

## ウナギ血清中に存在する抗体依存性の溶血活性物質の特性

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	楠田, 理一 福永, 剛
巻/号	53巻12号
掲載ページ	p. 2111-2115
発行年月	1987年12月

ウナギ血清中に存在する抗体依存性の溶血活性物質の特性<sup>\*1</sup>

楠田理一, 福永剛

(1987年5月6日受理)

## Characterization of Antibody Dependent Hemolytic Activity in Eel Serum

Riichi Kusuda<sup>\*2</sup> and Takeshi Fukunaga<sup>\*2</sup>

It is well known that fish serum possesses two pathways of complement activity homologous to mammalian complement. One is called the classical pathway which is antibody dependent and the other is the alternative pathway which is independent of the antibody. Both pathways are considered important for the immunological and natural defense mechanisms of fishes against invading pathogens. Although the complement activities of many fishes have been previously studied, the classical pathway of eel *Anguilla japonica* complement have not been investigated. In this paper, the hemolytic activity of eel serum was investigated by using sheep red blood cells (SRBC) sensitized with eel antiserum. The antiserum was obtained from eel immunized with SRBC suspension as immunogen. The hemolytic activity increased as the agglutinating antibody titer increased. The optimum conditions for hemolytic activity were confirmed at a reaction temperature of 30°C and at pH 7.5. The hemolytic activity was inactivated entirely by heating the serum at 45°C for 30 min, inhibited partially with EDTA, EGTA and zymosan and enhanced with divalent cation Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>.

In general, the complement activity of mammalian has some representative properties like being temperature dependent, heat labile, requiring Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, and consumption activity by zymosan. In the present investigation, the properties of the antibody dependent hemolytic activity of eel serum were observed to be similar with those of the mammalian. These findings therefore suggest that the hemolytic activity in eel serum is caused by the complement activity.

補体の作用には細菌細胞壁障害による殺菌および静菌作用、好中球に対する走化作用などがあり、生体防御に重要な役割を果たしている。その活性経路には抗体の存在下で働く古典経路 (classical pathway) と、抗体が産生されるまでの期間の非特異的な生体防御に重要な働きをする代替経路 (alternative pathway) があることが知られている。<sup>1)</sup> 魚類については以前から多くの魚種の血清中に、ほ乳類の赤血球を溶血する補体様物質の存在することが報告されているが、<sup>2)</sup> 現在では無顎類を除くほとんどの魚種に補体系が存在するとされている。<sup>3)</sup> しかし、魚類の補体活性のうち、抗体に依存する古典経路についてはテンジクザメ、<sup>4-6)</sup> ニジマス、<sup>7-10)</sup> コイ、<sup>11-13)</sup> channel catfish<sup>14)</sup> などを除いて詳細には検討されていない。

そこで、本報ではウナギの補体活性に関する研究の一環として血清中に認められた抗体に依存する溶血活性の特性を検討したので報告する。

## 材料および方法

**各試料の作製** ウナギ補体血清および抗 SRBC ウナギ免疫血清 (以下、免疫血清と略す) は、次のようにして作製した。

1. 供試魚 高知県南国市で養殖中の平均体重 165 g のニホンウナギ (*Anguilla japonica*) 25 尾を水温 25°C の水槽内で馴致して用いた。それらのうち、10 尾は補体源としての新鮮血清の採取に、15 尾は免疫血清の作製に用いた。

2. 免疫血清の作製 ウナギの筋肉内に濃度を 1.0 × 10<sup>9</sup> cells/ml に調整した SRBC 懸濁液を 1 尾あたり 0.2 ml 接種し、1 週間後に再度同様の接種を行った。4 週間後に 10 尾の動脈球から採血し、遠心分離して得られた血清をプールして免疫血清とした。また、免疫した 15 尾のうち 5 尾については、1 週間間隔に尾部静脈から

<sup>\*1</sup> 本研究の要約は1986年10月、日本水産学会秋期大会において発表した。

<sup>\*2</sup> 高知大学農学部水産病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

採血し、凝集抗体価ならびに溶血素価を測定した。

3. 補体源としての新鮮血清の作製 非免疫ウナギ 10 尾から同様の方法で採取した血清をプールして新鮮血清として用いた。新鮮血清は数本に小分けして  $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存し、測定を行うごとに解凍して用いた。

4. 溶血素価の測定方法 免疫血清を  $50^{\circ}\text{C}$  で 30 分非働化したのちに、容量  $0.1\text{ ml}$  の 2 倍階段希釈系列を作製し、それぞれに  $1.0 \times 10^9$  cells/ml に調整した SRBC 懸濁液を  $0.1\text{ ml}$  混合して  $30^{\circ}\text{C}$ 、30 分の感作を行った。その後、10 倍に希釈した新鮮血清を  $0.1\text{ ml}$  添加し、 $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。そして、 $2\text{ ml}$  の冷却した pH 7.5 の  $0.01\text{ M}$  EDTA-ゼラチン-ペロナル緩衝液 (EDTA-GVB) を添加して反応を停止させた。各試験管とも、 $3,000\text{ rpm}$  で 5 分間の遠心分離を行い、上清中のヘモグロビン量を  $412\text{ nm}$  における吸光度で測定して溶血率を求めた。溶血素価の経時変化は非働化免疫血清を 32 倍に希釈したときの溶血率を基準にとり、最も高い値を 100% とした相対活性であらわした。なお、凝集抗体価の測定は常法により行った。

5. 溶血活性の測定方法  $50^{\circ}\text{C}$  で 30 分間非働化した免疫血清を 10 倍に希釈したのちに等量の SRBC を混合し、 $30^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させて感作赤血球を作製した。そして、容量  $0.1\text{ ml}$  の新鮮血清の 2 倍階段希釈系列を作製したのち、それぞれに  $0.1\text{ ml}$  の感作赤血球を添加して  $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応の停止および溶血率の測定は、前項の測定方法と同様にして行った。

溶血活性の特性 ウナギの血清の抗体依存の溶血活性について反応至適 pH、反応至適温度、熱安定性ならびに EDTA, EGTA,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  の添加およびザイモザン処理の影響について検討した。

1. 至適 pH の検討  $1\text{ N}$  の HCl 溶液および NaOH 溶液を用いて pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0 に調節した  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  加 GVB を用いてそれぞれの溶血活性を測定した。

2. 至適温度の検討 反応温度を 10, 15, 20, 25, 30, 35,  $40^{\circ}\text{C}$  とし、各温度における溶血活性を測定した。

3. 熱安定性の検討 30, 35, 40, 45, 50, 55,  $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分間処理した血清の溶血活性を測定した。

4. EDTA, EGTA の添加の影響 反応させるときの緩衝液に EDTA-GVB および  $\text{Mg}^{2+}$  加  $0.008\text{ M}$  EGTA-ペロナル緩衝液 (EGTA-VB) を用いて溶血活性を測定した。なお、反応時間は 10, 20, 30, 60, 90, 120 分とし、それぞれの溶血活性の経時変化を求めた。

5.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  の添加の影響  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の両者を添加した GVB, および無添加の GVB を用いて、それぞれの溶血活性の経時変化を測定した。

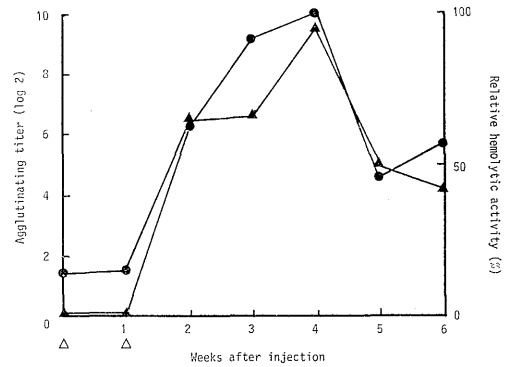


Fig. 1. Agglutinating titer of eels injected with SRBC suspension.  $\blacktriangle$ : agglutinating titer,  $\bullet$ : hemolytic activity  $\triangle$ : injection with SRBC,  $19^9$  cells/ml.

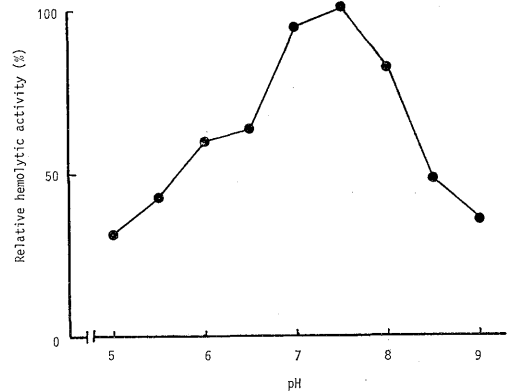


Fig. 2. Effect of pH on the hemolytic activity of eel serum.

6. ザイモザン処理の影響 ザイモザン懸濁液は  $50\text{ mg}$  のザイモザンを  $10\text{ ml}$  の生理食塩水に添加し、1 時間沸騰させたのちに遠心分離して上清を捨て、残ったザイモザンを  $100\text{ ml}$  の生理食塩水に懸濁させて作製した。ザイモザン処理は前述の懸濁液  $1\text{ ml}$  を遠心分離したのちの沈澱と  $1\text{ ml}$  の血清を混合し、 $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させて行った。血清中のザイモザンは遠心分離で除去した。この処理後の血清を用いて溶血活性の経時変化を測定した。なお、対照には  $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした血清を用いた。

## 結 果

SRBC 免疫後の凝集抗体価および溶血素価の変化 SRBC 接種後の凝集抗体価と溶血素価の経時変化は Fig. 1 に示すとおりである。2 つの値はほぼ同様の変化を示し、2 回目接種後に著しい上昇が認められ、いずれも初回接種後 4 週間目にピークに達した。

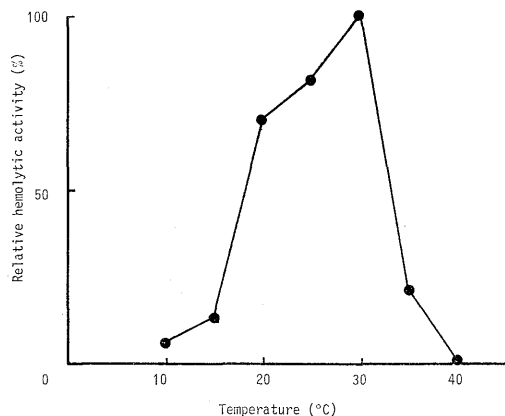


Fig. 3. Effect of incubation temperature on the hemolytic activity of eel serum.

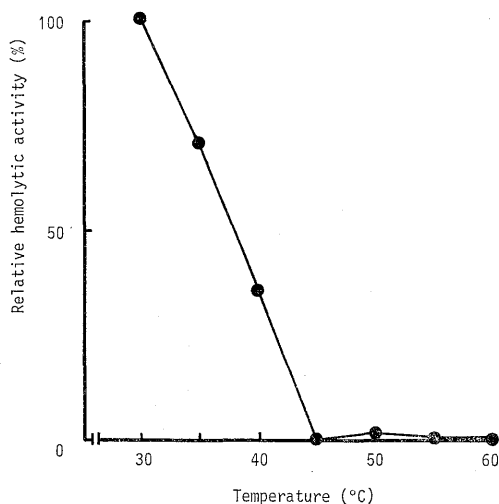


Fig. 4. Effect of heat inactivation on the hemolytic activity of eel serum.

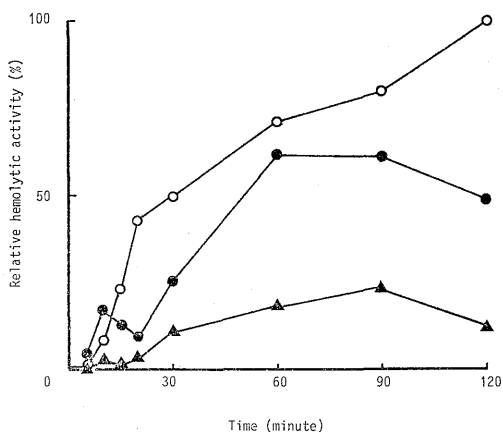


Fig. 5. Effect of EDTA and EGTA on the hemolytic activity of eel serum. ▲: EDTA, ●: EGTA, ○: control.

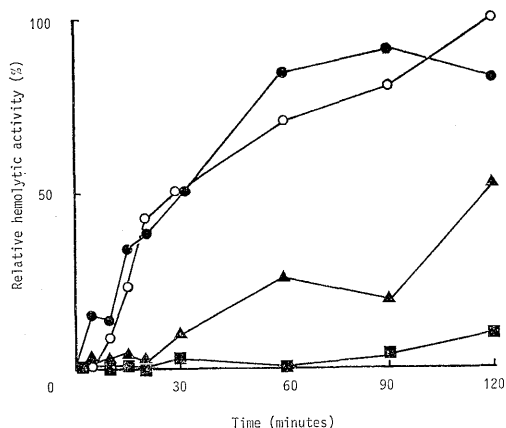


Fig. 6. Effect of divalent cation on the hemolytic activity of eel serum. ○: gelatin veronal buffer (GVB) with both  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ , ▲: GVB with  $Ca^{2+}$ , ●: GVB with  $Mg^{2+}$ , ■: GVB without  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ .

#### 溶血活性の特性

1. 反応至適 pH 各種 pH 条件下における溶血活性の相対活性値を測定した結果は Fig. 2 に示すとおりである。溶血活性は pH 7.5 で最も高く、この値を中心に pH 7.0 から 8.0 で比較的高い活性が認められた。酸性側あるいはアルカリ側では活性は低下した。
2. 反応至適温度 各種温度条件下における溶血活性の相対活性値を測定した結果は Fig. 3 に示すとおりである。溶血活性は 30°C で最も高かったが、15°C 以下および 35°C 以上の温度域では著しく低下し、40°C では消失した。
3. 熱安定性 溶血活性の熱安定性を、未処理血清の活性値を基準とした相対活性値で求めた結果は Fig. 4 に示すとおりである。処理温度が 30, 35, 40°C と高くなるにつれて 100%, 70%, 40% と活性は低下し、45°C 以上の温度では活性は認められなかった。
4. EDTA, EGTA の添加の影響 溶血活性に対する EDTA および EGTA の添加の影響は Fig. 5 に示すとおりである。反応時間 1 時間、血清の希釈を 32 倍を基準としたときの相対活性は EDTA 処理によって 25.2%, EGTA 処理によって 87.0% となり、いずれの処理によっても活性の低下が認められた。
5.  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  の添加の影響 溶血活性に対する  $Ca^{2+}$  および  $Mg^{2+}$  の添加の影響は Fig. 6 に示すとおりである。活性は  $Ca^{2+}$  と  $Mg^{2+}$  の両方を添加したとき、ならびに  $Mg^{2+}$  だけを添加したときに、ほぼ同様の最も高い値となった。ついで、 $Ca^{2+}$  だけを添加したときの活性が高く、いずれも添加していないものでは、活性が最も低かった。
6. ザイモザン処理の影響 溶血活性は血清をザイモ

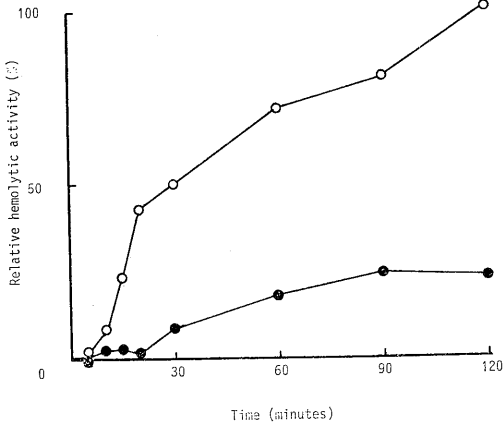


Fig. 7. Effect of zymosan on the hemolytic activity of eel serum. ●: zymosan-treated serum, ○: control.

ザン処理すると阻害され、1 時間反応させたときの相対活性は 24.4% となった。

### 考 察

本実験の結果、SRBC 接種後の凝集抗体価と溶血素価はほぼ同様の变化を示し、2 回目接種後にいずれもピークに達した。溶血素価測定には同一の血清を補体源として用いているので、この場合の溶血活性の増加は SRBC に対する抗体量の変化によるものと思われる。抗体が産生される以前にも、微弱な溶血が認められた。これは補体の代替経路を介した溶血であると考えられるが、非常に低いものであったことから、SRBC に対しては補体の非特異的な溶血活性が起こりにくいものと思われる。凝集抗体価と溶血素価の経時の变化を比較した報告はほかにみあたらないが、Yano らは SRBC を接種後のコイの抗体産生を、<sup>11)</sup> Sakai はキンギョの赤血球を接種後のニジマスの抗体産生の経時的な変化を<sup>10)</sup> 溶血素価で表現している。

溶血活性におよぼす pH の影響について検討した結果、pH 7.5 で最も活性が高く、この値を中心とした pH 7.0 から 8.0 の範囲で比較的高い活性が認められた。ほかの魚種についてみると、コイでは pH 7.2 から 8.5 で高い活性が認められるとされており、<sup>11)</sup> 今回の結果とはほぼ一致した。しかし、テンジクザメでは補体 C1 成分が結合するときの至適 pH は pH 6.9 であったとされている。<sup>4)</sup> これらのことから魚類の補体活性は pH 7.0 から 8.0 の範囲で活性が高いのではないかと考えられる。

反応至適温度を検討した結果、30°C で最も活性が高かった。補体活性の温度依存性については Yano らはコイでは 25°C を中心とした 20°C から 30°C が、<sup>11)</sup> Leg-

ler and Evans はキンギョと軟骨魚類では 28°C が、<sup>14)</sup> Day らはコイおよびテンジクザメなどでは 30°C が、<sup>6)</sup> Nonaka らはニジマスでは 25°C が、<sup>7)</sup> さらに Sakai はニジマスでは 30°C が<sup>8)</sup> 活性が高いとしており、魚種間あるいは研究者によって多少の差異がみられる。本実験においては 30°C で最も活性が高かったが、20°C から 30°C の広い範囲で比較的高い活性が認められた。このことは Yano らの報告とも一致しており、ほ乳類とは異なる魚類の特質ではないかと思われる。

熱安定性を検討した結果、溶血活性は 45°C、30 分の熱処理によって完全に消失した。魚類の補体の熱安定性については Sakai によって詳細に検討されており、<sup>8)</sup> サクラマスでは 42°C、ニジマスでは 44°C、ギンザケでは 45°C、キンギョでは 45°C およびテラピアでは 47°C でそれぞれ 20 分の熱処理によって失活するとされている。また、Yano らはコイでは 50°C、20 分の処理で失活するとしている。<sup>11)</sup> Legler and Evans は channel catfish など 6 魚種で熱安定性の検討をし、いずれも 50°C 付近、20 分の熱処理で活性が失活するとしている。<sup>14)</sup> さらに、Ourth and Wilson は channel catfish の補体の殺菌活性が 47°C、30 分の処理で 5% に減少するとしている。<sup>15)</sup> 本実験の結果とこれらの報告とは、処理時間などが相違するが、ほぼ同様の値が得られていることから熱によって失活しやすいウナギ血清中の溶血活性はほかの魚種で報告されているものと同様、補体系を介した活性であることが示唆される。

溶血活性に対する EDTA ならびに EGTA の添加の影響を検討した結果、活性は EDTA 処理によって 25.2% に、EGTA 処理によって 87.0% に阻害された。一般に EDTA は  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  の、EGTA は  $\text{Ca}^{2+}$  のキレート剤として働くことが知られている。また、補体の古典経路の活性化には  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の両方が、代替経路の活性化には  $\text{Mg}^{2+}$  が必要であることが知られている。<sup>1)</sup> 本実験における EDTA による溶血活性の著しい低下は、反応溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  がキレートされ、補体の 2 つの経路の両方の活性化が阻害されたためと思われる。また、EGTA による溶血活性の低下は反応溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  がキレートされ、古典経路の活性化が阻害されたものと考えられる。しかし、EDTA に比較して活性の低下が少ないことから、ウナギにおいては補体の古典経路が  $\text{Mg}^{2+}$  によっても、活性化されるのではないかと考えられる。

$\text{Ca}^{2+}$  ならびに  $\text{Mg}^{2+}$  の添加の影響を検討した結果、溶血活性は  $\text{Mg}^{2+}$  の添加によって著しく増加し、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の両方を添加した場合と同程度の活性が得られた。 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の添加の影響については Yano ら<sup>11,12)</sup> がコイで検討しており、溶血活性には 2 つの金属

イオンが不可欠であり、単独では活性化されず、かつ  $\text{Ca}^{2+}$  要求反応が  $\text{Mg}^{2+}$  要求反応に先行すると報告している。今回のウナギの溶血活性においては従来の報告とは異なり、 $\text{Mg}^{2+}$  のみの添加によっても反応が促進されたことから、古典経路に  $\text{Mg}^{2+}$  が単独で働き活性化される可能性も考えられる。しかし、今回の実験に用いた血清は金属イオンを除去していないので、その中に含まれる微量の  $\text{Ca}^{2+}$  と添加した  $\text{Mg}^{2+}$  とが相乗的に働いて大きな活性が得られた可能性も考えられる。したがって、今後は金属イオンを除去したウナギの血清を用いて、これらの金属イオンの補体活性に及ぼす影響を詳細に検討したうえで明確にしたい。

溶血活性に対するザイモザン処理の影響を検討した結果、活性が著しく低下した。ザイモザンは酵母菌の細胞壁を加熱処理したもので補体の代替経路を活性化するとされている。<sup>1)</sup> すなわち、今回の実験でザイモザン処理によって溶血活性が低下したのは、ザイモザンが血清中の補体を活性化し、消費するためではないかと思われる。

以上のように、ウナギの血清の SRBC に対する溶血活性は凝集抗体価にもなって上昇したことから、抗体に依存すると考えられる。また、本活性は pH 7.5 および 30°C で至適に反応し、易熱性で、EDTA ならびに EGTA によって失活し、 $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  によって促進されたことから、ほ乳類またはほかの魚類の補体の古典経路に相当するものと思われる。しかし、本活性が  $\text{Mg}^{2+}$  によって著しく促進されたことから、ウナギにお

ける補体の古典経路の活性化に  $\text{Mg}^{2+}$  が単独でも作用するのではないかと思われる。

## 文 献

- 1) 近藤元治: 補体学入門, 第1版, 南江堂, 東京, 1980, pp. 9-30.
- 2) G. A. Ingram: *J. Fish Biol.*, **16**, 23-60 (1980).
- 3) M. J. Manning and R. J. Turner: 比較免疫生物学(村松 繁, 大西耕司訳), 共立出版, 東京, 1979, pp. 64-92.
- 4) G. D. Ross and J. A. Jensen: *J. Immunol.*, **110**, 175-182 (1973).
- 5) G. D. Ross and J. A. Jensen: *J. Immunol.*, **110**, 911-918 (1973).
- 6) N. K. B. Day, H. Gewurz, R. Johnnansen, J. Finstad, and R. A. Good: *J. Exp. Med.*, **132**, 941-950 (1970).
- 7) M. Nonaka, N. Yamaguchi, S. Natsume, Sakai, and M. Takahashi: *J. Immunol.*, **126**, 1489-1494 (1981).
- 8) D. K. Sakai: *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **47**, 565-571 (1981).
- 9) D. K. Sakai: *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **48**, 979-991 (1981).
- 10) D. K. Sakai: *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **48**, 345-349 (1982).
- 11) T. Yano, H. Ando, and M. Nakao: *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **29**, 91-101 (1984).
- 12) T. Yano, H. Ando, and M. Nakao: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 841-846 (1985).
- 13) T. Yano, H. Matsuyama, and M. Nakao: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 281-286 (1986).