

## ヒメマス血清中の凝集素価に及ぼす加温処理の影響

誌名	養殖研究所研究報告 = Bulletin of National Research Institute of Aquaculture
ISSN	03895858
著者	池田, 和夫
巻/号	12号
掲載ページ	p. 61-64
発行年月	1987年12月

## ヒメマス血清中の凝集素価に及ぼす加温処理の影響

池田 和夫

(1987年9月10日受理)

### Effects of Heat Treatment on Agglutinin Activity in Serum of Kokanee (*Oncorhynchus nerka*)

Kazuo Ikeda\*

Effects of heat treatment on agglutinin activity of the serum was studied using kokanee (*Oncorhynchus nerka*) immunized by a single intraperitoneal injection of formalin-killed *Aeromonas salmonicida* strain Gifu and/or of sheep red blood cells (SRBC). Forty days after the immunization the blood was taken and agglutinin activity to *A. salmonicida* and hemolytic activity to SRBC were measured in non-treated and heat treated (45°C for 30 minutes) serum.

Fairly high agglutinin activities were observed in the serum of kokanee immunized with *A. salmonicida*. Heat treatment on the serum did not produce appreciable change in agglutinin activity although hemolytic activity disappeared by the treatment. On the other hand, for the serum of SRBC immunized and non-immunized, both activities of agglutinin and hemolysin completely disappeared by the heat treatment, though low levels of both activities were found in the non-treated serum. These results suggest that low agglutinin activity of the serum of non-immunized kokanee which disappeared by the heat treatment is mainly contributed by the complement. Thus, a treatment to denature the complement such as heating seems necessary for the determination of agglutinin activity, especially for the determination of low level of the activity.

*Key words:* kokanee · *Oncorhynchus nerka* · *Aeromonas salmonicida* · agglutinin · complement

血清中の凝集素価を測定する場合に免疫処理を行っていない魚群であるにもかかわらず比較的高い凝集素価がみられる場合がある。このことについては今まで不顕性感染等による自然抗体であろうと考えられてきたが、通常、魚が遭遇する機会の少ない抗原に対してもかなり高い凝集素価を示す場合が多く、著者は自然抗体以外の要因が関与しているのではないかと想定した。本研究では血清の加温処理前後の凝集活性を比較することにより従来自然抗体活性と考えられていた血清中の見かけ上の凝集素価への易熱性成分のかかわりを調べた。

## 方 法

材料魚として平均体重 305 g のヒメマス (*Oncorhynchus nerka*) 3 年魚 22 尾を使用した。免疫原として 1 尾当たり 20 mg/ml の *Aeromonas salmonicida* 岐阜株ホルマリン死菌 1 ml を 5 尾に、20%

---

\* 養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan)

SRBC (ヒツジ赤血球) 1 ml を 5 尾に、また、20 mg/ml の *A. salmonicida* 岐阜株ホルマリン死菌ならびに 20% SRBC 1 ml ずつを 7 尾に腹腔内注射し、ヒレを切って標識した。これらの免疫魚は 5 尾の非免疫魚と共に 1 つの塩化ビニール製水槽 (50×100 cm, 深さ約 35 cm) に収容し、14~15°C の地下水を注水しながら通気して飼育した。注射後 40 日目に全採血を行い、得られた血液は約 2 時間室温に置き、ついで、一夜 4°C の低温室内に保存したあと、3000 rpm (約 1500 g) 20 分間遠心分離を行って血清を分離した。得られた血清の一部を 45°C 30 分間ウォーターバスで加温したのち、未処理血清と同じ条件でマイクロプレート法で凝集素価を測定した。凝集素価測定用抗原として 2.5 mg/ml の *A. salmonicida* 岐阜株ホルマリン死菌、及び 0.5% SRBC を使用した。

## 結 果

結果を Table 1 に示した。

*A. salmonicida* を測定抗原とした系では、*A. salmonicida* 接種魚及び、*A. salmonicida*+SRBC 接種魚では、未処理血清及び 45°C 30 分の加温処理血清共に凝集素価はほとんど変わらず、log<sub>2</sub> タイターとして 7~14 の高い値を示した。一方、非免疫魚と SRBC 接種魚では未処理血清に 3 から 5 の凝集素価がみられたが、45°C 30 分の加温処理後ではすべて 1 以下となった。

また、SRBC を測定抗原とした系では加温処理をしない場合、全ての血清に 5~6 の溶血活性がみられたが、加温処理後ではすべて 1 以下となり、凝集活性はみられなかった。

Table 1. Effects of heat treatment on agglutinin activity in serum of kokanee

Antigen	Agglutinin Activity (log <sub>2</sub> titer)			
	<i>A. salmonicida</i>		SRBC* <sup>1)</sup>	
	No	Heated* <sup>2)</sup>	No	Heated* <sup>2)</sup>
anti- <i>A. salmonicida</i> serum	12	12	6	<1
	7	7	5	<1
	14	13	6	<1
	11	11	6	<1
	12	12	6	<1
anti-SRBC serum	4	<1	6	<1
	4	<1	6	<1
	4	<1	6	<1
anti- <i>A. salmonicida</i> +SRBC serum	12	12	6	<1
	12	12	5	<1
Control serum	4	<1	6	<1
	4	<1	6	<1
	4	<1	6	<1
	3	<1	6	<1
	5	<1	5	<1

\*<sup>1)</sup> Agglutinin activity to SRBC of non-treated serum was determined by hemolysis.

\*<sup>2)</sup> Heated at 45°C for 30 minutes.

## 考 察

赤血球を測定抗原として使用する場合には溶血と凝集は容易に判別されるが、菌体を測定抗原とした場合には溶菌と凝集の区別は通常判定し難い場合が多い。*A. salmonicida*を測定抗原とする場合、マイクロプレート法では陰性の時はウェルの底面中央に白点状の沈澱が現われ、陽性の場合には菌体が底面すべてに網目状に広がるため白点状の沈澱は出現せず肉眼的には透明に観察される。また、菌体の穿孔又は融解がおこった場合も肉眼的には白点状の沈澱は見られず陽性と判断され、これが見かけ上の凝集素価となる場合が考えられる。

*A. salmonicida*を測定抗原系とした場合の*A. salmonicida*接種魚及び、*A. salmonicida*+SRBC接種魚血清の測定値においては、未処理、加温処理後の血清間には差がないにもかかわらず、非免疫魚及びSRBC接種魚では未処理血清には凝集素価がみられるが、加温処理血清には凝集素価はみられなくなることから、非免疫魚及びSRBC接種魚の未処理血清にみられた凝集素価は、見かけ上の凝集素価であり、抗体による凝集反応ではないことがわかった。また、*A. salmonicida*を測定抗原系とした場合の*A. salmonicida*接種魚及び、*A. salmonicida*+SRBC接種魚血清の測定値では未処理、加温処理両血清間に差がないことから、この見かけ上の凝集素価は、真の凝集素価に加算されて検出されるものではなく、凝集素とは独立又は凝集素の量に関係なく作用するものであり、抗体による凝集素と作用部位が競合するものでないことを示している。

この易熱性成分を補体と考えると以下の様に今回の実験結果によく適合する。非免疫魚血清中には1以下の値を示す自然抗体と十分量の補体、又は抗体が存在せずに十分量の補体だけが存在するため、補体が十分に存在すると思われる $\log_2$ タイターとして3から5程度までの稀釈倍率のところでは測定抗原の*A. salmonicida*菌体にごく少量の自然抗体と十分量の補体の共同の働き(哺乳類等での古典的補体活性化経路)又は菌体存在下での補体の活性化(哺乳類等での第二補体活性化経路)で菌体の穿孔又は融解等の反応が起こり見かけ上の凝集素価として判定される。しかし、免疫操作により高い凝集素価を持つ血清の場合には、凝集素価判定値付近では血清の稀釈倍率が高くなるため補体量が少なくなり菌体の穿孔や融解等は稀釈倍率の低いところだけに起こり、判定値となる高稀釈域では凝集反応だけが起こって凝集素価は加温処理血清のそれと一致する。このことは真の凝集素価を求めるには、加温又は他の方法による補体系の不活化の必要性を示すと共に、菌体が血清中に入るだけで菌体の穿孔や融解が起こることから、魚類の細菌感染防御に易熱性成分であるこの補体が深く関与していることを示唆している。

本実験の場合、45°C 30分の加温処理で凝集素は不活化せず、補体と考えられる因子は不活化した。補体の不活化温度に関しては、サクラマスは42°C 20分、ニジマスは44°C 20分、ギンザケとキンギョは45°C 20分、ティラピアは47°C 20分という値が報告されており(Sakai 1981)、至適加温温度や加温時間は魚種や魚の状態等により変わることも予想される。

また、カサゴやギンブナをSRBCで免疫すると、通常血清分離条件では非免疫区の血清にも免疫区のそれにも溶血活性は殆ど見られず、免疫区に凝集活性のみが認められている(中西 私信)。このことから、魚種によって補体と考えられる因子の易熱性や活性の強弱に差があると考えられるので検討する必要がある。

飼育中にSRBC接種魚の5尾中2尾、及び*A. salmonicida*+SRBC接種魚の7尾中5尾が死亡した。SRBCを含まない*A. salmonicida*接種魚及び非免疫魚には死亡が全く見られなかったことから、

SRBC 注射になんらかの原因があった可能性が強い。

なお、本実験中 SRBC 投与によって凝集抗体が誘発されなかった原因は不明である。

## 文 献

- Sakai, D. K. 1981. Heat inactivation of complements and immune hemolysis reactions in rainbow trout, masu salmon, coho salmon, goldfish and tilapia. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 47 (5): 565-571.