

学位論文（要約）

論文題目： Taxonomic study on fish pathogenic *Streptococcus dysgalactiae* and its putative virulence factors (魚類病原性 *Streptococcus dysgalactiae* の分類および病原因子探索に関する研究)

氏名： 西木 一生

日本のブリ属養殖魚(カンパチ、ブリ)において、ランスフィールド C 群の *Streptococcus dysgalactiae*(GCSD)を原因細菌とする疾病が大きな問題となっている。GCSD には分類学的に *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*(Sdd)と *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*(Sde)の2亜種があり、主として家畜や人からの分離報告例がある。魚類由来 GCSD と哺乳動物由来株の違いを明らかにするため、遺伝学的および生化学的実験を行い、両者を比較した。DNA-DNA 相同性試験およびいくつかのハウスキーピング遺伝子配列を解析した結果、魚類由来株は遺伝学的に非常に類似していた。一方、哺乳動物由来株と魚類由来株間におけるDNA-DNA 相同値は73.4%-82.6%を示した。バイアス正弦ゲル電場電気泳動(BSFGE)の結果、哺乳動物由来株の遺伝子断片パターンは魚類由来株とは異なっていた。魚類由来株は哺乳動物由来のプラスミノゲンに対し、ストレプトキナーゼ活性を示さなかった。これらの特徴は魚類由来株と哺乳動物由来 Sdd, Sde を区別可能なものであった。日本の養殖魚由来 GCSD の疫学的な知見を得るため、分離地域、魚種、年代の異なる GCSD284 株をBSFGEで解析した結果、菌株間における強い関連性が示唆された。以上の結果から魚類由来 GCSD は遺伝学的に非常に均一な細菌集団であり、単一系統株による養殖場への蔓延が示唆された。

GCSD 感染症の血清診断方法を開発するため、GCSD における免疫原性表層タンパク質の同定を試みた。その結果、GCSD の SDS 抽出物から GCSD 感染魚の血清と反応する *S. dysgalactiae* surface immunogenic protein(Sd-Sip)を見出した。その後、組換え Sd-Sip(rSd-Sip)を作製し、抗体検出 ELISA へ利用することで GCSD 感染症の血清診断法の確立を目指した。GCSD 感染魚血清は、非感染魚血清に比べ有意に高い ELISA 値を示した($P < 0.01$)。この結果から rSd-Sip を利用した ELISA による抗体検出法が、GCSD 感染症の血清診断に利用可能であることが示唆された。また、より簡便で迅速な診断方法を開発するため、rSd-Sip をラテックスビーズに吸着させた。作製した抗原吸着ラテックスビーズと GCSD 感染魚血清をスライドグラス上で混和したところ、顕著な凝集反応が確認された。交叉反応を確認するため、*Lactococcus garvieae* と *S. iniae* に対するワクチンを接種したカンパチ血清を用いたスライド凝集反応試験を行ったところ、凝集は確認されなかった。本研究から、rSd-Sip 吸着ラテックスビーズを用いた凝集抗体検出法が開発された。この方法は養殖現場でも利用可能な簡便で迅速な診断法である。

魚類由来 GCSD に関する疫学および診断方法について研究が行われてきたが、病原因子に

関する知見は乏しい。そこで *S. pyogenes* および *S. suis* において病原因子として報告されている血清白濁因子 (SOF) について調査した。ほぼすべての魚類由来 GCSD の培養上清および SDS 抽出物から、SOF 活性が検出された。魚類由来 GCSD の *sof* 遺伝子配列を決定し、相同解析を行ったところ、菌株間における *sof* 遺伝子の相同性は 99%以上の値を示した。また、SOF 活性のない株を用いた感染試験を行ったところカンパチに対して病原性を示さなかった。以上の結果から、魚類由来 GCSD において SOF がカンパチに対する病原性に関わっている可能性が示唆された。