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

楠田 理一, 佐藤 洋大, 川合 研児, 二宮 学

(1995 年 11 月 10 日受付)

Increase in Immunobiological Activities of Yellowtail Immunized with Formalin-killed *Enterococcus seriolicida*

Riichi Kusuda,*¹ Hiromasa Sato,*¹ Kenji Kawai,*¹ and Manabu Ninomiya*²

In the present study, immunobiological activities in the serum and phagocytes of yellowtail *Seriola quinqueradiata* immunized with formalin-killed *E. seriolicida* (FKC) by intraperitoneal injection were investigated to elucidate the induced protective mechanisms. Immunized fish showed 66.7% survival, while no survivors were observed in the control group 4 weeks after the challenge. Agglutinating antibody levels, alternative complement pathway activity, antibacterial activity, opsonic activity of serum were also higher in immunized than in non-immunized fish. Phagocytic activity and intracellular bactericidal activity of macrophages did not show differences between the immunized and non-immunized fish.

The results suggest that non-cellular defense activities could be important mechanisms of yellowtail in protection to *E. seriolicida* infection.

キーワード: ブリ, 腸球菌症, *Enterococcus seriolicida*, 生体防御系

ブリ *Seriola quinqueradiata* の腸球菌症は、ブリ養殖場で年間を通じて多発するわが国水産養殖業における重要な疾病の1つである。¹⁾ 本症の治療には、マクロライド系やテトラサイクリン系の抗生物質などの化学療法剤が用いられてきたが、薬剤の多用による多剤耐性菌や、魚体内への残留が問題となっている。これらのことから、化学療法に依存しないワクチンによる予防法の可能性が検討されるようになった。飯田ら²⁾はブリを死菌ワクチンを用いて注射、浸漬および経口法で免疫すると、いずれの投与方法によっても予防効果が認められるとしている。しかしながら、本症に対する不活化ワクチン投与後の液性および細胞性防御因子の活性の変化については、ほとんど検討されていない。

そこで、本研究では不活化ワクチン免疫によるブリの感染防御機構を明らかにする目的で、ブリを *Enterococcus seriolicida* ホルマリン不活化菌体 (FKC) で免疫し、FKC の本症に対する有効性を確認したのちに、免疫に伴うブリの血清および貪食細胞の活性の変化を調べて、FKC の投与がブリの生体防御系に及ぼす影響について検討した。

実験方法

供試魚 高知県土佐市宇佐町の養殖業者から購入した平均体重 87 g のブリを用いた。

飼育方法 供試魚を 0.8 t の流水式 FRP 水槽にそれぞれ 20~25 尾ずつ収容し、エアレーションを行いながら飼育した。餌は 1 日当たり体重の 12% に相当するイカナゴにビタミン剤含有のハマチエード (武田薬品) を混合し、1 日 1 回投与した。なお、実験期間中の水温は 24.0~27.0°C であった。

供試菌株 1983 年に愛媛県宇和島市で養殖されていたブリ病魚の脳から分離した *E. seriolicida* S-2433 株の魚体通過強毒株を用いた。

FKC の作製 *E. seriolicida* S-2433 株を Todd-Hewitt ブイヨン培地 (Difco) に接種して、37°C で 48 時間培養後、暗所で 0.5% ホルマリンを添加して不活化した。その後、遠心により菌体を洗浄してホルマリンを除き、菌体をリン酸緩衝食塩水 (PBS) に懸濁して FKC 浮遊液とした。

免疫方法 免疫は FKC を PBS で 3 回洗浄後、湿菌

*¹ 高知大学農学部水族病理学研究室 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

*² 太陽化学株式会社総合研究所 (Central Research Laboratories, Taiyo Kagaku Co. Ltd., Takaramachi, Yokkaichi, Mie 510, Japan).

重量で 10 mg/ml の濃度に調整したのちに、1 尾当たり 0.1 ml 腹腔内注射して行った。なお、対照魚には免疫処理を行わなかった。

FKC の有効性の検討 FKC の有効性は免疫 4 週間後に実験的感染試験を行って調べた。まず、S-2433 株を Todd-Hewitt ブイヨン培地で 37°C、48 時間培養後、生菌濃度が 2.4×10^7 CFU/ml となるように滅菌 PBS で希釈した。この菌液を免疫区、対照区それぞれ 15 尾の魚の腹腔内に 1 尾当たり 0.1 ml 接種し、その後 10 日間飼育して生残率の変化を調べた。取り上げた死亡魚の腎臓から菌分離を行って、本症による死亡であることを確認した。

血清の採取 免疫 4 週間後に各区 5 尾の供試魚から、心臓穿刺によって採取した血液を、 $4,000 \times g$ で 2 分間遠心して血清を分離し、凝集抗体価、補体価、抗菌活性およびオプソニン効果の測定に用いた。

凝集抗体価の測定 血清の凝集抗体価は、FKC を抗原としてマイクロタイター法によって測定した。

補体価の測定 高田ら³⁾の方法に準じて代替経路の補体価を測定した。

血清の抗菌活性の測定 血清の抗菌活性は飯田・若林⁴⁾の方法によって測定した。

腹腔内浸出細胞 (PEC) の採取 10% プロテオズベプトン (Difco) を魚の腹腔内に 1 ml 接種し、48 時間後に 100 IU/ml のペニシリンと 0.14 mg/ml のストレプトマイシンおよび 10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む Eagle's MEM-10 培地 (A-MEM-10) を用いて PEC を採取した。採取した PEC の細胞数は 4×10^6 cells/ml に調整して以下の実験に用いた。

マクロファージの貪食活性の測定 PEC 浮遊液を、カバースリップ (Nunc) を入れた 24 穴の培養プレート (Delta) に 200 μ l 添加後、25°C で 30 分間培養して、カバースリップに付着した細胞をマクロファージとして実験に用いた。つぎに、100 mg/ml の FKC 浮遊液と非免疫魚の血清を 1 : 4 の割合で混合し、25°C、15 分間放置したのちに、3 回洗浄して 5 mg/ml に調整し、貪食粒子とした。マクロファージが付着したカバースリップに貪食粒子を添加して 25°C で 1 時間貪食させたのち、カバースリップを A-MEM-10 で 5 回洗浄し、エタノールで固定した。そして、常法によるギムザ染色を行ったのちに、光学顕微鏡を用いて観察した。

マクロファージの貪食活性に及ぼす免疫血清のオプソニン効果 免疫魚および対照魚の血清で感作した FKC と非免疫魚のマクロファージを用い、前述と同様の方法で測定した。

マクロファージの細胞内殺菌能の測定 前述の方法で採取した PEC を 50 μ l ずつ 96 穴の培養プレートに添加

し、25°C で 30 分間培養してマクロファージを付着させた。つぎに、*E. seriolocida* の生菌を前述と同様に非免疫魚血清で感作して抗生物質を含まない Eagle's MEM-10 培地 (MEM-10) で洗浄したのちに 2.5×10^7 CFU/ml に調整し、その 50 μ l をマクロファージが付着した上記の培養プレートに添加した。25°C で 30 分間貪食させたのちに、A-MEM-10 を用いてピペティングしながら洗浄し、付着しない細胞と細胞外の生菌を除去した。さらに、MEM-10 で洗浄したのちに、25°C で 0 または 60 分間培養した。マクロファージの破壊は滅菌精製水を等量添加して 15 分間静置して行った。さらに、生菌数の計数は混釈平板法によって行い、60 分間培養後のマクロファージ内生菌数の変化を求めた。

有意差の検定 FKC の有効性については、カイ 2 乗検定によって行った。また、血清の凝集抗体価については、U 検定によって行った。その他の測定値については、Student *t*-検定によって行った。

結 果

FKC の有効性を検討した結果は、Fig. 1 に示すとおりである。免疫区では 7 日後に 1 尾、8 日後に 4 尾したが、その後のへい死は認められなかった。対照区では 2 日後から死亡が始まり、7 日後までにすべて死亡した。10 日後の生残率は免疫区が 67%、対照区が 0% となり、両区の間には危険率 1% 以下で有意差が認められた。

免疫 4 週間後の凝集抗体価および代替経路の補体価は、Table 1 に示すとおりである。免疫魚の抗体価は 1 : 4 未満から 1 : 16 の範囲の値となり、抗体価が上昇する

Fig. 1. Changes in survival rate of immunized and non-immunized fish after bacterial challenge (n=15).

Significantly different from the control ($P < 0.01$).

●, immunized; ○, non-immunized.

傾向が認められた。対照魚ではいずれの個体も検出限界の1:4未満となり、抗体価の上昇は認められなかった。補体価は免疫魚が1,794 unit/ml, 対照魚が626 unit/mlとなり、免疫魚で高かった。凝集抗体価、補体価とも、免疫魚と対照魚の間には危険率5%以下で有意差が認められた。

E. seriolicida に対する血清の抗菌活性は、Fig. 2 に示すとおりである。免疫魚の血清中での生菌数は、添加直後には $10^{5.17}$ CFU/ml, 60 分後には $10^{5.16}$ CFU/ml となり、菌の増殖は抑制された。対照魚の血清中での生菌数は、添加直後には $10^{4.90}$ CFU/ml, 60 分後には $10^{5.61}$ CFU/ml となり、菌の増殖は抑制されなかった。抗菌

活性は、免疫魚と対照魚の間には危険率5%以下で有意差が認められた。

マクロファージの食食活性は、Table 2 に示すとおりである。FKC を食食したマクロファージは免疫魚が25.7%, 対照魚が29.3%となった。食食指数はそれぞれ2.0と2.5となった。マクロファージの食食率、食食指数とも、免疫魚と対照魚の間には差異が認められなかった。

マクロファージの食食生活に及ぼす免疫魚血清のオプソニン効果は、Table 3 に示すとおりである。平均食食率は免疫魚血清を作用させた場合には65.3%, 対照魚血清の場合には26.3%となり、両者の間には危険率1%以下で有意差が認められた。平均食食指数については、それぞれ4.6と2.2となり、危険率1%以下で両者間に有意差が認められた。

マクロファージの細胞内殺菌能は、Fig. 3 に示すとおりである。免疫魚のマクロファージ内の生菌数は培養直前には $10^{3.50}$ CFU/ml であったが、60 分間培養後には $10^{3.37}$ CFU/ml となり、培養直前の70%に低下した。これに対し、対照魚のマクロファージ内の生菌数は、培養直前には $10^{3.34}$ CFU/ml であったが、60 分間培養後には $10^{3.31}$ CFU/ml となり、培養直前の93%となっ

Table 1. Agglutinating antibody titer and alternative complement pathway activity (ACP) of immunized and non-immunized fish sera (n=5)

Serum	Antibody titer (1:)	ACP titer (unit/ml)
Immunized	8* ¹ (<4-16)* ^{2,3}	1,794* ³
Non-immunized	<4 (<4)	626

*¹ Mean value was calculated from fish sera showing titers ≥ 4 .

*² Figures in parentheses show the range of titers.

*³ Significantly different from the control ($P < 0.05$).

Fig. 2. Antibacterial activity immunized and non-immunized fish sera (n=5).

Significantly different from the control ($P < 0.05$).

●, immunized; ○, non-immunized.

Table 2. Phagocytic activity of macrophages collected from immunized and non-immunized fish (n=5)

Phagocyte	Phagocytic rate* ¹	Phagocytic index* ²
Immunized	25.7 ± 1.4* ³	2.0 ± 0.1
Non-immunized	29.3 ± 4.2	2.5 ± 0.3

*¹ Percentage of positive phagocytic cells in 200 macrophages examined.

*² Mean number of bacteria engulfed by the macrophage.

*³ Standard deviation.

Table 3. Opsonic activity of immune and non-immune sera on the phagocytic activity of macrophages collected from normal fish (n=5)

Serum	Phagocytic rate* ¹	Phagocytic index* ²
Immunized	65.3 ± 5.3* ^{3,4}	4.6 ± 0.3* ⁴
Non-immunized	26.3 ± 2.4	2.2 ± 0.1

*¹ Percentage of positive phagocytic cells in 200 macrophages examined.

*² Mean number of bacteria engulfed by the macrophage.

*³ Standard deviation.

*⁴ Significantly different from the control ($P < 0.01$).

Fig. 3. Intracellular bactericidal activity of macrophages from immunized and non-immunized fish (n=5).

Significantly different from the control was not observed ($P>0.05$).

●, immunized; ○, non-immunized.

た。しかし、免疫魚と対照魚との間には有意差が認められなかった。

考 察

ブリを *E. seriolocida* の FKC で免疫し、4 週間後に実験的感染を行って生残率を求めたところ、免疫区の生残率は、対照区より有意に高くなり、有効性が認められた。これまで、FKC の注射免疫は、魚類の連鎖球菌症に対して、顕著な防御効果を有するとされている。^{2,5,6)} 本研究においても、同様の結果が得られた。そこで、FKC の接種がブリの生体防御系に及ぼす影響について検討した。

FKC を接種したブリについて、血清および貪食細胞の生物学的活性を調べたところ、FKC 接種魚は対照魚と比較して、血清の抗体価、補体価、抗菌性およびオプソニン効果の亢進が認められた。これまでは、ワクチンの効果判定に血清中の抗体価が指標として用いられてきた。^{5,7)} しかしながら、抗体価と攻撃試験の結果が一致しないことも報告されており、⁸⁻¹¹⁾ ワクチン投与後の魚では抗体産生以外に、非特異的防御因子が活性化されているものと考えられる。本研究の結果においても、FKC

はブリの特異的および非特異的な液性防御因子の機能を亢進したことから、今後はワクチンの効果判定に当たっては、そのほかの液性および細胞性防御因子への影響も含めて、総括的に検討する必要があると考えられる。

血清の抗菌活性を検討したところ、ブリの免疫血清は *E. seriolocida* に対して静菌的に作用することが認められたことから、FKC で免疫したブリの血液中には、体内に侵入した原因菌の増殖を抑制する機構が備わり、*E. seriolocida* に対する感染防御に関与しているものと思われる。

免疫魚の血清には顕著なオプソニン効果が認められたが、非免疫魚の血清には認められなかった ($P<0.01$)。さらに、免疫魚血清の抗体価および代替経路補体価は、対照魚の血清よりも高い値を示した。血清のオプソニン効果は、血清中の抗体や補体などが抗原に作用して、貪食作用を亢進させるとされている。¹²⁾ また、楠田・田中¹³⁾ はブリでは、血清のオプソニン効果には抗体の役割が重要であるとしている。このことから、免疫魚血清のオプソニン効果の亢進には、FKC の接種によって産生された抗体、および量の増加した補体が関与しているものと考えられる。

貪食細胞の貪食機能の活性化について、Hamaguchi and Kusuda¹⁴⁾ はブリを、*Pasteurella piscicida* の FKC で免疫すると、実験感染に対する FKC の有効性が認められ、貪食細胞の活性が上昇するとしている。しかし、本実験においては、免疫魚のマクロファージの貪食活性および細胞内殺菌能の上昇は認められなかった。これらのことから、ブリの貪食細胞は免疫抗原によって、活性化の機能が異なるものと考えられる。

は乳類においては、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効果によって、貪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。^{15,16)} ブリにおいては免疫機能が十分に解明されてはいないが、ブリにおいてもは乳類に類似した免疫機能を有するものと考えられることから、FKC を接種したブリでは、まず、*E. seriolocida* に対する抗体が産生されるとともに、補体も増加し、攻撃菌が魚体内へ侵入すると、抗体や補体による抗菌およびオプソニン効果が *E. seriolocida* に作用するものと思われる。そして、血液中の液性防御因子によってオプソニン化された *E. seriolocida* は、マクロファージなどの貪食細胞に貪食されやすくなるものと考えられる。

以上のことから、ブリを腸球菌症原因菌 *E. seriolocida* の FKC で免疫すると、ブリの血清中に産生された特異的および非特異的な液性防御因子が働いて、本症の感染からブリを防御するものと考えられる。

文 献

- 1) R. Kusuda and F. Salati: Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **3**, 69-85 (1993).
- 2) 飯田貴次, 若林久嗣, 江草周三: ハマチの連鎖球菌症ワクチンについて. *魚病研究*, **16**, 201-206 (1982).
- 3) 高田明和, 高田由美子: 溶血による補体の Alternative pathway の活性測定. *免疫実験操作法*, **10**, 3361-3370 (1970).
- 4) 飯田貴次, 若林久嗣: 魚類の補体代替経路による殺菌作用. *魚病研究*, **18**, 77-83 (1983).
- 5) 佐古 浩: プリの β 溶血性連鎖球菌症予防ワクチンの有効性. *水産増殖*, **40**, 393-397 (1992).
- 6) M. Sakai, R. Kubota, S. Atsuta, and M. Kobayashi: Vaccination of rainbow trout *Salmo gairdneri* against β -haemolytic streptococcal disease. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1373-1376 (1987).
- 7) 福田 稔, 楠田理一: 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. *日本誌*, **47**, 147-150 (1981).
- 8) 楠田理一, 川合研見, 城 泰彦, 秋月友治, 福永 稔, 小竹子之助: アユのヒブリオ病に対する経口ワクチンの効果について. *日本誌*, **44**, 21-25 (1978).
- 9) F. Salati, K. Kawai, and R. Kusuda: Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol.*, **18**, 135-141 (1983).
- 10) T. Aoki, T. Kitao, M. Fukudome, S. Takahashi, and S. Egusa: Modification of the hyperosmotic infiltration method of vaccination against vibriosis in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel. *J. Fish Dis.*, **7**, 149-156 (1984).
- 11) T. Aoki, M. Sakai, and S. Takahashi: Protective immunity in ayu, *Plecoglossus altivelis*, vaccinated by immersion with *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathol.*, **19**, 181-185 (1984).
- 12) 中川俊郎: 感染防御における抗体の役割. *感染症*, **9**, 29-39 (1979).
- 13) 楠田理一, 田中卓史: *Streptococcus* sp. に対するプ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. *日本誌*, **54**, 2065-2069 (1988).
- 14) M. Hamaguchi and R. Kusuda: The effect of various cultivation periods on the efficacy of formalin killed cell vaccine of *Pasteurella piscicida* in yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1847 (1988).
- 15) 喜多英二: *Salmonella* の免疫とワクチン. *日細誌*, **47**, 599-606 (1992).
- 16) 和合治久: 動物免疫学入門 (和合治久編), 朝倉書店, 東京, 1994, pp. 132-139.