

学位論文要旨	
氏名	ハー タン トウン
題目	クルマエビの成長と免疫応答に及ぼすラクトバチルス加熱処理死菌体の効果 (Study on effects of heat-killed <i>Lactobacillus plantarum</i> on response in growth and defense system of Kuruma shrimp <i>Marsupenaeus japonicus</i> )
<p>本研究は <i>Lactobacillus plantarum</i> 加熱処理死菌体(HK-LP)が、クルマエビの成長、環境ストレス耐性、免疫応答およびリン・窒素排泄とクルマエビ飼育水及び糞中の細菌相に及ぼす影響を明らかにするために5つの飼育実験を行った。</p> <p>まず、クルマエビ幼生における HK-LP の効果を調べるために、HK-LP を 20%含有する製剤 (HK-LP Prep) の添加量を変えた 5 種類の微粒子飼料 (0, 0.001, 0.01, 0.1 及び 1 g/kg 飼料) をゾエア 1 期の幼生に給餌し、ポストラーバ 1 期 (PL1) までの 8 日間飼育した。0.1 及び 1 g/kg の HK-LP Prep の添加により、成長と環境ストレス耐性には差がみられなかったものの生残率は有意に改善された。次に PL 期における HK-LP の成長、環境ストレス耐性およびプロテアーゼ活性に及ぼす影響を調べた。幼生期と同じ 5 種類の微粒子飼料を 30 日間給餌した結果、1 g/kg 区において、成長とストレス耐性の改善が見られたが、プロテアーゼ活性には違いはみられなかった。また、給餌頻度による影響を明らかにするために、5 種類の飼料をそれぞれ給餌する 5 区、0.1 g/kg 添加飼料または 1 g/kg 添加飼料と無添加飼料を 1 日ごと交互に給餌する 2 区、0.1 g/kg 飼料または 1 g/kg 飼料を 4 日ごとに給餌し、その他の期間は無添加飼料を給餌する 2 区の計 9 区を設け、30 日間の飼育試験を行った。1 g/kg 飼料連続給餌区が最も高い成長、生残およびストレス耐性を示した。次に稚エビの成長、環境ストレス耐性、リン・窒素排泄および飼育水と糞中の細菌数における効果を明らかにするために、HK-LP 添加量の異なる 5 種類の配合飼料を給餌し 60 日間の飼育試験を行った。HK-LP 添加量は幼生期と同様とした。0.1 g/kg 飼料および 1 g/kg 飼料区の成長及びストレス耐性が高い値を示したが、その他の項目については違いがみられなかった。</p> <p>しかし、低塩分ストレス後の免疫活性は他の区に比べ高い値を示していた。最後に免疫賦活物質としての効果が期待される <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> を用いて稚エビにおける効果を <i>Lb. plantarum</i> と比較した。<i>Lb. plantarum</i> または <i>Lc. Lactis</i> を <math>10^7</math>cfu/kg, <math>10^{10}</math>cfu/kg 添加した生菌体飼料 4 種類と HK-LP 添加飼料 2 種類 (1, 2 g/kg), <i>Lc. lactis</i> 加熱処理死菌体(HK-LL)添加飼料 1 種類 (1g/kg) 及び無添加飼料の計 8 種類の飼料を用いて、30 日間飼育した。いずれの添加区も無添加区に比べ、成長、生残、ストレス耐性および免疫応答を示し、特にストレス負荷後も無添加区と比較して高い免疫活性を示していた。また、生菌体添加区ではプロテアーゼ活性に影響が見られた。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

Ha Thanh Tung

題 目

STUDY ON EFFECTS OF HEAT-KILLED *Lactobacillus plantarum* ON RESPONSE IN GROWTH AND DEFENSE SYSTEM OF KURUMA SHRIMP *Marsupenaeus japonicus*  
(クルマエビの成長と免疫応答に及ぼすラクトバチルス加熱処理死菌体の効果)

This research work was conducted to determine the effect of heat-killed *Lactobacillus plantarum* (HK-LP) on the growth performance and stress resistance, immune response, excretion of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* and the microbial community in rearing water and feces. To approach this, there are three studies consist of five experiments was conducted.

Firstly, the potentials of HK-LP for larviculture use were evaluated using larvae kuruma shrimp. Five dietary levels of a preparation containing 20% HK-LP (HK-LP Prep) (0 as control diet, 0.001; 0.01; 0.1 and 1 g/kg diet) were incorporated in microbound diet (MBD) and fed to five replicate groups of the zoea<sub>1</sub> stage larvae to postlarvae 1 stage for 8 days. The supplementation of HK-LP Prep at 0.1 and 1 g/kg diets improved survival but no effect on growth performances and stress resistance of larvae.

In second study, the same MBD in study 1 were used and 2 feeding trials were conducted for 30 days to investigate the effects of levels and feeding frequency HK-LP supplemental diets on growth performance, stress resistance of post-larval kuruma shrimp. In the first feeding trial, post-larvae shrimp were fed test diets in triplicate groups. Growth performance, stress resistance and protease were determined after feeding trial. The results suggested that 1 g/kg diet can be used to enhance growth, survival and stress resistance in post-larval kuruma shrimp, but no effect on protease activity. In second feeding trial, the post-larvae 15 stage were fed five test diets in a completely randomized design with 9 treatments for 1 month. For the treatment 1, 2, 3, 4 and 5, the shrimp was fed diet 1, 2, 3, 4 and 5 respectively, two times daily. The treatment 6, a day fed diet 4, alternated a day fed diet 1. The treatment 7, a day fed diet 5, alternated a day fed diet 1. The treatment 8, a day fed diet 4, alternated with 3 days fed diet 1. The treatment 9, a day fed diet 5, alternated with 3 days fed diet 1. The 2-day protocol of treatment 6 and 7, 4-day protocol of treatment 8 and 9 were repeated throughout the experimental period. The similar results with experiment 1 were found, the post-larvae received 1 g/kg diets everyday showed significantly higher survival, growth performance and stress resistance than those of control group.

In study 3, two experiments were conducted to investigate the effects of HK-LP supplemental diets on growth performances; stress resistance; immune response; phosphorus and nitrate excretion of juvenile shrimp and microbial community in rearing water and feces of shrimp. In the first feeding trial, five dietary levels of a preparation containing 20% HK-LP (HK-LP Prep) (0 as control diet, 0.001; 0.01; 0.1 and 1 g/kg diet) were incorporated in pellet and fed to juvenile shrimp for 60 days. The results indicated that, HK-LP Prep at 0.1 and 1 g/kg diet enhanced growth and stress resistance, but not affect on survival, feed intake, phosphorus and nitrate excretion, and bacteria count in both rearing water and feces. Besides that, those shrimp groups remained better immune response after the low salinity shock. For second experiment, the effects of HK-LP on kuruma shrimp juvenile were compared with live *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* and heat-killed *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* in term of growth performances, immune response and protease activity when the shrimp fed on diets containing heat-killed *L. plantarum* at 1 and 2 g/kg; heat-killed *L. lactis* subsp. *lactis* at 1 g/kg; *L. plantarum* at  $10^7$  and  $10^{10}$  cfu/kg and *L. lactis* subsp. *lactis* at  $10^7$  and  $10^{10}$  cfu/kg for 30 days. The results showed that HK-LP and other bacteria were similar effects on shrimp such as enhance of growth performances, stress resistance, immune response and better remain immune response ability under stress condition. However, the effects depend on feeding time and only live bacteria affected on protease activity.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	ハー・タン・トゥン
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 山本 淳
	副査 宮崎大学 教授 伊丹 利明
	副査 鹿児島大学 教授 田中 淑人
	副査 鹿児島大学 教授 藤井 信
審査協力者	
題目	Study on effects of heat-killed <i>Lactobacillus plantarum</i> on response in growth and defense system of Kuruma shrimp <i>Marsupenaeus japonicus</i> (クルマエビの成長と免疫応答に及ぼすラクトバチルス加熱処理死菌体の効果)
<p>本研究では、<i>Lactobacillus plantarum</i> 加熱処理死菌体(HK-LP)が、クルマエビの成長、環境ストレス耐性、免疫応答およびリン・窒素排泄とクルマエビ飼育水及び糞中の細菌相に及ぼす影響を明らかにするために5つの飼育実験を行っている。</p> <p>まず、クルマエビ幼生におけるHK-LPの効果を調べるために、HK-LPを20%含有する製剤(HK-LP Prep)の添加量を変えた5種類の微粒子飼料(0, 0.001, 0.01, 0.1及び1 g/kg 飼料)をゾエア1期の幼生に給餌し、ポストラバ1期(PL1)までの8日間飼育した。0.1及び1 g/kgのHK-LP Prepの添加により、成長と環境ストレス耐性には差がみられなかったものの生残率は有意に改善されることを明らかにした。次にPL期におけるHK-LPの成長、環境ストレス耐性およびプロテアーゼ活性に及ぼす影響を調べている。幼生期と同じ5種類の微粒子飼料を30日間給餌した結果、プロテアーゼ活性には違いはみられなかったものの、1 g/kg区において、成長とストレス耐性を改善することを明らかにしている。</p>	

また、HK-LP の推奨給餌頻度を明らかにするために、5種類の飼料を毎日それぞれ給餌する区（5区）、0.1 g/kg 添加飼料または 1 g/kg 添加飼料と無添加飼料を 1 日おきに交互に給餌する区（2区）、0.1 g/kg 飼料または 1 g/kg 飼料を 4 日おきに給餌し、その他の期間は無添加飼料を給餌する区（2区）の合計 9 区を設け、30 日間の飼育試験を行ない、1 g/kg 飼料を連続給餌することにより、最も高い成長、生残とストレス耐性が得られることを示している。

次に稚エビの成長、環境ストレス耐性、リン・窒素排泄および飼育水と糞中の細菌数における効果を明らかにするために、HK-LP 添加量の異なる 5 種類の配合飼料を給餌し 60 日間の飼育試験を行ない、稚エビでも 0.1 g/kg 飼料および 1 g/kg 飼料区の成長及びストレス耐性が高い値を示すことを明らかにした。さらに、低塩分ストレス後の免疫活性を調べ、0.1 g/kg 添加および 1 g/kg 添加区が、他の区に比べ高い値を示すことを発見し、HK-LP がストレス負荷後の免疫活性も向上させることを示した。

最後に免疫賦活物質としての効果が期待される *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* を用いて稚エビにおける効果を *Lb. plantarum* と比較している。*Lb. plantarum* または *Lc. lactis* を  $10^7$ cfu/kg、 $10^{10}$ cfu/kg 添加した生菌体飼料 4 種類と HK-LP 添加飼料 2 種類（1, 2 g/kg）、*Lc. lactis* 加熱処理死菌体(HK-LL)添加飼料 1 種類（1g/kg）及び無添加飼料の計 8 種類の飼料を用いて、30 日間飼育し、いずれの添加区も無添加区に比べ、高い成長、生残、ストレス耐性および免疫応答を示すこと、特にストレス負荷後も無添加区と比較して高い免疫活性を示すことを明らかにしている。

本研究は、これまで飼育池への散布による投与が主であった甲殻類のプロバイオティクの経口投与に関する重要な知見を提示し、甲殻類の健苗育成の発展に大きく寄与するものと期待できる。

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	ハー・タン・トゥン
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 山本 淳
	副査 宮 崎 大学 教授 伊丹 利明
	副査 鹿児島 大学 教授 田中 淑人
	副査 鹿児島 大学 教授 藤井 信
審査協力者	
実施年月日	平成21年 1月 29日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
(口答)・筆答	
<p>主査及び副査は、平成21年1月29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ハー・タン・トゥンが博士（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	ハー・タン・トゥン
<p>[質問1] <i>Lactobacillus plantarum</i>加熱死菌体 (HK-LP) を摂取したエビの免疫活性は、摂取後どの程度継続すると考えられるか。</p> <p>[回答1] 免疫活性反応は、飼育試験終了後すぐに測定しているため、効果がどの程度継続するかは明らかでない。</p> <p>[質問2] HK-LPは、継続的に給餌すべきか。</p> <p>[回答2] ポストラーバ期のエビを用いて給餌頻度を調べる実験を行ったが、HK-LP1g/kg添加飼料を継続給餌する区が最も効果があった。そのため、成長及び免疫活性を維持するためには継続的に給餌すべきと考える。</p> <p>[質問3] HK-LPを添加した場合の飼料のコストは。</p> <p>[回答3] 飼料素材のコストは重要な問題であり、HK-LPのメーカーも価格を下げようと努力している。現在、HK-LPは、200USD/kgで、本研究で得られた至適添加量1g/kg飼料では飼料価格が上昇することはないと考えられる。</p> <p>[質問4] なぜ、Protease活性を測定したのか。肝すい臓の活性を測定しているが、肝すい臓の酵素はエビ由来でありHK-LPの影響をみるためには消化管の活性を測定すべきではないか。</p> <p>[回答4] プロバイオティックスの添加により、Protease活性とタンパク消化吸収率が向上するという報告があり、今回も同様の結果が見られた。いくつかの研究例で活性を測定しているが、部位に関する記述がない。また、そのメカニズムも不明である。</p> <p>[質問5] エビの成長と免疫活性の関連はどう説明するか。</p> <p>[回答5] HK-LPはエビの免疫活性やストレス耐性を向上するため、環境ストレスにより消費されるエネルギーが少なくなり成長に使われるのではないかと考えられる。</p> <p>[質問6] 死菌体中の<math>\beta</math>-グルカンがエネルギー源として利用されるのか。</p> <p>[回答6] エビが<math>\beta</math>-グルカンを吸収して利用できるという報告が1件のみあるが、現在のところ不明である。</p> <p>[質問7] 環境ストレス下でも、総ヘモサイト数が多いと免疫活性を高いといえるのか。</p> <p>[回答7] 通常的环境では、ヘモサイト数が多いと免疫活性も高いと考えられる。ストレス下では、ヘモサイトは継続的に脱顆粒するため、生成されるヘモサイト数より消費数が多い場合は、総ヘモサイト数は減少する。しかし、顆粒球も免疫活性をもつためヘモサイト数の減少数が多いほど、免疫活性は高いと考えられる。</p> <p>[質問8] Protease活性と成長の関連性に関する知見はあるか。</p> <p>[回答8] 本研究では、生菌体を摂取したエビは成長も向上していた。同様に免疫活性も向上していたため、Protease活性と免疫活性のどちらが成長に影響していたかどうかは明らかでない。</p>	