甲殻類殊にザリガニの免疫学的研究 (第2報) その種属特異性について

井上 恵 美 子

関西医科大学微生物学教室 (主任 大沢忍婦教授)

〔受付: 10月10日1955年〕

緒 言

私共は甲殻類の中からアメリカザリガニ (*Cambarus clarkii*) を選んで免疫学的研究を行ひつゝあるが、その抗体産生能力について知り得た概要を第一報¹⁾で報告した。アメリカザリガニは種々の点で高等動物とは異つた免疫学的な性格をもっている。しかし異種の蛋白に対する沈降素の産生は明確であるので今回は沈降素を特に種属特異性の面から考察してみた。併せてザリガニ血清を中心とした種属特異性をその家兎抗血清について観察した結果について述べる。

1. ザリガニ免疫血清の沈降反応

体重約30g以上の大型のザリガニを選び、その心臓内に抗原血清を注入する。抗原血清にはヤギ、ウサギ及びイセエビのものを無菌的に採取し、非働化することなしに用いた。加温による免疫血清の非働化はこの場合の血清反応には影響が無いからである。注射は1回量0.3mlとし、3～5日間の間隔を以つて2回～4回反覆した。血清は最終注射の3日～7日後、心臓より採血、6時間後に分離して冷蔵し、翌日これを反応に用いた。実験の時季は9月～11月及び3月～5月に亘っている。沈降反応の術式は室温(10～18℃附近)で重畳輪環法による抗原稀釈法と抗血清稀釈法とを用いた。結果の判定は肉眼で2時間以内の各時間を細分して観察したものによる。種属間の特異性を知る為に上記ヤギ、ウサギ、イセエビの他、フナ、カメ、ニワトリ、マウス、ネコ、モルモット、ヒト、γ-グロブリン(ヒト)等の各種の抗原を用いた。

成 績

a. 抗ヤギ沈降素

4匹のザリガニから得た夫々の抗ヤギ血清のNo. 1, No. 3, No. 4は2回免疫のもので最終注射から3日後、No. 2は6回免疫で最終注射から7日目に採血したものである。主反応の他、各種動物血清に対して比較的広く反応する。反応の強さからみればヤギとカメは同程度で

次でネコ、マウス、ウサギ、モルモットがつゞき、ヒト、ニワトリがそのあとに位置する。No. 1血清はフナ血清に対して初期にわずかに白輪が現はれるが20分後には却つて(±)程度になり消失するのを認めた。No. 2血清はイセエビ血清に弱度に反応し、No. 3血清はウサギ、ヒト血清に反応せず、No. 4血清はニワトリ、ウサギ、ヒト等に反応しないが、これら4種の血清は何れも反応の傾向としては同じである(第1表)。

b. 抗ウサギ沈降素

4匹のザリガニにウサギ血清を注射し(2回或いは4回)最終注射から3日目(但しNo. 6は2回注射後2日目)の血清を採取して前述の如く沈降反応を行つてみる。各血清共大体、抗ヤギ沈降素の場合に似てヤギとカメに最も強く、次でウサギ及びモルモットでヒト及びニワトリに時に僅かに反応する。フナ及びイセエビには反応を示さない。然しNo. 7及びNo. 8の血清の如く他の動物血清に副反応を示して主反応を未だ欠くものもあるし、No. 5の血清は主反応よりもカメ血清に対する副反応の方が強い。(第1表)

c. 抗イセエビ沈降素

同じ甲殻類に属するイセエビ血清はザリガニに対してヤギやウサギ血清よりも抗原性が弱い。従つて4回に亘つて総量1.35ml注射したものが最終注射後4日目に初めて沈降素の出現を認めた。この場合にも主反応が弱く却つてカメ及びヤギに対する副反応の方が強い。正常ザリガニ血清が各種動物血清に対して沈降反応を示さないことは勿論である。(第1表)

吸収試験

抗ヤギ沈降素血清 (No. 1 及び No. 3) 2分をヤギ血

INOUE, Emiko: Studies on the immunological characters of crustacea, especially, on the species-specificity of American Crawfish (*Cambarus clarkii*). II. Kansai Medical School. Department of Microbiology. — Jap. J. of Bact., 11 (3), 239–243, 1956.

第1表 ザリガニ免疫血清の沈降反応の状況

反応原 血清 免疫血清 種類		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	附 記		
		イ セ エ ビ	フ ナ	カ メ	ニ ワ ト リ	マ ウ ス	ネ コ	モ ル モ ット	ウ サ ギ	ヤ ギ	ヒ ト (A B 及 型)	リ ン (ヒ ト グ ロ ブ)	卵 白 (5 %)	ザ リ ガ ニ	免 疫 回 数	最 終 採 血 迄 の 期 間 注 射 後	免 疫 の 時 期
抗 ヤ ギ	No. 1	—	+	++	++	++	++	+	++	++	+	—	—	—	2	3日	9月
	No. 2	+	(20'±)		+	±	+	+	+	++	±	—	—	—	6	7日	11月
	No. 3	—		++	—	+			±	—	++	—	—	—	2	3日	5月
	No. 4	±		++	(6h+)	—	+		+	—	++	—	—	—	2	3日	5月
抗 ウ サ ギ	No. 5	—	—	++	—			—	+	+	+		—	—	2	3	9
	No. 6	—	—	++	+		±	—?	++	++	(20'—) +?		—	—	2	2	10
	No. 7			++	—			+	—	++	—		—	—	4	3	5
	No. 8			++	—			+	—	++	—		—	—	4	3	5
抗イセ エビ	No. 9	+	+	++	—?			+	+	++	—		—	—	4	4	3

++……沈降素量5

第2表 ザリガニ免疫血清の沈降反応(吸収試験)

吸 收 原	反 応 原 血 清 抗ヤギ 免疫血清	1	2	3	4	5	6	7
		カ メ メ	ニ ワ リ	マ ウ ス	モ ル モ ット	ウ サ ギ	ヤ ギ	ヒ ト
ウ サ ギ 血 清	No. 1 吸収前 (3:2) 吸収後	++	++	++	+	+	++	+
	No. 3 吸収前 (2:3) 吸収後	++	—	+	±	—	++	—
	No. 4 吸収前 (1:1) 吸収後	++	—	+	+	—	++	—
ヤ ギ 血 清	No. 1 吸収前 (2:3) 吸収後	++	++	++	+	++	++	+
	No. 3 吸収前 (2:3) 吸収後	++	—	+	±	—	++	—

括弧内の数字は吸収の場合の混合の比を表す。

左は免疫血清, 右は吸収原の量。

清3分で吸収すれば(37°C, 2時間, 氷室に翌日迄)主沈降素は消失するが同時にニワトリ及びモルモット等に対

する副反応も消失し, カメに対する副反応は No. 1 血清では2時間後に弱度に現われる程度に残った。又 No. 3 血清では(±)程度である。抗ヤギ血清(No. 1, No. 3 及び No. 4)をウサギ血清で吸収すればウサギ血清に対する反応が消失するとともに(No. 1)副反応の消失する範囲が広がるがヤギ及びカメに対する副反応は残る。(第2表)

以上の所見から免疫操作によつてザリガニ血清中に出現する沈降素は特異沈降素であるとする事が出来る。但しこの沈降素はウサギ等の如き高等動物に生ずる抗体に比べて主反応の価が低く, また副反応の出現の範囲が広く, 同じ甲殻類から, 魚類, 両棲類, 鳥類, 哺乳類及び人類にまで及んでいる。

Ⅱ. 抗ザリガニ家兎免疫血清の反応。

ザリガニ血清はアルブミンとヘモチアインとを主成分としてグロブリンはチセリウス装置の電気泳動では殆んど証明出来ない(後述)。かゝる血清を家兎に注射して得る沈降素の示す特異性の状況を観察しようとして次の如き実験を試みた。

免疫血清の作製

健康な白色家兎の耳静脈に反覆4回(最初 0.5ml より増量して全量 5 ml)注射し最終注射より7日目に採血して血清を分離する。加熱せず殺菌剤を加へず無菌的に氷室に保存して使用した。

第3表 抗ザリガニ家兎血清の沈降反応 (抗原稀釈)

試験管番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	血清の 蛋白含有量 %
反応原稀釈 倍数	1×	2	4	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	
反応原種類																	
ザリガニ	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	—	5.8
アカテガニ	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	—	—	11.0
クロベンケイガニ	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	—	11.0
サワガニ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	—	—	
ガザミ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
イセエビ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.0
クルマエビ	—?	—?	—?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.0
クマエビ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.0
テナガエビ	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	—	—	10.0

沈降反応の術式は前記に従う。家兎によるザリガニ沈降素は産生し易く、沈降素価は約2万倍に及ぶ。この沈降素の示す副反応の範囲を十脚目の短尾亜目及び長尾亜目中から9種を選んでその血清について調べてみた。(第3, 4表)

9種の動物の名前は次の通りである。

1. アメリカザリガニ *Cambarus clarkii* (Girard).
2. アカテガニ *Sesarma* (*Holometopus*) *haematocheir* (de Haan)
3. クロベンケイガニ *Sesarma* (*Holometopus*) *dehaani* (H. Milne-Edwards)
4. サワガニ *Potamon* (*Geothelphusa*) *dehaani* (White)
5. ガザミ *Neptunus trituberculatus* (Miers)
6. イセエビ *Panulirus japonicus* (v. Siebold)
7. クルマエビ *Penaeus japonicus* (Bate)
8. クマエビ *Penaeus monodon* (Fabricius)
9. テナガエビ *Palaemon nipponensis* (de Haan)

第3表は抗原稀釈法によるもので2万倍まで主反応が現われるがアカテガニ、クロベンケイガニ、サワガニ、テナガエビ等に対する副反応が略同程度に認められる。ガザミ、イセエビ、クルマエビ、クマエビ等に対しては全く反応しない。換言すれば実験に用いた動物の範囲では淡水性動物がすべて同程度に反応を示し鹹水性動物はみな(—)を示したことになる。この十脚類の沈降反応がその棲息域の淡水、鹹水性によつて群分され、短尾目及び長尾目等の分類上の親近関係と関り合いの無い点は興味深い。

抗体稀釈法によつて所謂抗体量を測定してみると抗ザリガニ家兎血清はザリガニ血清にのみ20倍程度に反応

第4表 抗ザリガニ家兎血清の沈降反応 (抗体稀釈)

抗血清稀 釈倍数	1	2	3	4	5	10	20	40	80
反応原									
ザリガニ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—
クロベン ケイガニ	+/	+/	+/	+/	+/	+/	—	—	—
テナガエビ	+/	+/	+/	+/	—	—	—	—	—
イセエビ									
カメ									
ニワトリ									
マウス	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ネコ									
モルモット									
ヤギ									
ヒト									

し、クロベンケイガニには4倍又は10倍程度に、テナガエビには4倍程度に反応するのみで他の甲殻類及び高等動物血清には反応しない。(第4表)

補体結合反応

上記抗ザリガニ家兎血清を用いて補体結合反応による種属特異性の状態を調べた。使用した動物血清の種類はアカテガニ、サワガニ、クロベンケイガニ、ガザミ、イセエビ、テナガエビ及びクルマエビ等である。成績を第5表に示す。方法は常法により反応原を階段的に稀釈して補体結合の陽性の限界を求め又は抗血清を稀釈して一定濃度の反応原血清に対して陽性反応の限界を求めた。溶血系は山羊血球による。補体はモルモットの新鮮血清である。表にみる如く反応原の稀釈法では原血清及び3

第5表 抗ザリガニ家兎血清の補体結合反応上の特異性

方法	反応原 (血清)	反応原 稀釈度	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
			1×	5	10	50	100	200	400	800	1600	3200	6400
抗 原 稀 釈	ザリガニ原液	3×	—	+	++	+	+	+++	+++	+++	+++	++	—
		3×	—	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	—
	アカテガニ サワガニ クロベンケイガニ ガザミ イセエビ テナガエビ クルマエビ												
抗体 稀 釈	稀 釈 度		1×	2	4	8	16	32	64				
	ザリガニ 10×		+++	+++	+++	++	—	—	—				
	5×		+++	+++	+++	+	—	—	—				
	上記各種血清		—	—	—	—	—	—	—				

倍稀釈抗血清を用いた場合、主反応原に対してのみ3200倍まで陽性に現われ他の甲殻類血清に対しては全く反応を示さない。この点では前述の沈降反応の成績に比して特異性が極めて明瞭であるといえる。抗血清を稀釈して一定濃度の諸種反応原血清との間の特異性を比較した場合も全く同様であつて主反応は4～8倍稀釈まで現われるが他の種類の血清には少しも反応しない。従つてザリガニを中心とした甲殻類の家兎免疫血清においては沈降素の副反応の広さに比べて補体結合性抗体の特異性の高さは注目すべきである。(第5表)

総括及結論

総括： 種属の間に現われる血清学的特異性は一般に沈降反応において最も鋭敏であると認められ、またその特異性の鋭敏度は免疫原たる動物と被免疫動物との生物学的近縁の度に連関すると言われている。換言すれば近縁動物間に見られる類属反応は免疫動物として抗原を提供する動物と近縁な動物を選んだ場合にこれを避けることが出来る。血清蛋白の人と猿との間の沈降反応における類属反応の出現は、人及び猿から同様の生物学的分類上の距離にある家兎を免疫動物とする場合には避け難く、人から近縁な位置にある猿を用ふれば明確に区別し得ることは所謂 Uhlenhuth²⁾ の交叉免疫の名によつて周知である。かくの如き特異性の様相は吾々の近くでは冷血動物(柏原)³⁾、鳥類血清の特異性について既に詳細に行われており(赤松)⁴⁾、家兎を免疫動物とした場合にはその特異性は族以下に及難いといふ、即ちアヒル血清

を主とする場合にはアヒルとガチョウは区別し難く、アヒルとウツラ又はハトは区別し得ることを示している。またこの特異性は動物学上の進化の程度に併行して増加する。換言すれば生物学的に下位にある動物を免疫する程、その免疫血清の特異性の度は低下すると見られている。(奥田⁵⁾、内藤⁶⁾)

吾々の実験では家兎を免疫動物とした場合の抗ザリガニ沈降素がザリガニの他、広く高等の諸動物血清と反応を示さず、同じ甲殻類中の淡水産の十脚類の血清に略同じ程度の反応を示し、鹹水産の近縁動物に反応しないことは興味が深い。またザリガニを免疫動物とした場合にはヤギ血清等に対する沈降血清はザリガニ自身の血清を除く他、実験に用いた約10種の血清と殆んど凡て反応し比較的生物学的に近縁なイセエビに対してさへ時には弱度ながら反応している。抗ウサギ血清の場合には前者に比してイセエビ、フナ血清等に対する反応を欠いている。

吾々の無脊椎動物における実験の結果はザリガニの産生する沈降素が特異性の低いことを認めるのであつて、かゝる点に体液性免疫体の原始的な性状があると考えられる。

結 論

A. ザリガニをウサギ、ヤギ、イセエビ等の血清によつて免疫を行い、その結果生ずる沈降素について次の如き所見を得た。

1. ウサギ、ヤギ、イセエビ等の血清の注射によつて生ずるザリガニの沈降素は主抗原に対してのみならず広

く他種動物(哺乳類, 鳥類, 爬虫類, 魚類, 甲殻類)の血清に対して副反応を示す。実験の範囲では, ヒト, ヤギ, モルモット, ネコ, マウス, ニワトリ, カメ, フナ, イセエビにまで及んだ。

2. これらの副反応はヤギの血清による沈降素の場合のみならず, ウサギ, イセエビ等の血清による沈降血清においても略同様に認められる。

3. 無処置ザリガニの血清にはかゝる沈降反応現象は認められない。

4. 諸種動物の血清間に現われる副反応の程度は動物学的な親近関係と直接の関係がないと思われる場合もある。即ち抗ヤギ沈降素の場合にも, 抗ウサギ, 抗イセエビ沈降素の場合にも略同様であつて, ヤギ, カメ血清に対して最も強く現われる。

5. これらの沈降素は主抗原をもつて吸収すれば主抗原に対する主沈降素を失ふとともに各種動物血清に対する副反応も消失する。然し副反応の強い場合には主反応の消失にかゝらずこれを残す。副反応を示す1種抗原血清を以つて吸収を行へば主反応は低下し他の副反応は数種動物に対して消失する。

B. ザリガニの血清を以つて免疫した家兎血清を用い各種動物血清に対する沈降反応及び補体結合反応を行った結果次のような事が明らかとなつた。

1. 抗ザリガニ血清による沈降反応はザリガニ血清に対すると殆んど同様の強さでアカテガニ, クロベンケイガニ, サワガニ, テナガエビ等の淡水性の十脚類にあらわれる。然しガザミ, イセエビ, クルマエビ, クマエビ等の如き鹹水性十脚類には全くあらわれない。

2. 然し沈降反応を抗体稀釈法によつてその沈降素量を比較すれば淡水性十脚類の間にも明らかに差が現われクロベンケイガニ, テナガエビの順位で副反応は低下しその他の十脚類及び高等動物の血清には反応が現れない。

3. 補体結合反応による抗ザリガニ家兎血清の種属特異性は極めて著明であつて各種カニ及びエビ類に対して全く副反応を示さない。

追記 本研究は文部省科学研究助成補助金を受けた。ここに感謝の意を表する。また学生横岱子氏の援助を感謝する。因に本研究の成績の一部は第26回日本細菌学会総会及び第23回本学集談会(昭, 27, 5月)に報告したものである。

文 献

- 1) 大沢, 井上, 上尾: 甲殻類殊にザリガニの免疫学的研究。大阪女子医科大学雑誌, 5巻, 3号, 14-16, 昭 28 (1953)。
- 2) Uhlenhuth: Ein Verfahren zur biologischen Unterscheidung von Blut verwandter Tiere, D. Med. Ws., 31, 1673-1676, 1905.
- 3) 柏原笑児: 冷血動物の種属特殊性に就いて。日微生物理誌, 19, 2381-2394, 大 14 (1925)。
- 4) 赤松翁一: 蛋白免疫反応の特異性に関する実験的研究。特に鳥類の種族特異性に就いて。日微生物理誌, 19, 833-847, 大 14 (1925)。
- 5) 奥田史郎: 哺乳動物の血清学的特殊性に就て。日微生物理誌, 16, 1299-1315, 大 11 (1922), 17, 39-49, 大 12 (1923)。
- 6) 内藤達男: 動物性蛋白体の血清学的特異性問題に就て。日微生物理誌, 22, 2511-2542, 2733-2760, 昭 3 (1928)。