

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 SUKENDA

*Pseudomonas plecoglossicida*による細菌性出血性腹水病は、1995年頃から養殖アユに知られるようになったが、感染や発病の機序については殆ど研究されていない。本論文では*P. plecoglossicida*の分離菌株を用いてアユに対する感染実験を行い、感染門戸、感染後の菌の動態、ワクチンの効果を明らかにした。これに先立ち、感染後のアユの各部位の菌数変化を経時的に定量するために本菌の定量PCR法を確立した。また、本菌に緑色蛍光蛋白遺伝子を組み込み、感染後の菌の観察を容易にした。概要は以下の通りである。

1. 感染実験

分離菌株のアユに対する病原性と症状の再現性を確認するために浸漬法と注射法による感染実験を行った。菌株FPC941の15分間浸漬法によるLD₅₀は4.3x10⁶CFU/mLであった。また、同菌株の腹腔内注射および筋肉内注射のLD₅₀は、それぞれ9.5x10³および4.5x10²CFU/100g体重であった。さらに、浸漬感染(3x10⁷CFU/mL、15分間)させたアユ体内の感染菌の分布を調べたところ、攻撃2日後には肝臓、脾臓、腎臓および血液に菌の存在が確認された。

2. 浸漬免疫実験

ホルマリンで不活化したFPC941菌液(7x10⁸CFU/mL)にアユ(体重約7g)を30分間浸漬する方法で免疫した。浸漬攻撃試験(3x10⁷CFU/mL、15分間)における免疫区の死亡率は対照区よりも低く浸漬免疫が有効と認められた。また、追加浸漬免疫の免疫持続効果が示された。

初回免疫6週間後の浸漬攻撃の1、2、3日後に各試験区の抜き取り検査を行った。その結果、二回免疫魚の肝臓、脾臓、腎臓、血液のいずれからも菌は検出されなかった。一回免疫魚では一部から菌が検出された。また、対照魚では3尾中3尾から菌が検出された。この実験によって免疫の程度に個体差のあること、とくに一回免疫では十分に免疫されない個体がかかりに在ることが明らかになった。

3. 定量PCR法による感染菌の追跡

経時的に採取した試料を後刻まとめて計測する手段として*P. plecoglossicida*の定量PCR法を確立した。つぎに浸漬攻撃したアユを24℃の流水槽に収容し、攻撃後1、3、6、12、24、48、72時間後に5尾ずつ抜き取り、皮膚、鰓、肝臓、脾臓、腎臓、および血液の中の菌量を定量PCR法によって計測した。

皮膚からは1時間後、鰓からは3時間後に菌が検出され、皮膚あるいは両者が浸入門戸であることが示唆された。6時間後には肝臓、脾臓および腎臓からも菌が検出されるようになり、感染が成立したと推定された。また、48時間後、それまで検出されなかった血液に多量の菌が出現し、敗血症に転帰したと

が明らかになった。

4. 緑色蛍光蛋白遺伝子の組込み

クラゲ由来の緑色蛍光蛋白遺伝子 (*gfp*) を組込んで *P. plecoglossicida* を分子標識した。すなわち、市販の *gfp* ベクターの pGFPuv を *gfp* cDNA 源として、プラスミド pME4510 を基に *P. plecoglossicida* に移入できる *gfp* 発現ベクターとしてプラスミド pSKL01、pSKT03、pSKN04 を新たに構築した。これらのプラスミドを移入した菌株のうち、pSKT03 を持つ菌株が最も多量の緑色蛍光蛋白 (GFP) を産生し、非選択培地上でも安定であったことから pSKT03 をもつ菌株で感染実験を行った。浸漬感染3日後に血液塗抹標本および主要臓器の凍結切片標本を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、GFP 標識菌株は無標識菌株と変わらない感染力を示し、感染魚の組織中の *P. plecoglossicida* の所在は緑色蛍光を指標として容易に検出することができた。

5. アユ皮膚上の菌の付着場所

皮膚が主要な感染門戸であることが示唆されたことから、蛍光標識菌株を利用してアユの皮膚への菌の付着の仕方を明らかにした。蛍光標識 *P. plecoglossicida* の付着している箇所は、蛍光標識 *E. coli* および蛍光標識ラテックスビーズの付着箇所とほぼ一致していた。また、ラテックスビーズの付着箇所はトリパンプルーの染色箇所と一致した。これらの実験結果から、*P. plecoglossicida* には健全な皮膚に付着する特別な機能は備わっておらず、非病原菌である *E. coli* や非生物であるラテックスビーズと同じく、皮膚の損傷部位に専ら付着することが判明した。

以上の一連の研究の結果、*P. plecoglossicida* は、体表面のスレ（微細損傷部）に付着し、付着部位での防御反応を破って体内に侵入し、水温 24℃ では 6 時間後までに肝臓、脾臓、腎臓などの臓器で増殖し始め、24～48 時間後に敗血症になることが明らかとなった。また、浸漬ワクチンにより免疫が付与されることが分かった。これらの成果は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。