

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 羽室浩爾

魚類の防疫法としてワクチン、免疫賦活剤、高耐病性品種の育種などの対策を有効に進めるためには、魚類の生体防御機構についての深い理解が必須である。脊椎動物が持つ生体防御機構の中で最も重要なものとして、抗体とリンパ球により特徴づけられる獲得免疫系があげられるが、魚類での分子細胞レベルでの研究はようやく緒についた段階である。粘膜組織は、重要な感染経路、防御の場であるが、魚類では腸管と共に体表も粘液で覆われていることから、腸管と同様、全身系とは独立した局所的な粘膜免疫機構の存在が考えられてきた。魚類に対する浸漬免疫において、抗原は体表から吸収されるとの報告もあり、体表粘膜の免疫応答の解明は、理想的なワクチン技術の開発にもつながる重要な研究テーマである。本研究はその第 1 歩として、トラフグを材料に、魚類の粘膜免疫機構における抗体および B 細胞の免疫反応の解明を目指したものである。

第 1 章では、まず魚類粘膜における IgM 輸送機構について取り上げている。

研究材料として選択したトラフグの体表粘液や腸管粘液における免疫グロブリン M (IgM) の存在を、トラフグ IgM H 鎖に対するモノクローナル抗体を用いて調べ、4 量体 IgM として存在することを確認している。また、*in situ* hybridization により、皮膚、腸管の上皮細胞間リンパ球群内に、IgM 遺伝子発現細胞を確認され、トラフグ粘膜でも、哺乳類同様、局在 B 細胞が IgM を産生し、それが粘液中へ分泌されるのではないかと推察している。

次に、哺乳類腸管では、局所で産生された多量体 Ig (polymeric Ig ; pIg) が上皮細胞が発現する polymeric Ig receptor (pIgR) と結合して粘液中に輸送されることに着目し、トラフグゲノムデータベースに見出された哺乳類 pIgR のアミノ酸配列と相同性を示す配列に基づき、トラフグ皮膚 mRNA を材料とした RACE 法による cDNA クローニングにより、トラフグ pIgR の塩基配列を決定している。トラフグ pIgR の cDNA は 1392 塩基からなり、327 残基のアミノ酸をコードしていたが、Ig 様ドメイン 2 つと、膜貫通領域、短い細胞内領域とからなり、5 つの Ig 様ドメインをもつ哺乳類、4 つのニワトリとは大きく異なる構造をとっていた。哺乳類やニワトリの pIgR と比較検討したところ、最初の Ig 様ドメインは哺乳類 pIgR のドメイン 1 (D1) に、2 番目のドメインはドメイン 4 または 5 に相当するものと結論付けている。これらは直接 Ig との結合にかかわるドメインに相当するものとして知られており、魚類の pIgR は祖先型を保存した最も単純な構造をとっているものと推察している。

トラフグ pIgR 遺伝子は皮膚、腸をはじめとする様々な組織でその発現が認められた。さらに *in situ* hybridization の結果、皮膚と腸で上皮細胞において pIgR が発現していた。上皮細胞間には IgM 遺伝子発現細胞も認められることから、pIgR を介して IgM が粘液中へ輸送されるものと推定している。

さらに、pIgR に対する抗体を作製し、粘液中の 4 量体 IgM はすべて pIgR の断片である secretory component と結合しており、フリーの IgM や SC が存在しないことから、pIgR が粘液中への IgM 輸送に関わっているものと結論付けている。

第一章において、体表の粘液中にも IgM が存在すること、そして皮膚や腸管の上皮細胞層に IgM 産生細胞が存在すること、さらにその IgM は pIgR により粘液中へ輸送されていることを明らかにし、体表も腸管と同様に粘膜免疫系の一員である可能性が示されたことから、次に第二章においては実際に粘膜免疫系応答を解析した結果について記している。

研究の前提として、哺乳類の粘膜免疫機構において重要な役割を担っている、上皮細胞間に存在する上皮細胞間リンパ球 (intraepithelial lymphocyte ; IEL) について、その単離を試みている。皮膚と腸管の IEL は、Dithiothreitol および EDTA の処理による手法を確立している。

次いで、Keyhole Lympe Haemocyanin (KLH) を抗原として筋肉注射および肛門からの腸管内注入によりトラフグに投与して、体表粘液、腸粘液、血清中の抗体価および IgM 量の変動を調べている。

腸管投与群では、腸管だけでなく体表粘液中においても速やかな抗体価および IgM 量の増加が観察され、血清中では抗体価の上昇が観察されたものの、その上昇は粘液中より遅れたという。この結果は、抗体価が血清中、各粘液中においてほぼ同時期に上昇した筋肉注射の場合と大きく異なっていた。抗 KLH 抗体産生細胞数も、筋肉注射の場合と異なり末梢血白血球、脾臓白血球だけでなく、皮膚 IEL や腸管 IEL においてもすみやかな増加を観察している。また、IgM<sup>+</sup>細胞比率も皮膚 IEL、腸管 IEL、頭腎白血球において増加したという。このように腸管粘膜への異物の侵入に際しては、粘膜での免疫応答、それも異物に侵入された局所に加え、他の粘膜組織での応答も誘導されることが明らかとなった。このことは粘膜の免疫系が全身系のものとは独立していて、粘膜組織間にはネットワークが形成されていることを示すものである。粘膜以外に体内での応答も観察されたが、頭腎に関しては、非免疫魚でも抗 KLH 抗体産生細胞が多数存在すること、さらに免疫後の頭腎白血球での IgM<sup>+</sup>細胞比率が上昇したことから、頭腎が一次リンパ器官であり、抗原刺激により頭腎において B 細胞分化が活発化されたものと推察している。末梢血、脾臓白血球での抗 KLH 抗体産生細胞数が IEL と同時期に増加したことから、粘膜組織における抗原刺激により脾臓が二次リンパ器官として抗原特異的な抗体産生細胞を選択的に増殖させ、それらが血液を通して粘膜組織にホーミングするという図式を推察している。

以上、本研究により、魚類で初めて pIgR が発見され、pIgR を介した IgM の粘液中への輸送機構が明らかになった。さらに、魚類にも全身系と独立した粘膜免疫機構が存在すること、そして腸管だけでなく体表も含めた粘膜組織間にはネットワークが形成されているという全く新しい知見が得られている。水中で生活する魚類は脆弱な上皮で覆われる体表や腸管が異物との侵入口になっている。本研究の成果に基づき、魚類粘膜免疫機構の詳細な解析が進めることが、新たな魚類防疫法確立に貢献していくものと期待される。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。