

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05769

研究課題名(和文) MHCの多型性をアジュバントとして用いたエドワジエラ感染症に対するワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a vaccine against Edwardsiellosis using MHC polymorphism as an adjuvant

研究代表者

片桐 孝之 (Katagiri, Takayuki)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：50361811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：養殖における魚類エドワジエラ症に対するワクチンは、本菌が細胞内寄生病原体であることから、十分な効果が得られていない。これに対し、本研究では、系統の異なるクローンギンブナの血液をアジュバントとして細胞性免疫を活性化することにより、ホルマリン死菌を投与することで、ある程度のワクチン効果を得ることが出来た。また、MHCクラスIのみを発現していると考えられる赤血球の投与においてもFKCのワクチン効果が得られたこと。異系統の血球とFKCの同時投与でも効果が認められたことから、実用化を視野に入れた場合、その作業は比較的容易であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特別な性質を持つ細胞内寄生菌によるエドワジエラ感染症は未だに魚類養殖業において猛威をふるっており、十分な予防効果が得られているワクチンの開発には成功していない。本研究では、魚個体間の主要組織適合抗原(MHC)の多型性に視点をおき、別個体に接種した血液を細胞性免疫活性化のアジュバントとして利用しようとする新しい試みである。

研究の結果、MHCの異なるギンブナの血液注射は、レシピエントにE. tardaホルマリン死菌体投与にするとエドワジエラ症に対して強い免疫を獲得し、攻撃試験において有意な死亡率の低下を見た。また両注射を同時に行うことも可能で、作業が軽減できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vaccines against fish Edwardsiellosis in aquaculture have not been sufficiently effective because the bacterium is an intracellular parasitic pathogen. On the other hand, in this study, we were able to obtain a certain vaccine effect in ginbuna crusion carp by administering formalin killed bacteria by activating cell-mediated immunity using allogenic fish blood injection. In addition, the vaccine effect of FKC was obtained even in administration of red blood cells, which are thought to express only MHC class I. The effect was also observed when concurrent administration of allogenic blood cells and FKC was observed, suggesting that the work is relatively easy when practical application is considered.

研究分野：魚病学

キーワード：MHCの多様性 アジュバント 魚類ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の魚類養殖は、高度経済成長期とともに、1960年代から急速に生産量を増大したが、それに伴って発生する魚類の疾病被害は、養殖経営を脅かすほどに深刻となり、その対策が急務となった。当時は、細菌感染症には抗生物質や抗菌剤などの薬剤を用いた治療を行うという処置しなく、時として過剰な投与が消費者の反発を招き、大きな社会問題となった。この背景を踏まえ、現在では、世界中で病気を予防する「防疫」が主流の考え方となっている。その中心はワクチンであり、世界中のメーカーが市場を押さえるために熾烈な開発競争を行っている。

ワクチンとは、魚が疾病にかかることを予防するとともに、薬剤と比べて食品中や環境中へ成分が残留する恐れがなく、より安全な水産物の生産に役立つものである。その作用には、魚類の持つ特異的な免疫記憶を利用し、ワクチンと同種の病原体の感染に対して予防効果を発揮する。水産用ワクチンの中には「アジュバント」と呼ばれるワクチンに添加される成分を含むものがあり、「強く、長期の免疫応答を可能とする」こと、「ワクチンに含まれる抗原量や接種回数を減らせる」ことなどの大きなメリットを持つ。

ワクチンが消費者に受け入れやすい技術として普及して以来、世界における養殖生産量は劇的に増加しているが、未だに細胞内寄生菌に対するワクチンによる防疫体制は確立していない。すでに、世界中の魚病研究者の間では、細胞内寄生菌に対するワクチン開発の重要性が認識され、精力的に研究が行われているが、実用に耐えうる報告はない。

一般的にワクチンは、特異的な抗体産生を主とする液性免疫のみを活性化する。しかし、細胞内寄生菌が潜む宿主細胞と寄生菌を同時に排除するには、細胞性免疫の活性化が不可欠であるが、その活性化を担うアジュバントは見出されていない。従って、研究課題の核心をなす学術的な「問い」とは、魚類にとって安全・安価なアジュバントとして、血液が細胞性免疫をどのように活性化するのか、活性化した細胞性免疫が、ワクチンとなる細菌を特異的に攻撃し、その細菌を内在する宿主細胞をも排除できるのか、さらに、ワクチン効果を証明する攻撃試験までの、血液の投与量とタイミング、ワクチンの投与量とタイミング、ワクチン効果の有効期間(免疫記憶期間)などの条件はどうかを明らかにすることである。

2. 研究の目的

エドワジエラ属細菌は、グラム陰性の短桿菌で、最大の特徴は、魚体内に侵入した後、樹状細胞、好中球やマクロファージなどの貪食細胞によって貪食されるが、細胞内のファゴソーム(貪食胞)による殺菌機構から回避し、これら細胞内で生存・増殖することができることである。結果的に宿主細胞内に守られていることで、宿主の自然免疫や抗体によって排除されることがないため、循環系によって魚体内全体に分布を広げ、宿主に重篤な感染が成立する。

本研究の目的は、未だに有効なワクチン開発が成功していないエドワジエラ属の細胞内寄生菌に対して、その普及までを視野にいれ、アジュバントを用いたワクチン技術を確立することである。

3. 研究の方法

(1) ギンブナ同種異系統である S3N の血液とホルマリン死細胞ワクチン(FKC)、S3N の血液とリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、PBS と FKC、PBS を OB1 系統のギンブナに 7 日の間隔をあけて接種し、免疫応答とワクチン効果を *E. tarda* 攻撃による生残率で調べた。また、様々な免疫関連遺伝子の発現量を検討した。

(2) OB1 系統のギンブナを 5 区に別け、S3N の血液を打って 7 日後、3 日後、0 日後に FKC を打った 3 区、FKC のみを打った区、PBS のみを打った区を設定した。FKC を打って、14 日後に、*E. tarda* による攻撃試験を行なって生残率を調べた。また、(1) と同様に様々な免疫関連遺伝子の発現量を検討した。

(3) OB1 系統のギンブナを 6 区に別け、2 区には、S3N 系統(異系統)の血液、別の 2 区では OB1 系統(同系統)の血液を腹腔内注射し、他の 2 区ではそれぞれ PBS を腹腔内に注射した。(2) で最も効果が高かった 4 日後に FKC を注射し、血液注射 17 日後に *E. tarada* 攻撃による生残率を調べた。また、(1) (2) と同様に様々な免疫関連遺伝子の発現量を検討した。

4. 研究成果

(1) 攻撃試験では、S3N の血液と FKC 区、S3N の血液と PBS 区、PBS と FKC 区の相対生存率(RPS)は、それぞれ 61.46%、35.41%、30.63%であった。Th1 関連遺伝子 IFN- 1、IFN- 1rel2、IL-12p35、

および T-bet の発現がアップレギュレートされていることから、CMI 誘導による生残率への影響が示唆された。S3N の血液と FKC 区のみ、IFN- 1、IL-12p35、T-bet の遺伝子発現が有意に高く、2 つの物質間の相乗効果が示唆された。さらに、S3N の血液注射区の魚類においてのみ、IFN- 1、IFN- 2 および IFN- rel2 遺伝子の発現が有意に増加した。結果は、同種異系統である S3N の血液への拒絶反応が誘導されたことを示していた。

(2) 攻撃試験の結果、S3N の血液を打って 7 日後、3 日後、0 日後に FKC を打った 3 区で比較したところ、それぞれの生残率は、0%、88.33%、66.67% となり、FKC 注射までに S3N の血液を打って 7 日間経過した区での生存が認められなかったことから、一端細胞性免疫が活性化しても、ワクチン記憶に対して、時間が経ちすぎて、そのアジュバント効果が喪失したのでは無いかと推測された。また、S3N の血液と FKC を同時に打った区でも 66.67% と高い値を示したことから、ワクチン投与作業が 1 度で修了するとうメリットがあることが示された。

一方、S3N の血液を打って 7 日後、3 日後、0 日後に FKC を打った 3 区、FKC のみの区、PBS のみの区の頭腎における免疫関連遺伝子発現解析を行った。S3N の血液を打って 7 日後、3 日後、0 日後に FKC を打った 3 区では、CMI 関連遺伝子発現の一部では、FKC のみの区、PBS のみの区と比較して有意差が認められた。一方、抗体に関連する液性免疫関連遺伝子発現レベルには差は認められなかった。これらの結果は、(1) の結果に類似していた。

(3) 攻撃後、すべてのギンプナが最終的に死亡したが、これは、高濃度の *E. tarda* の攻撃が原因である可能性が考えられた。しかし、PBS と PBS 区、OB1 と FKC 区、OB1 と PBS 区では、すべての個体が死亡するまで、3 日と早く、これは、同系統の OB1 の血液ではアジュバント効果が期待できないことが理由であると考えられた。一方、異系統 S3N の血液と FKC を投与した区では、すべての個体が死亡するまで 8 日間を要した。これは、異系統の血液には、FKC のアジュバント効果が存在するという可能性を有するものと思われた。

II 型 IFN は、IFN- とも呼ばれ、CMI 誘導に重要であると考えられる。S3N 血液と FKC 区で IFN- アイソフォームの遺伝子発現が有意に増加していた。加えて、IFN- rel2 の遺伝子発現は、S3N 血液注射区でのみ有意に増加していた。

以上より、MHC の異なる同種異系統の血液は、FKC のアジュバント効果を高める可能性が示され、細胞内寄生菌に対する新たなワクチン開発の一助になることが期待できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jingjing Cao, Kunihiko Futami, Masashi Maita, Teruyuki Nakanishi, Takayuki Katagiri	4. 巻 143
2. 論文標題 Adjuvant effect of allogeneic blood in vaccines against edwardsiellosis in ginbuna crucian carp <i>Carassius auratus langsdorfii</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 1,6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsi.2023.109133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jingjing Cao, Goshi Kato, Misato Kuge, Teruyuki Nakanishi, Masashi Maita, Kunihiko Futami, Takayuki Katagiri
2. 発表標題 Comparative analysis of immune response on adjuvant effects of allogeneic blood in vaccines against Edwardsiellosis
3. 学会等名 The 13th Asian Fisheries and Aquaculture Forum（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Cao Jingjing, Goshi Kato, Misato Kuge, Teruyuki Nakanishi, Masashi Maita, Kunihiko Futami, Takayuki Katagiri
2. 発表標題 Comparative analysis of immune response on adjuvant effects of allogeneic blood in vaccines against Edwardsiellosis in ginbuna crucian carp <i>Carassius auratus langsdorfii</i>
3. 学会等名 令和4年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------