

細菌感染に伴うヒラメの Cu, Zn-SOD 活性の変化

長富 潔, 金井欣也, 原 研治, 石原 忠

(2001年5月2日受付, 2001年10月30日受理)

長崎大学水産学部

Changes in Cu, Zn-SOD activity in Japanese flounder
Paralichthys olivaceus with bacterial infection

KIYOSHI OSATOMI, KINYA KANAI, KENJI HARA AND TADASHI ISHIHARA

Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki, Nagasaki 852-8521, Japan

Cu, Zn-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) activities were compared in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* for four different kinds of bacterial infections. A significant increase in Cu, Zn-SOD levels was recorded in hepato-pancreas (approximately 6-fold activity of control fish) at the initial stages of *Edwardsiella tarda* infection, which decreased progressively to normal levels in the following 2 days. On the other hand, in fish infected with *Vibrio anguillarum* and *Streptococcus iniae*, activity of Cu, Zn-SOD was almost the same level as that in the control fish. Therefore, it was suggested that the remarkable change of Cu, Zn-SOD activities was a characteristic phenomenon of *E. tarda* infection.

キーワード：スーパーオキシドジスムターゼ, Cu, Zn-SOD, 活性酸素, ヒラメ, 魚病, 細菌感染, *Edwardsiella tarda*

活性酸素により引き起こされる酸素ストレスは生物にとっては避けられないリスクであり, 近年, 環境ストレスへの活性酸素の関与が指摘されている。さらには, 各種炎症性疾患の病態発現における活性酸素の役割についても論議を呼んでいる。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD, EC 1. 15. 1. 1) は, 活性酸素の一種であるスーパーオキシドラジカル (O_2^-) の不均化反応を触媒する酵素であり, 活性中心に金属を含む金属酵素である。その金属の種類によって細胞質に存在する Cu, Zn-SOD, ミトコンドリア内に存在する Mn-SOD, ある種の細菌にのみ存在する Fe-SOD の3種類に分類されていたが,¹⁾ 最近主に体液中に存在する分子量の大きい extracellular-SOD (EC-SOD) も Marklund²⁾ によって発見されている。SOD は活性酸素消去系の初発かつ律速酵素として働くことからこの系で最重要視されており, 哺乳類, 植物および微生物に関する多くの報告がある。³⁾ しかしながら, 生体内での役割については未だ不明な点が多い。

一方, 魚類の SOD に関する報告としては, 著者らのヒラメ肝臓由来 Cu, Zn-SOD の精製⁴⁾のほか, ヒラメ

皮膚,⁵⁾ サメ肝臓,⁶⁾ シラウオ肝臓⁷⁾ およびコイ肝臓⁸⁾ 由来 Cu, Zn-SOD の精製とその性状解析などがあるが, 魚病の病態発現時における SOD の役割に関する報告例はない。

本研究では, SOD の病態生化学研究の一つとしてヒラメ養殖に被害を与えているエドワジエラ症, レンサ球菌症およびビブリオ症の原因菌 *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio anguillarum* によるヒラメの実験感染系を用い, 病態発現における Cu, Zn-SOD 活性の挙動を調べた。

実験方法

供試魚 長崎県南高来郡口之津町の種苗生産業者より購入し, 長崎大学水産学部付属水産実験所の屋内コンクリート水槽 (1 m²) でヒラメ用配合飼料 (ヒガシマル製ドライペレット) を与えて流水飼育したヒラメ 200 尾を用いた。供試魚の平均体重は 67.3 g であった。

供試菌株 1986年1月に長崎市のヒラメ病魚の腸から分離された *E. tarda* NUF 251⁹⁾ (強毒株), 1985年12月に長崎県島原市の養鰻場の飼育水から分離され, 攻撃

* Tel : 81-95-847-1111. Fax : 81-95-844-3516. Email : osatomi@net.nagasaki-u.ac.jp

菌量 10^9 CFU/100 g 魚体重の筋肉接種でも全く死亡が見られなかった(未発表データ) *E. tarda* NUF 194 を弱毒株として用いた。また、1990年3月に香川県のヒラメから分離された *V. anguillarum* NUF 787 と1992年に熊本県のヒラメから分離された *S. iniae* NUF631¹⁰⁾ 菌株も用いた。

感染実験 感染方法として菌浴法と注射法を用いた。菌浴法では、*E. tarda* NUF 251 を普通ブイオン(ポリペプトン1.0%, 酵母エキス0.5%, 塩化ナトリウム0.5%, pH 7.2)で25°C, 40時間振とう培養し、遠心分離(7,800×g, 20分間)で集めた菌体を海水に懸濁し、エアレーションを行いながらその中でヒラメ30尾を15分間浸漬した。攻撃菌量は海水1 mLあたり 8.7×10^7 CFUであった。対照区のヒラメには菌を懸濁していない海水を用いて同様の処理を行った。感染区、対照区ともそれぞれ200 L円形パンライト水槽に収容し、無給餌で12日間流水飼育した。実験期間中の水温は23.5~25.2°Cであった。経時的に両試験区より3尾ずつ取り上げ、肝臓、腎臓を採取して直ちに-80°Cで凍結保存した。一方、注射法では、*E. tarda* NUF 251 およびNUF 194には普通寒天、*V. anguillarum* NUF 787には塩化ナトリウム濃度を2%にした普通寒天、*S. iniae* NUF 631にはトッドヒューイット寒天(Difco製)を用い、27°C, 24時間培養し、各攻撃菌量が致死量になるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.2)に懸濁し、0.2 mL/100 g 魚体重となるようヒラメ背部筋肉に注射した。対照区のヒラメにはPBSを同様に注射した。各感染群の攻撃菌量は、*E. tarda* NUF 251が 7.8×10^3 CFU/100 g 魚体重、*V. anguillarum*が 8.0×10^8 CFU/100 g 魚体重、*S. iniae*が 1.8×10^6 CFU/100 g 魚体重であった。*E. tarda* NUF 194について*E. tarda* NUF 251と同じ攻撃菌量とした。攻撃後、菌浴法の場合と同様に7日間飼育し、試料を採取した。水温は23.0~24.5°Cであった。

測定試料の調製 凍結保存しておいたヒラメの各臓器を使用時に細切し、30倍量のPBSを加えてポリトロンでホモジナイズ後、遠心分離(21,000×g, 20分間)し粗酵素液を得た。次いで、SOD活性測定時の発色を妨害するヘモグロビンを粗酵素液から除去するために、Tsuchihashi法¹¹⁾により、粗酵素液4.0 mLにエタノール1.0 mL、クロロホルム0.6 mLを加えてよく振とうした。これを遠心分離(1,000×g, 10分間)すると、3層に分かれ、中間層に変性ヘモグロビンが集まるので、その上層の水・エタノール層を回収した。次いで、残留クロロホルムをエバポレーターで減圧除去し、ゲル濾過(Sephadex G-25カラム, Pharmacia製, 1.5×5.0 cm)により脱塩したものをSOD活性の測定試料とした。なお、測定試料中のSOD種を同定するために、酵素試料

をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ゲル上でシアン化カリウムの有無の条件下でSODの活性染色をNBT染色法¹¹⁾により行った(アクリルアミドゲル-NBT法)。その結果、測定試料中のSODは、シアン化カリウムの添加により消失したことより、Cu, Zn-SOD 1種類であることが確認された(未発表データ)。

SOD活性測定 前報に準じ、⁴⁾亜硝酸法¹²⁾でSOD活性を測定した。この方法は O_2^- の分光学的測定法であり、 O_2^- 生成源としてキサンチンオキシダーゼとキサンチンナトリウムを加え、そこにSOD含有試料を加えて O_2^- 生成量の50%を消去する量によりSOD活性を求めた。

生菌数測定 各臓器に30倍量のPBSを加えてホモジナイズし、PBSで10倍階段希釈系列を作製した。その0.1 mLを菌種ごとに前記の培地の寒天平板に塗抹して27°Cで2日間培養し、コロニー数をカウントした。

統計処理 測定結果の有意差検定はt検定¹³⁾により行った。

結 果

ヒラメの各臓器におけるCu, Zn-SOD活性 無処理のヒラメを用い、各臓器のCu, Zn-SOD活性を亜硝酸法で測定した結果、肝臓>脾臓>腎臓>心臓>胃>鰓>黒色皮>白色皮の順に高いSOD活性値を示した(Fig. 1)。すなわち、肝臓のSOD活性が最も高かったのに対し、皮膚、鰓が、最も低い活性を示した。な

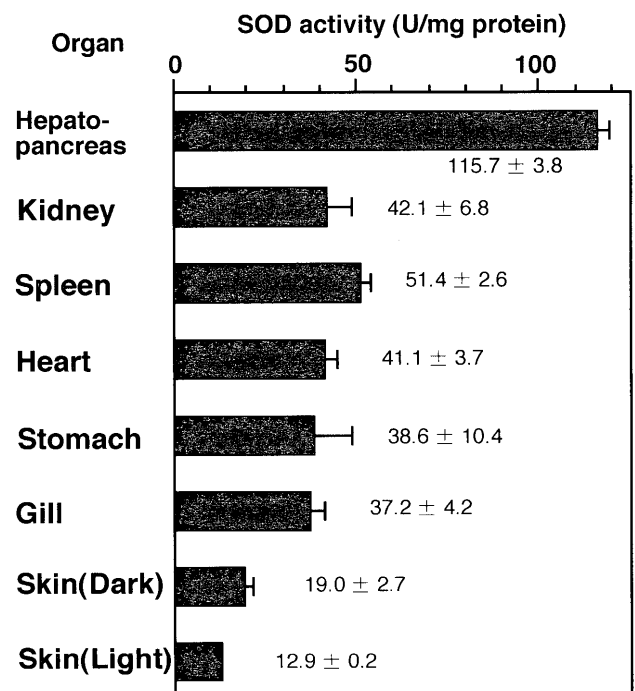


Fig. 1. SOD activity of various tissues and organs of Japanese flounder ($n=5$).

お、皮膚では黒色部（背部）の方が白色部（腹部）より高い活性を示し、この結果は Nakano らの報告¹⁴⁾と一致した。

***E. tarda* NUF251 菌浴感染における Cu, Zn-SOD 活性と生菌数の経時的变化** Cu, Zn-SOD 活性が最も高かった肝膵臓と、*E. tarda* の主要な増殖部位の一つと考えられる腎臓を用い、¹⁵⁾ *E. tarda* 感染時における Cu, Zn-SOD 活性と *E. tarda* の生菌数の経時的变化について調べた結果を Fig. 2 に示す。肝膵臓 (Fig. 2-(A)) では、感染魚の SOD 活性が菌浴 3 時間後に対照魚の活性の約 6 倍に上昇した。しかし、その後急激に低下し、1 日目には菌浴直後、つまり健常時の活性値とほぼ同程度に戻り、2 日目には対照魚の約 1/2 まで低下し、それ以降はほとんど変化しなかった。一方、生菌数は、菌浴後 2 日目までは検出限界以下であった。しかし、2 日目以降は急激に増加し、増加傾向は 10 日目まで続いた。すなわち、SOD 活性が対照魚の 1/2 まで低下した 2 日目以降より生菌数が急激に増加した。腎臓 (Fig. 2-(B)) の SOD 活性においては、肝膵臓でみられた菌浴 3 時間後

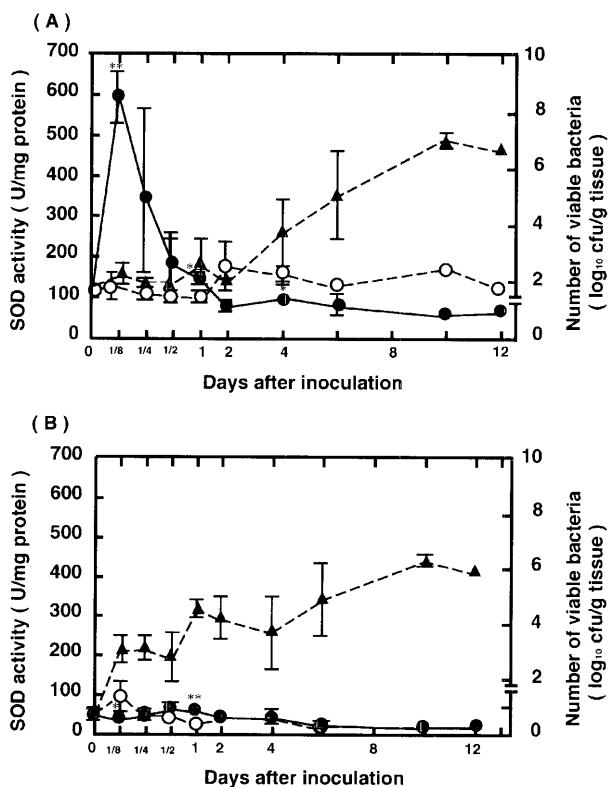


Fig. 2. Changes in SOD activity in the hepatopancreas (A) and kidney (B) after *E. tarda* NUF 251 infection by the water-borne method. (●), SOD activity in infected fish. (○), SOD activity in control fish. (▲), number of viable bacteria. Each point and bar indicates the mean value for three fish \pm SE. Significantly different at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**), from SOD activity of the control fish.

の増加現象は全く認められなかった。12 時間後には対照魚より多少高くなったが、肝膵臓と比較するとその程度は低かった。一方、生菌数は菌浴 3 時間後に 10^3 cfu/g 検出されており、その後も経時的に増加傾向を示した。

4 種菌株の感染区（注射法）における Cu, Zn-SOD 活性と生菌数の経時的变化

1. *E. tarda* NUF251 (強毒株) 感染区 感染魚の肝膵臓の Cu, Zn-SOD 活性は 6~12 時間後に対照魚の約 6 倍上昇したが、その後漸次減少し、48 時間後には対照魚と同程度まで低下した。72 時間後に再び上昇したが、168 時間後は対照魚以下に減少した。生菌数は 48 時間までは検出限界以下であったが、その後急激に増加し感染の成立を確認することができた (Fig. 3-(A))。腎臓における Cu, Zn-SOD 活性の変化は、肝膵臓と比較するとそれほど大きくないが、1~3 時間後に僅かな活性の上昇がみられ、12~72 時間後にもゆるやかな上

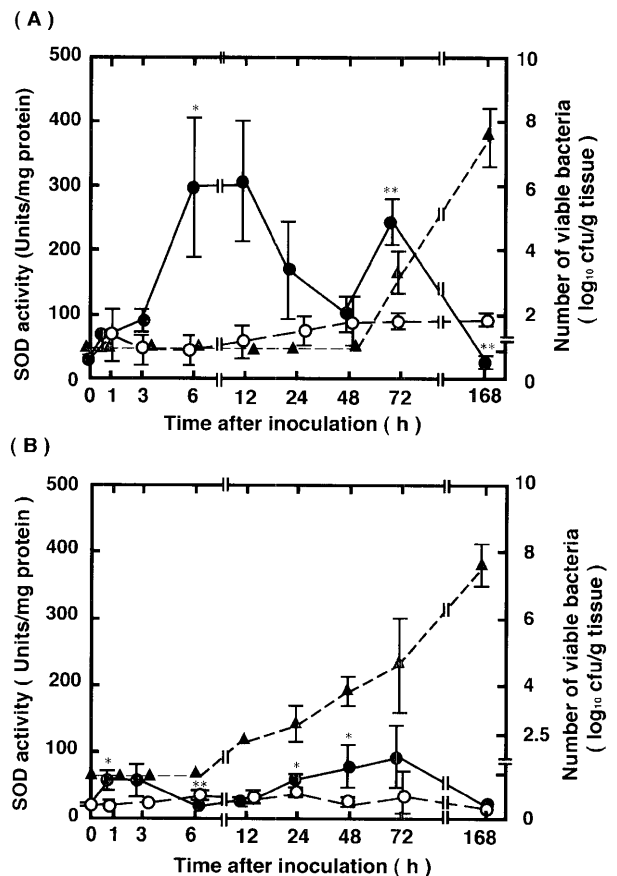


Fig. 3. Changes in SOD activity in the hepatopancreas (A) and kidney (B) after *E. tarda* NUF 251 (virulent strain) infection by the injection method. (●), SOD activity in infected fish. (○), SOD activity in control fish. (▲), number of viable bacteria. Each point and bar indicates the mean value for three fish \pm SE. Significantly different at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**), from SOD activity of the control fish.

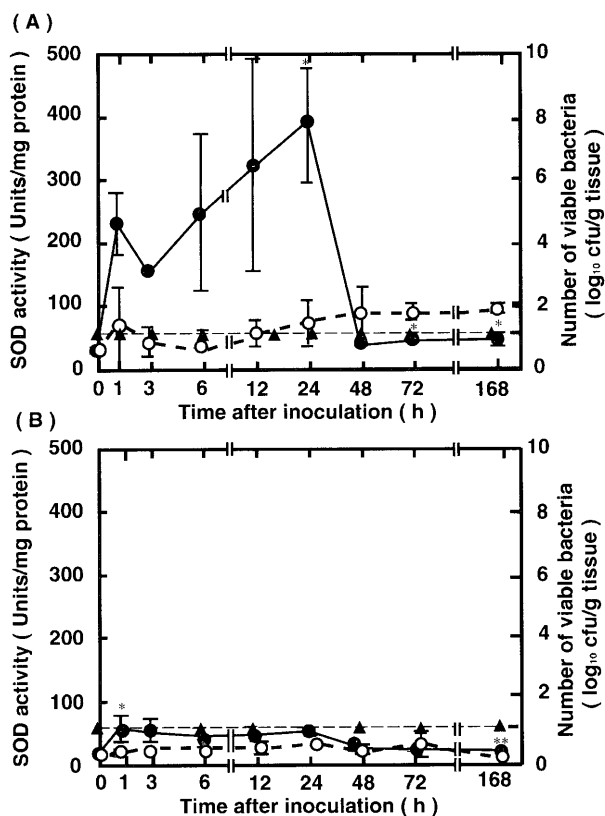


Fig. 4. Changes in SOD activity in the hepato-pancreas (A) and kidney (B) after *E. tarda* NUF 194 (a-virulent strain) infection by the injection method. (●), SOD activity in infected fish. (○), SOD activity in control fish. (▲), number of viable bacteria. Each point and bar indicates the mean value for three fish \pm SE. Significantly different at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.01$ (**), from SOD activity of the control fish.

昇を示した。一方、生菌数は12時間以降に少しずつ上昇した (Fig. 3-(B))。

2. *E. tarda* NUF194 (弱毒株) 感染区 肝臓の Cu, Zn-SOD 活性は菌接種1時間後に約5倍に急増し、その後も少しずつ上昇し、24時間後は約8倍まで上昇した。その後急激に低下し、48時間後には対照群の約1/2程度まで低下した (Fig. 4-(A))。一方、腎臓については Cu, Zn-SOD 活性の顕著な変化はみられなかった (Fig. 4-(B))。なお、両臓器の生菌数はいずれの調査時点において検出限界以下であった。

3. *V. anguillarum* NUF 787 感染区 菌接種後24時間までに全てのヒラメが死亡したため、それ以後は測定できなかった。両臓器において、生菌数は菌接種1時間後から急激に増加したが、Cu, Zn-SOD 活性は *E. tarda* 感染区の初期 (3~24時間) にみられたような顕著な上昇はなく、肝臓でゆるやかな上昇のみみられた (Fig. 5)。

4. *S. iniae* NUF631 感染区 肝臓では、生菌数

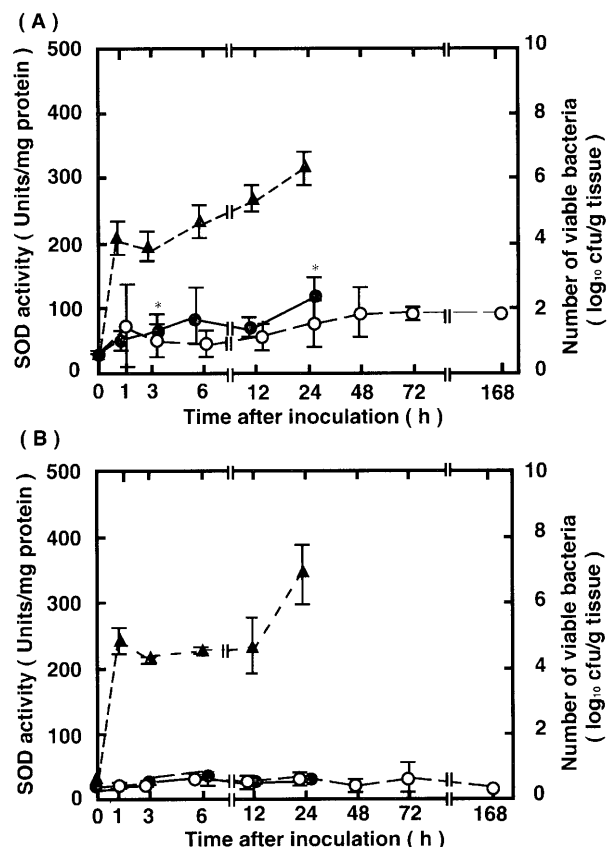


Fig. 5. Changes in SOD activity in the hepato-pancreas (A) and kidney (B) after *V. anguillarum* NUF 787 infection by the injection method. (●), SOD activity in infected fish. (○), SOD activity in control fish. (▲), number of viable bacteria. Each point and bar indicates the mean value for three fish \pm SE. Significantly different at $P < 0.05$ (*), from SOD activity of the control fish.

は12時間以降増加したが、Cu, Zn-SOD 活性は3~6時間後に微増したものの、その後は対照魚の1/2以下に低下した (Fig. 6-(A))。一方、腎臓では、生菌数は接種1時間以降少しずつ増加傾向を示していたが、Cu, Zn-SOD 活性は対照魚とほとんど同じであった (Fig. 6-(B))。

各感染区における SOD 指数の変化 前述の注射法による感染実験で得た Cu, Zn-SOD 活性の結果 (Fig. 3~Fig. 6) を相対的に比較するために、対照魚に対して感染魚の Cu, Zn-SOD 活性がどの程度上昇したかを表す指標として SOD 指数 (対照魚に対する感染魚の Cu, Zn-SOD 活性 (U/mg protein) の比) を算出した。その数値に基づいて各感染区における SOD 指数の変化を Fig. 7 に示した。肝臓においては、*E. tarda* NUF251 (強毒株) 感染魚の場合、菌接種6時間後に SOD 指数は7.47、その後一時減少したが72時間後に再び3.86と急激に上昇し2つの大きなピークが認められた。ま

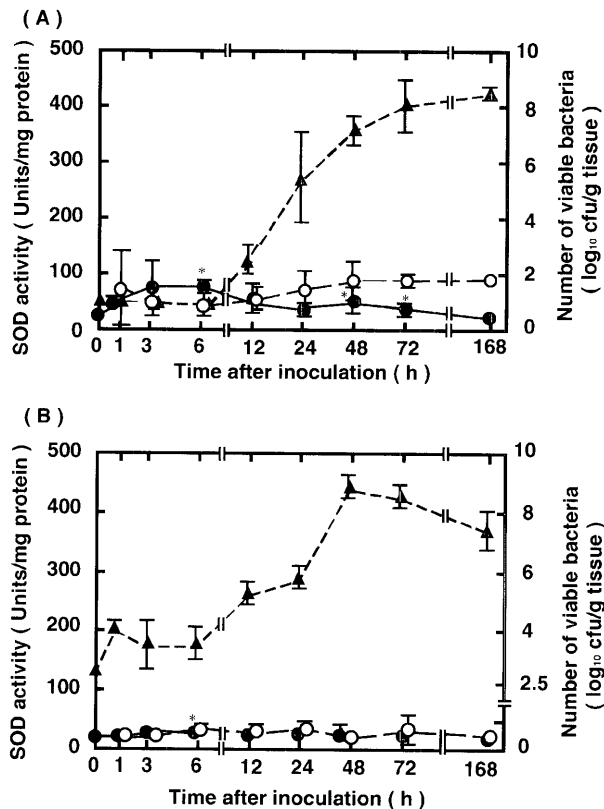


Fig. 6. Changes in SOD activity in the hepato-pancreas (A) and kidney (B) after *S. iniae* NUF 631 infection by the injection method. (●), SOD activity in infected fish. (○), SOD activity in control fish. (▲), number of viable bacteria. Each point and bar indicates the mean value for three fish \pm SE. Significantly different at $P < 0.05$ (*), from SOD activity of the control fish.

た, *E. tarda* NUF194 (弱毒株) 感染魚の場合は 6~24 時間後まで高い SOD 指数が保持されており, 48 時間後からは 0.5 以下に低下していた。一方, *V. anguillarum*, *S. iniae* 感染魚においても若干の変動はみられたが, *E. tarda* ほどではなかった。*V. anguillarum* 感染魚では 3~24 時間後までゆるやかに上昇し, 24 時間後に SOD 指数は 2.21 であった。*S. iniae* 感染魚においては, 6 時間までゆるやかに上昇したが 24 時間後には 0.5 以下に低下していた。腎臓の場合, *E. tarda* NUF251 感染魚で 2 つのピークがみられ, 第 1 のピークは肝臓ほど高くはないが類似した挙動を示した。ただし, 肝臓の場合と比較すると, 腎臓の方が早い時点で変動する傾向がみられた。*V. anguillarum* 感染魚および *S. iniae* 感染魚の SOD 指数は 1 前後であり, 対照魚と差のないことが判った。以上のことから Cu, Zn-SOD 活性の変動は菌株および臓器の種類によって異なることが明らかになった。

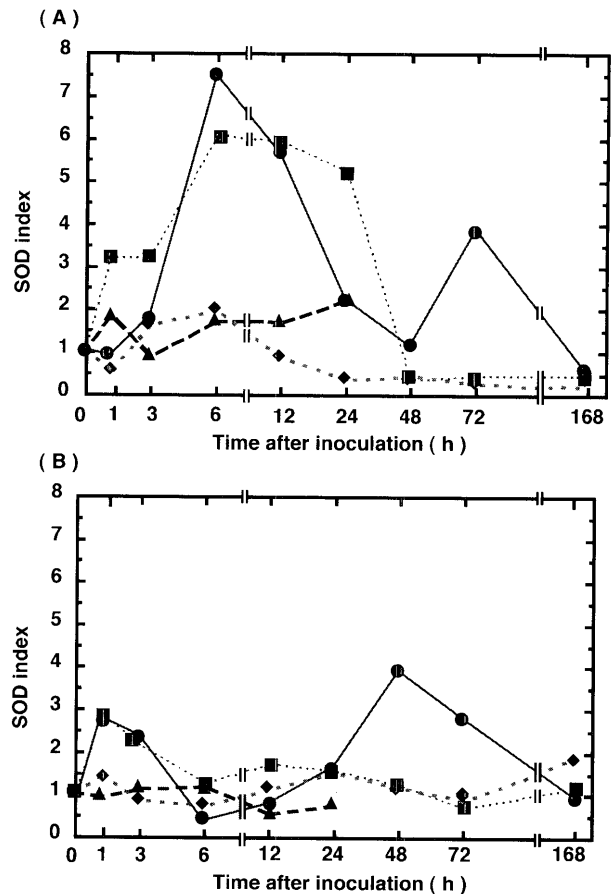


Fig. 7. Changes in SOD activity in the hepato-pancreas (A) and kidney (B) after four kinds of bacterial infection. (●), *E. tarda* NUF 251 (virulent strain). (■), *E. tarda* NUF 194 (avirulent strain). (▲), *V. anguillarum* NUF 787. (◆), *S. iniae* NUF 631. Each point and bar indicates the mean activity for three fish \pm SE.

SOD index

$$= \frac{\text{SOD activity (units/mg of protein) in infected fish}}{\text{SOD activity (units/mg of protein) in control fish}}$$

考 察

活性酸素は様々な病気と関係があり, その抑制に SOD が関与しているという報告がある。¹⁶⁾ すなわち, 種々の炎症性疾患に直接ないし間接的に活性酸素が関与しており, SOD が好中球の走化性因子の産生, 遊走の促進および抑制の両方に係わっているというものである。しかしながら, 病態時における SOD 活性の変動についての研究例としては, マウスに *Salmonella typhimurium* あるいは *Pseudomonas aeruginosa* を感染させてキサンチンオキシダーゼと SOD 活性の経時的変化を測定した Takahashi ら¹⁷⁾ の報告があるのみで, 魚類に関する報告はない。そこで本研究では, ヒラメの代表的な細菌感染症であるエドワジエラ症の原因菌 *E. tarda* を用いて, 菌浴法によるヒラメの感染実験を行っ

た。Takahashi ら¹⁷⁾は, *P. aeruginosa* を感染させたマウスの肝臓における SOD 活性が菌接種 3 日後に 2 倍に上昇し, その後徐々に低下したと報告している。一方, ヒラメ肝臓の Cu, Zn-SOD 活性は感染初期 (菌浴 3 時間後) の段階で非常に高い活性 (対照魚の約 6 倍) を示したが, それは一時的なもので, 数時間のうちに低下し, 対照魚とほぼ同レベルになった (Fig. 2)。この結果は, *E. tarda* の感染成立およびヒラメ由来 Cu, Zn-SOD の応答がマウスの場合と比較して極めて速いことを示している。

また, 最近 *E. tarda* 由来の SOD 遺伝子がクローニングされ, 一次構造から Fe-SOD に分類されることが明らかになった。¹⁸⁾ Fe-SOD と Cu, Zn-SOD は, シアン化カリウム存在下での活性の有無で区別することができる。アクリルアミドゲル NBT 法により, 感染区の測定試料中の SOD 種の同定を行ったところ, 活性バンドとして検出された SOD は 1 種類でシアン化カリウム存在下で消失したことから, ヒラメ由来の Cu, Zn-SOD であることが確認された。従って, *E. tarda* 由来の SOD が, SOD 活性の変化に影響を及ぼすことはないと考えられた。

次に, 細菌の種類により Cu, Zn-SOD 活性の変化が異なるのかを *E. tarda* の強毒株, 弱毒株, その他 2 種の魚病細菌 (*V. anguillarum*, *S. iniae*) による感染実験 (注射法) で調べた (Fig. 3~6)。肝臓における Cu, Zn-SOD 活性の変化をみると *E. tarda* NUF251 (強毒株) 感染区では, 菌浴法の結果と若干の時間のずれはあるものの同様の結果が確認された。一方, 同じ *E. tarda* で非病原性の *E. tarda* NUF194 (弱毒株) 感染区においても感染初期に高い Cu, Zn-SOD 活性が確認されたことより, 感染初期の Cu, Zn-SOD 活性の上昇は *E. tarda* の病原性に関係なく生じることが明らかとなった。*V. anguillarum* 感染区および *S. iniae* 感染区においては Cu, Zn-SOD 活性に大きな変化はみられなかった。このことから *E. tarda* 感染区における感染初期の Cu, Zn-SOD 活性の上昇は *E. tarda* 特有の現象であることが示唆された。なお, 腎臓においては *E. tarda* 感染区の SOD 活性に肝臓ほど大きな変化はみられなかった一方, ピークが肝臓より早期にみられた (Fig. 7)。腎臓において Cu, Zn-SOD 活性に大きな変化がなかった理由として, 腎臓は臓器重量当たりの Cu, Zn-SOD 活性が肝臓の 1/2 以下である一方 (Fig. 1), 肝臓より初期の段階から菌が検出されていることによると推察される。

E. tarda 感染区における Cu, Zn-SOD 活性の顕著な変化の原因は, 現在のところ不明である。可能性としては *E. tarda* 自体が活性酸素を産生しているか, あるいは *E. tarda* の構成成分の何らかの物質がマクロファージの

活性酸素産生能を亢進し, SOD 活性の変動を誘起しているという考え方である。前者については, 赤潮原因プランクトン *Chattonella marina* が活性酸素を産生することにより, 魚毒性発現を引き起こしていると報告されている。¹⁹⁾ また, 細菌においても *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus pneumoniae* が活性酸素種である O_2^- と H_2O_2 を細胞外に産生するという報告がある。²⁰⁾ そこで *E. tarda* が O_2^- を産生しているか否かをルミノール法²¹⁾ およびスコポレチン法²²⁾ で調べた。その結果, *E. tarda* からの O_2^- 産生は認められなかった (未発表データ)。このことから *E. tarda* が直接 SOD の基質である O_2^- を産生し, 結果として Cu, Zn-SOD 活性が上昇するという考えは否定された。後者については, 細菌のエンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS) が “oxidative burst” を誘起するという考え方がある。²³⁾ 実際に, マクロファージは LPS により活性化され, その活性酸素産生能は著しく亢進してくることが報告されている。²⁴⁾ また, 比較的大量の LPS を実験動物に投与すると, 48 時間後には肝臓内に炎症性マクロファージが増加してくるが, これらの活性酸素産生能は著明に亢進しているとの報告もある。²⁵⁾ *E. tarda* の LPS は, SDS-PAGE による泳動パターンの違いにより *V. anguillarum* のものと構造が異なることが明らかになっている。²⁶⁾ 従って, *E. tarda* 感染区における SOD 活性の変動が *E. tarda* の持つ LPS の構造によるものかは今後注目すべきところであろう。

本研究では, ヒラメの代表的細菌感染症であるエドワジエラ症の原因菌 *E. tarda* およびヒラメに病原性をもつ *V. anguillarum* と *S. iniae* の感染系を用い酵素活性を指標として Cu, Zn-SOD の挙動を調べてきた。その結果, *E. tarda* の感染初期において Cu, Zn-SOD の酵素的防御能を示唆するデータが得られた。今後は, *E. tarda* 感染に伴う酸素ストレスによる Cu, Zn-SOD のタンパクおよび遺伝子レベルでの変化を明らかにしていく必要がある。

謝 辞

本研究の一部は, 平成 12 年度文部省科学研究費基盤研究 (C) によって行われたものである。ここに記して感謝する。

文 献

- 1) 大柳善彦. 「活性酸素と病気」化学同人, 京都. 1989; 21-38.
- 2) Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982; **79**: 7634-7638.
- 3) Asada K, Kaneyasu S, Okada S, Hayakawa T. In: Bannister JV, Hill HAO (eds) *Chemical and Biological Aspects*

- of Superoxide and Superoxide Dismutase, Elsevier, Amsterdam. 1980; 136-153.
- 4) Osatomi K, Masuda Y, Hara K, Ishihara T. Purification, N-terminal amino acid sequence, and some properties of Cu, Zn-superoxide dismutase from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) hepato-pancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* 2001; **128B**: 751-760.
 - 5) Nakano T, Sato M, Takeuchi M. Unique molecular properties of superoxide dismutase from teleost fish skin. *FEBS Lett.* 1995; **360**: 197-201.
 - 6) Galtieri A, Natoli G, Lania A, Calabrese L. Isolation and characterization of Cu, Zn superoxide dismutase of the shark *Prionace glauca*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1986; **83B**: 555-559.
 - 7) Natoi G, Calabrese L, Capo C, O'Neill P, Prisco GD. Icefish (*Chaenocephalus aceratus*) Cu, Zn superoxide dismutase. Conservation of the enzyme properties in extreme adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990; **95B**: 29-33.
 - 8) Vig E, Gabrielak T, Leyko W, Nemcsok J, Matkoviak B. Purification and characterization of Cu, Zn-superoxide dismutase from common carp liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 1989; **94B**: 395-397.
 - 9) 馬久地隆幸, 清川智之, 本多数充, 中井敏博, 室賀清邦. ヒラメにおける *Edwardsiella tarda* の感染実験. 魚病研究 1995; **30**: 247-250.
 - 10) Nguyen HT, Kanai K, Yoshikoshi K. Experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.* 2001; **36**: 40-41.
 - 11) Beachamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971; **44**: 276-287.
 - 12) Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 1984; **142**: 290-296.
 - 13) 石居 進. 検定. 「生物統計学入門」培風館, 東京. 1975; 65-212.
 - 14) Nakano T, Sato M, Takeuchi M. Superoxide dismutase activity in the skin of fish. *J. Fish Biol.* 1993; **43**: 492-496.
 - 15) 金井欣也. ヒラメのエドワジエラ症に関する研究. 平成2年度魚病技術対策技術開発研究成果報告書 (第1分冊), 社団法人日本水産資源保護協会, 東京. 1990; 1-19.
 - 16) Westman NG, Marklund SL. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors. *Cancer Res.* 1981; **41**: 2962-2966.
 - 17) Takahashi M, Ushijima T, Ozaki Y. Changes in hepatic superoxide dismutase and xanthine oxidase activity in mice infected with *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 1988; **26**: 281-284.
 - 18) Yamada Y, Wakabayashi H. Identification of fish-pathogenic strains belonging to the genus *Edwardsiella* by sequence analysis of *sodB*. *Fish Pathol.* 1999; **34**: 145-150.
 - 19) Oda T, Ishimatsu A, Shimada M, Takeshita S, Muramatsu T. Oxygen-radical-mediated toxic effects of red tide flagellate *Chattonella marina* on *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Biol.* 1992; **112**: 505-509.
 - 20) Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; **10**: 1-18.
 - 21) Nishida A, Kimura H, Nakano M, Goto T. A sensitive and specific chemiluminescence method for estimating the ability of human granulocytes and monocytes to generate O_2^- . *Clin. Chem. Acta.* 1982; **179**: 177-182.
 - 22) Andrae WA. A sensitive method for the estimation of hydrogen peroxide in biological materials. *Nature* 1955; **175**: 859-860.
 - 23) 谷川久一, 野口和典. クッパー細胞とフリーラジカル「活性酸素と病態—疾患モデルからベッドサイドへ」(井上正康 編著) 学会出版センター, 東京. 1992; 379-390.
 - 24) Pabst MJ, Johnston RB. Increased production of superoxide anion by macrophages exposed *in vitro* to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 1980; **151**: 101-114.
 - 25) Birmelin M, Karck U, Dieter P, Frevdenberg N, Decker K. Distribution of endotoxin and endotoxin-stimulated prostanoic acid production in primary cultures of rat Kupffer cells. In: Kirn A, Knook DL, Wisse E (eds) *Cells in the hepatic sinusoid* Vol. 1, Kupffer Cell Foundation, The Netherlands. 1986; 295-300.
 - 26) Nomura J, Aoki T. Morphological analysis of lipopolysaccharide from gram-negative fish pathogenic bacteria. *Fish Pathol.* 1985; **20**: 193-197.