

学 位 論 文 要 旨

氏 名 横山 佐一郎

題 目 水棲動物におけるラクトフェリンの栄養と代謝
(Nutrition and Metabolism of Lactoferrin on Aquatic Animals)

ラクトフェリン (LF) はほ乳類に特異的な糖タンパク質で、ガン細胞の増殖抑制や鎮痛効果による心理的ストレスの軽減等の効果を持つことが知られている。また、飼料性 LF は魚類のストレス耐性を向上すると報告されているが、海産有用種の細胞性ストレス反応におよぼす LF の効果に関する知見はない。本研究では、飼料中 LF の定量法を確立し、海産有用種における飼料性 LF の効果を、成長、ストレスへの抵抗性および細胞性ストレス反応である熱ショックタンパク質 (HSP70s) 存在量の比較によって明らかにした。

ヒラメ (11.8 g) に対して、牛 LF を 0, 400, 1000 および 2000 mg / kg 飼料の濃度で添加した 4 種類の試験飼料を平均水温 26.7°C の下、30 日間給餌した後、致死的高水温 (34.0°C) に対する半数致死時間 (LT₅₀) および、24 時間の非致死的高水温 (31.0°C) 曝露に対する肝臓および皮膚の HSP70s 量を測定した。1000 mg LF 添加飼料区の LT₅₀ および皮膚の HSP70s 量は LF 無添加飼料区と比較して有意に延長もしくは増加し、400 および 1000 mg LF 添加飼料区は LF 無添加飼料区と比較して、有意に高い肝臓 HSP70s 量を示した。したがって、飼料性 LF はヒラメの高水温ストレス耐性を、肝臓および皮膚の HSP70s の増加を伴って向上すると考えられ、その効果的な添加量は 1000 mg / kg 飼料付近であると推察された。

ハタ (3.0 g) に対して、牛 LF を 0, 400, 800 および 1200 mg / kg 飼料の濃度で添加した 4 種類の試験飼料を 30 日間給餌した。給餌後のハタについて成長指標、体表粘液分泌量を測定すると共に、1 時間の空気露出に対する回復率、6 時間の低塩分 (3.5 ppt) 海水曝露に対する鰓弓中 HSP70s 量を測定した。LF 添加による成長の改善は認められなかったが、体表粘液分泌量は全ての LF 添加飼料区で有意に増加した。空気露出に対する回復率は LF 添加量の増加に伴い上昇する傾向にあり、1200 mg LF 添加区の回復率は有意に改善された。鰓弓中 HSP70s 量は LF 添加量の増加に伴い高くなる傾向を示し、800 および 1200 mg LF 添加区は LF 無添加飼料区に対して有意に高い HSP70s 量を示した。これらの結果から、飼料性 LF はハタの生体防御能およびストレス耐性向上に効果的であり、その効果的な添加量は 800 ~ 1000 mg / kg 飼料付近であると推察された。

その他、飼料性 LF はオニテナガエビの成長改善効果および塩分ストレス耐性向上、ブリの神経性ストレス反応の抑制効果を示した。また、飼料性 LF は魚類腸管内でその抗原性を高く保ったまま、移動することが明らかとなった。

本研究により、飼料性 LF の養魚飼料への使用は魚介類の健全性を高め、安全な養殖の遂行に寄与するものと考えられる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 YOKOYAMA SAICHIRO

題 目 Nutrition and Metabolism of Lactoferrin on Aquatic Animals
(水棲動物におけるラクトフェリンの栄養と代謝)

Lactoferrin (LF) is a glycoprotein originated from mammals secretion. In mammals, LF plays a role in biological functions such as tumor suppression and psychological stress reduction. Dietary LF also enhances nonspecific defense mechanism and tolerance to stress in fish. However, no research of its effect on tolerance to stress and cellular stress event in marine important species. The aim of this study is to investigate effect of dietary LF on growth, tolerance to stress and response in heat shock protein 70 family (HSP70s), which is known as typical cellular stress event, in Japanese flounder and orange spotted grouper.

Test diets containing four levels (0, 400, 1000 and 2000 mg LF / kg diet) of bovine LF (97.0% purity) were prepared, and fed to Japanese flounder (11.8 g) for 30 days at 26.7°C. After 30 day-feeding trial, median lethal time (LT_{50}) after being exposed to 34.0°C (lethal stress test) and the levels of HSP70s in liver and skin after being exposed to 31.0°C (sub-lethal stress test) were measured. Significantly higher level of HSP70s was measured in skin collected from the fish fed the diet with 1000 mg LF supplemented group. The fish fed the diet with 1000 mg LF supplemented group showed significantly longer LT_{50} compared to that of 0 mg LF group. In the sub-lethal stress test, the fish fed 400 and 1000 mg LF supplemented diets showed significantly higher levels of liver HSP70s compared to that of 0 mg LF group. The fish fed the diet with 1000 mg LF supplemented group showed significantly higher level of skin HSP70s compared to that of 0 mg LF group. These results suggested that dietary LF supplementation enhances cellular stress event and contributes tolerance to high temperature stress in Japanese flounder.

In the grouper juvenile (3.0 g), test diets containing four levels (0, 400, 800 and 1200 mg LF / kg diet) of bovine LF were prepared, and 30-day feeding trial was conducted. At the termination of feeding trial, amounts of secreted mucus on body surface were measured. The fish were exposed to the air for 60 min to examine the recovery from respiratory distress condition. Furthermore, fish were exposed to low salinity (3.5 ppt) sea water for 0 and 6h. After low salinity exposure, levels of branchial HSP70s were measured. Dietary LF did not affect growth parameters of grouper. Recovery rate from air exposure increased with increase dietary LF supplemented level. Significantly higher levels of branchial HSP70s were measured from the fish fed the diet with 800 and 1200 mg LF supplemented groups in both 0 and 6 h exposure. These results demonstrated dietary LF enhances tolerance to air exposure stress and low salinity stress together with increasing the level of branchial HSP70s in orange spotted grouper juvenile.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	横山佐一郎
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 手島 新一
	副査 宮崎大学 教授 村田 壽
	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
審査協力者	
題目	水棲動物におけるラクトフェリンの栄養と代謝 (Nutrition and Metabolism of Lactoferrin on Aquatic Animals)
<p>ラクトフェリン (LF) は、哺乳類体内に存在する特異的な糖タンパク質で、ガン細胞の増殖抑制あるいは鎮痛効果による心理的ストレスの軽減などいくつかの有効性が示されている。また、水棲動物においては、ストレス耐性の向上や疾病に対する抵抗性が改善されたとの報告が若干あるものの、代謝経路や至適摂取量などに関する基礎的知見が不十分なため、その機能についての詳細な検討が成されていない。本博士論文は、LFのより正確な定量法の確立を試み、数種水棲動物の飼育実験を行うことにより、成長、生残、ストレスに対する抵抗性、細胞性ストレス反応 (熱ショックタンパク質) 発現量等を指標として、餌料性LFの機能と効果を解明した研究である。</p> <p>本博士論文は、主に6実験からなり、LF定量法の確立、ヒラメの成長、生残、高温ストレスに対するLFの効果、チャイロマルハタの成長、生残、空气中露出および低塩分ストレスに対するLFの効果、トラフグにおける餌料性LFの消化管内挙動、オニテナガエビの成長、生残、高塩分ストレスに対するLFの効果、ブリの成長、生残、神経性ストレスに対するLFの効果について検討している。</p>	

LFの定量法に関しては、ブロッキングにカーボンコロイドブロッキング剤、サンプル抽出に尿素をタンパク質溶解剤として含む緩衝液を用いることで、回収率の格段の改善が認められたことを示している。ヒラメ実験からは、適量のLFを摂取することにより、ストレス耐性が向上することが判明し、これはLF摂取により熱ショックタンパク質合成が促進された結果、高水温ストレス耐性が向上したのではないかという仮説を提唱している。また、ハタの実験から、ヒラメと同様にストレス耐性を改善するばかりでなく、LF摂取により非特異的生体防御能が改善されたことを示している。さらに、ブリにおいては、LF摂取により血中コルチゾール濃度およびグルコース濃度が低く抑制されたことを発見した。フグを用いた腸内容物中のLF残存量については、投与されたLFがほとんど腸内でLFとしての抗原性を保っていることを明らかにしている。一方、オニテナガエビについては、適量のLF摂取により、成長改善、塩分ストレス耐性の向上が得られたことを示した。このように本研究は、餌料性LFが水棲動物の健全性を高めることおよび健全性の向上には熱ショックタンパク質の関与が考えられることをはじめて発見している。

以上のように、本論文で得られた成果は、水棲動物におけるラクトフェリンの効果および代謝についての新たな基礎的知見を与えるばかりでなく、養殖魚の健全性を高める養魚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。したがって、本研究成果は世界的な魚類・甲殻類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。

No. 1

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	横山佐一郎
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 手島 新一
	副査 宮崎大学 教授 村田 壽
	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
審査協力者	
実施年月日	平成 18 年 1 月 16 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成 18 年 1 月 16 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

横山 佐一郎

[質問1] ラクトフェリンを飼料に使用する場合、経済的な面はどうか。

[回答1] ラクトフェリン (LF) は牛乳から精製するため高価であるが、これまで廃棄されていた乳清を用いて電気浸透膜法などにより精製できるようになってきたため、今後、製造コストを下げることも可能であると予測される。また、LF添加によって抗病性やストレス耐性を向上できると考えられるので、ワクチン接種や投薬コストを節約でき、全体で見ると生産コストは下げることができると考えられる。

[質問2] 魚種によりLFの最適レベルに違いがあるのか。また、ストレスの種類によって最適レベルが変わると考えられるか。高添加区でストレス反応が低下している理由として何が考えられるか。

[回答2] 今回使用したヒラメやチャイロマルハタのような底棲魚では、最適添加量は800~1000ppmであったが、活発に活動する回遊魚では最適添加量は異なると考えられる。免疫賦活物質では過剰投与によるネガティブフィードバックが報告されているので、LFも同様の作用を示すと考えられる。魚種により投与量と投与期間を検討する必要があると考えられる。

[質問3] ヒラメなどではストレス耐性を向上させる効果がみられるが、フグでは腸管内に飼料性LFが残存している。また、血液、肝臓や筋肉中にはLFが検出されていない。飼料性LFが吸収されたと判断する根拠はなにか。

[回答3] LFを経口投与した魚の血液を経時的に採取して、LF含量を測定したがLFは検出されなかった。吸収されても血液中には検出限界以下しか存在しないか、もしくは、吸収されないで腸管内で作用するのではないかと考えられる。

[質問4] 飼料性LFがHSPを増加させるメカニズムはなにか。

[回答4] LFが貪食細胞を活性化し、貪食細胞中のHSPが増加すると考えられる。

[質問5] LFは通常、魚体中に存在しないということだが、LFの経口投与が魚の健康に及ぼす影響は考えられるか。

[回答5] 今回の研究でも2000ppm投与区で阻害が観察されたので、過剰投与により免疫能を低下させる恐れが考えられるため、投与量と投与期間については検討する必要がある。

[質問6] 現在、魚価が低下しているがLFの添加により飼料コストはどれくらい増加するか。

[回答6]すでに一部の市販飼料に使用されているが、価格については精製度やロットによって異なり、はっきりとはいえない。

[質問7]飼料作製時には加熱したのか。

[回答7]飼料は40°C以下でペレットを作製したが、LFは60°C以下では変性しないと言われている。

[質問8]魚種によって至適含量が異なるということだが、成長段階による投与量の差異はどうか。出荷サイズの魚と稚魚では異なるのか。

[回答8]今回行った空気露出ストレス耐性についてみると、出荷サイズの魚は稚魚に比べて耐性が強いので、LFの投与量は少なくすむのではないかと予測される。

[質問9]LFと似た物質にトランスフェリンがあるが、魚でトランスフェリンを用いた研究例があるか。

[回答9]魚におけるトランスフェリンの研究例は知らないが、LFはトランスフェリンに比べて抗菌性が高いので効果に違いがあるかもしれない。

[質問10]魚の体表粘液分泌量をタンパク量で比較しているが、糖の量はどうか。単位タンパクあたりの糖量もしくは単位糖あたりのタンパク量で比較すべきではないか。

[回答10]御指摘とおり、粘液分泌量の測定に関しては検討していきたい。

[質問11]初乳中のLFはどれくらいか。その後母乳中のLF量はどうなるのか。

[回答11]初乳中のLF量は2000 μ g/mlといわれているが、その後1/10に減少する。

[質問12]授乳初期の免疫を高めるのには必要であるが、その後は不必要であるということか。

[回答12]不必要ということではなく、ある程度成長すると体内で必要量を合成できるようになると考えられる。

[質問13]魚のHSP70ファミリーと今回使用したマウスのHSP70の相同性はどれくらいか。

[回答13]ヒラメとマウスでは90%、ヒトとの間でも80%はあるといわれている。

[質問14]LFを連続投与した場合、体内にLFは蓄積されると考えられるか。また、血液で検出されないということだが、血液中で代謝されて消失するのか、蓄積されて消失するのかどちらが考えられるか。

[回答14]仮にLFが吸収されるとしても、LFの半減期は牛では2時間程と短く、蓄積はされないものと考えられる。

[質問15]LFの見かけの吸収率は測定したのか

[回答 1 5] 本研究では測定していない。