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*1

楠田 理一・福田 穰

(1980 年 3 月 7 日受理)

Agglutinating Antibody Titers and Serum Protein Changes of Yellowtail after Immunization with *Pasteurella piscicida* Cells

Riichi KUSUDA*2 and Yutaka FUKUDA*2

Development of vaccine against pseudotuberculosis, caused by *Pasteurella piscicida*, in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, has been attempted, yet few studies of humoral aspect of the immune response in yellowtail have been reported. The present study was designed to obtain some informations about agglutinating antibody titers and serum protein changes of cultured yellowtail immunized by intraperitoneal injection with formalin-killed *P. piscicida* cells in FREUND's complete adjuvant.

Agglutinating antibody titers in immunized fish sera increased ranging from 1:256 to 1:2,048 five weeks after immunization. Serum protein changes after immunization were observed by electrophoretic analyses; cellulose acetate electrophoresis, polyacrylamide gel disc electrophoresis and agar gel immunoelectrophoresis. Both immunized and control fish sera were separated into four fractions by gel filtration on Sephadex G-200 and agglutinating antibody activity was found in the first fraction of immunized one. This fraction included the protein, more than approximately 800,000 in molecular weight, the changes of which were observed in number and density of precipitin lines formed in α - β -globulin region in agar gel immunoelectrophoresis after immunization.

It is concluded that production of agglutinating antibody results in serum protein changes, observed in agar gel immunoelectrophoresis, after parenteral immunization.

類結節症は梅雨期に各地のハマチ養殖場で流行し、大きな被害を与えている。現在、対策としては化学療法が行なわれているが、耐性菌の出現や公衆衛生上の問題が提起されるようになった。

本症の流行を経験したハマチには病原菌に対して特異的な凝集抗体が産生されることから、予防免疫の可能性が示唆されており、ワクチンの実用化が期待されている¹⁾。しかし、ワクチン実用化を進めるうえで重要であるハマチにおける抗体の産生状況や分離精製などの基礎的研究はほとんど行なわれていないのが現状である。

そこで、本報では各種電気泳動法と Sephadex G-200 によるゲル濾過法を用いて、類結節症の原因菌 *Pasteurella piscicida* の死菌を接種したハマチの血清タンパクの変化について検討したので報告する。

実験方法

供試魚 高知県浦の内湾で養殖された体重 40~100 g

のハマチを実験に供した。これを屋内の 0.5 t 流水式パンライト水槽に收容し、エアレーションを行ないながら生餌を投与して飼育した。なお、実験期間中の水温は 25~26°C であった。

免疫抗原 1978 年 7 月に三重県北牟婁郡のハマチ病魚腎臓から分離された *P. piscicida* MP-12 株を、2.0% 食塩加 BHI 寒天培地 (栄研) で 25°C 48 時間培養後、0.5% ホルマリンで 37°C 48 時間不活化した。これをリン酸緩衝食塩水を用いてホルマリンを完全に遠心除去したのち、湿菌量で 2 mg/ml の割合で滅菌生理食塩水に懸濁し、等量の FREUND's complete adjuvant (Difco) を加え乳濁化して免疫抗原とした。

免疫および採血 免疫抗原を 0.1 ml/尾の割合で腹腔内に接種して免疫区とした。同様に対照区として滅菌生理食塩水を 0.1 ml/尾の割合で接種した。そして、1 週間ごとに各 5 尾ずつを無作為にとりあげ、動脈球穿刺により採血して血清を分離した。

*1 本研究は 1979 年 4 月、日本水産学会春季大会において発表した。

*2 高知大学農学部水産病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

なお、供試魚はすべて外観上健康なものを使用した。採血後に腎臓から 2.0% 食塩加 BHI 寒天培地を用いて菌分離を試みた。

凝集抗体価の測定 マイクロタイター法を用いて行なった。反応抗原には MP-12 株ホルマリン不活化菌体を用いて、反応は 37°C で 2 時間行ない、4°C に一夜静置後判定した。

セルロースアセテート膜電気泳動 セルロースアセテート膜電気泳動(以下 CAE と略す)は支持体に Separax (富士写真フイルム(株)製)を用いて行なった。Barbital-barbital sodium 緩衝液 (pH 8.6, I=0.06) を膜の緩衝化および電極槽に使用した。通電は膜幅 1 cm あたり 0.8 mA の定電流で 30 分間行なった。泳動終了後、0.4% Ponceau 3R 染色液で 3 分間染色し、脱色には 3% 酢酸を使用した。Densitrol DMU-2 (Toyo) を用いて 505 nm における吸光度を測定してデンストメトリを得た。

ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動 ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動(以下 PAGE と略す)は 7.0% の分離ゲルを用いて行なった。電極槽には Tris-glycine 緩衝液 (pH 8.6) を使用した。通電は 4°C の条件下においてゲル管 1 本あたり 3.0 mA の定電流で、マーカーの Bromophenol blue (BPB) のディスクが陽極端から約 1 cm の位置に移動するまで行なった。泳動終了後 1.0% Amidoblack 10 B 染色液で 1 時間染色を行ない、7% 酢酸を用いて電気的に脱色した。

抗血清の作製 抗正常ハマチ血清を作製した。抗原は 1978 年 5 月に高知県香美郡の 2 kg 前後の健康な養殖ハマチ数尾から得たブルー血清である。抗原と等量の FREUND's complete adjuvant を混和してウサギ腎筋内に接種した。接種量は 1 回 4 ml とし、週 1 回の接種を 4 回くり返して行なった。4 回目の接種から 1 週間後に試験採血して寒天ゲル免疫電気泳動で抗原に対する沈降線を確認した後、全採血を行ない抗血清を得た。

寒天ゲル免疫電気泳動 寒天ゲル免疫電気泳動(以下 AIE と略す)は Ionagar No. 2 (Oxoid) を Barbital-barbital sodium 緩衝液 (pH 8.6, I=0.05) に 1.0% の割合で溶解して支持体とした。電極槽にも同一の緩衝液を用いた。76×26 mm のスライドガラスに液化寒天 3.0 ml を注ぎ寒天ゲル板を作製した。通電は 4°C の条件下においてスライドガラス 1 枚に対して 7.0 mA の定電流で 90 分間行なった。抗血清は 4°C で 48 時間反応させた後、生理食塩水で十分に洗浄し、乾燥フィルム状にして 0.5% Amidoblack 10 B 染色液で 15 分間染色した。脱色には 5% 酢酸を用いた。リボタンパクは Sudanblack B により、糖タンパクは過ヨウ素酸-Schiff (PAS) 反応により検出した。

ゲル透過 透過材として Sephadex G-200 (Pharmacia) を用いた。1.5×100 cm のカラムに試料血清 1.0 ml を添加してリン酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて溶出した。以上の操作はすべて 10°C の定温で行なった。なお、タンパク濃度はマイクロビュレット法²⁾で定量した。

2-Mercaptoethanol 処理 試料について終濃度約 5% になるように 2-Mercaptoethanol (2-ME) を添加して、室温に一夜放置後、凝集抗体活性を試験した。

結 果

免疫区および対照区ともに実験期間中の斃死は認められなかった。また、すべての供試魚の腎臓からは細菌を検出することができなかった。

凝集抗体価 免疫後のハマチ血清中の MP-12 株に対する凝集抗体価の変化を Fig. 1 に示す。凝集抗体価は免疫後 2 週間目から上昇する。免疫 5 週間後には 1:256 ~ 1:2,048 となり、低い凝集抗体価を示す個体は認められなくなった。

なお、MP-12 株に対する沈降抗体活性はすべての供試血清で確認できなかった。

血清タンパクの変化 ハマチ血清タンパクの CAE による分析を行なった結果、全部で 7 本のバンドが確認できた。バンドには陽極側から順に C1~C7 の番号をつけた。

CAE で検討した免疫後の各血清タンパク成分の相対的な変化を Fig. 2 に示す。全供試血清で明確なバンドが確認できるのは C2, C3, C5 および C6 の 4 本である。特に顕著な変化は C7 にみられる。C7 は免疫区および対照区の血清においても痕跡程度に確認できる個体もあるが、免疫 5 週間後においてはすべての個体でかなり高濃度に検出される。

Fig. 1. Changes of agglutinating antibody titers in immunized and control yellowtail sera.

P, pre-immunization; ●, immunized; ○, control.

Fig. 2. Changes of protein in the bands separated by cellulose acetate electrophoresis (CAE) from immunized and control yellowtail sera. P, pre-immunization.

Fig. 3. Agar gel immunoelectrophoretic (AIE) pattern of yellowtail sera.

免疫区のうち凝集抗体価の高い血清と対照区血清をPAGEで比較した結果をPlateの1に示す。免疫区血清においてはRf値で約0.2~0.3付近のバンド数、あるいはバンドの濃度の変化が確認できる。

ハマチ血清タンパクをAIEで分析し、確認されたすべての沈降線に陽極側から1~22の番号をつけ、模式的に示すとFig. 3のようになる。これらのうち2, 6, 13, 15, 16および18の6本の沈降線はすべての個体で鮮明、かつ容易に確認できるので、ほかの沈降線との相対的な位置を比較するために重要な指標となる。3の沈降線はかなり鮮明に出現するが、個体によってはこれを欠くものがある。なお、2および3の沈降線はリボタンパク染色で鮮明に染色される。また、糖タンパク染色では2, 3, 10, 13および19の沈降線が染色される。これらの結果をPlateの2に示す。

免疫後のAIEによる沈降線パターンの変化をPlateの3に示す。免疫区および対照区とも、免疫抗原あるいは

Fig. 4. Gel filtration of yellowtail serum on Sephadex G-200. Total bed volume, 167 ml; Void volume, 57 ml.

は生理食塩水の接種1~2週間後に1, 2, 3, 5および6の沈降線が移動度を増し、陽極側に長く伸びる変化が認められる。また、免疫3週間以後の血清においては原点よりやや陽極側に位置する10, 12, 17および20などの沈降線が複雑化して分離が不鮮明となる。免疫区

Table 1. Relative percentage and agglutinating antibody activity of the fractions separated by gel filtration on Sephadex G-200 from yellowtail sera

Serum		Fraction			
		G1	G2	G3	G4
Pre-immunization	Relative percentage	26.5	31.7	40.0	1.80
	Agglutinating antibody activity	—	—	—	—
Five weeks post-immunization	Relative percentage	32.3	37.7	27.2	2.90
	Agglutinating antibody activity	+	—	—	—

における出現頻度の高い沈降線は 12, 17, 19, 20, 21 および 22 であるが、免疫の高度化に伴う規則的な変化は特に確認できなかつた。

抗体の分離 免疫 5 週間後の免疫区ブルー血清および免疫前の対照区ブルー血清の Sephadex G-200 によるゲル濾過を行なった結果、両血清ともに 4 分画が得られた。この溶出パターンを Fig. 4 に示す。得られた分画には分子量の大きなものから順に G1~G4 の番号をつけた。なお、G1 分画の溶出位置は V_0 に一致する。各分画の濃度百分率および MP-12 株に対する凝集抗体活性を Table 1 に示す。免疫区血清の濃度百分率の増加は G1, G2 および G4 の分画で認められる。また、MP-12 株に対する凝集抗体活性は免疫区血清の G1 分画だけに認められた。なお、この凝集抗体活性は 2-ME 処理により消失した。

各分画の PAGE および AIE による分析結果は Plate の 4 および 5 に示すとおりである。すなわち、免疫区血清で変化の認められた PAGE における Rf 値が約 0.2~0.3 付近のバンドは G2 分画に含まれている。免疫後の特徴的な変化が確認された AIE における原点のやや陽極側に位置する 10, 12 および 17 の沈降線は G1 分画に含まれている。なお、G4 分画については PAGE および AIE とも、バンドあるいは沈降線を確認することができなかつた。

考 察

免疫研究の実施にあたって最も重要なことは、免疫を受ける個体とその抗原に未接触であることである。しかし、ハマチのような海産魚においては無菌魚を得て、さらにそれを無菌的に飼育することは不可能に近い。したがって、実施した免疫に対する反応が一次応答であるのか高次応答であるのかを判断することは困難である。本報では外観上健康なハマチを供試して採血時に無菌調査を行なった結果、少なくとも実験期間中には細菌性疾患に感染していなかつたと考えられるが、実験魚がすでに

類結節症の流行を経験した可能性は当然考慮しなければならない。

ハマチに *P. piscicida* 死菌を抗原としてアジュバントとともに腹腔内接種した場合には、個体差は大きいが血清中の特異的凝集抗体産生は免疫後 1~2 週間で開始され、3 週間後に最も高い活性となり、以後平衡状態に達するものと考えられる。これは小割養殖ハマチにおいて類結節症流行後 1~2 週間で血清中に高い凝集抗体活性を認めることができるという報告¹⁾と一致し、人為獲得免疫においても病後免疫と類似した凝集抗体の産生状況を示すものと思われる。

本報で得られたハマチ血清タンパクの CAE による泳動像は NAKAGAWA³⁾ および NAKAGAWA⁴⁾ の報告と比較的一致する。泳動条件などが異なるために直接の比較はできないが、免疫の進行に伴い濃度比の増加が確認されたバンド C7 は NAKAGAWA⁴⁾ が移動度および溶解性からヒトの γ -グロブリンに類似したタンパク成分としているバンドにはほぼ一致するものと思われる。このことは哺乳類における免疫グロブリンの γ -グロブリン域における偏在と比較して興味深い。

ハマチ血清タンパクの PAGE による分画については NAKAGAWA³⁾ の報告がある。本報とは分離ゲル濃度に多少の相違があるが、その泳動パターンはバンド数などに差異が認められるもののほぼ一致する。本報の免疫区血清においては Rf 値が約 0.2~0.3 付近のパターンに変化が確認できた。

本報ではハマチ血清タンパクを AIE で分析した結果、全部で 22 本の沈降線が確認できた。リボタンパクおよび糖タンパク染色により染色される沈降線はアルブミン域から α -グロブリン域にかけて集中し、NAKAGAWA⁴⁾ がハマチ血清アルブミンの主成分がリボ糖タンパクの一種であるとしている報告とはほぼ一致する。免疫区および対照区で接種後にアルブミンとプレアルブミンに相当すると思われる沈降線が移動度を増して長く伸びる変化が認められた。これらの変化はニホンウナギにおいて

も、BSAを用いた抗原刺激後に観察されており⁹⁾、接種によるストレスなどが血清タンパク成分に影響を与えた結果と思われる。免疫区血清の変化は免疫3週間以後に α - β -グロブリン域に位置する沈降線に確認された。

ゲル濾過法による魚類血清中の抗体分離の試みは、ニジマスなどで報告されている^{8,10)}。本報においてはハマチ血清タンパクを Sephadex G-200 を用いて4分画に分画し、免疫区血清における V_0 に溶出する G1 分画の分画比の増大と免疫抗原に対する凝集抗体活性を確認できた。すなわち、アジュバント処理した *P. piscicida* 死菌抗原でハマチを非経口的に免疫した場合には、免疫後2~3週間で血清中に免疫グロブリンに相当すると思われる凝集抗体活性をもつタンパクが産生されるものと思われる。このタンパクは球状タンパクであると仮定すると、分子量が約 800,000 以上となる。また、電気泳動的には α - β -グロブリン域の沈降線に一致する。以上のように、AIE でみられた免疫後の血清タンパクの変化は凝集抗体の産生に伴う変化であることが推測できる。

魚類の血清タンパクの成分は種々の要因により変動してきたことが知られており^{8,9)}、本報で認められたすべての変化が免疫に伴うものと断定することはできないのではないと思われる。INGRAM ら¹⁰⁾は brown trout における抗原刺激後の血清タンパク成分の変化を電気泳動法で分析した結果、成分の変化に免疫応答以外の要因が関与している可能性の高いことを示唆している。しかし、軟骨魚類、特にサメ類では物理化学的特性の異なる2種類の免疫グロブリン分子が産生されることが知られている^{11,12)}。また、硬骨魚類においても2種類以上の抗体の産生されているものが存在することも報告されている^{8,13)}。これらのことから、今回報告した分子量約 800,000 以上の凝集抗体活性をもつタンパク以外の例えば凝集抗体活性の著しく低い抗体タンパクが、ハマチ血清中に産生されている可能性もあるのではないかと考えられる。したがって、CAE における γ -グロブリン域のタンパク濃度比の増大や PAGE における Rf 値が約 0.2~0.3 のタンパク成分の変化なども無視することはできないであろう。今後は抗原の調製法や免疫スケジュールなどを検討し、これらの疑問を解明してゆくことが必要である。

要 約

近年、養殖ハマチの類結節症に対するワクチンの開発

が試みられているが、ハマチの液性免疫に関する報告はきわめて少ないのが現状である。本研究ではこれらの知見を得るために、*P. piscicida* ホルマリン死菌で免疫したハマチの血清中の凝集抗体価と血清タンパクの変化について検討した。

その結果、免疫魚の血清中の凝集抗体価は免疫5週間後に 1:256~1:2,048 まで上昇した。免疫後の血清タンパクの変化は各種電気泳動法により観察された。ハマチ血清は Sephadex G-200 を用いたゲル濾過法により4分画に分画されたが、免疫後の血清の G1 分画には凝集抗体活性が確認できた。この分画は免疫後に変化が観察された AIE における α - β -グロブリン域の沈降線を形成するタンパクを含み、約 800,000 以上の分子量であると考えられる。

これらのことから、AIE において観察された免疫後の血清タンパクの変化は血清中の凝集抗体が産生された結果、生じたものと推定できる。

文 献

- 1) 楠田理一：昭和 48 年度農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告書，高知大学農学部，南国市，1974，pp. 59-72.
- 2) R.F. ITZHAKI and D.M. GILL: *Anal. Biochem.*, **9**, 401-410 (1964).
- 3) H. NAKAGAWA, K. NANBA, M. KAYAMA, and S. MURACHI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 75-81 (1977).
- 4) H. NAKAGAWA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 251-257 (1978).
- 5) 永井 彰・須貝憲明：東海大学海洋学部紀要，**10**, 109-117 (1977).
- 6) 倉茂達徳・平石春男・山口宣夫・三橋 進：日本細菌学雑誌，**27**, 751-755 (1972).
- 7) 池田和夫：淡水研報，**28**, 55-60 (1978).
- 8) 池田弥生・尾崎久雄・上松和夫：日水誌，**41**, 803-811 (1975).
- 9) 池田弥生・尾崎久雄・早川万彦・池田静徳・見奈美輝彦：日水誌，**42**, 1055-1064 (1976).
- 10) G.A. INGRAM and J.B. ALEXANDER: *J. Fish Biol.*, **11**, 283-291 (1977).
- 11) A.A. SURAN, M.H. TARAIL, and B.W. PAPERMASTER: *J. Immun.*, **99**, 679-686 (1967).
- 12) D. FROMMEL, G.W. LITMAN, J. FINSTAD, and R.A. GOOD: *J. Immun.*, **106**, 1234-1243 (1971).
- 13) G.N. TRUMP: *J. Immun.*, **104**, 1267-1275 (1970).

Explanation of Plate

1. Polyacrylamide gel disc electrophoresis (PAGE) of whole yellowtail sera.
A: pre-immunization, B and C: five weeks post-immunization.
Agglutinating antibody titers are 1:4 in pre-immunization serum and 1:2,048 in five weeks post-immunization sera.
2. AIE of yellowtail sera stained with Sudanblack B (A) and and PAS method (B).
Wells: whole yellowtail serum, Troughs: anti-yellowtail serum rabbit serum.
3. Changes in AIE patterns of yellowtail sera after immunization.
Wells: A; pre-immunization, B; one week post-immunization, C; two weeks post-immunization, D; three weeks post-immunization, E; four weeks post-immunization, F; five weeks post-immunization, Troughs: anti-yellowtail serum rabbit serum.
4. PAGE of the fractions of yellowtail serum separated by gel filtration on Sephadex G-200.
A: whole serum, B: fraction G1, C: fraction G2, D: fraction G3.
5. AIE of the fractions of yellowtail serum separated by gel filtration on Sephadex G-200.
Wells: A; whole serum, B; fraction G1, C; fraction G2, D; fraction G3, Troughs: anti-yellowtail serum rabbit serum.