養殖ハマチの類結節症に対する受動免疫について

福田 穰*・楠田 理一*

(昭和 56 年 4 月 20 日受理)

Passive Immunization of Cultured Yellowtail against Pseudotuberculosis

Yutaka FUKUDA* and Riichi KUSUDA*

*Fish Dis. Lab., Fac. Agric., Kochi University, Nankoku, Kochi, Japan

(Received April 20, 1981)

In this study, the possibility of using passive immunization with rabbit immunoglobulin (RIg) as a preventive measure and a medical treatment for pseudotuberculosis in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, was investigated.

Yellowtail were passively immunized with RIg prepared from anti-*Pasteurella piscicida* rabbit serum by intraperitoneal injection. The absorption of RIg into serum and skin mucus after immunization were examined. The artificial challenges with virulent *P. piscicida* were carried out 6, 12, 24 hours before and 1, 12, 24 hours after immunization. The efficacy of passive immunization from the results was studied.

In immunized fish, agglutinating antibody titers in sera increased rapidly and the highest mean titer of 1:42 was obtained 3 hours after immunization. Maximum concentration of RIg in serum was detected 12 hours after immunization. However, no RIg was detected in serum after 24 hours post-immunization, and neither in all of skin mucus samples. Survival ratios for 8 days after challenge of fish immunized passively were not less than 70% in comparison with 0% survival in the control. On the contrary, survival ratios for 8 days after passive immunization of challenged fish were not more than 30%. It is concluded that passive immunization of yellowtail against pseudotuberculosis with RIg is highly effective for at least 24 hours after immunization.

受動免疫とは他動物の獲得した免疫能力が生体に与えられることで、自然および人為受動免疫に分類することができる。前者については、ほ乳類で母親が獲得した免疫能力、すなわち、各種の感染症に対する抗体が胎盤を通して胎児へと移行することや産後に与えられる母乳中にも抗体が含まれていることが知られている。また、鳥類で卵を経て母鳥の抗体が幼鳥に移行することも知られている。後者についてはおもに、免疫療法と同義的に使用されることが多い。しかし、免疫療法の内容は比較的広範にわたり、多種類の治療法が試みられている。すなわち、免疫グロブリンによる受動免疫のほかに、インターフェロン、リンパ球の輸注あるいは胸腺の移植などが行なわれている。本研究では狭義の人為受動免疫、すなわち、免疫グロブリンの移入による受動免疫について検討した。

受動免疫を行なう場合の重要な問題は被免疫動物のア

レルギー反応である。このことを考慮すると、使用する抗血清あるいは特異的免疫グロブリンは同種由来のものが最適であることはいうまでもない。しかし、高度に免疫されたハマチ抗血清を大量に得ることは困難であることと、ハマチ免疫グロブリンの精製法が確立されていないことから、同種抗血清による受動免疫は実験的に可能であっても、実用性はない。ここでは実用性を考慮して、十分な使用量を得ることができるほ乳類の抗血清を用いた受動免疫の可能性を検討するために、実験室内で容易に飼育管理ができ、かつ、比較的少量の血清が得られるウサギを用いて研究を進めた。

一般に、受動免疫は短期間でその効力を失うことが知られており、特に異種動物の抗体を用いた場合には、被免疫生体の拒否反応によって急速に、抗体の不活化および排除が進むであろう。本研究ではウサギ免疫グロブリンをハマチの腹腔内に接種して、その体液中への吸収、抗体活性の持続性およびハマチに対する毒性について検討した。また、攻撃試験によって受動免疫の効果を明ら

* 高知大学農学部水族病理学講座

かにした。

材料および方法

抗 *Pasteurella piscicida* ウサギ血清の作製 免疫抗原には 1979 年 6 月に高知県土佐市のハマチ病魚腎臓から分離された *P. piscicida* U-3 株を用いた。2.0% 食塩加ブレインハートインフュージョン寒天培地(栄研)で 25°C, 48 時間培養したのち、0.5% のホルマリンを含む生理食塩水に懸濁し、37°C で 48 時間不活化した。これを皮内接種してウサギを免疫し、抗血清を得た。抗血清は 56°C, 30 分間非動化したのちに使用した。

ウサギ免疫グロブリン (RIg) の調製 上記のウサギ抗血清から 33% 飽和硫酸塩析によって得られた分画を RIg とした。回収した RIg はリン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) に溶解したのち、同緩衝液に 4°C, 一夜透析して硫酸を除去し、これを受動免疫用 RIg とした。また、同様の方法で正常ウサギ血清から RIg を分画して、0.0175 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.3) で平衡化した DEAE-Cellulose (SIGMA) カラムに吸着されない分画を抗 RIg 血清作製用免疫抗原とした。

タンパク質の定量 ビューレット法 (GORNALL ら, 1949) を用いて行なった。

抗 RIg ニワトリ血清の作製 免疫抗原溶液に対して等量の FREUND's incomplete adjuvant (Difco) を常法により混合して、1 回につき 0.25 ml をニワトリ大腿部筋肉内に 2 週間おきに 3 回接種した。免疫終了 10 日後にためし採血を行ない、免疫電気泳動で沈降線を確認したのち、心臓穿刺により全採血を行ない、抗血清を得た。

受動免疫 平均体重約 30g のハマチに RIg 溶液 (72 mg protein/ml, U-3 株に対する凝集抗体価 1:8,192) を 0.1ml/尾の割合で腹腔内接種して免疫区とした。RIg の吸収と残存の測定では滅菌生理食塩水を同様に投与して対照区とした。また、攻撃試験による免疫効果の判定では対照区に無処理魚を用いた。実験魚は屋内の流水式パンライト水槽に収容し、エアレーションを行ないながら生餌を投与して飼育した。なお、実験期間中の水温は 25~26°C であった。

採血および採粘液 福田・楠田 (1981) の方法にしたがって行なった。

凝集抗体価の測定 反応抗原に U-3 株ホルマリン死菌を用いて、マイクロタイター法によって行なった。

RIg の定量 Radial immunodiffusion 法を用いて行なった。リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4, I=0.15) に 2.0% の塩化ナトリウムを添加した溶液 (PB-2%S)

に 2.0% の割合で Bacto-Agar (Difco) を添加して加熱溶解した。この寒天溶液に PB-2%S で希釈したニワトリ抗血清を 56°C の恒温槽中で等量加え、混合してシャーレ 1 枚あたり 5 ml を均一な層に広げ、平板には口径 3 mm の抗原用小孔を相互に 14 mm 離して作製した。抗原用小孔に試料および標準抗原 (受動免疫用 RIg) の希釈系をそれぞれ 20 μ l 注入したのち、湿潤箱中に収納して、37°C の恒温下で 48 時間反応させ、沈降輪の直径を測定した。

攻撃試験 福田・楠田 (1981) の方法にしたがって行なった。

結 果

RIg の吸収と残存 供試魚は RIg 投与後 1 日目で摂餌を開始した。また、遊泳状態も正常であり、斃死魚

(a)

(b)

図 1. 受動免疫後のハマチ血清中における凝集抗体価 (a) およびウサギ免疫グロブリン濃度 (b) の変化

Fig. 1. Changes of agglutinating antibody titer (a) and rabbit Ig concentration (b) in yellowtail serum after passive immunization with rabbit Ig. P, pre-immunization.

図 2. 受動免疫 12 (●), 24 (△) および 24 (▲) 時間後に生菌攻撃を行なった場合の生残率の変化。○, 対照区

Fig. 2. Changes of survival rate after challenge of fish immunized passively. Fish were challenged with virulent *Pasteurella piscicida* 1 (●), 12 (△) and 24 (▲) hours after immunization. ○, control.

図 3. 生菌攻撃 6 (●), 12 (△) および 24 (▲) 時間後に受動免疫を行なった場合の生残率の変化。○, 対照区

Fig. 3. Changes of survival rate after passive immunization of fish challenged with virulent *P. piscicida*. Fish were immunized passively 6 (●), 12 (△) and 24 (▲) hours after challenge. ○, control.

もなく、ハマチに対する RIg の毒性は認められなかった。

受動免疫後のハマチ血清中の U-3 株に対する凝集抗体価の変化を Fig. 1a 示す。血清中の抗体価の平均値は RIg 投与 3 時間後に 1:42 となり最大値を示したが、48 時間後には 1:4 以下となった。これに対して、対照区

ではすべての供試血清が 1:4 以下であった。また、体表粘液中の抗体価はすべて 1:4 未満であった。

受動免疫後のハマチ血清中の RIg 濃度の変化を Fig. 1b に示す。血清中の RIg 濃度の平均値は RIg 投与 6 時間後に 1.20 mg protein/ml となり最大値を示したが、24 時間後には検出されなくなった。対照区供試血清および全供試体表粘液から RIg は検出されなかった。

受動免疫の効果 受動免疫 1, 12 および 24 時間後に経口的に生菌攻撃したときの生残率の変化を Fig. 2 に示す。免疫区ではいずれも 70% 以上の高い最終生残率を示した。これに対して、対照区では攻撃 7 日後で全数が死亡し、生残率は 0% となった。

経口的に生菌攻撃を行ない、6, 12 および 24 時間後に受動免疫した場合の生残率の変化を Fig. 3 に示す。免疫区最終生残率は 10~30% であり、対照区との間に有意な差は認められなかった。

考 察

臨床医学の分野ではウマの抗毒素血清がヒトの破傷風、ジフテリアなどの毒素性疾患の治療に用いられてきた。現在では、これらの感染症に対してトキソイドによる予防免疫が行なわれているが、一方では標準ヒト免疫グロブリンや特殊高度ヒト免疫グロブリンなどの製剤が開発され、各種の感染症の予防に用いられている。また、最近では静注用乾燥ヒト免疫グロブリンが製剤化されて、治療的な使用も可能になっている (南谷, 1979)。

実験室レベルでは受動免疫が生体内での抗体の分解速度推定法として使用され、免疫グロブリンの代謝が研究されている。GROBERG ら (1979) は放射性同位元素で標識した coho salmon の免疫グロブリンを同種の腹腔内および静脈内に接種して、免疫グロブリン代謝の温度依存性などを検討している。

魚類の即時型過敏反応については、DREYER and KING (1948) がウマ血清と卵アルブミンを抗原として数種の魚に用いた場合のアナフィラキシー反応を観察している。また、FLETCHER and BALDO (1974) は皮膚糸状菌の一種 *Epidermophyton floccosum* の抽出物の皮内接種によって plaice が即時型の紅疹を生じることを報告している。plaice の反応については C-反応性タンパク質 (BALDO and FLETCHER, 1973) の関与が疑われているものの、これら魚類のアレルギー様反応と免疫反応との関係などはまったく知られていない。ハマチにおいてアレルギー反応が存在するかどうかは不明であるが、本実験ではハマチに対する異種動物タンパク質の投与は 1 回

だけであり、理論的にアレルギー反応は生じない。すなわち、本実験では RIg 1 回投与のハマチに対する毒性は認められなかったが、反復投与を行なった場合にショック投与となり、過敏症反応が発現する可能性は十分残されている。このことは魚類感染症に対する防疫方法として受動免疫を応用する場合の重要な問題となるであろう。

受動免疫後の血清中抗体価については HARRELL ら (1975) が rainbow trout に同種から得た抗 *Vibrio anguillarum* 血清を腹腔内接種して、抗体が血清中へ移行するのに要する時間および抗体活性の持続性を検討している。同報告では受動免疫後 10 分で血清中に抗体活性が検出され、抗体価は短時間のうちに急速に上昇し 10 時間後には 1:128 となっている。また、持続性については免疫後抗体価は徐々に低下するが、64 日後においても弱い抗体活性が検出されている。これに対して、本研究の結果から、ハマチを RIg で受動免疫した場合、血清中の抗体活性は免疫後 6 時間以内に最大となり、48 時間以内にはほぼ消失すると考えられる。このように持続時間が短いことは使用した Ig が異種動物由来であることに起因するものと思われる。また、RIg の吸収は抗体価の上昇とほぼ平行するが、血清中の RIg 濃度は抗体価のピークよりやや遅れて 6~24 時間で最高に達する。これらのことから、RIg のもつ凝集抗体活性の不活化が RIg の吸収とほぼ同時に進行していることが推察できる。

以上のことから、受動免疫効果を抗体活性だけで論議すると、即効性はあるが、その持続時間は長くとも 24 時間であると考えられる。受動免疫をハマチ類結節症の予防あるいは治療に応用するならば、侵入した病原体を移入された抗体が短時間のうちに不活化できるかどうか重要な問題となる。

受動免疫の魚類感染症に対する予防的効果については SPENCE ら (1965), AMEND and SMITH (1974) および HARRELL ら (1975) の報告がある。本研究においても *P. piscicida* に対して特異的凝集抗体活性をもつ RIg を投与することによって、ハマチが類結節症に対して抵抗性を獲得することが明らかになった。HARRELL ら (1975) の報告によれば、rainbow trout を同種の抗 *V. anguillarum* 血清で受動免疫した場合の防御効果の持続性は、血清中の凝集抗体活性の持続とほぼ相関関係を示すことが認められているが、抗体活性がかなり消失したのちにおいても、明らかな防御能が維持されている。同様に本研究において、血清中の抗体価が高いレベルで

維持されている期間はもちろん、抗体価の低下した免疫 24 時間後に生菌攻撃を行なった場合にも、高い防御効果が認められた。類結節症の実験的感染症法として、本研究で用いた胃内投与法における攻撃菌の生体組織内への侵入経路あるいは感染成立に要する時間などは推測の域をでないが、若林ら (1977) の報告によれば血流中に菌が検出されるようになるには少なくとも攻撃後 72 時間を要する。以上のことから、本研究における受動免疫の効果が、血中レベルでの防御反応の結果であると考えられるならば、血清中の凝集抗体活性の低下した受動免疫 96 時間後においても防御能は維持されていることになる。しかし、このことが特異的抗体が低レベルでも防御機構において高い機能を果していることを意味しているのかどうかは不明である。また、受動免疫で得られた体液中の抗体が血中でその機能を発揮するだけでなく、分泌されて局所的に働く場合も考えられる。本研究では体表粘液について検討した結果、抗体活性は検出されなかった。しかし、攻撃菌の侵入部位となると考えられる消化管に抗体が分泌されている可能性は否定できない。この場合には受動免疫と防御効果との関係はさらに複雑になるであろう。

受動免疫の魚類感染症に対する治療的効果に関する報告はみあたらない。ヒトの感染症に対する免疫グロブリン療法において、各種の静注用乾燥ヒト免疫グロブリン製剤が開発され、治療に使用されるようになったのもごく最近のことである (南谷, 1979)。本研究では RIg を用いた受動免疫の治療的効果を確認することができなかった。

いずれにしても、受動免疫をハマチ類結節症の予防に用いるためには大量の特異的免疫グロブリンを生体内に投与する必要がある。養殖魚に対して大量の免疫グロブリンを投与することは、技術的問題をぬきにしても、現状では実用性に欠けるものと思われる。しかし、養殖ハマチにおける連鎖球菌症 (楠田ら, 1976) やノカルジア症 (狩谷ら, 1968) のような現在のところ有効な対策法のない感染症について応用できる可能性が残されている。

要 約

特異的ウサギ免疫グロブリン (RIg) を用いて、腹腔内接種によりハマチに受動免疫を行なった場合の血清中の抗体活性は免疫後 6 時間以内に最大となり、48 時間以内にはほぼ消失する。また、ハマチ血清中に吸収された RIg の濃度は免疫後 6~24 時間で最大となり、24 時間

以内に検出限界未満となる。しかし、受動免疫により血流中に吸収された RIg は体表粘液中へ移行しない。同様の免疫法により、ハマチ類結節症の実験的感染に対して高い予防的効果が認められたが、治療的効果は認められなかった。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金によって行なわれたもので記して深謝します。

文 献

- AMEND, D. F. and L. SMITH (1974): Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): early changes in blood and aspects of the immune response after infection of IHN virus. *J. Fish. Res. Board Can.*, **31** (8), 1371-1378.
- BALDO, B. A. and T. C. FLETCHER (1973): C-reactive protein-like precipitins in plaice. *Nature*, **246**, 145-146.
- DREYER, N. B. and J. W. KING (1948): Anaphylaxis in the fish. *J. Immunol.*, **60**, 277-282.
- FLETCHER, T. C. and B. A. BALDO (1974): Immediate hypersensitivity responses in flatfish. *Science*, **185**, 360-361.
- 福田 穰・楠田理一 (1981): 各種投与法による養殖ハマチ類結節症ワクチンの有効性. 日水誌, **47** (2), 147-150.
- GORNALL, A. G., C. J. BARDAWILL and M. M. DAVID (1949): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766.
- GROBERG, W. J., Jr., E. W. VOSS, Jr. and J. L. FRYER (1979): Metabolism of coho salmon Ig: Intraperitoneal absorption properties of coho salmon tetrameric Ig. *Fish Pathol.*, **13** (4), 189-196.
- HARRELL, L. W., H. W. ETLINGER and H. O. HODGINS (1975): Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. I. Serum antibody protection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis. *Aquaculture*, **6**, 211-219.
- 狩谷貞二・窪田三朗・中村恵江・吉良桂子 (1968): 養殖ハマチ・カンパチにおけるノカルジア症について—I. 細菌学的研究. 魚病研究, **3** (1), 16-23.
- 楠田理一・川合研児・豊嶋利雄・小松 功 (1976): 養殖ハマチから分離された *Streptococcus* 属の新魚病細菌について. 日水誌, **42** (12), 1345-1352.
- 南谷幹夫 (1979): 感染症に対する免疫グロブリン療法. 感染症, **9** (6), 233-240.
- SPENCE, K. D., J. L. FRYER and K. S. PILCHER (1965): Active and passive immunization of certain salmonid fishes against *Aeromonas salmonicida*. *Can. J. Microbiol.*, **11** (3), 397-405.
- 若林久嗣・豊田 宏・江草周三 (1977): 胃内投与法による *Pasteurella piscicida* のハマチに対する人為感染について. 魚病研究, **11** (4), 207-211.