

タイノエに寄生されたマダイに観察される第2の好中球

近藤昌和[†], 安本信哉, 高橋幸則

Second Neutrophil Type Observed in Red Seabream *Pagrus major* with Parasitized *Ceratothoa verrucosa*

Masakazu Kondo[†], Shinya Yasumoto and Yukinori Takahashi

Abstract : In previous papers, we reported that the morphology and cytochemistry of neutrophil from red seabream *Pagrus major* infected with *Ceratothoa verrucosa* (Cv) were different to that of fish without Cv. Here, we call the neutrophil 'first type; neutrophil-1st'. By observation of blood smear from 3 fish (3 years old) infected with more than 4 Cv (5, 5 or 14 parasites/fish), we noticed the appearance of new type of neutrophil, 'second type; neutrophil-2nd'. The neutrophil-2nd had two types of granules. Both granule types had similar morphology but different cytochemical characteristics to those of ordinary chromophobic granules (oβG-1, oβG-2) of neutrophil from the fish without Cv. In present paper, we call the two granule-types of neutrophil-2nd extraordinary chromophobic granules (type 1, eoβG-1^{Cv2nd}; type 2, eoβG-2^{Cv2nd}). The eoβG-1^{Cv2nd} showed chromophobic, simple morphology (without stratified structure), peroxidase positive and lack of lysosomal enzymes. On the other hand, the eoβG-2^{Cv2nd} 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. The β-Glu was detected in a few L0. Both types of extraordinary granules showed negative reaction to Sudan black B, oil red O and Sudan III, however, L0 of eoβG-2^{Cv2nd} was stained blue with hematoxylin for counter stain in these preparations. Spot formation, a curious phenomenon appeared in PO-stained oβG-2 (positive L1 and negative L0), was not observed in eoβG-2^{Cv2nd}. The neutrophil-2nd was only granulocyte type in the head kidney, but two types of granulocytes, neutrophil-2nd and large granulocytes, were observed in the spleen of the fish infected with Cv.

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

緒 言

タイノエ症¹⁾の原因寄生虫であるタイノエ*Ceratothoa verrucosa*に寄生されたマダイ*Pagrus major* (以後、寄生魚と称す)では、未寄生魚とは異なる特徴を有する好中球が血液中出现し²⁾、この好中球は造血組織である頭腎で産生される³⁾。また、寄生魚の脾臓には、マダイの腹腔内に常在する'大型細胞'に類似した大型顆粒球 (あるいは大型細胞そのもの) が認められる³⁾。これらの知見を得た実験では、タイノエが口腔に1または2個体寄生しているマダイ (例外的に小型のタイノエが口蓋に3個体寄生している

マダイ) を用いた^{2,3)}。本稿では、タイノエが2年以上寄生し続け、採材の3ヶ月以内にタイノエが5個体以上寄生した3歳魚と考えられるマダイ^{*1)}について、血液中の好中球の形態学および細胞化学的特徴を調べるとともに、頭腎および脾臓中の顆粒細胞の観察結果を報告する。

材料および方法

タイノエが2個体(大型個体と中型個体がそれぞれ1個体)寄生しているマダイ3尾を、同一水槽内で市販の配合飼料(マリン6号, 林兼産業)を適宜給餌して飼育していたとこ

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

^{*1} 本研究では、2015年7月に下関市沿岸 (響灘) で釣獲された寄生魚 (全長約6 cm) を育成して用いた。採集された寄生魚は、魚体の大きさから当歳魚と考えられ、実験を2017年9月に実施したことから、タイノエは2年以上寄生し続け、本研究に使用した時点における寄生魚は3歳魚であると判断した。

ろ (水温25℃), 水槽内で複数回のマンカ幼生の産出があり, 2017年9月初めに取り上げて寄生状況を調べたところ, すでに寄生している2個体以外に複数の小型個体の寄生が認められた。この寄生魚3尾を水槽3基に1尾ずつ収容して飼育を継続したところ, 9月下旬に3尾中1尾 (No. 1) に摂餌量の低下と, 濾過槽からの落水付近にとどまる異常行動が観察された。

寄生魚3尾 (体重: No. 1, 530 g; No. 2, 860 g; No. 3, 780 g) を取り上げ, キナルジンで麻酔したのち採血するとともに, 寄生状況を調べた。また, 血液塗抹標本を作製し, 各種染色²⁾を施して観察した。さらに, 異常行動を示した個体 (No. 1) については, 前報³⁾と同様に脱血後, 頭腎と脾臓のスタンプレ本を作製してMay-Grünwald-Giemsa (MGG) 染色を行った。異常行動を示さなかった2尾はその後も飼育を継続し, 最初の採血後14日目に血液の, 同30日目は血液と臓器の標本を作製して観察した。

結果および考察

いずれの寄生魚においても, 大型個体と中型個体はそれぞれ1個体存在した。大型個体は腹面を口腔の背壁 (口蓋) に向けて寄生し, 中型個体は大型個体の側方に接して口腔の側壁 (口腔壁) に腹面を向けて寄生していた。中型個体の頭部の位置は大型個体のそれよりもやや後方にあり, 両個体とも宿主と同じ方向を向いていた。本研究で用いた寄生魚 (3尾) には, 大型個体と中型個体のほかに, 複数の小型個体が寄生していた^{*2}。異常行動を示した寄生魚 (No. 1) には小型個体が12個体寄生していた。この12個体のうち, 1個体は口蓋に寄生していたが, その位置は大型個体よりも宿主の前方であった。他の11個体は口腔壁や口腔の基底 (舌) に寄生していた。異常行動を示さなかった2尾 (No. 2とNo. 3) では小型個体はそれぞれ3個体認められ, No. 2では口腔壁に1個体, 舌に2個体寄生していた。また, No. 3では口腔壁に3個体観察されたが, うち1個体は中型個体の側方に位置していた (No. 3の中型個体は大型個体と小型個体に挟まれていた)。なお, No. 1は大型と中型のタイノエのみが寄生している時から, 口はほとんど閉まらず, 常に開放状態であった。また, No. 2とNo. 3においても本研究における採材時には口は完全には閉じなかった。

寄生魚の血液中における好中球の出現頻度は高くなく, 未寄生魚と同程度であった。MGG染色では好中球に2種類

の顆粒, すなわち難染色性の顆粒と, 顆粒の中心を取り囲むエオシン好性の層 (L0) およびその周辺の難染色性層 (L1) からなる顆粒が認められた (Fig. 1A)。これらの顆粒は未寄生魚の好中球に観察される2種類の好中球顆粒 (通常型難染色性顆粒 ordinary chromophobic granule, oβG; 1型, oβG-1; 2型, oβG-2) にそれぞれ類似していた。しかし, 寄生魚の好中球に見られる2種類の顆粒は, 未寄生魚のoβG-1およびoβG-2とは細胞化学的特徴が異なることから (Table 1), 異常型顆粒 (異常型難染色性顆粒 extraordinary chromophobic granule, eoβG) であると言える。前報²⁾において, タイノエに寄生されたマダイには, 3種類の顆粒を有する好中球が出現することを報告した。その好中球と本研究で存在が明らかとなった好中球の間には後述のように形態学および細胞化学的特徴に違いが認められること, 両好中球は同時に観察されず, タイノエの寄生後, 前報²⁾の好中球が時系列上先に出現していることから, 両好中球を区別するために, 前報²⁾における好中球を第1種好中球 (first neutrophil type, neutrophil-1st), 本研究における好中球を第2種好中球 (second neutrophil type, neutrophil-2nd) と呼ぶこととする。また, 両好中球の顆粒の略語の右肩にはタイノエの学名の略記 'Cv' を付し, さらに, 第1種好中球の顆粒には '1st' を, 第2種好中球の顆粒には '2nd' を添えて表記することとする。

第2種好中球の2種類のeoβGのうち, 未寄生魚のoβG-1に類似した顆粒 (eoβG-1^{Cv2nd}) には成層構造は観察されず, 顆粒全体がPO陽性であり (Fig. 1B), 各種リゾゾーム酵素は認められなかった。また, ズダン黒B (SBB), オイルレッドO (ORO) およびズダンIII染色といった脂肪染色にも陽性反応を示さなかった (Table 1)。これらの構造と染色性は第1種好中球の顆粒の一種であるeoβG-1^{Cv1st}と同じである²⁾。しかし, 未寄生魚のoβG-1とはSBB染色性が異なっていた (oβG-1はSBB陽性)。一方, 第2種好中球のエオシン好性のL0を有する顆粒 (eoβG-2^{Cv2nd}) には, 酸性フォスファターゼ (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に局在していた。また, β-Glu陽性のL0は少数観察された (Table 1)。これらのリゾゾーム酵素の染色性は, 未寄生魚のoβG-2と類似していた。しかし, 第1種好中球のeoβG-1^{Cv1st}にはAcPは検出されず, β-Gluは多くのL0に認められている²⁾。PO染色の結果, eoβG-2^{Cv2nd}のL0は

*2 寄生状況の詳細については次稿で報告する予定である。

陰性であり、L1に陽性反応が認められた (Fig. 1B)。同様の染色性は $\text{e}\beta\text{G-2}$ と $\text{e}\beta\text{G-1}^{\text{Cv1st}}$ にも観察されているが、 $\text{e}\beta\text{G-2}$ に出現する‘斑’ [顕微鏡の焦点を移動させることで、L0の上方および下方に出現する褐色の斑 (spot)] は、 $\text{e}\beta\text{G-1}^{\text{Cv1st}}$ と同様に $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv2nd}}$ にも認められなかった (Table 1)。 $\text{e}\beta\text{G-2}$ ではL1がSBB陽性 (L0は陰性) であり、OROおよびズダンIII染色には陽性反応を示さないのに対して、 $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv2nd}}$ は $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv1st}}$ と同様にいずれの脂肪染色に対しても陰性であった (Table 1)。しかし、脂肪染色後の対比染色 (核染色) に用いたヘマトキシリン染色 (マイヤーの処方) によって、 $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv2nd}}$ のL0が青染された (Fig. 1C)。L0のヘマトキシリン陽性像は $\text{e}\beta\text{G-2}$ および $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv1st}}$ には認められていない (Table 1)。

PO染色された $\text{e}\beta\text{G-2}$ に出現する斑が、 $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv1st}}$ では認められない理由として、両顆粒のL0内の成分が異なることによりL0の構造が変化することが推察されている²⁾。すなわち、 $\text{e}\beta\text{G-2}$ のL0に存在するAcPが $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv1st}}$ では陰性になり、少数の $\text{e}\beta\text{G-2}$ のL0にしか認められない $\beta\text{-Glu}$ が、多くの $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv1st}}$ のL0に検出される²⁾ (Table 1)。しかし、 $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv2nd}}$ ではAcPと $\beta\text{-Glu}$ の陽性像は $\text{e}\beta\text{G-2}$ と同様であるにもかかわらず、斑は形成されなかった。 $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv2nd}}$ のL0はヘマトキシリン陽性であることから、L0には正体不明のヘマトキシリン陽性物質が存在すると言える。 $\text{e}\beta\text{G-2}$ と $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv1st}}$ ではヘマトキシリン陰性であることから (Table 1)、 $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv2nd}}$ に斑形成 (spot formation) が観察されない理由として、本顆粒のL0に存在するヘマトキシリン陽性物質による構造変化が考えられる。

ヘマトキシリン染色を核染色に用いた他の細胞化学染色 (periodic acid Schiff反応, AcP, $\beta\text{-Glu}$, 各種エステラーゼ, PO) では、 $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv2nd}}$ のL0にヘマトキシリン陽性反応は認められなかった。このことは、標本の固定法の違いによると推察される。すなわち、脂肪染色では標本はホルマリン蒸気で固定されているのに対して、他の染色ではアルコールやアセトンといった有機溶剤を含む固定液中で標本は浸漬固定されている。

第1種好中球には $\text{e}\beta\text{G-1}^{\text{Cv1st}}$ と $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv1st}}$ の他に、未寄生魚では類似した顆粒がない誘導型顆粒 (誘導型難染色性顆粒 inducible chromophobic granule, $\text{i}\beta\text{G}$) が出現する¹⁾。この誘導型顆粒 (以後、 $\text{i}\beta\text{G}^{\text{Cv1st}}$ と表記する) は、難染色性でPO陽性のL0と、エオシン好性かつPO陰性のL1からなり、第1種好中球に特徴的であることから、本好中球の指標となると考えられている³⁾。本研究において、第2種好中球に

は $\text{i}\beta\text{G}^{\text{Cv1st}}$ は全く観察されなかった。

第2種好中球が血液中に観察される寄生魚の頭腎では、好中球が唯一の顆粒球であり、種々の成熟段階を示す多数の好中球が認められた (Fig. 2A)。これらの好中球には第1種好中球に見られる $\text{i}\beta\text{G}^{\text{Cv1st}}$ は全く観察されなかった。このことから、第2種好中球は第1種好中球と同様に³⁾、造血組織である頭腎で産生されると言える。第1種好中球が血液中に観察される寄生魚の脾臓には少数の第1種好中球とともに少数の大型顆粒球が存在する³⁾。また、未寄生魚では脾臓に少数の好中球は認められるものの、大型顆粒球は観察されない³⁾。本研究の結果、血液中に第2種好中球が観察される寄生魚 (No. 1) の脾臓には、多数の好中球 ($\text{i}\beta\text{G}^{\text{Cv1st}}$ が検出されないことから第2種好中球と考えられる) とともに、多数の大型顆粒球が認められた (Fig. 2B)。また、大型顆粒球は単独または集塊を形成して存在していた。しかし、第1種好中球が観察される寄生魚の脾臓の大型顆粒球では、顆粒間の細胞質基質は弱塩基好性であるのに対して³⁾、第2種好中球を有する寄生魚 (No. 1) では、細胞質基質は弱エオシン好性であった。

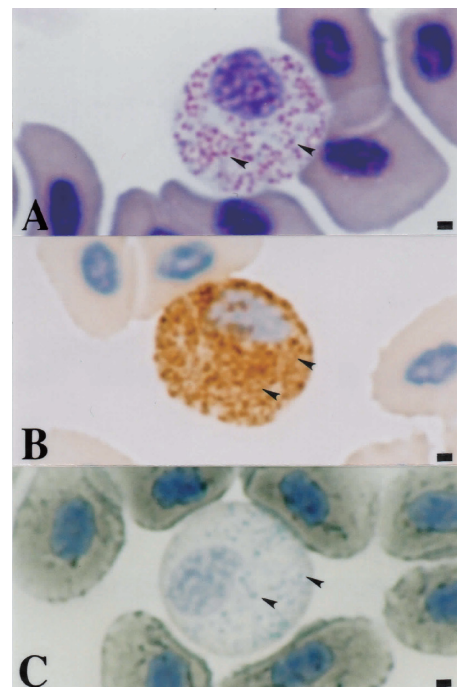


Fig. 1. Neutrophils (second neutrophil type, neutrophil-2nd) from red seabream with parasitized *Ceratothoa verrucosa*. A, May-Grünwald-Giemsa; B, peroxidase; C, Sudan black B (Negative reaction. Note hematoxylin-positive L0 of $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv2nd}}$). Arrowheads show $\text{e}\beta\text{G-2}^{\text{Cv2nd}}$. Counterstain in B & C: hematoxylin (Mayer's). Blood smear. Bars=1 μm .

Table 1. Comparison of neutrophil granules from red seabream (modified from Kondo et al.¹⁾)

Staining ^{*1,*2}	Origin of neutrophils, type of granules and reaction ^{*3}											
	Fish without <i>Ceratothoa verrucosa</i>				Fish infected with <i>Ceratothoa verrucosa</i>							
	eoβG		eoβG-2		eoβG		eoβG-2 ^{Cv1st}		eoβG		eoβG-2 ^{Cv2nd}	
-1	L0	L1	C	L0	E	L0	L1	L0	L1	L0	L1	
MGG	C	E	C	C	E	C	C	C	E	C	E	C
AIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcP	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
β-Glu	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
α-NAE	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
α-NBE	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
NASDCAE	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
PO	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
SBB	+	-	+	(SF: +)	-	-	(SF: -)	-	-	-	(SF: -)	-
Hem	-	-	-	(SF: -)	-	-	-	-	-	-	+	-
ORO, S-III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

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; Hem, hematoxylin stain (Mayer's; counter stain).

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⁾eoβG-1, ordinary chromophobic granule type 1; eoβG-2, ordinary chromophobic granule type 2; eoβG-1^{Cv1st}, extraordinary chromophobic granule type 1 of neutrophil-1st observed after infection with *Ceratothoa verrucosa* (oiCv); eoβG-2^{Cv1st}, extraordinary chromophobic granule type 2 of neutrophil-1st oiCv; eoβG-1^{Cv2nd}, extraordinary chromophobic granule type 1 of neutrophil-2nd oiCv; eoβG-2^{Cv2nd}, extraordinary chromophobic granule type 2 of neutrophil-2nd oiCv; L0, layer 0; L1, layer 1; C, chromophobic; E, eosinophilic; +, positive; -, negative (non-detection); ↑, increase of positive site; SF, spot formation.

⁴⁾A few of L0 were positive.

^{*}present report.

寄生魚のうち、No. 2とNo. 3については、最初の採材後も飼育を継続し、14日後に血液の、30日後には血液と臓器の標本を作製して観察した。なお、No. 2は30日後の採材当日に斃死していたため（原因不明）、30日後の採材はNo. 3のみから行った。その結果、30日後においても血液中には第2種好中球が観察され（第1種好中球は認められなかった）、頭腎の所見も最初の採材時のNo. 1と同様であった。脾臓においても多数の第2種好中球と考えられる好中球が認められたが、大型顆粒球の数はNo. 1に比べて少なく、細胞質基質は弱塩基好性であった。大型顆粒球の機能は不明であり、好中球造血への関与の有無も明らかではない³⁾。なお、この30日間に、No. 2とNo. 3それぞれの3個体の小型個体のうち、口腔壁に寄生していた1個体がともに消失し（14日後の採血時に確認。脱落した個体は確認できなかった）、No. 3では大型個体も脱落した（1日後に水槽の底に

脱落していた。無傷であったが死亡していた）。また、30日後の採材当日に、No. 2からマンカ幼生が産出されており、斃死したNo. 2からは大型個体、中型個体および小型個体（2個体）が回収され、いずれも生残していた。

本研究によって、タイノエに寄生されたマダイには第2の好中球（第2種好中球）が出現することが明らかとなった。しかし、既報²⁾のタイノエ寄生魚に観察される第1種好中球との関係は不明である。また、第2種好中球の出現を促す‘刺激’については、①タイノエに長期間寄生されたこと、②通常（1または2個体が普通^{1,4,5)}）よりも多くのタイノエに寄生されたこと（過剰な寄生）、③通常（口蓋への大型個体の寄生と、大型個体に接して口腔壁への中型個体の寄生が普通^{1,4,5)}）とは異なる部位への寄生（異常な寄生）のいずれか、またはこれらの複合によるのかは明らかではない。なお、いずれの寄生魚（採材当日に斃死していたNo. 2も含む）においても、鰓や内臓には寄生虫は認められなかった。したがって、No. 1の異常行動は、口腔内に多数のタイノエが寄生したことによる呼吸水の減少を補うための行動であると思われる。本研究に用いた寄生魚に通常とは異なる個数および場所への寄生が起こった原因として、口の開閉不全が考えられる。

文 献

- 1) 畑井喜司雄: タイノエ症. 畑井喜司雄, 小川和夫 (監), 新魚病図鑑 (第2版). 緑書房, 東京, 189 (2011) [Hatai K: Rhexanellosis. In: Hatai K, Ogawa K (ed) New Atlas of Fish Diseases (2nd edition). Midori Shobo, Tokyo, 189 (2011) (in Japanese)]
- 2) 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)]
- 3) 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頭腎と脾臓に観察される顆粒球について. 水大校研報, **66**, 199-201 (2018) [Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: On the granulocytes observed in head kidney and spleen of red seabream *Pagrus major* with parasitized *Ceratomyxa verrucosa*. *J Nat Fish Univ*, **66**,

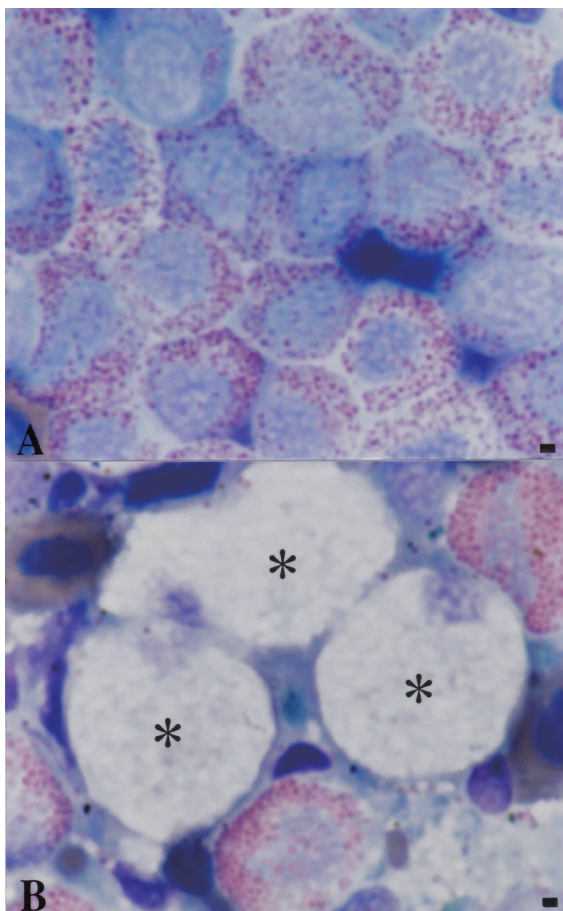


Fig. 2. Granulocytes in the head kidney (A) and spleen (B) from red seabream with parasitized *Ceratomyxa verrucosa*. In the head kidney, neutrophil (second neutrophil type, neutrophil-2nd) was the only granulocyte. Numerous neutrophils and large granulocytes (asterisks) were observed in the spleen. May-Grünwald-Giemsa. Imprint. Bars=1 μ m.

- 199-201 (2018) (in Japanese with English abstract)]
- 4) 山内健生, 大塚 攻, 仲達宜人: 瀬戸内海のウオノエ科魚類寄生虫. 広島大学大学院生物圏科学研究科瀬戸内圏フィールド科学教育研究センター報告, **1**, 1-9 (2004) [Yamauchi T, Ohtsuka S, Nakadachi N: Cymothoid fauna of Seto Inland Sea, Japan (Crustacea: Isopoda). *Bulletin Setouchi Field Science Center Graduate School Biosphere Science Hiroshima Univ*, **1**, 1-9 (2004) (in Japanese with English abstract)]
 - 5) 長澤和也: 鹿児島湾産マダイに寄生していたタイノエ *Ceratothoa verrucosa* (等脚目ウオノエ科). Nature of Kagoshima (旧名, 自然愛護; 別名, カゴシマネイチャー), **43**, 311-315 (2017) [Nagasawa K: *Ceratothoa verrucosa* (Isopoda: Cymothoidae) parasitic on red seabream *Pagrus major* in Kagoshima Bay, Kyushu, Japan. *Nature of Kagoshima*, **43**, 311-315 (2017) (in Japanese with English abstract)]