

皮膚背面に白濁症状を呈する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; dorsal skin cloudiness
	作成者: 近藤, 昌和, 渡邊, 里帆, 橘木, 啓人, 木村, 雄大,
	安本, 信哉
	メールアドレス:
	所属: 水産研究・教育機構, 水産研究・教育機構
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2012171
	This work is licensed under a Creative Commons

Attribution 4.0 International License.



皮膚背面に白濁症状を呈するマダイの好中球顆粒

近藤昌和[†], 渡邊里帆, 橘木啓人, 木村雄大, 安本信哉

Neutrophil Granules of Red Seabream *Pagrus major* with a Symptom of Cloudiness on the Dorsal Skin

Masakazu Kondo[†], Riho Watanabe, Keito Tachibanagi, Takehiro Kimura and Shinya Yasumoto

Abstract : Red seabream Pagrus major cultured in our laboratory showed a symptom of cloudiness on the dorsal skin around the base of dorsal fin in June 2020. In the whitish skin, epithelial cells were enlarged with no proliferation. Mucus cells were not observed in the epithelium. Numerous lymphocytes accumulated in the dermis under the epithelium. Photobacterium damselae damselae was isolated from the whitish skin surface, however, the symptom (whitish skin) was not reproduced by experimental infection (immersion method) of this bacterium. Here, we call this disease dorsal skin cloudiness (DSC). Two types of granules were observed in the neutrophils of red seabream infected with DSC. Both granule types had similar morphologies but different cytochemical characteristics to those of ordinary granules $(oG1^N, oG2^N)$ isolated from non-infected fish. In this paper, we called the two granule-types from the fish with the symptom of DSC as extraordinary chromophobic granules (type 1, eoG1^{DSC}; type 2, eoG2^{DSC}). The eoG1^{DSC} showed chromophobic, simple morphology (without stratified structure), peroxidase positive and lack of lysozomal enzymes. The eoG2^{DSC} was stratified granule with three-layer structure [inner eosinophilic layer (L0-0), middle chromophobic layer (L0-1) and outer chromophobic layer (L1)]. Lysozomal enzymes (acid phosphatase, β -glucuronidase and exterases) and peroxidase (PO) were localized in L0-0 and L1, respectively. Both types of extraordinary granules were Sudan black B negative. Spot formation, a characteristic phenomenon seen in PO-stained $oG2^{\mathbb{N}}$ (positive L1 and negative L0), was not observed in eoG2^{DSC}.

Key words : granule, neutrophil, Pagrus major, red seabream, dorsal skin cloudiness

緒 言

マダイPagrus majorの好中球には2種類の通常型顆粒 (ordinary granule, oG; 1型, oG1^N; 2型oG2^N)が存在し^{1.2}, 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る [この場合の顆粒を異常型顆粒 extraordinary granule (eoG) と呼ぶ]^{3.4})。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 granule, iG)が出現する³⁻⁵⁾。2020年6月 に, 水産大学校の屋外水槽で飼育していたマダイに皮膚背 面の白濁症状が観察され, 皮膚から病原細菌の一種である Photobacterium damselae damselaeが分離された⁶⁾。本報 告ではこの疾病を皮膚背面白濁症 (dorsal skin cloudiness, DSC)と称し、本症に罹患したマダイ(以後、DSC罹患魚 と称す)の好中球について報告する。

材料および方法

2020年6月上旬に,体重約 20 gマダイを飼育していた水 産大学校の大型屋外水槽(水量約10 kL)2基[水槽① (997尾収容)と水槽②(999尾収容)]に,背鰭基部の周 囲の皮膚が白濁する個体が少数出現した。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,DSC罹患魚の出現時の水温は21.0℃であった。水槽① では出現を確認した翌日(1日後)と2日後にそれぞれ1 尾,3日後に2尾死亡し,水槽②では2日後に1尾死亡した。

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 水槽①では出現3日後にはDSC罹患魚は約3割に達した。重 篤な個体では筋肉層が露出していた。また,水槽②では4 日後に約2割のマダイに症状が認められたが,重篤個体は 認められなかった。出現3日後にDSC罹患魚19尾を水槽① から別の水槽に移動後,18尾を研究室に持ち込んで細菌お よび寄生虫検査を行った(19尾中1尾は取り損ねたため, 後述の経過観察に使用した)。水槽①の残りのマダイ(974 尾)を全て取り上げて,塩酸オキシテトラサイクリン (OTC;水産用OTC散50%「KS」,共立製薬)による薬浴 を行った(有効OTC濃度50 ppm,1時間,水温約22℃)。 水槽②からDSC罹患魚出現4日後に,病理組織観察用とし て6尾,経過観察用として12尾を取り上げたのち,残りの マダイ(980尾)をOTCで薬浴した。薬浴後にそれぞれを 元の水槽に戻し(戻す前に水槽の底を掃除した),飼育を 継続した。

魚病診断

白濁した皮膚の表皮をスライドグラスで掻き取り顕微鏡 観察した。また,鰓の押しつぶし標本も観察した。表皮断 面および腎臓から菌分離を行った。また、下記の採血に用 いたDSC罹患魚3尾の表皮を体表粘液とともに白金耳で掻 き取り,菌分離に供した。培地にはブレインハートイン フュジョン寒天培地(栄研)および寒天を増量した海水サ イトファーガ寒天培地⁵⁾を用いた(培養温度25.0℃)。皮 膚断面からは少数の,掻き取った表皮は多数の均質なコロ ニーが両培地上に形成された。表皮から分離された細菌の 性状試験および同定を行った。

DSC罹患魚の経過観察と採血

水槽①から取り上げた1個体と水槽②からの12尾を,屋 外の1,000 L容円形ポリプロピレン製水槽(水量500 L)1 基に収容し(22.3℃),海水掛け流しで10日間経過観察し た。飼育期間中は市販の配合飼料(マリン3号,林兼産 業)を飽食量給餌した。収容5日後(22.1℃)に生残魚3尾 を取り上げて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¹⁻⁵⁾と同様に行った。

再現試験

DSCが発生する前に屋外水槽から屋内水槽(濾過槽と紫 外線殺菌灯を使用)に搬入し,25.0℃で育成していたマダ イ5尾(平均体重40.0 g;試験前に症状は認められていな い)を用いて、DSC罹患魚から分離した細菌による再現試 験を浸漬感染法によって試みた。なお、供試魚は試験前に
1週間22.0℃で馴致飼育した。感染後、7日間経過観察した (水温22.0℃)。飼育期間中は市販の配合飼料(マリン3 号、林兼産業)を飽食量給餌した。

結 果

DSC罹患魚(Fig. 1)の経過観察のために水槽に収容し た13尾は,採血ために3尾取り上げる前に3尾死亡し(収容 3,4および5日後にそれぞれ1尾;死亡率23%),取り上げ後 に1尾死亡した(収容7日後;水温22.5℃)。収容10日後(水 温22.0℃)の生残魚(6尾)には症状は認められなかっ た。また,死亡個体には筋肉の露出が見られたが,潰瘍は 形成されなかった。

DSC罹患魚の皮膚と鰓には寄生虫は観察されなかった。 白濁した皮膚の表皮を掻き取り顕微鏡観察したところ,運 動性を有する短桿菌が多数観察された。腎臓からは細菌は 分離されず,表皮を体表粘液とともに塗布した培地上には 円形乳白色の均一なコロニーが多数形成された。コロニー の大きさは25.0℃,24時間の培養で直径約1 mmであり, コロニーの周囲は円滑であった。またコロニーの表面に隆 起は認められなかった。均一なコロニーが得られたことか ら,本菌が原因菌と考えられた。本菌は運動性のあるグラ ム陰性の短桿菌(長径0.6-1.1 μm,短径0.6-0.8 μm)であ り,カタラーゼとオキシダーゼは陰性であった。API 20E (ビオメリュー・ジャパン)による性状試験の結果から Photobacterium damselaeであると推定された。さらに,



Fig. 1. Red seabream with a symptom of cloudiness (arrows) on the dorsal skin around the base of dorsal fin. Bar=5 cm

本菌をZappulliら (2005)⁷⁾ に準じてPCR-RFLP解析に供し たところ, *Photobacterium damselae damselae*に同定され た。

病理組織標本の予備的な観察の結果,皮膚の白濁部分で は表皮の上皮細胞が巨大化し(表皮の増生はない),表皮 に粘液細胞が認められず,白濁部分直下の真皮には多数の リンパ球を主体とする白血球が集積していた。表皮の外表 面には少数の細菌が認められた。

病魚から分離した*P. damselae damselae* (Pdd-I-2株) を用いて浸漬感染を行ったが(感染濃度1.0×10⁹ cfu/ml, 5尾/L,水温22.0℃,30分間)*,7日間の観察期間中に症状 は再現されず,死亡も認められなかった。

DSC罹患魚の血液中には好中球が多数観察された。好中 球にはMay-Grünwald-Giemsa (MGG) 染色性および各種 細胞化学染色性の異なる2種類の顆粒が観察された (Fig. 2; Table 1)。これらのうち1種類はMGG染色性が健常魚の oG-1^Nに類似していたが、細胞化学染色性が健常魚とは異 なる異常型顆粒であった (eoG1^{DSC})。また、健常魚のoG2^N と同様にエオシン好性の芯様構造を有する顆粒が観察され たが (Fig. 1A)、本顆粒のエオシン陽性部位はoG2^Nのそれ よりも小型であり、細胞化学染色性もoG2^Nとの間に違い が認められた (異常型顆粒、eoG2^{DSC})。eoG1^{DSC}は、oG1^N と同様にMGG染色によって難染色性を示し、成層構造を 示さなかった。また、ペルオキシダーゼ (PO) 陽性であ り (Fig. 2E). 各種リソゾーム酵素は検出されなかった。 しかし、oG1^Nとは異なり、SBB染色に対しては陰性で あった。eoG2^{DSC}はエオシン好性の内層、難染色性の中層 および難染色性の外層から構成されていた(Fig. 3)。 oG2^Nはエオシン好性のL0とその周囲の難染色性層(L1) から構成されているが、eoG2^{DSC}の内層はoG2^NのL0よりも 小型であった。eoG2^{DSC}の内層にはoG2^NのL0と同様に各種 リソゾーム酵素が検出され (Figs. 2B-2D), β-グルクロニ ダーゼ (Glu) 陽性の内層の数 は, oG2^NのGlu陽性L0より も多かった。POがeoG2^{DSC}の外層に検出された(Fig. 2E)。しかし, oG2^NのPO染色標本で観察される '斑' は eoG2^{DSC}には形成されなかった。これらのことから、 eoG2^{DSC}の外層はoG2^NのL1に, eoG2^{DSC}の内層と中層を合わ せた領域がoG2^NのL0に相当すると考えられる。以後、 eoG2^{DSC}の内層をL0-0, 中層をL0-1, 外層をL1と呼ぶこと とする。なお、oG2^NのL1が陽性を示すSBB染色には、 eoG2^{DSC}は陰性であった。eoG1^{DSC}とeoG2^{DSC}には核染色に 用いたヘマトキシリン染色(Mayerの処方)による陽性反 応像は観察されなかった。

水槽①からのマダイはOTCによる薬浴時に事故(酸



Fig. 2. Neutrophils from red seabream infected with dorsal skin cloudiness. A, May-Grünwald-Giemsa [Note eosinophilic particles (L0-0 of eoG2^{DSC})]; B, acid phosphatase; C, α-naphtyl acetate esterase; D, α-naphtyl butyrate esterase; E, peroxidase [poitive reaction was detected in eoG1^{DSC} (arrowheads) and L1 of eoG2^{DSC}]; F, scale bar (5 μm) which is adapted to all figures (A-E) in Fig. 1. Note small positive particles (L0-0 of eoG2^{DSC}) in B-D. Counter stain in B-E, hematoxylin (Mayer).

**Photobacterium damselae damselae*を寒天増量海水サイトファーガ寒天培地で25℃,24時間培養し,滅菌海水に懸濁した場合,600 nmにおける吸光度(光路長1 cm)が1の時,本菌の濃度は1.9×10⁹cfu/mlであった。

	Type of	f granules and							
Test ^{*1}		eoG	2 ^{DSC}	- Other positive site (shape,					
	eoG1200 =	L0	L1	- number and size)					
MGG	С	E+C	С						
AlP									
AcP	—	+*4	_	•					
Glu		+*4	_						
NAE	_	$+^{*4}$							
NBE	_	$+^{*4}$							
CAE		+*4	_						
Peroxidase	+	_	+						
(SF: -)									
PAS	<u> </u>	_ `	_	G (round or oval, a few) ^{*5} ; H					
PAS-aA	—	_	_						
AB (pH1.0)									
AB (pH2.5)			—						
TB	—		—	G (amorphous, a few, eq Yb); N					
SBB	—		—						
Oil red O	—	_	—						
Sudan III	—	<u> </u>	—						

Table 1. Summary of reactions of neutrophil from red seabream infected with dorsal skin cloudiness (DSC) to cytochemical tests

^{*1}AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; Glu, β -glucuronidase; NAE, α -naphtyl acetate esterase; NBE, α -naphtyl butyrate esterase; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS-aA, PAS after digestion with a-amylase; AB, alcian blue; TB, toluidine blue in distilled water;

SBB, Sudan black B. *²eoGl^{DSC}, extraordinary granule type 1 observed after infection with dorsal skin cloudiness (oaiDSC); eoG2^{DSC}, extraordinary granule type 2 oaiDSC [consist of eosinophilic inner layer (L0-0), chromophobic middle layer (L0-1) and chromophobic outer layer (L1);]; iG^{DSC}, inducible granule oaiDSC [consist of chromophobic inner layer (L0) and chromophobic outer layer (L1)]; +, positive; -, negative (non-detection); SF, spot formation.

³G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; Yb, Yasumoto body; eq, equivalent to.

*4Activity was limited in the small central area of L0 (L0-0).

^{*5}PAS-positive granule was accumulation of glycogen particles because the positive reaction of the granule disappeared after digestion with α -amylase.

欠)によって123尾が死亡した。薬浴後の両水槽における 収容尾数は水槽①で851尾、水槽②で980尾であった。水槽 ①では薬浴5日後(水温22.0℃)までに5尾死亡したが、そ の後の死亡はなく、症状も認められなくなった。一方、水 槽②では薬浴後に死亡はなく、症状も徐々に消失した。両 水槽のマダイには症状の再発はなく、現在(10月30日)、 体重200 g以上になっている。

考 察

これまでにマダイの皮膚が白濁する疾病として体表白濁 症 (body surface cloudiness, BSC) が報告されている⁸⁾。

BSCを発症したマダイでは、上皮細胞(=有棘細胞⁸⁾)の 著しい増殖と本細胞内外の浮腫による表皮層の肥厚および 表皮表層部に存在する多数の粘液細胞からの過剰な粘液に よって体表が白濁すると考えられている⁸⁾。また,BSCの 白濁は体表全体に生じる。一方、DSC罹患魚では上皮細胞 の増生はなく、上皮細胞の巨大化が観察された。また、白 濁した表皮には粘液細胞は認められず、皮膚の白濁は背鰭 基部周辺に限定されていた。これらのことから、DSCは BSCとは異なる疾病と言える。DSC罹患魚の表皮から海産 魚の皮膚潰瘍病の原因細菌であるP. damselae damselaeが 分離されたが⁶⁾, DSCの自然発症魚病にもP. damselae damselaeを浸漬したマダイにも皮膚に潰瘍は形成されな

かったことから, DSCは皮膚潰瘍病とも異なる。

DSC罹患魚における皮膚の白濁は巨大化した上皮細胞に よると考えられるが, P. damselae damselaeに浸漬したマ ダイに皮膚の白濁は再現されなかった。しかし,OTCに よる薬浴に効果が認められた。また,病理切片には表皮の 外表面に細菌は少数しか認められなかったが,掻き取った 表皮からは多数のP. damselae damselaeが分離された(P. damselae damselaeは表皮の最外層の外表面に付着する が,組織の固定中に容易に脱落すると考えられる)。これ らの結果から, P. damselae damselaeが皮膚表面 に付着しやすい状態になっており,本菌による何らかの刺 激によってDSCを発症すると考えられた。DSC罹患魚の表 皮に粘液細胞が観察されなかったことから,皮膚が白濁す る前に,粘液細胞が消失して粘液量が減少し,P. damselae damselaeが皮膚表面に付着したと推察される。

DSCにおける粘液細胞消失の原因は不明であるが,BSC の発生原因が環境水中の何らかの刺激物質と推察されてい ることから⁸⁾,DSCの粘液細胞消失の原因も環境水にある と思われる。本研究では以下の3点についても明らかにで きなかった:①DSC罹患魚の真皮におけるリンパ球を主と した白血球の集積が,P. damselae damselaeの表皮外表面 への付着によって起こるのか?②DSC罹患魚では最終的 に皮膚が消失して皮下の筋肉層が露出するが,これに真皮 中の白血球が関与しているのか?③DSC罹患魚の皮膚の 白濁部位が背鰭基部の周囲に限定される理由は何か?これ らの疑問点については今後の課題としたい。

本研究の結果,DSC罹患魚の好中球には2種類の異常型 顆粒 (eoG1^{DSC}, eoG2^{DSC}) が存在することが明らかとなっ た。BSCに罹患したマダイの好中球にも2種類の異常型顆 粒(eoG1^{BSC}, eoG2^{BSC})が観察されており³⁾, eoG1^{DSC} と eoG1^{BSC}の特徴は同じであるが(Table 2), eoG2^{DSC}のL0 がエオシン好性のL0-0と難染色性のL0-1から構成されてい るのに対して、eoG2^{BSC}はL0全体がエオシン好性である。 また,各種リソゾーム酵素の局在部位がeoG2^{DSC}ではL0-0 であるが、eoG2^{BSC}ではそれらの酵素はL0に検出される (Table 2)。さらに、BSC罹患魚の好中球では細胞質基質 がアルカリ性フォスファターゼ(AIP)陽性であるのに対 して³⁾, DSC罹患魚ではAIP陰性であった。DSC罹患魚の 好中球顆粒の特徴は滑走細菌 Tenacibaculum maritimum に感染したマダイの好中球顆粒に類似していた(Fig. 3)⁵⁾。 滑走細菌感染魚の好中球にも2種類の異常型顆粒 (eoG1Tm, eoG2Tm) が観察され, eoG1TmとeoG1^{DSC}は同じ 特徴を示し、eoG2TmとeoG2^{DSC}もα-ナフチルブチレートエ ステラーゼ活性の局在性を除いて類似していた(eoG2^{DSC} ではLO-0, eoG2TmではLO; Table 2)。滑走細菌感染魚の好 中球にもAIPは認められていない⁵⁾。滑走細菌は皮膚を含 む体表に感染することから、表皮の傷害によって好中球の eoG2にエオシン好性のL0-0と難染色性のL0-1が出現すると 考えられる。しかし、滑走細菌感染魚の好中球に観察され る誘導型顆粒(iGTm)は、DSC罹患魚には認められなかっ た(Table 2)。DSC罹患魚とは異なり、滑走細菌感染魚の 皮膚には発赤などの症状が観察される^{9.10)}。皮膚における 傷害の違いが誘導型顆粒の出現の有無と関連していると考 えられる。

DSC罹患魚の病理組織観察結果および罹患魚から分離された細菌のPCR-RFLP解析結果については別稿にて詳細に報告する予定である。



Fig. 3. Comparison of structure of type 2 neutrophil granules (G2) from red seabream. oG2^N, ordinary G2 from noninfected fish; eoG2, extraordinary G2 (eoG2^{DSC} and eoG2Tm, eoG2 in the neutrophils from the fish infected with dorsal surface cloudiness and gliding bacterium *Tenacibaculum maritimum*, respectively). □, chromophobic; ■, eosinophilic.

0	Origin of neutrophils, type of granules and reaction ^{*3}													
Staining*1,*	٦T			Fish infected with:										
	Non-infected fish "		DSC*b		BSC*c			Tenacibaculum maritimum*d						
	oG1N	oG2 ^N		and 1DSC .	eoG2 ^{DSC}		an C 1 BSC	eoG2 ^{BSC}		$a \sim C 1^{Tm}$	eoG2 Tm		iG Tm	
		LO	L1		L0	L1	6001	L0	L1		L0	L1	LO	L1
MGG	С	Е	С	C	E+C	С	C	Е	С	C	E+C	С	С	С
AlP		<u>·</u>	—		—	—	-		—	-	—		—	—
AcP	_	+	_	—	+*5	—	-	+		—	+*5	_	-	—
Glu	—	+*4	—	; —	+↑* ⁵	—	-	+1	—	-	$+\uparrow^{*5}$		—	—
NAE	—	+	—	-	+*5	—	-	+	_		+*5	—	—	_
NBE	—	+	—	-	+*5	—	—	+	—	-	+	—	—	
CAE	_	+		-	+*5	—	-	+	—	—	+*5	-	—	—
PO	· +	—	+	+	—	+	+	—	+	+	_	+	+	—
	(SF:+)		(SF:-)			(SF:-)			(SF:-)					
SBB	+	_	+	-		—	—	_		-		_	.—	—
		(SF	:-)	i 1										

Table 2. Comparison of neutrophil granules from red seabream infected with dorsal skin cloudiness (DSC), body surface cloudiness (BSC) and Tenacibaculum maritimum

*1MGG, May-Grünwald-Giemsa; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; Glu, β-glucuronidase; NAE, α-naphtyl acetate esterase; NBE, α-naphtyl butyrate esterase;

¹⁰GG, May-Gumwald Glemsa; AIP, alkaline phosphatase; ACP, acid phosphatase; Glu, β-glucuronidase; NAE, α -naphtyl acetate esterase; NBE, α -naphtyl butyrate esterase; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase; SBB, Sudan black B. ^{*2}All types of granules showed negative reaction to other tests (periodic acid Schiff reaction, alcian blue (pH1.0, pH2.5), toluidine blue in distilled, oil red O, Sudan III). ^{*3}oG1^N, ordinary granule type 1; oG2^N, ordinary granule type 2; eoG1^{DSC}, extraordinary granule type 1 observed after infection with dorsal skin cloudiness (aiDSC); oG2^{Ea}, ordinary granule type 2 observed aiDSC; eoG1^{ESC}, extraordinary granule type 1 observed after infection with body surface cloudiness (aiDSC); eoG2^{ESC}, extraordinary granule type 2 observed aiDSC; eoG1Tm, extraordinary granule type 1 observed after infection with *Tenacibaculum maritimum* (aiTm); eoG2Tm, extraordinary granule type 2 observed aiTm; iGTm, inducible granule induced aiTm; L0, layer zero; L1, layer 1; C, chromophobic; E, eosinophilic; +, positive; -, negative (non-detection); †, increase of positive site: SF, spot formation.

*⁴A few of L0 were positive.

^{*5}Activity was limited in the small central area of L0 (L0-0). ^{*a}Kondo et al. (2017)²; ^{*b}present report; ^{*c}Kondo et al. (2018)⁵; ^{*d} Kondo et al. (2021)⁴).

謝 辞

菌種の同定に協力していただいた水産大学校食品科学科 准教授 古下 学博士に感謝いたします。

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)
- 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.水大校研報,66,189-193 (2018) [Kondo M, Maekawa K, Yasumoto S, Takahashi Y: Neutrophil granules of red seabream *Pagrus major* infected with body surface cloudiness. *J Nat Fish Univ*, 66, 189-193 (2018) (in Japanese with English abstract)]
- 近藤昌和,安本信哉: タイノエに寄生されたマダイに おける新たな好中球型:第4種および第5種好中球.水 大校研報,68,71-77 (2020) [Kondo M, Yasumoto S: New neutrophil types in red seabream *Pagrus major* infested with *Ceratothoa verrucosa*: Fourth and fifth neutrophil types. *J Nat Fish Univ*, 68, 71-77 (2020) (in Japanese with English abstract)]
- 5)近藤昌和,渡邊里帆,橘木啓人,木村雄大,安本信哉:滑 走細菌*Tenacibaculum maritimum*に感染させたマダ イの好中球顆粒.水大校研報, 69,印刷中 [Kondo M, Watanabe R, Tachibanagi K, Kimura T, Yasumoto S: Neutrophil granules of red seabream *Pagrus major* infected with gliding bacterium *Tenacibaculum maritimum. J Nat Fish Univ*, 69, in press (in Japanese with English abstract)]
- 6) 室賀清邦: 魚類病原細菌. 小川和夫, 室賀清邦(編), 改

訂 · 魚病学概論. 恒星社厚生閣, 東京, 56-59 (2008) [Muroga K: Gyoruibyougensaikin (Fish pathogenic bacteria). In: Ogawa K, Muroga K (ed) Kaitei Gyobyougakugairon (Introduction to Fish Diseases, revised edition). Koseishakoseikaku, Tokyo, 56-59 (2008) (in Japanese)]

- 7) Zappulli V, Patarnello T, Patarnello P, Frassineti F, Franch R, Manfrin A, Castagnaro M, Bargelloni L: Direct identification of *Photobacterium damselae* subspecies *piscicida* by PCR-RFLP analysis. *Dis Aquat Org*, 65, 53-61 (2005)
- 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)]
- 9)高橋幸則:海産魚の細菌感染症と診断法. 青木 宙 (編),魚介類の微生物感染症の治療と予防. 恒星社厚 生閣,東京, 29-61 (2013) [Takahashi Y: Kaisangyo no saikinkansenshou no chiryou to yobou (Diagnosis and bacterial infection in marine fish). In: Aoki T (ed) Diagnosis, Treatment and Prevention of Pathogenic Microorganisms of Fish and Shellfish. Koseishakoseikaku, Tokyo, 1-29 (1974)(in Japanese)]
- 10) 若林久嗣: タイ類, ブリ, ヒラメの滑走細菌症. 江草周 三(編), 改訂増補 魚病学 [感染症・寄生虫病篇]. 恒星社厚生閣, 東京, 129-131 (1988) [Wakabayashi H: Tairui, buri, hirame no kassousaikinshou (Gliding bacterial disease in seabream, yellowtail and Japanese flounder). In: Egusa S (ed) Kaiteizouho Gyobyougaku [kansenshou・kiseichuubyou hen]

(Fish Disease (Infection and Parasitic disease), revised and expanded edition). Koseishakoseikaku, Tokyo, 129-131 (1988) (in Japanese)]