

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450307

研究課題名(和文) 注射ワクチンは何で効くのか？ —魚類腹腔における獲得免疫機構の解明—

研究課題名(英文) Adaptive immune system in teleost peritoneal cavity

研究代表者

末武 弘章 (SUETAKE, Hiroaki)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：00334326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 養殖魚の魚病対策としてワクチンの投与が行われている。ワクチンの作用基盤は獲得免疫だが、ワクチン投与部位である腹腔でどのように獲得免疫が活性化されるかはわかっていない。

本研究ではまずトラフグ腹腔内の白血球組成を調べた。その結果、抗体産生細胞であるB細胞が最大であり、ついでマクロファージであった。次に、抗原を投与したところ、マクロファージだけではなく、B細胞も取り込むことが示された。さらに、腹腔内のマクロファージが産生する細胞誘引因子によりB細胞が腹腔内に誘引、蓄積することが示された。このように、魚類の腹腔における獲得免疫の活性化にはB細胞とマクロファージの連携が大切であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Vaccination is one of the most effective ways to prevent fish diseases in aquaculture. The vaccination is based on adaptive immune system, but how the system is activated in the fish peritoneal cavity is still unknown.

First, we examined the composition of fugu peritoneal cavity leukocytes. The biggest population was B cells that produce antibody, and the second one was macrophages. Next, we cultured the peritoneal leukocytes with insoluble substance. Both macrophages and B cell took up the substance. At last, we demonstrated that the chemokine secreted from the peritoneal macrophages attracted the peritoneal B cells. Thus, interaction of B cells and macrophages in the fish peritoneal cavity play an important role in fish adaptive immune system.

研究分野：魚類生理学

キーワード：ワクチン 免疫 フグ

1. 研究開始当初の背景

養殖魚の魚病対策は治療より予防が重要であり、ワクチンの投与が世界的に広く行われている。今後もワクチンの投与はますます増えていくことが予想されている。現在、日本で認可されているワクチンは、注射ワクチン・浸漬ワクチン・経口ワクチンの3種類であるが、その中でも注射ワクチンの予防効果が圧倒的に高い。現在認可されている注射ワクチンのほとんどは可食部である筋肉ではなく腹腔内に注射するように指定されている。

ワクチンの作用基盤は獲得免疫とされている。獲得免疫とは、ワクチンや病原体といった抗原が体内に侵入すると、その抗原を特異的に攻撃する抗体などが生じ、再度の侵入に対して迅速に対応する仕組みである(末武、2010)。申請者は獲得免疫系の主役であるリンパ球の1つであるT細胞 (Araki et al., 2008; Toda et al., 2010)と、リンパ球を活性化する抗原提示細胞 (Sugamata et al., 2009)の存在を魚類で初めて示してきた。これらの知見も含め、魚類の獲得免疫研究はこの数年で大きく進展した。

魚類の腹腔内には、抗原提示細胞の1つであるマクロファージと、リンパ球が常在している。腹腔内に注射されたワクチンに対して、抗原提示細胞とリンパ球が腹腔内の獲得免疫応答に関与していると予測される。しかし、腹腔内のこれらの細胞が実際にどのようにして獲得免疫を活性化しているのかという基本的なことは不明のままであり、その解明は魚病ワクチン開発や免疫系の進化の理解につながると期待される。

2. 研究の目的

養殖魚の病害対策として用いられるワクチンは注射ワクチンが主流であり、日本ではそのほとんどにおいて魚の腹腔内に投与するように定められている。これにより、魚は獲得免疫系を発動し、病原体に対する免疫を獲得するが、腹腔内ワクチンがどのように獲得免疫

を誘導するのかという根本的な部分が不明である。本研究では、腹腔内の免疫細胞のうち、獲得免疫応答を担うリンパ球と、リンパ球を活性化する抗原提示細胞に着目し、腹腔内抗原投与後のこれらの細胞の動態とその役割を解明し、獲得免疫系の発動機構を明らかにする。注射ワクチン作用の基盤の解明は、ワクチンの開発や投与法の改善に寄与すると期待される。

3. 研究の方法

魚病ワクチンの投与部位である腹腔内でワクチンがどのように獲得免疫を誘導するのかを明らかにするために、獲得免疫の活性化において重要な抗原提示細胞とリンパ球に着目し、以下の研究を行った。

形態だけでは判別が難しい腹腔内の免疫細胞を免疫学的・分子生物学的に同定した。

腹腔内への抗原投与時の腹腔免疫細胞の動態を蛍光染色により調べた。

腹腔内に集積するIgM陽性B細胞とマクロファージにおけるケモカインとケモカイン受容体の遺伝子発現をRT-PCR法で調べた。

IgM陽性B細胞の走化性をケモタキシスアッセイで調べた。

免疫刺激によるケモカインとサイトカインの発現変動をRT-PCR法で調べた。

二次リンパ組織におけるケモカインの発現を免疫染色で調べた。

4. 研究成果

腹腔内白血球がどのような細胞から構成されているのかを、ゲノム情報が公開され、免疫関連遺伝子の情報が蓄積しているトラフグを材料にして解析した。トラフグを開腹し、腹腔内の白血球を回収した。まず、得られた細胞について、細胞塗抹標本を作製してギムザ染色による細胞染色を行った。また、フローサイトメトリー (FCM) で細胞数や細胞種を解析したところ、トラフグ腹腔ではリンパ球が最も大きい細胞集団であり、次に大

きいのがマクロファージ集団であった。これらのことから、抗原提示能を持つマクロファージとリンパ球とからなるこれらの細胞集団が腹腔の獲得免疫活性化に参与していると考えた。そこで、さらに、当研究室で作製した抗トラフグ免疫グロブリン M (IgM) 抗体を利用した FCM を行ったところ、リンパ球の多くが IgM 陽性細胞であったことから、トラフグ腹腔では IgM 陽性 B 細胞が主要な細胞集団であることが明らかになった。

ワクチンの成分である不活化した細菌などは不溶性の粒子状抗原である。そこで、これらが腹腔内細胞にどのように取り込まれるかを調べた。不溶性の異物を腹腔に投与したところ、貪食細胞であるマクロファージだけではなく、リンパ球である IgM 陽性 B 細胞にも取り込まれていることが明らかになった。これまで、腹腔に投与された抗原はマクロファージや好中球に取り込まれると考えられていたことから、腹腔における抗原取り込みに B 細胞が参与していることが新たに示された。

次に、腹腔内の貪食細胞の追跡実験を行ったが、染色した細胞の末梢組織での回収率が非常に低く、解析が困難であった。一方で、1) 多くの魚病ワクチンでは抗体が主要な作用因子であると考えられること、2) トラフグ腹腔内では IgM 陽性 B 細胞が主要な細胞集団であること、3) IgM 陽性 B 細胞が貪食能を示すこと、さらには 4) 海外の研究チームによって貪食能をもつ魚類の B 細胞が獲得免疫系の司令塔であるヘルパー T 細胞を活性化すること、が明らかにされた。こうしたことから、獲得免疫系の活性化における腹腔内の IgM 陽性 B 細胞の重要性が示された。そこで、IgM 陽性 B 細胞に着目して、以下の実験を進めることとした。これら IgM 陽性 B 細胞を腹腔に効率よく集めることができれば、獲得免疫系を活性化できるのではないかと予測し、IgM 陽性 B 細胞どのようにして腹腔に集積す

るのかを調べた。哺乳類では B 細胞の誘引には CXCL13 という細胞遊走因子 (ケモカイン) が重要な役割を果たしている。また、このケモカインに向かって遊走する細胞にはその受容体である CXCR5 が発現している。そこで、腹腔 IgM 陽性 B 細胞での遺伝子発現を RT-PCR 法により調べたところ、CXCL13 は発現していないものの CXCR5 の発現が認められた。このことは、他の細胞が B 細胞を腹腔に誘引していることを示唆している。そこで、腹腔内のもう一つの主要な細胞であるマクロファージでこれらを調べたところ、CXCL13 の発現が認められた。一方、マクロファージの培養上清に対する IgM 陽性 B 細胞の走化性を調べたところ、IgM 陽性 B 細胞がマクロファージの培養上清に誘引されることが示された。つまり、魚類の腹腔ではマクロファージが産生する CXCL13 によって IgM 陽性 B 細胞が誘引されている可能性が示された。そこで、培養上清中の IgM 陽性 B 細胞誘引因子が CXCL13 かどうかを検討するために、トラフグ CXCL13 に対する抗血清を作製した。腹腔マクロファージ培養上清に CXCL13 に対する抗血清を添加した結果、腹腔マクロファージ培養上清による IgM 陽性 B 細胞の誘引は有意に抑制された。この結果から腹腔では腹腔マクロファージが産生する CXCL13 により、IgM 陽性 B 細胞が腹腔内に誘引、蓄積されることが示された。また細菌由来のリポポリサッカライドをマクロファージの培養液に加えると CXCL13 の発現の増強が確認された。それに伴い炎症性のサイトカインである TNF α の発現の上昇も認められた。TNF α と CXCL13 の関係は今後の課題である。

さらに二次リンパ組織である脾臓において CXCL13 の発現を調べたところ、脾臓においても CXCL13 の発現が確認された。こうしたことから腹腔と二次リンパ組織にはともに CXCL13 を利用した IgM 陽性 B 細胞の誘引機構が存在する可能性が示された。

本研究の結果、魚類腹腔内の主要な細胞である IgM 陽性 B 細胞 とマクロファージはケモカインを介して相互作用し、腹腔内で貪食、および抗体産生を含む獲得免疫の活性化において重要な役割を示すことが明らかになった。

<参考文献>

末武弘章、ゲノムで明らかになった魚類の適応免疫系、日本水産学会誌、Vol.76、No.4、2010、p609-612

Araki K, Akatsu K, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. Characterization of CD8+ leukocytes in fugu (Takifugu rubripes) with antiserum against fugu CD8alpha. Dev Comp Immunol. 32(7), 2008, 850-858.

Toda H, Saito Y, Koike T, Takizawa F, Araki K, Yabu T, Somamoto T, Suetake H, Suzuki Y, Ototake M, Moritomo T, Nakanishi T. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish. Dev. Comp. Immunol. 35(6), 2011, 650-660.

Sugamata R, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y. Teleost B7 expressed on monocytes regulates T cell responses. J. Immunol. 182(11), 2009, 6799-6806.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

小高智之、齋藤匠、中条太郎、前田知己、末武弘章、宮台俊明。「トラフグ腹腔マクロファージが産生する CXCL13 は B 細胞遊走を促進する」第 27 回日本比較免疫学会学術集会(2015 年 8 月 21 日)、小浜市働く婦人の家(小浜市)

齋藤匠、小高智之、中条太郎、前田知己、末武弘章、宮台俊明。「トラフグ腹腔 B 細胞はマクロファージの産生する CXCL13 によって腹腔に集積する」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)

丸山亜美、中条太郎、前田知己、小高智之、末武弘章、宮台俊明。「トラフグに字リンパ組織における CXCL13 発現部位の同定」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)

齋藤匠、小高智之、末武弘章、前田知己、宮台俊明。「トラフグ腹腔 B 細胞の同定と機能解析」第 25 回日本比較免疫学会学術集会(2013 年 8 月 26 日)、岡山理科大学創立 50 周年記念館(岡山市)。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

末武 弘章 (SUETAKE, Hiroaki)
福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授
研究者番号：

(2)研究分担者

宮台 俊明 (MIYADAI, Toshiaki)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授
研究者番号：

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
小高智之 (ODAKA, Tomoyuki)
齋藤匠 (SAITO, Takumi)
丸山亜美 (MARUYAMA, Ami)
中条太郎 (CHUJO, Taro)
前田知己 (MAEDA, Tomoki)