

# 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<sup>1-5)</sup>。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)

賦与された魚では、確かに好中球の食菌活性は高められるが、*E. tarda* のように細胞内増殖をする病原細菌では好中球に活発に捕食されることは好都合であり、細胞内で増殖した細菌により感染症が進展し、結果として宿主を斃死させることになる。この理由から、ホルマリン不活化菌体による能動免疫の明瞭な効果は得られるにいたっていない。他方、生菌による能動免疫では、特異抗体の良好な産生と好中球の殺菌能の活性化が誘導され、効果的な感染防御が行われることが解明された<sup>3,5)</sup>。しかしながら、ワクチンとして用いる生菌は病原性を復活させる可能性があり、安全性に問題が残る。

従って本研究では、受動免疫を検討した。つまり *E. tarda* 感染症に対し、抗 *E. tarda* 鶏卵抗体（以下抗 *E. tarda*-IgY とする）を利用して受動免疫を試みた。抗体として IgY を選んだ理由は以下の通りである。抗原を接種した雌の鶏はその卵黄内に特異抗体である IgY を蓄積するため、産卵期間中、特異抗体を大量に得ることができる<sup>6-7)</sup>。産卵鶏に対しては鶏病予防を目的としたワクチネーション法が既に確立されている。鶏は大量飼育が容易であり 1 羽が年間約 250 個の卵を産み、その卵黄中には IgY のみが存在する。その鶏卵 1 個から約 100 mg の IgY を分画することができることから、抗体の大量調製に適しているという利点がある。そこで、本研究では *E. tarda* に特異的な抗体である抗 *E. tarda*-IgY を作製し実験に供した。抗 *E. tarda*-IgY の筋肉内注射で受動免疫したコイは、*E. tarda* 生菌の筋肉内接種による感染実験で、有効な受動免疫効果を発揮することが福村によりすでに報告されている<sup>8)</sup>。本研究では、抗 *E. tarda*-IgY と好中球がどのようにして免疫効果を発揮するのか検討した。

## 材料および方法

### 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 30 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

実験には、「コイにおける *Edwardsiella tarda* に

対する免疫応答-II」<sup>5)</sup> で作製した *E. tarda* の弱病原性株と強病原性株を用いた。

### 抗 *E. tarda*-IgY の作製

抗 *E. tarda*-IgY の作製は、株式会社ファーマーズに依頼し、鶏に *E. tarda* ホルマリン死菌を接種し、産卵された卵の卵黄を精製して得られた抗 *E. tarda*-IgY (29 % 製剤) を実験に供した。

### 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。

滅菌生理食塩水で 1 % 抗 *E. tarda*-IgY 水溶液を作製し、1 尾あたり 0.2 mL を 3 日間尾部の筋肉に接種した。注射によるストレスを軽減させるために 1 日空けた後、攻撃実験を行った。攻撃実験は、ハンクス液で菌数を調製した強病原性株もしくは弱病原性株を注射法により鰓内に接種した。強病原性株接種区には、ハンクス液を用いて菌数を  $9 \times 10^7$  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、 $7 \times 10^7$  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取り上げ、鰓を摘出し、鰓内液を採取した。採取した鰓内液は、「コイにおける *Edwardsiella tarda* に対する免疫応答-II」<sup>5)</sup> で述べたと同じ方法で処理し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。

## 結 果

### 光学顕微鏡による好中球の動態の観察

細菌接種から 17 時間後には、細菌を接種した鰓内には、鰓内の細菌に反応して好中球が浸潤してきていることが確認された。細菌接種から 17, 30, 48 時間経過後に鰓内液に浸潤していた好中球の諸像の出現数について検討した。

強病原性株接種区における好中球の動態の観察結果では、正常細胞が 63 % ~ 84 %、細胞内に細菌が少ない細胞が 14 % ~ 33 %、細胞内に細菌が多い細胞が 0 % ~ 4 %、崩壊細胞が 0 % ~ 3 % 観察された。弱病原性株接種区では正常細胞が 66 % ~ 93 %、細胞内に細菌が少ない細胞が 6 % ~

19%, 細胞内に細菌が多い細胞が1%未満~14%, 崩壊細胞が0%~1%観察された。両区の各段階にある好中球に危険率5%二標本t検定を行ったところ, 正常細胞が弱病原性株接種区において有意に多く, 細胞内に細菌が少ない細胞および崩壊細胞の出現は強病原性株接種区で有意に多いという結果が得られた ( $P<0.005$ )。

細菌接種から30時間後, 強病原性株接種区では, 正常細胞が63%~88%, 細胞内に細菌が少ない細胞が8%~31%, 細胞内に細菌が多い細胞が0%~10%, 崩壊細胞が0%~6%観察された。弱病原性株接種区では正常細胞が80%~95%, 細胞内に細菌が少ない細胞が4%~19%, 細胞内に細菌が多い細胞が1%未満~1%, 崩壊細胞が1%未満観察された。同様のt検定では, 強病原性株接種区で正常細胞の出現が有意に少なく, 他の好中球の段階においては強病原性株接種区での出現が有意に多いという結果が得られた ( $P<0.005$ )。

細菌接種から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, 正常細胞が47%~91%, 細胞内に細菌が少ない細胞が7%~30%観察された。細胞内に細菌が多い細胞(図1A)および崩壊細胞の出現には個体差がみられ, 10尾中2尾では, 細胞内に細菌が多い細胞が10%と12%, 崩壊細胞が12%と17%観察され, 10尾中8尾では, 細胞内に細菌が多い細胞が1%未満~2%, 崩壊細胞が1%未満~2%観察された。一方, 弱病原性株接種区では, 正常細胞が83%~97%であり, 細胞内に細菌が少ない細胞が2%~9%, 細胞内に細菌が多い細胞(図1B)が0%~1%, 崩壊細胞が0%~1%未満観察された。t検定の結果, 強病原性株接種区と弱病原性株接種区では好中球の全ての段階の出現において有意差が確認された ( $P<0.005$ )。

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。強病原性株接種区では, 細菌接種から17時間後と30時間後を比べると, 正常細胞が74%から75%と変化し, 細胞内に細菌が少ない細胞が23%から20%, 細胞内に細菌が多い細胞が2%から3%, 崩壊細胞が1%から2%と変化した。この時点での好中球の各段階における増減に有意差はみられなかった ( $P>0.1$ )。30時間後と48時間後を比較すると, 正常細胞が75%から73

%に変化した, 細胞内に細菌が少ない細胞は共に20%, 細胞内に細菌が多い細胞は共に3%であった。また, 崩壊細胞は2%から4%と増加した。細菌接種後48時間後における強病原性株接種区10尾全で, 各段階の平均好中球数をt検定の結果, 増減に有意差はみられなかった ( $P>0.1$ )。しかし, 細胞内に細菌が多い細胞および崩壊細胞の出現が多かった2尾を同様に検定すると, 細胞内に細菌が多い細胞および崩壊細胞の増加は有意であった。残り8尾との比較検定では, 細胞内に細菌が多い細胞の減少が有意との結果をえた ( $P<0.005$ )。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84%から88%, 細胞内に細菌が少ない細胞が12%から11%, 細胞内に細菌が多い細胞が3%から1%未満に変化した, 崩壊細胞は共に1%未満であった。48時間には, 正常細胞が92%, 細胞内に細菌が少ない細胞が6%, 細胞内に細菌が多い細胞および崩壊細胞が1%未満に変化していた。t検定では, 細胞内に細菌が少ない細胞の減少が有意であった ( $P<0.005$ )。

#### 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, 食胞内や細胞質に細菌を取りこんでいる好中球が, 弱病原性株接種区に比べ, 多く観察された。好中球の食胞内に存在する細菌は細胞壁の融解を示していた(図1C)。また, 好中球の細胞質に侵入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1D)。二次ライソゾーム化した細菌の細胞壁は融解を示していた。30時間後でも, 細菌接種から17時間後と同様の観察結果となり, 食胞内の細菌には細胞壁の崩壊と細胞質の空胞化が観察された(図2C)。このように食胞内で殺菌作用を発揮している好中球の微小顆粒は内容物の分泌のため空胞化していた。細胞質に移行し増殖していた細菌は細胞壁と細胞質の融解を示していた(図2D)。48時間後では, 細菌は好中球の細胞質に移行していることが多く, 細菌増殖像も確認されたが, それらの細胞壁は融解していた(図3C)。あるいは, 好中球の細胞質内で細菌が多数のライソゾームと癒合して巨大な二次ライソゾームを形成し, その中で崩壊していた(図3D)。



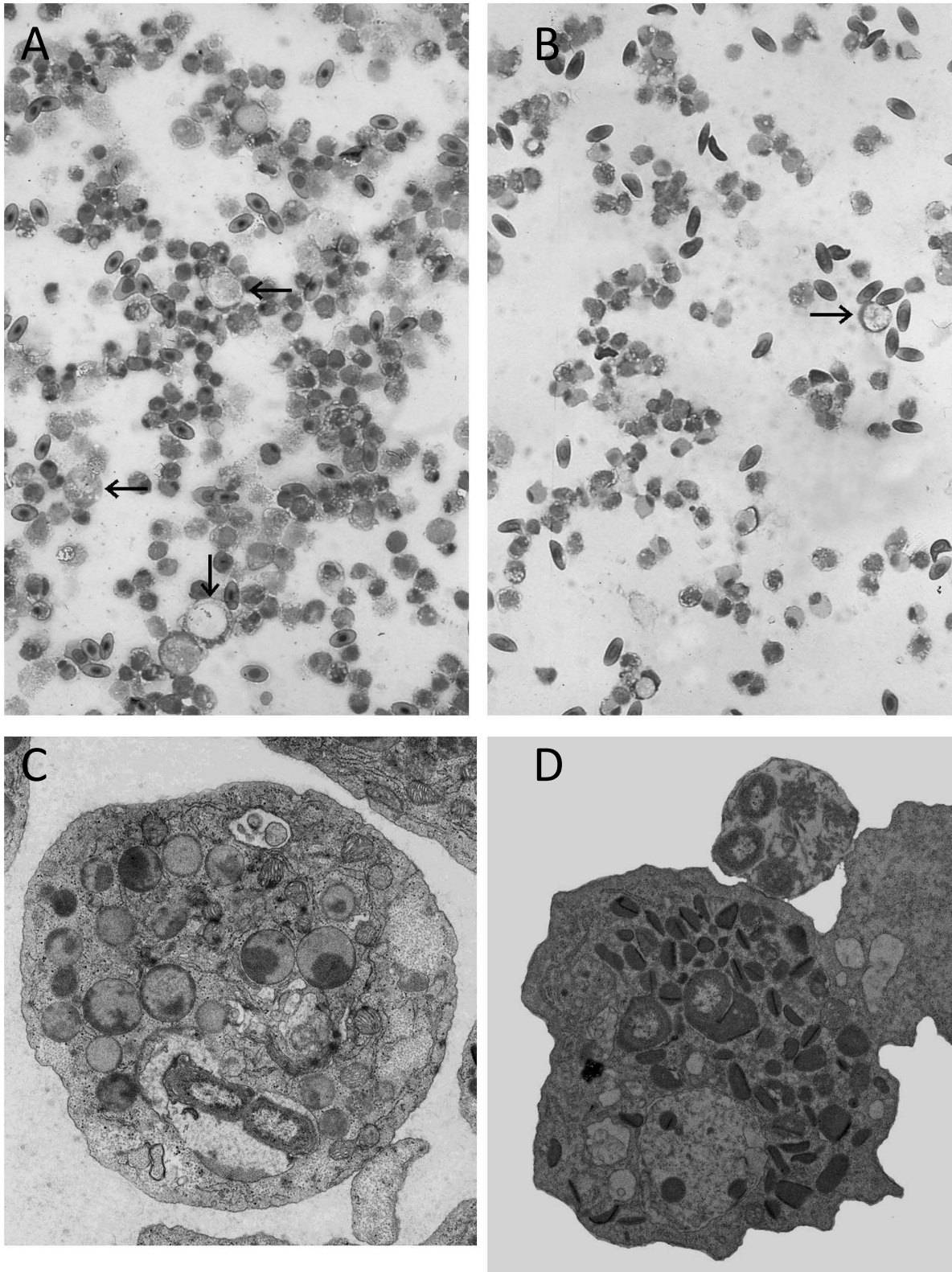


図 1

(A) 抗 *E. tarda*-IgY で受動免疫したコイの鰾に強病原性細菌接種 48 時間後に、鰾から採取した浸潤好中球。矢印は食胞に細菌を入れる好中球を示す。メイ・グリュンワルド・ギムザ染色 X 200 (B) 受動免疫したコイの鰾に弱病原性細菌接種 48 時間後に、鰾から採取した浸潤好中球。矢印は食胞に細菌を入れる好中球を示す。メイ・グリュンワルド・ギムザ染色 X 200 (C) 受動免疫したコイの鰾に強病原性細菌接種 17 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。好中球の食胞内で処理される細菌の細胞壁に傷害がみられる。微小顆粒は内容物の分泌のため電子密度が低くなっている。X 9000 (D) 受動免疫したコイの鰾に強病原性細菌接種 17 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。好中球の細胞質に移行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ている。X 7000



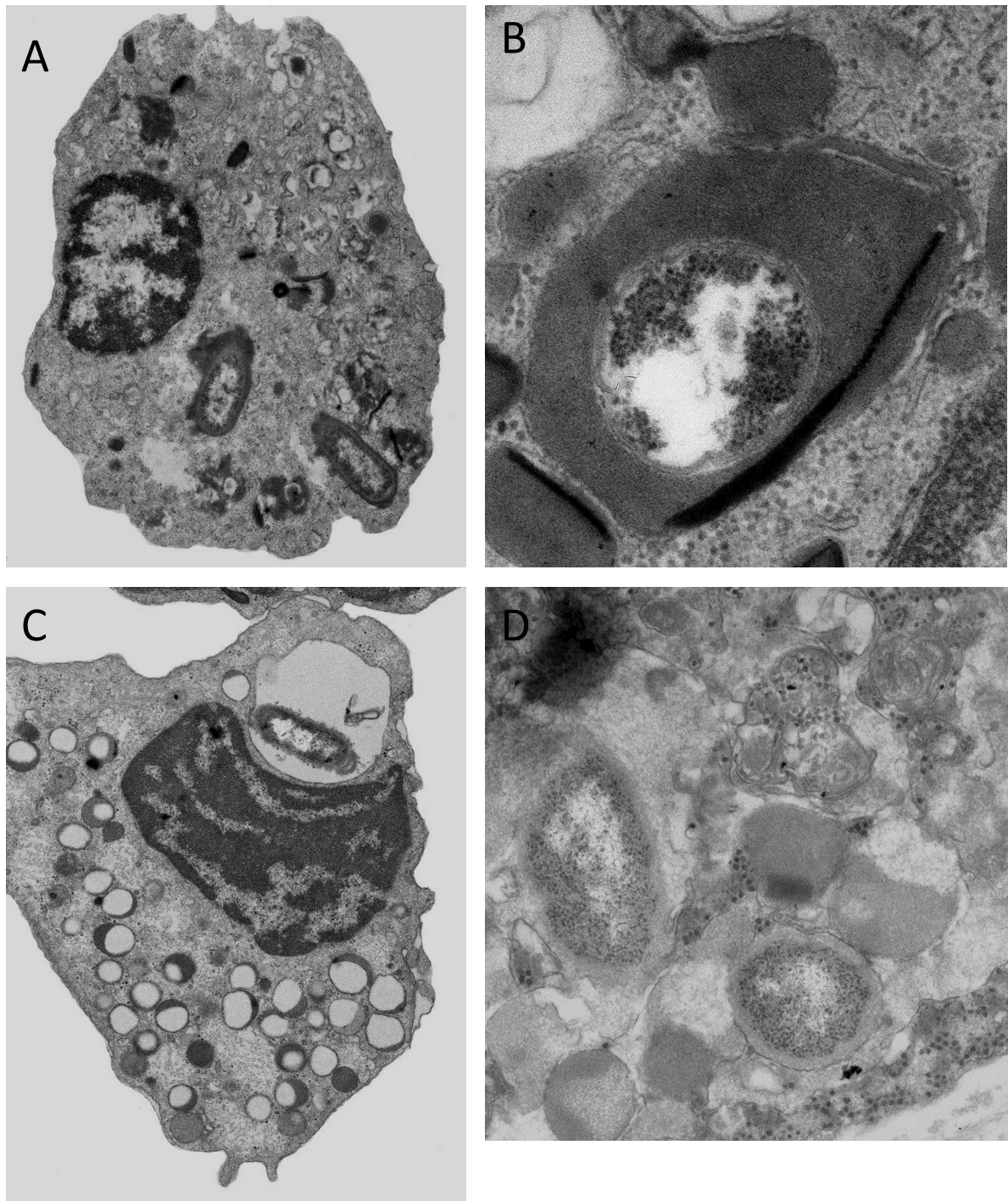


図 2

(A) 受動免疫したコイの鰾に弱病原性細菌接種 17 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。好中球の細胞質に移行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ている。X 7000 (B) 受動免疫したコイの鰾に弱病原性細菌接種 17 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。好中球の細胞質に移行した細菌処理の拡大図。二次ライソゾームを形成した細菌の細胞壁は融解し、細胞質は空胞化している。X 20000 (C) 受動免疫したコイの鰾に強病原性細菌接種 30 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。食胞に取り込まれた細菌は細胞壁と細胞質が融解している。微小顆粒は内容物の分泌のため空胞化している。X 7000 (D) 受動免疫したコイの鰾に強病原性細菌接種 30 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。好中球の細胞質に移行した細菌処理の拡大図。細菌の細胞壁と細胞質は融解している。X 20000



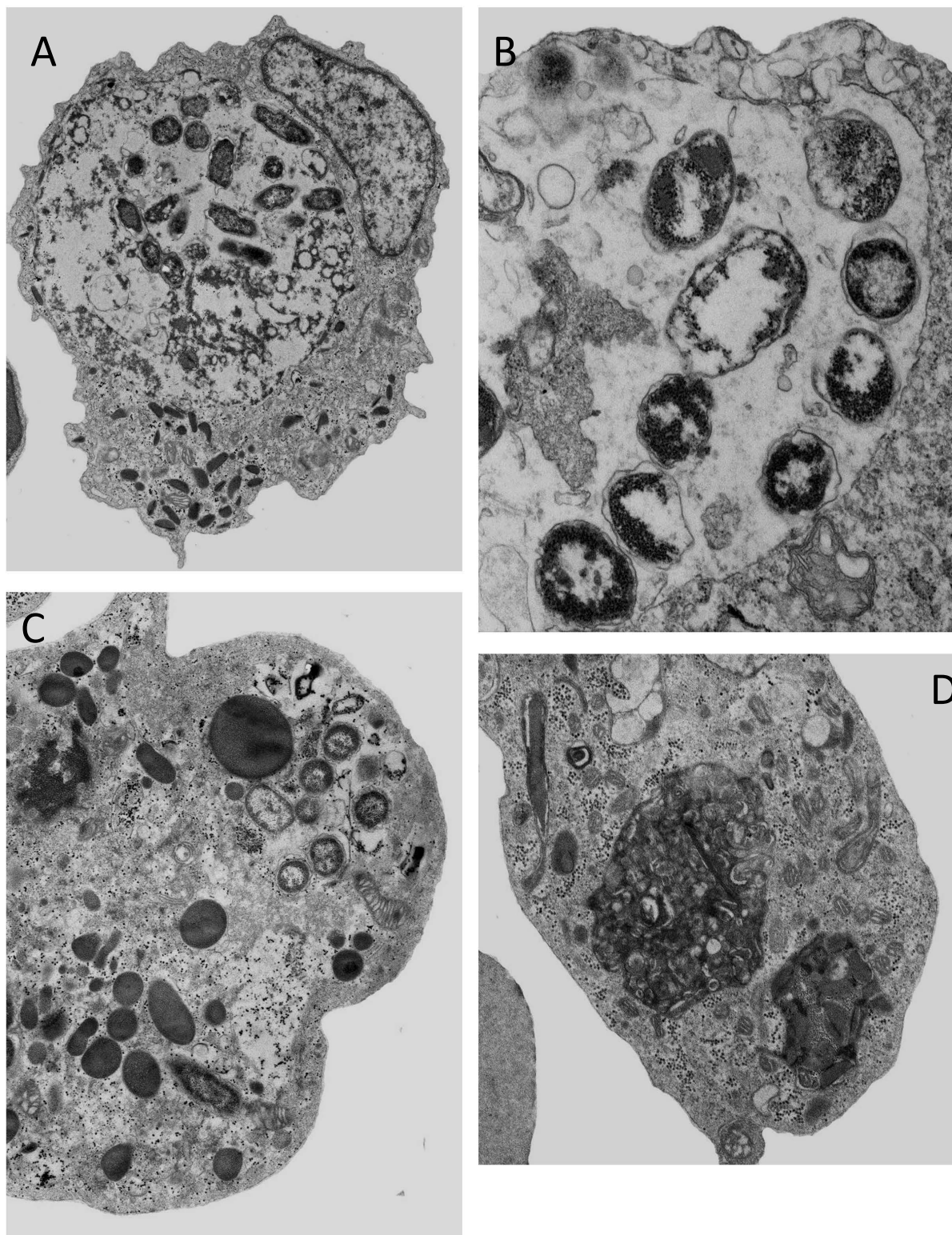


図 3

(A) 受動免疫したコイの鰾に弱病原性細菌接種 30 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。好中球の食胞内で増殖した細菌のほとんどが殺菌処理されている。X 5000 (B) 受動免疫したコイの鰾に弱病原性細菌接種 30 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。好中球の食胞内で殺菌処理されている細菌の拡大図。X 20000 (C) 受動免疫したコイの鰾に強病原性細菌接種 48 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。好中球の細胞質に移行した細菌の多くの細胞壁は融解している。X 6000 (D) 受動免疫したコイの鰾に強病原性細菌接種 48 時間後に鰾から採取した好中球の電子顕微鏡像。好中球の細胞質内で細菌が多数のライソゾームと癒合して巨大な二次ライソゾームを形成し、その中で崩壊している。X 5000

一方、弱病原性株接種区では、細菌接種から 17 時間後、好中球の食胞内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、その細胞壁と細胞質は融解していた (図 2 A, B)。30 時間後では、好中球の食胞内で増殖した細菌の消化像が顕著で、細胞壁や細胞質の融解を示していた (図 3 A, B)。細菌接種から 48 時間後では観察される好中球のほとんどが正常細胞であった。

抗 *E. tarda*-IgY による受動免疫を施した好中球の電子顕微鏡観察では、強病原性細菌と弱病原性細菌はともに、細菌の殺菌像と思われる細胞壁の崩壊や融解といった傷害が顕著に観察された。また、好中球の細胞質で観察された細菌より、食胞内で観察された細菌のほうに、より強い殺菌像がみられる傾向があった。

## 考 察

抗 *E. tarda*-IgY で受動免疫を施したコイでは、細菌を接種した鰓内に多数の好中球が浸潤し、細菌に対応していた。好中球の細菌への対応は、強病原性株と弱病原性株との間で、相異が見られた。細菌接種 17 時間後、好中球は活発に食菌をしていたが、好中球内の細菌の状態は以下の 2 種類があった。つまり、食胞内に細菌が存在する細胞と、細菌が食胞から細胞質に移行するか細胞質に侵入したかして細胞質に細菌が存在する細胞が観察された。電子顕微鏡観察ではこれら好中球内に取り込まれた細菌はその細胞壁に傷害を受けており、抗 *E. tarda*-IgY との抗原抗体反応の結果と推察された。つまり、抗 *E. tarda*-IgY は抗原抗体反応の結果、細菌の細胞壁に傷害を与えると判断された。その結果、細胞壁に傷害を負った細菌は好中球に捕食されやすくなると思われる。また、強病原性株接種魚では、細胞質に細菌が存在する好中球が多く見られた。これは、食胞に取り込まれた細菌が、食胞で起こる殺菌反応から逃れるため細胞質に侵入したと考えられた。また、細胞質で細菌が増殖して細胞崩壊に至った好中球が現れることから、強病原性細菌には、抗 *E. tarda*-IgY との抗原抗体反応を免れる細菌が少ないながらもいると考えられた。

反面、弱病原性株接種魚では、食胞内に細菌が

存在する好中球が多い傾向があった。その理由として、弱病原性細菌は抗 *E. tarda*-IgY との抗原抗体反応により菌体に障害を強く受け、食胞から細胞質へ逃れることが出来なかったためと判断された。

30 時間後、強病原性株接種魚では、細胞質内に細菌を多く入れる好中球および崩壊好中球はほとんど観察されず、反対に細胞内に細菌が少ない好中球が観察された。これは、抗 *E. tarda*-IgY による抗原抗体反応によって傷害を受けた細菌が好中球内で処理されており、細菌の処理が継続して行われているためと推察された。他方、弱病原性株接種魚では、好中球内で菌体の障害から消化を示す細菌が多く観察され、細菌の殺菌処理が終息に向かっていると確認された。

48 時間後には、強病原性株接種魚で好中球の細菌処理に個体差が見られた。2 尾において、好中球は細菌の細胞内増殖を許しており、この 2 尾では免疫効果が充分働いていないことが示唆された。同様のことは、抗 *E. tarda*-IgY の筋肉内接種により受動免疫したコイにおける攻撃実験において、少数の斃死魚がでたことでみられた。つまり、強病原性細菌では、抗 *E. tarda*-IgY の働きに抵抗できる菌体が存在し、その細菌が細胞内増殖することにより全身感染に進展し、感染魚が斃死に至ると推察された。

受動免疫したコイにおける好中球の細菌に対する反応を電子顕微鏡観察した結果、特異鶏卵抗体は、抗原抗体反応により細菌の細胞壁に強い障害を与え、結果として好中球の食菌作用を促し、好中球の食胞内での菌体破壊、細胞質でのライソゾームによる菌体処理を容易にさせると判断された。

ワクチンを用いた能動免疫では、産生された抗体を含む液性免疫のみならず、好中球やマクロファージおよびリンパ球などの細胞性免疫が複雑に作用するため、抗体だけの免疫作用を解明することが難しかった。本研究において、特異鶏卵抗体を用いたことにより、魚体内での細菌に対する抗体の働きを具体的に解明できたといえよう。

## 文 献

- 1) SALATI F., IKEDA Y. and KUSUDA R. (1987)  
Effect of *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide immunization on phagocytosis in the eel. Nippon



Suisan Gakkaishi 52 : 811-816

- 2) 馬久地隆幸, 清川智之, 本多数充, 中井敏博, 室賀清邦 (1995) ヒラメのエドワジエラ症に対する予防免疫の試み. 魚病研究 30 : 251-256
- 3) IGARASHU A. and IIDA T. (2002) A vaccination trial using live cells of *Edwardsiella tarda* in tilapia. Fish Pathol. 37 : 145-148.
- 4) 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
- 5) 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-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. 本誌, 本号
- 6) 八田一 (1993) 抗ヒトロタウイルス鶏卵抗体 (IgY) に関する研究. 大阪市立大学博士論文, 96 pp
- 7) 宮崎照雄 (1993) 鶏卵抗体の魚類感染症防除への利用. 日本農芸化学会誌 67 : 1440-1443
- 8) 福村加奈子 (2008) コイにおける *Edwardsiella tarda* 感染症に対する抗 *E. tarda*-IgY の受動免疫効果. 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文