

## タイノエに寄生されたマダイの頭腎と脾臓に観察される 顆粒球について

近藤昌和<sup>†</sup>, 安本信哉, 高橋幸則

### On the Granulocytes Observed in Head Kidney and Spleen of Red Seabream *Pagrus major* with Parasitized *Ceratothoa verrucosa*

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

**Abstract** : Neutrophils observed in the blood of red seabream *Pagrus major* with parasitized *Ceratothoa verrucosa* were characterized by the inducible chromophobic granules ( $i\beta G^{Cr}$ ) with two-layer structure (inner chromophobic layer (L0) and outer eosinophilic layer(L1)). A curious phenomenon, spot formation, was observed in/above the May-Grünwald-Giemsa-stained  $i\beta G^{Cr}$ . Dark brown and round spot was overlapped in L0 of  $i\beta G^{Cr}$ . Neutrophil was only granulocyte type and almost all neutrophils had the  $i\beta G^{Cr}$  in the head kidney (HK; hematopoietic tissue) of infected fish. On the other hand, two types of granulocytes, a few  $i\beta G^{Cr}$ -containing neutrophils and some large granulocytes, were observed in the spleen of infected fish. The latter was large-sized round or ovoid cell with eccentric nucleus and chromophobic large round granules. In the non-infected fish, neutrophils in blood, HK and spleen lacked  $i\beta G^{Cr}$ , and large granulocytes were not found in the spleen.

**Key words** : granulocyte, kidney, spleen, *Pagrus major*, red seabream, *Ceratothoa verrucosa*

前報において、タイノエ症の原因寄生虫であるタイノエ *Ceratothoa verrucosa* (甲殻亜門軟甲綱真軟甲亜綱フクロエビ上目等脚目ウオノエ科) に寄生されたマダイでは、血液中に未寄生魚とは異なる特徴を有する好中球が観察されることを報告した<sup>1)</sup>。未寄生魚の好中球には2種類の通常型難染色性顆粒 (ordinary chromophobic granule,  $o\beta G$ ; 1型,  $o\beta G-1$ ; 2型,  $o\beta G-2$ ) が存在し、 $o\beta G-1$ は成層構造を持たず顆粒全体がペルオキシダーゼ (PO) およびズダン黒B (SBB) 陽性を示す<sup>2)</sup>。また、 $o\beta G-2$ は顆粒の中心を囲むエオシン好性の層 (L0) とその周囲の難染色性層 (L1) からなる2層構造を示し、L0には各種リゾーム酵素が局在し、L1はPOおよびSBB陽性を示す<sup>2)</sup>。一方、タイノエに寄生されたマダイでは、 $o\beta G-1$ および $o\beta G-2$ と構造は類似するものの細胞化学的特徴が異なる異常型顆粒 (extraordinary chromophobic granule,  $eo\beta G$ ; 1型,  $eo\beta G-1^{Cr}$ ; 2型,  $eo\beta G-2^{Cr}$ ) とともに、未寄生魚では認められない構造を示す誘導型顆

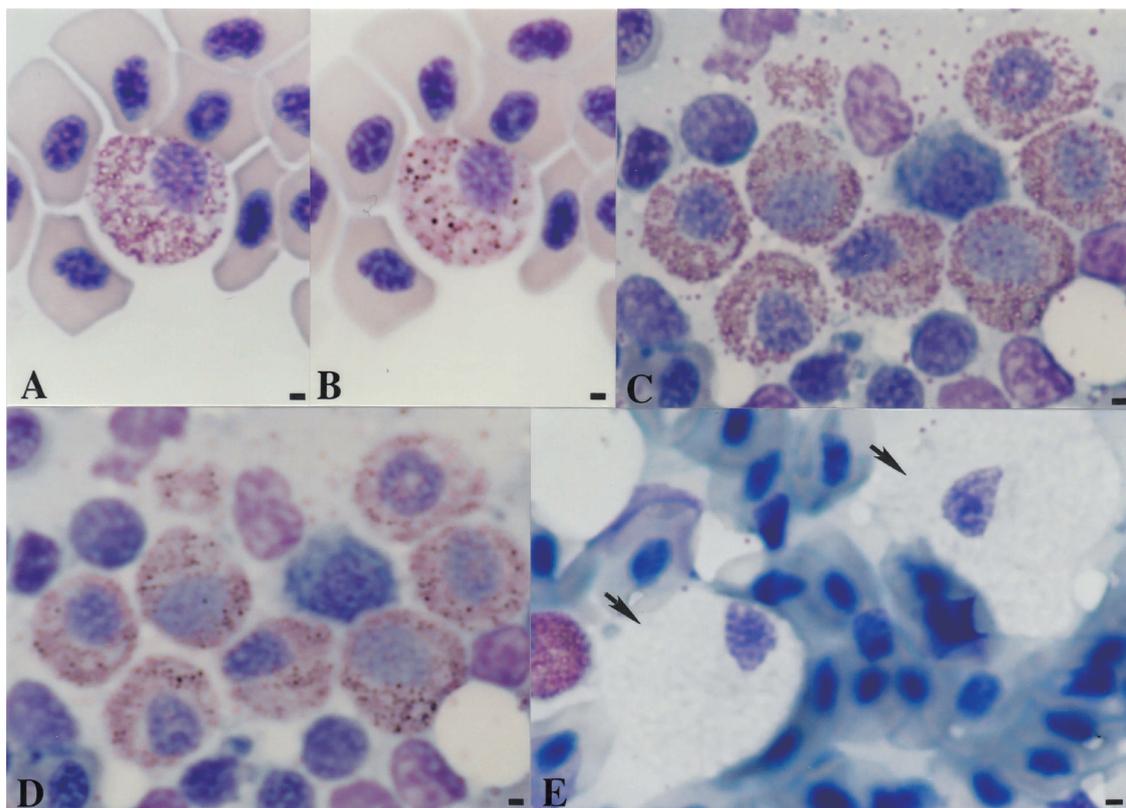
粒 (inducible chromophobic granule,  $i\beta G$ ) が出現する<sup>1)</sup>。この誘導型顆粒 (以後、 $i\beta G^{Cr}$ と表記する) は、難染色性でPO陽性のL0層と、エオシン好性かつPO陰性のL1層からなり、May-Grünwald-Giemsa (MGG) 染色標本では、顕微鏡の焦点を移動させることで、L0の上方に褐色の斑 (spot) が観察できる<sup>1)</sup>。同様の現象はPO染色した $o\beta G-2$ にも認められ、斑形成には $o\beta G-2$ のL0が2層構造を有する必要性が指摘されている<sup>3)</sup>。 $i\beta G^{Cr}$ における斑の形成原因は不明であるが、斑の形成過程に見られる種々の特徴は、PO染色した $o\beta G-2$ の斑に類似していることから、 $i\beta G^{Cr}$ のL0も2層構造を有するのかもしれない。斑形成をとまなう $i\beta G^{Cr}$ はタイノエ寄生魚の好中球に特徴的であることから、本顆粒の存在は同好中球の指標となると考えられる。

$i\beta G^{Cr}$ を有す好中球はこれまで血液でのみ調べられてきたが<sup>1)</sup>、この好中球の産生部位は不明である。この好中球が通常の好中球と同様に造血組織 (頭腎) で産生されてい

るのか,あるいは,タイノエの寄生による何らかの刺激によって,免疫臓器である脾臓で産生されるのかを明らかにするために,頭腎と脾臓のスタンプ標本にMGG染色を施して観察した<sup>\*1</sup>。

本研究の採材は2017年6月に行った。実験魚には2015年7月および2016年7月に下関市沿岸(響灘)で釣獲された,タイノエが寄生しているマダイ(全長約6 cm)を水産大学の飼育施設で育成して用いた。2015年7月に釣獲された寄生魚7尾(2個体寄生1尾と1個体寄生6尾)は,濾過槽を備えた500L容水槽(水量400 L)1基に収容して飼育し,前報<sup>1)</sup>でも用いた。前報<sup>1)</sup>のための採血(2016年9月)後,さらに同水槽で飼育した。この7尾における寄生個体数は2016年9月の採血時まで変化しなかったが<sup>\*2</sup>,その後,水槽内でマンカ幼生の産出が複数回起こり,本研究のための採材時には,2個体(大型個体と中型個体)寄生している

マダイと,大型のタイノエが1個体寄生しているマダイはそれぞれ3尾となり,残る1尾には他の寄生魚で認められる大型(および中型)のタイノエは観察されず,小型のタイノエ3個体(うち1個体は微小)が口蓋に寄生していた。これらの寄生魚のうち,2個体寄生魚を除いた4尾(体重370-664 g)を実験に供した。採材時にタイノエが2個体寄生していたマダイ3尾のうち2尾は,採集時にはタイノエが1個体寄生していたマダイであり,採集時に2個体寄生していたマダイから飼育水槽内に遊出した幼生が寄生して2個体寄生魚となったと推察される。また,採材時に小型のタイノエが3個体寄生していたマダイ1尾も,採集時にはタイノエが1個体寄生していたマダイであり,前報<sup>1)</sup>のための採血(2016年9月)後,当初から寄生していた1個体は脱落し,新たに水槽内に産出された幼生が寄生したと考えられる。2016年7月に釣獲した寄生魚2尾はいずれも1個体のタイノ



**Fig. 1.** Granulocytes from red seabream with parasitized *Ceratothoa verrucosa*. A & B, blood smear; C-E, imprint (C & D, head kidney (hematopoietic tissue); E, spleen). In blood and head kidney, neutrophil was the only granulocyte. The neutrophil from infected fish was characterized with the presence of  $i\beta G^{Gv}$  with chromophobic inner layer (L0) and eosinophilic outer layer (L1). The  $i\beta G^{Gv}$  showed dark brown spot over the core of itself with different focus (spot formation; B & D). A few neutrophils and some large granulocytes (arrows) were observed in the spleen of infected fish (E). May-Grünwald-Giemsa. Bars=1  $\mu$ m.

<sup>\*1</sup> 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[319:近藤昌和,安本信哉,高橋幸則:タイノエに寄生されたマダイの顆粒球(プログラムおよび講演要旨,32)]。

<sup>\*2</sup> 前報では寄生状況について記していなかったため,ここに示す。

エを有しており、55L容水槽（水量45L）1基に収容して飼育し、2017年6月の採材時には体重約60 gとなっていた。水温25℃で馴致飼育したこれら6尾（2015年7月採集個体4尾、2016年7月採集個体2尾）から、前報<sup>1)</sup>と同様に採血して血液塗抹標本を作製するとともに、尾柄部血管から注射器を用いて脱血した（体重の約2%量）。解剖して頭腎と脾臓を摘出し、切断面をスライドグラスに押印してスタンプ標本を作製した。これら標本にMGG染色を施して観察した。また、未寄生魚5尾（体重約379-514 g）を用いて対照標本を作製した。

いずれのタイノエ寄生魚においても、血液中の好中球には $i\beta G^{Cr}$ が観察された（Fig. 1A）。また、 $i\beta G^{Cr}$ は斑形成をともなっていた（Fig. 1B）。一方、未寄生魚の血液中の好中球には $i\beta G^{Cr}$ は認められなかった。血液塗抹標本上における好中球の出現は寄生魚、未寄生魚ともに同程度であった。寄生魚の頭腎では、ほとんど全ての好中球に $i\beta G^{Cr}$ が存在し、斑形成も認められた（Figs. 1C & 1D）。しかし、未寄生魚では頭腎のスタンプ標本上に好中球が寄生魚と同程度観察されるものの、いずれの好中球においても $i\beta G^{Cr}$ は認められなかった。寄生魚、未寄生魚ともに脾臓には少数の好中球が見られ、寄生魚では $i\beta G^{Cr}$ も認められたが（Fig. 1E）、未感染魚では好中球に $i\beta G^{Cr}$ は観察されなかった。また、寄生魚の脾臓には大型の顆粒球（大型顆粒球と称す）が少数存在した（Fig. 1E）。本細胞は長径約15  $\mu m$ の円形または卵円形であり、核は分葉せず偏在していた。核の大きさおよび染色質網は好中球と類似していた。細胞質には粗大な円形または卵円形の顆粒（長径1.5  $\mu m$ 以下）が充満しており、顆粒は明瞭な染色性を示さなかった（難染色性）。顆粒間の細胞質基質は弱塩基好性を示した。大型顆粒球の周囲には、特定の細胞の集積は認められなかった。大型顆粒球は未寄生魚の脾臓には観察されなかった。

マダイの腹腔内には3種類の常在性細胞が存在する<sup>4)</sup>。そのうち‘大型細胞large cell’と称される顆粒球と、本研究の寄生魚の脾臓に見られた大型顆粒球は類似している。‘大型細胞’の機能は不明であることから、寄生魚の脾臓に大型顆粒球が存在する意味も明らかではない。しかし、寄生魚では $i\beta G^{Cr}$ を有する好中球が造血組織である頭腎で産生されることから、この産生に大型顆粒球が関与するのかもしれない。

## 文 献

- 1) 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)]
- 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) 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)]
- 4) Watanabe T, Kamijo A, Narita H, Kitayama K, Ohta H, Kubo N, Moritomo T, Kono M, Furukawa K: Resident peritoneal cells of red sea bream *Pagrus major*. *Fish Sci*, **61**, 937-941 (1995)