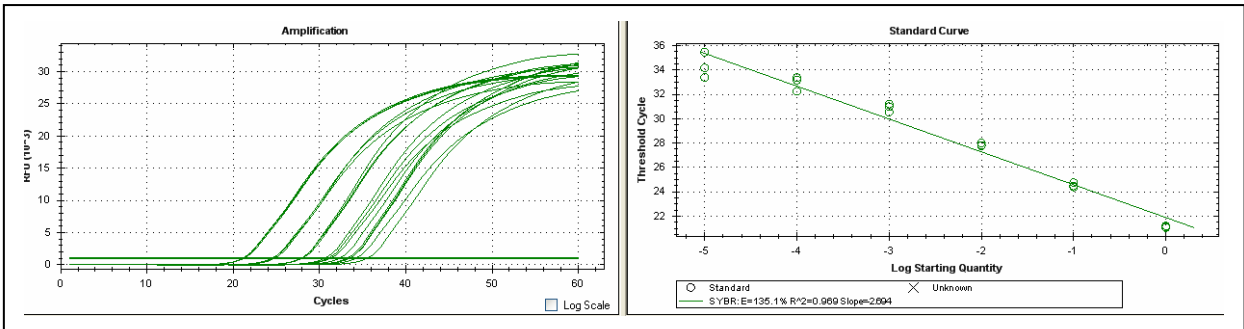


平成22年度県立大学地域貢献研究の研究成果について（完了報告・中間報告）

研究テーマ	ヒラメのウイルス性出血性敗血症ワクチンの効果的な投与方法の開発																											
研究期間	平成21～22年度																											
主たる研究者	【学部・学科】海洋生物資源学部・海洋生物資源学科 【職・氏名】教授・宮台俊明																											
<p>○研究目的</p> <p>ヒラメのウイルス性出血性敗血症（VHSV）はヒラメの稚魚に感染し、多くを死に至らしめる疾病であり、ヒラメの生産を低減させる大きな要因である。VHSV をホルマリンで不活化したワクチンはVHSV 感染症を予防する効果が認められるが、その効果は飼育水温によって異なる。効果の違いが現れる原因をつきとめるのが本研究の目的である。ウイルスの感染を防御する免疫の仕組みの中で、どの因子がワクチンの効果をもたらしているのかをつきとめるため、その因子の定量解析法を開発する。</p> <p>○研究成果</p> <p>ワクチンの温度依存性</p> <p>ワクチン投与後の飼育水温を12℃、20℃、28℃に設定して攻撃試験（感染力の強いウイルスを接種すること）を試みたところ、20℃で有意な効果を得ることができた（図1）。ところが、12℃、と28℃ではワクチン効果を得ることができなかった。ヒラメにとって、12℃、28℃は生育適温とはいえない。そのため、免疫機構が正常に機能しなかった可能性がある。しかし、ワクチンが奏功していた20℃においても抗ウイルス抗体の上昇を認めることができなかったことから、本ワクチンの場合、抗体以外の免疫因子が発症を抑制する働きをしていたと考えられた。</p> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="flex: 1;"> <table border="1"> <caption>図1のデータ</caption> <thead> <tr> <th>攻撃後の日数</th> <th>ワクチン接種区 (■) 累積死亡率 (%)</th> <th>ワクチン非接種区 (△) 累積死亡率 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>6</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>9</td><td>25</td><td>85</td></tr> <tr><td>12</td><td>30</td><td>97</td></tr> <tr><td>15</td><td>33</td><td>97</td></tr> <tr><td>18</td><td>33</td><td>97</td></tr> <tr><td>21</td><td>33</td><td>97</td></tr> </tbody> </table> </div> <div style="flex: 1; padding-left: 10px;"> <p>図1. ワクチン接種後、20℃で飼育し、1ヶ月後に強毒のウイルスを注射した後の累積死亡率の経過を表している。■がワクチン接種区、△がワクチン非接種区である。図に示す通り、ワクチン接種区の死亡率は低下していることが認められた。</p> </div> </div> <p>ヒラメの免疫関連遺伝子の検索と定量法の開発</p> <p>魚類、哺乳類の中で現在までに知られているウイルス感染防御に関わる因子が、ヒラメのVHSV ワクチン効果をもたらす要因になっているかどうかを調べる必要がある。そこで、以下のような因子の遺伝子を定量できるかどうかを検討した。</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) インターフェロン：細胞をウイルス感染から防御する。 (2) Mx：インターフェロンが作用した細胞の中で、ウイルスの増幅を抑制する。 (3) 炎症性サイトカイン：免疫細胞を賦活化する因子（数種類）。 (4) 細胞障害性Tリンパ球：ウイルス感染細胞を殺す細胞。 (5) 抗体：ウイルスに結合してウイルスを不活化する。 		攻撃後の日数	ワクチン接種区 (■) 累積死亡率 (%)	ワクチン非接種区 (△) 累積死亡率 (%)	0	0	0	3	0	0	6	0	0	9	25	85	12	30	97	15	33	97	18	33	97	21	33	97
攻撃後の日数	ワクチン接種区 (■) 累積死亡率 (%)	ワクチン非接種区 (△) 累積死亡率 (%)																										
0	0	0																										
3	0	0																										
6	0	0																										
9	25	85																										
12	30	97																										
15	33	97																										
18	33	97																										
21	33	97																										

(6) その他の免疫関連遺伝子

これらの遺伝子の情報を論文ならびにデータベースから収集し、遺伝子増幅法（PCR）で定量できるかどうかを検討した。図2はその1例（細胞障害性Tリンパ球に特有の遺伝子CD8）である。60回の遺伝子増幅反応を1つの反応液中で繰り返し行くと、1回の反応ごとに約2倍に遺伝子が増幅する。遺伝子の増幅に伴って蛍光量が増加する試薬を反応液中に添加しておく。左図の横軸は反応回数、縦軸は蛍光量を表す。図で示すように、何回目かの反応後には蛍光が検出できる量にまで到達する。最初に加えた遺伝子の数が減少するに従って、蛍光が検出できるまでに要する反応回数は増加する。右図の横軸は最初に反応液中に加えた遺伝子量、縦軸は蛍光が検出できるまでに要した反応回数を示している。



試行錯誤の結果、右図のように、(1)～(6)までの遺伝子を極めて正確に遺伝子量を測定できるようになった。

ワクチン接種後の免疫関連遺伝子の発現解析

免疫関連遺伝子の発現（染色体の遺伝子情報が読み取られ、タンパク質合成へと移行すること）量を上記の方法で定量することにより、少なくともウイルス感染3日後には上記の免疫関連遺伝子が主として腎臓で発現することがわかった（表）。今後、ウイルス感染後、ワクチン接種後、ワクチン接種した個体へのウイルス感染後に主として機能する免疫因子を明らかにすることが本研究の最終目標であり、現在その実験を遂行している。

表 VHSV接種後の免疫関連遺伝子の発現

免疫関連遺伝子		脾臓	腎臓
炎症性サイトカイン	IL-6	—	+
	TNF	+	+
	IFN γ	—	+
インターフェロン関連遺伝子	IFN	+	+
	Mx	+	+
	IRF	—	+
Tリンパ球関連遺伝子	CD40	+	+
	TCR β	—	+
	TCR δ	—	+
抗体遺伝子	CD3	—	+
	IgM	+	+
VHSV	VHSV	—	+

飼育水温20℃でウイルスを接種した。