

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	ハロルド・モドック・モンテクラロ
題 目	ザリガニ小触角の感覚特性と農薬への暴露の影響 (Sensory properties of crayfish antennules and their disruption by pesticide exposure)
<p>アメリカザリガニ <i>Procambarus clarkii</i> の小触角による化学的および機械的刺激に対する受容能力および反応行動と、有機リン系農薬であるダイアジノンがこれらの感覚能力に及ぼす影響を明らかにした。研究は、ザリガニの化学的、機械的受容細胞の分布する小触角の形態、機能に関する知見の集積を第一に行い、その後に農薬への暴露の影響について調べた。</p> <p>解剖学的な研究により、少なくとも 11 種の剛毛 (感覚毛) を同定した。化学受容細胞は小触角外肢にのみ確認され、小触角全体に分布する全剛毛の約 9%、外肢に分布する剛毛の約 25% を占めた。対比して、procumbent plumose 型、medium simple 型の機械受容を行う 2 種類の剛毛は小触角内肢・外肢ともに分布し、それぞれ全体の 67% と 16% を占め、アメリカザリガニ小触角に分布する剛毛の多くが機械受容細胞であることを明らかにした。</p> <p>電気生理学的に行った小触角内肢と外肢の水の正弦振動刺激に対する神経活動の記録からは、内肢・外肢ともに 5-200Hz の刺激に対して応答を示した。最少閾値は 50 Hz の振動刺激に対して得られ、内肢と外肢が受容できる水の振動速度閾値はそれぞれ、$38 \pm 6.2 \mu\text{m/s r.m.s}$ と $35 \pm 6.7 \mu\text{m/s r.m.s}$ であり両者で大差はなかった。小触角の振動数応答特性は魚類の側線器のそれと類似し、甲殻類と魚類とで異なる感覚器であるものの機能的な類似性を持つことが示唆された。</p> <p>行動学的な研究からは小触角機械感覚の感覚情報処理における重要性が示された。ザリガニは、小触角により水の流れの方向を認識するとともに、餌の認識と位置の認識を行うために 2 つの手段により化学刺激の受容を行うと考えられた。化学受容細胞を備える外肢は水中で頻繁に振動させ、水中の化学物質との遭遇機会を増加させるものと考えられた。また、小触角を下方に向けたときには顎脚の挙動によって口部側からの水流を発生させ、同様に小触角の感覚細胞に積極的に刺激を与えるものと考えられた。感覚細胞の分布特性および行動学的な観察結果から、小触角外肢は嗅覚器として主要な役割を果たし、内肢は機械受容器として機能することを推測した。</p> <p>行動学的研究により、ダイアジノンに暴露したザリガニは、化学刺激、機械刺激の認識能力が低下することを明らかにした。60 $\mu\text{g diazinon/L}$ に 5 日間暴露した個体は餌の匂いによる認識を行うまでの時間が有意に増加し、かつ索餌を成功させる割合も低下する傾向を示した。これらのダイアジノンへの暴露による餌の認識時間や索餌成功割合に及ぼす影響は、農薬を含まない水への暴露により 1 日以内に回復することも明らかとした。</p> <p>電気生理学的研究による、小触角のダイアジノンへの短期暴露 (10min-2h) の影響を調べた結果からは、0.5 mg diazinon/L および 1.0 mg diazinon/L への暴露により、機械刺激受容能力に有意な低下が生じることが明らかにした。小触角外肢は内肢と比較してより強い影響を受けることが示され、外肢に分布する化学受容細胞が刺激伝搬媒質である水を吸水するためと考えられた。ダイアジノンによる感覚能力の低下は索餌、交尾、生残等に強い影響を及ぼすことが推測された。</p> <p>本研究は、甲殻類の小触角の化学・機械感覚に関する基礎知見を得るとともに、農薬 (ダイアジノン) が甲殻類に及ぼす生理学的、行動学的影響について明らかにした。従来、半数致死濃度等が各種の汚染物質に対して調べられるが、本研究で実施した、神経生理学的あるいは行動学的なバイオアッセイ手法はその濃度以下での影響を定量的に評価する手法として有効であると考えられた。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Harold Modoc Monteclaro
題 目	Sensory properties of crayfish antennules and their disruption by pesticide exposure (ザリガニ小触角の感覚特性と農薬への暴露の影響)
<p>The ability of red swamp crayfish <i>Procambarus clarkii</i> to receive, evaluate and respond to chemical and mechanical signals using the antennules and the effect of the organophosphate pesticide diazinon on this ability were investigated. Using morphological procedures, at least eleven setal types in the antennules were identified. Chemoreceptors or aesthetascs comprised about 9% of the total setae in the antennules. In contrast, two mechanoreceptive setae – the procumbent plumose and medium simple setae – comprised about 67% and 16% of the total number of setae, respectively. These results revealed the dominance of mechanoreceptors in the crayfish antennules. Consequently, the mechanosensitivity of the lateral and the medial flagellum were examined through sinusoidal hydrodynamic stimulation. Receptor neurons in both flagella responded to the stimulus that ranged from 5 to 200 Hz. At 50 Hz, the lowest threshold to water particle velocity was 35 ± 6.7 and 38 ± 6.2 $\mu\text{m/s}$ r.m.s. for the lateral and medial flagellum, respectively. Results showed similarities with the threshold response of carp lateral line, thus raising the probability of the antennules as a lateral line analog in crustaceans. Based on behavioral studies, these mechanosensitive neurons play an important role in the crayfish antennular sensory process. <i>P. clarkii</i> employed two sniffing strategies that made use of both chemical and hydrodynamic signals to detect and localize odorant sources. These strategies included flicking of the lateral flagellum and the fanning of the antennules by maxillipeds when both flagella were lowered towards the mouth part. Thus, we suggest that although both lateral and medial flagella are capable of detecting chemical and hydrodynamic cues, the lateral flagellum primarily functions as an olfactory organ while the medial flagellum complements by acting as a detector of water velocity and direction.</p> <p>Diazinon disrupted crayfish's ability to detect chemical and mechanical signals. Crayfish exposed to 60 μg diazinon/L for 5 days took a significantly longer time to detect chemical stimuli. Also, the number of individuals that managed to locate the source of the stimulus was also reduced. However, affected crayfish appeared to have rapidly recovered their chemosensory ability. A day after the exposed individuals were transferred into diazinon-free water, detection time of exposed and control crayfish were not significantly different. Moreover, electrophysiological procedures showed that a 2-h exposure of the lateral and the medial flagellum to 0.5 and 1.0 mg diazinon/L, respectively, could result to a reduction in mechanosensitivity. The lateral flagellum appeared to be more susceptible to diazinon's action presumably because of the faster uptake of the chemical into the transduction system via the chemoreceptive setae. These disruptions have potential impacts on the ability of crayfish to detect important signals that influence foraging, mating, and survival.</p> <p>Results of this dissertation show the importance of chemical and mechanical signals among crustaceans and the effect of diazinon exposure on the reception of these signals. We showed that diazinon concentrations that are lower than the lethal concentrations (LC50) can cause serious impacts on the organism. Such bioassays should be necessary tools in assessing the impacts of pollution to aquatic organisms.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	Harold Modoc Monteclaro
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 松岡 達郎
	副査 鹿児島 大学 教授 小山 次朗
	副査 鹿児島 大学 准教授 安楽 和彦
	副査 鹿児島 大学 教授 中西 良孝
	副査 鹿児島 大学 准教授 宇野 誠一
審査協力者	
題 目	ザリガニ小触角の感覚特性と農薬への暴露の影響 (Sensory properties of crayfish antennules and their disruption by pesticide exposure)
<p>アメリカザリガニ <i>Procambarus clarkii</i> の小触角による化学的および機械的刺激に対する受容能力および反応行動と、有機リン系農薬であるダイアジノンがこれらの感覚能力に及ぼす影響を明らかにした。研究は、ザリガニの化学的、機械的受容細胞の分布する小触角の形態、機能に関する知見の集積を第一に行い、その後に農薬への暴露の影響について調べた。</p> <p>解剖学的な研究により、少なくとも 11 種の剛毛（感覚毛）を同定した。化学受容細胞は小触角外肢にのみ確認され、小触角全体に分布する全剛毛の約 9%、外肢に分布する剛毛の約 25%を占めた。対比して、procumbent plumose 型、medium simple 型の機械受容を行う 2 種類の剛毛は小触角内肢・外肢ともに分布し、それぞれ全体の 67%と 16%を占め、アメリカザリガニ小触角に分布する剛毛の多くが機械受容細胞であることを明らかにした。</p> <p>電気生理学的に行った小触角内肢と外肢の水の正弦振動刺激に対する神経活動の記録からは、内肢・外肢ともに 5-200Hz の刺激に対して応答を示した。最少閾値は 50 Hz の振動刺激に対して得られ、内肢と外肢が受容できる水の振動速度閾値はそれぞれ、38 ± 6.2</p>	

$\mu\text{m/s r.m.s}$ と $35 \pm 6.7 \mu\text{m/s r.m.s}$ であり両者で大差はなかった。小触角の振動数応答特性は魚類の側線器のそれと類似し、甲殻類と魚類とで異なる感覚器であるものの機能的な類似性を持つことが示唆された。

行動学的な研究からは小触角機械感覚の感覚情報処理における重要性が示された。ザリガニは、小触角により水の流れの方向を認識するとともに、餌の認識と位置の認識を行うために 2 つの手段により化学刺激の受容を行うと考えられた。化学受容細胞を備える外肢は水中で頻繁に振動させ、水中の化学物質との遭遇機会を増加させるものと考えられた。また、小触角を下方に向けたときには顎脚の挙動によって口部側からの水流を発生させ、同様に小触角の感覚細胞に積極的に刺激を与えるものと考えられた。感覚細胞の分布特性および行動学的な観察結果から、小触角外肢は嗅覚器として主要な役割を果たし、内肢は機械受容器として機能することを推測した。

行動学的研究により、ダイアジノンに暴露したザリガニは、化学刺激、機械刺激の認識能力が低下することを明らかにした。60 $\mu\text{g diazinon/L}$ に 5 日間暴露した個体は餌の匂いによる認識を行うまでの時間が有意に増加し、かつ索餌を成功させる割合も低下する傾向を示した。これらのダイアジノンへの暴露による餌の認識時間や索餌成功割合に及ぼす影響は、農薬を含まない水への暴露により 1 日以内に回復することも明らかとした。

電気生理学的研究による、小触角のダイアジノンへの短期暴露 (10min-2h) の影響を調べた結果からは、0.5 mg diazinon/L および 1.0 mg diazinon/L への暴露により、機械刺激受容能力に有意な低下が生じることを明らかにした。小触角外肢は内肢と比較してより強い影響を受けることが示され、外肢に分布する化学受容細胞が刺激伝搬媒質である水を吸水するためと考えられた。ダイアジノンによる感覚能力の低下は索餌、交尾、生残等に強い影響を及ぼすことが推測された。

本研究は、甲殻類の小触角の化学・機械感覚に関する基礎知見を得るとともに、農薬 (ダイアジノン) が甲殻類に及ぼす生理学的、行動学的影響について明らかにした。従来、半数致死濃度等が各種の汚染物質に対して調べられるが、本研究で実施した、神経生理学的あるいは行動学的なバイオアッセイ手法はその濃度以下での影響を定量的に評価する手法として有効であると考えられた。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Harold Modoc Monteclaro
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 松岡 達郎
	副査 鹿児島 大学 教授 小山 次朗
	副査 鹿児島 大学 准教授 安楽 和彦
	副査 鹿児島 大学 教授 中西 良孝
	副査 鹿児島 大学 准教授 宇野 誠一
審査協力者	
実施年月日	平成23年1月12日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) □答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成23年1月12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	Harold Modoc Monteclaro
[質問 1] 行動実験に使用した化学刺激の濃度は全ての実験において一定であったと言えるか？	[回答 1] 行動実験には市販のペレットを一定量計量し、実験個体を収容した水槽の水に溶解したので、使用した化学物質の量としては一定であったと言える。試薬は各日の実験前に準備した。
[質問 2] ダイアジノンが実験個体の視覚に影響を及ぼした可能性は考えられないか？	[回答 2] ダイアジノンに暴露した個体においても人影等に敏感に反応したのでその可能性は考えていない。さらに実験では視覚の影響を除去するために個体の眼を目隠しして行った。
[質問 3] ダイアジノンが個体に作用する機序をどのようにとらえているか？	[回答 3] ダイアジノンへの暴露により機械受容器と化学受容器に構造的な破壊が生じることはなかった。実験結果から、機械受容器と比較して化学受容器はより低濃度で影響を受けたことが明らかであった。色素を用いた観察からは、化学受容器には外界の水が浸透しやすい特徴を持つことも認められた。そのために化学受容器の細胞はより農業に直接的に暴露されたと考えている。これらの理由により、本研究で認められた化学・機械感覚の抑制は神経伝達経路に生じたものと考えている。
[質問 4] 本研究で行った行動実験手法は他の化学物質に対しても応用可能か？界面活性剤などは各地の水域において検出される汚染物質としてあげられる。	[回答 4] 応用可能であり、従来、農業が生物に及ぼす影響は体内の酵素活性への作用などが研究されてきているが、生物の生態に及ぼす影響を知るためには本実験で行ったような行動実験を取り組むことも必要と考えている。界面活性剤は感覚毛や体表の粘膜に影響を及ぼすことが知られている。
[質問 5] ザリガニが小触角を利用して臭い源を認識する過程はどのようなものか？	[回答 5] 過去の研究から、触角は左右に一对あり、両者で受容する刺激の濃度差を検出し臭いの方角を検出するとされている。また、水流に対しても触角が魚類の側線のように応じることが明らかとされたので、化学刺激のみでなく、機械刺激も利用すると考えている。
[質問 6] ダイアジノン暴露個体が臭い源に直線的に移動する確率が低下した理由は？	[回答 6] ダイアジノン暴露個体は非暴露個体と比較して化学刺激受容後の動きが活発であり、水槽内で様々な方向へ移動した結果、直接的な臭い源への接近確立が低下した。
[質問 7] 小触角上に同定された11種類のレセプターは種類によって分布域が異なるがその意味は何か？	[回答 7] 例えばProcumbent Plumose型のレセプターは触角基部に多く分布し触角の動きをとらえるように分布し、自己受容の役割を果たすと考えられる。一方、化学受容細胞であるAesthetasc型のレセプターは触角先端部に分布する。ザリガニが触角を振る際にはその先端部が大きく動き、水中の化学物質の受容器への取り込みを促進しているものと考えられ、各種のレセプターの分布はそれぞれの機能に合理的に配置されていると思われる。
[質問 8] イセエビなどと比較してザリガニの化学受容細胞の数は少ないが、ザリガニの化学刺激に対する依存度は低いと考えられるのか？	[回答 8] 研究結果からはザリガニはより流体力学的な刺激に対する依存が高いと考えられる。

化学刺激への依存度については言及できないが既往の報告から考えて化学刺激を索餌や個体間のコミュニケーションなどに利用していることは明らかである。

[質問 9] 小触角の内側肢と外側肢では機能に差がありそうだが、化学受容細胞を持たない内側肢の役割は何と言えるか？

[回答 9] 外側肢にも機械受容器は備えるがその分布位置から見て、例えば、小触角を下げ口部からの水流刺激に直接曝される位置に分布はしていない。そのような場合では内側肢の機械受容器が水流感覚として機能しているものと考えている。

[質問 10] 研究結果からみてLC₅₀以下の濃度への暴露が生じた際にどのような影響が生じると考えられているか？

[回答 10] 既往の報告でザリガニにおける化学物質を介した行動については知見が得られており、それを考慮すると、索餌、雌雄間のコミュニケーション、生殖行動に影響を及ぼすものと考えられる。

[質問 11] 自然界において今回明らかにしたダイアジノン濃度は検出されるのか？

[回答 11] 先進国においては無いと考える。開発途上国においては基準レベルの設置が行われていない地域もある。ダイアジノンの環境中での濃度に関する報告には本実験で得た感覚に作用を及ぼす濃度以上が検出された地域もある。

[質問 12] 本実験で感覚に影響を及ぼす閾値が検出できるのか？また、本研究で求めた閾値とは、NOEC（最大無影響濃度）とLOEC（最少影響濃度）では？

[回答 12] 本実験では閾値は行動もしくは神経活動に有意な低下が生じた濃度と定め、閾値濃度として表現した。ご指摘の通り本実験で明らかにした濃度はNOECおよびLOECであり、表現を改める。

[質問 13] 小触角を振る際の速度に変化は生じないのか？

[回答 13] 速度に変化は生じない。触角の運動には概ね一定な速度がダイアジノンへの暴露後も認められた。触角を振ることは触角表面に展開される境界層をはく離することにより、新たな水塊にレセプターを暴露することで臭いの受容を促進する。