

## *Vibrio anguillarum* O 抗原で免疫した数種魚類 における抗体産生細胞の出現

中村義直\*・中井敏博\*・室賀清邦\*

(1990年7月13日受付)

### Induction of Antibody Producing Cells in Some Fishes by Immunization with *Vibrio anguillarum* O-antigen

Yoshinao NAKAMURA, Toshihiro NAKAI  
and Kiyokuni MUROGA

Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University  
Higashi-Hiroshima 724, Japan

(Received July 13, 1990)

Changes in the number of antibody producing cells were studied by measuring plaque-forming cells (PFC) of the spleen and kidney in carp (*Cyprinus carpio*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), Japanese eel (*Anguilla japonica*), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), and red seabream (*Pagrus major*) after an intraperitoneal injection with *Vibrio anguillarum* O-antigen. It was confirmed in carp and ayu that the injected antigen was distributed at the highest levels in the spleen and kidney 3 to 6 h after the injection. PFCs appeared in the spleen and kidney of all the fish species tested. The number of PFC reached maximum value after 8-17 days. The number of PFC in the spleen was always higher than that in the kidney in carp, rainbow trout, ayu and eel, whereas in red seabream the former was lower than the latter. There was no difference in PFC number between the two organs in the Japanese flounder.

In an additional experiment, ayu was immunized by immersing in the O-antigen suspension (3 g/l) for 30 min. As a result, no PFCs were detected in the spleen or kidney and no agglutinating antibody was measured in the serum.

免疫応答について検討する一つの方法として、JERNE および CUNNINGHAM ら (JERNE and NORDIN, 1963; CUNNINGHAM, 1965; CUNNINGHAM and SZENBERG, 1968) により確立された細胞性抗体の検出法を用いて、抗体産生細胞の消長を調べる方法がある。魚類においてもニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) やブリ (*Seriola quinqueradiata*) などいくつかの魚種で抗体産生細胞の出現状況が報告されているが (ANDERSON *et al.*, 1979; CHILLER *et al.*, 1969; KITAO *et al.*, 1981), それぞれの実験における使用抗原や実験条件が異なっており、抗体産生細胞の出現時期あるいは出現数といった免疫応答のパターンを魚種間で比較することはあまりなされていない。

本研究では、わが国における重要養殖対象魚の中からアユ (*Plecoglossus altivelis*) やコイ (*Cyprinus carpio*) な

ど6魚種を選び、*Vibrio anguillarum* のO抗原で注射免疫した時のそれぞれの魚種における抗体産生細胞の出現状況について比較検討した。またそれに関連し、抗原接種後の魚体内における抗原の分布状況をアユおよびコイについて検討し、更にアユにおいては浸漬免疫した場合の抗原分布と免疫応答についても検討した。

#### 材料および方法

##### 供試魚

実験には、コイ (*C. carpio*, 平均体重 120 g, 飼育水温 21~24°C), アユ (*P. altivelis*, 94 g, 16~20°C), ニホンウナギ (*Anguilla japonica*, 106 g, 22~24°C), ニジマス (*O. mykiss*, 231 g, 8~14°C), ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*, 138 g, 24~25°C), およびマダイ (*Pagrus major*, 45 g, 20~21°C) の淡水および海産魚, 計6魚種を用いた。こ

\* 広島大学 生物生産学部

これらの魚種を広島県下の民間養殖場より購入し、実験に先立ち各実験水温下で2, 3日間馴致した。なお、ウナギは止水、マダイは循環水、その他の魚種は流水中で飼育し、ウナギを除くすべての魚種については適宜餌を与えた。

### 抗原

アユ病魚由来の *V. anguillarum* PT-81049 株 (血清型 J-0-1) を普通寒天培地 (栄研) で 25°C・24 時間培養後、0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.0) で回収し、同液で遠心洗浄を行ったのち、アセトン-アルコール抽出法 (KAATTARI and IRWIN, 1985) により O 抗原を作製した。なお、コイに対してはこの O 抗原のほか、PBS で 10<sup>7</sup> cells/ml の濃度に調製した羊赤血球 (日本バイオテスト研究所: 以下 SRBC と略す) も免疫抗原とした。

### 免疫法

(注射法) 免疫後の抗原分布を調べるための実験には 15 mg/ml の濃度に調整した O 抗原を、抗体産生細胞の出現を調べるための実験には 300 µg/ml の濃度に調整した O 抗原をそれぞれ用いた。前記の 6 魚種をウレタンまたは MS-222 で麻酔した後、O 抗原液をそれぞれの腹腔内に 1 ml ずつ接種した。またコイには別に SRBC 懸濁液を腹腔内に 1 ml ずつ接種した。

(浸漬法) 飼育水を用いて用意した O 抗原懸濁液 (3 g/l) にエアレーションを施しながらアユを 30 分間浸漬し、体表を軽く洗浄後、飼育水に戻した。

### 魚体内からの *V. anguillarum* O 抗原の検出

*V. anguillarum* O 抗原で注射免疫したコイおよびアユの脾臓、腎臓、鰓 (アユのみ)、および血清中における抗原分布を酵素抗体法を用いて測定した。なおアユについては浸漬法で免疫した場合についても検討した。免疫後、10 分から 2 週間後にかけて適当な時間間隔で 1 尾ずつ魚を取り上げ、各組織と血清を採取した。取り出した組織は、PBS 中で表面を洗い、秤量し、PBS を 2 ml 加えてホモジナイズした後、遠心分離 (6,000 g, 15 分) し、その上清液中の O 抗原を定量した。上清を 2 倍希釈系列で 11 段階に希釈し、それぞれの 100 µl を 96 穴のマイクロプレートに滴下し固定後、常法通り家兔抗 *V. anguillarum* (PT-81049 株) 血清およびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ Ig 抗体 (Kirkegaard & Laboratories, Inc) を順次反応させ、492 nm の波長で吸光度を測定した。

得られた吸光度から以下の方法により抗原量を求めた。まず初めに、1 尾の魚に接種した量と同量の O 抗原 (15 mg) を非免疫魚から摘出した組織懸濁液 2 ml と

混合し、先に述べた方法で求めた吸光度から検量線を作成し、この検量線から O.D. (Optical Density) が 0.5 となるポイントの抗原濃度を求めた。次に実験区より得た材料についてその O.D. が 0.5 となる希釈率を求め、各組織中の抗原量を求めた。そして次式により各組織における抗原分布率を算出した。

$$\text{分布率 (\%)} = (\text{分布抗原量} / \text{接種抗原量}) \times 100$$

また血清についても、非働化した後、PBS で希釈して吸光度を測定したが、全血量が不明であるために抗原の存在の有無だけを判定した。

### 抗体産生細胞 (Plaque-forming cells: 以下 PFC と略す) の定量法

#### a) 細胞懸濁液の調整

抗原を接種した 2, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 21 および 28 日後に各魚種をそれぞれ 6 尾ずつ取り上げ、脾臓および腎臓を摘出した。取り出した組織は、定量に必要な量の細胞を得るため 2 尾分をプールして 1 試料とし、以下の操作に供した。まず組織を Eagle's MEM 中で洗浄し、ハサミにより細断し、ガラスホモジナイザー中で MEM を加えてすりつぶした後、ステンレスメッシュ (pore size 75 µm) を通すことにより組織残渣を取り除き、さらに遠心洗浄を行い、細胞懸濁液を作製した。懸濁液の一部を 0.1% トリパンブルーで染色し生細胞からなることを確認した上で、トーマ血球計算盤を用いて 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> および 10<sup>7</sup> cells/ml の濃度の細胞 (主としてリンパ球) 懸濁液を調整した。

#### b) 感作羊赤血球の調整

SRBC は前もって Mg<sup>2+</sup> および Ca<sup>2+</sup> を含むゼラチンペロナル緩衝液 (pH 7.4) を用いて遠心洗浄した後、タンニン酸で処理し、タンニン酸処理 SRBC, PBS および O 抗原 (3 mg/ml) を 1:2:3 の割合で混合し、37°C で 30 分間反応させた。反応後、遠心回収し、MEM で 20% (v/v) SRBC 懸濁液を調整した。

#### c) 補体の調整

非免疫魚から採取した血液を凝固させた後、遠心分離して血清を得た。これらの血清は、それぞれの溶血素価に基づき PBS で 5~12 倍に希釈し、採血後 24 時間以内に補体源として実験に供した。

#### d) PFC の算定

PFC の算定は、カニンガム法 (CUNNINGHAM and SZENBERG, 1968) に従った。すなわち細胞懸濁液 100 µl, 20% 感作 SRBC 懸濁液 10 µl, および各同一魚種の新鮮補体 (希釈血清) 35 µl をそれぞれ混合し、その 100 µl をカニンガムチャンパー (高橋技研 76×26 mm) に注

入し、パラフィンで封入した。25°Cで24時間反応後、顕微鏡下で溶血斑の数を算定した。3検体(6尾分)のPFC数を平均することによって、脾臓および腎臓における10<sup>6</sup>細胞当りのPFC数を求めた。

**凝集素抗体価の測定**

PFC数の測定に供した個体より得た血清を材料に、非働化(56°C, 30分)後、*V. anguillarum* O抗原もしくはSRBCに対する凝集素価の有無を調べた。抗体価は、同抗原で感作したSRBCもしくは無感作のSRBC(SRBCで免疫した魚の場合)を反応抗原として用い、PBSを希釈液としてマイクロタイター法により測定した。

**結 果**

**免疫魚における *V. anguillarum* O 抗原の分布**

*V. anguillarum* O抗原で注射免疫したコイおよびアユの魚体内(脾臓、腎臓)におけるO抗原の分布率の変化をFig. 1に示した。O抗原は、接種10分後に既に脾臓および腎臓のいずれにも認められ、3もしくは6時間後には最高値に達し、その後24時間後までにかかなり減少したものの2週間後においても僅かながら認められ

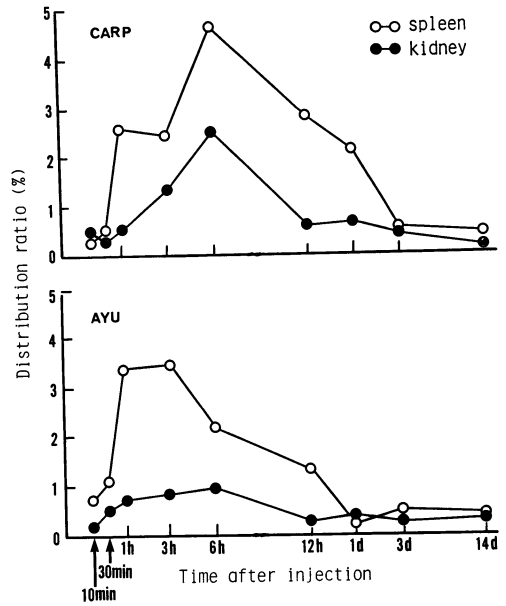


Fig. 1. Changes in the distribution of *V. anguillarum* O-antigen in the spleen and kidney of carp and ayu injected intraperitoneally with the O-antigen.

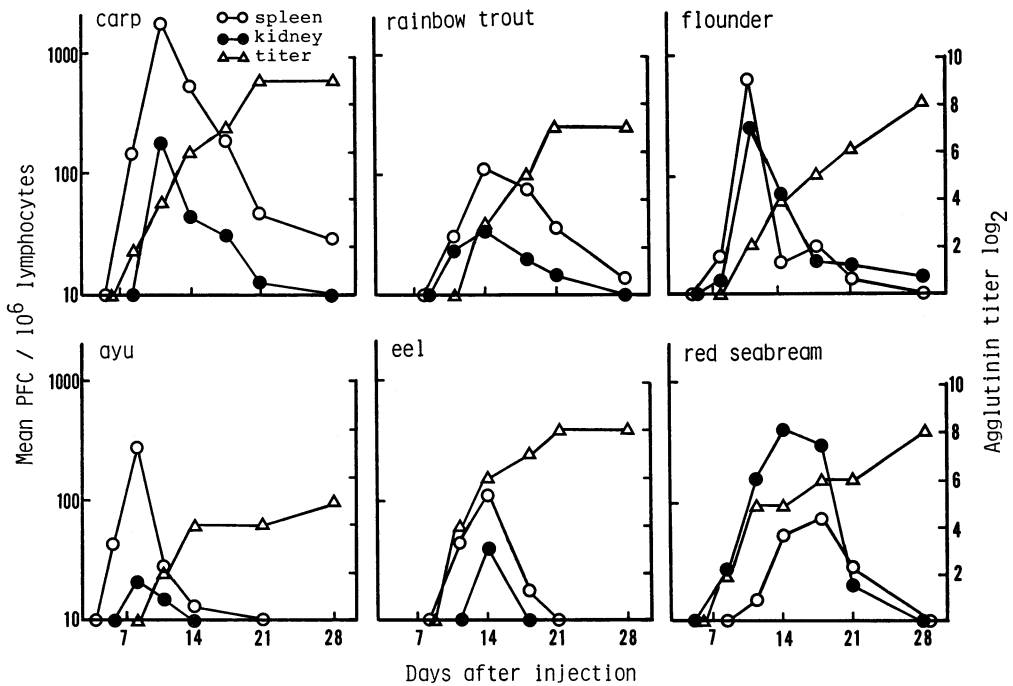


Fig. 2. The kinetics of the number of plaque forming cells (PFC) and agglutinin titer in 6 fish species injected intraperitoneally with *V. anguillarum* O-antigen.

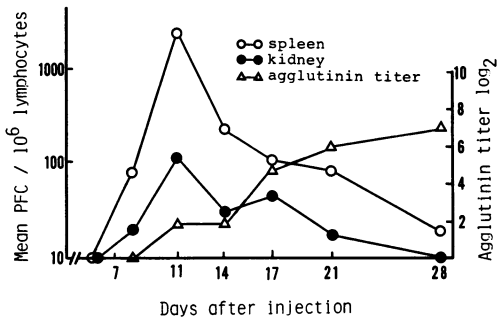


Fig. 3. The kinetics of PFC and agglutinin titer in carp injected intraperitoneally with SRBC.

た。またいずれの魚種の血清においても、接種 30 分後から 12 時間後にかけて抗原が検出された。

**免疫魚における PFC の出現状況および抗体価の変化**  
コイ、アユ、ニジマス、ウナギ、ヒラメおよびマダイの *V. anguillarum* O 抗原に対する免疫応答を Fig. 2 に示した。いずれの魚種においても、PFC は抗原接種から 6~11 日目に脾臓あるいは腎臓に出現し、8~17 日目に最高値に達した後、減少する傾向が認められた。抗体価は、PFC の出現と同時にやや遅れて上昇し始め、28 日目には  $2^5 \sim 2^9$  に達した。コイ、アユ、ニジマスおよびウナギでは、脾臓の PFC 数は常に腎臓の PFC 数より高い傾向にあったのに対し、ヒラメでは両者の数値は非常に接近し、マダイにおいては逆に腎臓の PFC 数の方が高い傾向にあった。

#### 羊赤血球 (SRBC) に対するコイの免疫応答

SRBC を接種したコイの免疫応答を Fig. 3 に示した。この実験結果を Fig. 2 に示した *V. anguillarum* O 抗原を接種した場合と比較すると、抗原接種後 28 日目の抗体価は  $2^7$  と O 抗原接種時の  $2^9$  よりやや低い値であったものの、PFC 数の変化を指標として見るかぎり顕著な差異は認められなかった。

#### 浸漬免疫したアユにおける免疫応答

浸漬免疫したアユにおいては、O 抗原は体内（脾臓、腎臓、鰓、血清）から全く検出されず、また 28 日後に至るまで脾臓および腎臓のいずれにおいても PFC の出現は認められず、抗体価の上昇も認められなかった。

#### 考 察

本研究では、まず *V. anguillarum* O 抗原で免疫したコイおよびアユにおける抗原の魚体内分布について検討した。Fig. 1 に示したように、腹腔内に接種された抗原は、10 分後には脾臓および腎臓で検出され、3 ないし 6 時間後に最高値に達した。それぞれの組織の重量およびこれらの組織に分布した抗原量を Table 1 にまとめた。そこに示された最高抗原濃度 (density) の値からわかるように、脾臓における抗原濃度は腎臓における抗原濃度の 3 倍強になっている。MACARTHUR *et al.* (1983) はカレイにおいて  $^{51}\text{Cr}$  で標識した他魚種の赤血球を抗原として同様の実験を行い、やはり脾臓で最も多くの抗原が検出されたと報告している。

本研究により明らかにされた淡水および海産 6 魚種における免疫後の PFC の消長のパターンは、KITAO *et al.* (1981) が *Pasteurella piscicida* 死菌および SRBC を抗原として行ったニジマス、コイおよびブリにおける実験結果と一致しており、このようなパターンは魚類における一般的な免疫応答と考えられた。

今回の実験結果では、供試した淡水魚 4 種で脾臓における PFC 数が腎臓における PFC 数に比べて常に高い傾向が認められたが、馬場 (1984) はコイの頭腎における PFC 数が脾臓に比べて非常に低値であることに関連し、頭腎は抗体産生に関与するリンパ球の供給源、すなわち中枢であり、脾臓はリンパ球が抗体産生細胞へと成熟する末梢性リンパ組織であろうと推察している。事実 PFC を指標とした免疫応答に関する報告の多くで、腎臓より脾臓の PFC 数の方が高い傾向が認められる。ただし本実験で用いたマダイや先に報告されているブルー

Table 1. The highest densities of the *V. anguillarum* O-antigen in the spleen and kidney of carp and ayu intraperitoneally injected with the O-antigen

	Carp			Ayu		
	average tissue weight (g)	highest amount of the antigen detected ( $\mu\text{g}$ )	highest density ( $\mu\text{g/g}$ )	average tissue weight (g)	highest amount of the antigen detected ( $\mu\text{g}$ )	highest density ( $\mu\text{g/g}$ )
Spleen	0.36	693	1925	0.80	524	655
Kidney	0.56	329	588	0.73	137	188

ギル (SMITH *et al.*, 1967) では全く逆の傾向が見られ、この仮説がすべての魚種にあてはまるかどうかは問題である。今後、リンパ組織としての脾臓と腎臓の役割分担についての魚種間の違いについて、より詳細な検討を行う必要がある。またこのような両組織間の PFC 出現数の違いのみならず、同一組織の PFC 数においても今回供試した 6 魚種間に大きな違いがみられた。例えば脾臓における PFC 数の最高値を比べてみると、コイでは  $1973/10^8$  細胞であったのに対し、マダイでは僅か  $94/10^8$  細胞であった。しかし、PFC 数のレベル (最高値) と抗体価のレベルの間に相関はみられず、また PFC 数のレベルと宿主の *V. anguillarum* に対する感受性との間にも特に関係は認められなかった。

コイにおいては *V. anguillarum* O 抗原の代わりに SRBC を接種した場合の免疫応答についても検討したが、O 抗原の場合と比べ、顕著な差異は認められなかった。前出の KITAO *et al.* (1981) は抗原として、*P. piscicida* の死菌と SRBC を用いているが、調べられた 3 魚種において抗原の違いによる抗体産生細胞の出現の差は認められていない。

最後に、浸漬法を用い *V. anguillarum* O 抗原で免疫したアユにおける抗原分布と免疫応答について触れる。アユにおいては、*V. anguillarum* ホルマリン死菌に浸漬することにより免疫が成立することが、攻撃試験に対する防御効果の面から確認されてきたが、浸漬により血中抗体価が上昇するか否かについては必ずしも一致した見解が得られていない (MUROGA and EGUSA, 1989)。本研究において、アユを *V. anguillarum* O 抗原を用いて浸漬免疫しても脾臓および腎臓といった組織における抗原の取り込みは認められず、PFC の出現および液性抗体の産生も認められなかったことから、*V. anguillarum* O 抗原を用いたアユの浸漬免疫には、液性抗体は関与しないと結論される。さらに、アユにおける *V. anguillarum* の侵入門戸が皮膚であるとの報告 (川合・楠田, 1981; MUROGA and DE LA CRUZ, 1987; KANNO *et al.*, 1989) を考慮すると、浸漬免疫の成立は、食細胞が主たる働きをなす細胞性免疫もしくは魚類では未だその存在が確認されていない分泌型の抗体が関与する局所免疫機構に依存していると考えられる。今後は、皮膚、鰓および消化管における抗原の取り込みと局所性免疫の成立機構について、より詳細な検討を加えることが必要であろう。

#### 謝 辞

本研究を進めるにあたり様々な御便宜、御援助を頂い

た広島県水産試験場の馬久地隆幸技師ならびに同水産試験場淡水魚支場の加藤友久技師およびその他の職員各位に深謝致します。

#### 引用文献

- 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 Diseases*, **2**, 169-178.
- 馬場 威 (1983): 比較免疫学からみた魚類の免疫特性. 魚病研究, **18**, 209-219.
- CHILLER, J. M., H. O. HODGINS, V. C. CHAMBERS, and R. S. WEISER (1969): Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) II. Studies on the kinetics of development of antibody-producing cells and on complement and natural hemolysin. *J. Immunol.*, **102**, 1202-1207.
- CUNNINGHAM, A. J. (1965): A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*, **207**, 1106-1107.
- CUNNINGHAM, A. J. and A. SZENBERG (1968): Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunol.*, **14**, 599-600.
- JERNE, N. K. and A. A. NORDIN (1963): Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, **140**, 405.
- KAATTARI, S. L. and M. J. IRWIN (1985): Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Dev. Comp. Immunol.*, **9**, 433-444.
- KANNO, T., T. NAKAI, and K. MUROGA (1989): Mode of transmission of vibriosis among ayu *Plecoglossus altivelis*. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 2-6.
- 川合研児・楠田理一 (1981): ビブリオ病経口ワクチンによるアユの免疫機構の研究—I. 体表における感染防御作用. 魚病研究, **16**, 1-8.
- KITAO, T., T. AOKI, and M. KANDA (1981): Immune response of marine and freshwater fish against *Pasteurella piscicida*. In. "Fish Biologics: Serodiagnosis and Vaccines", Developments in Biological Standardization, **49**, 355-368.
- MACARTHUR, J. I., T. C. FLETCHER, and A. W. THOMSON (1983): Distribution of radiolabelled erythrocytes and the effect of temperature on clearance in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J. Reticuloendothel. Soc.*, **34**, 13-21.
- MUROGA, K. and M. C. DE LA CRUZ (1987): Fate and location of *Vibrio anguillarum* in tissues of artificially infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish Pathol.*, **22**, 99-103.
- MUROGA, K. and S. EGUSA (1989): Vibriosis of ayu:

- A review. *J. Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ.*,  
27, 1-17.
- SMITH, A. M., M. POTTER, and B. MERCHANT (1967):  
Antibody-forming cells in the pronephros of the  
teleost *Lepomis macrochirus*. *J. Immunol.*, 99, 876-  
882.