魚類の抗体および補体の種間適合性

松山 博子, 中尾 実樹, 矢野 友紀

(1988 年 4 月 27 日受付)

Compatibilities of Antibody and Complement among Different Fish Species

Hiroko Matsuyama,* Miki Nakao*, and Tomoki Yano*

In order to examine species compatibilities of antibody and complement, hemolytic reactions were carried out adopting sheep erythrocytes sensitized with carp, tilapia, yellowtail, porgy or rabbit antibody in combination with sera of rainbow trout, ayu, carp, tilapia, porgy, yellowtail or guinea pig. None of the fish sera were potentiated by rabbit IgM, and the guinea pig complement did not react with fish antibodies. Some compatibilities were observed between antibody and complement of different fish species; rainbow trout, ayu and porgy complement were potentiated by porgy, carp and tilapia antibody, respectively.

The hemolytic activity of fish sera was lost by carrageenan-, ammonia- and heat-treatment, and the combination of ammonia-treated serum with carrageenan-treated serum (Cn) or heat-treated serum resulted in restoration of the hemolytic activity. This indicates that these fish sera contain the complement components C1, C4 and C2.

Hemolytic intermediate complex, EAC1, was incubated with Cn (serum deficient in C1) from different species to examine the species compatibility between C1 and C4. As a result, no compatibility was observed between the guinea pig and fish. Furthermore, in the majority of the combinations of C1 and Cn of different fishes, hemolysis were not induced; interspecies compatibilities were seen in only two combinations (porgy C1+tilapia Cn and tilapia C1+porgy Cn).

哺乳類の補体の研究には、通常ウサギの抗体で感作したヒツジ赤血球が用いられているが、魚類の補体はウサギの抗体とは適合しない。¹⁻⁴⁾ このため、魚類の補体の研究には同種の魚の自然抗体または免疫抗体で感作した赤血球が用いられてきたが、いまだに補体系が何種の成分から成り立っているのか明らかにされておらず、補体の成分活性測定法も確立されていない。一方、モルモットの補体系は詳しく研究され、調節因子を含めると 16 種の成分からなることが知られている。また、これら成分の活性測定に必要な溶血中間複合体の調製や精製補体成分の入手も容易なので、魚類とモルモットの補体成分との間に適合性が認められればこれらの試薬を用いて魚類の補体成分の活性測定が可能となる。

Ross and Jensen⁵⁾は、nurse shark の抗体で感作したヒツジ赤血球 (EAn) に nurse shark の補体第 1 成分 (C1n) を結合させた溶血中間複合体 (EAnC1n) が、モルモットの C4-C9 と反応することを報告した。彼らはこの EAn とモルモットの C4-C9 を用いて C1n の活性

を測定し、C1n を部分精製した。さらに、Jensen ら⁶⁾は近年モルモットの C8, C9 によって溶血する nurse shark の溶血中間複合体 (EAnC1nC2nC3nCn4) について報告している。

本研究ではニジマス、アユ、コイ、ティラピア、マダイ、モルモットの補体と、コイ、ティラピア、ブリ、マダイ、ウサギの抗ヒツジ赤血球抗体を用いて、抗体と補体、および補体成分間の種間適合性について調べた。

材料および方法

試薬 カラゲナンは和光純薬工業 (株) から、ヒツジ保存血は日本生物材料センター (株) から、モルモット乾燥補体は極東製薬工業 (株) から購入した。また、ウサギの抗ヒツジ赤血球抗体 (IgM) は大塚アッセイ (株) から入手した。本研究に用いた緩衝液の略号と組成は以下の通りである。GVVB²⁺: 0.15 mM CaCl₂ と 0.5 mM MgCl₂ を含む 0.1%ゼラチン-ペロナール緩衝液 (pH 7.5), GGVB²⁺: 0.15 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂ および

* 九州大学農学部水産化学教室 (Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan).

2.5% グルコースを含む 0.1% セラチン-ペロナル緩衝液 (pH 7.5), EDTA・GVB: 10 mM EDTA を含む 0.1% セラチン-ペロナル緩衝液 (pH 7.5)。

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* およびマダイ *Pagrus major* から血清を得た。すなわちマダイはキューヴィエ氏管から, 他の魚は尾静脈から採血し, 血液を室温に 1 時間, 氷水中に 1 時間放置後, 遠心分離し, 得られた血清を直ちに液体窒素中で凍結し, -80°C に保存した。

抗ヒツジ赤血球血清の作製 コイ抗血清,⁶⁾ ティラピア抗血清⁷⁾ およびマダイ抗血清⁸⁾ は既報に従って作製し, 非働化後, -80°C に保存した。また, ブリ抗血清は, 体重 550~800 g のブリ *Seriola quinqueradiata* にヒツジ赤血球ストローマ浮遊液 (1 mg N/ml)⁹⁾ 1 ml を 1 週間おきに 4 回腹腔内投与し, 最終投与から 5 日目に採血して得た。本抗血清は 45°C で 20 分間加熱して非働化後, -80°C に保存した。

感作ヒツジ赤血球 (EA) の調製 ヒツジ保存血を 3000 rpm で 5 分間遠心し, 沈渣として得られたヒツジ赤血球を EDTA・GVB で 3 回洗浄後, 同緩衝液中に 1×10^9 cells/ml となるように浮遊させた。また, コイ, ティラピア, ブリ, マダイの抗血清をその溶血素価に応じて EDTA・GVB で 30~150 倍に希釈した。各希釈抗血清と上記ヒツジ赤血球浮遊液 (1×10^9 cells/ml) を 1:1 の割合で混合し, 時々振り混ぜながら 25°C で 30 分間反応させて感作ヒツジ赤血球 (EA) を得た。これらの EA は GVB²⁺ で 3 回洗浄後, GGVB²⁺ 中に 5×10^8 cells/ml となるよう浮遊させて 5°C で保存し, 1 週間以内に使用した。なお, ウサギ抗体 (IgM) で感作したヒツジ赤血球は常法に従って調製した。

カラゲナン不活化血清 (Cn) の作製 各魚血清 1 ml にカラゲナン溶液 (2 mg/ml) を 50~120 μl 加えて 25°C で 10 分間インキュベートした。モルモット血清には同カラゲナン溶液を血清 1 ml 当たり 300 μl 加えて 37°C で 10 分間インキュベートした。これらの Cn は調製後直ちに使用した。

アンモニア不活化血清 (Am) の作製 各魚血清 1 ml に 1 N アンモニア 100~150 μl を加えて 25°C で 20 分間インキュベートした後, 加えたアンモニアの 1/2 量の 1 N 塩酸を加えて中和し, Am を得た。また, モルモットの Am は Mayer⁹⁾ の方法に従って作製した。これらの Am は氷水中に保存し, 3 時間以内に使用した。

加熱不活化血清 (H) の作製 魚類血清を 45°C (ニジマス, マダイ) あるいは 50°C (アユ, コイ, ティラピア) で 10 分間加熱後, 直ちに氷水中に移し, 3 時間以内に

使用した。モルモット血清は 56°C で 20 分間加熱した。

EAC1 の作製 各魚の EAC1 作製にはそれぞれの魚の Am を用いた。^{10,11)} すなわち, EA 浮遊液 (5×10^8 cells/ml) に 200% 溶血相当量の Am を加えて, 25°C で 10 分間反応させ, 得られた EAC1 を GGVB²⁺ で 2 回洗浄後, 同緩衝液中に 5×10^8 cells/ml となるよう浮遊させた。これらの EAC1 は 5°C に保存し, 3 日以内に使用した。なお, ニジマスの EAC1 作製にはマダイ抗体で調製した EA を, アユの EAC1 作製にはコイ抗体で調製した EA を, その他の魚の EAC1 作製には同種の抗体で調製した EA を用いた。

モルモットの EAC1 作製には Midpiece (血清のオィグロブリン画分)⁹⁾ を用いた。すなわち, ウサギ IgM で調製した EA 浮遊液 (5×10^8 cells/ml) に Midpiece を 200% 溶血相当量加えて 37°C で 10 分間反応させ, 生成した EAC1 を GGVB²⁺ で 2 回洗浄し, 同緩衝液中に 5×10^8 cells/ml となるよう浮遊させて 5°C に保存した。

結 果

抗体と補体の種間適合性 コイ, ティラピア, ブリ, マダイの抗体またはウサギの IgM で感作したヒツジ赤血球 (5×10^8 cells/ml) 0.2 ml に GVB²⁺ で希釈した魚またはモルモットの血清 0.5 ml と GVB²⁺ 0.8 ml を加えて 25°C で 60 分間 (モルモットの場合は 37°C で 60 分間) 反応させ, 遠心後, 上清の 541 nm における吸光度から溶血率を求めた。Table 1 にこれら抗体と補体の種間適合性試験の結果を示した。

表から明らかなように, 本実験に用いた魚の補体古典経路はウサギの IgM によっては活性化されなかった。一方, 魚種間の組合せにおいては, コイ補体とティラピア補体は同種の抗体によってのみ活性化され, 異種抗体との適合性はほとんどなかった。しかし, マダイ補体は同種抗体のほか, ティラピア抗体によっても強く活性化された。また, ニジマス補体はマダイ抗体によって, アユ補体はコイとティラピアの抗体によって, かなり強く活性化された。なお, モルモット補体はウサギ IgM によってのみ活性化され, 魚の抗体との適合性は認められなかった。

上記の実験結果から, 以後の血清の不活化試験と EAC1 の作製には, ニジマス補体に対してはマダイ抗体で調製した EA を, アユ補体に対してはコイ抗体で調製した EA を用い, その他の魚の補体に対しては同種抗体で調製した EA を用いた。

不活化血清の組合せ試験 ニジマス, アユ, ティラピア, マダイの血清をカラゲナン処理, アンモニア処理または熱処理した後, 原血清の溶血活性に応じて GVB²⁺ で 1/15~1/100 に希釈し, その 0.5 ml に EA 浮遊液 ($5 \times$

Table 1. Compatibilities of fish complement with different sources of antibody.*1,2

Complement	Antibody				
	Carp	Tilapia	Yellowtail	Porgy	Rabbit
Rainbow trout	—	—	—	+++	—
Ayu	+++	++	±	—	±
Carp	+++	—	+	+	—
Tilapia	—	+++	—	—	—
Porgy	+	++++	—	+++	—
Guinea pig	—	—	—	—	+++

*1 Fish sera were incubated with sensitized sheep erythrocytes at 25°C for 60 min, and guinea pig serum was incubated at 37°C for 60 min.

*2 + = no hemolysis; ++ = 25% hemolysis; +++ = 50% hemolysis; ++++ = 75% hemolysis; +++++ = 100% hemolysis.

Table 2. Effects of inactivating procedures on the hemolytic activity of fish sera.*1,2

Serum	Positive control	Cn	Am	H*3	Cn+Am	Am+H	H+Cn
Rainbow trout	+++	—	—	45°C	+++	+++	—
Ayu	+++	±	—	50°C	+++	+++	—
Tilapia	+++	—	±	50°C	+++	+++	—
Porgy	+++	—	—	45°C	+++	+++	—
Carp	+++	—	—	50°C	+++	+++	—
Guinea pig	+++	—	—	56°C	+++	+++	—

*1 The abbreviations used in this table are as follows: Cn, serum inactivated by carrageenan (0.1–0.25 mg/ml); Am, serum inactivated by ammonia (0.1–0.15 N); H, serum inactivated by heating.

*2 Fish sera were incubated with EA at 25°C for 60 min, and guinea pig serum was incubated at 37°C for 60 min.

*3 Minimum temperature required for inactivation for 10 min.

Table 3. Compatibilities of the first complement components (C1) with the carrageenan-treated sera (Cn) of different species.*1

EACI*2	Carrageenan-treated serum (Cn)					
	Rainbow trout	Ayu	Carp	Tilapia	Porgy	Guinea pig
Rainbow trout	+++	—	—	—	—	—
Ayu	—	++	—	—	—	—
Carp	—	—	+++	—	—	—
Tilapia	+	—	—	+++	++	±
Porgy	+	—	—	++	++	—
Guinea pig	—	—	—	—	—	+++

*1 Fish Cn was incubated with EACI at 25°C for 40 min, and guinea pig Cn was incubated at 37°C for 40 min.

*2 Carp, tilapia and porgy EACI were prepared by use of sheep erythrocytes sensitized with homologous antibodies. Rainbow trout, ayu and guinea pig EACI were prepared by use of sheep erythrocytes sensitized with porgy antibody, carp antibody and rabbit IgM, respectively.

10⁸ cells/ml) 0.2 ml と GVB²⁺ 0.8 ml を加えて 25°C で 60 分間反応させた。反応液を遠心後、上清の 541 nm における吸光度から溶血率を求めたところ、Table 2 に示すようにこれら 4 魚種の血清はいずれも、カラゲナン処理、アンモニア処理、熱処理によって溶血活性を失った。

次に、上記の不活化血清 (Cn, Am, H) 希釈液のうち 2 種を各 0.5 ml ずつ混合 (Cn+Am, Am+H, H+Cn) し、それぞれに EA 浮遊液 (5×10⁸ cells/ml) 0.2 ml と GVB²⁺ 0.3 ml を加えて 25°C で 60 分間反応後、遠心

して上清の 541 nm における吸光度から溶血率を求めた。その結果、Table 2 に示すように、今回調べた全ての魚種で、Cn+Am と Am+H の組合せは溶血活性を回復した。しかし、H+Cn の組合せでは溶血活性は回復しなかった。これらの組合せ試験の結果は、比較のために行ったコイおよびモルモットの結果と一致した。従って、各魚のカラゲナン処理血清 (Cn) は C1 を、アンモニア処理血清 (Am) は C4 を、熱処理血清 (H) は C1 と C2 をそれぞれ欠くと判断された。^{9,11)}

EACI と Cn との種間適合性 C1 と C4 以降の成分

との種間適合性を調べるために, EA にニジマス, アユ, コイ, ティラピアおよびマダイの Am, またはモルモットの Midpiece を反応させ, 得られた EAC1 に魚およびモルモットの Cn を加えて溶血反応を行った。すなわち, EAC1 浮遊液 (5×10^8 cells/ml) 0.2 ml に GVB²⁺ で希釈した Cn 0.5 ml と GVB²⁺ 0.8 ml を加えて 40 分間反応後, 遠心して上清の 541 nm における吸光度から溶血率を求めた。なお, 反応温度は魚の Cn を加えた場合は 25°C, モルモットの Cn を加えた場合は 37°C とした。

Table 3 に示すように, C1 と C4 以降の成分の適合性は哺乳類と魚類間だけでなく, 魚種間でも, ほとんどみられなかった。異なる魚種間で溶血活性が認められたのはティラピアの EAC1 とマダイの Cn, マダイの EAC1 とティラピアの Cn の 2 つの組合せだけであり, その他の魚種の EAC1 は同種の Cn によってのみ溶血し, 異種の Cn によってはほとんど溶血しなかった。

考 察

今回, ニジマス, アユ, コイ, ティラピア, マダイの補体とコイ, ティラピア, ブリ, マダイ, ウサギの抗体との適合性を調べたところ, 他の報告¹⁻⁴⁾と同様に魚の補体はウサギの抗体 (IgM) によっては活性化されず, また, モルモットの補体は魚の抗体によっては活性化されなかった。しかし魚種間では, ニジマス補体とマダイ抗体, アユ補体とコイ抗体, マダイ補体とティラピア抗体の間に適合性が認められた。一般に魚の補体の古典経路の活性は, 同種の魚の自然抗体,^{1,2)}あるいは免疫抗体^{4,6-8)}で感作した赤血球を用いて測定されているが, 本実験ではニジマスはマダイの, アユはコイの抗体を用いて補体活性を便宜的に測定した。また, Sakai⁹⁾はニジマスの抗体で感作したキンギョ赤血球を用いてサクラマス, ティラピアなど数種の魚の補体活性を測定しており, 他の魚種の抗体を用いて活性を測定することも可能である。しかし, 他種の抗体を用いた場合には, 同種の抗体を用いた場合と活性が異なることを考慮する必要がある。

カラゲナンとアンモニアに対する補体の感受性は, 魚種によってかなり差があった。すなわち, 不活化に要したカラゲナン量は血清 1 ml あたりニジマスでは 0.1 mg であったのに対し, ティラピアとマダイでは 0.2 mg, アユとコイでは 0.25 mg であった。Legler¹¹⁾は 6 種の淡水魚の血清をカラゲナン (0.25 mg/ml) で処理したところ, goldfish の補体のみはカラゲナンによって全く不活化されなかったと報告しているが, これはカラゲナンに対す

る補体の感受性の差によるものであり, カラゲナン添加量を増やせば不活化されたのではないかと考えられる。

著者らはコイ補体の溶血中間複合体を調製し, この複合体と各種不活化血清の組合せ試験から, コイ補体においても哺乳類と同様に, カラゲナンは C1 を, アンモニアは C4 を, 熱処理は C1 と C2 を不活化することを明らかにした。¹¹⁾ 本実験で調べた 4 魚種の補体の不活化試験の結果は哺乳類およびコイのそれと一致したので, これら 4 種の硬骨魚すべてに補体古典経路の成分である C1, C4, C2 が存在すると推測される。

前述したように, Ross and Jensen²⁾は nurse shark の EAnC1n がモルモットの C4-C9 によって溶血することを利用して nurse shark の C1n を部分精製したが, 今回調べた 5 種の硬骨魚の C1 はどれもモルモットの C4-C9 と反応しなかったため, これらの魚の C1 検出にはモルモットの補体を用いることはできない。しかし, Yano¹²⁾は最近, カラゲナンで不活化したコイ血清を C1 検出試薬として, コイ C1 を単離できることを示した。従って, 今後, 他の魚種においても, 同種の不活化血清を検出試薬として使用すれば補体成分の活性測定や精製が可能であると思われる。

文 献

- 1) D. W. Legler, E. E. Evans, and H. K. Dupree: *Trans. Am. Fish. Soc.*, **96**, 237-242 (1967).
- 2) G. D. Ross and J. A. Jensen: *J. Immunol.*, **110**, 175-182 (1973).
- 3) D. K. Sakai: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 979-991 (1981).
- 4) M. Nonaka, N. Yamaguchi, S. Natsume-Sakai, and M. Takahashi: *J. Immunol.*, **126**, 1489-1494 (1981).
- 5) J. A. Jensen, E. Festa, D. S. Smith, and M. Cayer: *Science*, **214**, 566-569 (1981).
- 6) T. Yano, H. Ando, and M. Nakao: *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **29**, 91-101. (1984).
- 7) T. Yano, Y. Hatayama, H. Matsuyama, and M. Nakao: *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **33**, 29-36 (1988).
- 8) H. Matsuyama, A. Hirata, M. Nakao, and T. Yano: *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **30**, 149-158 (1985).
- 9) M. M. Mayer: In "Experimental Immunochimistry" (2nd ed. by E. A. Kabat and M. M. Mayer, C. C. Thomas), Springfield, Ill., 1961, pp. 133-240.
- 10) P. G. Klein: *J. Exp. Med.*, **111**, 77-91 (1960).
- 11) T. Yano, H. Matsuyama, and M. Nakao: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 281-286 (1986).
- 12) T. Yano, H. Matsuyama, and M. Nakao: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 851-859 (1988).