

ギンブナの *Edwardsiella tarda* に対する
感染防御機構に関する研究

Analysis on protective immune responses against *Edwardsiella tarda* infection
in gimbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*

鹿児島大学大学院連合農学研究科

山崎 雅俊

2014

目次

略語一覧	I
------	---

序章	1
----	---

第一節 水産用ワクチン概論

第二節 エドワジエラ症

第三節 哺乳類の細胞内寄生細菌に対する細胞性免疫

第四節 魚類の細胞性免疫機構

第五節 クローンギンブナ

第一章 ギンブナの *Edwardsiella tarda* に対する感染モデルの確立

1. 背景と目的	18
----------	----

2. 材料と方法	19
----------	----

1) 供試魚

2) 供試菌株

3) LD₅₀ の測定

4) ギンブナ貪食細胞の単離

5) 供試細菌と貪食細胞の共培養

3. 結果と考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22

1) *E. tarda* 感染に対するギンブナの感受性

2) ギンブナ貪食細胞内の殺菌活性に対する *E. tarda* の抵抗性

3) 小括

第二章 ギンブナの *E. tarda* 感染時の獲得免疫応答

1. 背景と目的	26
2. 材料と方法	28
1) 供試魚	
2) 供試菌株	
3) 菌接種	
4) サンプルリング	
5) 組織内菌数の測定	
6) 抗体価の測定	
7) 腎臓白血球の単離	
8) CD4 ⁺ 細胞の単離	
9) cDNA の合成	
10) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析	
11) マクロファージおよび CD8 α^+ 、膜型 IgM ⁺ リンパ球の割合	
12) 細胞障害試験	
13) 統計解析	
3. 結果と考察	36
1) 自然免疫応答	
2) 細胞性免疫	
3) 液性免疫応答	
4) 小括	

第三章 ギンブナの *E. tarda* 感染に対する感染防御因子の特定

1. 背景と目的	46
2. 材料と方法	48
1) 供試魚	
2) 供試菌株	
3) <i>E. tarda</i> による感作	
4) CD4 ⁺ および CD8 α ⁺ 細胞の単離	
5) 養子移入	
6) 攻撃試験	
7) 組織内菌数の測定	
8) 白血球の単離	
9) cDNA の合成	
10) RT-PCR による CD4 ⁺ および CD8 α ⁺ 細胞の遺伝子発現解析	
11) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析	
12) 統計解析	
3. 結果と考察	54
1) 移入細胞の分画と発現解析	
2) Th1 様細胞の移入効果	
3) CTLs の移入効果	
4) 小括	

第四章 *E. tarda* 弱毒生ワクチンおよびホルマリン不活化ワクチンによって誘導される二次応答の比較

1. 背景と目的	64
2. 材料と方法	65
1) 供試魚	
2) 供試菌株	
3) ギンブナに対する <i>E. tarda</i> SPM31 株の LD ₅₀ の測定	
4) ホルマリン不活化菌体の作製	
5) ワクチネーション	
6) 攻撃試験	
7) サンプルリング	
8) 白血球の単離	
9) cDNA の合成	
10) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析	
11) 抗体価の測定	
12) CD8 α ⁺ リンパ球の割合	
13) 統計解析	

3. 結果と考察	72
1) <i>E. tarda</i> SPM31 株のギンブナに対する毒性	
2) 攻撃試験によるワクチン効果の検討	
3) FKC ワクチンおよび弱毒生ワクチンにより誘導される免疫応答	
4) 小括	
第五章 総合考察	80
謝辞	86
参考文献	88

略語一覽

Ag : Antigen

APC : Antigen presenting cells

BW : Body weight

CD : Cluster of differentiation

cDNA : Complementary DNA

CMC : Cell-mediated cytotoxicity

CMI : Cell-mediated immunity

CTLs : Cytotoxic T lymphocytes

dpi : Days post-infection

FBS : Fetal bovine serum

FKC : Formalin-killed cells

GFP : Green Fluoresce Protein

GVHR : Graft-versus-host reaction

HKLs : Head kidney leukocytes

IFN- γ : Interferon-gamma

Ig : Immunoglobulin

IL : Interleukin

PBS : Phosphate-buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

SPLs : Spleen leukocytes

LC : Live cells; a live attenuated cells

LD₅₀ : Lethal dose fifty

NO : Nitric oxide

mAb : Monoclonal antibody

MACS : Magnetic-activated cell sorting

MOI : Multiplicity of infection

sIgM : Surface Immunoglobulin M

Ths : Helper T cells

Th1 : Type 1 helper T cells

Th2 : Type 2 helper T cells

TKLs : Trunk kidney leukocytes

TSA : Tryptic soy agar

Treg : T regulatory cells

ROR : Retinoid-related orphan receptor

序章

第一節 水産用ワクチン概論

生物学的製剤（ワクチン）は水産増養殖において疾病の脅威に対抗する最も効果的な方法の一つである。ワクチンは、病原体に対して有効な免疫系の記憶を持たせることで、感染初期に病原体を排除することができる。ワクチンには不活化ワクチン、サブユニットワクチン、DNA ワクチン、弱毒生ワクチンなどの種類がある。代表的なワクチンの利点と欠点を [Table 1](#) に示した。不活化ワクチンにはホルマリンやフェノール、クロロホルム、熱、放射線などで処理し、死菌および不活化ウイルスワクチンと微生物が産生する毒素を不活化処理したトキソイドワクチンが含まれる。一方、サブユニットワクチンは病原微生物の有効抗原遺伝子は大腸菌や枯草菌、酵母のような無害な微生物あるいは培養動物細胞に導入し組み換えタンパクを抗原としたものである。また DNA ワクチンはその有効抗原遺伝子と宿主発現ベクターとの組み換えプラスミド DNA を直接宿主内に接種し、感染防御能を賦与するワクチンである。弱毒生ワクチンは継代培養や物理的および科学的処理によって病原性を弱毒化した変異株を抗原としたもので、最近では遺伝子工学的手法を用いて弱毒化したゲノム改変型についても研究が進められている。このように様々な種類のワクチンが存在するが、その効果や副反応は異なる。一般に、不活化ワクチンは効果が短期間しか持続せず、さらに細胞性免疫や局所免疫の成立が弱いという欠点がある。また、サブユニットワクチンも不活化ワクチン同様に免疫原性が弱く、細胞性免疫の誘導能も弱いとされる。一方、生ワクチンは宿主体内で増殖するため微量な接種で十分な効果がある。また、細胞性免疫や局所免疫が強く誘導されるとされている。DNA ワクチンにおいても有効性が非常に高く、弱毒生ワクチン同様に少量の接種で有効であることがメリットである。したがってワクチンの有効性という点で弱

毒生ワクチンや DNA ワクチンが不活化ワクチンやサブユニットワクチンと比較し優れていると考えられる。現在、海外では *Edwardsiella ictaluri* を原因細菌とするアメリカナマズの腸敗血症や *Renibacterium salmoninarum* を原因細菌とするアユやサケ科魚類の細菌性腎臓病 (BKD) について弱毒生ワクチンをベースとしたワクチンが販売されている。しかし、ワクチン病原体が排出されたりや突然変異により病原性が回復する可能性があり、安全面で問題があるため我が国において弱毒生ワクチンは認可されていない。また、DNA ワクチンについてもカナダでは伝染性臓器壊死症 (Infectious hematopoietic necrosis: IHN) 症に対するワクチンがサケ科魚類を対象に認可されているが、直接 DNA を接種し、魚体内で外来遺伝子が発現されるため、食の安全性の見地から本国では使用が認められていない。このように、国内で販売される水産用ワクチンについては不活化ワクチンおよびサブユニットワクチンのみについて開発が許可されているのが現状である (中西・乙竹, 2009)。

我が国では 2000 年に最初の水産用注射ワクチンが実用化されて以来、急速にワクチンの普及が進み、各疾病による被害も減少した。それまで抗生物質などの薬剤による治療が主であった魚病対策をワクチンによる予防へと転換させた注射ワクチンの功績は極めて大きいといえる。2013 年現在、日本ではアユやサケ科魚類およびブリ属魚類のビブリオ病、ブリ属魚類やヒラメの α 溶血性および β 溶血性レンサ球菌症、マダイやブリ属魚類のマダイイリドウイルス病、ブリやカンパチの類結節症などに対する 9 成分 50 品目の水産用ワクチンが市販されている。一方、養殖現場において甚大な被害があるにもかかわらず、未だにワクチン開発に難航している疾病がいくつかある。*Edwardsiella tarda* を原因細菌とするウナギやマダイ、ヒラメのパラコロ病あるいはエドワジエラ症、*Aeromonas salmonicida* によって引き起こされるサケ科魚類のせつそう病がこれに相当する。また最近ではブリ属魚類において *Nocardia seriolae* や *Mycobacterium* sp. を原因細菌とするノカルジア症やミコバクテリウム症などがレンサ

球菌症と入れ替わるように被害が増加している。これら病原細菌はいずれも細胞内寄生性細菌であるとされる（中西・乙竹, 2009）。

現在、国内で特に開発要望が高いワクチンはエドワジエラ症に対するワクチンである。鹿児島県水産技術開発センターの魚病総合対策事業報告書をもとに国内における平成 23 年度の魚病被害状況を作製し Table 2 にまとめた。この表で示した通りエドワジエラ症はヒラメ養殖において最も多発している疾病である。ブリ属魚類に発生するノカルジア症およびミコバクテリア症も甚大な被害をもたらす疾病ではあるが、発生地域が限定的であることや散発的発生が多いこと、またノカルジア症についてはスルファモノメトキシシンを用いた対策が確立されていることからワクチンが実用化されても全国的には普及しないと考えられている。一方、エドワジエラ症はヒラメに発生する最も深刻な疾病であり、近年ではマダイでも被害が拡大している。さらに本症の発生は 2 魚種が養殖されている西日本全域において見られることから、本症に対するワクチンの実用化が我が国の水産増養殖に与える影響は極めて大きいと考えられる（中西・乙竹, 2009）。

細胞内寄生細菌はマクロファージなどの貪食細胞に貪食されても、食胞内での殺菌機構からエスケープして細胞内で生存・増殖する特性を有している。また液性免疫の主体となる液性因子である抗体分子は細胞内に届かないため、抗体を誘導しても有効ではない。そのため液性免疫を誘導しやすい不活化ワクチン単体では細胞内寄生細菌に対する感染防御は困難であると考えられる。哺乳類では *Mycobacterium tuberculosis* や *Listeria monocytogenes* が細胞内寄生細菌として知られており、その感染防御には細胞性免疫が主要な役割を果たすことが報告されている。しかしながら、魚類の細胞内寄生細菌感染に対する防御免疫において細胞性免疫の役割については明らかになっていない。

Table 1
代表的なワクチンとその特性

ワクチンの種類	利点	欠点
不活化ワクチン	感染源とならない	複数回接種が必要 細胞性免疫の誘導が弱い
弱毒生ワクチン	1回の接種で長期間効果が持続する 細胞性免疫の誘導が強い	ワクチン病原体を排出することがある 病原性が回復する危険性がある
サブユニットワクチン	病原体を培養が不要 抗原の大量生産が可能	免疫原性が弱い 細胞性免疫の誘導が弱い
DNAワクチン	免疫原性が強い	

Table 2

平成23年度全国魚病被害状況

被害額の 多い魚種		被害額の多い疾病順		
		1	2	3
1	カンパチ	ノカルジア症 (19.2 %)	α レンサ球菌症 (17.8 %)	ビブリオ症 (12.3 %)
2	ブリ	ノカルジア症 (52.6 %)	類結節症 (15.8 %)	α レンサ球菌症 (10.5 %)
3	ヒラメ	エドワジエラ症 (29.6 %)	α レンサ球菌症 (14.8 %)	滑走細菌症 (8.6 %)

第二節 エドワジエラ症

エドワジエラ症の原因細菌である *Edwardsiella tarda* は腸内細菌科に属する通性嫌気性のグラム陰性細菌であり、宿主域が広く淡水および海水養殖に深刻な被害をもたらしている。最初の報告は養殖ウナギ (*Anguilla japonica*) であり、その後もアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*)、チダイ (*Evynnis japonica*)、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)、ニシキゴイ (*Cyprinus carpio*)、テラピア (*Oreochromis niloticus*) など多くの魚種において感染が報告されている (Hoshima, 1962; Meyer and bullock, 1973; Kusuda *et al.*, 1977; Sea-Oui *et al.*, 1984; Herman and Bullock, 1986; Kanai *et al.*, 1988; Kusuda and Salati, 1993)。また実験的にはゼブラフィッシュでの人為感染が報告されている (Plessley *et al.*, 2004)。現在ではマダイ (*Pagrus major*) やヒラメ養殖におけるエドワジエラ症による経済的損害が非常に大きく、問題になっている。

本症による産業的被害の深刻さ、また原因細菌の宿主範囲の広さから多くの研究者により感染・発症のメカニズム、病原因子の解明、防除技術の検討が試みられてきた。エドワジエラ症の主な症状として、腎臓の肥大、膿瘍に起因する内臓組織の壊死、腹水や内臓膿腫に起因する壊死、貧血による色素の喪失、肛門の発赤や腹水の貯留などがみられる (Plumb, 1999)。さらに本細菌は貪食細胞の食胞内での殺菌抵抗性を有する細胞内寄生性細菌であることが示されている (Iida *et al.*, 1993; Iida and Wakabayashi, 1993; Rao *et al.*, 2001; Ishibe *et al.*, 2008; Takano *et al.*, 2010)。エドワジエラ症の感染・発症メカニズムとして、江草 (1978) は侵入門戸の病巣から細菌を貪食した好中球が腎臓や腎臓の類洞に到達して好中球内で増殖した後、周囲の組織へ侵入し、組織を融解・壊死させ、その結果細菌の増殖はいっそう盛んになり、同時に好中球の浸潤、集合が起こり、そこに膿瘍が形成されるのではないかと推察している。侵入経路としては環境水中から原生動物を経由し伝搬あるいは上皮細胞を介した体内への侵入が示されている (King and

Shotts, 1988; Ling *et al.*, 2000)。さらに本症の発生水域で飼育されたヒラメは、その後滅菌海水で飼育しても数か月後に発症が見られることから、*E. tarda* は魚体内に潜伏し、好適水温期および魚体の生体防御能の低下に伴って増殖したのち発症に至ると考えられる。*E. tarda* については不活化菌体を用いた感作では感染防御に有効な免疫が獲得できないことが報告されている (Salati *et al.*, 1983; Igarashi and Iida, 2002)。このことから不活化菌体により誘導される液性免疫では感染防御できないことが推察される。すなわち、エドワジェラ症の発症を阻止するためには細胞性免疫を誘導することで細胞障害性 T 細胞による感染細胞の破壊および活性化マクロファージ等の貪食細胞による細胞外に放出された *E. tarda* の殺菌を行う必要があると考えられる。

第三節：哺乳類の細胞内寄生細菌に対する細胞性免疫応答

哺乳類においてはヒト結核症の原因細菌である *Mycobacterium tuberculosis* やリステリア症の原因細菌である *Listeria monocytogenes* などが細胞内寄生細菌として知られている。これら細胞内寄生細菌感染症に対する感染防御においても抗体をはじめとする液性免疫は有効ではなく、細胞性免疫が主要な役割を果たす (Neild and Roy, 2004; Parmer, 2004; Reece and Kufmann, 2008)。

細胞性免疫は主に武装化エフェクターT 細胞によって活性化されたマクロファージと抗原特異的細胞障害を行う細胞障害性 T 細胞 (CTLs) から構成される (Fig. 1)。細胞性免疫は 1 型ヘルパーT 細胞 (Th1) やナチュラルキラーT 細胞、マクロファージ、CTLs によって産生されるインターフェロン (Interferon: IFN) - γ によって誘導され活性化される。活性化マクロファージは一酸化窒素 (Nitric oxide : NO) を産生することで食胞内の細菌を強力に殺菌し、CTLs は細胞内寄生細菌に感染した感染細胞に対して抗原特異的にアポトーシスを誘導する (Carretelli *et al.*, 2005; Darrah *et al.*, 2000; Cambell, 1994; Flynn *et al.*, 1993; Saito and Nakano, 1996; Tascon *et al.*, 1998)。すなわち細胞性免疫は武装化エフェクター細胞である Th1 や CTLs が中心となる免疫機構といえる。

Th1 は樹状細胞による抗原提示とともにマクロファージが産生するインターロイキン (Interleukin: IL) -12 による刺激によって Naïve ヘルパーT 細胞 (Th0) から分化する。Th1 は IFN- γ や IL-2 を産生し、マクロファージを活性化させるとともに CTLs を誘導する。Th1 が産生する IFN- γ は T-bet と呼ばれる Th1 のマスター転写因子によって厳密に制御されている。T-bet が欠損しているマウスでは細胞内寄生細菌の排除が行えないことが明らかになっている (Szabo *et al.*, 2002; Ravindran *et al.*, 2005)。このことは哺乳類の Th1 の分化と活性化、すなわち細胞性免疫誘導において T-bet が必須であることを示している。一方、液性免疫を誘導する Th2 のマスター転写因子として GATA-3 が知られて

いる (Zheng and Flavell, 1997; Zhang *et al.*, 1997)。GATA-3 ノックアウトマウスでは Th2 への分化が起こらないことから Th2 への分化は GATA-3 の発現依存であることが示されている (Zhu *et al.*, 2010; Pai *et al.*, 2004)。これら Th1 と Th2 はそれぞれ異なったサイトカインを産生して Th1 は Th2 分化を、Th2 は Th1 分化を抑制することで、Th1/Th2 バランスを保ちながら生体内の恒常性維持に貢献している。

哺乳類の CTLs は細胞内寄生細菌に対する感染防御において重要な役割を果たす (Nordmann *et al.*, 1992; Tvinnereim and Wizel, 2007)。特に CTLs による抗原特異的細胞障害は細胞内寄生細菌感染細胞の除去のための主要な機構である (Kaufmann and Flesch, 1988; Kaufmann, 1993; Wizel *et al.*, 2008)。CTLs は標的細胞表面の MHC クラス I とともに提示された抗原を自身の細胞表面に発現している T 細胞レセプター (TCR) を介して認識する。また、CTLs はその細胞表面に CD8 を発現しており、CD8 は MHC クラス I と TCR の結合を補助する。CTLs は Fas/Fas リガンド経路およびパーフォリン (Perforin) /グランザイム (Granzyme) 経路の 2 種類の細胞障害機構を持っている。どちらの機構も標的細胞に対してアポトーシスを誘導するが、パーフォリン/グランザイム経路は主要な CTLs の細胞障害メカニズムである (Kägi *et al.*, 1994; Wlash *et al.*, 1994; van den Broek *et al.*, 1996; Trapani and Smyth, 2002)。この経路は主に標的細胞の細胞膜に小孔を形成するパーフォリンと構造的にセリンプロテアーゼファミリーに含まれる細胞質顆粒であるグランザイムで構成されている。CTLs により分泌された顆粒に含まれるパーフォリンは標的細胞の細胞膜に貫通する小孔を開けることで細胞の浸透圧調整機構を奪い、エキソサイトーシスによって分泌されたグランザイムは、パーフォリンによって形成された小孔より細胞内に侵入し標的細胞のアポトーシスを誘導する (Smyth and Trapani, 1995)。この機構により、ウイルスや細胞内寄生細菌に感染した細胞やガン細胞など、いかなる細胞をも殺すことができるとされる。さらに Perforin は *L. monocytogenes* や *M. tuberculosis* のような細胞内寄生細菌の抑制に必須な因子であることがすでに報

告されている (Kägi *et al.*, 1994; Kägi *et al.*, 1996; Stengar *et al.*, 1997; Woodworth *et al.*, 2008)。また Th の中にも細胞内寄生細菌に感染した細胞に対してパーフォリン依存的な細胞障害活性を示す細胞集団が報告されている (Canaday *et al.*, 2001; Klucar *et al.*, 2008)。一方、CTLs はグラニュリシン (Granulysin) と呼ばれる抗菌ペプチドも分泌顆粒内に有しており、本分子は直接的に病原体を殺菌する。さらにこのグラニュリシンはパーフォリンが細胞膜に開けた小孔から感染細胞内に侵入し、細胞内寄生体を直接攻撃することも報告されている (Stengar *et al.*, 1998)。このようにパーフォリン依存的細胞障害機構は細胞内寄生細菌の抑制に重要な役割を担っている。

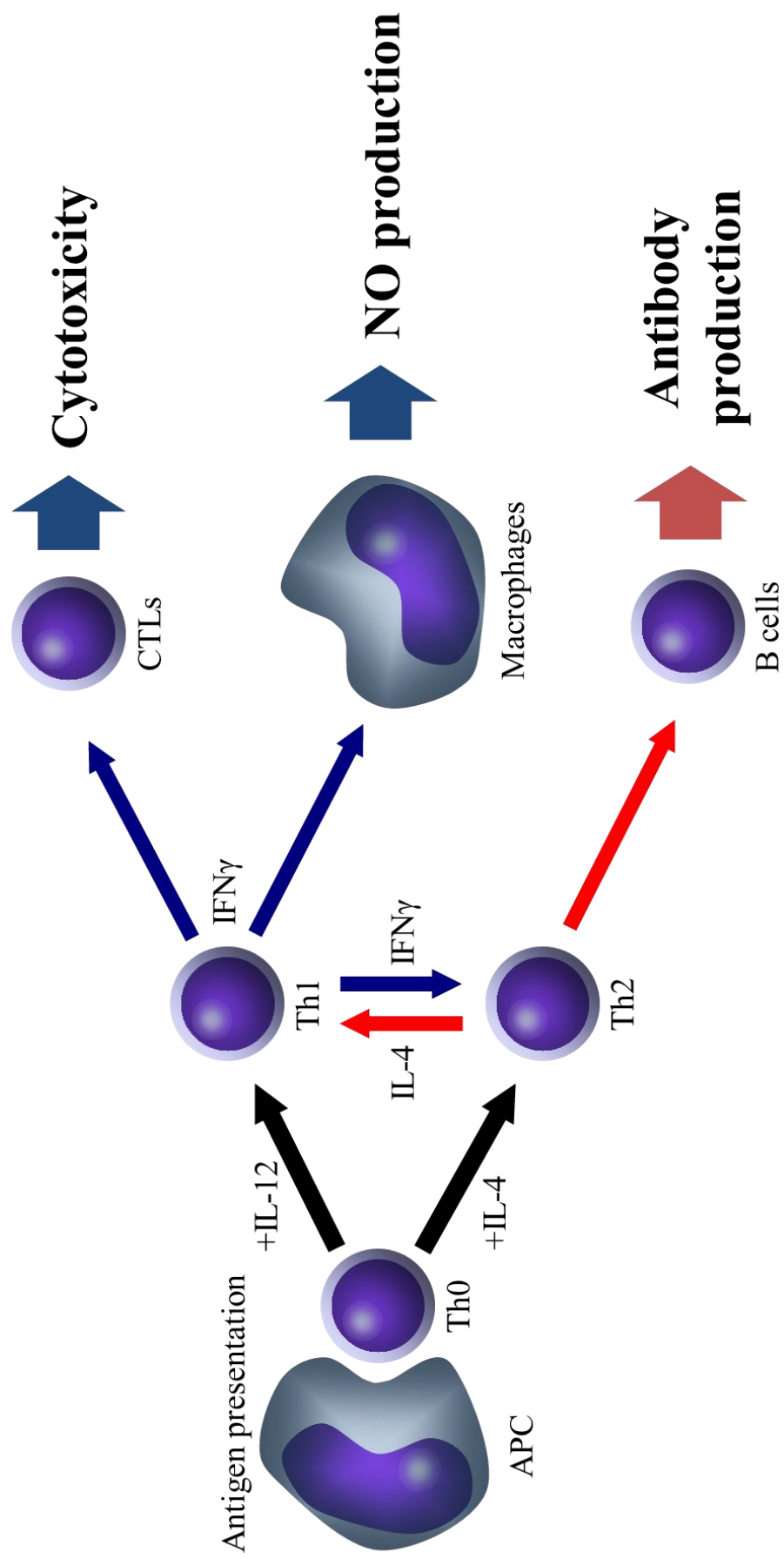


Fig. 1. Adaptive immune system in mammals

第四節 魚類の細胞性免疫機構

前述したとおり哺乳類の IFN- γ は細胞性免疫を誘導するために必須なサイトカインである。魚類においてもキンギョの IFN- γ 組換え体で処理したマクロファージは Th0 から Th1 への分化に必要な IL-12 や T 細胞の増殖因子である IL-2 などの遺伝子発現レベルや NO 産生量を増加させることが示されている (Grayfer and Belosevic, 2009)。これは魚類の細胞性免疫も哺乳類と同様に IFN- γ により誘導されることを示している。また、キンギョの IFN- γ 組換え体で処理したマクロファージは貪食した *Mycobacterium marinum* の生存率を有意に減少させた (Grayfer et al., 2011)。このことから魚類の細胞内寄生細菌感染に対する防御免疫においても哺乳類と同様に細胞性免疫が重要な役割を果たしていると考えられる。

哺乳類の Th0 から Th1 あるいは Th2 への分化はそれぞれ T-bet と GATA-3 によって厳密に制御されている。魚類において T-bet と GATA-3 遺伝子はすでに単離されており、特徴づけが行われている。また T-bet と GATA-3 遺伝子はリンパ球画分や sIgM⁺ 細胞画分に強く発現していることから哺乳類同様に T 細胞が発現していると考えられる (Takizawa et al., 2008a; 2008b)。さらに最近、原生動物である *Ichthyobodo necator* 感染時に IL-4/13A、IL-10、IgM、GATA-3 遺伝子の発現や sIgM⁺ 細胞数の増加など Th2 様の免疫応答の誘導が観察され、一方 CD8 や TCR β の遺伝子発現や CD8⁺細胞数の減少などの Th1 様の免疫応答の抑制が観察された (Chettri et al., 2013)。このことから魚類においても哺乳類同様に Th1/Th2 分化メカニズムが存在すると考えられる。

第三節で述べたとおり哺乳類の CTLs の抗原特異的細胞障害機構は細胞内寄生細菌感染細胞を含め細胞内寄生体感染細胞の破壊を行う主要なメカニズムである (Oldstone, 1987; Zinkernagel and Doherty, 1979; Kaufmann and Fleck, 1988; Kaufmann, 1993; Witzel et al., 2008)。魚類においてもアロ抗原やウイルス感染細胞に対して MHC クラス I 拘束性

の抗原特異的細胞障害機構が存在することが報告されている (Hasegawa *et al.*, 1998; Somamoto *et al.*, 2000; Nakanishi *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2006; Utke *et al.*, 2007; Utke *et al.*, 2008)。また、哺乳類の CTLs と同様に魚類の同種異型細胞に対する抗原特異的細胞障害活性を有する細胞集団は細胞表面に CD8 α 分子を発現しているリンパ球であることが確認されている (Toda *et al.*, 2009)。さらに哺乳類と同様にその細胞障害機構はパーフォリン/グランザイム経路依存的細胞障害であることもすでに報告されている (Companjen *et al.*, 2006; Toda *et al.*, 2010)。また哺乳類の CTLs には直接的に細菌に作用するグラニュリシンが存在する。近年、魚類においてもグラニュリシンの遺伝子が単離されており、CD8 α^+ リンパ球画分で強く発現していることが報告されている (Takizawa *et al.*, 2011)。また魚病細菌である *E. tarda* や *Lactococcus garviae* で感作した魚類の CD8 α^+ 細胞には、それぞれの細菌を抗原特異的に直接殺菌する機構が存在していることが報告されている (Nayak and Nakanishi, 2013)。これらの知見は魚類の細胞性免疫応答は細胞内寄生細菌感染に対する防御免疫においても重要な役割を果たすと考えられる。

第五節 クローンギンブナ

現在、数多くの水産用ワクチンが実用化されているが、その有効性評価は攻撃試験と特異抗体価のみを指標として行われているのが実情である。また、現行の水産用ワクチンの中で感染防御能と抗体価との間に相関が見られるワクチンはビブリオ症に対するワクチンのみであり、その他の疾病に対するワクチンの作用機序はわかっていない。Hastings (1988) はワクチンの有効性は感染防御能のみで評価されるのではなく、標的抗原に対する液性免疫および細胞性免疫誘導能を含めて評価すべきであると述べている (Hasting, 1988)。今後の水産用ワクチンの発展のためには液性免疫に加えて細胞性免疫の評価系が必須である。しかし現在、養殖対象魚において細胞性免疫機構検査法は確立されていない。

細胞性免疫において中心的な役割を果たす Th1 や CTLs は MHC 分子を介して自己・非自己認識を行うが、MHC 分子は多型性・多様性に富んでいる。そのため *in vivo* および *in vitro* における T 細胞のヘルパー活性や細胞障害活性を厳密に評価するためには MHC 型が一致する個体や細胞株を用いることが重要である。すなわち、細胞性免疫応答を評価するためには近交系やクローン系統を有する魚種を用いる必要がある。

ギンブナは自然環境下で雌性発生を繰り返すことから、得られる個体はすべてクローンである。またギンブナには確立されたクローン系統が複数存在し、さらに各クローン系統に由来する培養細胞株も存在する。そのため同一クローン系統内での細胞の共培養や同一クローン系統の個体間での細胞移植を拒絶反応なしに行うことが可能である。またギンブナにおいては細胞性免疫および液性免疫に関わるサイトカインや細胞表面分子マーカーの遺伝子が単離・同定されている (Somamoto *et al.*, 2005; Somamoto *et al.*, 2006; Takizawa *et al.*, 2008a; 2008b; Araki *et al.*, 2013)。さらに、ヘルパーT細胞や CTLs、B細胞といったリンパ球サブセットの細胞表面マーカー分子 (CD4, CD8, IgM) に対す

るモノクローナル抗体が作出されていることから、それらリンパ球サブセットの単離が可能である (Toda *et al.*, 2009; Toda *et al.*, 2011a, 2011b; Somamoto *et al.*, 2013)。加えて、ギンブナはそのクローン特性によって養子移入試験が可能である。養子移入は感作した特定のリンパ球サブセットを未感染個体に移入することで、その細胞集団の感染防御における役割を *in vivo* で解析する方法である (Pedrazzini *et al.*, 1987; Orme *et al.*, 1987; Nordmann *et al.*, 1992; Szalay *et al.*, 1995; Feng and Britton, 2000)。これまでにフナ造血器壊死症ウイルスに対する感染防御における抗原得的 CTLs の重要性がギンブナを用いた養子移入効果試験によって明らかにされている (Somamoto *et al.*, 2002; Somamoto *et al.*, 2013)。さらにギンブナの移植片対宿主反応 (Graft-versus-host reaction: GVHR) における T 細胞の免疫反応についても本試験法によって解明されている (Shibasaki *et al.*, 2010)。このようにギンブナはそのクローン特性を生かし、*in vivo* および *in vitro* における細胞性免疫の詳細な解析が細胞単位で行える魚種である。

魚類の細胞性免疫研究はアメリカナマズや 3 倍体ニジマス、クローンギンブナなどで行われている。アメリカナマズには数種類の T、B、NK 細胞株が存在し、細胞障害試験法も確立されている (Shen *et al.*, 2002)。しかしアメリカナマズにはクローン系や近交系が存在しないため、養子移入あるいは組織片移植といった *in vivo* での試験は行えない。また T 細胞を識別可能なモノクローナル抗体は作製されておらず、T 細胞サブセットレベルでの解析も不可能である。一方、3 倍体ニジマスでは細胞障害試験法も確立されおり、さらに CD8 α に対するモノクローナル抗体もすでに作製されている (Fischer *et al.*, 2003; Utke *et al.*, 2007; Utke *et al.*, 2008; Takizawa *et al.*, 2011)。そのため細胞性免疫応答はアメリカナマズよりも詳細に解析が可能である。しかし、3 倍体ニジマスは自然環境下には生息しておらず、人工授精により作出されているため系統の維持が困難である。一方、ギンブナは自然環境下においてクローン魚である上に飼育についても容易で特殊な施設も必要としない。このように他魚種と比較して飼育や系統の維持が容易で、

かつ細胞性免疫に関する研究ツールの豊富なギンブナは魚類の細胞性免疫応答を解析する上で最適なモデル動物である。

第六節 本研究の目的

第一節で述べたようにこれまでの水産分野における新規ワクチンの開発は攻撃試験と特異抗体価のみを指標とした有効性評価により進められてきた。しかし、これまで市販化されたワクチンの中には、どのような機序で有効性を発揮するのかが不明なもの存在する。すなわち現状の液性免疫応答のみを指標とした有効性評価手法では不十分であり、特に液性免疫が有効性を示さないと考えられる細胞内寄生細菌に対するワクチン開発は難航している。このような病原体に対するワクチン開発を促進させるためにはこれまでの有効性評価法に加えて細胞性免疫も含めた総合的な評価技術の確立が必要となる。

そこで本博士論文では現在、水産用ワクチンとして最も要望の高いエドワジエラ症に着目し、ワクチン開発の促進を目指して、その原因細菌である *E. tarda* に対する感染防御において主要な免疫機構を調べることを目的とした。そのために第一章では細胞性免疫を評価可能な唯一の魚種であるクローンギンブナをモデル魚として *E. tarda* への感受性を明らかにし、第二章では *E. tarda* 感染後の細胞性免疫と液性免疫応答を調べ、*E. tarda* 排除に貢献する免疫応答を明らかにした。第三章では各リンパ球画分の養子移入効果試験により *E. tarda* に対する感染防御において有効な細胞集団および免疫系の特定を行った。第四章では有効性の異なる弱毒生ワクチンとホルマリン不活化 (FKC) ワクチンを用い、ワクチン接種魚における獲得免疫応答を比較することでエドワジエラ症に対して有効性を示すワクチンの開発方針を明らかにした。

第一章 ギンブナの *Edwardsiella tarda* に対する感染モデルの確立

1. 背景と目的

序章で述べたように、*E. tarda* は貪食細胞内における殺菌機構に対して抵抗性を有する細胞内寄生細菌であり、その感染に対する防御免疫においては細胞性免疫が主要な役割を果たすと考えられる。一方、ギンブナは細胞性免疫を *in vivo* および *in vitro* で解析できる唯一の魚種である。しかし、*E. tarda* 感染に対して感受性試験を行った報告はなく、また細胞内寄生細菌に対する試験系も存在しない。そこで本章ではギンブナの *E. tarda* 感染に対するモデル動物としての適性を明らかにすることを目的とし、ギンブナの *E. tarda* に対する感受性を攻撃試験により検討するとともに、ギンブナ貪食細胞内の殺菌活性に対する抵抗性を *in vitro* 試験によって解析した。

2. 材料と方法

1) 供試魚

長野県産諏訪湖産クローンギンブナ OB1 系統 (*Carassius auratus langsdorfii*) は独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所より分与を受けた。水温を 25 °C に設定した 120 cm 循環式水槽に収容し試験開始まで 2 週間順応させた。

2) 供試菌株

供試菌株にはエドワジェラ症罹患ヒラメの腹水から分離された病原性株 *Edwardsiella tarda* FPC498 株を使用した。試験には凍結保存した菌株を用いて病原性回復のために魚体通過を行い、再分離された菌体をトリプトソーヤ寒天 (TSA) 培地 (日水製薬, Japan) で継代した後、25 °C で 48 時間培養後に使用した。

E. tarda の食細胞内での殺菌活性に対する抵抗性を調べるため、対照区にブリ属魚類のビブリオ病の病原細菌である *Vibrio anguillarum* を用いた。本細菌は魚類の宿主細胞内での細胞内寄生性を示さない細菌である。供試菌株にはブリ稚魚 (モジャコ) 由来病原性株 *V. anguillarum* NUF113 株を使用した。試験には凍結保存した菌株を TSA 培地で継代し 25 °C で 48 時間培養後に使用した。

3) LD₅₀ の測定

TSA 培地に増殖した菌体を掻き取り湿菌重量を測定した後、滅菌処理した PBS を用いて 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ CFU/ml に調整した。供試魚に調整した各菌液を 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて 100 g 魚体重あたり 1 ml となるように左体側より腹腔内接種した。試験魚は 60 cm 水槽に各試験区 6 尾ずつ収容し 25 °C、無給餌で 30 日間観察した。試験期間中は接種後、5 日毎に半量の水を交換した。死亡魚については 2 時間以内に取り上げて症状を確認した後、腎臓、脾臓および肝臓から菌分離を行った。また菌接種 30 日後、すべての試験魚を取り上げたのち、各組織より菌分離を行った。さらに死亡率からギンブナに対する *E. tarda* の LD₅₀ を Reed and Muench (1938) の方法により求めた (Reed and Muench, 1938)。

4) ギンブナ貪食細胞の単離

ギンブナの貪食細胞は頭腎および体腎より単離した。すなわち頭腎および体腎を 100 μm Nylon mesh (BD Falcon™, U.S.A.) 上で緩やかに圧をかけて磨砕し、滅菌スピッツ管 (栄研化学, Japan) 内に 3 ml の 1% FBS (JRH, U.S.A.) を含む RPMI-1640 培地 (RPMI-1; 日水製薬, Japan) に懸濁させた。そこに 1.040 および 1.080 g/ml に調整した Percoll™ 溶液 (GE Healthcare, U.S.A) を 2.5 ml 注射筒および 20 G×70 のカテラン針を用いて、スピッツ管底部に静かに加え、非連続の密度勾配の層を形成し、4 °C、500 ×g で 30 分間遠心分離を行なった。その後、1.040 g/ml 層と 1.080 g/ml 層の界面より白血球を回収し、RPMI-1 に懸濁した後 3 回洗浄を行ない、RPMI-1 に再懸濁した。そこに 1.080 および 1.090 g/ml に調整した Percoll™ 溶液を上記の方法に従って加え 4 °C、500 ×g で 30 分間遠心分離を行なった。分離後、1.080 g/ml 層と 1.090 g/ml 層の界面より貪食細胞を取り出し、RPMI-1 に懸濁させ 3 回洗浄を行なった。洗浄後、Thoma 血球計算盤 (ミナトメディカル, Japan) により貪食細胞数を計数した。

5) 供試細菌と貪食細胞の共培養

4) で単離した貪食細胞を 1×10^8 cells/ml に調整し、MOI = 10 となるように *E. tarda* FPC498 株および *V. anguillarum* NUF113 株をそれぞれ加えスピッツ管内で 25 °C、2 時間共培養し貪食させた。培養後、RPMI-1 で 3 回洗浄し、貪食されていない細菌を殺菌するためペニシリン (200 U/ml)、ストレプトマイシン (200 µg/ml)、ゲンタマイシン (200 µg/ml) 含有 RPMI-5 に懸濁し、25 °C で 1 時間培養した。培養後、RPMI-1 で 3 回洗浄し、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (100 µg/ml)、ゲンタマイシン (100 µg/ml) 含有 RPMI-5 に懸濁した。その後、96 穴細胞培養プレートに 5×10^5 cells/well となるように加え、25 °C で 3 時間培養した。

6) 細菌数の測定

5) の培養開始後、1 時間おきに各ウェルよりサンプリングした。すなわち培養液と同量の 2% Triton-X 含有 PBS を各ウェルに加え細胞を溶解した。細胞溶解液をチューブに回収して 22 °C、10,000 ×g で 3 分間遠心分離した後滅菌 PBS を用いて 3 回洗浄を行った。その後、Miles and Misra 法 ([Miles et al., 1938](#); [Kato et al., 2012](#)) を用いて各ウェル内の菌数を測定した。

3. 結果と考察

1) *E. tarda* 感染に対するギンブナの感受性

攻撃試験後の死亡率の結果を Table 3 に示した。100 g 魚体重あたり 10^7 および 10^8 CFU 接種区はすべて死亡した。また、 10^6 CFU 接種区および 10^5 CFU 接種区の死亡率はそれぞれ 66.7 % および 16.7 % となり、供試魚の死亡率は接種菌数依存的な増加を示した。これらの結果より *E. tarda* FPC498 株のギンブナに対する LD_{50} は 5×10^5 CFU/100 g 魚体重と算出された。また、すべての死亡魚において、エドワジエラ症の典型的な症状である腹水の貯留や腎臓の肥大化、肛門の発赤などが観察され、標的組織である腎臓や脾臓、肝臓より *E. tarda* が単離された。さらに死亡魚より単離された *E. tarda* を未感染魚に接種したところ同様の症状を示した。以上の結果は感受性動物における再現性の条件を満たしており、クローンギンブナは *E. tarda* に対して感受性を示すことが明らかとなった。

2) ギンブナ貪食細胞内の殺菌活性に対する *E. tarda* の抵抗性

ギンブナ貪食細胞内の *E. tarda* および *V. anguillarum* 生残率を Fig. 2. に示した。貪食細胞内に存在する *V. anguillarum* は培養開始時より時間経過とともに減少傾向を示し、試験開始 3 時間後には培養開始時の細菌数の 60 % まで低下した。一方、貪食細胞内の *E. tarda* は培養開始から 3 時間経過しても培養開始時の細菌数の 90 % 程度であった。以上のように *E. tarda* はギンブナ貪食細胞内の殺菌活性に対しても抵抗性を示すことが明らかになった。

3) 小括

ギンブナは *in vivo* および *in vitro* における細胞性免疫の詳細な解析が細胞単位で行える唯一の魚種である。一方、細胞内寄生細菌である *E. tarda* 感染に対しては細胞性免疫が主要な役割を果たすとされているが、詳細は明らかではない。第一章では *E. tarda* 感染に対するギンブナのモデル動物としての適性を検討した。攻撃試験の結果よりギンブナはエドワジエラ症の典型的な症状を示した。またギンブナ貪食細胞内の殺菌活性に対する抵抗性を *in vitro* で確認した。

ギンブナはエドワジエラ症に感染し、*E. tarda* はギンブナの貪食細胞内に細胞内寄生性を示すことから、ギンブナは *E. tarda* 感染に対する免疫応答を調べる上で適当なモデル動物であると考えられる。

Table 3LD₅₀ of *Edwardsiella tarda* against ginbuna crucian carp

Challenge dose* ¹ (CFU/100g body weight)	Strain
	FPC498
10 ⁸	6/6* ²
10 ⁷	6/6
10 ⁶	4/6
10 ⁵	1/6
LD ₅₀ (CFU/100g BW)	5 × 10 ⁵

Edwardsiella tarda FPC498 strain, a wild-type strain was isolated from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).

*¹ Challenge dose were determined based on a preliminary experiment,

*² Number of fish died / Number of fish tested 4 weeks after the challenge

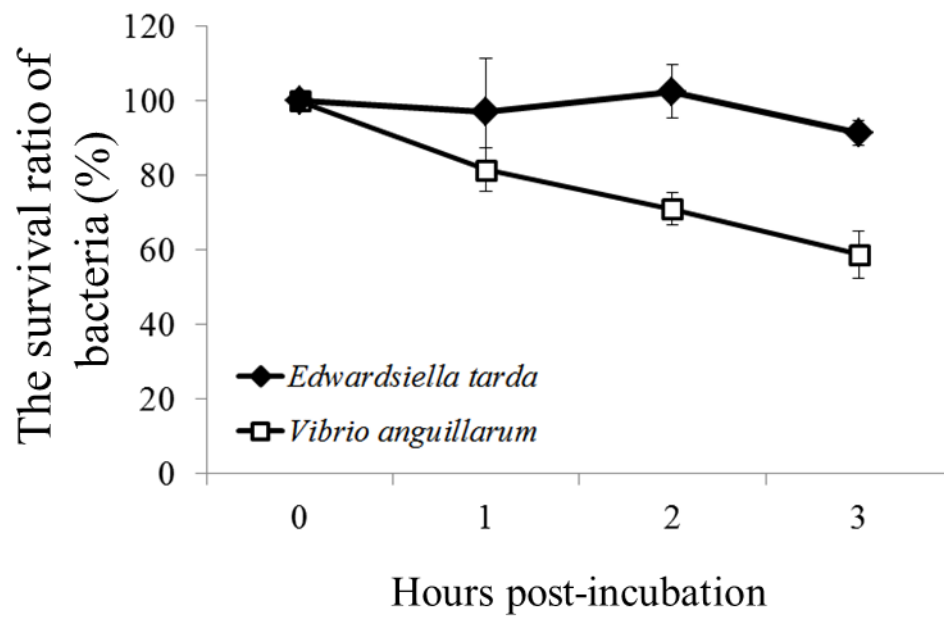


Fig. 2. Intracellular survival of *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum* in ginbuna phagocytes. Data are shown as means \pm standard deviation (SD) of triplicate.

第二章 ギンブナの *E. tarda* 感染時の獲得免疫応答

1. 背景と目的

哺乳類の細胞内寄生細菌に対する感染防御において細胞性免疫が主要な役割を果たす (Neild and Roy, 2004; Parmer, 2004; Reece and Kaufmann, 2008)。細胞性免疫は主に武装化エフェクターT 細胞によって活性化されたマクロファージと抗原特異的細胞障害機構を有する CTLs から構成される。すなわち細胞性免疫は武装化エフェクター細胞である Th1 や CTLs が中心となる免疫機構といえる。

細胞性免疫は Th1 や CTLs、NK 細胞、マクロファージなどが産生する IFN γ によって誘導される。魚類の IFN γ 組み換え体で処理したキンギョのマクロファージは Th0 から Th1 への分化に必要な IL-12 の遺伝子発現レベルを増加させ、貪食した *M. marinum* の生存率を減少させることが報告されている (Grayfer and Belosevic, 2009; Grayfer *et al.*, 2011)。また IFN γ 組み換え体を接種したヒラメは IFN γ の遺伝子発現レベルを増加させ、エドワジェラ症の進行を抑制した (Jung *et al.*, 2012)。これらの知見は魚類の IFN γ も哺乳類同様に細胞性免疫を誘導することを示しており、さらに *E. tarda* 感染に対しても重要な役割を担っていることが考えられる。

哺乳類の CTLs の抗原特異的細胞障害機構は細胞内寄生細菌に感染した細胞の破壊を行う主要なメカニズムである (Kaufmann and Flecksh, 1988; Kaufmann, 1993; Witzel *et al.*, 2008)。魚類の CTLs もアロ抗原およびウイルス感染細胞に対して抗原特異的障害機構を有しており、その機構は哺乳類と酷似していることはすでに証明されている (Somamoto *et al.*, 2000; Nakanishi *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2003 ; Utke *et al.*, 2007; Toda *et al.*, 2009)。このことから魚類の CTLs は *E. tarda* 感染細胞に対しても細胞障害を行うことが考えられる。

上述したように哺乳類の細胞性免疫はウイルスや細胞内寄生細菌の感染細胞を除去するとともに $\text{IFN}\gamma$ を介してマクロファージを活性化させ細胞内寄生体を強力に殺菌する。さらに魚類の細胞性免疫機構も哺乳類のものと酷似しており、細胞内寄生体に対して重要な役割を担っていると考えられる。しかし細胞内寄生細菌である *E. tarda* に対する主要な防御免疫機構は明らかではない。そこで第二章では細胞性免疫および液性免疫応答を調べ、*E. tarda* に対する感染防御において主要な免疫機構を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

1) 供試魚

長野県産諏訪湖産クローンギンブナ OB1 系統は独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所より分与を受けた。水温を 25 °C に設定した 120 cm 循環式水槽に収容し試験開始まで 2 週間順応させた。

2) 供試菌株

供試菌株にはエドワジェラ症罹患ヒラメの腹水から分離された病原性株 *E. tarda* FPC498 株を使用した。試験には凍結保存した菌株を用いて病原性回復のために魚体通過を行い、再分離された菌体を TSA 培地で継代した後、25 °C で 48 時間培養後に使用した。

CTLs による *E. tarda* 感染細胞に対する細胞障害試験のため Green Fluoresce Protein (GFP) を発現する *E. tarda* を作出した。すなわち pTurboGFP-B Vector (Evrogen, Russia) を *E. tarda* FPC498 株にエレクトロポレーション法を用いて伝達した。GFP 発現 *E. tarda* は 100 µg/ml のアンピシリン含有 TSA 培地で 25 °C で 48 時間培養したものを使用した。

3) 菌接種

TSA 培地に増殖した菌体を掻き取り湿菌重量を測定後、滅菌処理した PBS を用いて 10^5 CFU/ml に調整した。18 尾の供試魚（平均魚体重： 26.6 ± 3.8 g）に調整した菌液を 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて 100 g 魚体重あたり 1 ml (0.2 LD_{50}) となるように左体側より腹腔内接種した。試験魚は 60 cm 水槽にて 25 °C、無給餌で観察した。試験期間中は接種後、5 日毎に半量の水を交換した。

4) サンプルリング

菌液接種後、0、2、4、8、12、16、30 日目に無作為に 3 尾ずつ供試した。ヘパリン処理した 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて全採血を行った。採血後解剖し頭腎、体腎、脾臓および肝臓を回収した。血液については 4 °C、500 ×g、10 分間遠心分離を行い、血漿を回収した。頭腎および体腎は白血球単離に用い、体腎、脾臓および肝臓は組織内菌数の測定に用いた。

5) 組織内菌数の測定

単離した組織は重量を測定した後、100 μm Nylon mesh 上で緩やかに圧をかけて磨砕し、PBS に懸濁させた。細菌数は Miles and Misra 法 ([Miles et al., 1938](#); [Kato et al., 2012](#)) により測定した。

6) 抗体価の測定

培養した *E. tarda* をトリプトソーヤブイヨン (TSB) 培地 (日水製薬, Japan) に加え、25 °C、180 rpm で 24 時間培養した。4 °C、10,000 ×g、10 分間の条件で 3 回遠心洗浄し、上澄みを取り除いて、湿菌重量を測った。1 g の湿菌重量あたり 5 ml の BugBuster® Protein Extraction Reagent (Novagen, Germany) を加えて緩やかに攪拌した。マイクロチューブローテーターは MTR-103 (Iuchi, Japan) を用い、低速で緩やかに 20 分間培養した。培養後 4 °C、16,000 ×g、20 分間遠心分離した後、上澄みを新しいマイクロチューブに移した。これを *E. tarda* ソニケーション抗原とし、使用まで -80 °C で保存した。

4) で回収した血漿を用いて *E. tarda* 特異的 IgM 抗体価を測定した。96 穴 Immunoplate (Thermo Fisher, U.S.A.) に 0.1 M 炭酸一重炭酸バッファー (pH9.6) を用いてタンパク質含量 20 μg/ml に調整した *E. tarda* ソニケーション抗原を各ウェルに 50 μl 加え 25 °C、2 時間静置することで底面に抗原を吸着させた。完全に内容物を捨てた後、イムノブロ

ック（大日本製薬, Japan）を各ウェルに 250 μ l ずつ加え 25 $^{\circ}$ C、2 時間静置してブロッキングを行った。イムノウォッシャーAMW-8（BIOTEC, Japan）を使用し、0.05 % Tween 20 を含む PBS（PBS-T）で 3 回洗浄後、各ウェルに PBS で 20 倍希釈した血漿を 1 ウェルあたり 50 μ l となるように各サンプルにつき 3 ウェルずつ加えた。また対照区としてサンプルの代わりに PBS を用いて 20 倍希釈した未感染魚の血漿を 3 ウェルに、ブランクとして PBS を加えた対照区を 8 ウェルに加えた。25 $^{\circ}$ C、2 時間静置した後、PBS-T で 3 回洗浄し、PBS で 5000 倍希釈した抗ギンブナ IgM マウス IgG モノクローナル抗体を各ウェルに 50 μ l ずつ加え 25 $^{\circ}$ C、1 時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄後、PBS で 5000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG+M ヤギ血清（Life Technologies, U.S.A.）を各ウェルに 50 μ l 加え、25 $^{\circ}$ C、1 時間静置した。PBS-T で 3 回洗浄後、1-stepTM Turbo TMB-ELISA（Pierce, U.S.A.）を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、遮光しながら 25 $^{\circ}$ C で十分な発色が確認されるまで反応させた。マイクロプレートリーダーMPR-A4j II（東ソー, Japan）を使用し、波長 405 nm における吸光度を測定した。

7) 腎臓白血球の単離

4) で回収した頭腎および体腎を 100 μ m Nylon mesh 上で緩やかに圧をかけて磨砕し、RPMI-1 に懸濁させた後、スピッツ管に移した。そこに 1.040 および 1.080 g/ml に調整した PercollTM 溶液を 2.5 ml 注射筒および 20 G \times 70 のカテラン針を用いて、試験管底部に静かに加え、非連続の密度勾配の層を形成した後、4 $^{\circ}$ C、500 \times g、30 分間遠心分離を行った。分離後、白血球層を取り出し、RPMI-1 に懸濁させ 3 回洗浄を行なった。洗浄後、Thoma 血球計算盤により白血球数を計数した。

8) CD4⁺ 細胞の単離

菌接種 8 日および 30 日後、腎臓白血球を 1×10^7 cells/ml に調整し、抗ギンブナ CD4 ラット IgG モノクローナル抗体を 5000 倍希釈となるように加え、4 °C で 1 時間培養した。培養後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない RPMI-5 で 1×10^8 cells/ml に調整した。そこにマグネティックビーズ標識抗ラット IgG ヤギ抗体を 5 倍希釈となるように加え、4 °C で 30 分間培養した。培養後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない 0.5 % BSA および 2 mM EDTA 含有 PBS に懸濁した。懸濁後、細胞浮遊液を MS カラム (Miltenyi Biotec, U.S.A.) にアプライし CD4⁺ および CD4⁻ に分画した。

9) cDNA の合成

7) で単離した腎臓白血球 (5×10^6 cells) を 4 °C、500 ×g、10 分間遠心分離しペレット化した。そこに 1% 2-メルカプトエタノール (和光純薬工業, Japan) 含有 Buffer RTL Plus (QIAGEN, Germany) を 350 μl 加え攪拌し細胞を溶解した。その後、RNA 抽出を行うまで -80 °C で保存した。

-80 °C で保存した白血球溶解液から RNeasy Plus Mini kit (QIAGEN) を用いて説明書に従い Total RNA を抽出した。次に High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems, U.S.A.) を用いて、Total RNA から cDNA を合成した。すなわち 30 μl の Total RNA を鋳型とし、4 μl の 10×RT-Buffer、4 mM の dNTP Mix、1 μl の 25×RT Random Primers、0.3 μM の Oligo dT Primers、5 U の MultiScribeTM Reverse transcriptase を含む 40 μl の反応液を作製し、サーマルサイクラー CP708 (ASTEC, Japan) を用いて逆転写反応を行なった。得られた cDNA を PCR grade water で 5 倍希釈し、使用するまで -80 °C で保存した。

8) で単離した CD4⁺ 細胞 ($5 \sim 10 \times 10^3$ cells) を 4 °C、500 ×g、20 分間遠心分離しペレット化した。そこに 1% 2-メルカプトエタノール (和光純薬工業) 含有 Lysis Buffer (Invitrogen, U.S.A.) を 350 μl 加え攪拌し細胞を溶解させた。その後、使用するまで -80 °C

で保存した。

-80 °C で保存した CD4⁺ 細胞溶解液を PureLink™ RNA Micro Kit (Invitrogen, U.S.A.) を用いて説明書に従い total RNA を抽出した。抽出した total RNA は High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて上述した方法で逆転写反応を行なった。得られた cDNA を PCR grade water で 2 倍希釈し、使用するまで -80 °C で保存した。

10) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

腎臓由来白血球における IFN- γ (*ifng1* および *ifng2*)、IFN- γ rel (*ifngrel*)、Th1 細胞のマスター転写因子 T-bet (*tbx21*) および Th2 細胞のマスター転写因子 GATA-3 (*gata-3*) 遺伝子の発現を調べた。なおリアルタイム PCR に用いた特異的プライマーは Table 4 に示した。9) で合成した cDNA を鋳型として、10 μ l の Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, U.S.A.)、200 nM の Forward プライマーおよび Reverse プライマーを含む 20 μ l 反応液を混合し、Mini Opticon™ System (Biorad, U.S.A.) を用いてリアルタイム PCR を行った。反応は 95 °C で 3 分、次に 95 °C で 10 秒、60 °C で 30 秒を 50 サイクル行った。各遺伝子配列が組み込まれたコピー数が既知のプラスミドを鋳型として用い、検量線を作成した。なお、内因性コントロール遺伝子である *EF1 α* を用いて補正した値を発現量として解析を行った。

11) マクロファージおよび CD8 α ⁺、膜型 IgM⁺ リンパ球の割合

7) で単離した白血球を 1×10^6 cells/ml に調整し、抗ギンブナ CD8 α ラット IgG モノクローナル抗体および抗ギンブナ IgM マウス IgG モノクローナル抗体をそれぞれ 5000 倍希釈になるように加え、4 °C で 1 時間反応させた。その後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない RPMI-5 で再懸濁した。そこに FITC 標識抗ラット IgG ヤギ抗体および FITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (Jackson ImmunoResearch, U.S.A.) を 100 倍希釈となるように加え、4 °C、30 分間、暗中で反応させた。その後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない RPMI-1 に再懸濁させ、40 μ m のナイロンメッシュ (共進理工, Japan) を通した。そこに 10 mg/ml の Propidium iodide solution (SIGMA-ALDRICH, U.S.A.) を 2 μ l 加え、22 °C、10 分間、暗中で静置した。フローサイトメーター CYTOMICS FC 500 (BECKMAN COULTER, U.S.A.) を用いて解析した。すなわち前方散乱光 (FS) および側方散乱光 (SS) により ドットプロットを作成して FITC 陽性細胞領域を検出した後、総リンパ球に対する CD8 α ⁺ および sIgM⁺ リンパ球の割合を算出した。また FS/SS プロットでマクロファージにゲーティングし、その割合を調べた。

12) 細胞障害試験

腎臓白血球より CD8 α ⁺ 細胞を単離して、これをエフェクター細胞とした。すなわち 7) で単離した白血球を 1×10^7 cells/ml に調整し、抗ギンブナ CD8 α ラット IgG モノクローナル抗体を 5000 倍希釈となるように加え、4 °C で 1 時間反応させた。その後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない RPMI-5 で 1×10^8 cells/ml に調整した。そこにマグネティックビーズ標識抗ラット IgG ヤギ抗体 (Miltenyi Biotec, Germany) を 5 倍希釈となるように加え、4 °C で 30 分間反応させた。その後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない 0.5 % BSA および 2 mM EDTA 含有 PBS に懸濁した。細胞浮遊液を MS カラム (Miltenyi Biotec GmbH, Germany) にアプライし、CD8 α ⁺ 細胞を単離した。単離した CD8 α ⁺ 細胞は Effector 細胞の活性回復のため

めペニシリン (10 U/ml)、ストレプトマイシン (10 µg/ml)、ゲンタマイシン (10 µg/ml) 含有 RPMI-10 に懸濁し、25 °C で 12 時間培養した (Suzumura *et al.*, 1994)。

第一章、第二節 3) の方法により未感作魚の腎臓白血球から単離した貪食細胞をターゲット細胞とした。すなわち 7) と同様の方法で単離した腎臓白血球浮遊液を加えた滅菌スピッツ管底部に 1.080 および 1.090 g/ml に調整した Percoll™ 溶液を静かに加えて非連続の密度勾配の層を形成した後、4 °C、500 ×g、30 分間遠心分離を行なった。分離後、貪食細胞層を取り出し、RPMI-1 に懸濁させ 3 回洗浄を行なった。洗浄後、 1×10^8 cells/ml に調整し、MOI = 10 となるように GFP 発現 *E. tarda* 加え 25 °C で 2 時間共培養した。培養後、RPMI-1 で 3 回洗浄し、貪食されなかった細菌を殺菌するためペニシリン (200 U/ml)、ストレプトマイシン (200 µg/ml)、ゲンタマイシン (200 µg/ml) 含有 RPMI-5 に懸濁させ、25 °C で 1 時間培養した。培養後、RPMI-1 で 3 回洗浄し、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (100 µg/ml)、ゲンタマイシン (100 µg/ml) 含有 RPMI-5 に懸濁した。GFP 発現 *E. tarda* を貪食した貪食細胞数はフローサイトメーターで確認し、96 穴細胞培養プレートに 1×10^4 cells/well となるように加えた。

エフェクター細胞を 1×10^4 cells/well となるように加え、25 °C で 6 時間培養した。細胞障害試験は Jedema *et al.* (2004) の方法を改変し行った (Jedema *et al.*, 2004)。すなわち 10,000 個のマイクロビーズ (6 µm in diameter; Becton Dickinson, U.S.A.) と PI (2.5 ng/ml) を細胞懸濁液に加え、マイクロビーズが 2000 個に達する間に検出される生存しているターゲット細胞をフローサイトメーターの GFP-PI ドットプロットにより計数した。なお CD8α⁺ 細胞の細胞障害活性は計数した生存しているターゲット細胞の数を以下の式に当てはめ算出した。

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - \left(\frac{(\text{Number of Target cells with effector cells})}{(\text{Target cells without effector cells})} \right) \times 100$$

13) 統計解析

結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。*E. tarda* に対する特異抗体価の有意検定は PBS との *t* 検定によって行った。組織内菌数および発現解析、細胞組成、細胞障害活性の経時的変化のデータは分散分析 (ANOVA) を行った。また正規分布しているデータについては Ryan の方法により多重比較を行った。

3. 結果と考察

1) 自然免疫応答

E. tarda を腹腔内接種したギンブナの各組織における生菌数は2日目から4日目に減少した (Fig. 3)。また2日目にマクロファージの増加が見られた (Fig. 7A)。この結果よりこの菌数の減少は2日目に増加したマクロファージなどの貪食細胞が中心となる自然免疫による殺菌であると考えられる。一方、感染後4日目から8日目にかけて組織内菌数に変化は見られなかった (Fig. 3)。これは一部の *E. tarda* が自然免疫の殺菌機構に抵抗していると考えられる。

2) 細胞性免疫応答

細胞性免疫は主に Th1 や CTLs が中心となる免疫機構である。哺乳類の細胞内寄生細菌感染に対する防御免疫において細胞性免疫が重要な役割を担っている (Neild and Roy, 2004; Parmer, 2004; Reece and Kaufmann, 2008)。

哺乳類において Th0 は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞による抗原提示の刺激と IFN- γ によって Th1 に分化する。本研究において Th1 のマスター転写因子である T-bet 遺伝子には *E. tarda* 感染後8日目以降に有意な発現が見られた (Fig. 5D)。さらに8日目の CD4⁺ 細胞において T-bet 遺伝子の有意に高い発現が見られたことから、この時期に Th1 が誘導されていることが考えられる (Fig. 6A)。また感染12日目に IFN- γ 1 の発現が有意に上昇していた (Fig. 5A)。この結果から Th1 が IFN- γ 1 を産生し、細胞性免疫を誘導していると考えられる。

哺乳類において細胞内寄生細菌に感染した細胞の除去には細胞障害性T細胞(CTLs)が重要な役割を果たす (Kaufmann and Flesch, 1988; Kaufmann, 1993; Wizel *et al.*, 2008)。本研究において CD8 α ⁺ リンパ球は *E. tarda* 感染後4日目から8日目にかけて増加した

(Fig. 7B)。また CD8 α^+ 細胞の *E. tarda* に対する抗原特異的細胞障害活性も同時期に最大値に達した (Fig. 8)。加えて感染 8 日目まで変化のなかった組織内菌数は細胞障害活性が最大になった後、検出限界以下にまで減少していることから (Fig. 3)、魚類においても CTLs は細胞内寄生細菌感染細胞の除去に大きく貢献していると考えられる。

3) 液性免疫応答

B 細胞が産生する抗原特異的抗体は細胞外病原体に対して効果的である。魚類においても液性免疫は *Streptococcus agalactiae* や *Streptococcus iniae* など細胞内での抵抗性を有さない細菌に対して主要な役割を果たすことは受動免疫試験などにより明らかになっている (Pasnik *et al.*, 2006; LaFrentz *et al.*, 2011)。液性免疫の誘導は Th0 から分化した Th2 により行われる。本研究において Th2 のマスター転写因子である GATA3 遺伝子は *E. tarda* 感染 12 日目から有意な発現が見られた (Fig. 5E)。また腎臓中の sIgM $^+$ リンパ球の割合は *E. tarda* 感染後 12 日目から 30 日目に有意に増加した (Fig. 7C)。これらの結果より液性免疫は *E. tarda* 感染 12 日目以降に誘導されていると考えられる。さらに *E. tarda* 特異的抗体価は組織内菌数が検出限界以下となった 16 日以後、有意的に増加した (Fig. 4)。これらの結果より *E. tarda* 感染に対する防御免疫は液性免疫がなくとも完結することが明らかとなった。一方、Igarashi and Iida (2002) は *E. tarda* による攻撃試験において生残率と *E. tarda* 特異抗体価の間に相関関係はないと報告している (Igarashi and Iida, 2002)。これらの結果は *E. tarda* に対する防御免疫は液性免疫がなくとも成立することを示している。

4) 小括

E. tarda 感染後の組織内菌数および免疫応答を調べた結果、大部分の細菌は自然免疫によって殺菌されていると考えられる。しかし、一部の *E. tarda* は自然免疫の殺菌活性に対して抵抗していると考えられる。その *E. tarda* の排除は Th1 や CTLs の誘導および活性化と同時期に観察された。このことから、*E. tarda* 感染に対する防御免疫において細胞性免疫が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、液性免疫は組織内の細菌が検出されなくなってから誘導されていた。このことから *E. tarda* 感染に対する防御免疫は液性免疫が無くとも完結することが示唆された。

Table 4
PCR primers used for real-time PCR analysis

Genes	Primers	Sequence (5'→3')	Accessions
<i>eef1a</i>	EF1a-F1	CGGCAGCTTCAATGCTCAGGTCATC	AB491676
	EF1a-R1	ACGACGGTCGATCTTCTCCTTGA	
<i>ifng1</i>	IFNg1-F1	TGGGCGATCAAGGAAGATG	AB570431
	IFNg1-R1	ACTTCAGATTTTTGGTGTTTTTGG	
<i>ifng2</i>	IFNg2-F1	GCAGAAACCCTTTGGTCG	AB570432
	IFNg2-R1	GTTCTTCAGTTTCTCAGCTGTGT	
<i>ifngrel</i>	IFNgrel-F1	GCAAGCGCATTATAATACAGGA	AB570433
	IFNgrel-R1	AGTGCAGGAAGGCTTGGAA	
<i>tbx21</i>	T-bet-F1	CAGCTGAAAATAGATCATAACCCTTT	AB290187
	T-bet-R1	GGTTGGGGAAGGCGTAAG	
<i>gata3</i>	GATA3-F1	ACAAGATGAACGGCCAGAAC	AB302073
	GATA3-R1	GTGGTCGTTTGACAGTTTGC	

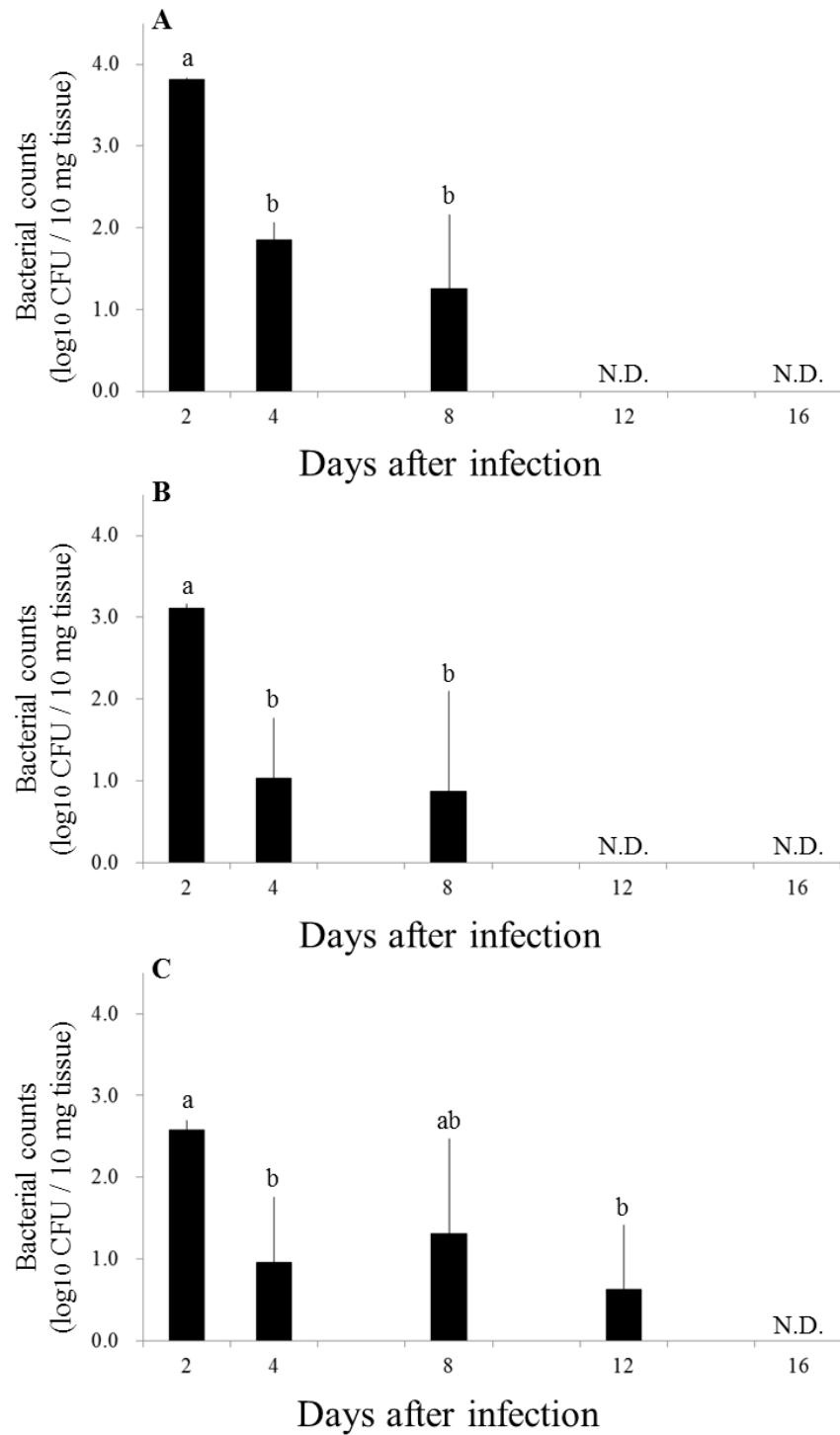


Fig. 3. Reduction of bacterial counts in fish kidney (A), spleen (B), and liver (B) after *E. tarda* infection. Bacterial counts are shown as mean \pm SD of 3 fish. N.D. indicates that no colony was detected in the media. Stastical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons with Ryan's method. The labels with different letters above each bar denote significant defference ($P < 0.05$).

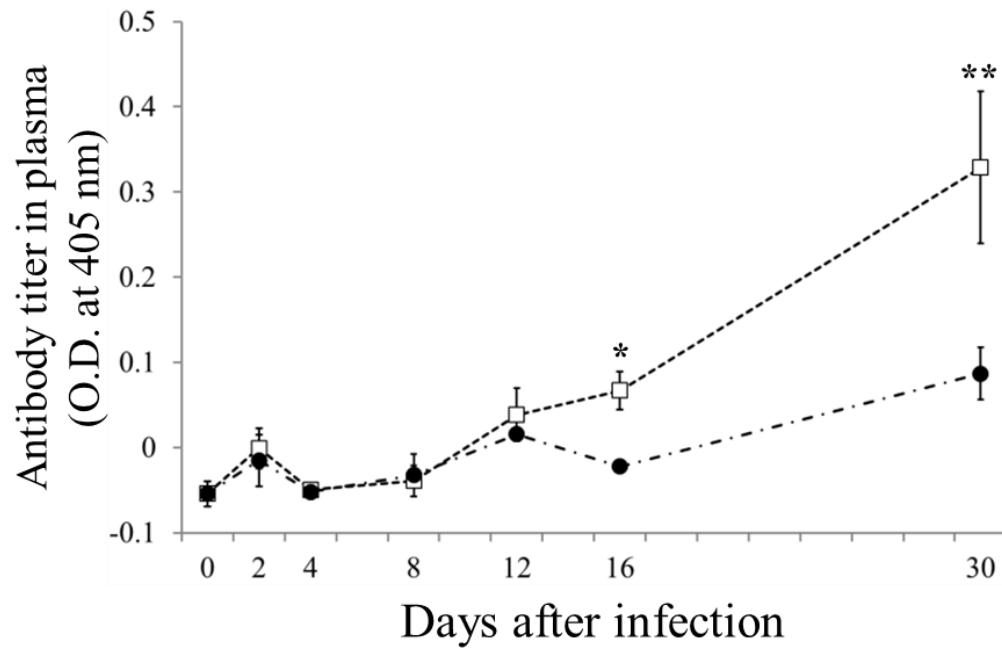


Fig. 4. Antibody responses in plasma *E. tarda* infection. Fish were injected with PBS (●) or *E. tarda* (□). Antibody titers are shown as the mean \pm SD of 3 fish. Statistical analysis was performed using Student's unpaired *t*-test. Asterisks indicate significant differences between the *E. tarda*- and PBS-injected groups during the same period (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

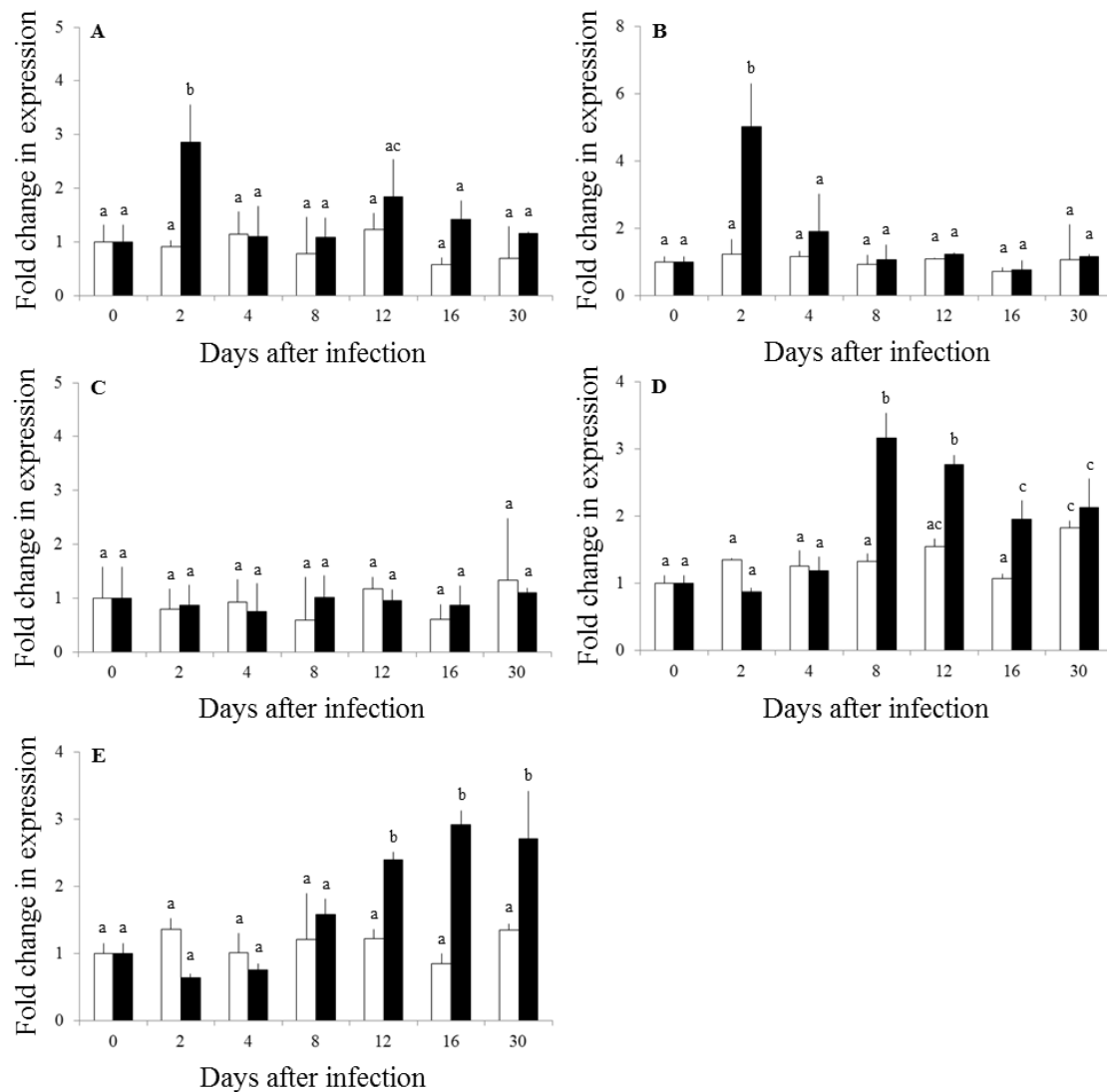


Fig. 5. Quantitative expression analysis of IFN- γ (A, *ifng1*; B, *ifng2*; C, *ifngrel*), T-bet (D, *tbx21*), and GATA-3 (E, *gata3*) in kidney leukocytes after *E. tarda* infection. Fish were injected with PBS (open bar) or *E. tarda* (closed bar). The expression levels were calculated as a ratio to the EF1 α (*eef1a*) level, and are shown as fold change in expression based on naïve fish sample (day 0). Data are shown as mean \pm SD of 3 fish. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons with Ryan's method. The labels with different letters above each bar denote statistical significance ($P < 0.05$); labels with the same letter on each bar of a graph indicate no statistical difference between the groups.

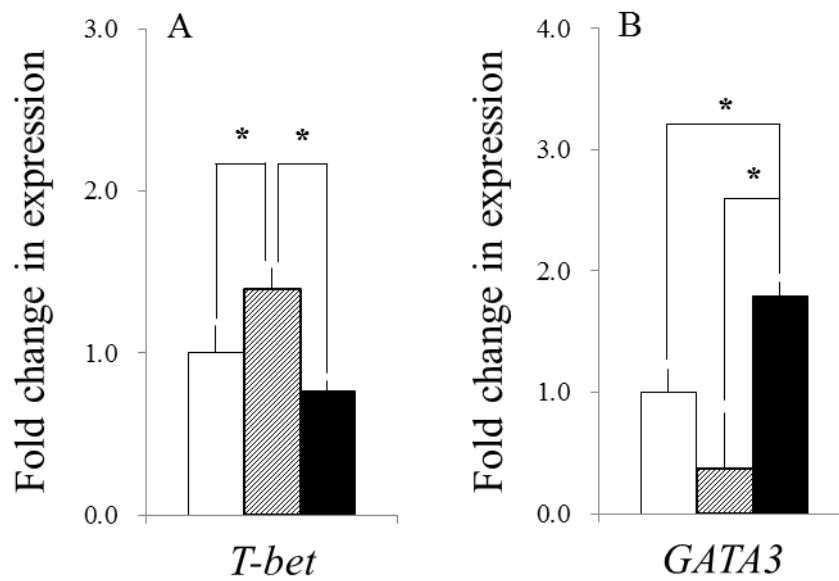


Fig. 6. Quantitative analysis of the expression of (A) *tbx21* and (B) *gata3* in CD4⁺ cells. CD4⁺ were isolated from kidney leukocytes at 8 (hatched bar) or 30 (closed bar) days after sensitized with *E. tarda* FPC498. Expression levels are presented as the ratio to the expression of *eef1a*, and the differences are shown as fold change in expression based on challenge in PBS-injected fish (open bar). Data are shown as means \pm standard deviation (SD) of three fish. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison with Ryan's method (* $P < 0.05$).

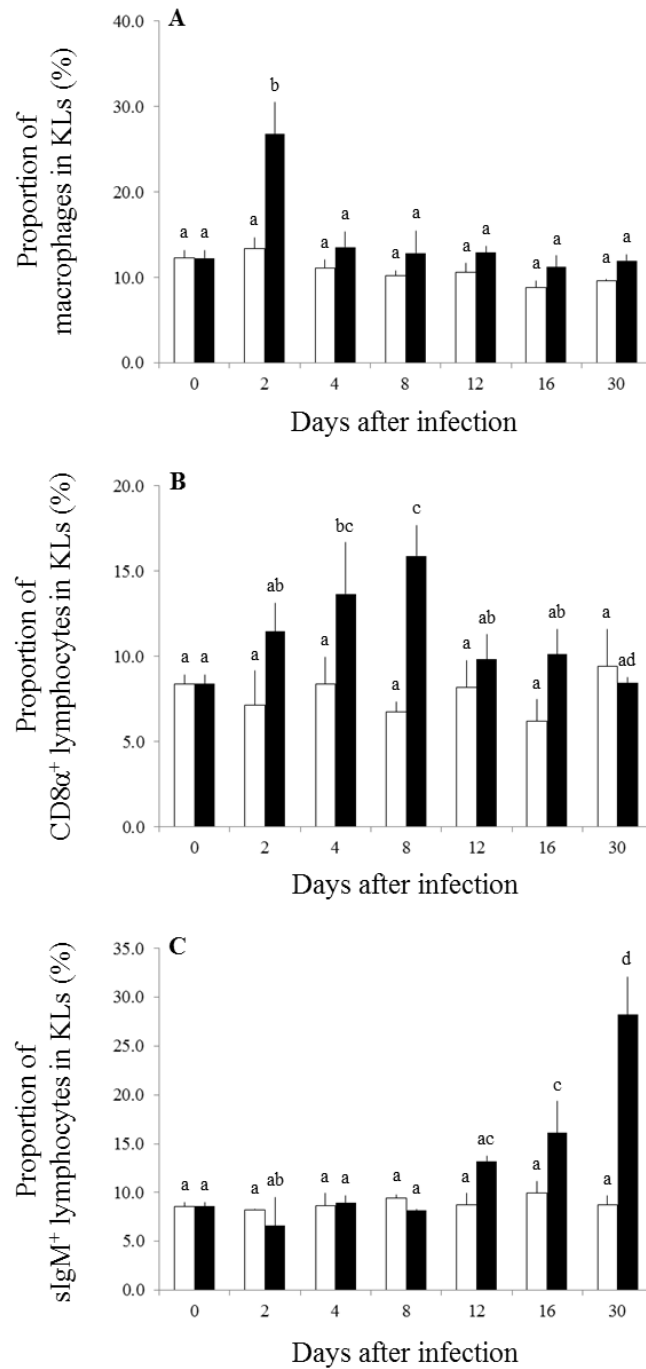


Fig. 7. Kinetics of macrophages (A), CD8α⁺ (B) and sIgM⁺ (C) lymphocytes in the kidney after *E. tarda* infection. Fish were injected with PBS (open bar) or *E. tarda* (closed bar). The percentages of cell populations in kidney leukocytes (KLs) are shown as mean ± SD of 3 fish. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons with Ryan's method. The labels with different letters above each bar denote significant difference ($P < 0.05$); labels with the same letter on each bar of a graph indicate no statistical difference between the groups.

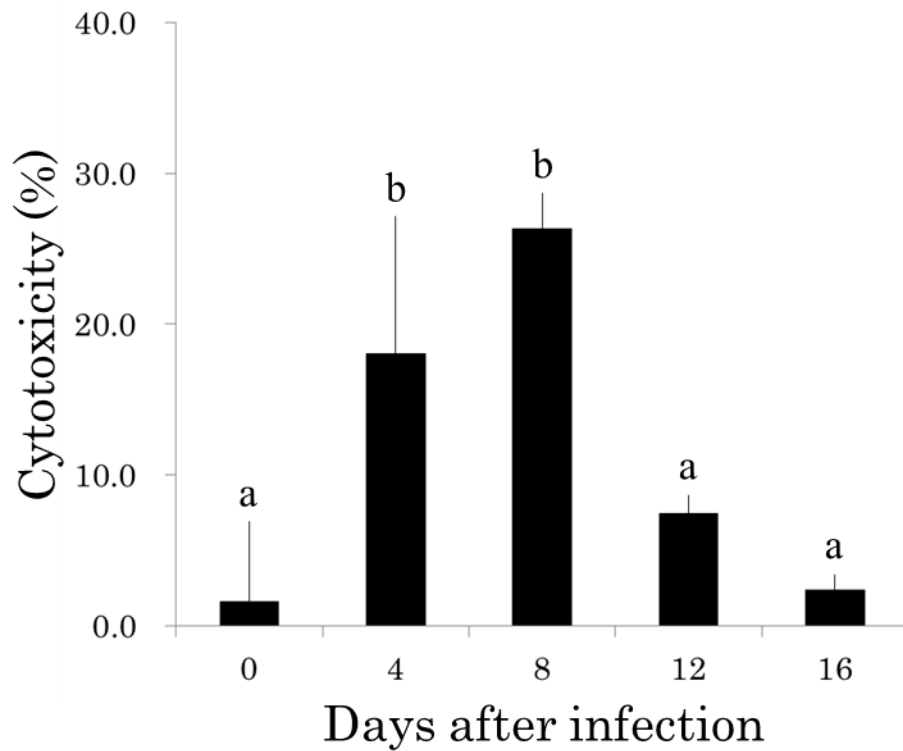


Fig. 8. Cytotoxic activity of CD8 α^+ cells after *E. tarda* infection. Data are shown as mean \pm SD of 3 fish. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons with Ryan's method. The labels with different letters above each bar denote significant difference ($P < 0.05$); labels with the same letter on each bar indicate no statistical difference between the groups.

第三章 ギンブナの *E. tarda* 感染に対する感染防御因子の特定

1. 背景と目的

序論で述べたように哺乳類の細胞内寄生細菌感染に対する防御免疫において細胞性免疫が重要な役割を担っている (Neild and Roy, 2004; Parmer, 2004; Reece and Kaufmann, 2008)。第二章において魚類の *E. tarda* 感染に対する防御免疫においても Th1 や CTLs が中心となる細胞性免疫が重要な役割を果たしていることが示唆された。

Th1 は抗原刺激と IFN γ や IL-12 などのサイトカインにより Th0 から分化する。分化後、IFN γ を介してマクロファージや CTLs を活性化し、細胞性免疫を誘導する。魚類の CD4⁺ 細胞も CHNV 感染に対する防御免疫において CTLs を活性化させることがすでに報告されている (Somamoto *et al.*, 2014)。第二章においても Th1 のマスター転写因子である T-bet の遺伝子発現の上昇と CTLs の活性化が同時期に観察された。このことから *E. tarda* 感染に対する防御免疫においても Th1 様 CD4⁺ 細胞が細胞性免疫を誘導していると考えられる。

哺乳類において細胞内寄生細菌に感染した細胞の除去には細胞障害性 T 細胞 (CTLs) が重要な役割を果たす (Kaufmann and Flesch, 1988; Kaufmann, 1993; Witzel *et al.*, 2008)。特に CTLs のパーフォリンを介した細胞障害機構は *L. monocytogenes* や *M. tuberculosis* のような細胞内寄生細菌の抑制には必須である (Kägi *et al.*, 1994; Kägi *et al.*, 1996; Stenger *et al.*, 1997; Woodworth *et al.*, 2008)。第二章において組織内菌数の減少が *E. tarda* 感染細胞に対する CTLs の細胞障害活性の上昇後、観察されたことから魚類においても CTLs が細胞内寄生細菌に感染した細胞の除去に重要な役割を担っていることが示唆された。しかし、CTLs が実際に組織内の *E. tarda* 排除に貢献しているかは明らかではない。

エドワジェラ症に対する免疫システムをさらに詳細に明らかにするためには細胞の機能を *in vivo* で直接解析しなければならない。養子移入は感作したリンパ球サブセットを未感染個体に移入し、その役割と各細胞群の免疫応答を調べる方法で、細胞性免疫を解析する上で効果的な手法である (Pedrazzini *et al.*, 1987; Orme *et al.*, 1987; Nordmann *et al.*, 1992; Szalay *et al.*, 1995; Feng and Britton, 2000)。これまでに魚類のウイルス感染や GVHR に対する T 細胞の免疫応答は養子移入試験によって詳細に解析されている (Somamoto *et al.*, 2002; Shibasaki *et al.*, 2010; Somamoto *et al.*, 2013a)。そこで第三章では CD4⁺ および CD8 α ⁺ 細胞の養子移入を行い、Th1 や CTLs の *E. tarda* 感染に対する防御免疫における役割の有無を明らかにした。加えて攻撃試験後の免疫関連遺伝子の発現を調べ、Th1 および CTLs 移入によって誘導される免疫応答を明らかにした。

2. 材料と方法

1) 供試魚

長野県産諏訪湖産クローンギンブナ OB1 系統は独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所より分与を受けた。水温を 25 °C に設定した 120 cm 循環式水槽に収容し試験開始まで 2 週間順応させた。

2) 供試菌株

供試菌株にはエドワジェラ症罹患ヒラメの腹水から分離された病原性株 *E. tarda* FPC498 株を使用した。試験には凍結保存した菌株を用いて病原性回復のために魚体通過を行い、再分離された菌体を TSA 培地で継代した後、25 °C で 48 時間培養後に使用した。

3) *E. tarda* による感作

TSA 培地に増殖した菌体を掻き取り湿菌重量を測定し、滅菌処理した PBS を用いて 10^5 CFU/ml に調整した。4～6 尾の供試魚（平均魚体重： 25.3 ± 3.6 g）に調整した菌液を 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて 100 g 魚体重あたり 1 ml ($0.2 LD_{50}$) となるように左体側より腹腔内接種した。試験魚は 60 cm 水槽にて 25 °C、無給餌で観察した。試験期間中は接種後、5 日毎に半量の水を交換した。

4) CD4⁺ および CD8α⁺ 細胞の単離

菌接種 8 日後、頭腎および体腎を単離し 100 μm Nylon mesh 上で緩やかに圧をかけて磨砕し、RPMI-1 に懸濁した。そこに 1.040 および 1.080 g/ml に調整した Percoll™ 溶液を 2.5 ml 注射筒および 20 G×70 のカテラン針を用いて、試験管底部に静かに加え、非連続の密度勾配の層を形成した後、4 °C で 500 ×g、30 分間遠心分離を行なった。分離後、白血球層を取り出し、RPMI-1 に懸濁させ 3 回洗浄を行なった。単離した白血球を 1×10⁷ cells/ml に調整し、抗ギンブナ CD8α ラット IgG モノクローナル抗体を 5000 倍希釈となるように加え、4 °C で 1 時間培養した。培養後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない RPMI-5 で 1×10⁸ cells/ml に調整した。そこにマグネティックビーズ標識抗ラット IgG ヤギ抗体を 5 倍希釈となるように加え、4 °C で 30 分間培養した。培養後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない 0.5 % BSA および 2 mM EDTA 含有 PBS に懸濁した。懸濁後、細胞浮遊駆を MS カラム (Miltenyi Biotec, U.S.A.) にアプライし CD8α⁺ および CD8α⁻ に分画した。また CD8α⁻ 細胞からはさらに抗ギンブナ CD4 ラット IgG モノクローナル抗体を用いて上述した方法で CD4⁺ および CD4⁻ 細胞に分画した。単離した CD4⁺ および CD8α⁺ 細胞は表面の細菌を殺菌するためペニシリン (200 U/ml)、ストレプトマイシン (200 μg/ml)、ゲンタマイシン (200 μg/ml) 含有 RPMI-10 に懸濁させ、25 °C で 1 時間培養した。培養後、4 °C、500 ×g、20 分間遠心分離を行い PBS で洗浄を行った。2 回洗浄後、PBS に再懸濁した。CD4 および CD8α 陽性画分はトリパンブルー染色により生残率を確認し、さらにフローサイトメーターにより細胞組成を測定した。また、遺伝子発現解析を行うため、単離した一部の CD4⁺ および CD8α⁺ 細胞 (5~10×10³ 細胞) を 4 °C、500 ×g、20 分間遠心分離しペレット化した。そこに 1% 2-メルカプトエタノール (和光純薬工業) 含有 Lysis Buffer (Invitrogen, U.S.A.) を 350 μl 加え攪拌し細胞を溶解した。その後、使用するまで -80 °C で保存した。

5) 養子移入

感作魚 4～6 尾より単離した $CD4^+$ および $CD8\alpha^+$ 細胞をプールし 4～6 尾の未感染魚に一尾あたり 1.5×10^4 cells/0.05 ml となるように静脈内移入した。また対照区として未感染魚由来 $CD4^+$ および $CD8\alpha^+$ 細胞を 4) と同様の方法で単離し、未感染魚に上記と同様の方法で移入した。この試験は二回繰り返し行った。

6) 攻撃試験

TSA 培地に増殖した菌体を掻き取り湿菌重量を測定し、滅菌処理した PBS を用いて 10^5 CFU/ml に調整した。細胞を移入した魚（平均魚体重： 25.3 ± 3.6 g）に調整した菌液を 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて 100 g 魚体重あたり 1 ml ($20 LD_{50}$) となるように左体側より腹腔内接種した。試験魚は 60 cm 水槽にて 25 °C、無給餌で 4 日間観察した。

7) 組織内菌数の測定

攻撃試験後、2 日目および 4 日目に腎臓と脾臓を単離した。単離した組織は重量を測定し、100 μ m Nylon mesh 上で緩やかに圧をかけて磨砕し、PBS に懸濁させた。細菌数は Miles and Misra 法 ([Miles et al., 1938](#); [Kato et al., 2012](#)) により測定した。

8) 白血球の単離

攻撃試験後、2 日目に試験魚を取り上げ頭腎、体腎および脾臓を単離した。単離した各組織は 100 μ m Nylon mesh 上で緩やかに圧をかけて磨砕し、RPMI-1 に懸濁した。そこに 1.040 および 1.080 g/ml に調整した PercollTM 溶液を 2.5 ml 注射筒および 20 G \times 70 のカテラン針を用いて、試験管底部に静かに加え、非連続の密度勾配の層を形成した後、4 $^{\circ}$ C、500 \times g、30 分間遠心分離を行なった。分離後、白血球層を取り出し、RPMI-1 に懸濁し 3 回洗浄を行なった。

9) cDNA の合成

4) および 8) で単離した白血球 5×10^6 細胞を 4 $^{\circ}$ C、500 \times g、10 分間遠心分離しペレット化した。そこに 1% 2-メルカプトエタノール（和光純薬工業, Japan）含有 Buffer RTL Plus（QIAGEN）を 350 μ l 加え攪拌し細胞を溶解させた。その後、RNA 抽出を行うまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

-80 $^{\circ}$ C で保存した白血球溶解液から RNeasy Plus Mini kit（QIAGEN）を用いて説明書に従い Total RNA を抽出した。次に High Capacity cDNA Reverse transcription Kit（Life Technologies）を用いて抽出した Total RNA から cDNA を合成した。すなわち 30 μ l の Total RNA を鋳型とし、4 μ l の 10 \times RT-Buffer、4 mM の dNTP Mix、1 μ l の 25 \times RT Random Primers、0.3 μ M の Oligo dT Primers、5 U の MultiScribeTM Reverse transcriptase を含む 40 μ l の反応液を作成し、サーマルサイクラー CP708（ASTECH）を用いて逆転写反応を行なった。得られた cDNA を PCR grade water で 5 倍希釈し、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

10) RT-PCR による CD4⁺ および CD8 α ⁺ 細胞の遺伝子発現解析

PCR は特異的プライマーを用いて行った。各プライマーの塩基配列を Table 5 に示した。PCR は前述の cDNA 溶液 4 μ l を鋳型とし、2 μ l の 10 \times NH₂ buffer、200 μ M の dNTP mix、2.5 mM の MgCl₂、0.1 μ M の Forward Primer、0.1 μ M の Reverse Primer、5 U の Biotaq DNA Polymerase を含む 20 μ l 反応液中で行った。*EF1 α* の PCR は 94 °C で 2 分、次に 94 °C で 10 秒、60 °C で 10 秒、72 °C で 1 分を 35 サイクル、最後に 72 °C で 2 分を行った。*CD4-1* および *CD8 α* の PCR は 94 °C で 2 分、次に 94 °C で 10 秒、60 °C で 10 秒、72 °C で 1 分を 40 サイクル、最後に 72 °C で 2 分を行った。PCR 産物は 2 μ g/ml エチジウムブロマイド含有 2 % アガロースゲルにロードして 100 V 定電圧、22 分間電気泳動を行なった。泳動後、UV-トランスイルミネーターで視覚化しデジタルカメラに取り込んだ。

11) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

頭腎および体腎、脾臓由来白血球における IFN- γ (*ifng1* および *ifng2*)、IFN- γ rel (*ifngrel*)、パーフォリン (*prf-1* および *prf-2*、*prf-3*)、Th1 細胞のマスター転写因子 T-bet (*tbx21*) および Th2 細胞のマスター転写因子 GATA-3 (*gata-3*) 遺伝子の発現を調べた。なおリアルタイム PCR に用いた特異的プライマーは Table 6 に示した。9) で合成した cDNA を鋳型として、10 μ l の Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、200 nM の Forward プライマーおよび Reverse プライマーを含む 20 μ l 反応液を混合し、Mini OpticonTM System (Biorad, USA) を用いてリアルタイム PCR を行った。反応は 95 °C で 3 分、次に 95 °C で 10 秒、60 °C で 30 秒を 50 サイクル行った。各遺伝子配列が組み込まれたコピー数が既知のプラスミドを鋳型として用い、検量線を作成した。なお、内因性コントロール遺伝子である *EF1 α* を用いて補正した値を発現量として解析を行った。

12) 統計解析

結果は平均値 ± 標準偏差で示した。組織内菌数と発現解析のデータは分散分析 (ANOVA) を行った。また正規分布しているデータについては Ryan の方法により多重比較を行った

3. 結果と考察

1) 移入細胞の分画と発現解析

MACS で分画した $CD4^+$ および $CD8\alpha^+$ 細胞はリンパ球を高純度で含んでいた (Table 7)。加えて RT-PCR による発現解析の結果、 $CD4^+$ および $CD8\alpha^+$ 細胞はそれぞれ $CD8\alpha$ および $CD4-1$ 遺伝子の発現は確認されなかった (Fig. 9)。このことから移入細胞はそれぞれ高純度の Ths および CTLs であると考えられる。

2) Th1 様細胞の移入効果

$CD4^+$ ヘルパーT 細胞は Th1 と Th2 を含み、それぞれ細胞性免疫と液性免疫を誘導する。第二章の結果より感染 8 日目の $CD4^+$ 細胞は T-bet の発現が有意に高い値を示し、感染 30 日目においては GATA-3 の発現が有意に高い値を示した。このことから感染 8 日目の $CD4^+$ 細胞は Th1 様細胞、感染 30 日目の $CD4^+$ 細胞は Th2 様細胞であることが考えられる。そこで本章では *E. tarda* 感染に対する Th1 様細胞の移入による防御効果を検討した。その結果、未感染魚はすべて死亡し、未感作 $CD4^+$ 細胞移入魚は 8 尾が死亡し、2 尾が組織の膿瘍など重度の症状を呈した。一方、感作 $CD4^+$ 細胞を移入したリシピエントは 2 尾において腹水の貯留が認められ、3 尾が肛門の発赤を呈したが、すべてが生残した (Table 8)。加えて、攻撃試験後 2 日目の腎臓と脾臓における感作 $CD4^+$ 細胞移入区の生菌数は未感染魚や未感作 $CD4^+$ 細胞移入区と比較し有意に減少した (Fig. 10)。これらの結果は Th1 が宿主の組織内菌数の減少に主要な役割を果たしていることを示している。

哺乳類の Th1 は $IFN-\gamma$ を介して抗原特異的細胞障害機構やマクロファージの活性化などの細胞性免疫を誘導する。しかし、感作 $CD4^+$ 細胞移入区の頭腎白血球の $IFN-\gamma 1$ や $IFN-\gamma 2$ の発現は攻撃試験後の未感染魚よりも有意に減少した (Fig. 11A, B)。対照

的に Perforin-1 遺伝子の発現は有意に高い値を示した (Fig. 11D)。この結果については 2 つの可能性が考えられる。一つ目は Th1 様細胞が攻撃試験後 2 日目より早い時期に IFN- γ を発現しているという可能性である。この場合、移入した CD4⁺ Th1 細胞によって誘導された CTLs が細胞障害機構によって *E. tarda* 感染細胞を破壊していると考えられる。二つ目はドナー由来 CD4⁺ 細胞自身が Perforin 依存的に *E. tarda* 感染細胞を破壊しているという可能性である。哺乳類の CD4⁺ T 細胞には CTLs として機能し、*M. tuberculosis* 感染細胞に対して Perforin 依存的な細胞障害機構を有しているポピュレーションが少数ながら存在する (Canaday *et al.*, 2001)。魚類の CD4⁺ 細胞にも同様に細胞障害機構を有しているポピュレーションが存在していることが推察される。

3) CTLs の移入効果

第二章において *E. tarda* 感染後 8 日目において CTLs の細胞障害活性が最大値を示した後、腎臓と脾臓の組織内菌数は検出限界以下まで減少した。このことから魚類の細胞内寄生細菌感染症に対しても CTLs の細胞障害機構が重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、CTLs が直接、*E. tarda* 排除に関与しているかは明らかではない。本章では *E. tarda* 感染に対する CTLs の役割を検討した。その結果、未感作 CD8 α ⁺ 細胞を移入したリシピエント 8 尾が死亡し、1 尾が肛門の発赤を示し、1 尾が組織の膿瘍を呈した。一方、感作 CD8 α ⁺ 細胞を移入したリシピエントは 2 尾において腹水の貯留が認められ、1 尾が肛門の発赤を呈したが、7 尾が症状を呈さなかった (Table 8)。加えて、攻撃試験後 2 日目の腎臓と脾臓における感作 CD8 α ⁺ 細胞移入区の生菌数は未感染魚や未感作 CD8 α ⁺ 細胞移入区と比較し有意に減少した (Fig. 10)。これらの結果から CTLs は *E. tarda* 感染に対する防御免疫において主要な免疫機構であると考えられる。

哺乳類の CTLs は細胞内寄生体に対する防御免疫において重要な役割を果たす (Kaufmann and Flesch, 1988; Kaufmann, 1993; Witzel *et al.*, 2008)。特に CTLs のパーフォリンを介した細胞障害機構は *L. monocytogenes* や *M. tuberculosis* のような細胞内寄生細菌の抑制には必須である (Kägi *et al.*, 1994; Kägi *et al.*, 1996; Stenger *et al.*, 1997; Woodworth *et al.*, 2008)。本研究において攻撃試験 2 日目の感作 CD8 α^+ 細胞を移入したリシピエントの頭腎白血球や脾臓白血球において *prf2* の高い発現が見られた (Fig. 11E)。この結果は CTLs が *E. tarda* 感染細胞に対して Perforin を介した細胞障害を行っていることが考えられる。また頭腎白血球や体腎白血球、脾臓白血球において *ifng1* や *ifng2* の発現は攻撃試験時の未感染魚より有意に高い値を示した (Fig. 11A, B)。これからの結果は移入した CTLs が IFN- γ を産生し、Th1 を誘導するとともに他の CTLs を活性化していると考えられる。

4) 小括

第二章において *E. tarda* 感染における組織内細菌の排除に細胞性免疫が主要な役割を果たしていることが示唆された。そこで本章では細胞性免疫の主役となる Th1 および CTLs の移入による防御効果を検討した。その結果、Th1 および CTLs の移入によりリシピエントに *E. tarda* 感染に対する防御効果が認められたことから、*E. tarda* 感染に対する防御免疫において細胞性免疫が決定的な役割を担っていることが明らかとなった。

Table 5
PCR primers used for RT-PCR analysis

Genes	Primers	Sequence (5'→3')	Accessions
<i>eef1a</i>	EF1a-F1	CGGCAGCTTCAATGCTCAGGTCATC	AB491676
	EF1a-R1	ACGACGGTCGATCTTCTCCTTGA	
<i>cd4-1</i>	CD4-1-F1	TACCGCGGGAACAACCTTAAC	AB331216
	CD4-1-R1	TCAGGTGGAGGTTCTGAAGG	
<i>cd8a</i>	CD8a-F1	CTAGTATTGTAAAAGAACTGAATGTCTGTG	AB186395
	CD8a-R1	GATAGGCTTCGGGTCCTGGTTTTTTACAGTT	

Table 6
PCR primers used for real-time PCR analysis

Genes	Primers	Sequence (5'→3')	Accessions
<i>eef1a</i>	EF1a-F1	CGGCAGCTTCAATGCTCAGGTCATC	AB491676
	EF1a-R1	ACGACGGTCGATCTTCTCCTTGA	
<i>ifng1</i>	IFNg1-F1	TGGGCGATCAAGGAAGATG	AB570431
	IFNg1-R1	ACTTCAGATTTTTGGTGTTTTTGG	
<i>ifng2</i>	IFNg2-F1	GCAGAAACCCTTTGGTCG	AB570432
	IFNg2-R1	GTTCTTCAGGTTTCTCAGCTGTGT	
<i>ifngrel</i>	IFNgrel-F1	GCAAGCGCATTATAATACAGGA	AB570433
	IFNgrel-R1	AGTGCAGGAAGGCTTGGA	
<i>prf1</i>	Perforin1-F1	CACTGTAAACAGAGCAAAGACAAAA	AB561140
	Perforin1-R1	AGAGAAGCGCTGTGTCTTGAG	
<i>prf2</i>	Perforin2-F1	TACTCCTTCACAAGCCACACC	AB561141
	Perforin2-R1	GTGCAGTAATGGAACCCAGAA	
<i>prf3</i>	Perforin3-F1	GACAAATATAGTTTCACCAAACATGA	AB561142
	Perforin3-R1	TGACTGCTTCAAGAAACTCTGC	
<i>tbx21</i>	T-bet-F1	CAGCTGAAAATAGATCATAACCCTTT	AB290187
	T-bet-R1	GGTTGGGGAAGGCGTAAG	
<i>gata3</i>	GATA3-F1	ACAAGATGAACGGCCAGAAC	AB302073
	GATA3-R1	GTGGTCGTTTGACAGTTTGC	

Table 7

Composition of magnetically separated CD4⁺ and CD8α⁺ donor cells from the kidney of ginseng as determined by flow cytometry

Transferred cells	Composition of MACS sorted cells (%)		
	Lymphocytes	Macrophages	Neutrophils
CD4 ⁺ cells	91.2 ± 3.8	2.3 ± 0.9	6.6 ± 3.5
CD8α ⁺ cells	92.0 ± 3.9	3.0 ± 1.4	4.3 ± 3.9
Kidney leukocytes	34.3 ± 3.7	15.5 ± 3.4	50.1 ± 6.9

Numbers indicate the percentage of transferred cell types in each fraction.

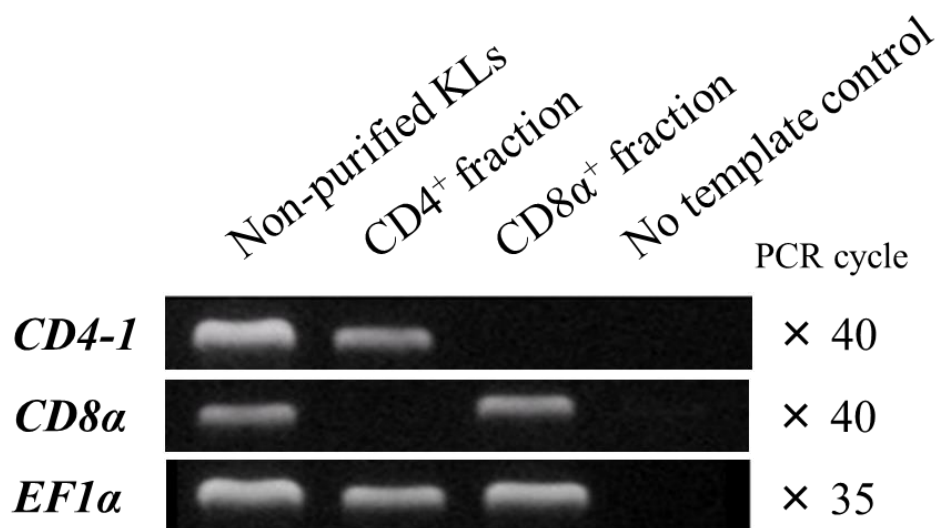


Fig. 9. Expression analysis of MACS-separated CD4⁺ and CD8α⁺ cells. The lymphocyte-rich fraction of kidney leukocytes was stained with rat anti-ginbuna CD8α mAb followed by magnetic bead-conjugated second antibody and CD8α⁺ and CD8α⁻ cells were separated with MACS. CD4⁺ and CD4⁻ cells were also separated from the CD8α⁻ fraction with rat anti-ginbuna CD4 mAb using the same methods. Total RNA was prepared from 5~10 × 10³ sorted cells for CD4⁺ and CD8α⁺ cells and used for RT-PCR analysis. RT-PCR was performed using gene-specific primer sets (Table 5) as follows: CD4-1 (*cd4-1*), CD8α (*cd8a*), and EF1α (*eef1a*). EF1α was used as an internal control. Numbers to the right indicate PCR cycles.

Table 8Protective effect of adoptive T cell transfer against *E. tarda* infection

Donor cells ^a	— ^b	+	++	+++	Dead
CD4 ⁺ cells					
From non-sensitized fish	0	0	0	2	8
From sensitized fish	5	2	3	0	0
CD8α ⁺ cells					
From non-sensitized fish	0	0	1	1	8
From sensitized fish	7	2	1	0	0
Without leukocytes (PBS)	0	0	0	0	10

^a Syngeneic leukocytes.^b Number of fish with illness. Scored as follows: —, no clinical sign; +, ascitic fluid in abdominal cavity; ++, plus swollen anus; +++, plus abscesses in the internal organs

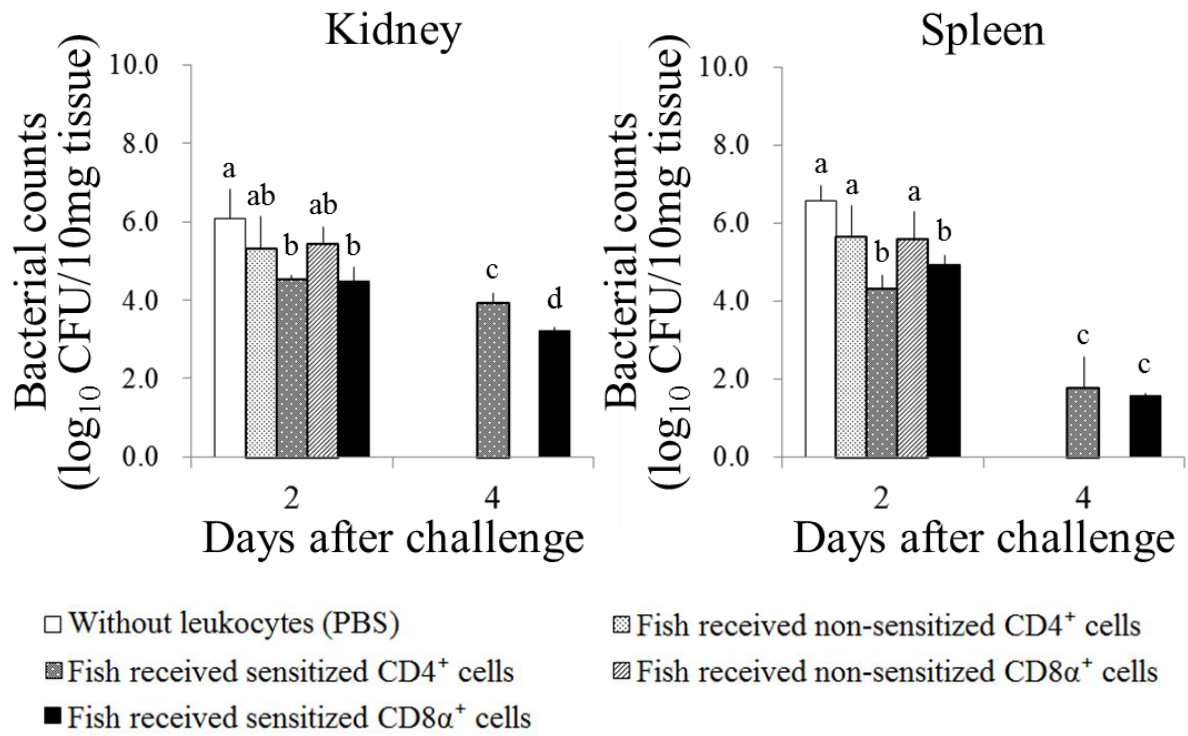


Fig. 10. Bacterial counts in kidney and spleen of CD4⁺ or CD8α⁺ cell recipients at 2 and 4 days after infection. Control fish received PBS via i.v. injection. Bacterial counts are shown as mean \pm SD of three fish. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons with Ryan's method. The labelings with different letters above each bar denote significant difference ($P < 0.05$); labelings with the same letter on each bar indicate no statistical difference between groups.

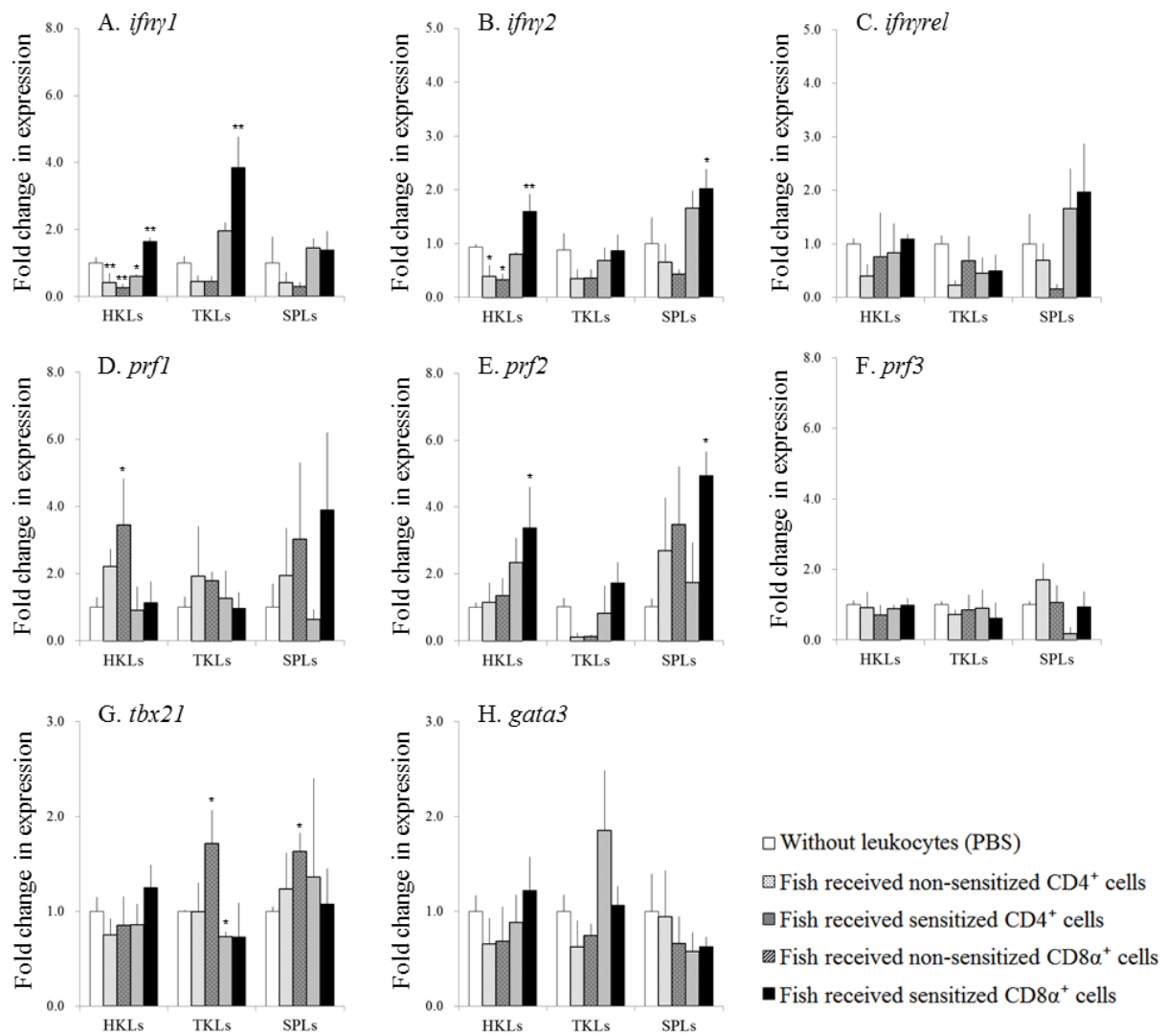


Fig. 11. Quantitative analysis of the expression of (A) *ifnγ1*, (B) *ifnγ2*, (C) *ifnγrel*, (D) *prf1*, (E) *prf2*, (F) *prf3*, (G) *tbx21*, and (H) *gata3* in head kidney leukocytes (HKLs), trunk kidney leukocytes (TKLs), and spleen leukocytes (SPLs) of CD4⁺ or CD8α⁺ cell recipients at 2 days post-infection (dpi). Each fish received 1.5×10^4 cells of non-sensitized or sensitized CD4⁺ or CD8α⁺ populations 8 days after sensitization with *Edwardsiella tarda*. Control fish received PBS via intravenous (i.v.) injection. Expression levels are presented as the ratio to the expression of *eef1a*, and the differences are shown as fold change in expression based on challenge in PBS-injected fish. Data are shown as means \pm standard deviation (SD) of three fish. Stastical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons with Ryan's method. Asterisks indicate significant differences compared with the same tissue from control fish (*P < 0.05, **P < 0.01).

第四章 *E. tarda* 弱毒生ワクチンおよび

ホルマリン不活化ワクチンによって誘導される二次応答の比較

1. 背景と目的

第三章で Th1 や CTLs が中心となる細胞性免疫が *E. tarda* 感染に対する防御免疫において決定的な役割を果たしていることが明らかになった。加えて抗原特異的細胞障害機構が組織内の *E. tarda* 排除に重要であることが示唆された。

これまで FKC ワクチンの試験は報告されているが、細胞内寄生細菌である *Mycobacterium* sp.や *Nocardia seriolae* を原因細菌とするミコバクテリウム症およびノカルジア症に対して効果的ではないことが示されている (Kato *et al.*, 2010, 2012)。さらにエドワジエラ症に対しては FKC ワクチン接種によって特異抗体価の上昇は見られるものの攻撃試験時の生残率と相関はなく、FKC ワクチンは有効ではないことが報告されている (Salati *et al.*, 1983; Igarashi and Iida, 2002)。一方、弱毒生ワクチンは *E. ictaluri* や *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *E. tarda* のような細胞内寄生細菌感染症に対して有効であることが報告されている (Klesius *et al.*, 1999; Marsden *et al.*, 1996; Moral *et al.*, 1998; Igarashi and Iida, 2002)。哺乳類において弱毒生ワクチンは細胞性免疫を強く誘導することが古くから知られている。これらの結果は魚類においても弱毒生ワクチンによって細胞性免疫が強く誘導されていることを示唆しているが、実際にどのような免疫機構が誘導するワクチンが有効かは明らかではない。そこで第四章では弱毒生ワクチンと不活化ワクチン接種魚における *E. tarda* 感染に対する獲得免疫応答を比較することでエドワジエラ症に対して有効性を示すワクチンの開発方針を明らかにした。

2. 材料と方法

1) 供試魚

長野県産諏訪湖産クローンギンブナ OB1 系統は独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所より分与を受けた。水温を 25 °C に設定した 120 cm 循環式水槽に収容し試験開始まで 2 週間順応させた。

2) 供試菌株

強毒株にはエドワジエラ症罹患ヒラメの腹水から分離された病原性株 *E. tarda* FPC498 株を使用した。試験には凍結保存した菌株を用いて病原性回復のために魚体通過を行い、再分離された菌体を TSA 培地で継代した後、25 °C で 48 時間培養後に使用した。

弱毒株には *E. tarda* FPC498 を親株として作出された *E. tarda* SPM31 株を用いた (Igarashi and Iida, 2002)。本菌株は親株と比較して、病原性に深く関わりとされる鉄獲得因子であるシデロフォア産生能が低い株である。試験にはグリセロール凍結保存した菌株を 50 mg/ml カナマイシン含有 TSA 培地で継代し、25 °C で 48 時間培養後に使用した。

3) ギンブナに対する *E. tarda* SPM31 株の LD₅₀ の測定

TSA 培地に増殖した FPC498 株および SPM31 株を掻き取り湿菌重量を測定し、滅菌処理した PBS を用いて $10^5 \sim 10^8$ CFU/ml にそれぞれ調整した。6 尾の供試魚に調整した菌液を 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて 100 g 魚体重あたり 1 ml となるように左体側より腹腔内接種した。試験魚は 60 cm 水槽にて 25 °C、無給餌で 30 日間観察した。試験期間中は接種後、5 日毎に半量の水を交換した。死亡魚については 2 時間以内に取り上げ症状の確認および腎臓、脾臓および肝臓から菌分離を行った。また菌接種 30 日後、すべての試験魚を取り上げ Reed and Muench (1938) の方法により LD₅₀ を求めた (Reed and Muench, 1938)。

4) ホルマリン不活化菌体の作製

培養した *E. tarda* FPC498 株を湿菌重量 1 mg/ml に PBS を用いて調整した。ホルマリンをホルムアルデヒド終濃度が 0.5 % になるよう菌浮遊液に加え 4 °C、24 時間静置した。その後、PBS で 22 °C、10000 ×g、3 分間の条件で 3 回遠心洗浄し、PBS に 1 mg/ml となるように再懸濁した。菌の不活化を確認するため 100 μl を TSA 培地に塗布し、25 °C、24 時間培養し、コロニーが形成されないことを確認した。ホルマリン不活化菌体 (FKC) 懸濁液は使用まで 4 °C で保存した。

5) ワクチネーション

生菌によるワクチネーションは *E. tarda* SPM31 株を用いて行った。50 mg/ml カナマイシン含有 TSA 培地に増殖した菌体を掻き取り湿菌重量を測定し、滅菌処理した PBS を用いて 10^7 CFU/ml に調整した。供試魚（平均魚体重： 14.3 ± 2.5 g）に調整した菌液を 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて 100 g 魚体重あたり 1 ml となるように左体側より腹腔内接種した。また 10^8 CFU/100 g 魚体重となるように FKC を腹腔内接種した。試験魚は 60 cm 水槽にて 25 °C、無給餌で 30 日間観察した。試験期間中は接種後、5 日毎に半量の水を交換した。

6) 攻撃試験

ワクチン効果を比較するため致死量の *E. tarda* で攻撃試験を行った。攻撃試験には強毒株である *E. tarda* FPC498 株を用いた。TSA 培地に増殖した菌体を掻き取り湿菌重量を測定し、滅菌処理した PBS を用いて 10^7 CFU/ml に調整した。ワクチン接種 30 日後、魚体に 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて 100 g 魚体重あたり 1 ml (20 LD_{50}) となるように左体側より腹腔内接種した。死亡魚は 2 時間以内に取り上げ症状の確認および腎臓、脾臓および肝臓から菌分離を行った。

ワクチン接種によって誘導される二次免疫応答を比較するため、比較的低い菌数 (0.2 LD_{50}) の *E. tarda* で攻撃試験を行った。本試験には攻撃試験同様に *E. tarda* FPC498 株を用いた。TSA 培地に増殖した菌体を掻き取り湿菌重量を測定し、滅菌処理した PBS を用いて 10^5 CFU/ml に調整した。ワクチン接種 30 日後、生残した魚体に 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて 100 g 魚体重あたり 1 ml となるように左体側より腹腔内接種した。

7) サンプルリング

E. tarda 接種後、0、1、2、4 日目に無作為に 3 尾ずつ供試した。ヘパリン処理した 1 ml 注射筒および 25 G の針を用いて全採血を行った。採血後解剖し、頭腎および体腎を回収した。血液は 4 °C、500 ×g、10 分間遠心分離を行い、血漿を回収した。頭腎および体腎は白血球単離に用い、血漿は凝集抗体価測定に用いた。

8) 白血球の単離

7) で回収した頭腎および体腎を 100 μm Nylon mesh 上で緩やかに圧をかけて磨砕し、RPMI-1 に懸濁した後、スピッツ管に移した。そこに 1.040 および 1.080 g/ml に調整した Percoll™ 溶液を 2.5 ml 注射筒および 20 G×70 のカテラン針を用いて、試験管底部に静かに加え、密度勾配の層を形成した後、4 °C、500 ×g、30 分間遠心分離を行なった。分離後、白血球層を取り出し、RPMI-1 に懸濁させ 3 回洗浄を行なった。洗浄後、Thoma 血球計算盤により白血球数を計数した。

9) cDNA の合成

8) で単離した白血球 5×10^6 cells を 4°C 、 $500 \times g$ 、10 分間遠心分離しペレット化した。そこに 1% 2-メルカプトエタノール（和光純薬工業）含有 Buffer RTL Plus（QIAGEN）を $350 \mu\text{l}$ 加え攪拌し細胞を溶解させた。その後、RNA 抽出を行うまで -80°C で保存した。

-80°C で保存した白血球溶解液から RNeasy Plus Mini kit（QIAGEN）を用いて説明書に従い Total RNA を抽出した。次に High Capacity cDNA Reverse transcription Kit（Applied Biosystems）を用いて逆転写反応を行ない抽出した Total RNA から cDNA を合成した。すなわち $30 \mu\text{l}$ の Total RNA を鋳型とし、 $4 \mu\text{l}$ の $10 \times \text{RT-Buffer}$ 、 4 mM の dNTP Mix、 $1 \mu\text{l}$ の $25 \times \text{RT Random Primers}$ 、 $0.3 \mu\text{M}$ の Oligo dT Primers、 5 U の MultiScribe™ Reverse transcriptase を含む $40 \mu\text{l}$ の反応液を作成し、サーマルサイクラー CP708（ASTECH, Japan）を用いて逆転写反応を行なった。得られた cDNA を PCR grade water で 5 倍希釈し、使用するまで -80°C で保存した。

10) リアルタイム PCR による遺伝子の発現解析

腎臓由来白血球における IFN- γ (*ifng1* および *ifng2*)、IL-10 (*il10*) Th1 細胞のマスター転写因子 T-bet (*tbx21*) および Th2 細胞のマスター転写因子 GATA-3 (*gata-3*) 遺伝子の発現を調べた。なおリアルタイム PCR に用いた特異的プライマーは Table 9 に示した。8) で合成した cDNA を鋳型として、10 μ l の Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, U.S.A.)、200 nM の Forward プライマーおよび Reverse プライマーを含む 20 μ l 反応液を混合し、Mini OpticonTM System (Biorad, U.S.A.) を用いてリアルタイム PCR を行った。反応は 95 °C で 3 分、次に 95 °C で 10 秒、60 °C で 30 秒を 50 サイクル行った。各遺伝子配列が組み込まれたプラスミドを鋳型として用い、既知のコピー数に対する閾値サイクルをプロットすることにより検量線を作成した。なお、内因性コントロール遺伝子である *EF1 α* を用いて補正した値を発現量として解析を行った。

11) 抗体価の測定

血漿は菌接種後 1、2、4 日目の試験魚より回収した。非働化は 50 °C で 30 分間行った。抗体価は Plumb and Areechon (1990) の方法を改変した凝集測定法によって測定した。すなわち非働化した血漿を 50 μ l の PBS によって 2 倍ずつ段階希釈し、そこに 50 μ l の FKC-*E. tarda* (1×10^9 CFU/ml) を加えた。測定は肉眼で行い、凝集を示したウェルのうち最も希釈倍率の高い値を抗体価とした。

12) CD8 α^+ リンパ球数の算出

8) で単離した白血球を 1×10^6 cells/ml に調整し、抗ギンブナ CD8 α ラット IgG モノクローナル抗体を 5000 倍希釈になるように加え、4 °C で 1 時間反応させた。その後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない 5%FBS 含 RPMI-1640 培地 (RPMI-5) で再懸濁した。そこに FITC 標識抗ラット IgG ヤギ抗体および FITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (Jackson ImmunoResearch) を 100 倍希釈となるように加え、4 °C で 30 分間、暗中で反応させた。その後、RPMI-1 で 3 回洗浄を行ない RPMI-1 に再懸濁し、40 μ m のナイロンメッシュ (共進理工) を通した。そこに 10 mg/ml の Propidium iodide solution (SIGMA-ALDRICH) を 2 μ l 加え、22 °C で 10 分間、暗中で静置し解析用試料とした。試料はフローサイトメーター CYTOMICS FC 500 (BECKMAN COULTER) を用いて解析した。すなわち前方散乱光 (FS) および側方散乱光 (SS) によりドットプロットを作成して FITC 陽性細胞領域を検出した後、体腎の組織重量に対する CD8 α^+ リンパ球数を算出した。

13) 統計解析

結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。発現解析および凝集抗体価、CD8 α^+ リンパ球数のデータは分散分析 (ANOVA) を行った。また正規分布しているデータについては Ryan の方法により多重比較を行った。

3. 結果と考察

1) *E. tarda* SPM31 株のギンブナに対する毒性

E. tarda SPM31 株の魚体に対する毒性低下はティラピアで報告されている。本試験ではギンブナに対する毒性の低下を確認した。100 g 魚体重あたり 10^8 CFU 接種区はすべて死亡した。一方、 10^7 CFU 接種区および 10^6 CFU 接種区、 10^5 CFU 接種区はすべてが生残した (Table 10)。これらの結果より *E. tarda* SPM31 株のギンブナに対する LD_{50} は 5×10^7 CFU/100 g 魚体重と算出された。親株である *E. tarda* FPC498 株の LD_{50} は 5×10^5 CFU/100 g 魚体重であったことからギンブナに対する *E. tarda* SPM31 株の毒性は親株よりも弱いことが確認された。

2) 攻撃試験によるワクチン効果の検討

FKC ワクチンがエドワジエラ症に対してワクチン効果を有さないことはすでに報告されている (Salati *et al.*, 1983; Igarashi and Iida, 2002)。一方、*E. tarda* SPM31 株の弱毒生ワクチンとしての有効性はティラピアを用いた試験によってすでに確認されている (Igarashi and Iida, 2002)。本試験ではギンブナのエドワジエラ症における FKC ワクチンと弱毒生ワクチンのワクチン効果を検討した。攻撃試験の結果を Fig. 12 に示した。攻撃試験後、すべての FKC 感作魚は死亡したことから、ギンブナのエドワジエラ症においても FKC ワクチンが効果を有さないことも明らかとなった。一方、*E. tarda* SPM31 株で感作した魚はすべてが生残した。このことからギンブナのエドワジエラ症においても弱毒生ワクチンの有効性が確認された。

3) FKC ワクチンおよび弱毒生ワクチンにより誘導される免疫応答

弱毒生ワクチン接種区の $\text{IFN}\gamma 1$ および $\text{IFN}\gamma 2$ 、T-bet 遺伝子の発現は FKC ワクチン接種区と比較し有意に高かった (Fig. 13A, C)。また、攻撃試験後 4 日目の弱毒生ワクチン接種区の腎臓白血球における $\text{CD}8\alpha^+$ 細胞数は FKC ワクチン接種区と比較して有意に増加していた (Fig. 15)。このことから弱毒生ワクチン接種によって攻撃試験後に細胞性免疫が強く誘導されていると考えられる。これに対して IL-10 や GATA-3 遺伝子の発現は対照区 (PBS 接種区) と比較し有意に減少した (Fig. 13B, D)。この結果より弱毒生ワクチンは液性免疫の誘導を抑制していると考えられる。一方、FKC ワクチン接種区の IL-10 遺伝子の発現は弱毒生ワクチン接種区と比較して有意に高かった (Fig. 13B)。さらに *E. tarda* に対する特異的抗体価は FKC ワクチン接種区において菌接種後 2 日目から 4 日目にかけて有意に増加したのに対して (Fig. 14)、腎臓白血球中の $\text{CD}8\alpha^+$ 細胞数は 2 日目から 4 日目にかけて有意ではないが減少傾向を示した (Fig. 15)。このことから FKC ワクチン接種によって攻撃試験後に液性免疫が強く誘導され、細胞性免疫の誘導を抑制されたと考えられる。

4) 小括

攻撃試験の結果、弱毒生ワクチンを接種した試験区はすべて生残し、攻撃試験時に細胞性免疫を誘導した。一方、FKC ワクチンを接種した試験区はすべて死亡し、攻撃試験時に液性免疫を強く誘導した。これらの結果より弱毒生ワクチンは *E. tarda* による攻撃試験時に細胞性免疫を強く誘導することによって *E. tarda* 感染に対防御免疫誘導に貢献していると考えられる。一方、FKC ワクチンは液性免疫を強く誘導するとともに細胞性免疫の誘導を抑制することによって *E. tarda* の感染を拡大させていることが示唆された。

Table 9
PCR primers used for real-time PCR analysis

Genes	Primers	Sequence (5'→3')	Accessions
<i>eef1a</i>	EF1a-F1	CGGCAGCTTCAATGCTCAGGTCATC	AB491676
	EF1a-R1	ACGACGGTCGATCTTCTCCTTGA	
<i>ifng1</i>	IFNg1-F1	TGGGCGATCAAGGAAGATG	AB570431
	IFNg1-R1	ACTTCAGATTTTGGTGTTTTTGG	
<i>ifng2</i>	IFNg2-F1	GCAGAAACCCTTTGGTCG	AB570432
	IFNg2-R1	GTTCTTCAGGTTTCTCAGCTGTGT	
<i>il10</i>	IL-10-F1	TCAAAAACACCAATCAACTCCA	
	IL-10-R1	GGCGAACTCAAAGGGATTTA	
<i>tbx21</i>	T-bet-F1	CAGCTGAAAATAGATCATAACCCTTT	AB290187
	T-bet-R1	GGTTGGGGAAGGCGTAAG	
<i>gata3</i>	GATA3-F1	ACAAGATGAACGGCCAGAAC	AB302073
	GATA3-R1	GTGGTCGTTTGACAGTTTGC	

Table 10LD₅₀ of *Edwardsiella tarda* against ginbuna crucian carp

Challenge dose* ¹ (CFU/100g body weight)	Strain	
	FPC498	SPM31
10 ⁸	6/6* ²	6/6
10 ⁷	6/6	0/6
10 ⁶	4/6	0/6
10 ⁵	1/6	0/6
LD ₅₀ (CFU/100g BW)	5 × 10 ⁵	5 × 10 ⁷

FPC498, a wild-type strain; SPM31, a lowered siderophore productive mutant

*¹ Challenge dose were determined based on a preliminary experiment,

*² Number of fish died / Number of fish tested 4 weeks after the challenge

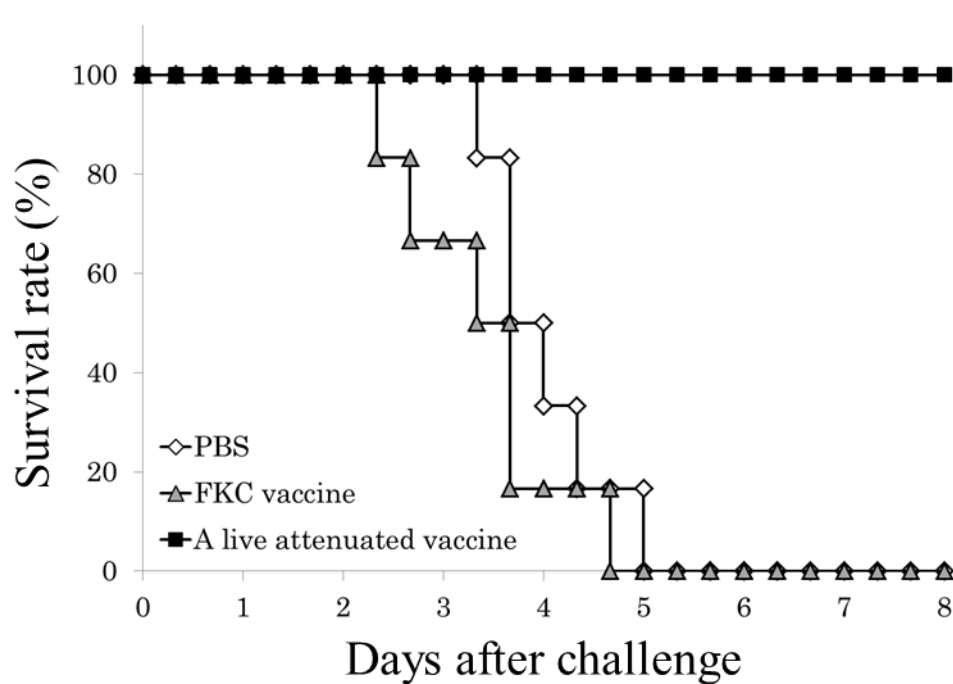


Fig. 12. Survival rate of ginbuna crucian carp challenged with differing doses of *E. tarda* by i.p. injection. Experimental group of 6 fish were vaccinated with 1×10^8 CFU/100 g BW of FKC or 1×10^7 CFU/100 g BW ($0.2 LD_{50}$) of SPM31 strain by i.p. injection, respectively. Control group of 6 fish were injected with 1 ml/100 g BW of PBS. Challenge was performed at 30 days post vaccination. Each experimental 6 fish were challenged with 1×10^7 CFU/100 g BW ($20 LD_{50}$) of *E. tarda* FPC498 strain. Dead fish were observed for clinical sign and isolated bacteria from kidney, spleen, and liver.

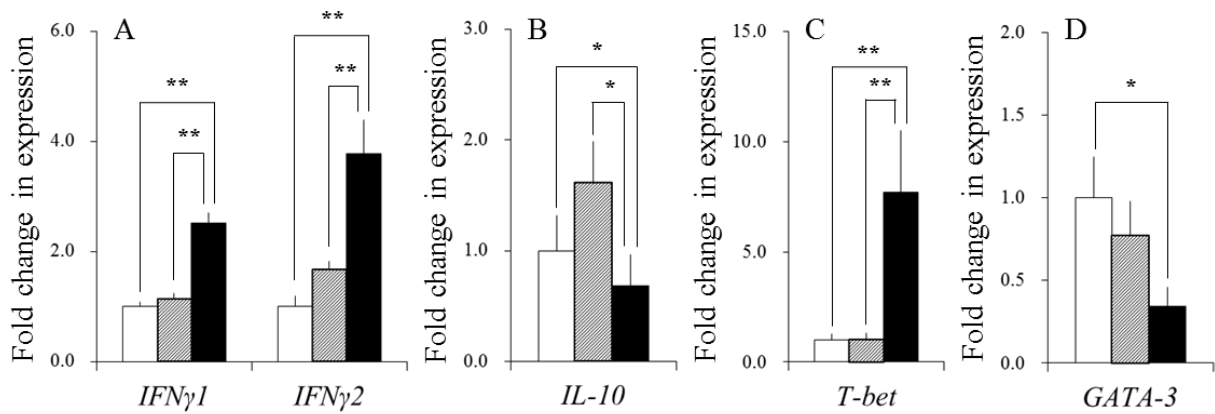


Fig. 13. Quantitative analysis of the each gene expression of (A) *ifng*, (B) *il10*, (C) *tbx21*, and (D) *gata3* in kidney leukocytes of fish vaccinated with FKC (hatched bar) or live attenuated (closed bar) vaccine at 1 day post challenge. Expression levels are presented as the ratio to the expression of *eef1a*, and the differences are shown as fold change in expression based on challenge in PBS-injected fish (open bar). Data are shown as means \pm standard deviation (SD) of three fish. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons with Ryan's methods. Asterisks indicate significant differences compared with control fish (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

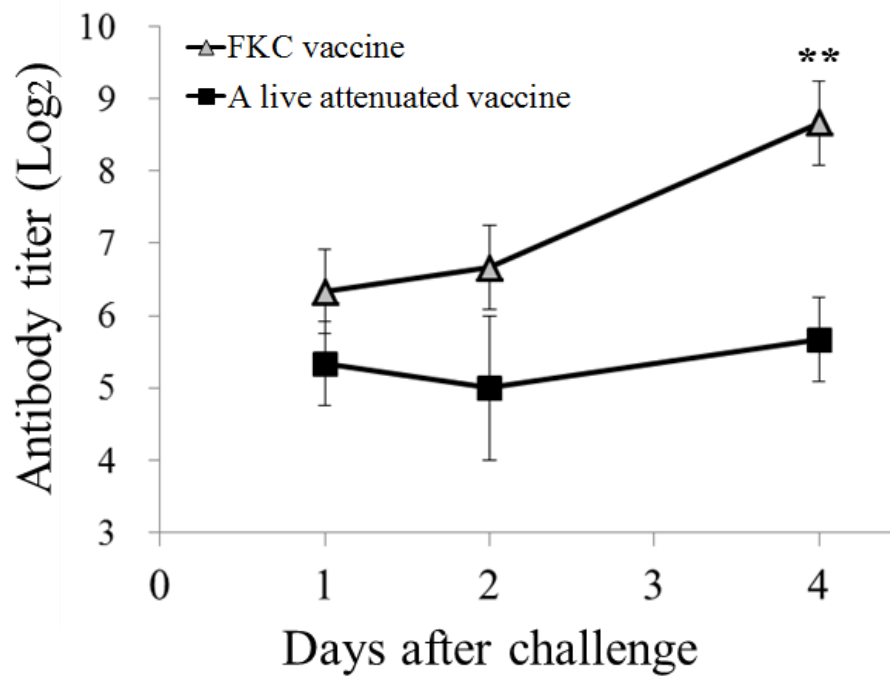


Fig. 14. Agglutination activity of serum of fish vaccinated with FKC or a live attenuated vaccine at 1, 2, and 4 days after challenge. Data are shown as means \pm standard deviation (SD) of three fish. Statistical analysis was performed using Stastical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons with Ryan's method. Asterisk indicates significant difference between FKC- and a live attenuated- vaccinated group in the same period (** $P < 0.01$).

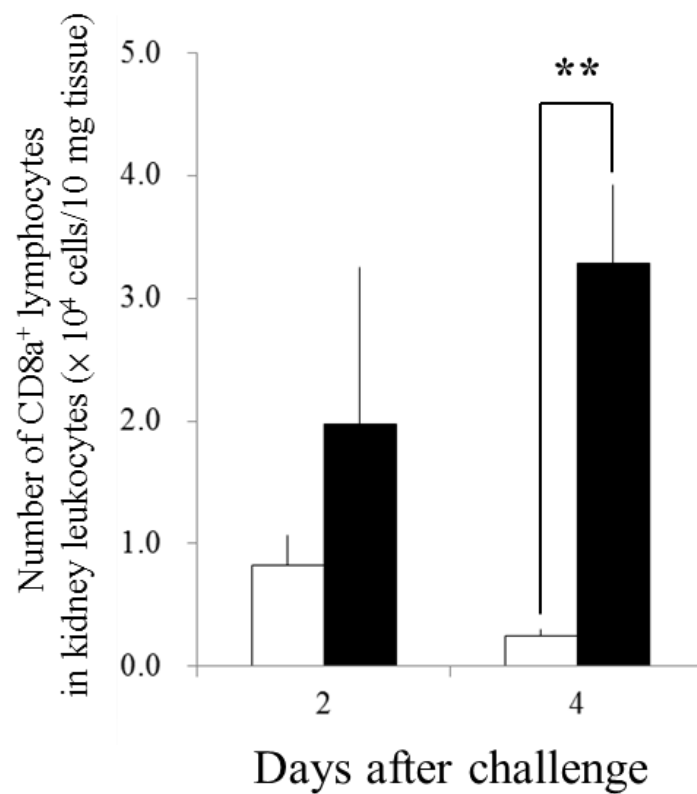


Fig. 15. Kinetics of CD8a⁺ lymphocytes in kidney leukocytes of fish vaccinated with FKC (open bar) or live attenuated (closed bar) vaccine at 2 and 4 days post-infection. Data are shown as means \pm standard deviation (SD) of three fish. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison with Ryan's methods. Asterisk indicates significant difference between a FKC- and live attenuated-vaccinated group in the same period (** $P < 0.01$).

第五章 総合考察

Edwardsiella tarda を原因細菌とするエドワジエラ症は古くから水産増養殖において経済的被害を及ぼしてきた。近年ではヒラメやマダイなどの海面養殖における本症の被害は甚大であり、水産分野において最もワクチン開発が望まれている疾病である。現在、国内で市販されている水産用ワクチンはすべて不活化ワクチンである。エドワジエラ症に対するワクチン開発はこれまで試験的に行われてきたが、不活化ワクチンは本細菌に対して有効ではないことが報告されている (Salati *et al.*, 1983; Igarashi *et al.*, 2002)。これは本細菌が上皮細胞への侵入性や貪食細胞の食胞内での抵抗性を有している細胞内寄生細菌であるためと考えられている (Iida *et al.*, 1993; Iida and Wakabayashi, 1993; Ling *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2001; Ishibe *et al.*, 2008; Takano *et al.*, 2010)。

哺乳類においては結核の原因細菌 *Mycobacterium tuberculosis* やリステリア症の原因細菌 *Listeria monocytogenes* などが細胞内寄生細菌として知られており、これらの感染症に対する防御免疫では細胞性免疫が主要な役割を果たす (Neild and Roy, 2004; Parmer, 2004; Reece and Kufmann, 2008)。しかし、魚類の細胞内寄生細菌感染に対する主要な免疫機構は明らかにされていない。そこで本論文ではギンブナを用いて魚類の細胞内寄生細菌である *E. tarda* に対する主要な免疫機構を明らかにすることを目的とした。

B 細胞が産生する特異抗体は細胞外病原体の排除に対して効果的である。魚類においても液性免疫は *Streptococcus agalactiae* や *Streptococcus iniae* など貪食細胞内における殺菌機構に対して抵抗性を有さない細菌に対して主要な役割を果たすことは受動免疫試験などにより明らかになっている (Pasnik *et al.*, 2006; LaFrentz *et al.*, 2011)。一方、Igarashi and Iida (2002) はセラピアへの *E. tarda* による攻撃試験において生残率と *E. tarda* に対する特異抗体価の間に相関関係はないと報告している。本論文第四章においても血清中の凝集抗体価と生残率との間には関連性は認められなかった (Fig. 12, 14)。

また第二章の結果より組織内 *E. tarda* の排除は液性免疫がなくとも完結することが明らかとなった (Fig. 16)。以上の結果より細胞内寄生細菌である *E. tarda* 感染に対して液性免疫は主要な防御免疫ではないことが考えられる。

哺乳類のヘルパーT細胞には Th1、Th2、Th17、Treg の4つのサブセットが存在する。Th1 は IFN- γ や IL-2、IL-12 などのサイトカインを介して細胞性免疫を誘導する。一方、Th2 は IL-4 や IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 などのサイトカインを産生して液性免疫を誘導する。また Th1 と Th2 は Th1/Th2 バランスと呼ばれる拮抗関係にあり、互いに産生するサイトカインにより体内での細胞性免疫と液性免疫のバランスを維持している ()。第二章において、その Th1/Th2 分化のメディエーターである T-bet および GATA3 遺伝子の発現解析を *E. tarda* を接種したギンブナ腎臓白血球を用いて行った結果、T-bet 遺伝子は *E. tarda* 感染 8 日目に最も高い発現量を示し、その後減少した (Fig. 5D)。一方、GATA-3 遺伝子は感染 12 日目より発現が上昇し 30 日目で最大値となった (Fig. 5E)。その発現細胞の特定を行ったところ感染 8 日目では T-bet 遺伝子の発現が上昇し、感染 30 日目では GATA-3 遺伝子の発現が CD4⁺ 細胞で上昇していた (Fig. 6)。このことから魚類も哺乳類と酷似した Th1 および Th2 の分化メカニズムを有していると考えられる。また、感作 CD4⁺ 細胞を移入したリシピエントの頭腎白血球において Perforin 遺伝子が高い発現を示したことから、このレシピエントの組織では *E. tarda* 感染細胞に対する細胞障害が行われていると考えられる (Fig. 11D)。本研究においてこの細胞障害が CD4⁺ CTLs によるものなのか、Th1 によって誘導された CTLs に由来するものなのかは明らかではないが、これらの結果から *E. tarda* 感染に対する防御免疫において液性免疫ではなく細胞性免疫が主要な免疫機構の一つを担っていると考えられる。

哺乳類において CTLs の抗原特異的細胞障害は細胞内寄生細菌感染細胞の除去のための主要な機構である (Kaufmann and Flesch, 1988; Kaufmann, 1993; Wizel *et al.*, 2008)。第二章でも *E. tarda* を接種したギンブナにおいて CTLs の細胞障害の活性が上昇した後、

組織内 *E. tarda* の減少が観察された (Fig. 16)。さらに第三章では感作 CD8 α ⁺ 細胞の移入によって感染防御能の伝達が確認されたことから CTLs は *E. tarda* 感染に対する防御免疫において主要な免疫機構であることが考えられる (Table 8)。また、感作 CD8 α ⁺ 細胞を移入したリシピエントの組織白血球において、Perforin および IFN- γ 遺伝子の高い発現を確認した (Fig. 11A,B, E)。哺乳類の CD8⁺ T 細胞は細胞内寄生細菌に対する感染防御における初期の IFN- γ を介した細胞性免疫応答において重要な役割を果たす (Yoshikai and Nishimura, 2000)。本研究においても CD8 α ⁺ 細胞は感染細胞の除去のみならず、IFN- γ を介して細胞性免疫を強く誘導することで *E. tarda* 感染に対する防御免疫に大きく貢献していると考えられる。

先にも述べたように魚類の細胞内寄生細菌である *E. tarda* や *Mycobacterium* sp., *Nocardia seriolae* に対して FKC ワクチンは有効ではないことが報告されている (Salati *et al.*, 1983; Igarashi and Iida, 2002; Kato *et al.*, 2010, 2012)。一方、弱毒生ワクチンは *E. ictaluri* や *A. salomonicida*, *A. hydrophila*, *E. tarda* のような細胞内寄生細菌感染症に対して有効性は明らかにされている (Klesius *et al.*, 1999; Marsden *et al.*, 1996; Moral *et al.*, 1998; Igarashi and Iida, 2002)。哺乳類において弱毒生ワクチンは細胞性免疫を強く誘導することが古くから知られているが、魚類においてその作用機序について細胞レベルで解析された報告はない。そこで第四章では FKC ワクチンおよび弱毒生ワクチンの有効性を調べるとともにその作用機序の解明を行った。それぞれのワクチン接種魚について *E. tarda* 感染時に誘導される免疫応答を解析した結果、感染後すべての個体が生残した弱毒生ワクチン接種魚の腎臓白血球においては IFN- γ や T-bet 遺伝子の有意な発現上昇が見られ、CD8 α ⁺ 細胞数の有意な増加が見られたことから細胞性免疫が強く誘導されていることが考えられる (Fig. 13A, C; Fig. 15)。対照的に IL-10 や GATA-3 遺伝子の発現は PBS 接種区と比較し有意に減少した (Fig. 13B, D)。このことから、弱毒生ワクチンは液性免疫の誘導を抑制していると考えられる。一方、攻

撃試験時にすべての個体が死亡した FKC ワクチン接種区は弱毒生ワクチン接種区と比較して *E. tarda* を用いた攻撃試験後に IL-10 遺伝子の有意な発現が観察され、加えて *E. tarda* に対する凝集抗体価の有意な上昇が確認された (Fig. 13B, D; Fig. 14)。さらに FKC ワクチン接種区では攻撃試験後 2 日目から 4 日目にかけて CD8 α^+ 細胞数の減少が観察された (Fig. 15)。この結果より FKC ワクチンは液性免疫を強く誘導するだけでなく細胞性免疫の誘導を抑制することによって *E. tarda* 感染に対する抵抗性を低下させていることが考えられる。近年、Chettri *et al.* (2013) はニジマスの寄生虫である *Ichthyobodo necator* 感染後に IL-4 や IL-13A、IL-10、IgM、GATA-3 の発現や IgM $^+$ 細胞数の増加など Th2 様の免疫応答が活性化する一方、CD8 や TCR β 、T-bet の発現や CD8 $^+$ 細胞数の低下などの Th1 様の免疫応答が抑制される現象を報告している (Chettri *et al.*, 2013)。これらの結果から魚類も哺乳類同様に Th1/Th2 バランスの調節機構が備わっていることが考えられる。

本論文では細胞内寄生細菌である *E. tarda* 感染に対する防御免疫において細胞性免疫が主要な役割を果たしていることを明らかにした。また弱毒生ワクチンにより *E. tarda* に対する感染防御に有効な細胞性免疫記憶を誘導することも明らかにした。現在、わが国では環境汚染への懸念や毒性復帰による被害の恐れなどから水産用医薬品として弱毒生ワクチンの実用化は認められていない。そのため不活化ワクチンをベースとしたワクチン開発が必要である。しかし、不活化ワクチンでは細胞性免疫を誘導できないばかりか、誘導を抑制してしまうことから、アジュバントを併用することで、液性免疫誘導を押さえつつ細胞性免疫を誘導する技術の開発が求められる。近年、細胞性免疫を亢進させるアジュバントや手法が医学や獣医学領域において開発されており、こうした技術を水産分野に応用することで現在問題となっている細胞内寄生細菌感染症に対するワクチン開発の促進が期待される。また、IFN- γ や IL-12 など細胞性免疫を誘導するサイトカインのアジュバントとしての応用も考えられる。その基盤となる知見を得た本

研究は魚類の細胞内寄生菌に対する細胞性免疫誘導型ワクチンの開発の一助となると
信じる。

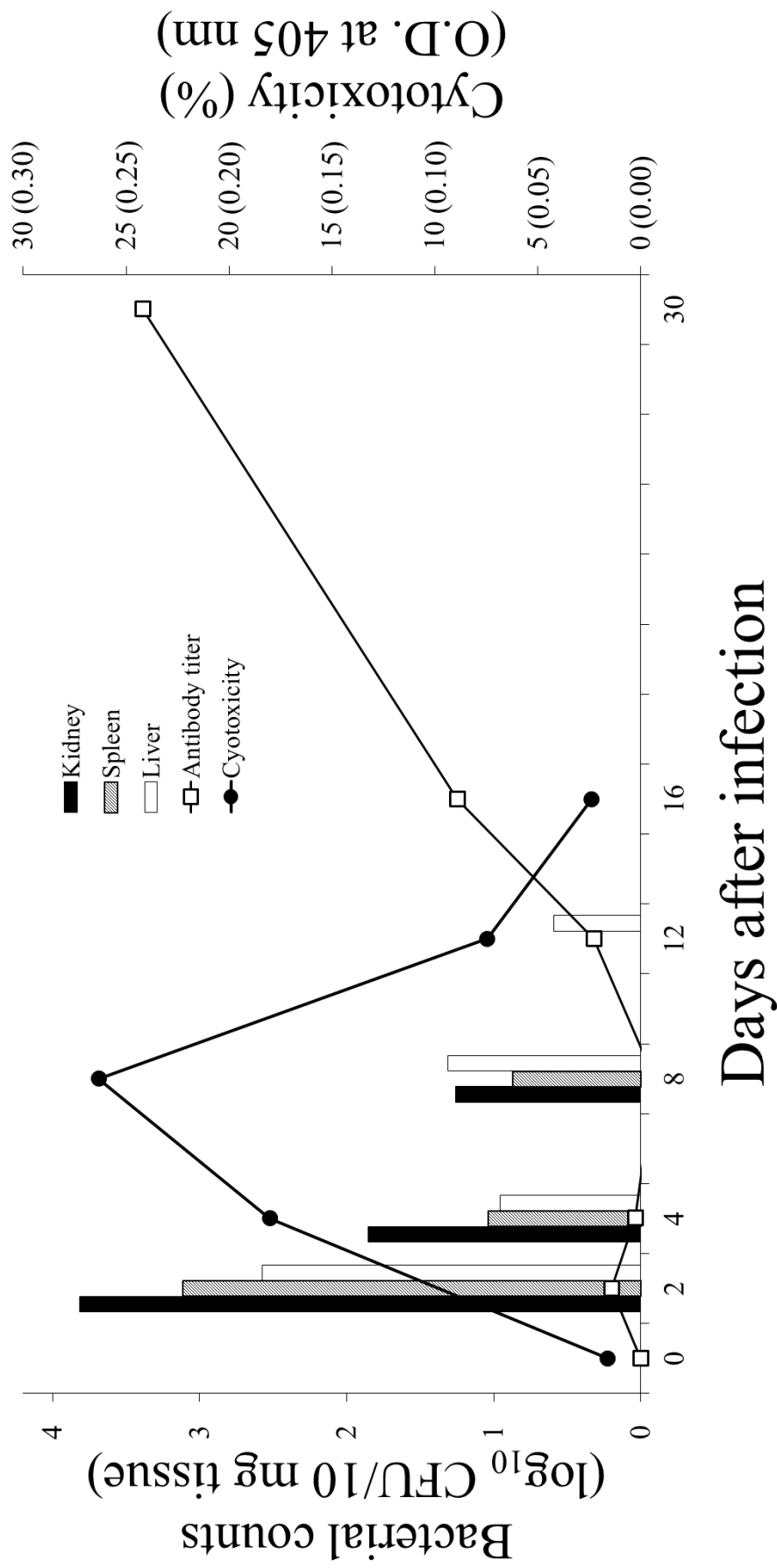


Fig. 16. Time course of cell-mediated cytotoxicity response, antibody (IgM) response, and bacterial counts in fish infected with *E. tarda*. $CD8\alpha^+$ cells were collected from kidney on the selected days and incubated with *E. tarda*-infected syngeneic cells at an effector: target ratio of 5: 1. Data of cytotoxic and antibody responses, bacterial counts are shown as means of three fish. Anti-*E. tarda* antibody IgM quantified by ELISA.

謝辞

本研究を遂行し学位論文にまとめるに当たり、多くのご支援とご指導を賜りました、指導教員である鹿児島大学水産学部教授 山本淳先生に心より感謝申し上げます。山本先生は私にとって父のような存在であり、時には厳しくご指導いただきたいこと、優しく励ましてくださったことは今後の努力の糧になるものであります。

鹿児島大学水産学部助教 荒木亨介先生には、本研究および論文執筆はもちろんのこと、筆者が入室以来、六年の長きにわたり、終始ご指導、ご助言いただきました。また荒木先生は教員としてだけではなく、時には兄のように親身になって相談にのっていただいたこと、アドバイスをくださったこと、決して忘れません。

また副査を引き受けていただくとともに審査・博士論文作成においてご助言をいただきました鹿児島大学水産学部教授 小塩俊介先生および同学部教授 小山次郎先生、鹿児島大学農学部生物資源化学科教授 候徳興先生、琉球大学大学院医学研究科教授 松崎吾郎先生に心から感謝いたします。

供試魚を提供いただきとともに、研究に対してご助言をいただきました独立行政法人水産総合センター養殖研究所 中易千早博士に心より感謝いたします。また、論文執筆において適切なご助言をいただきました日本大学生物資源科学部教授 中西照幸先生に深く感謝いたします。

また、他研究室でありながら様々な助言や支援をしていただいた鹿児島大学水産学部准教授 小谷知也先生および同学部助教 横山佐一郎先生に深くお礼申し上げます。

学部 3 年生より私に実験を教えていただくとともに研究の世界に導いていただきました鹿児島大学水産学部准教授 宇野誠一先生および同学部助教 國師恵美子先生に深く感謝いたします。

また共にこの研究を行った鹿児島大学水産学部魚病学研究室卒業生の下野友未さん、多治見誠亮君、鳥居加奈さん、増田鷹侑君に心より感謝申し上げます。

最後になりますが、平成 20 年 3 月 19 日に永眠した父にこの論文をささげるとともに、いつも心の支えになってくれた長崎に住む母と姉、そして二人の祖母と叔母に心から感謝いたします。

参考文献

Araki K, Takizawa F, Yamasaki M, Esumi M, Morimoto T, Ototake M, Yamamoto A, Nakanishi T. Expression profiles of interferon gamma genes in response to immunostimulants and alloantigen in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. Fish Sci 2013; 79: 213-20.

Campbell PA. Macrophage-*Listeria* interactions. Immunol Ser 1994; 60: 313-28.

Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding CV, Silver RF, Boom WH. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. J Immunol 2001; 167: 2734-42.

Carretelli CR, Rizzo A, Paolillo R, Catania MR, Catanotti P, Rossano F. Effect of nitric oxide on the growth of *Chlamydomonas pneumoniae*. Can J microbiol 2005; 51: 941-7.

Chettri JK, Kuhn JA, Jaafar RM, Kania PW, Møller OS, Buchmann K. Epidermal responses of rainbow trout to *Ichthyobodo necator*: immunohistochemical and gene expression studies indicate a Th1-/Th2-like switch. J Fish Dis 2013; 10: 1111-23.

Companjen A, Heinhuis B, Aspers K, Rombout J. In vivo evoked specific cell mediated cytotoxicity in carp (*Cyprinus carpio* L.) uses mainly a perforin/granzyme-like pathway. Fish Shellfish Immunol 2006; 20: 113-7.

Darrah PA, Hondalus MK, Ischiropoulos H, Mosser DM. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. *Infect Immun* 2000; 68: 3587-93.

Du L, Yang X, Yang L, Wang X, Zhang A, Zhou H. Molecular evidence for the involvement of ROR α and ROR γ in immune response in teleost. *Fish Shellfish Immunol* 2012; 33(2): 418-26.

Feng CG, Britton WJ. CD4⁺ and CD8⁺ T cells mediate adoptive immunity to aerosol infection of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J Infect Dis* 2000; 181(5): 1846-9.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147: 3815-22.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-51.

Fischer U, Utke K, Ototake M, Dijkstra J M, Köllner B. Adaptive cell-mediated cytotoxicity against allogeneic targets by CD8-positive lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol* 2003; 27: 323-37.

Fischer U, Utke K, Somamoto T, Köllner B, Ototake M, Nakanishi T. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 20(2): 209-26.

Flores MV, Hall C, Jury A, Crosier K, Crosier P. The zebrafish retinoid-related orphan receptor (ror) gene family. *Gene Expr Patterns* 2007; 7(5): 535-43.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; 178: 2249-54.

Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol* 1992; 148(6): 1792-6.

Grayfer L, Belosevic M. Molecular characterization, expression and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interferon gamma. *Dev Comp Immunol* 2009; 33: 235-46.

Grayfer L, Hodgkinson JW, Belosevic M. Analysis of the antimicrobial response of primary phagocytes of goldfish (*Carassius auratus* L.) against *Mycobacterium marinum*. *Dev Comp Immunol* 2011; 35: 1146-58.

Hasegawa S, Nakayasu C, Yoshitomi T, Nakanishi T, Okamoto N. Specific cell-mediated cytotoxicity against an allogeneic target cell line in isogeneic gimbuna crucian carp. *Fish Shellfish Immunol* 1998; 8(4): 303-13.

Herman RL, Bullock GL. *Edwardsiella tarda* as a cause of mortality in striped bass. *Trans Am Fis Soc* 1986; 115: 232-5.

Hoshima T. On a new bacteria, *Paracolobacterium anguillimotiferum* n. sp.. Bull Japan Soc Sci Fish 1962; 28: 162-4.

Igarashi A, Iida T. A vaccination trial using live cells of *Edwardsiella tarda* in Tilapia. Fish Pathol 2002; 37: 145-8.

Iida T, Miura K, Wakabayashi H, Kobayashi M. Intracellular bactericidal activity of eel neutrophils determined by staining with acridine orange. Fish Pathol 1993; 28: 49-50.

Iida T, Wakabayashi H. Resistance of *Edwardsiella tarda* to opsonophagocytosis of eel neutrophils. Fish pathol 1993; 28: 191-2.

Ishibe K, Osatomi K, Hara K, Kanai K, Yamaguchi K, Oda T. Comparison of the response of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paraliuchthys olivaceus*) against high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. Fish Shellfish Immunol 2008; 24: 243-51.

Jedema I, van der Werff NM, Barge RM, Willemze R, Falkenburg JH. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. Blood 2004; 103: 2677-82.

Jung CY, Hikima J, Ohtani M, Jang HB, Del Castillo CS, Nho SW, Cha IS, Park SB, Aoki T, Jung TS. Recombinant interferon- γ activates immune responses against *Edwardsiella tarda* infection in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish Shellfish immunol 2012; 33: 197-203.

Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. CD8⁺ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. Eur J Immunol 1994; 24: 3068-72.

Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-dependent mice. Nature 1994; 369: 31-7.

Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis. Annu Rev Immunol 1996; 14: 207-32.

Kanai K, Tawaki S, Uchida Y. An ecological study of *Edwardsiella tarda* in flounder farm. Fish Pathol 1988; 23: 41-7.

Kato G, Kato K, Saito K, Pe Y, Kondo H, Aoki T, Hirono I. Vaccine efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG against *Mycobacterium* sp. Infection in amberjack *Seriola dumerili*. Fish Shellfish Immunol 2011; 30: 467-72.

Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. BCG vaccine confers adaptive immunity against *Mycobacterium* sp. infection in fish. Dev Comp Immunol 2010; 34(2): 133-40.

Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirano I. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japanese flounder against *Nocardia seriolae*. Fish shellfish immunol 2012; 33(2): 243-50.

Kaufmann SH. Immunity to intracellular bacteria. Annu Rev Immunol 1993; 11: 129-63.

Kaufmann SH, Flesch IE. The role of T cell-macrophage interactions in tuberculosis. Springer Semin Immunopathol 1988; 10(4): 337-58.

King CH, Shotts CA. Heterologous isolated challenge of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, immune to *Edwardsiella ictaluri*. Aquaculture 1997; 157: 147-55.

Klucar P, Barnes PF, Kong Y, Samten B, Tvinnereim A, Spallek R, Nepom GT, Singh M, Shams H. Characterization of effector functions of human peptide-specific CD4⁺ T-cell clones for an intracellular pathogen. Hum Immunol 2008; 69(8): 475-83.

Kusuda R, Itami T, Munekiyo M, Nakajima H. Characteristics of *Edwardsiella* sp. from an epizootic of cultured crimson sea breams. Bull Japan Soc Sci Fish 1977; 43: 129-34.

Kusuda R, Salati F. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. Ann Rev Fish Dis 1993; 3: 69-85.

Ling SHM, Wang XH, Xie L, Lim TM, Leung KY. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in in vivo and in vitro fish models. Microbiol 2000; 146: 7-19.

Matsui M, Moriya O, Yoshimoto T, Akatsuka T. T-bet is required for protection against vaccinia virus infection. J Virol 2005; 79: 12798-806.

Meyer FP, Bullock GL. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Appl Microbiol 1973; 25: 155-6.

Miles AA, Misra, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. J Hyg 1938; 38: 732-49.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001; 19: 683-765.

Nakanishi T, Fischer U, Dijkstra J M, Hasegawa S, Somamoto T, Okamoto N, Ototake M. Cytotoxic T cell function in fish. Dev Comp Immunol 2002; 26: 131-9.

中西照幸, 乙竹充. 水産用ワクチンハンドブック. 恒星社厚生閣; 2009.

Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell RA. Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4⁺ T cells following activation of Naïve CD4⁺ T cells. J immunol 1997; 158: 1085-94.

Nayak SK, Nakanishi T. Direct antibacterial activity of CD8⁺/CD4⁺ T-cells in gibel carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Fish Shell immunol 2013; 34: 136-41.

Neild AL, Roy CR. Immunity to vacuolar pathogens: What can we learn from *Legionella*? Cell Microbiol 2004; 6: 1011-8.

Nordmann P, Ronco E, Nauciel C. Role of T-lymphocyte subsets in *Rhodococcus equi* infection. Infect Immun 1992; 60: 2748-52.

Oldstone MB. Immunotherapy for virus infection. Curr Top Microbiol Immunol 1987; 134: 211-29.

Orme IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 1987; 138: 293-8.

Pai SY, Truitt ML, Ho IC. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 101: 1993-8.

Parmer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. Nat Rev Immunol 2004; 4: 812-23.

Pedrazzini T, Hug K, Louis JA. Importance of L3T4⁺ and Lyt-21⁺ cells in the immunologic control of infection with *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-Guérin in mice. Assessment by elimination of T-cell subsets in vivo. J Immunol 1987; 139: 2032-7.

Plumb JA. *Edwardsiella* Septicaemias. In: Woo PTK, Bruno DW, editors. Fish diseases and disorders, volume 3: viral, bacterial, and fungal infections, vol. 3. Oxon, UK: CAB International; 1999, P. 479-521.

Pressley ME, Phelan PE 3rd, Witten PE, Mellon MT, Kim CH. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. Dev Comp Immunol 2005; 29(6): 501-13.

Rao PSS, Lim TM, Leung KY. Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reaction oxygen intermediates. Infect immun 2001; 69: 5689-97.

Ravindran R, Foley J, Stoklasek T, Glimcher LH, McSorley SJ. Expression of T-bet by CD4 T cells is essential for resistance to *Salmonella* infection. J Immunol 2005; 175: 4603-10.

Reece ST, Kaufmann SH. Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology. Int J Med Microbiol 2008; 298: 143-50.

Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. Trends Microbiol 2001; 9(2): 86-92.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 1938; 27: 493-7.

Russo R, Shoemaker CA, Panangala VS, Klesius PH. *In vitro* and *in vivo* interaction of macrophages from vaccinated and non-vaccinated channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*. Fish Shellfish Immunol 2009; 26(3): 543-52.

Saito S, Nakano M. Nitric oxide production by peripheral macrophages of *Mycobacterium bovis* BCG-infected or non-infected mice: regulatory role of T lymphocytes and cytokines. J Leukoc Biol 1996; 59: 908-15.

Sea-Oui DK, Muroga K, Nakai T. A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp *Cyprinus carpio*. Fish pathol 1984; 19: 197-9.

Shen L, Stuge TB, Zhou H, Khayat M, Barker KS, Quiniou SM, Wilson M, Bengtén E, Chinchar VG, Clem LW, Miller NW. Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review. Dev Comp Immunol 2002; 26(2): 141-9.

Shibasaki Y, Toda H, Kobayashi I, Moritomo T, Nakanishi T. Kinetics of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in graft-versus-host reaction (GVHR) in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. Dev Comp Immunol 2010; 34: 1075-1081.

Shoemaker CA, Klesius PH, Plumb JA. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. Vet Immunol Immunopathol 1997; 58(2): 181-90.

Smyth MJ, Trapani JA. Granzyme: exogenous proteinase that induce target cell apoptosis. Immunol Today 1995; 16: 202-6.

Somamoto T, Nakanishi T, Okamoto N. Specific cell-mediated cytotoxicity against a virus-infected syngeneic cell line in isogeneic ginbuna crucian carp. Dev Comp Immunol 2000; 24: 633-40.

Somamoto T, Nakanishi T, Okamoto N. Role of specific cell-mediated cytotoxicity in protecting fish from viral infection. Vitrol 2002; 297: 120-7.

Somamoto T, Yoshiura Y, Nakanishi T, Ototake M. Molecular cloning and characterization of two types of CD8 α from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Dev Comp Immunol 2005; 29(8): 693-702.

Somamoto T, Yoshiura Y, Sato A, Nakao M, Nakanishi T, Okamoto N, Ototake M. Expression profiles of TCR β and CD8 α mRNA correlate with virus-specific cell-mediated cytotoxic activity in ginbuna crucian carp. Virology 2006; 348(2): 370-7.

Somamoto T, Nakanishi T, Nakao M. Identification of anti-viral cytotoxic effector cells in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Dev Comp Immunol 2013; 39: 370-7.

Somamoto T, Kondo M, Nakanishi T, Nakao M. Helper function of CD4⁺ lymphocytes in antiviral immunity in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Dev Comp Immunol. 2014; 44(1): 111-115.

Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, Modlin RL. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 1997; 276: 1684-7.

Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 281: 121-25.

Suzumura, E, Kurata O, Okamoto N, Ikeda Y. Characteristica of natural killer-like T cells in carp. *Fish Pathol* 1994; 29: 199-203.

Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Aleckman BP, Glicker LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002; 295: 338-42.

Szalay G, Ladel CH, Kaufmann SHE. Stimmunilation of protective CD8+ T lymphocytes by vaccination with nonliving bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12389-92.

Takano T, Matsuyama T, Oseko N, Sakai T, Kamaishi T, Nakayasu C, Sano M, Iida T. The efficacy of five avirulent *Edwardsiella tarda* strains in a live vaccine against Edwardsiellosis in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol* 2010; 29(4): 687-93.

Takizawa F, Araki K, Kobayashi I, Moritomo T, Ototake M, Nakanishi T. Molecular cloning and expression analysis of T-bet in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). Mol Immunol 2008; 45: 127-36.

Takizawa F, Mizunaga Y, Araki K, Moritomo T, Ototake M, Nakanishi T. GATA3 mRNA in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*): cDNA cloning, splice variants and expression analysis. Dev Comp Immunol 2008; 32: 898-907.

Takizawa F, Dijkstra JM, Kotterba P, Korytář T, Kock H, Köllner B, Jaureguiberry B, Nakanishi T, Fischer U. The expression of CD8 α discriminates distinct T cell subsets in teleost fish. Dev Comp Immunol 2011; 35(7): 752-63.

Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8⁺ T cells requires the production of gamma interferon. Infect Immun 1998; 66: 830-4.

Toda H, Shibasaki Y, Koike T, Ohtani M, Takizawa F, Ototake M, Moritomo T, Nakanishi T. Alloantigen-specific killing is mediated by CD8-positive T cells in fish. Dev Comp Immunol 2009; 33: 646-52.

Toda H, Araki K, Moritomo T, Nakanishi T. Perforin-dependent cytotoxic mechanism in killing by CD8 positive T cells in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Dev Comp Immunol 2010; 35: 88-93.

Toda H, Saito Y, Koike T, Takizawa F, Araki K, Yabu T, Somamoto T, Suetake H, Suzuki Y, Ototake M, Morimoto T, Nakanishi T. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in teleost fish. *Dev Comp Immunol* 2011; 35: 650-60.

Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(10): 735-47.

Tvinnereim A and Wivel B. CD8⁺ T cell protective immunity against *Chlamydia pneumoniae* includes an H2-M3-restricted response that is largely CD4⁺ T cell-independent. *J Immunol* 2007; 179: 3947-57.

Utke K, Bergmann S, Lorenzen N, Köllner B, Ototake M, Fischer U. Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Fish Shellfish Immunol* 2007; 22: 182-96.

Utke K, Kock H, Schuetze H, Bergmann SM, Lorenzen N, Einer-Jensen K, Köllner B, Dalmo RA, Vesely T, Ototake M, Fischer U. Cell-mediated immune responses in rainbow trout after DNA immunization against the viral hemorrhagic septicemia virus. *Dev Comp Immunol* 2008; 32(3): 239-52.

van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 1996; 184(5): 1781-90.

Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MT, Young JD, Ahmed R, Clark WR. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad USA* 1994; 91: 10854-8.

Wang T, Monte MM, Huang W, Boudinot P, Martin SA, Secombes CJ. Identification of two FoxP3 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with differential induction patterns. *Mol Immunol* 2010; 47(16): 2563-74.

Wizel B, Nyström-Asklin J, Cortes C, Tvinnereim A. Role of CD8⁺ T cells in the host response to *Chlamydia*. *Microbes Infect* 2008; 10: 1420-30.

Woodworth JS, Wu Y, Behar SM. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8⁺ T cells require perforin to kill target cells and provide protection in vivo. *J Immunol* 2008; 181: 8595-603.

Yajima T, Nishimura H, Ishimitsu R, Yamamura K, Watase T, Busch DH, Pamer EG, Kuwano H, Yoshikai Y. Memory phenotype CD8⁺ T cells in IL-15 transgenic mice are involved in early protection against a primary infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur J Immunol* 2001; 31: 757-66.

Yoshikai Y, Nishimura H. The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. *Microbes Infect* 2000; 2: 381-9.

Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 21597-603.

Zhang Z, Chi H, Niu C, Bøggwald J, Dalmo RA. Molecular cloning and characterization of Foxp3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol* 2011; 30(3): 902-9.

Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89: 587-96.

Zheng WP, Zhao Q, Zhao X, Li B, Hubank M, Schatz DG, Flavell RA. Up-regulation of Hlx in immature Th cells induces IFN-gamma expression. *J Immunol* 2004; 172(1): 114-22.

Zhu J. Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 2010; 88: 244-9.

Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 1979; 27: 51-177.