

2015. 6

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人

高知大学学報

高知大学学位授与記録第七十四号

総務課広報戦略室発行

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づきその論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

 *
 *
 *
 *
 *
 *

高知大学学報

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総黒博第14号	関本 岳朗	Comparative ecological-physiological study on tolerance to sea, brackish and fresh water bodies as habitat in oceanic, brackish water and fresh water Halobatinae and Halovellinae species (Heteroptera: Gerridae) (外洋棲、沿岸性、淡水性ウミアメンボ亜科・ウミカタビロアメンボ亜科昆虫の浸透圧耐性についての比較生理生態学研究)	1
甲総黒博第15号	橋口 健太郎	主要養殖魚の各種刺激に対するストレス応答	8

<p>ふりがな 氏名（本籍） 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目</p> <p>発 表 誌 名</p>	<p>せきもと たけろう 関本 岳朗（石川県） 博士（学術） 甲総黒博第14号 学位規則第4条第1項該当 平成27年3月23日 Comparative ecological-physiological study on tolerance to sea, brackish and fresh water bodies as habitat in oceanic, brackish water and fresh water Halobatinae and Halovellinae species (Heteroptera: Gerridae) (外洋棲、沿岸性、淡水性ウミアメンボ亜科・ウミカタビロアメンボ亜科昆虫の浸透圧耐性についての比較生理生態学研究)</p> <p>Takero SEKIMOTO, Koki IYOTO, Yuki OSUMI, Takashi SHIRAKI, Tetsuo HARADA(2013) Lowered salinity tolerance in sea skaters <i>Halobates micans</i>, <i>Halobates sericeus</i>, and <i>Halobates</i> sp.(Heteroptera:Gerridae). <i>Environment Entomology</i>, 42 : 572-577.</p> <p>Takero SEKIMOTO, Yuki OSUMI, Takashi SHIRAKI, Akane KOBAYASHI, Kentaro EMI, Mitsuru NAKAJO, Masatoshi MOKU, Vladimir KOŠTÁL, Chihiro KATAGIRI, Tetsuo HARADA(2014) Comparative study of salinity tolerance and oceanic sea skater, <i>Halobates micans</i> and its closely related fresh water species, <i>Metrocoris histrio</i>. <i>Natural Science</i>, 6:1141-1148.</p> <p style="text-align: center;">審査委員 主査 教授 原田 哲夫 副査 准教授 伊谷 行 副査 准教授 久保田 賢</p>
--	---

論文の内容の要旨

1. Purpose:

There have been few comparative and eco-physiological studies on the salinity adaptation among oceanic, brackish and fresh water species in invertebrates. The semi-aquatic bugs in Halobatinae and Haloveliinae include oceanic, brackish and fresh water species. Therefore, this study aims to test a hypothesis that the salinity tolerance reflects the salinity level of the habitat of each species, using oceanic species (*Halobates micans*, *H. sericeus* and *H. germanus*), brackish-water species, *Halovelia septentrionalis* and a fresh-water water species, *Metrocoris histrio*.

2. Methods:

2.1. Sampling

All samples of oceanic species were collected using a Neuston Net during a cruise by the R/V MIRAI and R/V HAKUHOMARU owned by JAMSTEC in the tropical Pacific Ocean (Tomini Gulf), temperate and tropical Pacific Ocean (Routes including a straight track from Tokyo to Honolulu), and tropical Indian Ocean. All samplings of oceanic species were performed at night, under artificial light.

All specimens as mainly adults of *H. septentrionalis* were collected by hand from the shore nearby Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyu (Sesoko Station in Okinawa Main Land) in Japan.

Adults and 5th instar larvae of a fresh-water species, *M. histrio* were collected from spring water in AMENOMIKUMARI shrine (33°53'N 133°53'E) nearby Kochi University twice on 11th June 2011 and 19th May 2014.

2.2. Salinity tolerance experiment

All specimens of adult and 5th instar larvae in each species were used for the salinity tolerance experiments. The number of specimens for the experiment on each species were as follows: *H. micans*, female=587, male=381, 5th instar larvae=41; *H. sericeus*, female=7, male=14; *H. septentrionalis*, female=137, male=78; *M. histrio*, female=77, male=73 and 5th instar larvae =8. were placed on white and semi-translucent aquaria (30 cm × 30 cm × 40 cm) filled with several salinities in the laboratory. Whether they survived or not were observed, without foods, with 1-2 hour intervals until they have completely died. However, the brackish-water species, specimens of *H. septentrionalis* had been monitored only for 184 or 109 hours because of administrative limitation on the period when the laboratory could be used.

Air and water temperature during all experiments were similar to temperatures in each habitat where the samples were collected. For the experiment on oceanic species (*H. micans* and *H. sericeus*), air and water temperatures were kept at 29±2°C. For the brackish-water species, *H. septentrionalis*, both air and water temperatures were kept at 32±2°C. And, in fresh-water species, *Metrocoris histrio*, both temperatures were kept at 20±2°C.

3. Results:

3.1. Salinity tolerance experiment on oceanic species

The oceanic two species, *Halobates micans* and *H. sericeus* (Fig. 1) survived relatively long hours of more than 100 hours under 11-36 ‰ of salinity. *Halobates micans* and *H. sericeus* showed “low salinity coma” with paralysis in legs movements within 2-9 hr on average and died within 2 hr after the start of the coma. Although tolerance to fresh water differed statistically between *H. micans* (n=254, 6-7 hours in survival on average) from tropical Indian Ocean and *H. sericeus* (n=5, 2-3 hours) from Pacific Ocean (Mann-Whitney U-test, $z=-4.177$, $p<0.001$; both exhibiting “fresh water coma”, but the difference was small (4-5 hours difference).

Salinity tolerance experiment on *H. germanus* was not performed in this study. However, adult specimens exposed to fresh water could survive at least for 6 hours without low salinity coma (n=9).

3.2. Salinity tolerance experiment on brackish species

The brackish water species, *H. septentrionalis* showed high tolerance at 0‰ to 45‰ with hours in survival of 93 hr to 170 hr on average, when more than 108 hr in survival were estimated as “109 hr” for the condition of 45‰ and more than 184 hour in survival were estimated as “185 hours” for the other salinity conditions. More than 50 % of the specimens in the salinity conditions of 0 ‰ to 45 ‰ had survived over 100 hours as the “half-life” period (Fig. 2).

3.3. Salinity tolerance of fresh water species

The fresh water species, *M. histrio* showed lower resistance to salinity. Time in survival was half at 5‰ of 80 hours at 0 ‰, while it was less than 10 hr at 10‰ or higher salinity (Fig. 3). The threshold value to reduce the survival hours in comparison with those under 0 ‰ as the value of fresh water was evaluated as around 3 ‰ in *M. histrio*, because 20 to 40 % of adults showed the reduction of hours in survival less than 15 hours under 3-5 ‰.

4. Discussion:

This study compared the salinity tolerance among Gerroidea species inhabiting in open sea, shore and freshwater environment. They showed a variety of tolerance depending on each habitat. The two oceanic species, *Halobates micans* and *H. sericeus* have tolerance to relatively wide salinity from 36‰ to 11‰. Why do oceanic sea skaters need to have this various range of salinity tolerance? They have no chance to be exposed to brackish water throughout their all stage. And salinity of sea water in major oceans are relatively stable from 31‰ to 38‰. (Data from the World Ocean Atlas). However, the oceanic sea skater could be directly exposed to rain falls since they are existing on “sea surface”. Thus, acquiring their ability of lower salinity tolerance could be naturally selected through the heavy rain falls.

For example, *Halobates sp* from Tomini Gulf where precipitation is so high (Sekimoto et al., 2013) showed longer survival time more than 24 hours even on fresh water than those inhabiting open ocean (a couple of hours only). This high tolerance to fresh water could be naturally selected by such high precipitation. Referring to *Halobates germanus*, adults specimens were exposed to fresh water for 6 hours and all specimens could survive without paralysis (Sekimoto et al., unpublished). This resistance to fresh water could be related to their distribution restricted to the sea area near to the islands in the tropical and subtropical Pacific Ocean where there is significant influence from fresh waters flown from rivers.

On the other hand, the fresh water Halobatinae species, adults of *Metrocoris historio*, showed their survival time to be decreased when they had been exposed to more than 3‰ salinity. This narrow range of resistance to salinity as 0‰ to 3‰ should be related to fresh water habitat. *Metrocoris histrio* inhabits fresh water environment such as relatively “lotic” water bodies like as spring and mountain stream which are hardly contaminated with “salinity”. There is no chance for them to be exposed to saline water.

The brackish water Halovellinae species, *Halovelia septentrionalis* showed superior tolerance

論文の内容の要旨

both to lower and higher salinities. They could survive more than 93 hours at 0‰ to 45‰. This high range of tolerance of *H. septentrionalis* can correspond with that by a pink shrimp, *Farfantepenaeus duorarum* which inhabits very wide range of salinity waters with 5‰ to 55‰ (Criales et al., 2011). In the field, they can be observed to glide on sea surface around shore, and be often left in the tide pool under the lower tide period. Therefore, *H. septentrionalis* left in the tidal pool must be exposed to wide variety of salinity water from the hyper salinity which had been caused by evaporation in daytime, to fresh water which was as heavy rain fall. This wide range of salinity as habitat could naturally select the tolerance to the wide variety of salinity high salinity in this species.

5. Conclusion:

The hypothesis that the salinity tolerance reflects the salinity level of the habitat of each species would be true in the semi-aqua bugs.

6. References

Criales, M.M., Zink, I.C., Browder, J.A. and Jackson, T.L. (2011). The effect of acclimation salinity and age on the salinity tolerance of pink shrimp post larvae *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **409**: 283-289.

Sekimoto, T., Iyota, K., Osumi, Y., Shiraki, T. and Harada, T. (2013). Lowered salinity tolerance in sea skaters *Halobates micans*, *Halobates sericeus*, and *Halobates* sp. (Heteroptera: Gerridae). *Environmental Entomology* **42**: 572-577.

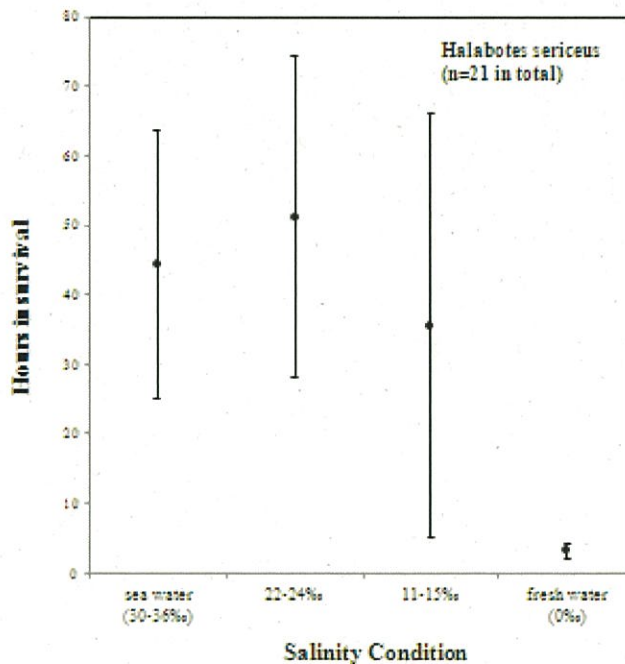


Fig. 1: Effect of water salinity on the adults of *H. sericeus* from the Tropical Pacific Ocean (ANOVA: $df=3$, $F_5=5.051$, $p=0.011$).

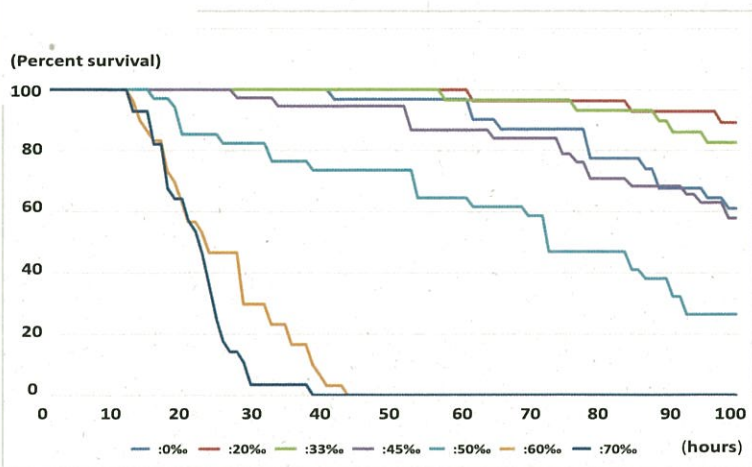


Fig. 2: Survival curve under several salinities in *Halovellia septentrionalis*

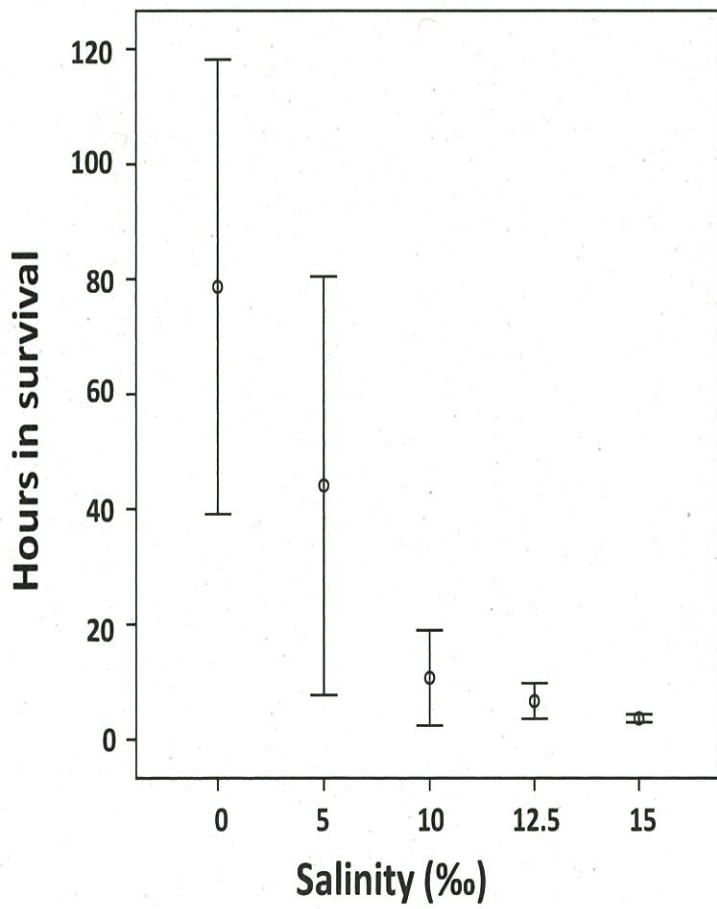


Fig. 3: Hours in survival under several salinity conditions in a fresh water species, *Metrocoris histrio*.

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、外洋棲、沿岸性、淡水性ウミアメンボ亜科・ウミカタピロアメンボ亜科昆虫の浸透圧耐性（塩分耐性）についての生理・生態学的研究であり、以下の5部から構成されている。

1. 総合序論
2. 外洋棲ウミアメンボ亜科昆虫における塩分耐性
3. 沿岸性ウミカタピロアメンボ亜科昆虫，ケシウミアメンボにおける塩分耐性
4. 淡水性ウミアメンボ亜科昆虫，シマアメンボにおける塩分耐性
5. 総合考察

1. 総合序論では、まず、昆虫、昆虫以外の節足動物、魚類に範囲を広げ、浸透圧耐性についての先行研究を俯瞰している。浸透圧耐性には大きく分けて2つの機能がある。1つ目は、体液浸透圧をある範囲に調整する能力、2つ目は環境水の浸透圧に応じた受動的な体液浸透圧変動への耐性能である。1つ目の能力は、体液浸透圧の変化を打ち消す、恒常性＝ホメオスタシス機能と言える。動物によって、体液塩分濃度を下げる機能を持つもの、逆に上げる機能を持つもの、その両方の機能を持つものに分かれる。近縁の分類群で、外洋域、沿岸域、淡水域の広いに生息域に進出した動物の浸透圧耐性を比較した研究は稀であり、本総合序論は、本研究の独自性・新規性を浮き彫りにしている。

2-1. 外洋棲ウミアメンボ2種、*Halobates micans*（ツヤウミアメンボ：ツヤ）と*H. sericeus*（コガタウミアメンボ）は11-36(%)の広い塩分範囲下で、(飢餓下)平均100時間以上生存したが、塩分0の淡水で飼育されると、2-9時間で“低塩分麻痺”（中肢と後肢が痙攣を起こす）状態となり、2時間以内に全て死亡した。本知見は、外洋の海表面に生息するウミアメンボ類の降水への対応として、海水の3分の1程度までは、低塩分耐性を維持していることを示した点で、海洋生物学の分野に貴重な新知見を与えた。また、西部太平洋赤道付近の低緯度地方は降水量が多く、ここに生息するツヤと*H. germanus*（セントウミアメンボ：センタ）は淡水麻痺に要する時間が250-300分と長く、低緯度地方に殆ど生息しないコガタの100分より淡水麻痺し難い性質があり、これも多雨への適応機能として、新知見を与えた。

2-2. インドネシア・ドミニ湾内で大量に採取されたウミアメンボ、*Halobates* sp. は淡水での飼育下では、約24時間も“低塩分麻痺”を起こさなかった。この異常とも思える低塩分への耐性は、本個体群が湾に生息し、周辺からの陸水による淡水供給が多いことと、年間降水量が比較的多いことと関係していると考えられる。淡水への曝露頻度が高い程、低塩分に強いという作業仮説を本研究結果は提示しており、海洋生物学のうち、生理・生態学領域に新しい知見をもたらすものである。

3. 沖縄本島今帰仁村の海岸のうち、細い海峡状になった場所でケシウミアメンボ個体群が潮だまり（タイドプール）に生息しており、成虫を採集し、琉球大学瀬底実験施設へ運搬した。同施設で塩分耐性実験を行った。塩分0-45では、平均93時間から170時間の生存時間を示し、広い範囲での塩分耐性を示した。また、生存曲線を描くと、0-50で半数の個体が死滅する時間が72時間より長かったが、60-70では僅かに23時間に止まった。個体群が採集された海岸は遠浅で、干潮時には広い面積でタイドプールが広がる。日中の日照りによりこれらタイドプールは蒸発による高い塩分海水となり、また降水時には淡水によってタイドプールが洗われることは容易に想像できる。本種による広い範囲での塩分耐性は、彼らの生息水域における激しい塩分変動への適応と考えられ、海洋生物学のうち、生理・生態学領域に新知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

4. 高知市内の某神社の湧水よりシミアメンボ成虫を採集，高知大学教育学部3号棟の環境生理学研究室で，様々な塩分水に置き，生存時間を飢餓下で調べた．淡水では，平均80時間生存したが，5の低塩分で生存時間が半分に減少し，10かそれより高い塩分水では，平均生存時間が10時間以下であった．シミアメンボは河川上流のうち，流れが淀んでいる部分や，地下水や河川の伏流水が湧き出ているところに好んで生息する．このような水界は，年中水温が安定しており，15℃から25℃の範囲で保たれていることが多い．シミアメンボは河川の中流から下流域には生息せず，汽水にさらされる危険性は極めて少ない．僅か5の低塩分にも十分に耐えられない本種は，塩分への曝露がないために，塩分耐性を獲得させてこなかったものと考えられる．また安定した温度環境も，交差耐性の観点から，この弱い塩分耐性と関係している可能性もある．河口など汽水域にも進出し，9までなら塩分耐性を十分に示す淡水産のナミアメンボ (Kishi et al., 2009) と比較するとき，塩分環境とは無縁の本種の耐性の弱さが際立つ．本知見は動物学のうち，耐性生理・生態学の分野に一石を投じている．

5. 総合考察

本論文は，「外洋棲ウミアメンボ亜科」，「沿岸性ウミカタピロアメンボ亜科」，「淡水性ウミアメンボ亜科」に属するそれぞれのアメンボ類がその生息水域の塩分変動の特徴を見事に反映して，塩分耐性を進化させてきたことを示唆している．黒潮圏に生息するアメンボ類の環境適応能を本研究は明らかにしたという点で，「黒潮圏科学」の発展に寄与するものと考えられる．

ふりがな	はしぐち けんたろう
氏名（本籍）	橋口 健太郎（鹿児島県）
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	甲総黒博第15号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成27年3月23日
学位論文題目	主要養殖魚の各種刺激に対するストレス応答
発表誌名	橋口健太郎、川合研兒、今城雅之、大島俊一郎（2015）日本の主要海産養殖魚の各種刺激に対するストレス応答、水産増殖（62巻4号） 橋口健太郎、川合研兒、今城雅之、大島俊一郎（2015）ブリのストレス応答に及ぼす淡水浴の影響、水産増殖（63巻1号）
	審査委員 主査 教授 大島 俊一郎 副査 教授 大谷 和弘 副査 准教授 中村 洋平

論文の内容の要旨

世界の養殖生産は年々増加しており現在では総漁獲量の20%を占めており、その中でもサケマス類の養殖は盛んで、漁獲量の7割以上が養殖されている。このように人口の急激な増加を背景に世界の養殖業は重要な産業であり、2030年には総漁獲量の50%を超えると予測されている。日本における養殖生産は漁業全体の20%程度で、その生産量は25万トンで、その内訳は64%がブリ類（ブリ *Seriola quinqueradiata*, カンパチ *Seliora dumerili*, ヒラマサ *Seliora lalandi*）、23%がマダイ *Pagrus major* となっている。さらに、ブリ類の総生産量のうち約6割、マダイでは約8割が養殖魚で占められており、ブリ類およびマダイは日本の主要海産養殖魚となっている。また、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* はブリ類およびマダイよりもその生産額は低いが高級魚として人気の高い魚で、日本の養殖業において重要な魚種の一つである。このように養殖業は年々世界での需要の高まりとともに重要な産業となっている。

養殖業の利点として、安全・安心かつ高品質な養殖魚を安定して生産可能であることが挙げられ、我が国においても品質を保証するためにトレーサビリティが定着しつつある。また、予め需要を把握した上で生産ができることから事業計画が作りやすく経営の見通しを立てられることや、丈夫で品質の高い系統を選抜育種することで効率的かつ高品質の水産物を養殖できることも利点として挙げられる。一方、養殖業の問題点の一つに感染症の発生が挙げられ、養殖現場では細菌病、ウイルス病および寄生虫病など種々の感染症が発生し産業的に大きな被害をもたらすことがある。感染症予防のためにワクチン接種を行ったり、感染症の治療のために薬剤を投与することがあるが、これらの処置は養殖魚の品質に対する消費者の不安を煽り、ワクチンや薬剤は価格が高いためから養殖業者にとってコストの増大となるので、できるだけ使用を避けることが消費者や生産者の立場からも望ましい。

論文の内容の要旨

また、治療薬の抗生物質を誤った方法で投与すると薬剤耐性菌が出現し、薬剤による治療効果が十分に得られなくなる可能性がある。そのため、できるだけ感染症を発生させないように養殖魚を飼育することが強く求められている。

養殖現場における感染症の発生には、魚体に対するストレスが関与していることが報告されている。ストレスとは広義には外的刺激と定義され、およびこれを受けた生物に生理学的変化が認められるものを指す。一方、魚類で言う狭義のストレスとは、外的刺激により引き起こされる非特異的・生物学的な緊張状態の現象すべてのことを指し、対象とする魚の生存に影響を及ぼすような負の現象として定義できる。養殖魚に与えるストレスの原因として、化学的要因(水質、汚染、飼料の質・組成、排泄物など)、物理的要因(水温、光、音、溶存ガスなど)、生物的要因(収容密度、遊泳空間、微生物、寄生虫など)および管理的要因(ハンドリング、運搬、貯蔵、給餌方法、疾病治療など)が挙げられる。ストレス反応は、ホルモンの分泌などの刺激に対して防御反応を示す「警告期」、警告期の反応によって個体がさらに抵抗力を増した時期である「抵抗期」、成長阻害や免疫能の低下など刺激に耐えられなくなった「疲弊期」の3段階に分けられる。個体がストレスを受けると一次反応としてコルチゾールなどのホルモンが分泌される。つづいて、二次反応としてそのホルモンの働きにより血中グルコース濃度が上昇することが知られている。グルコースは生物の主要なエネルギー源であり、血中グルコース濃度が上昇すれば血糖や血圧の低下を防げることから、緊急事態に遭遇した際に、即時に生理活性を高めストレス状態を改善することができる。血中グルコース濃度は各種刺激を受けてから早い段階から高まるが、平常値や刺激を受けてからの変化の度合は、魚種によって異なっている。

また、同じ魚種でも刺激の種類によって血中グルコース濃度の変動度合いは異なることが報告されている。その後、ストレス反応は生体に様々な影響を与え、魚類においても生理作用、成長、生体防御能および繁殖に影響を与えることが報告されており、これらのほとんどの研究でストレスが生体に悪影響を与えるとされている。そのため、ストレスを与えずに養殖魚を飼育することが望ましいが、ストレスを与えずに飼育することは難しく、養殖業をさらに発展させるためにはストレスを緩和する方法を検討する必要がある。

プレバイオティクスとは消化管で消化されずに腸まで届き、腸内細菌を活性化させる物質の総称で、腸内細菌のうち特定の菌の代謝を活性化し増殖させることによって生体の健康が維持増進される。代表的なプレバイオティクスとしては、イヌリンなどの食物繊維やフラクトオリゴ糖およびガラクトオリゴ糖などのオリゴ糖類についてよく調べられている。プレバイオティクスの研究は魚類でも行われており、プレバイオティクスを投与することで成長促進、生体防御能の上昇および抗病性の上昇など有益な効果をもたらすことが報告されている。また、プレバイオティクスを投与することで塩分ストレスに対するストレス耐性が上昇することも報告されている。しかし、魚類にプレバイオティクスを投与してストレスを負荷後に、生体防御能や抗病性にもたらす影響を検証した研究は少なく、ブリ類についてはこれまでに研究報告はない。

ビタミンは微量で動物の栄養状態を支配する有機化合物で、炭水化物、タンパク質、脂質と異なり、生体内の代謝を営む種々の生理現象に潤滑油的な役割を演じ、動物体内ではほとんど生合成されないものである。その中で、ビタミンC(アスコルビン酸)やビタミンE(α -トコフェロール)は活性酸素等のフリーラジカルからDNAやタンパク質などの細胞高分子を保護するための抗酸化剤として働くことが知られており、ビタミンCまたはビタミンEを経口投与することで、成長の促進や生体防御能

論文の内容の要旨

を上昇させるといった効果が多く魚種で報告されている。また、ビタミンCまたはビタミンEを投与した際のストレス耐性についても様々な魚種で調べられており、これらを投与することによってストレス耐性が上昇することが報告されている。しかし、ブリ類についてのビタミンCおよびビタミンEの投与効果は、成長や生体防御能に影響を与えることが報告されているが、ストレス耐性についての報告はない。

これまでに各種研究の結果から感染症の発生とストレスの間には密接な関係性があると考えられているにも関わらず、わが国の主要養殖魚におけるストレス応答に関する研究はほとんどない。そのため、養殖現場で日常行われている作業によって、魚類がどの程度ストレスの負荷を受けているのかは不明である。今後、魚類の感染症とストレスの関連性を明らかにしていく上で、各種刺激に対するストレスの程度を把握しておくことは重要である。また、ストレスが生体防御能や抗病性に悪影響を与えるのであれば、その対策についても検討する必要がある。

そこで本研究では、日本の主要海産養殖魚であるブリ、マダイおよびヒラメに加え、世界的に重要な養殖魚であるニジマス *Oncorhynchus mykiss* を対象動物として、養殖現場で日常行われていると考えられる各種刺激 {網による空中保持 (10 秒間空気に暴露), 水位低下 (供試魚の背鰭が出る程度まで水位を落とす), 淡水浴 (淡水に5分間浸漬する) または塩水浴 (塩濃度3%の塩水に30分間浸漬), ホルマリン浴 (ホルマリンの濃度を200ppmとなるように調製した水槽に30分間浸漬) および腹腔内注射 (生理食塩水を100 μ L 腹腔内に接種)} を付与した後の血液性状および非特異的生体防御能ならびに感染症に対する感受性の変化について調べた。また、感染症に対する感受性が上昇したストレスに対して、ストレス緩和効果が期待されるイヌリン、ビタミンCおよびビタミンEを経口投与してその効果を調べた。

本研究では、はじめに各種刺激付与後の血中グルコース濃度および非特異的生体防御 (貪食活性, リゾチーム活性および補体価) を測定し、刺激に対する反応を調べた。

網による空中保持では、ブリおよびヒラメでは30分後、マダイでは1時間後、ニジマスでは24時間後に血中グルコース濃度が最も高くなり同じ刺激でも魚種によって反応が異なることが明らかとなった。水位低下のようにブリやヒラメでは応答を示さない刺激でもマダイにとっては刺激となることや、ホルマリン浴のようにブリ、マダイおよびニジマスでは高いグルコース濃度を示した刺激でもヒラメはあまり応答を示さないことなど魚種によって刺激に対する応答が異なることが明らかとなり、血中グルコース濃度が高くなる刺激も魚種によって異なった。各種刺激を付与した際の生体防御能の変化についても、魚種および刺激によって応答が異なり、貪食能が刺激の影響を最も受けやすいことが明らかとなり、その傾向はブリにおいて顕著にみられ、全ての刺激に対して減少した。また、血中グルコース濃度の変化が最も大きかったマダイでは生体防御能の変化はほとんど認められなかったことや、塩水浴を行ったニジマスでは貪食率が上昇したことなどストレスを付与しても生体防御能に悪影響を与えるとは一概に言えない結果となった。

続いて、各種刺激付与後に実験感染を行い、感染症に対する感受性にどの程度影響を与えるかを調べた。類結節症原因菌を感染させたブリでは淡水浴および腹腔内注射、滑走細菌に感染させたヒラメでは淡水浴およびホルマリン浴、レンサ球菌を感染させたニジマスでは全ての刺激に対して感染症に対する感受性を高め、ストレスの影響を受けることが明らかとなった。しかし、マダイでは死亡率に有意な差異が認められず、ストレス反応は起こるものの感受性には影響を与えないことが明らかとなった。また、ブリやニジマスにおいても血中グルコース濃度が上昇した刺激でも感受性は上昇せず、

論文の内容の要旨

反対に血中グルコース濃度が上昇しなかった刺激で感受性が高くなるといった現象も観察された。このことから、ストレスは感染症に対する感受性を高めるとは一概に言えず、原因菌の感染部位や侵入経路、感染時の宿主側の生体防御能の活性度合いおよび飼育環境など様々な要因によって感受性は左右されると考えられる。

ブリでは淡水浴、ニジマスでは塩水浴を与えた際のイヌリンの投与によるストレス緩和効果を調べ、マダイおよびヒラメではイヌリンを投与し、免疫賦活効果を調べた。ブリでは、イヌリンを1週間経口投与することによって生体防御能の上昇が認められ、実験感染では淡水浴前だけでなく淡水浴後にもイヌリンを投与することで死亡率が低くなり、ストレス緩和効果が認められた。このことから、イヌリンの投与は有効なストレスの対処方法であると考えられる。また、マダイ、ヒラメおよびニジマスについては、本研究においてイヌリンの投与効果は認められなかったことから、今後、投与期間や投与量の再検討ならびに他のプレバイオティクスの投与についても検討する必要がある。ビタミンCおよびビタミンEの投与によるストレス緩和効果は、ブリに淡水浴を行った際に検証した。ビタミンCをブリに1週間経口投与したが、生体防御能の上昇や感染症に対する感受性の低下が認められず、ストレス緩和効果を示さなかった。しかし、ビタミンEをブリに1週間経口投与すると生体防御能の上昇は認められなかったが、実験感染においてはイヌリンと同様に淡水浴前後でビタミンEを投与することによって死亡率が低下し、ストレス緩和効果が認められた。

以上のことから本研究では、ブリ、マダイ、ヒラメおよびニジマスの各種刺激が血中グルコース濃度、生体防御能(食食活性、リゾチーム活性および補体価)および感染症に対する感受性に及ぼす影響を明らかにした。さらに、イヌリン、ビタミンCおよびビタミンEを経口投与することによるストレス緩和効果を検証し、イヌリンおよびビタミンEではストレス緩和効果が認められた。淡水浴はブリ類の養殖現場では寄生虫を除去する目的で行われ、有効な対策手段でありブリ類の養殖において必要不可欠であることから、淡水浴のストレスを緩和できたことは特に大きいと考えられる。このように本研究において明らかになったことは、養殖魚の飼育方法の改善および感染症の予防につながり、養殖業のさらなる発展に貢献すると考えられる。しかし、本研究で調べた刺激は養殖魚にかかっていると予想されるストレスの一部にしか過ぎず、他の刺激に対しても本研究と同様にストレスの影響を調べる必要がある。

論文審査の結果の要旨

養殖業の問題点の一つに感染症の発生が挙げられ、養殖現場では細菌病、ウイルス病および寄生虫病など種々の感染症が発生し産業的に大きな被害をもたらしている。感染症を予防するためにワクチンを接種したり、治療のために薬剤を投与することがあるが、これらの処置は養殖魚の品質に対する消費者の不安を煽り、また、ワクチンや薬剤は価格が高いためから養殖業者にとってコストの増大となるので、できるだけこれらの使用を避けることが消費者や生産者の立場からも望ましい。また、治療薬である抗生物質を誤った方法で投与した結果、薬剤耐性菌が出現し、薬剤による治療効果が十分に得られなくなる可能性がある。そのため、できるだけ感染症を発生させないように養殖魚を飼育管理することが強く求められている。

養殖現場における感染症の発生には、魚体に対するストレスが関与していることが示唆されている。ストレスとは広義には外的刺激と定義され、およびこれを受けた生物に生理学的変化が認められるものを指すとされている。一方、魚類で言う狭義のストレスとは、外的刺激により引き起こされる非特異的・生物学的な緊張状態の現象すべてのことを指し、対象とする魚の生存に影響を及ぼすような負の現象として定義できるとされている。養殖魚に与えるストレスの原因として、化学的要因（水質、汚染、飼料の質・組成、排泄物など）、物理的要因（水温、光、音、溶存ガスなど）、生物的要因（収容密度、遊泳空間、微生物、寄生虫など）および管理的要因（ハンドリング、運搬、貯蔵、給餌方法、疾病治療など）が挙げられる。個体がストレスを受けると一次反応としてコルチゾールなどのホルモンが分泌される。つづいて、二次反応としてそのホルモンの働きにより血中グルコース濃度が上昇することが知られている。ストレス反応は生体に様々な影響を与え、魚類の生理作用、成長、生体防御能および繁殖に影響を与えることが報告されており、これらのほとんどの研究でストレスが生体に悪影響を与えるとされている。そのため、ストレスを与えずに養殖魚を飼育することが望ましいが、ストレスを与えずに飼育することは難しく、養殖業をさらに発展させるためには魚のストレスを緩和する方法を調べる必要がある。

本博士論文研究では、日本の主要海産養殖魚であるブリ、マダイならびにヒラメに加え、世界的に重要な養殖魚であるニジマスを対象動物として、養殖現場で日常行われていると考えられる各種刺激（網による空中保持（10 秒間空気に暴露）、水位低下（供試魚の背鰭が出る程度まで水位を落とす）、淡水浴（淡水に 5 分間浸漬する）または塩水浴（塩濃度 3% の塩水に 30 分間浸漬）、ホルマリン浴（ホルマリンの濃度を 200ppm となるように調製した水槽に 30 分間浸漬）および腹腔内注射（生理食塩水を 100 μ L 腹腔内に接種））を付与した後の血液性状および非特異的生体防御能ならびに感染症に対する感受性の変化について調べた。また、感染症に対する感受性が上昇したストレスに対して、ストレス緩和効果が期待されるイヌリン、ビタミン C およびビタミン E を経口投与して、その効果を調べた。

はじめに各種刺激付与後の血中グルコース濃度および各種非特異的生体防御活性（食食活性、リゾチーム活性および補体価）を測定し、刺激に対する反応を調べた。網による空中保持では、ブリおよびヒラメでは 30 分後、マダイでは 1 時間後、ニジマスでは 24 時間後に血中グルコース濃度が最も高くなり同じ刺激でも魚種によって反応が異なることが明らかとなった。水位低下のようにブリやヒラメでは応答を示さない刺激でもマダイにとっては刺激となることや、ホルマリン浴のようにブリ、マダイならびにニジマスでは高いグルコース濃度を示した刺激でもヒラメではあまり応答を示さないことなど、魚種によって刺激に対する応答が異なることが明らかとなり、血中グルコース濃度が高くなる刺激も魚種によって異なった。各種刺激を付与した際の生体防御能の変化についても、魚種および刺激によって応答が異なり、食食能が刺激の影響を最も受けやすいことが明らかとなり、その傾向はブリ

論文審査の結果の要旨

において顕著であり、全ての刺激に対して減少した。また、血中グルコース濃度の変化が最も大きかったマダイでは生体防御能の変化はほとんど認められなかったことや、塩水浴を行ったニジマスでは食食率が上昇したことなどストレスを付与しても生体防御能に悪影響を与えとは一概に総括できない結果となった。

また、各種刺激付与後に実験感染を行い、感染症に対する感受性にどの程度影響を与えるかを調べた。類結節症原因菌を感染させたブリでは淡水浴および腹腔内注射、滑走細菌に感染させたヒラメでは淡水浴およびホルマリン浴、レンサ球菌を感染させたニジマスでは全ての刺激に対して感染症に対する感受性が高まり、ストレスの影響を受けることが明らかとなった。しかし、マダイでは死亡率に有意な差異は認められず、ストレス反応は認められるが感染症に対する感受性には影響がないことが明らかとなった。また、ブリやニジマスでも血中グルコース濃度が上昇した刺激でも感受性の高まりは確認できず、反対に血中グルコース濃度が上昇しなかった刺激で感受性が高くなるといった現象も観察された。このことから、ストレスは感染症に対する感受性を高めるとは一概に言えず、原因菌の感染部位や侵入経路、感染時の宿主側の生体防御能の活性度合いおよび飼育環境など様々な要因によって左右されると考えられる。

ブリでは淡水浴、ニジマスでは塩水浴を与えた後にイヌリンの経口投与によるストレス緩和効果を調べ、マダイおよびヒラメではイヌリンを投与後に、免疫賦活効果を調べた。ブリでは、イヌリンを1週間経口投与することによって生体防御能の上昇が認められ、実験感染では淡水浴前だけでなく淡水浴後にもイヌリンを投与することで死亡率が低下し、ストレス緩和効果が認められた。このことから、イヌリンの投与は有効なストレスの対処方法であると考えられる。また、マダイ、ヒラメならびにニジマスについては、本研究においてイヌリンの投与効果は認められなかったことから、今後、投与期間や投与量の再検討や他のプレバイオティクスの投与についても検討する必要がある。

ビタミンCおよびビタミンEの投与によるストレス緩和効果は、ブリに淡水浴を行った後に検証した。ビタミンCをブリに1週間経口投与したが、生体防御能の上昇や感染症に対する感受性の低下は認められず、ストレス緩和効果を示さなかった。しかし、ビタミンEをブリに1週間経口投与すると生体防御能の上昇は認められなかったが、実験感染においてイヌリンと同様に淡水浴前後でビタミンEを投与することによって死亡率が低下し、ストレス緩和効果が認められた。

以上のことから本研究では、主要養殖魚であるブリ、マダイ、ヒラメならびにニジマスに対する各種刺激が血中グルコース濃度、生体防御能（食食活性、リゾチーム活性および補体価）および感染症に対する感受性に及ぼす影響をはじめ明らかにした。さらに、発生したストレスの対策として、イヌリン、ビタミンCおよびビタミンEを餌に混ぜて経口投与することによるストレス緩和効果を検証し、イヌリンおよびビタミンEでは実際にストレス緩和効果が認められた。淡水浴はブリ類の養殖現場では寄生虫を除去する目的で行われ有効な対策手段であり、ブリ類の養殖では今のところ必要不可欠であることから、淡水浴のストレスを緩和できたことは特に本研究の大きな研究成果であると言える。

このように本研究において得られた各種知見は、養殖魚の飼育方法の改善や感染症の予防につながり、今後、持続的な養殖業の発展に十分に貢献すると考えられる。

学位申請者の橋口健太郎氏は、2010年に本学を卒業（農学士）後、本大学の総合人間自然科学研

論文審査の結果の要旨

究科農学専攻に進学し、2012年に修士号（農学修士）を取得している。

申請者は、学会発表、発表論文数などの学位取得要件を満たしており、博士論文の内容も我が国の主要養殖魚を対象にストレスについての新規性のある事実を明らかにし、また、ストレスの対策についても具体案を提示し、今後、持続可能な養殖を実現していく為に重要な提案を行った。

本博士論文は、持続可能な養殖を実現させる為に新規性のある知見を多く含み、本委員会の委員全員が一致して博士（学術）の学位を与うるに相応しいと判断し、合格とした。