

魚類好中球の酸素依存性殺菌活性に関する研究

伊藤 琢也

1998

魚類好中球の酸素依存性殺菌活性に関する研究

Studies on the oxygen-dependent bactericidal activity of fish neutrophils

- (1) 魚類好中球の分離
- (2) 魚類好中球の培養
- (3) 魚類好中球のスーパーオキシド産生量の測定
- (4) 魚類好中球の酸素依存性殺菌活性の測定
- (5) 魚類好中球の過酸化水素産生量の測定

- (1) 阻害剤 (PMA) の最適濃度
- (2) スーパーオキシド産生能に及ぼす阻害剤の影響
- (3) スーパーオキシド産生能
- (4) 阻害剤の影響
- (5) 過酸化水素産生能

鹿児島大学大学院連合農学研究科

伊藤琢也

1998

目次

第一章 序論	1
第二章 ウナギ好中球の活性酸素産生動態	6
1. 材料および方法	7
(1)実験魚	
(2)異物接種によるウナギ好中球の誘導	
(3)採血	
(4)ウナギ好中球の分離	
(5)ウナギ好中球の刺激剤	
(6)ウナギ好中球のスーパーオキシド産生量の測定	
(7)ウナギ好中球の酸素消費量の測定	
(8)ウナギ好中球の過酸化水素産生量の測定	
2. 結果	11
(1)刺激剤 (PMA) の最適濃度	
(2)スーパーオキシド産生動態と消去酵素の影響	
(3)スーパーオキシド産生量	
(4)酸素消費量	
(5)過酸化水素産生量	
3. 考察	13
第三章 ウナギ好中球の産生する活性酸素による殺菌	32
1. 材料および方法	33
(1)実験魚およびウナギ好中球の分離	
(2)オプソニンとしての正常血清の調製	

(3)使用菌株	
(4)ウナギ好中球による殺菌活性の測定	
(5)活性酸素消去剤	
(6)食胞形成阻害剤 (サイトカラシン B)	
(7)サイトカラシン B 処理ウナギ好中球でのスーパーオキシド 産生の測定	
(8)過酸化水素による殺菌	
2. 結果	36
(1)最適血清濃度の検討	
(2)各菌種に対するウナギ好中球による殺菌活性	
(3)ウナギ好中球による殺菌に対する各種活性酸素消去剤の影 響	
(4)サイトカラシン B によるウナギ好中球の食胞形成阻害	
(5)殺菌におけるサイトカラシン B の影響	
(6)ウナギ好中球のスーパーオキシド産生に対するサイトカラ シン B の影響	
(7)過酸化水素による殺菌	
3. 考察	39
第四章 魚類好中球における NADPH 酸化酵素の証明	75
1. 材料および方法	76
(1)好中球の分離	
[シトクロム b-558 大サブユニットに対する抗体の作製]	
(2)抗原の調製	
(3)ウサギへの免疫	
(4)ELISA による抗体価の測定	
(5)抗血清の調製	

(6)抗シトクロム <i>b</i> -558 抗体の精製	
[魚類好中球におけるシトクロム <i>b</i> -558 の検出]	
(7)ドットブロット法	
(8)SDS-PAGE のための好中球試料作製	
(9)好中球の SDS-PAGE	
(10)ウェスタンブロット法	
(11)蛍光抗体法	
2. 結果	84
(1)免疫したウサギの血中抗体価	
(2)ドットブロット法によるシトクロム <i>b</i> -558 の検出	
(3)ウナギ好中球の SDS-PAGE	
(4)ウェスタンブロット法によるシトクロム <i>b</i> -558 の検出	
(5)蛍光抗体法によるシトクロム <i>b</i> -558 の検出	
3. 考察	86
第五章 総合考察	100
要約	105
謝辞	107
参考文献	108

第一章 序論

魚類防疫に関する研究は、数少ない天然魚の疾病を例外として主に水産養殖業の発達と共に進展してきたと言える。すなわち、養殖業における生産量の増加、技術革新による養殖形態の変化、対象魚種の多様化に伴い、数多くの魚病問題が発生し、その結果として魚病学、魚類防疫学などの学問分野に非常に多くの知見が集積されてきた。しかしながら、魚病研究の進展にも拘らず、現在の養殖現場においては甚大な被害をもたらす疾病が依然として存在し、新たな魚病も数多く発生している。この問題の要因として、一般的に養殖魚の飼育環境を、外部からの病原体の侵入防止を含め、好適条件で維持することが困難であること、魚病対策の研究において原因となる病原体のみが重要視され、魚類の持つ生体防御機構についての研究が十分なされていないことが考えられる。

魚病は環境、病原体、宿主の3要素の組み合わせが成立する(Wedemeyer, 1996)ため、3要素の内いずれか一つでも除去あるいは改善すれば病気発生の防止につながると考えられる。現在、養殖生産の多くを占める海面養殖は半ば自然環境に依存した形態であるため、現場における徹底した環境管理や病原体の完全な駆逐は現実的とは言えない。そこで宿主要素の改善、すなわち宿主の持つ生体防御能を利用して疾病を減らそうという試みが注目されてきている。その典型はワクチネーションであり、生体の持つ特異的防御機構を利用したものである。しかし水産用ワクチンは現在、本邦のものでアユ、サケ科魚類のビブリオ病、ブリの α 溶血性連鎖球菌症に対する不活化ワクチン3種のみで(*1 水産庁, 1997)、世界でもせつそう病、ビブリオ病、レッドマウス病、冷水性ビブリオ病及びコイの春ウイルス血症に対するワクチンが市販されているのみ(Evelyn, 1997)と少ない。甚大な被害をもたらす伝染性造血器壊死症、伝染性膀胱壊死症、ウイルス性出血性敗血症などの治療困難なウイルス性疾病の予防に有効なワクチンとしてリコンビナントワクチン(Leong *et al.*, 1997)、弱毒生ワクチン(Evelyn, 1997)等の開発が精力的に試みられているが、魚類でのワクチネーションによる疾病予防の本格的な普及には、ワクチン

による感染防御成立機序、各病原体の発病病理の解明、効果的な免疫応答を誘導する感染防御抗原の検索など多くの課題が残されており、効果的かつ実用可能なワクチンの開発に至っていないのが現状である。

魚類の生体防御機構では防御に関与する基本的な要素を持つということは哺乳類と変わらないものの、レクチンなどの体表粘液にみられる防御因子(Ingram, 1980)や非常に高い補体の代替経路活性(矢野, 1995)の存在など、哺乳類にはない特徴を非特異的防御機構の中に兼ね備えていることが知られている。これらのことは、特異的防御機構の中心となる抗体産生における二次応答が哺乳類に比べ弱い(矢野, 1995)こととあいまって、魚類の生体防御のうち非特異的防御機構の果たす役割が大きい可能性を示唆している。魚病で問題となっている病原体は、魚体や環境水中に普遍的に存在し、魚自身の生体防御能の低下や環境条件の悪化によって病気を引き起こすいわゆる条件性病原体の範疇にあてはまるものが多く(室賀, 1996)、このような常在性の病原体に対しては成立に時間のかかる抗体依存性の特異的防御よりも外界からの病原体の侵入により早く反応できる非特異的機構による防御が有利であると考えられる。さらに、従来偏性病原体として考えられていたブリ類結節症の原因菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Pasteurella piscicida*)でさえ、最近 PCR 法によって養殖環境水中から検出されており(*2 川上, 1996)、このような偏性病原体に対処するには魚体の防御能を通常のレベルより高めておく必要があると考えられる。この非特異的防御能を高めて病気を予防しようという目的で最近、養殖の現場で使用され始めているものが免疫賦活剤と呼ばれ、それには細菌、カビ、キノコ類、酵母、海藻等を由来とする種々の多糖類(Yano *et al.*, 1989; Dexiang and Ainsworth, 1992; Dalmo and Seljelid, 1995; Itami *et al.*, 1996)、放線菌由来のペプチド(Kitao and Yoshida, 1986)、ラクトフェリン(Sakai *et al.*, 1993)、レバミゾール(Kajita *et al.*, 1990)など多種多様な物質が含まれる。免疫賦活剤の作用は特異的免疫成立以前の非特異的生体防御能の活性化が主たるものであり、補体、lysozyme 活性の上昇(Yano *et al.*, 1989)や、貪食能、活性酸素、サイトカイン産生能の増強(Robertsen *et al.*, 1990; Dexiang and Ainsworth, 1992)が数多く報告され

ている。しかしながら、魚類免疫学においては、このような免疫賦活剤の生体防御に与える影響といった実学に即した研究が先行し、その応用を支える基礎的な知見が不足しがちである。実際、魚類の非特異的生体防御機構で中心となる好中球は初期感染防御の局面で外来微生物の貪食、不活化（殺菌）、消化といった非常に重要な役割を果たしていることが広く認識されているにもかかわらず、それらの作用機序については深く研究されてはいない。

好中球を代表とする貪食細胞が行う殺菌には活性酸素が関連する酸素依存性機構とリゾチーム、ラクトフェリン、塩基性ペプチド、各種加水分解酵素、および貪食細胞内の pH の低下 (Edwards, 1994) などの酸素非依存性機構とに大別される。貪食は正常に行うが殺菌ができない好中球を持つために感染を繰り返すヒトの遺伝性疾患である慢性肉芽腫症により、好中球の殺菌において酸素依存性機構が重要な役割を果たすことが窺い知れる (Quie *et al.*, 1967)。すなわち、正常な好中球では細菌を貪食する際に急激な酸素消費 (respiratory burst) が見られるのに対し、この患者の好中球ではそれが観察されない (Holmes *et al.*, 1967)。この現象から好中球による殺菌には respiratory burst が深く関与しており、その後 respiratory burst の結果として産生される活性酸素が殺菌の主要因子であることが明らかとなった (Babior, 1984)。哺乳類貪食細胞での研究によって respiratory burst で消費された酸素分子は細胞膜に存在する NADPH 酸化酵素により、一電子を供与された結果、スーパーオキシド (O_2^-) に変換されることが明らかとなった (Makino *et al.*, 1986)。この第一の活性酸素から不均化反応によって過酸化水素が産生され、以後様々な活性酸素種が派生し (Babior, 1984)、貪食細胞の産生するこれら活性酸素によって殺菌が行われることも実験的に確かめられている (Johnston *et al.*, 1975)。活性酸素を産生する NADPH 酸化酵素は、その機能が完全に解明されているわけではないが、ヒト好中球を中心とした研究から細胞膜に存在する膜因子と細胞質中に存在する細胞質因子から構成され、貪食などの膜刺激によって活性化されることが判明し (Rossi, 1986)、無細胞系による実験などからその活性化機構の研究も進んでいる (Bromberg and Pick, 1985; 竹重, 1990)。

魚類貪食細胞における活性酸素産生を測定した報告は、化学発光法を用いたアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) 白血球 (Scott and Klesius, 1981) を初めとして、現在まで数多くの魚種で報告されてきている (Secombes and Fletcher, 1992)。そして Nagerkerke *et al.* (1990) により、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) 頭腎由来マクロファージで、さらにウナギ (*Anguilla japonica*) の好中球においても respiratory burst が示され (Iida and Wakabayashi, 1995)、その活性は哺乳類の NADPH 酸化酵素でみられるのと同様に Mg^{2+} で増強され、 Ca^{2+} によって抑制されることが明らかにされた (Iida and Wakabayashi, 1995)。このように、魚類貪食細胞においても NADPH 酸化酵素の存在が指摘されてきた。

前述したように魚類の生体防御の内、非特異的防御機構は感染防御にとって重要であり、そのなかでも特に好中球は、初期防御で中心的役割を果たす因子である。魚類好中球の血液中白血球組成における比率は、10%以下のコイ (*Cyprinus carpio*)、ニジマス、15~35%のウナギ、ブリ (*Seriola quinquerodiata*)、80%以上のヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) などと魚種によって異なり、核の形態も桿状から哺乳類と同様に分葉核を持つ魚種まで様々である (池田ら, 1988)。この多様性ゆえに魚類好中球に関する研究は統一的な見解を得ることが難しく、未解明な部分が多く残されている。好中球の機能を解析するには *in vitro* での実験系が重要であるが、その実験に供するために、質的、量的に満足しうる好中球を収集できる分離法は各魚種ごとに異なり (Mainwaring and Rowley, 1985; Finco-Kent and Thune, 1987; McDowall *et al.*, 1987)、報告されているものは少ない。しかしながら、ウナギにおいては高い活性を維持した好中球を血液中から比較的高純度で収集できる分離法が長村・若林 (1985) により確立されている。この方法で分離されたウナギ好中球を用いることにより、細胞内グリコーゲンが貪食のエネルギー源として使われ (朴・若林, 1990)、細菌感染によりその含量が変化すること (Nagamura and Wakabayashi, 1985)、グリコーゲン含量の低い頭腎好中球では末梢血好中球より貪食能が低いこと (Park and Wakabayashi, 1992) 等、魚類好中球におけるグリコーゲンと貪食作用の関係が明らかにされた。活性酸素産生に関しても前述の respiratory burst

の存在をはじめ、血清中のオプソニンの存在、刺激剤としての菌種、菌量が活性酸素産生に大きく影響すること (Moritomo *et al.*, 1988) 等が報告されている。このようにウナギ好中球の持つ生体防御機構に関する研究が多くなされており、魚類において重要な生体防御因子である好中球の機能に関する知見が集積しつつある。そこで筆者は、魚類好中球において主要な生体防御機構であると考えられる活性酸素による酸素依存性殺菌活性に着目し、そのメカニズムを探るべく、ウナギ好中球を使用し、活性酸素の量的動態、殺菌活性および産生酵素系についての研究を行った。

*1 水産庁 (1997): 養殖業者の皆様へ 水産用の医薬品の使用について 第12報.

*2 川上秀昌 (1996): 類結節症の感染・発病条件に関する研究 ブリ類結節ワクチンの開発研究 PCR法を用いての *Pasteurella piscicida* の検出、魚病対策技術開発研究成果報告書, 日本水産資源保護協会, 46-50.

第二章 ウナギ好中球の活性酸素産生動態

哺乳類での研究から、好中球が respiratory burst において最初に産生する活性酸素はスーパーオキシド(O_2^-)であり、そのスーパーオキシドは respiratory burst 時に消費された酸素分子(O_2)すべてが NADPH 酸化酵素により一電子を供与された結果の産物であること、そのため酸素消費とスーパーオキシド産生との量比は 1:1 であることが証明されている (Makino *et al.*, 1986)。さらに活性酸素種に属する過酸化水素はすべてが respiratory burst 時に産生されたスーパーオキシドから不均化反応($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$)によって生じることも知られており (Rossi *et al.*, 1986)、respiratory burst での好中球における酸素代謝動態は酸素消費量 : スーパーオキシド産生量 : 過酸化水素産生量 = 2:2:1 という量比になることが証明されている。

魚類貪食細胞でも活性酸素は殺菌因子として以前より注目され (Scott and Klesius, 1981)、特にスーパーオキシド産生はいくつかの種において報告されているが (Chung and Secombes, 1988; Secombes *et al.*, 1988; Dexiang and Ainsworth, 1991)、それらは定性的な測定や、測定時間が非常に長いものであるため定量性に乏しく、respiratory burst における酸素消費とスーパーオキシド産生の量的な比較検討は全くなされていない。魚類においても貪食細胞が産生するスーパーオキシドが NADPH 酸化酵素によって消費された酸素分子に由来するならば、哺乳類での知見と同様に respiratory burst での酸素消費量とスーパーオキシド産生量は等しくなることが予想される。このような仮説のもと、比較的高純度の好中球が得られる分離法が確立されているウナギを用い、respiratory burst におけるスーパーオキシド産生の動態および最適条件を検討し、その定量を行った。スーパーオキシド産生量測定で得られた条件をもとに、続いて respiratory burst での好中球の酸素消費量および過酸化水素産生量を測定し、それらの量比について検討した。

スーパーオキシドの測定には nitroblue tetrazolium (NBT)還元法、シトクロム C 還元法、化学発光法、ESR 法等があり、簡便さ、検出感度

の点でそれぞれに長所があるが、今回はその中でも定量的測定が可能であり、汎用されているシトクロム C 還元法を利用した。酸素消費量は広く用いられている酸素電極を用いた方法によって測定し、過酸化水素産生量の測定には高感度の検出方法であるスコポレチン蛍光法を利用した。

また、Nagamura and Wakabayashi (1985)によって異物を腹腔内接種されたウナギから分離された好中球（誘導好中球）のグリコーゲン含量は通常的好中球よりも有意に高いことが報告されており、そのような好中球においては活性酸素産生能にも変化が予測されるため、誘導好中球と非誘導好中球の酸素消費、スーパーオキシドおよび過酸化水素産生についてもそれぞれ比較した。

1. 材料および方法

(1) 実験魚

実験には宮崎県宮崎郡佐土原養鰻漁業協同組合から購入した平均体重 200g のウナギを使用した。購入後、感染症予防の目的で 1% 塩水浴を 24 時間行った後、淡水に戻した。ウナギは水温 25~28℃、無給餌で飼育し、好中球分離は購入後 1 週間以内に行った。

(2) 異物接種によるウナギ好中球の誘導

誘導好中球を得るため、長村・若林 (1985) および Moritomo *et al.* (1988)の方法を用いて、採血 15~18 時間前に *Escherichia coli* IAM 1239 ホルマリン死菌溶液 (湿菌重量 10mg/ml)、2% カゼイン、それぞれ 0.1ml/尾をウナギ腹腔内に接種した。なお、2% カゼインは 20g のカゼイン (和光純薬) と 8.2g の NaCl を 950ml の蒸留水に加え、室温で攪拌し pH を 8~9 に保ちながら 1N NaOH を 15ml 滴下、さらに 2 時間攪拌後、pH 7.3~7.4 に調整し蒸留水で 1000ml にメスアップし、オートクレーブしたものをを用いた。

(3)採血

ホルマリン死菌、2%カゼイン接種および無接種ウナギを1.5%ウレタンに浸漬して麻酔し、胸部を切開し露出させた動脈球から少量のヘパリンNaが入った注射筒で採血した。採血後、直ちに混和し、分離操作に移った。

(4)ウナギ好中球の分離

分離は長村・若林(1985)の方法に従って行った。すなわち、比重がそれぞれ1.085, 1.075である11%フィコール・メトリゾ酸Na溶液1mlおよび6%フィコール・メトリゾ酸Na溶液3mlを用いて丸底スピッツ管に不連続密度勾配を作成し、その上に採血したウナギ血液を静かに重層した。重層後、直ちに400×g, 4℃で30分間遠心操作を行い、6%と11%のフィコール・メトリゾ酸Na溶液の境界面にできた好中球分画層をパスツールピペットで吸引し、Ca²⁺, Mg²⁺およびフェノールレッド不含のハンクス液(HBSS)に浮遊した。2回HBSSで遠心洗浄(200×g, 5分間)した後、HBSSで1×10⁷細胞/mlに調整した。なお、6%および11%フィコール・メトリゾ酸Na溶液はFicoll 400(Pharmacia)を蒸留水に6%および11%になるよう溶解し、32.8%メトリゾ酸Na溶液(Nycomed Pharma AS)と12:5の比率で混合し、0.45μmのフィルター(ミリポア)で濾過滅菌したものを用いた。

(5)ウナギ好中球の刺激剤

好中球のrespiratory burstを惹起する刺激剤として可溶性のPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma)を100μg/mlになるようにdimethyl sulfoxide (DMSO, 和光純薬)に溶解し、分注して-80℃に保存した。使用直前にCa²⁺不含のKrebs-Ringerリン酸緩衝液(KRP, pH 7.4)で希釈して使用した。

(6)ウナギ好中球のスーパーオキシド産生量の測定

PMAの刺激によって好中球から産生されるスーパーオキシドの測定

は Pick and Mizel (1981)によるマイクロプレートを用いたシトクロム C 還元法に従った。この方法はスーパーオキシドによるシトクロム C の還元量をその 550nm での吸光度から求めることによって間接的にスーパーオキシド産生量を測定するものである。96 穴平底 ELISA 用マイクロプレート(岩城硝子)の各 well にウナギ好中球浮遊液 1×10^5 細胞/well、酸化型シトクロム C (Sigma) を $160 \mu\text{M}$ となるように加え、PMA や後述の試薬も含め全量が $100 \mu\text{l/well}$ となるように KRP を加えた。最終濃度 $0.001 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の PMA の添加によって反応を開始し、室温で各 well の 550nm での吸光度をマイクロプレートリーダー (MPR-A4I、東ソー) によって経時的に測定した。対照としてスーパーオキシド、過酸化水素の消去酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD、和光純薬)、カタラーゼ (Sigma) がそれぞれ 300U/ml 、 $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加された well でも同様の測定を行った。各測定につき 3well 用い、その平均値を測定値とした。マイクロプレートリーダーで測定した吸光度は well の測光路長を 3mm として計算した計算式 $\text{nM /well} = (\text{O.D.}_{550} \times 100) / 6.3$ (Pick and Mizel, 1981) によってスーパーオキシド産生量に換算し、 $\text{nM}/10^7$ 細胞/分で表した。また、非誘導好中球、2%カゼインおよび大腸菌死菌誘導好中球のスーパーオキシド産生量は、それぞれにつき 4 個体のウナギから分離した好中球で測定した値の平均と標準誤差で表した。

(7)ウナギ好中球の酸素消費量の測定

ウナギ好中球の respiratory burst における酸素消費は、Iida and Wakabayashi (1995)の方法を用いて行った。すなわち、マグネチックスターラーが内蔵された容量 0.6ml の円形チャンバーに KRP に浮遊させた 6×10^5 個の好中球をいれ、クラーク型酸素電極を備えた酸素モニター (YSI 5357 probe, Yellow Springs Instrument Co.) によって酸素消費量を測定した。5 分程刺激前の resting 状態での酸素消費量を測定した後、PMA を最終濃度で $0.1 \mu\text{g/ml}$ となるようにチャンバー内に添加し、続けて測定を行った。測定値は酸素モニターに接続したレコーダーに

よって記録した。チャンバー内をマグネチックスターラーによって常に攪拌状態にし、反応温度は恒温水循環装置によって 25℃に保った。測定開始時の反応液中の溶存酸素濃度は、Jacobsen の式（三宅・北野、1980）により 25℃、0.8%NaCl 溶液での酸素飽和度が 5.58ml/l であることから、249 μ M となった。

また、非誘導好中球、2%カゼインおよび大腸菌死菌誘導好中球の酸素消費量は、それぞれにつき 4 個体のウナギから分離した好中球で測定した値の平均と標準誤差で表した。

(7)ウナギ好中球の過酸化水素産生量の測定

過酸化水素産生は Root *et al.* (1975)によって報告されているスコポレチン蛍光法を応用した。この方法は過酸化水素の存在下で西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)によって、蛍光を発する還元型スコポレチンが無蛍光の酸化型スコポレチンに変化することを利用し、その蛍光強度の減少を測定することを原理としている。測定には蛍光分光測定用 96 穴平底黒色プレート (Labsystems) を用い、各 well にウナギ好中球 1×10^4 個、スコポレチン (和光純薬) 2 μ M、HRP (和光純薬) 20nM となるよう加え、KRP によって全量が最終的に 200 μ l となるように調整した。最終濃度 0.1 μ g/ml の PMA を加えたプレートを蛍光分光光度計 (励起光 355nm、蛍光 460nm、Fluoroskan II、Labsystems) にセットし、室温下で経時的な蛍光強度を測定した。スーパーオキシド産生の測定と同様に SOD (和光純薬)、カタラーゼ (Sigma) をそれぞれ 300U/ml、50 μ g/ml の最終濃度で添加した well でも同様の測定を行った。なお、測定時の温度変化等、微妙な差違がスコポレチンの酸化に対して影響を与えることが予想されたので各測定毎に好中球の過酸化水素産生量測定と同一のプレート上で既知濃度 (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 μ M) の過酸化水素溶液による蛍光減少量を測定し、測定毎の標準曲線を作製した。この標準曲線より各 well におけるウナギ好中球の過酸化水素産生量を算出した。各濃度の過酸化水素溶液は H₂O₂ 標準溶液 (0.1mM) を用いて作成した。H₂O₂ 標準溶液は各測定の直前に過酸化水素原液 (31%、三菱瓦斯化学)

を冷蒸留水で 1000 倍に希釈し、そのモル濃度を H_2O_2 の 230nm でのミリモル吸光係数 $\epsilon=0.081/\text{mM}/\text{cm}$ によって算出した後、さらに冷蒸留水で希釈して 0.1mM に合わせ氷冷したものを用いた。

スコポレチン蛍光法では各測定につき 2well を用い、その平均値を測定値とした。非誘導好中球、2%カゼインおよび大腸菌死菌誘導好中球の過酸化水素産生量は、それぞれにつき 6 個体のウナギから分離した好中球で測定した値の平均と標準誤差で表した。

なお、酸素消費量、スーパーオキシドおよび過酸化水素産生量における非誘導好中球（対照）と誘導好中球との比較には、 t 検定を用い、分散の等しい場合には Student の方法により、不等分散の場合には Welch 法により有意差検定を行った。

2. 結果

(1) 刺激剤 (PMA) の最適濃度

PMA 濃度がウナギ好中球のスーパーオキシド産生に与える影響を調べるため、大腸菌死菌誘導好中球を用い最終濃度 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように PMA を添加し、10 分間当たりのシトクロム C 還元量を測定したところ、低濃度から濃度依存的に反応量は増加し、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で最大であった (表 1、図 1)。それ以上の濃度では逆に抑制がみられた。PMA の溶媒であるジメチルスルホキシド (DMSO) の濃度は PMA 濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の時、0.1% であった。0.25% 以上の DMSO 濃度は、ウナギ好中球のスーパーオキシド産生を抑制した (表 2、図 2)。0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PMA 濃度を最適濃度と判断し、以後すべての実験をこの濃度で行った。

(2) スーパーオキシド産生動態と消去酵素の影響

大腸菌死菌誘導好中球を用い、PMA を添加した時間を 0 分としたシトクロム C 還元の経時的変化とスーパーオキシドの消去酵素である

SODによる影響を図3に示した。まず、PMAを添加しない場合には当然のことながらシトクロムCの還元は見られなかった。PMAの添加直後から急激なシトクロムCの還元がみられ、30分後以降で緩やかな反応になった。SODを添加した場合にはPMAの刺激があってもシトクロムC還元は観察されなかった。さらに過酸化水素の消去酵素であるカタラーゼを添加してPMAで刺激した場合には、刺激後10分までは影響が見られなかったが、それ以降では添加しないものに比べ、約1/2にシトクロムCの還元が抑えられた(図4)。測定は3回行い、いずれにおいても同様の傾向が観察された。

(3)スーパーオキシド産生量

SODの添加によって抑えられたシトクロムC還元量(SOD無添加PMA刺激好中球によるシトクロムC還元量 - SOD添加PMA刺激好中球によるシトクロムC還元量)を材料および方法1.(6)の式に代入し、スーパーオキシド産生量を算出した(表3)ところ、PMA添加後10分間ではほぼ直線性を示した(図5)。非誘導、2%カゼインおよび大腸菌死菌誘導好中球のスーパーオキシド産生量はそれぞれ 2.38 ± 0.59 , 11.36 ± 1.16 および 11.67 ± 2.03 nM/ 10^7 細胞/分であり、誘導好中球での値は非誘導好中球に比べて有意($p < 0.05$)に高かった(表4)。

(4)酸素消費量

PMA添加前ではウナギ好中球のresting状態の酸素消費が認められ、PMA添加1,2分後から明らかにresting状態と異なる酸素消費の増大が見られた(図6)。PMA添加後の酸素消費からresting状態の酸素消費を差し引いた量を正確なrespiratory burstと判断し、ウナギ好中球のrespiratory burst時の酸素消費量として表した(表5)。非誘導、2%カゼインおよび大腸菌死菌誘導好中球の酸素消費量はそれぞれ 2.64 ± 0.63 , 11.54 ± 0.85 および 12.45 ± 0.85 nM/ 10^7 細胞/分であり、いずれにおいてもスーパーオキシド産生量とほぼ等しい値であった。誘導好中球での値は非誘導好中球に比べて有意($p < 0.05$)に高かった。なお、resting

状態の酸素消費量は非誘導、2%カゼインおよび大腸菌死菌誘導好中球で有意差は認められなかった。

(5)過酸化水素産生量

図7、8、9に示すようにPMA添加によってウナギ好中球による過酸化水素産生がみられ、この反応はSODによって約2倍量に増強された。そして過酸化水素の消去酵素であるカタラーゼで完全に抑制されたことからこの反応が過酸化水素に特異的なものであることが確認された。ウナギ好中球の過酸化水素産生量はSODの添加によってすべてのスーパーオキシドを過酸化水素に変換した場合の値で表した。非誘導、2%カゼインおよび大腸菌死菌誘導好中球の過酸化水素産生量はそれぞれ 0.27 ± 0.06 、 5.00 ± 0.19 および 5.30 ± 0.18 nM/ 10^7 細胞/分であり、誘導好中球においてはスーパーオキシド産生量および酸素消費量の1/2に近い値であった(表6)。誘導好中球での値はやはり非誘導好中球に比べて有意($p < 0.01$)に高かった。

3. 考察

貪食細胞が行う生体防御機構の内、活性酸素による抗微生物活性の重要性は、度重なる感染症に悩まされる慢性肉芽種症(chronic granulomatous disease, CGD)患者の好中球が正常な貪食能をもちながら活性酸素を産生できないこと(Holmes *et al.*, 1967)、好中球の殺菌活性がある種の細菌においては嫌気的狀態で低下すること(Mandell, 1974)などの事実によって示されている。好中球は生理的状態では自分自身にも有害である活性酸素を産生するわけではなく、炎症の際に生体内に侵入してきた細菌などの異物に遭遇して初めてこれを産生し、細胞外または食胞内に放出する(Baggiolini, 1984)。生体内での好中球が活性酸素を産生しうる刺激因子としては、病原体である生きた細菌、寄生虫、ウイルスなどが考えられる。実験的には粒状刺激物質としてzymosan、免疫複合体、不活化あるいは変性した細菌があり、これ

らは生理的刺激因子と同様に食作用を誘導する。しかしながら必ずしも食作用を誘導する物質に限られるのではなく可溶性のものでも respiratory burst を惹起する細胞膜刺激物質が数多く知られている。そのような可溶性刺激物質には、PMA などのホルボールエステル (Wolfson *et al.*, 1985) をはじめ、抗体 (Rossi *et al.*, 1971)、補体 (Goetzl and Austen, 1974)、サイトカイン (Nathan, 1989)、ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン (fMLP) (Bender *et al.*, 1983)、各種脂肪酸 (Kakinuma, 1974)、界面活性剤 (Kakinuma *et al.*, 1976) などがあり、それぞれ細胞膜上の様々な因子に作用する物質であるが、そのような種々の細胞膜因子の変化は最終的にはすべてスーパーオキシド産生酵素である NADPH 酸化酵素の活性化をもたらすことで共通している (石橋・岡村, 1990)。respiratory burst における好中球の活性酸素産生量を測定する場合、反応性が高く、また産生された活性酸素はすべて細胞外へ放出されるため粒状刺激物質に比べてより定量的測定に好都合であるといった理由から PMA が汎用されている。今回、ウナギ好中球の活性酸素産生動態を調べるにあたって刺激剤として PMA を使用したが、その最適濃度は 0.1 μ g/ml であり、ニジマスの頭腎マクロファージで報告されている濃度 (Secombes *et al.*, 1988) より 10 倍低いものであった。この理由としては種間での感受性の差以外に、PMA の溶媒として用いられる DMSO が高濃度になるとスーパーオキシド産生に対して抑制効果を示すことから使用した DMSO 濃度の差による可能性も考えられた。

一般的にシトクロム C 還元法はその消去酵素である SOD で抑制される分の還元量をスーパーオキシドによる特異的反応とみなし、スーパーオキシド産生量として表される (柿沼ら, 1992) が、今回のウナギ好中球を用いた実験では予想外にカタラーゼによってもシトクロム C 還元の影響が観察され、生じた過酸化水素が何らかの形でこの測定系に影響を与えることが示された。今回この影響を受けない 10 分以内の測定数値を用いることにより、より正確なスーパーオキシド産生を表すことができたと思われる。シトクロム C 還元法を用いて貪食細胞のスーパーオキシド産生を評価する場合は SOD のみならず、カタラーゼの

添加実験を行って過酸化水素によるシトクロム C 還元の影響がないか確かめることが重要であると考えられた。

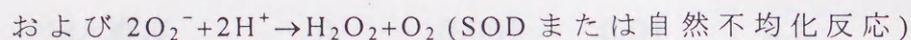
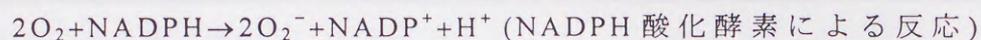
非誘導、カゼインおよび大腸菌死菌誘導好中球のいずれにおいてもスーパーオキシド産生量はほぼ酸素消費量と一致した。この事実から魚類好中球においても哺乳類での知見 (Makino *et al.*, 1986) と同様、respiratory burst で消費した酸素のすべてがスーパーオキシドに変換されることが証明された。このことは魚類好中球でも NADPH 酸化酵素による酸素分子の一電子還元の結果、スーパーオキシドが産生されることを示唆している。酸素消費量の測定からウナギ好中球の resting 状態では非誘導好中球と誘導好中球に差がなく、PMA 刺激によって始めてその反応性に差が現れた。これは、好中球が膜刺激のない状態では基礎酸素代謝量は誘導の有無にかかわらず一定であることを意味し、通常状態では dormant な NADPH 酸化酵素が膜刺激によって始めて活性化される (Edwards, 1994) ことを裏付けていると言える。

誘導された好中球の酸素消費 (respiratory burst)、スーパーオキシド産生とも非誘導好中球に比べ有意に高い値を示した。カゼインおよび死菌を接種されたウナギ好中球のグリコーゲン含量は通常より有意に高く (Nagamura and Wakabayashi, 1985)、また好中球の細胞内グリコーゲン量は貪食能にも影響することが知られている (Robert and Scott, 1968)。これらを総合して考えると、ウナギ生体内への異物侵入に対し、その不活化および排除のために活性酸素産生能 (殺菌能) の高い活性化された好中球が造血組織から血流中に放出されたと考えられた。リポポリサッカライド (LPS)、fMLP、カゼインで処理されたヒト好中球およびマウスマクロファージのスーパーオキシド産生能が増強されることが報告され (Pabst and Johnston, 1980; Bender *et al.*, 1983)、これを priming 効果としている。in vivo においてもヒトの急性細菌感染症患者の好中球が高いスーパーオキシド産生を示すことが報告されている (MaCall *et al.*, 1979)。魚類でもキンギョマクロファージ細胞株で LPS によるスーパーオキシド産生の増強作用が見られており (Wang *et al.*, 1995)、今後、魚類好中球でこのような活性酸素産生系の priming

効果を指標とした assay を行うことがその活性化機構の解明に役立つのではないかと考えられる。

過酸化水素産生においても酸素消費量およびスーパーオキシド産生量と同様に異物誘導好中球で高い値が得られたことから、誘導好中球では活性酸素産生能が高まっていることが確認された。

今回の respiratory burst におけるウナギ好中球の一連の酸素代謝動態を総括してみると、活性化された状態であると考えられる誘導好中球での酸素消費量：スーパーオキシド産生量：過酸化水素産生量の比はほぼ 2：2：1 であった。この関係は哺乳類貪食細胞の respiratory burst において示されている反応式：



に化学量論的に非常によく当てはまるものであり、このことは魚類好中球においても哺乳類と同様に活性酸素産生系として NADPH 酸化酵素が存在することを支持する証左になると考えられる。

表 1. ウナギ好中球のスーパーオキシド産生に与えるPMA濃度の影響

PMA濃度 (μ g/ml)	0	0.001	0.01	0.1	1	10
シトクロムC還元量 (%)	2.6	6.4	30.8	100.0	66.7	25.6

PMA濃度0.1 μ g/mlにおける10分間当たりのシトクロムC還元量を100.0%として表した

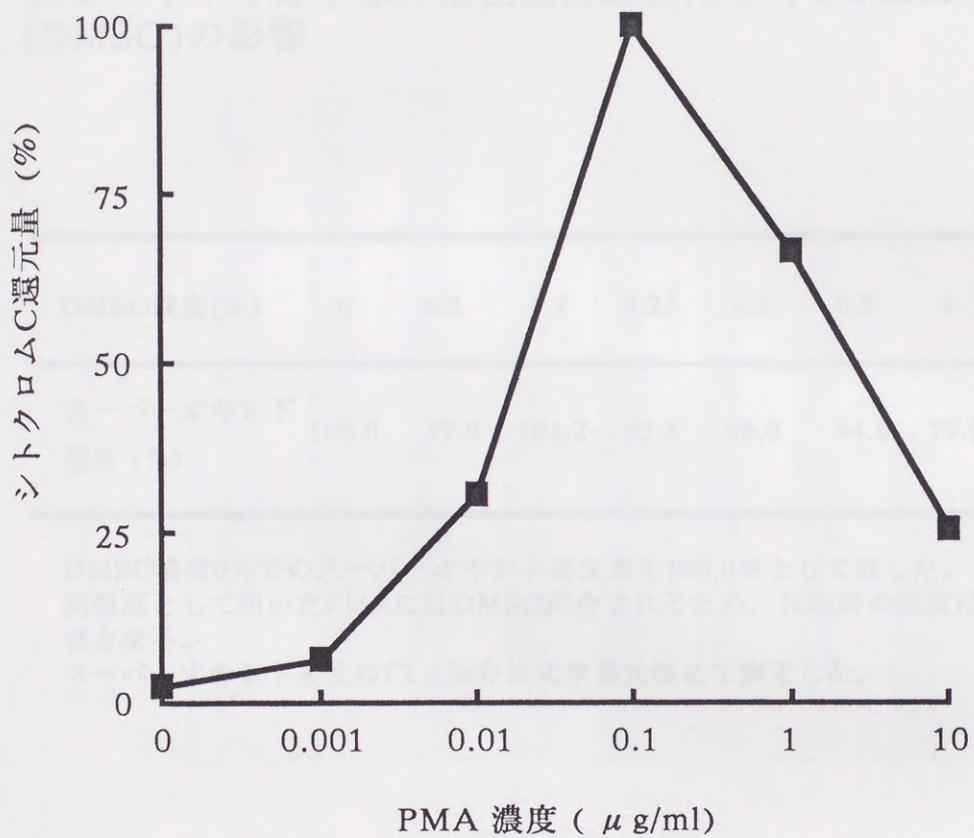


図 1. ウナギ好中球のスーパーオキシド産生に与えるPMA濃度の影響 PMA濃度0.1 μg/ml における10分間当たりのシトクロムC還元量を100.0%として表した。

表 2. ウナギ好中球の活性酸素産生に与えるdimethyl sulfoxide (DMSO)の影響

DMSO濃度(%)	0	0.1	0.2	0.25	0.3	0.5	1	1.5	2
スーパーオキシド 産生 (%)	100.0	99.9	101.2	95.6	96.0	84.8	79.9	47.6	22.4

DMSO濃度0%でのスーパーオキシド産生量を100.0%として表した。
 刺激剤として用いたPMAにはDMSOが含まれるため、反応時の濃度は0.1%を加えた
 値となる。
 スーパーオキシド産生はCLA依存性化学発光法にて測定した。

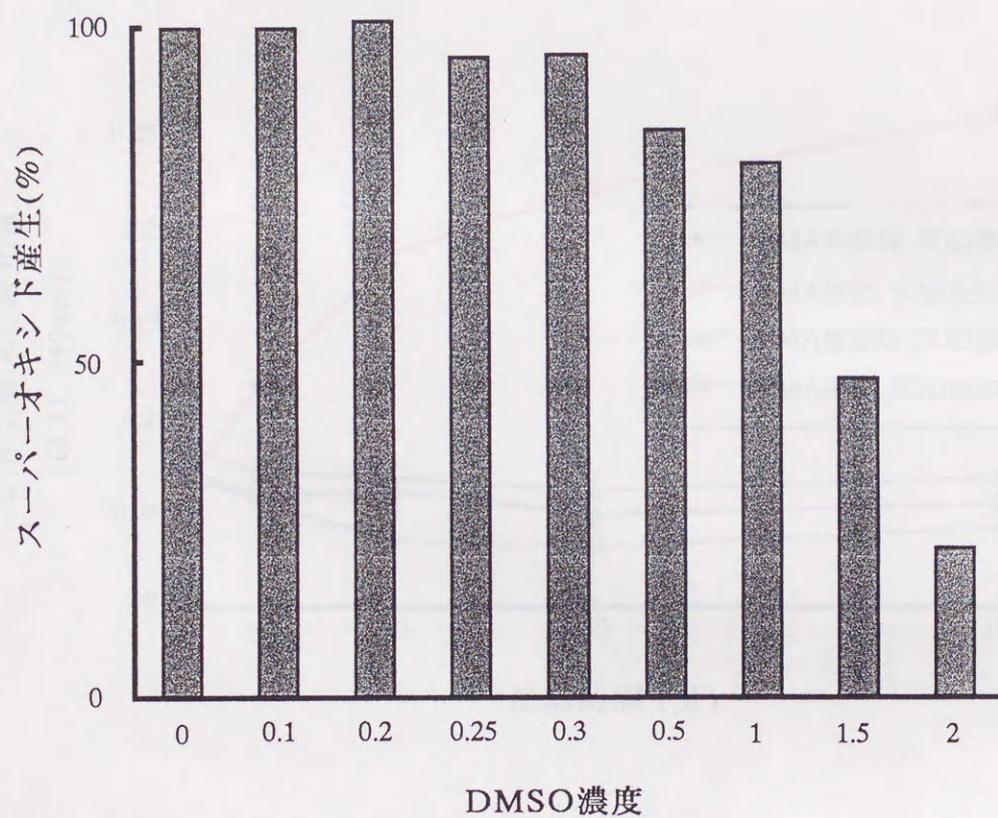


図 2. ウナギ好中球の活性酸素産生に与えるdimethyl sulfoxide (DMSO)の影響
 DMSO濃度0%でのスーパーオキシド産生量を100.0%として表した。
 スーパーオキシド産生はCLA依存性化学発光法にて測定した。

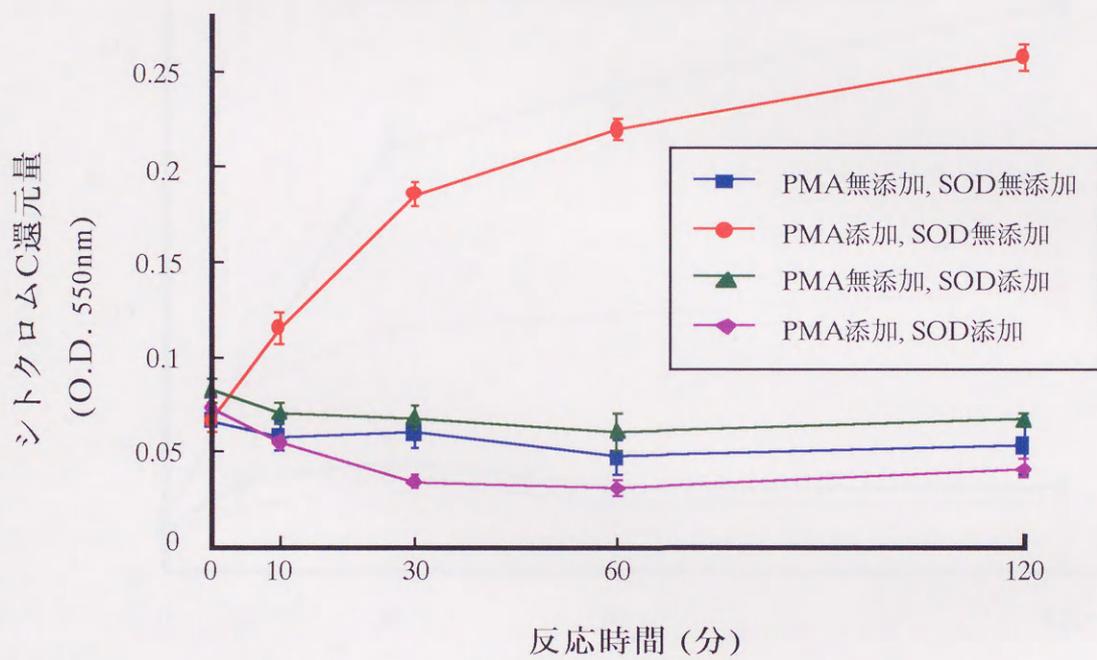


図 3. ウナギ好中球によるシトクロムC還元に対するSODの影響
大腸菌死菌で誘導したウナギ好中球を使用、3回測定の実験値を示した

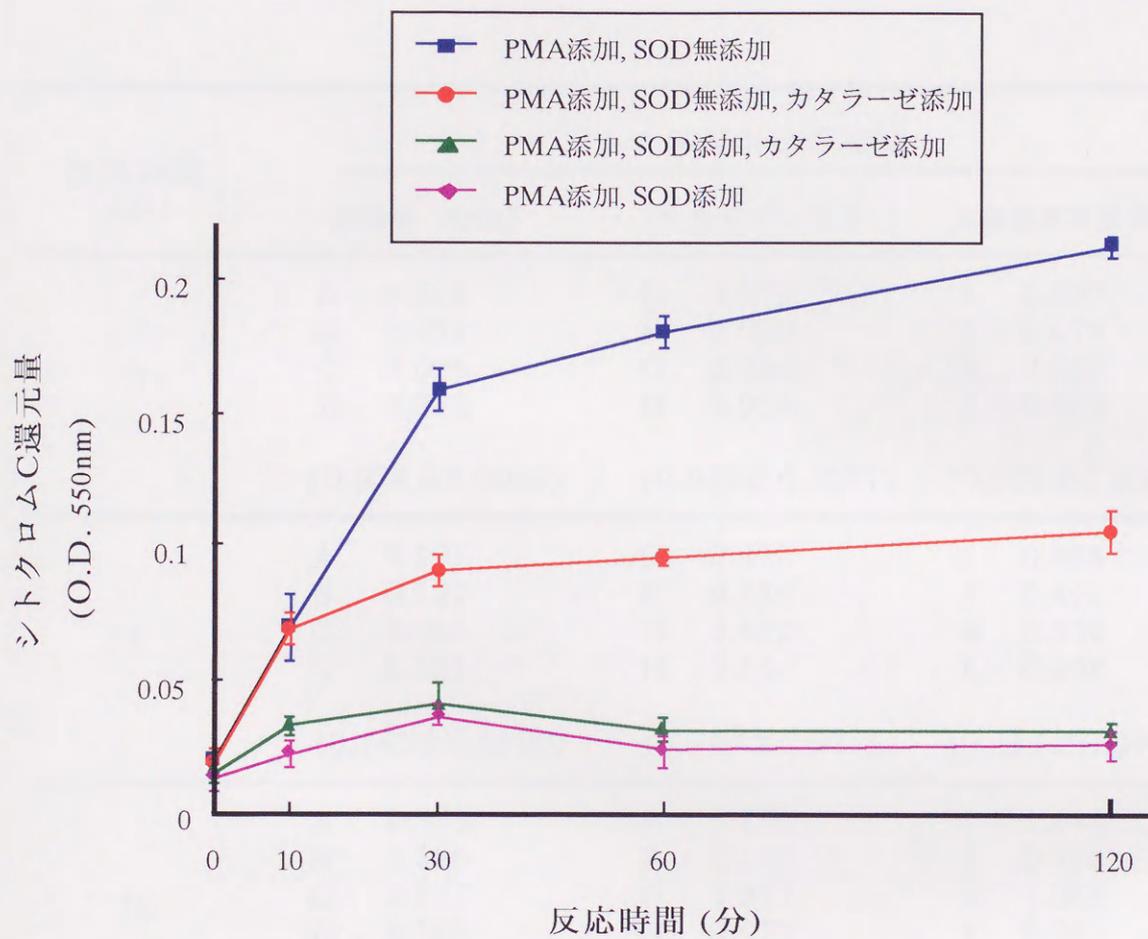


図 4. ウナギ好中球によるシトクロムC還元に対するカタラーゼの影響 大腸菌死菌で誘導したウナギ好中球を使用、3回測定の結果の代表値を示した

表 3. 反応0, 5および10分におけるウナギ好中球のスーパーオキシド
 産生量

反応時間 (分)	ウナギ好中球の種類					
	非誘導 (対照)		2% カゼイン誘導		大腸菌死菌誘導	
0	A	0.016	E	0.079	I	0.047
	B	0.032	F	0.000	J	0.079
	C	0.016	G	0.032	K	0.079
	D	0.032	H	0.016	L	0.079
	(0.024±0.0046)		(0.032±0.0171)		(0.071±0.0080)	
5	A	0.191	E	0.810	I	0.888
	B	0.127	F	0.556	J	0.492
	C	0.063	G	0.492	K	0.730
	D	0.191	H	0.540	L	0.508
	(0.143±0.0306)		(0.599±0.0715)		(0.655±0.0949)	
10	A	0.333	E	1.270	I	1.444
	B	0.286	F	1.110	J	0.978
	C	0.127	G	0.957	K	1.269
	D	0.302	H	0.978	L	0.987
	(0.262±0.0722)		(1.079±0.0722)		(1.170±0.1138)	

数値はスーパーオキシド nM/10⁵細胞で表した。

() 内は平均値±標準誤差を示す。

アルファベットは別個体から分離したウナギ好中球を示す。

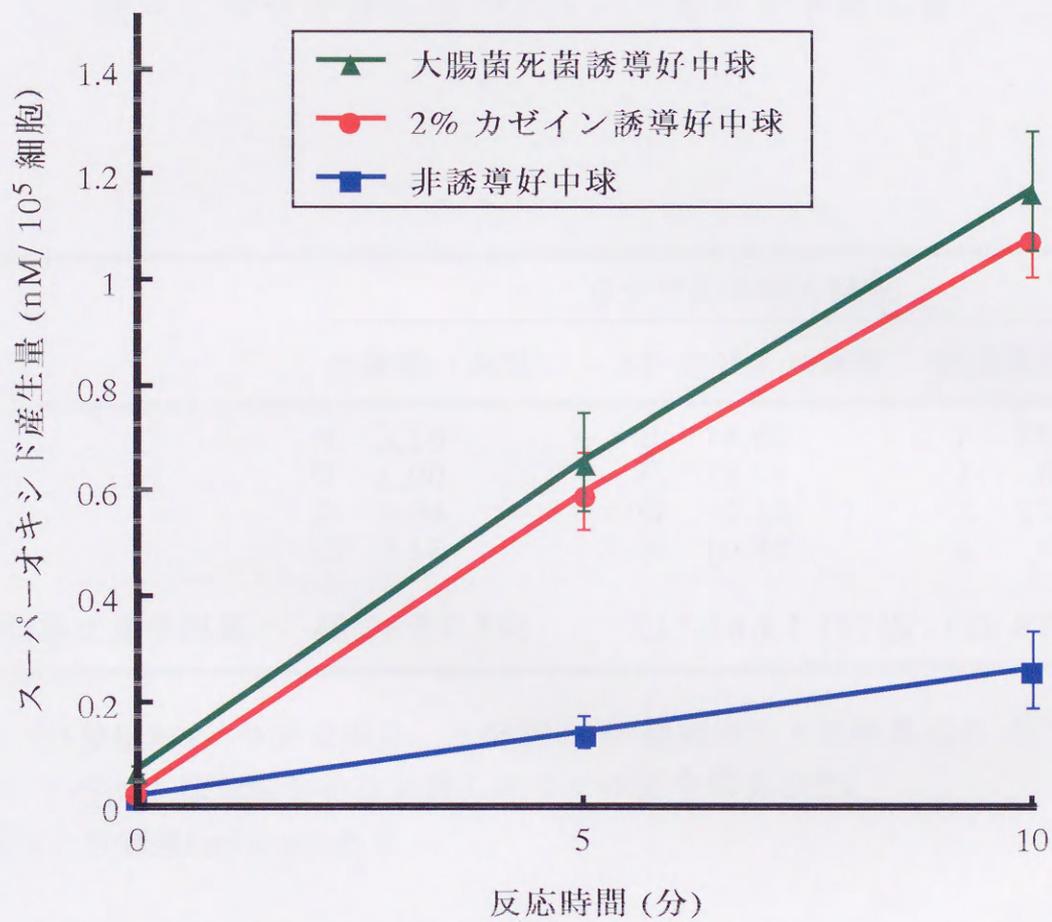


図 5. 反応 0, 5 および 10 分におけるウナギ好中球のスーパーオキシド産生量

表 4. ウナギ好中球のスーパーオキシド産生量

ウナギ好中球の種類		
非誘導 (対照)	2% カゼイン誘導	大腸菌死菌誘導
A 3.50	E 14.62	I 16.82
B 1.90	F 11.12	J 8.26
C 0.94	G 9.20	K 13.02
D 3.18	H 10.48	L 8.58
平均値±標準誤差	(2.38±0.59)	(11.36±1.16)※ (11.67±2.03)※

表 3. の5分値から0分値を減じ、一分間、 10^7 細胞当りに換算した (nM/ 10^7 細胞/分)。アルファベットは別個体から分離したウナギ好中球を示す。

※対照と有意差($p < 0.05$)あり

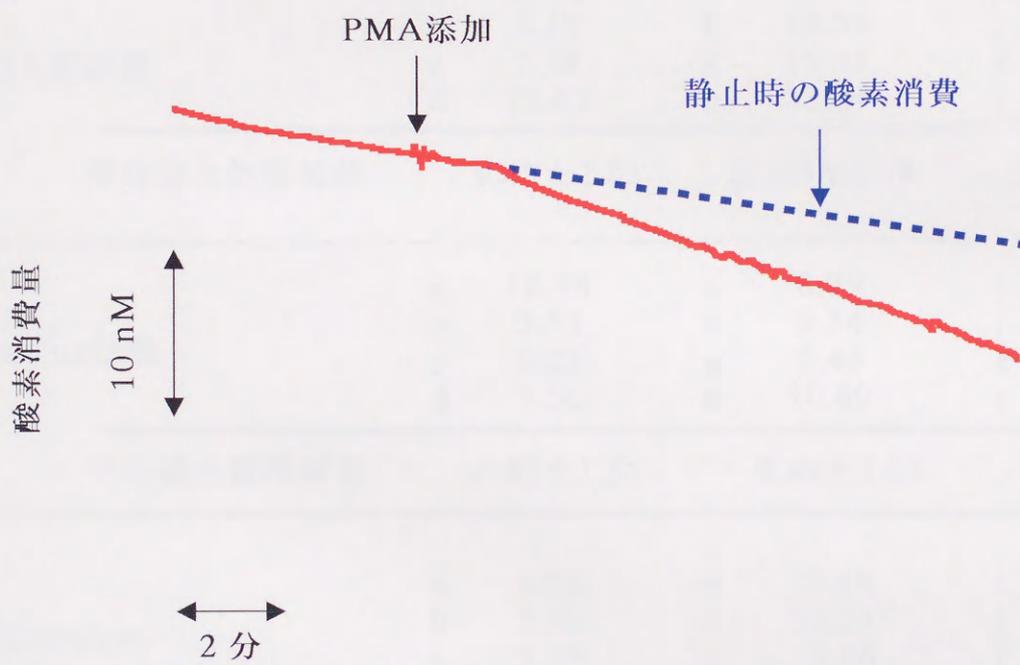


図 6. ウナギ好中球の酸素消費を示すレコーダーからの実測値
(大腸菌死菌誘導好中球)

表 5. ウナギ好中球の酸素消費量

		ウナギ好中球の種類					
		非誘導 (対照)		カゼイン誘導		大腸菌死菌誘導	
PMA添加後	a	14.53	e	21.77	i	17.64	
	b	5.19	f	19.71	j	20.80	
	c	7.48	g	15.31	k	20.75	
	d	10.67	h	23.34	l	19.71	
	平均値±標準偏差	9.47±2.03		20.03±1.74		19.73±0.74	
Resting状態	a	10.38	e	8.29	i	5.19	
	b	3.11	f	9.34	j	10.42	
	c	6.23	g	5.45	k	8.30	
	d	7.56	h	10.89	l	5.19	
	平均値±標準偏差	6.82±1.51		8.49±1.15		7.28±1.28	
Respiratory burst	a	4.15	e	13.48	i	12.45	
	b	2.08	f	10.37	j	10.38	
	c	1.25	g	9.86	k	12.45	
	d	3.11	h	12.45	l	14.52	
	平均値±標準偏差	2.64±0.63		11.54±0.85※		12.45±0.85※	

PMA添加後の酸素消費量からresting状態での酸素消費量を減じた値をrespiratory burst時の酸素消費量とした (O_2 nM/ 10^7 細胞/分)。

アルファベットは別個体から分離したウナギ好中球を示す。

※; 対照と有意差($p < 0.05$)あり

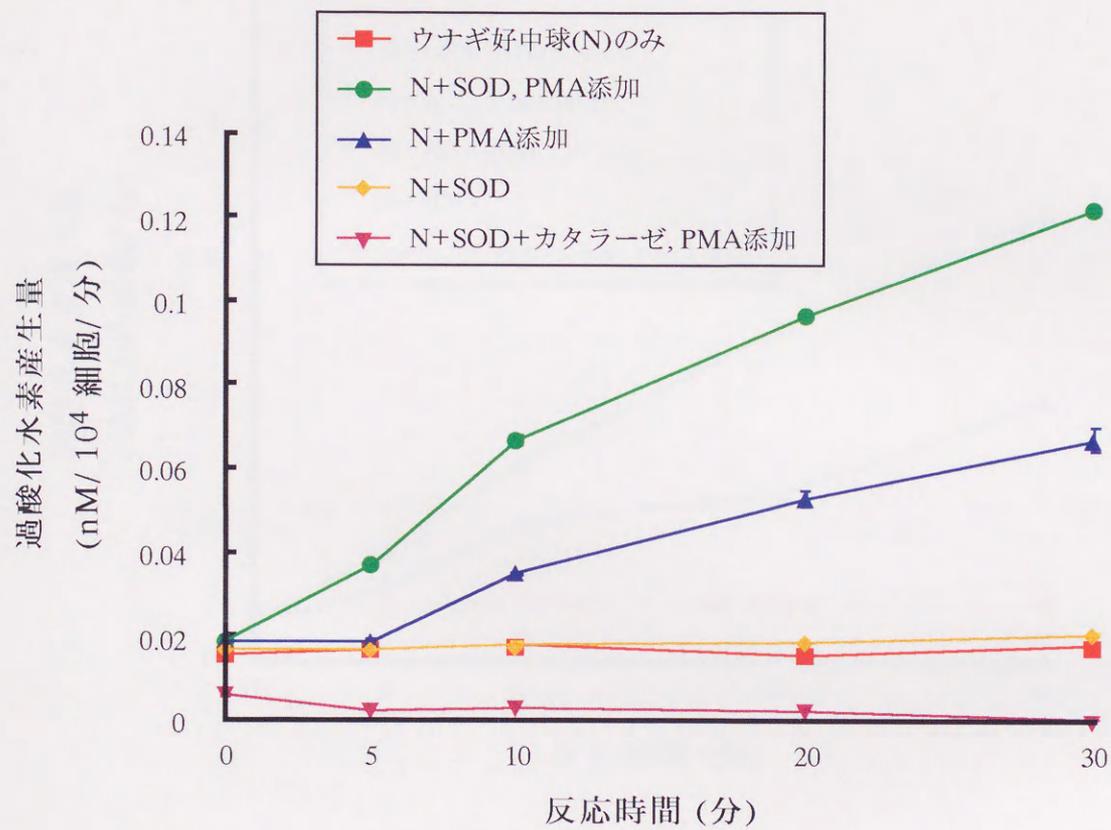


図 7. スコポレチン蛍光法により測定された大腸菌死菌誘導ウナギ好中球の過酸化水素産生
6回測定の代表値を示した

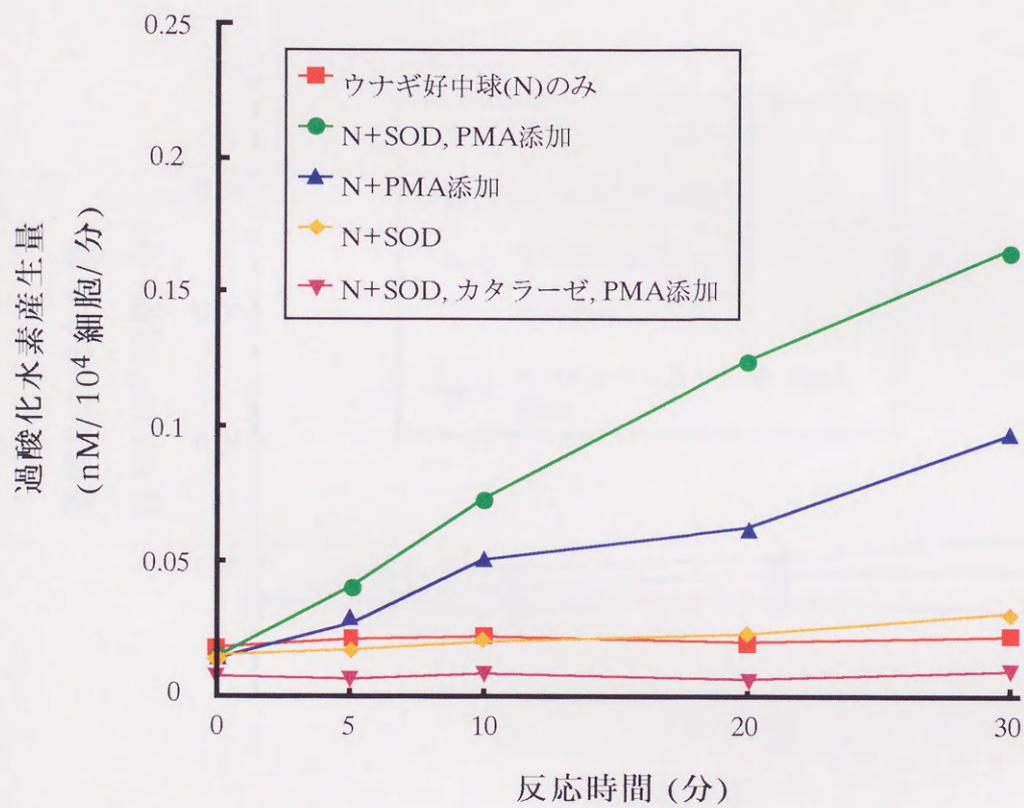


図 8. スコポレチン蛍光法により測定された2%カゼイン誘導ウナギ好中球の過酸化水素産生
6回測定の代表値を示した

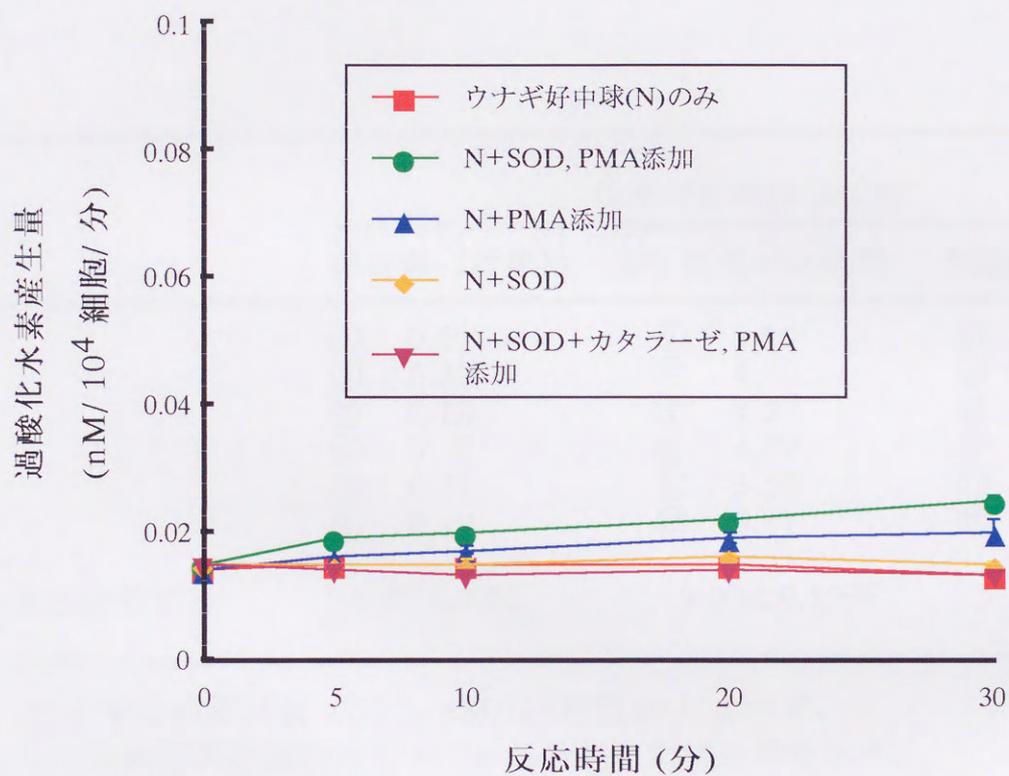


図 9. スコポレチン蛍光法により測定された非誘導（対照）ウナギ好中球の過酸化水素産生
6回測定の結果を示した

表 6. ウナギ好中球の過酸化水素産生量

ウナギ好中球の種類			
	非誘導 (対照)	2% カゼイン誘導	大腸菌死菌誘導
①	0.51	⑦ 5.10	⑬ 4.91
②	0.30	⑧ 4.70	⑭ 5.01
③	0.18	⑨ 4.30	⑮ 6.03
④	0.12	⑩ 4.89	⑯ 5.30
⑤	0.31	⑪ 5.60	⑰ 4.95
⑥	0.19	⑫ 5.41	⑱ 5.62
平均値±標準誤差	0.27±0.06	5.00±0.19※	5.30±0.18※

SOD存在下での測定値 (H_2O_2 nM/ 10^7 細胞/分) を示す。

①~⑱はそれぞれ別個体のウナギから分離した好中球を示す。

※対照と有意差($p < 0.01$)あり

第三章 ウナギ好中球の産生する活性酸素による殺菌

哺乳類での研究から好中球、マクロファージのような食細胞は異物を貪食した際に種々の活性酸素を産生し、放出された活性酸素はその強力な酸化作用により細菌、寄生虫などを不活化することが明らかになっている。活性酸素による殺菌の重要性は、殺菌に対する活性酸素消去剤の影響 (Johnston *et al.*, 1975; Misra and Fridovich, 1976; Sagone *et al.*, 1976; Sasada and Johnston, 1980) や細菌の持つ活性酸素消去酵素量の違いによる殺菌抵抗性 (Beaman and Beaman, 1984; 金ヶ崎, 1990) に関する多くの研究によって確かめられている。哺乳類の好中球が貪食の際に産生すると考えられている活性酸素および活性酸素を由来とする酸化物質にはスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、次亜塩素酸、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) などがあり、実際にそれらのいくつかは消去剤を用いた実験から殺菌因子であることが証明されている (金ヶ崎, 1990)。

魚類貪食細胞が酸素依存性殺菌活性を持つ、すなわち殺菌が貪食細胞由来の活性酸素によって行われていることを真の意味で証明している報告はニジマスの頭腎組織中の貪食細胞でしかなく (Sharp and Secombes, 1993)、初期の生体防御で主体となっているはずの好中球における活性酸素による殺菌については全く検討されていない。そこで、第一章においてウナギ好中球で実際に検出されたスーパーオキシド、過酸化水素、および強力な酸化作用を持つと考えられているヒドロキシルラジカルに対する消去剤存在下でのウナギ好中球による殺菌活性を測定し、魚類好中球の酸素依存性殺菌機構について検討した。また、貪食細胞に取り込まれた細菌は貪食作用の結果として形成された食胞内でより効率的に殺菌されることが知られていることから、食胞形成を阻害した状態での殺菌活性についても検討を行った。

1. 材料および方法

(1) 実験魚およびウナギ好中球の分離

実験魚は第二章と同様に宮崎郡佐土原町養鰻組合から購入した平均体重 200g のウナギを用い、25℃、無給餌で飼育し、2週間以内に使用した。好中球の分離は第二章と同様に長村・若林（1985）の方法に従った。すなわち、採血 15～18 時間前に *E. coli* IAM 1239 ホルマリン死菌溶液（湿菌重量 10mg/ml）0.1ml/尾をウナギ腹腔内に接種し、動脈球からヘパリン加注射筒で採血し、1.075-1.085 フィコール・メトリゾ酸 Na 溶液による不連続密度勾配遠心法で好中球を分離し、2回遠心洗浄した後、HBSS で 2×10^6 細胞/ml に調整した。

(2) オプソニンとしての正常血清の調製

貪食細胞が細菌を効率よく貪食するためには正常血清中に含まれている補体などのオプソニンによる細菌のオプソニン化が必要である。しかしながら血清自身にも殺菌活性が認められるため（飯田・若林，1983）、ウナギ好中球による殺菌活性の測定にとって最適な血清濃度を検討した。殺菌活性測定に使用するウナギ正常血清は、以下のように調製した。10尾のウナギから血液凝固防止操作をせずに採血した血液を個体ごとスピッツ管に移し、1時間室温（20℃）で凝固させた後、1200×g、4℃で15分遠心した。できるかぎり氷冷に保ちつつ、上清の血清をまとめ、原液のままか、または HBSS で 2,4 倍に希釈した後 0.45μm のフィルターで濾過滅菌し、直ちに使用しない場合は分注して -80℃ に保存した。最適血清濃度を求めるための実験には 1, 2, 4, 8 倍希釈血清および供試菌株として *E. coli* IAM1239 を使用した。

(3) 使用菌株

殺菌に活性酸素が関与しているかを検討するためには、ウナギ好中球によって殺菌されうる細菌を使用する必要がある。殺菌活性の測定に先立ち、ウナギ好中球により殺菌されやすい菌株のスクリーニング

を行った。殺菌活性測定のための供試菌を表7に示した。ESI、ESI2、ESI3の3株は、外見上正常と観察されたウナギ体表粘液を滅菌生理食塩水で適当に希釈し、その希釈溶液を塗布したトリプトソーヤ寒天培地（ニッスイ）で23℃、2日間培養した後に形成されたコロニーを由来としている。すべての菌はトリプトソーヤ寒天培地により23℃で維持、継代し、殺菌活性測定のためにそれぞれの菌を継代24~36時間後に滅菌した薬匙によって平板培地上から測りとりHBSSに浮遊し、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ colony forming unit(CFU)/mlに調整した。

(4)ウナギ好中球による殺菌活性の測定

殺菌活性の測定はJohnston *et al.* (1975)の方法を参考にして行った。まず、細菌浮遊液0.1ml、希釈血清0.1ml、HBSS0.3mlを1.5mlマイクロチューブに入れ、25℃、15分間ローテーターによって12rpmで回転攪拌し、細菌のオプソニン化をした。その後、ウナギ好中球浮遊液0.5mlを加え、25℃、12rpmで回転攪拌することで好中球による細菌の貪食を促した。好中球の添加から0, 60, 120分後にマイクロチューブ内の試料液50 μ lを9.95mlの滅菌蒸留水の入ったスピッツ管に懸濁し、好中球に貪食された細菌を取り出すためスピッツ管を1分間激しく振騰することにより浸透圧ショックを与え、好中球を破壊した。その細菌浮遊液25または50 μ lを平板培地に播き、一定時間培養した後に形成されたコロニー数から反応0, 60, 120分の各時間におけるチューブ内の生菌数を算出した。

(5)活性酸素消去剤

上述の殺菌活性測定時に活性酸素消去剤を添加し、それぞれウナギ好中球の殺菌活性に与える影響を調べた。活性酸素消去剤としては、スーパーオキシド消去酵素であるSOD(和光純薬)、過酸化水素消去酵素であるカタラーゼ(和光純薬)およびヒドロキシルラジカル(OH \cdot)の消去剤として知られているD-マンニトール(和光純薬)または安息香酸Na(和光純薬)を用い、それぞれ最終濃度で1000U/ml, 750 μ g/ml, 40mM,

20mMとなるようにマイクロチューブに添加した。

(6)食胞形成阻害剤 (サイトカラシン B)

食胞細胞の食胞形成阻害作用が知られている (Zigmond and Hirsch, 1972) サイトカラシン B のウナギ好中球食胞作用に対する影響を調べた。1.5mlマイクロチューブにウナギ好中球浮遊液 (2×10^6 細胞/ml) 0.5ml、ESI浮遊液 (約 2.5×10^9 CFU/ml) 0.1ml、4倍希釈ウナギ正常血清 0.1ml およびサイトカラシン B (Sigma) を最終濃度で 0、5、10、20、40、100 μ g/ml となるよう添加し HBSS で全量を 1ml にした。チューブをローテーターにセットし、25 $^{\circ}$ C、30分間 12rpm で回転攪拌した。攪拌後、反応液 300 μ l を 1ml の冷 HBSS に加えた後、遠心細胞収集装置 (SC-2、トミー) によってスライドグラスに塗抹し、その標本に May-Grünwald Giemsa 染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。ウナギ好中球の食胞能は 500 個以上計測した好中球のうち細菌を取り込んだ好中球の割合を表す食胞率と好中球 1 個当たりの食胞細菌数を表す食胞指数によって示した。

(7) サイトカラシン B 処理ウナギ好中球でのスーパーオキシド産生の測定

食胞形成阻害剤として用いるサイトカラシン B が活性酸素産生に抑制的作用を持っていないことを確認するためにサイトカラシン B 存在下でのウナギ好中球のスーパーオキシド産生を測定した。測定は Iida and Wakabayashi (1995) が報告しているスーパーオキシドに特異的に反応し、簡便性に優れる CLA (Cypridina luciferin analog) 化学発光法によって行った。ガラスチューブ (6 \times 50mm、KIMBLE) に 40 μ M CLA (2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo [1,2-a]pyrazine-3-one, 東京化成) 100 μ l、ウナギ好中球浮遊液 (1×10^7 細胞/ml) 100 μ l、サイトカラシン B を最終濃度 10 μ g/ml となるように加え、HBSS で全量を 450 μ l にした。このチューブを化学発光検出器 (Lumicounter 600、日音) にセットし、一分程バックグラウンドの発光を測定した後、マイクロシリンジで PMA (1 μ g/ml) 50 μ l を加え、続けて発光を測定した。検出器に接続

したレコーダーによって測定値を経続的に記録した。なお、サイトカラシン B を加えず、その溶媒として含まれる DMSO をサイトカラシン B 添加時と同濃度の 1% になるように加えたものを対照として同様の測定を行った。

(8) 過酸化水素による殺菌

ESI が完全に殺菌される過酸化水素濃度を求めるために過酸化水素希釈系列を作り、各濃度での殺菌率を調べた。過酸化水素原液 (31%、三菱瓦斯化学) の正確なモル濃度を 230nm でのミリモル吸光係数 $\epsilon=0.081/\text{mM}/\text{cm}$ によって算出し、最終濃度が 10、20、50、100、250、500、1000 μM となるように HBSS で希釈した過酸化水素溶液をそれぞれ 9.9ml ずつ作製した。各濃度の過酸化水素溶液に約 $5 \times 10^4 \text{CFU}/\text{ml}$ の ESI 浮遊液 100 μl を加え、60 分後その 50 μl をとり、生菌数を (5) の殺菌活性測定と同様の方法で測定した。対照である HBSS における生菌数を 100% として各濃度での生存率を表した。

2. 結果

(1) 最適血清濃度の検討

使用された 1、2、4、8 倍希釈血清の最終反応濃度はそれぞれ 10、5、2.5、1.25% であった。反応を 120 分間行った場合のウナギ好中球による *E. coli* の殺菌に対する血清濃度の影響を表 8 に示した。対照として好中球が添加されていない場合でも血清濃度に依存して殺菌がみられ、0 分での生菌数の生存率を 100% とすると血清濃度 1.25、2.5、5、10% ではそれぞれ 104.7、99.5、73.0、43.8% となった (図 10)。そしてウナギ好中球による殺菌を (100 - ウナギ好中球添加チューブ内での反応 120 分後の生菌数 \times 100 / 対照チューブ内での 120 分後の生菌数、殺菌率 (%)) として表したところ、血清濃度 1.25、2.5、5、10% でそれぞれ 14.9、16.9、34.3、55.6% となった (図 11)。正常血清濃度が高いほどオプソニン効果は高いが、同時に血清自身による殺菌活性も高値を示

した。哺乳類貪食細胞の殺菌活性測定では通常 10%の血清濃度が使用されているが、今回の結果からウナギ正常血清 10%および 5%ではかなりの殺菌がみられたため、より正確な貪食細胞の殺菌活性を評価するために血清による殺菌活性が生じない濃度として 2.5% (最終濃度) を以後の測定に用いることとした。

(2)各菌種に対するウナギ好中球による殺菌活性

各菌種を用いて行ったウナギ好中球の殺菌活性を表 9、図 12 に示した。*Bacillus subtilis* の場合、菌の塗布に使用したコーンラージ棒にエタノール火炎滅菌後でも生存するため、菌の汚染が起こり正しい菌数計測が不可能であった。また、*Vibrio alginolyticus* は蒸留水中での攪拌操作によって殺菌されたため殺菌活性測定ができなかった。*Aeromonas hydrophila*、*Lactococcus garvieae* (*Enterococcus seriolicida*)、*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella typhimurium* では、ほとんど殺菌されず反応 60 分後には生菌数の増加が見られた。*Micrococcus luteus*、*E. coli*、*Staphylococcus aureus*、ESI 2、ESI 3 では殺菌が観察されたものの、それらの殺菌率は 120 分で 4.1~28.1%と低いものであった。ESI はウナギ好中球により効率よく殺菌され、その殺菌率は 120 分後で 92.4%と非常に高い値であった。このような結果から ESI は活性酸素による殺菌活性を測定するために最適な菌株であると判断され、以後 ESI を用いた実験を行った。なお、ESI の生化学的性状については表 10 に示した通りで、これらの性状よりシュードモナス科に分類された。

(3)ウナギ好中球による殺菌に対する各種活性酸素消去剤の影響

SOD、カタラーゼ、D-マンニトールおよび安息香酸 Na の添加がウナギ好中球の ESI の殺菌に与える影響をそれぞれ 3 尾のウナギを用いて測定し (表 11~15)、その典型例を図 13~17 に示した。それぞれの測定において好中球を加えず消去剤のみ添加した陰性対照では生菌数は変化せず、好中球を加えた陽性対照では反応時間と共に明らかな菌数の減少が見られた。カタラーゼを添加した場合では陽性対照に比べ

60分、120分とも生菌数が増加し殺菌活性が抑制された(表12、図14)。それに対して、SOD、D-マンニトールおよび安息香酸Naの添加では陽性対照と生菌数に差はなく(表11、13、14、図13、15、16)、SODとカタラーゼを同時に添加した場合でもカタラーゼ単独の添加時と差がない(表12、15、図14、17)ことからSODのカタラーゼとの協同作用のないことが確認された。以上より、スーパーオキシドおよびヒドロキシルラジカルはウナギ好中球によるESIの殺菌に関与せず、過酸化水素が重要な殺菌因子であることが明らかとなった。

Johnston *et al.* (1975) は殺菌活性測定においてラテックスビーズを消去酵素と共に好中球に貪食させることにより、より高い殺菌抑制効果が得られることを報告している。それゆえラテックスビーズとSOD、カタラーゼを混合し、同様の測定を行ったが、ラテックスビーズ無添加の場合と差は見られなかった(表16、17、図18、19)。

(4) サイトカラシンBによるウナギ好中球の食胞形成阻害

サイトカラシンB濃度の増加に伴い貪食率、貪食指数共に阻害され(表18、図20)、サイトカラシンBはウナギ好中球においても食胞形成阻害作用を持つことが明らかとなった(図21)。サイトカラシンB濃度が高いほど貪食能は抑えられたが、溶媒のDMSOが好中球の活性酸素産生阻害効果を示す(第二章表2、図2)ことから、DMSO濃度が1%となるサイトカラシンB濃度10 μ g/mlが食胞形成阻害実験において適切と判断し、以後の実験の使用濃度とした。サイトカラシンB10 μ g/ml処理好中球でのESIの貪食率は93.6%と高いものの、貪食指数は無処理の対照好中球での36.3に比べ、1/3以下の9.5と低い値であり、トータルの貪食能で考えるとサイトカラシンB10 μ g/ml処理によって貪食食胞の形成は阻害されることが明らかとなった。なお、このサイトカラシンB10 μ g/mlの濃度で処理された好中球の生存率は95%以上であることがトリパンブルー色素排除能により確かめられた。

(5) 殺菌におけるサイトカラシンBの影響

対照好中球 (DMSO 1%処理) の場合、ESI の生存率が 60 分後で 28.4%、120 分後で 10.9% と経時的に殺菌反応が進んだのに対し、サイトカラシン B (10 μ g/ml) 処理好中球では ESI の生存率は 60、120 分後とも約 50% で維持され、これらは対照に比べ有意に高い値であった。(表 19、図 22)。この結果から食胞形成の阻害によってウナギ好中球の殺菌活性は明らかに抑制されることがわかった。またサイトカラシン B 処理好中球の殺菌活性は過酸化水素消去酵素であるカタラーゼの添加によって影響を受けなかった。このことより今回検出された過酸化水素による殺菌は好中球の食胞内で行われていることが明らかとなった。

(6)ウナギ好中球のスーパーオキシド産生に対するサイトカラシン B の影響

サイトカラシン B 処理好中球では対照の 1% DMSO 処理好中球に比べスーパーオキシド産生を示す発光のピークに達するまでの時間がやや長くなる傾向が見られたが (図 23)、10 分間当たりの総発光量では有意な差はなかった (表 20、図 24)。

(7)過酸化水素による殺菌

過酸化水素濃度に依存して ESI の生存率は減少し、500 μ M 以上の濃度で完全に殺菌された (表 21、図 25)。

3. 考察

魚類好中球による殺菌活性の測定は、その重要性にも関わらず非常に少なくアメリカナマズで報告されているのみであり (Ainsworth and Dexiang, 1990) その報告でも活性酸素による殺菌については触れておらず、魚類好中球での活性酸素による殺菌機構はほとんど明らかにされていない。貪食細胞の殺菌活性を調べる場合、ある細菌に対する抵抗性が生体防御能の内、主としてその貪食細胞に依存しているような細菌を使用する必要がある。また、用いる貪食細胞の活性やオプソニ

ンとしての血清についても検討しなければならない。本研究ではまず、第二章で得られた知見から高い活性酸素産生能を有する大腸菌死菌誘導ウナギ好中球を用い、殺菌活性測定に適当な血清濃度を求め、そのような条件下で容易に殺菌されうる菌株のスクリーニングを行った。その結果、哺乳類の好中球によって殺菌されやすい *E. coli* や *S. aureus* のような菌種 (Johnston *et al.*, 1975) でのウナギ好中球による殺菌率は比較的 low、殺菌活性測定に適当でないと判断された。そしてウナギ好中球によって殺菌されやすい菌株としてウナギの体表から分離した ESI が得られたが、この主な理由としては表 20、図 20, 21 からわかるようにウナギ好中球によって非常に貪食されやすいことが考えられた。貪食細胞と殺菌されやすい被食細菌の組み合わせが異なることは種によって病原体の感受性に差があることから考えると当然の結果であり、殺菌因子の消去剤や阻害剤を使用して殺菌活性を検討する際には、食細胞と被食細菌との組み合わせを検討し、最適な条件のもとで実験を行うことが重要であると考えられる。

ESI および活性酸素消去剤を用いたウナギ好中球の殺菌活性の測定により、過酸化水素が殺菌に関与していることが明らかとなり、魚類好中球が確かに酸素依存性殺菌活性を有することが証明された。実験方法は異なるが、ニジマス頭腎マクロファージを用いた場合でも、カタラーゼの添加によって同様に殺菌活性の阻害が認められており (Sharp and Secombes, 1993)、魚類貪食細胞の酸素依存性殺菌においては過酸化水素の存在が重要であると言える。ウナギ好中球は食胞形成の阻害によって殺菌活性が抑制され、そのような状態では過酸化水素による殺菌活性は発揮されないことが明らかとなった。この事実は過酸化水素による殺菌には好中球の食胞形成が必須条件であることを示している。哺乳類の好中球が細菌を貪食した場合、食胞内に放出された過酸化水素からファゴリソソーム (食胞と各種酵素等が含まれる細胞内顆粒の融合) 形成の結果として同じく食胞内に放出されたミエロペルオキシダーゼ (MPO) の触媒作用によって強力な酸化作用を持つ次亜塩素酸 (HClO) が生成され、この HClO が殺菌に大きく関与する

と考えられている (Sips and Hamers, 1981)。しかしながら、ウナギ好中球には MPO がほとんど検出されず (朴・若林, 1989)、実際 MPO 阻害剤である NaN_3 の添加によってもルミノール依存性の化学発光が影響を受けない (Iida and Wakabayashi, 1995) ことから HClO はウナギ好中球の respiratory burst で産生されていないと考えられる。このため、ウナギ好中球が細菌を貪食した際に、産生、放出された過酸化水素は食胞内およびその周辺で蓄積されることが予想される。貪食細胞が形成する食胞内ではファゴリソソームの形成に伴って多くの酸素非依存性殺菌因子が混在する複雑な環境となる (金ヶ崎, 1990) ため、活性酸素のみを単独で考えることは難しいが、仮にウナギ好中球が産生する過酸化水素の細胞内濃度を考えてみると、

$$(\text{ウナギ好中球細胞内の過酸化水素濃度, } \mu\text{M}) = p/v \times t$$

p; 過酸化水素産生量 ($\mu\text{M}/\text{分}$)

v; 容量 (l)

t; 過酸化水素産生開始後の時間 (分)

と表すことができる。第二章より過酸化水素産生量は約 $5\text{nM}/10^7$ 細胞/分 (SOD 非存在下では約 1/2)、ウナギ好中球の細胞内容量が $9\text{mm}^3/10^7$ 細胞 (平均細胞直径を $12\mu\text{m}$ として) であるから、1~2 分間で $500\mu\text{M}$ 以上の濃度になると計算される。一方、ESI は $500\mu\text{M}$ の過酸化水素濃度で完全に殺菌されることから、理論上、ウナギ好中球内での過酸化水素による殺菌は十分可能であると推定された。

Jonston *et al.* (1975) はヒト好中球の殺菌活性が SOD、またマンニトールおよび安息香酸 Na によっても抑制されたことを理由として、Haber-Weiss 反応によりスーパーオキシドと過酸化水素から生成が示唆されるヒドロキシルラジカルが殺菌に関わっている可能性を指摘した。また、メチオナル法を用いたヒト貪食細胞からの検出 (Tauber and Babior, 1977; Weiss *et al.*, 1977) などから、ヒドロキシルラジカルが殺菌因子として注目された。魚類貪食細胞においてもヒドロキシルラジカルの産生 (Nash *et al.*, 1987)、それによる殺菌を示唆する報告 (Sharp and Secombes, 1993) がある。しかしながら、信頼度の高い ESR

スピントラッピング法を用いた検出実験など (Cohen *et al.*, 1988; Ueno *et al.*, 1989) のように貪食細胞のヒドロキシラジカル産生能力自体を疑問視する報告もある。今回のウナギ好中球を用いた実験では、菌種が異なるものの Jonston *et al.* (1975) と同様の方法でヒドロキシラジカルによる直接の殺菌作用は検出されなかった。ヒドロキシラジカルは非常に反応性が強いため殺菌活性が期待されるが、その強い反応性ゆえに発生した部位に存在するあらゆる物質に瞬時に反応すると考えられ、消去剤として挙げられている多くの物質も SOD やカタラーゼのように特異的なものではない (中野, 1989)。貪食細胞が生成したヒドロキシラジカルが殺菌活性を持つという確証は現在のところ得られておらず、この問題を解決するためには貪食細胞が産生するヒドロキシラジカルを正確に評価できる測定系の開発が必要であると思われる。

今回行った実験からウナギ好中球の過酸化水素による殺菌活性が証明されたが、過酸化水素以外の活性酸素が魚類好中球の酸素依存性殺菌活性に関与する可能性も残されている。従来殺菌活性にそれ自身関与しないと考えられていたスーパーオキシドが *S. aureus* の殺菌に直接働くことが IgG を結合させた SOD を用いた実験によってヒト好中球で証明された (Hampton *et al.*, 1996)。今後、魚類好中球でもこのような方法の応用や被検菌の選定など設定条件の検討を行い、スーパーオキシドをはじめとした各種活性酸素による殺菌活性の関与について調べる必要がある。

サイトカラシン B を用いた実験から魚類好中球の食胞内殺菌の重要性が証明された。現在、養殖現場で問題となっているブリの類結節症やサケ科魚類の細菌性腎臓病の原因菌である *P. damsela* subsp. *piscicida* や *Renibacterium salmoninarum* は貪食細胞内で殺菌されず、増殖することが知られており (畑井, 1992; Gutenberger *et al.*, 1997)、貪食細胞内でのこれらの細菌の生存メカニズムを解析するための研究が必要とされている。これには魚類貪食細胞の持つ細胞内殺菌活性を正確に把握することが重要であり、今後、今回の実験を参考にした厳密な貪食細

胞内殺菌活性測定系の開発が望まれる。

カタラーゼはウナギ好中球の殺菌活性を抑制したが、その添加量を増加しても殺菌活性を完全に抑えることは出来なかった。このことはウナギ好中球において酸素非依存性殺菌機構が存在する可能性を示唆している。哺乳類ではディフェンシン、リゾチーム、ラクトフェリン、各種加水分解酵素など多くの酸素非依存性殺菌因子が知られている (Edwards, 1994) が、魚類好中球における酸素非依存性殺菌活性についての研究はほとんど行われていない。このような非依存性殺菌活性を測定できる系も細胞内殺菌活性測定系と共に今後確立されなければならない課題であると考えられる。

表 7. ウナギ好中球による殺菌活性の測定に使用した菌株

Aeromonas hydrophila A9

Bacillus subtilis ATCC 6633

Escherichia coli IAM 1239

Lactococcus garvieae

(*Enterococcus seriolicida* FPC 136)

Micrococcus luteus ATCC 9341

Pseudomonas aeruginosa IAM 1054

Salmonella typhimurium IID 1000

Staphylococcus aureus IAM 1011

Vibrio alginolyticus IID 950

ESI

ESI 2

ESI 3

ESI, ESI 2, ESI 3はウナギ体表粘液から分離した。

表 8. ウナギ好中球による *E. coli* の殺菌に対する正常血清濃度の影響

血清濃度 (%)	反応チューブ内の生菌数 ($\times 10^5$ CFU/チューブ)				殺菌率 (%) ($100-b \times 100/a$)
	0分	120分後			
		好中球無添加 対照 (a)	好中球添加 (b)		
1.25	7.68	8.04 (104.7)	6.84	14.93	
2.5	7.36	7.32 (99.5)	6.08	16.94	
5	7.40	5.40 (73.0)	3.56	34.32	
10	7.40	3.24 (43.8)	1.44	55.56	

() 内は0分の生菌数を100.0%とした場合の生存率 (%) を表す。

図 10. ウナギ正常血清の *E. coli* の生存に与える影響 (反応120分)
0分での生菌数の生存率を100.0%とした

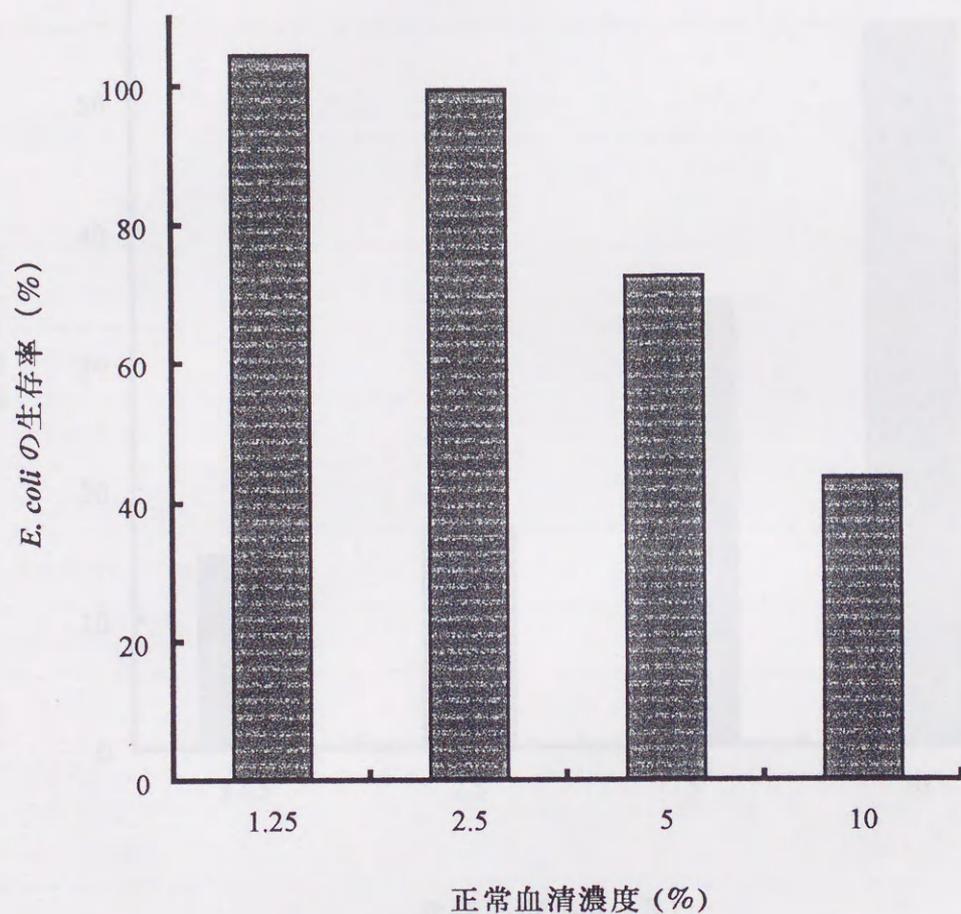


図 10. ウナギ正常血清の *E. coli* の生存に与える影響 (反応120分)
0 分での生菌数の生存率を100.0%とした

表9. 各種菌に対するウナギ好中球の殺菌活性

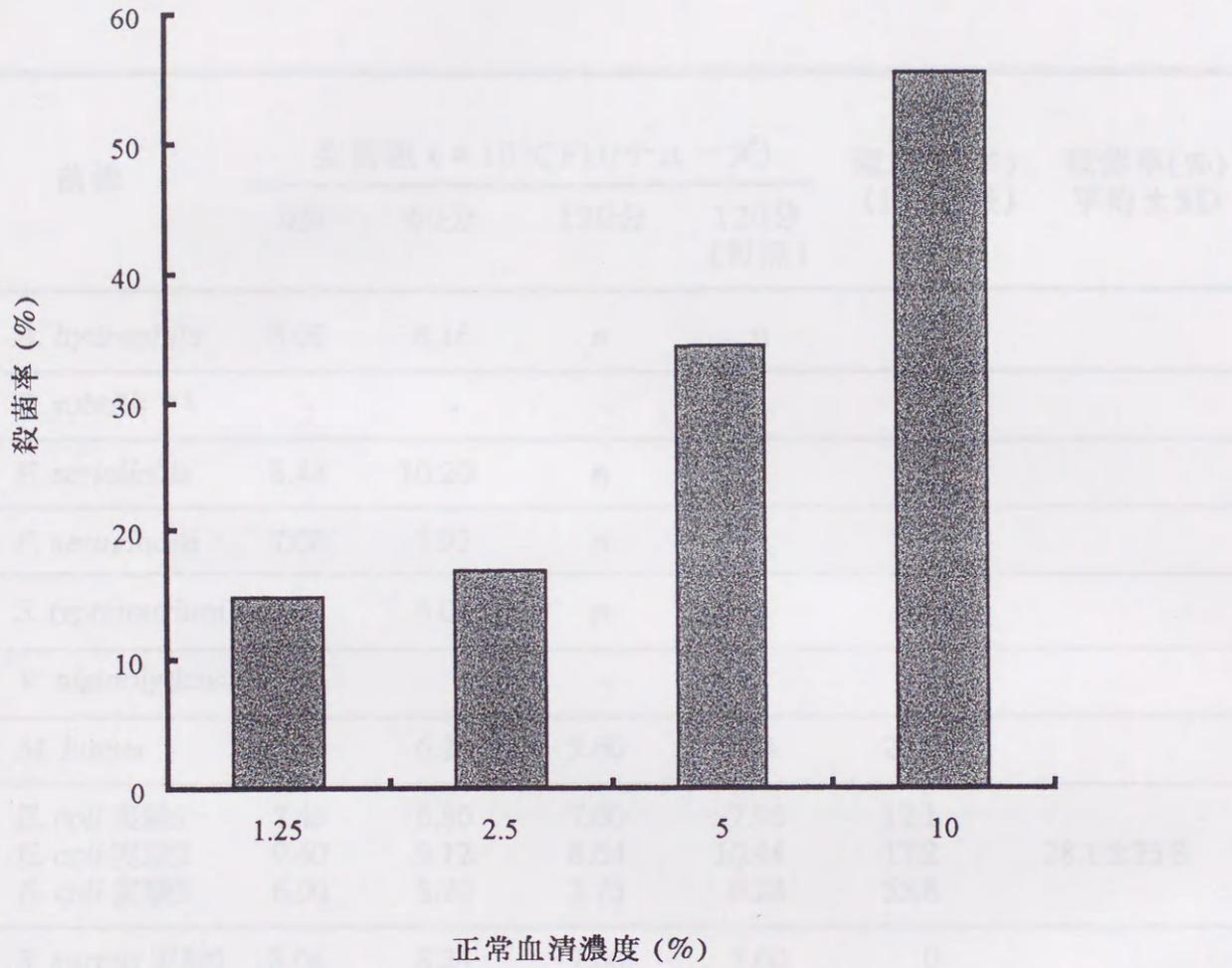


図 11. ウナギ好中球の *E. coli* の殺菌に対する正常血清濃度の影響 (反応時間120分)

表 9. 各菌株に対するウナギ好中球の殺菌活性

菌株	生菌数 ($\times 10^5$ CFU/チューブ)				殺菌率(%) (120分後)	殺菌率(%) 平均 \pm SD
	0分	60分	120分	120分 (対照)		
<i>A. hydrophila</i>	8.08	8.16	n	n	n	
<i>B. subtilis</i> *1	-	-	-	-	-	
<i>E. seriolicida</i>	8.44	10.20	n	n	n	
<i>P. aeruginosa</i>	7.08	7.92	n	n	n	
<i>S. typhimurium</i>	5.72	6.04	n	n	n	
<i>V. alginolyticus</i> *2	-	-	-	-	-	
<i>M. luteus</i>	6.64	6.20	5.60	7.04	21.0	
<i>E. coli</i> 実験1	7.48	6.80	7.00	7.96	12.1	
<i>E. coli</i> 実験2	9.60	9.12	8.64	10.44	17.2	28.1 \pm 23.8
<i>E. coli</i> 実験3	6.00	5.20	2.76	6.24	55.8	
<i>S. aureus</i> 実験1	8.04	8.24	7.60	7.60	0	
<i>S. aureus</i> 実験2	6.64	5.92	5.36	7.12	24.7	14.0 \pm 12.8
<i>S. aureus</i> 実験3	6.88	6.88	6.56	7.92	17.2	
ESI 実験1	5.96	1.61	0.20	5.04	96.0	
ESI 実験2	10.08	2.76	0.96	9.80	90.2	92.4 \pm 3.5
ESI 実験3	7.40	2.00	0.68	6.48	89.5	
ESI 2	6.80	6.96	6.40	7.16	10.6	
ESI 3	7.56	7.12	6.40	6.68	4.1	

n; 測定せず

*1; 菌の汚染の為、測定不能

*2; 蒸留水中での攪拌操作により殺菌された為、測定不能

表 10. ESIの生化学的性状

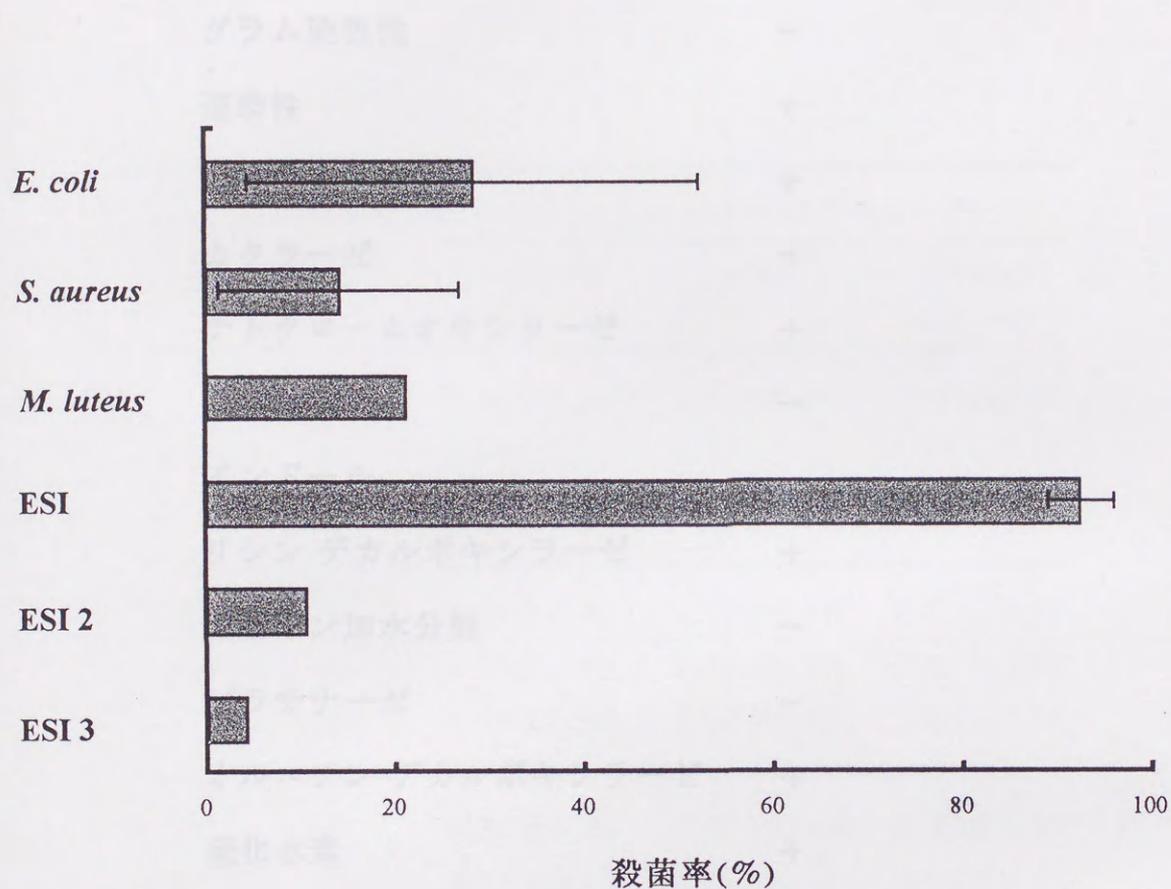


図 12. 各菌種に対するウナギ好中球の殺菌活性 (反応時間120分)

表 10. ESIの生化学的性状

グラム染色性	-
運動性	+
37°Cでの発育	+
カタラーゼ	+
チトクロームオキシターゼ	+
OFテスト	-
インドール	-
リシン デカルボキシラーゼ	+
カゼイン加水分解	-
ゼラチナーゼ	-
オルニチン デカルボキシラーゼ	+
硫化水素	+
0% NaClでの発育	+
6% NaClでの発育	-
O/129感受性	-
DNase	+

表 11. SOD存在下でのウナギ好中球の殺菌活性

	反応時間 (分)	ESIの生菌数 ($\times 10^5$ CFU/チューブ)		
		ウナギ好中球 (N)	SOD	N+SOD
ウナギA	0	7.40 \pm 0.29	7.36 \pm 0.52	7.60 \pm 0.30
	60	1.99 \pm 0.19	6.37 \pm 0.63	1.95 \pm 0.14
	120	0.71 \pm 0.06	6.84 \pm 0.97	0.65 \pm 0.30
ウナギB	0	7.97 \pm 0.40	7.97 \pm 0.38	8.00 \pm 0.37
	60	3.93 \pm 0.43	7.84 \pm 0.74	3.51 \pm 0.58
	120	1.93 \pm 0.32	7.97 \pm 0.66	1.85 \pm 0.26
ウナギC	0	6.39 \pm 0.29	6.45 \pm 0.43	6.40 \pm 0.37
	60	2.71 \pm 0.32	6.37 \pm 0.26	2.08 \pm 0.41
	120	0.93 \pm 0.46	6.23 \pm 0.28	1.51 \pm 0.79

数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

図 11. SOD存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3回の実験の典型例(表 11, ウナギA)を示した

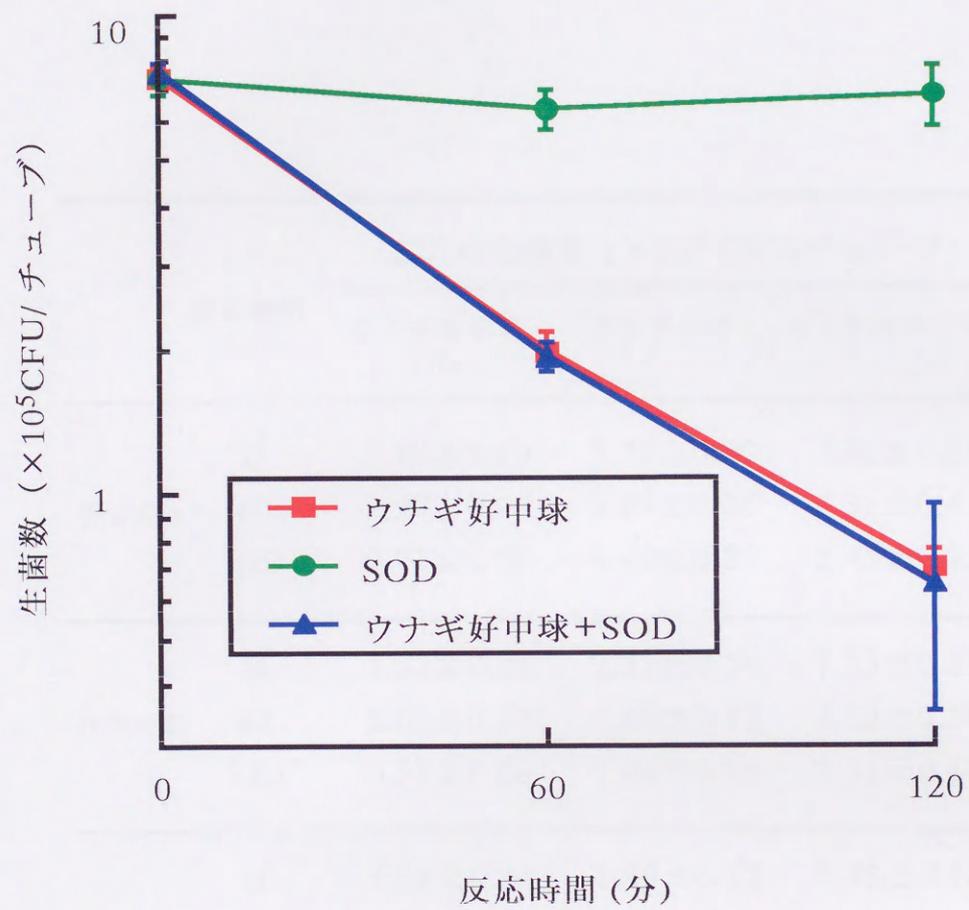


図 13. SOD存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3回の実験の典型例 (表 11. ウナギA) を示した

表 12. カタラーゼ存在下でのウナギ好中球の殺菌活性

	反応時間 (分)	ESIの生菌数 ($\times 10^5$ CFU/チューブ)		
		ウナギ好中球 (N)	カタラーゼ	N+カタラーゼ
ウナギA	0	7.40 \pm 0.29	7.79 \pm 0.30	7.51 \pm 0.22
	60	1.99 \pm 0.19	5.99 \pm 0.26	3.31 \pm 0.42
	120	0.71 \pm 0.06	6.49 \pm 0.27	2.45 \pm 0.23
ウナギD	0	7.31 \pm 0.36	7.32 \pm 0.14	7.53 \pm 0.37
	60	2.00 \pm 0.24	6.88 \pm 0.42	3.12 \pm 0.34
	120	0.57 \pm 0.08	7.04 \pm 0.26	2.91 \pm 0.67
ウナギE	0	7.65 \pm 0.34	7.39 \pm 0.12	7.63 \pm 0.16
	60	1.95 \pm 0.22	7.21 \pm 0.86	3.24 \pm 0.11
	120	0.71 \pm 0.15	7.21 \pm 0.18	2.20 \pm 0.25

数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

図 14. カタラーゼ存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3 回の実験の典型例 (表 12. ウナギA) を示した。

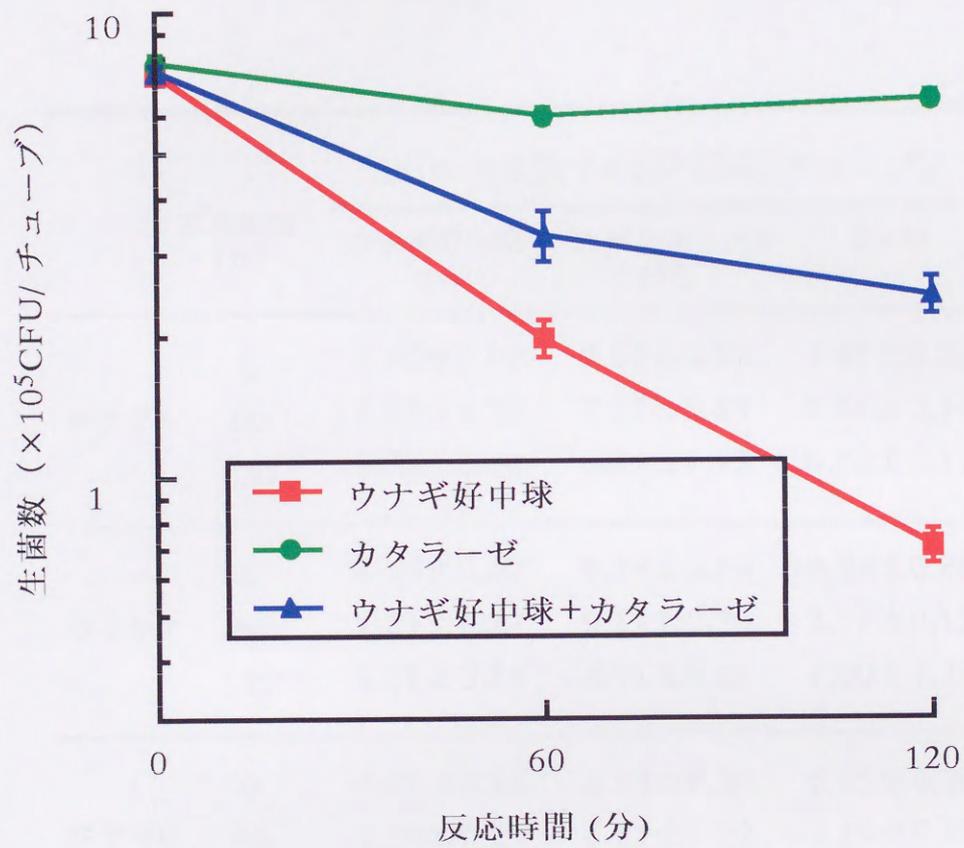


図 14. カタラーゼ存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3 回の実験の典型例 (表 12. ウナギA) を示した

表 13. D-マンニトール存在下でのウナギ好中球の殺菌活性

	反応時間 (分)	ESIの生菌数 ($\times 10^5$ CFU/チューブ)		
		ウナギ好中球 (N)	D-マンニトール (M)	N+M
ウナギA	0	7.40 \pm 0.29	7.92 \pm 0.37	7.41 \pm 0.29
	60	1.99 \pm 0.19	7.27 \pm 0.88	2.04 \pm 0.14
	120	0.71 \pm 0.06	6.93 \pm 1.13	0.68 \pm 0.12
ウナギF	0	9.25 \pm 0.62	9.04 \pm 0.59	9.24 \pm 0.80
	60	2.81 \pm 0.27	9.11 \pm 0.79	2.79 \pm 0.12
	120	1.01 \pm 0.34	8.71 \pm 0.50	1.00 \pm 0.28
ウナギG	0	6.65 \pm 0.34	6.73 \pm 0.36	6.95 \pm 0.20
	60	2.00 \pm 0.21	6.81 \pm 0.22	2.19 \pm 0.12
	120	0.45 \pm 0.20	6.67 \pm 0.28	0.51 \pm 0.14

数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

図 15. D-マンニトール存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3例の実験の典型例(表 13. ウナギA)を示した。

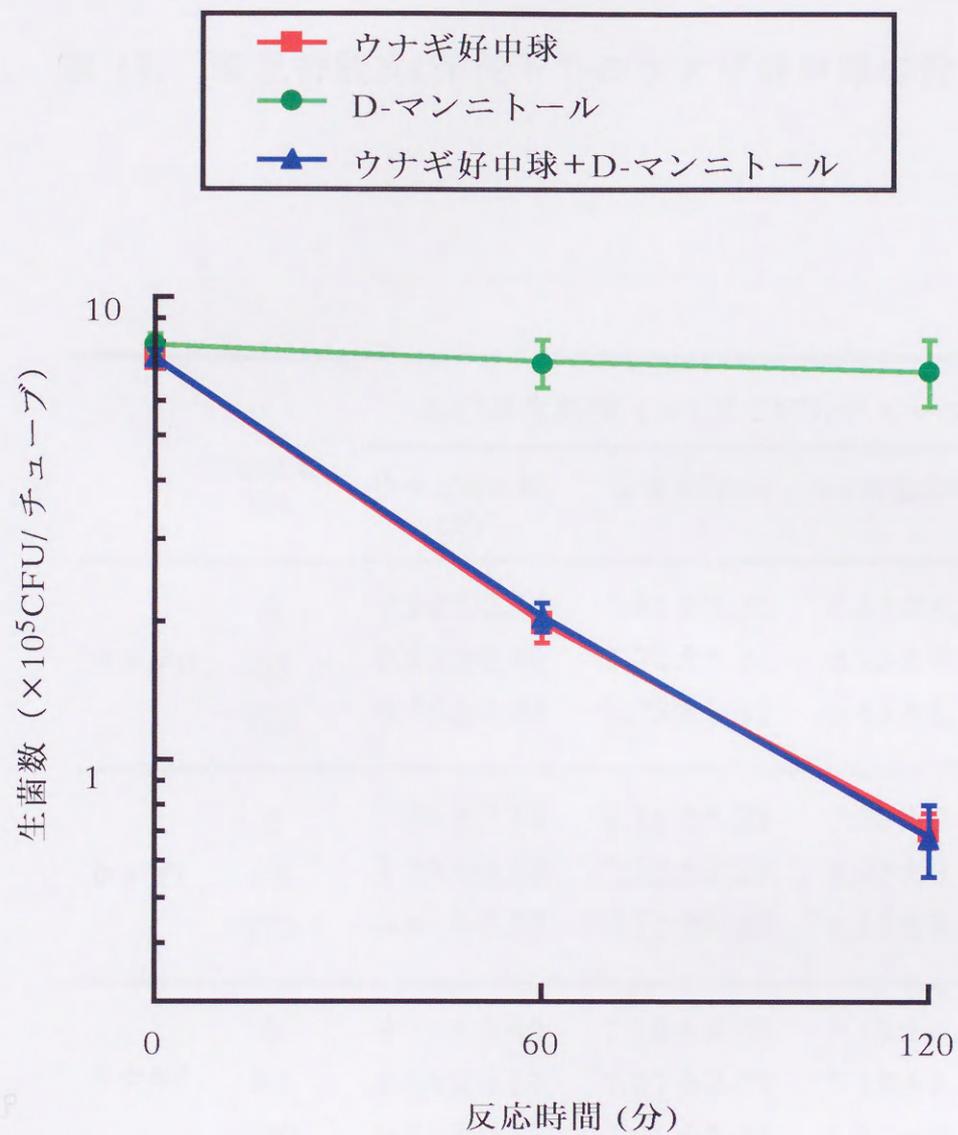


図 15. D-マンニトール存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3回の実験の典型例 (表 13. ウナギA) を示した

表 14. 安息香酸Na存在下でのウナギ好中球の殺菌活性

	反応時間 (分)	ESIの生菌数 ($\times 10^5$ CFU/チューブ)		
		ウナギ好中球 (N)	安息香酸Na	N+安息香酸Na
ウナギH	0	7.52 \pm 0.34	7.81 \pm 0.33	7.64 \pm 0.35
	60	2.23 \pm 0.40	7.72 \pm 0.24	2.23 \pm 0.31
	120	0.76 \pm 0.04	7.73 \pm 0.32	0.63 \pm 0.14
ウナギI	0	7.23 \pm 0.14	7.16 \pm 0.32	7.28 \pm 0.45
	60	2.89 \pm 0.22	7.23 \pm 0.29	2.92 \pm 0.21
	120	0.91 \pm 0.33	7.12 \pm 0.28	1.12 \pm 0.08
ウナギJ	0	7.13 \pm 0.40	7.23 \pm 0.70	7.19 \pm 0.42
	60	3.05 \pm 0.27	7.07 \pm 0.77	3.16 \pm 0.32
	120	0.81 \pm 0.21	7.01 \pm 0.24	1.15 \pm 0.34

数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

図-16. 安息香酸Na存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3回の実験の典型例(表14/ウナギH)を示した

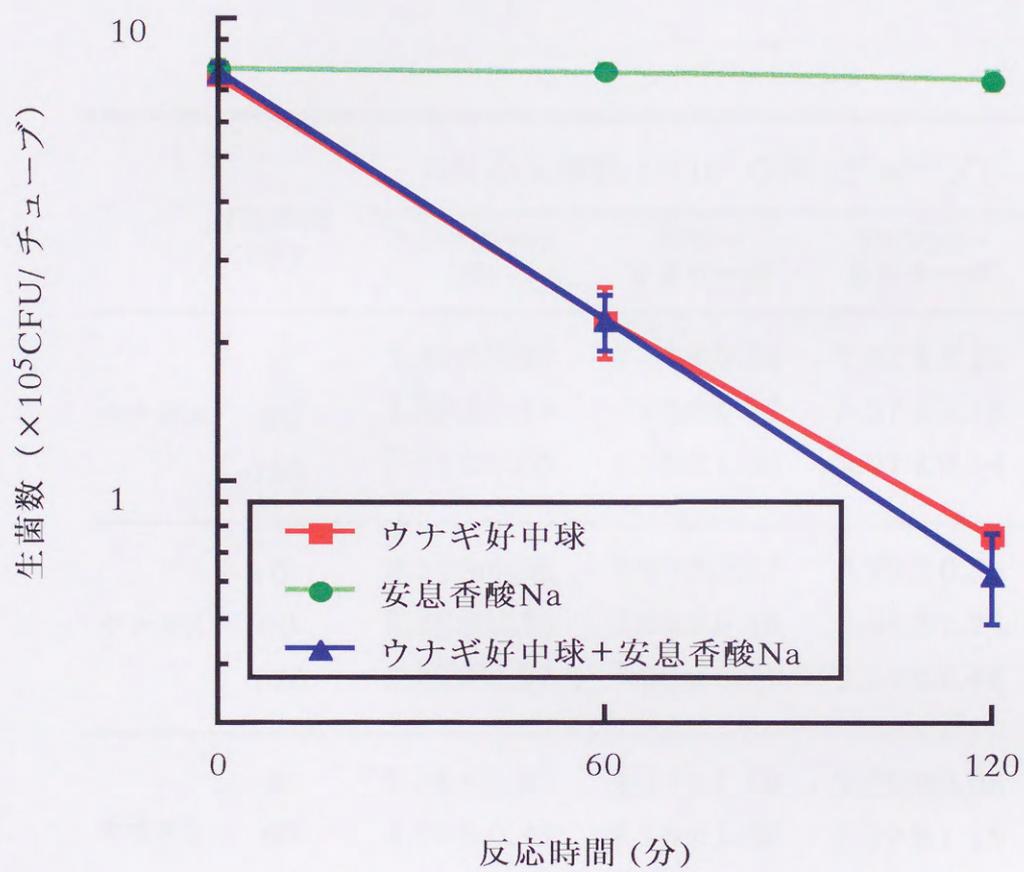


図 16. 安息香酸Na存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3回の実験の典型例 (表 14. ウナギH) を示した

表 15. SODおよびカタラーゼ共存在下でのウナギ好中球の殺菌活性

反応時間 (分)	ESIの生菌数 ($\times 10^5$ CFU/チューブ)			
	ウナギ好中球 (N)	SOD+ カタラーゼ	N+SOD+ カタラーゼ	
ウナギA	0	7.40 \pm 0.29	7.03 \pm 0.86	7.20 \pm 0.21
	60	1.99 \pm 0.19	7.63 \pm 0.58	3.27 \pm 0.18
	120	0.71 \pm 0.06	6.95 \pm 1.06	2.07 \pm 0.54
ウナギK	0	8.17 \pm 0.28	7.99 \pm 0.37	7.79 \pm 0.56
	60	2.29 \pm 0.34	7.88 \pm 0.48	3.49 \pm 0.74
	120	0.83 \pm 0.27	7.80 \pm 0.41	2.64 \pm 0.48
ウナギL	0	9.28 \pm 0.80	9.19 \pm 1.39	9.25 \pm 0.06
	60	4.29 \pm 0.45	9.16 \pm 1.00	6.29 \pm 1.15
	120	2.24 \pm 1.02	8.72 \pm 1.67	4.43 \pm 0.43

数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

図 17. SODおよびカタラーゼ共存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3回の実験の代表例(表 15-ウナギA)を示した

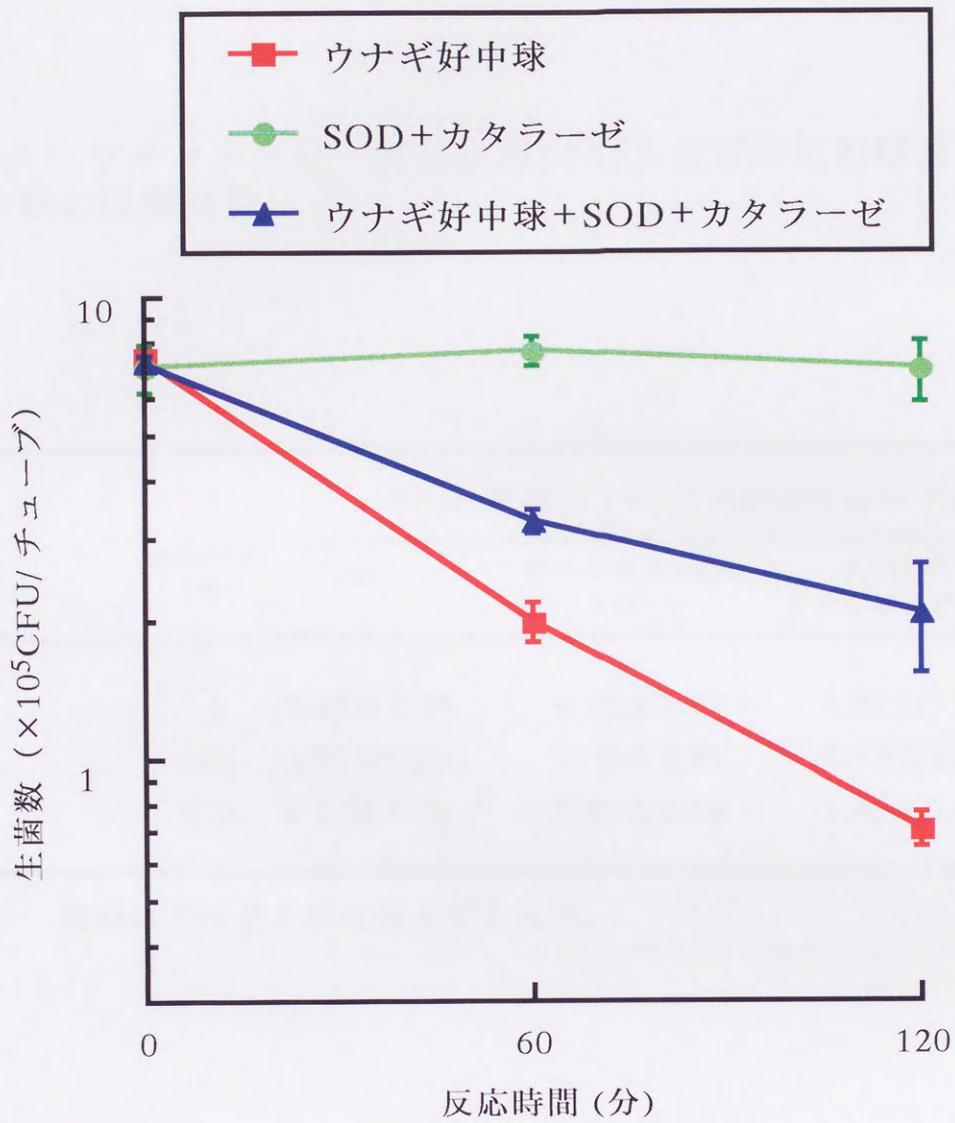


図 17. SODおよびカタラーゼ共存在下でのウナギ好中球の殺菌活性
3回の実験の典型例 (表 15. ウナギA) を示した

表 16. ラテックスビーズおよびSOD共添加時におけるウナギ好中球の殺菌活性

反応時間 (分)	ESIの生菌数 ($\times 10^5$ CFU/チューブ)		
	SOD	ウナギ好中球(N) +SOD	N+SOD+ ラテックスビーズ
0	6.45 \pm 0.43	6.40 \pm 0.37	6.37 \pm 0.52
60	6.37 \pm 0.26	2.08 \pm 0.41	2.19 \pm 0.34
120	6.23 \pm 0.28	1.51 \pm 0.79	1.45 \pm 0.65

数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

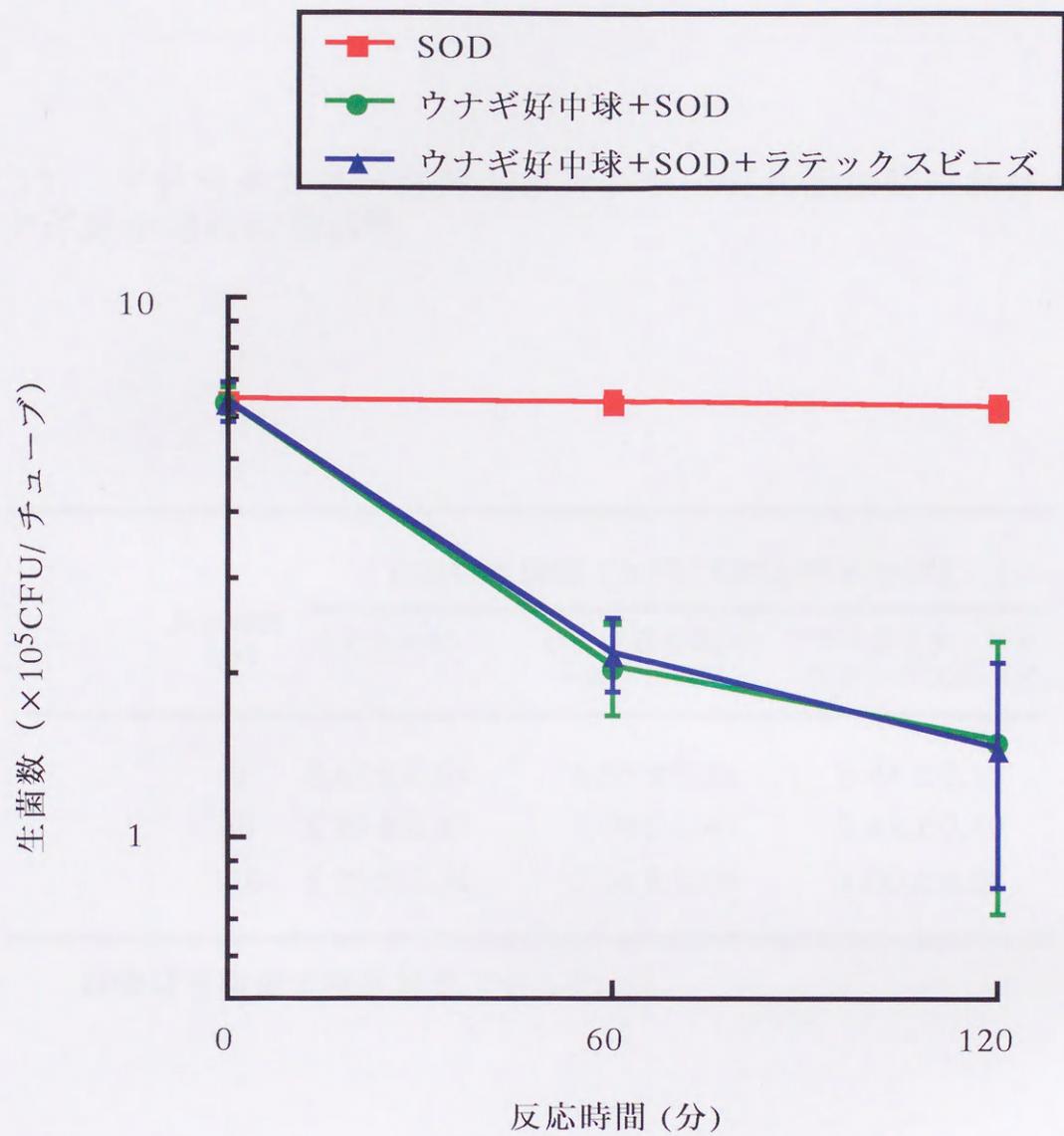


図 18. ラテックスビーズおよびSOD共添加時でのウナギ好中球の殺菌活性

表 17. ラテックスビーズおよびカタラーゼ共添加時における
ウナギ好中球の殺菌活性

反応時間 (分)	ESIの生菌数 ($\times 10^5$ CFU/チューブ)		
	カタラーゼ	ウナギ好中球(N) +カタラーゼ	N+カタラーゼ+ ラテックスビーズ
0	6.47 \pm 0.57	6.55 \pm 0.51	6.44 \pm 0.17
60	6.45 \pm 0.32	4.04 \pm 0.45	3.44 \pm 0.49
120	6.28 \pm 0.32	3.08 \pm 0.38	3.00 \pm 0.21

数値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

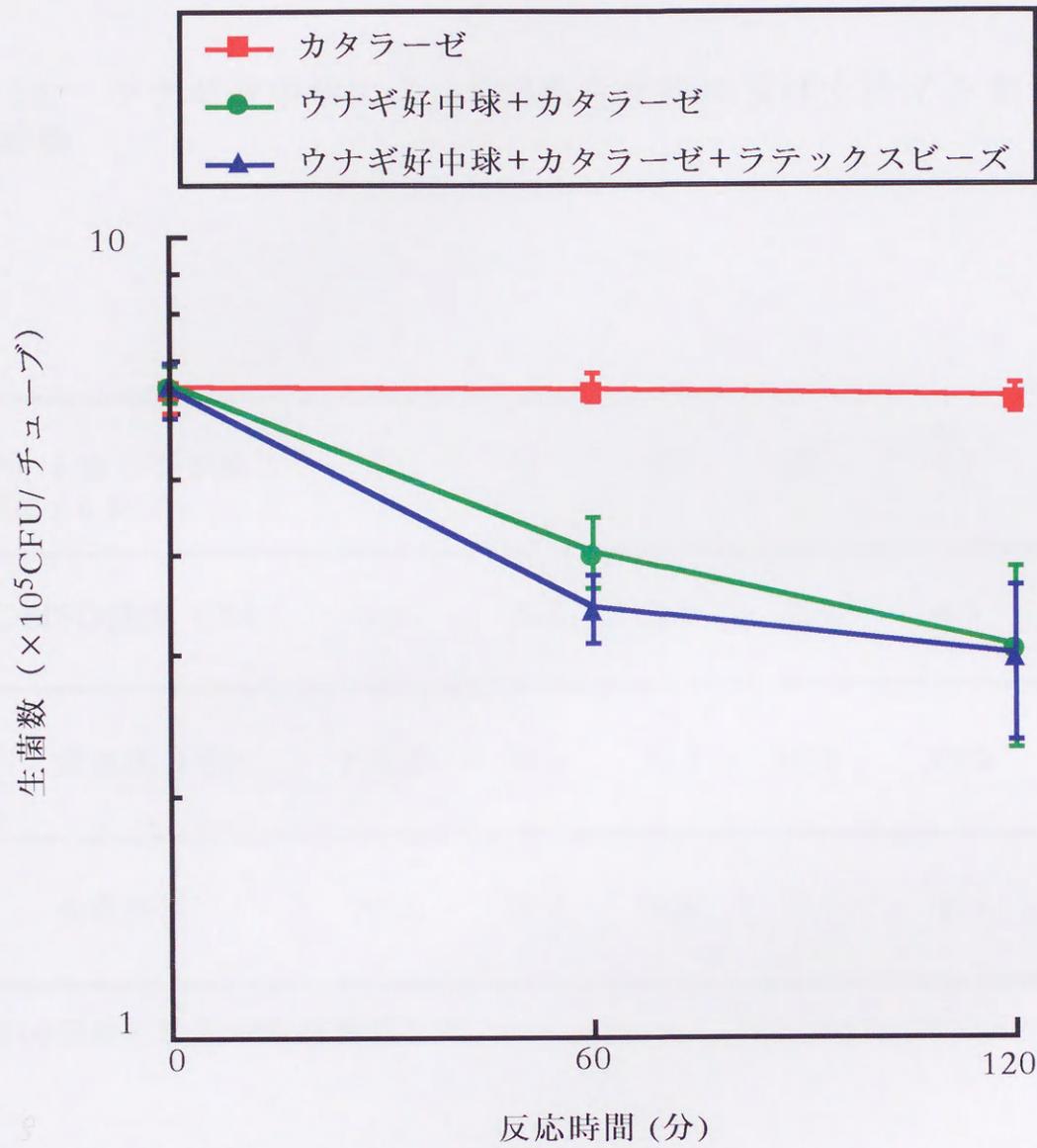


図 19. ラテックスビーズおよびカタラーゼ共添加時におけるウナギ好中球の殺菌活性

表 18. ウナギ好中球によるESIの食食能に及ぼすサイトカラシンBの影響

サイトカラシンB 濃度 (μ g/ml)	0	5	10	20	40	100
DMSO濃度 (%)	0.0	0.5	1.0	2.0	4.0	10.0
食食率 (%)	100.0	98.8	93.6	80.9	59.2	9.2
食食指数	36.3	29.4	9.5	3.7	1.7	0.2

500個以上の好中球を観察した。

$$\text{食食率 (\%)} = \frac{\text{細菌 (ESI) を食食した好中球}}{\text{観察した好中球数}} \times 100$$

$$\text{食食指数} = \frac{\text{観察した好中球に食食された細菌 (ESI) 数}}{\text{観察した好中球数}}$$

図 20. ウナギ好中球によるESIの食食能に及ぼすサイトカラシンBの影響

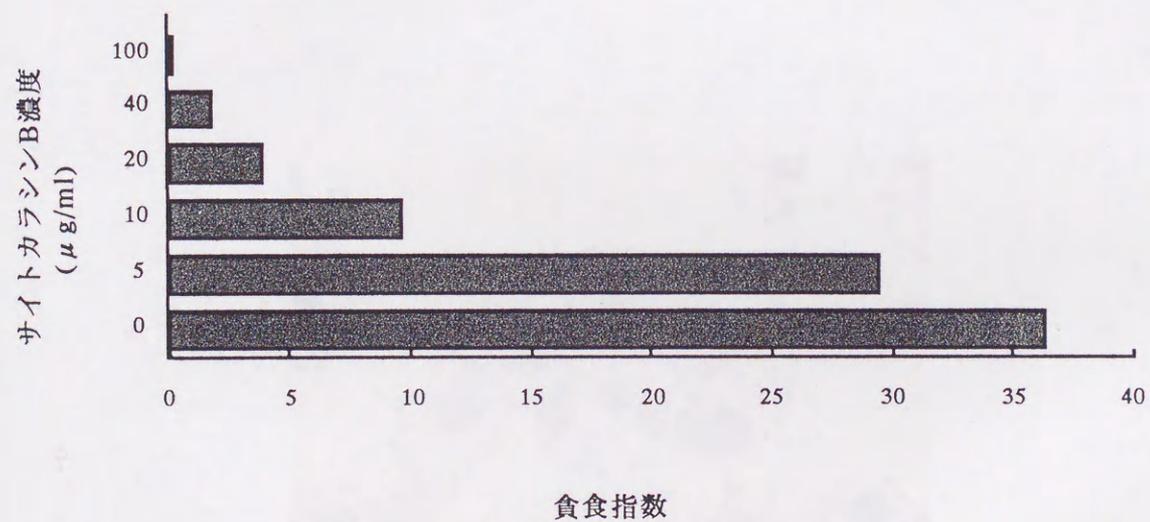
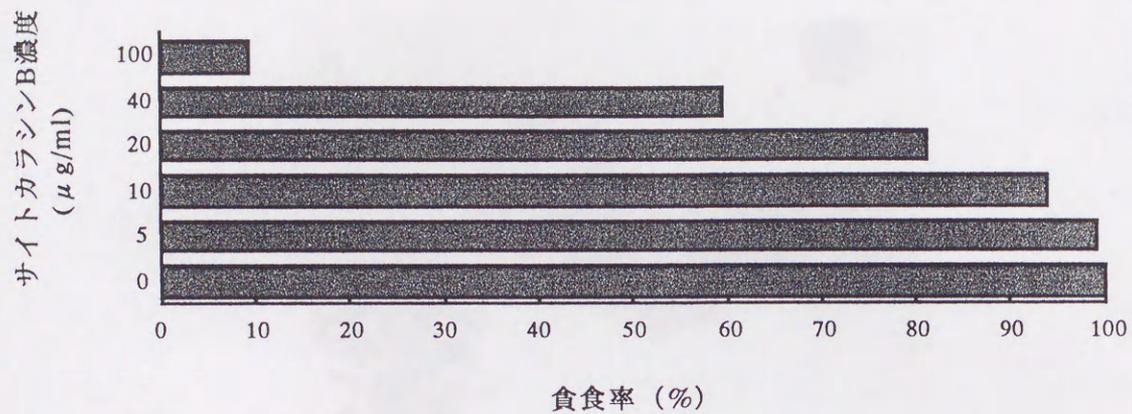


図 20. ウナギ好中球によるESIの食食能に及ぼすサイトカラシンBの影響

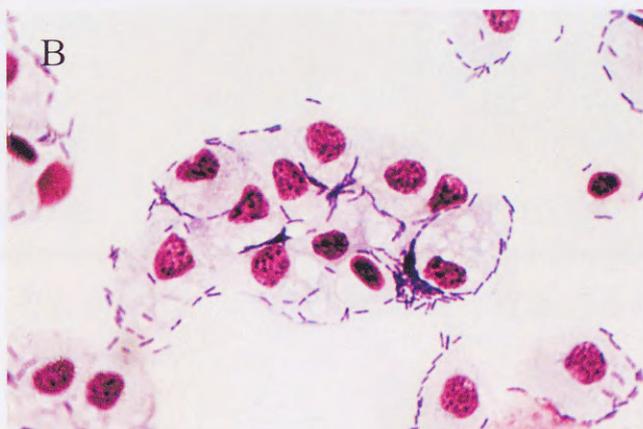
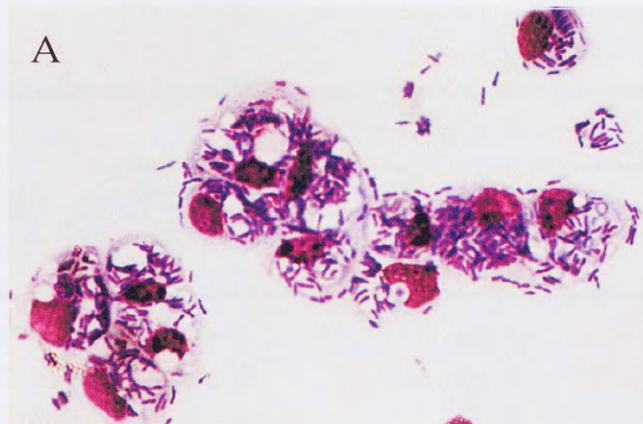


図 21. サイトカラシンB処理ウナギ好中球によるESIの貪食像
A; 無処理好中球、B; サイトカラシンB (20 μ g/ml) 処理好中球
貪食時間30分

表 19. ウナギ好中球の殺菌における食胞形成阻害剤（サイトカラシンB）の影響

反応時間 (分)	ESIの殺菌率 (%)			
	無処理 (対照) 好中球 (N)	サイトカラシンB (CB)処理N	CB処理N+ カタラーゼ	
60	ウナギN	27.7	58.0	58.0
	ウナギO	34.6	64.2	55.2
	ウナギP	23.5	40.4	38.6
	ウナギQ	42.9	48.6	60.5
	ウナギR	13.4	59.2	54.4
	平均値±標準偏差	28.4±11.2	54.1±9.5※	53.4±8.6※
120	ウナギN	4.9	56.1	48.2
	ウナギO	4.7	58.3	39.7
	ウナギP	5.8	39.4	58.7
	ウナギQ	36.8	39.2	70.0
	ウナギR	2.2	61.7	39.3
	平均値±標準偏差	10.9±14.6	50.9±10.8*	51.2±13.2*

※, *はそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ で対照と有意差あり

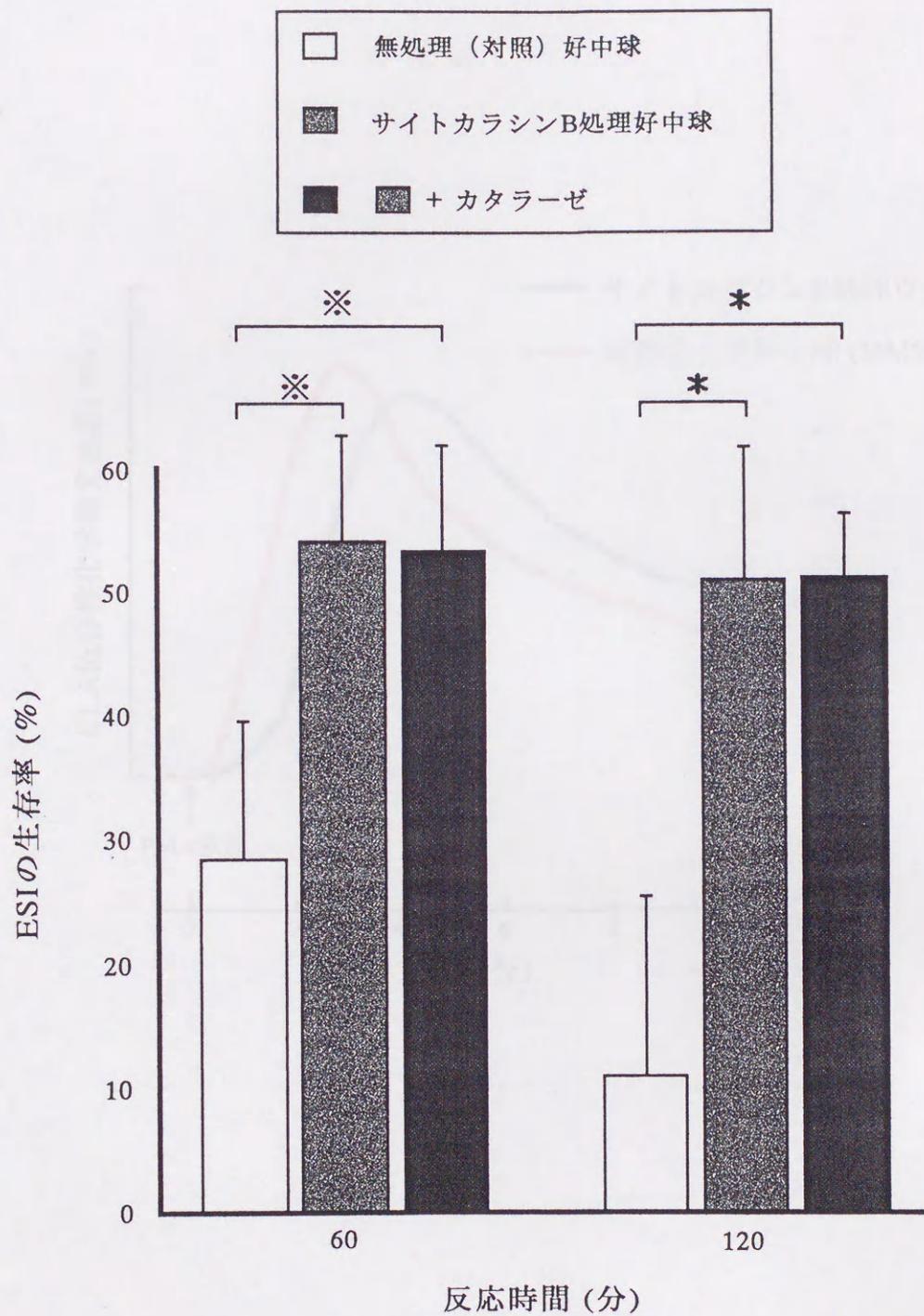


図 22. ウナギ好中球の殺菌における食胞形成阻害剤 (サイトカラシンB) の影響
 ※, *はそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ で対照と有意差あり

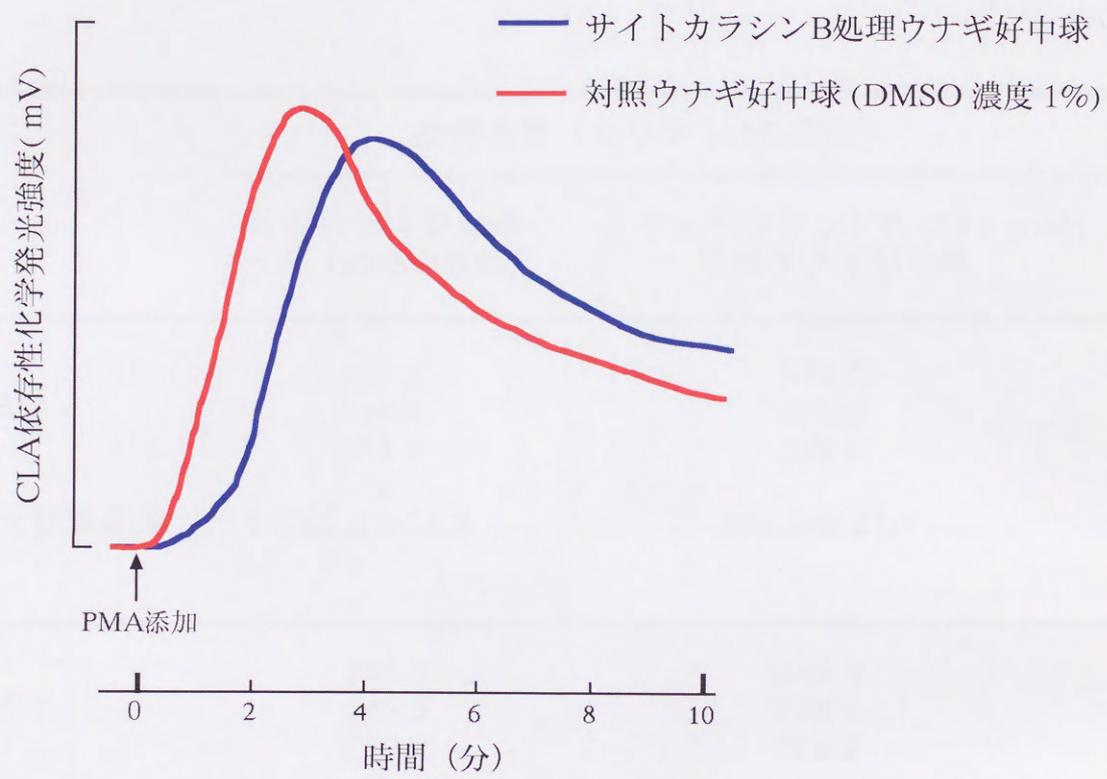


図 23. サイトカラシンB ($10 \mu\text{g/ml}$)で処理したウナギ好中球のCLA依存性化学発光 (スーパーオキシド産生)

表 20. サイトカラシンBで処理したウナギ好中球のスーパーオキシド
 産生 (CLA依存性化学発光)

	総発光量 (カウント/10 分間)	
	対照ウナギ好中球 (1% DMSO処理)	サイトカラシンB (10 μ g/ml) 処理ウナギ好中球
ウナギS	355.5	379.0
	386.5	390.0
	354.5	339.0
平均±標準偏差	365.5±14.9	369.3±21.9
ウナギT	266.0	246.5
	245.5	229.5
	240.0	255.5
平均±標準偏差	250.5±11.2	243.8±10.8

図 24. サイトカラシンBで処理したウナギ好中球のスーパー
 オキシド産生 (CLA依存性化学発光)

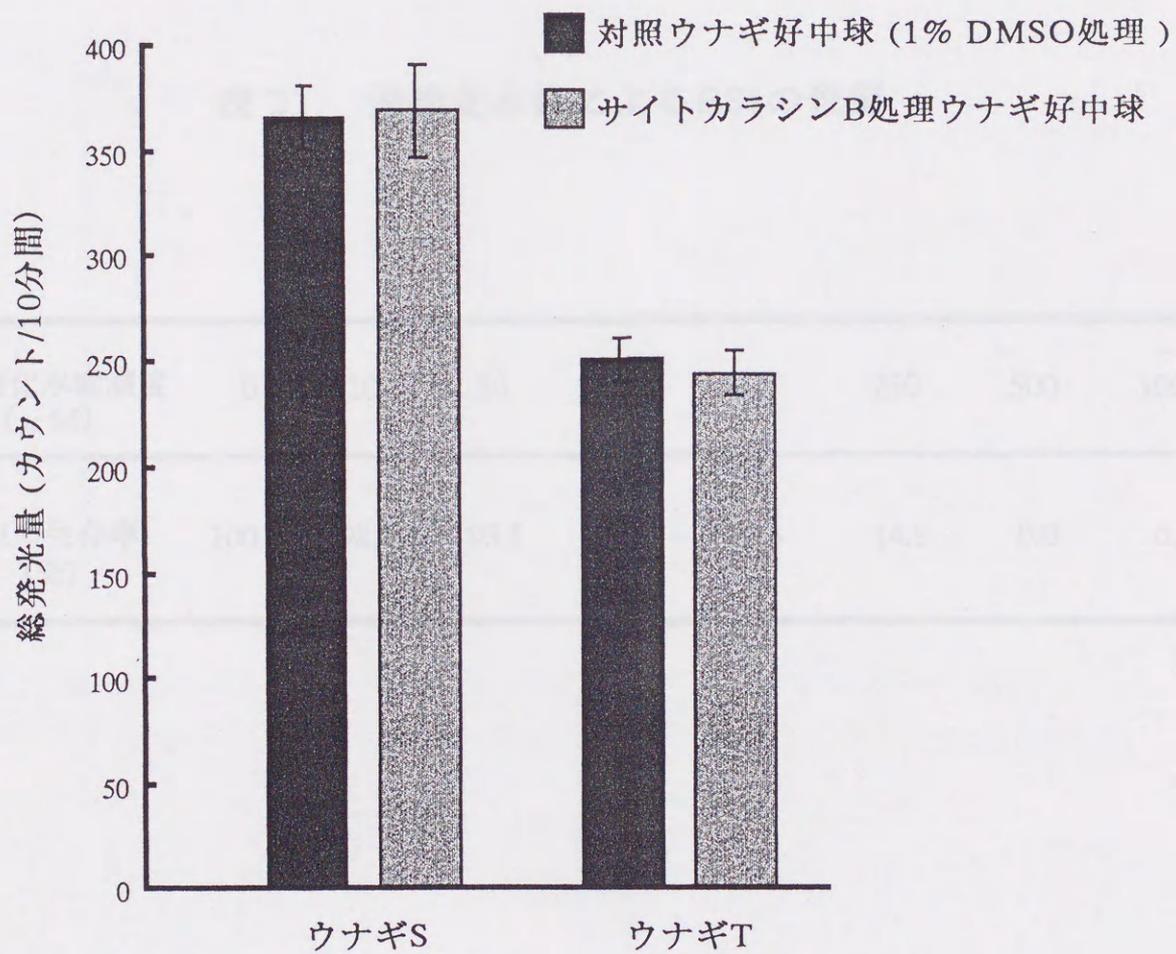


図 24. サイトカラシンBで処理したウナギ好中球のスーパーオキシド産生 (CLA依存性化学発光)

表 21. 過酸化水素によるESIの殺菌

過酸化水素濃度 (μ M)	0	10	20	50	100	250	500	1000
ESIの生存率 (%)	100.0	98.5	95.5	65.7	43.3	14.9	0.0	0.0

図25) 過酸化水素による ESI の殺菌

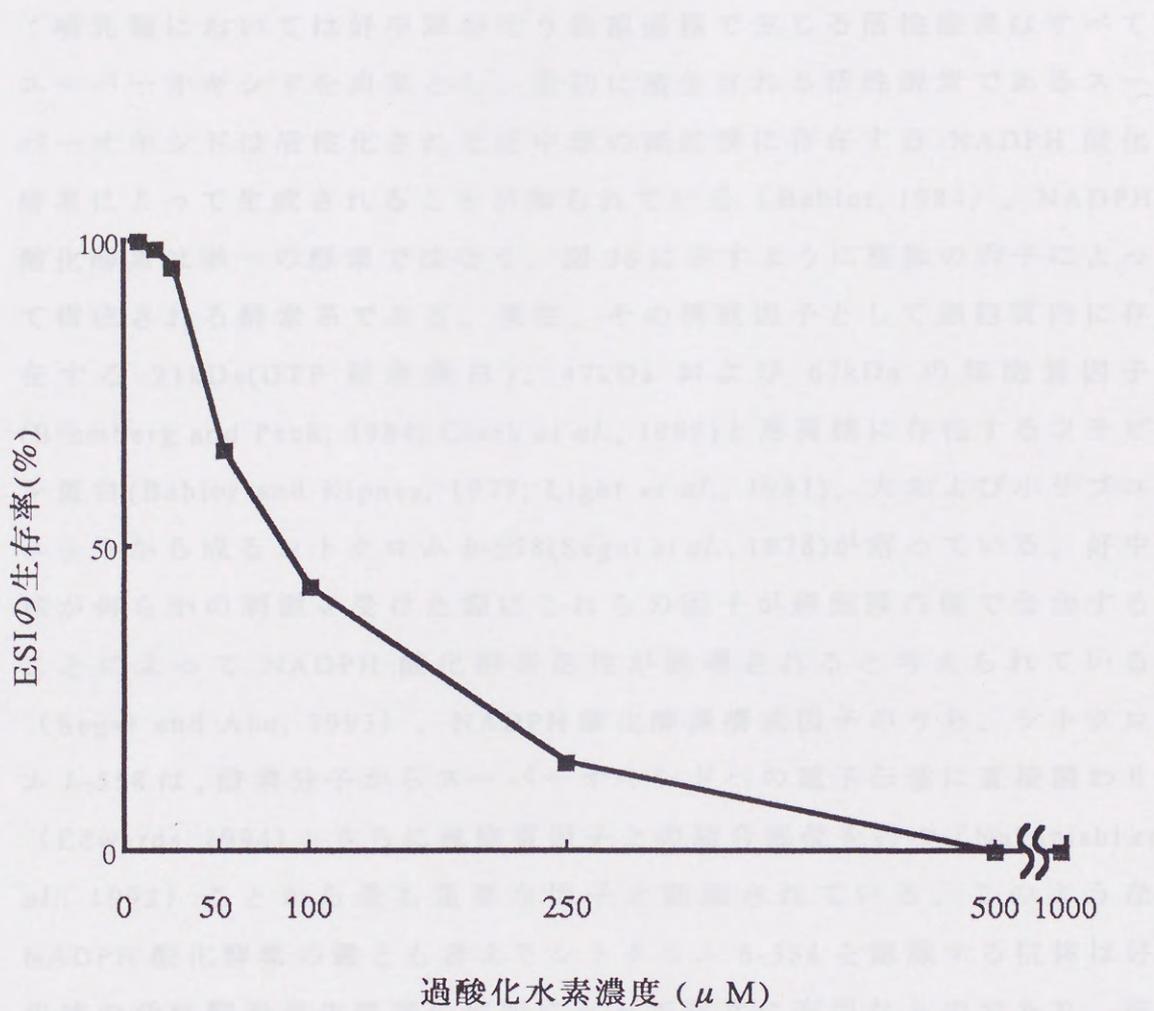


図 25. 過酸化水素による ESI の殺菌

第四章 魚類好中球における NADPH 酸化酵素の証明

哺乳類においては好中球が行う殺菌過程で生じる活性酸素はすべてスーパーオキシドを由来とし、最初に産生される活性酸素であるスーパーオキシドは活性化された好中球の細胞膜に存在する NADPH 酸化酵素によって生成されることが知られている (Babior, 1984)。NADPH 酸化酵素は単一の酵素ではなく、図 26 に示すように複数の因子によって構成される酵素系である。現在、その構成因子として細胞質内に存在する 21kDa(GTP 結合蛋白)、47kDa および 67kDa の細胞質因子 (Bromberg and Peck, 1984; Clark *et al.*, 1989) と形質膜に存在するフラビン蛋白 (Babior and Kipnes, 1977; Light *et al.*, 1981)、大および小サブユニットから成るシトクロム *b*-558 (Segal *et al.*, 1978) が解っている。好中球が何らかの刺激を受けた際にこれらの因子が細胞膜内側で会合することによって NADPH 酸化酵素活性が誘導されると考えられている (Segal and Abo, 1993)。NADPH 酸化酵素構成因子のうち、シトクロム *b*-558 は、酸素分子からスーパーオキシドへの電子伝達に直接関わり (Edwards, 1994)、さらに細胞質因子との結合部位を持つ (Nakanishi *et al.*, 1992) ことから最も重要な因子と認識されている。このような NADPH 酸化酵素の鍵とも言えるシトクロム *b*-558 を認識する抗体は好中球の活性酸素産生機構の解明にとって非常に有用なものであり、抗シトクロム *b*-558 抗体を使った実験から哺乳類好中球のみならずマクロファージさらには B リンパ球にもシトクロム *b*-558 の存在が確認され (Kobayashi *et al.*, 1990; Maly *et al.*, 1989)、NADPH 酸化酵素の局在様式や機能に関しても多くの知見が得られている (Nakamura *et al.*, 1988; Verhoeven *et al.*, 1989; Jesaitis *et al.*, 1990; Rotrosen *et al.*, 1990; Imajoh-Ohmi *et al.*, 1992; Nakanishi *et al.*, 1992)。そこで、ヒトのシトクロム *b*-558 大サブユニットの一部を構成するペプチドを抗原として抗シトクロム *b*-558 抗体を作成し、魚類好中球におけるシトクロム *b*-558 の検出を試みた。

1. 材料および方法

(1) 好中球の分離

ウナギ好中球の分離は第二章と同様の操作によって行った。すなわち、*E. coli* IAM1239 死菌を 1mg 腹腔内に接種したウナギより採血し、フィコール・メトリゾ酸による不連続密度勾配遠心法によって好中球を分離した。分離されたウナギ好中球は HBSS で 1×10^6 または 1×10^7 細胞/ml に調整した。

対照としてヒト好中球を分離した。分離は柿沼ら (1992) による方法を利用した。すなわち、健常者の橈側皮静脈からヘパリン Na の入ったシリンジで 10ml 採血し、2%デキストラン溶液 6.7ml とよく混和した後、室温で静置した。30 分後、赤血球層の上の白血球を含んだ血漿層を静かにとってスピッツ管に移し、パスツールピペットで 2ml の Ficoll-Paque (Pharmacia) を静かに血漿層の下部に入れた。400×g、20°C で 30 分遠心した後、上層とリンパ球、単球、血小板を含んだ中間層を捨て、残った赤血球を含む好中球層に 0.2%NaCl を加えてよく攪拌し、直ちに等量の 0.6%NaCl を加えて等張に戻し、混入赤血球の溶血を行った。さらに 150×g、20°C で 5 分間遠心し、上清を捨て沈査を 2 回遠心洗浄した後、HBSS に浮遊し、 1×10^7 細胞/ml に調整した。

またウナギ以外にクロソイ (*Sebastes schlegeli*)、シマアジ (*Caranx delicatissimus*)、スズキ (*Lateolabrax japonicus*)、ブリ、メジナ (*Girella punctata*) の各種海産魚種からも好中球を分離した。これら各種海産魚は大分県海洋水産研究センターで飼育されていたものを使用した。好中球の分離には Endo *et al.* (1995, 1997) による鰯を利用した方法を適用した。まず、分離に先だって鰯内へ *E. coli* 死菌 5mg/ml を 0.5~2ml 接種した。死菌接種 24 時間後魚を取り上げ十分放血した後、腹部を切開し腹腔内臓器を取り除き鰯を露出した。約 5ml の冷 HBSS をシリンジで鰯内に加え魚体を暫く揺り動かした後、HBSS を回収するという操作を数回繰り返すことにより鰯内に滲出してきた好中球を得た。得られた好中球は、HBSS で 2 回遠心洗浄の後、 1×10^7 細胞/ml に調整した。

なお、ブリを除く海産魚種では多量の好中球を得るため3~5尾から分離した好中球をプールした。

[シトクロム *b*-558 大サブユニットに対する抗体の作製]

(2) 抗原の調製

シトクロム *b*-558 大サブユニットに対する抗体を作成するために用いた抗原およびその調製法は Imajoh-Ohmi *et al.*(1992)を参考にした。ヒト好中球のシトクロム *b*-558 は膜貫通型蛋白質であり、大小両サブユニットとも細胞膜の内外に露出する部位を持っていることが報告されている (Imajoh-Ohmi *et al.*, 1992)。その模式図を図 27 に示した。シトクロム *b*-558 大および小サブユニット蛋白の一時構造はヒトの cDNA クローニングから明らかにされている (Royer-Pokora *et al.*, 1986; Teahan *et al.*, 1987)。今回の実験で抗原として利用したのは、大サブユニットの 569 個のアミノ酸残基の内、細胞膜外側領域の 150~172 残基 (SYLNFARKRIKNPEGGLYLAVTL) およびカルボキシル末端である細胞膜内側領域の 550~569 残基 (ISNSESGPRGVHFIFNKENF) である。これら 2 つのペプチドに後のキャリアー蛋白への架橋部位としてシステイン (C) を結合した Le; SYLNFARKRIKNPEGGLYLAVTL-C および Li; C-ISNSESGPRGVHFIFNKENF (サフディー・テクノロジー) を合成した。

合成ペプチド単独では抗原性が低いため、キャリアー蛋白に結合した (大海ら, 1994)。キャリアー蛋白には keyhole limpet hemocyanin (KLH) を用い、ペプチドとの結合に先立ち、架橋剤である *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydrosuccinimide ester (MBS) で KLH のアミノ基を修飾したもの (KLH-MB) を作成した。KLH-MB の作成は以下のように行った。まず KLH (Sigma) 16mg を 10mM リン酸 Na 緩衝液 (pH7.2) 10ml に加えよく攪拌した後、13000×*g*、5分遠心して上清をとり、KLH 溶液とした。この KLH 溶液を室温で攪拌しながら MBS (0.3g/ml dimethyl formamide) 10μl を少量ずつ加え、さらに 30分攪拌して溶解した後、13000×*g*、5分遠心して上清を得た。得られた上清を平衡化した Sephadex G-25 カラムにかけ、50mM リン酸 Na 緩衝液 (pH6.0) 中で KLH-MB を溶

出、同時に 280nm での吸光度を測定しながらフラクションコレクター（アトー）によって分取した。KLH-MB が溶出されたフラクションをひとつにまとめ（約 10ml）、10 等分して -80°C に保存した。なお SephadexG-25 カラムは下端にシリコンチューブを付けたエコノカラム（BioRad）に蒸留水で膨潤させた SephadexG-25（Pharmacia）を上部まで詰めた後、50mM リン酸 Na 緩衝液（pH6.0）で十分平衡化することによって作成した。

以上のようにして作成した KLH-MB 1ml、0.5ml の蒸留水に溶解した合成ペプチド 1mg（Le または Li）および 0.2M リン酸二 Na 溶液 0.5ml を混合し、その液面に窒素ガスを吹き付けた後、室温の下、ローターで 3 時間振盪してペプチドと KLH-MB を結合した。KLH 結合ペプチド溶液は分注し（ペプチド $100\mu\text{g}/\text{tube}$ ）、免疫まで -80°C に保存した。

(3) ウサギへの免疫

免疫動物にはウサギ（ニュージーランドホワイト種、雌、生後三か月齢）を用いた。初回免疫は、アジュバントに Freund complete adjuvant (FCA, Difco) を用いて KLH 結合合成ペプチド（KLH-Le または KLH-Li）を接種した。すなわち、KLH-Le または KLH-Li $100\mu\text{g}$ を滅菌生理食塩水 1ml に溶解した抗原溶液と FCA 1.5ml とを接続管で連結された 2 つのルーアロック式ガラス注射筒（エムエス）でよく混合し、得られたエマルジョンをウサギ背部に数カ所に分けて皮下注射した。初回免疫から 3 週間および 5 週間後に FCA の代わりに Freund incomplete adjuvant (Difco) を用いて初回と同様の方法による 2 回の追加免疫を行った。なお Le および Li の 2 つの抗原につき、それぞれ 2 羽のウサギ（E1、E2 および I1、I2）を免疫した。

(4) ELISA による抗体価の測定

免疫したウサギの血中抗体価を ELISA 法によって測定した。ELISA には初回免疫から 3、5 および 7 週間後にウサギの耳介静脈から少量採血し、室温で一時間保温、一晚 4°C に静置した後、 $1200\times g$ 、10 分間遠

心して分離した血清を用いた。分離血清は 0.45 μ m フィルター（ミリポア）で濾過滅菌し、分注して測定まで -80 $^{\circ}$ C に保存した。ELISA による抗 Le および抗 Li 抗体の抗体価の測定は次のようである。まず合成ペプチド (Le, Li) を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.2) に溶解して 1 μ g/ml の抗原溶液を作成した。この抗原溶液を 96well ELISA 用マイクロプレート (岩城硝子) に 50 μ l/well ずつ加え、4 $^{\circ}$ C で一晩静置し、抗原のコートを行った。その後抗原溶液を捨て、0.05% Tween20 を含む PBS (Tween20-PBS, pH7.2) で各 well を 2 回洗浄し、1% スキムミルクを含む Tween20-PBS を 200 μ l/well ずつ加え、さらに 4 $^{\circ}$ C で一晩静置し、ブロッキングを行った。再び Tween20-PBS で 2 回洗浄し、試料である免疫ウサギ血清および対照として用いた抗 *Vibrio anguillarum* ウサギ抗血清の PBS 希釈溶液をそれぞれ 100 μ l/well ずつ加え、室温で 60 分間反応を行った。反応後 2 回洗浄し、1% スキムミルク加 Tween20-PBS で 2000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体（和光純薬）を 50 μ l/well 加え、60 分間反応を行った。反応後 3 回洗浄し、OPD 発色基質溶液を 100 μ l/well ずつ加え、発色反応を行った。反応 30 分後、各 well の吸光度を ELISA リーダー (O.D.497、BioRad) によって測定した。OPD 発色基質溶液は反応直前にクエン酸リン酸緩衝液 (pH5.0) 10ml に Orthophenylenediamine (OPD、和光純薬) 4mg を溶解した後、30% 過酸化水素を 3 μ l 加えることにより作成した。

(5) 抗血清の調製

免疫したウサギの血中抗体価が十分上昇したのを確認した後、頸動脈から全採血を行った。採血した血液を室温で一時間保温した後、4 $^{\circ}$ C で一晩静置した。翌日 1200 \times g、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し、上清の血清を回収した。得られた抗血清は、蛋白吸着率の低い 0.22 μ m のフィルター (SLGV025LS、ミリポア) で濾過し、分注した後 -80 $^{\circ}$ C に保存した。

(6) 抗シトクロム *b*-558 抗体の精製

抗体精製の前段階としてウサギ抗血清（抗 Le、Li）から IgG 画分を

プロテイン A カラムによって分離した。IgG に親和性を持つプロテイン A を利用したカラムには市販のキット (Mono Ab TM rec-Protein A Column Purification System、ZYMED) を使用した。その結果、抗血清 1ml から約 7ml の IgG 画分 (1.16~1.95mg/ml、ウサギ IgG 溶液 1mg/ml \div 1.35 [O.D.₂₈₀]) として計算) を得た。

さらにその IgG 画分中に含まれる合成ペプチドに反応する抗体のみを得るために、ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを用いて抗シトクロム *b*-558 抗体の精製を行った。ペプチド固定化アフィニティーカラムは以下のようにして作成した。0.3g の 2-fluoro-1-methylpyridinium toluene-4-sulfonate (FMP 活性化セルロファイン、生化学工業) を蒸留水 50ml で十分に膨潤させ、市販のカラム (ムロマックミニカラム L 容量 10ml、室町化学工業) に充填した。10ml の蒸留水でカラムを洗浄し、一旦、液を涸らして下側の口を閉じた後、カップリングバッファー (50mM 炭酸 Na-重炭酸 Na 緩衝液、pH8.5) に溶解した合成ペプチド 1mg を加え、上部の口を閉じて室温で一晩転倒混和した。翌日カラムを固定して下端にシリコンチューブを取り付け、内部のペプチド溶液を捨てた後、5ml のカップリングバッファーでカラムを洗浄した。さらに 20ml のブロッキングバッファー (0.1M モノエタノールアミン、50mM Tris-HCl 緩衝液、pH8.0) でカラムを洗浄した後、10ml のブロッキングバッファーをカラム内に残して上下の口を閉じ室温で 3 時間転倒混和してブロッキングを行った。ブロッキング終了後、再度カラムを固定して内部の溶液を流し、蒸留水 20ml、0.1M Gly-HCl (pH2.5) 20ml、洗浄バッファー (1M NaCl, 1% Triton X-100, 20mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5) 20ml、さらに蒸留水 20ml の順でカラムを洗浄し、合成ペプチド固定化アフィニティーカラムを作成した。使用するまでカラムには最終濃度 5mM NaN₃ を添加し、冷蔵庫に保存した。

作成されたペプチドカラムにプロテイン A カラムで分離した IgG 画分を通し、合成ペプチドに吸着した特異的な抗体画分のみを回収した。すなわち、Tris 緩衝生理食塩水 (TBS; 0.15M NaCl, 20mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5) でカラムを平衡化し、カラム内の TBS を流しきって下端を

閉じた後、約 7ml の IgG 画分 (1.16~1.95mg/ml) をカラムに加え、転倒混和して 4°C で一晩静置した。翌日カラムを冷却チェンバー内に固定し、TBS 10ml、洗浄バッファー 30ml、TBS 30ml、0.15M NaCl 10ml の順にカラムを洗浄した後、1.5ml の溶出バッファー (0.1M Gly-HCl、pH2.5) を静かにゲルに重層した。その上に 3ml さらに 1ml の溶出バッファーをのせ、中和のために 1M Tris 溶液 0.2ml が入ったスピッツ管にカラムからの溶出液を回収した。回収溶液の抗 Le または Li 抗体の IgG 濃度は 21~74 μ g/ml であった。精製抗体は抗血清と同様に濾過滅菌、分注した後、-80°C に保存した。

[魚類好中球におけるシトクロム *b*-558 の検出]

(7) ドットブロット法

得られた抗ペプチド抗体が認識しうるエピトープが魚類好中球に存在するか否か、つまりシトクロム *b*-558 大サブユニットの魚類好中球での存在を調べるためにウナギ好中球破碎液に対してドットブロッティングを行った。ウナギ好中球 (1×10^7 細胞/ml) を氷冷しながら超音波処理装置 (UP-50H、KUBOTA) で破壊したウナギ好中球破碎液、対照として合成ペプチド Le、Li (それぞれ 10 μ g/ml) および PBS さらにヒト好中球 (1×10^7 細胞/ml) 破碎液をメタノール続いて蒸留水で処理した polyvinylidene difluoride (PVDF、フナコシ) 膜上にそれぞれ 1 μ l ずつスポットした後、PBS で洗浄、続いて 1% スキムミルク加 Tween20-PBS で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、膜を Tween20-PBS で洗浄し、1000 倍希釈した抗 Le、Li 抗血清、抗 Le、Li 精製抗体 (IgG 濃度 0.5~1 μ g/ml) および PBS と 37°C、1 時間反応した。反応後、Tween20-PBS で 3 回洗浄し、2000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (和光純薬) と 37°C、1 時間反応した。反応後、Tween20-PBS で 4 回洗浄した膜を 3,3'-diaminobenzidine (DAB、同仁化学) 5mg を溶解した PBS 10ml に 30% 過酸化水素 3 μ l を添加した DAB 発色液に浸し、発色反応を行った。発色反応後直ちに水道水に浸し反応を停止した。

内因性 MPO による反応が見られた場合には、その酵素活性を阻止す

るため標本を冷エタノールに 10 分間浸漬した後、0.3%過酸化水素と 30 分間反応させるか、または 6mM 過ヨウ素酸水溶液に 10 分間浸漬、洗浄した後、3mM 水素化ホウ素 Na 水溶液に 30 分間浸す方法を試みた。

(8) SDS-PAGE のための好中球試料作製

好中球浮遊液 (1×10^7 細胞/ml) 1ml を 1.5ml マイクロチューブに入れ、100% trichloro-acetic acid (TCA、和光純薬) 100 μ l を加え、水中で 15 分間固定した後、13000 $\times g$ 、5 分間遠心して TCA を除いた。チューブに 2% Triton X-100、5% 2-mercapto ethanol 加 9M 尿素溶液 80 μ l さらに 0.1% bromophenol blue(BPB)添加 10% lithium lauryl sulfate 20 μ l を加え、好中球沈査を超音波処理装置 (UP-50H、KUBOTA) で十分破碎した後、2M Tris 溶液を適宜加え中和し、SDS-PAGE 用の試料とした。また TCA 固定をせずに同様の操作によって調整されたものを未固定試料とした。それらの試料は分注後、 -80°C に保存した。

(9) 好中球の SDS-PAGE

好中球試料の蛋白質を Laemmli (1970) による SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)によって分析した。SDS-PAGE は 12.5%の分離ゲルおよび 3%の濃縮ゲルを用い、ミニスラブ電気泳動槽 (AE-6400、アトー) で行った。泳動槽に泳動バッファー (25mM Tris、192mM Glycine、0.1% SDS) を入れ、作成されたゲルを装着した後、試料添加前に 30 分間、15mA/ゲルで pre-running を行った。pre-running の後、各 well に試料を 5 μ l ずつアプライし、定電流 (15mA/ゲル) で BPB 色素がゲルの下端に来るまで 120~180 分間泳動した。泳動後ゲルを取り出し、直ちにウェスタンブロット法または蛋白染色を行った。蛋白染色は coomassie brilliant blue(CBB)染色を用い、CBB 溶液 (10%酢酸、50%メタノール、0.2%CBB) にゲルを浸し 1 時間振盪した後、脱色固定液 (10%酢酸、50%メタノール) に浸し一晚振盪することにより行った。

(10) ウェスタンブロット法

SDS-PAGE によって分離したゲル上のタンパク質を膜に転写し、抗シトクロム *b*-558 大サブユニット抗体によって好中球に存在するシトクロム *b*-558 の検出を行った。まず、転写用の PVDF 膜 (Immobilon-P、ミリポア) をゲルと同じ大きさに切り、100%メタノールに 30 秒浸した後、ブロッティング溶液 A(25mM Tris、5%メタノール)に 30 分以上浸漬した。ゲルと同じ大きさに切った電極用濾紙 (CB-15A 型、アトー) 6 枚の内、2 枚をブロッティング溶液 B(300mM Tris、5%メタノール)に、3 枚をブロッティング溶液 C(25mM Tris、40mM ϵ -アミノ-n-カプロン酸、5%メタノール)に、1 枚をブロッティング溶液 A に浸した。電気泳動転写装置 (ホライズプロット AE-6675P 型、アトー) の下部電極板をブロッティング溶液 B で湿らせておき、溶液 B に浸しておいた濾紙を 2 枚重ねて置いた。その上に溶液 A に浸しておいた濾紙 1 枚を載せ、PVDF 膜、続いて泳動後のゲルを気泡が入らないように載せた。さらに溶液 C に浸しておいた濾紙 3 枚を重ね、上部電極板をおろして濾紙、膜、ゲルを密着させた。ブロッティングのための通電はゲル面積 1cm^2 当たり 2mA の定電流で 60 分間行った。

蛋白質が転写された PVDF 膜はブロッキング溶液 (1%スキムミルク、0.1%正常ヤギ血清加 PBS) で 4°C 、一晩ブロッキングした。ブロッキング後、Tween20-PBS で洗浄した膜を抗血清、精製 IgG(抗 Le または抗 Li、最終濃度 $0.5\sim 1\mu\text{g/ml}$)、ウサギ正常血清または PBS と 37°C で 1 時間反応した。反応後、Tween20-PBS で 3 回洗浄し、2500 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (和光純薬) と 37°C 、1 時間反応した。反応後、Tween20-PBS で 4 回洗浄した膜を DAB 発色液に浸し発色反応を行った。発色反応は水道水によって停止した。

(11) 蛍光抗体法

試料内に存在する目的タンパク質を膜上で検出するウェスタンブロット法と異なり、細胞や組織における抗原の検出に有効な方法として蛍光抗体法がある。今回の実験ではウェスタンブロット法で反応が見られた抗 Li 抗体を用いて蛍光抗体法を試み、ウナギ好中球におけるシ

トクロム *b*-558 の検出を行った。ウナギ好中球浮遊液 (1×10^6 細胞/ml) 300 μ l をサイトスピン (SC-2、トミー) によってスライドグラスに遠心 (150 \times g、3分) 塗抹し、4%パラホルムアルデヒドで10分間固定した。固定後、細胞膜の透過性を亢進させて抗体が膜を通過できるように 0.2% TritonX-100 に2分間浸漬することによって試料標本を作成した。なお固定後、PBS に浸したものを対照標本とした。標本はまず 5% 正常ヤギ血清加 PBS で 37 $^{\circ}$ C 1時間ブロッキングした後、Tween20-PBS で洗浄し、PBS で10倍希釈した抗 Li 血清と 37 $^{\circ}$ C で1時間反応した。反応後、Tween20-PBS で3回洗浄し、50~100倍希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ウサギ IgG 抗体 F(ab')₂ (和光純薬) と 37 $^{\circ}$ C、1時間反応した。反応後、Tween20-PBS で3回洗浄し、グリセリンで封入した後、落射型蛍光顕微鏡 (BV 励起、ニコン) で観察した。

2. 結果

(1) 免疫したウサギの血中抗体価

4羽 (E1、E2、I1、I2) 何れのウサギにおいても免疫回数を重ねるにつれて血中抗体価は上昇し、初回免疫から7週間後に測定した最終的な抗体価は、対照として用いた抗 *V. anguillarum* ウサギ血清の値の2倍以上を陽性とした場合、それぞれ E1; >100000、E2; >100000、I1; >100000、I2; 5000 であった。

(2) ドットブロット法によるシトクロム *b*-558 の検出

ドットブロット法の結果を図 28 に示した。Le で免疫したウサギ E1 から得られた抗 Le 精製抗体は Le にのみ、また Li で免疫したウサギ I1 から得られた抗 Li 精製抗体は Li にのみ反応し、両抗体の間に交差反応がないことが確かめられた。ウナギ好中球破碎液のスポットには両精製抗体ともに反応し、さらに破碎せずそのままスポットした場合でも弱く反応した。しかし一次抗体の代わりに PBS を用いた場合でも反応が見られ、確認のためヒト好中球破碎液でドットブロット法を行った

ところ、非常に強い反応が見られた。ヒト好中球の反応は二次抗体（ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体）なし、またはスポット直後に DAB と反応させた場合でも反応したため、ヒト好中球の内在性 MPO によるものと考えられた。ヒト好中球の内在性 MPO 活性の阻害を試みたが活性を抑えることはできず、ドットブロット法からシトクロム *b*-558 を検出することは難しいと判断された。ウナギ好中球での反応はスポットだけでは反応しないことから、ヒトと異なり内因性 MPO による反応ではないと考えられた。以上より、ドットブロット法によるシトクロム *b*-558 の明確な証明が困難であることからウェスタンブロット法による検出を試みた。

(3)ウナギ好中球の SDS-PAGE

TCA 固定を行ったウナギ好中球試料中の蛋白質は SDS-PAGE によって様々な分子量に分離された（図 29）。しかしながら、未固定試料では高分子領域においてバンドが消失していた。これは、好中球自身の持つ種々のプロテアーゼによる蛋白質の分解によるものと考えられた。ヒト好中球試料でも同様の現象が見られたことから、ウェスタンブロットティングには TCA 固定を行った好中球試料を用いた。

(4)ウェスタンブロット法によるシトクロム *b*-558 の検出

TCA 固定したウナギ好中球破碎試料に対し、抗 Li 抗体を反応させたウェスタンブロット法の結果を図 30 に示した。レーン 1, 2 では二次抗体として PBS を用いたため全く反応がなかった。レーン 3~7 では 27kDa 付近に共通したバンドがみられ、これらは二次抗体がなんらかの原因で反応しており、このバンドの反応がドットブロットの結果に影響した可能性が考えられる。一次抗体に抗 Li 抗血清(1000 倍希釈)；レーン 4, 5 および抗 Li 精製抗体 (1 μ g/ml) ；レーン 7 を用いた場合、分子量 80~110kDa に糖蛋白で見られるブロードなバンドが検出され、これらは他のレーンで見られないことからシトクロム *b*-558 大サブユニットを示す特異的なバンドであると判断された。また、精製抗体では消失

する非特異的と思われるバンド (35kDa 付近) が抗血清で見られた。抗 Li 精製抗体はウナギ血清蛋白には全く反応しなかった (レーン 8)。次に陽性対照としてヒト好中球試料とウナギ好中球試料の反応性を比較した (図 31) ところ、ヒト好中球でもウナギ好中球と同様の分子量領域にブロードなバンドが検出され、ウナギ好中球にもヒト好中球と同様のシトクロム *b*-558 大サブユニットが存在することが明らかとなった。しかし、ヒト好中球では 60kDa 付近にクリアーなバンドが出現したのに対し、ウナギ好中球ではそれより低い分子量 (約 55kDa) に弱いバンドが検出された。これらのバンドは糖蛋白であるシトクロム *b*-558 大サブユニットの糖鎖部分がはずれたものか、あるいは試料調整の際に分解されたポリペプチドではないかと推測される。なお、抗 Le 抗体を用いた場合ではウナギおよびヒト好中球ともに特異的なバンドは検出されず、免疫原の合成ペプチド Le には反応する能力があるものの、シトクロム *b*-558 大サブユニットを認識することができないと判断された。

ウナギ以外の魚種 (5 種の海産魚) から分離した好中球を試料として、SDS-PAGE (図 32) および抗 Li 精製抗体を用いたウェスタンブロット法を行ったところ、すべての魚種において明らかな反応がみられた (図 33)。しかし、それらの反応領域は魚種によって異なっていた。

(5) 蛍光抗体法によるシトクロム *b*-558 の検出

抗 Li 抗体でウナギ好中球に対する蛍光抗体法を行ったところ、Triton-X 100 による膜の透過処理を施した場合には特異蛍光が観察されたのに対し、PBS 処理では蛍光が見られなかった (図 34)。

3. 考察

魚類貪食細胞での活性酸素の産生は、アメリカナマズ (Scott and Klesius, 1981)、ストライプトバス; *Morone saxatilis* (Stave *et al.*, 1983)、ニジマス (Higson and Jones, 1984)、コイ (Siwicki *et al.*, 1985)、plaice;

Pleuronectes platessa (Nash *et al.*, 1987)、ウナギ (Iida and Wakabayashi, 1995) など多くの魚種で報告されており、産生された活性酸素による殺菌活性もニジマスマクロファージ (Sharp and Secombes, 1993) で示されており、ウナギ好中球においても第二章にあるように過酸化水素による殺菌活性が証明された。しかしながら、好中球を代表とする貪食細胞の活性酸素産生酵素であると考えられる NADPH 酸化酵素についての魚類での知見は甚だ少なく、ニジマス頭腎マクロファージ破砕物のシトクロム *b* 酸化還元差スペクトルを示した報告 (Secombes *et al.*, 1992) のみである。貪食細胞の NADPH 酸化酵素に関する研究はそれが複数の因子から成る酵素系で、刺激によって膜で会合するという複雑な動態を示すものであることから、分離および酵素活性の検出が難しく進んでいなかった。ところがスーパーオキシドを産生できない慢性肉芽種症患者の好中球がシトクロム *b*-558 を欠損していることが判明し (Segal *et al.*, 1978)、この発見を機会に行われた多くの実験により、シトクロム *b*-558 が NADPH 酸化酵素系の中心的因子であることが明らかにされた。実際シトクロム *b*-558 が酸素分子へ電子を渡してスーパーオキシドを生成することが示唆されている (Iizuka *et al.*, 1985; Ueno *et al.*, 1991)。また抗体を用いた免疫細胞化学的手法によってシトクロム *b*-558 の好中球における細胞内局在に関する報告も数多くなされている。中でもヒトシトクロム *b*-558 の cDNA 配列から明らかにされた合成ペプチドおよびそのペプチドに対する抗体を用いた Rotrosen *et al.* (1990)、Imajoh-Ohmi *et al.* (1992)、Nakanishi *et al.* (1992) らの実験から、好中球でのシトクロム *b*-558 の局在様式の解明のみならず、シトクロム *b*-558 が NADPH 酸化酵素の機能部位であることも証明されている。このように哺乳類で得られている知見をもとに魚類好中球における NADPH 酸化酵素の直接的な証明をすべく、ヒトシトクロム *b*-558 大サブユニットのアミノ酸配列を基に抗体を作成した。得られた抗体の内、抗 Le 抗体はウナギ好中球に反応しなかった。この抗体はヒト好中球にも反応しないことから、抗原として使用した合成ペプチドには結合能があるが、実際の好中球に存在する大サブユニット Le 部分の蛋白構

造を認識できないものと考えられ、Le部分がウナギ好中球に存在しないことを意味するものではない。このLe部分は、ヒト好中球ではその細胞表面に存在するため (Imajoh-Ohmi *et al.*, 1992)、生きた細胞を直接認識できる抗Le抗体はフローサイトメトリーなどに有用であると考えられる。今後、シトクロム *b*-558 を細胞外から認識しうる抗体の作成、およびその抗体と魚類貪食細胞との反応の解析が待たれる。一方、抗Li抗体はウェスタンブロット法によってウナギ好中球に反応することが解り、その反応バンドは従来のヒト好中球で報告されているシトクロム *b*-558 大サブユニットの分子量 70~90kDa という領域にほぼ一致した。事実、抗Li抗体は対照として用いたヒト好中球に対しても同様の領域に反応したことから、魚類好中球においてもヒトと同様のシトクロム *b*-558 大サブユニットが存在することが証明された。このことは好中球の持つ NADPH 酸化酵素の一因子であるシトクロム *b*-558 が種間を越えて保存されていたことを示唆しており、魚類免疫学だけでなく比較免疫学的にも大変興味深い事実であると言える。蛍光抗体法により、抗Li抗体はウナギ好中球に存在するシトクロム *b*-558 大サブユニットを認識し、その認識部位 (エピトープ) である大サブユニットのカルボキシル (C) 末端はウナギ好中球の細胞内側に存在することが明らかとなった。哺乳類ではシトクロム *b*-558 の大サブユニット C 末端および小サブユニットのアミノ基、C 末端が細胞質側に、大および小サブユニットそれぞれの一部が細胞外側に突き出した膜貫通型の構造をとっていることが解かっており (Nakamura *et al.*, 1988; Imajoh-Ohmi *et al.*, 1992)、合成ペプチドおよびその抗体を用いた実験から両サブユニットの C 末端が細胞質因子と会合することによりスーパーオキシド産生に直接関わる機能部位であることも証明されている (Rotrosen *et al.*, 1990; Nakanishi *et al.*, 1992)。魚類好中球でも存在が確認された大サブユニットの C 末端が哺乳類同様に機能部位となっている可能性が考えられるため、魚類貪食細胞においても細胞内側領域に対するペプチドまたは抗体の影響が測定できる無細胞系などの活性酸素産生測定法を確立する必要があるだろう。

貪食細胞で産生される活性酸素は生体内に侵入した微生物のみならず、生体組織にとっても障害作用がある。このため、異物刺激などが存在しない通常の貪食細胞内シトクロム *b*-558 は膜表面ではなく主に特殊顆粒に存在し、食作用刺激により食胞に移行し NADPH 酸化酵素が活性化するという説があり、これを支持する結果が幾つか得られている (Borregaard *et al.*, 1983; Ambruso *et al.*, 1990; Jesaitis *et al.*, 1990)。今回の実験で用いたウナギ好中球は *E. coli* 死菌接種によって誘導され、さらに分離過程の遠心操作等で細胞膜に対する刺激を受けていたと考えられる。今後、このように刺激されたウナギ好中球と膜への刺激を極力除いた操作によって分離された好中球との間でシトクロム *b*-558 発現量、細胞内局在様式を比較検討することにより魚類貪食細胞の NADPH 酸化酵素活性化機構の解明に有益な情報が提供されると思われる。

抗 Li 抗体の反応性をウナギ以外の魚種でも確かめるため、各種海産魚の鰾から分離した好中球でウェスタンブロット法を行った。この実験は一回しか行っておらず予報的ではあるが、すべての海産魚種の好中球試料で反応が見られた。これより、ウナギ以外の好中球においてもシトクロム *b*-558 大サブユニットの存在が示唆されたが、魚種間で反応領域に差が見られ、魚種によってはかなり広いバンドを形成するものもあった。海産魚種試料は複数個体の好中球を混合したものであったため、この影響が抗体の反応性に現れた可能性がある。今後、個体毎の試料を用いた実験をする必要があるが、各魚種における好中球の大サブユニットの分子量が異なる可能性も考えられる。哺乳類好中球の大サブユニットは糖鎖が付加された約 90kDa の糖蛋白質であることから、エンドグリコシダーゼ処理によって糖鎖が除かれると分子量約 50kDa の蛋白になるという報告がある (Dinauer *et al.*, 1987)。今回のウナギ好中球とヒト好中球の間で見られた低分子領域でのバンドパターンの差違や各魚種での反応分子量領域の相違を解明するための手段の一つとしてウェスタンブロット法における脱糖鎖処理の利用が考えられる。シトクロム *b*-558 は膜に存在する疎水性蛋白質のため精製およ

び試料調整が困難であるが、魚類好中球でも活性酸素産生に関わる因子である可能性が高く、今後その構造、局在および機能を明らかにすることが魚類貪食細胞の酸素依存性殺菌の解明にとって是非必要であると思われる。



図 26. 哺乳類好中球における NADPH 酸化酵素の構成因子

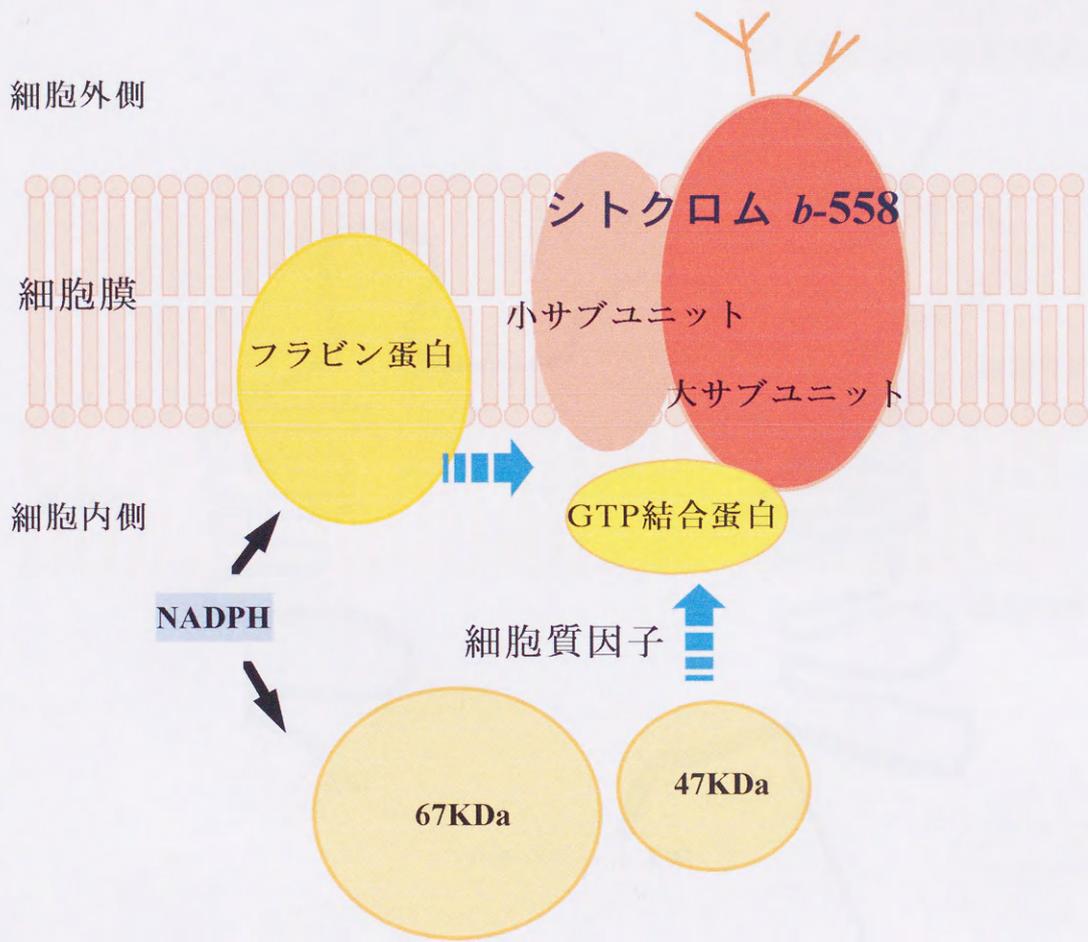


図 26. 哺乳類好中球における NADPH酸化酵素の構成因子

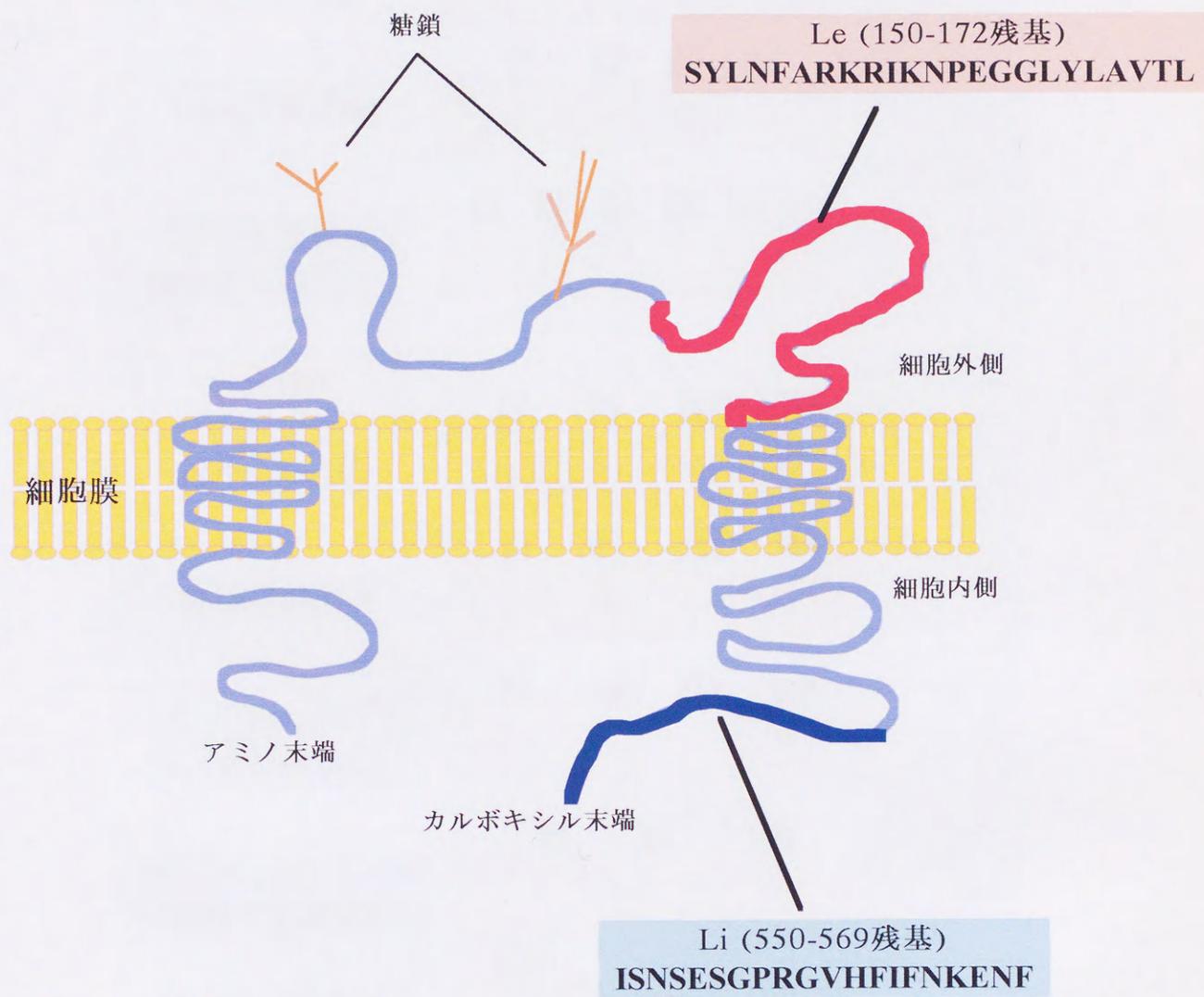
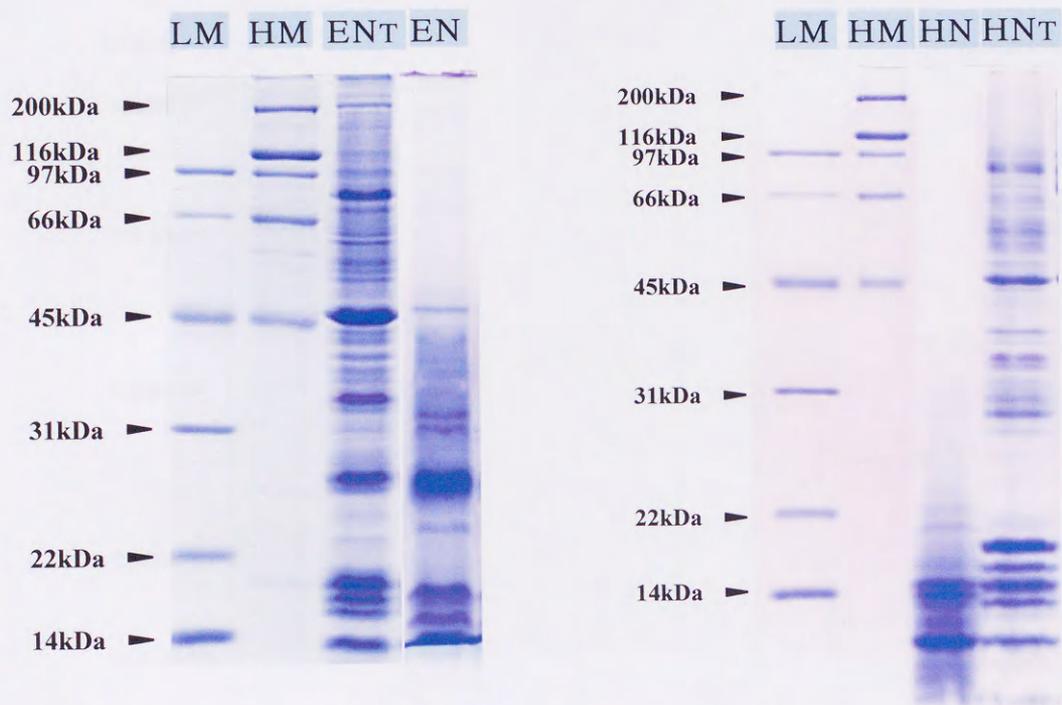


図 27. 哺乳類好中球細胞膜に存在するシトクロムb-558大サブユニットの構造



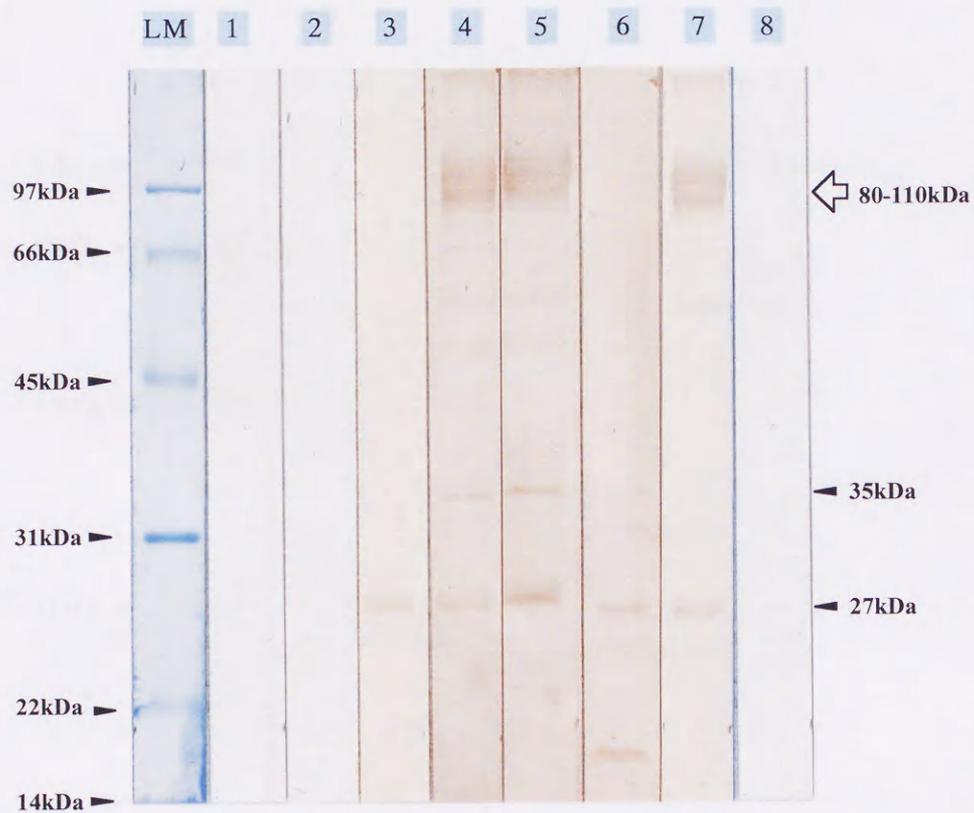
Li、Le、ES、EI、HS、HI、per-IgGはそれぞれ合成ペプチドLi、Le、ウナギ好中球破碎液、ウナギ好中球無破碎浮遊液、ヒト好中球破碎液、ヒト好中球無破碎浮遊液、および二次抗体のスポットを示す。

図 28. 抗Le、Li 抗体のウナギおよびヒト好中球に対する反応



LM; 低分子量マーカー
 HM; 高分子量マーカー
 ENT; ウナギ好中球TCA固定試料
 EN; ウナギ好中球未固定試料
 HNT; ヒト好中球TCA固定試料
 HN; ヒト好中球未固定試料

図 29. ウナギおよびヒト好中球試料ののSDS-PAGE泳動パターン



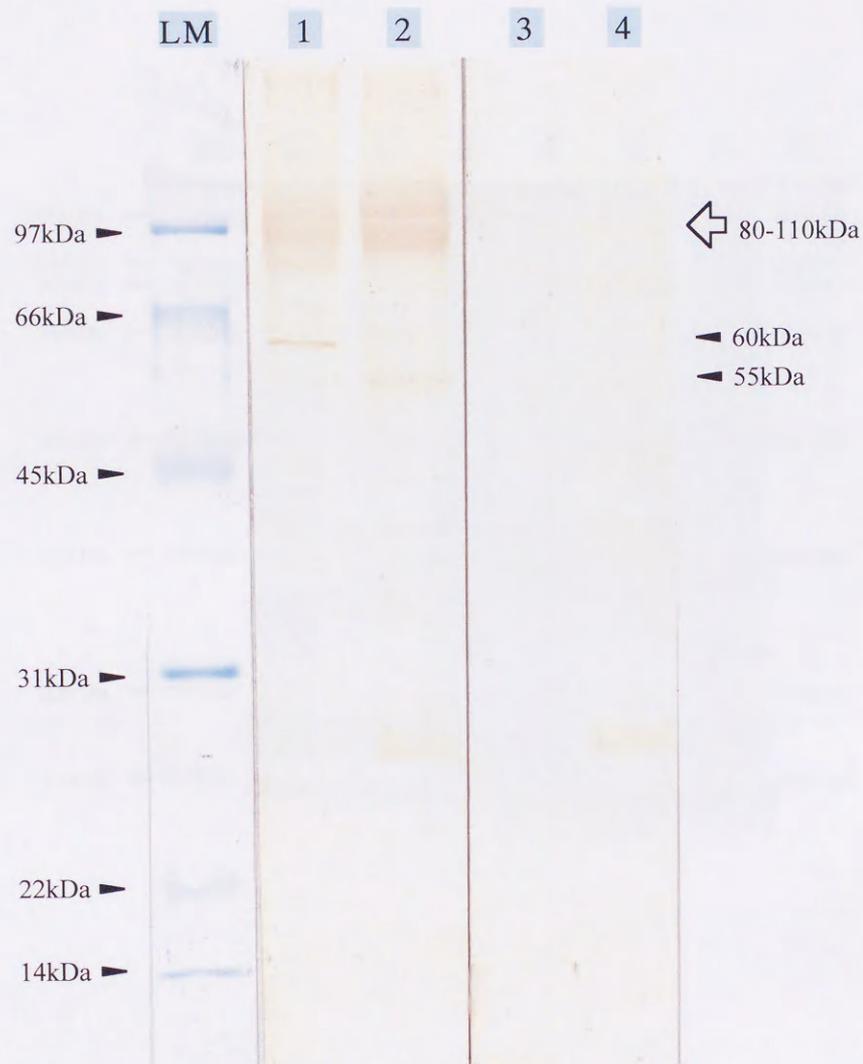
LM; 低分子量マーカー(CBB染色)

- 1; ウナギ好中球TCA固定試料 (5 μ l)、一次抗体 ; PBS
- 2; ウナギ好中球TCA固定試料 (5 μ l)、一次抗体 ; 抗Li抗血清 ($\times 1000$)
- 3; ウナギ好中球TCA固定試料 (5 μ l)、一次抗体 ; PBS
- 4; ウナギ好中球TCA固定試料 (5 μ l)、一次抗体 ; 抗Li抗血清 ($\times 1000$)
- 5; ウナギ好中球TCA固定試料 (10 μ l)、一次抗体 ; 抗Li抗血清 ($\times 1000$)
- 6; ウナギ好中球TCA固定試料 (5 μ l)、一次抗体 ; 抗*Vibrio anguillarum*抗血清 ($\times 1000$)
- 7; ウナギ好中球TCA固定試料 (5 μ l)、一次抗体 ; 抗Li精製抗体 (1 μ g/ml)
- 8; ウナギ血清試料 (蛋白濃度1~2mg/ml)、一次抗体 ; 抗Li精製抗体 (1 μ g/ml)

レーン1, 2 ; 二次抗体にPBSを使用。

レーン3~8; 二次抗体にペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体 ($\times 2500$) を使用。

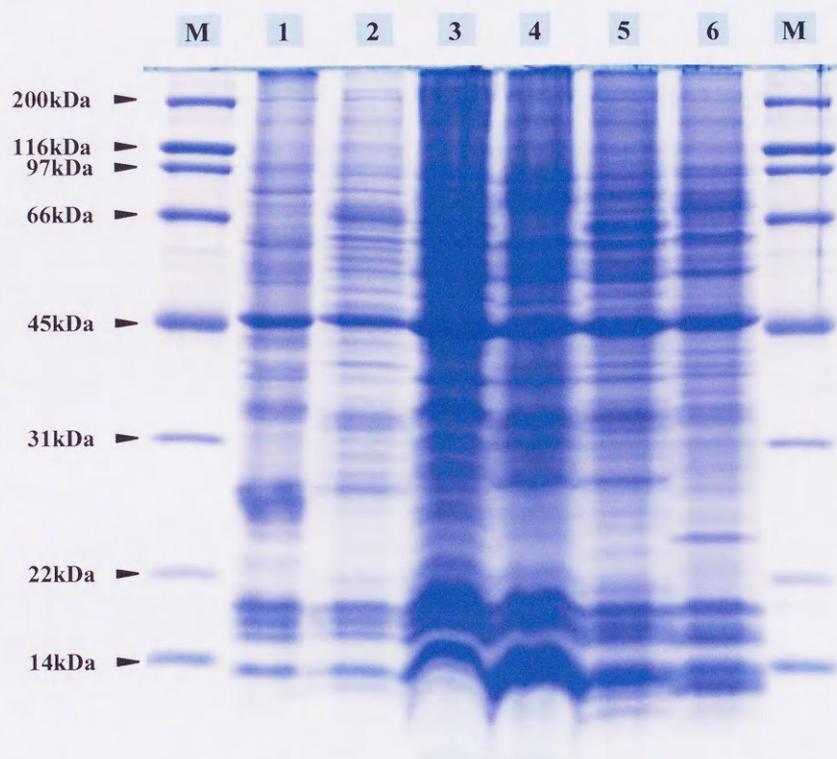
図 30. ウェスタンブロット法によるウナギ好中球試料からのシトクロムb-558大サブユニットの検出



LM; 低分子量マーカー(CBB染色)

- 1; ヒト好中球TCA固定試料、一次抗体 ; 抗Li精製抗体 (1 μ g/ml)
- 2; ウナギ好中球TCA固定試料、一次抗体 ; 抗Li精製抗体 (1 μ g/ml)
- 3; ヒト好中球TCA固定試料、一次抗体 ; ウサギ正常血清 ($\times 1000$)
- 4; ウナギ好中球TCA固定試料、一次抗体 ; ウサギ正常血清 ($\times 1000$)

図 31. ウェスタンブロット法によるウナギおよびヒト好中球試料からのシトクロムb-558大サブユニットの検出



M; 分子量マーカー

1; ウナギ好中球TCA固定試料

2; ブリ好中球TCA固定試料

3; スズキ好中球TCA固定試料 (複数個体プール試料)

4; クロソイ好中球TCA固定試料 (複数個体プール試料)

5; シマアジ好中球TCA固定試料 (複数個体プール試料)

6; メジナ好中球TCA固定試料 (複数個体プール試料)

図 32. 各種海産魚種好中球のTCA固定試料のSDS-PAGE泳動パターン



M; 分子量マーカー(CBB染色)

1, 7; ウナギ好中球TCA固定試料

2, 8; ブリ好中球TCA固定試料

3, 9; スズキ好中球TCA固定試料 (複数個体プール試料)

4, 10; クロソイ好中球TCA固定試料 (複数個体プール試料)

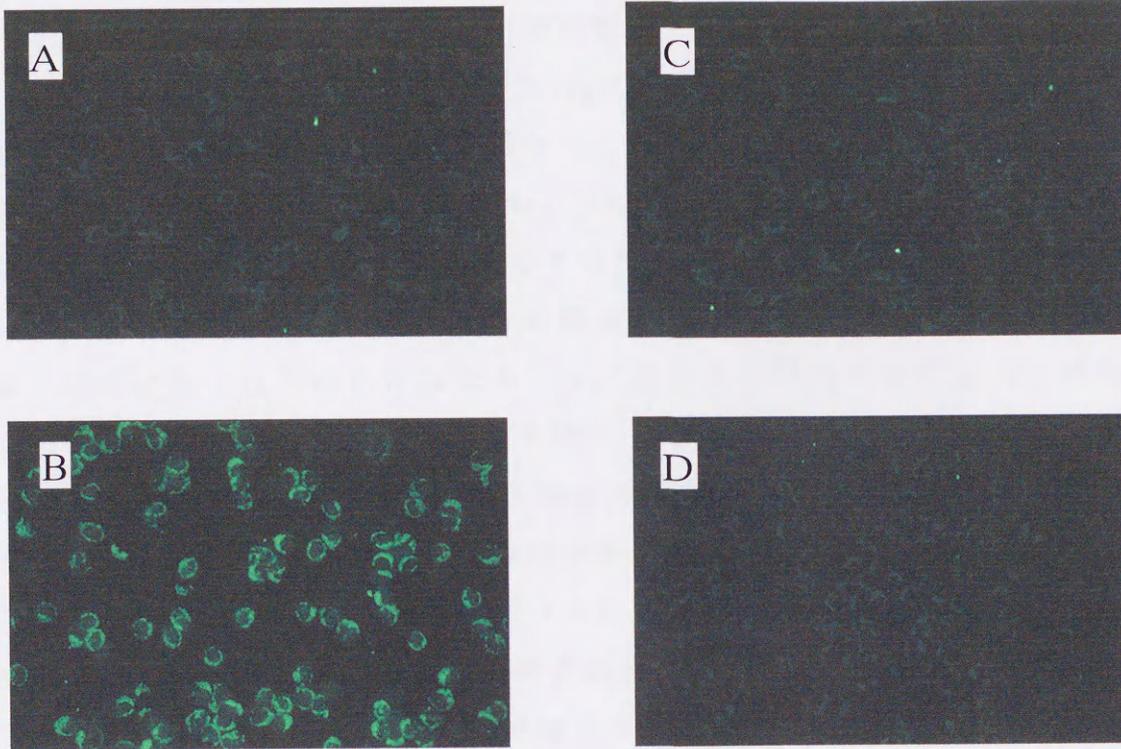
5, 11; シマアジ好中球TCA固定試料 (複数個体プール試料)

6, 12; メジナ好中球TCA固定試料 (複数個体プール試料)

1~6; 一次抗体として抗Li精製抗体 (1 μ g/ml) を使用

7~12; 一次抗体としてウサギ正常血清 ($\times 1000$) を使用

図 33. ウェスタンブロット法による各種海産魚種好中球試料からのシトクロムb-558大サブユニットの検出



A, C; 固定後PBSで処理
 B, D; 固定後Triton Xで処理
 A, B; 一次抗体に抗Li抗血清 (×10) を使用
 C, D; 一次抗体にウサギ正常血清 (×10) を使用

図 34. 蛍光抗体法によるウナギ好中球からのシトクロムb-558大サブユニットの検出

第五章 総合考察

今回のウナギ好中球を用いた実験により respiratory burst における酸素消費量：スーパーオキシド産生量：過酸化水素産生量の量比が 2：2：1 となり、哺乳類同様の酸素代謝動態がウナギ好中球にも存在する、すなわち魚類好中球における NADPH 酸化酵素の存在が機能面から証明された。ウナギ好中球で証明されたこの respiratory burst での酸素代謝動態に関する知見はウナギ好中球だけでなく、ニジマスマクロファージで示唆されていた (Secombes and Fletcher, 1992) ことからもすべての魚類貪食細胞に対して適用できるものであると考えられる。

今回、ヒドロキシルラジカルの測定については特異的な定量法が確立されていないことから行わなかった。魚類貪食細胞では間接的ながらヒドロキシルラジカルの生成を示唆する報告がある (Nash *et al.*, 1987; Sharp and Secombes, 1993)。哺乳類貪食細胞におけるヒドロキシルラジカル産生能の有無については明確な解答が得られておらず、その判断を下すためにはヒドロキシルラジカルに特異性が高く、且つ生細胞から検出できる厳密な測定法の開発を待たねばならない。

また MPO 陽性好中球はウナギではほとんどない (朴・若林, 1989) が、MPO を有する哺乳類好中球では強力な殺菌因子 (Sips and Hamers, 1981) と考えられている HCIO の産生が確認されている (She *et al.*, 1997)。多くの魚類好中球も MPO 陽性であることから respiratory burst の際に HCIO が産生されると考えられ、高性能液体クロマトグラフィーを利用した検出法 (She *et al.*, 1997) などによる魚類好中球での HCIO 産生量の測定が望まれる。

なお大腸菌死菌などで誘導されたウナギ好中球では活性酸素産生が増大し、造血組織である頭腎において好中球に存在する NADPH 酸化酵素が priming 効果を受けたことが示唆された。この現象は、免疫賦活剤による貪食細胞に対する活性酸素産生能の増強作用と同様のものと考えることができ、魚類における好中球 NADPH 酸化酵素の priming 機構に関する知見は強力な免疫賦活剤やより効果的な使用方法の開発に貢献するであ

ろうと思われる。

魚類貪食細胞における NADPH 酸化酵素に関する研究は少なく、ニジマスマクロファージで NADPH 酸化酵素様の活性の存在が示唆されている (Secombes *et al.* 1992)のみであった。この報告も NADPH 酸化酵素様という言葉が示すように哺乳類貪食細胞で確認されている NADPH 酸化酵素が魚類貪食細胞で存在することを示す直接的証明ではない。今回、抗ペプチド抗体の使用により、ウナギ好中球から NADPH 酸化酵素の一因子であるシトクロム *b*-558 大サブユニットが検出され、その糖蛋白として分子量はヒトのシトクロム *b*-558 大サブユニットと同じであることが明らかとなった。また、抗シトクロム *b*-558 抗体はウナギ好中球以外の各種海産魚の好中球に対してもその反応分子量領域に差があったものの、明らかに反応したことから、魚類の好中球には普遍的にシトクロム *b*-558 が存在すると考えられた。ウナギ好中球での存在が証明されたシトクロム *b*-558 大サブユニットの構造についても、そのカルボキシル末端が哺乳類と同様に細胞内に存在することが示され、魚類好中球におけるシトクロム *b*-558 大サブユニットの局在様式の一部が明らかになった。カルボキシル末端は哺乳類においてスーパーオキシド産生のための機能領域となっている (Rotrosen *et al.*, 1990; Nakanishi *et al.*, 1992) ため、魚類好中球においてもこの部分の機能解析が期待される。

シトクロム *b*-558 は貪食細胞のみでなく成熟した B リンパ球にも存在することがヒトで確認され、その B リンパ球は抗体などの刺激や表面抗原の架橋によって少量のスーパーオキシドを産生することが報告されている (Kobayashi *et al.*, 1989; Maly *et al.*, 1989)。T リンパ球およびナチュラルキラー細胞にはシトクロム *b*-558 は存在せず、スーパーオキシド産生も見られないことから、B リンパ球での活性酸素産生は抗原処理における細胞内情報伝達や T リンパ球への情報伝達に関与していることが推察されている (中村, 1990)。魚類においてもシトクロム *b*-558 が B リンパ球に存在するか調べる必要があるだろう。さらに抗体を用いてシトクロム *b*-558 の組織内分布を調べることによって、魚類における NADPH 酸化

酵素の役割を理解することができると考えられる。

今回作成することができた抗 Li 抗体は NADPH 酸化酵素の機能、局在様式および組織内分布などの解析に有用であり、抗 Li 抗体および細胞外からシトクロム *b*-558 を認識できる抗体、また NADPH 酸化酵素の他の構成因子を認識する抗体などの利用により、今後、魚類における NADPH 酸化酵素に関する研究の進展が期待される。

魚類好中球の殺菌機構に関する研究は非常に少なく、基本的には哺乳類好中球での機構と同様であろうと予想されている。今回、ウナギ好中球を用いた実験によって、産生された活性酸素の内、過酸化水素が殺菌に関与していることが証明され、過酸化水素による殺菌には貪食細胞の形成が必須であることも確かめられた。ウナギ好中球が産生する過酸化水素と細菌との関係を考える上で一つの興味深い事実がある。*Edwardsiella tarda* の感染によりパラコロボを発症したウナギの典型症状に諸臓器の膿瘍形成ならびに顕著な組織融解が認められることである(宮崎, 1992)。 *E. tarda* の病原性株は、ウナギの体内に侵入した時、好中球を含む非特異的防御機構から巧みにエスケープし(飯田, 1992)、たとえ貪食された場合でも殺菌されない(飯田ら, 1993)。ゆえに抵抗性菌(病原性株)は体内で生存、増殖し、その病巣において蓄積した多数の好中球による攻撃、すなわち過度の過酸化水素放出が続けられる可能性がある。生じた過酸化水素は周囲組織に直接障害を及ぼしたり、あるいは好中球自身を崩壊し細胞内消化酵素を放出させることにより結果的に顕著な組織融解がもたらされる、と推論すると前述の病理所見で見られる現象を合理的に考えることができる。この推論は好中球が持つ防御能が生体にとってマイナス要因として働くことを意味するものである。今後、魚類好中球の過酸化水素産生量を指標にした病原性株と非病原性株との比較検討により、病原体の病原性と宿主の生体防御機構との相互関係の解明にとって有益な考えが導かれる可能性が考えられる。

消去剤を用いた実験からヒドロキシルラジカルによる殺菌活性は検出されなかったが、過酸化水素は鉄イオンと反応しヒドロキシルラジ

カルを生成するため、細菌の細胞内に入った過酸化水素から生じたヒドロキシルラジカルが細菌の DNA を損傷する可能性が示唆されている (Imlay and Linn, 1988)。ウナギ好中球の殺菌過程においても MPO によって消費されない高濃度の過酸化水素が細菌内でヒドロキシルラジカルに変化し、直接の殺菌因子となっている可能性が考えられる。

哺乳類好中球は通常 MPO を有し、貪食された細菌は MPO によって過酸化水素と塩素イオンから産生された HClO によって殺菌され、MPO 欠損症患者の好中球では細胞内殺菌の延滞が見られる (Root and Cohen, 1981) ことから、好中球の酸素依存性殺菌機構においては HClO による殺菌機構が重要視されている。一方多くの MPO 欠損症患者は慢性肉芽腫症患者のような易感染性を示さず、HClO 以外の活性酸素または他の殺菌活性因子の増強などの補償作用によって正常な生体防御能が維持されていると推測されている (金ヶ崎, 1990)。魚類は非常に多様な種によって構成されていることから、それぞれに特有な生体防御機構が存在する可能性や生体全体の防御機構の中で重要となる防御因子が異なる可能性が考えられる。その一端として MPO を持たないウナギ好中球と MPO を持つ他魚種好中球との HClO 産生量および殺菌活性の比較検討を行うことにより、各魚種で異なると考えられるトータルな生体防御能の中での好中球の酸素依存性殺菌活性の重要度が明らかにされ、そこで得られた知見は魚種ごとの生体防御能の解明および疾病予防対策に役立つと考えられる。

最近、MPO 陽性であるコイの好中球が自発的細胞障害活性を持つことが報告された (Kurata *et al.*, 1995)。哺乳類好中球が細胞障害活性を発揮する場合、その障害活性因子として活性酸素、特に HClO が効果的に働くことが報告されている (Clark and Szot, 1981)。コイ好中球の持つ細胞障害活性は哺乳類好中球での知見と異なり MPO 阻害剤および HClO の消去剤で阻害されず、カタラーゼによって阻害されるため、過酸化水素が関与する別の機構の存在が示唆されている。魚類好中球による細胞障害活性の生体防御における意義は明らかにされていないが、障害活性を発現するために活性酸素が関与していることは明白である。魚類好中球

における細胞障害活性のための活性酸素産生と殺菌のための respiratory burst による活性酸素産生がどのような関係にあるのかは興味深い疑問であり、今後両者の関係についての研究が期待される。

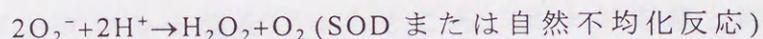
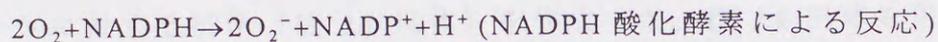
好中球は寿命の短い細胞であるが、サイトカイン、細菌の生産物、細菌の貪食によって通常起こるアポトーシスが抑制されることにより生存期間が長くなる (Colotta *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993; Baran *et al.*, 1996) ことが報告されている。このことは生体内で存在する場所、状況によって好中球がその機能発現の調節を受けることを意味している。また好中球の活性酸素産生は可逆的反応である (Cohen *et al.*, 1982) ことが報告されており、好中球の状況に対応した柔軟な機能を持つという側面を利用することによって、持続的且つ効果的な活性酸素産生を誘導できる可能性が考えられる。このような非特異的防御能の人為的なコントロールは魚病の発生予防対策として非常に有用と考えられ、今後、好中球の活性化および機能調節に関する研究が必要であろうと考えられる。

本研究を総括すると、魚類好中球の respiratory burst においても哺乳類で知られている一連の酸素代謝が同様に行われており、酸素代謝 (活性酸素産生) を引き起こす NADPH 酸化酵素についてもその重要構成因子であるシトクロム *b*-558 の存在が魚類好中球で証明された。さらに魚類好中球が産生する活性酸素自身が殺菌活性を有することも明らかとなり、魚類好中球においても哺乳類と同様の酸素依存性殺菌機構が備わっていることが構造および機能の両面から確実に証明されたと言える。

要約

魚類の防御機構において強力な防御因子として位置づけられている好中球の酸素依存性殺菌活性を解明するため、主にウナギを用いて (1)魚類好中球の respiratory burst (食食時の酸素の大量消費) における酸素代謝動態、(2)産生された活性酸素による殺菌、および(3)活性酸素産生酵素である NADPH 酸化酵素の存在について検討した。

(1) ウナギ好中球の respiratory burst でのスーパーオキシドおよび過酸化水素産生量を測定し、酸素消費量との比較を行った。スーパーオキシド産生量は酸素消費量と等しく、過酸化水素産生量はその約 1/2 であった。この量的関係は哺乳類貪食細胞の respiratory burst で NADPH 酸化酵素によって引き起こされる酸素代謝動態；



に当てはまる結果であり、魚類好中球でも哺乳類同様の酸素代謝機構の存在が証明された。

大腸菌死菌、カゼインの腹腔内接種によって誘導されたウナギ好中球の酸素消費量、スーパーオキシドおよび過酸化水素産生量は非誘導好中球と比べ有意に高い値であった。これより生体外からの異物の侵入に対してこれを不活化、排除するために殺菌能の高い好中球が造血組織である頭腎から放出されることが示された。

(2) ウナギ好中球によって殺菌されやすい細菌である ESI を使用菌株としてウナギ好中球の活性酸素消去剤存在下での殺菌活性を調べた。ウナギ好中球の殺菌活性は過酸化水素の消去酵素であるカタラーゼによって抑制され、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)およびヒドロキシルラジカルの消去剤による影響を受けなかった。SOD によるカタラーゼとの協同的な殺菌抑制作用は観察されなかった。これよりウナギ好中球の殺

菌には過酸化水素が重要な因子として働くことが明らかとなった。

活性酸素産生を抑制しない食胞形成阻害剤であるサイトカラシン B はウナギ好中球の殺菌活性を抑制し、サイトカラシン B で処理したウナギ好中球ではカタラーゼの殺菌活性に対する影響が認められなかったことから、ウナギ好中球による過酸化水素依存性の殺菌活性には食胞形成が必須であると考えられた。

ウナギ好中球の殺菌活性測定に使用した ESI は $500\mu\text{M}$ の過酸化水素溶液で完全に殺菌された。一方、測定された過酸化水素産生量からウナギ好中球内の過酸化水素濃度は 1~2 分間で $500\mu\text{M}$ 以上になると計算された。よって、ウナギ好中球内での過酸化水素による殺菌は十分可能であると推察された。

(3) 哺乳類貪食細胞で知られている NADPH 酸化酵素の構成因子であるヒトシトクロム *b*-558 大サブユニットのカルボキシル末端に相当する合成ペプチドに対する抗体 (抗 Li 抗体) を作成した。抗 Li 抗体を用いてウェスタンブロット法を行ったところ、ヒト好中球と同様に分子量 80-110kDa に特異的なブロードバンドがウナギ好中球試料から検出された。抗 Li 抗体は、ブリ、スズキなど各種海産魚種の好中球にも反応したが、反応分子量領域に差が見られ、魚種間でシトクロム *b*-558 の構造が異なる可能性が示唆された。

蛍光抗体法により、抗 Li 抗体は界面活性剤で細胞膜の透過性を上げた後にのみウナギ好中球のエピトープを認識することが示された。これらの結果から魚類好中球にシトクロム *b*-558 が存在し、そのカルボキシル末端が哺乳類同様に細胞内に存在することが証明され、NADPH 酸化酵素が種を越えて保存されていることが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました宮崎大学教授川津浩嗣先生に深謝致します。宮崎大学助教授飯田貴次先生には本研究の方向づけをして頂き、研究および論文作成において終始懇切丁寧な御指導、御助言を頂きました。ここに謹んで感謝致します。

宮崎大学助教授延東真先生、同助教授吉田照豊先生ならびに同助教授酒井正博先生には研究遂行上多大なる御助言、御指導、御協力を頂きました。心より感謝致します。

第四章で用いた各種海産魚好中球試料作成の為、大分県海洋水産研究センター養殖環境部福田穰博士ならびに同職員の方々には魚の飼育設備、実験器具等の使用において御協力を頂きました。ここに感謝致します。

また、東京大学医科学研究所細菌感染研究部助教授大海忍先生には、ウェスタンブロットの結果について有益なる御助言を頂きました。厚く感謝致します。

最後に、著者が本研究を行う過程で実験動物の購入、飼育をはじめ様々な点において宮崎大学農学部水族防疫学講座の諸兄妹に御協力を頂きました。おかげで有意義で楽しい研究生活を過ごすことができました。ここに記して感謝申し上げます。

参考文献

Ambruso, D. R., Bolscher, B. G. J. M., Stokman, P. M., Verhoeven, A. J. and Roos, D. (1990): Assembly and activation of the NADPH:O₂ oxidoreductase in human neutrophils after stimulation with phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.*, **265**, 924-930.

Ainsworth, A. J. and Dexiang, C. (1990): Difference in the phagocytosis of four bacteria by channel catfish neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.*, **14**, 201-209.

Babior, B. M. and Kipnes, R. S. (1977): Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: Evidence for a flavin requirement. *Blood*, **50**, 517-524.

Babior, B. M. (1984): Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction. *Blood*, **64**, 959-966.

Baggiolini, M. (1984): Phagocytes use oxygen to kill bacteria. *Experientia*, **40**, 906-909.

Baran, J., Guzik, K., Hryniewicz, W., Ernst, M., Flad, H.-D. and Pryjma, J. (1996): Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.*, **64**, 4242-4248.

Beaman, L. and Beaman, B. L. (1984): The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Ann. Rev. Microbiol.*, **38**, 27-48.

Bender, J. G., McPhail, L. C. and Van Epps, D. E. (1983): Exposure of human neutrophils to chemotactic factors potentiates activation of the

respiratory burst enzyme. *J. Immunol.*, **130**, 2316-2323.

Borregaard, N., Heiple, J. M., Simons, E. R. and Clark, R. A. (1983): Subcellular localization of the *b*-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.*, **97**, 52-61.

Bromberg, Y. and Pick, E. (1984): Unsaturated fatty acids stimulate NADPH-dependent superoxide production by cell-free system derived from macrophages. *Cell Immunol.*, **88**, 213-221.

Bromberg, Y. and Pick, E. (1985): Activation of NADPH-dependent superoxide production in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.*, **260**, 13539-13545.

Chung, S. and Secombes, C. J. (1988): Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comp. Biochem. Physiol.*, **89**, 539-544.

Clark, R. A. and Szot, S. (1981): The myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system as effector of neutrophils-mediated tumor cell cytotoxicity. *J. Immunol.*, **126**, 1295-1301

Clark, R. A., Malech, H. L., Gallin, J. I., Nuno, H., Volpp, B. D., Pearson, D. W., Nauseef, W. M. and Curnutte, J. T. (1989): Review: Genetic variants of chronic granulomatous disease: Prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *New Engl. J. Med.*, **321**, 647-652.

Cohen, H. J., Chovaniec, M. E., Wilson, M. K. and Newburger, P. E.

(1982): Con-A-stimulated superoxide production by granulocytes: Reversible activation of NADPH oxidase. *Blood*, **60**, 1188-1194.

Cohen, M. S., Britigan, B. E., Hassett, D. J. and Rosen, G. M. (1988): Do human neutrophils form hydroxyl radical? Evaluation of an unresolved controversy. *Free Radical Biol. Med.*, **5**, 81-88.

Colotta, F., Polentarutti, F. Re. N., Sozzani, S. and Mantovani, A. (1992): Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, **80**, 2012-2020.

Dalmo, R. A. and Seljelid, R. A. (1995): The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [$\beta(1,3)$ -D-glucan] on Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., macrophages in vitro. *J. Fish Dis.*, **18**, 175-185.

Dexiang, C. and Ainsworth, A. J. (1991): Assessment of metabolic activation of channel catfish peripheral neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.*, **15**, 201-208.

Dexiang, C. and Ainsworth, A. J. (1992): Glucan administration potentiates immune defense mechanism of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.*, **15**, 295-304.

Dinauer, M. C., Orkin, S.H., Brown, R., Jesaitis, A.J. and Parkos, C. A. (1987): The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome *b* complex. *Nature*, **327**, 717-720.

Edwards, S. W. (1994): Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge University Press, New York, 299p.

Endo, M., Yoshida, T., Sakai, M. and Iida, T. (1995): The swim bladder as a site for administration of chemical agents: application to fish immunology. *Fish & Shellfish Immunol.*, **5**, 85-87.

Endo, M., Arunlertaree, C., Ruangpan, L., Ponpornpist, A., Yoshida, T. and Iida, T. (1997): A new method for collecting neutrophils using swim bladder. *Fisheries Science*, **63**, 644-645.

Evelyn, T. P. T. (1997): A historical review of fish vaccinology. In "Fish Vaccinology" (eds. by Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P. J. and Brown, F.), Basel, Karger, 3-12.

Finco-Kent, D. and Thune, R. L. (1987): Phagocytosis by catfish neutrophils. *J. Fish Biol.*, **31A**, 41-49.

Goetzl, E. J. and Austin, K. F. (1974): Stimulation of human neutrophil leukocyte aerobic glucose metabolism by purified chemotactic factors. *J. Clin. Invest.*, **53**, 591-599.

Gutenberger, S. K., Duimstra, J. R., Rohovec, J. S. and Fryer, J. L. (1997): Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. *Dis. Aquat. Org.*, **28**, 93-106.

Hampton, M. B., Kettle, A. J. and Winterbourn, C. C. (1996): Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. *Infect. Immun.*, **64**, 3512-3517.

畑井喜司雄(1992): ブリ 細菌病 類結節症,「魚病図鑑, 畑井喜司雄・小川和夫・広瀬一美編, 緑書房, 東京」, 6.

Higson, F. K. and Jones, O. T. G. (1984): The generation of active oxygen species by stimulated rainbow trout leucocytes in whole blood. *Comp. Biochem. Physiol.*, **77**, 583-587.

Holmes, B., Page, A. R. and Good, R. A. (1967): Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J. Clin. Invest.*, **46**, 1422-1432.

飯田貴次・若林久嗣(1983): 魚類の補体の代替経路による殺菌作用. 魚病研究, **18**, 77-83.

飯田貴次(1992): ウナギの非特異的生体防御機能に対する *Edwardsiella tarda* のエスケープ機序に関する研究. 東京大学農学部博士論文, 154p.

飯田貴次・三浦薫・若林久嗣・小林正典(1993): アクリジン・オレンジ染色によるウナギ好中球内殺菌活性の測定. 魚病研究, **28**, 49-50.

Iida, T. and Wakabayashi, H. (1995): Respiratory burst of Japanese eel neutrophils. *Fish Pathol.*, **30**, 257-261.

Iizuka, T., Kanegasaki, S., Makino, R., Tanaka, T. and Ishimura, Y. (1985): Studies on neutrophil *b*-type cytochrome *in situ* by low temperature absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12049-12053.

池田弥生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎(1988): 魚類血液図鑑, 緑書房, 東京, 361p.

Imajoh-Ohmi, S., Tokita, K., Ochiai, H., Nakamura, M. and Kanegasaki, S. (1992): Topology of cytochrome *b*₅₅₈ in neutrophil membrane analyzed by

anti-peptide antibodies and proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **267**, 180-184.

Imlay, J. A. and Linn, S. (1988): DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **240**, 1302-1309.

Ingram, G. A. (1980): Substances involved in the natural resistance of fish to infection - A review. *J. Fish Biol.*, **16**, 23-60.

石橋貞彦・岡村直樹(1990): 白血球の活性化 細胞レベルでの活性化機構, 「白血球と生体防御, 水上茂樹・柿沼カツ子・竹重公一朗編, 講談社, 東京」, 179-190.

Itami, T., Kondo, M., Suganuma, A., Abe, T., Nakagawa, A., Suzuki, N. and Takahashi, Y. (1996): Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *J. Fish. Dis.*, **19**, 185-187.

Jesaitis, A. J., Buescher, E. S., Harrison, D., Quinn, M. T., Parkos, C. A., Livesey, S. and Linner, J. (1990): Ultrastructural localization of cytochrome *b* in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J. Clin. Invest.*, **85**, 821-835.

Johnston, R. B. Jr., Keele, B. B. Jr., Misra, H. P., Lehmyer, J. E., Webb, L. S., Baehner, R. L. and Rajagopalan, K. V. (1975): The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. *J. Clin. Invest.*, **55**, 1357-1372.

Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1990): The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus*

mykiss. *Fish Pathol.*, **25**, 93-98.

Kakinuma, K. (1974): Effects of fatty acids on the oxidative metabolism of leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **348**, 76-85.

Kakinuma, K., Hatae, T. and Minakami, S. (1976): Effect of ionic sites of surfactants on leukocyte metabolism. *J. Biochem.*, **79**, 795-802.

柿沼カツ子・千葉司・藤井博匡・三木俊明(1992): 生体における活性酸素の測定法 白血球の活性酸素生成, 「活性酸素測定マニュアル, 浅田浩二・中野稔・柿沼カツ子編, 講談社, 東京」, 53-77.

金ヶ崎士朗(1990): 白血球と病態 殺菌, 「白血球と生体防御, 水上茂樹・柿沼カツ子・竹重公一朗編, 講談社, 東京」, 209-221.

Kitao, T. and Yoshida, T. (1986): Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **12**, 287-296.

Kobayashi, S., Imajoh-Ohmi, S., Nakamura, M. and Kanegasaki S. (1990): Occurrence of cytochrome *b₅₅₈* in B-cell lineage of human lymphocytes. *Blood*, **75**, 458-461.

Kurata, O., Okamoto, N. and Ikeda, Y. (1995): Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*, possess a spontaneous cytotoxic activity. *Dev. Comp. Immunol.*, **19**, 315-325.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lee, A., Whyte, M. K. B. and Haslett, C. (1993): Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.*, **54**, 283-288.

Leong, J. C., Anderson, E., Bootland, L. M., Chiou, P.-W., Johnson, M., Kim, C., Mourich, D. and Trobridge, G. (1997): Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. In "Fish Vaccinology" (eds. by Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P. J. and Brown, F.), Basel, Karger, 267-277.

Light, D. R., Walsh, C., O'Callaghan, A. M., Goetzl, E. J. and Tauber, A. I. (1981): Characteristics of the cofactor requirement for the superoxide-generating NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemistry*, **20**, 1468-1476.

MaCall, C. E., Bass, D. A., DeChatelet, L. R., Link, A. S. and Mann, M. (1979): In vitro response of human neutrophils to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine: correlation with effects of acute bacterial infection. *J. Infect. Dis.*, **140**, 277-286.

Mainwaring, G. and Rowley, A. F. (1985): Separation of leucocytes from the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) using density gradient centrifugation and differential adhesion to grass coverslips. *Cell Tissue Res.*, **241**, 283-290.

Makino, R., Tanaka, T., Iizuka, T., Ishimura, Y. and Kanegasaki, S. (1986): Stoichiometric conversion of oxygen to superoxide anion during the respiratory burst in neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **261**, 11444-11447.

Maly, F. E., Nakamura, M., Gauchat, J. F., Urwyler, A., Walker, C.,

Dahinden, C. A., Cross, A. R., Jones, O. T. G. and de Weck, A. L. (1989): Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome *b*₂₄₅ components by human tonsillar B lymphocytes and B cell lines. *J. Immunol.*, **142**, 1260-1267.

Mandell, G. L. (1974): Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.*, **9**, 337-341.

McDowall, A. A., Healey, L. J. and Manning, M. J. (1987): Separation of carp, *Cyprinus carpio* L., pronephric cells on discontinuous bovine serum albumin density gradients. *J. Fish Biol.*, **31A**, 227-229.

Misra, H. P. and Fridovich, I. (1976): Superoxide dismutase and the oxygen enhancement of radiation lethality. *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 577-581.

三宅泰雄・北野康 (1980) : 新水質化学分析法, 地人書館, 東京, 265p.

宮崎照雄(1992): ウナギ 細菌病 パラコロ病, 「魚病図鑑, 畑井喜司雄・小川和夫・広瀬一美編, 緑書房, 東京」, 124.

Moritomo, T., Iida, T. and Wakabayashi, H. (1988): Chemiluminescence of neutrophils isolated from peripheral blood of eel. *Fish Pathol.*, **23**, 49-53.

室賀清邦 (1996): 細菌病 魚類病原細菌, 「魚病学概論, 室賀清邦・江草周三編, 恒星社恒星閣, 東京」, 47-51.

長村吉晃・若林久嗣(1985): ウナギ血液からの好中球の分離法. 魚病研究, **20**, 65-66.

Nagamura, Y. and Wakabayashi, H. (1985): Changes in glycogen content of

neutrophils in eel, *Anguilla japonica*, by bacterial infection. *Fish Pathol.*, **20**, 389-394.

Nagelkerke, L. A. J., Pannevis, M. C., Houlihan, D. F. and Secombes, C. J. (1990): Oxygen uptake of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes following stimulation of the respiratory burst. *J. Exp. Biol.*, **154**, 339-353.

Nakamura, M., Sendo, S., van Zwieten, R., Koga, T., Roos, D. and Kanegasaki, S. (1988): Immunocytochemical discovery of the 22- to 23-Kd subunit of cytochrome b_{558} at the surface of human peripheral phagocytes. *Blood*, **72**, 1550-1552.

中村三千男(1990): 好中球の活性酸素産生とチトクローム b_{558} . 活性酸素・フリーラジカル, **1**, 151-160.

Nakanishi, A., Imajoh-Ohmi, S., Fujinawa, T., Kikuchi, H. and Kanegasaki, S. (1992): Direct evidence for interaction between COOH-terminal regions of cytochrome b_{558} subunits and cytosolic 47-kDa protein during activation of an O_2^- generating system in neutrophils. *J. Biol. Chem.* **267**, 19072-19074.

中野稔(1989): 活性酸素 基礎編 活性酸素の消去 「活性酸素, 八木国夫・中野稔監修, 医歯薬出版, 東京」, 64-85.

Nash, K. A., Fletcher, T. C. and Thomson, A. W. (1987): Effect of opsonization on oxidative metabolism of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) neutrophils. *Biochem. Physiol.*, **86**, 31-36.

Nathan, C. F. (1989): Respiratory burst in adherent human neutrophils: Triggering by colony-simulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood*, **73**,

301-306.

大海忍・辻村邦夫・稲垣昌樹(1994): 抗ペプチド抗体実験プロトコール, 秀潤社, 東京, 215.

Pabst, M. J. and Johnston, R. B. (1980): Increased production of superoxide anion by macrophages exposed *in vivo* to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, **151**, 101-114.

朴性佑・若林久嗣(1989): ニホンウナギ頭腎中の白血球の性状. 魚病研究, **24**, 225-231.

朴性佑・若林久嗣(1990): 異物刺激がウナギの好中球のグリコーゲン含量に与える影響. 魚病研究, **25**, 231-236.

Park S.-W. and Wakabayashi, H. (1992): Comparison of pronephric and peripheral blood neutrophils of eel, *Anguilla japonica*, in phagocytic activity. *Fish Pathol.*, **27**, 149-152.

Pick, E. and Mizel, D. (1981): Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Meth.*, **46**, 211-226.

Quie, P. G., White, J. G., Holmes, B. and Good, R. A. (1967): *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J. Clin. Invest.*, **46**, 668-679.

Robert, B. and Scott, M. D. (1968): The role of glycogen in blood cells.

New Engl. J. Med., **278**, 1436-1439.

Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R. and Raa, J. (1990): Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cells walls. *J. Fish Dis.*, **13**, 391-400.

Root, R. K., Metcalf, J., Oshino, N. and Chance, B. (1975): H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. *J. Clin. Invest.*, **55**, 945-955.

Root, R. K. and Cohen, M. S. (1981): The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev. Infect. Dis.*, **3**, 565-598.

Rossi, F., Zatti, M., Patriarca, P. and Cramer, R. (1971): Effect of specific antibodies on the metabolism of guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **9**, 67-85.

Rossi, F. (1986): The O₂⁻-forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanism of activation and function. *Biochem. Biophys. Acta*, **853**, 65-89.

Rotrosen, D., Kleinberg, M. E., Nunoi, H., Leto, T., Gallin, J. I. and Malech, H. L. (1990): Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocytes oxidase cytochrome b₅₅₈. *J. Biol. Chem.*, **265**, 8745-8750.

Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., Cole, F. S., Curnutte, J. T. and Orkin, S. H. (1986): Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease-on the basis of its chromosomal location. *Nature*, **322**, 32-38.

Sagone, A. L. Jr., King, G. W. and Metz, E. N. (1976): A comparison of the metabolic response to phagocytosis in human granulocytes and monocytes. *J. Clin. Invest.*, **57**, 1352-1358.

Sakai, M., Otubo, T., Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1993): Enhancement of resistance of bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. *J. Fish Dis.*, **16**, 239-247.

Sasada, M. and Johnston, R. B. Jr. (1980): Macrophage microbicidal activity. *J. Exp. Med.*, **152**, 85-98.

Scott, A. L. and Klesius, P. H. (1981): Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish. *Develop. Biol. Standard*, **49**, 243-254.

Secombes, C. J., Chung, S. and Jeffress, A. H. (1988): Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C. *Dev. Comp. Immunol.*, **12**, 201-206.

Secombes, C. J., Cross, A. R., Sharp, G. J. E. and Garcia, R. (1992): NADPH oxidase-like activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, **16**, 405-413.

Secombes, C. J. and Fletcher, T. C. (1992): The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **2**, 53-71.

Segal, A.W., Jones, O. T. G., Webster, D. and Allison, A. C. (1978): Absence of a newly described cytochrome *b* from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet*, **2**, 446-449.

Segal, A. W. and Abo, A. (1993): The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *TIBS*, **18**, 43-47.

Sharp, G. J. E. and Secombes, C. J. (1993): The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunol.*, **3**, 119-129.

She, Z. W., Mays, D. C., Sagone, A. L. and Davis, W. B. (1997): Aminobenzoic acid compounds as HOCl traps for activated neutrophils. *Free Rad. Biol. Med.*, **22**, 989-998.

Sips, H. J. and Hamers, M. N. (1981): Mechanism of the bactericidal action of myeloperoxidase: Increased permeability of the *Escherichia coli* cell envelope. *Infect. Immunol.*, **31**, 11-16.

Siwicki, A., Studnicka, M. and Ryka, B. (1985): Phagocytic ability of neutrophils in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bamidgeh*, **4**, 123-128.

Stave, J. W., Robertson, B. S. and Hetrick, F. M. (1983): Chemiluminescence of phagocytic cells isolated from the pronephros of striped bass. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 269-276.

竹重公一朗 (1990): 白血球の活性化 無細胞系での活性化, 「白血球と生体防御, 水上茂樹・柿沼カツ子・竹重公一朗編, 講談社, 東京」, 190-198.

Tauber, A. I. and Babior, B. (1977): Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, **60**, 374-379.

Teahan, C., Rowe P., Parker, P., Totty, N. and Segal, A. W. (1987): The

X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the β -chain of cytochrome *b*₂₄₅. *Nature*, **327**, 720-721.

Ueno, I., Kohno, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y. and Kanegasaki, S. (1989): Reevaluation of the spin-trapped adduct formed from 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide during the respiratory burst in neutrophils. *J. Biochem.*, **105**, 905-910.

Ueno, I., Fujii, S., Ohya-Nishiguchi, H., Iizuka, T. and Kanegasaki, S. (1991): Characterization of neutrophil *b*-type cytochrome *in situ* by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *FEBS Lett.*, **281**, 130-132.

Verhoeven, A. J., Bolscher, B. G. J. M., Meerhof, L. J., van Zwieten, R., Keijer J., Weening, R. S. and Roos, D. (1989): Characterization of two monoclonal antibodies against cytochrome *b*₅₅₈ of human neutrophils. *Blood* **73**, 1686-1694.

Wang, R., Neumann, N. F., Shen, Q. and Belosevic, M. (1995): Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish. *Fish & Shellfish Immunol.*, **5**, 329-346.

Wedemeyer, G. A. (1996): Biological interactions. In "Physiology of fish in intensive culture systems". Chapman & Hall, New York, pp166-201.

Weiss, S. J., King, G. W. and LoBuglio, A. F. (1977): Evidence for hydroxyl radical generation by human monocytes. *J. Clin. Invest.*, **60**, 370-373.

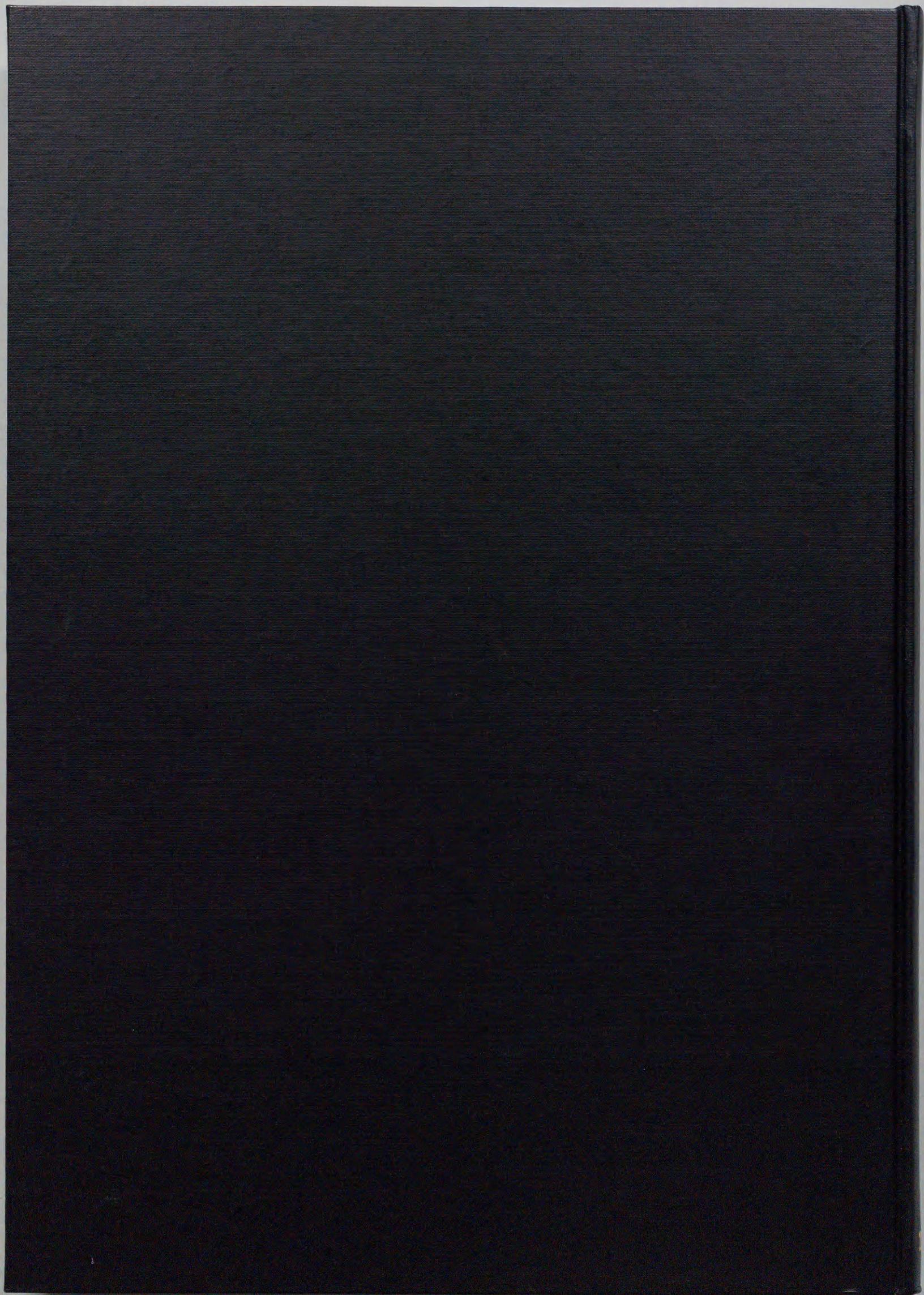
Wolfson, M., McPhail, L. C., Nasrallah, V. N. and Snyderman, R. (1985): Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in

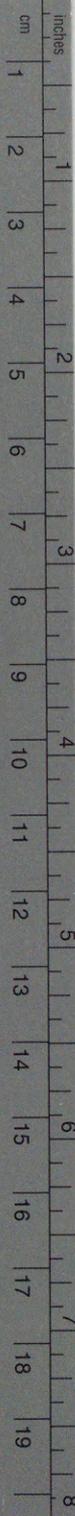
human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme. *J. Immunol.*, **135**, 2057-2062.

Yano, T., Mangindaan, R. E. P. and Matsuyama, H. (1989): Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1, 3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1815-1819.

矢野友紀 (1995): 魚類の生体防御, 「生物生産と生体防御, 村上浩紀・緒方靖哉・松山宣明・河原畑勇・矢野友紀編, コロナ社, 東京」, 171-254.

Zigmond, S. H. and Hirsch, J. G. (1972): Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp. Cell Res.*, **73**, 383-393.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

