

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	山崎雅俊		
審査委員	主査	鹿児島	大学 教授 山本 淳
	副査	鹿児島	大学 教授 越塩俊介
	副査	鹿児島	大学 教授 小山次朗
	副査	鹿児島	大学 教授 侯 徳興
	副査	琉球	大学 教授 松崎吾朗
審査協力者			
実施年月日	平成 26年 1月 22日		
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)		<input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成 26年 1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。具体的には別紙の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博士（水産学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>			

学位申請者
氏名

山崎雅俊

[質問1] 背景で説明した4種類のワクチンのなかに細胞性免疫の誘導が強いものがすでに示されていたが、本研究は必要なのか？

[回答1] 哺乳類での知見であり、魚類ではまだそういった知見はない。

[質問2] 淡水魚と海水魚でワクチン効果の違いは？ヒラメを使わなかった理由は？

[回答2] おそらくある。マウスと人での実験でも効果が違うことが示されている。今後検討する必要がある。細胞性免疫に焦点を当てた場合、ギンブナがモデル動物として最適であった。

[質問3] Perforin 遺伝子の発現からCTLs による細胞障害を示唆しているが、タンパク発現は見えていないのか。またFasリガンドは関係していないのか。標的細胞のアポトーシスは確認したのか？

[回答3] 魚類のCTLs による抗原特異的細胞障害においてFas-Fasリガンド経路はあまり中心的な経路ではない。Perforin に対する抗体がないため、本研究では遺伝子の発現を調べた。アポトーシスは確認していない。

[質問4] 魚種による*E. tarda* に対する感受性の違いは何に起因するのか？

[回答4] *E. tarda* の感染性は宿主細胞の表面タンパクへの接着性に関連するため、免疫からのアプローチでは説明できない。

[質問5] なぜ液性免疫は感染防御に機能しないのに誘導されるのか？

[回答5] 液性免疫はたとえ機能しなくても一連の免疫応答の流れとして誘導され、抗原に対して特異的な抗体が産生される。

[質問6] 4章では感染後4日目に抗体価が上がっているが、1章ではなぜ感染後12日以降に上がっているのか？

[回答6] 1章では一時応答を、4章は二次応答を見ているため、抗体産生の誘導時期が異なる。

[質問7] 不活化ワクチンは液性免疫を誘導する一方で細胞性免疫の誘導を阻害するのならば、不活化ワクチンをベースとして細胞性免疫を誘導するワクチンは作れるのか？

[回答7] IL-12、INF γ をアジュバントとして用いることでTh1を誘導させることができるのではないかと。哺乳類では実用化に向けて研究開発が進められている。また抗原を化学修飾することで細胞性免疫の誘導を高める試みも行われている。

学位申請者
氏名

山崎雅俊

〔質問 8〕腎臓白血球を使用している。ほ乳動物では一般に脾臓や血液から白血球を分離するが、なぜ腎臓から分離した白血球を用いたのか？

〔回答 8〕腎臓は魚の主な造血器官であり、脾臓は主に赤血球の造血に関わっている。また魚体が小さかったため、脾臓よりも大きい組織である腎臓から白血球を分離して用いた。

〔質問 9〕 $INF\gamma$ や IL-10 の発現解析になぜ ELISA ではなくリアルタイム PCR を用いたのか？

〔回答 9〕現在はギンプナでも ELISA で $INF\gamma$ の産生を評価できるが、当時は方法が確立されておらずできなかった。IL-10 は抗体がないためタンパク解析ができない。

〔質問 10〕ワクチンの不活化にホルマリンを用いるのは一般的なのか？

〔回答 10〕熱、フェノール、過酸化水素水などで不活化の方法もある。不活化の方法により細胞性免疫の誘導が異なるとの報告があるが今回はホルマリンを使用した。

〔質問 11〕症状として出血などが起こるということは上皮細胞等にも侵入すると考えられるが、*E. tarda* はどの細胞にどのようなシステムを使って感染するのか？

〔回答 11〕好中球に貪食され体中をまわる一方、上皮細胞からの侵入も報告されている。

〔質問 12〕ほ乳動物では好中球は細胞内寄生のキャリアになりづらいが、魚類では好中球をターゲットにするのかマクロファージにするのか？

〔回答 12〕魚類においても殺菌機能が高い好中球よりもマクロファージのほうがキャリアになりやすい。

〔質問 13〕養殖対象魚類の細胞性免疫応答を測定する手法についてなにかアイデアがあるか？

〔回答 13〕ヒトの結核に対してはツベルクリン反応に代わるクオンティフェロン試験がある。これを魚に応用することで $INF\gamma$ -ELISA により細胞障害試験を行わずに細胞性免疫誘導を見られるようになるのではないかと予想している。