魚類の補体代替経路の特性

矢野友紀*・藤木和浩*・中尾実樹*・松山博子*

(昭和 63 年 4 月 7 日受付)

Characteristics of the Alternative Complement Pathway in Fish Serum

Tomoki YANO, Kazuhiro FUJIKI, Miki NAKAO and Hiroko MATSUYAMA

Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka, 812, Japan.

(Received April 7, 1988)

Divalent cation requirements for the hemolysis of rabbit red blood cells (RaRBC) by the alternative complement pathway (ACP) of fish (rainbow trout *Salmo gairdneri*, ayu *Plecoglossus altivelis*, carp *Cyprinus carpio*, tilapia *Tilapia nilotica*, yellowtail *Seriola quinqueradiata*, porgy *Pagrus major* and flounder *Paralichthys olivaceus*) were investigated using sera freed of divalent cations and natural antibody. Among divalent cations tested (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} and Ba^{2+}), Mg^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} activated the ACP of all fishes, on the other hand, Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} and Cd^{2+} activated the ACP of one to four fishes. It is of great interest that carp serum hemolyzed RaRBC in the presence of Ca^{2+} alone, while mammalian ACP is known to be activated by Mg^{2+} , but not with Ca^{2+} . The fish sera hemolyzed sheep red blood cells (SRBC), which are not hemolyzed by mammalian sera, in the presence of Mg^{2+} and EGTA (ethylene glycol-bis (2-aminoethyl ether) tetraacetic acid). In particular, the degree of hemolysis (%) of SRBC by yellowtail and flounder sera were 60-85% of that of RaRBC. In addition, neuraminidase-treatment of SRBC raised the degree of hemolysis of the cells. This indicates that the sialic acid content of the membrane of a target cell influences the activation of the fish ACP.

著者らは先に、ニジマス、アユ、コイ、ティラピア、ブリ、マダイおよびヒラメの補体代替経路活性 (ACH 50) を、EGTA と Mg^{2+} の存在下で、ウサギ赤血球 (RaRBC) を標的細胞として測定し、魚類の ACH 50 値が哺乳類のそれに比べて著しく高い (5~50 倍) こと、およびその活性は EDTA 処理、ザイモサン処理、熱処理によって失われることを明らかにした (矢野ら, 1988)。本研究ではさらに、魚類の補体代替経路の 2 価陽イオン要求性と、膜表面のシアル酸を除去したヒツジ赤血球に対する反応性について調べ、哺乳類の補体代替経路の性質と比較した。

材料および方法

試 薬

Amberlite IRC-50 はオルガノ (株) から、EGTA (ethyleneglycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic

acid) および EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) は和光純薬工業 (株) から、ノイラミニダーゼ (Type X) は Sigma 社から購入した。また、各金属塩化物 ($MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $NiCl_2$, $ZnCl_2$, $SrCl_2$, $CdCl_2$ および $BaCl_2$) は片山化学工業 (株) から、ウサギとヒツジの赤血球は日本生物材料センター (株) から入手した。本実験に用いた緩衝液の略号と組成は次の通りである。10 mM EGTA・Mg・GVB, 10 mM EGTA と 10 mM $MgCl_2$ を含む 0.1% ゼラチン-ペロナル緩衝液。30 mM EGTA・Mg・GVB, 30 mM EGTA と 30 mM $MgCl_2$ を含む 0.1% ゼラチン-ペロナル緩衝液 (pH 7.4)。10 mM EDTA・GVB, 10 mM EDTA を含む 0.1% ゼラチン-ペロナル緩衝液 (pH 7.5)。GVB(f), 0.1% ゼラチン-ペロナル緩衝液 200 ml を Amberlite IRC-50 カラム (5 ml) に通して 2 価陽イオンを除去した後、pH を魚種に応じて 7.0 または 7.5 に再調整したもの。

* 九州大学農学部水産化学教室

供試魚および血清の採取

福岡県内の養殖業者から入手したニジマス (*Salmo gairdneri*), アユ (*Plecoglossus altivelis*), コイ (*Cyprinus carpio*), ティラピア (*Tilapia nilotica*), ブリ (*Seriola quinqueradiata*), マダイ (*Pagrus major*) およびヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) を実験に供した。採血はマダイはキューヴィエ氏管から, その他の魚種は尾静脈から行った。採取血液を室温に1時間, 氷水中に1時間放置後, 遠心し, 得られた血清を直ちに液体窒素中で凍結させ -80°C で保存した。また, ウシとブタの血液は福岡市屠畜場で採取し, 常法により血清を分離して -80°C に保存した。ヒト血清は著者らのものを使用した。

血清中の2価陽イオンと自然抗体の除去

魚類および哺乳類の血清 0.5 ml を GVB (f) で平衡化した Amberlite IRC-50 カラム (2 ml) に添加し, GVB (f) で溶出した。はじめの溶出液 0.3 ml を捨て, 次の溶出液 2.0 ml を採取し, これにウサギ赤血球ストローマ浮遊液 (矢野ら, 1987) 0.1 ml を加えた。 0°C で時々振り混ぜながら 60 分間インキュベートし, 遠心後, 上清をその溶血活性に応じてさらに 1~1/60 に希釈した。

補体代替経路の2価陽イオン要求試験

2 価陽イオンと自然抗体を除去した血清 0.2 ml とウサギ赤血球浮遊液 [2×10^8 cells/ml GVB (f)] 0.1 ml との混液に, 金属塩化物 (MgCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 , SrCl_2 , CdCl_2 , または BaCl_2) をその最終濃度が 0.01, 0.1, 1.0 および 10 mM となるよう添加し, 最後に GVB (f) で 0.35 ml に定容した。次いで, ニジマス, アユおよびティラピアは 20°C , pH 7.0 で 1.5 時間, コイは 20°C , pH 7.5 で 1.5 時間, ブリは 20°C , pH 7.5 で 2.5 時間, マダイとヒラメは 20°C , pH 7.5 で 2.0 時間, ヒト, ブタおよびウシは 37°C , pH 7.4 で 40 分間それぞれインキュベートした。各試験管に 10 mM EDTA-GVB 1.4 ml を加えて反応を止め, 遠心後, 上清の 414 nm における吸光度から, 各金属イオン濃度における溶血率 (%) を求めた。

ノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球の調製と溶血試験

SCHAUER (1985) の方法に準拠して, ヒツジ赤血球膜に含まれるシアル酸をノイラミニダーゼによって除去した。すなわち, 0.9% NaCl を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.7) 1.0 ml に懸濁させたヒツジ赤血球 (1×10^9 cells) にノイラミニダーゼ溶液 0.1 ml (10 units) を加え, 37°C で 60 分間反応させた。遠心後, 沈殿を 10 mM EGTA-Mg-GVB で洗浄し, 同緩衝液に 2×10^8 cells/ml となるよう懸濁させた。

次に, 各魚血清をその溶血活性に応じて 10 mM EGTA-Mg-GVB で 1/15~1/250 に希釈し, その 0.25 ml にノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球浮遊液 (2×10^8 cells/ml) 0.1 ml を加え, 至適条件下 (矢野ら, 1988) で反応させて溶血率を求めた。また比較のために, ノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球のかわりに無処理ヒツジ赤血球 (2×10^8 cells/ml) とウサギ赤血球 (2×10^8 cells/ml) を用いた場合の溶血率を測定した。なお, 哺乳類の血清による溶血反応は緩衝液に 30 mM EGTA-Mg-GVB を用い, 37°C で 40 分間行った (天野, 1982)。

実験結果

補体代替経路の2価陽イオン要求性

ニジマス, アユ, コイ, ティラピア, ブリ, マダイおよびヒラメの血清は, いずれも Amberlite IRC-50 を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって2価陽イオンを除くと, ウサギ赤血球に対する溶血活性を消失した。

Fig. 1 は, 2 価陽イオンと自然抗体を除去した魚類および哺乳類の血清に, 金属イオン (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} または Ba^{2+}) をその最終濃度が 0.01~10 mM となるよう加えてウサギ赤血球の溶血反応を行い, 各金属イオンの至適濃度における溶血率を相互に比較したものである。図から, Mg^{2+} 以外に Co^{2+} と Ni^{2+} が全魚種の補体代替経路を活性化させること, およびその程度 (溶血率) は魚種によっては Mg^{2+} を上回ることがわかる。また, Mn^{2+} はアユ, ブリ, マダイ, ヒラメにおいて Mg^{2+} と同程度の効果があること, Zn^{2+} はアユの, Ca^{2+} と Sr^{2+} はコイの, Cd^{2+} はマダイの補体代替経路を活性化させることがわかる。一方, 比較のために測定した哺乳類の血清の場合, Mg^{2+} の他に, Mn^{2+} と Co^{2+} がヒトとブタの, Co^{2+} と Ni^{2+} がウシの補体代替経路の活性化に効果があったが, 他の金属イオンには効果が認められなかった。なお, 魚類の場合 10 mM ZnCl_2 添加区と 10 mM CdCl_2 添加区において, 哺乳類の場合 1.0 mM と 10 mM ZnCl_2 添加区および 10 mM CdCl_2 添加区において, 補体の関与しない溶血が起きたので, これらの区は測定から除外した。

補体代替経路によるノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球の溶血

Fig. 2 はノイラミニダーゼ処理および無処理ヒツジ赤血球の溶血率を, ウサギ赤血球の溶血率を 100% として相対溶血率で示したものである。図から, 哺乳類の血清は膜構造にシアル酸を有するヒツジ赤血球を溶血しない

Fig. 1. Metal requirements for the hemolysis of rabbit red blood cells (RaRBC) by fish and mammalian sera. Each serum was previously freed of divalent cations and natural antibody, and incubated with RaRBC in the presence of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} or Ba^{2+} .

が、魚類の血清はある程度ヒツジ赤血球を溶血することがわかる。特に、ブリとヒラメの場合、ヒツジ赤血球の溶血率は、ウサギ赤血球の溶血率の 60%~85% にも達した。また、図からノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球の溶血率は、全魚種で無処理ヒツジ赤血球の溶血率より

も高いことがわかる。すなわち、ノイラミニダーゼ処理によって膜表面のシアル酸を除くと、ヒツジ赤血球の溶血率がニジマスでは 32%、アユでは 50%、コイでは 908%、ティラピアでは 150%、ブリでは 12%、マダイでは 346%、ヒラメでは 49% それぞれ増大した。

Fig. 2. Effect of neuraminidase treatment on the hemolysis of sheep red blood cells (SRBC) by fish and mammalian sera. The degree of hemolysis is expressed as percentages of that of RaRBC.

考 察

著者らは先に、魚血清中の補体代替経路は EDTA 処理によって失活することを報告した (矢野ら, 1988)。また今回の実験では血清中の 2 価陽イオンを Amberlite IRC-50 を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって除くと、溶血活性の消失が観察された。これらの結果は魚類の補体代替経路の活性化には 2 価陽イオンが不可欠であることを意味している。なお、補体代替経路の 2 価陽イオン要求性試験に先立って、血清中の自然抗体を除去したのは、補体の古典経路の活性化に基づく溶血を防止するためである。

4 種の淡水魚と 3 種の海水魚の補体代替経路の 2 価陽イオン要求性を調べた結果、全魚種の補体代替経路が Mg^{2+} , Co^{2+} および Ni^{2+} によって活性化されることがわかった。また、一部の魚種では Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} または Cd^{2+} によっても活性化された。一方、比較のた

めに調べた哺乳類のヒト、ブタ、ウシの場合、同経路の活性化は Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} または Ni^{2+} によって起き、その他の金属イオンによる活性化は認められなかった。また, LEW *et al.* (1975) は先にモルモット、ヒト、ラットの補体代替経路の活性化は Mg^{2+} , Mn^{2+} および Co^{2+} によって起こることを明らかにしている。従って、今回一部の魚種で補体代替経路の活性化が Ca^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} または Cd^{2+} によって起きたことは、魚類の補体代替経路の方が哺乳類のそれより金属イオンに対する特異性が一般に低いことを示している。

哺乳類では補体の古典経路は Mg^{2+} と Ca^{2+} を、代替経路は Mg^{2+} のみを必要とするといわれており、上記の実験でコイの補体代替経路が Ca^{2+} のみの存在下で活性化されたことは大変興味深い。今後、この活性化機構について更に研究する価値がある。また、 Ca^{2+} 添加時のウサギ赤血球の溶血率が Mg^{2+} 添加時の溶血率を大きく上回ったことは、 Ca^{2+} がコイ血清中に約 3 mM 含まれて

いる(板沢, 1970)ことを考慮すると注目に値する。著者らは先の研究で、Mg-EGTA の存在下で 7 種の魚の補体代替経路の活性 (ACH 50 値) を測定したが、その際、コイの ACH 50 値 (51 units/ml) は、他の魚の ACH 50 値 (328~1,016 units/ml) に比べて極端に低かった。本研究において、コイの場合、 Ca^{2+} による溶血は Mg^{2+} による溶血の約 9 倍に達することがわかったので、これを基に計算すると、実際のコイ血清のウサギ赤血球に対する溶血活性は他の魚種のそれに十分比肩し得ることになる。

FEARON (1978) によれば、補体代替経路の活性化物質であるウサギ赤血球と非活性化物質であるヒツジ赤血球の相違はそれぞれの細胞膜のシアル酸含量に関係しているという。すなわち、ヒツジ赤血球膜は、シアル酸含量が高いため補体代替経路を活性化しないが、ノイラミナーゼで処理してシアル酸を除去するとウサギ赤血球膜と同様活性化物質となるという。また、OURTH and BACHINSKI (1987) は、調査した 15 種のグラム陰性菌のうち、channel catfish 血清が殺菌力を示したのは膜構造にシアル酸を欠く非病原性菌種のみで、膜構造にシアル酸を持つ病原性菌種に対しては何ら効果を示さなかったと報告している。彼らはまた、前もってノイラミナーゼ処理した病原性菌種に対しては channel catfish 血清が強い殺菌作用を示すことから、同血清の殺菌力の強弱は、膜表面のシアル酸含量の多少に関連があると述べている。

今回の実験で、ノイラミナーゼ処理ヒツジ赤血球の方が無処理ヒツジ赤血球より溶血率が高かったことは、魚類の補体代替経路の活性化には標的細胞膜のシアル酸含量が影響を与えることを示唆しており、OURTH and BACHINSKI (1987) の報告と一致する。しかしながら、魚類の血清は哺乳類の血清と違って、シアル酸含量の多いヒツジ赤血球をもかなり溶血した。なかでも、ブリとヒラメではその溶血率はウサギ赤血球の溶血率の 60~85% にも達した (Fig. 2)。今後、このような特異な性質を示す魚類の補体代替経路の活性化機構について更に研究する必要がある。

要 約

1. 魚類の補体代替経路の 2 価陽イオン要求性を調べるために、あらかじめ 2 価陽イオンと自然抗体を除去し

たニジマス、アユ、コイ、ティラピア、ブリ、マダイおよびヒラメの血清に各種金属イオンを添加してウサギ赤血球に対する溶血反応を行った。その結果、全ての魚種で Mg^{2+} 以外に Co^{2+} と Ni^{2+} の添加によって溶血が起きた。また、魚種によっては Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Sr^{2+} または Cd^{2+} の添加によっても溶血が起きた。なお、コイの血清が Ca^{2+} のみの存在下でウサギ赤血球を溶血したことは、 Ca^{2+} が血清常成分であるだけに注目に値する。

2. 魚類の血清は哺乳類の血清と異なっており、Mg-EGTA 存在下でウサギ赤血球のみならず、ヒツジ赤血球をも溶血し、特に、ブリとヒラメにおいてはその溶血率はウサギ赤血球の溶血率の 60~85% にも達した。

3. 魚類の補体代替経路によるヒツジ赤血球の溶血率は、ノイラミナーゼ処理によって増大した。このことは魚類の補体代替経路の活性化には標的細胞膜のシアル酸含量が影響を与えることを示唆している。

文 献

- 天野哲基 (1982): Alternative pathway による溶血補体価 (ACH 50) の測定, 「補体学, 稲井眞弥・井上公蔵・田村 昇編, 370, 医歯薬出版, 東京」134-139.
- FEARON, D. T. (1978): Regulation by membrane sialic acid of β 1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**(4), 1971-1975.
- 板沢靖男 (1970): 血液の化学的性状, 「魚類生理, 川本信之編, 554, 恒星社厚生閣, 東京」10-13.
- LEW, F. T., Y. YUKIYAMA, H. S. WAKS and A. G. OSLER (1978): Activation of the alternative (properdin) pathway by divalent cations. *J. Immunol.*, **115**(3), 884-888.
- OURTH, D. D. and L. M. BACHINSKI (1987): Bacterial sialic acid modulates activation of the alternative complement pathway of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.*, **11**(3), 551-564.
- SCHAUER, R. (1985): Characterization of sialic acids. In "Methods in Enzymology" (ed. by V. GINSBURG) Vol. 50, Academic Press, New York, pp. 64-89.
- 矢野友紀・松山博子・田中浩二・中尾実樹 (1987): マダイ血清の代替経路による溶血補体価 (ACH 50). 日水誌, **53**(10), 1887-1891.
- 矢野友紀・畑山幸宏・松山博子・中尾実樹 (1988): 主要養殖魚の補体代替経路活性の測定法について. 日水誌, **54**(6), 1049-1054.