

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

海産魚の滑走細菌症は多くの養殖魚種で発生し、マダイやヒラメでは大きな被害をもたらしている。特にマダイの種苗生産では、早期採卵の拡大に伴い損害は増え続けている。唯一著効の見られる治療法はニフルスチレン酸による薬浴であるが、薬事法改正によりマダイに対する使用が禁じられたため、それに変わる有効な対策が強く求められている。食の安全性の観点からも、抗菌剤に頼らない予防法の開発は不可避である。

本研究ではホルマリン不活化ワクチンの効果を検討し、マダイの滑走細菌症に対して十分な予防効果が認められることを明らかにした。滑走細菌症の原因菌は培養が容易であるため、本ワクチンも容易かつ低コストに生産できるものと期待される。投与は短時間の浸漬法によって行うため、種苗の移動などの通常作業に組み込むことで、ほとんど追加の負担なく使用可能な点も評価できる。検討すべき課題はいくつか残っているものの、マダイの滑走細菌症に対してはすぐにも実用化可能な水準に達していると考えられる。既に製品化に向けた開発も始まっており、今後の展開には大いに期待できる。

ヒラメの滑走細菌症については、現状のワクチンでは予防効果が得られないことを明らかにした。実用化には更なる検討が必要であるが、マダイとヒラメに見られた相違は両魚種の免疫機構を研究する上でも興味深い課題である。

また、従来の診断で*Tenacibaculum maritimum*感染症とされていたものの中に、別種の細菌によると考えられる事例が含まれることを明らかにした。滑走細菌症の対策には、両者の識別が必要であることを示した点は重要である。

以上のように、本研究は海産養殖魚種における重要疾病である滑走細菌症に対して、ホルマリン不活化ワクチンの有効性と今後の検討課題を明らかにした点で大いに評価できる。

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。

氏 名	中 瀬 玄 徳 <small>なか せ げん とく</small>			
学位の種類	博 士 (農学)			
学位記番号	農 第 1 0 4 号			
学位授与の日付	平成 19 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	魚類養殖の飼育水環境に関する微生物生態学的研究			
論文審査委員 (主 査)	教授	江	口	充
(副主査)	教授	村	田	修
(副主査)	教授	宮	下	盛

論文内容の要旨

わが国のタンパク質の自給を考えていく上で、魚類養殖産業は非常に重要な位置を占める。その魚類養殖産業は、人工種苗の安定供給なくしては成り立たない。今日の人工種苗の生産は、その技術の進歩によって集約化が可能になっているが、それに伴い種苗生産環境に存在する細菌が原因となる仔魚の大量へい死が新たな問題となっている。種苗生産環境の細菌群を上手に制御・管理することは、効率的な種苗生産を行う上で避けられない課題である。種苗生産環境の細菌群に関する研究は、未だ十分とは言えず、全ての細菌群を包括的に調査した例がほとんどない。種苗生産環境の細菌群の制御を実現するためには、細菌群集の把握とその動態の解析が重要となる。

本論文では、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、仔魚飼育水を中心とした種苗生産環境の細菌群集構造とその動態の解析を行ない、仔魚飼育水中の細菌群集の制御手法について検討している。本論文において得られた結果は次のとおりである。

第 1 章の序論では研究の背景が述べられており、続く第 2 章において、仔魚飼育水の細菌群集構造の解析を行なっている。第 2 章では、マダイの仔魚飼育試験とクロマグロの仔魚飼育試験を行い、仔魚飼育水の細菌群集を調査した。仔魚飼育水の細菌群集構造を FISH 法で解析した結果、 α -proteobacteria あるいは *Cytophaga-Flavobacterium* が優占することが多く、そのような場合には飼育水の細菌群集構造は比較的安定していた。マダイ仔魚の飼育試験を行った水槽の一つでは、総細菌数に占める α -proteobacteria と *Cytophaga-Flavobacterium* の存在比率の低下と γ -proteobacteria の存在比率の増大が起きた後、仔魚の大量へい死が発生した。他のマダイの飼育試験の水槽においては、細菌群集構造が安定しており、仔魚の大量へい死は発生しなかった。これらの結果は、 α -proteobacteria や *Cytophaga-Flavobacterium* グループの細菌群が優占し、細菌群集構造が飼育期間を通して安定している飼育水が、仔魚の生残にとって有益であること示している。

第 3 章では、飼育水中の細菌群がどのような仕組みで決定されるのか、あるいは、どのようにすれば制御が可能となるのかについて、餌料生物と共に飼育水に持ち込まれる細菌群に注目して検討を行なっている。第 3 章第 1 節では、餌料生物の一つであるワムシについて、その周囲海水の浮遊細菌およびワムシに付着している細菌

の細菌群集の解析を行なった。付着細菌および浮遊細菌群の両方の細菌群集は、 α -proteobacteria、 γ -proteobacteria および *Cytophaga-Flavobacterium* といった細菌群の他に、EUB338 プローブでしか標識できない細菌群も存在しており、特定の細菌グループが優占しているという様な細菌群集構造ではなかった。

ワムシ周囲海水中の浮遊細菌群は、EUB338 プローブによる標識率が沿岸海水のそれよりも高かった。これは、ワムシ周囲海水中の浮遊細菌群が、沿岸海水の細菌群より高い増殖活性を持つことを示す。さらに、ワムシの給餌によって飼育水に持ち込まれる細菌の量を試算すると、飼育水の総細菌数の 20%前後に達した。これらの結果は、ワムシの給餌によって飼育水に持ち込まれる細菌群が、増殖活性という質の点でも、量の点でも飼育水の細菌群集に大きな影響を与えることを示唆している。

第 3 章第 2 節では、飼育水に添加されているもう一つの餌料生物である、ナノクロロプシスについて、その培養液中の細菌群集を解析している。ナノクロロプシス培養液中の総細菌数は、天然の沿岸海水の総細菌数と大きく変わらなかった。ただし、総細菌数に対する DVC 陽性細胞 (活発な増殖活性を有する細胞) の存在割合については、ナノクロロプシス培養液中の細菌群が沿岸海水の細菌群よりも常に高くなった。これは、ナノクロロプシス培養液中の細菌群が高い増殖ポテンシャルを保持することを示す。ナノクロロプシス培養液中の活発に増殖していた細菌群集で最も優占していた細菌のグループは、 α -proteobacteria と *Cytophaga-Flavobacterium* であった。

ナノクロロプシス培養液を飼育水に添加した場合、ナノクロロプシスと共に飼育水に持ち込まれる細菌数は、飼育水中の総細菌数の 5%程度になる。単に量だけを考えると、ナノクロロプシス培養液中の細菌群が飼育水の細菌群集へ大きな影響を与えるとは考えにくい。しかし、重要なのは、ナノクロロプシス培養液中の細菌群が極めて高い増殖活性を保持しているという点である。しかも、それら増殖活性の高い細菌群のほとんどは、 α -proteobacteria あるいは *Cytophaga-Flavobacterium* グループといった特定の細菌群によって占められている。したがって、この細菌の増殖活性が高い培養液が仔魚飼育水へ添加された場合、最初の添加量が飼育水全体の 5%であっても仔魚飼育水の細菌群集に与える影響は大きいと考察している。

第4章では、ナノクロロプシスの飼育水への添加の影響について、実際に仔魚飼育水にナノクロロプシスを添加した場合と無添加の場合を比較した実験を行なっている。第4章では、マーブルゴビー仔魚とメイチダイを用いた飼育試験を行なった。これらの飼育試験のいずれにおいても、仔魚の最終的な生残率は、ナノクロロプシスを添加した試験区においてより高くなった。

マーブルゴビーの飼育試験では、ナノクロロプシスを飼育水に添加した事により、特に飼育試験を開始した時の細菌群集構造が顕著に変化した。ナノクロロプシス添加区における総細菌数に対する、 α -proteobacteria と *Cytophaga-Flavobacterium* のグループの細菌群の存在比率が、無添加区のそれよりも有意に高くなったのである。ナノクロロプシス培養液中では、 α -proteobacteria と *Cytophaga-Flavobacterium* が優占しているので、試験開始時の細菌群集構造の相違は、ナノクロロプシスの添加に起因する現象といえる。試験開始日以降においても、ナノクロロプシス添加区と無添加区では、飼育水の細菌群集の変動の様子が異なっており、ナノクロロプシス添加区では、総細菌数に対する γ -proteobacteria の存在比率が常に低い水準に抑制されていた。

メイチダイの試験では、ナノクロロプシスを飼育水に添加する時期を変えて実験を行なった。仔魚のふ化後2日目から添加した場合と受精卵の飼育水槽への収容前から添加した場合である。ふ化後2日目からナノクロロプシスを添加した場合は、ナノクロロプシスを添加しても、飼育水中の細菌群集を制御する効果は十分に得られなかった。受精卵の収容前にナノクロロプシスを添加した場合は、マーブルゴビーの場合と同様に、試験開始時およびそれ以降において、細菌群集を制御する効果が得られた。これは、仔魚飼育水で細菌数が増大し、群集構造が確立される前に、ナノクロロプシスを添加し、細菌群集の制御を始めることの重要性を示している。

第5章では、第2章から第4章までの結果を総括し、仔魚飼育において、 α -proteobacteria や *Cytophaga-Flavobacterium* の細菌群が優占して、細菌群集構造が安定する飼育水が都合の良い飼育水であることを示し、さらに、その様な飼育水を作るためには、ナノクロロプシスの飼育水への添加が有効であることを述べている。そして、効率的な種苗生産を行う上で望ましい飼育水を微生物生態学的な観点から総合的に考察している。

わが国の魚類養殖では、主要な魚種において人工種苗が用いられている。その人工種苗の生産は集約的に行われているが、集約化の結果、種苗生産環境に存在する細菌群が原因となる仔魚の大量へい死が発生するようになった。本論文では、種苗生産環境の細菌群を制御・管理し、効率的な種苗生産を行う手法を検討する目的で、細菌群集構造とその動態の解析を行なっている。

種苗生産環境に存在する細菌群を対象とした従来の研究は培養法で行なわれてきた。そのため、細菌群全体を対象に解析することができていなかった。本論文(第2章)では、種苗生産環境に存在する細菌群全体を対象とした群集構造解析を行なうため、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法を用いている。FISH法を用いたことで、飼育水中の細菌群を個々の細菌としてではなく、群集として捉えることを可能にしている。その結果、仔魚飼育水では、 α -proteobacteria あるいは *Cytophaga-Flavobacterium* のグループが優占することが多く、そのような場合には飼育水の細菌群集構造は比較的安定する事が明らかにされている。逆に細菌群集構造が大きく変化した場合では、仔魚の大量へい死が発生する、といった飼育水中における細菌群の動態を把握することにも成功している。この様に、飼育水中の細菌群集の変動の様子を定量的かつ定性的に示した例はまだ無い。

飼育水の細菌群に影響を与える要因として、餌料生物と共に飼育水に持ち込まれる細菌群にも注目している。本論文(第3章)では、餌料生物として、仔魚の餌料であるシオミズツボワムシとそのワムシの餌料であるナノクロロプシス(植物プランクトン)を調査している。ワムシ周囲海水中の浮遊細菌群について、真性細菌を標識できる EUB338 プローブの標識率から、それら細菌群の増殖活性が沿岸海水のそれよりも高い事を明らかにしている。同時に、ワムシ給餌によって飼育水へと導入される総細菌数の推定を行い、ワムシの給餌によって飼育水に持ち込まれる細菌群が、増殖活性という質の点でも、量の点でも飼育水の細菌群集に大きな影響を与えると述べている。従来のワムシの細菌群に関する研究は特定の細菌群に注目して行なわれる事が多く、飼育水の細菌群への影響を評価している点が新しい。

もう一つの餌料生物であるナノクロロプシスについても、その培養液中の細菌群集を解析し、総細菌数が天然の沿岸海水のそれと大きく変わらないにも拘らず、ナノクロロプシス培養液中の細菌群は、増殖ポテンシャルが高いことを明らかにしている。培養液中の細菌群集構造の解析に当たっては、FISH法に Direct Viable Count (DVC) 法を併用することで、ナノクロロプシス培養液中の活発に増殖していた細菌群集で最も優占していた細菌のグループを特定し、それらの細菌グループが、 α -proteobacteria と *Cytophaga-Flavobacterium* である事を示している。既に研究が進んでいる珪藻などの培養液に比べ、ナノクロロプシス培養中の細菌群集は、ほとんど解析が行なわれておらず、種苗生産の現場にとって有用な情報であると言える。ナノクロロプシスについても、飼育水へと添加

された場合の飼育水中の細菌群集への影響が検討されている。ナノクロロプシス培養液中の細菌群が極めて高い増殖活性を保持しているという点と、それら増殖活性の高い細菌群のほとんどは、 α -proteobacteria あるいは *Cytophaga-Flavobacterium* グループといった特定の細菌群によって占められているという特徴を挙げ、飼育水の細菌群集に与える影響は大きいと考察している。この点については、さらに飼育試験を行なって検討を加えている。

ナノクロロプシスの飼育水への添加による、飼育水中の細菌群への影響をより詳細に検討するため、実際に仔魚飼育水にナノクロロプシスを添加した場合と無添加の場合を比較した実験を行なっている(第4章)。試験には、マーブルゴビーとメイチダイの仔魚が用いられている。本論文では、これらの飼育試験のいずれにおいても、仔魚の最終的な生残率が、ナノクロロプシスを添加した試験区において無添加区より高いことが示されている。仔魚の生残は、既存の研究例の示す結果や、生産現場で経験的に知られている傾向と一致している。しかし本論文では、ナノクロロプシスの添加による仔魚の生残率が向上した理由を、飼育水の細菌群を制御する効果に求めており、この点が従来の研究と大きく異なる。マーブルゴビーとメイチダイの飼育水の細菌群集構造を解析した結果は、ナノクロロプシスの飼育水への添加が、細菌群集構造を顕著に変化させることを証明している。特に試験開始時には、ナノクロロプシス添加区における総細菌数に対する、 α -proteobacteria と *Cytophaga-Flavobacterium* グループの細菌群の存在比率が、無添加区のそれよりも有意に高くなっている。また、試験開始日以降においても、ナノクロロプシス添加区と無添加区では、飼育水の細菌群集の変動の様子が異なっており、ナノクロロプシス添加区では、総細菌数に対する γ -proteobacteria の存在比率が常に低い水準に抑制されることも示した。さらに、メイチダイの試験では、ナノクロロプシスを飼育水に添加する時期を変えて実験を行なっている。受精卵収容前と収容2日後とでは、受精卵収容前に添加した場合で細菌群種の制御が可能であるとしている。仔魚飼育を始める前(受精卵収容前)にナノクロロプシスの飼育水への添加を行なうことが、細菌群集の制御を行なう上で重要な様である。

魚類種苗の効率的な生産を行う上で望ましい状態の飼育水を、微生物生態学的な観点から検討した例は、他になく本論文が初めてのものである。本論文で得られた成果は、種苗生産に関する知見の中で最も手薄であると考えられている分野を補うという点において、非常に有益なものであると考えられる。その成果は、国際学術雑誌 (Fisheries Science) に発表予定(1報は受理済み、1報は審査中)であり、高い評価を得ている。従って、本研究論文は本学大学院の博士(農学)の学位論文として十分に価値のあるものであると判定する。

氏名	うえはら かず ひこ 上原 一彦
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農第105号
学位授与の日付	平成19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	イタセンパラの増殖方法に関する研究
論文審査委員(主査)	教授 太田博巳
(副主査)	教授 熊井英水
(副主査)	教授 細谷和海