

## Information

**Hiroshima University has granted the Doctor's degree to the following researchers.  
The list is only concerned with the Graduate School of Biosphere Science.**

### DEPARTMENT OF BIOSPHERE SCIENCE

March 5, 2014

Doctor of Philosophy Chikako KUSAKA

March 5, 2014

Doctor of Agriculture Kangdong JIANG

March 5, 2014

Doctor of Philosophy Mari MORIMOTO

March 5, 2014

Doctor of Philosophy Bambang ARIYADI

March 5, 2014

Doctor of Agriculture Sachio KONO

September 1, 2014

Doctor of Agriculture Keisuke YAMAMOTO

September 1, 2014

Doctor of Agriculture Rongqinsi DAI

September 1, 2014

Doctor of Philosophy Ahmad Syazni KAMARUDIN

September 1, 2014

Doctor of Philosophy Norshida ISMAIL

September 1, 2014

Doctor of Agriculture Takashi MORIMOTO

### DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 5, 2013

Doctor of Agriculture Kei SASAKI

March 5, 2013

Doctor of Agriculture Kojin NAKADA

March 5, 2013

Doctor of Agriculture Xiaojun PAN

March 5, 2013

Doctor of Agriculture Maki KAMIMOTO

**DEPARTMENT OF ENVIRONMENT DYNAMICS AND MANAGEMENT**

September 1, 2014

Doctor of Philosophy

Dekoum Vincent Marius ASSAHA

September 1, 2014

Doctor of Philosophy

Zhilu Fu

## Physiological study on developmental method of in vitro maturation using human oocyte

Chikako KUSAKA

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

ヒト卵体外成熟培養法開発のための生理学的研究

日下 千賀子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

ヒトでは、挙児希望の夫婦において男女のどちらかに生殖障害がある場合、不妊治療として体内成熟卵を用いた体外受精 (IVF) が行われる。しかし、加齢により卵巣機能が低下した症例では、体内成熟卵を得ることが難しく、未成熟卵を採卵し、体外で受精可能な状態へと成熟させる体外成熟培養技術に注目が集まっている。しかし、ヒトにおいて未成熟卵の採卵数が少なく、ヒト卵に適した体外成熟培養条件が確立されていないため、体外成熟卵の IVF 後の胚発生能は、体内成熟卵と比較し低いのが現状である。

したがって本研究では、未成熟卵の採卵法の開発と、体内の卵成熟過程を体外で模倣する培養法の考案を行い、高い発生能を有するヒト卵の獲得が可能な体外成熟培養法の確立を目的として研究を行った。

### 採卵前の卵胞刺激ホルモン投与が体外成熟培養に及ぼす影響の検討

卵胞期での卵胞刺激ホルモン (FSH) 投与は卵胞数増加だけではなく、卵丘細胞層の肥厚化、卵胞ホルモン ( $E_2$ ) 分泌を促進し、採卵時における卵の形態像や受精後の発生能に影響を及ぼすため FSH 投与周期区と自然周期区において、採卵数、末梢血ホルモン、卵・卵丘細胞複合体 (COC) の卵丘細胞層数、IVF 後の発生能、胚移植後の妊娠能を比較した。その結果、FSH 投与周期区において、卵丘細胞層数は増加しなかったが、採卵数と IVF 後の桑実期胚到達率が有意に高く、末梢血ホルモンでは、 $E_2$  濃度が有意に高く、LH/FSH 比が有意に低かった。また、FSH 投与周期区では、グレード B COC において、最も胚盤胞期胚到達率が高く、グレード C COC と比較し桑実期胚到達率が有意に高い値を示した。胚移植を行うと妊娠率は FSH 投与周期区全体で 52.6% であり、卵丘細胞層数による違いはなかった。以上の結果から、採卵前の FSH 投与により採卵数が増加し、卵胞閉鎖を阻害する結果、IVF 後の発生能が向上したと考えられた。体外成熟卵を用いた IVF による胚移植での妊娠率は 4~25% とする他の報告と比較し、本法では 52.6% と高く、体外成熟卵であっても高い妊娠能を持つことが明らかになった。

### 体外成熟培養における培養条件の検討

ブタ卵において体外成熟培養時の黄体ホルモン ( $P_4$ ) 濃度は卵の成熟能や発生能と関連するため、ヒト卵において  $P_4$  に着目した。

第二章において、発生能の高かった卵丘細胞層数 3 層以上の Good morphology グループ (グレード A COC とグレード B COC) と発生能の低かった卵丘細胞層数 2 層以下の Poor morphology COC (グレード C COC) の体外成熟培養後の  $P_4$  濃度を比較した結果、Poor morphology COC が有意に低かった。そこで、Poor morphology COC に対し、20 ng/ml  $P_4$  を添加し培養すると、無添加と比較し、受精率が有意に高かった。しかし、Good morphology グループでは、20 ng/ml  $P_4$  添加により成熟率は上昇したが、桑実期胚到達率、胚盤胞期胚到達率は有意に低い値を示した。以上から、採卵時の卵丘細胞層数により  $P_4$  分泌量の不足が予想される場合は、外因性  $P_4$  を添加することによって卵の受精後の発生能が向上すると考えられた。

### 体外成熟培養における培地への添加因子の検討

体外成熟卵の発生能向上のため、体内成熟卵の卵胞液成分の解析から卵の発生能を向上させる物質の特定を試みた。体内成熟卵の採卵時に卵胞液を採取し、IVF後に胚盤胞期胚に到達した発生良好群と、分割期胚で停止した発生不良群とに卵胞液を分類し、メタボローム解析に供試した。その結果、発生不良群と比較し、発生良好群の卵胞中にプリンヌクレオチドが高濃度に存在することが明らかになった。このため、未成熟マウスを用いて卵胞発育・排卵期におけるペントースリン酸経路と *de novo* でのプリンヌクレオチド合成経路に着目し、卵胞発育時の代謝酵素の遺伝子発現を検討した。Glucose 6 phosphate dehydrogenase をコードする *G6pdx* の mRNA 発現量は eCG 非投与と比較し、eCG 投与後24時間で有意に上昇し、eCG 投与後24時間と比較し、eCG 投与後48時間時点において有意に減少していた。しかし、その酵素活性は eCG 投与後、有意に減少し、mRNA 発現量の経時変化と一致しなかったため、体内での卵の発生能獲得に、ペントースリン酸経路によるネガティブフィードバック機構によって制御されたプリンヌクレオチド合成経路の関与が推定された。

発生良好群に高濃度で存在した Hx をヒト卵体外成熟培養系に4 mM 添加し、IVM後の成熟能、IVF後の発生能に及ぼす影響を検討した結果、Hx 添加区では胚盤胞期胚に到達した卵は得られなかった。以上から、卵の発生能の獲得過程についてプリンヌクレオチドが関連する事、プリンヌクレオチドの発現量の調整にはペントースリン酸経路の律速酵素である Glucose 6 phosphate dehydrogenase が関与すると考えられた。しかし、ヒト卵の体外成熟培養系への応用には、Hx 添加によりネガティブフィードバックが推察されるため、その添加時期、添加量、添加する因子の詳細な検討が必要であると考えられた。

本研究では正常月経周期の女性において、FSH 投与後に未成熟卵を採取し、それを体外成熟することで、体外受精胚移植により、妊娠率は52.6%と他の報告の妊娠率(4~25%)よりも高い成績を得ることができた。さらに、未成熟卵を卵丘細胞の付着により形態的に分類することで、形態良好なCOCには200 mIU/ml FSH, 1 IU/ml hCG 添加培地を用いること、形態が不良なCOCには上述のホルモン環境に20 ng/ml P<sub>4</sub>をさらに添加することで良好な成績が得られることも明らかとなった。したがって、本研究により、採卵時の卵丘細胞層数による新規のヒト卵体外成熟培養条件を考案することに成功した。本法が普及することにより、高齢女性の不妊治療成績が向上すると期待される。

キーワード：高度生殖補助医療、卵体外成熟培養、ステロイドホルモン

## The Cooperative Nature of Rural Cooperative Economic Organization in China

Kangdong JIANG

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

中国における農村合作経済組織の協同組合的性格に関する研究

姜 康董

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本論文では、(1) 中国における改革開放期、とりわけ「合作社法」の制定以降、改革開放期の第三段階の農民合作経済組織の歴史的な位置づけと特徴を明らかにすること、(2) 第三段階の農民合作経済組織の多様な現状を整理し、その典型的な把握を試みること、(3) 現在主流となっている「三大合作」の事例分析を行い、その協同組合としての実態について実証的に検討すること、を課題に、統計データの解析と事例調査による総合的な把握を通して接近した。

第1章では、百年近くの歴史を抱えている合作社の歴史的な位置づけ及び特徴を段階ごとに明らかにした。中国における農村合作社の発展を3つの時期に区分し、協同組合の特徴を時期ごとに検討した。

第2章では、中国における農業産業化の先進地といわれる江蘇省の專業合作社に対する実態調査に基づき、專業合作社が協同組合としての実態、すなわち協同組合的性格をどれくらい有しているのか、協同組合として展開する可能性はあるのか、という点について形成主体別類型毎にあきらかにした。まず先行研究から形成主体別類型を整理した。次に、事例合作社6社について実態に即し分析した。その結果を見てみると、協同組合としての実態を有すると考えられるのは1社のみであり、他の合作社については、出資、運営、利益分配の全てについて不十分な実態が多くみられた。

第3章では、形成主体が大規模農家である農民主導組合型專業合作社の事例を通して、農村能人から農民主導組合型への変貌、いわゆる協同組合性を如何に形成されたのかにおける大規模農家の役割と、その展開過程の実態、組織・事業構造を明らかにした。事例のS專業合作社では大規模農家としての栽培技術と篤農家としての商業的能力を共有するのみならず、そこから産出した利益も共有された。また、複数の中心人物はそれぞれに生産、供給、加工、販売など各方面の利益を代表し、相互に監督しているなかで、一人一票制、合作社員大会の開催、利用高での配当からみると、協同組合性を獲得しつつある。

第4章では、農村能人主導型の中で、「農村經紀人」が主体となったG專業合作社の事例を取り上げ、その組織・事業構造といった実態を明らかにした。「農村經紀人」のS氏はG合作社を設立し、客観的な成果を掲げ、農家の増収にはG合作社の役割が大きいと考える。しかし、S氏が個人の資本を蓄積するため、一人一票での選挙を行わず、G合作社において民主的運営が見当たらない。ただし、政府からの財政支援などを保つため、G合作社は協同組合性を持つようになる必要性が出ており、また、若い農家たちが非民主的運営への不満や反対によって、これからG合作社が実質的に協同組合性を獲得する可能性があることが明らかになった。

第5章では、社区合作社と土地合作社について、その展開が多くみられる江蘇省の事例に基づき、その協同組合としての実態をどの程度有するのか、今後展開する可能性を有しているのか、という点を明らかにし

た。まず、社区合作社の集団有資産の運営は社区合作社の立地により運営方式が異なるため経済効果に大きく影響することがわかった。そして、社区合作社は実質的に社区委員会をベースにした組織であり、社区合作社は社区委員会と離れられない関係にある以上、協同組合性を獲得するのは難しい。続いて、土地合作社は選挙せず社区委員会が管理するケースが多く、利用高配当が行われず、出資高配当が土地の賃借料となり、協同組合としての実態がほとんど有していないが、民主的に管理し、一人一票制に基づき選挙が行われる土地合作社も存在している。

第6章では、中国初の法人格が与えられた、江蘇省の村組織——社区委員会が形成主体とする徐州市P社区合作社の事例を取り上げ、社区委員会から社区合作社への変貌プロセスを明らかにした。P合作社としての運営組織は事実上行政組織と同一であり、P合作社としての選挙が行われていないが、農家が集団有資産の運営により所持株の配当をもらえることは、従来の社区委員会より一歩前進したと考える。また、一人一票での選挙が行われていることから（2枚看板とはいえ、合作社員は自らの意志により投票したため）、協同組合としての実態を部分的に有しているといえる。ただし、P合作社は協同組合への展開の可能性が制限されていると考えられる。

第7章では、中国における土地合作社の先進地とされる江蘇省無錫市のM土地合作社を取り上げ、その展開過程における社区委員会と元村幹部の役割と、その運営実態を明らかにした。元村長であるU氏は、一人一票での選挙によりM合作社の理事長となり、M社区委員会は、技術の普及・指導にあたる政府機関の紹介に大きな役割を發揮し、U氏は販路確保のための中核的役割を果たした。また、M合作社は一人一票での選挙と自ら農業の経営と、汚職を防ぐため役員立候補の制限を評価すべきと考える。この意味では、村幹部主導型土地合作社は民主的に管理され、協同組合性を有している可能性が大きい。

補章では、江蘇省で初めて登録された金融株式合作社——O合作社を取り上げ、形成主体が供銷合作社である「地方型農村金融合作社」の展開過程の実態、組織・事業構造を明らかにした。運営実態をみると、O合作社では、O合作社は民主的管理が行われていないが、O合作社は合作社員に資金面での助けを提供し、「地方型農村金融合作社」の果たすべき役割を果たしたことにより、合作社員に対してO合作社は存在意義があるものであると明らかになった。

以上の事例を通じて、農村合作經濟組織は技術普及、農家所得の向上、農業生産・流通効率の向上などの面において、存在意義が大きいことがわかった。しかし、農村合作經濟組織における一人一票制、合作社員大会の開催、利用高での配当などの面において、多くの課題が存在し、合作社員である農家の利益が侵害されていることも事実である。これらの問題をいかに解決していくのかといった点は、今後の中国農村の動きに大きく影響するといえる。

**キーワード：**農村合作經濟組織、三大合作、協同組合的性格

## Studies on animal assisted education for children at Japanese kindergartens

Mari MORIMOTO

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

幼稚園の保育者の動物飼育に対する「知識」と「態度」の向上を図る試み  
— 幼児と飼育動物に配慮した「動物介在教育」の実現を目指して—

森元 真理

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 第I章 序論

子どもと動物の関わりに関する研究が海外において進んでおり、動物との関わりが子どもの心に及ぼす影響について様々な報告がなされている。その中で、生き物を介して子ども達の心を育む動物介在教育(Anima; Assisted Education)が注目されつつある。わが国の幼稚園では、子どもの心の発達を主な目的として動物飼育の行われてきた歴史がある。しかし、動物を教育の場に介在させる前提として、適切な飼育管理が必須条件であるにもかかわらず (IAHAIO, 2001)、動物の管理に対する保育者の意識や対応には様々な問題のある事が指摘されている。そこで本研究は、幼稚園の動物の適切な飼育管理とその動物を介在した効果的な教育を実践するために、飼育動物として最も多く飼われているウサギを対象に飼育管理の実態を明らかにし、幼稚園と保育者の抱える問題の改善を試みた。

### 第II章 幼稚園における動物飼育の実態

幼稚園飼育動物の管理状況についてのフィールド調査はほとんどない。そこで本研究では、広島県内の47幼稚園を対象として主要な飼育動物種であるウサギの飼育管理に関する調査を実施すると共に、ウサギを飼育している特定の園を対象に管理状況(飼育管理及び健康管理)を長期間観察した。47園を対象とした調査では「ウサギの飼育管理状況」を主成分分析で、「ウサギの状態」を100点満点で評価した。その結果、飼育管理の指標として「ウサギのQOLの向上に不可欠な管理項目」と「ウサギの生存にとって不可欠な管理項目」の2主成分が抽出され、主成分得点の散布図からは多くの園がウサギのQOLと生存に関する管理項目において不適切な状況にある事が明らかとなり、両管理項目が適切な幼稚園はウサギの状態評価の得点が90点以上となる傾向にあった。また、ウサギの管理状況の長期的な観察調査からは、掃除や餌やり等の基本的な飼育管理すら十分に行われていない事が明らかになった。

以上から、幼稚園において飼育動物を介した動物介在教育を実現するには、まず不適切な飼育管理状況を改善する事が必要であり、そのためには保育者の動物飼育に対する「知識」と「態度(取り組み姿勢)」を向上させる事が必要であると考えられた。

### 第III章 幼稚園における幼児と保育者の動物飼育(ウサギとモルモット)との関わりの実態

保育者は飼育を通じた教育効果に満足しているとされるが、不適切な飼育管理の幼稚園ではむしろ負の教育効果があるという指摘もある。本研究では、幼稚園の保育者と年中児と飼育動物との関わりを約1年間にわたり継続的に観察してその実態を明らかにすると共に、卒園前の幼児に面接を実施して、1年間の動物飼育が幼児の心に及ぼす影響を調べた。その結果、幼児の飼育動物に対する関わりでは不適切な場面が多く確認され、関わり時には保育者が不在のことが多く、不適切な発話や行動はほとんど注意されなかった。また、期間中に半数以上の飼育動物が怪我や病気となり死亡した個体も見られた。面接では、飼育動物との日常的な関わり頻度が高かった幼児でも、動物

の病状やその死について自発的に話す事はほとんど無く、幼児と動物との関わりは希薄と考えられたので、保育者が期待する思いやりの心を育む教育には繋がっていない事が示唆された。

#### 第IV章 ウサギの飼育管理に関する保育者の「知識」の向上を目指して—ニュースレターの配布を通した保育者への教育—

本研究では、飼育動物ニュースレターを通して飼育に対する保育者の知識と意識の向上を図る事を試みた。31園を対象に7ヶ月間に渡って「飼育動物ニュースレター」を毎月郵送すると共にアンケートを同封する事で、動物飼育に対する教員の知識と意識の変化を調査した。その結果、ニュースレター配布後6ヶ月の間に「飼育改善案」を実践した保育者の数は安定していたが、実践しなかった保育者の数は徐々に減少が見られ、期間の後半では両者の割合には有意な差が認められた事から ( $P < 0.05$ )、一部の保育者の飼育に対する知識と意識の向上に一定の効果のある事が示唆された。

今後はニュースレターの更なる質の向上を図ると共に、保育者と直接的な意見交換が行える訪問活動や講習会等を実践する事が必要であると考えられた。

#### 第V章 ウサギの飼育管理に関する保育者の「態度」の向上を目指して—飼育ウサギへの名づけが保育者の「態度」に及ぼす影響—

本研究では、愛情と関心の指標として幼稚園の主要な飼育動物であるウサギの「名づけ」に着目し、広島県内47園を対象に飼育管理状況との関連性を調べた。その結果、ウサギに名前をつけている園の方がつけていない園よりも季節管理（暑さ、寒さ対策等）を有意に実践していた事から ( $p < 0.05$ )、「名づけ」行為と適切な飼育管理との間に関連性のある事が示唆された。さらに名付けについて質的な考察を行うと、管理が適切な園では外見に基づいた単純な「名づけ」よりも動物への思い入れを示す「名づけ」が多く認められた。子ども達の心を育むための動物飼育では、「ウサギ」といった概念的な総称として呼ぶのではなく、ウサギの各個体を認識した上で名前を付ける事が望ましいと考えられたので、今後は飼育動物に対する「名づけ」を組み込んだ教育プログラムについて検討していきたい。

#### 第VI章 総括的考察及び結論

動物に関するネガティブな情報は子ども達の嫌悪感や恐怖心を増幅させるとの報告もあり (Peter et al., 2008)、本調査で認められた「不衛生な飼育環境」や「病気の動物の放置」等が見られる状況では、幼児が飼育動物と日常的に関わる事が教育的に逆効果になると考えられた。子どもは「自分にとって重要な人」「養育にあたる人」等の行動を模倣すると言われており、保育者の動物への接し方が子ども達と動物との関わり方に大きく影響を及ぼすと考えられる。わが国では、多くの幼稚園が動物を飼育しているので、飼育管理状況が不適切な園の保育者の「知識」と「態度」の改善は急務である。

今後は保育者の「知識」や「態度」の向上を図るために、本研究で試みた以外の方法についても検討し、幼児と飼育動物の双方に配慮した動物介在教育の実現を目指したい。また、改善が困難な園については、飼育以外の方法で動物介在教育の実践方法を検討し、飼育動物を通した動物介在教育を積極的に実践したいと考えている園に対しては、幼児教育学や動物管理の専門家と連携して研究する事で、保育者の「知識」と「態度」を高めながら、飼育動物の福祉に配慮した教育プログラムを開発したいと考えている。

キーワード：動物介在教育、幼稚園、ウサギのQOL、保育者の「知識」と「態度」



## Studies on the mucosal barrier system in the oviduct of hens

Bambang ARIYADI

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

ニワトリ卵管の粘膜バリアシステムに関する研究

バンバン アリアディ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### Goal of the study

Mucins, tight junctions of epithelium, and leukocyte activity form mucosal barrier to play roles to prevent infection in the mucosal tissues. The goal of this study was to determine the mechanism by which mucosal barrier mediated by mucins and tight junction is formed in the mucosal epithelium of the oviduct. Specifically, it was focused on the mechanism by which mucin synthesis for mucosal barrier is stimulated by oviductal growth, gonadal steroid and bacterial component, LPS, in the lower segment of oviduct, namely vagina, uterus or isthmus. Then, the existence of the epithelial barrier formed by tight junction was also examined.

### 1. Formation of mucosal surface barrier by mucin in the lower oviductal segments and its changes with egg-laying phase and gonadal steroid stimulation in hens.

White Leghorn laying and molting hens were used. Molting hens were given either sesame oil (control groups) or estradiol benzoate (EB groups) via i.m. injection ( $n = 5$  per group). The lower segments of oviduct (vagina, uterus, and isthmus) of these birds were collected. Localization and gene expression of mucosal mucin were analyzed by quantitative RT-PCR and immunohistochemistry. Localization of mucin polysaccharide was performed by alcian blue (AB) staining. In the vagina, uterus and isthmus, mucin expression was formed, and immunoreactive mucin5AC and AB-positive mucopolysaccharide were localized in the mucosal epithelium. Their expression and densities were reduced in molting hens compared with laying hens, and up-regulated by EB. These results suggest that mucin synthesis in the lower segments of the oviduct is reduced due to decline of circulating estrogen level.

### 2. Induction of mucin expression by lipopolysaccharide in the lower oviductal segments in hens

The mucosal tissues of the vagina and uterus were collected from White Leghorn laying and molting hens, and molting hens with or without i.m. injection with 1 mg EB daily for 7 d. These tissues were cultured in TCM-199 culture medium with or without LPS for 1.5 or 3 h. Then, mucin expression was analyzed by quantitative RT-PCR. Cultured tissues were also processed for paraffin sections and stained with AB. Mucin expression in the cultured vagina and uterus tissues of laying and molting hens was up-regulated by LPS in a dose- and time-dependent manner. However, there was no significant response to LPS for induction of mucin in the tissues of EB-group hens. These results suggest that mucin expression responsible for mucosal barrier is stimulated by LPS in the vagina and uterus of both laying and molting hens.

### **3. Toll-like receptor signaling for the induction of mucin expression in response to lipopolysaccharide in hen vagina**

Expression of TLR4, its adaptor molecules, and transcriptional factors in the vaginal mucosa of laying and molting hens treated with or without estradiol were examined by RT-PCR. Expression of mucin in the cultured mucosal tissue stimulated by LPS together with inhibitors of transcriptional factors was analyzed by quantitative RT-PCR. Expression of TLR4, its adaptor molecule; MyD88 or TRIF, and transcriptional factors; cFos and cJun, were declined in molting hens compared with laying hens, and was upregulated by estradiol. In mucosal tissue of laying hens, mucin expression was upregulated by LPS, whereas it was suppressed by inhibitors of transcriptional factors. These results suggest that MyD88-dependent pathway in the downstream of TLR4 and transcriptional factor of NF $\kappa$ B and AP-1 participate in the induction of mucin expression by LPS in the vaginal mucosa. Also, these signaling functions may be declined during molting due to the decline of circulating estrogen level.

### **4. Expression of tight junction molecule “claudins” in the lower oviductal segments and their changes with egg-laying phase and gonadal steroid stimulation in hens.**

The lower segments of oviduct of these birds were collected. Gene expression of *claudin-1*, *-3*, and *-5* were examined by RT-PCR. Localization of claudin-1 was examined by immunohistochemistry. Expression of *claudin-1*, *-3*, and *-5* genes and density of claudin-1 protein in the lower oviductal segments were significantly higher in laying hens than in molting hens, and their expression was upregulated by EB. These results suggest that barrier functions of the mucosal epithelium at the lower oviductal segments may be disrupted due to reduction of claudin expression in molting hens.

### **5. Conclusion**

This study has identified that the mucosal barrier system mediated by mucin and tight junction is formed in hen oviduct. This mucosal barrier system in the oviduct is expected to play important roles to protect the oviductal tissue from infection by pathogenic microorganisms. The expressions of mucin and tight junction molecules were declined in molting hens with regression of oviduct and upregulated by estrogen. Thus, the mucosal barrier system formed by mucin and tight junction are probably weakened due to less circulating estrogen level. It was also established by this study that mucin expression was stimulated by LPS of Gram negative bacteria such as *Salmonella* organism through NF $\kappa$ B and AP-1 mediated manner in the oviduct.

**Key words:** chicken oviduct, molting, estradiol, mucin, claudin

## Nutritional property and feeding of short panicle paddy rice cultivar for ruminant production

Sachio KONO

*Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Livestock Technology  
Research Center, Shobara 727-0023, Japan*

極短穂型飼料用イネの栄養特性と給与技術に関する研究

河野 幸雄

広島県立総合技術研究所畜産技術センター, 727-0023 庄原市

### 緒論

米の消費量の減少や貿易自由化要求など我が国の水田農業を取り巻く環境が大きく変化する中、水田保全と飼料自給率の向上のために水田を活用した飼料生産の必要性が高まっている。しかし、保水性を重視して造成されてきた水田は、飼料作物や牧草の生産には適さない例も多い。そのため政府は、平成12年から「水田農業経営確立対策」の中で水田に飼料用のイネを栽培し、植物体全体をサイレージ化して飼料利用するイネ WCS (ホールクロップサイレージ) を推奨した。その後も今日に至るまで「水田農業構造改革対策」、「農業者戸別所得保障制度」、「経営所得安定対策」を通して、それらの対象作物にイネ WCS を位置づけ、栽培利用を推進している。その結果、平成25年度における全国の WCS 用イネの栽培面積は2万5千ヘクタールを超え、夏作の主要な飼料用作物として定着してきた。

これまで各地でそれぞれの気候風土に適応したイネ WCS 専用のさまざまな品種が開発され、実際に栽培されるようにもなっている。しかし、元来、湖沼植物であるイネは、茎が中空のため嫌気性発酵のサイレージ調製時に空気が残存することにより、良質な発酵品質を得にくい。また、茎葉の表面がシリカ層で覆われているために繊維の消化性が低い。さらに、モミ殻の構造が強固なため無傷モミでは第一胃内での微生物による分解を受けにくく、モミに含まれるデンプン質子実の利用性が抑制されるなど、牛用飼料としては必ずしも適していない。すなわち、従来品種の飼料用イネは主に WCS 収量の増加を育種目標にして開発されてきたため、上述したような飼料としての欠点を克服するものではなかった。

最近、独立行政法人近畿中国四国農業研究センターで、モミの数が極端に少なく、栄養損失の原因になる不消化子実の排泄を大幅に抑制する極短穂型イネの開発が行われ、新たな WCS 用イネとして「たちすずか」が品種登録された。本研究は、「たちすずか」を反芻家畜用 WCS 飼料として実際に利用する立場から、施肥量や収穫時期の違いによる化学成分や第一胃内分解性の変化や栄養価および泌乳用飼料、肥育用飼料としての生産効果などを究明したものである。

### 極短穂型飼料用イネ「たちすずか」の成分

「たちすずか」の化学成分は、代表的な従来品種である「クサノホシ」に比べて、全草に対する穂部の割合が少ないが、穂部の化学成分は同等であった。一方、茎葉部の糖および糖を含む非繊維性炭水化物の含有率が大幅に高かった。そのため全草の化学成分でみると、「たちすずか」は家畜の利用し易い非繊維性炭水化物の含有率が従来品種と遜色ないことが判明した。また、従来品種では糖が少ないためサイレージ調製の際に発酵しにくいことが課題であったが、茎葉部にショ糖を多く蓄積する「たちすずか」はサイレージ発酵の面でも有利と推察された。

次に、栽培や収穫条件による化学成分の違いを明らかにするため、肥料として牛ふん堆肥プラス発酵鶏ふんを用いた「たちすずか」の栽培試験を行い、施肥水準と出穂後日数が化学成分に及ぼす影響について調べた。その結果、窒素施肥量が「たちすずか」の粗蛋白質含有率に影響しやすいことや、出穂後日数の経過に

伴い、粗蛋白質だけでなく、非繊維性炭水化物の含有率が大きく変化することを明らかにした。

### 収穫時期による栄養価と第一胃内分解性

出穂後日数0, 30, 60日目に収穫した「たちすずか」と「クサノホシ」について、in situ 法による第一胃内分解性の評価を行った結果、「クサノホシ」が出穂後日数に比例して乾物と繊維成分の分解性が大幅に低下するのに対し、「たちすずか」では出穂後60日まで高い分解性を維持することを明らかにした。このことは、従来品種の「クサノホシ」ではさまざまな事情によって収穫適期が遅れると飼料価値を大きく低下するのに対し、「たちすずか」は刈遅れによる飼料価値の低下を生じにくい長所を有することを意味している。

ヒツジおよび乾乳牛を用いて、黄熟期収穫による「たちすずか」WCSと「クサノホシ」WCSの消化試験を行った結果、「たちすずか」では繊維消化率が高かった。さらに、繊維消化性への影響が大きいとされているリグニンとケイ酸の含有率を調べた結果、「たちすずか」での繊維の高消化性は、リグニンとケイ酸の含有率が共に「クサノホシ」よりも少ないことに起因することを明らかにした。

通常の和牛肥育においては、粗飼料として頻繁に利用されているイナワラや牧草ストロー類は、TDN含有率が低いという欠点を有するが、同時に脂肪交雑に不利となる $\beta$ -カロテン含有率も低いという肥育用飼料としての利点を持っている。そこで、秋の黄熟期と冬季に収穫した「たちすずか」WCSのTDN含有率を比較した結果、冬季収穫の「たちすずか」では秋収穫したものよりTDN含有率が大幅に低かった。他方で、冬収穫「たちすずか」はイナワラよりもTDN含有率が高く、低 $\beta$ -カロテンの要素も兼備していることから、和牛肥育用の粗飼料として望ましい特徴をもつと推察した。

### 泌乳牛と肥育牛への給与効果

「たちすずか」WCSもしくは「クサノホシ」WCSを含む2種類の混合飼料(TMR)を泌乳牛に給与した結果、「たちすずか」区は想定通りに不消化子実の排泄に伴う栄養損失が著しく少なかった。また、「たちすずか」区では「クサノホシ」区よりも泌乳量が多く体重も増加するなど、泌乳牛への給与メリットを有することを示した。

肥育牛への給与について、「たちすずか」WCS、「クサノホシ」WCSおよびイナワラを用いた3種類のTMRの比較試験を行ない、「たちすずか」区はイナワラ区よりも増体成績がよく、「クサノホシ」区に比べて肉質成績が優ることを明らかにした。別途、「たちすずか」WCSの配合割合を高く設定したTMRの給与試験を実施し、「たちすずか」WCSは粗飼料多給型の肥育体系でも利用できる可能性を示唆する結果も得た。

以上、極短穂型飼料イネ品種「たちすずか」に関する一連の研究を通して、「たちすずか」は飼料としての栄養特性が優れ、乳牛、肉牛双方への給与効果も大きい画期的な飼料イネ品種であることを明らかにした。

キーワード：飼料用イネ品種、ホールクロップサイレージ、第一胃内分解性、栄養価、乳生産効果、肥育効果

## Studies on yearly and seasonal changes in demersal fish and crustacean assemblages and factors affecting such changes in the East China Sea and the Yellow Sea

Keisuke YAMAMOTO

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

東シナ海と黄海における底生魚類・甲殻類群集の経年・季節変動と  
その変動要因に関する研究

山本 圭介

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 緒言

東シナ海と黄海には、1,100種を超える魚類が分布し、そのうちの約200種が漁獲対象となる。本海域はわが国にとって重要な漁場のひとつであったことから漁業資源の管理を目的に1948年から漁業資源研究が始められ、数多くの研究が行われた。しかし、東シナ海と黄海の全域を対象とするスケールでの研究は研究資源の制約により少なく、さらに、過去の研究は生物群集の季節的な分布変動を考慮していないため観察された群集構造の変化が生物群集の混合によるものか、群集構造の変化であるのかが明確でない。このため、東シナ海と黄海では生物群集の長期変動に関する精度の高い情報が不足している。そこで、西海区水産研究所により1986～2007年の間に実施された合計21期の着底トロール調査を解析し、黄海冷水系水塊と黒潮系水塊に分布する底生魚類群集、エビ類群集、短尾類群集の長期的な構造変化とその要因を明らかにした。

### 第1章 底生生物群集の経年変動

東シナ海と黄海に分布する2つの底生生物群集で、1990年代と2000年代の間に浅海性種の分布密度が急激に減少した。この現象は、東シナ海と黄海の沿岸から浅海域にかけて長期間にわたって強い漁獲圧が加えられた結果であると考えられた。また、分布域がほとんど重ならないウマヅラハギ（沿岸性）とサラサハギ（沖合性）の自然交雑個体が確認された。これはウマヅラハギの沿岸部の産卵場に強い漁獲圧が加えられたため、サラサハギが利用する沖合域の産卵場を利用するウマヅラハギが増加したことで発生したと考えられた。

### 第2章 底生生物群集の季節変動

東シナ海と黄海には、季節を通して分布の変化が小さく環境傾度の変化も小さい2つの水塊（高水温と高塩分の黒潮系水塊と低水温の黄海冷水系水塊）、夏季・秋季に分布が大きく拡大、冬季に縮小し環境傾度の変化が大きい沿岸水系水塊（低塩分）の3つの主要な水塊が分布した。東シナ海と黄海の底生魚類相は夏季に黒潮系水塊の分布が北側に拡大することにより暖海性種の分布域が広がり出現種数と種多様度が高くなった。底生エビ類相は夏季と冬季ではほぼ共通した。しかし、夏季には3つの主要な水塊にそれぞれ暖海性、冷水性、低塩性のエビ類群集が分布したが、冬季には沿岸水系水塊が縮小したため暖海性と冷水性の2種類のエビ類群集に変化した。大型カニ類群集で明瞭な季節変化がみられず夏季、冬季ともにヒラツメガニが優占した。

### 第3章 総合考察

本研究において、最初に冷水性の浅海性種が、つづいて温帯性の浅海性種の分布密度が急激に減少した。一方、沖合性と広深性種の分布密度は減少するも調査期間の終わりまで一定の水準で維持された。これは、

大陸棚上で浅海性種と沖合性種・広深性種ともに強い漁獲圧を加えられて分布密度が減少したが、浅海性種では沖縄舟状海盆により周囲の海域からの移入が制限され減少する一方であったのに対し、沖合性種と広深性種は大陸棚斜面域からの移入があることにより減少が軽減されたと推察された。

また、強い漁獲圧下では漁獲圧に抵抗力をもつ少数の種が優占したため、生物群集の種多様度が減少した。種多様度が低下すると生態系が乱獲から回復する能力が低下するとされ、漁獲圧に対してより脆弱となると考えられる。

現在の東シナ海と黄海の底生生物群集は、周辺国から加えられた強い漁獲圧により資源が著しく低位で、乱獲に対して脆弱な状態にあると考えられる。今後も強い漁獲圧が継続されることが予想され、資源崩壊が危惧される。魚類群集の保全を実施するため国際的な漁業管理を行う必要がある。

キーワード：底生魚類，底生甲殻類，東シナ海，黄海，資源変動

## Development of the unconventional processing agricultural market and agro-industry in China

Rongqinsi Dai

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

中国における非従来型加工農産物市場の展開と食品加工資本

戴 容秦思

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

中国における食料市場をとりまく環境が急激に変貌するなか、加工農産物とりわけ近年になって中国国民の食生活に浸透してきた「非従来型」加工農産物に関する食品安全性問題が多発している。本研究では、市場展開過程の相違によって、中国の加工農産物を「従来型」と「非従来型」に大別する。うち非従来型加工農産物とは、加工製品あるいは原料となる農産物が外部から中国に導入され、新たに加工部門が産業として成立し、従来存在しなかった市場が新規展開された加工農産物をさす。中国における非従来型加工農産物市場が改革開放後に急速に拡大した主な背景として、関連食品工業の急成長があげられる。

本研究は、中国における非従来型部門の食品加工資本に注目し、その動向が加工農産物市場の展開に与える影響を明らかにした。具体的にコーヒー焙煎業、プロイラー産業、乳業の3業種を事例に分析した。主な研究手法として、既存文献の研究、統計分析、フィールドリサーチを行った。

### 第1章 中国における食料市場の変化

本章では、中国の食料市場の変化とその特徴を、とくに加工食品に注目しながら明らかにした。その変化として、食料需給構造の変化によって食料市場が拡大し、食料消費に対する選択性が急激に増加した。特に加工食品の消費増大が顕著にみられた。加工食品市場に注目すると、国内の原料市場と製品市場の不均衡な展開が生じていることを指摘した。消費側の側面では、小売段階において大規模の外資系小売店の展開という動きがみられ、消費者も大規模小売店から加工食品を大量購入する点が顕著にみられた。中国の加工食品市場は、国民所得の上昇、大衆消費社会の形成を前提として形成されたといえる。

### 第2章 中国食品工業の展開と食品加工資本

本章では、中国の食品工業の展開過程を、国家経済体制の転換過程および諸政策の影響をふまえながら明らかにした。その結果、中国の食品加工部門は、国家体制および企業体制の変化によって資本として成立し、資本主義的蓄積の方向へ進展していった。この動きはさらに政策によって推進され、一部業種の集中およびグローバル化が進んでいる。外国資本の参入が多くみられる中、依然として国有資本の市場支配力が強いことが特徴的である。中国における食品加工資本の展開に対する国家政府による政策的・資本的関与が強いといえる。

### 第3章 食品加工資本の製品市場対応

本章では、食品加工資本と製品市場との相互影響の解明を目的に、加工資本が製品市場に対する働きかけと対応について検討した。その結果、大規模加工資本の製品を主流とする全国統一市場が形成される中、中小規模加工資本は、地元での販路確保ないし固定化のための有効な手段として、製品チャネルの特約化を展開していることが明らかになった。このように、大規模加工資本の働きかけは製品市場に大きな変化をもたらし、そうした変化もまた、中小規模加工資本の市場対応に大きな影響を与えていることが指摘できる。

#### 第4章 乳業資本の原料調達構造と生乳生産者

本章および第5章、第6章では、食品加工資本の原料調達行動が原料生産に与える影響を、事例をとりあげて検討した。

本章では、乳業資本の原料調達構造と生乳生産者への影響を明らかにした。その結果、原料の契約生産が最も多くみられる中、乳業による原料生産部門の統合の度合いは、乳業資本がどれだけ原料生産段階へ資本投下をしているかということと正比例する。生乳生産側にとって、契約生産の問題点は主に、生産資材面および原料価格面における自由度の低さと交渉立場の弱さにある。農業生産資材の共同調達・利用ができる農民的酪農生産者組織の結成がより重要となってくるといえる。

#### 第5章 コーヒー生産の展開と加工資本の原料調達

本章では、中国におけるコーヒー生産の展開と加工資本による原料取引の実態を明らかにした。その結果、生果実チェリーを原料として買取る加工資本による契約農家の統合度合いは、一次加工品である生豆を買取る加工資本より高いことが明らかになった。契約農家によるチェリー精選処理の把握は、加工資本からの規制を緩和させる重要な点である。ただし、コーヒー製品の大量生産を行う加工資本はチェリー精選処理を内部化し、チェリーを買取る傾向が強い。加工資本による統合の度合いが強い中、原料の加工技術をある程度把握することが農家の自主的経営につながる重要な点であると指摘した。

#### 第6章 村落基盤型プロイラーインテグレーションの展開

本章では、郷鎮企業主導による村落を基盤とするプロイラーインテグレーションの性格を事例分析明らかにした。その結果、村落基盤型プロイラーインテグレーションの展開過程は、農外資本による原料生産農家に対する収奪といったプロイラーインテグレーションの一般形態と違って、原料生産農家自らの商品化過程としても考えられる。こうした地域における血縁・地縁組織の基盤に基づくプロイラーインテグレーションは、農村地域住民の経済的利益の実現につながっていることが明らかになった。ただし、資本主義的生産体制をとっている限り、加工資本としての村落基盤型プロイラー企業の行動はいずれその基盤の規定から逸脱する可能性もある。

#### 結論

非従来型加工農産物は中国における生産と消費の伝統的・慣習的性格を有していないため、中国独自の市場や生産体系が形成されなかった。中国に参入した非従来型部門の加工資本は資本主義先進諸国においてすでに確立され、資本主義的生産体系と加工農産物市場を同時に中国にもたらしたといえる。非従来型原料の生産者の多くは加工資本の誘致によって生産展開され、その生産活動も加工資本によって掌握されていることが明らかになった。非従来型部門の加工資本の展開に伴う農業生産者の組織化・企業化は、実質資本主義発展による農民の分化・分解過程であるとえる。また、非従来型部門を始めとする中国食品工業の資本主義的展開は、加工農産物の輸入拡大による国内原料生産・加工の空洞化、資本本位の技術革新による原料価格の切下げ、原料品質向上の放棄、そうした加工製品の長期消費の安全性問題等をもたらす可能性がある旨を指摘した。以上、本研究は、非従来型部門の分析を通して、中国における食品工業の急成長の実態とそれが加工農産物市場に与える影響を示唆した。中国の国内農業および国民生活の向上に帰する加工農産物市場の展開を考える際、上記の懸念に留意すべきであり、①原料生産者組織の協同組合理の展開、②原料生産者への直接的経済支援、③原料生産者の加工分野への参入の3点の振興が重要と考えられる。

キーワード：改革開放、加工資本、統合、農産物市場、原料



## Biological studies on the wild populations of yellowfin black seabream, *Acanthopagrus latus* in Japan

Ahmad Syazni KAMARUDIN

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

日本産キチヌの生物学的研究

アマド ジャズニー カマルディン  
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Fish biology and their life history are important in order to contribute to the optimization of the species management in each population. In Japan, *Acanthopagrus latus* is known as one of the important Sparidae fish along with red seabream, *Pagrus major* and black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. Stock enhancement programs of *P. major* and *A. schlegelii* are heavily conducted in Japan, in contrast to *A. latus*. Hiroshima Bay had been chosen as a study site to study the biology and life history of *A. latus* due to the fact that more than twenty million *A. schlegelii* had been released since the early 1980s in Hiroshima Bay. Unfortunately, fundamental study on the biology of *A. latus* inhabiting Hiroshima Bay is still unclear.

This thesis mostly focused on the biological character of *A. latus* inhabiting Hiroshima Bay. The length-weight relationship, age and growth of *A. latus* showed that the fish are properly inhabit and adequately suitable with the environmental condition of Hiroshima Bay. *A. latus* spawned in October and November, suggesting that the physiology and metabolism in term of reproduction inside the *A. latus* is different with other Sparidae fish inhabiting Hiroshima Bay. Yellowfin seabream is known as a protandrous hermaphrodite where it is matured as male before transforming to female in later stage of life.

During the spawning season, the feeding intensity of *A. latus* had drop dramatically, suggesting that the effect of spawning on foraging process. The IRI % obtained in the present study demonstrated that the diet composition of *A. latus* in Hiroshima Bay was mainly composed of polychaetes, bivalves and decapods. Ontogenetic shift of prey preference were detected in *A. latus* while growing where it transformed from selective feeder to more generalist feeder. Besides, considering seasonality changes, the feeding niche showed that *A. latus* was a more selective feeder in winter and a more generalist feeder in spring. This suggests physiological change in metabolism during winter when the seawater temperature was low, such that *A. latus* actively sought prey inhabiting the sediments where temperatures could be a bit warmer.

The preferences for a distinct prey category contribute to reducing the feeding overlap amongst the species; therefore, the stable isotope analysis can be used at least in part as a tool to differentiate them according to food preference. For instance, *A. latus* can be categorized as omnivorous and the prey preferences are difference from other Sparidae fish, resulting in different stable isotope signature. The stable isotope signature also can be used to determine the food webs of *A. latus*. In present study, finding

suggested that fishes in Hiroshima Bay possess complex food webs of inshore area due to the variation of stable isotope signatures.

A total of ten microsatellite loci had successfully isolated from the genomic library of *A. latus* and amplified reproducible peaks. These microsatellite loci revealed to be useful tool for determining the genetic variability and genetic structure of *A. latus* in western Japan. Using microsatellite, there is high genetic variability found among seven populations of *A. latus* in western Japan. Furthermore, the inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) among *A. latus* subpopulations in western Japan revealed evidence for the occurrence of weak, but significant inbreeding in four locations (Hiroshima, Kochi, Tokushima, Mie). Global  $F_{ST}$  among seven populations in western Japan revealed no genetic structure, due to high homogeneity between populations.

Furthermore, mitochondrial DNA (mtDNA) sequence was also used to distinguish the genetic status of *A. latus* in western Japan, revealing no genetic structure detected among seven populations. mtDNA sequence of Japan population were then compared to mtDNA sequence of *A. latus* in China population in regard to understand the history of fish movement in the past. There are seven haplotypes recorded to be shared with the Chinese population, where one haplotypes (EF506769) from the Chinese population are found in 14.3% of individuals in western Japan. Given high nucleotide and haplotype diversities, we suggested that *A. latus* including Chinese population have been impacted by secondary contact with the previously differentiated lineage or due to long evolutionary in a stable population.

Additionally, historical expansion during the past glaciations that changed the sea level and sea surface temperatures have resulted in population mixing of *A. latus* with Chinese population. Three major haplotype clades consist of individuals from Japan and China has been drawn based on unweighted pair-group method with arithmetic mean using (UPGMA) analysis. Moreover, *A. latus* are not found in Okinawa Island, Japan, suggesting that the Kuroshio Current acts as a barrier for larval dispersal across the Kuroshio axis (between populations in mainland Japan and Okinawa).

In conclusion, based on the result, it can be explained that growth and life cycle of *A. latus* in Hiroshima Bay is not affected by the stock enhancement programme of *A. schlegelii*. The distinct prey category of *A. latus* can be the decent indicator for the survival and viability of the fish for a long time in Hiroshima Bay. Furthermore, microsatellite and mtDNA analysis revealed a single population of *A. latus* in western Japan, thus indicating single management unit should be implemented prior to stock enhancement program in the future. Furthermore, the growth performance of *A. latus* together with the genetic characteristic shown that the fish were able to survived and distributed in low level temperature. Interestingly, mtDNA haplotype revealed that *A. latus* of Chinese and Japan population are connected, possibly since the past glaciations and indicate long evolutionary process in a stable population.

**Key words:** *Acanthopagrus latus*, genetic resources, growth, feeding habit, Hiroshima Bay,

## Ecological studies on parasitic copepods infecting fish fins, with special references to the life cycle and infection-site specificity

Norshida ISMAIL

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

魚類の鰭に寄生するカイアシ類の生態学的研究、  
特に生活史と寄生部位特異性について

ノシダ・イズマイル

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Fundamental of parasitology need a vast knowledge of many associated field such as biology, ecology and molecular. In chapter 1, basic introduction of the concept parasitism, site-specificity and some brief information about two species of parasitic copepods studied in the thesis were described. This recent study involved basic information on life cycle and ecology of *Peniculus minuticaudae* (Pennellidae). More advance study was carried out as an effort to understand the mechanism underlying the site-specificity to the fins of *Caligus fugu* (Caligidae).

In chapter 2, the complete life cycle of a pennellid copepod *Peniculus minuticaudae* Shiino, 1956 was proposed based on the findings of all post-embryonic stages together with the post-metamorphic adult females infecting the fins of threadsail filefish *Stephanolepis cirrhifer* Temminck and Schlegel, 1850 cultured in a fish farm at Ehime Prefecture, Japan. The hatching stage was observed as infective copepodid. The life cycle of *P. minuticaudae* consists of six stages separated by moults prior to adult: copepodid, four chalimi and adult. In this study, adult males were observed frequently in precopulation amplexus with various stages of females however, copulation occurs only between adults. Fertilized pre-metamorphic adult female carrying spermatophores may detach from the host and settle again to undergo massive differential growth to become post-metamorphic adult female. Comparison in the life cycle of *P. minuticaudae* has been made with three known pennellids; *Lernaeocera branchialis* Linnaeus, 1767, *Cardiodectes medusaeus* Wilson, 1917 and *Lernaeenicus sprattae* Sowerby, 1806. Among the compared species, *P. minuticaudae* is the first ectoparasite pennellid was discovered to complete life cycle on a single host without any infection site preferences between infective copepodid and fertilized pre-metamorphic female stage.

In chapter 3, seasonal ecology aspects of *Peniculus minuticaudae* infecting threadsail filefish *Stephanolepis cirrhifer* cultured in a fish farm at Ehime Prefecture, Japan was documented. The study was carried out from September 2011 to August 2012. A total of 120 host fishes were examined for parasites infection. Prevalence, mean intensity, composition of parasites based on life cycle stages, distribution of parasite on host, and reproduction parameters were investigated. Prevalences of *P. minuticaudae* infection relatively high all year rounds but decreased during the last two months of sampling period. Adult females (post-metamorphic, ovigorous, metamorphing and pre-metamorphic) contribute to the highest composition of the parasite population throughout the study period. Only adult females were found attached on the fins, and they show preference to the second dorsal fins. Based on

the abundance of post-metamorphic females carrying egg strings, the hatching stage (copepodid) and the count of pre-copulation couples, it is assumed that the spawning season of *P. minuticaudae* was during spring with the peak reproductive capability in mid-spring.

*Caligus fugu* (Yamaguti, 1936) is parasitic copepod from the family Caligidae (Copepoda: Siphonostomatoida) which is highly host-specific to puffer fishes such as *Takifugu* spp. In Japan *C. fugu* was recorded to infect several species of pufferfish including the tiger puffer *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel, 1850), grass puffer *Takifugu niphobles* and the panther puffer *Takifugu pardalis* (Temminck & Schlegel, 1850) (Yamaguti, 1936; Ikeda et al., 2006; Ohtsuka et al. 2009). Pufferfish industry in Japan has been nowadays facing an economic problem from the heavy infection of parasites on high value fish, the tiger puffer *T. rubripes* (Ohtsuka et al., 2009; Maran et al., 2011). Towards constructing an effective parasite management, in chapter 4 I tried to investigate the chemical substances involved in host and site recognition of infective stage of *C. fugu*, the copepodid using behavioral and molecular approach. In the present study behavioral observation using Y-tube bioassay showed that copepodid *C. fugu* positively responded to the stimulation of puffer-conditioned water by actively swimming upward and toward the arm containing stimulus water. The active and directional swimming activity was reduced after the FCW was heated, suggesting that the semiochemical candidate(s) might be in a form of water-soluble protein. The SSH cDNA library of *T. rubripes* pectoral fin has been successfully constructed. Copepodids showed activation and directional response when stimulated using a series of diluted culture medium that may contain the secreted chemical substances from cells transfected with the *T. rubripes* pectoral fin SSH cDNA library.

Finally, in chapter 5, several parasites shows the preference to infect the host's fins were listed. The factors influencing these preferences also were discussed. The results from chapter 2 and 3 shows that for some copepods, all stages in the life cycle can be spent on the fins while for some other copepods, infection site or host switching might occur at the later stage of the life cycle particularly among adult females, where they will find a new infection site which provide them a better survival and fecundity. From chapter 4, we can concluded that site-recognition in copepods might involve the recognition of specific chemical cues released from the host to the environment. However, more efforts are required to understand the mechanism leading to site –specificity which is not yet fully explained by the recent discovery.

**Key words:** Parasitic copepod; Pennellidae; Caligidae; Site-specificity; Life cycle; Seasonal infection

## Effect of simultaneous exposure to skin sensitizers on skin sensitization response

Takashi MORIMOTO

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

皮膚感作性物質の混合影響

森本 隆史

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

皮膚感作性物質により引き起こされるアレルギー性接触皮膚炎（皮膚感作性反応）は、発症頻度の高い職業病である。実際の化学工場では、同時に複数の化学物質を使用したり、複数の化学物質を混合して使用する。そのため、化学物質の毒性において混合影響を予測すること、すなわち、混合操作を行うことで現れる毒性を事前に理解することが極めて重要である。しかしながら、これまでの混合影響に関する研究報告は、吸入毒性に関するものが中心で、その報告数も非常に少ない。皮膚感作性反応は化学物質に特異的な反応であり、吸入毒性とは「特異性」の点で大きく異なることから、既知の研究報告から皮膚感作性における混合影響を予想することはできない。そこで、本研究では、皮膚感作性物質を感作相において混合することの影響（皮膚感作性における混合影響）に関する検討を行なった。

第2章第1節では、モルモットを用いて皮膚感作性における混合影響を検討した。化学物質の皮膚感作能の評価で良く利用されるマキシマイゼーション試験を用いて、皮膚感作性物質には Th1型皮膚感作性物質として DNCB および Oxa, Th2型皮膚感作性物質として PA および TDI を選択し、Th1型同士（DNCB と Oxa）、Th1型（DNCB）と Th2型（PA）、Th2型同士（PA と TDI）を混合した。各混合液で動物を感作させた後、混合したそれぞれの皮膚感作性物質に対する皮膚感作性反応の変化にて、混合影響を評価した。Th1型同士、Th2型同士の混合では、混合操作による皮膚感作性反応の低減を認め、Th1型と Th2型の混合では、何ら変化は認めなかった。以上の結果より、皮膚感作性において混合影響の存在が明らかとなり、その影響の発現の有無は、混合する皮膚感作性物質の組み合わせにより、決定されることが明らかとなった。

第2章第2節では、マウスを用いて皮膚感作性の混合影響を検討した。前節と同じ混合の組み合わせで、マウス耳介腫脹試験を用いて、同様に混合影響を評価した。モルモットの結果と同様に、Th1型同士、Th2型同士の混合では、混合操作による皮膚感作性反応の低減を認め、Th1型と Th2型の混合では、何ら変化は認めなかった。以上の結果から、皮膚感作性における混合影響の存在と、その影響の発現が混合する皮膚感作性物質の組み合わせにより決定されることに加え、これらはモルモットとマウスで大きな違いがないことが明らかとなった。

これら動物実験の結果から、感作相での作用機序は Th1型（DNCB）と Th2型（PA）で異なることが考えられた。混合影響の発現を決定する作用機序を明らかにするため、皮膚感作性物質ごとの作用機序を比較することとした。まず、第3章では、皮膚感作性物質の抗原形成とその分類について検討を行なった。

皮膚感作性の抗原形成を模倣した *in chemico* 試験の1つであるグルタチオン結合性試験を用いて、DNCB, Oxa, PA および TDI の抗原形成について調査した。DNCB, Oxa および PA では、グルタチオンとの結合物が認められたが、TDI では結合物は認められなかった。また、グルタチオン結合物が認められた DNCB, Oxa および PA の反応性は、いずれも80%以上と高い値を示した。以上の結果より、抗原形成において、使

用した皮膚感作性物質は、「DNCB, Oxa および PA」と「TDI」に分類されることが判明した。

第4章では、皮膚感作性物質による皮膚樹状細胞の応答とその分類について検討を行なった。皮膚樹状細胞は活性化されると、抗原を皮膚からリンパ節へと運搬する役割を担っている。マウスの皮膚では、3つの樹状細胞のサブタイプ（ランゲルハンス細胞, Langerin 陽性 CD11陽性真皮樹状細胞, Langerin 陰性 CD11陽性真皮樹状細胞）が存在する。そこで、樹状細胞の分類マーカーとして Langerin を用いて、皮膚感作性物質塗布の部位における Langerin 変化を調査し、皮膚樹状細胞の応答を各皮膚感作性物質間で比較した。DNCB および Oxa では、表皮において Langerin の減少が認められたが、PA および TDI では減少は示されなかった。既知の研究報告から、表皮の Langerin はランゲルハンス細胞であり、その減少はランゲルハンス細胞の活性化もしくはリンパ節への移動を示していると考えられた。以上の結果から、皮膚樹状細胞の応答では、4つの皮膚感作性物質は、「DNCB および Oxa」と「PA および TDI」に分類されることが判明した。

第3章および第4章の研究結果から、感作相における作用機序では、皮膚感作性物質ごとに異なる反応が進むことが示された。とりわけ、皮膚樹状細胞の応答における違いは、第2章の結果で示された作用機序の違いを示すものであり、混合影響の発現を決定する感作相の作用機序であるものと示唆された。

本研究により、皮膚感作性における混合影響の存在と、その混合影響の発現は、混合する皮膚感作性物質の組み合わせにより決定されることが明らかとなった。混合影響の発現に影響する感作相の作用機序として、応答する皮膚樹状細胞の役割が重要であり、皮膚樹状細胞の応答によって、皮膚感作性物質を分類することで、混合影響発現の有無を予測できることが示された。

化学物質の混合影響は、まず混合影響発現の有無を予測することが重要であり、混合影響が発現する組み合わせについては、その混合濃度によって相乗的に毒性が高まることが想定されるので、事前に対応策を講ずることが可能となり、より安全な使用に繋がると期待される。

キーワード：皮膚感作性反応, 混合影響, 抗原形成, 皮膚樹状細胞

## A study of factors which affect dimethyl trisulfide formation in Japanese sake

Kei SASAKI

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

清酒老香の主成分 dimethyl trisulfide の生成を制御する因子に関する研究

佐々木 慧

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

清酒では老香と呼ばれる比較的短期間の貯蔵で生じる dimethyl trisulfide (DMTS) を主成分とする劣化臭が知られている。清酒における DMTS の生成機構については解析が進められているが未だ不明な点が多い。一方で、保存後のポリスルフィド濃度や官能的な老香強度を目的変数とした酒質の統計解析も報告されているものの、これらの報告では製造条件の影響については解析されていない。本研究では、清酒貯蔵中の DMTS 生成に影響を与える因子の解析を目的に製造条件と測定項目を用いた統計解析、及び抽出した条件を用いた実証試験を行った。また、統計解析の結果から関連が予想された酵母の死滅と DMTS 生成の関係について明らかにした。

### 第1章 数値で表される清酒製造条件と清酒成分の統計解析

統計解析の試料には清酒製造場の協力のもと収集した上槽直後の清酒を用いた。提供された清酒は70℃で1週間貯蔵し、貯蔵後に生じる DMTS 濃度 (DMTS-pp) を GC/MS にて測定した。

DMTS-pp をはじめ多くの変数で正規分布とならなかったため、変数の正規分布を仮定しない解析法を用いるか、あるいは正規分布を示した変数と log 変換して正規分布を示した変数 [log (変数) と記述] のみを用いた解析を行った。

log (DMTS-pp) を目的変数としたステップワイズ法による重回帰分析及び partial least square regression (PLSR) 解析を行った。この2つの統計解析の結果、もろみにおける平均品温 (平均品温)、もろみの毎日の温度の合計値 (積算温度)、log (含硫アミノ酸濃度)、log (亜鉛濃度) の4つの説明変数が log (DMTS-pp) に対して重要な変数として選択され、説明率は重回帰分析では63.4%、PLSR 解析では64.2%となった。また全19の説明変数を投入した PLSR 解析の説明率は68.1%と4つの説明変数のみを投入した解析の説明率64.2%と大きな差は見られず、これらの4つの変数が重要であることが明らかになった。これらの変数に関しては次の報告がある：①清酒中の含硫アミノ酸濃度は保存後のポリスルフィド濃度への寄与が大きい、②亜鉛濃度は酵母内容物の漏出と米の溶解により増加する、③もろみの温度条件は酵母の硫黄取り込み、酵母の死滅及び内容物の漏出、原料米の溶解等の要因に影響する。加えて、品温を前期、中期、後期に分割した重回帰分析では、平均品温と積算温度に代わって前期平均品温と後期積算温度が選択された。前者は米の溶解に、後者は酵母の死滅に影響が大きいことから、温度条件が影響する様々な要因のうち、DMTS の生成には米の溶解と酵母の死滅の影響が大きいと考えられた。

### 第2章 数値で表せない清酒製造条件と DMTS 生成の統計解析と実証試験

Mann-Whitney の U 検定 (U 検定) により、数値で表すことのできない定性項目における集団間の DMTS-pp を比較した。U 検定の結果、掛米の種類、使用酵母の系統、酒母製造法、アルコール添加の有無、上槽方法の項目で、比較した集団間で危険率が低かった。

これらの項目のうちアルコール添加の有無と上槽方法が実証試験により DMTS-pp に影響する要因であることが明らかになった。小仕込み試験で得たもろみに様々な量の30%エタノールを添加して上槽したとこ

ろ、アルコール添加量が多い試料ほど DMTS-pp が減少することがわかった。また清酒を水で希釈した試験でも DMTS-pp は元の清酒の濃度より顕著に減少したことから、アルコールの添加により反応基質が希釈されることで劣化処理中の DMTS 生成速度が減少し、DMTS-pp が減少したと考えた。また上槽方法では搾り具合の指標であるもろみ垂れ歩合に注目し、同じもろみから上槽の初期、中期、末期の搾り具合の異なるサンプルを採取した。この結果搾り末期の画分で DMTS-pp が増加し、搾り具合が DMTS 生成に影響することが明らかになった。

### 第3章 酵母内容物の漏出と DMTS 生成

これまでの統計解析や過去の報告から関連が予想された酵母の死滅と DMTS 生成の関係について実証試験を行った。最高品温と最高品温保持日数を変えることで後期積算温度を変えた小仕込み試験では、DMTS-pp はメチレンブルー染色率 (MB 率)、260 nm の吸光度 (Abs260)、積算温度などの酵母の死滅に関連すると思われる項目との間で高い相関が見られた。また、ガラスビーズで酵母菌体を破碎して内容物を抽出した試験では、酵母内容物が DMTS-pp を増加させることを明らかにした。最後にもろみにエタノールを添加して酵母を死滅させた試料 (酵母死滅酒) を用いて酵母の死滅が DMTS-pp に与える影響や要因の解析を行った。酵母死滅酒では7日間の貯蔵を経ずに DMTS-pp を増加させる成分と、7日間の貯蔵後にさらに増加させる成分があることが示唆された。後者の成分は高分子化合物でかつ熱に不安定であったことから、貯蔵後に DMTS-pp を増加させる物質の候補としては酵素が考えられた。これらの結果から死滅した酵母から溶出した酵素が清酒の DMTS 生成に寄与している可能性が考えられた。加えてこの反応には25~30℃付近に DMTS-pp の増加反応の最適温度があることを明らかにした。

キーワード：清酒, 老香, DMTS, 統計解析, 清酒製造条件



## Studies on Morphology and Cytochemistry in Blood Cells of *Ayu Plecoglossus altivelis altivelis*

Kojin NAKADA

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

アユ生体防御機構解明を目的としたアユ白血球の分類とその変化

中田 公人

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

アユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) は、我が国内水面漁業の主要な魚種であり、広く種苗放流、養殖が行われてきた。しかし、近年その漁獲量が激減しており、その原因として、河川環境悪化や魚病の蔓延などさまざまな問題が提起されているが、アユ放流事業現場では人工種苗の健苗性が強く求められている。種苗生産、養殖を行う上で魚病対策は重要であり、魚病発生を未然に防止することにより、魚の健康を維持して飼育する必要がある。そのためには現場で魚の健康度をモニターする簡便な測定法の開発が切望される。それには免疫の中心である血液中の白血球を用いたモニタリングが有望といえる。しかし、アユの白血球の詳細な分類学的研究は乏しいことから、アユの血球の分類を行った。また、この同定法を用いて、各血球が疾病、ストレス等によりどのような変化を起こすかを明らかにした。

第1章では、アユの種苗生産を取り巻く問題について本研究の背景を述べ、アユ疾病対策の研究を行う上で免疫応答機構の中で中心的な役割を担っている白血球の分類学的、機能的知見は重要であるが、アユの白血球の詳細な分類学的知見は極めて乏しいことを述べた。

第2章では、アユ白血球の形態学のお呼び組織化学的研究を行い、アユ末梢血白血球の同定を行った。試験に用いたアユは、高梁川栽培漁業研究所(岡山県総社市)にて種苗生産、飼育されているアユを用いた。血液試料は Percoll による密度分配により赤血球を除き、白血球、栓球を得た。そして、塗抹用試料は Cytopsin 及び擦りガラス法により作成した。塗抹用試料は、Romanowsky の May Grunward Giemsa (MGG) 染色及び Leishwan Giemsa (LSG) 染色、Peroxidase (PO) 染色、Alkaline phosphatase (AP) 染色、Esterase 染色  $\alpha$ -naphthyl butyrate (EST  $\alpha$ -NB) 法、Acid phosphatase (ACP) 染色、さらに、Periodic acid-Sciff (PAS) 染色、Toluidin blue 染色を行った。血球は光学顕微鏡下で観察、得られた撮影画像は画像解析ソフト Image J により解析した。

アユ血液中でみられた血球の MGG 染色の染色性及び形態学的特徴から栓球、白血球の特定を行った。アユ末梢血でみられた血球は、栓球、リンパ球、好中球、好塩基球、単球/マクロファージであった。それらの末梢血での主組成は、栓球、リンパ球、好中球であり、好塩基球、単球/マクロファージの存在は希有であった。また、末梢血でみられた単球/マクロファージと形態的に類似した細胞が脾臓でみられた。各血球の特徴は、栓球は核クロマチンが均一な構造を示し、核が濃染された超小型な細胞と核が明るく染まる細胞が存在した。リンパ球は、細胞質が好塩基性に染まり、核周明庭を持っていた。大型のリンパ球は、空胞の存在など単球/マクロファージと似た特徴を持つが核周明庭の有無で判別された。好中球は、細胞質が無染色であり、核が偏在していた。

各血球の核面積(N)、細胞面積(C)を測定し、N/C 比を求めた。N/C 比によるリンパ球、好中球、単球/

マクロファージの分別はある程度可能といえるが、小型の栓球、リンパ球、好中球の核面積/細胞面積比は重複する細胞が一部みられ、その他の特徴と総合的に判断する必要がある。

魚類の特殊染色所見は魚種によりさまざまと異なることが知られている。アユの染色所見は人のものと類似した結果を示した。アユでは、リンパ球が ACP, PAS, 好中球が DAB, NAP, ACP, PAS, 脾臓単球/マクロファージが ACP, EST  $\alpha$ -NB, 栓球が ACP で陽性であった。なお、アユ栓球は PAS 染色で陰性であった。

第3章では、アユの疾病因子に対する応答に関する研究として、アユ血球組成の経月変化を6-10月の間、養殖アユの末梢血中の栓球、白血球を1カ月毎に調べた。季節、成熟等による血球組成に明瞭な変化を把握することはできなかったが、潰瘍のみられた7月のアユの血球組成によると、好中球、リンパ球は小型化、及び全好中球割合が低い状態がみられた。また、墨粒子を腹腔内に投与することにより実験的に炎症を起こし、アユの血球動態及び形態学的、細胞化学的变化について検討した。その結果、末梢血、腹腔内ともに墨粒子投与後、好中球は腹腔内では4時間で増加、末梢血では2-3日目に一時増加がみられたがその後の減少は著しくかった。単球/マクロファージは末梢血では投与まえには検出されなかったが、投与後、1日目に緩やかな増加が続いてみられ、7日目においても続いた。また、腹腔内でも投与後、増加がみられ14日目まで続いていた。すなわち、炎症部血球組成と末梢血血球組成は類似の推移を示すといえる。

異物(墨粒子、蛍光ラテックス粒子)の血球への取り込み実験は、腹腔内では、単球/マクロファージ、リンパ球は墨粒子、蛍光ラテックス粒子をよく取り込んだが、好中球は墨粒子をわずかに取込んだが、蛍光ラテックス粒子を取込みなかった。末梢血では、腹腔内とほぼ同様の傾向を示したが、好中球の取込みは腹腔内より末梢血でよかった。そして、末梢血での栓球の取込みはみられたが、赤血球はほとんどみられなかった。腹腔内と末梢血共に血球に取り込まれないフリーの粒子がみられ、腹腔内から循環系にフリー粒子の状態での移行が示唆された。

異物投与に伴い腹腔内では好中球の核崩壊細胞が投与後7-14日にみられた。また、単球/マクロファージに取り込まれた好中球やその顆粒、両細胞の接着などがみられた。また、腹腔内好中球の PO 染色像は染色様態の異なるさまざまの細胞がみられ、腹腔内では墨粒子投与後、時間経過とともに PO 染色弱陽性好中球の割合は増加、陽性好中球の割合は減少した。そして、PO 染色弱陽性好中球は Percoll 低密度域に、陽性好中球は高密度域にみられ、血球は形態的、機能的変化により密度が変化するといえる。

炎症部位の血球組成変化は末梢血に反映することから、末梢血測定データを蓄積することによりアユの健康度把握が期待される。また、炎症部位で特異的にみられる血球は疾病の指標と得るので、本研究結果で得られた白血球の同定法を用いる事により、免疫の初期の段階で働く白血球の動態が明らかとなる。本研究により、アユが疾病に至る過程の解析などが飛躍的に向上することが期待できる。

キーワード：疾病防御, アユ, 白血球, 同定, 貪食細胞, 炎症

## Studies on the control of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in the processing of vegetables

Xiaojun PAN

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

野菜の加工における腸管出血性大腸菌 O157の制御に関する研究

潘 小軍

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

近年、国内外で野菜を原因とする大規模な腸管出血性大腸菌 O157食中毒が多発し、その対策が緊急の課題となっている。本博士論文は、生食野菜およびその加工品による細菌性食中毒予防のための最重要のステップである原料葉物野菜の洗浄殺菌、さらに浅漬け等の野菜加工品における微生物制御について、実用的かつ効率的な方法について評価し、新しい提案をしたものである。

### 第1章 序論

食品の生産から消費までの微生物制御は、食品の安全確保における重要な課題である。現在、野菜加工現場では次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌が主流であるが、消費者が求める高い品質と、安全性を確保する強力な殺菌処理の両立は困難である。ハードル理論に基づいて、いくつかの微生物制御因子を組み合わせると、一つ一つのハードルを低く設定しても、全体としては十分な効果が期待できる。一方、野菜漬物や浅漬けなどの野菜加工品の微生物安全性確保において保存料などの食品添加物の使用は有効であるが、長期的にはこれらの健康への影響が憂慮されるため、人類が長い歴史の中で摂取してきた経験のある天然食材の有する抗菌性を利用した微生物制御法が期待される。本論文では、野菜の殺菌に塩素系殺菌剤の洗浄殺菌効果を検証するとともに、他の殺菌法との効果的な組み合わせや交差汚染の予防について検討した。また、野菜浅漬けやジュースなどの加工品の微生物的安全性を高める目的で、植物抽出液等の天然物の利用についても検討した。

### 第2章 塩素系殺菌剤による野菜類の洗浄殺菌

3種類の葉物野菜（レタス、ホウレンソウ、白菜）について非接種野菜（生菌数、大腸菌群）、および腸管出血性大腸菌 O157接種野菜を用いて塩素系殺菌剤（次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素溶液）の洗浄殺菌条件の最適化を行った。その結果、殺菌液の濃度や処理時間は殺菌効果に比例せず、1-2 D（対数）程度の菌数減少にとどまった。野菜の品質に影響しない実用的な浸漬処理条件は、次亜塩素酸ナトリウム（NaClO）溶液では100 ppm、二酸化塩素（ClO<sub>2</sub>）溶液では50 ppm でいずれも5分と結論した。

### 第3章 塩素系殺菌剤と物理的処理の併用効果

塩素系殺菌剤による野菜の洗浄殺菌効果を高める目的で、超音波やバブリング、低温加熱などの併用試験を行った。超音波とバブリングにより野菜に強固に付着した菌体の離脱を試みたが、洗浄効果の上昇はみられなかった。低温加熱（50℃）をした直後あるいは同時に100 ppm NaClOあるいは50 ppm ClO<sub>2</sub>など塩素系殺菌剤で処理すると殺菌効果が高まり大腸菌群では約4D減少した。これについて、付着菌自身のストレス損傷、あるいは加熱による野菜表面構造の変化によるものと考察した。

#### 第4章 野菜の塩素洗浄殺菌における交差汚染の防止

野菜加工現場では節約のため洗浄殺菌液が繰り返し使用される実態があるが、有機物による塩素殺菌の効果減少、さらには汚染ロットが入った場合の汚染の拡大などが危惧される。そこで、殺菌液を交換せずに野菜を洗浄し続けた場合の交差汚染について塩素濃度との関係から検証した。大腸菌 O157汚染野菜を初期濃度が10-20 ppm の NaClO で洗浄を繰り返すと、数回目で有効塩素濃度は1 ppm 以下に低下し、洗浄液中に O157が残存した。これで野菜を洗浄すると交差汚染が生じることを実証した。初期濃度50 ppm 以上では10回洗浄後も数 ppm 以上の塩素が残留し、交差汚染はみられなかったことから、現在推奨されている100-200 ppm NaClO での野菜の洗浄は汚染ロット混入時の交差汚染の防止に役立っていることを証明した。

#### 第5章 植物抽出液による野菜浅漬けの微生物制御

浅漬けは本来の発酵食品ではないため、食中毒菌が生残り、増殖することもある。日本では、白菜の浅漬けによる O157食中毒事件が発生し、浅漬け類製造における衛生管理が非常に重要となっている。浅漬けや漬物等の野菜加工品には保存料などの化学合成添加物が使われることがあるが、これらの長期摂取によるヒトの健康への影響が憂慮されるため、天然物質の有する抗菌性が注目されている。そこで、八角、烏梅（うばい）など中国産植物・漢方のエタノール抽出物の抗菌性を調べ、培地（白菜乳剤）や自製した白菜の浅漬けでの抗 O157効果について調べた。この結果、0.1%八角、0.1%烏梅、0.5%ガラガルの組合せにより、それぞれの単独使用よりも、生菌数、大腸菌群数、乳酸菌数、接種 O157数はいずれも減少したことから、浅漬けの安全性を高める手段として植物抽出液の利用は有効であることを示した。

#### 第6章 植物精油による野菜ジュースの微生物制御

海外では野菜ジュースやリンゴ果汁などの飲料による O157食中毒が頻発している。一方、HACCP の食品工場への導入が積極的に進められ、米国 FDA では果汁の製造工程において5 Log (5D) の殺菌を要求している。本章では八角など植物精油のジュース中での抗菌性や耐熱性に及ぼす影響について検討した。これらの O157に対する静菌および殺菌活性は酸性条件 (pH 4.5) で顕著になり、野菜ジュースに添加すると室温でも検出限界以下まで殺菌された。また、とくに八角精油は O157の耐熱性 ( $D_{55}$ ) を著しく低下させたことから、これらは加熱処理による野菜ジュースの栄養劣化を最小限にして O157の制御が可能であると考察した。

本研究は、原料野菜の洗浄殺菌やカット野菜、浅漬けなどの野菜加工品の微生物制御に関する科学的なデータを提供し、種々の制御技術を組み合わせることによる新たな知見を提示した。本論文の成果は食品製造現場における衛生管理、とくに交差汚染の防止策やその重要性について普及・啓発するもので、食品の安全性の確立への貢献が期待される。

キーワード：腸管出血性大腸菌 O157:H7, 生食野菜, 塩素系殺菌剤, 交差汚染, 微生物制御

## Studies on the identification of antiviral plant-derived compounds and their mechanism of action

Maki KAMIMOTO

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

植物由来抗ウイルス成分の同定と作用機序に関する研究

神本 真紀

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

ノロウイルス食中毒の発生防止策の構築は、日本のみならず世界においても重要な課題である。これまでに、植物由来成分である柿抽出物が強い抗ノロウイルス作用および12種の病原ウイルスに対して不活化作用を有することが判明している。しかし、柿抽出物に含まれる抗ウイルス成分やその作用機序についてはほとんど分かっていない。抗ノロウイルス物質として柿抽出物を利用するためには、これらの点を理解することが必要である。本論文は、ノロウイルス食中毒の発生を防止するため、天然由来成分によるノロウイルス制御法を確立することを目的とし、抗ウイルス成分の同定および作用機序の解明を含む以下の4つの研究を実施したものである。

### 1. 柿抽出物に含まれる抗ウイルス物質の同定

柿抽出物に含まれる柿タンニンが抗ウイルス物質である可能性が示唆されている。本項では、柿抽出物に含まれる抗ウイルス成分を同定することを目的とした。柿抽出物に含まれる縮合型タンニンの性質である収斂作用（タンパク質変性作用）に着目し、縮合型タンニン（柿タンニン）量と抗ウイルス効果の関係性について検証した。抗ウイルス効果はノロウイルスのゲノム測定および代替ウイルスであるMS2ファージの感染価測定により評価した。その結果、柿タンニン量依存的にノロウイルスゲノムおよびMS2ファージの感染価が有意に減少することが判明した。以上の結果より、柿抽出物に含まれる主な抗ウイルス成分は柿タンニンであることが判明した。

### 2. 柿抽出物によるウイルスに対する作用機序の解明

タンニンの性質である収斂作用がノロウイルスゲノムおよびMS2ファージの感染価を減少させている可能性が示唆されている。本項では、柿タンニンの収斂作用と抗ウイルス効果の関係を検証し、作用機序を解明することを目的とした。MS2ファージに対する柿抽出物の不活化効果およびゲノム評価を検証し、透過型電子顕微鏡による形態観察およびドッキングシミュレーション解析結果を合わせて考察した。柿抽出物処理によるMS2ファージの感染価減少とゲノム量の減少は相関関係にあり、ゲノム量の減少は、感染価の減少を意味することが判明した。ノロウイルスの柿抽出物処理によるゲノム量の減少もMS2ファージでの結果と類似しており、柿タンニンは同様のメカニズムでノロウイルスを不活化すると推察された。これらの抗ウイルス作用は、柿タンニンによる収斂作用によるものと考えられ、そのメカニズムは、柿タンニンがウイルス表面に作用してウイルス表面タンパク質を変性させることで、ウイルスの不活化、ウイルスゲノムの減少を引き起こしていると推察された。以上より、柿タンニンによる収斂作用が抗ウイルス作用であることを明らかにし、その推定される作用機序を示した。

### 3. 柿抽出物を含む消毒剤の効果の検証

本項では、開発した消毒剤の抗ウイルス効果を証明することを目的とし、感染価の異なるMS2ファージ

のゲノム評価や感染価測定、透過型電子顕微鏡による形態観察による検証を行った。開発した消毒剤は、ノロウイルスおよびMS2ファージのゲノム量、そしてMS2ファージの感染価を有意に減少させる効果を示すことが明らかとなった。さらに、柿抽出物以外のその他の成分の作用により、抗ウイルス効果が高まることが判明した。形態観察から、本消毒剤に添加された柿抽出物に含まれる柿タンニンの収斂作用によりウイルスの不活化・ゲノムの減少が引き起こされることが判明した。以上より、開発した消毒剤のウイルスに対する作用機序を明らかにし、ノロウイルスに対しても不活化作用を示している可能性を示した。

#### 4. 新たな抗ウイルス物質の探索と効果の検証

本項では、天然由来の新たな抗ウイルス物質を探索することを目的とし、化学構造の観点から効果を検証することとした。市販ポリフェノール類11種および7種類の植物抽出液の抗ウイルス効果を、ノロウイルスのゲノム測定およびMS2ファージの感染価測定にて評価した。その結果、ノロウイルスのゲノムおよびMS2ファージの感染価を有意に減少させたのは、高分子の縮合型タンニンを有する柿、バナナ、カリンの抽出液のみであることが判明した。一方、縮合型タンニンの基本骨格をなすフラバン-3-オール類では効果が認められなかった。このことは、フラバン-3-オール類のような単量体では効果がなく、重合体であることが抗ウイルス作用を示すには重要であることを示している。本研究より、ポリフェノール類の中で強力な抗ウイルス活性を示すのは高分子の縮合型タンニンを有する植物抽出液のみであることを明らかにし、新たにバナナおよびカリンの抽出液が抗ウイルス活性を有することを発見した。

本研究より、柿抽出物に含まれる柿タンニンの収斂作用が抗ウイルス作用であることを明らかにした。さらに、柿タンニンと同じく、高分子の縮合型タンニンを含むバナナ、カリンが抗ウイルス作用を示すことを明らかにした。本研究結果は、食品加工場で使用可能な新たな消毒剤の開発や、衛生管理用品への応用に繋がり、ノロウイルス制御法の確立に貢献するものと考えられる。

キーワード：ノロウイルス、MS2ファージ、柿タンニン、縮合型タンニン、抗ウイルス物質

## Physiological Characterization of Salinity Tolerance in the Leafy Vegetable, Huckleberry (*Solanum scabrum* Mill.)

Dekoum Vincent Marius ASSAHA

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

ナス科植物 Huckleberry (*Solanum scabrum* Mill.) における耐塩性の生理学的特性

デコム ビンセント マリウス アサハ  
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Huckleberry (*Solanum scabrum* Mill.) is a glycophyte and one of the most important leafy vegetables in many parts of Africa, especially in Cameroon where it is cultivated and exported. It is rich in Ca, Fe, vitamin A and protein and has been shown to have important medicinal attributes such as anti-inflammation and antioxidant activity. However, the growth of huckleberry has been shown to be hampered by drought stress, but its tolerance to salinity is unknown. This study was conducted with the aim of characterizing the physiological responses of huckleberry to salinity. This was achieved by 1. determining the growth and mineral uptake, 2. evaluation of the Na distribution pattern and the activity of some antioxidant enzymes, and 3. analyzing a high affinity potassium transporter (*HKT*) gene that excludes Na from shoots.

### 1. Comparative growth and mineral accumulation in huckleberry and eggplant

The mineral content of the plants grown under 50 and 150 mM NaCl was compared with that of eggplant. The growth of huckleberry was better than that of eggplant and the accumulation of the major elements K and Ca in huckleberry was enhanced under salt stress. Especially Na concentration was observed to be more elevated in the stem and root and much reduced in the leaf of huckleberry compared to eggplant. This yielded much lower Na/K and Na/Ca ratios in huckleberry compared to eggplant. It was concluded that huckleberry is more tolerant than eggplant owing to reduced transport of Na to the leaf, which helped the plants to maintain high levels of important minerals such as K, Mg and Ca.

### 2. Spatial Na accumulation and the activity of some antioxidant enzymes

Following the previous results showing reduced leaf Na accumulation in huckleberry, further studies were required to determine the pattern of Na uptake and distribution in the plant. The analysis of Na content revealed that of the total shoot Na content, only 50% was transported to leaf blade compared with 81% in eggplant, indicating that indeed there is the presence of a Na transport regulating mechanism possibly located in root, stem and petiole in huckleberry and seems to be lacking in eggplant. Thus, the tolerance of huckleberry could primarily lie in its ability to exclude Na from leaf blade.

The activities of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), soluble peroxidases (sPOD) and cell wall peroxidases (cwPOD) were measured in the leaf and root of huckleberry and eggplant. The results showed that except for CAT, the activities of these enzymes were higher in the root than leaf of both plants. However, root activity was more enhanced in huckleberry than eggplant. The cwPOD activity markedly increased in root and leaf of huckleberry, but decreased in eggplant for both tissues. Although the cwPOD has been shown to be involved in lignin and suberin synthesis, which in the root intervenes in controlling Na transport to the shoot under salinity stress, it appears in the present study to be

the main ROS scavenger in the leaf of huckleberry.

### 3. Analysis of a high affinity potassium transporter (*HKT*) gene

The Na accumulation pattern in huckleberry suggest the existence of control points for Na exclusion in leaf blade. HKTs have been shown to control the transport of Na to leaf blade by extracting Na from the transpiration stream into xylem parenchyma cells, hence minimizing the amount of Na reaching the leaf. In light of this function, we measured the Na concentration in all four organs (leaf blade, petiole, stem and root) and analyzed the expression of the *Solanum scabrum* *HKT* (*SsHKT*) and *S. melongena* *HKT* (*SmHKT*) genes in these organs of plants grown in hydroponic culture under salinity stress. The *Solanum scabrum* *HKT* (*SsHKT*) expression pattern was proportional to that of Na concentration i.e. strongest in the root and progressively decreased to the leaf blade (lowest). The highest induction of *SsHKT* expression observed in the root corresponded to the highest Na accumulation, indicating that *SsHKT* like other class 1 HKTs, would likely function in retrieving Na from the transpiration stream in all the plant organs, especially in the root and stem.

### 4. Conclusion

The results of the present study show that the adaptation of huckleberry to salinity involves enhanced antioxidant activity and reduced Na accumulation in leaf blade. Gene expression analysis revealed that the reduced accumulation of Na in leaf blade would be achieved by the induction of *SsHKT* expression in root and stem. This *SsHKT* function owes to the presence of the SGGG selectivity filter motif, characteristic of class 1 HKTs, which renders it selectively permeable to Na. Induction of *SsHKT* expression by 27.9-fold in the root, coincided with the highest Na accumulation and enhanced antioxidant activity, suggesting that, the mechanism of salinity tolerance in huckleberry may involve a coordinated action of ROS detoxification and regulation of Na transport at the level of the root. In eggplant on the contrast, low antioxidant activity and weak expression of *SmHKT* could contribute to its susceptibility to salinity stress.

**Key words:** cell wall peroxidase, oxidative stress, salinity tolerance, Na, Na transporter, *Solanum melongena*, *S. scabrum*,



## **A physio-ecological study of ephyrae of the common jellyfish *Aurelia aurita* s.l. (Cnidaria: Scyphozoa), with special reference to their survival capability under starvation**

Zhilu Fu

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

付 志璐

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The moon jellyfish *Aurelia aurita* s.l. is the most common scyphozoan jellyfish in the coastal waters around the world, and the mass occurrences of this species have been reported from various regions. Therefore, it is important to identify causes for the enhancement of *A. aurita* populations to forecast likely outbreaks prior to the season of medusa blooms. In the population dynamics of scyphozoan jellyfish, the following two factors are important to determine the size of adult (medusa) population: (1) the abundance of benthic polyps, which reproduce asexually and undergo seasonal strobilation to release planktonic ephyrae, and (2) the mortality of ephyrae before recruitment to the medusa stage. Although much knowledge has been accumulated about physio-ecology of the polyp stage by previous studies, only few studies have been conducted for the ephyra stage.

The success for survival through larval stage is basically affected by two factors, viz. food availability and predation. For development to the medusa stage, ephyrae must start feeding before their nutritional reserves run out. However, they are functionally inefficient feeders compared to the medusa stage and the liberation of *A. aurita* ephyrae usually takes place during winter and early spring, when the biomass and production of prey zooplankton are the annual lowest. Therefore, starvation is considered to be a primary factor accounting for the mortality of ephyrae. The goal of this study is to understand physio-ecological characteristics of *A. aurita* ephyrae in order to enable forecast of medusa population outbreaks prior to regular medusa bloom season. For this, I conducted laboratory experiments mainly to examine the effect of starvation on various physio-ecological aspects of *A. aurita* ephyrae.

This thesis consists of 5 chapters. In Chapter 1, I extensively reviewed past and current scyphozoan jellyfish blooms in East Asian seas, in particular Chinese waters. The East Asian seas are a representative sea area in the world where massive jellyfish blooms recurrently take place. As *A. aurita* is the most prominent bloom forming species in this area, it is of importance not only to identify causes for the blooms but also forecast the blooms.

In Chapter 2, in order to evaluate starvation resistance and recovery capability in first-feeding *A. aurita* ephyrae, I determined the median longevity ( $ML_{50}$ ), i.e. duration of starvation at which 50% of ephyrae die, and the point-of-no-return ( $PNR_{50}$ ), i.e. duration of starvation after which 50% of ephyrae die even if they subsequently feed, at 15, 12 and 9°C. The  $ML_{50}$  were 50, 70 and 100 d, and the  $PNR_{50}$  were 33.8, 38.4 and 58.6 d at 15, 12 and 9°C, respectively. These  $PNR_{50}$  are nearly one order of magnitude longer than those of larval marine molluscs, crustaceans and fishes, demonstrating that *A. aurita* ephyrae have strong starvation resistance and recovery capability. By the time of the  $PNR_{50}$ , ephyrae showed significant body size reduction: ca. 30 and 50% decrease in disc diameter and carbon content, respectively.

In Chapter 3, I investigated the effect of starvation on respiration rate of *A. aurita* ephyrae, because their extremely long  $PNR_{50}$  was thought to be attributed to their low metabolic rates. The respiration rate of a newly released ephyra was actually very low, i.e. 0.24, 0.24 and 0.19  $\mu\text{l O}_2$  ephyra<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> at 15, 12 and 9°C, respectively. The respiration rates tended to decrease with the increase of starvation period, but the carbon weight-specific respiration rates were constant for up to the period nearly  $PNR_{50}$ . The minimum food requirement based on the respiration rate was equivalent to 2.0, 2.0 and 1.6% of ephyra carbon weight at 15, 12 and 9°C, respectively. I also examined the effect of starvation on pulsation rate; it was accelerated by starvation for up to 20 d, indicating that moderately starved ephyrae actively swim. The maximum swimming speed achieved by *A. aurita* ephyrae was 8.9 cm min<sup>-1</sup>, suggesting that their main prey are confined to slow moving zooplankton such as barnacle nauplii, veliger larvae and hydromedusae. The pulsation rate decreased for ephyrae after 30 d of starvation, and hence the heavily starved ephyrae may be exposed to higher predation loss.

In Chapter 4, I examined whether a scyphozoan jellyfish *Chrysaora pacifica* acts as predators of *A. aurita* ephyrae, since extraordinarily long starvation resistance and strong recovery capability of *A. aurita* ephyrae implied that predation loss may probably be more important to determine their mortality in the field. I confirmed that *C. pacifica* young medusae could feed on *A. aurita* ephyrae.

In the last chapter (Chapter 5), I fully discussed the physio-ecological specificity of *A. aurita* ephyrae, in particular emphasis to adaptation mechanisms for starvation. In the Inland Sea of Japan, for example, the release of ephyrae is programmed to occur during winter and early spring (i.e. January-March), when the zooplankton biomass and production rates are at its annual lowest. Thus, it is very likely that newly released ephyrae are exposed to severe nutritional stress in this cold season of minimal food abundance. Extremely long  $PNR_{50}$  of *A. aurita* ephyrae may be a physiological as well as ecological adaptation allowing them to survive the first few months after release. In the Inland Sea of Japan, the mortality of ephyrae seems to be very high like in Tokyo Bay, where 99% of ephyrae die before young medusa stage, but actual causes for the mortality could not be identified in this study. Meanwhile, a sympatric scyphozoan *C. pacifica* can be one of prominent predators of *A. aurita* ephyrae. In order to make the forecast of *A. aurita* medusa population outbreaks in a reliable manner, detailed population dynamics studies particularly during the ephyra stage as well as more studies on predators are needed in the future.

**Key words:** *Aurelia aurita*, ephyra, mortality, point-of-no-return, East Asian seas