

コイにおける *Edwardsiella tarda* に対する免疫反応-II 生菌ワクチン投与による能動免疫効果に 関与する好中球の電子顕微鏡観察

島田 真央・宮崎 照雄*

三重大学大学院生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻 水圏生物生産学講座 水族病理学教育研究分野

Immune Responses to *Edwardsiella tarda* in Koi-II Electron Microscopic Studies on Neutrophils in Koi Immunized with Live Bacteria of *E. tarda*

Mao SHIMADA, Teruo MIYAZAKI*

Laboratory of Fish Pathology, Graduate School of Bioresources, Mie University

Abstract

We studied on responses of neutrophils to *E. tarda* after an injection with the weakened-virulent bacteria and high-virulent bacteria within the swimbladder in koi *Cyprinus carpio*, which were either unvaccinated or vaccinated by intramuscular injections with live bacteria of weakened-virulence. In the unvaccinated group challenge with the weakened-virulent bacteria (n=30), infiltrated neutrophils phagocytized bacteria at 17-30 hs post challenge, and bacteria-laden neutrophils were decreased whereas normal cells were markedly increased at 48 hs. Electron microscopy (EM) revealed phagocytized bacteria were markedly damaged in the cell wall and cytoplasm within the phagosomes, and formed secondary lysosomes in the cytoplasm. In the unvaccinated group challenged with the high-virulent bacteria (n=30), neutrophils phagocytized bacteria at 17-30 hs, resulting in an increase in fragmented cells at 48 hs. EM revealed neutrophils allowing propagation of undamaged bacteria in the cell. On the other hand in the vaccinated group challenge with the weakened-virulent bacteria (n=30), many neutrophils phagocytized bacteria at 17-30 hs, and bacteria-laden neutrophils were decreased at 48 hs. EM revealed phagocytized bacteria were markedly damaged within the phagosomes and the cytoplasm of neutrophils. In another vaccinated group challenged with the high-virulent bacteria (n=30), bacteria-laden neutrophils were increased between 30 and 48 hs whereas fragmented cells were markedly increased in just one fish in 48 hs. EM revealed phagocytized bacteria were markedly damaged within the phagosomes and the cytoplasm of neutrophils except for one fish that allowed bacterial propagation within neutrophils. These results determined that neutrophils were activated by immunization with live bacteria and successfully treated *E. tarda* of high-virulence as well as weak-virulence.

Key Words: *Edwardsiella tarda*, active immunization, live bacteria of weakened-virulence, neutrophils, phagocytosis, electron microscopy

緒 言

弱病原性化した *E. tarda* 株を生菌ワクチンとして筋肉内接種することにより能動免疫を施されたコイは、*E. tarda* 生菌攻撃に対して効果的な感染防御を顕すことが明らかになった¹⁾。本研究では、コイにおける能動免疫効果について、発動した好中球による細菌への反応を光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて観察し、免疫効果をより明確に実証することをめざした。当該実験に際して、好中球の採取法は、鰓内細菌接種法が適当であると考えた。これは、体表から注射針を直接鰓内に差込んで細菌懸濁液を鰓内に接種し、その後、鰓内に浸潤してきた好中球を採取する方法である²⁻⁴⁾。鰓は大きな内腔をもち、薄い線維性結合組織で囲まれていることから、接種した細菌懸濁液の流出を防ぐことができる。細菌を接種すれば鰓内壁に炎症が起こり、好中球を主体とする炎症細胞が容易に採取できるので、免疫実験に適している。また、鰓を好中球の採取場所として用いることは、組織片の混入が無く、純粋かつ大量の好中球が容易に得られることが利点としてあげられる⁴⁾。

本研究では、まず、免疫を施していないコイの鰓内に強病原性 *E. tarda* もしくは弱病原性 *E. tarda* を接種し、病原性強度の異なる *E. tarda* に対する好中球の動態を明らかにする基礎実験を先行した。好中球の動態は、細菌を接種した鰓内に浸潤した好中球を採取し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。

その結果、好中球の動態を観察することにより、免疫の有効性を判定出来ると判断できたので、第二回実験では、弱病原性 *E. tarda* を生菌ワクチンとして用いた能動免疫を施し、強病原性 *E. tarda* および弱病原性 *E. tarda* の攻撃に反応してきた好中球の動態を観察することにより、免疫の有効性を判定した。

材料および方法

1. 弱病原性 *E. tarda* および強病原性 *E. tarda* に対する好中球の反応

供試魚

実験には、三重県下養鯉場および、山口県下関市の独立行政法人水産大学校から分与をうけた平

均体重 40 g のコイ (*Cyprinus carpio*) 当歳魚を供した。実験中の飼育水温は 25 °C に設定した。

供試細菌

本実験には、選抜した *E. tarda* 菌株を繰り返しコイの筋肉内に注射することにより強毒化させたものを、強病原性株として実験に供した。強病原性生菌を Heart Infusion (HI) 液体培地 (日水) を用いて 25 °C で 48 時間静置培養し、その後、3000×g・15 分間遠心分離を行ない、沈殿物をハンクス液 (日水) に再懸濁して、2 回洗浄した。そして、沈殿物をハンクス液で再度懸濁し、分光光度計 (日立) を用いて菌数を調製した細菌懸濁液を実験に供した。なお、上記の方法で 10⁷ CFU/mL に調整した強病原性株懸濁液をコイの筋肉内に体重の 0.5 % 量となるように接種した時、斃死率が 100 % となることを確認した。

弱病原性菌株は、前述の分離菌株を HI 培地で繰り返し継代培養を重ねることにより弱毒化した株を弱病原性株として本実験に供した。なお、弱病原性株は 10⁷ CFU/mL に調整した細菌懸濁液をコイの筋肉内に体重の 0.5 % 量となるように接種した時、斃死率が 0 % であることを確認した。

実験方法

100 L 容量のパンライト水槽に平均体重 40 g のコイを強病原性株接種区 30 尾、弱病原性株接種区 30 尾に分けて収容した。強病原性株接種区にはハンクス液を用いて菌数を 8×10⁷ CFU/mL に調製した強病原性株懸濁液を、弱病原性株接種区には菌数を 7×10⁷ CFU/mL に調製した弱病原性株懸濁液を、それぞれコイの鰓内に体重の 1 % 量となるように接種した。細菌接種から 17, 30, 48 時間経過後にコイを 10 尾ずつ取り上げ、鰓を摘出し、鰓内液を採取した。採取した鰓内液には凝固防止を目的としてヘパリンを混合・攪拌し、3000×g・30 秒間遠心分離して細胞集塊を採取した。余分な上澄を除去して、再度攪拌し、スライドグラスに塗抹した。自然乾燥させた後、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色を施し、光学顕微鏡下で好中球を観察した。

近藤ら⁵⁾によると、コイの好中球には 2 種類の顆粒を持つ細胞があり、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色を施すと、小型でオレンジ色に染色さ

れる顆粒を持つ細胞と、大型で円形あるいは卵円形の無色の顆粒を持つ細胞が観察されると報告されている。本研究では、この2種類の顆粒球ともに好中球として見つかった。好中球を、細菌を全く食菌していない正常細胞（図1A）、細胞内に細菌が少ない細胞（図1B）、細胞内に細菌が多い細胞（図1C）、および細菌の増殖によって崩壊した崩壊細胞（図1D）の4段階に分け、1尾につき好中球を500個ずつ観察し各段階の好中球を計測した。なお、病原性の異なる *E. tarda* に対する好中球の反応の違いを検討するにあたり、危険率5%で二標本t検定を行った。

また、採取した好中球はまとめて（5尾分）、改良カルノフスキー固定液で固定・静置し、浮遊細胞を沈殿させた。その後、上澄を捨てFBSと卵白の混合液を適量加えて再懸濁し、 $3000 \times g \cdot 30$ 秒間遠心分離後、上澄を捨てて沈殿物を改良カルノフスキー固定液で前固定した。その後、 0.2 M リン酸緩衝液で洗浄し、2%四酸化オスミウム固定液にて後固定した。さらに、EPON 812に包埋後、70 nmの超薄切片を作製し、酢酸ウラ

ニル・クエン酸鉛染色を行い、透過型電子顕微鏡（日立 H-7000）を用いて細胞の観察を行った。

2. *E. tarda* 生菌ワクチンで能動免疫したコイにおける強病原性 *E. tarda* および弱病原性 *E. tarda* に対する好中球の反応

供試魚

実験には、三重県下養鯉場および、山口県下関市の独立行政法人水産大学校から分与をうけた平均体重30gのコイ (*Cyprinus carpio*) 当歳魚を供した。実験中の飼育水温は25℃に設定した。

供試細菌と生菌ワクチンの作製

第1回実験で使用したと同じ菌株を用いた。生菌ワクチンの作製には弱病原性株をHI液体培地を用いて25℃で培養した。培養48時間後、 $3000 \times g \cdot 15$ 分間遠心分離を行ない、沈殿物を滅菌生理食塩水に再懸濁し分光高度計（日立）を用いて菌数を調製した細菌懸濁液を生菌ワクチンとして実験に供した。

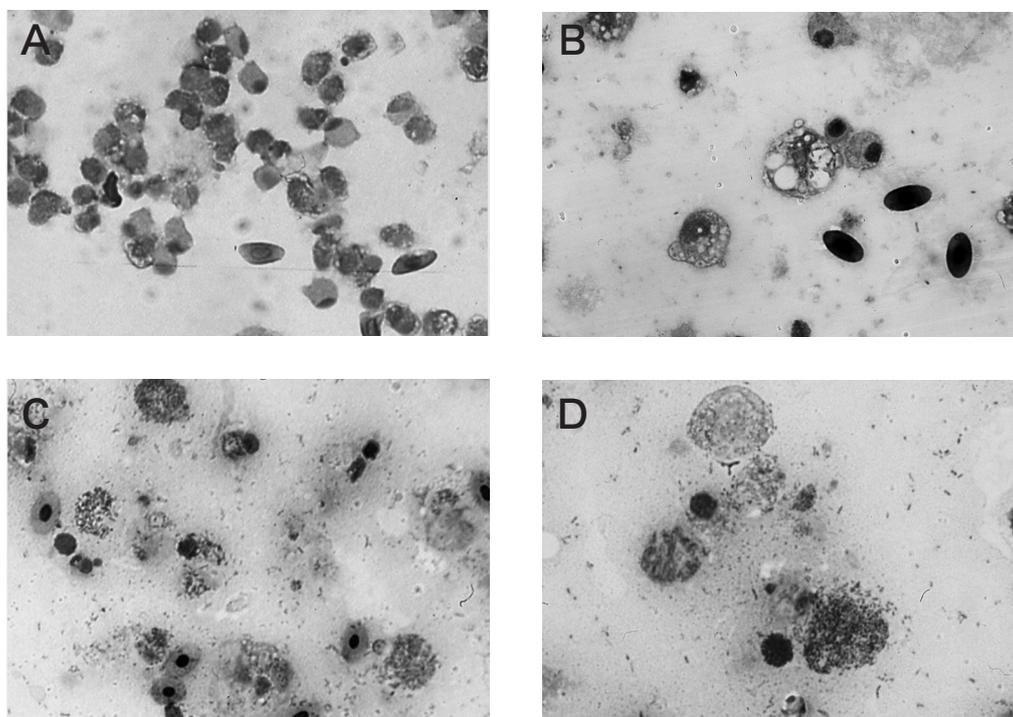


図 1

鰾内に *E. tarda* を接種後、鰾内に浸潤してきて細菌に対応している好中球の諸像。(A) 細菌を全く食菌していない正常細胞。メイ・グリュンワルド・ギームザ染色, X 480 (B) 細胞内に細菌が少ない細胞。メイ・グリュンワルド・ギームザ染色, X 480 (C) 細胞内に細菌が多い細胞。メイ・グリュンワルド・ギームザ染色, X 480 (D) 細菌の増殖によって崩壊した崩壊細胞。メイ・グリュンワルド・ギームザ染色, X 480

実験方法

100 L 容量のパンライト水槽に平均体重 30 g のコイを強病原性株接種区 30 尾、弱病原性株接種区 30 尾に分けて収容した。この両区ともに、滅菌生理食塩水を用いて 3×10^6 CFU/mL に調製した生菌ワクチンを、体重の 0.5 % 量となるように尾部の筋肉内に接種した。その 10 日後、ブースターとして、 3×10^6 CFU/mL の生菌ワクチンを同量追加接種して能動免疫を施した。

最初のワクチン接種から 21 日目にハンクス液で菌数を調製した強病原性株および弱病原性株を注射法により鰾内に接種した。強病原性株接種区には、ハンクス液を用いて菌数を 9×10^7 CFU/mL に調製した強病原性株懸濁液を、弱病原性株接種区にはハンクス液を用いて菌数を 7×10^7 CFU/mL に調製した弱病原性株懸濁液をそれぞれコイの鰾内に体重の 1 % 量となるように接種した。細菌接種から 17, 30, 48 時間経過後にコイを取り上げ、鰾を摘出し、鰾内液を採取した。採取した鰾内液は、第 1 回実験と同様に処理し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. 弱病原性 *E. tarda* および強病原性 *E. tarda* に対する好中球の反応

1 a. 光学顕微鏡による好中球の動態の観察

細菌接種から 17 時間後における鰾内液では強病原性株接種区および弱病原性株接種区いずれの区でも好中球が鰾内の細菌に反応し、鰾内に浸潤してきていることが確認された。強病原性株接種区と比較して、弱病原性株接種区では鰾内に浸潤した好中球数が少ない傾向がみられた。

好中球の細菌処理段階を計測したところ、強病原性株接種区では、全体の 65~93 % が正常細胞であり、細胞内に細菌が少ない細胞は 6~18 %、細胞内に細菌が多い細胞は 1~20 %、崩壊細胞は 0~5 % の割合で混在していた。他方、弱病原性株接種区では 88~99 % の好中球が正常細胞であり、細胞内に細菌が少ない細胞および細胞内に細菌が多い細胞はそれぞれ、1~12 % および 0~2 % の割合であった。また、崩壊細胞は 0~1 % であった。強病原性株接種区と弱病原性株接種区に

おける 4 段階ごとの好中球の出現割合を危険率 5 % 二標本 t 検定したところ、正常細胞の出現は弱病原性株接種区の方が有意に多く、細胞内に細菌が少ない細胞および細胞内に細菌が多い細胞の出現は、強病原性株接種区の方が有意に多かった ($P < 0.005$)。

細菌接種から 30 時間後における鰾内液では、両区で一度に観察できる好中球数が急激に増加し、活発な好中球の浸潤が確認できた。強病原性株接種区では正常細胞は 48~79 % であり、細胞内に細菌が少ない細胞は 18~41 %、細胞内に細菌が多い細胞は 3~13 %、崩壊細胞は 0~10 % の割合で混在していた。他方、弱病原性株接種区では、正常細胞は 66 %~82.6 %、細胞内に細菌が少ない細胞は 14~29 % であり、細胞内に細菌が多い細胞は 1~3 %、崩壊細胞は 0~2 % の割合であった。強病原性株接種区と弱病原性株接種区における 4 段階ごとの好中球の出現割合を危険率 5 % 二標本 t 検定した結果、正常細胞は弱病原性株接種区の方が有意に多く、細胞内に細菌が多い細胞および崩壊細胞の出現は強病原性株接種区の方が有意に多かった ($P < 0.005$)。

48 時間後における鰾内好中球の計数結果として、強病原性株接種区では、正常細胞は 21~49 %、細胞内に細菌が少ない細胞は 14~45 %、細胞内に細菌が多い細胞は 10~38 %、崩壊細胞は 5~26 % の割合であった。一方、弱病原性株接種区では、正常細胞は 65~95 % であり、細胞内に細菌が少ない細胞は 5~33 %、細胞内に細菌が多い細胞は 0~5 %、崩壊細胞は 0~4 % の割合であった。強病原性株接種区と弱病原性株接種区における各段階の好中球の出現を同様の t 検定した結果、正常細胞の出現は弱病原性株接種区の方が有意に多く、反対に細胞内に細菌が少ない細胞、細胞内に細菌が多い細胞、崩壊細胞の出現は、強病原性株接種区の方が有意に多かった ($P < 0.005$)。

強病原性株接種区および弱病原性株接種区それぞれの区で、経時的に各段階の平均好中球数を比較した結果、強病原性株接種区では、細菌接種から 17 時間後において、すでに細胞内に細菌が多い細胞が 11 % 観察された。30 時間後では 17 時間後と比べて、正常細胞が 83 % から 67 % と減少し、細胞内に細菌が少ない細胞が 11 % から 24 %、細胞内に細菌が多い細胞が 5 % から 6 %、崩壊細

胞が1%から3%と増加していた。これらの増減をt検定した結果、正常細胞の減少および細胞内に細菌が少ない細胞の増加は有意であった ($P < 0.005$)。さらに、30時間後と48時間後を比較すると、正常細胞が67%から36%に減少した反面、細胞内に細菌が少ない細胞が24%から28%、細胞内に細菌が多い細胞が6%から20%、崩壊細胞が3%から16%に増加していた。これらの増減をt検定した結果、正常細胞の減少と、細胞内に細菌の多い細胞および崩壊細胞の増加は有意であった ($P < 0.0005$)。以上の結果から、強病原性細菌の好中球内増殖が実証された。強病原性株が感染魚を斃死に至らしめるのは、細菌が好中球内で増殖することにより、増殖した細菌が全身感染するためと判断された。

他方、弱病原性株接種区では、細菌接種から17時間後と30時間後を比較すると、正常細胞が94%から76%、細胞内に細菌が少ない細胞が5%から22%、細胞内に細菌が多い細胞1%から2%に変化していた。崩壊細胞は共に1%未満となり差がなかった。t検定の結果、正常細胞の減少、また細胞内に細菌が少ない細胞および細胞内に細菌が多い細胞の増加は有意であった ($P < 0.005$)。

48時間後では正常細胞が82%、細胞内に細菌が少ない細胞が15%、細胞内に細菌が多い細胞が3%、崩壊細胞が1%未満となり、細胞内に細菌が少ない細胞の減少は有意であった ($P < 0.005$)。以上の結果から、好中球に貪食された弱病原性株は細胞内増殖する能力に弱く、時間経過とともに減少し、従って全身感染に至ることはなく、結果として感染魚を斃死に至らすことがないと判断された。

1 b. 電子顕微鏡による好中球の観察

強病原性株接種区では、細菌接種から17時間後には、好中球による食菌後、細菌が食胞内から細胞質に侵入している像が観察された (図2 A)。また、細胞質内で細菌が増殖して崩壊した好中球も観察された (図2 B)。30時間後では、細菌の細胞内増殖を許して崩壊した好中球が多く観察された (図2 C)。好中球が細菌を食胞内で処理しつつある像も観察されたが少数であった (図2 D)。48時間後の観察では、細菌が食胞内で増殖している像 (図3 A) や細胞質内で増殖している像

(図3 B) が多く観察された。

他方、弱病原性株接種区においては、細菌接種から17時間後には、強病原性株接種区と同様に、各段階の好中球像が観察されたが、好中球内に観察された細菌はこの時点からすでに傷害を受けていた。つまり、細胞質内に移行した細菌はライソゾーム顆粒と反応し二次ライソゾームを形成し、その中の細菌の細胞壁は変性していた。また、細胞質にフリーで存在する細菌の多くは細胞壁と細胞質の分離を起こしていた (図3 C)。また、好中球の食胞内で増殖した細菌はいずれも細胞壁の膨化、細胞質の空胞化、細菌の核の不明瞭化あるいは細胞質の濃縮と委縮といった傷害を示していた (図3 D)。30時間後でも、好中球の食胞内にとりこまれた細菌は好中球の殺菌作用によって処理され、細胞壁の崩壊、細胞質の濃縮と委縮、崩壊を示していた (図4 A)。また、好中球の細胞質内で増殖した細菌も、処理され、細胞壁の崩壊、細胞質の濃縮と委縮、菌体の変形がみられた (図4 B)。なお、好中球が酵素を出して細菌を処理したことを示す細胞質内微細顆粒が激減した好中球も現れていた。48時間後では、細菌を処理する好中球は観察されず、ほとんどが正常細胞であった。

2. *E. tarda* 生菌ワクチンで能動免疫したコイにおける強病原性 *E. tarda* および弱病原性 *E. tarda* に対する好中球の反応

2 a. 光学顕微鏡による好中球の動態の観察

細菌接種から17時間後、強病原性株接種区と弱病原性株接種区の両区で好中球の鰓内浸潤が確認された。強病原性株接種区では、正常細胞は76%~94%、細胞内に細菌が少ない細胞は6%~21%、細胞内に細菌が多い細胞は1%未満~4%、崩壊細胞は0%~6%の割合で存在した。他方、弱病原性株接種区では、正常細胞は60%~85%、細胞内に細菌が少ない細胞は6%~23%、細胞内に細菌が多い細胞は4%~15%、崩壊細胞は1%未満~5%であった。強病原性株接種区と弱病原性株接種区における各段階の好中球の出現割合を危険率5%二標本t検定した結果、弱病原性株接種区で正常細胞、細胞内に細菌が少ない細胞および細胞内に細菌が多い細胞の増加は有意であった ($P < 0.005$)。

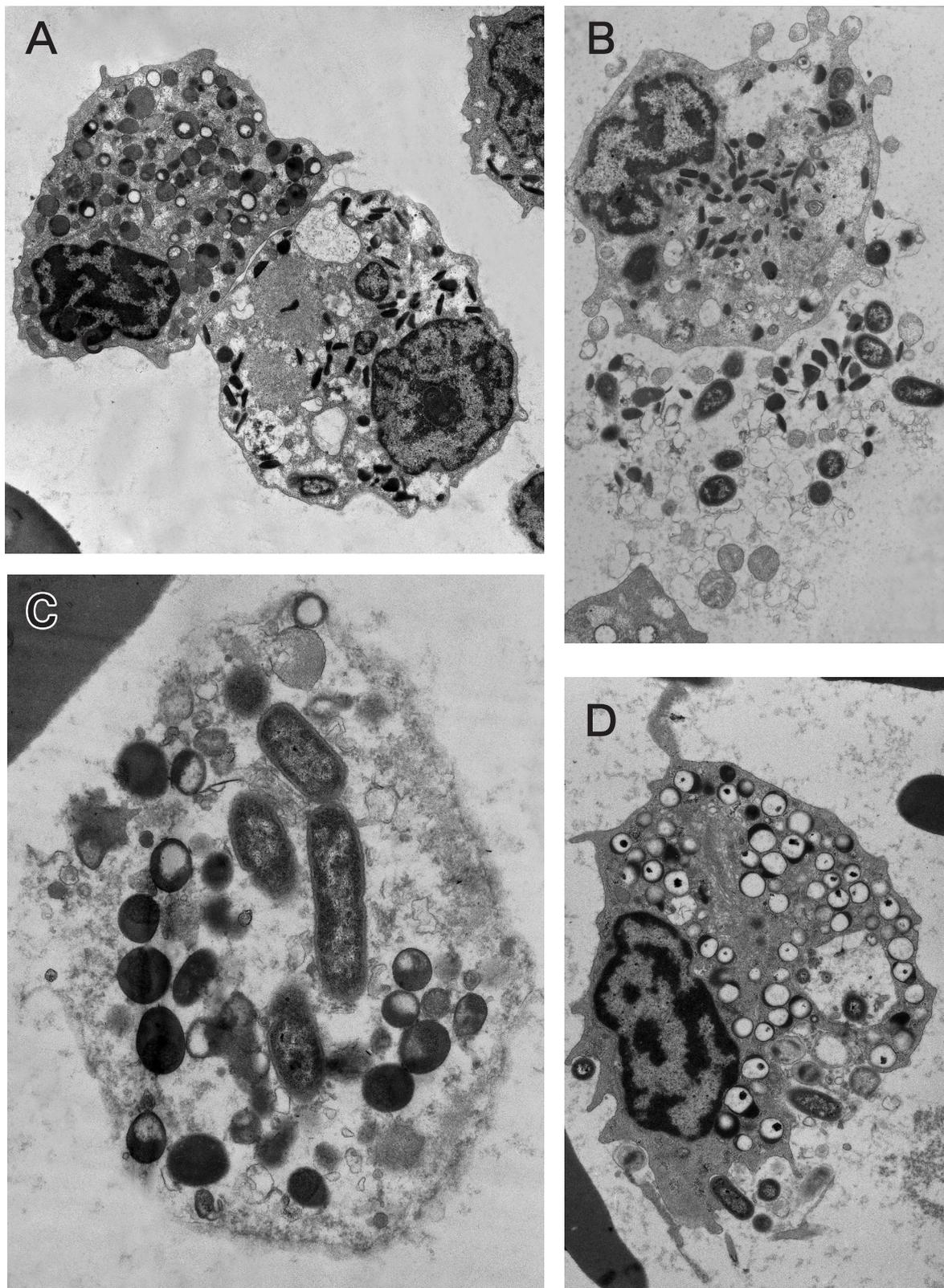


図 2

(A) 強病原性 *E. tarda* 接種区の 17 時間後における好中球の電子顕微鏡像。右側の好中球では細菌が食胞から細胞質に移行している。左側の好中球は微小顆粒をもつ正常細胞。X 4000 (B) 強病原性 *E. tarda* 接種区の 17 時間後における好中球の電子顕微鏡像。下の好中球は細菌の増殖によって崩壊し、上の好中球では細菌が食胞から細胞質に移行している。X 5000 (C) 強病原性 *E. tarda* 接種区の 30 時間後における好中球の電子顕微鏡像。好中球の細胞質内で細菌が分裂し、増殖している。顆粒は内容物(殺菌に関する酵素)を放出したため空胞化したものが多い。X 10000 (D) 強病原性 *E. tarda* 接種区の 30 時間後における好中球の電子顕微鏡像。好中球が食胞内で細菌を処理し、さらに細菌を食菌している。X 7000

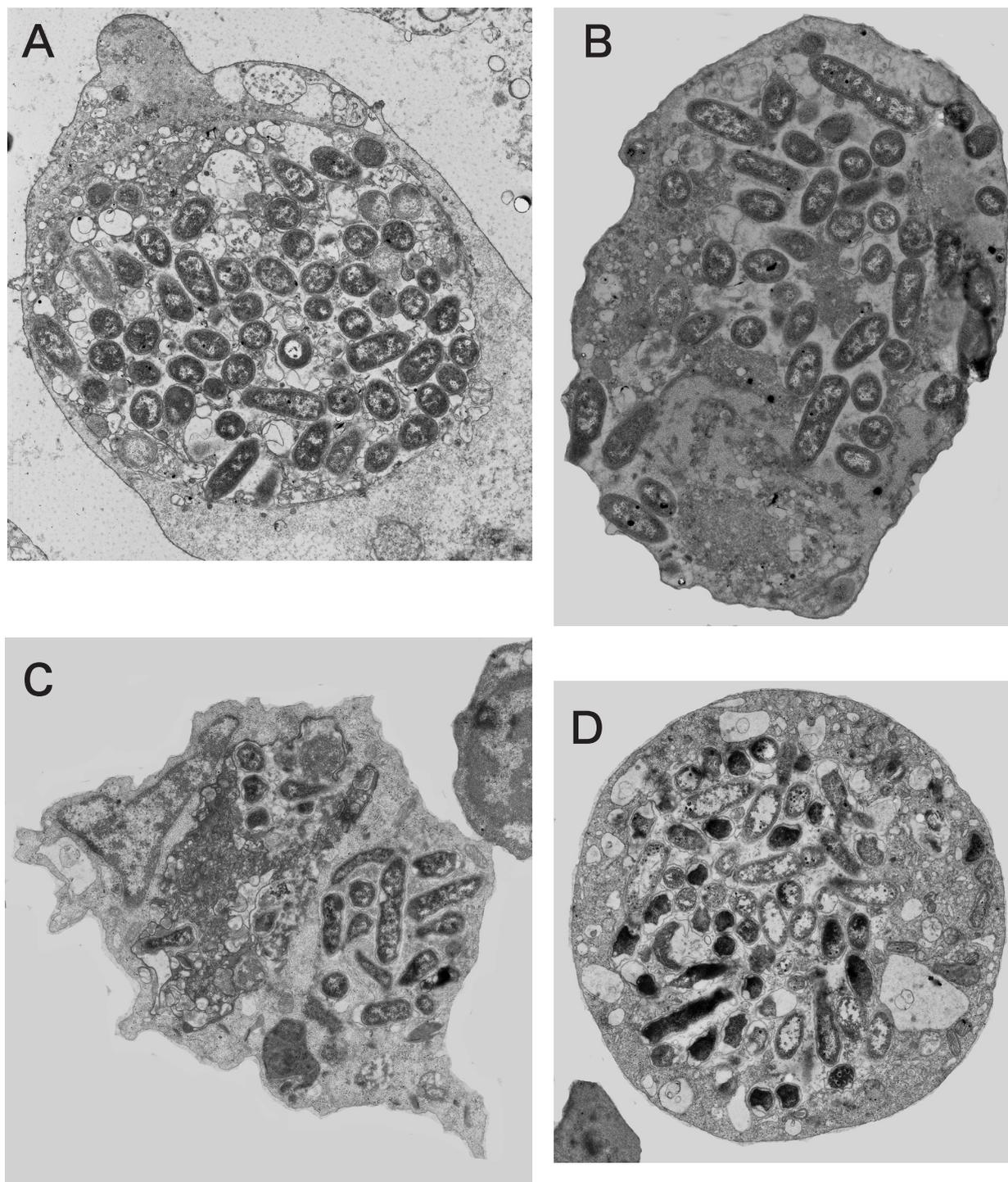


図 3

(A) 強病原性 *E. tarda* 接種区の 48 時間後における好中球の電子顕微鏡像。好中球の食胞内での細菌増殖が顕著である。電子顕微鏡像 X 5000 (B) 強病原性 *E. tarda* 接種区の 48 時間後における好中球の電子顕微鏡像。好中球の細胞質内での細菌増殖が顕著である。細胞質内微小顆粒はほとんど消失している。X 5000 (C) 弱病原性 *E. tarda* 接種区の 17 時間後における好中球の電子顕微鏡像。好中球に取り込まれた細菌が細胞質に移行し増殖しているが、細胞質内のリソゾームの働きにより二次ライソゾームの形成、細胞壁と細胞質の分離、菌体の変形など傷害を受けた細菌が多く見られる。X 5000 (D) 弱病原性 *E. tarda* 接種区の 17 時間後における好中球の電子顕微鏡像。細菌は食胞内で増殖したが、好中球の殺菌作用を受け、菌体の変形、細胞壁の傷害、細胞質と細胞壁の分離、細胞質の濃縮あるいは空胞化を示している。X 7000

細菌接種から 30 時間後になると、強病原性株接種区では、正常細胞は 70 %～87 %、細胞内に細菌が少ない細胞は 7 %～16 %、細胞内に細菌が多い細胞は 1 %～8 %、崩壊細胞は 3 %～8 %の割合で存在した。他方、弱病原性株接種区では、正常細胞は 70 %～90 %、細胞内に細菌が少ない細胞は 7 %～21 %、細胞内に細菌が多い細胞は 0 %～7 %、崩壊細胞は 0 %～4 %の割合で存在した。強病原性株接種区と弱病原性株接種区における各段階の好中球の出現を t 検定した結果、崩壊細胞の出現が強病原性株接種区で有意に多かった ($P < 0.0001$)。

細菌接種から 48 時間後では、強病原性株接種区において、正常細胞は 58 %～78 %、細胞内に細菌が少ない細胞は 8 %～24 %、細胞内に細菌が多い細胞は 1 %～8 %の割合で存在した。しかし崩壊細胞の出現割合は、個体差がみられ、10 尾中 9 尾では 5 %～14 %だったのに対し、1 尾では 25 %観察された。他方、弱病原性株接種区では、観察される好中球数が少ない傾向があり、正常細胞が多く観察された。正常細胞は 80 %～96 %、細胞内に細菌が少ない細胞は 3 %～15 %、細胞内に細菌が多い細胞は 1 %未満～7 %、崩壊細胞は 0 %～2 %の割合であった。

強病原性株接種区と弱病原性株接種区における各段階の好中球の出現を t 検定した結果、強病原性株接種区では、細胞内に細菌が少ない細胞および崩壊細胞の出現が有意に多かった ($P < 0.001$)。

強病原性株接種区および弱病原性株接種区それぞれで、経時的に各段階の平均好中球数を比較したところ、強病原性株接種区では、細菌接種から 17 時間後と 30 時間後を比較すると、正常細胞が 83 %から 79 %に減少し、細胞内に細菌が少ない細胞が共に 12 %、また、細胞内に細菌が多い細胞が 3 %から 4 %、崩壊細胞が 2 %から 5 %に増加していた。これらの増減を t 検定した結果、崩壊細胞の増加は有意であった ($P < 0.005$)。48 時間後には、正常細胞が 71 %、細胞内に細菌が少ない細胞が 16 %、細胞内に細菌が多い細胞が 4 %、崩壊細胞が 10 %に変化していた。t 検定の結果、正常細胞の減少、細胞内に細菌が少ない細胞および崩壊細胞の増加は有意であった ($P < 0.005$)。他方、弱病原性株接種区では、細菌接種から 17 時間後と 30 時間後を比較すると、正常細胞が 74 %

から 83 %に増加したのにあわせて、細胞内に細菌が少ない細胞が 17 %から 13 %、細胞内に細菌が多い細胞が 7 %から 3 %、崩壊細胞が 3 %から 1 %に減少していた。これらの増減を t 検定した結果、正常細胞の増加、細胞内に細菌が多い細胞の減少は有意であった ($P < 0.005$)。48 時間には、正常細胞が 88 %、細胞内に細菌が少ない細胞が 8 %、細胞内に細菌が多い細胞が 3 %、崩壊細胞が 1 %に変化した。細胞内に細菌が少ない細胞の減少は、有意との検定結果が得られた ($P < 0.005$)。

2 b. 電子顕微鏡による好中球の観察

生菌ワクチンで能動免疫した魚では、強病原性株でも、細菌接種から 17 時間後には既に、好中球の殺菌作用が観察された。好中球の食菌した食胞にはタンパク様物質が多く、取り込まれた細菌の細胞膜や細胞質は融解し始めていた。また、食胞から細胞質内に移行した細菌はライソゾームと癒合し二次ライソゾームを形成していた (図 4 C, D)。細胞質内で二次ライソゾームを形成した細菌は細胞壁の崩壊が観察された (図 4 D)。細菌接種から 30 時間後でも、好中球内増殖した細菌はライソゾームと癒合して二次ライソゾームを形成し、その細胞壁が融解した細菌がおおく観察された (図 5 A)。細菌を殺菌処理する好中球の細胞質には空胞形成が顕著なことが多かった。また、細菌が好中球の食胞内で処理され、融解物と残骸を残すだけの細菌も観察された (図 5 B)。48 時間後では、好中球の細胞質内で殺菌作用によって細菌が処理され、細胞壁の崩壊、細胞質の空胞化を示す細菌がみられた (図 5 C)。他方、強病原性株接種魚では、細菌が細胞内で多数増殖し、好中球の殺菌作用に抵抗性を示す細菌も確認された (図 5 D)。細菌が細胞内で増殖した好中球は、崩壊に至っていた。

他方、弱病原性株接種区では、細菌接種から 17 時間後、すでに好中球による細菌の処理が進んでいた。好中球の食胞内で増殖した細菌が殺菌作用によって処理され、細胞壁の崩壊、細胞質の空胞化もしくは細胞質の委縮を示す細菌が多かった (図 6 A, B)。細菌接種から 30 時間後も引き続き、好中球の細菌処理が観察された。好中球の食胞内の細菌は、その細胞壁が融解していた。殺菌作用の顕著な好中球の微小顆粒は殺菌関連の内

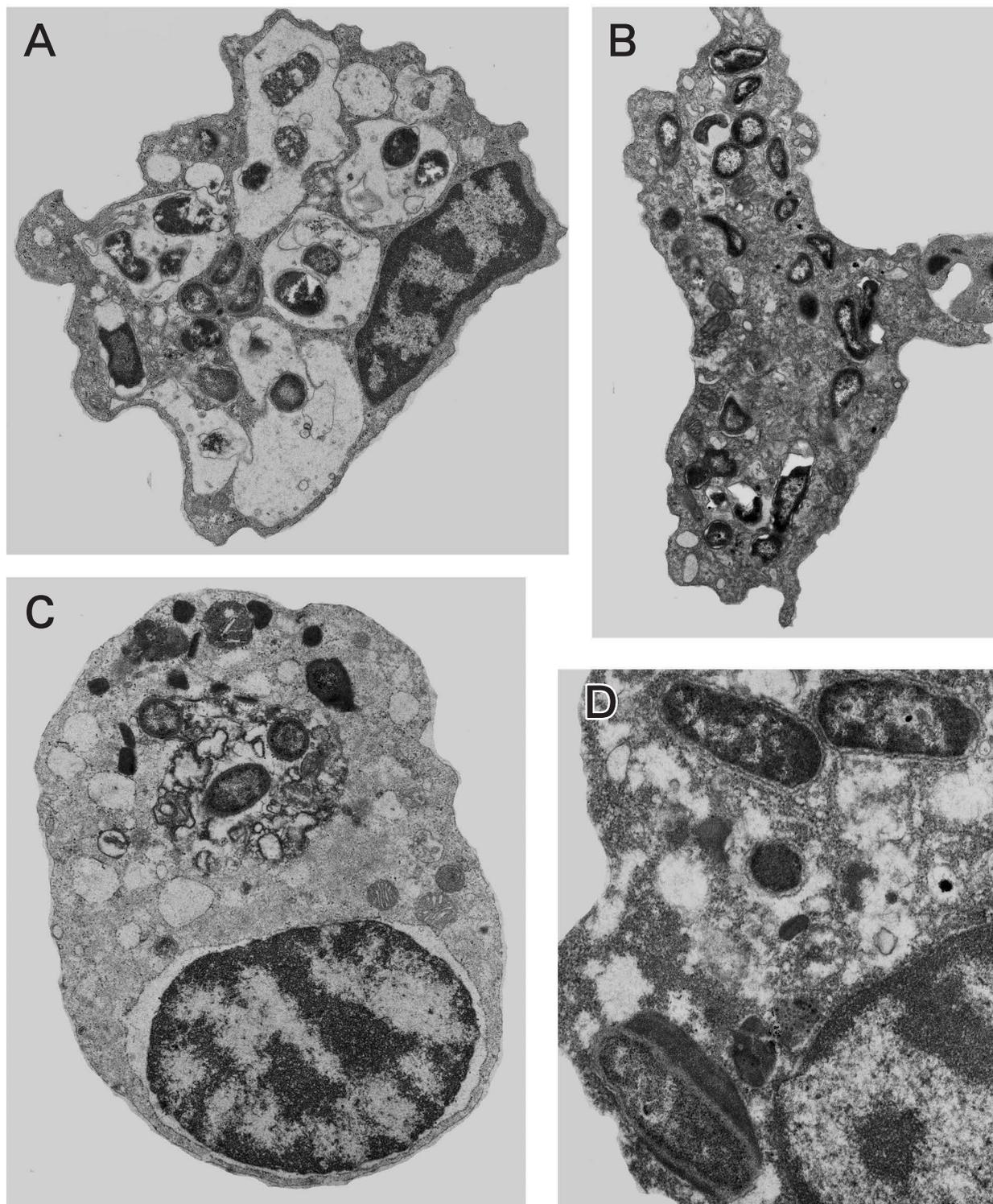
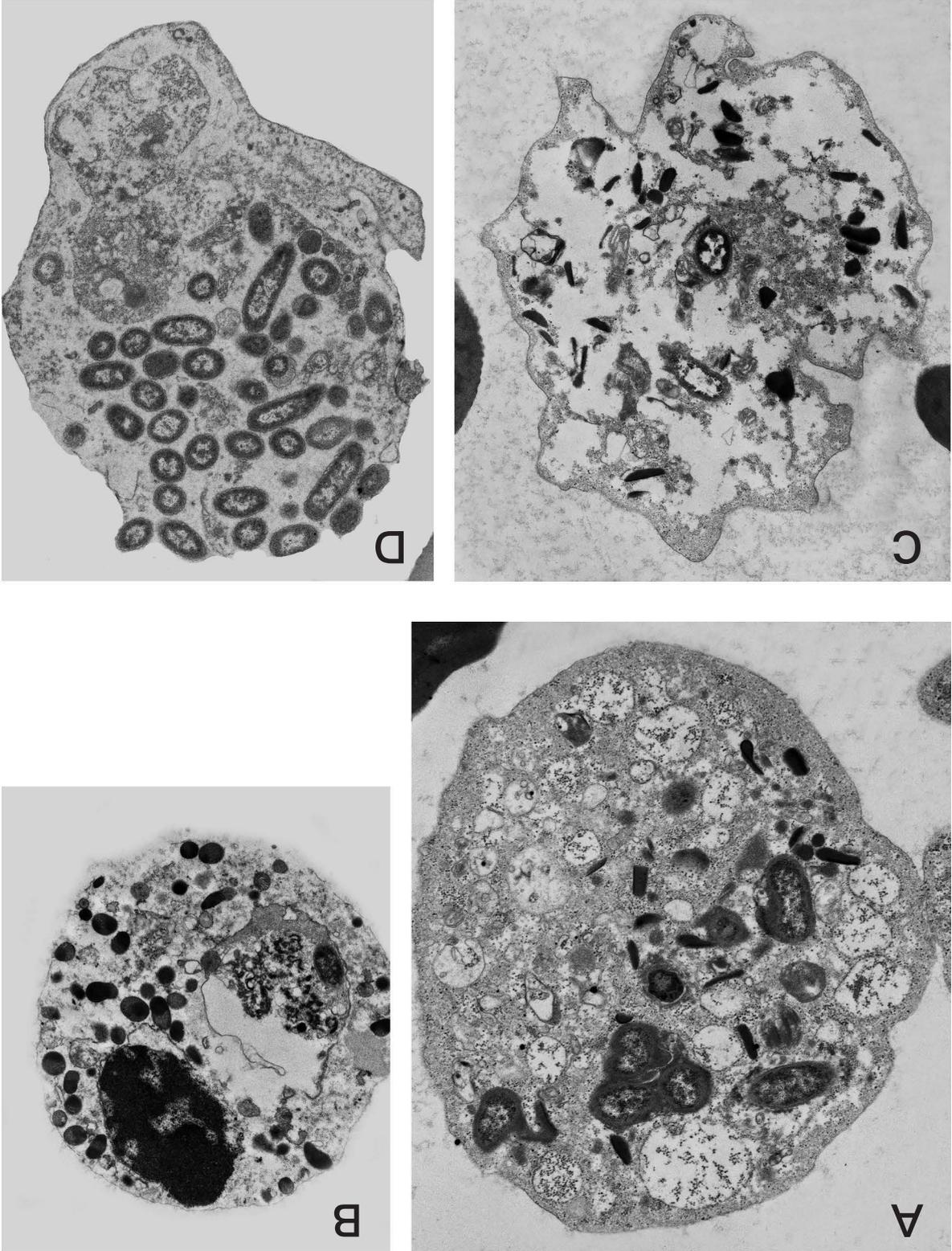


図 4

(A) 弱病原性 *E. tarda* 接種区の 30 時間後における好中球の電子顕微鏡像。好中球の食胞内で細菌が増殖しているが、そのほとんどが殺菌作用を受けて激しく変性している。X 6000 (B) 弱病原性 *E. tarda* 接種区の 30 時間後における好中球の電子顕微鏡像。好中球の細胞質増殖した全ての細菌が殺菌作用を受けて激しく変性している。X 7000 (C) 生菌ワクチンによる能動免疫を施したコイの好中球の電子顕微鏡像。強病原性 *E. tarda* 接種 17 時間後、食胞内の細菌に対してタンパク様物質が分泌されている。また、食胞から細胞質に移行した細菌はライソゾームと癒合し二次ライソゾームを形成している。X 8000 (D) 生菌ワクチンによる能動免疫を施したコイの好中球の電子顕微鏡像。強病原性 *E. tarda* 接種 17 時間後、食胞から細胞質に移行した細菌がライソゾームと癒合して二次ライソゾームを形成し、また、細胞壁の傷害を示している。X 17000

(A) 生菌ワクチンによる能動免疫を施したコイの好中球の電子顕微鏡像。強病原性 *E. tarda* 接種 30 時間後、食胞から細胞質に移行した細菌がライソソームと癒合して二次ライソソームを形成し、また、細胞壁の崩壊を示している。X 7000
 (B) 強病原性 *E. tarda* 接種 30 時間後、好中球の食胞内で、タンパク様物質が分泌され細菌が処理されている。X 7000
 (C) 強病原性 *E. tarda* 接種 48 時間後、好中球の殺菌作用が進展し、細菌が激しく変性するとともに好中球自体も崩壊に至っている。X 6000
 (D) 強病原性 *E. tarda* 接種 48 時間後、一部の細菌は好中球内で増殖し、好中球は崩壊している。X 5000

図 5



容物質の分泌のため空胞化していた (図 6 C)。また、好中球の細胞質内でも二次ライソゾームを形成して細菌が処理されており、細菌は崩壊していた (図 6 D)。48 時間後ではほとんどの好中球が正常細胞であった。一部の好中球は、食胞内で細菌処理していた (図 7 A)。また、細胞質で増殖した細菌の処理も進展し、ほぼ全ての細菌が細胞壁の膨化、細胞質の濃縮と委縮、変形を示して死滅していた (図 7 B)。

以上電子顕微鏡による観察の結果、好中球内の細菌は傷害を受けたものが多く観察された。以上のことから、生菌ワクチンの接種により誘導された抗 *E. tarda* 抗体との抗原抗体反応と、好中球の活性化により細菌が処理されていることが明らかになった。

考 察

1. 弱病原性 *E. tarda* および強病原性 *E. tarda* に対するコイの好中球の反応

鰻内細菌接種後、好中球が活発に鰻内に浸潤してきた。光学顕微鏡での観察では、好中球の細菌取り込み状況は、細胞内に細菌が少ないものから細胞内に細菌が多いものまで観察された。好中球内の細菌数の増加が、細菌の細胞内増殖によるものか、好中球の食菌能の亢進によるものかの判定には困難がともなった。そのため、好中球の電子顕微鏡観察を合わせて行った。

細菌接種後 17 時間で、弱病原性株接種魚の好中球内細菌は細胞壁や細胞質に傷害がみられたことから、既に好中球の殺菌作用によって処理が行われていると判断された。他方、強病原性細菌は好中球に補食された後も菌体に傷害を受けていないことから、殺菌作用に対し抵抗性を示していることが分かった。

細菌接種から 30 時間後においては、両区ともに好中球が活発に浸潤して観察できる好中球数が急激に増加した。コイは炎症時、好中球の出現が注射部位では起炎後 24 時間後、末梢血では起炎後 48 時間後に最大になるとともに、食菌能および活性酸素産生能も最大になるとされている⁶⁻⁷⁾。今回の実験でも同様の現象が確認されたといえる。

強病原性細菌接種魚では、細胞内に細菌が多い

好中球および細胞崩壊に至った好中球の割合が、弱病原性細菌接種魚に比べ、有意に多かった。電子顕微鏡観察の結果、強病原性細菌は好中球の殺菌作用に対して抵抗性を持ち、細胞内で増殖し、好中球を崩壊していることが確認された。一方、弱病原性細菌接種魚の好中球では食胞内や細胞質内にいる細菌が細胞壁や細胞質が傷害を受けており、好中球の殺菌処理が進展していることが確認された。

細菌接種から 48 時間後、強病原性細菌は好中球の殺菌作用に対する抵抗性を示し、好中球内で活発に増殖して細胞崩壊に至らしており、細菌接種から 48 時間後でも強病原性細菌に対して好中球の殺菌作用が効果を発揮していないと判断された。一方、弱病原性細菌接種魚では、観察された好中球は細菌を含まない正常細胞であり、48 時間以内に好中球の細菌処理が終息したと判断された。弱病原性細菌は、好中球に食菌された後、殺菌作用を受けて速やかに処理されるため、病原性を発揮できないと判断された。

以上の結果をまとめると、免疫していない通常のコイでは、好中球は強病原性細菌に対して殺菌作用が有効でないことが示された。他方、弱病原性細菌は好中球の誘導能が低く、好中球に食菌されたあとは、好中球の殺菌作用によって確実に処理されているとわかった。

2. *E. tarda* 生菌ワクチンで能動免疫したコイにおける強病原性 *E. tarda* および弱病原性 *E. tarda* に対する好中球の反応

E. tarda 生菌ワクチンで能動免疫したコイでは、高濃度の抗 *E. tarda* 抗体の産生とともに、好中球が活性化され、好中球の食菌作用が高まったようにみえた。生菌ワクチンで免疫した魚において細胞性免疫が誘導されることは、アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) に対する *E. ictaluri* 生菌ワクチンによる免疫実験例でも明らかにされている⁸⁻⁹⁾。

細菌接種から 17 時間後、弱病原性細菌接種魚では、細菌を取り込んだ好中球の出現が強病原性細菌接種魚に比べて有意に多く観察されたことから、能動免疫を施されたコイでは、好中球の食菌作用が高まっていると判断された。また、1 個の好中球内で多数の細菌が殺菌処理されている像が

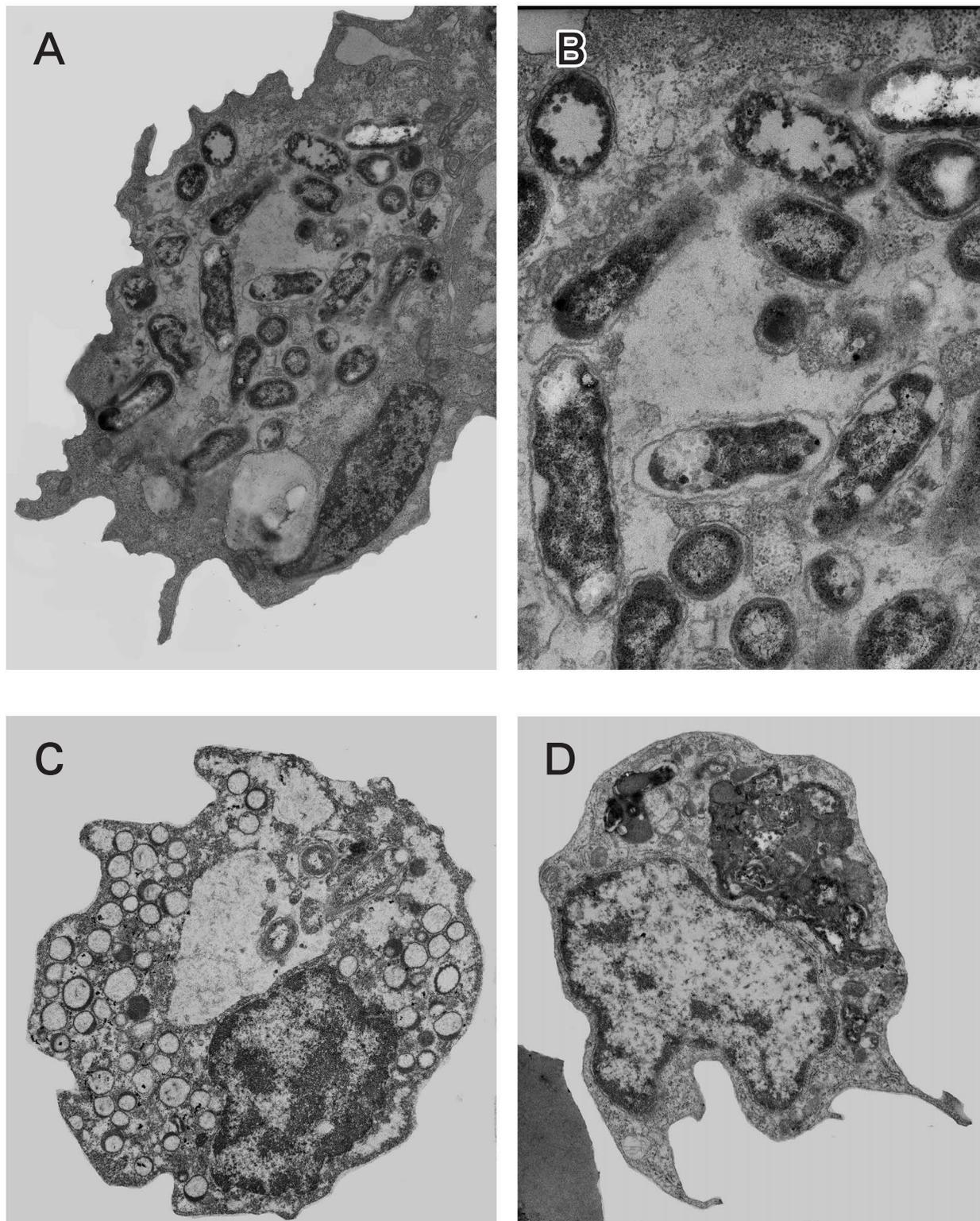


図 6

生菌ワクチンによる能動免疫を施したコイの好中球の電子顕微鏡像。

(A) 弱病原性 *E. tarda* 接種 17 時間後、食胞に多数の細菌が取り込まれ、殺菌作用を受けて激しく変性している。細胞質に移行した細菌も変性している。X 8000 (B) 図 A の拡大図。食胞内の細菌は、殺菌作用を受け、細胞壁の融解、細胞質の萎縮と空胞化などの変性を示す。X 20000 (C) 弱病原性 *E. tarda* 接種 30 時間後、食胞内の細菌は取り込まれた後殺菌作用を受けて変性から崩壊に至っている。細胞内微小顆粒は、空胞化しており、殺菌作用関連酵素の活発な分泌があったことを伺わせる。X 7000 (D) 弱病原性 *E. tarda* 接種 30 時間後、細胞質に移行したほとんどの細菌が、ライソゾームと癒合して大きな二次ライソゾームを形成している。X 8000

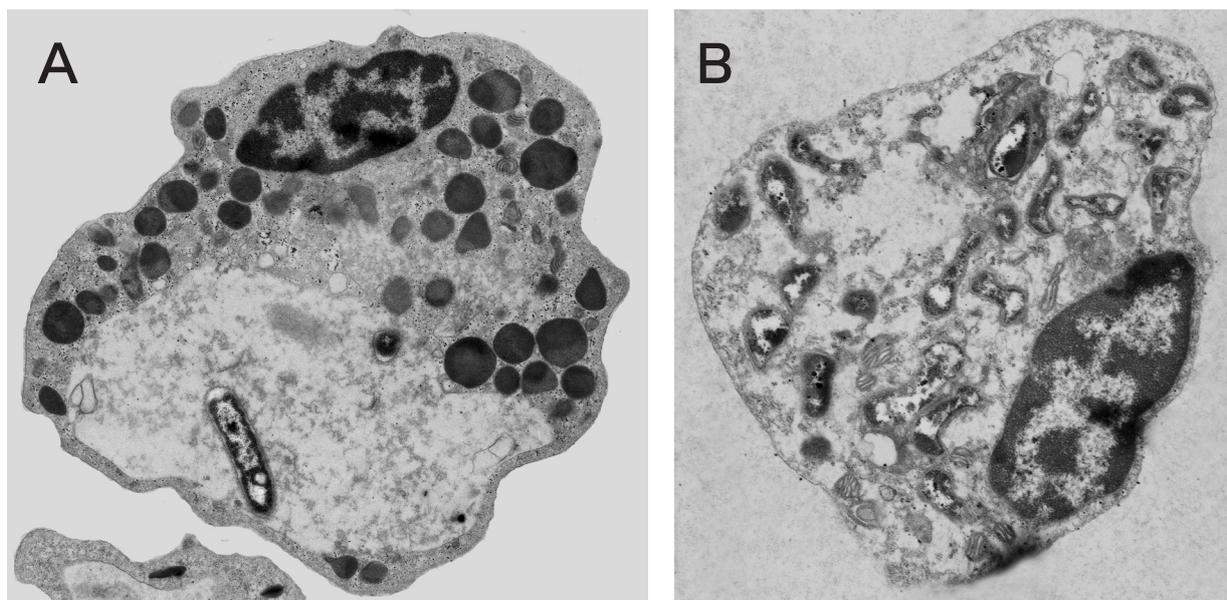


図 7

生菌ワクチンによる能動免疫を施したコイの好中球の電子顕微鏡像。

(A) 弱病原性 *E. tarda* 接種 48 時間後、好中球の大きな食胞内に取り込まれた細菌は変性している。細胞内微小顆粒は、電子密度の濃淡を示し、殺菌作用関連酵素の活発な分泌をしていることを伺わせる。X 6000 (B) 弱病原性 *E. tarda* 接種 48 時間後、好中球の細胞質に移行した細菌は変性から崩壊に至っている。また、好中球の細胞質も崩壊している。X 8000

観察され、好中球の殺菌能も亢進していることが確認された。強病原性細菌接種魚では、好中球の食菌作用により取り込まれたあと食胞から細胞質内に侵入した細菌もライソゾームと合体し二次ライソゾームを形成し、細胞壁が崩壊した細菌も観察された。このように免疫魚では、抗体の抗原抗体反応とともに好中球の殺菌能が亢進しており、非免疫魚では処理の困難であった強病原性細菌にも好中球は殺菌反応を及ぼすことができることがわかった。

細菌接種から 48 時間後、弱病原性細菌接種魚では、ほとんどの好中球が正常細胞であり、既に細菌の処理はほぼ完了したと考えられた。強病原性細菌接種魚では好中球による細菌の処理が継続的に行われていると考えられた。しかしながら、10 尾中 1 尾に細菌の細胞内増殖による崩壊細胞が多く観察された。これは、細菌が好中球の殺菌能に抵抗力があり細胞内増殖できたとも考えられるが、反対にこの魚では免疫が効果的に起こらなかったとも考えられる。前報¹⁾で、生菌ワクチンで免疫したコイに生菌攻撃を行った実験でも 16 尾中 1 尾が斃死に至った。これは免疫の発現には個体差があることを示している。

以上の実験結果から、弱病原性化した *E. tarda* を用いた生菌ワクチン接種による能動免疫は、ホルマリン不活化ワクチンよりも免疫効果が大きく、産生された高力価の特異抗体との抗原抗体反応および好中球の殺菌能の亢進が、細菌感染防御に有効に働くと判断された。

文 献

- 1) 島田真央, 宮崎照雄 (2013) コイにおける *Edwardsiella tarda* に対する免疫反応-I. 不活化ワクチンと生菌ワクチンによる能動免疫効果. 本誌・本号
- 2) ENDO M., YOSHIDA T., SAKAI M. and IIDA T. (1995) The swim bladder as a site for administration of chemical agents: application to fish immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 5 : 85-87
- 3) ENDO M., ARUNLERTAREE C., RUANGPAN L., PONPORNPIST A., YOSHIDA T. and IIDA T. (1997) A new method for collecting neutrophils using swim bladder. *Fish. Sci.* 63 : 644-645
- 4) 松山知正, 飯田貴次, 延東真 (1998) 鰻を用いた白血球の収集法. 月刊 海洋号外 14 : 140-144
- 5) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則 (2002) コイ好中球顆粒のメイーグリュンワルド・ギムザ染色性.

- 水産大学校研究報告 50 : 109-117
- 6) 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. 日本水産学会誌 50 : 1375-1384
 - 7) MATSUYAMA T., IIDA T. and KUROKURA H. (1999) Kinetics of defense activities of inflammatory neutrophils in carp and red sea bream. Fish Pathol. 34 : 133-137
 - 8) SHOEMAKER C. A. and KLESIUS P. H. (1997) Protective immunity against enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following controlled exposure to *Edwardsiella ictaluri*. J. Fish Dis. 20 : 101-108.
 - 9) KLESIUS P.H. and SHOEMAKER C.A. (1999) Development and use of modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine against enteric septicemia of catfish. Adv. Vet. Med. 41 : 523-537

コイにおける *Edwardsiella tarda* に対する免疫反応-III 抗 *E.tarda* 鶏卵抗体 (IgY) で受動免疫したコイにおける 強病原性 *E. tarda* および弱病原性 *E.tarda* に対する好中球の反応

島田 真央・奥村友理子・宮崎 照雄*

三重大学大学院生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻 水圏生物生産学講座 水族病理学研究室

Immune Responses to *Edwardsiella tarda* in Koi-III Electron Microscopic Studies on Neutrophils in Koi with Passive Immunization using Anti *E. tarda*-IgY (Egg Yolk Antibody)

Mao SHIMADA, Yuriko OKUMURA and Teruo MIYAZAKI*

Laboratory of Fish Pathology, Graduate School of Bioresources, Mie University

Abstract

We studied on responses of neutrophils to *Edwardsiella tarda* after an injection with the weakened-virulent *E. tarda* and high-virulent *E. tarda* within the swimbladder in koi *Cyprinus carpio*, which were given anti *E. tarda*-IgY by intramuscular injections for passive immunization. In a fish group challenged with the weakened-virulent bacteria (n=30), infiltrated neutrophils markedly phagocytized bacteria at 17 hs post challenge, and bacteria-laden neutrophils were decreased whereas normal cells were markedly increased between 30 and 48 hs. On the other hand, in a fish group challenged with the high-virulent bacteria (n=30), neutrophils phagocytized bacteria between 17 and 48 hs. Fragmented neutrophils were increased in two fish at 48 hs. Electron microscopy revealed phagocytized bacteria received marked damage in the cell wall followed by cellular digestion within the phagosomes, and formed secondary lysosomes in the cytoplasm in both fish groups. A small number of fragmented neutrophils allowed intracytoplasmic propagation of bacteria. These results determined that anti *E. tarda*-IgY and neutrophils performed successful collaboration to treated *E. tarda*: IgY damaged the bacterial cell wall and neutrophils worked for bactericide

Key Words: *Edwardsiella tarda*, anti *E. tarda*-IgY, passive immunization, neutrophils, phagocytosis, electron microscopy

緒 言

免疫には能動免疫と受動免疫という方法がある。能動免疫はワクチン療法とも呼ばれ、不活化抗原や生ワクチンを接種し、免疫応答を誘導させる方法である。それに対して、受動免疫とは精製した

特異抗体や抗体産生細胞を生体内に接種し、宿主にかわり免疫応答を行わせる方法である。これまで、養殖魚類の *Edwardsiella tarda* 感染症の防御を目的として、ホルマリン不活化菌体および生菌を用いた能動免疫が研究されてきた¹⁻⁵⁾。一連の研究において、ホルマリン不活化菌体により免疫を

2013年6月20日受理

〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

* for correspondence (miyazaki@bio.mie-u.ac.jp)