

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	レックス・フェルディナンド・トライファルガー
題 目	エビ類におけるフコイダンの生物学および免疫学的研究 (Studies on the biological and immunological effects of fucoidan in penaeid shrimp)
<p>近年、エビ類養殖での疾病の多発により、疾病の予防を目的とした免疫賦活成分の同定に注目が集まっている。褐藻由来の硫酸多糖の一種であるフコイタンは、哺乳類や脊椎動物では免疫賦活効果が報告されており、増養殖での利用が望まれている。しかし、海産動物におけるフコイダンの生理活性に関する研究は少なく、エビ類に関しては特に研究例が少ない。</p> <p>本研究では、経済的に重要な養殖種であるエビ類におけるフコイダンの飼料性免疫賦活剤としての効果を検討した。</p> <p>まず、2章では <i>Undaria pinnatifida</i> 由来フコイダンの長期給餌（8週間）がクルマエビに有効であり、500mg/kg 飼料の添加により、成長と免疫活性が向上することを明らかにした。次にフコイタン中の有効成分を明らかにするために、フコイタンを分画し、それぞれの画分についてクルマエビ稚エビに対する効果を検討した。その結果、各画分及び粗精製フコイダンのいずれも、クルマエビ稚エビの免疫活性、成長及び低塩分ストレス耐性を改善することがわかった。また、クルマエビ幼生においても同様の結果が得られた。ゾエア期では、500mg/kg 添加飼料の給餌により、成長、生残及びゾエア期の <i>Vibrio harveyi</i> 感染に対する抵抗性を向上させることが明らかになった。また、ミシス期の 100mg/kg 添加飼料の給餌によって、生残とポストラバ幼生の体長および飢餓耐性が改善されることがわかった。</p> <p>現在、健康と免疫におけるビタミンなどの微量栄養素の役割が認識されるようになった。5章でクルマエビ稚エビの成長と免疫におけるフコイタンとビタミンCの相互作用を確認した。本実験の結果、フコイタンがエビの成長を改善されるためにはビタミンCが必要であることがわかった。特に高ビタミンC添加（1000-2000mg/kg）により、フコイダンの免疫活性及び成長に及ぼす効果が、有意に高くなることが示された。</p> <p>6章では、東南アジアでの養殖の重要種であるウシエビ幼生に対するフコイダンの効果を検討した。飼料中 500-2000mg/kg のフコイタン添加により、ウシエビ幼生の成長が有意に改善され、発光細菌病の原因菌である病原性 <i>V. harveyi</i> 感染に対する抵抗性も高めることがわかった。</p> <p>養殖種の疾病に対する抵抗性および成長の向上は、増養殖で強く望まれており、本研究で得られた <i>U. pinnatifida</i> 由来フコイタンに関する知見は、成長、免疫活性及びストレス耐性の高いエビ類養殖に応用できるものと期待される。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Rex Ferdinand Traifalgar
題 目	Studies on the biological and immunological effects of fucoidan in penaeid shrimp (エビ類におけるフコイダンの生物学的および免疫学的研究)
<p>Due to disease outbreaks in shrimp aquaculture, identification of immune stimulatory compounds for immunoprophylactic means of disease control has received widespread attention. Fucoidan, a sulphated polysaccharide from brown algae has been documented as a potent immune stimulatory agent in mammalian vertebrates and has the potential for aquaculture use, but the biological activity of this compound on marine animals specifically on shrimp has not been fully evaluated. Thus, the present investigations were conducted to evaluate the potential of fucoidan as a dietary immunostimulant for economically important penaeid shrimp.</p> <p>The study (chapter 2) indicated that long-term (8-weeks) dietary supplementation of <i>Undaria pinnatifida</i> fucoidan is beneficial for juvenile <i>P. japonicus</i>. An optimum dose of 500mg fucoidan/kg diet was identified and supplementation resulted to improved growth performance and enhanced immunological responses. In an effort to identify active components of <i>U. pinnatifida</i> fucoidan (chapter 3), the fucoidan was fractionated into component polysaccharides and biological effects on juvenile <i>P. japonicus</i> were evaluated. All purified fractions including the crude preparation were found equally effective in improving shrimp immune responses, growth performance and salinity stress tolerance. Also, dietary fucoidan supplementation was found beneficial for <i>P. japonicus</i> larvae (chapter 4). Dietary supplementation at 500 mg/kg enhanced metamorphosis survival and increased resistance of zoea against <i>Vibrio harveyi</i> infection. A supplementation dose of 100 mg/kg for mysis improved metamorphosis survival and produced bigger postlarvae with higher tolerance to starvation stress.</p> <p>Currently, the vital role of micronutrients (vitamins) in improving health and immunity has been recognized. In this study (chapter 5) synergistic effects of vitamin C and fucoidan supplementation were observed to influence growth and immune responses of juvenile <i>P. japonicus</i>. The study suggests that growth promoting effects of fucoidan requires vitamin C. Immunological enhancement and growth promoting effects of fucoidan is significantly augmented at higher doses of vitamin C supplementation (1000-2000 mg/kg). Biological effects of fucoidan on postlarval <i>P. monodon</i> were also evaluated (chapter 6). The study showed that dietary administration of fucoidan at a dose of 500-2000 mg/kg significantly improved the biological growth performance of this shrimp. Laboratory infection challenge test indicated that dietary administration of fucoidan at 500-2000 mg/kg to postlarvae can confer protection against the pathogenic <i>Vibrio harveyi</i> a causative agent of luminous bacterial disease in shrimp culture.</p> <p>Disease resistance and growth promotion is highly desired in aquaculture. The collective results of this study suggest that dietary supplementation of <i>U. pinnatifida</i> fucoidan at adequate dosage as presented in this study could enhance growth, immunological response and stress tolerance of shrimp.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	レックス・フェルディナンド・トライファルガー
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 坂田 泰造
	副査 鹿児島 大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島 大学 教授 門脇 秀策
	副査 鹿児島 大学 准教授 侯 徳興
審査協力者	
題 目	Studies on the biological and immunological effects of fucoidan in penaeid shrimp (エビ類におけるフコイダンの生物学的および免疫学的研究)
<p>近年、エビ類養殖での疾病の多発により、疾病の予防を目的とした免疫賦活成分の利用に注目が集まっている。褐藻由来の硫酸多糖類の一種であるフコイタンは、哺乳類や脊椎動物では免疫賦活効果が報告されており、水産動物の増養殖での利用が望まれている。しかし、海産動物におけるフコイダンの生理活性に関する研究は少なく、エビ類に関しては特に研究例が少ない。</p> <p>本研究では、経済的に重要な養殖種であるエビ類におけるフコイダンの飼料性免疫賦活剤としての効果を検討している。</p> <p>まず、2 章では <i>Undaria pinnatifida</i> 由来フコイダンの長期給餌（8 週間）がクルマエビに有効であり、500mg/kg 飼料の添加により、成長と免疫活性が向上することを明らかにした。次に粗精製フコイタン中の有効成分を明らかにするために、粗精製フコイタンを分画し、それぞれの画分についてクルマエビ稚エビに対する効果を検討した。その結果、各画分及び粗精製フコイダンのいずれも、クルマエビ稚エビの免疫活性、成長及び低塩分ストレス耐性を改善することがわかった。また、クルマエビ幼生においても同様の結果が得られている。</p>	

ゾエア期では、500mg/kg 添加飼料の給餌により、成長、生残及びゾエア期の *Vibrio harveyi* 感染に対する抵抗性を向上させることが明らかにした。また、ミシス期では100mg/kg 添加飼料の給餌によって、幼生の生残とポストラバ幼生の体長および飢餓耐性が改善されることが明らかにしている。

現在、水産動物においても健康と免疫におけるビタミンなどの微量栄養素の役割が認識されるようになったが、5章ではクルマエビ稚エビの成長と免疫におけるフコイダンとビタミンCの相互作用を確認している。飼育実験の結果、フコイダンがエビの成長を改善するためにはビタミンCが必要であること、特に高ビタミンC添加(1000-2000mg/kg)により、フコイダンの免疫活性及び成長に及ぼす効果が、有意に高くなることが示している。

6章では、東南アジアでの養殖の重要種であるウシエビ幼生に対するフコイダンの効果を検討している。飼料中500-2000mg/kgのフコイダン添加により、ウシエビ幼生の成長が有意に改善され、発光細菌病の原因菌である病原性 *V. harveyi* 感染に対する抵抗性も高めることがわかった。

養殖種の疾病に対する抵抗性および成長の向上は、増養殖の分野で強く望まれており、本研究で得られた *U. pinnatifida* 由来フコイダンに関する知見は、成長、免疫活性及びストレス耐性の高いエビ類養殖に応用できるものと期待される。

本研究は、天然物由来の成分を用いて疾病の予防を行い健全な種苗を生産するという水産動物の種苗生産技術の改善に有益な知見を提示している。

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	レックス・フェルディナンド・トライファルガー
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 坂田 泰造
	副査 鹿児島 大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島 大学 教授 門脇 秀策
	副査 鹿児島 大学 准教授 侯 徳興
審査協力者	
実施年月日	平成21年 1月 19日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） <span style="float: right;">(口答)・筆答</span>	
<p>主査及び副査は、平成21年1月19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レックス・フェルディナンド・トライファルガーが博士（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

レックス・フェルディナンド・トライファルガー

〔質問1〕本研究で使用したフコイダンの分子量は測定したか。

〔回答1〕メカブフコイダンの物理性状に関する研究は多くなされているため、今回は分子量は測定していない。これまでの研究例では、9,000から23,000kDと報告されている。

〔質問2〕フコイタンはどのようにクルマエビの免疫反応を活性化させるのか。飼料性フコイタンは血リンパ中に取り込まれるのか。

〔回答2〕フコイタンがクルマエビ血リンパ中に取り込まれるのかどうかは、血液中のフコイタン検出法が確立していないため明らかではない。しかし、これまでフコイタン分解酵素は細菌でしか発見されていないこと、クルマエビは飼料性多糖類を利用する能力が低いことから、血リンパ中にはフコイタンは取り込まれていないと推測される。

フコイタンによるクルマエビの免疫反応の活性化は、フコイタンが消化管内壁に存在する免疫細胞に結合し細胞を活性化することによって生じると考えられる。

〔質問3〕クルマエビのゾエア期の食性は急速に変化し、ゾエア2期は大量斃死が起こりやすい。それぞれの成育ステージについてフコイダンの効果を調べるべきではないか。

〔回答3〕クルマエビは短期間で成育し、その栄養評価が難しいため、ゾエア・ミシス期およびミシス・ポストラバ期に分けて評価を行った。両者ともフコイタン添加により生残率の改善が見られたが、至適添加量に違いが見られたので、成育ステージにより効果が異なる可能性が考えられる。

〔質問4〕クルマエビに対するフコイタン画分の効果を検討しているが、これら画分の構成成分が影響していると考えているのか。

〔回答4〕各画分の分子量については検討していないが、フコースと硫酸基量には違いが見られた。哺乳類では、硫酸基含量が脂質代謝や殺菌活性に影響すると報告されているが、いずれもin-vitroもしくは皮下注射によるもので、経口投与した例はない。今回の研究では、画分のフコースまたは硫酸基量とクルマエビの成長及び免疫反応に関連性はみられなかった。このことから、すべてのフコイタン画分はクルマエビの免疫反応を活性化する効果があり、消化管の免疫細胞に結合して、自然免疫を活性化していると考えられる。

〔質問5〕フコイタンはどのようにエビの免疫反応を活性化させるのか。

〔回答5〕一般にエビはパターン認識タンパク質で異物を認識する。パターン認識タンパク質は微生物由来多糖類を認識することができる。エビの免疫反応に関連するTollレセプターも多糖類を認識するため、フコイタンはこのタンパクに結合して免疫を活性化させるのではないかと考えられる。

〔質問6〕エビの免疫機構におけるフェノールオキシダーゼ（PO）活性の役割は何か。

〔回答6〕POは、メラニン生成過程にかかわる酵素で、エビの生体防御の主要なものである。この酵素はジ及びモノフェノールからキノンを生成し、最終的にメラニンとなる。中間反応物とメラニンは病原体に対し、毒性を示す。

〔質問7〕殺菌活性とPO活性の向上は、総ヘモサイト数の増加と関連していると考えられるか。

〔回答7〕エビのヘモサイトは、免疫反応に重要な細胞の一つであり、POや殺菌物質の代謝及び貯蔵に関係していると報告されていることから、総ヘモサイト数の増加が殺菌活性とPO活性の増加に影響していると考えられる。