

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	任 同 軍
題 目	魚類仔稚魚期における発育、ストレス耐性および免疫応答に及ぼす飼料性ビタミン C の効果に関する研究(Effects of vitamin C on growth, survival, stress resistance and immunological response for larval and juvenile fish)
<p>ビタミン C (アスコルビン酸: AsA) は水生動物において必須の栄養素であり、魚類のストレス耐性や生体防御能の向上効果が報告されている。しかし、重要養殖対象種のマダイ仔稚魚及びウナギに関する飼料性 AsA の効果および要求量に関する報告、他の微量栄養素との交互作用に関する知見は乏しい。本研究はマダイ仔稚魚およびウナギにおける飼料性 AsA 最適添加量とその効果を栄養学及び免疫学的指標より明らかにする目的で行った。</p> <p><b>(実験 1)</b> AsA 源として AsA リン酸 Na/Ca エステル (AMP-Na/Ca) を 4 濃度 (AsA として 0, 206, 768 および 1508 mg / kg diet) となるよう添加した微粒子飼料を単体でマダイ仔魚 (ふ化後 10 日齢) に 14 日間給餌した。AsA 768 および 1508 区は AsA 0 区と比較して有意に高い生残率を示した。また、AMP-Na/Ca 添加量の増加とともに魚体のビタミン C 含量は増加し、AsA 768 および 1508 区の低塩分 (7ppt) および高水温 (飼育水温+10℃) ストレストテストにおける半数致死時間 (LT<sub>50</sub>) は AsA 0 区と比較して有意に延長された。</p> <p><b>(実験 2)</b> 3 濃度の AMP-Na/Ca (AsA として 0, 800 および 1600 mg / kg diet) それぞれに 3 濃度のリン脂質 (0, 2 および 4 %) を添加した微粒子飼料を単体でマダイ仔魚 (ふ化後 26 日齢) に 14 日間給餌した。AsA 800×PL 4% および AsA 1600×PL 4% 区は他の試験区と比較して有意に高い生残率を示した。また、低塩分 (7ppt) ストレストテストにおける AsA 1600×PL 4% 区の LT<sub>50</sub> は AsA 0×PL 0, 2 および 4 % 区と比較して有意に延長されたが、AsA 800×PL 4% 区との比較ではその差は有意ではなかった。</p> <p><b>(実験 3)</b> マダイ稚魚 (36.0 g) に対して 3 濃度の AMP-Na/Ca (AsA として 0, 40 および 400 mg / kg diet) を添加した試験飼料を 3 週間給餌した後、血漿、血清および体表粘液中の生物化学的指標を測定した。AsA 0 区は有意に高い血漿コレステロール、トリグリセリド及び血清 GOT を示した。また AsA 40 及び 400 区の血清リゾチーム活性は AsA 0 試験区より有意に高くなった。</p> <p><b>(実験 4)</b> AsA 源として AsA Ca エステルを 6 濃度 (AsA として 3, 10, 27, 126, 645 および 3135 mg / kg diet) で添加した飼料を用いてウナギ稚魚 (11.0 g) に対し 8 週間の飼育試験を行った。AsA 含量 27mg / kg 以上の試験区は有意に高い日間増重率と血清殺菌活性を示した。また、AsA 含量 645mg / kg 以上の試験区は他の試験区と比較して高い脳の AsA 蓄積量、血液性状及び血清総タンパク量を示した。従って、飼料中の最適 AsA 含量は 645 mg/kg 付近であると考えられた。</p> <p><b>(実験 5)</b> 2 濃度の AMP-Na/Ca (AsA として 32 および 762 mg / kg diet) 添加量に対してラクトフェリン (Lf) が無添加 (Lf-) および 500 mg / kg diet 添加 (Lf+) となるような試験飼料をウナギ稚魚に 3 週間与えた場合、AsA762×Lf+ 及び AsA762×Lf- 区は AsA32 区よりも有意に高い粘液および血清リゾチーム活性、粘液殺菌活性を示した。また、粘液殺菌活性におけるビタミン C とラクトフェリンの交互作用も見られた。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Tongjun Ren
題 目	Effects of vitamin C on growth, survival, stress resistance and immunological response for larval and juvenile fish (魚類仔稚魚期における発育、ストレス耐性および免疫応答に及ぼす飼料性ビタミンCの効果に関する研究)
<p>Vitamin C is essential nutrient in most aquatic animals. Role of vitamin C involving stress resistance, and non-specific defense mechanisms has been reported in a number of fish. Despite this, the information of vitamin C in marine fish larvae including red seabream and Japanese eel is still scarce. Therefore, the main purpose of the present research was to investigate the effect or optimum dietary level for red seabream larvae and Japanese eel juveniles. Furthermore, the interactions between vitamin C and other micro nutrients such as phospholipid and were also determined.</p> <p>(Study 1) In the red seabream, 10 days old larvae were fed micro bound diets (MBD) containing various AsA contents (0, 206, 768 and 1508 mg/kg diet) without any live food supply for 14 days. Survival rates of larvae that received diets containing 768 and 1508 mg AsA were significantly higher than those receiving AsA free diet. AsA contents of whole body and tolerance to low salinity (7ppt) and high temperature (ambient + 10°C) stress increased with increasing dietary AsA levels.</p> <p>(Study 2) 26 days old red seabream larvae were fed MBDs containing 3 levels of AsA (0, 800 and 1600 mg / kg diet) and PL (0, 2 and 4 %) for 14 days. The larvae fed 800 or 1600 mg / kg AsA with 4% PL diets showed highest survival rate, and similar with live-food supplement group. The larvae fed 1600 mg/kg AsA with 4% PL diet showed highest stress resistance in all diets, and no significant difference was observed with larvae fed 800 mg / kg AsA with 4% PL diet.</p> <p>(Study 3) Test diets containing 3 levels of AsA (0, 40, and 400 mg / kg diet) were fed to juvenile red sea bream for 3 weeks. Total cholesterol, triglyceride in plasma and Glutamic oxaloacetic transaminase in serum of fish fed diet AsA 0 was significantly (<math>P &lt; 0.05</math>) higher than those of fish fed diets AsA40 and 400. Lysozyme activity (LA) of serum of fish fed diets AsA40 and 400 was significantly (<math>P &lt; 0.05</math>) higher than fish fed diet AsA0.</p> <p>(Study 4) In the Japanese eel, test diets containing 6 levels of AsA (3, 10, 27, 126, 645 and 3135 mg / kg diet) were fed to juvenile Japanese eels for 8 weeks. The eels fed diets containing more than 27 mg AsA / kg showed higher specific growth rates and bactericidal activity of serum than those of the fish fed the diets containing 3 and 10 mg AsA / kg. Furthermore, the inclusion of 645mg AsA / kg or more also increased the hematocrit, hemoglobin, total serum protein value, and liver and brain vitamin C concentrations.</p> <p>(study 5) Test diets containing 32 or 762 mg AsA / kg diet, and with or without 500 mg Lf / kg diet were fed to juvenile Japanese eels for 3 weeks. The eels fed diet containing 762 mg AsA / kg showed significantly (<math>P &lt; 0.05</math>) higher LA of mucus &amp; serum, and bactericidal activity of mucus than the fish fed the diet containing 32 mg AsA / kg. Lf was a significant factor on LA of serum, and there was interaction between AsA and Lf on serum bactericidal activity.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	任 同 軍
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 越塩 俊介
	副査 鹿児島 大学 教授 田中 淑人
	副査 宮 崎 大学 教授 伊丹 利明
	副査 鹿児島 大学 教授 門脇 秀策
	副査 宮 崎 大学 教授 村田 壽
審査協力者	
題 目	Effects of Vitamin C on Growth, Survival, Stress Resistance and Immunological Responses for Larval and Juvenile Fish (魚類仔稚魚期における発育, ストレス耐性及び免疫応答に及ぼす飼料性ビタミンCの効果に関する研究)
<p>水棲動物のビタミンC要求については、水溶性で非常に壊れやすい等の理由から、多くの研究があるにもかかわらず、不明な点が多かった。しかしながら、最近の技術革新によるビタミンC誘導体の開発により、水棲動物に対するビタミンC研究が飛躍的に進歩した。しかしながら、仔稚魚期のビタミンC要求及び誘導体の効果については、誘導体を用いた研究が開始されて歴史が浅く、更なる知見の蓄積が必要である。</p> <p>このような背景から、本研究では、海産魚のモデルとしてマダイ仔稚魚を、淡水魚のモデルとしてほとんど知見が皆無であるウナギ稚魚を用いて栄養学及び免疫学的指標によりビタミンC要求を誘導体あるいは結晶型アスコルビン酸を用いて明らかにした。本研究は、5つの実験からなり、実験1、2では、マダイ仔魚を用いた発育、ストレス耐性、及びビタミンCとリン脂質との相互作用に関する検討、実験3ではマダイ稚魚の免疫活性に関する検討、実験4、5ではウナギ稚魚の成長、免疫活性及びビタミンCとラクトフェリンとの相互作用についての検討を行った。</p>	

マダイの研究から、10日齢の仔魚は多量のビタミンCを摂取する事により、良好に生残し、ビタミンCの蓄積も高くなり、さらに、低塩分や高水温ストレスに対しても高い抵抗力を示した。また、仔魚に対するビタミンCとリン脂質の影響は、生残率、低塩分に対する抵抗性を指標にすると、高ビタミンC・リン脂質(800 ppm以上、4%)の飼料中への添加において最も優れていた。マダイ稚魚に置いては、ビタミンCの摂取により、血漿コレステロール値、血漿トリグリセリド値、血清GOT値が下がる事が判明した。更に、ビタミンCを飼料中に40あるいは400 ppm添加した飼料を摂取した稚魚は、血清リゾチームの活性が高まった。

一方、ウナギにおいては、結晶型のビタミンCを用いた場合、約30 ppm以上を飼料へ添加することで成長や殺菌活性が改善された。添加量をさらに増加する事によって、脳や肝臓へのビタミンCの蓄積が上昇した。免疫増強作用があるラクトフェリンとビタミンCとの併用投与を行うと高ビタミン、高ラクトフェリン投与群において、高い粘液産生能、高い血清リゾチーム活性、高い粘液殺菌活性を示し、その相乗効果が現れた。

以上のように、本論文で得られた成果は、魚類仔稚魚期における発育、成長、免疫反応に関するビタミンCについての新たな基礎的知見を与えるばかりでなく、仔稚魚期における配合飼料の開発に貢献するという実用的な面からも価値が高いと判断される。さらに、研究成果は世界的な魚類の増養殖の発展に寄与すると思われ、審査委員会は本研究論文が学位論文として十分な内容であると判断した。

## 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	任 同軍				
審査委員	主査	鹿児島大学	教授	越塩 俊介	
	副査	鹿児島大学	教授	田中 淑人	
	副査	宮崎大学	教授	伊丹 利明	
	副査	鹿児島大学	教授	門脇 秀策	
	副査	宮崎大学	教授	村田 壽	
審査協力者					
実施年月日	平成18年12月25日				
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）				<input checked="" type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査の5名は、平成18年12月25日（月曜日）、学位申請者本人に対して学位論文の内容について説明を求めるとともに、その内容及び関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者として十分な学力並びに識見を有するものと認め、博士（水産学）の学位を与えるに足る十分な資格を持つものと判定した。</p>					

学位申請者 氏名	任 同 軍
<p>[質問 1] 免疫反応の向上におけるビタミン C 要求量は正常な成長を与える要求量に対して 10 倍程高いようだが、現実の飼料へビタミン C を添加する際にはどちらのビタミン C 添加量が適しているのか。</p> <p>[回答 1] 養殖魚の健康を維持するという点から高濃度の添加が良い。</p> <p>[質問 2] 天然ウナギの臓器におけるビタミン C 蓄積量に関する報告はあるか。また、天然ウナギの主なビタミン C 源は何か。</p> <p>[回答 2] 天然ウナギのビタミン C 蓄積量に関する報告はない。また、ウナギは肉食性のため、自然界では食物連鎖によりビタミン C を摂取すると考えられる。</p> <p>[質問 3] 最適添加量を定める時には水温といった環境要因と体重を最適化してやる必要があるのではないか。また、給餌頻度は実際の養殖現場で行なわれているものと同様か。</p> <p>[回答 3] マダイにおいては実際の生産水温と同じ水温で試験を実施した。また、ウナギ養殖現場においてその水温は通年 30 度程に加温されている。したがって本実験でも同様の水温に設定した。また、給餌試験に先立って最適な給餌頻度を求めておいた。</p> <p>[質問 4] 淡水産仔魚と海産仔魚ではアスコルビン酸の代謝は異なるのか。</p> <p>[回答 4] 淡水魚は一般的に卵黄栄養期が長いため、異なることが予想される。</p> <p>[質問 5] APM を利用する利点とは何か。</p> <p>[回答 5] ペレット状飼料では作製工程でのアスコルビン酸の損失を防ぐことが可能である。ウナギ用飼料のように作製工程において熱、圧力にさらされない形態の飼料では、経済性を考慮してアスコルビン酸のカルシウム塩がビタミン C 源として適当であろう。</p> <p>[質問 6] APM とカルシウム塩のビタミン C としての機能に違いはあるのか。</p> <p>[回答 6] カルシウム塩は APM と比較して溶出しやすい性質を持つが、機能性に違いはない。</p> <p>[質問 7] アスコルビン酸を大量に添加することにメリットはあるのか。</p> <p>[回答 7] 養殖された魚が健全であるという点で、消費者に良い印象を与えることができる。</p> <p>[質問 8] 生物餌料（ワムシ）はアスコルビン酸を産生できるのか。また、産生できないとすれば、ワムシのアスコルビン酸は何に由来しているのか。</p> <p>[回答 8] 本研究で用いたワムシに含まれるアスコルビン酸は栄養強化剤由来である。</p>	