

銅処理したウナギの血液における食菌作用の低下

虫明敬一*・中井敏博*・室賀清邦*

(昭和 59 年 11 月 19 日受理)

Lowered Phagocytosis in the Blood of Eels Exposed to Copper

Keiichi MUSHIAKE, Toshihiro NAKAI and Kiyokuni MUROGA

Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima University, Fukuyama 720, Japan

(Received November, 19, 1984)

In a previous paper, the authors reported that the susceptibilities of Japanese eel (*Anguilla japonica*) to *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas anguilliseptica* were increased by exposure to sublethal concentrations of copper (100 or 250 $\mu\text{g-Cu/l}$) for 24 or 48 hours, and this was interpreted as a tertiary response to stress. In the present study, primary and secondary responses to stress caused by copper exposure were investigated.

The apparent increase of corticosteroids was observed in eels exposed to copper for 12 hours. The numbers of lymphocytes and granulocytes in the 24 hour-exposed eels decreased to one third of those of control fish. It was also demonstrated by an *in vitro* test that phagocytic rate of leucocytes in the blood of the stressed eels lowered against *E. tarda* but not against *Vibrio anguillarum*.

From these results, the increased susceptibility to the pathogens is interpreted as due to lowered phagocytosis.

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) を致死濃度以下の銅液に 24 ないし 48 時間浸漬すると, *Edwardsiella tarda* および *Pseudomonas anguilliseptica* に対する感受性が增大することを前報 (MUSHIAKE *et al.*, 1984) で報告し, この変化は銅処理によるウナギのストレス反応 (ストレスの 3 次反応) の一つであろうと推論した。

本報では, この現象を更に詳しく解明するために, ストレスの 1 次および 2 次反応 (PICKERING, 1981) について検討を加えてみた。即ち, 致死濃度以下の銅液に浸漬したニホンウナギにおけるコルチコステロイドの分泌, 血中白血球数およびその食菌能, および抗体産生能について検討を加えた。

材料および方法

1. 実験飼育水と銅処理

養殖業者から直接購入した健康なニホンウナギ (体重 52~115 g) を, 水温 20°C の水槽中で 1 週間程度予備飼育した後, 実験に供した。実験飼育水 (以下飼育水と略す) は, 前報 (MUSHIAKE *et al.*, 1984) と同様 0.005% NaCl 添加脱イオン水とし, 予めウナギを収容しておい

た飼育水 (水温 25°C) に銅原液 (1000 mg-Cu/l) を銅イオン濃度が所定の濃度となるように添加した。そして, 所定の時間銅処理した後, ウナギを取り上げ以下の検査に供した。

2. 血漿コルチコステロイドの定量

0 (対照区), 100, 250 および 400 $\mu\text{g-Cu/l}$ の各濃度の銅液に 12, 24, 48 および 96 時間浸漬した後, ウナギを静かに取り上げ, ウレタン (1.5%) で麻酔した。麻酔後, ヘパリン処理した注射器を用いて動脈球より採血し, 2,500 rpm で 10 分間遠心分離して血漿を得, 市販のキット ((株) 和光純薬工業, n-ブタノール抽出法) を用いてコルチコステロイド量を測定した。

3. *in vivo* における白血球数の変化

250 $\mu\text{g-Cu/l}$ の銅液に 12, 24, 48 および 96 時間浸漬したウナギの血液塗抹標本を作製し, メイ・ギムザ染色 (結城, 1963) を施した後, 赤血球 10,000 に対する相対的な白血球数を求めた。ここでは便宜上, 白血球を顆粒球 (好酸球, 好中球, 好塩基球を含む) とリンパ球に分類したが, いずれにも分類できなかった血球もある。実験は各区 5 尾ずつ用い 2 回行った。

4. *in vitro* における顆粒球の食菌能

* 広島大学生物生産学部

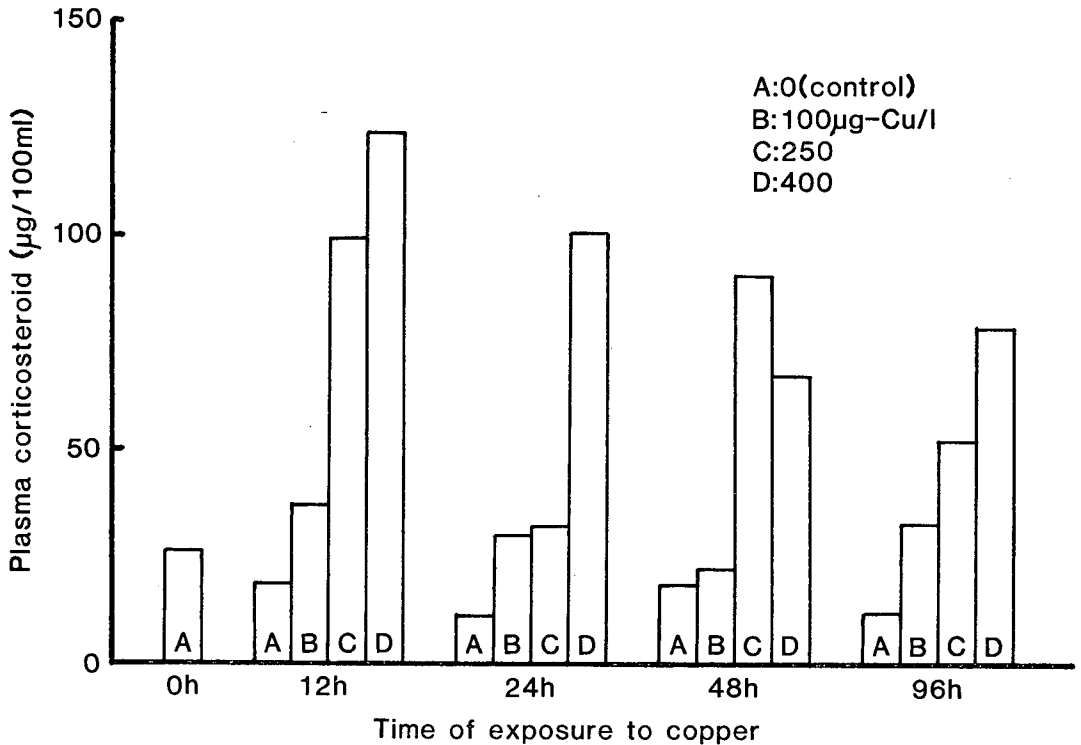


Fig. 1. Concentration of plasma corticosteroids in Japanese eels exposed to copper for various period of time.

0 (対照区) および 250 µg-Cu/l の銅液に 24 時間浸漬 (*E. tarda* の場合は 96 時間処理も加えた) したウナギ各 5 尾から採血した。採血後、血液 1.5 ml を直ちに各々へパリンを入れた小試験管に移し、*E. tarda* (ET-82016 株) および *Vibrio anguillarum* (PT-81049 株、血清型 J-O-1) の生菌懸濁液 0.1 ml をそれぞれ 1.5×10^8 および 1.1×10^7 CFU/ml となるよう加え混合した。混合後、*E. tarda* の場合は 25°C、*V. anguillarum* の場合は 20°C の恒温器の中で振盪 (36 回転/分) した。1, 6, 12, 24, 48 および 72 時間後に血液塗抹標本を作製し、メイ・ギムザ染色を施した後、顆粒球 50 細胞を計数し、食菌率および平均食菌数 (phagocytic index) を次式により求めた。

$$\text{食菌率 (\%)} = \frac{\text{食菌陽性顆粒球数}}{\text{計数顆粒球数 (50 細胞)}} \times 100$$

$$\text{平均食菌数} = \frac{\text{食菌陽性顆粒球中に見られた菌体総数}}{\text{食菌陽性顆粒球数}}$$

なお、食作用が進行し、菌体が球形化している場合のみならず顆粒球中には原型をとどめた菌体が認められ

た場合も食菌陽性とみなした。反対に、食菌が完了して空胞が形成されたと思われる顆粒球でも観察時に内部に菌体が見られないものは、食菌陰性とした。

5. 免疫応答

0 (対照区) および 250 µg-Cu/l の銅液にそれぞれ 24 時間ウナギを浸漬した後、*E. tarda* (ET-82016 株) のホルマリン死菌を魚体重 100 g 当たり 1 mg 筋肉内接種した。あわせて飼育水に 24 時間浸漬しただけの非接種区も設けた。免疫後、ウナギを水温 25°C の飼育水中に收容し、3, 5, 7, 10, 14 および 21 日後 (ただし、非免疫区は 7, 14 および 21 日後のみ) にそれぞれの区から 5 尾ずつ魚を取り上げ採血した。白血球数は前述の方法により、赤血球 10,000 に対する相対数として求めた。血漿抗体価はホルマリン抗原を用いてマイクロタイター法により測定した。

結 果

血漿コルチコステロイドの測定結果を Fig. 1 に示した。12時間銅処理したウナギにおいては、処理した銅液

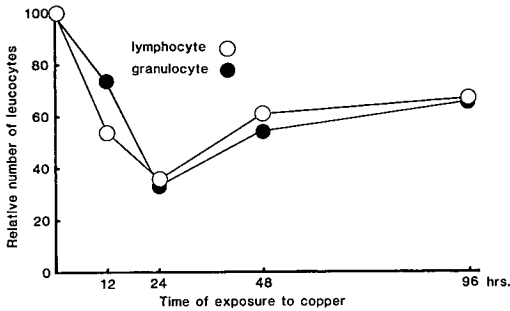


Fig. 2. Relative number of leucocytes of the eels treated with copper (250 µg/l).

の濃度に比例するように血漿コルチコステロイドの濃度が上昇していた (対照区: 18.8, 100 µg-Cu/l 区: 37.5, 250 µg-Cu/l 区: 99.5, 400 µg-Cu/l 区: 123.5 µg/100 ml)。しかし、24~96 時間と銅浸漬時間を長くしてもコルチコステロイドの値が更に高くなるということはなく、概ね逆に減少する傾向が見られた。

in vivo における白血球数は、同じ実験を2つの魚群について行ったが、各魚群ごとに対照区でのそれぞれの白血球数を100とし、それに対する各区の顆粒球およびリンパ球の相対値として求め、その経時の変化を Fig. 2 に示した。その結果、24時間銅処理後に顆粒球およびリンパ球ともに最も低い値を示し (それぞれの相対値が 33.0 および 35.6)、対照区の 1/3 にまで減少した。

in vitro における顆粒球の *E. tarda* および *V. anguillarum* に対する食菌率と平均食菌数の変化を Fig. 3 に示した。*E. tarda* に対しては、対照区に比べると24 および 96 時間銅処理したウナギの顆粒球に食菌能の低下が見られた。血液と菌を混合し反応を開始してから24 時間後には、24 時間銅処理したウナギの顆粒球の食菌率は 13.6% となり、対照区の食菌率 (29.6%) のほぼ 1/2 に低下していた。この時点における平均食菌数は対照区のそれと違いはなかったが、48 時間あるいは 72 時間反応させた場合には平均食菌数の低下も認められた。96 時間銅処理したウナギの顆粒球の食菌率も低下していたが、24 時間銅処理の場合程ではなかった。*V. anguillarum* に対しては、*E. tarda* に対する場合のような顆粒球の食菌率の明らかな低下は見られなかった。

免疫後の白血球数の相対値の経時の変化を Fig. 4 に示したが、銅処理をせずに *E. tarda* 死菌を接種した区 (B) では、接種3日後には顆粒球の相対値が 217.6、10 日後には 340.6 にまで増加した。リンパ球には顆粒球ほ

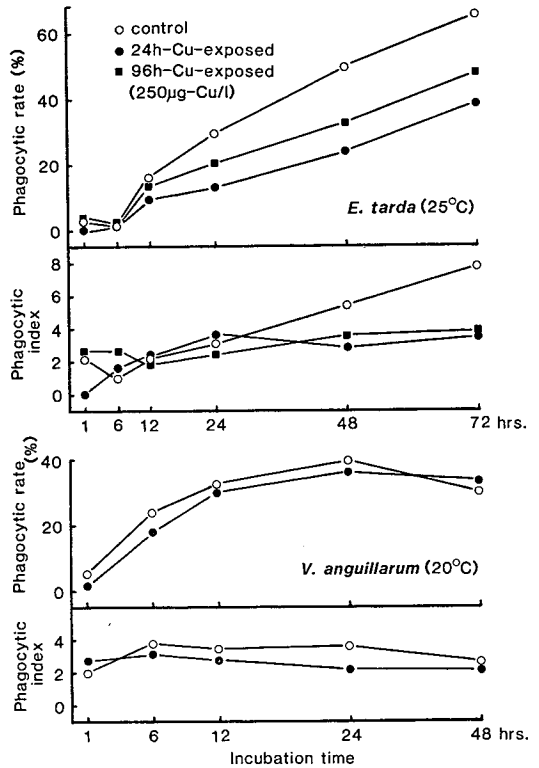


Fig. 3. *In vitro* phagocytic activity of granulocytes of the eels against *E. tarda* and *V. anguillarum*.

ど顕著な変化は見られなかった。これに比べて銅処理した区 (A) では死菌接種による顆粒球の増加は見られず、むしろリンパ球では接種14 日後に非接種魚の 1/2 にまで減少した。

また、銅処理したウナギと銅処理しないウナギの抗体産生の比較を Fig. 5 に示したが、銅処理区と対照区の間には *E. tarda* に対する抗体産生能力の差はほとんど見られなかった。

考 察

100, 250 および 400 µg-Cu/l の銅液に12 時間浸漬したウナギにおいて血漿コルチコステロイドの増加が見られ、12 時間後には既にストレスの1 次反応が現われていることがわかった。致死濃度以下の 100 および 250 µg-Cu/l の場合、ホルモンの濃度は12 時間浸漬区で最も高くなりその後低下するが、48 時間もしくは 96 時間後に再びやや増加する傾向が認められた。同様の現象はサケ科魚類でも認められている (DONALDSON and DYE,

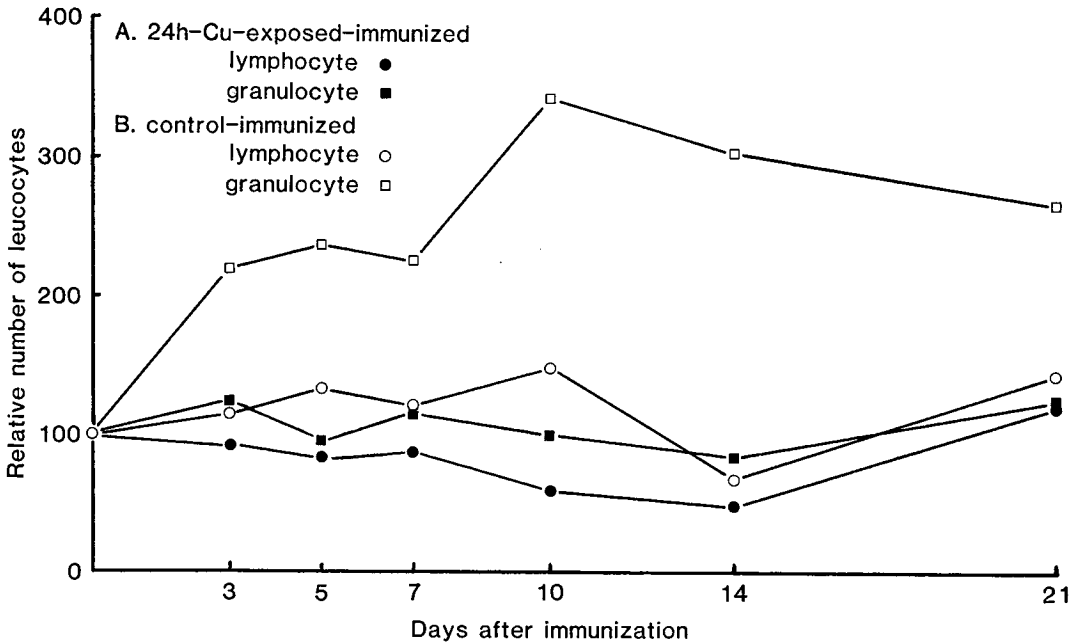


Fig. 4. Changes with time of the relative number of leucocytes of the eels treated with copper (250 $\mu\text{g/l}$) followed by immunization with formalin-killed *E. tarda* (ET-82016) cells.

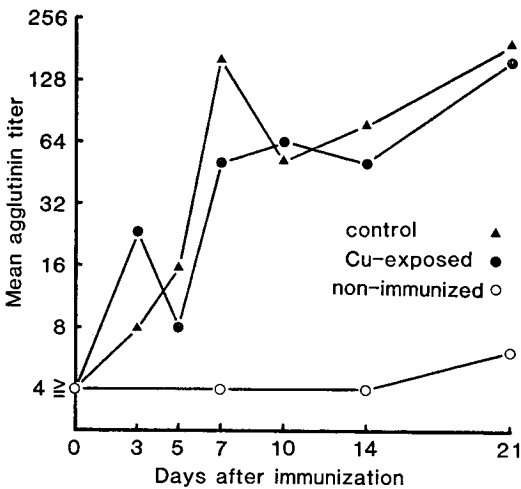


Fig. 5. Plasma agglutinin production in control and Cu-exposed eels after immunization with *E. tarda* (ET-82016) bacterin.

1975; SCHRECK and LORZ, 1978)。

ストレスの2次反応である白血球数の変化を Fig. 2 に示したが、銅処理開始後24時間で顆粒球およびリン

パ球ともに最も減少していた。このことは、前報で報告したように、*E. tarda* および *P. anguilliseptica* の筋肉内注射攻撃に対するウナギの死亡率が24時間銅処理群で最も高かった事実とよく結びつく。さらに、単に白血球の数だけでなく、*E. tarda* に対する顆粒球の食菌率も銅処理によって低下した。特に24時間処理した顆粒球でその傾向が顕著であり、*E. tarda* に対する食菌率は対照区のそのほぼ1/2に低下し、白血球数の減少(1/3)と合すると、血中顆粒球の食菌作用は1/6に低下していたとみることができ、この白血球の機能低下が *E. tarda* に対するウナギの感受性の増大をもたらした一要因と考えられる。一方、*V. anguillarum* に対する顆粒球の食菌能には銅処理の影響はほとんど見られず、そのため銅処理しても *V. anguillarum* に対する感受性が変化しなかった(前報)ものと判断される。

ストレスの2次反応である免疫応答に対する影響については、ゼブラフィッシュにおける垂鉛(SAROT and PERLMUTTER, 1976)やギンザケにおけるクロム(SUGATT, 1980)で抗体産生の抑制作用が報告されている。しかし、本実験では銅処理によって白血球数の増加は抑えられるものの、抗体産生にはほとんど影響が見られなかった。

以上の結果を総合すると、致死濃度以下の銅液 (250 $\mu\text{g-Cu/l}$) に 24 時間浸漬したウナギにみられた *E. tarda* に対する感受性の増大は、主として同菌に対する血中白血球の食菌作用の低下によるものであろうと判断された。

文 献

- DONALDSON, E. M. and H. M. DYE (1975): Corticosteroid concentrations in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) exposed to low concentrations of copper. *J. Fish. Res. Board Can.*, **32**, 533-539.
- MUSHIAKE, K., K. MUROGA and T. NAKAI (1984): Increased susceptibility of Japanese eel (*Anguilla japonica*) to *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas anguilliseptica* following exposure to copper. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 1797-1801.
- PICKERING, A. D. (1981): Introduction: the concept of biological stress, in "Stress and Fish", ed. by A. D. PICKERING, 367 p, Academic Press, London, 1-9.
- SAROT, D. A. and A. PERLMUTTER (1976): The toxicity of zinc to the immune response of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, injected with viral and bacterial antigens. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **105**, 456-459.
- SCHRECK, C. B. and H. W. LORZ (1978): Stress response of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) elicited by cadmium and copper and potential use of cortisol as an indicator of stress., *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 1124-1129.
- SUGATT, R. H. (1980): Effects of sodium dichromate exposure on the immune response of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, against *Vibrio anguillarum*., *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, **9**, 207-216.
- 結城了吾 (1963): 魚類の血液細胞に関する諸問題, 特にその顕微鏡的検査の吟味, シンポジウム「魚類血液学の水産への応用」, 日水誌, **29**, 1098-1103.