

論文内容の要旨

氏名 西田 剛
 学位の種類 博士(農学)
 学位記番号 農第150号
 学位授与の日付 平成23年3月22日
 学位授与の要件 学位規程第4条第1項該当
 学位論文題目 トラフグにおける海水由来元素の要求と利用に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 石橋 泰典
 (副主査) 教授 太田 博巳
 (副主査) 教授 滝井 健二

トラフグにおける海水由来元素の要求と利用に関する研究

農学研究科 水産学専攻
 博士後期課程 西田 剛

近年、魚類養殖では寄生虫、細菌、ウイルス病等の様々な感染症が拡大し、大きな問題になっている。一方で、2002年に薬事法が改正され、魚類養殖でもホルマリンを始めとする各種薬剤の使用が禁止されるようになった。とりわけ、トラフグ養殖は国内の代表的な魚類養殖業の1つであるが、寄生虫被害が著しく、ホルマリンによる薬浴治療ができなくなってからは衰退の一途をたどるようになった。食の安全性を考慮した薬剤に頼らない養殖システムや感染症治療法の開発は今後ますます要望される最も大きな課題の一つである。

ところで、魚類は陸生動物とは異なり、いくつかの元素を餌と環境水の2経路から吸収することができる。特に、海産魚は90種類以上の元素が豊富に存在する海水に生息するため、多くの環境水由来元素が栄養素や浸透圧調節等に利用され、様々な役割を果たすと考えられている。しかし、海産魚の環境水由来元素の要求性に関する研究は一部の元素で実施されたに過ぎず、そのほとんどが未だ明らかにされていない。一方で、海水中に存在する元素は、魚類以外にも様々な動植物に利用されるが、生物が要求する元素組成は種で大きく異なることが知られている。特に、寄生虫、細菌などの病原微生物が海水から吸収しなければならぬ元素の組成や量比は、魚類と異なる事が予測される。

海産魚が海水から吸収しなければならない元素群がわかれば、海産魚の卵、仔稚魚の基礎研究に用いる培地組成が明確になる。また、魚類と様々な病原微生物との間で必須となる元素の組成や量比に違いがあれば、養殖の様々な場面で利用することが可能になる。しかし、海水由来元素の要求性の違いから飼育方法や感染症の治療法を検討した例は、これまでにほとんど見られない。

そこで本研究は、トラフグの卵および仔稚魚をモデル実験魚として用い、海水由来元素の要求性を明らかにするとともに、その役割について検討した。また、トラフグ養殖で深刻な被害を引き起こし、完全な駆除方法が存在しない寄生虫ヘテロボトリウム *Heterobothrium okamotoi* の元素要求を調べ、元素組成の違いを利用した寄生虫の感染予防法と駆除法について検討した。

I章:卵および仔稚魚の海水由来微量元素の要求性

海水中の元素は、その濃度に応じて90%以上を占める主要元素群と微量元素群に区分される。まずI章では、魚類において栄養学的に要求性が確認されているSi, Fe, Cu, Zn, Mo, MnおよびIの各種微量元素を全て、または1種類ずつ除いた人工海水を作成し、トラフグの卵、前期仔魚および外部栄養期の仔稚魚をそれぞれ収容して、成長、孵化率、無給餌生残指数、生残率等に及ぼす影響を検討した。その結果、全ての微量元素を除いても、卵の孵化率、前期仔魚期の無給餌生残指数、外部栄養期仔稚魚の成長、生残率等に顕著な影響はみられなかった。すなわち、トラフグの卵および仔稚魚は、卵に保存、または餌から摂取できる微量元素のみで正常な発育を示す可能性が高く、環境水からの微量元素の吸収は必ずしも必要ではないと考えられた。

II章:卵および仔稚魚の海水由来主要元素の要求性

次に2章では、海水中の主要元素群に属するNa, Mg, K, Ca, S, Sr, B, BrおよびFの各元素を1種類ずつ除いた人工海水を作成し、トラフグの卵、前期仔魚および後期仔魚をそれぞれ収容して、成長、孵化率、無給餌生残指数、生残率、全魚体元素含量等に及ぼす影響を検討した。

その結果、卵期ではNa, KおよびCa除去海水区の孵化率が0%を示し、Mg除去海水区で低下傾向がみられたが、他の試験区に顕著な差異はなかった。また、ICP-MSおよびICP-AESを用いて各試験区卵の元素含量を測定したところ、Na, MgおよびSr除去海水区でそれぞれの除去元素が有意に低下した。

次に、前期仔魚期では、Na, CaおよびK除去海水区の無給餌生残指数が対照区のそれより有意に低下したが、他の試験区に顕著な差はみられなかった。

さらに、外部栄養期の仔稚魚期では、Na, KおよびCa除去海水区の魚の生残率が試験開始後の数日間に低下して全滅したが、その他の試験区魚の成長および生残率に顕著な差異はみられなかった。しかし、試験終了時に全魚体の各種元素含量を調べたところ、Mg, Sr, BおよびBr除去海水区のそれぞれの除去元素が対照区のそれより低下傾向を示し、MgおよびSrで有意差がみられた。またMg除去海水区ではNa含量が有意に増加し、健全な生理状態では無い可能性が示唆された。これより、卵期では、海水中のNa, Ca, KおよびMgの4元素が必須であることが示唆された。一方、仔稚魚期では海水中のNa, KおよびCaの3元素が生命の維持に必須であり、長期間飼育する場合にはMgが必要である可能性もあると考えられた。

III章:卵および仔稚魚に必要な最小必要元素群の組成とその役割

前章までの結果をもとに最小必要元素組成の人工海水を作成し、卵および仔稚魚を飼育して、生残率等に及ぼす影響を調べた。また、海水由来の最小必要元素の役割を調べるとともに、Mgの吸収が可能な経路と役割を検討した。

まず最小必要元素の影響を調べた結果、卵期では全ての主要元素を含む9元素区と必須元素のみで作成した4元素区の孵化率等に差異はみられなかった。また、前期仔魚期でも9元素区と4元素区の無給餌生残指数等に顕著な差はなかった。一方、外部栄養期の仔稚魚期では、必須元素のみで作成した3元素海水区と新たに作成したMg除去海水区の魚で生残率および成長が有意に低下した。そこで、Na, K, CaおよびMgの4元素区を作成して9元素区と比較した結果、成長および生残率に有意な差異は無く、外部栄養期の仔稚魚は、使用する餌飼料や飼育期間などによって変化するものの、Na, K, CaおよびMgの4元素が最小必要元素として必要であると考えられた。

次に、海水中のNa, Ca, KおよびMgの役割を推定するため、各元素除去海水にトラフグ稚魚をそれぞれ収容し、横転までの時間を計測するとともに、横転時における血漿浸透圧および血漿元素含量を測定した。その結果、Na, CaおよびK除去海水区の魚は、実験開始の4, 55および59時間後に横転したが、Mg除去海水区の魚は72時間経過後も横転等の行動変化が確認されなかった。横転時および試験終了時における各試験区魚の血漿浸透圧を測定した結果、Na, KおよびCa除去海水区の魚の血漿浸透圧が有意に高い値を示し、3元素が魚体の浸透圧維持に不可欠な海水元素であると考えられた。また、各試験区魚の血漿元素含量を測定したところ、Na, CaおよびK除去海水区ではMg含量が増加傾向を示し、Na除去海水区のK含量が有意に増加した。海産魚の塩類細胞では、海水から魚体へのCa pumpとともに、魚体から海水へのNaおよびKのCo-transport pumpの働くこと等が知られている。本実験の結果より、海水のNa, KおよびCaのいずれかが欠乏すると各種塩類細胞のpumpが正常に働かず、数十時間内に体内の塩類バランスが崩れ、浸透圧攪乱現象が生じて魚がへい死すると考えられた。一方、海水浸透圧が2番目に高いMgが欠乏しても体内の浸透圧や元素組成に顕著な影響がみられず、Mgは浸透圧の調節よりも、必須栄養素として利用される可能性が高いと考えられた。

しかし、2章の結果のように、トラフグは環境水中のMgが無くても、試験条件によっては欠乏症がみられず、餌飼料から必要なMgを吸収できると考えられた。そこで、カゼイン精製飼料を作成し、飼料中のMgの有無がトラフグ稚魚の生残率、成長および魚体Mg含量に及ぼす影響について検討した。その結果、飼料と

論文審査結果の要旨

海水から Mg を除いた試験区の魚の生残率と全魚体 Mg 含量は著しく低下したが、Mg 欠乏飼料で飼育しても海水中に Mg があれば、魚の生残率、成長および全魚体 Mg 含量に顕著な差の無いことがわかった。2 章の結果と合わせて考えるとトラフグは Mg を餌と環境水の両経路から吸収可能であること、Mg の要求量は環境水中の Mg のみで満たされる可能性が高いこと、飼料中に吸収可能な Mg が十分に存在すれば、要求量を満たせる可能性のあることがそれぞれ示唆された。

以上の結果から、トラフグ仔稚魚は、Na, K, Ca および Mg の 4 元素海水のみで飼育可能なこと、環境水由来の Na, K および Ca を浸透圧調節の必須元素として利用すること、Mg は主に餌または環境水由来の栄養素として利用すること等がそれぞれわかった。

IV 章：寄生虫ヘテロボツリウムの駆除率等に及ぼす海水元素組成の影響

最後に、トラフグ養殖で深刻な被害を引き起こし、完全な駆除方法が存在しない寄生虫ヘテロボツリウム *Heterobothrium okamotoi* の元素要求を調べ、元素組成の違いを利用した寄生虫駆除法について検討した。

まず、ヘテロボツリウムの生活史が、卵期、浮遊幼生期、仔虫期および成虫期に区分されることから、発育段階毎に各種元素除去海水に対する耐性を調べた試験区は全ての主要元素を含んだ 9 元素区、トラフグに必須の元素のみで作成した 4 元素海水区、4 元素海水区より、Na, Mg, K および Ca の各種元素を除いた 3 元素海水区、各種元素除去海水の浸透圧対照群として低塩濃度試験区 (25ppt, 6.7ppt) および蒸留水区の 9 試験区を設けた。その結果、ヘテロボツリウムは、全ての発育段階を通じて Ca 除去海水と蒸留水に対する耐性の低いことがわかった。また、成虫以外の発育段階では各種元素除去海水に対する耐性も低い傾向が示された。

そこで次に、トラフグが Mg および Ca 除去海水に対する耐性が強いことから、それらの海水にトラフグを浸漬し、浮遊幼生への感染防止、感染した仔虫および成虫の駆除効果をそれぞれ検討した。その結果、成虫の駆除に及ぼす顕著な効果はみられなかったが、Mg および Ca の除去海水区の浮遊幼生感染数が対照区のそれよりも有意に低下した。さらに、仔虫を感染させたトラフグ稚魚を Ca 除去海水に浸漬したところ、高い駆虫効果が確認された。

以上の結果より、各種元素除去海水が薬剤を使わない新しい寄生虫の駆除技術として有効である可能性が示唆された。今後は、様々な病原微生物に対し、複数の主要元素を除いた海水による駆除効果等を検討すれば、様々な海産魚の病原体駆除方法として発展する可能性があると考えられる。

魚類は陸生動物と異なり、いくつかの元素を餌と環境水の 2 経路から吸収できる。特に、海産魚は 90 種類以上の元素が存在する海水に生息するため、多くの環境水由来元素が栄養素や浸透圧調節等に利用されている。しかし、海産魚の海水由来元素の要求性に関する研究は非常に少ない。一方で、海水中に存在する元素は、魚類以外にも様々な動植物に利用されるが、生物が要求する元素組成は種で大きく異なる。特に、寄生虫等の病原微生物が海水から吸収しなければならない元素の組成や量比は、魚類と異なる事が予測される。海産魚が海水から吸収しなければならない元素群がわかれば、卵、仔稚魚の基礎研究に用いる培地組成が明確になる。また、魚類と病原微生物との間で必須元素の組成や量比の違いがあれば、養殖の様々な場面で利用できる。しかし、海水由来元素の要求性の違いから飼育法や治療法を検討した例は、これまでにほとんどない。

本研究は、トラフグの卵および仔稚魚をモデル実験魚として用い、海水由来元素の要求性を明らかにするとともに、その役割についても検討している。また、トラフグ養殖で深刻な被害を引き起こし、完全な駆除方法が存在しない寄生虫ヘテロボツリウム *Heterobothrium okamotoi* の元素要求を調べ、元素組成の違いを利用した新しい寄生虫の感染予防法と駆除法について検討している。

まず、魚類で栄養学的に要求性が確認されている 7 種微量元素を除いた人工海水を作成し、トラフグの卵、前期仔魚および外部栄養期の仔稚魚をそれぞれ收容し、生残率等に及ぼす影響を検討した。その結果、微量元素を除いても、卵の孵化率、前期仔魚期の無給餌生残指数、仔稚魚の成長、生残率等に顕著な影響はみられなかった。すなわち、トラフグの卵および仔稚魚は、卵に保存、または餌から摂取できる微量元素のみで正常な発育を示す可能性が高く、環境水からの微量元素の吸収は必ずしも必要ではないことを明らかにした。

次に、海水中の主要元素群に属する Na, Mg, K, Ca, S, Sr, B, Br および F の各元素を 1 種類ずつ除いた人工海水を作成し、トラフグの卵、前期仔魚および後期仔魚をそれぞれ收容して、成長等に及ぼす影響を検討した。その結果、卵期では、海水中の Na, Ca, K および Mg の 4 元素が必須であること、前期仔魚期および外部栄養期の仔稚魚期では、Na, Ca および K の 3 元素が必須であることを示した。しかし、試験終了時に仔稚魚全魚体の元素含量を調べたところ、Mg, Sr, B および Br 除去海水区のそれぞれの除去元素が対照区のそれより低下傾向を示し、Mg 除去海水では Na 含量が増加して、健全な状態で無いことが示唆された。これより、仔稚魚期では海水中の Na, K および Ca の 3 元素が生命の維持に必須であり、長期飼育には Mg が必要であることを明瞭にしている。

さらに、上記の結果をもとに最小必要元素組成の人工海水を作成し、卵および仔稚魚を飼育して、生残率等に及ぼす影響を調べたところ、卵、前期仔魚および外部栄養期の仔稚魚期の全てで、Na, K, Ca および Mg の 4 元素のみの飼育

が可能なことを見出した。次に、海水由来の最小必要元素の役割を調べるため、各元素除去海水にトラフグ稚魚をそれぞれ收容し、横転時間、横転時における血漿浸透圧および血漿元素含量を測定した。その結果、Na、Ca および K 除去海水区の魚は、実験開始の数時間後に横転したが、Mg 除去海水区の魚には行動変化が確認されなかった。各試験区魚の血漿浸透圧を測定した結果、Na、K および Ca 除去海水区の魚の血漿浸透圧が有意に高い値を示し、3元素が魚体の浸透圧維持に不可欠な海水元素であると考えられた。また、血漿元素含量を測定したところ、Na、Ca および K 除去海水区では対象欠乏元素以外の一部の元素が増加した。本実験の結果より、海水の Na、K および Ca が欠乏すると各種塩類細胞の pump が正常に働かずに対象欠乏元素が増大し、浸透圧上昇が生じて魚がへい死すること、Mg が欠乏しても体内浸透圧や元素組成に影響がみられず、必須栄養素として利用されることを見出した。

しかし、環境水中の Mg が無くても欠乏症がみられないことがあり、餌飼料から必要な Mg を吸収できると考えられた。そこで、カゼイン精製飼料を作成し、飼料中の Mg の有無がトラフグ稚魚の生残率等に及ぼす影響を検討した。その結果、トラフグは Mg を餌と環境水の両経路から吸収可能なこと、Mg の要求量は環境水中の Mg のみで満たされる可能性が高いこと、飼料中に吸収可能な Mg が十分に存在すれば、要求量を満たせる可能性のあることをそれぞれ明瞭にした。

最後に、トラフグ養殖で被害を引き起こし、駆除方法がない寄生虫ヘテロボツリウムの元素要求を調べ、元素組成の違いを利用した寄生虫駆除法を検討した。まず、ヘテロボツリウムの発育段階毎に各種元素除去海水に対する耐性を調べた結果、全ての発育段階で Ca 除去海水と蒸留水に対する耐性の低いことがわかった。また、成虫以外の発育段階では各種元素除去海水に対する耐性も低い傾向が示された。そこで次に、トラフグが Mg および Ca 除去海水に対する耐性が強いことから、それらの海水にトラフグを浸漬し、感染防止および駆除効果をそれぞれ検討した。その結果、成虫の駆除に及ぼす顕著な効果はなかったが、Mg および Ca の除去海水区の浮遊幼生感染数が対照区のそれよりも低下した。さらに、仔虫を感染させたトラフグ稚魚を Ca 除去海水に浸漬し、高い駆除効果を確認した。

以上の結果、各種元素除去海水が薬剤を使わない新しい寄生虫の駆除技術として有効である事を見出した。今後は、様々な病原微生物に対し、複数の主要元素を除いた海水による駆除効果等を検討すれば、様々な海産魚の病原体駆除方法として発展する可能性があり、そのモデルを例示することに成功した。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成23年2月9日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏名	三宅康賀			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	農第151号			
学位授与の日付	平成23年3月22日			
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当			
学位論文題目	養殖クロマグロ肉の品質に関する研究			
論文審査委員(主査)	教授	塚	正	泰之
(副主査)	教授	滝	井	健二
(副主査)	教授	安	藤	正史