Pasteurella piscicida で免疫したハマチの血清中における沈降抗体の検出と特性

福田 穰*・楠田理一**

(昭和 57 年 5 月 7 日受理)

Detection and Characterization of Precipitating Antibody in the Serum of Immature Yellowtail Immunized with *Pasteurella piscicida* Cells

Yutaka FUKUDA* and Riichi KUSUDA**

*Oita Pref. Fish. Exp. Stn., Kamiura, Minami-Amabe, Oita, Japan

**Fish Dis. Lab., Fac. Agr., Kochi Univ., Nankoku, Kochi, Japan

(Received May 7, 1982)

Precipitating antibody against crude lipopolysaccharide (LPS) of *Pasteurella piscicida* in the serum of immature yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, immunized with the cellular antigen was demonstrated by gel diffusion method (Fig. 1). The serum from immunized yellowtail showed a precipitin line formation when the specific soluble antigen, LPS was reacted against the fish serum after electrophoresis. The single line occurred in the μ -globulin region identified to yellowtail immunoglobulin (Fig. 2). The precipitating antibody activity was detected in the high molecular weight fraction of gel filtration on Sepharose 6B (Fig. 3).

It is concluded that precipitating antibody produced in the serum of immature yellowtail corresponds with macroglobulin in young fish.

著者らは養殖ハマチ稚魚が類結節症流行後および *Pasteurella piscicida* 不活化菌体による人為免疫後に特異的な凝集抗体を血清中に産生することを確認した(福田・楠田, 1980; 楠田・福田, 1980). しかし, これら稚魚期のハマチ血清中には *P. piscicida* に対する沈降抗体活性が検出できなかった(FUKUDA and KUSUDA, 1981)

このように, ハマチ稚魚においては沈降抗体を検出できなかったが, ハマチの成長に伴い沈降抗体産生能が生じる可能性も考えられる。そこで, ハマチ未成魚に *P. piscicida* 不活化菌体を接種したところ, これらの免疫血清中に *P. piscicida* 菌体粗 LPS に対する特異的な沈降抗体が検出できた。

本報ではこれらの検出結果と, 電気泳動およびゲル濾過を用いて沈降抗体の特性について検討した結果を述べる。

材料および方法

供試魚および免疫スケジュール 供試した未成魚の体重は Table 1 に示すとおりである。免疫抗原の調製, 免疫スケジュールおよび飼育方法は福田・楠田(1982)と同様の方法で行なった。なお, 免疫抗原量は 2 ml/尾/回とした。

凝集抗体価の測定 マイクロタイター法により行なった。反応抗原には楠田・福田(1980)と同様に *P. piscicida* MP-12 株ホルマリン不活化菌体を用いた。

Table 1. Agglutinating antibody titers and precipitating antibody activities in immunized yellowtail sera

Fish No.	Body weight (g)	Agglutinating antibody titer (1:)	Precipitating antibody activity
1	1240	128	++
2	990	32	+
3	1130	64	+

* 大分県水産試験場

** 高知大学農学部水産病理学講座

Fig. 1. Detection of precipitating antibody activity in immunized yellowtail sera. Center well, crude LPS from *P. piscicida* cells; Ring of wells, immunized yellowtail sera.

Fig. 2. Characterization of precipitating antibody in immunized yellowtail serum by agar gel immunoelectrophoresis. Well b: immunized yellowtail serum, Troughs: a; anti-yellowtail serum rabbit serum, c; crude LPS from *P. piscicida* cells.

ゲル内沈降反応 OUCHTERLONY 法により行なった。すなわち、Bacto-Agar (Difco) を PBS に 1.0% の割合で溶解した液化寒天 3.0 ml を 76×26 mm のスライドガラスにそそぎ、寒天ゲル板を作製した。そして、試料添加後に湿潤箱中に収納して、室温で 48 時間以上放置し、形成された沈降線を観察した。さらに、観察後に生理食塩水で未反応のタンパク質を洗浄除去し、乾燥フィルム状にして 0.5% Amidoblack 10B 染色液で染色した。寒天ゲル免疫電気泳動 (AIE) は楠田・福田 (1980) の方法にしたがって行なった。なお、反応抗原には福田・楠田 (1980) と同様に *P. piscicida* MP-12 株から抽出した菌体粗 LPS を用いた。

ゲル濾過 濾過材として Sepharose 6B (Pharmacia)

Fig. 3. Detection of precipitating antibody activity in the fractions of immunized yellowtail serum separated by gel filtration on Sepharose 6B. Center well, crude LPS from *P. piscicida* cells; Samples, first fraction (a), second fraction (b), third fraction (c), fourth fraction (d) and fifth fraction (e).

を用いて、福田・楠田 (1982) と同様の方法で行なった。

結 果

免疫血清の MP-12 株に対する凝集抗体価および沈降抗体活性は Table 1 に示すとおりである。凝集抗体価は 1:32~1:128 であったが、いずれの血清からも沈降抗体活性が検出された。特に、No. 1 個体から得られた抗血清 (No. 1 抗血清) は MP-12 株菌体粗 LPS 抗原に対して明瞭な沈降線を形成した (Fig. 1)。

AIE を用いて No. 1 抗血清中の沈降抗体の電気的な性質を分析した結果は Fig. 2 に示すとおりである。すなわち、ハマチの沈降抗体が MP-12 株菌体粗 LPS 抗原と反応して形成する特異沈降線は β -グロブリン域に出現した。

No. 1 抗血清を Sepharose 6B によるゲル濾過で分画し、各分画の沈降抗体活性を試験した結果は Fig. 3 に示すとおりである。すなわち、沈降抗体活性は第 2 分画に検出された。

考 察

魚類の免疫血清中に沈降抗体活性が確認できることは ANDERSON and KLONTZ (1970), EVERHART (1972) および永井・須貝 (1977) らによって報告されている。しかし、著者らは *P. piscicida* 不活化菌体で免疫した平均体重 45 g のハマチ稚魚の血清中には、高い凝集抗体活性が認められたにもかかわらず沈降抗体活性が検出さ

れなかったことを報告した (FUKUDA and KUSUDA, 1981)。

今回の実験においては 1,000 g 前後のハマチ未成魚を稚魚の場合と同様に免疫したところ、血清中に高い凝集抗体価が認められなかったにもかかわらず沈降抗体活性を検出することができた。このことから、稚魚および未成魚の産生する抗体には凝集活性や沈降活性などの免疫学的反応性に質的な差異があるのではないと思われる。

本研究において、AIE によりハマチ血清中の沈降抗体の電気的な性質を分析したところ、特異沈降線はβ-グロブリン域に出現することがあきらかになった。ANDERSON and KLONTZ (1970) は *Aeromonas salmonicida* で rainbow trout を、永井・須貝 (1977) は BSA で ニホンウナギを免疫したのちに血清中に産生される沈降抗体が AIE で β-グロブリン域に泳動することを確認している。このように、異なる魚種においても沈降抗体の電気的性質がほぼ一致していることは興味深い。

さらに、ハマチ抗血清を Sepharose 6B によるゲル濾過で分画し、各分画の沈降抗体活性を試験したところ、活性は第 2 分画、すなわち高分子分画に溶出した。したがって、ハマチ未成魚の産生する沈降抗体はマクログロブリンに属することがあきらかとなった。このことは、すでに述べた AIE における挙動とともにハマチ稚魚の産生する凝集抗体の特性 (福田・楠田, 1982) とよく一致する。

このように、ハマチ未成魚および稚魚の抗体は生化学的によく似ているが、前述のように免疫学的反応性に差異があることも考えられる。EVERHART (1972) は goldfish が BSA や各種のハプテンに対して産生する沈降抗体の活性が弱いことを確認し、その理由としては魚類の抗体が易溶性であるために沈降物を形成するには巨大な格子状の抗原抗体複合物を生成する必要があるのではないかと推察している。ハマチ稚魚においても同様な理由で沈降抗体が検出しにくいのかもしれない。この点についてはさらに検討する必要がある。

要 約

体重 1,000 g 前後のハマチ未成魚を *P. piscicida* 不活化菌体で免疫したところ、菌体に対する高い凝集抗体価が認められなかったにもかかわらず菌体粗 LPS と反応する沈降抗体を検出することができた。この沈降抗体が LPS と反応して形成する特異沈降線は AIE で β-グロブリン域に出現したまた、沈降抗体活性のゲル濾過における挙動から、ハマチ未成魚の沈降抗体はマクログロブリンに属することがあきらかとなった。以上のことから、ハマチ未成魚の産生する沈降抗体は稚魚の凝集抗体と生化学的によく一致した。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金によって行なわれたもので、記して深謝します。また、実験魚を提供していただいた高知大学海洋生物教育研究センター職員の方々に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- ANDERSON, D. P. and G. W. KLONTZ (1970): Precipitating antibody against *Aeromonas salmonicida* in serums of inbred albino rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **27**, 1389-1393.
- EVERHART, D. L. (1972): Antibody response of goldfish to a protein immunogen and to haptenic determinants. *Immunology*, **22**, 503-507.
- 福田 穰・楠田理一 (1980): 養殖ハマチにおける類結節症流行後の抗体産生と血清タンパクの変化. *日水誌*, **46** (11), 1301-1305.
- FUKUDA, Y. and R. KUSUDA (1981): Acquired antibody against pseudotuberculosis in yellowtail. *Fish Pathol.*, **15** (3/4), 263-269.
- 福田 穰・楠田理一 (1982): ハマチ免疫グロブリンの精製と特性. *日水誌*, **48** (7), 921-926.
- 楠田理一・福田 穰 (1980): *Pasteurella piscicida* で免疫したハマチの凝集抗体価と血清タンパクの変化. *日水誌*, **46** (7), 801-807.
- 永井 彰・須見憲明 (1977): ニホンウナギ血漿蛋白の免疫電気泳動的研究. *東海大学紀要海洋学部*, **10**, 109-117.