

## ブリの類結節症に対する細胞性免疫機構に関する研究

浜 口 昌 巳

### Studies on Cellular Immune Response of Yellowtail *Seriola quinqueradiata* against Pseudotuberculosis

Masami HAMAGUCHI

Pseudotuberculosis, caused by the bacterium *Pasteurella piscicida*, occurs every year in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, in Japan resulting in great economic losses to marine fish farms. Various drugs have been used to control this disease, but resistant strains of the bacterium have recently appeared. A vaccine using formalin-killed bacterin (FKB) has been developed. However, the efficacy of this vaccine is low and thus its use for yellowtail culture is impractical. The reason for this is that the bacterium is capable of intracellular growth in the phagocytic cells of yellowtail. This suggests that the cellular immune response, consisting of an interaction between lymphocytes and phagocytic cells, may play an important role in controlling this disease. Thus, a killed bacterin vaccine like FKB would not be expected to be effective against such intracellular pathogens because it does not activate the cellular immune response. The aim of the present study was to investigate the cellular immune response of yellowtail in order to develop a practical vaccine against pseudotuberculosis in yellowtail.

Yellowtail lymphocytes were identified by fluorescent antibody techniques, and their reactivity to various mitogenic substances, their distribution in yellowtail and their function in controlling the disease were examined. Two types of lymphocytes were found. One type possessed surface membrane immunoglobulin (smIg) and the cell surface antigens of thymic lymphocytes (CATL). These cells were capable of cap formation at 4°C with an optimum at 18–25°C. Antigen-bound smIg disappeared within 3 to 4.5 hrs at 25°C, and reappeared after 6 to 24 hrs in RPMI 1640 medium without anti-yellowtail immunoglobulin M rabbit IgG. However, it did not reappear in an excess of anti-yellowtail immunoglobulin M rabbit IgG. Cap formation was inhibited by iodoacetamide, sodium azide, dinitrophenol and potassium cyanide. Cap formation did not occur with monovalent antibody. The smIg cells had a mitogenic reactivity against pokeweed mitogen (PWM) and bacterial lipopolysaccharide (LPS). The data show that the smIg cells of yellowtail are similar to mammalian B lymphocytes. The other type of lymphocyte possessed CATL, but no smIg, and showed mitogenic reactivity against concanavarin A (Con A) and phytohemagglutinin (PHA). These lymphocytes did not cross react with mouse Ia antigen. The first type of lymphocyte occurred mainly in the spleen and liver, whereas the second type occurred in the thymus and kidney. In the blood, the first type constituted  $60.5 \pm 8.3\%$  of the lymphocytes, the second type  $36.6 \pm 4.2\%$ . In the kidney, antibody producing cells were mainly observed. Both types of lymphocytes were present in the thymus. However, the different functions of these lymphocytes developed upon maturation after leaving the thymus. The immune response against the bacterium was controlled by these lymphocytes. The first type of lymphocyte was capable of antigen recognition, immunological memory and antibody-production. In vivo tests showed that the second type was very important in reducing mortalities from the disease.

Yellowtail phagocyte cells were prepared and observed, and their killing of the intracellular bacteria was examined. To prepare neutrophils and macrophages that were phagocytic, the changes in number and composition of peritoneal exudate cells (PEC) were followed after injection of yellowtail with *P. piscicida* FKB or proteose-peptone (PP). The increase of PEC after injection of FKB was greater than after injection of PP. Most of the cells in the peritoneal cavity of healthy fish were lymphocytes. After

injection of either of the two substances, neutrophils, eosinophils and basophils appeared first, followed by macrophages. The percentage of lymphocytes gradually decreased. Macrophages appeared earlier in fish injected with FKB than in fish injected with PP. The peak number of neutrophils in PEC was observed 6 hrs after injection of FKB and 12 hrs after injection of PP. The peak number of macrophages in PEC was observed 48 hrs after injection of FKB and 192 hrs after injection of PP. Accordingly, neutrophil and macrophage preparations were made at these times. Phagocytosis of the bacterium by neutrophils required opsonization of the serum, but phagocytosis by macrophages did not. However, specific antibody significantly increased the phagocytic activity and phagocytic index of both cells. After addition of complement, in both cells neither phagocytic activity nor phagocytic index changed. In the presence of specific antibody and complement, phagocytic activity and phagocytic index were significantly higher than in the control, and higher than in the previously mentioned tests. These results suggest that in yellowtail the activation of the classical pathway of complement by antigen-antibody reaction is important in opsonization of the bacteria. Moreover, phagocytosis of macrophages was induced by the supernatant of a lymphocyte culture. This indicates that an interaction between macrophages and lymphocytes occurs in yellowtail. After phagocytosis, the bacterial pathogen grows gradually inside the phagocytic cells and the disease develops. The fate of the bacterium after phagocytosis and the interactions between the phagocytic cells and the bacterium were studied. In addition, methods for assessing the amount of killing of intracellular bacteria by yellowtail phagocytic cells were investigated. The following method was found applicable. A mixture of phagocytic cells from yellowtail kidney, a suspension of viable bacteria and normal yellowtail serum was prepared and incubated at 25°C for 30 min. Then, 100 µg/ml streptomycin and 1,500 units/ml penicillin G were added to the mixture, which was incubated again at 25°C for 15 min. The phagocytic cells and the remaining extracellular bacteria were separated by centrifugation at 5,900 × g for 5 min on Percoll at 1.070 specific gravity. Phagocytic cells were washed three times by modified L-15, and resuspended in modified L-15 at a density of 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml. After incubation at 25°C for 60 min, the phagocytic cells were destroyed by exposure to 15% sodium chloride solution containing 0.2% non-ionic detergent, BL-25, at 0°C for 15 min. The number of viable bacteria in the destroyed phagocytic cells was counted by the pour plate method using BHI agar containing 1.0% sodium chloride. Avirulent and low virulent strains of the bacterium were killed by neutrophils and macrophages. However, high virulent strains of the bacterium were killed only by macrophages obtained from fish surviving the disease. In addition, killing of intracellular bacteria by macrophages was induced by the supernatant of a culture of lymphocytes obtained from fish surviving the disease and from fish immunized by the live bacterium. The data indicate that the function of macrophages was controlled by lymphocytes products. Moreover, the lymphocytes obtained from fish surviving the disease and from fish immunized by the live bacterium produced substances effective in controlling the disease, and the cellular immune response, that is, the interaction between lymphocytes and macrophages, was stimulated by the live bacterium.

The efficacy of vaccines and substances in activating the cellular immune response was examined *in vivo*. Because the virulent live bacterium has a high risk for practical use as a vaccine, attenuated live bacterin (ALB) was tested instead. ALB, as well as FKB and heat-killed bacterins (HKB) were prepared from the bacterium and their efficacy in immersion vaccination against pseudotuberculosis in yellowtail was compared. The ALB preparation stimulated the highest phagocytic activity in the fish and was the most effective in protecting the fish. The results suggest that the efficacy of ALB vaccination is based on the activation of phagocytic cells. In general, ribosomal vaccines have a high capability of stimulating the cellular immune response. Therefore, the efficacy of ribosomal and other antigens prepared from the bacterium was compared. Yellowtail were immunized twice by intraperitoneal injection using these antigens to determine the effects on exposure to the virulent bacterium. The antigen preparations used were ribosomal antigen P and S (RBP and RBS), outer membrane fraction (OMF), lipopolysaccharide (LPS), precipitated antigens (PCA), and extracellular products (ECP), with FKB as a control. Three weeks after the last immunization, RBP resulted in the highest level of phagocytic activity among the immunized groups, although it resulted in the lowest level of specific antibody against the bacterium LPS and in the lowest level of serum opsonization. The RBP preparation was the most effective of the antigen preparations. Levamisole has an immunostimulant effects on tumor immunity, based on cellular immune response, in animals. Yellowtail injected levamisole before exposing the bacterium was enhanced resistance to the disease. The data indicate that the resistance to the disease in yellowtail was based on cellular immune response.

In summary, vaccines prepared from attenuated live bacterin and from RBP of the bacterium were more effective than various killed bacterins of the bacterium because they have a high capability of activating mature lymphocytes. The results suggest that yellowtail has a cellular immune system consisting of lymphocytes and macrophages like mammals and that the control of pseudotuberculosis in yellowtail may be possible based on the activation of the cellular immune response with ALB and RBP prepared from *P. piscicida*.

**Key word** Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, *Pasteurella piscicida*, pseudotuberculosis in yellowtail, cellular immune response

## 目 次

緒 言	30
第1章 研 究 史	30
第2章 ブリのリンパ球機能に関する研究	34
第1節 蛍光抗体法によるブリのリンパ球の分類	35
第1項 蛍光抗体法により検出されるブリの表面抗体保有細胞	35
第2項 ブリの pre-B 細胞および抗体産生細胞の検出	43
第3項 蛍光抗体法によるブリの胸腺リンパ球表面抗原保有細胞の検出	46
第2節 ブリの表面抗体保有細胞および胸腺リンパ球表面抗原保有細胞の同定	50
第3節 ブリの各種リンパ球, pre-B 細胞および抗体産生細胞の体内分布	55
第4節 免疫に伴う各種リンパ球の変化	60
第5節 リンパ球移入によるブリの免疫機構の変化	66
第6節 総合考察	73
第3章 ブリの貪食細胞の機能に関する研究	75
第1節 ブリの腹腔内浸出細胞からの貪食細胞の採取方法の検討	76
第2節 ブリの貪食細胞の化学走化性および集化性の検討	83
第3節 ブリの貪食細胞の <i>Pasteurella piscicida</i> に対する貪食活性	91
第4節 ブリ貪食細胞の細胞内殺菌活性の測定法の検討	98
第5節 ブリの貪食細胞の <i>Pasteurella piscicida</i> に対する細胞内殺菌活性	106
第6節 総合考察	114
第4章 ブリの類結節症に対する免疫学的手法による予防法の検討	115
第1節 ブリの類結節症に対する弱毒生菌ワクチンの有効性	116
第2節 ブリの類結節症に対する <i>Pasteurella piscicida</i> リボゾーム ワクチンの有効性	121
第3節 ホルマリン不活化菌体を用いた浸漬法ワクチンと細胞性免疫調節剤 レバミゾールの併用効果	128
第4節 総合考察	133
第5章 総 括	133

第6章 要 約	135
謝 辞	137
文 献	138

## 結 言

1977年に、200海里海洋新時代が始まって、わが国の水産業の発展をになってきた遠洋漁業や北洋漁業が衰退し、日本の水産業をとりまく環境はきびしいものとなっている。そのため、遠洋漁業や北洋漁業に代って、増養殖業のさらなる発展が期待されている。

増養殖業のうち、マダイ、クロダイ、アワビ、サケなどでは採卵、ふ化技術が確立されて増殖効果をあげつつあるが、いっぽうでは増養殖業の集約化や合理化がすすみ、過密や過給餌による飼育が行われて、自家汚染や種々の疾病が発生して問題となっている。

ブリ養殖においては類結節症、連鎖球菌症、ピブリオ病、ノカルジア症、ミコバクテリア症などの細菌性の、腹水症などのウイルス性の、あるいはえらむしなどの寄生虫性の疾病による被害が知られているが、近年では単一症による被害のほかに、これらの疾病の合併症が多発するようになり、問題となっている。これらの疾病の予防には飼育密度の適正化、栄養剤の添加による飼料の改善や適量投餌などの養殖技術の改善が必要であるが、養殖業者はこれらの改善による疾病の予防よりも、各種化学療法剤の投与による治療に依存しているのが現状である。その結果、薬剤の多用によって耐性菌が出現し、治療効果の低下が起きている。

そこで、各種疾病に対するワクチンによる予防法の研究が行われるようになり、淡水魚ではアユおよびニジマスのピブリオ病に対するワクチンが実用化の段階になってきた。しかし、海産魚においては、ブリの類結節症のワクチンに関する研究が行われているが、実用化には至っていない。その理由として、ブリの類結節症のような細胞内増殖性菌による疾病では、従来、実用化された淡水魚のワクチンとは異なる細胞性免疫機構を活性化するワクチンの開発が必要であるにもかかわらず、ブリの細胞性免疫機構を明らかにしないで、実用化試験のみが行われているためであると考えられる。

そこで、本研究はブリ養殖業において被害の大きい類結節症に対するブリの細胞性免疫機構を明らかにするとともに、ワクチン実用化の可能性について新しい知見が得られたので報告する。

## 第1章 研 究 史

### 類結節症

ブリの類結節症は1969年6月に西日本沿岸域の養殖ブリ稚魚の脾臓や腎臓に多数の小白点が形



成される疾病として窪田他 (1970a) により最初に記載された。その後、窪田他 (1970a, 1970b, 1972) は病魚の病理組織学的病徴から本症を細菌性類結節症と命名した。しかし、現在では単に類結節症と呼ばれている。また、彼らは各臓器に形成される白点は細菌の大集落とそれを囲む結節様構造物であるとしている。

原因菌については木村・北尾 (1971) は *Corynebacterium* 属かその近縁属に属する細菌であると報告した。しかし、その後 SIMIZU and EGUSA (1972), 楠田・山岡 (1972), KOIKE et al. (1975), 楠田他 (1978) によって詳細な研究が行われた結果、原因菌は SNIESZUKO et al. (1964) がアメリカの Chesapeake 湾の white perch から分離した菌と生物学的、生化学的および血清学的な性状で一致することが明らかにされた。そして、現在では JANSSEN and SURGALLA (1969) の記載に従って、*Pasteurella piscicida* に同定されている。

本症の感染経路については、若林他 (1977) によって検討されており、感染実験の結果から経口感染の可能性が高く、感染の成立にはストレスが影響するとされている。しかし、楠田・浜口 (1987) は浸漬法による感染実験の結果、感染が成立することから経皮および経鰓感染の可能性もあるとしている。

本症原因菌に対する化学療法剤の感受性については、木村・北尾 (1971), SIMIZU and EGUSA (1971) および楠田・井上 (1972) の研究がある。また、楠田・井上 (1976, 1977a, 1977b) によってアンピシリンの試験管内作用やブリ魚体内での有効性が報告されている。さらに、遠藤他 (1987) および TAKAHASHI and ENDOH (1988) によって本症に対する微細化オキシリン酸の有効性が報告されている。FUKUI et al. (1987) は本菌に対するフロルフェニコールの試験管内および生体内抗菌作用を、YASUNAGA and YASUMOTO (1988) および YASUNAGA and TSUKAHARA (1988) は本剤のブリに対する有効性および投与量の設定を行っている。中内・宮崎 (1988) はアモキシシリンのブリに対する安全性を、北尾他 (1989) は本菌に対するアモキシシリンの感受性を検討している。さらに、TAKAHASHI et al. (1990) はフルメキンの治療効果を検討している。

本症原因菌の化学療法剤に対する耐性菌の出現状況には、AOKI and KITAO (1985), TAKASHIMA et al. (1985), 楠田他 (1986) および楠田他 (1988) によって検討されており、クロラムフェニコール、チアンフェニコール、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン、アンピシリン、ナリジクス酸、オキシリン酸、ニフルスチレン酸ナトリウムに対する耐性菌が認められているが、それらの出現状況は分離年度によって異なるとされている。また、楠田他 (1986, 1988, 1990) はこれらの薬剤のうち複数のものである多剤耐性菌が増加する傾向にあり、今後は化学療法剤による治療が困難となるのではないかとしている。

本菌の血清型については KITAO and KIMURA (1974) および楠田他 (1978) の報告があり、ブリ由来の菌株は同一の血清型に属するとされている。

本症のワクチンによる予防については楠田・福田 (1980) によってその可能性が示唆されて以来、福田・楠田 (1982), FUKUDA and KUSUDA (1985) のホルマリン不活化菌体ワクチンを用いた報告があり、経口法、浸漬法、噴霧法、注射法の各投与方法が試みられ、有効性が認められている。しかし、いずれの方法も実用化に至る有効性は得られていない。楠田・浜口 (1987) および

HAMAGUCHI and KUSUDA (1988) は投与法が簡便で安全性の高いホルマリン不活化菌体を用いた浸漬法ワクチンにおいても、処理回数を増やしたり、菌体の培養時間を変えることによって、有効性を上昇させることができるとしている。また、ブリ体内への各種ワクチンの侵入経路については河原・楠田 (1987) によって検討されている。しかし、HAMAGUCHI and KUSUDA (1989) は本症に対する不活化菌体ワクチンは野外では有効性が低いと報告している。不活化ワクチン以外では、楠田他 (1988) および KUSUDA and HAMAGUCHI (1988) は細胞内増殖性をもつ病原菌による疾病に対して細胞性免疫を活性化する効果が期待されているリボゾームワクチンや弱毒生菌ワクチンについて検討し、これらのワクチンがホルマリン不活化ワクチンよりも有効性が高いとしている。村岡他 (1991) は本菌のチオシアン酸カリウム抽出成分 (PTE) および Naked bacteria 混合物の本症に対する有効性を検討している。ワクチン以外の免疫学的手法としては、福田・楠田 (1982) は本菌に対する抗血清の受動免疫について報告している。ワクチン以外の免疫学的手法としては、福田・楠田 (1982) は本菌に対する抗血清の受動免疫について報告している。

### 魚類の細胞性免疫機構

魚類の細胞性免疫機構にかかわるリンパ球については、サブポピュレーションの分類や機能の研究が行われている。

リンパ球のサブポピュレーションについては、その表面抗原の検出、各種芽球化因子に対する反応性およびロゼット形成能について調べられ、これらの結果に基づいて分類が行われた。魚類のリンパ球表面の抗原については最初に、ELLIS and PARKHOUSE (1975) および EMMERICH et al. (1975) がガンギエイおよびコイを用いて記載しており、魚類においても表面抗体を保有する細胞が存在することを明らかにした。しかし、ELLIS and PARKHOUSE (1975) はガンギエイのリンパ球の細胞表面抗体を調べた結果、ほとんどの細胞が表面抗体を保有していること、また、EMMERICH et al. (1975) はコイの胸腺中のリンパ球が表面抗体を保有することから、表面抗体の検出によって魚類のリンパ球のサブポピュレーションを分類することは適当でないとしている。また、RUBEN et al. (1977) はキンギョのすべてのリンパ球は表面抗体を保有するとしている。いっぽう、CAPSI et al. (1980) はコイの、LOBB et al. (1982) はアメリカナマズの、浜口・楠田 (1988) はブリのリンパ球には細胞表面抗体を保有するものとしないものが存在することを明らかにし、表面抗体の検出によって魚類のリンパ球のサブポピュレーションの分類ができるとしている。

リンパ球の各種芽球化因子に対する反応性による分類については CUCHENS and CLEM (1977) がブルーギルのリンパ球の各種芽球化因子に対する反応性を調べ、芽球化因子によってほ乳類と同じように芽球化が起こることから、魚類のリンパ球においても芽球化因子に対する反応性によって、B および T リンパ球の分類が可能であるとしている。そのほかにも、ETLINGER et al. (1976, 1978), CHILMONZYK (1978), SAKAI (1981), BLAXHALL (1985) によって、それぞれコイ、ニジマスおよびブラウントラウトのリンパ球の各種芽球化因子に対する反応性を調べた結果、それらはほ乳

類のBおよびTリンパ球に該当する2つのサブポピュレーションに分類できるとしている。

リンパ球のロゼット形成細胞によるサブポピュレーションの分類については RUBEN et al. (1977) の研究がある。RUBEN et al. (1977) はコイを異種赤血球と TNP 抗原で免疫し、胸腺、脾臓および前腎の細胞のロゼット形成およびナイロンウールへの付着性の結果から、リンパ球には2つのサブポピュレーションが存在し、抗原の特異的な認識はこれら2種のリンパ球の共同作用によって行われるとしている。また、LEWIS et al. (1979) はロゼット形成能などによってアメリカナマズのリンパ球を2種類に分けることができるとしている。

リンパ球の機能については魚を免疫したのちのBおよびTリンパ球の免疫応答に及ぼす影響について研究されている。Bリンパ球の機能については、Bリンパ球から分化するとされている抗体産生細胞 (PFC) による抗体産生、および抗原結合細胞 (ABC) による抗体認識などが調べられている。抗体産生細胞については SMITH et al. (1967), CHILLER et al. (1969), ORTIZ-MUNIZ and SIGEL (1971), PONTIUS and AMBROSIUS (1972), SAILENDRI and MUTHUKAPPAN (1975), CORBEL, (1975), WARR et al. (1977), RUKERS and MUISWINKEL (1977), 中西(1982), GINKEL et al. (1985) および INGRAM (1985) によってブルーギル、ニジマス、パーチ、ティラピア、キンギョ、コイ、カサゴで調べられている。いずれも抗体産生細胞が増加したのちに、血清中の抗体量が増加しているとされている。さらに、CHILLER et al. (1969) はニジマスヒツジ赤血球で免疫したのち、脾臓および前腎から PFC を得ており、凝集抗体価が1:64以上の場合にロゼットが多数形成されるとしている。RUKERS et al. (1980) は12から 24°C の水温でコイをヒツジ赤血球で免疫し、脾臓および腎臓の PFC を調べている。その結果、低温では1次応答を延期させるが、その大きさには影響せず、18°C 以下では2次応答は起こらないとしている。GINKEL et al. (1985) はニジマスヒツジ赤血球と DNP-Ficoll で免疫し、脾臓と前腎の細胞のプラーク形成と培養温度について調べている。その結果、PFC は4~20°C では認められ、10°C が最適温度であるとし、両免疫区では大きな違いは認められないとしている。免疫による各種リンパ球の動向については GOSTING et al. (1981) は浸漬法および腹腔内接種法を用いて、ベニザケを *Vibrio anguillarum* で免疫したのち、血液中の ABC を調べている。その結果、ABC の応答は浸漬法より腹腔内接種法のほうが1週間長いとしている。SAKAI et al. (1984) は浸漬法および腹腔内接種法を用いて、ニジマスヒツジ赤血球を *Vibrio anguillarum* で免疫したのち、脾臓および頭腎の PFC と ABC を調べ、いずれの免疫法を用いても両者の出現には違いがみられないとしている。

また、Tリンパ球の機能については移植片による拒絶反応および細胞障害性が調べられ、Tリンパ球とのかかわり合について研究されている。KALLMANN et al. (1958) は plamtyfish, HILDEMAN (1958) はキンギョ、FINSTAD et al. (1966) は paddlefish を用いて移植免疫の解明を行い、同種移植片では適合するが、異種移植片は拒絶するとしている。これらのことから魚類には細胞障害性をもつ細胞が存在することが明らかにされた。SAKAI (1984) はニジマスヒツジ赤血球をニジマス培養細胞 (RTG-2) とブルーギル培養細胞 (BF-2) で免疫したところ、免疫魚ではリンパ球が BF-2 に対して細胞障害効果を示すとしている。このことから、移植片拒絶反応はこのような細胞障害性リンパ球によって起こるのではないかとしている。橋本・池田 (1987) は異種白血球で免疫したコ

イにおいても、細胞障害性リンパ球が存在するとしている。また、GRAVES et al. (1985) はアメリカナマズの寄生虫に対する感染防御性を調べた結果、細胞障害性をもつ細胞が存在するとしている。

いっぽう、魚類の貪食活性については最初に、19世紀に METCHNIKOFF や MESHIL が真骨魚の白血球が *Bacillus anthracis* を貪食したことを記載している。その後は細胞性免疫機構に関連した貪食機能についての報告はしばらくみられなかったが、今世紀に入って多数の研究が行われるようになった。

魚類の好中球およびマクロファージの貪食活性については入江 (1932) がフナに、松田 (1937) はコイに、畑井 (1972) はウナギでそれぞれ確認したとしている。さらに、ELLIS (1976) はツノガレイの好中球およびマクロファージに、LESTER and BUDD (1979) はホワイトサッカークのマクロファージに貪食が認められたとしている。いっぽう、FURGUSON (1976), MCKINNEY et al. (1977), 森 (1981), SUZUKI (1984) および KUSUDA and IKEDA (1987) はそれぞれ、ブラントラウト, gar, キンギョ, イワナ, ニジマスおよびウナギでは好中球や単球のほかに栓球やリンパ球が貪食性を示すとしている。しかし、栓球やリンパ球の貪食性は弱く、現在では WARDLE (1971) の定義にしたがって、栓球は血液凝固因子として考えられている。これらのことから、魚類の貪食細胞は好中球とマクロファージが主体であると考えられている (MCKINNEY et al. 1977)。また、SÖVÉNYI and KUSUDA (1987) および SUZUKI (1988) は頭腎中の幼若好中球も貪食活性を示すとしている。

免疫と貪食活性の関係については AVTALION and SHAHRABANI (1975) がコイを *Staphylococcus aureus* で免疫したところ、血液中の白血球の貪食殺菌活性が上昇したとしている。SONG and KOU (1981) はウナギを *Edwardsiella anguillimortifera* で浸漬免疫すると、免疫魚の貪食活性は上昇したとしている。WRATHMELL and PARISH (1980) は硬骨魚の貪食細胞の特異抗体や補体によるオプソニン効果と貪食活性の関係を報告している。そのほか、GRIFFIN (1983) および SAKAI (1984) はサケ科魚類の貪食細胞の抗体や補体によるオプソニン効果について報告している。SALATI et al. (1987) および SALATI et al. (1987) はそれぞれウナギおよびマダイを *Edwardsiella tarda* のリポ多糖で免疫すると白血球の貪食活性が上昇したとしている。また、楠田他 (1988) および KUSUDA and HAMAGUCHI (1988) はブリをそれぞれ *P. piscicida* リボゾームワクチンおよび弱毒生菌ワクチンで免疫すると頭腎の貪食細胞の活性が上昇したとしている。いずれも、魚類の貪食活性が免疫機構と関連するのではないかと考えられる。

## 第2章 ブリのリンパ球機能に関する研究

ほ乳類の免疫機構はBおよびTリンパ球の2種類によって調整されていることが知られている。Bリンパ球は抗体産生細胞に分化して抗体を産生し、体液性免疫機構に関与するほか、その1部は免疫記憶細胞となり、病原体の再侵入を監視するとされている。Tリンパ球は抗体産生の調整のほかに組織適合性の監視、細胞障害性、リンフォカイン産生性などの機能を持ち、細胞性免疫

機構に関与するとされている(新保 1978, SCHWARTZ et al. 1978, 坂口・岸本, 1979)。いっぽう、魚類のリンパ球には各種リンパ球芽球化因子に対する反応性からは乳類のBおよびTリンパ球に類似した細胞が存在することが知られている(ETLINGER et al. 1976, CUCHENS and CLEM 1977, ETLINGER 1978, SAKAI 1981, BLAXHALL 1985)。しかし、ブリのリンパ球の分類や機能についてはこれまでに調べられていない。

そこで、本章ではブリのリンパ球を分類するとともにその機能について検討した。

## 第1節 蛍光抗体法によるブリのリンパ球の分類

### 第1項 蛍光抗体法により検出されるブリの表面抗体保有細胞

一般に、BおよびTリンパ球などのリンパ球のサブポピュレーションの分類はギムザ染色による形態学的検査では困難であることが知られている(北見 1985)。そのため、ほ乳類では蛍光抗体を用いて各種リンパ球表面上の特異抗原を検出して、分類が行われている(RAFF 1971, PARASKEVAS et al. 1972, 関沢他 1975, AHMED et al. 1977, HUBER et al. 1977, 山名 1978, ZINK-ELNAGELET et al. 1978, TADA 他 1978, YAKURA et al. 1981, YAKURA et al. 1983)。また、ほ乳類のBリンパ球にはその表面上に抗体が存在することが知られており、それを検出することによって同定が行われている(EY 1973, WARNER 1974, KUMAGAI et al. 1975, 関沢他 1975, 安保他 1975, 安保他 1975; 中村 1977; GOLAY, 1986)。魚類においても、ELLIS and PARKHOUSE (1975), EMMERICH et al. (1975), WARR et al. (1976), CAPSI et al. (1980), LOBB et al. (1982)によってガンギエイ、コイ、アメリカナマズなどのリンパ球に表面抗体(smIg)を保有するものがあるとされている。

そこで、本研究ではブリのリンパ球のサブポピュレーションの分類を行うために、蛍光抗体法による細胞表面抗体の検出法について検討した。

### 実験方法

**供試魚** 高知県浦の内湾で飼育されていた魚体重 37-780 g の1および2年魚のブリを用いた。  
**飼育方法** 供試魚は 800 l の流水式プラスチック水槽に収容して、魚体重の12%にあたるイカナゴミンチにハマチエードS(武田薬品工業)を加えたものを、朝夕2回にわけて投与して飼育した。なお、本実験期間中の飼育水温は 23.8~24.9°C であった。

**精製ブリ抗体の作製** *Pasteurella piscicida* ホルマリン不活化菌体で2週おきに3回免疫して得たブリの血清から、硫酸塩析、Sephrose CN-4B(Pharmacia)と*P. piscicida*からWESTPHOL and JANN(1965)の方法によって抽出した粗リポ多糖(LPS)をリガンドとしたアフエニティークロマトグラフィー、Sephrose 6B(Pharmacia)によるゲルろ過、DEAE Sephadex A-50(Pharmacia)によるイオン交換クロマトグラフィーによって抗体を精製した。

**抗ブリ抗体ウサギ抗血清の作製** 生理的食塩水を用いて 1 mg/ml の濃度となるように調製した精製ブリ抗体とフロイントの完全アジュバント(Difco)を等量混合したものをウサギの皮下に

接種した。この抗原接種は1週おきに3回行ったのち、さらに2週おきに2回行った。最後の接種から4週間後に追加接種を行い、1週間後に耳静脈から採血した。血液は4°Cで1晩放置したのち、400×gで30分間の遠心操作によって血清を分離し、抗ブリ抗体ウサギ抗血清とした。

**FITC標識抗ブリ抗体ウサギ抗体の作製** 抗ブリ抗体ウサギ抗血清から DEAE Affi-Gel Blue (Bio-rad) により IgG 画分を回収し、BANNER et al. (1983) の方法により FITC 標識を行った。

**ブリ血球浮遊液の調製** ヘパリン処理したシリンジを用いて心臓穿刺法により採血したブリ血液を、5%ウシ胎児血清 (FBS) および 0.01 M アジ化ナトリウムを含む RPMI 1640 (MRPMI 1640) 培地で2倍希釈したのち、比重1.077の Ficoll-Hypaque を用いて栓球を含む白血球を分離した。これらの血球を同培地で3回洗浄したのちに、 $1 \times 10^7$  cells/ml となるように調製し、栓球を含む白血球浮遊液 (白血球浮遊液) を作製した。

**smIg 保有細胞の検出法の比較** smIg の検出法として、直接蛍光抗体法と間接蛍光抗体法を比較した。直接法は反応至適濃度に調整した FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ IgG と 0.02 M アジ化ナトリウムを含む MRPMI 1640 培地で、 $1 \times 10^7$  cells/ml に調製した白血球浮遊液を等量混合し、25°C で30分間反応させた。そして、400×g で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、落射型蛍光顕微鏡 (Nikon) で検鏡して smIg 保有細胞数を計数した。間接法は抗ブリ抗体ウサギ IgG と 0.02 M アジ化ナトリウムを含む MRPMI 1640培地で  $1 \times 10^7$  cells/ml に調製した白血球浮遊液を等量混合し、25°C で30分間反応させた。そして、同培地を用いて細胞を 400×g, 5分間の遠心操作により3回洗浄した。さらに FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ Fab を加え、25°C で30分間反応させたのち、前述の方法で細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡で smIg 保有細胞数を計数した。なお、対照血清には抗 *P. piscicida* ウサギ抗血清と正常ウサギ血清を用いた。

**smIg像の分類** 前述の方法により smIg 保有細胞を検出し、観察された蛍光像によって smIg 保有細胞をタイプに分けた。

**smIg像の経時的变化** MRPMI 1640培地で  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように調製した細胞浮遊液と、至適濃度の FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ IgG を加え、0, 4, 18, 25, 30, 37°C で反応させた。0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4.5, 6, 12時間後に一定量の白血球を取り出して smIg 像を観察し、0時間の smIg 保有細胞数に対する各タイプ別細胞の構成比率を求めた。

**smIgによる抗原移送の検討** 移送用抗原には、抗ブリ抗体ウサギ IgG を用いた。ブリ白血球浮遊液と抗ブリ抗体ウサギ IgG を混合し、0°C で1時間反応させたのちに 25°C に移し、0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4.5, 6, 12, 24時間反応させた。そして、0.01 M アジ化ナトリウム存在下で FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ Fab および FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ IgG をそれぞれ反応させ、smIg 保有細胞数を計測した。

**cap 形成に及ぼす各種代謝阻害剤の影響** 代謝阻害剤として 0.01 M ヨードアセトアミド、0.01 M アジ化ナトリウム、0.005 M ジニトロフェノール、0.001 M シアン化カリウム、0.01 M フェリシアン化カリウムを含む MRPMI 1640培地中で、25°C で15分間反応させたのちに、smIg の検出を行った。これらのうち、cap 形成の認められる細胞数の比率を求めた。

**smIg 像に及ぼす smIg 検出抗体の種類** の検討 常法により抗ウサギ IgG から F(ab)<sub>2</sub> および

Fab 画分を調製し、前述の方法によって FITC 標識を行った。そして、直接法によって smIg 保有細胞を検出し、cap 形成の認められる細胞数の比率を求めた。

## 結 果

直接蛍光抗体法によってブリの表面抗体保有細胞を検出した結果は Fig. 1 に示すとおりである。FITC 標識抗ブリ抗体によってブリの血液中には表面抗体を保有する細胞が認められた。

直接蛍光抗体法と間接蛍光抗体法による smIg の検出率を比較した結果は、Table 1 に示すとおりである。両方法とも対照血清との反応は認められず、特異性は高かった。直接法と間接法を比較すると、蛍光強度は間接法のほうが強かったが、検出される細胞数には差異が認められなかった。

ブリの smIg 保有細胞の蛍光像は Fig. 2A-D に示すとおりである。これらの蛍光像から smIg 保有細胞は3つのタイプの細胞に分類された。A と B は同じタイプでフォーカスをずらしたものである。これらの細胞はびまん状に染まっており、蛍光が細胞表面上に散在していた。また、フォーカスの位置によっては不連続なリング状の蛍光像を示した。これらの細胞をタイプ1とし

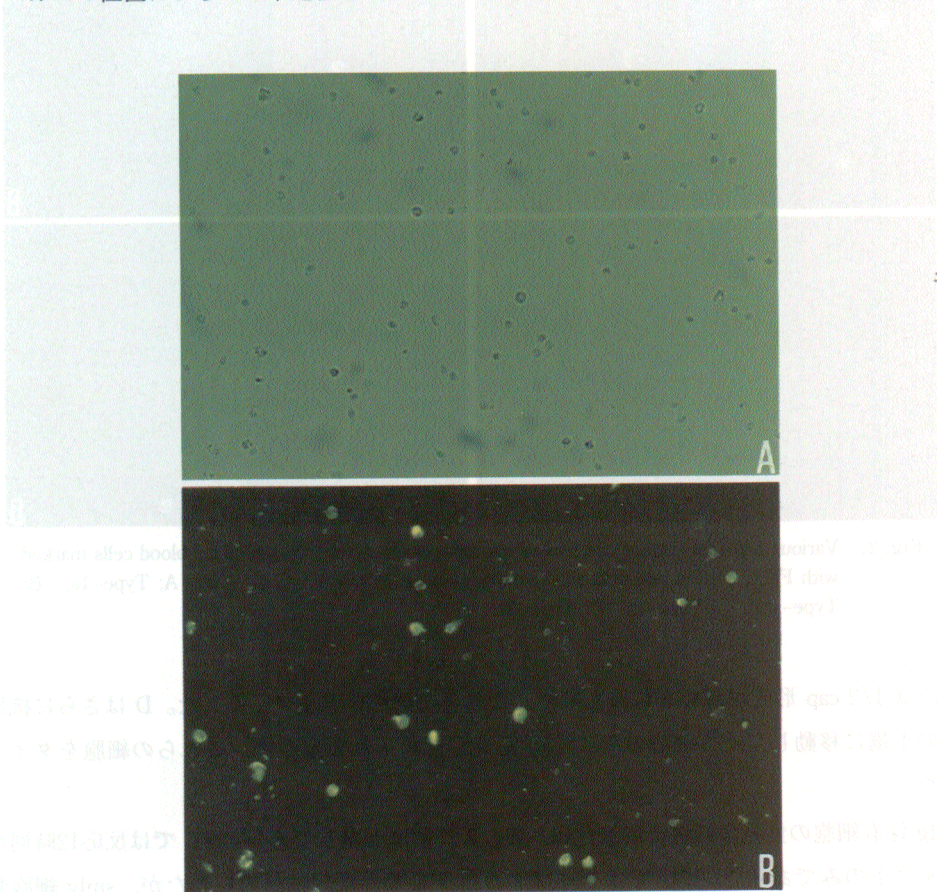


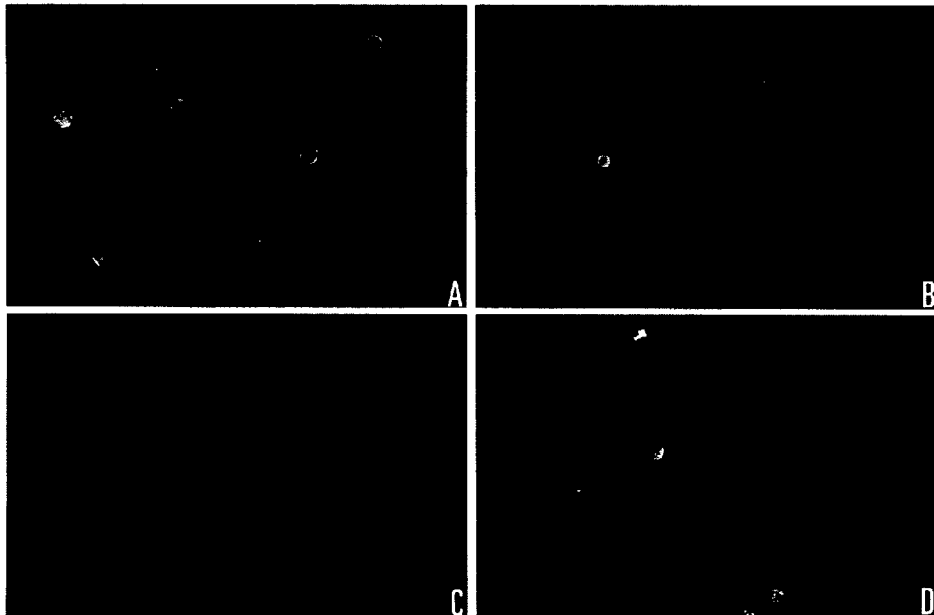
Fig. 1. Profiles of yellowtail blood cells under phase contrast microscope (A; X400) and surface membrane immunoglobulin (smIg) on the cells marked with FITC labeled anti-yellowtail-immunoglobulin M rabbit IgG (B; X 200).



**Table 1.** Detection of surface immunoglobulin on yellowtail blood cells using the fluorescent antibody technique (FAT)

Antibody	Mean percent of smIg cells	Intensity of fluorescence
Direct FAT		
FITC labeled anti-YIgM-RiG	24.8	++
FITC labeled anti- <i>P. piscicida</i> -RiG	0	—
FITC labeled normal RiG	0	—
Indirect FAT		
Anti-YIgM-RiG + FITC labeled anti-RiG-GiG	25.2	+++
RiG + FITC labeled anti-RiG-GiG	0	—
Normal rabbit serum + FITC labeled anti-RiG-GiG	0	—

YIgM, Yellowtail immunoglobulin M; RiG, Rabbit immunoglobulin G; GiG, Goat immunoglobulin G. Fluorescence: +++, intense; ++, moderate; —, negative.



**Fig. 2.** Various types of surface membrane immunoglobulin (smIg) on yellowtail blood cells marked with FITC labeled anti-yellowtail-immunoglobulin M rabbit IgG (X 400, A; Type-1a, B; Type-1b, C; Type-2, D; Type-3).

た。C は 1/2 cap 形成が認められるもので、これらの細胞をタイプ 2 とした。D はさらに抗原が細胞の 1 端に移動し、その部分のみに Cap 形成が認められるもので、これらの細胞をタイプ 3 とした。

smIg 保有細胞の蛍光像の経時変化は、Fig. 3 に示すとおりである。0°C では反応 12 時間後までタイプ 1 のみであった。4°C ではタイプ 1 から 3 までの変化は認められたが、smIg 細胞数に変化は認められなかった。18~30°C の温度ではタイプ 1~3 への変化が速やかに起こり、反応 6 時間後にはほとんどの smIg 像が消失した。37°C ではタイプ 1~3 への変化は認められたが、



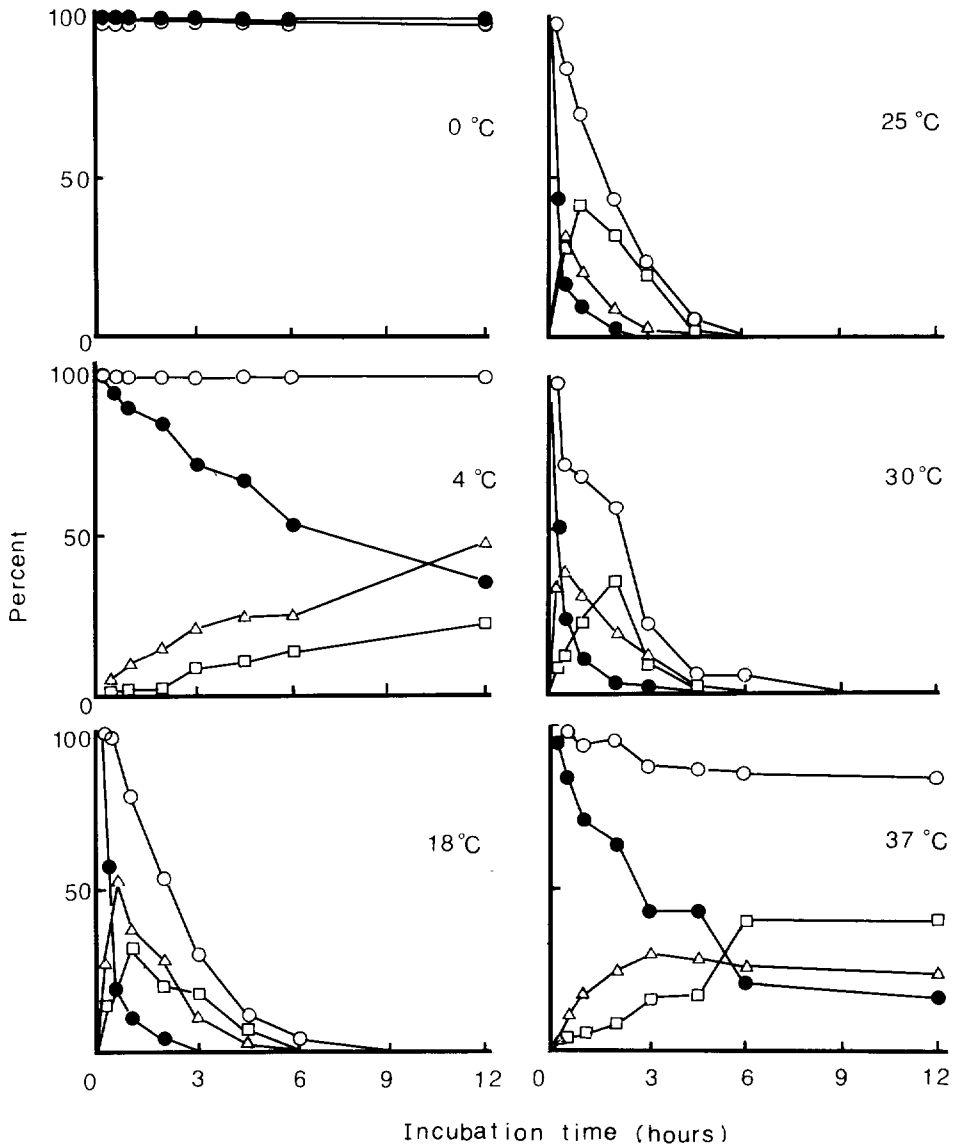


Fig. 3. Changes in percent composition of various types of smIg on yellowtail blood cells detected at various temperature. Symbols: ●, Type 1; △, Type 2; □, Type 3; ○, Type 1 + Type 2 + Type 3.

18~30°Cと比較してやや遅れる傾向を示した。また、18~30°Cでは smIg 保有細胞が6時間までに消失した。

25°Cでの smIg による抗原の移送は Fig. 4 に示すとおりである。smIg 保有細胞を含む培地中に過剰な抗原がない場合には、smIg と結合した抗原は smIg とともに3~4.5時間で消失した。その後は、smIg のみが6~12時間にかけて経時的に再び出現した。smIg 保有細胞を含む培地中に過剰な抗原がある場合には、smIg と結合した抗原は smIg とともに3~4.5時間で消失した。その後は、smIg は再び出現しなかった。

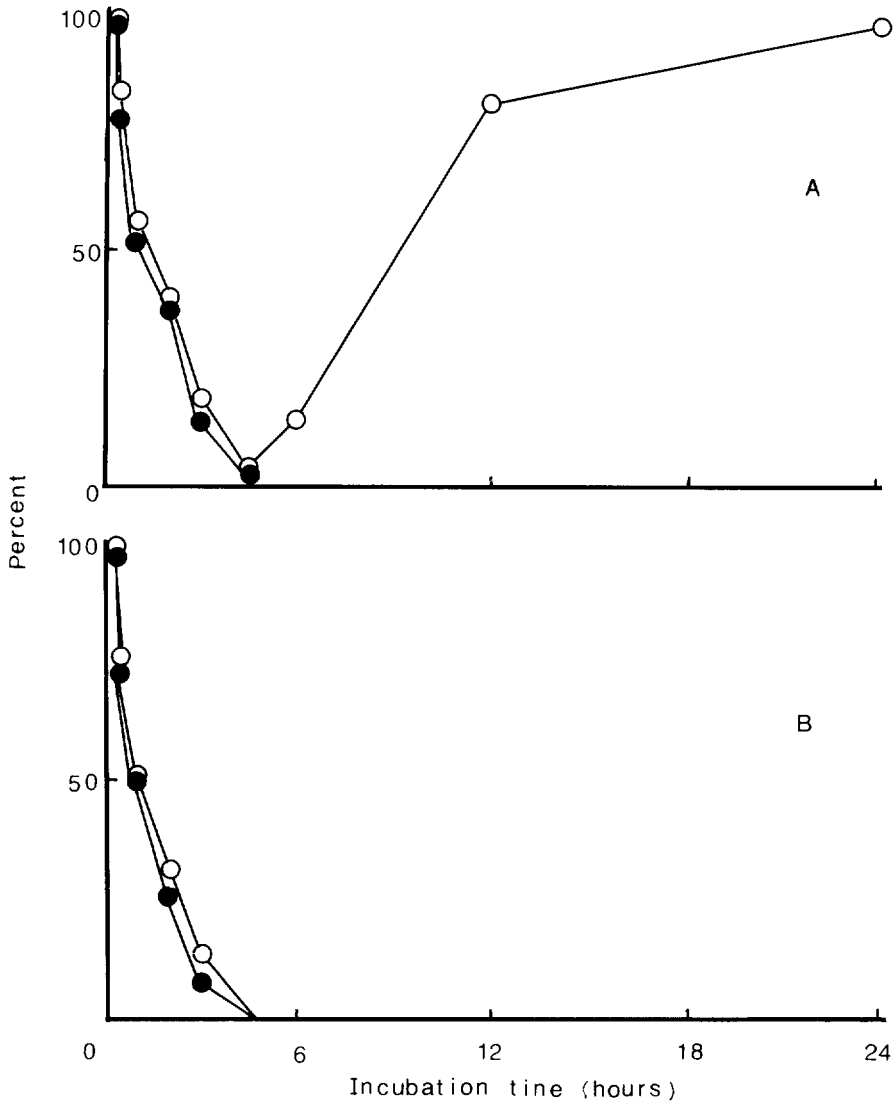


Fig. 4. Transportation of anti-yellowtail-immunoglobulin M rabbit IgG bound smIg by movement of smIg on yellowtail blood cells in RPMI 1640 medium without (A) and with excessive amount of anti-yellowtail immunoglobulin rabbit IgG (B). Symbols: ○, smIg of yellowtail; ●, anti-yellowtail-immunoglobulin M rabbit IgG.

Table 2. Inhibition of cap formation of smIg cells in yellowtail blood by various compounds

Compounds	Concentration (M)	Inhibition (%)
Iodoacetamide	0.01	100
Sodium azide	0.01	100
Dinitrophenol	0.005	100
Potassium cyanate	0.001	100
Potassium ferricyanide	0.001	40
Not added	0	0

cap 形成におよぼす各種代謝阻害剤の影響は、Table 2 に示すとおりである。cap 形成抑制率はヨードアセトアミドが100, アジ化ナトリウムが100, ジニトロフェノールが100, シアン化カリウムが100, フェリシアン化カリウムが40%であった。

smIg 検出抗体の種類と蛍光像に及ぼす影響は、Table 3 に示すとおりである。IgG および F(ab)<sub>2</sub> で検出される蛍光像は Fig. 2 に示すものと同じであった。Fab で検出される蛍光像は、Fig. 5 に示すとおりで、細胞周辺に連続したリング状蛍光を示した。IgG, F(ab)<sub>2</sub> および Fab によって白血球中に検出される smIg 保有細胞数それぞれ27.8, 29.7, 28.4%となり、有意差は認められなかった。cap 形成阻止能は Fab, F(ab)<sub>2</sub> および IgG の順に高かった。また、smIg 検出用抗体として IgG を用いると、Fig. 6 に示すとおり細胞の凝集像が認められた。

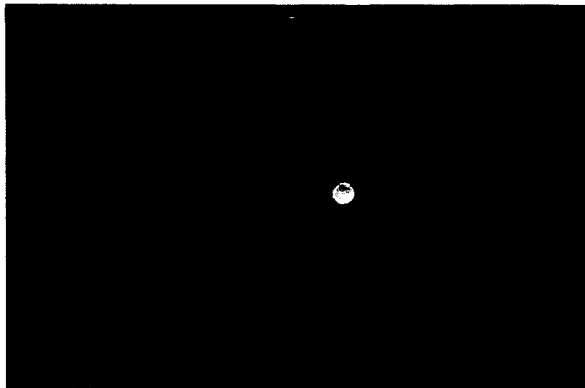


Fig. 5. Surface membrane immunoglobulin (smIg) on yellowtail blood cells marked with FITC labeled anti-yellowtail-immunoglobulin M rabbit Fab fraction (X 400).

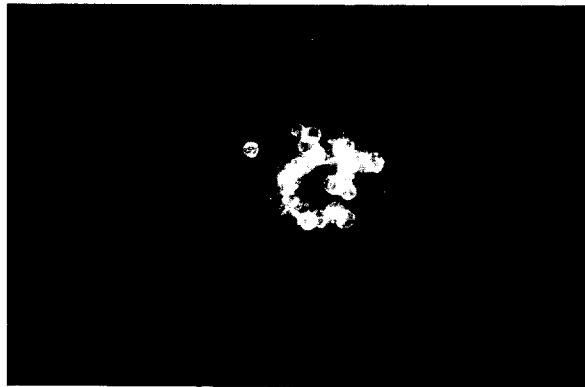


Fig. 6. Surface membrane immunoglobulin (smIg) on yellowtail blood cells marked with FITC labeled anti-yellowtail-immunoglobulin M rabbit IgG (X 400; Agglutination).

Table 3. Comparison of reactivity of various FITC labeled rabbit immunoglobulin fractions

Fraction	Mean percent of smIg cells	Inhibition of cap formation	Agglutination smIg cells
IgG	27.8	0	+
F(ab) <sub>2</sub>	29.7	12	—
Fab	28.4	100	—

## 考 察

UNANUE et al. (1972) はマウスの smIg の検出にすべてのクラスの免疫グロブリンに対するウサギ IgG を用いている。いっぽう、細胞表面には抗体のほかにも Fc リセプターなどの多様な抗原が存在することが知られている (MACKENZIE and POTTER 1979)。これらの抗原との反応をさけるために、抗体を高度に精製する必要があると思われる。福田・楠田 (1981) はブリの免疫グロブリンは IgM 様のマクログロブリンの 1 種類であるとしている。そこで、本研究ではこの IgM 様抗体を *P. piscicida* 菌体をマーカーとして高度に精製したブリ抗体に対するウサギ IgG を用いてブリの smIg を検出した。その結果、ブリにおいては血液中に smIg 保有細胞が存在し、蛍光抗体法で容易に検出できることがわかった。その検出法として、直接蛍光抗体法と間接蛍光抗体法を比較すると、蛍光強度は間接法の方が強かったが、検出細胞数には差異が認められなかった。このように、両法とも有効であったが、操作の簡便さから、通常の smIg 保有細胞の計数には直接法を用いた方がよいと思われる。

cap 形成は 0°C では認められなかったが、4°C 以上の温度では認められた。cap 形成時間は 18~30°C が最も早く 4°C および 37°C では遅れる傾向を示した。本研究により、ブリの smIg 保有細胞は cap 形成能を有することが明らかになった。ほ乳類の B リンパ球の cap 形成は 4°C では起こらないとされているが (TAYLOR et al. 1971, UNANUE et al. 1972)、魚類では低温でも cap 形成が起こるとされている (ELLIS and PARKHOUSE 1975)。cap 形成はほ乳類では細胞の代謝と関係することが知られている (UNANUE et al. 1973)。ブリの smIg 保有細胞の cap 形成が 4°C や 37°C で遅れるのは、その至適生息水温である 18~25°C の範囲をこえると、ブリの代謝活性が低下するからではないかと考えられる。

smIg による抗原の移送も細胞の代謝活性と密接に関係しているので、試験管内でその反応を検討するためには、温度や培地成分の種類などが重要とされる。現在までにブリの細胞培養に適した培地に関する知見が少ないので、本実験では 25°C で RPMI 1640 培地を用いて smIg による抗原の移送について調べた。その結果、抗ブリ抗体ウサギ IgG と結合することによって、smIg の分布に変化が認められ、3~4.5 時間後には、ウサギ IgG はブリの細胞上から消失した。消失後に、反応系に過剰な抗ブリ抗体ウサギ IgG が存在するときには、細胞上に smIg の再生は認められないが、過剰な抗体が存在しないときには、6~12 時間後には細胞上に smIg が再生した。

マウスではこの表面抗体の再出現は 37°C で 1 時間後から認められ、それ以後は経時的に増加することが報告されている (LOOR et al. 1972)。ブリでは時間が遅れるものの smIg の再出現が認められ、ほ乳類と同様の結果が得られた。smIg やリガンドの消失は、ほ乳類では細胞内への取り込みによって起こることが知られているが (TAYLOR 1971, UNANUE et al. 1972)、ブリにおける smIg の消失は smIg の細胞内への取り込みによるのか、あるいは smIg が細胞膜から遊離するのかわくはさらに検討する必要があると思われる。

ブリの smIg 保有細胞の cap 形成に及ぼす各種代謝阻害剤の影響については、ほ乳類で報告されている濃度 (UNANUE et al. 1973, LOOR et al. 1972) で同様の結果が得られている。すなわち、

ヨードアセトアミド、アジ化ナトリウム、ジニトロフェノールおよびシアン化カリウムにより阻害された。ほ乳類の cap 形成は解糖系やリン酸酸化系の阻害剤により阻害されるとされているが (UNANUE et al. 1973), ブリにおいてはどのような物質によって阻害されるか、さらに検討する必要があると思われる。しかし、今回用いた代謝阻害剤の阻害効果から、smIg の移動に関する代謝機構はほ乳類とよく似ているのではないかと考えられる。また、通常の smIg 保有細胞の検出には、ほ乳類と同様にアジ化ナトリウムにより cap 抑制を行うのがよいと考えられる。

smIg 検出抗体は抗ブリ抗体ウサギ IgG および F(ab)<sub>2</sub> では cap 形成が認められたが、Fab では認められず、ほ乳類 (LOOR et al. 1972) と同様な結果が得られた。このことから、ブリの smIg 保有細胞の cap 形成も多価抗原の架橋刺激により誘引されるのではないかと考えられる。また、cap 形成の抑制は、アジ化ナトリウムなどの代謝阻害剤を使用できないときは、FITC 標識 Fab を用いるのがよいと思われる。

ほ乳類においては、表面抗体がBリンパ球に大量に存在することから、それを検出することによって、簡易的にBリンパ球の同定が行われている (WANNER 1975)。Bリンパ球の smIg は抗原刺激などによって、Bリンパ球細胞膜上の結合部位が変化し、それによって cap 形成が起こるとされている (TAYLOR et al. 1971, LOOR et al. 1972)。魚類においても、リンパ球の表面上に抗体があることが確認されている (ELLIS and PARKHOUSE 1975, EMMERICH et al. 1975, WARR et al. 1976)。ELLIS and PARKHOUSE (1975) はリンパ球中の smIg 保有細胞の比率が高いことから、魚類のリンパ球のすべてが smIg をもつのではないかと報告している。また、EMMERRICH et al. (1975) はコイの胸腺細胞の smIg 保有率は65-68%であり、成熟したカエルやほ乳類と比較して高く、胸腺由来細胞も smIg を保有していると報告している。これらのことから、魚類においては smIg の保有から、ただちにBリンパ球に同定できないと思われるが、その検出はリンパ球の簡易同定には有用であると考えられる。また、魚類のリンパ球はマイトゲン反応などからはほ乳類のTリンパ球やBリンパ球様の機能をもつことが知られている (ETLINGER et al. 1976, CUCHENS and CLEM 1977, ETLINGER 1978, SAKAI 1981, BLAXHALL 1985)。そのため、魚類のリンパ球が高率で smIg を保有するのは、Tリンパ球様の細胞も抗原リセプターとして smIg を利用しているのではないかとと思われる。

本研究結果から、ブリの smIg 保有細胞は cap 形成能や各種代謝阻害剤の影響などの多くの点ではほ乳類のBリンパ球と類似していることが認められた。

## 第2項 ブリの pre-B および抗体産生細胞の検出

一般に、ほ乳類のBリンパ球は骨髄中に認められる pre-B 細胞から成熟Bリンパ球へと変化して最終的には抗体産生細胞となるが、このBリンパ球の成熟状態の変化のなかで、smIg を保有するのは成熟Bリンパ球のみであることが知られている (BURROWS et al. 1978, PEARL et al. 1978, OSMOND et al. 1984)。いっぽう、pre-B 細胞や抗体産生細胞は smIg を保有しないが、細胞内に抗体を保有することが知られており、これを検出することによって、これらの細胞の簡易同定が行われている (HJUMANS 1969, RAFF 1977)。前節では、蛍光抗体法によるブリの smIg 保有細

胞 (smIg) の検出とその細胞の性質について調べたところ、cap 形成能などから、ほ乳類のBリンパ球に近い細胞であることが明らかとなった。しかし、ブリの pre-B 細胞や抗体産生細胞についての知見は乏しい。

そこで、本節ではブリのBリンパ球の成熟に伴う変化を明らかにするために、蛍光抗体法によるブリの細胞内抗体の検出を行い pre-B および抗体産生細胞の同定を行った。

## 実 験 方 法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した平均体重 80.7 g のブリ稚魚を用いた。

**飼育方法** 供試魚は流水式 800 l のプラスチック水槽に収容して、魚体重あたり12%の冷凍イカナゴ切身にビタミン剤 (武田薬品) を加えたものを、朝夕2回に分けて投与した。なお、本実験期間中の水温は 23.4~24.7°C であった。

**免疫方法** 生理的食塩水を用いて 2 mg/ml に調製したウサギ IgG (RIgG) と、フロイントの不完全アジュバント (Difco) を等量混合したものを、ブリ稚魚の腹腔内に1週おきに3回接種して免疫した。

**蛍光標識抗ブリ抗体ウサギ抗体の調製** 抗ブリ抗体ウサギ抗血清から DEAE Affi-gel Blue (Bio-rad) により IgG 画分を回収して、Banner et al. (1983) の方法により FITC 標識を行った。また、常法によってローダミン (TRITC) 標識抗体も作製した。

**smIg の検出** smIg の検出法には、直接蛍光抗体法を用いた。すなわち、反応至適濃度に調整した TRITC 標識抗ブリ抗体ウサギ IgG と 0.02 M アジ化ナトリウムを含む MRPMI 1640 培地で、 $1 \times 10^7$  cells/ml に調製した白血球浮遊液を等量混合し、25°C で30分間反応させた。そして、400×g で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、落射形蛍光顕微鏡 (Nikon) で検鏡した。

**smIg保有細胞の検出法の比較** smIg の検出は反応至適濃度に調整した FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ IgG と 0.02 M アジ化ナトリウムを含む MRPMI 1640 培地で、 $1 \times 10^7$  cells/ml に調製した白血球浮遊液を等量混合し、25°C で30分間反応させた。そして、400×g で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、蛍光顕微鏡で観察した。

**頭腎細胞浮遊液の調製** ヘパリン処理したシリンジを用いて心臓穿刺法により採血した供試魚から、ただちに頭腎部を摘出した。頭腎部は0.15% NaCl 加ハンクス液 (日水, HBSS) 中でハサミを用いて細片化したのち白金メッシュで臓器片を取り除いた。そして、血液および各臓器細胞浮遊液は比重1.095に調製した Percoll 溶液に重層して、1,500×g で5分間の遠心操作を行い、赤血球を除去した。その後、血液および各臓器細胞は HBSS を用いて 400×g で5分間の遠心洗浄を3回繰り返したのち、HBSS 中に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁して頭腎細胞浮遊液とした。

**細胞内抗体の検出** 頭腎細胞浮遊液を用いて、SÖVÉNYI and KUSUDA (1987) の方法によってスメアを作製した。スメアは -20°C の95%エタノールで30分間固定したのち、HBSS で洗浄した。

洗浄後、猪子・糸賀 (1974) の方法によってペルオキシダーゼ染色およびヘマトキシリン染色を行ったのち至適濃度の FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ IgG を重層して、37°C で1時間反応させた。反応後、HBSS を用いてスメアを洗浄したのち、蛍光顕微鏡 (日本光学) で観察し、細胞内抗体を検出した。

**細胞内特異抗体の検出** 免疫魚から作製した血液および各臓器細胞浮遊液を用いて前述の方法でスメアを作製して固定・染色したのち、1 mg/ml の濃度に調製した RIgG 液を重層し、25°C で2時間反応させた。スメアは HBSS で洗浄したのち、FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG を重層して 37°C で1時間反応させた。反応後、スメアは HBSS で洗浄したのち、蛍光顕微鏡を用いて細胞内特異抗体保有細胞を検出した。

### 結 果

頭腎部の細胞内抗体保有細胞の蛍光像および特徴は Fig. 7 A-D および Table 4 に示すとおりである。細胞内抗体保有細胞は蛍光像の強弱および形態から Fig. 4A-D に示した4種類に分類された。A は楕円形の細胞で長径が 10-15  $\mu\text{m}$ 、短径が 8-12  $\mu\text{m}$  で細胞質が強い蛍光を示し、細胞内の暗い部分の面積が細胞の半分以下のもので、Type 1 とした。B はほぼ円形の細胞で直径が 12-17  $\mu\text{m}$  で細胞質内が Type 1 よりは弱い蛍光を示し、細胞内の暗い部分の面積が細胞の半分以下のもので Type 2 とした。C は洋ナシ形の細胞で、細胞質内の蛍光が弱く、細胞内の暗い部分の面積が細胞の半分程度のもので Type 3 とした。D は楕円形の細胞で、細胞質内の蛍光が

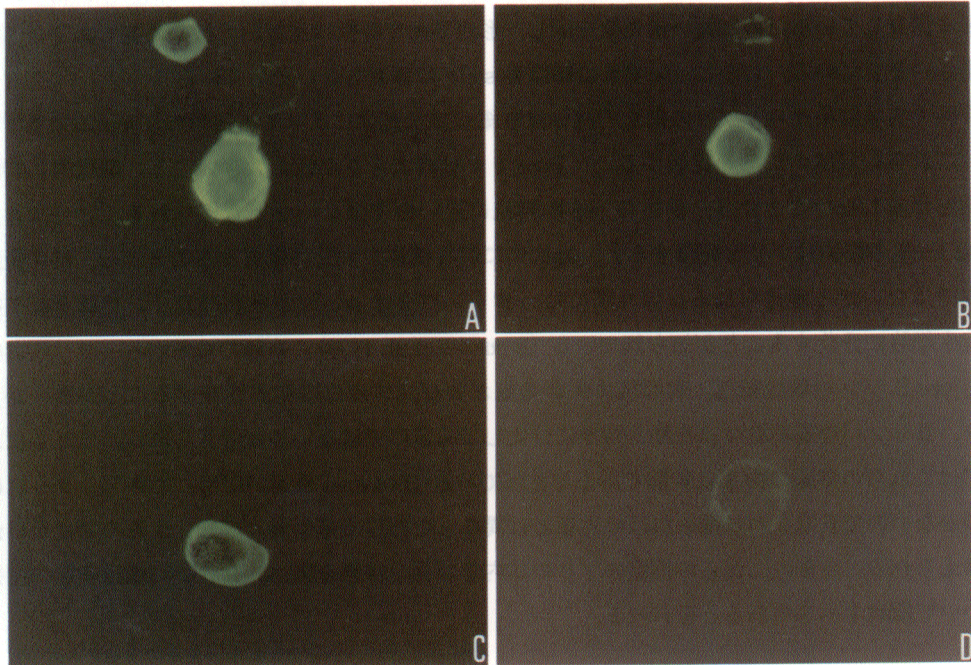


Fig. 7. Various types of appearance of immunoglobulin in cytoplasm of yellowtail head kidney cells marked with FITC labeled anti-yellowtail-immunoglobulin M rabbit IgG (X 1,000, A; Type-1, B; Type-2, C; Type-3, D; Type-4).

**Table 4.** Characteristics of head kidney cells with immunoglobulin in cytoplasm (cIg) of yellowtail

Characteristics	Type of cIg cells			
	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4
Size ( $\mu\text{m}$ )	10-15 ×8-12	12-17	10-15 ×8-10	12-17
Peroxidase	—	—	—	—
smlg	—	—	—	—
Fluorescence	+++	+++	+++	+

Fluorescence: + + +, intense; +, distinct.

弱く、細胞内の暗い部分の面積が細胞の80%以上を占めるもので、Type 4 とした。また、いずれの Type の細胞とも、ペルオキシダーゼが陰性で、smlg を保有していなかった。細胞内特異抗体保有細胞を検出した結果、Type 1~3 の細胞は細胞内特異抗体を保有していたが、Type 4 は保有していなかった。

## 考 察

一般に、細胞内抗体保有細胞には pre-B 細胞と抗体産生細胞があることが知られている。RAFF (1977) と HJMAN (1969) は細胞内抗体保有細胞を蛍光抗体法によって検出した結果、pre-B 細胞は細胞質内に抗体の  $\mu$  鎖だけをもち、また、その保有量も少ないために蛍光が弱く、比較的大型の核が大きい細胞であるとしている。いっぽう、抗体産生細胞は細胞質内に多量の抗体分子を保有しているために強い蛍光像を示し、形態学的な特徴は比較的大型の細胞であるが、核は小さいとしている。しかし、いずれの細胞も smlg は保有しないとしている。

今回の実験結果から、ブリの細胞内抗体保有細胞は蛍光像によって4種類の Type に分類できた。これらの細胞の形態を比較すると、Type 4 が核の大きさが最も大きいこと、細胞内に特異抗体を保有しないことから、前述の pre-B 細胞に近いのではないかと考えられる。いっぽう、Type 1~3 の細胞はブリを免疫すると、細胞内に特異抗体を大量に保有することから、抗体産生細胞ではないかと考えられる。ほ乳類では、Bリンパ球は pre-B から成熟Bリンパ球を経て抗体産生細胞に分化することが知られている (BURROWS et al. 1978)。本節の結果から、ブリにおいても pre-B リンパ球様細胞、表面抗体保有細胞および抗体産生細胞が存在することが明らかとなり、Bリンパ球様細胞はほ乳類と同様に分化してくるのではないかと考えられる。ほ乳類においてはこれらの細胞の由来は骨髄であるとされている (BURROWS et al. 1978)。しかし、ブリには骨髄がないのでBリンパ球様細胞はほ乳類とは異なった部位で産生および分化するのではないかと考えられる。今後はこれらの細胞のブリの体内での分布状態を調べ、Bリンパ球様細胞の由来について検討すべきであると思われる。

### 第3項 蛍光抗体法によるブリの胸腺リンパ球表面抗原保有細胞の検出

ほ乳類や鳥類ではTリンパ球の成熟および分化の場所が胸腺であることが知られている



(WEISSMAN 1972, WEISSMAN et al. 1975, WEKERLE et al. 1980)。前節までに、ブリのリンパ球の分類を進めるために、蛍光抗体法によるブリの smIg 保有細胞および細胞内抗体保有細胞の検出を行ってきた。その結果、ほ乳類のBリンパ球に類似する細胞が認められた。いっぽう、ブリにおいても胸腺が存在するので、胸腺由来のほ乳類のTリンパ球に類似する細胞があるのではないかと考えられる。

そこで、本節では蛍光抗体法によるブリの胸腺抗原保有細胞の検出を行った。

## 実験方法

**供試魚** 高知県浦の内湾で飼育されていた魚体重 37-780 g の 1 および 2 年魚のブリを用いた。

**飼育方法** 供試魚は 800 l のプラスチック水槽に収容して、魚体重の12%量のイカナゴにハマチエードS (武田薬品工業) を加えたものを、朝夕 2 回にわけて投与した。なお、本実験期間中の水温は 23.9~25.8°C であった。

**胸腺リンパ球浮遊液の調製** 28尾のブリ稚魚から採取した胸腺をダルベッコのリン酸緩衝食塩水 (日水, PBS) 中でそれぞれ細片化したのち、白金メッシュでろ過して臓器片を除去した。ろ液中の細胞は同液で 400×g で 5 分間の遠心操作によって 3 回洗浄したのち、比重 1.077 の Ficoll-paque 液に重層して 1000×g 5 分間の遠心操作を行い、リンパ球層を回収した。リンパ球は PBS で 3 回洗浄したのち、同液に  $1 \times 10^8$  cells/ml となるように調製して胸腺リンパ球浮遊液とした。

**胸腺リンパ球表面抗原 (CATL) の調製** ブリ胸腺細胞浮遊液と 10 mM の EDTA 水溶液とを等量混合し、37°C で 2 分間反応させた。反応後、400×g で 5 分間の遠心操作を行って上清を回収した。上清は Lowry 法によってタンパク量を測定したのちに、PBS でタンパク濃度が 50  $\mu\text{g/ml}$  となるように調製し、ブリ CATL 懸濁液として、使用時まで -80°C で保存した。

**抗 CATL ウサギ血清の作製** このブリ CATL 懸濁液とフロイントの完全アジュバントとを等量に混合して乳化したのち、ウサギの皮下に接種した。免疫は 1 週おきに 3 回行ったのち、さらに 2 週おきに 2 回行った。最終免疫から 4 週間後に追加免疫を行い、1 週間後に耳静脈から採血した。血液は 4°C で 1 晩放置したのち、400×g で 30 分間の遠心操作によって血清を分離したのち、56°C で 30 分間の非働化を行い、抗ブリ CATL ウサギ抗血清とした。

**抗 CATL 血清とブリの赤血球、血清および抗体との反応性の検討** ヘパリン処理したシリンジを用いて、心臓穿刺法によって採血した血液を PBS で 2 倍希釈したのち、比重を 1.095 に調製した Percoll に重層して、400×g で 30 分間の遠心操作を行った。遠心後、赤血球画分を回収して、PBS で 3 回洗浄したのち、同液に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁した。この赤血球懸濁液に 10 倍量の蒸留水を加えて溶血させたのち、400×g で 5 分間の遠心操作によって上清を回収し、ブリ赤血球抗原液とした。ブリ血清および抗体の調製は本章第 1 節第 1 項の方法によって行った。抗 CATL ウサギ血清とブリの赤血球、血清および抗体との反応性の比較は ELISA 法によって行った。すなわち、PBS を用いてそれぞれのタンパク量が 100  $\mu\text{g/ml}$  となるように調整し、その 100  $\mu\text{l}$  を 96 穴のマルチプレート (Nunc) に添加して、4°C で 18 時間反応させた。反応後、各

ウェルを PBS で 3 回, 0.05% Tween 20 加 PBS で 1 回洗浄したのち, 1% ウシ血清アルブミン加 PBS 100  $\mu$ l を添加した。37°C で 1 時間反応させた。反応後, 前述の方法で各ウェルを洗浄したのち, PBS で 2 倍段階希釈した抗 CATL ウサギ血清を添加して, 37°C で 2 時間反応させた。前述の方法でウェルを洗浄したのち, 松原他 (1985) の方法によって作製したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗体ヤギ抗体を添加した。37°C で 2 時間反応させたのちにウェルを洗浄し, 0.005% o-フェニレンジアミン加リン酸緩衝液を添加して 25°C で 30 分間反応させたのち, 各ウェルの発色度をクロマトスキャナー (島津 CS-900) で 492 nm の吸光度を測定して, ELISA タイターを算出した。

**FITC 標識抗 CATL ウサギ抗体の作製** 抗 CATL ウサギ抗血清をアセトン乾燥肝臓粉末, プリ赤血球および精製プリ抗体でそれぞれ 2 回吸収したのち, 本節第 1 項の方法によって IgG 画分を回収するとともに FITC 標識を行った。

**FITC 標識抗 CATL ウサギ抗体の反応力価の測定** プリ胸腺細胞浮遊液と 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 倍に希釈した FITC 標識抗 CATL ウサギ抗体および FITC 標識正常ウサギ抗体を等量混合して, 25°C で 1 時間反応させた。反応後, 蛍光顕微鏡 (日本光学) で蛍光像を観察した。

**プリ血球浮遊液の調製** ヘパリン処理したシリンジを用いて心臓穿刺法により採血したプリ血液を, 5% ウシ胎児血清 (FBS) および MRPMI 1640 培地で 2 倍希釈したのち, 比重 1.077 のヒトリンパ球分離液 Ficoll-Hypaque (Pharmacia) を用いて栓球を含む白血球を分離した。これらの血球を同培地で 3 回洗浄したのちに,  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように調製し, 栓球を含む白血球浮遊液 (白血球浮遊液) を作製した。

**プリ胸腺由来細胞の検出** プリ血液白血球浮遊液と 800 倍に希釈した FITC 標識抗 CATL ウサギ抗体および FITC 標識正常ウサギ抗体を等量混合して, 25°C で 1 時間反応させた。反応後, 蛍光顕微鏡で蛍光像を観察した。

## 結 果

抗プリ胸腺抗原ウサギ抗血清とプリの赤血球, 血清および精製抗体との反応性は Table 5 に示すとおりである。平均 ELISA タイターは赤血球が 1:64, 血清が 1:512, 精製抗体が 1:256, CATL が 1:32,768 となった。

FITC 標識抗 CATL ウサギ抗体の胸腺細胞に対する反応性の比較は Table 6 に示すとおりであ

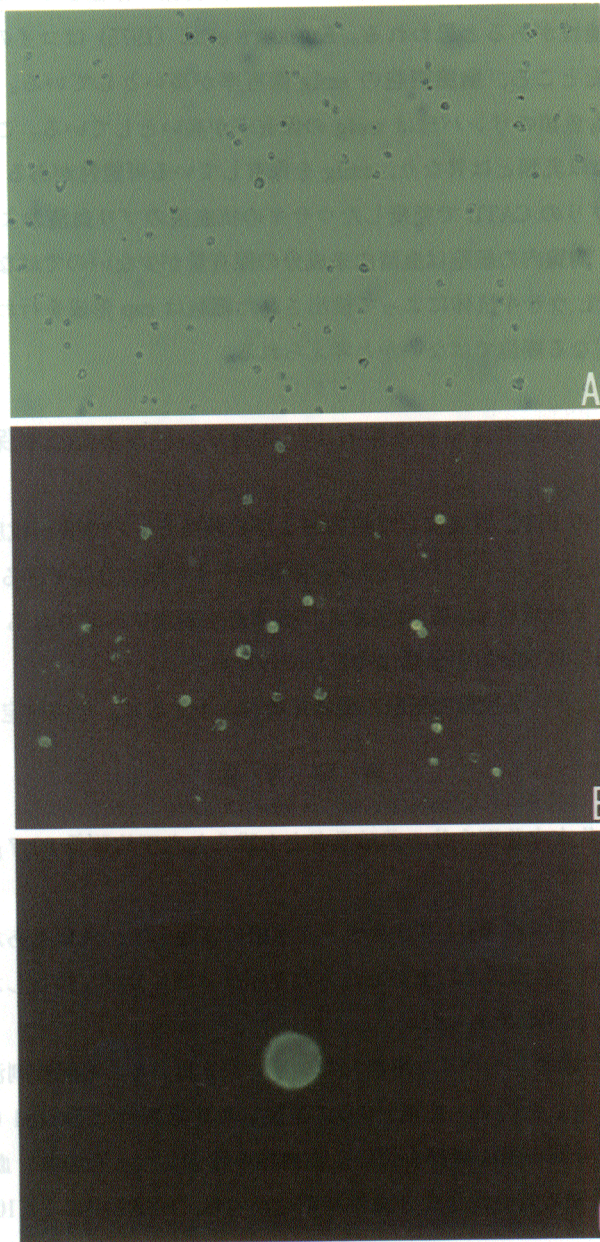
**Table 5.** ELISA titer of anti-cells surface antigen of yellowtail thymic lymphocytes rabbit IgG against yellowtail erythrocytes, serum and purified immunoglobulin M

Substances	ELISA titer (1:)
Erythrocytes	64
Serum	512
Immunoglobulin M	256
CATL	32768

**Table 6.** Reactivity of FITC labeled anti-cell surface antigens of yellowtail thymic lymphocytes (CATL) and normal rabbit IgG against yellowtail thymic lymphocytes

Rabbit serum	Dilution of FITC labeled rabbit IgG						
	10	50	100	200	400	800	1600
Anti-CATL	+++*	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Normal	+++	+	+	—	—	—	—

\* Fluorescence: +++, intense; ++, moderate; +, distinct; —, negative.



**Fig. 8.** Profiles of yellowtail blood lymphocytes under phase contrast microscope (X 200, A) and cell surface antigens on yellowtail thymic lymphocytes (CATL) on yellowtail blood cells marked with FITC labeled anti-CATL rabbit IgG (B; X 200, C; X 1,000).

る。胸腺細胞には1600倍、対照血清には100倍となった。

FITC 標識抗 CATL ウサギ抗体によって検出された蛍光像は Fig. 8A-C に示すとおりである。ブリの血液白血球中には CATL を保有している細胞が認められたが、cap 形成は認められなかった。

## 考 察

ブリでは、骨髓やファブリキウス嚢は存在しないが、胸腺は存在しているので、Tリンパ球様細胞が存在する可能性があると思われる。EMMERICH et al. (1975) はコイの胸腺内の smIg 保有細胞の検出を行ったところ、胸腺細胞の smIg 保有率が高いとしている。いっぽう、ELLIS and PARKHOUSE (1975) も魚類のリンパ球は smIg の保有率が高いとしている。このことから、魚類の Tリンパ球様細胞はほ乳類とは異なり、smIg を保有している可能性があると思われる。しかし、本研究結果から、ブリの CATL で免疫したウサギの抗血清のブリ血清および抗体に対する反応性が低いことから、胸腺内の細胞は血清由来成分の保有量が少ないのではないかと考えられる。また、FITC 抗 CATL ウサギ抗体によって検出された細胞は cap 形成を行わないことから、表面抗体保有細胞とは異なる細胞ではないかと考えられる。

## 第 2 節 ブリの表面抗体保有細胞および胸腺リンパ球表面抗原保有細胞の同定

前節までに、ブリの FITC 標識抗ブリ抗体および抗胸腺リンパ球表面抗原 (CATL) ウサギ抗体を用いた蛍光抗体法によって、ブリのリンパ系細胞を 4 種類に分類できることが明らかとなった。それらのうち、2 種類は pre-B 細胞および抗体産生細胞に同定されると思われるが、smIg 保有細胞および CATL 保有細胞の分類は明らかではない。

そこで、本節ではこれら 2 種類の細胞の機能を調べるとともに、その同定を行った。

## 実 験 方 法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した平均体重 80.7 g のブリ稚魚を用いた。

**飼育方法** 供試魚は流水式 800 l プラスチック水槽に收容して、魚体重あたり 12% の冷凍イカナゴ切身にビタミン剤 (武田薬品) を加えたものを朝夕 2 回に分けて投与した。なお、本実験期間中の水温は 24.1~25.9°C であった。

**血液白血球浮遊液の調製** ヘパリン処理したシリンジを用いて、心臓穿刺法により採血した血液を HBSS で 2 倍希釈したのち、比重 1.095 に調製した比重調製剤 Percoll (Sigma) 溶液に重層して、1,500×g で 5 分間の遠心操作を行い、赤血球を除去した。その後、血液細胞は HBSS を用いて 400×g で 5 分間の遠心洗浄を 3 回繰り返したのち、HBSS 中に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁した。

**胸腺リンパ球浮遊液の調製** ブリ稚魚から採取した胸腺をダルベッコの PBS 中でそれぞれ細

片化したのち、白金メッシュでろ過して臓器片を除去した。ろ液中の細胞は同液で  $400\times g$  で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、比重1.077の Ficoll-Hypaque 液に重層して  $1,000\times g$  5分間の遠心操作を行い、リンパ球層を回収した。リンパ球は PBS で3回洗浄したのち、同液に  $1\times 10^8$  cells/ml となるように調整して胸腺リンパ球浮遊液とした。

**smIg 保有細胞の検出法の比較** smIg の検出は反応至適濃度に調整した FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ IgG と 0.02 M アジ化ナトリウムを含む MRPMI 1640 培地で、 $1\times 10^7$  cells/ml に調整した白血球浮遊液を等量混合し、 $25^\circ\text{C}$  で30分間反応させた。そして、 $400\times g$  で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、蛍光顕微鏡で観察した。

**ブリ CATL 保有細胞の検出** ブリ血液白血球浮遊液と800倍に希釈した FITC 標識抗 CATL ウサギ抗体および FITC 標識正常ウサギ抗体を等量混合して、 $25^\circ\text{C}$  で1時間反応させた。反応後、蛍光顕微鏡で蛍光像を観察した。

**Percoll を用いた分離比重の比較** 比重を1.053, 1.058, 1.064, 1.068, 1.073, 1.078, 1.084 に調整した Percoll 溶液に、血液白血球浮遊液および胸腺細胞浮遊液を重層して、 $1,500\times g$  で5分間の遠心操作を行った。そして、各比重層に形成された細胞層を回収して HBSS で洗浄したのち、蛍光抗体法によって smIg 保有細胞および CATL 保有細胞を検出した。

**smIg 保有細胞および CATL 保有細胞の貪食性および形態学的検査** 血液白血球浮遊液および胸腺細胞浮遊液と正常ブリ血清および0.5%ラテックス溶液とを、それぞれ5:4:1の割合で混合したのち、 $25^\circ\text{C}$  で1時間反応させた。反応後、血液白血球浮遊液には FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ抗体、胸腺細胞浮遊液には FITC 標識抗 CATL ウサギ抗体を反応させたのち、暗所でスメアを作製した。蛍光顕微鏡を用いてスメア上の smIg 保有細胞および CATL 保有細胞を観察したのち、ステージ目盛りを用いてそれぞれの細胞の位置を確認した。その後、スメアを95%エタノールで固定したのち、ペルオキシダーゼとギムザの2重染色を行い、それぞれの細胞の貪食性および染色形態を観察した。

**ナイロンウールの付着性の比較** 血液白血球浮遊液と胸腺細胞浮遊液の smIg および CATL 保有細胞を、ナイロンウールを通過させる前後に検出して、それぞれの細胞のナイロンウールに対する付着性を検討した。

**smIg 保有細胞と CATL 保有細胞の細胞表面抗原の比較** 白血球浮遊液と FITC 標識を行っていない抗 CATL ウサギ抗体とを混合し、 $25^\circ\text{C}$  で30分間反応させたのちに、白血球を洗浄した。そして、洗浄白血球にローダミン標識抗ウサギ抗体ヤギ抗体 (E-Y Laboratory) を反応させた。再び白血球を洗浄したのちに、smIg 保有細胞の検出を行った。そして、蛍光顕微鏡で観察して、CATL 保有細胞と smIg 保有細胞の蛍光像を比較した。

**smIg 保有細胞および CATL 保有細胞の分離** 血液白血球から Fluorescent active cell sorter (コールター社, FACS) を用いて、smIg 保有細胞および CATL 保有細胞を分離した。そして、それぞれの細胞を 5 mM, HEPES, 0.15% NaCl, 20%ブリ血清加 RPMI 1640 培地 (日水) に  $1\times 10^7$  cells/ml となるように懸濁した。この各細胞浮遊液にフィットヘモアグルチニン (Difco, PHA), コンカナバリン A (和光純薬, Con A), ポークウィートマイトゲン (Difco, PWM), *Escherichia*

*coli* LPS (Difco) および抗ブリ抗体ウサギ抗体を、最終濃度がそれぞれ 0.1, 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加したのち、25°C で96時間培養した。培養後 400×g で5分間の遠心操作を行い、培養上清を回収したのち、グルコースCテストキット (和光純薬) を用いて培地中のグルコース量を測定した。

結 果

Percoll を用いた smIg 保有細胞および CATL 保有細胞の分離比重を比較した結果は Table 7 に示すとおりである。smIg 保有細胞は比重が1.068~1.078, CATL 保有細胞は1.053~1.064の画分中の比率が最も高かった。

Table 7. Separation of lymphocytes with discontinuous layer of Percoll

Specific gravity of Percoll solution	Lymphocytes	Cells with smIg*	Cells with CATL**
1.053	+***	—	++
1.058	++	+	+++
1.064	++	+	++
1.068	+++	++	++
1.073	+++	+++	+
1.078	++	++	+
1.084	+	+	+

\*, Surface membrane immunoglobulin on lymphocytes.

\*\* , Cell surface antigens of yellowtail thymic lymphocytes.

\*\*\*, Percent of lymphocytes and cells: + + +, >50%; + +, 25-50%; +, 5-25%; —, <5%.

Table 8. Characteristics of the cells with cell surface membrane immunoglobulin (smIg) and cell surface antigens of thymic lymphocytes (CATL) of yellowtail

Characteristics	Cell with smIg	Cell with CATL
Size ( $\mu\text{m}$ )	3-6	3-6
Shape	round	round
Peroxidase	—	—
Phagocytosis	—	—
Cap formation	+	—
Adherence against nylon wool	+	—
smIg	+	—
CATL	+	+

smIg 保有細胞および CATL 保有細胞の染色形態, 貪食性, ナイロンウールの付着性および細胞表面抗原を検討した結果は Table 8 に示すとおりである。両細胞とも直径が 3~6  $\mu\text{m}$  の円形の細胞で核も円形であった。ギムザ染色によって細胞質は青灰色に染色され, 核質にはクロマチン網工が観察された。ペルオキシダーゼは陰性で, 貪食性も認められなかった。cap 形成は smIg 保有細胞にのみ認められた。また, ナイロンウールの通過性は CATL 保有細胞に認められたが, smIg 保有細胞には認められなかった。また, smIg 保有細胞は同時に抗 CATL ウサギ抗体と反応したが, CATL だけを保有する細胞も認められた。

各種レクチンに対する反応性は Fig. 9 に示すとおりである。ブリの血液中の smIg 保有細胞は PWM, LPS および抗ブリ抗体ウサギ抗体と反応した。反応至適濃度はそれぞれ, 1, 100, 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となった。CATL 保有細胞は PHA, Con A および PWM と反応した。反応至適濃度はそれぞれ 1, 1, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

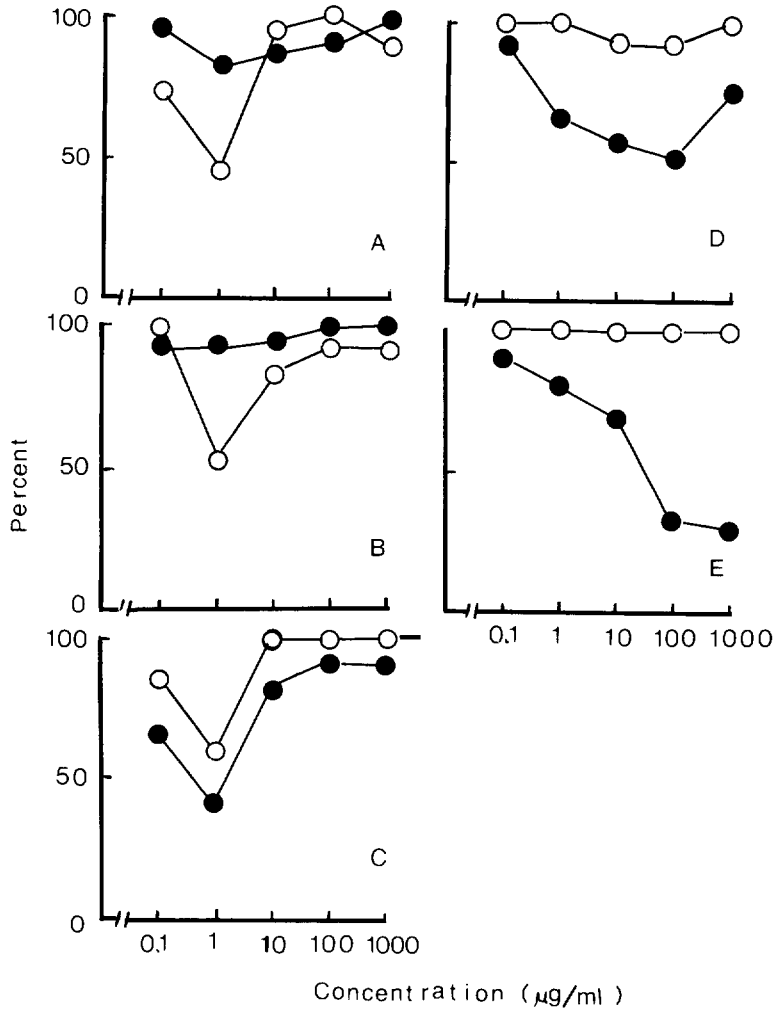


Fig. 9. Responsibility of yellowtail B-like and T-like lymphocytes against various mitogenic reagents. Symbols: ●, B-like lymphocytes; ○, T-like lymphocytes; A, PHA; B, Con A; C, PWM; D, LPS; E, anti-yellowtail immunoglobulin rabbit IgG.

考 察

smIg 保有細胞および CATL 保有細胞を比重遠心法によって分離したところ, smIg 保有細胞は比重が1.068~1.078, CATL 保有細胞は1.053~1.064の画分中の比率が最も高かった。LEWIS et al. (1979) はアメリカナマズのリンパ球の smIg 保有細胞やロゼット形成細胞の分離比重を調べたところ, smIg 保有細胞は比重が1.068, ロゼット形成細胞は1.070以上の画分に含まれると

している。本節の結果もこれらの報告と同様であった。

ブリの smlg 保有細胞および CATL 保有細胞は形態学的検査の結果、直径が 3~6  $\mu\text{m}$  の円形の細胞で、核も円形であった。ギムザ染色によって細胞質は青灰色に染色され、核質にはクロマチン網工が観察された。さらに、ペルオキシダーゼ顆粒をもたず、貪食性も認められなかった。これらのことから、ブリの smlg 保有細胞および CATL 保有細胞はいずれもリンパ球に同定されるものと思われる。また、ナイロンウールの通過性は CATL 保有細胞では認められたが、smlg 保有細胞には認められなかった。一般に、ほ乳類では T リンパ球はナイロンウールを通過するが、B リンパ球は通過しないので、この性質を利用してリンパ球の分離が行われている (栗林他 1976)。ブリのリンパ球においても、smlg 保有細胞と CATL 保有細胞のナイロンウールの通過性に差異が認められたことから、これらの細胞の分離方法として使用できる可能性があると思われる。また、smlg 保有細胞は同時に抗ブリ胸腺抗原ウサギ抗体と反応し、smlg 保有細胞は CATL も保有していることが明らかとなった。いっぽう、CATL 保有細胞だけを持つ細胞も認められた。SECOMBES et al. (1983) はコイの抗体および胸腺細胞抗原に対するモノクローナル抗体を作製して、コイの成長に伴うリンパ球表面抗原の変化を検討している。それによると、コイのリンパ球には smlg と CATL を保有するもの、smlg のみを保有するもの、CATL のみを保有する 3 種類のリンパ球が存在しており、成長とともに smlg のみを保有するリンパ球の比率が高まるとしている。ブリでは、smlg のみを保有するリンパ球は検出されず、smlg と CATL の両方を保有する細胞がほとんどであり、SCOMBES et al. (1983) の報告と相違が認められた。しかし、本研究ではポリクローナル抗体を使用しているために、その特異性に問題があると思われる。今後はモノクローナル抗体を用いて、ブリのリンパ球表面抗原の解析を進める必要があると思われるが、CATL 保有細胞の 1 部が smlg を保有していることが考えられ、これら 2 つの細胞群の機能は重複しているのではないかと考えられる。

リンパ球や細胞の分離には、現在ではモノクローナル抗体を用いた FACS によって行われることが多い (WHITE et al. 1978, TANAKA al. 1981, LOKEN and STALL 1982)。そこで、本節でも FACS を用いて smlg 保有細胞と CATL 保有細胞の単離を行った。その結果、それぞれの細胞群は単一のピークを示し、細胞の大きさに差異が認められないことから、構成細胞の種類が同じであることが考えられた。いっぽう、各種レクチンなどのリンパ球芽球化因子に対する反応性はリンパ球の同定的手段として用いられている。一般に、芽球化因子としては、T リンパ球では PHA, ConA, 同種白血球が、B リンパ球では高濃度 PPD, LPS, *Staphylococcus protein A*, 抗免疫グロブリン血清が、両者に反応するものとしては PWM が知られている。また、リンパ球の芽球化の判定方法としては形態学的な変化を観察する方法 (河合他 1970)、放射性物質の取り込みによる方法 (土屋他 1979, BACH et al. 1966)、培地中のグルコース消費量による方法 (MACHAFFIE 1967, DECODE 1980, 河野他 1980) などの方法が知られている。本節ではそれらのうちで客観性が高く、また操作の簡便なグルコース消費量によって、ブリのリンパ球の芽球化の判定を行った。その結果、ブリの smlg 保有細胞は PWM, *E. coli* LPS および抗ブリ抗体ウサギ抗体に対して反応したが、PHA および Con A に対する反応性は低かった。いっぽう、ブリの



CATL のみを保有する細胞は PHA , Con A および PWM によく反応することが明らかとなった。これらのことから、ブリの smIg 保有細胞はほ乳類の B リンパ球に、CATL のみを保有する細胞は T リンパ球に類似する特徴および機能をもった細胞であることが明らかとなった。魚類のリンパ球の各種レクチンなどの芽球化因子に対する反応性は ETLINGER (1976), CUCHENS and CLEM (1977), CHILMONCZYK (1978), ETLINGER (1978), SAKAI (1981), BLAXHALL (1985) によってそれぞれ、ブルーギル、ニジマス、コイ、ブラウントラウトなどで調べられており、B および T リンパ球のいずれかに反応するリンパ球の存在が明らかにされている。このように、魚類のリンパ球も芽球化反応によってほ乳類と同様に、B および T リンパ球に分類できることが知られている。本節の実験結果から、ブリのリンパ球も 2 種類のリンパ球から構成されることが明らかとなった。さらに、ブリのリンパ球は 2 種類の細胞から構成されるが、それらの細胞の表面抗原の検出結果から、smIg 保有細胞は CATL を保有していることにより、CATL 保有細胞から派生してきたのではないかと考えられる。ほ乳類においても胸腺中に B リンパ球抗原をもつ細胞が存在するとされており (JENTZ 1979)、ブリの B リンパ球は胸腺に由来するのではないかとと思われる。しかし、ブリの 2 種類のリンパ球はそれぞれ B および T リンパ球の機能をもち、互いに独立して存在すると思われるので、以後は smIg 保有細胞を B リンパ球、CATL だけを保有する細胞を T リンパ球とする。また、ブリのリンパ球を蛍光抗体法によって分類するときは、本節で用いた 2 重染色法がよいと思われる。今後はブリ体内におけるこれらの細胞の分布状態を調べこの 2 種類の細胞の分化について検討する必要があると思われる。

### 第 3 節 ブリの各種リンパ球、pre-B 細胞および抗体産生細胞の体内分布

前節までに、蛍光抗体法によるブリのリンパ系細胞の分類とそれぞれの細胞の同定を行った。その結果、ブリのリンパ系細胞は B リンパ球、T リンパ球、pre-B 細胞および抗体産生細胞に分類できることが明らかとなった。それらのうち、B リンパ球は CATL を保有していることから、胸腺に由来する細胞から分化してきたのではないかと考えられる。しかし、その分化の場所や方法については明らかではない。

そこで、本節ではブリの各種リンパ球、pre-B 細胞および抗体産生細胞の体内分布を調べ、それぞれの細胞の分化および定着部位について検討した。

#### 実験方法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した平均体重 80.7 g のブリ稚魚を用いた。

**飼育方法** 供試魚は流水式 800 l プラスチック水槽に収容して、魚体重あたり 12% の冷凍イカナゴ切身にビタミン剤 (武田薬品) を加えたものを朝夕 2 回に分けて投与した。

**各臓器および血液細胞浮遊液の調製** ヘパリン処理したシリンジを用いて心臓穿刺法により採血したのち、ただちに脳、鰓、胸腺、頭腎部、腎臓前部、腎臓中部、腎臓後部、肝臓、脾臓およ

び腸管を採取した。これらの臓器を HBSS 中で解剖用ハサミで細片化したのち、白金メッシュでろ過して臓器片を取り除いた。そして、これらの各臓器細胞浮遊液および HBSS で 2 倍希釈した血液を、比重 1.095 に調製した Percoll 溶液に重層して、 $1,500 \times g$  で 15 分間の遠心操作を行い、赤血球以外の細胞層を採集した。細胞は HBSS を用いて  $400 \times g$  で 5 分間の遠心洗浄を 3 回繰り返して洗浄したのち、HBSS 中に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁し、各臓器および血液細胞浮遊液とした。

**各臓器および血液リンパ球浮遊液の調製** 各臓器および血液細胞浮遊液に HBSS 中に 1 mg/ml の濃度となるように調製したカルボニル鉄懸濁液を加えて、 $25^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応後、比重 1.077 に調製した Percoll 溶液に重層して、 $1,500 \times g$  で 15 分間の遠心操作を行い、リンパ球層を採集した。リンパ球は HBSS を用いて  $400 \times g$  で 5 分間の遠心洗浄を 3 回繰り返して洗浄したのち、HBSS 中に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁し、各臓器および血液リンパ球浮遊液とした。

**各臓器および血液細胞浮遊液中のリンパ球数の測定**  $100 \mu\text{l}$  の各臓器および血液細胞浮遊液を  $400 \times g$  で 5 分間の遠心操作を行い、細胞を回収した。この細胞を  $10 \mu\text{l}$  のウシ胎児血清に懸濁したのち、常法によりスメアを作製した。スメアは 95% のエタノールで固定したのち、ペルオキシダーゼとギムザの 2 重染色を行った。染色後に検鏡して 1,000 個以上の細胞を観察し、リンパ球の比率を求めた。この比率に細胞数を乗じてリンパ球の絶対数を求めた。

**ブリの B リンパ球の検出** smIg の検出は反応至適濃度に調整した FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ IgG と 0.02 M アジ化ナトリウムを含む MRPMI 1640 培地で、 $1 \times 10^7$  cells/ml に調製した各臓器および血液リンパ球浮遊液を等量混合し、 $25^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。そして、 $400 \times g$  で 5 分間の遠心操作によって 3 回洗浄したのち、蛍光顕微鏡で観察した。

**ブリの T リンパ球の検出** ブリの各臓器および血液リンパ球と 800 倍に希釈した FITC 標識抗ブリ CATL 表面抗原ウサギ抗体を  $25^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた後、蛍光顕微鏡で蛍光像を観察して CATL 陽性細胞数を求めた。この値から先に求めた B リンパ球数をひいて T リンパ球数とした。

**細胞内抗体の検出** 頭腎細胞浮遊液を用いて、SÖVÉNYI and KUSUDA (1987) の方法によってスメアを作製した。スメアは  $-20^\circ\text{C}$  の 95% エタノールで 30 分間固定したのち、HBSS で洗浄した。洗浄後、猪子・糸賀 (1974) の方法によってペルオキシダーゼ染色およびヘマトキシリン染色を行ったのち至適濃度の FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ IgG を重層して、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応後、HBSS を用いてスメアを洗浄したのち、蛍光顕微鏡 (日本光学) で観察し、細胞内抗体を検出した。

**細胞内特異抗体の検出** 免疫魚から作製した血液および各臓器細胞浮遊液を用いて前述の方法でスメアを作製して固定・染色したのち、1 mg/ml の濃度に調製した RIgG 液を重層し、 $25^\circ\text{C}$  で 2 時間反応させた。スメアは HBSS で洗浄したのち、FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG を重層して  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応後、スメアは HBSS で洗浄したのち、蛍光顕微鏡を用いて細胞内特異抗体保有細胞を検出した。

結 果

各臓器および血液細胞浮遊液中のリンパ球数を調べた結果は Table 9 に示すとおりである。10<sup>4</sup> 個の各臓器および血液細胞中のリンパ球数は脳が 10<sup>2.9</sup>, 鰓が 10<sup>3.5</sup>, 胸腺が 10<sup>3.9</sup>, 頭腎部が 10<sup>3.1</sup>, 腎臓前部が 10<sup>3.1</sup>, 腎臓中部が 10<sup>3.1</sup>, 腎臓後部が 10<sup>3.2</sup>, 肝臓が 10<sup>2.9</sup>, 脾臓が 10<sup>3.5</sup>, 腸管が 10<sup>3.1</sup> および血液細胞が 10<sup>3.6</sup> 個となった。

Table 9. Distribution of lymphocytes in yellowtail various organs

Organs	Log number of lymphocytes (10 <sup>4</sup> cells)	Mean percent in lymphocyte		
		smIg* <sup>1</sup>	CATL* <sup>2</sup>	NM* <sup>3</sup>
Brain	2.9(0.3)* <sup>4</sup>	22.1( 5.8)	74.8( 9.2)	3.0(0.9)
Gill	3.5(0.2)	41.5( 3.2)	53.8( 5.7)	5.7(1.0)
Thymus	3.9(0.1)	0.4( 0.2)	88.6(10.3)	11.0(2.7)
Head kidney	3.1(0.2)	28.6( 3.2)	70.4( 5.7)	0.9(0.1)
Kidney 1	3.1(0.1)	37.0( 2.1)	61.2( 2.1)	1.8(0.1)
Kidney 2	3.1(0.3)	36.6( 4.8)	62.8( 6.2)	0.6(0.1)
Kidney 3	3.2(0.1)	42.2( 3.3)	54.2( 2.9)	3.6(0.3)
Liver	2.9(0.2)	81.4( 5.6)	18.0( 7.8)	0.6(1.0)
Spleen	3.5(0.3)	91.1(10.3)	5.5( 2.1)	3.4(0.8)
Intestine	3.1(0.2)	44.9( 4.6)	50.4( 6.3)	5.7(0.6)
Blood	3.6(0.3)	60.5( 8.3)	36.6( 4.2)	2.9(0.4)

\*<sup>1</sup> Surface membrane immunoglobulin.

\*<sup>2</sup> Cell surface antigens of yellowtail thymic lymphocytes only.

\*<sup>3</sup> Not marked with FITC labeled anti-smIg and anti-CATL rabbit IgG

\*<sup>4</sup> Standard deviation

各臓器および血液細胞浮遊液中のBおよびTリンパ球の比率を調べた結果は Table 9 に示すとおりである。各臓器および血液細胞中のBおよびTリンパ球の比率はそれぞれ脳が22.1と74.8%, 鰓が41.5と53.8%, 胸腺が0.4と88.6%, 頭腎部が28.6と70.4%, 腎臓前部が37.0と61.2%, 腎臓中部が36.6%と62.8%, 腎臓後部が42.2と54.2%, 肝臓が81.4と18.0%, 脾臓が91.1と5.5%, 腸管が44.9と50.4%および血液細胞60.5と36.6%となった。

各臓器および血液細胞浮遊液中の抗体産生細胞数を調べた結果は Table 10 に示すとおりである。10<sup>4</sup> 個の各臓器および血液細胞中の抗体産生細胞数は脳が0, 鰓が19.4, 胸腺が0, 頭腎部が83.2, 腎臓前部が74.8, 腎臓中部が73.4, 腎臓後部が67.1, 肝臓が9.3, 脾臓が26.6, 腸管が4.8, 血液細胞が9.2個となった。

各臓器および血液細胞浮遊液中の pre-B 細胞と抗体産生細胞の比率を調べた結果は Table 10 に示すとおりである。脳, 鰓, 胸腺, 腎臓前部, 腎臓中部および腸管細胞中には抗体産生細胞だけであった。Pre-B 細胞は頭腎部が0.1%, 腎臓後部が0.4%, 肝臓が37.1%, 脾臓が39.5%および血液が0.9%となった。

Table 10. Distribution of yellowtail cell with immunoglobulin in cytoplasm (cIg)

Organs	Number of cells with cIg (/10 <sup>4</sup> cells)	Mean percent in cell with cIg		
		APC* <sup>1</sup>	pre-B cell	NI* <sup>2</sup>
Brain	0 (—)* <sup>3</sup>	0 (—)	0 (—)	0 (—)
Gill	19.4( 9.3)	95.2( 2.3)	0 (—)	4.8(1.1)
Thymus	0 (—)	0 (—)	0 (—)	0 (—)
Head kidney	83.2(11.9)	84.6(11.4)	0.1(0.1)	15.3(2.5)
Kidney 1	74.8(12.4)	90.2( 2.9)	0 (—)	9.8(1.6)
Kidney 2	73.4(21.6)	85.2( 2.4)	0 (—)	14.8(3.2)
Kidney 3	67.1(11.4)	89.6( 0.4)	0.4(0.1)	10.0(2.8)
Liver	9.3( 2.2)	43.5( 2.8)	37.1(9.8)	19.4(2.6)
Spleen	26.6(15.6)	50.4( 2.5)	39.5(2.6)	10.1(8.5)
Intesitne	4.8( 0.6)	100.0(—)	0 (—)	0 (—)
Blood	9.2( 1.1)	79.6( 8.2)	0.9(0.1)	19.5(2.9)

\*<sup>1</sup> Antibody producing cells.

\*<sup>2</sup> Standard deviation.

\*<sup>3</sup> Not identified.

## 考 察

鳥類やほ乳類のリンパ球は骨髄およびファブリキウス嚢と胸腺という2つの分化の部位をもち、造血組織由来の幹細胞がこれらのいずれかに移行し、BおよびT細胞に分化してくることが知られている (COOPER et al. 1966)。そのために、Tリンパ球の分化部位である胸腺内にはBリンパ球はほとんど認められない。しかし、ブリなどの硬骨魚類では胸腺は存在するが骨髄やファブリキウス嚢は存在しないので、頭腎や脾臓などがその代わりとなるのではないかと考えられている。前節において、ブリのBリンパ球は同時に胸腺抗原をもつことから、胸腺由来細胞から分化してきたのではないかと考えられる。本節において、各臓器および血液細胞浮遊液中のBおよびTリンパ球の比率を調べた結果、これらの2つの細胞の体内分布には差異が認められ、肝臓、脾臓および血液中にはBリンパ球、胸腺、脳および頭腎はTリンパ球の比率が高いことが明らかとなった。これらのことから、Bリンパ球には肝臓や脾臓が重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。EMMERICH et al. (1975) はコイの smIg 保有細胞を検出した結果、血液、脾臓および頭腎中に高い比率で検出され、さらに、胸腺細胞の65~68%の細胞が smIg を保有していたとしている。WARR et al. (1979) はニジマスの胸腺リンパ球も smIg を保有するとしている。いっぽう、PASQUIER et al. (1972) は両性類の smIg の検出を行った結果、脾臓の smIg 保有細胞の比率は成長に伴う変化は認められなかったが、胸腺細胞では幼生時には70%であるのに対し、成体では9%となったとしている。このように、胸腺の機能は成熟段階と密接な関連があると思われる。一般に、ヒトでは胸腺の機能は出生直後が最も高く、それ以後は低下することが知られている。本実験に用いたブリ供試魚は稚魚期の段階にあるため、コイなどの結果と異なる可能性があると思われる。また、奥村 (1985) は胸腺内には多様なフェノタイプの細胞が存在し、それらの

うち胸腺外部に出てくる細胞は1部分であるとしている。このように、ブリの胸腺内の smIg 保有細胞の比率が低かったのは、ブリの成熟度によるのではないかと考えられるが、今後さらに検討する必要があると思われる。いっぽう、ELLIS et al. (1975) はツノガレイの胸腺細胞の体内循環を調べた結果、循環系のリンパ球は胸腺内にもどることがなく、そのほとんどが脾臓や頭腎などに定着したとしている。このことから、硬骨魚の胸腺を含めたリンパ球の流れは1方向であり、幹細胞～胸腺～脾臓および腎臓と流れるのではないかと考えられる。これによって、ブリの体内におけるリンパ球の流れを考えると、Bリンパ球が CATL を保有していることや、pre-B 細胞が脾臓や肝臓に多いこと、および本章第4節の結果から、胸腺から脾臓、脾臓から肝臓へと移行するものと、胸腺から直接循環系に入ってから出て行くものの2つに分かれるのではないかと考えられる。そして、前者が脾臓や肝臓で表面抗体を保有するような特徴や LPS に対する反応性を獲得するのではないかと考えられる。しかし、JENTZ (1979) はウサギの胸腺内にも Bリンパ球に該当する細胞が存在しているとしている。このことから、ブリの Bリンパ球が胸腺抗原を保有するのはこのような胸腺内の Bリンパ球となるような細胞群が存在し、胸腺をでたのちにその形質が脾臓や肝臓で発現するのではないかと考えられる。いっぽう、pre-B 細胞は脾臓や肝臓に多い結果となった。魚類では pre-B 細胞の体内分布はこれまでに調べられていないが、ほ乳類では骨髄など Bリンパ球の産生部位とされている場所に多いことが知られている (HJMMANN 1969)。このことから、ブリの pre-B 様細胞が脾臓や肝臓に多く、また、ブリには骨髄が存在しないことから、これらの臓器が Bリンパ系細胞の産生に関与しているのではないかと考えられる。

ブリの抗体産生細胞は腎臓や頭腎部に多く分布していることが明らかとなった。抗体産生細胞はニジマスでは脾臓に多く (CHILLER 1969)、コイでは頭腎に多いことが知られている (RUKERS and MUISWINKEL 1977)。ブリはコイと同様であることが明らかとなった。抗体産生細胞は pre-B 細胞から smIg を持つ Bリンパ球を経て分化してくることが知られている (HJMMANN 1969)。しかし、これらのうち pre-B 細胞と Bリンパ球は脾臓および肝臓に多く分布していた。このような分布域の差異については、Bリンパ球の1連の分化の流れを考えると、明確にすることはできなかった。いっぽう、Bリンパ球から抗体産生細胞への移行には Tリンパ球が関与することが知られている。このことから、脾臓に抗体産生細胞が少ないのは Tリンパ球が少ないからではないかと考えられる。それに対して、頭腎は Tリンパ球の比率が高く、Bリンパ球から抗体産生細胞への移行が可能なのではないかと考えられる。以上の結果から、ブリの体内のリンパ球の動向を考えると、ブリのリンパ球のすべてが CATL を保有していることから、まず胸腺を経由すると思われる。その後、胸腺内で分化して循環系にでるものと、脾臓や肝臓に移行して Bリンパ球としての機能を発現するものに分かれるのではないかと考えられる。そして、脾臓や肝臓で成熟した Bリンパ球は抗原の侵入とともに、頭腎および腎臓に定着した Tリンパ球の助力によって、その場で抗体産生細胞に分化するのではないかと考えられる。

#### 第4節 免疫に伴う各種リンパ球の変化

前節までに、ブリのリンパ球はほ乳類と同様にBおよびTリンパ球の2種類で構成されることが明らかとなった。ほ乳類の細胞性免疫機構はこれらの2種類の細胞によって調整されていることが知られている(山口 1976, 坂口 1979)。ブリにおいても細胞性免疫機構はほ乳類と同様に、これらの2種類の細胞によって調整されるものと思われる。しかし、それぞれの細胞の細胞性免疫機構に及ぼす影響や機能については明らかにされていない。

そこで、本節では各種胸腺依存抗原で免疫した後のこれらの2種類の細胞の動向を調べるとともに、細胞性免疫機構に及ぼす影響や機能について検討した。

#### 実験方法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した平均体重 24.8 g のブリ稚魚を用いた。

**飼育方法** 供試魚は 800 l の流水式プラスチック水槽に収容して、魚体重の12%にあたるイカナゴミンチにハマチエードS (武田薬品工業) を加えたものを朝夕2回にわけて投与した。なお、本実験期間中の水温は 23.4~24.9°C であった。

**免疫抗原の作製** 免疫抗原にはトリニトロフェノール (TNP) 化したヒザラガイヘモシアニン (TNP-KLH), ウサギ IgG (TNP-IgG) およびウシ血清アルブミン (TNP-BSA) を用いた。各抗原の TNP 化は次のようにして行った。各抗原 100 mg を 10 ml の 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解したのち、10~50 mg のトリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを添加して18時間室温で反応させた。反応後、PBS したのち、透析内液に PBS を加えて 20 ml とし、タンパク量および導入された TNP 基数を測定した。タンパク量の測定は Lowry の方法によって行った。TNP 基数の測定は透析内液を PBS で50倍に希釈したのちに、348 nm の吸光度を測定し、同条件下での  $\epsilon$ -TNP-リジンのモル吸光係数17.400を用いて、TNP のモル数を算出した。この TNP のモル数を透析内液中の各抗原のモル数で割って、各抗原1分子あたりの TNP 基数を算出した。なお、各抗原の TNP 基数は10前後となるように調製した。

**免疫方法** 供試魚の腹腔内に 2 mg/ml の濃度の各抗原とフロイントの不完全アジュバントとを等量に混合したものを 0.5 ml ずつ接種した。

**血清の採取** 免疫ののち、1週間ごとに各区10尾の供試魚を取り上げて心臓穿刺法によって採血した血液から 4°C, 1,500×g で30分間の遠心操作によって血清を採取した。

**血液リンパ球浮遊液の調製** 免疫ののち1週間ごとに各区10尾の供試魚を取り上げ、ヘパリン処理したシリンジを用いて、心臓穿刺法により採血した血液を HBSS で2倍希釈したのち、比重1.095に調製した Percoll 溶液に重層して、1,500×g で5分間の遠心操作を行い、赤血球を除去した。その後、血液細胞は HBSS を用いて 400×g で5分間の遠心洗浄を3回繰り返したのち、HBSS 中に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁した。

血清中の抗体量の測定 抗ブリ抗体ウサギ抗体を用いて、松原ら (1985) のブリの血清抗体測定用の ELISA 法によって行った。

抗体産生細胞の検出 頭腎内の細胞内特異抗体保有細胞を検出した。頭腎細胞浮遊液の調製は 0.39% NaCl, 5 mM HEPES, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のストレプトマイシン, 150 units/ml のペニシリン G および 20% 非働化ブリ血清を含む L-15 (Flow Laboratory, ML-15) を用いて前節の方法によって行った。細胞濃度は  $2 \times 10^7$  cells/ml とした。赤血球の抗原感作はヒツジ赤血球 (SRBC) と各抗原を用いて細野 (1972) および HOSONO and MURAMATSU (1972) の方法によって行った。この抗原感作 SRBC は ML-15 中にヘマトクリット値が 15% となるように懸濁した。この SRBC 懸濁液と頭腎細胞浮遊液を等量混合したものと HBSS を用いて 0.6% 濃度に調製したアガロース溶液を等量混合したのち、あらかじめアガロースを被覆したスライドガラスに重層した。湿潤箱中で  $25^\circ\text{C}$ , 24 時間反応させたのちにスライドガラスは ML-15 を用いて至適濃度に希釈したブリ血清溶液中に浸漬した。そして、 $25^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させてプラーク数を計数した。

抗原結合細胞の検出 各免疫抗原を用いてグルタルアルデヒド法によって各免疫抗原感作ヒツ

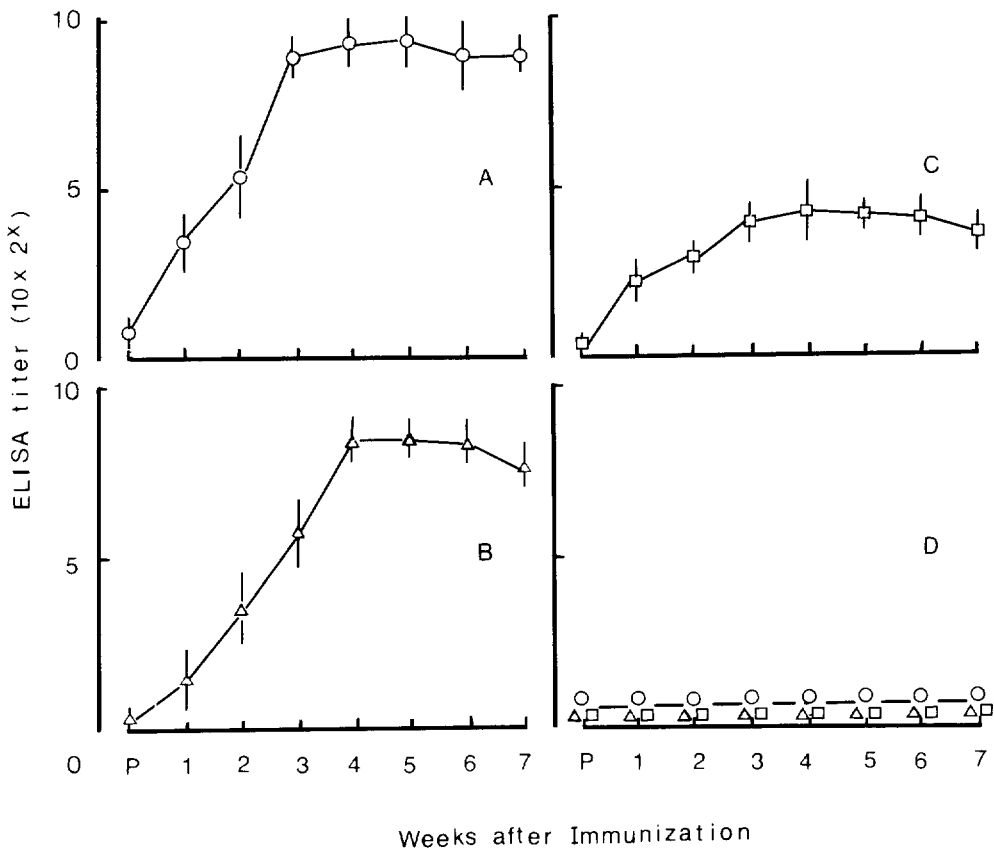


Fig. 10. Changes in levels of serum antibody levels against various antigens after immunization intraperitoneally. Symbols; A,  $\circ$ , TNP-keyhole iympt hemocyanin (TNP-KLH); B,  $\triangle$ , TNP-rabbit IgG (TNP-RlgG); C,  $\square$ , TNP-bovine serum albumin (TNP-BSA); D, control (no immunized fish); P, pre-immunization.

ジ赤血球を作製し、5 mM HEPES, 0.15% NaCl および 5%ウシ胎児血清加 RPMI 1640 培地に  $1 \times 10^8$  cells/ml の濃度となるように懸濁した。この赤血球懸濁液と血液リンパ球とを混合して、25°C で 2 時間反応させた。反応後、0.5%プリリアントクレシルブルー加0.1%グルタルアルデヒド溶液を加えたのち、血球計算盤 (Thoma, Erma) に添加して検鏡し、3 個以上の赤血球を結合したリンパ球を計数した。

抗原結合細胞の同定 TNP-KLH 免疫区の魚から各週ごとに採取した血液リンパ球を抗ブリ抗体ウサギ抗体で処理したのち、前述の方法で抗原結合細胞数を測定して、未処理試料と比較した。

結 果

免疫後の血液中の抗体量の変化は Fig. 10 に示すとおりである。各免疫区では免疫後 1 週間から血清中の抗体量は増加し、免疫 3 ~ 4 週間後に最大となった。各免疫区の血清中の最大抗体量は TNP-K-LH 区では  $1:2^{9.4}$ , TNP-RiGg 区では  $1:2^{8.1}$ , TNP-BSA 区では  $1:2^{4.0}$ , 対照区ではいずれの抗原に対しても  $1:2^{0.8}$  以下となった。

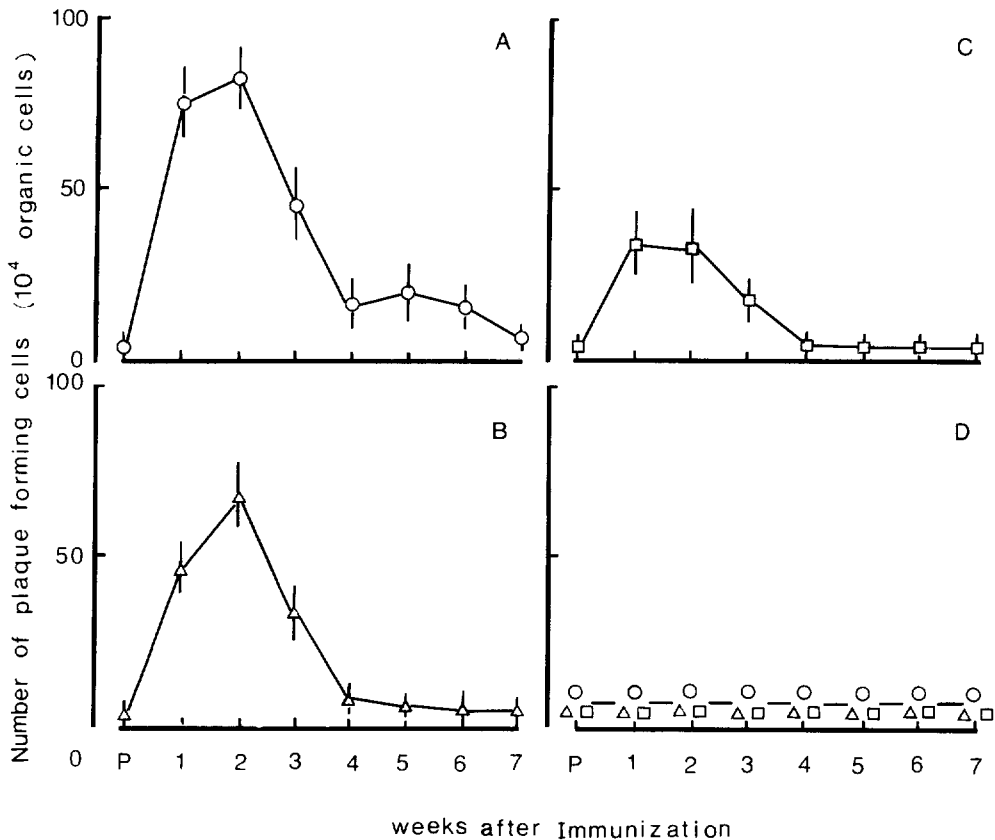


Fig. 11. Changes in number of hemolytic plaque forming cells in head kidney against various antigen coated sheep red blood cells. Symbols: A, ○, TNP-KLH; B, □, TNP-RiGg; C, △, TNP-BSA; D, control (no immunized fish); P, pre-immunization.



免疫後の頭腎中の抗体産生細胞数の変化は Fig. 11 に示すとおりである。各免疫区では免疫後 1 週間から頭腎中の抗体産生細胞は増加し、免疫後 1～2 週間で最大となった。各免疫区の頭腎細胞 10,000 個中の最大抗体産生細胞数は TNP-KLH 区では 78, TNP-RlgG 区では 68, TNP-BSA 区では 39, 対照区ではいずれの抗原に対しても 5 個以下となった。

免疫後の頭腎中の抗原結合細胞数の変化は Fig. 12 に示すとおりである。各免疫区では免疫後 1～2 週間と 5 週間以後に 2 つのピークを示したが、対照区では抗原結合性細胞は検出されなかった。血液リンパ球数に対する抗原結合細胞数の割合は各免疫区の最初のピークでは TNP-KLH 区が 4.8, TNP-RlgG 区が 2.0, TNP-BSA 区では 0.6% となった。2 番目のピークでは TNP-KLH 区が 16.7, TNP-RlgG 区が 16.4, TNP-BSA 区では 9.3% となった。

TNP-KLH 免疫区の抗原結合細胞数の抗ブリ抗体ウサギ抗体処理後の変化は Fig. 13 に示すとおりである。免疫後の抗原結合細胞数の 2 つのピークのうち、最初のピーク時の抗原結合細胞数は抗ブリ抗体ウサギ抗体処理によって変化しなかったが、2 番目のピークはこの処理によって抗原結合細胞数は減少した。これらの減少は 1% 以下の危険率で有意差が認められた。

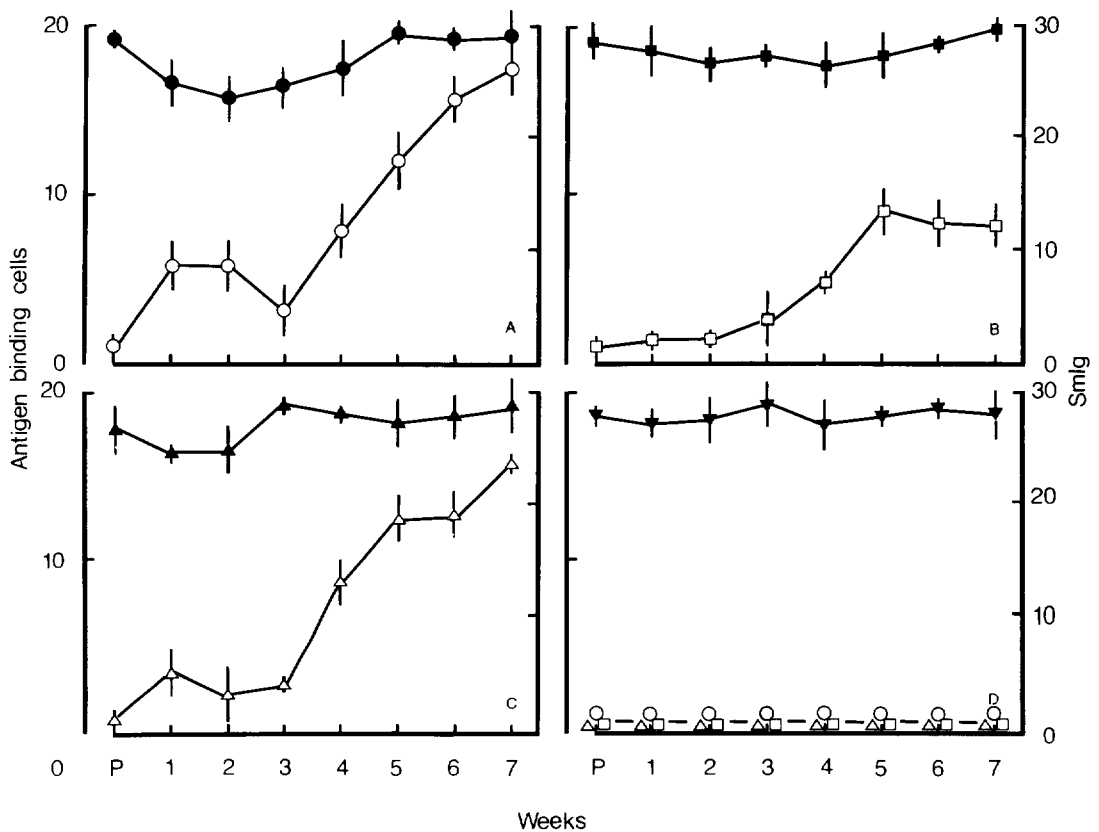


Fig. 12. Changes in percent composition of various antigen binding cells (open symbols) and smlg cells (closed symbols) in yellowtail blood lymphocytes. Symbols; A, ○, TNP-KLH; B, △, TNP-RlgG; C, □, TNP-BSA; D, ▽, control (no immunized fish); P, pre-immunization.

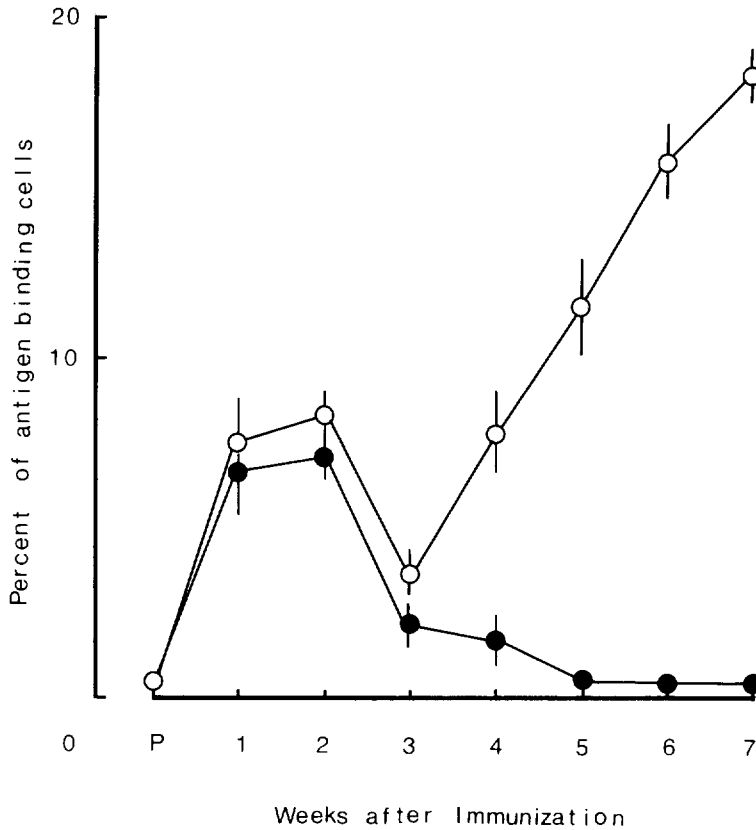


Fig. 13. Inhibition of antigen binding of yellowtail lymphocytes appeared after immunization with TNP-KLH by anti-yellowtail immunoglobulin M rabbit IgG. Symbols: ●, treated by the IgG; ○, control (no immunized fish); P, pre-immunization.

### 考 察

抗原が体内に侵入してくると胸腺依存性抗原の場合には、まずマクロファージで貪食処理されて、その細胞表面上の I reagon associated antigen (Ia) 抗原系を通じて Tリンパ球に抗原提示される。その後、抗原提示を受けた Tリンパ球は Bリンパ球を刺激し、抗体産生細胞への分化を促進する。いっぽう、胸腺非依存性抗原の場合は抗原自体が Bリンパ球表面上のレセプターと結合し、抗体産生細胞への分化を促進することが知られている (SCHWARTZ et al. 1978, 永山 1978)。このように、ほ乳類の免疫機構では 2種類のリンパ球とマクロファージによって調製されていることから、胸腺依存性抗原を用いるとこれらの細胞群の免疫に伴う機能の検討が容易ではないかと思われる。いっぽう、ブリにおいても 2種類のリンパ球の存在が確認されたことから、このようなリンパ球の相互作用によって免疫機構が構成されているのではないかと思われる。そこで、本研究では胸腺依存性抗原を用いてブリの免疫機構に及ぼす 2種類のリンパ球の影響について検討した。

その結果、各免疫区の血清中の抗体量は免疫後 3～4 週間で最大となった。福田・楠田

(1981) は *Pasteurella piscicida* のホルマリン不活化菌体で免疫したブリの血清中の抗体価は免疫後3～4週間で最大となるとしており、本研究においても同様な結果が得られた。また、用いる抗原によって最大抗体量に差異が認められたが、今回の実験では各抗原の投与量を一定にしたため、抗原性の差異によるものではないかと考えられる。

ブリの頭腎中の抗体産生細胞はいずれの免疫区においても、免疫後2週間で最大となった。また、出現数は血清中の抗体量と比例する傾向を示し、抗体産生細胞の出現数の多い免疫区では血清中の抗体量も多かった。魚類の抗体産生細胞に関する研究はこれまでに SMITH et al. (1967), CHILLER et al. (1969), PONTIUS and AMBROSIUS (1972), SAILENDRI and MUTHUKKAPPAN (1975), WARR et al. (1977), RIJKERS and MUISWINKEL (1977), 中西 (1982), GINKEL et al. (1985), INGRAM (1985) によってブルーギル、ニジマス、パーチ、ティラピア、キンギョ、コイ、カサゴで調べられている。用いる魚種によって時間的差異は認められるが、いずれも抗体産生細胞が出現したのちにその数が減少する頃から血清中の抗体価が上昇する傾向が認められている。ブリにおいても、まず抗体産生細胞が出現して、その後に血清中の抗体量が最大となり、同様な結果が得られた。

リンパ球の抗原結合性は、免疫記憶との関連が示唆されており、外来抗原の認識に役だっていると考えられている。ブリの抗原結合細胞は免疫後1～2週間と5週間以降の2つにピークを示した。抗ブリ抗体ウサギ抗体の処理によって最初のピークはほとんど影響を受けなかったが、2番目のピークは抗原結合細胞数は減少した。このことから、ブリの免疫後の早い時期に表れる抗原結合細胞と遅い時期に表れる抗原結合細胞では抗原の結合様式が異なり、早い時期に表れるものは抗体以外のレセプター、遅い時期に表れるものは抗体レセプターによって抗原と結合するのではないかと考えられる。また、どちらもリンパ球であることが明らかとなった。これらのことから、ブリの抗原結合細胞は免疫後早く出現するTリンパ球と遅れて出現するBリンパ球の2種類によるものではないかと考えられる。また、この2種類の細胞の抗原結合様式が異なるのではないかと考えられる。魚類の抗原結合細胞については RUBEN et al. (1977), ANDERSON et al. (1979), GOSTING et al. (1981), SAKAI et al. (1984), BALZER et al. (1984) の報告がある。RUBEN et al. (1977) はキンギョの抗原結合細胞について調べた結果、キンギョの抗原結合性細胞はそれぞれ性質の異なる2種類の細胞に分類されるが、いずれの細胞の抗原結合性も抗キンギョ抗体によって抑制されることから、抗体成分あるいはそれに近い分子構造をもったレセプターによって結合するのではないかとしている。しかし、ブリのほうがキンギョより系統発生的に高い位置にあるので、リンパ球の分化の程度が異なり、レセプターの分化が進んでいる可能性があるのではないかと考えられる。今後はTリンパ球の抗原結合レセプターについてさらに検討する必要があると思われる。また、前節までにブリのBリンパ球は胸腺をでて脾臓に移り、そこで細胞表面抗体や各種レクチンに対する反応性を獲得するのではないかと考えられた。本節の結果からBリンパ球による抗原結合細胞の出現が血清中の抗体量の上昇後に表れたことから、Bリンパ球の細胞表面抗体は血清中の抗体に由来するのではないかと考えられる。したがって、脾臓および肝臓での smIg 保有性が発現するとき、血流中の抗体の1部分が smIg となるのではないかと考えられる。以上の結果をまとめてみると、ブリの体内では免疫後1～2週間でTリンパ球からなる抗原結合

リンパ球の最初のピークが現れ、ついで2週間で抗体産生細胞が最大となり、3～4週間で血清中の抗体量が最大となり、抗体量に比例してBリンパ球から成る抗原結合細胞の2番目のピークが現れるという経路を経て免疫機構が作用するのではないかと考えられる。

### 第5節 リンパ球移入によるブリの免疫機構の変化

前節までにブリのリンパ球の分類と同定を行い、ブリのリンパ球もほ乳類と同様に2種類に分けられることが明らかとなった。そして、レクチンに対する反応性や機能検査などからBおよびTリンパ球に類似する細胞ではないかと考えられた。本節では類結節症に対するリンパ球の作用について検討するために、本症に対して抵抗性をもつブリのリンパ球を分離して、本症に未感染のブリの血管内に移入して本症に対する免疫機構の変化について検討した。

#### 実験方法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した平均体重 89.8 g のブリ稚魚と、同市浦の内湾で飼育されていた平均体重 1482 g のブリ2年魚を用いた。

**飼育方法** ブリ稚魚は 800 l の流水式プラスチック水槽に収容して、魚体重の12%にあたるイカナゴミンチにハマチエードS（武田薬品工業）加えたものを朝夕2回に分けて投与した。2年魚は 2.5 m 四方の網いけすに収容して魚体重の約10%にあたるハマチエードSを加えたアジおよびイワシの冷凍切身を朝夕2回に分けて投与した。なお、本実験期間中の水温は 22.8～26.7°C であった。

**供試菌** 1984年に大分県で養殖ブリ病魚の腎臓から分離した *Pasteurella piscicida* OT-8447 強毒株を用いた。本株は魚体通過を2回繰り返したのち、凍結乾燥を行って 4°C で保存したものを使用した。

**抗原の作製** 供試菌を1.5% NaCl 加 BHI ブイヨンに接種し、25°C で24時間振とう培養した菌液にホルマリンを0.5%濃度となるように添加し、冷暗所に48時間静置したのち、1,000×g で15分間の遠心操作によって菌体を回収した。菌体を滅菌した PBS で3回洗浄したのち、100 mg/ml の濃度となるように同液に懸濁して *Pasteurella piscicida* ホルマリン不活化菌体抗原液 (P-FKB) とした。また、日本生物材料センターから購入した綿羊保存血液をから赤血球を分離して、滅菌 PBS で3回洗浄したのち、同液に  $1 \times 10^8$  cells/ml となるように懸濁し、SRBC 抗原とした。

**免疫方法** 腹腔内接種法と浸漬法によって免疫した。前者は滅菌 PBS で50倍に希釈した抗原液とフロイントの不完全アジュバントとの等量混合液 1 ml を供試魚の腹腔内に接種して行った。後者は抗原液を綿ろ過海水を用いて1,000倍に希釈し、エアレーションを行いながら供試魚を5分間浸漬して行った。いずれの方法も1週おきに2回処理したのち、1カ月に追加処理を行った。なお、浸漬法免疫魚および腹腔内接種法免疫魚には最終免疫から3週間後のブリを用いた。

補体価の測定 ウサギ赤血球を用いて PLATT-MILES and ISHIZAKA (1974) の方法によって行った。

実験的感染試験 1.5% NaCl 加 BHI 平板で 25°C, 24時間培養した OT-8447 を滅菌 PBS に懸濁し、海水を用いて希釈して感染用生菌液とした。生菌濃度は感染耐化魚の作成には  $1.8 \times 10^3$  CFU/ml, 感染防御性の判定には  $5.8 \times 10^3$  CFU/ml とした。実験的感染はこの生菌液に供試魚をエアレーションを行いながら 5 分間浸漬して行った。なお、感染耐化魚は実験的感染 3 週間後のブリを用いた。

リンパ球浮遊液の調製 各種免疫魚、感染耐化魚、2 年魚および類結節症未感染ブリ稚魚からヘパリン処理したシリンジを用いて心臓穿刺法によって採血したのち、ただちに脾臓および腎臓を摘出した。血液からのリンパ球の分離は血液を比重 1.077 に調製した Ficoll-Hypaque 液に重層して 4°C で 400×g, 30 分間の遠心操作によって行った。遠心後、リンパ球層を回収して HBSS で 3 回洗浄したのち、同液に  $1 \times 10^8$  cells/ml となるように懸濁した。脾臓および頭腎からのリンパ球の分離は各臓器を HBSS のなかで解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュで臓器片を取り除いた。吉永 (1973) の方法によって 0.83% の  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Tris 液で混入した赤血球を破壊したのち、比重 1.077 に調製した Ficoll-Hypaque 液に重層して 4°C で 400×g, 30 分間の遠心操作を行った。遠心後、リンパ球層を回収して HBSS で 3 回洗浄したのち、同液に  $1 \times 10^8$  cells/ml となるように懸濁した。さらに、それぞれの懸濁液と HBSS で 1 mg/ml の濃度となるように調製したカルボニル鉄懸濁液を混合して 25°C で 1 時間反応させた。反応後、50×g で 5 分間の遠心操作を行って上清のリンパ球層を回収して、HBSS に  $1 \times 10^8$  cells/ml となるように懸濁してリンパ球浮遊液とした。

リンパ球の移入 FA-100 (田辺製薬) で麻酔した類結節症未感染ブリの鰓の血管内に各種リンパ球浮遊液を 0.1 ml 移入した。

移入リンパ球の分離部位の差異による抗体産生量の変化 類結節症未感染のブリの腹腔内に腹腔内接種法によって免疫したブリのリンパ球浮遊液を移入した直後に、滅菌 PBS で 50 倍に希釈した抗原液を 1 ml 接種した。接種 1 週間後に各魚体を取り上げ、心臓穿刺法によって採血した。血液は 4°C で 1 晩放置したのち、400×g で 15 分間の遠心操作によって血清を分離した。そして、滅菌 PBS で 30 倍に希釈した P-FKB 抗原液を用いてマイクロタイター法で血清中凝集抗体価を測定した。

移入リンパ球数の差異による抗体産生量の変化 類結節症未感染魚の腹腔内に腹腔内免疫魚の頭腎リンパ球浮遊液の原液および 10～10 万倍希釈液を移入した直後に、滅菌 PBS で 50 倍に希釈した P-FKB 抗原液を 1 ml 接種した。それぞれ、接種 1 週間後に各魚体を取り上げ、前述の方法で血清中の凝集抗体価を測定した。

リンパ球移入時間の差異による抗体産生能の変化 ブリの腹腔内に各リンパ球浮遊液移入 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間後に滅菌 PBS で 50 倍に希釈した SRBC 抗原液を 1 ml 接種した。それぞれ、接種 1 週間後に各魚体を取り上げ、前述の方法で血清中の凝集抗体価を測定した。

各種ブリの類結節症に対する感染防御性の比較 前述の方法で準備した浸漬法免疫魚、腹腔内

接種法免疫魚，感染耐化魚，2年魚および類結節症未感染ブリ稚魚に実験的感染を行い感染防御性を比較した。

各種ブリの血清中の抗体価および補体価の比較 浸漬法免疫魚，腹腔内接種法免疫魚，感染耐化魚，2年魚および類結節症未感染ブリ稚魚の血清中の P-FKB に対する抗体価および補体価を前述の方法で測定して比較した。

リンパ球移入による感染防御性の変化 ブリの腹腔内に頭腎リンパ球移入24時間後に各区20尾の供試魚に実験的感染を行ったのち，10日間飼育して生残数の変化を観察した。なお，へい死魚は腎臓から菌分離を行い類結節症によるへい死であることを確認した。

2年魚の血清および各種リンパ球の移入による感染防御性の変化 感染耐化魚から前述の方法で血清および各種リンパ球を分離して類結節症未感染魚に移入し，24時間後に実験的感染試験を行って感染防御性の変化を調べた。

## 結 果

移入リンパ球の分離部位の差異による血清中の凝集抗体価の変化は Table 11 に示すとおりである。血清中の平均凝集抗体価は免疫魚の脾臓，頭腎および血液リンパ球を移入した区ではそれぞれ  $1:2^{8.5}$ ， $1:2^{9.5}$ ， $1:2^{7.0}$  となった。非免疫魚の脾臓，頭腎および血液リンパ球を移入した区では，それぞれ  $1:2^{5.0}$ ， $1:2^{4.8}$ ， $1:2^{4.2}$  となった。HBSS のみを移入した区では  $1:2^{4.6}$  となった。免疫魚の各種リンパ球を移入した区と非免疫魚のリンパ球を移入した区の凝集抗体価には，危険率1%で有意差が認められた。

**Table 11.** Changes in serum antibody levels of yellowtail injected lymphocytes isolated from various organs and blood of immunized yellowtail and control with sheep red blood cells, unimmunized and PBS as control.

Fish	Source of lymphocytes	Agglutination antibody titer ( $1:2^x$ )
Immunized	Spleen	8.5(1.9)*
	Head kidney	9.5(1.5)
	Blood	7.0(0.6)
Unimmunized	Spleen	5.0(1.1)
	Head kidney	4.8(1.3)
	Blood	4.2(0.4)
Control	—	4.6(0.2)

\* Standard deviation.

移入リンパ球数の差異による血清中の凝集抗体価の変化は Table 12 に示すとおりである。血清中の平均凝集抗体価は免疫魚の頭腎リンパ球を  $10^8$ ， $10^7$ ， $10^6$ ， $10^5$ ， $10^4$  cells/ml 移入した区では，それぞれ  $1:2^{9.7}$ ， $1:2^{8.0}$ ， $1:2^{7.1}$ ， $1:2^{6.0}$ ， $1:2^{4.8}$  となった。非免疫魚の頭腎リンパ球を  $10^8$ ， $10^7$ ， $10^6$ ， $10^5$ ， $10^4$  cells/ml 移入した区では，それぞれ  $1:2^{4.8}$ ， $1:2^{5.0}$ ， $1:2^{4.2}$ ， $1:2^{4.1}$ ， $1:2^{4.2}$  となった。HBSS のみを移入した区では  $1:2^{4.6}$  となった。血清中の凝集抗体価は免疫魚の各種リンパ球を  $10^5 \sim 10^8$  cells/ml 移入した区と非免疫魚のリンパ球を移入した区には，危

**Table 12.** Changes in serum agglutination antibody titer of yellowtail injected lymphocytes isolated from head kidney of immunized and unimmunized yellowtail at various density

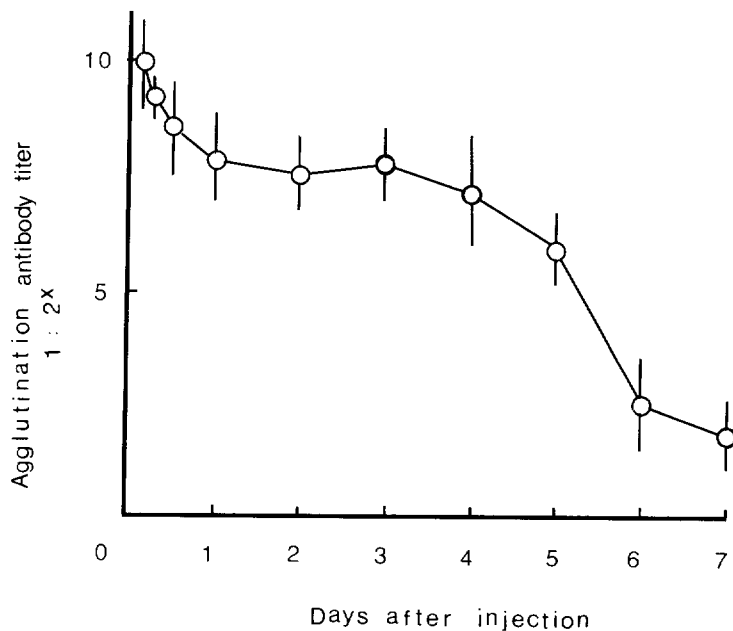
Fish	Log number of lymphocytes	Agglutination antibody titer (1:2 <sup>x</sup> )
Immunized	8	9.7(2.3)*
	7	8.0(1.9)
	6	7.1(0.8)
	5	6.0(1.0)
	4	4.8(0.5)
Unimmunized	8	4.8(1.1)
	7	5.0(0.2)
	6	4.2(0.1)
	5	4.1(0.3)
	4	4.2(0.4)
Control	—	4.6(0.1)

\* Standard deviation

険率5%以上で有意差が認められた。

頭腎リンパ球移入後の抗原接種時間の差異による凝集抗体価の変化は Fig. 14 に示すとおりである。平均凝集抗体価はリンパ球移入直後から24時間後まで低下したが、移入24から72時間まで変化は認められなかった。しかし、それ以後は経時的に低下する傾向がみられた。

各種ブリの類結節症に対する感染防御性を比較した結果は Fig. 15 に示すとおりである。実験



**Fig. 14.** Changes in serum antibody levels of yellowtail immunized with Sheep red blood cells (SRBC) at various days after injecting lymphocytes isolated from head kidney of immunized yellowtail with SRBC.

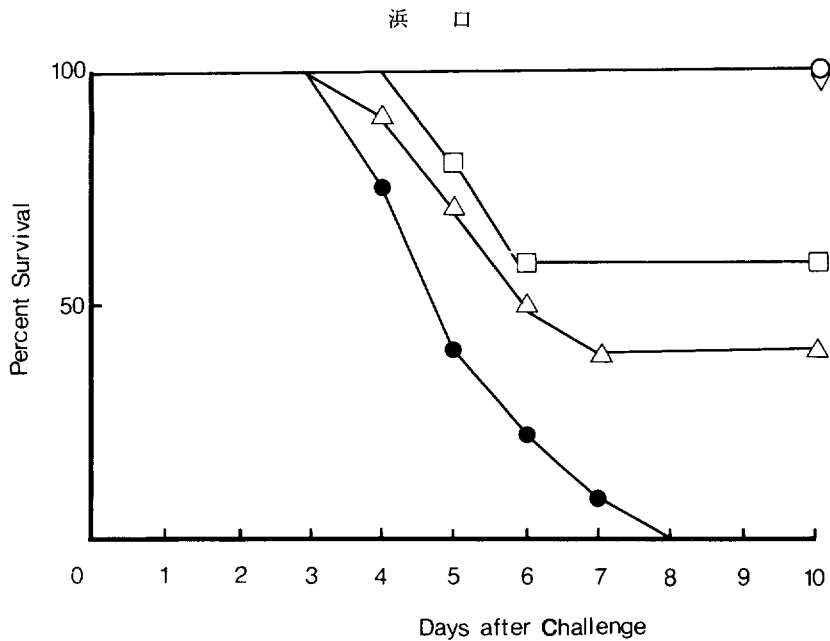


Fig. 15. Changes in percent survival of various yellowtail groups after experimental challenge with *Pasteurella piscicida*. Symbols: △, fish immunized twice by immersion method with *P. piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB); □, fish immunized intraperitoneally with P-FKB; ○, survivors after experimental challenge with *P. piscicida*; ▽, fish reared for 2 years; ●, normal unimmunized fish.

的感染から10日後の最終生残率は浸漬法免疫魚では39.6%, 腹腔内接種法免疫魚では65.7%, 感染耐化魚および2年魚では100.0%および類結節症未感染ブリ稚魚では0%となった。

各種ブリの血清中の抗体価および補体価を測定した結果は Table 13 に示すとおりである。血清中の抗体価は浸漬法免疫魚では  $1:2^{2.3}$ , 腹腔内接種法免疫魚では  $1:2^{5.8}$ , 感染耐化魚では  $1:2^{3.9}$ , 2年魚では  $1:2^{2.6}$  および類結節症未感染ブリ稚魚では  $1:2$  以下となった。血清中の補体価は浸漬法免疫魚では658.4, 腹腔内接種法免疫魚では642.8, 感染耐化魚では622.8, 2年魚では635.8および類結節症未感染ブリ稚魚では 656.8 units/ml となった。

Table 13. Mean serum antibody levels and complement activity of various yellowtail

Yellowtail	Atibody (1:2 <sup>x</sup> )	Complement (units/ml)
Fish immunized twice by immersion method with <i>P. piscicida</i> FKB* (P-FKB)	2.3	658.4
Fish immunized intraperitoneally with P-FKB	5.8	642.8
Survivors after experimental challenge with <i>P. piscicida</i>	3.9	622.8
Fish reared for 2 years	2.6	635.8
Normal unimmunized fish	<1.0	656.8

\* Formalin killed bacterin

浸漬法免疫魚, 腹腔内接種免疫魚, 感染耐化魚, 2年魚および類結節症未感染魚の頭腎リンパ球移入後の感染防御性の変化は Fig. 16 に示すとおりである。感染10日後の最終生残率は感染耐化魚, 2年魚, 腹腔内接種免疫魚, 浸漬法免疫魚および類結節症未感染魚の頭腎リンパ球を移入



ブリの細胞性免疫機構

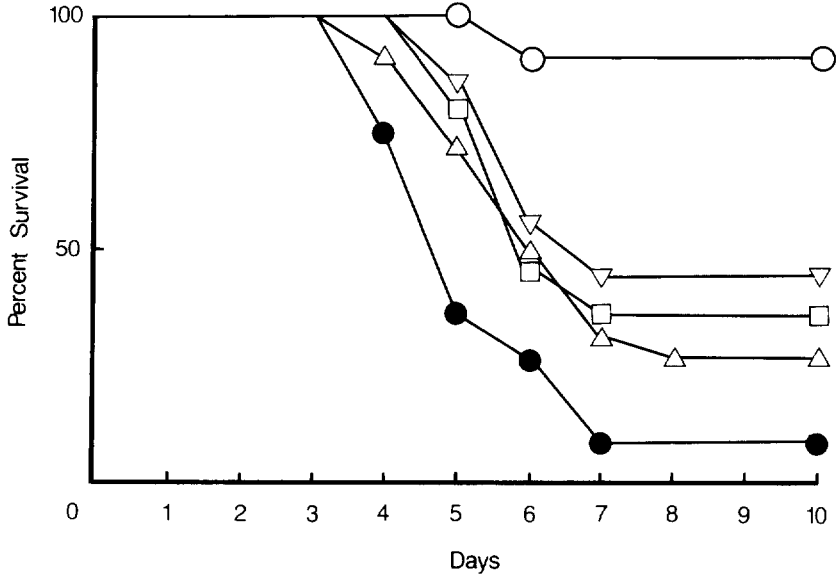


Fig. 16. Changes in percent survival of yellowtail which were injected homologous lymphocytes intravenously after challenge with *Pasteurella piscicida*. Lymphocytes isolated from:  $\Delta$ , fish immunized twice by immersion method with *P. piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB);  $\square$ , fish immunized intraperitoneally with P-FKB;  $\circ$ , survivors after experimental challenge with *P. piscicida*;  $\nabla$ , fish reared for 2 years;  $\bullet$ , normal unimmunized fish.

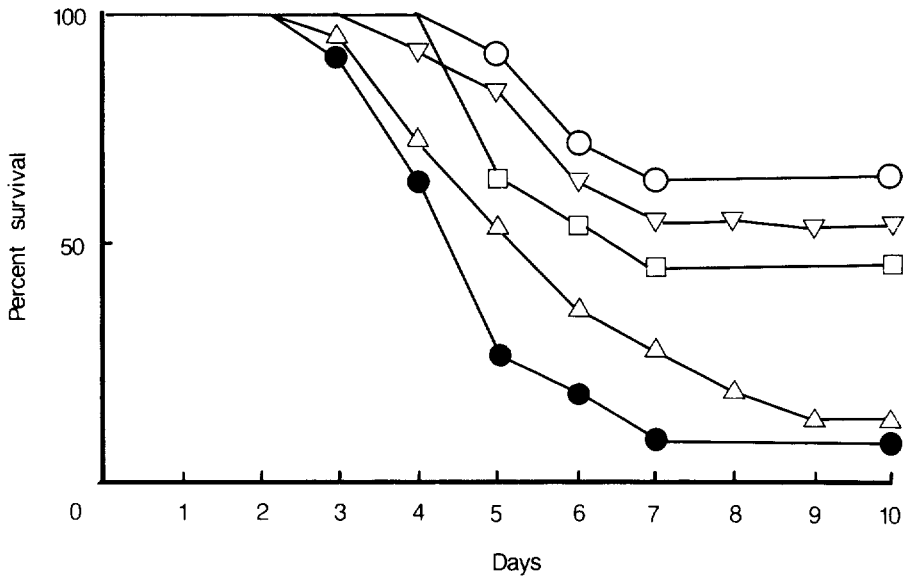


Fig. 17. Changes in percent survival of yellowtail which were injected lymphocytes isolated from spleen, head kidney and blood of yellowtail after challenge with *Pasteurella piscicida*. Lymphocytes isolated from:  $\nabla$ , spleen;  $\circ$ , head kidney;  $\square$ , blood;  $\Delta$ , serum of survivors of yellowtail after experimental challenge with *P. piscicida*;  $\bullet$ , control.

した区ではそれぞれ65, 55, 45, 10, 5%となった。

感染耐化魚の血液, 脾臓, 頭腎リンパ球および血清を移入した後の感染防御性の変化は Fig. 17 に示すとおりである。感染10日後の最終生残率は血液, 脾臓, 頭腎リンパ球および血清を移入した区および対照区ではそれぞれ40, 45, 90, 20, 5%となった。

## 考 察

ほ乳類においては免疫機構におけるリンパ球の役割は抗原認識, 抗原排除, 免疫記憶, 免疫応答の補助などが知られている。いっぽう, 魚類においても免疫機構におけるリンパ球の役割はニジマスやコイで調べられており, 免疫記憶や抗原排除機能がほ乳類と同様に存在することが知られている (SAKAI 1981)。ブリのリンパ球の役割については前節までに明らかにすることができた。そこで, 本研究では細胞移入法によるリンパ球機能の測定法を検討するとともに, ブリの類結節症に対する感染防御性におよぼすリンパ球の機能について検討した。その結果, *P. piscicida* で免疫した魚のリンパ球を非免疫魚に移入すると抗体産生能が1週間以内に活性化し, この活性化の程度は移入するリンパ球数によって変化することが明らかとなった。前節において, ブリにおいても2次免疫応答が認められ, 1週間前後で抗体価の上昇が認められた。このことから, ブリの免疫記憶の1部はリンパ球に存在しており, また, リンパ球は移入された個体内で機能を発揮するのではないかと考えられる。しかし, ほ乳類では細胞の移入および移植には主要組織適合抗原 (MHC) 障壁があり, しばしば拒絶反応などが起こり, これを回避するためには免疫抑制剤が必要であることが知られている (奥村 1985)。いっぽう, 魚類では遺伝的に確立された系統が存在しないので, MHC 拘束性の回避は不可能であると思われる。しかし, 移植実験の結果, 同種移植片では拒絶は起こらないが, 異種移植片では起こることから (KALLMANN 1958, HILDEMAN 1958, FINSTAD et al. 1966), 魚類の MHC 拘束性は個体レベルではなく種レベルではないかと考えられる。さらに, SAKAI (1982) はニジマスでリンパ球移入の実験を行っており, 移入されたニジマスの体内でリンパ球の機能が発揮されたことから, 魚類の MHC 拘束性はほ乳類と比べて弱いのではないかとしている。本実験においてはブリの移入リンパ球の機能は移入後に経時的に低下することから, 徐々に MHC 拘束性によって排除されている可能性はあるが, リンパ球移入3日間後までは十分機能を発揮することが明らかとなった。このことから, ブリの体内では免疫抑制剤を使用しなくても, リンパ球移入3日後以内では移入したリンパ球の機能が期待できると思われる。そこで, 類結節症に対する感染防御性が高いことが知られている多年魚, 感染耐化魚および腹腔内接種法免疫魚のリンパ球を非免疫魚に移入して, 感染防御に及ぼすリンパ球の影響を調べた。実験的感染試験はリンパ球移入に伴うストレスが大きいため, 移入24時間後に行った。その結果, 感染防御性は感染耐化魚のリンパ球を移入した区で最も高い値を示した。ついで, 2年魚の順となり, いずれも類結節症の生菌感作を受けたと思われる魚体のリンパ球が感染防御に有効であることが明かとなった。一般に, ブリの類結節症は2年魚以降の被害が小さいことが知られている。楠田・福田 (1980) は類結節症流行後のブリの血液中の凝集抗体価を測定した結果, 本症流行後に *P. piscicida* に対する抗体価が上昇することから, 2年魚以降の本症に対する感染

防御性の上昇は血清中の抗体によるのではないかとしている。しかし、楠田他(1988)は本症に対するリボゾームワクチンの有効性を調べた結果、本症に対する感染防御性は血清中の抗体価のほか、食細胞の活性化など細胞性免疫機構の活性化が必要であるとしている。また、*P. piscicida* は細胞内増殖性をもっていることが知られているが(窪田他 1970b)、*Mycobacterium*, *Listeria* および *Salmonella* などの細胞内増殖性細菌に対する感染防御には活性Tリンパ球による細胞性免疫機構が必要であることされている(青木 1978, HAHN and KAUFMANN 1981, O'MALLEY et al. 1982, ORME and COLLINS 1983, ORME 1988)。さらに、活性Tリンパ球が関連したマクロファージの殺菌作用は種々の細菌感染症に対して有効であることが知られている(BLANDEN et al. 1975, POWDERLY et al. 1986)。本節において、感染耐化魚の持つ感染防御性は頭腎リンパ球で高く、血清では低い結果が得られたことから、本症に対する感染防御性は感染耐化魚および2年魚のリンパ球に存在するのではないかと考えられる。いっぽう、第3節の結果からブリの頭腎リンパ球にはTリンパ球様細胞が多いことが明らかになった。これらのことから、生菌感作ブリの感染防御効果は頭腎リンパ球に多数含まれるTリンパ球が生菌感作を受けて活性化したためではないかと考えられる。福田・楠田(1981)は免疫血清の接種による本症に対する受動免疫が成立するとしており、本症に対する血清中の抗体の有効性が認められている。しかし、本節においては血清中の抗体量は感染耐化魚よりも腹腔内接種法によって免疫したブリのほうが高い結果が得られた。いっぽう、MACGREGOR and KOSTER (1971) は細胞内増殖性菌の1種である *Listeria monocytogenes* の生菌で免疫したマウスのリンパ球を分離し、非免疫マウスに移植したのちに、攻撃試験を行った結果、感染防御性は上昇したとしている。このことから、*L. monocytogenes* に対する感染防御性はリンパ球に由来するとしている。本節の結果から、本症に対する感染防御性は生菌感作によって活性化されるリンパ球が関与しているのではないかと考えられる。しかし、MACGREGOR and KOSTER (1971) は感作リンパ球の感染防御性はリンパ球を移植されたマウスのマクロファージの機能を低下させると認められなくなることから、リンパ球とマクロファージの共同作用によって発現するのではないかとしている。このように、感染防御性はリンパ球単独で発現するのではなく、マクロファージなどの食細胞系とのネットワークとして存在すると思われる。しかし、ブリの食細胞の *P. piscicida* に対する反応はこれまでに不明な点が多いので今後検討する必要があると思われる。

## 第6節 総 合 考 察

本章の結果から考察されるブリのリンパ球の分化経路および類結節症に対する機能については Fig. 18 に示すとおりである。ブリのリンパ球はまずその基となる細胞が頭腎などの造血組織で産生され、それが胸腺に移動してそこで成熟するとともに、CATL などの細胞表面抗原系を獲得して胸腺由来リンパ球としての機能を持つようになると思われる。胸腺を経たのち、リンパ球の流れは2つに分かれ、小数はそのまま血流中へとでてゆき、残りの大部分は脾臓に移行する。脾臓へ移行したリンパ球はそこでさらに成熟・分化する。脾臓での分化はおもにこれまでにブリが

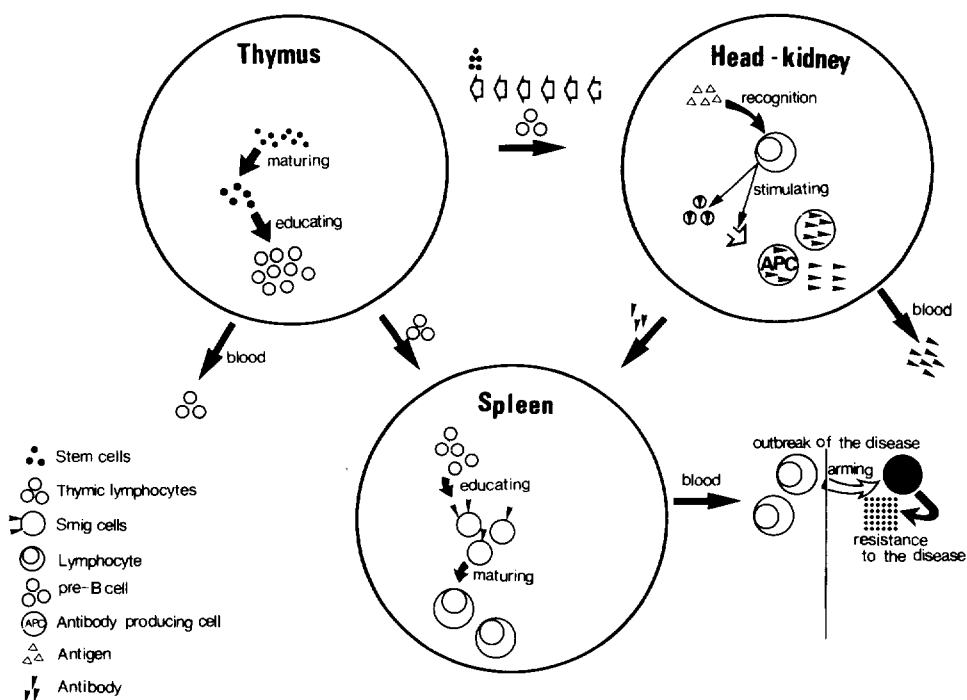


Fig. 18. Scheme of lymphocytes maturation and functions in yellowtail.

遭遇してきた各種抗原に対する smIg で構成される外来抗原リセプターの獲得であり、ここで完全な成熟リンパ球として血流中に出て行くものと思われる。血流中にでた成熟リンパ球は外来抗原が集積し易い、腎臓に集まり、ここで抗原の監視を行っており、抗原の発見とともに抗体産生細胞への分化の情報を提供するものと考えられる。さらに、成熟リンパ球は生菌などの外来抗原に接触することによって、防御因子を産生して、直接感染防御に関与するのではないかと推察される。

このように、ブリのリンパ球はほ乳類のようにBおよびTリンパ球の分化が完全ではなく、両方の機能を合わせ持ったものとなっていると考えられる。このリンパ球の分化の程度は、系統発生学的に魚類がほ乳類よりも下位にあるために未分化であるのではなく、ヒトなどとは異なり、感染の機会が大きい水界に生存していくためではないかと推察される。野本 (1987) はほ乳類では、非特異的防御機構とリンパ球を介したクローン増殖性の免疫機構の間隙をうめる反応として短期間で発動する Primitive T cell response (PT response) の存在を指摘している。ブリのリンパ球はこのような PT response に近い作用を示し、またBおよびT細胞の機能を重ね合わせることによって、水界での感染機会の多さに速やかに対応するようになっていないかと考えられる。また、頭腎に分布する成熟リンパ球は類結節症の原因菌と接触することによって、ほ乳類のリンフォカインやインターフェロンに相当する因子を産生するようになるのではないかと考えられる。

### 第3章 ブリの貪食細胞の機能に関する研究

ほ乳類の食細胞には好中球を中心とした多形核白血球と、マクロファージなどの単核食細胞があり、それぞれ貪食や殺菌能に差異があることが知られている(永山 1988, 野本 1988)。好中球の貪食は血清中の補体成分の作用が必要であり、表面に補体活性化因子をもつものは貪食するが、もたないものは貪食できないとされている。また、マクロファージでは表面に補体活性化因子をもたないものでも、活発に貪食するとされている(野本 1988)。そして、これらの貪食細胞は生体内に侵入してきた細菌を取り込んで消化することによって、生体防御に関与するとされている(野本 1982)。しかし、これらの貪食細胞による殺菌活性は病原細菌の種類によって異なることが知られている。*Pseudomonas aeruginosa* および *Escherichia coli* などの細胞外増殖性細菌はこれらの貪食細胞に取り込まれて容易に殺菌されるが(AUSTRIAN 1977, LEIJH et al. 1979, LIEBERMAN 1979, 尾形 1983), *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* および *Salmonella typhimurium* などの細胞内増殖性をもつ細菌はいずれの貪食細胞に取り込まれても殺菌されにくいとされている(LEFFORD et al. 1973, MACKANESS 1962, BLANDEN et al. 1966)。また、*Legionella pneumophila* (PAYNE 1987, HORWITZ et al. 1987, 齊藤他 1987) および *Leishmania donovani* (BACCARNI et al. 1988) などのように貪食細胞内に能動的に侵入し、そこで増殖する細菌も知られている。これらの細胞内増殖性細菌に対する貪食細胞の細胞内殺菌活性には、細胞性免疫機構に関わる活性Tリンパ球が重要であることが知られている(VENEMANN and BERRY, 1970; TAKEYA et al. 1977)。活性Tリンパ球はマクロファージを活性化するリンフォカインを産生し、これによって活性化されたマクロファージは細胞内増殖性細菌に対する殺菌活性が上昇するとされている(今西・岸田 1978)。また、リンパ球によって産生された抗体は貪食活性を上昇する効果をもっているとされている。このように、貪食細胞はリンパ球と協同して細胞性免疫機構を構成し、生体防御にあたっている。

いっぽう、魚類でも好中球およびマクロファージが存在し、ほ乳類と同様に貪食および殺菌を行うことが知られている(入江 1932, 松田 1937, ELLIS 1977, FERGUSON 1976, 1984, MCKINNEY et al. 1977, LESTER and BUDD 1979, 森 1981, SUZUKI 1984, IKEDA and KUSUDA 1986)。これらのほかに、栓球および小型リンパ球にも貪食能が認められている(FERGUSON 1976, MCKINNEY et al. 1977, 森 1981, SUZUKI 1984, KUSUDA and IKEDA 1986)。しかし、これらの細胞の貪食活性は弱く、栓球やリンパ球は貪食以外の重要な機能をもっている(WARDLE 1961)、魚類の貪食細胞はほ乳類と同様に好中球とマクロファージが主体をなすのではないかと考えられる。また、類結節症原因菌 *Pasteurella piscicida* は細胞内増殖性をもつことが知られている(窪田他 1970a)。さらに、前章において、ブリにはほ乳類と同様な機能をもったリンパ球が存在することが明らかとなったことから、本症原因菌に対する細胞内殺菌活性はほ乳類と同様に活性Tリンパ球の補助が必要となる可能性が高い。

そこで、本章ではブリの好中球とマクロファージの貪食および殺菌能を検討するとともに、細

胞性免疫機構に関する機能について検討した。

## 第1節 ブリの腹腔内浸出細胞からの貪食細胞の採取方法の検討

特定の細胞の機能を検査するためには、純度の高い細胞を大量に採取する必要がある。血液や臓器から特定の細胞を採取すると、操作が複雑となるために細胞の回収率が低くなると思われる。ほ乳類では腹腔内浸出細胞 (PEC) は用いる刺激剤の種類によって、得られる細胞の種類や活性度に差異が認められるが、好中球やマクロファージなどを大量に採取する方法として広く用いられている。ブリにおいても好中球やマクロファージの採集に有効であると思われる。いっぽう、刺激剤を実験動物に投与したのちに採集される PEC は、細胞相が経時的に変化するとされている。そのために、目標とする細胞を効率よく採取するためには、用いる実験動物の各種刺激剤に対する PEC 細胞相の経時変化をあらかじめ知る必要があると思われる。しかし、これまでにブリの腹腔内浸出細胞の経時変化に関する研究はほとんど行われていない。

そこで、本研究ではブリの腹腔内にプロテオーズペプトンおよび *Pasteurella piscicida* ホルマリン不活化菌体 (P-FKB) を接種したのちの PEC の細胞数および細胞相の経時変化について検討し、好中球とマクロファージの採集時間について調べた。

## 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ブリ稚魚を用いた。なお、魚体のサイズによる腹腔内の体積の差異をなくすために体長が  $17.9 \pm 0.5$  cm, 体重が  $83.7 \pm 1.0$  g の魚体を選別して実験に供試した。

**供試魚の飼育方法** 供試魚は 800 l の流水式プラスチック水槽に収容して、魚体重の12%量のハマチエード S (武田薬品工業) を添加したイカナゴミンチを朝夕 2 回にわけて投与した。しかし、摂餌直後は腹腔内浸出細胞の回収が困難となるので、取り上げ前は12時間以上投餌を停止した。なお、本実験期間中の水温は  $25.8 \sim 26.7^\circ\text{C}$  であった。

**供試菌** 1984年に大分県で養殖ブリ病魚の腎臓から分離した *Pasteurella piscicida* OT-8447 強毒株を用いた。本株は魚体通過を 2 回繰り返したのち、凍結乾燥を行って  $4^\circ\text{C}$  で保存したものを使用した。

***P. piscicida* ホルマリン不活化菌体 (P-FKB) の作製** 供試菌を 1.5% NaCl 加 BHI ブイヨンに接種し、 $25^\circ\text{C}$  で 24 時間振とう培養した菌液にホルマリンを 0.5% 濃度となるように添加し、冷暗所に 48 時間静置したのち、 $1,000 \times g$  で 15 分間の遠心操作によって菌体を回収した。菌体を滅菌した PBS で 3 回洗浄したのち、 $100 \text{ mg/ml}$  の濃度となるように同液に懸濁して P-FKB 抗原液とした。

**腹腔内浸出細胞 (PEC) の採取** 供試魚の腹腔内に 1 ml の滅菌した 10% プロテオーズペプトン水溶液、および P-FKB を  $2 \text{ mg/ml}$  の濃度となるように懸濁した滅菌 PBS を接種した。接種前、接種後 3, 6, 12, 24, 48, 96, 192, 384 時間後に供試魚を 5 尾取り上げ、心臓穿刺法によって採

血したのちに脳穿刺によって即殺した。腹部体表面を70%アルコールを用いて消毒したのち、2 ml の ML-15 を腹腔内に接種した。そして、腹部をマッサージしたのちに、腹部を切開して腹腔内の ML-15 を回収し、シリコン処理を行ったガラス試験管に採取した。

**細胞数の測定** 回収した腹腔内浸出細胞浮遊液を Thoma の血球計算盤に添加して、赤血球を除く細胞数を測定した。

**細胞相の観察** 回収した PEC 浮遊液はシリコン処理を行った遠心管を用いて  $400 \times g$ 、5分間の遠心操作を行い、得られた沈査を  $10 \mu l$  の非働化ウシ胎児血清に懸濁したのち、常法によってスメアを作製した。スメアは95%エタノールで固定して猪子・糸賀の方法 (1974) によってペルオキシダーゼ染色を行ったのちにギムザ染色を行なった。染色後、スメア上の赤血球以外の細胞を2000個以上観察して好中球、マクロファージ、好塩基球、好酸球およびリンパ球のいずれかに分類して、腹腔内浸出細胞の構成比率を求めた。この腹腔内浸出細胞の構成比率に前項で求めた細胞数を乗じて、各種細胞の絶対数を求めた。なお、赤血球が全細胞の50%を超える個体については、実験から除外した。

## 結 果

PEC 細胞数の経時的变化は Fig. 19 に示すとおりである。プロテオーズペプトンを接種した区の PEC 数は接種直後から接種12時間後まで急速に増加し、接種24時間後に最高となった。それ以後の変化は小さく接種384時間後までほとんど変化は認められなかった。PEC 数の最高値は  $10^{6.3}$  cells/ml となった。P-FKB を接種した区の PEC 数は接種直後から接種12時間後まで増加し、接種12時間後に最高となった。その後は接種384時間後まで徐々に減少した。PEC 数の最高値は  $10^{7.1}$  cells/ml となった。

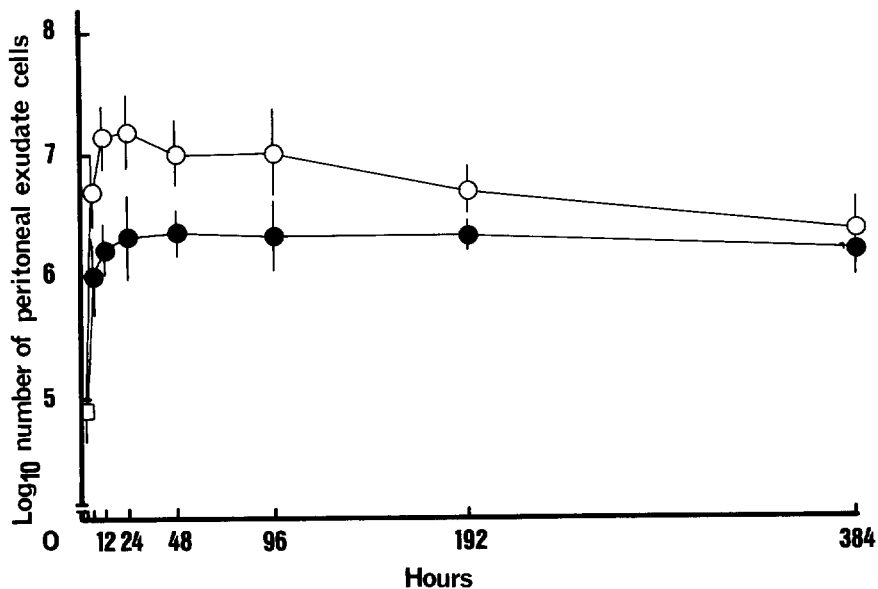


Fig. 19. Change in the numbers of peritoneal exudate cells after injection of proteose-peptone (●) and *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB, ○).

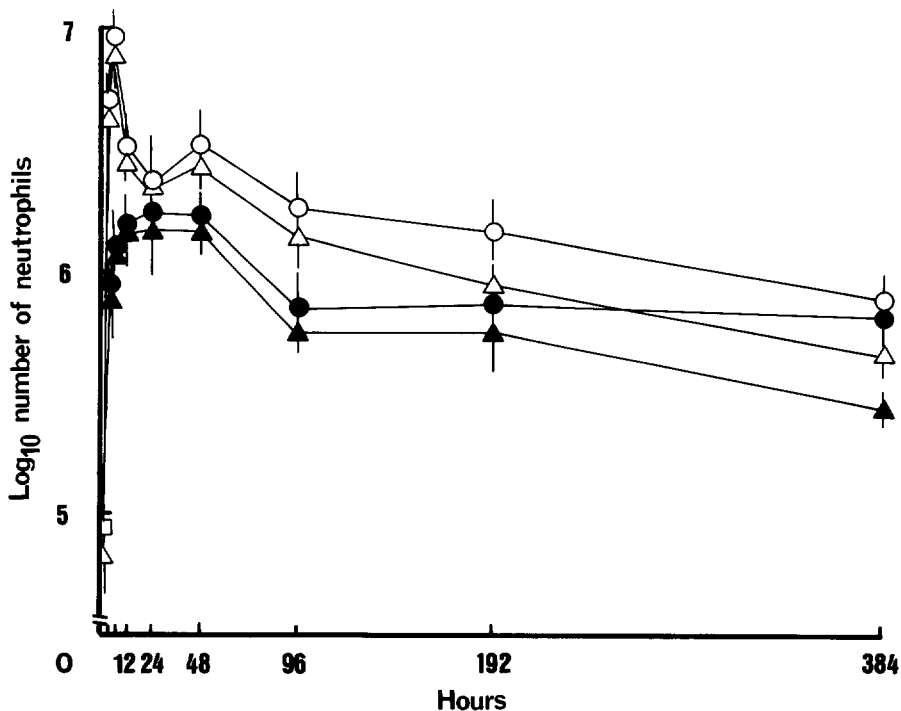


Fig. 20. Change in the numbers of peritoneal exudate neutrophils after injection of proteose peptone (●) and *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB, ○). Symbols: ▲, peroxidase positive neutrophils in group injected proteose peptone; △, peroxidase positive neutrophils in group injected P-FKB.

PEC中の好中球数の経時変化はFig. 20に示すとおりである。好中球数はプロテオーズペプトン接種区では接種直後から増加し、接種12時間後に最高となった。その後は多少の変動が認められたが、接種384時間後まで徐々に減少した。好中球数の最高値は $10^{6.3}$  cells/mlとなった。また、ペルオキシダーゼ陽性好中球数は接種384時間後まで95%以上であり経時的な変化は認められなかった。P-FKBを接種した区では接種直後から増加し、接種6時間後に最高となった。その後は接種384時間後まで徐々に減少した。好中球数の最高値は $10^{6.9}$  cells/mlとなった。また、ペルオキシダーゼ陽性好中球数は接種384時間後まで95%以上であり、経時的な変化は認められなかった。

PEC中のマクロファージ数の経時変化はFig. 21に示すとおりである。マクロファージ数はプロテオーズペプトン接種区では接種直後から接種12時間後まで増加し、その後は、接種48時間後まで減少したが再び増加し、接種192時間後に最高となった。その後は減少し、最高値は $10^{6.2}$  cells/mlとなった。また、ペルオキシダーゼ陽性マクロファージは接種直後から接種24時間後まで増加したが、その後は、接種96時間後まで減少した。しかし、接種96時間後から384時間後までは再び増加した。ペルオキシダーゼ陽性マクロファージ数の最高値は $10^{4.5}$  cells/mlとなった。P-FKBを接種した区では接種直後から接種48時間後まで増加し、接種48時間後に最高となった。その後は接種384時間後まで徐々に減少し、最高値は $10^{6.6}$  cells/mlとなった。また、ペルオキシ



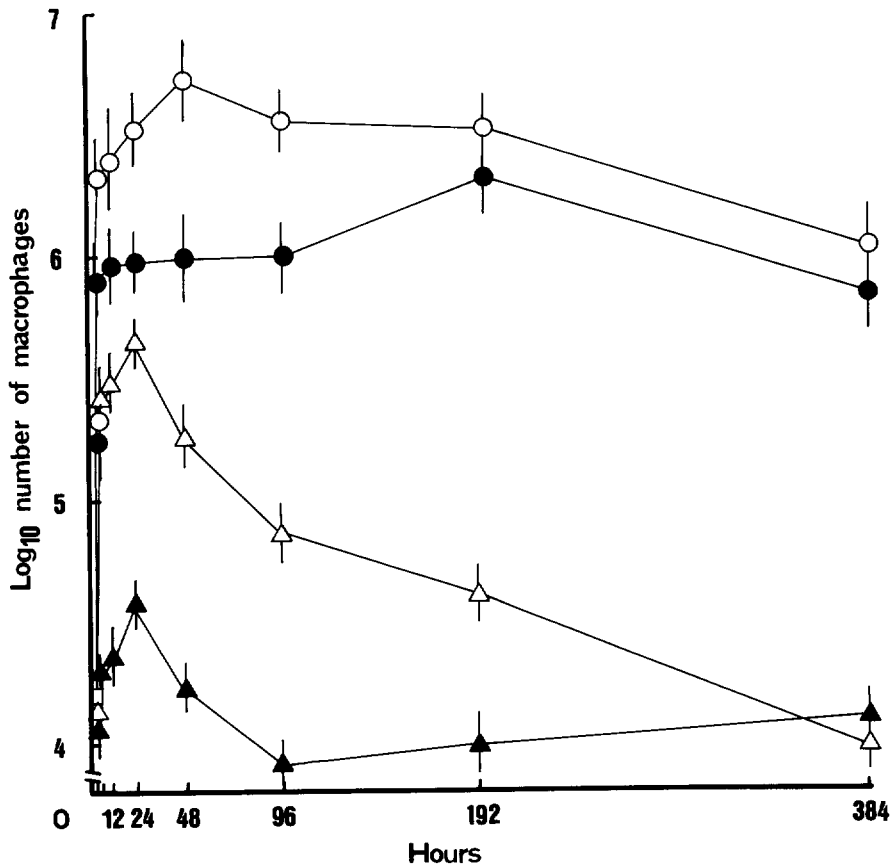


Fig. 21. Change in numbers of peritoneal exudate macrophages after injection of proteose peptone (●) and *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB, ○). Symbols: ▲, peroxidase positive macrophages in group injected proteose peptone; △, peroxidase positive macrophages in group injected P-FKB.

ダーゼ陽性マクロファージは接種直後から接種24時間後まで増加して最高値は  $10^{5.4}$  cells/ml となったが、その後は減少した。

PEC 中の好塩基球数の経時的変化は Fig. 22 に示すとおりである。好塩基球数はプロテオースペプトン接種区では接種直後から増加し、接種6時間後に最高となった。その後は多少の変動が認められたが、接種384時間後まで徐々に減少した。好塩基球数の最高値は  $10^{4.3}$  cells/ml となった。P-FKB を接種した区では接種直後から増加し、接種6時間後に最高となった。その後は接種96時間後まで徐々に減少した。好中球数の最高値は  $10^{5.1}$  cells/ml となった。

PEC 中の好酸球数の経時的変化は Fig. 23 に示すとおりである。好酸球数はプロテオースペプトン接種区では接種直後から増加し、接種12時間後で最高となった。その後は多少の変動が認められたが接種384時間後まで徐々に減少し、最高値は  $10^{4.8}$  cells/ml となった。P-FKB を接種した区では接種直後から増加し、接種6時間後で最高となり最高値は  $10^{4.4}$  cells/ml となった。その後は接種384時間後まで徐々に減少した。

PEC 中のリンパ球数の経時的変化は Fig. 24 に示すとおりである。リンパ球数はプロテオース

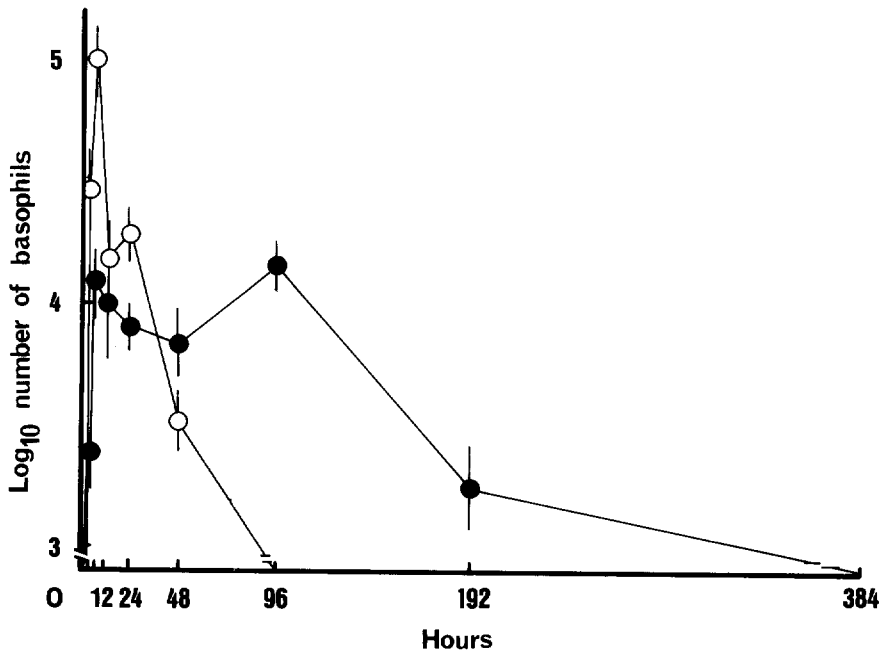


Fig. 22. Change in the numbers of peritoneal exudate basophils after injection of proteose peptone (●) and *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB, ○).

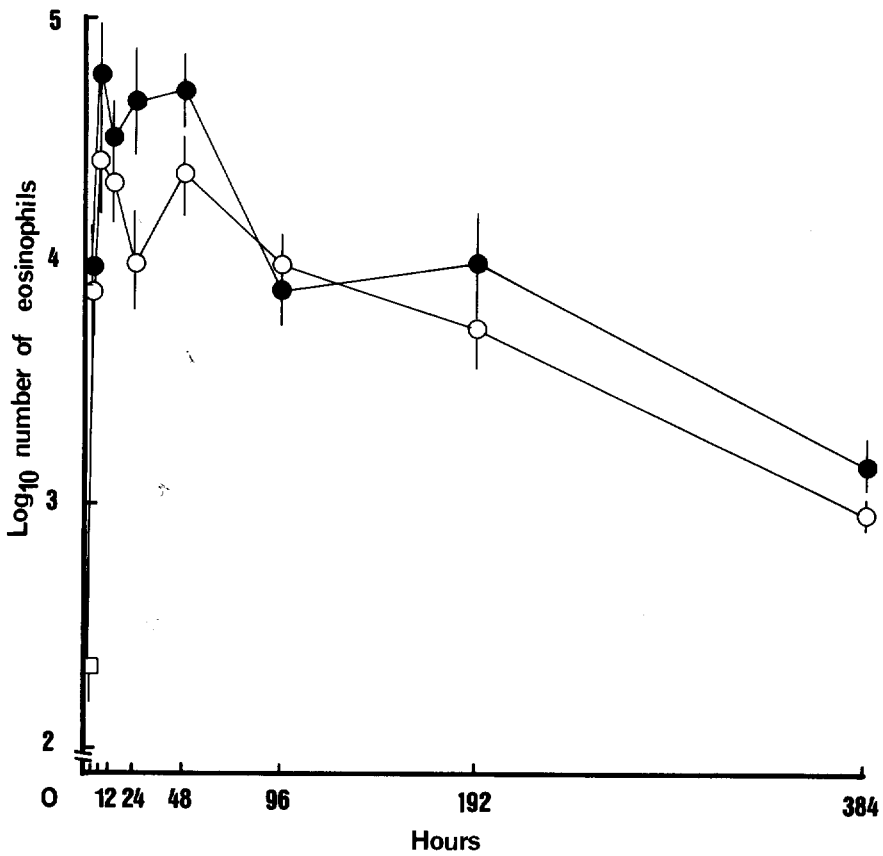


Fig. 23. Change in the numbers of peritoneal exudate eosinophils after injection of proteose peptone (●) and *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB, ○).

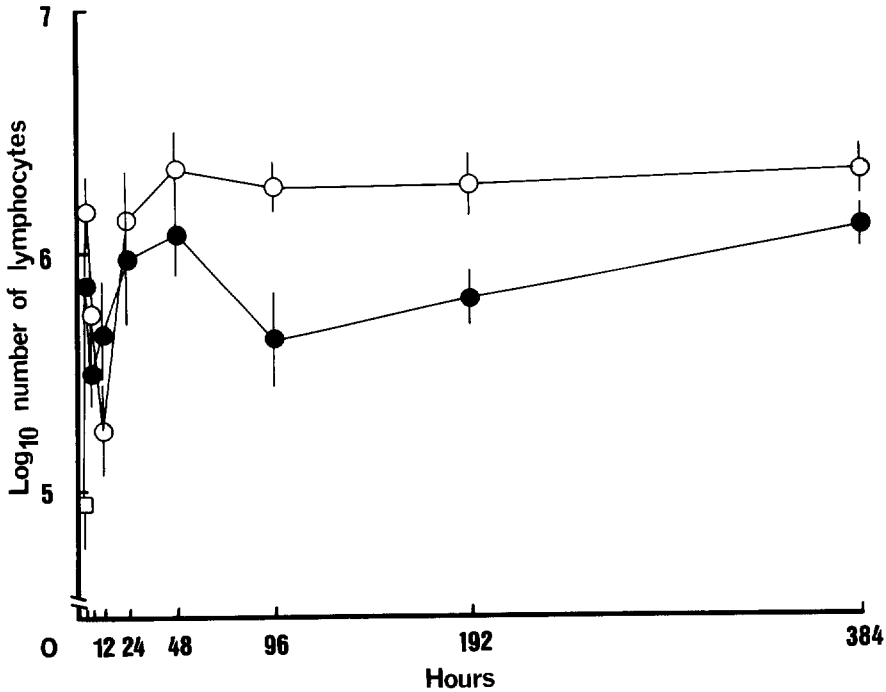


Fig. 24. Change in the numbers of peritoneal exudate lymphocytes after injection of proteose peptone (●) and *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB, ○).

ペプトン接種区では接種直後から減少し、接種6時間後に最低となった。その後は接種48時間後まで増加した。接種96時間後には再び減少したが、その後接種384時間後まで徐々に増加し、最高値は  $10^{6.1}$  cells/ml となった。P-FKB を接種した区では接種直後から接種3時間後まで増加したが、その後、接種12時間後まで減少した。接種12時間後から接種48時間後までは再び増加し、その後は接種384時間後までほとんど変化しなかった。最高値は  $10^{6.4}$  cells/ml となった。

### 考 察

魚類の白血球および細胞の分類については種々の研究が行われているが、魚種間の細胞の染色性に大きな差異が認められており、統一的な分類となっていない。なお、ブリの白血球の分類に関する知見は乏しい。そこで、本研究ではブリの腹腔内浸出細胞の分類はペルオキシダーゼとギムザの2重染色を行って、神代(1956)、池田(1986)および鈴木(1988)の報告に基づいて、好中球、マクロファージ、好塩基球、好酸球およびリンパ球に分類した。その結果、ブリの腹腔内浸出細胞には好中球、マクロファージ、好塩基球、好酸球およびリンパ球が認められた。ブリの腹腔内浸出細胞はプロテオースペプトンやP-FKBを接種したのち認められ、これらの細胞が経時的に変化することが明らかとなった。

プロテオースペプトンを接種したブリのPECの経時的变化は好中球の浸出が認められ接種後12時間で最大となった。好中球はPECの70%以上の比率であった。好塩基球や好酸球も接種後短時間で上昇し、6~12時間に最大となった。これらに対してマクロファージの増加の割合は小

さく、接種192時間後で最大となった。リンパ球数は接種後まもなく減少し、それ以後は接種384時間後まで徐々に増加する傾向を示した。いっぽう、P-FKBを接種した区では接種直後から好中球が増加し接種12時間後で最大となった。好塩基球および好酸球ともに接種直後から増加して、それぞれ接種6時間後で最大となった。マクロファージは接種後徐々に増加し、接種48時間後で最大となった。リンパ球は接種直後には減少したがその後、接種384時間後まで徐々に上昇した。また、P-FKBを接種した区のほうが浸出してくる細胞数は多かった。一般に、腹腔内への細胞の浸出は炎症反応として起ることが知られている。ほ乳類の炎症部位への細胞の浸出については光本(1983)、HAYASHI(1984)、笠倉(1987)、香取ら(1988)の総説があり、炎症部位には炎症刺激後5~6時間で血しょうの浸出が認められ、それとともに好中球が浸出し、ついで24時間以降にマクロファージを含む単核球の浸出が認められるとしている。魚類の炎症部位への細胞の浸出はほ乳類と同様である結果が得られており、好中球から単球の順に起こることが知られている(WEINREB 1958, FINN and NIELSEN 1971a,b, PHAROMSUTHIRAK 1977, SUMMER and BARTOS 1981, MACARTHUR et al. 1984, 安田他 1984, SUZUKI 1988)。本実験においてもプロテオーズペプトンおよびP-FKBを接種したブリの腹腔へ、まず好中球、好酸球および好塩基球の顆粒球の浸出が認められ、その後マクロファージの浸出へと変化する傾向がみられ、これらの報告と同様の結果が得られた。いっぽう、それぞれの細胞の浸出時間についてはMACARTHUR et al. (1984)はツノガレイの腹腔内にグリコゲンおよび*Vibrio alginolyticus*を接種したときの好中球の浸出は接種後48~72時間に最大となるとしている。鈴木・日々谷(1988)はコイの眼組織へアラビアゴムを接種したのちの浸出細胞の変化を調べている。その結果、炎症部位への好中球の浸出は接種後24時間で最大となるとしている。飼育水温や炎症起因剤は異なるが、いずれの結果と比較してもブリの炎症部位への好中球の浸出は早い結果が得られた。いっぽう、マクロファージの浸出はプロテオーズペプトンを接種した場合よりもP-FKBを接種すると早くなる傾向を示した。好中球の炎症部位への浸出は血清成分の炎症組織への浸出によって活性化した血清由来の補体成分が関与することが知られている。これに対して、マクロファージはこのほかに好中球由来のプロテアーゼやTリンパ球の産生するリンフォカインによって誘導されることが知られている(HAYASHI et al. 1984, 笠倉 1987)。今回の実験において、マクロファージの浸出がプロテオーズペプトンを接種した場合よりも、P-FKBを接種すると早くなる傾向を示したのは、*P. piscicida*に対して特異的な因子が作用したのではないかと考えられる。本実験に用いたマクロファージ誘導物質のうち、抗原特異性があるのはTリンパ球によって産生されるリンフォカインであると思われる。免疫によって誘導される感作リンパ球は抗原と接触することによってリンフォカインを産生するとされている(新保 1978, 笠原 1982, 笠倉 1987)。本実験に用いた供試魚はブリの類結節症が終息した後に購入したものであるため、野外で飼育中に本症原因菌に感作されたのではないかと考えられる。楠田・福田(1980)は類結節症流行後の養殖場のブリの血清中の本菌に対する抗体価が上昇するとしている。このように、本実験に用いたブリは飼育期間中に類結節症の流行によって自然感作を受け感作Tリンパ球が誘導されたのではないかと考えられる。今後はこのマクロファージの浸出と免疫の関係について明らかにする必要があると思われる。

また、PEC の数はプロテオーズペプトンよりも P-FKB を接種したときの方が多くことが明らかとなった。この原因としては NAGAMURA and WAKABAYASHI (1985) は菌体接種によってウナギの好中球の代謝活性が変化するとしている。また、菌体は炎症起因为物質となることから、プロテオーズペプトンより起炎性が高いのではないかと考えられる。PEC の数がプロテオーズペプトンよりも P-FKB を接種したときの方が多くはこの起炎性の差異によるのではないかと考えられる。さらに、前述の特異免疫による可能性もあると思われる。

以上の結果から、ブリの腹腔内浸出細胞からの好中球の分離はプロテオーズペプトンおよび P-FKB を腹腔内に接種したのち12時間前後で、マクロファージは48～192時間に回収した PEC から行うのがよいと思われる。

## 第2節 ブリの貪食細胞の化学走化性および集化性の検討

前節において、ブリの腹腔内浸出細胞の経時的变化について検討した。その結果、ブリの腹腔内浸出細胞はプロテオーズペプトンよりも、*P. piscicida* FKB で誘導したほうが浸出細胞数が多く得られ、しかも、マクロファージの浸出時間が早くなることから、細胞の集化性には特異免疫が関与するのではないかと考えられた。

そこで、本節では貪食細胞の集散に関与する化学走化性および集化性因子について検討した。

### 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魚体重 89.7 g のブリ稚魚を用いた。

**供試菌株** 1984年に大分県のブリ病魚から分離した *Pasteurella piscicida* OT-8447 株から調製した強毒、弱毒および無毒株を用いた。強毒株は魚体通過を2回繰り返して毒力を強化し、弱毒および無毒株は継代を繰り返して毒力を低下させた。それぞれの株の浸漬法および接種法攻撃による10日間の LD<sub>50</sub> は Table 14 に示すとおりである。LD<sub>50</sub> は強毒株が浸漬法および接種法攻撃ともに 10<sup>3</sup> CFU/ml 以下、弱毒株が浸漬法攻撃では 10<sup>6</sup> CFU/ml 以上、接種法では 10<sup>5.4</sup> CFU/ml、無毒株が浸漬法および接種法ともに 10<sup>8</sup> CFU/ml 以上となった。

**ホルマリン不活化菌体 (P-FKB) の作製** 供試菌を1.5% NaCl 加 BHI ブイヨンに接種し、25°C で24時間振とう培養した菌液にホルマリンを0.5%濃度となるように添加し、冷暗所に48時間静置したのち、1,000×g で15分間の遠心操作によって菌体を回収した。菌体を滅菌した PBS で3回洗浄したのち、100 mg/ml の濃度となるように同液に懸濁して P-FKB 抗原液とした。

**ブリ好中球浮遊液の調製** ブリの腎臓および腹腔内浸出細胞から好中球浮遊液を作製した。頭腎からの好中球の調製は心臓穿刺法によって採血した供試魚から直ちに頭腎部を摘出した。頭腎は ML-15 中で解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュでろ過して、臓器片を取り除いた。ろ液中の細胞は ML-15 を用いて 400×g で5分間の遠心操作によって洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して 25°C で30分間反応させた。反応後、非附着細胞を回収して、ML-15 に 1×10<sup>7</sup> cells/ml となるように懸濁して好中球浮遊液とした。腹腔内浸出細胞か

らの好中球の調製は10%のプロテオーズペプトン 1 ml をブリの腹腔内に接種し、6時間後に供試魚を取り上げ、心臓穿刺法によって採血したのちに脳穿刺によって即殺した。腹部体表面を70%アルコールを用いて消毒したのち、2 ml の ML-15 を腹腔内に接種した。そして、腹部をマッサージしたのちに、腹部を切開して腹腔内の ML-15 を回収し、シリコン処理を行ったガラス試験管に採取した。この PEC は ML-15 を用いて 400×g で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して 25°C で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を回収して、ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁して好中球浮遊液とした。

**マクロファージ浮遊液の調製** ブリの頭腎および腹腔内侵出細胞からマクロファージ浮遊液を調製した。頭腎からのマクロファージの調製は心臓穿刺法によって採血した供試魚から直ちに頭腎部を摘出した。頭腎は ML-15 中で解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュでろ過して、臓器片を取り除いた。ろ液中の細胞は ML-15 を用いて 400×g で5分間の遠心操作によって洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して 25°C で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を取り除いたのち、付着細胞をピペティングによって回収した。回収したマクロファージは ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁してマクロファージ浮遊液とした。腹腔内侵出細胞からのマクロファージの調製は10%のプロテオーズペプトン 1 ml をブリの腹腔内に接種し、96時間後に供試魚を取り上げ、心臓穿刺法によって採血したのちに脳穿刺によって即殺した。腹部体表面を70%アルコールを用いて消毒したのち、2 ml の ML-15 を腹腔内に接種した。そして、腹部をマッサージしたのちに、腹部を切開して腹腔内の ML-15 を回収し、シリコン処理を行ったガラス試験管に採取した。この PEC は ML-15 を用いて 400×g で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して 25°C で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を取り除いたのち、付着細胞をピペティングによって回収した。回収したマクロファージは ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁してマクロファージ浮遊液とした。

**免疫血清の作製** ブリの腹腔内に 1 mg の P-FKB を1週おきに2回接種して、最後の接種から3週間後に取り上げ、心臓穿刺法によって採血した。ただちに、400×g で30分間の遠心操作によって血清を分離して、-80°C で保存した。

**抗体価の測定** P-FKB を用いて、マイクロタイター法によって行った。

**補体価の測定** ウサギ赤血球を用いて PLATT-MILES and ISHIZAKA (1974) の方法によって行った。

**化学走化性の測定** ブリの好中球およびマクロファージの化学走化性は、BOYDEN (1962) のケモタキシスチャンパー法によって測定した。ケモタキシスチャンパー (野村サイエンス) の下室に走化性因子を添加したのち、好中球にはポアサイズ  $3 \mu\text{m}$  の、マクロファージには  $5 \mu\text{m}$  のニュークレポアフィルター (Nuclepore) を装着した。上室に 0.2 ml の好中球およびマクロファージ浮遊液を添加したのち、25°C で90分間反応させた。反応後に、フィルターの上部を ML-15 で洗浄したのち、フィルターを取り出し、下室に面したほうを上にしてスライドグラス上に張り付けた。フィルターは95%エタノールで固定したのちに、ギムザ染色を行い、検鏡によってフィルター下面の1定面積中に遊走した細胞数を計数した。なお、ZIGMOND and HIRSH

(1973) の Checkerboard assay を行って、ケモカインネシスやランダムマイグレーションによる遊走を除外した。

正常血清の化学走化性に及ぼす *P. piscicida* FKB 濃度の影響 類結節症未感染の正常ブリ30尾から採取した血清をプールし、P-FKB を 0.02, 0.2, 2, 20, 200 mg/ml となるように懸濁した PBS を等量混合して、25°C で30分間反応させた。反応後に、5,000×g で5分間の遠心操作によって上清を回収し、化学走化性を測定して影響を調べた。

化学走化性に及ぼす加熱処理の影響 前述の方法によって、正常血清の化学走化性に及ぼす加熱処理の影響を調べた。血清の加熱処理は 50°C で5分間加熱して行った。この加熱処理血清を用いて化学走化性を測定して影響を調べた。

化学走化性に及ぼす抗体および補体価の影響 補体価が同じで抗体価が異なる血清と抗体価が同じで補体価の異なる血清を用いて前述の方法で化学走化性を測定した。

病原性の異なる菌体に対するブリ血清の化学走化性 PBS に *P. piscicida* OT-8447 株の強毒、弱毒および無毒株を  $1 \times 10^9$  CFU/ml となるように懸濁した。この懸濁液とブリの正常魚から採取した血清とを等量に混合して 25°C で30分間反応させたのち、5,000×g で5分間の遠心操作を行って、得られた上清の化学走化性を測定した。

各種菌体で誘導した腹腔内浸出細胞数の変化 ブリの浸漬法免疫魚、腹腔内接種法免疫魚、感染耐化魚、2年魚および正常魚の腹腔内に 2 mg の *Streptococcus* sp. *Pasteurella piscicida*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli* および PBS を接種した。そして、12時間後に本章前節と同様の方法で PEC 数を測定して腹腔内浸出細胞数の変化を調べた。

血清の化学走化性による PEC の誘導 正常血清と PBS を用いて 2 mg/ml の濃度となるように調製した FKC 溶液とを等量に混合し、25°C で30分間反応させたのち、5,000×g で5分間の遠心操作を行った。得られた上清 1 ml を類結節症未感染のブリの腹腔内に接種し、12時間後に本章前節と同様の方法で PEC 数を測定して誘導性を調べた。

リンパ球浮遊液の調製 感染耐化魚からヘパリン処理したシリンジを用いて心臓穿刺法によって採血したのち、ただちに頭腎を摘出した。頭腎からのリンパ球の分離は各臓器を HBSS のなかで解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュで臓器片を取り除いた。吉永 (1973) の方法によって 0.83% の  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Tris 液で混入した赤血球を破壊したのち、比重 1.077 に調製した Ficoll-Hypaque 液に重層して 4°C で 400×g, 30分間の遠心操作を行った。遠心後、リンパ球層を回収して HBSS で3回洗浄したのち、同液に  $1 \times 10^8$  cells/ml となるように懸濁した。さらに、それぞれの懸濁液と HBSS で 1 mg/ml の濃度となるように調製したカルボニル鉄懸濁液を混合して 25°C で1時間反応させた。反応後、50×g で5分間の遠心操作を行って上清のリンパ球層を回収して、 $1 \times 10^7$  cells/ml となるように ML-15 に懸濁して頭腎リンパ球浮遊液とした。この懸濁液に P-FKB を 0.01 mg/ml となるように懸濁して、25°C で6時間培養した。培養後に 400×g の遠心操作によって得られた上清をポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過した。その 1 ml を類結節症未感染のブリの腹腔内に接種し、12時間後に本章前節と同様の方法で PEC 数を測定して誘導性を調べた。

結 果

正常血清の化学走化性に及ぼす P-FKB 濃度の影響は Fig. 25 に示すとおりである。正常血清による平均化学走化指数は好中球では F-KB 濃度が 0.01 mg では 1.95, 0.1 mg では 2.59, 1 mg では 3.08, 10 mg では 4.45, 100 mg では 4.65 となった。マクロファージでは P-FKB 濃度が 0.01 mg では 1.90, 0.1 mg では 2.15, 1 mg では 2.35, 10 mg では 3.85, 100 mg では 3.90 となった。

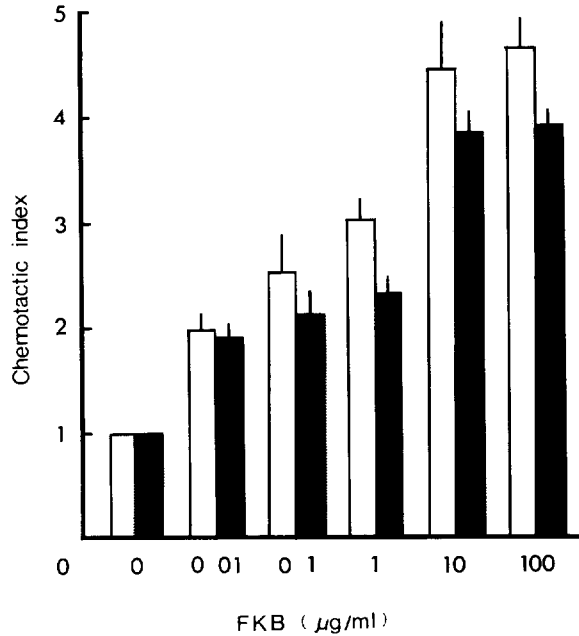


Fig. 25. Effect of concentration of *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterins on chemotactic effect of yellowtail normal serum. □, neutrophils; ■, macrophages.

化学走化性に及ぼす加熱処理の影響は Fig. 26 に示すとおりである。平均化学走化指数は正常血清と P-FKB の反応液では好中球が 4.49, マクロファージが 3.80 となった。加熱血清と P-FKB 反応液では好中球が 0.91, マクロファージが 1.05 となった。正常血清と P-FKB の反応後に加熱処理を行った液では好中球が 0.89, マクロファージが 1.00 となった。

化学走化性に及ぼす抗体および補体価の影響は Fig. 27 に示すとおりである。補体価が 625.4 units/ml で抗体価が 1:256 の血清による ML-15 に対する遊走を 100 とした時の化学走化指数は好中球が 3.78, マクロファージが 3.42 となった。抗体価が 1/2 になると好中球では 3.62, マクロファージでは 3.31 となった。抗体価が 1/3 になると好中球では 3.49, マクロファージでは 3.21 となった。各血清の化学走化指数には有意差は認められなかった。補体価が 625.4 units/ml で抗体価が 1:2 以下の血清による化学走化指数は好中球が 4.40, マクロファージが 3.80 となった。補体価が 1/2 となると好中球が 2.68, マクロファージが 3.29 となった。補体価が 1/3 と



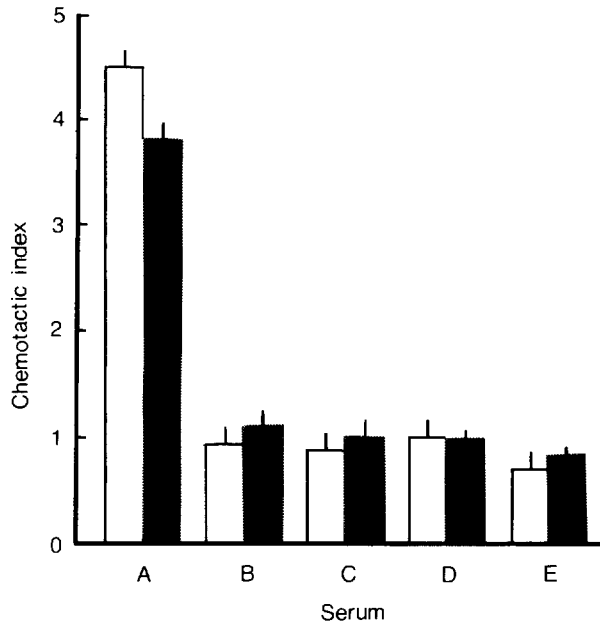


Fig. 26. Effect of incubation at various temperatures on chemotactic effect of normal yellowtail serum. □, neutrophils; ■, macrophages; A, normal serum+*Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB); B, heat inactive serum+P-FKB; C, heating after reacting normal serum and P-FKB; D, normal serum; E, heat inactive serum.

ると好中球が1.92, マクロファージが3.42となった。補体価の変化に伴って好中球の化学走化指数には1%の危険率で有意差が認められた。

病原性の異なる菌体に対する正常ブリ血清の化学走化性は Fig. 28 に示すとおりである。強毒株に対する正常ブリ血清による平均化学走化指数は好中球では0.89, マクロファージでは0.91となった。弱毒株に対する正常ブリ血清による平均化学走化指数は好中球では3.41, マクロファージでは2.78となった。無毒株に対する正常ブリ血清による平均化学走化指数は好中球では4.95, マクロファージでは4.70となった。

各種ブリの各種病原菌株に対する腹腔内浸出細胞数の変化は Fig. 29 に示すとおりである。浸漬法免疫魚の平均 PEC 数は *Streptococcus* sp. では  $10^{6.20}$ , *P. piscicida* では  $10^{6.10}$ , *V. anguillarum* では  $10^{6.08}$ , *E. tarda* では  $10^{6.06}$ , *E. coli* では  $10^{6.41}$  および PBS  $10^{6.05}$  となった。腹腔内接種法免疫魚の平均 PEC 数は *Streptococcus* sp. では  $10^{6.22}$ , *P. piscicida* では  $10^{6.58}$ , *V. anguillarum* では  $10^{6.09}$ , *E. tarda* では  $10^{6.07}$ , *E. coli* では  $10^{6.28}$  および PBS  $10^{6.04}$  cells/ml となった。感染耐化魚の平均 PEC 数は *Streptococcus* sp. では  $10^{6.10}$ , *P. piscicida* では  $10^{6.95}$ , *V. anguillarum* では  $10^{6.95}$ , *E. tarda* では  $10^{6.04}$ , *E. coli* では  $10^{6.08}$  および PBS  $10^{6.05}$  と cells/ml となった。2年魚の平均 PEC 数は *Streptococcus* sp. では  $10^{6.76}$ , *P. piscicida* では  $10^{6.93}$ , *V. anguillarum* では  $10^{6.12}$ , *E. tarda* では  $10^{6.23}$ , *E. coli* では  $10^{6.42}$  および PBS では  $10^{6.03}$  cells/ml となった。正常魚の平均 PEC 数は *Streptococcus* sp. では  $10^{6.08}$ , *P. piscicida* では  $10^{6.10}$ , *V. anguillarum* では  $10^{6.04}$ , *E. tarda* では

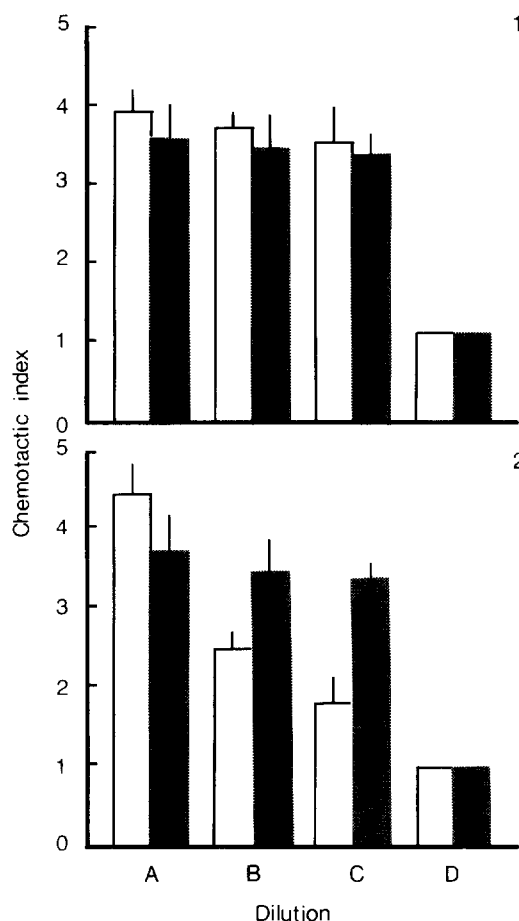


Fig. 27. Relationship between chemotactic effect of serum antibody levels and complement activity. 1, group of diluting antibody and complement 625.4 units/ml; 2, group of diluting complement and antibody titer 1:256: Dilution: A, 1:1; B, 1:2; C, 1:3; D, 1:4; □, neutrophils; ■, macrophages.

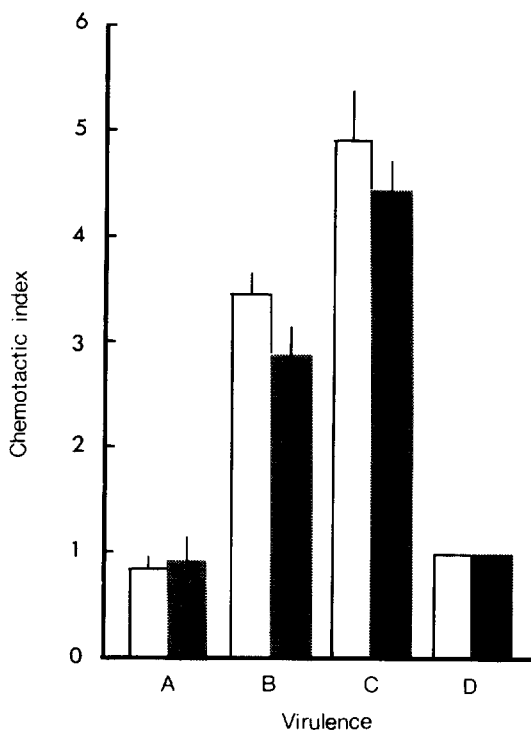


Fig. 28. Chemotactic effect of normal yellowtail serum samples mixed with high and low virulent, and avirulent strains of *Pasteurella piscicida*, respectively. A, high virulent; B, low virulent; C, avirulent; D, control; □, neutrophils; ■, macrophages.

$10^{6.06}$ , *E. coli* では  $10^{6.41}$  および PBS では  $10^{6.05}$  cells/ml となった。*P. piscicida* に対する PEC 数は正常魚と比較して腹腔内接種法免疫魚, 感染耐化魚および2年魚で1%の危険率で有意差が認められた。

血清の化学走化性による PEC を誘導した結果は Fig. 30 に示すとおりである。平均 PEC 数は P-FKB 処理血清では  $10^{6.47}$ , 未処理血清では  $10^{6.45}$ , PBS では  $10^{6.26}$  cells/ml となった。P-FKB 処理血清と未処理血清の PEC 数には有意差は認められなかった。

感染耐化魚のリンパ球の培養上清による PEC を誘導した結果は Fig. 31 に示すとおりである。PEC 数は感染耐化魚の頭腎リンパ球の培養上清では  $10^{6.99}$ , 類結節症未感染の正常魚の頭腎リンパ球の培養上清では  $10^{6.28}$ , PBS では  $10^{2.01}$  cells/ml となった。感染耐化魚の頭腎リンパ球の培

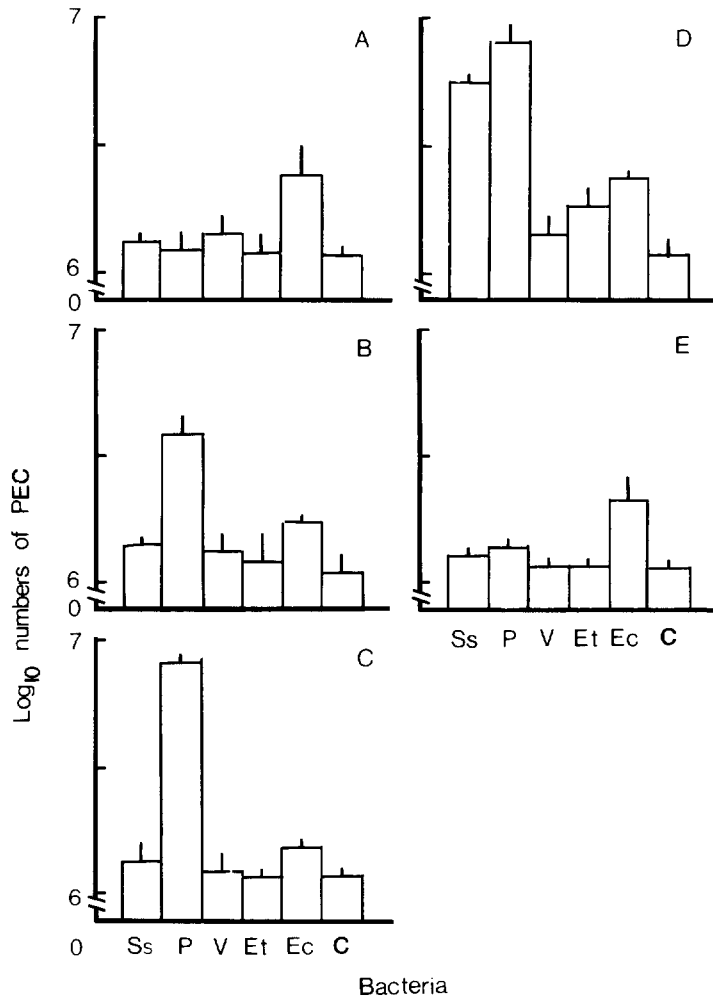


Fig. 29. Changes in the numbers of peritoneal exudate cells of various yellowtails after injection of various pathogenic bacteria. Symbols: Ss; *Streptococcus* sp.; P, *Pasteurella piscicida*; V, *Vibrio anguillarum*; ET, *Edwardsiella tarda*; Ec, *Escherichia coli*; C, control (PBS injection); A, fish immunized twice by immersion method with *P. piscicida* formalin killed bacterins (P-FKB); B, fish immunized by intraperitoneally injection with P-FKB; C, survivors after experimental challenge with *P. piscicida*; D, fish reared for 2 years; E, normal unimmunized fish.

養上清と正常魚の頭腎リンパ球の培養上清の PEC 数には 1% 以下の危険率で有意差が認められた。

### 考 察

ブリの血清の *P. piscicida* に対する化学走化性を調べた結果、ブリ血清中の化学走化因子は P-FKB と反応することによって産生され、その産生は P-FKB の濃度によって変化した。また、この走化性因子は血清を加熱処理すると産生されなくなり、また易熱性の物質であった。また、この因子の産生には血清中の抗体量による変化は認められなかったが、補体価による変化は認めら

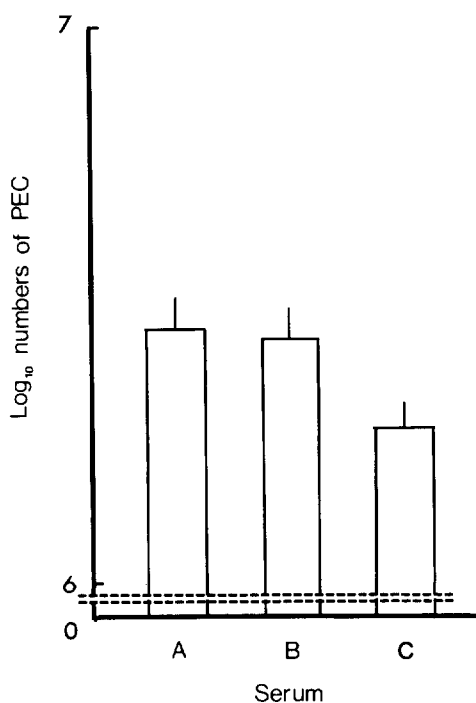


Fig. 30. Mean numbers of peritoneal exudate cells after injection of chemotactic factor of yellowtail serum (A), normal serum (B) and PBS as control (C).

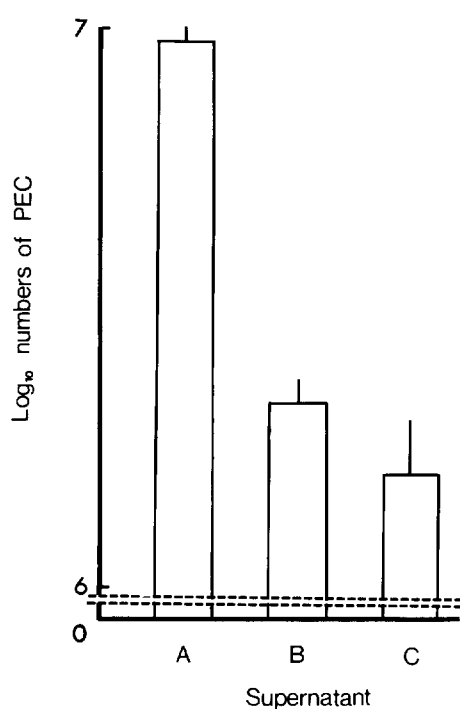


Fig. 31. Mean numbers of peritoneal exudate cells after injection of supernatant of cultured lymphocytes isolated from the yellowtail, immunized with *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterins. The lymphocytes isolated from survivors after experimental challenge with *P. piscicida* (A), normal fish (B) and PBS as control (C).

れたことから、血清中の補体価と関連する因子ではないかと考えられる。

好中球やマクロファージなどの貪食細胞は貪食を行う前に、生体内に侵入してきた病原体や炎症部位に向かって移動する能力をもつことが知られており、この移動のうち一定方向に向かうものを走化性としている (KELLER 1977)。貪食細胞の走化性因子については補体成分である C3b や C5a, 細菌性走化性因子, 組織分解産物, 血しょう酵素, ロイコエグレッシン, リンフォカイン, ウイルス性因子が知られている (小林 1978)。これらのなかでも C5a などの補体由来因子は強い走化性をもつことが知られており、この補体成分は補体活性化構造をもつ菌体の表層構造などによって活性化されて遊離し、貪食細胞を集化させるとされている (神原他 1982)。これらのことから、ブリの血清の走化性因子は補体由来のものではないかと考えられる。魚類の貪食細胞の化学走化性に関する研究は Griffin (1984), MACARTHUR et al. (1985), SUZUKI (1986), IIDE and WAKABAYASHI (1988) がある。SUZUKI (1986) はコイの血清中の化学走化性因子は補体の代替経路に由来するとしている。本節の結果からもブリの化学走化性因子は抗体量に関係なく産生されていることから、補体の代替経路によって産生されているのではないかと考えられる。また、この血清の走化性因子の産生性は *P. piscicida* の病原性によって差異が認められることが明

らかとなった。このことから、強毒株の細胞表面には補体代替経路の活性化を起こさないものが存在しているのかもしれない。さらに、強毒株ほど走化性因子の産生量が少ないことから、貪食細胞の集化が抑えられることによって強毒株は好中球やマクロファージの貪食を受けにくいのではないかと考えられる。このように、ブリの血清成分にも細胞を集化させる走化性因子が存在することが明らかとなった。いっぽう、前節ではプロテオーズペプトンと P-FKB を用いて PEC を誘導したところ、P-FKB を用いたほうが PEC 数が多く、マクロファージの浸出が早かったことから、PEC の浸出と免疫の関係が示唆された。そこで、本節では免疫や各種処理後のブリの PEC 数の変化を調べたところ、腹腔内接種法で免疫魚、感染耐化魚および2年魚で PEC 数の増加が認められた。これらのことから、ブリの PEC の浸出には免疫機構が作用しているのではないかと考えられる。また、血清由来の化学走化性因子によって PEC 数は変化しなかったが、2年魚の頭腎リンパ球と P-FKB を混合して培養した上清によって PEC 数が増加した。このことから、ブリの PEC の浸出には感作リンパ球の産生物質も関与することが明らかとなった。楠田他 (1989) はブリの細胞内増殖細菌性疾患である *Nocardia kampfachi* の感染症において、腹腔内へ接種した原因菌体に対するの貪食細胞の集化性を検討したところ、生菌で感作したブリで細胞の集化性が高まったとしている。このことから、ブリにおいても、生菌感作によって集化性物質の産生性が高まるのではないかと考えられる。いっぽう、リンパ球の培養上清中には貪食細胞の走化性や集化性を誘引する物質が存在することが知られている (WARD et al. 1970, HANDA et al. 1987)。そのなかのリンフォカインは感作された活性 T リンパ球によって産生されることが知られており、マクロファージの集化性や活性化に関与することが知られている (小林 1978)。いっぽう、前節において *P. piscicida* FKB 接種区ではマクロファージの浸出時間が早くなったことから、リンフォカインの関与が考えられる。また、前章第5節の結果からブリの感染耐化魚の頭腎リンパ球に高い感染防御性が認められたこと、頭腎には T リンパ球が多いことなどから、感染耐化魚の感染防御性は頭腎中の生菌感作 T リンパ球によるのではないかと考えられる。

### 第3節 ブリの貪食細胞の *Pasteurella piscicida* に対する貪食活性

好中球やマクロファージの貪食機構は生体内に侵入した病原体の排除方法の1つとして重要であることが知られている。好中球は抗体や補体との共同作用によって病原体を貪食し、マクロファージは抗体や補体が存在しなくても、病原体や生体の老廃物および化学物質を貪食して処理することが知られている。これらの貪食細胞による病原体の処理は体内に侵入した病原体のまわりに集合して貪食し、最終的には細胞内で消化殺菌することによって行われるとされている。前節では、ブリの貪食細胞の化学走化性や集化性について検討し、これらの細胞の *P. piscicida* に対する集合性を明らかにした。

そこで、本研究ではこの集合ののちに認められるブリの好中球およびマクロファージの貪食活性について調べた。

実 験 方 法

供試魚 高知県浦の内湾の養殖業者から購入した平均魚体重 58.6 g のブリ稚魚を用いた。

飼育方法 供試魚は 800 l のプラスチック水槽に収容して、魚体重の12%にあたるイカナゴにハマチエードSを加えたものを朝夕2回にわけて投与した。なお、本実験期間中の水温は 23.8 ~24.4°C であった。

供試菌株 1984年に大分県のブリ病魚から分離した *Pasteurella piscicida* OT-8447 株から調製した強毒、弱毒および無毒株を用いた。強毒株は魚体通過を2回繰り返して毒力を強化し、弱毒および無毒株は継代を繰り返して毒力を低下させた。それぞれの株の浸漬法および接種法攻撃による10日間の LD<sub>50</sub> は Table 14 に示すとおりである。LD<sub>50</sub> は強毒株が浸漬法および接種法攻撃ともに 10<sup>3</sup> CFU/ml 以下、弱毒株が浸漬法攻撃では 10<sup>6</sup> CFU/ml 以上、接種法では 10<sup>5.4</sup> CFU/ml、無毒株が浸漬法および接種法ともに 10<sup>8</sup> CFU/ml 以上となった。

Table 14. Lethal dose of high and low virulent and avirulent strains prepared from *Pasteurella piscicida* OT-8447 against yellowtail

Strains	Methods of experimental challenge	LD <sub>50</sub> against yellowtail
High virulent	Intraperitoneal injection	<3.0*
	Immersion	<3.0
Low virulent	Intraperitoneal injection	5.1
	Immersion	>6.0
Avirulent	Intraperitoneal injection	>6.0
	Immersion	>6.0

\* Log<sub>10</sub> number of viable *Pasteurella piscicida*.

P-FKB 抗原の作製 供試菌を1.5% NaCl 加 BHI ブイヨンに接種し、25°C で24時間振とう培養した菌液にホルマリンを0.5%濃度となるように添加し、冷暗所に48時間静置したのち、1,000 ×g で15分間の遠心操作によって菌体を回収した。菌体を滅菌した PBS で3回洗浄したのち、100 mg/ml の濃度となるように同液に懸濁して P-FKB 抗原液とした。

免疫方法 腹腔内接種法と浸漬法によって免疫した。前者は滅菌 PBS で50倍に希釈した P-FKB 抗原液とフロイントの不完全アジュバントとの等量混合液 1 ml を供試魚の腹腔内に接種して行った。後者は抗原液を綿ろ過海水を用いて1,000倍に希釈し、エアレーションを行いながら供試魚を5分間浸漬して行った。いずれの方法も1週おきに2回処理したのち、1カ月に追加処理を行った。なお、浸漬法免疫魚および腹腔内接種法免疫魚には最終免疫から3週間後のブリを用いた。

ブリ好中球浮遊液の調製 ブリの腎臓および腹腔内浸出細胞から好中球浮遊液を作製した。頭腎からの好中球の調製は心臓穿刺法によって採血した供試魚から直ちに頭腎部を摘出した。頭腎は ML-15 中で解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュでろ過して、臓器片を取り

除いた。ろ液中の細胞は ML-15 を用いて  $400\times g$  で5分間の遠心操作によって洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュ (Coaster) に添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を回収して、ML-15 に  $1\times 10^7$  cells/ml となるように懸濁して好中球浮遊液とした。腹腔内侵出細胞からの好中球の調製は10%のプロテオーズペプトン 1ml をブリの腹腔内に接種し、6時間後に供試魚を取り上げ、心臓穿刺法によって採血したのちに脳穿刺によって即殺した。腹部体表面を70%アルコールを用いて消毒したのち、2ml の ML-15 を腹腔内に接種した。そして、腹部をマッサージしたのちに、腹部を切開して腹腔内の ML-15 を回収し、シリコン処理を行ったガラス試験管に採取した。この PEC は ML-15 を用いて  $400\times g$  で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を回収して、ML-15 に  $1\times 10^7$  cells/ml となるように懸濁して好中球浮遊液とした。

**マクロファージ浮遊液の調製** ブリの頭腎および腹腔内侵出細胞からマクロファージ浮遊液を調製した。頭腎からのマクロファージの調製は心臓穿刺法によって採血した供試魚から直ちに頭腎部を摘出した。頭腎は ML-15 中で解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュでろ過して、臓器片を取り除いた。ろ液中の細胞は ML-15 を用いて  $400\times g$  で5分間の遠心操作によって洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を取り除いたのち、付着細胞をピペッティングによって回収した。回収したマクロファージは ML-15 に  $1\times 10^7$  cells/ml となるように懸濁してマクロファージ浮遊液とした。腹腔内侵出細胞からのマクロファージの調製は10%のプロテオーズペプトン 1ml をブリの腹腔内に接種し、96時間後に供試魚を取り上げ、心臓穿刺法によって採血したのちに脳穿刺によって即殺した。腹部体表面を70%アルコールを用いて消毒したのち、2ml の ML-15 を腹腔内に接種した。そして、腹部をマッサージしたのちに、腹部を切開して腹腔内の ML-15 を回収し、シリコン処理を行ったガラス試験管に採取した。この PEC は ML-15 を用いて  $400\times g$  で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を取り除いたのち、付着細胞をピペッティングによって回収した。回収したマクロファージは ML-15 に  $1\times 10^7$  cells/ml となるように懸濁してマクロファージ浮遊液とした。

**好中球およびマクロファージの貪食活性の測定** 好中球およびマクロファージ浮遊液 0.5 ml と正常ブリ血清 0.4 ml と ML-15 を用いて  $1\times 10^8$  cells/ml に調製した P-FKB 液を混合して、30, 60, 180, 360分後に 0.1 ml の混合液を取り出し、 $400\times g$  で5分間の遠心操作によって細胞を回収した。細胞は  $10\mu\text{l}$  のウシ胎児血清に懸濁したのち、スメアを作製した。スメアは95%エタノールで固定したのち、ペルオキシダーゼとギムザの2重染色を行った。そして、検鏡して貪食活性および貪食指数を測定した。

**好中球およびマクロファージの貪食に及ぼす各種血清成分の影響** 浸漬法免疫魚、腹腔内接種法免疫魚、感染耐化魚、2年魚および類結節症未感染魚から心臓穿刺法によって採血した血液を  $4^{\circ}\text{C}$  で18時間反応させたのち、 $400\times g$  で15分間の遠心操作によって血清を分離した。これらの

血清を用いて前述の方法で類結節症未感染魚から得た腹腔内好中球およびマクロファージの貪食活性を測定した。

好中球およびマクロファージの貪食におよぼす各種処理の影響 浸漬法免疫魚，腹腔内接種法免疫魚，感染耐化魚，2年魚および類結節症未感染魚から調製した腹腔内好中球およびマクロファージ浮遊液を用いて正常血清および自己血清をオプソニンとして前述の方法で貪食活性を測定した。

リンパ球の培養上清がブリの好中球およびマクロファージの貪食活性に及ぼす影響 感染耐化魚からヘパリン処理したシリンジを用いて心臓穿刺法によって採血したのち，ただちに頭腎を摘出した。頭腎からのリンパ球の分離は各臓器を HBSS のなかで解剖用ハサミを用いて細片化したのち，白金メッシュで臓器片を取り除いた。吉永 (1973) の方法によって 0.83% の  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Tris 液で混入した赤血球を破壊したのち，比重 1.077 に調製した Ficoll-Hypaque 液に重層して  $4^\circ\text{C}$  で  $400\times\text{g}$ ，30 分間の遠心操作を行った。遠心後，リンパ球層を回収して HBSS で 3 回洗浄したのち，同液に  $1\times 10^8$  cells/ml となるように懸濁した。さらに，それぞれの懸濁液と HBSS で 1 mg/ml の濃度となるように調製したカルボニル鉄懸濁液を混合して  $25^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応後， $50\times\text{g}$  で 5 分間の遠心操作を行って上清のリンパ球層を回収して， $1\times 10^7$  cells/ml となるように ML-15 に懸濁して頭腎リンパ球浮遊液とした。この懸濁液に P-FKB を 0.01 mg/ml となるように懸濁して， $25^\circ\text{C}$  で 6 時間培養した。培養後に  $400\times\text{g}$  の遠心操作によって得られた上清をポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過した。その頭腎リンパ球培養上清と頭腎好中球およびマクロファージをそれぞれ 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 の割合で混合して  $25^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたのち，各細胞を  $400\times\text{g}$  で 5 分間の遠心操作によって洗浄したのち，前述の方法で貪食活性を測定した。

## 結 果

好中球およびマクロファージの貪食活性を測定した結果は Fig. 32 に示すとおりである。P-FKB に対する好中球の貪食活性は貪食開始後 1 時間で最大となり，最大貪食活性は 29.8% となった。マクロファージでは貪食活性は 3 時間で最大となり，最大貪食活性は 49.1% となった。

好中球およびマクロファージの貪食に及ぼす免疫血清および正常血清の影響は Table 15 に示すとおりである。オプソニンとして免疫血清，正常血清および血清無添加のときの好中球の貪食活性はそれぞれ 53.4, 42.7, 3.6% となった。これらを加熱処理した後にはそれぞれ 9.2, 8.7, 3.6% となった。各血清添加区と無添加区および非加熱処理区と加熱処理の間には 1% 以下の危険率で有意差が認められ，免疫血清と正常血清の間にも有意差は認められた。オプソニンとして免疫血清，正常血清および血清無添加のときのマクロファージの貪食活性はそれぞれ 56.9, 50.9, 38.6% となった。これらを加熱処理した後にはそれぞれ 49.9, 39.2, 38.6% となった。免疫血清添加区と無添加区の間には 1% 以下の危険率で有意差が認められたが，免疫血清と正常血清および非加熱処理区と加熱処理の間には有意差は認められなかった。

好中球およびマクロファージの貪食に及ぼす各種ブリ血清の影響は Table 16 に示すとおりで



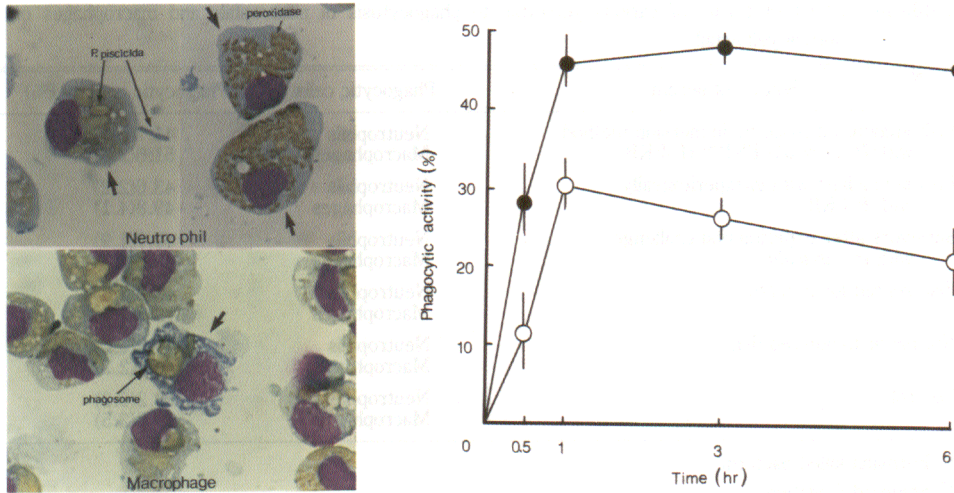


Fig. 32. Phagocytic activity of yellowtail peritoneal exudate neutrophils (○) and macrophages (●) against *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin.

Table 15. Effect of serum of immunized and unimmunized yellowtail to phagocytosis of neutrophils and macrophages of normal yellowtail

Phagocytic cell	Source of serum	Heat treatment at 50°C for 5 min	Phagocytic activity (%)
Neutrophils	Immunized	—	53.4(2.6)*
		+	9.2(3.4)
	Unimmunized	—	42.7(5.6)
		+	8.7(3.9)
Macrophages	Immunized	—	56.9(2.8)
		+	49.9(6.9)
	Unimmunized	—	50.9(9.2)
		+	39.2(4.6)
	Not added	—	38.6(2.9)

\* Standard deviation.

ある。浸漬法免疫魚，腹腔内接種法免疫魚，感染耐化魚，2年魚，類結節症未感染魚の血清および培地をオプソニンとしたときの好中球の貪食活性はそれぞれ，41.7，43.6，42.7，46.9，41.3，9.2%となった。各血清添加区と培地の間には1%の危険率で有意差が認められたが，各血清の間には有意差が認められなかった。浸漬法免疫魚，腹腔内接種法免疫魚，感染耐化魚，2年魚，類結節症未感染魚の血清および培地をオプソニンとしたときのマクロファージの貪食活性はそれぞれ51.6，49.8，49.2，48.6，46.4，39.8%となった。

各種ブリの好中球およびマクロファージの貪食活性は Table 17 に示すとおりである。浸漬法免疫魚，腹腔内接種法免疫魚，感染耐化魚，2年魚，類結節症未感染魚の好中球の貪食活性はそれぞれ，41.6，42.3，49.3，50.4，39.8%となった。各区の間には有意差が認められなかった。浸

**Table 16.** Effect of serum of various yellowtail to phagocytosis of neutrophils and macrophages of normal yellowtail

Source of serum	Phagocytic cells	Phagocytic activity (%)
Fish immunized twice by immersion method with <i>P. piscicida</i> FKB* <sup>1</sup> (P-FKB)	Neutrophils	41.7(5.1)* <sup>2</sup>
	Macrophages	51.6(2.3)
Fish immunized with intraperitoneally with P-FKB	Neutrophils	43.6(2.2)
	Macrophages	49.8(4.1)
Survivors after experimental challenge with <i>P. piscicida</i>	Neutrophils	42.7(1.9)
	Macrophages	49.2(2.2)
Fish reared for 2 years	Neutrophils	46.9(3.3)
	Macrophages	48.6(1.2)
Normal unimmunized fish	Neutrophils	41.3(4.0)
	Macrophages	46.4(2.5)
Control	Neutrophils	9.2(0.2)
	Macrophages	39.8(2.5)

\*<sup>1</sup> Formalin killed bacterin.

\*<sup>2</sup> Standard deviation.

**Table 17.** Phagocytic activity of neutrophils and macrophages of various yellowtails

Yellowtail	Phagocytic cells	Phagocytic activity (%)
Fish immunized twice by immersion method with <i>Pasteurella piscicida</i> FKB* <sup>1</sup> (P-FKB)	Neutrophils	41.6(2.5)* <sup>2</sup>
	Macrophages	46.3(5.8)
Fish immunized with intraperitoneally with P-FKB	Neutrophils	42.3(2.8)
	Macrophages	45.3(3.4)
Survivors after experimental challenge with <i>P. piscicida</i>	Neutrophils	49.3(2.2)
	Macrophages	59.8(1.8)
Fish reared for 2 years	Neutrophils	50.4(2.2)
	Macrophages	61.3(3.1)
Normal unimmunized fish	Neutrophils	39.8(2.9)
	Macrophages	41.5(3.3)

\*<sup>1</sup> Formalin killed bacterins.

\*<sup>2</sup> Standard deviation.

漬法免疫魚，腹腔内接種法免疫魚，感染耐化魚，2年魚，類結節症未感染魚のマクロファージの貪食活性はそれぞれ46.3, 45.3, 59.8, 61.3, 41.5%となった。

リンパ球の培養上清がブリの好中球およびマクロファージの貪食活性に及ぼす影響は Fig. 33 に示すとおりである。マクロファージの貪食活性はリンパ球の培養上清とマクロファージ浮遊液を1:4の割合で混合したときに最大となった。好中球では貪食活性の上昇には有意差が認められなかったが、マクロファージでは1:4混合区と他の区との間に1%の危険率で有意差が認められた。

## 考 察

ほ乳類の好中球による細菌の貪食には好中球表面の補体成分の1種であるC3bレセプターと血清成分によって細菌表面上に形成されたC3bとの結合および好中球表面上のFcレセプターと細菌と結合した抗体のFcによって開始することされている。このように好中球の細菌の取り込みには血清成分とくに補体および抗体が関与することが知られている (COHN 1959, GHEBRE-

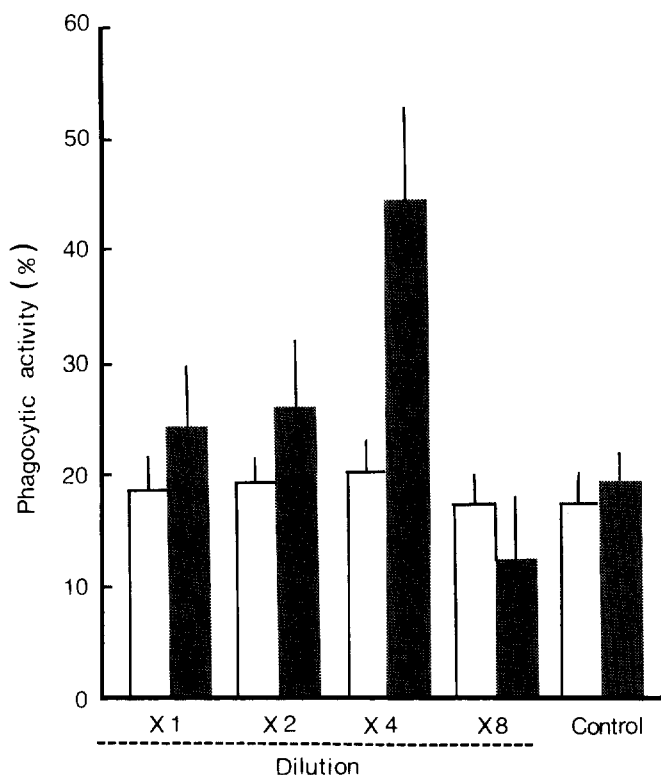


Fig. 33. Phagocytic activity of head kidney phagocytic cells activated with supernatant of culture of lymphocytes from survivors after experimental challenge with *Pasteurella piscicida* mixed with *P. piscicida* formalin killed bacterins. □, Neutrophils; ■, macrophages.

HIWET and MILLER-EBERHARD 1979, 中川 1979, MILLER 1985)。そのため、好中球は表面に補体を活性させる構造のないラテックス粒子などは貪食できないとされている。いっぽう、マクロファージは細胞表面に C3b レセプターや Fc レセプターをもっているが、これらと反応しないラテックスやカーボン粒子もよく貪食することが知られている (野本 1988)。また、好中球はおもに *Pseudomonas aeruginosa* や *Escherichia coli* などの化膿性菌、マクロファージはおもに *Listeria monocytogenes* などの細胞内増殖性菌の貪食殺菌に関与することが知られている (野田・浅川 1974)。このように好中球とマクロファージの貪食活性には差異が認められるが、いずれも生体防御には必要であることが知られている (野本 1988)。

そこで、本節ではブリのこれらの貪食細胞の貪食性について検討した。その結果、ブリの腹腔内浸出好中球およびマクロファージは KUSUDA and HAMAGUCHI (1988), 楠田他 (1988) の頭腎から分離した貪食細胞の活性と比較して上昇していることが明らかとなった。ほ乳類では臓器マクロファージは活性が低い状態にあり、浸出性のマクロファージは活性が上昇していることが知られている (野本 1988)。この原因としては、マクロファージは分化の過程が進むにつれて、生物活性が上昇するとされている (COHN 1968)。一般に、マクロファージの分化は血液単球～臓器マクロファージ～浸出性マクロファージへと進むことから、今回ブリの腹腔内浸出マクロファージの活性が上昇したのはこの理由によるのかもしれない。いっぽう、浸出性の好中球の活性が上

昇するという報告は見あたらないが、好中球の貪食活性はある種の化学走化性因子によって活性化されることが知られている(野本 1982)。このことから、走化性因子の影響を受けたと思われる浸出性好中球の貪食能が上昇しているのではないかと考えられる。つぎに、ブリの好中球およびマクロファージの貪食能に及ぼす血清の影響を調べたところ、好中球の貪食能は血清が存在しないとほとんど認められないことが明らかとなった。また、非働化血清でも低い貪食活性を示すことから、ブリの好中球の貪食には血清中の補体が関与しているのではないかと考えられる。ほ乳類の好中球の貪食性は血清中の補体に依存していることが知られている(野本 1982)。ブリにおいても同様ではないかと思われる。いっぽう、ブリのマクロファージの貪食には血清の添加と無添加では大きな変化がない結果となった。しかし、抗体価の高い免疫血清をオプソニンとすると貪食能が上昇する傾向を示した。SAKAI (1984) はサケ科魚類の腹腔内浸出細胞を用いて、血清のオプソニン効果を検討した結果、腹腔内浸出細胞の貪食活性はオプソニンによって上昇するとしている。そのほかの魚種でも血清成分による貪食細胞の活性化は FUJII (1981), O'NEILL (1985) によって報告されている。本節の結果もこれらと同様であり、抗体価の高い免疫血清は好中球およびマクロファージの貪食活性を上昇させることが明らかとなった。つぎに、各種ブリの血清のオプソニン効果および好中球およびマクロファージの貪食活性を測定して、比較したところ浸漬法免疫魚、腹腔内接種法免疫魚、感染耐化魚、2年魚、類結節症未感染魚の血清のオプソニン効果には有意差が認められなかった。いっぽう、これらの魚から調製した腹腔内浸出好中球およびマクロファージの貪食活性を測定した結果、有意差は認められなかったが、腹腔内接種法免疫魚、感染耐化魚および2年魚で高くなる傾向を示した。これらの魚の本症に対する抵抗性は高いことから、貪食活性の上昇が感染防御性に重要なのではないかと考えられる。楠田他(1988) は本症に対するリボゾームワクチンの有効性を報告しており、本症に対しては貪食細胞の活性化が必要なのではないかとしている。本節の結果からも本症に対しては貪食細胞の活性化が重要なのではないかと考えられる。また、前節では感染耐化魚の頭腎リンパ球の培養液がマクロファージの集化性を上昇させることから、リンフォカイン様物質がブリにおいても存在するのではないかと考えられた。そこで、本節ではこのリンパ球の培養上清を活性が低い状態にある頭腎好中球およびマクロファージに作用させたのち、貪食活性を測定したところ好中球の貪食活性は上昇したが有意差が認められなかったが、マクロファージの貪食活性の上昇は正常魚のリンパ球培養上清を用いたときと比較して有意差が認められた。マクロファージを活性化させるリンパ球の産生因子としては MAF, インターフェロンおよびリンフォカインが知られている(MELTZER 1981, O'MALLEY 1982, 徳永 1983, 谷山・赤川 1984, ESPARZA et al. 1987)。これらのいずれかが作用していると思われる。前章第5節で認められた感染耐化魚のリンパ球移入による感染防御性の上昇は頭腎リンパ球の貪食細胞活性化因子によるのではないかと考えられる。

#### 第4節 ブリ貪食細胞の細胞内殺菌活性の測定法の検討

マクロファージや好中球は生体内に侵入してくる病原体を貪食したのちに、細胞内で消化およ

び殺滅して、生体防衛に寄与することが知られている(野本 1982, 野本 1988)。しかし、*Mycobacterium tuberculosis* などの抗酸菌群、*Listeria monocytogenes* および *Salmonella typhimurium* などの貪食細胞の殺菌活性に対して抵抗性をもつ菌種に対する貪食細胞の消化・殺菌処理には生菌免疫で誘導される活性Tリンパ球などの関与が必要であるとされている(HAHN and KAUFMANN 1981, ORME and COLLINS 1983, ORMA 1988, 金井 1975)。窪田他(1970b)はブリの類結節症においては病魚の貪食細胞内で、本症原因菌である *Pasteurella piscicida* の増殖像が認められるとしており、本菌も貪食細胞内で殺菌活性に抵抗して増殖する菌種であると思われる。また、KUSUDA and HAMAGUCHI (1988) および楠田他(1988)はブリ類結節症に対しては弱毒生菌ヤリボゾームなどの細胞性免疫の誘発効果が認められているワクチンの有効性が高いとしている。これらのことから、ブリ類結節症に対する有効性の高いワクチンを開発するためには、ブリの貪食細胞に *P. piscicida* が取り込まれたのちの殺菌効果を調べる必要があると思われる。しかし、これまでに *P. piscicida* に対するブリの貪食細胞内の殺菌活性を測定した報告はみあたらない。

そこで、本研究ではブリの腎臓由来の貪食細胞を用いて、*P. piscicida* を貪食させたのちの細胞内殺菌活性の測定方法について検討した。

## 実験方法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した体重 50~180 g のブリ稚魚を用いた。

**供試菌株** 1984年に大分県のブリ病魚の腎臓から分離された *Pasteurella piscicida* OT-8447 株を用いた。本株は分離後、魚体内通過を2回繰り返したのち、凍結乾燥を行い、4°C に保存して使用した。使用に際しては、1.5%食塩加 BHI 液体培地(Difco)に溶解して、25°C で1夜培養したのち、2%食塩加 BHI 寒天斜面培地に接種し、25°C で20時間培養して実験に供試した。

**腎臓細胞浮遊液の調製** 動脈球穿刺法により採血したブリ稚魚から、頭腎部を含む腎臓部を取り出した。腎臓は表面を70%エタノールで処理し、滅菌した1%食塩水で洗浄したのちに ML-15 中で、解剖用のはさみを用いて細片化した。氷冷下で10分間静置したのちに上清を採集し、150×g で5分間の遠心操作を2回行って細胞を洗浄した。洗浄後にエオジン Y を用いて生細胞数を計数し、ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁し、腎臓細胞浮遊液とした。

**固定腎臓細胞浮遊液の調製** 前述の方法で調製した腎臓細胞浮遊液にグルタルアルデヒドを 0.1%の濃度となるように添加し、4°C で30分間反応させた。反応後に ML-15 を用いて細胞を 150×g で5分間の遠心洗浄を5回行ったのち、ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁し、固定腎臓細胞浮遊液とした。

**細胞外菌体の除去法の検討** ストレプトマイシンとペニシリン G を反応させたのちに通常の遠心分離を行う方法と、ストレプトマイシンとペニシリン G を反応させたのちに Percoll を用いて比重遠心を行う方法について比較した。前者の方法は固定腎臓細胞浮遊液に *P. piscicida* 生菌を  $10^6$  CFU/ml となるように懸濁したのち、ストレプトマイシンを10および 100  $\mu$ g/ml、ペニシリン G を150および 1,500 unit/ml となるように添加し、25°C で15分間反応させた。反応後に ML-15 を用いて 150×g で5分間の遠心操作を行い、腎臓細胞画分を採取した。腎臓細胞画分は L-

15を用いて、 $150\times g$ で5分間の遠心洗浄を3回行ったのち、1 mlのML-15に再懸濁した。そして、混積平板法によって残存生菌数を測定した。後者の方法は固定腎臓細胞浮遊液に*P. piscicida*生菌を $3.8\times 10^7$  CFU/mlの濃度となるように懸濁したのち、ストレプトマイシンを100  $\mu\text{g/ml}$ 、ペニシリンGを1,500 unit/mlとなるように添加し、 $25^\circ\text{C}$ で15分間反応させた。反応後に比重を1.070に調製したPercoll溶液1 mlに、その反応液400  $\mu\text{l}$ を重層したのち、 $3,500\times g$ で5分間の遠心操作を行い、腎臓細胞画分を回収した。腎臓細胞画分はML-15を用いて $150\times g$ で5分間の遠心洗浄を3回行ったのち、1 mlのML-15に懸濁した。そして、混積平板法によって残存生菌数を測定した。

界面活性剤によるブリの腎臓細胞の破壊法の検討 それぞれ0.2%のBL-9EX, BL-21, BL-25, BC-25TX, BC-30TX, BC-40TX, BS-20, BO-50, BB-20, BB-30, HCO-60, Triton X-100を含む1, 7, 11, および15%の食塩水と、 $1\times 10^7$  cells/mlの細胞浮遊液を等量混合して、氷冷下で15分間反応させた。そして、前述の方法で生細胞数を測定して破壊能を比較した。また、残存細胞についてはスメアを作製し、ギムザ染色を行ったのちに細胞を同定した。

界面活性剤以外のブリ腎臓細胞の破壊法の検討 ブリの腎臓細胞に対する浸透圧の変化、ヤギおよびモルモットの補体による処理および高速遠心操作による破壊方法を検討した。浸透圧の変化は蒸留水および8%食塩水と細胞浮遊液を等量混合し、氷冷下で15分間反応させたのち、前述の方法により生細胞数を測定して破壊能を比較した。ヤギおよびモルモット補体によるブリ腎臓細胞の処理は、2%食塩水中にヤギおよびモルモット補体(Cappel)をそれぞれ1および10%となるように溶解し、細胞浮遊液と等量混合して、 $25^\circ\text{C}$ で15分間反応させたのち、前述の方法により生細胞数を測定し、破壊能を比較した。高速遠心操作による細胞の破壊は細胞浮遊液を $1,500\times g$ 、5分間の遠心操作を行ったのち、前述の方法により生細胞数を測定し、破壊能を比較した。また、残存細胞についてはスメアを作製し、ギムザ染色を行ったのちに細胞を同定した。

ブリの腎臓細胞の破壊条件が*P. piscicida*の生残性に及ぼす影響 前述の細胞破壊条件の検討の結果、破壊能の高かった0.2%のBL-9EX, BL-21, BL-25, BC-25TX, Triton X-100加11および15%食塩水と*P. piscicida*生菌濃度が $10^6\sim 10^7$  CFU/mlとなるように調製したL-15を等量混合し、氷冷下で0, 15, 60分間反応させたのち、混積平板法によって生菌数を計数した。

腎臓細胞内*P. piscicida*生菌数の経時的変化 L-15を用いて $1\times 10^6$  CFU/mlに調製した*P. piscicida*生菌懸濁液と類結節症未感作のブリから採集した血清を1:4の割合で混合し、 $25^\circ\text{C}$ で10分間反応させた。反応後にブリ稚魚の腎臓から前述の方法で作製した細胞浮遊液と等量混合し、15, 20, 25,  $30^\circ\text{C}$ で2 rpmの回転培養を行った。そして、0, 7.5, 15, 30, 60, 90分後にそれぞれ反応液を取り出し、ストレプトマイシンを100  $\mu\text{g/ml}$ とペニシリンGを1,500 unit/mlとなるように添加し、 $25^\circ\text{C}$ で15分間反応させたのち、Percollを用いた比重遠心を行う方法で細胞外生菌を除去した。細胞はML-15に再懸濁したのち、0.2% BL-25加15%食塩水と等量混合し、氷冷下で15分間反応させて破壊した。反応後に混積平板法によって生菌数を測定した。

細胞内殺菌活性の測定 各10尾の類結節症未感作魚および2年魚から腎臓細胞浮遊液を作製し、前述の方法で $25^\circ\text{C}$ で30分間貪食させたのち、ストレプトマイシンとペニシリンGを前述の濃度

となるように添加し、25°Cで15分間反応させた。その反応液を比重を1.070に調製した Percoll 溶液に重層して、1,000×gで5分間の遠心操作を行い、腎臓細胞画分を採取した。腎臓細胞は ML-15 を用いて 150×gで5分間の遠心洗浄を3回行ったのち、ML-15中に $1 \times 10^7$  cells/mlとなるように懸濁した。この懸濁液は25°Cで0, 60, 120, 180分間培養したのち、1定量を取り出して0.2% BL-25 加15%食塩水を等量混合し、氷冷下で15分間反応させた。反応後に混積平板法で生菌数を測定し、細胞内殺菌活性を求めた。

## 結 果

ストレプトマイシンとペニシリン G を反応させたのちに、通常の遠心操作と Percoll を用いた比重遠心法による細胞外の生菌の除去法を検討した結果は Table 18 に示すとおりである。遠心操作の前には  $2.4 \times 10^6$  CFU/ml であったが、遠心操作後の上清は  $1.3 \times 10^4$  CFU/ml となり、ストレプトマイシンを 10  $\mu$ g/ml およびペニシリン G を 150 unit/ml となるように添加したときは  $1.9 \times 10^4$  CFU/ml となり、ストレプトマイシンを 100  $\mu$ g/ml およびペニシリン G を 1,500 unit/ml となるように添加したときは  $7.8 \times 10^3$  CFU/ml と低下した。Percoll を用いた比重遠心法では、遠心操作の前は  $5.3 \times 10^6$  CFU/ml であったが、Percoll を用いた比重遠心操作により  $8.9 \times 10^4$  CFU/ml となった。さらに、ストレプトマイシンを 100  $\mu$ g/ml およびペニシリン G を 1,500 unit/ml となるように添加したときは  $2.9 \times 10^2$  CFU/ml となった。

Table 18. Separation of yellowtail phagocytic cells and *Pasteurella piscicida* by a combination of antibiotics and centrifugation without and with Percoll

Centrifugation		Concentration of antibiotics		Viable <i>P. piscicida</i> (CFU/ml)
Percoll	gravity	streptomycin	penicillin G	
—	150 xg	100*	1,500**	3.9***
—	150 xg	10	150	5.1
—	150 xg	0	0	6.2
—	—	0	0	7.0
+	3,500 xg	100	1,500	1.1
+	3,500 xg	0	0	6.8
+	—	0	0	7.1

\* mg/ml; \*\* units/ml;

\*\*\* Log<sub>10</sub> number of viable *P. piscicida*.

各種界面活性剤によるブリの腎臓細胞の破壊能を比較した結果は Table 19 に示すとおりである。0.2% BL-9EX 加11および15%食塩水、0.2% BL-21 加11および15%食塩水、0.2% BL-25 加11および15%食塩水、0.2% Triton X-100 加11および15%食塩水に高い細胞破壊能が認められた。また、残存細胞については細胞種のかたよりは認められなかった。

界面活性剤以外の方法によるブリの腎臓細胞の破壊能を比較した結果は Table 20 に示すとおりである。細胞破壊能は蒸留水による方法にのみに認められ、それ以外の8%食塩水処理、ヤギおよびモルモット補体処理および高速遠心処理では認められなかった。

**Table 19.** Desruction of Yellowtail phagocytic cells by 0.2% detergents in hyper-osmotic solution using sodium chloride at 0°C

Surface activator	Concentrations of sodium chloride (%)			
	1	7	11	15
BL-9EX	C	B	A	A
BL-21	C	B	A	A
BL-25	C	B	A	A
BC-25TX	C	B	B	B
BC-30TX	C	C	B	B
BC-40TX	C	C	C	B
BS-20	C	C	C	C
BO-50	C	C	C	C
BB-20	C	C	C	C
BB-30	C	C	C	C
HCO-60	C	C	C	C
Triton X-100	B	B	A	A

Percent of disruction of phagocytic cells; A, <5%; B, 5-30%; C, >30%.

**Table 20.** Destruction of yellowtail phagocytic cells by complement of guinea pig and goat, osmotic shock and centrifugaiton at 1,500×g for 5 min

Method	Rate of destruction of phagocytic cells
1% goat complement	C*
10% goat complement	C
1% guinea pig complement	C
10% guinea pig complement	C
0% sodium choloride	A
8% sodium choloride	C
Centrifugation at 1,500×g for 5 min.	C

\* Percent of disruction of phagocytic cells: A, <5%; 5-30%; C, >30%.

前述の腎臓細胞の破壊能の高かった方法における *P. piscicida* の生残性に及ぼす影響を検討した結果は Fig. 34 に示すとおりである。*P. piscicida* の生残性に及ぼす影響は0.2% BL-25 加15% 食塩水が最も小さく、そのほかの方法では生残性が低下した。

細胞内 *P. piscicida* 生菌数の経時的変化を検討した結果は Fig. 35 に示すとおりである。細胞内生菌数はいずれの温度においても、15~30分反応後に急激に増加したが、それ以後の変化は小さかった。平均細胞内生菌数は 25°C で30分反応後に  $2.9 \times 10^3$  CFU/10<sup>7</sup> cells となった。平均細胞内生菌数は培養温度が 25°C で最も高く、ついで 30°C, 20°C, 15°C の順となった。

ブリ1年魚および2年魚から調製した腎臓細胞の *P. piscicida* 生菌に対する細胞内殺菌活性を測定した結果は Fig. 36 に示すとおりである。1年魚の腎臓細胞の *P. piscicida* 細胞内生菌数は経時的に増加する傾向が認められ、2時間反応以後は急激に増加した。2年魚の腎臓細胞の *P. piscicida* 細胞内生菌数は60~90分間反応後までは低下する傾向が認められ、60分間反応後には平均1オーダー程度低下した。しかし、それ以後は生菌数が増加する傾向を示した。



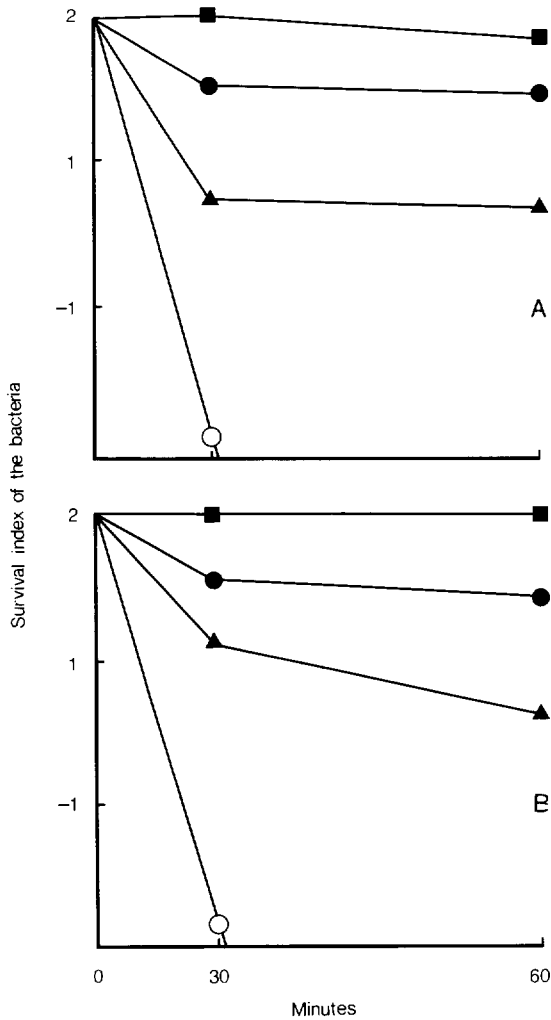


Fig. 34. Effect of disruption of yellowtail phagocytic cells by various non-ionic detergents in 11 (A) and 15 (B) % sodium chloride solution on viability of *Pasterella piscicida*. Symbols: ○, BL-9EX; ●, BL-21; □, BL-25; △, Triton X-100.

考 察

貪食細胞内の殺菌活性の測定は貪食細胞と生菌を混合して貪食させたのち、両者を分離しないで生菌数を測定する方法と、両者を分離して貪食細胞内の生菌数のみを測定する方法がある。前者は操作が簡便であるが、貪食細胞内である程度殺菌されても、用いる菌株の増殖性が高い場合にはそれを上回って増殖して、測定が困難になると思われる。そこで、本研究ではブリの貪食細胞と生菌を混合して貪食させたのち、細胞外の生菌を除去して細胞内殺菌活性を測定する方法について検討した。この細胞外の生菌の除去法としては低速遠心法や細胞内に浸透しないストレプトマイシン、ペニシリンGおよびリソスタフィンなどの薬剤によって、細胞外の生菌の増殖を抑える方法が知られている (HOLMES 1966, TAN et al. 1972, QUIE et al. 1969)。しかし、それぞれの方法を単独で用いても、ブリの貪食細胞と *P. piscicida* を完全に分離することができなかった。そこで、本研究ではストレプトマイシンおよびペニシリンGを反応させたのち、通常の遠心操作

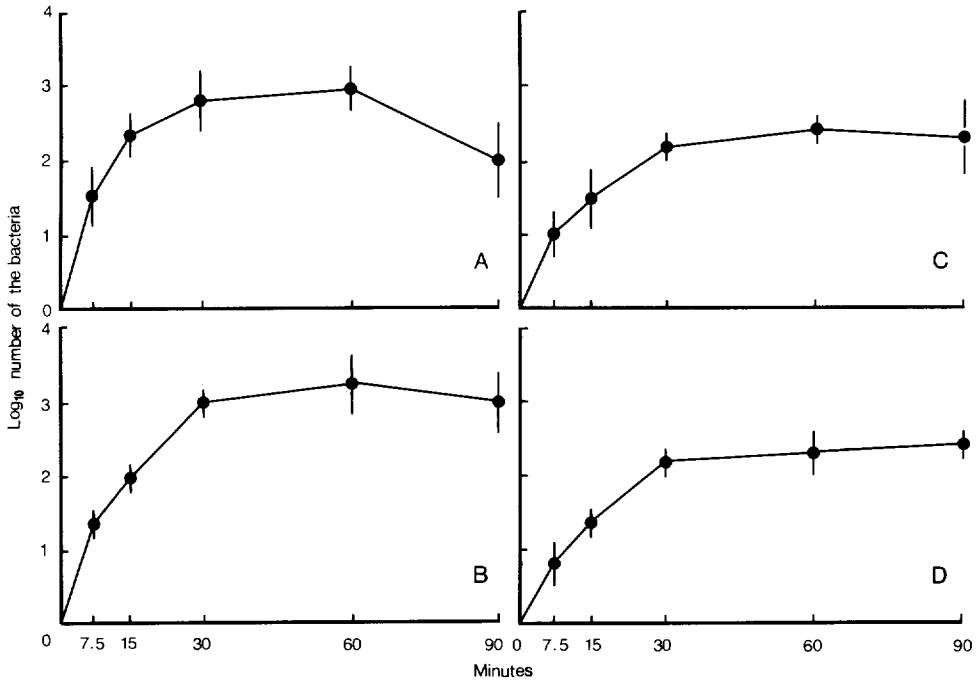


Fig. 35. Change in the numbers of viable *Pasteurella piscicida* in yellowtail phagocytic cells at various temperature. A, 30 C; B, 25 C; C, 20 C; D, 15 C.

を行う方法と、Percoll を用いた比重遠心法を行う方法について検討した。その結果、ストレプトマイシンおよびペニシリン G を反応させたのち、Percoll を用いた比重遠心法が最も効率よく細菌を除去できることができた。しかし、それ以外の方法では細菌の除去が不十分であり、細胞との分離がうまくいかないのではないかとと思われる。

一般に、細胞内殺菌活性の測定を行うためには、貪食細胞の破壊条件を求める必要がある。ほ乳類の貪食細胞の破壊法は蒸留水、凍結融解法、超音波処理法および Triton X-100 などの界面活性剤によって貪食後の細胞を破壊することが知られている (MIYATA et al. 1984, 野本 1981, BUCHMEIER and SCHREIBER 1985, ZELIGS 1981, 松村他 1986)。しかし、蒸留水、凍結融解法および超音波処理法はいずれも *P. piscicida* の生残性に影響を及ぼすので、ブリの貪食細胞の *P. piscicida* に対する細胞内殺菌活性の測定法には不適當であると思われる。そこで、*P. piscicida* に対して、比較的毒性が低いと思われる非イオン系界面活性剤、補体および高速遠心法を用いたブリの貪食細胞の破壊方法について検討した。使用する界面活性剤の濃度は松村他 (1986) が Triton X-100 を用いてマウスの腹腔内細胞の細胞内殺菌活性を測定する際にその有効濃度を調べた結果、0.2% を中心として、0.03~1% の範囲の濃度が細胞の破壊能が高く、また、細胞内生菌の回収量が多かったとしている。そこで、本研究ではすべての界面活性剤の最終濃度を 0.1% とした。その結果、細胞の破壊効率は界面活性剤 BL-25 を最終食塩濃度が 8% という高調条件のもとで氷冷しながら作用させる方法が最も高く、*P. piscicida* の生残性に及ぼす影響が最も小さかったことから、この方法がブリの腎臓細胞の細胞内殺菌活性の測定に適していると思われる。

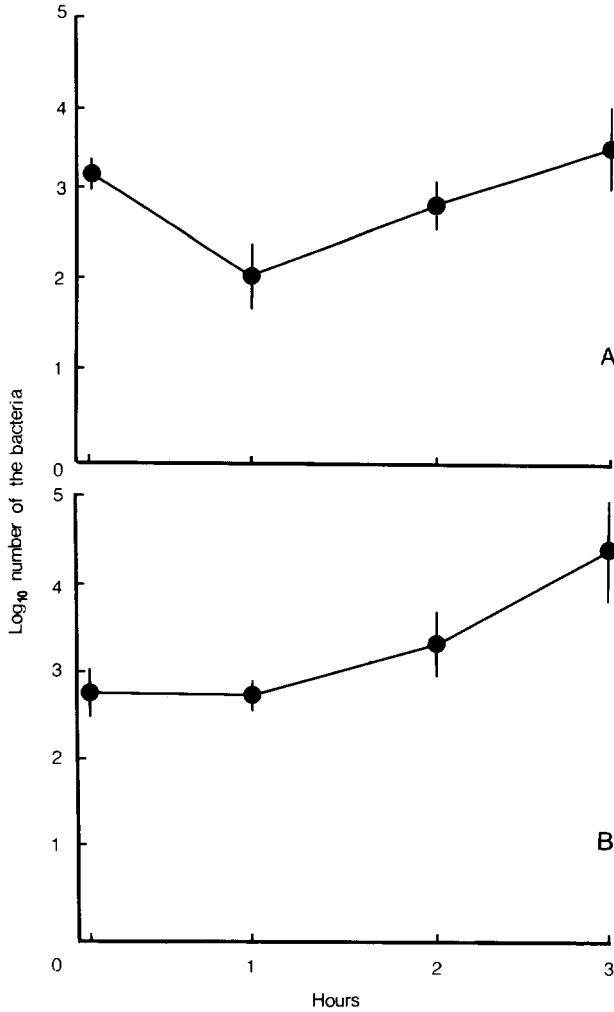


Fig. 36. Intracellular bacterial killing activity of head kidney phagocytic cells of yellowtail. Symbols: A, survivors after experimental challenge with *P. piscicida*; B, normal unimmunized fish.

細胞内殺菌活性を測定するためには、細菌を貪食細胞に十分に貪食させる条件を求める必要がある。本研究ではブリの貪食細胞の *P. piscicida* に対する貪食性は、いずれの温度においても、30～60分間の反応で最大となった。KUSUDA and HAMAGUCHI (1988), HAMAGUCHI and KUSUDA (1988) はブリの頭腎細胞の *P. piscicida* ホルマリン不活化菌体に対する貪食時間を3時間としている。また、楠田・田中 (1988) はブリのガラス附着性マクロファージのブリ連鎖球菌のホルマリン不活化菌体に対する貪食時間を1時間としている。しかし、細胞内の生菌数によって貪食性を測定することは不活化菌体とは異なり、細胞による菌の消化による生菌数の減少や細胞内での菌の増殖による増加などが考えられるので、短時間で完了させるのがよいと思われる。そこで、細胞内殺菌活性を測定するための *P. piscicida* 生菌に対するブリ細胞の貪食時間は30分間、反応温度は25°Cが最もよいと思われる。

以上の条件を用いて、ブリの1年魚と2年魚の腎臓細胞の *P. piscicida* に対する殺菌活性を測定したところ、1年魚よりも2年魚の頭腎細胞のほうが殺菌活性が高まる傾向を示した。また、

2年魚の殺菌活性は1時間培養後が最高で、それ以後は細胞内の生菌数が増加する傾向を示した。これは、貪食細胞が遭遇する菌数が自然条件と比較して異常に高いと思われるので、貪食細胞の処理能力を超えた菌が1時間以降に増殖するものと思われる。このことから、ブリの貪食細胞の *P. piscicida* に対する細胞内殺菌活性の測定は1時間培養後に行うのがよいと思われる。しかし、1年魚と2年魚の細胞内殺菌活性には明かな差異が認められた。一般に、2年魚では類結節症に対する被害が少ないことから、この細胞内殺菌能の差異が類結節症に対するブリの抵抗性と関連するのではないかと思われる。

本研究の結果から、ブリの貪食細胞の細胞内殺菌活性の測定方法は次の方法がよいと思われる。すなわち、ML-15を用いて  $1 \times 10^8$  CFU/ml に調製した *P. piscicida* 生菌懸濁液と類結節症未感作のブリから採集した血清を1:4の割合で混合し、25°Cで10分間反応させる。反応後にブリ稚魚の腎臓から前述の方法で作製した細胞浮遊液と等量混合し、25°Cで30分間貪食させたのち、ストレプトマイシンを  $100 \mu\text{g/ml}$ 、ペニシリンGを  $1500 \text{ unit/ml}$  となるように添加し、25°Cで15分間反応させる。その反応液を比重を1.070に調製した Percoll 溶液に重層し、 $3,500 \times g$  で5分間の遠心操作を行い、腎臓細胞画分を採取する。腎臓細胞はL-15を用いて  $150 \times g$  で5分間の遠心洗浄を3回行ったのち、ML-15中に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁する。この懸濁液は25°Cで0, 60, 120, 180分間培養したのち、1定量を取り出して0.2% BL-25加15%食塩水を等量混合し、氷冷下で15分間反応させる。反応後に混積平板法によって生菌数を測定し、細胞内殺菌活性を求める方法である。今回の研究では供試生菌をそのつど培養して調製したが、この方法では生菌濃度にばらつきが認められた。そこで、供試菌液は生菌濃度を測定したのち、 $-80^\circ\text{C}$  で保存したものを使用するのがよいと思われる。

## 第5節 ブリ貪食細胞の *Pasteurella piscicida* に対する細胞内殺菌活性

前節では、ブリの貪食細胞の *P. piscicida* を貪食させたのちの細胞内殺菌活性の測定方法について検討した。その結果、ブリの貪食細胞の *P. piscicida* に対する細胞内殺菌活性の測定はこれまでに報告例のない条件で行う必要があることが明らかになった。

そこで、本節では前節の方法をさらに改良してブリの2つの貪食細胞である好中球およびマクロファージのそれぞれの *P. piscicida* に対する細胞内殺菌活性の特性について検討した。

## 実験方法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した体重50~180gのブリ稚魚を用いた。

**供試菌株** 1984年に大分県のブリ病魚から分離した *Pasteurella piscicida* OT-8447株から調製した強毒、弱毒および無毒株を用いた。強毒株は魚体通過を2回繰り返して毒力を強化し、弱毒および無毒株は継代を繰り返して毒力を低下させた。それぞれの菌株のブリに対する攻撃後10日間の  $\text{LD}_{50}$  は強毒株が浸漬法および接種法攻撃ともに  $10^3$  CFU/ml 以下、弱毒株が浸漬法攻撃では  $10^6$  CFU/ml 以上、接種法では  $10^{5.4}$  CFU/ml、無毒株が浸漬法および接種法ともに  $10^8$

CFU/ml 以上となった。細胞内殺菌活性の測定のために、それぞれの菌株は2%食塩加 BHI 液体培地で24時間培養したのち、 $1 \times 10^{10}$  CFU/ml の濃度となるように、滅菌牛胎児血清に懸濁し、使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

**ブリ好中球浮遊液の調製** ブリの腎臓および腹腔内浸出細胞から好中球浮遊液を作製した。頭腎からの好中球の調製は心臓穿刺法によって採血した供試魚から直ちに頭腎部を摘出した。頭腎は ML-15 中で解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュでろ過して、臓器片を取り除いた。ろ液中の細胞は ML-15 を用いて  $400 \times g$  で5分間の遠心操作によって洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を回収して、ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁して好中球浮遊液とした。腹腔内浸出細胞からの好中球の調製は10%のプロテオースペプトン 1 ml をブリの腹腔内に接種し、6時間後に供試魚を取り上げ、心臓穿刺法によって採血したのちに脳穿刺によって即殺した。腹部体表面を70%アルコールを用いて消毒したのち、2 ml の ML-15 を腹腔内に接種した。そして、腹部をマッサージしたのちに、腹部を切開して腹腔内の ML-15 を回収し、シリコン処理を行ったガラス試験管に採取した。この PEC は ML-15 を用いて  $400 \times g$  で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を回収して、ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁して好中球浮遊液とした。

**マクロファージ浮遊液の調製** ブリの頭腎および腹腔内浸出細胞からマクロファージ浮遊液を調製した。頭腎からのマクロファージの調製は心臓穿刺法によって採血した供試魚から直ちに頭腎部を摘出した。頭腎は ML-15 中で解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュでろ過して、臓器片を取り除いた。ろ液中の細胞は ML-15 を用いて  $400 \times g$  で5分間の遠心操作によって洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を取り除いたのち、付着細胞をピペッティングによって回収した。回収したマクロファージは ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁してマクロファージ浮遊液とした。腹腔内浸出細胞からのマクロファージの調製は10%のプロテオースペプトン 1 ml をブリの腹腔内に接種し、96時間後に供試魚を取り上げ、心臓穿刺法によって採血したのちに脳穿刺によって即殺した。腹部体表面を70%アルコールを用いて消毒したのち、2 ml の ML-15 を腹腔内に接種した。そして、腹部をマッサージしたのちに、腹部を切開して腹腔内の ML-15 を回収し、シリコン処理を行ったガラス試験管に採取した。この PEC は ML-15 を用いて  $400 \times g$  で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して  $25^{\circ}\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を取り除いたのち、付着細胞をピペッティングによって回収した。<sup>2</sup> 回収したマクロファージは ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁してマクロファージ浮遊液とした。

**腎臓細胞内 *P. piscicida* 生菌数の経時的変化** そして、0, 7.5, 15, 30, 60, 90分後にそれぞれ反応液を取り出し、ストレプトマイシンを  $100 \mu\text{g/ml}$  とペニシリン G を  $1,500 \text{ unit/ml}$  となるように添加し、 $25^{\circ}\text{C}$  で15分間反応させたのち、Percoll を用いた比重遠心を行う方法で細胞外生菌を除去した。細胞は ML-15 に再懸濁したのち、0.2% BL-25加15%食塩水と等量混合し、氷冷

下で15分間反応させて破壊した。反応後に混釈平板法によって生菌数を測定した。

**好中球の細胞内殺菌活性の測定** ML-15 を用いて  $1 \times 10^6$  CFU/ml に調製した *P. piscicida* 生菌懸濁液と類結節症未感作のブリから採集した血清を 1:4 の割合で混合し、25°C で10分間反応させた。反応後、10尾の供試魚から調製した好中球浮遊液と等量混合し、25°C で30分間貪食させたのち、ストレプトマイシンとペニシリンGを前述の濃度となるように添加し、25°C で15分間反応させた。その反応液を比重を1.070に調製した Percoll 溶液に重層して、 $1,000 \times g$  で5分間の遠心操作を行い、好中球画分を採取した。好中球は ML-15 を用いて  $150 \times g$  で5分間の遠心洗浄を3回行ったのち、L-15 中に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁した。この懸濁液は25°C で0, 60, 120, 180分間培養したのち、1定量を取り出して0.2% BL-25 加15%食塩水を等量混合し、氷冷下で15分間反応させた。反応後に混釈平板法で生菌数を測定し、好中球内殺菌活性を求めた。

**マクロファージの細胞内殺菌活性の測定**  $50 \mu\text{l}$  のマクロファージ浮遊液を96穴の細胞培養用マイクロプレート (Nunc) に添加して、25°C で15分間培養した。培養後、各ウエルに ML-15 中に  $1 \times 10^8$  CFU/ml となるように調製した *P. piscicida* の浮遊液  $50 \mu\text{l}$  を添加し、25°C で30分間培養した。その後、各ウエルを 0.05 mg/ml のストレプトマイシンと 10 units/ml のペニシリンGを含む ML-15 で1回、ML-15 で2回洗浄したのち、各ウエルに ML-15 を  $50 \mu\text{l}$  ずつ添加して25°C で培養した。培養開始直後と60および120分後に5ウエルに氷冷した0.2% BL-25 加15%食塩水を  $50 \mu\text{l}$  添加し、室温で15分間反応させたのち、混釈平板法によって生菌数を測定してマクロファージ内殺菌活性を測定した。

**各種ブリから調製した好中球の細胞内殺菌活性の比較** 浸漬法免疫魚、腹腔内接種法免疫魚、感染耐化魚および2年魚から前述と同様の方法で好中球浮遊液を作製して、細胞内殺菌活性を測定した。

**各種ブリから調製したマクロファージの細胞内殺菌活性の比較** 浸漬法免疫魚、腹腔内接種法免疫魚、感染耐化魚および2年魚から前述の方法でマクロファージ浮遊液を作製して、細胞内殺菌活性を測定した。

**各種ブリから採取した血清成分の細胞内殺菌活性に及ぼす影響** 浸漬法免疫魚、腹腔内接種法免疫魚、感染耐化魚および2年魚から採取した血清を10%濃度となるように ML-15 に添加して、細胞内殺菌活性を測定した。

**頭腎由来マクロファージの細胞内殺菌活性に及ぼすリンパ球の培養上清の影響** 感染耐化魚および正常魚からヘパリン処理したシリンジを用いて心臓穿刺法によって採血したのち、ただちに頭腎を摘出した。頭腎からのリンパ球の分離は各臓器を HBSS のなかで解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュで臓器片を取り除いた。吉永 (1973) の方法によって0.83%の  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Tris 液で混入した赤血球を破壊したのち、比重1.077に調製した Ficoll-hypaque 液に重層して4°C で  $400 \times g$ 、30分間の遠心操作を行った。遠心後、リンパ球層を回収して HBSS で3回洗浄したのち、同液に  $1 \times 10^8$  cells/ml となるように懸濁した。さらに、それぞれの懸濁液と HBSS で 1 mg/ml の濃度となるように調製したカルボニル鉄懸濁液を混合して25°C で1時間反

応させた。反応後、 $50\times g$  で5分間の遠心操作を行って上清のリンパ球層を回収して、 $1\times 10^7$  cells/ml となるように ML-15 に懸濁して頭腎リンパ球浮遊液とした。この懸濁液に P-FKB を  $0.01\text{ mg/ml}$  となるように懸濁して、 $25^\circ\text{C}$  で6時間培養した。培養後に  $400\times g$  の遠心操作によって得られた上清をポアサイズ  $0.22\ \mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過した。その頭腎リンパ球培養上清と頭腎好中球およびマクロファージをそれぞれ1:2の割合で混合して  $25^\circ\text{C}$  1時間反応させたのち、各細胞を  $400\times g$  で5分間の遠心操作によって洗浄したのち、前述の方法で細胞内殺菌活性を測定した。

結 果

各種ブリから調製した好中球の細胞内殺菌活性を比較した結果は Fig. 37 に示すとおりである。強毒株に対する培養0, 1, 2時間後の好中球内生菌数は浸漬法免疫魚では  $10^{2.6}$ ,  $10^{3.2}$ ,  $10^{3.6}$ , 腹腔内接種法免疫魚では  $10^{2.6}$ ,  $10^{2.7}$ ,  $10^{3.8}$ , 感染耐化魚では  $10^{2.3}$ ,  $10^{2.4}$ ,  $10^{3.2}$ , 2年魚では  $10^{2.4}$ ,  $10^{2.9}$ ,  $10^{3.2}$  および類結節症未感染魚では  $10^{2.8}$ ,  $10^{3.1}$ ,  $10^{3.4}$  CFU/ml となった。弱毒株に対する培養0, 1, 2時間後の好中球内生菌数は浸漬法免疫魚では  $10^{3.1}$ ,  $10^{2.6}$ ,  $10^{2.0}$ , 腹腔内接種法免疫魚では  $10^{3.4}$ ,  $10^{2.9}$ ,  $10^{2.0}$ , 感染耐化魚では  $10^{3.2}$ ,  $10^{2.5}$ ,  $10^{1.8}$ , 2年魚では  $10^{2.9}$ ,  $10^{2.3}$ ,  $10^{1.6}$ , および類結節症未感染魚では  $10^{3.3}$ ,  $10^{2.8}$ ,  $10^{1.8}$  CFU/ml となった。

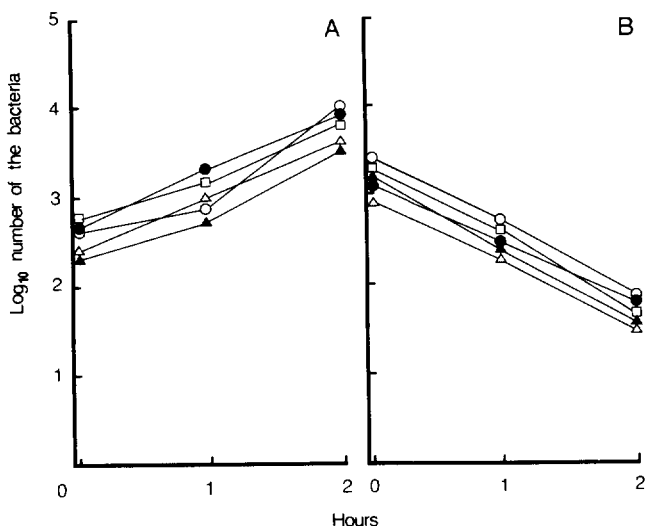


Fig. 37. Intracellular bacterial killing activity of peritoneal exudate neutrophils of yellowtail against high (A) and low (B) virulent strains of *Pasteurella piscicida*. Symbols: ●, fish immunized twice by immersion method with *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB); ○, fish immunized by intraperitoneally injection with P-FKB; △, survivors after experimental challenge with *P. piscicida*; ▲, fish reared for 2 years; □, normal unimmunized fish.

各種ブリから調製したマクロファージの細胞内殺菌活性を比較した結果は Fig. 38 に示すとおりである。強毒株に対する培養0, 1, 2時間後のマクロファージ内生菌数は浸漬法免疫魚では  $10^{1.9}$ ,  $10^{2.1}$ ,  $10^{4.2}$ , 腹腔内接種法免疫魚では  $10^{1.6}$ ,  $10^{1.6}$ ,  $10^{3.4}$ , 感染耐化魚では  $10^{1.4}$ ,  $10^{1.2}$ ,  $10^{3.0}$ ,

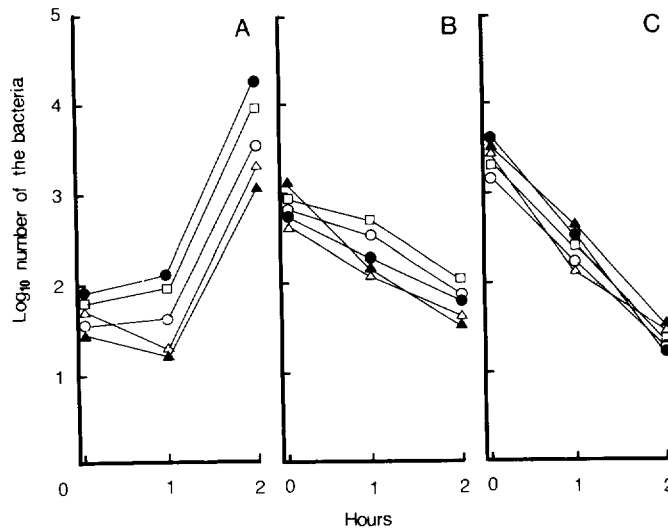


Fig. 38. Interacellular bacterial killing activity of peritoneal exudate macrophages of yellowtails against high (A) and Low (B) virulent, and avirulent strains of *Pasteurella piscicida*. Symbols: ●, fish immunized twice by immersion method with *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB); ○, fish immunized intraperitoneal injection method with P-FKB; △, survivors after experimental challenge with *P. piscicida*; ▲, fish reared for 2 years; □, normal unimmunized fish.

2年魚では  $10^{1.7}$ ,  $10^{1.2}$ ,  $10^{3.2}$  および類結節症未感染魚では  $10^{1.8}$ ,  $10^{1.9}$ ,  $10^{4.0}$  CFU/ml となった。弱毒株に対する培養0, 1, 2時間後のマクロファージ内生菌数は浸漬法免疫魚では  $10^{2.8}$ ,  $10^{2.4}$ ,  $10^{2.0}$ , 腹腔内接種法免疫魚では  $10^{2.8}$ ,  $10^{2.6}$ ,  $10^{2.0}$ , 感染耐化魚では  $10^{3.1}$ ,  $10^{2.2}$ ,  $10^{1.8}$ , 2年魚では  $10^{2.6}$ ,  $10^{2.1}$ ,  $10^{1.8}$ , および類結節症未感染魚では  $10^{2.9}$ ,  $10^{2.8}$ ,  $10^{2.2}$  CFU/ml となった。無毒株に対する培養0, 1, 2時間後のマクロファージ内生菌数は浸漬法免疫魚では  $10^{3.6}$ ,  $10^{2.6}$ ,  $10^{1.4}$ , 腹腔内接種法免疫魚では  $10^{3.2}$ ,  $10^{2.2}$ ,  $10^{1.4}$ , 感染耐化魚では  $10^{3.5}$ ,  $10^{2.8}$ ,  $10^{1.6}$ , 2年魚では  $10^{3.5}$ ,  $10^{2.1}$ ,  $10^{1.5}$  および類結節症未感染魚では  $10^{3.3}$ ,  $10^{2.4}$ ,  $10^{1.5}$  CFU/ml となった。

各種ブリから採取した血清成分の好中球の細胞内殺菌活性に及ぼす影響を調べた結果は Fig. 39 に示すとおりである。正常血清をオプソニンとしたとき強毒株に対する培養0, 1, 2時間後の好中球内生菌数は浸漬法免疫魚では  $10^{2.3}$ ,  $10^{2.6}$ ,  $10^{3.4}$ , 腹腔内接種法免疫魚では  $10^{3.2}$ ,  $10^{2.4}$ ,  $10^{3.2}$ , 感染耐化魚では  $10^{2.9}$ ,  $10^{2.8}$ ,  $10^{3.7}$ , 2年魚では  $10^{2.1}$ ,  $10^{2.2}$ ,  $10^{3.2}$ , および類結節症未感染魚では  $10^{2.6}$ ,  $10^{3.1}$ ,  $10^{4.1}$  CFU/ml となった。非働化血清をオプソニンとしたとき、強毒株に対する培養0, 1, 2時間後の好中球内生菌数は浸漬法免疫魚では  $10^{1.1}$ ,  $10^{1.2}$ ,  $10^{2.1}$ , 腹腔内接種法免疫魚では  $10^{1.9}$ ,  $10^{1.8}$ ,  $10^{2.2}$ , 感染耐化魚では  $10^{1.9}$ ,  $10^{1.7}$ ,  $10^{2.6}$ , 2年魚では  $10^{0.4}$ ,  $10^{0.6}$ ,  $10^{1.4}$  および類結節症未感染魚では  $10^{0.8}$ ,  $10^{0.9}$ ,  $10^{2.3}$ , オプソニンをうけないときは  $10^{0.2}$ ,  $10^{0.4}$ ,  $10^{1.1}$  CFU/ml となった。

各種ブリから採取した血清成分のマクロファージの細胞内殺菌活性に及ぼす影響を調べた結果は Fig. 40 に示すとおりである。正常血清をオプソニンとしたとき強毒株に対する培養0, 1, 2時間後のマクロファージ内生菌数は浸漬法免疫魚では  $10^{2.2}$ ,  $10^{2.3}$ ,  $10^{3.9}$ , 腹腔内接種法免疫魚では



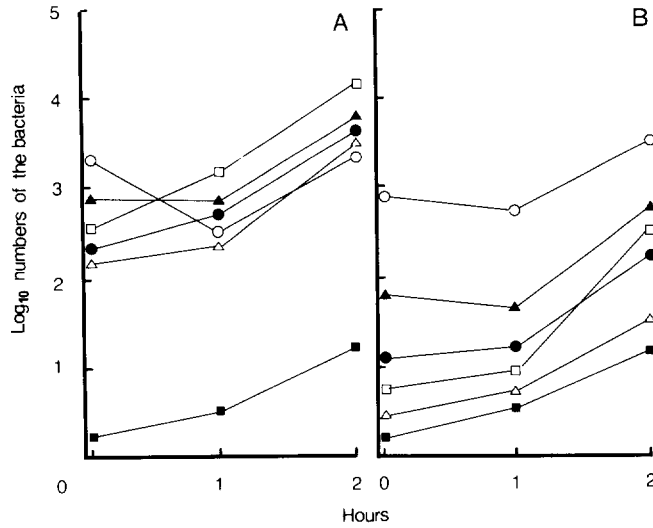


Fig. 39. Effect of various yellowtail sera on intracellular killing activity of peritoneal exudate neutrophils of normal unimmunized yellowtail against high virulent strains of *Pasteurella piscicida*. Symbols: ●, fish immunized twice by immersion method with *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB); ○, fish immunized intraperitoneally with P-FKB; △, survivors after experimental challenge with *P. piscicida*; ▲, fish reared for 2 years; □, normal unimmunized fish; ■, PBS as control; A, normal serum; B, heat inactive serum.

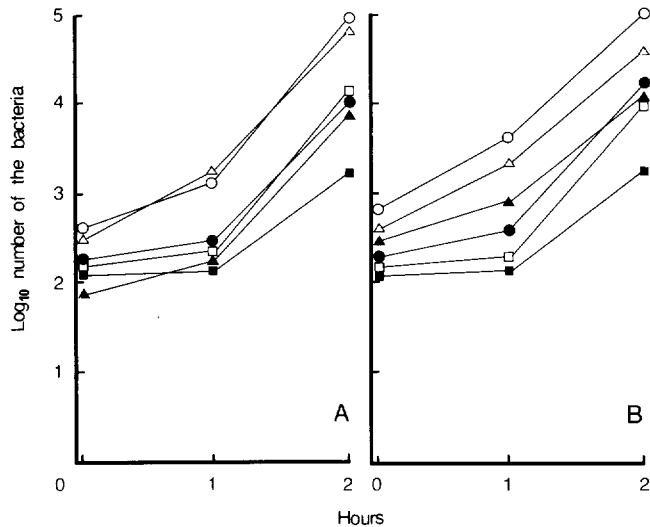


Fig. 40. Effect of various yellowtail sera on intracellular killing activity of peritoneal exudate macrophages of normal unimmunized yellowtail against high virulent strain of *Pasteurella piscicida*. Symbols: ●, fish immunized twice by immersion method with *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin (P-FKB); ○, fish immunized intraperitoneally with P-FKB; △, survivors after experimental challenge with *P. piscicida*; ▲, fish reared for 2 years; □, normal unimmunized fish; ■, PBS as control; A, normal serum; B, heat inactive serum.

$10^{2.6}$ ,  $10^{3.1}$ ,  $10^{4.9}$ , 感染耐化魚では  $10^{2.5}$ ,  $10^{3.1}$ ,  $10^{4.6}$ , 2年魚では  $10^{1.9}$ ,  $10^{2.1}$ ,  $10^{3.8}$  および類結節症未感染魚では  $10^{2.2}$ ,  $10^{2.3}$ ,  $10^{4.0}$  対照では  $10^{2.1}$ ,  $10^{2.1}$ ,  $10^{3.1}$  CFU/ml となった。非働化血清をオプソニンとしたとき強毒株に対する培養 0, 1, 2 時間後のマクロファージ内生菌数は浸漬法免疫魚では  $10^{2.2}$ ,  $10^{2.4}$ ,  $10^{4.2}$ , 腹腔内接種法免疫魚では  $10^{2.9}$ ,  $10^{3.6}$ ,  $10^{4.9}$ , 感染耐化魚では  $10^{2.6}$ ,  $10^{3.2}$ ,  $10^{4.4}$ , 2年魚では  $10^{2.4}$ ,  $10^{2.7}$ ,  $10^{4.0}$  および類結節症未感染魚では  $10^{2.1}$ ,  $10^{2.1}$ ,  $10^{3.9}$  オプソニンを用いないときは  $10^{2.0}$ ,  $10^{2.0}$ ,  $10^{3.1}$  CFU/ml となった。

頭腎由来貪食細胞の細胞内殺菌活性に及ぼすリンパ球の培養上清の影響は Fig. 41 に示すとおりである。強毒株に対する培養 0, 1, 2 時間後のリンパ球培養上清処理好中球内生菌数は 2年魚では  $10^{2.3}$ ,  $10^{2.9}$ ,  $10^{4.4}$ , 類結節症未感染魚では  $10^{2.1}$ ,  $10^{3.1}$ ,  $10^{4.6}$  対照では  $10^{2.1}$ ,  $10^{2.5}$ ,  $10^{3.4}$  CFU/ml となった。強毒株に対する培養 0, 1, 2 時間後のリンパ球培養上清処理マクロファージ内生菌数は 2年魚では  $10^{2.3}$ ,  $10^{1.8}$ ,  $10^{2.4}$ , 類結節症未感染魚では  $10^{1.8}$ ,  $10^{2.4}$ ,  $10^{4.4}$  対照では  $10^{1.4}$ ,  $10^{1.9}$ ,  $10^{3.9}$  CFU/ml となった。

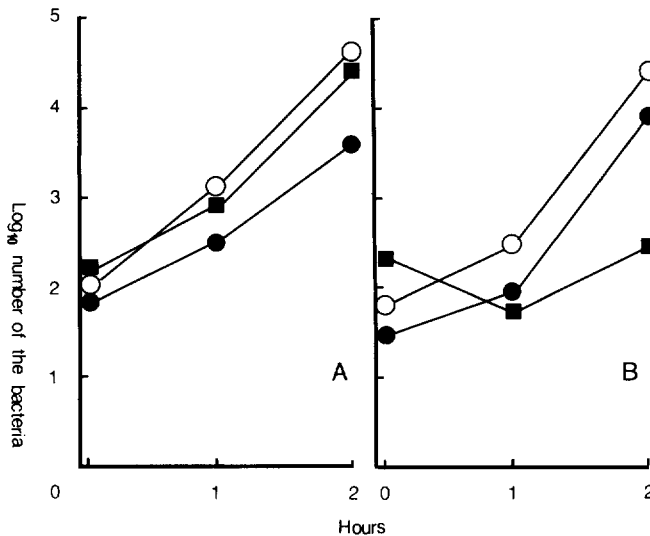


Fig. 41. Effect of supernatant of cultured lymphocytes isolated from yellowtail on intracellular killing of head kidney phagocytic cells against high virulent strain of *Pasteurella piscicida*. The lymphocytes isolated from:  $\triangle$ , survivors after experimental challenge with *P. piscicida*;  $\square$ , normal unimmunized fish;  $\blacksquare$ , PBS as control; A, neutrophils; B, macrophages.

## 考 察

前節において、ブリの好中球およびマクロファージの貪食活性は腹腔内浸出細胞のほうが頭腎由来細胞よりも上昇すること、好中球の貪食活性は血清の補体成分に依存すること、マクロファージの貪食活性は依存しないこと、抗体によっていずれの細胞の貪食活性も上昇することが明らかとなった。さらに、マクロファージの貪食活性は2年魚の頭腎リンパ球の培養上清によって上昇したことから、2年魚の頭腎リンパ球はリンフォカイン様物質を産生するのではないかと考えられた。したがって、ブリの好中球およびマクロファージはほ乳類と同様な貪食様式をもつ

のではないかと考えられる。そこで、本節では、前節の知見をもとにしてブリの *P. piscicida* に対する細胞内殺菌活性を測定した。

まず、各種ブリの腹腔内浸出好中球およびマクロファージの細胞内殺菌活性を測定したところ、強毒株に対する好中球の細胞内殺菌数はいずれのブリにおいても経時的に上昇し、細胞内殺菌は認められなかった。弱毒株に対してはいずれのブリにおいても経時的に減少し、細胞内殺菌が認められた。いっぽう、強毒株に対するマクロファージの細胞内生菌数は感染耐化魚および2年魚のマクロファージでは培養1時間後に減少する傾向が認められ細胞内殺菌能が認められたが、そのほかのブリでは認められなかった。また、弱毒および無毒株に対してはいずれのブリにおいても細胞内生菌数は経時的に減少し、細胞内殺菌能が認められた。しかし、経時的な菌数の減少率は無毒株のほうが高く、菌の毒力が低下するにつれて、容易に殺菌されることが明かとなった。一般に、化膿性菌などの細胞外増殖性菌に対しては好中球、*Mycobacterium tuberculosis*、*Listeria monocytogenes* および *Salmonella typhimurium* などの細胞内増殖性菌に対してはマクロファージの貪食殺菌能が有効であることが知られている (AUSTRIAN 1977, LEUJ et al. 1979, LIEBERMAN 1979, MACKANESS 1962, BLANDEN et al. 1966, LEFFORD et al. 1973)。いっぽう、*P. piscicida* は細胞内増殖性菌であることが知られている (窪田他, 1970b)。これらのことから、ブリの類結節症の感染防御には好中球よりもマクロファージのほうが有効なのではないかと考えられる。また、マクロファージの本菌強毒株に対する細胞内殺菌活性は感染耐化魚や2年魚でのみ認められた。感染耐化魚は実験的感染、2年魚は自然感染したもので感染形態は異なるが、これらのブリはいずれも生菌感作をうけていることから、強毒株に対する細胞内殺菌活性はブリの加令によって上昇するのではなくて、生菌感作によって上昇するのではないかと考えられる。

*P. piscicida* 生菌の取り込み量は好中球では菌株の病原性による差異はほとんど認められなかったが、マクロファージでは菌株の病原性が増加するにつれて低下する傾向がみられた。ヒトの条件性病原菌である *Acinetobacter calcoaceticus*、*Pseudomonas aeruginosa* および *Staphylococcus epidermidis* の病原株には菌体表面に貪食細胞の活性を抑制する因子や slime を保有していることが知られている (SCHWARZMANN and BORING 1971, JOHNSON et al. 1986, 尾花他 1987)。これらのことから、*P. piscicida* の細胞表面上にも貪食活性を受けにくくする成分が存在するのではないかと考えられる。また、本章第2節の結果から、*P. piscicida* は菌の病原性が高くなるにつれて、血清の走化性因子の産生が抑制されることが認められている。菌の病原性が高くなるにつれて、マクロファージの生菌に対する貪食活性が低下したのは、これらの理由に基づくのではないかと考えられる。

細胞内殺菌活性に及ぼす血清成分添加の影響を調べた結果、血清中の抗体量が多い腹腔内接種免疫魚および感染耐化魚から得た血清を用いると好中球の生菌貪食活性および細胞内殺菌活性が、上昇する傾向が認められた。いっぽう、マクロファージでは血清中の抗体量が多い腹腔内接種免疫魚および感染耐化魚から得た血清を用いると貪食量が増加するが、細胞内殺菌活性は低下した。このことから、好中球では血清中の抗体量の増加によるオプソニンの上昇によって貪食活性および細胞内殺菌活性が高くなるが、マクロファージでは貪食活性の上昇によって細胞内の生菌量が

増加して生菌の増殖を容易にするのではないかと考えられる。血清中の抗体価を上昇させるだけでは、好中球の細胞内殺菌活性は期待できるが、マクロファージではかえって細胞内での菌の増殖を容易にすると思われる。前章第5節において類結節症に対する感染防御性はいずれも血清中の抗体価が高い腹腔内接種法免疫魚と感染耐化魚を比較すると、感染耐化魚のほうが高く、有意差も認められた。このことと本節のこれまでの結果から、類結節症に対する感染防御性は血清中の抗体価を上昇させるだけではなく、マクロファージの細胞内殺菌活性も同時に上昇させる必要があるのではないかと考えられる。いっぽう、マクロファージの細胞内殺菌活性は生菌感作と関連があることが明らかとなった。この生菌感作によるマクロファージの活性化については、前節で活性が低い状態にある頭腎マクロファージの貪食活性が感染耐化魚の頭腎リンパ球の培養上清によって上昇することが認められている。そこで、本節では同様に細胞内殺菌活性に及ぼす影響を調べたところ、感染耐化魚の頭腎リンパ球の培養上清で処理することによって、頭腎マクロファージの細胞内殺菌活性が上昇した。ESPARZA ら (1987) はリンパ球の産生物質によってマクロファージの抗腫瘍および殺菌活性が上昇したとしている。このことから、生菌感作されたブリのマクロファージの貪食および細胞内殺菌活性の上昇は頭腎リンパ球の産生物質によるのではないかと考えられる。一般に、細胞内増殖性細菌に対しては、死菌ワクチンより生菌ワクチンが有効であることが知られている (HAHN and KAUFMANN 1981, ORME and COLLINS 1983)。生菌ワクチンの有効性は生菌感作によって活性Tリンパ球が誘導されて、それによって産生されるリンフォカイン、MAF およびインターフェロンなどによってマクロファージが活性化しており、これらの細胞性免疫機構の作用によって細胞内増殖性菌に対する感染防御が成立するとされている (野本 1982, MIYATA et al. 1982, NOMOTO et al. 1983)。ブリの類結節症に対する感染防御機構もほ乳類と同様であり、本症の予防にはこのような細胞性免疫機構を活性化するワクチンが必要なのではないかと考えられる。

## 第6節 総 合 考 察

本章の結果から考察されるブリの貪食細胞の *Pasteurella piscicida* に対する反応は Fig. 42 に示すとおりである。ブリの貪食細胞である好中球とマクロファージではそれぞれ *P. piscicida* に対する反応の経路と機能には差異が認められた。好中球は血清中に存在する抗体および補体の協同作用によって *P. piscicida* に対する集化や貪食作用を発揮し、これらの協同因子が存在しないとその機能は低下した。いっぽう、マクロファージはこれらの因子が存在すると集化や貪食の機能はこう進したが、存在しなくても機能の低下は認められなかった。また、マクロファージは成熟リンパ球が *P. piscicida* 生菌と遭遇することによって産生する因子によって活性化され、通常の状態では殺菌できない *P. piscicida* の強毒株に対する殺菌作用を発現するようになった。これらのことから、ブリにおいてもほ乳類と同様にリンパ球が生菌感作によってリンホカイン様因子を産生するものと思われる。したがって、前章においてブリの成熟リンパ球が類結節症に対する防御性因子の存在が示唆されたが、この因子は本章で明らかとなったマクロファージ活性化因子と

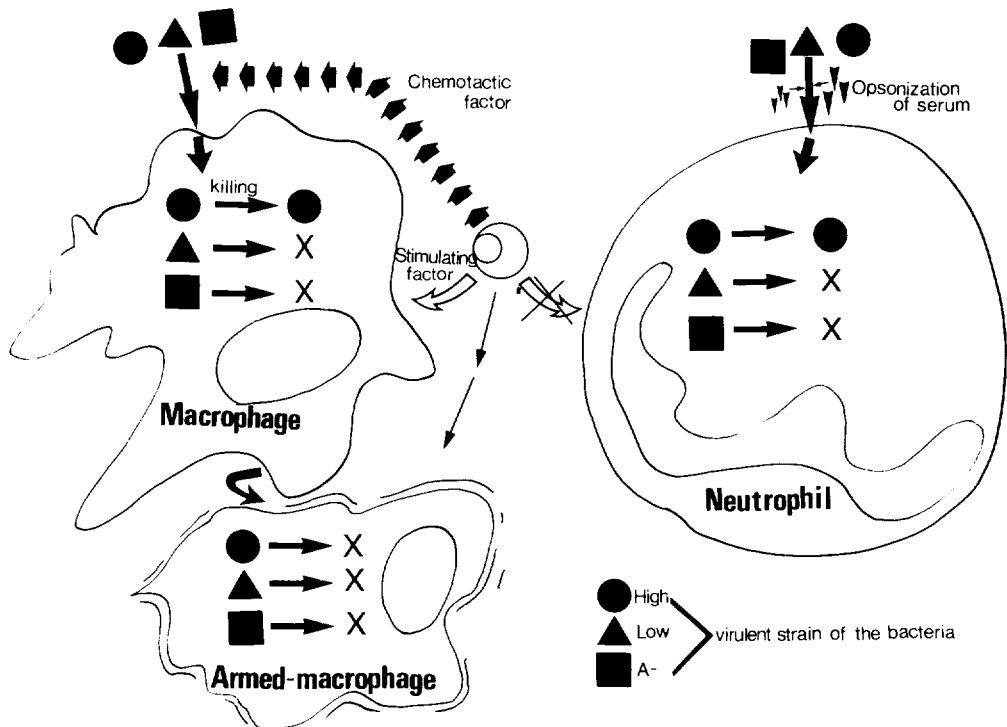


Fig. 12. Scheme of phagocytic function of neutrophils and macrophages against *Pasteurella piscicida*.

関連があると思われる。以上の結果から、ブリの類結節症に対する防御性は生菌感作によって成熟リンパ球を活性化し、マクロファージの活性を上昇させる因子を産生する能力を獲得することによって発現するのではないかと考えられる。

#### 第4章 ブリ類結節症に対する免疫学的手法による予防法の検討

ブリの類結節症に対する免疫学的手法による予防法の検討は KUSUDA (1977) によってその可能性が示唆されて以来、研究が進められている。楠田・福田 (1980) はブリの腹腔内に *Pasteurella piscicida* から調製したホルマリン不活化菌体をフロイントの不完全アジュバントとともに接種すると、ブリの血清中に分子量が800,000以上の抗体による凝集抗体価が上昇するとしている。また、福田・楠田 (1980) は類結節症流行後の養殖場のブリの血清中の抗体価を調べたところ、本症流行後には凝集抗体価が上昇するとしている。また、本症の被害はブリの1年魚で最も多く、2年魚以上ではほとんどみられないことから、本症流行後の血清中の抗体価の上昇が本症の予防に役立っているのではないかとしている。これらのことから、ワクチンによるブリの類結節症の予防の可能性が示唆された。そして、福田・楠田 (1981) は各種投与方法による養殖ブリの類結節症ワクチンの有効性を検討した。その結果、接種法、経口法および浸漬法のいずれにも有効性が認められたとしている。しかし、それぞれの抗体産生部位の違いから接種法では血清中の抗体が、経口法および浸漬法では粘液中の抗体が本症の予防に関与するのではないかとしてい

る (FUKUDA and KUSUDA 1981)。福田・楠田 (1982) は抗 *P. piscicida* ウサギ血清を用いてブリを受動免疫してその有効性を調べた結果、生菌攻撃の 1, 12, 24 時間前に受動免疫を行うと有効性が高まることから、本症の予防は抗体が重要な働きをしているのではないかとしている。ブリの血清中の抗体に関する研究は福田・楠田 (1982a, 1982b) によって行われている。福田・楠田 (1982a) は、ブリの血清中の凝集抗体を精製してその特性を調べた結果、4 量体のマクログロブリンであるとしている。いっぽう、福田・楠田 (1982b) はブリの血清中の沈降抗体について検討し、沈降抗体も凝集抗体に類似した特性をもつマクログロブリンであるとしている。このようにブリの類結節症に対する血清因子について検討が進められ、実用化が検討されるようになった。養殖魚のワクチンの実用化のためには魚は空气中に露出する時間が限られ、また極めて多数の個体を対照とするために、投与方法が簡便であることが要求される。この目的にかなう投与方法として、現在までに経口法 (DUFF 1942)、浸漬法 (AMEND and FENDER 1976) および噴霧法 (GOULD 1980, ITAMI and KUSUDA 1980) などが考案されている。それらのうちでも、浸漬法は操作が簡便の上に、ワクチンの使用量が少なくすむので、実用性の面で優れていると考えられている。FUKUDA and KUSUDA (1985) は本症に対する浸漬法ワクチンの実用化を進めるために、浸漬法に適した抗原の検討を行った。その結果、浸漬法ワクチンには可溶性の抗原が有効であるとしている。しかし、楠田・浜口 (1987) は本菌のホルマリン不活化菌体を抗原とした浸漬法では、浸漬回数を増やしても本症の実験的感染に対する有効性の上昇はごく僅かであったとしている。また、HAMAGUCHI and KUSUDA (1989) は野外においても本菌のホルマリン不活化菌体を抗原とした浸漬法では有効性は低かったとしている。このように、本症に対するホルマリン不活化菌体を用いた浸漬法による本症の予防は養殖現場では困難であることが明らかにされている。さらに、楠田他 (1988) はブリの類結節症に対するリボゾームワクチンの研究から、本症には血清中の抗体価の上昇よりも食細胞の活性化が必要であるとしており、本症に対する有効なワクチンの開発のためにブリの細胞性免疫機構の利用が示唆された。

そこで、本章ではブリの細胞性免疫機構の特性を基にして、ブリの類結節症に対する予防法について検討した。

## 第 1 節 ブリ類結節症に対する弱毒生菌ワクチンの有効性

前章までの研究においてブリの類結節症に対しては活性 T リンパ球の誘導によるマクロファージの活性化が必要であることが明らかとなった。この活性 T リンパ球は感染耐化魚や 2 年魚など生菌感作を受けたブリに存在することから、本章の予防には生菌ワクチンによる感作が有効ではないかと考えられる。しかし、病原性の高い菌株を用いて生菌感作を行うと、感染によって魚がへい死する恐れがある。現在、医学・獣医学領域では主にウイルス性疾病や結核に対して生菌ワクチンが使用されているが、いずれもなんらかの方法で弱毒化した菌株が用いられている。

そこで、本節では人為的に生菌感作を行う方法として弱毒化した菌株を用いた生菌ワクチンによってブリを免疫して有効性を死菌ワクチンと比較した。

## 実験方法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した平均体重 28 g のブリ稚魚を用いた。

**飼育方法** 供試魚は 800 l の流水式プラスチック水槽に収容し、魚体重の 12% にあたるイカナゴミンチにハマチエード S (武田薬品工業) を加えたものを朝夕 2 回にわけて投与した。なお、本実験期間中の水温は 23.4~24.3°C であった。

**供試菌株** 1984年に大分県のブリ病魚から分離した *Pasteurella piscicida* OT-8447 株から調製した強毒、弱毒および無毒株を用いた。強毒株は魚体通過を 2 回繰り返して毒力を強化し、弱毒および無毒株は継代を繰り返して毒力を低下させた。それぞれの株の浸漬法および接種法攻撃による 10 日間の LD<sub>50</sub> は強毒株が浸漬法および接種法攻撃ともに 10<sup>3</sup> CFU/ml 以下、弱毒株が浸漬法攻撃では 10<sup>6</sup> CFU/ml 以上、接種法では 10<sup>5.4</sup> CFU/ml、無毒株が浸漬法および接種法ともに 10<sup>8</sup> CFU/ml 以上となった。

**弱毒生菌および無毒生菌の魚体内通過回数による感染力の変化** 魚体内通過は弱毒生菌および無毒生菌ワクチン液 0.1 ml をブリの腹腔内に接種したのち、48 時間後に腎臓から菌分離を行った。再分離された菌は再び同じ方法で魚体内通過を繰り返した。第 3 章第 2 節と同様にブリ稚魚に対する LD<sub>50</sub> を測定した。

**各種ワクチンの作製** 弱毒生菌 (ALB) および無毒生菌 (AVB) の調製は前述の方法によって行った。ホルマリン不活化菌体 (FKB) は、供試菌を 1.5% NaCl 加 BHI プイオンに接種し、25°C で 24 時間振とう培養した菌液にホルマリンを 0.5% 濃度となるように添加し、冷暗所に 48 時間静置したのち、1,000×g で 15 分間の遠心操作によって菌体を回収した。菌体を滅菌した PBS で 3 回洗浄したのち、100 mg/ml の濃度となるように同液に懸濁して抗原液とした。加熱死菌 (HKB) は BHI 寒天培地を用いて 25°C で 48 時間培養した OT-8447 菌体を PBS に懸濁したのち、75°C で 1 時間の加熱を行って作製した。いずれの抗原も PBS に 100 mg/ml の濃度となるように懸濁してワクチンとした。

**免疫方法** 免疫は浸漬法によって行った。まず、各種抗原液を綿ろ過海水を用いて 1,000 倍に希釈し、エアレーションを行いながら供試魚を 5 分間浸漬して行った。いずれの方法も 1 週おきに 2 回処理した。

**実験的感染試験** 1.5% NaCl 加 BHI 平板で 25°C、24 時間培養した供試菌株を滅菌 PBS に懸濁し、海水を用いて 2.3×10<sup>3</sup> CFU/ml の濃度となるように希釈して感染用生菌液とした。実験的感染はこの生菌液に供試魚をエアレーションを行いながら 5 分間浸漬して行った。

**血清中の抗体量の測定** FKB を用いてマイクロタイター法によって行った。

**血清中の補体価の測定** ウサギ赤血球を用いて高田・高田 (1976) の方法によって行った。

**頭腎細胞の貪食活性の測定** 頭腎からの貪食細胞の調製は心臓穿刺法によって採血した供試魚から直ちに頭腎部を摘出した。頭腎は ML-15 中で解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュでろ過して、臓器片を取り除いた。ろ液中の細胞は ML-15 を用いて 400×g で 5 分間の遠心操作によって洗浄したのち、ML-15 に 1×10<sup>7</sup> cells/ml となるように懸濁して頭腎貪食細

胞浮遊液とした。

貪食活性の測定 頭腎貪食細胞浮遊液 0.5 ml と正常ブリ血清 0.4 ml と ML-15 を用いて  $1 \times 10^8$  cells/ml に調製した FKB 液を混合して、30, 60, 180, 360分後に 0.1 ml の混合液を取り出し、 $400 \times g$  で5分間の遠心操作によって細胞を回収した。細胞は  $10 \mu\text{l}$  のウシ胎児血清に懸濁したのち、スメアを作製した。スメアは95%エタノールで固定したのち、ペルオキシダーゼとギムザの2重染色を行った。そして、検鏡して貪食活性および貪食指数を測定した。

マクロファージ浮遊液の調製 ブリの頭腎および腹腔内侵出細胞からマクロファージ浮遊液を調製した。頭腎からのマクロファージの調製は心臓穿刺法によって採血した供試魚から直ちに頭腎部を摘出した。頭腎は ML-15 中で解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュでろ過して、臓器片を取り除いた。ろ液中の細胞は ML-15 を用いて  $400 \times g$  で5分間の遠心操作によって洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して  $25^\circ\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を取り除いたのち、付着細胞をピペッティングによって回収した。回収したマクロファージは ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁してマクロファージ浮遊液とした。腹腔内侵出細胞からのマクロファージの調製は10%のプロテオーズペプトン 1 ml をブリの腹腔内に接種し、96時間後に供試魚を取り上げ、心臓穿刺法によって採血したのちに脳穿刺によって即殺した。腹部体表面を70%アルコールを用いて消毒したのち、2 ml の ML-15 を腹腔内に接種した。そして、腹部をマッサージしたのちに、腹部を切開して腹腔内の ML-15 を回収し、シリコン処理を行ったガラス試験管に採取した。この PEC は ML-15 を用いて  $400 \times g$  で5分間の遠心操作によって3回洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュに添加して  $25^\circ\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を取り除いたのち、付着細胞をピペッティングによって回収した。回収したマクロファージは ML-15 に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁してマクロファージ浮遊液とした。

マクロファージの細胞内殺菌活性の測定  $50 \mu\text{l}$  のマクロファージ浮遊液を96穴の細胞培養用マイクロプレート (Nunc) に添加して、 $25^\circ\text{C}$  で15分間培養した。培養後、各ウエルに ML-15 中に  $1 \times 10^8$  CFU/ml となるように調製した *P. piscicida* の浮遊液  $50 \mu\text{l}$  を添加し、 $25^\circ\text{C}$  で30分間培養した。その後、各ウエルを 0.05 mg/ml のストレプトマイシンと 10 units/ml のペニシリン G を含む ML-15 で1回、ML-15 で2回洗浄したのち、各ウエルに ML-15 を  $50 \mu\text{l}$  ずつ添加して  $25^\circ\text{C}$  で培養した。培養開始直後と60および120分後に5ウエルに氷冷した0.2% BL-25 加15%食塩水を  $50 \mu\text{l}$  添加し、室温で15分間反応させたのち、混積平板法によって生菌数を測定してマクロファージ内殺菌活性を測定した。

## 結 果

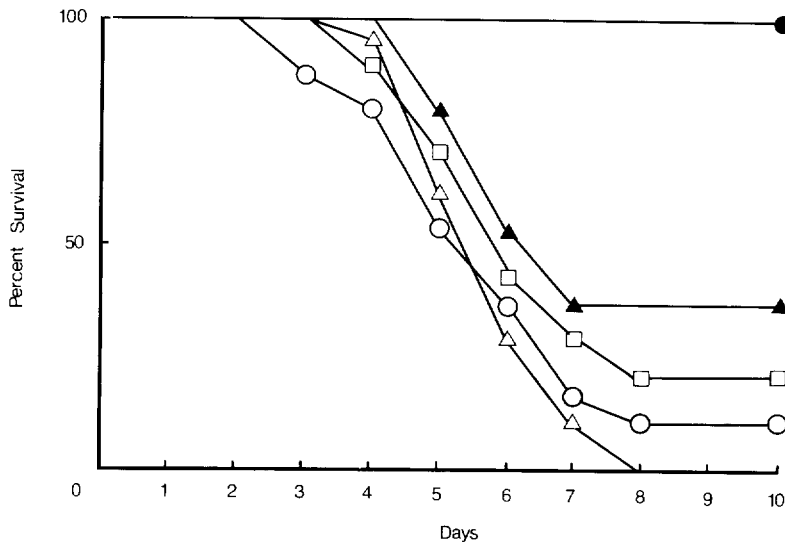
弱毒生菌および無毒生菌の魚体内通過回数による感染力の変化は Table 21 に示すとおりである。魚体内通過回数の増加に伴う浸漬法感染による LD50 は弱毒生菌では通過 1 および 3 回が  $10^6$  以下、5回が  $10^{5.2}$ 、7回が  $10^{4.1}$ 、10回では  $10^{3.1}$  CFU/ml となった。無毒生菌では感染力の上昇は認められなかった。



**Table 21.** Changes in virulence of attenuated live bacterins (ALB) and avirulent live bacterins (AVB) prepared from *Pasteurella piscicida* with repeating passage in yellowtail

Number of passage	Log <sub>10</sub> number of LD <sub>50</sub>	
	ALB	AVB
1	>6.0	>6.0
3	>6.0	>6.0
5	5.2	>6.0
7	4.1	>6.0
10	3.1	>6.0

実験的感染後の生残率の経時的变化は Fig. 43 に示すとおりである。実験的感染10日後の最終生残率は弱毒生菌区が100.0%、無毒生菌区が37.3%、ホルマリン不活化菌体区が22.2%、加熱死菌区が17.7%、対照区が18.3%となった。弱毒生菌、無毒生菌およびホルマリン不活化菌体免疫区の生残率は対照区の生残率に対して5%以上の危険率で有意差が認められたが、加熱死菌免疫区では対照区と有意差は認められなかった。



**Fig. 43.** Changes in percent survivals of yellowtail immunized with attenuated live bacterin (ALB, ●), avirulent live bacterin (AVB, ▲), formalin killed bacterin (FKB, □) and heat killed bacterin (HKB, △) prepared from *Pasteurella piscicida* and PBS as control (○) after experimental challenge with the bacteria.

各区の血清中の *P. piscicida* LPS 特異抗体量、補体価および頭腎細胞の貪食活性を測定した結果は Table 22 に示すとおりである。血清中の特異抗体量は弱毒生菌区が18.8、無毒生菌区が9.4、ホルマリン不活化菌体区が17.5、加熱死菌区が14.5、対照区が 8.2  $\mu\text{g/ml}$  となった。各免疫区と対照区の間には1%の危険率で有意差が認められたが、各免疫区の間には有意差は認められなかった。血清中の補体価は弱毒生菌区が672.4、無毒生菌区が681.2、ホルマリン不活化菌体区が

675.7, 加熱死菌区が649.7, 対照区が 672.1 units/ml となった。各免疫区と対照区の間および各免疫区の間には有意差は認められなかった。頭腎細胞の貪食活性は弱毒生菌区が19.2, 無毒生菌区が9.1ホルマリン不活化菌体区が8.0, 加熱死菌区が4.8, 対照区が4.7%となった。各免疫区と対照区の間には5%の危険率で有意差が認められ, さらに, 弱毒生菌と各免疫区の間にも有意差は認められた。培養0および1時間後の腹腔内マクロファージの細胞内生菌数は弱毒生菌区それぞれ  $10^{2.5}$ ,  $10^{1.7}$ , 無毒生菌区が  $10^{2.3}$ ,  $10^{3.0}$ , ホルマリン不活化菌体区が  $10^{2.4}$ ,  $10^{3.1}$ , 加熱死菌区が  $10^{2.4}$ ,  $10^{2.9}$ , 対照区が  $10^{2.1}$ ,  $10^{2.7}$  CFU/ml となり, 弱毒生菌区でのみ細胞内殺菌が認められた。

**Table 22.** Mean serum antibody levels, complement activity, phagocytic activity and intracellular bacterial killing of yellowtail immunized with attenuated live bacterins (ALB), avilurent live bacterins (AVB), formalin-killed bacterins (FKB) and heat inactive bacterins (HKB) prepared from *Pasteurella piscicida*

Antigens	Antibody ( $\mu\text{g/ml}$ )	Complement (units/ml)	Phagocytic activity (%)	Number of viable <i>P. piscicida</i>
ALB	18.8	672.4	19.2	2.5-1.7*
AVB	9.4	681.2	9.1	2.3-3.0
FKB	17.5	675.5	8.0	2.4-3.1
HKB	14.5	649.7	4.8	2.4-2.9
Control	8.2	672.1	4.7	2.1-2.7

\*  $\text{Log}_{10}$  number of intracellular bacteria for 0 h-1 h.

## 考 察

これまでに本研究ではブリの類結節症に対するブリの感染防御性は感染耐化魚および2年魚で高いことが明らかとなった。その理由としては, これらの魚はいずれも生菌感作を受けており, それによって頭腎のリンパ球がリンフォカイン様物質を産生する能力を獲得し, 再び生体内に *P. piscicida* が侵入したときは, 速やかにこの物質を産生し, マクロファージの集化, 貪食および細胞内殺菌活性を上昇させるからではないかと考えられる。また, その一連の反応は死菌ワクチンでは誘導できないことが明らかとなった。楠田他 (1989) はブリの *Nocardia kampfachi* 感染症では死菌で免疫した場合よりも生菌で免疫したほうが, 原因菌に対する貪食細胞の集化性が高まったとしており, ブリにおいても生菌免疫と死菌免疫では発動する免疫機構に差異が認められている。また, 本症に対しては死菌ワクチンによる浸漬法ワクチンの実用化は困難であることがわかったことから, その予防法は人為的にブリを生菌感作する方法が最もよいのではないかと考えられる。しかし, 第2章第5節で行った感染耐化処理は病原性の高い生菌を使うために, 処理時に生菌濃度を誤るとほとんどの供試魚が死んでしまうおそれがあり, 実用化には向いていないと思われる。いっぽう, 本研究で用いた弱毒生菌は魚体内通過5回までなら感染力は低く, 安全性は高いと思われる。そこで, 本節では継代を繰り返すことによって菌の病原性を低下させた弱毒生菌および無毒生菌を作製した。そして, それぞれの有効性をホルマリン不活化菌および加熱

死菌と比較した。その結果、感染防御性は弱毒生菌では高かったが、無毒生菌、ホルマリン不活化菌体および加熱死菌では低かった。弱毒生菌で免疫した区では他の免疫区と比較して血清中の抗体価は差異が認められなかったが、頭腎細胞の貪食活性および腹腔内浸出マクロファージの細胞内殺菌活性は高い値をしめした。この原因としては、これまでに調べてきたように、生菌感作による頭腎リンパ球のリンフォカイン様物質の産生性とその作用によるものではないかと考えられる。生菌ワクチンの有効性は生菌感作によって活性Tリンパ球が誘導されて、それによって産生されるリンフォカイン、マクロファージ活性化因子 (MAF) およびインターフェロンなどによってマクロファージが活性化しており、これらの細胞性免疫機構の作用によって細胞内増殖性菌に対する感染防御が成立するとされている (野本 1982, MIYATA et al. 1982, NOMOTO et al. 1983)。ブリの類結節症に対する感染防御機構もほ乳類と同様であり、本症の予防にはこのような細胞性免疫機構を活性化するワクチンが有効であると考えられる。いっぽう、同じ生菌でも無毒生菌では弱毒生菌と比較して、有効性は低かった。野本 (1982) は生体防御と感染成立のかかわりあいのなかで、血清成分や好中球によって容易に処理される異物に対しては免疫は成立しないとしている。このことから、無毒生菌はブリ血清に対する抵抗性がなく、血清成分によって速やかに処理されるため、抗原としての刺激時間が短いのではないかと考えられる。また、生菌感作を行うためには、生菌ワクチンの病原性が完全に失われてもよくないのではないかとと思われる。しかし、本節の結果から、類結節症ワクチンの実用化には、弱毒生菌ワクチンによってブリを免疫する方法が最もよいと思われる。

## 第2節 ブリの類結節症に対する *Pasteurella piscicida* リボゾームワクチンの有効性

リボゾームワクチンは医学および獣医学領域では、各種ウイルスおよび細菌性疾病に対して有効であるとされている (GREGORY 1986)。また、本ワクチンは不活化ワクチンでは有効性が低いとされている細胞内増殖性細菌に対しても有効であり、持続性が長いとされている。窪田他 (1970b) はブリ類結節症病魚の病理組織を検討した結果、原因菌の貪食細胞内増殖が認められるとしており、本症は細胞内増殖性感染症の可能性があると思われる。このことから、ブリ類結節症に対しては不活化ワクチンよりも生菌ワクチンのほうが有効ではないかと考えられる。しかし、養殖魚のワクチンとして、生菌ワクチンは安全性に問題があると思われる。本ワクチンは抽出操作が煩雑であるが、細胞内増殖性細菌感染症に対し、生菌ワクチンと同様の効果が期待されており、安全性も高いと思われる。

そこで、本研究では有効性の高いブリ類結節症ワクチンを検討するために、本症原因菌からリボゾーム画分および対照の各種免疫抗原を調製し、腹腔内接種法によってブリを免疫し、有効性を比較した。

### 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魚体重 8.8g のブリ稚魚を用いた。

**飼育方法** 供試魚を 800 l の FRP 水槽に収容し、エアレーションを行いながら飼育した。餌は 1 日当り魚体重の 15% に当たるイカナゴにビタミン剤（武田薬品）を混合し、朝夕 2 回投与した。

**リボゾーム画分の調製** 1984年に大分県のブリ病魚から分離された *Pasteurella piscicida* OT-8447 株の魚体通過強毒株を、1.5% NaCl 加 BHI ブイヨン (Difco) に接種し、25°C で 24 時間振盪培養したのちに集菌し、滅菌した PBS で 3 回洗浄した菌体を用い、北 (1975) の方法によってリボゾーム P 画分 (PBP) および S 画分 (PBS) を調製した。すなわち、洗浄菌体を 0.01 M MgCl<sub>2</sub>, 0.025% SDS 1 μg/ml RNase-1, 0.5 μg/ml RNase-2 を含む pH 7.1 の 0.01 M リン酸緩衝液 (PB) に懸濁したのち、0.02 mm のガラスビーズを加えて細胞ホモジナイザーでホモジナイズしたのちに PB で抽出した。この抽出液を 27,000×g で 15 分間および 45,000×g で 15 分間の遠心操作を行い、未破壊の菌体を取り除いたのちに、上清をさらに 100,000×g で 3 時間の遠心した。得られた沈査を 0.5% SDS 加 PB に懸濁したのち、1 時間室温で反応させ、4°C で 1 夜放置した。その後、0.1 mM MgCl<sub>2</sub> 加 PB に懸濁し、RBP とした。また、上清を 270,000×g で 3 時間遠心し、得られた沈査を PB に懸濁して RBS とした。

**対照免疫抗原の調製** 対照免疫抗原として、菌体外膜成分 (OMF), LPS, 菌体自己融解抗原 (PCA), 菌体外産生物 (ECP) およびホルマリン不活化菌体 (FKB) を用いた。OMF は Rice and KASPER (1982) と MURPHY and APICELLA (1985) の方法を改変して行った。すなわち、洗浄菌体を 300 ml の 0.01 M EDTA, 0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2% NaCl を含む pH 7.1 の EDTA 緩衝液に懸濁し、37°C で 3 時間反応させた。反応後に超音波処理を行い、80,000×g で 24 時間遠心操作を行った。得られた沈査を蒸留水に懸濁したのち、4°C で 1 晩反応させて OMF とした。LPS は WESTPHAL and JANN (1965) のフェノール-水抽出法によって調製した。PCA は福田 楠田 (1985) の方法によって調製した。ECP は菌体を 25°C で 24 時間培養した培養液に 0.5% となるようにホルマリンを加え、25°C で 48 時間作用させたのち、Amicon cassette system (Millipore) で 3 回濾過し分子量 10,000 以上の画分を採集し、凍結乾燥して調製した。FKB は福田・楠田 (1981) の方法によって調製した。

**免疫方法** 各抗原とも、1 mg の菌体から調製できる量を 1 週おきに 2 回、供試魚の腹腔内に接種した。対照区には滅菌生理食塩水を同様に接種した。

**実験的感染試験** 第 2 回目の抗原接種から 3 週間後に実験的感染を行い有効性を判定した。まず、1.5% NaCl 加 BHI 平板で 25°C, 48 時間培養した *P. piscicida* OT-8447 株を滅菌 PBS に懸濁し、海水を用いて生菌濃度が  $5.2 \times 10^3$  CFU/ml となるように希釈した。各濃度の生菌懸濁海水 25 l あたり各区 30 尾の供試魚を、エアレーションしながら 5 分間浸漬した。実験的感染後 10 日間飼育して生残率の変化を調べた。斃死魚は腎臓から菌分離を行い、抗 *P. piscicida* 血清を用いて、類結節症による斃死であることを確認した。

**RBP の投与濃度と有効性の変化** RBP は 1.6, 16, 160, 1600 μg RNA, FKB は 0.01, 0.1, 1, 10 mg の投与濃度で魚を免疫したのち、前述の方法で生菌濃度  $8.2 \times 10^3$  CFU/ml の実験的感染を行い、有効性を比較した。なお、菌体 1 mg は 16 μg RNA の RBP に相当した。

**血清の採取** 第2回目の抗原接種から3週間後に各区10尾の魚を取り上げ、心臓穿刺法によって採取した血液を4°Cで1晩放置したのち、遠心操作を行って血清を分離し、凝集抗体価の測定および補体価の測定に使用した。

**凝集抗体価の測定** FKB および各抗原を感作させたヒツジ赤血球 (SRBC) を抗原として、マイクロタイター法により測定した。抗原の感作はグルタルアルデヒド処理 SRBC を用いて、常法によって行った。

**血清の補体価の測定** ウサギ赤血球を用いて、SALATI ら (1987) の方法によって補体価を測定した。

**頭腎細胞の貪食活性の測定** 採血した供試魚からただちに頭腎を取り出し、ML-15 培地中でハサミを用いて細切したのち、白金メッシュで濾過して  $1 \times 10^7$  cells/ml の濃度の白血球浮遊液を作製した。貪食用粒子には各抗原を感作した Latex ( $0.81 \mu\text{m}$ ) と FKB を用いた。感作 Latex の作製は高木・楠田 (1982) の方法によって行った。貪食は細胞浮遊液 0.5 ml と自己血清 0.4 ml  $1 \times 10^8$  cells/ml に調製した貪食粒子 0.1 ml を混合し 25°C で3時間反応させた。反応後に混合液を 100  $\mu\text{l}$  取り出し、400 $\times$ g で5分間の遠心操作を行って得られた沈査を 10  $\mu\text{l}$  の牛胎児血清に懸濁し、スメアを作製した。スメアは乾燥および10%ホルマリン加エタノールで固定したのち、ペルオキシダーゼ染色とギムザ染色を行ったのちに検鏡して、100個の貪食細胞に取り込まれた粒子数を測定した。

**血清のオプソニン効果** 非免疫魚の頭腎細胞浮遊液を作製し、免疫魚の血清を用いて前述の方法で貪食活性を測定した。

## 結 果

各抗原で免疫した供試魚の生存率は Fig. 44 に示すとおりである。  $5.2 \times 10^3$  CFU/ml の生菌濃

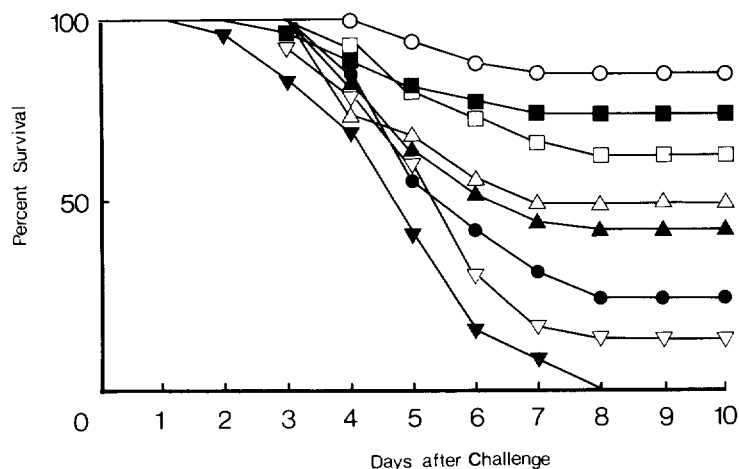


Fig. 44. Changes in percent survival of yellowtail immunized with various *Pasteurella piscicida* antigens and experimental challenged by immersion in the bacteria OT-8447 strain suspension at a concentration of  $5.2 \times 10^3$  CFU/ml. ○; RPB, ●; RBS, □; OMF, ■; LPS, △; PCA, ▲; ECP, ▽; FKC, ▼; PBS as control.

度では RBP が85.3%, RBS が13.8%となり, 対照の OMF が63.3%, LPS が74.2%, PCA が43.8%, ECP が25.0%, FKB が45.7%となった。また, 非免疫対照群は0%であった。いずれの免疫区の生残率も非免疫対照区と比較して有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められたが, 対照抗原である FKB と有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められたのは, RBP のみであった。

RBP と対照の FKB の投与濃度別の生残率の比較は Fig. 45 に示すとおりである。生残率は  $8.2 \times 10^3$  CFU/ml の生菌濃度では 1.6  $\mu$ g RNA が26.7%, 16  $\mu$ g RNA が40.0%, 160  $\mu$ g RNA が56.7%, 1600  $\mu$ g RNA が50.0%となった。これらに対し, FKB 免疫区では 0.01 mg, が23.3%, 0.1 mg が40.0%, 1 mg が26.7%, 10 mg が23.3%となった。

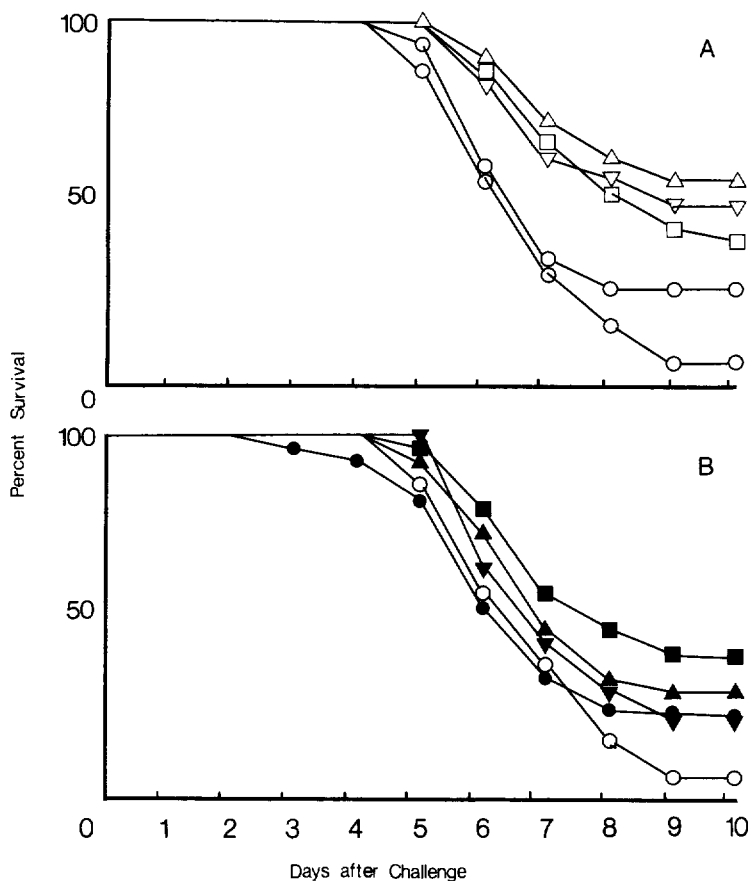


Fig. 45. Changes in percent survival of yellowtail immunized with various amount of RBP (A) and FKB (B), and challenged by immersion in a *Pasteurella piscicida* OT-8447 strain suspension at a concentration of  $8.2 \times 10^3$  CFU/ml. Concentration (A)  $\mu$ g RNA/fish: ○; 1.6, □; 16, △; 160, ▽; 1,600, (B) mg/fish: ●; 0.01, ■; 0.1, ▲; 1, ▼; 10, ○; PBS as control.

第2回目の抗原接種から3週間後の各区の供試魚の血清の抗体価は Table 23 に示すとおりである。それぞれの抗原を感作 SRBC に対する平均凝集抗体価は RBP が1:13, RBS が1:10となり, 対照の OMF が1:21, LPS が1:18, PCA が1:31, ECP が1:8, FKB が1:31と

Table 23. Agglutination antibody titer of yellowtail sera immunized by various *Pasteurella piscicida* antigen preparations

Immunization group	Homologous antigens	<i>P. piscicida</i> FKC
RBP	13*( 8- 16)**	<4(<4)
RBP	10 ( 4- 16)	<4(<4)
OMF	21 ( 4- 649)	12( 4-32)
LPS	18 ( 8- 32)	6( 4- 8)
PCA	31 (16-128)	29(16- 64)
ECP	8 ( 4- 16)	5(<4- 8)
FKC	31 (16-128)	31(16-128)
Control***	<4 (<4)	<4(<4)

\* Geometric mean.

\*\* Range of data.

\*\*\* Data from fish injected PBS.

なった。また、非免疫対照群が1:4以下であった。*P. piscicida* FKCに対する平均凝集抗体価はRBPが1:4以下となり、対照のRBSが1:4以下、OMFが1:12、LPSが1:6、PCAが1:29、ECPが1:5、FKCが1:31となった。また、非免疫対照群は1:4以下であった。

各免疫魚の血清の補体価はTable 24に示すとおりである。各免疫区の平均補体価はRBPが68.7、RBSが71.6となり、対照のOMFが62.3、LPSが78.4、PCAが71.2、ECPが66.7、FKCが69.7となった。また、非免疫対照群は67.8 unit/mlであった。

Table 24. Complement activity of yellowtail sera immunized by various *Pasteurella piscicida* antigen preparations

Immunization group	Complement activity
RBP	68.7(4.8)*
RBS	71.6(2.4)
OMF	62.3(1.9)
LPS	78.4(5.2)
PCA	71.2(4.1)
ECP	66.7(3.4)
FKC	69.7(4.6)
Control**	67.8(4.6)

\* Standard deviaton.

\*\* Data from fish injected PBS.

頭腎細胞の貪食活性はTable 25に示すとおりである。各抗原を感作した latex 粒子に対する頭腎貪食細胞100個あたりの平均貪食粒子数は、RBPが47.3、RBSが19.2となり、対照のOMFが24.1、LPSが29.4、PCAが22.1、ECPが22.0、FKCが21.4となった。また、非免疫対照群は15.2であった。*P. piscicida* FKCに対する頭腎貪食細胞100個あたりの平均貪食粒子数は、RBPが24.1、RBSが9.2となり、対照のOMFが16.2、LPSが20.5、PCAが17.4、ECPが9.4、FKC

**Table 25.** Phagocytic index of head kidney cells isolated from yellowtail immunized by various *Pasteurella piscicida* antigen preparations

Immunization group	Phagocytic index	
	Homologous antigen coated Latex	<i>P. piscicida</i> FKC
RBP	47.3(4.2)*	24.1(3.0)
RBS	19.2(2.8)	9.2(1.0)
OMF	24.1(1.4)	16.2(2.4)
LPS	29.4(2.6)	20.5(1.1)
PCA	22.1(1.4)	17.4(0.8)
ECP	22.0(2.5)	9.4(1.1)
FKC	21.4(1.2)	19.4(0.3)
Control**	15.2(1.8)	8.4(1.0)

\* Standard deviation.

\*\* Data from fish injected with PBS

**Table 26.** Changes in phagocytic index opsonized by sera of yellowtail immunized with various *Pasteurella piscicida* antigen preparations

Immunization group	Phagocytic index
RBP	7.2(1.4)*
RBS	6.1(0.8)
OMF	9.2(1.0)
LPS	8.4(0.6)
PCA	18.4(1.2)
ECP	6.4(1.1)
FKC	16.2(0.9)
Control**	6.2(0.3)

\* Standard deviation.

\*\* Data shows phagocytic index opsonized by PBS.

が19.4となった。また、非免疫対照群は8.4であった。

各免疫魚の血清のオプソニン効果は Table 26 に示すとおりである。各免疫区の血清をオプソニンとして使用したときの平均貪食粒子数は RBP が7.2, RBS が6.1となり、対照の OMF が9.2, LPS が8.4, PCA が18.4, ECP が6.4, FK C が16.2となった。また、非免疫対照群は6.2であった。

## 考 察

ブリ類結節症に対する各可溶性抗原の有効性は RBP, OMF, LPS, PCA, FKB, ECP および RBS の順に高かった。FUKUDA and KUSUDA (1985) は LPS や PCA の有効性がホルマリン不活化菌体よりも高いとしているが、本研究結果からはホルマリン不活化菌体の有効性と有意差が認められたのは RBP のみであった。また、同じリボゾーム画分でも、RBP と RBS には有効性に差異が認められた。リボゾームワクチンの有効性はそれに大量に含まれる RNA がアジュバント効



果をもつことが知られている (JACHERTS and DRESCHER 1970, MEISS and FISHMANN 1972, GUMBINER 1973)。RBP と RBS の有効性の差異は RBP は RNA が、RBS はタンパク質が主成分であり、アジュバント作用をもつ RNA が RBP に多く含まれるためではないかと思われる。いっぽう、RBP で免疫したブリ稚魚の凝集抗体価や補体価は、ほかの区と比較して有意差が認められなかった。SALATI 他 (1983) はウナギの *Edwardsiella tarda* に対する免疫防御性は、血清の凝集抗体価とは直接関係しないとしている。このことから、血清の凝集抗体価を感染防御の指標とするのは困難であるが、RBP で免疫した魚の凝集抗体価の上昇が低いにもかかわらず、高い有効性が認められるのは、液性の抗体以外の因子が関与しているためではないかと思われる。さらに、RBP で免疫した魚では、血清のオプソニン効果は低いにもかかわらず、頭腎細胞の貪食活性が最も高い結果が得られた。これらのことから、RBP で免疫すると貪食細胞の活性が高まるのではないかと考えられる。LPS は貪食細胞の活性を上昇させることが知られている (LEE et al. 1981)。また、SALATI and KUSUDA (1986) はウナギの *E. tarda* に対する免疫防御性は LPS 抗原によって誘引される貪食細胞の活性化によるのではないかとしている。ブリにおいても、LPS 免疫区では頭腎細胞の貪食活性が上昇したが、RBP ではそれ以上の上昇が認められた。GONGGRUP et al. (1981) は *Pseudomonas aeruginosa* 感染症に対しては、LPS よりもリボゾームワクチンの有効性が高いことから、リボゾームワクチンには未同定の免疫活性物質が含まれているのではないかとしている。RBP 免疫魚の貪食活性の上昇は、これらの物質が関与しているのかも知れない。また、リボゾームワクチンは細胞性免疫を活性化することが知られている (VENNEMAN and BERRY 1971a, 1971b, SMITH and BIGLEY 1972)。RBP 免疫魚では細胞性免疫機構が活性化され、貪食活性が上昇するのではないかとと思われる。

RBP はいずれの濃度においても FKB よりも有効性が高かった。また、FKB の有効性は投与量が増すにつれて低下した。さらに、菌体一定量から抽出できる RBP はもとの FKB よりも有効性が高かった。これらのことから、FKB にはブリ免疫機構を抑制するような物質が含まれているのではないかとと思われる。SALATI and KUSUDA (1986) は *E. tarda* の lipid が免疫機構を抑制していると報告している。RBP の有効性が高いのはこのような免疫抑制物質が含まれていないためではないかと思われる。

窪田他 (1970b) は類結節症の病理組織学的検討を行った結果、本菌がブリの貪食細胞内で増殖している状態が観察されたとしている。このことから、本菌は細胞内増殖性をもつと考えられる。細胞内増殖性病原体に対する感染防御には細胞性免疫機構の活性化が必要であるとされている (HAHN and KAUFFMAN 1983)。生ワクチンは細胞性免疫を活性化し、これらの病原体に対して有効であることが知られている。KUSUDA and HAMAGUCHI (1988) はブリ類結節症に対し、弱毒生菌ワクチンが有効であったとしている。RBP はブリの細胞性免疫を活性化し、それによって貪食機能の上昇が起こり、本症に対して有効性が高くなるのではないかと考えられる。

本研究において、ブリ類結節症に対しては各種菌体抗原のなかでも RBP の有効性が最も高いことがわかった。今後は浸漬法や経口法などの簡便な方法によって RBP をブリに投与して、有効性を検討し、本ワクチンの実用化をはかる必要があると思われる。

### 第3節 ホルマリン不活化菌体を用いた浸漬法ワクチンと細胞性免疫調節剤 レバミゾールの併用効果

前節までにブリの類結節症に対するホルマリン不活化菌体を用いた浸漬法ワクチンについて検討し、処理回数の増加、各種投与方法との併用および抗原の作製法などの操作によって、有効性を高めることができることを明らかにした。しかし、野外試験においてはその操作を組み合わせても、実用的な効果が得られないことが明らかとなった。実用的な効果が得られない理由については、本症のような細胞内寄生性病原細菌による感染症においては、不活化菌体によるワクチンのみでは細胞性免疫機構の活性化ができないために、低い有効性しか得られないのではないかと考察した。

そこで、本節では細胞性免疫機構を活性化することが知られている免疫調節剤レバミゾールを、ホルマリン不活化菌体を用いた浸漬法ワクチンに併用し、有効性を高めることができるかどうか検討した。

#### 実 験 方 法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した平均体重 19 g のブリ稚魚を用いた。

**飼育方法** 本章第1節と同様の方法で飼育した。なお、本実験期間中の水温は 24.6～26.8°C であった。

**供試菌株** 1984年に大分県のブリ病魚から分離した *Pasteurella piscicida* OT-8447 株から調製した強毒株を用いた。強毒株は魚体通過を2回繰り返して毒力を強化したのち、凍結乾燥し使用時まで保存した。

**ホルマリン不活化菌体の作製** 供試菌を1.5% NaCl 加 BHI ブイヨンに接種し、25°C で24時間振とう培養した菌液にホルマリンを0.5%濃度となるように添加し、冷暗所に48時間静置したのち、1,000×g で15分間の遠心操作によって菌体を回収した。菌体を滅菌したダルベッコの PBS で3回洗浄したのち、100 mg/ml の濃度となるように同液に懸濁してホルマリン不活化菌体懸濁液とした。

**免疫方法** 抗原液を綿ろ過海水を用いて1,000倍に希釈し、エアレーションを行いながら供試魚を5分間浸漬して行った。

**レバミゾールの投与** レバミゾールを 0.1 mg/ml の濃度となるように滅菌 PBS に溶解したのち、ブリの腹腔内に 0.1 ml ずつ接種して投与した。

**実験的感染試験** 1.5% NaCl 加 BHI 平板で 25°C, 24時間培養した OT-8447 を滅菌 PBS に懸濁し、海水を用いて生菌濃度が  $2.8 \times 10^3$  CFU/ml および  $3.5 \times 10^3$  CFU/ml の濃度となるように希釈して感染用生菌液とした。この液に供試魚をエアレーションを行いながら5分間浸漬し、実験的感染とした。

**血清中の抗体量の測定** *P. piscicida* から調整したホルマリン不活化菌体を用いて、マイクロ

タイター法によって行った。

血清中の補体価の測定 ウサギ赤血球を用いて高田・高田 (1976) の方法によって行った。

頭腎貪食細胞の調製 心臓穿刺法によって採血した供試魚から直ちに頭腎部を摘出した。頭腎は ML-15 中で解剖用ハサミを用いて細片化したのち、白金メッシュでろ過して、臓器片を取り除いた。ろ液中の細胞は ML-15 を用いて  $400\times g$  で5分間の遠心操作によって洗浄したのち、細胞培養用ペトリディッシュ (Coaster) に添加して  $25^{\circ}C$  で30分間反応させた。反応後、非付着細胞を回収して、ML-15 に  $1\times 10^7$  cells/ml となるように懸濁して頭腎貪食細胞浮遊液とした。

貪食活性の測定 頭腎貪食細胞浮遊液 0.5 ml, 正常ブリ血清 0.4 ml, ML-15 を用いて  $1\times 10^8$  cells/ml に調製した FKB 液を混合して、60分後に 0.1 ml の混合液を取り出し、 $400\times g$  で5分間の遠心操作によって細胞を回収した。細胞は  $10\ \mu l$  のウシ胎児血清に懸濁したのち、スメアを作製した。スメアは95%エタノールで固定したのち、ペルオキシダーゼとギムザの2重染色を行った。そして、検鏡して貪食活性および貪食指数を測定した。

類結節症の感染防御性に及ぼすレバミゾールの投与時間の影響 類結節症未感染のブリに感染の6, 12, 24, 48時間前、感染直前および感染の6, 12, 24, 48時間後にレバミゾールを投与した。実験的感染は前述の方法で行い、10日間飼育して生残率の変化を検討した。

浸漬法ワクチンとレバミゾールの併用効果 浸漬法ワクチン処理の24時間前および浸漬法ワクチン処理後実験的感染の24時間前に、それぞれレバミゾールを投与した。実験的感染は免疫後3週間でいった。対照区には同様な処理を行った。

## 結 果

類結節症の感染防御性に及ぼすレバミゾールの投与時間の影響は Fig. 46 に示すとおりである。実験的感染ののち、10日後の最終生残率は感染の48時間前に投与した区が10%, 24時間前に投与した区が40%, 12時間前に投与した区が20%, 6時間前に投与した区が10%, 感染の直後に投与した区が10%, 感染の6時間後に投与した区が10%, 12, 24, 48時間後に投与した区が0%, 対照区はいずれも0%となった。感染の12および24時間前に投与した区の生残率は対照区およびほかの投与区の生残率に対して、5%以下の危険率で有意差が認められた。

感染の24時間前にレバミゾールを投与した魚の血清中の *P. piscicida* LPS 特異抗体量、補体価および頭腎細胞の貪食活性を測定した結果は Table 27 に示すとおりである。血清中の特異抗体量はレバミゾール投与区が  $8.3\ \mu g/ml$ , 対照区が  $8.6\ \mu g/ml$  となった。血清中の補体価はレバミゾール投与区が 659.2 units/ml, 対照区が 649.8 units/ml となった。頭腎細胞の貪食活性はレバミゾール投与区12.8%, 対照区が8.9%となった。頭腎細胞の貪食活性はレバミゾール投与区と対照区との間には5%の危険率で有意差が認められたが、血清および補体価には有意差は認められなかった。

浸漬法ワクチンとレバミゾールの併用効果は Fig. 47 に示すとおりである。実験的感染ののち、10日後の最終生残率は浸漬法ワクチン処理の24時間前にレバミゾールを投与した区では42.4%, 浸漬法ワクチン処理後実験的感染の24時間前にレバミゾールを投与した区では56.8%, 浸漬法ワ

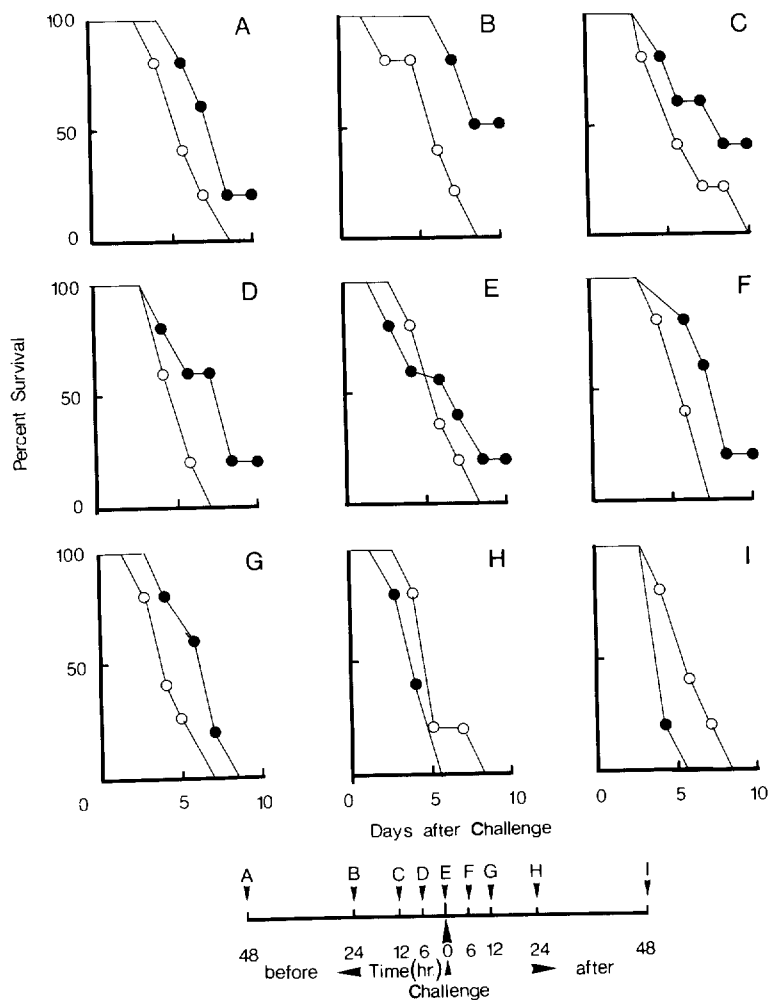


Fig. 46. Effect of levamisole treatment on the control of pseudotuberculosis in yellowtail. Symbols: ▽ and ●, levamisole treatment; △, challenge with *Pasteurella piscicida*; ○, PBS as control.

Table 27. Mean levels of serum antibody, complement activity and phagocytic activity of yellowtail injected with levamisole (LMS) before 24 h and PBS as control

Yellowtail	Antibody ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Complement (units/ml)	Phagocytic activity (%)
LMS injected	8.3	659.2	12.8
Control	8.6	649.8	8.9

クチン単独区では42.0%, 対照区はそれぞれ8.0%および10.0%となった。

各処理区の血清中の抗体価, 補体価および頭腎細胞の貪食活性は Table 28 に示すとおりである。血清中の特異抗体量は浸漬法ワクチン処理の24時間前にレバミゾールを投与した区が27.7, 浸漬法ワクチン処理後実験的感染の24時間前にレバミゾールを投与した区が28.2, 浸漬法ワクチン単独区が27.9, 対照区がそれぞれ 8.0, 8.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となった。血清中の補体価は浸漬法ワクチン

ブリの細胞性免疫機構

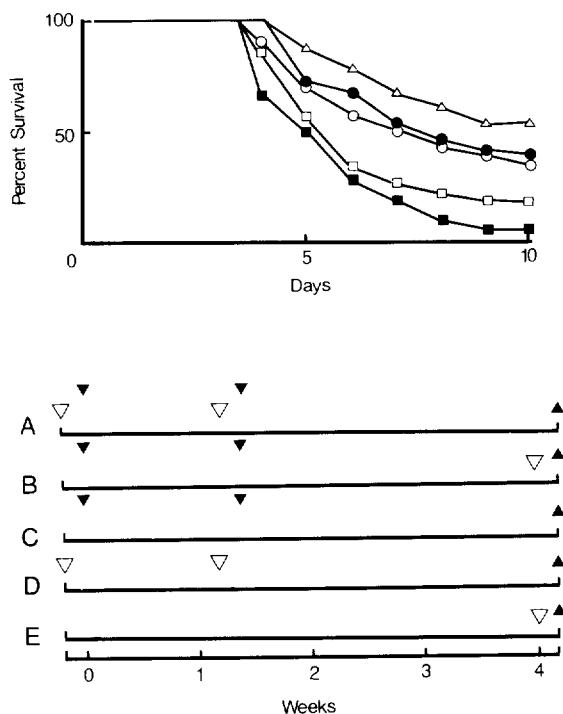


Fig. 47. Changes in percent survival after experimental challenge with *Pasteurella piscicida* on yellowtail treated by various methods. Symbols: ●, group A; △, group B; ○, group C; □, group D; ■, group E; ▽, levamisole treatment; ▼, vaccination; ▲, challenge with *P. piscicida*.

ン処理の24時間前にレバミゾールを投与した区が625.7, 浸漬法ワクチン処理後実験的感染の24時間前にレバミゾールを投与した区が638.2, 浸漬法ワクチン単独区が643.2, 対照区がそれぞれ648.2, 651.4 units/ml となった。頭腎細胞の貪食活性は浸漬法ワクチン処理の24時間前にレバミゾールを投与した区が9.6, 浸漬法ワクチン処理後実験的感染の24時間前にレバミゾールを投与した区が12.6, 浸漬法ワクチン単独区が9.9, 対照区がそれぞれ8.6, 10.4%となった。血清中の抗体価は各免疫区と対照区との間には5%以下の危険率で有意差が認められたが, それ以外は認められなかった。

Table 28. Mean levels of serum antibody, complement activity and phagocytic activity of cells in head kidney on yellowtail of various groups

Group	Antibody (μg/ml)	Complement (units/ml)	Phagocytic activity (%)
A	27.7	625.7	9.6
B	28/2	638.2	12.6
C	27.9	643.2	9.9
D	8.0	648.2	8.6
E	9.9	651.4	10.5

A-E correspond with the letters in Fig. 47.

## 考 察

免疫調節剤は生体の免疫機能が低下状態にあるときには増強的に、こう進状態にあるときには抑制的に働き、免疫機能が正常な状態にあるときには影響を与えないものとされている。現在では、癌の治療の免疫療法などに利用されているが、免疫調節剤を投与すると、腫瘍細胞に対する生体の細胞性免疫機構が強化されて、腫瘍細胞の排除に有効に作用することが知られている。レバミゾールは原虫駆虫剤として開発されたが、のちに免疫調節効果がみいだされ、免疫調節剤の1つとして用いられている。

魚類においても、各種感染症に対してレバミゾール、FK-565、B-グルカンなどの免疫調節剤が有効であるとされている (KAJITA et al. 1990, SIWICKI 1987, YANO et al. 1989, KITANO and YOSHIDA 1986)。伊沢他 (1983) はコイを用いて免疫調節剤であるレバミゾールおよびFK-565の影響を調べた結果、これらを投与したコイのT細胞系の細胞の機能およびマクロファージの機能がこう進し、*Aeromonas hydrophila* に対する感染防御性が上昇したとしている。このように、レバミゾールなどの免疫調節剤の投与によって、魚類の細胞性免疫機構が活性化するのではないかと考えられている。ブリにおいても類結節症に対する感染防御性は感染の24時間前にレバミゾールを投与すると上昇することが明らかとなった。また、感染24時間前にレバミゾールを投与した魚の血清中の抗体価や補体価は非投与対照魚と比較して差異が認められなかったが、頭腎細胞の貪食活性は上昇した。KAJITA et al. (1990) はニジマスにレバミゾールを投与すると白血球の貪食性に加えて、血清中の補体価も上昇したとしており、今回の結果と血清の補体価の上昇の点で差異が認められたが、いずれも貪食細胞の活性が認められている。前章までの結果から、類結節症に対する感染防御性は貪食細胞の活性化などの細胞性免疫機構が必要ではないかと考えられる。このことから、感染前24時間にレバミゾールを投与した魚の感染防御性の向上は頭腎細胞の貪食活性の上昇によるのではないかと考えられる。いっぽう、浸漬法ワクチンの有効性に及ぼすレバミゾール投与の影響を調べたところ、浸漬法ワクチン単独区と比較してワクチン処理前に投与した区では感染防御性に差異は認められなかったが、浸漬法ワクチン処理の後感染の24時間前に投与した区では感染防御性が上昇する傾向を示した。これらのことから、レバミゾールは浸漬法ワクチンの取り込みや免疫効果の上昇には効果はないが、感染の24時間前に投与することによって、貪食活性の上昇など細胞性免疫機構の一部が活性化され感染防御効果を示すのではないかと考えられる。

ほ乳類ではレバミゾールの分子量が240で経口投与でも容易に吸収されることから、臨床使用時には経口投与が行われている。ブリの類結節症に対する浸漬法ワクチンの野外試験においては対照区と比較して斃死が遅れるなどの効果が認められたが、実用性のある予防効果は得られていない (HAMAGUCHI and KUSUDA 1989)。以上のことから、ホルマリン不活化菌体を用いた浸漬法ワクチンで魚を処理したのち、類結節症の流行前からレバミゾールを経口投与し、浸漬法ワクチンの欠点である細胞性免疫機構の活性化能力の欠如を補うことによって、予防効果をあげることができるのではないかと考えられる。

## 第4節 総合考察

前章までの知見から、ブリの類結節症に対する感染防御性は生菌感作による成熟リンパ球の活性化とそれともなうマクロファージ活性化因子の産生によるものと推察された。本章では、この機構を利用して人為的方法による類結節症の予防方法として、生菌ワクチン、リボゾームワクチンおよび免疫活性化剤の使用によるブリの細胞性免疫機構の活性化を検討した。その結果、従来使用されてきたホルマリン不活化および加熱死菌などの死菌ワクチンと比較して、いずれも効果が高いことが明らかとなった。このことから、ブリの類結節症の予防には成熟リンパ球の活性化などの細胞性免疫機構を誘発することが重要であるということが明らかとなった。しかし、生菌ワクチンは実際に養殖現場で使用するためには、使用法などを限定しないと魚体内通過による強毒化などの問題点がある。また、リボゾームワクチンは製造法が煩雑でワクチンとして高価であることなどの経済的な問題点がある。免疫活性化剤はその使用に際して抗生物質などと同様な使用認可試験が行われる必要性があり、容易には使用できないと思われる。このように、いずれの方法も実用化にはさらに検討が行われなければならないが、現在多数の被害が発生しているブリの類結節症に対する有効な予防法であると思われる。

## 第5章 総 括

類結節症は稚魚期のブリに流行して大きな被害を与えている細菌性の疾病である。現在、本症の治療には化学療法剤の投与が行われているが、耐性菌の蔓延によって治療が困難となっている。そのために、ワクチンによる予防対策の確立が緊急を要するものとなっているが、実用化には至っていない。本症の原因菌である *Pasteurella piscicida* のような細胞内増殖性の認められる疾病に対するワクチンの実用化のためには、細胞性免疫機構を明らかにする必要があると思われる。従来、魚類のワクチンの開発には体液性免疫機構に基づいた方法でおこなわれてきたので、細胞性免疫機構の解明とそれを利用したワクチンの開発に乏しいのが現状である。そこで、本研究ではブリの類結節症に対する細胞性免疫機構を解明し、本症の予防法について検討した。

細胞性免疫機構の解明はリンパ球および貪食細胞の機能に分けて調べるとともにその相互作用について検討した。まず、リンパ球についてはそのサブポピュレーションの分類を行ったのち、諸機能について検討した。ブリのリンパ球の分類は FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ抗体および抗ブリ胸腺リンパ球表面抗原 (CATL) ウサギ抗体を用いた蛍光抗体法によって行った。また、これらの抗体を用いて、各種リンパ球のブリの体内分布および免疫後の動向を調べた。リンパ球機能の測定は試験管内培養法を用いて、各種レクチンに対する反応およびリンパ球の移植試験によって調べた。ブリの貪食細胞についてはブリ好中球およびマクロファージの *P. piscicida* の強毒、弱毒および無毒株に対する化学走化性、集化性、貪食および細胞内殺菌活性の免疫に伴う変化を調べた。最後に、これらの知見から本症の予防法として、細胞性免疫機構を活性化する能力が高

いと想定された生菌ワクチン、リボゾームワクチンおよび免疫活性剤の有効性を調べた。

ブリのリンパ球は細胞表面抗体を保有し、cap 形成能や各種レクチンに対する反応性から、ほ乳類のBリンパ球に類似する細胞とTリンパ球に類似する細胞の2種類に分類された。このBリンパ球様細胞は抗CATL抗体との反応性およびブリ体内の分布状況および試験管内培養試験結果から、胸腺由来細胞が脾臓に移行し、そこで表面抗体やPWMおよびLPSレセプターなどのBリンパ球に特徴的な機能を獲得して、分化するのではないかとと思われる。それに対して、Tリンパ球様細胞は胸腺内で分化してCon AおよびPHAに対する反応性を獲得し、そのまま腎臓や血液などに移行するのではないかとと思われる。しかし、いずれの細胞もCATLを保有することから、ほ乳類のようにBおよびT細胞の分化が不完全であると思われた。したがって、ブリのリンパ球はTリンパ球に近いBリンパ球が主体ではないかと考えられる。ブリに抗原を投与すると、まず抗原結合能をもつTリンパ球様細胞が増加し、ついでBリンパ球様細胞が増加する傾向を示した。さらに、これらの細胞は抗体産生細胞の増加にも関与することから、ブリの免疫機構はこれらの2種のリンパ球群の相互作用によって調整されているのではないかとと思われる。いっぽう、本症に対して感染防御性が高い*P. piscicida*の感染耐化魚および2年魚の成熟リンパ球の多い頭腎リンパ球を未感染のブリに移植すると、感染防御性が移行したことから、本症の感染防御には感染耐化によって活性化したリンパ球が関与するものと思われる。また、免疫、感染耐化魚および2年魚のリンパ球はマクロファージを活性化および集化する因子を産生することが明らかとなった。しかし、この集化因子の産生能は感染耐化魚および2年魚などの生菌感作をうけた魚で高い傾向を示した。いっぽう、*P. piscicida*に対するブリの貪食活性はブリの好中球およびマクロファージに認められたが、いずれも菌の病原性が高くなるにつれて低下する傾向を示した。また、*P. piscicida*強毒、弱毒および無毒株に対する好中球の細胞内殺菌活性はいずれの菌株に対しても、本菌で免疫したブリおよびブリ2年魚の血清をオプソニンとして使用したときに認められた。それに対して、マクロファージではオプソニン血清に関係なく、弱毒および無毒株に対する殺菌活性が認められたが、強毒株に対しては認められず、逆に細胞内で増殖が促進された。しかし、強毒株に対するマクロファージの細胞内殺菌活性は感染耐化魚および2年魚では、免疫魚および本症未感染魚に比べて高くなる傾向が認められた。これらのことから、本症に対するブリ貪食細胞の機能は感染耐化することによって上昇するのではないかと考えられる。次に、リンパ球と貪食細胞の相互作用について検討した結果、生菌感作を受けたブリの成熟リンパ球は貪食細胞の集化、貪食および細胞内殺菌活性を上昇させる因子を産生することが明らかとなった

以上の細胞性免疫機構の解明から、本症に対しては細胞性免疫機構を活性化させる方法が有効であると思われる。これらの知見をもとに本症に対する予防ワクチンの効果を検討したところ、ホルマリン不活化菌体では抗体産生能は高かったが、感染防御効果は低かった。いっぽう、弱毒生菌ワクチン、リボゾームワクチンおよび細胞性免疫機構活性化剤では抗体産生能に加えて貪食活性も上昇し、高い感染防御効果が認められた。

本実験結果から得られたブリの類結節症に対する感染防御機構はFig. 48に示すとおりであると考えられる。すなわち、不活化菌体から調製したワクチンによって免疫されたブリにおいては、



ブリの細胞性免疫機構

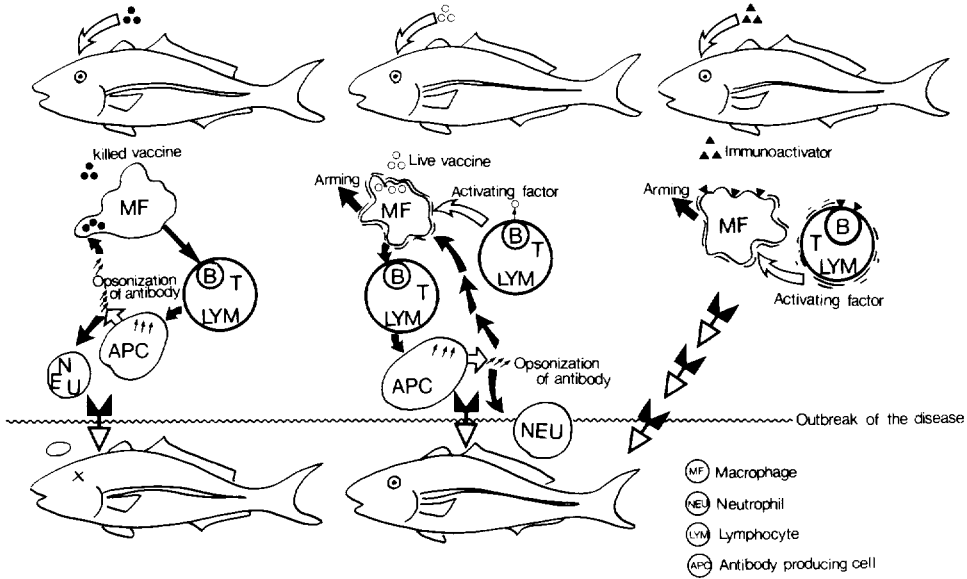


Fig. 48. Cellular immune systems of yellowtail against *Pasteurella piscicida*.

血清や粘液中への抗体産生が起こり、産生された抗体によるオプソニン効果によって好中球の貪食活性および細胞内殺菌活性が高まるものと思われる。しかし、マクロファージでは貪食活性は上昇するが、細胞内殺菌活性は上昇しないので、逆にマクロファージ内では取り込まれた *P. piscicida* の増殖が促進される。そのために、不活化および死菌ワクチンの効果は低い結果となると考えられる。それに対して、弱毒生菌から調製したワクチンによる免疫、2年魚および感染耐化魚などの生菌感作を受けたブリではTリンパ球の活性化が起こり、マクロファージなどの活性化因子が産生されるようになる。この因子は貪食細胞の *P. piscicida* に対する集合性を上昇させる。また、不活化ワクチンと同様に生菌感作によって、血清中および粘液中への抗体が産生され、この抗体によるオプソニン効果による貪食細胞の活性化が起こる。さらに、マクロファージの活性化因子によって *P. piscicida* に対する細胞内殺菌活性が上昇し、オプソニン効果によって取り込まれた生菌が容易に処理されるようになる。このようにして、ブリは類結節症に対する感染防御性を獲得するのではないかとと思われる。これらのことから、本症の予防ワクチンの実用化には細胞性免疫機構の活性化が必要であり、本症の予防には生菌ワクチンやリボゾームワクチンが有効ではないかと思われる。

第6章 要 約

1. FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ抗体を用いた蛍光抗体法によって、ブリのリンパ球の細胞表面抗体を検出した結果、ブリのリンパ球にも細胞表面抗体を保有する細胞が認められた。また、この表面抗体保有細胞は cap 形成能および各種代謝阻害剤の cap 形成抑制試験から、ほ乳類の

Bリンパ球に類似した細胞ではないかと考えられる。

2. FITC 標識抗ブリ抗体ウサギ抗体を用いた蛍光抗体法によって、ブリの細胞内抗体保有細胞の検出を行った結果、細胞内抗体保有細胞は蛍光像から4種類のタイプに分けられることが明らかとなった。それらの染色形態の検討によって、4種類の細胞のうち1種類は pre-B 細胞、残りの3種類は抗体産生細胞に分類されるのではないかと考えられる。

3. FITC 標識抗ブリ胸腺リンパ球表面抗原ウサギ抗体を用いた蛍光抗体法によって、胸腺リンパ球表面抗原保有細胞の検出を行った結果、ブリのリンパ球にも胸腺リンパ球表面抗原を保有する細胞が存在することが明らかとなった。

4. ブリの表面抗体保有細胞および胸腺リンパ球表面抗原保有細胞の染色形態、貪食性、ナイロンウールの通過性および各種リンパ球芽球化因子に対する反応性を比較したところ、ブリの表面抗体保有細胞はほ乳類のBリンパ球に、胸腺リンパ球表面抗原保有細胞はほ乳類のTリンパ球に同定されることが明らかとなった。また、表面抗体保有細胞は胸腺リンパ球表面抗原を保有しているが、胸腺リンパ球細胞表面抗原だけを保有している細胞と比較して、機能は異なっていることが明らかとなった。

5. ブリの各種リンパ球、pre-B および抗体産生細胞の体内分布を検討したところ、Bリンパ球は肝臓および脾臓に、Tリンパ球は胸腺および頭腎部に、pre-B 細胞は肝臓および脾臓に、抗体産生細胞は頭腎および腎臓に多いことが明らかとなった。Bリンパ球の前駆細胞である pre-B 細胞が脾臓および肝臓に多いことから、ブリのBリンパ球は肝臓や脾臓で分化するのではないかと考えられる。

6. ブリの各種リンパ球および抗体産生細胞の免疫に伴う変化を調べたところ、ブリの体内では免疫1～2週間後に抗原結合Tリンパ球が出現し、ついで2週間後に頭腎中の抗体産生細胞数が最大となり、3～4週間後に血液中の抗体量が最大となり、その後抗原結合性Bリンパ球が増加することが明らかとなった。

7. リンパ球移入によるブリの類結節症に対する感染防御性の変化を調べたところ、感染耐化魚の頭腎リンパ球を類結節症未感染魚に移入すると感染防御性が高まることが明らかとなった。このことから、ブリの感染耐化魚の本症に感染防御性は頭腎に多いTリンパ球が関与するのではないかと考えられる。

8. ブリの好中球およびマクロファージを大量に採集するために、腹腔内浸出細胞の経時的変化を調べた。その結果、好中球の採集はプロテオーズペプトンおよび *P. piscicida* ホルマリン不活化菌体を腹腔内に接種したのち、12時間に、マクロファージの採集は接種後48～192時間に回収した腹腔内浸出細胞から行うのがよいと思われる。また、プロテオーズペプトンより *P. piscicida* ホルマリン不活化菌体を腹腔内に接種した区の方が腹腔内浸出細胞数は多かった。

9. 好中球やマクロファージは *P. piscicida* 菌体と血清の反応生成物に対して走化性を示した。しかし、この走化性は菌体の病原性が上昇するにつれて低下する傾向を示した。また、ブリの腹腔内を用いた細胞の集化性を調べたところ細胞の集化性は血清由来の走化性因子よりも頭腎リンパ球の培養上清の方が強いことが明らかとなった。

10. ブリの好中球およびマクロファージの貪食活性を調べたところ、ブリの好中球の貪食は血清のオプソニンがないと低かったが、マクロファージではオプソニンの有無に関わらず貪食が認められた。また、*P. piscicida* に対するマクロファージの貪食活性は感染耐化魚の頭腎リンパ球の培養上清によって上昇することが明らかとなった。

11. ブリの貪食細胞の *P. piscicida* に対する細胞内殺菌活性の測定法を検討した結果、次の方法がよいと思われる。ブリの貪食細胞に *P. piscicida* 生菌を貪食させたのち 100  $\mu\text{g/ml}$  のストレプトマイシンおよび 1,500 units/ml ペニシリン G を反応させる。そして、その反応液は比重を 1.077 に調製した Percoll 溶液に重層して、3,500 $\times$ g で 5 分間の遠心操作を行い、細胞外の生菌を除去する。貪食細胞は ML-15 を用いて洗浄したのち、一定量を取り出して 0.2% BL-25 加 15% 食塩水と等量混合して氷冷下で 15 分間反応させて貪食細胞を破壊する。この貪食細胞破壊液中の菌数を混積平板法によって測定する。

12. 好中球およびマクロファージの *P. piscicida* に対する細胞内殺菌活性を測定した結果、*P. piscicida* の強毒株に対する細胞内殺菌活性は好中球では認められなかったが感染耐化魚および 2 年魚のマクロファージでは認められた。また、頭腎マクロファージの細胞内殺菌活性は感染耐化魚の頭腎リンパ球の培養上清によって上昇する傾向が認められた。

13. 細胞性免疫機構の活性化能の高い *P. piscicida* の弱毒生菌から調製した浸漬法ワクチンの有効性をほかのワクチンと比較したところ、弱毒生菌を用いた浸漬法ワクチンの有効性が高いことが明らかとなった。このことから、本症の予防ワクチンには弱毒生菌から調製した浸漬法ワクチンが有効なのではないかと考えられた。

14. ブリの類結節症に対する有効性の高いワクチンを開発するために *P. piscicida* リボゾムワクチンをブリに接種して免疫し、有効性をほかの菌体抗原と比較した。その結果、リボゾムワクチン免疫魚はほかの免疫区と比較して、血清の抗体価やオプソニン活性は低かったが、頭腎細胞の貪食活性や実験的感染に対する感染防御性は最も高い値を示した。このことから、本症に対するリボゾムワクチンの有効性は貪食活性の上昇によるものではないかと考えられる。

15. 本症に対するホルマリン不活化菌体から調製した浸漬法ワクチンは実用的であるが、細胞性免疫機構の活性化能が低く感染防御効果が低いので、浸漬法ワクチンに免疫調節剤レバミゾールを併用することによって感染防御効果が上昇するかどうかを検討した。その結果、本ワクチンとレバミゾールを併用することによって、貪食細胞の活性化が認められ、有効性も上昇する傾向がみられた。

## 謝 辞

本研究をまとめるにあたり、始終御懇篤なご指導を賜わるとともに御校閲をいただいた恩師高知大学農学部楠田理一教授に深甚なる敬意を表します。また、研究遂行にあたり種々の有益なる御助言を賜わった愛媛大学農学部丹比邦保教授、高知大学農学部川合研児助教授および高知医科大学山元弘助教授に心から感謝申し上げます。さらに、本稿作製にあたって、御校閲ならびに御

指導をいただいた水産庁南西海区水産研究所資源増殖部部長月館潤一博士および介類増殖研究室長石岡宏子博士に深甚なる感謝の意を表します。高知大学海洋生物教育研究センターにおける研究遂行にあたっては、奥田哲男技官に種々の御助力をいただきました。ここに感謝の意を表します。野外試験にあたっては、高知県水産試験場増殖科主任研究員安藤裕章氏の御助力に負うところが大きく、その御厚情に対して心から感謝の意を表します。また、本研究遂行にあたって絶えず御協力をいただいたハンガリー科学アカデミーの Dr. Jozsef Sövényi, フランス INRA の Dr. Salati Fulvio および南西水研介類増殖研究室薄浩則研究員をはじめ、高知大学農学部水族病理学講座および高知医科大学免疫学講座の諸氏に感謝の意を表します。さらに、図表等の作製に御助力いただいた曾我梶枝さんおよび向井直美さんに記して厚くお礼を申し上げます。

## 文 献

- ABDOU, N. L., J. B. ALAVI and N. I. ABDOU, 1976: Human bone marrow lymphocytes: B and T cell precursors and subpopulations. *Blood*, **47**, 423-430.
- 安保 徹・山口 泰・熊谷勝雄, 1975: ヒトB細胞の表面免疫グロブリンに関する研究 (II). ——細胞親和性免疫グロブリンの解離と内因性表層免疫グロブリン保有細胞の検出——. *臨床免疫*, **7**, 385-389.
- 安保 徹, 山口 泰, 熊谷勝雄, 1975: ヒトB細胞の表面免疫グロブリンに関する研究 (III). ——リンパ球の酸性処理によって明らかになった B1, B2 細胞——. *臨床免疫*, **7**, 1187-1191.
- AHMED, A. I. SCHER, S. O. SHARROW, A. H. SMITH, W. E. PAUL, D. H. SACHS and K. W. SELL, 1977: B-lymphocytes heterogeneity: Development and characterization of an alloantiserum which distinguishes B-lymphocyte differentiation alloantigens. *J. Exp. Med.*, **145**, 101-110.
- AKAGAWA, K. S. and T. TOKUNAGA, 1985: Lack of binding of bacterial lipopolysaccharide to mouse lung macrophages and restration of binding by  $\gamma$ -interferon. *J. Exp. Med.*, **162**, 1444-1459.
- AKEDA, H., M. MITSUYAMA, K. TATSUKAWA, K. NOMOTO and K. TAKEYA, 1981: The synergistic contribution of macrophages and antibody to protection against *Salmonella typhimurium* during the early phase of infection. *J. Gen. Microbiol.*, **123**, 209-214.
- AMEND, D. F. and D. C. FENDER, 1976: Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solution: a model for vaccinating fish. *Science*, **192**, 793-794.
- ANDERSON, D. P. and B. MERCHANT, 1983: Flush exposure and injection immunization of rainbow trout to selected DNP conjugates. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 261-268.
- ANDERSON, D. P., B. S. ROBERTSON and O. W. DIXON, 1979: Cellular immune response in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson to *Yersinia ruckeri* O-antigen monitored by the passive haemolytic plaque assay test. *J. Fish Dis.*, **2**: 169-178.
- ANDERSON, D. P. and A. J. ROSS, 1972: Comparative study of hagerman red mouth disease oral bacterins. *Prog. Fish Cult.*, **34**, 226-228.
- ANDERSON, J., O. SJOBERG and G. MOLLER, 1972: Induction of immunoglobulin and antibody synthesis *in vitro* by lipopolysaccharides. *Eur. J. Immunol.*, **2**, 349-353.
- ANTIPA, R. and D. F. AMEND, 1977: Immunization of pacific salmon: comparison of intraperitoneal injection and hyperosmotic infiltration of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Res. Board Can.*, **34**, 203-208.
- ANTIPA, R., R. GOULD and D. F. AMEND, 1980: *Vibrio anguillarum* vaccination of sockeye salmon *Onchorynchus nerka* (Walbaum) by direct and hyperosmotic immersion. *J. Fish Dis.*, **3**, 161-165.
- 青木隆一, 1978: 最近のサルモネラ症. *感染症*, **8**, 161-168.
- 青木隆一, 1978: 感染と細胞性免疫. *Today's therapy*, '78特集“感染免疫”, 1-10.
- AOKI, T., T. KITAO, M. FUKUDOME, S. TAKAHASHI and S. EGUSA, 1984: Modification of the hyperosmotic infiltra-

- tion method of vaccination against vibriosis in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel. *J. Fish Dis.*, **2**, 149-156.
- AOKI, T. and T. KITAO, 1985: Detection of transferable R plasmids in strains of the fish pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida*. *J. Fish Dis.*, **4**, 345-350.
- AOKI, T., M. SAKAI, and S. TAKAHASHI, 1984: Protective immunity in Ayu, *Plecoglossus altivelis*, vaccinated by immersion with *Vibrio anguillarum*. *Fish. Pathol.*, **19**, 181-185.
- AUSTRARIAN, R., 1977: Prevention of pneumococcal infection by immunization with capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: Current status of polyvalent vaccines. *J. Infect. Dis.*, **136**, 38-42.
- AVTALION, R. R., 1981: Environmental control of the immune response in fish. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, **11**, 168-188.
- AVTALION, R. R. and R. SHAHRABANI, 1975: Studies on phagocytosis in fish I. *In vitro* uptake and killing of living *Staphylococcus aureus* by peripheral leucocytes of carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology*, **29**, 1181-1187.
- BACCARINI, M., S. HOCKERTZ, A. F. KIDERLEN and M. LOHMANN-MATTHES, 1988: Extracellular killing of *Leishmania promastigotes* and amastigotes by macrophage precursors derived from bone marrow culture. *J. Exp. Med.*, **167**, 1486-1492.
- BACH, F. H., 1966: One-way stimulation in mixed leucocyte culture. *Science*, **153**, 545-547.
- BANNER, C. R., J. S. ROHOVER and J. L. FRYER, 1982: A rapid method for labeling rabbit immunoglobulin with fluorescein for use in detection of fish pathogens. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **2**, 35-37.
- BELL, G. R., 1976: Preliminary observations on phagocytosis in the peripheral blood of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Pathol.*, **10**, 237-241.
- BENNER, R. and A. van OUDENAREN, 1976: Antibody formation in mouse bone marrow. *Immunology*, **30**, 49-57.
- BIELEK, E., 1981: Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell Tissue*, **2**, 27-43.
- BLANDEN, R. V., G. B. MACKANESS and F. M. COLLINS, 1966: Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. *J. Exp. Med.*, **124**, 585-600.
- BLAXHALL, P. C., 1981: A comparison of methods used for the separation of fish lymphocytes. *J. Fish Biol.*, **18**, 177-181.
- BLAXHALL, P. C., 1985: The separation and cultivation of fish lymphocytes. in: "Fish Immunology", (ed. by E. A. Ellis) Academic Press, London, 245-259.
- BLAXHALL, P. C. and K. W. DAISLEY, 1973: Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.*, **5**, 771-781.
- BLAZER, V. S., R. O. BENNETT and R. E. WOLKE, 1984: The cellular immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to sheep blood cells. *Dev. Comp. Immunol.*, **8**, 81-87.
- BOWERS, A. and J. B. ALEXANDER, 1981: Hyperosmotic infiltration: immunological demonstration of infiltrating bacteria in brown trout, *Salmo trutta* L., *J. Fish Biol.*, **18**, 9-13.
- BOYDEN, S., 1962: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.*, **115**, 453-466.
- BRADSHOW, C. M., L. W. CLEM, and M. M. SIGEL, 1969: Immunologic and immunochemical studies on the gar, *Lepisosteus platyrhincus*. I. Immune responses and characterization of antibody. *J. Immunol.*, **103**, 495-504.
- BRAUN-NESJE, R., K. BERTHEUSSEN, G. KAPLAN, and R. SELJELID, 1981: Salmonid macrophages: separation, *in vitro* culture and characterization. *J. Fish Dis.*, **4**, 141-151.
- BUCHMEIER, N. A. and R. D. SCHREIBER, 1985: Requirement of endogenous interferon- $\gamma$  production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7404-7408.
- BURROWS, P. D., J. F. KREARNEY, A. R. LAWTON and M. D. COOPER, 1978: Pre-B cells: Bone marrow persistence in anti- $\mu$ -suppressed mice, conversion to B lymphocytes, and recovery after destruction by cyclophosphamide. *J. Immunol.*, **120**, 1526-1531.
- CANNON, M. S., H. H. MOLLENHAUER, A. M. CANNON, T. E. EURELL and D. H. LEWIS, 1980: Ultrastructural localization of peroxidase activity in neutrophil leucocytes of *Ictalurus punctatus*. *Can. J. Zool.*, **58**, 1189-1143.
- CANNON, M. S., H. H. MOLLENHAUER, T. EURELL, D. H. LEWIS, A. M. CANNON, and C. TOMPKINS, 1980: An ultrastructural study of the leukocytes of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Morph.*, **164**, 1-23.

- CASPI, R. R., R. SHAHRABANI, and R. R. AVATALION, 1980: The cells involved in the immune response of fish: I. The separation and study of lymphocyte sub-populations in carp—a new approach. Elsevier/North Holland, Phylogeny of Immunological Memory, 131–142.
- CATTON, W. T., 1951: Blood cell formation in certain teleost fishes. *Blood*, **6**, 39–60.
- CHILLER, J. M., H. O. HODGINS, V. C. CHAMBERS, and R. S. WEISER, 1969: Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Immuno-competent cells in the spleen and anterior kidney. *J. Immunol.*, **102**, 1193–1201.
- CHILMONCZYK, S., 1978: In vitro stimulation by mitogens of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Ann. Immunol.*, **129**, 1, 3, 1978.
- CHILMONCZYK, S., 1982: Rainbow trout lymphoid organs: cellular effect of corticosteroids and anti-thymocyte serum. *Dev. Comp. Immunol.*, **6**, 271–280.
- CHILMONCZYK, S., and D. MONGE, 1980: Rainbow trout gill pillar cells: Demonstration of inert particle phagocytosis and involvement in viral infection. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **28**, 327–332.
- CLEM, L. W. and M. M. SIGEL, 1963: Comparative immunochemical and immunological reactions in marine fishes with soluble, viral and bacterial antigens. *Federation Proc.*, **22**, 1138–1144.
- CLINE, M. J., J. SPRENT, N. L. WARNER and A. W. HARRIS, 1972: Receptors for immunoglobulin on B lymphocytes and cells of a cultured plasma cell tumor. *J. Immunol.*, **108**, 1126–1128.
- CLINE, M. J., and M. A. SUMNER, 1972: Bone marrow macrophage precursors. I. Some functional characteristics of the early cells of the mouse macrophage series. *Blood*, **40**, 62–69.
- COHN, Z. A., M. D., and S. I. MORSE, 1959: Interactions between rabbit polymorphonuclear leucocytes and staphylococci. *J. Exp. Med.*, **110**, 419–443.
- COOPER, M. D., D. A. RAYMOND, M. A. SOUTH and R. A. GOOD, 1966: The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J. Exp. Med.*, **123**, 75–102.
- CORBEL, M. J., 1975: Immune response in fish. *J. Fish Biol.*, **7**, 539–563.
- COUTINHO, A., L. FORNI, F. MELCHERS and T. WATANABE, 1977: Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.*, **7**, 325–328.
- CROY, T. R. and D. F. AMEND, 1977: Immunization of sockeye salmon (*Onchorynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, **12**, 317–325.
- CUCHENS, M. A. and L. W. CLEM, 1977: Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effect of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cell. Immunol.*, **34**, 219–230.
- CUSHING, J. E., Jr., 1942: An effect of temperature upon antibody-production in fish. *J. Immunol.*, **45**, 123–126.
- DECODE, W., 1980: Measurement of mitogen stimulation of lymphocytes with a glucose consumption test. *J. Immunol. Methods*, **33**, 127–131.
- DOENHOFF, M. J., R. MUSALLAM, K. D. KEELER and D. W. DRESSER, 1979: Restricted heterogeneity of antibody synthesized by T-cell deprived mice. *Immunology*, **38**, 57–62.
- DUFF, D. C. B., 1942: The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *J. Immunol.*, **44**, 87–94.
- EGUIDIUS, E. C. and K. ANDERSON, 1979: Bath immunization—a practical and nonstressing method of vaccinating sea farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardsons against vibriosis. *J. Fish Dis.*, **2**, 405–410.
- ELLIS, A. E., 1976: Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.*, **8**, 143–156.
- ELLIS, A. E., 1977: The leucocytes of fish. *J. Fish Biol.*, **11**, 453–491.
- ELLIS, A. E., 1980: Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Dis.*, **3**, 413–426.
- ELLIS, A. E., A. L. S. MUNROE and R. J. ROBERTS, 1976: Defence mechanisms in fish I. A study of the phagocytic system and the fate of the intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J. Fish Biol.*, **8**, 67–78.
- ELLIS, A. E. and P. M. E. PARKHOUSE, 1975: Surface immunoglobulins on the lymphocytes of the skates, *Raja naevus*. *Eur. J. Immunol.*, **5**, 726–728.
- ELLIS, A. E. and M. de SOUSA, 1974: Phylogeny of the lymphoid system, I. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. *Eur. J. Immunol.*, **4**, 338–343.
- EMMERICH, F., R. F. RICHTER, and H. AMBROSIOUS, 1975: Immunoglobulin determinants on the surface of lym-

- phoid cells of carps. *Eur. J. Immunol.*, 5, 76-78.
- 遠藤 藤夫・小野沢 正人・浜口 昌巳・楠田 理一, 1987: 微細化によるオキシリン酸のブリにおけるバイオアベイラビリティの向上. *日水誌*, 53, 1711-1716.
- ESPARZA, I., D. MANNEL, A. RUPPEL, W. FALK and P. H. KRAMMER, 1987: Interferon r and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.*, 166, 589-594.
- ETLINGER, H. M., H. O. HODGINS, and J. M. CHILLER, 1976: Evolution of the lymphoid system II. Evidence for lymphocytes heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. *J. Immunol.*, 116, 1547-1552.
- ETLINGER, H. M., H. O. HODGINS and J. M. CHILLER, 1978: Evolution of the lymphoid system III. Morphological and functional consequences of mitogenic stimulation of rainbow trout lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 2, 263-276.
- EY, P. L., 1973: Immunoglobulin on the surface of sheep lymphocytes 1, Class and cellular distribution. *Eur. J. Immunol.*, 3, 37-43.
- FERGUSON, H. W., 1976: The ultrastructure of plaice (*Pleuronectes platessa*) leucocytes. *J. Fish Biol.*, 8, 139-142.
- FERGUSON, H. W., 1984: Renal portal phagocytosis of bacteria in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson): ultrastructural observations. *Can. J. Zool.*, 62, 2505-2511.
- FINSTAD, J., B. W. PAPERMASTER, and R. A. GOOD, 1964: Evolution of the immune response. II. Morphologic studies on the origin of the thymus and organized lymphoid tissue. *Lab. Invest.*, 13(5), 490-512.
- FINN, J. P. and N. O. NIELSEN, 1971: The inflammatory response of rainbow trout. *J. fish Biol.*, 3, 463-478.
- FINN, J. P. and N. O. NIELSEN, 1971: The effect of temperature variation on the inflammatory response of rainbow trout. *J. Pathol.*, 105, 257-268.
- FLETCHER, T. C. and A. WHITE, 1973: Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa*, L.) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture*, 1, 417-428.
- FORNI, L., and A. COUTINHO, 1978: An antiserum which recognizes lipopolysaccharide-reactive B cells in the mouse. *Eur. J. Immunol.*, 8, 56-62.
- FRYER, J. L., J. S. ROHOVEC, G. L. TEBBIT, J. S. MCMICHAEL and K. S. PILCHER, 1976: Vaccination for control of infectious diseases in Pacific salmon. *Fish Pathol.*, 10, 155-164.
- FUJII, T., 1981: Antibody-enhanced phagocytosis of lamprey polymorpho-nuclear leucocytes against sheep erythrocytes. *Cell Tissue Res.*, 219, 41-51.
- 深山 宗・淀井 淳司・増田 徹, 1976: Fc レセプター陽性細胞と陰性細胞の分離. 免疫実験操作法, 1262-1265.
- 福田 穰・楠田 理一, 1980: 養殖ハマチにおける類結節症流行後の抗体産生と血清タンパクの変化. *日水誌*, 46, 1310-1315.
- 福田 穰・楠田 理一, 1981: 養殖ハマチにおける類結節症に対する受動免疫について. *魚病研究*, 16, 85-89.
- FUKUDA, Y. and KUSUDA, 1981: Acquired antibody against pseudotuberculosis in yellowtail. *Fish Pathol.*, 15, 263-269.
- 福田 穰・楠田 理一, 1981: 各種投与方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, 147-150.
- 福田 穰・楠田 理一, 1982: *Pasteurella piscicida* で免疫したハマチの血清中における沈降抗体の検出と特性. *魚病研究*, 17, 125-127.
- 福田 穰・楠田 理一, 1982: ハマチ免疫グロブリンの精製と特性. *日水誌*, 48, 921-926.
- FUKUDA, Y. and R. KUSUDA, 1985: Vaccination of yellowtail against pseudotuberculosis. *Fish Pathol.*, 20, 421-425.
- FUKUI, H., Y. FUJIKARA and T. KANO, 1987: In vitro and in vivo antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens. *Fish Pathol.*, 201-207.
- GARDNER, G. R. and P. P. YEVICH, 1969: Studies on the blood morphology of three estuarine cyprinodontiform fishes. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 26, 433-447.
- GENKEL, F. W., E. B. MUNISWINKEL, B. MERCHANT, E. F. LIZZIO, O. W. DIXON and D. P. ANDERSON, 1985:

- Temperature comparisons for antibody production *in vitro* by plaque-forming cells from trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), and mica. *J. Fish Biol.*, **27**, 265-272.
- GHEBREHIWET, B. and H. J. MULLER-EBERHARD, 1979: C3e: An acidic fragment of human C3 with leukocytosis-inducing activity. *J. Immunol.*, **123**, 616-621.
- GOLAY, J. T., 1986: Functional B-lymphocytes surface antigens. *Immunology*, **59**, 1-5.
- GONGGRUP, R., P. W. VOLLEBERG, P. J. M. R. LEMMENS and C. P. A. van BOVEN, 1981: Evidence for the presence of lipopolysaccharide in ribonuclease-sensitive ribosomal vaccine of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, **31**(3), 896-905.
- GOOD, R. A. and J. FINSTAD, 1964: Phylogeny of immune reactions. Immunological capacity of polydon and other fishes. *Fed. PROC.*, **23**, 285.
- GOSTING, L., D. M. MIRANDO, and R. W. GOULD, 1981: Antigen-binding cells in the peripheral blood of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* Walbaum, induced by immersion or intraperitoneal injection of *Vibrio anguillarum* bacterin. *J. Fish Biol.*, **19**, 83-86.
- GOULD, R. W., P. J. O'LEARY, R. L. GARRISON, J. S. ROHOVEC and J. L. FRYER, 1978: Spray vaccination: A method for the immunization of fish. *Fish Pathol.*, **13**, 63-68.
- GRAVES, S. S., D. L. EVANS and D. L. DAWE, 1984: Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Immunol.*, **134**, 78-85.
- GREGORY, R. L., 1986: Microbial ribosome vaccine. *Rev. Infect. Dis.*, **8**(2), 208-217.
- GRIFFIN, B. R., 1983: Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 253-259.
- GRIFFIN, B. R., 1984: Random and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) Leukocytes: Activation by antibody, complement, and normal serum components. *Dev. Comp. Immunol.*, **8**, 589-597.
- GUMBINER, C., P. Y. PATERSON, G. P. YOUmans and A. E. YOUmans, 1973: Adjuvanticity of Mycobacterial RNA and poly A: U for induction of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *J. Immunol.*, **110**(1), 309-313.
- HAIN, H. and KAUFMANN, S. H. E., 1981: The role of cell-mediated immunity in bacterial infection. *Rev. Infect. Dis.*, **3**, 1221-1235.
- HAMAGUCHI, M. and R. KUSUDA, 1988: The efficacy of various cultivation periods on the efficacy of formalin killed cell vaccine of *Pasteurella piscicida* in yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1847.
- 浜口昌巳・楠田理一, 1988: 蛍光抗体法により検出されるブリの表面抗体保有細胞. 魚病研究, **23**, 257-262.
- HAMAGUCHI, M. and R. KUSUDA, 1989: Field testing of *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin against pseudotuberculosis in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Mar. Sci. Fish., Kochi Univ.* **11**, 11-16.
- 浜口昌巳・村岡愛一郎・田中卓史・楠田理一, 1989: ブリ貪食細胞の *Pasteurella piscicida* に対する細胞内殺菌能の測定法. 日水誌, **55**, 971-977.
- 浜口昌巳・田中卓史・楠田理一, 1989: ブリの腹腔内浸出細胞からの好中球およびマクロファージの採取. 日水誌, **55**, 1511-1515.
- HAMMERLING, U. and K. RAJESKY, 1971: Evidence for surface-associated immunoglobulin on T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **1**, 447-452.
- HANDA, T., M. MITSUYAMA, Y. WATANABE, T. KOGA and K. NOMOTO, 1987: A significant role of the macrophage accumulation induced by MCF in the protection of mice against *Listeria monocytogenes in vivo*. *Cell. Immunol.*, **106**, 303-342.
- HARREL, L. W., H. M. ETRINGER and H. O. HODGINS, 1976: Humoral factor important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. 2. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. *Aquaculture*, **7**, 363-370.
- HAYASHI, H., M. HONDA, Y. SHIMOKAWA and M. HIRASHIMA, 1984: Chemotactic factors associated with leukocyte emigration in immune tissue injury: their separation, characterization, and functional specificity. In "International Review of Cytology", (ed. by G. H. BOURNE and J. F. DANIELLI), Vol. 89 Academic Press, New York, pp. 179-250.
- 畑井喜司雄, 1972: 魚における血流中接種細菌の動態に関する研究—II—. ウナギの血流中における *Aeromo-*



- nas 菌の消長に伴う白血球の変動. 魚病研究, 7, 34-43.
- HECKMAN, J. R., F. W. ALLENDORF, and J. E. WRIGHT, 1971: Trout leukocytes: Growth in oxygenated cultures. *Science*, **173**, 246-247.
- HJUMANS, W., H. R. E. SHUIT and F. KLEIN, 1969: An immunofluorescence procedure for the detection of intracellular immunoglobulins. *Clin. exp. Immunol.*, **4**, 457-472.
- HOOD, L., and J. PAHL, 1974: The immune system: A model for differentiation in higher organisms. *Advances in Immunol.*, **14**, 291-316.
- HORWITZ, M., 1987: Characterization of avirulent mutant *Legionella pneumophila* that survive but do not multiply within human monocytes. *J. Exp. Med.*, **166**, 1310-1328.
- HOSONO, M. and S. Muramatsu, 1972: Use of 2-mercaptoethanol for distinguishing between IgM and IgG antibody-producing cells of mice immunized with bovine globulin. *J. Immunol.*, **109**, 857-862.
- 細野正道・村松 繁, 1973: 抗原被覆赤血球を用いる溶血ブランク法, 免疫実験操作法 A. 499-507.
- HUBER, B., R. K. GERSHON and H. CANTOR, 1977: Identification of A B-cell surface structure involved in antigen-dependent triggering: absence of this structure on B cells from CBA/N mutant mice. *J. Exp. Med.*, **145**, 10-20.
- HIDA, T. and H. WAKABAYASHI, 1988: Chemotactic and leucocytosis-inducing activities of eel complement. *Fish Pathol.*, **23**, 55-58.
- 池田和夫, 1978: *Aeromonas salmonicida* の死菌ならびに生菌に対するニジマスの免疫応答の比較. 淡水研報, **28**, 47-53.
- 池田弥生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎, 1986: 「魚類血液図鑑, 緑書房, 東京」188-191.
- 今西二郎・岸田綱太郎, 1978: インターフェロン研究の現況. 感染症, **8**, 121-128.
- INGRAM, G. A., 1985: The immune response of brown trout, *Salmo trutta* to sheep and human 'o' erythrocytes. in: "Fish Immunology" (ed. by A. E. ELLIS), pp. 157-170., Academic Press, London.
- 猪子恵司・糸賀 敬, 1974: o-トリジン使用による白血球 Peroxidase 反応の検討. 九血会誌, **24**, 1-6.
- 伊丹利明・楠田理一, 1980: 養殖アユのピブリオ病に対する噴霧ワクチンの研究—I. ワクチンのペントナイト添加と調整の必要性. 日水誌, **46**(5), 533-536.
- 伊丹利明・楠田理一, 1980: 養殖アユのピブリオ病に対する噴霧ワクチンの研究—II. ワクチンの持続性ならびに製法による有効性の差異. 日水会誌, **46**, 699-703.
- 入江 亮, 1932: 鮎白血球ノ分類, 遊走速度, 並ニ貪食性ニ就テ. 十全会雑誌, **37**, 1605-1622.
- JACHERTS, D. and J. DRESCHER, 1970: Antibody response in rhesus monkeys and guinea pigs to inoculation with RNA derived from antigenically stimulated cell-free systems. *J. Immunol.*, **104**(3), 746-752.
- JANSSEN, P. A. J., 1976: The levamisole story. *Progress Research*, **20**, 347-383.
- JANSSEN, W. A. and M. J. SURGALLA, 1968: Morphology, physiology and serology of *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Rocucc-americanus*). *J. Bacteriol.*, **96**, 1606-1610.
- JENTZ, P., C. T. CHOU, I. SZYMANSKA, R. R. ALCALA, S. DUBISKI, and B. CINADER, 1979: Immunoglobulin synthesis by thymus B cells. *Immunology*, **38**, 275-282.
- JOHNSON, G. M., D. A. LEE, W. E. REGELMAN, E. D. GRAY, G. PETERS and P. G. QUIE, 1986: Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime, **54**, 13-20.
- 神代まさ俊, 1955: 魚類の白血球に関する研究. 京都大学医学部解剖学第2講座論文集, **3**, 1-43.
- KALLMAN, K. D. and N. GXURDEN, 1958: *Ann. NY. Acad. Sci.*, **73**, 599-601.
- KAJITA, Y., M. SAKAI, S. ATSUTA and M. KOBAYASHI, 1990: The immuno-modulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.*, **25**, 93-98.
- 加納康彦, 1980: 血液細胞の分離. 臨床病理, **29**, 55-63.
- 笠倉新平, 1987: 炎症とサイトカイン, 日本炎症学会編, 13-20, 日本医学館.
- 笠原和恵, 1982: 日常検査としてのTリンパ球・Bリンパ球. 近代出版, 37-54.
- 香取 信, 室田誠逸, 山本尚三, 1988: 講座 プロスタグランジン3. "炎症・アレルギー・免疫・がん", 東京化学同人.
- KAUFMANN, S. H. E., 1984: T cell clones and their products: experimental clues for the immunoprophylaxis and immunotherapy of intracellular bacterial infections. *Infection*, **12**, 124-129.
- 川合研児・楠田理一, 1983: アユのピブリオ病に対する *Vibrio anguillarum* の抽出リポ多糖経口ワクチンの効果, 日水誌, **49**(4), 511-514.

- 河合 忠, 1970: リンパ球幼若化現象の検索. 臨床検査, 14, 1422-1428.
- 河原栄二郎・楠田理一, 1988: プリに浸漬投与した *Pasteurella piscicida* 各種抗原の組織内分布. 日水誌, 54, 1101-1105.
- 神原 武・上田啓司, 1979: 食細胞の走化性因子. 臨床免疫, 14, 951-961.
- KELLER, H. U., P. C. WILKINSON, M. ABERCROMBIE, E. L. BECKER, J. G. HIRSH, M. F. MILLER, W. S. RAMSEY and S. H. ZIGMOND, 1977: A proposal for the definition of terms related to locomotion of leucocytes and other cells. *Cil. Exp. Immunol.*, 27, 377-380.
- 木村正雄・北尾忠利, 1971: 類結節症の原因菌について. 魚病研究, 6, 8-14.
- KITA, E., 1976: Protective antigens of ribosomal fractions in typhoid infection of mice. *J. Nara Med. Ass.*, 27, 217-228.
- KITAO, T. and M. KIMURA, 1974: Rapid diagnosis of pseudotuberculosis in yellowtail by means of the fluorescent antibody technique. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 40, 889-893.
- KITAO, T. and T. YOSHIDA, 1986: Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Vet. Immun. Immunopathol.*, 12, 287-291.
- 北尾忠利・中内良介・斉藤雷太・田中一郎, 1989: アモキシシリンの魚病細菌に対する試験管内抗菌活性. 魚病研究, 24, 83-87.
- 小林陽之助, 1978: 感染と白血球走化性. 感染症, 8, 19-23.
- KOIKE, Y., Y. KUWAHARA and H. FUJIWARA, 1975: Characterization of "*Pasteurella*" *piscicida* isolated from white perch and cultured yellowtail. *Japan J. Microbiol.*, 19, 241-247.
- 小島荘明, 1977: 寄生虫と免疫. 感染症, 7, 1-8.
- 河野 均, 1980: ブドウ糖消費試験を応用したリンパ球芽球化反応の測定. 臨床病理, 28 (補冊), 27.
- KRAWINKEL, U. and K. RAJEWSKY, 1976: Specific enrichment of antigen-binding receptors from sensitized murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 6, 529-536.
- KRUGER, G. J. and S. Z. SPIESEL, 1975: Stimulation of B-lymphocytes by endotoxin: Reactions of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing TT thymus grafts. *J. Immunol.*, 108, 1088-1091.
- 窪田三郎・木村正雄・江草周三, 1970a: 養殖ブリ稚魚の細菌性類結節症の研究—1. 病徴学および病理組織学, 魚病研究, 4, 111-118.
- 窪田三郎・木村正雄・江草周三, 1970b: 養殖ブリ稚魚の細菌性類結節症の研究—2. 結節形成の機構, 魚病研究, 5, 31-34.
- 窪田三郎・木村正雄・江草周三, 1972: 養殖ブリ稚魚の細菌性類結節症の研究—3. 結節および菌集落に関する知見, 魚病研究, 6, 69-72.
- KUMAGAI, K., T. ABO, T. SEKIZAWA and M. SASAKI, 1975: Studies of surface immunoglobulins on human B lymphocytes 1. Dissociation of cell-bound immunoglobulins with Acid pH or at 37°C. *J. Immunol.*, 115, 982-987.
- 熊谷勝男・安保 徹・関沢 剛, 1977: B細胞表面免疫グロブリンの検出法. 免疫実験操作法, 1817-1815.
- 栗林景容・高林有道・増田 徹, 1976: Nylon wool column によるマウスT細胞の濃縮. 免疫実験操作法, 1258-1261.
- 楠田理一・浜口昌巳, 1987: プリ類結節症に対する浸漬法ワクチンの処理回数と経口法併用による有効性の比較. 日水誌, 53, 1005-1008.
- KUSUDA, R. and M. HAMAGUCHI, 1988: The efficacy of attenuated live bacterin of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in yellowtail. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 8, 51-52.
- KUSUDA, R. and Y. IKEDA, 1987: Studies on classification of eel leucocytes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 205-209.
- 楠田理一・井上喜久治, 1976: 養殖ハマチの類結節症に対するアンピシリンの水産薬としての応用に関する研究—1. 類結節症に対する *in vitro* での抗菌力, 耐性獲得および耐性消失. 日水誌, 42, 969-973.
- 楠田理一・井上喜久治, 1977: 養殖ハマチの類結節症に対するアンピシリンの水産薬としての応用に関する研究—2. 経口投与によるハマチへの吸収, 排せつ, 残留および安全性. 高知大学学術研究報告書, 26, 1-6.
- 楠田理一・井上喜久治, 1977: 養殖ハマチの類結節症に対するアンピシリンの水産薬としての応用に関する研究—3. ハマチ類結節症人為感染魚ならびに自然感染魚に対する治療効果. 魚病研究, 12, 7-10.

- 楠田理一・板岡 睦・川合研児, 1988: 1984年および1985年に養殖ブリから分離された *Pasteurella piscicida* の薬剤感受性. 日水誌, **54**, 1521-1526.
- 楠田理一・川合研児・松井隆史, 1978: 養殖ハマチの細菌性類結節症の原因菌に関する研究—II. 血清学的性状による種の同定. 魚病研究, **13**, 79-83.
- 楠田理一・福田 穰, 1980: *Pasteurella piscicida* で免疫したハマチの凝集抗体価と血清タンパクの変化. 日水誌, **46**(7), 801-807.
- 楠田理一・川合研児・安部和智, 1986: 1978年から1982年までの間に養殖ブリから分離された *Pasteurella piscicida* の薬剤感受性. 高知大・海洋生物研報, **8**, 15-23.
- 楠田理一・木村喜洋・浜口昌巳, 1989: *Nocardia kampfchi* で免疫したブリの血液中および腹腔内の白血球の動態. 日水誌, **55**, 1183-1188.
- 楠田理一・二宮 学・浜口昌巳・村岡愛一郎, 1988: ブリ類結節症に対する *Pasteurella piscicida* リボゾームワクチンの有効性. 魚病研究, **23**, 191-196.
- 楠田理一・杉浦浩義・川合研児, 1990: 1986年から1988年に養殖ブリから分離された *Pasteurella piscicida* の薬剤感受性. 日水誌, 239-242.
- 楠田理一・高木修作, 1983: 養殖ハマチの連鎖球菌感染症魚の抗体産生能. 高知大 海洋生物研報, **5**, 2-28.
- 楠田理一・田中卓史, 1988: *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.
- 楠田理一・山岡正興, 1972: 養殖ハマチの細菌性類結節症の原因菌に関する研究—I. 形態学的ならびに生化学的性状による種の同定. 日水誌, **38**, 1325-1332.
- LAMERS, C. H. J., M. J. H. DeHAAS, and W. B. VanMUISWINKEL, 1985: The reaction of the immune system of fish to vaccination: Development of immunological memory in carp, *Cyprinus carpio* L., following direct immersion in *Aeromonas Hydrophila* bacterin. *J. Fish Dis.*, **8**, 253-262.
- LEFFORD, M. J., D. D. MCGREGOR and G. B. MACKANESS, 1973: Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in rats. *Infect. Immun.*, **8**, 182-189.
- LEIJH, P. C. J., M. T. van den BARSELAAR, T. L. van ZWET, M. R. DAHA and R. van FURTH, 1979: Requirement of extracellular complement and immunoglobulin for intracellular killing of micro-organisms by human monocytes. *J. Clin. Invest.*, **63**, 772-784.
- LESTER, R. J. G. and J. BUDD, 1979: Some changes in blood cells of diseased coho salmon. *Can. J. Zool.*, **57**, 1458-1464.
- LEWIS, D. H., T. E. EURELL, M. S. CANNON, and L. C. GRUMBIES, 1979: T and B cell analogues from peripheral blood of immune channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish Biol.*, **14**, 31-37.
- LIBERMAN, M. M., D. C. MCKISSOCK and G. L. WRIGHT, 1979: Passive immunization against *Pseudomonas* with a ribosomal vaccine induced immune serum and immunoglobulin fractions. *Infect. Immun.*, **23**, 509-521.
- LIPSKY, P. E. and A. ROSENTHAL, 1973: Macrophage-lymphocyte interaction. 1. Characteristics of the antigen-independent-binding of guinea pig thymocytes and lymphocytes to syngeneic macrophages. *J. Exp. Med.*, **138**, 900-924.
- LOBB, C. J. and L. W. CLEM, 1982: Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. *Dev. Comp. Immunol.*, **6**, 473-479.
- LOKEN, M. R. and A. M. STALL, 1982: Flowcytometry as an analytical and preparative tool in immunology. *J. Immunol. Methods*, **50**, 85-112.
- LOOR, F., L. FORNI, and B. PERNIS, 1972: The dynamic state of the lymphocyte membrane. Factors affecting the distribution and turnover of surface immunoglobulins. *Eur. J. Immunol.*, **2**, 203-212.
- MACARTHUR, J. I., T. C. FLETCHER, B. J. S. PIRIE, R. J. L. DAVIDSON and A. W. THOMSON, 1984: Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. *J. Fish Biol.*, **25**, 69-81.
- MACARTHUR, J. I., A. W. THOMSON and T. C. FLETCHER, 1985: Aspects of leucocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa* L., *J. Fish Biol.*, **27**, 667-676.
- MACHAFFIE, R. A. et al., 1967: The effect of hemoagglutinin upon glucose catabolism in lymphocytes. *Blood*, **29**, 640-646.
- MAHAJAN, C. L. and J. S. DHEER, 1979: Cell type in the peripheral blood of an air-breathing fish *Channa punctata*.

- tatus. *J. Fish Biol.*, **14**, 481-487.
- MATSUBARA, A., MIHARA, S. and KUSUDA, R., 1985: Quantitation of yellowtail serum antibody specific for *P. piscicida* LPS using the ELISA technique. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 927-932.
- 松田 正, 1937: 生体外ニ於ケル白血球ノ細菌貪食機能ニ関スル研究. 其27 総括編. 十全会雑誌, **42**, 3703-3720.
- 松村治雄・寺田泰比古・中野昌康, 1986: Triton X-100 を用いてのマウス腹腔内マクロファージ内の生菌数定量法. 日細菌誌, **41**, 619-621.
- MASTUO, K., TAKEYA, K., NOMOTO, S., SHIMOTORI and R. TERASAKA, 1981: T-cell-independent activation of macrophages by viable BCG in tumor-bearing mice. *Cell. Immunol.*, **57**, 293-306.
- MCCARTY, D. H., J. P. STEVENSON and M. S. ROBERTS, 1973: Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). I. The Kamloops variety. *J. Fish Biol.*, **5**, 1-8.
- MCGREGOR, D. D. and F. T. KOSTER, 1971: The mediator of cellular immunity 4. Cooperation between lymphocytes and mononuclear phagocytes. *Cell. Immunol.*, **2**, 317-325.
- MCKINNEY, E. C., S. B. SMITH, H. G. HAINES, and M. M. SIGEL, 1979: Phagocytosis by fish cells. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **21**(2), 89-95.
- MEISS, H. K. and M. FISHMAN, 1972: Formation of antibody in rabbit spleen cell cultures stimulated with immunogenic RNA. *J. Immunol.*, **108**(5), 1172-1178.
- MIAKE, Y. S., T. MATSUMOTO, K. NOMOTO and K. TAKEYA, 1980: Relationship between non-specific activity of macrophages and immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Immunol.*, **40**, 295-301.
- MILLER, D. R. and S. BECK, 1975: Polymorphonuclear leucocytes phagocytosis: quantitation by a rapid radioactive method. *J. Clin. Invest.*, **86**, 344-348.
- MITSUYAMA, M., K. NOMOTO and K. TAKEYA, 1982: Direct correlation between delayed footpad reaction and resistance to local bacterial infection. *Infect. Immun.*, **36**, 72-79.
- MITSUYAMA, M., K. TAKEYA, K. NOMOTO, and S. SHIMOTORI, 1978: Three face of phagocyte contribution to resistance against *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, **106**, 165-171.
- MIYATA, M., M. MITSUYAMA, N. OGATA, K. NOMOTO, and K. TAKEYA, 1982: Two steps in the generation of acquired cellular resistance against *Listeria monocytogenes*: accumulation and activation of macrophages. *Immunol.*, **47**, 247-253.
- MIYATA, M., M. MITSUYAMA, N. OGATA and K. NOMOTO, 1984: Protective mechanisms against infection by *Listeria monocytogenes*: accumulation and activation of macrophages. *J. Clin. Lab. Immunol.*, **13**, 111-115.
- 森 貞朗, 1981: キンギョの異物貪食系に関する研究—II. 白血球のペルオキシダーゼ反応と食作用について. 魚病研究, **16**(3), 91-96.
- 森 貞朗, 1981: 魚類血液からの白血球分離について. 魚病研究, **16**(3), 145-149.
- MORROW, W. J. W. and A. PULSFORD, 1980: Identification of peripheral blood leucocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) by electron microscopy. *J. Fish Biol.*, **17**, 461-475.
- MORITOMO, T., T. IIDA and H. WAKABAYASHI, 1988: Chemiluminescence of neutrophils isolated from peripheral blood of eel. *Fish Pathol.*, **23**, 49-53.
- MURPHY, T. F. and M. A. APICELLA, 1985: Antigenic heterogeneity of outer membrane proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* is a basis for a serotyping system. *Infect. Immun.*, **50**(1), 15-21.
- 長村俊彦・伊沢久夫, 1981: 各種動物の免疫応答 (魚類). 獣医領域における免疫学 (伊藤久雄・清水悠紀臣・内貴正治・見上彪編). 近代出版, 東京, pp. 397-413.
- NAGAMURA, Y. and H. WAKABAYASHI, 1983: Periodic acid-Schiff reaction of neutrophils of the eel, *Anguilla japonica*. *Fish Pathol.*, **17**, 269-280.
- 長村吉晃・若林久嗣, 1985a: ウナギ血液からの好中球の分離法. 魚病研究, **20**(1), 65-66.
- NAGAMURA, Y. and H. WAKABAYASHI, 1985b: Changes in glycogen content of neutrophils in eel, *Anguilla japonica*, by bacterial infection. *Fish Pathology*, **20**, 389-394.
- 中川俊郎, 1979: 感染防御における抗体の役割. 感染症, **9**, 153-159.
- 中西照幸, 1983: カサゴ *Sebastes marmoratus* の免疫応答—I. ヒツジ赤血球に対する抗体産生および溶血プラーク形成細胞の応答について. 養殖研報, **3**, 81-89.
- 中西照幸, 1983: カサゴ *Sebastes marmoratus* の免疫応答—II. ヒツジ赤血球に対する抗体産生および溶血プラーク形成細胞の応答に及ぼす水温の影響について. 養殖研報, **4**, 121-129.

- 中内良介・宮崎照雄, 1988: アモキシシリンのブリに対する安全性. 魚病研究, **23**, 251-255. 永山在明, 1988: 食細胞の機能と感染防御. 感染症, **18**, 177-184.
- 野田明孝・浅川瑞穂, 1974: マクロファージ. 感染症, **4**, 81-87.
- 野竹邦弘・小林 進・吉川和宏・坂井俊之助, 1978: ナイロンウールカラム簡易作製法. 免疫細胞 I, 139-144.
- 野本亀久雄, 1981: マクロファージの殺菌能. 臨床免疫, **13**, 403-407.
- 野本亀久雄, 1982: 生体防御機構の変動と感染症成立のかかわりあい. 日細菌誌, **37**(2), 479-495.
- 野本亀久雄, 1988: PMN, M $\phi$ の食菌と生体防御. 日細菌誌, **43**(5), 899-910.
- NOMOTO, K., Y. SHIMAMOTO, K. TANIGUCHI, C. KUBO, H. KAWAUCHI, M. MITSUYAMA, and K. TAKEYA, 1983: Development of immunity against *Listeria monocytogenes* in athymic nude versus neonatally thymectomised mice. *Cell. Immunol.*, **75**, 134-143.
- 尾花芳樹・西野武志・谷野輝雄, 1987: 食細胞機能に及ぼす *Acinetobacter calcoaceticus* の産生する Slime の影響について. 感染症学雑誌, **61**, 1059-1063.
- 尾形信雄, 1983: 緑膿菌感染防御機構の解析. 福岡医誌, **74**, 335-350.
- 奥村康編, 1985: 今日の免疫学. 南江堂.
- OJIMA, Y., S. HITOTSUMACHI, and M. HAYASHI, 1970: A blood culture method for fish chromosomes. *Japan J. Geneticus*, **45**, 161-162.
- O'MALLEY, J. A., NASSUBAUM-BLUMENSON, A., SHEEDY, D., GROSSMAYER, B. J. and LE, J., 1982: Identificatin of T cell subset that produces human  $\alpha$ -interferon. *J. Immunol.*, **128**, 2522-2526.
- O'NEILL, J. G., 1985: An *in vitro* study of polymorphonuclear phagocytosis and the effect of temperature. In: Fish immunology. Eds.: M. J. Manning and M. F. Tatner. Academic Press, London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Montreal, Sidney, Tokyo, pp. 47-56.
- ORME, T., 1988: The T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Twenty-third joint research conference on tuberculosis. *US-Japan Cooperative Medical Science Program*. 135-139.
- ORME, I. M. and F. M. COLLINS, 1983: Resistance of various strains of *Mycobacterium* to killing by activated macrophages in vivo. *J. Immunol.*, **131**, 1452-1454.
- ORTIZ-MUNIZ, G. and M. M. SIGEL, 1971: Antibody synthesis in lymphoid organs of two marine teleosts. *J. Ret. Endo. Soc.* **9**: 42-52.
- OSMOND, D., F. MELCHERS and C. J. PAIGE, 1984: Pre-B cells in mouse bone marrow: *In vitro* maturation of peanut agglutinin binding B lymphocytes precursors seperated from bone marrow by fluorescence-activated cell sorting. *J. Immunol.*, **133**, 86-90.
- OWEN, J. T., D. E. WRIGHT, S. HABU, M. C. RAFF and M. D. COOPER, 1977: Studies on the generation of B-lymphocytes in fetal liver and bone marrow. *J. Immunol.*, **118**, 2067-2072.
- PARASKEVAS, F., S-T. LEE, K. B. ORR, and L. G. ISRAELS, 1972: A Receptor for Fc on Mouse B-lymphocytes. *J. Immunol.*, **108**, 1319-1327.
- PASQUIER, L. DU, N. WEISS and F. LOOR, 1972: Direct evidence for immuno-globulins on the surface of thymus lymphocytes of amphibian larvae. *Eur. J. Immunol.*, **2**, 366-370.
- PAYNE, N. R., and M. A. HORWITZ, 1987: Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J. Exp. med.*, **166**, 1377-1389.
- PEARL, E. R., L. B. VOGLER, A. J. OKOS, W. M. CRIST, A. R. LAWTON and M. D. COOPER, 1978: B lymphocytes recursors in human bone marrow: An analysis of normal individuals and patients with antibody-deficincystates. *J. Immunol.*, **120**, 1169-1175.
- PERKINS, K. A., and B. M. CHAIN, 1986: Presentation by peritoneal macrophages: modulation by antibody-antigen complexes. *Immunology*, **58**, 15-21.
- PHROMSUTHIRAK, M., 1977: Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. *Fish Pathol.*, **11**, 193-206.
- PLATT-MILES, T. A. and K. ISHIZAKA, 1974: Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.*, **113**, 348.
- PONTIUS, H. and H. AMBROSIVS, 1972: Contribution to the immune biology of poikilothermic vertebrates. IX. Studies on the cellular mechanism of humoral reactions in perch (*Perca fluviatilis* L.). *Acta Biol. Med. Germ.* **29**: 319-339.

- PORTNOY, D. A., P. S. JACKS, and D. J. HINRICHS, 1988: Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.*, **167**, 1459-1471.
- POWDERLY, W. G., G. B. PIER and R. B. MARKHAM, 1986: T lymphocytes-mediated protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in granulocytopenic mice. *J. Clin. Invest.*, **78**, 375-380.
- QUIE, P. G., J. G. WHITE, B. HOLMES, and R. A. GOOD, 1967: *In vitro* bacterial capacity of human polymorphonuclear leukocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J. Clin. Invest.*, **46**, 668-679.
- RAFF, M. C., 1971: Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice. *Transpl. Revs.*, **6**, 52-80.
- RICE P. A. and D. L. KASPER, 1982: Characterization of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* that disseminate: Roles of blocking antibody and gonococcal outer membrane proteins. *J. Clin. Invest.*, **70**, 157-167.
- RUIKERS, G. T., E. M. H. FREDERIX-WOLTERS, and W. B. Van MUISWINKEL, 1980: The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Immunol.*, **41**, 91-97.
- RUIKERS, G. T. and W. B. Van MUISWINKEL, 1977: The immune system of cyprinid fish. The development of cellular and humoral responsiveness in the rosy barb (*Barbus conchoniensis*). in "Developmental Immunobiology" (eds. J. B. SOLOMON and J. D. HORTON), pp. 233-240. Elsevier, North-Holland, Amsterdam.
- RUIKERS, G. T., E. M. H. FREDERIX-WOLTERS and W. B. Van MUISWINKEL, 1980 The haemolytic plaque assay in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Immunol. Methods* **33**: 79-86.
- RUBEN, L. N., G. W. WARR, J. M. DECKER, and J. J. MARCHALONIS, 1977: Phylogenetic origins of immune recognition: Lymphoid heterogeneity and the hapten/carrier effect in the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell. Immunol.*, **31**, 266-283.
- 斎藤 厚・朝長昭光・門田淳一・平谷一人・福島喜代康・森 賢治・重野芳輝・河野 茂・広田正毅・原耕平・朝野和典・山口恵三・石井良和・市川正孝・高野邦雄, 1987: レジオネラに対する貪食細胞の反応. 感染症学雑誌, **61**(12), 1429-1442.
- 斉藤博士・須甲松信, 1984: マクロファージの検査法. 日本臨床, **42**, 1367-1374.
- SAILENDRI, K. and V. MUTHUKARPPAN, 1975: The immune response of the teleost, *Tilapia mossambica*, to soluble and cellular antigens. *J. exp. Zool.* **191**: 371-382.
- SAKAI, D. K., 1981: Blastogenic response of peripheral lymphocyte separated from rainbow trout to phytohemagglutinin, concanavalin A and pokeweed mitogen. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 1545-1550.
- SAKAI, D. K., 1982: Immunological roles of sensitive lymphocytes and resistant lymphocytes against cyclophosphamide in rainbow trout immune system reorganized by adoptive transfer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 1059-1064.
- SAKAI, D. K., 1981: Separation of lymphocytes from the peripheral blood of rainbow trout and goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 1281-1288.
- SAKAI, D. K., 1984: Tentative observation of cytotoxic circulating lymphocytes present in rainbow trout immunized with a cultured cell antigen. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**(3), 403-408.
- SAKAI, D. K., 1984: Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes. *J. Fish Dis.*, **7**, 29-38.
- SAKAI, M., T. AOKI, T. KITAO, J. S. ROHOVEC, and L. FRYER, 1984: Comparison of the cellular immune response of fish vaccinated by immersion and injection of *Vibrio anguillarum*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**(7), 1187-1192.
- 坂口薫雄・岸本忠三, 1979: 抗体産生のメカニズム. 感染症, **9**, 113-119.
- SAKEMI, T., A. KUROIWA, and K. NOMOTO, 1980: Effect of carrageenan on the induction of cell-mediated cytotoxic responses *in vivo*. *Immunology*, **12**, 75-81.
- SALATI, F., M. HAMAGUCHI and R. KUSUDA, 1987: Immune response of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol.*, **22**, 93-98.
- SALATI, F., Y. IKEDA and R. KUSUDA, 1987: Effect of *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide immunization on phagocytosis in the eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 201-204.
- SALATI, F., K. KAWAI and R. KUSUDA, 1983: Immuneresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol.*, **18**, 135-141.

- SALATI, F. and R. KUSUDA, 1986: Immune response of eel to *Edwardsiella tarda* lipid. *Fish Pathol.*, 21, 201-205.
- SCHWARTZ, R. H., A. YANO and W. E. PAUL, 1978: Interaction between antigen-presenting cells and primed T lymphocytes. *Immunological Rev.*, 40, 153-180.
- SCHWARTZMANN, S. and J. R. BORING, 1971: Anti-phagocytic effect of slime from a muoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 3, 762-767.
- 関沢 剛・佐々木睦男・熊谷勝男, 1975: ヒトB細胞の表面免疫グロブリンに関する研究 (1)—各種表面免疫グロブリンの染色性と染色像
- SECOMBES, C. J., 1983: Ontogeny of the immune system in carp (*Cyprinus carpio* L.), The appearance of antigenic determinations on lymphoid cells detected by mouse anti-carp thymocyte monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.*, 7, 455-464.
- SIGEL, M. M. and L. M. CLEM, 1965: Antibody response of fish to viral antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 126, 662-677.
- SILVEIRA, N. P. A., N. F. MENDES, M. E. A. TOLNAI, 1975: Tissue localization of two population of human lymphocytes distinguished by membrane receptors. *J. Immunol.*, 108, 1456-1460.
- SIMIZU, U. and S. EGUSA, 1972: A re-examination of the fish-pathogenic bacterium that had been reported as a *Pasteurella piscicida*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 38, 803-812.
- 新保敏和, 1978: リンパ球の機能検査とその意義. 感染症, 8, 173-178.
- SIWICKI, A., 1987: Immunomodulating activity of levamisole in spawners carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fish Biol.*, 31, Supplement.
- SIWICKI, A., 1989: Immunostimulating influence of levamisole nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 13, 87-91.
- SMITH, R. A. and N. J. BIGLEY, 1972: Ribonucleic acid-protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogens. *Infect. Immun.*, 6(3), 377-383.
- SMITH, A. M., M. POTTER and E. B. MERCHANT, 1967: Antibody-forming cells in the pronephros of the teleost *Lepomis macrochirus*. *J. Immunol.*, 99, 876-882.
- SNIEZKO, S. F., G. L. BULLOCK, E. HOLLIS and J. G. BOONE, 1964: *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.*, 88, 1814-1815.
- SNIESZKO, S. F., 1970: Immunization of fishes; a review. *J. Wildl. Dis.*, 6, 24-30.
- SONG, Y. L. and G. H. KOU, 1981: The immunoresponses of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella tarda* as studied by the immersion method. *Fish path.*, 15, 249-255.
- SOMMER, C. V. and J. M. BATOS, 1981: *In vitro* leukocyte migration assay in rainbow trout with a flexible silicone coverslip. *J. Comp. Pathol.*, 91, 443-445.
- SÖVÉNYI, J. F. and R. KUSUDA, 1987: Kinetics of *in vitro* phagocytosis by cells from head-kidney of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, 22, 83-92.
- 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.*, 45, 726-729.
- STEINMAN, R. M., G. KAPLAN, M. D. WITMER and Z. A. COHN, 1979: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers and maintenance *In vitro*. *J. Exp. Med.*, 149, 1-16.
- SUNBBARAO, B., D. E. MOSIER, A. AHMED, J. J. MOND, I. SCHER, and W. E. PAUL, 1979: Role of a nonimmunoglobulin cell surface determinant in the activation of B lymphocytes by thymus-independent antigens. *J. Exp. Med.*, 149, 495-506.
- SUZUKI, K., 1984: A light and electron microscope study on the phagocytosis of leucocytes in rockfish and rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50, 1305-1315.
- SUZUKI, Y., 1986: Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 1895-1899.
- SUZUKI, Y., 1986: Neutrophil chemotactic factor in eel blood plasma. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 811-816.
- SUZUKI, Y., 1988: Demonstration of heavy basophils in carp peripheral blood by Percoll density gradient centrifugation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1257.
- 鈴木 謙・日比谷京, 1988: コイの実験的炎症における白血球の動態. 魚病研究, 23, 179-184.

- TADA, T., T. TAKEMORI, K. OKUMURA, M. NONAKA, and T. TOKUHISA, 1978: Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: Independent and synergistic effects of Ia<sup>-</sup> and Ia<sup>+</sup> helper T cells. *J. Exp. Med.*, **147**, 446-458.
- TAKAHASHI, Y. and T. ENDO, 1987: Evaluation of the efficacy of an ultrafine preparation of oxolinic acid in the treatment of pseudo-tuberculosis in yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 2157-2162.
- TAKAHASHI, Y., T. ITAMI, A. NAKAGAWA, T. ABE, and Y. SUGA, 1990: Therapeutic effect of flumequine against pseudotuberculosis in cultured yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 223-227.
- TAKAHASHIMA, N., T. AOKI and T. KITAO, 1985: Epidemiological surveillance of drug-resistant strains of *Pasteurella piscicida*. *Fish Pathol.*, **20**, 209-217.
- TAKEYA, K., S. SHIMOTORI, T. TANIGUCHI, and K. NOMTO, 1977: Cellular mechanisms in the protection against infection by *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Gen. Microbiol.*, **100**, 373-379.
- TAN, J. S., C. WATANAKUNAKORN, and J. P. PHAJR, 1971: A Modified assay of neutrophil function: Use of lysostaphin to differentiate defective phagocytosis from impaired intracellular killing. *J. Lab. Clin. Med.*, **78**, 316-322.
- TANAKA, H., S. TSURU, and T. TOKUNAGA, 1981: Cytotoxic activity of Ia-positive macrophages enriched by fluorescence-activated cell sorting. *Immunology Letters*, **2**, 251-255.
- TAYLOR, R. B., P. H. DUFFUS, M. C. RAFF, and S. dePETRIS, 1971: Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nat. New Biol.*, **233**, 255-267.
- 谷山忠義・赤川清子, 1984: マクロファージの分化とマーカー. 免疫薬理, **2**, 325-331.
- TIZARD, I. R., 1971: Macrophage-cytophilic antibodies and the functions of macrophage-bound immunoglobulins. *Bacteriol. Rev.*, **35**, 365-378.
- 徳永徹他結核学会編, 1978: 細胞性免疫をめぐる. 結核, **53**, 601-612.
- 徳永 徹, 1980: BCG の抗腫瘍作用の機序. 結核, **55**, 351-357.
- 土屋達行, 1979: *Staphylococcus aureus* Cowan 1 株菌体を利用したリンパ球培養の検討. 臨床病理, **28**, 補冊, 91.
- 上田啓司・前田省三・神原 武, 1975: マクロファージ Chemotaxis の *In vitro* 測定法. 免疫実験操作法, 1365-1369.
- UNANUE, E. R., M. J. KARNOVSKY, and H. D. ENGERS, 1973: Ligand-induced movement of lymphocytes membrane macromolecules. III. Relationship between the formation and fate of anti-Ig-surface Ig complexes and cell metabolism. *J. Exp. Med.*, **137**, 674-675.
- UNANUE, E. R., W. D. PERKINS and M. J. KARNOVSKY, 1972: Ligand-induced movement of lymphocytes membrane macromolecules. I. Analysis by immunofluorescence and ultrastructural radioautography. *J. Exp. Med.*, **136**, 885-906.
- van FURTH, R., and Z. A. COHN, 1972: The mononuclear phagocyte system; a new classification of macrophage, monocytes and their precursor cells. *Bull. World Hlth Org.*, **46**, 845-852.
- Van GINKEL, F. W., W. B. Van MUISWINKEL, B. MERCHANT, E. F. LIZZIO, O. W. DIXON, and D. P. ANDERSON, 1985: Temperature comparisons for antibody production *in vitro* by plaque-forming cells from trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), and mice. *J. Fish Biol.*, **27**, 265-272.
- VENNEMAN, M. R. and L. J. BERRY, 1971a: Cellular mediated resistance induced with immunogenic preparations of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.*, **4**, 381-387.
- VENNEMAN, M. R. and L. J. BERRY, 1971b: Experimental salmonellosis: Differential passive transfer of immunity with serum and cells obtained from ribosomal and ribonucleic acid immunized mice. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **9**, 491-502.
- 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**, 207-211.
- WARNER, N. L., 1974: Membrane immunoglobulins and antigen receptors on B and T lymphocytes. *Adv. Immunol., Immunol.*, **19**, 67-72.
- WARD, P. A., H. G. REMOLD and J. R. DAVID, 1970: The production by antigen-stimulated lymphocytes of a leukotactic factor distinct from migration inhibitory factor. *Cell. Immunol.*, **1**, 162-174.
- WARDLE, C. S., 1971: New observations on the lymph system of the plaice *Pleuronectes platessa* and other teleosts. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **51**, 977-990.



- 渡辺慶一, 1983: 生体内マクロファージの形態. メディカルリサーチ, マクロファージの分化と機能, 1-29.
- WATSON, L. J., I. L. SHEMEISTER, and L. L. JACKSON, 1963: The haematology of goldfish, (*Carassius auratus*). *Cytologia*, **28**, 118-130.
- WEINREB, E. L., 1958: Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* irideus. I. Hematology: under normal and experimental conditions of inflammation. *Zoologica N. Y.*, **43**, 145-154.
- WEISSMAN, I. L., 1972: Thymus cell maturation: Studies on the origin of cortisone-resistant thymic lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **137**, 504-510.
- WEISSMAN, I. L., T. MASUDA, C. OLIVE and S. H. FRIEDBERG, 1975: Differentiation and migration of T lymphocytes. *Israel J. Med. Sci.*, **11**, 1267-1277.
- WEKERLE, H., U. KETELSEN and M. ERNST, 1980: Thymic nurse cells: Lymphoepithelial cell complexes in murine Thymuses morphological and serological characterization. *J. Exp. Med.*, **151**, 925-944.
- WESTPHOL, O. and K. JANN, 1965: Bacterial lipopolysaccharides. Extracti on with phenol-water and further applications of the procedure. (eds. by R. L. Whistler, J. N. BeMiller and J. L. Wolfrom), In "Methods in carbohydrate chemistry" vol. V, Academic Press, New York, 83-91.
- WHITE, R. A. H., D. W. MASON, A. F. WILLIAMS, G. GAIFRE and C. MILSTEIN, 1978: T-lymphocytes heterogeneity in the rat: separation of functional subpopulations using monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, **144**, 664-673.
- YAKURA, H., F. S. BOURCET and E. A. BOYSE, 1983: On the function of Ly-5 in the regulation of antigen-driven B cell differentiation. *J. Exp. Med.*, **157**, 1077-1088.
- YAKURA, H., F. S. SHEN, M. KAEMMER and E. A. BOYSE, 1981: Lyb-2 system of mouse B cells: Evidence for a role in the generation of antibody-forming cells. *J. Exp. Med.*, **153**, 129-135.
- 山口康夫, 1976: 免疫応答におけるT細胞, B細胞およびマクロファージの役割. 感染症, **6**, 201-208.
- 山名征三, 1978: 膜蛍光抗体法による抗リンパ球抗体の力価測定. 免疫実験操作法, 1821-1822.
- YANO, T., R. E. P. MANGINDANN and H. MATSUYAMA, 1989: Enhancement of the resistance of carp, *Cyprinus carpio*, to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some B-1, 3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1815-1819.
- 安田恒雄・延東 真・境 正・木村正雄, 1984: 炎症時のコイ顆粒白血球に関する組織化学的研究. 日本誌, **50**, 1375-1380.
- YASUNAGA, N. and S. YASUMOTO, 1988: Therapeutic effect of Florfenicol on experimentally induced pseudotuberculosis in yellowtail. *Fish Patol.*, **23**, 1-5.
- YASUNAGA, N. and JUN-ICHIRO TSUKAHARA, 1988: Dose titration study of florfenicol as a therapeutic agent in naturally occurring pseudotuberculosis. *Fish Pathol.*, **23**, 7-12.
- YOSHIKAI, Y., S. MIAKE, T. MATSUMOTO, K. NOMOTO, and K. TAKEYA, 1981: Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the induction of suppressor T cells of delayed footpad reaction to SRBC in mice. *Immunol.*, **43**, 241-247.
- 吉永 秀, 1973: 赤血球除去用トリス緩衝液. 免疫実験操作法, 免疫細胞 I-25.
- YUKI, R., 1957: Blood cell constituents in fish. I. Peroxidase staining of the leucocytes in rainbow trout (*Salmo irideus*). *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, **8**, 36-44.
- YUKI, R., 1958: Blood cell constituents in Fish. II. Peroxidase staining of the leucocytes in the kidney and some other organs. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, **8**(4), 264-269.
- YOCUM, D., M. CUCHENS, and L. W. CLEM, 1975: The hapten-carrier effect in teleost fish. *J. Immunol.*, **114**, 925-927.
- ZELINGS, B. J., 1981: Bactericidal and fungicidal assay. (eds. by Millanti J. A. and Ghaffar, A.) In "Manual of macrophage methodology", New York, Marcel Dekker, Inc., 271-280.
- ZIGMOND, S. H. and J. G. HIRSH, 1973: Leucocytes locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell derived chemotactic factor. *J. Exp. Med.*, **137**, 387-410.
- ZINKERNAGEL, R. M., G. N. CALLAHAN, A. ALTHAGE, S. COOPER, P. A. KLEIN, and J. KLEIN, 1978: On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: Evidence for dual recognition?. *J. Exp. Med.*, **147**, 882-896.
- ZITRON, I. M., D. E. MOSIER, and W. E. PAUL, 1977: The rule of surface IgD in the response to thymic-independent antigens. *J. Exp. Med.*, **146**, 1707-1718.