

原生動物寄生虫（デンブンベンモウチュウ、シオミズハクテンチュウ）に感染したマダイの好中球顆粒

近藤昌和[†], 前川幸平, 窪田太貴, 安本信哉, 高橋幸則

Neutrophil Granules of Red Seabream *Pagrus major* Infected with Protozoan Parasites: *Amyloodinium ocellatum* (Kinetoplastea) and *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora)

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

Abstract : Two types of granules observed in the neutrophils of red seabream *Pagrus major* infected with protozoan parasites: *Amyloodinium ocellatum* (*Ao*) and *Cryptocaryon irritans* (*Ci*). However, morphological and cytochemical characteristics of the granules were different in each parasite. The granules from the fish with parasitized *Ao* were classified in extraordinary chromophobic granule (eo β G-2^{Ao}) and inducible chromophobic granule (i β G^{Ao}). The former had similar morphology to that of ordinary chromophobic granule (o β G-2) from non-infected fish; eosinophilic granule core (layer around the center of granule, L0) and chromophobic surrounding area of L0 (layer around the L0, L1). However, eo β G-2^{Ao} showed lack of acid phosphatase, increase of β -glucuronidase-positive L0, non-formation of spot on peroxidase (PO) staining preparation, and positive reaction to oil red O (ORO) and Sudan III in L1. The i β G^{Ao} had two-layer structure (chromophobic L0 and L1) and the L0 was PO, Sudan black B (SBB), ORO and Sudan III positive. On the other hand, neutrophil granules from the fish with parasitized *Ci* were classified in type 1 and type 2 extraordinary chromophobic granule (eo β G-1^{Ci}, eo β G-2^{Ci}) with similar structure and cytochemical character to that of two types of ordinary chromophobic granule (o β G-1, o β G-2) from non-infected fish except for SBB: The eo β G-1^{Ci} and eo β G-2^{Ci} were SBB negative.

Key words : granule, neutrophil, *Pagrus major*; red seabream, *Amyloodinium ocellatum*, *Cryptocaryon irritans*

緒 言

著者らはこれまでに、マダイ *Pagrus major* の血液中の好中球に2種類の顆粒が存在することを報告した^{1,2)}。また、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とともに、未感染魚の好中球には観察されない顆粒が出現することを明らかにした^{3,4)}。すなわち、未感染魚では顆粒全体が一様に難染色性 (chromophobic, β) を示す顆粒と、エオシン好性の芯様構造とその周囲の難染色領域からなる成層構造を示す顆粒が観察された^{1,2)}。前報ま

でこれらの顆粒を、通常型 (ordinary, o) 顆粒と呼び、いずれも難染色性領域を有することから、前者を1型 (o β G-1)、後者を2型 (o β G-2) と命名した^{2,4)}。また、未感染魚には観察されず、感染症罹患時に出現する顆粒を誘導型顆粒 (inducible (i) granule) とした。マダイのエドワジエラ症の原因細菌である *Edwardsiella anguillarum* やタイノエ症の原因寄生虫であるタイノエ *Ceratomyxa verrucosa* に感染した場合の誘導型顆粒にはともに難染色性領域が存在することから^{3,4)}、これら感染症における誘導顆粒をi β Gと表記し、エドワジエラ症およびタイノエ症によって出現するi β Gを

それぞれ1型 (iβG-1) および2型 (iβG-2) とした⁴⁾。iβG-1とiβG-2はともに2層からなる成層構造を有するが, May-Grünwald-Giemsa (MGG) 染色性や細胞化学染色性が互いに異なる^{3,4)}。

本研究ではアミルウジニウム症の原因寄生虫であるデンブンベンモウチュウ *Amyloodinium ocellatum* および海産魚の白点病の原因寄生虫シオミズハクテンチュウ *Cryptocaryon irritans* のそれぞれに寄生されたマダイの好中球顆粒について報告する^{*1,*2)}。

材料および方法

水産大学の屋外水槽にて海水掛け流し条件で飼育していたカンパチ *Seriola dumerili* (全長約13 cm) にアミルウジニウム症が発生した (海水は濾過や殺菌を行っていない天然海水; 発生時の水温は約27°C)。このカンパチ (13尾) をバスケット (38×28×23 cm) 2つに入れ (6尾および7尾), 濾過槽, 紫外線殺菌筒および水槽用ヒーターを備えた屋内水槽 (水量800 L) で飼育していたマダイ (体重約 500 g) 5尾と同居させた (水温25±1°C)。カンパチは同居2日以内に全個体死亡し, 鰓に多数の虫体が観察された。同居3日後にマダイは配合飼料 (マリン6号, 林兼産業) を摂餌しなくなり, 4日後に3尾死亡し, 生残魚を実験に供した (死亡魚, 生残魚ともに鰓に多数の虫体が認められた)。屋内水槽 (水量800 L; 濾過槽と水槽用ヒーターを備え, 殺菌筒は設置していない。水温25±1°C) で飼育していたマダイ (30尾; 体重約 200 g) に白点病が発生した。死亡率が50%となった時点で生残魚を6尾取り上げ実験に供した (供試魚の鰓には多数の虫体が認められた)。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⁴⁾と同様に行った。なお, 本稿では成層顆粒の中心 (実体ではなく単に座標としての中心) 付近の領域を, layer 0 (L0) と名付け, L0を囲む層をlayer 1 (L1) と呼ぶこととする。したがって, 上述のoβG-2はエオシン好性のL0と難染色性のL1から構成されることとなる。同様に, iβG-1とiβG-2はそれぞれ難染色性のL0とL1および難染色性のL0とエオシン好性のL1から構成されると記述される。感染魚の好中球に観察され, 未感染魚のoβG-1およびoβG-2に相当すると考えられる顆粒

についてはこれまで未感染魚と同じ名称 (oβG-1, oβG-2) を用いてきたが^{3,4)}, 細胞化学的特徴が明らかに異なる場合には‘通常’ではなく‘異常 (extraordinary, eo)’⁵⁾とするとともに, 感染原の学名の略称 (*E. anguillarum* の場合には *Ea*, タイノエでは *Cv*) を顆粒名の右肩に添えることとする。このことは誘導型顆粒についても適用される。なお, oβG-2のペルオキシダーゼ染色像に関する考察から, oβG-2は3層構造 (L0が2層からなる) であることが推察されたが⁵⁾, 実体としては認められていないので本稿ではoβG-2はL0とL1の2層構造からなることとする。

結果および考察

デンブンベンモウチュウならびにシオミズハクテンチュウに寄生されたマダイの血液中には多数の好中球が観察された。いずれの原生動物寄生虫に感染したマダイにおいても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 (Fig. 1A, デンブンベンモウチュウ; Fig. 2)。しかし, 細胞化学染色を行ったところ, デンブンベンモウチュウにおける難染色性顆粒は2層構造を有していることが明らかとなった。未感染魚の好中球に2層構造を有する難染色性顆粒は観察されないことから^{1,2)}, デンブンベンモウチュウ感染により出現した難染色性顆粒は誘導型顆粒 (iβGAo) であると判断した。また, デンブンベンモウチュウ感染魚におけるエオシン好性のL0を有する成層顆粒には, 酸性フォスファターゼ (AcP) が検出されず, 中性脂肪染色であるオイルレッドOとズダンIIIに陽性であることから未感染魚のoβG-2とは異なる (Table 1)。したがって, 本顆粒はoβG-2の異常型と考えられることから, eoβG-2^{4o)}と称することとする。デンブンベンモウチュウに感染したマダイの好中球にはeoβG-2^{4o)}とiβG^{4o)}の2種類の顆粒が存在し, eoβG-2^{4o)}のL0にはoβG-2のL0にも普通に検出される各種エステラーゼ (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, ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ) が, oβG-2と同様に認められた (Table 1)。しかし, β-グルクロニダーゼ (β-Glu)は未感染魚では少数のoβG-2のL0にしか観察されないのに対して²⁾, eoβG-2^{4o)}では多数の顆粒のL0

^{*1)} *Amyloodinium ocellatum*と*Cryptocaryon irritans*の標準和名は横山, 長澤 (2014)⁶⁾にしたがった。

^{*2)} 本研究の一部は, 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)]。

に本酵素活性が検出された (Fig. 1B)。eoβG-2^{4o}にはアルカリ性フォスファターゼ (AIP) は検出されなかったが、ペルオキシダー (PO) 活性がL1に検出された (Fig. 1C)。oβG-2もL1がPO陽性であり、PO染色されたoβG-2のL0は無色透明で明瞭の陰性部位として観察され、焦点をL0からずらすことで、褐色の斑 (spot) が形成される¹²⁾。しかし、eoβG-2^{4o}のPO染色像ではL0はoβG-2の様な明瞭な陰性像を示さず、斑も形成されなかった (Table 1)。同様の現象はタイノエ寄生魚のeoβG-2^{Cv}においても認められる。eoβG-2^{Cv}とeoβG-2^{4o}はともにAcP陰性であり、β-Glu陽性であることから、これら酵素の有無がPO染色時の斑形成に関与しているのかもしれない。eoβG-2^{4o}はL1がズダン黒B (SBB) 陽性であり (Fig. 1D)、オイルレッドOとズダンIIIによっても染色された (Fig. 1E)。oβG-2もL1がSBB陽性であるが、オイルレッドOとズダンIIIには陰性である (Table 1)。

また、eoβG-2^{Cv}はこれらの脂肪染色のいずれに対しても陽性反応を示さない (Table 1)。

iβG^{4o}には各種リゾソーム酵素は認められなかったが、PO活性がL0に検出された (Fig. 1C)。また、L0は各種脂肪染色に陽性であった (Figs. 1D & 1E)。iβG^{4o}と同様に2層の難染色性領域からなるiβG^{Ea}ではAIPがL0に検出されているが、PO陰性であり、いずれの脂肪染色に対しても陰性である (Table 1)。

eoβG-2^{4o}のL1とiβG^{4o}のL0のSBB陽性像は、oβG-1およびoβG-2のSBB染色像に比べて淡く、eoβG-2^{4o}とiβG^{4o}のSBB陽性部位と、オイルレッドOおよびズダンIII陽性部位は一致すること、oβG-1およびoβG-2はオイルレッドOおよびズダンIII陰性であることから、eoβG-2^{4o}とiβG^{4o}のSBB陽性物質はoβG-1およびoβG-2のそれとは異なると思われる。

前報において、成層構造を持たないoβG-1と2層構造を有

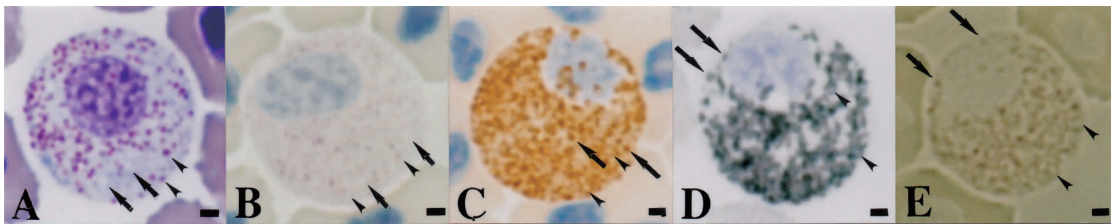


Fig. 1. Neutrophils from red seabream with parasitized *Amyloodinium ocellatum*. A, May-Grünwald-Giemsa; B, β-glucuronidase; C, peroxidase; D, Sudan black B; E, oil red O. Arrowheads, eoβG-2^{4o}; arrows, iβG^{4o}. Bars=1 μm.

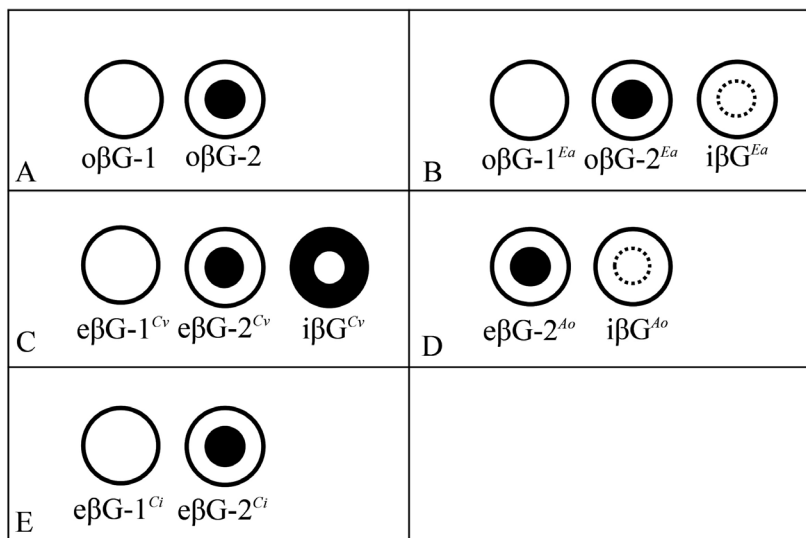


Fig. 2. Schematic illustration of neutrophil granules from red seabream. A, non-infected fish; B-E, infected fish (B, *Edwardsiella anguillarum*; C, *Ceratothoa verrucosa*; D, *Amyloodinium ocellatum*; E, *Cryptocaryon irritans*). Open area, chromophobic; closed area, eosinophilic; inner layer, L0; outer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

Table 1. Comparison of neutrophil granules from red seabream

| Staining ^{*1,*2} | Origin of neutrophils, type of granules and reaction ^{*3} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|--|---|-------|---|---------------------|---|---|---|---------------------|---|---------------------|----|---|----|---------------------|----|---------------------|----|--|----|---------------------|----|---------------------|----|----|---|
| | Non-infected fish ^a | | | | | | Fish infected with: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <i>Edwardsiella anguillarum</i> ^{*b} | | | | | | <i>Ceratomyxa verrucosa</i> ^{*c} | | | | | | <i>Amyloodinium ocellatum</i> ^{*d} | | | | | | <i>Cryptocaryon irritans</i> ^{*d} | | | | | | | |
| | oβG | | oβG-2 | | oβG-2 ^{Ea} | | oβG | | oβG-1 ^{Cv} | | oβG-2 ^{Cv} | | oβG-2 ^{Cv} | | oβG-2 ^{Lo} | | oβG-2 ^{Lo} | | oβG-2 ^{Lo} | | oβG-2 ^{Lo} | | oβG-2 ^{Ci} | | | |
| MGG | C | E | C | C | C | C | C | C | C | E | C | L0 | L1 | L0 | L1 | L0 | L1 | L0 | L1 | L0 | L1 | L0 | L1 | L0 | L1 | |
| AIP | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| AcP | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | ↓ |
| β-Glu | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-NAE | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-NBE | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| NASDCAE | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PO | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | (SF: +) | | | | | | (SF: -) | | | | | | (SF: -) | | | | | | (SF: +) | | | | | | | |
| SBB | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ORO, S-III | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

^{*1}MGG, May-Grünwald-Giemsa; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; β-Glu, β-glucuronidase; α-NAE, α-naphthyl acetate esterase; α-NBE, α-naphthyl butyrate esterase; NASDCAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase; SBB, Sudan black B; ORO, oil red O; S-III, sudan III.

^{*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).

^{*3}oβG-1, ordinary chromophobic granule type 1; oβG-2, ordinary chromophobic granule type 2; oβG-1^{Ea}, ordinary chromophobic granule type 1 observed after infection with *Edwardsiella anguillarum* (oaiEa); oβG-2^{Ea}, ordinary chromophobic granule type 2 oaiEa; iβG^{Ea}, inducible chromophobic granule oaiEa (formerly called inducible chromophobic granule type 1 (iβG-1)); oβG-1^{Cv}, extraordinary chromophobic granule type 1 observed after parasitization with *Ceratomyxa verrucosa* (oapCv); oβG-2^{Cv}, extraordinary chromophobic granule type 2 oapCv; iβG^{Cv}, inducible chromophobic granule oapCv (formerly called inducible chromophobic granule type 2 (iβG-2)); oβG-2^{Lo}, extraordinary chromophobic granule type 2 observed after parasitization with *Amyloodinium ocellatum* (oapLo); iβG^{Lo}, inducible chromophobic granule oapLo (formerly called inducible chromophobic granule type 2 (iβG-2)); oβG-1^{Ci}, extraordinary chromophobic granule type 1 observed after parasitization with *Cryptocaryon irritans* (oapCi); oβG-2^{Ci}, extraordinary chromophobic granule type 2 oapCi; L0, layer 0 (formally called granule core (GC)); L1, layer 1 (formally called mantle (surrounding part of GC)); 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.

^{*a-d}: ^aKondo et al., ^bKondo et al., ^cKondo et al., ^dpresent report.

する $\alpha\beta$ G-2はともにPOおよびSBB陽性であり ($\alpha\beta$ G-1全体と $\alpha\beta$ G-2のL1が陽性)、各種リソゾーム酵素は $\alpha\beta$ G-2のL0に存在することから、 $\alpha\beta$ G-2は $\alpha\beta$ G-1に各種リソゾーム酵素を含むエオシン好性成分が付加され (各種リソゾーム酵素がエオシン好性とはかぎらないが)、同成分が何らかの原因で中心部に集合してL0となったものと推察した²⁾。デンプンベンモウチュウ感染魚の好中球には $\alpha\beta$ G-1は観察されず、 $\alpha\beta$ G-1と同様な難染色性の単層構造からなる顆粒も認められなかった。しかし、 $\epsilon\alpha\beta$ G-2^{4a)}のL1と $i\beta$ G^{4a)}のL0はともにPOおよび各種脂肪染色に陽性であり、各種リソゾーム酵素は $\epsilon\alpha\beta$ G-2^{4a)}のL0に局在していた (Table 1)。このことからデンプンベンモウチュウ感染魚の好中球における顆粒形成過程を以下の様に推察した。まずPO陽性 (SBB陰性) で単層の難染色性顆粒が形成され、これらの一部では各種リソゾーム酵素を含むエオシン好性成分が付加されてエオシン好性のL0を有する顆粒となる。次いでオイルレッドOやズダンIII陽性 (SBB陽性) の脂肪成分がいずれの顆粒にも付加されて2種類の顆粒 [①顆粒全体がPOと脂肪染色陽性の単層難染色性顆粒と、②各種リソゾーム酵素を含むL0 (エオシン好性) とPOおよび脂肪染色陽性のL1 (難染色性) からなる顆粒 (= $\epsilon\alpha\beta$ G-2^{4a)})]となり、最後にPO陰性かつ脂肪染色陰性の難染色性成分が①に付加されるとともに、2層構造を形成して $i\beta$ G^{4a)}となると考えられる。

シオミズハクテンチュウ感染魚の好中球にも2種類の顆粒 (難染色性顆粒と、エオシン好性のL0と難染色性のL1を有する顆粒) が観察され、細胞化学染色特性は未感染魚の $\alpha\beta$ G-1および $\alpha\beta$ G-2に類似していた。しかし、いずれの顆粒においてもSBB陰性であったことから、2種類の顆粒は $\epsilon\alpha\beta$ G-1^{C)}および $\epsilon\alpha\beta$ G-2^{C)}と称することが妥当と考えられる。

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, 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 *Ceratomyxa verrucosa*. *J Nat Fish Univ*, **65**, 203-206 (2017) (in Japanese with English abstract)]
- 5) 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)]
- 6) 横山 博, 長澤和也: 養殖魚介類の寄生虫の標準和名目録. 生物圏科学, **53**, 73-97 (2014) [Yokoyama H, Nagasawa K: Synopsis of Japanese names of parasites from cultured fishes and shellfishes in Japan. *Biosphere Sci*, **53**, 73-97 (2014) (in Japanese with English abstract)]