

マガレイ仔魚の生残，成長，飢餓耐性能に及ぼす栄養強化ワムシの給餌効果

佐藤敦一*，藤岡 崇*，清水洋平*

Feeding effects of enriched rotifers on the survival, growth and starvation resistance of Brown Sole (*Pleuronectes herzensteini*) larvae

Nobukazu SATOH, Takashi FUJIOKA and Yohei SHIMIZU

Feeding experiments of rotifers enriched with different levels of n-3HUFA (highly unsaturated fatty acid) by two kinds of commercial algae (MARINE GLOS and MARINE ALPHA) to larval brown sole (*Pleuronectes herzensteini*) for the purpose of improving the survival, growth and starvation resistance were conducted using 200L and 5L rearing tanks for 27 days.

Suitable concentration of n-3HUFA were estimated more than 433.1~590.1mg/100g on a dry matter basis for the survival, growth and starved resistance of larvae. Especially feeding of rotifers enriched both DHA (docosahexaenoic acid) and EPA (eicosapentaenoic acid) was more effective to the survival of larvae than that only enriched with DHA.

Ability of starvation resistance of larvae was apparently raised with feeding rotifers enriched by DHA rather than EPA.

キーワード： マガレイ，生残，成長，飢餓耐性能，DHA，EPA，n-3HUFA，栄養強化，シオミズツボワムシ

まえがき

マガレイ (*Pleuronectes herzensteini*) は，サハリン・千島から山陰地方にかけて分布する¹⁾。北海道におけるマガレイの漁獲量は，道南太平洋海域において1985年度の627 t から減少し，200~300 t で推移している。また，マガレイは，カレイ類の中で占める割合が漁獲量・同金額ともに高い魚種であり²⁾，漁場と漁業生産力の維持，管理への貢献に向け，人工種苗放流による資源量の安定化が必要である。

マガレイは，20日齢前後に大量斃死が観察され，種苗生産工程の確立にあたっては，仔魚の生残率の安定化が大きな問題点となっていた³⁾。

一方，海産魚類では，生物餌料中のn-3系列の高度不飽和脂肪酸 (n-3HUFA) が大きく仔魚の生残に関係して

おり，特にその2大構成成分のDHA (ドコサヘキサエン酸) とEPA (エイコサペンタエン酸) の含量が仔魚の生残を左右する大きな要因とされている⁴⁾。さらに，魚種によりその要求量が異なることが知られており⁴⁾，マガレイ自体の要求量を調査する必要がある。しかし，これまでにマガレイの生残に対する餌料の質的影響を論じた知見はない。

そこで，本試験ではマガレイ仔魚の生残率の向上を図るために市販栄養強化剤によりどの程度栄養強化 (以下強化) を図るべきなのかを明らかにするため，マガレイ仔魚の生残，成長，発育におよぼす強化ワムシ中のn-3HUFA濃度の影響について検討した。また，仔魚の飢餓耐性能に対する同濃度の影響を調べるため，飢餓試験を行い，新たな知見が得られたので報告する。

材料および方法

試験区は、給餌ワムシ中のn-3HUFA含量を4段階に設定した区(I~IV)と、さらにEPA強化区(EPA)とDHA強化区(DHA)の計6区とした(Table 1)。ワムシの強化は、市販の栄養強化剤2種類の添加量を調節して行った。すなわち、EPAを強化することを目的として、市販の強化剤マリンアルファ(株)日清マリンテック)を使用し、DHAを強化することを目的として、マリングロス(株)日清マリンテック)を用いた。給餌は1日2回行い、午前用の餌と午後用の餌として、栄養強化時間を考慮して、それぞれ別のものを用意した(Table 1, 2)。水槽は、200ℓポリカーボネート水槽を12基用い、各区の水槽に1日齢(平均体長3.1mm)のマガレイ仔魚5,000尾ずつ収容

Table 1 Enrichment condition of rotifer.

Experimental lot.	Enrichment volume (ml)		Enrichment time	
	MA*1	MG*2	MA	MG
I	Control (<i>Chlorella</i> 10ml)		—	
II	2	2		
III	10	10	18~22h*3	1.5~6.0h*4
IV	20	20		
EPA	20	—	18~22h	—
DHA	—	20	—	1.5~6.0h

*1 Marine alpha (Nissin Marinotec CO.LTD)

*2 Marine glos (Nissin Marinotec CO.LTD)

*3 18 hours enrichment food for feeding in the morning.

22 hours enrichment food for feeding in the evening.

*4 1.5 hours enrichment food for feeding in the morning.

6.0 hours enrichment food for feeding in the evening.

Table 2 Experimental condition of larval brown sole.

Feeding period	21 days
Fish number/Capacity	5,000 individual /200l tank
Water temperature	15°C
Water exchange	1~3 time/day
Feeding	2 time/day
Light intensity	Natural light in indoor
Live food	Rotifer
Food density	1~5 individual /ml

Table 3 Experimental condition of the starvation.

Starving period	22~27 days after hatching
Fish number/Capacity	70 individual /5 liter beaker
Water temperature	15°C
Water exchange	None (poor aeration)
Light condition	Natural light

し(2水槽試験)、飼育水温は15°C、光条件は自然光のみで行った。試験に用いた仔魚は、苫小牧市で漁獲された天然親魚から自然産卵法により採卵した受精卵を200ℓアルテミアふ化槽で卵管理(15°C)して得られた。海水にはろ過海水を使用した。換水率は、1換水/日から開始し、成長するにつれ換水率を高め、17~21日齢で3換水/日とした。試験期間は、1日齢から21日齢の計21日間(2002年7月12日~8月1日)で行った(Table 2)。

この間のワムシ給餌量は、仔魚の成長に合わせ1~5個体/mlとした。その後、各区70個体ずつを5ℓビーカーへ収容し、5日間飢餓試験を行った(Table 3)。20日齢には、各区の体長を測定すると同時に、発育段階を有瀧ら⁵⁾の分類に従って区分し、各区の発育ステージ組成を調べた。すなわち、Cステージ(開口期上屈前仔魚)、Dステージ(上屈前仔魚)、Eステージ(上屈仔魚)、Fステージ(変態直前期上屈後仔魚)に分類した。

分析は、各試験区のワムシおよび仔魚の全魚体における脂肪酸組成について行った。仔魚サンプルは、試験区ごとにまとめたのち、分析に供した。

脂肪酸組成の分析は、2N-塩酸・メタノール法を用いた。すなわち、試料を凍結乾燥したのち、50~100mgをネジ付き試験管にとり、2N-塩酸・メタノール(35%塩酸:メタノール=1:5)混合液4mlを加えて110°C、5時間還流した。その後、石油エーテル5~10mlを用いて脂肪酸メチルエステルを抽出した。そしてC15:0(Methyl Pentadecanoate AJ 150)を内部標準物質として200μg加えたのち乾固し、ガスクロマトグラフィー(島津製作所GC14A)に注入し、EPA、DHA、n-3HUFAの絶対量を求めた。

ガスクロマトグラフィーによる分析は、次の条件で行った。

- ・使用カラム: ULBON HR-SS-10 (0.25mm×50m)
- ・カラム温度: 150→220°C (3°C/min)
- ・キャリアーガス: ヘリウム
- ・スプリット: 30:1
- ・検出器: FID

総脂質の抽出は、クロロホルム:メタノール=2:1の混液を用いるフォルチらの方法⁶⁾に従って行った。水分含量は、105°Cの常圧加熱法で求めた。なお、これらの分析は、クロレラ工業株式会社に依頼した。

21日齢における生残率、20日齢における体長は、チューキーの多重比較検定(有意水準5%)で解析を行った。

結果

1. 生残と成長

試験終了時の生残率は、I区とII区で有意差は認めら

れないものの、2水槽間の値はいずれもⅡ区(25.2, 16.4)がⅠ区(6.2, 7.0)よりも高かった。そして、Ⅰ区およびⅡ区よりもⅢ区およびⅣ区は、有意に高かった(Fig.1)。Ⅲ区とⅣ区との間では有意差が認められなかった。また、EPA区は、試験区間で最も2水槽間における値のばらつきが大きかった。DHA区は、Ⅲ区より有意に低く、Ⅳ区

とは有意差は認められなかった。

各区の20日齢での体長は、Ⅰ区が最も小さく、Ⅱ区が次に小さかった。そして、Ⅰ区およびⅡ区よりもⅢ区およびⅣ区が有意に大きかった。Ⅲ区とⅣ区との間には有意差が認められなかった。また、EPA区とDHA区との間では有意差は認められなかった(Fig.2)。

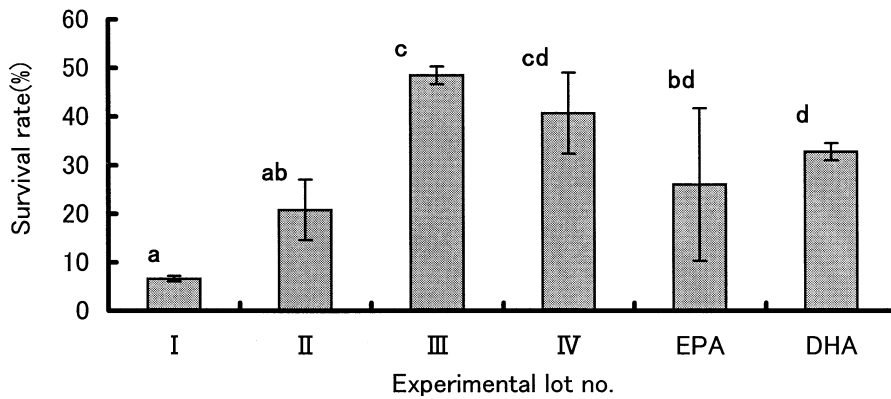


Fig.1 Survival rate in each experimental lot. Values having the different superscript letters in the graph are significantly different ($p < 0.05$).

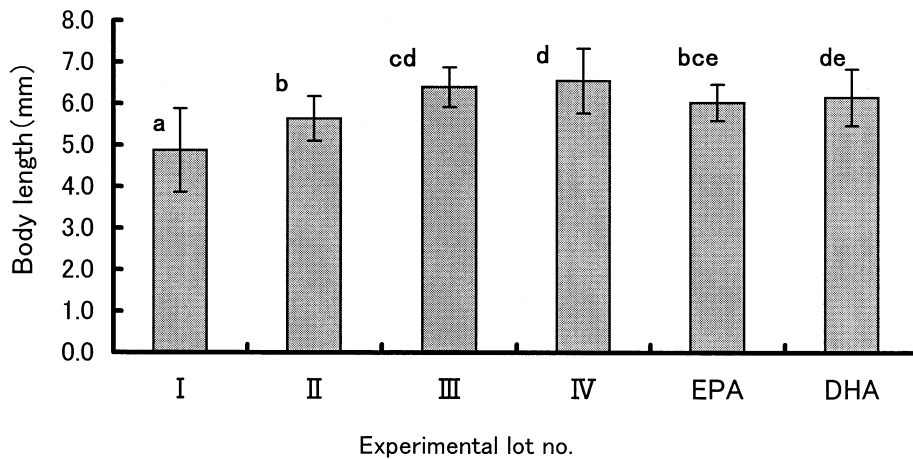


Fig.2 Body length (20 Days after hatching) in each experimental lot. Values having the different superscript letters in the graph are significantly different ($p < 0.05$).

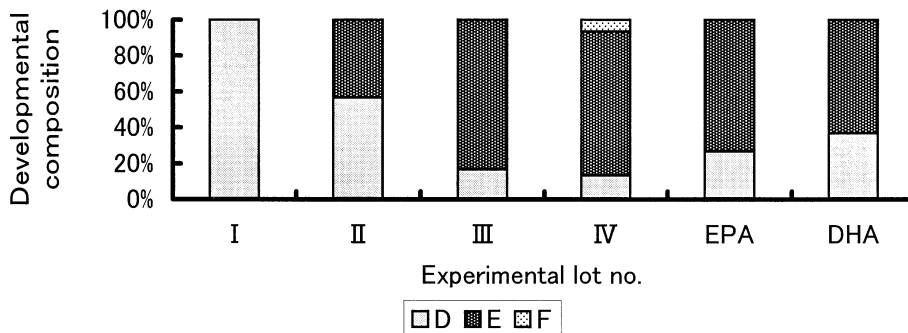


Fig.3 Developmental stage composition of larvae in brown sole (20 days after hatching). Each classification of developmental stage (D~F) was modified from Aritaki et al (2004).

2. 発育ステージ組成

20日齢における発育ステージ組成では, I区は最も発育が遅れ, II区は次に発育が遅く, III区およびIV区では組成に差が認められなかった。また, EPA区およびDHA区では両者に差は認められなかった (Fig.3)。

3. 飢餓耐性試験

絶食後の生残率は, 3日目では各区で差は認められなかったものの, 5日目ではI区 (8.1%) < II区 (8.5%) < III区 (32.9%) < IV区 (52.1%) となった。またEPA区 (18.3%) < DHA区 (46.5%) であった(Fig.4)。

4. 餌料ワムシおよび仔魚の脂肪酸組成

I, II, III, IV区のワムシ中n-3HUFA含量は, 強化剤の添加量の違いを反映しており, 対照区のI区には, EPA, DHAとも全く含まれず, II, III, IV区では, EPA, DHA含量ともII, III, IV区の順に増加した。また, EPA区のワムシは, n-3HUFAのうちEPAのみが強化されており, DHA区のワムシはn-3HUFAのうちDHAのみが強化されていた (Table 4)。

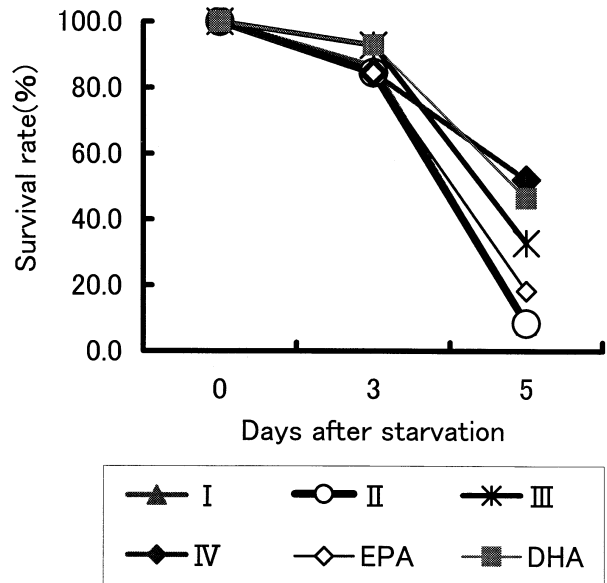


Fig.4 Survival rate during starvation in each lot.

Table4 Fatty acid composition (EPA,DHA) of total lipids in rotifers fed on six different enriched conditions (mg/100g dry weight).

Fatty acid	Experimental lot no.											
	I (Control)		II		III		IV		EPA		DHA	
	1.5h ^{*1}	6h ^{*2}	1.5h	6h	1.5h	6h	1.5h	6h	1.5h	6h	1.5h	6h
EPA	0.0	0.0	69.9	56.6	153.6	140.6	254.1	224.8	399.3	373.4	35.8	83.6
DHA	0.0	0.0	79.2	71.7	153.6	270.8	161.7	342.8	0.0	0.0	155.1	543.1
n-3HUFA	0.0	0.0	149.1	147.2	307.2	411.4	433.1	590.1	399.3	373.4	190.9	626.7
Clude lipid (% dry basis)	11.8	10.5	12.6	10.6	13.5	14.1	13.3	13.5	12.5	12.3	13.4	16.3
Moisture(%)	89.2	85.5	89.3	89.4	89.1	89.6	89.9	89.8	90.7	90.5	86.6	88.0

*1 1.5 hours enrichment feed for feeding in the morning.

*2 6h hours enrichment feed for feeding in the evening.

Table5 Fatty acid composition(EPA,DHA) of total lipids in brown sole larvae fed on six different enriched rotifers (mg/100g dry weight).

Fatty acid	Experimental lot no.					
	I (control)	II	III	IV	EPA	DHA
EPA	237.7	258.5	332.0	401.8	876.5	159.2
DHA	216.1	567.2	826.5	860.9	92.6	883.0
n-3HUFA	518.6	825.7	1158.5	1312.9	1190.0	1042.2
Clude lipid (% dry basis)	No data	14.5	15.2	15.1	15.4	15.3

I～IV区の仔魚中におけるn-3HUFA含量はワムシ中のn-3HUFA含量に応じて上昇した。EPA区とDHA区における仔魚のEPA含量およびDHA含量は、EPA区がEPA含量876.5(mg/100g)、DHA含量92.6(mg/100g)であり、DHAよりもEPAが明らかに多く蓄積していた。一方、DHA区がEPA含量159.2(mg/100g)、DHA含量883.0(mg/100g)とDHAのほうがEPAよりも多く蓄積していた(Table 5)。なお、A区の総脂質含量および全試験区の水分含量は、サンプル量が少なく分析できなかった。

考 察

Ⅲ区以上のn-3HUFA含量のワムシを給餌することで、20日齢前後におけるマガレイ仔魚の生残率および成長が著しく改善された。このため、生残および成長を図るには、他の海産魚類⁹⁾と同様にn-3HUFAが必須脂肪酸(EFA)であると考えられた。

DHA区およびEPA区との間で成長に有意な差は認められなかった。マダイやヒラメでは生残および成長に対し、DHAとEPAの力価が等しいことが明らかにされている^{7,8)}。本試験では、生残率についてEPA単独強化区のばらつきが非常に大きく、EPAとDHAの生残への関与の差については不明であるが、成長については両者の関わりはほぼ等しいと考えられる。

DHA区と比較し、Ⅲ区のDHA+EPA強化ワムシ給餌区の方が、生残率が有意に高く、発育も速かった。これらは、ワムシをDHA単独強化するより、EPAと併せて強化する方がマガレイ仔魚の生残を高め、発育を速めること、すなわちDHAとEPAの交互作用が仔魚の生残・発育に対しプラスに働くことを示唆している。

Ⅲ区とⅣ区のワムシ中のn-3HUFAの含量がⅢ区<Ⅳ区であったにもかかわらず、Ⅲ区およびⅣ区の生残率に有意な差は認められなかった。ヨーロッパヘダイの仔魚期におけるEFA量はDHA/EPA比によって異なることが明らかにされており、DHAがEPAよりも多く餌料中に含まれる場合、EFA量が低減することを示唆している⁹⁾。Ⅲ区のDHA/EPA比は、1.0(1.5h強化)、1.9(6h強化)であり、D区の同比は、それぞれ0.6、1.5であったことからⅢ区の方がⅣ区よりも比が高い傾向を示しており、これがEFA量についてⅢ区がⅣ区よりも低減したため、生残率、成長、発育に差が認められなかったと考えられた。

ワムシ中のn-3HUFA含量に応じて仔魚中のEPA、DHA、n-3HUFA含量が上昇し、仔魚の飢餓耐性能も併せて向上した。さらに、EPA区とDHA区の仔魚飢餓耐性能は、後者が前者より高かった。ヨーロッパヘダイでは、飢餓状態にするとn-3HUFAを保持し、さらにEPAよりもDHAの方が多く保持されることが示されている¹⁰⁾。これらのこ

とから、飢餓耐性能の向上には、ワムシのn-3HUFA強化が有効であり、EPAとDHAでは、後者の強化のほうが効果的であることが示唆された。

マガレイ仔魚を本試験と同じ環境条件で飼育し、ワムシとアルテミアを併用給餌した場合、DステージからEステージに発育が進行するとき、ワムシの摂餌量が急減し、アルテミアへの切り替えが徐々に行われる¹¹⁾。この発育段階は、ワムシの摂取量が減少する分、アルテミアを摂取し、生残に必要な栄養を摂取する必要がある。また、大量減耗が観察されるのもこの発育段階である。この時期までに体内に必要な量のn-3HUFA、DHA、EPAを蓄積させ、D～Eステージにおける飢餓耐性能を十分付与することは、仔魚が必要量のアルテミアを摂取するまでにおける減耗の危険性を低下させることに繋がると思われる。

海産魚類は、先に述べたとおり、n-3HUFAをEFAとし、その2大構成成分であるDHAとEPAとでは、前者の方がEFAとしての力価が高いことが知られており、さらに要求量は魚種によって異なり、同一魚種の成長段階においても異なることが報告されている^{4,12)}。

そこでワムシ給餌期における各魚種と本試験で生残・成長・飢餓耐性能を指標とした場合、最も試験区間で成績の良かったD区におけるワムシ中のn-3HUFA含量(乾燥重量換算)を他魚種と比較するとマダイでは3.5%¹³⁾、ブリでは2.3～3.0%¹⁴⁾、マダラでは7%¹⁵⁾、メナダでは4～5%¹⁶⁾、ヨーロッパヘダイでは1.5%⁹⁾であった。本試験のD区の乾燥重量あたりのn-3HUFA含量(%)を計算すると、0.4～0.6%となる。この値は、これらの5魚種の要求量と比べて低い。本試験での最高生残率は約50%であった。このことから、マガレイ仔魚のワムシ給餌期における真のn-3HUFA要求量はもう少し高い値にある可能性が高く、今後詳細に検討する必要がある。そのためには、高純度のエチルエステルの使用等により、栄養強化レベルの上限範囲を高くし、要求量を検討する必要がある。

現在、DHAやEPAのエチルエステルを使用し、ワムシ給餌期およびアルテミア給餌期におけるマガレイ要求量の検討、種苗性・健苗性の比較検討を行っており、知見が得られつつある。

要 約

本試験は、餌料ワムシ中のn-3高度不飽和脂肪酸(n-3HUFA)濃度とマガレイ仔魚の生残・成長・飢餓耐性能との関係を検討し、大量斃死が観察される20日齢前後の生残、成長を改善することを目的として飼育試験を行った。

1. マガレイ仔魚の減耗防除にはn-3HUFAが必須であ

り, 生残率, 成長, 飢餓耐性能を指標とした場合, 乾燥重量あたり433.1~590.1 (mg/100 g) 以上のワムシを給餌することが重要であると推察された。

2. 生残率を指標とした場合, n-3HUFAの2大構成成分であるEPAとDHAでは, DHA単独強化よりもDHAとEPAの両者を強化したワムシを給餌する方が有効であると示唆された。
3. DHAとEPAでは, 単独強化した場合, DHAの方が仔魚飢餓耐性能を高めることが示唆された。

謝 辞

本試験を行うにあたり, 採卵用親魚の搬入等にご協力いただいた苫小牧漁組の吉田昭二氏, えりも町役場の三戸充氏及び芳賀恒介氏に深謝いたします。

参考文献

- 1) 尼岡邦夫, 仲谷一宏: 北日本魚類大図鑑. 北日本海洋センター, 北海道, 1997, pp.314
- 2) 北海道水産林務部: 北海道水産現勢2002年. 2002, 1-30
- 3) 佐藤敦一, 杉本卓: 栽培漁業技術開発試験研究マガレイ種苗生産技術開発. 北海道立栽培漁業総合センター事業報告書. 12-13 (2001)
- 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, 39, 571-580 (1991)
- 5) Aritaki, M. and Seikai, T.: Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes herzensteini*. *Aquaculture*, 240, 517-530 (2004)
- 6) Folch, J., Lee, M. and Stanley H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-506 (1957)
- 7) Furuita, H., Takeuchi, T., Toyota, M. and Watanabe, T.: EPA and DHA requirements in early juvenile red sea bream using HUFA enriched *Artemia Nauplii*. *Fisheries Science*, 62, 246-251 (1996)
- 8) Furuita, H., Takeuchi, T., Toyota, M. and Watanabe, T.: EPA and DHA Requirements in early juvenile Japanese flounder using HUFA enriched *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 218, 491-499 (2003)
- 9) Rodriguez, J.A., Perez, P.B., Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., Lorenzo Hernandez, A.: The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture*, 169, 9-23 (1998)
- 10) Koven, W.M., KISSIL, G.W.M. and TANDLER, A.: Lipid and n-3 Requirements of *Sparus aurata* Larvae During Starvation and Feeding. *Aquaculture*, 79, 185-191 (1989)
- 11) 佐藤敦一, 藤岡崇, 清水洋平: 北海道産マガレイ仔魚飼育における生物餌料の撰餌と適正水温条件. 北水試研報, 64, 113-120 (2003)
- 12) Kyoung-Duck Kim, Sang-Min Lee: Requirement of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids for juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 229, 315-323 (2004)
- 13) Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T. and Kitajima, C.: Requirement of Larval Red Seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 859-867 (1989)
- 14) 石崎靖朗, 竹内俊郎, 渡邊武, 清水健, 今泉圭之輔: ビタミンEのタイプと含量が異なる種々のサメ卵乾燥粉末強化ワムシによるブリ仔魚の飼育試験. 水産増殖, 44, 527-535 (1996)
- 15) 竹内俊郎, 鄭 鋒, 與世田兼三, 廣川 潤, 渡邊武: DHA強化ワムシのマガレイ仔魚に対する栄養価. 日水誌, 60, 641-652 (1994)
- 16) 吉松隆夫, 林雅弘, 戸田亨次, 古市政幸, 北島力: メナダ仔魚の必須脂肪酸要求と飼育水槽へのナンノクロロプシスの添加効果. 日水誌, 61, 912-918 (1995)