

# ブリ貪食細胞の*Pasteurella piscicida*に対する細胞内殺菌能測定法の検討

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	浜口, 昌巳 村岡, 愛一郎 田中, 卓史
巻/号	55巻6号
掲載ページ	p. 971-977
発行年月	1989年6月

ブリ貪食細胞の *Pasteurella piscicida* に対する  
細胞内殺菌能測定法の検討

浜口昌巳, 村岡愛一郎, 田中卓史, 楠田理一

(1988年11月14日受付)

A Method for Determination of Intracellular Bacterial Killing  
by Yellowtail Phagocytic Cells against *Pasteurella piscicida*Masami Hamaguchi,\*<sup>1</sup> Aiichiro Muraoka,\*<sup>2</sup> Takushi Tanaka,\*<sup>1</sup>  
and Riichi Kusuda\*<sup>1</sup>

Applicability of some methods for determination of intracellular bacterial killing by yellow-tail phagocytic cells against *Pasteurella piscicida* was investigated. The following method was found applicable.

A mixture of phagocytic cells prepared from yellowtail kidney, viable *Pasteurella piscicida* suspension and normal yellowtail serum was prepared, and incubated at 25°C for 30 min. Then, 100 µg/ml streptomycin and 1,500 units/ml penicillin G were added to the mixture, and incubated again at 25°C for 15 min. The phagocytic cells and the remaining extracellular bacteria were separated by centrifuging at 5,900×g for 5 min on Percoll at 1.070 specific gravity. Phagocytic cells were washed three times by modified L-15, and resuspended in modified L-15 at a density of 1×10<sup>7</sup> cells/ml. After incubation at 25°C for 60 min, the phagocytic cells were destroyed by 15% sodium chloride solution containing 0.2% non-ionic detergent, BL-25, at 0°C for 15 min. The number of viable bacteria in destroyed phagocytic cells was counted by the pour plate method using BHI agar containing 1.0% sodium chloride.

マクロファージや好中球は生体内に侵入してくる病原体を貪食したのちに、細胞内で消化および殺菌して、生体防衛に寄与することが知られている。<sup>1-3)</sup>しかし、*Mycobacterium tuberculosis* などの抗酸菌群、*Listeria monocytogenes* および *Salmonella typhimurium* などの貪食細胞の殺菌活性に対して抵抗性をもつ菌種に対する貪食細胞の消化・殺菌処理には生菌免疫で誘導される活性Tリンパ球などの関与が必要であるとされている。<sup>4-6)</sup>窪田ら<sup>7)</sup>はブリ類結節症においては病魚の貪食細胞内で、本症原因菌である *Pasteurella piscicida* の増殖像が認められるとしており、本菌も貪食細胞内で殺菌活性に抵抗して増殖する菌種であると思われる。また、Kusuda and Hamaguchi<sup>8)</sup> および楠田ら<sup>9)</sup>はブリ類結節症に対しては弱毒生菌やリポソームなどの細胞性免疫の誘発効果が認められているワクチンの有効性が高いとしている。これらのことから、ブリ類結節症に対する有効性の高いワクチンを開発するためには、ブリの貪食細胞に *P. pisci-*

*cida* が取り込まれたのちの殺菌能の経時的变化を調べる必要があると思われる。しかし、これまでにブリの貪食細胞内の殺菌能を測定した報告はみあたらない。

そこで、本研究ではブリの腎臓由来の貪食細胞を用いて、*P. piscicida* を貪食させたのちの細胞内殺菌能測定方法について検討した。

## 実験方法

**供試魚** 高知県土佐市宇佐町宇佐の養殖業者から購入した体重 50~180 g のブリ稚魚 *Seriola quinqueradiata* および体重 892~1,485 g の2年魚を用いた。

**供試菌株** 1984年に大分県で養殖されていたブリ病魚の腎臓から分離された *Pasteurella piscicida* OT-8447 株を用いた。本株は分離後、魚体内通過を2回繰り返した強毒株を村岡ら<sup>10)</sup>の方法により凍結乾燥を行い、4°Cに保存して使用した。使用に際しては、1.5%食塩加 BHI 液体培地 (Difco) に溶解して、25°Cで1夜培養し

\*<sup>1</sup> 高知大学農学部水族病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku Kochi 783, Japan).

\*<sup>2</sup> アース製薬株式会社第3研究部 (Biomedical Research Laboratories, Earth Chemical Company Ltd., Sakoshi Ako, Hyogo 678-01, Japan).

\*<sup>3</sup> T. Orme: Twenty-third joint research conference on tuberculosis, p. 135-139.

たのち, 1.5% 食塩加 BHI 寒天斜面培地に接種し, 25°C で 20 時間培養して実験に供試した。なお, 本株はブリの新鮮血清の影響を受けないことを確認して実験に供試した。

**腎臓生細胞浮遊液の調製** 動脈球穿刺法により採血したブリ稚魚から, 頭腎部を含む腎臓部を取り出した。腎臓の表面を 70% エタノールを含む脱脂綿で迅速に消毒し, ただちに滅菌した 1% 食塩水で洗浄したのちに 20 mM HEPES, 25 units/ml ヘパリンナトリウム, 5% 牛胎児血清および 0.39% 食塩加 2/3 濃度の L-15 (Flow Laboratory, 以下 L-15) 中で, 解剖用のはさみを用いて細片化した。氷冷下で 10 分間静置したのちに上清を採集し, 150×g で 5 分間の遠心操作を 2 回行って細胞を洗浄した。ついで, 細胞をエオジン Y で染色したのち, Thoma (Erma) の血球計算盤を用いて全細胞数 および生残率を計数し, 生細胞濃度が  $1.0 \times 10^7$  cells/ml となるように L-15 に懸濁し, 腎臓生細胞浮遊液とした。

**腎臓固定細胞浮遊液の調製** 上述の方法で調製した腎臓生細胞浮遊液に 0.1% の濃度となるようにグルタルアルデヒドを添加し, 4°C で 30 分間反応させて腎臓細胞を固定した。ついで, 固定細胞を 150×g で 5 分間の遠心操作によって回収したのち, L-15 で 5 回洗浄した。洗浄した固定細胞を  $1.0 \times 10^7$  cells/ml となるように L-15 に懸濁し, 腎臓固定細胞浮遊液とした。

**腎臓細胞と生菌の分離法の検討** 食食による細胞内への菌の取り込みを防ぐために, 固定した腎臓固定細胞と *P. piscicida* 生菌の混合液に抗生物質を添加して殺菌したのち, 通常の遠心分離を行う方法と Percoll を用いて比重遠心を行う方法の 2 つの分離効果を比較して, 分離方法を検討した。

前者の方法は腎臓固定細胞浮遊液に *P. piscicida* 生菌を  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml となるように懸濁したのち, ストレプトマイシンを 10 および 100 μg/ml, ペニシリン G を 150 および 1,500 units/ml となるように添加し, 25°C で 15 分間作用させた。ついで, L-15 を用いて 150×g で 5 分間の遠心操作を行い, 腎臓固定細胞を採取した。腎臓固定細胞は L-15 を用いて, 150×g で 5 分間の遠心洗浄を 3 回行ったのち, 1 ml の L-15 に再懸濁した。そして, 混積平板法によって残存生菌数を測定した。

後者の方法は腎臓固定細胞浮遊液に *P. piscicida* 生菌を  $3.8 \times 10^7$  CFU/ml の濃度となるように懸濁したのち, ストレプトマイシンを 100 μg/ml, ペニシリン G を 1,500 units/ml となるように添加し, 25°C で 15 分間作用させた。ついで, 比重 1.070 に調製した Percoll 溶液 1 ml に, その反応液 400 μl を重層したのち, 5,900×g で 5 分間の遠心操作を行い, 腎臓固定細胞画分を回収した。腎臓固定細胞画分は L-15 を用いて 150×g で 5 分

間の遠心洗浄を 3 回行ったのち, 1 ml の L-15 に懸濁した。そして, 混積平板法によって残存生菌数を測定した。

#### 界面活性剤によるブリの腎臓生細胞の破壊法の検討

それぞれ 0.2% の BL-9EX, BL-21, BL-25, BC-25TX, BC-30TX, BC-40TX, BS-20, BO-50, BB-20, BB-30, HCO-60 (以上, 日光ケミカルズ), Triton X-100 (半井化学) を含む 1, 7, 11 および 15% の食塩水と,  $1.0 \times 10^7$  cells/ml の腎臓生細胞浮遊液を等量混合して, 氷冷下で 15 分間反応させた。そして, 上述の方法で細胞数を測定して界面活性剤の細胞破壊能を比較した。また, 腎臓細胞の破壊処理前と処理後の細胞のスマアを作製し, ギムザ染色を行ったのちに検鏡し, 好中球およびマクロファージなどの食食細胞の種類による破壊能の差異を調べて界面活性剤による破壊法の検討を行った。

#### 界面活性剤以外のブリ腎臓生細胞の破壊法の検討

ブリの腎臓生細胞に対する浸透圧の変化, ヤギおよびモルモットの乾燥補体による処理および高速遠心操作による破壊方法を検討した。浸透圧の変化は蒸留水および 8% 食塩水と腎臓生細胞浮遊液を等量混合し, 氷冷下で 15 分間反応させたのち, 上述の方法によって破壊能を比較した。ヤギおよびモルモット乾燥補体 (Cappel) によるブリ腎臓細胞の処理は, 2% 食塩水中にヤギおよびモルモットの乾燥補体をそれぞれ 1 および 10% となるように溶解し, 細胞浮遊液と等量混合して 25°C で 15 分間反応させたのち, 上述の方法によって破壊能を比較した。高速遠心操作による細胞の破壊は細胞浮遊液を 7,250×g, 5 分間の遠心操作を行ったのち, 上述の方法によって破壊能を比較した。

**ブリの腎臓生細胞の破壊条件が *P. piscicida* の生残率に及ぼす影響** 上述の細胞破壊条件の検討の結果, 破壊能の高かった 0.2% の BL-9EX, BL-21, BL-25, BC-25TX, Triton X-100 加 11 および 15% 食塩水と, *P. piscicida* 生菌濃度が  $10^6 \sim 10^7$  CFU/ml となるように調製した L-15 を等量混合し, 氷冷下で 0, 15, 60 分間反応させたのち, 混積平板法によって生菌数を計数し, 生残率に及ぼす影響を検討した。

**腎臓生細胞内の食食生菌数の経時的変化** L-15 を用いて  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml に調製した *P. piscicida* 生菌懸濁液と, 類結節症流行前のブリ稚魚から採取して -80°C に凍結保存した未処理血清をオプソニンとして 1:4 の割合で混合し, 25°C で 10 分間反応させた。反応後にブリ稚魚の腎臓から上述の方法で作製した腎臓生細胞浮遊液と等量混合し, 15, 20, 25, 30°C で 2 rpm の回転培養を行った。そして, 0, 7.5, 15, 30, 60, 90 分後にそれぞれ 100 μl の混合液を取り出し, ストレプトマイシンを 100 μg/ml とペニシリン G を 1,500 units/ml と

るように添加し、25°Cで15分間作用させたのち、Percollを用いた比重遠心法で細胞外生菌を除去した。細胞はL-15に再浮遊したのち、0.2% BL-25加15%食塩水と等量混合し、氷冷下で15分間反応させて破壊した。反応後に混釈平板法によって生菌数を計数し、食食生菌数の経時的变化を調べた。

**細胞内殺菌能の測定** 各10尾の類結節症未感作魚および2年魚から腎臓生細胞浮遊液を作製し、上述の方法で25°Cで30分間*P. piscicida*を食食させたのち、ストレプトマイシンとペニシリンGを上記の濃度となるように添加し、25°Cで15分間作用させた。ついで、この細胞浮遊液を比重を1.070に調製したPercoll溶液に重層して、5,900×gで5分間の遠心操作を行い、腎臓生細胞画分を採取した。腎臓生細胞はL-15を用いて150×gで5分間の遠心洗浄を3回行ったのち、L-15中に $1.0 \times 10^7$  cells/mlとなるように浮遊させた。この浮遊液を25°Cで0, 60, 120, 180分間培養したのち、一定量を取り出して0.2% BL-25加15%食塩水と等量混合し、氷冷下で15分間反応させた。ついで、混釈平板法によって生菌数を測定し、細胞内殺菌能を検討した。

## 結 果

ブリの腎臓固定細胞と*P. piscicida*生菌の混合物にストレプトマイシンとペニシリンGを添加したのちに、通常の遠心分離法とPercollを用いた比重遠心法による細胞と生菌の分離法を検討した結果はTable 1に示すとおりである。通常の遠心分離法では、腎臓固定細胞中の残存生菌数は遠心操作の前には $1.0 \times 10^7$  CFU/mlであったが、遠心操作後には $1.3 \times 10^8$  CFU/mlとなった。ストレプトマイシンを10 µg/mlおよびペニシリンGを150 units/mlとなるように添加したときには $1.9 \times 10^8$  CFU/mlとなり、ストレプトマイシンを100 µg/mlおよびペニシリンGを1,500 units/mlとなるように添加したときには $7.8 \times 10^8$  CFU/mlとなり、低下した。いっぽう、

Percollを用いた比重遠心法では、残存生菌数は遠心操作の前は $3.8 \times 10^7$  CFU/mlであったが、Percollを用いた比重遠心操作により $8.9 \times 10^4$  CFU/mlとなった。さらに、ストレプトマイシンを100 µg/mlおよびペニシリンGを1,500 units/mlとなるように添加したときには $2.9 \times 10$  CFU/mlとなった。

各種界面活性剤によるブリの腎臓生細胞の破壊能を比較した結果はTable 2に示すとおりである。0.2% BL-9EX加11および15%食塩水、0.2% BL-21加11および15%食塩水、0.2% BL-25加11および15%食塩水、0.2% Triton X-100加11および15%食塩水に高い細胞破壊能が認められた。また、これらの界面活性剤によって腎臓生細胞中の好中球およびマクロファージなどの食食細胞も破壊され、食食細胞の種類の差異による破壊能の変化は認められなかった。

界面活性剤以外の方法によるブリの腎臓生細胞の破壊能を比較した結果はTable 3に示すとおりである。生細胞破壊能は蒸留水による方法のみに認められ、それ以外の8%食塩水処理、ヤギおよびモルモット補体処理および高速遠心処理では認められなかった。

上述の腎臓生細胞の破壊能の高かった方法における*P. piscicida*の生残率に及ぼす影響を検討した結果はFig. 1に示すとおりである。*P. piscicida*の生残率に及ぼす影響は0.2% BL-25加15%食塩水が最も小さく、そのほかの方法では生残率が低下した。

各種温度における腎臓生細胞内の食食生菌数の経時的变化を検討した結果はFig. 2に示すとおりである。平均食食生菌数は25°Cで最も多くなり、30分後には $9.9 \times 10^2$  CFU/ $10^7$  cells、60分後には最大の $1.1 \times 10^3$  CFU/ $10^7$  cellsとなった。また、平均食食生菌数が最大となる反応時間は30°C、25°Cおよび20°Cでは60分後、15°Cでは90分後であった。

ブリ1年魚および2年魚から調製した腎臓生細胞の*P. piscicida*生菌に対する細胞内殺菌活性を測定した結

Table 1. Separation of yellowtail phagocytic cells and *Pasteurella piscicida* by a combination of antibiotics and centrifugation with and without percoll

Centrifugation		Concentration of antibiotics		Viable bacterial count (CFU/ml)
Percoll	Gravity	Streptomycin*1	Penicillin G*2	
—	150×g	100	1,500	$7.8 \times 10^8$
—	150×g	10	150	$1.9 \times 10^8$
—	150×g	0	0	$1.3 \times 10^8$
—	—	0	0	$1.0 \times 10^7$
+	5,900×g	100	1,500	$2.9 \times 10$
+	5,900×g	0	0	$8.9 \times 10^4$
+	—	0	0	$3.8 \times 10^7$

\*1 µg/ml.

\*2 units/ml.

**Table 2.** The range of percent destruction of yellowtail phagocytic cells by various non-ionic detergents in various concentrations of sodium chloride solution at 0°C

Detergent	Concentration of sodium chloride (%)			
	1	7	11	15
BL-9EX	<70	70-95	>95	>95
BL-21	<70	70-95	>95	>95
BL-25	<70	70-95	>95	>95
BC-25TX	<70	70-95	70-95	70-95
BC-30TX	<70	<70	70-95	70-95
BC-40TX	<70	<70	<70	70-95
BS-20	<70	<70	<70	<70
BO-50	<70	<70	<70	<70
BB-20	<70	<70	<70	<70
BB-30	<70	<70	<70	<70
HCO-60	<70	<70	<70	<70
Triton X-100	70-95	70-95	>95	>95

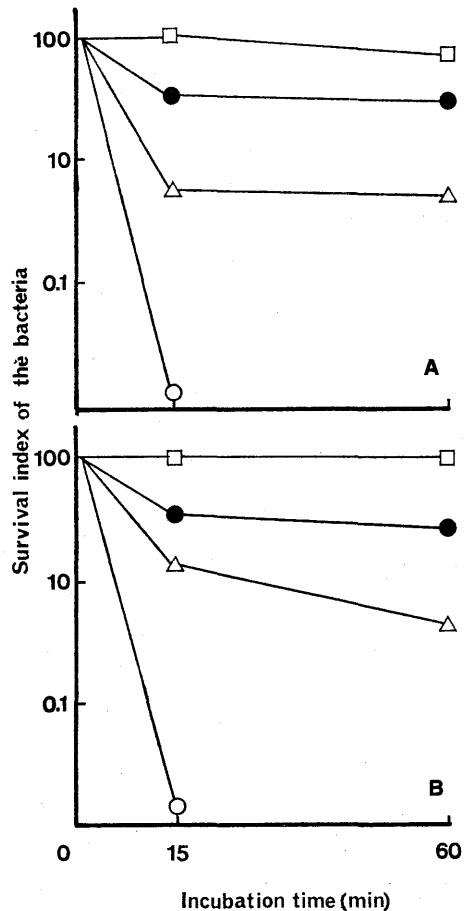
**Table 3.** The range of percent destruction of yellowtail phagocytic cells by a guinea pig and a goat complement, osmotic shock and centrifugation

Method	The range of percent destruction
Complement	
10% Guinea pig	<70
1% Guinea pig	<70
10% Goat	<70
1% Goat	<70
Osmotic shock	
0% sodium chloride	>95
8% sodium chloride	<70
Centrifugation	
1,440×g for 5 min	<70

果は Fig. 3 に示すとおりである。1年魚の腎臓生細胞の *P. piscicida* 細胞内生菌数は経時的に増加する傾向が認められ、2時間反応以後は急激に増加した。2年魚の腎臓生細胞の *P. piscicida* 細胞内生菌数は60~90分間反応後までは低下する傾向が認められ、60分間反応後には平均1オーダー程度低下した。しかし、それ以後は生菌数が増加する傾向を示した。

### 考 察

貪食細胞内の殺菌活性の測定は貪食細胞と生菌を混合して貪食させたのち、両者を分離しないで生菌数を測定する方法と、両者を分離して生菌数を測定する方法がある。前者は操作が簡便であるが、貪食細胞内である程度殺菌されても、用いる菌株の増殖性が高い場合にはそれ



**Fig. 1.** Effect of destruction of phagocytic cells by various non-ionic detergents in 11 (A) and 15 (B) % sodium chloride solutions against a viability of *Pasteurella piscicida*. Symbols: ○, BL-9EX; ●, BL-21; □, BL-25; △, Triton X-100.

を上回って増殖して、測定が困難になると思われる。したがって、本研究ではブリの貪食細胞に生菌を貪食させたのち、細胞外の生菌を除去して細胞内殺菌能を測定する方法について検討した。

細胞外の生菌の除去法としては低速遠心法や細胞内に浸透しないストレプトマイシン、ペニシリンGおよびリソスタフィンなどの薬剤によって、細胞外の生菌の増殖を抑える方法が知られている。<sup>11-18)</sup>しかし、それぞれの方法を単独で用いても、ブリの貪食細胞と細胞外の *P. piscicida* を完全に分離することができなかった。そこで、本研究ではストレプトマイシンおよびペニシリンGを添加したのち、通常の遠心操作を行う方法と、Percollを用いた比重遠心法を行う方法について検討した。その結果、ストレプトマイシンおよびペニシリンGを反応させたのち、Percollを用いた比重遠心法によって効率よ

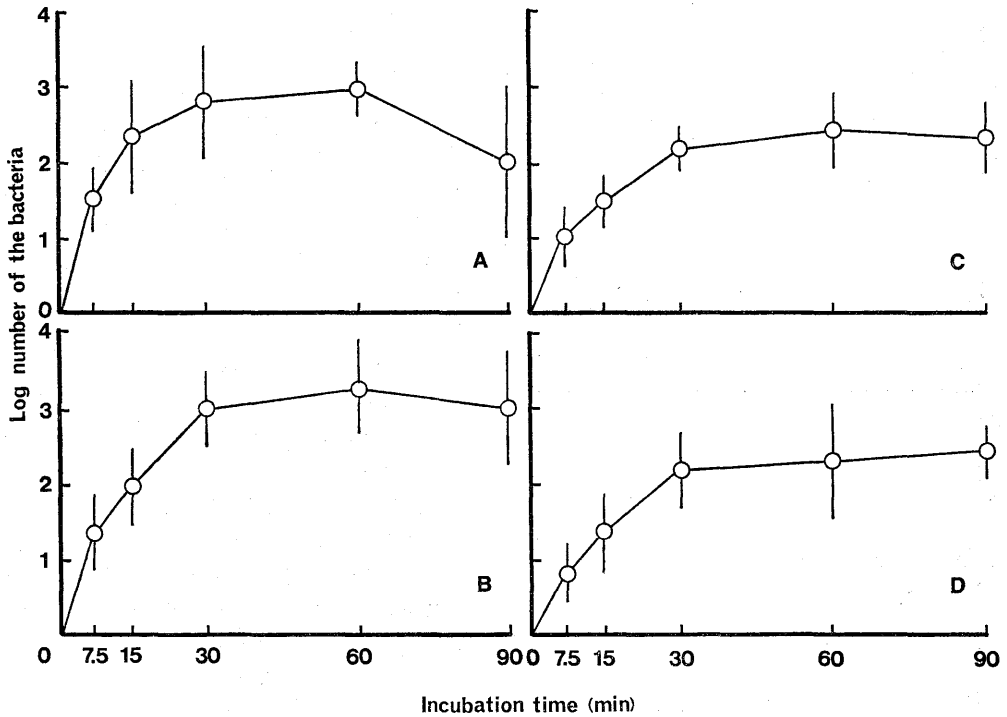


Fig. 2. Changes in log number of viable *Pasteurella piscicida* in yellowtail ( $n=5$ ) phagocytic cells.

Cultivation temperature: A, 30°C; B, 25°C; C, 20°C; D, 15°C.

く細胞外の生菌を除去できることが明らかとなった。この原因としては、Percoll には *P. piscicida* に対する殺菌能は認められなかったが、Percoll を用いた遠心分離法では細胞画分と菌体画分が分離されるので、細胞と生菌の分離効率がよいからではないかと考えられる。したがって、貪食後の細胞と生菌の分離法はストレプトマイシンとペニシリン G を添加したのち、Percoll を用いた比重遠心法で行うのがよいと思われる。

は乳類の貪食細胞の破壊法には蒸留水法、凍結融解法、超音波処理法および Triton X-100 などの界面活性剤によって貪食後の細胞を破壊する方法が知られている。<sup>14-18)</sup> しかし、蒸留水法、凍結融解法および超音波処理法はいずれも *P. piscicida* の生残率に影響を及ぼすので、ブリの貪食細胞の *P. piscicida* に対する細胞内殺菌能の測定法には不適當であると思われる。したがって、*P. piscicida* に対して、比較的毒性が低いと思われる非イオン系界面活性剤、補体および高速遠心法を用いたブリの貪食細胞の破壊方法について検討した。松村ら<sup>13)</sup>は Triton X-100 を用いてマウスの腹腔内細胞の細胞内殺菌能を測定する際にその有効濃度を調べた結果、細胞の破壊能は 0.2% を中心として 0.03~1% の範囲が優れており、細胞内生菌の回収量も多かったとしている。そこで、本研究ではすべての界面活性剤の最終濃度を 0.1%

とした。その結果、細胞の破壊効率は界面活性剤 BL-25 を最終食塩濃度が 8% という高張条件のもとで水冷しながら作用させる方法が最も高く、*P. piscicida* の生残率に及ぼす影響が最も小さかった。また、本法によってブリの腎臓細胞中の好中球やマクロファージは効率よく破壊されることから、この方法がブリの貪食細胞の細胞内殺菌能の測定に適していると思われる。

細胞内殺菌能を測定するためには、細菌を貪食細胞に貪食させる条件を求める必要がある。本研究では各反応温度におけるブリの貪食細胞内の貪食生菌数の経時的变化を測定した結果、25°C で 60 分後に最大値に達したが、30 分後においても最大値に近い値となった。Kusuda and Hamaguchi<sup>9)</sup> および浜口、楠田<sup>10)</sup> はブリ頭腎の貪食細胞の *P. piscicida* 不活化菌体に対する貪食条件は 25°C で 180 分間が最適であるとしている。また、楠田、田中<sup>20)</sup> はブリのガラス付着性マクロファージのブリ連鎖球菌のホルマリン不活化菌体に対する最適貪食条件は 25°C で 60 分間であるとしている。しかし、貪食細胞内の貪食量を生菌を用いて測定する場合には不活化菌体の場合と異なり、貪食された生菌が細胞内で増殖して菌数が増加することも考えられる。したがって、本生菌に対するブリ貪食細胞内殺菌能を測定するための貪食条件は、最適に近い条件であればより短時間

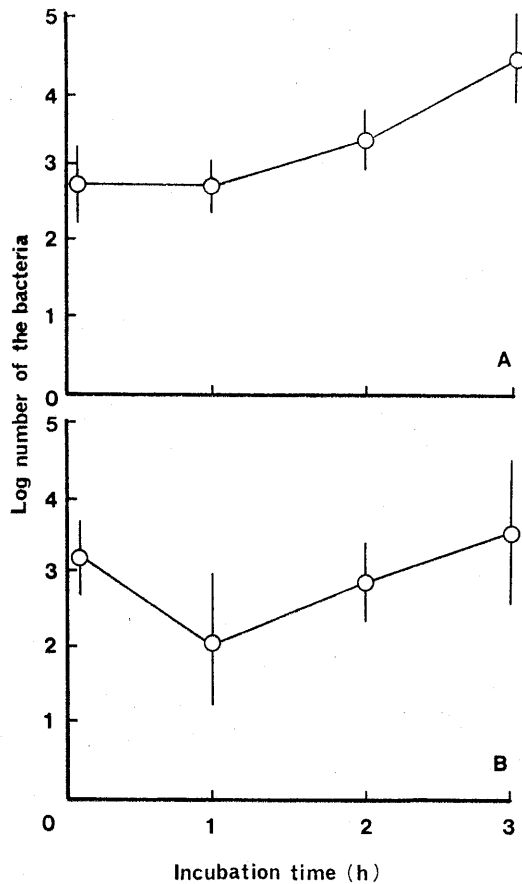


Fig. 3. Intracellular bacterial killing of phagocytic cells prepared from a kidney of 1 year old (A) and 2 years old (B) yellowtail ( $n=10$ ) against *Pasteurella piscicida*.

で貪食させるのがよいと考えられるので、25°Cで30分間とするのがよいと思われる。

以上の条件を用いて、ブリの1年魚と2年魚の腎臓生細胞の *P. piscicida* に対する細胞内殺菌能を測定したところ、1年魚ではほとんど認められなかったが、2年魚では培養1時間後に認められた。そこで、ブリの貪食細胞の *P. piscicida* に対する細胞内殺菌能の測定は培養1時間後に行うのがよいと思われる。また、1年魚と2年魚の細胞内殺菌能には明らかな差異が認められた。この差異については魚体の成長に伴う感染症に対する抵抗性の差異によるのか、あるいは飼育期間中の *P. piscicida* 生菌による感作の違いによるのかは明らかにはできなかった。一般に2年魚では類結節症に対する被害が少ないことが知られている。この原因としては、福田、楠田<sup>21)</sup>は本症流行後にブリの血清中の凝集抗体価が上昇するからではないかとしている。このような血清中の抗体量の上昇に加えて、細胞内殺菌能の差異もブリの本症に

対する抵抗性に関連するのではないと思われる。

以上の結果から、ブリの貪食細胞の細胞内殺菌能の測定方法は次の方法がよいと思われる。すなわち、L-15を用いて  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml に調製した *P. piscicida* 生菌懸濁液と類結節症流行前のブリ稚魚から採取した未処理血清を 1:4 の割合で混合し、25°C で 10 分間反応させる。反応後にブリ貪食の腎臓から前述の方法で作製した生細胞浮遊液と等量混合し、25°C で 30 分間貪食させたのち、ストレプトマイシンを 100  $\mu$ g/ml、ペニシリン G を 1,500 units/ml となるように添加し、25°C で 15 分間作用させる。ついでこの細胞浮遊液を比重 1.070 に調製した Percoll 溶液に重層し、5,900 $\times$ g で 5 分間の遠心操作を行い、腎臓細胞画分を採取する。腎臓細胞は L-15 を用いて 150 $\times$ g で 5 分間の遠心洗浄を 3 回行ったのち、L-15 中に  $1.0 \times 10^7$  cells/ml となるように懸濁する。この懸濁液を 25°C で 0, 60, 120, 180 分間培養したのち、一定量を取り出して 0.2% BL-25 加 15% 食塩水を等量混合し、氷冷下で 15 分間反応させる。反応後に混積平板法によって生菌数を計数し、細胞内殺菌能を測定する方法である。

なお、今回の研究では供試生菌をそのつど培養して調製したが、この方法では生菌濃度にばらつきが認められた。そこで、供試菌液には生菌濃度を測定したのちに -80°C で保存したものを使用するのがよいと思われる。

## 文 献

- 1) 野本亀久雄: 日細誌, 37, 479-495 (1982).
- 2) 野本亀久雄: 日細誌, 43, 899-910 (1988).
- 3) 永山在明: 感染症, 18, 177-186 (1988).
- 4) H. Hahn and S. H. E. Kaufmann: *Rev. Infect. Dis.*, 3, 1221-1235 (1981).
- 5) I. M. Orme and F. M. Collins: *J. Immunol.*, 131, 1452-1454 (1983).
- 6) 金井興美: 感染症, 5, 59-63 (1975).
- 7) 窪田三郎, 木村正雄, 江草周三: 魚病研究, 4, 111-118 (1970).
- 8) R. Kusuda and M. Hamaguchi: *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 8, 50-52 (1988).
- 9) 楠田理一, 二宮 学, 浜口昌巳, 村岡愛一郎: 魚病研究, 23, 191-196 (1988).
- 10) 村岡愛一郎, 橋本伸一, 楠田理一: 日水誌, 51, 1659-1663 (1985).
- 11) B. Holmes: *Nature*, 210, 1131-1132 (1966).
- 12) J. S. Tan, C. Watanakunakorn, and J. P. Phair: *J. Lab. Clin. Med.*, 78, 316-322 (1972).
- 13) P. G. Quie, J. G. White, B. Holmes, and R. A. Good: *J. Clin. Invest.*, 46, 668-679 (1969).
- 14) M. Miyata, M. Mitsuyama, N. Ogata, and K. Nomoto: *J. Clin. Lab. Immunol.*, 13, 111-115 (1984).
- 15) 野本亀久雄: 臨床免疫, 13, 403-407 (1981).

- 16) N. A. Buchmeier and R. D. Schreiber: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7404-7408 (1985).
- 17) B. J. Zeligs: in "Manual of macrophage methodology" (ed. by H. B. Herscowitz, H. T. Holden, J. A. Bellanti and A. Ghaffar) Marcel Dekker, Inc., New York, 1981, pp. 36-54.
- 18) 松村治雄, 寺田泰比古, 中野昌康: 日細誌, **43**, 619-621 (1986).
- 19) 浜口昌巳, 楠田理一: 日水誌, **54**, 1845 (1988).
- 20) 楠田理一, 田中卓史: 日水誌, **54**, 2065-2069 (1988).
- 21) 福田 穰, 楠田理一: 日水誌, **46**, 1310-1315 (1980).