

平成30年6月25日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14971

研究課題名(和文) 魚類の鰓上皮抗原取り込み細胞を標的としたニードルフリーワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of needle-free vaccine targeting gill-epithelial antigen sampling cells in fish

研究代表者

加藤 豪司 (Goshi, Kato)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：50624219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ニジマスの鰓上皮組織には、不活化した病原細菌を取り込む鰓上皮抗原取込細胞が存在する。当該細胞はレクチンの一種UEA1に結合性を有するため、UEA1をワクチンの運び屋として利用すれば鰓上皮細胞を標的とした魚類のニードルフリーワクチンの開発につながると考え、研究を行った。UEA1に抗原モデルとしてBSAまたは、蛍光ビーズを共有結合させ、ニジマスに浸漬投与した。浸漬投与30分後に、鰓上皮抗原取込細胞によるBSAまたはビーズの取り込みをフローサイトメトリーおよび免疫組織化学で解析した。しかしながら、どちらの実験においても、UEA1を介した鰓上皮細胞による抗原モデル物質の取込は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：We previously identified gill epithelial antigen sampling (GAS) cells in the rainbow trout gill epithelium. GAS cells show affinity to a lectin *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA1), so that GAS cells is a promising target of bath vaccination using UEA1 as a vaccine vehicle. Rainbow trout was bath administrated with UEA1-BSA conjugate or UEA1-microbeads conjugate for 30 min, and the gill epithelial cells removed from the gills from the experimental fish were analyzed with flow cytometry or immunofluorescence assay. However, no uptake of the vaccine model were observed in the epithelial cells from the vaccinated fish. These results suggest that UEA1 binds to a molecule which is not related to the uptake in the gill epithelium.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：魚類免疫学

1. 研究開始当初の背景

水産用ワクチンは養殖魚の感染症予防に使用されており、魚病被害の軽減に大きく貢献している。しかし、水産用ワクチンの用法はほとんどの場合が注射であり、稚魚や魚種によっては投与できない場合もある。さらに、術者の安全、労働コストおよび魚体へのストレスなどの問題点から注射法に代わるワクチン投与法の開発が重要な課題となっている。

哺乳類の粘膜上皮には、ワクチンなどの抗原を取り込む小嚢細胞 (M 細胞) が存在しており、細胞表面で捕捉した病原体を飲作用により体腔側へと運搬することで免疫応答を誘導する(1)。レクチンの一種 *Ulex europaeus* agglutinin 1 (UEA1) は、M 細胞の表面に結合する M 細胞リガンドとして知られている。このことから哺乳類では、UEA1 を利用してワクチン抗原を M 細胞へ直接デリバリーする粘膜ワクチンが開発されている。

魚類では、ワクチン液に魚を漬け込む浸漬法が3種類の病原性細菌に対してのみ使用されている。申請者はこれまでの研究から、浸漬投与されたワクチン抗原は鰓上皮組織の一部の細胞集団により取り込まれることを明らかにした(2)。また、この鰓上皮抗原取り込み細胞 (Gill-epithelial Antigen Sampling cell : GAS 細胞) は UEA1 に結合することを示した。そこで本研究では、UEA1 を利用して、GAS 細胞を標的とした魚類の浸漬 (ニードルフリー) ワクチン技術の開発を目的に研究を行う。

2. 研究の目的

本研究では UEA1 に抗原を結合させたワクチン (UEA1 ワクチン) を利用して魚類の浸漬ワクチン技術を開発するために、以下の点について明らかにする。

1. GAS 細胞による UEA1 ワクチン取り込みの確認
2. UEA1 ワクチンの浸漬投与により誘導される免疫応答
3. UEA1 ワクチンの有効性評価

3. 研究の方法

【1. GAS 細胞による UEA1 ワクチン取り込みの確認】

UEA1 と蛍光マイクロビーズ (粒径: 1 μ m) をアミノ基およびカルボキシル基を利用して共有結合させた。それらをニジマスに浸漬投与し、GAS 細胞が UEA1 を介してマイクロビーズを取り込むか、免疫組織化学およびフローサイトメトリーにより確認した。

タンパク質結合キットを用いて UEA1 と BSA を結合し、アユに浸漬投与する。UEA1-BSA の GAS 細胞による取り込みを免疫組織化学により確認する。

【2. UEA1 ワクチンの浸漬投与により誘導される免疫応答】

UEA1 - ワクチンの感染防御抗原となりうる *F. psychrophilum* の抗原タンパク質を探索した。すでに公表されている当該細菌の抗原タンパク質のうち、7 種類を選定し組換えタンパク質を作製した。それらをアユに投与し、感染防御抗原としての有効性を検討した。

【3. UEA1 ワクチンの有効性評価】

アユの細菌性冷水病に対するワクチンの有効性評価法とするために、免疫関連遺伝子の発現解析手法の検討を行った。DDBJ に登録されているアユのデータベースから抗体遺伝子 (IgM、IgD、IgdD) の配列を得た。また、次世代シーケンサーの出力データベースである Short Read Archive からアユの免疫関連遺伝子として、T 細胞マーカー遺伝子 (CD3、CD8) を探索した。

アユは年魚であり、1 年のうちに性成熟して産卵後死亡する。性成熟を開始する夏至以降は免疫力が下がり、ワクチン実験には使用できないことが経験的に知られている。そこで、上記で作製した遺伝子発現解析手法の検討のために、成熟アユおよび未成熟アユのこれら遺伝子の発現解析を行った。

4. 研究成果

【1. GAS 細胞による UEA1 ワクチン取り込みの確認】

カルボキシル基でコートされた蛍光マイクロビーズをニジマスに浸漬投与したが、免疫蛍光染色では GAS 細胞によるこれらビーズの取り込みを確認できなかった。ビーズと UEA1 の結合方法に問題があると考え、蛍光マイクロビーズ側の官能基をアミノ基に変えて同様の実験を行ったが、GAS 細胞による蛍光ビーズの取り込みは確認できなかった。そこで、同様の処理をしたニジマスの鰓から上皮細胞を剥離し、フローサイトメトリーにより解析したところ、UEA1 でコートしていないビーズを取り込んだ細胞が全体の約 0.3%程度だったのに対し、UEA1 で標識したビーズを取り込んだ細胞の割合も 0.5%程度とほとんど変わらず、UEA1 は粒状抗原の取込を促進しないことが示唆された。次に、可溶性抗原のモデルとして BSA を UEA1 に結合させ、ニジマスに浸漬投与した。上記同様に免疫染色およびフローサイトメトリーを用いて、GAS 細胞による UEA1-BSA の取り込みを解析したが、どちらの解析方でも UEA1-BSA の取り込みは確認されなかった。以上のように、魚類では UEA1 による抗原の取り込みは促進されず、UEA1 の標的となる GAS 細胞上の分子は抗原取込に関係するレセプター等の分子ではないことが考えられた。

【2. UEA1 ワクチンの浸漬投与により誘導される免疫応答】

当初の研究目的から、UEA1 を利用した細菌

性冷水病に対する浸漬ワクチンを開発するために、*F. psychrophilum* の感染防御抗原を探索した。これまでに報告されている当該病原細菌の抗原タンパク質、aminopeptidase、FspA、Fp0073、FP0139、FP1387、OmpA、および PepX の遺伝子について大腸菌の組換えタンパク質発現系を用いて、組換えタンパク質を作製した。それぞれの組換えタンパク質をアユの腹腔内に投与し、6 週間後に *F. psychrophilum* による感染実験を行ったところ、対照試験区の累積死亡率が約 80%であったのに対し、OmpA を接種した試験区の累積死亡率は約 30%となった（図 1）。対照試験区と OmpA 接種区の生存率の間には 1%水準の統計的有意さが確認された。このことから、OmpA はアユの細菌性冷水病に対する感染防御抗原として、ワクチンの有望な候補であると言える。

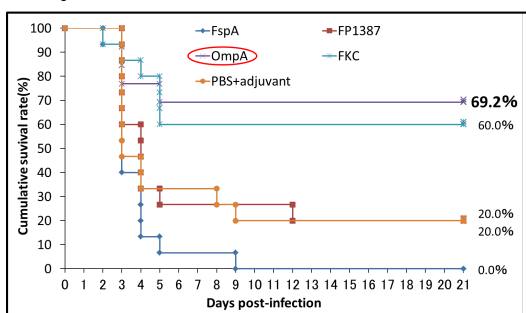


図 1. アユの細菌性冷水病に対する感染防御抗原の探索.

【3. UEA1 ワクチンの有効性評価】

UEA1 ワクチンの有効性評価法の一つとして、免疫関連遺伝子の発現解析について、条件の検討を行った。抗体遺伝子 (IgM、IgD、IgT) および T 細胞マーカー遺伝子 (CD3、CD8) を十分特異的に検出できるプライマーセットを作製できた。

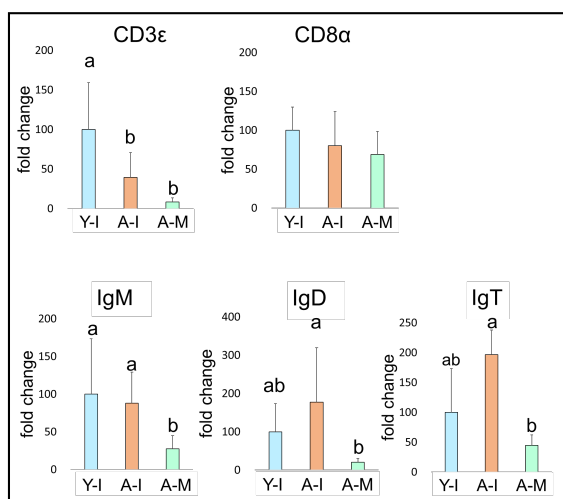


図 2. アユ抗体遺伝子、白血球マーカー分子 (CD3 および CD8) の遺伝子発現解析. サンプルとして、実験開始時コントロール (Y-I)、電照飼育アユ (未成熟 A-I) および自然日長で飼育したアユ (成熟 A-M) の体腎由来 cDNA を用いた.

成熟および未成熟のアユにおけるこれら遺伝子の発現レベルについて検討したところ、T 細胞マーカー遺伝子 CD3 の発現レベルは、性成熟および加齢の両者に影響を受けて減少していくことが分かった。また、細胞障害性 T 細胞のマーカー遺伝子である CD8 の発現レベルには、統計的な有意差はみられなかったものの、CD3 と同様の傾向があることが分かった (図 2 上)。

一方で、抗体遺伝子の発現レベルについては、実験開始時に採取した対照試験区および電照飼育して成熟を抑制したアユでは特に差は認められないものの、成熟すると統計的に有意に減少することが示された (図 2 下)。以上のことから、成熟したアユでは、これまでの経験通り免疫力が低下することが示唆された。一方で、電照飼育することで、アユの免疫力はある程度維持されることが分かった。今後は、性成熟が開始される夏至以降は、電照飼育したアユを実験に供する必要があることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Nayu Kawashima, Shungo Minami, Kyuma Suzuki, Chihaya Nakayasu, Motohiko Sano, Goshi Kato, Change in kidney leukocyte composition with maturation and aging in ayu *Plecoglossus altivelis*, 10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, August 2017, Indonesia

河島奈悠、南 俊伍、鈴木究真、中易千早、佐野元彦、加藤豪司、成熟と加齢に伴うアユ腎臓の白血球組成の変化、平成 29 年度日本魚病学会秋季大会、2017 年 03 月、神奈川県

南 俊伍、鈴木究真、新井 肇、渡辺 峻、佐野元彦、加藤豪司、アユの細菌性冷水病に対する感染防御抗原の同定、平成 28 年度日本魚病学会秋季大会、2016 年 09 月、奈良県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京海洋大学・学術研究院・助教・
加藤 豪司 (KATO, Goshi)

研究者番号：50624219

(2) 研究分担者

群馬県水産試験場・その他部局等・独立研
究員
鈴木 究真 (SUZUKI, Kyuma)

研究者番号：80450386

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()