

論文審査の結果の要旨

報告番号	博(生)甲 第114号	氏名	首藤公宏
学位審査委員会		主査	金井欣也
		副査	藤田雄二
		副査	吉越一馬
<p>・論文審査の結果の要旨</p> <p>首藤公宏君は平成14年3月に長崎大学水産学部を卒業し、同年4月に同大学大学院生産科学研究科博士前期課程に入学した。平成16年3月に前期課程を修了後、同年4月に同研究科博士後期課程に進学し、現在に至っている。</p> <p>首藤君は卒業研究及び博士前期課程において、魚病細菌 <i>Streptococcus iniae</i> の莢膜保有株に認められる特異抗原の性状解析及びトランスポゾン (Tn) を用いた莢膜欠損変異株の作出を行った。博士後期課程では、莢膜欠損変異株を用いて研究を進め、<i>S. iniae</i> の病原性及び免疫原性における莢膜の役割を明らかにしてきた。平成18年12月に主論文「魚病細菌 <i>Streptococcus iniae</i> のヒラメに対する病原性及び免疫原性における莢膜の役割」を完成させ、参考論文3編を添えて長崎大学生産科学研究科に博士(学術)の学位を申請した。</p> <p>長崎大学大学院生産科学研究科教授会は、平成18年12月20日の定例教授会において、予備審査委員会の審査結果に基づき、本論文を受理しても差し支えないと認め、学位審査委員を選定した。学位審査委員会は主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会で発表させるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成19年2月21日の研究科教授会に報告した。</p> <p><i>S. iniae</i> を原因菌とするレンサ球菌症は淡水魚及び海水魚の養殖における重要な疾病の1つである。本論文は、まず特異抗原の部分精製と性状解析及び莢膜欠損変異株の作出を行い、作出した変異株を用いて、特異抗原と莢膜の関係、変異株の病原性及びヒラメの生体防御に対する抵抗因子としての莢膜の役割、ならびに変異株の免疫原性及び防御抗原としての莢膜の役割を検討したものである。</p> <p>莢膜保有株の代表株である <i>S. iniae</i> NUF631 の培養菌のオートクレーブ抽出液から、セタブロン分画及びイオン交換クロマトグラフィーによって特異抗原を部分精製した。粗精製特異抗原はマイナスに帯電し、電気泳動で多糖が検出されたことから、本体が酸性多糖</p>			

であると推察された。粗精製特異抗原でヒラメを免疫すると弱いながらも免疫効果が認められた。

特異抗原と莢膜の関係を明らかにするため、Tn 挿入変異法を用いて NUF631 株から特異抗原欠損変異株を作出し、変異株の莢膜保有を調べた。その結果、得られた変異株 11 株は、いずれも莢膜を発現していなかった。このことから、特異抗原は酸性多糖であり莢膜の構成成分であることが判明した。また、NUF631 株染色体 DNA の Tn 挿入部位を調べたところ、11 株中 6 株は莢膜合成遺伝子群に含まれる 4 遺伝子にそれぞれ Tn が挿入されており、それによって莢膜合成変異が起ったものと考えられた。

S. iniae の病原性における莢膜の役割を明らかにするため、変異株のヒラメに対する病原性、魚体内及び血漿中での消長、腹腔マクロファージの食作用に対する抵抗性を調べた。その結果、変異株はいずれも病原性が著しく低下していた。血管内に接種された親株がヒラメ腎臓内で増殖したのに対し、変異株では生菌数が減少した。しかし、血漿中では親株と同程度の増殖性を示した。ヒラメの新鮮血清でオプソニン化した変異株が容易に腹腔内マクロファージに貪食・殺菌されたのに対し、親株はそれらに抵抗性を示した。これらのことから、莢膜はマクロファージの食作用に対する防御壁になっていると考えられた。

つぎに *S. iniae* の免疫原性における莢膜の役割を調べた。親株と変異株から作製したホルマリン死菌の免疫防御効果を比較したところ、変異株の方が明らかに低かった。したがって、莢膜が重要な防御抗原であることが判明した。免疫防御メカニズムを解明するため、ヒラメ免疫血清でオプソニン化した *S. iniae* に対する腹腔マクロファージの食作用を調べた。その結果、親株免疫血清で処理された親株はマクロファージに貪食されやすく、マクロファージからの活性酸素の産生も促した。しかし、変異株免疫血清で処理された親株はマクロファージの食作用に抵抗性を示し、活性酸素産生も誘導しなかった。このことは、親株免疫血清に含まれる抗莢膜抗体がオプソニンとして働き、マクロファージの貪食・殺菌作用を高めることを強く示唆している。なお、電顕観察及びウサギ抗ヒラメ抗体を用いたウエスタンブロットによって、菌体莢膜上にヒラメ抗体が結合していることを確認しており、これは抗莢膜抗体が関わっていることを示す 1 つの証拠と考えられる。

これまで、*S. iniae* が莢膜を保有し、莢膜が本菌の病原性に関わることがいくつかの研究報告等で示唆されていたが、最も重要な病原性因子であるとともに免疫防御における重要な防御抗原であることが、本研究により明確に示された。さらに、本論文は、魚類の *S. iniae* 感染症の感染及び免疫防御メカニズムの解明に役立つ多くの重要な知見を含んでおり、高く評価できる。

以上のように、本論文が魚病学ならびに養殖漁業の発展に大きく貢献するものであることを認め、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。