

学 位 論 文 要 旨

氏 名

田岡 洋介

題 目

実験飼育魚の成長と免疫反応に及ぼすプロバイオティクスの影響に関する研究
(Studies on Effect of Probiotics on the Growth and Immune Response of Experimental Fish)

水産増養殖における疾病予防のために使用されてきた抗生物質の代替法として注目されているプロバイオティクスの実験飼育魚に対する影響について検討した。

最初に市販プロバイオティクス製剤を用いて、閉鎖式循環システムで飼育したヒラメおよびテラピアに対する影響を調べた。ヒラメの場合、コントロール（無投与）区、経口投与区および飼育水添加区を設定した。プロバイオティクス添加区で成長促進および生残率の向上が認められ、非特異的免疫賦活効果およびストレス耐性の向上が認められた。テラピアにおいてはホルマリン死菌経口投与区も設けて飼育したところ、同様に非特異的免疫賦活効果およびストレス耐性の促進が確認された。ヒラメおよびテラピアに対する *Vibrio anguillarum* および *Edwardsiella tarda* を用いた攻撃試験では、プロバイオティクス添加区で高い生残率が確認され、また生菌投与の方が死菌投与よりも効果的である結果が得られた。

実験飼育魚に対するプロバイオティクス製剤の効果が認められたが、より効率的な利用を期待する場合、製剤に含まれる細菌株の性状をよく知って使用する必要がある。そこで、新たに魚類腸管からプロバイオティクス候補菌を分離し、プロバイオティクスとしての性状を確認して、飼育魚に与える影響について検討した。分離した 31 株について、魚病細菌に対する抗菌活性および胆汁、酸、人工胃腸液に対する耐性を試験したところ、フグ腸管内由来の PU-T8 株および乳酸菌製剤由来の ProD 株がプロバイオティクス菌株として有望であることが示唆された。細菌学的性状検査により PU-T8 株および ProD 株は、それぞれ *B. subtilis* および *L. plantarum* であると同定された。また PU-T8 株の 16S rDNA 塩基配列のホモロジー検索の結果からも *B. subtilis* と高い相同性を有していた。PU-T8 株は *E. tarda* および *Vibrio* 属魚病細菌に対して広い抗菌スペクトルを示した。また本菌株は孢子を形成し、固形飼料調製時の高温下でも高い生残率が得られた。

In vitro 試験で選択した PU-T8 株と ProD 株を用いてキンギョの飼育試験を行った。キンギョに対して PU-T8 株および ProD 株を経口投与または PU-T8 株を閉鎖式循環水槽の飼育水へ直接投与した。12 日間飼育後、*E. tarda* SU226 株を用いた攻撃試験を実施したところ、経口投与の場合に PU-T8 株および ProD 株添加区で死亡率が低下した。試験魚腸管内の *Bacillus* 属および *Lactobacillus* 属菌数は、PU-T8 添加区および ProD 株添加区でそれぞれ高い計数値が得られた。一方、*E. tarda* 菌数は両菌株添加区の方がコントロール区より有意に低い値であった。PU-T8 株を飼育水に投与した場合も同様の傾向が認められ、飼育水、試験魚腸管内およびフィルターにおいても高い *Bacillus* 属菌数が確認された。本菌株による *E. tarda* の増殖抑制、魚類腸内での生残、魚類非特異的防御反応の賦活効果および死亡率の低下が認められたことから、PU-T8 株は魚類疾病予防のための新規プロバイオティクスとして有望であると考えられる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Yousuke Taoka

題 目 Studies on Effect of Probiotics on the Growth and Immune Response of Experimental Fish (実験飼育魚の成長と免疫反応に及ぼすプロバイオティクスの影響に関する研究)

As alternative means of antibiotics used for disease prevention, the application of probiotics is expected in aquaculture. In this study, I investigated the effect of probiotics on the growth and non-specific immune response of experimental cultured fish.

Firstly, the rearing experiments with Japanese flounder and tilapia was carried out using commercial probiotics in a closed recirculating system. In the case of Japanese flounder, probiotics were given to fish by oral administration or by direct supplementation to the rearing water. In probiotics-treatment groups, the growth enhancement, improvement of survival rate, resistance to stress and stimulation of non-specific immune response of fish were confirmed. In the case of tilapia, formalin-killed probiotics showed the same effect on the stimulation of non-specific immune response and enhancement of stress resistance of fish as live probiotic cells. In pathogen challenge test with *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella tarda* to Japanese flounder and tilapia, the probiotic groups showed higher survival rate than the control group. The probiotic effect on fish was dependent on means of probiotics supplementation and viability of probiotic bacteria.

Secondly, candidate bacteria for probiotics were isolated from various sources including fish intestines and sediments, and examined on probiotic properties. Thirty-one strains isolated were characterized with antagonistic activity against fish pathogenic bacteria and resistance to bile, acid and artificial gastrointestinal juices. A strain PU-T8 isolated from the intestine of tiger puffer fish and a strain ProD isolated from a commercial probiotics product were selected as potential candidates for probiotics. Strains PU-T8 and ProD were tentatively identified as *B. subtilis* and *L. plantarum*, respectively based on physiological and biochemical characterizations. The sequence analysis of 16S rDNA region also showed that strain PU-T8 was closely related to *Bacillus subtilis*. In the mixed cultures, strain PU-T8 grew well and inhibited the growth of *V. anguillarum* strain NUF113 and *E. tarda* strain SU226. This strain formed dormant spore and showed heat resistance.

Finally, the rearing experiments of gold fish were carried out using strains PU-T8 and ProD. The two strains were orally administered to gold fish or directly supplied to the rearing water in a closed culture system with aeration. After 12 days of rearing with the diet containing one or two strains, gold fish were subjected to pathogen challenge test with *E. tarda* SU226. In the case of oral administration, fish mortality was lower in the probiotics-addition groups than the control group. Viable counts of *Bacillus* sp. and *Lactobacillus* sp. were higher and that of *E. tarda* was lower in the probiotics-addition groups as compared with those of the control group. In the case of direct supplementation of test bacteria to the rearing water, strain PU-T8 cells were detected at higher levels in the rearing water, fish intestine and filter media. From the results on growth inhibition of pathogens, survival of the strain in fish intestine, immunomodulatory effects and reduction of fish mortality, it is supported that strain PU-T8 would be potential candidate for probiotics in fish aquaculture.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	田岡 洋介
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 坂田 泰造
	副査 鹿児島 大学 教授 山本 淳
	副査 宮崎 大学 教授 酒井 正博
	副査 鹿児島 大学 教授 林 征一
	副査 宮崎 大学 助教授 林 雅弘
審査協力者	
題 目	<p>Studies on Effect of Probiotics on the Growth and Immune Response of Experimental Fish (実験飼育魚の成長と免疫反応に及ぼすプロバイオティクスの影響に関する研究)</p>
<p>近年、水産増養殖の隆盛とともに疾病の予防と治療のために多数の抗生物質や化学薬品が使用され、その結果として多剤耐性菌の出現や化学汚染が問題となっている。最近では養殖魚の疾病予防対策として健全育成や免疫力の増強を計るためにプロバイオティクスの利用が注目されている。プロバイオティクスとは動物の飼料とともに投与され、宿主動物の腸内細菌相に影響して宿主動物の健康・成長を増進する効果のある生きた微生物細胞と定義されている。本論文は、市販のプロバイオティクス製剤および新たに魚類腸内から分離したプロバイオティクス菌株を投与して飼育した実験魚に対する成長および自然免疫力への効果について検討したものである。</p> <p>最初に市販プロバイオティクス製剤（主として乳酸菌、バチルス菌、酵母）を用いて、閉鎖式循環システムで飼育したヒラメおよびテラピアに対する影響を調べた。ヒラメの場合（約 15 g）、対照区（C 区、無投与区）、経口投与区（PB 区）および飼育水添加区（WS 区）を設定して試験した。プロバイオティクス添加区（PB 区と WS 区）でヒラメの成長促進効果と生残率の向上が認められた。またプロバイオティクス添加区</p>	

において体表粘液および血清中のリゾチーム活性が対照区（C区）と比較して有意に高くなっていた。

テラピア（約110 g）を用いた試験では、プロバイオティクス製剤の生菌区、ホリマリン死菌区および飼育水添加区（WS区）を設定した。テラピアにおいても、非特異的免疫賦活効果（リゾチーム活性、血清の殺菌活性、白血球遊走能の増加）および塩分耐性の向上が認められた。またヒラメおよびテラピアに対する病原菌（*Vibrio anguillarum* および *Edwardsiella tarda*）の攻撃試験では、プロバイオティクス添加区で高い生残率が得られ、免疫力の向上が示唆された。テラピアの場合に、死菌投与よりも生菌投与の方がより効果的であることが示された。

次に、プロバイオティクス菌株の効果をより明確に解析するために、新たに魚類消化管からプロバイオティクス候補菌株を分離し、プロバイオティクスとしての性状を確認した後に飼育魚に対する効果を検討した。分離した31菌株について魚病細菌に対する抗菌活性、胆汁、酸および人工胃腸液に対する耐性を試験した結果、フグ腸管由来のPU-T8株および乳酸菌製剤由来のProD株がプロバイオティクス菌株として有望であることが示された。細菌学的性状検査によりPU-T8とProD株は、それぞれ*B. subtilis*、*L. plantarum*と同定された。PU-T8株は16S rDNA塩基配列のホモロジー検索の結果からも*B. subtilis*と高い相同性を有していた。PU-T8株は魚病細菌（*E. tarda*と*Vibrio*属菌）に対して広い抗菌スペクトルを示し、また胞子を形成するのでプロバイオティクスとしての利用に適していると考えられる。*In vitro*試験で選択されたPU-T8株とProD株を用いてキンギョ（約2.1 g）の飼育試験を実施した。12日間飼育後、*E. tarda*による攻撃試験を行った結果、PU-T8株およびProD株投与区でキンギョ腸管内の*E. tarda*菌数の減少および死亡率の低下が見られた。またPU-T8株を飼育水に添加して飼育した場合も、PU-T8菌株の腸管内での生存、*E. tarda*の腸管内での増殖抑制、魚体の免疫賦活、死亡率の低下などの効果が認められた。

以上のように、本論文で実験飼育魚に対して市販プロバイオティクス製剤および新たに分離したプロバイオティクス菌株が成長促進および免疫増強効果を有することを確認したことは、今後の水産増養殖における健全育成と疾病予防に有益な知見を提供するものとして評価される。従って、本論文は博士（水産学）の学位論文として十分な価値を持つものと判定した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	田岡 洋介	
審査委員	主査 鹿児島大学 教授	坂田 泰造
	副査 鹿児島大学 教授	山本 淳
	副査 宮崎大学 教授	酒井 正博
	副査 鹿児島大学 教授	林 征一
	副査 宮崎大学 助教授	林 雅弘
審査協力者		
実施年月日	平成 19年 1月 11日	
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）		<input checked="" type="radio"/> 口答・筆答
<p>主査および副査は、平成19年 1月11日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について諮問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（水産学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>		

学位申請者 氏名	田岡 洋介
<p>[質問 1] 最初に市販プロバイオティクス (PB) を用いてその効果を検証し、次に新たに分離した PB 菌株の効果を試験している。両者の試験の関係について説明してほしい。</p> <p>[回答 1] 最初の試験では市販 PB がどの魚種にどのような効果があるのかを検証したものである。本研究において使用した PB 製剤は 4 種の微生物の混合製剤であり、個々の菌株の具体的な効果を検証することは困難である。そこで新たに魚類消化管内から PB 菌株を分離し、個別の菌株の PB 効果を検討した。</p> <p>[質問 2] 市販製剤でも効果が得られたのであれば、市販製剤に含まれる 4 種の菌株を分離して試験することも考えられる。新たに PB 菌株を分離した意義について説明してほしい。</p> <p>[回答 2] 市販製剤に含まれている 4 種の菌株の生菌数がどの程度維持されるのか、また魚類に対して最も適した菌株であるのかが不明であったので、新規に魚類消化管から有望株を分離することにした。</p> <p>[質問 3] 市販製剤では主として免疫賦活について、分離 PB 菌株では殺菌活性について調べている。市販製剤に含まれている菌株の病原細菌に対する殺菌活性は如何か？</p> <p>[回答 3] 市販製剤には主として <i>Bacillus subtilis</i> と <i>Lactobacillus acidophilus</i> が含まれている。以前の研究で複数の乳酸菌を分離し、魚病細菌に対する抗菌活性を調べたところ、<i>E. tarda</i> や <i>Vibrio</i> 属などの病原菌に対して幅広い抗菌活性を示した。</p> <p>[質問 4] 市販製剤を投与した魚では血清リゾチーム活性が増加しており、同時に血清中の殺菌活性も上昇している。血清中の殺菌活性はリゾチーム活性によるものなのか。</p> <p>[回答 4] 血清中の殺菌活性は大腸菌を用いて測定している。リゾチームはグラム陽性菌に対して強く作用するので、殺菌活性の増加は主として血清中の補体によるものと考えられる。</p> <p>[質問 5] 分離した PB 菌株に対しては主として抗菌活性について調べている。免疫賦活作用については如何か。</p> <p>[回答 5] 分離菌株については、血清中の Nitric oxide 濃度を測定しているが免疫能に関するデータは不十分である。なお、攻撃試験において <i>E. tarda</i> 菌数の減少や生残率の向上が認められるので免疫賦活効果を有するものと判断している。</p> <p>[質問 6] 実験計画としては、まず PB 菌株を分離し、その菌株を用いて同じ魚種、同じ測定項目について比較検討することが望ましいのではないか。</p> <p>[回答 6] PB 菌株の効果を検証して行く上では指摘の通りである。今後の研究では考慮したい。</p> <p>[質問 7] NBT 還元能に変化があるようだが、使用した全血中の顆粒球数を測定開始時に</p>	

平均化したのか、NBT還元能には顆粒球数も影響するのではないか。

[回答7] 本実験では全血をそのまま使用し、顆粒球数をそろえることはしていない。結果の判定にはその点を考慮する必要がある。

[質問8] テラピアのヘモグロビン濃度について、飼育30日後の測定値は飼育開始時の2倍以上に増加している、この測定値は信頼できるのか。

[回答8] 魚類では一般的に10 g/100 ml程度の値が報告されている。飼育30日目で20~30 g/100 mlになっているので再検討したい。

[質問9] テラピアの飼育30日目の血清殺菌活性は15日目よりも全体的に低い結果が示されている。30日目の殺菌活性の精度を問う意味でも、熱処理した血清を用いた結果を示すべきではないか。

[回答9] 熱処理した血清を用いた試験も実施しているので学位論文には追加したい。

[質問10] PBというのはいろいろな要素に効果があるように思える。魚類腸管内でPBが魚体に対してどのような作用を及ぼすのか、そのメカニズムに関する考察は如何か。

[回答10] PB効果のメカニズムを解明するには、特定のPB菌株と特定の魚種を用いて具体的に検証する必要がある。例えば、特定のPB菌株が魚体にどのような作用を及ぼすかを組織および細胞レベルで追跡する必要がある。

[質問11] 免疫賦活効果としてはどのような経路を経て最終的な賦活効果を発揮するのか、例えば細胞壁の成分は賦活効果に関係しているのか。

[回答11] 賦活効果の検証としては、例えばPB菌株の細胞構成成分を分画し、その成分が免疫関連遺伝子の発現に関与しているかを分析することなどが考えられる。

[質問12] 基本的には腸内上皮から菌体成分が吸収されてPB効果につながると考えられるが、実験方法によってはPB効果の本質を解明できるのではないか。

[回答12] 腸の吸収に関しては、株化された腸内細胞を用いてPB菌株の付着能や菌体成分の吸収を調べる方法などが考えられる。

[質問13] PB菌の菌体成分に対して腸管上皮細胞には種々のToll様レセプターが存在する。投与されたPB菌が溶菌して種々の成分が露出した場合、菌体成分がレセプターと結合して細胞間の情報伝達が行われ、種々のサイトカインの合成・分泌が誘導される。魚類においては哺乳類において認識できるレセプター以外のものの存在も示唆されている。このような知見をもとに考察できるのではないか。

[回答13] 腸管上皮細胞における免疫応答に関しては文献を参照したい。