

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (学術)	氏名	Indah Istiqomah												
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当														
<p>論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;">Mechanisms of protection induced by atypical <i>Edwardsiella tarda</i> vaccine in red sea bream <i>Pagrus major</i></p> <p style="text-align: center;">(養殖マダイのエドワジエラ症に対するワクチンの感染防御機構)</p>															
<p>論文審査担当者</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 25%;">主 査</td> <td style="width: 25%;">教 授</td> <td style="width: 25%;">中井 敏博</td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>教 授</td> <td>長澤 和也</td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>教 授</td> <td>大塚 攻</td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>教 授</td> <td>河合 幸一郎</td> </tr> </table>				主 査	教 授	中井 敏博	審査委員	教 授	長澤 和也	審査委員	教 授	大塚 攻	審査委員	教 授	河合 幸一郎
主 査	教 授	中井 敏博													
審査委員	教 授	長澤 和也													
審査委員	教 授	大塚 攻													
審査委員	教 授	河合 幸一郎													
<p>[論文審査の要旨]</p> <p>本論文で扱う <i>Edwardsiella tarda</i> (腸内細菌科) は細胞内寄生性を有するため、本菌感染症 (エドワジエラ症) に対しては薬剤による化学療法もワクチンによる予防免疫も効果が低い。そのため、特にマダイやヒラメ養殖での本病による被害が甚大であり、有効な防除対策法の確立が求められている。</p> <p>本論文は養殖マダイのエドワジエラ症に対する不活化注射ワクチンを開発し、その感染防御機構を明らかにすることを目的とした。</p> <p>第1章 <i>E. tarda</i> 株の病原性関連遺伝子の解析</p> <p>本研究に使用した <i>E. tarda</i> の2表現型菌株、すなわち鞭毛を有する定型株 (FK1051 : ヒラメ由来) と無鞭毛の非定型株 (MEE0309) について、全ゲノム解読をおこなってそれらの病原性関連遺伝子を比較した。病原性関連 116 遺伝子のうち、61%は両株間で相同性が低く、特に <i>E. tarda</i> の細胞内寄生性にかかわると考えられる分泌装置 (III 型、IV 型、VI 型) 遺伝子に顕著な相違が認められた。両表現型株の宿主特異性にはこの分泌機構が関与すると推測された。しかし、当初の予想に反して、菌の付着性に関連する線毛遺伝子 (<i>etfA, B, C, D</i>) はきわめて相同性が高かった。</p> <p>第2章 高塩濃度下での <i>E. tarda</i> 線毛の発現</p> <p>高塩濃度 (3%NaCl) で培養すると、低塩濃度培養 (0-2%NaCl) に比べて増殖性は低下したが、<i>E. tarda</i> は定型株、非定型株ともに血球 (モルモット赤血球) 凝集活性が上昇した。電顕観察の結果、高塩濃度で培養した菌体には低塩濃度培養菌にはなかった直径約 4nm の線毛が両株に認められた。<i>E. tarda</i> 線毛遺伝子 <i>etfA</i> (major fimbrial subunit gene) の発現をみたところ、いずれの株でも高塩濃度培養菌で 20~30 倍高かった。これらの結果から、高塩濃度培養により発現する線毛と菌の付着性との関係が示唆された。<i>E. tarda</i> は海水という生存・増殖に不適な高塩濃度環境を逃れるため、線毛を発現して宿主の体内</p>															

という好適な環境に効率よく侵入するものと考えられる。

### 第3章 *E. tarda* 不活化ワクチンの有効性

非定型株 MEE0309 をワクチン株とした。2%NaCl 液体培地で培養し、ホルマリンで不活化したものを免疫抗原とした。これをマダイに腹腔内注射免疫し ( $10^8$  cells/fish)、3週間後にホモ株での注射攻撃をおこなった結果、RPS 値が 60%以上となるすぐれた免疫効果が得られた。免疫有効最少抗原量は  $10^7$  cells/fish で、その効果はすくなくとも 4 か月間持続し、有効抗原量の 1,00 倍を接種しても、魚の行動と成長に悪影響は認められなかった。日本における水産用ワクチンが不活化ワクチンに限られている現状において、本不活化菌体抗原は本病の実用的ワクチンとして最有力候補である。

### 第4章 *E. tarda* 不活化ワクチンの感染防御機構

不活化菌体抗原の感染防御機構を知るため、種々の *in vitro* および *in vivo* 試験をおこなった。生菌攻撃後の免疫魚の体内菌濃度は非免疫魚に比べて有意に低下した。補体そのものには *E. tarda* に対する殺菌活性は認められず、またマクロファージそのものの食菌能も免疫魚と非免疫魚で差がなかったが、抗体と補体をオプソニンとして作用させることにより免疫魚のマクロファージ (活性化マクロファージ) の食食・殺菌能が高まった。これに加えて、病理・免疫組織化学的検討から、感染初期では活性化マクロファージが、その後は特に腎臓において顕著にみられる肉芽腫形成による封じ込めとメラノマクロファージセンターの増幅による殺菌が感染防御の主体であると結論された。

論文内容について審査をおこなった結果、本論文は *E. tarda* および不活化ワクチンによる防御機構に関して多くの学術的新知見を含んでおり、またそれらの応用的価値も高いことから、本論文は学位論文に相応しいものであると認められる。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (学術) の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。