

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450286

研究課題名(和文) 魚類の粘膜免疫の活性化による獲得免疫誘導機構の解明

研究課題名(英文) Local and systemic adaptive immunity toward viral infection via mucosal organs in teleost

研究代表者

杉本 智軌 (Somamoto, Tomonori)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40403993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では粘膜組織である鰓と腸管に着目して、魚類の粘膜に直接ウイルス抗原を投与する経鰓感作と経腸管感作法によって局所および全身の獲得免疫が誘導されるかを検討した。その結果、粘膜感作によって、局所だけでなく全身における細胞性免疫および液性免疫応答が誘導された。興味深いことに、不活化ウイルスにおいてもウイルス感染細胞に対する傷害活性が誘導されたことから、魚類では局所免疫の活性化によって不活化ワクチンでも細胞性免疫が誘導されることが示された。以上の結果より、魚類の鰓および腸管は、ウイルス抗原に対する粘膜ワクチン投与部位として有望であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To understand potential of mucosal tissues (gills and intestine) as vaccination sites for inducing adaptive systemic immunity, we investigated T-cell immunity following direct gill infection method, which exposes virus only to gills and anal intubation. Gene expression analysis and flow cytometry analysis showed that vaccination with viral antigen to the mucosal tissues can induced virus-specific T cell immunity in both systemic (kidney) and mucosal (gill and intestine) organs. In addition, the mucosal vaccination could induce specific cell-mediated cytotoxicity and secretion of CHNV-specific IgM in serum, indicating that local priming of the gill site can generate adaptive systemic immunity. Interestingly, intestinal vaccination with inactive virus could induce Th-1 immune response, and provide efficient protection against the virus infection. These findings suggest that the gills and intestine could be prospective antigen-sensitization sites for mucosal vaccination.

研究分野：魚類免疫学

キーワード：粘膜ワクチン 魚 獲得免疫 ウイルス ギンブナ

1. 研究開始当初の背景

消化管や呼吸器の粘膜組織は主な病原体の感染経路となっており、「粘膜免疫」は、生体防御機構において重要な役割を担っていると考えられている。近年、粘膜免疫を利用した「粘膜ワクチン」は、抗原感作部位である粘膜だけでなく全身の獲得免疫系を誘導することから、次世代のワクチンとして期待されている。

魚類ワクチンの主流な投与方法である注射法は、粘膜を介さず直接ワクチンを接種するため全身免疫のみしか活性化できない。したがって、局所と全身の両免疫系を活性化させることができる「粘膜ワクチン」の開発に成功すれば、今まで以上に効果的な魚類ワクチンが開発されるかもしれない。

2. 研究の目的

魚類は鰓や体表といった組織が粘膜で覆われているため、哺乳類よりも強固な粘膜免疫を有することが推測される。したがって、鰓や腸管といった粘膜組織における魚類の免疫機構の特徴を明らかにすることができれば、粘膜免疫をより効率良く活性化させるワクチンやワクチン投与方法の開発が期待できる。本研究では粘膜組織である鰓と腸管に着目して、粘膜に直接ウイルス抗原を投与する経鰓感作と経腸管感作法によって局所および全身の獲得免疫が誘導されるかを検討する。

3. 研究の方法

獲得免疫における細胞性免疫と液性免疫の評価系が確立されているクローンギンブナ (OB1 系統、S3n 系統) を実験魚とする。ギンブナに感染するギンブナ造血器壊死ウイルス(CHNV)を抗原とする。

(1) 経鰓感作における獲得免疫応答

ギンブナを麻酔したのち、鰓蓋をピンセットで開きフナ造血器壊死ウイルス (CHNV) 希

釈液を鰓葉にピペットで滴下する。その後、ウェットタオルに魚を包んで5分間空気中に放置し、CHNVを吸着させる。感作した魚は、水槽に戻し、サンプリング日まで飼育する。経時的にサンプリングし、経鰓感作における細胞性および液性免疫の応答を以下の項目を解析する。

同系感染細胞を用いたウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性の測定 (細胞性免疫の評価): 同型感染細胞 (CFS 細胞) に対する白血球の傷害活性を LDH 法によって測定する。

CHNV 特異抗体の産生応答 (液性免疫の評価): 血清中の CHNV 特異抗体量を ELISA によって測定する。

各種サイトカインの mRNA 発現量の変動 (液性と細胞性免疫のバランス: Th1/Th2 バランス): ギンブナで同定されている Th1/Th2 バランスに関与するサイトカインをリアルタイム PCR で測定する。

鰓 (局所) と腎臓 (全身) の CD8 陽性細胞、CD4 陽性細胞と IgM 陽性細胞の割合: CD8、CD4 と IgM に対するモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーで解析する。

(2) 経腸管感作における獲得免疫応答

注射針付きシリンジにポリエチレンチューブ (直径 1 mm) を装着し、チューブの先をギンブナの肛門に入れ、ウイルス液 (不活化あるいは生きた CHNV) を注入する。経時的にサンプリングし、経腸管感作における細胞性および液性免疫の応答を(1)で記述した、の実験系により測定する。

(3) 経腸管ワクチンによる感染防御効果

不活化 CHNV を経腸管および腹腔内接種したギンブナに CHNV (10^6 TCID₅₀/100g fish weight) を感染させる。対照区は PBS を接種する。その3日後に腎臓と脾臓を取り出し、培地を加えたあとホモジネートし、組織液を遠心する。上清を回収して 0.25 μm のフィル

ターで過滅菌する。濾過液のウイルス力価を TCID₅₀ 法によって測定し、組織液 1 g あたりのウイルス量を積算する。

4. 研究成果

(1) 経鰓感作後の獲得免疫応答

鰓に直接感染させ 12 時間後の鰓組織 1 g あたりの CHNV 量は 10⁶ TCID₅₀ 以上にまで増殖した。2 週間間隔で 2 回感染させたときの、12 時間後では、10⁷ TCID₅₀ 程度であった。以上のことから、経鰓感染法によって CHNV が鰓に感染すること、鰓において CHNV を排除する 2 次応答が起こっていることが明らかになった。

経鰓感作法によって、末梢血白血球の CHNV 感染細胞に対する細胞障害活性が誘導されたことから、鰓のみの感作で全身の細胞性免疫が誘導されることが分かった。また、経鰓感染によって誘導された細胞性免疫は、同じウイルスを腹腔内に接種した場合より、早く応答することが推測された。

経鰓感作法によって不活化 CHNV を投与すると、血中の抗 CHNV-IgM の上昇が確認されたことから、鰓のみの感作で全身の液性免疫が誘導されることが分かった。

経鰓感作法によって不活化 CHNV を投与すると、鰓における IFN-gamma と腎臓におけるパーフォリンの mRNA 発現量の上昇が確認され、局所と全身における細胞性免疫の亢進が確認された。

腎臓における CD8α 陽性細胞の割合の増加がみられた一方で、IgM 陽性細胞の割合は減少していた。この結果は、鰓からの抗原感作では、細胞性免疫をより優位に誘導することを示唆している。

以上の ~ の結果から、鰓は全身の獲得免疫を誘導することが可能な抗原感作場所であり、効果的に細胞性免疫を誘導することから、ウイルスに対するワクチンの有効な投与の場である可能性が示された。

(2) 経腸管感作後の獲得免疫応答

生きた CHNV による感染だけでなく、不活化ウイルスの感作によって、ギンブナ白血球のウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性が誘導された。

不活化 CHNV で感作した場合、生ウイルスで感染させた場合と同様に、腸管において細胞傷害 T 細胞の関連分子 (IFN, TCR, T-bet) の発現が上昇した。

不活化 CHNV で感作した場合、IgM 陽性細胞の割合は上昇しなかった一方で CD8 陽性細胞の割合の増加がみられた。

(3) 経腸管ワクチン投与によるウイルス感染防御効果

不活化 CHNV を経腸管感作することにより、著しく CHNV の増殖を抑制することを明らかにした (図 1)。この結果は、不活化ウイルスの粘膜ワクチンによって細胞性免疫が誘導され、効果的にウイルスを排除したことを示している。

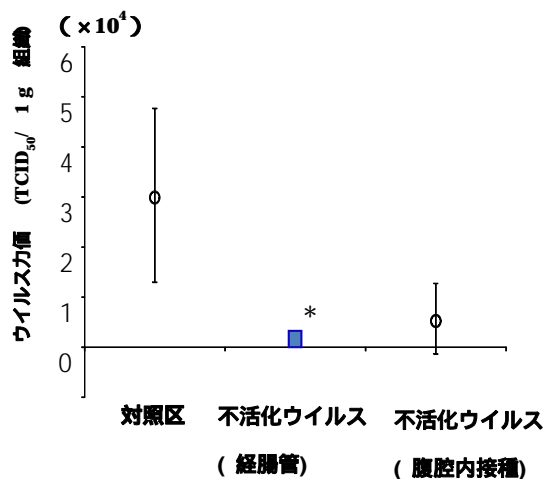


図 1 不活化ウイルス投与後の腎臓のウイルス力価。同量の抗原を腸管、腹腔内の 2 ルートから 2 回ワクチネーションし、その後、CHNV を腹腔内接種により感染させた。*は対照区と比較して有意に低いことを示す。

(1) ~ (3) の結果から、魚類の鰓および腸管は、ウイルス抗原に対する粘膜ワクチン投与部位として有望であることが明らかになった。また、魚類では不活化ワクチンで

も細胞性免疫を誘導できることが示された。

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 5 件)

Nur I, Abdelkhalek NK, Motobe S, Nakamura R, Tsujikura M, Somamoto T, Nakao M. Functional analysis of membrane-bound complement regulatory protein on T-cell immune response in ginbuna crucian carp. *Molecular Immunology*, 2016, 査読有, 70: 1-7. (doi: 10.1016/j.molimm.2015.11.010.)

Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M. Carp thrombocyte phagocytosis requires activation factors secreted from other leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 2015, 査読有, 107-111. (doi: 10.1016/j.dci.2015.05.002.)

Somamoto T, Miura Y, Nakanishi T, Nakao M. Local and systemic adaptive immune responses toward viral infection via gills in ginbuna crucian carp, *Developmental and Comparative Immunology* 2015, 査読有, 52: 81-87. (doi: 10.1016/j.dci.2015.04.016)

Tsujikura M, Nagasawa T, Ichiki S, Nakamura R, Somamoto T, Nakao M. A CD46-like Molecule Functional in Teleost Fish Represents an Ancestral Form of Membrane-Bound Regulators of Complement Activation. *Journal of Immunology*, 査読有, 2015; 194:262-72. (doi: 10.4049/jimmunol.1303179)

Nagasawa T, Nakayasu C, Rieger AM, Barreda DR, Somamoto T and Nakao M. Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. *Frontiers in Immunology*, 査読有, 2014; 5, 445. (doi: 10.3389/fimmu.2014.00445)

〔学会発表〕(計 7 件)

Tajimi S, Somamoto T, Nakanishi T, Nakao M. Induction of T cell immunity by intestinal immunization with inactivated virus in ginbuna crucian carp, The 13th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, Murcia, Spain, 2015-06-29.

Yoshioka K, Kato-Unoki Y, Somamoto T, Nakao M. Structural and functional diversity of properdin isotypes in the common carp complement system, 2015, The 13th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, Murcia, Spain, 2015-06-30

Nagasawa T, Somamoto T, Nakao M., Phagocytosis by carp thrombocyte needs activation factors secreted from other leukocytes population, 2015, The 13th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology, Murcia, Spain, 2015-06-30

満崎敬子・中尾実樹・杣本智軌、コイとギンブナにおけるコイヘルペスウイルスへの免疫応答の比較、日本水産学会春季大会、東京海洋大学、2015-03-28

赤木 良太・長沢 貴宏・杣本 智軌・中尾 実樹、コイB細胞における自然免疫活性化能、日本水産学会、九州支部会宮崎市民ブラザ、2015-01-10.

菅原亮太・吉浦康寿・杣本 智軌・中尾 実樹. Rag1 欠損ゼブラフィッシュの免疫調節機構. 日本水産学会秋季大会, 九州大学, 2014-09-21

Hajime Hatta, Tomonori Somamoto, Atsushi. Satou, Kinjiro Morimoto. Preparation of anti-Koi Herpes Virus IgY and its prophylactic effect. EGG BANFF FORUM CONFERENCE Poland WROCLAW, 2014-06-26.

〔図書〕(計 1 件)

Nakao M, Somamoto T. The evolution of complement system functions and pathways in vertebrates. In: Malagoli D, editor. The Evolution of the Immune system: a Balance between Conservation and Diversity: Elsevier-Academic Press. 2016; Chapter 6, 161-171.

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杣本 智軌 (SOMAMOTO Tomonori)
九州大学・農学研究院・准教授
研究者番号： 40403993

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()