DHA 強化ワムシのマダラ仔魚に対する栄養価^{*1}竹内俊郎, 鄭 鋒, 與世田兼三,
廣川 潤, 渡邊 武

(1993 年 12 月 13 日受付)

Nutritive Value of DHA-Enriched Rotifer for Larval Cod

Toshio Takeuchi,^{*2} Zheng Feng,^{*2} Kenzo Yoseda,^{*3} Jun Hirokawa,^{*3}
and Takeshi Watanabe^{*2}

Two feeding experiments were conducted to evaluate the nutritive value of rotifers enriched with different levels of docosahexaenoic acid (DHA) for larval cod *Gadus macrocephalus*.

Rotifers containing different levels of DHA (0-3.1%) were prepared by the direct method in which triglycerides, methyl esters, *Euglena* and shark's egg (dried powder), each containing different amounts of DHA and eicosapentaenoic acid (EPA), were emulsified. The larvae fed on rotifers containing more than 1.5% DHA showed high percentages of abnormal fish floating on the water surface together with high mortalities and hydrops in eyes and fins. These abnormalities and mortality were lowest in the fish fed the rotifers containing about 1% DHA. The larvae fed the rotifers containing 2% DHA also showed good growth performances. These fish contained 11 µg/g vitamin E (VE) dry basis in the whole body, while other groups of fish had only a trace amount of VE. On the other hand, the DHA content in fish rapidly decreased from 0.6 to 0.1-0.2 g/100 g (wet basis) during 20 days after hatching in all groups of fish.

It is inferred that a suitable level of DHA in rotifers for larval cod is approximately 1% and that co-existence of VE seems to be required for effective utilization of DHA.

キーワード: マダラ, ワムシ, ドコサヘキサエン酸, 仔魚, 栄養価

マダラ *Gadus macrocephalus* Tilesius の種苗生産に関する歴史は古く、石川県では 1943~1945 年の間に、ふ化後約 1 週間の仔魚を放流するという方法で初めて行われた。その後しばらく人工ふ化放流事業は途絶えていたが、1971 および 1972 年が極端な不漁であったことを契機に石川県増殖試験場は再びマダラのふ化放流を開始した。¹⁾ 一方、マダラの発生に関する研究は我が国では、1952 年に山本・西岡^{*2}により受精卵の発生、さらに、卵のふ化水温、仔魚の飼育、および浸透圧の変化に対する適応などについての研究がなされ、マダラのふ化仔魚の飼育に必要な生物学的諸特性の輪郭が多少ではあるが明らかにされた。

1980 年代以前のマダラの種苗生産における飼育方法は餌料系列としてマダイ²⁾やクロダイ²⁾と同様にシオミズツボワムシ (以下ワムシと略記)、アルテミア (幼生お

よび養成) 天然プランクトンおよび魚肉ミンチが用いられたが、比較的大型の天然プランクトンや養成アルテミアを大量に必要とする点でマダイなどは多少異なっている。さらに、仔魚から稚魚期までの飼育では、ふ化後 10 日目以前の初期減耗が 50% 以上と大きいことや、それ以後もマダラに特徴的な水面に浮上してへい死する異常魚 (以下、異常浮上魚^{*3}と呼ぶ) や水腫魚^{*4}が散発的に見られ、60 日齢で生残率が通常 3~6% と低い結果となっている。このようにマダラの種苗生産では飼育方法、餌料の種類や給餌量など不明な点が多かった。

日本栽培漁業協会 (日栽協) では種苗生産における技術開発の一環として、1983 年からマダラの種苗生産を再開した。しかし、異常浮上魚の発生など原因不明の初期減耗が大きく、体長 20 mm までの稚魚の生残率は 1986 年の 10,000 尾 (7%) を最高に、その後低迷を続けている。

^{*1} 本研究の概要については平成 4 年度日本水産学会秋季大会で口頭発表した。

^{*2} 東京水産大学資源育成学科 (Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Minato, Tokyo 108, Japan).

^{*3} 日本栽培漁業協会能登島事業場 (Notojima Station, Japan Sea-Farming Association, Notojima, Kashima, Ishikawa 926-02, Japan).

^{*4} 山本護太郎, 西岡丑三: マダラの発生ならびにふ化幼生の飼育, 日水研創立 3 周年記念論文集, 301-308 (1952).

^{*5} 異常浮上魚: 鰾にガスが異常貯留することにより、仔魚は表層に浮遊する症状を呈する魚。

^{*6} 水腫魚: 仔魚の眼球および腹鰭に水泡状の膨らみを呈する魚。

現在のところ, この異常浮上魚および水腫魚の症状が栄養性疾患によるものかどうかは不明であるが, この症状は毎年出現し, 減耗の最大の要因であり, この原因の解明と防除がマダラ種苗生産の鍵を握っているとまでいわれている。

近年多数の海水魚の種苗生産についての研究成果^{4,8)}により, 餌料として用いられているワムシおよびアルテミア中の脂質, 特に脂肪酸が仔魚の生残および活力などに大きな影響を及ぼすことが明らかにされた。その中で, ワムシおよびアルテミアに含まれる海水魚の必須脂肪酸 (以下, EPA と略記) であるエイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサヘキサエン酸 (DHA) 含量の多寡は最も重要な因子の一つとなっている。これらの脂肪酸を生物餌料へ強化することにより, 仔稚魚の健苗育成が可能となりつつある。^{2,4)} さらに, 最近の研究結果^{9), *7, 8)}により, 海水魚に対する EPA としての効果は EPA よりも DHA の方が大きいことが明らかにされた。しかし, マダラはマダイやブリなどとは異なり冷水性魚類に属し, またマダラ仔稚魚の栄養要求に関する知見は極めて不十分である。そのため, マダラ種苗生産技術の向上を計る上で, マダラ仔稚魚の栄養要求についての研究は急務である。特に, 種苗生産における初期減耗の主な発生要因は個体発生の初期, とりわけ卵黄吸収後の外部栄養への転換期に適当な質の餌が不足することにより生じるものと考えられる。

そこで, 本研究はマダラ種苗生産における初期減耗の要因の解明を目的に, EPA および DHA 含有油脂または DHA 含量が異なる種々の栄養強化剤を用いて, 両脂肪酸を取り込ませたワムシで, マダラ仔魚を飼育し, ワムシ中の脂質, 特に EPA および DHA が仔魚の成長, 生残, および異常魚の発現などに及ぼす影響を検討した。

実験方法

供試魚 供試魚には, 1991 および 1992 年に石川県能登島町鰺目漁協で漁獲された成熟成魚から人工採卵し, 日裁協能登島事業場でふ化させた仔魚を用いた。

実験区 試験は2回行い, それぞれ実験 I (Expt. I) および実験 II (Expt. II) とし, 実験区を Table 1 に示した。実験 I では強化剤の種類 (詳細については後述) により次の5試験区を設けた。1区: 生ナンクロロプシス (生ナンクロ)+DHA オイル区, 2区: 冷凍ナンクロ+DHA オイル区, 3区: 冷凍ナンクロ+エステル 85 区, 4区: フェオダクチラム (フェオ)+DHA オイル区, 5区: 無強化区。

Table 1. Enrichment of rotifer in Experiments I and II

Tank no.	Enrichment methods	Abbreviations
Expt. I		
1	<i>Nannochloropsis</i> + DHA oil ^{*1}	N + DHA
2	Frozen <i>Nannochloropsis</i> + DHA oil ^{*1}	FN + DHA
3	Frozen <i>Nannochloropsis</i> + Ester-85 ^{*2}	FN + E85
4	<i>Phaeodactylum</i> + DHA oil ^{*1}	Pha + DHA
5	No enrichment	No
Expt. II		
6	Frozen <i>Nannochloropsis</i>	FN
7	Frozen <i>Nannochloropsis</i> + 1/2 Corn oil + 1/2 DHA oil ^{*1}	FN + 1/2DHA
8	Frozen <i>Nannochloropsis</i> + DHA oil ^{*1}	FN + DHA
9	<i>Euglena</i> (DHA 40%)	EDHA40
10	<i>Euglena</i> (DHA 50%)	EDHA50
11	Shark's egg ^{*3}	Egg

*1 Triglycerides containing 17.7% EPA + 17.7% DHA.

*2 Methyl esters containing 85% *n*-3HUFA (26.0% EPA + 51.1% DHA).

*3 Dried powder containing 52.8% lipid, 9.0% EPA + 19.7% DHA.

Table 2. Enrichment conditions for rotifer in Experiments I and II

	Experiment	
	I	II
Tank volume (l):	10	10
Rotifer (individual/ml):	500	250
<i>Nannochloropsis</i> (10 ⁶ cell/ml):	15-18	—
Frozen <i>Nannochloropsis</i> (10 ⁶ cell/ml):	35-45	60-80
<i>Phaeodactylum</i> (10 ⁴ cell/ml):	10-12	—
Oil (ml/10 l):	2.5	2.5
<i>Euglena</i> (10 ⁸ cell/10 l):	—	12
Shark's egg (g/10 l):	—	8.0
Water temperature (°C):	20	20
Enrichment time (h):	20	20

実験 II では次の6区 (6~11 区) を設定した。すなわち, 6区: 冷凍ナンクロ区, 7区: 冷凍ナンクロ+1/2 コーン油+1/2DHA オイル区, 8区: 冷凍ナンクロ+DHA オイル区, 9区: ユーグレナ DHA40 (EDHA40) 区, 10区: ユーグレナ DHA50 (EDHA50) 区, 11区: サメ卵粉末区。

*7 豊田雅典, 竹内俊郎, 渡邊 武, 藤本 宏, 今泉圭之輔: 平成3年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1991, p. 38.

*8 M. S. Izquierdo, T. Arakawa, C. Kitajima, T. Takeuchi, and T. Watanabe: 平成元年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1989, p. 251.

Table 3. Rearing conditions for larval cod in Experiments I and II

	Experiment	
	I	II
Fish size	4.4 mm TL	4.3 mm TL
Tank capacity	500 l	100 l
Number of fish	12000	2200
Water temperature	6.3–11.2°C	8.0–12.2°C
Circulation rate	0–1 round/day	0–2.5 round/day
Feeding frequency	Once/day	Twice/day
Quantity of live food	(50–200) × 10 ⁴ rotifer/day	(30–120) × 10 ⁴ rotifer/day
Feeding period	23 days	30 days

ワムシの強化 強化方法を Table 2 に示す。強化に使用した L 型ワムシは同事業場で 1 億個体に対して 1 日 60 g のパン酵母、さらにワムシ 10 億個体に対して 1 日 1–2 m³ 分の冷凍および生ナシクロ (2000 万細胞/ml 換算) を添加して培養したものである。二次強化には直接法を用い、実験 I では 10 l のワムシ培養水 (500 個体/ml) に対して、生ナシクロは 1,500–1,800 万細胞/ml、冷凍ナシクロは 3,500–4,500 万細胞/ml、DHA オイルおよびエスター 85 は 2.5 ml の割合で、生ナシクロはその培養水をそのまま、冷凍ナシクロは直接、オイルは 95 ml の水道水を加えて小型ミキサーで 2 分間乳化したものを培養水に添加した。実験 II では 10 l のワムシ培養水 (250 個体/ml) に対して、冷凍ナシクロは 6,000–8,000 万細胞/ml、油脂は 2.5 ml、ユーグレナは 12 億細胞、サメ卵粉末は 8 g の割合で、冷凍ナシクロおよびユーグレナは直接、油脂およびサメ卵粉末は 95 ml の水道水を加え乳化した後、培養水に添加した。使用した油脂のうち DHA オイル (日水製) は EPA および DHA をそれぞれ 17.7% ずつ含むトリグリセリド (TG) タイプに調整されたものである。エスター 85 は EPA および DHA をそれぞれ 26.0% および 51.1% を含むメチルエステル (日化飼製)、コーン油は局方のそれぞれ市販品を用いた。ユーグレナはハリマ化成 (株) 筑波研究所で特に本研究用に培養されたもので、EDHA40 および EDHA 50 とは EPA および DHA をそれぞれ 7.3 と 38.5% および 10.3 と 52.7% 含有し、その他の栄養素は両者全て同一としたものである。サメ卵粉末 (アブラツノザメの卵を凍結乾燥したもの; 理研ビタミン製) は脂質を 52.8%、EPA を 9.0%、DHA を 19.7% 含有するものを使用した。ワムシの強化は 20°C のウォーターバス水槽内で行い、強化時間は 20 時間とした。

飼育方法 飼育条件を Table 3 に示す。実験 I では全長 4.43 ± 0.10 mm のふ化仔魚を 500 l の不透明バンライト水槽に各区 12,000 尾ずつ収容した後、23 日間の飼育実験を行った。換水率は飼育開始後 2 日目の 30%/1 日

から終了時 100%/1 日まで徐々に増加した。給餌は 1 日 1 回 (13:00) 行い、その量は試験開始後 2 日目から各区ともワムシを 1 日 50 万個体、その後徐々に増加し、終了時には 1 日 200 万個体を与えた。実験 II では全長 4.30 ± 0.12 mm のふ化仔魚を、100 l の不透明バンライト水槽に各区 2200 尾ずつ収容した後、30 日間の飼育実験を行った。換水率は飼育開始後 2 日目の 30%/1 日から終了時 250%/1 日まで徐々に増加させた。給餌は 1 日 2 回 (10:00, 15:00) 行い、その量は飼育開始後 2 日目から各区とも 30 万個体、その後徐々に増加させ、終了時には 1 日 120 万個体を与えた。なお、飼育期間中生ナシクロを毎日飼育水中に 100 万細胞/ml になるように添加した。

サンプリング 実験 I では飼育開始から 5 日ごとに無作為に各区より 30 尾の魚を取り上げ、全長を測定した。実験終了時には各区 100 尾ずつの魚を用いて、水腫魚の発生割合の観察を行うとともに、50 尾の全長を測定した。分析用サンプルのワムシは 3 日ごとに区切り計 5 回、仔魚は実験開始時、実験開始後 10 日目、15 日目、20 日目、および終了時に採集した。実験 II では飼育終了時に各区 100 尾ずつの魚を取り上げ、水腫魚の発生割合の観察を行うとともに、50 尾について全長を測定した。分析用サンプルとしてはワムシを飼育期間中に 3 日、仔魚を飼育開始および終了時に採集した。採集したサンプルは水道水でよく洗浄した後、水分を十分に切り、-45°C で急速に冷凍させ、分析するまで -30°C で保存した。

分析方法 ワムシは解凍後 10,000 回転 (rpm) で 10 分間の遠心分離 (国産遠心器社製、H-200 型) を行ったものを分析に供した。ワムシおよび仔魚は Folch らの方法¹⁰⁾により総脂質 (TL) を抽出し、常法によりけん化・メチル化した後、ガスクロマトグラフ (GLC) (島津製作所製、GC-15A, 水素炎イオン検出器付) で脂肪酸組成を分析した。なお、分析条件は既報⁹⁾に準じた。また、対験 I のワムシは 3 日毎のサンプルを 1 まとめとし、5 回の繰り返し分析とした。実験 II のワムシは 3 日採集した

Table 4. Fatty acid composition of total lipids (TL) of rotifers used in Expt. I

(area %)

Fatty acid	Enrichment of rotifer				
	Tank no.				
	1 N+DHA	2 FN+DHA	3 FN+E85	4 Pha+DHA	5 No
14:0	3.8±0.30 ^{*1}	4.3±0.69	2.6±0.49	3.5±0.45	3.3±0.46
15:0	0.4±0.03	0.4±0.05	0.3±0.05	0.4±0.06	0.5±0.08
16:0	12.8±0.52	13.7±0.57	11.1±1.03	11.1±0.84	13.1±0.87
16:1n-7	16.1±1.10	17.5±2.01	14.3±2.13	12.3±0.76	17.8±1.17
17:0	0.3±0.04	0.3±0.03	0.3±0.03	0.3±0.04	0.4±0.05
16:3n-6	0.4±0.07	0.5±0.04	0.3±0.07	0.5±0.03	0.5±0.07
16:3n-3	0.8±0.32	0.8±0.12	0.4±0.10	1.2±0.21	1.0±0.32
18:0	2.2±0.10	2.2±0.24	1.8±0.06	2.2±0.19	2.9±0.27
18:1n-11	0.6±0.50	0.6±0.48	0.9±0.08	0.1±0.34	2.1±0.20
18:1n-9	10.4±1.55	11.0±0.75	7.7±0.89	12.4±1.30	12.1±1.44
18:1n-7	3.2±0.24	3.0±0.27	2.2±0.19	2.9±0.21	3.3±0.34
18:1n-5	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.02	0.3±0.03
18:2n-6	2.5±0.16	3.2±0.28	5.5±0.53	2.3±0.07	3.9±0.14
18:3n-6	0.1±0.02	0.2±0.02	0.1±0.02	0.1±0.01	0.1±0.03
18:3n-3	0.3±0.06	0.3±0.02	0.7±0.06	0.5±0.05	0.4±0.07
18:4n-3	0.6±0.20	0.6±0.08	0.7±0.13	1.3±0.17	0.2±0.02
18:4n-1	0.1±0.01	0.1±0.02	0.0±0.02	0.2±0.03	tr ^{*2}
20:0	0.0±0.01	0.0±0.01	tr	0.0±0.01	0.0±0.03
20:1n-(11+9)	2.3±0.28	2.2±0.32	1.8±0.16	2.6±0.15	3.0±0.42
20:1n-7	0.2±0.04	0.2±0.03	0.2±0.02	0.2±0.02	0.3±0.05
20:2n-6	0.2±0.02	0.2±0.02	0.2±0.01	0.2±0.01	0.2±0.03
20:3n-6	0.5±0.09	0.3±0.06	0.4±0.05	0.3±0.03	0.5±0.08
20:4n-6	3.0±0.32	2.9±0.20	2.9±0.12	2.3±0.20	3.0±0.30
20:3n-3	0.0±0.03	0.0±0.03	0.0±0.01	0.0±0.01	0.0±0.02
20:4n-3	0.5±0.05	0.5±0.08	1.0±0.14	0.8±0.07	0.3±0.05
20:5n-3	22.8±2.42	20.2±0.41	22.5±1.26	19.5±1.50	15.7±0.80
22:1n-(13+11)	0.1±0.05	0.1±0.04	0.0±0.01	0.2±0.04	0.1±0.03
22:1n-9	0.3±0.07	0.3±0.06	0.3±0.04	0.3±0.05	0.4±0.09
22:1n-7	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.02
22:4n-9	0.2±0.03	0.2±0.08	0.4±0.07	0.4±0.05	0.1±0.02
22:4n-6	0.2±0.04	0.2±0.05	0.2±0.03	0.2±0.03	0.3±0.06
22:5n-6	0.2±0.07	0.2±0.06	0.2±0.08	0.5±0.05	0.1±0.05
22:5n-3	3.1±0.32	2.8±0.39	3.3±0.38	3.0±0.32	3.8±0.47
22:6n-3	4.3±1.14	4.0±0.94	9.9±2.51	10.1±1.16	1.7±0.27
Σ n-3	32.8±2.19	29.5±1.36	38.9±3.73	36.8±2.95	23.4±1.31
Σ n-6	7.5±0.44	7.9±0.42	10.1±0.53	6.7±0.29	8.9±0.52
Σ Monoene	33.9±2.74	35.5±1.69	28.0±2.94	31.6±1.94	39.4±2.64
Σ n-3HUFA	31.0±2.11	27.6±1.38	36.9±3.66	33.7±2.86	21.8±1.26
TL (%)	3.9±0.80	3.6±0.59	3.8±0.30	4.3±0.32	2.1±0.39
TL (%) (d.b.)	26.5±3.27	26.5±2.50	28.0±1.17	30.4±1.63	18.7±1.65
EPA in rotifer (d.b.)	0.9±0.17	0.7±0.13	0.8±0.10	0.8±0.05	0.3±0.05
	6.0±0.94	5.3±0.57	6.3±0.51	6.0±0.46	2.9±0.21
DHA in rotifer (d.b.)	0.1±0.08	0.1±0.04	0.3±0.11	0.4±0.04	0.0±0.01
	1.1±0.39	1.0±0.23	2.7±0.70	3.1±0.41	0.3±0.07
Σ n-3HUFA in rotifer (d.b.)	1.2±0.25	1.0±0.16	1.4±0.20	1.4±0.10	0.4±0.07
	8.2±1.13	7.3±0.62	10.3±1.14	10.3±1.10	4.0±0.28

*1 Mean±SD (n=5). *2 tr, trace.

サンプルを1まとめにして分析に供した。さらに、Vitamin E (以下 VE と略記) の分析はワムシについては抽出した脂質を 50% のエタノールでけん化した後、仔稚魚については脂質を抽出後それぞれ *n*-ヘキサンに溶解し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) (島津製作所製, LC-9A)¹¹⁾ により定量した。

結果および考察

ワムシの総脂質含量、脂肪酸組成、および VE 含量 実験 I に用いたワムシの TL 含量および TL の脂肪酸組成を Table 4 に示す。各試験区のワムシの TL 含量を乾燥重量当たりで比較すると、4 区が最も高く 30.4%、次に 3 区が 28.0%、1 区と 2 区はほぼ同じ 26.5%、無強化区は最も低く 18.7% であった。

脂肪酸組成では、5 区のモノエン酸の割合が最も高く 39.4% であった。1 および 2 区は 5 区に比べわずかに減少していたが、3 および 4 区は 5 区より 10% 程度低かった。EPA の割合は 1 区が最高の 22.8% で、ついで 3 区の 22.5% であった。2 区と 4 区の間に大きな差はなかった。一方、5 区は最低の 15.7% であった。DHA の割合は 4 区が最高の 10.1% で、次に 3 区の 9.9% で、両区の間には大差なかった。1 区と 2 区は 4% 前後、さらに 5 区は最も低い 1.7% であった。しかし、いずれも冷凍ナシクロだけで強化したワムシの 0.7% よりも高い割合を示した。次に、乾燥重量当たりのワムシ中に占める EPA, DHA, および *n*-3HUFA 含量を見ると、EPA は 3 区が最も高く 6.3% であり、1 区と 4 区は 6.0%、2 区は 5.3% であった。DHA および *n*-3HUFA 含量は 4 区が最も高く、それぞれ 3.1 と 10.3%、次に 3 区で 2.7 と 10.3%、1 区と 2 区は 1.1, 8.2% および 1.0, 7.3% となっていた。5 区の EPA, DHA, および *n*-3HUFA はそれぞれ 2.9, 0.3, および 4.0% とすべて低い値を示した。

生ナシクロおよび冷凍ナシクロで二次培養したワムシは EPA を豊富に含むが、DHA はわずか 0.3% であった。これらの値は従来の値と一致していた。¹²⁾ また DHA オイルあるいはエステル 85 の併用強化により、ワムシ中の DHA 含量を増加させることができた。

実験 II に用いたワムシの TL 含量、TL の脂肪酸組成、およびワムシ中の VE 含量を Table 5 に示す。ワムシの TL 含量は乾燥重量当たり 7 区は最高の 25.1%、10 区は最低の 20.2% であった。なお、6, 9, および 10 区は強化前より脂質含量が低く、他の 3 区は強化前よりも高かった。TL の脂肪酸組成を見ると、冷凍ナシクロを使用した 6~8 区の EPA の割合は 19.0~23.6% の範囲で高かったが、DHA は冷凍ナシクロ単用の 6 区がわずか 0.05% で、DHA オイルの併用により 1.6~1.8% に増加した。さらに、コーン油を使用した 7 区では 18:2*n*-6 が

15.0% と高い値を示した。一方、9~11 区のワムシ中の EPA は 12.1~15.5% の範囲で、DHA は 10 区が最も高く 13.2%、9 および 11 区はそれぞれ 7.4 と 8.3% であった。乾燥重量当たりのワムシ中の EPA, DHA, および *n*-3HUFA 含量を見ると、EPA は 8 区が最も高く 5.5% で、6 および 7 区は同じ 4.8% であった。9, 10, および 11 区がそれぞれ 2.8, 3.1, および 2.9% で大差なかった。DHA は 10 区が最も高く 2.7%、ついで、11 区と 9 区がそれぞれ 2.0 と 1.5% であった。また、7 区と 8 区は同じ 0.4% で、6 区にはほとんど含まれていなかった。*n*-3HUFA は 8 区と 10 区が高く、それぞれ 6.7 と 7.0% で、次に、11 区と 7 区がそれぞれ 6.1 と 5.9% であった。6 区と 9 区は若干低く、それぞれ 5.6 と 5.4% であった。VE 含量は、冷凍ナシクロおよび冷凍ナシクロ+油脂強化区 (6~8 区) のワムシ中には検出されなかったが、ユーグレナおよびサメ卵で強化したものには乾燥重量当たり 25~56 μg/g 存在し、ユーグレナ強化の方がサメ卵強化ワムシより高い値を示していた。

このようにワムシの TL の脂肪酸組成は強化剤の脂肪酸組成をよく反映していた。実験 II でコーン油添加の 7 区のワムシでは 18:2*n*-6 の割合が 15.0% と高かったのに対して、20:4*n*-6 は増加しなかったことから、ワムシ中では 18:2*n*-6 が 20:4*n*-6 に転換されないことが示唆された。さらに、ワムシ中の EPA および DHA 含量を見ると、6 区のワムシでは実験 I の 5 区と同様に EPA 含量が高かったのに対して、DHA はほとんど含まれていなかった。また、7 区と 8 区の DHA 含量は DHA オイルの使用量が異なるにもかかわらず、ほぼ同じであった。これは EPA 含量が多い冷凍ナシクロを使用しかつ濃度が高かったため、ワムシの油脂の取り込みに影響が生じたものと思われる。すなわち、二次培養時の冷凍ナシクロ濃度が 5000 万細胞/ml 以上になると、油脂併用の二次培養効果が低下する可能性が示唆された。一方、ユーグレナおよびサメ卵の TL 中の DHA の割合はサメ卵が 19.7% で、EDHA40 および EDHA50 に比べて 20~30% 低かったが、11 区のワムシ中の DHA 含量は 9 区より高く、10 区より低かった。このことからワムシはサメ卵の DHA をユーグレナ中の DHA よりも取り込みやすいと考えられる。

飼育結果 実験 I および II の飼育結果を Table 6 に示す。

実験 I: 終了時の魚の平均全長は 4 区 (フェオ+DHA オイル) で若干劣ったが、その他の区の間にはほとんど差がみられなかった。一方、生ナシクロ+DHA オイル区 (1 区) とフェオ+DHA オイル区 (4 区) では実験開始後 8 日目から、冷凍ナシクロ+エステル 85 区 (3 区) では 12 日目から仔魚が水面に浮くいわゆる異常浮上魚

Table 5. Fatty acid composition (area %) of the total lipids (TL) and vitamin E content of rotifers used in Experiment II

Fatty acid	Tank no.					
	6 FN	7 FN+1/2DHA	8 FN+DHA	9 EDHA40	10 EDHA50	11 Egg
14:0	5.79	4.35	5.63	6.33	1.87	1.14
15:0	0.51	0.38	0.48	1.06	0.70	0.49
16:0	15.01	13.65	14.32	10.93	12.27	15.85
16:1n-7	23.79	16.68	22.23	15.76	15.19	12.01
17:0	0.22	0.26	0.28	0.39	0.41	0.57
16:3n-6	0.55	0.53	0.66	0.57	0.66	0.47
16:3n-3	0.11	0.04	0.05	0.24	0.56	0.29
16:4n-1	nd*	0.22	0.26	nd	nd	nd
18:0	1.75	1.73	1.72	2.12	2.01	2.83
18:1n-(9+7)	11.70	15.14	12.67	19.12	12.01	18.74
18:1n-5	0.07	nd	nd	nd	0.05	nd
18:2n-6	4.51	15.03	4.29	3.91	3.83	3.36
18:3n-6	0.21	0.16	0.19	0.14	0.18	0.10
18:3n-3	0.19	0.47	0.18	0.49	0.66	0.34
18:4n-3	0.18	0.35	0.37	0.22	0.31	0.40
20:1n-(11+9)	1.73	1.67	1.85	2.85	2.25	5.01
20:1n-7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
20:2n-9	0.16	0.12	0.17	0.18	0.16	0.15
20:2n-6	0.16	0.28	0.15	0.56	0.63	0.23
20:3n-6	0.31	0.25	0.26	0.58	0.41	0.33
20:4n-6	3.44	2.61	3.17	4.38	3.90	3.90
20:3n-3	0.07	0.05	0.06	0.03	0.04	0.03
20:4n-3	0.19	0.24	0.32	0.46	0.65	0.78
20:5n-3	23.63	19.03	23.42	13.54	15.47	12.11
22:1n-(13+11)	nd	0.02	0.02	0.04	0.04	3.37
33:1n-9	0.17	0.13	0.15	0.23	0.17	tr*
22:1n-7	nd	nd	nd	nd	0.04	tr
22:4n-6	0.15	0.13	0.15	0.56	0.42	0.57
22:5n-6	nd	0.14	0.13	0.67	0.79	0.39
22:5n-3	3.37	2.68	3.12	4.91	5.37	4.25
22:6n-3	0.05	1.57	1.79	7.43	13.18	8.31
Σ n-3	27.79	24.43	29.31	27.32	36.24	26.51
Σ n-6	9.33	19.13	9.00	11.37	10.82	9.35
Σ Monoene	37.46	33.64	36.92	38.00	29.75	39.13
Σ n-3HUFA	27.31	23.57	28.71	26.37	34.71	25.48
TL(%)	2.62	3.44	3.05	2.68	2.78	3.10
TL (%) (d.b.)	20.34	25.04	23.31	20.51	20.15	23.98
EPA in rotifer	0.62	0.65	0.71	0.36	0.43	0.38
(d.b.)	4.81	4.77	5.46	2.78	3.12	2.90
DHA in rotifer	0.00	0.05	0.05	0.20	0.37	0.26
(d.b.)	0.01	0.39	0.42	1.52	2.66	1.99
Σ n-3HUFA in rotifer	0.72	0.81	0.88	0.71	0.96	0.79
(d.b.)	5.55	5.90	6.69	5.41	6.99	6.11
VE in rotifer (μg/g)	tr	tr	tr	5.31	7.78	3.23
(d.b.)	tr	tr	tr	40.6	56.4	25.0

* tr, trace; nd, not detected.

Table 6. Results of the 23-day feeding (Expt. I) and 30-day feeding (Expt. II) experiments with cod larvae

Tank no.	Materials used for rotifer enrichment	Total length (mm)		Body weight (mg)	Abnormal fish*1 rate (%)	Dropsy rate (%)	Survival rate (%)
		Initial	Final				
Expt. I							
1	N + DHA	4.43±0.10*2	7.61±0.54*3 (6.24~8.70)	2.29	6.1	67.0	40.1
2	FN + DHA	"	7.95±0.49 (6.88~8.83)	2.62	1.4	2.0	60.4
3	FN + E85	"	7.74±0.41 (6.57~8.40)	2.02	11.6	34.0	42.6
4	Pha + DHA	"	7.19±0.46 (6.03~8.23)	2.15	21.9	87.0	40.9
5	No	"	7.71±0.34 (6.95~8.28)	2.42	6.1	28.0	38.6
Expt. II							
6	FN	4.30±0.12	9.60±0.52 (8.03~10.64)	3.57	3.2	1.0	64.7
7	FN + 1/2DHA	"	9.36±0.45 (7.51~10.16)	3.34	1.3	5.0	63.9
8	FN + DHA	"	9.21±0.50 (7.73~10.20)	3.19	5.5	6.0	47.5
9	EDHA40	"	9.20±0.54 (8.05~10.36)	3.22	8.6	3.0	50.4
10	NDHA50*4	"	8.33±0.55 (6.83~9.23)	2.84	20.1	10.0	45.4
11	Egg	"	10.02±0.75 (7.80~11.28)	4.95	3.1	1.9	73.2

*¹ Fish floating on the water surface due to abnormally swollen air bladder.*² Mean±SD (n=30).*³ Mean±SD (n=50).*⁴ The feeding of this group was terminated at the 25th day.

が出現した。各区の異常浮上魚の出現率は4区が最も高く21.9%、ついで3区が11.6%、1区と5区が同じ6.1%で、2区は最低の1.4%であった。また、実験終了時の各区における水腫魚の発生割合は4区が最も高く87.0%、ついで1区が67.0%、3区と5区が30.0%前後、2区が最低の2.0%であった。一方、生残率は2区が60%と最も優れていたが、その他の区間に大差なく、40%前後であった。

Fig. 1 に実験 I のマダラ仔魚の生残率とワムシ中の DHA および *n*-3HUFA 含量との関係を示す。2 区の DHA および *n*-3HUFA 含量は乾燥重量当たりそれぞれ 1.0% と 7.3% で、この区の魚の生残率は最も高く 60.0% であった。その他の区では DHA および *n*-3HUFA 含量はいずれもこれより高いかあるいは低い値であり、生残率は 2 区より低くなった。この 2 区の *n*-3HUFA 含量はマダイ、シマアジおよび turbot など⁴⁾の海水魚のワムシ摂餌期における *n*-3HUFA 要求量と比較し 2 倍以上高くなっていた。

Fig. 2 に実験 I における各区仔魚の異常浮上魚の出現率および水腫魚の発生割合とワムシ中の DHA 含量との関係を示す。フェオ+DHA オイルで強化した 4 区では脂質含量が高く、DHA 含量も 3.1% とかなり高い値になり、異常浮上魚の出現率は 21.9% と最も高かった。ついで、3 区の 11.6% であり、DHA 含量が高くなるに伴い、異常浮上魚の出現率も高くなる傾向が見られた。一方、水腫魚の発生割合は同じ 4 区が最高の 87% であり、次に 1 区の 67% であった。このように、マダラ仔魚に対してフェオ+DHA オイルをワムシの二次強化餌料として用いることは不適当であると推察された。この原因がフェオグチラムにあるのか、あるいは DHA オイル添加に伴う過剰の DHA 含量によるものなのかについてはさらに検討する必要がある。また、2 および 3 区は同じ冷凍ナンクロを使用しているにもかかわらず、異常浮上魚の出現率および水腫魚の発生割合に差が生じた。ワムシへの DHA の取り込み割合が異なるためと考えられるがマダイ仔魚で報告されているようにエステル 85 の

Fig. 1. Effect of the DHA and *n*-3HUFA contents in rotifer on the survival rate of cod larvae in Expt. I.

形態がメチルエステルである^{*9}ことも原因の一つと推察される。また、1区では生ナシロで強化する場合のナシロ濃度は冷凍ナシロによる場合より1/2倍程度薄いため、二次強化時のワムシは数時間のうちにナシロを食い尽くしてしまい飢餓状態が長く続くことになり、ワムシの栄養価が低下したものと推察される。以上の結果から、全長7mmまでに与えたワムシの二次強化方法の違いにより異常浮上魚の出現率および水腫魚の発生割合に顕著な差が見られることがわかった。

Fig. 2. Effect of the DHA content in rotifer on the dropsy fish rate and abnormal fish* rate in Expt. I.

*See the footnote of Table 6.

実験 II: 実験 II の飼育結果を Table 6 に、各区仔魚の生残率、異常浮上魚および水腫魚の発生割合とワムシ中の DHA 含量との関係をそれぞれ Fig. 3 および 4 に示す。30 日間飼育後の平均全長は 8.3~10.0 mm、平均体重は 2.8~5.0 mg の範囲で、いずれもサメ卵区が優れていたが、その他の区の間には大差なかった。EDHA40 の 9 区、EDHA50 の 10 区およびサメ卵の 11 区では飼育開始後 8 日目から、他の実験区でも 9 日目から異常浮上魚が出現し、その割合は 11 日目に最大に達した。飼育終了

^{*9} M. S. Izquierdo, T. Takeuchi, T. Arakawa, C. Kitajima, and T. Watanabe: 昭和 63 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1988, p. 250.

Fig. 3. Effect of the DHA content in rotifer on the survival rate of cod larvae in Expt. II.

時における各区の異常浮上魚の出現率は EDHA50 の 10 区が 20.1% で最も高く、次に EDHA40 の 9 区の 8.6% であった。一方、7 区は最も低く、1.3% であった (Fig. 3)。また、水腫魚の発生割合は同じ 10 区が最も高く 10.0% で、ついで 8 区の 6.0% であった。6 区は最低の 1.0% であった。一方、生残率は 11 区が 73.2% と優れていたのに対して、EDHA40 の 9 区は 50.4% と低かった。さらに、EDHA50 の 10 区は飼育 25 日目で生残率が 45.4% と著しく劣ったため、その時点で飼育を中止した。Fig. 3 に示すようにサメ卵の 11 区を除いて、DHA 含量が高くなるに伴い、生残率が低下し、実験 I の飼育結果と同様 DHA 含量が高くなると、異常浮上魚の出現率も高くなる傾向が見られた。

このようにワムシ中の DHA 含量が 1.1~1.5% 以上になると、マダラ仔魚の成長と健康に対して悪影響が出る可能性が示唆された。しかし、サメ卵区ではワムシ中の DHA 含量が 2.0% と高かったにもかかわらず、全長、体重、および生残率のいずれにおいても良い成績が得られた。また、異常浮上魚および水腫魚の発生割合はそれぞれ 3.1 および 1.9% と両方とも低い値を示していた。さらに、11 区の仔魚は飼育終了時に乾燥重量当たり 10.7 $\mu\text{g/g}$ の VE を含有したが、他の区ではほとんど検出さ

Fig. 4. Effect of the DHA content in rotifer on the dropsy fish rate and abnormal fish* rate in Expt. II.

*See the footnote of Table 6.

れなかった (Table 7)。これらの結果からマダラ仔魚の成長に対しては DHA だけではなく、VE も何らかの影響を与えるものと推察された。一方、ユーグレナには多量の VE が含有されていた¹³⁾ことから、ユーグレナで強化したワムシ中にもサメ卵で強化したワムシよりも VE が多く含まれていた (Table 5)。しかし、マダラ仔魚からはほとんど VE は検出されなかった。このことは、本実験で使用したユーグレナ中の VE は、そのままの形でワムシ中に存在し、そのワムシ中の VE をマダラが利用しにくい可能性も考えられた。この点については今後さらに検討する必要がある。

仔魚の脂質含量および脂肪酸組成 実験 I におけるふ化後飼育経過に伴う各区仔魚の体脂肪酸組成中の EPA および DHA の割合とその含量の変化を Fig. 5 に示す。

Table 7. Fatty acid composition (area %) of total lipids (TL) and vitamin E content of cod larvae in Experiment II

Fatty acid	Initial	Final					
		6 FN	7 FN + 1/2DHA	8 FN + DHA	9 EDHA40	10 EDHA50	11 Egg
14 : 0	1.05	1.88	1.80	2.00	3.08	2.45	1.42
15 : 0	0.30	0.34	0.34	0.35	0.86	0.54	0.39
16 : 0	20.70	17.56	17.96	18.25	16.35	18.14	17.73
16 : 1 <i>n</i> -7	4.48	8.75	8.21	8.59	9.35	9.38	7.12
17 : 0	0.43	0.33	0.33	0.36	0.45	0.40	0.39
16 : 3 <i>n</i> -6	0.42	0.42	0.39	0.42	0.40	0.39	0.40
16 : 3 <i>n</i> -3	0.04	0.40	0.24	0.26	0.21	0.26	0.07
16 : 4 <i>n</i> -1	0.09	0.22	0.13	0.13	0.19	0.08	0.16
18 : 0	4.37	5.67	5.39	5.73	4.65	4.94	5.10
18 : 1 <i>n</i> -(9+7)	16.91	13.20	13.00	12.98	13.10	10.67	14.96
18 : 1 <i>n</i> -5	0.02	nd*	nd	nd	nd	nd	nd
18 : 2 <i>n</i> -6	0.38	2.46	4.28	2.35	2.09	2.00	2.39
18 : 3 <i>n</i> -6	0.02	0.14	0.14	0.13	0.15	0.16	0.10
18 : 3 <i>n</i> -3	0.11	0.09	0.04	0.03	0.13	0.13	0.14
18 : 4 <i>n</i> -3	0.07	0.11	0.04	0.12	0.18	0.20	0.06
20 : 1 <i>n</i> -(11+9)	1.25	0.99	0.98	1.01	1.38	0.67	2.05
20 : 1 <i>n</i> -7	nd	0.48	0.42	0.44	tr	0.39	nd
20 : 2 <i>n</i> -9	nd	0.15	0.13	0.12	0.12	0.10	0.18
20 : 2 <i>n</i> -6	0.13	0.22	0.44	0.22	0.40	0.25	0.21
20 : 3 <i>n</i> -6	0.06	0.42	0.39	0.37	0.52	0.40	0.38
20 : 4 <i>n</i> -6	5.74	5.19	5.14	5.15	5.83	5.04	6.10
20 : 3 <i>n</i> -3	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.06	0.03
20 : 4 <i>n</i> -3	0.25	0.29	0.35	0.29	0.32	0.40	0.51
20 : 5 <i>n</i> -3	10.74	23.71	23.60	22.77	16.32	14.91	13.49
22 : 1 <i>n</i> -(13+11)	0.02	0.03	0.03	0.03	nd	nd	0.04
22 : 1 <i>n</i> -9	nd	0.05	0.03	0.03	0.02	nd	0.03
22 : 1 <i>n</i> -7	nd	0.07	0.05	0.05	nd	nd	0.03
22 : 4 <i>n</i> -6	0.25	0.67	0.50	0.51	0.58	0.32	0.70
22 : 5 <i>n</i> -6	0.40	0.03	0.06	0.11	0.72	0.67	0.46
22 : 5 <i>n</i> -3	1.58	10.84	10.13	10.54	7.31	6.49	7.82
22 : 6 <i>n</i> -3	25.74	2.56	3.33	4.43	13.15	16.88	14.56
Σ Saturated	26.85	25.78	25.82	26.69	25.39	26.47	25.03
Σ <i>n</i> -3	38.59	38.06	37.80	38.50	37.68	39.33	36.68
Σ <i>n</i> -6	7.40	9.55	11.34	9.26	10.69	9.23	10.74
Σ Monoene	22.68	23.57	22.72	23.13	23.85	21.11	24.23
Σ <i>n</i> -3HUFA	38.37	37.46	37.48	38.09	37.16	38.74	36.41
TL (%)	3.36	2.94	2.08	2.74	2.63	2.77	2.22
TL (%) (d.b.)	34.23	22.83	16.13	21.52	19.99	19.40	17.03
EPA in fish	0.36	0.70	0.49	0.62	0.43	0.41	0.30
(d.b.)	3.68	5.41	3.81	4.90	3.26	2.89	2.30
DHA in fish	0.86	0.08	0.07	0.12	0.35	0.47	0.32
(d.b.)	8.81	0.58	0.54	0.95	2.63	3.27	2.48
Σ <i>n</i> -3HUFA in fish	1.29	1.10	0.78	1.04	0.98	1.07	0.81
(d.b.)	13.13	8.55	6.05	8.20	7.43	7.52	6.20
VE in fish (μg/g)	14.23	tr*	tr	tr	tr	tr	1.40
(d.b.)	144.8	tr	tr	tr	tr	tr	10.7

* tr, trace; nd, not detected.

Fig. 5. Variation of area % and contents of EPA and DHA in cod larvae during the feeding period in Expt. I.

EPA の割合は 1, 3, および 5 区では 20 日目まで、2 区は 15 日目まで、4 区では 10 日目まで増加し、その後各区とも減少した。一方、DHA の割合は 1, 2, および 4 区は 20 日目まで減少した後、増加する傾向を示したのに対して、3 および 5 区は実験終了時まで減少し続けた。魚体湿重量 100 g 中に占める EPA 含量は各区とも 15 日目頃まではわずかに減少したが、2 区は 20 日目以降著しく増加し、逆に 4 区は減少した。一方、DHA 含量はふ化直後の 0.63 g から 20 日目の 0.08~0.23 g と減少した。なお、4 区の減少割合は小さかった。また、2 区は EPA と同様に飼育終了時に増加する傾向が見られた。マダラふ化仔魚には卵黄に由来する DHA 量がかかなり多いが、魚の成長とともに卵黄を吸収し、脂質、特に DHA を主なエネルギー源として消費しているものと推察される。⁴⁾ また、仔魚はふ化後 8 日程度で卵黄を吸収し尽くし、初めて外界から餌を摂食し、消化吸収するといわれている。⁴⁾ 今回の魚体中の DHA 含量の変化とワムシ中の DHA 含量

を比較すると、ワムシの DHA 含量が 1% 以下の 5 区では魚体中の DHA 含量は飼育終了時まで減少し続けたのに対して、1% 以上の 1~4 区では 20 日目以降増加していた。特に、飼育成績が優れていた 2 区で飼育終了時に EPA および DHA 含量が増加していることは興味深い。

Table 7 に実験 II の飼育開始および終了時における各区の魚体の脂肪含量、脂肪酸組成、および VE 含量を示す。

飼育開始時のふ化仔魚の脂質含量は乾燥重量当たり 34.2% であったのに対して、終了時には各区とも減少し、特に 7 および 11 区はそれぞれ 16.1 および 17.0% と最も低い値を示した。ふ化仔魚の脂肪酸組成を見ると、飽和酸は 26.9%、モノエン酸は 22.7%、EPA は 10.7%、DHA は 25.7% であった。実験終了時における仔魚の体脂肪酸組成中飽和酸の割合は 25.0~26.7%、モノエン酸は 21.1~24.2% とふ化仔魚と大差なかった。一方、EPA の割合はすべての区で増加したが、特に、6~8 区ではふ

化仔魚に比べ13%前後増加していた。DHAの割合は各区とも減少したが、6~8区はふ化仔魚より20%以上、9~11区は10%前後減少していた。また、実験終了時における魚体乾燥重量当たりのEPA含量は6, 7, および8区がそれぞれ5.4, 3.8, および4.9%でふ化仔魚の3.7%より増加したのに対して、9, 10, および11区はそれぞれ3.3, 2.9, および2.3%とふ化仔魚よりも減少していた。一方、DHA含量は各区ともふ化仔魚の8.8%よりも大きく減少し、9, 10, および11区ではそれぞれ2.6, 3.3, および2.5%となったが、6, 7, および8区の0.6, 0.5, および1.0%よりは減少割合が小さかった。

ふ化仔魚には乾燥重量当たり145 $\mu\text{g/g}$ とかなり多量のVEが含まれていたが、実験終了時には、11区の仔魚は11 $\mu\text{g/g}$ 含有していたのに対して、他の実験区の魚体中には検出されなかった。

このように、実験IおよびIIの結果からマダラの初期発育段階でEPAには大きな変動はないが、DHAはふ化後5日目から10ないし20日目までの間に急激に減少すること、DHA含量が減少し始めた時期から仔魚の減耗も始まり、さらに、DHA含量が低下していた時期に仔魚の斃死が増加することが明らかとなった。これまでの研究から器官の分化などの形態的变化や生理生態的变化と仔稚魚の大量斃死時期に関連しているといわれているが、今回の結果からDHAも仔稚魚の生残と密接に関わっていることが示唆された。また、冷凍ナシクロとDHA含有油脂の併用で強化したワムシのDHA含量は乾燥重量当たり1%で、この区の仔魚の生残率は高く、異常浮上魚の発生率および水腫魚の出現割合も低かった。一方、ユーグレナで強化したワムシではDHA含量が1%以上になり、異常浮上魚の発生率および水腫魚の出現割合も増加し、DHA過剰投与の影響が示唆された。しかし、サメ卵で強化したワムシ中のDHA含量は約2%であったにもかかわらず、成長、生残が優れ、異常浮上魚の発生率および水腫魚の出現割合も低かった。さらに、飼育終了時にはこの区の仔魚にのみVEが検出された。このことから、健全なマダラを得るにはワムシ中にDHAだけでなく、VEも必要であり、両者のバランスが重要であると推察された。また、ワムシ中のDHAおよびn-3HUFA含量が高過ぎると、過剰症あるいはメチルエステルによる何らかの悪影響が生じる可能性も示唆された。

以上、マダラ仔魚の成長過程においてワムシの脂質、特に脂肪酸中のDHAは重要な役割を演じていることが明らかとなった。マダラ仔魚に対するワムシ中の適正DHA含量は1%前後と推察されたが、VEとの関係も示唆され、今後両者の関連についてVEの要求量を含め

検討する必要がある。さらに今回、各強化剤で強化したワムシ脂質中の脂質組成や、各脂質におけるDHAの存在形態について検討していないため、この点についても仔稚魚の成長と関連し詳細な実験が必要であろう。

謝 辞

本研究を行うに当たりDHA濃度の異なる種々のユーグレナを調製していただいたハリマ化成(株)筑波研究所、DHAオイルを調製し、提供していただいた日本水産(株)中央研究所、ならびにサメ卵粉末を供与していただいた理研ビタミン(株)に厚くお礼申し上げる。なお、本研究の一部は文部省科学研究費および水産庁受託研究費各補助金によった、ここに謝意を表する。

文 献

- 1) 町田洋一: マダラの種苗生産。水産の研究, 4, 46-51 (1985)。
- 2) 藤田矢郎: 魚類種苗生産の初期餌料としてのプランクトンの重要性。日本プランクトン学会報, 20, 49-53 (1973)。
- 3) 與世田兼三: マダラ種苗生産の現状。水産の研究, 11(4), 99-104 (1992)。
- 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, 29, 571-580 (1991)。
- 5) T. Takeuchi, M. Toyota, S. Satoh, and T. Watanabe: Requirement of juvenile red seabream *Pagrus major* for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56, 1263-1269 (1990)。
- 6) T. Watanabe, M. S. Izquierdo, T. Takeuchi, S. Satoh, and C. Kitajima: Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1635-1640 (1989)。
- 7) M. S. Izquierdo, T. Watanabe, T. Takeuchi, T. Arakawa, and C. Kitajima: Requirement of larval red sea bream *Pagrus major* for essential fatty acid. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 859-867 (1989)。
- 8) T. Watanabe, T. Takeuchi, T. Arakawa, K. Imaizumi, S. Sekiya, and C. Kitajima: Requirement of juvenile striped jack *Longirostris delicatissimus* for n-3 highly unsaturated fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1111-1117 (1989)。
- 9) 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, pp. 69-79。
- 10) 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)。
- 11) 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)。
- 12) 渡邊 武, 北島 力, 荒川敏久, 福所邦彦, 藤田矢郎: 脂肪酸組成からみたシオミズツボワムシの栄養価。日水誌, 44, 1109-1114 (1978)。
- 13) 武富英俊, 左右田健次, 勝井五一郎: 微生物におけるトコフェロールの存在に関する調査。ビタミン, 57, 133-138 (1983)。