

コブツキナガクビムシに寄生されたマダイの好中球顆粒

近藤昌和[†], 安本信哉

Neutrophil Granules of Red Seabream *Pagrus major* Infected with *Clavellotis dilatata*

Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract : Two types of extraordinary chromophobic granules (type 1, eoG-1^{Cd}; type 2, eoG-2^{Cd}) were observed in the neutrophils of red seabream *Pagrus major* infected with *Clavellotis dilatata* (parasitic copepod). The eoG-1^{Cd} showed chromophobic, simple morphology (without stratified structure), peroxidase (PO) positive, Sudan black B (SBB) negative and lacked lysosomal enzymes. The eoG-2^{Cd} was stratified granule with two-layer structure [inner eosinophilic layer (L0) and outer chromophobic layer (L1)] and SBB negative. Alpha-naphtyl butyrate esterase and PO were detected in L0 and L1, respectively. Spot formation, a curious phenomenon appeared in PO-stained type 2 ordinary chromophobic granule (oG-2; positive L1 and negative L0) from non-infected fish, was not observed in the infected fish. Acid phosphatase (AcP), β -glucuronidase (β -Glu), α -naphtyl acetate esterase (α -NAE) and naphthol AS-D chloroacetate esterase (CAE) were detected in L0 of eoG-2^{Cd} as small central positive particles. These findings indicate that the L0 of eoG-2^{Cd} consists of L0-0 (inner part in L0; AcP, β -Glu, α -NAE and CAE positive) and L0-1 (outer part of L0-0).

Key words : granule, neutrophil, *Pagrus major*, red seabream, *Clavellotis dilatata*, Copepoda

未感染マダイ *Pagrus major* の好中球には2種類の通常型顆粒 (ordinary chromophobic granule, oG; 1型, oG-1; 2型, oG-2) が観察され, 感染症に罹患した場合の好中球顆粒の特徴は, 未感染魚とは異なることが知られている (近藤ら¹⁾ を参照)。前報¹⁾において, 吸虫 (種は未同定) のメタセルカリアに寄生されたマダイでは好中球に2種類の異常型顆粒 (extraordinary chromophobic granule, eoG; 1型, eoG-1^{Mc}; 2型, eoG-2^{Mc}) が観察されることを報告した。eoG-2^{Mc} の特徴としては, 各種リソゾーム酵素 (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 -NAE), α -ナフチルブチレートエステラーゼ (α -NBE), およびナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (CAE)) のうち β -Gluを除いて, 成層構造を有するeoG-2^{Mc}の内層 (L0) 内の狭い領域に酵素活性が検出されることがあげられる。このことはL0がさら

に2層 (内側のL0-0とその周囲のL0-1) に区分されることを示している。

前報¹⁾で用いたメタセルカリアが寄生したマダイが収容されていた水槽には, メタセルカリアが寄生せずにコブツキナガクビムシ *Clavellotis dilatata* (甲殻亜門顎脚綱カイアシ亜綱) ^{*1}の寄生が認められたマダイが混在していた。本研究ではコブツキナガクビムシのみが寄生したマダイの好中球顆粒の特徴について報告する^{*2}。

卵嚢を有するコブツキナガクビムシの雌成体が1-2個体寄生していたマダイ5尾を実験に供した (No. 1, 64.0 g; No. 2, 48.1 g; No. 3, 43.0 g; No. 4, 78.0 g; No. 5, 55.9 g)。No. 1, No. 2およびNo. 3にはそれぞれコブツキナガクビムシが1個体, No. 4とNo. 5にはそれぞれ2個体寄生していた。寄生部位は以下の通りであった: No. 1, 口蓋; No. 2, 舌の側面; No. 3, 口底 (狭義) ^{*3}; No. 4, 口蓋と右第2鰓弓の下枝前鰓

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): kondonom@fish-u.ac.jp

^{*1} *Clavellotis dilatata* の標準和名は長澤, 上野 (2015)²⁾にしたがった。

^{*2} 本研究の一部は, 日本比較免疫学会第30回学術集会 (2018年 8月21日) において報告した (近藤昌和, 安本信哉: 感染魚の好中球顆粒 (講演要旨, 34))。

^{*3} 本稿では, 口腔の腹側を広義の口底とし, 口底 (広義) は舌と狭義の口底からなると定義する。

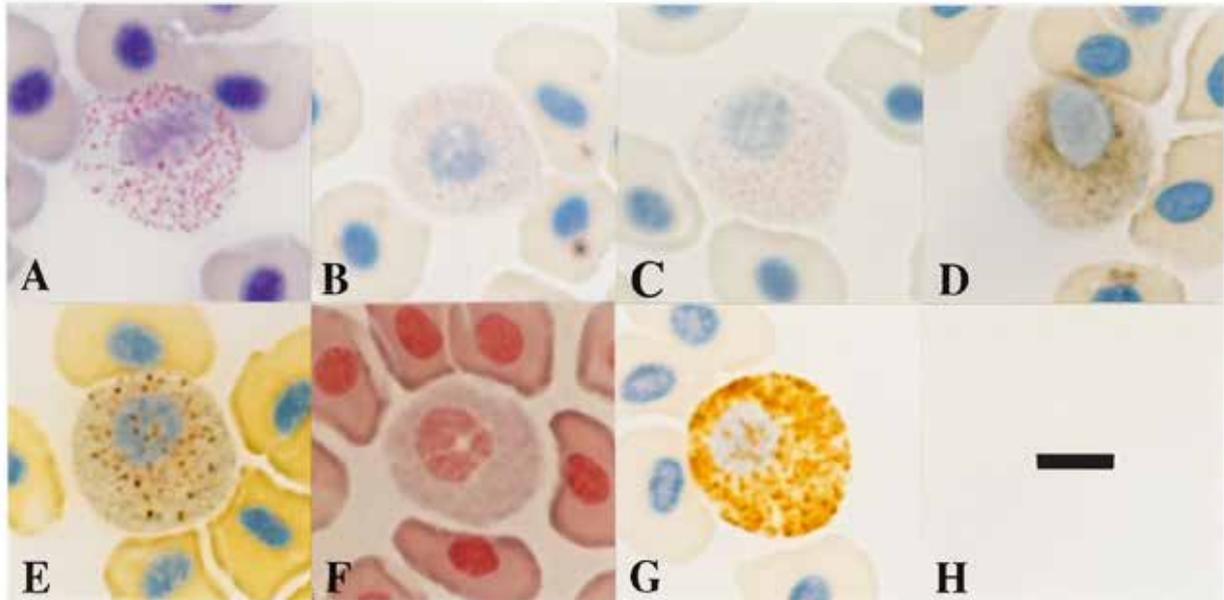


Fig. 1. Neutrophils from red seabream infected with *Clavellotis dilatata*. A, May-Grünwald-Giemsa; B, acid phosphatase; C, β -glucuronidase; D, α -naphtyl acetate esterase; E, α -naphtyl butyrate esterase; F, naphthol AS-D chloroacetate esterase; G, peroxidase; H, scale bar (5 μ m) which is adapted in all figures (A-G) in Fig. 1. Counter stain: B-E & G, hematoxylin (Mayer); F, safranin O. Note small positive particles (L0-0) in B-D & F.

Table 1. Comparison of neutrophil granules (chromophobic granule, G) from red seabream *Pagrus major* infected with metacercaria (species unidentified) or *Clavellotis dilatata* (modified from Kondo et al.¹⁾)

Staining ^{*1,2}	Origin of neutrophils, type of granules and reaction ^{*3}								
	Non-infected fish			Fish infected with:					
				Metacercaria			<i>Clavellotis dilatata</i> ^{*5}		
	oG -1	oG-2 L0	L1	eoG -1 ^{Mc}	eoG-2 ^{Mc} L0	L1	eoG -1 ^{Cd}	eoG-2 ^{Cd} L0	L1
MGG	C	E	C	C	E	C	C	E	C
AIP	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AcP	—	+	—	—	+	—	—	+	—
β -Glu	—	+ ^{*4}	—	—	+ \uparrow	—	—	+ \uparrow (L0-0)	—
α -NAE	—	+	—	—	+	—	—	+	—
α -NBE	—	+	—	—	+	—	—	+	—
CAE	—	+	—	—	+	—	—	+	—
PO	+	—	+	+	—	+	+	—	+
		(SF: +)			(SF: —)			(SF: —)	
SBB	+	—	+	—	—	—	—	—	—
		(SF: —)							

^{*1}MGG, May-Grünwald-Giemsa; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; β -Glu, β -glucuronidase; α -NAE, α -naphtyl acetate esterase; α -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 (PAS), PAS after digestion with α -amylase, alcian blue (pH1.0, pH2.5), toluidine blue in distilled, oil red O, Sudan III).

^{*3}oG-1, ordinary type 1; oG-2, ordinary type 2; eoG-1^{Mc}, extraordinary type 1 observed after infection with (oai) metacercaria (oaiMC); eoG-2^{Mc}, extraordinary type 2 oaiMC; eoG-1^{Cd}, extraordinary type 1 oai *Clavellotis dilatata* (oaiCd); eoG-2^{Cd}, extraordinary type 2 oaiCd; L0, layer 0; L0-0, inner layer of L0; L1, layer 1; C, chromophobic; E, eosinophilic; +, positive; —, negative (non-detection); \uparrow , increase of positive site; SF, spot formation.

^{*4}A few of L0 were positive.

^{*5}present report.

耙列の鰓耙基部; No. 5, とともに口蓋。コブツキナガクビムシはこれら寄生部位において、第2小顎の先端部が変形した固着装置 (bullae) を上皮に打ち込んで固着寄生しており²⁾、固着部位では上皮が顕著に隆起していたが、そこに発赤は観察されなかった。キナルジンで麻酔した実験魚の尾柄部血管から採血した (採血時の水温: 22.0°C)。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⁾と同様に行った。

コブツキナガクビムシ寄生魚の血液中における好中球の出現頻度は未寄生魚と同程度であった。May-Grünwald-Giemsa (MGG) 染色では、成層構造を持たない難染色性顆粒と、エオシン好性のL0とその周囲の難染色性層 (L1) からなる成層顆粒が認められた (Fig. 1A)。各種細胞化学染色の結果、これら2種類の好中球顆粒はともに異常型顆粒 (eoG-1^{Cd}とeoG-2^{Cd}) であることが明らかとなった (Table 1)。寄生魚の好中球にはアルカリ性フォスファターゼは検出されず、両顆粒はperiodic acid Schiff 反応、トルイジンブルー、アルシアンブルー、オイルレッドO、ズダンIII およびズダン黒B (SBB) 染色に陽性反応を示さなかった (Table 1)。また、eoG-2^{Cd}のL0はSBB染色後のヘマトキシリン染色 (核染色) にも染色されなかった。各種リソゾーム酵素がいずれもL0内に検出されたが (Figs. 1B-1F)、 α -NBE陽性粒子はL0と同大であったのに対して (Fig. 1E)、他のリソゾーム酵素 (AcP, β -Glu, α -NAE, CAE) の陽性粒子はL0よりも小型であった。また、 β -Glu陽性粒子は、未寄生魚よりも増加した。ペルオキシダーゼ (PO) 活性はeoG-1^{Cd}と、eoG-2^{Cd}のL1に検出されたが、eoG-2^{Cd}のPO染色標本に斑形成は認められなかった。

メタセルカリア寄生魚においても、好中球に2種類の異常顆粒 (eoG-1^{Mc}, eoG-2^{Mc}) が認められており¹⁾、構造および細胞化学的特徴ならびにPO染色像において斑形成が認められないことはコブツキナガクビムシ寄生魚と類似していた (Table 1)。しかし、eoG-2^{Mc}ではL0と同程度の大きさの β -Glu陽性粒子が、eoG-2^{Cd}の場合にはL0よりも小型の陽性粒子として観察された。また、eoG-2^{Mc}のL0内にL0よりも小型の陽性部位として検出される各種エステラーゼのうち、 α -NBEはeoG-2^{Cd}ではL0と同大の陽性粒子として

認められた。これらの観察結果から、コブツキナガクビムシ寄生魚においてもeoG-2^{Cd}のL0はL0-0とL0-1の2層に区分されていると考えられる。eoG-2^{Mc}ではメタセルカリアの寄生によって好中球内で産生された未知の因子が顆粒内に蓄積され、他の顆粒内成分との相互作用によって、L0内にL0-0とL0-1が形成されると考えられている¹⁾。eoG-2^{Cd}においても同様であるが、メタセルカリア寄生とコブツキナガクビムシ寄生では好中球で産生される因子が異なることから、L0-0に局在する成分に違いが認められるのではないかと推察される。

PO染色された各種eoG-2には斑が観察されておらず¹⁾、その原因として、L0内の構成成分、特に β -Gluの存否がL0の微細構造に変化をもたらした可能性が挙げられている¹⁾。斑が形成されないeoG-2^{Cd}においても β -Glu陽性のL0が増加していることからこの推察は妥当と思われる。また、 β -GluはeoG-2^{Cd}のL0-0に局在すると考えられることから、L0内でも特にL0-0に β -Gluが存在することが斑の不形成に重要であると言える (L0-0はL0内に位置し、L0はL0-0とL0-1に区分されることから、L0に β -Glu活性が検出されることは、L0-0にも同酵素が存在することを意味する)。

文 献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉: 吸虫のメタセルカリアに寄生されたマダイの好中球顆粒. 水大校研報, **67**, 161-166 (2019) [Kondo M, Yasumoto S: Neutrophil granules of red seabream *Pagrus major* infected with metacercaria of trematode. *J Nat Fish Univ*, **67**, 161-166 (2019) (in Japanese with English abstract)]
- 2) 長澤和也, 上野大輔: 日本産魚類に寄生するナガクビムシ科カイアシ類の目録 (1939-2015年). 生物圏科学, **54**, 125-151 (2015) [Nagasawa K, Uyeno D: A checklist of copepods of the family Lernaeopodidae (Siphonostomatoida) from fishes in Japanese waters (1939-2015). *Biosphere Sci*, **54**, 125-151 (2015) (in Japanese with English abstract)]