

【平成23年1月-3月授与分】博士學位論文内容の要旨 及び審査の結果の要旨

<https://hdl.handle.net/2324/20220>

出版情報：2011-10-07. 九州大学
バージョン：
権利関係：



氏名・(本籍・国籍)	マリー ジニー テレバンコ ヤノリア Mary Jeanie Telebanco-Yanoria (フィリピン)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博乙第146号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Genetic and breeding studies toward establishing an international standard blast differential system in rice (<i>Oryza sativa</i> L.) (いもち病国際標準判別体系確立に向けたイネ (<i>Oryza sativa</i> L.) の遺伝育種学的研究)
論文調査委員	(主査) 教授 吉村 淳 (副査) 教授 土屋 健一 准教授 安井 秀

論文内容の要旨

Differential varieties (DVs) and blast isolates are essential for establishing a differential system as a tool for blast research and breeding programmes in rice. As an initial step, this study characterized the pathogenicity of 119 blast isolates collected from the Philippines using 19 rice DVs targeting 18 resistance genes. First, the isolates were classified into 31 groups based on their reactions to nine DVs targeting nine resistance genes: *Pia*, *Pib*, *Pii*, *Pit*, *Pita*, *Pish*, *Piz-t*, *Pi3* and *Piz-5*. They were then subdivided into 70 pathotypes considering the reactions of the varieties to nine other resistance genes: *Pik*, *Pik-h*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pik-s*, *Pita-2*, *Piz*, *Pil* and *Pi20(t)*. The findings suggest a wide variation in blast pathogens in the Philippines. Twenty isolates that had good differentiating ability, stable reaction and good sporulating ability were selected as standard isolates. The data on the pathogenicity of the blast isolates from the Philippines are useful for clarifying the differentiation and relationship between blast races and resistance genes. These isolates were then used to develop near-isogenic lines (NILs) as an ideal set of DVs for blast resistance.

Twenty-seven NILs with the genetic background of indica variety CO 39, which is broadly susceptible to rice blast, were developed following six repeated backcrosses as an initial set of numerous DVs. This set of NILs included 14 resistance genes [*Pish*, *Pib*, *Piz-5*, *Piz-t*, *Pi5(t)*, *Pik-s*, *Pik*, *Pik-h*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pil*, *Pi7(t)*, *Pita* and *Pita-2*] derived from 26 donor varieties. A second set of NILs containing 11 blast resistance genes [*Pib*, *Piz-5*, *Pi9*, *Pi3*, *Pia*, *Pik-s*, *Pik*, *Pik-h*, *Pi7(t)*, *Pita* and *Pita-2*] derived from 19 donor varieties in the genetic background of the susceptible japonica variety Lijiangxintuanheigu (LTH) were also developed. The NILs were selected in each backcross generation using a

specific avirulent blast isolate for each targeted resistance gene. The NILs showed reaction patterns identical to those of the corresponding monogenic lines (MLs) against 20 standard isolates from the Philippines, suggesting that the target resistance genes had been introduced successfully. Genome surveys using simple sequence repeat (SSR) markers showed that the NILs had a genetic composition similar to that of each recurrent parent. The introgression of targeted resistance genes was confirmed using SSR markers located within the chromosome regions to which the resistance gene had been mapped previously. The morphological characteristics of each NIL were generally similar to those of the recurrent parents. The developed NILs should be useful DVs for monitoring blast races and revealing the pathogenicity of blast isolates from both tropical and temperate regions, complementing the existing set of MLs, and should constitute an important genetic tool for studying blast resistance in indica and japonica rice varieties. In addition, these NILs are valuable genetic resources for determining blast resistance in rice breeding programmes involving indica and japonica types. Using the differential system, wide variation in the resistance to disease caused by rice blast was found among 922 rice varieties collected mainly from Asia. These varieties were classified into clusters A–F using Ward's hierarchical cluster analysis based on their reactions to the 20 standard blast isolates from the Philippines. The most susceptible clusters were B and C from the Far East (Japan). Varieties from East and South-East Asia were less frequent in clusters B and C than those from Japan, and were more frequent in clusters E and F, which were the most resistant of the cluster groups. Varieties from South Asia showed the widest variation, occurring in all clusters, although less frequently in cluster B. The cluster B varieties were predominantly Japanese ones, including a high frequency of isozyme type VI, corresponding to the japonica type. By contrast, isozyme types I, II, III and V, which dominated in South Asia, were less frequency in cluster B. The distribution of resistance corresponded to the geographic distribution of rice varieties and might be related to the differentiation into indica and japonica types. These findings provide useful information that improves our understanding of the variation in blast resistance at a global level.

論文審査の結果の要旨

国際標準の判別体系の確立は、今後のいもち病研究および同病抵抗性育種計画を推進するのに不可欠なものである。本研究では、国際標準のいもち病判別体系の確立に向けて、フィリピン産いもち病菌の分類、いもち病抵抗性遺伝子の準同質遺伝子系統 (Near-isogenic lines: NILs) の作出、多数の品種が保有する同病抵抗性遺伝子の推定を行った。

まず、既報の判別品種／系統19系統(18の抵抗性遺伝子を有する)を用いて、フィリピン産いもち病菌119菌株の病原性を調べたところ、70の病原性グループ(パソタイプ)に分けられ、フィリピン産本病原菌は病原性において大きな多様性を有することを示した。この結果を受けて、抵抗性遺伝子を容易に判別できる20の標準菌株が選定され、それらはNILs作出に用いられた。

次に、インド型品種 CO39 と日本型品種 Lijiangxintuanheigu (LTH) のそれぞれを遺伝的背景とするいもち病抵抗性遺伝子の NILs の作出のため、戻し交配と抵抗性検定を繰り返して、均一な遺伝的背景を有する抵抗性遺伝子系統を選抜した。CO39 の遺伝的背景においては、26の抵抗性遺伝子供与親から14の抵抗性遺伝子 (*Pish*, *Pib*, *Piz-5*, *Piz-t*, *Pi5(t)*, *Pik-s*, *Pik*, *Pik-h*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pi1*, *Pi7(t)*, *Pita*, *Pita-2*) を有するNILs (27系統) が作出され、LTH の遺伝的背景においては、19の抵抗性遺伝子供与親から11 の抵抗性遺伝子 (*Pib*, *Piz-5*, *Pi9*, *Pi3*, *Pia*, *Pik-s*, *Pik*, *Pik-h*, *Pi7(t)*, *Pita*, *Pita-2*) を有するNILs (20系統) が作出された。これらのNILs は各抵抗性遺伝子の抵抗性反応パターンから抵抗性遺伝子導入の確認を行うとともに、SSR (Simple Sequence Repeats) マーカーによるゲノム構成の検討を行ったところ、抵抗性遺伝子座乗領域以外ではほぼ反復親と同様のゲノム構成を有していた。作出されたNILs は、いもち病菌の病原性判別に極めて有効であり、インド型と日本型で作出されたことから、いもち病抵抗性研究の共通基盤となるばかりでなく、抵抗性遺伝子の給源としても有意義である。

さらに、主としてアジアに分布する922品種を用いて抵抗性検定を行い、20の標準菌株に対する抵抗性反応パターンに基づき分類を行った結果、供試品種は6つの品種群に分けられ、これら品種群と抵抗性遺伝子の分布の関係を明らかにした。

以上要するに、本研究は、稲作重要病害であるいもち病に関して、国際標準の判別体系を確立したものであり、植物育種学および植物病理学の発展に寄与する価値ある業績と認められる。よって、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	や の かず たか 矢野和孝 (高知県)		
学位の種類	博士 (農学)		
学位記番号	生資環博乙第147号		
学位授与の日付	平成23年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	ナス科およびショウガ科植物に発生する青枯病の発生生態と防除に関する研究		
論文調査委員	(主査) 教授	土屋 健一	
	(副査) 教授	高木 正見	准教授 古屋 成人
		准教授 尾崎 行生	

論文内容の要旨

青枯病は、熱帯、亜熱帯、温帯地域を中心に世界各地において、ナス科をはじめ 200 余種の植物に萎凋や立枯症状の被害をもたらす難防除土壌伝染性細菌病害である。青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) には、宿主範囲、病原性および生理・生化学的性質等で異なる多くの系統が存在するが、従来、宿主植物との親和性の違いによる 5 つの「レース」と、生化学的特徴の異なる 6 つの「生理型」の二つの体系に基づいた分類が世界的に汎用されてきた。日本ではこれまでに、ナス科ほか多種の植物を犯すレース 1 (生理型 N2, 3 および 4) とジャガイモを犯すレース 3 (生理型 N2) の存在が、それぞれ報告されてきた。一方、わが国独自に抵抗性台木利用による青枯病防除を目的として、4 種のナス属植物に対する病原性に基づく 5 つの菌群 (I~V) への類別法が併用されている。しかしながら、栽培体系の変化に対応する有効な防除対策の確立とともに種苗、農産物流通のグローバル化に伴う新規系統の侵入に対する懸念が注目されてきた。本論文は高知県におけるナス科植物青枯病菌の菌群の分布解析と有効な青枯病制御技術の開発、および日本での初確認となるショウガ科植物青枯病の発生生態とその病原系統の分子解析による判別について取りまとめたものである。

高知県内で 1993 年から 1997 年の間に、罹病ナスから分離された青枯病菌について、ナス属植物に対する病原性に基づく菌群類別から、I~V 群の菌群の存在が明らかになるとともに、その検出頻度は III 群菌、IV 群菌の順で高く、I、II および V 群菌では低いことを認めた。これら菌群の構成比と優占菌群は、台木品種の導入と栽培歴による病原菌に対する選択圧により、変遷していることが推察された。本病の制御を目的として、薬剤防除における抗菌剤であるパリダマイシン液剤の発病遅延効果と抵抗性誘導剤であるアシベンゾラル S メチル水和剤の土壌灌注処理による防除効果を実証した。また、既存品種および細胞融合種の中から、いずれの菌群に対しても圃場試験において高度抵抗性を有する有望なナス台木品種を選定した。さらに、胚軸切断捕捉法により分離された内生細菌の中から顕著な発病抑制能を有する菌株を見出し、それらが新たな生物的防除素材として利用できる可能性を示唆した。

ショウガ類の主要産地である高知県において、1995 年から 1999 年にかけて、三種のショウガ科植物 (クルクマ、ショウガ、ミョウガ) に、未報告の萎凋性立枯症が発生し、いずれも青枯病であることを検証し、それぞれ日本での新病害として病名登録を行った。各罹病植物からの分離菌株について、判別植物に対する病原性および細菌学的性質の調査から、ショウガ科植物青枯病菌は既報の在来系統とは異なり、レース 4、生理型 4 と同定され、日本での初発見であることが判明した。また同分離菌株は、rep-PCR によるフィンガープリント解析により二つの DNA 系統 (I 型、II 型) に類別可能であり、それらの DNA プロファイルは在来のレース 1 およびレース 3 に属する系統菌株とはいずれも異なった。二つの DNA 系統にそれぞれ特異的なプライマーを用いた PCR により、

DNA 系統 I 型はクルクマ、ショウガ、およびミョウガのいずれの植物からも検出されるのに対し、同 II 型はショウガのみから検出された。また DNA 系統 I 型はタイ産のショウガ、クルクマ分離株と、また同 II 型は中国、オーストラリア産ショウガ分離株との高い相同性がそれぞれ示された。さらにショウガ青枯病菌は、低濃度で感染し、種根茎伝染することを解明した。これらの病害発生状況と細菌学のおよび分子生態学的解析に基づき、日本での初発生となるショウガ科植物青枯病は、二つの DNA 系統に判別される外来性の青枯病菌レース 4 によって引き起こされ、その後、異なる伝播経路により発病拡大したものと推察された。

以上の結果から、高知県におけるナス科植物青枯病と新規ショウガ科植物青枯病の発生生態が解明されるとともに、防除適用薬剤の効力と施用法、抵抗性台木品種の選定、および有望な生物防除素材の選抜法が示された。これらの知見は難防除病害である本病の総合的防除技術の開発に大きく貢献できるものと判断された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、我が国で新たに発生したショウガ科植物青枯病の病原細菌の分類学的所属、病原性および識別方法を明らかにし、さらに従来から重大な問題となっているナス科植物も含めた青枯病の制御技術について検討したものである。

高知県に分布するナス青枯病菌について、ナス属植物に対する病原性に基づく菌群類別を検討し、その構成比と優占菌群を明らかにした。また、バリダマイシン液剤の発病遅延効果とアシベンゾラル S メチル水和剤の土壌灌注処理による防除効果を実証するとともに、いずれの菌群に対しても高度抵抗性を有する有望なナス台木品種を選定した。さらに胚軸切断捕捉法により分離された内生細菌株が新たな生物的防除素材として利用できる可能性を指摘した。

3 種のショウガ科植物（クルクマ、ショウガ、ミョウガ）に新たに発生した青枯病の病原細菌が日本での初発見となるレース 4、生理型 4 であることを解明し、それぞれ新病害として病名登録を行った。また、同分離菌株が rep-PCR による多型解析により 2 つの DNA 系統（I 型、II 型）に類別可能であり、それらの DNA プロファイルは在来のレース 1 およびレース 3 の系統菌株とはいずれも異なることを示した。さらに、DNA 系統 I 型がタイ産のショウガ、クルクマ分離株と、また同 II 型が中国、オーストラリア産ショウガ分離株とそれぞれ高い相同性を持つことを確認した。ショウガ青枯病菌は、低濃度で感染し、種根茎伝染することを明らかにし、我が国のショウガ科植物分離株は、海外から侵入後、伝播した可能性が高いものと推察した。これら 2 つの DNA 系統にそれぞれ特異的な PCR および植物接種試験により、これら 2 系統を識別できることを明らかにした。

以上要するに、本論文は日本におけるナス科およびショウガ科植物に発生する青枯病の発生生態の解明と防除技術の開発を実施したものであり、植物病理学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	は の た け し 羽 野 健 志 (鳥根県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博乙第148号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies on the evaluation of the effect of endocrine disrupting chemicals using transgenic see-through medaka (<i>Oryzias latipes</i>), <i>olvas-GFP/STII-YI</i> strain (透明・光るメダカ (<i>olvas-GFP/STII-YI</i> 系統) を用いた内分泌かく乱化学物質の影響評価に関する研究)
論文調査委員	(主査) 准教授 大 嶋 雄 治 (副査) 准教授 安 東 宏 徳 准教授 北 野 健

論 文 内 容 の 要 旨

化学物質は現代社会にとって極めて重要であるが、それらの中には生物の内分泌系に作用して発生や生殖等に影響を与える物質(内分泌かく乱化学物質)が存在することが明らかにされており、その影響評価が急務となっている。一般的に内分泌かく乱化学物質による性分化・再生産への影響を評価する場合、多数の実験動物を用いて長期間の曝露・飼育を実施した後、生殖腺組織を観察する等、多大な労力と時間を必要とするため、これらの影響を迅速かつ少ないコストと犠牲で検出できる試験系の開発が求められている。

本研究では、体表に色素が殆ど存在しない透明なメダカ(STII系統)に、生殖細胞で常時発現する *vasa* 遺伝子の調節領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子(*GFP*)を結合したトランスジェーン(*olvas-GFP*)を導入した生殖腺が光るトランスジェニックメダカ(*olvas-GFP/STII-YI*系統)を用い、内分泌かく乱化学物質の影響評価系への適用を検討した。

最初に、無処理のふ化後1, 5, 10, 15日令 *olvas-GFP/STII-YI*系統仔魚を用い、蛍光顕微鏡および画像解析装置により生殖腺の *GFP* 蛍光面積を測定するとともに、生殖腺部位を取り出して *GFP* 蛍光を持つ生殖細胞数を調べた。その結果、ふ化後1日令から遺伝的メスの *GFP* 蛍光面積および生殖細胞数は遺伝的オスに比べ有意に増加し、10日令では約10倍となっていた。よって、性分化の過程で生じる雌雄の差異を、10日令仔魚の生殖腺の *GFP* 蛍光面積を測定することにより生きた状態で観察可能であると結論した。

次に、女性ホルモン様作用を持ち自然界の河川において検出例が多数報告されているエチニルエストラジオール(EE_2)を、ナノインジェクション法により受精直後の胚に微量注入(0, 0.1, 0.5, 2.5, 5.0 ng/egg)し、性分化への影響を生殖細胞の観察により調べた。その結果、0.5 ng/egg以上の処理区で10日令仔魚の遺伝的オスの中に生殖細胞数、蛍光面積ともに対照区遺伝的オスの6-10倍と遺伝的メスと同等にまで増加した個体が観察された。さらに、仔魚を100日令成魚まで飼育して生殖腺組織を調べたところ、0.5 ng/egg以上の処理区の遺伝的オスが卵巣を持ち、表現型がメスとなる現象、つまり、オスからメスへの性転換が観察された。よって、 EE_2 が性分化異常を引き起こす作用は、10日令仔魚生殖腺の *GFP* 蛍光面積を測定することにより迅速かつ簡便に検出可能であることが示唆された。また、ふ化直後の *olvas-GFP/STII-YI*系統仔魚に EE_2 を35日間飼育水から曝露(0, 25.2, 45.1, 80.1, 158, 447, 880, 1710 ng/L)し生殖腺組織を観察した結果、45.1 ng/L以上の処理区の遺伝的オスで

卵巣を持つ個体が見られ、メスへの性転換が起こっていた。同様に女性ホルモン様作用を持ち汚染が報告されているノニルフェノール(NP)を受精直後の胚に注入(0, 2.0, 10, 50, 125, 250 ng/egg)した結果、全ての処理区で10日令仔魚の蛍光面積、100日令成魚ともに遺伝子型の性と表現型の性は一致しており、性分化異常は観察されなかった。これは、NPの女性ホルモン様作用が弱い、もしくはNPがメダカ体内で代謝、排泄されたためと考察した。

さらにEE₂による *ovas-GFP/STII-YI* 系統の成熟した生殖腺への影響を調べるため、60日令成魚をEE₂ (0, 47.8, 94.8, 216, 522 ng/L) に4週間飼育水から曝露後、生殖腺 GFP 蛍光面積の測定を行った結果、遺伝的オスでは216 ng/L以上の処理区で蛍光面積が開始時の約30%にまで減少していた。その生殖腺組織を観察した結果、精巣は萎縮して結合組織が大部分を占めており、再生産に大きな障害が予想される状態であった。またEE₂濃度依存的に精巣に卵母細胞が見られた。遺伝的メスでも、卵巣の蛍光面積は522 ng/L区で曝露開始時の約50%にまで減少していた。次に、60日令オス成魚をEE₂ (0, 43.7, 85.8, 215, 473 ng/L) に3週間曝露した後、清水下で6週間飼育して同一個体における生殖腺蛍光面積の変化を経時的に観察した。その結果、曝露3週目には215 ng/L区以上で精巣の蛍光面積は25%にまで減少したが、清水飼育終了時の精巣の蛍光面積は曝露開始時の値にまで回復した。組織観察の結果では、結合組織は殆どなく正常な精子形成が観察され精巣の回復が確認された。

以上の研究の結果、*ovas-GFP/STII-YI* 系統を用いてその生殖腺の GFP 蛍光画像を解析することにより、化学物質の生殖腺の発達と分化に及ぼす害作用を生きた状態で検出可能であることが明らかとなった。また成熟した生殖腺への影響および清水飼育による回復過程の観察も同一個体で可能となった。*ovas-GFP/STII-YI* 系統は、内分泌かく乱化学物質の影響評価やそのメカニズムを解明する上で有用なモデルになるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は、生殖細胞で特異的に発現する *vasa* 遺伝子の調節領域に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を結合させたコンストラクトを、透明なメダカ (STII 系統) に導入した透明・光るメダカ (*ovas-GFP/STII-YI* 系統) を用い、内分泌かく乱化学物質の影響を評価したものである。

まず、ふ化後1, 5, 10, 15日令の *ovas-GFP/STII-YI* 系統仔魚について、生殖腺の GFP 蛍光面積を測定すると同時に、生殖腺を取り出して GFP 蛍光を持つ生殖細胞数を調べた。その結果、遺伝的メスの GFP 蛍光面積および生殖細胞数は、ふ化後1日令から遺伝的オスのそれらに比べ有意に増加し、10日令では約10倍となっていた。よって、10日令仔魚の生殖腺の GFP 蛍光面積を測定することにより、生きた状態で生殖腺発達と雌雄差を観察可能であると結論している。

続いて、エストロゲン様作用を持ち、環境中から検出されているエチニルエストラジオール(EE₂)を、受精直後の胚にマイクロインジェクション (0, 0.1, 0.5, 2.5, 5.0 ng/egg) し、本物質の性分化への影響を調べた。その結果、0.5 ng/egg以上のEE₂を投与した10日令仔魚の遺伝的オスの中に、生殖細胞数および蛍光面積ともに遺伝的メスと同レベルまで増加した個体が出現した。さらに、仔魚を100日令成魚まで飼育して生殖腺組織を調べたところ、0.5 ng/egg以上の投与区で、オスからメスへ性転換した個体が現れた。よって本メダカ系統を用いれば、EE₂による性分化異常を GFP 蛍光面積の測定により10日令で迅速かつ簡便に検出可能であることがわかった。

次に、EE₂が及ぼす *olvas-GFP/STII-YI* 系統の成熟した生殖腺への影響を調べるため、60 日令成魚を EE₂ (0, 47.8, 94.8, 216, 522 ng/L) に 4 週間水から曝露し、生殖腺 GFP 蛍光面積を測定した。その結果、216 ng/L より高濃度の曝露区のオス精巣では、蛍光面積が開始時の約 30 %にまで減少し、組織は萎縮して結合組織が大部分を占めていた。また、522 ng/L 曝露区のメスでも卵巣の蛍光面積が曝露開始時の約 50%にまで減少し、再生産への大きな障害が予想される状態であった。さらに、60 日令オス成魚を EE₂(0, 43.7, 85.8, 215, 473 ng/L)に 3 週間曝露した後、EE₂を含まない水で 6 週間飼育して、同一個体における精巣の蛍光面積の変化を経時的に観察した。その結果、精巣の蛍光面積は、曝露 3 週目に 215 ng/L 以上の曝露区で対照区の 25 %にまで減少したが、6 週間後には蛍光面積は曝露開始時の値にまで回復し、精巣の結合組織は殆ど消失して、正常な精子形成が観察された。本結果は、EE₂による成熟生殖腺への影響と回復の過程を、同一個体で生きたままで連続観察した初めての報告である。

以上要するに、本論文は、*olvas-GFP/STII-YI* 系統を用いてその生殖腺の GFP 蛍光画像を解析することにより、化学物質の生殖腺の性分化と発達に及ぼす作用を生きた状態で検出可能であること、成熟生殖腺への影響およびその回復過程が同一個体で観察可能であることを明らかにしたものであり、水産生物環境学の発展に寄与する価値ある業績と認められる。

よって、本研究は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	イン グオジュン 殷 国 俊 (中 国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博乙第149号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	APPLICATION OF CHINESE MEDICINAL HERBS FOR NON-SPECIFIC IMMUNO-STIMULATION AND HEPATOPROTECTION IN FISH (魚類における中国産薬草の非特異的免疫刺激および肝臓保護作用とその応用)
論文調査委員	(主査) 教授 中尾実樹 (副査) 准教授 柚本智軌 自然免疫応用技研株式会社 研究開発担当取締役 稲川裕之

論 文 内 容 の 要 旨

Aquaculture is developing, expanding and intensifying throughout the world, especially in Asian countries, however, the frequent outbreaks of various kinds of fish diseases have constituted the most important threat to the sustainable development of aquaculture. The usefulness of antibiotics for infectious disease control has been challenged by its potential harm to the public health due to antibiotic resistance and residue problem, therefore there is an urgent need to search for alternatives. In the recent years, there has been growing interest in the use of Chinese Medicinal Herbs (CMHs) to prevent and control both infectious and non-infectious fish diseases because of their well documented immunostimulating and

hepatoprotective effects in human beings and terrestrial animals.

The studies presented in this dissertation aimed to evaluate the effects and clarify the possible mechanisms of immunostimulation and hepatoprotection of several CMHs in fish. Two herbal polysaccharides (*Astragalus polysaccharide* and *lentinan*) were chosen for the in vitro tests for immunostimulation in the Common Carp (*Cyprinus carpio*). Results showed that both herbal polysaccharides enhanced the production of reactive oxygen species and nitric oxide by macrophage and stimulated the proliferation of peripheral blood leukocytes (PBLs) in a dose-dependent way. Up-regulation of cytokine gene expression was seen in *lentinan* stimulated macrophages (IL-1 β) and *Astragalus polysaccharide* stimulated PBLs (IL-1 β , TNF α , iNOS and IL-10). Four CMHs (*Astragalus radix*, *Ganoderma lucidum*, *Scutellaria radix*, *Lonicera japonica*) were tested for their in vivo effects of non-specific immunostimulation in the common carp (*Cyprinus carpio*) and/or the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Results showed that all the herbs, used alone or in combination or with vaccine, can stimulate the non-specific immune responses of fish, as shown by enhancing some components of the innate immune system such as the respiratory burst activity and phagocytosis of phagocytic blood cells, lysozyme activity and circulatory antibody titres in plasma during certain periods of feeding experiments. Disease resistance of fish can be increased by the inclusion of *Astragalus radix*, *Ganoderma lucidum* and *Lonicera japonica* in the diets as shown by the increased survival after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Glycyrrhiza glabra* extract was chosen and tested for its hepatoprotective and antioxidant effect in the Common Carp (*Cyprinus carpio*) using an in vitro model of carbon tetrachloride (CCl₄) induced hepatocyte injury. Results showed that pre-treatment and pre & post-treatment of the hepatocytes with *Glycyrrhiza glabra* extract significantly reduced the elevated levels of lactate dehydrogenase, glutamate oxalate transaminase, glutamate pyruvate transaminase and malondialdehyde and increased the reduced levels of superoxide dismutase and glutathione peroxidase by CCl₄, suggesting its protective effects against CCl₄ induced hepatocyte injury.

The results presented in this dissertation demonstrated the non-specific immunostimulating and hepatoprotective activities of CMHs in fish, suggesting that CMHs can be potentially used as immunostimulants and hepatoprotective agents for the prevention and control of infectious and non-infectious diseases in aquaculture.

論文審査の結果の要旨

近年、中国における養殖漁業生産が急速に伸びている一方で、感染症および非感染性の疾病による養魚の大量損失が大きな問題となっており、さまざまな問題点をもつ抗生物質に替わる、免疫学的な魚病の予防と治療法の確立が急務となっている。中国では、古来から各種薬草を用いた人間や家畜の疾病予防と治療が成果を上げている。そこで、本研究では、同様な漢方薬草による魚病被害の軽減方策の確立を目指し、中国産の薬草が養殖魚の非特異的自然免疫機構に及ぼす増強効果および肝細胞障害保護作用を検討した。

まず、*Astragalus radix* (黄芪) から抽出した多糖 (APS) およびシイタケ由来の β -1,3-glucan である *lentinan* がコイの末梢血および頭腎の白血球に与える in vitro での免疫刺激効果を検討した。その結果、*lentinan* は主に頭腎マクロファージによる IL-1 β 産生を促進した一方で、APS は末梢血白血

球による炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF α)、および誘導性一酸化窒素合成酵素の産生を 2~6 時間以内に上昇させ、魚類に急性の炎症反応を惹起させることを明らかにした。さらに、APS 投与後 8~24 時間で IL-10 の発現が誘導されることも認め、APS で誘導された急性炎症応答が IL-10 で終息されるという、APS による一連の自然免疫応答メカニズムを提唱している。

これらのサイトカイン産生刺激効果は、APS などの漢方薬草抽出物が魚類にも免疫賦活作用を示すことを示唆したので、4 種の薬草 *A. radix*、*Ganoderma lucidum* (霊芝)、*Scutellaria radix* (コガネバナ、黄芩)、*Lonicera japonica* (スイカズラ) の熱水抽出物をコイおよびティラピアに経口投与し、非特異的免疫機能の刺激効果とワクチンの増強効果を検討した。コイを用いた解析では、特に *A. radix* と *G. lucidum* の混合投与によって、*Aeromonas hydrophila* ワクチン投与魚および非投与魚から分離した末梢白血球の貪食活性、活性酸素産生能および血漿のリゾチーム活性と抗体価が上昇した。また、*A. hydrophila* による上記ワクチン接種魚および非接種魚の攻撃試験を実施したところ、*A. radix* と *G. lucidum* の混合投与は両群の生残率を向上させることが判明した。ティラピアを用いた同様の試験においても、活性酸素産生能を除いて、コイの場合とほぼ同様の免疫賦活および感染防御効果を認め、特に *G. lucidum* と *L. japonica* の混合投与に高い効果を見いだした。

さらに、近年中国で頻発するものの治療が困難なままである養殖魚の肝臓障害 (緑肝症) に対する、*Glycyrrhiza glabra* (甘草) の予防、治療効果を検討した。コイ肝細胞の初代培養に四塩化炭素を加えて細胞障害を誘発する *in vitro* 実験モデルによって解析したところ、*G. glabra* 抽出物を四塩化炭素処理前あるいは処理と同時に投与すれば、培養上清中の各種逸脱酵素 (乳酸脱水素酵素、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ、およびグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ) を指標とした細胞障害を有意に軽減できることを見いだした。また、その肝細胞障害軽減効果は、四塩化炭素処理で低下する肝細胞による活性酸素除去酵素 (グルタチオンペルオキシダーゼおよびスーパーオキシドディスムターゼ) の発現レベルを、*G. glabra* 抽出物が上昇させるためであると考察している。

以上要するに、本研究は中国産各種薬草が魚類の免疫系に与える影響を分子・細胞レベルで解析し、養殖魚の感染症および肝臓障害の防除に応用するための基礎的知見を蓄積した点で、比較免疫学、水族生化学に寄与する価値ある業績と認める。よって本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有すると認める。