

平成 22 年度

日本水産学会九州支部  
総会・大会

講演要旨集

日時：平成 22 年 1 月 22 日（土）

総会 13:00 ~ 13:30

大会 13:30 ~ 17:00

高校生による研究発表 10:40~12:10

場所：鹿児島大学水産学部 5 号館

23 号教室（一般講演）

21 号教室（高校生による研究発表）

日本水産学会九州支部

## 一般講演

日時：平成23年1月22日（土）13:00～17:00

場所：鹿児島大学水産学部4号館23号教室

- 13:00 総 会
- 13:30 1 パルス変調を用いたクロロフィル蛍光法及び酸素電極法による  
ホンダワラ属藻類4種（ヒバマタ目）の光合成特性  
°土屋勇太郎（鹿大水）・Gregory N. Nishihara（長大海セ）・寺田竜太（鹿大水）
- 13:45 2 パルス変調クロロフィル蛍光法と酸素電極法を用いた鹿児島・  
沖縄県産ヒジキの光合成温度耐性  
°天野裕平・土屋勇太郎（鹿大水）・Gregory N. Nishihara（長大海セ）・  
寺田竜太（鹿大水）
- 14:00 3 分布南限におけるアマモの温度耐性と生育環境の季節変化  
°河野敬史（鹿大水）・Gregory N. Nishihara（長大環東シナ海セ）・寺田竜太（鹿大水）
- 14:15 4 葉緑体DNA多型に基づく赤潮原因藻*Heterosigma akashiwo*の検出・識別技術の開発  
吉川毅・°上川畑智美・赤瀬信一郎・前田広人（鹿大水）
- 14:30 休 憩
- 14:40 5 八代海の環境保全に関する研究13  
八代海における植物プランクトン組成と*Chattonella antiqua*の増殖時の環境条件  
°城本祐助・原口浩一・富田潤也（熊本県大環境）・櫻田清成（熊本県水研セ）・  
大和田紘一（熊本県大環境）
- 14:55 6 八代海の環境保全に関する研究14  
八代海への海底堆積物からの栄養塩溶出量の見積もりと水柱への寄与  
°原口浩一（熊本県大環境共生）・櫻田清成（熊本県水研セ）・城本祐助・  
大和田紘一（熊本県大環境共生）
- 15:10 7 諫早湾マガキ養殖場におけるタテジマフジツボ及びドロフジツボの  
出現状況について  
°山田秀樹（長大生産）・サトイト シリル グレン（長大水）・大橋智志（長崎水試）・  
北村等（長大水）
- 15:25 8 宮崎県内3ヶ所におけるヨシノボリ属魚類の回遊状況について  
°甲斐史文・神田猛（宮大農）・望岡典隆（九大院農）・森下孝一郎（福岡歯科大）
- 15:40 9 北赤道海流近傍の中規模渦がシラスウナギの来遊に与える影響  
°田島 圭・和田伸久（九大院生資環）・安倍大介（水研セ中央水研）・  
西田二郎（宮崎県内水面振興セ）・望岡典隆（九大院農）
- 休 憩
- 16:05 10 コイ補体C3aに由来するペプチドの抗菌作用  
°無津呂淳一（福女短・食栄）・中尾実樹（九大院農）
- 16:20 11 クルマエビのWSDVは、免疫によって予防できるか  
°是永大樹（宮崎大農）・河野智哉（宮崎大 IR 推進機構）・吉村晃広・久世悠・  
高山博章・酒井正博（宮崎大農）
- 16:35 12 *Edwardsiella tarda* ホルマリン不活化菌体が宿主に十分な感染防御能を  
付与しない要因  
°鳥居加奈・山崎雅俊・荒木亨介（鹿大水）・中易千早（水研セ養殖研）・  
山本淳（鹿大水）
- 16:50 13 *Lactococcus garvieae*の疫学的研究およびリンコマイシン（LCM）耐性  
に関する研究  
°松井翔・吉田照豊（宮崎大・農）

## 高校生による研究発表(ポスター発表)

日時：平成 23 年 1 月 22 日 (土) 10:40~12:10

場所：鹿児島大学水産学部 4 号館 21 号教室

- ポスター1      スーパーサイエンスハイスクールにおける課題研究の取組  
                         ~鹿児島湾の底性魚介類について~  
鹿児島県立錦江湾高等学校 理数科 2 年 福島聡馬・教諭 讃岐斉
- ポスター2      スーパーサイエンスハイスクールにおける課題研究の取組  
                         ~鰻池および愛宕川における水生生物について~  
鹿児島県立錦江湾高等学校 理数科 2 年 福島聡馬・教諭 讃岐斉
- ポスター3      赤潮プランクトンの増殖と除去方法  
鹿児島県立国分高等学校 立和名正二 (指導教諭)
- ポスター4      網掛川の水質検査  
鹿児島県立加治木工業高等学校 末増宗久 (指導教諭)

## 1. パルス変調を用いたクロロフィル蛍光法及び酸素電極法によるホンダワラ属藻類4種（ヒバマタ目）の光合成特性

°土屋勇太郎（鹿大水）・Gregory N. Nishihara（長大海セ）・寺田竜太（鹿大水）

【目的】温帯，亜熱帯性ホンダワラ属藻類が混生する鹿児島湾では，亜熱帯性種が増加傾向にあるとされ，藻場構成種の生理的特性等の基礎的知見を集積することが求められている。藻類の光合成特性は，主に酸素電極法やプロダクトメーター法で測定されるが，近年，パルス変調を用いたクロロフィル蛍光測定法が注目されている。本研究では，鹿児島湾に生育するホンダワラ属藻類4種（マメタワラ，ヤツマタモク，コブクロモク，キレバモク）の光合成特性について，クロロフィル蛍光測定法と酸素電極法を用いて明らかにするとともに，両法の特性を比較することを目的とした。

【方法】材料は2010年4-6月に鹿児島県桜島袴腰で採取した。クロロフィル蛍光測定法は，Imaging-PAM（Heinz Walz GmbH）を用いて光化学系IIにおける電子伝達速度（rETR）を10-36°Cの温度条件で測定した。酸素電極法は，酸素電極（YSI 5905）を用いて純光合成速度と呼吸速度を12-32°Cの温度条件で測定した。また，桜島近傍の水温を2009年6月から1年間毎日測定した。

【結果】酸素電極を用いた純光合成速度は，全ての種において20°Cで最大に達した。一元配置の分散分析と多重比較の結果，マメタワラとヤツマタモク（温帯性種）は16-28°C，コブクロモクとキレバモク（亜熱帯性種）は16-24°Cで20°Cと有意な差が認められなかった。一方，光化学系IIにおけるrETRはそれぞれ28-30°Cで最大に達し，32°C以上で顕著に低下した。rETRは純光合成速度より高温条件で最大に達したが，呼吸速度が高温になるほど増加したことから，それぞれの生育に至適な水温環境は30°Cより低温に傾くことが示唆された。また，年間水温は約15-29°Cで推移しており，rETRも30°Cを超えると顕著に低下したことから，当該海域はそれぞれの生育に至適な環境と示唆された。

## 2. パルス変調クロロフィル蛍光法と酸素電極法を用いた鹿児島・沖縄県産ヒジキの光合成温度耐性

°天野裕平・土屋勇太郎（鹿大水）・Gregory N. Nishihara（長大海セ）・寺田竜太（鹿大水）

【目的】九州南部では食用海藻のヒジキ（ヒバマタ目）の生育地が減少傾向にあり，本種群落を維持・再生するために，生理生態学的な知見が求められている。本研究では，分布南限周辺である鹿児島県と沖縄県におけるヒジキの温度耐性をパルス変調クロロフィル蛍光法と酸素電極法で明らかにすることを目的とした。

【方法】材料は，鹿児島県長島と桜島，沖縄県宇堅の各調査地で採集した。光合成活性はImaging-PAM（Heinz Walz GmbH）を用いて10-35°Cの温度条件で光化学系IIの電子伝達速度（rETR）を測定した。さらに，酸素電極（YSI Model 58）を用いて12-32°Cの温度条件で酸素発生速度と呼吸速度を測定した。また，鹿児島県の各調査地にデータロガー（Onset HOB0）を設置し，水温を1年間測定した。

【結果】酸素発生速度は24°Cで最大を示した。一元配置分散分析と多重比較による検定では，鹿児島県では16-28°C，沖縄県では20-24°Cで24°Cと有意差が見られなかった。これらの水温帯では24°Cと同程度の光合成活性を示していると解釈し，生育に至適な水温帯と考えた。調査地における水温は，長島で14.0-28.9°C，桜島で15.6-29.4°Cで推移し，概ね一致した。rETRは約30°Cで最大となり，それ以上の温度条件下では急激に下降したことから，30°C以上の水温では光化学系IIの活性に影響が生じると推察された。

### 3. 分布南限におけるアマモの温度耐性と生育環境の季節変化

○河野敬史 (鹿大水)・Gregory N. Nishihara(長大環東シナ海セ)・寺田竜太(鹿大水)

【目的】環境変動等で水温が長期的に変化する場合、日本産アマモの分布南限に位置する鹿児島湾の群落では、衰退や消失が強く懸念される。本研究では、南限群落の個体群動態と生育環境を明らかにすると共に、パルス変調クロロフィル蛍光測定法を用いて温度耐性を明らかにすることを目的とした。

【方法】2010年4月から同年11月まで計5回、鹿児島湾南部の指宿市児ヶ水で調査を行った。温度耐性実験は、Imaging-PAM (Heinz-Waltz GmbH製)を用い、高温度条件(20-36°C)、低水温条件(10-20°C)、各光強度(0-1076 mol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>)下で、光合成・光化学系IIの電子伝達速度(ETR)活性の測定を行った。体サイズ・密度の調査では、方形枠(20 cm四方)を用いて草体を地下茎ごと刈り取り、株密度・草丈・乾重量を測定した。また、溶存態窒素・リン濃度、水温を測定した。

【結果】草体の株密度は4月に400本 m<sup>-2</sup>だったが、8月には25本 m<sup>-2</sup>となった。その後アマモ草体は消失し、11月には1417本 m<sup>-2</sup>と期間を通じて最も高密度になった。また、花穂数は5月に167本 m<sup>-2</sup>に達したが、8月から11月にかけて花穂の形成は行われなかった。草丈は4月に43.7 cmに達し、その後流出を続け、8月に7.0 cmと期間を通じて最小値を記録した。株密度および草丈の結果から、アマモの新規加入は10-11月頃であると推察され、水温の低下とともに草体の伸長および花穂の形成が行われると考えられた。ETR活性は30-36°Cで高い活性を示した。しかし、10-20°Cの低水温条件下では、ETR活性が急激に低くなる傾向を示した。一般に、アマモ(多年生)の生育上限水温は約28°Cと報告されているが、本調査地の夏季水温は30°Cに達した。今後は、ETR活性による温度耐性の評価と共に、他の方法を併用して南限個体群の温度耐性について明らかにする必要があると考える。

### 4. 葉緑体DNA多型に基づく赤潮原因藻*Heterosigma akashiwo*の 検出・識別技術の開発

吉川 毅・○上川畑智美・赤瀬信一郎・前田広人 (鹿大水)

【目的】ラフィド藻*Heterosigma akashiwo*は、西日本の閉鎖系内湾域でしばしば赤潮を形成し養殖魚介類の斃死を誘発している。本研究では、赤潮発生海域における本藻個体群の検出・識別技術の開発を目的として、本藻赤潮ブルームのモデル系を作成し、葉緑体DNA上に確立した種内識別指標による*H. akashiwo*の検出を試みた。

【方法】2010年7月に鹿児島県鹿児島湾沿岸より採取した天然海水を用い、赤潮ブルームのモデル系として、(1) *H. akashiwo* NIES-5株、NIES-6株のゲノムDNAを添加した天然海水環境DNA (2) NIES-5、NIES-6培養細胞を添加した天然海水の環境DNA の2種のモデルを作成した。本藻種内識別指標A~Eを用い、各モデル系からの各分離株の検出を試みた。

【結果】モデル系(1)、(2)いずれにおいても*H. akashiwo*両株の特異的検出を確認した。特に、モデル系(2)では、海水100 mLから10 cells mL<sup>-1</sup>の細胞密度の*H. akashiwo*の検出が可能であった。一般に、本藻は数万細胞/mL以上で魚類の斃死を引き起こすことから、種内識別指標A~Eが赤潮発生海域での本藻のモニタリングに有用であることが示唆された。

## 5. 八代海の環境保全に関する研究-13

### 八代海における植物プランクトン組成と *Chattonella antiqua* の 増殖時の環境条件

○城本祐助・原口浩一・富田潤也(熊本県大環境)・櫻田清成(熊本県水研セ)・大和田紘一(熊本県大環境)

【目的】八代海では毎年のように夏季に有害赤潮が発生しており、魚類養殖業に甚大な被害をもたらしている。2009年は *Chattonella antiqua* の大量発生によって八代海で約30億円の被害であった。本研究では2009年度の八代海における植物プランクトンの組成と季節変化を元に、*C. antiqua* と他の植物プランクトン卓越時の環境条件を明らかにした。

【方法】2009年4月～2010年3月には毎月1回の頻度で八代海8測点の水温、塩分、栄養塩濃度および植物プランクトンの細胞数密度について調査した。さらに、2009年6月～10月に毎週1回の頻度で八代海の北部(姫戸沖)と南部(水俣沖)でも同様の調査を行った。

【結果】八代海全域で *C. antiqua* の出現を確認したが、1000 cells/ml以上の赤潮状態を観測したのは姫戸沖だけであった。姫戸では7月中旬に珪藻の細胞数が年間最大となり、表層の栄養塩の枯渇に伴って衰退した。珪藻が衰退した時期には *C. antiqua* の細胞が3 cells/mlであったが、これが翌週には1370 cells/mlに増加した。赤潮に至った要因として、25℃以上の高水温であったこと、底層および中層に栄養塩が豊富にあったこと、珪藻の増殖が抑制されたことで *C. antiqua* が好適な増殖環境にあったことが分かった。

## 6. 八代海の環境保全に関する研究 14

### 八代海への海底堆積物からの栄養塩溶出量の見積もりと水柱への寄与

○原口浩一(熊本県大環境共生)・櫻田清成(熊本県水研セ)・城本祐助

・大和田紘一(熊本県大環境共生)

【目的】八代海は、夏季にはラフィド藻や渦鞭毛藻の大増殖といった富栄養化に伴う問題と、冬季にはノリ養殖の不作などの栄養塩濃度低下に伴う漁業問題を抱える。漁業対策や環境保全を立てるうえで、窒素やリンの負荷量を明らかにすることは極めて重要であり、流域圏に大都市をもたない八代海では海海底堆積物からの栄養塩類の溶出速度の推定が不可欠である。

【方法】2004年と2005年度に熊本県によって行われた八代海の海底堆積物調査結果の無機態窒素(DIN)、リン(DIP)の間隙水濃度から溶出速度を算出し、季節変動を明らかにするとともに、水柱への寄与について評価した。

【結果】DINの溶出速度は夏に最も大きく、DIPには季節変化が認められなかった。DINの溶出速度が最も多かったのは湾奥海域であり、他の海域に比べ2-3倍大きい。海域面積を元に八代海全域の溶出速度の年平均値を求めると、DINでは $763 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ 、DIPでは $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ と見積もられた。陸域負荷を加えた全供給量に占める溶出量は、DINでは49%、DIPでは81%に相当し、栄養塩供給源として海底からの溶出が大きな役割を果たしていることが判明した。

## 7. 諫早湾マガキ養殖場におけるタテジマフジツボ及びドロフジツボの出現状況について

○山田秀樹(長大生産)・サトイト シリル グレン(長大水)・大橋智志(長崎水試)・北村等(長大水)

【目的】諫早湾マガキ養殖場では、タテジマフジツボ及びドロフジツボによる被害が報告されている。本研究では、同海域で見られるフジツボ類幼生の形態的特徴を解析し、これら2種の判別に用いた。さらに、同海域における2種類の幼生の出現状況を調べた。

【方法】養殖筏より採取したタテジマフジツボ、アメリカフジツボ、アミメフジツボ、シロスジフジツボ及びドロフジツボの卵塊からノープリウス幼生を孵出させ、飼育に供した。各種幼生はキブリス幼生まで飼育し、その際に毎日顕微鏡下で幼生のステージと形態の特徴を観察して大きさを測定した。ステージは、第一触角の刺毛数で確認した。野外調査は、2010年9月3日、9日、22日および30日の計4回行い、海面(0m)から2m間隔及び海底付近の海水を100Lずつ汲み上げ、70 $\mu$ mプランクトンネットでろ過し、集めたプランクトンからフジツボ幼生の種類、ステージ及び個体数を顕微鏡下で調べた。

【結果】飼育の結果、アメリカフジツボのⅢ～Ⅵ期及びアミメフジツボのⅡ～Ⅵ期の幼生は甲表面に微細棘がみられ他種と判別できた。他はⅡ期以上において全長に有意な差がみられたことから、全長でタテジマフジツボ及びドロフジツボの判別ができた。野外では9月3日に海面での幼生数が最も多かった。また、9月3日の海面ではシロスジフジツボが多かったが、その他の調査日と水深ではタテジマフジツボとドロフジツボが多くみられた。タテジマフジツボ及びドロフジツボについて、Ⅵ期、キブリス幼生が深い層に多く現れた。

## 8. 宮崎県内3ヶ所におけるヨシノボリ属魚類の回遊状況について

○甲斐史文・神田猛(宮大農)・望岡典隆(九大院農)・森下孝一郎(福岡歯科大)

【目的】ハゼ科ヨシノボリ属魚類は、基本的には両側回遊型であるが、幾つかの種では陸封型も知られている。耳石中のSr:Ca比から生活型を推定する方法も確立されてきており、本研究では、宮崎県内のヨシノボリ属魚類の回遊状況を明らかにすることを目的とした。

【方法】宮崎県内の五十鈴川、一ツ瀬川、および火口湖である御池に生息するヨシノボリ属魚類を材料とした。五十鈴川では、小園堰(潮止め)にトラップを仕掛け湖上の状況を、また、上記3ヶ所のヨシノボリ属を採集し、耳石中のSr:Ca比を求め、回遊状況を推定した。

【結果】小園堰では、6～9月にオオヨシノボリの稚魚(体長8～19mm)、4～6月に体長22～42mmのシマヨシノボリの遡上が確認された。オオヨシノボリは上流域に、シマヨシノボリは中流域以下に生息している。耳石のSr:Ca比から、これら2種は両側回遊型であった。

一ツ瀬川にはダム2つあり、下流の杉安ダムの上流側でオオヨシノボリ、トウヨシノボリの生息が確認された。これらは耳石のSr:Ca比から、陸封型であった。杉安ダム下流には横断構造物はなく、確認されたシマヨシノボリ、オオヨシノボリ、トウヨシノボリは、耳石のSr:Ca比から、いずれも両側回遊型であった。しかし、トウヨシノボリの中には陸封型が混在していた。

御池は火口湖であり、他の水域との密接な繋がりはない。ここではトウヨシノボリとゴクラクハゼの生息が確認されたが、耳石のSr:Ca比から、すべて陸封型であった。

宮崎県で確認されたシマヨシノボリ、オオヨシノボリ、トウヨシノボリ、およびゴクラクハゼのうちシマヨシノボリには両側回遊型のみ、他の3種には両側回遊型と陸封型の両方が見られた。

## 9. 北赤道海流近傍の中規模渦がシラスウナギの来遊に与える影響

○田島 圭・和田伸久（九大院生資環）・安倍大介（水研セ中央水研）

西田二郎（宮崎県内水面振興セ）・望岡典隆（九大院農）

【目的】ウナギは西マリアナ海嶺南部海域で産卵し、仔魚は北赤道海流により西方へ輸送された後、黒潮域でシラスウナギへと変態し、東アジア沿岸へ来遊する。輸送ルートの北赤道海流の近傍では、頻繁に中規模渦（直径数百 km 規模の環状流）が発生している。本研究では、中規模渦の規模、発生数がシラスウナギの来遊履歴と来遊量に与える影響を検討した。

【方法】（財）宮崎県内水面振興センターによって一ツ瀬川で2006~'09年11~3月に採捕された計358個体のシラスウナギ、同河川および大淀川における1日当たりの採捕量（CPUE）、衛星観測データに基づく海面流速場およびそこから抽出した中規模渦に関する物理情報を用いた。シラスウナギは冷凍保存後、体各部および湿重量を測定し、肥満度を求めた。その後、耳石を摘出し、核を含む面まで研磨し、走査型電子顕微鏡で微細構造を観察し、採捕年毎に高齢個体（葉形仔魚期の日数が180日以上）の出現率と河川到達日を求めた。また、シラス来遊履歴および来遊量と中規模渦の発生状態との関係をそれぞれ調べた。

【結果】1日当たりのシラス採捕量は2006年は4,689g、'07年は2,184g、'08年は7,150g、'09年は1,519gであった。'08年に来遊したシラスは、有意に小型であり（全長： $56.0 \pm 2.28$  mm）、'09年の個体は、有意に肥満度が低かった（ $0.6 \pm 0.10$ ）。シラス不漁に加え高齢個体が多く出現した年（'07年、'09年）は、多くの中規模渦が発生した。この中規模渦が頻発する時期に伴って、北赤道海流の平均流速は他の時期よりも相対的に弱くなっていた。早期来遊群シラスの減少の一要因として、直径200~300kmの中規模渦に起因する仔魚の滞留や、北赤道海流による主要輸送機構の弱化により、葉形仔魚期が長期化することが考えられた。

## 10. コイ補体C3aに由来するペプチドの抗菌作用

○無津呂 淳一（福女短・食栄）・中尾 実樹（九大院農）

【目的】補体成分C3、C4およびC5は活性化されると、それぞれC3a、C4a、C5aという約8 kDaの白血球活性化断片（アナフィラトキシン）を放出するが、近年、C3a、C4a、C5aの新規機能として抗菌作用が報告されている。本研究ではコイのアナフィラトキシンでも抗菌機能が保存されているのか、また抗菌的に作用する菌種を明らかにするために、各アナフィラトキシン中の一部に相当する合成ペプチドの抗菌作用を調べた。

【方法】合成ペプチドについては北海道システム・サイエンス(株)に合成を委託し、純度90%以上のものを供試した。ペプチド、及びタンパク質の抗菌作用は、Radial Diffusion Assay (RDA)を用いて測定した。3%-TSB培地にて35°Cで一晩培養した各種細菌の懸濁液を、50°Cに保温した下層寒天培地に終濃度、 $5 \times 10^6$  cells/mlとなるように加え、均一にペトリ皿上に固めた。次いで下層寒天培地にあけた4 mm径の試料孔にペプチド溶液を添加し、35°Cで3時間インキュベートし、試験液が完全に浸透したことを確認した後、融解した上層寒天培地を注いだ。さらに35°Cで18時間培養した後、阻止円の半径を計測し、最小発育阻止濃度（MIC）を算出した。

【結果】*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. Enteritidis*, 及び*E. coli*に対して抗菌作用を検討したところ、コイC3a、C4aの配列を基に作成した合成ペプチドは、*S. Enteritidis*, 及び*E. coli*、に対して抗菌作用（MIC: 25-40  $\mu$ m）を示すことが判明した。また、 $\alpha$ -ヘリックス構造の安定化に関与する部位のアミノ酸残基をロイシンに、また、いくつかの部位をアルギニンに置換して正電荷の遍在性を高めたところ、抗菌作用が強まることが判明した。



## 1 1. クルマエビの WSDV は、免疫によって予防できるか

○是永大樹 (宮崎大農)・河野智哉(宮崎大 IR 推進機構)・吉村晃広・久世悠・  
高山博章・酒井正博(宮崎大農)

【目的】世界各国のエビ養殖現場に甚大な被害を与えている急性ウイルス血症(WSD)は、大きな問題になっている。しかし現在までに、このウイルス疾病に対する有効な対処法は確立されておらず、有効なワクチンの開発および使用方法の確立が望まれている。そこで本研究では、WSDV のエンベロープタンパク質である VP28 の組み換え体を用いたサブユニットワクチンを作製し、本ワクチンの有効性および免疫賦活剤との併用による抗病性の向上効果について検討を行った。

【方法】WSDV 感染クルマエビより抽出した DNA を鋳型に PCR を行い、VP28 遺伝子を増幅した。次に、増幅した VP28 遺伝子をタンパク質発現用ベクター(pEU-E01-MCS, cellFree Science, Japan) に VP28 遺伝子を組み込み、キメラプラスミド DNA を構築した。次に、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系によりサブユニットワクチンを作製した。続いて、サブユニットワクチンおよび免疫賦活剤 (Imiquimod, poly I:C) を単独または混合接種し、WSDV による攻撃試験によって有効性を確認した。また、混合接種後の免疫関連遺伝子の発現解析を行った。

【結果】サブユニットワクチンまたは免疫賦活剤を接種し、1 週間後に攻撃試験を行った結果、ともにコントロール区と比べ生存率は有意に高く、WSDV に対する抗病性の向上が認められた。さらに、サブユニットワクチンおよび免疫賦活剤の混合接種では、単独で接種するよりも抗病性が向上することが確認された。免疫関連遺伝子の発現解析では、混合接種後において、コントロールと比べ顕著な発現量の増加が確認された。

本研究は、生研センターからの研究費によって行われた。

## 1 2. *Edwardsiella tarda* ホルマリン不活化菌体が宿主に十分な感染防御能を付与しない要因

○鳥居 加奈・山崎 雅俊・荒木 亨介(鹿大水)・中易 千早(水研セ養殖研)・山本 淳(鹿大水)

【目的】エドワジェラ症の原因細菌である *Edwardsiella tarda* は細胞内寄生細菌であり、本疾病の予防策としてワクチン開発が求められている。しかし、現在主流のホルマリン不活化菌体ワクチンでは *E. tarda* に対する感染防御に十分な効果が得られないと言われている。そこで本研究ではこの要因を明らかにするため、抗体価を液性免疫の指標として、細胞障害性 T 細胞 (CTL) の表面マーカー遺伝子である *CD8-a* およびその細胞障害のエフェクター因子である *Perforin* を細胞性免疫の指標として、生菌 (LC) とホルマリン不活化菌体 (FKC) を接種後、ギンブナの免疫応答に違いがあるのかを調べた。

【方法】ギンブナ (OB1 系統) に対して 100g 魚体重あたり  $1 \times 10^5$  CFU の *E. tarda* FPC498 株 LC と同菌株の FKC を腹腔内接種し、30 日後 100g 魚体重あたり  $1 \times 10^7$  CFU の同菌株 LC で攻撃試験を行った。次に、ギンブナを 100g あたり  $1 \times 10^5$  CFU の LC および FKC でそれぞれ感作し、経時的に血漿と腎臓白血球 (KLs) をサンプリングした。ELISA 法により血漿中の抗体価を測定し、KLs より mRNA 抽出後、半定量 PCR 法により免疫関連遺伝子の発現解析を行った。

【結果】感作後 30 日目の抗体価は LC 区より FKC 区の方がより高い数値を示した。しかし攻撃試験の結果、FKC 区の方が LC 区に比べ高い死亡率を示した。このことから抗体は *E. tarda* に対する感染防御時において十分な効果を示さないと考えられる。また、免疫関連遺伝子発現解析の結果、*CD8-a* は LC 区では感作後 12 日目から 16 日目に、FKC 区では 8 日目から 16 日目に強く発現し、また LC 区は FKC 区より強い発現を示した。*Perforin* は両試験区において全てのアイソタイプが感作後 8 日目から 16 日目に強い発現を示した。その中でも、LC 区の *Perforin-2* については FKC 区と比較して強い発現が確認された。これらの結果の違いが FKC 感作では *E. tarda* に対する感染防御に十分な効果が得られない要因でないかと推察された。

### 13. *Lactococcus garvieae*の疫学的研究およびリンコマイシン(LCM)耐性に関する研究

○松井翔・吉田照豊(宮崎大・農)

【目的】*Lactococcus garvieae*(LG)を原因細菌とする $\alpha$ 溶血性レンサ球菌感染症は、ブリ属魚類養殖業に多大な被害を及ぼしてきた重要な疾病である。しかしながら、疫学的な知見はほとんど報告されていない。そこで本研究では疫学研究としてLGの遺伝多型解析および薬剤感受性試験を行った。また、本研究の結果から得られたLCM(リンコマイシン)感受性株および耐性株を用いて、テンプレートファージのLCM耐性機構への関与の可能性についても検討した。

【方法】供試菌株として1974年から2010年にかけてブリ属魚類を中心とし分離されたLG(533株)を用いた。遺伝多型解析は制限酵素*Sma*Iで消化したLGの染色体DNAを、バイアス正弦電場ゲル電気泳動法(BSFGE)で解析した。LCM感受性試験は拡散ディスク法を用い、各菌株の感受性パターンを調査した。また、マイトマイシンCを用いLCM耐性株のテンプレートファージを誘発し、LCM感受性株(KG32)に溶原化させた後LCM耐性株の出現の有無を調査した。

【結果】BSFGEの結果、得られた遺伝子型はS1型～S18型までの18タイプに分類された。年代別にみると、1990年代には多様な遺伝子型が確認されたが、2005年以降は、主としてS1型とS17型の2タイプが確認された。LCM感受性試験の結果、S1型はLCM耐性株、S17型はLCM感受性株がほとんどであった。マイトマイシンCにより誘発されたテンプレートファージにより溶原化されたと考えられたKG32株は、LCMに耐性を示した。また、LCM耐性に変異したKG32株の遺伝子型は、BSFGEで解析した結果、変化していた。