

論文審査の結果の要旨

報告番号	博（水・環）甲 第11号	氏 名	Tanvir Rahman
学位審査委員	主査 金 井 欣 也 副査 長 富 潔 副査 菅 向 志 郎		
論文審査の結果の要旨			
Tanvir Rahman氏は、2011年10月に文部科学省国費留学生として来日し、長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科の研究生となった。2012年4月に同研究科博士後期課程に入学し、現在に至っている。同氏は、水産・環境科学総合研究科に入学以降、環境海洋資源学を専攻して所定の単位を修得するとともに、海水魚の滑走細菌症原因菌 <i>Tenacibaculum maritimum</i>の病原性および血清学的性状に関する研究に従事した。2014年12月にその成果を学位論文「Studies on the Pathogenicity and Serological Properties of the Fish Pathogen <i>Tenacibaculum maritimum</i>」として完成させ、参考論文として、学位論文の印刷公表論文1編（うち審査付き論文1編）、印刷公表予定論文1編（うち審査付き論文1編）、その他の論文6編を付して、博士（学術）の学位の申請をした。長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科教授会は、2014年12月17日の定例教授会において論文内容等を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、上記の審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を実施するとともに、最終試験を行い、論文審査および最終試験の結果を2015年2月18日の水産・環境科学総合研究科教授会に報告した。 滑走細菌症は海産養殖魚の稚魚期にしばしば発生するが、治療が難しく、ワクチンなどの予防法も確立されていない。また、原因菌 <i>T. maritimum</i>の病原性や血清学的性状に関しては十分に解明されていない。本論文では、<i>T. maritimum</i>の運動性株と非運動性変異株を用いて本菌の病原性および血清学的特性の解明を試みた。 非運動性変異株はトラフグ病魚から運動性株とともに分離されたものである。まず、この両者を比較することで非運動性株の特性を明らかにした。非運動性株は寒天培地上に小型円形コロニーを形成し、液体培養ではフラスコの内面に付着しなかった。ヒラメに対して病原性を示さず。魚体表面への付着能も弱かった。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による菌体タンパク質の解析において、非運動性株は運動性株と異なるバンドパターンを示した。血清学的性状試験において運動性株が有する菌体表在性抗原の1つ（AntigenX）を欠如していた。本抗原は易熱性であり、菌体外産物から部分精製を行った結果、高分子量の物質であることが判明した。これらのことから、菌体表面構造の変化が変異株の病原性の低下に関与しており、AntigenXがそれに関係している			

と推定した。

次に、*T. maritimum*の感染メカニズムを検討した。滑走細菌症では体表に患部が形成されることから、皮膚から感染すると考えられているが、そのメカニズムは分かっていない。本研究では、上記の運動性株と非運動性変異株を用いて、免疫組織化学で感染と増殖の様子を詳しく調べた。魚体表面にカミソリで擦過傷を与えたヒラメを運動性株で浸漬攻撃すると、損傷部に多くの細菌が付着しているのが観察された。一方、表皮が備わった正常な部位に細菌は観察されなかった。その後時間経過とともに*T. maritimum*は真皮層に侵入・増殖し、筋肉層では筋周膜に沿って深部に達する様子が観察された。筋肉の壊死が見られたが、筋肉内に*T. maritimum*はほとんど観察されなかった。変異株では、損傷部に細菌は観察されず、体表の付着菌数は時間経過とともに減少した。以上のことから、*T. maritimum*は受傷により露出した皮膚結合組織に付着し、増殖しながら結合組織に沿って深部に侵入するという感染のメカニズムが明らかになった。

本菌の血清型に関しては単一であるとする報告と複数あるとする報告があり、未だ確定していない。本研究では日本で分離された*T. maritimum* 21菌株について、ホルマリン死菌および加熱死菌を用いて代表株2菌株から作製したウサギ抗血清およびその吸収血清による定量凝集試験を行った。その結果、ホルマリン死菌において非運動性変異株を除くすべての菌株が高い凝集価を示した。加熱死菌では非運動性変異株を含む全菌株が比較的低い凝集価で大まかに2つのグループに分かれた。このことから、日本の*T. maritimum*はすべてに共通する易熱性表在性抗原を有し、耐熱性抗原により複数の血清型に分けうるということが分かった。なお、非運動性変異株は易熱性表在性抗原を持たないと考えられる。

菌体タンパク質のSDS-PAGEにおいて非運動性変異株にほとんど確認できなかった19.6 kDaのポリペプチドバンドの同定を試みた。運動性株の菌体抽出液から当該ポリペプチドを部分精製し、N末端アミノ酸配列を調べ、その配列をもとに作製したプライマーを用いて遺伝子の塩基配列を決定した。得られた塩基配列から推定されたアミノ酸配列についてタンパク質データベースと相同性検索を行い、本タンパク質が物質輸送に関わるポーリンを構成する表在性タンパク質であろうと推定した。非運動性株はポーリンの形成不全により菌体内外の物質輸送能が低下している可能性が考えられる。

以上のように、本論文は滑走細菌症の感染発病機構の解明と本症の防除法の開発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。学位審査委員会は、本論文は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。