

令和元年6月17日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07882

研究課題名(和文) ヒラメエドワジエラ症の肝炎発生における肝門脈上流リンパ組織の関与

研究課題名(英文) Influence of lymphoid organs located upstream of portal vein on induction of hepatitis of Japanese flounder affected with edwardsiellosis

研究代表者

倉田 修 (Kurata, Osamu)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：90277666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメ細菌感染症(エドワジエラ症)で見られる肝炎の誘発は感染菌が直接的な原因ではない。我々は肝臓近傍リンパ組織で産生される炎症性メディエーターの肝臓内流入が肝炎誘発の原因と考えた。感染初期の脾臓では種々の炎症性メディエーター(エイコサノイド、IL-1)を産生し、それらは肝門脈血中にも検出された。このことから、脾臓が産生する炎症性メディエーターが本肝炎の誘発原因であると推測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主要臓器の過度な炎症は動物の健康を害し、場合によっては死因となる。ヒラメの重要疾病であるエドワジエラ症は重度な肝炎を引き起こし、これが死亡の原因となっている。肝炎の進行を抑えることが本疾病の効果的な予防対策と考え、肝炎誘発の原因について研究を行った。その結果、肝臓近傍のリンパ組織(脾臓)から産生される炎症性メディエーターが肝炎誘発の原因であることを示唆できた。本成果はヒラメエドワジエラ症の予防対策研究の基盤となる一方、臓器間相互作用による炎症形成という新たな研究領域を創出する。

研究成果の概要(英文)：The bacterial cells are not directly responsible for induction of hepatitis observed in a bacterial disease (edwardsiellosis) of Japanese flounder *Paralichthys plivaceus*. We hypothesized that influx of inflammatory mediators from lymphoid organs to the liver causes the induction of hepatitis. The spleen at the early stages of edwardsiellosis produced some inflammatory mediators such as eicosanoids and interleukin 1 which were also detected in portal venous blood. Therefore we suggest that inflammatory mediators produced by the spleen induce the hepatitis of edwardsiellosis.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：肝炎 脾臓 炎症性メディエーター エイコサノイド 肝門脈血 サイトカイン ヒラメ Edwardsiella tarda

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

### 1. 研究開始当初の背景

ヒラメエドワジエラ症は、グラム陰性細菌の *Edwardsiella tarda* が原因となる感染症であり、現在有効な治療法はなく、ヒラメ生産に大きな被害をもたらしている。本病態の特徴は、肝臓に激しい化膿性の炎症反応を生じることである。組織学的には、好中球を中心とする多数の白血球が肝臓組織内に浸潤および集簇しており、多くの浸潤細胞は細胞死を起している。さらに、その周囲では、肝実質細胞や脾臓組織（ヒラメは肝臓内に脾臓組織が入り込んだ肝脾臓を持つ）の傷害が認められる。本肝炎は、自己組織傷害の著しい極めてユニークな病態であり、ヒラメエドワジエラ症による死亡の有力な原因として挙げられる。

感染魚の肝臓では炎症性サイトカインとして知られるインターロイキン 8 (IL-8) の遺伝子発現が顕著である。我々は、ヒラメ IL-8 の白血球に対する生物活性について解析を行い、ヒラメ IL-8 は好中球の走化性および活性化を誘導することを明らかにした。このことから、本肝炎の発生機序の一端として、好中球の肝臓内浸潤および活性化は肝臓で多量に産生される IL-8 による作用であることを見出した。

何故、肝臓で IL-8 の高発現が起こるのであるのか？ヒラメエドワジエラ症の肝臓での IL-8 遺伝子の発現は比較的早期に起こり、同時に好中球は肝臓内に浸潤している。しかしながら、この時、感染菌の肝臓における繁殖は認められない。一般に、感染症における炎症反応は組織内に侵入および繁殖した病原体が原因となる。ヒラメエドワジエラ症における肝炎の誘発はこの一般概念では説明することができない。我々は、肝臓に繋がる肝門脈の上流に位置する肝臓近傍のリンパ組織（腸管リンパ組織および脾臓）に注目し、これらのリンパ組織の活性化が肝臓における IL-8 の発現を誘導しているのではないかと考えた。つまり、感染した病原体は、免疫応答の場であるこれらリンパ組織に取り込まれ、リンパ組織に局在している免疫細胞の活性化を引き起こす。そして、活性化した免疫細胞から産生される炎症性メディエーターが静脈血と共に肝門脈を通り肝臓に流れ込み、肝臓における IL-8 の発現を誘導しているという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

肝門脈上流に位置するリンパ組織からのシグナルが、ヒラメエドワジエラ症で生じる肝炎の誘発原因であることを検討する。本研究では、感染後のリンパ組織における炎症性メディエーターの発現および肝門脈血中における同メディエーターの存在を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) エドワジエラ症感染初期ヒラメの準備

解析対象のヒラメは試験項目に応じて小型（魚体重約 12g）および大型（魚体重約 430g）を使用した。ブレインハートインフュージョン液体培地で対数増殖期まで繁殖させた *Edwardsiella tarda* NJB0401 を海水で約  $10^6$  CFU/mL（小型魚）または約  $10^7$  CFU/mL（大型魚）に希釈した。*E. tarda* 海水に試験ヒラメを浸漬し、水温 22 で 10 分間放置することで感染させた。

感染後 4 日～6 日に試験魚をサンプリングし、肝門脈血液、肝臓、肝臓近傍リンパ組織（脾臓および腸管）を試験項目に応じて採取した。

全ての試験魚について、腎臓からの *E. tarda* の分離培養、肝臓組織における好中球の浸潤および *E. tarda* の検出のための免疫組織染色を実施し、試験魚の病態を評価した（表 1）。

表1. 試験魚の病態評価

	病態			
	1	2	3	4
腎臓からの菌分離	-	+	+	+
肝臓における <i>E. tarda</i> の検出	-	-	+	+
肝臓における炎症細胞の集簇	-	-	-	+

#### (2) 脂質メディエーターの解析

炎症性メディエーターの一つである脂質メディエーターの検出を試みた。*E. tarda* 感染初期（病態 2）のヒラメ脾臓における各種エイコサノイドの存在を LC-MS/MS により解析した（一般財団法人化学物質評価研究機構）。また、後述する網羅的遺伝子発現解析で同定されたエイコサノイド合成関連酵素である leukotriene A-4 hydrolase (LTA4H) および alachidonate 5-lipoxygenase (5-LO) を標的とした定量 PCR により、*E. tarda* 感染初期におけるヒラメ脾臓の各種酵素遺伝子の発現について調べた。

#### (3) 網羅的遺伝子発現解析

*E. tarda* 感染初期（病態 1 および 2）のヒラメ脾臓および肝臓から Trizol 試薬を用いて総 RNA を抽出した。

各標本について次世代シーケンス解析を行い、得られた各遺伝子をデータベースと照合し、注釈（アノテーション）付けを行った。

#### (4) ヒラメ IL-1 に対する抗体の作製

ヒラメ IL-1 遺伝子情報（Accession number AB070835）より、抗原に適したペプチド配列部位を予測した。本ペプチドにキャリアタンパク（キーホールリンペットヘモシアニン：KLH）

を付加したものを抗原としてウサギ抗血清を作製し、Protein A/G を用いて抗血清から IgG を精製した。精製 IgG には KLH に対する抗体も含まれていることから、KLH アセトンパウダーによる吸収処理を行い、抗ヒラメ IL-1 抗体として準備した。

本抗体の反応性を確認するために、ヒラメ IL-1 の大腸菌組換えタンパクを作製した。本組換えタンパクは封入体（不溶性タンパク）を形成し、PBS で洗浄された封入体は電気泳動（SDS-PAGE）によりほぼ単一のバンドとして認められた。本封入体を 8M 尿素で可溶化後、1M アルギニン添加 PBS の段階希釈によりリフォールディングした。本可溶化組換えタンパクを材料に ELISA およびウエスタンブロッティングにより抗ヒラメ IL-1 抗体の反応性を確認した。

#### (5) 肝門脈血清における各種炎症性メディエーターの検出

大型ヒラメの肝門付近の門脈を切断し、そこから流出した血液を毛細管で回収した。回収血液を氷上で静置・凝固後、遠心分離により血清を得た（1尾あたり約 500  $\mu$ L）。得られた血清は直ちに凍結保存した。

肝門脈血清中の脂質メディエーターは LC-MS/MS により（上記参照）また IL-1 はウエスタンブロッティングにより検出を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 肝門脈上流リンパ組織で発現する炎症性メディエーター

感染初期の脾臓では、腸管に比べ IL-1 遺伝子の著しい発現上昇が認められた（図 1）。このことから、脾臓は *E. tarda* 感染後早期に活性化され、肝臓を刺激する炎症性メディエーターを産生している可能性が示唆された。一方、腸管は早期の活性化が認められず、肝臓を刺激することができる炎症性メディエーターを産生するリンパ組織としては働いていないことが予想された。以上より、脾臓を解析リンパ組織とすることとした。

*E. tarda* 感染ヒラメ（病態 2）の脾臓および正常ヒラメの脾臓を材料に脂質メディエーター（エイコサノイド）の検出を行った結果、試験区間で差のある成分が見つかった（表 2）。*E. tarda* 感染ヒラメの脾臓ではリポキシゲナーゼ（L0）の作用によりアラキドン酸から合成されるエイコサノイド（ロイコトリエン B4：LTB4、等）が多く、これらの成分は感染に対する炎症反応の誘導に関与していることが考えられた。

同ヒラメ脾臓の網羅的遺伝子発現解析の結果、感染ヒラメの脾臓で検出された遺伝子には、IL-1 等の炎症性サイトカインに加え、生理活性脂質代謝酵素も含まれていた。特に、LTB4 の合成に関与する一連の酵素遺伝子（LTA4H および 5-L0）が本試験により確認された。感染ヒラメの脾臓では LTB4 が上昇していることから、これらの酵素遺伝子はその生合成に関与している可能性が示唆された。同時期の感染ヒラメの肝臓では、LTB4 レセプターおよび IL-1 レセプター遺伝子が発現上昇し、脾臓で合成された各成分に応答する状態であることが推測できた。また、IL-8 や好中球関連分子の遺伝子発現上昇が確認され、肝臓の初期病変である好中球の肝臓内浸潤の状態を裏付けた。

生理活性脂質代謝酵素遺伝子の定量 PCR 法を確立し、*E. tarda* 感染初期（病態 1~3）のヒラメ脾臓におけるこれら酵素遺伝子の発現変化を調べたところ、5-L0 遺伝子は顕著な発現低下を示し、一方、LTA4H 遺伝子は発現上昇する傾向が見られた（図 2）。LTA4H 遺伝子の発現上昇は感染初期の脾臓で生じた LTB4 の生合成に関与しているものと思われる。

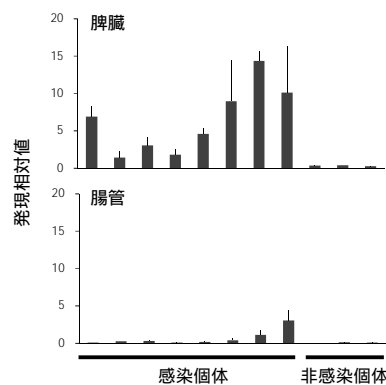


図1. *E. tarda* 感染ヒラメ臓器における IL-1 遺伝子の発現

表2. *E. tarda* 感染ヒラメ脾臓で検出されたエイコサノイド

成分	感染ヒラメ <sup>a</sup>		正常ヒラメ <sup>b</sup>	
	平均(pg/mg) <sup>c</sup>	標準偏差 <sup>c</sup>	平均(pg/mg)	標準偏差
PGF2a	- <sup>d</sup>	-	0.436	0.023
PGE2	-	-	0.677	0.02
LTB4	0.359	0.01	-	-
5HETE	1.748	0.118	-	-
8HETE	4.155	0.141	0.458	0.037
9HETE	2.191	0.157	-	-
11HETE	1.686	0.174	0.267	0.031
12HETE	7.709	0.220	0.765	0.001
15HETE	1.796	0.134	-	-

a: 9尾の脾臓をプールして解析した

b: 13尾の脾臓をプールして解析した

c: 連続3回分析により得られた

d: 検出限界以下

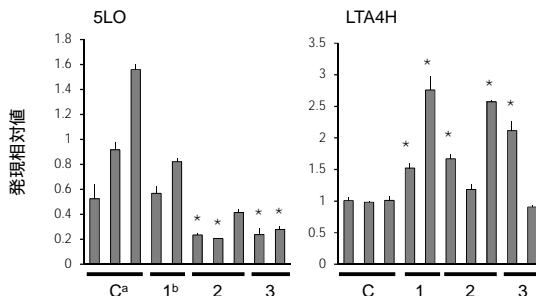


図2. 生理活性脂質代謝酵素遺伝子の発現. a: 非感染 b: 病態 \*: p<0.01

#### (2) 肝門脈血清中の炎症性メディエーター

肝臓上流のリンパ組織である脾臓では多くの炎症性メディエーターの発現上昇が認められた。そこで、同病態時の門脈血中における各種炎症性メディエーターの検出を試みた。肝門脈血清中のエイコサノイドは感染により変動し、アラキドン酸由来エイコサノイド数種（11HETE、12HETE、等）は、脾臓と同様に上昇していた（表 3）。一方、エイコサペンタエン酸（EPA）お

よびドコサヘキサエン酸(DHA)由来脂質メディエーターは感染ヒラメで低下し、アラキドン酸由来エイコサノイドと逆の変動を示した。同時期の脾臓では 5-L0 遺伝子の発現低下が生じており、本酵素の低下が EPA・DHA 由来脂質メディエーターの減少に関連しているものと考えた。近年、EPA・DHA 由来脂質メディエーターの抗炎症作用機序が明らかにされつつある。本研究の成果は *E. tarda* 感染ヒラメの肝炎発生における EPA・DHA 由来脂質メディエーターの作用を示唆する興味深い知見である。本脂質メディエーターの役割解明に向けて、今後継続して研究していくこととする。

表3. *E. tarda*感染ヒラメ肝門脈血清中に検出された脂質メディエーター

成分	感染ヒラメ <sup>a</sup>		正常ヒラメ <sup>a</sup>	
	平均(ng/mL) <sup>b</sup>	標準偏差 <sup>b</sup>	平均(ng/mL)	標準偏差
11HETE	0.745	0.029	0.338	0.027
12HETE	0.131	0.008	0.074	0.008
PGF3a	0.224	0.030	0.445	0.050
10-HDoHE	1.134	0.040	2.262	0.429
14-HDoHE	2.019	0.126	3.092	0.512
17-HDoHE	5.235	0.332	11.687	0.459

a: 2尾の血清をプールして解析した

b: 連続3回分析により得られた

本研究で作製した抗ヒラメ IL-1 抗体は天然(未変性)IL-1 には反応しないことが確認され、ELISA の適用は困難となった。しかしながら、変性タンパクには反応したため、脾臓および肝門脈血清タンパクを対象としたウエスタンブロッティングを試みた。その結果、*E. tarda* 感染ヒラメの脾臓において IL-1 推定分子量の位置に反応バンドが検出された(図3)。このことから、脾臓で産生された IL-1 は肝門脈血中に流入しているものと推測された。しかしながら、肝門脈血清中では IL-1 の存在を確認できなかった。この原因は検出感度の問題であると考えられ、今後、ウエスタンブロット法の改善が必要である。肝門脈を経由して IL-1 は肝臓を刺激していると予想しているが、その作用は明らかでない。

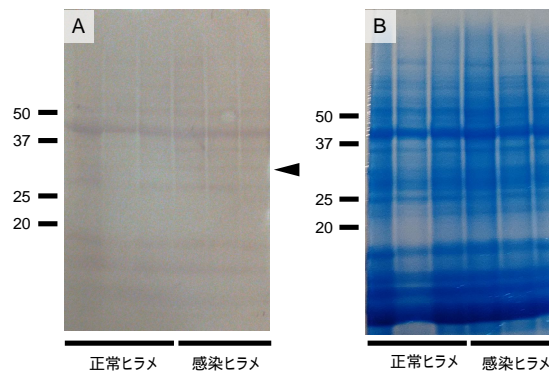


図3. *E. tarda*感染ヒラメ脾臓におけるIL-1 の検出

A: ウエスタンブロット B: SDS-PAGE (CBB)

矢頭はIL-1 を指す

肝門脈上流リンパ組織からの炎症性メディエーターが肝臓を刺激し、細胞走化性因子である IL-8 の産生を高め、好中球を主体とする肝炎を誘発するという仮説のもと本研究を実施した。その結果、炎症性メディエーターであるエイコサノイドや IL-1 が *E. tarda* 感染ヒラメの脾臓(肝門脈上流リンパ組織)で産生され、それらが肝門脈血中にも移行していることを明らかにした。今後は、これらエイコサノイドや IL-1 が線維芽細胞、上皮系細胞、平滑筋細胞、内皮細胞等を刺激し、IL-8 の産生を誘導するか否かを明らかにしていく。これにより、非リンパ組織である肝臓への炎症性メディエーターの作用機序を考察し、リンパ組織を中心とする組織間免疫調節機構の研究へと展開する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

倉田 修, 宮下素優, 戸田宗生, 和田新平, 坂井貴光. ヒラメ MHC クラス 陽性細胞の検出. 日本比較免疫学会第30回学術集会. 2018年.

Takamitsu Sakai, Satoshi Miwa, Atsushi Fujiwara, Tomokazu Takano, Osamu Kurata. Proteomic analysis with 2D-PAGE of liver protein extracted from Japanese flounder affected with *Edwardsiella piscicida*. 10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (国際学会). 2017年.

Shusei Toda, Osamu Kurata, Shinpei Wada, Takamitsu Sakai. Distribution of MHC class positive cells in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. 10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (国際学会). 2017年.

Osamu Kurata, Shinpei Wada. *Edwardsiella tarda*-infected cell degeneration in Japanese flounder neutrophils. 10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (国際学会). 2017年.

倉田 修. 魚類の炎症反応調節・制御機構に関する研究(平成28年度日本魚病学会研究奨励賞). 平成29年度日本魚病学会春季大会. 2017年.

Osamu Kurata, Shinpei Wada. Gene expression of interleukin 8 in liver of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* infected with *Edwardsiella tarda*. 2nd International Conference of Fish and Shellfish Immunology (国際学会). 2016年.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕（計 1 件）

倉田 修. 魚類の炎症反応調節・制御機構に関する研究. 魚病研究. 査読無（平成 28 年度日本魚病学会研究奨励賞記事）. 52, 168-171, 2017.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：坂井 貴光

ローマ字氏名：(SAKAI, takamitsu)

所属研究機関名：国立研究開発法人水産研究・教育機構

部局名：増養殖研究所

職名：主任研究員

研究者番号（8 桁）: 50416046

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。