

平成 27 年度水産学奨励賞

魚類細胞内寄生性細菌に対するワクチンの開発^a

加藤 豪 司

東京海洋大学学術研究院

Development of vaccines against bacterial pathogens difficult to prevent

GOSHI KATO

The Graduate School of Maritime Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology,
Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

1. はじめに

2000年にブリのピブリオ病およびレンサ球菌症不活化混合ワクチンが市販化されたことにより、わが国の養殖生産における魚病被害額はそれまでの半分以下に抑えられるようになった。¹⁾ これまでに9種類の病原体に対する17種類の水産用ワクチンが承認されており、魚病被害の軽減に貢献している。²⁾ しかしながら、これらの水産用ワクチンはすべてが病原体をホルマリン等で不活化した不活化ワクチンであり、近年では不活化ワクチンでは予防が難しい細胞内寄生性細菌による感染症の被害率が大きくなっている。一般的に、不活化ワクチンは宿主の液性免疫応答を誘導し、抗原特異的な抗体の産生を促進する。抗体は病原体表面の抗原物質を認識して結合し、病原体の感染力を奪う(中和抗体)か、貪食細胞による病原体の貪食を促進する(オプソニン化)。しかし、細胞内寄生性細菌は宿主の細胞内に寄生するため、抗体は病原体までアクセスすることができない。このため、細胞内寄生性病原体に対しては、感染細胞を除去する細胞障害性T細胞(CTL)など、抗原特異的な細胞性免疫の誘導が必要である。筆者らは、これまでに、魚類に病原性を有する細胞内寄生性細菌 *Mycobacterium* sp., *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Pdp*) および *Nocardia seriolae* に対して、細胞性免疫応答を効果的に惹起できるワクチンの開発を行ってきた。

2. *Mycobacterium* sp. に対するワクチンの開発

細胞内寄生性細菌の *Mycobacterium* sp. を原因とするミコバクテリウム症は1985年に発生³⁾して以降、ブリ属魚類養殖に対して経済的な被害を与え続けている。

本菌は試験管内においてリファンピシンに対して感受性を示すが、⁴⁾ 感染魚にこれを投与しても治療効果は得にくい。⁵⁾ *Mycobacterium* sp. は、人畜共通病原体 *M. marinum*, ウシ型結核菌 *M. bovis* およびヒト結核菌 *M. tuberculosis* などと近縁であり、主要抗原であるAg85複合体はそれぞれの種間で高いアミノ酸同一率を示す。⁶⁾ このように *Mycobacterium* 属細菌は種間で高い抗原交差性を示し、ヒトの肺結核に対する弱毒生ワクチン *M. bovis* Bacillus Calmette and Guèrin (BCG) は、結核菌以外にも *M. leprae*,⁷⁾ *M. ulcerans*⁸⁾ に対しても感染防御効果を示すことが報告されている。そこで筆者らは、カンパチの *Mycobacterium* sp. 感染症に対するBCGワクチンの感染防御効果について研究を行った。弱毒化菌株であるBCGをカンパチに接種すると、その体内菌数は時間経過に伴い減少していくことから、BCGワクチンはカンパチに対して病原性を示さないことがわかった。また、BCG接種後4週間目に *Mycobacterium* sp. による感染実験を行ったところ、BCGワクチン接種魚は対照試験区(PBS接種区)よりも生存時間が長くなり、最終的な死亡率も低く抑えられた。攻撃菌である *Mycobacterium* sp. の増殖もBCG接種魚では抑えられていることがわかり、BCGワクチンはカンパチの *Mycobacterium* sp. に対して感染防御効果を有することが示された。⁶⁾

哺乳類では、BCG接種や結核菌への感染履歴をツベルクリン検査により調べることができる。ツベルクリン反応は、抗原特異的な細胞性免疫応答により誘導される遅延型アレルギー反応(Delayed-type hypersensitivity: DTH)の一つであり、メモリーTh1細胞により分泌さ

れるサイトカイン IFN- γ が重要な働きを担っている。⁹⁾ そこで、BCG 接種により誘導される魚類の免疫応答を解析するために、魚類の DTH 応答について研究を行った。*Mycobacterium* sp. の培養上清から精製したタンパク質 (Purified protein derivative: PPD) を抗原液として BCG 接種したヒラメに投与し、PPD 投与後の免疫応答をマイクロアレイ法により解析した。*Mycobacterium* sp. の不活化菌体を接種した対照試験区では、PPD 接種後に発現上昇する免疫関連遺伝子はほとんど観察されなかった。一方で、BCG 接種した魚では PPD 接種してから 24 時間後に、IFN- γ 、IL-1 β 、TNF α 、MHC class II および MIP3 α などの哺乳類の DTH において重要な役割を果たす遺伝子の発現上昇が観察された。¹⁰⁾ これらのことから、魚類でも BCG 接種により抗原特異的な細胞性免疫が誘導され、*Mycobacterium* sp. に対する感染防御効果が得られることがわかった。さらに、IFN- γ などの遺伝子発現レベルを指標とすれば、魚類でも DTH を利用した細胞性免疫応答の評価が可能であることが示された。¹¹⁻¹²⁾

3. *Pdp* に対する DNA ワクチンの開発とコドン使用頻度の最適化

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* による類結節症はブリ、^{13,14)} ヒラメ¹⁵⁾をはじめ様々な魚種で発生しており、世界中の魚類養殖で問題となっている。*Pdp* は宿主のマクロファージ内で生存・増殖することができる細胞内寄生性の病原細菌である。¹⁶⁾ 本症に対しては、油性アジュバント添加ホルマリン不活化ワクチンの有効性が示されており、現在日本でも水産用医薬品として使用されている。¹⁷⁾

DNA ワクチンは病原体の抗原遺伝子を発現ベクターに組み込んだプラスミド DNA であり、接種すると宿主の体内で抗原遺伝子が転写・翻訳され、免疫系に認識される。まず、翻訳された抗原は、それを発現した細胞の MHC class I 分子により抗原提示され、抗原特異的な CTL を誘導する。¹⁸⁾ さらに、発現細胞から分泌された抗原は B 細胞により認識され、抗原特異的な抗体の酸性を誘導する。¹⁸⁾ このように、DNA ワクチンは細胞性免疫応答および液性免疫応答の両者を効率よく誘導できる優れたワクチン技術である。しかし、DNA ワクチンの有効性を制限する要因として抗原遺伝子と宿主動物のコドン使用頻度の差異が挙げられる。例えば、真核生物であるブリではアルギニンを指定するコドンとして AGA (31%) および AGG (29%) を主に使用するが、原核生物である *Pdp* では CGU (24%) および CGC (26%) を主に使用する (Codon Usage Database: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>)。これらのコドン使用頻度の違いから、抗原遺伝子を効率よく発現できず、ワクチ

ン有効性が制限されてしまうと考えられている。実際に、哺乳類では抗原遺伝子のコドン使用頻度を宿主のコドン使用頻度に最適化することで、DNA ワクチンの感染防御効果を改善できることが報告されている。¹⁹⁻²¹⁾

このような背景から、*Pdp* の抗原遺伝子 PPA1²²⁾ をコードした DNA ワクチン pPPA1^{wt} および PPA1 のコドン使用頻度を魚類に最適化した DNA ワクチン pPPA1^{opt} を作製し、各ワクチンの *Pdp* に対する感染防御効果を検討した。まず、pPPA1^{wt} または pPPA1^{opt} をヒラメの筋肉内に注射投与し、投与後 3 日目および 7 日目の投与部位における各遺伝子の転写レベルおよび発現レベルを解析した。その結果、各 DNA ワクチン間で抗原遺伝子の転写レベルに差異は認められなかったものの、抗原タンパク質の発現レベルは pPPA1^{opt} 接種区で有意に高くなることがわかった。続いて、これら DNA ワクチンによる細胞性免疫応答の誘導を確認するために、DNA ワクチン接種魚の *Pdp* 抗原に対する DTH 応答の有無を解析した。その結果、pPPA1^{wt} 接種区の IFN- γ および IL-1 β の遺伝子発現レベルは、pPPA1^{opt} 接種区よりも有意に高くなっており、コドン最適化により細胞性免疫応答が強く惹起されることが示唆された。また、*Pdp* に対する凝集抗体価も pPPA1^{opt} 接種区では pPPA1^{wt} 接種区よりも高くなっており、コドン使用頻度の最適化により液性免疫の誘導も強化されることがわかった。*Pdp* による感染実験では対照試験区のベクター DNA 投与区の最終的な生残率が 8% であったことに對し、pPPA1^{opt} 接種区では 91%、および pPPA1^{wt} 接種区では 69% となり両 DNA ワクチンの感染防御効果が示された。²³⁾ これらの研究成果から、PPA1 遺伝子を用いた DNA ワクチンが *Pdp* による類結節症に対して有効であること、およびコドン最適化により魚類でも DNA ワクチンの有効性が向上することがわかった。

4. *Nocardia seriolae* に対する DNA ワクチンの開発

Nocardia seriolae はグラム陽性、弱抗酸性の放線菌であり、ブリ、カンパチ²⁴⁾ およびヒラメ²⁵⁾ に対して病原性を示す。本菌によるノカルジア症は、わが国で最も生産量の多いブリ属魚類の養殖で多発しており、近年ではもっとも被害額の大きな感染症の一つになっている。スルファモノメトキシシンおよびスルフィソゾールナトリウムによる治療が可能である^{26,27)} が、抗生物質および合成抗菌剤を多用することは薬剤耐性菌の出現につながるため、ワクチンの開発が強く求められている。ホルマリンおよび加熱処理により不活化した菌体を接種しても感染防御効果が得られないことが報告されており^{24,28)}、未だ効果の高いワクチンは開発されていない。*N. seriolae* に一度感染し耐過した個体 (感染耐過魚) は、再攻撃に対して強い抵抗力を示す。²⁹⁾ また、*N. seriolae* の培養上清

から PPD を精製して感染耐過魚に投与すると DTH 応答が誘導されることから、本菌の排除には抗原特異的な細胞性免疫応答が重要な役割を果たすことが示唆されている。¹²⁾

Nocardia 属細菌は、*Mycobacterium* 属細菌とともに *Corynebacterium* 亜目に分類される。これらの細菌はワックス状の分厚い細胞壁を有しており、この細胞壁を合成する酵素として *mycoryl transferase* を盛んに分泌している。³⁰⁾ *Mycoryl transferase* は別名 Ag85 複合体と呼ばれており、宿主動物の免疫応答を強く誘導する主要抗原である。*Mycobacterium* 属細菌による感染症に対しては、Ag85 複合体を抗原として用いた DNA ワクチンが哺乳類および魚類で開発されている。³¹⁻³²⁾ そこで、まず、縮重プライマーを用いて *N. seriolae* の Ag85 複合体遺伝子のクローニングを行ったところ、362 アミノ酸をコードする 1,086 bp の *N. seriolae* の Ag85 様遺伝子 (Ag85L) を得ることができた。次いで、本遺伝子を連結した発現プラスミド pAg85L^{wt} およびそのコドン使用頻度を魚類に最適化した pAg85L^{opt} を作製した。これらをカンパチに投与して *N. seriolae* による感染実験を行ったところ、対照試験区とした PBS 接種区の最終的な生残率が 51% であったのに対し、pAg85L^{wt} 接種区では 88% および pAg85L^{opt} 接種区では 98% の魚が生残した。また、これら DNA ワクチンを接種したカンパチでは、攻撃後で *N. seriolae* の体内増殖が抑えられており、ワクチン接種魚ではノカルジア症の症状である脾臓の肥大や結節の形成がまったく観察されなかった。これらのことから、DNA ワクチン pAg85L^{opt} および pAg85L^{wt} は *N. seriolae* に対して非常に高い感染防御効果を示すことがわかった。

5. おわりに

生ワクチンの水産動物への使用に対しては、病原性復帰の可能性、生ワクチン株の伝播・増殖が水中では起こりやすいこと、および接種動物の隔離が難しいことなど多くのリスクが挙げられる。生ワクチンの代替として、細胞性免疫を効果的に惹起できる DNA ワクチンは非常に魅力的な技術である。この記事でも紹介してきたように、DNA ワクチンは様々な魚類の感染症に対して有効性が示されており、実際に 2005 年にはカナダでサケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (Infectious hematopoietic necrosis: IHN) に対する DNA ワクチンが承認された。³³⁾ DNA ワクチンとして接種された抗原遺伝子の DNA は宿主の染色体には組み込まれないため、DNA ワクチン接種動物は遺伝子組換え動物にはあたらない。³⁴⁾ わが国でも産業動物への DNA ワクチン使用に関する法整備が始まっており (農林水産省ホームページ: <http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/>

tetuduki/2016 年 6 月 6 日)、今後、DNA ワクチンが水産用医薬品として承認されることが大いに期待される。

謝 辞

平成 27 年度日本水産学会 水産学奨励賞を受賞するにあたり、まず、大学院在学中に主指導教員としてご指導賜りました東京海洋大学教授 廣野育生先生に心より感謝いたします。また、東京海洋大学准教授 近藤秀裕先生ならびに東京海洋大学名誉教授 青木 宙先生には副指導教員としてご指導賜り、深く感謝の意を表します。東京海洋大学大学院ゲノム科学研究室の先輩諸氏、卒業生、修了生の皆様方にもこの場をお借りして感謝の意を表します。学術振興会特別研究員として快く私を受け入れてくださった水産総合研究センター増養殖研究所病害防除部の中易千早先生、松山知正先生、坂井貴光先生、高野倫一先生、佐野菜採先生、ならびに川上 穰先生に深く感謝いたします。また、研究所での活動をサポートしていただきました乙竹 充先生、前野幸男先生、森 広一郎先生、栗田 潤先生はじめ、増養殖研究所病害防除部および魚病診断研修センターの皆様にも深く感謝の意を表します。同特別研究員として 1 年間という短い間でしたが、私を快く受け入れてくださり公私に渡り海外生活を支えてくださったドイツ Friedrich-Loeffler-Institut の Uwe Fischer 博士、山口卓哉博士、Susann Schares 氏、Veronica Soto Lampe 氏、ならびに Gabriel Czerwinski 氏に深く感謝いたします。最後に、水産学奨励賞に私を推薦してくださった東京海洋大学教授 佐野元彦先生、増養殖研究所 乙竹 充先生、ならびに本選考に関わってくださった先生方に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 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, 東京, 2009.
- 2) 水産用医薬品の使用について 第 29 報. 消費・安全局 畜水産安全管理課, 東京, 2016.
- 3) Kusuda R, Kawakami K, Kawai K. A fish-pathogenic *Mycobacterium* sp. Isolated from an epizootic of cultured yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; **53**: 1797-1804.
- 4) Kawakami K, Kusuda R. In vitro effect of some chemotherapeutics on the causative of mycobacterium infection in yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 2111-2114.
- 5) Kawakami K, Kusuda R. Efficacy of rifampicin, streptomycin and erythromycin against experimental mycobacterium infection in cultured yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 51-53.
- 6) Kato G, Kato K, Saito K, Pe Y, Kondo H, Aoki T, et al. Vaccine efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG against *Mycobacterium* sp. infection in amberjack *Seriola dumerili*. *Fish Shellfish Immunol.* 2011; **30**: 467-472.
- 7) Ponninghaus JM, Fine PE, Sterne JA, Wilson RJ, Msosa E, Gruer PJ, Jenkins PA, Lucas SB, Liomba NG, Bliss L.

- Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi. *Lancet* 1992; **339**: 636–639.
- 8) Portaels F, Aguiar J, Debacker M, Steunou C, Zinsou C, Guedenon A, Meyers WM. Prophylactic effect of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against osteomyelitis in children with *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002; **9**: 1389–1391.
 - 9) Black CA. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol Online J* 1999; **5**: 7. (Accessed on April 10, 2016) <http://dermatology-s10.cdlib.org/DOJvol5num1/reviews/black.html>.
 - 10) Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. BCG vaccine confers adaptive immunity against *Mycobacterium* sp. infection in fish. *Dev Comp Immunol* 2010; **34**: 133–140.
 - 11) Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. A novel immune-related gene, microtubule aggregate protein homologue, is up-regulated during IFN- γ -related immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev Comp Immunol* 2012; **36**: 349–358.
 - 12) Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japanese flounder against *Nocardia seriolae*. *Fish Shellfish Immunol.* 2012; **33**: 243–250.
 - 13) Kubota S, Kimura T, Egusa S. Studies of a bacterial tuberculosis of yellowtail: 1. Symptomatology and histopathology. *Fish Pathol.* 1970; **4**: 111–118.
 - 14) Kusuda R, Yamaoka M. Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pateurella piscicida* as the causative agent: I. On the morphological and biochemical properties. *Nippon Suisan Gakkasishi* 1978; **38**: 1325–1332.
 - 15) Fukuda Y, Matsuoka S, Mizuno Y, Narita K. *Pasteurella piscicida* infection in cultured juvenile Japanese flounder. *Fish Pathol.* 1996; **31**: 33–38.
 - 16) Elkamel AA, Hawke JP, Henk WG, Thune RL. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages. *J. Aquat. Anim. Health* 2003; **15**: 175–183.
 - 17) Gravningen K, Sakai M, Mishiba T, Fujimoto T. The efficacy and safety of an oil-based vaccine against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): a field study. *Fish Shellfish Immunol.* 2008; **24**: 523–529.
 - 18) Whitton JL, Rodriguez J, Zhang J, Daniel E, Hasset E. DNA immunization: mechanistic studies: a review. *Vaccine* 1999; **17**: 1612–1619.
 - 19) Narum DL, Kumar S, Rogers WO, Fuhrmann SR, Liang H, Oakley M, Taye A, Sim BK, Hoffman SL. Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merozoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infect. Immun.* 2001; **69**: 7250–7253.
 - 20) Stratford R, Douce G, Zhang-Barber L, Fairweather N, Eskola J, Dougan G. Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus. *Vaccine* 2000; **19**: 810–815.
 - 21) Ko HJ, Ko SY, Kim YJ, Lee EG, Cho SN, Kang CY. Optimization of codon usage enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding mycobacterial antigen Ag85B. *Infect. Immun.* 2005; **73**: 5666–5674.
 - 22) Hirono I, Kato M, Aoki T. Identification of major antigenic proteins of *Pasteurella piscicida*. *Microb. Pathog.* 1997; **23**: 371–280.
 - 23) Kato G, Yamashita K, Kondo H, Hirono I. Protective efficacy and immune responses induced by a DNA vaccine encoding codon-optimized PPA1 against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in Japanese flounder. *Vaccine* 2015; **33**: 1040–1045.
 - 24) Kusuda R, Nakagawa A. Nocardial infection of cultured yellowtail. *Fish Pathol.* 1978; **13**: 25–31.
 - 25) Kudo T, Hatai K, Seino A. *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish. *Int. Syst. Bacteriol.* 1988; **38**: 173–178.
 - 26) Itano T, Kawakami H. Drug susceptibility of recent isolates of *Nocardia seriolae* from cultured fish. *Fish Pathol.* 2002; **37**: 152–153.
 - 27) Ismail TF, Nakamura A, Nakanishi K, Minami T, Murase S, Yanagi T, Itami T, Yoshida T. Modified resazurin microtiter assay for *in vitro* and *in vivo* assessment of sulfamonomethoxine activity against the fish pathogen *Nocardia seriolae*. *Fish Sci.* 2012; **78**: 351–357.
 - 28) Shimahara Y, Yasuda H, Nakamura A, Itami T, Yoshida T. Detection of antibody responses against *Nocardia seriolae* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a preliminary vaccine trial in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *B. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 2005; **25**: 270–275.
 - 29) Itano T, Kawakami H, Kono T, Sakai M. Live vaccine trials against nocardiosis in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* 2006; **261**: 1175–1180.
 - 30) Tang X, Deng W, Xie J. Novel insights into *Mycobacterium* antigen Ag85 biology and implications in countermeasures for *M. tuberculosis*: a review. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2012; **22**: 179–187.
 - 31) Denis O, Tanghe A, Palfiet K, Jurion F, van den Berg TP, Vanonckelen A, Ooms J, Saman E, Ulmer BJ, Content J, Huygen K. Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. *Infect. Immun.* 1998; **66**: 1527–1533.
 - 32) Pasnik DJ, Smith SA. Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for *Mycobacterium marinum* in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; **103**: 195–206.
 - 33) Salenius K. The road to licensure of a DNA vaccine. *Curr. Top. Invest. Drugs* 2007; **8**: 635–641.
 - 34) Report of the OIE/FAO/WHO meeting on the assessment of food safety related to the use of recombinant vaccines in food-producing animals, 2010, Paris, 18–19 January.