

## ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の 防御に関する研究

芦田 貴行\*<sup>1</sup>, 沖増 英治\*<sup>2</sup>, 雨村 明倫\*<sup>2</sup>

### Studies on Protection against Enterococcosis of Yellowtail and Edwardsiellosis of Japanese Flounder

Takayuki Ashida\*<sup>1</sup>, Eiji Okimasu\*<sup>2</sup>, and Akinori Amemura\*<sup>2</sup>

Rep. Res. Inst. Mar. Biores., Fukuyama Univ., (10), 1 - 69 (1999)

Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, and Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, are popular cultured marine fish in Japan. The enterococcosis of yellowtail and edwardsiellosis of Japanese flounder are serious problems for fish culture. Antibiotics are effective for treating these bacterial diseases, but the easy use of these chemicals has led to the appearance of drug-resistant bacteria and the persistence of the drugs in the fish. In this study, more effective techniques for preventing these diseases involving the use of immunostimulants and a vaccine, which will prevent the appearance of antibiotic-resistant bacteria and harm to our health, were developed.

First, the effects of quillaja and beet saponins on the resistance against enterococcosis of yellowtail was examined. The survival of infected fish was monitored for 9 days after immersion challenge. The results showed that all fish in the control (without saponin) for the challenge groups had died by day 6 after the challenge, whereas the rate of survival of fish in the saponin-fed groups were 40%. Thus, the feeding of saponins was found to elevate the survival rate after bacterial challenge. In these experiments the amount of lipid peroxide (LPO) in the liver increased after the enterococcosis, however, those in the liver of saponin-fed fish did not increase after the infection.

---

\*<sup>1</sup> 福山大学大学院生命工学専攻博士後期課程 (Doctoral Programs in Life Science and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Fukuyama University, Fukuyama 729-0292).

\*<sup>2</sup> 海洋生物工学科 (Department of Marine Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama 729-0292).

On the other hand, the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathioneperoxidases (GPxs), which are active oxygen-scavenging enzymes, increased in the kidney and spleen of yellowtail after the challenge, and saponin feeding resulted in progressive increases in the activities following the challenge. The activation of these enzymes was thought to reduce the oxidative stress caused by the enterococcosis. Infection and oxidative stress induce a serious stress response to organisms, resulting in the acquisition of stress resistance to the organisms. Chaperone proteins, hsps, whose function is to prevent the improper aggregation or association of partially folded proteins, prevent the denaturation of proteins due to various forms of stress such as heat and infection. In the kidney and spleen, hsp60 and hsp32 were produced continuously at high levels in the saponin-fed fish. These results showed that saponins seem to promote hsp induction. The promotion of active oxygen-scavenging enzymes and hsp induction on pre-feeding of saponins may help to reduce the bacterial infection stress more effectively, and the reduced infection stress may increase the survival rate after enterococcosis of yellowtail.

Next, the effect of quillaja saponin feeding on edwardsiellosis of Japanese flounder was studied, however, the effect was low. Therefore, we investigated the effect of bacterial  $\beta$ -1,3-glucan (curdlan) on this disease, because some  $\beta$ -glucans are known to increase the non-specific immune response of a host. In a short period (1, 2, 3 and 4 weeks) feeding test, the phagocytic activity of Japanese flounder increased until 2 weeks with everyday feeding of curdlan, and the superoxide generation in fish fed curdlan every day for 3 weeks was enhanced from 10 to 20% with the low concentrations of curdlan (*in vitro*). When fish were fed every 2 days for 4 months (long period feeding test) their phagocytic activity increased, however, levels were lower than in the short period feeding test, whereas the superoxide generation did not increase. Thus, the feeding period and feeding mode influenced the effect of curdlan.

Then, the effect of a vaccine (formalin-killed *Edwardsiella tarda*) on activation of the specific immune defense mechanism in Japanese flounder was studied. The agglutination titer of Japanese flounder fed diets containing the vaccine was higher than that in the vaccine-unsupplemented diet group, however, the survival rate of the vaccine group (30%) was not notably higher than that in the curdlan or quillaja saponin-fed fish, or the control (without an immunostimulant) after immersion challenge. For effective treatment, we examined the combined effects of these immunostimulants and the vaccine. When the vaccine was fed with curdlan and quillaja saponin, the survival rates of *E. tarda*-infected fish (42%) increased significantly compared to the control group. In these fish, the phagocytic activity of leucocytes and the antibody titers in serum were higher than in vaccine only fed fish, however, the combinations of the immunostimulants and vaccine were not effective for the superoxide generation by leucocytes.

Finally, the influence of oral administration of quillaja saponin, curdlan and vaccine on the hsp60 expression levels in the intestine, kidney and spleen of Japanese flounder was examined. In the

immunostimulants and vaccine-fed fish, the hsp60 expression pattern in the intestine was found to be different from those in the kidney and spleen, i.e. the hsp60 level in the intestine increased more highly compared to the control (no feeding of an immunostimulants or the vaccine), but did not increase significantly with the levels in the kidney and spleen. It was suggested that the surfaces of mucosal tissues such as the intestine, and respiratory and urogenital tracts develop a special immune defense system: M cells which exist in the intestinal epithelium transport antigens for efficient endocytosis and transcytosis; the antigens transported by M cells are processed and presented by macrophages, and then the macrophages activate  $\gamma$ ,  $\delta$ -T cells in the intraepithelial pocket. The activation of the mucosal immune defense system is thought to be caused by hsp60 recognized by  $\gamma$ ,  $\delta$ -T cells. Thus, hsp60 seems to regulate the T cell response against this disease as an important function in the activation of the mucosal immune system, and the immunostimulants and vaccine we used seem to stimulate the expression of hsp60. However, after infection the hsp60 level in the intestine decreased. The reason for this is that cells of the intestine were disrupted or the mucosal immune system was damaged by edwardsiellosis.

On the other hand, the hsp60 levels in the kidney and spleen of the control group increased after infection. These results showed previously that hsp60 increased in the kidney of yellowtail on enterococciosis. The abnormal expression of such stress proteins has been widely observed in a number of infection conditions including oxidant injury, ischemia and inflammation. The hsp60 induced in these organs may have protected them from the oxidative stress caused by bacterial infection. Thus, it seems that hsp 60 induction is an important event induced by bacterial infection stress in the kidney or other organs. As the hsp60 level in the intestine decreased with edwardsiellosis, probably through damage to the mucosal immune system, as mentioned above, we will be able to determine the extent of infection stress in fish by measuring the hsp60 levels in organs.

In conclusion, the feeding of saponins elevated the hsp60 levels in some organs of yellowtail, which led to a higher survival rate of yellowtail after s enterococciosis. In Japanese flounder, the single feeding of saponin, curdlan or the vaccine was not effective against edwardsiellosis. However, the combination of these immunostimulants and vaccine raised the agglutination antibody titers in serum and triggered the phagocytic activity of leucocytes, which enhanced the ultimate survival rate of fish after infection as a result. The method of oral administration of immunostimulants and vaccine used here was better than intraperitoneal injection, spraying and immersion, since with this method a mass of fish is immunized with very little handling stress.

**Key words** : yellowtail, enterococciosis, immunostimulant, active oxygens, heat shock protein, Japanese flounder, edwardsiellosis, oral vaccine, agglutination titer, phagocytosis

## 序 章

従来の水産業は、技術の向上と莫大な資本投資によって生産性の合理化と漁場の拡大が図られてきた。しかし、日本の漁業生産量は 1989 年をピークに海洋資源の枯渇や、国際海洋法による 200 海里経済水域批准による漁場の減少などによって、減少の一途をたどっている。これに対して、養殖による漁業生産量は毎年着実に増加しており、21 世紀を担う食料蛋白質として注目されている。農林水産省の漁業・養殖業の基礎資料によると、1996 年度の海産養殖魚の生産量は約 25 万 t に達している。その中でブリ *Seriola quinqueradiata* が約 60% を占め、マダイ *Pagrus major* , ギンザケ *Oncorhynchus kisutch* , ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の順となっている。

しかし、このように水産養殖業の急速な発達に伴って、種々の問題が表面化するようになった。なかでも、養殖魚の疾病による被害の増加が大きな問題となっている。養殖魚の疾病による被害の増加は、自然環境下で生育している魚類と比較して、高密度や漁場の汚染による水質環境の悪化、限られた餌料による栄養条件での飼育など的人為的要因によって、感染症が誘発されるためと考えられている。水産庁の各都道府県に対するアンケート調査によると、水産養殖業における魚病被害額は、給餌養殖生産額（約 3,000 数億億円）の約 7% で推移しているとされている。しかし、魚病はその性格上、発生事例や被害額が公表されることは少なく、実際の養殖現場においてはこれらの統計を大きく上回る被害が発生しているものと推測されている。被害額を養殖魚種別でみると、養殖生産量の多いブリが、全体の約 50%、マダイが約 10%、ヒラメが約 5% を占めている。また、魚病の原因別でみると、細菌性疾病が約 40%、ウイルス性疾病が約 30%、寄生虫性疾病が約 10%、その他の疾病が約 20% となっており、細菌による魚病の発生が大きな問題となっている。細菌による魚病のうち、海産養殖魚の主要魚種であるブリでは腸球菌症が、ヒラメではエドワジエラ症が、最も重要な疾病となっている。

ブリの腸球菌症は、1974 年に高知県土佐清水市のブリ養殖場の 1 才魚および 2 才魚において発生が確認され、楠田ら<sup>1)</sup>によって、*Streptococcus* sp. による新しい疾病として報告され、本病を連鎖球菌症と呼ぶことが提案された。その後 *Streptococcus* sp. は、*Enterococcus* 属に移され *Enterococcus seriolicida* sp. nov. なる新種名が提案され<sup>2)</sup>、その病名を腸球菌症と呼称されることになった。近年、本菌は *Lactococcus garvieae* と同種であることが明らかにされ<sup>3)</sup>、本菌の原因菌の種名には *L. garvieae* の種名が用いられるようになった。しかし、本症の病名は腸球菌症として、そのまま用いられている。病魚には、外観的に鰓蓋内側の発赤と眼球の突出が、解剖的に肝臓の退色や出血、腸管の発赤、心外膜の出血が認められる<sup>4)</sup>。現在、本症はブリ養殖において最も一般的かつ被害の大きな疾病の一つとなっている。また、抗生物質の多用による耐性菌の増加が、本症による魚病被害を拡大する要因の一つとして挙げられている。

ヒラメのエドワジエラ症は、1982 年に中津川<sup>5)</sup>によって養殖場の若年魚において発生する *Edwardsiella tarda* による疾病として報告された。病魚には、外観的に腹部の膨張、腹水の貯留、脱腸が、解剖的に肝臓、腎臓の炎症が認められる<sup>6)</sup>。現在では、ヒラメ養殖において最も被害の大きな魚病として問題となっている。また、治療薬として認められている塩酸オキシテトラサイクリンに対する耐性率の急激な増加も懸念されている。

## ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

ブリの腸球菌症やヒラメのエドワジエラ症をはじめとする、多くの細菌感染魚には、解剖的に腎臓、脾臓の炎症が認められる。炎症反応は生体に侵入した異物を排除し、病原菌によって生じた病変を修復しようとする一連の生体反応である。また、炎症によって産生される活性酸素は、宿主の臓器や組織に対しても、種々の酸化ストレスを与えることが明らかにされている<sup>7)</sup>。生物は熱、化学物質、低酸素などの急激な環境変化に対して、ストレス蛋白質 (heat shock protein, hsp) と呼ばれる一群の蛋白質を誘導し、恒常性の維持をはかることが知られている。また、hsp は炎症組織においても誘導され、細菌感染に対する抵抗性を付与するとされている<sup>8)</sup>。したがって、細菌感染後の臓器の hsp レベルは、細胞の炎症程度を客観的に評価する一つ的手段となるものと推察される。

そこで、本研究では主要な海産養殖魚であるブリとヒラメで発生する細菌感染症のなかで、被害が大きく治療が困難である腸球菌症とエドワジエラ症に対する防御の手段として、免疫賦活効果を持つ生理活性物質およびワクチンを経口投与して防御効果を調べるとともに、これらの投与効果を臓器内に発現する hsp レベルによって評価した。

## 第一章 ブリの腸球菌症の防御に関する研究

### 緒言

ブリ *Seriola quinqueradiata* の腸球菌症は 1974 年に養殖ブリでその発生が確認され, 原因菌は *Streptococcus* 属の新しい病原菌 *Streptococcus* sp. に同定され, 病名をブリ連鎖球菌症と呼称することが提案された<sup>1)</sup>。のちに, 本菌は *Enterococcus* 属に移され, *Enterococcus seriolicida* sp. nov. なる新種名と, その病名を腸球菌症呼ぶことが提案され<sup>2)</sup>, 本菌は長らく *E. seriolicida* として分類されてきた。近年, 本菌は *Lactococcus garvieae* と同種であることが明らかにされ<sup>3)</sup>, 本症の原因菌の種名は *L. garvieae* が用いられるようになった。しかし, 本症の病名は腸球菌症として, そのまま用いられている。本症は初夏から秋にかけての高水温期に幼魚から成魚まで魚令を問わず発生し, 発生後は長期間にわたって斃死が継続することなどから, ブリを養殖する上で重要な細菌感染症の一つとして問題となっている。

本症に対する防御手段として, 実験室レベルでは sodium nifurstyrenate, macrolide 系抗生物質, lincomycin などの化学療法剤の投与が有効であると報告されて以来<sup>9,10)</sup>, フィールドでは macrolide 系抗生物質の投与による治療対策がとられてきた。しかし, 現在では抗生物質の多用による耐性菌の出現や, 体内残留などの公衆衛生上の問題が課題となっている。また, 1997 年春には本症に対する経口ワクチン (ピシバックレンサ, 共立商事) も開発, 市販されているが, 効果を得るためには, 多量のワクチンを必要とすることなどの問題が残されている。

そこで, 本研究では薬剤耐性菌の出現頻度や公衆衛生上の問題がなく, マウス *Mus musculus* において免疫賦活効果が認められている, シソ *Quillaja saponaria* から抽出した quillaja saponin とサトウダイコン *Beta vulgaris* から抽出した beet saponin の 2 種類の生理活性物質を経口投与し, ブリの腸球菌症に対する防御効果について検討した。

## 第一節 Saponin の投与効果

### 実験材料および方法

**供試魚** 日本栽培漁業協会屋島事業場から分与を受け、試験に供試するまで福山大学内海生物資源研究所の飼育水槽において飼育した平均体重 150 g のブリを用いた。

**供試菌株** 高知大学農学部（現福山大学工学部）楠田理一教授より分与を受けた *L. garvieae* (*E. seriolicida* S-2433 株) を用いた。

**Saponin** 本研究で用いた quillaja saponin と beet saponin は、太陽化学総合科学研究所より分与された。Quillaja saponin は、シソの葉より抽出されたトリテルペノイドに糖が結合した配糖体構造をもつ saponin である。また、beet saponin は、サトウダイコンからの粗抽出標品である。

**実験感染に対する saponin 投与効果** 200 l 容ダイライト水槽 4 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min を行いながら、供試魚をそれぞれ 5 尾収容した。これらの供試魚にイカナゴミンチを餌として与え、試験まで 1 週間予備飼育した。Saponin の効果を評価するために、Fig. 1 に示すような 4 試

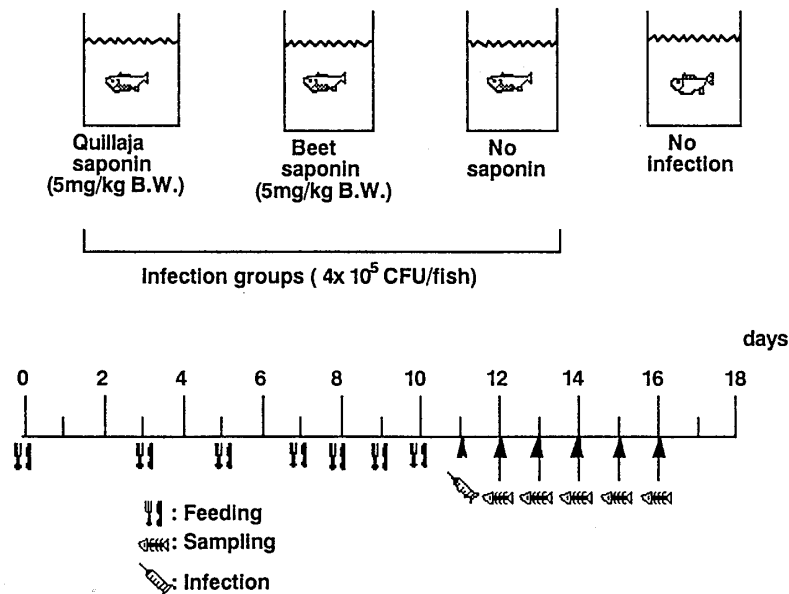


Fig. 1. Experimental conditions.

験区を設けた。Quillaja saponin および beet saponin 投与区には, 体重 1 kg 当たりそれぞれ 5 mg をイカナゴミンチに混ぜて, 最初の 8 日間は隔日で 1 日 1 回計 4 回, 次の 3 日間は毎日 1 回計 3 回, 合計 7 回投与した。対照は 2 区設け, イカナゴミンチのみを同様に投与した。実験感染は, 投与開始 11 日後に腹腔内注射法によって行った。すなわち, brain heart infusion (BHI, Difco) 培地を用いて培養した対数増殖期にある *L. garvieae* をブリ 1 尾当たり  $4 \times 10^5$  CFU 注射し, 感染後 9 日間の生残率を調べた。なお, 対照の 2 区には同様にして実験感染した感染対照区 (no saponin) と実験感染しない対照区 (no injection) を設けた。また, 実験感染 9 日後の saponin 投与区と感染対照区の最終斃死率から有効率を求めた。

### 結果

Quillaja saponin および beet saponin 投与区の実験感染後の生残率変化は, Fig. 2 に示した。

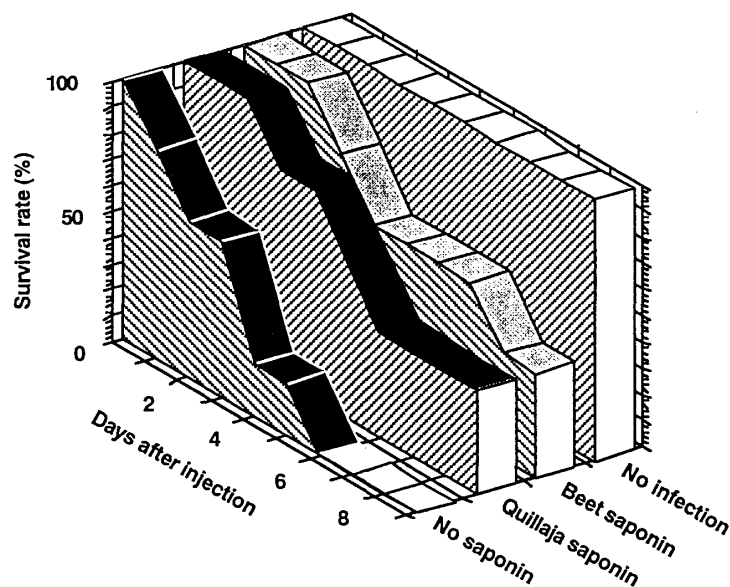


Fig. 2. Changes in survival of yellowtail after injection with *Lactococcus garvieae*.

Saponin を投与した試験区ではいずれも感染 3 日後に斃死が確認され, quillaja saponin 投与区では, 感染 6 日後に生残率が 40%まで低下したが, その後斃死はみられなかった。Beet saponin 投与区では感染 7 日後まで 60%の高い生残率を示したが, 8 日後には 40%まで低下した。これに対して, 感染対照区では, 感染 6 日後にすべてのブリが斃死した。なお, 対照区の斃死はみられなかった。感染 9 日後の有効率は Table 1 に示すとおりで, quillaja saponin および beet saponin とも 40%であった。



ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

Table 1. Relative percentage survival of yellowtail fed on saponins 9 days after injection

Exp. condition	Specific mortality	Mortality (%)	RPS
Q. saponin	2	60	40
B. saponin	2	60	40
No saponin	5	100	-

$$\text{Relative percent survival (RPS)} = \left( 1 - \frac{\% \text{ mortality in the saponin group}}{\% \text{ mortality in the no saponin group}} \right) \times 100\%$$

考 察

マウス<sup>11-13)</sup>やブリ<sup>14)</sup>において免疫賦活効果があるとされている saponin をブリに 2 週間投与したところ、*L. garvieae* 実験感染 9 日後の有効率は、40%であった。しかし、ブリの腸球菌症による斃死は感染後長期間にわたって観察されることから、saponin を与えても試験終了後に斃死するブリが存在した可能性がある。したがって、saponin の投与は実験感染に対する延命効果を高めることは明らかにされたが、saponin の有効性については検討の余地が残されていると考えられる。しかし、腹腔内注射による実験感染は、直接体内に病原菌を接種することから野外における自然感染と比較してはるかに過酷な条件で感染が成立するものと推察される。これらのことを考慮すると、saponin 投与はブリの腸球菌症に対する防御手段として効果が期待できると思われる。

## 第二節 Saponin の投与による活性酸素消去酵素の推移

### 目 的

腸球菌感染症を発病したブリでは、外観的に眼球の突出、鰓蓋内面の激しい発赤が、解剖学的には心外膜の白濁肥厚、肝臓からの出血、腸の激しい炎症、腎臓及び脾臓の鬱血などが認められている<sup>5)</sup>。このような病徴からブリの腸球菌症は腎臓、肝臓のような循環器系の臓器組織に対して炎症を引き起こす疾患であると考えられる。感染魚では *L. garvieae* の侵入によって白血球が活性化され、活性酸素分子種が産生されるとともに、虚血と再灌流によって臓器からも活性酸素分子が産生され、組織内の脂質の過酸化が促進されて過酸化脂質量が上昇するものと考えられる。

前節において、ブリの腸球菌症に対して saponin の投与が延命効果を示すことが明らかになった。そこで、本節ではブリに saponin を経口投与したのちに、実験感染を行って、経日的に臓器を摘出して臓器内の過酸化脂質量と、活性酸素を消去する superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) の活性を測定し、それらの推移から saponin 投与の有効性の評価を試みた。

### 実験材料および方法

**供試魚** 日本栽培漁業協会屋島事業場から分与を受け、試験に供するまで福山大学内海生物資源研究所の飼育水槽において飼育した平均体重 200 g のブリを用いた。

**供試菌株** 高知大学農学部（現福山大学工学部）楠田理一教授より分与を受けた *L. garvieae* (*E. seriolicida* S-2433 株) を用いた。

**Saponin** 太陽化学総合科学研究所より分与された quillaja saponin および beet saponin を用いた。

**SOD と GPx 活性に対する saponin 投与効果** 200 l 容ダイライト水槽 4 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min をしながら供試魚をそれぞれ 6 尾収容した。これらの供試魚にイカナゴミンチを餌として与え、試験まで 1 週間予備飼育した。Saponin の効果を評価するために、Fig. 1 に示すような 4 試験区を設けた。Quillaja saponin および beet saponin 投与区には、体重 1 kg 当たりそれぞれ 5 mg をイカナゴミンチに混ぜ、最初の 8 日間は隔日で 1 日 1 回計 4 回、次の 3 日間は毎日 1 回計 3 回、合計 7 回投与した。対照は 2 区設け、イカナゴミンチのみを同様に投与した。実験感染は、投与開始 11 日後に腹腔内注射法によって行った。すなわち、BHI (Difco) 培地を用いて培養した対数増殖期にある *L. garvieae* をブリ 1 尾当たり  $4 \times 10^5$  CFU 注射し、感染後 9 日間の生残率を調べた。なお、

## ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

対照の 2 区には同様にして感染させた 感染対照区 (no saponin) と感染を行わない対照区 (no infection) を設けた。

**臓器内 *L. garvieae* 菌体数の測定** 試験感染前後のブリから肝臓、腎臓および脾臓を摘出しテフロンホモジナイザーにいたのち 9 倍量の 0.85% NaCl を加え、ホモジナイズを行った。得られたホモジネートを 0.85% NaCl で 1,000 倍希釈したのちに、その 100  $\mu$ l を BHI (Difco) 寒天培地上に滴下して広げた。そして、25  $^{\circ}$ C で一晚培養したのちコロニー数をカウントした。また、本菌を顕微鏡下で観察した。

**過酸化脂質量測定**<sup>15)</sup> 試験感染前および感染 4 日後のブリから肝臓を摘出し、テフロンホモジナイザーにいたのち 9 倍量の 1.15% KCl を加え、ホモジナイズを行った。得られたホモジネート 0.5 ml に 1% phosphoric acid 0.3 ml および 0.67% 2-thiobarbituric acid 1 ml を添加して沸騰水浴中で 45 分加熱したのち、冷却して 4 ml の *n*-butanol で振とう抽出した。これを 1,600  $\times$  g、10 分の遠心を行ったのちに、上層を取って、535 および 520 nm の吸光度 ( $A_{535} - A_{520}$ ) で測定した。10 nM 1,1,3,3-tetramethoxypropane を標準液として用い、同様の操作を行って、臓器中の過酸化脂質 (lipid hydroperoxide, LPO) 濃度を定量した。

**酵素活性測定試料の調製** 活性酸素分解系酵素の推移を検索するために、saponin を投与したのち、実験感染を行ったブリから、感染直前、感染 1 日、2 日、3 日、4 日、7 日後に肝臓、腎臓および脾臓を摘出し、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む 9 倍容量の 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) を加え、2 分間の超音波処理 (Tomy, UD-201) を施した。この懸濁液を 100,000  $\times$  g で超遠心し、上清を 4 $^{\circ}$ C の 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 中で一晚透析して測定用試料とした。

**Superoxide dismutase (SOD) 活性測定**<sup>16-19)</sup> SOD 測定は、xanthine-xanthine oxidase 系による superoxide 活性阻害システム (和光) を使用し、0.4 mM xanthine と 0.24 mM nitroblue tetrazolium を含む 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8.0) に各臓器の 100,000  $\times$  g 上清蛋白質、0.049 U/ml xanthine oxidase を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートしたのち 69 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) を添加し、560 nm の吸光度を測定した。測定値から sample の superoxide 産生阻害率を求め、全 SOD 活性値とした。Mn-SOD 活性は反応溶液に 1 mM KCN を添加し、上述の測定法によって得られた活性値を Mn-SOD の活性値とした。また、CuZn-SOD 活性は全 SOD 活性値から Mn-SOD の活性値を差し引き算出した。

**Glutathione peroxidase (GPx) 活性測定**<sup>20)</sup> 測定用 sample を 1 mM EDTA、1 mM NaN<sub>3</sub>、1 mM glutathione (GSH)、0.2 mM NADPH、0.2 U/ml glutathione reductase を含む 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 中で 25 $^{\circ}$ C でインキュベートしたのち、17.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加して 340 nm

の吸光度の変化を測定し, NADPH 還元速度より glutathione peroxidase (GPx) 活性を算出した。また, phospholipid hydroxyperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) 活性は, 基質として  $H_2O_2$  の代わりに 0.15% *t*-butyl hydroperoxide を添加して測定した。

### 結果

Saponin を投与せず試験感染を行ったブリの肝臓, 腎臓および脾臓内における *L. garvieae* 生菌数は Fig. 3 に示した。感染 1 日後には, 調査したすべての臓器において生菌が検出され, 感染 2 日後に

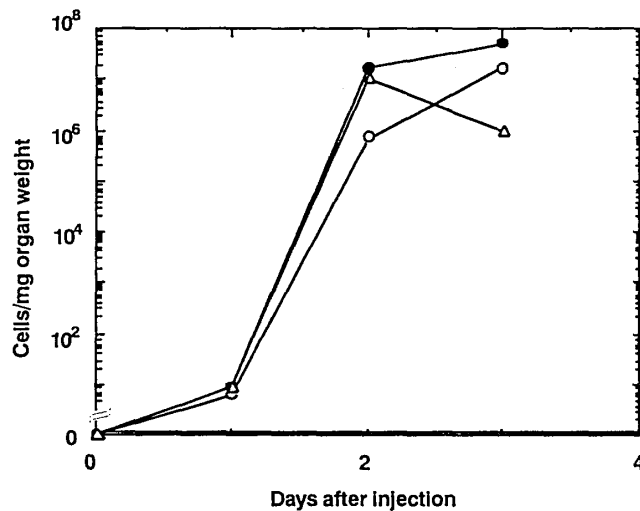


Fig. 3. Distributions of *Lactococcus garvieae* in three organs after injection.

○, liver; ●, kidney; △, spleen.

は  $10^5$  から  $10^7$  cells/mg organ weight に達した。さらに, 感染 3 日後においては 3 臓器中で腎臓の生菌数が最も高い値を示した。また, これらのコロニーを顕微鏡下で観察したところ, 連鎖球菌であることが確認された。

ブリ肝臓の LPO 量を測定した結果は, Fig. 4 に示した。ブリ肝臓の LPO 量は, saponin を投与してもしなくても, 差異は認められず低い値であった。しかし, saponin を投与後に実験感染を行った感染 4 日後のブリ肝臓 LPO 量は, 感染前と差異が認められないのに対して, 感染対照区では感染前の 34 倍となった。また, quillaja saponin と beet saponin を投与した後に実験感染を行ったブリの肝臓の LPO 量は, 顕著な変化を示さなかった。

ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

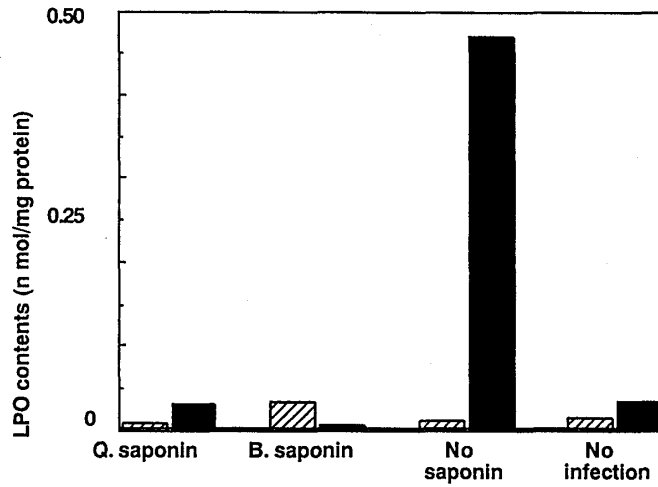


Fig. 4. Lipid hydroperoxide contents in the liver of yellowtail 4 days after injection with *Lactococcus garvieae*.

▨, before injection; ■, 4 days after injection.

Table 2. SODs and GPxs activities in three organs of yellowtail without feeding of saponins before injection

Organ	Activity (unit / mg protein)			
	CuZn-SOD	Mn-SOD	GPx*	PHGPx**
Liver	7.2	2.1	0.032	0.011
Kidney	5.4	0.7	0.035	0.013
Spleen	4.9	0.02	0.030	0.015

\* The activity was measured with  $H_2O_2$  as a substrate.

\*\* The activity was measured with *t*-BtOOH as a substrate.

Saponin を投与しない対照の肝臓、腎臓および脾臓の活性酸素を消去する酵素の活性は、Table 2 に示すとおりである。これら三種類の臓器において GPx および、PHGPx 活性に大きな差異は認められなかった。しかし、CuZn-SOD および Mn-SOD 活性はいずれも肝臓において腎臓と脾臓よりも高い値を示した。また、*L. garvieae* 実験感染後の各活性酸素消去酵素活性の推移は、これらの活性値を 100% として相対活性値で示した。CuZn-SOD 活性の推移は Fig. 5 に示すとおりで、測定したすべてのブリの臓器において試験感染後の大きな変動は認められなかった。しかし、Mn-SOD 活性の推移は Fig. 6 に示すとおりで、感染 3 日後以降すべての臓器組織において上昇し、肝臓で 2 倍、腎臓で 2.5 倍、脾臓

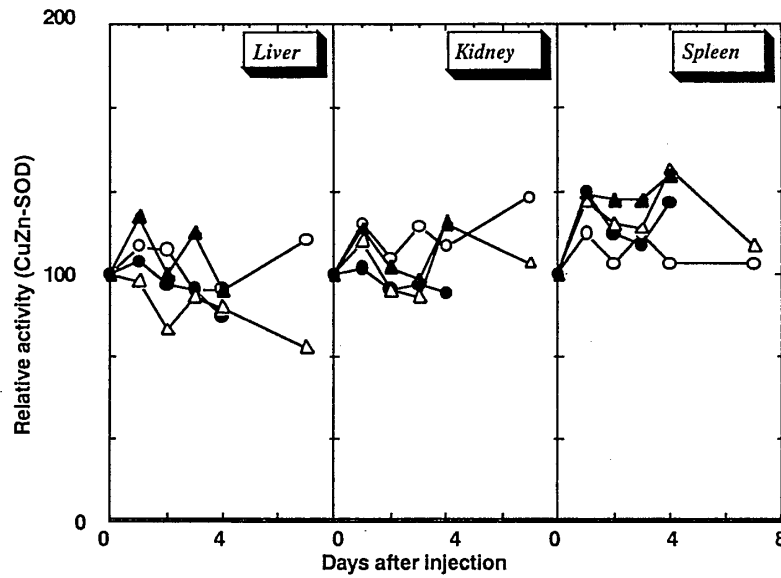


Fig. 5. CuZn-SOD activity in three organs of yellowtail fed on saponins after injection with *Lactococcus garvieae*.

△, quillaja saponin ; ▲, beet saponin; ●, no saponin; ○, no injection.

で 2.5 倍となった。その傾向は quillaja saponin 投与魚の肝臓および腎臓 と beet saponin 投与魚の肝臓において顕著であった。いっぽう、GPx 活性の推移は Fig. 7 に示すとおりで、脾臓においては感染前と比較して、2 倍に上昇した。また、PHGPx 活性は Fig. 8 に示すとおりで、肝臓においては感染 4 日後に quillaja saponin と beet saponin 投与魚、および感染対照区においては徐々に増加して 1.5 倍になったが、感染を行わない対照においては低い上昇しか認められなかった。脾臓においおては感染 1 日後以降に上昇し、quillaja saponin と beet saponin 投与魚、および感染対照区では約 2 倍に上昇したのに対し、感染を行わない対照区では低い上昇しか認められなかった。

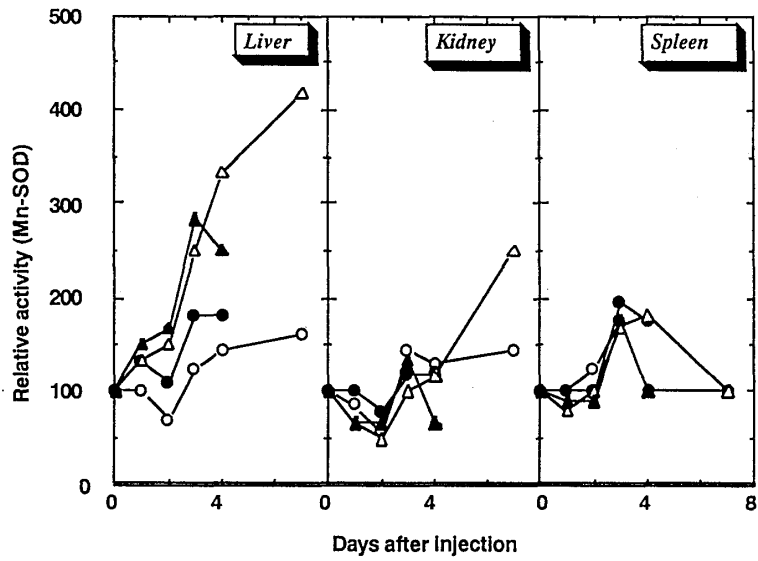


Fig. 6. Mn-SOD activity in three organs of yellowtail fed on saponins after injection with *Lactococcus garvieae*.

△, quillaja saponin ; ▲, beet saponin; ●, no saponin; ○, no injection.

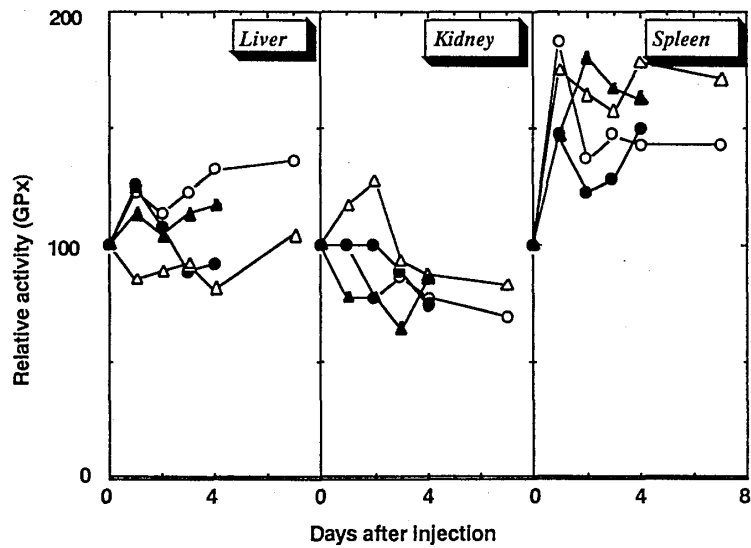


Fig. 7. GPx activity in three organs of yellowtail fed on saponins after injection with *Lactococcus garvieae*.

△, quillaja saponin ; ▲, beet saponin; ●, no saponin; ○, no injection.

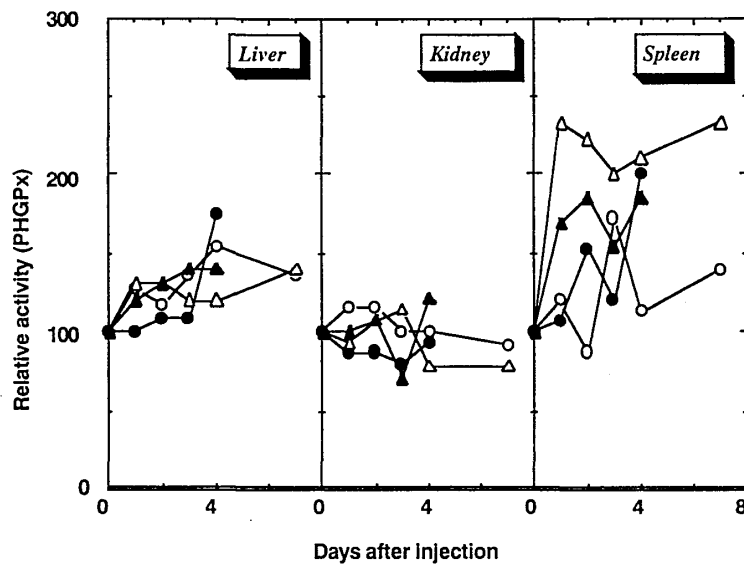


Fig. 8. PHGPx activity in three organs of yellowtail fed on saponins after injection with *Lactococcus garvieae*.

△, quillaja saponin ; ▲, beet saponin; ●, no saponin; ○, no injection.

### 考 察

肝臓, 腎臓および脾臓における試験感染後の生菌数を調べたところ, すべての臓器において細菌の増殖が認められた。したがって, これらの臓器においては細菌が定着して増殖しているものと考えられ, 種々の生体防御機構が活性化されているものと推察される。魚類においては, 細胞性免疫機構が液性免疫機構よりも優位に働くとされている。細胞性免疫機構では, 活性酸素の産生が異物の排除に働く一方で, 宿主に対しても傷害を与えるとされている。一般に, 感染後の生体では炎症に伴って発生した活性酸素を消去する SOD, GPx, catalase などの酵素が誘導, 活性化され, 活性酸素による傷害を軽減するとされている。魚類においても健康な 6 種の海産魚のウキブクロにおいて SOD, GPx が存在することが確認されている<sup>21)</sup>。本研究では, 実験感染後のプリの Mn-SOD 活性が上昇しており, 肝臓, 腎臓および脾臓のミトコンドリアの酸化的ストレスが軽減されていることが示唆される。Werns and Lucchesi<sup>22)</sup> は, 白血球によって産生される活性酸素が組織に傷害を与えるとしている。また, 本症は腎臓および脾臓において鬱血が認められ, 虚血さらに症状の回復に伴う再灌流によって宿主の臓器に酸化的ストレスが与えられやすい疾患であると考えられる。したがって, saponin の経口投与によって肝臓の SOD 活性が増加し, 高い O<sub>2</sub> 処理能力が付与されたのではないかと推察される。いっぽう, GPx は GSH によって H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および種々の過酸化物を還元して生体を酸化的ストレスから保護する重要な働きを持つ酵素であり<sup>23)</sup>, 真核生物の細胞質やミトコンドリアに局在する<sup>24-27)</sup>。現在のところ, 細胞質に局在する cGPx<sup>28)</sup>, plasma GPx<sup>29,30)</sup>, PHGPx<sup>31-33)</sup>, gastrointestinal GPx<sup>34,35)</sup> の 4 つのアイソザイムの存



## ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

在することが明らかにされている。本試験においては、細菌感染後の GPx が顕著に誘導され、その活性は saponin 投与により維持された。GPx は感染状態において、抗酸化酵素として活性酸素分子の除去に働き、細胞を酸化ストレスから保護する働きがあるとされている<sup>36)</sup>。感染前の saponin 投与によって感染後、GPx が活性化され酸化ストレスを軽減する作用を持つと推察される。また、PHGPx は酸化ストレスによって生じる過酸化脂質を分解して、生体膜の保護効果を示すこと<sup>38)</sup>、15-lipoxygenase 活性を抑制して、脂質の過酸化を防止することが明らかにされている<sup>37)</sup>。したがって、細菌感染前のブりに saponin を投与し、細菌感染後の PHGPx 活性を誘導を促進することは、炎症による組織の崩壊を防ぐ有効な手段であろう。

### 第三節 Saponin の投与による臓器内 hsp の推移

#### 目 的

宿主では細菌感染に対して種々の免疫機構が活性化されて、抗体や活性酸素を産生するとされている。宿主免疫機構の活性化は、感染した細菌の排除を行う一方で、炎症が生じている周辺組織に傷害を与える。腸球菌症に感染したブリでは、鰓蓋内側や肝臓の出血、心外膜の炎症、および腎臓と脾臓の肥大が観察されている<sup>1)</sup>。また、前節では顕著な病変が認められる肝臓、腎臓および脾臓において活性酸素を消去する Mn-SOD および GPxs が活性化され、LPO 値が上昇することが明らかになった。これらのことから、本症は宿主の臓器に酸化的ストレスを与えやすい疾患であると考えられる。

そこで、第一節の試験感染に対して延命効果の認められた saponin の投与効果を検討するために、種々のストレスによって誘導され、細胞死に対する抵抗性を付与する効果を持つとされているストレス蛋白質 (heat shock protein, hsp) の中で、とくに酸化的ストレスと関わりの深い hsp60 および hsp32 の推移を調べた。

#### 実験材料および方法

**供試魚** 日本栽培漁業協会屋島事業場から分与を受け、試験に供するまで福山大学内海生物資源研究所の飼育水槽において飼育した平均体重 200 g のブリを用いた。

**供試菌株** 高知大学農学部 (現福山大学工学部) 楠田理一教授より分与を受けた *L. garvieae* (*E. seriolicida* S-2433 株) を用いた。

**Saponin** 太陽化学総合科学研究所より分与された quillaja saponin および beet saponin を用いた。

**Hsp の誘導に対する saponin の投与効果** 200 l 容ダイライト水槽 4 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min をしながら供試魚をそれぞれ 5 尾収容した。これらの供試魚にイカナゴミンチを餌として与え、試験まで 1 週間予備飼育した。Saponin の効果を評価するために、Fig. 1 に示すような 4 試験区を設けた。Quillaja saponin および beet saponin 投与区には、体重 1 kg 当たりそれぞれ 5 mg をイカナゴミンチに混ぜて最初の 8 日間は隔日で 1 日 1 回計 4 回、次の 3 日間は毎日 1 回計 3 回、合計 7 回投与した。対照は 2 区設け、イカナゴミンチのみを同様に投与した。実験感染は、投与開始 11 日後に腹腔内注射法によって行った。すなわち、BHI (Difco) 培地を用いて培養した対数増殖期にある *L. garvieae* をブリ 1 尾当たり  $4 \times 10^5$  CFU 注射した。なお、対照には同様にして感染した感染対照区と

## ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

感染しない対照区の 2 区を設けた。

**臓器試料の調製** Hsp のレベルを調べるために, saponin を投与後の試験感染直前, 感染 3 時間, 2 日, 4 日後にブリの肝臓, 腎臓および脾臓を摘出し, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む 9 倍容量の 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) を加え, 2 分間の超音波処理を行った。この処理液を 100,000 x *g* で遠心したのち, 上清を 4°C の 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 中で一晩透析して, 試料とした。

**Hsp60 レベルの測定** 試料のタンパク質濃度は, BCA タンパク測定キット (Pierce) を用いて, 0.2 mg/ml に調整した。このサンプルに対して 0.2% SDS, 0.02%  $\beta$ -mercaptoethanol, 60% glycerol, 0.01% bromphenol blue を含む 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) を等量加え, 沸騰水浴中で 3 分間加熱した。このようにして SDS 化したタンパク質 (20  $\mu$ l/well) を, 10% acrylamide gel を用いて pH 6.8 と 8.8 の pH 不連続 SDS-PAGE に供した。分離したタンパク質を Multiphor II electrophoresis system (Pharmacia) によって polyvinylidene difluoride membrane に転写して, 0.85% NaCl および 0.02% Tween 20 を加え 40 mM imidazol buffer (pH 7.4) を用いて洗浄し, milk 溶液 (フナコシ) を用いて室温で一晩 blocking した。この転写膜は, hsp60 の発現を調べるために, 一次抗体として mouse anti *Yerainia enterocolitica* hsp60 mAb (フナコシ) を用いて, 室温で 1 時間反応させた。これを洗浄液で洗浄したのち, 二次抗体として peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG mAb (フナコシ) を用いて, 室温で 1 時間反応させた。洗浄液で洗浄したのち, TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine membrane peroxidase substrate system (フナコシ) を用いて発色させた。また, hsp 濃度は NIH-image software を用いて測定し, 任意単位 (A.U.) で示した。

**Hsp32 レベルの測定** 試料のタンパク質は, 上述の方法と同様に SDS 化して 12% acrylamide gel に供し, Western blot を行った。なお, hsp32 の発現を調べるための一次抗体には, rabbit anti rat hsp32 (heme oxygenase-1) mAb (フナコシ), 二次抗体には peroxidase-labeled goat anti rabbit IgG mAb (フナコシ) を用いた。

**過酸化水素存在下における *L. garvieae* 培養** *L. garvieae* に酸化的ストレスを与えるため, 0, 0.02, 0.2, 2 mM となるように過酸化水素を添加した BHI 培地 を調製し, 対数増殖期にある *L. garvieae* を 10<sup>4</sup> cells/ml となるように接種した。培養開始 3, 6, 24 時間後の培養液を 1 ml 採取し, 1,000 倍希釈した菌液 100  $\mu$ l を BHI 寒天培地に滴下した。そして, 25 °C で一晩培養してコロニー数をカウントした。また, 培養開始後 24 時間が経過した培養液を 7,000 x *g* で 10 分間の遠心を行った。この操作によって得られた菌体を, 臓器サンプルと同様に 2 分間の超音波処理して, SDS-PAGE に供し, 引き続き Western blot を行った。

ブリの肝臓ミトコンドリア調製<sup>38)</sup> 摘出した肝臓は, テフロンホモジナイザーに入れ, 0.25 M sucrose,

5 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA を含む medium A (pH 7.4) を 10 倍量添加してホモジナイズした。得られたホモジネートを 80 x g で 5 分間遠心し, 上清を 0.33 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1% bovine serum albumin を含む medium B (pH 7.4) に重層した。これを 700 x g で 10 分間, 引き続いて 7,000 x g で 10 分間遠心した。沈殿は medium A で洗浄したのち, 0.25 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1% BSA を含む medium C (pH 7.4) に懸濁し, 7,000 x g で 10 分間の遠心を行い, 得られた沈殿をミトコンドリア画分とした。

### 結果

Saponin を経口投与したブリの実験感染後における hsp60 発現は腎臓のみで認められ, 肝臓と脾臓では認められなかった。感染後のブリ腎臓の hsp60 発現は, Fig. 9 に示すとおりである。腎臓の hsp60

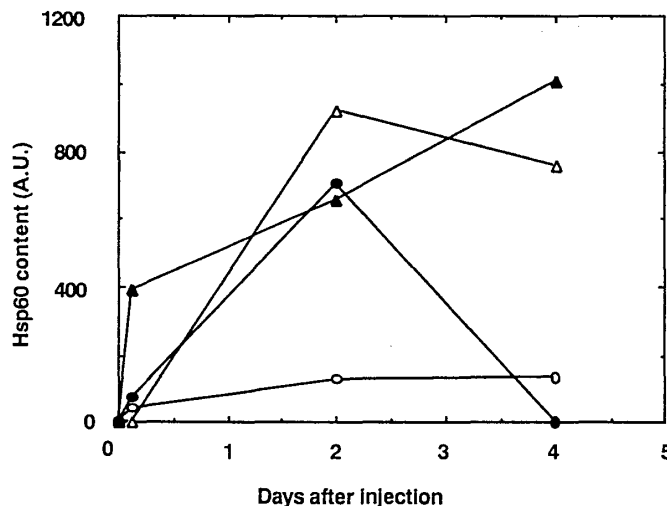


Fig. 9. Effect of saponin feeding on heat shock protein 60 (hsp60) expression in the kidney of yellowtail after injection with *Lactococcus garvieae*.

△, quillaja saponin ; ▲, beet saponin; ●, no saponin; ○, no injection.

は, 感染後すべての試験区において上昇した。Quillaja saponin 投与区の hsp60 は, 感染 1 日後に最も高くなり, その後は減少した。Beet saponin 投与区の hsp60 は, 感染 3 時間後から発現が認められ, その後は増加した。いっぽう, 感染対照区では感染 2 日後に最高に達し, その後は減少した。Saponin 投与区の感染 4 日後の hsp60 レベルは, 感染対照区と比較して高い値を示した。感染させなかった対照区では, 試験期間を通して低い値となった。

2 μM から 2 mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加した BHI 培地中で培養した *L. garvieae* の増殖は, Fig. 10 に示すとおりで, 20 μM 以上の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加で培養初期の増殖が阻害された。その傾向は, 2 mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

添加した場合に最も顕著に現れた。しかし、24 時間培養後には  $H_2O_2$  添加の影響は、認められなかった。ブリの肝臓ミトコンドリアと菌体調製タンパク質の hsp60 を比較した結果は、Fig. 11 に示した。ブリの肝臓ミトコンドリアに由来する hsp60 バンドは、ブリの腎臓に由来する hsp60 バンドと同一の移動度を示した。しかし、*L. garvieae* に由来する hsp60 は、これらと異なる移動度を示した。

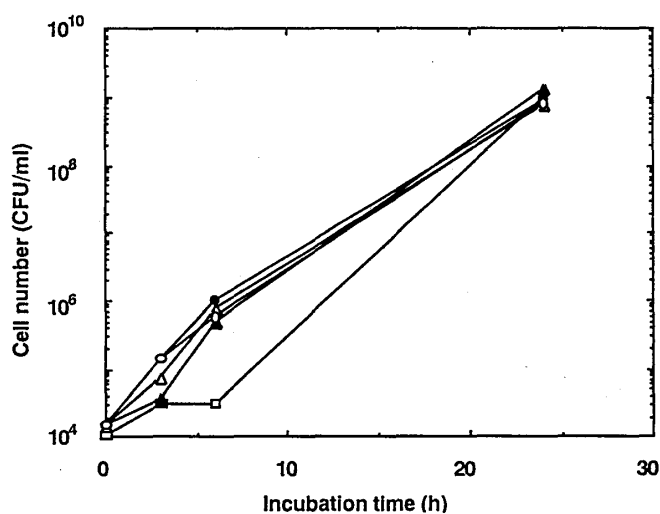


Fig. 10. Effect of  $H_2O_2$  on growth of *Lactococcus garvieae*.  
○, 0 mM; ●, 2  $\mu$ M; △, 20  $\mu$ M; ▲, 0.2 mM; □, 2 mM.

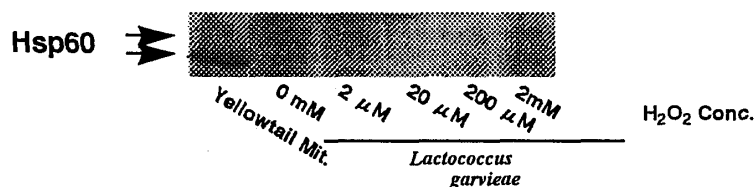


Fig. 11. Detection of hsp60 in the mitochondria from liver of yellowtail and in *Lactococcus garvieae* cells.

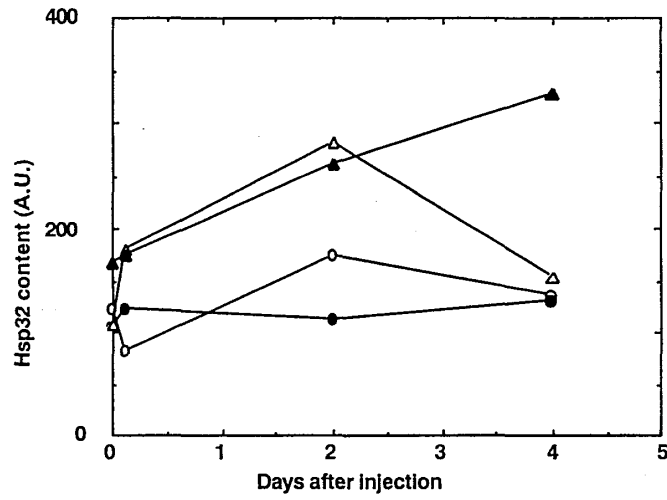


Fig. 12. Effect of saponin feeding on heat shock protein 32 (hsp32) expression in the kidney of yellowtail after injection with *Lactococcus garvieae*.  
△, quillaja saponin ; ▲, beet saponin; ●, no saponin; ○, no injection.

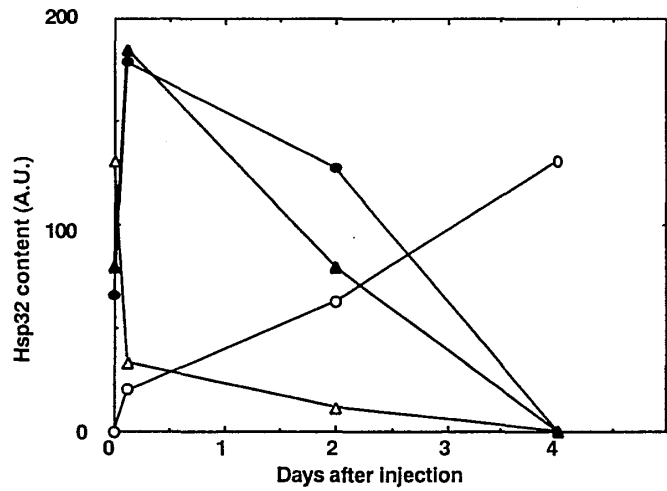


Fig. 13. Effect of saponin feeding on heat shock protein 32 (hsp32) expression in the spleen of yellowtail after injection with *Lactococcus garvieae*.  
△, quillaja saponin ; ▲, beet saponin; ●, no saponin; ○, no injection.

実験感染後のブリの腎臓 hsp32 (heme oxygenase-1) は, Fig. 12 に示した。Quillaja saponin 投与区の感染前のブリの hsp32 レベルは, 感染対照区と beet saponin 投与区のそれぞれ 2 倍と 1.6 倍高い値を示した。しかし, 感染後はほかの投与区と同様に減少した。また, beet saponin 投与区と感染対照区においては, 感染 3 時間後に急激に上昇したが, その後は減少した。

脾臓の hsp32 は Fig. 13 に示すとおりである。Quillaja saponin および beet saponin 投与区の脾臓の hsp32 は, 感染 3 時間後には, 上昇する傾向が認められた。Quillaja saponin 投与魚では感染 4 日後には減少したのに対して, beet saponin 投与区では連続的な増加した。Hsp32 は, 感染後 4 日目の beet saponin 投与区においては, 感染対照区と比べ 1.6 倍高い値を示した。対照区および感染対照区の beet saponin 投与区においては, 感染対照区と比べ 1.6 倍高い値を示した。対照区および感染対照区の hsp32 のレベルには, 大きな変化は認められなかった。

## 考 察

前節においてブリの腸球菌症では, 感染によって引き起こされる一連の炎症反応を軽減するために, 種々の活性酸素を消去する酵素の活性が上昇することを明らかにした。また, 生体では種々のストレスに対して hsp が合成誘導され, ストレスに対する抵抗性を付与することが明らかにされている<sup>39-42)</sup>。Thomas et al.<sup>43)</sup> は海産硬骨魚類にも hsp が存在し, 熱ショックによって細胞内に誘導されることを明らかにしている。本研究では炎症に伴う虚血, 再灌流によって活性酸素が発生するミトコンドリアに局在しているとされている hsp60 と, 代謝産物が活性酸素処理に関与するとされている hsp32 とに着目して, saponin の投与がブリの腸球菌症に対する hsp 発現に与える影響を検討した。

Saponin を経口投与したブリの試験感染における hsp60 発現は腎臓のみで認められ, 肝臓と脾臓では認められなかった<sup>44)</sup>。前節においては, 肝臓, 腎臓および脾臓における感染後の *L. gairdneri* 生菌数は, 腎臓において最も高い値を示した。これらのことから, 腎臓における本菌による感染ストレスの上昇によって, hsp60 の誘導が促進したものと推察される。また, 腎臓の hsp60 レベルの上昇は beet saponin 投与区において, 感染 3 時間後の早い時期に認められた。Quillaja saponin および beet saponin 投与区の感染後の hsp60 レベルは, 感染対照区よりも高い値を示した。したがって, saponin には感染に対して hsp60 の誘導を維持する効果があるものと思われる。また, beet saponin にはその誘導を促進する効果のあることが推察される。

Hsp60 はシャペロニンとも呼ばれ, 種々のストレスによって変性したタンパク質を再構成するとともに, 凝集したタンパク質の分解を促進する効果を持つとされている。また, 生理的な条件下でも新しく合成された蛋白質の高次構造形成や会合などに関与している<sup>45,46)</sup>。したがって, saponin の投与による試験感染後のブリの腎臓 hsp60 誘導は, 炎症組織の保護と修復に関与するものと推察される。また, saponin 投与区の感染後の延命効果は, 細菌感染によって生じるストレスが, 誘導された hsp60 によって軽減されるためではないかと推察される。

*L. garvieae* は、感染したブリに種々の傷害を与えるものと考えられる。しかし、ブリの臓器中に侵入した *L. garvieae* はブリの生体防御機構の活性化によって、種々のストレスを受けるものと推察される。そこで、ブリの腎臓で発現された hsp60 が、ブリの細胞に由来するかどうかを明らかにするために、*L. garvieae* の酸化的ストレスに対する応答を調べた。しかし、ブリの感染前の腎臓 hsp60 の発現量は非常に低く、腎臓から hsp60 を抽出するのは困難であると考えられた。Hsp60 はミトコンドリアタンパク質の膜輸送に必須のタンパク質であり<sup>46,47)</sup>、ミトコンドリアに高濃度で存在していることが明らかにされている<sup>48-50)</sup>。そこで、本研究ではブリの肝臓ミトコンドリアから、hsp60 を調製することを試みた。これらのミトコンドリアと本菌体試料を Western blot によって解析した結果、ブリの肝臓ミトコンドリア由来の hsp60 タンパク質は、ブリの腎臓由来の hsp60 と同一の移動度を示した。しかし、ブリの hsp60 タンパク質バンドは *L. garvieae* から調製したものと異なる移動度を示した。したがって、Fig. 9 で認められた hsp60 の発現は、本菌の感染によって誘導されたブリに由来するものであることが明らかである。

いっぽう、感染後の hsp32 レベルは腎臓で減少、脾臓で増加する傾向が認められた。Hsp32 は熱ショック、過酸化水素および重金属などによって誘導される分子量 32 kDa のタンパク質であり<sup>51)</sup>、heme oxygenase 活性を持つとされている<sup>52)</sup>。また、heme oxygenase は heme 蛋白質から CO と Fe<sup>2+</sup> を放出して、heme の biliverdin への酸化を触媒すると考えられる。Heme oxygenase には heme oxygenase-1 と heme oxygenase-2 の 2 種のアイソザイムが存在するとされている<sup>53)</sup>。Heme oxygenase-1 は、肝臓や脾臓のような網内系細胞に分布することが確認されている<sup>54)</sup>。いっぽう、heme oxygenase-2 は脳や精巣に分布する分子量 36 kDa の非誘導酵素であるとされている<sup>55)</sup>。また、一般に魚類においては腎臓が尿を作る臓器であるとともに、造血系の臓器であり、脾臓は、造血系の臓器であるとともに、血球を壊す臓器であることが知られている。本研究において、*L. garvieae* 感染後の hsp32 の発現は、腎臓と脾臓で異なった傾向を示すことが明らかになった。したがって、臓器による hsp32 の発現の相違は、その生理的機構の違いによるものではないかと推察される。また、hsp32 の誘導は炎症による酸化的ストレスの上昇によるものではないかと思われる。Hsp32 の誘導は種々の化学物質によるストレスを軽減するとともに、炎症時にマクロファージから産生される活性酸素による生体の酸化的ストレスを軽減するとされている<sup>56)</sup>。また、hsp32 によって heme から代謝された bilirubin や biliverdin は、抗酸化作用を持つことが知られている<sup>57,58)</sup>。したがって、saponin の経口投与は hsp32 の誘導を促進し、その結果細菌感染後の臓器の酸化的ストレスが軽減され、感染に対する延命効果に寄与するものと推察される。



#### 第四節 摘要

生理活性物質である saponin の経口投与によるブリの腸球菌症に対する防御効果を検討した。Quillaja saponin と beet saponin を投与した試験区では、感染対照区と比較して斃死が遅れることが認められた。また、saponin を経口投与したブリの感染 9 日後の有効率は、40 %であった。したがって、saponin ではブリの腸球菌症に対する延命効果を高めることが出来た。

Saponin の投与効果を感染後の臓器内の過酸化脂質量 (LPO 量) と活性酸素消去酵素の動態より評価した。ブリの肝臓の LPO 量は、2 種の saponin 投与区では感染後の上昇が抑制されたが、感染対照区では上昇した。また、活性酸素を消去する SOD と GPxs の活性は、感染後に quillaja saponin と beet saponin 投与区では顕著に上昇した。したがって、saponin の投与は感染後のブリの臓器内の Mn-SOD と GPx, PHGPx 活性誘導を促進し、LPO 量の上昇を抑制する効果を持つのではないかと考えられた。

試験感染後のブリ臓器内では、細菌増殖と活性酸素を消去する酵素の活性上昇および LPO 量の上昇から感染に伴う酸化ストレスを高くなっていると考えられる。生体では、種々のストレスに対して hsp が誘導され組織の保護・修復を行うことが知られている。そこで、2 種類の saponin の投与が感染後のブリの hsp 発現に与える効果について検討した。その結果、saponin には感染後の病変が顕著に認められる腎臓において、酸化ストレスの軽減と関わりのある hsp60 および脾臓において、hsp32 の誘導が促進することが認められた。

ブリの腸球菌症に対する抵抗性を高めるためには、細菌感染後の初期段階において活性酸素消去酵素の活性を高め、LPO 量の上昇を抑制することが重要であると推察された。また、感染後に hsp の誘導とその発現量が維持されたことは、感染に対する臓器の保護効果を高め、延命を促進する要因の一つとなったものと推察された。したがって、ブリの腸球菌症に対する saponin の投与は試験感染後のブリ臓器内 Mn-SOD, GPxs の活性化を促進し、種々の炎症反応によって産生される LPO 値の上昇を抑制することが示唆された。また、saponin は感染初期において hsp60, hsp32 の誘導を促進し、臓器の保護効果を高め *L. garvieae* 試験感染に対する延命効果をもたらしたものと推察された。

## 第二章 ヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

### 緒言

*Edwardsiella tarda* は、1973年にウナギ *Anguilla japonicus* のパラコロ病の原因菌として分離された<sup>59)</sup>。本菌は海産魚においても、1976年にボラ *Mugil cephalus*<sup>60)</sup> つづいて1977年にチダイ *Evynnis japonicus*<sup>61)</sup>において腹部の膨張が認められる流行病の原因菌として分離された。さらに、中津川<sup>4)</sup>によって主要海産養殖魚であるヒラメ *Paralichthys olivaceus* の流行病の原因菌として分離された。これらの流行病の病名としては、淡水魚のウナギではパラコロ病が、海産魚では魚種によって若干症状が異なることもあって、エドワジエラ症が用いられている。ヒラメのエドワジエラ症は初夏から晩秋にかけての高水温期に、魚令を問わず発生する。病魚では外観的に腹部の膨張、腹水の貯留および脱腸が、解剖的に肝臓と腎臓の炎症が認められる<sup>6)</sup>。本病の発生は1995年以降に急激に増加するようになり、現在ではヒラメ養殖において最も被害の大きな疾病となっている。

本症に対する治療薬としては、塩酸オキシテトラサイクリン (OTC) が用いられている。しかし、薬剤の多用によって耐性菌が出現するようになり、大きな問題となっている。また、OTC 投与の問題点としては投与後の効果の現れるのが遅いこと、投与終了後 1, 2 週間経過すると再び斃死が増加すること、病勢が強まってからの効果が低いこと完治するのが難しいことなどが挙げられる。したがって、より効果的な予防・治療法の確立が望まれている。宿主の免疫機構を高める作用を持つ生理活性物質は、抗生物質のような耐性菌の出現や体内残留などの問題が少なく、魚病に対する有効な防御手段となるもの考えられる。

いっぽう、魚類養殖現場ではヒラメのエドワジエラ症をはじめとする種々の疾病に対して、魚病被害を軽減するための研究が盛んに行われている。その過程で魚類の持つ生体防御能の研究も盛んに進められ、補体<sup>62)</sup>や活性酸素<sup>63)</sup>が関与する非特異的免疫機構についても検討されている。また、特異的免疫機構に関しては魚類においても、T および B 様細胞が存在すること<sup>64,65)</sup>、抗体産生機構にヘルパー T 細胞が関与していることが明らかにされている<sup>66)</sup>。このように、魚類には哺乳類に劣らない免疫機構が存在していると考えられている。

魚病ワクチンは、種々の魚病に対して効果が確認されており、ワクチンの開発が盛んに行われるようになった。魚類に対するワクチン投与は、腹腔内注射法<sup>67)</sup>、経口投与法<sup>68)</sup>、浸漬法<sup>69)</sup>およびスプレー法<sup>70)</sup>が検討されている。これらのうち、経口投与法は簡便かつ一度に大量の魚に対して投与できるワクチンの投与法である。しかし、経口投与法は腹腔内注射法と比較してその有効性が低く、一部の限られた魚病に対して有効性が報告されているのに過ぎない。また、十分な効果を得るには、多量のワクチン投与を必要とすることなどの問題点が残されている。そこで、本章では前章でプリの腸球菌症に対して効果が認められた quillaja saponin と  $\beta$ -1,3-glucan (curdlan) をヒラメに投与し、エドワジエラ症に対する予防効果について検討した。また、本症に対する経口ワクチンの開発を試みるとともに、免疫賦活効果を持つ 2 種類の生理活性物質とワクチンとの併用効果についても検討した。

## 第一節 生理活性物質およびワクチンの効果

### 1. Saponin の投与効果

#### 目 的

前章において、saponin を投与したブリは *Lactococcus garvieae* の試験感染において、活性酸素消去酵素と hsp60 発現の誘導を促進し、延命を高める効果のあることを明らかにした。そこで、本研究ではヒラメのエドワジエラ症に対する saponin の投与効果について検討した。本節ではブリに投与した 2 種類の saponin のうち、精製度合いが高く、マウスにおいてアジュバント効果が認められている quillaja saponin を用いた。

#### 実験材料および方法

**供試魚** 日本栽培漁業協会伯方島事業場から分与を受けた受精卵を、福山大学内海生物資源研究所で孵化後、試験に供するまで当研究所の飼育水槽において飼育した平均体重 100 g のヒラメを用いた。

**供試菌株** 高知大学農学部（現福山大学工学部）楠田理一教授より分与を受けた *E. tarda* IF-1 株を用いた。

**Saponin** 太陽化学総合科学研究所より分与された quillaja saponin を用いた。

**実験感染に対する saponin の投与効果** 200 l 容ダイライト水槽 2 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min をしながら、供試魚をそれぞれ 10 尾収容した。これらの供試魚に固形餌料を与え、試験まで 1 週間予備飼育した。saponin の効果を評価するために、quillaja saponin 投与区には、体重 1 kg 当たり 5 mg を餌に添加して 2 週間毎日投与した。対照区には、固形餌料を同様に投与した。試験感染は、投与開始 2 週間後に浸漬法によって行った。感染には BHI (Difco) 培地を用いて 25℃で 16 時間培養したのちに 9,000 x g で遠心して得られた *E. tarda* を 2.4 x 10<sup>8</sup> cells/ml となるように海水 10 l に懸濁添加した。供試魚をこの海水中に 10 分間浸漬して実験感染させたのちに、200 l 容水槽に移して、その後 8 日間観察した。そして、感染 8 日後の saponin 投与区と感染対照区の斃死率から有効率を求めた。

結果

*E. tarda* 実験感染後の生残率の変化は, Fig. 14 に示すとおりである。斃死は quillaja saponin 投与区および感染対照区とも感染 3 日後より確認された。その後は, quillaja saponin 投与区では徐々に斃死し, 感染 8 日後には生残率が 10% になった。これに対し, 感染対照区では感染 3 日後以降急激に斃死し, 感染 7 日後には生残率が 0% になった。これらのように, quillaja saponin 投与区の生残率は感染対照区と比較して, 大きな差異は認められなかったが斃死が遅れる傾向を示した。また, quillaja saponin 投与区の感染 8 日後の有効率は, Table 3 に示すとおりで 10% であった。

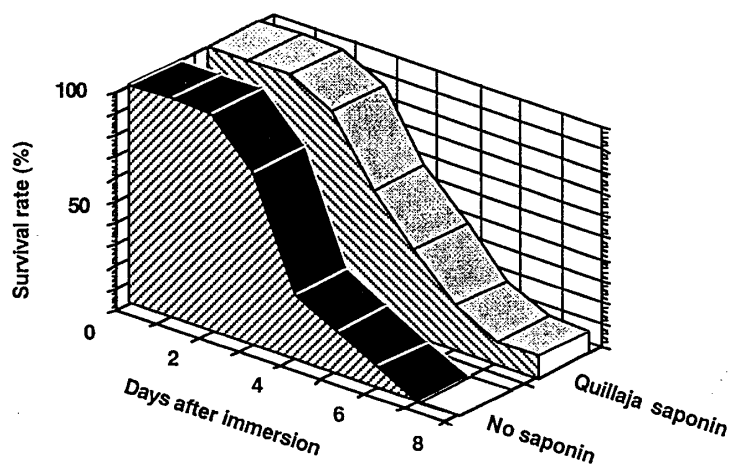


Fig. 14. Effect of orally administered quillaja saponin on the resistance of Japanese flounder against edwardsiellosis.

Table 3. Relative percentage survival of Japanese flounder fed on saponin 8 days after immersion with *Edwardsiella tarda*

Exp. condition	Specific mortality	Mortality (%)	RPS
Q. saponin	1	90	10
No saponin	10	100	-

$$\text{Relative percent survival (RPS)} = \left( 1 - \frac{\% \text{ mortality in the saponin group}}{\% \text{ mortality in the no saponin group}} \right) \times 100\%.$$

## 考 察

Quillaja saponin を投与したヒラメの *E. tarda* 実験感染に対する防御効果は、有効率 10%であり極めて低い値を示した。したがって、quillaja saponin の単独投与では多少の延命効果が認められるものの、有効性に大きな期待ができないものと考えられる。

## II. $\beta$ -1,3-glucan の投与効果

### 目 的

前項においてヒラメの *E. tarda* 試験感染に対する quillaja saponin の投与効果はほとんど認められなかった。そこで、本症に対して有効に作用する生理活性物質の検討を試みた。

哺乳類においては、biological response modifier (BRM) として非特異的生体防御機構を高める生理活性物質が知られており、これらは種々の感染症に対して有効であるとされている。魚類においても、生理活性物質を用いて非特異的生体防御機構を高めて、種々の感染症に対する抵抗性を高めようとする試みが行われている。魚類に対する有効性が認められている生理活性物質のなかで、投与した魚の体内残留等の問題が低いと考えられる物質の一つに多糖類が挙げられる。多糖類の一種である  $\beta$ -glucan は、哺乳類において抗腫瘍活性や非特異的免疫機構を活性化する作用を持ち、細菌やカビおよびウイルス感染に対して有効に作用することが明らかにされている<sup>71,72)</sup>。また、魚類においても  $\beta$ -glucan はこれらの感染に対しても有効に作用することが知られている。すなわち、 $\beta$ -glucan を腹腔内に注射したコイ *Cyprinus carpio*<sup>73)</sup> やブリ *Seriola quinqueradiata*<sup>74)</sup> では食欲能や補体が活性され、細菌感染に対する抵抗性が上昇する。しかし、glucan を長期間投与すると有効性が低下する<sup>75,76)</sup>。したがって、より効果的な glucan 投与方法の確立が必要であると考えられる。

そこで、本項では細菌由来の  $\beta$ -1,3-glucan (curdlan)<sup>77)</sup>を用いて各種の投与方法によってヒラメに投与し、ヒラメ白血球の食欲能および superoxide ( $O_2^-$ ) の産生能と試験感染による有効性を検討した。

### 実験材料および方法

**供試魚** マルア水産から購入し、試験に供するまで福山大学内海生物資源研究所の飼育水槽において飼育した平均体重 200 g のヒラメを用いた。

**Curdlan** 武田薬品工業より提供された curdlan を用いた。本研究に用いた curdlan は、分子量約 300,000、DMSO に可溶性  $\beta$ -1,3-glycoside 結合のみを持つ  $\beta$ -1,3-glucan である。

**Curdlan の投与方法** 200 l 容ダイライト水槽 4 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min をしながら、供試魚をそれぞれ 12 尾収容した。これらの供試魚に固形餌料を与え、試験まで 1 週間予備飼育した。Curdlan の投与効果を評価するために、短期間の連続投与および長期間の隔日投与を行った。短期間の連続投与には、curdlan を含む餌料を体重 1 kg 当たり 110 mg を毎日投与した。また、対照区には固形餌料を同様に投与した。いっぽう、長期間の隔日投与には curdlan を含む餌料を体重 1 kg 当たりそれぞれ 110 mg を 1 日おきに 4 か月間投与した。また、対照区には固形餌料を同様に投与した。

**白血球の分離**<sup>78)</sup> Curdlan 投与試験終了 2 週間後に、ヒラメの腹腔、末梢血および頭腎から 3 種類の白血球を調製して供試した。腹腔内滲出白血球は、ヒラメ腹腔内に 1 尾当たり 2% casein (Acros Organics) を添加した、0.14 M NaCl, 27 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を含む PBS を 10 ml 注射して 15 時間後に腹腔内に滲出した白血球を PBS で洗浄して回収した。得られた白血球を RPMI 1640 培地 (Bio Whittaker) に懸濁して、これを polymorphonuclear leucocytes (PMNs) として用いた。末梢血中白血球は、Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) を用いた遠心密度勾配法によって分離した。すなわち、血液を尾静脈から heparin 処理したシリンジを用いて採血し、heparin を含む PBS で 2 倍希釈したのち、Ficoll-Paque に重層した。そして、450 x g で 30 分間、20℃で遠心した。分離された中間層の白血球画分を回収し、RPMI 1640 培地 に懸濁して用いた。頭腎白血球は、Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) を用いた遠心密度勾配法によって分離した。すなわち、頭腎をハサミで細かく切断したのちに 10% fetal bovine serum (Gibco Laboratories) を含む RPMI 1640 medium に懸濁した。これを室温で 1 時間インキュベートしたのち、0.5 x 0.5 mm のステンレスメッシュで濾過した。濾液は末梢血中白血球と同様に、Ficoll-Paque を用いて分離後、白血球画分を回収し、RPMI 1640 培地 に懸濁して用いた。

**貪食活性の測定**<sup>79)</sup> RPMI 1640 培地に懸濁した 3 種類のヒラメ白血球に、ヒラメ血清を用いてオプソニン化処理した Bodipy 蛍光 zymosan A 粒子 (Molecular Probes) をそれぞれ 20 μg/ml 添加した。懸濁液は 1 時間室温でインキュベートしたのちに、Ficoll-Paque を用いて白血球を分離回収した。そして、Hemacolor (Merck) 染色を行って蛍光および非蛍光顕微鏡下で観察した。なお、蛍光顕微鏡観察は BP 490 と EY 455 のフィルターの組み合わせで行った。貪食能は約 600 細胞当たりの貪食白血球数を測定し、次式により貪食活性を計算した。

$$\text{貪食活性 (\%)} = (\text{貪食した白血球数}) \div (\text{計測した全ての白血球数}) \times 100$$

**PMNs の O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生測定**<sup>80)</sup> PMNs の O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生は cytochrome c (cyt c) 還元法によって、20℃で 550 nm の吸光度の増加から算出した。なお、細胞は貪食活性の測定に用いたものと同様の PMNs を使用した。反応溶液には 154 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> および 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を加えた Krebs-Ringer phosphate buffer, KRP buffer (pH 7.4) を用いた。反応液に 25 μM cyt c (和光), PMNs (10<sup>6</sup> cells/ml), 10 mM glucose, 0.25 mM CaCl<sub>2</sub>, curdlan および phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) を順次添加して反応させ、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生を測定した。O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生は PMA の添加後 1

## ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

分から 4 分後までの 3 分間の cyt c 還元より算出した。さらに、反応開始 6 分後には superoxide dismutase (SOD) を最終濃度 35 U/ml となるように添加し、cyt c 還元阻害による吸光度の変化を測定した。

また、測定開始 4 分後には PMA 以外の NADPH oxidase 活性化物質として、formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP, Sigma) と *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* から調製された lipopolysaccharide (LPS, Difco) を添加し、吸光度の変化を測定した。活性は PMA, fMLP, LPS の添加後 3 分間の吸光度の変化より算出し、curdlan を添加しない場合を 100% として相対  $O_2^-$  産生率を算出した。

**無細胞系の  $O_2^-$  産生に与える curdlan の影響** 50  $\mu$ M xanthine を含む 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) に 25  $\mu$ M cyt c を加えたのち、DMSO もしくは DMSO に可溶化した 100 nM の curdlan を 2  $\mu$ l 加えてインキュベートした。反応開始 1 分後には、8 mU/ml xanthine oxidase (和光) を添加し、cyt c 還元を 25°C で 550 nm の吸光度の上昇によって測定した。

**Xanthine oxidase の酸素利用に与える curdlan の影響** 50 mM xanthine を含む 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) に、DMSO もしくは DMSO に可溶化した 100 nM curdlan を 2  $\mu$ l 加えて 25 °C で 2 分間プレインキュベートして、反応開始 2 分後に 8 mU/ml xanthine oxidase (和光) を添加したのち、溶存酸素量の減少を oxymeter を用いた酸素電極法によって測定した。

**実験感染に対する curdlan の投与効果** 実験感染に使用した供試魚には、日本栽培漁業協会伯方島事業場から分与を受けた受精卵を福山大学内海生物資源研究所で孵化後、試験に供するまで本学内海生物資源研究所の飼育水槽において飼育した平均体重 60 g のヒラメを用いた。供試菌株には、高知大学農学部 (現福山大学工学部) 楠田理一教授より分与を受けた *E. tarda* IF-1 株を用いた。Curdlan は、武田薬品工業より提供された curdlan を用いた。200 l 容ダイライト水槽 2 個に海水 3.6 l/min 供給と通気 3 l/min をしながら、供試魚をそれぞれ 25 尾収容した。これらの供試魚に固形餌料を与え、試験まで 1 週間予備飼育した。curdlan の投与効果を評価するために、curdlan 投与区には、体重 1 kg 当たり 130 mg を毎日 2 週間投与した。対照区には、固形餌料を同様に投与した。実験感染には 供試菌を BHI (Difco) 培地を用いて 25°C で 16 時間培養したのちに、9,000 x g で遠心して得られた *E. tarda* を海水 10 l に  $3 \times 10^7$  cells/ml となるように添加して行った。供試魚をこの海水中に 10 分間浸漬し、感染後 19 日間観察した。そして、感染 19 日後の curdlan 投与区と感染対照区の斃死率から有効率を求めた。

結果

ヒラメに curdlan を毎日投与した短期間の連続投与の貪食活性は, Fig. 15A に示すとおりである。

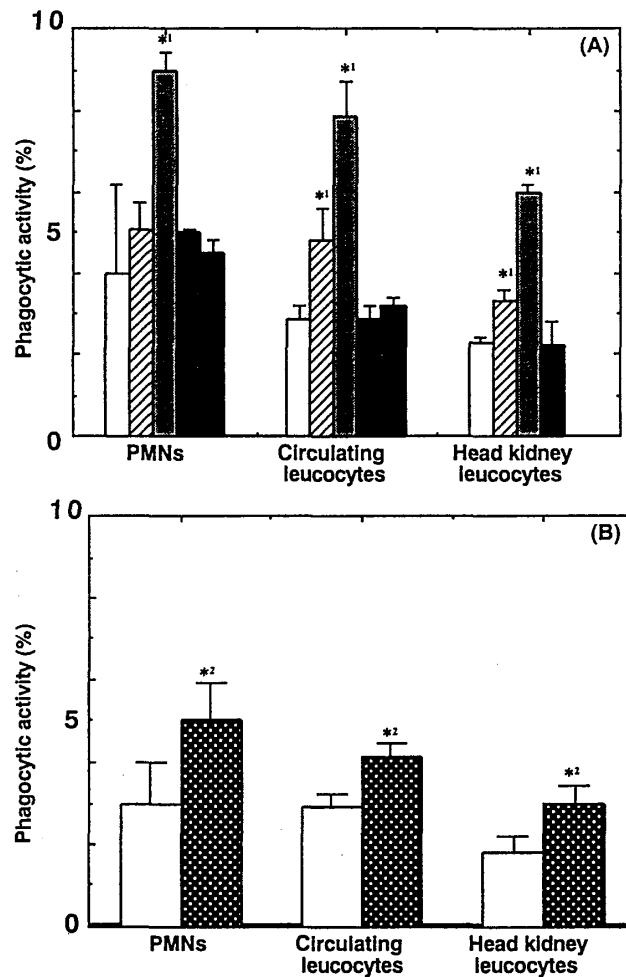


Fig. 15. Phagocytic activities of leucocytes isolated from Japanese flounder fed on curdlan-containing diets for different feeding periods.

(A) The fish were fed on the diets everyday for:

□, 0 weeks; ▨, 1 week; ■, 2 weeks; ■, 3 weeks; ■, 4 weeks.

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 3$ ).

\*1Significantly different from 0 weeks with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

(B) The fish were fed on the diets every 2 days for 4 months.

□, control; ■, curdlan-administered fish.

\*2Significantly different from the control with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 3$ ).



PMNs, 血液および頭腎より調製した白血球の食食能は, curdlan 投与開始から 2 週間までは対照区と比較して有意 ( $p<0.05$ ) に上昇したが, 4 週間後には投与前の値まで減少した。なお, 4 週間後の頭腎白血球は測定出来なかった。また, 長期間の隔日投与のヒラメ白血球の食食能は, Fig. 15B に示すとおりである。3 種類の白血球食食能はいずれも対照区と比較して有意 ( $p<0.05$ ) に上昇した。しかし, その活性は 2 週間 curdlan を投与したヒラメより有意 ( $p<0.05$ ) に低い値であった。

Curdlan のヒラメ白血球の  $O_2^-$  産生に与える直接的効果は, Fig. 16 に示すとおりである。ヒラメ

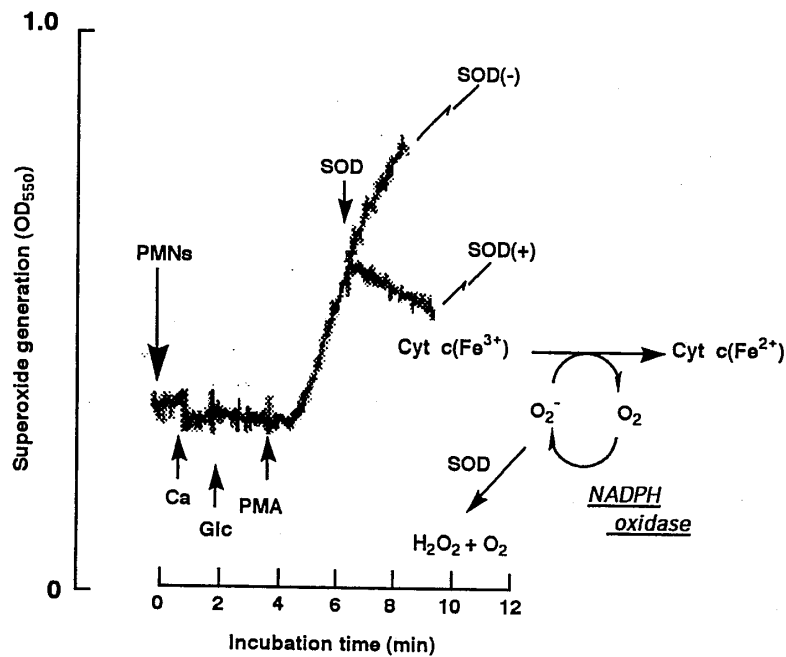


Fig. 16. Effect of superoxide dismutase on the cytochrome c reduction with superoxide from the stimulated PMNs with PMA.

の白血球の  $O_2^-$  産生は, PMA を用いて刺激することによって認められた。また, 過程において反応開始 6 分後に SOD を添加したところ, 550 nm の吸光度の上昇が阻害された。しかし, fMLP および LPS の添加では吸光度の上昇が認められなかった。

また, curdlan が  $O_2^-$  を産生する酵素反応に与える影響は, Fig. 17 に示した。その結果, curdlan の存在の有無に関わらず同様の吸光度の変化が認められた。また, curdlan の X-XOD (xanthine-xanthine oxidase) の無細胞系によって産生した  $O_2^-$  の cyt c 還元に対する影響は, 認められなかった。また, curdlan の XOD の酸素消費に与える影響は, Fig. 18 に示すとおりである。その結果, XOD の酸素消費は curdlan の存在下と非存在下で, 差異が認められなかった。

Curdlan を連続投与したヒラメと投与しなかったヒラメはいずれも, PMA 非存在下において白血球が産生する  $O_2^-$  による cyt c 還元は認められなかった。Curdlan を *in vitro* で白血球懸濁液に添加

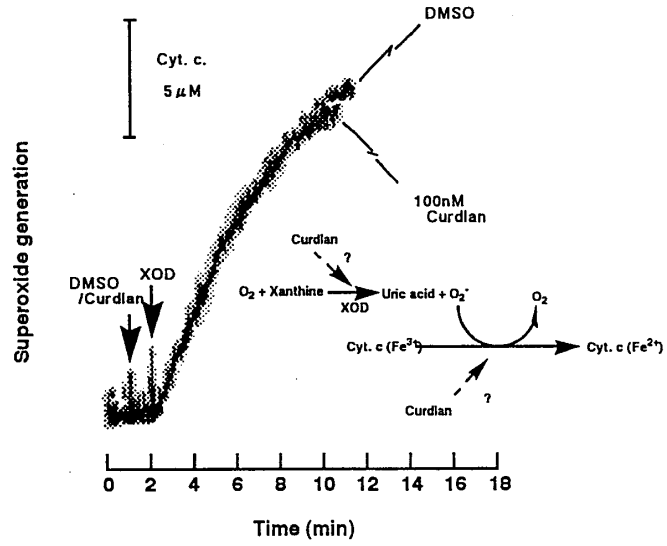


Fig. 17. Effect of curdlan on superoxide production by cell-free system (X-XOD).

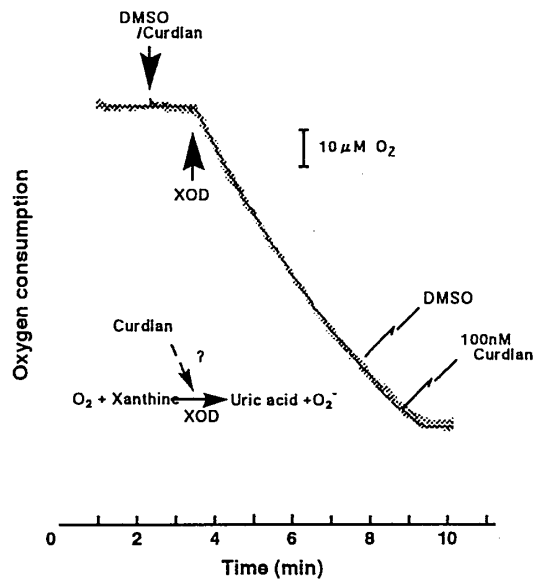


Fig. 18. Effect of curdlan on X-XOD reaction.

し、魚体内に取り込まれた curdlan が白血球の  $O_2^-$  産生に与える影響を検討し、Fig. 19A に示した。Curdlan を 1 および 2 週間 curdlan を連続投与したヒラメでは、 $O_2^-$  産生の活性化は認められなかった。しかし、3 週間連続投与したヒラメ白血球では、低濃度 (< 10 nM) の curdlan 添加によって  $O_2^-$

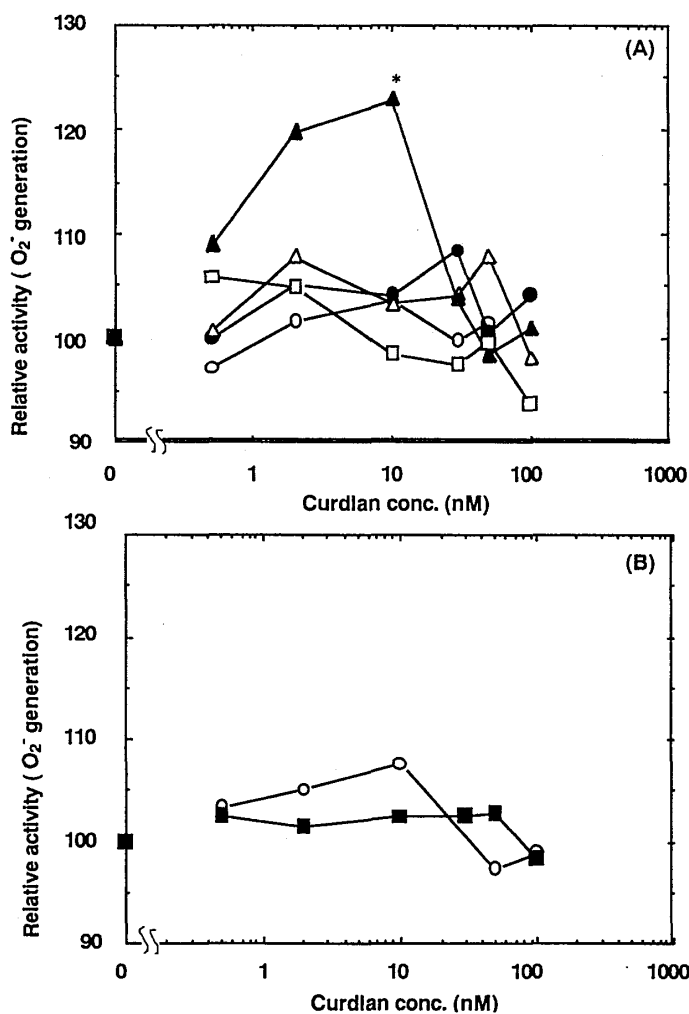


Fig. 19. Effect of the feeding period of curdlan-containing diets to Japanese flounder on superoxide generation from peritoneal PMNs by the stimulation with PMA in the presence of different concentrations of curdlan.

(A) The fish were fed on the diets everyday for :

○, 0 weeks ; ● , 1 week ; △ , 2 weeks ; ▲ , 3 weeks ; □ , 4 weeks.

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 2$ ).

\*Significantly different from the control with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

(B) The fish were fed on the diets every 2 days for 4 months.

○, control fish ; ■ , curdlan-administered fish.

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 2$ ).

産生の上昇が認められた。しかし, 10 nM 以上の添加では,  $O_2^-$  産生に影響は認められなかった。また, 長期間の隔日投与におけるヒラメ白血球の  $O_2^-$  産生は, Fig. 2-19 B に示すとおりで, curdlan 添加による影響は認められなかった。

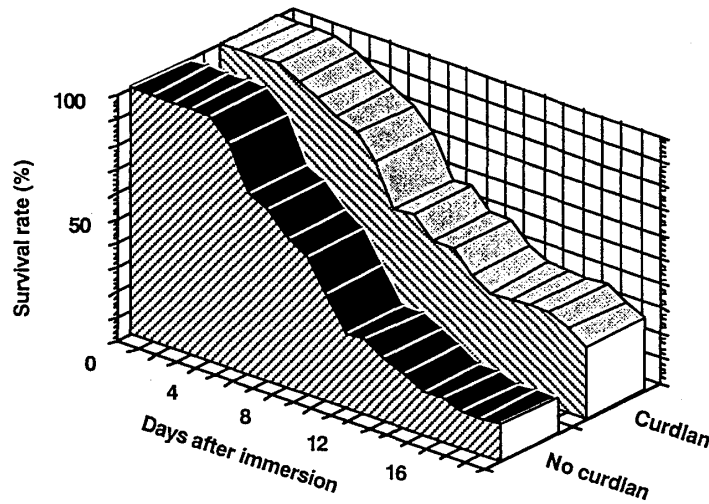


Fig. 20. Effect of orally administered curdlan on the resistance of Japanese flounder against edwardsiellosis.

Table 4. Relative percentage survival of Japanese flounder fed on curdlan 19 days after immersion with *Edwardsiella tarda*

Exp. condition	Specific mortality	Mortality (%)	RPS
Curdlan	17	71	17
No curdlan	20	85	-

$$\text{Relative percent survival (RPS)} = \left( 1 - \frac{\% \text{ mortality in the saponin group}}{\% \text{ mortality in the no saponin group}} \right) \times 100\%$$

*E. tarda* の実験感染の結果は, Fig. 20 に示した。Curdlan 投与区では, 感染 4 日後に斃死が始まり, その後は徐々に斃死が続いた。これに対し, 感染対照区では感染 5 日後に斃死が始まり, その後急激に生残率が低下した。これらのように curdlan 投与区では, 感染対照区と比較して感染後の生残率の減少に遅延効果が認められた。感染 19 日後の curdlan 投与の有効率は, Table 4 に示したとおりで 17%であった。

考 察

種々の魚類に対する有効性が認められている glucan のヒラメのエドワジエラ症に対する投与効果について検討した。本研究では、従来から広く一般に用いられてきた腹腔内注射法に代わって、より簡便に多くの魚に対して処理できる経口投与法を用いた。しかし、glucan は長期間連続して経口投与すると、実験感染に対する有効性が低下することが指摘されている<sup>75,76)</sup>。そこで、glucan の投与法と投与期間がヒラメ白血球の食食能と殺菌能に与える影響を評価した。

Curdlan を短期間の連続投与したヒラメの食食活性は、投与後 2 および 3 週間までは活性が上昇した。しかし、その活性は投与期間が 4 週間になると低下した。また、長期間の隔日投与では、curdlan 投与区では対照区と比較して食食能が促進された。しかし、その活性化は短期間の連続投与と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に低い値を示した。したがって、curdlan の長期間の隔日投与では、白血球の食食能の活性化効果は、十分得られないものと推察される。

白血球は生体内に侵入した異物を食食し  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  のような活性酸素を産生して、殺菌機構が活性化される。哺乳類では白血球の生体膜に存在する NADPH oxidase の活性化によって  $O_2^-$  が産生され、産生された活性酸素が殺菌に働く<sup>81)</sup>。また、NADPH oxidase を活性化するシグナル伝達経路を人為的に刺激する物質として PMA<sup>82,83)</sup>、fMLP<sup>84,85)</sup> および LPS<sup>86-89)</sup> が知られている。魚類においてはニジマスのマクロファージを PMA で刺激し、cyt. c 還元法を用いるとマクロファージの殺菌能が評価出来ることが示されている<sup>90)</sup>。本研究では、ヒラメの PMNs に対して *in vitro* で PMA を添加したところ、cyt c 還元が認められた。また、この還元は、superoxide dismutase (SOD) の添加で停止した。したがって、本実験において認められた cyt c 還元に伴う吸光度変化は、PMA 刺激によって白血球が産生した  $O_2^-$  によるものである。

つぎに、本実験系で添加した curdlan と PMA 刺激によって白血球から産生された  $O_2^-$  分子とが直接的に反応する可能性について検討した。その結果、XOD の酸素利用に与える curdlan の影響は、curdlan 添加による  $O_2^-$  産生速度および XOD の酸素消費速度に影響を与えなかった。したがって、curdlan は酵素反応に対する酸素利用に影響を与えないものと推察される。Sveinbjornsson *et al.*<sup>91)</sup> はサケに投与した  $\beta$ -1,3-D-polyglucose が、腸管から吸収されリンパ組織にも存在することを明らかにしている。また、 $\beta$ -1,3-glucan は補体経路およびアラキドン酸代謝経路の活性化によってヒト白血球食食能の活性化を引き起こすものと推察されている<sup>90,92-94)</sup>。したがって、ヒラメにおいても経口投与した  $\beta$ -1,3-glucan が腸管より吸収され、ヒトの場合と同様に非特異的免疫機構を活性化したものと推察される。

Matsuo *et al.*<sup>75)</sup> は、ニジマスに対する peptidoglycan の経口投与効果について検討し、28 日間の連続投与では *Vibrio* 感染症に対する抵抗性が高まるが、60 日間の連続投与では効果を示さないとしている。また、Yoshida *et al.*<sup>76)</sup> も、oligosaccharide の長期投与が感染症に対して有効な投与効果を示さないことを明らかにしている。ヒラメに curdlan を適切に経口投与することは、ヒラメ白血球の食食能、 $O_2^-$  産生の活性化を誘導し、白血球の食食能と殺菌能が活性化するのであろう。しかし、本研究においても curdlan を投与した PMNs の  $O_2^-$  産生は、3 週間の連続投与では高い活性を示した。しかし、curdlan の投与効果は、投与期間が長くなると低下した。しかし、その効果は curdlan の投与期間と投与

法によって影響されることが明らかになった<sup>95)</sup>。したがって, curdlan の投与効果を高めるためには投与期間の設定が重要である。

さらに, 貪食細胞の活性化が最も顕著であった curdlan を 2 週間連続投与したヒラメに対して, *E. tarda* による試験感染を行った。その効果は, 有効率 17%であり quillaja saponin 単独投与と比較しわずかに高い値を示した。しかし, その有効性は極めて低く, ヒラメのエドワジエラ症に対する防御手段として実用化を目指すのは不十分であると考えられる。

### Ⅲ. ワクチンの投与効果

#### 目 的

前項までの試験では, quillaja saponin および curdlan の 2 種類の生理活性物質の投与によるヒラメのエドワジエラ症に対する防御効果は著しく低いものであった。そこで *E. tarda* 細菌に特異的な防御能を活性化することで防御能の向上を図ることを試み, ヒラメのエドワジエラ症に対するワクチンの投与について検討した。魚病予防に対するワクチン投与の試みはアユ *Plecoglossus altiveis*<sup>70)</sup>, ウナギ<sup>96)</sup>, ヒラメ<sup>67)</sup>をはじめとする主要な養殖魚において検討が行われている。しかし, ワクチンの経口投与については, 一部の魚病において実用化されているに過ぎない。そこで, ヒラメにワクチンを経口投与し, ワクチン投与後の血中抗体価を調べてヒラメの抗体産生機構に与える影響を検討した。さらに, ヒラメのエドワジエラ症に対する防御効果を試験感染によって評価した。

#### 実験材料および方法

**供試魚** 日本栽培漁業協会伯方島事業場から分与を受けた受精卵を, 福山大学内海生物資源研究所で孵化後, 試験に供するまで当研究所の飼育水槽において飼育した平均体重 100 g のヒラメを用いた。

**供試菌株** 高知大学農学部 (現福山大学工学部) 楠田理一教授より分与を受けた *E. tarda* IF-1 株を用いた。

**ワクチンの調製** ワクチンは Fig. 21 に示す方法で調製した。*E. tarda* を 0.85% NaCl を加えた BHI 培地中で 25°C, 48 時間培養した。この菌液に, 最終濃度 0.5%となるように formalin を添加し, 4°Cで 48 時間インキュベートして不活化した。この不活化菌液を 0.85% NaCl で遠心洗浄したのち, 4°Cの 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) に対し 24 時間透析した。透析後の不活化菌液を凍結

ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

乾燥し、ワクチン (formalin-killed cells, FKC) として投与試験に用いた。

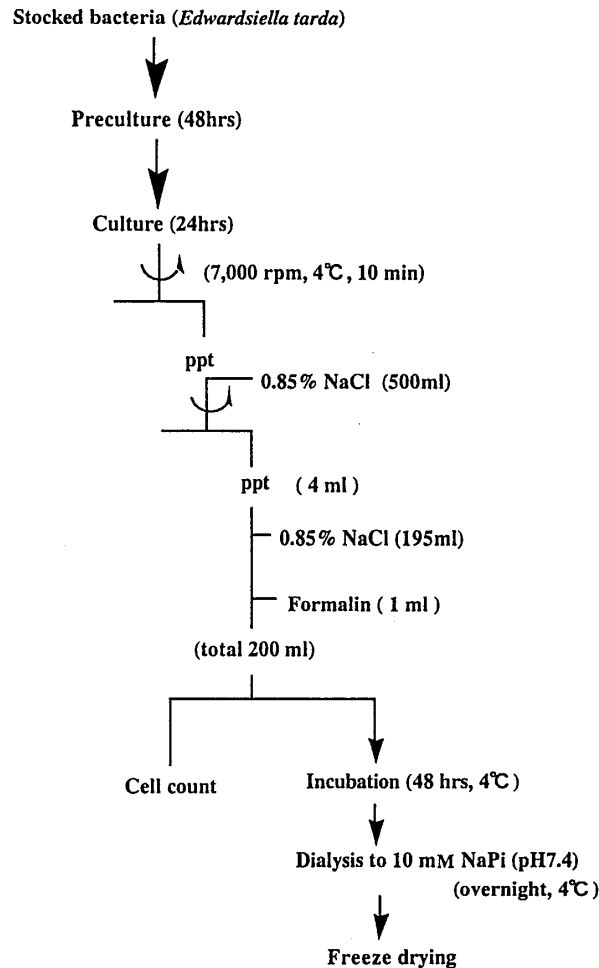


Fig. 21. Preparation of formalin-killed *Edwardsiella tarda*.

**ワクチンの投与方法** 200 l 容ダイライト水槽 2個に海水 3.6 l/min 供給と通気 3 l/min をしながら、供試魚をそれぞれ 6 尾収容した。これらの供試魚に固形餌料を与え、試験まで 1 週間予備飼育した。ワクチンの投与効果を評価するために、体重 1 kg 当たり 34 mg のワクチンを餌に添加して毎日 2 週間投与した。また、対照区には固形餌料を同様に投与した。

**血中抗体価の測定** ワクチン投与試験終了後に尾静脈より採血し、室温で 1 時間静置したのち、4°C で一晩インキュベートして凝固させた。これを 1,800 x g で 30 分間の遠心を行って上清を  $\phi=0.22 \mu\text{m}$  のフィルターを用いて濾過滅菌し、供試血清として用いた。さらに、血清を 45°C で 20 時間イン

キュベートし, 補体を不活性化したものを抗体価測定用のサンプルとした。抗体価の測定は細菌の直接凝集法によって行った。その方法は Fig. 22 に示すとおりである。血清は 96 穴マイクロタイタープレートに加えたのちに, 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を含む phosphate - buffered saline (PBS, pH 7.4) を用いて, 2 倍希釈系列を作成した。それぞれに 3  $\mu\text{l}$  の FKC ( $10^{10}$  cells/ml) を添加し, 25°C で 1 時間静置した。このマイクロタイタープレートを 4°C で一晩 インキュベートして, 顕微鏡下で凝集の有無を調べて判定し  $\log_2$  で示した。

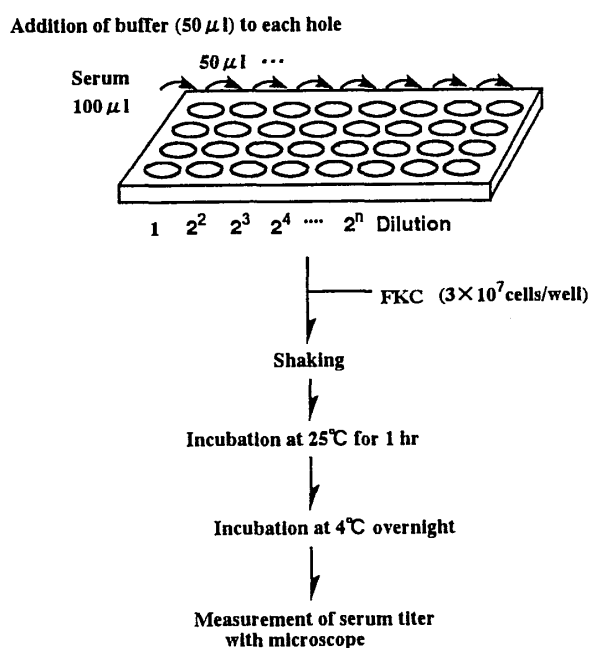


Fig. 22. Assay of agglutination titer in antiserum.

実験感染に対するワクチンの投与効果 200 l 容ダイライト水槽 2 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min をしながら, 供試魚をそれぞれ 10 尾収容した。これらの供試魚に固形餌料を与え, 試験まで 1 週間予備飼育した。ワクチンの効果を評価するために, ワクチン投与区には, 体重 1 kg 当たり 34 mg を餌に添加し 2 週間毎日投与した。また, 対照区には固形餌料を同様に投与した。実験感染には BHI (Difco) 培地を用いて 25°C で 16 時間培養したのちに  $9,000 \times g$  で遠心して得られた *E. tarda* を海水 10 l に  $2.4 \times 10^8$  cells/ml となるように添加した。供試魚をこの海水中に 10 分間浸漬して感染させたのちに 200 l 容水槽に移し, その後 8 日間観察した。そして, 感染 8 日後の curdian 投与区と感染対照区の斃死率から有効率を求めた。



結果

ヒラメに対するワクチンの経口投与が *E. tarda* に対する血液中抗体価に与える影響は、Fig. 23 に示すとおりである。ワクチン投与区では、血中の凝集抗体価が  $\log_2 5.9$  まで上昇した。ワクチンの経口

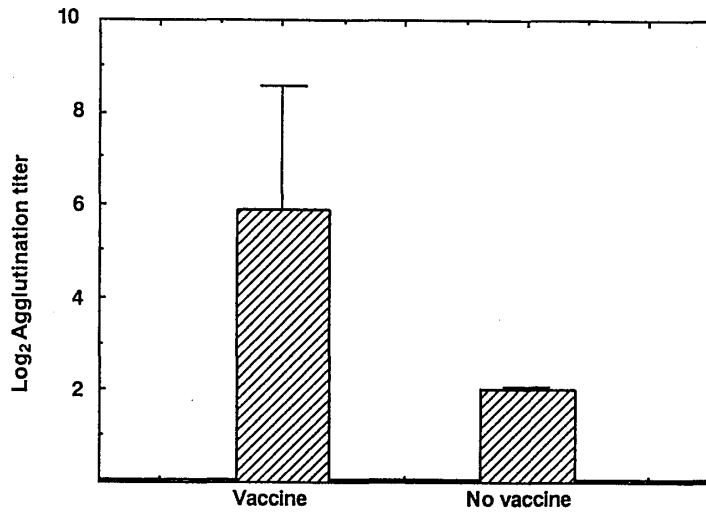


Fig. 23. Agglutination titer of serum in Japanese flounder fed on vaccine for 2 weeks.

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 2$ ).

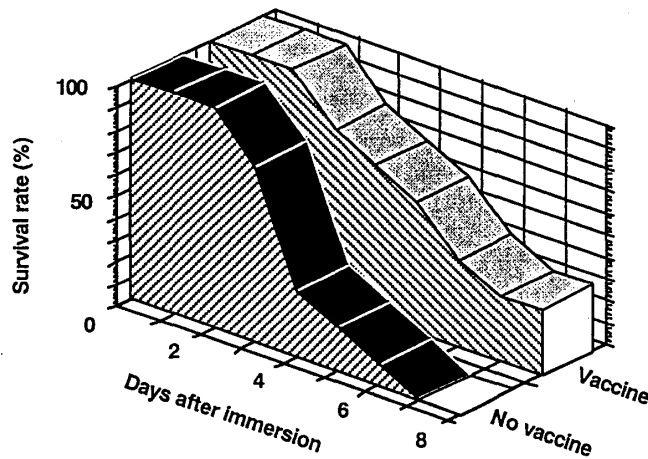


Fig. 24. Effect of orally administered vaccine on the resistance of Japanese flounder against edwardsiellosis.

投与によって, 血中抗体価の変化が認められたワクチン投与区および対照区のヒラメについて, *E. tarda* 浸漬感染による試験感染を行った。その結果は, Fig. 24 に示すとおりである。ワクチン投与区の生残率は, 感染 3 日後より減少した。これに対して, 感染対照区の生残率は感染 3 日後より急激に低下し, 感染 7 日後にはすべてのヒラメが斃死した。また, 感染 8 日後のワクチン投与区の有効率, Tabel 5 に示すとおりで 30%であった。

**Table 5.** Relative percentage survival of Japanese flounder fed on vaccine 8 days after immersion with *Edwardsiella tarda*

Exp. condition	Specific mortality	Mortality (%)	RPS
Vaccine	7	70	30
No vaccine	10	100	-

$$\text{Relative percent survival (RPS)} = \left( 1 - \frac{\% \text{mortality in the vaccine group}}{\% \text{mortality in the no addition group}} \right) \times 100\%.$$

### 考 察

ワクチンを経口投与したヒラメでは, *E. tarda* に対する血中抗体価が上昇し, 抗体産生機構の活性化が認められた。しかし, 浸漬法による *E. tarda* 実験感染に対しては, その有効率が 30%と低い値となった。馬久地ら<sup>67)</sup>は, ヒラメのエドワジエラ症に対するワクチンの効果を検討している。それによると, 経口および浸漬法による効果は, 腹腔内注射法と比較して低いことを示している。また, *E. tarda* はヒラメのエドワジエラ症の原因菌であるとともに, ウナギのパラコロ病の原因菌であることが知られている。Song and Kou<sup>97)</sup>は, ウナギの本症に対するワクチンの投与効果について検討し, *E. tarda* より調製した lipopolysaccharide を用いた浸漬法の有効性が高いとしている。しかし, Salati *et al.*<sup>98)</sup>はホルマリン不活化菌体 (FKC) の腹腔内注射によって免疫したウナギでは, 抗体価が上昇するがその延命効果は低いとしている。

本症に対して, quillaja saponin, curdlan およびワクチンの単独投与では, 十分な防疫効果を得ることは難しいものと推察される。したがって, 防御効果を高めるためには, 魚類の免疫機構を全般的に活性化することが必要であると考えられる。

## 第二節 生理活性物質とワクチンの併用効果

### 目 的

魚類を含む脊椎動物の生体防御機構は、マクロファージや好中球を主とした貪食細胞による細胞性免疫機構と、抗体産生による液性免疫機構とに大別される。前節において、ヒラメに対する quillaja saponin および curdlan の経口投与効果を調べたところ、延命効果が認められたが、その効果は低かった。また、ヒラメにワクチンを単独で投与したところ、血中の抗体価は上昇したが、顕著な予防効果は認められなかった。しかし、ワクチンの有効率は、quillaja saponin および curdlan を投与した場合と比較して高かった。

魚類の免疫機構では、貪食細胞による細胞性免疫機構が抗体産生による液性免疫機構よりも優位に働くことが知られている。したがって、本症に対する防御効果を高めるためには、ヒラメの細胞性ならびに液性免疫機構の両者を活性化する必要があると考えられる。

そこで、本節では本症に対する防御効果を高めるために、前章の第一節においてブリの腸球菌症に対する延命効果の認められた quillaja saponin と、前節においてヒラメ白血球を活性化する効果の認められた  $\beta$ -1,3-glucan (curdlan) の 2 種類の生理活性物質とワクチンとを併用投与し、これらの相乗効果を検討した。また、免疫後のヒラメの血中抗体価、白血球の貪食活性および  $O_2^-$  産生を測定するとともに、試験感染前後の腸管、腎臓および脾臓の hsp60 レベルを測定し、これらの測定値から併用効果について考察した。

### 実験材料および方法

**供試魚** 日本栽培漁業協会伯方島事業場から分与を受けた受精卵を、福山大学内海生物資源研究所で孵化後、試験に供するまで本学内海生物資源研究所の飼育水槽において飼育したヒラメを用いた。

**供試菌株** 高知大学農学部（現福山大学工学部）楠田理一教授より分与を受けた *E. tarda* IF-1 株を用いた。

**ワクチンの調製** ワクチンの調製は前節と同様、Fig. 21 に示す方法で行った。*E. tarda* を 0.8% NaCl を加えた BHI 培地中で 25℃、48 時間培養した。この菌液に、最終濃度 0.5% となるように formalin を添加し、4℃で 48 時間インキュベートして菌体を不活化した。この不活化菌体を 0.85% NaCl で遠心洗浄したのち、4℃の 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) の中で 24 時間透析した。透析後の不活化菌液を凍結乾燥し、ワクチン (formalin-killed cells, FKC) として投与試験に用いた。

**Curdlan** 武田薬品工業より提供された curdlan を用いた。

**Saponin** 太陽化学総合科学研究所より分与された quillaja saponin を用いた。

**ワクチンと quillaja saponin の実験感染に対する併用投与効果** 200 l 容ダイライト水槽 2 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min をしながら, 体重 170 g の供試魚をそれぞれ 15 尾収容した。そして, 固形餌料を与え, 試験まで 1 週間予備飼育した。ワクチンおよび quillaja saponin の併用投与効果を評価するために, 体重 1 kg 当たりワクチンを 34 mg, quillaja saponin を 5 mg 併用して餌に添加し, 毎日 2 週間投与した。また, 対照区には固形餌料を同様に投与した。実験感染は, 投与開始 2 週間後に浸漬法によって行った。実験感染には, BHI (Difco) 培地を用いて 25℃ で 16 時間培養したのちに 9,000 x g で遠心して得られた *E. tarda* を  $5 \times 10^8$  cells/ml となるように海水に懸濁して用いた。供試魚をこの海水中に 10 分間浸漬して感染させたのちに, 200 l 容水槽に移して, その後 18 日間観察した。そして, 感染 18 日後のワクチンと生理活性物質投与区と感染対照区の斃死率から有効率を求めた。

**ワクチン, quillaja saponin, curdlan の実験感染に対する併用投与効果** 200 l 容ダイライト水槽 2 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min をしながら, 体重 60 g の供試魚をそれぞれ 25 尾収容した。そして, 固形餌料を与え, 試験まで 1 週間予備飼育した。ワクチンおよび生理活性物質の併用投与効果を評価するために体重 1 kg 当たりワクチンを 34 mg, quillaja saponin を 5 mg および curdlan を 110 mg を餌に添加して毎日 3 週間投与した。また, 対照区には固形餌料を同様に投与した。試験感染は, 投与開始 2 週間後に浸漬法によって行った。試験感染には BHI (Difco) 培地を用いて 25℃ で 16 時間培養したのちに 9,000 x g で遠心して得られた *E. tarda* を  $3 \times 10^7$  cells/ml となるように海水に懸濁して用いた。供試魚をこの海水中に 10 分間浸漬して感染させたのちに, 200 l 容水槽に移して, その後 19 日間観察した。

**抗体価, 貪食活性,  $O_2^-$  産生能に対するワクチンおよび生理活性物質の投与効果** ワクチンおよび生理活性物質の投与方法 : 200 l 容ダイライト水槽 5 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min しながら, 体重 100 g の供試魚をそれぞれ 5 尾収容した。これらの供試魚に固形餌料を与え, 試験まで 1 週間予備飼育した。ワクチンおよび生理活性物質の投与効果を評価するために, 体重 1 kg 当たりワクチンを 34 mg, quillaja saponin を 5 mg および curdlan を 110 mg を餌に添加して毎日 2 週間投与した。また, 対照区には固形餌料を同様に投与し, 以下に述べる方法で抗体価, 貪食活性,  $O_2^-$  産生能を測定した

**血中抗体価の測定** ワクチン投与後に尾静脈より採血し, 室温で 1 時間静置したのち, 4℃で一晩インキュベートして凝固させた。これを 1,800 x g で 30 分間の遠心を行って上清を  $\phi=0.22 \mu m$  のフィルターを用いて濾過滅菌し, 供試血清として用いた。さらに, 血清を 45℃で 20 分間インキュベート

## ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

し、補体を不活性化したものを抗体価測定用のサンプルとした。抗体価の測定は細菌の直接凝集法によって行った。その方法は Fig. 22 に示したとおりである。血清は 96 穴マイクロタイタープレートに加えたのちに、0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を含む phosphate-buffered saline (PBS, pH7.4) を用いて、2 倍希釈系列を作成した。それぞれに 3  $\mu\text{l}$  の FKC ( $10^{10}$  cells/ml) を添加し、25°C で 1 時間静置した。このマイクロタイタープレートを 4°C で一晩 インキュベートして、顕微鏡下で凝集の有無を調べて判定し  $\log_2$  で示した。

**白血球の分離** ワクチン投与試験終了後、2 週間後にヒラメの腹腔、末梢血および頭腎からの 3 種類の白血球を調製して供試した。腹腔内滲出白血球は、ヒラメ腹腔内に 1 尾当たり 2% casein (Acros Organics) を加えた PBS を 10 ml 注射して 15 時間後に腹腔内に滲出したものを回収した。得られた白血球を PBS で洗浄した後 RPMI 1640 培地 (Bio Whittaker) に懸濁して、これを polymorphonuclear leucocytes (PMNs) として用いた。

末梢血中白血球は、Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) を用いた遠心密度勾配法によって分離した。すなわち、血液を尾静脈から heparin 処理したシリンジを用いて採血し、0.02% heparin を含む PBS で 2 倍希釈したのち、Ficoll-Paque に重層した。そして、450 x g で 30 分間、20°C で遠心した。分離された中間層の白血球画分を回収し、RPMI 1640 培地 に懸濁して用いた。

頭腎白血球は、Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) を用いた遠心密度勾配法によって分離した。すなわち、頭腎をハサミで細かく切断したのちに 10% fetal bovine serum (Gibco Laboratories) を含む RPMI 1640 medium に懸濁した。これを室温で 1 時間インキュベートしたのち、0.5 x 0.5 mm のステンレスメッシュで濾過した。濾液は末梢血中白血球と同様に、Ficoll-Paque を用いて分離後、白血球画分を回収し、RPMI 1640 培地 に懸濁して用いた。

**貪食活性の測定** RPMI 1640 培地に懸濁した 3 種類のヒラメ白血球に、ヒラメ血清を用いてオプソニン化処理した Bodpy 蛍光 zymosan A 粒子 (Molecular Probes) をそれぞれ 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加した。懸濁液は 1 時間室温でインキュベートしたのちに、Ficoll-Paque を用いて白血球を分離回収した。そして、Hemacolor (Merck) 染色を行って蛍光および非蛍光顕微鏡下で観察した。なお、蛍光顕微鏡観察は BP490 と EY455 のフィルターの組み合わせで行った。貪食能は約 600 細胞当たりの貪食白血球数を測定し、次式により貪食活性を計算した。

$$\text{貪食活性 (\%)} = (\text{貪食した白血球数}) \div (\text{計測した全ての白血球数}) \times 100$$

**PMNs の  $\text{O}_2^-$  産生測定** PMNs の  $\text{O}_2^-$  産生は cytochrome c, Cyt c 還元法によって、20°C で 550 nm の吸光度の変化から算出した。反応溶液には 154 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  および 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を加えた Krebs-Ringer phosphate buffer (KRP, pH 7.4) を用いた。反応液に 25  $\mu\text{M}$  Cyt c (和光), PMNs ( $10^6$  cells/ml), 10 mM glucose, 0.25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 異なる濃度の curdlan および PMA (Sigma) を順次添加して反応させ、 $\text{O}_2^-$  産生を測定した。 $\text{O}_2^-$  産生は PMA の添加 1 分から 4 分までの 3 分間の Cyt c 還より算出し、curdlan を添加しない場合を 100% として相対  $\text{O}_2^-$  産生

率を算出した。

**臓器内の hsp 60 発現に対するワクチンおよび生理活性物質の投与効果** 200 l 容ダイライト水槽 5 個に海水 3.6 l/min の供給と通気 3 l/min をしながら, 体重 60 g の供試魚をそれぞれ 25 尾収容した。これらの供試魚には固形餌料を餌として与え, 試験まで 1 週間予備飼育した。ワクチンおよび 2 種類の生理活性物質の併用投与効果を評価するために, 体重 1 kg 当たりワクチンを 34 mg, quillaja saponin を 5 mg および curdlan を 110 mg を餌に添加して毎日 2 週間投与した。また, 対照区には固形餌料を同様に投与した。実験感染は, 投与開始 2 週間後に浸漬法によって行った。すなわち, BHI 培地を用いて培養した対数増殖期にある *E. tarda* を  $9,000 \times g$  で遠心して生理食塩水を用いて洗浄し, 海水 10 l に懸濁し 1 ml 当たり  $3 \times 10^7$  cells/ml となるように調製した。供試魚をこの海水中に 10 分間浸漬して感染させたのちに 200 l 容水槽に移し, その後 19 日間飼育し, 以下に述べる方法で飼育魚の臓器を調製し, hsp60 レベルを測定した。

**臓器試料の調製** Hsp レベルを調べるために, saponin を投与後の感染直前および感染 19 日後にヒラメの腸管, 腎臓および脾臓を摘出し, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) および 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を加えた 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) を 9 倍容量となるように加えたのち, 2 分間の超音波処理 (Tomy, UD-201) を行った。この処理液を  $100,000 \times g$  で遠心し, 上清を 4℃の 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) に対して一晩透析して, hsp 測定用の試料とした。

**Hsp60 レベルの測定** 試料のタンパク質濃度は, BCA タンパク測定キット (Pierce) を用いて, 0.2 mg/ml に調製した。このサンプルに対して 0.2% SDS, 0.02%  $\beta$ -mercaptoethanol, 60% glycerol, 0.01% bromphenol blue を含む 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) を等量加え, 沸騰水浴中で 3 分間加熱した。このようにして SDS 化したタンパク質 (20  $\mu$ l/well) を, 10% acryamide gel を用いて pH 6.8 と 8.8 の pH 不連続 SDS-PAGE に供した。分離したタンパク質を polyvinylidene difluoride membrane に転写して, 0.85% NaCl および 0.02% Tween 20 を加え 40 mM imidazol buffer (pH 7.4) を用いて洗浄し, milk 溶液 (フナコシ) を用いて一晩室温で blocking した。この転写膜は, hsp60 の発現を調べるために, 一次抗体として mouse anti human hsp60 mAb (フナコシ) を用いて, 室温で 1 時間反応させた。これを洗浄液で洗浄したのち, 二次抗体として peroxidase-labeled goat anti mouse IgG mAb (フナコシ) を用いて, 室温で 1 時間反応させた。洗浄液で洗浄したのち, TMB, 3,3',5,5'-tetramethyl benzene membrane peroxidase substrate system (フナコシ) を用いて発色させた。また, hsp 濃度は NIH-image software を用いて測定し, 任意単位 (A.U.) で示した。

結果

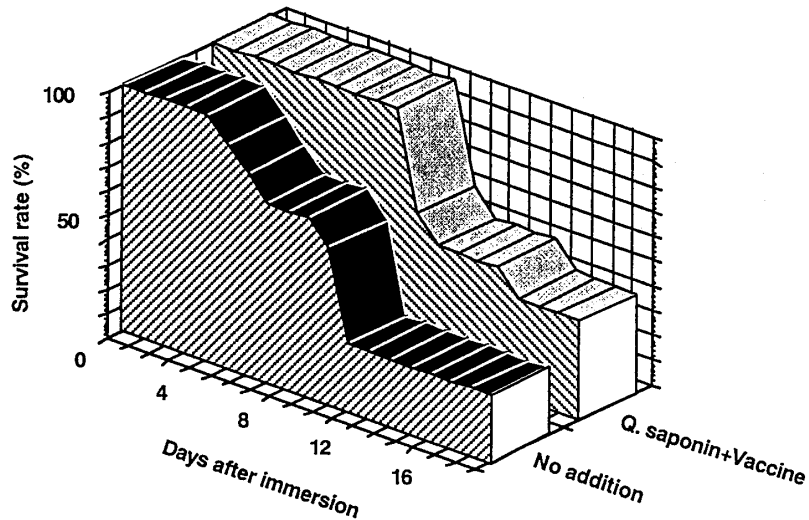


Fig. 25. Effect of orally administered quillaja saponin and vaccine on the resistance of Japanese flounder against edwardsiellosis.

Table 6. Relative percentage survival of Japanese flounder fed on quillaja saponin and vaccine 18 days after immersion with *Edwardsiella tarda*

Exp. condition	Specific mortality	Mortality (%)	RPS
Q. saponin Vaccine	6	60	18
No addition	8	73	—

$$\text{Relative percent survival (RPS)} = \left( 1 - \frac{\% \text{ mortality in the vaccine group}}{\% \text{ mortality in the no addition group}} \right) \times 100\%.$$

生残率 ワクチンと quillaja saponin を併用した場合の試験感染後の生残率変化は、Fig. 25 に示すとおりである。ワクチンと quillaja saponin 併用区では、実験感染 10 日後に斃死が確認され、その後も斃死が続いた。これに対して、感染対照区では感染 5 日後に斃死が確認され、その後も斃死が続いた。このように、ワクチンと quillaja saponin 併用区の生残率の減少は、感染対照区と比較して遅れる傾向が認められた。また、ワクチンと quillaja saponin 併用区の感染 18 日後の有効率は、Table 6 に示すとおりで 18%となった。

いっぽう、ワクチンと curdlan および quillaja saponin を併用した場合の実験感染後の生残率の減少

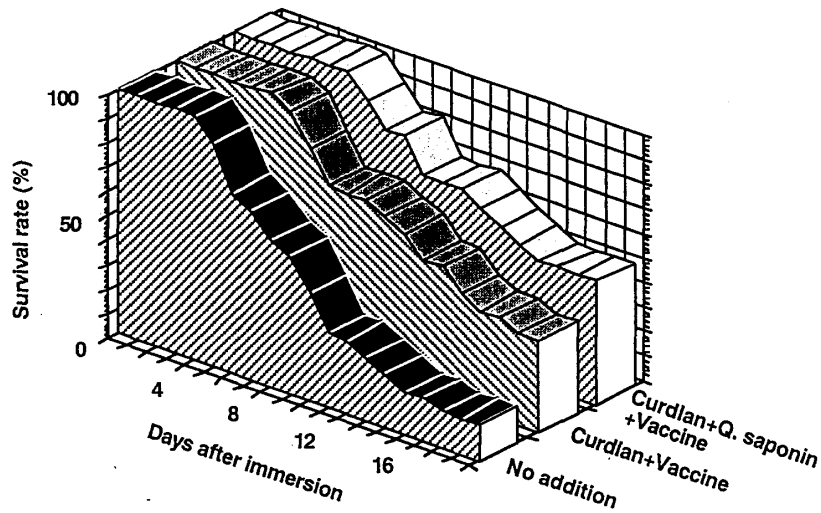


Fig. 26. Effect of orally administered quillaja saponin, curdlan and vaccine on the resistance of Japanese flounder against edwardsiellosis.

Table 7. Relative percentage survival of Japanese flounder fed on quillaja saponin, curdlan and vaccine 19 days after immersion with *Edwardsiella tarda*

Exp. condition	Specific mortality	Mortality (%)	RPS
Curdlan Vaccine	15	62	27
Q. saponin Curdlan Vaccine	11	50*	42
No addition	20	85	—

$$\text{Relative percent survival (RPS)} = \left( 1 - \frac{\% \text{ mortality in the vaccinen group}}{\% \text{ mortality in the no saponin group}} \right) \times 100\%.$$

\*Significantly different from the control of immersion with Fisher's exact probability test ( $p < 0.05$ ).

は、Fig. 26 に示すとおりである。ワクチン、quillaja saponin および curdlan 併用区とワクチンおよび curdlan 併用区ではそれぞれ感染 7 日後と 6 日後に斃死が確認された。また感染対照区では感染 5 日後に斃死が確認され、ワクチンと生理活性物質を併用した 2 区では、生残率の減少が遅れた。また、ワクチンと 2 種類の生理活性物質の併用区の感染 19 日後の生残率は 50% となり、感染対照区の 15%



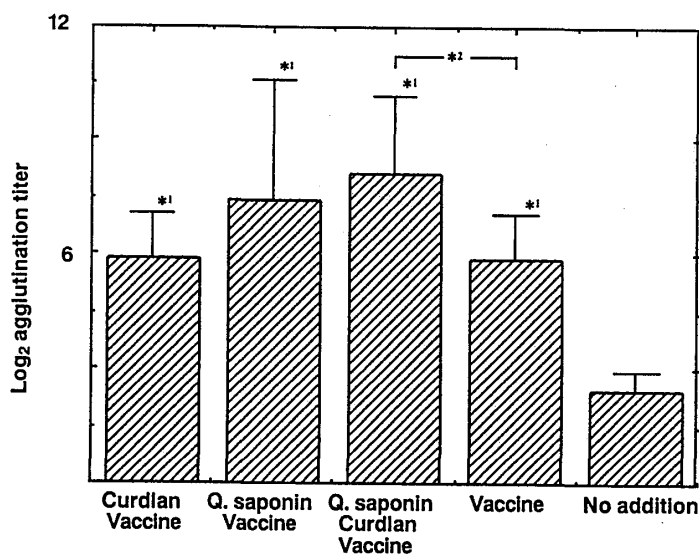


Fig. 27. Agglutination titer of Japanese flounder fed on immunostimulant-containing diets supplemented with vaccine for 2 weeks.

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 3$ ).

\*1 Significantly different from the no addition with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

\*\*2 Significantly different from the vaccine with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

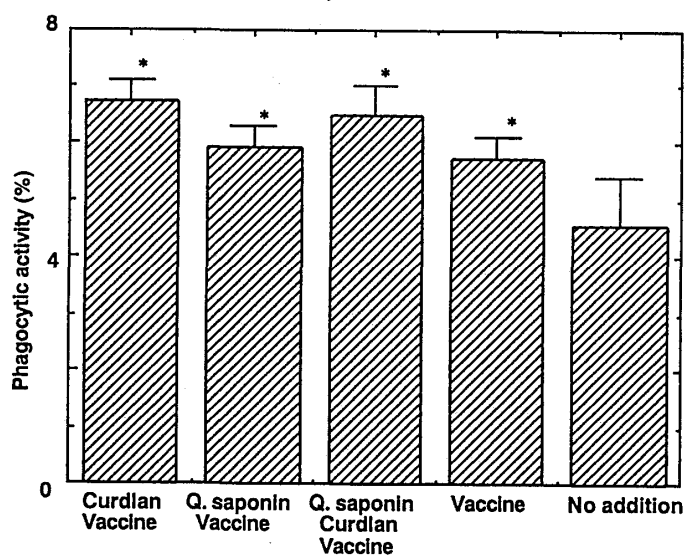


Fig. 28. Phagocytic activities of Japanese flounder PMNs fed on immunostimulant-containing diets supplemented with vaccine for 2 weeks.

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 3$ ).

\* Significantly different from the no addition with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

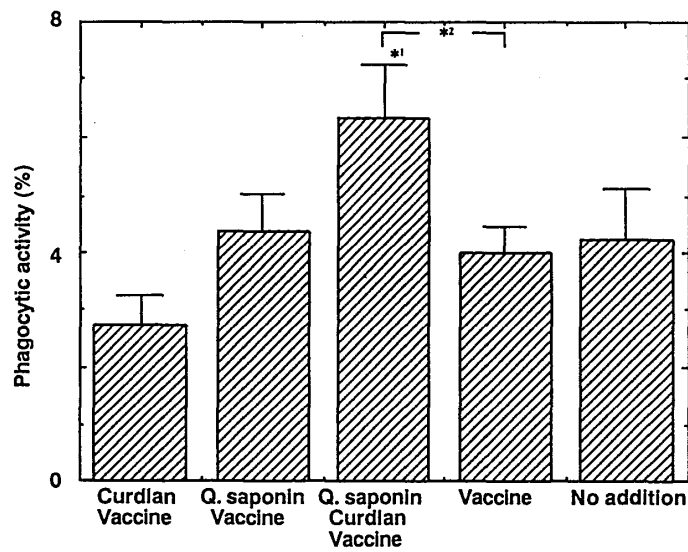


Fig. 29. Phagocytic activities of Japanese flounder circulating leucocytes fed on immunostimulant-containing diets supplemented with vaccine for 2 weeks.

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 3$ ).

\*<sup>1</sup>Significantly different from the control with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

\*<sup>2</sup>Significantly different from the vaccine with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

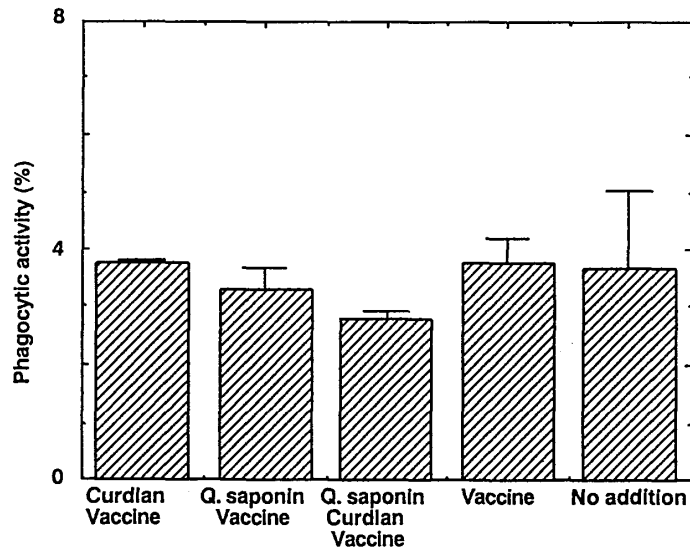


Fig. 30. Phagocytic activities of Japanese flounder head kidney leucocytes fed on immunostimulant-containing diets supplemented with vaccine for 2 weeks.

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 3$ ).

## ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

と比較して有意 ( $p<0.05$ ) に、高くなった。さらに、感染 19 日後の有効率は Table 7 に示すとおりで、ワクチンと curdlan の併用区が 27%、ワクチンと 2 種類の生理活性物質の併用区が 42% となった。

**血中抗体価** 試験餌料を投与したヒラメの *E. tarda* に対する血中抗体価は、Fig. 27 に示すとおりである。ワクチン単独投与区の抗体価は、 $\log_2 5.9$  を示し、対照区の  $\log_2 2.4$  と比較して有意 ( $p<0.05$ ) に上昇が認められた。また、ワクチンと curdlan の併用区の抗体価は  $\log_2 5.9$  を示し、対照区と比較して有意 ( $p<0.05$ ) に上昇が認められた。しかし、ワクチンと curdlan の併用による抗体価の上昇は認められなかった。

いっぽう、ワクチンと quillaja saponin の併用区では  $\log_2 7.4$  を示し、ワクチン単独投与区と比較して抗体価が上昇した。とくに、ワクチンと 2 種類の生理活性物質の併用区では  $\log_2 8.1$  を示し、ワクチン単独投与区と比較して有意 ( $p<0.05$ ) に高い値を示した。

**貪食活性** PMNs の貪食活性は Fig. 28 に示すとおりである。ワクチンと 2 種類の生理活性物質の併用区では、5.8% から 6.7% の活性値を示した。これらの活性は、対照区の 4.6% と比較して有意 ( $p<0.05$ ) に高い値であった。しかし、ワクチンと生理活性物質の併用による効果は認められなかった。また、末梢血中白血球の貪食活性は Fig. 29 に示すとおりで、ワクチンと 2 種類の生理活性物質の併用区では 6.3% であった。これは対照区の 4.2% と比較して有意 ( $p<0.05$ ) に高く、ワクチンの単独投与区の 4.0% と比較しても有意 ( $p<0.05$ ) に高い値であった。しかし、頭腎より調製した白血球の貪食活性は、Fig. 30 に示すとおりで、ワクチンと生理活性物質の併用による影響は認められなかった。

**$O_2^-$  産生** 白血球の  $O_2^-$  産生は Fig. 31 に示すとおりである。ワクチンと生理活性物質の投与区では 3.4% から 3.8% の産生率を示し、対照区では 3.5% となり、ワクチンと生理活性物質の投与区では、対照区と比較して  $O_2^-$  産生の活性化が認められなかった。

**Hsp60 発現** 実験感染の直前と 19 日後の生残魚の腸管の hsp60 レベルは Fig. 32 に示すとおりである。感染直前の hsp60 はワクチンと生理活性物質を併用した 2 区においては、対照区と比較して上昇した。とくに、ワクチンと curdlan の併用区においては、対照区と比較して有意 ( $p<0.05$ ) に高い値を示した。いっぽう、感染後の hsp60 レベルは、ワクチンと生理活性物質を併用した 2 区では対照区と比較して減少したが有意差は認められなかった。感染前後の hsp60 は、ワクチンと生理活性物質を併用した 2 区では有意差は認められなかったが、対照区では感染後有意 ( $p<0.05$ ) に高い値を示した。腎臓の hsp60 は、Fig. 33 に示すとおりである。感染前のワクチンと 2 種の生理活性物質の併用区においては、対照区と比較して上昇した。しかし、対照区に対して有意差は認められなかった。また、感染後の hsp60 レベルはワクチンと生理活性物質を併用した 2 区では、対照区と比較して減少したが有意差は認められなかった。感染前後の hsp60 レベルは、ワクチンと生理活性物質を併用した 2 区では有意差は認められなかったが、対照区では感染後有意 ( $p<0.05$ ) に上昇した。

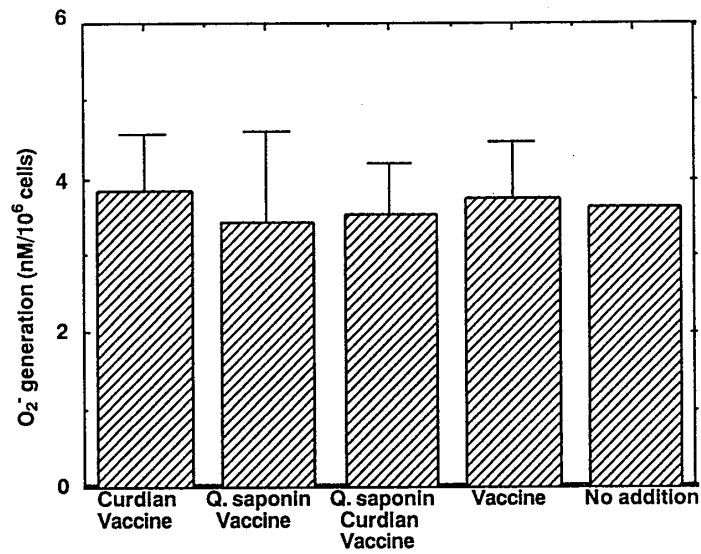


Fig. 31. Superoxide generation activities of Japanese flounder PMNs fed on immunostimulant-containing diets supplemented with vaccine for 2 weeks.

Vertical bars represent standard deviation ( $N = 3$ ).

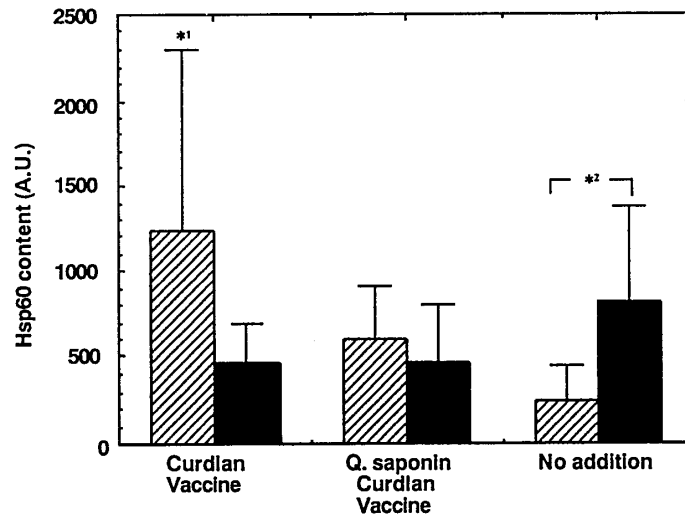


Fig. 32. Heat shock protein 60 (hsp60) expression in intestine before and after immersion with *Edwardsiella tarda*.

▨, before immersion ( $N=6$ ); ■, after immersion ( $N=4\sim 8$ ).

\*1 Significantly different from the no addition with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

\*2 Significantly different from the before immersion with  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).

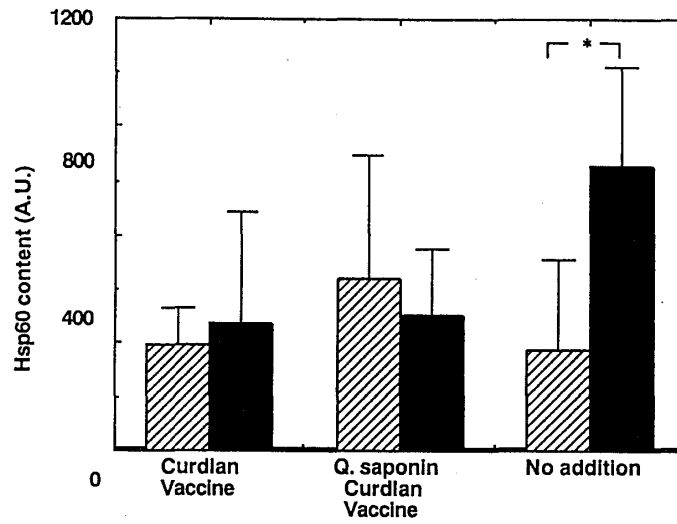


Fig. 33. Heat shock protein 60 (hsp60) expression in kidney before and after immersion with *Edwardsiella tarda*.

▨, before immersion (N=6); ■, after immersion (N=4~8).

\* Significantly different from the before immersion with *t*-test ( $p < 0.05$ ).

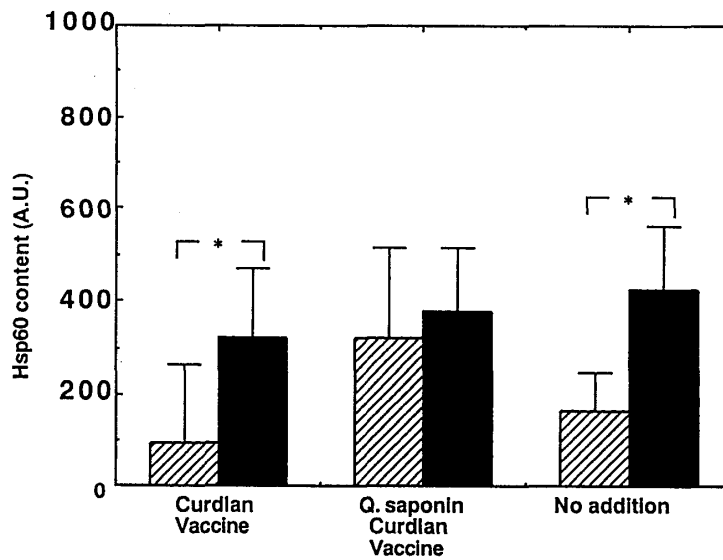


Fig. 34. Heat shock protein 60 (hsp60) expression in spleen before and after immersion with *Edwardsiella tarda*.

▨, before immersion (N=6); ■, after immersion (N=4~8).

\* Significantly different from the before immersion with *t*-test ( $p < 0.05$ ).

いっぽう, 脾臓の hsp60 は Fig. 34 に示すとおりである。感染前のワクチンと quillaja saponin と curdlan の併用区においては, 対照区に比較して上昇する傾向を示したが, ワクチンと curdlan の併用区では低下する傾向を示した。しかし, いずれの試験区とも対照区に対して有意差は認められなかった。また, 感染後の hsp60 レベルはワクチンと curdlan の併用区とワクチン, quillaja saponin, curdlan の併用区いずれも対照区に比較して低下したが, 有意差 ( $p < 0.05$ ) は認められなかった。感染前後の hsp60 レベルの有意差 ( $p < 0.05$ ) は, ワクチンと curdlan 併用区および対照区では認められたが, ワクチンと quillaja saponin と curdlan 併用区では認められなかった。

### 考 察

ヒラメのエドワジエラ症は, その養殖において最も被害の大きな魚病である。そこで, 本症に対する有効な予防法の確立が望まれている。前節では免疫賦活効果を持つ quillaja saponin と curdlan の 2 種類の生理活性物質を単独投与して防御効果を調べたが, 顕著な効果は認められなかった。そこで, ワクチンを投与して *E. tarda* に対する特異的な防御機構を活性化させて防御能の向上を図ることを試みた。魚類の感染症に対するワクチンの投与効果については, 種々の魚種で各種の投与方法による有効性が検討されている<sup>67-70)</sup>。それらのなかで, 経口投与による予防法は一度に多くの魚に対する投与が可能で, 投与時の魚に与えるストレスが少ない投与方法であると考えられている。佐古<sup>90)</sup>は  $\beta$  型連鎖球菌症に対する不活化ワクチンの各種投与方法による有効性の差異について検討し, 経口法と浸漬法による防御効果は注射法に比較して低いとしている。馬久地ら<sup>67)</sup>はヒラメのエドワジエラ症に対しても同様であるとしている。また, 前節においても経口ワクチンの顕著な効果は認められなかった。そこで, 本節ではヒラメのエドワジエラ症に対する経口ワクチンの防御効果を高めるために, ワクチンと生理活性物質の併用について検討した。

ワクチンと生理活性物質を併用して経口投与したヒラメの生残率は, 感染対照区に比較して高くなった。また, 有効率は前節の単独投与と比較しても高くなった<sup>100)</sup>。したがって, 経口ワクチンの効果は単独投与では認められなくても, 併用によって認められると考えられる。そこで, ヒラメに対するワクチンと生理活性物質の併用投与が, どのような要因によって有効率が高められたのかを, 免疫後の血中抗体価, 白血球の貪食能と  $O_2$  産生率および臓器内の hsp60 レベルを測定して検討した。

免疫後のヒラメの血中抗体価は, ワクチンと quillaja saponin との併用区では, ワクチン単独投与区と比較して上昇する傾向が認められた。とくに, ワクチンと 2 種の生理活性物質の併用区では, 高い値を示した。マウスに quillaja saponin を抗原とともにマウスに腹腔内注射すると, 抗体の産生能が促進される<sup>12)</sup>。また, マウスにワクチンとともに quillaja saponin を経口投与するとアジュバント効果が認められ, 免疫応答が促進される<sup>11,101,102)</sup>。いっぽう, channel catfish<sup>103)</sup> およびサケ<sup>104,105)</sup> の腹腔内に  $\beta$ -1,3-glucan を注射すると, 血中抗体価が上昇して抗体産生機構が活性化される。本研究においても, ヒラメにワクチンと quillaja saponin あるいは curdlan を併用投与すると, 血中抗体価はワクチン単独投与区に比較して上昇がみられた。したがって, ヒラメにワクチンと quillaja saponin あるいは curdlan

を併用投与すると、アジュバント効果を持つと思われる。また、アジュバント効果はワクチンに quillaja saponin と curdlan を併用して投与した場合に顕著に認められることから、2種類の生理活性物質の併用によって、相乗効果が期待できるものと考えられる。前節において、ヒラメにワクチンを単独で経口投与すると、血中抗体価は上昇したが、有効率は低く顕著な効果が認められなかった。したがって、魚類においてはワクチンの投与による血中抗体価の上昇と有効性とは、必ずしも一致しないのではないかと考えられる。このような事例はウナギ<sup>106)</sup>やアユ<sup>107,108)</sup>においても報告されている。そこで、ヒラメに対するワクチンと生理活性物質の併用効果を白血球の貪食能と  $O_2^-$  産生率から評価した。

貪食能は、PMNs ではワクチン単独投与区、ワクチンと quillaja saponin 併用投与区、ワクチンと curdlan 併用投与区、ワクチンとこれら2種の生理活性物質の併用投与区のすべてが、対照区に比較して高い値を示した。末梢血中白血球ではワクチンとこれら2種の生理活性物質の併用投与区が、対照区と比較して高い値を示した。しかし、頭腎白血球では対照区と差異が認められなかった。Jorgensen *et al.* は、glucan がニジマスの白血球を活性化すること<sup>109)</sup>、また、Jeney and Anderson<sup>110)</sup> は、ニジマスの腹腔内に抗原と glucan とを注射すると、非特異的免疫機構が活性化されることを報告している。また、Newman *et al.*<sup>111)</sup> によるとワクチンと quillaja saponin とを併用して投与すると、CD8+ リンパ球を活性化する。これらのように、ワクチンと quillaja saponin および curdlan を併用して投与すると、非特異的免疫機構が活性化されることが明らかにされている。本研究においても、ヒラメにワクチンと生理活性物質を併用投与したヒラメでは、白血球が活性化されて貪食能が高くなることが明らかになった。したがって、ワクチンと生理活性物質の併用投与は、ヒラメの貪食能を高めるのに有効と思われる。ワクチンと生理活性物質を併用して投与すると、単独投与に比較して血中抗体価と貪食能が高められて、実験感染に対する有効率が上昇するのであろう。

また、白血球の  $O_2^-$  産生率はワクチンの単独投与区および生理活性物質との併用投与区では、対照区と差異が認められなかった。これらのことから、ワクチンと生理活性物質の単独および併用投与は、白血球の  $O_2^-$  産生率に影響しなかった。

前章において、ブリに saponin を投与すると延命効果が認められ、その効果に hsp60 の誘導が関与していることが示唆された。ヒラメのエドワジエラ症では、外観的には腹部の膨張、腹水の貯留および脱腸が、解剖的には肝臓や腎臓に炎症が認められる<sup>5)</sup>。また、細菌感染にともなう炎症では、組織の酸化的ストレスが高くなるとされている<sup>6)</sup>。そこで、本節ではヒラメに対するワクチンと2種の生理活性物質を併用投与し、感染前後の腸管、腎臓および脾臓の hsp60 レベルの変化を調べ、併用効果に hsp60 が影響を及ぼすかどうかについて検討した。その結果、腸管の hsp60 はワクチンと curdlan、ワクチンと curdlan および quillaja saponin を併用投与した2区では、対照区に比較して感染前に上昇する傾向が認められた。腸管は、食物の消化と吸収が主な機能であるが、病原体などの異物が直接侵入することから、粘膜組織に特有の粘膜免疫機構が発達していると考えられている。粘膜免疫機構は、経口的に腸管内へ侵入した異物が、腸管に分布するリンパ組織であるパイエル板に存在している M 細胞に取り込まれて、腸管上皮細胞間に存在するリンパ球である  $\gamma, \delta$ -T 細胞の活性化を誘導して、活性化されると考えられている<sup>112)</sup>。したがって、ヒラメに投与したワクチンは腸管の粘膜免疫機構を活性化したと考えられる。粘膜免疫機構の活性化は hsp60 を認識する  $\gamma, \delta$ -T 細胞によって調節され<sup>113,114)</sup>、粘膜

免疫機構の発達した腸管組織においては hsp60 が関与して、局所免疫機構を活性化すると考えられる。これらのことから、ワクチンと生理活性物質との併用投与区の腸管では、投与後の hsp60 が上昇して粘膜免疫機構が活性化されていると推察される。また、対照区の腸管の hsp60 がワクチンと生理活性物質を投与した 2 区に比較して、感染後に上昇する傾向を示した。これは、ワクチンや細菌などの異物が腸管内に侵入した初期段階に、粘膜免疫機構を活性化するために hsp60 が誘導されたと考えられる。これらのことから、ワクチンと生理活性物質とを併用投与すると腸管の hsp60 レベルを上昇させ、粘膜免疫系の活性化を促して延命効果が高くなると推察される。

いっぽう、腎臓と脾臓においては併用投与しても、腸管のような投与後の hsp60 レベルの上昇は認められなかった。しかし、腎臓では対照区の実験感染後の hsp60 レベルが上昇した。また、脾臓ではワクチンと curdlan の併用投与区および対照区の感染後の hsp60 レベルが、高い値を示した。前章のブリの腸球菌症の試験感染においても、腎臓の hsp60 レベルは感染前では低く、感染後に高くなった。本研究で示したように、感染によって hsp60 レベルが増加することは、腸管、腎臓および脾臓において認められる共通の現象である。しかし、粘膜免疫機構の発達した腸管と腎臓および脾臓では、感染前のワクチンと生理活性物質の併用投与に対する応答の違いから推測すると、その誘導様式が異なると思われる。なお、腎臓と脾臓の hsp60 の誘導様式の差異については、明らかにすることができなかった。Schwan and Goebel<sup>119)</sup>は細菌の貪食によって、貪食細胞の hsp 合成が誘導されるとしている。また、hsp60 は一連の炎症反応が沈静化するのに伴って減少し、炎症反応が終了すると誘導されなくなる。したがって、腎臓および脾臓の hsp60 レベルが高い病魚では、炎症が沈静化されておらず、細菌感染によるストレスが高い状態にあると推察される。これに対して、ワクチンと quillaja saponin および curdlan の併用投与区では、感染前と感染後の病魚の腎臓と脾臓の hsp60 レベルに有意差は認められなかった。したがって、併用投与区の病魚では、感染による腎臓および脾臓のストレスは低いものと思われ、症状が発現しなかったかあるいは治癒傾向にあったのではないかと推察される。なお、腎臓と脾臓の hsp60 はシャペロニンとして、炎症組織の保護と修復に関与すると考えられる。そこで、hsp60 は臓器が受けているストレスの程度を示していると考えられる。

ワクチンおよび生理活性物質の単独投与では、試験感染に対して高い防御効果は得られなかった。しかし、これらを併用投与したヒラメでは血中抗体価、白血球の貪食能および感染に対する有効率が高く、感染によるストレスが低い状態にあったと考えられる。したがって、ワクチンと生理活性物質を併用した経口投与法は、ヒラメの本症に対する有効な防御手段となろう。



### 第三節 摘要

主要海産養殖魚であるヒラメのエドワジエラ症は、1982年頃から発生するようになり、その原因菌として *Edwardsiella tarda* が分離された。その後、本症は初夏から晩秋にかけての高水温期に魚令を問わず発生するようになり、1995年以降には多発するようになった。現在では、ヒラメ養殖において最も被害の大きな疾病となっている。本症に対する治療薬としては、塩酸オキシテトラサイクリンが用いられているが、薬剤の多用によって耐性菌が出現するようになり、大きな問題となっている。したがって、より効果的な予防・治療法を確立することが重要な課題となってきた。そこで、本章では前節においてブリの腸球菌症に対して効果が認められた quillaja saponin と、魚類の免疫機構を活性化する効果があるとされている  $\beta$ -1,3-glucan (curdlan) の2種類の生理活性物質、およびワクチンをヒラメに投与して、エドワジエラ症に対する投与効果を検討した。

これら2種の生理活性物質うち、quillaja saponin のヒラメのエドワジエラ症に対する防御効果は、多少の延命効果が認められるものの有効性には大きな期待ができないことが明らかになった。Curdlan については、ヒラメの生体防御能に与える投与期間および投与方法の影響を白血球の貪食能と PMA 刺激による  $O_2^-$  産生率から調べて検討した。その結果、curdlan を連続投与したヒラメ白血球の貪食能は、投与開始後2週間までは対照区に比較して上昇したが、3週間以上投与すると活性が減少して投与開始前の水準まで低下した。また、curdlan 投与は  $O_2^-$  産生に影響しなかった。しかし、curdlan を3週間投与したヒラメの PMN に、*in vitro* で curdlan を添加したところ、 $O_2^-$  産生率が上昇した。いっぽう、4か月間 curdlan を隔日投与したヒラメ白血球の貪食能は、対照区に比較して高くなった。しかし、その活性は短期間の連続投与に比較して低下した。これらのことから、curdlan 投与がヒラメの非特異的免疫機構に与える効果は、その投与方法と投与期間によって影響されることが明らかになった。そこで、白血球貪食能に対する活性化効果が顕著に認められた curdlan を、2週間連続投与したのちに、*E. tarda* で実験感染を行って有効性を評価したところ、curdlan 投与による顕著な延命効果は認められなかった。

そこで、*E. tarda* のホルマリン不活化菌体をワクチンとして経口投与し、特異的な防御機構を活性化してワクチンの効果を検討した。その結果、ワクチンの単独投与では血液中抗体価の上昇が認められ、有効率も生理活性物質を単独投与した場合に比較して高い値となったが、顕著な延命効果は認められなかった。

したがって、次にワクチンと quillaja saponin および curdlan の2種類の生理活性物質の併用投与を検討した。ワクチンと生理活性物質を併用投与したヒラメでは、ワクチンを単独投与した場合に比較して抗体価と貪食能が上昇した。したがって、quillaja saponin および curdlan にはアジュバント効果があることが示唆された。また、ワクチンとこれら2種の生理活性物質を併用投与すると、*E. tarda* 実験感染に対する有効率が高められた。このように、ワクチンや生理活性物質の投与は単独では十分な有効性は得られなかったが、併用すると、相乗効果が認められることが明らかになった。しかし、これらの併用投与は白血球の  $O_2^-$  産生には影響しなかった。

ヒラメにワクチンと quillaja saponin と curdlan の2種の生理活性物質を併用投与し、感染前後の腸管、腎臓および脾臓の hsp60 の変化を調べ、併用投与が、hsp60 の発現にどのような影響を及ぼす

かについて検討した。その結果, 腸管と腎臓および脾臓とでは hsp60 の誘導様式に差異が認められた。すなわち, 腸管の hsp60 はワクチンと生理活性物質の併用投与区では, 対照区に比較して感染前に上昇する傾向が認められた。しかし, 腎臓と脾臓においては併用投与しても, 腸管のような投与後の hsp60 レベルの上昇は認められなかった。腸管は病原体などの侵入経路であることから, 粘膜組織に特有な粘膜免疫機構が発達しているとされている。粘膜免疫機構は, 腸管上皮細胞間に存在するリンパ球である  $\gamma, \delta$ -T 細胞が hsp60 を認識して, 活性化されると考えられている。これらのことから, ワクチンと生理活性物質との併用投与区の腸管では, 投与後の hsp60 レベルが上昇して粘膜免疫機構が活性化されているのではないかと推察された。ワクチンと生理活性物質とを併用投与すると, 腸管の hsp60 レベルが上昇し, 粘膜免疫系の活性化を促進して延命効果が高くなるのではないかと思われた。

いっぽう, 腎臓では対照区の感染後の hsp60 レベルが上昇した。腎臓の hsp60 は前章のブリの腸球菌症の試験感染においても感染前では低く, 感染後に高くなった。また, 脾臓ではワクチンと curdian の併用投与区および対照区の感染後の hsp60 レベルが, 高い値を示した。したがって, 腎臓および脾臓の hsp60 は粘膜免疫機構の発達した腸管とは異なり, 炎症組織の保護と修復に関与するシャペロニンとして機能していると思われた。腎臓および脾臓の hsp60 レベルが高い病魚では, 炎症が沈静化されておらず, 細菌感染によるストレスが高い状態にあるのではないかと推察された。これに対して, ワクチンと 2 種の生理活性物質の併用投与区では, 感染前と感染後の生残魚の腎臓と脾臓の hsp60 レベルに有意差は認められなかった。したがって, 併用投与区の病魚の腎臓および脾臓の感染によるストレスは, 低いと思われた。これらのことから, ワクチンと生理活性物質との併用投与では, 感染後のヒラメにおいて症状が発現しなかったか, あるいは治癒傾向にあったと推察された。

ワクチンと生理活性物質の経口投与は, 単独では十分な防御効果は得られないが, 併用によって血中抗体価, 白血球の貪食能および試験感染に対する有効率も高くなった。また, 感染後の病魚では症状が発現しないか, 発現してもそれらは治癒傾向にあったと推察された。したがって, ワクチンと生理活性物質を併用した経口投与法は, ヒラメの本症に対する有効な防御手段となるのではないかと思われた。

## 総 括

ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症は、海産養殖魚の主要魚種であるブリとヒラメにおいて発生する細菌性の疾病の中で、その被害が大きく、治療が困難であることから問題とされている魚病である。これまでに、これらの魚病に対する治療薬として抗生物質などの化学療法剤が用いられてきた。しかし、現在では抗生物質の多用による耐性菌の出現や、体内残留などの公衆衛生上の問題が課題となっている。そこで、本研究ではこれらの魚病に対して、薬剤耐性菌の出現頻度や公衆衛生上の問題が少なく、マウスにおいて免疫賦活効果が報告されている生理活性物質を用いた有効な防御手段について検討した。

### ブリの腸球菌症に対する saponin の投与効果

Saponin の経口投与によるブリの腸球菌症に対する防御効果を検討した。Quillaja saponin と beet saponin を投与した試験区では、感染対照区と比較して斃死が遅れた。Saponin 経口投与の後、腸球菌症の原因菌である *Lactococcus garvieae* を実験感染させた感染 9 日後の有効率は、40%であった。このように、saponin 投与はブリの腸球菌症に対する延命効果を高めることが示された。そこで、saponin の投与効果を感染後の臓器内の過酸化脂量 (LPO 量) と活性酸素消去酵素の推移より調べた。ブリの肝臓の LPO 量は、2 種の saponin 投与区では感染後の上昇が抑制されたが、感染対照区では上昇した。また、活性酸素消去能を有する Mn-SOD と GPxs の活性は、感染後に quillaja saponin と beet saponin 投与区では顕著に上昇した。したがって、saponin の投与は感染後のブリの臓器内の Mn-SOD と GPxs 活性誘導を促進し、LPO 量の上昇を抑制すると考えられた。

感染後の臓器内に細菌の著しい増殖が、みられた。それに伴う臓器の活性酸素消去酵素の活性および LPO 量の上昇は、感染によって酸化ストレスが高まったためであると考えられる。生体では、種々のストレスに対して hsp が誘導され、組織の保護・修復を行うことが知られている。そこで、2 種類の saponin の投与が感染後のブリの hsp 発現に与える効果について検討した。その結果、saponin 投与魚では感染後の病変が顕著に認められる腎臓において、酸化ストレスの軽減と関わりのある hsp60 および hsp32 の誘導が促進された。

ブリの腸球菌症に対する抵抗性を高めるためには、細菌感染後の初期段階において活性酸素消去酵素の活性を高め、LPO 量の上昇を抑制することが重要であると推察された。また、感染後に hsp の誘導とその発現量が維持されたことが、感染に対する臓器の保護効果を高め、延命を促進したものと推察された。したがって、ブリの腸球菌症に対する saponin の投与は試験感染後のブリ臓器内 Mn-SOD、GPxs の活性化を促進し、種々の炎症反応によって産生される LPO 量の上昇を抑制すると考えられた。また、saponin は感染初期において hsp60、hsp32 の誘導を促進し、臓器の保護効果を高め、実験感染に対する延命効果をもたらしたものと推察された。

### ヒラメのエドワジエラ症に対する quillaja saponin と curdlan の投与効果

ヒラメのエドワジエラ症に対する生理活性物質の防御効果について検討した。まず、quillaja saponin

の投与効果について検討するために、投与後に本症の原因菌である *Edwardsiella tarda* を用いて実験感染を行った。その結果、多少の延命効果が認められるものの有効性には大きな期待ができないことが明らかになった。そこで、 $\beta$ -1,3-glucan (curdlan) の投与効果について検討した。まず、curdlan の投与期間と投与法が、ヒラメの生体防御能に与える影響について、白血球の貪食能と PMA 刺激による  $O_2^-$  産生率から評価した。その結果、curdlan を連続投与したヒラメ白血球の貪食能は、投与開始後 2 週間までは対照区に比較して上昇したが、3 週間以上投与すると活性が減少して投与開始前の水準まで低下した。また、curdlan の投与は、 $O_2^-$  の産生に何ら影響を与えなかった。しかし、curdlan を 3 週間投与したヒラメ PMN に、curdlan をさらに *in vitro* で添加したところ  $O_2^-$  の産生率が上昇した。いっぽう、4 か月間 curdlan を隔日投与したヒラメ白血球の貪食能は、対照区に比較して高い値を示した。しかし、その活性は短期間の連続投与に比較して低い値を示した。これらのことから、curdlan の投与がヒラメの貪食能と  $O_2^-$  産生能に与える効果は、その投与法と投与期間によって影響されることが明らかになった。そこで、白血球貪食能に対する活性化効果が顕著に認められた curdlan を、2 週間連続投与したのちに実験感染を行って有効性を評価したところ、curdlan 投与による顕著な効果は認められなかった。

#### ヒラメのエドワジエラ症に対するワクチンの投与効果

*E. tarda* のホルマリン不活化菌体をワクチンとして経口投与し、特異的な防御機構を活性化する方法を検討した。その結果、ワクチンの単独投与によって血液中抗体価の上昇が認められ、実験感染に対する有効率も生理活性物質を単独投与した場合に比較して高い値を示したが、顕著な感染防御効果は認められなかった。

そこで、ワクチンと quillaja saponin および curdlan の 2 種類の生理活性物質の併用投与について検討した。ワクチンと生理活性物質を併用投与したヒラメでは、ワクチンを単独投与した場合に比較して抗体価と貪食能が上昇した。したがって、quillaja saponin と curdlan はアジュバント効果を持つことが示唆された。また、ワクチンとこれら 2 種の生理活性物質を併用投与すると実験感染に対する有効率が高められた。このように、ワクチンや生理活性物質の単独投与では十分な有効性は得られなかったが、併用すると相乗効果が認められることが明らかになった。しかし、これらの併用投与は白血球の  $O_2^-$  産生には影響しなかった。

ヒラメにワクチンと quillaja saponin と curdlan の 2 種の生理活性物質を併用投与し、感染前後の腸管、腎臓および脾臓の hsp60 の発現量を調べ、併用投与が hsp60 発現レベルに影響を及ぼすかどうかについて検討した。その結果、腸管と腎臓および脾臓とでは hsp60 の誘導様式に差異が認められた。すなわち、腸管の hsp60 はワクチンと生理活性物質の併用投与区では、対照区に比較して感染前に上昇する傾向が認められた。しかし、腎臓と脾臓においては併用投与しても、腸管のような投与後の hsp60 の上昇は認められなかった。腸管は病原体などの異物の侵入経路であることから、粘膜組織に特有な粘膜免疫機構が発達している。粘膜免疫機構は、腸管上皮細胞間に存在するリンパ球である  $\gamma \delta$ -T 細胞が hsp60 を認識して、活性化されると考えられる。これらのことから、ワクチンと生理活性物質との併用投与区の腸管では、投与後の hsp60 が上昇して粘膜免疫機構が活性化されていると推察された。

## ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

ワクチンと生理活性物質とを併用投与すると、腸管の hsp60 を高めて粘膜免疫系の活性化を促して延命効果が高くなると思われた。

いっぽう、腎臓では対照区の感染後の hsp60 が上昇した。腎臓の hsp60 はブリの腸球菌症の実験感染においても感染前では低く、感染後に高くなった。また、脾臓ではワクチンと curdlan の併投与区および対照区の感染後の hsp60 が、高い値を示した。したがって、腎臓および脾臓の hsp60 の発現量は粘膜免疫機構の発達した腸管とは異なり、炎症組織の保護と修復に関与するシャペロニンとして機能していると思われた。腎臓および脾臓の hsp60 の発現量が高い病魚では、炎症が沈静化されておらず、細菌感染によるストレスが高い状態にあると推察された。これに対して、ワクチンと 2 種の生理活性物質の併用投与区では、感染前と感染後の生残魚の腎臓と脾臓の hsp60 の発現量に有意差は認められなかった。したがって、併用投与区の病魚の腎臓および脾臓の感染によるストレスは、低いと思われた。これらのことから、ワクチンと生理活性物質との併用投与では、感染後のヒラメにおいて症状が発現しなかったか、あるいは治癒傾向にあったと推察された。

ワクチンと生理活性物質の経口投与は、単独では十分な防御効果は得られないが、併用すると過剰的に *E. tarda* に対する血中抗体価が上昇して、生理活性物質のアジュバント効果、白血球の貪食能の活性化が認められてその結果、試験感染に対する有効率を高めたと推察される。また、感染後の生残魚では症状が発現しなかったか、あるいは発現してもそれらは治癒傾向にあったと推察された。したがって、ワクチンと生理活性物質を併用した経口投与法は、ヒラメの本症に対する有効な防御手段となると思われた。経口投与法は腹腔内注射法、浸漬法およびスプレー法に比較して、魚にストレスを与えず、一度に多量の魚に投与できることから、本症に対する実用的な防御手段として評価出来ると考えられる。

## 謝 辞

試験菌株の分与と本稿の御校閲ならびに有益な御助言を賜った、本学工学部海洋生物工学科 楠田理一教授に深謝致します。

本研究を進めるにあたり御指導、御助言を頂いた大黒神島かき管理委員会 猪子嘉生氏、日本栽培漁業協会 高橋庸一氏、福山大学工学部海洋生物工学科 阪本憲司助手ならびに深謝致します。

また、適切なる御助言と励ましの言葉を賜った本学工学研究科生命工学系研究科長 福井作蔵教授、同工学部生物工学科長 松浦史登教授、同工学部生物工学科 浅田浩二教授、同応用生物科学科 里内清教授に深謝致します。

本研究に携わった内海生物資源研究所配属の生物工学科卒業研究生に感謝いたします。

文 献

- 1) 楠田理一, 河合研児, 豊嶋利雄, 小松功: 養殖ハマチから分離された *Streptococcus* 属の新魚病細菌について. 日水誌, 42, 1345-1352 (1976).
- 2) R. Kusuda, K. Kawai, F. Salati, C. R. Banner, and J. L. Fryer: *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 406-409 (1991).
- 3) L. Texeira, V. C. Meriquior, M. C. E. Vianmi, M. G. S. Carvalho, S. E. L. Fracalazza, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner, and R. R. Facklam: Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffaloes with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 664-668 (1996).
- 4) Y. Ikeda and T. Minami: Hematological and hemochemical assessment on streptococcal infection in cultured yellowtail. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48, 1383-1388 (1976).
- 5) 中津川俊雄: ヒラメ幼魚から分離された *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, 18, 99-101 (1983).
- 6) T. Miyazaki and N. Kaige: Comparative histopathology of edwardsiellosis in fish. *Fish Pathol.*, 20, 219-227 (1985).
- 7) M. J. Davies and R. T. Dean: Radical-mediated protein oxidation, in "The Pathology of Protein Oxidation" (ed. by Oxford University Press), New York, 1997, pp.207-218.
- 8) M. Jaattela and D. Wissing: Heat shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: Possible mechanism of self-protection. *J Exp. Med.*, 177, 231-236 (1993).
- 9) 柏木哲, 杉本昇, 渡辺和子, 太田外之, 楠田理一: 養殖ハマチの連鎖球菌症に対するニフルスチレン酸の化学療法的研究 - II. 人為的感染魚に対する投薬効果. 魚病研究, 12, 157-162 (1977).
- 10) 楠田理一, 鬼崎 忍: プリ連鎖球菌 *Streptococcus* sp. に対するマクロライド系抗生物質およびリンコマイシンの試験管内作用. 魚病研究, 20, 453-457, (1985).
- 11) I. Maharaj, K. J. Froh, and B. Campbell: Immune response of mice to inactivated rabies vaccine administered orally: potentiation by quillaja saponin. *Can. J. Microbiol.*, 32, 414-420 (1986).
- 12) C. R. Kensil, U. Patel, M. Lennick, and D. Marciani: Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria molina cortex*. *J. Immunol.*, 146, 431-437 (1991).
- 13) M. J. Newman, J. Wu, B. H. Gardner, K. J. Munroe, D. Leombruno, J. Recchia, C. R. Kensil, and R. T. Coughlin: Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J. Immunol.*, 148, 2357-2362 (1992).
- 14) M. Ninomiya, H. Hatta, M. Fujiki, M. Kim, T. Yamamoto, and R. Kusuda: Enhancement of chemotactic activity of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) leucocytes by oral administration of quillaja saponin. *Fish Shellfish Immunol.*, 5, 325-328 (1995).
- 15) M. Uchiyama and M. Mihara M: Determination of malonylaldehyde precursor in tissues by

ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

- thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, **86**, 271-278 (1978).
- 16) 浅田浩二, 中野稔, 柿沼カツ子: 生体における活性酸素消去系の測定法, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1992, pp. 188-189.
  - 17) J. M. McCord and I. Fridovich: The utility of superoxide dismutase in studying free radical reaction. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6056-6063 (1969).
  - 18) L. W. Oberley and D. R. Spitz: in "Assay of superoxide dismutase activity in tumore tissue", (ed. by L. Packer), Academic Press Inc, London, 1984, pp. 457-464.
  - 19) D. R. Spitz and L. W. Overley: An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal. Biochem.*, **179**, 8-18 (1989).
  - 20) 土田成紀, 佐藤清美: グルタチオン研究のエポック. 蛋白・核酸・酵素, **33**, 1564-1573 (1988).
  - 21) S. M. Morris and J. T. Albright: Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in the rate mirabile and gas gland epithelium of six species of marine fishes. *J. Exp. Zool.*, **232**, 29-39 (1984).
  - 22) S. W. Werns and B. R. Lucchesi: Free radicals and ischemic tissues injury. *Trend Pharmacol. Sci.*, **11**, 161-165 (1990).
  - 23) J. A. Simpson, S. Narita, S. Gieseg, S. Gebicki, J. M. Gebicki, and R. T. Dean : Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochem. J.*, **282**, 621-624 (1992).
  - 24) J. Zakowski and A. L. Tappel : Purification and properties of rat liver mitochondria glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* , **526**, 65-76 (1978).
  - 25) D. Epp, R. Landenstein, and A. Wendel: The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.2nm resolution. *Eur. J. Biochem.*, **133**, 51-69 (1983).
  - 26) A. L. Tappel : Selenium-glutathione peroxide: properties and synthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.*, **24**, 87-97 (1984).
  - 27) L. Timcenko-Youssef R. K. Yamazaki, and T. Kimura: Subcellular localization of adrenal cortical glutathione peroxidase and protect role of the mitochondrial enzyme against lipid peroxidase damage. *J. Biol. Chem.*, **260**, 13355-13359 (1985).
  - 28) J. Frampton, D. Conkie, I. Chambers, W. McBain, M. Dexter, and P. R. Harrison: Changes in minor transcripts from the  $\alpha 1$  and  $\beta$  major globin and glutathione peroxidase genes during erythropoesis. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3671-3688 (1987).
  - 29) K. R. Maddipati, C. Gasparski, and L. J. Marnett: Characterization of the hdroperoxide-reducing activity of human plasma. *Arch. Biochim. Biophys.*, **254**, 9-17 (1987).
  - 30) K. Takahashi, N. Avissar J. Whitin, and H. Cohen: Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase in selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **256**, 677-686 (1987).
  - 31) F. Ursini, M. Maiorino, M. Valente, L. Ferri, and C. Cregolin: Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and

- exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochem. Biophys. Acta*, 710, 197-211 (1982).
- 32) F. Ursini, M. Maiorino, and C. Cregolin: The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 839, 62-70 (1985).
- 33) J. P. Thomas, M. Maiorino, F. Ursini, and A. W. Girotti: Protect action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-binding lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.*, 265, 454-461 (1990).
- 34) F. F. Chu, J. H. Doroshov, and R. S. Esworthy: Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase. GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.*, 268, 2571-2576 (1993).
- 35) F. F. Chu and R. S. Esworthy: The expression of an intestinal of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch. Biochem. Biophys.*, 323, 288-294 (1995).
- 36) H. Ye-Shih, J. L. Magnenat, R. T. Bronson, J. Cao, M. Gargano, M. Sugawara, and C. D. Funk: Mice deficient I cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.*, 272, 16644-16651 (1997).
- 37) K. Schnurr, J. Belkner, F. Ursini, T. Schewe, and H. Kuhn: The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. *J. Biol. Chem.*, 271, 4653-4658 (1996).
- 38) 小沢高将, 浅井淳平, 内海耕髓: ミトコンドリア, 南江堂, 東京, 1971, pp. 358-360.
- 39) M. Asburner and J. J. Bonner: The reduction of gene activity in droaophilia by heat shock. *Cell*, 17, 241-254 (1979).
- 40) H. Pelham: Activation of heat-shock genes in eukaryotes. *Trends Genet.*, 1, 31-35 (1985).
- 41) S. Lindquist: The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 1151-1191 (1986).
- 42) M. Karin: Metallothioneins: Proteins in search of function. *Cell*, 41, 9-10 (1985).
- 43) J. D. Thomas and N. S. George: Species- and tissue-specific synthesis patterns for heat-shock proteins hsp70 hsp90 in several marine teleost fishes. *Physiol. Zool.*, 66, 863-880 (1993).
- 44) T. Ashida, E. Okimasu, and A. Amemura: Decrease in mortality of yellowtail *Seriola quinqueradiata* due to *Enterococcus seriolicida* infection by feeding saponins, and expression of hsp60 in kidney. *Fisheries Sci.*, 65, 490-491 (1999).
- 45) W. A. Fenton, Y. Kashi, K. Furtak, and A. L. Horwich: Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature*, 371, 614-619 (1994).
- 46) O. Joachim, L. H. Arthur, N. Walter, and H. F-Ulrich: Protein folding in mitochondria residues complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature*, 341, 124-130 (1989).
- 47) Y. C. Minh, H. F-Ulrich, M. Jorg, A. P. Robert, K. Frantisek, N. Walter, M. H. Elizabeth, L. H. Richard, and L. H. Arthur: Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of



- proteins imported into yeast mitochondria. *Nature*, 337, 620-626 (1989).
- 48) T. W. McMullin and R. L. Hallberg: A normal mitochondrial protein is selectively synthesized and accumulated during heat shock in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.*, 7, 4414-4423 (1987).
- 49) S. Jindal, A. K. Dudani, C. B. Harley, and R. S. Gupta: Primary structure on a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol. Cell Biol.*, 9, 2279-2283 (1989).
- 50) L. A. Mizzen, C. Chang, J. I. Garrels, and W. J. Welch: Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp75, a member of the hsp70 family and hsp58, a homolog of the bacterial GroEL protein. *J. Biol. Chem.*, 264, 20664-20675 (1989).
- 51) T. Hiwasa and S. Sakiyama: Increase in the synthesis of a 32,000 Mr protein in BALB/C3T3 cells after treatment with tumor promoters, chemical carcinogens, metal salts and heat shock. *Cancer Res.*, 46, 2474-2481 (1986).
- 52) S. M. Keyse and R. M. Tyrrel: Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 99-103 (1989).
- 53) R. Tenhunen, H. S. Marver, and R. Schmid: The enzyme catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J. Lab. Clin. Med.*, 75, 410-421 (1970).
- 54) M. D. Maines, G. M. Trakshel, and R. K. Kutty: Characterization of two constitutive forms of rat liver mitochondrial heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.*, 261, 411-419 (1986).
- 55) M. D. Maines : Hemeoxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.*, 2, 2557-2568 (1988).
- 56) D. P. Kenneth and S. Tonegawa: Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10925-10930 (1997).
- 57) S. Roland, N. Alexander, and B. A. Glazer: Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5918-5922 (1987).
- 58) R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, and B. N. Ames: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235, 1043-1046 (1987).
- 59) H. Wakabayashi and S. Egusa: *Edwardsiella tarda* (*Paracolobacterium anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 39, 931-936 (1973).
- 60) 楠田理一, 豊嶋利雄, 岩村善利, 佐古浩: 高知県興津湾のボラから分離された *Edwardsiella tarda* について. 日水誌, 42, 271-275 (1976).
- 61) 楠田理一, 伊丹利明, 宗清正広, 中島博司: 養殖チダイから分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について. 日水誌, 43, 129-134 (1977).

- 62) H. Matsuyama, T. Yano, T. Yamakawa, and M. Nakao: Opsonic effect of the third complement (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish Shellfish Immunol.*, 133, 2920-2924 (1984).
- 63) T. Itou, T. Iida, and H. Kawatsu: Kinetics of oxygen metabolism during respiratory burst in Japanese eel neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.*, 20, 323-330 (1996).
- 64) R. C. Sizemore, N. W. Miller, M. A. Cuchens, C. J. Lobb, and L. W. Clem: Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The cellular requirements for *in vitro* mitogenic response of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.*, 133, 2920-2924 (1984).
- 65) L. W. Clem, N. W. Miller, and N. W. Bly: Evolution of lymphocyte populations, their interactions, and temperature sensitivities, in "Phylogenesis of the Immune System" (ed. by G. W. Warr and N. Cohen), CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, pp. 191-213.
- 66) N. W. R. C. Miller, R. C. Sizemore, and L. W. Clem: Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The cellular requirements *in vitro* antibody response of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.*, 20, 323-330 (1996).
- 67) 馬久地隆幸, 清川智之, 本多数充, 中井敏博, 室賀清邦: ヒラメのエドワジエラ症に対するワクチンの試み. 魚病研究, 30, 251-256 (1995).
- 68) K. Kawai, R. Kusuda, and T. Itami: Mechanism of protection in ayu orally vaccinated for vibriosis. *Fish Pathol.*, 15, 257-262 (1981).
- 69) R. Kusuda, K. Kawai, and T. Itami: Efficacy of bath-immunization against vibriosis in cultured ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 46, 1053 (1980).
- 70) T. Itami and R. Kusuda: Efficacy of a vaccination by spray administration against vibriosis in cultured ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44, 1413 (1978).
- 71) N. R. DiLuzio: Update on the immunomodulating activities of glucan. *Springer Sem. Immunopath.*, 8, 387-400 (1985).
- 72) R. Seljelid, L. T. Rasmussen, O. Larm, and J. Hoffman: The protective effect of  $\beta$ -1,3-D-glucan derivatized plastic beads against *Escherichia coli* infection in mouse. *Springer Sem. Immunopath.*, 25, 55-60 (1985).
- 73) T. Yano, R. E. P. Mangindaam, and H. Matsuyama: Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some  $\beta$ -1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1815-1819 (1989).
- 74) H. Matsuyama, R. E. P. Mangindaam, and T. Yano: Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101, 197-203 (1992).
- 75) 松尾健, 宮園勲: ペプチドグリカンの長期投与がニジマス稚魚の抗病性と成長に及ぼす影響. 日水誌, 59, 1377-1379 (1993).
- 76) T. Yoshida, R. Kruger, and V. Inglis: Augmentation of non-specific protection in African catfish,

ブリの腸球菌症とヒラメのエドワジエラ症の防御に関する研究

- Clarias gariepinus* (Berchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *J. Fish Dis.*, **18**, 195-198 (1995).
- 77) T. Harada: The story of research into curdland and bacteria producing it. *Trends Glycosci. Glycotech.*, **4**, 309-317 (1992).
- 78) G. Jeney and D. P. Anderson: Glucan injection or bath expose given alone or in combination with a bacteria enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **166**, 315-329 (1993).
- 79) C. Dexiang and J. A. Ainsworth: Assesment of metabolic activation of cannel catfish peritoneal blood neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.*, **15**, 201-208 (1991).
- 80) 武田州弘, 芦田貴行, 永良育久, 沖増英治, 雨村明倫, 松本正樹: 魚類白血球のスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 産生能の特徴とキラヤサポニンの産生能への影響. 福山大内海研報, **5**, 17-25 (1994).
- 81) L. Fialkow and G. P. Downey: Reactive oxygen intermediates as signaling molecules regulating leukocyte activation, in "Oxidative Stress and Signal Transduction" (ed. by H. J. Forman and E. Cadenas), Chapman and Hall, Univ. South. Calf., New York, 1997, pp.200-235.
- 82) A. S. Kraft and R. K. Berkow: Tyrosine kinase and phosphotyrosine phosphatase activity in human promyelocytic leukemia cells and human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, **70**, 356-362 (1987).
- 83) M. Kansha, K. Takeshige, and S. Minakami: Decrease in the phosphotyrosine phosphate activity in the plasma membrane of human neutrophils on stimulation by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1179**, 189-196 (1993).
- 84) C. K. Huang, G. R. Laramee, and J. E. Casnellie: Chemotactic factor induced tyrosine phosphorylation of membrane associated proteins in rabbit peritoneal neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 794-801 (1988).
- 85) R. L. Berkow and R. W. Dodson: Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. *Blood*, **75**, 2445-2452 (1990).
- 86) A. N. Shakhov, M. A. Collart, P. Vassalli, and A. S. Nedospasov, and C.V. Jongrneei:  $\kappa$ B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumore factor  $\alpha$  gene in macrophages. *J. Exp. Med.*, **171**, 35-47 (1990).
- 87) J. M. Muller, H. W. L. Ziegler-Heitbrock, and P. A. Baeuerle: Nucrear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunol.*, **187**, 233-256 (1993).
- 88) Q. W. Xie, Y. Kashiwabara, and C. Nathan: Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 4705-4708 (1994).
- 89) A. Ding, S. Hwang, H. M. Lander, and Q. W. Xie: Macrophages derived from C3H/HeJ (Lpsd) mice respond to bacterial lipopolysaccharide by activating NF-kappa B. *J. Leco. Biol.*, **57**, 174-179 (1995).
- 90) J. K. Czop, D. T. Fearon, and K. F. Austen: Opsonin-independent phagocytosis of activators of

- the alternative complement pathway by human monocytes. *J. Immunol.*, 120, 1132-1138 (1978).
- 91) B. Sveinbjornsson, B. Smedsrod, T. Berg, and R. Seljelid: Intestinal uptake and organ distribution of immunomodulatory aminated  $\beta$ -1,3-D-polyglucose in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 5, 39-50 (1995).
- 92) J. K. Czop and K. F. Austen: Functional distribution by human monocytes between their C2b receptors and their recognition units for particulate activators of the alternative complement pathway. *J. Immunol.*, 125, 124-128 (1980).
- 93) J. D. Williams, J. K. Czop, and K. F. Austen: Release of leukocytes by human monocytes on stimulation of their phagocytic receptor for particulate activators. *J. Immunol.*, 132, 3034-3040 (1984).
- 94) J. D. Williams, T. H. Lee, R. A. Lewis, and K. F. Austen: Intracellular reaction of the 5-lipoxygenase pathway product, leukotriene B<sub>4</sub>, by human neutrophils activated with unopsonized zymosan. *J. Immunol.*, 134, 2624-2630 (1985).
- 95) T. Ashida, E. Okimasu, T. Nishihara, T. Kitanaka, K. Nomura, and A. Amemura: Oral administration of curdlan ( $\beta$ -1,3-glucan) potentiates the non-specific immune system of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and its effect is influenced by the feeding period. *Suisanzosyoku*, 47, 439-444 (1999).
- 96) F. Salati, K. Ono, and R. Kusuda: Oral vaccination of glass eel *Anguilla japonica* against *Edwardsiella tarda* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 4, 309-310 (1991).
- 97) Y. L. Song and G. H. Kou: The immunoresponse of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studied by the immersion method. *Fish Pathol.*, 15, 249-255 (1981).
- 98) F. Salati, Y. Ikeda, and R. Kusuda: Effect of *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide immunization on phagocytosis in the eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 201-204 (1987).
- 99) 佐古浩: ブリの $\beta$ 溶血性連鎖球菌症予防ワクチンの有効性. 水産増殖, 40, 393-397 (1992).
- 100) T. Ashida, E. Okimasu, M. Ui, M. Heguri, Y. Oyama, and A. Amemura: Protection of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against edwardsiellosis by oral administration of immunostimulants in combination with formalin-killed *Edwardsiella tarda*. *Fisheries Sci.* 65, 527-530 (1999).
- 101) J. B. Campbell, I. Maharaj, and J. Roith: Vaccine formulations for oral immunization of laboratory animals and wildlife against rabies, in "Rabies in the Tropics" (ed. by E. Kuwert, C. Merieux, H. Koprowski, and K. Bogel), Springer-Verlag, Heidelberg, 1985, pp. 285-283.
- 102) J. Crick, F. Brown, A. A. King, E. W. Williams, G. Tompson, and J. Fearne: Control of wildlife rabies, in "Rabies in the Tropics" (ed. by E. Kuwert, C. Merieux, H. Koprowski, and K. Bogel), Springer-Verlag, Heidelberg, 1985, pp. 294-301.
- 103) D. Chen and A. J. Ainsworth: Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.*, 15, 295-304

(1992).

- 104) R. Aakre, H. I. Wergeland, P. M. Asjord, and C. Andresen : Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using bacteria containing beta-1,3-D-glucan as adjuvant. *Fish Shellfish Immunol.*, 4, 47-61 (1994).
- 105) G. Rorstad, P. M. Asojord, and B. Robertsen : Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 3, 179-190 (1993).
- 106) F. Salati, K. Kawai, and R. Kusuda: Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol.*, 18, 135-141 (1983).
- 107) T. Aoki, T. Kitao, M. Fukudome, S. Takahashi, and S. Egusa: Modification of the hyperosmotic infiltration method of vaccination against vibriosis in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*, Termminck and Schlegel. *J. Fish Dis.*, 7, 149-156 (1984).
- 108) T. Aoki, M. Sakai, and S. Takahashi: Protective immunity in ayu, *Plecoglossus altivelis*, vaccinated by immersion with *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathol.*, 19, 29-39 (1984).
- 109) J. B. Jorgensen, G. J. E. Sharp, C. J. Secombes, and B. Robertsen : Effect of yeast cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 3, 267-277 (1993).
- 110) G. Jeney and D. P. Anderson : Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhances the nonspecific defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116 , 315-329 (1993).
- 111) M. J. Newman, J. Y. Wu, B. H. Gardner, K. J. Munroe, D. Leombruno, J. Recchia, C. R. Kensil, and R. T. Coughlin: Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J. Immunol.*, 148, 2357-2362 (1992).
- 112) I. N. Farstad, T. S. Halstensen, O. Fausa, and P Brandtzaeg : Heterogeneity of M-cell associated B and T cells in human peyer's patches. *Immunol.*, 83, 453-464 (1994).
- 113) S. Ohga, Y. Yoshikai, Y. Takeda, H. Hiromatsu, and K. Nomoto: Sequential appearance of gamma/delta- and alpha/beta- bearing T cell in the peritoneal cavity during an i.p. infection with *Listeria monocytogen*. *Eur. J. Immunol.*, 20, 553-558 (1990).
- 114) K. Hiromatsu, Y. Yoshikai, G. Matsuzaki, S. Ohga, and K. Nomoto: A protective role of gamma/delta T cell in primary infection with *Listeria monocytogen* in mice. *J. Exp. Med.*, 175, 45-46 (1992).
- 115) W. R. Schwan and W. Goebel: Host cell response to *Listeria monocytogenes* infected include differential transcription of host stress response genes involved in signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 91, 6428-6432 (1994).