

氏 名	徳 田 有 希
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1090 号
学位授与の日付	平 成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 水 産 学 専 攻
学位論文題目	ヒラメの液性免疫機構に関する細胞生物学的研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 坂 口 守 彦	教 授 田 中 克	教 授 宮 本 元
--------	----------------------	-----------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

近年における水産増養殖生産の増加に伴い、魚病の発生が重大な問題となっている。魚病問題の解決には、魚類の生体防御機構、特にその免疫機構について詳しく知る必要があるが、これまではサケ科魚類とコイ、ナマズなどの淡水魚を中心として研究されてきたにすぎない。本論文は、海産の有用魚種であるヒラメの免疫機構を明らかにすることを目的として、液性免疫応答の主役である抗体(免疫グロブリン M; IgM)の精製と B 細胞の同定、抗ストレスホルモンであるグルココルチコイド (GC) の抗体産生に及ぼす影響などについて検討した結果をまとめたものである。その主な内容は以下のとおりである。

1. ヒラメ血清より硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過により IgM を精製した。精製 IgM は分子量約 900,000 で、80,000 の重鎖と 27,000 の軽鎖からなることを確認した。これまでに硬骨魚類の IgM は 4 量体であると報告されているが、本研究の結果はヒラメ IgM が 5 量体である可能性を示した。また、ヒラメ IgM がプロテイン A 非結合性であることを示した。多くの硬骨魚類の IgM はプロテイン A 結合性であることから、ヒラメ IgM の性状が他の硬骨魚類のそれとは明らかに異なることがわかった。

2. 抗ヒラメ IgM モノクローナル抗体を作製し、FB 17 と命名した。この抗体が高等脊椎動物の B 細胞に相当するリンパ球を認識することを確認し、ヒラメリンパ球の分類を行った。その結果、ヒラメにおいても性質・機能の異なるリンパ球亜群が存在することを明確にした。

3. 体内における液性免疫機構に関わる器官を同定するために、脾臓・頭腎・体腎における Ig 保有細胞の分布を検討し、各器官に成熟 B 細胞と推定される Ig 保有細胞が存在することを確認した。また、各器官における Ig 保有細胞の割合の相関関係を調べ、頭腎と体腎における Ig 保有細胞の割合は互いによく相関しているが、頭腎と脾臓、または体腎と脾臓間では相関関係は認められないことを示した。さらに、頭腎および体腎にはプラスト細胞又はプラズマ細胞であると考えられる Ig 保有量の少ない細胞が認められるが脾臓には見られないことを明らかにした。以上の結果から、脾臓の Ig 保有細胞と頭腎のそれは、抗原刺激に対する反応性又は B 細胞の分化段階が異なっており、免疫応答並びに B 細胞の分化の場としては腎臓が重要な器官であることを示した。

4. FB 17 と抗ヒラメ IgM ウサギ抗血清を用いたサンドイッチ ELISA 法により、培養白血球の分泌する微量な IgM の検出を可能にした。この系を用い、抗体産生に及ぼす GC の影響を検討した。まず、培養白血球に合成 GC (デキサメタゾン) を添加することにより、Ig 保有細胞数および分泌 IgM 量が減少することを示した。さらに、デキサメタゾンがマイトジェン誘導性の IgM 分泌を抑制することを示した。これらの結果から、GC が Ig 保有細胞の増殖と抗体産生を抑制するとともに、抗原刺激などに対する免疫応答性を低下させることにより免疫抑制作用を示すことが明らかとなり、ヒラメにおいても高等脊椎動物で報告されているような、免疫系と内分泌系にまたがる複雑な調節機構が存在する可能性が示された。

5. 一般に GC はそのレセプター (GR) を介して作用を発揮することから、白血球が GR を保有していることが考えられる。そこで肝臓から GR 遺伝子を単離し、決定した塩基配列をもとに設計したプライマーを用いて、白血球より調製した全

RNA を鋳型とする逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を行った。その結果、白血球において本遺伝子が発現していることを確認した。

以上の結果から、ストレスにより増加した血中 GC が、白血球が保有する GR を介して免疫系に作用し、抗体産生や抗原刺激に対する応答性を低下させるというストレス誘導性の免疫抑制機構が存在することが予想された。

論文審査の結果の要旨

水産増養殖生産の増加に伴い、多発する魚病が重大な問題になっている。しかし、有用海産魚類の免疫機構については現在まだ十分に解明されておらず、特にストレスによる免疫能の低下機構に関する研究は進んでいなかった。本研究は、主要な養殖魚であるヒラメを材料としてイムノグロブリン (Ig) の精製、抗体産生に関わる細胞の同定などを行ったうえで、液性免疫機構に及ぼす抗ストレスホルモンの影響を明らかにしたものである。成果のうち特に評価できる点は以下のとおりである。

1. 血清より Ig を精製し、分子量、サブユニット構造、プロテイン A 結合性などを検討した結果、これまでに知られている硬骨魚類 Ig の性状とは相違することを示した。

2. 精製 Ig に対するモノクローナル抗体を作製し、高等脊椎動物の B 細胞に相当するリンパ球を認識することを確認した。この抗体を用いて、ヒラメ体内において性質、機能の異なるリンパ球亜群が存在することを初めて明らかにした。

3. リンパ器官である脾臓・頭腎・体腎には成熟 B 細胞が分布しているが、頭腎と体腎には、脾臓には認められない未分化の B 細胞あるいは形質細胞と予想される Ig 保有細胞が存在することを明らかにし、腎臓が液性免疫機構において重要な役割を果たしていることを示した。

4. ストレスによる免疫力低下が抗ストレスホルモンであるグルココルチコイド (GC) により仲介されている可能性を確かめるために、培養ヒラメ白血球に合成 GC を添加したところ、GC が Ig 保有細胞の増殖と Ig 分泌を抑制すること及びマイトジェン応答性を低下させることを明らかにした。

5. ヒラメ GC レセプター (GR) 遺伝子を単離し、白血球が GR 遺伝子を発現していることを示した。魚類白血球において GR 遺伝子の発現を認めたのは本研究が最初である。この結果は、GC が白血球の GR を介して免疫応答性を低下させる作用を有し、ひいてはストレスによる耐病性の低下が GC により引き起こされる可能性を示唆するものである。

以上のように、本論文はヒラメの液性免疫機構について検討したものであるが、特に、抗体産生の抑制が抗ストレスホルモンにより調節されていることを明確にしたことは、魚類生理化学、水産生物学、水産増殖学などの分野の発展に貢献するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 12 年 1 月 20 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。