

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 荒木 亨 介

近年の水産養殖業の集約化と発展に伴い、疾病の発生による大きな産業的被害が問題となっているが、有効な対策は大きく遅れている。この一因として魚類の免疫学に対する理解が極めて不十分である点があげられる。特に抗体を産生する B 細胞と共に、免疫系の骨格をなす最も重要な細胞である T 細胞は、細胞表面の T 細胞受容体 (TCR) が抗原と結合することで様々な形で免疫応答に関わる細胞であるが、魚類においてはその産生器官としての胸腺の存在、また移植片拒絶現象など、T 細胞の存在を示唆する報告はあるものの知見に乏しい。さらに哺乳類では、細胞傷害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞といったサブセットが知られるが、魚類の T 細胞あるいはそのサブセットの識別・単離は未だほとんどなされていない。哺乳類のような T 細胞表面マーカー分子に関する情報、またそれら分子に対する抗体などのツールがまだまだ充実していないためである。本研究はゲノムデータベースが充実しているトラフグを材料にすることで、これまで大きく立ち遅れていた魚類 T 細胞に関する基礎的知見を数多く得ており、機能の一部も明らかになるなど優れた内容を含んだものである。

まず初めに第 1 章として、T 細胞表面マーカー分子の一次構造解析について述べている。哺乳類ではすべての T 細胞表面に TCR と共に発現する CD3 分子群、ヘルパー T 細胞表面のみに発現する CD4 分子、細胞傷害性 T 細胞にのみ発現する CD8 分子群をマーカーとすることで、T 細胞および T 細胞サブセットの識別を行っているが、これらの配列情報に基づきトラフグゲノムデータベースを利用して、CD3 α 鎖、CD3 γ/δ 鎖、CD4鎖、CD8 α 鎖、CD8 β 鎖の cDNA クローニングを行い、すべての一次構造を決定している。これは単一魚種では初めてのことであり、魚類においてもすでに T 細胞サブセットの分化が起こっていることを示すものとして注目に値する。

次に第 2 章として、それらのマーカー分子の遺伝子発現解析を行なった結果について述べている。RT-PCR 法を用いて、トラフグ CD3 α 鎖、CD3 γ/δ 鎖、CD4鎖、CD8 α 鎖、CD8 β 鎖、および TCR α 鎖の遺伝子発現が、PBL、リンパ系組織 (胸腺、頭腎、体腎、脾臓)、および粘膜組織 (腸管、皮膚、鰓) において発現していることを認めている。さらに、リンパ系組織において *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、T 細胞マーカー遺伝子発現細胞の分布を調べ、各組織に陽性細胞が多数分布していることを示している。

次に、第 3 章では、細胞表面マーカーに対する抗体の作成と、それによるリンパ球サブセットの分離について述べている。従来、報告されている魚類 T 細胞に対する抗体は、抗原分子 (エピトープ) が明確でないなど、難点が多かった。そもそも CD 抗原の解明は、それに対する抗体があってこそ有力なツールとなることから、トラフグ CD3 α 鎖、CD4鎖、CD8 α 鎖のアミノ酸をコードする領域の cDNA を哺乳類細胞発現ベクター pcDNA3 に組み込み、これらをマウスへの免疫抗原として、マウス筋肉への DNA 免疫を試みている。残念

ながら、 $CD8\alpha$ のみで血中抗体価の上昇を確認でき、それもモノクローナル抗体作成には至っていないが、この抗血清を用いた血球の分離には成功している。この抗血清、および福井県立大学宮台博士が作成した抗トラフグ Ig モノクローナル抗体を用いて、マグネティックセルソーティングにより PBL を分画し、各画分における細胞の形態、およびリンパ球細胞表面マーカー遺伝子 ($TCR\alpha$, $CD3\alpha$ 鎖, $CD3\gamma/\delta$ 鎖, $CD4$ 鎖, $CD8\alpha$ 鎖, $CD8\beta$ 鎖, IgL 鎖) の発現を調べた結果、抗 Ig 抗体により B 細胞を含む画分と T 細胞を含む画分に分画できること、抗 $CD8\alpha$ 抗血清により、 $CD8^+$ T 細胞を含む画分と、 $CD4^+$ T 細胞および B 細胞を含む画分に分画することに成功している。これにより、 $CD3$ や $CD4$ に対する抗体がないという制約があるものの、魚類で初めて T 細胞サブセットを分画する方法が確立したといえ、今後の機能解析につながる重要な成果と考えられる。

最後に第 4 章として、これらの方法で分離したリンパ球サブセットに、リンパ球に対する非特異的刺激物質であり、ヒトでは細胞性免疫能を評価する重要な指標として知られているマイトジェンの刺激に対するリンパ球幼弱化などの反応性の違いを解析している。トラフグ PBL をコンカナバリン A (ConA), リポポリサッカライド (LPS), フィトヘマグルチニン (PHA), ポクウィードマイトジェン (PWM) での刺激下で培養し、細胞増殖能を $5'$ -bromo- $2'$ -deoxyuridine (BrdU) 取り込み法により測定することで、反応性の試験を行なった結果、トラフグ PBL はすべてのマイトジェンに対して応答性を示したという。このマイトジェンで刺激した PBL をフローサイトメトリー解析および RT-PCR 解析、そして抗体により分画した細胞群をマイトジェン刺激したのちの細胞増殖試験を行ったところ、すべての試験において LPS および PWM は Ig^+ 細胞を、PHA は $CD8^+$ 細胞を活性化し、増殖させることが明らかにしている。これらの結果からトラフグにおいて、LPS および PWM は B 細胞マイトジェンであり、PHA は $CD8^+$ T 細胞マイトジェンであるとしている。LPS および PWM は哺乳類の B 細胞マイトジェンでもあることから、哺乳類と魚類では B 細胞の活性化機構が同様であることが示されたが、T 細胞サブセットに関しては ConA が $CD8^+$ T 細胞を活性化しないなど哺乳類での知見とは多少異なる結果が示されたことから、T 細胞の活性化機構においては魚類と哺乳類で何らかの相違がある可能性が見ている。

以上のように、本研究は魚類で初めて一魚種内で T 細胞および T 細胞サブセットを識別するための基礎的知見を集めることに成功し、T 細胞サブセットを分画し、その形態や機能の一端を明らかにするなど、魚類の T 細胞に関する基礎的知見を飛躍的に増加させた極めて重要な研究である。こうした成果は、免疫能の評価手法など、水産増養殖分野における防疫対策に応用されることも期待される。よって、審査委員一同、博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認めた。