

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 22日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780176

研究課題名（和文）魚類の獲得免疫系における細胞性免疫と液性免疫のウイルス感染防御効果

研究課題名（英文）Role of cellular and humoral immunity against viral-infection in teleost fish

研究代表者

杉本 智軌（SOMAMOTO TOMONORI）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40403993

研究成果の概要（和文）：

本研究は、魚類の細胞性と液性の両免疫系におけるウイルス感染防御の役割を生体レベルで解明することを目的とし、クローンギンブナを用いた細胞傷害活性の測定法を指標に細胞性免疫、抗体産生応答を指標に液性免疫を評価し、さらにリンパ球識別マーカーを用いてT細胞やB細胞の細胞レベルでの機能を解析し、哺乳類と魚類の抗ウイルス機構の相違点について明らかにした。特にT細胞による細胞性免疫機構において、魚類特有の誘導機構が備わっている可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

To understand a role of cellular and humoral immunity against viral-infection in teleost fish, we have investigated in vivo functions of T-cells and B-cells in controlling of viral infection employing clonal ginbuna crucian carp. The results obtained in this study suggest that anti-viral T-cell functions in teleosts do not completely correspond to mammalian ones.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1300,000	390,000	1690,000
2011年度	900,000	270,000	1170,000
2012年度	900,000	270,000	1170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：水産学一般

科研費の分科・細目：魚病

キーワード：魚類、免疫学、ウイルス学、獲得免疫、ギンブナ

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫機構は細胞性免疫と液性免疫から構成され、病原体の種類によって両免疫系を使い分けている。哺乳類のウイルス病

に対する感染防御機構においては、細胞性免疫が主要な役割を果たしているが、魚類の抗ウイルス機構における両免疫系それぞれの重要性及び役割は示されていない。

2. 研究の目的

本研究では、細胞性と液性の両免疫系におけるウイルス感染防御効果を生体レベルで解明することを目的とし、クローンギンブナを用いた細胞傷害活性の測定法を指標に細胞性免疫、抗体産生応答を指標に液性免疫を評価し、さらにリンパ球識別マーカーを用いてT細胞やB細胞の細胞レベルでの機能を解析した。

3. 研究の方法

(1) ウイルス感染時におけるギンブナ T細胞と B細胞の生体内の動向調査

ウイルス感染によって、ギンブナのT細胞やB細胞の割合がどのように変化するかを明らかにするため、以下のとおりに各細胞の割合を調べた。

致死量以下のCrucian carp hematopoietic virus (CHNV)を腹腔内接種により感染させた後、感染8日目と16日目に各臓器の血球を分離し、T細胞（ヘルパーT細胞とキラーT細胞）とB細胞の割合を、抗ギンブナCD8 α 、抗ギンブナCD4と抗ギンブナIgM抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した。

(2) ウイルス感染時におけるギンブナのヘルパーT細胞の生体内での機能

(養子移入免疫研究)

魚類のヘルパーT細胞が哺乳類のものと同じように、2次免疫応答を補助するのかを以下の実験により解析した。

CHNV感染ドナー由来のCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）を含む白血球群、CHNV感染ドナー由来のCD4陽性T細胞を除去した白血球群、非感染ドナーの白血球群のそれぞれ3種をドナー細胞とし、同系統のレシピエントのギンブナに移入した。次に、移入したレシピエントにCHNVを 10^6 TCID₅₀/50g魚体重で腹腔内接種した。

その後、液性免疫の指標として、レシピエントの血清中のCHNV特異抗体産生量をELISAで、細胞性免疫の指標としてCHNV-感染細胞に対する傷害活性を遊離LDH活性法にて測定した。

(3) ウイルス感染時におけるギンブナの細胞性免疫の担当細胞の特定

(2)の実験結果より、魚類の細胞性免疫の誘導には、哺乳類とは異なる機構が備わっていることが推測されたため、当初の

計画を少し変更し、細胞性免疫の担当細胞の特定を試みた。魚類のウイルス抗原特異的な細胞障害活性の主役が、本当に細胞障害性T細胞(CTL)なのかを検討するため、以下の実験を行った。

CHNVを致死量以下で感染させたS3n系統のクローンギンブナから末梢血白血球を分離し、抗ギンブナCD8抗体、抗ギンブナIgM抗体を用いた磁器ビーズ分離法によって細胞障害T細胞(CTL)とB細胞、プラスチック附着性を利用し単球、比重分離法を用いて好中球を単離し、それらをエフェクター細胞とした。また、CHNVを感染させたCFS細胞(S3n系統のギンブナ由来の細胞株)を標的細胞とし、エフェクター細胞と標的細胞を混合培養し、細胞障害活性をLDH遊離法にて測定した。

4. 研究成果

(1) T細胞とB細胞の生体内の動向
脾臓では、キラーT細胞の割合が有意に低下した一方で、B細胞は有意に上昇した。また、体腎では、ヘルパーT細胞の割合が有意に上昇した。末梢血白血球、鰓、頭腎、腸管における、ヘルパーT細胞、キラーT細胞やB細胞の割合の有意な変動はみられなかった。以上の結果から、CHNVの標的臓器である体腎でヘルパーT細胞の増加が確認できたことから、ウイルス排除におけるヘルパーT細胞の関与が示唆された。しかし、その他の血球がウイルス感染に感染しているか否かは、本実験だけでは明らかにすることはできなかった。

(2) ヘルパーT細胞の生体内での役割

ヘルパーT細胞を含むドナー細胞を移入したレシピエントは、他のドナー細胞を移入したレシピエントと比較して、より早い時期(感染5日後)に特異抗体を産生し始め、有意に高い抗体産生量を示した。一方で、レシピエントの細胞性免疫応答は、ヘルパーT細胞の有無に関わらず、感作ドナー細胞を移入することで、亢進することが分かった。以上の結果から、魚類のヘルパーT細胞はウイルス感染時に特異抗体産生を補助することが明らかとなった。また、ウイルス感染細胞に対する細胞性免疫応答は、ヘルパーT細胞に依存しない経路によっても、活性化されることが示唆された。

(3) 細胞性免疫の担当細胞の特定

CTLを除去しても、2/3の障害活性が残ること、単離した単球とIgM/CD8陰性リンパ球は、CTLと同等かそれ以上の障害活性を有することが明らかとなった。以上の結果から、ウイルス感染細胞に対する細胞性免疫は、CTLだ

けでなく、単球や NK 様細胞も大きく関与していることが示唆された。この結果と前年度までの見解から、Th 細胞に依存しない経路によって単球や NK 様細胞が活性化され、二次応答様の細胞性免疫が誘導されることが推測された。

以上の実験結果より、魚類の抗ウイルス機構は、哺乳類と相同な B 細胞の抗体産生の誘導機構を有することを明らかとした。一方で、細胞性免疫においては、魚類特有の誘導機構が備わっている可能性が示された。今後その未知なる機能の解明を試みる。

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 8 件)

- ① 辻倉正和・杣本智軌・鶴木陽子・中尾実樹、魚類における膜型補体制御因子の同定と機能解析：次世代魚病ワクチンアジュバントへの展開に向けて 生物機能研究、査読無、2010、14 巻、38-44
 - ② Nakanishi T, Toda H, Shibasaki Y, Somamoto T, Cytotoxic T cells in teleost fish, Dev. Comp. Immunol. 査読有、2011、35、1317-23
DOI: 10.1016/j.dci.2011.03.033
 - ③ Toda H., Y. Saito, T. Koike, F. Takizawa, K. Araki, T. Yabu, T. Somamoto, H. Suetake, Y. Suzuki, M. Ototake, T. Moritomo, T. Nakanishi, Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish, Dev. Comp. Immunol. 査読有、2011、35、650-660
DOI: 10.1016/j.dci.2011.01.013.
 - ④ Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK, Somamoto T, The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. Dev. Comp. Immunol. 査読有、35、1296-308
DOI: 10.1016/j.dci.2011.03.003.
 - ⑤ Urabe S, Somamoto T, Sameshima S, Unoki-Kato Y, Nakanishi T, Nakao M, Molecular characterization of MHC class I and beta-2 microglobulin in a clonal strain of ginbuna crucian carp, Carassius auratus langsdorfii, Fish and Shellfish Immunology, 査読有 31, 469-474
- DOI: 10.1016/j.fsi.2011.06.004
- ⑥ Sameshima S, Nakao M, Somamoto T. Diversity of CD2 subfamily receptors in cyprinid fishes, Results in Immunology, 査読有 2012, 2, 25-34
DOI: 10.1016/j.rinim.2012.01.003
 - ⑦ Somamoto T, Nakanishi T and Nakao M, Identification of anti-viral cytotoxic effector cells in the ginbuna crucian carp, Carassius auratus langsdorfii, Dev. Comp. Immunol. 査読有、2013, 39, 370-377
DOI: 10.1016/j.dci.2012.11.001.
 - ⑧ Ichiki S, Kato-Unoki Y, Somamoto T, Nakao M. The binding spectra of carp C3 isotypes against natural targets independent of the binding specificity of their thioester, Dev. Comp. Immunol. 査読有、2012, 38, 10-16
DOI: 10.1016/j.dci.2012.03.004.
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 杣本 智軌、中西 照幸、中尾 実樹、ウイルス感染で誘導されたギンブナ細胞傷害 T 細胞と単球の細胞傷害活性、日本比較免疫学会 第 22 回学術集会、2010 年 8 月 2 日、九州大学
 - ② 辻倉 正和、塚本 春香、杣本智軌、中尾実樹、魚類における膜型補体制御因子の同定、日本比較免疫学会 第 22 回学術集会、第 22 回学術集会、2010 年 8 月 2 日、九州大学
 - ③ Soha Gomma, T. Somamoto, M. Nakao、Characterization of zymosan-binding proteins in Nile Tilapia serum, 日本比較免疫学会 第 22 回学術集、2010 年 8 月 2 日、九州大学
 - ④ Nakao M, Ichiki S, Mutsuro J, Tsujikura M, Somamoto T. Function of diversity of the complement component isotypes in bony fish innate immunity: A model study using the common carp The ninth International Congress on the Biology of Fish, 2010 年 9 月 10 日, Barcelona, Spain
 - ⑤ 中西照幸、杣本智軌、戸田秀明、柴崎康宏、藪健史、魚類の細胞性免疫機構について、第 151 回日本獣医学会 微生物シンポジウム、2011 年 3 月 31 日東京農工

大学

- ⑥ 白水 正道・徳永 弓枝・吉浦 康寿、乙竹 充・杣本 智軌・中尾 実樹、Ragl 欠損ゼブラフィッシュにおける獲得免疫不全の検証、第 23 回日本比較免疫学会、2011 年 8 月 21 日、独立行政法人海洋研究開発機構（神奈川県）
- ⑦ 多治見誠亮・杣本智軌・中西照幸・中尾実樹、不活化ウイルス経腸管感作後のギンブナ T 細胞の免疫応答、2012 年 1 月 19 日、日本水産学会九州支部大会、鹿児島大学（鹿児島県）
- ⑧ Tomonori Somamoto, Teruyuki Nakanishi, Miki Nakao, Functions of CD8-positive and CD4-positive lymphocytes against virus-infection in ginbuna crucian carp, 12th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, 2012 年 07 月 09 日～2012 年 07 月 13 日, Fukuoka city, Hilton Sea Hawk Hotel
- ⑨ Vo Kha Tam, Chie Okura, Masakazu Kondo, Tomonori Somamoto, Miki Nakao, Isotypic Diversity in the Ontogenetic Expression of the Complement Component in the Common Carp (Cyprinus carpio), 12th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, 2012 年 07 月 09 日～2012 年 07 月 13 日, Fukuoka city, Hilton Sea Hawk Hotel
- ⑩ Takahiro Nagasawa, Chihaya Nakayasu, Tomomasa Matsuyama, Aja M. Rieger, Daniel R. Barreda, Tomonori Somamoto, Miki Nakao, Phagocytosis and bactericidal abilities of teleost thrombocytes, 12th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, 2012 年 07 月 09 日～2012 年 07 月 13 日, Fukuoka city, Hilton Sea Hawk Hotel
- ⑪ 福田圭佑・杣本智軌・中尾実樹、ギンブナにおけるコイヘルペスウイルスに対する防御機構の解明、日本水産学会九州支部大会、2013 年 01 月 26 日、福岡市、九州大学
- ⑫ 白水正道・杣本智軌・吉浦康寿・中尾実

樹、Ragl 欠損ゼブラフィッシュにおける T 細胞の機能不全の検証、日本水産学会九州支部大会、2013 年 01 月 26 日、福岡市、九州大学

- ⑬ 中村亮太・辻倉正和・中尾実樹・杣本智軌、コイ膜型補体制御因子 cTcrem のモノクローナル抗体作製と機能解析、日本水産学会九州支部大会、2013 年 01 月 26 日、福岡市、九州大学
- ⑭ 豊福太樹、山下基子、長沢貴宏、杣本智軌、中尾実樹、ギンブナ樹状細胞マーカー CD83 に対する抗体の作製と発現、日本水産学会春季大会、2013 年 03 月 26 日、東京都、東京海洋大学
- ⑮ 長沢貴宏、中易千早、杣本智軌、中尾実樹、コイ栓球は他の白血球により活性化され貪食能を示す、日本水産学会春季大会、2013 年 03 月 26 日、東京都、東京海洋大学

〔図書〕（計 1 件）

- ① 中尾実樹 杣本智軌、メジカルビュー社、補体への招待 「2.5.2. 補体系の進化：脊椎動物」（大井洋之、木下タロウ、松下操 編）2011、6 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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

杣本 智軌 (Somamoto Tomonori)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40403993