

LPS で誘導したヒラメ好中球の
Edwardsiella tarda に対する食作用について

福嶋 義之*, 金井 欣也

Phagocytic Activities of LPS-induced Neutrophil
of Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*,
against *Edwardsiella tarda*

Yoshiyuki FUKUSHIMA and Kinya KANAI

Phagocytic activities of intraperitoneally exuded neutrophil against live cells of *Edwardsiella tarda* were studied in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with lipopolysaccharide of the bacterium. Addition of normal serum, or normal serum and antiserum did not increase the phagocytic rate or phagocytic index of the neutrophil, while it stimulated the phagocytic activities of the macrophage coexisted with the neutrophil. The present results suggest that against *Edwardsiella tarda* complement or antibody does not act as an opsonin on the phagocytosis of flounder neutrophil.

Key words : 好中球 neutrophil ; マクロファージ macrophage ; *Edwardsiella tarda* ; オプソニン opsonin ; 食作用 phagocytosis ; ヒラメ Japanese flounder.

ヒラメ養殖に最も被害を及ぼすエドワジエラ症は, *Edwardsiella tarda* を原因菌とする細菌性疾病である。一般に哺乳類では, 感染症の初期に好中球が主体となって病原菌の排除にあたり, 免疫された宿主では抗体のオプソニン作用により食作用が助長されることが知られている。ヒラメのエドワジエラ症においても, 軀幹部や臓器に膿瘍の形成が認められることや, 病魚の腹水から作成した塗抹標本や肝臓のスタンプ標本において, 好中球の食菌像が見られる¹⁾ことから, 好中球が *E. tarda* の排除に関わっているものと考えられる。そこで, *E. tarda* 感染時のヒラメ好中球の働きを明確にすることを目的とし, 本菌のリポ多糖で刺激して集めた好中球の食菌能について検討した。合わせて, ヒラメ正常血清および *E. tarda* のホルマリン不活化菌体でヒラメを免疫して得られた抗血清のオプソニン作用についても検討した。

材料および方法

供試魚 長崎県南高来郡口ノ津町の種苗生産業者より購入し, 長崎大学水産学部附属水産実験所の屋内コンクリート水槽でドライペレット (ヒガシマル製) を与えて流水飼育した平均体重280gのヒラメを, 23°Cで馴致して用いた。なお, 飼育中供試魚にエドワジエラ症の発生はなかった。

供試菌 ヒラメ病魚由来 *E. tarda* NUF251を用いた。

腹腔内滲出好中球の調整 *E. tarda* NUF251よりフェノール水法で抽出した水溶性のリポ多糖 (LPS) を, Ca および Mg を含まない1.3%NaCl 含 Dulbecco リン酸緩衝食塩水 (DPBS) で500 μ g/mlに調整した。これをヒラメ腹腔内に, 魚体重100gあたり0.1ml注射した。12時間後にヒラメを取り上げ, 全採血した後に1mlあたり40unitのヘパリンを含むDPBSを腹腔内に注射し, よくマッサージして腹腔

* 現住所: 東京都千代田区三番町6番地14 日本生命三番町ビル6階 株式会社ミドリ十字 臨床開発部。

内滲出細胞(PEC)を浮遊させた。腹部を切開して無菌的にPEC浮遊液を採取し、DPBSで遠心洗浄(400xg, 10分, 20°C)後、DPBSに再浮遊させた。このPEC浮遊液0.5mlをPercollの連続密度勾配に重層し、角度35度のアングルローターを用いて遠心分離(400xg, 60分, 20°C)して細胞を分画した。好中球分画を回収してDPBSで2回洗浄(400xg, 10分, 10°C)し、Thomaの血球計算板で細胞数を計測後、DPBSで 3×10^7 cells/mlに調整して好中球浮遊液とした。この浮遊液の組成は、好中球が約90%を占め、他はマクロファージとリンパ球であった。

なお、Percollの連続密度勾配は、容量7mlのポリカーボネイト製の遠沈管に1.075g/mlに密度を調整したPercollを5ml入れ、角度35度のアングルローターを用いて遠心操作(22,000xg, 30分, 20°C)を行い、作成した。

菌懸濁液の調整 *E. tarda* NUF251を普通寒天に接種して31°Cで21時間培養後、 6×10^8 cells/mlとなるようにDPBSに懸濁した。

ヒラメ正常血清および非働化血清の調整 健康なヒラメより採取して液体窒素中で保存しておいた血清を、使用時に自然解凍して用いた。非働化は46°C, 30分の加熱により行った。

抗NUF251ヒラメ抗血清の調整 *E. tarda* NUF251ホルマリン不活化菌体を免疫原として作製した凝集抗体価2048のヒラメ抗血清を、抗体価が128となるようにDPBSで希釈後、非働化して使用した。

反応液の調整 ヒラメ正常血清添加区、ヒラメ正常血清および抗NUF251ヒラメ抗血清添加区ならびに対照区として非働化血清添加区を設けた。正常血清添加区は、好中球浮遊液、菌懸濁液およびヒラメ正常血清をそれぞれ0.1ml混合し、DPBSを加えて全量を0.5mlとした。正常血清・抗血清添加区は、好中球浮遊液、菌懸濁液、ヒラメ正常血清および希釈抗血清をそれぞれ0.1ml混合し、DPBSを加えて全量を0.5mlとした。非働化血清添加区は、好中球浮遊液、菌懸濁液および非働化血清をそれぞれ0.1ml混合し、DPBSを加えて全量を0.5mlとした。

食能の測定 各反応液を23°C中で1分間に120回振盪して食菌させた。食菌開始後15, 30および60分に各々の反応液から0.1ml取り、DPBSを加えて遠心分離(180xg, 5分, 4°C)して細胞を回収した。これを0.05mlのDPBSに懸濁し、蒸留水で61mg/mlに調整したウシ血清アルブミン溶液を0.05ml加えて塗抹標本を作製した。Wright-Giemsa染色を

施して、食率および貪食している好中球1個あたりの平均取り込み菌数を測定した。また、同じプレパラートに見られたマクロファージについても、同様に測定した。実験は3回行い、結果は各々の測定値の平均値で表した。

有意差検定 各区の間の有意差をStudentのt検定により調べた。

結 果

好中球の貪食試験の結果をFig. 1に示した。食率においては、正常血清添加区が食菌開始60分後に対照区の60.2%に対し67.2%と高い値を示したが、有意な差ではなかった。正常血清・抗血清添加区では他の区に比べて、観察時間中常に低い食率を示し、食菌開始後30分には他の2区との間に、60分後には正常血清区との間に5%の危険率で有意差を認めた(Fig. 1 A)。貪食している好中球1個あたりの平均取り込み菌数においては、正常血清添加区および正常血清・抗血清添加区ともに食菌開始後30分より、対照区に比べ高く推移したが、有意な差は認められなかった(Fig. 1 B)。

好中球分画に混入していたマクロファージの貪食活性の結果をFig. 2に示した。正常血清添加区、正常血清・抗血清添加区ともに、観察時間中常に対照区に比べ高い食率を示した(Fig. 2 A)。正常血清添加区では、食菌開始後30および60分の食率が対照区と比べ5%の危険率で有意に高かった。正常血清・抗血清添加区の食率は、食菌開始後15分には対照区との間に5%の危険率で、30分後には対照区との間に1%、正常血清区との間に5%の危険率で、60分後には対照区との間に1%の危険率で有意な差を認めた。貪食しているマクロファージ1個あたりの平均取り込み菌数では、正常血清添加区は食菌開始30分後から対照区に比べて高い値で推移した。正常血清・抗血清添加区は食菌開始15分後から試験区中最も高い値で推移し、60分後には対照区との間に5%の危険率で有意差が認められた(Fig. 2 B)。

考 察

魚類白血球の食作用に関する研究は多数行われている。一般にマクロファージには食能が認められており、補体や抗体のオプソニン効果も検討されている²⁻⁴⁾。好中球については、食作用が認められたとする報告⁵⁻⁸⁾と食作用は認められなかったとする報告^{9,10)}に分かれる。ヒラメの好中球は西村¹⁾によ

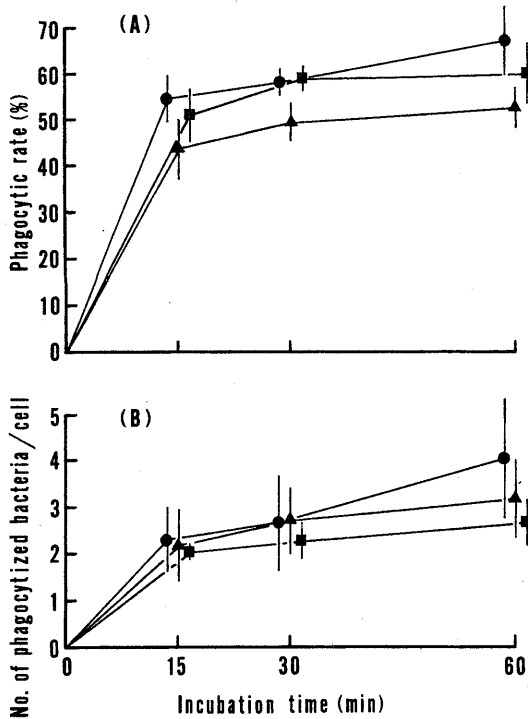


Fig. 1. Effects of opsonins on the phagocytic rate (A) and phagocytic index (B) of intraperitoneally exuded neutrophil of Japanese flounder against *E. tarda*. Phagocytic rate means the percentage of the number of neutrophil phagocytizing bacteria to a total number of neutrophil observed, and phagocytic index means the average number of phagocytized bacteria per neutrophil phagocytizing bacteria.

●, normal serum ; ▲, normal serum plus antiserum ; ■, inactivated serum. Vertical bars represent standard deviations (n=3).

て食作用が認められており、今回の実験においてもそれが確認された。

本実験では、正常血清添加により好中球の貪食活性が対照区に比べて高まる傾向がみられたが、両者の間に有意な差はなかった (Fig. 1)。これより、補体のオプソニン作用は示唆されるものの、強い効果はないのではないかと考えられた。マクロファージにおいては、正常血清の添加により貪食活性が著しく上昇し、補体のオプソニン効果が強く示唆された (Fig. 2)。正常血清・抗血清添加による好中球の貪食活性の上昇はみられなかったのに対し (Fig. 1)、マクロファージの貪食活性は試験区中最も高い値を示した (Fig. 2)。このことより、特異抗体はマクロファージにはオプソニンとして働くが好中球には影響しないことが示唆され、免疫された状態では

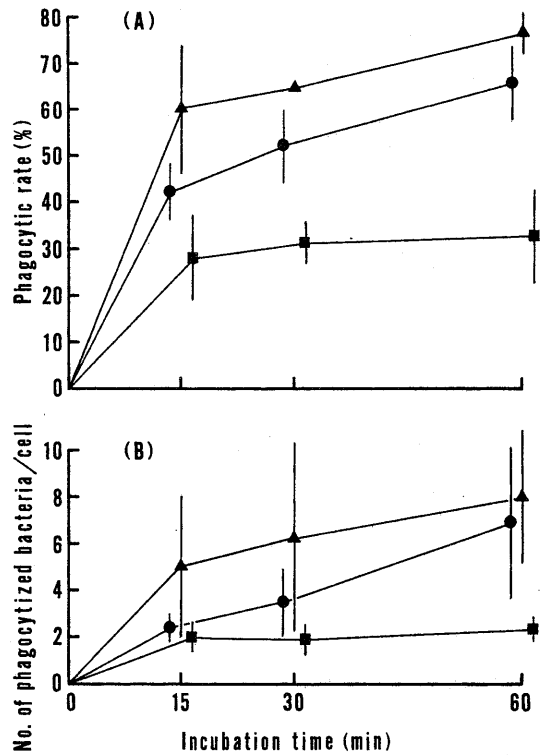


Fig. 2. Effects of opsonins on the phagocytic rate (A) and phagocytic index (B) of intraperitoneally exuded macrophage of Japanese flounder against *E. tarda*.

●, normal serum ; ▲, normal serum plus antiserum ; ■, inactivated serum. Vertical bars represent standard deviations (n=3).

マクロファージが抗体と協同して貪食の中心的役割を果たすのではないかと考えられた。Finco-Kent and Thune⁶⁾ はナマズ白血球の貪食能を調べた結果、正常血清存在下においてマクロファージの方が好中球よりも活性が高かったと報告している。また、Sakai²⁾ はニジマス、ギンザケおよびカラフトマスで、Honda *et al.*³⁾ はニジマスで、楠田・田中⁴⁾ はブリで、それぞれ抗体のオプソニン作用を検討し、特異抗体および補体の存在下でマクロファージの貪食活性が上昇するという結果を得ている。これらの報告ではマクロファージの表面に Fc および C レセプターの存在が示唆されており、本実験の結果から、ヒラメマクロファージの表面にもレセプターが存在することが推察される。一方、ヒラメ好中球の表面にはレセプターが存在しない可能性があり、そのためにオプソニンの影響を受けないとも考えられる。この点を明らかにする為には、これら貪食細胞の表面レセプターの検出を試みる必要がある。

Moritomo *et al.*⁷⁾ は正常血清で処理した各種細菌に対するウナギの好中球の食食能を調べた結果, *E. tarda* に対する食食活性が低かったと報告している。その理由として, 彼らは *E. tarda* の毒性が影響しているのではないかと述べている。今回の実験では, *E. tarda* の強毒株を使用したか, 弱毒株や *E. tarda* 以外の細菌に対しては食食活性やオプソニン効果に違いがあるのか, それには細菌の毒性が影響するのか, 今後調べていく必要がある。

今回の実験で, 正常血清・抗血清添加により好中球の食食率が低下する傾向にあるという結果を得た (Fig. 1 A) が, この理由は不明である。オプソニン添加によるマクロファージの食食活性の上昇が一因として考えられたが, 好中球浮遊液中に占めるマクロファージの割合は 10% 以下であり, 正常血清添加区では好中球の食食率の低下が見られないこと等からマクロファージの影響ではないと思われた。

引用文献

- 1) 西村 真: 長崎大学大学院水産学研究科修士論文 (1990).
- 2) Sakai, D. K. : *J. Fish Dis.*, **7**, 29-38 (1984).
- 3) Honda, A., H. Kodama, M. Moustafa, F. Yamada, T. Mikami, and H. Izawa : *Fish Path.*, **20**, 395-402(1985).
- 4) 楠田理一, 田中卓史: 日水誌, **54**, 2065-2069 (1988).
- 5) MacArthur, J. I., T. C. Fletcher, B. J. S. Pirie, R. J. L. Davidson, and A. W. Thomson : *J. Fish Biol.*, **25**, 69-81 (1984).
- 6) Finco-Kent, D., and R. Thune : *J. Fish Biol.*, **31**, Supplement A, 41-49 (1987).
- 7) Moritomo, T., T. Iida, and H. Wakabayashi : *Fish Path.*, **23**, 49-53 (1988).
- 8) Waterstrat, P. R., A. J. Ainsworth, and G. Capley : *Dev. Comp. Immunol.*, **15**, 53-63 (1991).
- 9) Ellis, A. E., A. L. S. Munroe, and R. J. Roberts : *J. Fish Biol.*, **8**, 67-78 (1976).
- 10) Ellsaesser, C. F., N. W. Miller, M. A. Cuchens, C. J. Lobb, and L. W. Clem : *Trans. Am. Fish. Soc.*, **114**, 279-285 (1985).