

## *Streptococcus iniae* のホルマリン死菌で免疫したヒラメの 感染防御メカニズムに関する研究

角田 紀子<sup>\*1</sup>, 金井 欣也<sup>\*1</sup>, 塚原淳一郎<sup>\*2</sup>,  
一ノ瀬弘幸<sup>\*3</sup>, 佐々木英治<sup>\*4</sup>

### Defense mechanism of Japanese flounder immunized with formalin-killed cells of *Streptococcus iniae*

Noriko KAKUTA<sup>\*1</sup>, Kinya KANAI<sup>\*1</sup>, Junichiro TSUKAHARA<sup>\*2</sup>,  
Hiroyuki ICHINOSE<sup>\*3</sup> and Hideharu SASAKI<sup>\*4</sup>

To study the defense mechanism of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* immunized with formalin-killed cells of *Streptococcus iniae*, changes in viable count of intravenously inoculated live cells of *S. iniae* were investigated. The majority of the bacterial cells were trapped in the kidney and spleen of both immunized and non-immunized flounder within 10 min post-inoculation (pi). Then the viable counts in these organs of immunized fish increased by 24 h pi and thereafter decreased to the detection limit at 96 h pi. On the other hand, those of non-immunized fish increased to the lethal level at 48 h pi. Viable counts of inoculated *S. iniae* in the organs of normal flounder preinjected with sera of immunized fish collected at 2 day pi of live bacteria decreased, suggesting the appearance of macrophage-activating factor(s) in the sera. Partial purification of the factor suggested the multiplicity of the factor, and one of the most active components was a high molecular weight substance exhibiting bacterial agglutination.

**Key Words:** *Streptococcus iniae*, ヒラメ Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*,  
ホルマリン死菌 formalin-killed cell, macrophage, 生体防御機構 defense mechanism

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* のレンサ球菌症は1981年にその発生が報告されて以来、わが国のヒラメ養殖における重要な疾病の1つにあげられている。<sup>1)</sup> 本症の治療にはテトラサイクリン系抗生物質が用いられているが、<sup>2)</sup> 魚体への薬の残留や耐性菌の発生などが問題となるため薬剤治療に依存しない予防方法の確立が望まれる。魚類の特異的生体防御機構を利用した予防方法の1つとしてワクチネーションがある。わが国で現在製造承認され市販されている水産用ワクチンは、アユのピブリオ病ワクチン、サケ科魚類のピブリオ病ワクチン、ブリの溶血性レンサ球菌症ワクチン、イリドウイルス感染症ワクチン、ブリの溶血性レンサ球菌症とピブリオ病の混合ワクチン、ブリ属魚類のイリドウイルス感染症と溶血性レンサ球菌症の混合ワクチンの6種類である。<sup>3)</sup> ヒラメのレンサ球菌症ワクチンは未だ実用化されておらず、早急なワクチン開発が望まれる。

加藤<sup>4)</sup> は本症の原因菌 *Streptococcus iniae* のホルマリン

死菌 (FKC) をヒラメの腹腔内に接種することにより感染予防効果が認められることを報告している。レンサ球菌類のFKCを投与した魚の免疫防御に関する研究は、楠田ら<sup>5)</sup> が *Enterococcus seriolicida* (= *Lactococcus garvieae*) のFKCについてプリで、Sakai et al.<sup>6)</sup> が溶血性 *Streptococcus* sp. (= *S. iniae*) のFKCについてニジマスで行っているが、ヒラメの *S. iniae* FKCについては研究されていない。

本研究では *S. iniae* のFKC接種によって免疫したヒラメの感染防御メカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、FKCで免疫したヒラメを *S. iniae* で攻撃して魚体内における攻撃菌の消長を調べた。また、攻撃後2日目に採取した免疫魚の血清を正常魚に接種したところ、その感染防御能が高まったことから、感染防御能活性化因子が攻撃後に免疫魚の体内に産生されると考え、活性化因子の部分精製およびその働き

\*1 長崎大学水産学部

\*2 長崎県総合水産試験場

\*3 三鷹製薬株式会社

\*4 財団法人松岡科学研究所

### 材料および方法

#### 供試菌

1983年に長崎県のヒラメ病魚より分離された *S. iniae* NUF44および1992年に熊本県のヒラメ病魚から分離された *S. iniae* NUF631を用いた。両菌株は当研究室で液体窒素を用いて凍結保存されており、使用時に解凍してトッドヒューイット (TH, Difco Laboratories) 寒天に接種し、27 °C で培養した。なお、NUF44は弱毒株でヒラメに対する免疫原性が弱く、NUF631は強毒株で免疫原性を有することが知られている。

#### 供試魚

長崎県西彼杵郡高島町の種苗生産業者より購入したヒラメ稚魚を長崎県総合水産試験場に搬入後、1,000 L パンライト水槽に収容し、ヒラメ用配合飼料 (ドライペレット, ヒガシマル) を与えて流水飼育した。

#### FKCの調製

*S. iniae* NUF44およびNUF631をTHブイオンに接種し、27 °C で24時間振盪培養した。培養後ホルマリン (和光純薬) を0.5%加えて室温で48時間静置して培養菌を不活化した。遠心分離 (10,000rpm, 15min, 4 °C) で集めた不活化菌を滅菌した0.01Mリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.2) で5回遠心洗浄し、湿重量で100mg/mLの濃度で0.02%  $\text{NaN}_3$  加PBSに懸濁し、冷蔵庫で保存した。

#### 凝集抗体価の測定

血清の凝集抗体価は *S. iniae* NUF44またはNUF631のFKCを抗原として96穴U型マイクロプレートを用いてマイクロタイター法によって測定した。

#### 免疫魚における攻撃菌の魚体内消長

PBSで2 mg/mLの濃度に調整した *S. iniae* NUF631のFKCを0.5mL/100 g body weight (B.W.) の割合でヒラメ (116.6 ± 22.5 g) の腹腔内に接種した。非免疫魚にはPBSを同様に注射した。実験区ごとにフィンカットで標識し、1,000 L パンライト水槽1つに収容してドライペレットを与えて2週間流水飼育を行った。免疫期間中の平均水温は27.5 °Cであった。

*S. iniae* NUF631のTH寒天、15時間培養菌を  $2.1 \times 10^5$  colony forming unit (CFU)/mLの濃度でPBSに懸濁した。免疫魚および非免疫魚の尾柄部血管内に0.1mL/100 g B.W. の割合で菌懸濁液を接種し、10分、1, 6, 12, 24, 48, 96時間後に接種魚をそれぞれ3尾ずつ取り上げ、尾部血管から採血後、腎臓、脾臓、肝臓および脳を摘出した。血液は採血後直ちにPBSで10倍希釈し、臓器には9倍量のPBSを加えてホモジナイズした後、それぞれ10倍段階希釈系列を作製し、各希釈液をTH寒天に0.1mL塗抹した。2日間培養後、培地上のコロニーを計数し、血液1 mLまたは臓器1 gあたりの生菌数を求めた。

#### 免疫血清接種魚における攻撃菌の魚体内消長

2 mg/mLに調整した *S. iniae* NUF631のFKCを0.5mL/100 g B.W.の割合でヒラメ20尾に腹腔内接種した (免疫魚)。非免疫魚20尾にはPBSを同様に注射した。パンライト水槽に収容し、ドライペレットを与えて2週間流水飼育を行った。TH寒天で培養後PBSに懸濁した *S. iniae* NUF631培養菌を  $1.4 \times 10^4$  CFU/100 g B.W.の割合で免疫魚および非免疫魚各10尾の尾柄部血管内に接種した。残りの免疫魚および非免疫魚各10尾にはPBSを注射した。接種より48時間後、すべてのヒラメより採血し、室温で2時間静置して凝固させた後、血清を採取した。得られた血清をそれぞれ免疫・攻撃血清、非免疫・攻撃血清、免疫・非攻撃血清および非免疫・非攻撃血清とし、-30 °C で保存した。

4種類の血清をそれぞれブールし、メンブレンフィルター (ポアサイズ0.45 μm, Millipore) でろ過後、0.5mL/100 g B.W.の割合で正常魚 (179.3 ± 22.5 g) の腹腔内に接種した。その24時間後に *S. iniae* NUF631の培養菌を  $1.7 \times 10^4$  CFU/100 g B.W.の割合で尾柄部血管内に接種し、前述と同様の方法で血液および臓器中の生菌数の変化を調べた。

#### 免疫・攻撃血清の接種量の検討

ろ過滅菌し-30 °C に凍結保存されていた免疫・攻撃血清、免疫・非攻撃血清および正常血清をPBSで2, 4, 8, 16および32倍希釈し、0.5mL/100 g B.W.の割合でそれぞれ3尾宛正常魚 (80.6 ± 10.7 g) の腹腔内に接種した。対照としてPBS注射区を設けた。その24時間後に *S. iniae* NUF631の培養菌を  $9.3 \times 10^3$  CFU/100 g B.W.の割合で尾柄部血管内に接種し、前述と同様の方法で血液および腎臓の生菌数の変化を調べた。

#### 免疫・攻撃血清にみられる感染防御能活性化因子の部分精製

免疫・攻撃血清を0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) に透析後、同じ緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel (Amersham Biosciences) カラム (1 × 30cm) に添加し、0 から0.5MまでのNaCl連続濃度勾配をかけて溶出を行った。波長280nmにおける吸光値による溶出曲線をもとに溶出液を5つのフラクション (F 1 ~ 5) に分け、それぞれに80%飽和量の硫酸を加えて塩析した。生じた沈殿を少量のPBSに溶解し、0.02%  $\text{NaN}_3$  加PBSに一晩透析した後、さらにPBSを加えてもとの血清量にあわせた。調製した5つのフラクションをそれぞれ0.5mL/100 g B.W.の割合で正常魚 (166.5 ± 10.9 g) の腹腔内に接種した。同様にPBSを注射したヒラメを対照とした。フラクション接種より24時間後に *S. iniae* NUF631の培養菌を  $9.5 \times 10^3$  CFU/100 g B.W.の割合で尾柄部血管内に接種し、前述と同様の方法で血液および臓器中の生菌数の変化を調べた。実験期間中の平均水温は24.0 °Cであった。

防御能活性化作用がみられたフラクションをPBSで平衡化したSephacryl S-300 (Amersham Biosciences) カラム (2.5 × 90cm) によるゲルろ過で分画した。DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーと同様の方法で3つのフラクション (GF 1 ~ 3) を調製し、各フラクションを0.5mL/100 g B.W.となるように正常魚 (169.1 ± 21.8 g) の腹腔内

に接種し、前述と同様の方法で生菌接種 ( $1.5 \times 10^4$  CFU/100 g B.W.) および生菌数測定を行った。実験期間中の平均水温は21.8 であった。

#### 腎臓マクロファージの細胞内殺菌試験

PBSで2倍希釈した免疫・攻撃血清および正常血清を0.5 mL/100 g B.W.となるように正常魚の腹腔内に接種し、2日後に採血してから腎臓を摘出した。40unit/mLヘパリン(清水製薬)加1.3%NaClダルベッコPBS (NaCl 13 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.9 g, KCl 0.2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g, 超純水1,000mL, DPBS-H)を入れた滅菌プラスチックシャーレの中でピンセットを用いて腎臓を破砕し、パストールピペットを用いて細胞浮遊液を試験管に移した。シャーレに再びDPBS-Hを加えて、同様の操作を数回繰り返した。細胞浮遊液中の組織断片を沈殿させるために氷水中で10分間静置した。沈殿を除いた後、遠心分離 (1,500rpm, 10min, 20 ) で細胞を集め、DPBSに再懸濁した。

容量7 mLのポリカーボネイト製遠沈管に53% Percoll (密度1.075 g/mL, Amersham Biosciences) を5 mL入れ、高速遠心 (15,000rpm, 30min, 20 ) により連続密度勾配を形成させた。これに腎臓細胞浮遊液を重層して遠心分離 (2,000rpm, 60min, 20 ) し、注射器を用いてマクロファージ層を回収した。DPBSを加えて3回遠心洗浄 (1,500rpm, 5 min, 20 ) することによりPercollを除いた。遠心後上清を除去して20%ウシ胎児血清および0.5% NaCl加RPMI 1640培地 (RPMI培地, 日水製薬) を加えて静かにピペティングして混合し、 $\text{CO}_2$ インキュベーター (5%  $\text{CO}_2$ , 25 ) で60分間培養した。

*S. iniae* NUF631のTH寒天15時間培養菌を  $1 \times 10^8$  CFU/mLになるようにPBSに懸濁した。菌懸濁液、使用時に採取したヒラメ血清 (新鮮血清) およびPBSを2:1:1の割合で混合し、30分間静置して菌をオプソニン化した。マクロファージ浮遊液 ( $1 \times 10^7$  cells/mL) にオプソニン化した菌液 ( $5 \times 10^7$  CFU/mL) を1/10量加え (細胞: 菌 = 2:1),  $\text{CO}_2$ インキュベーターで60分間貪食させた。細胞に取り込まれなかった菌を殺菌するためにゲンタマイシン (和光純薬) を50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにマクロファージ浮遊液に加え、 $\text{CO}_2$ インキュベーターで60分間培養した。DPBSを加えて3回遠心洗浄 (1,500rpm, 5 min, 20 ) し、再びRPMI培地を加えて $\text{CO}_2$ インキュベーターで培養した。RPMI培地を加えた時点を0時間とし、0, 12, 24時間後の細胞内生菌数を測定した。

各時間にマクロファージ浮遊液100  $\mu\text{L}$ を滅菌マイクロチューブにとり、氷冷した滅菌蒸留水を900  $\mu\text{L}$ 加えた後10秒間ミキサーで激しく攪拌した。2分間静置した後、10倍階段希釈系列を作製して各希釈液をTH寒天に0.1mL塗抹した。2日間培養後、出現したコロニー数から細胞100個あたりの生菌数を求めた。細胞外の菌を除去するために培養12時間および24時間後の生菌数測定の際には上記のゲンタマイシン処理を行った。

なお、ガラス器具および遠沈管はシリコン (富士システムズ) 処理を施し滅菌したものを使用した。

#### 血液および血漿の殺菌試験

PBSで2倍希釈した免疫・攻撃血清および正常血清を0.5 mL/100 g B.W.の割合で正常魚の腹腔内に接種し、2日後に1/10量のヘパリン溶液 (1,000unit/mL) を入れた注射器を用いて採血した。血液はシリコン処理を施した滅菌試験管に移し、一部を遠心分離 (1,500rpm, 10min) して血漿を採取した。

*S. iniae* NUF631のTH寒天15時間培養菌を  $1 \times 10^3$  CFU/mLになるようにPBSに懸濁し、血液および血漿に1/10量加えて25 で培養した。菌液添加時を0時間とし0, 3, 6, 12時間後に各試験管から血液および血漿を100  $\mu\text{L}$ ずつ取りTH寒天に塗抹した。2日間培養後、出現したコロニー数から血液および血漿1 mLあたりの生菌数を求めた。

## 結 果

#### 免疫魚における攻撃菌の魚体内消長

FKCで免疫後*S. iniae* NUF631の培養菌を血管内接種したヒラメの血液、腎臓および脾臓の生菌数変化をFig. 1 Aに、肝臓および脳が生菌数変化をFig. 1 Bに示した。免疫魚では、攻撃10分後の血液の生菌数が $10^2$  CFU/mLであったのに対し、腎臓および脾臓の生菌数はおよそ $10^4$  CFU/gであり、血液の約100倍であった。腎臓および脾臓の生菌数はその後1時間後まで減少する傾向を示した。1時間から12時間後ま

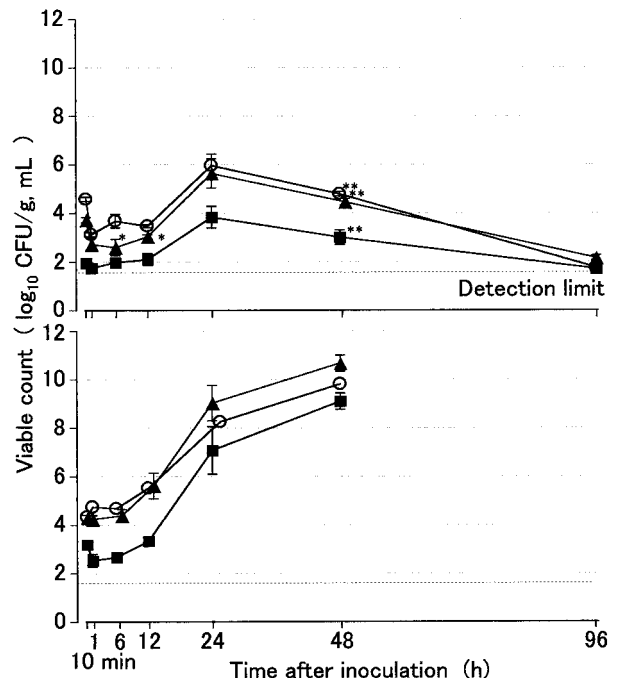


Fig. 1A Changes in viable count of intravenously inoculated *S. iniae* NUF631 in the kidney (○), spleen (□) and blood (△) of Japanese flounder immunized (top) or non-immunized (bottom) with formalin-killed cells (FKC) of NUF631 (n=3). Asterisks indicate significant difference (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ) between immunized and non-immunized fish by Student *t*-test.

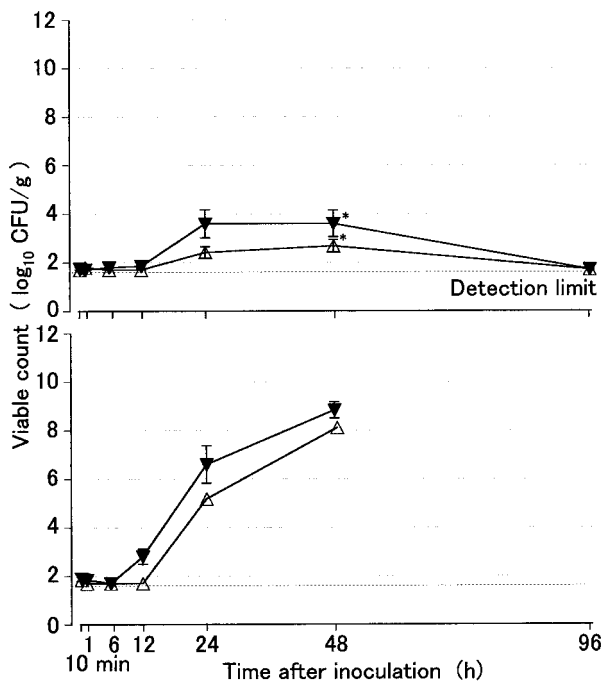


Fig. 1B Changes in viable count of intravenously inoculated *S. iniae* NUF631 in the liver ( ) and brain ( ) of Japanese flounder immunized (top) or non-immunized (bottom) with FK of NUF631 ( $n=3$ ). Asterisks indicate significant difference ( $P<0.01$ ) between immunized and non-immunized fish by Student *t*-test.

では生菌数の大きな変化はみられなかったが, 12時間から24時間後まで一旦増加した後減少し始め, 96時間後には検出限界 ( $5 \times 10$  CFU/g) に達した。免疫魚に死亡はみられなかった。これに対して非免疫魚の腎臓および脾臓においては生菌数の減少はみられず, 12時間後以降生菌数が増加し, 48時間後以降死亡魚が現れ, 96時間後までに全ての供試魚が死亡した。免疫魚および非免疫魚ともに肝臓および脳の生菌数は血液に類似した変化を示した。

#### 免疫血清接種魚における攻撃菌の魚体内消長

免疫血清接種後 *S. iniae* NUF631 の培養菌を血管内接種したヒラメの血液, 腎臓および脾臓の生菌数変化を Fig. 2 に示した。免疫・攻撃 (I-C) 血清接種魚の腎臓および脾臓の生菌数は攻撃後30分から24時間まで  $10^4$  CFU/g 前後を維持し, 24時間後以降減少して48時間後には検出限界近くに達した。血液からは攻撃30分から48時間後までほとんど菌が検出されなかった。これに対し, 残り3種類の血清接種魚の血液および臓器の生菌数は攻撃30分から48時間後まで増加し, 血液で  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL, 臓器で  $10^7 \sim 10^9$  CFU/g となった。

各血清の凝集抗体価を Table 1 に示した。 *S. iniae* NUF631 の FK を抗原として測定した抗体価はいずれも  $1 : < 4$  あるいは  $1 : 4$  であった。NUF44 の FK を抗原とした場合は, 免疫・攻撃 (I-C) 血清および免疫・非攻撃 (I-NC) 血清の抗体価は非免疫魚 (NI-C, NI-NC) の血清に比べてやや高く, プール血清の抗体価は非免疫血清が  $1 : < 4$  であっ

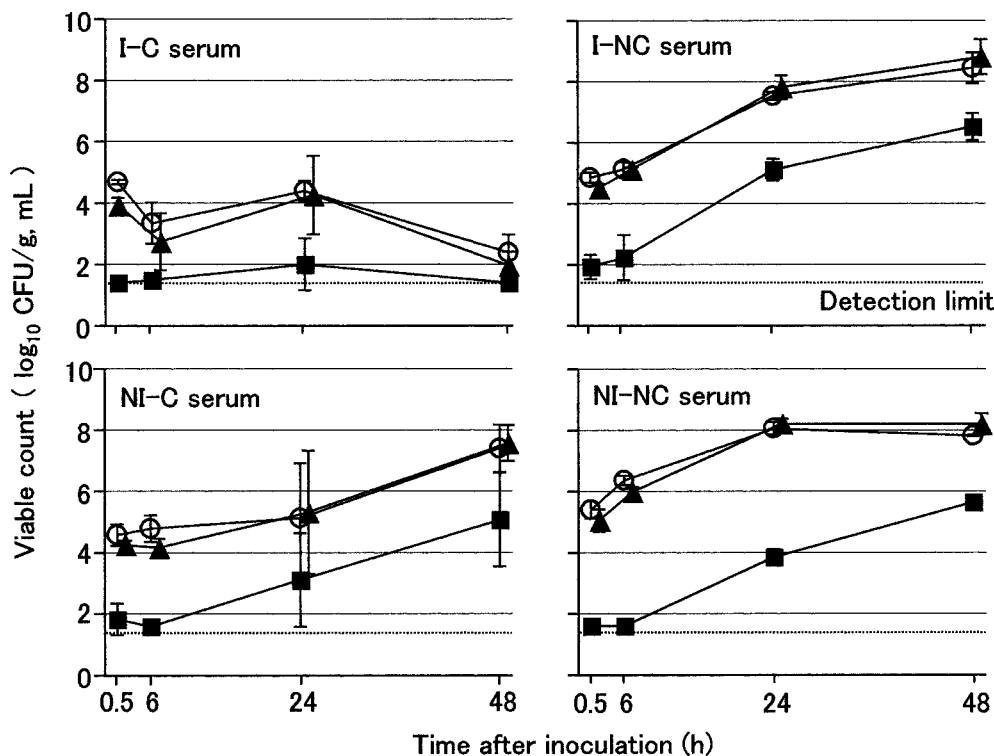


Fig. 2 Changes in viable count of intravenously inoculated *S. iniae* NUF631 in the kidney ( ), spleen ( ) and blood ( ) of Japanese flounder preinjected with immunized and challenged (I-C), immunized but not challenged (I-NC), non-immunized but challenged (NI-C) and non-immunized and not challenged (NI-NC) flounder sera ( $n=3$ ).

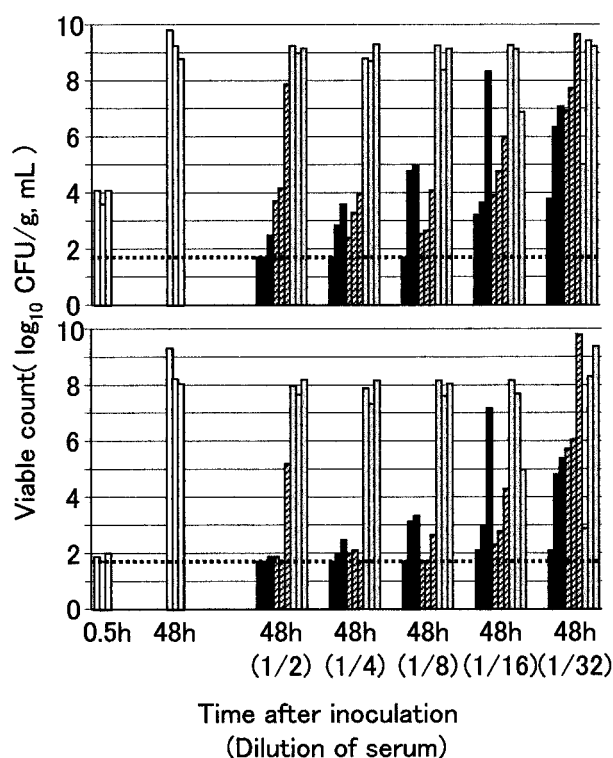
**Table 1.** Agglutinating titers of immunized and challenged (I-C), immunized but not challenged (I-NC), non-immunized but challenged (NI-C) and non-immunized and not challenged (NI-NC) flounder sera

Serum	No.	Antigen	
		NUF 631 FKC	NUF 44 FKC
I-C serum	1	1:<4	1:16
	2	1:4	1:4
	3	1:<4	1:8
	4	1:<4	1:4
	5	1:<4	1:8
	Pool	1:<4	1:8
I-NC serum	1	1:<4	1:4
	2	1:<4	1:128
	3	1:4	1:4
	4	1:<4	1:<4
	5	1:<4	1:4
	Pool	1:<4	1:4
NI-C serum	1	1:4	1:<4
	2	1:<4	1:<4
	3	1:<4	1:<4
	4	1:<4	1:<4
	5	1:<4	1:<4
	Pool	1:<4	1:<4
NI-NC serum	1	1:<4	1:4
	2	1:4	1:4
	3	1:<4	1:4
	4	1:<4	1:4
	5	1:4	1:4
	Pool	1:4	1:<4

たのに対してそれぞれ 1 : 8 および 1 : 4 であった。

免疫・攻撃ヒラメ血清の接種量の検討

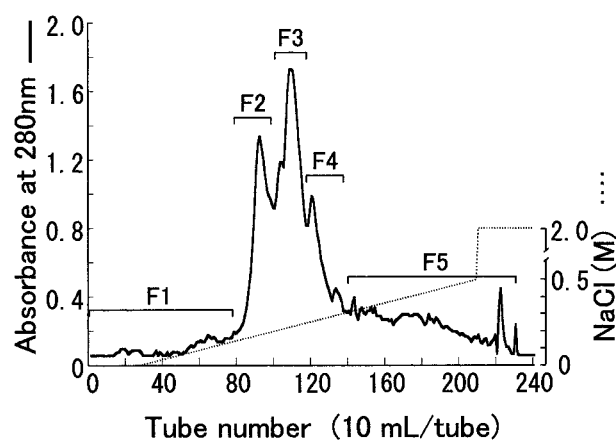
希釈血清を接種後 *S. iniae* NUF631 の培養菌を血管内接種したヒラメの腎臓および血液の生菌数変化を Fig. 3 に示した。PBS 注射区では腎臓の生菌数は攻撃30分後に  $10^4$  CFU/g 検出され、48時間後には  $10^9$  CFU/g まで増加した。正常血清接種魚の腎臓の生菌数は48時間後には全ての希釈段階においてPBS区と同レベルであった。一方、免疫・攻撃血清接種魚の生菌数は2倍希釈血清で  $10^2$  CFU/g と最も低く、個体差があり、また、希釈が増すにしたがって差は小さくなったが、32倍希釈までPBS区に比べて低かった。2倍から8倍希釈免疫・攻撃血清接種魚の腎臓の生菌数は正常血清に比べて有意に低かった ( $P < 0.01$ )。免疫血清接種魚の腎臓の生菌数も16倍希釈までPBS注射区に比べて低かった。48時間後の血液の生菌数は、PBS区および正常血清接種魚では  $10^8$  CFU/mL に達したのに対し、免疫・攻撃血清および免疫血清ではそれよりも低かった。2倍から16倍希釈免疫・攻撃血清接種魚のほとんどが  $10^2$  から  $10^3$  CFU/mL となり、PBS区と比べ有意に低かった。免疫血清接種魚でも2倍および16倍希釈の1尾を除く16倍希釈までの血清接種魚すべてで免疫・攻撃ヒラメ血清と同様に生菌数が少なかった。血液の生菌数についても2倍から8倍希釈免疫・攻撃血清と正常血清の間に有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。



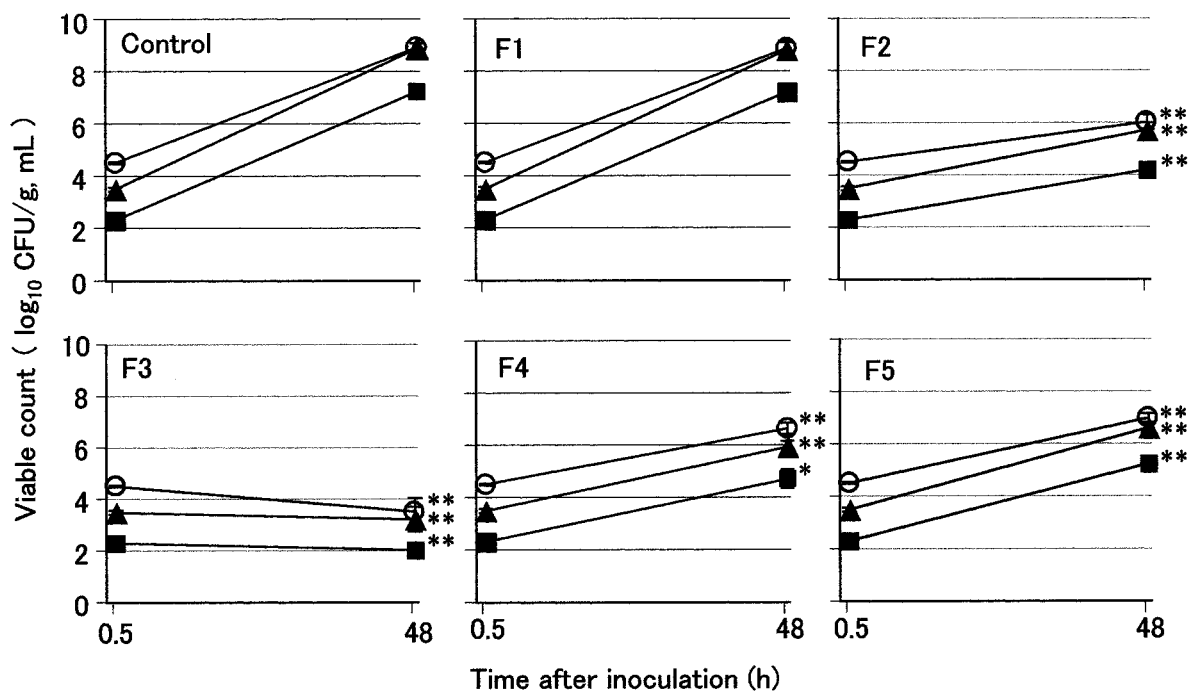
**Fig. 3** Changes in viable count of intravenously inoculated *S. iniae* NUF631 in the kidney (top) and blood (bottom) of Japanese flounder preinjected with diluted immunized and challenged ( ), immunized but not challenged (▨), and non-immunized and not challenged (■) flounder sera and PBS ( ) (n = 3).

免疫・攻撃血清にみられる感染防御能活性化因子の部分精製

免疫・攻撃血清をDEAE-Sephacelイオン交換クロマトグラフィーに供して得られたタンパク質の溶出パターンを Fig. 4 A に、5つのフラクションを正常魚に腹腔内接種し、*S. iniae* NUF

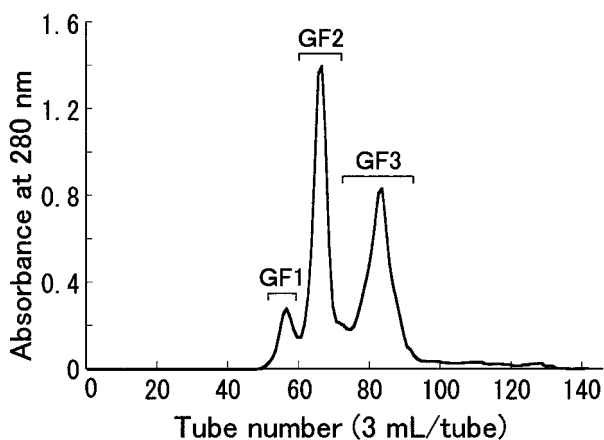


**Fig. 4A** DEAE-Sephacel ion-exchange column (1 × 30cm) chromatography of immunized and challenged flounder serum. Five pooled fractions (F1 to F5) were concentrated by ammonium sulfate precipitation. Buffer: 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0.



**Fig. 4B** Changes in viable count of intravenously inoculated *S. iniae* NUF631 in the kidney (○), spleen (△) and blood (□) of Japanese flounder preinjected with fractions (F1 to F5) obtained in ion-exchange chromatography of immunized and challenged flounder serum (n=3). Asterisks indicate significant difference (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ) between test sample and control by Student *t*-test.

631で攻撃したときの生菌数の測定結果をFig. 4 Bに示した。NaCl濃度0.18, 0.23, 0.25 M付近をピークとする3つのフラクション (F2 ~ 4) およびその前後 (F1およびF5) について調べたところ, F1接種魚の臓器中の生菌数は対照区と同じ $10^9$  CFU/gであったのに対し, その他のフラクションではそれよりも有意に低く, とくにF3接種魚では $10^{3.5}$  CFU/gと最も低かった。このことからF3をSephacryl S-300カラムによるゲルろ過に供し, さらに分画を試みた。その結果3つのピークがみられ, それぞれをプールしてGF1 ~ 3とした (Fig. 5 A)。



**Fig. 5A** Gel filtration of F3 fraction in the ion-exchange chromatography (Fig.4) on a Sephacryl S-300 column (2.5 × 90cm). Three pooled fractions (GF1 to GF3) were concentrated by ammonium sulfate precipitation. Buffer: 0.01 M PBS, pH 7.2.

これらを正常魚に接種し, *S. iniae*で攻撃したときの生菌数変化をFig. 5 Bに示した。すべてのフラクションで対照区よりも生菌数が低かったが, GF1接種魚のみ生菌数の減少がみられた。腎臓および血液の生菌数について, GF1接種魚と対照区との間に有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。

各フラクションの凝集抗体価をTable 2に示した。*S. iniae* NUF44 FKCを抗原とした場合, F2およびF3の抗体価は1:32, GF1の抗体価は1:16となった。その他のフラクションは1:<4であった。NUF631 FKCを抗原とした場合は全てのフラクションで1:<4であった。

**Table 2.** Agglutinating titers of fractions obtained in ion-exchange chromatography (F1-F5) and gel filtration (GF1-GF3)

Fraction	Antigen	
	NUF 631 FKC	NUF 44 FKC
F1	1:<4	1:<4
F2	1:<4	1:32
F3	1:<4	1:32
F4	1:<4	1:<4
F5	1:<4	1:<4
GF1	1:<4	1:16
GF2	1:<4	1:<4
GF3	1:<4	1:<4

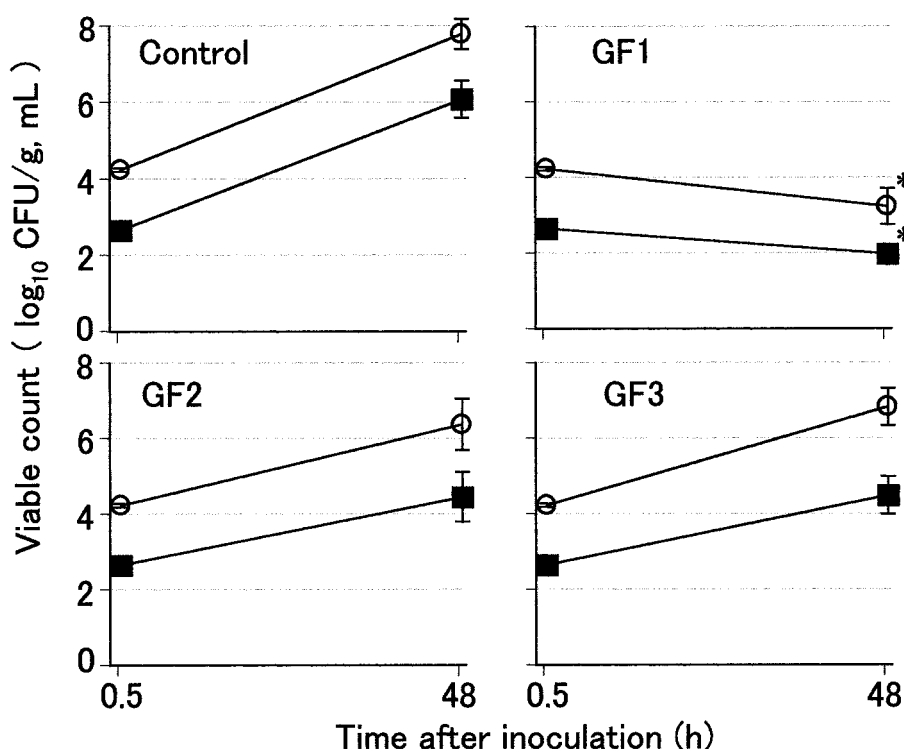


Fig. 5B Changes in viable count of intravenously inoculated *S. iniae* NUF631 in the kidney (○) and blood (■) of Japanese flounder preinjected with fractions (GF1 to GF3) obtained in gel filtration of the F3 fraction (n=3). Asterisks indicate significant difference ( $P < 0.01$ ) between test sample and control by Student *t*-test.

腎臓マクロファージの細胞内殺菌試験

腎臓細胞100個あたりの細胞内生菌数の変化をFig. 6に示した。免疫・攻撃血清接種魚および正常血清接種魚の0時間

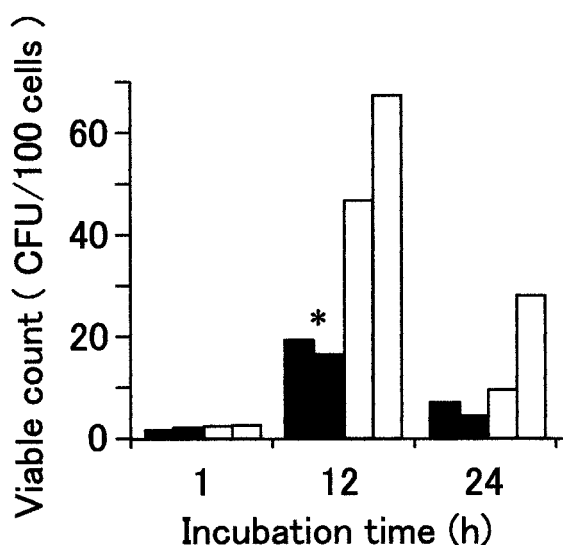


Fig. 6 Changes in viable count of *S. iniae* NUF631 in renal cells obtained from Japanese flounder preinjected with immunized and challenged (■) and normal (□) flounder sera (n=2). Asterisk indicates significant difference ( $P < 0.01$ ) between the test groups by Student *t*-test.

の細胞内取り込み菌数に差はみられなかった。12時間後には両区とも増加したものの、免疫・攻撃血清接種魚の生菌数は正常血清接種魚と比べて有意に低かった ( $P < 0.05$ )。両区とも24時間後には生菌数が減少した。

血液および血漿の殺菌試験

血液および血漿に*S. iniae* NUF631を接種したときの生菌数の変化をFig. 7に示した。免疫・攻撃血清接種魚および正常血清接種魚ともに血液に菌を接種した直後から12時間後まで生菌数が増加した。また0時間から12時間まで両区の生菌数に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。血漿においても同様に生菌数が増加した。血液と血漿の生菌数の間にも差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

考 察

哺乳類においては死菌ワクチンで免疫すると抗体が産生され、その抗体によるオプソニン作用によって食細胞の貪食作用が効率よく行われるようになり、感染防御能が上昇するとされている。<sup>7)</sup> 魚類においても*E. seriolocida*のFKCを接種したブリでは特異抗体が産生され、血清中の抗体および補体のオプソニン作用が感染防御に関与することが示唆されている。<sup>5)</sup> 本研究では*S. iniae*のFKCで免疫したヒラメにおける感染防御メカニズムを知るために、血管内接種した*S. iniae*の血液および主要臓器における生菌数変化を調べ、免疫魚の

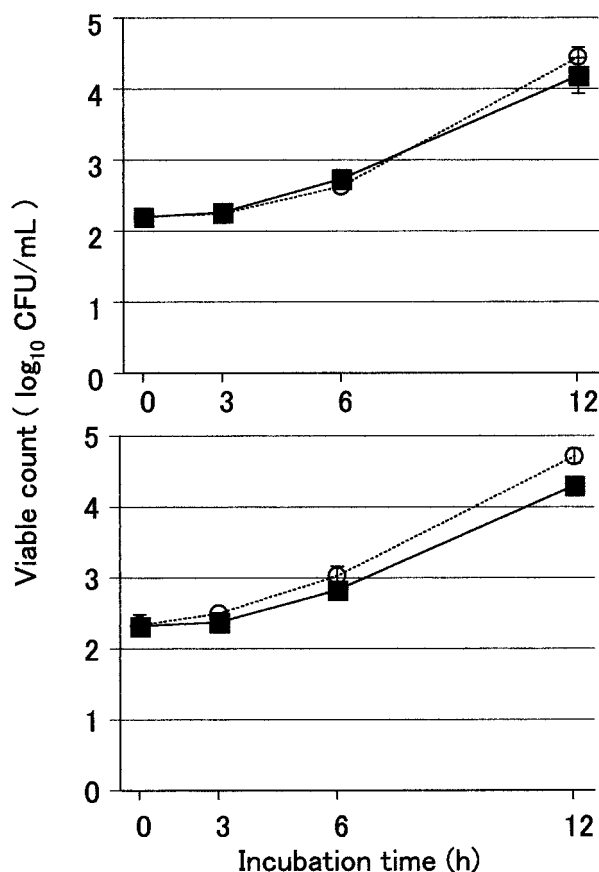


Fig. 7 Changes in viable count of *S. iniae* NUF631 in the blood (top) and plasma (bottom) obtained from Japanese flounder preinjected with immunized and challenged (■) and normal (●) flounder sera.

体内における*S. iniae*の分布および殺菌の経緯を観察した。その結果、攻撃10分後には免疫魚、非免疫魚ともに腎臓および脾臓から高い生菌数が検出され、血液中の*S. iniae*は速やかに腎臓や脾臓に取り込まれると考えられた。Nguyen et al.<sup>8)</sup>は、ヒラメの腎臓や脾臓において*S. iniae*は食細胞に取り込まれた状態で存在していることを組織学的に明らかにしている。その後、免疫魚では攻撃1時間後に腎臓や脾臓の生菌数が一旦減少しており、非免疫魚に比べて食細胞の殺菌活性が高まっていたと考えられた。しかし、生残した菌が24時間後まで増殖した。その時点で血液からも腎臓の100分の1程度の生菌数が検出されているが、これは食細胞が死んだために細胞外に放出された菌または菌を取り込んだ状態で血液中に流れ込んだ食細胞によるものと推察された。<sup>8)</sup> 体内各所の生菌数は24時間後以降著しく減少しており、攻撃が感染防御能を高める刺激となったと考えられた。また、免疫魚では腎臓や脾臓の生菌数が著しく減少したことから、*S. iniae*は感染によってさらに活性化された食細胞によって殺菌されると考えられた。

前述の実験結果から、免疫魚を攻撃することによって感染防御能（とくに食細胞の殺菌活性）を高める何らかの因子が免疫魚の体内に産生されると思われた。そこで、免疫後に生

菌接種したヒラメの血清（免疫・攻撃血清）を正常魚に接種することにより感染防御活性が高まるかどうか検討した。その結果、免疫・攻撃血清接種魚では攻撃48時間後には生菌数が検出限界に達したことから、免疫・攻撃血清中に感染防御能活性化因子が存在すると考えられた。加藤<sup>4)</sup>は*S. iniae* FKcで免疫したヒラメの血清を正常魚に接種することにより受動免疫が成立することから、免疫魚の感染防御に抗体が関与していることを示唆している。しかし、本実験においては免疫のみ行ったヒラメの血清（免疫・非攻撃血清）の接種では攻撃30分から48時間後まで生菌数が増加し続け、感染防御活性が認められなかった。このことから、抗体以外にも何らかの防御因子が関与していることが考えられた。しかし、つぎに行った免疫・攻撃血清の感染防御能活性化作用の強さを調べる実験では、免疫・攻撃血清よりは弱いものの免疫・非攻撃血清接種魚においても活性化作用が認められた。これは、本実験に用いた血清が前実験のものとは異なることから、血清を採取した免疫魚の違いが結果の差となったと思われる。

細胞間の情報を伝達するサイトカインは魚類の生体防御においてもその存在が不可欠であり<sup>9)</sup> ヒラメにおいてもインターロイキン2、インターフェロン および が存在することが報告されている。<sup>10)</sup> また、マクロファージ活性化因子(MAF)はヒト、モルモットおよびマウスなどで広く認められており、魚類においてもニジマス<sup>11)</sup> サケ科魚類<sup>12)</sup>を始め数魚種でその産生が報告されている。本実験において、FKc免疫後生菌接種することによりヒラメの血清中に感染防御能を活性化する因子が産生され、その因子は腎臓や脾臓のマクロファージなど食細胞を活性化していると考えられたことから、本因子はサイトカインの一種ではないかと考えられた。そこで免疫・攻撃ヒラメ血清中にみられる感染防御能活性化因子の部分精製を試みた。免疫・攻撃血清をイオン交換クロマトグラフィーで分画したところ、F3画分が最も強かったが、F1を除くすべての画分で感染防御能活性化作用が認められ、複数の活性化因子の存在が推定された。F3のSephacryl S-300を用いたゲル過分画ではGF1画分に活性化作用がみられ、本因子は分子量が100万近くの高分子であることが予想された。マウスのMAFは分子量2万、2.8万、4.6万、5.5万と多種のものが存在することが知られており<sup>13)</sup> 魚類のMAFもそれと近い分子量であることが予想される。それに比べてGF1画分は非常に高分子量であり、MAFとは異なる物質である可能性が考えられる。また、GF1画分には菌の凝集活性が検出されており、抗体が活性化因子の本体である可能性もある。この点を明らかにするためにさらに活性化因子の精製を進める必要がある。

哺乳類においては好中球やマクロファージによる食菌および殺菌作用が生体防御において重要な役割を果たしているが、魚類においても食細胞の働きは直接的あるいは間接的に生体防御に大きく関わっている。<sup>14)</sup> 楠田ら<sup>5)</sup>は、*E. seriolicida*のFKcで免疫したブリの腹腔内マクロファージには貪食活性はみられるものの殺菌活性はみられなかったと報告している。本研究では、腎臓マクロファージを使って食細胞の殺菌活性を調べたところ、免疫・攻撃血清を接種したヒラメの腎臓マ



クロファージは正常血清を接種したヒラメのもの比べて食菌12時間後の生菌数が有意に低かったことから、マクロファージの殺菌活性が高まっていたと考えられた。なお、培養12時間後の生菌数が1時間後より高かったことや、24時間後には正常血清区においても生菌数の減少がみられたことから、実験方法にやや問題があったと思われる。本実験では*S. iniae*を貪食させる時の条件を25℃で60分間とした。浜口ら<sup>15)</sup>はブリの食細胞に*P. piscicida*を貪食させる場合は、短時間で貪食させるのがよいとした上で、25℃、30分間を最適条件としてあげている。また細胞の培養温度や貪食させるときの温度は供試魚の飼育水温を考慮に入れるべきである<sup>16)</sup>とも言われている。したがって、細胞と菌の比率、貪食時間や細胞外細菌の除去方法など実験方法をさらに検討する必要があると思われる。

前述のように本研究においてはFKC免疫魚の感染防御には腎臓や脾臓の食細胞が関与していると考えられ、主に臓器中でその殺菌が行われていると推定した。しかし、*E. seriolicida*のFKCを接種したブリの血清には殺菌活性がみられるとされており、*E. seriolicida*に対する感染防御に抗体や補体など血液中の液性因子が関与していると考えられている。<sup>5)</sup>一方、*S. iniae*のFKCを接種したニジマスでは血清の殺菌活性は認められず、免疫魚の感染防御に血清の殺菌活性は関与しないと報告されている。<sup>6)</sup>本研究では免疫・攻撃血清を接種したヒラメについて調べたが、血液および血漿中で*S. iniae*の生菌数が増加したことから、血液中の成分は殺菌に関与していないと考えられた。また、血液と血漿の生菌数に差はみられなかったことから、血液中の白血球が*S. iniae*の殺菌に関与することもほとんどないと思われた。

以上のことから、*S. iniae*のFKCで免疫したヒラメでは、*S. iniae*の感染によって腎臓や脾臓の食細胞（おそらくマクロファージ）の殺菌活性が上昇し、感染菌の細胞内殺菌が行われて感染防御されると考えられ、食細胞の活性化には免疫・攻撃血清中の液性因子が関与すると推定された。今後は食細胞の活性化機構の解明が必要と思われる。なお、前述のように特異抗体が食細胞の活性化因子として働く可能性があるが、サイトカイン等他の液性因子の関わりも調べる必要があろう。

## 文 献

- 1) 中津川俊雄：養殖ヒラメの連鎖球菌症について。魚病研究, 17, 281-285 (1983).
- 2) 金井欣也：海産魚の細菌病。「魚病学概論」(室賀清邦, 江草周三編). 恒星社厚生閣, 東京. 58-63 (1998).
- 3) 若林久嗣：魚類の感染症 - 我が国の現状と課題 -. 日水誌, 68, 815-824 (2002).
- 4) 加藤達夫, 金井欣也: 血清タイプの異なる*Streptococcus iniae*で作製したヒラメレンサ球菌ワクチンの有効性の差異. 平成12年度日本魚病学会春季大会講演要旨集 (2000).
- 5) 楠田理一, 佐藤洋大, 川合研児, 二宮 学: *Enterococcus seriolicida*ホルマリン不活化菌体の投与がブリの生体防御系に与える影響. 日水誌, 62, 780-784 (1996).
- 6) M. Sakai, S. Atsuta and M. Kobayashi: Protective immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated with  $\alpha$ -haemolytic streptococcal bacterin. Fish Pathol., 24, 169-173 (1989).
- 7) 喜多英二: *Salmonella*の免疫とワクチン. 日細誌, 47, 599-606 (1992).
- 8) H.T. Nguyen, K. Kanai and K. Yoshikoshi: Immunohistochemical examination of experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol., 36, 169-178 (2001).
- 9) 飯田貴次: 魚類の生体防御。「魚病学概論」(室賀清邦, 江草周三編). 恒星社厚生閣, 東京. 9-20 (1998).
- 10) 中西照幸: 魚類の感染防御とサイトカイン. 化学と生物, 35, 471-473 (1997).
- 11) S. Graham and C.J. Secombes: The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. Immunol., 65, 293-297 (1988).
- 12) C.H. Francis and A.E. Ellis: Production of a lymphokine (macrophage activating factor) by salmon (*Salmo salar*) leucocytes stimulated with outer membrane protein antigens of *Aeromonas salmonicida*. Fish Shell. Immunol., 4, 489-497 (1994).
- 13) 鎌形有祐, 岡 光夫, 内山竹彦, 吉岡守正, 藤川 浩, 五十嵐英夫: Toxic-shock-syndrome toxin-1 (TSST-1) によるマウス脾臓細胞からのマクロファージ活性化因子の産生. 感染症学雑誌, 61, 907-913 (1987).
- 14) 楠田理一, 田中卓史: *Streptococcus* sp. に対するブリマクロファージの食菌作用に及ぼす抗体および補体のオプソニン効果. 日水誌, 54, 2065-2069 (1988).
- 15) 浜口昌巳, 村岡愛一郎, 田中卓史, 楠田理一: ブリ貪食細胞の*Pasteurella piscicida*に対する細胞内殺菌能測定法の検討. 日水誌, 55, 971-977 (1989).
- 16) C.J. Secombes: Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. van Muiswinkel (eds), Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, New Jersey, 137-154 (1990).

