

# アユの体表粘液における生体防御機構 に関する研究\*1

伊 丹 利 明\*2

## Defense Mechanism of Ayu Skin Mucus

Toshiaki Itami

### 目 次

第1章 序 論	3
第2章 アユのビブリオ病に対する噴霧法ワクチンの感染防御効果	4
2.1 <i>Vibrio anguillarum</i> の生存性と病原性に及ぼす塩分濃度の影響	5
2.2 噴霧法ワクチンの有効性	8
2.3 摘 要	14
第3章 噴霧法ワクチン投与による免疫抗原の魚体内侵入機構の解析	15
3.1 免疫原の侵入門戸	15
3.2 体表粘液とワクチンとの親和性	17
3.3 摘 要	18
第4章 体表粘液における分泌抗体の性状と生体防御上の役割	18
4.1 各種ワクチン投与魚の血清および体表粘液の凝集活性	19
4.2 各種ワクチン投与魚の血清による受動免疫効果	20
4.3 体表粘液および血清からの抗体の精製	23
4.4 噴霧法ワクチン投与魚の血清と体表粘液からのELISAによる抗体の検出	29
4.5 摘 要	35

---

水産大学校研究業績 第1458号, 1993年6月10日受付.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 1458. Received June 10, 1993.

\*1 京都大学農学部研究科博士論文(1993年3月)。

\*2 水産大学校増殖学科水族防疫学講座 (Laboratory of Fish Diseases, Department of Aquaculture and Biology, Shimonoseki University of Fisheries).

第5章 体表粘液における溶菌物質の性状と生体防御上の役割	36
5.1 溶菌物質の分布	36
5.2 粗精製した溶菌物質の性状	36
5.3 リゾチームの精製	45
5.4 摘 要	54
第6章 体表粘液における赤血球凝集素の性状と生体防御上の役割	55
摘 要	60
第7章 総 括	60
総合考察	61
Summary	64
謝 辞	66
文 献	66

## 第1章 序論

魚類の皮膚は表面を覆う表皮とその内側の真皮とからなり、表皮層には粘液を分泌する粘液細胞が、また真皮層には線維性の結合組織のなかに鱗などが存在する(落合：1987)。表皮中の粘液細胞は粘液を貯溜しており、表皮の表層部に近づくにしたがって肥大し、表層に達した部位で粘液を分泌する。粘液は糖タンパク質からなり、シアル酸を多く含むとされている(Nakagawa *et al.*:1987, 浅川：1992)。粘液の主な機能は1) 体表面をなめらかにして水の抵抗を少なくする, 2) 浸透圧調節の一部を担う, 3) 外部からの物理的, 化学的刺激を軽減する, 4) 微生物などの侵入を阻止する, 5) その他特殊な例として, 粘液で産卵巣を作ったりあるいは仔魚の初期飼料となることも報告されている(横手：1982)。このように, 体表粘液は魚類が生息環境に適応するためにはなくてはならない機能を持っているが, なかでも微生物などの体内への侵入を阻止する機能は, 魚類の生存にとってきわめて重要であると考えられる。

近年, 魚類養殖の急速な発展に伴って魚病が多発し, 深刻な問題となっている。この原因としては, 過密養殖, 飼料の過剰投与, 不適切な栄養バランスならびに養殖環境の自家汚染などが考えられる。とくに, 過密養殖に起因するストレスや取り扱いによる体表の擦過傷が原因で起こる疾病が多い傾向がみられる(安永：1972)。このような擦過傷による表皮の剥離や真皮の組織破壊は環境水中の微生物の侵入門戸となり, 患部での病原菌の付着増殖に始まる全身性の細菌性疾患によって斃死する。とくに魚類では哺乳類のようなリンパ節の発達が見られないので(Roitt *et al.*:1987), 体内に侵入した微生物に対する抵抗力は弱く, 比較的簡単に敗血症を起こして斃死する。現在行われている魚病対策では, 抗生物質のような化学療法剤を使用するために, 薬剤耐性菌の出現や, 薬剤の残留による公衆衛生上の問題が生じる危険性を有している。そこで, 魚類の生体防御機構のなかでも最前線の感染防衛組織として重要な働きをしている体表粘液の生体防御機能を解明し, さらに体表における生体防御能を人為的に向上させることによってより抗病性が高く, 健康な養殖魚の飼育ができるものと考えられる。しかし, 魚類の体表粘液における生体防御機構について総合的に解明した研究はなされていない。

魚類の体表粘液における生体防御機構の解明にあたって注目すべきことは, 寄生体の感染門戸が表皮にあることである。この条件に合致する実験対象となる宿主と寄生体の関係としては, アユとそのピブリオ病の病原菌である

*Vibrio anguillarum*の組合わせが挙げられる。ピブリオ病の原因菌である *V. anguillarum* に感染したアユは体表に出血を呈して死亡し(室賀：1983), その感染性と致死性はともに高い。病原菌の感染門戸としては表皮が考えられており, おそらく経皮感染に始まって筋肉に感染病巣を形成したのち, すみやかに致命的敗血症に進展すると考えられている(江草：1978)。このように, アユのピブリオ病は病原性が強く, その感染門戸が表皮であることが強く示唆されているので, 体表粘液における生体防御機構を解明する実験対象として妥当であると考えられる。

養殖アユの生産額は内水面養殖の中でウナギ養殖について大きく, わが国の養殖産業上重要な位置を占めているが, ピブリオ病の発生によって大きな経済的被害をうけている。このような被害を軽減するために, 当初多くの化学療法剤が投与されたが, そのことが薬剤に対する耐性菌の出現を招くこととなり, 疾病の発生を抑制することが困難となった。そこで, 本疾病の予防のために実用的なワクチンの開発が試みられた。魚類の細菌性疾患に対するワクチンの開発は, 1942年にDuffによってcutthroat trout(マスの1種; *Salmo clarkii*)に *Bacterium salmonicida* のクロロホルム不活化菌体を経口投与したことに始まるが, 1970年代になって魚類のワクチンに対する開発が本格的に行われるようになり, 経口ワクチン(Schaperclaus:1972, Fryer *et al.*:1972, Rohovec *et al.*:1975)の他にも浸漬法ワクチン(Amend and Fender:1976, Antipa and Amend:1977, Croy and Antipa:1977)や噴霧法ワクチン(Gould:1977, Gould *et al.*:1978)の有効性が認められるようになった。アユのピブリオ病に対するワクチンとしては, 経口ワクチン(楠田ら：1978, Kawai *et al.*:1981, 川合：1985)や浸漬法ワクチン(青木・北尾：1978, Kusuda *et al.*:1980)の有効性が報告された。このように, いずれのワクチン投与方法においても感染に対する予防効果がみられるが, その詳細な作用機作については明らかではなかった。しかし, 川合(1985)はアユのピブリオ病に対する経口ワクチン投与実験から, またFletcher and White(1973a)はplaice(ツノガレイの1種: *Pleuronectes platessa*)の経口ワクチン投与実験から, それぞれ投与魚の体表粘液に抗体の存在を報告した。浸漬法ワクチンについては, Lobb(1987)がcatfish(アメリカナマズ科の1種: *Ictalurus punctatus*)にジニトロフェニール化ウマ血清アルブミンを浸漬法によって投与したところ, 投与魚の体表粘液中に抗体を検出した。このように, ワクチンの投与方法に違いはあるものの, ワクチン投与によって魚類の体表粘液中に抗体が産生され, その

抗体が体表粘液中で生体防御因子として作用し、感染を予防するための重要な働きをしていることが指摘されている。しかしながら、今日まで、その体表粘液中の抗体の性状についての研究は極めて少ない。

一方、体表粘液における液性生体防御因子としては、上記のようなワクチンによって誘導される特異防御因子と非特異防御因子が知られている。非特異防御因子については、現在までにリゾチーム (Fletcher and Grant: 1969, Fletcher and White: 1973b, Murray and Fletcher: 1976, 高橋ら: 1986a, b, 1987), 赤血球凝集素 (Di Conza: 1970, Di Conza and Halliday: 1971), 補体 (Harrel *et al.*: 1976, ), プロテアーゼ (Hjelmeland *et al.*: 1983) および C 反応性タンパク質 (Ramos and Smith: 1978) が報告されている。なかでもリゾチームは、粘液と強固に結合することが報告されており (Creeth *et al.*: 1979), 粘液におけるリゾチームの生体防御因子としての役割は大きいと考えられる。リゾチームは、1922年に Fleming (鶴: 1977) がヒトの体液と粘液中に存在する高い溶菌活性をもつ酵素として報告して以来、広範囲の生物種に存在が確認されている。近年、リゾチームの活性は単に溶菌作用だけではなく、免疫グロブリンとの相互作用あるいは細胞性の生体防御機構との相互関係を持つことなどが明らかにされており、生体防御機構におけるリゾチームの生物活性はより重要視されるに至っている。また、赤血球凝集素については魚類の体表粘液から検出されたとする報告は少ない。しかし、体表粘液の主成分が糖タンパク質であり、赤血球凝集素の主成分とも一致することから、赤血球凝集素は体表粘液中に分布すると考えられる。最近、赤血球凝集活性をもつレクチンが無脊椎動物の生体防御機構における異物認識 (名取: 1992) や哺乳類のマクロファージにおける lectinophagocytosis (Ofek and Sharon: 1988) などの活性を有していることが報告されていることから、赤血球凝集素は体表粘液の生体防御を論じる上で重要な因子であると考えられる。

本研究は、以上のような経緯を背景に、アユを対象魚種として魚類の生体防御機構のなかでも最前線の防御物質として重要な働きをしている体表粘液から、特異生体防御因子としてワクチン投与によって誘導される抗体を、また非特異生体防御因子としてリゾチームと赤血球凝集素を、それぞれ分離してその性状を詳細に検討したものである。

本論文は大きく2つに分けられる。すなわち、第2章から第4章においては液性の生体防御機構のなかの特異生体防御因子である抗体について、第5章から第6章においては、同機構のなかの非特異生体防御因子であるリゾチーム

と赤血球凝集素について述べた。まず、第2章では体表粘液中に抗体を誘導する方法を開発するために、アユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンの有効性について検討し、*V. anguillarum* の96時間培養ホルマリン不活化菌液の有効性が高いことを明らかにした。第3章では、噴霧法ワクチン投与による抗原の侵入門戸を検索し、体表と鰓の両方から抗原が侵入することならびに体表粘液中のレクチン様物質が免疫抗原の捕捉に重要な役割を果たしていることを示した。第4章では、噴霧法ワクチンによって誘導された体表粘液中の抗体は血清中の抗体と同一のものであることから、血清中から移行したものであることを示唆した。第5章では、体表粘液中のリゾチームを精製し、第6章では赤血球凝集素を部分精製して、各々の性状を明らかにした。第7章では本研究の成果を総合的に考察した。

## 第2章 アユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンの感染防御効果

### 緒 言

ピブリオ病は養殖アユに多大な被害を与えることから、抗生物質が多用されたため、耐性菌の出現が認められている。このために、治療が困難となったばかりではなく、抗生物質の残留などによる公衆衛生上の問題も指摘されている。

そこで、本病の予防対策として、経口ワクチンや浸漬法ワクチンが開発され、有効性が認められた。しかし、前者ではワクチン投与効果の持続性が短いことと多量のワクチンを必要とすることが、また後者では処理による魚へのストレスが問題となっているため、これらの欠点を補えるようなワクチンの開発が望まれている。

一般に、経口ワクチンや浸漬法ワクチンを投与した魚の血清中の抗体価は上昇しないため、効果の判定方法としては *Vibrio anguillarum* 強毒株による人為感染実験による斃死率の差をワクチン無投与魚と比較しなければならない。人為感染方法としては、病原菌を注射によって接種する方法や自然感染による斃死魚と実験魚を同居させる方法などが行われてきた。しかし、注射による攻撃の問題点は、病原体を魚体内に直接注入するため、生体防御機構の第一線である体表粘液中に病原体が接触する機会がなく、体表粘液が持っている防御因子が作用しないことである。また、同居感染では斃死魚から排出される菌数が明らかではないこ

とや他の菌種による感染の恐れがあることなどに問題点が残されている。

そこで本章では、*V. anguillarum*が好塩性の細菌であることから塩分濃度と本菌の生存性と病原性の関係を調べ、ワクチン効果の判定に適正な人為感染条件を明らかにするとともに、この方法を用いて噴霧法ワクチンの有効性について検討した。

## 2.1 *Vibrio anguillarum*の生存性と病原性に及ぼす塩分濃度の影響

アユのビブリオ病の原因菌である *V. anguillarum* は養殖種苗に用いられる海産稚アユ (Muroga and Egusa : 1967) から、湖産稚アユ (室賀・江草 : 1970, 室賀ら : 1974) から分離され、海水および淡水両域のアユに病原性を示すことが知られている。本菌の生化学的ならびに血清学的性状については楠田ら (1979, 1981), 絵面ら (1980) および Kitao *et al.* (1983) によって詳細に検討されている。その結果、アユ由来の本菌の血清型は3~5群に分類されているが、それらのうち、淡水域由来株はいずれも1群のみで構成され、その他の血清型は海水域由来であるとされている。このように、本菌の分類学的位置については比較的良好に研究されているが、本菌による感染成立に重要な要因となる生態学的知見は少ない。

そこで本節では、ワクチンの投与効果の適正な判定法を確立するために、淡水由来の *V. anguillarum* の各種塩分濃度における生存性について検討するとともに、各種塩分濃度下におけるアユに対する本菌の病原性について検討し、再現性が高く自然感染魚と類似した斃死状況ならびに症状を再現できる人為感染方法について調べた。

### 材料および方法

#### 各種塩分濃度における *V. anguillarum* の生存実験

(1) 供試菌 1978年徳島県阿南市の養殖場のアユ病魚から分離した血清型が淡水型であることを確認した *V. anguillarum* の強毒株を用いた。本菌を2%食塩加普通寒天培地(日水)で25℃, 20時間培養したのち、滅菌生理食塩水に約 $10^{10}$  cells/mlとなるように再懸濁したものを供試菌液とした。

(2) 各種塩分濃度系列 海水希釈系列と食塩濃度系列の2系列を作製し、それぞれの試水における本菌の生存性を検討した。海水希釈系列は蒸留水で希釈した1, 10, 25お

よび50%海水ならびに希釈していない海水の5試水を作製した。食塩濃度系列は食塩を蒸留水に0, 5, 50, 500, 5,000および10,000 ppmになるように添加した6試水、ならびにアユ飼育水に0, 2,000および8,500 ppm添加した3試水の合計9種類の試水を作製した。各試水は121℃, 20分間高压滅菌して用いた。なお、海水は高知県手結海岸で、飼育水は地下水を用いている徳島県阿南市のアユ養殖場で採水した。

生存菌数の測定 各試水100 mlに供試菌液0.1 mlを加え、十分に攪拌したのち、18℃に静置して一定期間ごとに生菌数を測定した。なお、生菌数の測定は平板塗抹法により、2%食塩加普通寒天培地(日水)で25℃, 48時間培養して行った。

#### 塩分濃度による *V. anguillarum* の病原性検査

(1) 供試魚 屋外の500 l流水式角型実験水槽で予備飼育した平均体重28 gのアユを用いた。餌料には予備飼育から実験終了まで市販のアユ用ペレットを用い、これを毎日1回投与した。

(2) 供試菌液 前項と同じ淡水型の *V. anguillarum* 強毒株を2%食塩加ブイオン(日水)に接種し、25℃で20時間攪拌培養したのちを用いた。

(3) 攻撃試験用試水 アユ飼育水に食塩を添加して、食塩濃度0, 2,000および8,500 ppmの3種類の攻撃試験用試水を作製した。

(4) 攻撃試験方法 供試菌液を最終濃度 $6.4 \times 10^6$  cells/mlになるように食塩濃度の異なる各攻撃試験用試水に添加し、通気しながら供試魚を20分間浸漬して菌浴攻撃を行った。攻撃後、供試魚をアユ飼育水を満たした実験水槽にもどし、10日間飼育して斃死の有無を観察するとともに、斃死魚の腎臓から菌の分離を試みた。なお、供試尾数は食塩濃度が0 ppm攻撃区で10尾、2,000 ppm攻撃区で15尾および8,500 ppm攻撃区で16尾とした。

### 結果および考察

#### 各種塩分濃度における *V. anguillarum* の生存性

海水希釈系列における *V. anguillarum* の生菌数の経時の変化をFig. 1に示した。1%海水では菌接種後12時間以内に10 cells/ml未満となったが、10, 25および50%海水ならびに希釈していない海水では30日後においても $10^4$  cells/ml以上で推移した。

蒸留水に食塩を添加した食塩濃度系列における生菌数の経時の変化をFig. 2に示した。供試菌接種後、食塩濃度

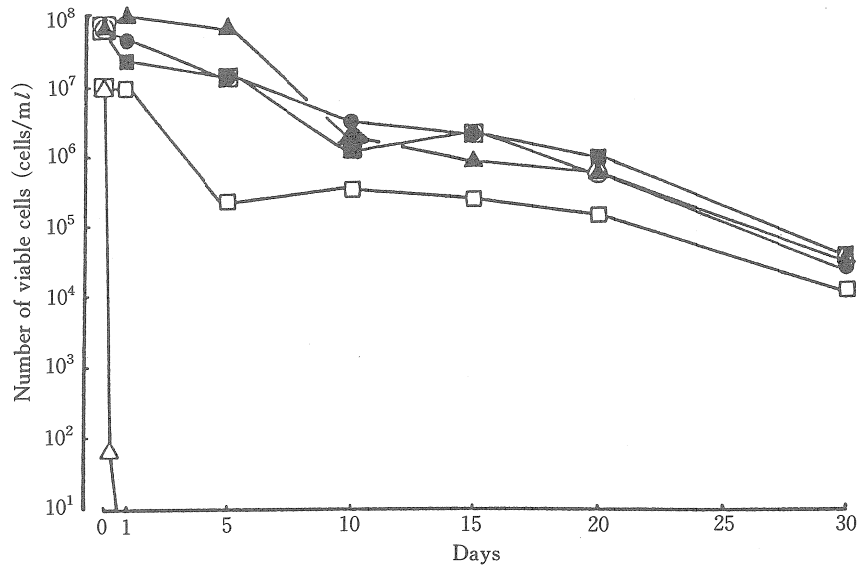


Fig. 1. Changes in viable cell number of *V. anguillarum* inoculated in diluted seawater and non-diluted seawater.  
 △ ; 1% seawater, □ ; 10% seawater, ● ; 25% seawater, ▲ ; 50% seawater, ■ ; non-diluted seawater.

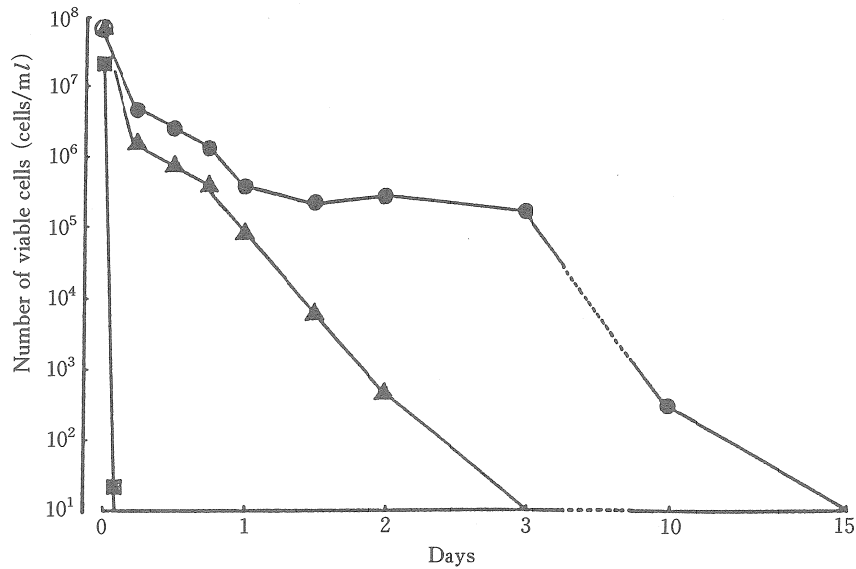


Fig. 2. Changes in viable cell number of *V. anguillarum* inoculated in NaCl-added distilled water.  
 ■ ; 500 ppm NaCl, ▲ ; 5,000 ppm NaCl, ● ; 10,000 ppm NaCl.

0 および 5 ppm では 1 分以内に、50 ppm では 10 分以内に、500 ppm では 20 分以内に、5,000 ppm では 3 日以内に、10,000 ppm では 15 日以内にそれぞれ菌数が 10 cells/ml 未満となった。このように、食塩無添加あるいは食塩低濃度区において供試菌の生存性が短い原因は、低張液中での溶菌あるいは低塩分濃度に基づく生理活性の低下によるものと考えられる。

つぎに、飼育水に食塩を添加した塩分濃度系列における生菌数の経時的变化を Fig. 3 に示した。供試菌接種後、食塩濃度 0 ppm では 6 時間後に 10 cells/ml 未満となったが、食塩濃度 2,000 および 8,500 ppm では 30 日後も  $10^2 \sim 10^3$  cells/ml で推移した。後者は海水中での生存能とほぼ一致し、蒸留水に食塩 10,000 ppm を添加した場合の生存期間よりも長かった。これは、海水および飼育水中の有機物ならびに各種イオンの共存による効果に基づくものと考えられる。

室賀ら (1976) によると、塩分を含む養魚池水で飼育されたニホンウナギ (*Anguilla japonica*) のピブリオ病原菌 *Vibrio* sp. は蒸留水中で 1 時間以内、生理食塩水中で 6 時

間以内、および淡水中では 24 時間以内に死滅するのに対して、海水中では 84 日以上生存したとしている。この報告では接種菌量が明示されておらず、また実験温度も 25℃ であり、著者らの場合とは条件が異なるので詳細な比較はできない。しかし、少なくとも海水中での生存性が長い点については、著者らの結果と一致する。また、楠田 (1975) は海産魚の潰瘍病原菌 *Vibrio* sp. K-3 株について海水中での生存性を調査したところ、40 日以上生存したとしており、著者らの結果と一致する。

このように、供試菌は淡水飼育アユ由来であるにもかかわらず、海水中での生存期間が長かった。このことから、供試菌は元来海水中に生息していたものが、淡水に移行したのではないかと考えられる。

#### 塩分濃度による *V. anguillarum* の病原性の差異

攻撃後の供試魚の生存率の推移を Fig. 4 に示した。攻撃用試水の食塩濃度が 0 および 2,000 ppm の場合には、10 日後にそれぞれ 50 および 20% が生存したのに対して、8,500 ppm では 8 日後にすべて斃死し、生存率は 0% となった。

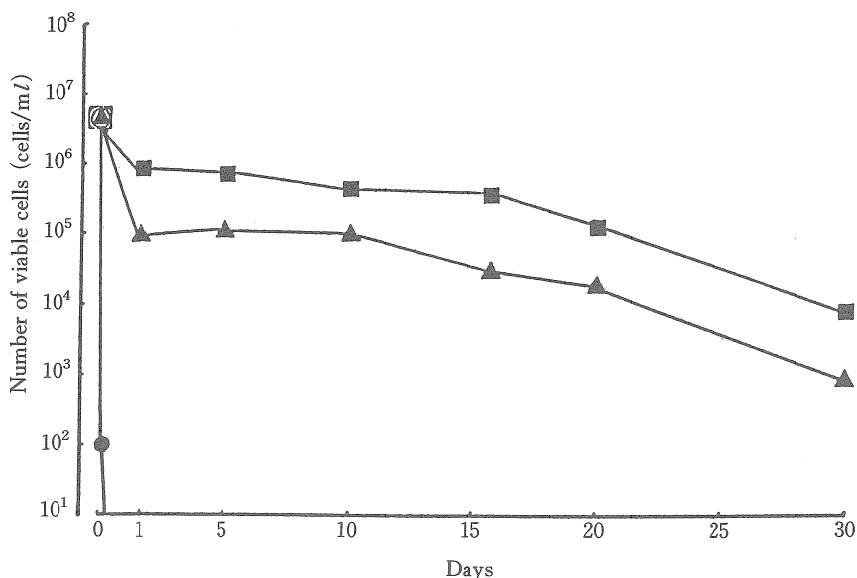


Fig. 3. Changes in viable cell number of *V. anguillarum* inoculated in pond water and NaCl-added pond water.

● ; pond water, ▲ ; 2,000 ppm NaCl-added pond water,  
■ ; 8,500 ppm NaCl-added pond water.

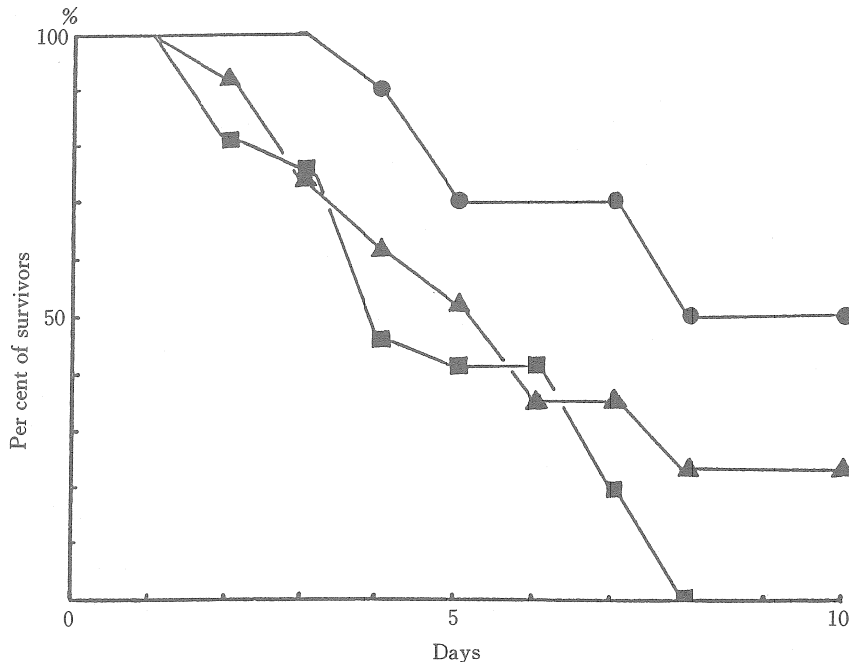


Fig. 4. Changes of survival ratio of ayu after water-borne challenge with different NaCl concentrations.

● ; pond water, ▲ ; 2,000 ppm NaCl-added pond water,  
■ ; 8,500 ppm NaCl-added pond water.

斃死魚の典型的な症状は、食塩濃度が0 ppmでは胸鰭および腹鰭基部の発赤ならびに体側に発赤を伴う膨隆あるいは潰瘍が認められ、腸管の発赤はまれであった。2,000 ppmでは胸鰭および腹鰭基部の発赤、体側部の潰瘍および腸管の発赤が認められた。8,500 ppmでは体表全体の発赤と腫脹、体側部に2~3箇所の出血性潰瘍および腸管の発赤などが認められた。なお、すべての斃死個体から淡水型の *V. anguillarum* が純培養に近い状態で分離された。実験期間中の水温は17.0~17.5°Cであった。

このように、菌浴攻撃を行った場合、攻撃用飼育水への塩分添加量の増加とともにアユの斃死率が上昇し、症状が進行する傾向が認められた。これらの現象は供試菌株の病原性が高まっただけでなく、急激な塩分の変化によってアユの浸透圧調節不全が生じ、その結果として感染防御能力が低下したことも考えられる。

Ellis(1988)はワクチン効果の判定には、ワクチンを投与していない対照区の魚の斃死率が60%以上であることが必要であるとしている。今回の実験から、飼育水中に2,000

ppmあるいは8,500 ppmの食塩を添加することによって、供試魚の60%以上が斃死することが明らかとなった。しかし、8,500 ppm食塩添加の場合、全ての供試魚が死亡するという自然感染ではみられない強い病勢がみられたことから、8,500 ppm食塩の添加では自然状態(養殖環境)における斃死状況を反映していないものと考えられる。したがって、ワクチン効果の判定のための実験条件としては適切ではないと判断した。そこで、ワクチン効果を判定するために行う攻撃方法には、2,000 ppmの食塩を添加した飼育水中に攻撃用菌株を約 $10^6$  cells/mlとなるように懸濁して、供試魚を20分間浸漬する方法が妥当であると結論した。

## 2.2 噴霧法ワクチンの有効性

養殖アユのジブリオ病に対する予防対策として、経口ワクチンや浸漬法ワクチンが開発され、それらの有効性が確認されている(楠田ら:1978, 青木・北尾:1978, 中島ら:1979)が、ワクチンの投与量、効果の持続性および魚体へ



のストレスなどに問題が残されており、より有効で安全性が高く、使用法が簡便なワクチンの探索が望まれている。

1977年にはGouldによって噴霧法ワクチンが開発され、ギンザケ (coho salmon; *Oncorhynchus kisutch*) のピブリオ病に対して有効性が認められた。当初開発されたワクチンは *Vibrio anguillarum* の96時間培養ホルマリン不活化菌液に0.15%ベントナイトを添加し、pHを3.0に調整したものであった。本ワクチンの有効性は高く、魚に対するストレスも軽微であることから、実用性が高いものと考えられた。しかし、その後Gould *et al.* (1978) はベントナイトの添加やpHの調整が必要でないことを報告した。

そこで、本節ではアユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンにおけるベントナイトの添加やpH調整の必要性について調べるとともに、製法の異なるワクチンの有効性の差異と持続性について検討し、ワクチンの投与効果を明らかにした。

材料および方法

ベントナイト添加とpH調整したワクチンの作製と処理法

(1) 供試魚 屋外の500 l流水式水槽で予備飼育した平均体重21gのアユを用いた。そして、各実験水槽に20~21尾を収容し、毎日1回ペレット餌料を投与して飼育した。

(2) ワクチンの製法 1973年に山口県長門市深川のアユ病魚から分離した *V. anguillarum* V-36株を用い、Fig. 5に示す製法により作製した。すなわち、2%食塩加ブイヨ

ン(肉エキス0.75%, ポリペプトン1.5%, 食塩2.0%, pH 7.0)で25℃, 96時間振とう培養した菌液に0.5%のホルマリンを添加し、20℃で24時間不活化した。これを5つに分けて、ベントナイトを0.15%加えてpHを3.0に調整したGouldのワクチン(以下Aワクチンとする)、ベントナイトを0.15%添加したベントナイト添加ワクチン(Bワクチン)、pHを3.0に調整したpH調整ワクチン(Cワクチン)、0.22 μmのマイクロフィルターで菌体を除去した培養ろ液ワクチン(Dワクチン)およびホルマリン不活化ワクチン-96(Eワクチン)の合計5種を作製した。

(3) ワクチンの噴霧法 各ワクチンをエアークンプレッサーに接続したスプレーガンに入れ、5 kg/cm<sup>2</sup>の圧力をかけて噴霧口から20~25 cm離れた網上の供試魚に5~7秒間一様に噴霧した。対照としては無噴霧群を設けた。なお、ワクチン噴霧後の供試魚の摂餌状態と遊泳状態を観察した。

(4) 血中凝集素価の測定 ワクチン噴霧2週間後に各群5尾から尾部切断法により採血して血清を分離し、マイクロタイター法によって *V. anguillarum* ホルマリン死菌に対する凝集素価を測定した。

(5) 有効性の判定法 ワクチン噴霧後2週間の凝集素価を測定した残りの各15~16尾に、菌浴攻撃を行って効果を判定した。菌浴攻撃の方法としては、2,000 ppmの食塩を加えた36 lの各飼育水中に、2%食塩加ブイヨ(日水)で25℃, 20時間培養した *V. anguillarum* V-36株抗血清に凝集するアユ病魚由来の強毒株を1.2×10<sup>7</sup> cells/ml添加し、その中に供試魚を入れて、通気しながら20分間浸漬した。

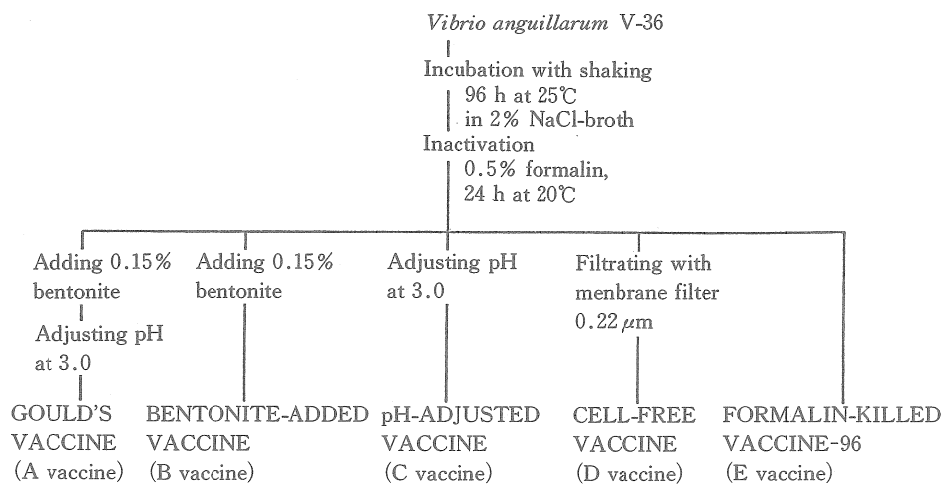


Fig. 5. Scheme for the vaccine preparation.

攻撃後に供試魚を流水式実験水槽に戻し、10日間飼育して斃死の有無を観察した。なお、実験期間中の水温は17.0～18.5℃であった。

#### 不活化ワクチンの作製と処理法

(1) 供試魚 前項と同様に、平均体重21gのアユを各実験水槽に20～21尾を収容し、毎日1回ペレット餌料を投与して飼育した。

(2) ワクチンの製法 *V. anguillarum* V-36株を用い、Fig.6に示す製法により4種類のワクチンを作製した。まず、2%食塩加ブイオンで25℃、96時間振とう培養した菌液に0.5%ホルマリンを添加し、20℃で24時間不活化したホルマリン不活化ワクチン-96(前項に記したEワクチン)と、同じく96時間振とう培養した菌液を100℃で2時間加熱処理した熱処理ワクチン(Fワクチン)の2種を作製した。また、25℃で48時間振とう培養菌液に0.5%ホルマリンを添加し、20℃、24時間不活化したホルマリン不活化ワクチン-48(Gワクチン)とホルマリン不活化後超音波で菌体を破壊した超音波処理ワクチン(Hワクチン)の2種を作製した。そして、これらの合計4種を噴霧法ワクチンとして使用した。

(3) ワクチンの噴霧法 前項と同様にして噴霧した。対照としては無噴霧群を設けた。なお、ワクチン噴霧後の供試魚の摂餌状態と遊泳状態を観察した。

(4) 血中凝集素価の測定 前項と同様にして凝集素価を測定した。

(5) 有効性の判定法 ワクチン噴霧後2週間の凝集素価を測定した残りの各15～16尾に、前項と同様にして菌浴攻撃を行って効果を判定した。攻撃菌数は $8.2 \times 10^8$  cells/mlとした。なお、実験期間中の水温は18.0～19.5℃であった。

#### ワクチン効果の持続性の検討法

(1) 供試魚 ワクチン噴霧群には屋外の500 l流水式水槽で予備飼育した平均体重15gのアユ140尾を用いた。そして、前節と同じ方法で飼育した。対照の無噴霧群には噴霧群に使用した養殖池のアユを、そのつど流水式水槽に馴致して用いた。なお、飼育中の斃死魚はすみやかにとりあげ、腎臓から菌の分離を試みた。

(2) ワクチンの製法 *V. anguillarum* V-36株を用いて、前項に示す製法で、96時間振とう培養してホルマリン不活化ワクチン-96(Eワクチン)を作製した。

(3) ワクチン噴霧法 前項と同じ方法で行った。

(4) 血中凝集素価の測定方法 前項と同様にして凝集素価を測定した。

(5) 有効性の判定法 ワクチンを噴霧したのち、1, 2, 4, 6, 12および16週間後に前項と同様の方法で生菌浴攻撃を行った。攻撃後に供試魚を別の流水式実験水槽に移し、10日間飼育して斃死の有無を観察した。なお、生菌浴攻撃に供試した尾数は噴霧群、対照の無噴霧群ともに1および4週間後にはそれぞれ10尾とし、2, 6, 12および16週間後には15尾とした。

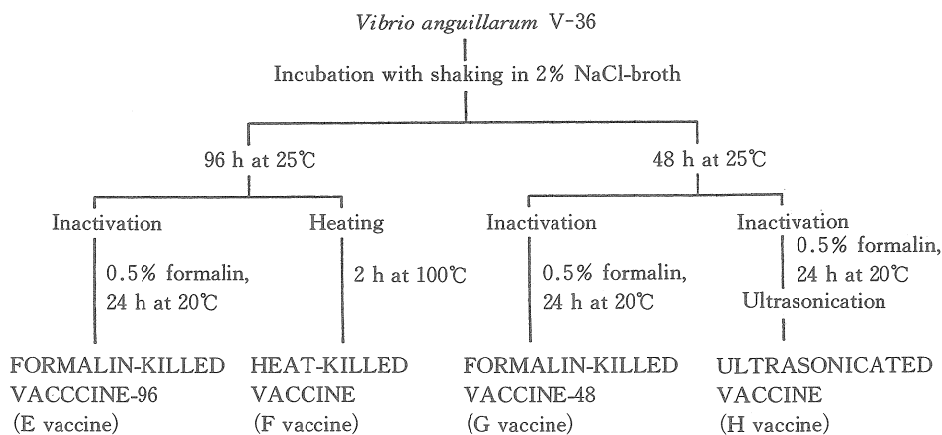


Fig. 6. Scheme for the vaccine preparation.

結果

ベントナイト添加とpH調整によるワクチン効果

すべての供試魚はベントナイト添加の有無およびpH調整の有無に関係なく、ワクチン(A, B, C, D, Eワクチン)噴霧後1日目で摂餌を開始した。また、遊泳状態も正常で、飼育期間中の斃死は認められなかった。

各ワクチン噴霧群の血中凝集素価は上昇せず1:4以下で、対照の無噴霧群の凝集素価と同じであった。

各噴霧法ワクチンの有効性の差異をFig. 7に示した。すなわち、ワクチン噴霧群を攻撃して10日後の最終生存率はEワクチン噴霧群で100%、Aワクチン噴霧群で74%、Bワクチン噴霧群で67%、およびCワクチン噴霧群で44%であった。これに対してDワクチンと無噴霧群では攻撃後8日目と6日目に全数が死亡し、生存率は0%であった。不活化ワクチンの製法による有効性の差異 すべての供試魚はE, F, GとHワクチンのいずれのワクチンを噴霧後1日目で摂餌するようになった。また、飼育中の斃死はまったく認められなかった。

各ワクチン噴霧群の血中凝集素価は上昇せず、無噴霧群と同様に1:4以下であった。

不活化したE~Hワクチンの有効性の差異をFig. 8に示した。すなわち、生菌攻撃して10日後の最終生存率はEワクチン噴霧群が81%、Hワクチン噴霧群では80%、Fワクチン噴霧群は74%、Gワクチン噴霧群は62%であったのに対して、対照の無噴霧群は13%であった。

ワクチン効果の持続性 もっとも効果のあったEワクチンの持続性を調べるために、ワクチンを噴霧して、1, 2, 4, 6, 12および16週間後に攻撃した結果をFig. 9に示した。ワクチン噴霧後1週間後の攻撃による最終生存率はワクチン噴霧群では90%、対照の無噴霧群では10%であった。2週間後の攻撃ではワクチン噴霧群が100%、無噴霧群では0%であった。4, 6, 12および16週間後の攻撃では、ワクチン噴霧群がいずれも80%、無噴霧群は13%であった。なお、この際のEワクチンを噴霧したすべての供試魚は、1日後には摂餌を開始したが、29日と31日後には合計3尾が斃死した。斃死魚の外部症状は認められず、腎臓からは菌が分離されなかった。Eワクチン噴霧群の血中凝集素価は各週とも上昇せず、無噴霧群と同様に1:4以下であった。

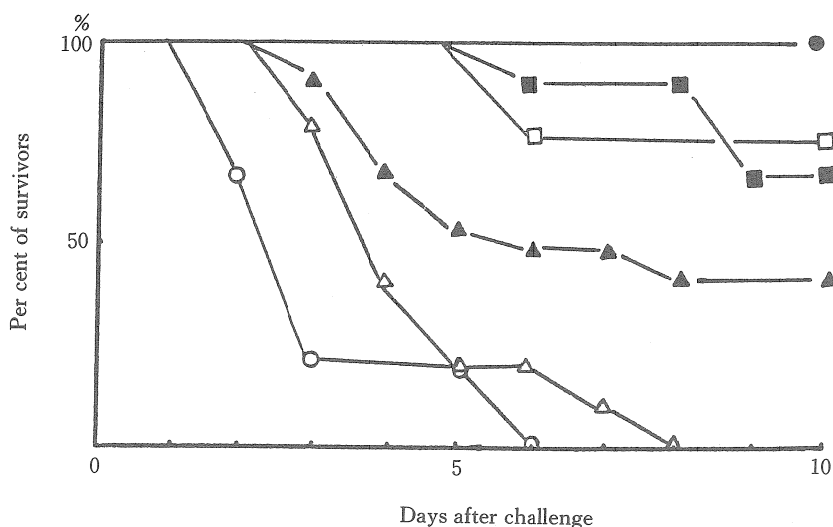


Fig. 7. Survival effect on ayu of different *V. anguillarum* vaccines by spray vaccination. Water-borne challenge level was  $1.2 \times 10^7$  cells/ml.  
 □; Gould's vaccine (A vaccine), ■; bentonite-added vaccine (B vaccine),  
 ▲; pH-adjusted vaccine (C vaccine), △; cell-free vaccine (D vaccine),  
 ●; formalin-killed vaccine-96 (E vaccine), ○; no vaccine.

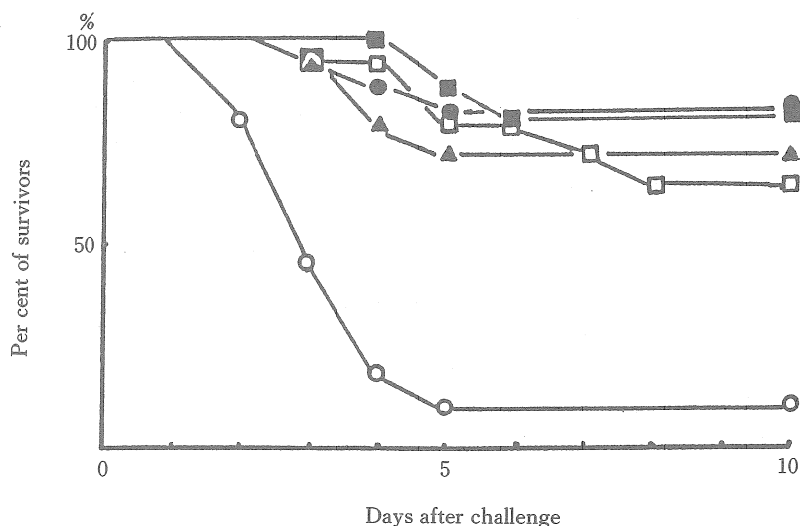


Fig. 8. Survival effect on Ayu of different *V. anguillarum* vaccines by spray vaccination. Water-borne challenge level was  $8.2 \times 10^6$  cells/ml.  
 ●; formalin-killed vaccine-96 (E vaccine), ▲; heat-killed vaccine (F vaccine),  
 □; formalin-killed vaccine-48 (G vaccine), ■; ultrasonicated vaccine (H vaccine),  
 ○; no vaccine.

### 考 察

魚類の細菌性疾病に対する経口ワクチンの本格的な研究は、Duff (1942) が cutthroat trout (マスの1種; *Salmo clarkii*) に *Bacterium salmonicida* のクロホルム死菌を投与した実験に始まる。その後、経口ワクチンに関する多くの研究が行われたが、有効性の認められたものは Ross *et al.* (1965) および Klontz *et al.* (1970) の報告があるにすぎない。近年になって、Fryer *et al.* (1964) および Rohovec *et al.* (1975) によってギンザケ (coho salmon; *Oncorhynchus kisutch*) およびマスノスケ (chinook salmon; *Oncorhynchus tshawytscha*) に対する経口ワクチンの有効性が認められたことから、経口ワクチンの実用化が期待されるようになった。

一方、Amend and Fender (1976) によって浸漬法ワクチンによる免疫法が有望であることが示唆された。そして、その免疫法は Antipa and Amend (1977) によってギンザケ (coho salmon) のピブリオ病に應用され、浸漬法ワクチンの有効性が確認された。ついで、Gould *et al.* (1979), Egidius *et al.* (1979) によってサケ (chum salmon;

*Oncorhynchus keta*), ベニザケ (sockeye salmon; *Oncorhynchus nerka*) およびニジマス (rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) のピブリオ病に対して有効性と実用性の高いことを示した。アユのピブリオ病に対しても、青木・北尾 (1978) および中島ら (1979) によって浸漬法ワクチンの有効性の高いことが明らかにされた。

また、1977年には Gould (1977) によって噴霧法ワクチンが開発され、ギンザケ (coho salmon; *Oncorhynchus kisutch*) のピブリオ病に対して、*V. anguillarum* の96時間培養ホルマリン不活化菌液に0.15% ベントナイトを添加し、pHを3.0に調整したワクチンの噴霧が最も有効であることが示された。しかし、その後、Gould *et al.* (1978) は、ニジマス (rainbow trout) やギンザケ (coho salmon) のピブリオ病に対する噴霧法ワクチンについて、ベントナイト添加やpH調整を行わない96時間培養ホルマリン不活化ワクチンや熱処理ワクチンの噴霧においても、ワクチンの有効性が高いことから、ベントナイトの添加やpHの調整は必要ないとした。

そこで本節において、まずアユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンのベントナイト添加とpH調整が必要である

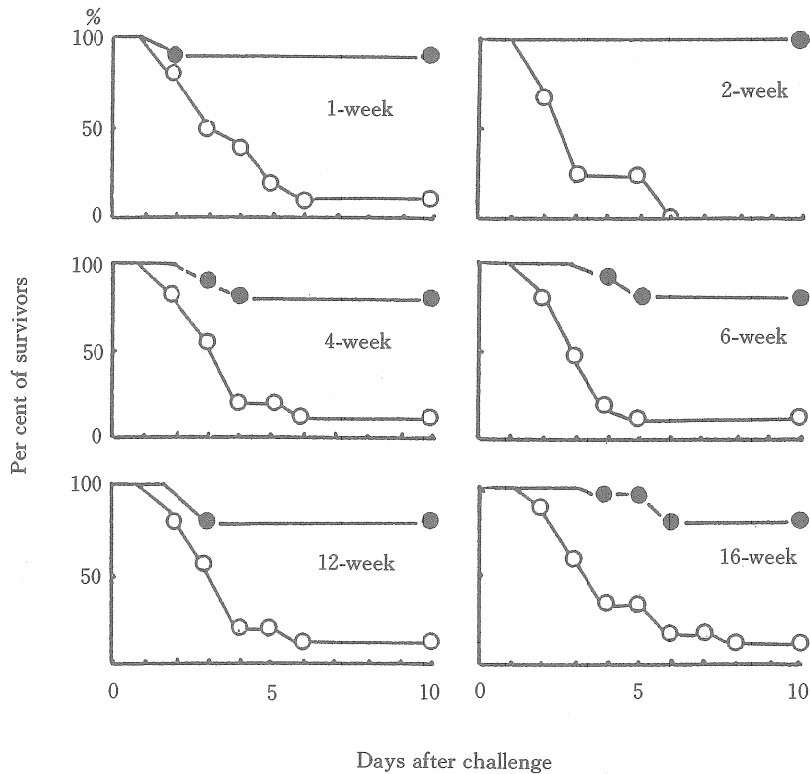


Fig. 9. Duration of the vaccination effect. Water-borne challenge was carried out one, two, four, six, twelve and sixteen weeks after vaccination with formalin-killed vaccine-96; and challenge levels were  $8.1 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^7$ ,  $5.8 \times 10^6$ ,  $8.2 \times 10^6$ ,  $5.8 \times 10^6$  and  $4.7 \times 10^6$  cells/ml, respectively. ●; vaccinated, ○; unvaccinated.

のかどうかについて検討した。なお、各ワクチン噴霧群の血中凝集素価の上昇は認められなかったことから、ワクチンの効果は生菌攻撃後の生残率で判定した。ホルマリン不活化ワクチンにベントナイトの添加やpHの調整を行ったA~Cワクチン噴霧群よりも、これらの処理をしていないEワクチン噴霧群の有効性がやや高かった。したがって、Gould *et al.* (1978)の見解と同様に、アユのビブリオ病に対する噴霧法ワクチンにおいても、ベントナイトの添加やpHの調整は必要ないものと思われる。

培養ろ液のDワクチンについては生菌攻撃10日後の生残率が無噴霧群と同じ0%となり、有効性はほとんど認められなかった。しかし、Dワクチン噴霧群の斃死は対照の無噴霧群より遅れて始まることから、培養ろ液中にも有効な成分が含まれているのではないかと思われる。本実験では

培養ろ液の毒性による供試魚の斃死はみられなかったが、青木・北尾(1978)は *V. anguillarum* の不活化培養菌液を遠心分離した上澄液に稚アユを浸漬すると、斃死が認められるとしている。このような培養ろ液の毒性の差異は供試魚の大きさや、ワクチン作製に用いた菌株の毒素産生性、あるいはワクチンの投与方法によるものと考えられる。

つぎに、噴霧法不活化ワクチンの作製過程の違いによる有効性を検討し、96時間培養したEワクチンの効果は48時間培養したHワクチンよりもやや高いことが判ったが、このことは、長時間培養によって、自己融解した細胞や代謝産物が感染防御上の有効な抗原となることを示唆していると思われる。したがって、ホルマリン不活化噴霧法ワクチンには短時間培養したものよりも、96時間培養した菌液を用いる方が、有効性が高いと考えられる。

つぎに、ホルマリン不活化ワクチン(Eワクチン)と加熱ワクチン(Fワクチン)の最終生残率が81%と74%となり、ホルマリンで不活化したEワクチンの有効性がやや高いものの、加熱で不活化したFワクチンにおいても、かなり高い予防効果が認められた。したがって、楠田ら(1978)のアユのピブリオ病に対する経口ワクチンにおける見解と同様に、噴霧法ワクチンにおいても、菌体の対熱性抗原が感染防御に主要な役割を果たしているのではないかと考えられる。ホルマリン不活化ワクチン(Gワクチン)とホルマリン不活化後超音波処理をした超音波処理ワクチン(Hワクチン)を比べると、それぞれの最終生残率が62%と81%となり、Gワクチンよりも超音波処理したHワクチンの有効性が高い。楠田ら(1978)はアユのピブリオ病に対する経口ワクチンにおいても、超音波処理を行った方が防御効果の高いことを認めている。したがって、噴霧法ワクチンにおいても超音波で破壊された細胞壁や、その結果放出される細胞内容物が、有効な感染防御抗原として作用するのではないかと考えられる。

ワクチン効果の持続性の実験においては、噴霧法ワクチンの最も高い有効性が認められたのは2週間後で、噴霧群の全数が生存したのに対して、対照の無噴霧群は生菌攻撃後6日目で全数が死亡した。4週間以降の噴霧群の生残率は多少低下する傾向がみられたが、16週までの有効性には差異が認められなかった。したがって、96時間培養ホルマリン不活化ワクチン(Eワクチン)の効果は、少なくとも噴霧後16週間までは持続されるものと考えられる。一般に、アユの養殖期間は4~5ヵ月であることから、養殖アユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンは、ブースターを追加噴霧する必要のないことが示唆された。なお、この実験ではワクチン投与後飼育期間中に3尾が斃死した。しかし、斃死魚には外部症状も認められず、また腎臓からも菌は分離されなかった。このことから、斃死は噴霧後28日目に行った分養による事故死であると考えられる。

噴霧法ワクチンの持続期間についてGould *et al.*(1978)は、ベントナイトを添加してpHを調整した*V. anguillarum* 96時間培養ホルマリン不活化ワクチンを噴霧したギンザケ(coho salmon)の血中凝集素価は、112日(16週間)後において無噴霧群よりも高い値が維持されるとされたとしている。今回のアユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンにおいては、血中凝集素価の上昇は認められなかったものの、ワクチンの効果はGould *et al.*(1978)と同様に16週間後においても認められた。一方、養殖アユのピブリオ病に対する経口ワクチンの予防効果の持続期間については楠田ら

(1978)の報告があり、4週間までであるとされている。また、養殖アユの浸漬法ワクチンについては青木・北尾(1978)および中島ら(1979)の報告があり、予防効果は113日以上であるとされている。以上のように噴霧法ワクチンの予防効果の持続性は、経口ワクチンよりもかなり長く、浸漬法ワクチンと同様に長期間にわたって持続することが明らかとなった。しかし、ワクチン効果の持続期間はアユの養殖期間以上に長い必要はないので、今後はワクチン液の希釈、あるいは噴霧時間の短縮を検討すれば、ワクチンの経済性を高めることも可能であると考えられる。

今回の実験においては、各ワクチン噴霧群とも、血中凝集素価の上昇は認められなかった。しかし、Gould *et al.*(1978)はギンザケ(coho salmon)やニジマス(rainbow trout)にピブリオ病のワクチンを噴霧すると、血中凝集素価が上昇することを報告している。一方、青木・北尾(1978)はアユのピブリオ病に対する浸漬法ワクチンの場合には、血中凝集素価の上昇は認められないとしている。また、経口ワクチンを投与した場合の血中凝集素価は上昇しないとする報告は多い(楠田ら:1978, Krantz *et al.*:1964, 保科:1962, Saito *et al.*:1964, Spence *et al.*:1965)。このような血中凝集抗体の有無はワクチンの投与方法、供試魚の種類や大きさ、水温、あるいはストレスなどによって生じるのではないかと考えられる。今後の検討によってそれらを明らかにする必要がある。また、本法による抗原の侵入経路や血中抗体の有無など本ワクチンによって誘導される免疫性についてその基礎的な知見を明らかにする必要がある。

### 2.3 摘 要

1. アユのピブリオ病に対するワクチンの効果を適正に評価するために、再現性が高い人為感染方法について検討した。まず、*V. anguillarum*の各種溶液中での生存性を検討したところ、海水中およびアユ養殖場の飼育水に食塩を2,000および8,500 ppm添加した溶液中での生存期間が最も長く、30日以上であった。そこで、この結果を*V. anguillarum*の人為感染試験に応用した。すなわち、食塩濃度を2,000ppmにした飼育水に*V. anguillarum*の20時間培養菌液を $10^6$  cells/mlとなるように添加し、この菌液にアユを20分間浸漬した結果、攻撃後10日の斃死率が80%となったことから、ワクチンの投与効果を判定するための方法として妥当であることが明らかとなった。

2. アユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンとしては、

*V. anguillarum*の96時間培養菌液に0.5%の割合にホルマリンを加えて不活化したものに高い有効性が認められた。このことから、当初必要とされていたベントナイトの添加やpHの調整は必要ないことが明らかとなった。また、本ワクチンを100℃ 2時間の加熱処理をしたワクチンにもホルマリン不活化ワクチンとほぼ同等の有効性が認められたことから、本ワクチンの主要な感染防御抗原は *V. anguillarum* 菌体の耐熱性抗原ではないかと考えられた。

3. 本ワクチンの有効性の持続期間は少なくとも16週間であったことから、ワクチンをアユの池入れ時に1回投与することによって、養殖のほぼ全期間に渡って有効性が期待できることが明らかになった。

### 第3章 噴霧法ワクチン投与による免疫抗原の魚体内侵入機構の解析

#### 緒言

前章においてアユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンの有効性を明らかにした。しかし、噴霧された免疫抗原がどのような経路で体内へ取り込まれるのかは明らかではない。すなわち、ワクチンを噴霧している間、アユは鰓蓋の開閉を繰り返しているため、ワクチンは体表以外にも鰓と接触しており、鰓から抗原として吸収されている可能性が考えられる。しかし、体表および鰓のいずれの部位においても粘液が表面を覆っているため、ワクチンの主成分である *Vibrio anguillarum* 菌体が体内へ取り込まれる第1段階としては、菌体が粘液に付着することも不可欠であると考えられる。

そこで本章では、抗原吸収部位を特定するために、アユの体表あるいは鰓だけにワクチンを投与して、感染防御能が獲得されるかどうかを人為攻撃実験を行って調べた。また、体表粘液と *V. anguillarum* 菌体との試験管内における親和性について調べ、体表粘液が選択的に菌体を吸着する可能性について検討した。

#### 3.1 免疫抗原の侵入門戸

Amend and Fender (1976) は高張浸漬法ワクチンの抗原侵入門戸を検討するために、アルブミンをニジマス (rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) に浸漬投与したところ、抗原は主に側線から吸収され、ついで鰓からも吸収

されることを示した。青木・北尾(1978)はコリスチンを用いた同様の実験を行い、抗原の大部分は鰓から血流中へ侵入するのではないかと推定した。しかし、これらの実験はいずれも可溶性の物質が用いられており、菌体のような粒子状の物質が上記の実験と同様に体側あるいは鰓から侵入するかどうかは明らかではない。また、免疫原として有効な侵入経路を調べるためには、単に取り込まれた抗原量を部位別に調べるのではなく、部位別に吸収された抗原によって誘導された感染防御能で評価する方が妥当であると考えられる。

そこで本節では、噴霧法ワクチンによる抗原の侵入メカニズムについて検討するために、鰓あるいは体表にのみワクチンを接触させたアユに人為感染実験を行い、噴霧部位による感染防御効果を比較し、免疫原として有効な抗原の侵入門戸について検討した。

#### 材料および方法

**供試魚** 流水式0.5トン水槽で馴致した平均体重84gのアユを、各群15尾ずつ用いた。

**供試ワクチン** 2.2で用いた96時間培養ホルマリン不活化ワクチン-96(Eワクチン)を供試した。

**ワクチン投与** ワクチンを通常通り全身に接触させるために、手動式スプレーを用いてワクチンを供試魚に噴霧し、これを全身噴霧群とした。ワクチンを鰓に接触させるために、供試魚の体側を新聞紙とビニールでおおい、頭部を下にした状態で鰓蓋をピンセットで開き、ワクチンを手動式スプレーを用いて鰓に直接噴霧した。そして、飼育水中に頭部を浸して鰓を洗浄後、水槽へ移して鰓噴霧群とした。つぎに、ワクチンを体表にのみ接触させるため、供試魚の頭部を新聞紙とビニールでおおい、頭部を上にして尾部先端から胸鰭基部までの体表にワクチンを手動式スプレーを用いて噴霧したのち、飼育水中で体表を洗浄後、水槽へ移して体側噴霧群とした。

**攻撃方法** ワクチン噴霧後2週間目に攻撃を行った。攻撃菌液の調製、生菌数の計数ならびに攻撃方法は前節と同様の方法で行った。ただし、攻撃には2,000ppm NaCl添加飼育水を用いた。攻撃菌数は各群とも $4.7 \times 10^6$  cells/mlであった。また、攻撃後10日間はピブリオ病による斃死魚の出現を毎日観察し、斃死魚から菌の分離を試みた。

## 結果および考察

ワクチン処理後2週間目に攻撃した結果をFig.10に示した。攻撃後の最終生存率は、全身噴霧群で80%、体側噴霧群で64%、鰓噴霧群では45%であった。これに対して無処理群では20%であった。

ワクチン噴霧群の感染防御効果はいずれも無処理群にくらべて高く、ワクチン噴霧群のなかでは全身噴霧群が最もすぐれており、ついで体側噴霧群、鰓噴霧群の順であった。したがって、抗原を体表と鰓のいずれに噴霧してもアユの免疫系を活性化させ、生体防御に必要なある程度の抗体が産生されると考えられるが、その生体防御能は全身を噴霧されたものより劣っていた。

浸漬法ワクチンの侵入門戸については Amend and Fender (1976) や 青木・北尾 (1978) の研究がある。Amend and Fender (1976) は血清アルブミンを浸漬投与した場合に、体表から侵入して血流中へ入るアルブミンの量は鰓から侵入する量の約2倍であるとしている。青木・北尾 (1978) はコリスチンを用いて同様の実験を行い、鰓から侵入して血

流中へ入るコリスチンの量は体表から侵入する量の約9倍であるとしている。これらの実験から、可溶性抗原の場合、侵入する抗原量の違いはあるものの、鰓と体表のいずれからも抗原が血流中へ侵入するものと思われる。しかし、菌体のような非可溶性の抗原が血流中へ侵入したかどうかは、これらの研究では明らかではない。Nelson *et al.* (1985) は浸漬法ワクチンをニジマスに投与した場合、免疫抗原 (*V. anguillarum* 死菌体) は浸漬直後には鰓蓋、鰓弓および鰓耙の粘液中和腸管内にみられ、1時間後には腎臓に検出されたことから、浸漬法によるワクチン投与では抗原が鰓から血流中に侵入した結果、全身性の免疫が誘導されたのではないかと推察した。しかし、本研究では鰓からの抗原侵入を示唆しているものの、体表からの侵入については明らかにしていない。

浸漬法ワクチン投与と噴霧法ワクチン投与とは、免疫抗原が対象魚の体表や鰓に接触したのちに免疫が獲得される点においては同じであるので、前述の研究結果と著者の実験結果から、噴霧法ワクチンも浸漬法と同様に抗原は少なくとも鰓からは侵入することが明らかとなった。さらに、

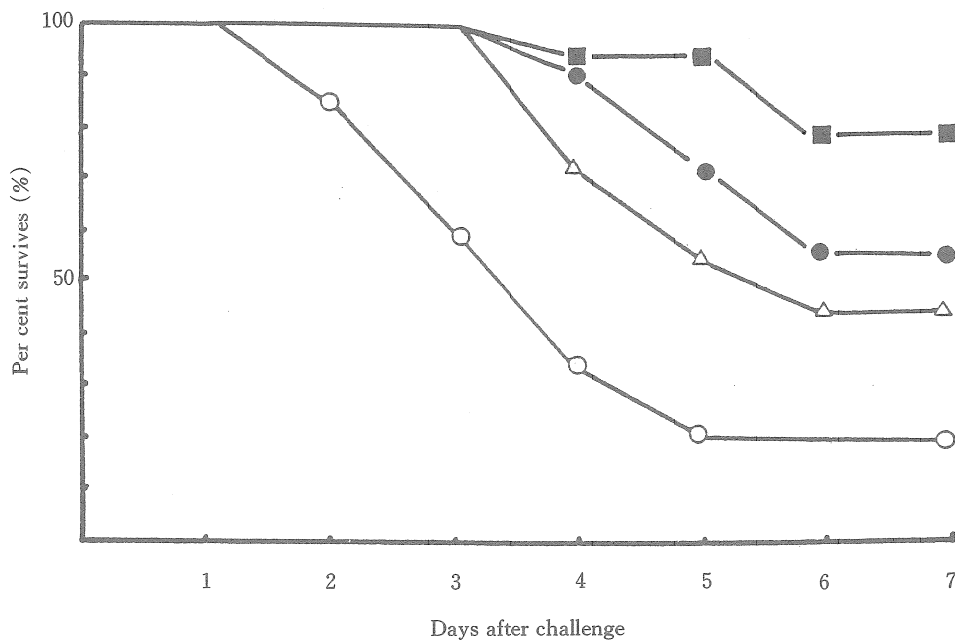


Fig. 10. Survival effect of spraying sites of fish body for immunization by spray method.  
 △; gill, ●; trunk, ■; whole body, ○; control.



体表からの抗原の侵入については、今回の実験結果から抗原の侵入が示唆されたが、今後詳細な検討が必要である。

### 3.2 体表粘液とワクチンとの親和性

前節において、噴霧ワクチンの免疫抗原の侵入経路は体表と鰓の両方であることが示唆された。しかし、体表も鰓も表面は粘液で覆われているため、ワクチン噴霧直後に免疫抗原が体表あるいは鰓から体内へ直接侵入するとは考えられない。そこで、免疫獲得の必須条件としては、免疫原が体表から遊離することなく、粘液中に保持されることが必要であると考えられる。

そこで、本節では体表粘液が選択的に抗原と結合して抗原を粘液中に保持するのではないかと考え、これを証明するためにワクチンの主成分である *Vibrio anguillarum* 菌体と体表粘液との親和性について検討した。親和性については、*V. anguillarum* 由来のリポポリサッカライド (LPS) を感作してあらかじめ凝集させておいたウサギ赤血球に、体表粘液を添加して、体表粘液がこの凝集を解離をできるかどうかについて調べた。

#### 材料および方法

**体表粘液の調製** 平均体重35gのアユ50尾を用いた。供試魚を tricaine methan-sulfonate で麻酔したのち、体表を蒸留水で洗浄し、プラスチック片を用いて体表粘液を採取した。これに4倍量の0.15M NaCl加0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.2, リン酸緩衝食塩水) を加えてホモジナイズしたのち、4℃で23,000×g、20分間遠心分離し、得られた上澄液をろ過して供試粘液試料とした。

**体表粘液の分画** 分離には ConA Sepharose (Pharmacia) を用いた。すなわち、体表粘液を ConA Sepharose カラムに添加し、洗浄後、0.05Mの $\alpha$ -methyl-D-mannoside を含む0.5M NaCl加0.02M Tris-HCl緩衝液で溶出して、ConA Sepharose 非吸着画分と吸着画分に分画した。タンパク質は280 nmにおける吸光度の測定によって検出した。

**赤血球の調製** ウサギ赤血球はニュージーランドウサギの耳翼静脈から採血し、ガラスビーズを用いて脱線維素血液を作製した。赤血球をリン酸緩衝食塩水で洗浄後、2.5%浮遊液を調整して試験に供した。

***V. anguillarum* 菌体からのリポポリサッカライド (LPS) の調製**

(1) 供試菌株 ワクチン作製株である *V. anguillarum*

V-36株と対照株として *Escherichia coli* を用いた。

(2) LPSの調製 *V. anguillarum* は1.5%食塩加普通寒天培地で25℃、24時間培養し、*E. coli* は普通寒天培地で37℃、24時間培養した。培養菌体をリン酸緩衝食塩水で洗浄後、Staub (1967)の方法を用いてフェノール-水抽出、超遠心(105,000×gで3時間遠心分離を2回繰り返す)およびセタボロン (CTAB; cetyl-trimethylammonium bromide) 処理を行って、菌体内LPSを精製した。

**体表粘液による凝集解離効果の測定** 精製した菌体内LPSを凍結乾燥し、その0.5mgをリン酸緩衝食塩水1mlに溶解したのち、ウサギ赤血球浮遊液2mlと混合した。37℃で30分間反応後、リン酸緩衝食塩水で3回洗浄し、2.5%赤血球浮遊液として試験に供した。活性測定には96穴のマイクロタイター用プレートを用いた。2倍階段希釈した体表粘液あるいは ConA Sepharose の各分画試料25 $\mu$ lにLPS吸着赤血球浮遊液25 $\mu$ lを添加・混合して25℃で2時間と、さらに4℃で1晩反応させたのち、凝集の解離の有無を観察した。LPS感作によって形成された凝集赤血球を解離させた試料の最高希釈倍率の逆数を解離力価とした。

#### 結果および考察

前節において、アユ体表粘液中にはワクチンの主成分である *V. anguillarum* を捕捉する物質が存在するのではないかと考えられたので、本節では体表粘液と *V. anguillarum* との親和性を明らかにするために、*V. anguillarum* 由来のLPSによって凝集したウサギ赤血球に体表粘液由来の試料を添加して、凝集赤血球に対する体表粘液試料の解離効果を *E. coli* のそれと比較検討した。

アユ体表粘液、ConA Sepharose 吸着画分および ConA Sepharose 非吸着画分の各試料と *V. anguillarum* および *E. coli* 由来LPSとの親和性を、解離力価を用いて Table 1に示した。

*V. anguillarum* のLPSの感作によって形成されたウサギ赤血球の凝集に対する体表粘液の解離効果について検討したところ、*V. anguillarum* 由来LPSに対する体表粘液の解離力価(64)の方が *E. coli* 由来LPSに対する力価(16)より高いことから、体表粘液中には *V. anguillarum* のLPSに対して高い親和性をもつ物質の存在が明らかとなった。このような傾向は ConA Sepharose 非吸着画分および ConA Sepharose 吸着画分においてもみられた。とくに、ConA Sepharose 吸着画分では *V. anguillarum* に対す

Table 1. Disaggregation activities of body mucus extract and its fractions by ConA Sepharose against erythrocyte aggregates by LPS of *V. anguillarum* and *E. coli*

Samples	LPS source	Disaggregating titer (1 : )							
		4	8	16	32	64	128	256	512
Body mucus	<i>V. anguillarum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
	<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
ConA through fraction	<i>V. anguillarum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
	<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
ConA adsorbed fraction	<i>V. anguillarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-

る力価が256で、*E. coli*のそれが16であり、体表粘液や非吸着画分における各菌体の解離力価の差異に比べてその差が顕著であった。これらのことから、体表粘液中には *V. anguillarum* の菌体内 LPS に対して高い親和性を持つ物質が存在することが明らかとなった。さらにこのことから、アユの体表粘液には *V. anguillarum* 菌体に強い親和性を示す物質が存在し、菌体は体表上で捕捉されてその一部が粘膜層下のマクロファージ (Ourth: 1980) などに貪食されたのち、抗原として認識され、抗体産生を誘導するのではないかと推定された。

このように、アユの体表粘液には *V. anguillarum* に対して親和性を示す物質が存在し、これがワクチンの噴霧に対しては免疫抗原を捕捉する場として免疫成立に重要な役割を果たしていると考えられる。

### 3.3 摘 要

1. ワクチンにおける免疫抗原の侵入経路を調べるために、鰓と体表にワクチン液を噴霧したのち、人為攻撃実験を行ったところ、鰓噴霧群と体表噴霧群の生残率はいずれも全身浸漬群の約50%~80%の値を示したことから、噴霧法による免疫抗原の侵入経路は体表と鰓の両方であると推察された。

2. アユ体内への抗原侵入の最初となる体表粘液と抗原との親和性について検討した。すなわち、*V. anguillarum* 由来の LPS でウサギ赤血球を凝集させ、これに段階希釈した体表粘液を添加して、体表粘液による凝集解離効果について調べた。その結果、*V. anguillarum* 菌体はアユ体表粘液に対して高い親和性を示したことから、ワクチン

投与によって抗原が体表粘液に付着・保持されたのち、粘膜層下のマクロファージなどによって取り込まれることによって、抗体産生が誘導されるものと考えられた。

## 第4章 体表粘液における分泌抗体の性状と生体防御上の役割

### 緒 言

前章までにおいて、ピブリオ病に対する噴霧法ワクチンを投与したアユが人為感染に対して感染防御能を示したことから、ワクチンの有効性が明らかとなった。しかし、ワクチン投与後も血清中抗体価の上昇がみられないことから、ワクチン投与による抗原刺激によって抗体が産生されているかどうかは明らかではない。

経口ワクチンを投与したアユ (Kawai *et al.*: 1981) および注射法ワクチンを投与した plaice (ツノガレイの1種; *Pleuronectes platessa*) (Fletcher and White: 1973a) では、体表粘液中の抗体価の上昇が報告されており、前者の場合、この抗体が人為感染に対して有効な防御因子であることが明らかとなっている。

本章では、噴霧法ワクチン投与魚の体表粘液中の抗体の検出と精製を試みるとともに、血清中抗体との異同ならびに血清中から体表粘液への抗体の分泌の可能性について検討した。

#### 4.1 各種ワクチン投与魚の血清および体表粘液の凝集活性

一般に、魚類の血清中凝集素価はワクチンを注射すると上昇するが、経口および浸漬法では上昇しないとされている (Di Conza: 1970, Di Conza and Halliday: 1971, 川合: 1985)。また、前章で示したように噴霧法によるワクチン投与魚の血清中にも凝集抗体は検出されなかった。しかし、Fletcher and White (1973a) はピブリオ病のワクチンを plaice (ツノガレイの1種; *Pleuronectes platessa*) に注射した結果、血清中、腸粘膜および体表粘液中に凝集抗体を検出している。川合(1985)はピブリオ病ワクチンを経口投与したアユの凝集素価を測定したところ、血清と腸粘液中の凝集素価は対照区のそれと差異はないが、体表粘液ではワクチン投与群の方が明らかに高いことを報告している。これらのことから、ワクチンを投与したアユでは体表粘液中の抗体が感染防御上の大きな要因となっているものと考えられる。

本節では噴霧法ワクチンによって免疫されたアユの血清中および体表粘液中の凝集素価を調べ、これを経口ワクチンおよび注射ワクチン投与群と比較検討した。

#### 材料および方法

**供試魚** 平均体重31gのアユ20尾を1群とし、計80尾を用いた。

**供試ワクチンおよび投与方法** 2.2で用いたホルマリン不活化ワクチン(Eワクチン)を噴霧法、経口法および注射法を用いて投与した。対照区にはワクチン無投与群を用いた。

(1)噴霧法ワクチン 2.2と同様にして投与した。

(2)経口ワクチン 上記のワクチンを6,500×gで遠心分離して菌体を集菌したのち、これに等量の生理食塩水を添加、混合した。本菌体懸濁液をアユ用乾燥餌料に、1日の投与量が魚体重1kgあたり湿菌重量で1gとなるようにワクチンを吸着させ、10日間自由摂餌によって連続投与した。

(3)注射ワクチン 経口ワクチンの場合と同様に集菌して菌体懸濁液を作製し、1尾あたり湿菌重量で0.2mgとなるように腹腔内注射を行った。

**血清の分離** 供試魚の血液の採集は噴霧ワクチン投与群では噴霧後2週間目、経口ワクチン投与群では最終投与終了後5日目、注射ワクチン投与群では注射後4週間目に行った。尾部切断によって採血し、4℃で一晩静置したのち血清を分離した。血清は10尾分を1プールとして凝集抗体価

を測定した。

**体表粘液の採集** 供試魚を tricaine methansulfonate で麻酔したのち、3.2と同様にして体表粘液を採取し、10尾分を1プールとして試料とした。粘液試料を50%飽和硫酸で塩析し、沈殿画分を0.01Mリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解してポリエチレングリコール#7,500で採材時の試料量の約10倍に濃縮したものを凝集抗体価の測定に用いた。

**凝集抗体の測定** 反作用抗原には、免疫抗原として用いた *Vibrio anguillarum* 不活化菌体を洗浄して、0.15M NaCl 加0.01Mリン酸緩衝液(pH7.2)に再懸濁したものを用いた。凝集抗体価はマイクロタイター法を用いて測定した。

**供試魚の飼育と観察** 流水式0.5トン水槽を用い、噴霧、注射および対照群には実験期間中毎日1回アユ用乾燥餌料を投与して飼育した。また、経口ワクチン投与群にはワクチン投与終了後4日間は上記乾燥餌料を与えた。実験期間中は毎日、アユの摂餌状態と斃死の有無を観察した。なお、実験期間中の水温は17.5~18.0℃であった。

#### 結果および考察

各ワクチン投与群およびワクチン無投与群の血清中および体表粘液中の凝集素価を Fig. 11 に示した。各群の血清中の凝集素価は注射ワクチン投与群で1:256と著しく高かったが、噴霧および経口ワクチン投与群ならびに対照群ではいずれも1:4であり、噴霧法ワクチン投与魚、経口ワクチン投与魚およびワクチン無投与魚の間には差異が認められず、噴霧ワクチンによって産生される抗体量はマイクロタイター法では検出されにくいほどの微量か、あるいはほとんど産生されていないのではないかと考えられる。しかし、各群の体表粘液中の凝集素価は、注射ワクチン投与群で1:64、噴霧および経口ワクチン投与群ではいずれも1:16であったが、対照群では1:4であり、これらのワクチン投与魚はワクチン無投与魚より明らかに高い値を示したことから、いずれのワクチンでも抗体産生を促し、その抗体が体表粘液中に分布することが判った。ただ、供試魚の摂餌状態は噴霧法および経口法ワクチン投与群ならびに対照群では良好であったが、注射ワクチン投与群では摂餌が不活発であった。

体表粘液中の抗体について Fletcher and Grant (1969) は、ヒト赤血球、ヘモシアニンおよび *V. ichthyoderma* 菌体を腹腔内に注射した plaice (*Pleuronectes platessa*) の体表粘液中に凝集抗体価が上昇すると報告している。さらに、Fletcher and White (1973a) は *V. anguillarum* を皮下ある

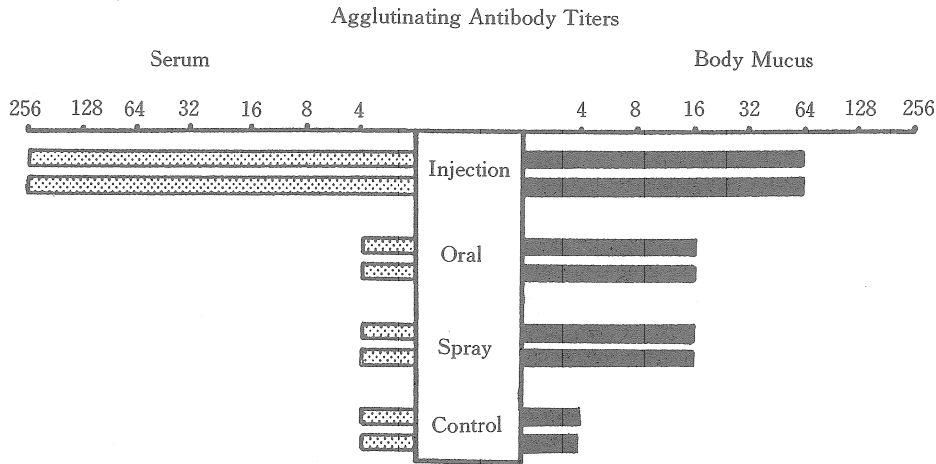


Fig. 11. Agglutinating antibody titers of sera and body mucus extracts of immunized and non-immunized ayu.

いは腹腔内に接種した plaice (*Pleuronectes platessa*) では、血清、体表粘液および腸粘液に、また経口的に投与した場合には血清と腸粘液に抗体がそれぞれ検出されることを明らかにしている。また、Bradshaw *et al.* (1971) はヒツジ赤血球を筋肉内に接種して免疫した gar (鱗骨魚科の 1 種; *Lepisosteus platyrhincus*) が体表粘液中に IgM を産生することを報告している。Di Conza (1970) および Di Conza and Halliday (1971) は catfish (ハマギギの 1 種; *Tachysurus australis*) にヒツジ赤血球を接種したところ、体表粘液中に凝集抗体が検出され、この抗体は血清中にみられる IgM 抗体と同様の高分子凝集抗体であると報告した。Fletcher and White (1973a) は血清中の抗体価がかなり上昇した場合に、体表粘液中へ抗体の一部が移行するのではないかと考えている。しかし、川合 (1985) はアユに経口ワクチンを投与した場合に、血清中の抗体価が低いにもかかわらず体表粘液中に抗体が存在することから、体表粘液に分泌される抗体は、血清中から体表粘液へ供給されるとしても特殊な機構で分泌されたのではないかと指摘している。今回の噴霧ワクチン投与魚の場合も、血清中抗体価が低いにもかかわらず体表粘液中に抗体が検出されたことから、経口ワクチンと同様に血清中の抗体量に依存しないで体表粘液中に抗体を分泌する機構があると考えられる。しかし、このように体表粘液中における抗体の存在を全身性の免疫の一部と捉えるか、あるいはこれに対して局所免疫と

して捉えるかは、血清中の抗体が体表粘液へ移行するのかどうかを究明し、さらに体表粘液中と血清中の抗体を精製し、両者の性状を明らかにする必要がある。

#### 4.2 各種ワクチン投与魚の血清による受動免疫効果

前節において噴霧法によるワクチン投与魚の血清中には凝集抗体が検出されなかったが、体表粘液中では検出されたことから、体表粘液中の抗体は血清中の抗体が粘液中へ移行・蓄積したものなのか、あるいは局所的に体表で産生されたもののどちらかであると推測した。Kawai *et al.* (1981) はピプリオ病に対する経口ワクチンを投与したアユの血清を正常アユに接種したのち、48時間後に病死魚との同居による人為感染実験を行ったところ、受動免疫が成立することを確認した。このことから、アユに経口ワクチンを投与した場合、血清中に低濃度の抗体が産生されて、能動的に体表粘液に移行すると推察した。しかし、抗体が移行に要する時間や接種抗体量による移行量の差異など抗体の移行に係わる基礎的な要件は明らかではない。

本節では噴霧法、経口法および注射法ワクチン投与群から得られた血清の受動免疫効果を比較し、上述の基礎的要件を明らかにしたのち、噴霧ワクチン投与における体表粘液中への抗体の移行について検討した。

### 材料および方法

**供試魚** 平均体重64gのアユを用いた。血清を採取するための80尾と、血清を接種して受動免疫効果を判定するための79尾の合計159尾を用いた。

**供試ワクチンおよび投与方法** 4.1で調製した噴霧ワクチン、経口ワクチンおよび注射ワクチンを同節と同様の方法で投与した。対照区はワクチン無投与区とし、各区の供試尾数を20尾ずつとした。

**供試血清** 各ワクチン投与魚および無投与魚から4.1と同様に血清を分離し、1区分の血清を1プールとした。各プール血清をマイクロタイター法を用いて血清中凝集素価を測定したのち、0.22 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過滅菌し、受動免疫実験に供試するアユ1尾に対して0.1mlを腹腔内接種した。各区8~12尾を用いた。

**攻撃方法** 攻撃菌液の調製、生菌数の計数ならびに攻撃方法は4.1と同様の方法で行った。攻撃は血清接種1時間後

と血清接種24時間後の2回行った。攻撃菌数は接種1時間後の攻撃では $2.9 \times 10^6$ 、24時間後では $2.2 \times 10^6$  cells/mlであった。また、攻撃後7日間におけるピブリオ病による斃死魚の有無を毎日確認し、斃死魚から菌の分離を試みた。

### 結果

血清接種後1時間で攻撃した結果をFig.12に示した。各区の最終生残率は、注射ワクチン投与魚血清を接種した区で90%、経口ワクチンおよび噴霧ワクチン投与魚血清を接種した区ではいずれも40%、対照区では25%であった。

血清接種後24時間で攻撃した結果をFig.13に示した。各区の最終生残率は、注射ワクチン投与魚血清を接種した区で100%、経口ワクチン血清接種区で82%、噴霧ワクチン血清接種区で80%、対照区では25%であった。

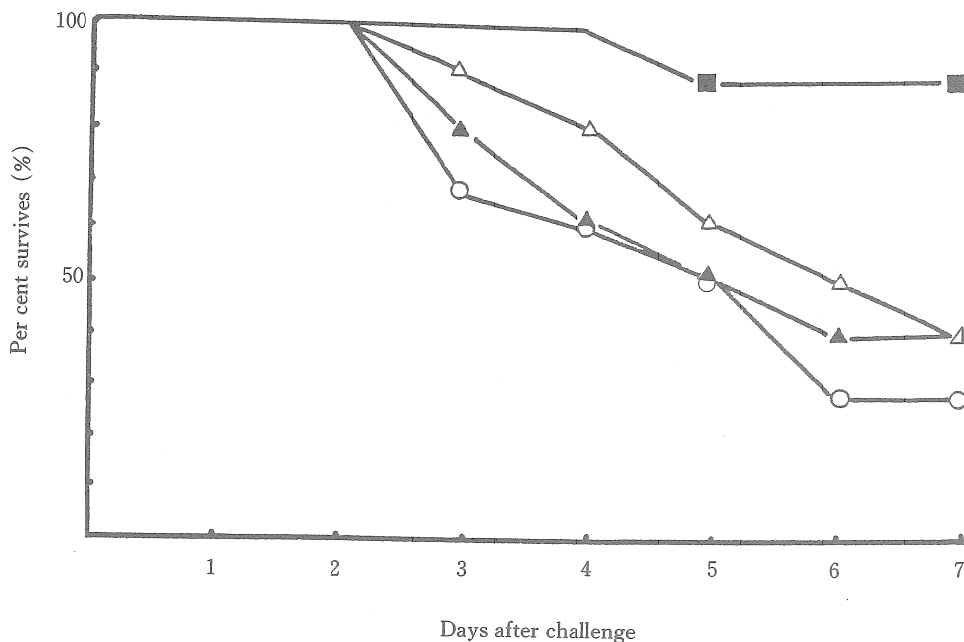


Fig. 12. Effect of passive immunization. Fish were challenged 1 h after injection of immunized or non-immunized serum. Each group of fish was injected with the ayu serum of spray-immunized fish (▲), orally immunized fish (△), intraperitoneally immunized fish (■) or non-immunized fish (○).

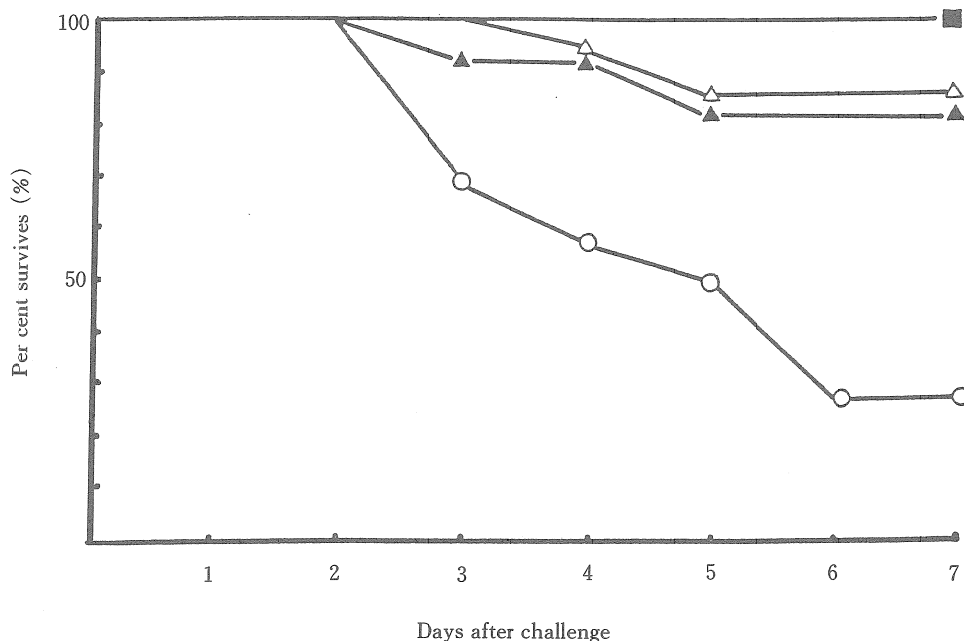


Fig. 13. Effect of passive immunization. Fish were challenged 24 h after injection of immunized or non-immunized serum. Each group of fish was injected with the ayu serum of spray-immunized fish (▲), orally immunized fish (△), intraperitoneally immunized fish (■) or non-immunized fish (○).

### 考 察

魚類を用いた受動免疫については, Spence *et al.* (1965), Harrel *et al.* (1976), および川合 (1985) が報告している。前 2 者は注射ワクチンを投与した魚から得た凝集抗体価の高い血清を正常魚に接種して, その受動免疫効果を攻撃実験で明らかにした。一方, 後者は経口ワクチン投与魚血清を正常アユに接種して, 2 日後に攻撃実験を行った結果, 血清中凝集素価の低い血清でも受動免疫が成立することを明らかにした。

*Vibrio anguillarum* のアユに対する感染について, 舟橋ら (1974) はまず *V. anguillarum* がアユの体表に付着し, 皮膚組織あるいは隣接の組織で増殖したのち敗血症に進展すると推定した。Muroga and De La Cruz (1987) も同様に *V. anguillarum* のアユに対する初期感染部位が体表にあることを示した。

川合 (1985) はアユのビブリオ病に対する経口ワクチンの作用機構を明らかにするために, 免疫魚の体表における付着細菌数や粘液の付着阻止活性を検討した。その結果, 経口ワクチンを投与したアユの体表粘液中に抗体が分泌され, この抗体が菌体の体表への付着を阻止するとともに, あらたに産生された粘液によって体表から菌体を除去して, 感染を効果的に防御していると考察した。このように, アユのビブリオ病では, 体表が初期感染門戸であり, 体表粘液中に産生された抗体が感染防御上主要な役割を占めていると考えられる。

本節で行った受動免疫実験では, 血清接種後 1 時間で攻撃した実験区最終生残率は注射ワクチン血清接種区で最も高く, 感染防御効果が認められたが, 噴霧および経口ワクチン投与区の生残率は対照区とほとんど差異がなく, 感染防御効果は認められなかった。このことから, 血清接種後 1 時間で攻撃した場合は, 血清中凝集素価の高いことが

受動免疫の成立に不可欠な条件であると考えられた。しかし、血清接種後24時間で攻撃した実験区では、注射ワクチン、経口ワクチンおよび噴霧ワクチンのいずれの血清を接種した区でも感染防御効果が認められ、受動免疫が成立した。すなわち、凝集素価の高い注射ワクチン投与魚血清だけでなく、凝集素価の低い経口ワクチンや噴霧ワクチン投与魚の血清でも受動免疫が成立したことから、腹腔内に接種された抗体がなんらかの能動的な機構によって体表粘液中に移行・蓄積した結果、体表における初期感染を効率よく防御したのではないかと考えられる。そして、抗体は接種直後には体表粘液へ移行せず、少なくとも24時間が必要であることが明らかになった。このことは、噴霧ワクチン投与によって産生された体表粘液中の抗体は、局所的に体表で産生されたものではなく、全身性免疫の一部として体表粘液中に蓄積されたことを示唆しているものとも考えられる。しかし、体表粘液中に移行した抗体と血清中のそれとの異同については両者を精製して、その生化学的ならびに免疫学的性状を比較検討する必要がある。

#### 4.3 体表粘液および血清からの抗体の精製

体表粘液中の生体防御物質である抗体についての知見は、近年しだいに蓄積されつつあるが(Fletcher and Grant: 1969, Bradshaw *et al.*: 1971, Fletcher and White: 1973a, Kawai *et al.*: 1981), その詳細な性状について検討したものは少ない(Ourth: 1980, Lobb and Clem: 1981a, b, Louis-Cormier *et al.*: 1984)。また、アユの抗体についての報告はなく、その精製法や生化学的性状についても明らかではない。

4.1の結果から、噴霧法ワクチン投与魚では体表粘液中の凝集素価は高いが、血清中凝集素価が低いため、両抗体を精製してその性状を比較することは困難であると考えられる。しかし、注射法ワクチン投与魚においては、血清中および体表粘液中のいずれの部位においても凝集素価が高いことから、抗体の精製には注射ワクチン投与魚の血清を用いるのが適当であると考えられた。

そこで、本節では *Vibrio anguillarum* に対するワクチン(Eワクチン)をアユの腹腔内に投与し、投与後の体表粘液中の抗体および血清中の抗体を精製し、その生化学的性状を比較検討した。

#### 材料および方法

**供試魚** 供試魚には平均体重88gのアユ63尾を用いた。供試魚を流水式のコンクリート水槽(18.5℃)に収容し、毎日1回ペレット餌料を投与して飼育した。

**免疫抗原の調整と投与** アユのピブリオ病原因菌 *V. anguillarum* の96時間培養菌体を0.5%ホルマリンで不活化(Eワクチン)したのち、生理食塩水に浮遊させ、等量のフロイントの完全アジュバント(Freund's complete adjuvant(Difco))と混合して乳濁化したものを免疫抗原とした。アユ1尾あたり0.2mlの免疫抗原を腹腔内接種によって投与した。

**試料の調製** 抗原を投与して3週間後に3.2の方法を用いて体表粘液を採取し、同様に処理して体表粘液試料とした。また、3.1の方法を用いて血清試料(29ml)を調製した。

**凝集抗体の測定** 凝集抗体価はマイクロタイター法を用いて、2.2と同様にして測定した。

**抗体の精製** 以下に述べる方法で抗体を精製した。なお、タンパク質の検出は波長280nmにおける吸光度の測定によって行った。

(1) **硫酸塩析** 50%飽和硫酸塩析法を用いた。本法を2回繰り返して得られた沈殿を、0.15M NaCl加0.01Mリン酸緩衝液(pH7.2, リン酸緩衝食塩水)に溶解後、ゲルろ過試料とした。

(2) **ゲルろ過** ゲルろ過剤として Sephacryl S-300 (Pharmacia)を用い、緩衝液としてリン酸緩衝食塩水を用いた。

(3) **イオン交換クロマトグラフィー** イオン交換体には DEAE-Toyopearl 650M(東ソー)を用いた。0.05Mリン酸緩衝液(pH6.5)で平衡化したイオン交換体に、同緩衝液で透析した試料を吸着させたのち、0~0.2M NaClによる濃度勾配を用いて溶出を行った。

**純度の検定** 7%ポリアクリルアミドゲル(pH9.5)を用いて、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動(PAGE)(萩田・中村:1981)を行った。タンパク質のバンドの検出にはクマシーブリリアントブルー R-250を用いた。また、精製試料については、同時に泳動した2本のゲルのうちの1本を染色し、残りの1本を厚さ2mmに細断し、各切片を150 $\mu$ lのリン酸緩衝食塩水に浸漬して、タンパク質を抽出したのち、抽出液100 $\mu$ lに反応用抗原25 $\mu$ lを加えて、凝集活性の有無を観察した。

**分子量の測定** 精製試料の分子量を Sephacryl S-300を用いたゲルろ過によって測定した。標準タンパク質にはアル

ドラーゼ(分子量 160,000), カタラーゼ(240,000)およびフェリチン(450,000, いずれも Serva 社)を用いた。また, ボイドボリューム( $V_0$ )の測定にはブルーデキストラン 2,000(Pharmacia)を用いた。

2-メルカプトエタノール(2-ME)に対する感受性 精製試料に最終濃度0.1Mとなるように2-MEを添加し, 37°Cで1時間反応後, 凝集活性の有無を調べた。

### 結 果

体表粘液からの抗体の精製 供試した体表粘液の *V. anguillarum* に対する凝集素価は1:16であった。本粘液を50%硫酸により塩析したところ, 沈殿画分に凝集活性が認められた。本画分について, Sephacryl S-300によるゲルろ過を行って得られたタンパク質の溶出パターンと *V. anguillarum* に対する各画分の凝集活性を Fig. 14 に示した。凝集活性は  $V_0$  よりやや遅れて溶出し, その凝集素価は1:2~1:8であった。この活性画分について, DEAE-Toyopearl 650Mによるイオン交換クロマトグラフィーを行って得られた結果を Fig. 15 に示した。凝集活性は NaCl

濃度0.07M付近に溶出した画分にみられた。さらに, この活性画分について Sephacryl S-300によるゲルろ過を行って得られた結果を Fig. 16 に示した。凝集活性は第1ピーク(I)を濃縮した試料にみられた。

血清からの抗体の精製 供試した血清の *V. anguillarum* に対する凝集素価は1:64であった。本血清を50%硫酸により塩析したところ, 沈殿画分に凝集活性が認められた。本画分の, Sephacryl S-300によるゲルろ過におけるタンパク質の溶出パターンと *V. anguillarum* に対する各画分の凝集活性を Fig. 17 に示した。凝集活性は  $V_0$  よりやや遅れて溶出し, その凝集素価は1:2~1:4であった。この活性画分について, DEAE-Toyopearl 650Mを用いたイオン交換クロマトグラフィーを行って得られた結果を Fig. 18 に示した。凝集活性は NaCl 濃度0.05~0.09Mに溶出した画分にみられた。さらに, この活性画分について Sephacryl S-300によるゲルろ過を2回行って得られた結果を Fig. 19 に示した。1回のゲルろ過では, 凝集活性を示した画分が他の画分と明確に分離しなかったが, 2回目のゲルろ過によって分離した。

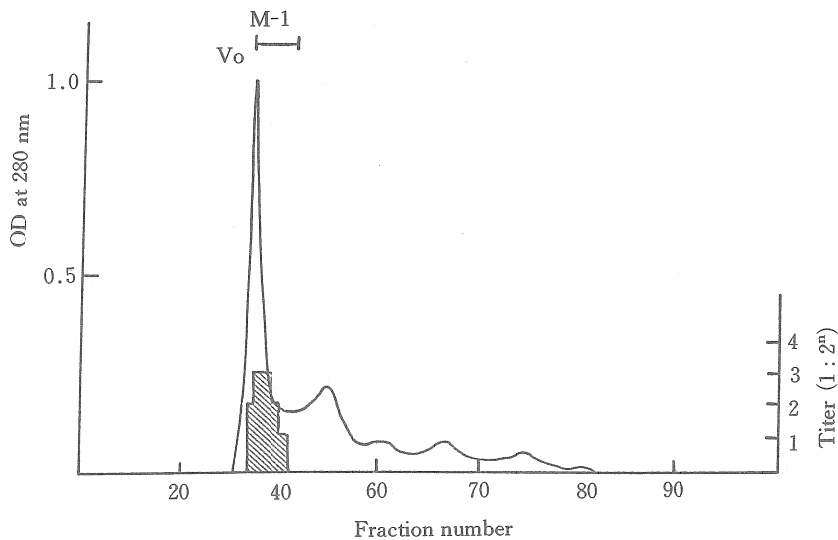


Fig. 14. Sephacryl S-300 gel filtration of the fraction prepared by salting-out the skin mucus of ayu with 50% saturated ammonium sulfate. The column (1.6×90 cm) was equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.15M NaCl at 4°C. Two ml fractions were collected at a flow rate of 12 ml/h. The solid line shows the optical density at 280 nm and the shaded area shows the agglutinating antibody titers against *V. anguillarum*. The fraction showing the agglutinating activity were pooled (M-1).  $V_0$ ; void volume.



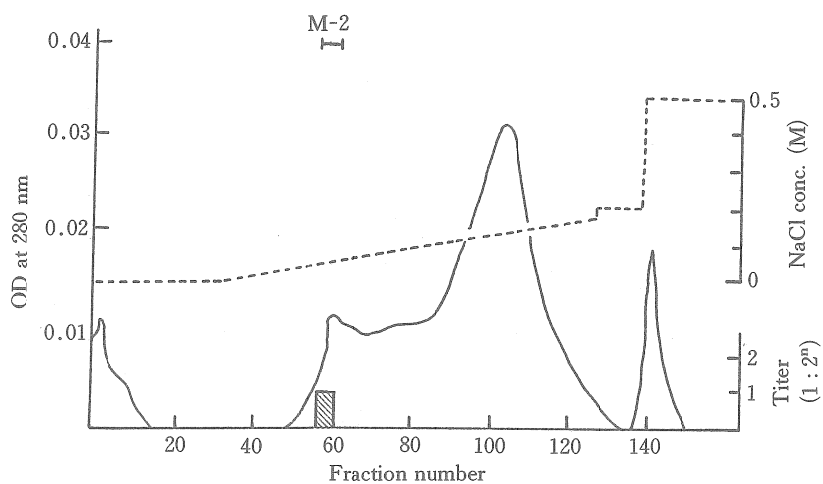


Fig. 15. DEAE-Toyopearl 650M chromatography of the pool of antibody-containing fraction (M-1) in Fig. 14. The sample was dialyzed against the starting buffer (0.05M phosphate buffer, pH 6.5) and applied to the column (1.6 × 10 cm). After washing with the starting buffer, a linear gradient of NaCl to 0.2M was developed. Two-ml fractions were collected at a flow rate of 60 ml/h. The solid line and the broken line show the optical density at 280 nm and the concentration of NaCl, respectively. The shaded area shows the agglutinating antibody titers against *V. anguillarum*. The fractions showing the agglutinating activity were pooled (M-2).

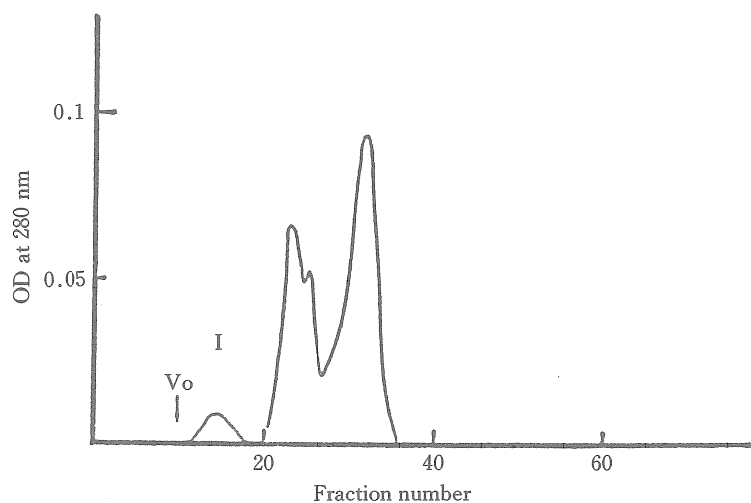


Fig. 16. Sephacryl S-300 gel filtration of the pool of antibody-containing fraction (M-2) in Fig. 15. The column (1.0 × 25.5 cm) was equilibrated at 4°C with 0.01M phosphate buffer containing 0.15M NaCl. One-ml fractions were collected at a flow rate of 12 ml/h. The solid line shows the optical density at 280 nm. Vo; void volume.

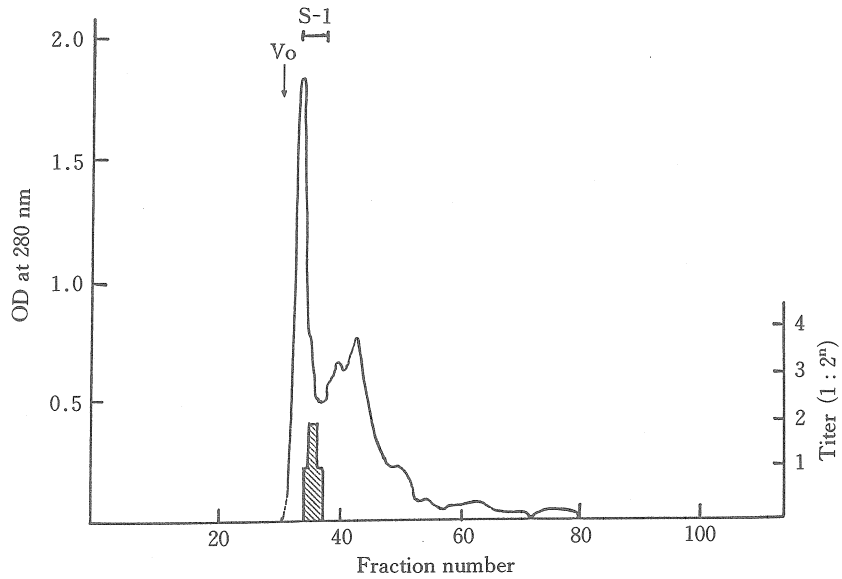


Fig. 17. Sephacryl S-300 gel filtration of the fraction prepared by salting-out the serum of ayu with 50% saturated ammonium sulfate. The column ( $1.6 \times 90$  cm) was equilibrated at  $4^{\circ}\text{C}$  with  $0.01\text{M}$  phosphate buffer containing  $0.15\text{M}$  NaCl. Two- $\text{ml}$  fractions were collected at a flow rate of  $12\text{ ml/h}$ . The solid line shows the optical density at  $280\text{ nm}$  and shaded area shows the agglutinating antibody titers against *V. anguillarum*. The fractions showing the agglutinating activity were pooled (S-1).  $V_0$ ; void volume.

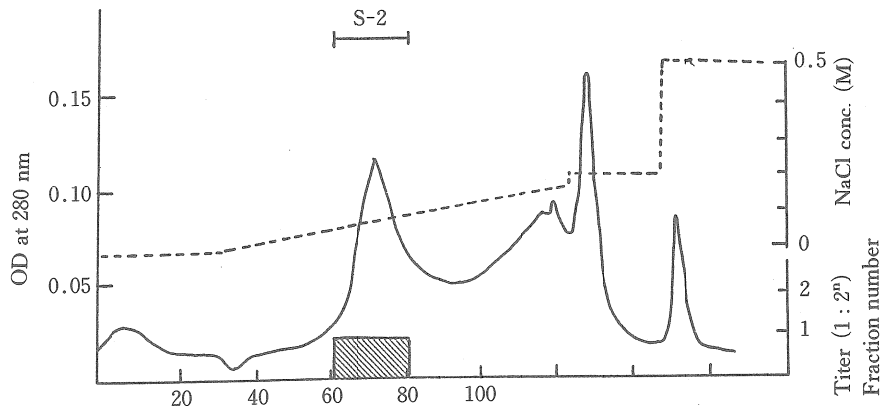


Fig. 18. DEAE-Toyopearl 650M chromatography of the pool of antibody-containing fraction (S-1) in Fig. 17. The sample was dialyzed against the starting buffer ( $0.05\text{M}$  phosphate buffer,  $\text{pH } 6.5$ ) and applied to the column ( $1.6 \times 10$  cm). After washing with the starting buffer, a linear gradient of NaCl to  $0.2\text{M}$  was developed. Two- $\text{ml}$  fractions were collected at a flow rate of  $60\text{ ml/h}$ . The solid line and the broken line show the optical density at  $280\text{ nm}$  and the concentration of NaCl, respectively. The shaded area shows the agglutinating antibody titers against *V. anguillarum*. The fractions showing the agglutinating activity were pooled (S-2).

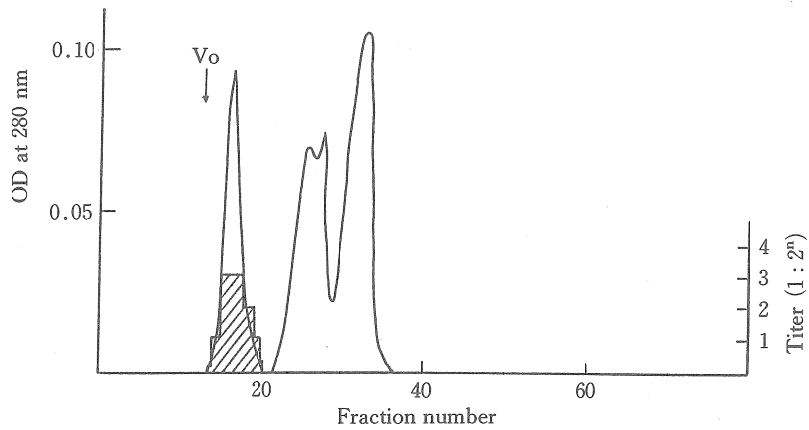


Fig. 19. The second step of Sephacryl S-300 gel filtration of the pool antibody-containing fraction obtained by Sephacryl S-300 chromatography of S-2 in Fig. 18. The column (1.0 × 25.5 cm) was equilibrated at 4°C with 0.01M phosphate buffer containing 0.15M NaCl. One-ml fractions were collected at a flow rate of 12 ml/h. The solid line shows the optical density at 280 nm and the shaded area shows the agglutinating antibody titers against *V. anguillarum*.  $V_o$ ; void volume.

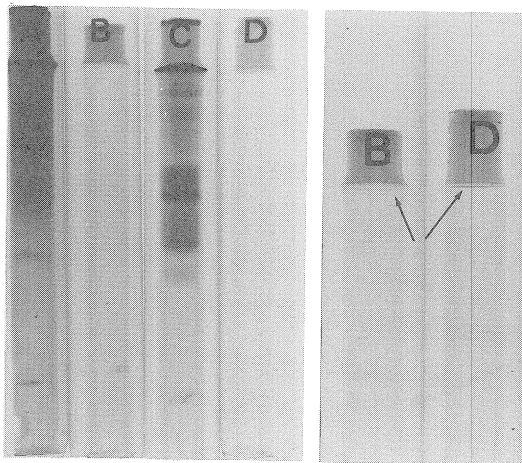


Fig. 20. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of whole skin mucus (A), purified Ig from skin mucus (B), whole serum (C) and purified Ig from serum (D).

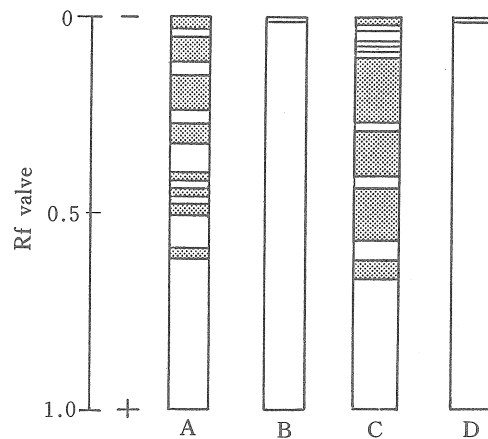


Fig. 21. Schematic drawing of polyacrylamide gel electrophoretic patterns of whole skin mucus (A), purified Ig from skin mucus (B), whole serum (C) and purified Ig from serum (D).

純度の検定 体表粘液および血清から精製した各抗体の純度を検定するために、抗体をPAGEによって分析した結果をそれぞれ Fig. 20 および Fig. 21 に示した。いずれの画分も Rf 値 0.01 付近に明瞭な 1 本のバンドを形成した

(Fig. 20 および 21 の B と D)。また、このバンドの抽出液には凝集活性が認められた。

分子量の測定 各精製試料および標準タンパク質について Sephacryl S-300 によるゲルろ過を行った結果を Fig. 22 に

示した。標準タンパク質の溶出容量を用いて作製した標準曲線から、両者の精製試料の分子量を測定したところ、いずれも900,000と推定された。

2-MEに対する感受性 凝集素価1:8を示す両精製試料を2-MEで処理したところ、いずれも凝集活性は消失した。

### 考 察

噴霧法ワクチン投与によって体表粘液で抗体が誘導されることを4.1において明らかにしたが、体表粘液による生体防御機構の全体像を把握するには、本抗体の性状を知ることが大切であると思われる。Kawai *et al.* (1981) および Muroga and De LaCruz (1987) はアユのピブリオ病における初期感染門戸が表皮であることを示唆し、さらに Kawai *et al.* (1981) は体表粘液中の抗体が生体防御物質としての重要な位置をしめていることを明らかにしたが、血清中の抗体との比較を行っていない。

まず、体表粘液試料および血清試料を50%飽和硫酸によって塩析したところ、沈殿画分に凝集活性が認められた。これは、Kawai *et al.* (1981) がアユにピブリオ菌体ワクチンを経口投与したときに、体表粘液から凝集活性を検出し

た際の結果と一致する。また、本画分について Sephacryl S-300によるゲルろ過を行ったところ、いずれも  $V_0$  からやや遅れて凝集活性を示す画分が溶出した。これらの活性画分について DEAE-Toyopearl 650M クロマトグラフィーを行った結果、両試料中の凝集抗体活性は、いずれも pH6.5 の 0.05M リン酸緩衝液中で DEAE-Toyopearl 650M に吸着した。さらに、NaCl 濃度勾配による溶離を試みたところ、凝集活性画分は体表粘液試料では NaCl 濃度 0.07M 付近に、また血清では 0.04~0.09M の広範囲にそれぞれ溶出した。このように、体表粘液と血清において、抗体がイオン交換体から溶離する際の NaCl 濃度に若干の相違がみられたが、この原因は明らかではない。

さらに、Sephacryl S-300によるゲルろ過を体表粘液試料では1回、血清試料では2回行ったところ、凝集活性画分がいずれも  $V_0$  からやや遅れた第1ピークに出現した。この画分を PAGE を用いて分析したところ、いずれもクマシーブリリアントブルー R-250 による染色で、Rf 値 0.01 付近に1本のバンドが認められ、このバンドの抽出液は *V. anguillarum* に対して凝集活性を示した。また、両抗体の分子量はともに約900,000で、2-ME に対して感受性を示した。これらのことから、体表粘液と血清から精製

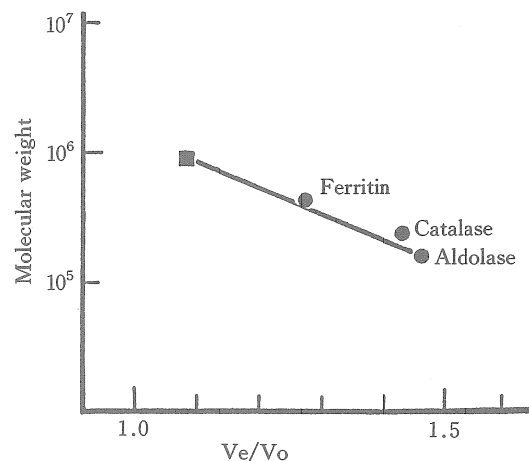


Fig. 22. Molecular weight determination of the immunoglobulins (■) purified from the skin mucus and the serum by Sephacryl S-300 gel filtration. The standard proteins used were aldolase (MW: 160,000), catalase (240,000) and ferritin (450,000). The void volume was determined by Blue Dextran 2,000 (Pharmacia).

された抗体は、いずれも高分子 IgM 抗体ではないかと推定された。

一般に、硬骨魚類の血清中の高分子抗体は 4 量体 (Shelton and Smith : 1970, Cisar and Fryer : 1974) で、その沈降定数は 13.2S ~ 19.4S (Cisar and Fryer : 1974, Everhart : 1972, Marchalonis : 1969), 分子量は 700,000 ~ 870,000 (Clem : 1971, Pollara *et al.* : 1968) に分布することが明らかにされている。一方、体表粘液中の抗体は、plaice (ツノガレイの 1 種; *Pleuronectes platessa*) (Fletcher and Grant : 1969, Fletcher and White : 1973a), アユ (Kawai *et al.* : 1981), gar (鱗骨魚科の 1 種; *Lepisosteus platyrhincus*) (Bradshaw *et al.* : 1971), ニジマス (rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) (Ourth : 1980) および sheephead (タイ科の 1 種; *Archosargus probatocephalus*) (Lobb and Clem : 1981a, b) で検出されており、それらの多くは、血清中の高分子 IgM タイプの抗体と免疫学的に同一で、凝集活性を持つ抗体であるとされている。このことは、今回アユの体表粘液と血清から精製した抗体の分子量がいずれも 900,000 であり、生化学的にも類似した性状であることとよく一致する。最近、Lobb and Clem (1981b) は sheephead (*Archosargus probatocephalus*) の体表粘液中に IgA 様 (2 量体) の低分子抗体が存在することを報告しているが、著者らの実験では高分子抗体のみが認められた。しかし、アユに IgA 様抗体が存在したとしても、本実験では抗体の検出に凝集活性を用いたために、結合価の低い 2 量体の IgA を検出できなかったことも考えられる。

一般に、ほ乳類では主に消化管、呼吸器および生殖器の粘膜に分泌型 IgA (sIgA) が存在し、外界からの異物の侵入を防御している。sIgA の産生および分泌機構については、腸管の場合、粘膜固有層の形質細胞で IgA が 2 量体として産生され、この IgA と上皮細胞で産生される secretory component (SC) とが結合して、sIgA として分泌される (名倉 : 1987)。一方、本研究および他の研究者の結果から、魚類における体表粘液中の抗体の由来については、体表粘液の抗体と血清の抗体とが免疫学的に同一の物質であるので、前者は後者から移行したものであって、局所で産生された抗体ではないと考えられ、全身性免疫の可能性が示唆されていた。しかし、Lobb and Clem (1981a) は放射性同位元素で抗体を標識して、sheephead (*Archosargus probatocephalus*) の体表粘液中に SC を持つ sIgA 様の抗体が存在することを示唆した。さらに、Louis-Cormier *et al.* (1984) はニジマス (rainbow trout) にヒツジ赤血球を腹腔内接種し、体表粘液中に抗体を検出するとともに、体表

粘液や上皮層中に膜結合性 IgM をもつリンパ球が存在することを示した。このようなことから、体表粘液中の抗体はほ乳類にみられるような局所免疫である可能性も考えられ、体表粘液での生体防御機構を解明するうえからも、また系統発生的な見地からも興味深い。

#### 4.4 噴霧法ワクチン投与魚の血清と体表粘液からの ELISA による抗体の検出

前節において、*Vibrio anguillarum* ワクチンを腹腔内に投与したアユの体表粘液中には血清中と生化学的に同じ抗体が存在することを示し、これらの抗体はいずれも分子量約 900,000 で 2-メルカプトエタノール (2-ME) に感受性を持つ凝集抗体であることを明らかにした。

一方、アユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンは、第 2 章で示したようにワクチン投与による感染防御効果は明らかとなっており、また血清や体表粘液中の凝集抗体は検出されているが、両者の異同については明らかではない。

そこで、本節では精製したアユの血清中抗体を免疫原としてウサギに投与して、抗アユ抗体ウサギ抗体を作製し、これを用いて噴霧法ワクチン投与魚の血清と体表粘液中から ELISA 法を用いて抗体を検出するとともに、両抗体の精製を試みた。

#### 材料および方法

**供試魚** 平均体重 62 g のアユ 180 尾を用いた。

**ワクチンの調製と投与** 抗原としてはアユ病魚由来の *V. anguillarum* を用いた。注射法ワクチンおよび噴霧法ワクチンの調製と投与は 4.3 と同様の方法を用いた。対照区としてはワクチン無投与魚を用いた。

**アユ抗体精製用試料の調製** 注射法によって免疫したアユを用いて、尾部切断法により採血し、4.1 と同様にして抗体精製用アユ血清を調製した。

**凝集抗体価の測定** 2.2 と同様にして測定した。

**抗体の精製** 50% 硫酸塩析法、DEAE-Toyopearl 650M (東ソー), SP-Toyopearl 650M (東ソー), Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) および Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia) を用いて精製を行った。硫酸塩析法および DEAE-Toyopearl 650M によるイオン交換クロマトグラフィーならびにタンパク質の検出は本章第 3 節と同様の方法で行った。

(1) **イオン交換クロマトグラフィー** SP-Toyopearl 650M には 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したイ

オン交換体に同緩衝液で透析した試料を吸着させた後、NaClによる濃度勾配を用いて溶出を行った。Mono Q HR 5/5には5%グリセリンと0.15M NaClを含む0.02M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)を用い、溶出にはNaClによる濃度勾配を用いた。

(2)ゲルろ過 ゲルろ過剤としてSuperose 6 HR 10/30を用いた。緩衝液には0.1M NaClを含む0.02M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)を用いた。

**アユ抗体に対するウサギIgGの調製** 精製アユ抗体をフロイントの完全アジュバント(Freund's complete adjuvant (Difco))と等量混合して、白色ウサギの皮下に7日~10日間隔で4回接種した後、最終接種後7日後に耳翼静脈から採血して抗血清を作製した。ウサギ抗血清を50%硫酸塩析し、沈殿画分を0.028M NaClを含む0.02M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解・透析し、Sephadex G-25で脱塩した。脱塩した試料をDEAE Affi-Gel Blue(BioRad)に添加し、同緩衝液で溶出して未吸着画分を精製ウサギIgGとした。

**純度の検定** 精製アユ抗体の純度をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)と免疫電気泳動を用いて検定した。

(1)PAGE 4.3と同様にしてポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)(萩田・中村:1981)を用いて検定した。

(2)免疫電気泳動 電気泳動用担体にはペロナール緩衝液(pH8.5)に溶解した1.2%寒天を用いた。スライドグラスに展開した寒天上で精製アユ抗体とアユ血清をそれぞれの試料添加孔に添加して、7mAで泳動したのち、湿潤箱中で抗アユ抗体ウサギ抗血清と反応させて沈降線を観察した。

**噴霧法ワクチン投与魚の血清および体表粘液の調製** 噴霧法ワクチン投与魚および無投与魚の血清を4.1と、またこれらの体表粘液を3.2と同様にして調製した。

**酵素抗体法(ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay)による抗体の検出** 反応用抗原には*V. anguillarum*の粗リポポリサッカライド(LPS)を固相化して用い、アユの血清および体表粘液中の*V. anguillarum* LPSに対する特異抗体を検出した。1次抗体として抗アユ抗体ウサギIgGを、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヒツジIgGを用いた。

(1)抗原の調製 供試菌体からフェノール水抽出したLPS画分をセタボロン(CTAB; cetyltrimethylammonium bromide)で処理(Westphal and Jann: 1965)し、粗LPSを調製して抗原とした。

(2)抗体検出用の試料の調製 噴霧法ワクチン投与区および対照区の血清は0.15M NaCl添加0.01Mリン酸緩衝液

(リン酸緩衝食塩水)で100倍に希釈し、体表粘液はそのままELISA用試料とした。また、噴霧法ワクチン投与魚の血清ならびに体表粘液の各精製途中の試料については、溶出液をそのまま用いた。

(3)ELISA法 ELISA法にはアミノプレート(住友ベークライト社)を用いた。本プレートの活性化のために、各穴に2%グルタルアルデヒドを100 $\mu$ l添加して、2時間静置したのち、蒸留水で洗浄した。炭酸緩衝液(pH9.6)に溶解した粗LPSを各穴に200 $\mu$ lずつ分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置して固相化した。粗LPS溶液を捨てたのち、リン酸緩衝食塩水で調製した1.5%ウシ血清アルブミン溶液200 $\mu$ lを分注後、2時間室温で反応させてブロッキングした。そして、0.05%のTween20を含むリン酸緩衝食塩水(Tweenリン酸緩衝食塩水)で各穴を3回振盪洗浄後、抗体測定用の試料100 $\mu$ lを添加した。室温で3時間反応後、Tweenリン酸緩衝食塩水で3回振盪洗浄し、一次抗体としての抗アユ抗体ウサギIgGを200 $\mu$ lずつ各穴に分注して振盪後、室温で2時間反応させた。反応終了後、Tweenリン酸緩衝食塩水で3回振盪洗浄したのちに、2次抗体としてのペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヒツジIgG(和光)を200 $\mu$ lずつ各穴に分注して振盪し、室温で2時間反応させた。反応終了後、Tweenリン酸緩衝食塩水で3回振盪洗浄したのち、基質として $\sigma$ -フェニレンジアミン溶液を200 $\mu$ lずつ分注し、30分反応後、6N硫酸で反応を停止し、マイクロプレートリーダー-MRP 4A(東ソー)を用いて492 nmにおける吸光度を測定した。

**噴霧法ワクチン投与魚の血清および体表粘液からの抗体の精製** 噴霧法ワクチンを投与したアユの血清と体表粘液を硫酸塩析法、DEAE-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl 650M, Mono Q HR 5/5およびSuperose 6 HR 10/30を用いて注射ワクチン血清と同じ条件で精製を行った。ただし、硫酸塩析法に用いた飽和硫酸の添加濃度は血清の場合は50%、体表粘液の場合は75%とした。また、体表粘液試料のSP-Toyopearl 650Mによる分画では、初期緩衝液で洗浄後、0.5M NaClを含む緩衝液で溶出した。供試試料および各精製段階の試料の抗体活性の検出にはELISA法を用いた。

## 結 果

**アユ抗体の精製** 血清試料を50%硫酸で塩析したところ、沈殿画分に*V. anguillarum*に対する凝集活性がみられた。活性画分をDEAE-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl

650M, Mono Q HR 5/5およびSuperose 6 HR 10/30のタンパク質の溶出プロフィールおよび *V. anguillarum* に対する凝集活性を Fig.23に示した。まず、DEAE-Toyopearl 650Mによるイオン交換クロマトグラフィーでは、凝集活性がNaCl濃度0.07~0.16M (Fig.23A)で、SP-Toyopearl 650MではNaCl濃度0.1~0.23M (Fig.23B)で、またMono Q HR 5/5ではNaCl濃度0.17~0.2M (Fig.23C)で溶出した。Superose 6 HR 10/30によるゲルろ過では、 $V_0$ よりやや遅れて活性画分が溶出した (Fig.23D)。

**純度の検定** PAGEと免疫電気泳動法における泳動パターンを Fig.24に示した。PAGEでは、Rf値0.01付近に

1本のバンドが認められた。免疫電気泳動法では、精製アユ抗体試料およびアユ血清試料のいずれに対しても、試料添加孔よりやや陰極側にそれぞれ1本の沈降線を形成した。**噴霧法ワクチン投与魚の血清および体表粘液からの抗体の検出と精製** 噴霧法ワクチン投与魚の血清および体表粘液のいずれも凝集活性はみられなかった。しかし、ELISAによる検出では、492 nmにおける吸光度がそれぞれ0.18および0.125であったが、対照区の血清および体表粘液のそれは0.021および0.015であった。噴霧法ワクチン投与魚の血清のDEAE-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl 650M, Mono Q HR 5/5およびSuperose 6 HR 10/30からのタン

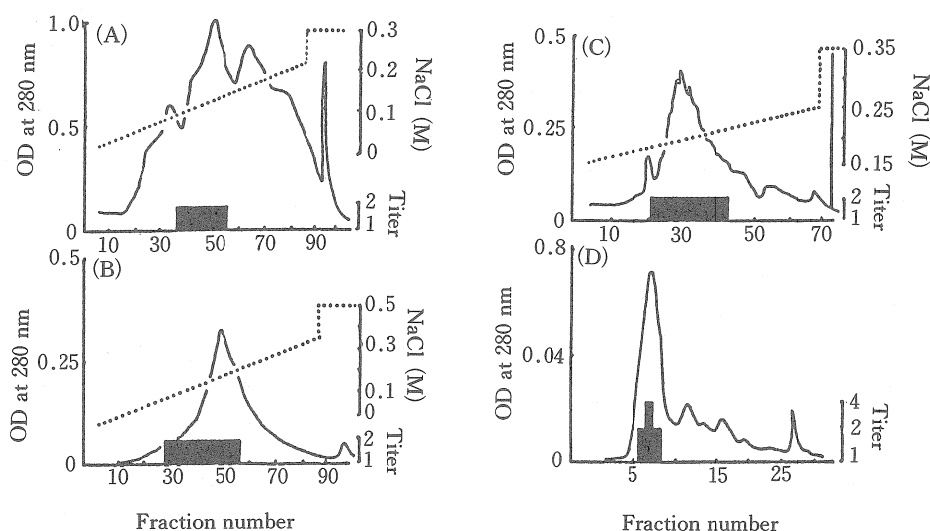


Fig. 23. Liquid chromatography of the hyper-immunized ayu serum.

- (A) The crude extract was applied on the DEAE-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH7.5). After washing with the starting buffer containing 0.05M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.05-0.2M NaCl in the buffer.
  - (B) Antibody fraction was applied on the SP-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH6.0). After washing with the starting buffer, the column was eluted by a linear gradient of 0-0.3M NaCl in the buffer.
  - (C) Antibody fraction was applied on the Mono Q HR 5/5 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH7.5) containing 5% glycerol and 0.15M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.15-0.25M NaCl in the buffer.
  - (D) Antibody fraction was applied on the Superose 12 HR 10/30 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH7.5) containing 5% glycerol and 0.1M NaCl.
- ; the optical density at 280 nm, .....; concentration of NaCl,  
 ■; shaded area shows the agglutinating antibody titers against *V. anguillarum*.

パク質の溶出プロフィールおよびELISAによって検出された *V. anguillarum* の粗LPS画分に対する抗体活性を Fig.25に示した。血清試料では、50%硫酸塩析で得られた沈殿画分を緩衝液に溶解して、DEAE-Toyopearl 650Mによるイオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、NaCl濃度0.1~0.2Mで抗体が検出された(Fig.25A)。しかし、この抗体陽性画分をSP-Toyopearl 650Mで溶出したところ、抗体はほぼ全域にわたって検出された(Fig.25B)。この抗体画分をMono Q HR 5/5で分画したところ、0.18~0.2M付近に抗体が検出された(Fig.25C)。Superose 6 HR 10/30によるゲルろ過では、 $V_0$ よりやや遅れて抗体が溶出した(Fig.25D)。

噴霧法ワクチン投与魚の体表粘液試料の各精製段階におけるタンパク質の溶出プロフィールおよびELISAによって検出された *V. anguillarum* の粗LPS画分に対する抗体活性を Fig.26に示した。75%硫酸塩析で得られた沈殿画分を緩衝液に溶解して、DEAE-Toyopearl 650Mによるイオン交換クロマトグラフィーを行い、NaCl濃度0.12~0.15M付近に抗体を検出した(Fig.26A)。この抗体陽性画分をSP-Toyopearl 650Mを用いて分画すると、0.5M NaClで溶出した直後に抗体活性が検出された(Fig.26B)。この抗体画分をMono Q HR 5/5にかけたところ、NaCl濃度0.15~0.2M付近に抗体が検出された(Fig.26C)。最後に、この抗体をSuperose 6 HR 10/30カラムによるゲルろ過を行い、 $V_0$ よりやや遅れた画分に抗体を捕集した(Fig.26D)。

### 考 察

前節において、*V. anguillarum* の死菌ワクチンをフロイントの完全アジュバントと混合してアユの腹腔内に接種したところ、血清および体表粘液中にも凝集抗体が検出された。これを精製した結果、精製抗体は分子量約900,000で2-MEに感受性を持つことが明らかになった。そこで、本節では噴霧法ワクチン投与魚の体表粘液と血清中の抗体の異同について検討するため、ELISA法を用いて抗体の検出を試みるとともに、血清抗体の精製と同様の条件で液体クロマトグラフィーを行い、その溶出パターンを比較検討した。

まず、今回用いた精製抗体は注射ワクチン投与魚の血清から精製したが、より精製度を高めるために前節の方法を改良した。すなわち、前節では50%硫酸塩析、Sephacryl S-300によるゲルろ過とDEAE-Toyopearl 650Mによるイ

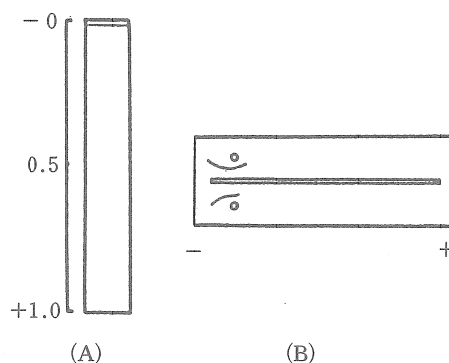


Fig. 24. Schematic drawing of polyacrylamide gel electrophoretic pattern (A) and immunoelectrophoretic pattern (B) of purified ayu antibody in the upper well and whole ayu serum in the lower well.

オン交換クロマトグラフィーを用いたが、今回は硫酸塩析とDEAE-Toyopearl 650Mによる分離に加えて、SP-Toyopearl 650MおよびMono Q HR 5/5によるイオン交換クロマトグラフィー、ならびにSuperose 6 HR 10/30によるゲルろ過を行った。その結果、最終の精製段階であるSuperose 6 HR 10/30によるゲルろ過において、凝集活性を持つタンパク質のピークがみられ、分子量は約900,000であることが明らかとなった。このピークはPAGEの分析によってこの凝集抗体がかなりの純度に精製されていることが確認されるとともに、ゲルろ過の溶出パターンとPAGEでの易動度から、先に報告した抗体と生化学的に同一の物質であることが確認された。この活性画分はウサギに接種して作製した抗体の免疫電気泳動によって、アユ血清および精製抗体のいずれに対しても1本の沈降線として認められ、このことから、精製抗体は免疫学的にも純粋であることが確認された。

ELISA法によって高い抗体価が確認された噴霧法ワクチン投与魚の血清および体表粘液の精製が行われた。DEAE-Toyopearl 650Mによるイオン交換クロマトグラフィーでは、血清のELISA抗体は主にNaCl濃度0.1~0.2Mに検出、そのほか0.3M NaClにおいても抗体が若干検出された。体表粘液試料のELISA抗体は主として0.12~0.15Mに溶出し、前者と同様に0.3Mにおいても抗体が検出された。0.1~0.2Mあるいは0.12~0.15Mに溶出した抗体の大きなピークは、注射ワクチンを投与したアユの



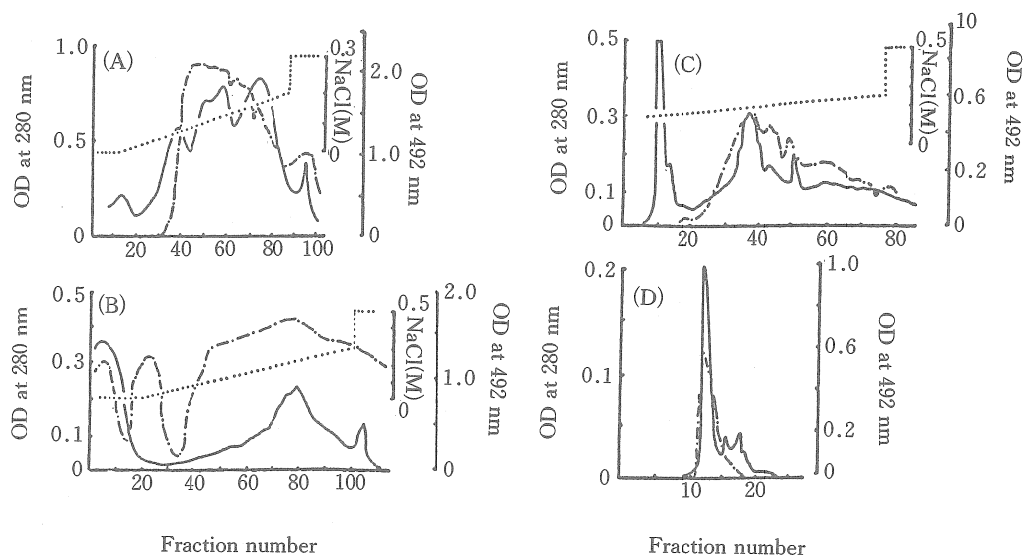


Fig. 25. Liquid chromatography of the serum of spray-vaccinated ayu.

- (A) The crude extract was applied on the DEAE-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5). After washing with the starting buffer containing 0.05M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.05-0.2M NaCl in the buffer.
- (B) Antibody fraction was applied on the SP-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 6.0). After washing with the starting buffer, the column was eluted by a linear gradient of 0-0.3M NaCl in the buffer.
- (C) Antibody fraction was applied on the Mono Q HR 5/5 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol and 0.15M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.15-0.25M NaCl in the buffer.
- (D) Antibody fraction was applied on the Superose 12 HR 10/30 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol and 0.1M NaCl.

—; the optical density at 280 nm, ·····; concentration of NaCl,  
- · - ·; the optical density at 492 nm by ELISA.

血清中の凝集抗体が検出されたNaCl濃度とほぼ同じであった。しかし、噴霧法ワクチン血清や体表粘液で検出された0.3M NaClで溶出したELISA抗体は、注射ワクチン血清から検出された凝集抗体と部分的に共通の抗原をもつが種類の異なる抗体である可能性が考えられる。ただ、今回の実験においては収量が少なく、これ以上の検討を行わなかったことから、その性状は明らかではない。

SP-Toyopearl 650Mによる分画では、噴霧法ワクチン血清のELISA抗体が未吸着画分からNaClによる溶出画分の全域にわたって検出された。体表粘液試料では、NaClによる濃度勾配溶出法を行わなかったために、血清試料との直接の比較はできないが、0.5Mの溶出画分の比較的狭い範囲にのみ抗体が検出された。注射ワクチン血清ではNaCl 0.1~0.23Mに溶出し、他の画分には凝集活性

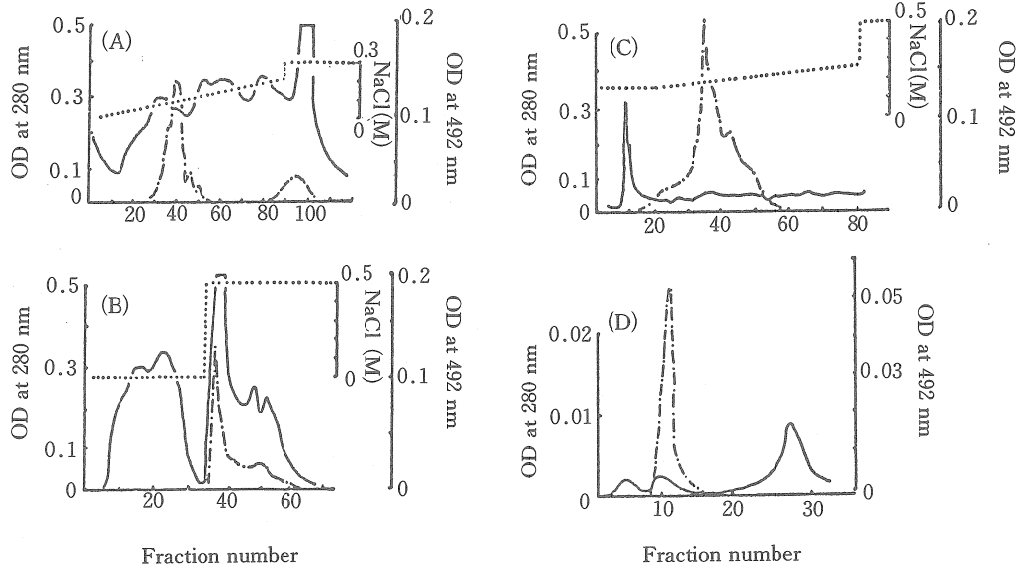


Fig. 26. Liquid chromatography for the skin mucus of spray-vaccinated ayu.

- (A) The crude extract was applied on the DEAE-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5). After washing with the starting buffer containing 0.05M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.05-0.2M NaCl in the buffer.
- (B) Antibody fraction was applied on the SP-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 6.0). After washing with the starting buffer, the column was eluted by 0.5M NaCl in the buffer.
- (C) Antibody fraction was applied on the Mono Q HR 5/5 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol and 0.15M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.15-0.25M NaCl in the buffer.
- (D) Antibody fraction was applied on the Superose 12 HR 10/30 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol and 0.1M NaCl.

—; the optical density at 280 nm, .....; concentration of NaCl,  
 - - -; the optical density at 492 nm by ELISA.

はみられなかった。このように、SP-Toyopearl 650M に対する噴霧法ワクチン血清の試料だけが、他の試料とは異なった溶出パターンを示した原因は明らかではない。Mono Q HR 5/5によるイオン交換クロマトグラフィーでは、いずれの試料のELISA抗体および凝集抗体もNaCl濃度0.15~0.2M付近に検出された。Superose 6 HR 10/30によるゲルろ過では、いずれの試料からも抗体はVo

より少し遅れて検出された。以上の結果から、噴霧法ワクチンで誘導される血清あるいは体表粘液中の *V. anguillarum* に対する主なELISA抗体は、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過によって凝集抗体とほぼ同じ位置に検出されたことから、静電的性状や分子量は凝集抗体と同じものであると考えられる。しかし、噴霧法ワクチン投与魚の血清と体表粘液からは、DEAEイオン交換体におい

て凝集抗体とは異なる抗体が若干検出された。これが異なる抗体であるかどうかについてはさらに詳細な検討が必要である。

ELISA法による抗体の検出については、ニジマス (rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) の *Yersinia ruckeri* と VHS に対する抗体 (Muriel: 1985), channel catfish (アメリカナズ科の1種; *Ictalurus punctatus*) の *Edwardsiella ictaluri* に対する抗体 (Waterstrat *et al.*: 1989), ニジマス (rainbow trout) の *V. anguillarum* に対する抗体 (Thuvander *et al.*: 1987), およびニホンウナギ (eel; *Anguilla japonica*) の *Edwardsiella tarda* に対する抗体 (Iida *et al.*: 1991) がそれぞれ報告されている。前二者は注射法ワクチン投与魚の、また後二者は浸漬法ワクチン投与魚について、いずれも血清中の抗体価がワクチン無投与区より有意に高いことを明らかにしている。しかし、いずれの報告においてもワクチン投与魚の体表粘液中の ELISA 抗体を検出したものはなく、噴霧法ワクチン投与魚の体表粘液中に ELISA 抗体が産生されて、これが凝集抗体と類似のものであることを明らかにしたのは本実験がはじめてである。

体表粘液中の抗体については、Kawai *et al.* (1981) がすでにアユのピブリオ病に対する経口ワクチン投与魚の体表粘液中に抗体が産生されることを明らかにしたが、その物理化学的性状は調べられていない。前節で明らかにしたように、注射法ワクチン投与魚における体表粘液中の抗体は血清中の抗体と同様の IgM 様の抗体であった。浸漬法ワクチンについては、Lobb (1987) が channel catfish (*Ictalurus punctatus*) にジニトロフェニール化ウマ血清アルブミンを浸漬法によって投与したところ、5尾中4尾の魚の体表粘液中の抗体価が無処理の対照区より高かったとしている。このことから、浸漬法によって投与された同アルブミンは血清中の抗体と同じ抗体の産生を体表粘液中に誘導することを示し、さらに浸漬法処理魚の皮膚を組織化学的に検討した結果、局所免疫の可能性を示唆した。

体表粘液中の抗体については、全身性の免疫かあるいは局所性の免疫によるものかは研究者によって見解が異なる。全身性の免疫であるとする研究者は、その根拠として、体表粘液中の抗体が血清中のそれと免疫学的に同一であることを挙げている (Fletcher and Grant: 1969, Bradshaw *et al.*: 1971, Fletcher and White: 1973a)。一方、Lobb and Clem (1981a) は標識抗体で受動免疫した魚の体内分布の調査結果から、また Lous-Cormier *et al.* (1984) は上皮層中

に膜結合性の IgM を有するリンパ球が存在した結果から、局所性の免疫の可能性を示唆している。今回の実験では、これらの問題を解明するまでには至っていないが、噴霧法ワクチン投与魚の体表粘液中に産生される主な抗体が血清中の IgM 様凝集抗体と生化学的および免疫学的にほぼ同一の高分子抗体であることから、4.2 で示した血清中の抗体が体表粘液へ移行する可能性が高いことを強く示唆している。しかし、DEAE イオン交換体に対する挙動が異なる ELISA 抗体も検出されているので、今後これが IgM 様抗体以外の抗体であるかどうかについて、詳細な検討が必要である。

#### 4.5 摘要

噴霧法ワクチンによって誘導された特異的生体防御機構を明らかにするために、体表粘液における凝集抗体の存在と体表粘液への抗体の移行ならびに血清中の抗体との異同について検討した。

1. 噴霧法、経口および注射法ワクチンを投与したアユの血清中および体表粘液中の抗体価を比較したところ、注射ワクチン投与魚では血清中および体表粘液中のいずれにも高い抗体価が認められた。しかし、経口および噴霧法ワクチンを投与したアユでは、対照区の抗体価に比べて、体表粘液中の抗体価のみが高く、血清中の抗体価には差異が認められなかった。

2. 血清中の抗体が体表粘液へ移行するかどうかを検討するために、噴霧法ワクチンを投与して得られた免疫アユ血清を正常なアユに接種して、1時間後と24時間後に浸漬法による人為感染実験を行った。その結果、1時間後の攻撃に対しては感染防御効果はみられなかったが、24時間後の攻撃に対しては防御効果が認められたことから、血清中の抗体は能動的に体表粘液中へ移行するが、これには24時間を要すると考えられた。

3. 血清中の抗体と体表粘液中のそれとの異同について検討するために、抗体価の高い血清が得られる注射ワクチン法を用いてアユを免疫し、抗体を精製した。その結果、血清および体表粘液中の抗体は分子量が約90万で2-MEに感受性をもつIgM様の抗体であることが明らかとなった。

4. 精製した血清中抗体に対するウサギ抗体を作製し、ELISA法によって噴霧法ワクチン投与魚の血清ならびに体表粘液から抗体を検出した。その結果、噴霧法ワクチン投与魚の血清と体表粘液には、いずれも注射ワクチンに

よって誘導される抗体と免疫学的ならびに生化学的に同一の抗体が存在することが明らかとなった。

## 第5章 体表粘液における溶菌物質の性状と生体防御上の役割

### 緒 言

魚類の体表面は環境水と接しているために、水中の病原微生物をはじめとする種々の寄生体の侵襲を受けやすい。そこで、体表粘液はこれらの寄生体から生体を防御するために、最前線で重要な役割をはたしている (Harrel *et al.*: 1976)。体表粘液による生体防御の方法としては、寄生体を粘液ごと体外に排除する物理的方法 (Cameron and Enderan: 1973) と、粘液中の液性成分が細菌の溶菌や凝集などに関与する化学的方法とが知られている (Fletcher and Grant: 1969, Di Conza: 1970, Di Conza and Halliday: 1971, Bradshaw *et al.*: 1971, Fletcher and White: 1973b, 1976, Harrel *et al.*: 1976, Murray and Fletcher: 1976, Fletcher *et al.*: 1977, Ramos and Smith: 1978, Ingram: 1980)。

そこで、本章ではまずアユの体表粘液における溶菌活性について検討した。一般に、溶菌現象は細菌の細胞壁が酵素によって破壊され、これについで細胞内容物が漏出するという2つのステップに分けられる。第1段階の細胞壁の破壊は、リゾチームに代表されるグリコシダーゼによる細胞壁多糖類の加水分解によって起るほか、タンパク質加水分解酵素によっても生じ、両酵素の共存によって溶菌活性が著しく促進されることが知られている。第2段階の細胞内容物の漏出は酵素の活性に依存しない過程である。

魚類における溶菌酵素の研究は、消化器 (望月・松宮: 1981)、腎臓 (Murray and Fletcher: 1976)、脾臓 (Fänge *et al.*: 1976)、肝臓 (Sankaran and Gurnani: 1972) および血清 (Fletcher *et al.*: 1977) などを用いて行われているが、体表粘液における溶菌活性に関する報告 (Hjelmeland *et al.*: 1983) は少ない。最近、高橋ら (1984, 1986a, b, 1987) は、コイおよびブリの体表粘液中にリゾチーム様あるいはプロテアーゼ様の溶菌活性物質が存在することを明らかにした。そして、体表粘液は外環境と接し、細菌の侵襲を受けやすい部位であることから、このような溶菌性物質は非特異的生体防御因子として重要な働きをしているのではないかと指摘した。

そこで、本章ではアユの体表粘液における溶菌活性について、リゾチーム様酵素とプロテアーゼ様酵素の両面から検討を行い、とくにリゾチームを精製してその生理的特性を明らかにした。

### 5.1 溶菌物質の分布

高橋ら (1984) は、ストレスを負荷したコイの各組織に付着・増殖する細菌数の変化から、体表粘液の中には非特異的な抗菌物質が存在するのではないかと推論した。さらに、コイの体表粘液からリゾチームを分離・粗精製して、その酵素化学的性状を明らかにした (高橋ら: 1986a, b)。しかし、アユの体表粘液についてはこのような検討はなされていない。

そこで本節では、アユの非特異的生体防御因子としてのリゾチーム様活性について、体表粘液や鰓粘液などにおける分布ならびに活性の酵素化学的性状について検討した。

### 材料および方法

**供試魚および試料の調製** 平均体重45gのアユ50尾を供試した。供試魚を tricaine methansulfonate で麻酔したのち、体表粘液、血清、鰓粘液、腎臓および腸管を採取した。体表粘液は、0.0075M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を用いて3.2と同様にして採取した。血清は、心臓穿刺によって採血したのち、25℃に2時間放置後、6℃で900×g、20分の遠心分離によって得た。鰓粘液は、心臓穿刺および尾部切断によって充分放血させたのち、鰓を摘出し、4℃のリン酸緩衝液に1時間浸漬して粘液を溶出させた。腎臓および腸管は、摘出後すみやかにリン酸緩衝液中に浸漬した。血清を除くすべての組織および粘液は、ホモジナイズしたのち、4℃で20,000×g、20分間遠心分離した。この上澄み液を孔径が0.45 μm のマイクロフィルターでろ過したものを試料とした。

**溶菌活性の測定** *Micrococcus lysodeikticus* のアセトン・エーテル乾燥菌体を用いて溶菌活性を測定した。溶菌活性値は、試料添加直後と反応終了時の吸光度の差をもって表した。また、溶菌活性値として unit を用いた。1 unit は、1分間に530 nm における吸光度を0.01変化させる溶菌活性とした。ただし、試料の添加量はタンパク質量にして100 μg とし、これにリン酸緩衝液を加えて全容を1.5 ml とした試料希釈溶液に基質液2.5 ml を混合した。反応温度は35℃とした。タンパク質量の測定には Lowry *et al.* (1951)

の方法を用いた。

つぎに、体表粘液および腎臓中の溶菌性物質について酵素化学的性状を検討するために、その反応至適条件および各種pH条件下における熱安定性を下記の方法によって調べた。

(1) 反応至適pH 0.0075Mリン酸緩衝液を用いて、pH 5.0~8.0における溶菌活性を調べた。反応温度は体表粘液で30℃、腎臓で35℃とした。

(2) 反応至適温度 0.0075Mリン酸緩衝液(pH 6.5)を用いて、反応温度10~60℃における溶菌活性を調べた。

(3) 反応至適リン酸緩衝液モル濃度 リン酸緩衝液(pH 6.5)のモル濃度を0.001~0.075Mに調整して、溶菌活性を調べた。反応温度は体表粘液で30℃、腎臓で35℃とした。

(4) 各種pHにおける熱安定性 酸性(0.1M酢酸緩衝液, pH 3.5), 中性(0.01Mリン酸緩衝液, pH 7.0)およびアルカリ性(0.05M Tris-HCl緩衝液, pH 9.0)の緩衝液中で100℃, 10分間加熱後、至適条件下での溶菌活性を調べた。なお、対照として卵白リゾチーム(Sigma社製)を用い、上記と同じ方法によって熱安定性を調べた。

## 結果

**各部位における溶菌性物質の分布** アユの体表粘液、鰓粘液、腎臓、腸管および血清における溶菌性物質の分布状況を各部位の活性値としてFig. 27に示した。溶菌活性は体表粘液、腎臓、腸管および血清の順に高く、それぞれ20.0, 11.8, 7.6, 5.8, 0 unitであった。

### 溶菌性物質の酵素化学的性状

(1) 反応至適pH 体表粘液および腎臓における溶菌性物質の反応至適pHを、各種pH条件下の溶菌活性としてFig. 28に示した。各pHにおける体表粘液および腎臓の活性は、それぞれpH 6.5とpH 7.0で高く、pH 6.0以下の酸性域では両部位ともに低かった。

(2) 反応至適温度 体表粘液および腎臓の反応至適温度を、各種温度条件下の溶菌活性としてFig. 29に示した。各温度における活性は体表粘液、腎臓ともに35℃で最も高く、それぞれ37.0と18.0 unitであった。しかし、20℃以下および50℃以上での活性は、両部位ともに著しく低下した。

(3) 反応至適リン酸緩衝液モル濃度 体表粘液および腎臓の反応至適リン酸緩衝液モル濃度を、各種モル濃度下の溶菌活性としてFig. 30に示した。各モル濃度における活性は、体表粘液で0.0075M、腎臓では0.01Mで最も高く、

それぞれ33.8と18.2 unitであった。

(4) 各種pHにおける熱安定性 体表粘液および腎臓の各種pHにおける熱安定性を、未処理試料の溶菌活性に対する加熱試料の比活性としてFig. 31に示した。pH 3.5, 7.0および9.0で加熱処理した各試料の比活性は、体表粘液で58.2, 11.7および10.0%であり、腎臓ではそれぞれ59.3, 9.2および0.8%であったのに対して卵白リゾチームではそれぞれ79.0, 76.9および27.1%であった。このように、体表粘液および腎臓に含まれる溶菌性物質は、卵白リゾチームと同様に、アルカリ性域よりも酸性域での熱安定性が高い傾向が認められた。

## 考察

本実験において、アユの体表粘液、鰓粘液、腎臓および腸管の各試料は *M. lysodeikticus* に対して溶菌活性を示した。このことは酵素の基質特異性から考えて、溶菌性物質の主体がリゾチームであることを示唆しているものと思われる。リゾチームの魚体内分布については、望月・松宮(1981)がサケ(*Onchorynchus keta*), キンメダイ(*Beryx*

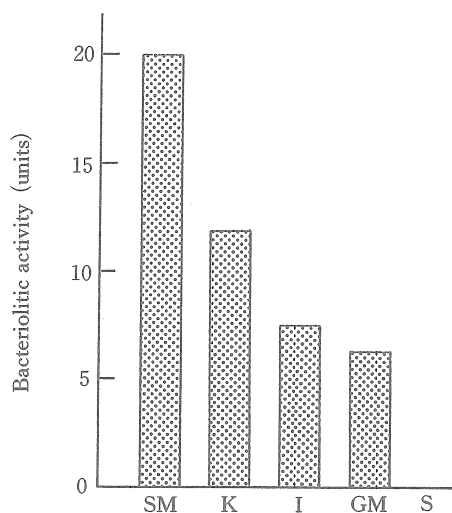


Fig. 27. Bacteriolytic activity of the skin mucus (SM), kidney (K), intestine (I), gill mucus (GM) or serum (S) in ayu, measured by the turbidimetric method using actone-ether-dried cell of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate.

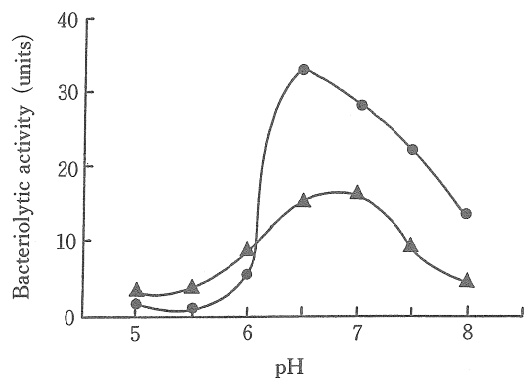


Fig. 28. Effect of pH on the bacteriolytic activity of the homogenate of the skin mucus (●) or the kidney (▲) in ayu. The activity was measured by the turbidimetric method using aceton-ether-dried cells of *M. lysodeikticus* as the substrate in 0.0075 M phosphate buffer incubated at 30°C for the skin mucus or at 35°C for the kidney.

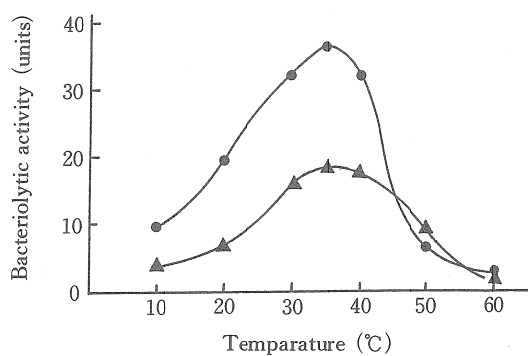


Fig. 29. Effect of temperature on the bacteriolytic activity of the homogenates of the skin mucus (●) or the kidney (▲) in ayu. The activity was measured by the turbidimetric method using aceton-ether-dried cells of *M. lysodeikticus* as the substrate in 0.0075 M phosphate buffer of pH6.5.

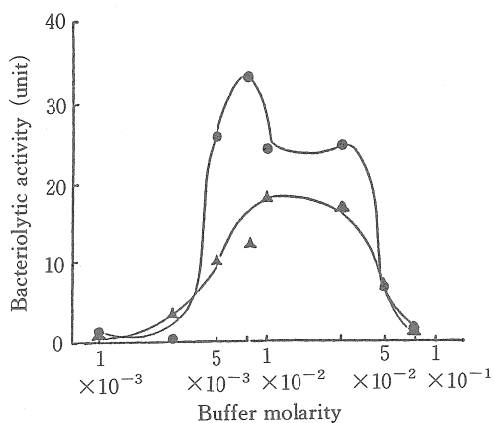


Fig. 30. Effect of phosphate buffer molarity on the bacteriolytic activity of the homogenates of the skin mucus (●) or the kidney (▲) in ayu. The activity was measured by the turbidimetric method using aceton-ether-dried cells of *M. lysodeikticus* as the substrate in phosphate buffer of pH6.5 incubated at 30°C for the skin mucus or at 35°C for the kidney.

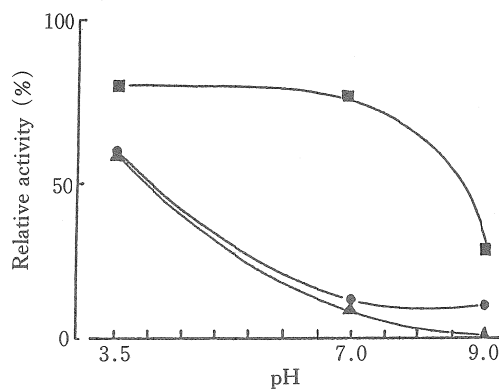


Fig. 31. Thermostability of the homogenates of the skin mucus (●) or the kidney (▲) in ayu, and of the lysozyme (■) purified from hen egg-white. Each of the samples was heated at 100°C for 10 min in various buffers of pH 3.5, 7.0 or 9.0, then the bacteriolytic activity was determined by the turbidimetric method in the optimal condition for each sample.

splendens)など8種類の海産魚について報告している。これによると、*M. lysodeikticus* に対して高い溶菌活性を示した部位は、サケでは腎臓、筋肉、腸であり、キンメダイでは胃、肝臓であった。Sankaran and Gurnani (1972) はティラピア (tilapia; *Tilapia mosambica*)、クロホシマンジュウダイ (scat; *Scatophagus argus*) および target perch (シマイサキの1種; *Therapon puta*) の肝臓と鰓に、*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性を認めたとしている。Fangeら (1976) は、rat-tail (ギンザメの1種; *Chimaera monstrosa*)、velvet belly (ツノザメの1種; *Etmopterus spinax*) および starry ray (ガンギエイの1種; *Raja radiata*) の造血器や脾臓に高い溶菌活性が認められたことを明らかにしている。さらに、ニジマス (rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) (Vladimirov: 1968)、plaice (ツノガレイの1種; *Pleuronectes platessa*) (Fletcher and White: 1976, Fletcher et al.: 1977)、および lumpsucker (ダンゴウオの1種; *Cyclopterus lumpus*) (Fletcher et al.: 1977) の血清にリゾチーム活性が認められている。このように、リゾチーム活性は海産魚や淡水魚の各組織に広く分布することが知られている。

本実験において、アユの体表粘液、鰓粘液、腎臓、腸管および血清のうちで、最も高い溶菌活性を示した部位は体表粘液であった。一般に、魚類の体表は外部からの細菌によって侵襲を受けやすい部位であることから、この部位における溶菌活性が高かったことは、体表が生体防御上重要な部位であり、かつ粘液中の溶菌性物質がこの部位で、重要な防御的役割を果たしているのではないかと推察される。

体表粘液と同様に、鰓も外部からの攻撃を受けやすい部位であるが、鰓粘液の溶菌活性は体表粘液のそれより低かった。この原因としては、試料中に血液が混入したために試料中のタンパク質濃度が高くなり、結果的に溶菌性物質の相対濃度が低くなった可能性も考えられる。

本実験における腎臓の溶菌活性は、体表粘液について高かった。溶菌活性が腎臓で高かった原因は、頭腎が白血球を産生する器官 (Roberts: 1980) であり、リゾチームが白血球に由来する物質である (Hansen: 1974) ためではないかと思われる。

次に、腸管の *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性は、キンメダイやサケ (望月・松宮: 1981) でも認められており、今回アユにも認められた。体表と同様に腸管も細菌の侵襲を受けやすい部位であることから、腸管内の溶菌酵素は他の消化酵素と協同して作用するとともに、腸管細菌叢の維持や病原細菌の増殖を抑制しているものと考えられる。

本実験では、血清の溶菌活性は認められなかった。魚類における血清の溶菌活性については、plaice (*Pleuronectes platessa*) (Fletcher and White: 1976)、ニジマス (rainbow trout) (Vladimirov: 1968) および lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*) (Fletcher et al.: 1977) で明らかにされており、生殖時期や季節によって活性が変化することことも知られている。したがって、今回アユの血清に溶菌活性が認められなかったのは、このような性的あるいは季節的変動に起因した可能性も考えられる。

次に、アユの体表粘液および腎臓の溶菌活性について、その反応至適条件を検討した結果、まず反応至適 pH は体表粘液で pH 6.5、腎臓では pH 7.0 付近であった。Hjelmeland et al. (1983) は、降海型のニジマス (rainbow trout) の体表粘液を用いて、*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性の至適 pH を調べたところ、pH 6.0 であったとしている。高橋ら (1986b) が、コイの体表粘液の至適 pH を調べたところ、pH 6.5 であった。このように、アユの体表粘液の溶菌活性は、ニジマスやコイの体表粘液とほぼ同様の反応至適 pH を示した。しかし、高橋ら (1986a) が明らかにしたように、コイの体表粘液から分離・粗精製したリゾチームは、pH 7.2 と 9.0 の2つの反応至適 pH を有していた。このことから、魚類の体表粘液における溶菌活性の至適 pH はリゾチーム単独のそれではなく、*M. lysodeikticus* に溶菌作用を示す複合的物質の反応至適 pH である可能性が考えられる。

Hjelmeland et al. (1983) は降海型のニジマス (rainbow trout) の体表粘液を用いて、*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性の温度依存性を調べたところ、反応至適温度は 30~40℃ であったとしている。高橋ら (1986a) が、コイの体表粘液について調べた結果では、至適温度が 20℃ であり、10~50℃ の温度域で至適条件下の 70% 以上の値を示し、幅広い反応温度域をもつことが明らかになっている。本実験におけるアユの体表粘液および腎臓の反応至適温度は、いずれも 35℃ であったが、至適条件下の 70% 程度の値を示したのは 30~40℃ の範囲であり、コイにくらべて反応温度域が狭い傾向がみられた。この原因が両者の生態および生息環境の差異を反映したものか、あるいは生体防御物質の種類や作用の違いによるものなのかは不明である。

Sankaran and Gurnani (1972) は tilapia (*Tilapia mosambica*) と scat (*Scatophagus argus*) の肝臓を用いて、*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性の反応至適リソ酸緩衝液モル濃度を調べ、tilapia で 0.005M、scat では 0.02~0.08M で最大の活性を示したとしている。また、コイの体表粘液

から粗精製したリゾチームの反応至適リン酸緩衝液モル濃度は、0.01Mであった(高橋ら:1986a)。本実験におけるアユの体表粘液および腎臓の反応至適リン酸緩衝液モル濃度は、それぞれ0.0075Mおよび0.01Mであった。このように、アユの体表粘液および腎臓の溶菌活性が比較的低モル濃度域で高いのは、上記部位に分布する溶菌活性物質が実験時のアユの生息環境(淡水)に適応して、生体防御の機能を果たしているのではないと思われる。

次に、アユの体表粘液および腎臓における溶菌活性物質の各種pH条件下における熱安定性について検討したところ、両部位ともに酸性溶液中では安定であるが、中性およびアルカリ性の溶液中では不安定であった。高橋ら(1986a)は、コイの体表粘液から得た粗精製リゾチームの熱安定性について、酸性域では安定であるが、アルカリ域では不安定であることを明らかにした。このような現象は、卵白リゾチームをはじめとする動・植物由来のリゾチームにみられる一般的傾向である(山崎:1983)。

このように、アユの体表粘液、鰓粘液、腎臓および腸管には、*M. lysodeikticus*に対して溶菌活性を示す物質が分布していることが明らかになった。また、体表粘液および腎臓の溶菌活性については、*M. lysodeikticus*に対して高い溶菌活性を示すだけでなく、酸性条件下での熱安定性が高いことなどから、その主体はリゾチームではないと思われる。しかし、魚類の体表粘液、腎臓あるいは血清中にはプロテアーゼ(Hjelmeland *et al.*:1983)、補体(Legler *et al.*:1967, Harrel *et al.*:1976, Sakai:1981a, b)など種々の物質が存在し、溶菌活性の発現に協同ならびに相互的に作用していると考えられることから、リゾチームをはじめとするこれらの抗菌性物質の単離・精製を進める必要がある。

## 5.2 粗精製した溶菌物質の性状

前節において、体表粘液のリゾチーム様活性は腎臓や血清などよりも高いことが明らかとなったが、その溶菌活性物質がリゾチーム単独のものなのか、あるいは他の酵素との協同的な作用によるものなのかは明らかではない。高橋ら(1986a)はコイの体表粘液由来のリゾチーム様酵素の活性について検討し、その粗精製酵素はコイの生息環境に生存する細菌に対して十分溶菌作用をしないことから、コイの体表粘液中には複数と思われる溶菌活性物質が存在し、それらが協同的に作用して、コイの生息環境の細菌を溶菌するのではないかと推論した。

本節では、アユに大きな被害を与えるピアリオ病の原因菌 *Vibrio anguillarum* とリゾチーム活性測定に常用される *Micrococcus lysodeikticus* の2種の細菌を溶菌基質として用いて、これらの菌体に対するアユ体表粘液の溶菌活性ならびにその酵素化学的性状を調べ、複数の溶菌性物質の存在の有無について検討した。

### 材料および方法

**供試魚および試料の調製** 平均体重49gのアユ50尾を用いた。0.15M NaClを含む0.01M リン酸緩衝液(pH7.2)を用いて3.2と同様にして体表粘液を採取し、ホモジナイズしたのち4℃で20,000×gで20分間遠心分離し、その上澄液をゲルろ過用試料とした。

**ゲルろ過による溶菌活性画分の分離** Toyopearl HW-50(東ソー)を用いて体表粘液試料を分画した。ゲルベッド容量は90mlとし、溶出液には0.5MのNaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH6.5)を用い、流速を0.3ml/min、分取量を3mlとした。

**溶菌活性の測定** *M. lysodeikticus*の凍結乾燥菌体およびホルマリンで不活化した *V. anguillarum*の凍結乾燥菌体を用いて溶菌活性を測定した。活性の測定は前節と同様の方法を用いた。ただし、基質としての菌体を浮遊させる緩衝液には0.01M Tris-HCl緩衝液を用い、*M. lysodeikticus*菌体ではpH7.2に、*V. anguillarum*菌体ではpH7.7にそれぞれ調製した。反応温度は前者を30℃、後者を15℃とした。基質液2mlに分画試料40 $\mu$ lを添加して、添加後60分の530nmにおける吸光度を測定して溶菌活性を求めた。

つぎに、ゲルろ過によって得られた画分のうち、両菌体に対する溶菌活性が最も高い画分を用いて *M. lysodeikticus*および *V. anguillarum*に対する溶菌活性の酵素化学的性状を検討するために、反応至適条件、酵素反応阻害剤による影響およびキチン処理による活性の変化について調べた。ただし、反応は特記しないかぎり前述の条件で行った。

**溶菌至適pH** pH3.5から5.5では0.01M酢酸緩衝液、pH5.5から7.8では0.01Mリン酸緩衝液、pH7.0から8.5では0.01M Tris-HCl緩衝液、pH8.6から10.5では0.01M glycine-NaOH緩衝液をそれぞれ用いて溶菌活性を調べた。

**溶菌至適温度** 反応温度5~70℃における溶菌活性を調べた。

**酵素反応阻害剤による影響** フッ化フェニルメチルスルフォニル(PMSF)および*p*-クロルマーキュリ安息香酸ナ



トリウム(PCMB)をそれぞれ1 mM, また leupeptin, anti-pain および pepstatin A をそれぞれ 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように反応溶液中に添加して, これらの阻害剤が溶菌活性に及ぼす影響について検討した。対照には卵白リゾチームを用いて, *M. lysodeikticus* および *V. anguillarum* に対する溶菌活性を前述と同様にして測定した。ただし, 反応に用いた緩衝液は0.005Mリン酸緩衝液(pH7.5)とし, 反応温度は30 $^{\circ}\text{C}$ とした。

**キチン処理による影響** キチン処理は, 分画試料1 mlにキチン150 mgを添加混合して20 $^{\circ}\text{C}$ で60分間反応後, 遠沈して行った。この操作を3回繰り返して, 得られた上澄液を試料とした。この試料の *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性を検討したのち, *V. anguillarum* に対する溶菌活性の温度依存性について検討するとともに, 15 $^{\circ}\text{C}$ における本試料のpH依存性について調べた。

## 結果

**ゲル過による溶菌活性画分の分離** アユの体表粘液を, Toyopearl HW-50によって分画した各画分の280 nmにお

ける吸光度を測定して得られたタンパク質の溶出曲線と, 各画分の *M. lysodeikticus* および *V. anguillarum* に対する溶菌活性をFig.32に示した。タンパク質の溶出曲線は5つのピークを形成し, このうち第1ピークは排除容量( $V_0$ )付近に溶出した。*M. lysodeikticus* および *V. anguillarum* に対する溶菌活性は, いずれも試験管番号20番で最も高い活性を示し, タンパク質溶出曲線の第1ピークと第2ピークの間分布した。

**溶菌至適pH** 上記20番目の分画試料の *M. lysodeikticus* および *V. anguillarum* に対する溶菌活性の反応至適pHを, 各種pH条件下の溶菌活性としてFig.33に示した。各pHにおける *M. lysodeikticus* に対する活性( $\Delta\text{OD}$ )は, Tris-HCl緩衝液を用いた場合, pH7.2で最も高く0.073であった。リン酸緩衝液を用いた場合は, pH6.5で比較的高い値を示した。また, *V. anguillarum* に対する活性は Tris-HCl緩衝液を用いた場合, pH7.5で最も高く, 0.152であった。リン酸緩衝液ではpH7.5に比較的高い活性が認められた。

**溶菌至適温度** この分画試料の *M. lysodeikticus* および *V. anguillarum* に対する溶菌活性の反応至適温度を, 各種温

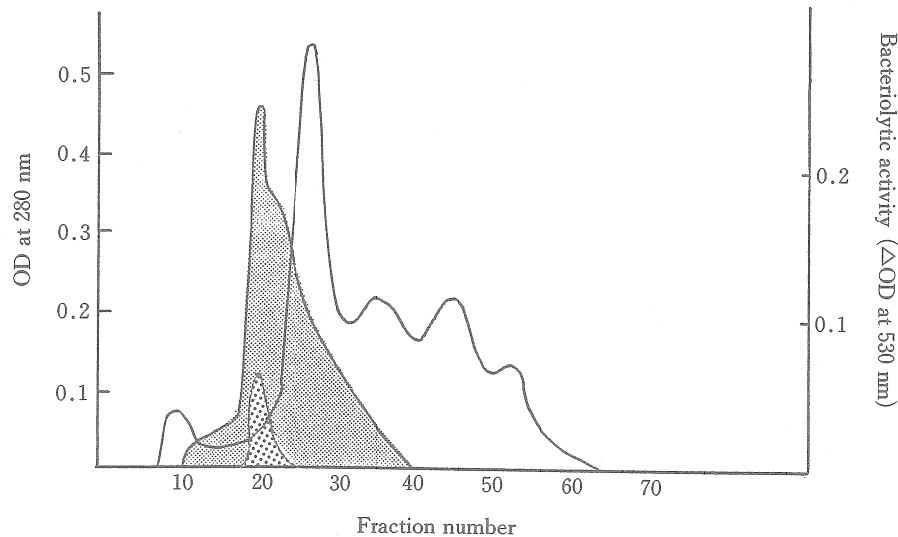


Fig. 32. Gel chromatograph profile of skin mucus homogenate from ayu on Toyopearl HW-50 column. Fully drawn line shows  $A_{280}$ , and the light shaded area and the dark shaded one show the bacteriolytic activity against lyophilized cells of *V. anguillarum* (■) and *M. lysodeikticus* (■), respectively.

度条件下における溶菌活性として Fig. 34 に示した。各温度条件下における *M. lysodeikticus* に対する活性は、30℃で最も高く 0.065 であった。また、10℃および 50℃付近に微弱な活性が認められた。一方、*V. anguillarum* に対する溶菌活性は、15℃と 45℃でピークを形成し、とくに前者で 0.204 の最も高い値を示した。

**酵素反応阻害剤による影響** 本試料と卵白リゾチームの、*M. lysodeikticus* および *V. anguillarum* に対する溶菌活性に及ぼす各種プロテアーゼ阻害剤の影響を Fig. 35 に示した。すなわち、*M. lysodeikticus* および *V. anguillarum* に

対する溶菌活性は PCMB によって、比活性にしてそれぞれ 23% と 78% に低下したが、他の阻害剤ではほとんど影響は認められなかった。一方、卵白リゾチームの *M. lysodeikticus* および *V. anguillarum* に対する溶菌活性は、いずれの阻害剤によっても影響を受けなかった。

**キチン処理による影響** キチン処理を行った試料では *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性は認められなかった。キチン処理および未処理試料の *V. anguillarum* に対する反応至適温度を、各種温度条件下における溶菌活性として Fig. 36 に示した。すなわち、キチン処理試料の活性は 30℃

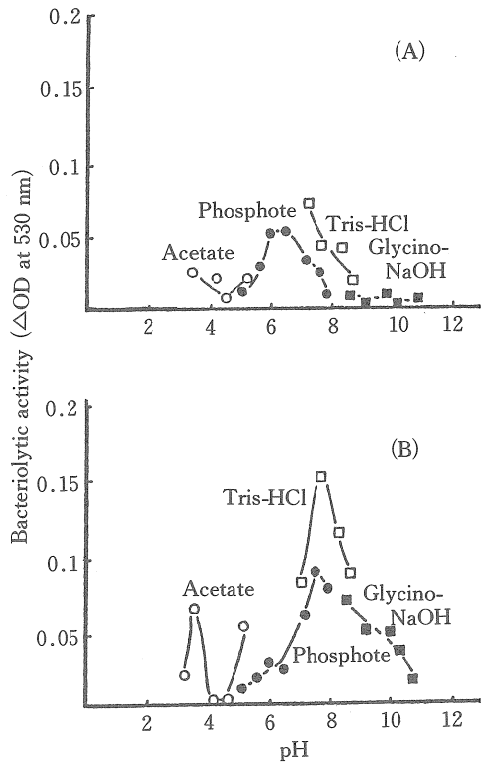


Fig. 33. Effect of pH on bacteriolytic activity of the active fraction (in Fig. 32) of the skin mucus from ayu against lyophilized cells of *M. lysodeikticus* (A) and *V. anguillarum* (B) suspended in acetate buffer (○), phosphate buffer (●), Tris-HCl buffer (□) and glycine-NaOH buffer (■) adjusted to various pH.

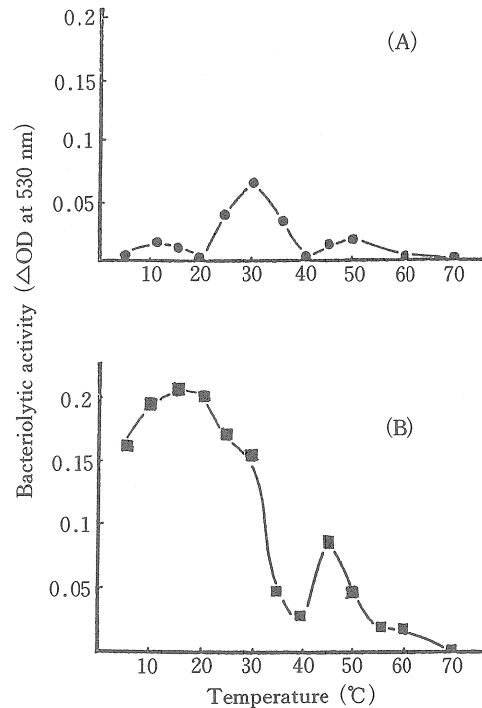


Fig. 34. Effect of temperature on bacteriolytic activity of the active fraction (in Fig. 32) of the skin mucus homogenate from ayu against lyophilized cells of *M. lysodeikticus* (A) and *V. anguillarum* (B) suspended in Tris-HCl buffer of pH 7.2 and 7.7, respectively.

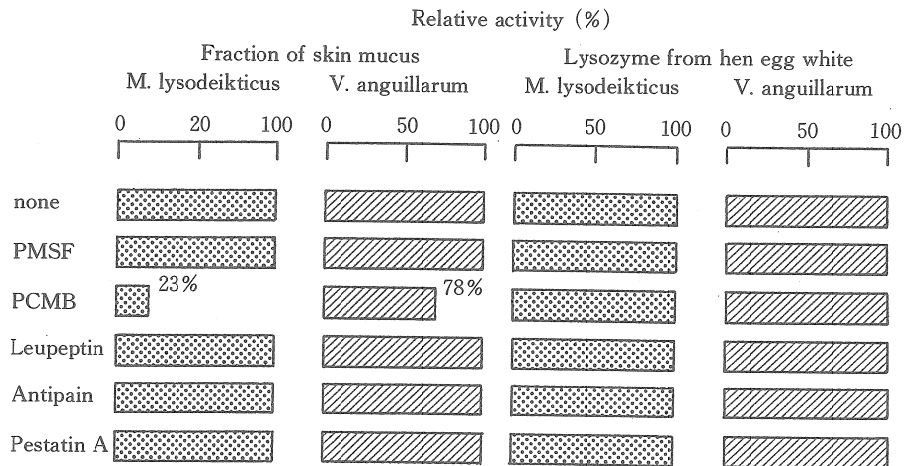


Fig. 35. Effect of some chemicals on bacteriolytic activity of the active fraction of the skin mucus homogenate from ayu and the lysozyme from hen egg-white against lyophilized cells of *M. lysodeikticus* (☒) and *V. anguillarum* (▨) incubated in Tris-HCl buffer of pH 7.7 at 15°C and pH 7.2 at 30°C, respectively.

で最も高く0.147であり、45°Cでも0.114と比較的高い値を示した。つぎに、キチン処理試料および未処理試料の *V. anguillarum* に対する溶菌活性について、15°CにおけるpH依存性をFig. 37に示した。Tris-HCl緩衝液を用いた場合の溶菌活性は、pH 8.6において0.157の最も高い値を示した。しかし、リン酸緩衝液ではほとんど活性が認められなかった。

#### 考 察

体表粘液の溶菌物質について高橋ら(1986a, b)が、コイの体表粘液とそれから分離した粗精製リゾチームとの *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性の酵素化学的性状の比較検討結果から、体表粘液にはリゾチーム様酵素のほかにも溶菌活性を持つ酵素が存在し、これらの酵素の協同作用によって、コイの生息環境に適合した活性が発現されるのではないかと推察した。また、Hjelmeland *et al.* (1983)は海水飼育ニジマス(rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*)の体表粘液に、*M. lysodeikticus*を溶菌するリゾチーム活性と *V. anguillarum*を溶菌するプロテアーゼ活性の両者が存在することを明らかにするとともに、プロテアーゼの精

製を試みている。そこで、本節ではアユの体表粘液に含まれる溶菌物質が複数存在するかどうかを調べるためにToyopearl HW-50によるゲルろ過によって分画し、*M. lysodeikticus*と *V. anguillarum*に対する溶菌活性のピークが同じ画分に認められたことから、アユ体表粘液中の *M. lysodeikticus*と *V. anguillarum*に対する溶菌物質は同一のものか、あるいはもし異なる酵素であるとしても、分子量が近似した物質ではないかと推定された。Hjelmeland *et al.* (1983)は、ニジマス(rainbow trout)の体表粘液をSephadex G-150 (pHarmacia)を用いて分画し、各画分における *M. lysodeikticus*と *V. anguillarum*に対する溶菌活性の分布が部分的に重複するものの、異なる画分にピークが溶出したとし、著者らとは異なった結果を得ている。恐らく、魚種によって体表粘液中の溶菌酵素の種類や分子量が相違するのか、あるいは異なる活性をもつ物質が重複して溶出してきたものではないかと思われる。

つぎに、アユ体表粘液を上記ゲルろ過剤で分画した画分のうち、両菌体に対して高い溶菌活性を示した画分を用いて、溶菌活性の反応至適条件(pHおよび温度)について検討したところ、分画試料の *M. lysodeikticus*に対する反応至適pHは、Tris-HCl緩衝液を用いた場合pH 7.2であり、

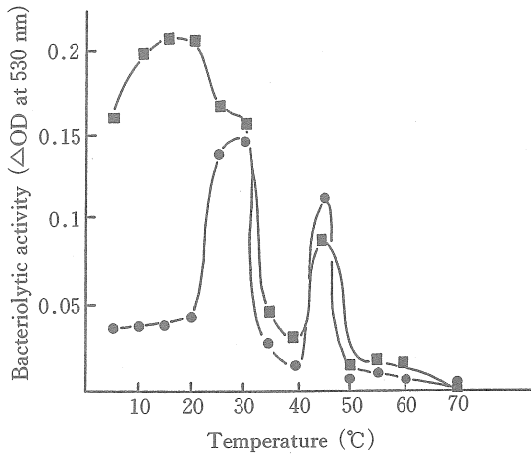


Fig. 36. Effect of temperature on bacteriolytic activity of the active fraction treated by chitin (●) and the active fraction (■) against lyophilized cells of *V. anguillarum* suspended in Tris-HCl buffer of pH 7.7.

リン酸緩衝液を用いた場合は pH 6.5 に高い活性が認められた。コイ (高橋ら: 1986b) とアユの体表粘液の *M. lysodeikticus* に対する反応至適 pH は、リン酸緩衝液を用いた場合にはいずれの魚種も pH は 6.5 であった。また、Hjelmeland *et al.* (1983) によるニジマス (rainbow trout) の体表粘液の溶菌活性の反応至適 pH は 6.0 であった。このように、本実験で Tris-HCl 緩衝液を用いて求めた反応至適 pH は、リン酸緩衝液を用いたコイ (高橋ら: 1986b) の体表粘液のそれより高い傾向を示したが、リン酸緩衝液を用いた場合のそれはコイ体表粘液の反応至適 pH と一致し、ニジマス (rainbow trout) 体表粘液 (Hjelmeland *et al.*: 1983) のそれより高かった。また、分画試料の *V. anguillarum* に対する溶菌活性の反応至適 pH は、Tris-HCl 緩衝液を用いた場合 pH 7.7 であり、前述した *M. lysodeikticus* に対する反応至適 pH よりも高かった。また、リン酸緩衝液を用いた場合には、pH 7.5 に高い溶菌活性が認められたが、これはニジマス (rainbow trout) 体表粘液 (Hjelmeland *et al.*: 1983) の *V. anguillarum* に対する反応至適 pH よりも低い値を示した。

前節において、アユ体表粘液の *M. lysodeikticus* に対する反応至適温度が 35°C であったことを明らかにしたが、本

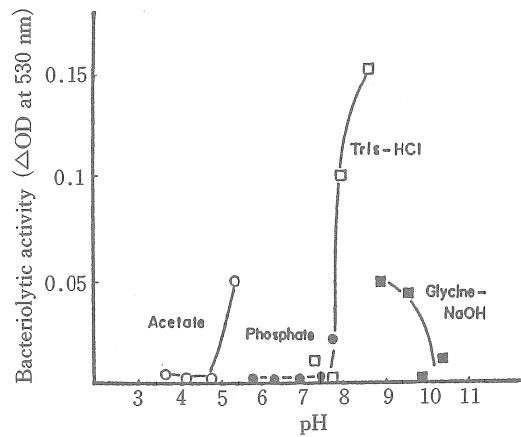


Fig. 37. Effect of pH on bacteriolytic activity of the active fraction treated by chitin against lyophilized cells of *V. anguillarum* incubated in acetate buffer (○), phosphate buffer (●), Tris-HCl buffer (□) and glycine-NaOH buffer (■) adjusted to various pH at 15°C.

実験において粗精製された試料では反応至適温度が 30°C であった。Hjelmeland *et al.* (1983) はニジマス (rainbow trout) の体表粘液のそれが 30~40°C であるとし、高橋ら (1986a, b) はコイの体表粘液とそれから粗精製したリゾチームについて反応至適温度が、前者では 20°C、後者では 40°C であったことを報告している。このように、本実験における *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性の反応至適温度は、アユおよびニジマス (rainbow trout) 体表粘液と同様の傾向を示したが、コイ体表粘液およびそれから分離した粗精製リゾチームとは差異が認められた。一方、体表粘液の *V. anguillarum* に対する溶菌活性の反応至適温度については Hjelmeland *et al.* (1983) がニジマス (rainbow trout) について検討し、30~40°C であったことを報告している。本実験において、アユ体表粘液の粗精製画分における同菌に対するそれは 15°C であり、ニジマス (rainbow trout) 体表粘液の分画試料における溶菌物質の *M. lysodeikticus* と *V. anguillarum* に対する溶菌活性の反応至適 pH および温度には差異が認められたことから、両菌体に作用する溶菌物質はそれぞれ異なる酵素ではないかと推定される。

そこで、本分画試料および対照としての卵白リゾチームに各種プロテアーゼ阻害剤を添加して、それぞれの添加効

果について比較検討したところ、分画試料では、PCMBの添加によって活性が著しく低下したのに対して、卵白リゾチームでは活性の低下が認められなかった。このことから、分画試料中には卵白リゾチームとは異質の溶菌活性物質が存在し、その物質はPCMBの添加によってSH基が修飾されて活性低下をおこすような物質(村地:1990)、例えばチオールプロテアーゼのような酵素ではないかと考えられる。Hjelmeland *et al.* (1983) はニジマス (rainbow trout) 体表粘液からプロテアーゼを分離・精製し、それをセリンプロテアーゼであるとしている。本実験では、セリンプロテアーゼの阻害剤であるPMSFによっては分画試料の活性が全く阻害されなかったことから、アユ体表粘液はニジマス (rainbow trout) のそれとは異なり、セリンプロテアーゼを含まないのではないかと考えられるが、この点についてはアユ体表粘液中の溶菌酵素を精製して詳細に検討する必要がある。

以上述べたように、アユ体表粘液中に存在した *M. lysodeikticus* および *V. anguillarum* を溶菌する酵素はToyopearl HW-50のゲルろ過によって異なった画分に分画されなかったが、この溶菌活性画分は両菌体に対する反応至適条件およびPCMBによる阻害効果において差異が認められたことから、複数の溶菌酵素が作用しているのではないかと考えられる。さらに、複数の酵素の存在をより明確にするために、*M. lysodeikticus* を溶菌するリゾチーム様活性をキチンを用いて分画試料から除去し、残存した溶菌物質の *V. anguillarum* に対する溶菌活性の反応至適温度およびpHについて検討したところ、キチン処理試料は未処理試料の反応至適温度であった15℃ではほとんど活性を示さず、30℃と45℃にピークが認められた。このことから、分画試料からリゾチーム様活性を除去すると、*V. anguillarum* に対する反応至適温度が高い温度域へ移動することが明らかとなった。これらの結果から、15℃での *V. anguillarum* に対する溶菌活性はリゾチーム様活性に依存しており、この活性によってアユの体表粘液は生息適温域での生体防御効果を発揮できるものと考えられる。また、30℃および45℃に反応の至適をもつ溶菌活性は、キチン処理によってほとんど影響を受けなかったことから、リゾチーム様酵素に依存しないものと思われる。つぎに、キチン処理試料の15℃における反応至適pHは、Tris-HCl緩衝液を用いた場合pH8.6であり、未処理試料のpH(7.7)よりかなり高く、アユの生息水域のpHとは大きく相違する。

このように、アユ体表粘液の分画試料中には、リゾチー

ム様酵素を含む複数の溶菌酵素の存在が示唆された。そして、これらの酵素が互いに協同的に作用することによってアユが通常生息している水温およびpH域で十分な溶菌活性を示し、生体防御上の重要な機能を果たしているのではないかと考えられる。

### 5.3 リゾチームの精製

前節において、アユの体表粘液中にリゾチーム様とプロテアーゼ様の溶菌活性物質が存在し、これらの非特異的生体防御因子が協同的に作用して病原細菌を溶菌することを明らかにした。なかでも、体表粘液におけるリゾチーム活性は、その他の器官や臓器のそれと比較して高いこと、また棲息水温域が最適であることから、環境と接し、細菌の侵襲を受けやすい当該部位において、重要な働きをしているのではないかと考えられる。しかし、リゾチーム様酵素による *Vibrio anguillarum* に対する溶菌活性は明らかではない。

本節では体表粘液中の非特異的防御因子の中で溶菌活性の高いリゾチームについて、その性状と生体防御因子としての役割を明らかにすることを目的として、アユの体表粘液からリゾチームを精製して生化学的性状を明らかにするとともに、*V. anguillarum* をはじめとする各種魚病細菌に対する溶菌活性について検討した。

#### 材料および方法

**供試魚および試料の調製** 平均体重50gのアユ150尾を用いた。体表粘液は3.2と同様にして調製した。ただし、採材には0.01M Tris-HCl緩衝液(pH7.2)を用いた。

**溶菌活性の測定** 前節と同様に *Micrococcus lysodeikticus* 凍結乾燥菌体を用いて溶菌活性を測定した。ただし、反応用菌液には0.01M Tris-HCl緩衝液(pH7.2)を用い、本菌液2mlに試料10 $\mu$ lを添加して30℃で60分間反応させて530nmにおける吸光度を測定した。溶菌活性値は、試料を添加していない対照区の吸光度と試料添加区の吸光度の差をもって表した。また、溶菌活性値としてunitをも用いた。1unitは1分間にタンパク質重量1 $\mu$ gあたり530nmにおける吸光度を0.01変化させる溶菌活性とした。タンパク質の定量にはLowry *et al.* (1951)の方法を用いた。**リゾチームの精製** 以下に述べる方法でリゾチームを精製した。なお、液体カラムクロマトグラフィーの際のタンパク質の検出は波長280nmにおける吸光度の測定によって

行った。

(1)濃縮 透析膜(スペクトラポア, 6,000~8,000)に試料を入れ, ポリエチレングリコール#6,000を用いて濃縮した。

(2)イオン交換クロマトグラフィー イオン交換体には SP-Toyopearl 650M(東ソー)を用いた。0.01Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で透析した試料を, リン酸緩衝液に平衡化した SP-Toyopearl 650Mカラム(2.5×30 cm)に添加し, リン酸緩衝液で洗浄後, 0~0.3M NaClによる濃度勾配を用いて溶出した。流速は1 ml/minとし, 4 mlずつ分取した。

(3)アフィニティークロマトグラフィー Heparin SepHarose CL-6B(pHarmacia)を用いた。溶菌活性画分を0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.3)で透析したのち, 試料を Heparin SepHarose CL-6Bカラム(2.5×25 cm)に添加し, 同緩衝液で洗浄後, 0~0.25M NaClによる濃度勾配を用いて溶出した。流速は1.5 ml/minとし, 4 mlずつ分取した。

(4)再イオン交換クロマトグラフィー イオン交換体には Mono S HR 5/5(pHarmacia)を用いた。溶菌活性画分を1.25%にサッカロースを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で透析し, 同緩衝液に平衡化した Mono S HR 5/5カラムに添加したのち, 同緩衝液で洗浄後, 0~0.12M NaClによる濃度勾配を用いて溶出した。流速は0.5 ml/minとし, 分取量は1 mlとした。

(5)ゲルろ過 ろ過材としては Superose 12 HR 10/30(Pharmacia)を用いた。溶菌活性画分を透析膜で濃縮後, カラムに添加し, 1.25%サッカロースおよび0.2M NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で溶出した。流速は0.3 ml/minとし, 0.6 mlずつ分取した。また, 分子量の測定には, 標準タンパクとしてリボヌクレアーゼ A(分子量13,700), キモトリプシノーゲン A(分子量25,000)およびアルブミン(分子量43,000)を用いてゲルろ過を行い, 精製リゾチームの分子量を測定した。ボイドボリュームの測定にはブルーデキストラン2,000(Pharmacia)を用いた。  
純度の検定と分子量の測定 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)を行った。電気泳動用グラジエントゲル SDS-PAG プレート10/20(第一化学薬品)を用いて Laemmli(1970)の方法で泳動した。精製試料添加後, 50 mAの定電流で約1時間泳動後, クマシーブリリアントブルー R-250で染色した。分子量測定用マーカーには SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用 MW-マーカー(オリエンタル酵母)を用いた。

等電点の測定 薄層ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法を行った。両性担体には Bio-Lyte 3/10(BioRad)を用いた。モデル111ミニ IEFセル(BioRad)を用いて, 薄層ポリアクリルアミドゲルを作製し, これに精製試料を添加したのち, 100Vで10分, 200Vで10分および450Vで20分間泳動を行った。泳動終了後クマシーブリリアントブルー R-250で染色した。脱色には1次脱色液として0.5%硫酸銅と12%イソプロパノールを含む7%酢酸溶液を, 2次脱色液として25%イソプロパノールを含む7%酢酸溶液をそれぞれ用いた。等電点測定用マーカーとしては PI カリブレーションキット(Pharmacia)を用いた。

アミノ酸分析 体表粘液から精製した2種類のリゾチームの各々を塩酸で加水分解(110℃, 24時間および72時間)したのち, 全自動アミノ酸分析計 Model AA01(三菱化成)を用いて, 17種類のアミノ酸について組成分析を行った。

ウサギ抗体の作製 精製リゾチームのII型を同量のフロイントの完全アジュバント(Difco)と混合したのち, ウサギの皮下に1 mlを1週間間隔で4回接種した。最終接種後10日に耳静脈から採血したのち, 血清を分離した。血清を Tris-HCl緩衝液に透析したのち, DEAE Affi-Gel Blue(BioRad)カラムクロマトグラフィーを行って, ウサギ IgGを精製した。

酵素阻害剤の影響 阻害剤には, ヘパリン, ヒスタミンおよび N-アセチルグルコサミンを用いた。精製試料をあらかじめ阻害剤と混合し, 5分間静置したのち, *M. lysodeikticus*の懸濁液を添加し, 至適条件下で反応させて溶菌活性を測定した。添加した阻害剤の反応液中での濃度は, ヘパリンを10, 100および200 units/mlとし, ヒスタミンと N-アセチルグルコサミンではいずれも5および10 mMとした。

酵素抗体法(EIA; enzyme immunoassay)による抗原性の解析 精製リゾチームと卵白リゾチームとの交差性を検討した。反応抗原には精製リゾチーム I, II型画分(各0.04 μg/ml)と市販の卵白リゾチーム(Sigma, 25 μg/ml)を用いた。抗体には精製リゾチーム II型に対するウサギ IgGを用いた。EIAには, カルボプレート(住友ベークライト)を用いた。同プレートを10% 1-ethyl-3-(diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochlorideで活性化した。抗原液を100 μlずつ各穴に添加して抗原を固相化したのち, 5%スキムミルクでブロッキングし, ウサギ IgGを添加した。これにペロキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ IgGを反応させたのち, σ-フェニレンジアミンを基質として加え, 反応終了後, 硫酸で反応を停止した。マイクロ

プレートリーダー MRP 4A(東ソー)を用いて492 nmにおける各反応溶液の吸光度を測定した。

**反応至適条件の検討** 5.2の方法を用いて反応至適温度、至適 pH および至適リン酸緩衝液モル濃度について検討した。ただし、緩衝液にはリン酸緩衝液を用いた。

**各種魚病細菌に対する溶菌活性** 供試菌には *Pasteurella piscicida*, *V. anguillarum*, *Enterococcus seriolicida*, *Aeromonas salmonicida* および *A. hydrophila* を用いた。各菌株を培養後、0.5% ホルマリンで不活化したのち、0.01M Tris-HCl 緩衝液で3回洗浄して溶菌活性の測定に用いた。測定には精製試料を用い、*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性測定法と同様に行った。

## 結果

**体表粘液からのリゾチームの精製** 透析膜で濃縮した試料を SP-Toyopearl 650M を用いてイオン交換クロマトグラ

フィーを行って得られたタンパク質の溶出パターンと *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性を Fig. 38 に示した。*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性は NaCl 濃度が 0.2M 付近にみられた。この活性画分について Heparin Sepharose CL-6B によるアフィニティーロマトグラフィーを行って得られた結果を Fig. 39 に示した。溶菌活性は NaCl 濃度が 0.1M 付近にみられた。さらに、この活性画分を Mono S HR 5/5 によるイオン交換クロマトグラフィーを行って得られた結果を Fig. 40 に示した。溶菌活性は NaCl 濃度が 0.092M (I 型) と 0.10M (II 型) 付近にそれぞれのピークが認められ、type I (I 型) と type II (II 型) と名付けた。それぞれの活性画分を濃縮したのち、別々に Superose 12 HR 10/30 によってゲルろ過を行って得られた 280 nm 吸収タンパク質溶出パターンと溶菌活性(一で示した)の結果を Fig. 41 に示した。それぞれ活性のあった 15.4~16 ml の溶出画分の分子量を測定し、結果を Fig. 42 に示した。溶出した活性画分の分子量は両者とも約 18,000 であった。これ

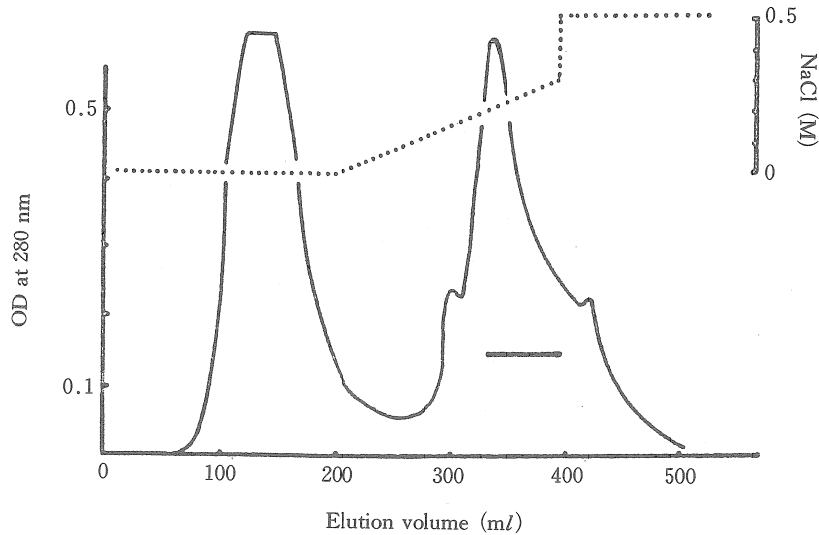


Fig. 38. Ion exchange column chromatography of the ayu skin mucus on SP-Toyopearl 650M. The crude extract of skin mucus was dialyzed against 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0) and applied to an SP-Toyopearl 650M column (2.5 × 30 cm) equilibrated with the same buffer. The column was washed with the buffer and lysozyme fraction was eluted with a linear gradient of 0-0.3M NaCl concentration in the buffer at a flow rate of 1 ml/min. Four ml portions were collected in each fraction. The solid and the broken line show optical density at 280 nm and the concentration of NaCl, respectively. A bar represents the lysozyme fraction.

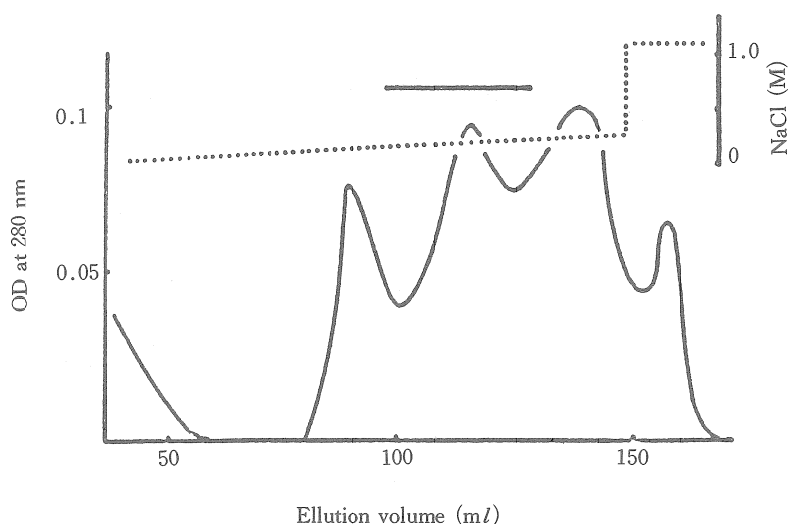


Fig. 39. Affinity column chromatography of the lysozymes (Fig. 38) on Heparin Sepharose CL-6B. The lysozyme fraction pooled by SP-Toyopearl 650M ion exchange column chromatography was dialyzed against 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2) and applied to a Heparin Sepharose CL-6B column ( $2.5 \times 25$  cm) equilibrated with the same buffer. The column was washed with the buffer and lysozyme fraction was eluted with a linear gradient of 0-0.25 M NaCl concentration in the buffer at a flow rate of 1.5 ml/min. Four ml portions were collected in each fraction. The solid and the broken line show the optical density at 280 nm and the concentration of NaCl, respectively. A bar represents the lysozyme fraction.

らの各精製段階での精製度に関する結果を Table 2 に示した。両リゾチームの総回収率は 4 % であった。

**純度の検定と分子量の測定** 体表粘液から精製したリゾチームの純度を検定するために、SDS-PAGE を行った結果を Fig. 43 に、また標準タンパクを用いて分子量測定を行った結果を Fig. 44 に示した。いずれの精製試料も Rf 値 0.84 付近に 1 本のバンドを形成し、その分子量は約 18,000 であった。

**等電点の測定** 精製試料の等電点を測定するために、電気泳動法を行った結果を Fig. 45 に示した。各精製試料は高 pH 域にそれぞれ 1 本のバンドを形成し、等電点は 9.4 と 9.8 とであった。

**アミノ酸分析** アミノ酸分析の結果を Table 3 に示した。体表粘液由来リゾチームの I 型にはロイシンとアラニンが多く、II 型にはリジンおよびヒスチジンが多いことが明らかとなった。しかし、シスチンはいずれのリゾチームからも検出されなかった。

**阻害剤による影響** ヘパリン、ヒスタミンおよび N-アセチルグルコサミンによる精製リゾチームの溶菌活性に及ぼす影響を Table 4 に示した。I 型の溶菌活性はヘパリン 100 units の添加によって完全に失活したのに対して、II 型のそれは 200 units の添加でも比活性にして 71.5% が残存した。ヒスタミンは、I 型の活性を 5 mM で、II 型を 10 mM でそれぞれ失活させた。N-アセチルグルコサミンは 10 mM の濃度で、I 型および II 型に対して比活性で各々 80.9%、87.6% と、ほぼ同程度に活性を低下させた。

**EIA 法による抗原性の解析** 抗 II 型リゾチームウサギ抗血清に対する精製リゾチーム I 型、II 型および卵白リゾチームの反応性について検討した。492 nm における吸光度は II 型リゾチームに対しては 0.172、I 型リゾチームに対しては 0.116 と、I 型および II 型間には交差反応性がみられた。しかし、卵白リゾチームに対しては吸光度は 0 であり、II 型リゾチームとの交差性はみられなかった。

**反応至適条件の検討** 精製リゾチーム I 型および II 型試料



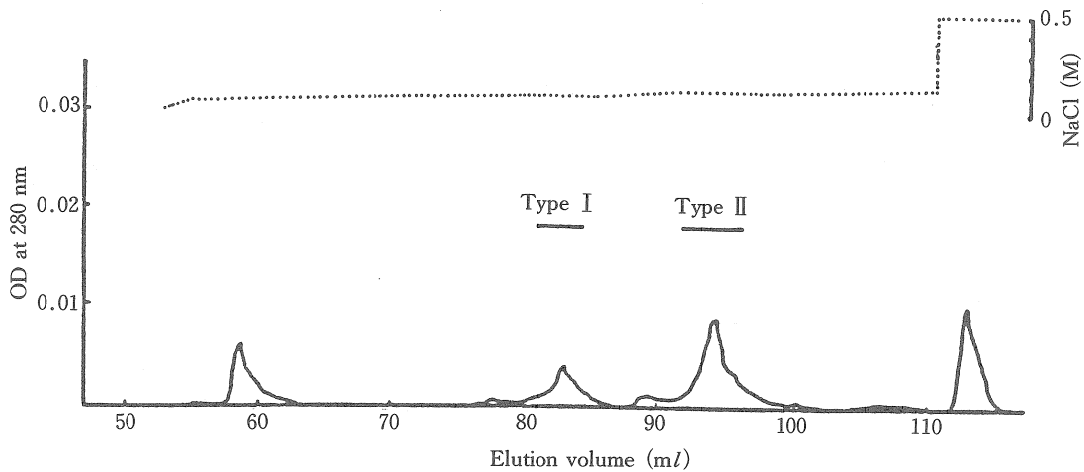


Fig. 40. Ion exchange column chromatography of the lysozymes (Fig. 39) on Mono SHR 5/5. The lysozyme fraction pooled by Heparin Sepharose CL-6B column chromatography was dialyzed against 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 1.25% saccharose and applied to a mono S HR 5/5 column (0.5 × 5.2 cm) equilibrated with the same buffer. The column was washed with the buffer and lysozyme fraction was eluted with a linear gradient of 0-0.125M NaCl concentration in the buffer at a flow rate of 0.5 ml/min. One ml portions were collected in each fraction. The solid line and the broken line show the optical density at 280 nm and the concentration of NaCl, respectively. A bar represents the lysozyme fraction.

Table 2. Summar of purification of lysozyme from ayu skin mucus

Fraction	Total activity (× 10 <sup>6</sup> units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/μg)	Yield (%)
Crude extract	4,813	23,595	0.02	100
SP-Toyopearl 650M	2,511	715	3.5	52
Heparin Sepharose	1,735	41.8	41.5	36
Mono S HR 5/5				
Type I	124	0.27	454.6	11
Type II	383	0.21	1784.6	
Superose 12 HR				
Type I	27	0.20	1378.8	4
Type II	146	0.07	2018.2	

The enzyme activity of each step was assayed using lyophilized cells of *Micrococcus lysodcikiicus*.  
The enzyme unit of lysozyme activity was expressed in 0.01 change of optical density at 530 nm per min.

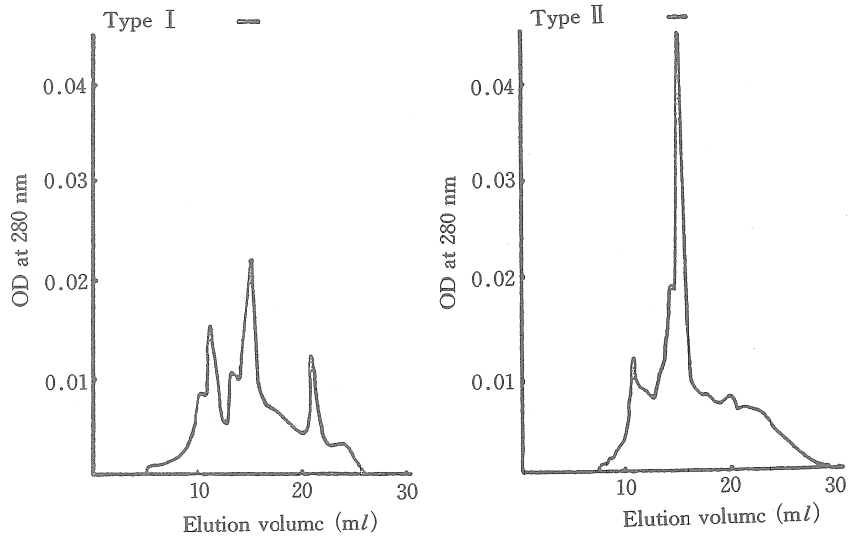


Fig. 41. Gel filtration of the type I and type II of the lysozymes on Superose 12 HR 10/30. Each lysozyme fraction of type I and tupe II pooled by Mono S HR 5/5 ion exchange column chromatography was applied to a Superose 12 HR 10/30 column ( $1.0 \times 32$  cm) equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0) containing 1.25% saccharose and 0.2 M NaCl. Lysozyme fraction was eluted at a flow rate of 0.3 ml/min. Each fraction was 0.6 ml. The solid line shows the optical density at 280 nm. A bar represents the lysozyme fraction.

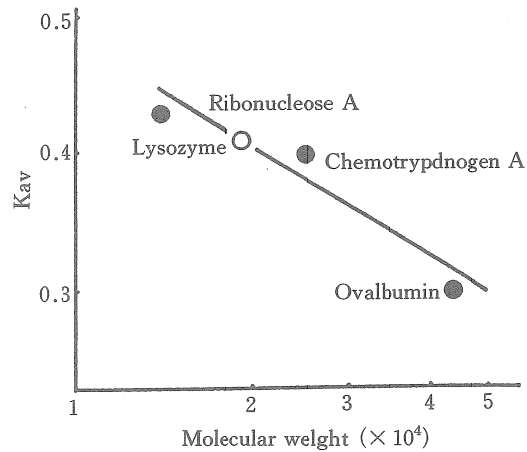


Fig. 42. Determination of molecular weight of the lysozymes by Superose 12 HR 10/30 of an FPLC system. The elution position of lysozymes (type I and type II) was indicated by an open circle. Standard proteins were ribonuclease A (a: MW 13,700), chymotrypsinogen A (b: 25,000) and ovalbumin (c: 43,000).

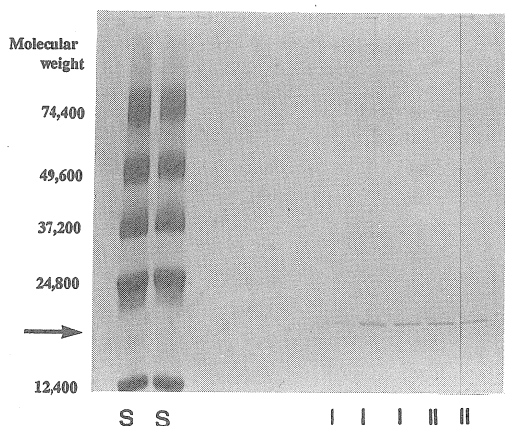


Fig. 43. SDS polyacrylamide gradient gel electrophoresis of two purified lysozymes from ayu skin mucus. Electrophoresis was performed at 50 mA according to the method of Laemmli (1970) with a 10-20% gradient polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250 and destained with 7% acetic. Standard proteins were monomer (MW: 12,400), dimer (24,800), trimer (37,200), tetramer (49,600), and hexamer (74,400) of cytochrome C. S: Standard proteins, I: Type I lysozyme, II: Type II lysozyme

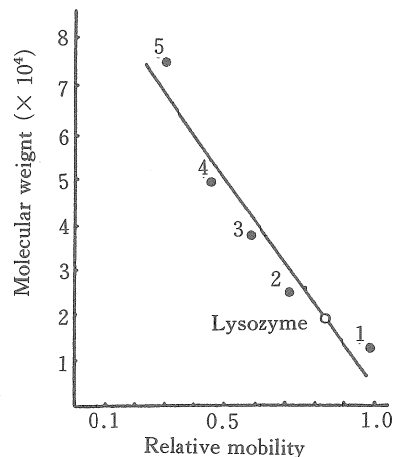


Fig. 44. Determination of molecular weight of two purified lysozymes with SDS polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Electrophoretic condition was described in the legend of Fig. 43. Standard proteins were monomer (MW: 12,400), dimer (24,800), trimer (37,200), tetramer (49,600), and hexamer (74,400) of cytochrome C.

の *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性に及ぼす温度、pH およびリン酸緩衝液モル濃度の影響を Fig. 46 に示した。反応至適温度は 35℃、至適 pH は 6.9 付近、至適モル濃度は 0.01 であることが明らかとなった。

**各種魚病細菌に対する溶菌活性** 精製試料の各種魚病細菌に対する溶菌活性は Table 5 に示す通りである。精製試料はいずれも *M. lysodeikticus*, *A. hydrophila* および *P. piscicida* に対して比較的高い活性を示したが、*V. anguillarum*, *A. salmonicida* および *E. seriolocida* に対する活性は低かった。

### 考 察

前節において、アユの体表粘液中にリゾチーム様あるいはプロテアーゼ様の溶菌活性物質が存在し、それらが協同的に作用して病原細菌を溶菌することを明らかにした。また、アユの体表粘液中にはこのような溶菌活性物質のほか抗体が存在し、これらが総合的に働いて、外界との接点であり細菌などの侵襲を受けやすい体表粘液で第一線の生体防御を行っていることを明らかにした。そこで、本節ではこれらの生体防御機構の詳細を明らかにするために、リゾチームを精製してその性状を明らかにするとともに、各種魚病細菌に対する溶菌活性を検討した。

まず、アユ体表粘液由来のリゾチームは、Heparin Sepharose CL-6B に吸着することおよびヘパリンによって活性が阻害されることから、ヘパリンに親和性を持つことが明らかとなった。このようにヘパリンとの親和性をもつリゾチームとしてはヒト母乳中のリゾチームが報告されている (Boesman-Finkelstein and Finkelstein: 1982)。精製

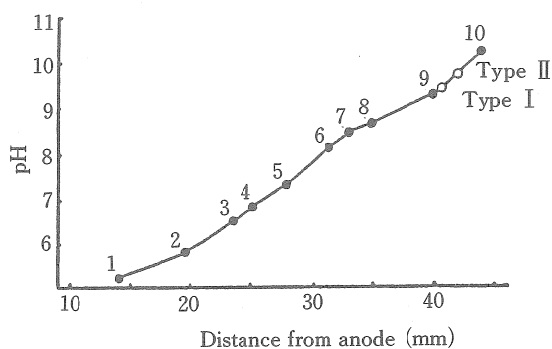


Fig. 45. Determination of pI of two lysozymes purified from ayu skin mucus by thin-layer polyacrylamide gel isoelectric focusing (IEF-PAG). Isoelectric focusing were performed at 100 V for 10 min, 200 V for 10 min, and 450 V for 20 min in Model 111 Mini IEF Cell (BioRad). Bio-Lyte 3/10 was used for the carrier ampholytes. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250 and destained with 7% acetic acid containing 0.5%  $\text{CuSO}_4$  and 12% 2-propanol, and then with 7% acetic containing 25% 2-propanol. Standard proteins for IEF-PAG were  $\beta$ -lactoglobulin A (1: pI 5.20), bovine carbonic anhydrase B (2: 5.85), human carbonic anhydrase B (3: 6.55), horse myoglobin (4: 6.85, 5: 7.35), lentil lectin (6: 8.15, 7: 8.45, 8: 8.65), trypsinogen (9: 9.30), and cytochrome C (10: 10.25).

Table 3. Amino acid composition of the two lysozymes purified from ayu skin mucus

Amino acid	Residues/100 residues	
	Type I	Type II
Asp	9.5	9.2
Thr	5.2	5.4
Ser	7.7	8.2
Glu	12.0	12.0
Pro	3.0	3.2
Gly	12.6	12.5
Ala	9.9	8.9
Cys	0	0
Val	8.1	7.9
Met	1.6	1.2
Ile	4.8	4.5
Leu	7.0	5.6
Tyr	2.5	2.2
Phe	3.4	3.6
Lys	6.6	8.7
His	1.9	3.0
Arg	3.9	3.8

Hydrolysis was performed in 6N HCl at 110°C for 24 and 72h. The values for Thr and Ser were extrapolated to zero time of hydrolysis and those for Ile, Leu, and Val were the highest values. The values for other 12 amino acids were the average ones from 2 hydrolysates.

Table 4. Effects of some chemicals on the lysozyme activity of types I and II

	Relative activity (%)	
	Type I	Type II
Heparin		
10 units/ml	48.9	95.6
100	0	77.9
200	0	71.5
Histamine		
5 mM	0	34.9
10	0	0
N-Acetyl-D-glucosamine		
5 mM	85.1	97.1
10	80.9	87.6

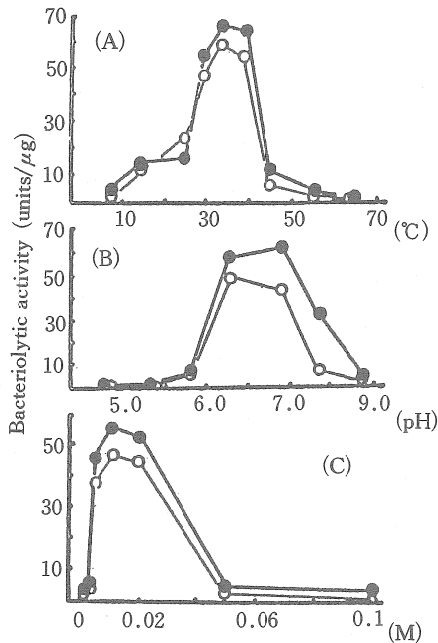


Fig. 46. Effects of temperature (A), pH (B), and phosphate buffer molarity (C) on activity of the purified lysozyme of type I (○) and type II (●) of ayu skin mucus.

A: 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0).

B: 0.01 M phosphate buffer at 35°C.

C: phosphate buffer (pH 7.0) at 35°C.

リゾチームの性状については、アユの体表粘液からリゾチームを分離精製した結果、等電点の異なる2種類のリゾチームが検出された。両リゾチームはともに分子量が約18,000であるが、等電点はそれぞれ9.4と9.8であった。このように、分子量が同じで等電点の異なる酵素はいわゆるアイソザイムではないかと考えられる。このような例は、ニジマス (rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) の腎臓由来リゾチームで報告されており、分子の質量は14.4kDaで、等電点はそれぞれ9.5と9.65であった (Grinde *et al.*: 1988)。今回、著者らが分離したリゾチームはニジマス (rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) のそれと等電点はほぼ一致するが、分子量はやや大きい傾向を示した。他の動物種において多型のリゾチームが分離・精製された報告は、

Table 5. The bacteriolytic activity of the purified lysozyme against fish pathogenic bacteria

	Type I (units/ $\mu$ g)	Type II (units/ $\mu$ g)
<i>Pasteurella piscicida</i>	40.0	25.1
<i>Vibrio anguillarum</i>	0	0
<i>Aeromonas salmonicida</i>	0	0
<i>A. hydrophola</i>	86.1	50.2
<i>Enterococcus seriolicida</i>	6.1	0.8

Formalin-killed cells of the bacteria were incubated with the lysozyme at 30°C for 60 min in 0.01 M Tris-HCl buffer pH 7.2), and optical density was measured at 530 nm. The enzyme unit of lysozyme activity was expressed in 0.01 changes of optical density at 530 nm per min.

Kaki-duck (Herman and Jolles: 1970, Herman *et al.*: 1971)およびPeking-duck (Kondoら: 1982)の卵白由来リゾチームにもみられる。今回、著者らが精製したアユの体表粘液リゾチームに2つの型がみられたが、これが上述のようなアイソザイムである可能性は高い。しかし、精製途中でリゾチームがトランスアミダーゼによって変化したことも考えられるので、今後詳細な検討が必要である。

アミノ酸分析の結果から精製リゾチームのI型とII型ではリジン、ヒスチジン、ロイシンおよびアラニンの含有量に差異が認められたが、そのほかのアミノ酸については類似した値が得られた。このことから、IおよびII型リゾチームはアミノ酸の組成からも類似したタンパク質であることが明らかである。また、II型にはリジンおよびヒスチジンのような塩基性のアミノ酸が多いことから、II型の等電点がI型より高くなったものと考えられる。一般に、卵白リゾチームなどでは4個のシステイン残基があるため、4個のS-S結合が存在し、これがリゾチームの立体構造の保持や熱処理に対する活性の安定性に役立っているとされている (林・井本, 1974)。体表粘液から精製したリゾチームはpH 7の緩衝液中での50°C 10分の加熱で失活した (未発表)が、卵白リゾチームでは同様の加熱処理に対しては70%の活性が残存すること (高橋ら: 1986a)から、精製リゾチームは卵白リゾチームと比較して不安定な酵素であると考えられ、これはタンパク質の安定性を維持するシステインが存在しなかったことに起因するのではないかと考えられる。

精製リゾチームの反応至適条件については、ニジマス (rainbow trout) の腎臓から分離・精製されたリゾチームのそれが、いずれも pH 5.5 で温度は 45°C であった (Grinde *et al.*: 1988) のに対し、アユでは pH 6.9 で温度が 35°C と、ニジマス (rainbow trout) のそれとはやや異なることが明らかとなった。このように同じ淡水魚由来のリゾチームでもその性状が異なる原因については明らかではない。

各種阻害剤による影響については、ヘパリンによるリゾチーム活性の阻害濃度が、II 型よりも I 型に対して低濃度であることが明らかとなった。また、ヒスタミンについても I 型が II 型よりも低濃度で阻害されることが示された。ヘパリンやヒスタミンに対する感受性が I 型と II 型で異なることから、体表粘液から精製された両リゾチームの性状には若干の相違があるものと考えられる。また、N-アセチルグルコサミンは両リゾチームに対して同程度の弱い阻害活性を持つことが明らかとなった。このように、ヒスタミンによって活性が阻害されるが N-アセチルグルコサミンに対して阻害を受けにくいリゾチームとしては、ババイヤ (Haward and Glazer: 1969) およびイチジク (Glazer *et al.*: 1969) 由来のリゾチームが報告されている。

EIA 法を用いた体表粘液由来リゾチーム I 型および II 型ならびに卵白リゾチームの交差反応性では、II 型を免疫抗原として作製したウサギ抗体は I 型と交差性を持つことから、I 型と II 型には共通抗原が存在することが明らかとなった。しかし、本抗体は卵白リゾチームとは反応しなかったことから、体表粘液由来リゾチームは卵白リゾチームとは共通抗原を持たないと考えられる。

各種魚病細菌に対するアユ体表粘液の溶菌活性については、*A. hydrophila* および *P. piscicida* に対する溶菌活性が比較的高かったが、アユの病原菌である *V. anguillarum* に対してはほとんど溶菌活性はみられなかった。前節において、アユの体表粘液中には *M. lysodeikticus* と *V. anguillarum* を溶菌する物質が存在することを明らかにし、これらの菌体に対する溶菌活性の反応至適条件が異なること、酵素阻害剤による阻害効果が異なることならびにキチン処理による溶菌活性の変化の違いなどからアユの体表粘液中にはリゾチーム様の溶菌酵素のほかプロテアーゼ様の酵素が存在することを示した。今回、精製リゾチームが *V. anguillarum* を溶菌しないことが明らかになったことから、元来体表粘液に含まれている *V. anguillarum* に対する溶菌活性はプロテアーゼ様の酵素によるものではないかとも考えられるが、前節の結果をも合せて考察すると、*V. anguillarum* に対する体表粘液の溶菌活性はリゾチームと

他の酵素との協同作用によってはじめてアユの棲息水温域で発揮されることになるであろう。

#### 5.4 摘 要

アユの体表粘液における非特異的生体防御機構を明らかにするために、体表粘液中の溶菌物質について検討した。

1. アユにおけるリゾチームの分布について検討したところ、単位タンパク質当たりの活性値は体表粘液が最も高く、ついで鰓、腎臓、腸管および血清の順であった。体表粘液での活性が高いことは、体表粘液における生体防御機構の重要性を反映したものと考えられた。また、その活性の反応至適条件はアユの生息環境とよく合致したものであった。体表粘液における溶菌活性はアルカリ性域より酸性域での熱安定性が高いことから、溶菌活性物質の主体はリゾチームであると推察された。

2. 体表粘液におけるリゾチーム活性と *V. anguillarum* に対する溶菌活性について明らかにするために、試料をゲルろ過したところ、両活性はともに同一画分に溶出した。そこで、この画分を用いてキチン処理による影響について調べたところ、その処理によってリゾチーム活性は消失したが、*V. anguillarum* に対する活性 (プロテアーゼ様活性) は残存した。そして、*V. anguillarum* に対する溶菌活性の反応至適温度は、キチン処理前の 15°C から処理後には 30 と 45°C へ移行したことから、アユの体表粘液中には複数の溶菌活性物質が存在し、これらが協同的に作用してアユの棲息環境に適した条件下で十分な生体防御能を発揮していると考えられた。とくに、リゾチームは *V. anguillarum* に対する溶菌活性がアユの棲息水温付近で発揮するように作用しているものと考えられた。

3. アユ体表粘液中のリゾチームの性状を明らかにするために、リゾチームの精製を試みた。その結果、リゾチームは SP-Toyopearl 650M, Heparin Sepharose CL-6B, Mono S HR 5/5 および Superose 12 HR 10/30 を用いて精製することができた。体表粘液からは 2 種類のリゾチームが精製されたが、これらはアイソザイムであると考えられた。リゾチームの分子量はいずれも 18,000、等電点は 9.4 (I 型) と 9.8 (II 型) であり、アミノ酸分析の結果、II 型の塩基性アミノ酸の含量が I 型のそれよりやや多かったが、I 型と II 型は免疫学的に交差性を示した。精製リゾチームは魚病細菌のうち *A. hydrophila* と *P. piscicida* に対して溶菌活性を示したが、*V. anguillarum* に対してはほとんど活性を示さなかった。この結果と前項の結果から、体表

粘液においてリゾチームは *V. anguillarum* を直接溶菌しないが、他のプロテアーゼ様活性と協同して作用することによって、アユの棲息環境に合致した条件下で溶菌活性を発揮できるものと結論された。

## 第6章 体表粘液における赤血球凝集素の性状と生体防御上の役割

### 緒言

第4および5章において、アユ体表粘液中に抗体やリゾチームの存在ならびにその性状を明らかにした。しかし、体表粘液における主要な防御機構としてはこれら2者のほかに付着・増殖をはじめた病原菌を非特異的に凝集させて体表粘液とともに体外へ排除する機構も考えられる。Di Conza (1970) は catfish (ハマギギの1種; *Tachysurus australis*) の体表粘液から、また Spitzer *et al.* (1976) は Pacific hagfish (ヌタウナギの1種; *Eptatretus stouti*) から、それぞれウサギやヒトO型(Rh-)赤血球を凝集するタンパク質をそれぞれ検出し、これらの物質が病原菌を凝集し、粘液細胞から産生された粘液とともに病原菌の凝集物を体外に排出するであろうと推察している。本章では体表粘液中の凝集素を分離してその性状について検討した。

### 材料および方法

**体表粘液の調製** 平均体重35gのアユ50尾から3.2と同様に体表粘液を採取した。なお、採取には0.15M NaClを含む0.01M リン酸緩衝液(pH 7.4, リン酸緩衝食塩水)を用いた。

**赤血球の調製** ウサギ赤血球はニュージーランドウサギの耳翼静脈から採血し、ガラスビーズを用いて脱線維素血液を作製した。ヒツジ赤血球とモルモット赤血球はいずれも市販の脱線維素血液(東洋血清株式会社)を用いた。ヒト赤血球はA, B, OおよびAB型赤血球を採取し、脱線維素血液を作製した。いずれの赤血球もリン酸緩衝食塩水で洗浄後、2.5%浮遊液を調整して試験に供した。

**赤血球凝集活性の測定** 活性測定には96穴のマイクロタイター用プレートを用いた。試料をリン酸緩衝食塩水で2倍段階希釈しこれに等量の赤血球浮遊液を添加し、マイクロミキサーで攪拌後、20℃で2時間反応させて凝集の有無とその程度を観察した。

**赤血球凝集素の分離** アフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過法によって赤血球凝集素を分離した。タンパク質の検出には280nmにおける吸光度を測定した。また、赤血球凝集素の検出にはウサギ赤血球を用いた。

(1)アフィニティークロマトグラフィー 担体にはConA Sepharose (Pharmacia)を用いた。体表粘液試料を1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>および0.5M NaClを含む0.02M Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に透析した後、同緩衝液に平衡化したConA Sepharoseゲルに添加した。同緩衝液でゲルを洗浄した後、0.05M, 0.1M, 0.2Mおよび0.5Mの $\alpha$ -methyl-D-mannosideを含む0.5M NaCl加0.02M Tris-HCl緩衝液で段階溶離を行った。

(2)ゲルろ過法 ConA Sepharoseによる分離で、0.05M  $\alpha$ -methyl-D-mannosideによって溶出した画分を、リン酸緩衝食塩水で平衡化したSephacryl S-300ゲル(Pharmacia)200mlを充填したカラムに添加して、ゲルろ過を行った。流速は0.5ml/minとし、分取量は2.9mlとした。

**単糖に対する親和性の検討** 前述の方法で試料と赤血球を反応させたのち、これに反応溶液中で0.25Mとなるように調製した各種糖類溶液を添加して、攪拌したのち、25℃で1時間反応後、4℃で1晩静置して、凝集の解離の状態を観察した。単糖には、D-ガラクトース、L-ラムノース、D-フコース、D-マンノース、L-フコース、D-フルクトース、2-デオキシ-D-ガラクトース、N-アセチル-D-グルコサミンおよびN-アセチル-D-ガラクトサミンを用いた。単糖に対する親和性の検討には、体表粘液およびConA Sepharose吸着画分ならびにSephacryl S-300で分画した画分のうち最も活性の高かったものを凍結乾燥で濃縮してそれぞれ実験に供した。

**電気泳動法による解析** ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)(萩田・中村:1981)を用いた。タンパク染色にはクーマシプリリアントブルーR-250を用いた。

### 結果

**各種赤血球に対する体表粘液の凝集活性** 各種赤血球に対するアユ体表粘液の凝集活性をTable 6に示した。赤血球凝集素価はウサギ赤血球に対しては1:16であったが、ヒツジ、モルモットおよびヒトA, B, OおよびAB型の各赤血球に対しては凝集活性はみられなかった。

**赤血球凝集素の分離** ConA Sepharoseによるアユ体表粘液のタンパク質の溶出パターンをFig.47に示した。アユ

Table 6. Hemagglutination activity of ayu skin mucus against erythrocytes of several species of animals

	Hemagglutination titer (1:)			
	8	16	32	64
Rabbit	+	+	-	-
Sheep	-	-	-	-
Guinea pig	-	-	-	-
Human	-	-	-	-
type A	-	-	-	-
type B	-	-	-	-
type O	-	-	-	-
type AB	-	-	-	-

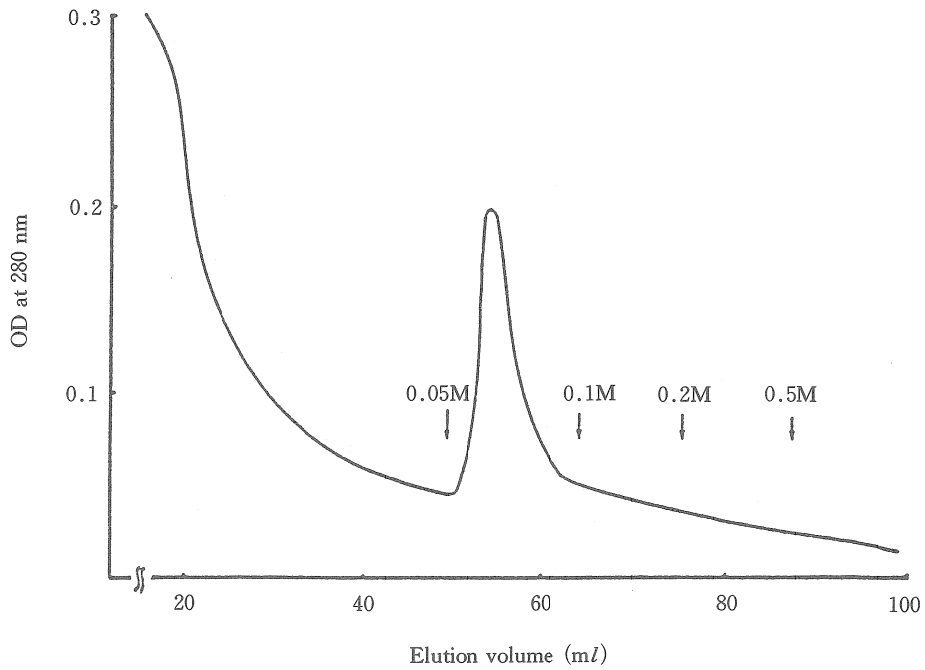


Fig. 47. Affinity column chromatography of the hemagglutinating fraction on ConA Sepharose. The homogenate of ayu skin mucus was dialyzed against 0.02 M Tris-HCl buffer containing 0.5M NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub> and 1mM MgCl<sub>2</sub> and applied to a ConA Sepharose column equilibrated with the same buffer. The column was washed with the buffer and hemagglutinating fraction was serially eluted with 0.05 M, 0.1 M and 0.5 M  $\alpha$ -methyl-D-mannoside in 0.02 M Tris-HCl buffer. The solid line represents the optical density at 280 nm.



体表粘液を ConA Sepharose に添加して、洗浄したのち、0.05M  $\alpha$ -methyl-D-mannoside を含む緩衝液で溶出したところ、55 ml 画分に大きなタンパク質のピークが溶出した。しかし、0.1M、0.2M および 0.5M の  $\alpha$ -methyl-D-mannoside ではタンパク質の溶出はみられなかった。アユ体表粘液の ConA Sepharose に吸着して 0.05M  $\alpha$ -methyl-D-mannoside で溶出した画分(吸着画分)と、ConA Sepharose に吸着しなかった画分(非吸着画分)のウサギ赤血球に対する赤血球凝集活性を調べた。非吸着画分については280 nm における吸光度が0.25以上の画分を、また吸

着画分については吸光度が0.08以上の画分をそれぞれ集めて、PBS に透析後赤血球凝集素価を測定したところ、前者で1:8、後者では1:16であった。

上記吸着画分をSephacryl S-300を用いてConA Sepharose 吸着画分を分画した結果を Fig. 48 に示した。タンパク質の主要なピークが2つみられ、凝集活性はいずれのピークにもみられたが、第1ピークの活性が第2ピークのそれよりもやや高かった。いずれの画分にも活性がみられた。各種糖類による赤血球凝集解離効果 アユ体表粘液によって生じたウサギ赤血球の凝集が各種糖類の添加によって解

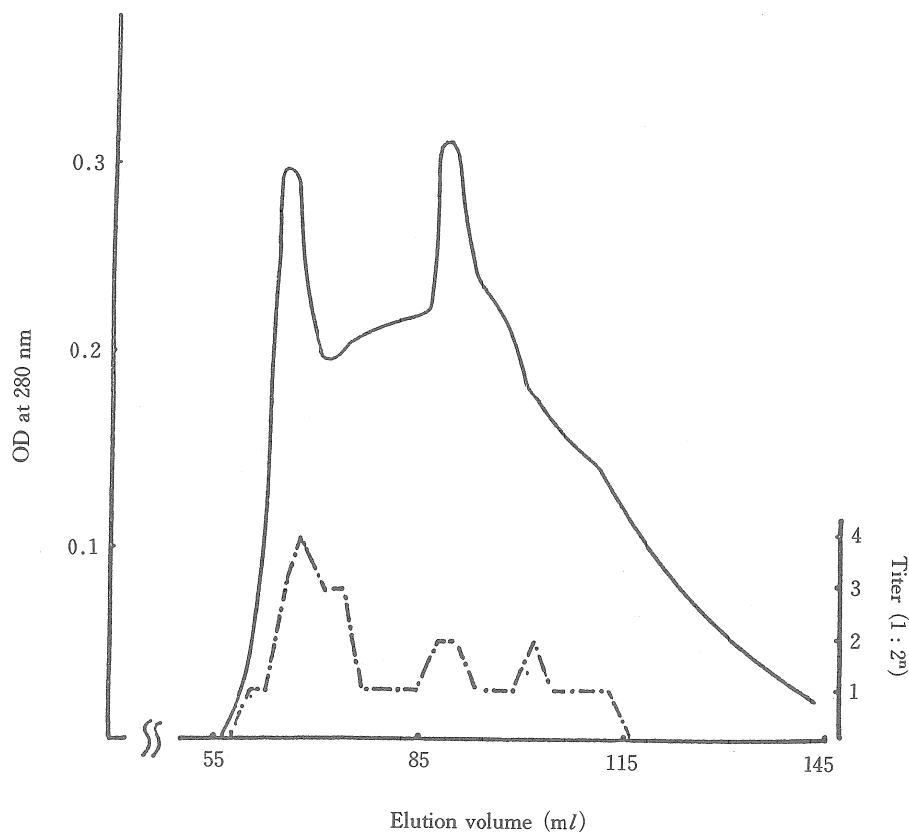


Fig. 48. Gel filtration of the hemagglutinating fraction on Sephacryl S-300. The fraction which was eluted with 0.05 M  $\alpha$ -methyl-D-mannoside from ConA Sepharose and pooled was applied to a Sephacryl S-300 column equilibrated with phosphate buffered saline (pH 7.4). Hemagglutinating fraction was eluted at flow rate of 0.5 ml/min. The solid line and broken line represent the optical density at 280 nm and hemagglutination titer, respectively.

離した結果を Table 7 に示した。アユ体表粘液による凝集素価は 1:80 であったが、D-ガラクトース、L-ラムノース、D-マンノースおよび D-フコースの添加によって凝集が解離して、凝集素価は 1:10 未満となった。また、D-フルクトースの添加によって凝集素価は 1:10 となったが、L-フコース、2-デオキシ-ガラクトース、N-アセチル-D-グルコサミンおよび N-アセチル-D-ガラクトサミンを添加した場合は凝集素価は 1:40~80 であり、無添加区とほとんど差異はみれなかった。

つぎに、アユ体表粘液の ConA Sepharose 吸着画分とウサギ赤血球との凝集が各種糖類の添加によって解離した結果を Table 8 に示した。ConA Sepharose 吸着画分のみによって生じた凝集素価は 1:160 であったが、これに D-ガラクトース、L-ラムノースおよび D-フコースを添加したところ 1:10 未満となり、D-マンノース、D-フルクトースおよび N-アセチル-D-グルコサミンでは 1:20 となった。L-フコース、2-デオキシ-ガラクトースおよび N-アセチル-D-ガラクトサミンの添加では凝集素価は無添加区と差異はみれなかった。

Sephacryl S-300 による画分によって生じたウサギ赤血球の凝集が各種糖類の添加によって解離した結果を Table 9 に示した。本試料による赤血球の凝集素価は 1:320 であったが、D-ガラクトース、L-ラムノースおよび D-フコースの添加によって凝集素価は 1:10 未満となった。D-マンノースの添加によって 1:40 および L-フコースでは 1:80 となった。D-フルクトース、2-デオキシ-ガラクトー

ス、N-アセチル-D-グルコサミンおよび N-アセチル-D-ガラクトサミンの添加では凝集素価は無添加区と差異は認められなかった。

**Table 8.** Dissociation of rabbit erythrocyte aggregate with selected monosaccharides. Erythrocyte aggregate was formed by the eluate from ConA Sepharose affinity column chromatography of ayu skin mucus homogenate.

monosaccharide	Titer (1:)
PBS	160
D-Galactose	<10
L-Rhamnose	<10
D-Mannose	20
L-Fucose	160
D-Fucose	<10
D-Fructose	20
2-deoxy-galactose	160
N-acetyl-D-glucosamine	20
N-acetyl-D-galactosamine	160

**Table 9.** Dissociation of rabbit erythrocyte aggregate with selected monosaccharides. Erythrocyte aggregate was formed by the eluate from ConA Sepharose S-300 column chromatography on which the active fraction of ConA Sepharose affinity column chromatography of ayu skin mucus homogenate was applied.

monosaccharide	Titer (1:)
PBS	320
D-Galactose	<10
L-Rhamnose	<10
D-Mannose	40
L-Fucose	80
D-Fucose	<10
D-Fructose	320
2-deoxy-galactose	320
N-acetyl-D-glucosamine	320
N-acetyl-D-galactosamine	320

**Table 7.** Dissociation rabbit erythrocyte aggregate formed by ayu skin mucus homogenate with selected monosaccharides

monosaccharide	Titer (1:)
PBS	80
D-Galactose	<10
L-Rhamnose	<10
D-Mannose	<10
L-Fucose	40
D-Fucose	<10
D-Fructose	10
2-deoxy-galactose	80
N-acetyl-D-glucosamine	40
N-acetyl-D-galactosamine	80

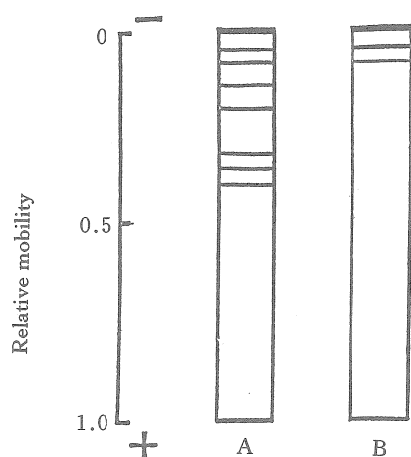


Fig. 49. Patterns of polyacrylamide gel electrophoresis with the eluate from ConA Sepharose (A) and the eluate from Sephacryl S-300 (B).

電気泳動法による解析 ConA Sepharose 溶出画分およびこの画分をさらに Sephacryl S-300 によって分画した最も活性の高い画分の PAGE による分析結果を Fig. 49 に示した。ConA Sepharose 溶出画分では 7 本のバンドが、また Sephacryl S-300 による画分では 2 本のバンドがそれぞれみられた。

#### 考 察

魚類の体表粘液に由来する赤血球凝集素に関する報告は少ないが、Di Conza (1970) は catfish (*Tachysurus australis*) からウサギ、ヒツジ、モルモットおよびヒト赤血球を凝集するタンパク質を、また Spitzer *et al.* (1976) は Pacific hagfish (*Eptatretus stout*) の体表粘液からヒト O 型 (Rh-) 赤血球を凝集するタンパク質をそれぞれ検出した。また、Kamiya and Shimizu (1980) は windowpane flounder (*Lophopsetta muculata*) からウサギおよびマウス赤血球を凝集するタンパク質を精製した。今回、アユ体表粘液から検出された赤血球凝集活性は catfish (*Tachysurus australis*) や windowpane flounder (*Lophopsetta muculata*) と同様にウサギ赤血球に対して強い凝集活性を示したが、ヒツジ、モルモットおよびヒト赤血球を凝集しなかった。

体表粘液中の赤血球凝集素は ConA Sepharose に吸着して 0.05M  $\alpha$ -methyl-D-mannoside で溶出する画分と、

ConA Sepharose に吸着しない画分に分けられた。一般に固定化したコンカナバリン A に吸着する糖タンパク質は 2 本側鎖の複合型糖鎖あるいは高マンノース型糖鎖をもつとされている (Ogata *et al.*: 1976, Kurusius *et al.*: 1976)。アユの体表粘液の ConA Sepharose 吸着画分は  $\alpha$ -methyl-D-mannoside で溶出することから、高マンノース型の糖鎖を含む糖タンパク質であろうと推察される。

ConA Sepharose 吸着画分は、D-ガラクトース、L-ラムノースおよび D-フコースに対しては強い親和性を示した。さらに、この画分を Sephacryl S-300 で分画した活性画分は、D-ガラクトース、L-ラムノースおよび D-フコースに対して強い親和性を示したが、D-マンノースおよび D-フルクトースに対する親和性は、ConA Sepharose 溶出画分のそれより低下した。とくに、D-フルクトースに対する親和性は体表粘液試料を ConA Sepharose で分画した場合にはほとんど低下しなかったものの、Sephacryl S-300 による分画へと精製がすすむに伴って顕著に親和性が低下した。体表粘液試料、ConA Sepharose 溶出画分および Sephacryl S-300 活性画分の赤血球凝集素はいずれも共通して D-ガラクトース、L-ラムノースおよび D-フコースに対して強い親和性を示したが、2-デオキシ-ガラクトースおよび N-アセチル-D-ガラクトサミンに対する親和性は認められなかった。体表粘液由来の赤血球凝集素における糖との親和性について詳細に検討した報告は少ないが、Kamiya and Shimizu (1980) は、windowpane flounder (*Lophopsetta muculata*) から精製された赤血球凝集素は N-acetylneuraminic acid で凝集を阻止されたが、D-マンノース、L-フコース、N-アセチル-D-グルコサミンおよび N-アセチル-D-ガラクトサミンでは凝集を阻止されないことを明らかにした。D-マンノースに対して、アユ体表粘液の部分精製赤血球凝集素は親和性を示したが、windowpane flounder (*Lophopsetta muculata*) では親和性を示さないことから、これらの赤血球凝集素の性状は異なるものと考えられる。

魚類の血清や卵由来の赤血球凝集素における糖との親和性についていくつかの報告がみられる。血清由来赤血球凝集素については、*Channa punctatus* (タイワンドジョウ属の 1 種) の血清中に、ヒト A および A B 型赤血球、ラット、マウスならびにモルモット赤血球に 2 価の陽イオンの存在下で強い凝集活性を示し、Gal ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) GalNAc に対する親和性が高いレクチンが存在するという Manihar and Das (1990) による報告、卵由来の赤血球凝集素については、ブラウンマス (brown trout; *Salmo trutta*) および Pacific

herring (ニシンの1種; *Clupea harengus*) の卵中に、ヒトB型赤血球を凝集し、L-ラムノースとD-ガラクトースに親和性を持つ凝集素が存在するという Anstee *et al.* (1973) の報告がある。このほか、black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) の卵中からヒトB型赤血球を凝集し、L-ラムノースと $\alpha$ -D-ガラクトシドによって凝集を阻害されるレクチン (Rogers: 1978) や、chinook salmon (マスノスケ; *Oncorhynchus tshawytscha*) の卵中からヒトB型赤血球およびウサギ赤血球に対して凝集活性を示し、L-ラムノースとD-ガラクトースによって凝集が阻止されるレクチン (Voss *et al.*: 1978)、chum salmon (サケ; *Oncorhynchus keta*) 卵からウサギ赤血球に対して凝集活性を示し、L-ラムノースによって凝集が阻止されるレクチン (Kamiya *et al.*: 1990)、アマゴ (*Oncorhynchus rhodurus*) の卵からウサギ、ラットおよびヒトB型赤血球を凝集し、L-ラムノース、D-ガラクトース、 $p$ -ニトロフェニル $\alpha$ -D-ガラクトシドおよびメリピオースによって凝集が阻止されるレクチン (Ozaki *et al.*: 1983) が知られている。これらの卵由来のレクチンはほとんどに共通してL-ラムノースとD-ガラクトースに対して親和性を持つことが特徴的である。今回、アユ体表粘液から部分精製された赤血球凝集素はD-ガラクトース、L-ラムノースおよびD-フコースに対して親和性を示したことから、上述の卵由来のレクチンとはD-ガラクトースとL-ラムノースの親和性において部分的に類似するものの、D-フコースに対するそれは異なる。このように、体表粘液由来赤血球凝集素は卵由来のそれとは、D-ガラクトースとL-ラムノースに対する親和性が共通することから、部分的に類似した構造を持つと考えられる。しかし、D-フコースに対する親和性は体表粘液にのみみられる性質であることから、本凝集素は卵由来とは異なり体表粘液に特有の構造を持っているのではないかと推察される。しかしながら、Sephacryl S-300で分画した活性画分の電気泳動分析によって2本のバンドが検出されたことから、これらが2種類の赤血球凝集素であるのか、あるいは1種類の赤血球凝集素のほかに不純物が混入しているのかは明らかではない。

一般に、レクチンは動物あるいは植物細胞を凝集するタンパク質あるいは糖タンパク質をいうが、その活性は単糖あるいはオリゴ糖によって阻害され、また2個以上の糖を結合させる部位をもつと定義されている (大沢: 1985)。今回アユの体表粘液から部分精製された赤血球凝集素はウサギ赤血球を凝集し、ConA Sepharose に吸着する高マンノース型の糖鎖を含む糖タンパク質で、D-ガラクトースな

ど3種類の単糖に特異的な親和性を示すことから、レクチンである可能性は高いと考えられる。本章で検出された赤血球凝集素のうち ConA Sepharose 吸着画分は、3.2で検出された *V. anguillarum* の LPS と高い親和性を持つ画分 (ConA Sepharose 吸着画分) と一致することから、本物質は Di Conza (1970) や Spitzer *et al.* (1976) が指摘しているように、*V. anguillarum* のような侵入しようとする寄生体を凝集する働きを持っているのではないかと推察される。今後、本赤血球凝集素を精製してレクチンであるかどうかを明らかにするとともに、生体防御因子としての機能についてさらに詳細に検討する必要がある。

## 摘 要

1. アユ体表粘液における赤血球凝集素の存在を明らかにするために、各種赤血球に対するアユ体表粘液の凝集活性を検討した。その結果、アユ体表粘液はウサギ赤血球を凝集するが、ヒツジ、モルモットおよびヒト赤血球を凝集しないことが明らかとなった。

2. 体表粘液の赤血球凝集活性は、ConA Sepharose に吸着する画分および非吸着画分の両方に認められた。ConA Sepharose 吸着画分をさらに Sephacryl S-300 でゲルろ過を行って、赤血球凝集活性を粗精製した。本画分は電気泳動では2本のバンドを形成した。本画分の赤血球凝集活性はD-ガラクトース、L-ラムノースおよびD-フコースに親和性を持つことが明らかとなった。

## 第7章 総 括

本研究は、アユの体表粘液における生体防御機構のうち、液性の特異的生体防御機構と非特異的生体防御機構について総合的に究明したものである。特異的生体防御機構については、ピブリオ病に対するワクチンの有効性とワクチン投与によって誘導される体表粘液中の抗体に基づく感染防御メカニズムおよび抗体の諸性状について解明した。また、非特異的生体防御機構については、体表粘液中のリゾチームおよび赤血球凝集素の存在とその性状を明らかにした。

第1章では、アユのピブリオ病の原因菌の性状と、ピブリオ病に対する治療対策ならびに予防対策の既往の研究について論述して、体表粘液における感染防御機構の重要性を指摘するとともに、それにもかかわらず魚類の体表粘液における感染防御機構についての研究が皆無に等しい現状

をふまえ、本研究着手の背景と経緯について述べた。

第2章では、アユのピブリオ病に対するワクチンの効果を適正に判定するための攻撃方法について検討したのち、ワクチンの有効性について調べた。その結果、*V. anguillarum*は塩分の存在下での病原性が高く、ワクチン効果の判定のための攻撃実験には2,000 ppmの塩水に供試菌を約 $10^6$  cells/mlとなるように入れ、これに供試魚を20分間通気しながら浸漬する方法が適当であることを明らかにした。この方法を用いて、アユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンの有効性について検討し、*V. anguillarum*の96時間培養菌液にホルマリンを0.5%となるように添加したホルマリン不活化ワクチンが極めて有効であること、その有効性は少なくとも噴霧後16週間は持続することを明らかにした。

第3章では、前章で有効性が明らかとなった噴霧法ワクチンにおける免疫抗原の侵入経路について検討した。まず、アユの体側にワクチンを噴霧した区と、鰓だけにワクチンを噴霧した区における攻撃後の生残率を比較した結果、両区とも全身噴霧区とワクチン無投与区との中間的な生残率を示したことから、噴霧法ワクチンによる免疫抗原の侵入経路は体表と鰓の両方であると推定した。つぎに、アユ体内への抗原侵入の最初の場となる体表粘液と抗原との親和性について検討を行った。すなわち、*V. anguillarum*由来のLPSでウサギ赤血球を凝集させたのち、これに段階希釈した体表粘液を添加して、体表粘液による凝集解離効果について検討した。その結果、*V. anguillarum*菌体はアユ体表粘液に対して高い親和性を示したことから、ワクチン投与によって抗原が体表粘液に付着・保持されたのち、粘膜層下のマクロファージなどによって取り込まれることによって、抗体産生が誘導されるものと推定した。

第4章では体表粘液における抗体の分泌機構を解明するために、体表粘液中の抗体の存在と体表粘液への抗体の移行経路を調べた。噴霧法ワクチン投与魚の体表粘液中の抗体価は対照区のそれよりも高かったが、血清中の抗体価には対照区のそれと差異がみられなかった。そこで、血清中の抗体が体表粘液中へ移行するかどうかを検討するために、噴霧法ワクチンで免疫したアユの血清を用いて正常アユを受動免疫したのち、人為感染実験を行って受動免疫効果を検討したところ、1時間後に攻撃した区では感染防御効果はみられなかったが、24時間後に攻撃したものでは明らかな防御効果がみられた。このことから、抗体が血液から体表粘液へ能動的に移行することが明らかとなり、そのためには24時間を必要とすることが解った。また、体表

粘液中の抗体と血清中の抗体の異同を検討するために、高度に免疫したアユの血清から抗体を精製し、これに対するウサギ抗血清を用いて噴霧法ワクチン投与魚の体表粘液および血清中の抗体を検出するとともに精製した。その結果、体表粘液中の抗体は血清中の凝集抗体と生化学的ならびに免疫学的にも同一であり、分子量は約90万で2-MEに対して感受性をもつIgMタイプの凝集抗体であることが明らかとなった。

第5章では、体表粘液における非特異的生体防御機構を明らかにするために、粘液中の溶菌物質について検討した。その結果、体表粘液中には*V. anguillarum*を溶菌するプロテアーゼ様の物質と*M. lysodeikticus*を溶菌するリゾチーム様の物質が存在し、これらが協同的に作用して、アユの棲息条件下で溶菌活性を示すことが明らかとなった。このうち、リゾチームについて精製を行い、等電点が9.4と9.8の2つのタイプが認められ、いずれも分子量が約18,000であったことから、アイソザイムと推定した。

第6章では、体表粘液中の赤血球凝集素について検討を行った。その結果、体表粘液中の赤血球凝集素はウサギ赤血球を凝集したが、ヒツジ、モルモットおよびヒト赤血球を凝集しなかった。赤血球凝集素は、コンカナバリンAに親和性をもつものと親和性を示さないものの2種類に分類された。コンカナバリンAに親和性を持つ赤血球凝集素はD-ガラクトース、L-ラムノースおよびD-フコースに対して親和性を示したことなどから、レクチン様物質であると推定した。

## 総合考察

### —— 生体防御機構についての一考察 ——

本研究によって、アユの体表粘液中にはワクチン投与によって誘導される抗体ならびに非特異生体防御因子としてのリゾチームとレクチン様物質の存在が明らかとなった。そこで、これらの物質が体表粘液において病原微生物の侵襲に対してどのように作用するかについて、物理的障壁と化学的障壁に分けて考察する。

環境水中の病原体が体表粘液と接触すると、体表粘液は物理的な障壁として生体防御の役割を果たす。すなわち、一般に魚類の体表粘液はシアル酸含有糖タンパク質で構成されているが(Asakawa: 1983)、この糖タンパク質は糖鎖が密に結合し、ランダムコイル状の構造をした領域を持っているため、長時間のアクチナーゼ処理によっても分解・

低分子化されることはない(Nakagawa *et al.*: 1988)。また、シアル酸の存在が糖分解酵素による分解を受けにくくしていることも報告されている。このことから、体表粘液は環境水中の病原微生物の産生する酵素に抵抗性を示し、粘液が物理的なバリアーとして生体防御能を示すと考えられる。また、この機能を助ける防御因子としては、レクチン様物質がある。非特異生体防御因子としてのレクチンは常に粘液中に存在して、侵襲する病原細菌を凝集し、これを粘液とともに、体外へ効率よく排出すると考えられる。このような粘液物質と病原菌との凝集物を排除する方式はヒトの呼吸道においても認められる(ミムス: 1977)。このようにして、まず体表粘液は粘液表面における難分解性の物理的障壁として、さらには、常に産生される粘液による表皮から環境水中への排除圧によって生体を防御している。

しかし、微生物にとって強固なバリアーである粘液も、網ずれや棘による刺傷などによって破綻し、真皮や筋肉層が露出して感染門戸となる場合がある。例えば、楠田(1965)はササノハベラの体表粘液を除去して海産魚の潰瘍病原菌 *Vibrio* sp. K-3 株を患部に塗布して発病させており、また Saito *et al.* (1964) はニジマスと同様に処置して *V. anguillarum* を感染させている。このような創傷に対しても、表皮は粘液を大量に産生して創傷部分の粘液層の修復と病原細菌の物理的排除を行うと同時に、化学的防御機構によって付着した微生物を排除すると考えられる。今回精製された抗体やリゾチームならびにレクチン様物質がこの化学的障壁の役割を果たすと考えられる。

まず、非特異的防御因子であるリゾチームやレクチンが侵入した病原菌に作用する。一般にリゾチームは溶菌活性を持つとされているが、これ以外の生理活性は明らかではなかった。しかし、近年、リゾチームがヒト多形核白血球(Klockars and Roberts: 1976)やマクロファージ(Thacore and Willet: 1966)の貪食活性を直接的に高めること、あるいはリゾチームによって感作された細菌はラットの肺胞マクロファージによって容易に貪食されること(Biggar and Sturgess: 1977)が証明されている。すなわち、リゾチームの生理活性としては溶菌活性以外に、食細胞との相互関係が生体防御に重要な意義を持つものと考えられる。これを魚類の体表粘液における生体防御機構にあてはめると、体表粘液へ侵入した細菌は、リゾチームによって感作され、表皮中に存在する好中球、好酸球および好塩基球などの顆粒球系の白血球(Cross and Matthews: 1991)やマクロファージ(Ourth: 1980)によって貪食されやすくなると同時に、これらの血球は走化性因子を産生して、より多くの

血球を患部に集める(Carpenter: 1975)。そして、細菌を貪食したマクロファージはリゾチームを多量に産生し(Bigger and Sturgess: 1977)、患部におけるマクロファージの集合と集合したマクロファージによるリゾチームの産生により、局所的に効率の良い防御機構を構築すると考えられる。

また、レクチンについては、それが結合した *E. coli* や *Salmonella typhimrium* は多形核白血球やマクロファージによって貪食されやすくなる現象(lectinophagocytosis)がヒトやマウスにおいて観察されている(Ofek and Sharon: 1988)。第3章で明らかにしたように、体表粘液中には *V. anguillarum* のLPSに強い親和性を示す物質が存在し、これがワクチン中の抗原を捕捉したのち、抗原認識と抗体産生へと導くと考えられる。この抗体産生の過程で、抗原はマクロファージによって貪食されるが、この場合抗原はLPS親和性物質と結合していると考えられるので、これが上述のlectinophagocytosisである可能性があり、魚類においてもその存在が示唆されたことは興味深い。このようなレクチンの作用をワクチン開発の点からみると、噴霧法や浸漬法ワクチンのように体表面からの抗原の取り込みによって抗体産生を誘導する場合には、抗原と粘液中のレクチンが結合し、この結合体がマクロファージによって貪食されるか否かがワクチンの投与効果の有無を決定するとも考えられる。魚類の疾病に対するワクチンの投与方法は、投与効果、労力、コストならびに魚に与えるストレスなどを考慮して浸漬法や噴霧法に依存せざるを得ないので、現在ワクチン開発の遅れている疾病については、その感染防御抗原の決定と同時に、抗原と体表粘液との親和性について検討する必要があると思われる。

特異防御因子である抗体については、上述した過程で細菌がマクロファージに取り込まれ、抗体産生細胞によって細菌に対する抗体が産生されて粘液中に分泌される。あるいは、噴霧法ワクチンによって投与された抗原が同様な過程を経て、抗体産生を誘導すると考えられる。産生された抗体は、再度侵入した病原細菌(抗原)と抗原抗体複合物を形成し、いわゆるオプソニンとして作用するために細菌は白血球に貪食されやすくなる。また、抗体は体表粘液中に存在する補体(Harrel *et al.*: 1976)との協同作用によって、抗原抗体複合物を殺菌することができる(Carpenter: 1975)。さらに、ヒトでは抗原抗体補体複合物にリゾチームが作用することによって、溶菌現象が起る(井上: 1984, Inoue: 1976)ことが知られており、魚類でも同様の活性が見られるのではないかと考えられる。このようにして、粘液中の

抗体はリゾチームや補体などの非特異防御因子と協同して殺菌あるいは溶菌作用を発揮しているものと推察される。

以上のように、これらの非特異的あるいは特異的液性防御因子は、液性因子間で相互に協同して作用するだけでな

く、表皮中の顆粒性白血球やマクロファージなどの細胞性の因子とも相互に関連し、複雑で精緻な防御機構を構築していると考えられる。

## Summary

### Defense Mechanism of Ayu Skin Mucus (*Plecoglossus altivelis*)

The external body surface of fish is covered with mucus, which is secreted from the goblet cell in the epidermis. The mucus mainly consists of glycoprotein containing a large amount of sialic acid. The functions of the mucus have been reported to be lubrication, osmoregulation, mechanical protection and chemical defense barrier. Thus, mucus on the body surface plays an important role for fish to survive in the water environment. The chemical defense barrier, particularly, is important as a first defense system to protect the fish from invasion of parasites in their habitat.

The purpose of this study is to elucidate the chemical factors in the body mucus of ayu, including immunoglobulin of the specific defense system, and lysozyme and hemagglutinin of the non-specific defense system. Spray vaccination, a newly developed method of spraying the vaccine solution onto the body surface of fish to vaccinate a large mass of fish, was demonstrated to be effective for controlling vibriosis of ayu. IgM type immunoglobulin was purified from the serum and the body mucus of immunized ayu. Lysozyme was purified and the hemagglutinin was partially purified from the skin mucus and then characterized.

Conditions of challenge procedure were determined for evaluating the vaccine efficacy by the challenge test. The challenge procedure was to immerse the ayu in a live cell suspension of *V. anguillarum* at a concentration of about  $10^6$  cells/ml of pond water containing 0.2% NaCl for 20 min with aeration. Using this water-borne challenge procedure, the suitable vaccine solution for spray vaccination was the formalin-killed culture of *V. anguillarum* that had been incubated for 96h at 25°C. The efficacy of this vaccine lasted for at least 16 weeks after vaccination.

The antigen uptake site of the body by spray vaccination was examined. Ayu that received the vaccine on the body surface of the trunk, on the gill or on the whole body surface were challenged by the water-borne route. Percent mortality of the fish that received the vaccine on the body surface of the trunk or on the gill were intermediate values between whole vaccinated fish and non-vaccinated fish. These results suggested that the antigen can be taken up at both the body surface of the trunk and the gill. But the first step for uptake of antigen was assumed that the antigen would be held in the mucus layer on the body surface and the gill by affinity to the mucus; otherwise the antigen would be washed away. To examine the affinity of the mucus for the antigen of *V. anguillarum*, the aggregated red blood cells of rabbits by lipopolysaccharide of *V. anguillarum* were dissociated by the addition of serial dilution of body mucus. These results suggested that LPS of *V. anguillarum* cells showed high affinity to the body mucus of ayu. Therefore, the antigen of the vaccine can be held in the mucus by its high affinity to *V. anguillarum* cells as the first step for uptake of the antigen.

Agglutinating antibody titers of serum and skin mucus were compared among fishes vaccinated by the spray, injection or oral administration technique. The antibody titer in the skin mucus of ayu vaccinated by the spray method was higher than that of the control, but no difference was observed in serum antibody titers between them. The passive immunization test was carried out using the serum of spray-vaccinated fish to reveal the possible secretory route of antigen from blood to body mucus. Passively immunized fish that received the spray-vaccinated fish serum by injection were artificially challenged at 1 h or 24 h after serum transfer. Efficacy of passive im-



munization was found in fish challenged 24 h after serum injection, but not found in the fish challenged 1 h after injection. These results suggested that a small amount of antibody, which was not detectable by the bacterial agglutination method in the serum of spray-vaccinated fish, was actively transferred in the skin mucus, and that the antibody was accumulated in the mucus within 24 h after passive immunization to provide protection for ayu against vibrio infection by the water-bone route. Agglutinating antibodies were purified from serum and skin mucus of the hyper-immunized ayu that were injected with vibrio cells emulsified with Freund's complete adjuvant. The molecular weights of the purified antibody of serum and mucus were about 900,000 and agglutinating activity was lost after treatment with 2-mercaptoethanol. Therefore, the antibody in the mucus was thought to be identical with that in the serum and both were IgM type antibodies with high molecular weights. Also, the antibody in the serum and mucus of spray-vaccinated fish was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The biochemical and immunological characteristics of the antibody in the mucus were demonstrated to be identical with that in the serum.

To clarify the non-specific defense system, the bacteriolytic activity was examined. The vibriolytic activity and the lysozyme activity were detected in the skin mucus of ayu. It was demonstrated that these activities worked together at the relatively low temperature (15°C) of the ayu habitat. Two types of lysozymes were purified from ayu mucus. The isoelectric points of each type were approximately 9.4 and 9.8, with both molecular weights being 18,000, and these were thought to be isozymes. Both lysozymes did not lyse vibrio cells.

Hemagglutinating activity was detected in the skin mucus of ayu. The hemagglutinin in the skin mucus agglutinated the rabbit erythrocytes but not the red blood cells of humans, sheep and guinea pigs. The hemagglutinin in the skin mucus was found to be of two types; one had affinity to concanavalin A (Con A) and the other did not. The hemagglutinin that had affinity to Con A also showed affinity to D-galactose, L-rhamnose and D-fucose.

From the results of this research, antibody, vibriolytic substance, lysozymes and hemagglutinin were found in the skin mucus of ayu. It is suggested that these factors can act together to protect the fish from invasion of pathogenic bacteria in the environment.

## 謝 辞

本研究をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った京都大学農学部教授 石田祐三郎先生に謹んで深謝の意を表します。

本研究の端緒を賜り、永年にわたって御懇切なる御指導と御鞭撻をいただいた恩師、高知大学農学部教授 楠田理一先生に衷心から感謝申し上げます。また、研究遂行に御支援と御鞭撻を賜った水産大学校増殖学科助教授 高橋幸則先生に深く感謝の意を表します。

研究遂行上、有益なる御助言を賜ったオレゴン州立大学教授 J. L. Fryer 先生、近畿大学教授 小林 博先生、水産大学校教授 武居 薫先生、京都大学農学部助教授 内田有恆先生、高知大学農学部助教授 川合研見先生、京都大学農学部講師 左子芳彦先生、ならびに水産大学校助手 満谷 淳先生に謹んで謝意を表します。また、研究遂行に多大の御便宜を賜った水産大学校増殖学科および製造学科の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- Amend, D. F. and D. C. Fender (1976): Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solutions: a model for vaccinating fish. *Science*, **192**, 793-794.
- Anstee, D. J., P. D. J. Holt, and G. I. Pardoe (1973): Agglutinins from fish ova defining blood groups B and P. *Vox Sang.*, **25**, 347-360.
- Antipa, R. and D. F. Amend (1977): Immunization of pacific salmon: comparison of intraperitoneal injection and hyperosmotic infiltration of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* bacterins. *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**, 203-208.
- 青木 宙・北尾忠利 (1978): アユのピブリオ病. 魚病研究, **13**, 19-24.
- Asakawa (1983): Structure of disaccharide from eel skin mucus glycoprotein and its linkage to protein moiety. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 1601-1606.
- 浅川牧夫 (1992): 魚類の体表面粘質物と生体防御—ウナギシアル酸含有糖タンパク質の機能. 化学と生物, **30**, 267-269.
- Biggur, W. D. and J. M. Sturgess (1977): Role of lysozyme in the microbicidal activity of rat alveolar macrophages. *Infect. Immun.*, **16**, 974-982.
- Boesman-Finkelstein, M. and R. A. Finkelstein (1982): Sequential purification of lactoferrin, lysozyme and secretory immunoglobulin A from human milk. *FEBS Lett.*, **144**, 1-5.
- Bradshaw, C. M., A. S. Richard, and M. M. Sigel (1971): IgM antibodies in fish mucus. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **136**, 1122-1124.
- Cameron, A. M. and R. Endean (1973): Epidermal secretions and the evolution of venom glands in fishes. *Toxicon*, **11**, 401-410.
- Carpenter, C. L. (1975): In vitro antigen-antibody reactions: cytotoxicity and neutralization, in "Immunology and serology", W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 226-266.
- Cisar, J. O. and J. L. Fryer (1974): Characterization of anti-*Aeromonas salmonicida* antibodies from coho salmon. *Infect. Immunity*, **9**, 236-243.
- Clem, L. W. (1971): Phylogeny of immunoglobulin structure and function. IV. Immunoglobulins of the giant grouper, *Epinephelus itaira*. *J. Biol. Chem.*, **246**, 9-15.
- Conssarini-Dunier, M. (1985): Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to titrate rainbow trout serum antibodies against two pathogens: *Yersinia ruckeri* and Egtvet virus. *Aquaculture*, **49**, 197-208.
- Creeth, J. M., J. L. Bridge, and J. R. Horton (1979): An interaction between lysozyme and mucus glycoproteins—implications for density gradient separations. *Biochem. J.*, **181**, 717-724.
- Cross, M. S. and R. A. Matthews (1991): Identification of a new granulocyte type in the skin of carp *Cyprinus carpio* (L.). *J. Fish Biol.*, **39**, 279-283.
- Croy, T. P. and D. F. Amend (1977): Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. *Aquaculture*, **12**, 317-325.
- Di Conza, J. J. (1970): Some characteristics of natural haemagglutinins found in serum and mucus of the catfish, *Tachysurus australis*. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, **48**, 515-523.
- Di Conza, J. J. and W. J. Halliday (1971): Relationship of catfish serum antibodies to immunoglobulin in mucus

- secretions. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 49, 517-519.
- Duff, D. C. B. (1942): The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *J. Immunol.*, 44, 87-94.
- Ellis, A. E. (1988): General principles of fish vaccination, in "Fish vaccination" (ed. by A. E. Ellis), Academic Press, London, pp. 1-19.
- Egidius, E. C. and K. Anderson (1979): Bath-immunization-a practical and non-stressing method of vaccinating sea-farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson against vibriosis. *J. Fish Dis.*, 2, 405-410.
- 江草周三 (1978): ビブリオ病, 「魚の感染症」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 101-127.
- Everhart, D. L. (1972): Antibody response of goldfish to a protein immunogen and to haptenic determinants. *Immunology*, 22, 503-507.
- 絵面好男・田島研一・吉水守・木村喬久 (1980): 魚類 *Vibrio* 属病原菌の分類学的ならびに血清学的検討. 魚病研究, 14, 167-179.
- Fänge, R., G. Lundblad, and J. Lind (1976): Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Mar. Biol.*, 36, 277-282.
- Fainaru, M., A. C. Wilson, and R. Arnon (1974): Correlation of structural differences on several bird lysozymes and their loop regions with immunological cross-reactivity. *J. Mol. Biol.*, 84, 635-640.
- Fletcher, T. C. and B. A. Baldo (1976): C-reactive protein-like precipitins in lump sucker (*Cyclopterus lumpus* L.) gamates. *Experientia*, 32, 1199-1201.
- Fletcher, T. C. and P. T. Grant (1969): Immunoglobulins in the serum and mucus of plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem. J.*, 115, 65.
- Fletcher, T. C. and A. White (1973a): Antibody production in plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture*, 1, 417-428.
- Fletcher, T. C. and A. White (1973b): Lysozyme activity in the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Experientia*, 29, 1283-1285.
- Fletcher, T. C. and A. White (1976): The lysozyme of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55B, 207-210.
- Fletcher, T. C., A. White, and B. A. Baldo (1977): C-reactive proteinlike precipitin and lysozyme in the lump-sucker *Cyclopterus lumpus* L. during the breeding season. *Comp. Biochem. Physiol.*, 57B, 353-357.
- Fryer, J. L., J. S. Rohovec, G. L. Tebbit, J. S. McMichael, and K. S. Pilcher (1964): Vaccination for control of infectious diseases in Pacific salmon. *Fish Pathol.*, 10, 155-164.
- 舟橋紀男・宮崎照雄・小寺和郎・窪田三郎 (1974): アユのビブリオ病の病理組織学的研究. 魚病研究, 3, 136-143.
- Glazer, A. N., A. O. Barel, J. B. Haward, and D. M. Brown (1969): Isolation and characterization of fig lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 244, 3583-3589.
- Grinde, B., J. Jolles, and P. Jolles (1988): Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Eur. J. Biochem.*, 173, 269-273.
- Gould, R. W. (1977): Development of a new vaccine delivery system for immunizing fish and investigation of the protective antigens in *Vibrio anguillarum*. Ph. D. thesis, Oregon State University. pp. 145.
- Gould, R. W., P. J. O'Leary, R. L. Garrison, J. S. Rohovec, and J. L. Fryer (1978): Spray vaccination: a method for the immunization of fish. *Fish Pathol.*, 13, 63-68.
- Gould, R. W., R. Antipa, and D. F. Amend (1979): Immersion vaccination of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) with two pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 36, 222-225.
- 萩田善一・中村正二郎 (1981): DISC 電気泳動法, 「電気泳動実験法」(電気泳動学会編), 文光堂, 東京, pp. 196-208.
- Hansen, N. E. (1974): Plasma lysozyme -a measure of neutrophil turnover. An analytical review. *Acta Haematol.*, 7, 7-87.
- Harrel, L. W., H. M. Etlinger, and H. O. Hodgins (1976): Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. II. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. *Aquaculture*, 7, 363-370.
- Haward, J. B. and A. N. Glazer (1969): Papaya lysozyme-terminal sequences and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.*, 244, 1399-1409.
- Herman, J. and J. Jolles (1970): The primary structure of

- duck egg-white lysozyme II. *Biochim. Biophys. Acta*, **200**, 178-179.
- Herman, J., J. Jolles, and P. Jolles (1971): Multiple forms of duck-egg-white lysozyme. *Eur. J. Biochem.*, **24**, 12-17.
- Hjelmeland, K., M. Christie, and J. Raa (1983): Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *J. Fish Biol.*, **23**, 13-22.
- 保科利一 (1962): ウナギの鱗赤病に関する研究. 東京水産大学特別研報, **6**, 1-104.
- 林 勝哉・井本泰治 (1974): リゾチームの構造, 「リゾチーム」, 南江堂, 東京, pp.31-102.
- Iida, T., H. Yonekura, M. Izumiyama and H. Wakabayashi (1991): Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of eel serum antibody. *Fish Pathol.*, **26**, 201-205.
- Ingram, G. A. (1980): Substances involved in the natural resistance of fish to infection-A review. *J. Fish Biol.*, **16**, 23-60.
- Inoue, K., Y. Akiyama, T. Kinoshita, Y. Higashi, and T. Amano (1976): Evidence for a one-hit theory in the immune bactericidal reaction and demonstration of a multi-hit response for hemolysis by streptolysin O and *Clostridium perfringens* theta-toxin. *Infect. Immun.*, **13**, 337-344.
- 井上公藏 (1984): 免疫殺菌反応の研究. 日誌, **36**, 833-848.
- Jakowska, J. (1963): Mucus secretion in fish-a note. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **106**, 458-462.
- Jolles, P. and J. Jolles (1984): What's new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.*, **63**, 165-189.
- Jung, A., A. E. Sippel, M. Grez, and G. Schutz (1980): Exons encode functional and structural units of chicken lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5759-5763.
- Kamiya, H., K. Muramoto, R. Goto, M. Sakai, and H. Ida (1990): Properties of a lectin in chum salmon ova. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1139-1144.
- Kamiya, H. and Y. Shimizu (1980): Marine biopolymers with cell specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, **622**, 171-178.
- 川合研児 (1985): アユのピブリオ病経口ワクチンに関する研究. 高知大学農学部紀要, **44**, 1-80.
- Kawai, K., R. Kusuda, and T. Itami (1981): Mechanism of protection in ayu orally vaccinated for vibriosis. *Fish Pathol.*, **15**, 257-262.
- Kitao, T., T. Aoki, M. Fukudome, K. Kawano, Y. Wada, and Y. Mizuno (1983): Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased fresh-water fish in Japan. *J. Fish Dis.*, **6**, 175-181.
- Klontz, G. W. and D. P. Anderson (1970): Oral immunization of salmonids: a review. in "A symposium on diseases of fishes and shellfishes special publication No. 5" (ed. by S. F. Snieszko), American Fisheries Soc., Washington, D. C., 16-20.
- Klockars, M. I. and P. Roberts (1976): Stimulation of phagocytosis by human lysozyme. *Acta Haematol.*, **55**, 289-292.
- Kondo, K., H. Fujino, and T. Amano (1982): Chemical and immunological properties and amino acid sequences of three lysozymes from peking-duck egg white. *J. Biochem.*, **91**, 571-587.
- Krantz, G. E., J. M. Reddecliff, and C. E. Heist (1964): Immune response of trout to *Aeromonas salmonicida* Part II. Evaluation of feeding techniques. *Prog. Fish-Cult.*, **26**, 65-69.
- Kurusius, T., J. Finne, and H. Rauvala (1976): The structural basis of the different affinities of two types of acid N-glycosidic glycopeptides for Concanavalin A-Sepharose. *FEBS Lett.*, **71**, 117-120.
- 楠田理一 (1965): 海産魚の潰瘍病に関する研究. 京都府水試業績, **25**, 1-116.
- 楠田理一 (1975): 魚類, 甲殻類の病原微生物 (1) バクテリア, 糸状菌, 原生動物, 「海洋の生態系と微生物」 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.85-96.
- 楠田理一・川合研児・城 泰彦・秋月友治・福永 稔・小竹子之助 (1978): アユのピブリオ病に対する経口ワクチンの効果について. 日水誌, **44**, 21-25.
- Kusuda, R., K. Kawai, and T. Itami (1980): Efficacy of bath-immunization against vibriosis in cultured ayu. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 1053 (1980).
- 楠田理一・川合研児・佐古 浩 (1981): 病魚から分離された *Vibrio* 属細菌の分類学的研究 - II. 血清学的性状による検討. 高知大学海洋生物教育センター研報, **3**, 89-95.
- 楠田理一・佐古 浩・川合研児 (1979): 病魚から分離され

- た *Vibrio* 属細菌の分類学的研究 - I. 形態学的, 生物学的ならびに生化学的性状による検討. 魚病研究, 13, 123-127.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Legler, D. W., E. E. Evans, and H. K. Dupree (1967): Comparative immunology: serum complement of freshwater fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 96, 237-242.
- Lobb, C. J. (1987): Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization. *Dev. Comp. Immunol.*, 11, 727-738.
- Lobb, C. J. and L. W. Clem (1981a): Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XI. Secretory immunoglobulins in the cutaneous mucus of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 5, 587-596.
- Lobb, C. J. and L. W. Clem (1981b): The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus, and bile. *J. Immunol.*, 127, 1525-1529.
- Louis-Cormier, E. A. St., C. K. Osterland, and P. D. Anderson (1984): Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Dev. Comp. Immunol.*, 8, 71-80.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Manihar, S. R. and H. R. Das (1990): Isolation and characterization of a new lectin from plasma of fish *Channa punctatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1036, 162-165.
- Marchalonis, J. J. (1969): Isolation and characterization of immunoglobulin-like proteins of the Australian lungfish (*Neoceratodus forsteri*). *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 47, 405-419.
- ミムス, C. A. (1977): 体内への微生物の侵入, 「感染症 - 感染と免疫のしくみ」(甲野禮作・水谷裕迪訳), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp. 8-36.
- 望月 篤・松宮政弘 (1981): 海産魚のリゾチーム分布. 日本水誌, 47, 1065-1068.
- 村地 孝: チオールプロテアーゼの活性部位, 「蛋白分解酵素と生体防御」(村地 孝, 浅田敏雄, 藤井節郎編), 学会出版センター, 東京, 1990, pp. 253-270.
- 室賀清邦 (1983): ピブリオ病, 「魚病学」(江草周三編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 62-72.
- Muroga, K. and S. Egusa (1967): *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of ayu in Lake Hamana. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 33, 636-640.
- 室賀清邦・江草周三 (1970): 淡水養殖アユ病魚から分離された *Vibrio anguillarum* について. 魚病研究, 5, 16-20.
- Muroga, K. and M. C. De La Cruz (1987): Fate and location of *Vibrio anguillarum* in tissue of artificially infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish Pathol.*, 22, 99-103.
- 室賀清邦・西淵光昭・城 泰彦 (1976): 養殖ウナギから分離された病原性 *Vibrio*-II. 生理学的性状および病原性. 魚病研究, 11, 147-151.
- 室賀清邦・属 博夫・杉山瑛之・田原恒男・城 泰彦 (1974): 1973年春から夏にかけて徳島および岡山県下に流行したアユのピブリオ病の原因菌について. 魚病研究, 8, 147-151.
- Murray, C. K. and T. C. Fletcher (1976): The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice *Pleuronectes platessa* L. tissues. *J. Fish Biol.*, 9, 329-334.
- 名倉 宏 (1987): 腸管粘膜における生体防御のしくみ - 局所免疫機構の役割. 化学と生物, 25, 566-574.
- Nakagawa, H. N. Enomoto, and M. Asakawa (1987): Occurrence of glycosidases and enzymatic properties of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases in the external mucous materials of various fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1039-1045.
- 中島基寛・近畑裕郎 (1979): アユのピブリオ病に対するワクチン経口投与と高張浸漬法の効果. 魚病研究, 14, 9-13.
- 名取俊二 (1992): 発生と生体防御, 「無脊椎動物の生体防御」(名取俊二, 野本亀久雄, 古田恵美子, 村松 繁, (財)水産無脊椎動物研究所編), 学会出版センター, 東京, pp. 27-40.
- Nelson, J. S., J. S. Rohovec, and J. L. Fryer (1985): Tissue location of vibrio bacterin delivered by intraperitoneal injection, immersion and oral route to *Salmo gairdneri*. *Fish Pathol.*, 19, 263-269.
- 落合 明 (1987): 皮膚系, 「魚類解剖学」(落合 明編), 東京, 緑書房, pp. 7-21.
- Ofek, I., D. Mirelman, and N. Sharon (1977): Adherence

- of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*, 265, 623-625.
- Ofek, I. and N. Sharon (1988): Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugar and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.*, 56, 539-547.
- Ogata, S., T. Muramatsu, and A. Kobata (1975): Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography on Concanavalin A-Sepharose. *J. Biochem.*, 78, 687-696.
- 大沢利昭 (1985): 総論, 「レクチンと細胞生物学」(大沢利昭編), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp.1-15.
- Ourth, D. D. (1980): Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 4, 65-74.
- Ozaki, H., M. Ohwaki, and T. Fukada (1983): Studies on lectin of amago (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev. Comp. Immunol.*, 7, 77-87.
- Pollara, B., A. Suran, J. Finstad, and R. A. Good (1968): N-terminal amino acid sequences of immunoglobulin chains in *Polydon spathula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 59, 1307-1312.
- Ramos, F. and A. C. Smith (1978): The C-reactive protein (CRP) test for the detection of early disease in fishes. *Aquaculture*, 14, 261-266.
- Roberts, R. J. (1980): 硬骨魚の解剖学と生理学, 「魚病学」(佐野徳夫訳), 文永堂, 東京, pp.31-37.
- Roitt, I. R., J. Brostoff, and D. Male (1987): 免疫の進化, 「免疫学イラストレイテッド」(木村一郎訳, 多田富雄監訳), 南江堂, 東京, pp.165-176.
- Rogers, D. J. (1978): Lectin-type agglutinins, with anti-BI and anti-HI activity, from the ova of the black seabream, *Spondyliosoma cantharus*. *Med. Lab. Sci.*, 35, 239-245.
- Rohovec, J. S., R. L. Garrison, and J. L. Fryer (1975): Immunization of fish for control of vibriosis. Proceedings of the Third US-Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo Japan. Spec. Publ. Fish. Agency Jpn. Sea Reg. Fish. Res. Lab., Niigata, 102-112.
- Ross, A. J. and G. W. Klontz (1965): Oral immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against an etiological agent "redmouth disease". *J. Fish. Res. Board Can.*, 22, 713-719.
- Saito, Y., M. Otsuru, T. Furukawa, K. Kanda, and A. Sato (1964): Studies on an infectious disease of rainbow trout. *Acta Medica et Biologica*, 11, 267-295.
- 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. (1981): Spontaneous and antibody-dependent hemolysis activities of fish sera and inapplicability of mammalian complements to the immune hemolysis reaction of fishes. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47, 979-991.
- Sankaran, K. and S. Gurnani (1972): On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 9, 162-165.
- Schaperclaus, W. (1972): Oral und parenterale aktive immunisierung von karphen gegen *Aeromonas punctata*. *Arch. exp. Vet.*, 26, 863-874.
- Shelton, E. and M. Smith (1970): The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) immunoglobulin: A tetrameric macroglobulin. *J. Mol. Biol.*, 54, 615-617.
- Simpson, R. J. and F. J. Morgan (1982): Complete amino acid sequence of embden goose (*Anser anser*) egg-white lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 744, 349-351.
- Spence, K. D., J. L. Fryer, and K. S. Pilcher (1965): Active and passive immunization of certain salmonid fishes against *Aeromonas salmonicida*. *Can. J. Microbiol.*, 11, 397-405.
- Spitzer, R.H., S. W. Downing, E. A. Koch, and M. A. Kaplan (1976): Hemagglutinins in the mucus of Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 54B, 409-411.
- Staub, A. M. (1967): Cell wall antigen from Gram-negative bacteria, in "Methods in immunology and immunochemistry I" (ed. by C. A. Williams and M. W. Chase), Academic Press, New York, pp.28-33.
- Suzuki, Y. (1985): Hemolysin and hemagglutinin in skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51, 2083.
- Thacore, H. and H. P. Willet (1966): The formation of spheroplasts of *Mycobacterium tuberculosis* in tissue culture cells. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 93, 786-790.
- Thuvander, A., T. Hongslo, E. Jansson, and B. Sundquist

- (1987) : Duration of protective immunity and antibody titers measured by ELISA after vaccination of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis. *J. Fish Dis.*, 10, 479-486.
- 高橋幸則・藤野博文(1984) : コイの体表, 皮膚, 鰓および腸管における飼育条件別の付着・増殖細菌数. 日水誌, 50, 735-742.
- 高橋幸則・伊丹利明・古根川紀潮(1986a) : コイの体表粘液から分離したリゾチーム様酵素の性状. 日水誌, 52, 1209-1214.
- 高橋幸則・伊丹利明・古根川紀潮(1986b) : コイの体表粘液ならびに腸管に分布する溶菌性物質の性状. 魚病研究, 21, 187-191.
- 高橋幸則・梶脇利彦・伊丹利明・岡本隆義(1987) : プリの体表粘液における溶菌性物質の性状. 日水誌, 53, 425-431.
- 鶴 大典(1977) : 溶菌酵素研究の歴史と現状, 「溶菌酵素」(船津 勝, 鶴 大典編), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp. 1-13.
- Vladimirov, V. L. (1968) : Immunity in fish. *Bull. Off. int. Epizoot.*, 69, 1365-1372.
- Voss, E. W., J. L. Fryer, and G. M. Banowitz (1978) : Isolation, purification, and partial characterization of a lectin from chinook salmon ova. *Arch. Biochem. Biophys.*, 186, 25-34.
- Waterstrat, P., J. Ainsworth, and G. Capley (1989) : Use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) antibodies to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Fish Dis.*, 12, 87-94.
- Westphal, O. and K. Jann (1965) : Bacterial lipopolysaccharids, in "Method in carbohydrate chemistry vol. V" (ed. by R. L. Whistler, J. N. Bemiller and M. L. Wolfrom), Academic Press, New York, 83-91.
- 山本一夫(1985) : レクチンと糖タンパク質糖鎖の相互作用, 「レクチンと細胞生物学」(大沢利昭編), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp. 96-112.
- 山崎信行(1983) : 動植物起源の溶菌酵素, 「溶菌酵素」(船津 勝, 鶴 大典), 講談社, 東京, pp. 34-70.
- 安永統男(1972) : スレに起因する種苗用マダイの細菌性疾患の一原因菌と薬浴の効果. 魚病研究, 7, 67-71.
- 横手元義(1982) : 皮膚, 「魚類組織図説—正常組織と病理組織」(日比谷 京編), 講談社, 東京, pp. 8-15.