

平成 19 年度日本水産学会九州支部大会講演要旨

平成 20 年 1 月 26 日 (土)

会場 ; 宮崎大学農学部講義室

A会場 ; 109 教室 (13 : 35~17 : 00)

B会場 ; 205 教室 (13 : 35~16 : 45)

## プログラム A会場 (109 教室)

(13:35-13:50)

**A-1** : 海産微細藻の大気炭酸ガスの利用能と細胞内蓄積

○若松真至・幡手英雄・村田 寿 (宮崎大農)・塩盛弘一郎・斉藤康男 (宮崎大工)

(13:50-14:05)

**A-2** : 植物プランクトン種間のアレロパシーを介した増殖相互作用

○山崎康裕・紫加田知幸・額田篤史・一木智子・松原賢・島崎洋平・大嶋雄治・中尾実樹・本城凡夫 (九大院農)

(14:05-14:20)

**A-3** : 珪藻 *Skeletonema costatum* が産生するアレロパシー物質

○大道優平・廣瀬道宣・山崎康裕・島崎洋平・大嶋雄治・本城凡夫 (九大院農)

(14:20-14:35)

**A-4** : 海洋微生物ラビリンチュラ類におけるウラシル要求性突然変異株の解析

○倉村智世・長野直樹・田岡洋介・林 雅弘 (宮崎大学農学部)

(14:35-14:50)

**A-5** : 海産ヤブレッツボカビ HR-3 株からのアミノペプチダーゼの精製と酵素学的性状

○福永哲也・吉川毅・坂田泰造 (鹿大水)

(14:50-15:05)

**A-6** : *Vibrio harveyi* フェージの分離と生化学的性状

○岡野翔・吉川毅・坂田泰造 (鹿大水)

休憩 (15:05-15:15)

(15:15-15:30)

**A-7** : カタクチイワシ主体 MP がカンパチの成長と抗病性に及ぼす影響

○中西健二・米村輝一朗・長野昌子・岩田一夫・毛良明夫 (宮崎水試)  
村田 寿・吉田照豊 (宮崎大農)

(15:30-15:45)

**A-8** : 養殖ブリの抗酸菌症に対するホルマリン不活化ワクチンとストレプトマイシン投与の有効性試験

○平江多績・村瀬拓也 (鹿児島水技セ)・Sompoth Weerakun・青木菜緒・倉田修・畑井喜司夫 (日獣大)

(15:45-16:00)

**A-9** : クルマエビにおける WSDV に対する DNA ワクチンの開発

○園田航平・河野智哉・酒井正博 (宮崎大 農)

(16:00-16:15)

**A-10** : 魚類病原性 *Streptococcus dysgalactiae* の分子疫学および薬剤感受性調査

○鵜瀬直樹 (宮大農)・野本竜平 (鹿大連合農)・米村輝一郎・中西健二 (宮崎水試)・平江多績・村瀬拓也 (鹿児島水技セ)・伊丹利明・吉田照豊 (宮大農)

(16:15-16:30)

**A-11** : 新型レンサ球菌症の新地域・新魚種での発生事例について

○村瀬拓也・平江多績 (鹿児島県水技センター)・仁部玄通 (鹿児島県水産振興課)・吉田照豊・野本竜平・鵜瀬直樹 (宮崎大学農学部)

(16:30-16:45)

**A-12** : *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* の遺伝疫学的研究

○壹岐美晴・山野佳那 (宮崎大・農)・中西健二・米村輝一郎 (宮崎水試)・平江多績 (鹿児島水技セ)・福田穰 (大分水試)・中岡典義 (愛媛水試)・金井欣也 (長崎大)・伊丹利明・吉田照豊 (宮崎大・農)

(16:45-17:00)

**A-13** : 日本の養殖海産魚類から分離された *Lactococcus garvieae* の疫学的解析

○古川三記子 (宮崎大農)・米村輝一郎・中西健二 (宮崎水試)・福田穰 (大分水試)・平江多績・村瀬拓也 (鹿児島水技セ)・伊丹利明・吉田照豊 (宮崎大農)

## プログラム B 会場 (205 教室)

(13:35-13:50)

**B-1** : トラフグ精巣セルトリ細胞の培養系の開発

○新居早也佳・李 敬勲・山口明彦・松山倫也 (九大院農)

(13:50-14:05)

**B-2** : 未成熟期トラフグの脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン (GtH) mRNA の発現解析

○重松 亨・李 敬勲・新居早也佳・Harunur Rashid・山口明彦・松山倫也 (九大院農)

(14:05-14:20)

**B-3**: 性転換に伴うホシササノハベラの脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン (GtH) mRNA 発現量の変化 ○入江 奨・北野 載・山口明彦 (九大院農)・太田耕平 (ハワイ大医)・松山倫也 (九大院農)

(14:20-14:35)

**B-4**: 抗リン酸化ラミンペプチド抗体を用いたキンギョ卵母細胞に存在するラミンキナーゼのスクリーニング ○岩谷美穂・山口明彦・松山倫也 (九大院農)

(14:35-14:50)

**B-5**: 2種類のギンブナ CD4 様分子

○野中誠子・柚本智軌 (九大院農)・中西照幸 (日大生物資源)・乙竹充 (養殖研)・中尾実樹 (九大院農)

(14:50-15:05)

**B-6**: コイの I 型インターフェロン(I-IFN)の構造および機能解析

○北尾陽一・河野智哉・酒井正博 (宮崎大農)

休憩 (15:05-15:15)

(15:15-15:30)

**B-7**: ペントシジンを指標とする後期糖化反応の阻害活性評価

○山波千春・幡手英雄・若松真至・柚木給美・村田 寿 (宮崎大農)

(15:30-15:45)

**B-8**: 大阪湾底質のエストロゲン活性強度分布に関する研究

○木藤麻美・小山次朗 (鹿大水)・田中博之 (水総セ・瀬戸内水研)

(15:45-16:00)

**B-9**: 黒はんぺんの物性分析と特徴

○大橋宏昭 (長崎大水産)・池ノ谷政利 (焼津蒲鉾商工協)・市川寿 (長崎大水産)

(16:00-16:15)

**B-10**: ハマグリの定着・移動・成長と資源管理

○逸見泰久 (熊本大・沿岸セ)・梶原信輔 (熊本大・自然科学)・小林哲 (佐賀大・農)

(16:15-16:30)

**B-11**：日向灘におけるブリのアーカイバルタグ標識放流調査

○福田博文（宮崎水試）・阪地英男（水研セ）・久野正博（三重科技セ水）・梶達也（高知水試）・青野怜史（高知県宿毛漁業指導所）・田中耕治（鹿児島水技開セ）

(16:30-16:45)

**B-12**：ウニ類分布及び魚類のホンダワラ類採食と波浪流動条件との関係

○荒武久道・佐島圭一郎（宮崎水試）・渡辺耕平（西日本オーシャンリサーチ）・吉田吾郎（瀬戸水研）

## A-1 海産微細藻の大気炭酸ガスの利用能と細胞内蓄積

○若松真至・幡手英雄・村田 寿（宮崎大農）・塩盛弘一郎・斉藤康男（宮崎大工）

**【目的】** 現在人為的な温室効果ガスの放出、中でも炭酸ガス濃度の上昇から地球温暖化や砂漠化などさまざまな環境問題が表面化してきている。大気炭酸ガスの動態には海洋が大きく関与しており、その削減には光合成植物プランクトンによる炭素固定も重要な役割を担っているものと考えられる。そこで本研究では、水産種苗生産の初期餌料として広く使用されている海産微細藻を用いたモデル実験系を設定し、その大気炭酸ガス利用能やそれに伴う細胞内蓄積炭素量を検討した。

**【方法】** 海産珪藻 *Chaetoceros gracilis* を主に用いたが、真正眼点藻 *Nannochloropsis sp.* についても大気炭酸ガス利用能を測定した。各微細藻は 20°C、12 時間照明（3500 lux）で培養し、*C. gracilis* では 32 日間、*Nannochloropsis sp.* では 70 日間培養を続けた。大気炭酸ガス利用能の測定には対数増殖期、定常期などの各増殖相にある細胞培養液を用いた。細胞培養液を外気の流通および遮断可能な容器に移し、適時閉鎖環境下でヘッドスペース中の炭酸ガスを利用・削減させた。残存量を赤外線式炭酸ガス濃度計 CD-602（FUSO 社製）で測定し、微細藻の単位細胞および培養液当たりの大気炭酸ガス利用量を求めた。細胞内の蓄積炭素量は、各増殖相の *C. gracilis* 細胞を遠心分離（1000 rpm, 30 min）によって回収し、凍結乾燥後、元素分析装置 Series II CHNS/O Analyzer 2400（パーキンエルマー社製）で測定した。

**【結果】** 微細藻の大気炭酸ガス利用能を測定するための至的条件をまず検討した。その結果、培養容器のヘッドスペースガス容量約 1000 mL に対して、細胞培養液が 100 mL、60 分間がその大気炭酸ガス利用量を適切に反映することが示唆された。*C. gracilis* 細胞あたりの大気炭酸ガス吸収量は、細胞分裂の活発な対数増殖期に最大となり、その後減少したものの定常期後期まで吸収を続けたが、死滅期に達すると僅かに炭酸ガスの放出が観察された。この 32 日間で培養液 1 mL あたりの総炭酸ガス吸収量は約 800  $\mu$  g になるものと推測された。一方、細胞内の蓄積炭素量は、細胞あたりでは対数期と比較して定常期前期、後期ともに増加したが、定常期間中の変化はほとんどなかった。しかし培養液あたりに換算すると、定常期後期まで蓄積炭素量が増加し、多量の炭酸ガスが細胞内の有機化合物として固定・蓄積されていることが示唆された。*Nannochloropsis sp.* 細胞の大気炭酸ガス吸収動態も *C. gracilis* とほぼ同様な傾向を示し、培養 70 日間で培養液 1 mL の総炭酸ガス吸収量の推計は約 1500  $\mu$  g であった。

## A-2 植物プランクトン種間のアレロパシーを介した増殖相互作用

○山崎康裕・紫加田知幸・額田篤史・一木智子・松原賢・島崎洋平・大嶋雄治・中尾実樹・本城凡夫（九大院農）

【目的】 Pratt (1966) や Honjo et al. (1978, 1985) は、現場調査からラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* が珪藻 *Skeletonema costatum* と交互に優占することを示し、*H. akashiwo* によるアレロパシー物質の産生を示唆した。さらに、我々は *S. costatum* と *H. akashiwo* が共にアレロパシー物質を産生し、互いに増殖を抑制し合うことを明らかにした (Yamasaki et al. 2007)。本研究では、室内及び現場において他種植物プランクトンと *H. akashiwo* のアレロパシーを介した増殖相互作用を調べた。

【方法】 4 種植物プランクトンの増殖に与える *H. akashiwo* のアレロパシー効果を調べるために、アレロパシー物質濃度と初期細胞密度をそれぞれ 4 通り、計 16 通りの試験区を設定して培養を行った。2007 年の初夏 (5~6 月) に博多湾箱崎港の植物プランクトンの種組成、水温、塩分及び pH の変化を調査し、現場でのアレロパシー効果を判定するために、栄養塩を添加した表層水を用いて *S. costatum* の増殖を調べた。また、*H. akashiwo* の赤潮海水中に存在するアレロパシー物質を免疫学的手法で検出した。*H. akashiwo* の赤潮濾過海水と培養濾液から、透析 (分画分子量: 3,500) と凍結乾燥によって得たそれぞれの粗抽出物が *S. costatum* の増殖に与える影響を調べた。

【結果】 *H. akashiwo* のアレロパシー効果はその物質濃度だけではなく、検定 4 種の初期細胞密度によっても大きく変化することが室内実験により判明した。6 月上旬、箱崎港において *H. akashiwo* 赤潮 ( $4.5 \times 10^5$  cells ml<sup>-1</sup>) が発生し、赤潮期間の濾過海水で *H. akashiwo* のアレロパシー物質が Dot-blot 法によって検出された。同様に、栄養塩を添加した赤潮盛期の濾過海水でも *S. costatum* の増殖が著しく抑制された。さらに、Dot-blot 法で赤潮盛期に検出されたアレロパシー物質の濃度 (40 µg protein ml<sup>-1</sup>) で粗抽出物によるバイオアッセイを行った結果、*S. costatum* の増殖が著しく抑制された。以上の結果は *H. akashiwo* 赤潮盛期の海水中に *S. costatum* の増殖を抑制するに十分な濃度でアレロパシー物質が存在していたことを示している。以上の結果から、*H. akashiwo* のアレロパシーは検定 4 種に対して種特異的かつ細胞密度依存的な効果を示しており、現場において *H. akashiwo* の単一種赤潮の形成や個体群の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

### A-3 珪藻 *Skeletonema costatum* が産生するアレロパシー物質

○大道優平・廣瀬道宣・山崎康裕・島崎洋平・大嶋雄治・本城凡夫（九大院農）

【目的】珪藻 *Skeletonema costatum* とラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* は、米国や日本の沿岸海域で交互に優占することが観察されており、室内実験において、*H. akashiwo* によるアレロパシー物質の産生が示唆されている（Pratt 1966 ; Honjo *et al.* 1978）。近年、Yamasaki *et al.* (2007) は、無菌培養した *H. akashiwo* と *S. costatum* の増殖相互作用を混合培養実験によって調べ、両者が共にアレロパシー物質を産生していることを示した。本研究では、*S. costatum* の *H. akashiwo* に対する増殖抑制効果に着目し、*S. costatum* が産生するアレロパシー物質の精製を試みた。

【方法】まず、*S. costatum* の死滅期の培養濾液から固相抽出により *S. costatum* のアレロパシー物質を抽出した。次に、固相抽出によって得られた 5 ml の吸着画分溶液にクロロホルム 10 ml と水 15 ml を添加し（クロロホルム：メタノール：水 = 2:1:3）液-液抽出を行った。その後、液-液抽出で得たクロロホルム画分を濃縮し、薄層クロマトグラフィー（TLC, 展開溶媒 クロロホルム：メタノール = 2:1）に供した。さらに、*H. akashiwo* に対して強い増殖抑制効果を示した T-2 画分（Rf 値 = 0.60）を逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC, 流速  $0.8 \text{ ml min}^{-1}$ 、溶離液 50-90% アセトニトリル）に供した。最後に、*H. akashiwo* に対して強い増殖抑制効果を示した F-4 画分（溶離時間 37 分）のエレクトロスプレーイオン化質量分析法（ESI-MS）を行った。なお、得られた各画分の増殖抑制効果は、48 ウェルプレートを用いた微量培地検定法によって調べた。

【結果】固相抽出を行い、各画分の増殖抑制効果を調べた結果、*S. costatum* の培養濾液の吸着画分で *H. akashiwo* の増殖が著しく抑制されたが、通過画分には *H. akashiwo* に対する増殖抑制効果が認められなかった。次に、固相抽出の吸着画分を液-液抽出によってさらに分画した結果、クロロホルム層に *H. akashiwo* に対する強い増殖抑制効果が認められた。このことからアレロパシー物質は、比較的疎水性の高い物質であると考えられた。その後、このクロロホルム画分を TLC に供した結果、2 つのバンド（Rf 値 = 0.60 と 0.47）が検出された。*H. akashiwo* に対する強い増殖抑制効果が確認された Rf 値 = 0.60 のバンドをメタノールで抽出し RP-HPLC に供した結果、2 つのピーク（溶離時間 = 37 分、38 分）が検出され、これらのピークにのみ増殖抑制効果が確認された。最後に、より強い増殖抑制効果が確認された溶離時間 37 分の F-4 画分の ESI-MS による測定を行った結果、*H. akashiwo* に対する強い増殖抑制効果を持つ F-4 画分は、少なくとも分子量 268 と 514 の混合物であると推定された。



## A-4 海洋微生物ラビリンチュラ類におけるウラシル要求性突然変異株の解析

○倉村智世・長野直樹・田岡洋介・林 雅弘 (宮崎大学農学部)

### 【目的】

海洋性真核微生物であるラビリンチュラ類は細胞内に著量の高度不飽和脂肪酸を蓄積することから新たな油糧微生物として注目されている。ラビリンチュラ類の形質転換系は未だ確立しておらず、遺伝子工学的研究も過去に薬剤耐性遺伝子を用いた形質転換の検討が1例報告されているのみである。本研究ではラビリンチュラ類の形質転換系の確立を目標とし、宿主細胞の候補として栄養要求性突然変異株、特に関連遺伝子のクローニングも行われているウラシル要求性株の取得を試みた。

### 【方法】

ウラシル要求性を指標とした宿主-ベクター系を確立するために、まず有効な宿主細胞となりうるウラシル要求性株の取得を試みた。本研究室が沖縄県八重山諸島海域にて分離した *Aurantiochytrium* sp. mh0186 株に UV 照射による変異処理を行った。ウリジン前駆体であるオロト酸のアナログである 5-fluoroorotic acid (5-FOA) で選択圧をかけたポジティブスクリーニング法により、目的とするウラシル要求性突然変異株を得た。これらの要求性株をウラシル添加、無添加完全合成最小培地に播きウラシル要求性を確認した。

### 【結果】

得られたウラシル要求性株において、増殖速度、脂肪酸組成、酵素 orotate phosphoribosyl transferase (Ura5) の酵素活性を野生株と比較した。各変異株の増殖速度は野生株のものと比較して極端に増殖が変化した株は認められなかった。脂肪酸組成が大きく変化した株も認められず、いずれの変異株でも野生株と同様に総脂肪酸の約45%を DHA が占めていた。Ura5 活性を確認したところ、活性が完全に欠損している株が12株認められた。

## A-5 海産ヤブレッツボカビ HR-3 株からのアミノペプチダーゼの精製と酵素学的性状

○福永哲也・吉川毅・坂田泰造(鹿大水)

【目的】：ラビリンチュラ類（目）に分類されるヤブレッツボカビ（thraustochytrids）は沿岸生態系における有機物分解者として重要な役割を果たしている。また細胞内に DHA や DPA などの PUFA を高濃度に蓄積していることが知られている。従って、海藻類、マングローブ落葉、付着細菌等由来の高分子有機物・難分解性有機物を分解し、それ自身は動物プランクトンの被捕食者となって海洋生物生産に寄与していると考えられる。本研究ではヤブレッツボカビのタンパク質分解に関与しているアミノペプチダーゼを分離精製して酵素学的性状を明らかにした。

【方法】：沿岸海水より分離されたヤブレッツボカビ HR-3 株（宮大農、林雅弘博士より分与）を海水栄養培地で培養し、濃縮菌体を超音波で破碎した。無細胞液から硫酸沈殿で回収して粗酵素液とした。粗酵素液を陰イオン交換クロマトグラフィ (Toyopearl Super Q-650M, 2.0 x 22.0 cm) およびゲル濾過クロマトグラフィ (Toyopearl HW-55F, 2.0 x 70.0 cm) を用いて分離精製した。酵素活性は L-leucine-*p*-nitroanilide (LNA) および L-alanine-*p*-nitroanilide (ANA) を基質として 405 nm の吸光度の増加で測定した。得られた酵素画分について至適温度、至適 pH、基質特異性、熱耐性、金属イオンの影響、阻害剤の影響などの酵素学的性状を調べた。

【結果】：粗酵素液を陰イオン交換クロマトグラフィで分画した結果、LNA 及び ANA 分解活性の 2 つのピークが見られた。それぞれの活性画分を Fr-L、Fr-A とし、さらにゲル濾過クロマトグラフィによって精製した。2 つの活性の精製倍率は 157.8 および 194.7 となった。また Fr-L については Native-PAGE ゲル上のタンパク質染色と活性染色のバンドが一致した。Fr-L はロイシン (LNA) に対して強い分解活性を示し、Fr-A はアラニン (ANA) に対して強い分解活性を示した。両活性とも 40°C の温度処理で急激な低下が見られ、80°C で完全に失活した。また両者の至適温度、至適 pH は 37°C、pH 7 であった。Fr-L は  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  で活性促進されたの対し、Fr-A は  $\text{Na}^{+}$  で活性化された。両活性とも  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、SDS で著しい活性の低下が見られた。各種阻害剤試験の結果、Fr-L は SH 酵素、Fr-A はセリン酵素であることが示唆された。

## A-6 *Vibrio harveyi* ファージの分離と生化学的性状

<sup>0</sup>岡野翔・吉川毅・坂田泰造（鹿大水）

【目的】 *Vibrio harveyi* は代表的な魚病細菌であり、東南アジアにおけるウシエビ養殖等に被害を与えている。現在、抗生物質などの薬剤投与が行われているが、薬剤耐性菌の出現などの問題がある。その代替法の一つとして、バクテリオファージを用いたファージ療法が考えられる。しかしファージ療法にも様々な問題点があり、確立した方法とは言えないのが現状である。本研究は、ファージ療法に最適なファージ株を確立することを目的として、*V. harveyi* 感染ファージの分離とその性状解析を試みた。

【方法】 鹿児島湾周辺海水から *V. harveyi* ファージを 12 株分離した。*Vibrio* 属菌株を用いた交叉感染試験により分離ファージ株は 5 つのグループに分けられた。そのうち *V. harveyi* ATCC14126 株に感染性を示した 4 つのグループから各代表株（ $\phi$ H17-5c、 $\phi$ H17-7b、 $\phi$ H17-8b および  $\phi$ H17-9b）を選択した。代表 4 株を用いて電子顕微鏡（TEM）による形態観察および一段増殖実験（m. o. i=0.1）を行った。SDS-PAGE により濃縮ファージ粒子液のタンパク質を分画し、プロテインシーケンサを用いてタンパク質サブユニットの N 末端アミノ酸配列を決定した。N 末端アミノ酸配列を基に設計したプライマーを用いて、ファージ DNA の PCR 増幅を試みた。また、ファージ DNA の制限酵素断片長多型分析（RFLP 分析）によりファージ DNA の解析を行った。

【結果】 鹿児島湾周辺の海水から分離した *V. harveyi* ファージ 12 株は、感染パターンの異なる 5 つのグループに分けられた。代表 4 株のうち  $\phi$ H17-5c は尾部を有していなかったが、他の 3 株は尾部構造が観察された。一段増殖実験において  $\phi$ H17-7b と  $\phi$ H17-8b の放出量は 100 以上であったのに対し、 $\phi$ H17-5c と  $\phi$ H17-9b は 10 以下であった。SDS-PAGE の結果、濃縮ファージ粒子液中には 1 本または 2 本の主要バンドと複数の微少バンドが検出された。全てのファージ株に共通した約 38 kDa のタンパク質バンドはアミノ酸配列の相同性検索の結果、宿主菌由来であることが示された。一方、約 29 kDa のアミノ酸配列に基づくプライマーを用いた PCR ではファージ DNA を鋳型とした増幅が見られた。またファージ DNA の RFLP 分析によりファージグループ間に断片長多型が認められた。

## A-7 カタクチイワシ主体 MP がカンパチの成長と抗病性に及ぼす影響

○中西健二・米村輝一朗・長野昌子・岩田一夫・毛良明夫（宮崎水試）  
村田 寿・吉田照豊（宮崎大農）

【目的】カタクチイワシの養殖用餌料への利用について、ブリではカタクチイワシ単独給餌をするとビタミン B1 欠乏症が発症し死亡することが明らかにされているが、カンパチの健康や成長への影響については十分に検証がされていない。そのため、カンパチ養殖経営者の中にはブリと同様の栄養性障害を危惧しつつも、カンパチに給餌される餌の調整に関しては、経営者の経験に頼っている状況にある。

そのため、宮崎水試は宮崎大学と共同で、カタクチイワシを餌料としてカンパチを養成した場合の、ビタミン B1 欠乏症の発症と成長や抗病性に及ぼす影響について研究を実施している。

昨年度、当歳魚を用いた試験の結果、①カンパチもブリと同様にビタミン B1 欠乏症を発症するが、発症までの期間がブリより遅延すること、②餌料に一定量のビタミン B1 を添加することでその発症を抑えることが可能であることを明らかにした。

今年度は、1 歳魚を用いてビタミン B1 欠乏症発症までの期間及びビタミン B1 の適正投与量を把握するために試験を行った。

【方法】海面小割生簀に 1 キロサイズのカンパチを收容し、6 月～11 月までの 5 か月間飼育を行った。カタクチイワシと配合飼料を 4 : 1 で混合したモイストペレット(MP)に、ビタミン B1 添加剤を MP100g 中にそれぞれ 0mg(1 区)、1.25mg(2 区)、2.50mg(3 区) 添加した 3 種類の試験餌料を作製し、週 5 日間飽食給餌を行った。そして、試験開始時及び 1 か月経過毎に体重測定を実施するとともにサンプリングを行った。さらに、3 か月経過時及び 5 か月経過時には抗病性試験を行った。

【結果】5 か月間の飼育ではビタミン B1 欠乏が原因と考えられる死亡は発生しなかったものの、試験開始から 3 か月経過時以降、1 区(ビタミン B1 無添加)の飼育成績が悪化し、試験終了時の平均体重は 1 区とほかの区(2・3 区)間で有意な差が認められた。さらには、抗病性試験において、3 か月経過時には各試験区間の死亡率に差は認められなかったが、5 か月経過時には 1 区比べて 2 区の死亡率は有意に低かった。

以上のことから、カンパチ 1 歳魚においてはビタミン B1 無添加のカタクチイワシ主体 MP で飼育すると、ビタミン B1 欠乏による死亡は発生しないものの、成長及び飼料効率が悪くなるとともに、抗病性の低下による感染症のリスクが高まることが示唆された。しかし、2・3 区の平均体重及び抗病性試験結果には有意な差が認められなかったことから、カタクチイワシ主体 MP にビタミン B1 添加剤を 1.25～2.50mg/100gMP 添加すれば、ビタミン B1 欠乏による弊害を予防できることが明らかとなった。

## A-8 養殖ブリの抗酸菌症に対するホルマリン不活化ワクチンとストレプトマイシン投与の有効性試験

○平江多績，村瀬拓也（鹿児島水技セ），Sompoth Weerakun,青木菜緒，倉田修，畑井喜司夫（日獣大）

【目的】*Mycobacterium marinum* を原因菌とする養殖ブリの抗酸菌症（ミコバクテリア症）は南九州の養殖場で発生が確認されている。一部地区では本疾病が夏から秋に発生し大きな被害を出す年もある。病魚は体色の黄色化や腹水の貯留による腹部膨満がみられ，脾臓や腎臓に多数の白色結節が観察される。本疾病は病変部のチールネルゼン染色により赤色の桿菌を確認することで容易に診断できるが，現在，有効な治療薬は知られていない。そこで，本症に対する予防・治療薬について検討するために，ホルマリン不活化ワクチンとストレプトマイシン投与の有効性を検討した。

【方法】ブリを FRP 製 1 トン水槽に各 20 尾収容し，人為感染させるために *Mycobacterium marinum* (NJB0419) を 1 尾あたり  $5.6 \times 10^4$ CFU 接種した。ワクチン試験区にはあらかじめ感染の 3 週間前に不活化前生菌数換算  $5.9 \times 10^8$ CFU/mL を 0.2%ホルマリン添加 PBS で懸濁させ 0.1ml を腹腔内へ接種しておいた。ストレプトマイシン試験区には感染 4 時間後または 10 日後から魚体重 1kg あたり 1 日量 25mg と 50mg を市販 E P に展着させて経口投与し，それぞれの対照区と死亡尾数について有意差を求めた。

【結果】感染後 28 日目から本症による死亡が始まり，50 日目で終息した。病魚は体色の黄色化や臓器に白色結節がみられ，臓器からは原因菌が確認された。ワクチン投与区では対照区と比較して死亡尾数に有意な差は得られなかったが，ストレプトマイシンを，感染 4 時間後から 50mg 投与した試験区は対照区と比較して死亡尾数が有意に低く，有効性が示唆された。

## A-9 クルマエビにおける WSDV に対する DNA ワクチンの開発

○園田航平、河野智哉、酒井正博（宮崎大 農）

### 【目的】

急性ウイルス血症(WSD)は、世界各国のエビ養殖現場に甚大な被害を与えているウイルス病の一つである。しかし、現在までに効果的な対処法は確立されておらず、ワクチンの開発が望まれている。これまで無脊椎動物の免疫機構は自然免疫が中心と考えられていたが、近年 WSDV のエンベロープタンパク質である VP28 の組み換え体の接種によって、WSDV に対する防御能が増加することが報告されている。

DNA ワクチンは、抗原コード遺伝子を発現ベクターへ組み込み、宿主体内で抗原タンパク質を発現させるワクチンである。水産分野では、DNA ワクチンの研究は魚類においてのみ行われており、甲殻類においてはまだ報告されていない。そこで、本研究では、クルマエビにおける、WSDV に対する DNA ワクチンの開発を試みた。

### 【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。続いて、増幅した VP28 遺伝子を pCMV ベクターに組み込み、ワクチン用のプラスミド DNA を作製した。作製したワクチンの有効性は、ワクチン接種 1 週間後に WSDV で攻撃試験を行い、コントロール区との累積死亡率の比較によって検討した。さらに、ワクチン接種から攻撃試験までの期間を 1 ヶ月に延ばし、ワクチンの有効性の持続期間を検討した。

### 【結果】

ワクチン接種 1 週間後における攻撃試験の結果、ワクチン区の累積死亡率は対照区 (PBS 区)と比較して有意に低く、ワクチンとしての有効性が確認された。しかし、ワクチン接種 1 ヶ月後の攻撃試験では、対照区とワクチン区の累積死亡率に有意な差は見られず、ワクチン効果の持続は確認できなかった。

## A-10 魚類病原性 *Streptococcus dysgalactiae* の分子疫学および薬剤感受性調査

○鵜瀬直樹（宮大農）・野本竜平（鹿大連合農）・米村輝一郎・中西健二  
（宮崎水試）・

平江多績・村瀬拓也（鹿児島水技セ）・伊丹利明・吉田照豊（宮大農）

【背景・目的】2002年に Lancefield C 群の *Streptococcus dysgalactiae*(GCSD)を原因細菌とするレンサ球菌症が初めて認められ、既に5年が経過した。現在では大きな被害となっている。しかし、被害が甚大であるにもかかわらず、本疾病に対する疫学調査の報告は少ない。本疾病の対策としては現在のところ抗菌剤が用いられているが、魚類由来 GCSD に関する薬剤感受性の知見についても乏しいのが現状である。本研究では、国内、国外より分離された魚類由来菌株 GCSD の分子疫学的研究および薬剤感受性調査をおこなった。

【材料・方法】供試菌株として2002年から2007年にかけて西日本のブリ属魚類養殖場にて死亡した魚類から分離された GCSD 約250株と台湾のボラより分離された同種菌株を用いた。国内外の菌株の分子疫学的比較をバイアス正弦電場ゲル電気泳動法にて行った。薬剤感受性試験は海産魚類養殖において使用される、アンピシリン、エリスロマイシン、リンコマイシン、オキシテトラサイクリン(OTC)およびフロルフェニコールについて最小発育阻止濃度を測定した。OTC耐性が確認された菌株について耐性遺伝子の探索を試みた。

【結果・考察】分子疫学的比較の結果、国内分離菌株において地域ごとによる遺伝子型がみられた。また台湾由来菌株と同タイプの遺伝子型が、日本で2006年に分離された GCSD で確認された。このことは本疾病の海外からの流入の可能性を示唆しており、養殖魚類の種苗の導入の際には注意が必要であると考えられた。薬剤感受性試験の結果、調査した菌株のうち多くの菌株が OTC に耐性化していた。その他の抗生物質については殆どの菌株が感受性を示した。また、OTC に耐性化した菌株の殆どは耐性遺伝子 *tet(M)* を保有していた。

## A-11 新型レンサ球菌症の新地域・新魚種での発生事例について

○村瀬拓也・平江多績（鹿児島県水技センター）、仁部玄通（鹿児島県水産振興課）、  
吉田照豊・野本竜平・鶴瀬直樹（宮崎大学農学部）

【目的】西日本の海面養殖に多大な被害をもたらしていた従来型レンサ球菌症はワクチンの投与によりその被害を低減化することに成功したが、同じような病状を示す新型レンサ球菌症については未だ被害の拡大が続いている。

鹿児島県では平成15年から新型レンサ球菌症の発生を確認しているが、特徴としてブリ・カンパチでの発生しか確認されていない(日本国内)こと、高水温(25℃以上)時に被害が多くなることが知られている。

そこで、近年の海水温の上昇に伴い、これまでに新型レンサ球菌症の発生が見られなかった地域や魚種について被害が拡大していないかを把握する。

【方法】鹿児島県水産技術開発センターに持ち込まれた病魚について一般魚病検査を行い、スタンプ標本・培地展開にてレンサ球菌を確認した場合、ランスフィールド血清型を判断するパストレックスストレップ(バイオラッド社製)を使用して新型レンサ球菌症の確定診断を行う。また、発生箇所での海水温についてデータの収集を行う。

【結果】魚種では本年9月にマアジで、地域では10月に東シナ海側で新たに新型レンサ球菌症と診断する事例があった。また、ヒラマサで新型レンサ球菌症の発生を確認したとの情報を得ている。

海水温は東シナ海側で9、10月にこれまで集積した数値で最も高い値を記録した。データは水産技術開発センターで集積しているフェリー情報を使用した。



## A-12 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* の遺伝疫学的研究

○壹岐美晴・山野佳那(宮崎大・農)・中西健二・米村輝一朗(宮崎水試)・平江多績(鹿児島水技セ)・福田穰(大分水試)・中岡典義(愛媛水試)・金井欣也(長崎大)・伊丹利明・吉田照豊(宮崎大・農)

【目的】主にブリ属魚類に被害をもたらす類結節症は、海産魚類養殖において重要な疾病であるが、原因細菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*P.p*) の疫学的研究は少ない。そこで本研究では、1984 年以降に分離された *P.p* 株の遺伝型及び薬剤感受性の動向を調べた。また、アンピシリン(ABPC)耐性 *P.p* 株が持つ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生能の確認及び *bla* (耐性に関与する遺伝子) の検出を行った。

【方法】1984~2007 年に四国・九州地方で養殖中の病魚から分離された *P.p* 319 株を供試した。遺伝型別は、供試菌株を制限酵素 *Apa* I または *Sma* I で処理後、バイアス正弦電場ゲル電気泳動(BSFGE)で泳動パターンを比較した。薬剤感受性試験は、寒天平板希釈法で ABPC、ビコザマイシン、フロルフェニコール、オキシリン酸、オキシテトラサイクリン(OTC)、ノボビオシン、チアンフェニコール(TP)、スルフィゾゾールに対する最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生能は、セフィナーゼディスクを用いて確認した。*bla* の検出については、Morii *et al.* (2004) によって決定された塩基配列から作成したプライマーを用いて PCR を行った。

【結果】BSFGE の結果、*P.p* は *Apa* I で 30、*Sma* I で 28 の泳動パターンにそれぞれ分けることができた。薬剤感受性試験の結果、MIC 分布は ABPC、OTC、TP については二峰性、他の 5 薬剤については一峰性であった。 $\beta$ -ラクタマーゼは ABPC 耐性株全てで陽性反応が確認された。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株について *bla* 検出 PCR を行った結果、ほとんどの菌株でバンドが検出された。

## A-13 日本の養殖海産魚類から分離された *Lactococcus garvieae* の疫学的解析

○古川三記子（宮崎大農）・米村輝一郎・中西健二（宮崎水試）・福田穰（大分水試）・平江多績・村瀬拓也（鹿児島水技セ）・伊丹利明・吉田照豊（宮崎大農）

**【目的】** 近年の養殖対象魚種の多様化に伴い、ブリ属以外の魚種にも *Lactococcus garvieae* 感染症の被害が認められており、本症ワクチンが普及したブリ属魚類養殖においても未だ被害の報告がある。本年度日本水産学会春季大会では、バイアス正弦電場電気泳動（BSFGE）による遺伝子型別解析の結果から、ブリ属由来株の多くが S1・A1 の遺伝子型に分類されたのに対して、ブリ属以外の魚種由来の主要な遺伝子型が S17・A5 型であったことを報告した。そこで本研究では 2007 年に分離された菌株の BSFGE 解析に加え、S17・A5 型に分類された菌株の抗原解析およびワクチンの有効性について検討した。

**【方法】** 1980 年から 2007 年までの間に西日本を中心とした養殖場において分離された *L. garvieae*（約 400 株）を供試菌株として使用した。BSFGE 解析は制限酵素 *Sma* I および *Apa* I を用いて行った。抗原解析はゲル内沈降反応を試みた。ワクチン有効性試験はカンパチ（平均体重：868g）を用い、KG9408(KG-型)ホルマリン死菌を抗原として免疫した。免疫 14 日後、KG9408(S1・A1 型)、NA7905（S1・A1 型;2007 年分離株）および KT07SA3（S17・A5 型;2007 年分離株）をそれぞれ  $10^6$ CFU/FISH とするよう供試魚腹腔内に注射した。攻撃 7 日後に血液、腎臓および脳から細菌分離を行い、保菌の有無を調査した。

**【結果】** BSFGE 解析の結果、*L. garvieae* は *Sma* I 処理時では S1~S18 型までの 18 タイプ、*Apa* I 処理時では A1~A5 型までの 5 タイプに分類された。2005 年に初めて確認された S17・A5 型は年々増加傾向にあった。ゲル内沈降反応の結果 KT05A1（S17・A5 型）は、S1・A1 型と一部異なる抗原を保有していた。ワクチン有効性試験においては、KG9408(S1・A1 型)および NA7905（S1・A1 型）攻撃区では、保菌魚は全く認められなかったが、KT07SA3（S17・A5 型）攻撃区では、攻撃後の一部の魚から *L. garvieae* が分離された。

## B-1 トラフグ精巣セルトリ細胞の培養系の開発

○新居早也佳・李 敬勲・山口明彦・松山倫也（九大院農）

【目的】脊椎動物では、精巣のセルトリ細胞に *DMRT1* (*Doublesex-Mab3 related transcription factor 1*) と呼ばれる転写因子が発現し、未分化生殖腺の精巣への分化、またその後の精巣の発達や維持に重要な役割を果たしているが、その発現および作用機構については不明な点が多い。当研究室では、ゲノム情報が整備されているトラフグ (*Takifugu rubripes*) を材料として、魚類生殖腺の分化機構を解析しており、これまでに、トラフグ *DMRT1* が分化した精巣のセルトリ細胞で強く発現し、精原細胞の増殖に関与する可能性を示した。したがって、セルトリ細胞の培養系が確立できれば、*DMRT1* の機能解析を通じて *in vitro* での精原細胞の増殖、分化の制御が可能になると考えられる。また応用としては、培養精原細胞を用いた遺伝子導入を目的とした精子ベクターの開発にも役立つことが期待できる。そこで本研究では、トラフグ精巣セルトリ細胞の培養系の確立を目的として、培地添加物などの初代培養条件の検討や、培養した細胞の機能維持の評価を行なった。

【方法】①初代培養条件の検討：10～16 ヶ月齢のトラフグから精巣を摘出し、酵素の種類、処理時間について、条件検討を行なった。得られた細胞集団（生殖細胞やセルトリ細胞を含む体細胞）は、雌雄や発達ステージの異なるフグ血清（排精中、排卵後、10～16 ヶ月齢）を加えた L-15 培地（5%FBS）中で、20℃で培養した。②セルトリ細胞の機能維持の評価：貪食能テスト、および RT-PCR による *DMRT1* の発現解析を行い、初代培養におけるセルトリ細胞の機能維持を評価した。また、*DMRT1* 以外のセルトリマーカー遺伝子の発現も RT-PCR によって解析した。

【結果】培養条件検討の結果、0.05% collagenase type II で 6 時間処理すると、最も高い細胞の回収率、生存率が得られた。また、フグ血清の添加により増殖促進効果が見られたが、血清の種類によって細胞形態に差がみられた。培養細胞には貪食能が見られ、さらに *DMRT1* が発現していたことから、セルトリ細胞の機能維持が確認できた。

## B-2

### 未成熟期トラフグの脳下垂体における 生殖腺刺激ホルモン(GtH) mRNA の発現解析

○重松 亨・李 敬勲・新居早也佳・Harunur Rashid・  
山口明彦・松山倫也 (九大院農)

【目的】生殖腺刺激ホルモン(GtH)は、共通の $\alpha$ 鎖と特異的な $\beta$ 鎖からなるヘテロ 2 量体構造をもつ糖タンパク質ホルモンで、FSH(濾胞刺激ホルモン)と LH(黄体形成ホルモン)が存在する。成熟期の魚類では、脳下垂体から放出された GtH は生殖腺に局在する受容体と結合した後、種々の性ステロイドホルモンの合成を介して配偶子形成を制御すると考えられているが、未成熟期での GtH の機能については不明である。トラフグはゲノム情報が利用できることに加え、年 1 回産卵型で、配偶子形成が同調して進行するため、GtH の合成、分泌パターンは単純であると考えられ、生殖腺の分化、発達における GtH の機能解析に有利なモデル種になると考えられる。本研究では、魚類における未成熟期の生殖腺に対する GtH の作用機構解明のための第一歩として、稚魚期以降の未成熟トラフグを材料に、脳下垂体における GtH $\alpha$ 、FSH $\beta$ 、LH $\beta$  mRNA の発現解析を行った。

【材料と方法】70, 100, 130 日齢および 300 日齢のトラフグ仔稚魚より、脳下垂体と生殖腺を摘出した。脳下垂体における各 GtH サブユニット(GtH $\alpha$ 、FSH $\beta$ 、LH $\beta$ )の発現は *in situ* hybridization (ISH) 法、および RT-PCR 法で解析した。また生殖腺はブアン固定し、パラフィンによる組織切片標本作製した後、顕微鏡観察によって発達ステージを決定した。

【結果】ISH 法では、FSH $\beta$ 発現細胞が 300 日齢(雌、無卵黄の卵母細胞期;雄、精子形成期)で確認されたが、70 日齢(雌、卵原細胞期;雄、精原細胞期)では認められなかった。LH $\beta$ は 70 日齢、300 日齢共に確認できなかった。一方、RT-PCR 法では、FSH $\beta$ の発現が 70 日齢から 300 日齢の全時期で確認され、LH $\beta$ の発現は 300 日齢でのみ確認された。ISH 法、RT-PCR 法共に GtH $\alpha$ の発現は全個体で確認された。以上の結果から、トラフグにおいては FSH が雌雄両生殖腺の初期の発達に関与している可能性が示された。現在、性分化期前後(30-50 日齢)での GtH サブユニット、および生殖腺での GtH レセプター mRNA の発現を調べている。

### B-3 性転換に伴うホシササノハベラの脳下垂体における 生殖腺刺激ホルモン (GtH) mRNA 発現量の変化

○入江 奨・北野 載・山口明彦 (九大院農)・太田耕平 (ハワイ大医)・松山倫也 (九大院農)

【目的】ホシササノハベラ *Pseudolabrus sieboldi* は雌性先熟の性転換魚であり、飼育下で計画的に性転換を誘導できるため魚類の性転換機構を研究する上でのよいモデル種となる。我々のこれまでの研究により、本種のメスから二次オスへの性転換では、生殖腺におけるステロイド合成経路がアンドロステノン (AD) を分岐点として、AD → エストロン (E1) → エストラジオール-17β (E2) のエストロゲン合成経路から、AD → テストステロン (T) → 11-ケトテストステロン (11-KT) へのアンドロゲン合成経路へと転換し、11-KT により卵形成系から精子形成系へと移行することが明らかにされた。生殖腺におけるステロイドの合成は、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GtH) により制御されていると考えられているが、魚類の性転換時における GtH の役割はほとんど明らかにされていない。GtH は、共通のα鎖と特異的なβ鎖からなるヘテロ 2 量体構造をもつ糖タンパク質ホルモンで、FSH (濾胞刺激ホルモン) と LH (黄体形成ホルモン) が存在する。本研究では、本種の性転換に関わる GtH の機能を明らかにするために、飼育下で性転換を誘導した個体を用いて、脳下垂体における FSHβ および LHβ サブユニット mRNA の発現量を解析した。

【方法】メス、性転換前期 (Phase1)、性転換後期 (Phase2) および二次オス、各 4 個体より脳下垂体を採取した。脳下垂体から total RNA を抽出し、cDNA 合成を行った後、cDNA を鋳型として本種の FSHβ および LHβ 遺伝子配列から設計した特異的プライマーを用い、Real-Time PCR System により FSHβ および LHβ mRNA の発現量を測定した。

【結果】LHβ mRNA 量は、性転換過程を通して変化が見られなかった。一方、FSHβ mRNA 量はメスから Phase2 にかけて約 3 倍増加し、その後二次オスになると減少し、メスと同等の値となった。以上の結果より、本種の性転換を誘導するステロイド合成経路の転換には FSH が関与していることが示唆された。

## B-4 抗リン酸化ラミンペプチド抗体を用いたキンギョ 卵母細胞に存在するラミンキナーゼのスクリーニング

○岩谷美穂・山口明彦・松山倫也（九大院農）

【目的】核ラミナは細胞の核膜を裏打ちして支えており、中間径繊維に属するラミン蛋白質の重合によって構築されている。体細胞分裂前期にラミンは cdc2 キナーゼ（MPF）によりリン酸化され、核ラミナの脱重合に続いて核膜崩壊が起き、細胞周期が進む。一方、魚類の卵母細胞は卵黄蓄積後、第一減数分裂前期のステージで停止している。この時期の核は巨大であり卵核胞（GV）と呼ばれる。GV ラミナを構成するラミンは体細胞型ラミン（A, B1, B2）と異なり、ラミン B3 である。キンギョの卵成熟では MPF が引き金となり卵核胞崩壊（GVBD）が起き、ラミン B3 は脱重合する。しかし、卵成熟前のキンギョ卵母細胞（減数分裂 G2 期）では MPF 活性のない状態にもかかわらず、重合したラミン B3 の一部はすでにリン酸化を受けた状態でラミナに存在している。これは、卵母細胞では cdc2 キナーゼ以外の未知のキナーゼがラミン B3 のリン酸化を行っていることを示唆する。本研究では卵母細胞に存在するこの新規ラミンキナーゼを同定することを目的とした。

【方法】ラミン B3 を産生する大腸菌に、キンギョ卵母細胞由来の発現ファージ（cDNA ラミブラリー）を感染させ、抗リン酸化ラミンペプチド抗体を用いてイムノスクリーニングを行った。その結果、ラミンキナーゼ活性を持つ 35 個のクローンが得られたので、その塩基配列を解析した。

【結果】得られたクローンでキナーゼの活性を持つものは、CDC-like kinase 4（CLK4a, b）、SR-rich protein kinase 1（SRPK1a, 1b）、dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases（DYRK2, 3）、Pim-3 kinase に分類できた。このうち CLK4、SRPK1 は SR に富む領域（SR ドメイン）を認識しリン酸化するキナーゼであり、ラミン B3 の SR ドメインを認識しリン酸化したと考えられ、これらのキナーゼが生体内で機能する可能性が示された。

○野中誠子・柚本智軌・中西照幸<sup>1</sup>・乙竹充<sup>2</sup>・中尾実樹  
(九大院農、<sup>1</sup>日大生物資源、<sup>2</sup>養殖研)

**【目的】** CD4 はヘルパーT 細胞(Th)上の T 細胞レセプター(TCR)のコレセプターである。体内に侵入した異物を貪食した樹状細胞などから Th が抗原提示を受ける際に、CD4 は抗原提示細胞上の主要組織適合抗原複合体(MHC)クラスⅡと結合し、TCR の働きを補助する。哺乳類 CD4 は4つの Ig 様ドメインから構成されているが、近年、フグ・ニジマス・ナマズなどの魚類で4つの Ig 様ドメインから構成される CD4 様分子と、2つあるいは3つの Ig 様ドメインから構成される第2の CD4 様分子が発見された。これら2種の CD4 様分子のどちらが哺乳類 CD4 に対応する機能を持つかは明らかにされていない。本研究では T 細胞の機能解析に有用なギンブナを用いて、CD4 様遺伝子の塩基配列の決定・臓器発現解析・刺激白血球での発現解析を試みた。

**【方法】** 魚類で既知の2種の CD4 様分子(CD4L1・CD4L2)の塩基配列をアライメントし、縮重プライマーを設計した。ギンブナの胸腺からトータル RNA を抽出し、cDNA を合成した。これをテンプレートとして RACE 法により塩基配列を決定した。得られた配列から CD4L1・CD4L2 それぞれに特異的なプライマーを設計し、各臓器における発現解析を行った。また、ギンブナの末梢血から分離した白血球を PHA で刺激し、刺激から 0, 12, 24 時間後にトータル RNA を抽出し、cDNA を合成した。これを用いて刺激白血球における CD4L1・CD4L2 の発現応答を解析した。

**【結果】** ギンブナでは第1の CD4 として CD4L1、第2の CD4 として CD4L2-1・CD4L2-2 が同定された。CD4L1 は4つの Ig 様ドメイン、CD4L2-1 と CD4L2-2 は3つの Ig 様ドメインから構成されていた。また各臓器における発現解析の結果、CD4L1 は胸腺で最も強く発現し、CD4L2 は胸腺よりもむしろ脾臓や腎臓で強く発現していることが明らかとなった。末梢血白血球においては、PHA 刺激により CD4L1 の発現量が 1.3 倍に増加したが、CD4L2-1 は 0.8 倍に減少し、CD4L2-2 は 1.3 倍に増加した。以上の結果から、CD4L1 は T 細胞で発現し、CD4L2 は T 細胞以外の免疫細胞でも発現している可能性が推測される。

## B-6

## コイの I 型インターフェロン(I-IFN)

### の構造および機能解析

○北尾陽一・河野智哉・酒井正博（宮崎大農）

#### 【目的】

哺乳類において、I 型インターフェロン（I-IFN）はウイルスに対する免疫反応において重要な役割を果たすとともに、細菌感染においてもマクロファージやナチュラルキラー細胞の活性化といった多様なメカニズムによって免疫賦活作用を発揮する重要なサイトカインである。本研究では、コイから I-IFN 遺伝子を分離し、構造および機能について解析を行った。

#### 【方法】

I-IFN 遺伝子を分離するために、免疫賦活剤で刺激したコイの頭腎から cDNA ライブラリーを作製した。次に、既知の I-IFN の遺伝子配列をもとに縮重プライマーを作製し、cDNA ライブラリーを鋳型に PCR を行い I-IFN のクローニングを試みた。また、RACE 法によってコイの I-IFN のアミノ酸をコードする領域の塩基配列を決定した。得られたコイの I-IFN のアミノ酸配列をもとに、他の魚種の I-IFN との相同性および系統解析を行った。次に *in vitro* のタンパク質合成系を用いてレコンビナントコイ I-IFN タンパク質を作製した。このレコンビナントコイ I-IFN タンパク質を、コイの頭腎細胞に作用させその機能について検討した。

#### 【結果】

二つの I-IFN 遺伝子（CL1、CL2）をクローニングした。コイの I-IFN 遺伝子は CL1 で 183 個、CL2 では 186 個のアミノ酸残基から構成されていた。二つの I-IFN 遺伝子の相同性は 75.2% であった。ゲノム構造は、他の硬骨魚類と同様に 5 つのエキソンと 4 つのイントロンから構成されていた。レコンビナントコイ I-IFN タンパク質を、コイの頭腎細胞に作用させた結果、1 時間後に I-IFN 誘導物質（Mx）の発現量が最大になり、その後減少することが確認された。



## B-7 ペントシジンを指標とする後期糖化反応の阻害活性評価

○山波千春・幡手英雄・若松真至・柚木給美・村田 寿（宮崎大農）

**【目的】**タンパク質糖化反応（メイラード反応）は食品だけでなく、生体内でも進行し、その後期産物（AGE）は糖尿病合併症などの要因と考えられている。そのため、AGE は食品化学や医薬理学分野でも広く研究されており、有効な阻害剤の開発が期待されている。AGE 阻害活性は、一般にメイラード反応に伴う蛍光特性を利用して評価されているが、検出された蛍光物質の全てが有害な AGE であるとはいえない。そこで、本研究では AGE 阻害活性をより厳密に評価するために AGE の一種で糖尿病合併症などの指標とされているペントシジンに着目し、その生成抑制力の測定を試みた。同時にペントシジンの HPLC 法による分離・定量法も検討した。

**【方法】**ペントシジンは、同物質を優先的に合成できる BOC-Arginine、BOC-Lysine および D-Ribose を用いた系（A-L-R 系）およびウシ血清アルブミン（BSA）と D-Ribose を用いた系（BSA-R 系）の二つの反応系で生成された。これらの反応系に AGE 生成阻害剤であるアミノグアニジンやハーブエキス（タイム抽出液）を添加し、60℃で適時反応させた。反応終了後、蛍光（Ex 370 nm/Em 440 nm または Ex 330 nm/Em 375 nm）を測定し、阻害剤の添加による蛍光強度の減少から AGE 阻害活性（%）を求めた。一方、反応液に含まれるペントシジンは、両反応液を加水分解、Sep-Pak Cartridge 処理を行った後、逆相系 HPLC 法（Wako-Wakosil-II 5C18 AR）で分離、定量した。

**【結果】**ペントシジンを優先的に合成可能な A-L-R 系でペントシジン生成量を調べたところ、同物質によるものと思われる蛍光特性は経日的に増加し、60℃、6 日間の反応が阻害活性の評価に適切であることがわかった。同反応系に AGE 生成阻害剤を添加すると、蛍光強度の明瞭な低下が確認され、AGE 阻害活性を測定できることが示唆された。このことは HPLC を使用して測定したペントシジン量からも確認された。一方、タンパク質を反応系に用いた BSA-R 系では、ペントシジン由来の蛍光強度の変動は認められなかったものの、HPLC 法でペントシジン生成量は測定できた。以上の結果から、A-L-R 系でペントシジン生成量を指標とした阻害活性を測定することで、効率的でより厳密な AGE 阻害活性が評価できるものと思われた。また、生体内のペントシジンの定量に本研究の HPLC 法が有効であることも示唆された。

## B-8 大阪湾底質のエストロゲン活性強度分布に関する研究

○木藤麻美・小山次朗（鹿大水）・田中博之（水総セ・瀬戸内水研）

### 【目的】

現在、女性ホルモンを含むエストロゲン様物質による魚類内分泌攪乱現象が国内外で観察され、大きな社会問題となっている。多くのエストロゲン様物質は底質から検出されており、“底質-ベントス-魚類”という食物連鎖を通じて魚類に影響する可能性がある。本研究ではエストロゲンレセプター・バインディングアッセイ法により、大阪湾表層底質抽出物のエストロゲン活性強度を求め、その結果から作製したエストロゲン活性強度分布図により、大阪湾におけるエストロゲン様物質による汚染状況を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

瀬戸内海区水産研究所より分与された、大阪湾全域 28 地点の底質(スミスマッキンタイア-採泥器で採取)を乾燥させ、その 1.00g にジクロロメタン、メタノールを加えてエストロゲン様物質を超音波抽出した。抽出液の溶媒を 5ml のジメチルスルホキシドに置換し、さらにそれを 300 倍希釈した液を試験液とし、(財)化学物質評価研究機構より分与されたメダカエストロゲンレセプター(ER- $\alpha$ )によるバインディングアッセイ法により、そのエストロゲン活性強度を測定した。ER- $\alpha$  と [ $^3\text{H}$ ]・E2 との結合率から求めた結合阻害率(100-結合率)をエストロゲン活性強度とし、その結果をGISソフトに取り込み、底質のエストロゲン活性強度分布図を作製した。

### 【結果】

分布図を作製した結果、湾奥東北部 5 地点で 50~100% 高い阻害率が認められた。300 倍希釈した試料にも拘らず高い数値を示したということは、エストロゲン活性強度が非常に高いことがうかがえる。付近には淀川、大和川、大津川が流入していることから、流入河川による生活排水や工場排水などの負荷があったものと考えられる。一方、湾中部では阻害率が 20~30% 程度と比較的低く、エストロゲン様物質による汚染の少ないことが推察された。

## B-9

### 黒はんぺんの物性分析と特徴

○大橋宏昭<sup>1</sup>、池ノ谷政利<sup>2</sup>、市川寿<sup>1</sup>（<sup>1</sup>長崎大水産、<sup>2</sup>焼津蒲鉾商工協）

【目的】 近年、我国では伝統食品のレッドデータブック作製が始まるなど郷土色豊かな加工品に関心が持たれている。静岡県の名産練り品に、サバやイワシを原料としたゆで蒲鉾、“黒はんぺん”がある。黒はんぺんは、江戸期より愛顧されてきたとされる。昭和初期に専業加工業が起こり、焼津市を主要生産地として年間 2,300t 程の生産量があるが、専業生産者数 6 軒を数えるばかりとなっており、この練り製品の調査と記録を残そうと考えた。黒はんぺんの、主として物性に関するキャラクターゼーションを行ったので報告する。

【方法】 試料は、市販の黒はんぺん 25 種を収集し、GS 値、JS 値、折り曲げテスト、水分含量、WHC、水分活性、pH、ハンター白度を調べた。また、赤身魚を原料とした練り製品（ゆで蒲鉾 4 種、蒸し蒲鉾 30 種、ちくわ 14 種、揚げ蒲鉾 14 種）および白身魚を原料とした板付け蒲鉾（14 種）について同様の性状を測定し、比較した。

【結果】 黒はんぺんの破断強度は高く、GS 値は一般的な赤身魚ちくわと同等であり、ゆで蒲鉾の 1.41 倍、蒸し蒲鉾の 1.25 倍だった。しかし、折り曲げテスト結果は、赤身魚練り製品では約 90%の試料が AA だったのに対し、黒はんぺんは 68%が C だった。また、黒はんぺんは、白身魚の板付け蒲鉾と同等かそれ以上の破断強度をもつものの、水分含量は白身魚板付け蒲鉾よりも 5%以上低かった。さらに、黒はんぺんの WHC は低く、赤身魚ゆで蒲鉾、蒸し蒲鉾の 0.94 倍、赤身魚揚げ蒲鉾の 0.87 倍、同ちくわの 0.83 倍だった。

これらの結果から、黒はんぺんは、硬いが脆い物性を有し、保水力が低い、これは原料魚肉のゲル形成特性を踏まえ、水分含量を高めずにゲル強度を確保しているためだと考えられる。また、黒はんぺんの物性値と 100g 当たり販売価格との間には相関がなかったことから、一般的な練り製品に見られるような、ゲル強度が商品価値に關与する程度も薄いものと見られる。

## B-10 ハマグリ の 定着・移動・成長と資源管理

○逸見泰久（熊本大・沿岸セ），梶原信輔（熊本大・自然科学），小林哲（佐賀大・農）

### 【目的】

ハマグリ *Meretrix lusoria* は日本各地の干潟で最も普通に見られる二枚貝であったが、現在は多くの地域で激減し、様々なレッドリストに絶滅の危険がある種として掲載されている。演者らは、福岡県糸島郡加布里湾と熊本市白川河口で、2006年1月より本種の定量採集を行っている。本講演では、ハマグリの生活史特性を紹介し、資源管理の可能性について議論する。

### 【方法】

生物の生活史を明らかにするには、できるだけ人為的影響ない場所で研究を行う必要がある。幸い、我々が調査地を行っている加布里では厳密な漁獲管理が行われており、ハマグリは殻長3cm以上に限定しても平均30個体/m<sup>2</sup>前後が生息している。一方、白川河口では乱獲のためか、ハマグリの密度は低い。

調査では、50cm四方のコドラートを調査地域に毎月30～50地点設置し、砂泥を1mmの篩でふるってハマグリを採集した。さらに、毎月、感潮域12地点で表層2cmをコア採泥し、稚貝の着底を調べた。

### 【結果】

稚貝は、冬季に主として河川内に出現し、成長するにつれて海域に移動した。稚貝の成長は遅く、孵化2年後の殻長は平均12mmに過ぎなかった。一方、成貝の成長は速く、2006年1月に殻長平均22mmの年級群は2007年7月には殻長平均35mmに成長した。成貝の生残率は高く、急激な成貝の密度減少は梅雨の降雨期や冬期にも見られなかった。

演者は、干潟が健全で乱獲がなければ、ハマグリはシオフキと並ぶ砂質干潟の優占種で、これらの保全は生態系を守る上でも重要であると考えている。白川河口では、漁獲圧が高く、稚貝に比べ成貝は極端に少なかった。ただし、現在明らかになりつつあるハマグリの生活史特性（比較的速い成長、低い死亡率、長い寿命、新規加入量の年変動）は、白川河口においてもハマグリの資源管理が有効であることを示唆している。

## B-11 日向灘におけるブリのアーカイバルタグ標識放流調査

福田博文(宮崎水試)・阪地英男(水研セ)・  
久野正博(三重科技セ水)・梶達也(高知水試)・  
青野怜史(高知県宿毛漁業指導所)・田中耕治(鹿児島水技開セ)

### 【目的】

ブリは日本周辺を広域に回遊する魚種と考えられており、近年のアーカイバルタグ(水温・水深・照度の測定値を蓄積し、毎日の位置を推定する)を用いた調査により、日本海側では3歳以上のブリが主産卵場である東シナ海と北海道沿岸との間を大回遊していることが明らかにされている。一方、太平洋側でも同手法により、3歳以上のブリが熊野灘・遠州灘～四国南岸を回遊している状況が明らかにされつつあるが、これは、熊野灘における放流調査の結果であり、他の海域では標識放流は行われていない。本研究では宮崎県北部の日向灘においてアーカイバルタグを装着したブリを放流し、日向灘に来遊するブリの回遊生態を明らかにすることを目的とする。

### 【方法】

平成19年2月20日、宮崎県延岡市浦城の大型定置網で漁獲された8～11kg級のブリ10尾にアーカイバルタグ(LOTEK LTD2310)を装着し、延岡市沖で放流した。

### 【結果】

平成19年12月現在で5尾が再捕されている。そのうち4尾が2月下旬から3月中旬にかけて日向灘を南下し、3尾が薩南海域へ達して4月～5月上旬までそこに滞留した。その後、2尾は日向灘を北上して5月上旬に大分県南部及び8月上旬に愛媛県瀬戸内海側で再捕され、残りの1尾は九州西岸～日本海を北上し5月下旬に石川県で再捕された。これらの結果と、日向灘で漁獲されるブリの成熟状態が完熟期にないこと、薩南海域における産卵時期(3月～5月)から、2月末に日向灘へ来遊してくるブリは薩南海域への産卵回遊群が主体であると推定された。

2月下旬から3月中旬にかけて日向灘を南下した4尾の遊泳水深は15m～40m、遊泳水温は17℃～18℃台であった。また、薩南海域では黒潮の影響による水温フロントにより移動が阻害されている様子がみられ、そのような際には水温勾配の緩やかな水深にまでダイビングしてフロントを通過すると考えられた。以上のことから、日向灘におけるブリの漁況と海況の関係解析において、表層海況による解析の有効性・重要性が示されるとともに、ブリの行動は水温環境の影響を強く受けていると考えられ、黒潮の離接岸による海況変動や17℃～18℃台の水温帯分布が漁海況解析のポイントになることが示唆された。

## B-12 ウニ類分布及び魚類のホンダワラ類採食と波浪流動条件との関係

○荒武久道・佐島圭一郎（宮崎水試）

・渡辺耕平（西日本オーシャンリサーチ）・吉田吾郎（瀬戸水研）

### 【目的】

串間市沿岸の鬢垂島東岸にはウニ類が高密度で生息し、比高の高い岩礁上面にはフタエモクが藻場を形成するが、それより低い周辺にはフタエモクは見られず無節サンゴモが優占している。一里崎周辺では秋季にヒラネジモクが魚類に採食されるが、その程度は浅所側ほど低い。これらの比高や水深の違いによる景観の相違は、植食動物の分布や採食に影響する波浪流動条件の相違である可能性がある。今回、鬢垂島東岸のウニ類分布、及び、一里崎周辺のヒラネジモク被食の程度と波浪流動との関係を検討したので報告する。

### 【方法】

鬢垂島東岸：ウニ類の分布は、2007年7月24日に岩礁上面と、周辺のそれぞれにおいて任意に設定した1×1mの観察枠10個のウニ類生息密度で評価した。流速は8月22日に岩礁上面と周辺において海底から5cm上で測定した。

一里崎周辺：調査は2007年9月11日にヒラネジモク藻場の上限から下限までの範囲の水深の異なる6点で行った。ヒラネジモク被食の程度は、概観及び藻体長の上位20個体の平均全長で評価した。流速の測定はヒラネジモク群落直上で行った。

流速の測定は、いずれの場合でもプロペラ式流速計を用いて、反復流動中の流速最大時に10回行った。

### 【結果】

鬢垂島東岸：藻場が形成される岩礁上面の流速（平均±SD=58.8±11.03 cm/s）は、周辺（31.0±9.37 cm/s）よりも大きかったが、岩礁上面にもムラサキウニ（12.5±5.15 個体/m<sup>2</sup>）、ナガウニ（2.5±1.78 個体/m<sup>2</sup>）、タワシウニ（92.0±39.30 個体/m<sup>2</sup>）が分布しており、ムラサキウニと、タワシウニではむしろ周辺よりも多かった（ともに U-test, p<0.001）。岩礁上面岩礁上面の高い流速はウニ類の分布を制限してはいなかったが、フタエモク採食を制限している可能性はある。

一里崎周辺：被食の程度の概観は浅所側で低く、深所側ほど高かった。ヒラネジモク藻体長と水深には相関は認められなかったが、水深1m付近を境として、浅所側で長く（TL：22.7～29.4 cm）、深所側で短かった（11.7～17.0 cm）。流速は水深とほぼ反比例し、水深が増すほど低かった。この藻場で見られるヒラネジモクの被食の程度の差は、相対的な流速の差で説明できる可能性がある。

