

# 魚類独自の免疫機構を利用した新しい水産用ワクチン技術の開発

加藤 豪司（東京海洋大学大学院 海洋生物資源学部門）

gkato00@kaiyodai.ac.jp

## はじめに

2000年にブリのビブリオ病およびレンサ球菌症不活化混合ワクチンが市販化されたことにより、わが国の養殖生産における魚病被害額はそれまでの半以下に抑えられるようになった。これまでに9種類の病原体に対する17種類の水産用ワクチンが承認されており、魚病被害の軽減に貢献している。一方で、これまでに報告されている魚介類の病原体はすでに100種類を超えており、各病原体に対して迅速にワクチンを開発することが求められている。また、ほとんどの水産用ワクチンは注射法で投与されるが、魚種によっては注射投与ができないものもあり、ワクチン投与法の改善が課題となっている。

## 細胞内寄生性の病原体に対する魚類の免疫応答とワクチンの開発

魚介類の養殖における魚病被害額は、約100億円前後と見積もられている。過去に大きな経済的被害を及ぼしたビブリオ病やレンサ球菌症といった感染症は、ワクチンの登場により予防できるようになった。これらの水産用ワクチンはすべてが病原体をホルマリン等で不活化した不活化ワクチンであり、近年では不活化ワクチンでは予防が難しい細胞内寄生性細菌による感染症の被害率が大きくなっている。例えば、わが国で最大の生産量をほこるブリ類の養殖では、*Mycobacterium* sp.によるミコバクテリウム症、*Nocardia seriolae*によるノカルジア症および*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*による類結節症などが大きな被害をもたらしており、これらの細胞内寄生性細菌による魚病被害額は40億円以上と推計されている。一般的に、不活化ワクチンは宿主の液性免疫応答を誘導し、抗原特異的な抗体の産生を促進する。抗体は病原体表面の抗原物質を認識して結合し、病原体の感染力を奪う（中和抗体）か、貪食細胞による病原体の貪食を促進する（オプソニン化）。しかし、細胞内寄生性細菌は宿主の細胞内に寄生するため、抗体は病原体までアクセスすることができない。このため、細胞内寄生性病原体に対しては、感染細胞を除去する細胞障害性T細胞（CTL）など、抗原特異的な細胞性免疫の誘導が必要である。魚類は獲得免疫系を有する進化的に最も古い脊椎動物であり、特異抗体や細胞障害性T細胞など、哺乳類と類似した免疫システムを有する。一方で、免疫担当細胞である白血球亜集団の構成や免疫システムを制御するサイトカイン分子には、魚類と哺乳類で様々な違いが発見されている。魚類の細胞性免疫を効果的に惹起できる水産用ワクチンの研究・開発を行うためには、このような魚類独自の免疫システムを詳細に知らなければならない。

ヒトの肺結核に対する弱毒生ワクチン *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette and Guèrin (BCG) は、細胞性免疫応答を強力に惹起することで、近縁である *M. tuberculosis*、*M. leprae* および *M. .lcerans* などの細胞内寄生性細菌に対して感染防御効果をもたらす。このことから、魚類への応用を試みたところ、BCG ワクチンはカンパチやヒラメの *Mycobacterium* sp.感染症に対して感染防御効果を示すことが明らかとなった[1]。哺乳類では、抗原特異的な細胞性免疫応答により誘導される遅延型アレルギー反応（Delayed-type hypersensitivity: DTH）を利用したツベルクリン検査

により、BCG 接種や結核菌への感染履歴を調べることができる。そこで、*Mycobacterium sp.*の培養上清から精製したタンパク質（Purified protein derivative: PPD）を抗原液として BCG 接種したヒラメに投与し、PPD 投与後の免疫応答をマイクロアレイ法により解析した。*Mycobacterium sp.*の不活化菌体を接種した対照試験区では PPD 接種後に発現上昇する免疫関連遺伝子はほとんど観察されなかったが、BCG 接種した魚では多くの免疫関連遺伝子の発現上昇が観察された（Figure 1）。哺乳類では典型的な Th1 系応答であるとされているツベルクリン反応であるが、本研究では IgM および IgD 遺伝子などの Th2 系の免疫関連遺伝子の発現上昇も確認され、魚類では Th1 と Th2 の拮抗が比較的緩やかであることが示唆された[2]。

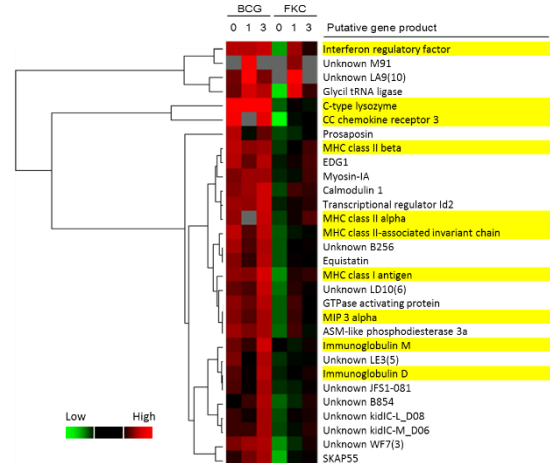


Figure 1 Microarray analysis of tuberculin response in teleost fish.

哺乳類では抗結核免疫を有する個体に PPD を接種すると、抗原提示を受けた  $CD4^+$  Th1 細胞が  $IFN-\gamma$  を産生・分泌することで、PPD 接種部位に肉芽腫性の炎症応答を誘導する。比較免疫学的にみれば、魚類でも  $CD4^+$  Th 細胞や  $IFN-\gamma$  が細胞性免疫において重要な役割を担うことが予想できる。しかし、魚類では哺乳類の CD4 に相同な遺伝子が 2 種類（CD4-1 および CD4-2）存在することが分かっており、魚類細胞性免疫応答におけるこれらの役割分担を明らかにする必要があった。CD4-1 は哺乳類の CD4 分子と同様に 4 つの Ig 領域から構成されており、CD4-2 は 2 つの Ig ドメインのみを有する短い分子である。アミノ酸配列から CD4-2 は哺乳類の CD4 および魚類の CD4-1 分子の祖先的な分子であることが示唆されている。まず、CD4-1 および CD4-2 遺伝子の発現細胞を明らかにするために *In situ* hybridization を行ったところ、両者は互いに異なった細胞集団で発現することがわかった（Figure 2A）。また、 $IFN-\gamma$  遺伝子や  $IFN-\gamma$  誘導遺伝子（MTAP）

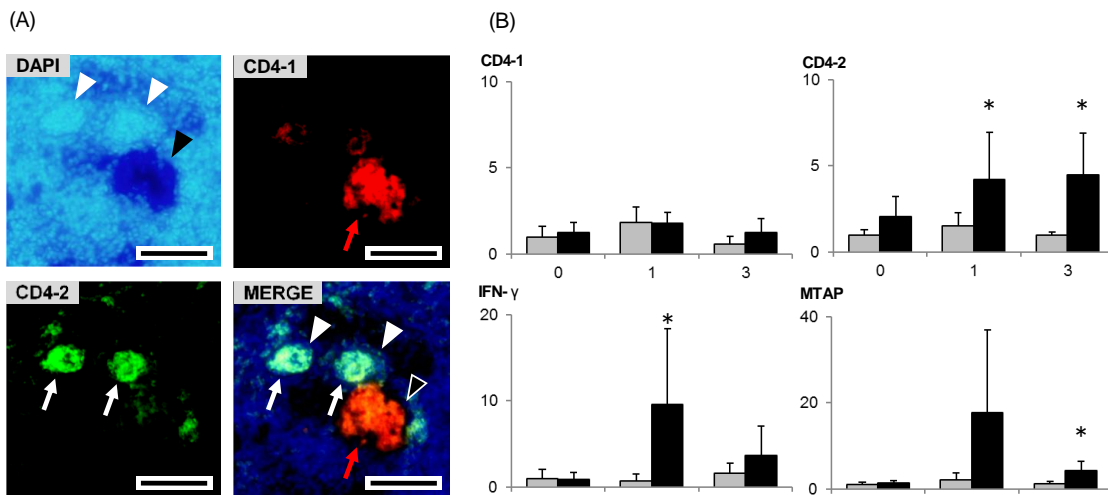


Figure 2 Gene expression of CD4-1 and CD4-2. (A) Fluorescent *in situ* hybridization for CD4-1 and CD4-2 in the spleen of Japanese flounder. Black and white arrowheads indicate melano-macrophage centers and cell clusters, respectively. Red and white arrows indicate CD4-1 and CD4-2 positive cells, respectively. Scale bars, 50 $\mu$ m. (B) gene expression levels of CD4-1, CD4-2,  $IFN-\gamma$  and MTAP in trunk kidney during the tuberculin response. Black and grey boxes represent the average of the gene expression values for 6 fish samples in the BCG-vaccinated group and PBS-injected group, respectively. Error bars indicate SD. Asterisk shows significant difference between BCG-vaccinated group and PBS-injected group at the same time point (\*:  $P < 0.05$ ).

の遺伝子発現上昇に伴い、CD4-2 の遺伝子発現量が顕著に増加することが明らかとなった (Figure 2B)。一方で、CD4-1 遺伝子の発現レベルに大きな変化はみられないことから、魚類の細胞性免疫応答では CD4-1 陽性 T 細胞集団よりも、むしろ CD4-2 陽性 T 細胞集団が重要な役割を担うことが示唆された[3]。

### 魚類の細胞内寄生性細菌感染症 DNA ワクチンの開発

以上の研究成果から、細胞内寄生性細菌に対しては CD4-2 陽性細胞を中心とした細胞性免疫応答の惹起が重要であることが示唆された。BCG ワクチンのように、魚類でも弱毒生ワクチンに関する研究は行われており、細胞内寄生性細菌に対して、病原性の低い近縁の菌種がワクチンとして予防効果を示すことが報告されている。しかし、病原性復帰の危険性、接種動物の隔離が難しいこと、および水環境中では弱毒菌の伝播が容易になることなどの様々なリスクから、水産増養殖分野で弱毒生ワクチンを使うことは難しいとされている。弱毒生ワクチンに対し、近年注目されているワクチン技術が、DNA ワクチンである。DNA ワクチンは病原体の抗原遺伝子を発現ベクターに組み込んだプラスミド DNA であり、接種すると宿主の体内で抗原遺伝子が転写・翻訳され、免疫系に認識される。まず、翻訳された抗原は、それを発現した細胞の MHC class I 分子により抗原提示され、抗原特異的な CTL を誘導する。さらに、発現細胞から分泌された抗原は B 細胞により認識され、抗原特異的な抗体の産生を誘導する。このように、DNA ワクチンは細胞性免疫応答および液性免疫応答の両者を効率よく誘導できる優れたワクチン技術である。

*Nocardia seriolae* はグラム陽性、弱抗酸性の放線菌であり、ブリ、カンパチおよびヒラメに対して病原性を示す。本菌によるノカルジア症は、わが国で最も生産量の多いブリ属魚類の養殖で多発しており、近年ではもっとも被害額の大きな感染症の一つになっている。スルファモノメキシシンおよびスルフィソゾールナトリウムによる治療が可能であるが、抗生物質および合成抗菌剤を多用することは薬剤耐性菌の出現につながるため、ワクチンの開発が強く求められている。ホルマリンおよび加熱処理により不活化した菌体を接種しても感染防御効果が得られないことが報告されており、未だ効果の高いワクチンは開発されていない。そこで、*N. seriolae* の抗原遺伝子である Ag85 様遺伝子 (Ag85L) をクローン化し、本遺伝子を連結した発現プラスミド pAg85L を作製した。これを DNA ワクチンとしてカンパチに投与し *N. seriolae* による感染実験を行った。対照試験区とした PBS 接種区の最終的な死亡率が 66%であったのに対し、pAg85L 接種区では 3% の死亡率にとどまった。また、これら DNA ワクチンを接種したカンパチでは、攻撃後で *N. seriolae* の体内増殖が抑えられており、ワクチン接種魚ではノカルジア症の症状である脾臓の肥大や結節の形成がまったく観察されなかった。このように、DNA ワクチン pAg85L は、魚類のノカルジア症に対して高い感染防御効果を有することが示された[4]。

DNA ワクチンとして接種された抗原遺伝子の DNA は宿主の染色体には組み込まれないため、DNA ワクチン

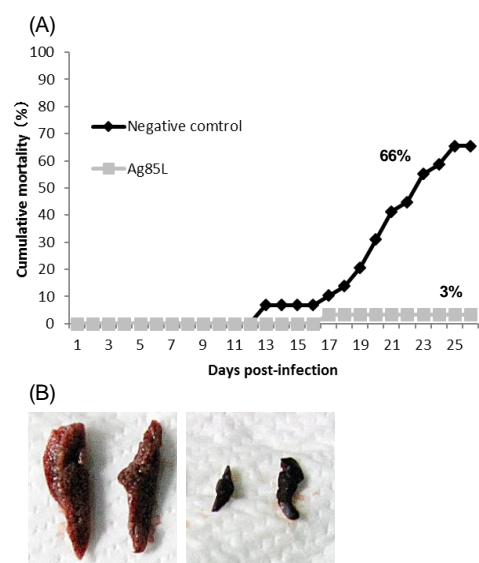


Figure 3 Protective efficacy of DNA vaccine pAg85L against *N. seriolae* infection in amberjack. (A) Cumulative mortality curve for the vaccinated fish. (B) Spleen of the control group (left panel) and the vaccinated group (right panel) after the challenge test.

接種動物は遺伝子組換え動物にはあたらない。わが国でも産業動物への DNA ワクチン使用に関する法整備が始まっており、今後、pAg85L DNA ワクチンが水産用医薬品として承認されることが大いに期待される。

### これからの水産用ワクチン研究・開発の課題

現在使用されている水産用ワクチンは、ほとんどが注射法により投与されている。しかし、アユやマグロのようにハンドリングストレスに弱い魚種や、サイズの小さな稚魚には注射によるワクチンの投与ができない。浸漬法は、ワクチン液に魚を漬けることでワクチンを投与する方法だが、適用できる魚病が少なく、日本ではビブリオ病のみに使用されている。そこで、ビブリオ病浸漬ワクチンの取込ルートについて研究を行った。その結果、浸漬投与されたワクチン抗原は鰓に存在する鰓上皮抗原取込細胞 (Gill epithelial antigen sampling cell: GAS cell) により取り込まれることを明らかにした[5]。今後は、GAS 細胞を標的とした魚類のニードルフリーワクチンの開発を目指し、GAS 細胞の生理学的性状や抗原補足システムについて研究を行っていきたいと考えている。

### 謝辞

平成 28 年農学進歩賞を受賞するにあたり、ご推薦をいただいた東京海洋大学教授 佐野元彦先生ならびに日本水産学会の推薦者選考委員の先生方に厚く御礼を申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、大学院在学中にご指導を賜りました東京海洋大学教授 廣野育生先生ならびに准教授 近藤秀裕先生に深く感謝の意を表します。学術振興会特別研究員としてお世話になりました旧水産総合研究センター増養殖研究所の中易千早先生、松山知正先生、坂井貴光先生および高野倫一先生に深く感謝いたします。最後に、現在、私の下で日夜研究に取り組んでくれている東京海洋大学水族病理学研究室の学生諸君に心より感謝いたします。

### 参考文献

- [1] Goshi Kato, Keitaro Kato, Kei Saito, Yo Pe, Hidehiro Kondo, Takashi Aoki, Ikuo Hirono. Vaccine efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG against *Mycobacterium* sp. infection in amberjack *Seriola dumerili*. *Fish and Shellfish Immunology* 30 (2), pp467-472, 2011.
- [2] Goshi Kato, Hidehiro Kondo, Takashi Aoki, Ikuo Hirono. BCG vaccine confers adaptive immunity against *Mycobacterium* sp. infection in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 34 (2), pp133-140, 2010.
- [3] Goshi Kato, Kana Goto, Ikuyo Akune, Shoichiro Aoka, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono. CD4 and CD8 homologues in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: Differences in the expressions and localizations of CD4-1, CD4-2, CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$ . *Developmental and Comparative Immunology* 39 (3), pp293-301, 2013.
- [4] Goshi Kato, Keitaro Kato, Walissara Jirapongpairoj, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono. Development of DNA vaccines against *Nocardia seriolae* infection in fish. *Fish Pathology* 49 (4), pp165-172, 2014.
- [5] Goshi Kato, Tomokazu Takano, Takamitsu Sakai, Tomomasa Matsuyama, Chihaya Nakayasu. *Vibrio anguillarum* bacterin uptake via the gills of Japanese flounder and subsequent immune responses. *Fish and Shellfish Immunology* 35 (5), pp1591-1597, 2013.