

令和元年6月15日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04984

研究課題名(和文) 簡便かつ鋭敏な細胞性免疫機能測定による水産用ワクチン有効性評価法の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation methods for the potency of fish vaccine by simple and sensitive determination of the function of cell-mediated immunity

研究代表者

中西 照幸 (NAKANISHI, Teruyuki)

日本大学・生物資源科学部・上席研究員

研究者番号：00322496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ノカルジア症に感染耐過したカンパチ由来の白血球におけるIFN γ の産生を指標として細胞性免疫誘導を評価する手法を開発した。鰭膜内にザイモザンを投与することにより鰭膜内への好中球の遊走や貪食を生体において観察することに成功した。また、PHAを鰭膜内へ投与すると投与部位へのリンパ球の遊走やリンパ球の幼若化を誘導し、生体における細胞性免疫誘導を明らかにした。さらに、CD8陽性の細胞傷害性T細胞が直接白点虫を傷害することを明らかにし、寄生虫に対するリンパ球による細胞性免疫機能測定に道を開いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産増養殖現場においては、ウイルスや細胞内寄生細菌による疾病の発生が大きな問題となっている。これらの疾病に対する感染防御にはTリンパ球の活性化を中心とした細胞性免疫が重要である。しかし、魚類においては近交系やそれに由来する細胞株が存在しないため細胞性免疫の研究が遅れている。また、多くの水産用ワクチンにおいてワクチンの有効性を評価する適切な指標がなく攻撃試験に頼っているのが現状である。こうした中で、産業的に重要な魚種において簡便かつ鋭敏な細胞性免疫機能評価法を開発した意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this project, we showed a) production of IFN γ in leukocytes from immunized amberjack leading to development of new evaluation method for the induction of cell-mediated immunity in aquaculture fish, b) A unique and simple method for analyzing the local immune responses in vivo using fish fin was developed. We demonstrated that migration of granulocytes and the respiratory burst activity were easily visible from outside of the fin because of the transparency of fin membrane. We also found the accumulation and in vivo blastogenesis of lymphocytes at the fin after PHA injection, c) We demonstrated the direct contact and killing activity of CD8-positive T lymphocytes against causative parasite of white spot disease.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：魚類 クローンギンブナ 細胞性免疫 リンパ球 ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水産増養殖現場においては、ウイルスや細胞内寄生細菌による疾病の発生が大きな問題となっている。これらの疾病に対する感染防御には T リンパ球の活性化を中心とした細胞性免疫が重要である。しかし、魚類においては細胞性免疫機能測定に必要な近交系やそれに由来する細胞株が存在せず、哺乳類に比べ細胞性免疫の研究が遅れている。

また、多くの水産用ワクチンにおいてワクチン投与魚に抗体価の十分な上昇が認められず、ワクチンの有効性を評価する適切な指標がなく攻撃試験に頼っているのが現状である。こうした中で、細胞性免疫機能に基づくワクチンの有効性評価法の確立が求められている。

研究代表者らは、クローンギンブナ及びそれに由来する細胞株を用いた魚類の細胞性免疫研究において、*in vivo* 及び *in vitro* におけるアロ抗原あるいはウイルス抗原特異的細胞障害試験法を確立し、ウイルスやエドワジェラ菌やノカルディア菌などの細胞内寄生細菌に対する感染防御に細胞性免疫が主要な役割を果たすことを世界に先駆けて証明した。また、CD4 及び CD8 に対するモノクローナル抗体(mAb)の作製に成功し、魚類において初めて CD8 陽性細胞障害性 T リンパ球(CTL)の抗原特異的細胞傷害活性や CD4 陽性 T 細胞のヘルパー活性を証明した。

しかし、ギンブナにおいて細胞性免疫機能測定法が確立されているが、近交系や細胞株及び抗体などのツールが揃っていない大多数の産業的に重要な魚種では測定が難しい。我々は、これまでに、(1) CTL が、MHC や T 細胞受容体を介さずに細菌を直接殺すこと、(2) 鱭の基部に抗原を注入すると透明な鱭膜の間隙に白血球が集積する現象を見出した。このように、遺伝的に均一な動物とそれに由来する細胞株がない養殖魚種においても細胞性免疫機能を測定することにより、攻撃試験に依らずにワクチンの有効性を鋭敏かつ簡便に評価する手法を開発できる展望が示された。

2. 研究の目的

我が国において水産用ワクチンが急速に普及し、販売高が抗菌剤を上回っているが、多くの水産用ワクチン投与魚において抗体価の十分な上昇が認められず、ワクチンの有効性を評価する適切な指標がなく攻撃試験に頼っているのが現状である。攻撃試験によるワクチンの有効性評価においては、多大な労力と多数の魚が必要とされる。そこで、本研究においては、これまでの我々の研究成果並びに予備実験結果を踏まえ、白血球における IFN 産生の測定、鱭膜内への抗原接種に伴う白血球の浸潤及びリンパ球が直接細菌等を殺す現象に着目した評価法など、攻撃試験に依らずにワクチンの有効性を鋭敏かつ簡便に評価する手法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞性免疫関連分子の活性に基づいた細胞性免疫機能測定法の開発

アロ抗原に対する細胞傷害活性に関与するグランザイム様酵素をギンブナ白血球より精製し、タンパク質レベルでの魚類グランザイムの同定および特性解明を試みた。ノカルジア症に感染耐過したカンパチより白血球を採取し、*in vitro* でマイトジェン刺激した後に、カンパチの組換え IFN に対する抗体を用いて、ウェスタンブロットング法及び免疫沈降法により IFN の分子量に相当するバンドの発現について検討した。

(2) 鱭膜内接種法による細胞性免疫機能測定法の開発

鱭膜内への Zymosan 投与後、経時的に白血球を採取しフローサイトメトリーにより細胞の種類や数を測定した。貪食の際に細胞内の PH の低下に伴い蛍光を発する試薬 (pHrodo 標

識 Zymosan) を用い好中球の貪食活性を測定した。また、呼吸バースト活性は NBT 還元法により解析した。 鱭膜内に PHA を投与後経時的に白血球を採取し、各種白血球に対する抗体を用いてフローサイトメトリー法により細胞の種類や数を測定した。

(3) リンパ球による殺菌活性を指標とした細胞性免疫機能測定法の開発

クローンギンブナの腎臓及び鰓より単離した CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、マクロファージ及び好中球と白点虫を *in vitro* で 1 時間培養後、蛍光顕微鏡下で接触及び障害活性を観察した。 白点虫に対する各種白血球の遊走についてはブラインドウェルチャンパーを用いて測定し、フローサイトメトリーにより移動した白血球の組成を比較した。

4. 研究成果

(1) 細胞性免疫関連分子の活性に基づいた細胞性免疫機能測定法の開発

当初、細胞傷害性誘導酵素グランザイムに注目してギンブナ白血球より精製し機能を明らかにした。しかしギンブナで同定されたグランザイム A に相同な遺伝子はコイ目で進化した遺伝子と考えられ、ブリ等で見つけることはできなかった。そこで、海産魚において細胞性免疫機能を測定する方法として、細胞性免疫において重要な役割を果たすインターフェロン (IFN) を新たな評価指標とした。カンパチの組換え IFN に対する抗体を作製し、これを用いてウェスタンブロッティング法及び免疫沈降法により、ノカルジア症に感染耐過したカンパチ由来の白血球をマイトジェンで刺激した後に解析した結果 IFN が検出されたが、非感染の健康魚からは検出されなかった。以上より、IFN の産生を指標としてノカルジア症に対する細胞性免疫誘導を評価できることが判明した。

(2) 鱭膜内接種法による細胞性免疫機能測定法の開発

透明な鱭膜内にザイモザン投与することにより鱭膜内への好中球の遊走及び貪食を生体外より観察することに成功した。また、貪食好中球の割合を FACS 解析により詳細に解析することにも成功した。鱭膜内に NBT を投与した結果、鱭膜の色が暗紫色に変化し、分離した好中球内において NBT が活性酸素群により還元されることで生じる暗紫色のホルマザン顆粒が観察され、生体内にて起こる呼吸バースト活性を解析することに成功した。

また、背鱭に PHA 投与した場合には、鱭膜内のリンパ球の幼若化が認められた。これは PHA 刺激に伴う幼若化応答を示す魚類の *in vivo* における初めての知見である。また、好中球の動態を解析したところ、PHA 投与 1 日目には腎臓において減少し、その後脾臓及び末梢血において増加し、遅れて投与部位の鱭において増加することが判明した。以上より、局所における刺激が全身的な反応を誘導していることが明らかとなり、本法は局所免疫と全身免疫との相互作用解析のモデルとして活用できると考えられる。

(3) リンパ球による殺菌活性を指標とした細胞性免疫機能測定法の開発

淡水性白点病の病原体である繊毛虫の *Ichthyophthirius multifiliis* (白点虫) に対して細胞傷害性 T 細胞が直接傷害活性を示すことが魚類で初めて明らかになった。すなわち、クローンギンブナの腎臓及び鰓より単離した CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、マクロファージ及び好中球と白点虫を *in vitro* で 1 時間培養すると、CD8 陽性細胞のみが直接白点虫と接触し傷害することが示された。

また、白点虫への腎臓及び鰓由来の白血球の遊走活性を比較した結果、マクロファージや好中球は白点虫への遊走を示さず、腎臓由来の CD8 陽性 T リンパ球のみが遊走能を示した。さら

に、セロントではなくトロフォントを鱗膜内に注射した場合のみ、CD4+細胞及び CD8 細胞の割合が、GATA3 および T-bet の mRNA 発現量が有意に上昇し、T リンパ球が活性化することが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- Tajimi S, Kondo M, Nakanishi T, Nagasawa T, Nakao M, Somamoto T. (2019) Generation of virus-specific CD8+ T cells by vaccination with inactivated virus in the intestine of ginbuna crucian carp. *Dev. Comp. Immunol.* 査読有 93, 37-44. DOI: 10.1016/j.dci.2018.12.009.
- Kato G, Kakazu T, Nakanishi T, 他 7 名、7 番目 (2019) Granulomatous inflammation in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii* against *Mycobacterium gordonae*. *Dev Comp Immunol.* 査読有 91, 93-100. DOI: 10.1016/j.dci.2018.10.009.
- Miyazawa R, Murata N, Matsuura Y, Shibasaki Y, Yabu T, Nakanishi T. (2018) Peculiar expression of CD3-epsilon in kidney of ginbuna crucian carp. *Front Immunol.* 査読有 2018 9:1321. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01321. eCollection 2018.
- Matsumoto M, Araki K, Nakanishi T, 他 5 名、5 番目 (2018) Adjuvant effect in aquaculture fish of cell-wall glycolipids isolated from acid-fast bacteria. *Dev Comp Immunol.* 査読有 85, 142-149. DOI: 10.1016/j.dci.2018.04.012.
- Matsuura Y, N. Takaoka, R. Miyazawa, T. Nakanishi (2017) A simple and non-invasive method for analyzing local immune responses in vivo using fish fin. *Dev. Comp. Immunol.* 査読有 74, 136-143. DOI: 10.1016/j.dci.2017.04.016.
- Matsuura Y, M. Takasaki, R. Miyazawa, T. Nakanishi (2017) Stimulatory effects of heat-killed *Enterococcus faecalis* on cell-mediated immunity in fish. *Dev Comp Immunol.* 査読有 74, 1-9. DOI: 10.1016/j.dci.2017.03.029.
- Shibasaki Y, C. Hatanaka, Y. Matsuura, R. Miyazawa, T. Yabu, T. Moritomo, T. Nakanishi (2016) Effects of IFN administration on allograft rejection in ginbuna crucian carp. *Dev Comp Immunol.* 査読有 62, 108-115. DOI: 10.1016/j.dci.2016.04.021.
- Matsuura Y, T. Yabu, H. Shiba, T. Moritomo, T. Nakanishi (2016) Purification and characterization of a fish granzymeA involved in cell-mediated immunity. *Dev Comp Immunol.* 査読有 60, 33-40. DOI: 10.1016/j.dci.2016.02.011.

〔学会発表〕(計 20 件)

- 加藤豪司、嘉数泰雅、山田貢央、佐藤将、中嶋一恵、中西照幸、佐野元彦、*Mycobacterium gordonae* に対するギンブナの免疫応答、日本水産学会春季大会、2019 年 3 月、東京海洋大学 (東京都港区)
- 塩田昂明、助田将樹、中西照幸、長澤貴宏、中尾実樹、杣本智軌、繊毛虫 *Ichtyophthirius multifiliis* の成長段階の違いによるギンブナの免疫応答の比較、日本水産学会春季大会、2019 年 3 月、東京海洋大学 (東京都港区)
- 助田将樹、塩田昂明、長沢貴宏、中尾実樹、杣本智軌、ギンブナ CD8+T リンパ球の寄生原虫に対する細胞遊走活性、日本水産学会秋季大会、2018 年 9 月 16-17 日、広島大学(東広島)
- Miyazawa R., Y. Matsuura and T. Nakanishi. Identification of natural killer cell by the expression of CD3ε in ginbuna crucian carp. The 3rd Asian Invertebrate immunity Symposium. September 5-8, 2018, Fukuoka (Japan)
- Kato G., T. Kakazu, T. Nakanishi, M. Sano. 他 5 名 7 番目、Immune response against *Mycobacterium gordonae* in ginbuna *Carssius auratus langsdorfii*. September 2-6, 2018, 8th International Symposium on Aquatic Animal Health, Charlottetown Canada

飯島佑理、宮澤龍一郎、松浦雄太、中西照幸、魚類の鱗膜を利用した in vivo における PHA 試験、平成 30 年度日本比較免疫学会、2018 年 8 月 9 日、日本大学（神奈川県藤沢市）
松浦雄太、松山知正、藪 健史、宮澤龍一郎、司馬 肇、中西照幸、「魚類白血球の細胞傷害機構に関するセリンプロテアーゼの同定並びに組織局在解析」、平成 30 年度水産学会春季大会、2018 年 3 月 28 日、東京海洋大学（東京都港区）
助田将樹、長沢貴宏、中尾実樹、杣本智軌、ギンブナ CD8+T リンパ球の細胞外寄生原虫に対する細胞傷害機構の解明 日本水産学会春季大会、2018 年 3 月 28 日、東京海洋大学（東京都港区）
松浦 雄太、藪 健史、宮澤 龍一郎、司馬 肇、中西 照幸、魚類白血球の細胞傷害に関するセリンプロテアーゼの精製とその特性解析、平成 29 年度生命化学系学会合同年次大会、2017 年 12 月、神戸
Nakanishi T. Cell-mediated immune mechanisms for further development of fish vaccine. International Workshop on Viral Haemorrhagic Septicaemia in Haeundae Grand Hotel, 13~14 December 2017, Busan, Korea
助田将樹、長沢貴宏、中尾実樹、杣本智軌 織毛虫 *Ichthyophthirius multifiliis* に対する魚類 CD8+T 細胞の傷害機構 平成 29 年度日本魚病学会秋季大会、2017 年 9 月 13 日、ホテルメリージュ（宮崎県宮崎市）
Matsuura Y., Takasaki M., Miyazawa, R., Nakanishi T. Stimulatory effects of heat-killed *Enterococcus faecalis* on cell-mediated immunity in fish, 11th Vaccine Congress, 2017 年 9 月、サンディエゴ, アメリカ合衆国
岸野友祐、U. Navaneethaiyer、宮澤龍一郎、中西照幸、組換え IL-12 のギンブナ腎臓白血球における IFN 遺伝子発現に及ぼす影響、平成 29 年度日本比較免疫学会、2017 年 8 月 25 日、北海道大学（札幌市）
松浦雄太、藪健史、宮澤龍一郎、司馬肇、中西照幸、魚類白血球の細胞傷害機構に関するセリンプロテアーゼの同定、平成 29 年度日本比較免疫学会、2017 年 8 月 25 日、北海道大学（札幌市）
助田将樹、長沢貴宏、中尾実樹、杣本智軌、織毛虫 *Ichthyophthirius multifiliis* に対するギンブナ T 細胞の傷害活性、平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017 年 3 月 27 日、東京海洋大学（東京都港区）
松浦雄太、高崎美帆、中西照幸、加熱殺菌 *Enterococcus faecalis* による細胞性免疫機能賦活作用の検討、平成 29 年度日本魚病学会春季大会、2017 年 3 月 11 日、日本大学（神奈川県藤沢市）
高岡尚起、松浦雄太、宮澤龍一郎、中西照幸、魚類の鱗膜を利用した、好中球の機能を in vivo にて測定する新規手法の開発、平成 29 年度日本魚病学会春季大会、2017 年 3 月 11 日、日本大学（神奈川県藤沢市）
松本萌・西村沙也香・早志和真・塩崎一弘・中西照幸・山本淳・荒木亨介、魚類ミコプラズマ症原因菌が合成する糖脂質の細胞性免疫誘導型アジュバントとしての有効性、平成 28 年度日本魚病学会秋季大会、2016 年 9 月 8 日、近畿大学農学部（奈良県奈良市）
Matsuura, Y., T. Yabu, H. Shiba, T. Nakanishi Purification and characterization of a fish granzyme A involved in cell-mediated immunity, 2nd international conference of fish & shellfish immunology, 2016 年 6 月 28 日, Portland, USA
Shibasaki, Y., C. Hatanaka, Y. Matsuura, R. Miyazawa, T. Yabu, T. Nakanishi Effects of IFN γ administration on allograft rejection in ginbuna crucian carp. 2nd international conference of fish & shellfish immunology, 2016 年 6 月 28 日, Portland, USA

〔図書〕(計 2 件)

Nakanishi T. J. Hikima, T. Yada. (2018) Osteichthyes: Immune systems of teleosts (Actinopterygii) in *Advances in Comparative Immunology*. Ed. by EL Cooper, pp. 687-749, Springer International Publishing AG p.1048
Nayak S. K. and Nakanishi T. (2016) Development of vaccines against *Nocardia* in fishes. *Vaccine Design: Methods and Protocols*. Ed. by Sunil Thomas, pp.193-201, Springer, New York p.854

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：間野 伸宏

ローマ字氏名：MANO, Nobuhiro

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10339286

研究分担者氏名：杉本 智軌

ローマ字氏名：SOMAMOTO, Tomonori

所属研究機関名：九州大学

部局名：農学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：40403993

研究分担者氏名：荒木 亨介(平成28, 29年度のみ)

ローマ字氏名：ARAKI, Kyouusuke

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：水産学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30409073

研究分担者氏名：高野 倫一

ローマ字氏名：TAKANO, Tomokazu

所属研究機関名：国立研究開発法人水産総合研究センター

部局名：増養殖研究所

職名：その他部局等・研究員

研究者番号(8桁)：40533998

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。