

論文提出による博士学位

| | |
|-----------|--|
| 氏名 | 田中 真二 |
| 学位記番号 | 生博 乙第 29 号 |
| 学位記授与の日付け | 平成 16 年 3 月 25 日 |
| 学位論文題目 | Studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, <i>Epinephelus septemfasciatus</i> at grow-out stage (育成期のマハタのウイルス性神経壊死症に関する研究) |
| 論文審査委員 | 主査 教授・宮崎 照雄 教授・柏木 正章 教授・神原 淳 広島大学大学院生物圏科学研究科 教授・中井 敏博 |

要 旨

マハタは美味で価格が高いことから、新しい海産養殖魚種の一つとして期待され、その養殖生産量は増加している。しかし、マハタ養殖ではその育成段階において、表層での横転遊泳と鰓の膨満を主徴とする大量死が高水温期に頻発し、マハタ養殖振興における最も大きな阻害要因となっている。これまでの予備的な研究では、こうした症例の病魚の神経組織から betanodavirus が検出されている。本ウイルスは世界各地で主に種苗生産期の海産魚に大量死を引き起こすウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN) の原因ウイルス (nervous necrosis virus: NNV) である。しかし、マハタから検出された betanodavirus の病原性は未検討である。本研究では、育成期におけるマハタの大量死の病因論に関する研究および予防策に関する検討を行った。

第 1 章では、マハタ病魚から検出された betanodavirus を健康なマハタおよびキジハタに人為感染させた結果、自然発病魚と同様の異常遊泳を伴う死亡と病理組織学的変化 (神経細胞の壊死と空胞形成) が再現され、病変部での betanodavirus の増殖が確認されたことから、本ウイルスの病原性が確認された。従って、育成期におけるマハタの高水温期の異常遊泳を伴う大量死は VNN によることが明らかにされた。また、本ウイルスは高水温で強い病原性を示した。

第 2 章では、自然発病魚の病理組織学的観察を行い、その中枢神経系の病変から原因ウイルス (SGNNV) の経鼻感染が疑われた。そこで、育成期のマハタの鼻腔に SGNNV を注入する感染実験を行った結果、異常遊泳

と神経組織の病変が再現され、また、SGNNV は鼻腔上皮から嗅神経、嗅球を経て嗅葉で増殖し、中枢神経系全体に拡がることが確認された。自然発病魚および実験感染魚の病理組織学的観察および電子顕微鏡による観察では、SGNNV は中枢神経系および眼球網膜の種々の神経細胞に顕著に感染し、また軸索を被覆する希突起膠細胞にも感染することが確認された。一方、顕著な感染病巣に隣接する髄膜の細胞、病巣部で増殖した小神経膠細胞および網膜の Muller 細胞といった非神経細胞は感染を免れていた。このことから、SGNNV は主に神経細胞を標的とすることが明らかにされた。なお、VNN は「ウイルス性脳症および網膜症」とも称されるが、本研究では中枢神経系の各所に多数のマクロファージの浸潤像が観察されたことから、正確には脳症ではなく脳炎とすべきと考えられた。

第 3 章では、マハタを含めた数種の海産魚に対して RG 型に属する SGNNV の感染実験を行い、病原性の有無を調べた。betanodavirus は 4 種の遺伝子型 (SJ (シマアジ) 型, RG (キジハタ) 型, TP (トラフグ) 型および BF (マツカワ) 型) に大別され、これまでの研究では遺伝子型により宿主特異性が異なることが示唆されている。ウイルス添加海水への浸漬による人為感染の結果、RG 型 NNV の宿主であるマハタおよびヒラメで病原性が確認され、また、これまで VNN の発生例のないマダイでは病原性が確認されなかった。このことは、これまでに示唆されている遺伝子型と宿主特異性の仮説と一致した。一方、同じ RG 型 NNV の宿主であるクエで全く病原性が確認されず、逆に TP 型 NNV の宿主で

あるトラフグで高い病原性が確認されたことはこれまでの仮説と矛盾した。これらの結果から、betanodavirusの宿主特異性につながる生物学的特性は複雑であり、上記の4種の遺伝子型のみにより決定されるわけではないことが示された。

第4章では、本症の予防対策として、マハタのSGNNVに対する防御免疫反応とワクチンの可能性について検討した。SGNNVの人為感染を耐過したマハタの血清は1:158~1:1257の高いウイルス中和抗体価を示した。また、耐過魚あるいは非感染魚の血清で処理

したSGNNVをそれぞれキジハタに接種した結果、前者が有意に低い死亡率を示したことからも、SGNNV感染耐過魚では獲得免疫が成立していることが示された。さらに、SGNNVの大腸菌組み替え外被タンパクを接種されたマハタは少なくとも110日間にわたり高い中和抗体価(平均1:160~1:480)を示し、また、感染実験における死亡率も対照区に比べて有意に低かった。これらの結果から、マハタにおけるVNNに対するワクチンの可能性が示唆された。

論文提出による博士学位

| | |
|-----------|---|
| 氏名 | 石川 健一 |
| 学位記番号 | 生博 乙第30号 |
| 学位記授与の日付け | 平成16年3月25日 |
| 学位論文題目 | 乳酸菌スターカルチャーを用いた低食塩発酵漬物の開発 |
| 論文審査委員 | 主査 教授・小宮 孝志 教授・古市 幸生 教授・久松 眞 医学部教授・樋廻 博重 |

要 旨

ヨーグルト、チーズなどの発酵乳製品では、乳酸菌をスターカルチャーとして利用する製法が一般的である。それらの利用は、食中毒菌や腐敗菌の生育阻止、品質の均一化、製造期間の短縮、好ましい風味の形成などの優れた利点がある。一方、漬物の製造では、乳酸菌を始めとするスターカルチャーの利用技術はまだ確立されていない。厳寒な気候のもとで長期間かけて野菜を発酵・熟成させることで、腐敗を回避し、穏和な風味の形成が進行することが知られている。したがって低温発酵は低塩もしくは無塩の漬物の製造にとって有力な方法と考えられる。

そこで本研究では、低食塩発酵漬物を製造するための乳酸菌スターカルチャー法を確立することを目的として、野菜、果物から分離された菌株、および酪農用菌株について、大根を用いたモデル系を利用して低温発酵能を有する乳酸菌を選択した。100株の乳酸菌を検定した結果、*Leuconostoc* sp. D-133株、*Lactobacillus casei* L-14株、*Pediococcus* sp. AG-1株、*Enterococcus faecium* ATCC 14432株、*Lactococcus diacetylactis* N-7株、*Lactococcus lactis* SC-10

株、*Lactobacillus acidophilus* A-100株、*Lacto-bacillus plantarum* AHU1526株、*Lactobacillus plantarum* N-3-2株などを選択した。このうち、特に優れていたD-133株とL-14株の2株は何ら栄養補給することなく緩やかに増殖し、有害微生物の生育を阻止して長期発酵を行うことができた。乳酸発酵大根の香気成分分析を行った結果、D-133株を接種して60日を経過すると「こく」や「まろやかさ」に関与するといわれている2, 3-ブタンジオールが220 µg/ml生成した。また、一定量以上の生成で不快臭となるアセトアルデヒド、アセトイン、ジアセチルはほとんど生成しなかった。一方、L-14株接種ではうま味成分である遊離グルタミン酸が増加することが明らかとなった。D-133株、L-14株を接種した大根では、対照と比べて褐変が抑制され、肉眼的にも白色が維持されたことから、乳酸菌接種による変色防止効果が確認された。

より豊かな風味を醸成し、さらにフェージ汚染に対応するため、混合乳酸菌スターの検討を行った。その結果、D-133株を 2.2×10^6 /g、L-14株を 3.5×10^7 /gの条件で赤かぶに混合接種し、10°Cで発酵させることで、発酵の初期段階でD-133株の菌数が増加し、不快なア