

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450305

研究課題名(和文) 魚類の抗酸菌症の感染防御における細胞性免疫の役割解明

研究課題名(英文) Role of cell-mediated immunity in the protection against nocardiosis and mycobacteriosis in fish

研究代表者

荒木 亨介 (Araki, Kyosuke)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・助教

研究者番号：30409073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カンパチのinterleukin (IL)-12およびinterferon (IFN)- は細胞性免疫に、IL-10は液性免疫に関与することが示された。特にIL-12については細胞性免疫誘導能および液性免疫抑制能の両方の機能を有しており、ノカルジア症に対する感染防御にはIL-12の産生が必須である事が明らかになった。ブリ類のミコバクテリア症に対する感染防御抗原としてミコバクテリア症原因菌の6 kDa early secretory target (ESAT-6)および10 kDa culture filtrate protein (CFP-10)が有効である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we showed 1) interferon- and interleukin-12 which are related to the cell-mediated immunity, play a crucial role in the protection against *Nocardia seriolae* infection in amberjack, 2) interleukin-10 is related to induction of humoral immune response against *Nocardia seriolae* infection, 3) IL-12 is a promising adjuvant for inactivated vaccine against Nocardiosis in amberjack, 4) 6 kDa early secretory target (ESAT-6) and 10 kDa culture filtrate protein (CFP-10) from *Mycobacterium* sp. have a potential for the protective antigen against *Mycobacterium* sp. infection in fish.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：ノカルジア症 ミコバクテリア症 細胞性免疫 ワクチン ブリ カンパチ IL-12 IFNgamma

1. 研究開始当初の背景

近年、養殖ブリ類にノカルジア症やミコバクテリア症など細胞内寄生細菌を原因菌とする感染症が発生して大きな問題になっている。これら疾病に対しては早急なワクチン開発が求められているが、原因細菌に対する感染防御機構への理解が不十分であることから、その開発は難航している。

哺乳類において、細胞内寄生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な役割を果たす。一方、研究代表者は、クローンギンブナを用いて細胞内寄生細菌であるエドワジエラ症原因菌に対する感染防御において、細胞性免疫の誘導が重要であることを示してきた。しかしノカルジア症やミコバクテリア症に対する感染防御における細胞性免疫の役割については未だ明らかにされていない。

加えて、我が国の水産用ワクチンは不活化ワクチンのみが承認される状況にあり、細胞内寄生細菌感染症に対して有効と思われる細胞性免疫を誘導可能なワクチンの開発は極めて困難である。そのため、ブリ類において細胞性免疫応答を評価可能な手法を確立すると共に、細胞性免疫誘導型ワクチン開発に向けた基礎的知見の集積が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、ブリ類養殖において最も問題となる疾病であるミコバクテリア症およびノカルジア症について、感染防御における細胞性免疫の役割を明らかにするとともに、細胞性免疫誘導型ワクチンの開発を目指すことを目標とした。具体的には以下の点について明らかにすることを目指した。

(1) カンパチの Th1 型サイトカイン Interleukin (IL)-12 および Interferon (IFN) gamma の *N. seriolae* に対する感染防御における役割の解明

(2) カンパチの Th2 型サイトカイン IL-10 の *N. seriolae* に対する感染防御における役割の解明

(3) *N. seriolae* 感染カンパチにおける結節形成と細胞性免疫の関連性について

(4) *Mycobacterium* sp. の細胞性免疫誘導抗原の解析

(5) ノカルジア症に対する細胞性免疫誘導型ワクチンの開発

3. 研究の方法

(1) カンパチは 2 種類の IL-12p35 遺伝子および 3 種類の IL-12p40 遺伝子を有していることから、計 6 種類の IL-12p70 の存在が考えられた。そこで、これら 6 種類の IL-12p70 について昆虫細胞を用いて組換え体を作製

して、各アイソフォームの細胞性免疫誘導能を *in vitro* で解析した。各 IL-12 組換え体、*N. seriolae* 不活化菌体、各 IL-12 組換え体+*N. seriolae* 不活化菌体を添加した培養液を用いてカンパチ白血球を培養した。その後、白血球における IFN γ 、IL-10 遺伝子の発現を解析した。

(2) カンパチより IFN γ 遺伝子を単離して、大腸菌を用いて組換え体を作製した。*In vitro* において、カンパチ頭腎白血球に組換え IFN γ を添加して培養を行い、24 時間後および 48 時間後における白血球の IFN γ 遺伝子発現を解析した。また、カンパチ末梢血白血球の組換え IFN γ 存在下および非存在下における *N. seriolae* に対する殺菌活性を比較した。

(3) カンパチの IL-10 遺伝子を単離して、大腸菌を用いて組換え体を作製した。カンパチ頭腎白血球を組換え IL-10 存在下あるいは非存在下で培養して、6 時間後および 24 時間後における IFN γ と TNF α の遺伝子発現を解析した。次に、IL-10 による B 細胞の増殖効果を調べるため、*N. seriolae* 生菌とともに組換え IL-10 をカンパチ腹腔内に接種した。なお、対照区として *N. seriolae* のみを接種する区も設けた。その後、7 日目および 14 日目に末梢血白血球中の B 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。また、同時に白血球における T-bet および Gata-3 遺伝子の発現を解析することで Th1/Th2 バランスの推移についても解析した。

(4) ブリ類のノカルジア症は感染した *N. seriolae* が腎臓や脾臓に結節を形成した後、潜伏感染期を経て発症に至る疾病である。治療薬としてスルファモノメトキシムやスルフィゾールナトリウムがあるが、外観的に発症が確認された個体に対しては効果が無く、簡便な早期診断技術やワクチンの開発が求められている。そこで、本研究では、ブリ類のノカルジア症の発症機序を探るため、*N. seriolae* に感染したカンパチにおける結節形成と免疫関連遺伝子の発現について経時的に解析を行った。

(5) ブリにおいてミコバクテリア症原因細菌 *Mycobacterium* sp. の培養上清 (Msp-PPD) を抗原として *in vitro* での遅延型過敏応答試験を利用した細胞性免疫誘導能の評価が可能であることをこれまで示してきた。本研究では、結核菌の PPD 中に分泌される細胞性免疫誘導抗原として知られている 6 kDa early secretory target (ESAT-6) および 10 kDa culture filtrate protein (CFP-10) について、*Mycobacterium* sp. より遺伝子を単離した。その後、これらの遺伝子を pcDNA3.1 ベクターに組み込み、ギンブナに接種した。その 1 日後および 3 日後に脾臓を摘出して組

織内の IFN γ 遺伝子の発現を調べた。

(6) カンパチの6種類の組換え IL-12 を混合したものをアジュバントとして *N. seriolae* 不活化菌体に添加したワクチンをカンパチに接種してその後の IFN γ , IL-10, T-bet, Gata-3 遺伝子の発現を解析するとともに凝集抗体価の推移についても調べた。なお、対照区として PBS 接種区および *N. seriolae* 不活化菌体のみを接種した区を設定した。次に *N. seriolae* 生菌を用いた攻撃試験によりワクチンの有効性を評価した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

カンパチ IL-12 の細胞性免疫誘導効果

*In vitro*での IL-12 による細胞性免疫誘導効果を調べた。*N. seriolae* 不活化菌体のみを添加して培養した白血球において IFN γ 遺伝子の発現は認められなかったのに対して、IL-12 組換え体と *N. seriolae* 不活化菌体を添加して培養した白血球においては IFN γ 遺伝子の有意な発現が認められた。一方、IL-10 遺伝子の発現については *N. seriolae* 不活化菌体のみを添加した場合に上昇が認められたが、IL-12 組換え体と *N. seriolae* 不活化菌体の添加によりその発現は抑制された。これらの結果より、IL-12 は液性免疫抑制効果と細胞性免疫誘導効果を有することが示唆された。

カンパチ IFN γ の機能解析

カンパチの組換え IFN γ を添加して培養した頭腎白血球において、無添加時と比較して強い IFN γ 遺伝子の発現誘導が確認された。また、組換え IFN γ の添加が白血球による *N. seriolae* の殺菌活性に与える影響を調べたところ、組換え IFN γ の添加により、殺菌活性が上昇することが示された。

カンパチ IL-10 による細胞性免疫抑制効果の検討

N. seriolae 生菌と共培養したカンパチ頭腎白血球において24時間後に IFN γ および TNF α 遺伝子の有意な発現上昇が認められたが、組換え IL-10 存在下で培養した白血球ではこれら遺伝子の発現が認められなかった。次に *N. seriolae* 生菌と組換え IL-10 を混合して接種したカンパチにおける B 細胞の増殖を調べたところ、接種後7日目および14日目において *N. seriolae* 生菌のみを接種した区と比較して B 細胞の有意な増殖が確認された。また Th1/Th2 バランスについて解析した結果、*N. seriolae* 生菌のみを接種した区では Th1 優位な状態が続いたのに対し、*N. seriolae* とともに IL-10 を接種した区では

Th2 優位に移行していることが明らかになった。これらの結果よりカンパチ IL-10 には細胞性免疫誘導を抑制する効果があることが示された。

N. seriolae 感染カンパチにおける結節の形成と免疫関連遺伝子の発現解析

N. seriolae を人為感染させたカンパチにおいて、感染後3日目より組織内における白血球の浸潤が観察されはじめた。その後14日目に体腎をはじめ複数の臓器において肥大化および肉芽腫形成・乾酪壊死が観察され始め、21日目には肉眼で結節の形成が観察された。その後は組織内の結節数が増加していく傾向にあった。一方、免疫関連遺伝子の発現を調べたところ、IFN γ 遺伝子の発現は3日目より上昇し始めて21日目にピークを迎えた後に減少していった。また細胞障害性 T 細胞マーカーである CD8 α 遺伝子の発現は感染後14日目より上昇し始め、28日目まで有意に強い発現を示した。これらのことから、哺乳類の結核と同様に感染により誘導された細胞性免疫が結節形成を助長すると共に感染の拡大を招いていることが推察された。

Mycobacterium sp. の細胞性免疫誘導抗原の解析

西日本の養殖ブリ類より分離された複数の *Mycobacterium* sp. 株について ESAT-6 および CFP-10 の遺伝子配列を解析して演繹アミノ酸配列を比較したところ、両分子ともに株間で非常に高い同一性が確認された。次にこれら遺伝子を組み込んだ pcDNA3.1 を接種したギンブナの脾臓における IFN γ 遺伝子の発現を調べた結果、筋肉内接種後1日目には発現は認められなかったが3日目に ESAT-6 および CFP-10 接種区において Mock 接種区と比較して有意に高い IFN γ 遺伝子の発現が認められた。このことから *Mycobacterium* sp. の ESAT-6 および CFP-10 は細胞性免疫誘導抗原であることが示唆された。

ノカルジア症に対する細胞性免疫誘導型ワクチンの開発

N. seriolae 不活化菌体のみを接種した区において IFN γ 遺伝子の発現は認められない一方で IL-10 遺伝子の発現上昇が確認された。また T-bet/Gata-3 の発現比より Th1/Th2 バランスを解析したところ Th2 優位となっていることが示された。*N. seriolae* 不活化菌体に IL-12 を添加したワクチン接種区においては、IFN γ 遺伝子の発現上昇が見られたが IL-10 遺伝子の発現は抑制されていた。また T-bet/Gata-3 遺伝子の発現解析より Th1 優位に移行していることが確認された。また *N. seriolae* に対する凝集抗体の分

泌は IL-12 をアジュバントとして添加することで抑制されることが示された。これらの結果より、*N. seriolae* 不活化菌体のみによる感染では液性免疫が誘導されるが、組換え IL-12 を添加することで液性免疫を抑制しつつ細胞性免疫を誘導可能であることが示された。すなわち魚類においても IL-12 は細胞性免疫誘導能を有する事が示された。また、攻撃試験の結果、PBS 接種区および *N. seriolae* 生菌接種区は全滅したのに対し、IL-12 を添加したワクチン接種区においては 88% の生残率を示した。このことより、ブリ類のノカルジア症に対する感染防御には細胞性免疫の誘導が必須であることが示された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

ブリ類において IFN γ および IL-12 の遺伝子を単離して組換え体を用いた機能解析により、これら分子は細胞性免疫に深く関わっていることが明らかになった。一方、魚類 IL-10 は細胞性免疫を抑制しつつ液性免疫の誘導に関わることが示された。国内外において、ブリ類の細胞性免疫に関する詳細な研究例はなく、本研究の新規性は非常に高い。

ブリ類のノカルジア症やミコバクテリア症に対してはワクチン開発が急がれている一方、これまでブリ類のこれら疾病原因菌に対する免疫応答や感染防御において細胞性免疫の有効性を直接的に証明した例についても国内、国外共にない。このような状況から、本研究により得られた成果は、今後のブリ類の細胞内寄生細菌感染症に対するワクチン開発の方向性を指し示す重要なものとなった。

(3) 今後の展望

本研究により、ブリ類のノカルジア症やミコバクテリア症に代表される細胞内寄生細菌感染症に対するワクチン開発において、細胞性免疫の誘導、特に IL-12 の産生誘導が重要であることが示された。今後は、これら疾病に対する不活化ワクチンをベースとして IL-12 の産生を誘導するアジュバントの開発研究が必要である。

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 6 件)

1. Chigwechokha, P.K., M. Tabata, S. Shinyoshi, K. Oishi, K. Araki, M. Komatsu, T. Itakura, K. Shiozaki Recombinant sialidase NanA (rNanA) cleaves alpha2-3 linked sialic acid

of host cell surface N-linked glycoprotein to promote *Edwardsiella tarda* infection. Fish Shellfish Immunol. 査読有 47(1), 34-45. (2015)

2. Yamasaki, M., K. Araki, K. Maruyoshi, M. Matsumoto, C. Nakayasu, T. Moritomo, T. Nakanishi, A. Yamamoto Comparative analysis of adaptive immune response after vaccine trials using live attenuated and formalin-killed cells of *Edwardsiella tarda* in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). Fish Shellfish Immunol. 査読有 45(2), 437-442. (2015)
3. Shibasaki, Y., T. Yabu, K. Araki, N. Mano, H. Shiba, T. Moritomo, T. Nakanishi Peculiar monomeric interferon gammas, IFN γ rel 1 and IFN γ rel 2, in ginbuna crucian carp. FEBS Journal 査読有 281(4), 1046-1056. (2014)
4. Yamasaki, M., K. Araki, T. Nakanishi, C. Nakayasu, A. Yamamoto Role of CD4+ and CD8 α + T cells in protective immunity against *Edwardsiella tarda* infection of ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Fish Shellfish Immunol. 査読有 36(1), 299-304. (2014)
5. Takizawa, F., K. Araki, M. Ohtani, H. Toda, Y. Saito, V.S. Lampe, J.M. Dijkstra, M. Ototake, T. Moritomo, T. Nakanishi, U. Fischer Transcription analysis of two Eomesodermin genes in lymphocyte subsets of two teleost species. Fish Shellfish Immunol. 査読有 36(1), 251-222. (2014)
6. Tsutsui, S., T. Arijii, A. Sato, T. Yoshida, N. Yamamura, T. Odaka, K. Araki, H. Suetake, T. Miyadai, O. Nakamura Serum GlcNAc-binding IgM of fugu (*Takifugu rubripes*) suppresses the growth of fish pathogenic bacteria: A novel function of teleost antibody. Dev. Comp. Immunol. 査読有 41(1), 20-26. (2013)

[学会発表](計 19 件)

1. 早志和真・松本萌・中西照幸・荒木亨介・山本淳 魚類ミコバクテリア症原因細菌が産生する ESAT-6 および CFP-10 の細胞性免疫誘導能の解析 平成 28 年度日本水産学会春季大会 2016 年 3 月 27 日

- 東京海洋大学(東京都港区)
2. 松本萌・Mahmoud Tanekhy Amer・早志和真・西谷篤・今岡慶明・柳宗悦・荒木亨介・山本淳 カンパチの Interleukin-10 による細胞性免疫の抑制 平成 28 年度日本水産学会春季大会 2016 年 3 月 28 日 東京海洋大学(東京都港区)
 3. 松本萌・荒木亨介・早志和真・下野友未・劉倩・柳宗悦・今岡慶明・山本淳 プリ類の Interferon- 遺伝子の単離および機能解析 平成 27 年度日本水産学会九州支部大会 2015 年 11 月 7 日 宮崎大学(宮崎県宮崎市)
 4. 高瀬諒・龍蘭せな・若松麗菜・Petros Kingstone Chigwechokha・本田晃伸・荒木亨介・小松正治・塩崎一弘 魚類肝臓におけるシアリダーゼ Neu1 の意義 平成 27 年度日本水産学会九州支部大会 2015 年 11 月 7 日 宮崎大学(宮崎県宮崎市)
 5. 新吉沙弥香、若松麗菜、Petros Kingstone Chigwechokha、松崎光輝、荒木亨介、小松正治、塩崎一弘 *E. tarda* の感染予防を目的としたシアリダーゼ NanA 阻害物質の探索 平成 27 年度日本水産学会九州支部大会 2015 年 11 月 7 日 宮崎大学(宮崎県宮崎市)
 6. 松本萌・荒木亨介・丸吉浩太・早志和真・末武弘章・柳宗悦・今岡慶明・山本淳 カンパチのノカルジア症不活化ワクチンにおける Interleukin-12 のアジュバント効果 平成 27 年度日本魚病学会秋季大会 2015 年 9 月 26 日 東京大学(東京都文京区)
 7. 荒木亨介・下野友未・丸吉浩太・松本萌・早志和真・山崎雅俊・柳宗悦・今岡慶明・山本淳 プリ類の抗酸菌症不活化ワクチン接種後の免疫応答 平成 27 年度日本魚病学会秋季大会 2015 年 9 月 26 日 東京大学(東京都文京区)
 8. 塩崎一弘・Petros Chigwechokha・新吉沙弥香・大木麗菜・荒木亨介・小松正治 *Edwardsiella tarda* 感染における宿主細胞の N 型糖タンパク糖鎖構造変化の重要性 平成 27 年度日本水産学会秋季大会 2015 年 9 月 24 日 東北大学(宮城県仙台市)
 9. Petros Chigwechokha・新吉沙弥香・本田晃伸・大木麗菜・荒木亨介・小松正治・宮城妙子・塩崎一弘 *Edwardsiella tarda* 感染による脱シアリル化機構と
- その意義 第 34 回日本糖質学会年会 2015 年 8 月 1 日 東京大学(東京都文京区)
10. 松本萌・荒木亨介・早志和真・丸吉浩太・劉倩・柳宗悦・今岡慶明・山本淳 カンパチ Interleukin-12 の機能解析 平成 27 年度日本水産学会春季大会 2015 年 3 月 28 日 東京海洋大学(東京都港区)
 11. 北野弘・荒木亨介・山本淳 SMART 理論による魚病細菌の選択培地の設計 平成 27 年度日本魚病学会春季大会 2015 年 3 月 8 日 東京海洋大学(東京都港区)
 12. 松本萌・荒木亨介・丸吉浩太・山口愉生也・渡邊勇歩・早志和真・劉倩・柳宗悦・山本淳 カンパチ Interleukin-12 遺伝子の単離および発現解析 平成 26 年度日本水産学会秋季大会 2014 年 9 月 21 日 九州大学(福岡県福岡市)
 13. 山崎雅俊・荒木亨介・中西照幸・中易千早・松崎吾朗・山本淳 魚類のホルマリン不活化ワクチンによる液性免疫誘導と細胞性免疫抑制 日本比較免疫学会第 26 回学術集会・第 25 回日本生体防御学会学術総会 2014 年 7 月 9 日 東北大学(宮城県仙台市)
 14. 山崎雅俊・荒木亨介・増田鷹侑・中西照幸・中易千早・山本淳 ギンブナの *Edwardsiella tarda* ホルマリン不活化ワクチンおよび弱毒生ワクチンにより誘導される二次免疫応答の比較 平成 26 年度日本魚病学会春季大会 2014 年 3 月 30 日 函館国際ホテル(北海道函館市)
 15. 山崎雅俊・荒木亨介・中西照幸・中易千早・山本淳 ギンブナのヘルパー T 細胞および細胞障害性 T 細胞は *Edwardsiella tarda* 感染に対する防御免疫において重要な役割を果たす 平成 25 年度日本水産増殖学会 2013 年 10 月 14 日 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
 16. 山崎雅俊・荒木亨介・中西照幸・中易千早・山本淳 ギンブナ Th1 様細胞の *Edwardsiella tarda* に対する感染防御における役割 平成 25 年度日本魚病学会秋季大会 2013 年 9 月 17 日 三重大学(三重県津市)
 17. Araki, K., Y. Shimono, M. Yamasaki, M. Matsumoto, S. Yanagi, K. Maeno, A. Yamamoto Adaptive immune response in yellowtail *Seriola quinqueradiata* induced by formalin-killed

Mycobacterium sp. in oil-adjuvant.
16th International Conference on
Disease of Fish and Shellfish 2013
年9月4日 タンペレ(フィンランド)

18. Yamasaki, M., K. Araki, T. Nakanishi,
C. Nakayasu, A. Yamamoto Comparative
analysis of adaptive immune response
to live and inactivated *Edwardsiella*
tarda in gibel carp,
Carassius auratus langsdorfii. 16th
International Conference on Disease
of Fish and Shellfish 2013 年9月5
日 タンペレ(フィンランド)
19. Tsutsui, S., T. Arijii, A. Sato, T.
Yoshida, N. Yamamura, T. Odaka, K.
Araki, H. Suetake, T. Miyadai, O.
Nakamura
N-acetyl-D-glucosamine-binding
immunoglobulin M of fugu (*Takifugu*
rubripes) inhibits the growth of fish
pathogenic bacteria: A novel function
of teleost antibody. 1st
International Conference of Fish and
Shellfish Immunology 2013 年6月 ヴ
ィーゴ(スペイン)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：魚類用ワクチンアジュバント
発明者：荒木亨介、松本萌、末武弘章
権利者：鹿児島大学、福井県立大学
種類：特許
番号：特願 2016-60775
出願年月日：2016年3月24日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 亨介 (Kyosuke Araki)
鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・
助教
研究者番号：30409073