

魚病細菌 *Streptococcus iniae* のヒラメに対する  
病原性と免疫原性における莢膜の役割

長崎大学大学院生産科学研究科  
首藤公宏

*Streptococcus iniae* を原因菌とするヒラメ  $\beta$  溶血性レンサ球菌症はヒラメ養殖に多大な被害を与える細菌性疾病である。これまで本症の治療には抗菌剤が用いられて来たが、食の安全性や抗菌剤に対する耐性化が危惧されるため、ワクチンによる予防法の確立が求められるようになった。しかし本症の感染・発病メカニズムおよび防除メカニズムに関する知見は乏しく、有効なワクチンを開発するためにも防御抗原を特定する必要がある。ヒラメ病魚由来 *S. iniae* は血清学的に  $K^+$  type (莢膜保有) と  $K^-$  type (莢膜非保有) の 2 型に分類され、 $K^+$  type は強毒性で、 $K^-$  type は弱毒性であると報告されている。ヒラメに対する免疫試験では、 $K^+$  type のホルマリン死菌 (FKC) は有効であるが、 $K^-$  type FKC には効果が認められない。さらに  $K^+$  type のオートクレーブ抽出液に特異抗原が検出される。莢膜も特異抗原も  $K^+$  type に特異的なため、双方の関連性が示唆された。そこで本研究では、まず特異抗原を部分精製してその構造および免疫原性について調べた。次に、 $K^+$  type から特異抗原欠損変異株を作製し、特異抗原と莢膜の関係、およびヒラメに対する *S. iniae* の病原性と免疫原性における莢膜の役割について検討した。

(第一章) *S. iniae* NUF631 ( $K^+$  type) から部分精製した特異抗原をポリアクリルアミドゲル電気泳動後糖染色したところ、梯子状のバンドパターンが検出された。このことから特異抗原は単糖またはオリゴ糖の繰り返し構造をとる酸性多糖であると考えられた。一般に莢膜は酸性多糖で構成されることから、莢膜と特異抗原の関連性が強く示唆された。また、粗精製特異抗原でヒラメを免疫すると NUF631 の攻撃に対して若干の感染防御効果が得られたことから、特異抗原が防御抗原である可能性が考えられた。

(第二章) 染色体 DNA 間を移動しうる転移因子 (トランスポゾン) を利用して NUF631 (親株) から特異抗原欠損変異株を作製し、特異抗原と莢膜の関係を調べた。トランスポゾンの挿入により特異抗原欠損変異株が 11 株得られ、それらのオートクレーブ抽出液には酸性多糖が検出されず、莢膜も観察されなかった。また、トランスポゾンに隣接する DNA の塩基配列をシーケンスし相同性検索を行ったところ、11 株中 6 株はデータベース上の

ヒト由来 *S. iniae* の莢膜合成遺伝子群の構成タンパク、CpsH、ORF276、CpsH、CpsH、CpsM、CpsI と高い相同性を示した。以上のことから特異抗原は酸性多糖であり、莢膜の構成成分であると考えられた。

(第三章) 作製した変異株のヒラメに対する病原性とヒラメ腹腔内マクロファージに対する抵抗性について検討した。病原性試験で変異株は親株に比べて毒力が著しく低下しており、血管内接種された菌は腎臓に取り込まれた後生菌数が減少した。変異株は親株よりもマクロファージに貪食されやすく、貪食の際のマクロファージからの活性酸素の放出量も多かった。またマクロファージ内で生菌数が減少した。このことから *S. iniae* の莢膜はマクロファージの食作用および殺菌作用に抵抗する働きを持つと考えられた。

(第四章) 親株と変異株から FKC を作製し、莢膜の防御抗原としての役割を検討した。各 FKC で免疫したヒラメを親株で攻撃すると、親株免疫区の生残率 90 % に対して変異株免疫区の生残率は 20 % 以下であった。したがって、莢膜 (特異抗原) が防御抗原であると考えられた。また、各 FKC で免疫したヒラメから採取した血清をオプソニンとして、腹腔内マクロファージの貪食能と活性酸素放出能を検討した結果、変異株はどの血清でオプソナイズしても貪食率及び活性酸素放出量が高かったが、親株は抗親株血清でオプソナイズした場合のみ貪食率および活性酸素放出量が上昇した。また、各オプソナイズ菌を電顕観察すると、変異株では抗親株血清および抗変異株血清でオプソナイズした場合に菌体表面に電子密度の高い物質が観察されたのに対して、親株では抗親株血清でオプソナイズした場合にのみ莢膜表面に電子密度の高い物質が観察された。さらに親株の菌体に結合した血清成分を SDS-PAGE 後イムノブロットした結果、親株を抗親株血清でオプソナイズした場合のみ抗体が検出された。このことから親株 FKC で免疫した時に高い効果が得られるのは、抗莢膜抗体が菌体に結合し、マクロファージの食作用および活性酸素放出を促進するからであると考えられた。

以上のことから *S. iniae* の莢膜はマクロファージの食作用および殺菌作用に対する抵抗因子として本菌の病原性に関わっており、莢膜に対する抗体がマクロファージの食作用および殺菌活性を高め、感染防御に関わっていると考えられた。