少し ($P < 0.05$), 有意ではないが正常体色および部分白化個体が増加する傾向がみられ、PI 値は有意に高かった ($P < 0.01$)。マダイ卵とワムシ併用給餌の6区では、他の実験区と比べ、部分白化個体 ($P < 0.01$) や完全白化個体 ($P < 0.05$) が著しく少なく、大部分が正常体色個体であり、PI 値は最も高かった (ともに $P < 0.01$)。特に 6-b 区ではそのほとんどが正常体色個体であり、PI 値も 99% と高い値を示した。微粒子飼料とアルテミア幼生併用給餌の7区では、4区と比べ、正常体色個体が増加し、部分白化個体が減

少し (ともに $P < 0.01$), 有意ではないが PI 値も高い値を示したが、一方で完全白化個体が増加する傾向がみられた。

成長 後期飼育に移行するまでの変態期の成長は、4区および5区が優れ、2区および3区が劣り、これ以外の区 (1, 6, 7 および 8 区) は4区および5区よりやや劣っていた (Fig. 1)。このため、変態が完了し、実験を終了するのに要した期間は2区および3区が他区よりも約10日長かった (Table 5)。

生残率 各実験区とも後期飼育に移行するまでの斃死は少なかった。ところが後期飼育に移行してワムシおよびアルテミア幼生を併用給餌するようになってから、斃死魚が増え、変態が完了し、実験を終了した時の生残率は13.9~81.4%であった (Table 5)。なお、各区とも発育段階で G~H に達した仔魚が多く斃死し、斃死魚の多くは体色が黒くなっていた。

生物飼料の脂質含量および脂肪酸組成 実験に供したワムシ、アルテミア幼生およびこれらをビタミン強化したもの、ならびにマダイ卵の総脂質含量および脂肪酸組成を Table 8 に示した。ビタミン強化によるワムシの脂質含量に顕著な変化は認められなかったが、アルテミア幼生の脂質含量は増加した。ワムシおよびアルテミア幼生の脂肪酸組成には強化による明瞭な差はみられなかった。ワムシでは 18:3n-3 が多く、18:1 が少なかった。アルテミア幼生では、16:1 や 20:5n-3 が多く、16:0 が少なかった。マダイ卵では 16:0, 18:1, 18:2n-6, 22:6n-3 が多く、16:1 や 18:3n-3, 20:5n-3 が少ない傾向がみられた。総 n-3 高度不飽和酸 (Σ n-3 HUFA) 量は、マダイ卵が一番多く (19.0~22.9%), 次いでアルテミア幼生 (12.9~17.0%) とワムシ (11.4%~16.0%) の順であった。

生物飼料の脂溶性ビタミン含量 実験に供した生物飼料の脂溶性ビタミン (ビタミン A, D₂, D₃, E) 含量を Table 9 に示した。なお、ビタミン D については、ビタミン強化したワムシおよびアルテミア幼生について分析したそれぞれ1検体の結果を記した。ビタミン強化により、ワムシとアルテミア幼生のビタミンAおよびE含量が増加していることは明らかである。また、マダイ卵ではビタミンAは検出されず、ビタミンEについてもビタミン強化していないアルテミア幼生の10分の1程度の含量であった。

考 察

マダイ卵の給餌効果 変態初期のヒラメ仔魚にマダイ卵をワムシと併用給餌すると、ワムシを単独給餌した場合と比べて正常体色個体の出現率が極めて高く、マダイ卵の給餌が白化個体の出現を抑制することが明らかとな

Table 8. Fatty acid composition of the total lipids in the experimental live foods

Fatty acid	Rotifer						Artemia nauplii						Red sea bream eggs		
	Nan* ¹	V* ²	Nan	V	Nan	V	V	V	V	V	V	V	5/10	5/18	5/24
	5/5* ³	5/5	5/17	5/17	5/22	5/22	5/5	5/5	5/17	5/17	5/22	5/22	5/10	5/18	5/24
14 : 0	10.1	9.8	8.6	8.9	8.7	11.5	3.9	4.6	1.1	4.4	3.7	5.3	4.4	4.0	3.8
16 : 0	16.3	13.3	14.2	12.7	15.6	15.3	8.0	9.8	10.2	8.8	9.0	9.8	18.0	18.2	18.7
16 : 1	15.5	24.2	16.7	27.9	18.1	24.0	33.5	29.5	18.3	30.5	30.0	28.0	9.1	10.2	10.1
18 : 0	0.6	0.7	0.6	0.9	1.2	1.1	0.6	1.3	5.5	0.8	0.9	1.1	4.0	4.4	4.9
18 : 1	6.1	9.1	6.9	12.7	7.5	11.6	14.0	16.8	32.1	13.2	14.5	14.6	22.4	23.3	23.3
18 : 2n-6	4.4	4.4	4.6	4.1	4.2	4.0	4.4	4.5	5.0	4.3	4.5	4.3	9.7	9.9	10.6
18 : 3n-6	0.1	0.1	Tr* ⁴	ND* ⁵	0.2	0.1	0.2	0.2	ND	0.3	0.4	0.3	0.5	0.5	0.6
18 : 3n-3	12.9	7.2	13.8	6.8	9.4	5.1	5.7	1.7	3.6	5.2	5.6	4.6	1.4	1.4	1.5
18 : 4n-3	2.6	2.2	3.0	2.3	1.1	1.6	0.8	0.3	0.3	1.3	0.9	1.8	1.0	1.0	1.0
20 : 1	1.4	1.2	1.3	0.9	1.5	1.2	0.1	0.1	0.6	0.2	0.1	0.3	1.2	1.5	1.7
20 : 2n-6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.3	0.3	0.5
20 : 3n-6	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3
20 : 4n-6	1.8	1.3	1.2	0.7	2.1	1.2	2.0	1.6	2.8	1.5	1.9	1.5	0.8	0.9	0.9
20 : 4n-3	2.0	1.4	2.9	1.9	2.9	1.8	0.4	0.4	0.7	0.4	0.2	0.3	0.7	0.8	0.8
20 : 5n-3	11.8	9.3	8.2	8.4	11.6	11.1	15.7	14.9	12.2	14.7	15.0	15.6	6.7	6.3	5.5
22 : 1	2.8	1.7	1.7	ND	3.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.2	0.3	0.3
22 : 4n-6	0.2	0.1	Tr	ND	0.1	ND	0.1	0.1	0.4	0.2	0.3	TR	0.1	0.1	0.1
22 : 5n-6	0.7	0.7	0.2	ND	ND	0.7	0.1	ND	0.2	0.4	0.2	ND	0.1	0.1	0.1
22 : 5n-3	0.5	0.6	0.3	0.4	1.0	0.9	Tr	Tr	Tr	ND	ND	0.4	2.2	2.3	2.2
22 : 6n-3	ND	0.2	0.1	0.7	0.5	0.5	0.4	0.4	Tr	0.8	0.2	0.7	13.3	12.3	10.5
Total n-6	7.5	6.8	6.2	4.9	6.8	6.1	6.9	6.5	8.5	6.8	7.4	6.3	11.7	12.0	13.1
Total n-3	29.8	20.9	28.3	20.5	26.5	21.0	23.0	17.7	16.8	22.4	21.9	23.4	25.3	24.1	21.5
Total n-3HUFA	14.3	11.5	11.5	11.4	16.0	14.3	16.5	15.7	12.9	15.9	15.4	17.0	22.9	21.7	19.0
Total lipid (%)	2.2	2.9	3.1	2.7	2.4	2.4	2.8	4.2	2.2	2.7	2.6	3.4	2.0	2.5	1.9

*¹ Rotifer cultured with *Tetraselmis* secondarily fed on *Nannochloropsis*.*² Rotifer or *Artemia* nauplii enriched with vitamins.*³ Sampling dates.*⁴ Less than 0.1%.*⁵ Not detected.

Table 9. Amount of fat-soluble vitamins contained in the experimental live foods

	Rotifer				Artemia nauplii				Red sea bream eggs			
	Nan*	V*	Nan	V	Nan	V	V*	V	5/10	5/18	5/24	
	5/5	5/5	5/17	5/17	5/22	5/22	5/5	5/5	5/10	5/18	5/24	
Vitamin A (IU/g)	5/5*	2.3	ND	31.8	ND	17.6	ND	5.2	ND	ND	ND	
Vitamin E (μg/g)	ND	118.1	ND	326.6	ND	592.0	12.8	243.0	1.4	1.4	0.6	
Vitamin D ₂ (IU/g)		33.6						17.3				
Vitamin D ₃ (IU/g)		44.2						21.9				
Total lipid (%)	2.2	2.9	3.1	2.7	2.4	2.4	2.8	4.2	2.0	2.5	1.9	

*1-4 Same as in Table 8.

った。したがって、これまで白化抑制効果があると報告された天然動物プランクトン^{9),*1}や微粒子飼料中^{4),*2}にも共通して含まれる物質がマダイ卵にも含まれ、それが白化個体出現を抑制したと推察される。しかし、今回の実験ではその物質を特定することはできなかった。

ビタミンAが白化抑制物質であるとの報告^{12,18)}があるが、今回の分析結果ではマダイ卵中にビタミンAは検出されなかった。ただし、10種類の海産魚の卵に含まれるビタミンAを定量したところ、多くの種類でビタミンAはエステル型ビタミンAまたはビタミンAアルデヒドとして検出され、アルコール型ビタミンA、すなわちレチノールとして蓄積されているものはほとんどなかったとの報告¹⁴⁾がある。また、サケ *Oncorhynchus keta* では未受精卵のビタミンAはエステル型であり、受精後発生が進むにつれて活性型のビタミンAであるアルコール型が増加し、さい嚢吸収後の仔魚では再びエステル型が増加する。¹⁰⁾ 今回分析したマダイ卵は、受精後 12 時間を経過したものであり、卵中のビタミンAはほとんどがエステル型であった可能性がある。今回の分析では、ビタミンAの形態は考慮しなかったため、たとえマダイ卵中にアルコール型以外のビタミンAやカロテノイド等ビタミンAの前駆体があったとしても、ビタミンAとしては検出されなかったものと考えられる。今後卵発生に伴うビタミンAの形態の変化も考慮して分析を行う必要がある。

本実験で、ヒラメ仔魚によるマダイ卵またはそのふ化仔魚の摂餌が確認されたのは、全長約 9 mm の F 段階以降の個体であった。既に、全長約 8 mm (D 段階後半) 以上のヒラメ仔魚は飼育水槽内でふ化したマダイ仔魚を摂餌することが報告されており、¹⁰⁾ 本実験においても、全長約 8 mm より、横断面が卵より小さいふ化仔魚を摂餌していたものと思われる。また、全体的にワムシ単独給餌区に比べマダイ卵とワムシ併用給餌区の成長が良かったことから、多くのヒラメ仔魚がマダイ卵もしくはそのふ化仔魚を摂餌していたと考えられる。また 6-a 区では後期飼育に移行した際に若干の F 段階の仔魚が残っていたため、6-b 区に比べ正常体色個体が少なかったが、白化個体になるかどうか決定される時期が D~F 段階とされている¹⁷⁾ことから、全仔魚が G 段階に進むまで引き続きマダイ卵を給餌することによって正常個体の出現率を更に向上させることができたのではないかとと思われる。

マダイ卵の給餌量については、今回、試験的に 1 日 1

*1 京都大学農学部附属水産実験所, 東京水産大学: 昭和 58 年度健苗育成技術開発委託事業報告書, 1984, pp. 1-30.

*2 金沢昭夫, 手島新一, 越塩俊介, 永松孝之, 尾田 正: 昭和 62 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 169 (1987).

水槽当たり約 1.0~1.5 g としたが、白化個体の出現が抑制できたことや成長もワムシおよびアルテミア幼生併用給餌区と同等であったこと、また、福所ら¹⁸⁾も白化個体出現の抑制にはヒラメ仔魚 1,000 尾に対し 1~2 g で十分であることを確認しており、この程度の給餌量で十分であったと考えられる。

今回、加温飼育による早期採卵を行ったマダイ親魚の産卵期¹⁹⁾と本実験の期間が一致していたので、実験期間中、毎日マダイ受精卵の供給が可能であった。ところが、種苗産量機関においては安定的なマダイ卵の供給が困難な場合も多いと思われるため、他魚種の卵の白化抑制効果も調べる必要がある。なお、ヒラメ卵の給餌も考えられるが、ヒラメ卵はマダイ卵より大きく、変態初期のヒラメ仔魚では摂餌するのが困難であると考えられる。

生物餌料のビタミン強化効果 ワムシをビタミン強化することにより、完全白化個体が減少し、部分白化および正常体色の個体が増加したことから、ビタミン強化ワムシは白化個体の出現の抑制にある程度の効果があると考えられる。一方、ビタミン強化アルテミア幼生には白化抑制効果がないことがわかった。しかし、ビタミン強化によりアルテミア幼生にもワムシ同様ビタミン A および E が取り込まれ、湿重量当りの含量も同程度であることから、今後、白化個体の出現を抑制する物質が何であるか、さらに検討する必要がある。ビタミン D については、今回ビタミン強化していない生物餌料の分析を行っていないが、生物餌料（天然動物プランクトン、ワムシ、アルテミア幼生）のビタミン D ($D_2 + D_3$) 含量が 0.04~0.42 IU/g (湿重量) であることが報告されている。^{*1} この量と比べて、本実験に用いたビタミン強化ワムシおよびビタミン強化アルテミア幼生のビタミン D 含量が高いことから、これらはビタミン D を取り込んだものと推察される。白化個体の出現を抑制する物質がビタミン強化のための培養液の中に含まれていたと考えられるが、アルテミア幼生ではビタミン強化効果がなかったこととあわせ、この物質の特定と生物餌料内およびヒラメ体内での作用機序については更に検討する必要がある。

微粒子飼料の給餌効果 微粒子飼料をアルテミア幼生と併用給餌すると、アルテミア幼生を単独給餌した場合に比べて正常個体の割合が増加し、PI 値もマダイ卵給餌区に次いで高かったので、微粒子飼料は白化抑制に効果的であると言える。しかし、既報^{*1}の実験結果と同様、アルテミア幼生を単独給餌した 4 区と比べ、完全白化個体が増加していた。これは、仔魚が十分微粒子飼料を摂

餌できなかったためと思われる。さらに白化個体の出現を抑制するには、給餌回数を増やす等給餌方法の工夫が必要であると考えられる。

ワムシとアルテミア幼生の併用効果 ワムシとアルテミア幼生を併用給餌した 1 区では、アルテミア幼生を単独給餌した 4 区に比べ、正常体色および部分白化個体が減少し、完全白化個体が増加し、PI 値も低くなった。一方、この 1 区とワムシ単独給餌の 2 区と比べると、白化および正常個体の出現率、ならびに PI 値の間に有意な差がなかった。これは、ワムシとアルテミア幼生を併用給餌することにより、それぞれを単独給餌するよりも白化個体の出現率が低くなる傾向がみられた既報^{*1}の実験結果とは異なっている。その原因として、後述するように本実験で用いたワムシの培養条件が既報^{*1}のものとは異なるため、脂質含量や n-3 HUFA 含量等ワムシの栄養価が異なり、本実験で用いたワムシとアルテミア幼生を併用給餌した場合、ワムシの影響が強く、ワムシがアルテミア幼生の持つ体色を発現させる作用を妨げたと考えられる。またワムシとアルテミア幼生をビタミン強化して給餌した 8 区では 1 区に比べ完全白化が減少し、正常体色および部分白化が増加し、PI 値も高くなったが、これはビタミン強化効果のみられたビタミン強化ワムシによる影響と思われる。

ワムシとアルテミア幼生を併用給餌した後期飼育に移行後の大量死の原因は明らかではないが、アルテミア幼生の単独給餌による仔稚魚の大量死に関しては、マダイ^{19,20)} ヒラメおよびインダイ²¹⁾についての報告があり、n-3 HUFA 欠乏がその一因とされている。本実験においても実験魚がアルテミア幼生を選択摂餌し、ワムシをほとんど摂餌しなかったことにより、n-3 HUFA 等変態後期のヒラメ仔魚に必要な栄養成分の摂取が不足した可能性がある。

ワムシの餌料価値 ワムシを単独給餌した区（2 区および 3 区）では、他の実験区と比べて後期飼育に至るまでの成長が劣った。この原因の一つとして、アルテミア幼生給餌区では多数のアルテミア幼生が翌朝まで摂餌されることなく残留していたのに対し、2 区および 3 区ではワムシの残留は全く認められなかったので、一日のワムシ給餌量が、アルテミア幼生の給餌量に比べて過少であったものと推測された。また、本実験で使用したワムシは同じ分析条件で分析した既報^{*2}のワムシと比べ、総脂質含量および $\sum$ n-3 HUFA 含量が低く、18:3 n-3 が多かった。これは、既報^{*2}のワムシが、ナンノクロロブシ

^{*1} 京都大学農学部附属水産実験所、東京水産大学：昭和 60 年度健苗育成技術開発委託事業報告書，1986，pp. 1-38.

^{*2} 東京水産大学、京都大学農学部附属水産実験所、長崎県水産試験場、水産庁養殖研究所：昭和 60 年度健苗育成技術開発委託事業中間報告書，1986，pp. 1-79.

スのみで培養したもの, またはナンノクロロブシスとパン酵母で培養したものをナンノクロロブシスで二次培養したものであったのに対し, 本実験に用いたワムシはテトラセルミスで培養した後にナンノクロロブシスで二次培養したものであることから, ナンノクロロブシスによる二次培養が効果的に行われず, ナンノクロロブシスに比べ 18:3 n-3 含量が著しく多く, Σ n-3 HUFA の少ないテトラセルミス²²⁾による培養の影響が残っていた可能性が考えられ, このことも, ワムシ単独給餌区の成長が著しく劣ったことの原因の一つと考えられる。

おわりに, ヒラメ受精卵を提供していただいた京都府立海洋センター職員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 青海忠久: ヒラメ, 浅海養殖 (社団法人資源協会編), 大成出版, 東京, 1986, pp. 246-265.
- 2) 能勢健爾: ヒラメ稚魚生産における白化問題とワムシの現状, さいばい, **32**, 33-36 (1984).
- 3) 青海忠久: ヒラメ白化個体の出現抑制, 養殖, **22**, 97-100 (1985).
- 4) 北島 力, 林田豪介, 下崎真澄, 渡辺 武: 人工稚魚ヒラメの体色異常出現に対する微粒子飼料の抑制効果, 長崎水試研報, **11**, 29-35 (1985).
- 5) T. Seikai: Reduction in occurrence frequency of albinism in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery-reared on wild zooplankton, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 1261-1267 (1985).
- 6) 南 卓史: ヒラメの初期生活史, 日水誌, **48**, 1581-1588 (1982).
- 7) T. Seikai: Influence of feeding period of Brazilian *Artemia* during larval development of hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus* on the appearance of albinism, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 521-527 (1985).
- 8) J. Folch, M. Lees, and G. H. Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-507 (1957).
- 9) T. Watanabe and T. Takeuchi: Evaluation of pollock liver oil as a supplement to diets for rainbow trout, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **42**, 893-906 (1976).
- 10) T. Watanabe, T. Takeuchi, M. Wada and R. Uehara: The relationship between dietary lipid levels and α -tocopherol requirement of rainbow trout, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 1463-1471 (1981).
- 11) D. B. Duncan: Multiple range and multiple F tests, *Biometrics*, **11**, 1-42 (1955).
- 12) 三木教立, 谷口朝宏, 浜川秀夫: 脂溶性ビタミン投与ワムシによるヒラメ白化防除と好適ビタミン量, 水産増殖, **37**, 109-114 (1989).
- 13) 三木教立, 谷口朝宏, 浜川秀夫, 山田幸男, 桜井則広: ビタミンA 投与ワムシ給餌によるヒラメ白化防除, 水産増殖, **38**, 147-155 (1990).
- 14) 武藤清一郎: 魚卵中のビタミンA の研究, 東北水研報, **17**, 73-79 (1960).
- 15) 山村弥六郎, 武藤清一郎: サケ卵発生中のビタミンA およびカロチノイドの変化, 東北水研報, **19**, 171-179 (1961).
- 16) 福所邦彦, 難波秀博, 山本剛史, 山崎芳恵, 李 明哲, 青海忠久, 渡辺 武: ヒラメ白化防除のためのマダイ卵の効果的給餌法, 養殖研報, **12**, 1-7 (1987).
- 17) T. Seikai, M. Shimozaki, and T. Watanabe: Estimation of larval stage determining the appearance of albinism in hatchery-reared juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1107-1114 (1987).
- 18) 福所邦彦, 藤村卓也, 山本剛史: 加温循環式水槽によるマダイの親魚養成と早期採卵, 水産増殖, **34**, 69-75 (1986).
- 19) 伏見 徹: マダイの稚魚生産に関する研究II, 広島水試研報, **1**, 49-54 (1968).
- 20) T. Watanabe, F. Oowa, C. Kitajima, and S. Fujita: Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia salina* and their content of ω 3 highly unsaturated fatty acids, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **46**, 35-41 (1980).
- 21) T. Watanabe, M. Ohta, C. Kitajima, and S. Fujita: Improvement of dietary value of brine shrimp *Artemia salina* for fish larvae by feeding them on ω 3 highly unsaturated fatty acids, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 1775-1782 (1982).
- 22) 福所邦彦, 岡内正典, S. Nuraini, 辻ヶ堂 節, 渡辺 武: テトラセルミスで培養したシオミズソボワムシのマダイ仔稚魚に対する餌料価値, 日水誌, **50**, 1439-1444 (1984).