

## 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 (oβG-1, oβG-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, eoβG-1<sup>BSC</sup>; type 2, eoβG-2<sup>BSC</sup>). The eoβG-1<sup>BSC</sup> showed chromophobic, simple morphology (without stratified structure), peroxidase positive, SBB negative and lack of lysosomal enzymes. The eoβG-2<sup>BSC</sup> was stratified granule with two-layer structure (inner eosinophilic layer (L0) and outer chromophobic layer (L1)). Lysosomal enzymes (acid phosphatase, β-glucuronidase (β-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 oβG-2 (positive L1 and negative L0), was not observed in eoβG-2<sup>BSC</sup>. Almost all L0 of eoβG-2<sup>BSC</sup> were β-Glu positive. Contrastively, this enzyme activity was detected in a few L0 of oβG-2.

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

## 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種類の通常型顆粒 (ordinary chromophobic granule, oβG; 1型, oβG-1; 2型, oβG-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 (eoβG) 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, iβG) が出現することを報告した<sup>3-5)</sup>。

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

(AIP) 陽性の誘導型顆粒 (iβG<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 *Ceratomyxa verrucosa* に感染したマダイでは、oβG-1とoβG-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 (eoβG-1<sup>Cv</sup>とeoβG-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 (iβG<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ブンベンモウチュウ *Amyloodinium ocellatum* の寄生では、マダイ好中球に2種類の顆粒 (eoβG-2<sup>Ao</sup>とiβG<sup>Ao</sup>) が観察される<sup>5)</sup>。eoβG-2<sup>Ao</sup>はoβG-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、oβG-2では陽性の酸性フォスファターゼ (AcP) が eoβG-2<sup>Ao</sup>では陰性であり、oβG-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、iβG<sup>Ao</sup>はiβG<sup>Ea</sup>と同様に難染色性の2層構造 (L0とL1) を有す

るが, AIPは検出されず,  $\text{i}\beta\text{G}^{\text{Ea}}$ 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L0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 ( $\text{eo}\beta\text{G}-1^{\text{Ci}}$ と $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ ) が認められ,  $\text{o}\beta\text{G}-1$ と $\text{o}\beta\text{G}-2$ 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患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°C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>26)</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L0を有する顆粒には, AcP,  $\beta$ -グルクロニダーゼ( $\beta$ -Glu),  $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ,  $\alpha$ -ナフチルプ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,  $\beta$ -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),  $\text{o}\beta\text{G}-2$ (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 $\text{o}\beta\text{G}-1$ および $\text{o}\beta\text{G}-2$ 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 $\text{eo}\beta\text{G}-1^{\text{BSC}}$ および $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{BSC}}$ と表記する。 $\text{eo}\beta\text{G}-1^{\text{BSC}}$ 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( $\text{eo}\beta\text{G}-1^{\text{Ci}}$ )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( $\text{eo}\beta\text{G}-1^{\text{Ci}}$ )と同じであった(Table 1)。一方,  $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{BSC}}$ 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( $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ ), デンプンベンモウチュウ( $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ao}}$ )およびシオミズハクテンチュウ( $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ )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 $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ と $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ao}}$ では認められず,  $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ では少数のL0に検出されるのに対して,  $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{BSC}}$ では, 未感染魚の $\text{o}\beta\text{G}-2$ と同様に多数のL0に観察された。また,  $\beta$ -Gluは $\text{o}\beta\text{G}-2$ では少数のL0に陽性反応が認められ,  $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ では陰性であるが,  $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{BSC}}$ では $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ および $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ao}}$ と同様に多数のL0が陽性である(Table 1)。 $\text{o}\beta\text{G}-2$ および4種類の $\text{eo}\beta\text{G}-2$ 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,  $\text{o}\beta\text{G}-2$ に見られる斑形成は4種類のうち $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ のみに観察される。前述のように, 斑形成が認められる $\text{o}\beta\text{G}-2$ と $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ のL0には $\beta$ -Gluがほとんど検出されず, 斑形成が見られない $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ci}}$ ,  $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ao}}$ および $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{BSC}}$ ではL0が $\beta$ -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あると示唆されている<sup>7)</sup>。L0に $\beta$ -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。 $\text{o}\beta\text{G}-2$ 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 $\text{eo}\beta\text{G}-2$ のうち $\text{eo}\beta\text{G}-2^{\text{Ao}}$ 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。eoβG-2<sup>4o</sup>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oβG-2のL1のそれと比べて淡い。したがって, eoβG-2<sup>4o</sup>のL1におけるSBB陽性物質はoβG-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 eoβG-2においても含まれないと推察される。

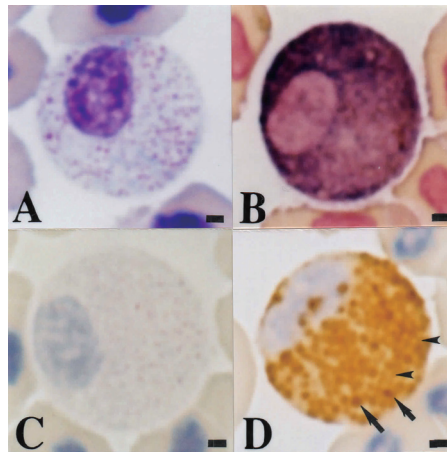


Fig. 1. Neutrophils from red seabream infected with body surface cloudiness. A, May-Grünwald-Giemsa; B, alkaline phosphatase; C, β-glucuronidase; D, peroxidase (arrows, eoβG-1<sup>BSC</sup>; arrowheads, eoβG-2<sup>BSC</sup>). Bars=1 μm.

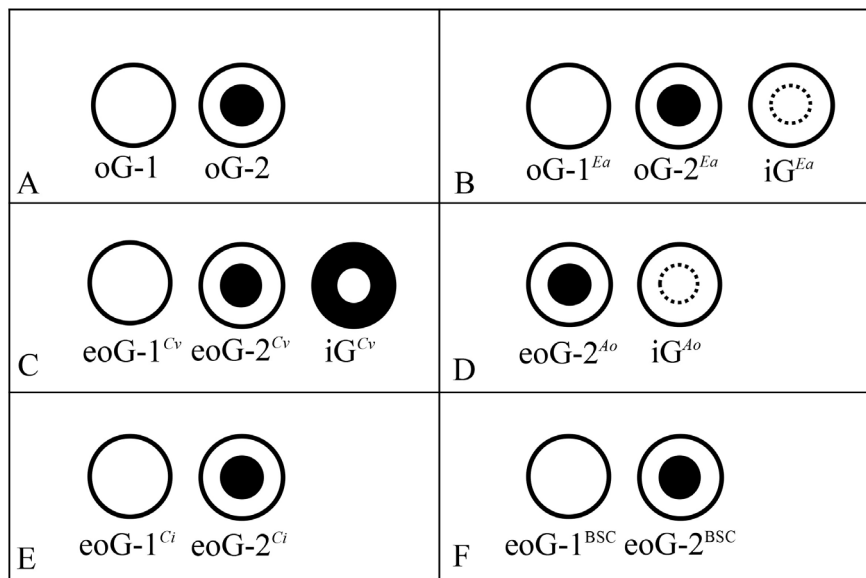


Fig. 2. Schematic illustration of neutrophil granules from red seabream. A, non-infected fish; B-E, infected fish (B, *Edwardsiella anguillarum*; C, *Ceratothoa verrucosa*; D, *Amyloodinium ocellatum*; E, *Cryptocaryon irritans*; F, body surface cloudiness). Open area, chromophobic; closed area, eosinophilic;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

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

Staining <sup>1,2,3</sup>	Origin of neutrophils, type of granules and reaction <sup>3</sup>																												
	Non-infected fish <sup>4</sup>			Fish infected with:																									
				<i>Edwardsiella anguillarum</i> <sup>5b</sup>				<i>Ceratomyxa verrucosa</i> <sup>5c</sup>				<i>Amyloodinium ocellatum</i> <sup>5d</sup>				<i>Cryptocaryon irritans</i> <sup>5d</sup>				Body surface cloudiness <sup>5e</sup>									
	oG	oG-2		oG	oG-2 <sup>5a</sup>	oG	iG <sup>5a</sup>	eoG	eoG-2 <sup>5c</sup>	iG <sup>5c</sup>	eoG-2 <sup>5d</sup>	eoG	eoG-2 <sup>5d</sup>	eoG	eoG-2 <sup>5e</sup>	eoG	eoG-2 <sup>5e</sup>	eoG	eoG-2 <sup>5e</sup>	eoG	eoG-2 <sup>5e</sup>	eoG	eoG-2 <sup>5e</sup>	eoG	eoG-2 <sup>5e</sup>				
	-1	L0	L1	-1 <sup>5a</sup>	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	-1 <sup>5c</sup>	L0	L1	-1 <sup>5e</sup>	L0	L1	-1 <sup>5e</sup>	L0	L1		
MGG	C	E	C	C	E	C	C	C	E	C	E	C	C	E	C	C	C	C	C	E	C	C	E	C	C	E	C		
AIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AcP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Glu	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -NAE	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -NBE	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAE	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PO	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SBB	+	-	+	(SF: +)	(SF: +)	(SF: +)	(SF: +)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)
OR, SIII	-	-	-	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)	(SF: -)

<sup>1</sup>MGG, May-Grünwald-Giemsa; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase;  $\beta$ -Glu,  $\beta$ -glucuronidase;  $\alpha$ -NAE,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase;  $\alpha$ -NBE,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase; SBB, Sudan black B; OR, oil red O; SIII, sudan III.  
<sup>2</sup>All types of granules showed negative reaction to other tests (periodic acid Schiff reaction (PAS), PAS after digestion with  $\alpha$ -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>5a</sup>, ordinary type 1 observed after infection (oai); *Edwardsiella anguillarum* (oaiEa); oG-2<sup>5a</sup>, ordinary type 2 oaiEa; iG<sup>5a</sup>, inducible oaiEa; eoG-1<sup>5c</sup>, extraordinary type 1 oai with *Ceratomyxa verrucosa* (oaiCv); eoG-2<sup>5c</sup>, extraordinary type 2 oaiCv; iG<sup>5c</sup>, inducible oaiCv; eoG-2<sup>5d</sup>, extraordinary type 2 oai with *Amyloodinium ocellatum* (oaiAo); iG<sup>5d</sup>, inducible oaiAo; eoG-1<sup>5e</sup>, extraordinary type 1 oai with *Cryptocaryon irritans* (oaiCi); eoG-2<sup>5e</sup>, extraordinary type 2 oaiCi; eoG-1<sup>BSC</sup>, extraordinary type 1 oai with body surface cloudiness (oaiBSC); eoG-2<sup>BSC</sup>, extraordinary type 2 oaiBSC; L0, layer 0; L1, layer 1; C, chromophobic; E, eosinophilic; +, positive; -, negative (non-detection);  $\uparrow$ , increase of positive site;  $\downarrow$ , decrease of positive site; SF, spot formation.  
<sup>4</sup>A few of L0 were positive.  
<sup>5a-d, e</sup>Kondo et al.<sup>2), 3), 4), 5)</sup>; Kondo et al.<sup>6)</sup>; <sup>6)</sup>Kondo et al.<sup>6)</sup>; present report.

## 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, 前川幸平, 窪田太貴, 安本信哉, 高橋幸則: 原生動物寄生虫 (デンブンベンモウチュウ, 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 protozoan parasites: *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)]