

氏名	ちやういーぱっく ていだぼーん CHAWEEPCK TIDAPORN
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博乙第201号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Regulation of infectious diseases of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) by galangal ( <i>Alpinia galanga</i> Linn.) extract (ガランガル( <i>Alpinia galanga</i> Linn.)抽出物によるバナメイエビ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )の感染症の制御)
審査委員	(主査)教授 亀井加恵子 教授 堀内淳一 教授 鈴木秀之

### 論文内容の要旨

エビの養殖産業において感染症は深刻な問題である。申請論文は、ショウガ科植物ガランガルの根茎に含まれる抗菌活性に着目し、ガランガル根茎抽出物の投与によるエビ感染症の抑制についての研究がまとめられている。本論文は、序論、第1～4章で研究成果、第5章(結論)で構成されている。

序論では、本論文の背景と目的が述べられている。世界およびタイにおけるエビ養殖の現状、エビの免疫システムや感染防御システム、エビの各種感染症が解説されている。さらに、現在使用されている抗菌剤の問題点である薬剤の残存や耐性菌の出現を説明し、ハーブ類など天然物の抗菌剤の代替としての可能性が論じられている。続いて、ショウガ科植物ガランガルについて、報告されている生物学的活性や薬理的活性、含有物質を説明するとともに、ガランガルの抗菌活性に着目してエビ感染症抑制へのガランガルの有用性を明らかにした本論文の目的が述べられている。

第1章では、3種のショウガ科植物の根茎のエタノール抽出物について、海洋性エビから単離した病原性ビブリオ菌7種に対する抗菌活性を評価し、ガランガル抽出物は検討したビブリオ菌全てに対して抗菌活性を持ち、他の2種のショウガ科植物よりも強い活性を示すことが明らかにされている。ガランガル根茎に含まれる抗菌物質の単離、同定を試みた。ガランガル根茎をメタノールで抽出し、逆相クロマトグラフィーによって3種類の抗菌物質を精製し、NMRによる解析の結果、それぞれ *trans-p*-hydroxy cinnamaldehyde, *trans-p*-acetoxy sinamic alcohol, *trans-p*-coumaryl diacetate と同定されている。*trans-p*-coumaryl diacetate についてビブリオ菌7種に対する最小発育阻止濃度および最小殺菌濃度を解析した結果、*trans-p*-coumaryl diacetate の抗菌活性は殺菌的であることが述べられている。

第2章では、エビの感染症 *white feces syndrome* および急性肝すい臓壊死病に対するガランガル抽出物の効果を検討し、ガランガル根茎のエタノール抽出物がバナメイエビ(*Litopenaeus vannamei*)より単離したビブリオ菌8種および真菌6種のいずれに対しても抗菌活性を示すことを明らかにしている。続いて、ガランガル抽出物のバナメイエビへの経口投与による感染症抑制効果の検討結果について述べられている。肝すい臓および腸内のビブリオ菌数および真菌類への

感染率を解析し、いずれもガラシ抽出物の経口投与によって減少することを明らかにしている。*Vibrio parahaemolyticus* への感染実験によって、ガラシ抽出物を経口投与したバナマイエビは有意に生存率が向上することを見出し、エビの感染症の抑制にガラシ抽出物の経口投与が有効であること結論している。

第3章では、まずガラシ根茎抽出物の投与によるエビの成長への影響の有無を解析し、種々の濃度でガラシ抽出物を混合した餌をバナマイエビに与えた場合、通常餌を投与した群と比較して、投与開始1ヶ月間の体重増加は低下したが、2ヶ月目では体重に有意差は認められないことを見出している。最初の体重減少は、ガラシの匂いのために摂食量が減少したことが原因であると考察されている。ガラシ抽出物投与による生存率への影響は見られないことを確認している。次に、種々の濃度のガラシ抽出物を1ヶ月間および2ヶ月間投与したバナマイエビに、*Vibrio harveyi* を腹腔内注射の3時間後に血リンパ液中の菌数を計数し、餌中のガラシ抽出物濃度に依存して菌数が減少していることを見出したことが述べられている。一方、ガラシ抽出物濃度に依存して *Vibrio harveyi* 注射後のエビの生存率が向上することを明らかにし、白斑病ウイルス感染に対しても同様の結果が示されている。これらの結果より、ガラシ抽出物の経口投与によって、バクテリアおよびウイルスいずれのエビ感染症も抑制されると結論づけている。

第4章では、ガラシ抽出物の経口投与による感染症抑制機構について検討した結果を述べている。異物質排除に関わるフェノロオキシダーゼ、溶菌酵素リゾチーム、抗菌ペプチドクラスチンなどバナマイエビの感染防御に関わる6因子について、発現量を定量的PCR法によって解析が行われた。ガラシ抽出物および *trans-p*-coumaroyl diacetate を注射したエビでは、注射後24時間から48時間においていずれの感染防御関連因子の発現量も増加し、また、ガラシ抽出物の経口投与によっても、各因子の発現量が増加することを明らかにした。ガラシ抽出物投与群はコントロール餌投与群と比べ、*Vibrio harveyi* 注射後の各因子の発現量の増加が有意に大きいことも明らかにした。これらより、ガラシ抽出物による感染抑制機構は、感染防御関連因子の発現誘導によるものであることが述べられている。

第5章では本論文の結論をまとめており、ガラシ根茎抽出物の経口投与がエビの感染症抑制に有効であるということが述べられている。ガラシは香辛料としてヒトに食されていることから、エビ養殖産業において残留薬剤の心配が無い抗菌剤代替品として期待できることを述べるとともに、エビにガラシ抽出物を経口投与する場合の最適条件として、飼料中の濃度0.25~0.5% (w/w)、投与期間7~10日間で提唱されている。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ショウガ科植物ガラシの根茎に含まれる抗菌活性に着目し、ガラシ抽出物の経口投与によるエビ感染症の制御方法を開発した、意欲的かつ独創的なものである。申請者はまず、ガラシ抽出物が海洋性エビから単離したビブリオ菌に対して抗菌活性を示すことを明らかにした。ガラシ根茎に含まれる抗菌物質3種類の単離と同定に成功し、そのうちの1種についてビブリオ菌に対する抗菌活性を解析し、殺菌的であることを明らかにした。次に、バナマイエビにガラシ抽出物を投与することによって、肝すい臓および腸内のビブリオ菌数および真菌類への感染率が減少することを明らかにした。*Vibrio parahaemolyticus* への感染実験によ

り、ガランガル抽出物を経口投与したバナメイエビは有意に生存率が向上することを明らかにした。ガランガル抽出物経口投与によるバナメイエビの成長への影響も検討し、ガランガル投与開始初期の体重増加は低下するが、2ヶ月目では体重に有意差は認められないことを見出した。最初の体重減少は、ガランガル特有の匂いのために摂食量が減少したことが原因であると考察している。次に、一定期間ガランガル抽出物を経口投与したバナメイエビに *Vibrio harveyi* を腹腔内注射した結果、飼料中のガランガル抽出物濃度に依存して血リンパ液中の菌数が減少することを明らかにした。また、飼料中のガランガル抽出物濃度に依存して *Vibrio harveyi* 注射後のエビの生存率が向上することも見出した。白斑病ウイルス感染に対しても同様の結果を得ている。これらより、ガランガル抽出物の経口投与によって、バクテリアおよびウイルスいずれのエビ感染症も抑制されると結論づけた。

注射および経口いずれの方法でガランガル抽出物を投与したエビでも、解析した全ての感染防御関連因子の発現量が増加することを明らかにした。ガランガル抽出物投与群は *Vibrio harveyi* 注射後の感染防御関連因子の発現量の増加が有意に大きいことも明らかにした。これより、ガランガル抽出物による感染抑制機構は、感染防御関連因子の発現誘導によるものであることを考察した。最後に、ガランガル根茎抽出物の経口投与がエビの感染症抑制に有効であることを結論として述べるとともに、エビにガランガル抽出物を経口投与する場合の最適条件を提唱している。

本研究は抗生物質や抗菌剤の代替としてのガランガルの可能性を示した、独創的で優れた研究である。エビ養殖産業では感染症が国際的に深刻な問題となっており、ガランガルを利用した新たなエビ感染症の抑制方法を提唱した本研究は社会的意義が極めて高いものである。また、ガランガルの経口投与によるエビの感染防御関連因子の発現誘導を明らかにしたことは、ガランガル投与による感染症抑制の裏付けとなる基礎的知見として高く評価できる。

これらの研究の成果は、査読性のある下記の国際科学雑誌 3 編に掲載されている。なお、いずれも申請者が筆頭著者である。

1. Tidaporn Chaweepack, Boonyee Muenthaisong, Surachart Chaweepack & Kaeko Kamei. The Potential of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) Extract against the Pathogens that Cause White Feces Syndrome and Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *International Journal of Biology* (2015) 7(3): 8-17. doi: 10.5539/ijb.v7n3p8.
2. Tidaporn Chaweepack, Chutima Khomvilai, Surachart Chaweepack & Kaeko Kamei. Effect of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) Extract on the Growth Rate and Resistance to *Vibrio harveyi* and White Spot Diseases in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Agricultural Science*; (2015) 7(9): 117-128. doi: 10.5539/jas.v7n9p117.
3. Tidaporn Chaweepack, Surachart Chaweepack, Boonyee Muenthaisong, Lila Ruangpan, Kei Nagata, Kaeko Kamei. Effect of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) extract on the expression of immune-related genes and *Vibrio harveyi* resistance in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture International* (2015) 23(1):385–399. doi: 10.1007/s10499-014-9822-2.