

Immunological study on age-dependent susceptibility to
Ochroconis infection
in marbled rockfish, *Sebastiscus marmoratus*

(オクロコニス症に対するカサゴの年齢に依存した感染感受性に
関する免疫学的研究)

学位論文の内容の要約

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 28 年入学

Lee Yih Nin

(指導教授：倉田 修)

カサゴ (*Sebastes marmoratus*) は日本の水産養殖業における重要な海産魚種である。養殖カサゴで発生する感染症は生産上の大きな問題であり、最近、*Ochroconis humicola* (真菌界、不完全菌類) を原因とするオクロコニス症がカサゴの種苗生産時における問題として報告された。本感染症はカサゴの他、オニオコゼ (*Inimicus japonicus*)、マダイ (*Pagrus major*) およびシマアジ (*Pseudocaranx dentex*) で報告されているが、いずれも稚魚で被害が見られている。このことから、稚魚は本菌の感染により重症化しやすく、発症には年齢に依存した機序があるように思われた。感染症の発生と宿主の免疫能は密接に関連する。そのため稚魚の重症化は年齢による免疫能の違いが原因ではないかと推測した。そこで本研究では、オクロコニス症に対する感受性および本症の病理発生とカサゴの年齢との関係について、また、年齢の異なるカサゴが示す免疫応答の違いについて調べ、稚魚が重症化する要因について検討した。

1. *Ochroconis humicola*に対するカサゴの感染感受性における年齢の影響

カサゴの年齢の違いによる*O. humicola*に対する感受性を調べるために感染試験を試みた。同一ロット(同時期に産仔した飼育群)における異なる年齢のカサゴ稚魚を民間種苗業者から入手した。入手時期は同年(産仔1年目)の8月、10月および12月で、各試験魚の魚体サイズはそれぞれ、 29 ± 2 mm (小型群)、 55 ± 3 mm (中型群) および 74 ± 6 mm (大型群)であった。試験魚(各群10尾)の頭蓋骨上部体表にナイロン糸を用いて傷をつけ、そこに*O. humicola* NJM1503の孢子($1 \times 10^5/50$ μ L)を滴下することで感染させた。試験魚は60日間飼育され、その間の死亡魚は病理組織観察に供試した。

各群の累積死亡率は100% (小型群)、20% (中型群) および0% (大型群)であった。すべての死亡魚は頭部に重度な潰瘍を形成した。死亡魚の病理組織学的特徴は、表皮および真皮の崩壊、頭蓋骨の部分的な欠損、皮膚から脳における菌糸の繁殖と炎症細胞の浸潤およびその細胞変性であった。これらの知見はカサゴ種苗のオクロコニス症で見られる特徴と一致し、本感染試験は自然発症の病態を再現した。*O. humicola*に対する感染感受性は小型群で高いことを明らかにし、本症の発生は年齢に依存していることを示唆した。

2. 年齢の異なるカサゴにおける*Ochroconis humicola*誘導性炎症病変の病理組織学的解析

*O. humicola*の腹腔内接種により誘導される炎症病変について年齢の異なるカサゴ間の違いを病理組織学的に検討した。試験魚は同一ロットの若年群（52±1 mm）および高年群（76±4 mm）を用いた。*O. humicola* NJM1503の孢子（ $1 \times 10^5/50 \mu\text{L}$ ）を各試験魚の腹腔内に接種した。試験1では、菌接種魚を30日間飼育し、その間の瀕死および死亡魚を病理組織標本とした。試験2では、菌接種後3日、5日、7日、10日および13日に各群の試験魚（3尾）を採取し、病理組織標本とした。

試験1の結果、若年群では菌接種15日後から死亡が観察され、最終的にすべての試験魚（10尾）が死亡した。菌接種後15日目に死亡した個体を除き、すべての死亡魚では腹腔内脂肪組織、肝臓、脾臓および腎臓で多数の菌糸が繁殖していた。15日目に死亡した個体は腹腔内脂肪組織および肝臓で菌糸の繁殖が観察された。これらの臓器では単核性白血球の浸潤が顕著であり、多くの浸潤細胞および実質細胞は変性壊死していた。高年群はすべての試験魚（10尾）が生存した。そのうち4尾の腹腔内脂肪組織において類上皮細胞性肉芽腫が観察された。菌糸の繁殖は肉芽腫内でのみ確認された。

試験2の結果、若年群の腹腔内脂肪組織および肝臓で炎症病変が観察されたが、高年群は炎症病変を示さなかった。菌接種後3日目から若年群の腹腔内脂肪組織で菌糸の繁殖および単核性白血球の浸潤が確認され、炎症病変は日毎に増大した。肝臓では、5日目に菌糸の繁殖が、7日目に単核性白血球の集簇が確認され、その後、炎症病変は増大した。

*O. humicola*により誘導される炎症病変は年齢の違いにより大きく異なった。若年カサゴの炎症反応は“急速で激しい”のに対し、高年カサゴの炎症反応は“限局的または無反応”であった。若年カサゴは菌の侵入に対し炎症反応をよく発達させたが、結果としては菌糸の侵襲を防げず死亡した。このことから、若年カサゴの“急速で激しい”炎症反応は感染防御に働くというよりはむしろ組織損傷の原因であるように思われた。

3. カサゴ免疫関連遺伝子のクローニングおよび一次構造解析

免疫関連遺伝子の発現解析は研究対象の動物種が持つ免疫能の評価に有用な試験である。一方、カサゴの免疫関連遺伝子の情報は乏しい。そこで、真菌感染防御に働く細胞性免疫を

担うT細胞および関連サイトカインの遺伝子同定を行い、カサゴの免疫能評価のための準備を行った。抗原刺激したカサゴの腎臓を材料にRNAシーケンスを行い、免疫関連遺伝子の部分塩基配列を得た。RACE法により対象遺伝子の全長を明らかにし、一次構造および分子系統解析により各遺伝子の同定を行った。

本試験によりカサゴのT細胞マーカー遺伝子（CD4、CD8 β 、CD3 ϵ 、CD28）およびサイトカイン遺伝子（IL-1 β 、IFN- γ ）を同定した。これら遺伝子配列から予測されるタンパクの一次構造は真骨魚類間で良く保存され、各分子の特徴的なモチーフも確認できた。カサゴで同定したそれぞれの分子は各魚種の同分子と共に一つのクラスターを形成する分子系統樹を示した。以上のことから、今回同定した遺伝子はそれぞれの遺伝子ホモログであることを確認し、SebCD4、SebCD8 β 、SebCD3 ϵ 、SebCD28、SebIL-1 β 、SebIFN- γ と命名した。

4. 年齢の異なるカサゴにおける免疫関連遺伝子の発現解析

はじめに今回同定した免疫関連遺伝子の各種臓器における遺伝子発現分布（試験①）および抗原刺激による遺伝子発現変化（試験②）を調べ、免疫能評価のための有用性について確認した。次に免疫関連遺伝子の発現解析により年齢の異なるカサゴが持つ免疫能の違いについて検討した（試験③）。

試験①：カサゴ（77 \pm 2 mm）の各種臓器から総RNAを抽出し、T細胞マーカー遺伝子に対する定量PCR解析を行った。SebCD4、SebCD8 β およびSebCD3 ϵ は胸腺で高発現し、脾臓や腸管でも発現が認められた。胸腺はT細胞の産生器官であること、また脾臓や腸管は二次リンパ組織としてT細胞が常在していることから、これらの遺伝子はT細胞の検出に有用であると考えた。一方、SebCD28は肝臓で高発現しており、胸腺や脾臓では必ずしも高い発現を示さなかった。組織形態学的観察から肝臓にはリンパ球が豊富に存在していないので、SebCD28はT細胞以外の細胞も発現している可能性が考えられた。

試験②：カサゴ（77 \pm 2 mm）の腎臓から採取した白血球（10⁶/mL）をLPS（25 μ g/mL）またはpoly I:C（10 μ g/mL）と混合培養することで抗原刺激を行った。刺激後6時間、12時間および24時間に白血球から総RNAを抽出し、SebCD4、SebCD8 β 、SebIFN- γ およびSebIL-1 β に対する定量PCR解析を行った。SebCD4はLPS刺激後12時間で、SebCD8 β は

LPSおよびpoly I:C刺激後6時間で遺伝子の発現上昇が観察された。SebIFN- γ およびSebIL-1 β は LPS刺激12時間後およびpoly I:C刺激6時間後に遺伝子の発現上昇が観察された。以上の結果、新たに同定された各遺伝子は抗原刺激に対して積極的な発現上昇を示したことから、カサゴの免疫能の評価に有用な免疫関連遺伝子であることを確認した。

試験③：同一ロットの若年群（52 \pm 1 mm）および高年群（77 \pm 2 mm）試験魚の腹腔内に*O. humicola* NJM1503の孢子（1 \times 10⁵/50 μ L）を接種した。接種後5日、7日および10日に試験魚（各5尾）の脾臓から総RNAを抽出し、SebCD4、SebCD8 β 、SebIFN- γ およびSebIL-1 β に対する定量PCR解析を行った。SebCD4およびSebIFN- γ の遺伝子発現上昇は両群で観察されたが、若年群は“速い応答で高発現レベル”であったのに対し、高年群は“遅い応答で中程度の発現レベル”であった。SebCD8 β の遺伝子発現変動は若年群でのみ観察され、SebIL-1 β は両群において着目すべき発現変動を示さなかった。

本研究により、オクロコニス症に対するカサゴの感染感受性は宿主の年齢に依存することを明らかにした。異なる年齢のカサゴは本症の原因菌に対する免疫応答に違いが見られ、重症化する若年カサゴではヘルパーT細胞の免疫応答（SebCD4およびSebIFN- γ ）が過敏であった。原因菌を接種した若年カサゴで観察された“急速で激しい”炎症反応はこの免疫応答の結果なのかもしれない。若年カサゴは原因菌に対して免疫応答を示すが、結果として菌の侵襲を防ぐことができず死に至る。つまり、若年カサゴの免疫機構は感染防御としての働きは乏しく、組織損傷を伴う炎症を誘発する未熟な機構であり、これが重症化する要因ではないかと考えた。