

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

細胞傷害能を有するコイ好中球の特性に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 倉田, 修 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/745">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/745</a>

細胞傷害能を有するコイ好中球の  
特性に関する研究

平成7年度  
(1995)



東京水産大学大学院  
水産学研究科  
資源育成学専攻  
倉田 修

表題 「細胞傷害能を有するコイ好中球の特性に関する研究」

目次	1
要旨	2
緒論	5
第1章 好中球の細胞傷害能	20
第1節 コイ好中球の細胞傷害能	21
第2節 ギンブナおよびアメリカナマズ好中球の細胞傷害能	33
第2章 コイ好中球の環境温度への順応性	38
第1節 コイナチュラルキラー様細胞の環境温度への順応性	39
第2節 細胞傷害能を有するコイ好中球の環境温度への順応性	44
第3章 モノクローナル抗体を用いたコイ好中球の解析	61
第1節 コイの腹腔内浸潤好中球に特異的に発現する 抗原を認識するモノクローナル抗体	62
第2節 モノクローナル抗体によって誘導される コイ好中球の細胞傷害能の活性化	79
結辞	95
謝辞	96

## 要旨

### 「細胞傷害能を有するコイ好中球の特性に関する研究」

魚類免疫系の基本的な骨格は、哺乳類のものとはほぼ同様であると考えられているが、魚類が変温動物であるために、変化する環境温度の中でも免疫系を作動し続けるという、哺乳類にはない魚類特有の機構もまた存在すると考えられる。抗体や免疫記憶に代表される特異免疫系は魚類にも存在するが、これらの機能は低環境温度下では十分に働かないことが知られている。このような背景から、変温動物である魚類の生体防御では、非特異免疫機構の役割が重要と考えられる。本研究は、非特異免疫機構の一端を担う好中球の新たな機能を主にコイで明らかにし、その特性を論じた。学位論文は、1)好中球の細胞傷害能、2)好中球の環境温度への順応性、3)モノクローナル抗体を用いた好中球の解析、の3つの内容から構成されている。

コイ頭腎から比重遠心分離により得られた細胞(比重1.08-1.09分画)に強い細胞傷害活性を認めた。この細胞分画には好中球が90%以上の割合で存在した。また、好中球の標的細胞への結合も観察されたことから、細胞傷害活性をもたらす細胞が好中球であることが明らかになった。コイ好中球は、標的細胞を速やかに傷害し、マウス由来細胞株よりもヒト由来細胞株を好んで傷害するという選択性も示した。また、カタラーゼによって好中球の傷害活性が阻害されることから、この作用における傷害因子として好中球によって産生される過酸化水素( $H_2O_2$ )が挙げられた。コイ以外の魚種における好中球の細胞傷害能はギンブナにおいて観察されたが、アメリカナマズではその活性は認められなかった。従って、好中球の細胞傷害能は魚種間で異なることが示唆された。

コイ頭腎白血球(比重1.077分画細胞)の細胞傷害活性は低温( $10^{\circ}C$ )に順応した。この傷害能の低温への順応に連動して、比重1.077分画の頭腎白血球における好中球の占有比率の上昇が観察された。このことから、細胞傷害能の低温への順応には、占有

比率が上昇した好中球の関与が示唆された。そこで、好中球による細胞傷害能の環境温度への順応性について調べたところ、25°Cで飼育されたコイの好中球の細胞傷害能は、10°C下よりも飼育温度である25°C下でより機能した。25°Cで飼育されたコイを10°Cに一定期間馴致することで、好中球の傷害能は、飼育温度である10°C下でより機能するようになり、温度変化に対して順応性を示した。10°Cに順応したコイを再び25°Cに馴致することで、好中球の傷害能は飼育温度である25°C下でより機能するようになり、この順応性が可逆的であることが示された。細胞傷害能と同様に標的細胞への結合能もまた温度に順応することが確認された。飼育温度の変化に伴い、頭腎に存在する好中球の割合は変動した。10°Cへの馴致期間が長くなるに従い、頭腎における好中球の割合は上昇し、再び25°Cで馴致することでその割合は低下した。このように、低温下の魚で低温に順応性を有する好中球の割合が上昇したという事実は、魚類の生体防御機構における低温適応戦略の一つであると思われた。

コイ好中球の機能をより深く理解するために、好中球に対するモノクローナル抗体(mAb)を作製した。作製されたmAbの中で、mAb 61C5および57F5はそれぞれ好中球の細胞表面抗原を認識し、フローサイトメーターによる分析から、各mAbが認識する抗原は頭腎および末梢血の好中球よりも腹腔内浸潤好中球においてその発現レベルが増すことを確認した。また、mAb 81F11は腹腔内浸潤好中球にのみ、その細胞内抗原を特異的に認識することが示された。浸潤好中球において発現レベルの増す細胞表面上の抗原や新たに発現してくる抗原は、好中球の機能発現に関与する物質であることを示唆している。好中球の細胞表面抗原を認識するmAb 61C5および57F5が、好中球の細胞傷害能に与える影響について検討したところ、両mAbは好中球の細胞傷害能を活性化した。すなわち、mAb 61C5および57F5が認識する各表面抗原は好中球の傷害能の発動に関連した物質であることが示された。この傷害能の活性化は、標的細胞の認識または傷害因子産生等の反応が鋭敏になることにより起こるものと考えられた。さらにカタラーゼを用いた試験により、mAb 61C5によって誘導される傷害活性の上昇は、 $H_2O_2$ の産生増大または新たに活性化された $H_2O_2$ 以外の

傷害因子によるものと思われ、一方、mAb 57F5によって誘導される傷害活性の上昇は、 $H_2O_2$ 等の傷害因子に関与するものではなく、その他の、例えば接着因子などの、機能の活性化によるものと推察された。すなわち、mAb 61C5と57F5は好中球の異なる傷害機構・過程を活性化していると考えられた。

## 緒論

生体は、細菌、真菌、寄生虫、ウイルスなどの感染性の生物から身を守るために防御能を備えている。この能力は多種類の細胞や可溶性因子により担われ、このシステムを免疫系と呼ぶ。魚類においても免疫系は存在し、その基本構成は哺乳類のものとはほぼ同様である。免疫系は大きく分けて、特異免疫機構と非特異免疫機構から成る。変温動物である魚類の免疫系は、様々な侵入異物に対応するだけでなく、変化する環境温度下においても正常に機能できるように対応し、侵入異物の排除を行う必要がある。魚類の免疫系は哺乳類と同様な基本構成は有しているものの、低温下では防御能の一端を担う特異免疫系が働かないことが明らかにされており、温度変化に対応できる魚類特有の防御機構の存在が考えられる。このような背景から、著者は非特異免疫機構に注目した。さらに、この機構を担う細胞が、哺乳類のように機能的に細分化されたものでなく、複数の機能を有するといった多様性を持つことで、変化する環境温度下においても有効に働くことができるのではないかと考えた。本研究は、コイにおいて非特異免疫機構の一端を担う好中球の新たな側面（細胞傷害能および環境温度に対する順応性）を明らかにした。本研究で明らかにしたコイ好中球の機能は、魚類の非特異免疫細胞に機能的多様性があることを示唆している。これは、魚類が変温動物であるがゆえに備えている魚類特有の防御能であると思われ、コイ好中球機能の新知見は従来の魚類生体防御の概念に新しい一面を付与するものである。

以下に本論文に関する基本的な事項について概説する。

### 魚類免疫機構(図1)

特異免疫機構は、侵入異物に対して特異的に反応し、また異物を記憶することで異物の再侵入を阻止する特徴を持つ。この機構はリンパ球により担われている。リ

ンパ球は機能の異なる2つの群(Bリンパ球、Tリンパ球)に大きく分けられる。Bリンパ球は抗体の産生を行う(Kattari, 1992)。硬骨魚類の抗体は、4量体構造を取り、分子量は約70万である(Wilson & Warr, 1992)。Bリンパ球の細胞表面上には膜型免疫グロブリンの発現が見られる(Dippen *et al.*, 1994)。免疫グロブリン遺伝子の研究は、魚類においても抗体に多様性があることを示唆している(Warr, 1995)。抗体産生における免疫学的記憶は、免疫魚に強い二次応答が見られることから明らかにされている(Lamers *et al.*, 1985)。魚類Tリンパ球の分類に定説はないが、膜型免疫グロブリン陰性や胸腺細胞抗原陽性のリンパ球またはある種のモノクローナル抗体が反応するリンパ球をTリンパ球として区分している(Secombes *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 1987)。魚類Tリンパ球の機能としては、抗体産生の補助機能(Miller *et al.*, 1985)、特異的細胞傷害能(Verlhac *et al.*, 1990)およびリンフォカイン産生能(Graham & Secombes, 1990)が確認されている。鱗片の拒絶試験結果は、細胞傷害性Tリンパ球にもまた免疫学的記憶の存在を示唆している(Hildemann, 1957)。

非特異免疫機構は、侵入異物に対する特異性はなく、また免疫学的記憶も有さない代わりに、異物侵入の際、早急にその排除に当たることができる特徴をもつ。この機構は、顆粒球、マクロファージおよびナチュラルキラー様細胞などによる細胞性防御機構、また補体やリゾチームなどの殺菌性タンパク質による液性防御機構によって担われている。顆粒球は細胞質内に存在する顆粒形態によって、通常、好中球、好塩基球および好酸球に分類される(Ainsworth, 1992)。しかしながら、顆粒形態は魚種によって様々であり、このように3種類に分類されないものもある(Ainsworth, 1992)。アメリカナマズの顆粒球には好中球のみが存在する(Ellsaesser *et al.*, 1985)。好中球は、炎症局所に最も早く浸潤する白血球として位置付けられている(Suzuki & Iida, 1992)。好中球は貪食能を有し(Secombes & Fletcher, 1992)、補食した異物を活性酸素の産生によって殺菌する(Secombes & Fletcher, 1992)。これらの能力は、補体のオプソニン化によって増強されることが認められている(Matsuyama *et al.*, 1992)。最



近の研究は、好中球がインターロイキン-1様の因子を産生し、免疫系の調節に関与していることを示唆している(Verburg-van Kemenade *et al.*, 1995)。好塩基球および好酸球の機能は現在のところよく知られておらず(Hine, 1992)、貪食能の有無についても議論が別れている(Steinhagen & Jendrysek, 1994; Temmink & Bayen, 1987)。これらの細胞は血液中よりもむしろ腸管上皮等の組織内に多数認められている(Rombout *et al.*, 1989)。マクロファージは多くの機能を備えた細胞である。マクロファージも貪食能を備え(Secombes & Fletcher, 1992)、その能力は補体や抗体のオプソニン化で増強することが知られている(Secombes & Fletcher, 1992)。炎症の際、好中球に続いて炎症局所に浸潤し(Suzuki & Iida, 1992)、浸潤したマクロファージは長期間そこに観察される(Iger & Abraham, 1990)。侵入異物に対して、マクロファージは集合化および包囲化などによってある種の肉芽腫を形成することが知られている(Wolke, 1992)。インターロイキン-1様の因子の産生も観察されており、免疫系の調節に関与していることが示唆されている(Verburg-van Kemenade *et al.*, 1995)。また、特異免疫系の誘導に関与する抗原提示能も備えている(Vellejo *et al.*, 1992)。ナチュラルキラー(NK)様細胞は、寄生虫感染およびウイルス感染防御を担っているものと考えられている(Moody *et al.*, 1985; Graves *et al.*, 1985a; Graves *et al.*, 1985b)。魚類のNK様細胞は、一般的にnonspecific cytotoxic cells(NCC)と呼ばれ、形態学的に小型無顆粒リンパ球に属する(Evans & Jaso-Friedmann, 1992)。抗体を介在させる傷害機構(ADCC)は存在しないものと考えられている(Graves *et al.*, 1985b)。NCC細胞表面上の抗原レセプターは、分子量4.0-4.2万のVimentin様タンパク質からなるシグナル伝達分子であるものと考えられている(Evans *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1992)。補体、C反応性タンパク質およびリゾチームなどの殺菌性タンパク質は、血中および体表粘液中に見いだされている(Alexander & Ingram, 1992)。これらの液性防御因子は、侵入異物に対して直接的効果と共にオプソニン効果を示す(Alexander & Ingram, 1992)。

## 低温による魚類特異免疫能の抑制

生息温度内の低環境温度域では、魚類の特異免疫能は抑制されることが知られている(Bly & Clem, 1992)。これは、特異免疫系の中心的役割をしているTリンパ球が温度に感受性を有するためである。通常、魚類防御能は侵入異物に対して抗体を産生する(Kaattari, 1992)。生息温度内の高水温域では、抗体の産生は速やかに行われるが、低水温域では、抗体産生の抑制または遅延が起こる(Avtalion, 1981)。低温による抗体産生の抑制は、Bリンパ球による抗体の産生やマクロファージによる抗原提示能の機能的低下ではなく、Tリンパ球の補助機能の低下によるものと考えられている(Bly & Clem, 1992)。また、移植鱗片の拒絶反応も低温下では著しい遅延が起こる(Hildemann, 1957)。この拒絶反応は細胞傷害性Tリンパ球によるものと考えられており(Hildemann, 1957)、低温によるTリンパ球の細胞傷害能の抑制は、*in vitro*でも確認されている(Verlhac, 1990)。Tリンパ球の機能指標となるCon Aを用いたマイトジェン反応(Clem *et al.*, 1984)や、リンパ球混合反応(Miller *et al.*, 1986)も、低温により抑制される。Tリンパ球はマクロファージ活性化因子を産生することが知られているが(Graham & Secombes, 1990)、このようなリンフォカイン産生能も低温下では抑制される(Hardie *et al.*, 1994)。図1に示したように、免疫系は複数の細胞間の相互作用により成立している。従って、Tリンパ球の機能低下はTリンパ球自身の役割だけでなく、それに関わる多くの防御能(抗体産生、マクロファージの殺菌能の活性化等)に影響を及ぼすことになる。

## コイ好中球の形態学的特徴

コイ顆粒球の分類は研究者によって見解が異なるが、好中球についてはいずれも同一の形態学的特徴が示されている(Temmink & Bayen, 1987; Bielek, 1981; Cenini, 1994)。好中球を分類する上で重要な形態学的特徴は、細胞質内の顆粒形態にある(Temmink & Bayen, 1987)。コイ好中球は細胞質内に膜で囲まれた卵形の顆粒を多数

有する。その顆粒には電子密度の高い棒状の芯が1-2存在する。細胞核は腎形または分葉形を示す。コイ頭腎に存在する顆粒球は好中球を含め4種類存在することが知られている(Temmink & Bayen, 1987)。好中球を除く3種類の顆粒球は、好中球に特徴的な顆粒形態とは明らかに異なる顆粒を有する。3種類の顆粒球は、好塩基球、好酸球およびこれらの顆粒球の顆粒を合わせもつ細胞に分けられる。好塩基球および好酸球の顆粒を合わせもつ細胞の存在から、好塩基球および好酸球が同一系列の細胞であるという仮説が提唱されている(Temmink & Bayen, 1987; Rombout *et al.*, 1989)。最近、これらの顆粒球とは異なる顆粒形態を持つ細胞が皮膚において観察された(Cross & Matthews)。この顆粒球は、ニジマスで観察されているEGC(eosinophil granule cell)(Vallejo & Ellis, 1989)と形態的および細胞の組織分布の点で類似している。細胞化学染色も種々顆粒球の特徴を表す。コイ好中球は細胞内酵素であるペルオキシダーゼおよび酸フォスファターゼ陽性を示す(Bayen, 1986; Suzuki, 1986)。しかし、これらの酵素は好中球に特異的なものではなく、他の顆粒球にも存在する(Bayen, 1986; Suzuki, 1986)。脂肪染色に使用されるズダンブラックBは好中球を特異的に染色する(図2)。Periodic acid-Schiff (PAS)染色は、好中球と他の顆粒球を区別する(Bayen, 1986; Barber & Westermann, 1978)。好中球はPAS陰性である。PAS陽性顆粒球(PAS-GL)は好塩基球と考えられている(Suzuki, 1986; Barber & Westermann, 1978)。ギムザ染色標本では、細胞質および核の形態を分類の基準として好中球を識別する(図3)。即ち、好中球の細胞質は弱好酸性に染まるかまたは無色であり、顆粒は通常認められず、核の形態は腎形または分葉形を示す。好塩基球の細胞質は脱顆粒したかのような無色の顆粒状のものが見られ、核は偏在して存在する(Suzuki, 1986)。好酸球は細胞質顆粒が好酸性に染色される(ただし、本研究では観察されなかった)。細胞の比重は各顆粒球で異なる。好中球の比重は1.08-1.09 g/mlであり、他の顆粒球はそれより重い比重を持つ(Temmink & Bayen, 1987)。

## 細胞傷害能

細胞傷害能は、ナチュラルキラー(NK)活性を意味している。現在、医学の分野では、“NK活性は大型顆粒リンパ球の形態を有するNK細胞が持つ能力”という限定された条件で用いられている(Saksela *et al.*, 1979)。従って、本論文ではこの意味と混同しないようにNK活性という表現を用いなかった。細胞傷害能は、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞などの異常細胞やある種の寄生虫に有効な防御能として位置づけられている(Herberman & Ortaldo, 1981; Hatcher and Kuhn, 1982)。細胞傷害能は、抗原刺激や抗体の関与を必要とせずに機能することができる(Moretta *et al.*, 1994)。従って、細胞傷害能を有する細胞は貪食細胞同様に感染の初期に速やかに反応することができる。細胞傷害能を有する細胞は、まず標的細胞に結合(接着)し細胞破壊の段階に入る(Henkart, 1985)。この結合の段階で破壊する対象を認識すると同時に傷害機構のスイッチが入るものと考えられている(Herberman *et al.*, 1986)。細胞傷害は様々な機構(顆粒内酵素等の脱顆粒による放出、活性酸素発生)により結合した標的細胞に対して作用することが知られている(Kessel and Verhoef, 1990)。細胞傷害能は多くの生物種で認められている(Boiledieu & Valembois, 1977; Parrinello *et al.*, 1993; Yoshino & Tuan, 1985; Soderhall *et al.*, 1985; Ghoneum and Cooper, 1987; Sieminski-Brodzina and Mashaly, 1991; Mandi *et al.*, 1985; Hinuma *et al.*, 1980)。しかしながら、認識に関与するレセプターや傷害の作用機序など、詳細な細胞傷害機構については現在まで不明な点が多い。

## 引用文献

- Ainsworth, A. J. Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 123-148, 1992.

- Alexander, J. B. and Ingram, G. A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 249-279, 1992.
- Avtalion, R. R. Environmental control of the immune response in fish. *CRC. Crit. Rev. Environ. Control* **11**, 163-188, 1981.
- Barber, D. L. and Westermann, J. E. M. Occurrence of the periodic acid-Schiff positive granular leucocyte (PAS-GL) in some fishes and significance. *J. Fish Biol.* **12**, 35-43, 1978.
- Bayen, C. J. Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: Isolation, separation and characterization. *Vet. Immunol. Immunopath.* **12**, 141-151, 1986.
- Bielek, E. Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell Tissue Res.* **220**, 163-180, 1981.
- Bly, J. E. and Clem, L. W. Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* **2**, 159-171, 1992.
- Boiledieu, D. and Valembois, P. Natural cytotoxic activity of sipunculid leukocytes on allogenic and xenogeneic erythrocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **1**, 207-216, 1977.
- Cenini, P. The ultrastructure of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Zool. Lond.* **204**, 509-520, 1984.
- Clem, L. W., Faulmann, E., Miller, N. W., Ellsaesser, C., Lobb, C. J. and Cuchens, M. A. Temperature-mediated processes in teleost immunity: Differential effects of *in vitro* and *in vivo* temperatures on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **8**, 313-322, 1984.
- Cross, M. L. and Matthews, R. A. Identification of a new granulocyte type in the skin of carp *Cyprinus carpio* (L.). *J. Fish Biol.* **39**, 279-283, 1991.

- Ellsaesser, C. F., Miller, N. W., Cuchens, M. A., Lobb, C. J. and Clem, L. W. Analysis of channel catfish peripheral blood leucocytes by bright-field microscopy and flow cytometry. *Trans. Am. Fish. Soc.* **114**, 279-285, 1985.
- Evans, D. L., Jaso-Friedmann, L., Smith, E. E., John, A. S., Koren, H. S. and Harris, D. T. Identification of a putative antigen receptor on fish nonspecific cytotoxic cells with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **141**, 324-332, 1988.
- Evans, D. L., Harris, D. T., Staton, D. L. and Jaso-Friedmann, L. Pathways of signal transduction in teleost nonspecific cytotoxic cells. *Dev. Comp. Immunol.* **14**, 295-304, 1990.
- Evans, D. L. and Jaso-Friedmann, L. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 109-121, 1992.
- Evans, D. L., Harris, D. T. and Jaso-Friedmann L. Function associated molecules on nonspecific cytotoxic cells: Role in calcium signaling, redirected lysis, and modulation of cytotoxicity. *Dev. Comp. Immunol.* **16**, 383-394, 1992.
- Ghoneum, M. H. and Cooper, E. L. Inhibition of frog SK effector-target cell binding. *Dev. Comp. Immunol.* **11**, 167-178, 1987.
- Graham, S. and Secombes, C. J. Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **14**, 59-68, 1990.
- Graves, S. S., Evans, D. L. and Dawe, D. D. Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* **8**, 43-51, 1985a.
- Graves, S. S., Evans, D. L. and Dawe, D. L. Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Immunol.* **134**, 78-85, 1985b.

- Hardie, L. J., Fletcher, T. C. and Secombes, C. J. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **18**, 57-66, 1994.
- Harris, D. T., Kapur, R., Frye, C., Acevedo, A., Camenisch, T., Jaso-Friedmann, L. and Evans, D. L. A species-conserved NK cell antigen receptor is a novel vimentin-like molecule. *Dev. Comp. Immunol.* **16**, 395-403, 1992.
- Hatcher, F. M. and Kuhn, R. E. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science* **218**, 295-296, 1982.
- Henkart, P. A. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Ann. Rev. Immunol.* **3**, 31-58, 1985.
- Herberman, R. B. and Ortaldo, J. R. Natural killer cells: Their role in defenses against disease. *Science* **214**, 24-30, 1981.
- Herberman, R. B., Reynolds, C. W. and Ortaldo, J. R. Mechanism of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Ann. Rev. Immunol.* **4**, 651-680, 1986.
- Hildemann, W. H. Scale homotransplantation in goldfish (*Carassius auratus*). *Ann. New York Acad. Sci.* **64**, 775-791, 1957.
- Hine, P. M. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* **2**, 79-98, 1992.
- Hinuma, S., Abo, T., Kumagai, K. and Hata, M. The potent activity of fresh water fish kidney cells in cell-killing I. Characterization and species-distribution of cytotoxicity. *Dev. Comp. Immunol.* **4**, 653-666, 1980.
- Iger, Y. and Abraham, M. The process of skin healing in experimentally wounded carp. *J. Fish Biol.* **36**, 421-437, 1990.
- Kaattari, S. L. Fish B lymphocytes: Defining their form and function. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 161-180, 1992.

- Kessel, K. P. M. van and Verhoef, J. A view to a kill: Cytotoxic mechanisms of of human polymorphonuclear leukocytes compared with monocytes and natural killer cells. *Pathobiology* **58**, 249-264, 1990.
- Koumans-van Diepen, J. C. E., Taverne-Thiele, J. J., Van Rens, B. T. T. M. and Rombout, J. H. W. M. Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cles in carp (*Cyprinus carpio* L.); an ontogenic study. *Fish Shellfish Immunol.* **4**, 19-28, 1994.
- Lamers, C. H. J., De Haas, M. J. H. and Van Muiswinkel, W. B. Humoral response and memory formation in carp after injection of *Aeromonas hydrophila* bacterin. *Dev. Comp. Immunol.* **9**, 65-75, 1985.
- Mandi, Y., Seprenyi, G., Pusztai, R. and Beladi, I. Are granulocytes the main effector cells of natural cytotoxicity in chickens ? *Immunobiol.* **170**, 284-292, 1985.
- Matsuyama, H., Yano, T., Yamakawa, T. and Nakao, M. Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish Shellfish Immunol.* **2**, 69-78, 1992.
- Miller, N. W., Sizemore, R. C. and Clem, L. W. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The cellular requirements for *in vitro* antibody responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.* **134**, 2884-2888, 1985.
- Miller, N. W., Deuter, A. and Clem, L. W. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for the mixed leucocyte reaction with channel catfish. *Immunology* **59**, 123-128, 1986.
- Miller, N. W., Bly, J. E., Van Ginkel, F., Ellsaesser, C. F. and Clem, L. W. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: Identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* **11**, 739-747, 1987.



- Moody, C. E., Serreze, D. V. and Reno, P. W. Non-specific cytotoxic activity of teleost leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **9**, 51-64, 1985.
- Moretta, L., Ciccone, E., Mingari, M. C., Biassoni, R. and Moretta, A. Human natural killer cells: Origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv. Immunol.* **55**, 341-380, 1994.
- Parrinello, N., Arizza, V., Cammarata, M. and Parrinello, D. M. Cytotoxic activity of *Ciona intestinalis* (Tunicata) hemocytes: properties of the in vitro reaction against erythrocyte targets. *Dev. Comp. Immunol.* **17**, 19-27, 1993.
- Rombout, J. H. W. M., Bot, H. E. and Taverne-Thiele, J. J. Immunological importance of the second gut segment of carp. II. Characterization of mucosal leucocytes. *J. Fish Biol.* **35**, 167-178, 1989.
- Saksela, E., Timonen, T., Ranki, A. and Hayry, P. Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. *Immunological Rev.* **44**, 71-123, 1979.
- Secombes, C. J., Van Groningen, J. J. M. and Egberts, E. Separation of lymphocyte subpopulations in carp *Cyprinus carpio* L. by monoclonal antibodies: immunohistochemical studies. *Immunology* **48**, 165-175, 1983.
- Secombes, C. J. and Fletcher, T. C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 53-71, 1992.
- Sieminski-Brodzina, L. M. and Mashaly, M. M. Characterization by scanning and transmission electron microscopy of avian peripheral blood mononuclear cells exhibiting natural killer-like (NK) activity. *Dev. Comp. Immunol.* **15**, 181-188, 1991.

- Soderhall, K., Wingren, A., Johansson, M. W. and Bertheussen, K. The cytotoxic reaction of hemocytes from the freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *Cell. Immunol.* **94**, 326-332, 1985.
- Steinhagen, D. and Jendrysek, S. Phagocytosis by carp granulocytes; *in vivo* and *in vitro* observations. *Fish Shellfish Immunol.* **4**, 521-525, 1994.
- Suzuki, Y. Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **52**, 1895-1899, 1986.
- Suzuki, Y. and Iida, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 149-160, 1992.
- Temmink, J. H. M. and Bayne, C. J. Ultrastructural characterization of leucocytes in the pronephros of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* **11**, 125-137, 1987.
- Vallejo, A. N. and Ellis, A. E. Ultrastructural study of the response of eosinophil granule cells to *Aeromonas salmonicida* extracellular products and histamine liberators in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Dev. Comp. Immunol.* **13**, 133-148, 1989.
- Vallejo, A. N., Miller, N. W. and Clem, L. W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 73-89, 1992.
- Verburg-van Kemenade, B. M. L., Weyts, F. A. A., Debets, R. and Flik, G. Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev. Comp. Immunol.* **19**, 59-70, 1995.
- Verlhac, V., Sage, M. and Deschaux, P. Cytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*) leucocytes induced against TNP-modified autologous spleen cells and influence of acclimatization temperatures. *Dev. Comp. Immunol.* **14**, 475-480, 1990.
- Warr, G. W. The immunoglobulin genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.* **19**, 1-12, 1995.
- Wilson, M. R. and Warr, G. W. Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 201-221, 1992.

Wolke, R. E. Piscine macrophage aggregates: A review. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 91-108, 1992.

Yoshino, T. P. and Tuan, T. L. Soluble mediators of cytolytic activity in hemocytes of the asian clam, *Corbicula fluminea*. *Dev. Comp. Immunol.* **9**, 515-522, 1985.

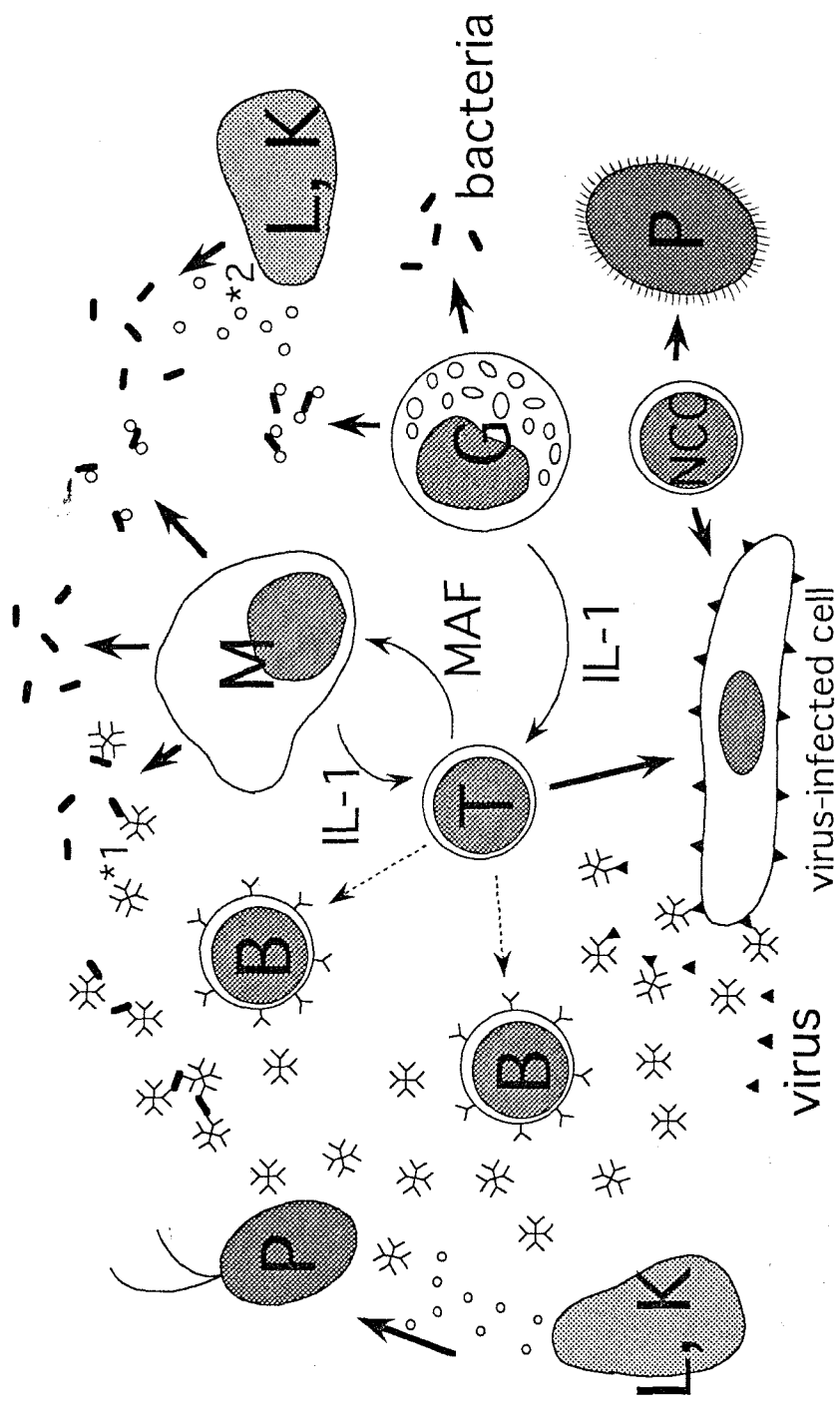


図1. 魚類免疫系の概略図。これまで報告された実験結果に基づき魚類免疫系を模式図化した。基本骨格は哺乳類の免疫系とほぼ同様であると考えられている。実際、これらの防御細胞が生体内でどのような役割をしているかについては不明な点が多い。T; Tリンパ球、B; Bリンパ球、M; マクロファージ、G; 顆粒球、NCC; nonspecific cytotoxic cell、L; 肝臓、K; 腎臓、P; 寄生虫、IL-1; インターロイキン1、MAF; マクロファージ活性化因子、\*1(※); 抗体、\*2(。); 殺菌性タンパク質(補体、リンチーム等)、→; 攻撃作用、-----; 補助作用。

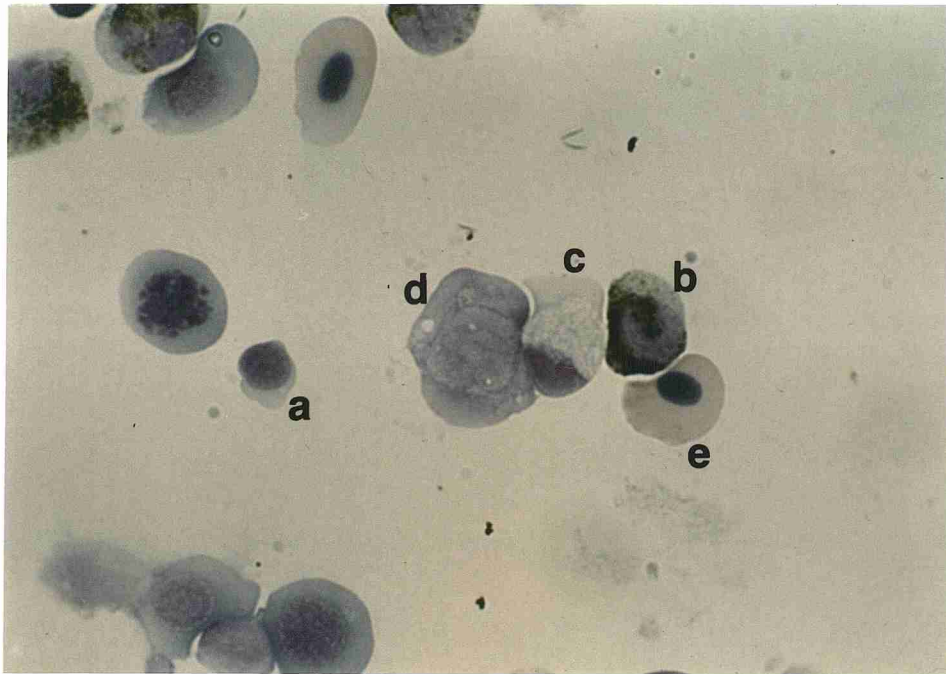


図2. 頭腎細胞のズダンブラックB染色像。好中球のみズダンブラックBによって黒く染色されている。a; リンパ球、b; 好中球、c; 好塩基球、d; マクロファージ、e; 赤血球。

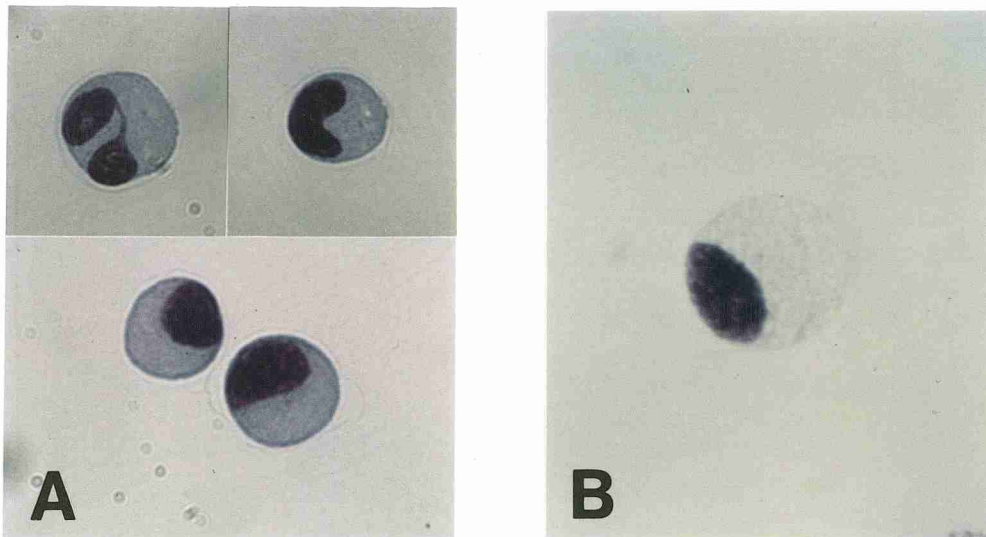


図3. コイ顆粒球のギムザ染色像。標本の固定は10%ホルマリンを含むメタノールで行った。染色液は、市販のギムザ液 (Merck Co.) をpH6.4のリン酸緩衝液で約100倍希釈したものを用いた。A; 好中球（細胞質は弱好酸性または無色であり、核は腎形または分葉形を示す）。B; 好塩基球（細胞質は脱顆粒したかのような無色の顆粒状のものが見られ、核は偏在している）。

## 第1章 好中球の細胞傷害能

### 第1節 コイ好中球の細胞傷害能

### 第2節 ギンブナおよびアメリカナマズ好中球の細胞傷害能

第1節 コイ好中球の細胞傷害能\*

\*Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*,  
possess a spontaneous cytotoxic activity

Kurata, O., Okamoto, N. and Ikeda, Y.

*Developmental and Comparative Immunology*, **19**, 315-325, 1995.



## NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CARP, *Cyprinus carpio*, POSSESS A SPONTANEOUS CYTOTOXIC ACTIVITY

Osamu Kurata, Nobuaki Okamoto and Yayoi Ikeda

Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku,  
Tokyo 108, Japan

(Submitted January 1995; Accepted May 1995)

□ Abstract—This study demonstrates for the first time that carp (*Cyprinus carpio*) neutrophilic granulocytes from the head kidney possess potent spontaneous cytotoxic activity against several human tumor cell lines. Carp head kidney cells isolated at a density of 1.09 g/mL contained more than 90% neutrophilic granulocytes. These cells were round and approximately 10  $\mu$ m in diameter with reniform or polymorphic nuclei and slightly eosinophilic cytoplasm when stained with Giemsa. Electron microscopy revealed that the cytoplasm contained numerous oval granules, some of which contained a dense rod-shaped core. The neutrophilic granulocytes readily formed conjugates with the human target cells and rapidly killed them. The neutrophilic granulocytes killed human derived target cells better than murine derived target cells. Inhibition of cytotoxicity by catalase suggested that the production of  $H_2O_2$  is involved as a mediator in the cytotoxic reaction. The size and granularity of the carp effector cells indicate that they are different from the small agranular nonspecific cytotoxic cells (NCC) described in the channel catfish.

□ Keywords—Fish; Carp; Head kidney; Neutrophilic granulocyte; K562; Spontaneous cytotoxic activity; Natural killer activity;  $H_2O_2$ .

Address correspondence to Nobuaki Okamoto, Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo 108, Japan.

### Introduction

Cell-mediated killing is an important fundamental defense mechanism in the control of tumor cells and virus-infected cells. Cells possessing cytotoxic activity are found in many species from invertebrates to vertebrates (1–6). Hemocytes from the clam, *Corbicula fluminea*, lyse mammalian erythrocytes by a secreted hemolytic factor (7). Crayfish, *Astacus astacus*, have two cell types, granular and semigranular cells, which possess cytotoxic activity (8). Spontaneous killer (SK) cells from frogs, *Rana pipiens*, are similar in morphology to mammalian large granular lymphocytes (4). Peripheral blood mononuclear cells and granulocytes from chickens are able to lyse virus-transformed chicken cells (6,9). Mammals possess a number of different kinds of cytotoxic cells which include cytolytic immune T cells (10,11), monocytes or macrophages (12,13), granulocytes (14–16) and natural killer (NK) cells (17–19). Although cytotoxic activity has been described in fish (20–26), only one type of cytotoxic cell has been well defined and it is the small agranular nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (27–29).

In the present study, neutrophilic granulocytes from carp head kidney were characterized and found to possess a potent spontaneous cytotoxic activity



toward several mammalian tumor cell lines.

## Materials and Methods

### *Fish*

Carp, *Cyprinus carpio*, weighing approximately 250 g were used for this study. The fish were maintained in 40 L tanks with running water at a temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . The fish were fed a commercial pellet diet to satiation twice a day.

### *Medium*

Cell cultures were performed in RPMI-1640 (Nissui Pharmaceutical Co.) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS: Commonwealth Serum Laboratories), 1.4 mM sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ), 4 mM L-glutamine, 100 units (U)/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin.

### *Cell Preparations*

Fish were anesthetized in water containing 100 ppm ethyl 4-aminobenzoate and effector cells were aseptically prepared from the head kidney. Cell suspensions were prepared by gently pressing the tissue through a 150-gauge mesh stainless steel sieve in 10 mL of RPMI-1640 without FBS. The cells were washed twice with RPMI-1640 containing 10% FBS at  $800 \times g$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ . Washed cells were then applied to a discontinuous Percoll (Sigma Chemical Co.) density gradient of 1.065, 1.08 and 1.09 g/mL and centrifuged at  $350 \times g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . Cells at each of the three interfaces were collected and washed twice with unsupplemented RPMI-1640. The effector cells from the three fractions were suspended in 2 mL of RPMI-1640 containing 10% FBS and incubated for 12 h at  $25^\circ\text{C}$

until used; preincubation has been shown to enhance the activity of effector cells (26).

Before use, the effector cells were counted and brought to a concentration of  $1 \times 10^7/\text{mL}$  in RPMI-1640 containing 10% FBS. The viability of cells was greater than 95% as determined by trypan blue exclusion.

### *Target Cells*

Seven human and murine tumor cell lines were used as targets and include; K562 (human chronic myelogenous leukemia), HL60 (human acute promyelocyte leukemia), Molt4F (human T cell acute lymphoblastic leukemia), HeLa (human uterocervical carcinoma), Daudi (human Burkitt's lymphoma), P815 (mouse mastocytoma) and YAC-1 (mouse molony virus induced T cell lymphoma). With the exception of HeLa cells, the cell lines were maintained in RPMI-1640 containing 10% FBS at  $37^\circ\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$ . HeLa cells were maintained in Eagle's minimum essential medium (MEM; Nissui Pharmaceutical Co.) using the same conditions. Because HeLa cells are adherent, these cells were treated with 0.1% trypsin and 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  free-phosphate buffer saline before used. The suspended HeLa cells were used as other nonadherent target cells for cytotoxicity assay.

### *Assay for Characteristics of Cytotoxic Activity*

Target cells ( $3 \times 10^6$ ) were labeled with 3.7 MBq of  $\text{Na}_2 \text{}^{51}\text{CrO}_4$  (Japan Atomic Energy Research Institute) for 1.5 h at  $37^\circ\text{C}$ . The labeled cells were washed three times with unsupplemented RPMI-1640 and diluted to  $2 \times 10^5$  cells/mL in RPMI-1640 containing 10% FBS. The cell suspension (100  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) was added to

round bottom 96-well microtiter plates (Corning Labs. Inc.). Thereafter, effector cells (100  $\mu\text{L}$ ) were added to each well, resulting in 50:1, 25:1 and 10:1 ratio of effector to target cells (E:T ratio). After incubation at 25°C for the indicated times, supernatants (200  $\mu\text{L}$ ) were harvested with an automated supernatant collection device (Skatron) and radioactivity measured using an automated gamma counter (Shimadzu RAW-300). Radioactivity of supernatants from target cells without effector cells and from target cells lysed with detergent (10% 7X, ICN Biomedicals) served as spontaneous and maximum release controls, respectively. Each value for  $^{51}\text{Cr}$ -release is the mean of triplicate wells. The percent cytotoxicity was calculated as follows:

Cytotoxicity % =

$$\frac{(\text{Test release}) - (\text{Spontaneous release})}{(\text{Maximum release}) - (\text{Spontaneous release})} \times 100$$

The kinetics of cytotoxicity was determined at 0.5, 1, 2, 4, 6 and 8 h after the effector cells and K562 cells were mixed. The assay was performed at an E:T ratio of 10:1 at 25°C.

The following were performed in order to investigate cytotoxic effects of supernatants from co-cultured effector cells and K562 cells. Effector cells ( $5 \times 10^6$ ) were co-cultured with K562 cells ( $1 \times 10^5$ ) in 500  $\mu\text{L}$  RPMI-1640 containing 10% FBS in Eppendorf microfuge tubes. K562 cells cultured in absence of effector cells and effector cells cultured in absence of K562 cells were used as controls. The tubes were incubated at 25°C. After incubating (0.5, 1, 2, 3 and 4 h), the tubes were centrifuged at  $800 \times g$  for 5 min at 4°C and cell-free supernatants were harvested. The supernatants (100  $\mu\text{L}$ ) were added to  $^{51}\text{Cr}$ -labeled K562 cells ( $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}/\text{well}$ ) in 96-well round bottom microtiter plates, and the plates incubated for 4 h at

25°C. The percent  $^{51}\text{Cr}$ -release was measured as mentioned above.

In additional experiments, catalase (from bovine liver; 19,900 U/mg; Sigma Chemical Co.) as an inhibitor of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , superoxide dismutase (SOD from bovine erythrocytes; 4200 U/mg; Sigma Chemical Co.) as an inhibitor of  $\text{O}_2^-$ , sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) and sodium cyanide ( $\text{NaCN}$ ) as inhibitors of myeloperoxidase (MPO), L-alanine, glycine and L-serine as scavengers of hypochlorous acid ( $\text{HOCl}$ ) were used. Each of the reagents was added when target and effector cells were mixed and their effects on cytotoxicity were examined. It was established by trypan blue exclusion that these reagents did not kill the effector cells (data not shown).

### *Morphological Observations*

For light microscopy, the effector cells were stained with Giemsa. The following were performed for transmission electron microscopy. The cells from the density interface of 1.09 g/mL were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6). After 90 min, the cells were washed eight times in 7.5% sucrose in 0.1 M phosphate buffer and postfixed with 1%  $\text{OsO}_4$  in phosphate buffered saline for 90 min. The cells were then dehydrated in graduated ethanol concentrations and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead acetate.

To observe conjugation of the fish effector to K562 cells, the following was performed. Cells from the 1.09 g/mL fraction ( $1 \times 10^5$ ) and K562 cells ( $1 \times 10^5$ ) were mixed in 200  $\mu\text{L}$  of RPMI-1640 containing 10% FBS. After incubation for 1 h at 25°C, samples were prepared according to the above methods for light and transmission electron microscopy.

## Results

### *Characteristics of Cytotoxic Activity*

The effector cells at the density interfaces for 1.065, 1.08 and 1.09 g/mL demonstrated cytotoxicity against K562 cells (Fig. 1). The effector cells from the 1.09 g/mL fraction demonstrated the highest degree of cytotoxicity (78.9% at an E:T ratio of 50:1, 74.2% at 25:1, 62.5% at 10:1). In contrast, the effector cells isolated from the 1.065 and 1.08 g/mL interfaces showed much less cytotoxicity (4.6% and 16.8% at 50:1, respectively).

The effector cells from the 1.09 g/mL fraction rapidly lysed K562 cells with significant killing occurring within the first 2 h; a plateau was reached after 4 h (Fig. 2). The level of cytotoxicity observed after 2 h was only slightly less than that seen at 4 h.

Cytotoxicity of the effector cells from the 1.09 g/mL fraction against seven different mammalian target cells is shown in Figure 3. The cytotoxicity was

at high levels against the human K562, HL60, Daudi and Hela cells, at a moderate level against Molt4F cells, and at low levels against the murine P815 and YAC-1 cells. The effector cells in the 1.09 g/mL fraction killed human derived target cells better than murine derived target cells.

Supernatants from 1.09 g/mL carp effector cells co-cultured with K562 cells at various incubation periods (0.5, 1, 2, 3 and 4 h) showed no cytotoxic effects against K562 cells (data not shown).

Addition of catalase partially inhibited the cytotoxicity of the effector cells from the 1.09 g/mL fraction against K562 target cells. L-Alanine and glycine gave a very small level of inhibition and the other reagents gave no inhibition (Fig. 4). Addition of concentrated catalase (400:  $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ ) almost completely inhibited cytotoxicity when assayed at an E:T ratio of 2.5:1 (Fig. 5). However, inhibition by high concentrations of L-alanine and glycine (40 mM) was minimal even when assayed at a ratio of 1.25:1 (data not shown).

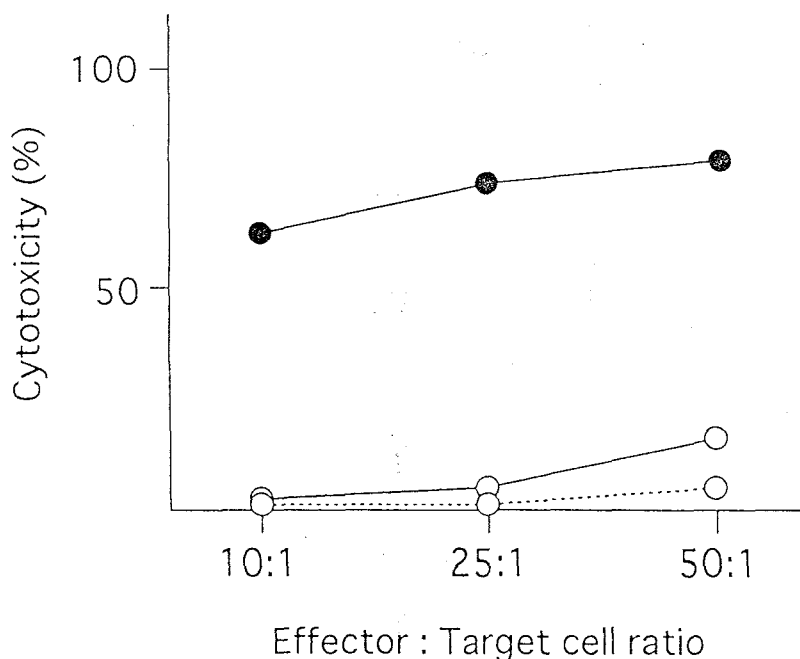
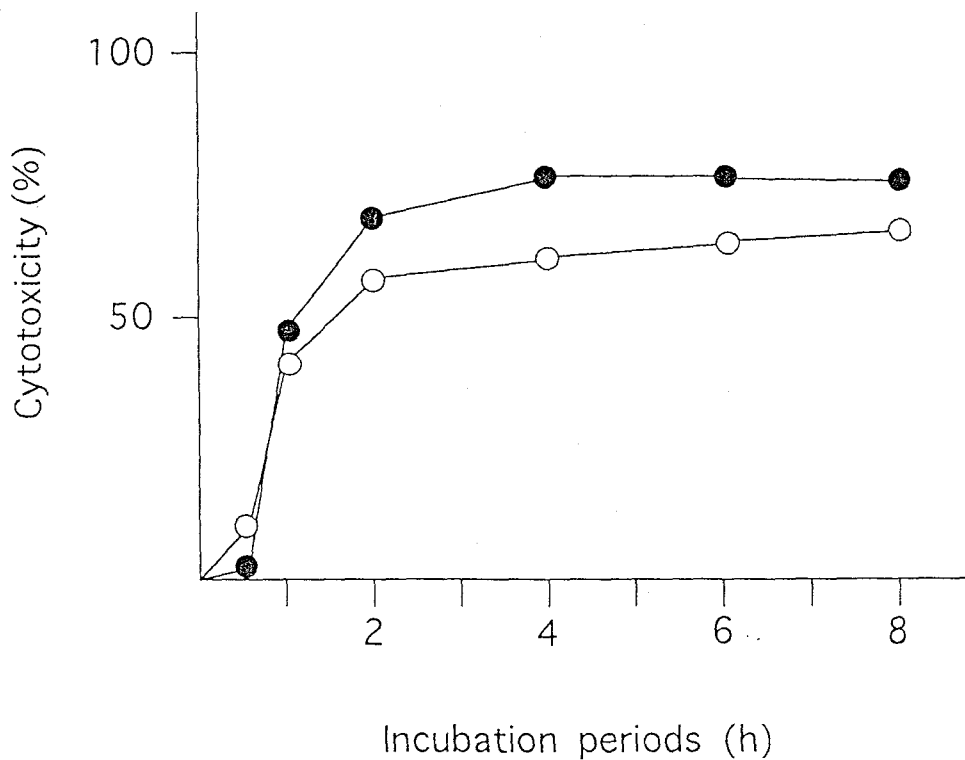
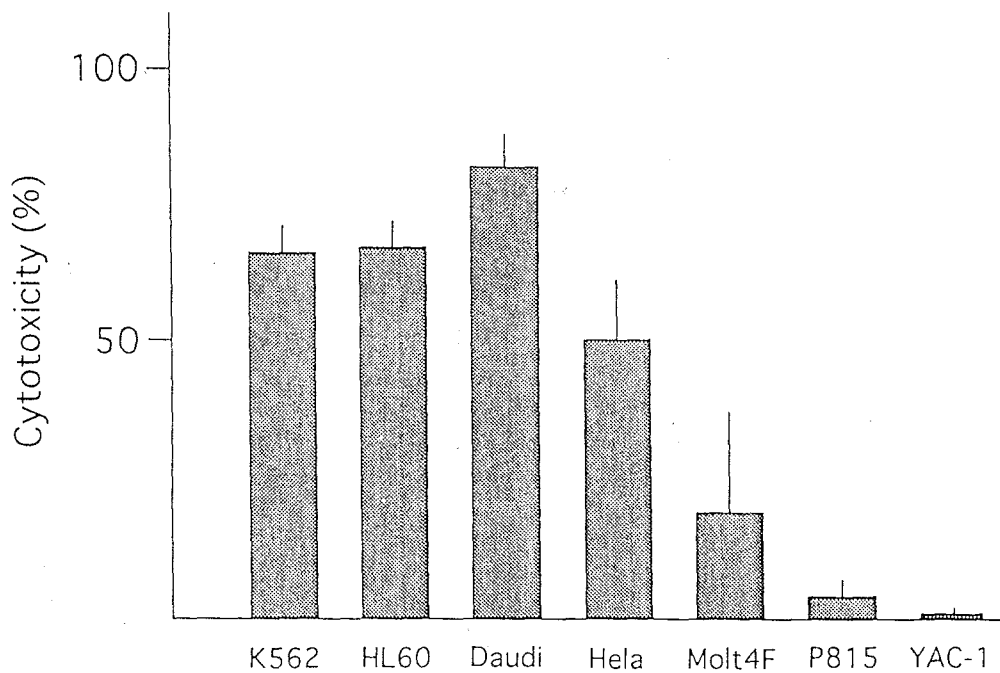


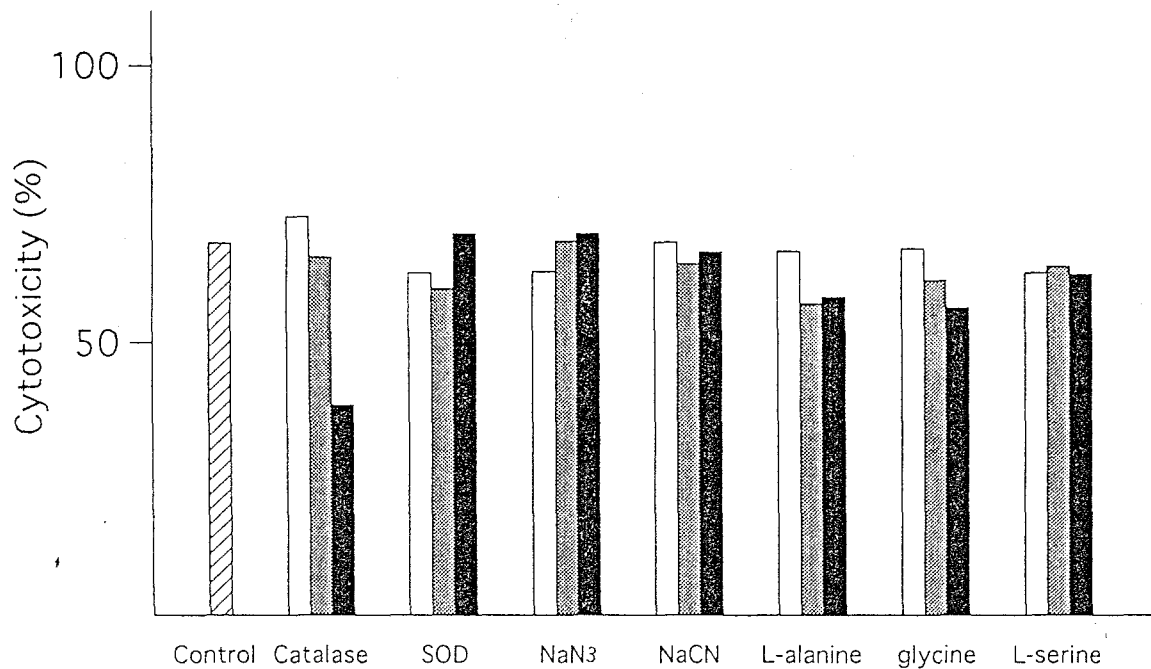
Figure 1. Cytotoxicity of carp effector cells from three fractions (1.065: ○--○, 1.08: ○—○, 1.09: ●—●) separated by Percoll density gradients centrifugation. K562 cells were used as a target cell.



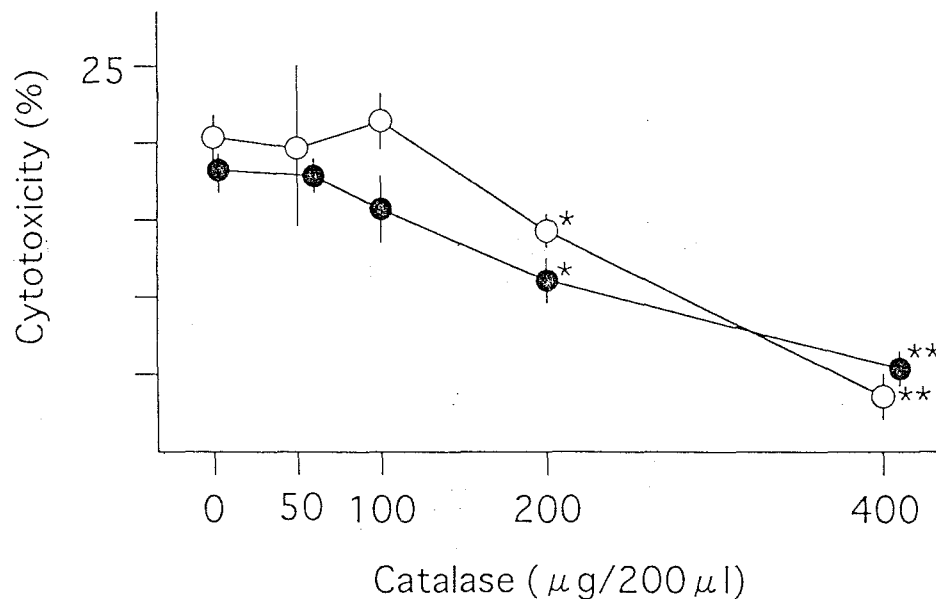
**Figure 2.** Kinetics of cytotoxicity by carp effector cells in the 1.09 g/mL fraction from fish 1 (○) and fish (●). K562 cells were used as a target cell.



**Figure 3.** Cytotoxicity of carp effector cells in the 1.09 g/mL fraction against seven mammalian target cells. This cytotoxicity assay was performed at an E:T ratio of 10:1 for 4 h. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of cytotoxicity from three experimental fish.



**Figure 4.** Effects of various reagents on the cytotoxicity of carp effector cells in the 1.09 g/mL fraction. The reagents were catalase; 100  $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$  (□), 200  $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$  (▨), 400  $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$  (■), SOD; 50 U/200  $\mu\text{L}$  (□), 100 U/200  $\mu\text{L}$  (▨), 200 U/200  $\mu\text{L}$  (■),  $\text{NaN}_3$ , NaCN; 0.25 mM (□), 0.5 mM (▨), 1 mM (■), L-alanine, glycine and L-serine; 10 mM (□), 20 mM (▨), 40 mM (■). Control is cytotoxicity of the effector cells without the reagents. K562 cells were used as a target cell. This cytotoxicity assay was performed at an E:T ratio of 5:1 for 2 h.



**Figure 5.** Effects of catalase (0, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ ) on the cytotoxicity of carp effector cells in the 1.09 g/mL fraction from fish A (○) and fish B (●). K562 cells were used as a target cell. This cytotoxicity assay was performed at an E:T ratio of 2.5:1 for 2 h. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of cytotoxicity of triplicate samples from individuals. Significantly different from non-addition of catalase (0  $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ ) (Student's *t*-test, \*:  $p < 0.005$ , \*\*:  $p < 0.0005$ ).

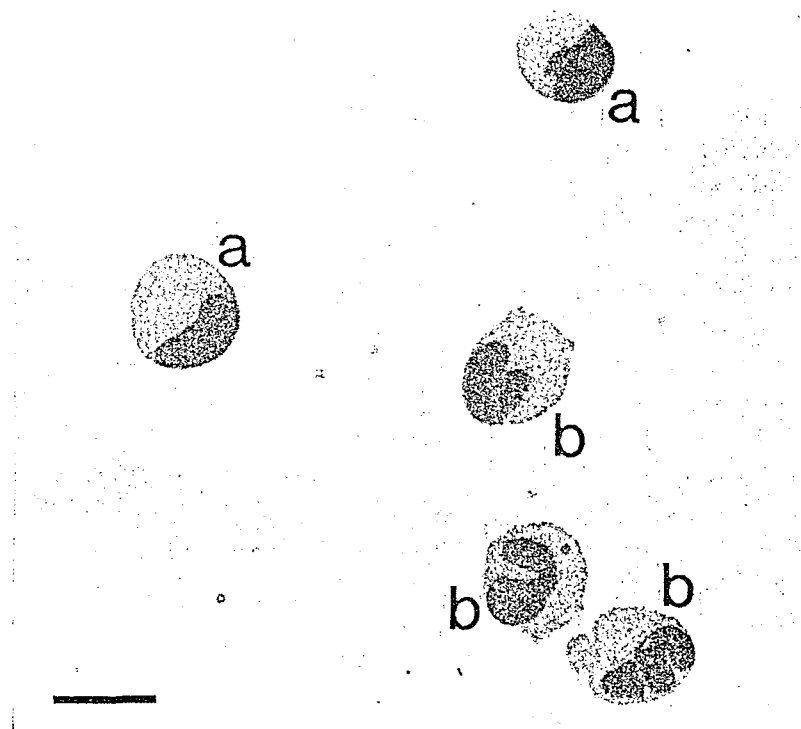
### *Morphological Observations*

Cells at the interface densities of 1.065 and 1.08 g/mL consisted of lymphocytes (L), granulocytes (G) and macrophages (M) and cells at the interface density of 1.09 g/mL consisted of lymphocytes and granulocytes. The proportions of the cells from five individual carp averaged 92(L):5(G):3(M), 89(L):6(G):5(M) and 9(L):91(G) in the density fractions of 1.065, 1.08 and 1.09 g/mL, respectively. The granulocytes in the 1.09 g/mL fraction were morphologically uniform-round-shaped cells (approximately 10  $\mu$ m in diameter) with reniform or polymorphic nuclei and a slightly eosinophilic cytoplasm when stained with Giemsa (Fig. 6). Electron microscopy revealed that the cytoplasm was filled with numerous oval granules. Some of the granules contained a dense rod-shaped core (Fig. 7).

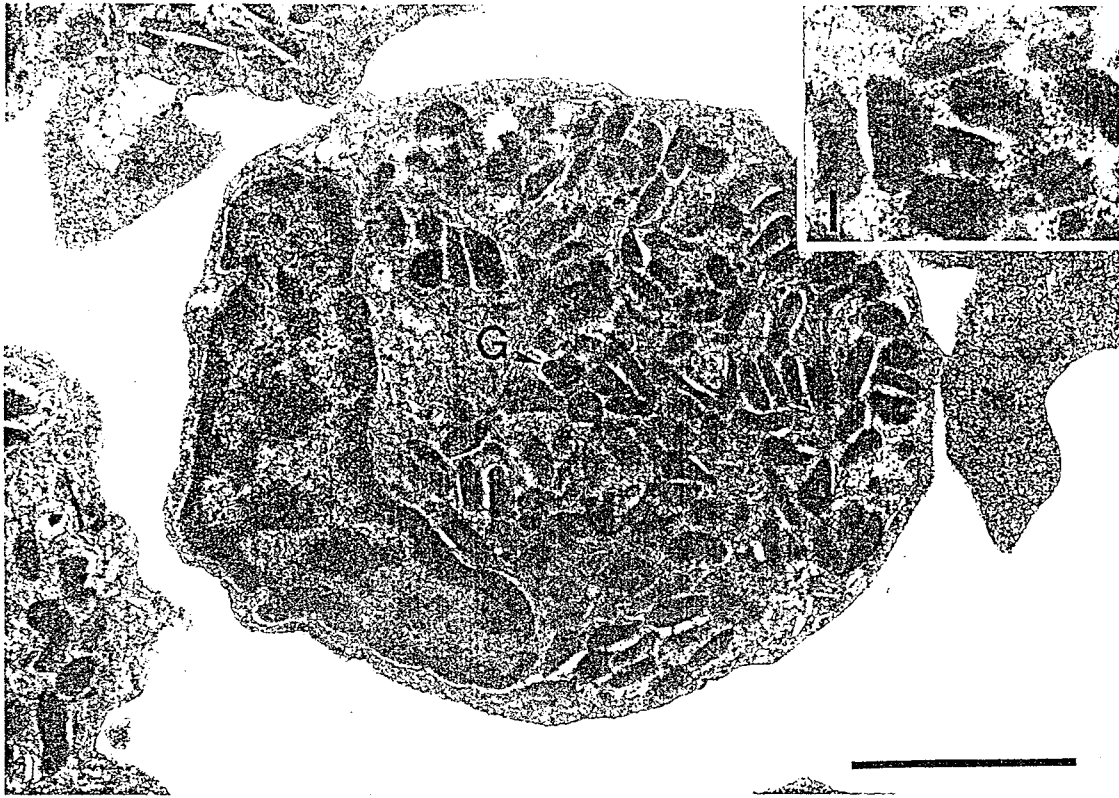
Conjugation of the granulocytes-K562 cells was observed by both light and transmission electron microscopy (Fig. 8). Conjugated granulocytes showed the same characteristics as the granulocytes present in the 1.09 g/mL fraction, with the shape of the conjugated granulocytes being irregular.

### **Discussion**

The head kidney cells from the 1.09 g/mL fraction contained 91% granulocytes and 9% lymphocytes and possessed a potent spontaneous cytotoxic activity against a variety of human tumor cells. In contrast, cells from the 1.065 and 1.08 g/mL fractions were lymphocytic rich (approximately 90% lymphocytes) and showed low cytotoxicity for the target cells used. It was confirmed by light and electron microscopy that the granulocytes



**Figure 6.** A light micrograph of the carp neutrophilic granulocytes in the 1.09 g/mL fraction (bar; 10  $\mu$ m). The nuclei were reniform (a) or polymorphic (b).



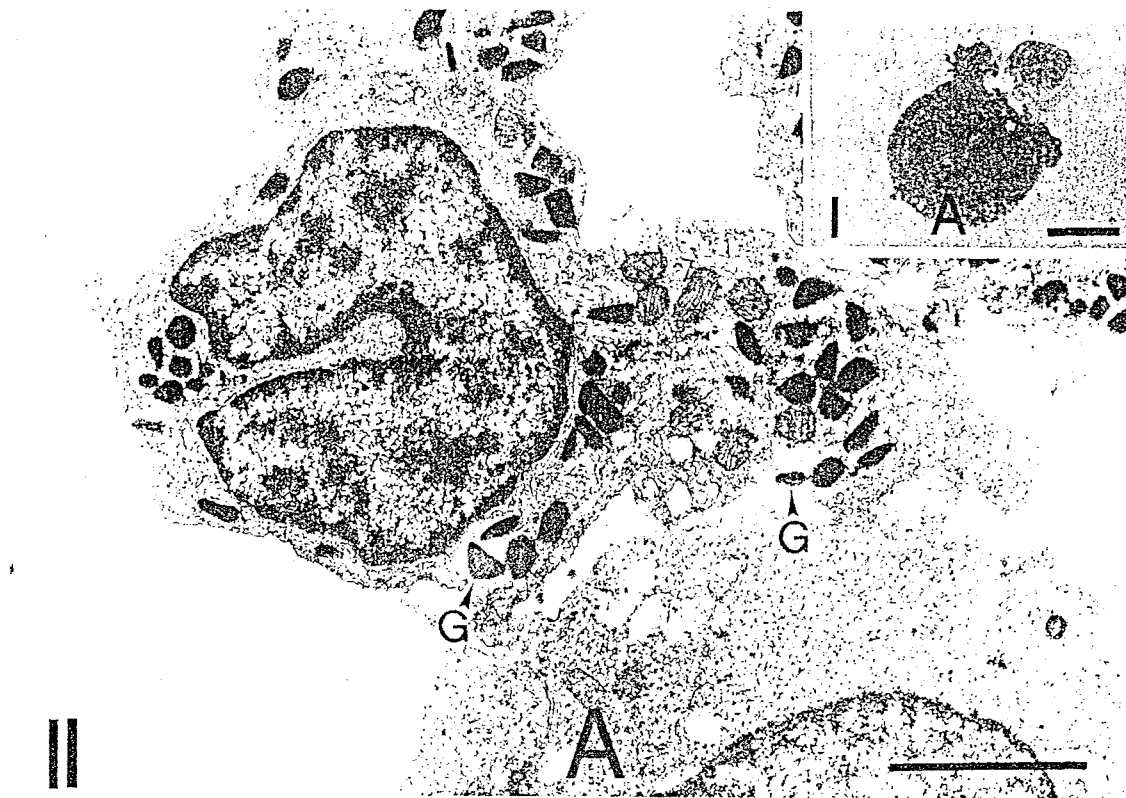
**Figure 7.** Electron micrographs of the carp neutrophilic granulocyte from the 1.09 g/mL fraction (bar; 2  $\mu$ m). The cytoplasm was filled with numerous oval granules (G) which contained a dense rod-shaped core (l).

conjugated with the mammalian target cells. These results clearly indicate that carp granulocytes are primary spontaneous cytotoxic cells.

Carp granulocytes in the head kidney have been classified into four types by Temmink and Bayne (30). They found that neutrophilic granulocytes have a density of 1.08–1.09 g/mL as determined by density gradient centrifugation with Percoll. The other three granulocyte types all had greater densities. In addition, carp neutrophilic granulocytes are characterized by numerous cytoplasmic granules which possess a dense rod-shaped core. Such granules are not found in mammalian neutrophils (31). The granulocytes observed in this study were identified as neutrophilic granulocytes based upon the presence of granules with a dense rod-shaped core and the cell density (1.08–1.09 g/mL). The granulocytes also showed some characteristics of

neutrophilic granulocytes such as being phagocytic against *E. coli* and positive with Sudan black B staining (data not shown). However, spontaneous cytotoxicity of the carp neutrophilic granulocytes against mammalian tumor cells has not been previously described. Cytotoxic function of the other granulocyte types was not determined because of the difficulty in collecting sufficient numbers of these cells in the absence of contaminating erythrocytes. Based upon morphological aspects, the carp neutrophilic granulocytes are clearly different from the small agranular NCC originally described from the channel catfish (27).

In contrast to the slow lysis of tumor cells by mammalian granulocytes (14,32), carp neutrophilic granulocytes rapidly lysed target cells. This finding implies that the specific cytotoxic mechanism used by carp neutrophilic granulocytes may differ from that used by mammalian



**Figure 8.** Micrographs of conjugation of the carp neutrophilic granulocyte and K562 cell in light (I, bar; 10  $\mu\text{m}$ ) and electron (II, bar; 2  $\mu\text{m}$ ) microscopy. The cells conjugating to K562 cell (A) formed as described in Figs. 6, 7. The granules (G) contained a dense rod-shaped core.

granulocytes. A number of different cytotoxic mechanisms have been described for mammalian cytotoxic cells (32–34). Lysis of target cells by natural killer (NK) cells presumably involves the recognition of NK target structures and NK negative target structures via receptors (33,35). In this study, the carp neutrophilic granulocytes were found to form conjugates with the target cells suggesting the existence of target recognition receptors. It is also assumed that the carp neutrophilic granulocytes lyse via conjugation with the target cells. This notion is supported by the finding that culture supernatants from co-cultured granulocytes and K562 failed to show a direct cytotoxic effect against K562 cells. It is also known that the cytotoxic reaction of fish NCC requires contact with a target cell for lysis to occur (28). The target recognition receptors on carp neutrophilic granulocytes may have a specificity for human cells, because carp

neutrophilic granulocytes killed the human cell lines very effectively but not the murine cell lines. The mechanism whereby the carp neutrophilic granulocytes recognize the targets is not known. Lysis of target cells can be performed by various lytic mediators which include granule proteins, e.g. perforin (36), granzyme A (37) and defensin (38), and toxic oxygen metabolites (13,32). Since cytotoxicity by the carp neutrophilic granulocytes was inhibited by catalase, it is assumed that  $\text{H}_2\text{O}_2$  may be involved in the lysis of the target cells. Toxic oxygen metabolites are important effectors in bacterial and tumor cell killings by mammalian granulocytes (39–42). Particularly, oxidized halogens which are powerful cytotoxic mediators in mammalian granulocytes (32). Human neutrophil generates HOCl from  $\text{H}_2\text{O}_2$ -MPO- $\text{Cl}^-$  system, and utilizes this compound to destroy tumor cells (40–42). It is known that carp neutrophilic granulocytes possess peroxidase



in their granules (43,44). However, inhibition of cytotoxicity of the carp neutrophilic granulocytes did not occur by addition of MPO inhibitors (azide and cyanide) or by addition of the HOCl scavengers (L-alanine, glycine and L-serine). These results suggest that the carp neutrophilic granulocytes may not use HOCl generated by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO-halide system for destruction of target cells and, therefore, may have a different cytotoxic mechanism than that of human granulocytes.

*Acknowledgements*—We wish to thank Dr N. W. Miller, Department of Microbiology, University of Mississippi Medical Center, U.S.A., for reviewing the manuscript; Dr M. Nakayasu, National Cancer Center Research Institution, Japan, for kindly providing the K562 and HL60 cells; and Japanese Cancer Research Resources Bank, for providing the Molt4F, Hela, Daudi, P815 and YAC-1 cells. This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan (Nos. 05660204, 05044136 and 06660232).

## References

- Boiledieu, D.; Valembois, P. Natural cytotoxic activity of sipunculid leukocytes on allogenic and xenogenic erythrocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 1:207–216; 1977.
- Bertheussen, K. The cytotoxic reaction in allogenic mixtures of echinoid phagocytes. *Exp. Cell Res.* 120:373–381; 1979.
- Parrinello, N.; Arizza, V.; Cammarata, M.; Parrinello, D. M. Cytotoxic activity of *Ciona intestinalis* (Tunicata) hemocytes: properties of the in vitro reaction against erythrocytes targets. *Dev. Comp. Immunol.* 17:19–27; 1993.
- Ghoneum, M. H.; Cooper, E. L. Inhibition of frog SK effector-target cell binding. *Dev. Comp. Immunol.* 11:167–178; 1987.
- Fleischer, B. Effector cells in avian spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 125:1161–1166; 1980.
- Sieminski-Brodzina, L. M.; Mashaly, M. M. Characterization by scanning and transmission electron microscopy of avian peripheral blood mononuclear cells exhibiting natural killer-like (NK) activity. *Dev. Comp. Immunol.* 15:181–188; 1991.
- Yoshino, T. P.; Tuan, T. L. Soluble mediators of cytolytic activity in hemocytes of the Asian clam, *Corbicula fluminea*. *Dev. Comp. Immunol.* 9:515–522; 1985.
- Soderhall, K.; Wingren, A.; Johansson, M. W.; Bertheussen, K. The cytotoxic reaction of hemocytes from the freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *Cell. Immunol.* 94:326–332; 1985.
- Mandi, Y.; Seprenyi, G.; Pusztai, R.; Beladi, I. Are granulocytes the main effector cells of natural cytotoxicity in chickens? *Immunobiology* 170:284–292; 1985.
- Shearer, G. M. Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 4:527–533; 1974.
- Forquest, F.; Calin, V.; Trescol-Biemount, M. C.; Kanellopoulos, J.; Mottez, E.; Kourilsky, P.; Rabourdin-Combe, C.; Gerlier, D. Generation of hen egg lysozyme-specific and major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocytes: recognition of cytosolic and secreted antigen expressed by transfected cells. *Eur. J. Immunol.* 20:2325–2332; 1990.
- Adams, D. O.; Hamilton, T. A. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2:283–318; 1984.
- Kessel, K. P. M. van; Strijp, J. A. G. van; Kats-Renaud, J. H. van; Verhoef, J. Cytotoxicity by human adherent cells: oxygen-dependent and -independent cytotoxic reactions by different cell populations. *Immunology* 58:291–296; 1986.
- Gerrard, T. L.; Cohen, D. J.; Kaplan, A. M. Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells. *J. Natn. Cancer Inst.* 66:483–488; 1981.
- Korec, S.; Herberman, R. B.; Dean, J. H.; Cannon, G. B. Cytostasis of tumor cell lines by human granulocytes. *Cell. Immunol.* 53:104–115; 1980.
- Okuno, T.; Takagaki, Y.; Pluznik, D. H.; Djeu, J. Y. Natural cytotoxic (NC) cell activity in basophilic cells: release of NC-specific cytotoxic factor by IgE receptor triggering. *J. Immunol.* 136:4652–4658; 1986.
- Rosenberg, E. B.; McCoy, J. L.; Green, S. S.; Donnelly, F. C.; Siwarski, D. C.; Levine, P. H.; Herberman, R. B. Destruction of human lymphoid tissue-culture cell lines by human peripheral lymphocytes in <sup>51</sup>Cr-release cellular cytotoxicity assays. *J. Natn. Cancer Inst.* 52:345–352; 1974.
- Sendo, F.; Aoki, T.; Boyse, E. A.; Buafo, C. K. Natural occurrence of lymphocytes showing cytotoxic activity to BALB/c radiation-induced leukemia RL31 cells. *J. Natn. Cancer Inst.* 55:603–609; 1975.
- Kiessling, R.; Klein, E.; Wigzell, H. "Natural" killer cells in the mouse 1. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5:112–117; 1975.
- Hinuma, S.; Abo, T.; Kumagai, K.; Hata, M. The potent activity of fresh water fish kidney cells in cell-killing I. Characterization and species-distribution of cytotoxicity. *Dev. Comp. Immunol.* 4:653–666; 1980.

21. Graves, S. S.; Evans, D. L.; Cobb, D.; Dawe, D. L. Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*) I. Optimum requirements for target cell lysis. *Dev. Comp. Immunol.* 8:293-302; 1984.
22. Moody, C. E.; Serreze, D. V.; Reno, P. W. Nonspecific cytotoxic activity of teleost leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 9:51-64; 1985.
23. Faisal, M.; Ahmed, I. I.; Peters, G.; Cooper, E. L. Natural cytotoxicity of tilapia leucocytes. *Dis. Aquat. Org.* 7:17-22; 1989.
24. Kiron, V.; Gunji, A.; Okamoto, N.; Satoh, S.; Ikeda, Y.; Watanabe, T. Dietary nutrient dependent variations on natural-killer activity of the leucocytes of rainbow trout. *Fish Pathol.* 28(2):71-76; 1993.
25. Yoshinaga, K.; Okamoto, N.; Kurata, O.; Ikeda, Y. Individual variations of natural killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathol.* 29(1):1-4; 1994.
26. Suzumura, E.; Kurata, O.; Okamoto, N.; Ikeda, Y. Characteristics of natural killer-like cells in carp. *Fish Pathol.* 29(3):199-203; 1994.
27. Evans, D. L.; Jaso-Friedmann, L. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2:109-121; 1992.
28. Evans, D. L.; Jaso-Friedmann, L.; Smith, E. E.; John, A. St.; Koren, H. S.; Harris, D. T. Identification of a putative antigen receptor on fish nonspecific cytotoxic cells with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 141:324-332; 1988.
29. Graves, S. S.; Evans, D. L.; Dawe, D. L. Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Immunol.* 134:78-85; 1985.
30. Temmink, J. H. M.; Bayne, C. J. Ultrastructural characterization of leucocytes in the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Dev. Comp. Immunol.* 11:125-137; 1987.
31. Permley, R. T. Mammals. In: Rowley, A. F.; Ratcliffe, N. A., eds. *Vertebrate Blood Cells*. Cambridge: Cambridge University Press; 1988:337-424.
32. Kessel, K. P. M. van; Verhoef, J. A view to a kill: cytotoxic mechanisms of human polymorphonuclear leukocytes compared with monocytes and natural killer cells. *Pathobiology.* 58:249-264; 1990.
33. Herberman, R. B.; Reynolds, C. W.; Ortaldo, J. R. Mechanism of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Ann. Rev. Immunol.* 4:651-680; 1986.
34. Henkart, P. A. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Ann. Rev. Immunol.* 3:31-58; 1985.
35. Moretta, L.; Ciccone, E.; Mingari, M. C.; Biassoni, R.; Moretta, A. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv. Immunol.* 55:341-380; 1994.
36. Yagiga, H.; Nakata, M.; Kawasaki, A.; Shinkai, Y.; Okumura, K. Role of perforin in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Adv. Immunol.* 51:215-242; 1992.
37. Hayes, M. P.; Berrebi, G. A.; Henkart, P. A. Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme. *A. J. Exp. Med.* 170:933-946; 1989.
38. Lichtenstein, A. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. *J. Clin. Invest.* 88:93-100; 1991.
39. Szejda, P.; Parce, J. W.; Seeds, M. S.; Bass, D. A. Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *J. Immunol.* 133:3303-3307; 1984.
40. Clark, R. A.; Szot, S. The myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system as effector of neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity. *J. Immunol.* 126:1295-1301; 1981.
41. Dallegri, F.; Frumento, G.; Patrone, F. Mechanisms of tumor cell destruction by PMA-activated human neutrophils. *Immunology* 48:273-279; 1983.
42. Weiss, S. J.; Slivka, A. Monocyte and granulocyte-mediated tumor cell destruction. *J. Clin. Invest.* 69:255-262; 1982.
43. Bielek, E. Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell Tissue Res.* 220:163-180; 1981.
44. Bayne, C. J. Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: isolation, separation and characterization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12:141-151; 1986.

第2節 ギンブナおよびアメリカナマズ好中球の細胞傷害能\*

\*Spontaneous cytotoxic activity of neutrophilic granulocytes  
in ginbuna crucian carp and channel catfish.

Kurata, O., Hasegawa, S., Okamoto, N., Nakanishi, T. and Ikeda, Y.

*Fish Pathology*, **31** (1), 51-52, 1996.

As in mammals fish neutrophilic granulocytes migrate more quickly than macrophages during the acute phase of inflammation<sup>1)</sup>, and phagocytose microorganisms<sup>2)</sup>. Recent research demonstrated that neutrophilic granulocytes from common carp *Cyprinus carpio* showed spontaneous cytotoxic activity against human leukemic cells as well as phagocytic activity<sup>3)</sup>. This capability of carp neutrophilic granulocytes is interesting to fish defense mechanisms. Therefore, it is necessary to examine spontaneous cytotoxic activity of neutrophilic granulocytes in other fish species.

In this study, spontaneous cytotoxic activity of neutrophilic granulocytes in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii* and channel catfish *Ictalurus punctatus* were investigated, by using common carp as control. Four ginbuna crucian carp (weighing 80-95g) obtained from National Research Institute of Aquaculture, four channel catfish (weighing 150-300g) from a private farm and four common carp (weighing 130-180g) from Yoshida Research and Experimental Station of Tokyo University of Fisheries were kept in 40 liter tanks with running water at temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Fish were fed to satiation twice a day with commercial pellet. Neutrophilic granulocytes were used as effector cells for cytotoxicity assay. Neutrophilic granulocytes were separated from the head kidney on discontinuous density gradients of Percoll (Pharmacia, Sweden) according to the method previously described<sup>3, 4)</sup>. The head kidney cells were applied to the discontinuous density gradients (1.065, 1.08 and 1.09 g/ml for ginbuna crucian carp and common carp, 1.065, 1.07 and 1.08 g/ml for catfish) and centrifugated at  $4^\circ\text{C}$  for 20 min at  $350 \times g$  for ginbuna crucian carp and common carp, and  $300 \times g$  for catfish. Neutrophilic granulocytes of ginbuna crucian carp and common carp were in the interface of 1.08-1.09 g/ml and that of catfish were in the interface of 1.07-1.08 g/ml. The effector cells were stained with Giemsa and Sudan black B, and observed under light microscopy to identify the cell types. A  $^{51}\text{Cr}$

release assay was adopted to determine the cytotoxicity of the effector cells. K562 (human chronic myelogenous leukemia) cells, which were often used for cytotoxicity assay of fish leucocytes<sup>5)</sup>, were used as target cells. The mixture of effector and <sup>51</sup>Cr-labeled target cells were incubated for 4 h at 25°C in 96 well microplates of round bottom (Corning Labs. Inc.). After incubation, supernatants were harvested and the radioactivities were measured. The percent cytotoxicity was calculated as previous described<sup>3)</sup>.

Percentages of neutrophilic granulocytes in the effector cells of ginbuna crucian carp, channel catfish and common carp were 85.5%, 86.3% and 95.0%, respectively, with others comprised of mainly lymphocytes. Cytotoxicities of neutrophilic granulocytes from three species were shown in Fig. 1. In ginbuna crucian carp, effector cells composed of neutrophilic granulocytes showed cytotoxicity against K562 target cells (approximately 64% at an E:T ratio of 50:1), while lymphocyte-rich fraction (1.07-1.08 g/ml including 73.9% lymphocytes) expressed low cytotoxicity (approximately 15 % at an E:T ratio of 50:1). This result indicated that neutrophilic granulocytes of ginbuna crucian carp also possess spontaneous cytotoxic activity as well as common carp. On the contrary, effector cells filled with neutrophilic granulocytes (fraction of 1.07-1.08 g/ml) from channel catfish showed extremely low or no cytotoxicity against K562 target cells. Lymphocytes fraction ( $\leq 1.065$  g/ml) of catfish including nonspecific cytotoxic cells (NCC) which are defined as small agranular lymphocytes showed cytotoxicity (data not shown). These results suggest the different cytotoxic activity of neutrophilic granulocytes among fish species. Spontaneous cytotoxic activities of neutrophilic granulocytes still need to be investigated with other target cells as well as other fish species for a better comprehension of this activity in fish.

## References

- <sup>1)</sup>Suzuki, Y. and T. Iida. (1992): *Ann. Rev. Fish Dis.*, **2**, 149-160.
- <sup>2)</sup>Ainsworth, A. J. (1992): *Ann. Rev. Fish Dis.*, **2**, 123-148.
- <sup>3)</sup>Kurata, O., N. Okamoto and Y. Ikeda. (1995): *Dev. Comp. Immunol.*, in press.
- <sup>4)</sup>Waterstrat, P. R., A. J. Ainsworth and G. Capley. (1988): *J. Fish Dis.*, **11**, 289-294.
- <sup>5)</sup>Evans, D. L. and L. Jaso-Friedmann. (1992): *Ann. Rev. Fish Dis.*, **2**, 109-121.

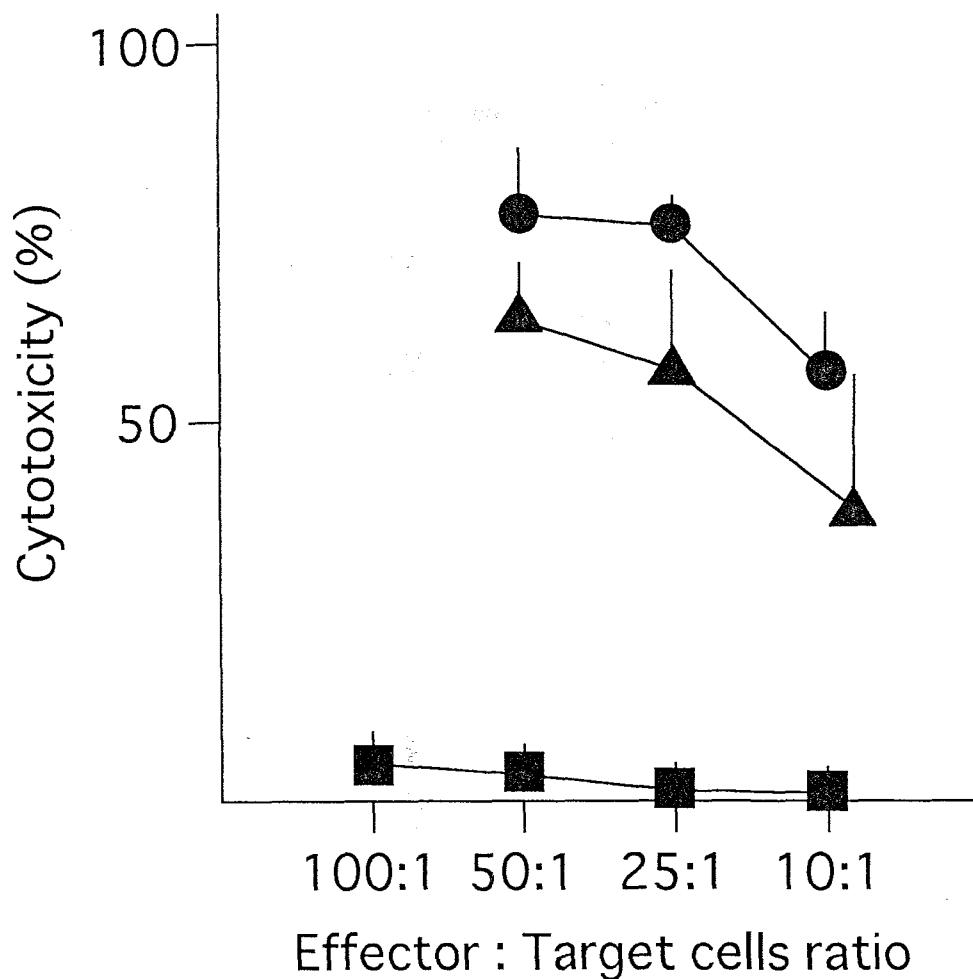


Fig. 1. Cytotoxicity of effector cells from ginbuna crucian carp (▲), channel catfish (■) and common carp (●) against K562 target cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of cytotoxicity from individual experimental fish.

## 第2章 コイ好中球の環境温度への順応性

### 第1節 コイナチュラルキラー様細胞の環境温度への順応性

### 第2節 細胞傷害能を有するコイ好中球の環境温度への順応性



第1節 コイナチュラルキラー様細胞の環境温度への順応性\*

\*Accommodation of carp natural killer-like cells  
to environmental temperatures.

Kurata, O., Okamoto, N., Suzumura, E., Sano, N. and Ikeda, Y.

*Aquaculture*, **129**, 421-424, 1995.



## Accommodation of carp natural killer-like cells to environmental temperatures

Osamu Kurata, Nobuaki Okamoto\*, Eri Suzumura, Natsumi Sano,  
Yayoi Ikeda

*Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo 108, Japan*

---

### Abstract

To assess cytotoxic activity of carp (*Cyprinus carpio*), head kidney leukocytes were examined with special reference to the effects of rearing water temperature and of assay temperature. Leukocytes as effector cells were separated from head kidney using Histopaque 1077 and cytotoxic activities were measured by the release of  $^{51}\text{Cr}$  from target cells which were K562, human chronic myelogenous leukemia cells. Cytotoxic activity of leukocytes from carp kept at higher temperature (25°C) was lower at lower assay temperature (10°C) than at higher assay temperature (25°C). However, activity from carp acclimated to low temperature (10°C) increased on 10°C assay and decreased on 25°C assay. Cellular composition of effector cells changed in connection with the above phenomenon. In carp acclimated to 10°C, small lymphocytes decreased while the others, e.g. large lymphocytes, granulocytes and macrophages, increased. Accommodation of carp natural killer-like cells to environmental temperatures may be regulated by changing the cellular composition of effector cells.

*Keywords:* *Cyprinus carpio*; Leukocytes; Natural killer activity; Temperature; Accommodation

---

### 1. Introduction

The immune response of fish which are poikilothermic is influenced by environmental temperature. T-lymphocytes of fish are responsible for specific immunity by helping antibody production (Miller and Clem, 1984), reject transplantation (Hildemann, 1957), respond to some mitogens (Clem et al., 1984), and possess specific cell-mediated cytotoxic activity (Verlhac et al., 1990). The functions are suppressed at low environmental temperatures. The killing activity of phagocytic cells is also suppressed at lower temperature, but endocytosis is not (MacArthur and Fletcher, 1985). To prevent infection by pathogens at

---

\*Corresponding author.

low temperature, fish may have alternative mechanisms from cell functions suppressed at those temperatures. In this study, the effect of low environmental temperature on natural killer activity was investigated in carp (*Cyprinus carpio*) and the significance of the natural killer-like cells at low environmental temperature is discussed.

## 2. Materials and methods

Carp (*Cyprinus carpio*) of both sexes and weighing 100–300 g were used. Fish were maintained in 40-liter tanks with running water at a temperature of 25°C over 2 weeks. To study the effect of lower environmental temperature, fish were acclimated to 10°C for 1, 7, 39 and 112 days. Fish were fed a commercial pelleted diet.

Cells prepared by gently pressing head kidney through 150-gauge mesh stainless-steel sieves were suspended in 10 ml of RPMI-1640 without fetal bovine serum (FBS). The cells were washed 2 times with RPMI-1640 without FBS at  $800\times g$  for 5 min at 4°C, overlaid onto Histopaque 1077 (Sigma) and centrifuged at  $450\times g$  for 40 min at 15°C. Cells at the interface were collected as effector cells and washed with RPMI-1640 without FBS. The effector cells were incubated in RPMI-1640 containing 10% FBS for 12 h at the same temperature as the fish were reared.

Cytotoxicity of effector cells from experimental fish was measured by  $^{51}\text{Cr}$  release assay. K562 (human chronic myelogenous leukemia) cells were used as a target for fish effector cytotoxic cells. The  $^{51}\text{Cr}$ -labeled K562 target cell suspension ( $2\times 10^5/100\ \mu\text{l}$ ) was delivered to each well of 96-well round bottom tissue culture plate (Corning) in  $100\ \mu\text{l}$ . Thereafter, effector cells were added to several wells in  $100\ \mu\text{l}$  volumes at a 50:1 ratio of effector to target cells. The plates were incubated at 25°C or 10°C. After 4 h, radioactivity of supernatants was measured using an automated gamma-counter (Shimazu Raw-300). Radioactivities of supernatants of target cells without effector cells and of target cells destroyed by a detergent (10% 7X, ICN Biomedicals) served as spontaneous and maximum release controls, respectively.

Each value of the  $^{51}\text{Cr}$  release was a mean from triplicate wells and cytotoxicity percentage was calculated as follows:

$$\text{Cytotoxicity \%} = \frac{(\text{Test release}) - (\text{Spontaneous release})}{(\text{Maximum release}) - (\text{Spontaneous release})} \times 100$$

The Welch *t*-test was employed for analysing the data for differences of cytotoxicity between 25°C and 10°C assays.

The effector cells were stained with Giemsa and the proportion of leukocyte populations in effector cells was determined by examining a total of 1000 cells in each specimen at  $\times 1000$  magnification.

## 3. Results

Cytotoxicity of effector cells from carp kept at 25°C showed higher activity of  $59.1 \pm 13.4\%$  (mean  $\pm$  s.d.) at 25°C assay temperature and lower activity of  $28.3 \pm 9.7\%$

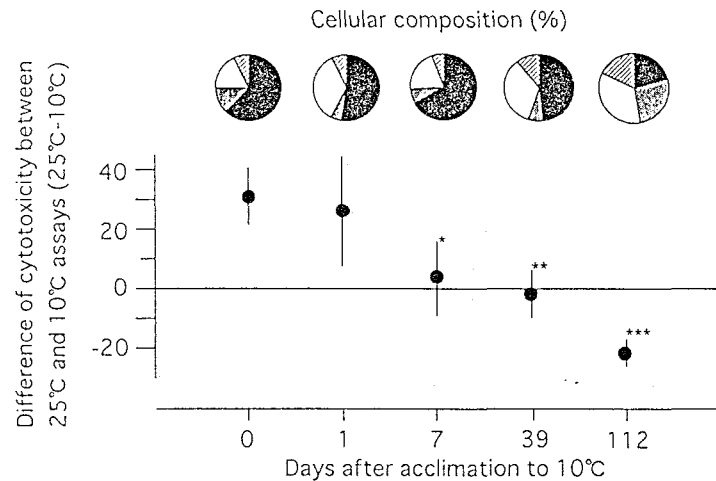


Fig. 1. Cellular composition (upper panel) and difference in cytotoxicity between 25°C and 10°C assay (lower panel) of effector cells of carp acclimated from 25°C to 10°C. These data were from 4 fish. Cellular composition: ■ small lymphocyte; □ large lymphocyte; ▨ granulocyte; ▩ macrophage. Differences in cytotoxicity: mean  $\pm$  s.d. calculated from the difference between 25°C and 10°C assays in individuals. Significantly different from day 0 after acclimation to 10°C: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

when assayed at 10°C. Effector cells from carp at lower environmental temperature (10°C) lysed the target cells during assay at 10°C stronger, as the fish were kept longer at 10°C. The cytotoxicity in fish acclimated to 10°C for 1 day did not differ when assayed at either 25°C or 10°C from that of fish reared at 25°C. The level of cytotoxicity using the 10°C assay achieved the same as the 25°C assay after 7 days of acclimation and was higher than that of the 25°C assay after 112 days. The activities of effector cells assayed at 25°C and 10°C after 112 days of acclimation were  $22.4 \pm 25.5$  and  $45.2 \pm 25.0\%$ , respectively, and was the converse to those from fish kept at 25°C. The differences of cytotoxicity in assays performed at 25°C and 10°C indicate that natural killer activity of carp accommodated to 10°C (Fig. 1).

The proportion of leukocytes in effector cell populations changed as fish were acclimated to the lower environmental temperature (10°C) (Fig. 1). Large lymphocytes, granulocytes and macrophages increased and small lymphocytes decreased in proportion, compared with the population of effector cells from carp held at the higher temperature (25°C).

#### 4. Discussion

In general, it is known that low temperature is suppressive to various immune responses in fish (Avtalion, 1981). However, in carp, natural killer activity was not suppressed but accommodated a lower environmental temperature. The natural killer activity adjusted to function better at 10°C as carp acclimated to 10°C. The proportion of leukocytes in effector cells changed as fish were kept longer at 10°C. At least two kinds of morphologically identified cells in carp leukocyte populations have cytotoxicity against K562 target cells (data not shown). These results suggest that accommodation of carp natural killer-like cells to environmental temperatures is regulated by changes in the composition of effector cells.

The system of carp natural killer activity is specific to poikilothermic animals and the defense mechanism may be important as an alternative function to other immune responses that are suppressed by low temperature.

## References

- Avtalion, R.R., 1981. Environmental control of the immune response in fish. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 11: 163.
- Clem, L.W., Faulmann, E., Miller, N.W., Ellsaesser, C., Lobb, C.J. and Cuchens, M.A., 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of in vitro and in vivo temperatures on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 8: 313.
- Hildemann, W.H., 1957. Scale homotransplantation in goldfish (*Carassus iusauratus*). *Ann. New York Acad. Sci.*, 64: 775.
- MacArthur, J.I. and Fletcher, T.C., 1985. Phagocytosis in fish. In: M.J. Manning and M.F. Tatner (Editors), *Fish Immunology*, Academic Press, London, pp. 29–46.
- Miller, N.W. and Clem, L.W., 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish in vitro antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. *J. Immunol.*, 133: 2356.
- Verlhac, V., Sage, M. and Deschaux, P., 1990. Cytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*) leucocytes induced against TNP-modified autologous spleen cells and influence of acclimatization temperature. *Dev. Comp. Immunol.*, 14: 475.

## 第2節 細胞傷害能を有するヨイ好中球の環境温度への順応性

## 要約

細胞傷害能を有するコイ好中球の環境温度への順応性について調べた。25°Cで30日間飼育されたコイ頭腎から比重分離により得られた好中球の細胞傷害活性は、25°Cの傷害試験で示された活性値が10°Cの傷害試験で示された活性値より高い値を示した。また、標的細胞結合率も同様な傾向であった。25°C飼育コイの好中球の細胞傷害能および標的細胞結合能は飼育温度である25°C下でより機能を発揮した。25°Cで飼育されたコイを10°Cに馴致し、その後の細胞傷害活性および結合率を調べた。10°C馴致4日後では、好中球の傷害能および結合能は25°Cで長期間飼育されたコイと類似の傾向を示したものの、10°Cへの馴致期間が長くなるに従い、好中球の傷害能および結合能は飼育温度である10°C下でより機能するようになった。好中球の傷害能の10°Cへの順応性は順応指標により評価された。10°Cに順応したコイを再び25°Cに馴致することによって、これらの機能は25°C下でより発揮するようになり、温度順応性は可逆的であった。頭腎白血球における好中球の占める割合もまた、10°Cへの馴致によって変動した。10°Cの馴致期間が長くなるに従い、好中球の比率は上昇し、25°Cの再馴致によって、好中球の比率は低下した。低温下の魚で、細胞傷害能や標的細胞結合能を低温に順応させることができる好中球の比率が上昇したことは、低温に対する魚類の生体防御反応の一つと思われた。

## 序論

魚類は変温動物であるために、その生理機能は環境温度と密接に関係している。免疫系も例外でなく、これまで、生息温度域内における低水温域では、魚類の免疫能は抑制されることが示されてきた(Bly & Clem, 1992)。中でも抗体産生能に及ぼす低水温の影響に関する研究は多く(Avtalion, 1981)、10°Cという低水温下では、コイの抗体産生能は顕著に抑制されることが知られている(Avtalion, 1969; Rijkers *et al.*, 1980)。低温による抗体産生能の抑制は、ヘルパーT細胞の機能低下が原因であると考えられている(Miller & Clem, 1984)。ヘルパーT細胞以外に、細胞傷害性T細胞の傷害能も低温下では抑制されることが知られている(Verlhac *et al.*, 1990)。また、T細胞はマクロファージ活性化因子(MAF)を産生すると考えられており(Graham & Secombes, 1990)、この産生能も低温下で抑制される(Hardie *et al.*, 1994)。このように、魚類では主にT細胞が温度に感受性を示し(Clem *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 1986)、T細胞を中心とする免疫系は低温下では抑制されることが示されている。一方、最近の研究は、好中球の貪食および殺菌能(Collazos *et al.*, 1994)、マクロファージのMAF感受性(Hardie *et al.*, 1994)、そしてナチュラルキラー様細胞による細胞傷害能(Kurata *et al.*, 1995a)が環境温度に順応することを明らかにしている。これらのことは、低温下の魚類生体防御における非特異免疫機構の重要性を示すものである。非特異免疫機構の一端を担う好中球は、初期防御の第一線で活躍する防御細胞として重要である(Suzuki & Iida, 1992)。好中球が貪食能だけでなく細胞傷害能も有することがコイにおいて明らかになった(Kurata *et al.*, 1995b)。この興味深い事実から、好中球の生体防御における役割を今後さらに重要視する必要がある。本研究は、細胞傷害能を持つコイ好中球の環境温度への対応について検討するために、25°C(コイの抗体産生における最適温度; Avtalion, 1981)および10°C(コイの抗体産生を抑制する温度; Avtalion, 1981)の2つの温度を設け、飼育温度、飼育期間および細胞機能試験温度の3つの要因



を組み合わせた実験を行った。

## 材料および方法

### 供試魚

魚体重100-300gのコイを本実験に使用した。実験魚は40l水槽に収容し、水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、流水式で1ヶ月間予備飼育した。低水温の影響を調べるために、実験魚は新しい水槽に移し、約12時間かけて $10^\circ\text{C}$ に馴致した。馴致4日、14日、28日、48日および77日後に実験魚を取り上げ、各実験に供試した。また、 $10^\circ\text{C}$ で50日間飼育した実験魚を約12時間かけて $25^\circ\text{C}$ に馴致し、馴致7日および14日後に各試験を行い回復状況を調べた。各試験には4尾ずつを供試した。飼育期間中、実験魚には市販の飼料を1日2回飽食量与えた。

### 細胞培養

細胞培養には10%牛胎児血清(FBS: Commonwealth Serum Laboratories、 $56^\circ\text{C}$ 、30分間熱非働化済み)、1.4 mM炭酸水素ナトリウム、4mM L-グルタミン、100単位/mlペニシリンおよび $100 \mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地(ニッスイ)を使用した。細胞洗浄には、以上の培地組成からFBSを除いたものを使用した。

### 好中球の分離

好中球はPercoll(Pharmacia, Sweden)を用いた不連続密度勾配遠心分離法により、頭腎から既報に従い分離した(Kurata *et al.*, 1995b)。無菌的に摘出した頭腎をステンレスメッシュ(150メッシュ)を用いて濾過し、細胞浮遊液とした。細胞浮遊液を、比重1.065、1.075( $25^\circ\text{C}$ 飼育コイは1.08)および1.09の3層よりなる不連続密度勾配上に重層し、 $350 \times \text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、20分間の遠心分離を行った。遠心分離により好中球は比重1.075-

1.09分画(25°C飼育コイは1.08-1.09分画)に集積した。分離された好中球は供試魚の飼育温度で約12時間前培養を行った。試験に用いた好中球は生残率95%以上であった(トリパンプルーを用いた色素排除試験により)。

### 細胞傷害試験

標的細胞にはK562細胞(human chronic myelogenous leukemia cells)を用いた。細胞傷害試験は<sup>51</sup>Cr遊離法により行った。K562細胞のアイソトープ標識は1.2MBqのNa<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>(NEN)を用いて、37°C、1.5時間の条件で行った。その後、標識細胞の細胞洗浄を3回行い、2×10<sup>5</sup>cells/mlの濃度に標識細胞を調製した。96-well丸底マイクロプレートを用い、1wellに対して標識細胞浮遊液100 μl(2×10<sup>4</sup>cells)を入れ、エフェクター細胞(好中球分画)と標的細胞の比率が10:1になるように、2×10<sup>6</sup>cells/mlの濃度に調製されたエフェクター細胞浮遊液100 μl(2×10<sup>5</sup>cells)を加えた。マイクロプレートは、25°Cまたは10°Cで2時間インキュベートした。インキュベート後、自動上清採取システム(Skatron)にて上清を回収し、γカウンター(Cobura II: Packard Instrument Co., Inc.)で上清の遊離放射能を測定した(試験遊離値)。エフェクター細胞の代わりに培地を加えた区の上清の遊離放射能を自然遊離値、洗剤(10% 7X, ICN Biomedicals)を加え強制的に標的細胞を溶解した区を最大遊離値として、細胞傷害活性値(%)を以下の計算式により求めた。

$$\text{細胞傷害活性値(\%)} = \frac{\text{試験遊離値} - \text{自然遊離値}}{\text{最大遊離値} - \text{自然遊離値}} \times 100$$

設定水温への細胞傷害活性の順応性を評価するために、順応指標(accommodation index; AI)を用いた。順応指標値は以下の式により導いた。

順応指標値(AI) =

$$\frac{25^{\circ}\text{Cの傷害試験で得られる活性値} - 10^{\circ}\text{Cの傷害試験で得られる活性値}}{25^{\circ}\text{Cの傷害試験で得られる活性値}}$$

順応指標値が小さくなればなるほど(マイナス方向に進むほど)、細胞傷害活性は10°Cに順応したものと評価した。

#### 標的細胞結合試験

標的細胞にK562細胞を使用した。エフェクター細胞( $2 \times 10^5$  cells)とK562細胞( $2 \times 10^5$  cells)を200  $\mu$ lの培地中で混合し、25°Cまたは10°Cで1時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を穏やかに攪拌し、塗抹標本を作製した。標本の染色にはギムザ染色を用いた。結合率は観察した総好中球数(300細胞以上観察)の内、K562細胞に結合している好中球数の割合で求めた。

#### 頭腎白血球の観察

各実験魚の頭腎細胞について塗抹標本を作製した。標本の染色にはズダンブラックB染色およびギムザ染色を用いた。頭腎白血球をリンパ球、好中球、好塩基球およびマクロファージに分類し、頭腎における各血球の比率を算出した。

### 結果

#### 温度に対する細胞傷害活性の対応

25°Cおよび10°C馴致後のコイより分離された好中球の細胞傷害活性を表1に示す。

25℃で30日間飼育されたコイの好中球は、25℃および10℃下の細胞傷害試験において異なる活性値を示した。2つの温度下での傷害試験で得られた活性値を比較すると、25℃の傷害試験で得られた活性値は10℃の傷害試験で得られた活性値よりも高値を示した。また、この傾向は10℃馴致4日後のコイの好中球でも認められた。10℃馴致14日および28日後のコイの好中球は、25℃および10℃の傷害試験においてほぼ同レベルの活性値を示した。10℃馴致48日および77日後のコイの好中球は、25℃飼育コイで見られた傾向とは反対に、10℃の傷害試験で得られた活性値が25℃で得られた活性値よりも高値を示した。10℃で48日間飼育後、25℃に馴致し、その7日後のコイの好中球は、25℃の傷害試験で得られた活性値が10℃の傷害試験で得られた活性値よりも高値を示し、25℃で30日間飼育したものと同様な傾向であった。また、25℃馴致14日後も同様の傾向であった。

順応指標値はコイの10℃への馴致期間が長くなるに従いマイナス方向に移行したが、10℃馴致したコイを再度25℃に馴致すると順応指標は比較的速やかにプラス方向に転じた(図1)。

#### 温度に対する標的細胞結合能の対応

25℃および10℃馴致後のコイより分離された好中球の標的細胞結合率を表2に示す。25℃で30日間飼育されたコイの好中球は、10℃の結合試験と比較して25℃の結合試験でK562細胞に対して高い結合率を示した。10℃馴致4日後のコイの好中球は25℃飼育コイと同様な傾向を示したが、10℃への馴致期間が14日以上のコイの好中球は、25℃の結合試験と比較して10℃の結合試験で高い結合率を示した。10℃で48日間飼育後、25℃に馴致し、その7日後のコイの好中球は、25℃の結合試験で得られた結合率が10℃の結合試験で得られた結合率よりも高値を示し、25℃で30日間飼育したものと同様な傾向であった。また、25℃馴致14日後も同様の傾向であった。

## 飼育温度による頭腎白血球の構成比の変化

25°Cおよび10°C馴致後のコイ頭腎におけるタイプ別白血球構成比を表3に示す。25°C馴致30日後のコイの頭腎中に見られる各血球の比率は、リンパ球が約60%を占め最も多く、次いで好中球が約30%を占めていた。10°C馴致14日および28日後でも、この傾向は認められた。10°C馴致48日後および77日後には、リンパ球よりも好中球の比率が増え、頭腎中に存在する好中球の比率は50%以上に達した。10°Cで48日間飼育後、25°Cに馴致し、その7日後のコイ頭腎には、10°Cで48日間以上飼育されたコイと同様、好中球が50%以上の比率で存在した。また、25°C馴致14日後のコイ頭腎では、好中球比率の低下傾向が認められ、馴致63日後(2尾)には、好中球比率が37.5%となった。

## 考察

コイ好中球の持つ特徴的な機能である細胞傷害能に注目して行った本実験結果は、その機能が環境温度に順応することを明らかにした。この順応性の特徴は飼育水温下でより機能を発揮するようになる点にあり(25°Cまたは10°Cで飼育されたコイの好中球がその飼育温度下の傷害試験でより高い活性値を示す)、このことを評価するために用いられた順応指標により、この特徴は明確に示された。25°Cで30日間飼育されたコイ好中球の順応指標はプラス値であり、このことは飼育温度である25°C下でより機能を発揮していることを示す。10°C馴致4日後のコイ好中球は、25°C飼育コイと同様に順応指標はプラス値であるが、その値は25°C飼育コイに比べ低くなり、10°Cへの順応が始まっていることを示している。10°Cへの馴致が14日を経過すると、順応指標は0付近になり、10°Cの傷害試験で得られる活性値は25°Cのものと同等の活性値を示すようになる。さらに、馴致期間を延ばすことで順応指標はマイナス値になり、飼育温度下でより機能を発揮するようになることがわかった。また、10°C(48

日間飼育)から25°Cに移行して飼育したコイ好中球の順応指標はプラス値を示すようになり、この温度順応性は可逆的であることも確認された。コイ科魚類である *Tinca tinca* の顆粒球のスーパーオキシドラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )産生能およびアメリカナマズ好中球の過酸化水素( $H_2O_2$ )産生能は低温に順応することが知られている(Collazos *et al.*, 1994; Dexiang & Ainsworth, 1991)。コイ好中球は、 $H_2O_2$ を産生することにより標的細胞を傷害することが示されており(Kurata *et al.*, 1995b)、今後、コイ好中球による傷害能の温度に対する順応における $H_2O_2$ 産生能の関与を明らかにする必要がある。

細胞傷害性細胞による標的細胞への結合は細胞傷害過程における初期の反応として重要である(Herberman *et al.*, 1986)。コイ好中球による標的細胞傷害の際、標的細胞への結合は必須であることが示されている(Kurata *et al.*, 1995b)。本実験において、この結合能も温度に順応することが明らかになった。25°Cで30日間飼育されたコイの好中球は、10°Cの試験下では25°Cの試験下のものと比べて結合率は低かったが、10°C馴致14日以降から好中球の結合率は25°Cの試験と比べて、飼育温度である10°Cの試験下でより高い値を示した。また、10°C(48日間飼育)から25°Cに移行して飼育したコイ好中球の結合率は、25°Cの試験下でより高い値を示し、細胞傷害能と同様の傾向が認められた。この結合能の順応は傷害能の順応と類似の動態を示したことから、好中球による標的細胞傷害の温度への順応において、結合能の順応も重要な要因であると考えられる。

コイの頭腎中に存在する好中球の比率は10°Cへの馴致によって上昇し、再び25°Cで飼育することで低下した。また、この比率の変動は一過性のものではなく長期的に認められた。環境温度の変化による頭腎中の白血球構成細胞の比率の変動はアメリカナマズにおいても認められ、低温(10°C)に馴致したアメリカナマズ頭腎の白血球構成細胞の比率は、TおよびBリンパ球は低下し、好中球が上昇する傾向を認めている(Ainsworth *et al.*, 1991a)。この比率の変化の傾向は、本実験の結果と一致している。どのようなメカニズムで白血球構成細胞の比率が変化するのは不明であるが、あ

る種ストレスを受けた魚においても類似の変化は認められている(Ellsaesser & Clem, 1986; Bly *et al.*, 1990)。この原因として血中コルチゾル濃度の上昇が挙げられている(Ainsworth *et al.*, 1991b)。温度変化や取り扱いによるストレスは血中コルチゾル濃度を上昇させることが知られており(Barton & Peter, 1982)、本実験のコイはこれらのストレスによって、好中球比率の変動が引き起こされている可能性がある。しかしながら、本実験結果はストレスにより誘導される比率の変動とは異なる2つの特徴的な変化を示した。1)本実験による好中球比率の変化は長期的に観察された。2)高温(25°C)から低温(10°C)にまたは低温から高温に馴致した魚で異なる好中球比率の変化を示した(25→10°C馴致コイは好中球比率上昇、10→25°C馴致コイは好中球比率低下)。ストレスによる白血球構成細胞比率の変動は、短期的に見られ、かつ好中球比率の上昇という特徴を持つ。本研究結果で示した特徴はこの点でストレス反応とは大きく異なる。従って、本研究における好中球の比率の変動は、単なるストレス反応(ストレス→コルチゾル上昇→好中球比率上昇)によって引き起こされたものではなく、環境温度に対する魚の対応機構を示すものと考えている。今後、温度による好中球比率の変化がどのような機構で誘導されるかを解明する必要がある。

T細胞を中心とした特異免疫機構が低温下で抑制される中で、温度への順応性を有する好中球の存在は、変温動物である魚類にとって非常に重要である。また、低温下のコイの頭腎において好中球比率が上昇したことは、低温に対する魚類の生体防御機構を考える上で興味深い事実である。頭腎白血球の総数を算出することは、頭腎が独立した器官でない等の理由から不可能である。しかしながら、25°C馴致コイと10°C馴致コイの間で、各魚の頭腎のサイズに大きな差異がないことを観察経験的に認めており、各馴致コイ間の頭腎白血球に大きな変動はないものと考えている。従って、温度変化に伴い白血球の比率変動が認められた本実験結果から、魚は生息する環境温度下でより機能する細胞を優位に存在させるような生体防御機能を保有しているのではないかと推察した。

## 引用文献

- Ainsworth, A. J., Dexiang, C. Waterstrat, P. R. & Greenway, T. (1991a). Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)- I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10°C. *Comparative Biochemistry and Physiology* **100A**, 907-912.
- Ainsworth, A. J., Dexiang, C. & Waterstrat, P. R. (1991b). Changes in peripheral blood leukocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* **3**, 41-47.
- Avtalion, R. R. (1969). Temperature effect on antibody production and immunological memory, in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). *Immunology* **17**, 927-931.
- Avtalion, R. R. (1981). Environmental control of the immune response in fish. *CRC Critical Reviews in Environmental Control* **11**, 163-188.
- Barton, B. A. & Peter, R. E. (1982). Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock. *Journal of Fish Biology* **20**, 39-51.
- Bly, J. E., Miller, N. W. & Clem, L. W. (1990). A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Developmental and Comparative Immunology* **14**, 211-221.
- Clem, L. M., Faulmann, E., Miller, N. W., Ellsaesser, C., Lobb, C. J. & Cuchens, M. A. (1984). Temperature-mediated processes in teleost immunity: Differential effects of *in vitro* and *in vivo* temperatures on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology* **8**, 313-322.



- Collazos, M. E., Ortega, E. & Barriga, C. (1994). Effect of temperature on the immune system of a cyprinid fish (*Tinca tinca*, L). Blood phagocyte function at low temperature. *Fish and Shellfish Immunology* **4**, 231-238.
- Dexiang, C. & Ainsworth, A. J. (1991). Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)- II. Adaptation of anterior kidney phagocytes to 10°C. *Comparative Biochemistry and Physiology* **100A**, 913-918.
- Ellsaesser, C. F. & Clem, L. W. (1986). Hematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *Journal of Fish Biology* **28**, 511-521.
- Hardie, L. J., Fletcher, T. C. & Secombes, C. J. (1994). Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Developmental and Comparative Immunology* **18**, 57-66.
- Herberman, R. B., Reynolds, C. W. & Ortaldo, J. R. (1986). Mechanism of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Annual Review of Immunology* **4**, 651-680.
- Kurata, O., Okamoto, N., Suzumura, E., Sano, N. & Ikeda, Y. (1995a). Accomodation of carp natural killer-like cells environmental temperatures. *Aquaculture* **129**, 421-424.
- Kurata, O., Okamoto, N. & Ikeda, Y. (1995b). Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*, possess a spontaneous cytotoxic activity. *Developmental and Comparative Immunology* **19**, 315-325.

- Miller, N. W. & Clem, L. W. (1984). Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. *The Journal of Immunology* **133**, 2356-2359.
- Miller, N. W., Deuter, A. & Clem, L. W. (1986). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for the mixed leucocyte reaction with channel catfish. *Immunology* **59**, 123-128.
- Rijkers, G. T., Frederix-Wolters, E. M. H. & Van Muiswinkel, W. B. (1980). The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology* **41**, 91-97.
- Suzuki, Y. & Iida, T. (1992). Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annual Review of Fish Diseases* **2**, 149-160.
- Verlhac, V., Sage, M. & Deschaux, P. (1990). Cytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*) leucocytes induced against TNP-modified autologous spleen cells and influence of acclimatization temperature. *Developmental and Comparative Immunology* **14**, 475-480.

表1. 25℃飼育コイの10℃馴致後および10℃馴致コイの  
25℃再馴致後の細胞傷害活性値\*

飼育温度	飼育期間	傷害試験温度	
		25℃	10℃
25℃	30日	55.1±5.2	16.2±13.3**
10℃	4日	78.2±1.2	53.7±8.8
	14日	60.8±24.3	60.8±12.7
	28日	32.5±40.1	31.5±21.8
	48日	14.6±21.2	33.7±16.2
	77日	19.7±20.7	59.2±9.5**
25℃	7日	58.2±36.0	1.0±0.5**
	14日	81.7±5.0	25.6±23.1**

\*値は4尾の細胞傷害活性値 (%) の平均値±標準偏差で表わされている。

\*\*25℃試験の活性値と比較して有意な差がある (Student's t-test,  $p < 0.05$ )。

→ は、この日に10℃馴致コイを25℃に再馴致したことを示す。

表2. 25℃飼育コイの10℃馴致後および10℃馴致コイの  
25℃再馴致後の標的細胞結合率\*

飼育温度	飼育期間	結合試験温度	
		25℃	10℃
25℃	30日	13.8±2.3	5.6±0.9
10℃	4日	10.4±3.5	6.7±1.9
	14日	11.9±3.1	14.1±2.3
	28日	5.9±2.9	7.7±3.7
	48日	8.1±6.7	20.5±11.1
25℃	7日	10.8±3.7	1.8±1.2
	14日	10.2±4.6	8.6±5.2

\*値は4尾の標的細胞結合率 (%) の平均値±標準偏差で表わされている。

→ は、この日に10℃馴致コイを25℃に再馴致したことを示す。

表3. 25℃飼育コイの10℃馴致後および10℃馴致コイの25℃再馴致後の  
頭腎白血球の構成細胞比\*

飼育温度	飼育期間	白血球構成細胞比 (%)			
		リンパ球	好中球	好塩基球	マクロファージ
25℃	30日	63.8±4.0	30.8±5.0	2.6±2.2	3.3±1.7
10℃	14日	60.0±16.5	28.7±9.6	5.0±3.5	6.3±4.5
	28日	65.3±3.0	28.3±2.1	3.3±1.2	3.0±1.7
	48日	30.5±8.3	55.8±7.4**	3.5±2.6	10.3±4.3
	77日	46.2±12.9	50.4±12.0**	2.5±2.2	0.9±0.2
25℃	7日	36.8±9.0	53.8±9.0**	4.5±2.6	5.0±3.6
	14日	45.3±17.0	43.3±20.1	5.5±3.3	6.0±1.4
	63日	58.5	37.5	3.0	1.0

\*値は4尾の結果の平均値±標準偏差で表わされている。ただし、25℃再馴致63日後は2尾の平均値である。

\*\*25℃飼育30日後の好中球比率と比較して有意な差がある(Student's t-test,  $p < 0.05$ )。

→ は、この日に10℃馴致コイを25℃に再馴致したことを示す。

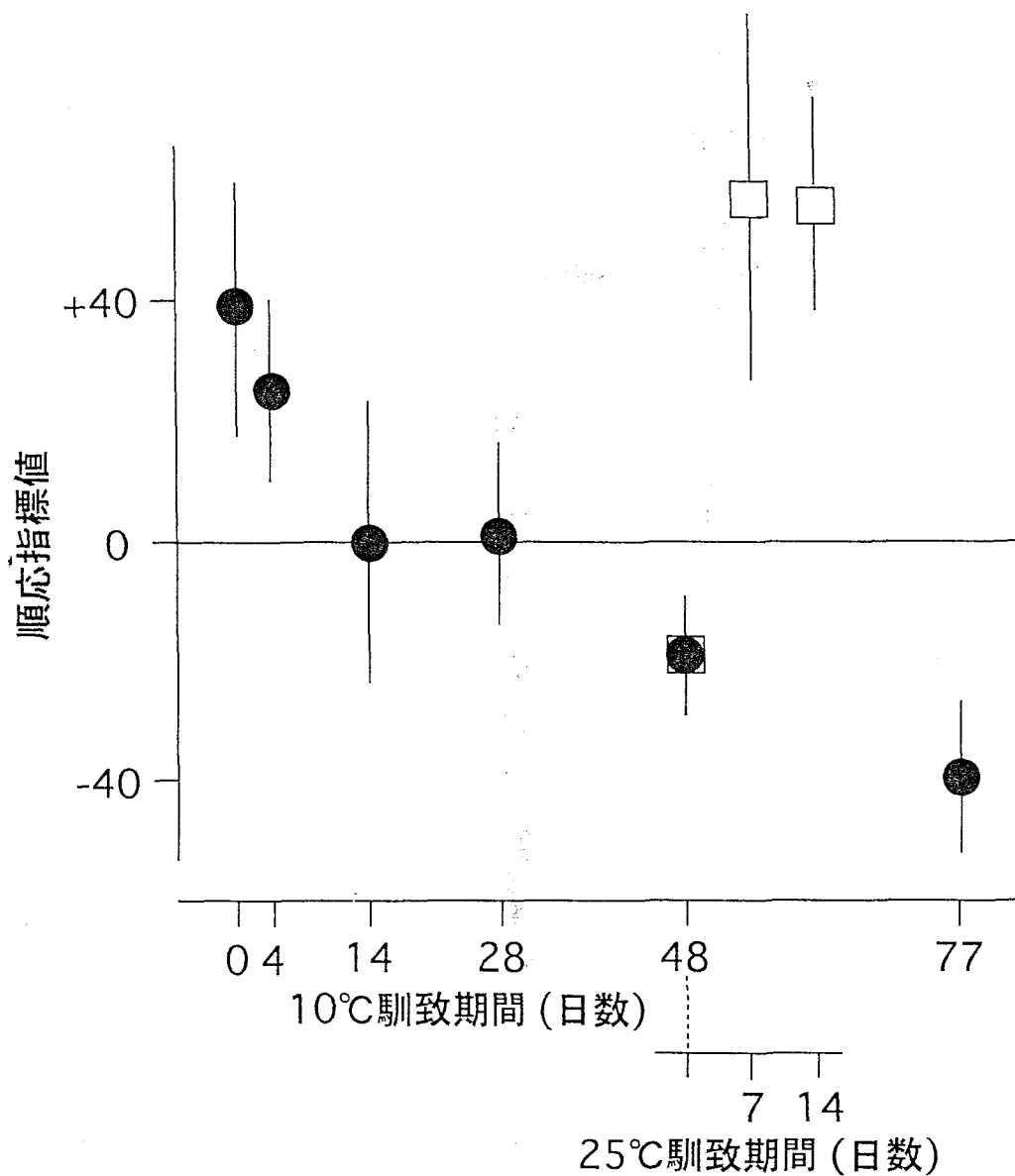


図1. 25°C飼育コイの10°C馴致後(●)および10°C馴致コイの25°C再馴致後(□)の好中球の細胞傷害能の順応指標値。結果は4尾の細胞傷害活性値から得られた順応指標値の平均±標準偏差で示されている。0日の結果は30日間、25°Cで飼育されたコイのものである。

### 第3章 モノクローナル抗体を用いたコイ好中球の解析

#### 第1節 コイ腹腔内浸潤好中球に特異的に発現する抗原を 認識するモノクローナル抗体

#### 第2節 モノクローナル抗体によって誘導されるコイ好中球の 細胞傷害能の活性化

第1節 コイ腹腔内浸潤好中球に特異的に発現する抗原を  
認識するモノクローナル抗体



## 要約

コイ好中球に対するモノクローナル抗体(mAb)を作製した。4つのmAb (50H10, 61C5, 57F5, 81F11)が樹立された。酵素抗体法(EIA)を施した標本の光学顕微鏡による観察から、mAb 50H10は好中球以外の白血球にも交差反応を示したが、mAb 61C5および57F5は好中球に特異的に反応することを認めた。mAb 81F11を除く3つのmAbは、フローサイトメーター(FCM)により、細胞表面上の抗原に反応することが示された。頭腎、末梢血および腹腔内浸潤好中球に対する各mAbの反応性はFCMおよびEIAによる光学顕微鏡観察によって調べられた。FCM分析により、mAb 61C5および57F5が認識する細胞表面上の各抗原は腹腔内浸潤好中球において発現レベルが増していることが確認された。EIAによる光学顕微鏡観察は、mAb 81F11が腹腔内浸潤好中球の細胞内抗原に特異的に反応することを認めた。腹腔内浸潤好中球において、発現レベルの増す細胞表面上の抗原や新たに発現してくる細胞内抗原は、好中球の機能発現に関与する分子であることを示唆している。

## 序論

現在、モノクローナル抗体(mAb)は、1)細胞の分類、2)分化発生、3)機能および4)生体内動態などの、様々な研究目的に対して有効な道具となっている。魚類分野においても、アメリカナマズ、コイおよびニジマス等の白血球または免疫グロブリンに対するmAbが作製され、mAbを利用した研究報告は多数認められるようになった(Secombes *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 1987; Van-Diepen *et al.*, 1991; Koumans-van Diepen *et al.*, 1994a, 1995a, 1995b; Slierendrecht *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1995)。mAbの利用は、1) ストレスによって特異的に誘導される好中球群の存在(Bly *et al.*, 1990)、2) 抗体産生細胞の発生(Koumans-van Dippen *et al.*, 1994b)、3) nonspecific cytotoxic cellの細胞表面レセプターの存在(Evans *et al.*, 1988)、4) 腸管付属リンパ組織における免疫細胞の分布(Rombout *et al.*, 1993)など、様々な研究において成果を挙げている。本研究ではコイ好中球に対するmAbの樹立を試みた。コイ好中球は、初期防御の第一線で活躍する防御細胞であり(Suzuki and Iida, 1992)、従来知られていた貪食能(Ainsworth, 1992)に加えて、細胞傷害能を有することが最近の研究で明らかになっている(Kurata *et al.*, 1995)。しかし現在までのところ、コイ好中球に特異的に反応するmAbを作製し、それを利用した研究報告は見当たらない。多様な機能を有するコイ好中球の生体防御における役割は大変興味深く、mAbの作製はコイ好中球の機能および生体内動態をより深く理解するために必須である。本研究では、腹腔内浸潤好中球と頭腎および末梢血好中球との比較から、浸潤好中球において発現レベルが増す抗原を認識するmAbの作製を試みた。

## 材料および方法

### 供試魚

魚体重100-300gのコイを本実験に使用した。実験魚は40l水槽に收容し、水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、流水式で飼育した。飼育期間中、実験魚には市販の飼料を1日2回、飽食量与えた。

### 細胞の分離

好中球の分離はPercoll(Pharmacia, Sweden)を用いた不連続密度勾配遠心分離法により、頭腎および末梢血から概法に従い分離した(Kurata *et al.*, 1995)。頭腎は無菌的に摘出され、ステンレスメッシュ(150メッシュ)を用いて1.4mM炭酸水素ナトリウム、4mM L-グルタミン、100単位/mlペニシリンおよび100  $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地(ニッスイ)中で濾過し、細胞浮遊液を作製した。尾部血管よりヘパリン処理されたシリンジを用いて末梢血を採取した。採取された血液を遠心分離し(800 $\times$ g、4 $^\circ\text{C}$ 、5分間)、白血球層を回収した。頭腎および末梢血より採取した白血球を、比重1.065、1.08および1.09の3層よりなる不連続密度勾配上に重層し、350 $\times$ g、4 $^\circ\text{C}$ 、20分間の遠心分離を行った。遠心分離により好中球は比重1.08-1.09分画に集積した。浸潤好中球を得るために、1%酵母エキス、0.8%NaClを含むアガロース(0.8%)約1 mlを腹腔内に注入した。注入に用いたアガロースは、煮沸し液状化したものを室温に静置し、シリンジから放出されると共に固形化する状態のものを使用した。注入約24時間後に腹腔内で固形化したアガロースを取り出し、ステンレスメッシュを用いてアガロース内に浸潤している細胞をHanks balanced salt solution に遊離させた。浸潤細胞には多数の好中球が含まれていることをズダンブラックB染色により確認した(図1)。

## モノクローナル抗体の作製

7周齢の雌のBALB/c系マウスに、比重遠心分離により頭腎から採取した好中球(比重1.08-1.09分画細胞)約 $2 \times 10^7$ 細胞を、3週間おきに計3回腹腔内接種することで免疫した。最終免疫は細胞融合の3日前に行った。免疫されたマウスより脾臓を摘出し、ステンレスメッシュを用いて細胞浮遊液とした(約 $10^8$ 細胞数)。細胞融合は、調製した脾細胞とP3X63-Ag8-U1(P3U1)マウスミエローマ細胞株を5:1(脾細胞:P3U1細胞株)の割合で混合し、ポリエチレングリコール1,540(Wako Pure Chemical Industries, LTD)によって行った。細胞融合後、ハイブリドーマを約 $7 \times 10^5$  cells/mlに調製し、先にフィーダー細胞(4周齢のddY系マウス由来の胸腺細胞)を蒔いた( $5 \times 10^5$  cells/well) 96well平底マイクロプレートに、 $100 \mu\text{l}$ ずつ分注した。培養液(HAT-GIT)には、 $1 \times 10^{-4}$  Mヒポキサンチン(H)、 $4 \times 10^{-7}$  Mアミノプテリン(A)および $1.6 \times 10^{-5}$  Mチミジン(T)を含むGIT培地(Wako Pure Chemical Industries, LTD)を用いた。ハイブリドーマ培養上清のスクリーニングは酵素抗体法およびフローサイトメーターを用いて行った。顆粒球陽性抗体を産生するハイブリドーマのクローニングは限界希釈法により2回行った。クローニングにはフィーダー細胞を用い(上記同様)、培養液にはHT-GIT( $1 \times 10^{-4}$  Mヒポキサンチンおよび $1.6 \times 10^{-5}$  Mチミジンを含むGIT培地)を使用した。作製したモノクローナル抗体のクラスおよびサブクラスの決定にはマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット(Amersham)を使用した。

## 光学顕微鏡観察のための酵素抗体法

頭腎細胞、末梢血および腹腔内浸潤細胞について、遠心法浮遊細胞収集装置(SC-2: Tomy Seiko Co., LTD.)を用い塗抹標本作製した。標本は10%ホルマリンを含むメタノールで固定した。本試験の反応は、アビジン・ビオチンシステム(ABC法)により行った。固定された細胞標本は、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)および0.1%NaN<sub>3</sub>を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS-BSA)でブロッキング(室温、10分間)を行った後、ハ

イブリードマ培養上清と1時間、室温、湿潤中で反応させた。反応後、標本をPBSで3回洗浄した。引き続き、PBS-BSAで100倍希釈された抗マウスIgGビオチン標識抗体(ヤギ由来、Bio Source International, Inc.-Tago Products)と1時間、室温、湿潤中で反応させた。反応後、標本をPBSで3回洗浄した。免疫細胞染色はABC-アルカリフォスファターゼ染色キット(Vector Lab. Inc.)により行った。後染色にギムザ染色を施した。細胞標本は光学顕微鏡下で観察し、好中球と好塩基球を区別した。なお、好塩基球の分類はSuzuki(1986)に従った。本研究では、細胞内顆粒が好酸性を呈するような好酸球を観察することはできなかった。

#### フローサイトメーター(FCM)による分析

頭腎および末梢血から比重遠心分離により採取した好中球(比重1.08-1.09分画細胞)、および腹腔内浸潤細胞を本試験に使用した。細胞( $1 \times 10^6$  cells)をハイブリードマ培養上清(mAb 50H10は300倍希釈、他は無希釈)と氷上で1時間反応させた。反応後、PBS-BSAで2回細胞洗浄( $800 \times g$ 、5分間、 $4^\circ\text{C}$ )を行った。洗浄された細胞は、PBS-BSAで100倍希釈された抗マウスIgG FITC標識抗体(ヤギ由来、Bio Source International, Inc. Tago Products)と氷上で1時間反応させた。反応後、細胞洗浄を行い、細胞濃度を約 $2 \times 10^6$  cells/mlにPBS-BSAで調製した。FCM(EPICS XL: Coulter Co.)は、細胞に反応した抗体の標識FITCの蛍光強度を調べるために使用された。波長488nm、出力15mWの空冷アルゴンレーザーを使用し、試料の流速は中速条件で行った。前方散乱光(FS)および側方散乱光(SSLog)による分析で示される顆粒球分画(Verburg-van Kemenade *et al.*, 1994)(図2)の細胞( $10^4$ 細胞数)を対象にし、データを得た。

## 結果

### モノクローナル抗体(mAb)

4種のmAb(50H10, 61C5, 57F5, 81F11)を樹立した(表1)。サブクラスは、mAb 50H10がIgG3、mAb 61C5、mAb 57F5およびmAb 81F11がIgG1であった。白血球に対する凝集能はmAb 50H10のみで認められ、その凝集力価は2段階希釈試験法で256倍であった。FCM分析の際の細胞凝集を防ぐため、抗体(mAb 50H10)は300倍に希釈後、使用した。

### 酵素抗体法を用いた光学顕微鏡による観察

mAb 50H10は、頭腎、末梢血および腹腔内浸潤細胞いずれにおいても、各種白血球(好中球、リンパ球、マクロファージおよび好塩基球)に反応性を示した(図3)。mAb 61C5およびmAb 57F5は、頭腎、末梢血および腹腔内浸潤細胞いずれにおいても、好中球にのみ反応性を示し、他の白血球との交差性は認められなかった(図4, 5)。mAb 81F11は、頭腎および末梢血の白血球に対しては反応性を示さないが、腹腔内浸潤細胞における好中球にのみ反応性を示し、他の白血球との交差性は認められなかった(図6)。6尾のコイについてそれぞれ検査したが、いずれも同様の結果を示した。

### FCMによる分析

本試験に用いた細胞は、頭腎および末梢血では比重分離された好中球であり、また腹腔内浸潤顆粒球の約77%が好中球であることから、FCMによる分析結果は好中球の特徴を示す。mAb 50H10、61C5および57F5陽性細胞はFCMの分析により検出された。mAb 50H10陽性好中球における蛍光強度は、頭腎好中球、末梢血好中球および腹腔内浸潤好中球に対して同様の値を示した(図7)。mAb 61C5陽性好中球における

蛍光強度は、頭腎好中球および末梢血好中球では同様の値を示したが、腹腔内浸潤好中球の蛍光強度ヒストグラムのピークは頭腎および末梢血好中球に比べて強蛍光側に移行した(図8)。mAb 57F5陽性好中球における蛍光強度は、mAb 61C5の結果と同様に腹腔内浸潤好中球の蛍光強度ヒストグラムのピークは頭腎および末梢血好中球に比べて強蛍光側に移行した(図9)。mAb 57F5陽性腹腔内浸潤好中球の蛍光強度は、mAb 61C5陽性腹腔内浸潤好中球のものより強蛍光側であった。mAb 81F11は、頭腎、末梢血および腹腔内浸潤好中球のいずれに対しても反応性を示さなかった。3尾のコイについてそれぞれ検査したが、いずれも同様の結果を示した。

## 考察

細菌感染などで起こる炎症に対して、好中球はマクロファージに先だって炎症局所に浸潤し、侵入異物の排除にあたることが知られている(Suzuki and Iida, 1992)。この過程は、頭腎中に貯蔵されていた好中球が、炎症による刺激によって血液中に放出され、炎症局所に遊走するものと考えられている(Suzuki and Iida, 1992)。炎症局所で見られる好中球は、活動的な(working)状態であるものと推察され、このことは浸潤好中球のグリコーゲン含量が高いことから指摘される(Park and Wakabayashi, 1990)。本研究は、頭腎、末梢血および腹腔内浸潤の各所における好中球の抗原性を調べ、特にアガロースの注入によって誘導された活動的な状態であると思われる浸潤好中球に特異的な抗原性の変化を認めた。

本研究で好中球に対する4つのmAb抗体が樹立された。mAb 50H10、61C5および57F5は、FCMの分析により陽性細胞が検出されたことから、細胞表面上の抗原を認識する抗体として特定された。mAb 50H10はリンパ球ならびに好中球以外の顆粒球である好塩基球にも反応性を示した。この反応性は、頭腎、末梢血および腹腔内浸

潤細胞のいずれにおいても認められた。FCMの分析において、mAb 50H10陽性細胞の蛍光強度は、頭腎、末梢血および腹腔内浸潤好中球のいずれも同様な値を示した。このことは、mAb 50H10が認識する細胞表面上の抗原の発現レベルに各所における好中球間で差がないことを示している。mAb 61C5および57F5は、頭腎、末梢血および腹腔内浸潤好中球に反応し、他の白血球との交差性は認められなかった。mAb 61C5および57F5を用いたFCM分析の結果は、腹腔内浸潤好中球の蛍光強度ヒストグラムのピークが頭腎および末梢血のものと比較して強蛍光側に移行していることを示した。このような変化は、同様に細胞表面抗原を認識するmAb 50H10を用いた場合は認められなかった。このことは、mAb 61C5および57F5によって特異的に認識される好中球の細胞表面上に存在する抗原の発現レベルが、腹腔内浸潤好中球において上昇していることを表している。つまり、この2つの抗体は好中球が活動状態になることによって発現が増す細胞表面上の抗原を特異的に認識しているものと思われる。細胞表面上に存在する抗原の多くは、抗原レセプター、サイトカインレセプターおよび接着因子等、その細胞の機能に関連したものである(Horejsi, 1991)。これらの因子は、細胞の活動状況に応じて、細胞表面上の発現レベルを変えることが知られている(Imhof and Dunon, 1995)。mAb 61C5および57F5が認識するコイ好中球の細胞表面上の抗原は活動状態にある好中球において発現レベルを増すものであり、好中球の重要な機能因子である可能性が示唆される。今後、mAb 61C5および57F5が認識するそれぞれの細胞表面抗原の機能的側面を明らかにする必要がある。mAb 81F11を用いたFCM分析の結果、頭腎、末梢血および腹腔内浸潤顆粒球において陽性細胞は認められず、mAb 81F11が認識する抗原は細胞表面上に存在しないことが示された。しかし、酵素抗体法を施した細胞の光学顕微鏡観察において、腹腔内浸潤好中球にのみ反応することが認められた。このことは、mAb 81F11は好中球の細胞内抗原を認識していることを示し、好中球の中でも腹腔内に浸潤した活動的な好中球にのみ反応するという特異性を持つことを表している。この点は、mAb 61C5およ



び57F5が示す特徴とは異なっている。活動状態の好中球でのみ発現が認められることから、この抗原もまた好中球に特異的に備わっている機能因子であると思われる。

活動状態にある好中球(腹腔内浸潤好中球)と常備されている好中球(頭腎および末梢血好中球)を比較し、その差異を把握することで、好中球の機能発現に関与する因子の研究を展開することができる。本研究により樹立されたmAb 61C5、57F5および81F11は、好中球の活動時における特異的な抗原の変化を認識するため、今後の好中球の機能および機能因子の研究において有効な道具となるであろう。また、活動状態にある好中球に特異的に反応するmAb 81F11は、免疫組織学的手法を用いた活性化好中球の生体内における動態を調べる目的においても有効である。

#### 引用文献

- Ainsworth, A. J. 1992. Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **2**: 123-148.
- Bly, J.E., Miller, N.W. and Clem, L.W. 1990. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, **14**: 211-221.
- Evans, D.L., Jaso-Friedmann, L., Smith, E.E., St. John, A., Koren, H.S. and Harris, D.T. 1988. Identification of a putative antigen receptor on fish nonspecific cytotoxic cells with monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **141**: 324-332.
- Horejsi, V. 1991. Surface antigens of human leucocytes. *Adv. Immunol.*, **49**: 75-147.
- Imhof, B.A. and Dunon, D. 1995. Leukocyte migration and adhesion. *Adv. Immunol.*, **58**: 345-416.

- Kurata, O., Okamoto, N. and Ikeda, Y. 1995. Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*, possess a spontaneous cytotoxic activity. *Dev. Comp. Immunol.*, **19**: 315-325.
- Koumans-van Diepen, J.C.E., Van de Lisdonk, M.H.M., Taverne-Thiele, A.J., Verburg-van Kemenade, B.M.L. and Rombout, J.H.W.M. 1994a. Characterisation of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, **18**: 45-56.
- Koumans-van Diepen, J.C.E., Taverne-Thiele, J.J., Van Rens, B.T.T.M. and Rombout, J.H.W.M. 1994b. Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.); an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.*, **4**: 19-28.
- Koumans-van Diepen, J.C.E., Egberts, E., Peixoto, B.R., Taverne, N. and Rombout, J.H.W.M. 1995a. B cell and immunoglobulin heterogeneity in carp (*Cyprinus carpio* L.); an immuno(cyto)chemical study. *Dev. Comp. Immunol.*, **19**: 97-108.
- Miller, N.W., Bly, J.E., Van Ginkel, F., Ellsaesser, C.F. and Clem, L.W. 1987. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: Identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.*, **11**: 739-747.
- Park, S.-W. and Wakabayashi, H. 1990. Effect of Irritants on the glycogen content of neutrophils in eel, *Anguilla japonica*. *Fish Pathol.* (in Japanese, with English abstract), **25**: 231-236.
- Rombout, J.H.W.M., Taverne-Thiele, A.J. and Villena, M.I. 1993. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): An immunocytochemical analysis. *Dev. Comp. Immunol.*, **17**: 55-66.

- Secombes, C.J., Van Groningen, J.J.M. and Egberts, E. 1983. Separation of lymphocyte subpopulations in carp *Cyprinus carpio* L. by monoclonal antibodies: immunohistochemical studies. *Immunology*, **48**: 165-175.
- Slierendrecht, W.J., Lorenzen, N., Glamann, J., Koch, C. and Rombout, J.H.W.M. 1995. Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **46**: 349-360.
- Suzuki, Y. 1986. Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**: 1895-1899.
- Suzuki, Y. and Iida, T. 1992. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **2**: 149-160.
- Van-Diepen, J.C.E., Wagenaarand, G.T.M. and Rombout, J.H.W.M. 1991. Immunocytochemical detection of membrane antigens of carp leucocytes using light and electron microscopy. *Fish Shellfish Immunol.*, **1**: 47-57.
- Verburg-van Kemenade, B.M.L., Groeneveld, A., Van Rens, B.T.T.M. and Rombout, J.H.W.M. 1994. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). *J. Exp. Biol.*, **187**: 143-158.
- Yoshida, S.H., Stuge, T.B., Miller, N.W. and Clem, L.W. 1995. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: Cytotoxic activity of channel catfish peripheral blood leukocytes directed against allogeneic targets. *Dev. Comp. Immunol.*, **19**: 71-77.

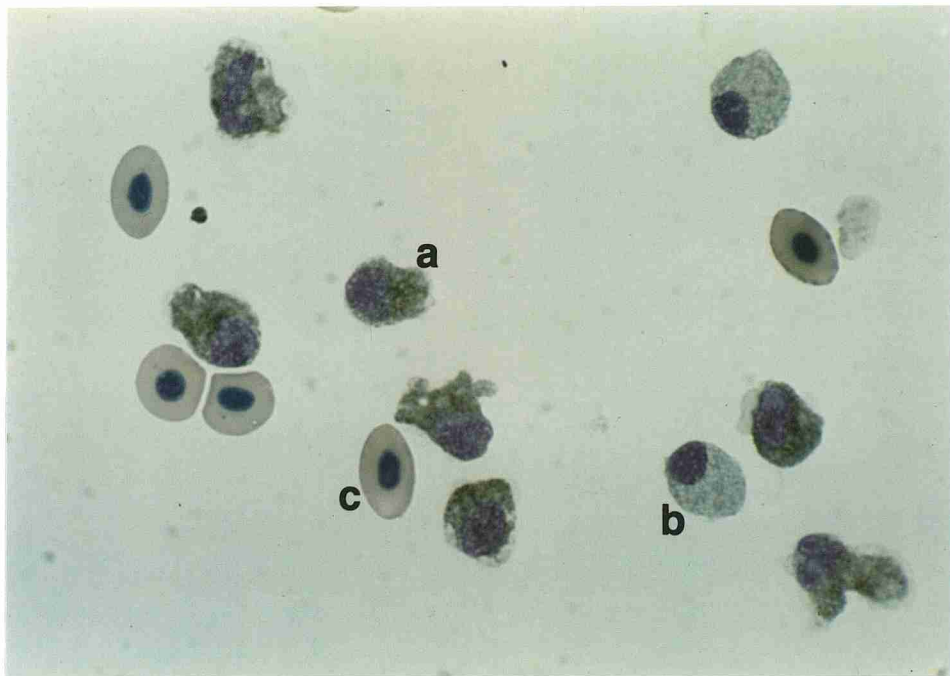


図1. 腹腔内浸潤細胞のズダンブラックB染色像。腹腔内浸潤細胞は、0.8%アガロース(1%酵母エキス、0.8%NaCl)を腹腔内に注入し、約24時間後に回収された。ズダンブラックB陽性細胞(好中球)は腹腔内浸潤細胞の70%以上を占めた。a; 好中球、b; 好塩基球、c; 赤血球。

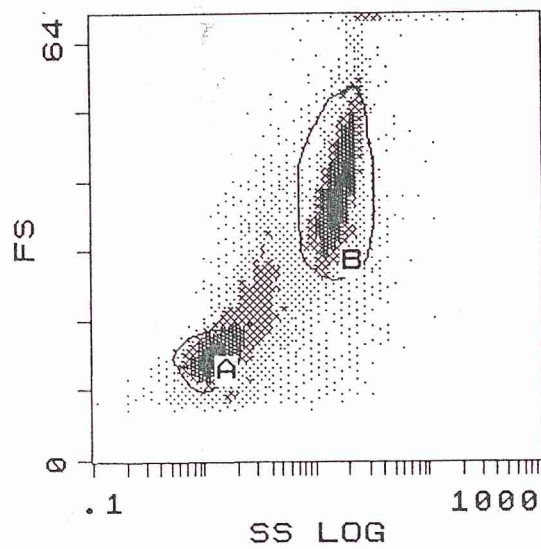
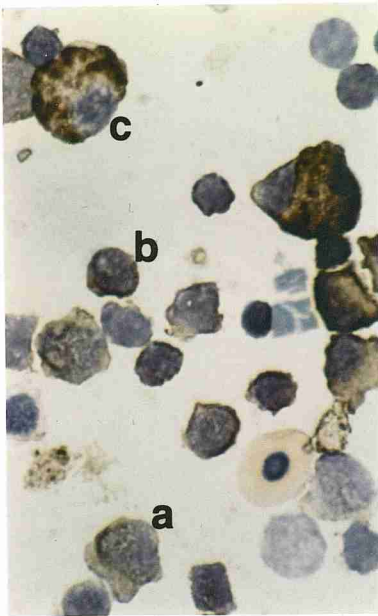
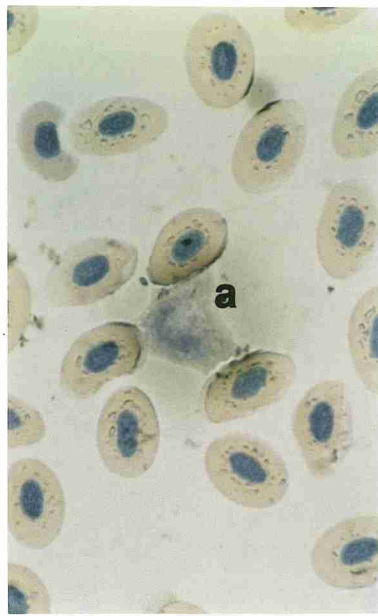


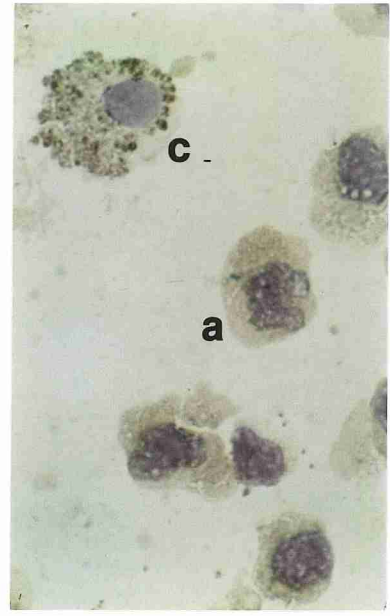
図2. フローサイトメーターを用いた、コイ頭腎白血球の前方(FS)および側方(SS LOG)散乱光による解析。Aの領域にはリンパ球が、Bの領域には顆粒球が分布する。



頭腎細胞



末梢血細胞

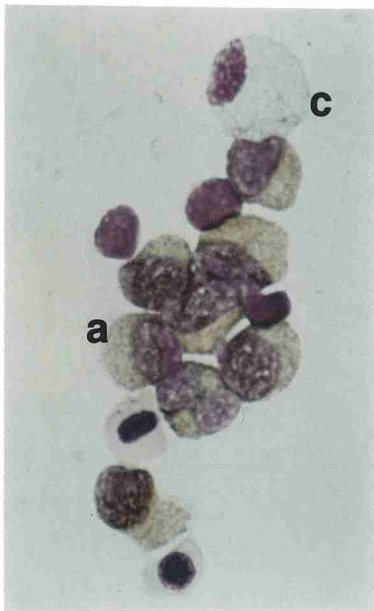


腹腔内浸潤細胞

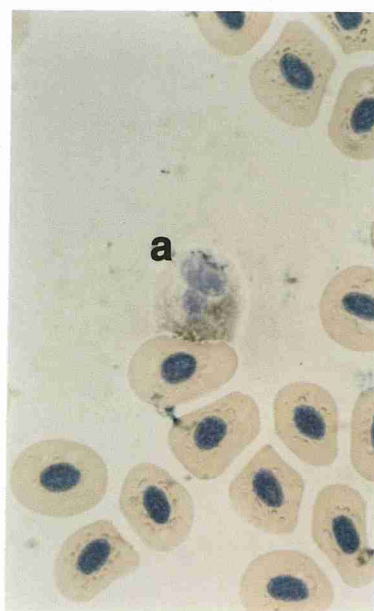
図3. モノクローナル抗体 50H10 による免疫細胞染色像。

抗体が反応した細胞は褐色に染色されている。

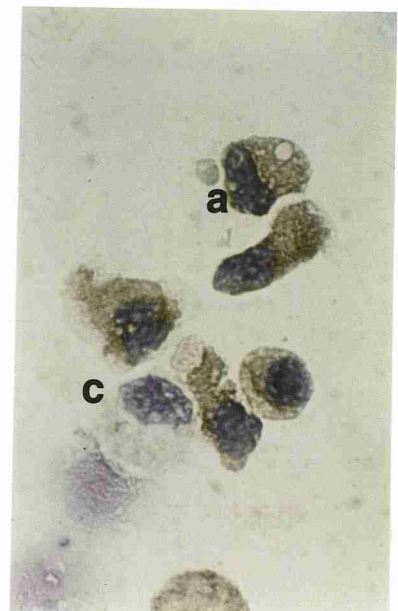
a; 好中球、b; リンパ球、c; 好塩基球。



頭腎細胞



末梢血細胞

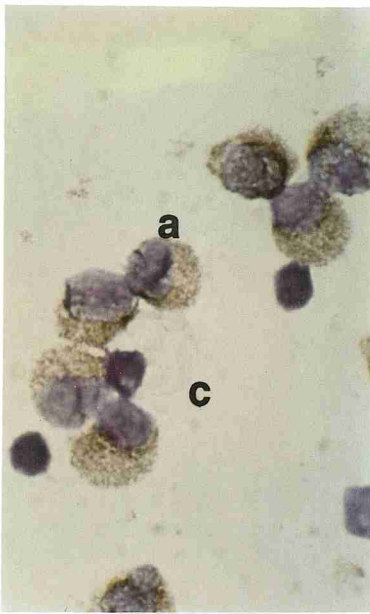


腹腔内浸潤細胞

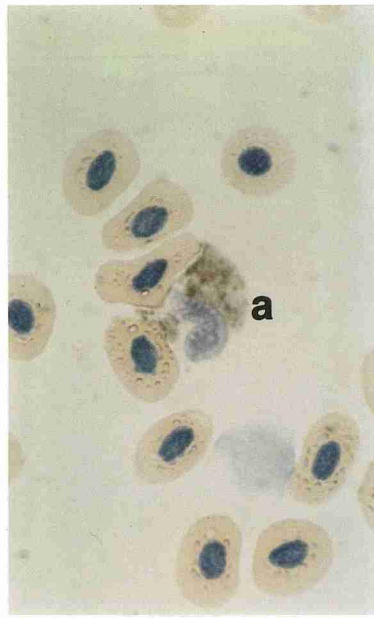
図4. モノクローナル抗体 61C5 による免疫細胞染色像。

抗体が反応した細胞は褐色に染色されている。

a; 好中球、c; 好塩基球。



頭腎細胞



末梢血細胞



腹腔内浸潤細胞

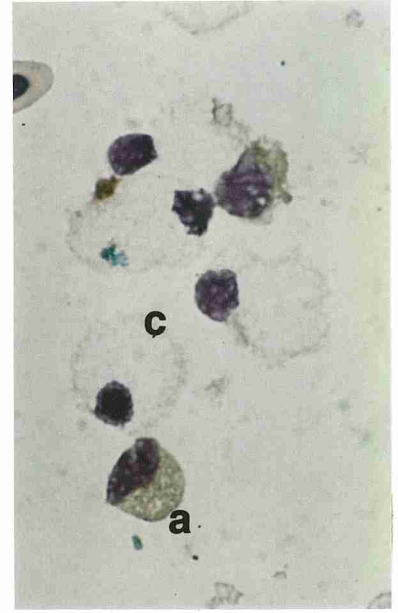
図5. モノクローナル抗体 57F5 による免疫細胞染色像。  
抗体が反応した細胞は褐色に染色されている。  
a; 好中球、c; 好塩基球。



頭腎細胞

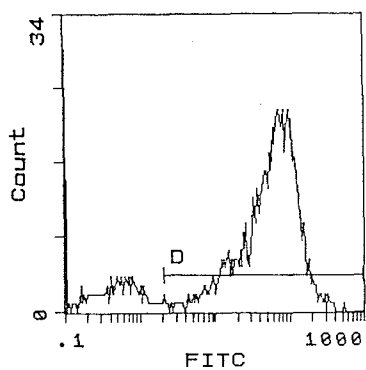


末梢血細胞

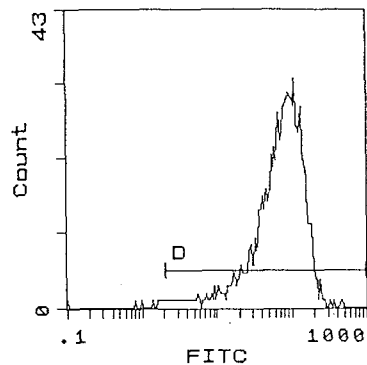


腹腔内浸潤細胞

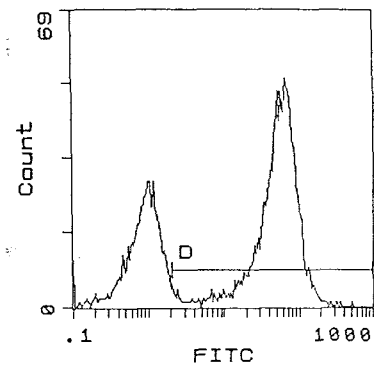
図6. モノクローナル抗体 81F11 による免疫細胞染色像。  
抗体が反応した細胞は褐色に染色されている。  
a; 好中球、b; リンパ球、c; 好塩基球。



頭腎好中球

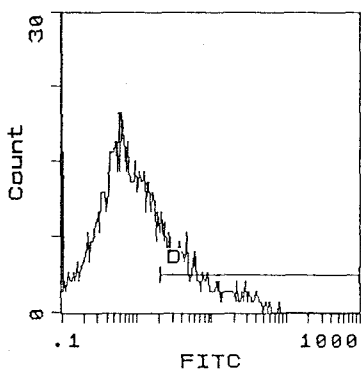


末梢血好中球

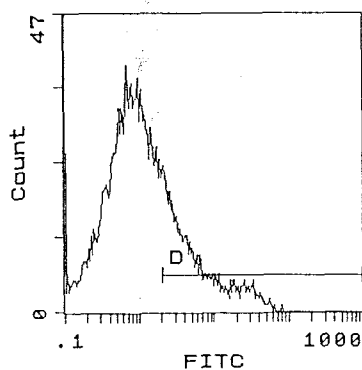


腹腔内浸潤好中球

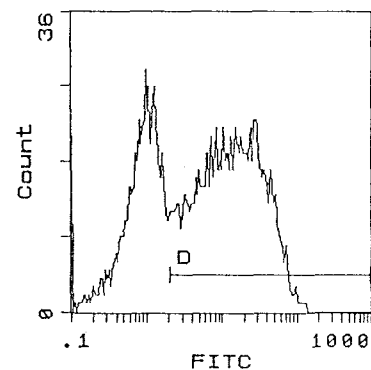
図7. モノクローナル抗体 50H10 を用いたフローサイトメーターによる解析。図のx軸(FITC)は蛍光強度を対数で表わしている。y軸(count)は細胞数を表わしている。図中のD領域は陽性細胞の分布域を示す(D領域外は陰性細胞の分布域である)。



頭腎好中球

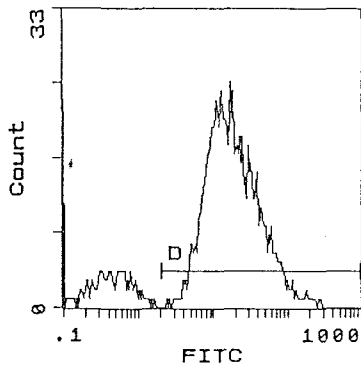


末梢血好中球

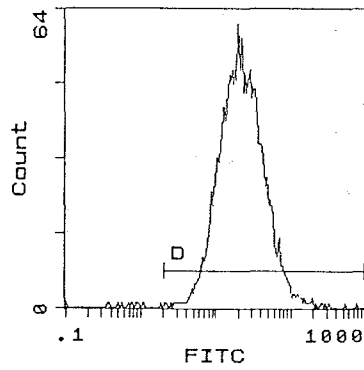


腹腔内浸潤好中球

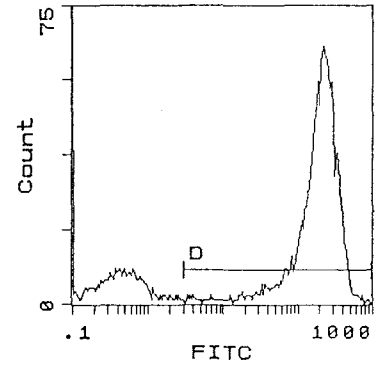
図8. モノクローナル抗体 61C5 を用いたフローサイトメーターによる解析。図のx軸(FITC)は蛍光強度を対数で表わしている。y軸(count)は細胞数を表わしている。図中のD領域は陽性細胞の分布域を示す(D領域外は陰性細胞の分布域である)。



頭腎好中球



末梢血好中球



腹腔内浸潤好中球

図9. モノクローナル抗体 57F5 を用いたフローサイトメーターによる解析。図のx軸(FITC)は蛍光強度を対数で表わしている。y軸(count)は細胞数を表わしている。図中のD領域は陽性細胞の分布域を示す(D領域外は陰性細胞の分布域である)。



第2節 モノクローナル抗体によって誘導される  
コイ好中球の細胞傷害能の活性化

## 要約

コイ好中球の細胞表面抗原を認識するモノクローナル抗体(mAb)61C5および57F5は、好中球が有する細胞傷害能の活性化を誘導した。mAb 61C5または57F5で処理された好中球の傷害活性の上昇率は、傷害試験開始1時間後で最も高い値を示し、以後下降した。このことから、この好中球の活性化は標的細胞の認識または傷害因子産生等の反応が鋭敏になることにより起こるものと思われた。mAb処理による好中球の過酸化水素( $H_2O_2$ )産生への影響を調べるために、 $H_2O_2$ の阻害剤であるカタラーゼを用い、それによる阻害効果を検討した。mAb 61C5で処理された好中球の傷害活性は高濃度のカタラーゼ添加によっても著しい阻害が見られないことから、mAb 61C5によって誘導される傷害活性の上昇は、 $H_2O_2$ または他の傷害因子の産生が増大したためと思われた。一方、mAb 57F5で処理された好中球の傷害活性は低濃度のカタラーゼ添加でも阻害が見られたことから、mAb 57F5によって誘導される傷害活性の上昇は、 $H_2O_2$ 等の傷害因子産生増大ではなく、細胞傷害に関わる他機構の機能上昇によるものと思われた。このように、2つのmAbはそれぞれ異なる傷害機構を活性化していることが示唆された。

## 序論

細菌感染などに起因する炎症において、早急に炎症局所に浸潤することができる好中球は、初期防御の第一線で活躍する防御細胞である(Suzuki & Iida, 1992)。好中球の主な機能としては貪食能が知られ、感染細菌や他の寄生体(Ainsworth, 1992)および組織残骸(Iger & Abraham, 1990)などが貪食の対象となっている。また、好中球はT細胞の増殖を促進するインターロイキン-1様の因子を産生し、免疫系の調節にも関与していることが示唆されている(Kemenade & Weyts, 1995)。コイを用いた最近の研究は、好中球が貪食能の他に細胞傷害能を有することを明らかにし、その傷害機構として $H_2O_2$ の産生を挙げている(Kurata *et al.*, 1995)。また、コイ好中球の細胞傷害能は環境温度の変化に順応性を有することも明らかにされている(本論文第2章)。コイに見られるこれらの好中球の能力特性および生体内における役割をより理解するため、好中球に対するモノクローナル抗体(mAb)が作製された(本論文第3章、第1節)。mAb 61C5および57F5が認識するコイ好中球細胞表面上の各抗原は、腹腔内に浸潤した好中球において、その発現レベルを増すことが明らかにされた。このことは、mAb 61C5および57F5が認識する各抗原が好中球の機能に関連した分子である可能性を示唆している。本研究では、好中球の細胞表面上の抗原を認識するmAb 61C5および57F5で処理された好中球の細胞傷害能を観察し、その細胞傷害機構への関与について検討した。

## 材料および方法

### 供試魚

魚体重140-250gのコイを本実験に使用した。実験魚は40l水槽に収容し、水温 $25 \pm 1^\circ C$ 、流水式で飼育した。飼育期間中、実験魚には市販の飼料を1日2回、飽食量

与えた。

### モノクローナル抗体(mAb)

好中球に対するmAb 61C5、57F5および4G1は第3章の方法によって得た (mAb 4G1は本論文第3章、第1節では未記載のmAbである)。各mAbを含むハイブリドーマ培養上清を本試験に使用した。mAb 61C5、57F5および4G1は好中球の細胞表面上の抗原を認識するmAbである。これらのmAbのサブクラスはIgG1である。mAb 61C5および57F5は好中球に対する凝集能は認められないが、mAb 4G1は好中球に対する凝集能を有している (2段階希釈法による試験で、凝集力価は128倍であった)。

### 好中球の分離

好中球の分離はPercoll(Pharmacia, Sweden)を用いた不連続密度勾配遠心分離法により、頭腎から概述の方法に従い分離した(5)。頭腎は無菌的に摘出され、ステンレスメッシュ(150メッシュ)を用いて1.4mM炭酸水素ナトリウム、4mM L-グルタミン、100単位/mlペニシリンおよび100  $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地(ニッスイ)中で濾過し、それを細胞浮遊液とした。RPMI-1640培地を用いて細胞洗浄(800 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、5分間)を2回行った後、細胞浮遊液は、比重1.065、1.08および1.09の3層よりなる不連続密度勾配上に重層され、350 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、20分間の遠心分離を行った。比重1.08-1.09分画に集積した好中球を回収し、細胞洗浄を2回行った。分離された好中球は、10%ウシ胎児血清(FBS: Commonwealth Serum Laboratories)を含むRPMI-1640培地に浮遊され、25 $^{\circ}$ Cで約12時間前培養された。使用直前に、トリパンプルーを用いた色素排除試験により細胞の生存率を求め、95%以上の生存率であることを確認した。

## 好中球のmAb処理

好中球は、RPMI-1640培地(10%FBS)で $6.25 \times 10^5$  cells/mlに調製された。96well丸底マイクロプレート(Corning Labs. Inc.)の各wellに細胞浮遊液 $80 \mu$ l( $5 \times 10^4$  cells)を分注した。終濃度が $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ および $10^{-6}$ となるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)でmAb(ハイブリドーマ培養上清)を希釈し、好中球が分注されたwellにその $20 \mu$ lを加えた。ハイブリドーマの培養(本論文第3章)に用いたHT-GIT( $1 \times 10^{-4}$  Mヒポキサンチン)および $1.6 \times 10^{-4}$  Mチミヂンを含むGIT培地; Wako Pure Chemical Industries, LTD)をPBSでmAbと同様に希釈したものを添加した区を対照として設けた。プレートは $25^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした。

## 細胞傷害試験

標的細胞にはK562細胞(human chronic myelogenous leukemia cells)を用いた。細胞傷害試験は $^{51}\text{Cr}$ 遊離法により行った。K562細胞のアイソトープ標識は $1.2\text{MBq}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (NEN)を用いて、 $37^\circ\text{C}$ 、1.5時間の条件で行った。その後、細胞洗浄を3回行い、RPMI-1640培地(10%FBS)で $2 \times 10^5$  cells/mlの濃度に標識細胞を調製した。先に好中球とmAbを反応させたマイクロプレートのwellに標識細胞浮遊液 $100 \mu$ lを加えた(エフェクター細胞と標的細胞の比率; E:T=2.5:1)。プレートは $25^\circ\text{C}$ でインキュベートした。一定時間後、自動上清採取システム(Skatron)にて上清を回収し、 $\gamma$ カウンター(cobura II; Packard Instrument Co., Inc.)で上清の遊離放射能を測定した(試験遊離値)。エフェクター細胞の代わりに培地を加えた区の上清の遊離放射能を自然遊離値、洗剤(10% 7X, ICN Biomedicals)を加え強制的に標的細胞を溶解した区を最大遊離値として、細胞傷害活性値(%)を以下の計算式により求めた。

$$\text{細胞傷害活性値(\%)} = \frac{\text{試験遊離値} - \text{自然遊離値}}{\text{最大遊離値} - \text{自然遊離値}} \times 100$$

また、mAb処理による細胞傷害活性値への影響は以下の式により導いた。

$$\text{傷害活性値の上昇率(\%)} = \frac{\text{mAb添加好中球の細胞傷害活性値} - \text{PBS添加好中球の細胞傷害活性値}}{\text{PBS添加好中球の細胞傷害活性値}} \times 100$$

mAb処理による好中球のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生への影響を調べるために、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の阻害剤であるカタラーゼ(ウシ肝臓由来; 19,900 U/mg; Sigma Chemical Co.)を試験区に添加し、それによる細胞傷害活性値の変化を確認した。使用したカタラーゼはPBSで融解、希釈した。カタラーゼの代わりにPBSを添加した区を対照として設けた。カタラーゼによる細胞傷害活性の阻害率は以下の式により導いた。

$$\text{傷害活性値の阻害率(\%)} = \frac{\text{PBS添加区の細胞傷害活性値} - \text{カタラーゼ添加区の細胞傷害活性値}}{\text{PBS添加区の細胞傷害活性値}} \times 100$$

なお、本試験に使用したmAbおよびカタラーゼは好中球およびK562細胞を直接傷害することはなかった(data not shown)。

## 酵素抗体法

K562細胞に結合している好中球に対するmAbの反応を調べた。好中球( $1 \times 10^5$  cells)とK562細胞( $1 \times 10^5$  cells)をRPMI-1640培地(10%FBS)200  $\mu$ l中で混合し、25°Cでインキュベートした。1時間後、穏やかに細胞を浮遊させ、遠心法浮遊細胞収集装置(SC-2: Tomy Seiko Co., LTD.)によって塗抹標本を作製した。標本は10%ホルマリンを含むメタノールで固定した。本試験の反応は、アビジン・ビオチンシステム(ABC法)により行った。固定された細胞標本は、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)および0.1%  $\text{NaN}_3$ を含むPBS(PBS-BSA)でブロッキング(室温、10分間)を行った後、mAb(ハイブリドーマ培養上清)と1時間、室温、湿潤中で反応させた。反応後、標本をPBSで3回洗浄した。次に標本は、PBS-BSAで100倍希釈された抗マウスIgGビオチン標識抗体(ヤギ由来、Bio Source International, Inc.-Tago Products)と1時間、室温、湿潤中で反応させた。反応後、標本をPBSで3回洗浄した。免疫細胞染色はABC-アルカリフォスファターゼ染色キット(Vector Lab. Inc.)により行った。後染色にギムザ染色を施した。細胞標本は光学顕微鏡下で観察した。

## 結果

### mAb処理された好中球の細胞傷害活性

mAb 61C5または57F5の添加によって、好中球の細胞傷害活性値は上昇した(図1)。一方、mAb 61C5および57F5と同様に好中球細胞表面抗原に反応するmAb 4G1の添加は、好中球の細胞傷害活性に影響を与えなかった。mAb 61C5または57F5の添加による好中球の傷害活性値の上昇率は、mAb濃度が低下するに従い下降した(図2)。また、mAb 61C5または57F5を添加された好中球の傷害活性値は、K562細胞と混合1時間後で高い上昇率を示し、時間が経過するに従ってその上昇率は下降した(図3)。mAbを添加された好中球の細胞傷害活性のカタラーゼによる影響を図4に示した。mAb

61C5を添加された好中球とmAb 57F5を添加された好中球の間で、カタラーゼの作用は異なった。mAb 61C5を添加された好中球の傷害活性は高濃度のカタラーゼでも維持されるのに対し、mAb 57F5を添加された好中球の傷害活性はmAb 61C5と比較してより低濃度のカタラーゼでも阻害が認められた。

#### K562結合好中球のmAbの反応

K562細胞に結合している好中球にmAb 61C5および57F5は反応した(図5)。mAb 61C5および57F5はK562細胞には反応しなかった。

#### 考察

コイ好中球細胞表面抗原を認識するmAb 61C5または57F5で好中球を処理することによって、好中球が有する細胞傷害能の活性化が認められた。同様に好中球細胞表面抗原を認識するmAb 4G1を用いた試験では、このような傷害能の活性化は認められなかった。従って、mAb 61C5および57F5は好中球が有する細胞傷害能の活性化を特異的に誘導することがわかった。好中球の活性化を誘導した2つのmAbは、K562細胞に結合している好中球に反応し、K562細胞には反応しないことが酵素抗体法を施した細胞の光学顕微鏡観察で確かめられた。また、好中球に反応させたmAb濃度の減少にともない、細胞傷害活性の上昇率は低下し、対照に用いたハイブリドーマ培養液(HT-GIT)では好中球の活性化を誘導しないことから、好中球表面抗原へのmAbの反応が活性化に重要であることが示された。mAb 61C5または57F5と反応させた好中球は、K562細胞との混合1時間後において傷害活性の高い上昇率が認められた。この上昇率は混合培養の時間経過にともない下降した。このことは、mAbで反応させた好中球は、K562細胞との混合早期の段階では傷害活性が高く、対照区に比べ差があるものの、時間経過に従い対照区との差はなくなっていることを示している。



従って、mAbによる好中球の活性化は、好中球が多くの標的細胞を傷害するようになるものではなく、好中球の標的細胞の認識または傷害因子の産生等の反応が鋭敏になるものと考えられる。コイ好中球による標的細胞の傷害はカタラーゼの添加によって著しく阻害されることから、好中球から産生される $H_2O_2$ が傷害因子として示唆されている(Kurata *et al.*, 1995)。mAb 61C5によって活性化された好中球の傷害活性は、 $400 \mu g/200 \mu l$ という高濃度のカタラーゼでも強い阻害は認められず、 $200 \mu g/200 \mu l$ の濃度では全く阻害されなかった。一方、mAb 57F5によって活性化された好中球の傷害活性は、高濃度のカタラーゼで強い阻害が認められ、 $100 \mu g/200 \mu l$ の低濃度においてもなお阻害が認められた。mAb 61C5および57F5によって活性化された好中球は1.5時間および2時間の傷害試験において類似の上昇率を示しているにも関わらず、カタラーゼの傷害活性への影響はmAb 61C5と57F5の間に大きく異なった。これらの結果は、mAb 61C5と57F5による好中球の活性化機構がそれぞれ異なることを示唆している。つまり、カタラーゼによって強い阻害を受けなかったmAb 61C5による好中球の活性化は、 $H_2O_2$ 産生能の上昇、または、現在までの研究では明らかになっていない $H_2O_2$ 以外の新たに活性化された傷害因子によるものと考えられた。一方、低濃度のカタラーゼでも阻害を受けたmAb 57F5による好中球の活性化は、 $H_2O_2$ などの傷害因子に関与するものではなく、その他の、例えば接着因子などの機能活性化によるものと考えられた。アメリカナマズのnonspecific cytotoxic cells (NCC)に関する研究は抗原レセプター(FAM)の存在を明らかにした(Evans *et al.*, 1988)。FAMに対するmAbでNCCを処理することによって、細胞傷害活性の上昇およびFAMの発現の上昇が誘導されることを明らかにしている(Evans *et al.*, 1990)。また、このmAbによる処理は、NCCの細胞質内カルシウムイオンの上昇を引き起こし、FAMがシグナル伝達分子であることを示唆している(Evans *et al.*, 1992)。ヒトのナチュラルキラー細胞による標的細胞の傷害においてもまた、接着因子およびレセプターによるそのリガンドの認識は重要であることが知られている(Moretta *et*

al., 1994)。もし、これらのキラー細胞が有する接着因子またはレセプターの発現レベルが上昇すれば、容易に標的細胞を認識でき、より速やかに標的細胞を傷害できるだろう。mAb 57F5によって処理された好中球は、1時間の試験時間における傷害活性の上昇率がmAb 61C5よりも高いことが本研究によって示された。このことは、mAb 57F5による好中球の活性化は標的分子を認識する接着因子またはレセプターの発現レベルの上昇によることも考えられる。今後、これら2つのmAbが好中球の持つどのような機構を活性化するのか、より深く検討することが重要である。

一般的に、多くの細胞表面抗原はその細胞の機能に関わっていることが知られている(Horejsi, 1991)。mAb 61C5および57F5が認識する細胞表面抗原は、活動状態にあると考えられる腹腔内浸潤好中球の細胞表面上において発現レベルを増すことから、好中球の機能に関連した物質であることが示唆されている(本論文第3章)。本研究において、これらのmAbが好中球の持つ細胞傷害能の活性化を誘導したことから、mAb 61C5およびmAb 57F5が認識する細胞表面抗原が好中球の細胞傷害機構活性化において重要な物質であることが強く示唆された。

## 引用文献

- Ainsworth, A. J. Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**:123-148; 1992.
- Evans, D. L., Jaso-Friedmann, L., Smith, E. E., St. John, A., Koren, H. S. and Harris, D. T. Identification of a putative antigen receptor on fish nonspecific cytotoxic cells with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **141**:324-332; 1988.
- Evans, D. L., Harris, D. T., Staton, D. L. and Jaso-Friedmann, L. Pathways of signal transduction in teleost nonspecific cytotoxic cells. *Dev. Comp. Immunol.* **14**:295-304; 1990.

- Evans, D. L., Harris, D. T. and Jaso-Friedmann, L. Function associated molecules on nonspecific cytotoxic cells: Role in calcium signaling, redirected lysis, and modulation of cytotoxicity. *Dev. Comp. Immunol.* **16**:383-394; 1992.
- Horejsi, V. Surface antigens of human leucocytes. *Adv. Immunol.* **49**:75-147; 1991.
- Iger, Y. and Abraham, M. The process of skin healing in experimentally wounded carp. *J. Fish Biol.* **36**:421-437; 1990.
- Kurata, O., Okamoto, N. and Ikeda, Y. Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*, possess a spontaneous cytotoxic activity. *Dev. Comp. Immunol.* **19**:315-325; 1995.
- Moretta, L., Ciccone, E., Mingari, M. C., Biassoni, R. and Moretta, A. Human natural killer cells: Origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv. Immunol.* **55**:341-380; 1994.
- Suzuki, Y. and Iida, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**:149-160; 1992.
- Verburg-van Kemenade, B. M. L., Weyts, F. A. A., Debets, R. and Flik, G. Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev. Comp. Immunol.* **19**:59-70; 1995.

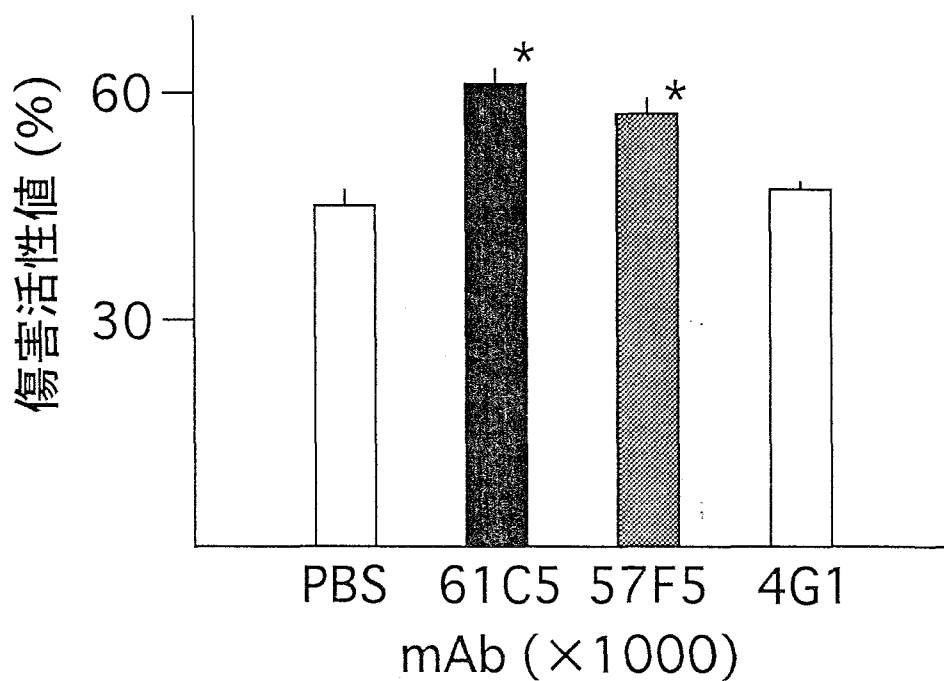


図1. モノクローナル抗体(mAb)処理された好中球の細胞傷害活性値。標的細胞にK562細胞を使用した。細胞傷害試験はE:T=2.5:1、2時間、25℃の条件で行った。結果は1尾について3重試験で得られた細胞傷害活性値の平均±標準偏差で表わされている。\*PBS処理区と比較して有意な差がある(Student's t-test,  $p < 0.01$ )。

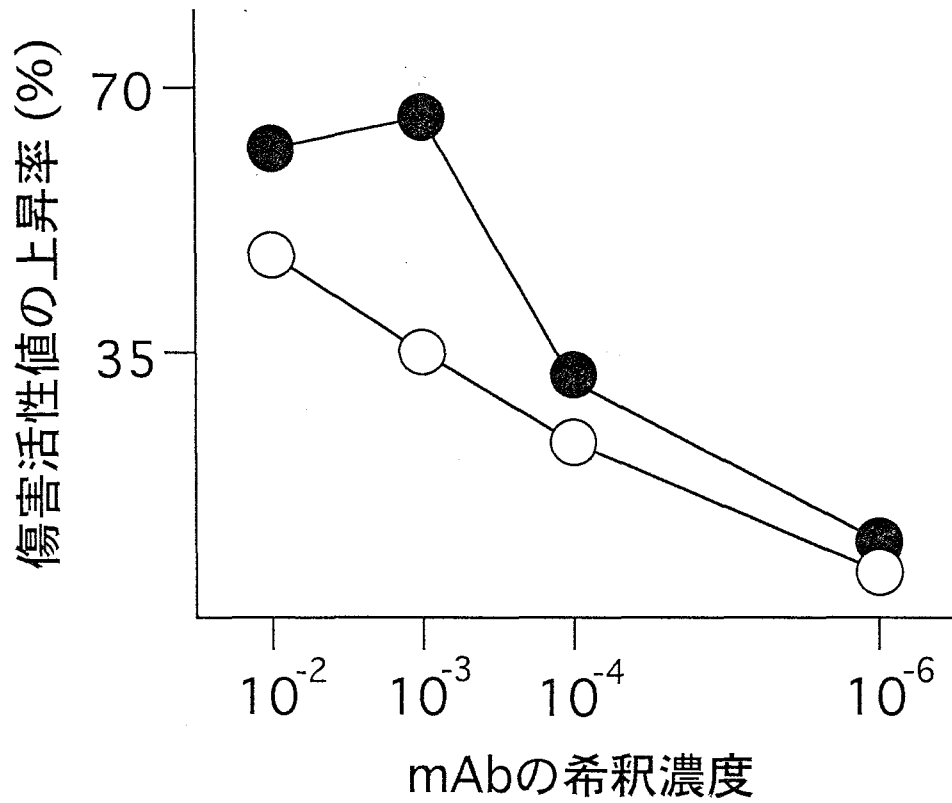


図2. モノクローナル抗体(mAb 61C5; ○、mAb 57F5; ●) 処理好中球の細胞傷害活性値の上昇率。細胞傷害試験は E:T=2.5:1、1.5時間、25℃の条件で行った。結果は1尾について3重試験で得られた細胞傷害活性値から算出された上昇率の平均で表わされている。

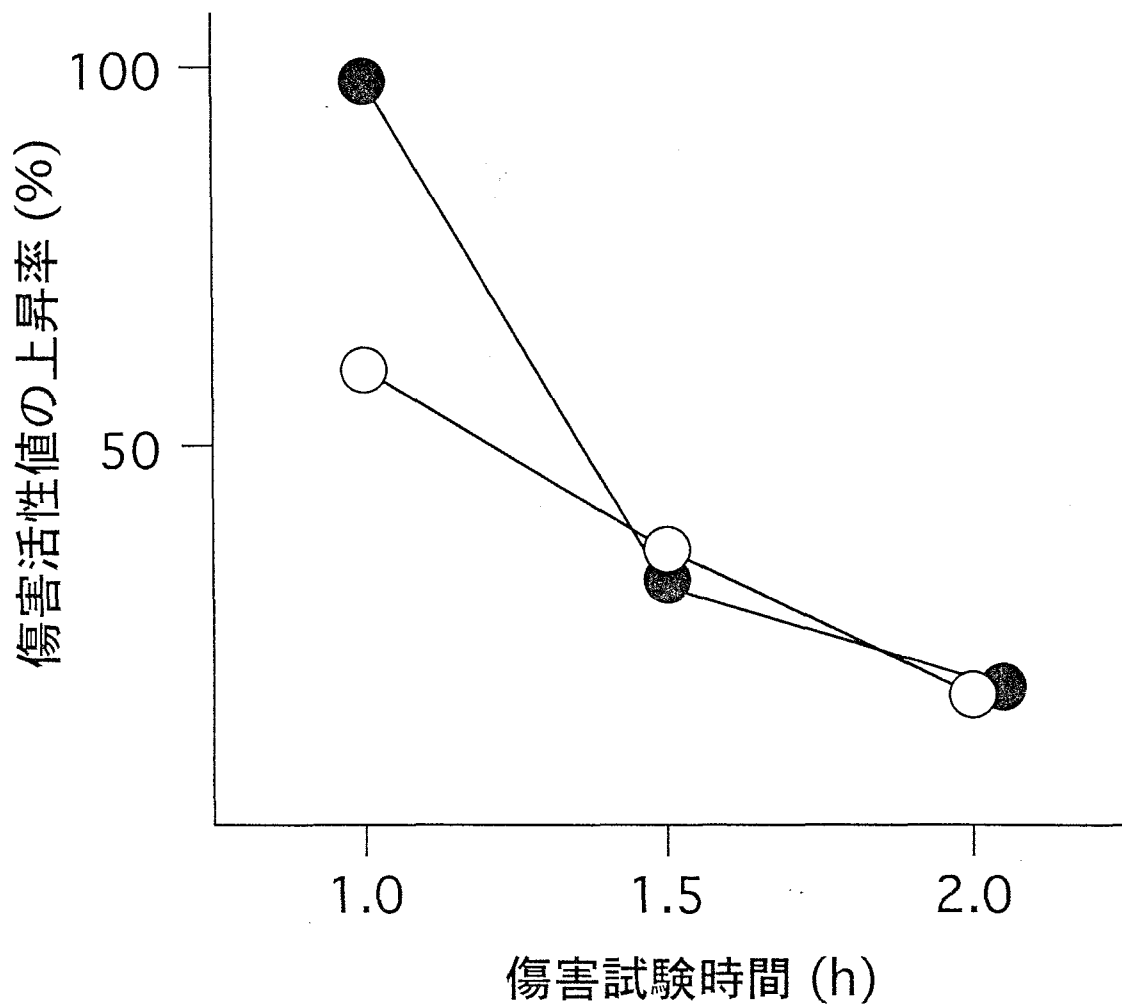


図3. 各傷害試験時間におけるモノクローナル抗体(mAb 61C5; ○、mAb 57F5; ●) 処理好中球の細胞傷害活性値の上昇率。好中球は終濃度1000倍のmAbで処理された。細胞傷害試験はE:T=2.5:1、25℃の条件で行った。結果は1尾について3重試験で得られた細胞傷害活性値から算出された上昇率の平均で表わされている。

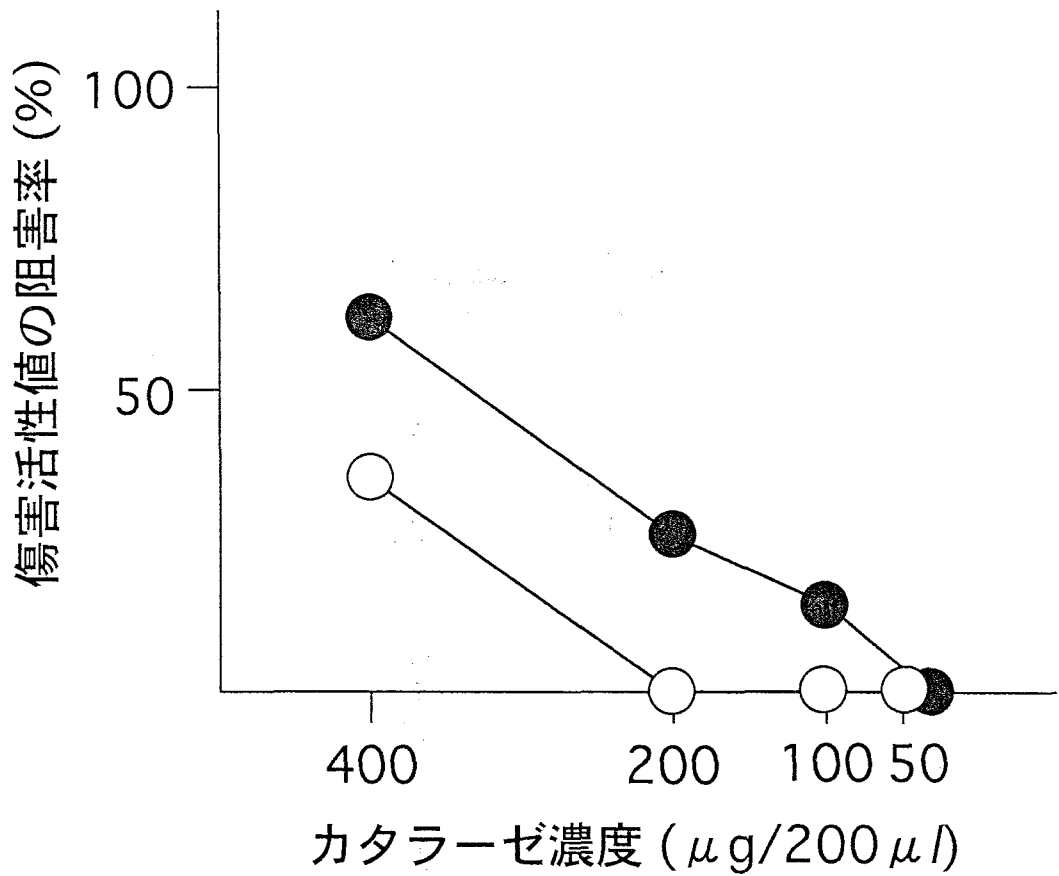


図4. モノクローナル抗体(mAb 61C5; ○、mAb 57F5; ●)処理好中球の細胞傷害活性のカタラーゼによる阻害率。好中球は終濃度1000倍のmAbで処理された。細胞傷害試験はE:T=2.5:1、2時間、25℃の条件で行った。結果は1尾について3重試験で得られた細胞傷害活性値から算出された阻害率の平均で表わされている。

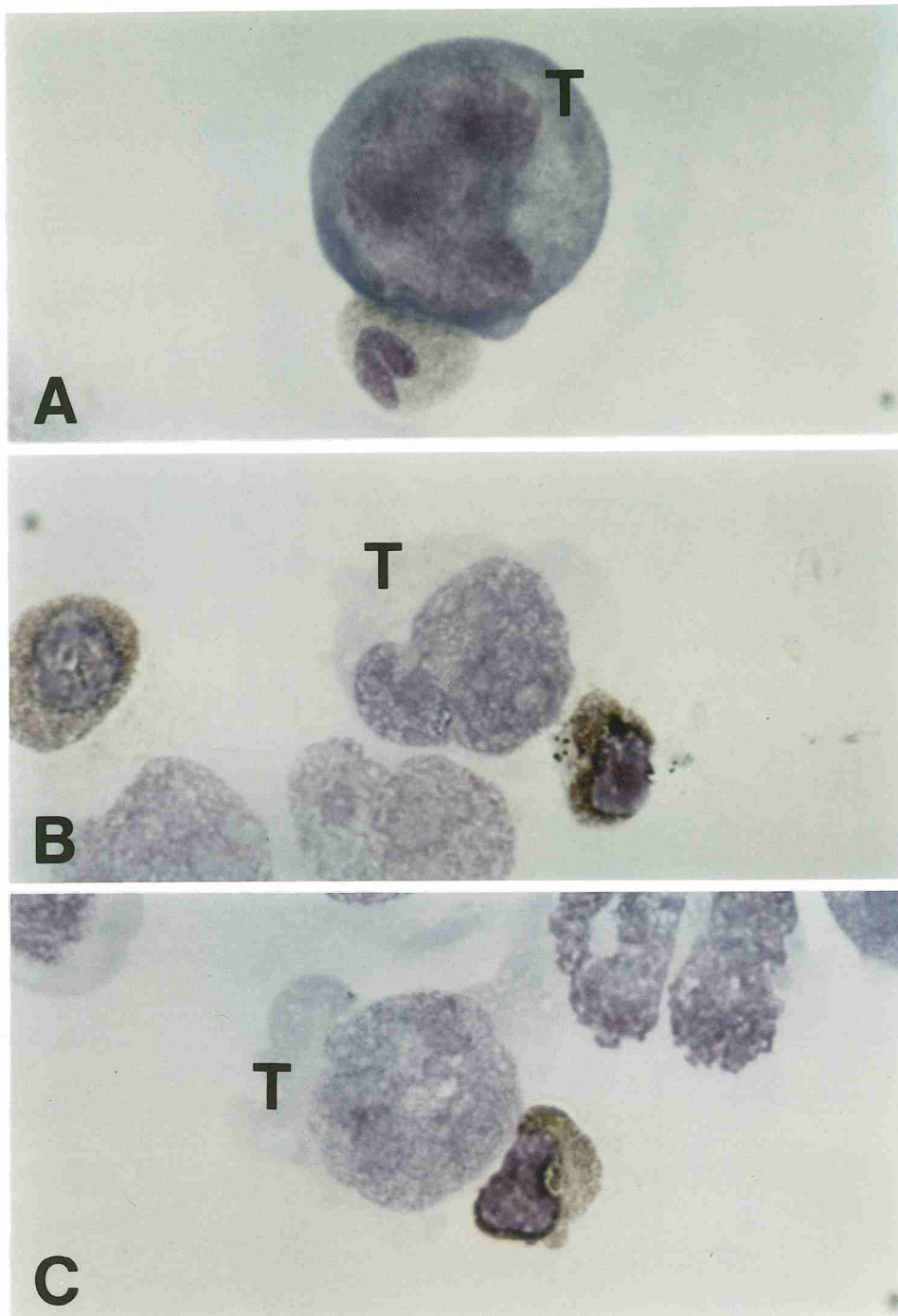


図5. K562細胞に結合した好中球の免疫細胞染色像。K562細胞に結合している細胞はズダンブラックBで染色され、好中球であることを示す(A)。モノクローナル抗体 61C5(B)および57F5(C)はK562細胞に結合している好中球に反応した(抗体が反応した細胞は褐色に染色される)。これらのモノクローナル抗体はK562細胞(T)には反応しなかった。



## 結 辞

コイ好中球が、従来知られている貪食能に加え、細胞傷害能も備えていることが本研究で明らかになった。このことは、寄生虫などの貪食することができない比較的大きな病原体やウイルス感染細胞、腫瘍細胞のような自己異常細胞に対しても、コイ好中球は攻撃し得る可能性を示している。また本研究は、コイ好中球が環境温度に順応性を持つことも明らかにした。魚類の特異免疫機構が低温下で働かない中で、コイ好中球のような温度変化に順応性を持つ細胞は、変温動物である魚類の生体防御にとって重要な役割を果たしているものと思われる。これらの特徴的な機能を有するコイ好中球の生体防御における役割を明らかにすることは、魚類特有の防御機構の解明のためにも必要なことである。本研究で樹立したモノクローナル抗体(mAb)は、侵入異物に対応した浸潤好中球において発現レベルの増す抗原を認識し、また好中球の細胞傷害能の活性化を誘発した。今後、これらのmAbが認識する表面抗原を単離し、その解析を行うと共に、それを介したシグナル伝達機構と傷害活性との関わりを明らかにしていくことは、魚類特有の働きを持つ好中球の生体内での調節、すなわち活性と制御のメカニズムの解明につながるものと確信する。また、好中球の生体内調節のメカニズムの解明が魚類免疫系の発展とそれを応用した魚病対策への道を開くことを期待する。

## 謝辞

本研究を行うに当たり、終始懇切なご指導を賜わり、また本論文のご校閲を頂いた東京水産大学資源育成学科水族生理学研究室池田彌生教授、ならびに岡本信明助教授、水族病理学研究室福田穎穂教授に深甚たる謝意を表します。日本コールター株式会社橋本 互氏にはフローサイトメーターを使わせて頂き、またモノクローナル抗体の作製に当たり適切な御助言を頂いた。東京水産大学吉田実験実習場の保田義博、熊沢 勝、増田房野の各氏、埼玉県水産試験場加須分場の方々には本研究を行うに際し、御便宜を頂いた。国立がんセンター発癌研究部中易教江博士、国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチア部山本紀一博士、ならびに財団法人がん研究振興財団細胞バンクには細胞を提供して頂いた。東京水産大学放射線利用施設、平野敏行施設長、ならびに尾崎 誠技官には多くの利便を提供して頂いた。特に期して心より感謝の意を述べたい。日本獣医畜産大学魚病学教室畑井喜司雄教授、和田新平講師ならびに中村和代さんには本研究を遂行するに当たり多大な御協力を賜わった。慎んで深謝します。また、舞田正志助手、佐野菜採さん、東京水産大学水族生理学研究室および日本獣医畜産大学魚病学教室の方々にも適切な御助言と御協力を頂いたことをここに記し、謝意を表します。