

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19242

研究課題名（和文）ブリ類の微胞子虫症ワクチンの開発に向けた免疫システムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of immune system for development of vaccine against microsporidiosis in yellowtail

研究代表者

坂井 貴光（Sakai, Takamitsu）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：50416046

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年ブリ類養殖に大きな被害を及ぼしている「べこ病」（微胞子虫症）に対するブリの免疫応答を解析するとともに、不活化した病原体破砕液を試作ワクチンとし、これを事前に接種したブリの本疾病に対する宿主応答についても解析した。その結果、べこ病の感染に対して、免疫関連臓器および血漿では、炎症や免疫の獲得に直接関与する免疫関連因子の顕著な応答は見られず、免疫系の抑制や調節に関する因子の発現の増加が観察された。このことから本病に有効なワクチンを開発するためには、免疫系の抑制因子の機能を抑えて原因微胞子虫に対する宿主の免疫を活性化させるための研究が今後重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ブリ類養殖では、微胞子虫 *Microsporidium seriolae* の感染を原因とする「べこ病」の被害が増加しており、その被害は産業的な問題になっている。安心・安全な養殖魚を計画的に生産するためには、魚病被害の軽減が必要であり、それを可能にするワクチンの開発が重要である。本研究で得られた「べこ病」に対するブリの免疫応答に関する成果は、本病のワクチン開発を進める上で重要な基盤情報になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Beko disease, a microsporidiosis, has been inflicting significant damage to the aquaculture of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) and amberjack (*S. dumerili*). We investigated the immune response against the disease in naive yellowtail and in the fish previously immunized with inactivated pathogen homogenate. While no particular increase was observed in the expression of immunological factors directly concerned with the inflammation or the acquired immune system in the immune-related organs or plasma of these fish, increase in the expression of the regulators or suppressors of the immune system was detected in those sites. Therefore, an important subject in future studies would be the inhibition of the immune suppressors in order to develop an effective vaccine against the disease.

研究分野：魚病学

キーワード：べこ病 ブリ *Microsporidium seriolae* 微胞子虫 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、西日本のブリ類養殖では、微胞子虫 *Microsporidium seriolae* の感染を原因とする「べこ病」の被害が増加しており、その被害は産業的な問題になっている。本病の特徴は、多数の胞子を産生するためのシストと呼ばれる乳白色の塊が筋肉組織内に形成され、シストの肥大やその周辺の筋肉組織の融解が起こり、商品価値の大幅な低下を招くだけでなく大量死が発生する場合もある。このため、本病に対するワクチン開発は重要な課題であるが、効果的なワクチンの成否に関わる魚類微胞子虫症に対する免疫の研究は未だ少なく、特にブリ類のべこ病に対する免疫系はこれまで明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

魚類でも未だ実用化例が無い微胞子虫症のワクチン開発に向け、魚類が持つ微胞子虫感染に対する免疫システムを解明する。本研究で対象にした微胞子虫症は、近年ブリ類養殖に産業的被害を及ぼしている *Microsporidium seriolae* を原因とする感染症(べこ病)である。ブリ類の免疫システムが、この感染の防除においてどのように機能しているのか、これまで良く分かっていなかった。本症に対して有効な免疫系を解明し、さらに、感染予防における獲得免疫の有効性を明らかにできれば、ワクチン開発を展開できるようになる。そこで、本研究では、微胞子虫感染に対するブリ類の免疫システムについて、血液、免疫組織及び感染部位を対象にした遺伝子・タンパク質・細胞機能レベルの統合オミクスによる包括的解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) *M. seriolae* の自然感染試験におけるブリの宿主応答の観察

難培養性の *M. seriolae* の人為感染試験法は確立されていないため、本研究におけるブリに対する感染試験は、べこ病の発生を観察することができる愛媛県農林水産研究所水産研究センター内の海面生け簀内で実施した。この自然感染試験では、宿主応答を解析するための臓器や血漿等をサンプリングするための試験区に加え、感染状況を定期的に把握するための感染モニタリング用の試験区を設けた。そのモニタリングは、筋肉組織における *M. seriolae* 遺伝子をリアルタイム PCR 法で定量すると共に、シストを計数することで実施した。宿主応答解析のためのサンプリングは、感染モニタリングで *M. seriolae* 遺伝子が検出されてから数日内に実施した。

宿主応答については、筋肉組織及び脾臓に対する病理組織観察、脾臓における免疫関連遺伝子の発現変動の解析(RNA-Seq 解析)、血漿中のタンパク質の動態、*M. seriolae* に対する抗体産生について観察した。

免疫関連遺伝子の発現変動については、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析により実施し、発現変動が認められた遺伝子を同定すると共に、その遺伝子の機能について KEGG パスウェイ等のデータベースから推定した。血漿中のタンパク質の動態においては、SDS-PAGE で見られる各タンパク質バンドの比較を検体間で行い、その差異が認められた領域のバンドを LC-MS/MS による半定量解析及び同定に供した。*M. seriolae* に対する抗体産生の観察については、*M. seriolae* の孢子破砕液を抗原とし、これに対する血漿中の IgM を ELISA 法で測定することで実施した。

(2) ワクチン試験におけるブリの宿主応答の観察(シスト形成期までの短期的な観察)

M. seriolae の孢子破砕液を作製し、このホルマリン不活化液を本試験での試作ワクチンとした。試験区には、本ワクチンの接種区(ワクチン区)に加え、魚類用アジュバントを添加したワクチンの接種区(アジュバント添加ワクチン区)、これらの比較対照の試験区となるアジュバントのみの接種区(アジュバント区)および PBS を接種した試験区(PBS 区)を設けた。ワクチン或いは比較対照物をブリの腹腔内に 100 µL 接種し、陸上水槽で 35 日間飼育した後、愛媛県農林水産研究所水産研究センター内の海面生け簀内に移送し、上述と同様の感染試験を実施した。各試験区の感染状況および宿主応答解析のためのサンプリングについては、感染モニタリングで *M. seriolae* 遺伝子が検出されてから数日内に実施した。

各試験区の宿主応答については、(1)自然感染試験時と同様の手法で観察し、遺伝子発現解析には、頭腎および肝臓も供試した。

(3) ワクチン接種魚および罹病魚血清移入魚に対する感染試験の長期的な観察

上述のワクチン試験と同様に試作ワクチンを腹腔内に接種し、陸上水槽で 42 日間飼育した後、海面生け簀内に移送し、上述と同様の感染試験を実施した。また、べこ病の罹病歴があるブリの血清を腹腔内に 50 µL 接種する試験区も設けた。罹病魚血清の接種作業は、海面生け簀での感染試験の開始直前に実施した。これらの試験区における感染状況については、感染モニタリングで *M. seriolae* 遺伝子が検出されてから 1 ヶ月後に調査した。

4. 研究成果

(1) *M. seriolae* の自然感染試験におけるブリの宿主応答

*M. seriolae*の自然感染魚を作出するため、海面の生け簀内でブリを2ヶ月飼育した。その感染状況については、筋肉組織中の*M. seriolae*遺伝子を定量PCR法で測定することにより把握し(図1) 標的遺伝子が検出されてから4日後(試験開始から25日目)と感染試験終了時に血漿や脾臓等のサンプリングを実施した。

試験開始から25日目の感染個体では、筋肉組織の病理組織観察において発達中のシストが多数認められた(図2)。尚、これらのシストに対する炎症は見られなかった。また、脾臓中にはシストは観察されず、顕著な病変は認められなかった。

脾臓の免疫関連遺伝子の発現解析では、幾つかの遺伝子に発現変動が認められた(表1)。最も顕著な増加が認められたのはPerforinであったが、Perforinと共に標的細胞への細胞障害に関わるGranzyme Bの発現上昇は認められなかった。発現量が上昇していた遺伝子の中で、TIGITおよびSOCS1にコードされるタンパク質は、免疫系の抑制に関わることが知られている。TIGITタンパク質は、T細胞やNK細胞の膜タンパク質として発現し、これらの細胞の活性化の抑制に関与する。また、SOCS1タンパク質は、サイトカインによって活性化される細胞内シグナル伝達経路のJAK/STAT経路に

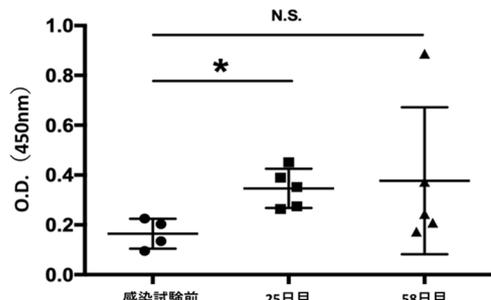
対して負の制御因子として機能する。免疫の抑制に関与する因子は、血漿のプロテオミクスでも検出された。試験開始直前、25日目および58日目の血漿のSDS-PAGE像を図3に示した。25日目の一部の個体と感染試験終了時の全ての個体において、約22kDa、30kDaと120kDaのタンパク質バンドが増加しており、これらのバンドに対するLC-MS/MS解析では、V-set domain-containing T-cell activation inhibitor 1(VTCN1)、Glutathione peroxidase 3およびCeroloplasminが同定された。このうちVTCN1は、T細胞活性化の抑制に関与する因子として知られている。*M. seriolae*に対する抗体の産生に関する結果を図4に示した。感染試験25日目の吸光値は、未感染魚より高い値を示したがその値は極めて低く、58日目においては、未感染魚との有意な差は認められなかった。

各解析で顕著な免疫応答が見られなかったことを考慮すると、上述の免疫応答の抑制に関与する因子は、シスト形成時期の病態に関与している可能性が推察された。

表1. 自然感染試験において25日目に変動が認められた脾臓中の遺伝子

発現変動が認められた遺伝子	発現量比
Perforin	20.35
Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 4D (MS4A4D)	5.18
B-lymphocyte antigen CD20	4.52
Viperin	4.07
Gelsolin	4.10
Suppressor of cytokine signaling 1	3.50
Zinc finger aiolos	3.38
Proteasome subunit beta type-7	3.60
Novel immune-type receptor 11	3.27
Chemokine-like factor	3.12
Interferon-induced GTP-binding Mx-like	2.94
Lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase	2.75
T-cell receptor alpha chain V region RL-5 precursor	2.84
Interferon-induced with tetratricopeptide repeats 1-like	2.78
Interferon regulatory factor 4-like	2.75
T-cell receptor type 2	2.82
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B-like	2.70
T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT)	2.67

発現量比：自然感染試験25日目/自然感染試験直前



*: P<0.05 (Dunn's multiple comparisons test following a Kruskal-Wallis test)

図4. 自然感染試験における抗体の産生状況(ELISA法)

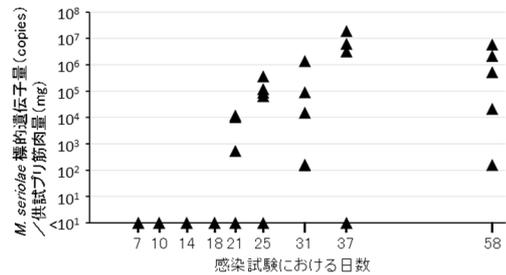


図1. 自然感染試験における各供試魚の筋肉組織中の*M. seriolae*遺伝子量

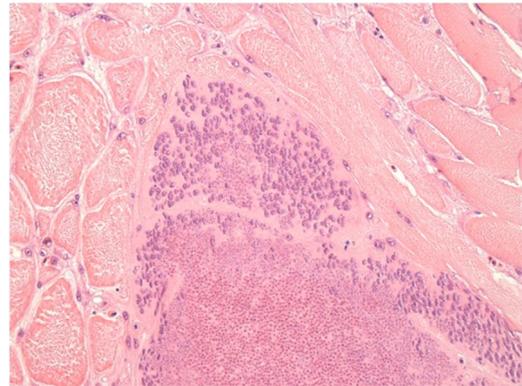


図2. 筋肉組織中で観察されたシスト(ヘマトキシリン・エオジン染色)

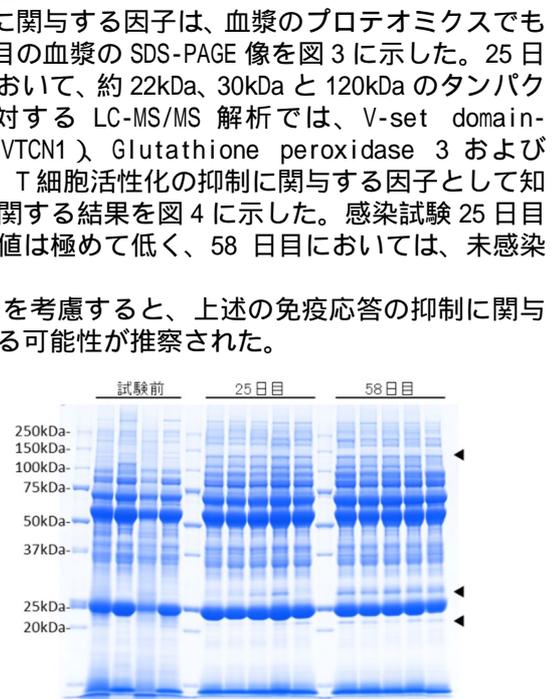


図3. 自然感染試験で採取した血清のSDS-PAGE像

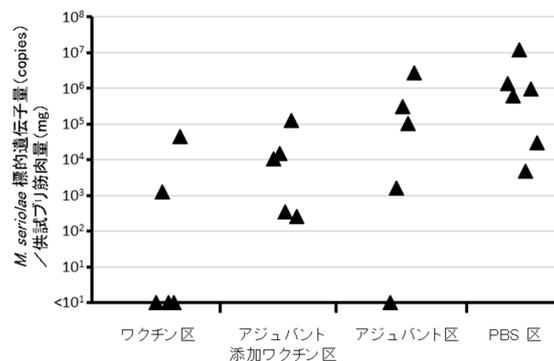


図5. ワクチン試験における感染状況(*M. seriolae*遺伝子に対する定量PCR法の結果)

(2) ワクチン試験で見られた宿主応答(シスト形成期までの短期的な観察)

感染状況のモニタリングで感染個体が検出されてから7日目(海面生け簀での飼育から30日目)各試験区のサンプリングを実施した(n=5)。ワクチン接種区では、*M. seriolae*の遺伝子やシストが検出された個体が他区より少なかった(図5)。各試験区の*M. seriolae*に対する抗体産生量については、アジュバント添加ワクチン接種区で高い抗体価を示す個体が見られたが、抗体の産生量と*M. seriolae*の感染状況との間に関連性は認められなかった(図6)。

頭腎、脾臓および肝臓の遺伝子発現解析において、PBS接種区で発現変動が認められた免疫関連遺伝子を表2に示した。自然感染試験の時より多数の免疫関連遺伝子の発現変動が検出されたのは、感染個体が検出されてからサンプリングを実施するまでの日数が影響していたのではないと思われる。脾臓では、上述の自然感染試験時でも見られた遺伝子の変動が認められ、PerforinやTIGITの発現量が増加していた。その他、刺激を受けたマクロファージなどの多くの免疫細胞で発現量が上昇することが知られているCD83や好中球等の活性化において発現量の上昇が見られるCD97等が検出される一方で、CD200、CD223、D307d、CD266やSIGLEC10等の免疫系の抑制的な調節に関わる遺伝子の発現量増加が観察された。肝臓では、B細胞等の活性化の促進に関係するCD100の遺伝子発現量の減少が認められた。また、補体系に関しては、C1qやC4の発現量の増加が見られることから、古典経路の動きが予想されるものの、C5のコンバーターゼ活性や膜侵襲性複合体の形成等の阻害に関わるComplement factor H-related 1が増加しており、標的細胞への溶解経路には至っていないことが推察された。

ワクチン接種区(*M. seriolae*遺伝子が検出されなかった3尾)とPBS接種区間の遺伝子発現の比較解析では、ワクチン接種区において、頭腎のGTPase IMAP family member 8(GIMAP8)とCytoplasmic 1-likeの発現量増加、脾臓のRas association domain-containing 8-likeの発現量の増加が検出された。この中で免疫系との関連性が示唆される遺伝子はGIMAP8であり、白血球の生残やホメオスタシスの調節に関わる免疫関連因子の一つと考えられている。

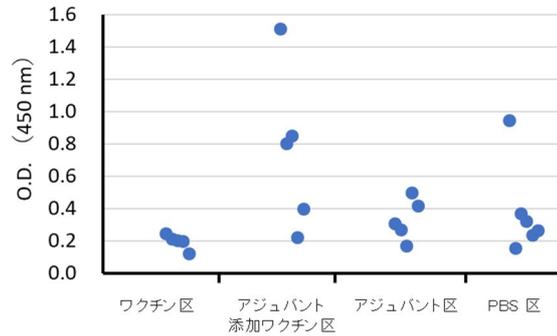


図6. ワクチン試験における血漿中の抗体産生量(ELISAの結果)

(3) ワクチン接種魚および罹病魚血清移入魚の長期的な観察

感染状況のモニタリングで感染個体が検出されてから37日目の各試験区の感染状況を図7に示した。各試験区共に殆どの個体の筋肉組織中で*M. seriolae*遺伝子が検出され、シストも観察された。本結果を踏まえると、短期的なワクチン試験で見られたワクチン試験区の未感染魚に対する宿主応答は、病態進行の遅延に関与していた可能性が推察される。また、罹病魚血清移入区の全ての個体で*M. seriolae*の感染が認められた点については、抗体を中心とした液性免疫系は、本病に有効な免疫系では無い、或いは、抗体を移入してもこれを介した免疫系が抑制されている可能性が示唆された。

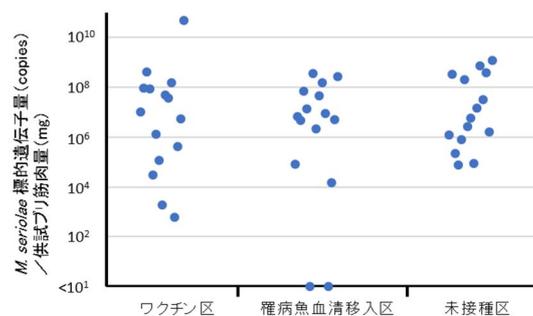


図7. ワクチン接種魚および罹病魚血清移入魚における感染状況(感染状況のモニタリングで感染個体が検出されてから37日目)(*M. seriolae* 遺伝子に対する定量PCR法の結果)

(4) 研究の総括

べこ病の主要な症状の原因となるシストの形成時期では、炎症や免疫の獲得に直接関与する免疫関連因子の顕著な発現変動は特に見られず、免疫系の抑制や調節に関与する因子が発現していることが明らかになった。これらの宿主応答は、べこ病の病態進行と関係していると思われる。ワクチン試験では、ワクチン接種区の未感染魚(筋肉組織に*M. seriolae*遺伝子が検出されなかった個体)でGIMAP8等の遺伝子の発現上昇が認められた。このような遺伝子は、本病の病態進行の遅延に関与している可能性があるため、今後、GIMAP8の機能解明や免疫応答の抑制因子の機能阻害に関する研究の進展が重要であると考えられた。

表2. ワクチン区で発現変動が認められた遺伝子

機能別分類	臓器	発現	遺伝子
免疫関連細胞の表面分子	脾臓	Up	CD7, CD11a, CD20, CD22, CD83, CD97, CD108, CD120b, CD131, CD178, CD194, CDw199, CD200, CD217, CD223, CD266, CD294, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD360, TIGIT, SIGLECS, SIGLEC10, Novel immune-type receptor 11, 29, 30
		Down	CD271
	頭腎	Up	IL31RA, TNFRSF6B, TLR13, Novel immune-type receptor 29, 30
	肝臓	Up	CD130, CD183
		Down	CD100, CD332
サイトカインおよび増殖因子	脾臓	Up	IL10, IL12B, CCL4, CCL19, TNFSF6
		Down	PGF (placenta growth factor)
	頭腎	Up	IL10, IL12B, CCL4, CCL19, CCL24
	肝臓	Up	THPO; thrombopoietin
		Down	Vascular endothelial growth factor A
イムノグロブリン等	脾臓	Up	Immunoglobulin mu heavy partial, Immunoglobulin tau heavy chain membrane-bound form, Immunoglobulin heavy chain variable partial, High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma
	肝臓	Up	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma
補体因子	肝臓	Up	Complement factor H-related 1-like Complement C1q subcomponent subunit B-like Complement C1q subcomponent subunit C-like
その他	脾臓	Up	Interferon regulatory factor 4
	肝臓	Up	Perforin Suppressor of cytokine signaling 3
		Up	Perforin
	頭腎	Up	Perforin

発現：PBS区とM. seriolae遺伝子が検出されなかったワクチン区の個体(n=3)との比較で、有意に2倍以上の発現変動が認められた遺伝子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂井貴光、山崎雅俊、川上秀昌、松浦雄太、米加田 徹、佐藤 純、西木一生、藤原篤志
2. 発表標題 べこ病のシスト形成期におけるプリの宿主応答
3. 学会等名 令和元年度 日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2019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
研究分担者	佐藤 純 (Sato Jun) (10443350)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・グループ長 (82708)	
研究分担者	藤原 篤志 (Fujiwara Atsushi) (30443352)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・主幹研究員 (82708)	
研究分担者	川上 秀昌 (Kawakami Hidemasa) (30762695)	愛媛県農林水産研究所・水産研究センター・係長 (86302)	
研究分担者	山崎 雅俊 (Yamasaki Masathoshi) (60743218)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・研究員 (82708)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石井 佑治 (Ishii Yuji) (20809040)	愛媛県農林水産研究所・水産研究センター・技師 (86302)	
研究 協力者	米加田 徹 (Mekata Tohru) (40597944)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主任 研究員 (82708)	
研究 協力者	松浦 雄太 (Matsuura Yuta) (40823894)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・任期 付研究員 (82708)	