

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31日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780179

研究課題名（和文） 魚類の細胞内寄生細菌感染症に対する感染防御機構の解明

研究課題名（英文） Protective immunity against intracellular bacteria in fish

研究代表者

荒木 亨介 (ARAKI KYOSUKE)

鹿児島大学・水産学部・助教

研究者番号：30409073

研究成果の概要（和文）：ギンブナを用いてエドワジエラ症原因菌に対する感染防御機構を調べたところ、本細菌に対する感染防御には液性免疫ではなく、細胞性免疫が重要であることが明らかになった。また、細胞障害性 T 細胞が感染防御の中樞を担っていることが示された。次にブリより単離した T 細胞関連遺伝子を用い、ミコバクテリウム症不活化ワクチンの有効性を解析した結果、不活化菌体単体では液性免疫を誘導したのに対し、アジュバント添加不活化菌体は細胞性免疫を誘導することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate whether cell-mediated immunity and/or humoral immunity contribute to protection against *Edwardsiella tarda* infection in fish, we examined T-cell related gene expression, specific antibody titers, bacterial clearance, and adoptive transfer of immunized lymphocyte subsets. Our results indicate that cell mediated immunity play an important roles in the protection against *E. tarda* infection in fish. In addition, cytotoxic T lymphocytes are crucial player in protecting fish from *E. tarda* infection. Subsequently, we have cloned T-cell related genes from yellowtail. Using these genes as a marker, vaccine efficacy of inactivated vaccine against mycobacteriosis was evaluated. Inactivated vaccine with adjuvant induced cell-mediated immune response, although inactivated cells enhanced humoral immunity in yellowtail.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚病、ワクチン、細胞内寄生細菌、細胞性免疫、T細胞、ギンブナ、ブリ

1. 研究開始当初の背景

近年の水産増養殖業の集約化と発展に伴い、養殖魚に次々に発生する新たな疾病による大きな産業的被害が問題となっている。これまでは薬剤による治療対策が進められてきたが、近年生産者や消費者の食の安心・安全への意識が高まり、養殖魚の疾病対策は薬剤による治療から、ワクチンによる予防へと移行してきた。しかし、細胞内寄生細菌を原因菌とする疾病に対するワクチン開発は難航している。宿主細胞内で殺菌からエスケープしつつ生存・増殖するそれら原因菌に対する感染防御機構への理解が不十分な状態で、試行錯誤的にワクチン開発を進めているためである。

一般に哺乳類では細胞内寄生細菌に対する感染防御には抗体を主体とする液性免疫ではなく、マクロファージや細胞障害性 T 細胞がエフェクターとなる細胞性免疫が有効であることが知られている。しかし現在のところ、養殖魚の細胞性免疫機能測定法は確立されていないことからこれら原因菌に対する感染防御機構について十分な解析が困難な状態にある。このような背景から、詳細な細胞性免疫応答の評価技術が確立されている唯一の魚種であるギンブナをモデル魚として研究を行う着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、これまでワクチン開発が困難とされてきた細胞内寄生性細菌感染症について、細胞性免疫機能の解析が可能なクローンギンブナを用いることで、その感染防御機構を明らかにすることを目標とした。具体的には以下の点を明らかにすることを目指した。

(1) ギンブナが感受性を示す細胞内寄生細菌感染症について、マクロファージや細胞障害性 T 細胞といった細胞性免疫における主要な因子が感染防御に有効であるかどうかを明らかにする。

(2) ワクチンアジュバントにより細胞性免疫の人為的な誘導法を開発する。

3. 研究の方法

(1) ギンブナの *Edwardsiella tarda* に対する感染防御機構の解明を行った。養殖マダイやヒラメに発症するエドワジエラ症の原因細菌 *E. tarda* は細胞内寄生細菌であり、ギンブナも感受性を示すことが解っている。そこで、クローンギンブナに本細菌を腹腔内接種したギンブナにおける組織内の生菌数、血中特異抗体価、膜型免疫グロブリン陽性リンパ球 (B 細胞) および CD8α 陽性リンパ球 (細胞障害性 T 細胞) の割合、*E. tarda* 感染細胞に対する CD8α 陽性リンパ球の抗原

特異的細胞障害活性、T 細胞関連遺伝子の発現を経時的に解析した。

(2) エドワジエラ症に対するワクチンを効率的に開発するためにはどの免疫系 (あるいはどの白血球集団) が感染防御において中心的な役割を果たすのかを明らかにする必要がある。そこで細胞性免疫において中心的な役割を果たす細胞障害性 T 細胞に着目した。*E. tarda* を接種後に生残した感染耐過ギンブナより CD8α 陽性白血球 (細胞障害性 T 細胞) を単離し、この画分を同クローン系統の未感染魚に養子移入後に *E. tarda* を用いた攻撃試験を行い、生残率を求めた。また *E. tarda* 感染後 2 日目における T 細胞関連遺伝子の発現および組織内生菌数を解析した。

(3) ブリ類は国内の海面養殖生産額の 50% 以上を占める極めて重要な養殖対象魚であるが様々な疾病の発症も問題となっている。特に細胞内寄生細菌感染症に対するワクチン開発は難航している。一方、ブリにおいて免疫学的研究ツールは全く整備されておらず、病原体に対する免疫応答を詳細に解析することができない。そこでブリより T 細胞関連遺伝子の単離を行い、得られた遺伝子を指標としてミコバクテリウム症に対する不活化ワクチンおよびアジュバント添加不活化ワクチンの有効性を調べた。具体的には、ワクチン接種ブリにおける血中特異抗体価、ミコバクテリウム症原因菌由来菌体外産生物に対する遅延型過敏反応、T 細胞関連遺伝子の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) ギンブナに 1×10^5 cfu/100g 魚体重 (0.2 LD₅₀) となるように *E. tarda* を腹腔内接種し、0, 2, 4, 8, 12, 16, 30 日後の組織内生菌数を調べた結果、4 日後までに急激に減少したが、その後 8 日後まで減少は見られず、12 日目に腎臓および脾臓の生菌数が検出限界以下となった。また血中抗体価は 16 日目以降に上昇したことから、*E. tarda* の排除に抗体は関与していないことが示された。一方、感染後 2 日目および 4 日目に腎臓白血球におけるインターフェロンガンマ遺伝子の発現が有意に上昇し、2 日目から 8 にかけて腎臓白血球中の細胞障害性 T 細胞の割合も有意に上昇していた。さらに感染後 4 日目と 8 日目の細胞障害性 T 細胞が *E. tarda* 感染細胞に対して有意に強い細胞障害活性を示したことから、*E. tarda* に対する感染防御には、自然免疫と細胞性免疫が主要な役割を果たすことが考えられた。

(2) ギンブナ (クローン系統 OB1) に 10^5 CFU/100g 魚体重 (0.2LD₅₀) の *E. tarda* を腹

腔内接種後、生残魚より CD8alpha 陽性白血球を分取して、未感作魚に血管内移入した。攻撃試験の結果、対照区は全ての魚が死亡したのに対し、感作 CD8alpha 陽性白血球を移入したギンブナは全ての個体が生存した。このことから、魚類の *E. tarda* に対する感染防御には細胞障害性が重要な役割を担っていることが示された。

(3) ブリより CD4-1、CD8alpha、CD8beta、T-bet、GATA-3、インターフェロンガンマ遺伝子を単離した。各組織におけるこれらの遺伝子発現解析を行ったところ、他魚種と同様の発現様式を示した。

またブリのミコバクテリウム症原因菌 *Mycobacterium* sp. を用いて不活化ワクチンおよびアジュバント添加不活化ワクチンを試作して、ブリ人工種苗に接種した。30 日後に *Mycobacterium* sp. を 10^2 cfu/fish となるように腹腔内接種を行った。ワクチン接種後 30 日目の個体より末梢血白血球を回収し *Mycobacterium* sp. 菌体外産生物に対する遅延型過敏反応を調べたところ、不活化ワクチン接種魚はほとんど反応が見られなかったのに対し、アジュバント添加不活化ワクチン接種魚の末梢血白血球は有意に強い反応を示した。また攻撃試験直前と攻撃試験後 10 日目における血中抗体価を調べたところ、不活化ワクチン接種魚はいずれ高い抗体価を示したのに対し、アジュバント添加不活化ワクチン接種魚の血中抗体価は殆ど上昇しなかった。このことから、不活化ワクチン接種魚の体内では液性免疫優位に、アジュバント添加不活化ワクチン接種魚の体内では細胞性免疫優位になっていることが示唆された。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望について

養殖魚の細胞内寄生細菌感染症は国内だけでなく世界中の養殖魚において問題となっている。海外では弱毒生ワクチンや DNA ワクチンを用いることでこれら疾病に対して対策が講じられているが国内では不活化ワクチンをベースとして開発が進められている。一般に哺乳類において不活化ワクチンは細胞内寄生細菌に対して有効と考えられる細胞性免疫の誘導能が弱いことが知られている。本研究において、魚類の細胞内寄生細菌に対する感染防御には細胞性免疫が重要であり、さらには細胞障害性 T 細胞が中心的な役割を果たすことを魚類で初めて示すことができた。また、ブリのミコバクテリウム症に対して不活化ワクチンは液性免疫を誘導し、細胞性免疫を抑制する事が明らかになった。先行研究において不活化ワクチンは有効性を示さないことがわかっており、このこと

からもミコバクテリウム症に対する感染防御には液性免疫は有効ではないことが考えられる。これに対して、アジュバントを添加することで、不活化ワクチンでも液性免疫を抑制して細胞性免疫を誘導可能であることが本研究で示された。また本研究により、魚類においても哺乳類と同様に細胞性免疫と液性免疫が互いに制御し合っていることが示唆された。これらの成果は養殖魚の細胞内寄生細菌感染症に対するワクチン開発の促進に繋がることが考えられる。

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 7 件)

- ① Araki, K., F. Takizawa, M. Yamasaki, M. Esumi, T. Moritomo, M. Ototake, A. Yamamoto, T. Nakanishi Expression profiles of interferon gamma genes in response to immune-stimulants and alloantigen in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. Fisheries Science, 査読有り, 79 巻, 2013, 213-220
DOI: 10.1007/s12562-012-0590-5
- ② Yamasaki, M., K. Araki, T. Nakanishi, C. Nakayasu, Y. Yoshiura, T. Iida, A. Yamamoto Adaptive immune response to *Edwardsiella tarda* infection in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 査読有り, 153 巻, 2013, 83-90
DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.02.004
- ③ Toda, H., K. Araki, T. Moritomo, T. Nakanishi Perforin-dependent cytotoxic mechanism in killing by CD8 positive T cells in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Developmental and Comparative Immunology, 査読有り, 35 巻, 2011, 88-93
DOI: 10.1016/j.dci.2010.08.010
- ④ 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. Developmental and Comparative Immunology, 査読有り, 35 巻, 2011, 650-660
DOI: 10.1016/j.dci.2011.01.013

〔学会発表〕(計16件)

- ① 山崎雅俊, 荒木亨介, 中西照幸, 中易千早, 山本淳 ギンブナの *Edwardsiella tarda* 生菌および不活化菌体により誘導される一時免疫応答の比較. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013 年 3 月 26 日~30 日, 東京
- ② 重岡恵介, 荒木亨介, 山崎雅俊, 下野友未, 山本淳 プリのマクロファージコロニー刺激因子受容体遺伝子の単離および発現解析. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013 年 3 月 26 日~30 日, 東京
- ③ 下野友未, 荒木亨介, 山崎雅俊, 柳宗悦, 前野幸二, 山本淳 プリのコモバクテリア不活化ワクチンの効果. 平成 24 年度日本水産学会九州支部大会, 2013 年 1 月 28 日, 福岡
- ④ Yamasaki, M., K. Araki, T. Nakanishi, C. Nakayasu, A. Yamamoto Cell-mediated immune response to *Edwardsiella tarda* infection in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. 12th International Congress of International Society for Developmental and Comparative Immunology, 2012 年 7 月 9 日~13 日, 福岡
- ⑤ Araki, K., M. Yamasaki, T. Nakanishi, C. Nakayasu, A. Yamamoto Protection of ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*) against *Edwardsiella tarda* infection using adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. 12th International Congress of International Society for Developmental and Comparative Immunology, 2012 年 7 月 9 日~13 日, 福岡
- ⑥ Araki, K., Y. Shimono, M. Yamasaki, T. Matsuyama, S. Yanagi, T. Murase, A. Yamamoto Characterization and expression of CD4 and CD8 genes in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. 12th International Congress of International Society for Developmental and Comparative Immunology, 2012 年 7 月 9 日~13 日, 福岡
- ⑦ 山崎雅俊, 荒木亨介, 多治見誠亮, 中西照幸, 中易千早, 飯田貴次, 山本淳 ギンブナの *Edwardsiella tarda* 強毒株および弱毒株により誘導される細胞性免疫応答の比較. 平成 24 年度日本水産学会春季大会, 2012 年 3 月 29 日, 東京
- ⑧ 山崎雅俊, 荒木亨介, 中西照幸, 中易千早, 山本淳 ギンブナの *Edwardsiella tarda* に対する感染防御における感作 CTL 移入効果の検討. 平成 23 年度日本魚病学会秋季大会, 2011 年 10 月 2 日, 長崎
- ⑨ 山崎雅俊, 下野友未, 鳥居加奈, 荒木亨介, 中易千早, 中西照幸, 山本淳 ギンブナの *Edwardsiella tarda* に対する感染防御における抗体及び細胞障害性 T 細胞の有効性について. 平成 22 年度日本魚病学会春季大会, 2011 年 3 月 27 日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 亨介 (ARAKI KYOSUKE)
鹿児島大学・水産学部・助教
研究者番号: 30409073