

愛媛大学沿岸環境科学研究センター  
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」  
共同研究報告書（2022年度）  
研究内容（別紙）

研究課題

芳香族炭化水素受容体を介したヘルパーT細胞サブセットの  
不均衡メカニズム解明と魚類疾病への感受性評価

鹿児島大学 山崎雅俊

## 1. 研究目的

哺乳類において、環境化学物質が芳香族炭化水素受容体（AhR）を介して Th サブセットの分化・誘導に影響し、アレルギー性皮膚炎の増悪化や常在細菌や病原体に対する感受性に影響しているという報告がある（Furue *et al.*, 2019, Araújo *et al.*, 2021）。一方、魚類において環境汚染物質と AhR への結合性や化学物質の代謝などは研究されているが、AhR 活性化を介した Th バランスの不均衡に至るメカニズムや病原体感受性に与える影響などの研究は行われていない。そこで本研究では、1) AhR の代表的なリガンドである多環芳香族炭化水素類（PAHs）の暴露により、魚体内の Th バランスがどのように崩れるかを確認し、2) 病原体に対する感染防御能がどの程度低下するのかを明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1. 試験魚

試験魚には、鹿児島大学水産学部環境保全学研究室で継代飼育しているヒメダカ（*Oryzias latipes*）を用いた。試験には、孵化後 179-181 日の成魚を供試した。

## 2.2. 暴露試験

Benzo[a]pyrene (BaP) は、コーンオイルで溶解し、2, 20, 200  $\mu\text{g/gBW}$  となるように腹腔内接種した。対照区にはコーンオイルを接種後、試験魚は 5L ガラス水槽に 40 尾を収容し、24°C で飼育した。一日一回半量を交換し市販餌料を 1 日 3 回給餌した。試験期間中、死亡魚は取り上げ症状を肉眼により観察した。

## 2.3. 感染試験

感染試験には、神経壊死症ウイルス (NNV) を供試した。ウイルスは E-11 細胞を用いて培養した。なお、細胞およびウイルス培養は、愛媛大学沿岸環境科学研究センター共同設備である無菌培養室を利用した。

感染試験は、180mL 飼育水に 20mL のウイルス液、またはウイルスの培養に用いた Minimum essential medium (MEM) を加えて、試験魚を 20 尾入れ、60 分間浸漬した。浸漬後、終容量 1200 mL となるように飼育水を加えて、24°C のインキュベーターで飼育した。試験期間中、死亡魚は取り上げ症状を観察した。なお、本感染試験は愛媛大学沿岸環境科学研究センター内にある感染実験施設を利用した。

## 2.4. 免疫関連遺伝子の発現解析

感染試験開始 24 時間後、頭腎を採取し、ISOGEN (ニッポン・ジーン) 内でホモジネートした。RNA はフェノール・クロロホルム抽出法で抽出し、High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) で cDNA を合成した。頭腎における  $\text{IFN}\gamma$ 、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-17A/F1、および Cyp1A 遺伝子の発現を調べた。合成した cDNA を鋳型として、GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) を用いて比較 Ct 法により発現解析を行った。

# 3. 研究成果

## 3.1. BaP 暴露試験結果

暴露試験の結果、各暴露区の累積死亡率は 200  $\mu\text{g/gBW}$  区で 42.5%、20  $\mu\text{g/gBW}$  区で 2.5% であり、2  $\mu\text{g/gBW}$  区および対照区では死亡魚は観察さ

れなかった (Fig.1)。また、200  $\mu\text{g/gBW}$  区および 2  $\mu\text{g/gBW}$  区では著しい食欲不振が観察されるとともに、暴露区では魚体体側に血管の拡張や一部発赤など炎症応答が肉眼観察された。また、この炎症反応は、接種濃度が高い方がより顕著に表れていた。このことから、BaP の腹腔内接種では炎症反応が誘導され、その炎症反応は濃度依存的に激しくなることが考えられた。一方、症状からの回復は接種濃度が低いほうが早かったことから、接種した BaP は速やかに体内で代謝され無毒されることにより、症状は寛解することが推察された。以上の結果より、一時的ではあるが、BaP の腹腔内接種では炎症性の免疫応答が誘導されることが明らかになった。

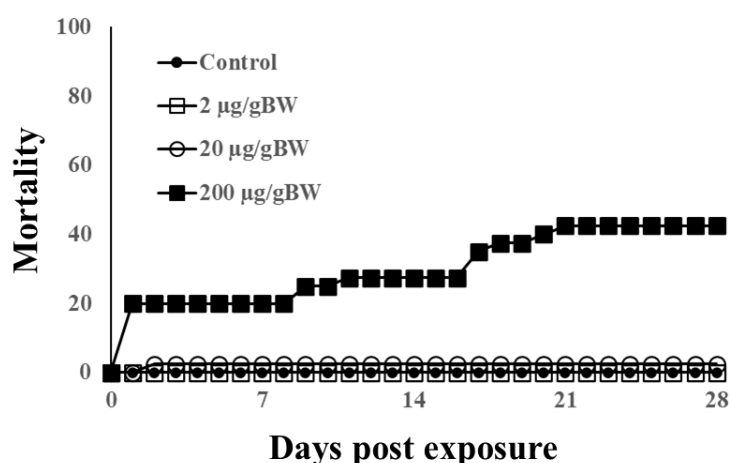


Fig.1. BaP 腹腔内接種後の累積死亡率の経時的変化

### 3.2. ウイルス感染試験結果

ウイルスによる感染試験の結果、浸漬感染を行ったすべての試験区で死亡魚が観察された。各区の累積死亡率は、未暴露後 VNN 感染区 (NC-VNN 区) で 46.7%、2  $\mu\text{g/gBW}$  暴露後 VNN 感染区 (2-VNN 区) で 20.0%、20  $\mu\text{g/gBW}$  暴露後 VNN 感染区 (20-VNN 区) で 26.7%であった (Fig.2)。試験終了時の累積死亡率は NC-VNN 区で高い傾向を示したが、生存時間分析におけるログ・ランク検定の結果、2-VNN 区或いは 20-VNN 区と有意的な差は見られなかった。以上の結果より BaP による炎症反応の収束後は、速やかに健常状態に回復し、その後の感染に対する防御免疫能には影響を与えないと推察された。

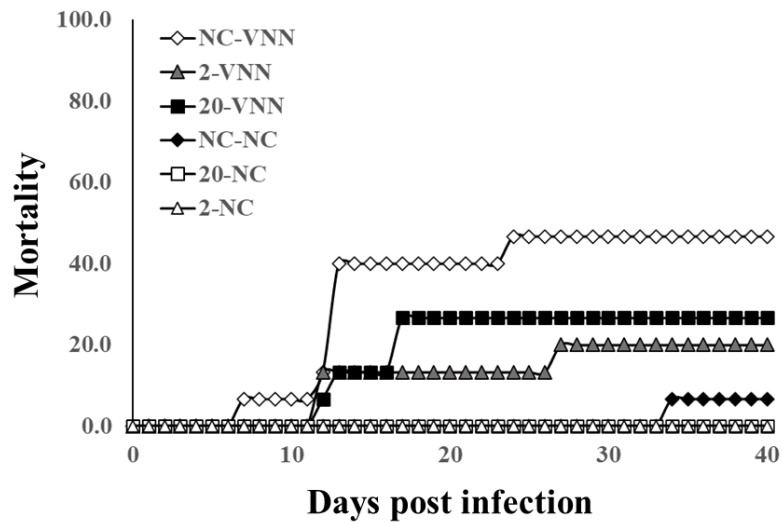


Fig.2. NNV 浸漬感染後の累積死亡率の経時的変化

### 3.3. 炎症性サイトカインの発現解析

炎症に関連するサイトカインである  $TNF\alpha$ 、 $IFN\gamma$ 、 $IL-17A/F1$  の発現解析の結果、全ての試験区間に有意な差は見られなかった (Fig.3)。AhR リガンドが AhR に結合した際に誘導されるチトクローム P450 (Cyp1) の発現解析の結果、20-VNN 区において高い傾向が見られたが、他の試験区と有意的な差は見られなかった。以上の結果は、BaP により誘導された炎症反応は、BaP の代謝・排出とともに収束し、炎症を司る細胞はメモリー細胞として記憶されないと推察された。

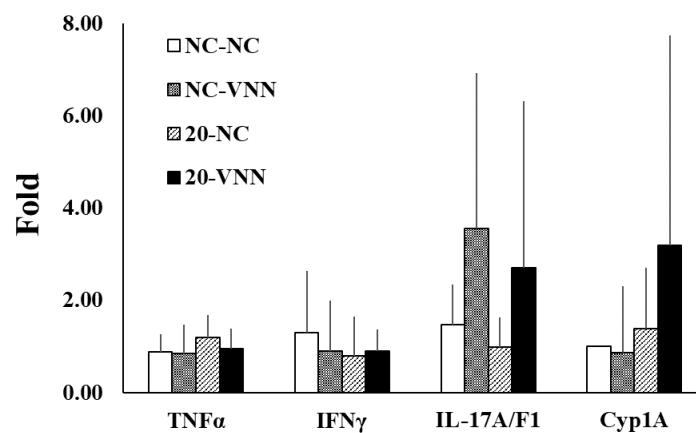


Fig.3. NNV 浸漬感染 24 時間後の炎症性サイトカインの発現解析

### 3.4. 総括

本研究課題では、魚類における AhR 活性化を介した Th バランスの不均衡に至るメカニズムや病原体感受性に与える影響を解明するため、BaP 暴露時に誘導される免疫応答を調べ、その時の病原体感受性を調べた。その結果、BaP の腹腔内接種では、①過剰な炎症反応が誘導されること、BaP の代謝・排出に伴い症状は寛解すること、③その免疫応答は記憶されずに一過性の誘導であることが示唆された。

### 4. 今後の課題

本研究により、BaP は魚体への腹腔内接種により炎症反応を誘導することが明らかとなった。哺乳類において、 $\beta$  ナフトフラボンや 6-formylindolo[3,2-b]carbazole などの AhR リガンドが AhR に結合し、ヘルパーT 細胞が Th17 に分化することにより、炎症応答が誘導されることが報告されている (Quintana *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016; Veldhoen *et al.*, 2008)。一方、BaP の腹腔内接種により炎症反応の誘導が具体的にどういった免疫攪乱なのかは未解明であり、その点の解明が今後の課題として残された。また、本年度の成果として、BaP の腹腔内接種により誘導された炎症応答は、時間ともに寛解することを見出した。しかしながら、その症状が回復するメカニズムに関しては、想像の域を出ない。さらに、過度な炎症反応、すなわち免疫攪乱が病原体感染に対して感染防御能に与える影響解明も今後の課題であると考えられる。