

学 位 論 文 要 旨

氏 名

ビン タン グエン

題 目

クルマエビの成熟と産卵に対するゴカイ抽出物, ビタミン C 及びビタミン E の効果
(Polychaete extracts, vitamins C and E on reproductive performance of kuruma shrimp,
Marsupenaeus japonicus Bate)

本研究は, クルマエビの成熟と産卵に対する海産ゴカイ抽出物, ビタミン C 及びビタミン E の効果を明らかにするために実施した。まず, ゴカイ抽出物のクルマエビの催熟, 産卵, 成長, ストレス耐性及び免疫応答に対する効果を明らかにするために 3 つの飼育実験を行った。ゴカイ中性脂質 (NLF) 添加量を変えた 4 種類の試験飼料 (NLF0%, 0.2%, 0.4% 及び 0.8%) を眼柄処理した雌エビに給餌し実験池で 15 日間飼育した。飼育試験の結果, NLF 添加区は無添加区に比べて高い最大卵影比を示した。また, 0.4% 及び 0.8% 添加区は 0% 及び 0.2% に比べて高い催熟効果を示し, クルマエビの卵巣成熟には飼料中 NLF0.4% 添加が最適であることを明らかにした。次に NLF とゴカイ TCA 可溶画分 (TSF) をそれぞれ 0.5% 添加した試験飼料を用いて, クルマエビ雌エビの催熟と産卵に対する効果を調べた。対照として活ゴカイ給餌区と無給餌区を設けた。無給餌区では卵影比の減少が観察され, 産卵はみられなかった。試験飼料区では, 活ゴカイ区とほぼ同等の成熟と産卵が確認され, 孵化率と雌エビ 1 尾当たりの産卵数は活ゴカイ区より有意に高い値を示した。卵巣, 卵及び幼生の脂肪酸分析の結果, 試験飼料区は活ゴカイ区に比べ 20:4n-6 量は低かったものの DHA 含量は高い値を示し, 飼料により供給された DHA が胚発生や孵化率に影響したものと示唆された。また, 稚エビに対するゴカイ抽出物の効果を明らかにするために, ゴカイ抽出物 (NLF, 極性脂質, TSF) をそれぞれ 0.5% 添加した試験飼料を用いて飼育試験を行った。対照としてエビの成長の改善効果が報告されている大豆レシチン極性脂質添加区 (SPL) と無添加区を設けた。60 日間の飼育試験の結果, 成長とストレス耐性はゴカイ TSF 区と SPL 区が有意に高い値を示し, TSF に成長改善効果があることが明らかとなった。また, ゴカイ抽出物添加区及び SPL 区は, 無添加区に比べ総ヘモサイト数及びプロフェノールオキシダーゼ活性が有意に高く, ゴカイ抽出物に免疫応答を向上する効果があることを示した。

次にクルマエビの成熟産卵に対するビタミン C とビタミン E の効果を明らかにするために 3x3 要因配置実験を行った。指標として, 雌エビの催熟, 産卵, ふ化幼生生残率, 組織ビタミン含量, 体化学成分組成及び脂質含量を用いた。実験池に収容した平均体重 50g の雌エビにアスコルビン酸含量 (0, 500 及び 1000 mg/kg 飼料) と α -トコフェロール含量 (0, 300 及び 600 mg/kg 飼料) の異なる 9 種類の試験飼料を給餌し 2 カ月間飼育した。飼育試験の結果, ビタミン C とビタミン E のいずれも産卵数に関しては有意な因子ではないことが示された。Hepatosomatic index は, ビタミン C と E の添加量が増えるにつれて上昇したが, ビタミン C と E に交互作用は確認できなかった。幼生ふ化率, ゾエアへの変態率, 卵と組織のビタミン C 及び E 含量, 組織水分含量及び脂質含量に関して, ビタミン C と E は有意な要因であり交互作用が確認された。

本研究により, クルマエビ雌エビではゴカイ抽出物が催熟及び産卵に効果を示すこと, 稚エビでは成長, ストレス耐性及び免疫応答に効果を示すことが明らかにされた。また, 催熟飼料への飼料性ビタミン C, E 及び HUFA の添加は, 産卵率とふ化幼生の質の向上に有効であることが明らかとなった。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Binh Thanh Nguyen
題 目	Polychaete extracts, vitamins C and E on reproductive performance of kuruma shrimp, <i>Marsupenaeus japonicus</i> Bate (クルマエビの成熟と産卵に対するゴカイ抽出物, ビタミンC及びビタミンEの効果)

The present study was conducted to investigate the effects of marine polychaete extracts, vitamins C and E on reproductive performance of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*.

In the first part, a series of 3 experiments was setup to examine the effects of marine polychaete extracts on reproductive and growth performances, stress tolerance, immune response parameters of *M. japonicus*. In experiment 1, four neutral lipid fraction (NLF) levels (0, 0.2%, 0.4% and 0.8%) incorporated with a basal diet (BD), were given to unilaterally ablated pond-reared females *M. japonicus* for a 15-day period. Maximum ovary shadow ratio (OSR) of NLF unsupplemented group was significantly lower than that of supplemented groups. 0.4% and 0.8% NLF groups showed significantly higher maturation response (MR) than 0 and 0.2% NLF groups. 0.4% NLF inclusion is the minimal efficient level for inducing *M. japonicus* gonad development. In experiment 2, a combination (CPF) of NLF and TCA-soluble fraction (TSF) was tested as supplements (each 0.5% DW) to BD with comparison to the feeding of live polychaetes (LPC) and non-feeding (NF). NF group showed only regressed trend of ovary development without spawning. Female fed CPF showed similar MR, spawning rate, significantly higher hatching rate and the number of nauplii per spawn than LPC group. (n-3) HUFA, particularly 22:6n-3, were lower in LPC group than that in CPF group while 20:4n-6 levels were opposites. Higher dietary 22:6n-3 was possible reason for better embryo-development and egg hatchability in CPF group. In experiment 3, 5 diets including a basal diet (BD), BD supplemented (0.5% of DW) with 3 polychaete extracts (NLF, polar lipid fraction (PLF) and TSF) and soybean lecithin polar lipid (SPL) were given to juvenile *M. japonicus* for 60 days. Growth and stress tolerance were significantly improved by TSF and SPL. Polychaete extracts and SPL significantly enhanced total hemocyte counts and prophenoloxidase activities.

In second part, a 3×3 factorial feeding trial was conducted to investigate effects and interactions of vitamin C (VC) and vitamin E (VE) on reproductive performance, larval quality, tissue vitamin concentrations, body composition, tissue and egg lipid contents of *M. japonicus*. Pond-reared females of 50 g mean body weight were fed 9 diets containing 3 grade levels of VC (0, 500 and 1000 mg ascorbic acid equivalent kg⁻¹ diet) and VE (0, 300 and 600 mg α-tocopherol kg⁻¹ diet) for 2 months. The results showed that neither dietary VC nor VE was a significant factor on fecundity. Hepatosomatic index increased with the elevation of both dietary VC and VE supplementations but without significant interaction. Significant effects and interactions between VC and VE were detected for hatchability, metamorphosis rates of nauplii into zoea I, tissue and egg VC and VE contents, moisture and lipid contents. Hatchability and metamorphosis rates increased, moisture reduced and lipids increased with dietary VC and VE supplementations.

The present study demonstrated that polychaete extracts incorporated in formulated diets enhanced reproductive and growth performance, resistance to stress and immune response in kuruma shrimp. Supplementations of HUFA, VC and VE in maturation feeds for female *M. japonicus* are recommended to obtain higher egg hatchability and better quality larvae.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	ビン タン グエン
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 大富 潤
	副査 鹿児島 大学 教授 杉元 康志
	副査 琉球 大学 教授 和田 浩二
	副査 鹿児島 大学 准教授 石川 学
審査協力者	
題 目	Polychaete extracts, vitamins C and E on reproductive performance of kuruma shrimp, <i>Marsupenaeus japonicus</i> Bate (クルマエビの成熟と産卵に対するゴカイ抽出物, ビタミン C 及びビタミン E の効果)
<p>日本における重要な養殖対象種であるクルマエビは、雌エビから採卵し孵化した幼生を市場サイズまで育成して出荷している。採卵に使用する雌エビは、天然の成熟雌エビや養殖池で育成した雌エビが用いられるが、天然産エビは漁獲量が安定せず、また、ウイルス等を保有している可能性があることから、人工飼育下で育成した雌エビの安定供給が望まれている。しかし、成熟可能なサイズのエビはイソゴカイ等の生餌を好み、配合飼料のみでは成熟が遅いため、クルマエビの催熟に適した配合飼料の開発が急務である。本研究は、クルマエビ催熟用配合飼料の開発を目的として、クルマエビの成熟と産卵に対する海産ゴカイ抽出物、ビタミン C 及びビタミン E の効果を明らかにするために行った。まず、ゴカイ抽出物のクルマエビの催熟、産卵、成長、ストレス耐性及び免疫応答に対する効果を明らかにするために 3 つの飼育実験を行っている。ゴカイ中性脂質 (NLF) 添加量を変えた 4 種類の試験飼料 (NLF0%, 0.2%, 0.4% 及び 0.8%) を眼柄処理した雌エビに給餌し実験池で 15 日間飼育し、NLF 添加区は無添加区に比べて高い催熟 (最大卵影比) を示すことを明らかにした。また、その最適添加量は、飼料中 NLF0.4% 添加が最適であることを明らかにしている。</p>	

次に NLF とゴカイ TCA 可溶画分 (TSF) をそれぞれ 0.5% 添加した試験飼料を用いて、対照として活ゴカイ給餌区と無給餌区を設け、クルマエビ雌エビの催熟と産卵に対する効果を調べている。その結果、無給餌区では卵影比の減少が観察され、産卵はみられず、試験飼料区では、活ゴカイ区とほぼ同等の成熟と産卵が確認され、孵化率と雌エビ 1 尾当たりの産卵数は活ゴカイ区より有意に高くなることを明らかにした。また、卵巣、卵及び幼生の脂肪酸分析の結果、試験飼料区は活ゴカイ区に比べ 20:4n-6 量は低かったものの DHA 含量は高い値を示し、飼料により供給された DHA が胚発生や孵化率に影響したものと示唆している。さらに育成用配合飼料素材としてのゴカイ抽出物の利用性についても検討し、ゴカイ抽出物 (NLF, 極性脂質, TSF) をそれぞれ 0.5% 添加した試験飼料を用いて、稚エビに対するゴカイ抽出物の効果を明らかにするための飼育試験を行っている。対照には、エビの成長の改善効果が報告されている大豆レシチン極性脂質添加区 (SPL) と無添加区を設け比較し、60 日間の飼育試験の結果、成長とストレス耐性はゴカイ TSF 区と SPL 区が有意に高い値を示し、TSF に成長改善効果があることが明らかにしている。また、ゴカイ抽出物添加区及び SPL 区は、無添加区に比べ総ヘモサイト数及びプロフェノールオキシダーゼ活性が有意に高く、ゴカイ抽出物に免疫応答を向上する効果があることも示唆している。

次にクルマエビの成熟産卵に対するビタミン C とビタミン E の効果を明らかにするために 3x3 要因配置実験を行っている。指標には、雌エビの催熟、産卵、ふ化幼生残率、組織ビタミン含量、体化学成分組成及び脂質含量を用い、実験池に収容した平均体重 50g の雌エビにアスコルビン酸含量 (0, 500 及び 1000 mg/kg 飼料) と α -トコフェロール含量 (0, 300 及び 600 mg/kg 飼料) の異なる 9 種類の試験飼料を給餌し 2 カ月間の飼育を行っている。飼育試験の結果、ビタミン C とビタミン E のいずれも産卵数に関しては有意な因子ではないものの、Hepatosomatic index は、ビタミン C と E の添加量が増えるにつれて上昇することを明らかにしている。また、幼生ふ化率、ゾエアへの変態率、卵と組織のビタミン C 及び E 含量、水分含量及び脂質含量に関して、ビタミン C と E は有意な要因であり交互作用を示すことを確認している。

本研究は、クルマエビ雌エビではゴカイ抽出物が催熟及び産卵に効果を示すこと、また、催熟飼料への飼料性ビタミン C, E 及び HUFA の添加は、産卵率とふ化幼生の質の向上に有効であることが明らかにしており、この結果は、クルマエビ催熟用配合飼料の開発に大いに寄与するものである。以上の理由から、本論文は博士(水産学)の学位論文として価値を十分満たしていると考えられる。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	ビン タン グエン
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 大富 潤
	副査 鹿児島 大学 教授 杉元 康志
	副査 琉球 大学 教授 和田 浩二
	副査 鹿児島 大学 准教授 石川 学
審査協力者	
実施年月日	平成24年 1月 20日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成24年1月20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、関連事項について試問を行った。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 ビン タン グエン 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

ビン タン グエン

[質問1] Fecundityは、どのように測定し算出したのか。

[回答1] 1尾当たりの初回産卵数を測定し、試験区ごとの平均を算出した。

[質問2] 雌エビの体重は測定したか。

[回答2] 甲殻長、体長、体重は試験開始時と試験中に測定した。

[質問3] Fecundityは、雌エビの大きさに影響されるので、異なる体重のエビで算出した場合、有意差が出ることがある。Relative Fecundityを使うべきである。また、初回産卵のみの測定の場合はBatch Fecundityとしたほうがよい。

[回答3] ご指摘の通り、Relative Fecundityを算出し、論文中の記述をBatch Fecundityに修正する。

[質問4] ビタミンCとEが孵化幼生に及ぼす影響はあるのか。

[回答4] 今回は、ゾエア期以降の飼育はしていないため明らかでない。

[質問5] 本研究で使用したゴカイの学名及び和名は何か。また、天然採取されたものか、養殖であるか。養殖の場合、どのような飼料を用いて飼育したのか。

[回答5] 今回使用したゴカイは、*Perinereis nuntia*、イソゴカイである。高知産の養殖イソゴカイを使用した。飼育に用いた飼料は不明である。ゴカイの飼料は、ゴカイの脂肪酸組成に影響を与えられられるので、確認できた情報については論文に追加したい。

[質問6] イソゴカイ中性脂質がクルマエビの成熟に効果を示しているが、中性脂質中のステロイドホルモンによるものか。

[回答6] 本研究では、ステロイドホルモンの同定と定量は行っていない。*Penaeus monodon*でも催熟効果が報告されており、同じように抽出したイカ抽出物ではホルモン用物質が確認されていることからホルモンが影響していると考えられる。

[質問7] TCA可溶性物質にはどのようなものが含まれているか。また、分離後のTCAの除去はどのようにしたのか。

[回答7] 過去の研究では、TCA可溶画分には遊離アミノ酸、ペプチド、核酸関連物質や有機酸などが含まれていると考えられる。TCAはエーテル可溶なので、TCA不溶画分を分離後、上澄みをジエチルエーテルで洗浄し除去した。

[質問8] 催熟飼料におけるゴカイ抽出物、ビタミンC及びビタミンEの効果はどうか。

[回答8] ゴカイ抽出物は親エビの成熟、産卵に影響した。ビタミンC及びEは、必須栄養素として飼料に添加する必要があるが、産卵数、卵質や孵化率を向上させる効果があると思われる。

[質問9] 水溶性のビタミンCと脂溶性のビタミンEがどのように影響し合っているのか。

[回答9] ビタミンEは、水相と接触する細胞膜表面に多く存在し脂質の酸化を防いでいると考えられる。酸化脂質と接触したビタミンEはビタミンEラジカルになるがビタミンCは、ビタミンEラジカルをビタミンEに還元する作用を有する。

学位申請者
氏名

ビン タン グエン

[質問10] フェノールオキシダーゼを測定した理由は何か。

[回答10] フェノールオキシダーゼは、甲殻類や昆虫の重要な生体防御機構の指標の一つであるので、免疫応答の指標として測定した。

[質問11] クルマエビにはポリサッカライド投与は効果があるのか。

[回答11] 本研究では調べていないが、過去の研究例では成長や免疫応答の向上が報告されている。

[質問12] Part1で用いた試験飼料のビタミンE及びC含量は、Part2より高いが催熟効果は低い。ビタミンEとCの過剰投与は、成熟を阻害すると考えられるか。

[回答12] Part1で催熟が低い理由は、親エビの活性など別な因子も影響していると考えられるが、過剰投与が成熟を妨げる可能性はあると考える。

[質問13] ふ化幼生の稚エビまでの生残率はどの程度か。今回は測定したか。

[回答13] 今回は、ふ化後ノープリウスがゾエアに変態した時点で終了し、ゾエア期以降については測定していない。今後、産卵後の幼生の健苗性については検討する必要がある。