

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22594

研究課題名（和文）感染やワクチン接種に応答して形成される魚類リンパ組織の同定とその特徴

研究課題名（英文）Characterization of lymphoid structure upon immune stimulation.

研究代表者

柴崎 康宏（SHIBASAKI, Yasuhiro）

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30750674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ節は抗体産生が誘導される部位として重要である。しかし、魚類はリンパ節を持たないため、抗体の産生誘導メカニズムが不明であり、効果的な水産用ワクチンの開発の障害となっていた。本研究では、ニジマスモデルとして、魚類の特異的抗体が産生される部位を特定することを目的とし、研究を行った。

魚類では、免疫刺激によって脾臓に免疫クラスターが形成され、その場に抗原特異的抗体が産生されることが明らかとなった。また、脾臓の細胞を用いた培養により、B細胞を分裂・増殖させて形質細胞様の細胞を得る方法が確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、魚類では免疫応答の際にB細胞やT細胞の集塊が形成され、そこで抗原に特異的な抗体が産生されるという、魚類における抗体産生メカニズムの一端が明らかになった。

今後、この場に注目して研究をすることで、魚類の抗体産生メカニズムの解明が進むことが期待される。

抗体産生メカニズムの解明は、効果的に抗体産生を刺激するワクチンや、ワクチンアジュバントの開発、免疫賦活効果をもつ物質の探索研究に有益な情報につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Lymph nodes are important organ for antigen-specific antibody production. However, because fish do not possess lymph nodes, the mechanism of induction of antibody production is unknown. Therefore, it has been an obstacle to the development of effective vaccines against fish disease. In this study, we aimed to identify the sites where specific antibodies are produced in fish.

研究分野：比較免疫学

キーワード：リンパ節 B細胞 抗体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ節は免疫細胞が抗原と効率的に出会い、抗原に特異的な免疫応答が活性化される(抗原特異的な抗体産生が誘導される)部位として重要である。魚類においても抗原特異的な抗体は産生されるが、魚類はリンパ節を持たず、どこで抗原特異的な抗体産生が誘導されるのか不明であった。それゆえ、ワクチン接種や感染時にどのような機序で免疫応答が誘導されるのか解っていなかった。近年申請者らは、免疫刺激後に、脾臓において、B細胞やヘルパーT細胞の凝集塊(免疫クラスター)が出現することを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究は、ニジマスモデルとして、感染やワクチン接種といった免疫刺激に対して、魚類の特異的な抗体が「どこで」、「どのように」産生されるかを明らかにすることを旨とし、免疫クラスターおよび免疫クラスターが形成される脾臓に着目し、大きく2つの課題に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

(1) 免疫刺激・感染時に形成される免疫クラスターに出現する抗原特異的な抗体産生細胞の特徴についての解析：ニジマスモデルを病原体の感染またはモデル抗原の接種により免疫刺激し、経時的にサンプリングを行い、細胞の増殖を検出できるEdU染色および免疫染色といった組織学的解析の実施並びに血中抗体価の測定を行った。

(2) 抗体産生細胞である形質細胞の特性解明に有用な、形質細胞培養系：ニジマスの脾臓より白血球を回収し、細胞培養を行った。培養した細胞に対し、細胞分裂や形態について解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫刺激・感染時に形成される免疫クラスターに出現する抗原特異的な抗体産生細胞の特徴についての解析

免疫刺激により形成された免疫クラスター内のB細胞にEdU陽性細胞が多く認められたことから、免疫クラスター内のB細胞は、他の部位にいるB細胞と比べて活発に増殖していることが解った。免疫後、時間の経過に伴って、免疫クラスターに抗原特異的な抗体産生細胞の出現が検出された。また、この抗原特異的な抗体産生細胞が出現する時期は、血中抗体価が上昇する時期とおおむね同時期であることが解った。さらに、その抗原特異的な抗体産生細胞が豊富な部位をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションにより回収し、抗体遺

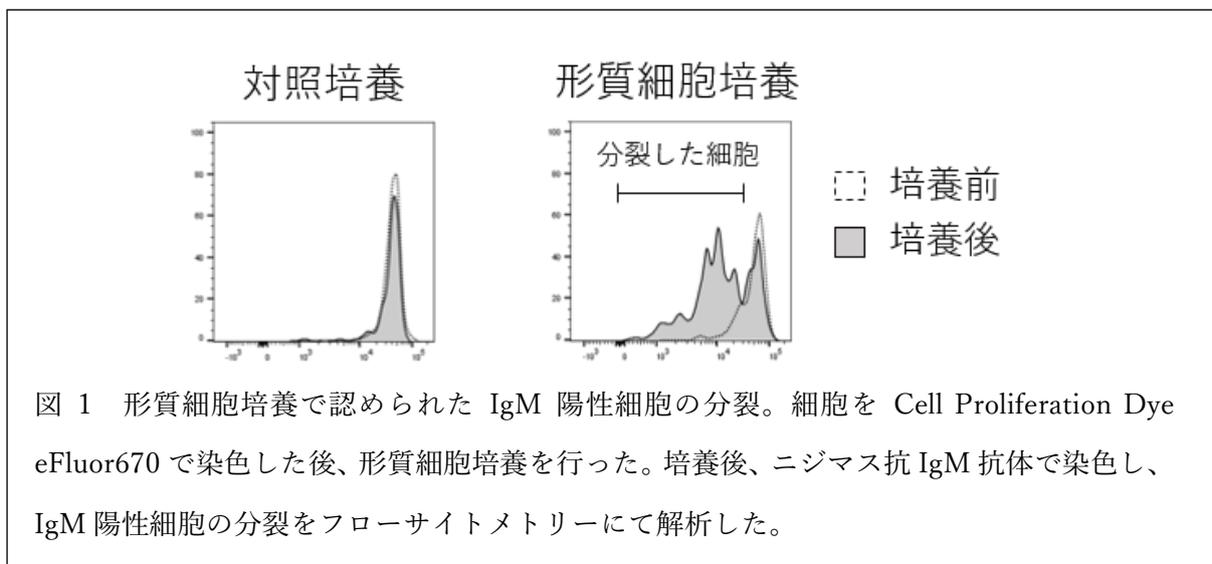
伝子のクロノタイプを解析することで、その由来を調べた。その結果、免疫クラスター内の抗体産生細胞の多くは共通の母細胞に由来していることが示唆された。これらより、抗原の刺激を受けた抗原特異的細胞が、時間の経過とともに、増殖を重ねながら免疫クラスターを形成し、抗原特異的抗体の産生のもととなるという抗体産生メカニズムの一端が見えてきた。  
(論文執筆中)

## (2) 抗体産生細胞である形質細胞の特性解明に有用な、形質細胞培養系

本形質細胞培養系により、2 か月以上にわたり IgM 陽性細胞を培養することができた。培養した IgM 陽性細胞の細胞分裂を解析するために、脾臓から回収した細胞を蛍光色素 (Cell Proliferation Dye eFluor670) で染色した後、培養した。その結果、培養後の IgM 陽性細胞は細胞分裂を行っており、中には 4~5 回以上分裂をした細胞が認められた (図 1)。

培養した IgM 陽性細胞の形態を確認するために、サイトスピン標本を作製し、免疫染色やメイギムザ染色を施し観察した。その結果、培養前と比較して培養後の細胞は、大型の細胞で偏在した核を持ち、細胞質に多くの抗体を産生している形質細胞様の細胞が多数認められた。

現時点では、分裂をしている細胞あるいは細胞分裂をしなかった細胞のどちらか (あるいはどちらも) 形質細胞様の形態に変化しているのか不明である。今後は、この培養で得た形質細胞様の細胞の出現様式を調べるため、経時的な解析を詳細に行うほか、遺伝子発現プロファイルの変化を調べていく予定である。



以上の様に、本研究では、免疫刺激によって脾臓に免疫クラスターが形成され、その場に抗原特異的抗体が産生されることが明らかとなった。また、脾臓の細胞を用いた培養により、B 細胞を分裂・増殖させて形質細胞様の細胞を得る方法が確立された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shingo Sato, Hidenori Kabeya, Sayuri Ishiguro, Yasuhiro Shibasaki & Soichi Maruyama	4. 巻 14
2. 論文標題 Lipoptena fortisetosa as a vector of Bartonella bacteria in Japanese sika deer (Cervus nippon)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-021-04585-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 瀧澤文雄・柴崎康宏	4. 巻 79
2. 論文標題 魚類特有の粘膜抗体 IgT の機能解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 44-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤桃花・溝口達也・中田結実・大井雄大・柴崎康宏・難波亜紀・間野伸宏・水谷哲也・柿崎智広
2. 発表標題 キングョで認められたアメーバ性肉芽腫症
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉野御祐・安田秋太・難波亜紀・柴崎康宏・間野伸宏
2. 発表標題 伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) の系統間における抗原性の差異と二度罹りとの関係
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小原啓・難波亜紀・柴崎康宏・間野伸宏
2. 発表標題 アユから分離されたMycobacterium stephanolepidisの性状および病原性
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------