

論文審査の結果の要旨

報告番号	博(生)甲第296号	氏名	鄒亜男
学位審査委員		主査 小田達也 副査 原 研治 副査 長富 潔	
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>鄒亜男氏は、2009年7月に中国大連水産学院(現:大連海洋大学)大学院水産養殖専攻修士過程修了し、修士の学位を取得しているが、2008年4月から2009年3月の一年間は研究生として、長崎大学水産学部に入學した。その後、2010年4月に長崎大学大学院生産科学研究科(博士後期課程)海洋生産科学専攻へ入學し、現在に至っている。同氏は、生産科学研究科に入學以降、赤潮プランクトン研究、特に毒性が強い渦鞭毛藻カレニア・ミキモトイ <i>Karenia mikimotoi</i> の生物毒性因子に関する研究に従事し、その成果を2012年12月に主論文「Evaluation of Micro-bioassay for the Study on the Toxic Mechanism of Dinoflagellate <i>Karenia mikimotoi</i>」として完成させ、参考論文として、学位論文の印刷公表論文2編(うち審査付き論文2編)、学位の基礎となる論文1編(うち審査付き論文1編)、その他の論文4編(うち審査付き論文4編)を付して、博士(水産学)の学位の申請をした。長崎大学大学院生産科学研究科教授会は、2012年12月19日の定例教授会において論文内容等を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、上記の審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を実施するとともに、最終試験を行い、論文審査および最終試験の結果を2013年2月20日の生産科学研究科教授会に報告した。</p> <p>以下に論文審査内容について記載する。</p> <p>渦鞭毛藻カレニア・ミキモトイ <i>Karenia mikimotoi</i> (以下カレニア) は、魚介類の大量斃死を引き起こすため、日本の赤潮重点監視対象種に指定されている。本種赤潮による漁業被害は、日本の他、世界各地で報告されており、魚類だけでなく、貝類にも強い毒性を示すことが報告されている。本種の魚類に対する毒性因子として、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS)、溶血毒素、高度不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) およびギムノシン (Gymnocin-A) 等が報告されてきたが、特定には至っておらず、明確な毒性機構は不明である。一方、赤潮生物の毒性機構解明には、毒性被害を受ける海洋生物等を用いたバイオアッセイ法がしばしば実施されているが、実験に用いる生物の培養維持には特別な施設が必要である他、それら生物を用いたバイオアッセイではしばしば再現性が乏しく、操作も煩雑であり、赤潮研究の推進を困難にしている一因となっている。また、赤</p>			

潮生物に存在すると推定される毒性因子を解明するためには、赤潮生物から毒性因子を分離・精製することが一般的に考えられる方法であるが、従来の魚介類等を用いたアッセイ法においては、大量のサンプル調製が必要になり、実際に分離・精製過程で毒性因子を検出し、その分子レベルで実態解明を遂行していくことは極めて難しいと考えられる。

そこで本研究では一般的実験室内でも実施可能な簡便で再現性の良いバイオアッセイ法を開発し、その方法論の有用性について実証することを第一の目的とした。さらに、本方法により、カレニアの毒性発現機構の解明、特にその毒性因子を突き止めることを第二の目的とする研究である。

これまでの研究成果に基づき、博多湾(FUK)と周防灘(SUO-1)から分離された2株のカレニアについて、動物プランクトンで広く種苗生産で稚魚の餌として用いられているワムシを用いたバイオアッセイを実施した。その結果、本2種のワムシに対する毒性が株間で大きく異なることを見出した。SUO-1株はワムシに対して極めて強い致死作用を示したが、FUK株は比較的ワムシ毒性が弱い事を見出した。さらに、各種動物赤血球を用いて溶血活性試験を実施した結果、ワムシに対する毒性が強いSUO-1株はいずれの赤血球に対しても強い溶血活性を示したが、FUK株は低活性であった。従って、カレニアのワムシ毒性には溶血性毒素が関与していると推定された。一方、カレニア細胞を遠心分離で除去した培養上清、或は超音波処理により破壊した細胞では、ワムシ毒性及び溶血活性ともに著しく低下した。これらの結果から、カレニアの毒性発現には生きた細胞が重要であることが強く示唆された。次に、カレニアに存在する毒性因子に関して、より詳細に検討する事を目的として、アフリカミドリザルの腎臓由来株化細胞である Vero 細胞、ブリの鱗上皮由来 MJF 細胞及びニジマスの鰓由来 RTgill-W 1 細胞を用いたバイオアッセイについて検討した。特に、細胞内マーカー酵素である LDH (lactate dehydrogenase)の細胞外への漏れを調べる事で、細胞のダメージの度合いを推定する方法を検討した。その結果、2株のカレニアの動物細胞に対する毒性も株間で異なることがわかった。SUO-1株はFUK株に比べ、いずれの細胞に対しても著しく強いLDH放出を誘導した。また、両株の細胞破壊液や培養上清は無活性であった。従って、カレニアの動物細胞に対する毒性発現には、生きた細胞の存在が重要であると推定された。さらに、アワビやエビに対してもSUO-1株はFUK株に比べより強い毒性を示した。LDH放出法により6種の赤潮生物の毒性を同様に調べた。無毒3種 (*H. triquetra*, *C. neogracile*, and *N. oculata*) はいずれの細胞に対しても、極めて低活性であったのに対して、有害種3種 (*K. mikimotoi*, *H. circularisquama*, and *C. antiqua*) は、いずれも強くLDH放出を誘導した。以上より、LDH放出法は赤潮プランクトンの毒性の推定に有用であると考えられた。以上のように本論文は、赤潮プランクトンの毒性機構解明に関して、新たな方法論を確立し、赤潮研究に多大の寄与をするものと評価できる。学位審査委員会は、水産化学の分野において極めて有益な成果を得るとともに、赤潮毒性学の進歩発展に貢献するところが大きく、博士(水産学)の学位に値するものとして合格と判定した。