

氏名(国籍)	ソルンサニット カンニャ (タイ)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2810号		
学位授与年月日	平成14年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Application of green tea polyphenols for the control of pathogenic <i>Vibrio</i> in Kuruma shrimp (緑茶ポリフェノールによるクルマエビ病原性ビブリオの抑制)		
主査	筑波大学教授	工学博士	松村正利
副査	筑波大学教授	農学博士	中原忠篤
副査	筑波大学教授	農学博士	松尾勝
副査	筑波大学助教授	農学博士	杉浦則夫

論文の内容の要旨

本研究は、緑茶の抗菌作用を利用したエビ養殖における病原性細菌の制御を行うことを目的としている。緑茶の成分が抗菌作用を持つことはよく知られており成分も解明されつつあるが、病原菌が問題となっているエビ養殖漁業に応用された例は未だない。緑茶粉と、有効成分であるという報告のある緑茶ポリフェノールを用い、エビの代表的な病原性細菌であるビブリオを標的細菌として用いた生体外および、エビを用いたエビ生体内での抗菌効果の検討を試みた。はじめに、タイ産、日本産の *Vibrio* 株の毒性をエビへのチャレンジテストで調べたところ、タイ産のビブリオが日本産の種よりもかなり強い毒性を示すことが明らかとなった。そこで、以後の実験にはタイ産の種を用いることにした。ビブリオ完全培地 325 培地、および滅菌海水培地を用いた、生体外実験の結果から、緑茶粉・緑茶ポリフェノール共にタイ産のビブリオに対して抗菌活性を持つことが明らかになった。緑茶粉は完全培地中では 1,000ppm 以上、滅菌海水培地中では 2,000ppm 以上で、緑茶ポリフェノールは完全培地中では 400ppm 以上、滅菌海水培地中では 300ppm 以上で完全にビブリオの増殖を阻害することがわかった。さらに、緑茶ポリフェノールを餌に混ぜ、その餌を用いてエビを飼育しビブリオ菌をチャレンジする実験を試みた。緑茶ポリフェノールを添加したエビ中腸腺内の細菌群の分析を試みたところ、グラム陽性細菌がグラム陰性菌より多く生存していることから、エビ抗菌作用に対してはグラム陽性菌の方が高い耐性を持っていることが明らかとなった。エビの増殖速度、脱皮頻度、生存率ともに、緑茶ポリフェノール添加餌で飼育したエビの方が高い値を示していた。通常、エビ等の甲殻類は脱皮直後かなりのストレスにさらされるため脱皮直後の致死率が非常に高くなるが、緑茶ポリフェノール添加餌で飼育した場合、脱皮をかなり頻繁に行っても致死率は下がらず、かえって脱皮頻度の少ない通常餌で飼育したエビよりも高い生存率を示していた。また、中腸腺内の全細菌量およびビブリオの量を調べたところ、緑茶ポリフェノール添加餌で飼育したエビの方が低い値を示していた。このことから、緑茶ポリフェノールがエビ体内に吸収されるとエビ体内の病原性細菌の増殖を阻害し、頻繁な脱皮にもかかわらず高い生存率を示していたと考えられる。エビ体内の細菌群の解析をより詳細に行うために、PCR-DGGE 法を用いたエビ中腸腺内の菌相の観察、さらに緑茶ポリフェノールによる菌相変化の観察を試みた。まずは、PCR-DGGE 法を魚類・甲殻類腸内細菌の解析に用いた報告が未だないため、PCR-DGGE の実験条件の最適化を行ったところ、8% ポリアクリルアミドゲルに 25 - 40% の濃度勾配を作製し、60℃ で、130 ボルト、3.5 時間の泳道を行うことでエビ中腸腺内の細菌群を的確に観察できることがわかった。この手法を用いて、通常餌、緑茶ポリフェノール添加

餌で飼育したエビの腸内細菌を比較したところ、かなり異なるバンドパターンが得られた。今後変化を示したバンドについての詳細な検討が必要であるが、細菌数・生存率・脱皮頻度などのデータが腸内細菌層の変化といかなる関係にあるのか、さらに緑茶ポリフェノールが腸内細菌層にもたらす影響についての検討を行うための手法・実験条件は確立された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、抗菌作用がある緑茶をエビ養殖に応用し、おもに病原性細菌の制御に用いることを目的としている。

以上のように、本研究は緑茶がエビ病原性細菌に対して抗菌活性を有することを明らかにし、さらにエビを用いた実験においてエビの生存率向上・体内病原性細菌の減少・エビの増殖を活性化することも見出した。また、PCR-DGGE法を始めてエビ腸内細菌相の解析に用いるために、実験条件の設定を行い、緑茶ポリフェノールにより菌相に変化が観察されたことから、この方法がエビ腸内細菌相観察に有効な方法であることを示した。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。