

# 体表白濁症に罹患し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; body surface cloudiness
	作成者: 近藤, 昌和, 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/2012124

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



## 体表白濁症に罹患したマダイの好中球顆粒

近藤昌和<sup>†</sup>,前川幸平,安本信哉,高橋幸則

### Neutrophil Granules of Red Seabream *Pagrus major* Infected with Body Surface Cloudiness

### Masakazu Kondo<sup>†</sup>, Kouhei Maekawa, Shinya Yasumoto and Yukinori Takahashi

Abstract : Two types of granules were observed in the neutrophils of red seabream *Pagrus major* infected with body surface cloudiness (BSC). Both granule types had similar morphologies but different cytochemical characteristics to those of ordinary chromophobic granules ( $\rho$ GC-1,  $\rho$ GC-2) from non-infected fish. In this paper, we called the two granule-types from the fish infected with BSC to extraordinary chromophobic granules (type 1,  $e\rho$ GC-1<sup>BSC</sup>; type 2,  $e\rho$ GC-2<sup>BSC</sup>). The  $e\rho$ GC-1<sup>BSC</sup> showed chromophobic, simple morphology (without stratified structure), peroxidase positive, SBB negative and lack of lysozomal enzymes. The  $e\rho$ GC-2<sup>BSC</sup> was stratified granule with two-layer structure (inner eosinophilic layer (L0) and outer chromophobic layer (L1)). Lysozomal enzymes (acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -Glu) and esterases) and peroxidase (PO) were localized in L0 and L1, respectively. Both types of extraordinary granules were Sudan black B negative. Spot formation, a curious phenomenon appeared in PO- stained  $\rho$ GC-2 (positive L1 and negative L0), was not observed in  $e\rho$ G-2<sup>BSC</sup>. Almost all L0 of  $e\rho$ G-2<sup>BSC</sup> were  $\beta$ -Glu positive. Contrastively, this enzyme activity was detected in a few L0 of  $\rho$ G-2.

Key words : granule, neutrophil, Pagrus major, red seabream, body surface cloudiness



著者らはこれまでに、マダイ*Pagrus major*の血液中の好 中 球 に2種 類 の 通 常 型 顆 粒 (ordinary chromophobic granule, o $\beta$ G; 1型, o $\beta$ G-1; 2型, o $\beta$ G-2) が存在し<sup>1,2</sup>, 感染症 に罹患したマダイではそれら顆粒の細胞化学的特徴が変化 することがあり(この場合の顆粒は異常型顆粒 extraordinary chromophobic granule (eo $\beta$ G) と呼ぶ), また, 感染症の種類によっては未感染魚の好中球には観察 されない誘導型顆粒 (inducible chromophobic granule,

マダイのエドワジエラ症の原因細菌である*Edwardsiella anguillarum*に感染したマダイの好中球には、未感染魚の2 種類の顆粒 (oβG-1とoβG-2) と同様な特徴を有する顆粒 (oβG-1<sup>Ea</sup>とoβG-2<sup>Ea</sup>) とともにアルカリ性フォスファターゼ

iBG)が出現することを報告した<sup>35)</sup>。

(AIP) 陽性の誘導型顆粒 (i $\beta$ G<sup>Ea</sup>) が観察される<sup>3</sup>。タイノ エ症の原因寄生虫であるタイノエ*Ceratothoa verrucosa*に感 染したマダイでは、o $\beta$ G-1とo $\beta$ G-2とは異なる細胞化学的特 徴を有する2種類の異常型顆粒 (eo $\beta$ G-1<sup>Cv</sup>とeo $\beta$ G-2<sup>Cv</sup>) およ びAIP陰性でペルオキシダーゼ (PO) 陽性の誘導型顆粒 (i $\beta$ G<sup>Cv</sup>) が認められる<sup>4)</sup>。アミルウージニウム症の原因寄 生虫であるデンプンベンモウチュウ*Amyloodinium ocellatum* の寄生では、マダイ好中球に2種類の顆粒 (eo $\beta$ G-2<sup>Ce</sup>と i $\beta$ G<sup>4o</sup>)が観察される<sup>5)</sup>。eo $\beta$ G-2<sup>4o</sup>to $\beta$ G-2と類似した構造(顆 粒の中心を取り囲むエオシン好性の層 (L0) とその周辺 の難染色性層 (L1) からなる) を有するが、o $\beta$ G-2では陽 性の酸性フォスファターゼ (AcP) が eo $\beta$ G-2<sup>ce</sup>では陰性で あり、o $\beta$ G-2では陽性所見が認められないオイルレッドO およびズダンIII染色によってL1が染色される。また、 i $\beta$ G<sup>4o</sup>ti $\beta$ G<sup>Ea</sup>と同様に難染色性の2層構造 (L0とL1) を有す

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 るが, AIPは検出されず,  $i\beta G^{Ea}$ では陰性のズダン黒B(SBB), オイルレッドOおよびズダンIII染色によってLOが染色され る。 白 点 病 の 原 因 寄 生 虫 シオ ミズ ハク テンチュウ *Cryptocaryon irritans*の 寄 生 で は, 2種 類 の 異 常 型 顆 粒 (eoβG-1<sup>Ci</sup> と eoβG-2<sup>Ci</sup>) が認められ, oβG-1 とoβG-2では陽性 のSBBが陰性である

体表白濁症は海水中のなんらかの刺激物質が原因と考え られている<sup>6)</sup>。本研究では非感染性疾病の一つである体表 白濁症に罹患したマダイの好中球について報告する\*。

#### 材料および方法

2016年11月に、水産大学校の大型屋外水槽(水量約10 kL)で飼育していた体重約 200 gマダイ(収容尾数:約 200尾)において摂餌量が低下し、ほとんど全ての個体に おいて体表全体に白濁が生じた。飼育水には濾過や殺菌を 行っていない天然海水を掛け流し条件で用いており、発生 時の水温は約17℃であった。病魚の皮膚の病理組織像から、 これらのマダイは体表白濁症に罹患したと判断された。本 症を呈するマダイ3尾を実験に供した。各供試魚をキナル ジンで麻酔し、尾柄部血管から採血した。血液塗抹標本の 作製および各種細胞化学染色法は前報<sup>240</sup>と同様に行った。 体表白濁症が発生した水槽のマダイを発生翌日に別の水槽 へ移動したところ、1週間後に摂餌量が回復し、10日後に は体表の白濁症状は認められなくなった。この間に死亡は 無かった。

#### 結果および考察

体表白濁症に罹患したマダイ(以後,罹患魚と称す)の 血液中には多数の好中球が観察された。May-Grünwald·Giemsa (MGG)染色では2種類の顆粒,すなわ ち難染色性の顆粒と,エオシン好性のL0とその周囲のL1 からなる顆粒が認められ,未感染魚の好中球に類似してい た(Figs. 1A, 2)。各種細胞化学染色を行ったところ,罹 患魚の好中球はAIP陽性であったが,陽性部位は細胞質基 質であり,陽性顆粒は認められなかった(Fig. 1B)。難染 色性顆粒には成層構造は観察されず,顆粒全体がPO陽性 であり(Fig. 1D),各種リソゾーム酵素は認められなかっ た。また,SBB陰性であり,オイルレッドOおよびズダン III染色にも陽性反応を示さなかった。一方、エオシン好 性のLOを有する顆粒には、AcP、β-グルクロニダーゼ (β-Glu), α-ナフチルアセテートエステラーゼ, α-ナフチル ブチレートエステラーゼおよびナフトールAS-Dクロロア セテートエステラーゼがL0に局在し、β-Glu陽性のL0が多 数観察された (Fig. 1C)。本顆粒の難染色性領域であるL1 はPO陽性であったが (Fig. 1D), oβG-2 (PO陰性のL0と陽 性のL1からなる)に認められる斑形成(spot formation)は 見られなかった (Table 1)。また,SBB,オイルレッドO およびズダンIII染色のいずれにも陰性であった。罹患魚 好中球の2種類の顆粒は、未感染魚のoβG-1およびoβG-2と MGG染色性ならびに構造が類似するが、細胞化学的特徴 が異なることから、異常型顆粒であると言える。罹患魚の 2種類の異常型顆粒をeoβG-1<sup>BSC</sup>およびeoβG-2<sup>BSC</sup>と表記す る。eoβG-1<sup>BSC</sup>の細胞化学的特徴はタイノエに寄生された マダイの好中球の1型異常型顆粒(eoβG-1<sup>cv</sup>)およびシオ ミズハクテンチュウ寄生マダイにおける1型異常型顆粒  $(eo\beta G-1^{Ci})$ と同じであった (Table 1)。一方,  $eo\beta G-2^{BSC}$ と同様にエオシン好性のL0と難染色性のL1からなる異常 型顆粒は、タイノエ (eoβG-2<sup>Cv</sup>)、デンプンベンモウチュ ウ(eoβG-2<sup>4</sup>の)およびシオミズハクテンチュウ(eoβG-2<sup>Ci</sup>) の寄生を受けたマダイの好中球で観察されている(Table 1)。 いずれの2型異常型顆粒においてもL0に各種エステラーゼ 活性が検出されているが、AcPはeoBG-2<sup>cv</sup>とeoBG-2<sup>4</sup>では 認められず, eoβG-2<sup>ci</sup>では少数のL0に検出されるのに対し て, eoβG-2<sup>BSC</sup>では, 未感染魚のoβG-2と同様に多数のL0に 観察された。また、β-GluはoβG-2では少数のL0に陽性反応 が認めら、eoBG-2<sup>Ci</sup>では陰性であるが、eoBG-2<sup>BSC</sup>では eoβG-2<sup>Cv</sup>およびeoβG-2<sup>4</sup>と同様に多数のLOが陽性である (Table 1)。oβG-2および4種類のeoβG-2のいずれも、L0は PO陰性であり、L1にPOが検出されているが、oβG-2に見 られる斑形成は4種類のうちeoβG-2<sup>ci</sup>のみに観察される。前 述のように、斑形成が認められるoBG-2とeoβG-2<sup>Ci</sup>のL0には β-Gluがほとんど検出されず、斑形成が見られないeoβG-2<sup>cv</sup>、 eoβG-2<sup>4</sup>およびeoβG-2<sup>BSC</sup>ではL0がβ-Glu陽性である。斑の 形成には、L0内にさらに層が存在する必要が示唆されて いる<sup>7</sup>。L0にB-Gluが含まれることでL0内の構造が乱れ、斑 が形成されなくなるのかもしれない。oBG-2のL1はSBB陽 性であり、オイルレッドOおよびズダンIIIには陽性反応を 示さない。一方,4種類のeoβG-2のうちeoβG-2<sup>4</sup>の以外では

\*本研究の一部は,平成29年度日本魚病学会秋季大会(2017年9月12日)において報告した[318:近藤昌和,前川幸平,安本信哉,高橋幸則: 体表白濁症に罹患したマダイの好中球顆粒(プログラムおよび講演要旨,31)]。 SBB, オイルレッドOおよびズダンIIIのいずれにも染色されない。 $eo\beta G-2^{4o}$ ではL1がいずれの脂肪染色においても陽性であるが、SBB陽性像は $o\beta G-2o$ L1のそれと比べて淡い。したがって、 $eo\beta G-2^{4o}$ のL1におけるSBB陽性物質は $o\beta G-2$ 

のL1の陽性物質とは異なり, oβG-2のL1に存在するSBB陽 性物質はいずれの種類のeoβG-2においても含まれないと推 察される。



Fig. 1. Neutrophils from red seabream infected with body surface cloudiness. A, May-Grünwald · Giemsa; B, alkaline phosphatase; C, β-glucuronidase; D, peroxidase (arrows, eoβG-1<sup>BSC</sup>; arrowheads, eoβG-2<sup>BSC</sup>). Bars=1 μm.



Fig. 2. Schematic illustration of neutrophil granules from red seabream. A, non-infected fish; B-E, infected fish (B, *Edwardsiella anguillarum*; C, *Ceratothoa verrucosa*; D, *Amyloodinium ocellatum*; E, *Cryptocaryon irritans*; F, body surface cloudiness). Open area, chromophobic; closed area, eosinophilic; inner layer, L0; outer layer, L1. Abbreviations as in Table 1.

									Origin	of neut	rophils, t	type of gra	anules a	ind reaction	3								
Staining*1,*2				Fish infected with:																			
	Non-infected fish*a			Edwardsiella anguillarum* <sup>6</sup>				Ceratothoa verrucosa*°					Amyloodinium ocellatum <sup>*d</sup>				Cryptocaryon irritans <sup>*d</sup>			Body surface cloudiness <sup>•e</sup>			
	oG oG-2		oG	oG-2 <sup>Ea</sup>		iG <sup>Ea</sup>		eoG	eoG-2 <sup>cv</sup>		iC	iG <sup>Cv</sup>		eoG-2 <sup>40</sup>		iG^{^o}		eoG-2 <sup>ci</sup>		eoG	eoG-2 <sup>BSC</sup>		
	-1	LO	L1	-1 <sup>Ea</sup>	L0	L1	L0	L1	-1 <sup>Cv</sup>	L0	L1	L0	L1	L0	Ll	L0	L1	-1 <sup>Ci</sup>	L0	L1	-1 <sup>BSC</sup>	L0	L1
MGG	С	Е	С	С	Е	C .	С	С	c	Е	С	С	E	Е	С	С	С	С	Е	С	С	Е	С
		(SF:+)										:+)					1 ( 			1 1 1			
AlP	_		_	-	_	_	+	_		_	_			_	_			—	_	_		_	-
AcP	_	+		- 1	+	_		_	-	_				_	-	_	_	—	+1	_	-	+	_
β-Glu	—	+*4	_	-	+*4	—		—	-	$+\uparrow$		_	-	+↑				—		_		$+\uparrow$	
α-NAE	—	+	—	_	+	—		—	-	+		_	-	+		_		—	+	_		+	-
a-NBE	—	+	—		+	—		—		+				+		-		—	+	_		+	
CAE	—	+			+	—		_	i	+	—		_	+	_		_	. <u> </u>	+	-	¦	+	
PO	+		+	+	-	+		—	¦ +		+	+	-		+	+	—	+	—	+	+	—	+
		(SF:+)		(SF:+)					<u> </u>	(SF:-)				(SF:-)			(SF:+)			(SF:-)		:-)	
SBB	+		+	+	-	+		_		_		_	-	_	+	+		—		—		_	
	(SF:-)		(SF:-)					1					(SF:	-)									
OR, SIII	-		_	-	-	-		-		—		_	-		+	+	_	—	-	_		—	
									1					(SF:	-)			1			r 1		

Table 1. Comparison of neutrophil granules (chromophobic granule, G) from red seabream Pagrus major (modified from Kondo et al.<sup>6</sup>)

<sup>\*1</sup>MGG, May-Grünwald Giemsa; AlP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; β-Glu, β-glucuronidase; α-NAE, α-naphtyl acetate esterase; α-NBE, α-naphtyl butyrate esterase; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase; SBB, Sudan black B; OR, oil red O; SIII, sudan III.

\*2All 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).

\*<sup>3</sup>oG-1, ordinary type 1; oG-2, ordinary type 2; oG-1<sup>Ea</sup>, ordinary type 1 observed after infection (oai) with *Edwardsiella anguillarum* (oai*Ea*); oG-2<sup>Ea</sup>, ordinary type 2 oai*Ea*; iG<sup>Ea</sup>, inducible induced oai*Ea*; eoG-1<sup>Cv</sup>, extraordinary type 1 oai with *Ceratothoa verrucosa* (oai*Cv*); eoG-2<sup>Cv</sup>, extraordinary type 2 oai*Cv*; iG<sup>Cv</sup>, inducible oai*Cv*; eoG-2<sup>Ao</sup>, extraordinary type 2 oai with *Amyloodinium ocellatum* (oai*Ao*); iG<sup>Aa</sup>, inducible oai*Ao*; eoG-1<sup>Ci</sup>, extraordinary type 1 oai with *Cryptocaryon irritans* (oai*Ci*); eoG-2<sup>Ci</sup>, extraordinary type 2 oai*Ci*; eoG-1<sup>BSC</sup>, extraordinary type 1 oai with body surface cloudness (oaiBSC); eoG-2<sup>BSC</sup>, extraordinary type 2 oaiBSE; L0, layer 0; L1, layer 1; C, chromophobic; E, eosinophilic; +, positive; -, negative (non-detection); ↑, increase of positive site; ↓, decrease of positive site; SF, spot formation. \*4 A few of L0 were positive.

<sup>\*a-d</sup>: <sup>\*a</sup> Kondo et al.<sup>2)</sup>; <sup>\*b</sup>Kondo et al.<sup>3)</sup>; <sup>\*c</sup>Kondo et al.<sup>4)</sup>; <sup>\*d</sup>Kondo et al.<sup>6)</sup>; <sup>\*e</sup>present report.

#### 文 献

- 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)
- 近藤昌和, 窪田太貴, 前川幸平, 安本信哉, 高橋幸則: タイノエに寄生されたマダイの好中球顆粒. 水大校研 報, 65, 203-206 (2017) [Kondo M, Kubota T, Maekawa K, Yasumoto S, Takahashi Y: Neutrophil granules of red seabream *Pagrus major* parasitized with *Ceratothoa verrucosa. J Nat Fish Univ*, 65, 203-206 (2017) (in Japanese with English abstract)]
- 5)近藤昌和,前川幸平,窪田太貴,安本信哉,高橋幸則: 原生動物寄生虫(デンプンベンモウチュウ,シオミズ ハクテンチュウ)に寄生されたマダイの好中球顆粒. 水大校研報,66,183-187 (2018) [Kondo M, Maekawa K, Kubota T, Yasumoto S, Takahashi Y: Neutrophil granules of red seabream *Pagrus major* parasitized with protozoean parasits: *Amyloodinium ocellatum* (Kinetoplastea) and *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora). *J Nat Fish Univ*, 66, 183-187 (2018) (in Japanese with English abstract)]
- 6)藤巻由紀夫, 富澤 泰, 畑井喜司雄, 窪田三朗: 体表の白濁症状を呈するマダイの病理組織学的検索. 魚病研究, 23, 111-115 (1988) [Fujimaki Y, Tomizawa Y, Hatai K, Kubota SS: A histopathological examination of red sea bream with a symptom of cloudiness on the body surface. *Fish Pathol*, 23, 111-115 (1988) (in Japanese with English abstract)]
- 7)近藤昌和,安本信哉,高橋幸則:マダイ好中球の有芯 顆粒の構造:顆粒における観察光の散乱様現象に基づ く一考察.水大校研報,65,251-253 (2017) [Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Structure of neutrophil

pithy granules from red seabream *Pagrus major*: Possible explanations from light scattering-like phenomenon by the granules under the light microscopic observations. *J Nat Fish Univ*, **65**, 251-253 (2017) (in Japanese with English abstract)]