

高密度ナンノクロロプシスを用いた 連続培養 L 型ワムシ *Brachionus plicatilis* の脂肪酸組成

小林 孝幸,^{1*} 長瀬 俊哉,¹ 藏野 憲秀,² 日野 明徳³

(2004 年 8 月 5 日受付, 2004 年 12 月 6 日受理)

¹荏原実業株式会社中央研究所, ²株式会社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研究所,
³東京大学大学院農学生命科学研究科

Fatty acid composition of the L-type rotifer *Brachionus plicatilis* produced
by a continuous culture system under the provision of high density *Nannochloropsis*

TAKAYUKI KOBAYASHI,^{1*} TOSHIYA NAGASE,¹ NORIHIDE KURANO² AND AKINORI HINO³

¹Central Research Laboratory, Ebarajitsugyo Co., Ltd., Kawasaki, Kanagawa 211-0012, ²Kamaishi Laboratories, Marine Biotechnology Institute Co., Ltd., Kamaishi, Iwate 026-0001, ³Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

Fatty acid profiles of the L-type rotifer *Brachionus plicatilis* harvested from a continuous culture system were compared respecting the quality of food algae. *Nannochloropsis oculata* propagated in high density by a panel type photo-bioreactor and fresh water *Chlorella* suspension on the market were tested. Continuous rotifer culture was carried out under 24°C and 26 psu in a 2000-mL polyethylene bottle.

No difference was observed as to the food efficiency when evaluated from the rotifer density and the daily harvesting rate.

Both fresh water *Chlorella* (FC) and the rotifer which fed on the algae (FC-R) had more polar lipid than non-polar one, whereas both *Nannochloropsis* (N) and the rotifer which fed on the algae (N-R) had more nonpolar lipid than polar one.

FC-R were rich in palmitic acid and linoleic acid, and N-R showed high icosapentaenoic acid (IPA) contents, which may reflect the composition in their food algae. A small amount of docosapentaenoic acid (DPA), however, was detected in N-R, although it was not contained in food (N). It is postulated that the rotifers metabolize IPA into DPA at least in the case when cultured with *Nannochloropsis*.

キーワード：脂肪酸組成, ナンノクロロプシス, イコサペンタエン酸, L 型ワムシ, 連続培養

海産ワムシ類は魚類や甲殻類の初期餌料として広く利用されているが、近年新たな培養技術が開発され、従来法といわれる間引き培養や植え継ぎ（バッチ式）培養に加え、高密度培養法、連続培養法などが普及しつつある。それぞれ特徴を有するなかでも、連続培養法は個体群が対数増殖期に維持されることから活性の高いワムシが生産され、また連続的な給餌が行われるためワムシの栄養価が一定していると考えられ、すでに粗放連続培養、連続換水培養などのバリエーションも生まれて更なる発展を見せている。¹⁻¹³ また種苗生産のシステムを劇的に改善し、上述した新技術開発の契機ともなった周辺

技術には、工業的プラントによって生産された濃縮淡水クロレラ（以下クロレラ）のワムシ培養用餌料としての応用があり、¹⁴ これによって種苗生産機関は、それまでナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* を自身で屋外培養していたために避けられなかった多大の労働力と、天候不順による不安定な生産性から開放されることになった。

一方、初期餌料としてのワムシの栄養価については、培養に用いた餌料の種類によって n-3 系列の高度不飽和脂肪酸（以下 n-3HUFA）含量に大きな差があるとされ、¹⁵ クロレラ給餌によって生産されたワムシでは、海

産魚介類稚仔に必要な n-3HUFA が大幅に不足していることが知られている。¹⁵⁻¹⁸⁾ これら栄養価をめぐる研究の場合、摂餌速度や同化率に影響するワムシの活性^{19,20)} が体成分の含有量を左右すると考えられるが、このことに配慮した実験研究²¹⁾ は従来行われていない。また、屋外培養されたナンノクロロプシスを餌料に用いる場合には、n-3HUFA 含量も培養回次ごとに異なり、ワムシの n-3HUFA 含量にも関わってくると考えられるが、ナンノクロロプシスの質に着目した研究²²⁾ は多くない。

本研究では、ナンノクロロプシスの餌料価値を、クロレラを対照区とした実験によりワムシの密度、卵率、脂肪酸組成等を指標として評価したが、ワムシの培養には、個体群の活性が高くかつ一定に維持される特徴から連続培養を採用した。また、ナンノクロロプシスについても、今後の種苗生産周辺技術に求められる培養の高密度化と品質の維持および省力化に好適と考えられるフォトバイオリアクターを用いた。

試料および方法

ナンノクロロプシスの培養 培養に用いたフォトバイオリアクターは、アクリル製の平面水槽 (5.5 cm × 140 cm × 50 cm, 水量 37 L) で屋外に設置した (Fig. 1)。海水は、油壺マリンパークから入手した砂ろ過海水を水道水で塩分 26 psu に希釈後中空糸膜でろ過し、Table 1 に示す条件で培養に供した。水温は装置内に設置した加温、冷却水管によって 20~25°C に調製し、底面の通気管からは 4 L/分の通気を行った。これには、ポンベより 18 L/日となるように二酸化炭素を混合した。

藻体の収穫は 3 日に一度 17 L を間引くことにより行い、その際、栄養塩 [硫酸アンモニウム (4.0 g), Na₂HPO₄ (1.2 g), クレワット 32 (0.2 g)] を間引き後に再び注水する 17 L の培養水中に添加した。収穫したナンノクロロプシスは、ワムシの連続培養試験餌料として使用し、密度測定には、ノイバウエル血球計算盤を用いた。

ワムシの連続培養 実験装置を Fig. 2 に、培養条件を Table 2 に示した。

ワムシ培養槽および収穫槽には 2000 mL 容の白色ポリエチレン容器を、また餌料槽には 2000 mL 容のガラス瓶を用い、パステールピペットによってそれぞれに通気を行った。培養槽には、チューブポンプを通じて餌料槽から餌料を懸濁させた海水が連続的に送られ、水量が 2000 mL を超えると隣接する収穫槽にオーバーフローする構造とした。なお、培養槽と収穫槽はウォーターバスにより温度を一定に維持した。

実験はナンノクロロプシス給餌および対照としたクロレラ給餌について行い、前者については藻体 1.7~2.2 ×

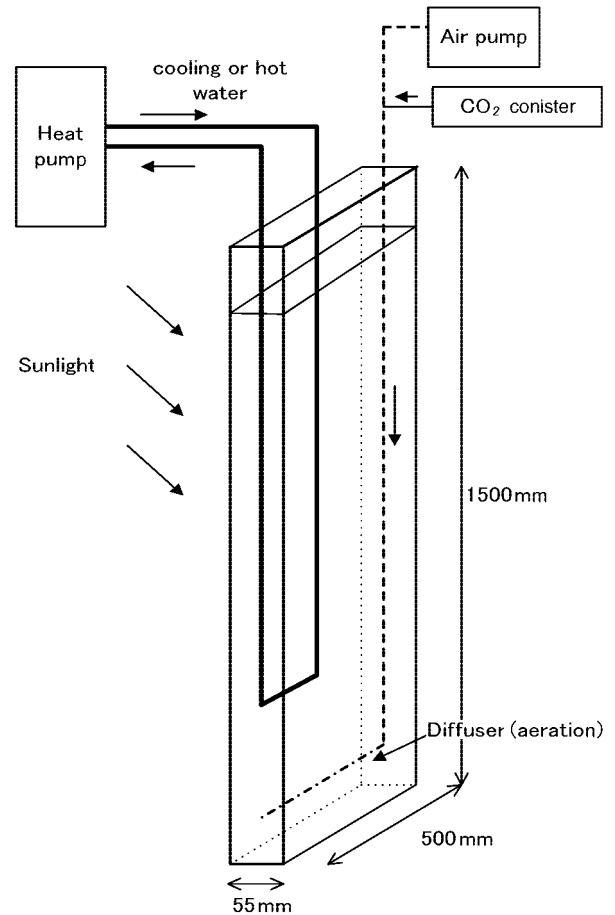


Fig. 1 Photobioreactor.

Table 1 Conditions of *Nannochloropsis oculata* semi-continuous culture

Volume (L)	37
Harvest (L/3 days)	17*1
Water temperature (°C)	20-25°C
Salinity (psu)	26
Aeration (L/min.)	4
CO ₂ mixture (L/day)	18
Culture period (days)	40

*1 The same amount of fertilized sea water was filled up after the harvest. The composition of nutrients was 4.0 g of Ammonium Sulfate, 1.2 g of Na₂HPO₄ and 0.2 g of Clewat 32 (Teikoku Chemical Industries Co., Ltd.).

10⁸ cells/mL を含むナンノクロロプシスの培養水 1000 mL を餌料槽に毎日充填した。クロレラ給餌区は市販の濃縮淡水クロレラ (クロレラ濃縮液, 日本クロレラ社製) 5 mL (1.5 × 10¹⁰ cells/mL) を海水 1000 mL に希釈し、餌料槽に毎日充填した。ワムシにはいわゆる L 型ワムシ (シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis*) 石川株を用い、予めクロレラを餌料とした連続培養から収穫

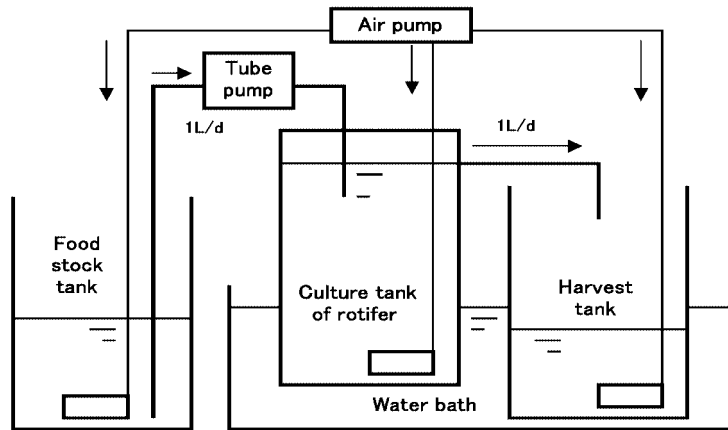


Fig. 2 Continuous rotifer culture system.

Table 2 Scheme of the continuous culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*

	Treatment	
	FC feeding* ¹	N feeding* ²
Culture (mL)	2000	2000
Water temperature (°C)	25	25
Salinity (psu)	25	26
Daily water exchange (%/day)	50	50
Culture period (day)	20	30
Daily ration (cells/day)	8.3×10^{10}	2.3×10^{11}
Food provision to the harvest tank (cells/day)	0.8×10^{10}	3.8×10^{10}

*¹ FC, Fresh water *Chlorella* on the market (1.5×10^{10} cells/mL).*² N, *Nannochloropsis oculata* (1.9×10^8 cells/mL).

後, 培養槽に700個体/mLの密度になるよう接種した。ワムシを収容した直後から餌料ポンプを作動させ, 連続培養を開始した。

収穫槽には, ワムシが飢餓状態となるのを防止するため, ナンノクロロプシス給餌区には200mLのナンノクロロプシスを, クロレラ給餌区には, 培養に用いたものと同じクロレラ0.5mLを海水200mLと混合したものを毎日加えた。実験期間中は毎日, 培養槽と収穫槽のワムシ密度と卵数を計測し, 計測後, 収穫槽のワムシはすべて収穫した。またナンノクロロプシスとクロレラの乾燥重量は, 濃縮したものをアルミホイルシャーレー(テラオカ社製)を用いて乾燥, 測定し, 収穫ワムシ1個体当りの給餌量を餌料効率として求めた。

脂肪酸組成の分析方法 餌料に用いたナンノクロロプシス, クロレラと, それらによって培養されたワムシを脂肪酸組成の分析に供した。

ナンノクロロプシスは遠心(6200×g, 20°C, 10分)によって濃縮したものを, ワムシは収穫槽からプランク

トンネット(40μm)で採集し水道水で洗浄後, 水分をよく切ったものをそれぞれ-80°Cで冷凍保存後分析に供した。クロレラは市販の状態の濃縮液をそのまま分析した。分析にあたって, 水分は常圧加熱乾燥法により, また総脂質含量はクロロホルム/メタノール(2/1, V/V)混液を用いるFolchら²³⁾の方法により定量した。脂質含量は, 抽出した総脂質をシリカカートリッジ(Sep-Pak Silica Cartridges, Waters社製)を用いてクロロホルム20mLおよびクロロホルム/メタノール(49/1, V/V)混液20mLで中性脂質を, 次いでメタノール30mLで極性脂質を分画し定量した。脂肪酸組成は, 中性脂質および極性脂質に分画したものを50%KOH-エタノール混液でケン化後, 7%三フッ化ホウ素-メタノール溶液でメチル化し脂肪酸メチルエステルとしたものをn-ヘキサンに溶解し, ガスクロマトグラフ(HP6890GC, Hewlett Packard社製)により求めた。分析条件は, カラムはフューズドシリカキャピラリーカラム(30m×0.32mm×0.25μm), キャリアーガスはヘリウム, 検出器は水素炎イオン化検出器を用い, ガス圧力はヘリウム100kPa, 水素50kPa, エア-50kPa, 温度は注入口250°C, カラム205°C, 検出器250°Cとした。

結 果

ナンノクロロプシスの培養結果 ナンノクロロプシスの培養結果をFig. 3に示した。接種密度を 1.2×10^8 cells/mLとして, 平成14年6月5日から7月14日までの40日間の培養を行い, ほぼ 2×10^8 cells/mLの密度で13回収穫した。3日毎に培養水量の45%を間引いたが密度は維持され間引き培養が成立した。

ワムシ連続培養結果 ワムシの培養結果をTable 3, Figs. 4および5に示した。

ナンノクロロプシス給餌区では, 培養槽中のワムシ密

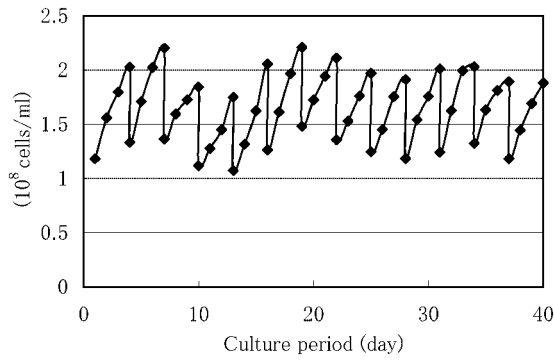


Fig. 3 Result of *Nannochloropsis* culture.

Table 3 Productivity of *Brachionus plicatilis* in continuous cultures

	Culture tank		Harvest tank	
	FC-R ^{*1}	N-R ^{*2}	FC-R	N-R
Rotifer density (ind./mL)	510 ± 78 ^{*3}	600 ± 90	360 ± 67	461 ± 107
Rotifer production (10 ⁴ individ./day)	—	—	43 ± 8	55 ± 13
Egg rate (%) ^{*4}	47.3	48.3	43.8	44.4
Algae the rotifer fed in a tank (mg/day)	—	—	0.83	1.09
Algae the rotifer fed (algae μg/rotifer/day)	—	—	1.93	1.98

^{*1} Rotifers fed fresh water *Chlorella*.

^{*2} Rotifers fed *Nannochloropsis oculata*.

^{*3} Mean ± SD.

^{*4} = (No. eggs/No. rotifers).

One mL of fresh water *Chlorella* contains 152 mg (DW) of cells.

2 × 10⁸ cells of *Nannochloropsis oculata* contains 0.94 mg (DW) of cells.

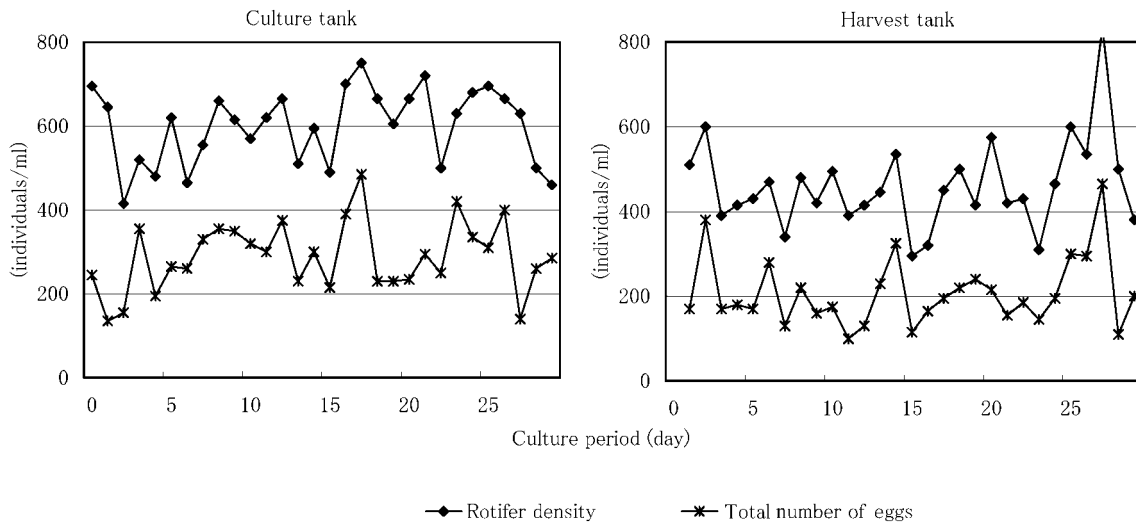


Fig. 4 Result of the continuous culture provided with *Nannochloropsis*.

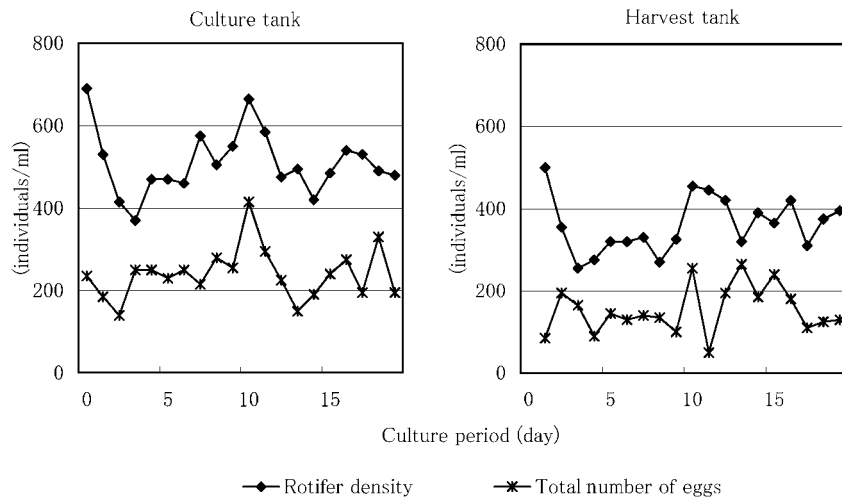


Fig. 5 Result of the continuous culture provided with fresh water *Chlorella*.

Table 4 Total lipids contents (%) and fatty acid compositions (area%) of nonpolar and polar lipids in algae and harvested rotifers

	N* ¹		N-R* ¹		FC* ¹		FC-R* ¹	
Moisture (%)	—		87.7		—		87.0	
Total lipid (d.b.%) ^{*2}	19.0		14.1		9.4		11.8	
NL* ³ (d.b.%)	13.0		8.0		2.7		5.4	
PL* ³ (d.b.%)	6.0		6.1		6.7		6.4	
Fatty acid (area%)	NL	PL	NL	PL	NL	PL	NL	PL
12 : 0	0.6	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.3	0.2
13 : 0	1.4	0.5	0.5	1.6	7.4	0.5	1.3	1.6
14 : 0	5.4	3.8	3.7	3.3	0.6	0.3	1.8	1.6
15 : 0	0.3	0.2	0.3	0.4	0.2	0.1	0.5	0.5
16 : 0	20.3	20.4	14.6	20.4	12.3	22.0	12.8	14.0
16 : 1n-7	21.5	14.6	13.0	9.0	2.2	2.0	3.0	1.8
16 : 2	0.6	0.6	0.3	0.2	29.0	21.4	15.1	6.9
17 : 0	0.4	0.3	0.5	0.5	0.3	0.5	0.9	0.6
16 : 3n-6	0.6	0.8	0.6	1.9	5.2	3.7	1.3	2.7
16 : 3n-3	1.8	2.3	0.8	2.2	0.1	0.1	1.0	2.7
16 : 4n-1	nd* ⁴	tr	tr	nd	0.5	0.5	0.3	0.3
18 : 0	0.5	0.3	1.8	2.1	1.3	2.5	3.1	3.2
18 : 1	6.4	7.1	9.7	6.5	1.1	1.7	4.0	3.2
18 : 2n-6 (LA)	4.1	6.2	5.4	7.8	33.3	38.4	35.8	39.7
18 : 3n-6	0.3	0.4	0.3	0.3	nd	tr	0.1	0.1
18 : 3n-3 (LNA)	5.1	5.3	2.4	2.7	5.8	4.4	4.0	4.9
18 : 4n-3	nd	nd	tr	0.4	nd	0.1	0.1	0.2
18 : 4n-1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	0.1
20 : 0	0.1	0.1	0.1	tr	tr	0.2	0.2	0.3
20 : 1	0.1	0.1	2.7	1.7	tr	0.2	2.0	2.2
20 : 2n-9	tr* ⁴	0.1	0.3	0.3	0.4	0.2	0.3	0.2
20 : 2n-6	tr	tr	0.4	0.2	nd	0.1	4.5	2.4
20 : 3n-9	0.1	0.2	0.1	0.1	tr	nd	0.5	0.7
20 : 3n-6	0.2	0.2	1.1	1.0	nd	nd	1.4	2.3
20 : 4n-6 (AA)	2.3	2.8	5.0	2.6	nd	nd	0.7	1.1
20 : 3n-3	nd	nd	0.3	0.2	nd	nd	0.5	0.4
20 : 4n-3	nd	nd	0.6	1.4	nd	nd	0.7	1.2
20 : 5n-3 (IPA)	27.1	32.3	29.5	20.0	nd	0.1	0.7	0.8
22 : 0	nd	0.1	0.1	tr	nd	tr	0.1	0.1
22 : 1	0.1	0.1	0.5	0.5	nd	nd	0.5	1.1
22 : 4n-9	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
22 : 4n-6	nd	tr	0.3	0.3	nd	nd	nd	nd
22 : 5n-6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
22 : 5n-3 (DPA)	nd	nd	3.7	6.4	nd	tr	0.1	0.3
22 : 6n-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Others	0.7	0.8	1.3	5.7	0.0	1.0	2.2	2.8
Σsaturates	29.0	25.8	21.8	28.5	22.4	26.3	21.1	22.0
Σmonoenes	28.1	21.9	26.0	17.7	3.3	3.9	9.6	8.3
Σn-6	7.4	10.6	13.0	14.1	38.4	42.1	43.9	48.2
Σn-3	34.0	39.9	37.2	33.4	5.9	4.7	7.0	10.5
Σn-6HUFA	2.4	3.1	6.8	4.1	0.0	0.1	6.6	5.7
Σn-3HUFA	27.1	32.3	34.0	28.1	0.0	0.2	2.0	2.7
Σn-6/Σn-3	0.2	0.3	0.3	0.4	6.5	8.9	6.3	4.6

*¹ See Tables 2 and 3.*² On dry matter basis.*³ NL, nonpolar lipids; PL, polar lipids.*⁴ nd, not detected; tr, trace (<0.05).

度は410~750個体/mL (600 ± 90 個体/mL) に維持され、収穫槽中の密度は300~800個体/mL (461 ± 107 個体/mL) で、毎日 $(40 \sim 70) \times 10^4$ 個体 [$(55 \pm 13) \times 10^4$ 個体/日] のワムシが収穫された。また平均卵率は培養槽では48.3%、収穫槽では44.4%であった。またワムシ1個体の生産に要したナンノクロロプシ平均給餌量は $1.98 \mu\text{g}$ であった (Table 3, Fig. 4)。

これに対してクロレラ給餌区では、培養槽中のワムシ密度は370~670個体/mL (510 ± 78 個体/mL) に維持され、収穫槽中の密度は250~460個体/mL (360 ± 67 個体/mL) で、毎日 $(30 \sim 50) \times 10^4$ 個体 [$(43 \pm 8) \times 10^4$ 個体/日] のワムシが収穫された。また平均卵率は培養槽では47.3%、収穫槽では43.8%であった。またワムシ1個体の生産に要したクロレラの平均給餌量は $1.93 \mu\text{g}$ であった (Table 3, Fig. 5)。

脂肪酸組成の分析結果 餌料藻および収穫されたワムシの分析結果を Table 4 に示した。乾燥重量当りの総脂質含量は、ナンノクロロプシス19.0%、ナンノクロロプシス給餌ワムシ (以下 N-R) 14.1%、クロレラ9.4%、およびクロレラ給餌ワムシ (以下 FC-R) 11.8% であった。乾燥重量当りの中性脂質および極性脂質含量は、ナンノクロロプシスではそれぞれ13.0% および6.0%、N-Rでは8.0% および6.1%、クロレラでは2.7% および6.7%、FC-Rでは5.4% および6.4% であった。脂肪酸組成 (area%) は、ナンノクロロプシスでは、中性脂質、極性脂質ともにパルミチン酸 (16:0)、16:1n-7 およびイコサペンタエン酸 (IPA; 20:5n-3) が特に高い値を示し、N-Rでは、それを反映してパルミチン酸およびIPAが特に高い値を示した。またN-Rは、ナンノクロロプシスに比べ中性脂質中のアラキドン酸 (AA; 20:4n-6) や極性脂質中のドコサペンタエン酸 (DPA; 22:5n-3) の割合が高かったが、反対にリノレン酸 (LNA; 18:3n-3) は低い値であった。クロレラでは、パルミチン酸、16:2 およびリノール酸 (LA; 18:2n-6) が特に高い値を示し、FC-Rでもそれを反映してパルミチン酸およびLAは高い割合であった。 $\Sigma n-6/\Sigma n-3$ の比率は、ナンノクロロプシスでは0.3以下、N-Rでは0.4以下であったのに対して、クロレラでは6.5以上、FC-Rでは4.6以上であった。

考 察

フォトバイオリクターを用いたナンノクロロプシスの培養は、通常屋外で行われるオープンポンド培養に比べ、約10倍程度の 2×10^8 cells/mL での高密度培養が可能であった。また間引き率0.45/3 days で間引き培養が成立した。

ナンノクロロプシスは温度、照度および塩分などの培養条件の違いにより、細胞中のIPA含量が異なること

が知られているが、²⁴⁻²⁶ 本実験では、 2×10^8 cells/mL の高密度培養にもかかわらず、中性脂質、極性脂質の両脂肪酸中IPAは、それぞれ25% (area%) 以上存在し、IPA含量の高い、実用性に問題の無い藻体が生産されていた。

ワムシの連続培養は収穫率0.5回転/日で、ナンノクロロプシスと淡水クロレラ給餌の両区ともに成立した。培養密度および総卵率は、両区でほぼ同様に推移した。また収穫ワムシ1個体当りの藻類摂餌量はナンノクロロプシス摂餌区 $1.98 \mu\text{g}$ 、淡水クロレラ摂餌区 $1.93 \mu\text{g}$ とほぼ等しかったことから、バイオリクターで培養した高密度ナンノクロロプシスと本実験に用いた淡水クロレラ市販品との餌料の効率は同等であったと考えられる。したがって、両区餌料のワムシに対する餌料価値は、乾燥重量を基準として同等であったことを意味している。

また脂肪酸組成に関してナンノクロロプシスを摂餌したワムシでは、IPAは中性脂質中で29.5%、極性脂質中では20.0%の割合で、またDPAはそれぞれ3.7% および6.4% であった。またn-3HUFAは、中性脂質中で34.0%、極性脂質中で28.1%を占めており、総脂質含量が14.1%であることを考慮すると、n-3HUFA含有量はマダイ種苗等の必要量を十分に満たしているものと考えられる。^{27,28} DPAは、ナンノクロロプシス中には全く含まれていなかった事、また淡水クロレラを摂餌したワムシではDPAは極微量しか存在しなかった事から考えて、ワムシ中のDPAはナンノクロロプシスを摂餌したワムシの体内で生成されたものと推察される。この、ワムシ体内中のDPAの生成代謝はバッチ式培養で収穫されたワムシでも報告^{29,30}されている。

一方、淡水クロレラで連続培養されたワムシでは、餌料の脂肪酸組成を反映してパルミチン酸やLAが多かったが、IPAやDPAは極微量検出されるだけで、n-3HUFAはほとんど含まれていなかった。

ワムシの脂肪酸組成は、餌料の脂肪酸組成をほぼ反映したが、高次への代謝も若干行われており、すなわちナンノクロロプシスで培養した場合、極性脂質中に代謝によって新たに出現するDPAは、IPAよりも海産種苗に対して効果的に働くことも示唆される。²⁹ なお、仔稚魚の活力等に影響を及ぼすドコサヘキサエン酸 (DHA; 22:6n-3) との効果の違いについては、今後の課題であろう。また、収穫槽への給餌は、栄養強化ではなく飢餓防止のための給餌であり、飢餓状態のワムシではさらにIPAからDPAへの転換が進行するとされている。²⁹

著者らが目標とするのは、市販の購入餌料に依存しない省力化された、かつ安定したワムシ生産である。本実験では、高密度培養のナンノクロロプシスを用いて、収穫率0.5回転/日にて410~750個体/mLのワムシ連続培養が達成された。また、そこで生産されたワムシはn

-3HUFA を豊富に含んでいた。

今後フォトバイオリアクターの効率化等により, ナンノクロプシスの培養での多大な労働力と, 天候不順による不安定な生産性が解決され, これらのシステムの実用化の研究が進むことを期待したい。

さらに本実験では, 淡水クロレラ給餌区よりナンノクロプシス給餌区の方がワムシの遊泳が活発で, 活力が高い現象が観察された。栽培漁業現場でも同様の評価もあることから, 今後, 両餌料でのワムシの活力差を定量的に評価する手法を検討する必要があると考えられる。

本研究は餌料自給式環境配慮型ワムシ連続培養システムの開発 (マリノフォーラム 21 提案公募型研究)³¹⁾の一環として行ったものである。ここに記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 吉村研治, 宮本義次, 中村俊政. 濃縮淡水クロレラ給餌によるワムシの高密度大量培養. 栽培技研 1992; **21**: 1-6.
- 2) Yoshimura K, Hagiwara A, Yoshimatsu T, Kitajima C. Culture technology of marine rotifers and the implications for intensive culture of marine fish in Japan. *Mar. Freshwater Res.* 1996; **47**: 217-222.
- 3) Yoshimura K, Usuki K, Yoshimatsu T, Kitajima C, Hagiwara A. Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. *Hydrobiologia* 1997; **358**: 139-144.
- 4) Fu Y, Hada A, Yamashita T, Yoshida Y, Hino A. Development of a continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 1997; **358**: 145-151.
- 5) 山下貴示. 装置連続培養. 「平成 11 年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース」ワムシの培養技術, 日本栽培漁業協会, 東京. 2000; 81-92.
- 6) 日野明徳. ワムシ連続培養装置. アクアネット 1998; **8**: 45-48.
- 7) 日野明徳. ワムシとその培養法研究の進展および展望. 日水誌 2001; **67**: 1136-1137.
- 8) 吉村研治. ワムシ高密度培養技術の進展とその現状. 日水誌 2001; **67**: 1138-1139.
- 9) 桑田 博. 日裁協におけるワムシ大量培養技術開発の取り組み. 日水誌 2001; **67**: 1140-1141.
- 10) 桑田 博. ワムシの粗放連続培養. アクアネット 2001; **12**: 22-28.
- 11) 田中賢二. ワムシ高密度培養系におけるバクテリアの挙動と制御. 日水誌 2001; **67**: 1142-1143.
- 12) 吉村研治. ワムシの高密度大量培養技術. 日水誌 2002; **68**: 629-632.
- 13) 吉松隆夫. ワムシの超高密度培養への挑戦. アクアネット 2003; **5**: 56-61.
- 14) Maruyama I, Nakao T, Shigeno I, Ando Y, Hirayama K. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 1997; **358**: 133-138.
- 15) 渡辺 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 1978; **44**: 1109-1114.
- 16) 安部 謙, 吉村研治, 双田 崇, 酒本秀一, 吉松隆夫, 田中賢二. 酵母クリームと濃縮淡水クロレラ併用給餌によるワムシの高密度大量培養. 水産増殖 2001; **49**: 489-494.
- 17) 吉松隆夫. ワムシ高密度大量培養用餌料の開発. 日水誌 2001; **67**: 1144-1145.
- 18) 林 雅弘. 高密度培養時代の新たなワムシ栄養強化餌料の探索. 日水誌 2001; **67**: 1146-1147.
- 19) 小磯雅彦, 日野明徳. 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.
- 20) 小磯雅彦, 日野明徳. 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.
- 21) 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.
- 22) 小林孝幸, 長瀬俊哉. 高密度ナンノクロプシスを用いた L 型ワムシの連続培養の試み. 日本水産増殖学会第 1 回大会講演要旨集, 水産増殖 2002; **50**: 456-457.
- 23) Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; **226**: 497-509.
- 24) 岡内正典, 周 文堅, 郇 婉虹, 福所邦彦, 金澤昭夫. 異なる増殖相におけるナンノクロプシス *Nannochloropsis oculata* の栄養価の相違. 日水誌 1990; **56**: 1293-1298.
- 25) 荒木 繁, 鹿山 光. 植物界における高度不飽和脂肪酸の分布. 「AA, EPA, DHA-高度不飽和脂肪酸」(鹿山光編) 恒星社厚生閣, 東京. 1995; 11-43.
- 26) Teshima S, Yamasaki S, Kanazawa A, Koshio S, Mukai H, Hirata H. Fatty acid composition of Malaysian marine *Chlorella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 1985.
- 27) 金澤昭夫. 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. 1993; 69-79.
- 28) 竹内俊郎. 魚の栄養学. 「動物の栄養」(唐澤 豊編) 文永堂出版, 東京. 2001; 295-319.
- 29) 渡辺 武. 脂質からみた仔稚魚用生物餌料の栄養価. 「養魚と飼料脂質」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京. 1978; 93-111.
- 30) 丸山 功, 中村寿雄, 松林恒夫, 安藤洋太郎, 前田直彦. 淡水産クロレラ単独または酵母併用ワムシの脂肪酸組成について. 水産増殖 1988; **36**: 259-263.
- 31) 長瀬俊哉, 小林孝幸. 餌料自給式環境配慮型ワムシ連続培養システムの開発. アクアネット 2003; **11**: 53-57.