細菌薄層を用いた魚類白血球の貪食能の解析

中易千早・舞田正志・岡本信明*・
池田彌生

(東京水産大学資源育成学科)

(1995年6月20日受付)

Analysis of Phagocytosis of Fish Leucocytes Using a Bacterial Thin-layer Method

Chihaya Nakayasu, Masasi Maita,
Nobuaki Okamoto* and
Yayoi Ikeda

Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of
Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

(Received June 20, 1995)

A method for estimating phagocytic activity of leucocytes using a bacterial thin-layer was applied for carp and rainbow trout leucocytes against *Edwardsiella tarda*. Blood was added onto petri dishes of which the bottom was coated with the bacteria. The number and area of plaques formed on the thin-layer were measured as indices of phagocytic activity at 10, 20 and 30°C using a computer program. Phagocytosis of carp leucocytes was most active at 30°C. In rainbow trout, the total plaque area and number of plaques were maximal at 20°C and average plaque area was largest at 30°C.

Key words: bacterial thin-layer, phagocytosis, *Edwardsiella tarda*, leucocyte

白血球の細菌に対する貪食能を判定する方法の一つとして、最近、医学分野で簡便かつ貪食に関する多くの情報を得られる食菌プラーク法が開発された^{1,2)}。本法の特色はシャーレに形成させた細菌薄層に対し全血を直接重層し、白血球の貪食をプラークとして検出できる点にある。本研究は同法の魚類白血球への応用を目的とした。

材料および方法

Edwardsiella tarda (菌株番号 HT-87004; ウナギ由来) を Tryptic soy broth (Difco) で 24 時間振蕩培養したものを用いた。培養した *E. tarda* を遠心分離して回収し、生理食塩水で数回洗浄後、生理食塩水に懸濁させた状態で

60°C, 10 分間静置し、再び遠心後、蒸留水に浮遊させた。この菌浮遊液を吸光度計にて、OD (450nm) = 14.5 (およその菌濃度 8×10^{10} CFU/ml) に調製した。同液の 2 ml を、直径 60 mm の組織培養用プラスチックシャーレ (Nunk, Denmark) 全面にいきたるように加え、細菌をシャーレに接着させるため 1 時間静置した。この後、上清を巴斯ツールピペットで除去し、ドライヤーで乾燥させた (Fig. 1)。コイ *Cyprinus carpio* (飼育水温 20°C) およびニジマス *Oncorhynchus mykiss* (飼育水温 18°C) の尾部血管より、3% ヘパリンナトリウムで処理した注射器を用いて採血し、その 1.5 ml を菌付着シャーレに静かに重層した。30 分間静置した後、巴斯ツールピペットで血液を除去し、淡水魚用リンゲル液を用いて表面を静かに 2 回洗浄した。試験はコイ及びニジマスを各 3 尾用い、10, 20, 30°C の反応温度で行った。試験終了後のシャーレをドライヤーで乾燥させ、メタノール固定

Fig. 1. A schema of the method for estimating phagocytosis on a bacterial thin-layer.

* Author to whom correspondence should be addressed.

後、ギムザ染色を施した。白血球の貪食能により形成された食菌プラーク像を顕微鏡下で 100 倍に拡大し、白黒画像処理プログラム (RIPP2, ライズ社) を用いて細菌薄層部分とプラーク部分の色の濃淡を基準としてプラーク部分の面積を測定した。結果は 10 視野中のプラーク数, 1 個当たりのプラーク面積および全プラークのトータル面積で示した。

結果および考察

標本を顕微鏡下で観察すると, Fig. 2 に示したように空白域が観察され (矢印; 食菌プラーク), その周辺には細菌を取り込んだ白血球が観察された。白血球を除いた血液ではプラークは観察されなかった。コイとニジマスそれぞれの供試魚が示した各反応温度での貪食能は種内では同じ傾向を示した。コイにおけるプラーク数, 平均プラーク面積および全プラークのトータル面積はいずれも 10°C で最も小さく, 30°C で最も大きかった (Table 1)。ニジマスではプラーク数およびトータル面積は 20°C で最大であったが, 平均プラーク面積は 20°C ではなく 30°C で最大値を示した。ニジマスにおいて全プラークのトータル面積が 20°C で最大であった理由は, 個々の白血球の貪食能が 20°C で特に高かったからではなく, 貪食に関わった白血球数が 20°C で多かったことによっている。この結果は反応温度の違いにより貪食に関わる細胞集団が異なるか, あるいは同一集団と仮定し

Fig. 2. Plaques obtained from the bacterial thin-layer method. White and black arrows show a plaque and a carp leucocyte, respectively. Scale: 40 μ m.

Table 1. Total plaque area, number of plaques and each plaque area at three incubation temperatures

	Temperature ($^{\circ}$ C)		
	10	20	30
Carp			
Total plaque area (μ m ²)	1014*	5509	37873
Number of plaques	13	46	225
Area of a plaque (μ m ²)	78	120	168
Rainbow trout			
Total plaque area (μ m ²)	601	16619	5880
Number of plaques	9	218	59
Area of a plaque (μ m ²)	67	76	100

*Data from a representative fish. Ten fields from each plate were examined with light microscopy at 100 $\times$. Plaque numbers and the area were calculated using a RIPP2 computer.

ても温度により貪食能力を異にする細胞群が存在する可能性を示唆している。

本食菌プラーク法は, アクリジン-オレンジ法³⁾のように白血球の殺菌能を直接測定できないが, 白黒画像処理プログラムと組み合わせることにより, 白血球を分離することなく血液中の貪食能が定量でき, さらにプラーク数とプラーク 1 個当たりの面積から, 貪食に関わった白血球数や個々の白血球の貪食能力も素早く測定することができるので, 水産分野での応用価値が高いと考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり, *Edwardsiella tarda* を分与いただいた徳島県水産試験場の沢田健蔵氏ならびに有益な助言を賜った慈恵医科大学の関 啓子先生に深謝する。本研究の一部は富士製粉株式会社の奨学寄付金によって行われた。

文 献

- 1) Seki, K., M. Murai, A. Shirahige, N. Kobayashi, S. Hawang and S. Masuda (1989): *Microbiol. Immunol.*, **33**, 81-85.
- 2) 関 啓子・小笠原正美・荒井美子・前田敏朗・大橋俊子・都志見格・松永貞一・益田昭吾 (1990): *臨床検査*, **34**, 1665-1668.
- 3) 飯田貴次・三浦 薫・若林久嗣・小林正典 (1993): *魚病研究*, **28**, 49-50.