魚類の補体

矢野友紀*

(1995年3月23日受付)

The Complement Systems of Fish

Tomoki Yano

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

(Received March 23, 1995)

The mammalian complement system consists of about 30 distinct proteins and is activated through the classical pathway (CCP) or the alternative pathway (ACP). The biological importance of this system has stimulated many scientists to study the complement system of fish. It has been reported that jawless fish (hagfish and lamprey) lacks cytolytic activity of the complement and seems to have only the ACP of C3 activation. The complement system of cartilaginous fish (nurse shark) possesses the CCP which is composed of 6 functionally distinct components, but there is no indication of the existence of an ACP. On the other hand, bony fish have both of the pathways, directly comparable to those of mammals and thus far a number of complement components have been isolated from fish species. We have isolated C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9, factor D and factor B from carp serum and have shown that these components interact basically in the same manner as their mammalian counterparts. It was also found that the ACP activity (ACH50) of bony fish was extremely high as compared with those of mammals, and that the function of the CCP of bony fish was only to fix C3 on target cells and triggers the activation of the ACP. These results suggest that the role of the ACP, which works effectively in the early stages of infection, is much more important in fish than in mammals. This paper describes the complement systems of fish concentrating upon that of bony fish.

Key words: complement, immunity, complement component, host-defense

哺乳類の補体（約20種類の血清タンパク質からなる）は抗原抗体複合体をはじめ多くの物質によって活性化され、生体防御に重要な役割を果たす。補体が活性化される経路には古典経路（classical pathway）と第二経路（alternative pathway）の二経路があり、前者では抗原抗体複合体によって、まずC1が活性化され、以下、C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9の順に反応する。一方、後者ではD因子とB因子の存在下でC3がグラム陽性菌の細胞壁、グラム陰性菌の内毒素（LPS）、ザイモサン、ウサギ赤血球などによって直接活性化される。C1からC5までの反応は連続した酵素反応であり、補体成分の活性化（ポリペプチド鎖の切断）によって生じたフラグメントの中には強い生物学的活性を示すものがある。すなわ

ち、C4, C3, C5の分解によって生じた分子量1万前後のC4a, C3a, C5aはアナフィラトキシンとしてマスト細胞に働き、その細胞内顆粒から毛細血管の拡張や平滑筋の収縮を引き起こすヒスタミンを放出させる。C5aは走化性因子としても知られており、白血球を炎症局所に誘導する。また、C3bには抗原粒子に結合して食細胞による異物貪食を促進する作用（オプソニン作用）がある。C6以降の補体成分の反応はポリペプチド鎖の切断を伴うことはなく、C5bにC6以降の成分が分子集合してできるC5b-9複合体（膜侵襲複合体、MAC）が細胞膜に作用し、細胞溶解を引き起こす（近藤, 1981; 長沢ら, 1982; Law and Reid, 1990）。

哺乳類では上記の補体成分（11成分）の他、血清中に存在する補体制御因子としてC1-インヒビター、C4結合タンパク質（C4bp）、I因子、H因子、Sタンパク質、プロ

* 九州大学農学部水産化学第一教室

バージンなどが、また種々の細胞（赤血球、白血球、マクロファージ、マスト細胞など）上に存在する補体レセプター・制御因子として CR1, CR2, CR3, C3a/C4a レセプター, DAF (decay accelerating factor), MCP (membrane cofactor protein), HRF (homologous restriction factor) などが知られている (長沢, 1986; 富田・杉田, 1986; Law and Reid, 1990)。

魚類の補体研究は哺乳類のそれに比べると著しく立ち遅れていたが、1980年代に入って本格的な研究が開始された (Dodds and Day, 1993)。本稿では、研究が最も進んでいる硬骨魚類の補体系を中心に魚類の補体系について概説する。

1. 無顎類 (円口類)

円口類に属するヤツメウナギ類とメクラウナギ類は現存する最も下等な脊椎動物である。カワヤツメ (*Lamprologus japonica*) とヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) の血漿からは C3 が単離されており (Table 1), いずれの C3 も Mg^{++} の存在下で血清中の易熱成分によって活性化さ

Table 1. Complement components identified in fishes, amphibians, reptiles and birds

Animal	Protein	cDNA
Cyclostomes		
Hagfish	C3	C3
Lamprey	C3	C3, B
Cartilaginous fish		
Nurse shark	C1n, C2n, C3n, C4n, C8n, C9n, MAC	
Bony fish		
Rainbow trout	C3, C5, MAC	C3, C9
Carp	C1, C4, C2, C3, C5 (C5b), C6, C7, C8, C9, B, D	
Yellowtail	C3	
Char	C3	
Sand bass	I, H (or C4bp)	
Amphibians		
Bullfrog	C1 (C1q)	
Clawed frog	C4, C3, B, MAC	C3, I
Axolotl	C3	
Reptiles		
Cobra	C3, I, MAC	C3
Birds		
Quail	C3	
Chicken	C1q, C3, B, I	

Average inner diameters of membrane lesions made by MAC are: nurse shark, 8.0 nm; clawed frog, 8.0 nm; cobra, 9.2 nm; guinea pig, 9.0 nm; human, 10.5 nm.

れ、オプソニン活性を発現することから、円口類には第二経路による C3 の活性化機構が存在すると考えられる (藤井, 1991a, 1991b)。カワヤツメ C3 は分子量 190 kDa で、3 本鎖、すなわち α 鎖 (83 kDa), β 鎖 (74 kDa) および γ 鎖 (32 kDa) からなり、 α 鎖上にチオールエステル結合が存在する (Nonaka *et al.*, 1984b)。これに対して、ヌタウナギ C3 は分子量 192 kDa で、他の脊椎動物の C3 と同じく α 鎖 (115 kDa) と β 鎖 (77 kDa) から構成され、 α 鎖上にチオールエステル結合が存在する (Fujii *et al.*, 1992)。哺乳類の C3, C4, C5 は構造および機能の面で類似していることから、共通の祖先分子に由来するといわれているが、カワヤツメ C3 が哺乳類の C4 に似て 3 本鎖構造をもつことは比較免疫学的見地から極めて興味深い。血漿中のヌタウナギ C3 は上述のように 2 本鎖構造をもつが、その遺伝子の塩基配列をみると、3 本鎖構造であるという (Ishiguro *et al.*, 1992)。ヌタウナギでは、C3 は恐らく 1 本鎖前駆体として合成された後、充分なプロセッシングを経ずに 2 本鎖のまま分泌されたのであろう。

円口類の血清からは溶血に関わる補体後半成分 (C5 以降の成分) は検出されていない。ヤツメウナギの血清中には溶血因子 (160 kDa) が存在するが、このタンパク質は補体成分ではないことが確かめられている (Nonaka *et al.*, 1984b)。最近、カワヤツメの C3 (Nonaka and Takahashi, 1992) と B 因子 (Nonaka *et al.*, 1994), およびヌタウナギ C3 (Ishiguro *et al.*, 1992) については、相補 DNA (cDNA) に基づいて全アミノ酸配列が決定されている。

2. 軟骨魚類

テンジクザメ (*Ginglymostoma cirratum*) には 6 成分 (C1n, C2n, C3n, C4n, C8n, C9n) からなる古典経路が存在することが明らかにされており (Table 1), 血清から C1n, C2n, C8n, C9n が単離されている (Ross and Jensen, 1973; Jensen *et al.*, 1981; Hyder Smith and Jensen, 1986)。C1n はヒツジ赤血球 (E) に結合したテンジクザメ抗体 (An) によって活性化され、その際生じた EAnC1n は C1 欠モルモット血清 (C4~C9 を含む) によって溶血する。また、C9n は哺乳類の溶血中間複合体 EAC1-8 を溶血する (Jensen *et al.*, 1981)。これらのことはサメの C1n と C9n が哺乳類の補体成分と適合することを示している。テンジクザメでは溶血中間複合体 EAnC1nC2n, EAnC1nC2nC3n も分離されており、前者は哺乳類の EAC14 に似て安定であるが、後者は EAC142 に似て極めて不安定

であるという (Jensen *et al.*, 1981)。

C1n, C2n, C3n はそれぞれ哺乳類の C1, C4, C2 に、また C8n と C9n はそれぞれ C8 と C9 に相当する成分と考えられるが、C4n が哺乳類のどの成分に相当するか定かでない。C4n が果たして単一の成分なのか、あるいは複数の成分からなるのか再度確かめてみる必要があると思われる。またテンジクザメには補体第二経路も存在すると思われるが、この経路の存在を証明する実験は未だなされていない。テンジクザメ補体が標的細胞上で膜侵襲複合体 (MAC) を形成することは電子顕微鏡観察によって確かめられている (Jensen *et al.*, 1981)。それによると、テンジクザメ MAC の直径はヒト MAC (10.5 nm) やモルモット MAC (9.0 nm) の直径より小さく、平均 8 nm であるという。最近、テンジクザメの白血球表面にブタの C5a を認識するレセプターが存在すると報告されている (Obenauf and Hyder Smith, 1992)。

3. 硬骨魚類

3.1 補体系の活性化経路と構成成分

Nonaka *et al.* (1981a) は、ニジマスの古典経路の活性化は Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で抗原抗体複合体 (ニジマス抗体で感作したヒツジ赤血球) によって起こること、および第二経路の活性化は Mg^{++} のみの存在下でザイモサン、イヌリン、ウサギ赤血球などによって起こることを明らかにした。硬骨魚類では、ニジマスの他、コイ、ティラピア、アユ、アメリカナマズ、ビンナガ、マダイ、ブラウンマスにおいて古典、第二経路の存在が確認されており (Giclas *et al.*, 1981; Ingram, 1987; Ourth and Bachinski, 1987; 松山ら, 1988; Yano, 1992)、恐らく、ほとんどの魚種に両経路が存在すると考えられる。ニジマス血漿からは 2 本鎖構造 (α , β 鎖) をもつ C3 (Nonaka *et al.*, 1984a) と C5 (Nonaka *et al.*, 1981b) が単離されており、ニジマス血清で処理したウサギ赤血球膜からは複数の成分からなる MAC (Nonaka *et al.*, 1984a) が分離されている (Table 1)。最近、ブリおよびイワナの血清から C3 が、サンドバス血漿から補体系の制御因子である I 因子と H 因子 (または C4bp) (Kaidoh and Gigli, 1989) がそれぞれ単離されている。また、ニジマスの C3 (Lambris *et al.*, 1993) と C9 (Stanley and Herz, 1987; Tomlinson *et al.*, 1993) については、cDNA の塩基配列から全一次構造が決定されている。

筆者らは、コイ補体系の構成成分と古典、第二経路の活性化機構を明らかにする目的で一連の研究を行い、これまでに以下のことを明らかにした。① コイ血清中には

Table 2. Molecular weights of complement components isolated from carp serum¹⁾

Complement components	Molecular weight (kDa)	
	Carp	Human
C1	1020	794 (22)
C4	170	205 (3)
C2	108 (1)	102 (1)
C3	194 (2)	185 (2)
C5	175 (2) ²⁾	190 (2)
C6	115 (1)	120 (1)
C7	106 (1)	110 (1)
C8	146 (3)	150 (3)
C9	91 (1)	71 (1)
D	29 (1)	24 (1)
B	93 (1)	92 (1)

¹⁾ Number of polypeptide is shown in parentheses.

²⁾ Molecular weight of C5b.

C1 から C9 までの 9 成分、D 因子および B 因子が総て存在する (Table 2)、② EA (コイ抗体で感作したヒツジ赤血球) への C1 と C4 の結合は Ca^{2+} の存在下で、また EAC14 への C2 の結合は Mg^{2+} の存在下で進行する (Fig. 1)、③ EAC14 は安定であるが、EAC142 は不安定で、0°C に保存しても急速 (半減期, 2.5 時間) に失活する、④ 哺乳類では EAC142 への C3 の結合は温度依存性で低温では進行しないとされているが、コイの場合は 0°C でも進行する、⑤ コイの C3 転換酵素 (C3bBb) によって C3 (184 kDa) は C3a (14 kDa) と C3b (168 kDa) に、またコイ D 因子によって B 因子 (93 kDa) は Ba (34 kDa) と Bb (166 kDa) にそれぞれ開裂する、⑥ コイの C8 と C9 はヒトおよびモルモットの補体成分と適合性を示す、⑦ C5 (C5b) には C6 から C9 までの成分が分子集散的に結合して MAC を形成する (Yano *et al.*, 1986,

Fig. 1. The classical and alternative pathways of carp complement. AgAb: antigen-antibody complex; RaRBC: rabbit red blood cell.

1988a, 1988b; Nakao *et al.*, 1988, 1989; Uemura *et al.*, 1992; 上村, 1993; Yano and Nakao, 1994)。

3.2 補体の特性と機能

硬骨魚類の補体成分は一般に、他の脊椎動物の抗体や補体成分とは適合せず、また他魚種のそれらとも適合しにくい (Sakai, 1981; 松山ら, 1988)。例えば、ニジマスやコイの抗体で感作したヒツジ赤血球は、同種か、または近縁種の血清との組み合わせによってのみ溶血する。またニジマスの C3 はコイやモルモットの補体成分とは適合せず、コイの C1, C4, C3 はヒトやモルモットの補体成分とは適合しない。硬骨魚類の補体は哺乳類のそれよりも熱に不安定で、コイ、アユ、キンギョ、マダイ、ティラピアなどの温水魚では 45~50°C で、ニジマス、シロザケ、ギンザケなどの冷水魚では 40~45°C で失活する (Sakai, 1981; 松山ら, 1988)。さらに、硬骨魚類の補体は低温においても溶血活性を失わず、多くの魚種では 0~4°C でも溶血活性を示す。これは恐らく溶血中間複合体 EAC142 と C3 との反応が低温でも進行するためではないかと思われる。なお、両生類や爬虫類の補体にも同様の特性が認められることから (Koppenheffer, 1987)、低温でも溶血活性を示すというのは変温動物の補体に共通の特性なのかも知れない。哺乳類の補体成分は各種の不活化剤や熱処理によって特異的に失活するが、コイの補体成分についても同様の特性が認められる (Yano *et al.*, 1986)。すなわち、コイの C1 と C4 はそれぞれカラゲナンとアンモニアによって、C4 と C3 はヒドラジンによって失活する。また C1, C2, B 因子は熱処理 (50°C, 15 分) によって容易に失活する。

硬骨魚類の補体は、溶菌、外毒素中和 (Sakai, 1984b)、寄生虫溶解 (Wehnert and Woo, 1980; Bower and Evelyn, 1988) などの直接的抗微生物作用の他、食細胞に対して貧食促進作用 (オプソニン効果) を示す (Griffin, 1983; Sakai, 1984a)。硬骨魚類の補体がオプソニン効果を示すことは、ニジマス、コイ、アメリカナマズ、ウナギ、ブリなどで報告されており、コイでは補体のオプソニン効果は C3 によるものであることが抗コイ C3 ウサギ抗体を用いた実験によって確かめられている (Matsuyama *et al.*, 1992)。なお、コイでは好中球表面に、ニジマスと大西洋サケではマクロファージ表面に、またブリでは末梢血リンパ上に C3 レセプターが存在すると報告されている (Griffin, 1983; Sakai, 1984a; Johnson and Smith, 1984; 西村・楠田, 1991; Matsuyama *et al.*, 1992)。この他、ニジマスやウナギの血清にザイモサンを加えてインキュ

ベートすると白血球走化性因子や白血球増多因子が生成することが明らかにされており (Griffin, 1984; Iida and Wakabayashi, 1988)、これらは恐らく、補体成分の活性化によって生じたフラグメント (C5a, C3e) の働きによるのであろう。

3.3 生体防御における古典、第二経路の役割

硬骨魚類の補体の活性は、基本的には哺乳類で用いられている方法 (Kabat and Mayer, 1961; Williams and Chase, 1977; Nagaki, 1981; 稲井, 1982; 天野, 1982; 稲井, 1992) に準拠して測定できる。すなわち、古典経路活性 (CH50 値) は、同種抗体で感作したヒツジ赤血球を標的細胞に用いて Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で、また第二経路活性 (ACH50 値) は、ウサギ赤血球を標的細胞に用いて EGTA (Ca^{++} のキレート剤) と Mg^{++} の存在下で測定できる。ただし、魚種によって最適反応温度、反応時間、pH などが異なるので、それぞれの魚種に適した条件下で測定する必要がある (矢野ら, 1988; Yano, 1992)。筆者らの方法で数種の硬骨魚類の CH50 値と ACH50 値を測定した結果、CH50 値は哺乳類と余り差がなかったが、ACH50 値は哺乳類に比べて著しく高かった (5~60 倍)。恐らく硬骨魚類では補体第二経路が、哺乳類で考えられる以上に、重要な役割を果たしているであろう (矢野ら, 1988)。

筆者らは、抗コイ D 因子ウサギ抗体 (IgG) を固定したカラムを用いてコイ血清から D 因子を除去すると、第二経路活性のみならず、古典経路活性も失われること、およびこの D 因子欠血清にコイ D 因子を加えると、両経路の活性が完全に復活することを見出した。D 因子は第二経路の構成成分であることから、D 因子除去によって古典経路活性が失われるというのは不思議な現象である。そこで、古典経路のどの反応段階が抗コイ D 因子抗体によって阻害されたか突き止めるために、D 因子欠コイ血で処理した標的細胞 (EA) に抗コイ C3 ウサギ抗体 (IgG) とモルモット血清を加えてインキュベートし、EA の溶血が起きるか調べてみた。その結果、EA は溶血し、EA 上に C3 が沈着していることが確かめられた。なお、D 因子欠コイ血清による溶血反応は C5 の活性化までは進まなかったと考えられる。何故なら、もし、進んでいたのであれば、C5b に C6 以降の成分が分子集合し、EA の溶血が起きたはずである。この実験結果は、硬骨魚類の古典経路は単独では標的細胞を溶解することができず、単に C3 を標的細胞上に固定して、第二経路活性化の“引き金”の役割を果たすに過ぎないことを示

している。

硬骨魚類の補体系はその構成成分をみる限り、既に哺乳類や鳥類と同等のレベルにまで分化・発達していると考えられるが、硬骨魚類の ACH50 値が哺乳類に比べて著しく高いことや、古典経路が単独では標的細胞を溶解することができないことを考え合わせると、硬骨魚類では抗体の関与なしに異物を非特異的に処理する経路、すなわち、第二経路が生体防御に重要な役割を果たしていると考えられる。

3.4 C3 の遺伝的多形

哺乳類の補体成分の多くは、遺伝的多形を示すことが知られているが (Whitehouse, 1988), 最近, ニジマスの C3 についても多形 (変異体) の存在が明らかにされており (Jensen and Koch, 1991), 異なる C3 をもつニジマスの間では VHS (viral haemorrhagic septicemia) に対する抵抗性が異なると報告されている (Sliependrecht *et al.*, 1993)。著者らもコイの C3 に多形が存在すること, および異なる C3 をもつコイの間では補体の溶血活性に著しい差がみられることを突き止めている。今後, 魚類の C3 の遺伝子型と抗病性との関連を明らかにすることは, 抗病性の高い養殖魚育成の観点から興味深い。

4. 脊椎動物の C3 に共通の構造的, 機能的特性

補体第3成分 (C3) は古典, 第二経路に共通した成分であり, その活性化フラグメントは生体防御に極めて重要な役割を果たす。C3 はこれまでに多くの脊椎動物から単離されており, それらは, ① 分子量が 180~200 kDa

である, ② ヤツメウナギを例外として2本鎖構造 (α 鎖, β 鎖) をもつ, ③ α 鎖上にチオールエステル結合が存在する, ④ 活性化フラグメント (C3b, iC3b) が食細胞に対して貪食促進作用 (オプソニン効果) を示す, などの点で共通している (Becherer *et al.*, 1989)。

C3 は補体成分の中で最も構造解析の進んだ成分であり, 現在までにヒト, ラット, マウス, モルモット, コブラ, ニジマス, ヤツメウナギおよびメクラウナギの C3 の全アミノ酸配列, およびウサギとツメガエル (*Xenopus laevis*) の C3 の部分アミノ酸配列が cDNA に基づいて決定されている (Alsenz *et al.*, 1992; Lambris *et al.*, 1993) (Table 3)。さらにヒト C3 分子については, C3 レセプター (CR1, CR2, CR3), H 因子, B 因子およびプロパージンとの結合部位が明らかにされている (Fig. 2)。哺乳類の C3 のアミノ酸配列は, ヒト C3 と高い同一性 (77~80%) と類似性 (85~89%) を示すが (Table 3), コブラ C3 のヒト C3 に対する同一性と類似性はそれぞれ 51% と 66% であり, メクラウナギ C3 のそれらは 31% と 47% に過ぎない。つまり, 系統樹が下がるに連れて同一性, 類似性共に低下する。Table 3 の右辺は, 各脊椎動物 C3 の活性化フラグメントとヒトの C3 レセプター (CR1, CR2), H 因子, B 因子およびプロパージンとの結合性を示したものである。表からわかるように, 哺乳類の C3 フラグメントはヒト C3 リガンドに対して高い結合性を示すのに対し, 下等動物の C3 フラグメントの結合性は総じて低い。このことは, 高等動物と下等動物とでは, 単に C3 のアミノ酸配列が異なるのみならず, C3 リガンドのアミノ酸配列も異なることを示唆している。

Table 3. Summary of the structural and functional properties of C3 from different species

	Chain structure	Thiolester bond	Amino acid sequence (% I/S to Hu C3) ¹⁾	Binding to Hu C3 ligands				
				CR1	CR2	H	B	P
Human C3	α/β	α	100/100	+	+	+	+	+
Rabbit C3 ²⁾	α/β	α	80/87	+	+	+	+	+
Rat C3	α/β	α	78/86	+	+	+	nd ³⁾	+
Mouse C3	α/β	α	77/85	+	+	+	nd	+
Guinea pig C3	α/β	α	78/86	+	nd	+	±	+
Cobra C3	α/β	α	51/66	—	—	—	—	—
Clawed frog C3 ²⁾	α/β	α	46/60	+	+	—	—	+
Trout C3	α/β	α	44/59	—	—	+	—	—
Lamprey C3	$\alpha/\beta/\gamma$	α	32/48	nd	nd	nd	nd	nd
Hagfish C3	α/β	α	31/47	nd	nd	nd	nd	nd

¹⁾ I/S: identity/similarity.

²⁾ Partial amino acid sequence.

³⁾ nd: not done.

Fig. 2. A scheme showing the regions of human C3 molecule which have been identified to bind factors H and B, CR1, CR2, CR3 and properdin (P).

興味深いことに、ヒトの白血球表面に存在する C3 レセプター (CR1, CR2) は、ニジマスの C3 フラグメントとは適合せず、それらを認識し得ないが (Table 3), 大西洋サケのマクロファージ表面にはヒトの C3 フラグメント (C3b, iC3b) を認識する C3 レセプターが存在すると報告されており (Johnson and Smith, 1984), さらに、ウニやミミズなどの無脊椎動物の食細胞表面にもヒトの C3 フラグメント (C3b, iC3b) を認識するレセプターが存在するという (Bertheussen, 1982; Bertheussen and Seljelid, 1982; Bertheussen, 1983; Laulan *et al.*, 1988)。これらのことは、下等動物の C3 レセプターの特異性が高等動物のそれに比べて低いことを示唆している。恐らく、動物の免疫機能が発達、複雑化するに連れて白血球上の C3 レセプターの特異性も高まったのであろう。

文 献

- Alsens, J., D. Avila, H. P. Huemer, I. Esparza, J. D. Becherer, T. Kinoshita, Y. Wang, S. Oppermann and J. D. Lambris (1992): Phylogeny of the third component of complement, C3: Analysis of the conservation of human CR1, CR2, H and B binding sites, Concanavalin A binding sites, and thiolester bond in the C3 from different species. *Dev. Comp. Immunol.*, **16**, 63-76.
- 天野哲基 (1982): Alternative pathway による溶血補体価 (ACH50) の測定, [補体学, 稲井真彌・井上公蔵・田村 昇共編, 医歯薬出版, 東京], pp. 134-140.
- Becherer, J. D., J. Alsens and J. D. Lambris (1989): Molecular aspects of C3 interactions and structural/functional analysis of C3 from different species. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **153**, 45-72.
- Bertheussen, K. (1982): Receptors for complement on echinoid phagocytes. II. Purified human complement mediates echinoid phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.*, **6**, 632-642.
- Bertheussen, K. (1983): Complement-like activity in sea urchin coelomic fluid. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 21-31.
- Bertheussen, K. and R. Seljelid (1982): Receptors for complement on echinoid phagocytes. I. The opsonic effect of vertebrate sera on echinoid phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.*, **6**, 423-431.
- Bower, S. M. and T. P. T. Evelyn (1988): Acquired and innate resistance to the haemoflagellate *Cryptobia salmositica* in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Dev. Comp. Immunol.*, **12**, 749-760.
- Dodds, A. W. and A. J. Day (1993): The phylogeny and evolution of the complement system. In "Immunology and Medicine" (ed. by K. Whaley, M. Loos and J. M. Weiler), Kluwer Academic Publishers, London, pp. 39-88.
- 藤井 保 (1991a): 補体系の系統発生. *細胞*, **23**, 543-547.
- 藤井 保 (1991b): 円口類の生体防御機構. *臨床免疫*, **23**, 1625-1634.
- Fujii, T., T. Nakamura, A. Sekizawa and S. Tomonaga (1992): Isolation and characterization of a protein from hagfish serum that is homologous to the third component of the mammalian complement system. *J. Immunol.*, **148**, 117-123.
- Giclas, P. C., D. C. Morrison, B. J. Curry, R. M. Laurs and R. J. Ulevitch (1981): The complement system of the albacore tuna *Thunnus alalunga*. *Dev. Comp. Immunol.*, **5**, 437-447.
- Griffin, B. R. (1983): Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 253-259.
- Griffin, B. R. (1984): Random and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leukocytes: Activation by antibody, complement, and normal serum components. *Dev.*

- Comp. Immunol.*, **8**, 589–597.
- Hyder Smith, S. and J. A. Jensen (1986): The second component (C2n) of the nurse shark complement system: Purification, physicochemical characterization and functional comparison with guinea pig C4. *Dev. Comp. Immunol.*, **10**, 191–206.
- Iida, T. and H. Wakabayashi (1988): Chemotactic and leukocytosis-inducing activities of eel complement. *Fish Pathol.*, **23**, 55–58.
- 稲井真彌 (1982): 補体価 (CH50) の測定, [補体学, 稲井真彌・井上公蔵・田村 昇共編, 医歯薬出版, 東京], pp. 119–133.
- 稲井真彌 (1992): 補体活性の測定, [新生化学実験講座, 12 巻, 分子免疫学 III, 日本生化学編, 東京化学同人, 東京], pp. 209–226.
- Ingram, G. A. (1987): Hemolytic activity in the serum of brown trout, *Salmo trutta*. *J. Fish Biol.*, **31** (Suppl. A), 9–17.
- Ishiguro, H., K. Kobayashi, M. Suzuki, K. Titani, S. Tomonaga and Y. Kurosawa (1992): Isolation of a hagfish gene that encodes a complement component. *EMBO J.*, **11**, 829–837.
- Jensen, L. B. and C. Koch (1991): Genetic polymorphism of component C3 of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) complement. *Fish Shellfish Immunol.*, **1**, 237–242.
- Jensen, J. A., E. Festa, D. S. Smith and M. Cayer (1981): The complement system of the nurse shark: Hemolytic and comparative characteristics. *Science*, **214**, 566–569.
- Johnson, E. and P. Smith (1984): Attachment and phagocytosis by salmon macrophages of agarose beads coated with human C3b and C3bi. *Dev. Comp. Immunol.*, **8**, 623–630.
- Kabat, E. A. and M. M. Mayer (1961): Experimental Immunochemistry, C. C. Thomas, Springfield, Ill., pp. 133–240.
- Kaidoh, T. and I. Gigli (1989): Phylogeny of regulatory proteins of the complement system. Isolation and characterization of a C4b/C3b inhibitor and a cofactor from sand bass plasma. *J. Immunol.*, **142**, 1605–1613.
- 近藤元治 (1981): 補体学 (第2刷), 南江堂, 東京, 252 p.
- Koppenheffer, T. L. (1987): Serum complement systems of ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.*, **11**, 279–286.
- Lambris, J. D., Z. Lao, J. Pang and J. Alsenz (1993): Third component of trout complement. cDNA cloning and conservation of functional sites. *J. Immunol.*, **151**, 6123–6134.
- Laulan, A., J. Lestage, A. M. Bouc and P. Chateaureynaud-Duprat (1988): The phagocytic activity of *Lumbricus terrestris* leukocytes is enhanced by the vertebrate opsonins: IgG and complement C3b fragment. *Dev. Comp. Immunol.*, **12**, 269–277.
- Law, S. K. A. and K. B. M. Reid (1990): 補体の分子生物学 (藤田禎三訳), 南江堂, 東京, 78 p.
- 松山博子・中尾実樹・矢野友紀 (1988): 魚類の抗体および補体の種間適合性. 日本水産学会誌, **54**, 1993–1996.
- Matsuyama, H., T. Yano, T. Yamakawa and M. Nakao (1992): Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish Shellfish Immunol.*, **2**, 69–78.
- Nagaki, K. (1981): Complement hemolytic activity. *Clin. Immunol.*, **13**, 154–160.
- 長沢滋治 (1986): 補体系プロテアーゼの活性化と制御機構, 蛋白質核酸酵素, **31**, 831–846.
- 長沢滋治・永木利義・井上公蔵 (1982): 補体系活性化の反応機作と制御機構, [補体学, 稲井真彌・井上公蔵・田村 昇編, 医歯薬出版, 東京], pp. 17–77.
- Nakao, M., T. Yano and H. Matsuyama (1988): Partial purification and characterization of the fourth component (C4) of carp complement. *Fish Pathol.*, **23**, 243–250.
- Nakao, M., T. Yano, H. Matsuyama and T. Uemura (1989): Isolation of the third component of complement (C3) from carp serum. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 2021–2027.
- 西村仁志・楠田理一 (1991): ブリ末梢血リンパ球上の C3 レセプターの存在. 日本水産学会誌, **57**, 2219–2222.
- Nonaka, M. and M. Takahashi (1992): Complete complementary DNA sequence of the third component of complement of lamprey. Implication for the evolution of thioester containing proteins. *J. Immunol.*, **148**, 3290–3295.
- Nonaka, M., N. Yamaguchi, S. Natsuume-Sakai and M. Takahashi (1981a): The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement. *J. Immunol.*, **126**, 1489–1494.
- Nonaka, M., S. Natsuume-Sakai and M. Takahashi (1981b): The complement system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Purification and characterization of the fifth component (C5). *J. Immunol.*, **126**, 1495–1498.
- Nonaka, M., M. Iwaki, C. Nakai, M. Nozaki, T. Kaidoh, M. Nonaka, S. Natsuume-Sakai and M. Takahashi (1984a): Purification of a major serum protein of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) homologous to the third component of mammalian complement. *J. Biol. Chem.*, **259**, 6327–6333.
- Nonaka, M., T. Fujii, T. Kaidoh, S. Natsuume-Sakai, M. Nonaka, N. Yamaguchi and M. Takahashi (1984b): Purification of a lamprey complement protein homologous to the third component of the mammalian complement system. *J. Immunol.*, **133**, 3242–3249.
- Nonaka, M., M. Takahashi and M. Sasaki (1994): Molecular cloning of a lamprey homologue of the mammalian MHC class III gene, complement factor B. *J. Immunol.*

- 152, 2263-2269.
- Obenauf, S. D. and S. Hyder Smith (1992): Migratory response of nurse shark leucocytes to activated mammalian sera and porcine C5a. *Fish Shellfish Immunol.*, **2**, 173-181.
- Ourth, D. D. and L. M. Bachinski (1987): Bactericidal response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by the classical and alternative pathways against bacterial pathogens. *J. Appl. Ichthyol.*, **3**, 42-45.
- Ross, G. D. and J. A. Jensen (1973): The first component (C1n) of the complement system of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*). II. Purification of the first component by ultracentrifugation and studies of its physicochemical properties. *J. Immunol.*, **10**, 911-918.
- 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**, 565-571.
- Sakai, D. K. (1984a): Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes. *J. Fish Dis.*, **7**, 29-38.
- Sakai, D. K. (1984b): The non-specific activation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, complement by *Aeromonas salmonicida* extracellular products and the correlation of complement activity with the inactivation of lethal toxicity products. *J. Fish Dis.*, **7**, 329-338.
- Slierendrecht, W. J., L. B. Jensen, V. Hørlyck and C. Koch (1993): Genetic polymorphism of complement component C3 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and resistance to viral haemorrhagic septicaemia. *Fish Shellfish Immunol.*, **3**, 199-206.
- Stanley, K. K. and J. Herz (1987): Topological mapping of complement component C9 by recombinant DNA techniques suggests a novel mechanism for its insertion into target membranes. *EMBO J.*, **6**, 1951-1957.
- 富田基郎・杉田雄二 (1986): 補体第二経路因子群の構造と反応特異性, 蛋白質核酸酵素, **31**, 847-864.
- Tomlinson, S., K. K. Stanley and A. F. Esser (1993): Domain structure, functional activity, and polymerization of trout complement protein C9. *Dev. Comp. Immunol.*, **17**, 67-76.
- 上村 毅 (1993): コイ補体の膜侵襲複合体 (MAC) とその構成成分に関する研究. 博士論文, 九州大学, p. 118.
- Uemura, T., M. Nakao and T. Yano (1992): Isolation of the second component of complement (C2) from carp serum. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 727-733.
- Wehnert, S. D. and P. T. K. Woo (1980): In vivo and in vitro studies on the host specificity of *Trypanoplasma salmositica*. *J. Wildl. Dis.*, **16**, 183-190.
- Whitehouse, D. B. (1988): Genetic polymorphisms of animal complement components. *Expl. Clin. Immunogenet.*, **5**, 143-164.
- Williams, C. A. and M. W. Chase (1977): Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 4, Academic Press, New York, pp. 127-274.
- Yano, T. (1992): Assays of hemolytic complement activity. In "Techniques in Fish Immunology" (ed. by J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, S. L. Kaattari and A. F. Rowley), SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp. 131-141.
- Yano, T. and M. Nakao (1994): Isolation of a carp complement protein homologous to mammalian factor D. *Mol. Immunol.*, **31**, 337-342.
- Yano, T., H. Matsuyama and M. Nakao (1986): An intermediate complex in immune hemolysis by carp complement homologous to mammalian EAC14. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 281-286.
- 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. 日本水産学会誌, **54**, 1049-1054.
- Yano, T., H. Matsuyama and M. Nakao (1988a): Isolation of the first component of complement (C1) from carp serum. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 851-859.
- Yano, T., H. Matsuyama and M. Nakao (1988b): Formation and characteristics of an intermediate complex EAC142 in immune hemolysis by carp complement. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1997-2000.