

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 4, 2015

Doctor of Philosophy Yasuhiro OGATA

March 4, 2015

Doctor of Agriculture Tomoko KAWAI

March 4, 2015

Doctor of Philosophy Takeshi HIRABAYASHI

March 4, 2015

Doctor of Philosophy Andriyani ASUTUTI

March 4, 2015

Doctor of Philosophy Zulhamsyah IMRAN

March 4, 2015

Doctor of Agriculture Takahiro NII

September 7, 2015

Doctor of Philosophy Junichi MUROOKA

September 7, 2015

Doctor of Agriculture Keisuke KIMOTO

September 7, 2015

Doctor of Agriculture Etsuro SAWAI

September 7, 2015

Doctor of Philosophy Pongthong PONGVINYOO

DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 4, 2015

Doctor of Agriculture Yuu UTASHIMA

DEPARTMENT OF ENVIRONMENT DYNAMICS AND MANAGEMENT

March 4, 2015

Doctor of Philosophy Sayuri BANDAI

September 7, 2015

Doctor of Agriculture Liyun LIU

September 7, 2015

Doctor of Philosophy

Yasuhito MIYATA

September 7, 2015

Doctor of Philosophy

Chikumbusko Chiziwa KAONGA

September 7, 2015

Doctor of Philosophy

Waqar Azeem JADOON

DESSERTATION PhD

September 7, 2015

Doctor of Agriculture

Masayuki TAKAHASHI

Study on efficient cow production by bioengineering technologies

Yasuhiro OGATA

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

生殖工学技術によるウシの効率的生産に関する研究

尾形 康弘

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

ウシはヒトと同じ単胎動物であり、280～285日の妊娠期間で1頭の子牛を生産する。そのため短期間での増頭や育種改良の実現は困難である。広島県の畜産業は、生産農家数、飼養頭数ともに減少し続けている。このような状況の中で、遺伝的多様性を維持しながら育種改良を行い、ブランド化を図るためには、新たな技術を導入するとともに、育種改良のために必要な期間の短縮と確実な遺伝的改良を行う必要がある。これまでの黒毛和種からの産子生産に加えて、受精胚移植技術を活用してホルスタイン種を借り腹とした、新たな繁殖システムの構築が欠かせない。そのためには、ホルスタイン種の安定的後継牛確保が必要となる。つまり、借り腹となるホルスタイン種の雌ウシの効率的な生産が重要なポイントとなる。そのために利用する技術が、経膈採卵技術と体外受精技術および体外胚操作技術を活用した性判別（遺伝子診断）である。通常、ホルスタイン種から受精胚を得るためには、体内受精胚生産技術を用いることが多い。しかしながら、この方法を泌乳中のウシに実施しようとするれば、採卵のために空胎期間が長くなることや、泌乳期間の短縮による泌乳量の減少が避けられない。酪農家は生乳生産による収入が大部分を占めること、また、自分の経営条件に適合した能力、血統の後継牛を計画的に確保しようとしているため、このようなウシの利用方法は現実的ではない。そこで、分娩後の生理的空胎期間（分娩後40～80日）を利用して受精胚生産が実施できれば、酪農経営に悪影響を与えることなく、酪農家の望むウシからの受精胚の確保が可能となる。この技術が構築されれば、乳生産を休むことなく後継牛が生産可能となり、経営の中で黒毛和種の受精胚移植用の借り腹ウシの確保ができる。その借り腹ウシに、黒毛和種の受精胚移植を行うことで酪農家から黒毛和種の素牛生産ができるため、高齢化等によって戸数が減少した和牛繁殖農家の生産能力を代替することが可能となる。ホルスタイン種を借り腹とした新たな酪農経営を実現することで、酪農経営の基盤安定化と同時に広島牛（黒毛和種）の短期間での育種改良を進め、新たなブランド化に向けた育種戦略を計画することができると考えられる（第1章、緒論）。

第2章では、性腺刺激ホルモン放出ホルモン（Gonadotropin Releasing Hormone; GnRH）の卵胞波新生作用を利用し、ウシ経膈採卵時に数多くの卵を採取することを目的として研究を実施した。発情周期に関係なく任意の時期に卵胞波の新生を誘起させるため、酢酸フェルチレリン等のGnRHアナログ製剤を投与して、卵巣内卵胞数の推移、卵採取数や品質の検討を行った。GnRH投与直後の0時間から24時間間隔で72時間目まで、卵巣内の卵胞動態を超音波画像診断装置で観察した。また、モニター上で観察できる卵胞数が最も多くなる、GnRH投与後48時間目に経膈採卵を実施し、採取される卵丘細胞卵子複合体（Cumulus-Oocyte Complexes; COCs）やその品質についても検査した。また、2種類のGnRH製剤であるプセレリンとフェルチレリンを用いて経膈採卵に利用する場合の有効性について比較検討を行った。その結果、GnRH投与時期については、GnRH投与後48時間での経膈採卵の実施が最も効果的であること、フェルチレリンおよびプセレリン製剤ともに、卵巣内の卵胞径が無処置のものより高い値を示すこと、両製剤間での大きな効果差は見受けられず、どちらも有効性が高いことが明らかにされた。

第3章では、マイクロマニピュレーター等の機器を使用せず、ウシ受精胚から性判別用（遺伝子診断）の試料をサンプリングする方法の開発を行った。本研究において新規に開発した細胞剥離法は、実体顕微鏡と

細く伸ばしたガラス管で桑実期胚から遺伝子診断用サンプル細胞を採取するもので、細胞への物理的障害を最小限にすることが可能である。本研究では、細胞剥離法と従来のブレード切断法でサンプリング後の胚の生存性、受胎性などの比較を行い、その有効性について検討を行った。その結果、細胞剥離法では、受精胚からのサンプル細胞採取は2個程度と少ない数で採取個数を調節することが可能なこと、細胞剥離によって受精胚の生存性は低下しないこと、修復培養48時間後の胚盤胞期胚の総細胞数は、細胞剥離法がブレード切断法よりも高い数値を示すこと、受胎性（受精胚移植比較試験）についても無処置胚と同程度の能力を有することが明らかにされた。

第4章では、生理的空胎期間を利用して経膈採卵・体外受精胚生産が可能かどうかを検討するために、分娩後40～80日までの泌乳最盛期のホルスタイン種に、第2章で有効性が明らかにされた GnRH を経膈採卵48時間前に投与し、採取した卵を用いて体外受精胚生産を試みた。GnRH 投与によって経膈採卵・体外受精で胚盤胞期胚の作出を行い、その胚の受胎性に問題がないかどうかの確認を行った。また、複数回の経膈採卵実施後に、人工授精を実施して、その後の繁殖性（受胎性）に及ぼす影響についても検討した。その結果、分娩後40～80日の生理的空胎期間での経膈採卵は、GnRH 投与を行うことで経膈採卵が可能な卵胞数、採取される卵数およびその品質も高くなり、体外受精により作出される胚盤胞期胚数も無処置より1.7倍以上高くなることが確認され、生理的空胎期間であっても、GnRH 投与によって、効率的な受精胚の生産が行えることが明らかにされた。また、GnRH 投与によって作出された胚盤胞期胚の受胎率も無処置で作出した受精胚と同様に受胎性には問題がないことが確認された。また、経膈採卵後の人工授精についても通常の人工授精のみのウシと比較した場合、受胎に要する日数、受胎性ともに差は見られず、経膈採卵によって、その後の繁殖性に与える影響は見られないことが明らかにされた。

本研究のように、生殖工学的技術を組み合わせて実際の畜産経営に導入できる様に技術構築した例は、これまでほとんどない。本研究で構築した技術によって、ホルスタイン種を繋養する酪農経営において、雌ウシ後継牛生産が計画的に実施可能となり、余剰に生産された後継牛に黒毛和種の受精胚を移植することで、黒毛和種の生産を組み込んで、新たな酪農経営へと発展させることができると考えられる。本研究で明らかにした技術は、酪農経営の経営基盤の安定と、短期間での黒毛和種生産基盤の確保と育種改良の進展に対し、大きな足がかりになると考えられる。(第5章, 総合考察)。

キーワード：ウシ, 経膈採卵, 体外受精, 性判別, GnRH

Molecular biological mechanism for preovulatory follicle formation that focus on ALDH family

Tomoko KAWAI

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

ALDH family に着眼した排卵卵胞形成に関する分子生物学的研究

川合 智子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

性成熟後の雌個体では、性腺刺激ホルモン FSH により卵が属する卵胞が発育し、エストロゲン (E2) が合成され、排卵される成熟卵が発育・選択される。マウスでは、排卵刺激に応答する排卵卵胞で LH 受容体 (*Lhcgr*) が高発現することが高い受性能・発生能をもつ卵の選択に必須である。しかし、FSH 刺激直後ではなく、排卵刺激前になって発現する *Lhcgr* の発現を制御する仕組みは不明である。そこで、本研究では、マウスを用いて FSH が *Lhcgr* 発現を誘導するために必要な新規因子の同定とその機能解析を行い、卵の発生能への影響を検討した。

ALDH family の同定と機能解析

新規機能因子を同定するため、未成熟マウスと FSH 様作用の eCG を投与し、排卵卵胞が観察される48時間後のマウスから顆粒層細胞を回収し、遺伝子網羅解析を行った。その結果、E2合成で CYP17A1による反応時に産生されると予想される副産物 acetaldehyde の分解酵素、ALDH family を同定した。

E2合成に関わる遺伝子の発現と acetaldehyde 濃度を経時的に検出した結果、eCG 投与マウスで *Cyp17a1* が有意に上昇し、それに伴い acetaldehyde 濃度も上昇した。しかし、eCG 投与48時間後では *Cyp17a1* は高いにも関わらず、acetaldehyde 濃度は24時間後と同レベルにまで低下した。この低下は acetaldehyde の毒性から卵胞を防御する解毒機構と推察し、ALDH family の発現変動と局在を検討した。Aldh1a1が eCG により有意に上昇し、内卵胞膜細胞と排卵卵胞では顆粒層細胞にも検出され、acetaldehyde 産生と分解酵素の局在が相補的であった。さらに、E2合成系と ALDH1A1の連動性を調べるため、プロモーター解析を行った結果、*Cyp17a1* を誘導する転写因子 GATA が *Aldh1a1* 発現をも制御していた。これらのことから、*Aldh1a1* が GATA 依存的に E2合成と同時期に活性化し、副産物を分解していると考えられた。

ALDH1の生理的な役割を検討するため、未成熟マウスに ALDH 抑制剤を eCG と腹腔内投与し、acetaldehyde 濃度、遺伝子発現、卵巣形態への影響を調べた。ALDH を抑制すると acetaldehyde 濃度が上昇し、胞状卵胞内では顆粒層細胞層が不均一で、遊離した細胞は TUNEL 染色陽性だった。さらに、卵胞発育期のマーカー遺伝子 *Cyp19a1*, *Lhcgr* の発現が有意に減少したため、ALDH1は acetaldehyde を分解し、顆粒層細胞の生存や細胞接着を介した正常な機能分化に作用していると考えられた。

ALDH1による acetaldehyde 分解機構が卵に与える影響

ALDH1による acetaldehyde 分解機構が卵に及ぼす影響を調べるため、eCG と ALDH 抑制剤を同時投与したマウスに hCG を投与し、排卵試験と交配試験を行った。排卵数、受精卵数と胚盤胞期胚への発生卵数は有意に低下し、卵胞内 acetaldehyde 濃度と卵胞発育・卵の発生能が関連していた。

ヒト不妊治療時に、様々な卵巣刺激法を促した患者から採卵時に、卵と卵胞液を回収した。卵を体外受精し、受精率と良好胚への発生率を検討し、卵胞液は acetaldehyde 濃度測定を行った。その結果、卵胞中の acetaldehyde 濃度が刺激法や同一患者の卵胞間でも大きく異なり、正常に受精と胚発生が誘起される卵が属

する卵胞内 acetaldehyde 濃度は有意に低かった。acetaldehyde 分解機構を考慮することは、最も発生能の高い卵を发育させるための刺激法考案と卵胞发育障害の原因解明の手がかりになると考えられた。

ALDH family 遺伝子が制御する RA 合成系とその役割

ALDH1は、経口摂取した vitaminA をレチノイン酸 (RA) に変換する役割も担う。ALDH1抑制剤により低下した *Lhcgr* 発現が RA 投与により回復したため、ALDH1は acetaldehyde 分解と RA 新規合成に関与し、両機能が排卵卵胞への发育に必要と考えられた。RA の卵巣機能に及ぼす役割を調べるため、vitaminA 欠乏飼料を離乳後からマウスに与え、性周期、卵巣形態、卵胞发育や排卵期のマーカー遺伝子発現、卵の排卵や受精、胚盤胞期胚への発生能への影響を検討した。その結果、発情期が長期化し、内因性の排卵刺激では排卵が不十分であること、この原因は *Lhcgr* が有意に抑制されていることを示した。また、過剰排卵処理を行っても排卵数や卵の成熟率、胚盤胞期胚への発生率が有意に改善されなかった。以上の結果から、卵胞发育期に合成される RA は、LH 感受性を高めることで高い発生能をもつ卵を排卵させると考えられた。

RA により制御される LH 受容体の発現制御機構

RA と *Lhcgr* 発現の関係を調べるため、内因性 RA に反応し LacZ を発現する RARE-LacZ 遺伝子導入マウスを用いた。FSH 作用を受けた顆粒層細胞で LacZ 陽性が認められ、同じ細胞に LHCGR も局在していた。LacZ 活性は、RA 合成の抑制剤で低下した。そこで、RA 合成抑制剤を eCG と同時投与すると *Lhcgr* 発現が有意に抑制され、排卵数、卵の成熟・発生能も低下した。しかし、*Lhcgr* プロモーター領域に RA 応答配列がない。つまり、RA による *Lhcgr* 発現制御は間接的と考え、Sp1 結合サイトの CpG 配列に着目し、DNA メチル化解析を行った。eCG 投与前では CpG 配列のメチル化割合は高いが、eCG 投与によりその割合は著しく減少した。一方、eCG と RA 合成抑制剤の同時投与はメチル化を維持した。

排卵卵胞への发育時には、*Lhcgr* 以外に多くの遺伝子で脱メチル化が起こっている。引き続き詳細に検討し、RA が誘起する脱メチル化とともに核内の遺伝子発現基盤を解明することで、顆粒層細胞の機能変化と卵の成熟・発生能の関係性が明らかになると考えている。

本研究において、FSH が制御する *Lhcgr* 発現には① ALDH1が E2合成に関与する遺伝子と共に発現上昇し、副産物 acetaldehyde を分解すること、② ALDH1は RA 合成へも関与し、*Lhcgr* プロモーター領域の脱メチル化を誘導することが重要であることを明らかにした。

これにより、遺伝的な背景に加えて、細胞内や生育・飼養環境が引き起こす繁殖障害や不妊病態の解明とその予防法の考案への貢献が期待される。

キーワード：卵胞发育，エピジェネティック，レチノイン酸，ステロイドホルモン，代謝

Diversity and molecular evolution of carnivorous calanoid copepods

Takeshi HIRABAYASHI

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8523, Japan

肉食性カラヌス目カイアシ類の摂餌様式の多様性と分子進化

平林 丈嗣

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島

カラヌス目カイアシ類は海洋で最も量的に多い動物プランクトンであり、その生態的機能について1900年代初頭から研究が活発になされてきた。かつて植物プランクトンなどの粒子を摂食する二次生産者として位置づけられていたが、最近の研究により他の動物プランクトンを捕食する種やデトリタスを専食する種の存在が明らかになってきた。しかし、肉食者の口器形態・摂餌様式の多様性や進化などについては包括的に研究がされていなかった。本研究では汽水性、沿岸性種および1,000 m以浅に生息する肉食性種の口器、特に餌を捕獲するために最も重要な第2小顎と顎脚の相同性を重視した形態比較をして、それらの摂餌様式を推定した。また、肉食者が粒子食者から進化したことについて深海性 *Heterorhabdidae* を材料にして分子系統学的解析（核の18S rRNA および28S rRNA 遺伝子、ミトコンドリアのシトクローム C 酸化酵素サブユニット1遺伝子）で明らかにすることを目的とした。

肉食性カラヌス目カイアシ類は第2小顎と顎脚の両方あるいはそのどちらかの体長に対する相対長が粒子食者のそれらと比較して顕著に伸長し、さらにそれらの付属肢には餌生物の捕獲用の刺毛が著しくキチン化して強固になる共通点が見られた。まず、顎脚の相対長が20.0% 以内の Group I (*Diaptomoidea*) とこの値を超える *Diaptomoidea* 以外の上科で構成される Group II に分けられた。さらに、第2小顎の相対長とエレメントの形態によって13タイプに分類され、それぞれの摂餌様式を推定した。Group I の *Candaciidae*、Group II の *Chiridiella*、*Cornucalanus*、*Heterorhabdus*、*Paraheterorhabdus* は“chopsticks mode”のみを採用して相対的に大型の餌を、その他のタイプはこの摂餌様式と“scooping mode”という様式を用いて相対的に小型の餌を捕獲していると推定した。前者では少数のエレメントの先端を主に用いて餌動物を掴み、後者では数多くのエレメントでバスケット状構造を作り出してその内部へ餌を囲みとるような摂餌行動をすると推測した。肉食者はカラヌス目の進化の中で何度も独立して派生したと推定される。

カラヌス目の粒子食から肉食への食性の転換は餌粒子の少ない外洋、特に深海への植民が起こった時に生じたと推定されており、粒子食者が独立的に外洋へ植民した結果、肉食者の口器形態の多様性が生じたと考えられる。

Heterorhabdidae の7属9種の18S rRNA 遺伝子と28S rRNA 遺伝子の結合配列を用いた分子系統解析においては、すでに提唱されている形態に基づく系統樹の樹形と一致した。すなわち、粒子食性 *Disseta* が最初に分岐し、雑食性 *Mesorhabdus*、*Heterostylites* を派生しつつ、最終的には肉食に特化した属 *Hemirhabdus*、*Neorhabdus*、*Heterorhabdus*、*Paraheterorhabdus* が分岐したことを示した。粒子食性祖先から“chopsticks mode”を採用する肉食者が進化したことを分子系統学的解析でも証明できた。また、ミトコンドリアのCO1遺伝子の変化速度を100万年あたり1.4%～2.6%として、原始的な粒子食性 *Disseta* と雑食性 *Mesorhabdus* のCO1遺伝子の遺伝的距離21.2%に適應すると、約1500万～810万年となり、中新世中期～後期にこの分岐が起こったと推察された。換言すると、*Heterorhabdidae* は中新世中期～後期に深海で懸濁物食から肉食へ

と進化しはじめたと予想される。また、Heterorhabdidae 内の18S rRNA 遺伝子と28S rRNA 遺伝子の結合配列の遺伝的距離 (pairwise genetic distance) は0.07~2.27% の範囲に収まったが、*Hemirhabdus*, *Neorhabdus*, *Paraheterorhabdus* および *Heterorhabdus* を含む4属間の遺伝的距離は0.14~0.92と非常に近い値を示した。この値は Heterorhabdidae と同じ上科に属し、基本的に粒子食である Metridinidae の属間の遺伝的距離 (0.21~2.21) と同等であり、Heterorhabdidae では属を生じる進化速度、つまり食性の変化を起こす速度が他のカラヌス目の種分化速度と同程度で生じており、急激な環境変化に伴う食性の進化が起こったことが推定された。

本研究では肉食性カラヌス目カイアシ類の食性を機能形態的側面から解析し、進化傾向について解析した。今後はさらに多くの粒子食者や深海に生息する肉食者を追加した形態解析、消化管内容物解析や安定同位体解析による餌生物の推定、カイアシ類の正確な分子時計の確立等によるカイアシ類の食性進化の全貌を明らかにすることが課題である。

キーワード：カラヌス目カイアシ類, 肉食, 相同, 分子進化

Nutritional Studies for Early Lactation Cows Milked by an Automatic Milking System

Andriyani ASUTUTI

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

自動搾乳システムにおける泌乳初期乳牛の栄養に関する研究

アンドウリヤニ アストウテイ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Automatic milking systems (AMS) are the latest milking machine utilized in dairy industry. Reducing labor cost and saving work load are major reasons for introduction of AMS by dairy farmers. Cows milked by AMS generally increase milk yield with increased milking frequency. The increase of milk production by frequent milking may affect the mobilization of fat stored in the body tissues, especially in an early lactation period. Related to higher milk protein yield, higher milking frequency may also affect mammary amino acid (AA) metabolism in cows milked by AMS. In addition, feeding strategy for close-up period must be applied to minimize the negative effects of negative energy balance on production performance in cows milked with higher frequency by AMS. Therefore, this study aimed to evaluate milk production and nutritional status in early lactating cows managed with AMS, with focusing on milking frequency and prepartum feeding levels.

In Experiment 1, 8 multiparous and 4 primiparous Holstein cows were assigned to two treatment groups of 2 or 4 times milking frequency. After parturition, cows were fed a partial mixed ration (PMR) *ad libitum* and milked by AMS from 10-18 days postpartum. The daily milk yield in AMS period was greater ($P < 0.001$) in 4 times than in 2 times milking cows. Yields of milk protein, lactose and solid not fat (SNF) were greater ($P < 0.001$), and fat yield tended to be greater in 4 times milking cows ($P = 0.073$). Average dry matter intake (DMI) and total digestible nutrient (TDN) intake in each period was similar between treatments. Body weight (BW) and body condition score (BCS) were similar between treatments, but BCS decreased with period from 20 to 35 days ($P < 0.05$). Arterial plasma concentration of glucose was lower ($P = 0.034$) in 4 times milking cows. However, the arterial concentrations of acetate, ketone body, non-esterified fatty acids, triglyceride, total cholesterol and urea-N did not differ between treatments. The arterial-venous difference of plasma metabolites by the mammary tissues were similar between treatments, however estimated mammary plasma flow was higher in 4 times compared with 2 times milking cows ($P < 0.05$) which probably affected milk and milk component yields. Arterial concentrations of hormones (GH, IGF-1 and prolactin) were similar between treatments.

In Experiment 2, the blood plasma samples of the coccygeal artery and right subcutaneous abdominal vein obtained in Experiment 1 were analyzed for free AA concentrations. Arterial plasma concentration of glutamate (Glu) was lower ($P = 0.022$) in 4 times milking than in 2 times milking cows. Arterial-venous concentration differences of each essential AA were not significantly different between treatments. Mammary uptakes of each essential AA except for tryptophan were higher ($P < 0.05$) in 4 times than in 2 times milking cows. In contrast, mammary uptakes of each non-essential AA excluding alanine, aspartate, serine and tyrosine were not different between treatments. Ratios of mammary uptake to milk output of branched-chain AA were lower ($P < 0.05$) and uptake to output ratios of glutamine, Glu and glycine were tended to be lower ($P = 0.055$) in 4 times than in 2

times milking cows.

In Experiment 3, 7 multiparous Holstein dry cows were divided into two treatment groups supplying diets at 125% (H) or 100% (M) of TDN requirements, respectively, during last 3 weeks of dry period (close-up period). After parturition, cows in both treatments were fed PMR ad libitum and started milking by AMS from 3 weeks postpartum. Dry matter intake at week 3-6 postpartum was similar between treatments, although DMI at week 1-2 was numerically higher for cows in the M treatment. Milk yield at week 1-2 was tended to be higher ($P = 0.09$) for cows in the M treatment compared with the H treatment. Compositions of fat and protein in milk at week 1-2 were similar between treatments, but lactose and SNF contents were higher ($P < 0.05$) for cows in the H treatment than those in the M treatment. At week 3-6 postpartum, protein and SNF contents were lower ($P < 0.05$) for cows in the H treatment. Milk fat yield was higher ($P < 0.05$) for cows in the H treatment compared with the M treatment at week 3-6.

In summary, the results of this study indicate that increasing milk yield with increasing milking frequency does not enhance fat mobilization till 3 weeks of lactation. The increase of milk yield with frequent milking by AMS is mainly owing to the increase of mammary plasma flow which affects AA uptake for milk protein synthesis. Efficient conversion of essential AA to milk protein by mammary gland may also affect higher milk protein yield in cows with higher milking frequency. On the other hand, feeding levels in prepartum period may not affect milk yield but increase milk fat production in early lactation by AMS.

Key words: amino acids, automatic milking, feeding levels, lactating cows, milking frequency, peripartum period

Integrated Sustainable Livelihood Approach toward the Strengthening of Social Resilience: A Case Study on Recovery of Fisheries Livelihood after the Tsunami in Krueng Raya Bay, Aceh-Indonesia

Zulhamsyah IMRAN

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

社会回復力の強化に向けた統合的かつ持続的な生計アプローチ：インドネシア・アチェ州、
クルングラヤ湾における津波後の水産業復興に関する事例研究

ザルハムシア イムラン
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

Integrated sustainable livelihood approach was implemented to relief fishing communities and restore fish resource in tsunami-affected areas, Aceh-Indonesia. This research objectives are to examine factors affecting on changes of fisheries livelihood pattern in fishing community, examine factors that cause decrease of anchovy resources and coastal ecosystems degradation, assess effectiveness of integrated and participatory sustainable livelihood approach, investigate the recovery process of fisheries livelihoods and roles of indigenous institution toward the strengthening of social resilience; and to provide recommendation for adaptive framework on recovery of fisheries livelihood.

Factors Affecting Changes of Fisheries Livelihood

In 2004, the tsunami had affected on fisheries livelihood in Krueng Raya Bay. As a result, USD 2.7 million fisheries livelihood assets was damage and loss. The pattern of fisheries livelihood was changed by the tsunami struck. It led a number of fishermen increasing from 10.6% of total population in 2003 to 15% in 2011; a number of fishing boat decreasing sharply; operational cost and re-investment of asset production increasing significantly; increase the percentage of fisheries household dependency on fisheries resources from 40% in 2003 to 60% in 2005. A declining of fish production in both volume and value could be identified as direct factor which shifted the income of fishing communities. An upward of food, fuel, wood, and equipment price; a change of workforce and livelihood; and an increasing immigration were contributed as indirect factor on change of fisheries livelihood.

Assessment Factor Contributing on the Anchovy Fisheries Decline

Fish resources, in particular anchovy (*Stolephorus commersonii*) in Krueng Raya Bay faced a depletion state aftermath the tsunami. A downward trend of anchovy production could be revealed by less of catch during west monsoon season of 2012, amounted 7.8 tons or 52% of the total catch with the operation of 7-29 units of lift net boats. Simple regression analysis resulted two different models of MSY either before or after the tsunami in 2004 which were shown as $y = 0.8696 - 0.00008x$ and $y = 0.1138 - 0.00002x$, respectively. Model 1 recommended to reduce the number of lift net boat to 43 units for optimization of yield. However, Model 2 suggested that only 23 units could be operated for optimal effort each year. Average recent catch in MSY showed 53.9% (less abundant) before the tsunami and 5.5% of average recent catch in MSY (depletion) after the tsunami. Such a tragedy of

resource depletion was accelerated by anthropogenic factors, increasing catch effort, destructive fishing gears, and degradation of coral reef and mangrove and the tsunami factor.

Incorporate Sustainable Livelihood Strategy on Recovery of Fisheries Livelihood

Poverty alleviation through increase of income is a main target of sustainable livelihood strategy. In study area, high dependency on fisheries resources, ranging between 0.61 and 0.81, brought poverty condition in fishing communities. It can be seen that 65.9% of total population was lived within coastal area and 69.2% of the 13 villages were coastal villages before the tsunami. The fisheries livelihood program successfully reduced a number of poverty population to 56.58% on 2009 from 97.70% in 2005. The strong internal characteristics of fishing community were regarded to cope fisheries livelihood recovery. But, their capacity of recovery process and financial capital were insufficient to restore fisheries livelihood without any aid delivered from Government of Indonesia and other donor agencies. Some lesson learnt were to integrate alternative livelihood development and social-ecological approach into development of fisheries livelihood.

Toward Strengthening Social Resilience through Fisheries Livelihood Recovery

Social resilience has role to govern the local community and coastal fisheries resources toward sustainable fisheries development in tsunami affected area. The four villages selected, i.e. Ruyung, Meunasah Keudee, Meunasah Kulam, Ruyung, Meunasah Mon showed a highest SoVI, which were in range 0.7850 – 0.8460, because these villages are located nearby sea and flat area. Indigenous institution had a contribution and adaptable to rebound social resilience. The Panglima Laot Lhok (sea commander) had determined and adapted role on recovery of the fishing community, particularly facilitated aid delivery to fishermen. Toke Bangku (financial trader) had stimulated for reinforcement of advance payment and market channel. The other institutions supported upon linking and bridging connectivity among stakeholders. Toward the strengthening social resilience of fishing communities could be gain through: revitalization of rule using the social value and religious; engagement of indigenous institution and local government unit; adoption of the sustainable livelihood approach; integration of management adaptive strategies; collaboration action among the stakeholders and local institution capacity building; and arranging exit strategies for fisheries and alternative livelihood development.

Conclusion and Recommendation

It is clear that anthropogenic factors contribute to depletion of fish resources and degradation of coastal ecosystem. The tsunami brings out fish resource and its ecosystems to the worse condition and resulted a huge negative affect on fisheries livelihood. It has caused a decreasing of income, increasing of poverty people, rising of social vulnerability, declining of social resilience within fishing communities. Toward the strengthening social resilience of fishing communities, it is needed to integrate sustainable livelihood based on community's participation for achieving self-social resilient of fisheries communities and cope fish resources depletion and ecosystem degradation.

Keywords: tsunami impact, sustainable livelihood strategies, social resilience, fishing communities

Studies on Eggshell Malformation through Cytotoxic Immune Factors Induced by Bacterial and Viral Antigens in the Hen Oviduct

Takahiro NI

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

ニワトリ卵管における細菌およびウイルス抗原誘導性の細胞傷害性免疫関連因子による
卵殻形成不全に関する研究

新居 隆浩

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

1. General Introduction

Infection by pathogens in the oviduct causes eggshell malformation, debility of host bird, contamination of egg and chicks, and food poisoning for human. The regulatory mechanism of immune function in the oviduct is of importance to enhance the defense function against infection, and it is also important for host animal health and safe and efficient egg production. The aim of this study was to determine the immunoresponse process including recruitment of cytotoxic cells induced by bacterial and virus infection, and the effects of the immune factors on the eggshell formation in hen oviducts.

2. Effects of Lipopolysaccharide on the Recruitment of Immunocomponent Cells in the Hen Oviduct

The aim of the study in Chapter 2 was to know why the susceptibility is high in hen oviduct during the molting phase. The expression of IL-1 β , IL-6 and IL-8 were up-regulated in association with CD4⁺ and CD8⁺ T cells recruitment in response to LPS in the oviduct of the laying hens, but the ability to recruit CD8⁺ T cells may be depressed during the molting phase in Experiment 1. The lesser recruitment of CD8⁺ T cells may be one of the reasons why the oviducts are more high susceptible during the molting phase. T cell pool was more developed in the vagina of LPS-repeated stimulation group than control in Experiment 2. The lesser antigen stimulation in the vagina during molting may result in the reduction of T cell pool, and it may be also one of the reason for the higher susceptibility in the oviduct during the molting phase.

3. Effects of Estrogen on the Cytotoxic Response to Avian Infectious Bronchitis Virus Infection in Hen Oviduct

The aim of Chapter 3 was to determine whether the egg-laying phase and estrogen affect the induction of cytotoxic cells at early stage of infection by avian infectious bronchitis (IB) virus in the oviduct. The frequency of CD8⁺ and TCR- $\gamma\delta$ ⁺ T cells in the isthmus, and CD8⁺ cells in the uterus was significantly higher in the aIBV group in the laying and M-EB hens, but not in the molting and M-oil hens. The expressions of cytotoxic cell-related molecules and cytokines in the isthmus, and of CX3CL1 and IFN- γ in the uterus were higher in the aIBV group in the laying and M-EB hens, but not in the molting and M-oil hens. These results suggests that infection by IB virus causes the cytotoxic immunoresponse with up-regulation of cytokines in the isthmus and uterus at early stage of infection. This response may be declined during the molting phase due to decrease in the circulating estrogen level.

4. Effects of Avian Infectious Bronchitis Virus Antigen on Eggshell Formation and Immunoreaction in Hen Oviduct

The aim of this study was to determine the mechanism by which the IB virus affects eggshell formation. Attenuated IB virus (aIBV group) or vehicle (control group) was injected into the oviductal magnum lumen of hens. Gene expression of collagen type I, but not collagen type V, in the isthmus and calbindin in the uterus was decreased in the aIBV group. The frequencies of CD8⁺ cells and TCRγδ⁺ T cells in the isthmus and uterus were significantly higher in the aIBV group than in the control group. The expression of cytotoxic molecules and cytokines was also higher in the aIBV group than in the control. These results suggest that IBV infection causes disorder of eggshell formation by disturbing gene expression of collagen type I in the isthmus and calbindin in the uterus, probably via the effects of substances from cytotoxic cells and proinflammatory cytokines.

5. Effects of IL-1β and IL-6 Stimulation on the Expression of the Eggshell Formation-related Factors in the Cultured Uterus Tissue

The aim of this study was to determine whether the IL-1β and IL-6 affect the expression of the eggshell formation-related factors in the uterus mucosa. The expression of IL-6 receptor was identified in the tubular gland cells and whole tissues, but IL-1β receptor was not identified in the tubular gland cells. Expression of calbindin, PMCA1, PMCA2, CA2 and SLC26A9 was significantly increased in the tissues incubated with IL-1β and IL-6 compared with control group. Whereas, the density of immunoreactive calbindin was significantly lower in the tissues incubated with IL-1β and IL-6 than in the control group. These results suggest that IL-1β and IL-6 temporarily upregulate the gene expression of eggshell formation-related genes, but down-regulate the protein density of calbindin in hen uterine mucosa at the early stage of stimulation. It is assumed that IL-1β and IL-6 affect the transportation of Ca²⁺ to cause eggshell malformation in hen uterus.

6. General Discussion

In conclusion, the cytokine production and attraction of the cytotoxic cells are important to protect the oviduct from infection by pathogenic bacteria and virus in hens. Estrogen is likely necessary for enhancement of cytotoxic immune reaction in the oviduct. It was also established by the current studies that the produced IL-1β and IL-6, and cytotoxic cells and cytotoxic factors induced by microbe infection are likely one of the factors of eggshell malformation caused by pathological microbe infection. These knowledge is expected to be useful for the basis of the technology development for the preventive hygiene in the oviduct and the safe egg production.

Key words: chicken oviduct, cytotoxic cell, chemokine, cytokine, eggshell, IB virus

The contents of activities of hands-on agricultural experience in elementary schools and their educational significance

Junichi MUROOKA

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

小学校における農業体験学習の活動内容とその教育的意義
—学校農園型を中心とした分析—

室岡 順一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本研究は、小学校における「学校農園型」の農業体験学習を対象に、農業体験学習に特有な活動内容について理論・実証面から分析することで、その教育的意義を明らかにすることを目的とした。本研究での農業体験学習は児童が主体となった体験活動という観点に立ち、まず具体的な活動の過程と内容を分析し、次に活動に対する評価内容を分析し、両者の対応関係から教育的意義を導き出す方法を採用した。

第1章 農業体験学習の今日的理解

本章では農業体験学習に関わる既往研究・調査を精査し、その今日的理解を明確にした。精査対象は4分野、①「学校園」経営の手引書、②公刊された実践記録、③農業体験学習の実施動向の社会調査、④農業体験学習の教育的効果の解明を目的とした実証研究のいずれかに該当する文献資料である。その結果、「農作業体験」が①～④すべてに共通する活動内容であったが、今日の農業体験学習は、作物を主対象とし、農園として土地を利用するなどを明らかとした。さらに、これらの文献が示す諸意義を集約し、主な意義は農作業体験に由来することを指摘した。

第2章 農業体験学習の基本要素

本章では農業体験学習を構成する基本要素を特定し、基本要素に則して前章の事例を解釈し、活動内容と教育的意義の対応関係について説明を試みた。その結果、前章の「農作業体験」は農業生産活動が学習活動として改変された「作物育成活動として教育活動に取り入れられること、作物育成活動の基本要素は学習活動主体（児童）、教育活動主体（教師）、活動協力者（農業者など）、活動対象（作物など）、活動手段（農機具など）、土地（土壌環境）から構成されることを明らかにした。

第3章 低学年による学校農園型の活動内容と教育的意義

本章では、低学年の児童による活動事例を対象に、その活動内容について分析し、教育的意義を導き出した。対象は、大阪府寝屋川市立M小学校の2007年度一年生児童が1年間にわたって野菜を栽培した生活科の活動「やさいをそだてよう」である。その活動過程は担任教師の報告書から把握し、活動過程に沿って時系列に再構成した活動内容ごとに解釈した。教育的意義は、児童が活動を振り返った作文をテキストマイニングとソシオグラムによって解析し、教育的意義に相当する評価内容を導き出した。

その結果、一学期は作物育成のみであったが、二学期以降は他の教職員や農業者が活動協力者として支援し、児童自らビニールハウスを製作し、収穫物を給食の食材としたり家に持ち帰るなど、「体験的な諸活動」が展開された。教育活動主体が基本要素を統御することで、学校農園型でも1年間で活動が変化することを明らかにした。また作文に共通する評価内容は、作物を育て、作物が育ち、収穫物を他者に食べてもらった事実と実感、それに伴う成就感であった。これらの評価は作物育成活動と「収穫物を食用に利用する小活動」

に由来する。これらの評価と既往文献が示した教育的意義を比較考察し、5つの意義を提示した。

第4章 全学年および高学年による学校農園型の活動内容

本章では、複数学年の児童による複数年の活動事例を対象に、その活動内容を分析した。対象は、大阪市立N小学校の全児童約320名が異学年集団を編成して、週1回、野菜などを栽培する特別活動「ふれあいタイム」、および同校の高学年児童（六年生）の「総合的な学習の時間」である。1991年度から始まった「ふれあいタイム」の長期過程と1年間の過程は、学校資料や授業観察によって把握した。活動内容は第3章と同様の方法で解釈した。

その結果、「ふれあいタイム」の長期過程は「ふれあい農園開始期」「ふれあいタイム確立期」「田辺ダイコン育成期」「体験学習期」の4つに時期区分された。前2者は狭義の活動の時期、後2者は今日一般的に理解されている農業体験学習が展開された時期であった。学校組織が教育活動主体となり、校内の基本諸要素を組み合わせる漸進的に活動構成を展開したことを明らかにした。一方、六年生の「総合的な学習の時間」は、体験学習期から年間テーマが田辺ダイコンに設定された。活動協力者から講義や栽培指導を受け、自らテーマを立てて調べ学習をおこない、班長として小集団を指導した。これらを通じて六年生は、活動協力者から学ぶ学習活動主体、班指導によって集団の形成・維持を図る能力形成、栽培経験と調べた知識からテーマを探究する学習主体など、能力や知識の多面的な発達を図っていた。

第5章 全学年および高学年による学校農園型の教育的意義

本章では、第4章と同じ事例を対象に、活動の評価内容から教育的意義を導き出そうとした。児童作文、調べ学習のレポート、教師・保護者の感想を解析し、第3章と同様の方法で導き出した。その結果、作文に共通する評価内容は、第3章と同様の結果を得た。学期別、年度別、学年別、パネル単位での解析でも同様の結果を得た。このことから、共通する評価内容は学年の違いや活動展開と関わりなく一般的な評価内容と考えられ、第3章で提示した意義が改めて実証された。一方、六年生は下級生が収穫した時に喜ぶ姿に充足感を得、教師も小集団活動における六年生の役割に注目しており、農業体験学習は社会化の能力形成面で意義があると考えられた。

第6章 農業体験学習の活動内容とその教育的意義

本章では各章を総括し、論文全体の結論を導いた。農業体験学習の活動は狭義、今日一般的に理解されている活動、広義の3つに大別される。この内、今日一般的に理解されている活動は、①作物育成活動、②活動協力者、③収穫物を食用に利用する小活動で構成される。ただし構成は、教育活動主体の統御で短期・長期に変化する。農業体験学習は、①活動内容の構成、②基本要素の種類、③各基本要素間の関係の有無・強弱・組み合わせのバリエーションによって特徴づけられる。教育的意義として、活動を通じ技能・技術を学び、遂行する能力を得、実感できる意義、活動を成就させることで満足感など得ることができる意義、他者から作物や食べ物の評価され、自らの活動の関係性を学ぶことができる意義などが明らかとなった。

キーワード：農業体験学習、小学校、活動内容、教育的意義、学校農園型

Studies on the conservation of the red-spotted masu salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* in northeastern Kyushu, southern Japan

Keisuke KIMOTO

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

九州北東部におけるアマゴの保全に関する研究

木本 圭輔

広島大学大学院生物圏科学研究科, 730-8528 東広島市

第1章 緒言

アマゴは日本固有のサケ科魚類であり、分布南限域である九州には河川型個体群だけが生息する。内水面資源は海面に比べ脆弱なため、アマゴを含む河川性サケ科魚類では、種苗生産技術が確立された1970年代以降、おもに養殖魚の放流により資源の維持・増殖が図られてきた。しかし近年、放流された養殖魚が、各河川の在来個体群に対して遺伝的・生態的な悪影響を与える可能性が指摘されている。したがって、養殖魚の放流はアマゴを含む河川性サケ科魚類の長期的な保全のためには実施すべきでないと考えられるが、漁業・遊漁による短期的な利用のためには必要である。河川性サケ科魚類の保全と利用の両立を図るためには、在来個体群の生息水域と自然再生産の実態に基づいて河川を区分し、放流と漁場管理手法を使い分ける「ゾーニング管理」が有効と考えられる。本研究では、大分県大野川水系神原川とその周辺河川（緒方川と波木合川）にゾーニング管理を導入することを目的として、以下の4つの調査を実施した。

第2章 流程に沿った魚類群集の変化

調査水域に約1 km おきに設けた15の調査点で2003年10月、2004年2月と8月に生息魚類の潜水目視観察を行い、魚類群集組成の流程に沿った変化様式を調べた。各調査点の魚類群集は、上流側のアマゴとタカハヤが優占する単純な組成から、下流側のウグイやカワムツ等が優占する複雑な組成へ移行し、アマゴとタカハヤが優占する上流側調査点（標高415-820 m）、ウグイ、カワムツ、タカハヤが優占する移行帯の調査点（260-397 m）、および多種のコイ科魚類が優占する下流側調査点（232-255 m）の3群に分類された。群集の変化様式は、流程に沿って単調に変化する環境変数（河川形態型、標高、河床勾配、平均水面幅、流量および日平均最低水温）と有意に相関した。一方、タカハヤの個体群密度はこれらの変数と相関せず、砂防堰堤下流側の移行帯で減少した。この変化は、人為改変による生息環境の悪化を含む、異なる要因の存在を示唆する。

第3章 アマゴ浮上稚魚の流程分布

調査水域に設けた14の調査区間において、2005年1-4月に2回（11-32日間隔）の潜水目視観察を行い、アマゴ浮上稚魚の流程分布を調べた。浮上稚魚の個体群密度は上流側で高かったが下流側では低く、流程分布の偏りは2回の調査を通じて変化しなかった。また、2003年10月、2004年2月と8月に調べた幼魚期以降の個体群密度も上流側が高く、季節間で有意な相関を示すとともに、浮上稚魚の個体群密度と有意に相関した。これらの結果と、河川型アマゴ個体群の生活場所と産卵場所が近接することを考慮すると、本調査水域のアマゴ浮上稚魚は約1か月間、産卵床付近に留まるものと考えられた。したがって、本調査水域のアマゴの自然再生産は上流側で良好、下流側で低調と推定される。

第4章 アマゴ浮上稚魚の生息場所利用

アマゴ生息域下流側における自然再生産の制限要因を把握するため、流路単位スケールにおける浮上稚魚の生息場所利用様式を調べた。緒方川の1.4 km 区間に設けた56の調査区画（各25 m）において、2007-2009年1-3月に潜水目視により浮上稚魚数を計数するとともに、環境変量（流路単位タイプ、産卵床からの距離、川幅水深比、左右岸の水深、流速、植生被度）を測定した。浮上稚魚数は、早瀬周辺の流路単位タイプと有意な正の相関、沿岸水深および産卵床からの距離と有意な負の相関を示した。早瀬周辺の流路単位タイプを利用する傾向は下流側に特有であり、浮上稚魚の好適な微生息場所（速い流れに近い緩流部分）が、下流側では早瀬付近に局在するためと考えられる。一方、流路単位スケールで好条件であっても、微生息場所条件が不十分な場所では、浮上稚魚が流下する可能性が示された。したがって、アマゴ生息域下流側では、早瀬周辺の流路単位タイプの内部に、好適な微生息場所を整備する必要がある。

第5章 アマゴ個体群の遺伝的構造

在来アマゴ個体群の生息水域を特定するため、調査水域に生息するアマゴの遺伝的構造を調べた。神原川では漁業・遊漁が可能であるが、源流部では公式な放流記録がない。支流波木合川のメンノツラ谷にはイワメ（アマゴの無斑型）が生息し、まんりょう谷のアマゴとともに生息域の大部分が禁漁であるが、後者では禁漁区の上流側で非公式な養殖魚の放流が行われたとの情報がある。得られた11種類の mtDNA ハプロタイプのうち Hap-1はすべての個体群に見られ、イワメで固定（100%）、神原川源流部のアマゴで優占（90.5%）したが、まんりょう谷では Hap-1は少なく（10.0%）、過去に放流されたと推定される養魚場のアマゴのハプロタイプが優占（70%）した。これらの遺伝的構造から、メンノツラ谷のイワメと神原川源流部のアマゴは在来個体群であると推定される。

第6章 総合考察

各章の結果から、本調査水域のアマゴ個体群の現状として、移行帯を含む下流側水域では人為改変の悪影響を受けている可能性があること、アマゴの自然再生産は魚類群集の移行帯より上流で良好、下流側で低調であること、在来アマゴ個体群は神原川源流部と波木合川のメンノツラ谷に生息していること等が示された。これらの実態に基づき、以下のゾーニング案が導出された。1) 神原川源流部において漁業、遊漁、放流を禁止。2) 波木合川禁漁区の上限を撤廃。3) 両禁漁区より下流側では漁業と遊漁および放流を可とする。4) ただし、下流側水域では、浮上稚魚の生息場所整備等により自然再生産の促進を試みる必要がある。本案は地元住民、大野川漁業協同組合、遊漁者、竹田市等で組織した委員会に受け入れられ、2009年までに漁業関連規則が改正された。現在、本調査水域において、本研究結果に基づくアマゴの保全が実施されている。

キーワード：アマゴ，保全，浮上稚魚，流程分布，生息場所利用，遺伝的構造

Taxonomy and biology on sunfishes of the genus *Mola*

Etsuro SAWAI

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

マンボウ属魚類の分類および生態に関する研究

澤井 悦郎

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

マンボウ属 *Mola* はフグ目マンボウ科に属し、全長3 m 以上、体重2 t 以上にも成長する大型回遊魚である。マンボウ属は尾鰭の要素を完全に欠き、代わりに舵鰭と呼ばれる背鰭と臀鰭の一部が変形してできた鰭を持つ。これら特徴的な巨大さや独特の外観などから、マンボウ属は古来より人々の興味関心を引き付けてきた。しかし、その巨体さが大きな制約となり、標本を得る困難性から、マンボウ属の名義種は過去に30種以上にも膨れ上がったが、Fraser-Brunner (1951) によって分類学的再検討が行われ、現在では *Mola mola*, *Mola ramsayi* の2種が一般的に広く認知されている。

近年、系統分類に関する研究にミトコンドリア DNA を用いた手法が取り入れられ、本研究の先行研究にあたる Yoshita et al. (2009) によって、マンボウ属は少なくとも独立した3種 (*Mola* spp. A-C) が世界に存在することが提唱された。本論文では Yoshita et al. (2009) の手法による種同定に基づく山野上・澤井 (2012) の和名定義に従い、これら3種をそれぞれウシマンボウ *Mola* sp. A, マンボウ *Mola* sp. B, C 種 *Mola* sp. C と呼ぶ。

Yoshita et al. (2009) は日本近海に出現するウシマンボウとマンボウの形態を比較し、全長1.8 m 以上の個体において、頭部や舵鰭の形状などに差異が見られることを見出した。しかし、Yoshita et al. (2009) の形態比較で用いられた個体数は少なく、タイプ標本との照合は行われていない。本研究では、新たに世界各地からマンボウ属の DNA サンプルを集め、各地域にどのような種が分布しているのかを調査し、各種の形態や生態の比較から、それぞれの生物学的特徴を明らかにすること、またタイプ標本との照合や種の記載論文の精査から、遺伝的に分けられたマンボウ属各種の学名を再検討することの2点を目的とした。

1. DNA 解析。世界各地から356個体のマンボウ属のサンプルを収集し、ミトコンドリア DNA の D-loop 領域を用いたマルチプレックス PCR 法やダイレクトシーケンス法により種同定した結果、先行研究と同様にマンボウ属は3種で構成された。本研究ではウシマンボウが大西洋やインド洋にも分布すること、またマンボウ種内において大西洋と太平洋のクレードが明瞭に分かれることが明らかとなり、マンボウ属各種にいくつかの地域集団が存在する可能性が示唆された。

2. 形態調査。日本近海からマンボウ属2種の形態異常個体（胸鰭変形、背鰭短縮、背鰭軟条配置異常、舵鰭臀部側欠損、舵鰭欠損、人為的な損傷、幼形形態、精巣肥大）の知見を得た。

国内の博物館関連施設で展示されているマンボウ属の大型剥製4標本（全長2.5 m 以上）について、種の再同定を行った。以前までこれら4標本はすべて *Mola mola* と同定されていたが、研究の結果、ミュージアムパーク茨城県自然博物館、アクアワールド茨城県大洗水族館、北九州市立自然史・歴史博物館に展示されている3標本はウシマンボウと同定され、海とくらしの史料館に展示されている1標本はマンボウと同定された。

写真の同定から北海道で確認されたウシマンボウは本種の北限記録を更新し、大分県で確認されたウシマンボウは九州で初めて確認された。

オマーン近海から得られたマンボウ属2個体は、Fraser-Brunner (1951) の分類を用いて、先行研究 (Jawad et al., 2012 ; Jawad, 2013) で形態的に別種 (*Mola mola*, *Mola ramsayi*) と同定された。しかし、DNA 解析

した結果、両個体とも同種（ウシマンボウ）と同定された。両個体の写真から形態調査を行った結果も、ウシマンボウと同定された。本研究と先行研究での種同定の食い違いから、Fraser-Brunner（1951）の分類は再検討の余地があることを示唆した。また、これらの形態調査の結果から、国内外ともに種の混同や誤同定が生じていることが示唆された。

3. 生態調査。6月～11月の期間に東北沿岸域に出現するウシマンボウとマンボウについて生態調査を行った。本研究の結果、マンボウ属2種は出現の時期、体の大きさ、性比、水温が異なった。マンボウは調査期間すべてに、雌雄ともに大小様々な体の大きさの個体が出現した。一方、ウシマンボウは夏季（7月～8月）に、全長2 m以上の雌のみが出現した。これはウシマンボウがマンボウより出現水温が高いことと一致する。マンボウは様々な体の大きさが出現したことから、東北沿岸域を摂餌場、生育場として利用していることが推察された。一方、ウシマンボウは小型個体が出現しないことから、東北沿岸域は大型個体のみが摂餌場として利用していることが推察された。またマンボウは大型個体と小型個体で出現時期や出現水温が異なったことから、マンボウ属は成長段階によって回遊パターンが変化する可能性が考えられた。

4. 分類学的再検討。ここまでで得られた知見から遺伝的に分けられた3種とタイプ標本の照合を行った。Catalog of fishesによると、現存するマンボウ属のタイプ標本は *Mola mola* の新参異名とされる *Ozodura orsini* と *Mola ramsayi* のもととなった *Orthragoriscus ramsayi* の2標本のみだった。これらの形態を調査した結果、*Ozodura orsini* Ranzani, 1839はマンボウ、*Orthragoriscus ramsayi* Giglioli, 1883はウシマンボウの形態的特徴と一致した。しかし、これらの調査中に行方不明とされていた *Mola mola* の新参異名とされる *Orthragoriscus alexandrini* Ranzani, 1839のタイプ標本が再発見され、形態調査を行った結果、ウシマンボウと一致した。学名を決定するために、種の記載論文の精査を行ったところ、*Mola mola* のもととなった *Tetraodon mola* Linnaeus, 1758は複数の論文を基にして記載されていたことが明らかとなり、タイプ標本はないものと考えられた。しかし、Linnaeus（1758）の記載した種は有効と考えられ、*Tetraodon mola* をマンボウ属の最初の種とした。また Linnaeus（1758）から Ranzani（1839）までの種の記載論文の中に *Orthragoriscus alexandrini* と一致する種は他にみられなかったことから、*Orthragoriscus alexandrini* をマンボウ属の2番目の種として有効とした。これらの結果より、ウシマンボウの学名は *Mola alexandrini* (Ranzani, 1839)、マンボウの学名は *Mola mola* (Linnaeus, 1758) と考えられた。C種は詳細な形態的特徴がわかっていないため、学名の決定は今後の課題とした。

これまでの結果、マンボウは南太平洋や主要なインド洋では確認されていない。一方、ウシマンボウは南北両半球広い分布が確認された。また、C種は北半球では確認されなかった。これらより、マンボウ属各種はそれぞれ種ごとに異なる分布域を持つ可能性が示唆された。

キーワード：マンボウ属、形態、生態、DNA解析、分類

Development of Good Agricultural Practices (GAP) in Thailand: A case study of Thai National GAP selected products

Pongthong PONGVINYOO

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

タイにおける Good Agricultural Practices (GAP) の発展
—GAP 対象品目に関する事例研究—

ボンソン ポンビンヨー
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

Good Agricultural Practices or GAP is a global appropriate cultivation method for the farmers to conduct food safety. It is an appropriate on-farm into farm gate cultivation management included, farm inputs selection, farm management, until post-harvest management. GAP aims to encourage the farmers to produce the safety agricultural products for the consumers. After FAO introduced GAP for a period of time, it become one of the minimum requirements for the agricultural trades in global market to secure the food safety and sustainable issues at the farm-level production. Many countries adopted the FAO GAP guidelines and established food security framework, including Thailand. Although there was the clear framework for the MOAC to implement GAP into farmers, halves of them stopped to maintain their certificates with in last 3 years. The reducing in the numbers of GAP certified farmers in Thailand shown the changing in direction of GAP development in the future. The evaluation of success of GAP development in Thailand still is on the discussing. This dissertation focused to identify the current situation of GAP development in Thailand.

This dissertation has four specific objectives: 1) To examine the factors affecting the farmers' practical perception on their GAP understanding; 2) To assess the situation of private standard dual-GAP development in Thailand, and to determine the opportunities of the practical collaboration between private and government sectors on the GAP development; 3) To expose the GAP realistic economic incentives from farmers' GAP experiences in the important export commodity; and 4) To define the current situation of GAP-based marketing and to identify the buyers' attitudes towards GAP-based product.

Conclusion and recommendation

After FAO introduced GAP for a period of time, it become one of the minimum requirements for the agricultural trades in global market to secure food safety and sustainable issues at the farm-level production. Many countries have adopted the FAO GAP guidelines and established food security framework, including Thailand. There were many obstacles on policy, extension services, research, and farmers' implementation levels during GAP developing process. The success of GAP is depended on the effectiveness of farmers' implementing GAP procedures. The farmers will increase their GAP standard attention when they can get premium price from selling their GAP-based product. In general, consumers markets have not yet developed enough mature to deal in GAP labelled products in some countries. Farmers might ignore this standard. Food safety issues including GAP are not cared at a farm-level. As a result, like Thailand, food safety of agricultural product is not reliable in the global trades.

Actually GAP gave both direct and indirect incentives to farmers, but they tend to believe that GAP can secure little incentive for them, in cases where a direct market for GAP-based product has not yet become mature in economic terms. Therefore, private sector need to generate a dual-GAP standard which will secure food safety and keep a certain level of product quality. Some dual-GAP standards labelling (such as 4C, GlobalGAP, etc.) have already be accepted widely in the global markets. Farmers can gain visible benefits (normally is premium price) from implementing such standards, and learn how to improve their food safety production on their farms.

However, it is also difficult to promote new dual-GAP standards. Private company have expanded the fundamental GAP knowledge among farmers through dual-GAP standard. This knowledge expanding becomes the best way how private company explore their new standard. Any dual-GAP standard needs the development of GAP as an essential requirement. GAP standard also needs the dual-GAP standard for the market access. Each standard cannot stand alone in market. This mutual-relationship positively motivates the development of both GAP and dual-GAP standards. This relationship inspires the farmers to improve their sustainable cultivation which positively affects the Thai agricultural food safety reliability in the global trades.

Keywords: GAP, QGAP, 4C, Dual-GAP standard, coffee, mangosteen, cost efficiency, marketing

A study of diagnostic enzyme production by microorganism

Yuu UTASHIMA

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

微生物による臨床検査用酵素の生産に関わる研究

歌島 悠

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

臨床検査とは、超音波や画像診断、心電図等の身体のなかの様子やその動きをみる「生体検査」と、尿や便、血液の成分を測定したり、取り出した組織の状態を観察する「検体検査」に分類され、特に検体検査においては、検体中の成分を分析するために、臨床検査薬が利用される。「検体検査」における「生化学検査」では、検体由来成分を酵素化学的若しくは、化学的に反応させ、分光光学的に分析を行う方法が主流であり、検査薬には酵素が広く利用されている。

臨床検査薬に使用される酵素には、グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH)、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼなどさまざまな酵素が利用される。また、これらの臨床検査用酵素には、誤診断を防ぐために高い基質への特異性と高い反応性が求められ、さらに、臨床検査薬の長期間の保存に耐えるため、高い安定性が求められる。また、副反応を防ぐために、高い精製純度が求められる。

独立行政法人酒類総合研究所で単離され、研究されている、担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2は、排水処理用の酵母として単離されたが、近年、宿主—ベクター系が開発され、さらに、キシロース添加により強力に誘導発現可能なキシラナーゼプロモーターも取得されたことにより、強力な異種タンパク質発現系が構築されている。

本研究では、*Cryptococcus* sp. S-2を宿主として、臨床検査用酵素の組換え生産に取り組んだ。

第1章では西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の *Cryptococcus* sp. S-2での組換え発現を検討した。HRPは過酸化水素 (H_2O_2) と色素などのメディエーターとの酸化反応を触媒する酵素であり、臨床検査において二次反応によく用いられる。HRPの組換え発現に関する報告は、1990年頃からあるが、大腸菌や酵母を用いた場合、その発現量は非常に低いことが確認されている。本研究では、宿主として *Cryptococcus* sp. S-2を用い、コドンの最適化、分泌シグナルの最適化、キシラナーゼプロモーターを用いた高密度培養により HRP の高発現を検討した。検討の結果、野生型配列を導入した場合、遺伝子内部に潜在的に存在する poly(A) 付加シグナルによって mRNA の転写が途中で停止し、不完全な mRNA が合成されていることを見出し、コドンの最適化により遺伝子内部に存在する poly(A) 付加シグナルが除去され、完全長の mRNA が合成されることを確認した。さらに、N 末端に存在する分泌シグナルを *Cryptococcus* sp. S-2由来のシグナルに置換し、C 末端に存在する液胞滞留シグナルを除去することによって、HRP の発現量を13.2倍に向上させることに成功した。さらに、キシロースを連続的に添加する高密度培養によって、HRP の発現量をさらに27倍向上させることで、培養液あたりの発現量を約110 mg/L まで向上させることに成功した。この生産量は、これまでに論文などで報告されたレベルよりはるかに高いレベルであり、*Cryptococcus* sp. S-2はタンパク質の異種発現宿主として非常に優れていることを確認した。

第2章では、血糖測定に用いられる GDH を対象として、その酵素の取得と改変、さらに、大腸菌、麹菌 *Aspergillus oryzae* と *Cryptococcus* sp. S-2での組換え発現に取り組んだ。GDHは血液中のブドウ糖と反応し、電子を放出するため、血糖値の測定を行う「自己血糖測定装置」に広く利用されている。本研究では、麹菌

が生産する基質特異性に優れた FAD 依存型グルコースデヒドロゲナーゼ (FAD-GDH) を取得し、アミノ酸置換により耐熱性を向上させることに成功した。次に、改変型 FAD-GDH を麹菌で組換え発現することにより N 型糖鎖の修飾が起こり、その結果、さらなる耐熱性の向上がみられた。さらに、改変型 FAD-GDH は、コドンの最適化と分泌シグナルの置換、連続的なキシロースの流加による高密度培養によって、*Cryptococcus* sp. S-2 で大量に組換え発現可能であることを確認した。また、ケカビ由来の FAD-GDH についても、同様の手法によって *Cryptococcus* sp. S-2 で組換え発現可能であることを確認した。

第3章では *Cryptococcus* sp. S-2 を産業的に利用しやすく、また、研究開発の対象としても扱いやすい微生物とするため、宿主—バクター系の改良に取り組んだ。具体的には、ウラシルマーカを用いたマーカリサイクル系を構築し、栄養要求性マーカの追加と改良、*ku70* 遺伝子破壊による遺伝子ターゲティング効率の向上により遺伝子組換え操作を容易にした。さらに、産業利用しやすい宿主とするために、*Cryptococcus* sp. S-2 が細胞外に排出する多糖類の生産量を低減させた変異株の取得を行った。本研究によって、*Cryptococcus* sp. S-2 を産業的にも、研究対象としても利用しやすい微生物に改良することが出来た。

以上に示すように、本研究によって、臨床検査用酵素を *Cryptococcus* sp. S-2 を用いて組換え発現させるための基盤技術を構築し、宿主—バクター系の整備、産業利用可能な宿主の取得が達せられた。本研究の成果によって、臨床検査において使用する酵素を微生物によって大量に組換え発現させることが可能となり、高純度で安価な、臨床検査用酵素を提供することが可能となり、広く医療の現場に貢献すると考える。

キーワード：臨床検査，酵素，組換え発現，担子菌酵母，*Cryptococcus* sp. S-2

Single and combined effects of ozone, acid and polycyclic aromatic hydrocarbons on plant

Sayuri BANDAI

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

オゾン, 酸性物質, 多環芳香族炭化水素の植物への単独および複合影響に関する研究

万代 小百合

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, 植物に対して大気汚染物質であるオゾン, 酸性物質, 多環芳香族炭化水素の単独・複合暴露を行い, これらの大気汚染物質および二次的に生成されるヒドロキシルラジカルが植物の生理生態的機能に及ぼす影響について実験的研究を行った。加えて, 活性酸素種消去剤を用いて植物を保護する手法についての検討を行った。

第1章では, 大気汚染物質が及ぼす植物への影響に関するこれまでの研究, ならびにヒドロキシルラジカルの植物への影響に関するこれまでの研究について示した。これらを踏まえた上で, 本論文の目的と意義を述べた。

第2章では, 農作物であるナスおよびインゲンマメを用いて, オゾンおよび多環芳香族炭化水素の一種であるフェナントレンの単独・複合暴露を行った。複合暴露処理区では, ナス, インゲンマメ双方の個葉の最大光合成速度にオゾンとフェナントレンの単独影響が認められ, さらにオゾンとフェナントレンの複合影響が認められた。単独処理区では, 個葉の最大光合成速度, 気孔コンダクタンス, 最大光量子収率, クロロフィル含量が対照区に比べて有意に低下し, 複合処理区においてはこれらに加えて葉内二酸化炭素濃度が有意に上昇した。葉面の可視障害については, オゾンに特徴的な黄変やフェナントレンに特徴的な赤褐色の斑点が発現した。最大光合成速度の低下の原因として, 気孔開閉機能, 葉内成分含量の低下によって影響を受けた可能性があると考えられた。さらに, マンニトール処理により生理活性の低下が抑えられ, 可視障害の程度が軽減したことから, 葉面付近で発生する活性酸素種が植物に影響を与えることが示唆された。

第3章では, 近年, 被害の拡大が報告されているナラ枯れと大気汚染物質との因果関係を探るための基礎実験として, コナラ苗木を用いてオゾンおよび硫酸溶液の単独・複合暴露を行った。複合処理区では, クロロフィル a/b に対してオゾンと硫酸の有意な相互作用が認められ, オゾンと硫酸が相加的に作用した可能性が考えられた。最大光合成速度, クロロフィル a+b にはオゾンと硫酸両方の有意な単独影響が認められた。また, 気孔コンダクタンス, 葉内二酸化炭素濃度にはオゾンの有意な単独影響が, 最大光量子収率, クロロフィル a/b には硫酸の有意な単独影響が認められた。対照区との比較では, オゾン, 硫酸溶液の暴露により最大光合成速度, 気孔コンダクタンス, 最大光量子収率, クロロフィル含量が有意に低下し, 葉内二酸化炭素濃度が有意に上昇した。葉面にはオゾンに特徴的な黄変や硫酸に特徴的な茶褐色の斑点が発現した。項目間の相関関係から, 光合成速度は, 気孔開閉機能, 炭素固定能力, 葉内成分含量の低下によって影響を受けた可能性があると考えられた。さらに, マンニトール処理により生理活性の低下が抑えられ, 可視障害の程度が軽減したことから, 第2章と同様に, 葉面付近で発生する活性酸素種が植物に影響を与えることが示唆された。

第4章では、大気汚染物質に感受性が高く、季節を問わず育成できる観賞用植物を用いて、プリムラに対してヒドロキシルラジカルを発生させるフェントン試薬、キンセンカに対してオゾンの単独暴露を行った。さらにこの章では、これまでに検討した活性酸素消去剤であるマンニトールに加え、アスコルビン酸およびカテキンと抗酸化能を持つ食品として知られる紅茶溶液の影響抑制効果について検討した。フェントン試薬の単独暴露によってプリムラの最大光合成速度が有意に低下した。また、オゾンの単独暴露によりキンセンカの最大光合成速度、気孔コンダクタンス、最大光量子収率、葉緑素量が有意に低下し、葉内二酸化炭素濃度が上昇した。キンセンカ葉面には黄変や壊死斑が発現し、オゾンの影響が可視障害にも表れた。プリムラ、キンセンカの最大光合成速度は、気孔コンダクタンスと有意な相関関係が認められる点が共通であり、光合成速度低下の原因として、気孔開閉機能が影響を受けた可能性があることが推察された。さらに、活性酸素種消去剤処理により生理活性の低下が抑えられ、可視障害の程度が軽減したことから、葉面付近で発生するヒドロキシルラジカルが観賞用植物に影響を与えることが示唆され、マンニトールに加え、紅茶溶液、アスコルビン酸およびカテキンが葉面における活性酸素種除去に効果的であることが示唆された。

第5章では、大気汚染物質の単独および複合影響、ならびにヒドロキシルラジカルの植物影響について総合的に考察した。単独、複合影響の程度について光合成速度の減少率を示し、樹木であるコナラ・アカマツ、観賞用植物であるキンセンカ・サンパチェンス、農作物であるナス・インゲンマメの順にAOT40当たりの光合成速度減少率が大きい傾向が見受けられることから、植物種によりオゾンに対する感受性の強さが異なることが考えられた。また、光合成速度に関しては、針葉樹より広葉樹が硫酸に対する感受性が高い可能性があることが推察された。植物葉面において光化学的に生成するヒドロキシルラジカルは、孔辺細胞と反応することによる気孔開閉機能の低下を招くと同時に、葉面のクチクラを損傷させることによって葉の栄養塩類の溶脱、光合成色素の分解、細胞の損傷を引き起こすことにより、葉の生理的機能を低下させ、最終的に光合成速度を招くと推定した。

キーワード：オゾン、酸性物質、多環芳香族炭化水素、単独影響、複合影響

Physiological studies on saline and alkaline toxicities and tolerances in Swiss chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*)

Liyun Liu

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

フダンソウ (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*) の塩・アルカリ障害及び耐性に関する
生理学的研究

劉 利雲

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528広島市

Saline soils ($\text{pH} < 8.5$) and alkaline soils ($8.5 < \text{pH} < 10.5$) are widespread adverse environmental problems globally, which significantly limit crop production. Swiss chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*) is a foliage vegetable closely related to beets with a large leaf blade, and thicker petiole. This plant is more tolerant to salinity than other leafy vegetables. However, there are few reports on Swiss chard resistance to salinity, and there is no information about its alkaline toxicity or alkaline tolerance in this plant. In chapter 1, the differences between saline soils and alkaline soils, as well as the different effects of salinity and alkalinity on plant growth were introduced. The objectives of this study were to examine toxic responses of Swiss chard to alkalinity via comparing the saline and alkaline toxicities in Swiss chard by determining its physiological characteristics, and to identify parameters that are more suppressed under alkaline conditions than under saline conditions.

In Chapter 2, in order to understand the difference between physiological responses of Swiss chard to salinity and alkalinity, Swiss chard plants were subjected to 50 mM and 100 mM of salinity ($\text{pH} 6.5$) and alkalinity ($\text{pH} 9.0$), respectively. The data revealed that the plant growth was more seriously inhibited under alkaline conditions than under saline conditions, because of the more decrease of chlorophyll (Chl) *a*, Chl *b*, photosynthetic rate (P_n), water use efficiency (WUE), K^+ content, and K^+/Na^+ ratio. Among these parameters, decreases of P_n and WUE were in close connection with decreases of Chl and K^+ contents under alkaline conditions. Therefore, it was concluded that Chl and K^+ are limiting factors for the plant growth under alkaline conditions.

Following the serious reduction of Chl content under alkaline conditions. In Chapter 3, the experiment was conducted to compare the possibility of saline and alkaline tolerance inductions in Swiss chard due to ALA foliar application (ALA is an essential precursor for biosynthesis of Chl). Twelve-week-old uniform seedlings were treated with ALA under saline and alkaline conditions. The observed results revealed that Chl content significantly increased due to ALA foliar application under alkaline conditions; the shoot and root dry weights, RWC, osmotic potential (OP), K^+/Na^+ ratio, and total N content increased due to ALA foliar application under alkaline conditions, while these parameters more increased under saline conditions; malondialdehyde (MDA) content significantly increased under alkaline conditions, but this increase was effectively depressed by ALA foliar application. This result clearly demonstrated that foliar-applied ALA had the potential to alleviate oxidative damage in alkalinity-stressed plants. These results suggest that, although ALA foliar application effectively increased Chl content, it could not completely alleviate oxidative damage caused by osmotic stress and ionic stress, and thus less increase in alkaline tolerance.

K is a major inorganic constituent for osmotic potential, ion homeostasis, and enzyme activation in plant cells. In chapter 2 and chapter 3, it was found that serious K^+ deficiency in Swiss chard leads to more destructive effects under alkaline conditions than under saline conditions. In light of this, Chapter 4 was conducted to investigate the impairments of water uptake, mineral elements, and antioxidant enzyme activities in the plant caused by alkalinity with or without K^+ application. The observed results revealed that the absence of K^+ somewhat intensified the effect of alkalinity on reducing plant growth, because RWC, K^+ content, micronutrient (Cl^- , BO_3^{3-} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , and Zn^{2+}) contents, and the activities of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), and guaiacol peroxidase (GPX), were more negatively affected under Alkaline-K treatment than under Alkaline+K treatment. Under Alkaline+K treatment, the GPX activity protected the plant against the oxidative damage caused by H_2O_2 , and K^+ application might help the plant by maintaining GPX activity. Under Alkaline-K treatment, potassium use efficiency (KUE) increased 18 times compared with that of control, suggesting that the plant can survive under Alkaline-K treatment depending on its efficient use of K^+ through saving it for biomass production. After analysis for MDA, and percentage contributions of Na^+ and K^+ to osmotic potential at full turgor, results revealed that oxidative damage was slightly induced, while Na^+ replaced K^+ as the main ion contributing to osmotic potential at full turgor under Alkaline-K treatment. This finding indicates that cytoplasmic K^+ content was maintained at a higher level, due to a high proportional substitution of vacuolar K^+ by Na^+ , which then markedly increased the KUE, somewhat reduced the oxidative damage caused by toxic Na^+ .

In Chapter 5, I concluded that alkalinity is more toxic than salinity, which is attributed mainly to the serious reductions in Chl and K^+ contents. ALA foliar application significantly increased Chl content more under alkaline conditions than under saline conditions. However, plant stress tolerance increased less, and K^+ content remained unaltered under alkaline conditions. In light of these observations, it was suggested that enhancement of plant alkalinity tolerance was consistent with the enhancement of K^+ content in the plant, but not enhancement of Chl content. The application of K under alkaline conditions showed that K supplementation enhanced the GPX activity and micronutrient contents, and the plant's survival under Alkaline-K treatment owes to high KUE, which is linked to a high proportional substitution of K^+ by Na^+ .

Keywords: Alkalinity, Antioxidant enzymes, 5-Aminolevulinic acid, *Beta vulgaris*, Chlorophyll, Potassium, Salinity

Study on improvement effects of sulfide-containing sediments using iron- and steel-making slag

Yasuhito MIYATA

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

鉄鋼スラグによる硫化物含有底質の改善効果に関する研究

宮田 康人

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

我が国では、高度経済成長期の急激な経済発展に伴い、陸域から栄養塩流入負荷の増大に加え、沿岸域の埋め立てや港湾建設、護岸整備等が進んだ。これに対し、環境省主導による流入負荷の削減が行われ、赤潮発生件数は少なくなり、透明度が上昇するなど、沿岸域の水質はかなりの程度回復した。一方、底質はいまだに劣悪な状況で、有機質の底泥が堆積し、貧酸素水塊や青潮の発生は解消していない。

そこで本研究では、貧酸素水塊や青潮の原因となる硫化水素の発生を抑制する技術として、鉄鋼スラグの適用が可能であると考えた。底泥からの溶存硫化物（硫化水素）による悪臭が問題となっている福山市内港を対象海域とし、製鋼スラグ（各種鉄鋼スラグのうち、鉄含有量が高い）による硫化水素ガス発生抑制効果およびその持続性に関し、実験室規模および実海域規模により明らかにすることを目的とした。

第1章では、わが国の沿岸海域環境の課題について述べるとともに、鉄鋼スラグの環境資材としての利用の可能性について述べた。鉄鋼スラグ以外の既往の底質改善材料についてもレビューし、硫化水素発生抑制のメカニズム、実海域における適用事例などについて述べた。これらの中で、製鋼スラグがその化学的組成から硫化水素を抑制するという観点で、底泥の改質効果が高いこと、および硫化物抑制による酸素消費抑制特性の有無およびその効果などについては十分な知見が得られていないことなどについて触れた。

第2章では、悪臭問題が顕在化している福山内港に堆積した有機泥を用いた実験室規模の試験の結果について述べた。採取した泥に対して、製鋼スラグを上置きまたは混合し、泥中の溶存硫化物の低減効果について検討し、以下の知見を得た。

- 1) 製鋼スラグを泥に上置きまたは混合することにより、泥の酸化還元電位が上昇した。すなわち、泥の性質が、還元的な状態から酸化的状態に改善された。
- 2) 直上水および底質間隙水の溶存硫化物濃度が有意に低減するとともに、気相への硫化水素ガス発生も抑制された。
- 3) これらの効果は試験期間（6ヶ月）の実験期間中継続した。
- 4) 製鋼スラグに比べ、天然石では覆砂効果は確認されたものの、底質間隙水中の硫化物の低減効果はほとんど見られないことから、物理的な覆砂効果に限定されると考えられた。
- 5) 実海域の泥中に浸漬し、後に回収した製鋼スラグの粒子表面および泥の走査型電子顕微鏡による観察結果から、製鋼スラグ表面においてFeSが生成していることが推察された。
- 6) 酸化還元電位-pH図による検討から、製鋼スラグの適用により、pHおよび酸化還元電位を高めるとともに、鉄が供給されることにより、平衡時の硫黄の主要な存在形態が変化し、溶存硫化物の生成が抑制されると推察された。さらに、溶出した鉄成分により硫化鉄が生成することで、硫化物を固定していると考えられた。

上記1)～6)の知見から、硫化水素による悪臭が問題となっている海域への製鋼スラグ上置き（覆砂）

または混合による溶存硫化物や硫化水素ガスの生成抑制の改善技術としての有効性が示唆された。

第3章において、製鋼スラグによる水中の酸素消費の低減について、室内試験により定量化することを試みた。福山内港の底泥に製鋼スラグを上置きし、溶存酸素濃度などの推移を調べた。この実験より、下記の知見を得た。

- 1) 泥から海水中への溶存硫化物の溶出が抑制され、溶存酸素濃度および酸化還元電位が高く推移した。一方、泥単体では溶存酸素濃度はほぼゼロ、酸化還元電位も低位で推移、海水への溶存硫化物の溶出が認められた。
- 2) スラグ上置きによる水中の溶存酸素消費の低減量は、 $100\sim 150\text{ mg/m}^2/\text{day}$ と見積もられた。
- 3) スラグ上置き区において、試験後の泥中の有機態炭素が大きく減少したことから泥中の有機物分解が生じた可能性が考えられた。つまり、スラグの存在によって好氣的有機物分解が促進されたことを示唆している。

以上の結果は、いずれもこれまでに無い知見である。

第4章において、福山内港の環境改善対策として、製鋼スラグ撒布による有機質中の硫化物低減技術の実海域実証試験について述べた。製鋼スラグを2011年8月に 430 m^2 の面積に、次いで2012年7月に $3,510\text{ m}^2$ の面積に施工した。施工後にスラグ試験区および対照区について底質間隙水、直上水の水質、および底質から発生するガスなどについてモニタリングした。約2年にわたる追跡調査の結果、下記の結果が得られた。

- 1) スラグ試験区における底質間隙水中の溶存硫化物濃度は対照区のそれに比べて著しく低減した。また酸化還元電位および溶存酸素濃度の向上など底質改善効果が認められ、その効果は少なくとも約2年間の調査期間持続した。そのメカニズムは上述の室内試験の通り、スラグから供給される鉄と溶存硫化物の反応により硫化鉄などが生成することによるものと考えられた。
- 2) スラグ試験区では対照区に比べて底泥からのガス発生量が低減した。
- 3) ただし、直上水およびさらにその上層の水質については、スラグ施工区および対照区間で差が認められなかった。これは潮汐等による移流拡散により海水が流動しているためと推察された。
- 4) 秋季から冬季にかけてスラグ試験区において底泥間隙水の溶存酸素濃度の上昇が観測された。一方、対照区においては認められなかった。この主な理由として、試験区においては溶存硫化物による酸素消費が抑えられたことが考えられた。
- 5) 冬季から春季において、とくに最も湾口側の試験区の海底で、ユウレイボヤ、スピオなど、多くの底生生物の着生が認められた。これは、秋季から冬季にかけて底層水の海水の溶存酸素濃度が高まったこと、および堆積する浮泥厚みが減少し、一部においてスラグ表面が露出することにより、スラグ表面がそれらの底生生物の着生基質として適していたものと考えられた。

上記1)～5)の知見から、底泥中の硫化物発生が問題となっている海域への製鋼スラグ撒布（覆砂）による環境改善の有用性が示唆された。

以上のように、海底に堆積した有機質の底泥からの溶存硫化物生成に起因する悪臭が問題となっている閉鎖性海域である福山港内港地区を対象海域として、製鋼スラグによる硫化水素の発生抑制による底泥改善効果を実験室規模および実海域規模で実証した。そのメカニズムとして、還元的な環境を酸化的に改質することによる硫化物の酸化および鉄の溶出による硫化鉄の生成であり、さらには硫化水素によって消費されていた酸素の濃度を回復するという新たな効果に関する知見を得ることができた。今回得られた科学的知見に基づき、高度経済成長期に失われた豊かな海域環境を修復あるいは創造する技術として鉄鋼スラグの適用が広がることが期待される。

キーワード：スラグ、沿岸海域環境、底質改善、硫化物、酸化還元電位、溶存酸素、貧酸素、底生生物

Occurrence, Sources and Degradation of Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion in Water, Sediments, Plankton and Fishes of Coastal Sea and River Waters, Japan

Chikumbusko Chiziwa KAONGA

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

沿岸水および河川水、堆積物、プランクトン、魚類中のジウロン、イルガロール1051、
フェニトロチオンの存在量、発生源、分解過程

チクンプスコ チジワ カオンガ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528東広島市

In this study Diuron (3-[3,4-dichlorophenyl]-1,1-dimethylurea), Irgarol 1051 (2-[tert-butylamino]-4-[cyclopropylamino]-6-[methylthio]-1,3,5-triazine) and Fenitrothion (O,O-Dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate) were monitored in Kurose River water to assess the contribution of agriculture and urban activities to river pollution. Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion were also analysed in marine samples (water, sediments, plankton and fishes) so as to assess the distribution pattern of these pesticides in Seto Inland Sea. Lastly, biodegradation and photodegradation of these pesticides was done. Using data in this study and literature information, the mass distributions of the pesticides in Seto Inland Sea were modelled.

Chapter 1 presents a general overview of pesticide use, contamination and some of the studies that have been done in Japan. This study mainly aimed at assessing contamination of pesticides in river water and the marine environment. The use of pesticides in agriculture and the urban environment leads to contamination of surface water bodies like rivers. The rivers in turn end up contaminating larger surface water bodies. Therefore in this study water samples were first collected from Kurose River which drains into Seto Inland Sea and Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion were analysed. Next seawater, sediments, plankton and fishes were analysed to identify the distribution pattern in marine samples. The persistence of these pesticides was assessed through biodegradation and photodegradation before using modelling to predict the distribution pattern of the pesticides.

Chapter 2 presents a study that was conducted on the pesticides Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion in Kurose River water from January to December, 2013 at six sites (Nakitakiji, Tokumasa, Izumi, Ochiai, Hinotsume and Kurose Bunka Centre) in Higashi Hiroshima City, Japan for a period of one year to assess the contribution of agriculture and urban activities to pesticide pollution of the river. The maximum pesticide concentrations were; 4620 ngL⁻¹, 50 ngL⁻¹ and 370 ngL⁻¹ for Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion, respectively. While Diuron and Fenitrothion were detected at all sites, Irgarol 1051 was only present at Izumi, a high density urban and industrial area which also registered the highest concentrations of the pesticides. The pattern showed by Diuron and Fenitrothion was linked to farming activities. Also, Diuron and Fenitrothion concentration correlated with pesticide utilization data for Hiroshima Prefecture. Irgarol 1051 showed a different pattern to that of Diuron and Fenitrothion and its source was attributed to paint. It was noted that 78% and 42% of water samples at Izumi sampling site exceeded the European Union (EU) guidelines for Diuron and Fenitrothion, respectively.

Chapter 3 presents a study that was conducted in Seto Inland Sea, Japan (2012 to 2013), to assess the distribution of Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion among water, sediments and aquatic organisms (plankton, fish and selected marine animals). The maximum concentrations for Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion were 2180 ngL⁻¹, 1070 ngL⁻¹ and 50 ngL⁻¹ in surface waters, respectively; 60 ngL⁻¹, 90 ngL⁻¹ and 40 ngL⁻¹ in bottom waters, respectively; 75 ngg⁻¹ dry weight (dw), 69 ngg⁻¹ dw and 51 ngg⁻¹ dw in sediments, respectively; 2830

ngg⁻¹ dw, 2040 ngg⁻¹ dw and 460 ngg⁻¹ dw in plankton, respectively; 4120 ngg⁻¹ dw, 3140 ngg⁻¹ dw and 480 ngg⁻¹ dw in fish and selected marine animals, respectively. The highest concentrations of Diuron and Irgarol 1051 were found close to a port and ship building industries, whilst maximum concentrations of Fenitrothion were detected near river estuaries. The general trend was that of decreasing pesticide concentrations away from the mouth of rivers flowing into the Seto Inland Sea. Our calculated bioconcentration factors (BCFs) indicate that plankton, whole fish and selected marine animals samples bio-accumulate antifoulants and pesticides. The accumulation gradient in fish samples was viscera > liver > gills > fillet. Measured concentrations of both the antifoulant booster biocide Irgarol 1051 and the insecticide Fenitrothion in both whole fish and marine animals sampled exceeded the Japanese Maximum Residual Limits (MRLs) as did 21% of foods sampled for Diuron under dry weight conditions.

Chapter 4 presents research done on the biodegradation and photodegradation of Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion in river water and seawater samples. The section also gives data on further research on the pesticides in river water (Kurose River) and marine samples (water, sediment, plankton and fishes) from Seto Inland Sea, Japan from 2012 to 2014. Data generated in this study and further information from literature were used to model the distribution pattern of the pesticides in Seto Inland Sea. The rate of biodegradation was slower than that of photodegradation. For example in river water, the photodegradation half-lives in days were 2.9, 3.5 and 1.9 for Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion, respectively. On the other hand in the same river water the biodegradation half-lives in days were 1424.8, 1703.1 and 1174.8 for Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion, respectively. The pesticides also degraded faster in river water than seawater. The seawater photodegradation half-lives in days were 43.6, 57.3 and 37.9 for Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion, respectively. On the other hand the seawater biodegradation half-lives in days were 2000.4, 2394.3 and 1650.2 for Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion, respectively. The main input for Diuron and Irgarol 1051 to Seto Inland Sea is ship bottom paint while Fenitrothion is mainly from rivers. The pesticides are mainly lost to sediments but the open ocean was found to be an equally important sink.

Chapter 5 gives a general discussion and summary of the results in this study. Agriculture and urban activities are contributing to the contamination of Kurose River which is also the case with most rivers worldwide that pass through high population density areas. The pesticides end up in Seto Inland Sea and are distributed among water, sediments, plankton and marine organisms. The highest concentrations of these pesticides were in marine organisms which was an indication of bioconcentration in agreement with information found in literature. The amounts remaining in water are biodegraded, photodegraded or lost to the open ocean. The major sinks for the pesticides were found to be sediments and the open ocean.

Key words: Diuron, Irgarol 1051, Fenitrothion, Kurose River, Seto Inland Sea, Modelling

Monitoring and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the air

Waqar Azeem JADOON

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

大気中の多環芳香族炭化水素のモニタリングおよびリスクアセスメント

ワカール アジーム ジャドゥーン
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528東広島市

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are recognized as ubiquitously distributed class of potent toxic substances present in the human environment at low concentrations. PAHs are long-lived organic compounds and originate almost entirely from anthropogenic activities such as traffic and industrial fossil fuel burning, biomass combustion and agricultural activities. Owing to their ubiquitous distribution and potential carcinogenicity, PAHs have been widely investigated worldwide. Hazards associated with these compounds are owing to their hydrophobicity, persistence and bioaccumulation properties of several individual PAHs. Hence the primary goal of this thesis is to identify and determine particulate PAHs in the aerosol of Kamihaya, Hiki, and Higashi Hiroshima, Japan. This study was conducted between August 2012 and July 2014. Chapter 1 provides a general overview on PAHs pollution of atmospheric aerosols, the sources of PAHs in air and briefly describes the significance of this study. It also provides the insight of PAHs related human and vegetation health effects.

Chapter 2 deals with the survey conducted to analyze particle-associated atmospheric PAHs at a rural site (Kamihaya) in Tanabe, Wakayama Prefecture, Japan from 2012–2013. Analysis of particulate matter revealed that total PAHs ($\Sigma 17\text{PAH}$) ranged from 0.036 to 10.16 ng m⁻³ with an average concentration of 3.20 ng m⁻³. The highest PAHs concentration of 10.16 ng m⁻³ was observed on September 19, 2012. Significant seasonal variations in PAHs concentrations were observed, with higher values during winter/spring and lower values in summer/autumn. This investigation reported high concentration of heavy molecular PAHs compared with low molecular PAHs. Trajectories revealed that PAHs in Kamihaya are of domestic origin, mainly from nearby Gobo power generation plant. Molecular diagnostic ratios and principal component analysis showed that atmospheric PAHs primarily arose from industrial and traffic emissions, while wood combustion appeared to be a minor source. Overall, the results of chapter 2 suggest that atmospheric PAHs in Kamihaya are a potential threat to the underlying vegetation and may cause damage to plants if combined with other air pollutants.

In 2013 – 2014 survey the mean concentrations of $\Sigma 17\text{PAH}$ in the aerosols were 2.43 > 1.63 > 1.18 ng m⁻³ at Higashi Hiroshima, Kamihaya and Hiki, respectively (Chapter 3). The mean $\Sigma 17\text{PAH}$ at all three sites varied seasonally with the highest concentrations in winter, whereas summer was characterized with lowest PAHs. T-test found significant seasonal variations of mean $\Sigma 17\text{PAH}$ at Higashi Hiroshima ($p < 0.01$) and Hiki ($p < 0.05$), while at Kamihaya variations were non-significant. High molecular weight (5-6-ring) PAHs are dominant at Kamihaya and Higashi Hiroshima, while 4-ring PAHs in Hiki. The temporal PAHs have been almost constant over the last 15 years in the aerosols of Higashi Hiroshima. However, BaP concentration reported in this study is lower than the previous investigations.

The influence of meteorological parameters on particulate PAH was observed in the aerosols of Kamihaya,

Hiki, and Higashi Hiroshima. It was found that ambient air temperature is the most significant meteorological parameter controlling the atmospheric PAHs. Statistically significant high correlation was found between $\Sigma 17\text{PAH}$ concentrations and ambient air temperature at Higashi Hiroshima. The correlation between mean $\Sigma 17\text{PAH}$ and air temperature was statistically significant and moderate in the aerosols of Kamihaya and Hiki. At Hiki southerly winds were found one of the important meteorological parameters acting as PAHs regulating force. There was no significant correlation of solar irradiance, rainfall and humidity with $\Sigma 17\text{PAH}$ at all three sampling sites. Trajectories analyses suggested that the PAHs from domestic sources (Gobo power generation) play an important role specifically in Kamihaya, and Hiki in general. Whereas, in Higashi Hiroshima PAHs from other East Asian countries play important role to increase the local pollution level. Based on PCA results it was concluded that PAHs emission is mainly from vehicular and industrial emissions. The other emission sources are domestic heating/cooking and biomass combustion. The lifetime lungs cancer risk (ILCR) was estimated at Hiki and Higashi Hiroshima, which was found with in the health-based guidelines of European Union by WHO (10^{-5}), however one order higher than US EPA guidelines (10^{-6}). The PAH at both residential sites pose a moderate lung cancer risk to the residents of these areas.

Chapter 4 deals with general discussion, concludes the whole study, and suggests the future work. This study deduces that traffic and industry are the significant PAHs emission sources. In Kamihaya and Hiki PAHs are mainly from domestic sources, while in Higashi Hiroshima long-range transport of atmospheric PAHs is important. This study investigated the importance of meteorological parameters in regulation of atmospheric PAHs in underlying study areas. Ambient air temperature and wind direction were the important meteorological factors in controlling the atmospheric PAHs in study areas. Our study will provide the basic information on status of atmospheric PAHs for future detailed studies on PAHs in relation with vegetation and human health. This thesis recommends developing the atmospheric PAHs inventories for Japan to fully understand their spatial distribution. This chapter also discusses the atmospheric PAH pollution preventions strategies. It also suggests legislations for PAH emissions from different sources and provision of guidelines of PAHs in different environmental matrices. The investigation of gaseous PAHs is needed to completely understand the status of atmospheric PAHs.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons, remote and suburban areas, atmosphere, risk assessment

The study on microbial community during alcoholic beverage production and the development of new method for detecting low-abundant microorganisms

Masayuki TAKAHASHI

National Research Institute of Brewing (NRIB),
Higashi-Hiroshima 739-0046, Japan

酒類製造工程における微生物叢変遷の解析と微生物叢解析のための
新規技術の開発に関する研究

高橋 正之

独立行政法人 酒類総合研究所, 739-0046 東広島市

酒類は農産物及び微生物を利用した製品であるため、その品質は原料、温度管理等の各種操作、醸造用微生物の種類やその他の微生物の生育等により影響を受けるという特徴があり、同一品質の製品を製造するには熟練した技術が必要である。中でも、汚染微生物の生育は、不快な香気成分の生成や苦味の増加、味の平坦化など品質に与える影響が極めて大きいために、これまでも精力的に研究がなされており、多種にわたる微生物が酒類の品質に対して様々な影響を与えることが報告されている。

これまでの酒類中の微生物に関する研究は、そのほとんどが培養法により行われてきた。培養法では、使用した培地や培養条件で検出される微生物にバイアスが生じるため、本来酒類中で生育しているにも関わらず、培養法では検出されない未知の微生物が存在している可能性がある。一例として、偏性嫌気性細菌である *Pectinatus* 属細菌と *Megasphaera cerevisiae* はいずれも20世紀後半に、汚染されたビールから初めて単離された微生物であり、ビールの品質に悪影響を与えることが報告されている。これらの微生物が問題となってきたのは、瓶詰等の技術が進歩した結果、瓶内中の溶存酸素が減少したことで、偏性嫌気性細菌が生育可能となったためである。このように、新規製法の導入や特殊な製品環境中では生育可能となる未知の潜在的な汚染微生物が他にも存在している可能性がある。そこで、本論文では、国内に新規参入事業者の数多く存在するワイン及びビールを対象として、培養法及び分子生物学的手法により製造工程中の微生物叢を改めて解析し、詳細な知見を得ることを目的として研究を実施した。

まず最初に、ワインの醸造工程及び市販ワインについて微生物叢解析を実施した。近年、消費者の食の安全性に対する意識の高まりを受けて、抗酸化作用や微生物の生育抑制作用を持つ亜硫酸を添加していないワインが製造されている。そこで、ワイン醸造工程及び市販ワイン中の微生物叢を培養法と PCR-DGGE 法を用いて解析し、野生酵母や乳酸菌に限らず幅広い微生物について亜硫酸添加の影響を評価した。その結果、醸造工程中及び市販ワインで様々な微生物が検出され、*Sphingomonas* sp., *Pseudozyma* sp., *Ochromonas* sp., *Methylophilus* sp. は、ワイン中から初めて検出された。醸造工程中における微生物叢解析では、亜硫酸添加で生育抑制を受ける微生物として、PCR-DGGE 法で *Tatumella terreus* や *Leuconostoc mesenteroides* が検出され、*T. terreus* は培養法でも同様の傾向で検出された。市販ワイン中の微生物叢解析では、亜硫酸添加の有無ではっきりとした違いが見られず、最終製品の微生物叢はろ過工程や製造設備、貯蔵環境などのようなその他の要因に影響されることが示唆された。

続いて、ビールや発泡酒等の醸造工程における微生物叢の変遷を調べた。通常、ビール醸造はプラントで行われることが多く、初期に原料を煮沸した上で密閉されたタンク中で発酵するのに加えて、抗菌作用を有するホップ成分を含むため、ある程度微生物の管理ができていたと考えられていた。そのため、分子生物学的手法を用いた微生物叢解析は、ランビック等の微生物の混入が起りやすいタイプに限られ、一般的なビールについては少ない現状にあった。さらに、近年、一部の発泡酒のように麦芽の使用割合を低く抑えた醸造法も広く用いられており、これまでとは異なる微生物叢となっている可能性がある。そこで、次世代型シー

ケンサー及び定量 PCR を用いて、ビール及び発泡酒の醸造工程中の詳細な微生物叢を定量的に調べることにした。次世代型シーケンサーによる解析の結果、検出された微生物における属レベルの多様性は191属と、培養法により検出された18属と比較し、10倍を超える極めて多様な環境であることが明らかとなった。醸造工程中の各細菌数の推移を解析したところ、健全な発酵をしているビールにおいても *Bacillus* 属や *Paenibacillus* 属の細菌は発酵中に増殖している可能性を示し、これまでにビール中から検出例のない *Tissierella* 属、*Tepidmonas* 属、*Polaromonas* 属、*Chryseobacterium* 属及び *Sphingomonas* 属も新たに発酵過程で増殖する可能性が示された。

最後に、分子生物学的手法で、酒類中の真菌叢解析を行う際に必要となる技術の開発を行った。分子生物学的手法を用いて酒類中の真菌叢の解析を行う場合に大きな障害となったのは、発酵開始時に添加する醸造用酵母であった。網羅的に調査することが目的のため、真菌全般を対象として検出可能な PCR 用プライマーセットを用いる必要があり、当然ながら醸造用酵母も検出対象に含まれることになる。そのため、検出される微生物のほとんどが醸造用酵母となり、醸造工程中における醸造用酵母以外の詳細な真菌叢を網羅的に把握することは、極めて困難であった。そこで、SNPs を有する野生型と変異型の核酸混合物から変異型のみを優先的に増幅する PCR 手法である CO-amplification at Lower Denaturation temperature PCR (COLD-PCR) から着想を得て、特定の配列の核酸の増幅を抑制し、その他の配列の核酸を優先的に増幅する改変 COLD-PCR 法を開発した。改変 COLD-PCR 法は、モデル実験系において、*Saccharomyces cerevisiae* の0.01%しか存在しない *Schizosaccharomyces pombe* を検出できることを示した。さらに、白ワイン発酵もろみの真菌叢を改変 COLD-PCR-DGGE 法により解析した結果、通常の PCR-DGGE 法では検出できなかった *Candida* sp. や *Cladosporium* sp. が検出できた。また、赤ワイン発酵もろみの真菌叢を改変 COLD-PCR 法と次世代シーケンサーを組み合わせる解析したところ、醸造用酵母である *Saccharomyces* 属の検出比率が劇的に減少し、その他の微生物の検出比率が増加したほか、通常の PCR を用いた結果と比較し、検出された属数も増加していた。改変 COLD-PCR 法は、発酵飲食品等の特定の微生物が多く存在している中での低存在比率の微生物の動態を観察するのに適しており、今後そのようなサンプルに対して活用していくことで、これまでに報告されていない微生物の検出やその挙動を詳細に解析できるようになるものと考えられる。

酒類製造において製造工程中に存在する微生物を知ることは、品質の安定化や品質の向上、安全性の確保を達成する上で重要な基盤となる。本研究により得られた知見及び開発された技術が、製品に潜在的に存在する細菌が、何らかのきっかけで品質の劣化等を引き起こした際の迅速な対応の一助になるとともに、予防的対応をとるために貢献することを期待したい。

キーワード：DGGE 法、次世代型シーケンサー、ビール、ワイン、酒類中の微生物多様性、COLD-PCR