マガキ組織における凝集素と殺菌素の活性^{*1}

森 勝義・五日市周三・村山克夫・野村 正

(1980年7月19日受理)

Activities of Agglutinin and Bactericidin in Oyster Tissues^{*1}Katsuyoshi MORI^{*2}, Shūzō ITSUKAICHI^{*3} Katsuo MURAYAMA^{*2},
and Tadashi NOMURA^{*2}

High natural agglutinin activities against sheep erythrocytes were observed in the extracts of the gill (mean titer: 141) and digestive diverticula (DD, mean titer: 128) from adult oyster, *Crassostrea gigas*, under hanging culture. Lower but considerable activities were found in the extracts of the mantle and adductor muscle. The natural bactericidal activity against HS 29 strain (*Arthrobacter* sp.) was conspicuously high in the DD extracts (mean titer: 231) and detectable also in the mantle and gill.

The natural agglutinin activities of DD and gill declined sharply with progressive development of the gonad and was minimal just before and during the spawning. However, these activities showed a rapid rising trend after the spawning season.

The agglutinin activities of DD and gill were enhanced by the injection of 0.1 ml/oyster of 10% sheep erythrocyte suspension into the connective tissue surrounding DD. The bactericidal activity of DD was observed to increase after the injection of formalin-killed HS 29 strain vaccine which was given into the connective tissue surrounding DD (dose: 1.8×10^8 cells/g fresh soft-body wt.) or the adductor muscle (8.3×10^5 cells/g fresh soft-body wt.).

ホタテガイの *Arthrobacter* sp. (HS 29 株) に対する自然殺菌素およびヒツジ赤血球 (SRBC) に対する自然凝集素の活性は消化盲嚢部においてのみ検出されるか、あるいは同組織において特異的に高く、かつ、消化盲嚢部におけるこれら両活性の季節的変動はいわゆる「個体の生理的活性」^{1,2)} のそれと良く一致することが前研究³⁾ により明らかにされた。これらの結果は、消化盲嚢部をホタテガイの生体防御機構の中核として位置づけるべきこと、および、殺菌素と凝集素をその生体防御能力を支える重要因子として認識すべきことを示唆している。

他方、組織呼吸量、鰓毛活性、軟体部全体のグリコーゲン含量および死亡率などから総合的に把握されるマガキ *Crassostrea gigas* の生理的活性は、特に大量斃死要因解析の基礎資料として重要であるため、従来、主として性成熟・産卵過程のエネルギー代謝との関連において検討されてきた⁴⁻⁶⁾。

本研究においては、以上の事実にかんがみ、マガキの自然凝集素・殺菌素活性の組織分布と自然凝集素活性の

季節的変動などを調べることににより、マガキの生理的活性を生体防御因子の力価によつて表現することの可能性を検討するとともに、生体防御因子を異種細胞接種によつて誘起しうるか否かについても明らかにしようとした。

実験方法

供試組織は、宮城県牡鹿半島西岸で垂下養殖中のマガキ成貝 (採苗後 1 年 9 か月から 2 年 6 か月までのもので、平均殻高は 7.0~11.9 cm) より採取した消化盲嚢部 (消化盲嚢のほかには胃および肝臓をも含む)・鰓・外套膜・閉殻筋である。

凝集素・殺菌素の力価測定法は前報³⁾ と同じである。凝集素価測定における指標細胞は 1% SRBC 懸濁液のみであつたが、殺菌素価測定用試験菌としては、HS 29 株 (*Arthrobacter* sp.)⁸⁾, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flavobacterium flavescens*, *Aeromonas hydrophyla* および

^{*1} 軟体動物の生体防御機構—II (Defense Mechanisms of Molluscs—II).

^{*2} 東北大学農学部水産学科 (Department of Fishery Science, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980, Japan).

^{*3} 岩手県栽培漁業センター (Iwate Prefectural Farming Fisheries Center, Kadonohama, Ofunato, Iwate 022, Japan).

Vibrio parahaemolyticus の 7 種を用いた。

凝集素活性に対する温度の影響は、1) -80°C と -18°C (7, 30 日間) で凍結保存した消化盲嚢部と鰓の各組織、2) 4°C (2, 6, 11 日間) で冷蔵した鰓抽出液、および 3) $20\sim 80^{\circ}\text{C}$ (10°C 間隔、ただし 55°C を加えて計 8 測定点、30 分間) に放置した消化盲嚢部と鰓の各抽出液について検討した。3) の場合、 40°C 以上では抽出液が凝固するので、 $1,000\times\text{g}$ で 10 分間 (室温) 遠心分離して得た上清液について活性を測定した。

凝集素活性に対する pH の影響は、消化盲嚢部と鰓の各抽出液について前報³⁾ と同じ方法により検討した。

凝集素または殺菌素の誘起を確認するための異種細胞接種実験では、マガキの右殻を一部除去して露出させた消化盲嚢部周辺結合組織あるいは閉殻筋に対し、凝集素の場合には 10% SRBC を 0.1 ml/個体 (対照: SRBC 懸濁液調製用 Tris-NaCl 緩衝液³⁾ を同量)、殺菌素の場合には $10^8\sim 10^{10}$ 細胞/ml の HS 29 ワクチン³⁾ を 0.1 ml/個体 (対照: 0.3% [v/v] ホルマリンを含む 3% NaCl を同量) ずつ注射した。なお、これらの誘起実験 (1979 年 12 月~1980 年 2 月) は、常に水温がほぼ一定 ($15^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) の循環水槽を用いて行なった。

結 果

自然凝集素・殺菌素活性の存在 SRBC に対する自然凝集素活性は鰓と消化盲嚢部で高く、外套膜と閉殻筋でもかなりの程度検出された。他方、HS 29 株を試験菌とする自然殺菌素活性は消化盲嚢部で著しく高く、かつ外

套膜と鰓でも低いながら検出されたが、閉殻筋では確認できなかった (Table 1)。

消化盲嚢部と鰓の自然凝集素活性に及ぼす温度の影響については、各組織を -80°C または -18°C で 7 日間凍結しても活性は何ら変化せず (Table 2)、また 4°C で冷蔵した鰓抽出液は 2 日間程度ではほとんど活性低下を示さなかった (Table 3)。しかし、 40°C (30 分間) では消化盲嚢部・鰓の各抽出液はいずれも 20°C (同) の場合の約 1/2 に低下し、 60°C (同) で完全に失活した (Figs. 1, 2)。

消化盲嚢部と鰓の自然凝集素活性に及ぼす pH の影響については、pH 7.0~7.6 で活性は低いが、その酸性側 (pH 6.0 まで) またはアルカリ性側 (9.0 まで) では高まることがわかった (Fig. 3)。なお、pH 6.0 以下では活性は漸次低下した。

Table 1. Activities of agglutinin and bactericidin in the oyster tissues (May, 1979)

Tissues	Agglutinin titer* ¹	Bactericidin titer* ²
Digestive diverticula	128.0 $\pm$ 78.3 (5)	231.1 $\pm$ 109.1 (9)
Gill	140.8 $\pm$ 69.8 (5)	16.4 $\pm$ 10.4 (9)
Mantle	89.6 $\pm$ 35.1 (5)	32.5 $\pm$ 21.2 (8)
Adductor muscle	41.6 $\pm$ 21.5 (5)	0 (6)

*¹ Reciprocal of dilution agglutinating sheep red blood cells in 48 h at 20°C (per gram of original tissue).

*² Reciprocal of dilution killing 50% of bacteria (HS 29 strain) in 90 min at 20°C (per gram of original tissue).
Averages and standard deviations (number of oysters) are presented.

Table 2. Effects of freezing storage on the natural agglutinin activity *in vitro* of oyster digestive diverticula and gills (Jan. to Feb., 1980)

Temperature	Tissues	Agglutinin titer		
		Storage (days)		
		0	7	30
-80°C	Digestive diverticula	128.0 $\pm$ 78.4	128.0 $\pm$ 78.4	35.2 $\pm$ 17.5
	Gill	230.4 $\pm$ 57.2	230.4 $\pm$ 57.2	89.6 $\pm$ 35.1
-18°C	Digestive diverticula	128.0 $\pm$ 78.4	128.0 $\pm$ 78.4	28.8 $\pm$ 20.8
	Gill	230.4 $\pm$ 57.2	230.4 $\pm$ 57.2	76.8 $\pm$ 28.6

SRBC (Sheep red blood cells, 1%) were used as indicator cells.
Averages and standard deviations on 5 samples are presented.

Table 3. Effects of cold storage (4°C) on the natural agglutinin activity *in vitro* of oyster gill (Jan., 1980)

Storage (days)	0	2	6	11
Agglutinin titer	281.6 $\pm$ 140.2	230.4 $\pm$ 57.2	153.6 $\pm$ 57.2	41.6 $\pm$ 21.5

SRBC (1%) were used as indicator cells.
Averages and standard deviations on 5 samples are shown.

Fig. 1. Effects of temperature on the natural agglutinin activity *in vitro* of oyster digestive diverticula (Feb., 1980). Each point indicates the mean value for individual determinations on 5 oysters ($\pm$ standard deviation). SRBC (Sheep red blood cells) were used as indicator cells.

Fig. 2. Effects of temperature on the natural agglutinin activity *in vitro* of oyster gill (Feb., 1980). Each point indicates the mean value for individual determinations on 5 oysters ($\pm$ standard deviation). SRBC (1%) were used as indicator cells.

Fig. 3. Effects of pH on the natural agglutinin activity *in vitro* of oyster digestive diverticula and gill against 1% SRBC (Feb., 1980). Each point indicates the mean value for individual determinations on 5 oysters ($\pm$ standard deviation).

Fig. 4. Seasonal changes in the natural agglutinin activity of oyster digestive diverticula and gill against 1% SRBC (May, 1979 to Jan., 1980). Each point represents the mean value for individual determinations on 5 oysters ($\pm$ standard deviation).

Fig. 5. Changes in the agglutinin activity of oyster digestive diverticula and gill against 1% SRBC with time after injection of 0.1 ml/oyster of 10% SRBC (Feb., 1980). The cells were injected into the connective tissue surrounding digestive diverticula. Each point represents the mean value for individual determinations on 5 oysters ($\pm$ standard deviation).

(A): digestive diverticula; (B): gill; ●: SRBC-injected group; ○: control group.

消化盲嚢部・鰓における自然凝集素活性の季節的変化
両組織の自然凝集素活性は、5月に128前後であったが、夏に向かうにつれて急激に低下し、7月には鰓で20前後、消化盲嚢部で10前後と最低を示した。この最低期は8月まで及んだが、9月には回復し始め、11月には両組織とも128~256と高い力価を記録した (Fig. 4)。すなわち、消化盲嚢部と鰓の自然凝集素活性は、マガキの性成熟の進行とともに低下し、産卵直前~産卵期に最低となり、身入期に入り回復した。

Fig. 6. Changes in the bactericidal activities of oyster digestive diverticula against HS 29 strain with time after injection of HS 29 strain vaccine (Dec., 1979). The vaccine was injected into the connective tissue surrounding digestive diverticula. Each point represents the mean value for individual determinations on 5 oysters ($\pm$ standard deviation).

Fig. 7. Changes in the bactericidal activities of oyster digestive diverticula against HS 29 strain with time after injection of HS 29 strain vaccine (Feb., 1980). The vaccine was injected into the adductor muscle. Each point represents the mean value for individual determinations on 5 oysters ($\pm$ standard deviation).

なお、性成熟・産卵に伴う自然凝集素活性の低下の度合は、鰓より消化盲嚢部の方が大きい傾向が認められた (Fig. 4)。

異種細胞投与による凝集素・殺菌素の誘起 10% SRBC 懸濁液を消化盲嚢部周辺結合組織に 0.1 ml/個体ずつ注射した結果、同血球に対する消化盲嚢部と鰓の凝集素価は、5日後に対照群を上回り、8日後でも依然として高水準にあった (Fig. 5)。

他方、HS 29 株より作製したワクチンを消化盲嚢部周辺結合組織に接種したところ (投与量、 1.8×10^8 細胞/g 軟体部湿重量)、同細菌に対する消化盲嚢部殺菌素価は、1日後より漸増傾向を示し、4日後には対照群のそれを明らかに上回った。しかし、8日後には対照群と同じ水

準に戻った (Fig. 6)。また、同ワクチンを閉殻筋に接種しても (投与量、 8.3×10^8 細胞/g 軟体部湿重量)、同様の誘起現象が認められた (Fig. 7)。

考 察

マガキのヒツジ赤血球に対する自然凝集素および *Arthrobacter* sp. (HS 29 株) に対する自然殺菌素の活性の体内分布は、晩春における力価でみる限り、いずれもホタテガイの場合⁸⁾ より広いことが明らかである (Table 1)。周年に亘る比較、ヒツジ以外の動物の赤血球や HS 29 株以外の細菌を用いての比較など、さらに詳細に検討すべき点があるけれども、兩種間にみられるこのような分布の相違は、生体防御機構の相違を反映しているように思われる。

マガキの HS 29 株に対する自然殺菌素価は、消化盲嚢部・外套膜・鰓のような主要器官において、ホタテガイの場合より著しく高いことが注目される (Table 1)。これが HS 29 株を試験菌とした場合に特異的に観察される現象であるのか、あるいは試験時期が異なれば違った結果が得られるのかについては目下のところ明らかでないが、本結果を生理生態学的に考察すると、固着生活を余儀なくされるマガキには、ある程度移動可能なホタテガイよりも高い生体防御能力を維持しなければならないという必然性が存在するのかもしれない。

マガキの消化盲嚢部と鰓における自然凝集素活性は、低温に対してかなり安定であることがわかった (Tables 2, 3)。このことは、ある程度の期間ならば試料の保存が十分可能であることを示している。しかし、40°C 以上の高温に対してはかなり不安定であり、60°C (30 分間) で完全に失活した (Figs. 1, 2)。この失活温度は、アメリカロブスター血清 (65°C)⁷⁾ とホタテガイ消化盲嚢部 (55°C)⁹⁾ のその中間に位置する。

マガキの鰓と消化盲嚢部における自然凝集素活性の至適 pH は、6.0 付近のほか、8.0 以上のアルカリ性側にも存在しそうである (Fig. 3)。このことは、マガキの自然凝集素が単一物質ではないという可能性を示唆しており、事実 HARDY ら⁸⁾ は最近マガキの血リンパより 7 種類の凝集素を単離し、各々がヒト・ウサギのリンパ球に与える影響 (有糸分裂促進・細胞障害などの有無) を調べている。また、Fig. 3 と同様の曲線が同じ二枚貝であるホタテガイの消化盲嚢部についても得られていることは⁹⁾、兩種の自然凝集素の化学的類似性を支持するものとして興味深い。

本研究によつて明らかにされたマガキの消化盲嚢部・鰓における自然凝集素活性の季節的変化 (Fig. 4) は、既に把握されている「個体の生理的活性」^{4,6)} のそれと良く一致している。したがって、マガキの生理的活性を

自然凝集素の力価によつて表現することは可能であると考えられる。また、ホタテガイの消化盲嚢部において、然凝集素・殺菌素活性が季節的に平行して推移し、両御因子の密接な機能的相関が示唆されている⁵⁾ので、後は、マガキの自然殺菌素活性についても、季節変動を追跡する必要があるだろう。

Fig. 5 に示したように、SRBC に対するマガキ消化盲嚢部・鰓抽出液の凝集素価は、消化盲嚢部周辺結合組織への SRBC 接種により上昇したが、このような異種細胞投与による組織抽出液の凝集素の誘起については、著者の知る限り、無脊椎動物ではまだ報告がない。血リンパの凝集素についても、オーストラリア産サソリ *An-droctonus australis* で、SRBC 注射に伴う若干の誘起が観察されている⁶⁾けれども、アメリカロブスターでは、ワクチン投与による殺菌素の誘起が認められるような条件下でさえ、凝集素には何ら変化が現われない⁷⁾。軟体動物でも、“抗原”投与による凝集素の誘起については否定的所見が多く、たとえばヒト A 型血球に対する自然凝集素を血リンパ中に有するカタツムリ *Helix pomatia* をいわゆる“免疫”しても誘起がみられない¹⁰⁾。このように、無脊椎動物における凝集素の誘起現象については、組織抽出液・血リンパの如何にかかわらず、なお解明すべき課題が数多く残されている。

Arthrobacter sp. より作製したワクチンをホタテガイに接種後、同細菌に対する消化盲嚢部殺菌素価の経時的变化を追跡した結果、接種 4 日後に著しい誘起がみられたことは既に報告したが⁵⁾、本研究においてはマガキについても同一のワクチン・試験菌を用いて同様の誘起現象を認めることができた (Figs. 6, 7)。ホタテガイのワクチン接種部位は閉殻筋のみであつたのに対し、マガキのそれは消化盲嚢部周辺結合組織と閉殻筋であつたが、両部位で誘起傾向に大差はなかつた。

しかし、誘起の度合および持続期間がワクチン接種部位により影響を受けるか否かについては、これら二部位のみならず、血管・血質の位置関係を考慮しながら他の器官組織についても詳細に検討しなければならないと考えられる。

以上要するに、異種細胞接種によるマガキの凝集素・殺菌素の誘起現象 (Figs. 5~7) については、今後の解明にまつところが多いが、本研究結果は、“抗原”投与による“免疫的”な誘起現象がマガキに存在することを示している。このような免疫様現象には、現在のところ、記憶能が証明されていないので、この点も検討すべき課題として残る。

北米大西洋岸に産する食用二枚貝 *Mercenaria mercenaria* の血リンパが、細菌のみならず微小海藻

(この貝の餌料として有効)をも凝集すること¹¹⁾、およびインド太平洋特産のシャコガイ科の 2 種 *Tridacna maxima* と *Tridacna gigas* の血リンパが、抗ガラクトサン異性を示す沈降素 (あるいは凝集素) を有すること¹²⁾など、二枚貝における凝集素と摂餌との関連を示唆するような知見が最近出てきているが、これは従来のオプソニン効果とは異なる新しい意義を凝集素に与えるものかもしれない。しかしながら、軟体動物や節足動物においては、食作用に対する感受性を高める物質、つまりオプソニンの本体は自然凝集素そのものであるとの考えがますます強まりつつあり^{13,14)}、この観点から凝集素の化学的性質に関する研究も活発化してきている^{11,15)}。

本研究の一部は、筆者らの一人、森に与えられた文部省科学研究費補助金 (課題番号、456136) によつたことを記し、謝意を表する。

文 献

- 1) K. MORI: *Bull. Mar. Biol. Stat. Asamushi Tohoku Univ.*, **15**, 59-79 (1975).
- 2) 森 勝義: 浅海完全養殖 (今井丈夫・猪野峻・黒木 宗尚・藤永 元作・山本護太郎編), 改訂版, 恒星社厚生閣, 東京, 1976, pp. 264-268.
- 3) 森 勝義・刀根靖幸・鈴木敏和・笠原恵介・野村 正: 日本水誌, **46**, 717-722 (1980).
- 4) 森 勝義・今井丈夫・豊島清明・臼杵 格: 東北水研報, No. 25, 49-63 (1965).
- 5) 森 勝義・玉手英夫・今井丈夫・市川 収: 東北水研報, No. 25, 65-88 (1965).
- 6) K. MORI: *Mar. Biol.*, **53**, 361-369 (1979).
- 7) J. W. CORNICK and J. E. STEWART: *J. Invertebr. Pathol.*, **21**, 255-262 (1973).
- 8) S. W. HARDY, A. W. THOMSON, and T. C. FLETCHER: *Comp. Biochem. Physiol.*, **60A**, 473-477 (1978).
- 9) Z. BRAHMI and E. L. COOPER: *Contemp. Topics Immunobiol.*, **4**, 261-270 (1974).
- 10) 木村 一郎: 感染・炎症・免疫, **8**, 309-335 (1978).
- 11) R. ARIMOTO and M. R. TRIPP: *J. Invertebr. Pathol.*, **30**, 406-413 (1977).
- 12) G. UHLENBRUCK, G. STEINHAUSEN, and B. A. BALDO: *Comp. Biochem. Physiol.*, **56B**, 329-333 (1977).
- 13) L. RENWRANTZ and W. MOHR: *J. Invertebr. Pathol.*, **31**, 164-170 (1978).
- 14) J. W. CORNICK and J. E. STEWART: *J. Invertebr. Pathol.*, **31**, 194-203 (1978).
- 15) P. C. STEIN and P. F. BASCH: *J. Invertebr. Pathol.*, **33**, 10-18 (1979).