水産研究・教育機構 機関リポジトリ
FRA Japan Fisheries Research and Education Agency Institutional Repository

タイノエに寄生されたマダイの好中球顆粒

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産大学校 公開日: 2024-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): granule; neutrophil; Pagrus major; red seabream; Ceratothoa verrucosa 作成者: 近藤, 昌和, 窪田, 太貴, 前川, 幸平, 安本, 信哉, 高橋, 幸則 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2012100

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

本論文　　Journal of National Fisheries University 65 (4) 203-206 (2017)

タイノエに寄生されたマダイの好中球顆粒

近藤昌和†，窪田太貴，前川幸平，安本信哉，高橋幸則

Neutrophil Granules of Red Seabream *Pagrus major* Parasitized with *Ceratothoa verrucosa*

Masakazu Kondo†, Taiki Kubota, Kouhei Maekawa, Shinya Yasumoto and Yukinori Takahashi

Abstract: Three types of granules were observed in the neutrophils of red seabream *Pagrus major* parasitized with *Ceratothoa verrucosa*. In May-Grünwald・Giemsa staining preparation, two types were identified as ordinary chromophobic granules (oβG; type 1 (oβG-1; without core) and type 2 (oβG-2; with eosinophilic core)) which were observed in the neutrophils from non-parasitized fish. Other type, which consist of chromophobic core and eosinophilic surrounding, was considered inducible chromophobic granules (iβG) because this type was not found in non-parasitized fish. Peroxidase activity was detected in all types of granules, but positive site was different among the granule types: oβG-1, whole granule; oβG-2, surrounding; iβG, core.

Key words: granule, neutrophil, *Pagrus major*, red seabream, *Ceratothoa verrucosa*

緒　言

これまでに著者らは，マダイ*Pagrus major*の好中球に2種類の顆粒が存在することを報告した[1,2]。すなわち，顆粒全体が難染性の顆粒（chromophobic granule, βG）と，エオシン好性の芯とその周囲の難染性領域からなる顆粒が観察された（以後，芯を有する顆粒において，芯の周囲の領域を単に“周囲”と称する）。両顆粒は未感染および未刺激マダイに普通に観察されることから，通常型顆粒（ordinary granule, o）と呼び，前者を1型（oβG-1），後者を2型（oβG-2）とした[3]。両顆粒の難染性の領域は，細胞化学的特性が類似していることから（ともにズダン黒B（SBB）陽性かつペルオキシダーゼ（PO）陽性），oβG-2はoβG-1にエオシン好性成分が付加され，同成分が自発的に濃縮して芯となったものと推察した[2]。oβG-2の芯には酸性フォスファターゼ（AcP）やエステラーゼといった各種ライソゾーム酵素が検出されたが（β-グルクロニダーゼ（β-Glu）陽性の芯は極めて少なく，アルカリ性フォスファターゼ（AlP）は検出されない），SBBおよびPOは陰性であった[2]。また，PO染色したoβG-2では顕微鏡の焦点を移動させることで，芯の上方に褐色の斑（spot）が形成されることを報告した[2]。oβG-1とoβG-2はマダイのエドワジエラ症の原因細菌である非定型*Edwardsiella tarda*（＝*E. anguillarum*）に人為感染させた場合にも好中球に観察され，これら顆粒の細胞化学的特徴は未感染魚と同様であった[3]。しかし，感染魚の好中球には両顆粒のほかに，難染性の芯と難染色性の周囲からなる顆粒が誘導され（誘導型顆粒; inducible granule, i），難染性であることから誘導型難染性顆粒（inducible chromophobic granule, iβG）と呼ぶこととした[3]。この顆粒の芯にはAlPが検出されたが，oβG-2の芯に認められる各種ライソゾーム酵素やSBBおよびPOはいずれも陰性であった[3]。

タイノエ*Ceratothoa verrucosa*は甲殻亜門軟甲綱真軟甲亜綱フクロエビ上目等脚目に属し，マダイの口腔壁に寄生する。タイノエに寄生されたマダイの好中球を観察したところ，oβG-1とoβG-2のほかに非定型*E. tarda*感染時とは異な

水産大学校生物生産学科（Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University）
†　別刷り請求先（corresponding author）: kondom@fish-u.ac.jp
*本研究の一部は，平成27年度日本比較免疫学会第28回学術集会（2016年８月18日）において報告した（一般-A1: 近藤昌和，窪田太貴，前川幸平，安本信哉，高橋幸則: 好中球顆粒：マダイ好中球の通常型および誘導型顆粒（講演要旨，14））。

る誘導型顆粒が観察された。また，oβG-1とoβG-2の細胞化学的特徴も未寄生魚とは異なっていたのでここに報告する*。

材料および方法

口腔壁にタイノエが寄生しているマダイ（全長約6 cm）を下関市沿岸（響灘）で釣獲した。これを水産大学校の飼育施設に搬入し市販の配合飼料（マリン6号，林兼産業）を適宜給餌し，水温20℃で育成した。なお，育成期間中に疾病の発生は認められなかった。水温を1℃ずつ昇温し，25℃で1週間飼育したのち，キナルジンで麻酔後，尾柄部血管から採血した。採血時の体重は約150 gであった。血液塗抹標本の作製および各種細胞化学染色法は近藤・高橋[4]にしたがった。

結果および考察

タイノエに寄生されたマダイ（以後，寄生魚と称す）の好中球には，May-Grünwald・Giemsa（MGG）染色性の異なる3種類の顆粒が観察された（Fig. 1A）。それらのうち2種類は未寄生魚のoβG-1とoβG-2に類似していたが，他の1種類は難染性の芯とエオシン好性の周囲からなっていた。この顆粒は未寄生魚では認められないことから，タイノエの寄生によって出現した誘導型顆粒であると言える。また，芯が難染性であることから，難染性顆粒の一種と考え，誘導型難染性顆粒（iβG）に分類した。非定型*E. tarda*感染マダイの好中球においてもiβGが出現するが，寄生魚のiβGとはMGG染色性が異なり，芯もその周囲も難染性である[3]。これらの違いから，非定型*E. tarda*感染時のiβGを1型（iβG-1）とし，タイノエ寄生によるiβGを2型（iβG-2）とする。MGG染色標本において顕微鏡の焦点を移動させることで，iβG-2の芯の上方（対物レンズ側）に赤褐色を呈する円形の斑が形成された（斑が観察される焦点では芯は観察されない; Fig. 1B）。この斑の中心は芯の中心と一致し，斑は芯よりも僅かに小さかった。同様の斑は緒言で述べたように，未寄生魚のoβG-2のPO染色標本においても観察される[2]。

寄生魚の好中球では，oβG-1とoβG-2はともにSBB陰性であった（Table 1）。このことは，未寄生魚の両顆粒がSBB陽性（oβG-1では顆粒全体が，oβG-2では周囲が陽性）であることと異なる[2]。各種ライソゾーム酵素は未寄生魚と同様にいずれもoβG-2の芯に検出されたが，未寄生魚のoβG-2に多数認められるAcPは寄生魚では全く認められなかった。また，未寄生魚では極めて少数のoβG-2の芯に検出されるβ-Gluは，寄生魚では多数の芯に観察された（Fig. 1C; Table 1）。非定型*E. tarda*感染魚に検出されるAlPは[3]，寄生魚には認められなかった。

寄生魚の好中球では，いずれの種類の顆粒にもPOが検出されたが（Fig. 1D; Table 1），陽性部位は顆粒の種類間で異なっていた。寄生魚のoβG-1では未寄生魚と同様に顆粒全体がPO陽性であった。oβG-2にもPO活性は認められ，周辺部の陽性反応が中央部よりも強いものの，未寄生魚に認められるような明瞭なPO陰性の芯は観察されなかった。また，寄生魚のoβG-2のPO染色標本では，未寄生魚のそれに観察される斑が形成されなかった。iβG-2では芯にPO陽性反応が認められ，周囲は陰性であった。

PO染色した標本において，PO陽性部位を通過する光は，PO陽性反応の色に対応する波長を有し、それ以外の波長の光はPO陽性部位を通過しないであろう。芯がPO陰性で周囲がPO陽性である顆粒にPO染色を施すと，PO陽性の周囲を通過した光がPO陰性の芯に入射することになるが，芯においてその入射光が何ら変化を受けず芯を通過する場

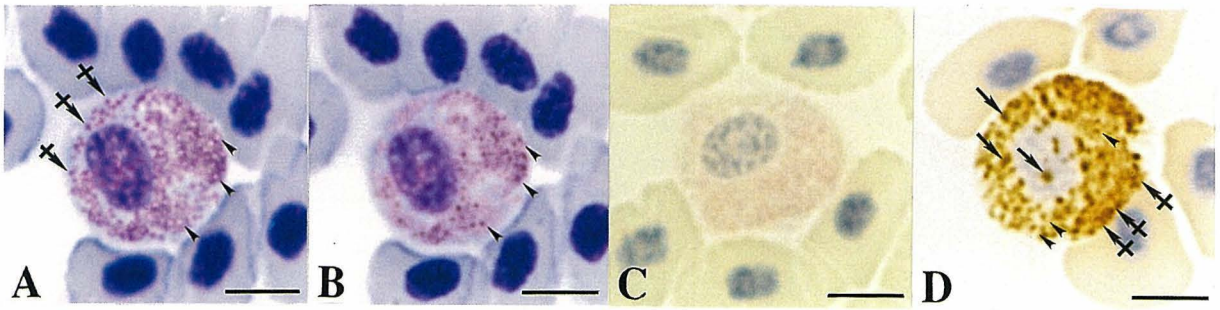

Fig. 1. Neutrophils from red seabream parasitized with *Ceratothoa verrucosa*. A, May-Grünwald・Giemsa (MGG; crossed arrows, oβG-2; arrowheads, iβG-2 with chromophobic core and eosinophilic surrounding); B, MGG (same cell in A with different focus; arrowheads, spots over the core of iβG-2); C, β-glucuronidase; D, peroxidase (arrows, oβG-1; crossed arrows, oβG-2; arrowheads, iβG-2 with positive core and negative surrounding). Bars=5 μm.

合を考える。このような顆粒ではPO陽性部位を通過して観察される色の濃淡は、その色の部位を通過した距離に比例するであろう。この顆粒の中心（芯の中心）を横切る水平断面に焦点を合わせた時に，顆粒がどのような像として認められるのかを考察すると以下のようになる：周囲の部分では顆粒の中心に向かって色は濃くなり，芯の部分では中心に向かって淡くなる。実際の観察では色の勾配は認知し難いかもしれないが，顆粒内のいずれの断面においても全く色が認識されないことは無いと考えられる。寄生魚のoβG-2のPO染色像はこの考察における像と合致する。したがって，寄生魚のoβG-2の芯はPO陰性であると解釈した。一方，未寄生魚のoβG-2では芯にPO陽性を示す色調は全く観察されない[2]。また，芯の上方に位置する周囲には，寄生魚ではPO陽性反応が認められたが，未寄生魚ではこの部位に陽性像は観察されなかった（このことは前報[2]では触れられておらず，本研究において改めて観察した結果である）。未寄生魚のoβG-2のPO染色像は，芯による何らかの光学現象の結果生じたと考えられる。これについては次報で議論したい。寄生魚と未寄生魚の間でoβG-2のPO染色像が異なる原因として，芯の構成成分が異なることが考えられる。寄生魚のoβG-2の芯にはβ-Gluが検出されるが，AcPは認められない。一方，未寄生魚では芯はAcP陽性であるが，β-Glu陽性の芯は極めて少数である。これらの酵素（あるいは他の成分）の有無が，芯の微細構造の違いとなって染色像に影響したのではないかと推察される。

寄生魚のiβG-2では難染色性の芯にPO陽性反応が認められた。寄生魚のoβG-1とoβG-2においてもPO陽性部位は難染性であり，これら3種類のPO陽性顆粒はいずれもSBB陰性であった。前報において，未寄生魚のoβG-2はoβG-1にエオシン好性成分が付加されたものではないかと推察したが[2]，寄生魚においても両顆粒の関係は同様と考えられた。また，iβG-2もoβG-1にエオシン好性成分が付加され，その成分が周囲に局在したと推察される。iβG-2とoβGはともにエオシン好性成分を有するが，その存在部位は異なる。また，oβG-2のエオシン好性の芯には各種ライソゾーム酵素が検出されるが（それら酵素がエオシン好性とは限らないが），iβG-2には芯およびエオシン好性の周囲のどちらにも認められない。これらの結果は，iβG-2とoβG-2のエオシン好性成分はそれぞれ異なることを示唆している。iβG-2とoβG-2の構造（芯とその周囲）と地球の地質学的構造（核とその周囲のマントル）の類似から，芯を構成する成分は周囲の成分よりも比重が高いとみなし，oβG-2の芯に局在するエオシン好性成分を高比重（high specific gravity），iβG-2の周囲の同成分を低比重（low specific gravity）として区別したい。

マダイと同様にタイ科に属するヨーロッパヘダイ*Sparus aurata*には2種類の顆粒球（好中球と好酸球）が同定されており，酸性色素にも塩基性色素にも明瞭な染色性を示さない好中性顆粒を有する好中球には2種類の，好酸性顆粒を有する好酸球には3種類の顆粒が観察されている[5]。ヨーロッパヘダイ好中球のPO陽性顆粒はAlP陽性，AcP陰性であり，芯構造は認められない。また，好中球には有芯顆粒

Table 1. Comparison of neutrophil granules (chromophobic granules, βG) from red seabream *Pagrus major*

Staining[*1, *2]	Origin of neutrophils, type of granules and reaction[*3]												
	Non-infected fish[*a]			Fish infected with:									
				Atypical *Edwardsiella tarda*[*b]					*Ceratothoa verrucosa*				
	oβG-1	oβG-2		oβG-1	oβG-2		iβG-1		oβG-1	oβG-2		iβG-2	
		Core	S		Core	S	Core	S		Core	S	Core	S
MGG	C	E	C	C	E	C	C	C	C	E	C	C[*4]	E
SBB	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−
AlP	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
AcP	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
β-Glu	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+↑	−	−	−
α-NAE	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−
α-NBE	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−
NASDCAE	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−
PO	+	−[*4]	+	+	−[*4]	+	−	−	+	−[*5, *6]	+	+	−

[*1]MGG, May-Grünwald·Giemsa; SBB, Sudan black B; AlP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; β-Glu, β-glucuronidase; α-NAE, α-naphtyl acetate esterase; α-NBE, α-naphtyl butyrate esterase; NASDCAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase.
[*2]All types of granules showed negative reaction to other tests (periodic acid Schiff reaction (PAS), PAS after digestion with α-amylase, alcian blue (pH1.0, pH2.5), toluidine blue in distilled, sudan III, oil red O).
[*3]oβG-1, ordinary βG type 1; oβG-2, ordinary βG type 2; iβG-1, inducible βG type 1; iβG-2, inducible βG type 2; S, surrounding of core; C, chromophobic; E, eosinophilic; +, positive; −, negative (non-detection); ↑, increase of positive site.
[*4]Spot was formed over the core.
[*5]Spot was not formed over the core.
[*6]Core was interpreted as negative according to the result of thought experiment.
[*a]Kondo et al.[2]
[*b]Kondo et al.[3]

も観察されているが，その顆粒はPO，AcPおよびAlPのいずれも陰性である[5]。一方，マダイの好中球では芯構造が認められず，明瞭な染色性を示さない顆粒（oβG-1）は，ヨーロッパヘダイと同様にPO陽性，AcP陰性であるが，ヨーロッパヘダイとは異なりAlP陰性である[2]。また，マダイ好中球の好酸性の芯を有する（芯の周囲は染色性を示さない）有芯顆粒（oβG-2）は，ヨーロッパヘダイと同様にAlP陰性であるが，ヨーロッパヘダイとは異なりPO陽性（周囲），AcP陽性（芯）である[2]。ヨーロッパヘダイの好酸球には芯構造を持たない1種類の顆粒と，2種類の有芯顆粒が観察され，前者はPO陽性，AcPとAlPは陰性であり，後者ではPO，AcPおよびAlPのいずれも陽性とされている[5]。また，好酸球の有芯顆粒は，芯にAcPおよびAlPが，周囲にPOが局在するタイプと，芯に3種類の酵素が，その周囲の外側（顆粒を包む膜の直下）にPOが存在するタイプに分けられており，後者は前者の発達段階に相当すると考えられている[5]。好酸球の芯を持たない顆粒における3種類の酵素の有無は，マダイ好中球のoβG-1のそれと類似する。また，好酸球の有芯顆粒の周囲にPOが，芯にAcPが局在する点はマダイ好中球のoβG-2と同じである。しかし，マダイoβG-2ではAlPは検出されない[2]。ヨーロッパヘダイの好酸球に，マダイ好中球のoβG-2と同様な，芯とその周囲の染色性が異なる顆粒が存在するか否かについては言及されておらず，マダイoβG-2のPO染色標本に認められる斑の形成が好酸球に起こるのかも不明である。

タイノエが寄生したマダイの好中球の機能が，未寄生魚のそれと異なるか否かは不明であるが，育成期間中に全く疾病が認められなかったこと，同様の飼育条件下で，未寄生魚には時にシオミズハクテンチュウ*Cryptocaryon irritans*の寄生による白点病が発生したことから，タイノエ寄生魚の生体防御能は未寄生魚と異なると考えられる。採血後1週間目にタイノエ寄生魚から，多数の仔虫が遊出した。今後，タイノエをマダイに人為寄生させたのちに各種病原体に感染させ，タイノエの寄生が抗病性に及ぼす影響を調べる予定である。

文　献

1）Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Two types of granules in neutrophils from red sea-bream *Pagrus major*. *J Nat Fish Univ*, **64**, 269-271 (2016)

2）Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Cytochemical characteristics of neutrophil granules from red seabream *Pagrus major*. *J Nat Fish Univ*, **65**, 141-145 (2017)

3）Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Inducible granules in neutrophils from red seabream *Pagrus major* infected with atypical *Edwardsiella tarda* (=*Edwardsiella anguillarum*). *J Nat Fish Univ*, **65**, 185-188 (2017)

4）近藤昌和，高橋幸則: ウナギ好中球の形態学的および細胞化学的特徴. 水大校研報, **58**, 1-13 (2009)

5）Meseguer J, López-Ruiz A, Esteban MA: Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry*, **102**, 37-44 (1994)