

学 位 論 文 要 旨

氏 名 大山 剛

題 目 魚病細菌 *Lactococcus garvieae* に対するブリの免疫防御反応と弱毒生ワクチンのブリへの応用に関する研究
(The protective immune response to the bacterial fish pathogen, *Lactococcus garvieae* and application of its attenuated live *L. garvieae* cells in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*)

ブリを魚病細菌 *Lactococcus garvieae* (レンサ球菌) の莢膜保有株 (MS93003 ; KG-型) および莢膜欠失株 (MS93003 ; KG+型) のホルマリン不活化菌体で免疫した。両ホルマリン不活化菌体共に、ブリに長期の感染防御を誘導した。ブリの血清中には、KG+株に対しては高い凝集抗体価が認められたが、KG-株には弱い凝集抗体価か全く凝集を示さなかった。この結果、KG-株の莢膜は、ブリに対して免疫原性は低く、しかも防御抗原ではないと考えられた。さらに防御抗原は、莢膜ではなく、KG+株の細胞表面に存在していることが示唆された。ホルマリン不活化KG+菌体で免疫したブリの感染防御には、株特異性は認められなかった。莢膜を有する菌株であるKG-株は、ワクチンしたブリの血清と反応させることで、ブリの貪食細胞に十分に貪食されることが判明した。また、KG-株において、線毛様構造物が観察された。

レンサ球菌株の細胞表面構造について研究した。その結果、大きな莢膜を有する菌株 (KG9408) と微細莢膜を有する菌株 (MS93003) が認められた。両細菌にも、線毛様構造物が観察された。また、莢膜および線毛様構造物ともにまったく観察されない菌株 (NSS9310) も認められた。大きな莢膜を有する菌株 (KG9408) のブリに対する毒性は、微細莢膜を有する菌株 (MS93003) 又は微細莢膜および莢膜も有しない菌株 (NSS9310) よりも強かった。バクテリオファージに対する感受性は、これら3株で明らかな違いが認められた。さらに、KG9408株およびMS93003株のホルマリン不活化菌体は、ブリに防御免疫を誘導した。しかし、NSS9310株の不活化菌体の免疫による防御免疫は、KG9408株およびMS93003株の免疫よりも顕著に低かった。それぞれのホルマリン不活化菌体で免疫したブリの血清を分離し、健康なブリにその血清を移入した。その結果、KG9408株およびMS93003株で免疫したブリより分離した血清を移入した個体で、強い感染防御が観察された。これらブリの免疫血清を用いて、それぞれの菌体の蛋白質を、免疫染色を施し解析した。その結果、KG9408株およびMS93003株のみに認められるが、NSS9310株には発現していない蛋白のバンドが検出された。

莢膜を有する毒性の強いMS93003V株を、TTC(2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド)を含有した寒天培地で継代培養することにより、元株のMS93003V株からMS93003A株を分離した。MS93003A株は、莢膜は欠失しているが、線毛を細胞表面に保有している菌株であった。MS93003A株は、ブリに対して病原性がないが、そのホルマリン不活化菌体のブリへの免疫は、感染防御を強く誘導した。そのため、病原性に関わる莢膜を欠失させた菌株であるMS93003A株を弱毒生ワクチンに応用した。その結果、MS93003A株の生ワクチンは、ホルマリン不活化菌体より免疫細菌数が低くても、また、低温下(17℃)で免疫しても十分な感染防御をブリに誘導することが確認できた。さらに、生体内通過を行った後でも病原性の回復は認められなかった。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Tsuyoshi Ooyama

題 目

The protective immune response to the bacterial fish pathogen, *Lactococcus garvieae* and application of its attenuated live *L. garvieae* cells in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*
(魚病細菌 *Lactococcus garvieae* に対するブリの免疫防御反応と弱毒生ワクチンのブリへの応用に関する研究)

Yellowtail, *Seriola quinqueradiata* were immunized with two different *Lactococcus garvieae* bacterins, formalin-killed KG- phenotype cells (capsulated phenotype) and formalin-killed KG+ phenotype cells (non-capsulated phenotype). Inoculation of either of these two vaccines conferred long-term protection to yellowtail against challenge with the capsulated *Lactococcus garvieae* strain. High agglutinating titres against KG+ phenotype cells persisted for 135 days but no or only low agglutinating titres against KG- phenotype cells were detected in fish given either bacterin. These results suggest that a capsule on KG- phenotype cells affects its immunogenicity, but the antigens conferring protection against lactococcal infection to fish may be located on the surface of KG+ phenotype cells and not in the cell capsule. The protection offered by formalin-killed KG+ phenotype cell vaccine was not strain specific. Capsulated *L. garvieae* cells were phagocytosed well and fimbriae-like appendages were seen in KG- phenotype cells after treatment with immune serum.

The cell surface components of strains of *Lactococcus garvieae* were examined. Two capsular types of *L. garvieae* were found; one with a highly developed capsule (KG9408) and one with a micro-capsule (MS93003) carrying fimbriae-like components projecting from cell surface. One strain (NSS9310) had neither cell capsule nor fimbriae-like structures on its cell surface. The strains with the highly developed capsule were more virulent to fish than either the micro-capsular or non-capsular. The KG9408, MS93003 and NSS9310 strains could be clearly differentiated by their susceptibility to bacteriophages. Protection against *L. garvieae* infection was induced in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* by immunization with formalin-killed *L. garvieae* KG9408 and MS93003 cells. Although protection was also induced by immunization with NSS9310, the level of protection was significantly lower than that with KG9408 and MS93003 vaccines. Passive immunization with yellowtail immune sera raised against KG9408 and MS93003 conferred strong protection to yellowtail with rapid bacterial clearance after challenge with *L. garvieae*. Immunoblotting analysis of protein antigens extracted from *L. garvieae* strains using rabbit anti-KG9408 and anti-MS93003 sera, and yellowtail anti-KG9408 and anti-MS93003 sera indicated that some bands seen in KG9408 and MS93003 strains were not detectable in NSS9310.

An attenuated *Lactococcus garvieae* strain lacking a virulence-associated capsule on its cell surface was evaluated for its application as a live vaccine. The attenuated strain (MS93003A) was obtained from the parent strain (MS93003V), which produced a well-developed capsule, by culturing on an agar medium supplemented with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). When live cells of *L. garvieae* (MS93003A) or formalin-killed cells (MS93003A) were used as an injectable vaccine, protection against virulent *L. garvieae* (MS93003V) was conferred on *Seriola quinqueradiata*. Furthermore, at a relatively lower water temperature and using a lower dose of the cells, application of live cells of *L. garvieae* (MS93003A) conferred a stronger immunity to fish when compared with that conferred by formalin-killed cells (MS93003A). The MS93003A cells did not recover their virulence even after in vivo passages in fish. MS93003A live cells also conferred long-lasting protective immunity to *S. quinqueradiata* against virulent *L. garvieae* infection.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	大山 剛
審査委員	主査 宮崎大学 助教授 吉田照豊
	副査 宮崎大学 教授 伊丹利明
	副査 宮崎大学 教授 香川浩彦
	副査 鹿児島大学 教授 山本 淳
	副査 鹿児島大学 助教授 大富 潤
審査協力者	
題 目	<p>The protective immune response to the bacterial fish pathogen, <i>Lactococcus garvieae</i> and application of its attenuated live <i>L. garvieae</i> cells in yellowtail, <i>Seriola quinqueradiata</i> (魚病細菌 <i>Lactococcus garvieae</i> に対するブリの免疫防御反応と弱毒生ワクチンのブリへの応用に関する研究)</p>
<p>ブリを魚病細菌 <i>Lactococcus garvieae</i> (レンサ球菌) の莢膜保有株 (MS93003 ; KG-型) および莢膜欠失株 (MS93003 ; KG+型) のホルマリン不活化菌体で免疫した。両ホルマリン不活化菌体共に、ブリに長期の感染防御を誘導した。ブリの血清中には、KG+株に対しては高い凝集抗体価が認められたが、KG-株には弱い凝集抗体価か全く凝集を示さなかった。この結果、KG-株の莢膜は、ブリに対して免疫原性は低く、しかも防御抗原ではないと考えられた。さらに防御抗原は、莢膜ではなく、KG+株の細胞表面に存在していることが示唆された。ホルマリン不活化KG+菌体で免疫したブリの感染防御には、株特異性は認められなかった。莢膜を有する菌株であるKG-株は、ワクチンしたブリの血清と反応させることで、ブリの食細胞に十分に貪食されることが判明した。また、KG-株において、線毛様構造物が観察された。</p>	

レンサ球菌株の細胞表面構造について研究した。その結果、大きな莢膜を有する菌株 (KG9408) と微細莢膜を有する菌株 (MS93003) が認められた。両細菌にも、線毛様構造物が観察された。また、莢膜および線毛様構造物ともにまったく観察されない菌株 (NSS9310) も認められた。大きな莢膜を有する菌株 (KG9408) のブリに対する毒性は、微細莢膜を有する菌株 (MS93003) 又は微細莢膜および莢膜も有しない菌株 (NSS9310) よりも強かった。バクテリオファージに対する感受性は、これら3株で明らかな違いが認められた。さらに、KG9408株およびMS93003株のホルマリン不活化菌体は、ブリに防御免疫を誘導した。しかし、NSS9310株の不活化菌体の免疫による防御免疫は、KG9408株およびMS93003株の免疫よりも顕著に低かった。それぞれのホルマリン不活化菌体で免疫したブリの血清を分離し、健康なブリにその血清を移入した。その結果、KG9408株およびMS93003株で免疫したブリより分離した血清を移入した個体で、強い感染防御が観察された。これらブリの免疫血清を用いて、それぞれの菌体の蛋白質を、免疫染色を施し解析した。その結果、KG9408株およびMS93003株のみに認められるが、NSS9310株には発現していない蛋白のバンドが検出された。

莢膜を有する毒性の強いMS93003V株を、TTC(2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド)を含有した寒天培地で継代培養することにより、元株のMS93003V株からMS93003A株を分離した。MS93003A株は、莢膜は欠失しているが、線毛を細胞表面に保有している菌株であった。MS93003A株は、ブリに対して病原性がないが、そのホルマリン不活化菌体のブリへの免疫は、感染防御を強く誘導した。そのため、病原性に関わる莢膜を欠失させた菌株であるMS93003A株を弱毒生ワクチンに応用した。その結果、MS93003A株の生ワクチンは、ホルマリン不活化菌体より免疫細菌数が低くても、また、低温下(17℃)で免疫しても十分な感染防御をブリに誘導することが確認できた。さらに、生体内通過を行った後でも病原性の回復は認められなかった。

学力確認結果の要旨				
学位申請者 氏 名	大山 剛			
審査委員	主査	宮崎大学	助教授	吉田照豊
	副査	宮崎大学	教授	伊丹利明
	副査	宮崎大学	教授	香川浩彦
	副査	鹿児島大学	教授	山本 淳
	副査	鹿児島大学	助教授	大富 潤
審査協力者				
実施年月日	平成18年 12月 22日			
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） (口答)・筆答				
<p>主査及び副査は、平成18年12月22日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙ような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（水産学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>				

学位申請者 氏 名	大山 剛
[質問1]	ワクチン効果は 200～300 日という発表内容であったが、それはこの細菌特有の話か？他の感染症の病原体はどのような状況か？
[回答1]	魚病のワクチン試験において、長期にわたる実験データで公表されたものは少ない。他の細菌のワクチンにおいて、私の知っている範囲では6ヶ月程度。経口ワクチン等では高水温期だけで効果が切れてしまい、せいぜい3ヶ月程度という情報もある。
[質問2]	もっとワクチンの効果を長期的に持続させる方法はないのか？
[回答2]	アジュバントを用いる方法があるが、日本では認可されていない。特に、オイル系のアジュバントの使用は困難とみられている。現在、国内で水溶性のものが研究されている。現場（養殖場）では、ワクチン接種後に弱い感染が起こることにより、追加の免疫刺激を受けることで効果が伸びていくことも考えられる。
[質問3]	毒性の強い株を TTC で継代した変異株は、さらに TTC 添加培地で継代を続けると再び毒性が回復するのか？特に、莢膜は回復するのか？
[回答3]	回復しないと思われる。今回の実験でも病原性および莢膜の回復はなかった。莢膜生成に関わる遺伝子の欠損が最近わかってきており、その遺伝子が再度保有されないかぎり回復はしないものと考えられる。
[質問4]	長期間の飼育で他の原因による死亡がないのはよかったが、県職員が論文をまとめる上で一番大変だったことは？
[回答4]	長期で試験魚を維持することが最も大変だった。他の病気などで死ななかったのは幸いだった。
[質問5]	生残率の実験で生死の個体差は何によるものか？どうすれば強い魚ができるのか？
[回答5]	生残には個体の性格が影響しているのかもしれないが、確率の問題かとも考える。
[質問6]	適切な飼育密度とか、現場で感染を避けるための指針となるものはあるのか？
[回答6]	低密度飼育により、魚病が感染しにくい、発生しにくいとされている。飼育密度、給餌方法、飼育環境維持など養殖業者を指導する、ある程度の指針はある。
[質問7]	その指針は経験によるものか？
[回答7]	実験データの他、過去の調査、経験等も考慮して作られている。
[質問8]	予防のための環境維持という点で行えることはあるのか？密度以外のものは？まわりの環境、水質等はどのようなものか？
[回答8]	基本的にはすべて予防の意味で養殖指導をしている。やはり飼育密度が大切である。赤潮対策を主目的に水質等調査を行っているが、調査を行う中で、その海域での魚病発生の増加と関連がみられれば、飼育密度、給餌指導などの指導を行う。
[質問9]	生ワクチンは FKC より低水温での効果が高いが、作用機作が FKC と異なる可能性が考えられるのか？
[回答9]	生ワクチンは生体内で FKC よりも防御抗原を多量に産生している可能性が考えられる。細胞性免疫の刺激も同様に考えられるが、証明したわけではない。
[質問10]	生ワクチン菌は生体内で増殖するのか？
[回答10]	低水温下での生体内消長データはない。高水温下で8日まで分離されることから、その間、強い免疫刺激が起こるものと推測している。