形態の異なるビタミンEのワムシおよびマダラ仔魚への 取り込みとワムシ中のDHA含量の影響

鄭 鋒, 竹内俊郎, 小林真人, 廣川 潤, 渡邊 武

(1996年3月14日受付)

A Study of Vitamin E Absorption in Rotifer and Cod Larvae and the Effect of DHA Content in Rotifer for Cod Larvae

Feng Zheng,*¹ Toshio Takeuchi,*¹ Masao Kobayashi,*²
Jun Hirokawa,*² and Takeshi Watanabe*¹

An experiment was conducted to determine the absorption of vitamin E (VE, α -toc.) in rotifer and cod larvae, and the effect of DHA content in rotifer on the drop rate of cod larvae. In this experiment, rotifers were enriched with dry shark eggs supplemented with different levels of three types VE, such as DL- α -toc. acetate, DL- α -toc. free, or D- α -toc. free.

It was shown that D- α -toc. free was accumulated in rotifer more efficiently than DL- α -toc. free. Cod larvae can convert DL- α -toc. acetate to a free type of VE, but its absorption was low compared with the free type of VE. Furthermore, it was also found that the occurrence of drop rate in cod larvae reduced when the DHA content in rotifer was increased.

キーワード: ワムシ, マダラ仔魚, ビタミンE, 取り込み, DHA

ビタミンE (VE) は周知の通り脂溶性ビタミンの一つであり, その生理作用は生体内における抗酸化作用に由来するものと考えられている。¹⁾ たとは, 酸化油を与えることにより筋萎縮症 (いわゆる背こけ病) を引き起こすことが淡水魚や海水魚で観察されている^{2,3)} が, VE が酸化油の毒性に対して効果的に作用することが明らかにされている。⁴⁾ また, 魚類の VE 欠乏症状としては成長, 飼料効率の低下をはじめ筋萎縮, 貧血, 眼球突出, 痙攣など多くの症状が報告されている。⁵⁾

一方, マダラ種苗生産過程における仔稚魚体内の VE 含量はドコサヘキサエン酸 (DHA) と類似した傾向を示し, VE 含量と脂質, 特に DHA の利用との間に何らかの関係があると考えられた。⁶⁾ さらに高 DHA 含有ワムシ区で異常魚 (浮上魚と水腫魚) が多発したが, その原因の一つに魚体の VE 含量が保っている可能性も示唆された。⁷⁾ ニジマス,⁸⁾ コイ,⁹⁾ ティラピア¹⁰⁾ を飼育する場合に飼料中の脂質含量または不飽和度の増加に伴って VE 必要量が高まることがわかっている。また, マ

ダイおよびブリ稚魚の VE 要求量は飼料中の脂質, 特に n-3 高度不飽和酸 (HUFA) 含量の増加に伴い高まることも明らかにされている。^{*} しかし, これらマダラ以外の研究はいずれも配合飼料で飼育した結果であり, 生物餌料, 特にワムシで飼育した場合の両者の関連性についての研究はほとんどない。そこで, 本研究ではワムシ摂餌期におけるマダラ仔稚魚の生残率および異常魚の発現に対する DHA と VE との関連を明らかにすることを目的とし, 酢酸 DL (合成) 型 VE (DL- α -Tocopherol acetate), 遊離 DL (合成) 型 VE (DL- α -Tocopherol) および D (天然) 型 VE (D- α -Tocopherol) の形態の異なる 3 種類の VE を添加したサメ卵乾燥粉末を用いて, ワムシを強化し, ワムシおよびマダラ仔魚への VE の取り込みを調べた。

材料および方法

【供試魚】既報^{11,12)}の方法で採卵し, ふ化させた仔魚を実験に供した。

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

*2 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).

* 吉武政広: マダイおよびブリ稚魚のビタミンE要求に及ぼす飼料中n-3高度不飽和酸の影響. 東京水産大学大学院修士論文, 1991, pp. 65-73.

【ワムシの強化方法】実験に用いたL型ワムシの栄養強化は10 lのワムシ培養水（ワムシの密度：約250個体/ml）に対して、冷凍ナンクロロブシス（ナンクロ）は20 gを直接、サメ卵乾燥粉末（理研ビタミン株製）は1～5区には3 g、6区には2 gの割合で95 mlの水道水に加え乳化した後、培養水にそれぞれ添加した。冷凍ナンクロ添加後のワムシ培養水中のナンクロ濃度は約3000～4000万細胞/mlであった。なお、冷凍ナンクロは当事業場において前もって作成し、-20℃以下で冷凍保存しておいたものである。ワムシの強化条件は既報⁷⁾に準じた。

【試験区】ワムシに対する栄養強化剤の種類、またはそれに含まれているVEのタイプおよび含量の違いにより、次の7実験区を設けた。

1. サメ卵乾燥粉末 VE 無添加区
2. サメ卵乾燥粉末 + 酢酸 DL（合成）型 VE 1% 添加区
3. サメ卵乾燥粉末 + 酢酸 DL（合成）型 VE 5% 添加区
4. サメ卵乾燥粉末 + 遊離 DL（合成）型 VE 5% 添加区
5. サメ卵乾燥粉末 + 遊離 D（天然）型 VE 5% 添加区
6. 冷凍ナンクロ + サメ卵乾燥粉末 VE 無添加区
7. 冷凍ナンクロ単用区

VEのタイプと含量が異なるサメ卵乾燥粉末はいずれも1区のものベースとし、さらに種々のVEを加えて理研ビタミン株式会社に作製したものである。

【飼育方法】全長 4.56 ± 0.18 mmのふ化仔魚を、500 lの不透明パンライト水槽に7区以外は各区2水槽（A, B）を用い、各水槽に6000尾ずつ収容した後、25日間の飼育試験を行った。また、ワムシ中のDHA含量の違いがその後のアルテミア摂餌期の生残率に及ぼす影響を調べるため、ワムシ給餌終了後、各区（1水槽）から500尾ずつの仔稚魚を500 lの水槽に移し、孵化直後の無強化アルテミア幼生（米国ユタ産）を給餌し、6日間継続飼育後の生残率を調べた。飼育期間中の水温は8.0～12.9℃、pHは8.24～8.36の範囲で変動した。換水率は飼育開始後2日目の100 ml/minから最大500 ml/minまで徐々に増加させた。給餌は1日2回（10:00, 15:00）行い、ワムシの量は、飼育開始後2日目から各区とも100万個体、その後徐々に増加させ、終了時には1日240万個体を与えた。一方、アルテミア幼生は1日12～14万個体を与えた。なお、飼育期間中毎日生ナンクロを飼育水中に100万細胞/mlになるように添加した。

飼育開始時に50尾のふ化仔魚を用いて体重および全

長を測定した。一方、ワムシ摂餌飼育終了時には各区から50尾ずつの魚を取り上げ、水腫魚の発生の観察を行うとともに、体重および全長を測定した。分析用サンプルとしてはワムシおよびアルテミアを飼育期間中に各3回、仔稚魚を飼育開始時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℃で急速に冷凍させ保存した。

【分析方法】飼育期間中に3回採集したワムシ、アルテミアおよび飼育試験開始時と終了時の仔魚について、それぞれ水分、脂質含量、脂肪酸組成およびVE含量を測定した。ワムシおよびアルテミアは解凍後10,000回転（rpm）で10分間の遠心分離（国産遠心器社製、H-200 n型）を行い分析に供した。ワムシ、アルテミアおよび仔魚はFolchらの方法¹³⁾により総脂質（TL）を抽出し、常法によりケン化・メチル化した後、ガスクロマトグラフ（GLC）（島津製作所製、GC-14AH、水素炎イオン検出器付）で脂肪酸の分析を行った。VEはワムシについては抽出した脂質を直接および50%のエタノールでケン化した後の不ケン化物を、仔稚魚については抽出した脂質をそれぞれn-Hexaneに溶解して高効率液体クロマトグラフ（LC-9A型、RF-5000：蛍光分光光度計、島津製作所製）により定量した。脂肪酸組成およびVEの分析条件は既報^{8,14)}の通りである。

結 果

【飼育結果】Table 1にワムシ給餌期の飼育終了時の全長、体重、水腫魚の発生割合、生残率および無強化アルテミア幼生による6日間飼育継続魚の生残率を示す。25日間飼育後の仔稚魚の全長は7.54～9.22 mm、体重は2.75～4.46 mgの範囲で、いずれも冷凍ナンクロ単用区が劣っていたが、その他の区に大差はなかった。生残率は2区のBおよび5区のBで40%前後と若干低かったが、他の区では大きな差はなく53～69%の範囲であり、ワムシ摂餌期の仔稚魚の生残率に明瞭な差はみられなかった。一方、水腫魚の発生割合は1および2区でそれぞれ平均9.6および12.1と低かったが、4, 6および7区では40%以上となった。すなわち、水腫魚および肝臓萎縮魚の発生割合は、VE無添加区よりVE添加区の方が高く、さらに同じ5%VE添加区における遊離型のDL（合成）またはD（天然）型より、酢酸型の方が低い傾向がみられた。また、冷凍ナンクロ使用の6および7区でも高割合の水腫魚が発生し、肝臓萎縮魚の割合も7区で18%と最も高かった。一方、ワムシ摂餌期以後、無強化アルテミア幼生でさらに6日間飼育した後の生残率は、7区は16.5%と最も低く、次に6区の44.5%であった。サメ卵強化区の1～5区の間には大きな差はなく、57.8～64.8%であった。

Table 1. Results of the feeding experiment with cod larvae

Tank no.	Type of enriched rotifer fed to cod larvae	Total length(mm)		Body weight (mg)	Dropsy rate (%)	Hepatic atrophy index (%) ^{*1}	Survival rate (%) ^{*2}	Survival rate (%) ^{*3}
		Initial	Final					
1	A Shark eggs	4.56±0.18 ^{*4}	8.24±0.94 ^{*4}	3.07	4.0	0	59.7	64.8
	B (No α -toc. added)		8.29±1.00	3.15	13.6	0	68.7	
2	A Shark eggs	"	9.22±0.74	4.30	6.0	0	65.4	57.8
	B (+1%DL- α -toc. acetate)		8.56±0.89	3.58	18.2	0	40.7	
3	A Shark eggs	"	9.05±0.80	3.80	21.2	0	62.8	61.9
	B (+5%DL- α -toc. acetate)		8.67±0.71	4.46	18.0	0	65.4	
4	A Shark eggs	"	8.58±0.90	3.08	47.2	13.2	61.9	59.0
	B (+5%DL- α -toc. free)		8.58±0.90	3.47	43.6	9.1	56.3	
5	A Shark eggs	"	8.25±0.78	3.27	26.0	6.0	59.5	60.1
	B (+5%D- α -toc. free)		8.18±0.94	2.97	42.0	10.0	46.7	
6	A <i>Nannochloropsis</i> +Shark eggs	"	8.42±0.74	3.46	42.0	6.0	53.3	44.5
	B (No α -toc. added)		8.32±0.82	3.43	45.5	1.8	59.3	
7	Frozen <i>Nannochloropsis</i>	"	7.54±0.84	2.75	54.0	18.0	66.9	16.5

^{*1} (Nmb of hepatic atrophy fish/total number of fish) × 100.

^{*2} Survival rate of cod larvae fed rotifer for 25 days from the day of hatching.

^{*3} Survival rate of cod larvae fed *Artemia* nauplii for 6 days. (After the termination of rotifer experiment, 500 fish were taken from each group and fed the unenriched nauplii).

^{*4} Mean±SD (n=50).

【分析結果】

1) サメ卵乾燥粉末の TL 含量および TL の脂肪酸組成: Table 2 に供試したサメ卵乾燥粉末の脂質含量および TL 中の主な脂肪酸組成を示す。脂質含量は乾燥重量当たりで 51.1~53.3% の範囲で、各強化剤の間に大きな差はなかった。脂肪酸中のエイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサペンタエン酸 (DPA) の含量は VE 5% 添加したものに比較し VE 無添加または 1% 添加区でわずかに高く、また DHA は約 3% 高かった。また、乾燥重量当たりの EPA 含量は 2.1~2.6 g/100 g, DHA 含量は 5.4~7.4 g/100 g, n-3HUFA 含量は 9.5~12.2 g/100 g であり、いずれも VE 5% 添加したものの (3~5 区) に比較し、VE 無添加および 1% (1 と 2 区) 添加したものの方が若干高かった。

2) ワムシおよびアルテミア幼生の TL 含量および TL の脂肪酸組成: Table 3 にワムシとアルテミア幼生の脂質含量および TL の脂肪酸組成を示す。ワムシの脂質含量は乾燥重量 (%) 当たり 3 区で最高の 23.5%, 7 区で最低の 17.8% であったが、いずれも強化前の 16.9% よりも高かった。なお、アルテミア幼生は 25.5% であった。

ワムシの脂肪酸組成ではサメ卵強化の 1~5 区で DHA の割合に差が見られたが、その他はほぼ同じであった。一方、サメ卵とナシクロ併用区 (6 区) およびナシクロ単用区 (7 区) では EPA の割合は 20% 以上と

Table 2. Main fatty acid composition (area%) of total lipids in normal shark eggs and VE fortified shark eggs

Fatty acid	Type of shark egg ^{*1}				
	1	2	3	4	5
18:0	2.9	2.9	3.1	3.1	3.0
18:1	17.2	17.1	17.8	18.2	17.6
18:2n-6	1.8	1.7	1.8	1.8	1.8
18:3n-3	0.8	0.7	0.8	0.7	0.7
20:4n-6	1.6	1.6	1.5	1.6	1.6
20:5n-3(EPA)	4.7	4.8	4.3	4.0	4.2
22:5n-3	2.7	2.8	2.4	2.5	2.5
22:6n-3(DHA)	13.5	13.8	10.7	10.4	10.7
TL(%)	53.0	52.8	52.6	51.1	53.3
TL(%) (d.b. ^{*2})	53.7	53.7	53.4	51.9	54.0
EPA in shark eggs (d.b.)	2.5	2.5	2.3	2.1	2.2
	2.5	2.6	2.3	2.1	2.3
DHA in shark eggs (d.b.)	7.2	7.3	5.7	5.3	5.7
	7.3	7.4	5.7	5.4	5.8

^{*1} See Table 1; Numbers 1 to 5 indicate tank/treatment of eggs.

^{*2} d.b.: dry basis.

高く、逆に DHA はそれぞれ 3.0 および 0.2% と低かった。アルテミア幼生ではリノール酸 (LA) およびリノ

Table 3. Fatty acid composition (area%) of total lipids in enriched rotifers and unenriched *Artemia nauplii* (Ar)

Fatty acid	Tank no.*1							Ar
	1	2	3	4	5	6	7	
14:0	2.4±0.2*2	2.5±0.2	2.5±0.2	3.2±0.5	2.5±0.2	3.3±0.1	3.7±0.2	0.9
15:0	0.5±0.1	0.5±0.0	0.5±0.1	0.6±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.2
16:0	14.9±0.2	15.1±0.3	15.3±0.5	16.3±0.7	15.7±0.3	14.6±0.4	15.3±0.4	12.5
16:1n-7	10.3±0.1	10.6±0.2	10.7±0.6	12.8±1.7	11.1±0.5	16.8±0.8	19.4±1.3	3.5
17:0	0.5±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0	0.6±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0	0.7
16:3n-6	0.4±0.0	0.5±0.1	0.3±0.1	0.5±0.2	0.4±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1	0.8
16:3n-3	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.2	0.1±0.0	nd*3	0.1
18:0	2.7±0.2	2.6±0.2	2.7±0.2	2.6±0.3	2.9±0.2	2.1±0.1	2.1±0.0	5.4
18:1	19.5±1.5	19.5±1.6	19.9±1.6	18.9±1.6	20.0±1.5	14.3±0.7	13.5±0.7	28.0
18:2n-6	2.9±0.0	3.0±0.1	3.1±0.1	3.3±0.2	3.1±0.1	3.2±0.1	3.5±0.2	5.7
18:3n-6	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1	0.3±0.1	0.5
18:3n-3	0.5±0.0	0.6±0.0	0.6±0.0	0.6±0.1	0.5±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	26.3
18:4n-3	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1	0.4±0.0	0.4±0.1	0.2±0.0	0.1±0.0	3.8
20:1	5.5±0.7	5.7±0.6	5.8±0.4	4.8±1.0	5.7±0.5	3.2±0.1	2.4±0.0	0.6
20:2n-6	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.0	0.2±0.1	0.2
20:3n-6	0.4±0.0	0.4±0.1	0.5±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	0.1
20:4n-6	3.4±0.2	3.2±0.2	3.2±0.2	2.9±0.3	3.3±0.3	3.7±0.2	3.5±0.2	0.5
20:3n-3	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	nd	nd	0.6
20:4n-3	1.2±0.0	1.2±0.1	1.3±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	0.6±0.1	0.3±0.0	0.6
20:5n-3(EPA)	11.5±1.9	11.5±2.2	11.2±2.0	11.3±2.5	11.2±2.3	21.2±1.3	22.4±1.5	2.0
22:1	2.5±0.5	2.7±0.4	2.6±0.2	2.1±0.5	2.6±0.4	1.3±0.0	0.8±0.0	tr
22:4n-6	0.5±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0	0.3±0.1	0.4±0.0	0.3±0.0	0.3±0.3	nd
22:5n-6	0.4±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.2±0.1	0.3±0.0	0.2±0.0	nd	nd
22:5n-3	3.9±0.2	3.8±0.3	3.6±0.4	3.2±0.5	3.6±0.2	3.4±0.1	3.5±0.3	nd
22:6n-3(DHA)	7.4±0.7	6.7±1.0	6.5±1.1	4.7±1.4	5.4±1.2	3.0±0.3	0.2±0.0	nd
Σn-3	25.1±2.8	24.4±3.5	24.0±3.5	21.5±4.5	22.4±4.0	28.6±1.8	26.6±1.8	29.7
Σn-6	8.5±0.3	8.4±0.2	8.2±0.2	8.1±0.3	8.4±0.3	8.7±0.4	8.9±0.4	7.7
ΣMonoene	37.9±2.5	35.8±2.3	39.0±2.7	38.6±3.1	39.4±2.9	35.6±1.6	36.1±2.0	32.1
Σn-3HUFA	24.0±2.8	23.3±3.4	22.8±3.5	20.4±4.4	21.3±3.8	28.1±1.7	26.3±1.9	3.3
TL(%)	3.4±0.2	3.3±0.2	3.5±0.2	3.0±0.1	3.1±0.1	3.1±0.1	2.8±0.1	2.8
TL(%) (d.b.*4)	22.8±0.7	23.1±0.2	23.5±0.9	20.0±0.1	20.8±0.5	19.4±0.8	17.8±0.1	25.5
EPA in sample (d.b.)	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.7±0.1	0.6±0.0	0.1
	2.6±0.5	2.7±0.5	2.6±0.4	2.3±0.5	2.3±0.5	4.1±0.4	4.0±0.3	0.5
DHA in sample (d.b.)	0.3±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	tr	nd
	1.7±0.2	1.5±0.2	1.5±0.2	0.9±0.3	1.1±0.3	0.6±0.1	tr	nd
Σn-3HUFA in sample (d.b.)	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1	0.9±0.1	0.7±0.1	0.1
	5.5±0.7	5.4±0.8	5.3±0.6	4.1±0.9	4.5±0.9	5.5±0.5	4.7±0.4	0.8

*1 See Table 1 *2 Mean±SD(n=3) *3 nd: not detected. *4 d.b.: dry basis.

レン酸 (LNA) が 26.3 と 28.0% と高い割合を示したのに対して, EPA は 2.0%, DHA は検出されなかった。

ワムシ乾燥重量当たりの EPA, DHA および n-3HUFA 含量をみると, EPA は 6, 7 区で 4 g/100 g と高く, 1~5 区では 2.3~2.7 g/100 g で大差はなかった。

DHA は 1 区で高く 1.7 g/100 g, 次いで, 2 区と 3 区では同じ 1.5 g/100 g, 4 および 5 区ではそれぞれ 1.0 および 1.1 g/100 g であった。サメ卵強化区の中で 4 および 5 区は低かった。一方, DHA はサメ卵と冷凍ナシクロ併用区では 0.6 g/100 g, 冷凍ナシクロ単用区にはほと

Table 4. Fatty acid composition (area%) of total lipids in cod larvae

Fatty acid	Initial	Tank no.*1												
		1		2		3		4		5		6		7
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
14:0	1.5	1.6	1.8	1.9	2.1	1.8	2.1	1.9	1.9	1.7	1.9	2.2	2.2	2.2
16:0	20.3	17.6	21.0	20.3	21.4	19.4	18.6	18.4	19.6	19.3	19.8	19.4	18.9	19.1
16:1n-7	5.3	5.0	5.7	5.6	6.2	5.5	5.9	5.5	5.5	5.3	5.5	7.5	7.7	8.0
18:0	4.0	5.2	5.6	5.5	5.6	5.5	4.5	5.0	5.0	5.4	5.2	5.1	4.8	5.4
18:1	14.8	13.7	15.1	14.4	15.0	15.1	13.1	13.7	13.5	14.3	13.6	12.6	12.0	12.0
18:2n-6	0.7	1.5	1.6	1.6	1.8	1.7	1.7	1.8	1.7	1.7	1.7	1.8	1.8	2.1
18:3n-6	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2
18:3n-3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
18:4n-3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3
20:1	1.3	2.0	2.1	2.0	2.1	2.2	1.7	1.9	1.9	2.0	1.9	1.7	1.6	1.4
20:2n-6	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3
20:3n-6	0.1	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4
20:4n-6	5.7	5.2	4.8	4.7	4.5	5.0	5.0	5.1	5.2	5.6	5.5	5.1	5.0	4.8
20:3n-3	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	tr	tr	0.1	0.1
20:4n-3	0.3	0.8	0.7	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.6	0.4
20:5n-3(EPA)	13.2	11.7	10.2	10.0	10.5	10.7	11.9	11.8	12.5	11.5	13.1	18.3	19.4	20.4
22:1	0.3	0.5	0.6	0.7	0.7	0.6	0.3	0.5	0.7	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5
22:4n-6	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
22:5n-6	0.4	0.6	0.5	0.5	0.4	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.3	0.3	0.2
22:5n-3	1.0	5.8	5.0	5.3	5.0	5.5	5.3	5.8	5.8	5.9	6.2	7.1	7.2	9.1
22:6n-3(DHA)	24.9	17.4	14.4	14.4	12.1	13.9	16.6	15.4	14.7	14.8	14.0	7.7	7.6	3.0
Σn-3	40.0	36.1	30.8	31.0	29.0	31.5	35.0	34.2	34.2	33.4	34.4	34.0	35.1	33.4
Σn-6	7.3	8.3	8.0	7.9	7.9	8.4	8.3	8.7	8.7	9.1	9.1	8.5	8.3	8.4
ΣMonoene	21.7	21.2	23.5	22.7	24.0	23.4	21.0	21.6	21.6	22.0	21.4	22.2	21.7	21.9
Σn-3HUFA	39.5	35.7	30.4	30.6	28.5	31.1	34.6	33.9	33.9	33.1	34.1	33.8	34.9	33.0
TL(%)	1.6	1.8	1.9	1.9	1.9	1.8	1.8	1.8	1.7	1.6	1.7	1.7	1.7	1.8
TL(%) (d.b.*2)	16.6	15.5	14.3	14.8	14.0	14.6	14.2	13.8	14.1	13.7	13.3	13.4	12.9	13.8
EPA in larvae(d.b.)	2.2	1.8	1.5	1.5	1.5	1.6	1.7	1.6	1.8	1.6	1.7	2.5	2.5	2.8
DHA in larvae(d.b.)	4.1	2.7	2.1	2.1	1.7	2.0	2.4	2.1	2.1	2.0	1.9	1.0	1.0	0.4
Σn-3HUFA in larvae(d.b.)	6.6	5.5	4.3	4.5	4.0	4.5	4.9	4.7	4.8	4.5	4.5	4.5	4.5	4.6

*1 See Table 1. *2 d.b.: dry basis.

んど含まれていなかった。n-3HUFAは4区と5区で若干低く、それぞれ4.1と4.5 g/100 gで、7区では4.7 g/100 gであった。その他の区では大差なく5.3～5.5 g/100 gであった。またアルテミア幼生にはEPAがわずかに0.5 g/100 gしかなく、DHAは含まれていなかった。

3) 仔魚のTL含量およびTLの脂肪酸組成: Table 4に飼育開始時および飼育終了時における仔魚の脂質含量およびTLの脂肪酸組成を示す。

飼育開始時のふ化仔魚の脂質含量は乾燥重量当たり16.6%であったのに対して、終了時には平均13.2～14.9%の範囲で、各区とも減少した。飼育終了時と飼育開始時のふ化仔魚の脂肪酸組成を比較すると、EPA、DPAおよびDHAに大きな違いが見られた。すなわち、1～5区のEPAはふ化仔魚の13.2%より多少減少したのに対して、6および7区は18.3～20.4%まで増加した。DPAはいずれの試験区でも増加したが、6および7区の増加幅は1～5区に比較し大きかった。一方、

DHA は試験終了時にすべての区で減少し, 特に6および7区ではふ化時の24.9%からそれぞれ7.7および3.0%まで著しく減少したのに対して, サメ卵強化区(1~5)では約14%前後であった。

魚体乾燥重量当たりのEPA含量は6および7区で平均それぞれ2.5および2.8 g/100 gとふ化仔魚の2.2 g/100 gより若干増加していたのに対して, 他の区では平均1.5~1.7 g/100 gとなり, ふ化仔魚よりも減少した。DHA含量は各区ともふ化仔魚の4.1 g/100 gより減少した。特に, 6および7区ではそれぞれ1.0および0.4 g/100 gまで減少した。

4) ワムシおよび仔魚へのVEの取り込み: Table 5にワムシおよび魚体のVE含量を示す。ワムシから抽出した脂質を直接測定した場合(ケン化前)には, サメ卵粉末に遊離型VEを5%添加した4と5区ではそれぞれ1188.2および1798.7 $\mu\text{g/g}$ と高濃度のVEが検出されたのに対して, 他の区では痕跡量または検出されなかった。一方, 抽出した脂質をケン化した後の不ケン化物を用いて測定した場合には, いずれの区でもVEが検出された。特に, 酢酸DL型VE 5%添加の3区でも5区とはほぼ等量の高濃度のVEが検出された。また, ワムシに対して, 同じ遊離型でもDL型とD型との間に取り込まれたVEの量に違いが見られた。すなわち, ワムシに取り込まれたVEは強化剤に含まれたVEのタイプおよび量の違いにより異なっていた。なお, ケン化前後でVE含量に差が見られたが, これはケン化処理によるロスが原因と思われる。

一方, 本試験ではすべての実験区の魚体からVEが検出され, ワムシに取り込まれたVEを多少反映していた。すなわち, 魚体乾燥重量当たりのVE含量は, 遊離型VEがワムシに多く取り込まれた4および5区ではそれぞれ平均168と197 $\mu\text{g/g}$ となり, ふ化仔魚の101 $\mu\text{g/g}$ を上回っていた。一方, 酢酸型VEが多く取り込まれた3区は平均51 $\mu\text{g/g}$, 2区は最も低い6 $\mu\text{g/g}$ と, いずれもふ化仔魚の値に比較し減少していた。仔魚では酢酸型と遊離型VEの取り込みに違いが見られたが, DL型とD型の間には大きな相違は見られなかった。なお, 魚体の場合には消化吸収されたVEは遊離型で存在することから, 今回特に, ケン化後のVEの測定は行わなかった。

考 察

強化したワムシ中のEPAおよびDHA含量は栄養強化剤のEPAおよびDHA含量をよく反映していた。すなわち, 7区はEPA含量が多い冷凍ナシクロを単用したため, ワムシ中のEPA含量も高かったが, DHAはほとんど含まれていなかった。6区では冷凍ナシクロとサメ卵を併用したことから, EPA含量は高く, DHAは0.6%と低かった。一方, 1~5区では強化剤であるサメ卵中のEPAの含量は低く, DHAの含量が高いことから, 強化したワムシ中のEPAの含量は強化前より若干減少し, DHAは著しく増加していた。しかし, 本実験ではサメ卵で強化したワムシ中のDHA含量は前報⁷⁾の実験に比べ低かった。これは本実験ではワムシの

Table 5. Vitamin E (VE) contents of rotifers and cod larvae

														Rotifer															
														Tank no.*1															
														1	2		3		4		5		6		7				
Before saponification																													
VE(μg/g, wet weight)														tr	nd		tr		176.7± 18.8*2		265.2± 59.2		tr		nd				
VE(μg/g, dry weight)														tr	nd		tr		1188.2±104.7		1798.7±347.4		tr		nd				
After saponification																													
VE(μg/g, wet weight)														7.40± 2.2	52.1± 18.9		258.0± 96.1		131.8± 8.8		212.9± 59.6		2.51±1.3		1.92±0.4				
VE(μg/g, dry weight)														49.3 ±14.8	357.7±110.1		1714.3±626.4		894.1±46.3		1440.6± 35.6		15.9 ±8.2		12.2 ±2.9				
														Cod larvae															
														Tank no.*1															
														Initial		1		2		3		4		5		6		7	
																A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B		
Before saponification																													
VE(μg/g, wet weight)														9.6	2.3	1.5	0.6	1.0	7.8	6.0	23.9	20.0	22.7	24.9	2.1	1.0	1.7		
VE(μg/g, dry weight)														100.7	20.0	11.4	4.4	7.1	63.5	48.5	168.8	166.8	193.7	200.3	16.9	7.9	13.3		

*1 See Table 1.

*2 Mean $\pm$ SD(n=3).

二次強化時のサメ卵の添加量が10 lの培養水に対して3 gと若干少なかったことによると思われる。

各強化ワムシで25日間飼育した後の仔稚魚の生残率をみると、平均53.1~66.9%の範囲で、各実験区には大差なかった。しかし、その後、無強化アルテミア幼生で6日間飼育した結果、7区の生残率は著しく低く16.5%となり、次に6区のそれが44.5%と劣っていた(Table 1, Fig. 1)。ワムシ中のDHA含量の多少がその後のアルテミア摂餌期のマダラの生残に大きく影響していた。本実験と同様に今までマダラの飼育実験および種苗生産過程においても、飼育25日までのワムシ単用時期では冷凍ナシワムシ強化ワムシで飼育した仔稚魚は優れた生残率を示した例がいくつかあった。しかし、ワムシ給餌終了時における冷凍ナシワムシ強化ワムシを給餌した区の魚体中のDHA含量は乾燥重量当たりでわずか0.42 g/100 gしか含まれていなかった。そのため、無強化アルテミアを摂餌したマダラはDHA不足となり生残率が低下したものと推察された。このことから、アルテミア中のDHA含量はマダラの生残および成長に大きな影響を与えたと考えられる。また、健全なマダラ種苗を作るためには、早期に適量のDHAを含有する餌・飼料を与えることが不可欠であると推察された。

一方、前報⁷⁾の実験では冷凍ナシワムシまたは冷凍ナシワムシ+DHAオイルで強化したワムシにはVEが検出さ

れなかった。しかし、本実験では冷凍ナシワムシを使用した強化ワムシ中のVE含量がサメ卵単用区に比べ低かったが、いずれの実験区のワムシにもVEが検出された。このことから、ナシワムシ中のVE含量は年毎あるいは培養方法により異なることが示唆された。

Fig. 2にワムシ中のVE含量が魚体のVE含量に及ぼす影響を示した。ワムシへの取り込みは強化剤中のVE含量とその存在形態の違いに大きく左右された。すなわち、遊離型VEを添加した4および5区を除き、その他の区ではケン化前には遊離型VEはほとんど検出されなかったが、ケン化後には強化剤中のVE含量を反映していた。特に、酢酸型5%添加の3区では遊離型5%添加の5区とほぼ同じ高濃度のVEが検出され、ワムシのVE取り込みに形態の差は見られなかった。従って、ワムシ体内に酢酸基を切断するための酵素が欠損しているか、活性が弱い場合、強化剤中のVEはそのまま取り込まれ、酢酸型のVEが遊離型のものに転換しにくいものと考えられた。遊離DLおよびD型のVEを比べると、D型添加の5区に高いVE含量が検出され、ワムシに対してDL型より、D型の方が取り込まれやすいと推察された。一方、今回の試験では、すべての試験区で魚体からVEが検出され、2と3区ではワムシ中の酢酸型のVE含量の増加に伴い、魚体中のVE含量も増加した。しかし、ワムシ中のVE含量はほぼ同量であるが、形態の異なる3区と5区では、5区の魚体から高濃度のVEが検出された。また、4区では同様にワムシ中のVE含量が3区に比較して少ないにもかかわらず、仔魚には3区より多くのVEが検出された。VEの活性はD- α -トコフェロール>DL- α -トコフェロール>DL- α -トコフェロールアセートの順といわれている。¹⁾ このこと

Fig. 1. Survival rate of larval cod fed on unenriched *Artemia* nauplii for 6 days after being fed rotifers with different levels of DHA.

Fig. 2. Relationship between VE contents of rotifers and cod larvae.

Fig. 3. Relationship between the DHA content of rotifers and the rate of survival and dropsy of cod larvae.

から、酢酸型 VE は魚体内で遊離型 VE と同様に代謝はされるが、遊離型のものと比較し取り込みはかなり劣るものと推察された。また、4 と 5 区の魚体にはそれぞれ 168 および 197 $\mu\text{g/g}$ の VE が含有され、ほぼワムシ中の VE 含有量と比例していた。このことから、マダラ仔魚の遊離 DL 型と遊離 D 型 VE の利用には大差はないと考えられた。しかし、今回の実験では、いずれの形態の VE を用いても魚体に VE が蓄積されたことから、前報⁷⁾の実験のユーグレナワムシで飼育した仔魚から VE が検出されなかった理由が単に形態の違いによるものではなく、他の原因によるものと推察されたが、その詳細については現在のところ特定できない。一般に、食物中の油脂の不飽和度が高いほど、生体の VE 要求量が高まることが知られているが、仔稚魚の発育には餌料の脂質、特に DHA が深く関与している。Fig. 3 に本試験ワムシ中の DHA 含量と仔魚の生残および水腫魚の発生率の関係を示す。VE を高割合に含む 4 および 5 区はワムシ中の DHA 含量が 1.1% 以下と 1~3 区に比較し低かった。一方、3 区はワムシ中の VE 含量が最も高かったにもかかわらず、水腫魚の発生率が低かった。また、6 区の冷凍ナシクロ+サメ卵区は n-3HUFAs 含量が 1~3 区と同じであったが、DHA 含量は 0.6% と 7 区に次いで低かった。この 2 区の水腫魚の発生率も高く、さらに 7 区では高割合の肝臓萎縮魚が発生した。現在の

ところ、VE のみが過剰症のないビタミンとして一般に認識されている。これらのことから、4~7 区の水腫魚や肝臓萎縮魚の発生率の増加は VE よりも DHA が大きく関与していることが示唆された。

本結果から、サメ卵乾燥粉末で強化したワムシ中の DHA 含量が 1.5~1.7% であり、VE 含量が乾燥重量当たり 50 $\mu\text{g/g}$ 程度含有していれば、マダラ仔稚魚に対して十分であると考えられた。すなわち、現在一般に使用されている乾燥サメ卵粉末（商品名、アクアラン；武田科学飼料）で強化したワムシに含まれる DHA および VE はマダラ仔魚に対して十分満足できるものと推察された。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金（一般 C: 06660258）により実施した、ここに謝意を表する。

参考文献

- 1) 美濃 真：ビタミン E. ビタミン学 (I) (日本ビタミン学会編)，東京化学同人，東京，1980，pp. 177-235.
- 2) 橋本芳郎，岡市友利，渡邊 武，古川 厚，梅津武司：酸化油脂によるコイの背コケ病の発生とビタミンの予防効果。日水誌，32，64-69 (1966).
- 3) 竹内俊郎：魚類における栄養素の欠乏症と要求量，「平成 3 年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース 仔稚魚の発育シリーズ」，水産庁，東京，1991，pp. 35-39.
- 4) 上原良吾：養魚用オイルの上手な使い方とその効果。養殖，9，10 月号，120-125 (1972).
- 5) 渡邊 武：魚類養殖とビタミン E. 油化学，39，299-306 (1990).
- 6) 鄭 鋒：マダラ仔稚魚の健全性に対する餌料脂質の効果に関する研究。東京水産大学大学院博士論文，1995，pp. 11-44.
- 7) 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，60，641-652 (1994).
- 8) 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).
- 9) T. Watanabe, T. Takeuchi, M. Matsui, C. Ogino, and T. Kawabata: Effect of α -tocopherol on carp-VII, The relationship between dietary levels of linoleate and α -tocopherol requirement. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 43, 935-946 (1977).
- 10) S. Satoh, T. Takeuchi, and T. Watanabe: Requirement of *Tilapia* for α -tocopherol. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 119-124 (1987).
- 11) 與世田兼三：マダラ種苗生産の現状。水産の研究，11，99-104 (1992).
- 12) 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組成の変化。日水誌，61，756-761 (1995).
- 13) 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).
- 14) 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).