

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850128

研究課題名(和文) ヒラメ鰓抗原取り込み細胞の性状解析：浸漬ワクチン技術の理論的根拠を探る

研究課題名(英文) Characterization of antigen sampling cells in gill epithelium of fish

研究代表者

加藤 豪司 (KATO, GOSHI)

東京海洋大学・その他部局等・助教

研究者番号：50624219

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)：浸漬法はワクチン液へ魚を漬ける方法であり、注射ができない魚種に対しても使用できるが、処方できる感染症が少ないため普及が進んでいない。浸漬投与したワクチン抗原は、魚類の鰓にある抗原取込(Gill epithelial antigen sampling: GAS)細胞から取り込まれる。本研究では、GAS細胞は浸漬ワクチンで効果が認められる病原性細菌のみを取り込むことがわかった。このことから、GAS細胞による抗原取り込みメカニズムをより詳細に研究すれば、浸漬ワクチンの適用拡大につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bath-vaccination is a useful method to immunize small fish that injected vaccine is not suitable for. However, this method can be used for limited number of fish diseases. Vaccine antigens bath-vaccinated to fish are taken up by gill epithelial antigen sampling (GAS) cells. In this study, we revealed that GAS cell take up only bacterins which shows protective efficacy as bath-vaccine. Understanding a physiology of the GAS cells may contribute to expansion of the usage of bath-vaccination method.

研究分野：水圏生産科学

キーワード：抗原取り込み 鰓粘膜 Aeromonas salmonicida UEA-1 浸漬ワクチン 次世代シークエンサー フロ
ーサイトメトリー 魚類免疫

1. 研究開始当初の背景

現在、水産用ワクチンは注射ワクチンが主流であるが、最近ではより投与の簡単な「魚を浸すワクチン(浸漬ワクチン)」開発の要望が高まっている。魚類体表面の大部分は粘膜であるため、浸漬ワクチンの開発には、粘膜組織に「ワクチン抗原を体内に運び込む細胞が存在すること」が必要条件となる。申請者は最近、抗原取り込み能を有する細胞が鰓の粘膜組織に多く存在することを示した。そこで本研究では、鰓粘膜に存在する抗原取り込み細胞(GAS細胞)について、その性状を明らかにするとともに、当該細胞を同定することを目的とする。本研究により、魚類の鰓粘膜を標的とした新たなワクチン投与方法の理論的根拠となる知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、魚類の鰓弁基部の上皮に存在する抗原取り込み細胞(Gill-epithelial Antigen Sampling cell; GAS細胞とする。)に焦点を絞り、その性状を明らかにするとともに、当該細胞を同定することを目的とする。

開始当初はヒラメをモデルとして使用する予定であったが、国内でも浸漬ワクチンが認可されているニジマスへ使用魚種を変更した。

3. 研究の方法

(1) 種々の細菌およびウイルスに対する GAS 細胞の取り込み能

これまでに、*V. anguillarum* の不活化菌体は GAS 細胞により取り込まれることを明らかにした。そこで、その他の細菌およびウイルスを用いてどのような抗原が当該細胞により取り込まれるか検討した。不活化前の病原体は粘膜上皮を侵襲して上皮から侵入する可能性があるため、本研究では使

用するすべての微生物を培養後にホルマリン等で不活化した。不活化した *A. salmonicida*、*Flavobacterium psychrophilum* および *Streptococcus iniae* は適切な濃度に飼育水で希釈し、そこへニジマスを浸漬した。浸漬後、経時的に鰓を採取してホルマリン固定し、パラフィン包埋切片を作製した。各病原体に対する特異抗体を用いて免疫組織化学を行い、暴露した不活化病原体が鰓上皮細胞に取り込まれているか確認した。

(2) GAS 細胞に特異的に接着するレクチンの探索

レクチンは糖鎖に結合性を示すタンパク質であり、ある細胞に特徴的な糖鎖を認識するレクチンは、その細胞を識別するマーカーとして利用されている。マメ科植物ハリエンシダ由来のレクチン *Urex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1)は、哺乳類の M 細胞に特異的に接着するため、M 細胞の識別に用いられている。そこで、GAS 細胞に対する種々のレクチン(UEA-1、小麦胚レクチン WGA、ピーナッツレクチン PNA、ドリコス豆レクチン DBA など)の結合性を解析して、当該細胞を識別するレクチンを探索した。*Aeromonas salmonicida* 不活化菌体を浸漬投与したニジマスの鰓を採取し、ホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作製した。蛍光標識した上記のレクチンおよび抗 *A. salmonicida* 抗体で多重染色を行い、GAS 細胞に特異的に接着するレクチンを特定した。

(3) GAS 細胞の網羅的な遺伝子発現解析

先行研究では、*V. anguillarum* 不活化菌体に暴露したヒラメの鰓上皮には、抗原を取り込む GAS 細胞と取り込まない非 GAS 細胞が観察された。そこで、網羅的な遺伝子発現解析を行い、これら細胞の遺伝子発現

パターンの違いを明らかにする。*A. salmonicida* を不活化してニジマスに浸漬投与した後、上皮細胞を回収し、UEA1 で染色した。染色された GAS 細胞および染色されない非 GAS 細胞をフローサイトメーターで分取し、各細胞集団の遺伝子発現動態を次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析に供した。

4. 研究成果

(1) 種々の細菌およびウイルスに対する GAS 細胞の取り込み能

ニジマスに *A. salmonicida*、*F. psychrophilum* および *S. iniae* の不活化菌体を浸漬投与したところ、*A. salmonicida* のみで鰓上皮による抗原取込が観察された。*A. salmonicida* に対しては不活化ワクチンの浸漬投与で高い感染防御効果が得られることが明らかにされている。一方で、*F. psychrophilum* および *S. iniae* の不活化菌体を浸漬投与しても十分な効果は得られない。以上のことから、GAS 細胞の選択的な抗原取り込みが、浸漬ワクチンの感染防御効果に深く関与していることが示唆された。

(2) GAS 細胞に特異的に接着するレクチンの探索

ニジマスの鰓を採取してパラフィン切片を作製し、UEA1 および WGA によるレクチン染色を行った。その結果、ニジマスの鰓上皮にも UEA1 陽性 WGA 陰性となる上皮細胞が存在することがわかった。また、*A. salmonicida* を取り込んだ細胞は、UEA1 陽性であったが、WGA には陰性であった。このことから、魚類の GAS 細胞は、哺乳類の M 細胞と類似したレクチン結合性を示すことが明らかとなった。

(3) GAS 細胞の網羅的な遺伝子発現解析

A. salmonicida の不活化菌体を浸漬投与したニジマスの鰓から、上皮細胞を回収し、フ

ローサイトメトリーによる解析を行った。GAS 細胞は UEA1⁺Bacteria⁺ の細胞集団として分離することができた。そこで、これらの細胞を分取し、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析を行ったところ、GAS 細胞では抗原のプロセッシングに関わるアネキシンや上皮細胞で発現するケラチン遺伝子を強く発現していた。

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0件)

[学会発表](計7件)

H. Miyazawa, M. Sano, U. Fischer, G. Kato, Antigen uptake in gill epithelium of rainbow trout and ayu during bath-vaccination. 2nd International Conference of Fish and Shellfish Immunology, June 2016, Maine, USA.

G. Kato, T. Yamaguchi, U Fischer. Antigen sampling cells in gill epithelium of rainbow trout. 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, September 2015, Gran Canaria, Spain.

宮澤春哉・佐野元彦・Uwe Fischer・加藤豪司・ニジマスおよびアユの鰓上皮細胞による細菌抗原の取り込み．第 18 回マリンバイオテクノロジー学会，2016 年 5 月，北海道．

加藤豪司．防除が難しい魚類細菌感染症に対するワクチンの開発．平成 28 年度日本水産学会春季大会，平成 27 年度日本水産学会水産学奨励賞受賞者講演 2016 年 3 月 東京．

G. Kato, H. Miyazawa, T. Yamaguchi, H. Kondo, M. Sano, U Fischer. Characterization of antigen sampling cells in rainbow trout gill epithelium.

2nd International Conference of Fish and Shellfish Immunology, June 2016, Maine, USA.

加藤豪司・山口卓哉・Uwe Fischer, ニジマス鰓上皮組織中の抗原取り込み細胞について. 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月, 東京.

加藤豪司・Uwe Fischer, ニジマス鰓上皮組織中の UEA1+WGA-細胞について. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会 2014 年 9 月, 福岡.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 豪司 (KATO, Goshi)

東京海洋大学学術研究院・助教

研究者番号: 50624219

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: