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^{*1}

楠 田 理 一, 田 中 卓 史

(1988 年 5 月 30 日受付)

Opsonic Effect of Antibody and Complement on Phagocytosis of *Streptococcus* sp. by Macrophage-like Cells of Yellowtail

Riichi Kusuda^{*2} and Takushi Tanaka^{*2}

In order to know the defense mechanism of yellowtail *Seriola quinqueradiata* against *Streptococcus* sp. infection, phagocytic response of glass adherent macrophage-like cells isolated from normal fish was examined after one hour incubation at 25°C. Phagocytosis was observed in Giemsa stained smears under light microscope. Opsonic effects of specific antibody and complement were also investigated.

Specific antibody increased the phagocytic activity and phagocytic index significantly. After addition of complement neither phagocytic activity nor phagocytic index changed significantly. In presence of specific antibody and complement, phagocytic activity and phagocytic index were significantly higher than in the control, and higher than in the previous tests. These results suggest that activation of the classical pathway of yellowtail complement by antigen-antibody reaction is an important function in opsonization of particulate antigen.

は乳類においては好中球、マクロファージなどの食細胞による食菌作用および殺菌作用が、種々の病原微生物の侵入に対する重要な生体防御の役割を果たしていることが知られている。¹⁻³⁾ さらに、食細胞はその膜表面に抗体および補体の Fc および C レセプターをもち、それらを介して食菌作用が促進されるとされている。^{1,2)} 一方、魚類では免疫応答による液性および細胞性免疫の解析が重要視されるようになってきた。なかでも、食細胞による食菌作用はは乳類と同様に、直接的あるいは間接的に生体防御の重要な役割をなしていると考えられるようになってきた。しかしながら、その防御機構に関する報告は少なく、サケ科魚類などを除き詳細な知見は得られていない。

そこで、本研究ではブリ食細胞による生体防御機構を調べる目的で、*Streptococcus* sp. に対する食細胞の食菌作用に及ぼす特異抗体および補体のオプソニン効果について検討した。

材料および方法

供試魚 高知県土佐市宇佐町の養殖業者から購入し

た、体重約 500~650 g のブリ当才魚を用いた。

ホルマリン不活化菌体 (FKC) の作製 *Streptococcus* sp. YT-3 株を用いて常法により作製した。

抗-*Streptococcus* sp. YT-3 ブリ血清の作製 湿菌重量で 10 mg/ml の FKC をブリ腹腔内に、1 週間間隔で 2 回接種を行った。そして、最初の接種より 3 週間後に採血を行って血清を得た。さらに、この血清を 50°C で 20 分間加熱処理を行い非働化し、抗-*Streptococcus* sp. YT-3 ブリ血清とした。

補体源の調整 正常な供試魚から得た血清に FKC を 100 mg/ml となるように加え、4°C で 7 時間反応させて抗体吸収を行った。その後、遠心操作によって FKC を除去して得た血清を補体源として用いた。

希釈用血清の作製 正常な供試魚から得た血清を同様の方法により非働化と抗体吸収を行って得た血清を希釈用血清として用いた。

マクロファージ様細胞の採取 頭腎を含む腎臓を無菌操作により摘出し、80% アルコールで表面殺菌を行い、生理食塩水で洗浄後、2/3 濃度 L-15 培地 (1% NaCl, 25 unit/ml ヘパリンナトリウム, 5% FCS, pH 7.2, Flow

^{*1} 本研究の要約は 1988 年 3 月、日本魚病学会春季大会において発表した。

^{*2} 高知大学農学部水産病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

Lab.) 中でハサミにより細断した。そして、10~15 分間氷中で静置後に、上清を回収した。得られた細胞浮遊液を 0.2% エオジン生理食塩水により計数を行い、生細胞数を 5.0×10^6 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液を 8 穴のチャンバースライド (LAB-TEK) の各穴に 0.3 ml/ずつ入れ、25°C で 1 時間培養後に L-15 培地を用いて 3 回洗浄を繰り返して得たガラス付着細胞を、マクロファージ様細胞とした。

凝集抗体価および補体価の測定 凝集抗体価はマイクロタイター法によって測定した。補体価は高田⁴⁾の方法に準じて代替経路の補体価を測定した。

食食能の測定方法 マクロファージ様細胞に血清を 0.27 ml/well と 5 mg/ml の FKC を 0.03 ml/well 加え、25°C で 1 時間培養したのちに、L-15 培地で 3 回洗浄し、常法によりギムザ染色を行って光学顕微鏡により観察した。

オプソニン効果の測定 オプソニン効果は抗体、補体のそれぞれと抗体補体混合試料について測定した。

抗体のオプソニン効果は抗-*Streptococcus* sp. YT-3 プリ血清を希釈用血清で 0, 2, 4, 8 倍に希釈した系列の食食能を測定して求めた。

補体のオプソニン効果は補体源を希釈用血清で 0, 2, 4, 8 倍に希釈した系列の食食能を測定して求めた。

抗体補体混合試料のオプソニン効果は補体源を同様の方法で 0, 2, 4, 8 倍に希釈した系列に、抗-*Streptococcus* sp. YT-3 プリ血清をそれぞれ一定量加えた系列の食食能を測定して求めた。

なお、それぞれの対照には希釈用血清を用いた。

結 果

各オプソニン効果測定用血清の凝集抗体価および補体価は Table 1, 2 および 3 に示すとおりであった。すなわち、抗体のオプソニン効果測定用血清は 0 倍希釈区で 1:128, 2 倍希釈区で 1:64, 4 倍希釈区で 1:32, 8 倍希釈区で 1:16, 対照区で 1:2 の凝集抗体価を示した。なお、補体は完全に非働化されていた。補体のオプソニン効果測定用血清では、補体価は 0 倍希釈区では 175.4 unit/ml, 2 倍希釈区では 81.3 unit/ml, 4 倍希釈区では 43.3 unit/ml, 8 倍希釈区では 16.7 unit/ml, 対照区では 0 unit/ml を示した。また、凝集抗体価はすべての希釈区で 1:2 以下であった。抗体補体混合試料のオプソニン効果測定用血清の補体価は 0 倍希釈区で 81.3 unit/ml, 2 倍希釈区で 48.3 unit/ml, 4 倍希釈区で 20.3 unit/ml, 8 倍希釈区で 7.7 unit/ml, 対照区で 0 unit/ml を示した。また、凝集抗体価はすべての希釈区で 1:32 であった。

抗体の影響による食食率の変化は Fig. 1 に示すとおりであった。すなわち、0 倍希釈区では $26.9 \pm 3.4\%$, 2

Table 1. Agglutination antibody titer and complement activity of yellowtail sera at different dilutions

Dilution of heat-inactivated serum* ¹	Agglutination titer (1:)	Complement activity (unit/ml)
0	128	0
2	64	0
4	32	0
8	16	0
Control* ²	2	0

*¹ Sera from immunized yellowtail were heated-inactivated.

*² Heat-inactivated and antibody-absorbed sera.

Table 2. Agglutination antibody titer and complement activity of yellowtail sera at different dilutions

Dilution of complement source*	Agglutination titer (1:)	Complement activity (unit/ml)
0	<2	175.4
2	<2	81.3
4	<2	43.3
8	<2	16.7
Control	<2	0

* Sera from normal yellowtail were absorbed with *Streptococcus* sp. formalin killed cell.

Table 3. Agglutination antibody titer and complement activity of yellowtail sera at different dilutions

Dilution of complement source*	Agglutination titer (1:)	Complement activity (unit/ml)
0	32	81.3
2	32	48.3
4	32	20.3
8	32	7.7
Control	32	0

* Sera from normal yellowtail were added certain heat-inactivated antisera after absorbed with *Streptococcus* sp. formalin killed cell.

倍希釈区では $13.4 \pm 1.2\%$, 4 倍希釈区では $9.4 \pm 1.7\%$, 8 倍希釈区では $6.0 \pm 1.5\%$, 対照区では $3.4 \pm 1.0\%$ を示し、食食率は抗体価の高い区ほど高い値を示した。また、細菌の取り込み量については Table 4 に示すとおりであった。すなわち、細菌の取り込み量についても、ほぼ同様の傾向が認められた。しかし、4 倍希釈区と 8 倍希釈区の間には差異は認められなかった。補体の影響による食食率の変化は Fig. 2 に示すとおりであった。すなわち、0 倍希釈区では $5.5 \pm 1.3\%$, 2 倍希釈区では $4.6 \pm 1.6\%$, 4 倍希釈区では $4.4 \pm 2.3\%$, 8 倍希釈区では $4.4 \pm 2.3\%$, 対照区では $3.5 \pm 0.9\%$ となり、食食率は全

Dilution of heat-inactivated serum

Fig. 1. Phagocytic activity of yellowtail macrophage-like cells against *Streptococcus* sp. in presence of sera containing specific antibody at different dilutions.

Table 4. Changes in the number of bacteria phagocytosed by yellowtail macrophage-like cells after addition of diluted heat-inactivated sera

Dilution of heat-inactivated serum	Percentage of Mφ-like cell containing a different number of phagocytosed bacteria*1		
	Number of intracellular bacteria/cell 1-10	11-20	21 ≤
0	46.6 ± 8.5	23.3 ± 2.4	30.2 ± 9.9
2	74.4 ± 20.6	19.0 ± 11.7	6.6 ± 9.3
4	95.7 ± 6.7	4.3 ± 6.4	0
8	93.0 ± 5.6	7.0 ± 5.6	0
Control*2	100	0	0

*1 Number of Mφ-like cells containing certain number of bacteria
 *2 Heat-inactivated and antibody-absorbed sera.

体的に低く、有意な差異は認められなかった。また、細菌の取り込み量については Table 5 に示すとおりであった。すなわち、0 倍希釈区および 4 倍希釈区でわずかではあるが、11~20 個の FKC を取り込んでいる細胞が認められたが、その割合は非常に低く、各希釈区での差異はほとんど認められなかった。

抗体と補体の影響による食食率の変化は Fig. 3 に示すとおりであった。すなわち、0 倍希釈区で 48.7 ± 3.6%，2 倍希釈区で 17.3 ± 2.1%，4 倍希釈区で 9.5 ± 1.1%，8 倍希釈区で 8.3 ± 1.2%，対照区で 6.3 ± 0.7% の食食率を示し、抗体の存在下では補体濃度の高い区ほど、明らかに高い食食率を示した。また、各希釈区における細菌の

Dilution of complement source

Fig. 2. Phagocytic activity of yellowtail macrophage-like cells against *Streptococcus* sp. in presence of sera containing complement at different dilutions.

Table 5. Changes in the number of bacteria phagocytosed by yellowtail macrophage-like cells after addition of diluted complement source

Dilution of complement source	Percentage of Mφ-like cell containing a different number of phagocytosed bacteria		
	Number of intracellular bacteria/cell 1-10	11-20	21 ≤
0	97.2 ± 6.0	2.8 ± 6.0	0
2	100	0	0
4	98.3 ± 3.6	1.7 ± 3.6	0
8	100	0	0
Control	100	0	0

取り込み量については Table 6 に示すとおりであった。すなわち、食食率と同様に補体濃度の高い区ほど多くの FKC を食菌していたが、4 倍希釈区以上の区で差異は認められなかった。

考 察

近年、魚類の免疫についての多くの研究が行われるようになった。なかでも、免疫応答による液性および細胞性免疫の解析が重要視されている。Avtalion and Shahrabani⁹⁾ はコイで、Song and Kou⁹⁾ および Salati ら⁷⁾ はウナギで、Honda ら⁸⁾ はエジマスで、また、Salati ら⁹⁾ はマダイで、免疫後に白血球の食食機能が活性化されるとしている。しかし、食食機能の活性化について詳細に検討されているものは少ない。また、ブリの連鎖球菌症ワクチンの有効性については飯田ら¹⁰⁾ の報告がある

Fig. 3. Phagocytic activity of yellowtail macrophage-like cells against *Streptococcus* sp. in presence of sera containing certain specific antibody and complement at different dilutions.

Table 6. Changes in the number of bacteria phagocytosed by yellowtail macrophage-like cells after addition of certain heat-inactivated immunized sera and diluted complement source

Dilution of complement source	Percentage of Mo-like cell containing a different number of bacteria phagocytosed		
	Number of intracellular bacteria/cell 1-10	11-20	21≤
0	32.7±7.1	17.5±8.2	49.8±12.4
2	80.3±7.0	10.6±1.6	9.1±7.4
4	100	0	0
8	100	0	0
Control	100	0	0

が、防御機構については解明はされていない。本実験において、抗体のオプソニン効果を検討した結果、特異抗体量の増加に伴い貪食率と細菌の取り込み量は高くなることが認められた。Sakai¹¹⁾ はニジマス、ギンザケおよびカラフトマスで、Honda⁸⁾ はニジマスで抗体のオプソニン効果について検討し、特異抗体の存在下ではマクロファージによる貪食率が上昇するとしている。また、Fujii¹²⁾ はヤツメウナギの多形核白血球について、抗体のオプソニン効果の検討を行い、同様の結果を得ている。本実験においても、これらの報告と一致する結果が得られたことから、ブリのマクロファージ様細胞も、サケ科魚類のマクロファージおよび、ヤツメウナギの多形核白血球と同様に、特異抗体によって貪食活性が促進するも

のと考えられる。

補体のオプソニン効果について、Sakai⁷⁾ はニジマス、ギンザケおよびカラフトマスで、Honda⁸⁾ はニジマスで補体のみをオプソニンとして用いた場合には、マクロファージによる貪食率は上昇しなかったとしている。しかし、Oliver¹³⁾ はカワマスの *A. salmonicida* 無毒株に対して検討したところ、貪食率は補体の添加によって上昇したとしている。また、Moritomo¹⁴⁾ はウナギの好中球の正常血清で処理した *E. coli*, *V. anguillarum* および *E. tarda* に対する貪食性について化学発光により測定したところ、無毒株である *E. coli* および *V. anguillarum* に対しては著しく高い活性を示したが、毒性を示す *E. tarda* に対してはその活性は低かったとしている。本実験においては、貪食率および細菌の取り込み量は全体的に低く、有意な差異は認められなかった。これらのことから、貪食活性は補体によって促進すると考えられるが、本実験で用いた *Streptococcus* sp. は高い毒性を持っているために、Sakai¹¹⁾ Honda⁸⁾ および Moritomo¹⁴⁾ と同様の結果が得られたものと思われる。

特異抗体と補体のオプソニン効果を検討した結果、補体量の増加に伴って、貪食率と細菌の取り込み量も高くなることが認められた。さらに、抗体価 1:32 で補体価 81.3 unit/ml の血清における貪食率と細菌の取り込み量は、抗体価 1:128 で補体価 0 unit/ml の血清および抗体価 1:2 以下で補体価 175.4 unit/ml の血清よりも明らかに高い値を示した。しかし、Wrathmell¹⁵⁾ は dogfish およびカレイでは抗体および補体によるオプソニン活性は認められず、これらのマクロファージには Fc および C レセプターが認められなかったとしている。しかし、Griffin¹⁶⁾ Sakai¹¹⁾ および Honda⁸⁾ はニジマスにおいては、特異抗体の存在下で、補体が貪食活性を著しく促進することから、マクロファージの細胞表面上に Fc および C レセプターが存在するのではないかとしている。本実験の結果はこれらの報告と一致し、ブリの場合においてもニジマスと同様に、補体の古典経路の活性化に伴い細菌が貪食細胞上の Fc および C 様のレセプターに結合しやすくなり、貪食能が活性化するのでないかと考えられた。

文 献

- 1) D. J. Drutz and J. Mills: Basic and Clinical Immunology, Lange Medical Publications, Los Altos, 1980, pp. 251-273.
- 2) P. C. Wilkinson: Clin. exp. Immunol., 25, 355-366 (1976).
- 3) D. M. Weir and H. M. Ögmundsdottir: Clin. exp. Immunol., 30, 323-329 (1977).

- 4) 高田明和, 高田由美子: 免疫実験操作法 (日本免疫学会編), **10**, 日本免疫学会, 金沢, 1981, pp. 3361-3370.
- 5) R. R. Avtalion and R. Shahrabani: *Immunology*, **29**, 1181-1187 (1975).
- 6) Y. L. Song and G. H. Kou: *Fish Pathol.*, **15**, 249-255 (1981).
- 7) F. Salati, Y. Ikeda, and R. Kusuda: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 201-204 (1987).
- 8) A. Honda, H. Kodama, M. Moustafa, F. Yamada, and T. Mikami: *Fish Pathol.*, **20**, 395-402 (1985).
- 9) F. Salati, M. Hamaguchi, and R. Kusuda: *Fish Pathol.*, **22**, 93-98 (1987).
- 10) 飯田貴次, 若林久嗣, 江草周三: 魚病研究, **16**, 201-206 (1982).
- 11) D. K. Sakai: *J. Fish Disease*, **7**, 29-38 (1984).
- 12) T. Fujii: *Cell Tissue Res.*, **219**, 41-51 (1981).
- 13) G. Olivier, T. P. T. Evelyn, and Lallier: *Dev. Comp. Immunol.*, **9**, 419-432 (1985).
- 14) T. Moritomo, T. Iida, and H. Wakabayashi: *Fish Pathol.*, **23**, 49-53 (1988).
- 15) A. B. Wrathmell and N. M. Parish: *Phylogeny of Immunological Memory*, Elsevier/North-Holland Biochemical press, Amsterdam, 1980, pp. 143-152.
- 16) B. R. Griffin: *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 253-259 (1983).