

*Vibrio harveyi*に感染させたマダイの好中球顆粒

近藤昌和[†], 原田宗幸, 安本信哉

Neutrophil Granules of Red Seabream *Pagrus major* Infected with *Vibrio harveyi*

Masakazu Kondo[†], Muneyuki Harada and Shinya Yasumoto

Abstract : Three types of granules, two extraordinary types and one inducible type, were observed in the neutrophils of red seabream *Pagrus major* infected with *Vibrio harveyi*. Both extraordinary granule types (eoG-1th, eoG-2th) had similar morphologies but different cytochemical characteristics to those of ordinary granules (oG-1, oG-2) from non-infected fish. The eoG-1th showed chromophobic, simple morphology (without stratified structure), peroxidase positive and lack of lysosomal enzymes. The eoG-2th 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 extraordinary types were Sudan black B (SBB) negative. Spot formation, a curious phenomenon appeared in PO- stained oG-2 (positive L1 and negative L0), was not observed in eoG-2th. Many L0 of eoG-2th were β -Glu positive. Contrastively, this enzyme activity was detected in a few L0 of oG-2. Inducible granule (iGth) was consisted of two chromophobic layers (inner L0 and outer L1). The L0 of iGth showed positive reaction to alkaline phosphatase, PO and SBB. Esterases were detected not only in the L0 of eoG-2th but also in the L1 of iGth.

Key words : granule, neutrophil, *Pagrus major*, red seabream, vibriosis, *Vibrio harveyi*

緒言

健全なマダイ *Pagrus major* (以後、健全魚と称す) の好中球には2種類の通常型顆粒 (ordinary granule, oG; 1型, oG-1; 2型, oG-2) が存在する^{1,2)}。しかし、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 [この場合の顆粒を異常型顆粒 extraordinary granule (eoG) と呼ぶ], また、感染症の種類によっては健全魚の好中球には観察されない誘導型顆粒 (inducible granule, iG) が出現する (近藤・安本^{3,4)}を参照)。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、健全魚の2種類の顆粒と同様な特徴を有する顆粒 (oG-1^{ea}とoG-2^{ea}) 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 (iG^{ea}) が観察される⁷⁾。

ビブリオ病はビブリオ属細菌による感染症であり、*Vibrio harveyi*も本病の原因細菌の一種である⁸⁾。本研究ではマダイに *V. harveyi* を人為感染させた場合に血液中に出現する好中球の特徴について報告する^{*1)}。

材料および方法

実験は40尾のマダイを用いて2回行った。*Vibrio harveyi* には天然アミモンガラ *Canthidermis maculata* の腎臓から分離された株を使用した^{*2)}。キナルジンで麻酔したマダイ (体重約250 g) の腹腔内に、生理食塩水 (0.85%) に懸濁した

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} 本研究の一部は、令和元年度日本魚病学会秋季大会 (2019年 9月12日) において報告した[214: 近藤昌和, 原田宗幸, 安本信哉: *Vibrio harveyi* に人為感染させたマダイの好中球顆粒 (プログラムおよび講演要旨, 21)]。

^{*2} 本研究で用いた菌株は、平成28年度日本魚病学会秋季大会 (2016年 9月7日) において *V. campbellii* として報告した[310: 安本信哉, 松井浩太郎, 大村拓也, 近藤昌和, 高橋幸則: マダイおよびカワハギに対する天然アミモンガラ由来 *Vibrio campbellii* の病原性および病理組織学的研究 (プログラムおよび講演要旨, 25)]。

V. harveyi (1回目, 2.0×10^{10} CFU/ml; 2回目, 2.8×10^{10} CFU/ml) を体重1 kg当たり1 ml接種し, 25°Cで飼育した。飼育期間中は市販の配合飼料 (マリン6号, 林兼産業) を飽食給餌した。水槽 (円形500L容) 2基を用い (水槽番号: ①と②), それぞれに*V. harveyi* を接種したマダイを10尾搬入した。初回の実験では接種4日後に, 2回目では3日後に, 水槽 (両回とも水槽②) から生残魚2尾を取り上げてキナルジンで麻酔し, 尾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²⁰⁾と同様に行った。採血時までの累積死亡率は, 1回目の実験では10% (水槽①) と30% (水槽②) であり, 2回目では30% (水槽①) と40% (水槽②) であった。なお, 2回目の実験の水槽①では, 接種3日後以降も飼育を継続したが (9日後まで), さらなる死亡は認められなかった。

結果および考察

*Vibrio harveyi*に感染させたマダイ (以後, 感染魚と称す) の血液中には大型の好中球が多数観察された。また, 細胞質にはMay-Grünwald-Giemsa (MGG) 染色性および各種細胞化学染色性の異なる3種類の顆粒が観察された (Fig. 1; Table 1)。このうち, 2種類の顆粒のMGG染色性は健常魚のoG-1およびoG-2に類似していたが, 細胞化学染色性が健常魚とは異なることから異常型顆粒であることが明らかとなった (eoG-1thおよびeoG-2th)。残る1種類の顆粒は健常魚には認められない誘導型顆粒であった (iGth)。

健常魚のoG-1に類似したeoG-1thは, oG-1と同様にMGG染色によって難染色性を示し, 成層構造を示さなかった。また, ペルオキシダーゼ (PO) 陽性であり (Fig. 1H), 各種リソゾーム酵素は検出されなかった。しかし, oG-1が陽性反応を示すSudan black B (SBB) 染色に対しては陰性であった。eoG-2thはoG-2と同様に2層からなる成層構造

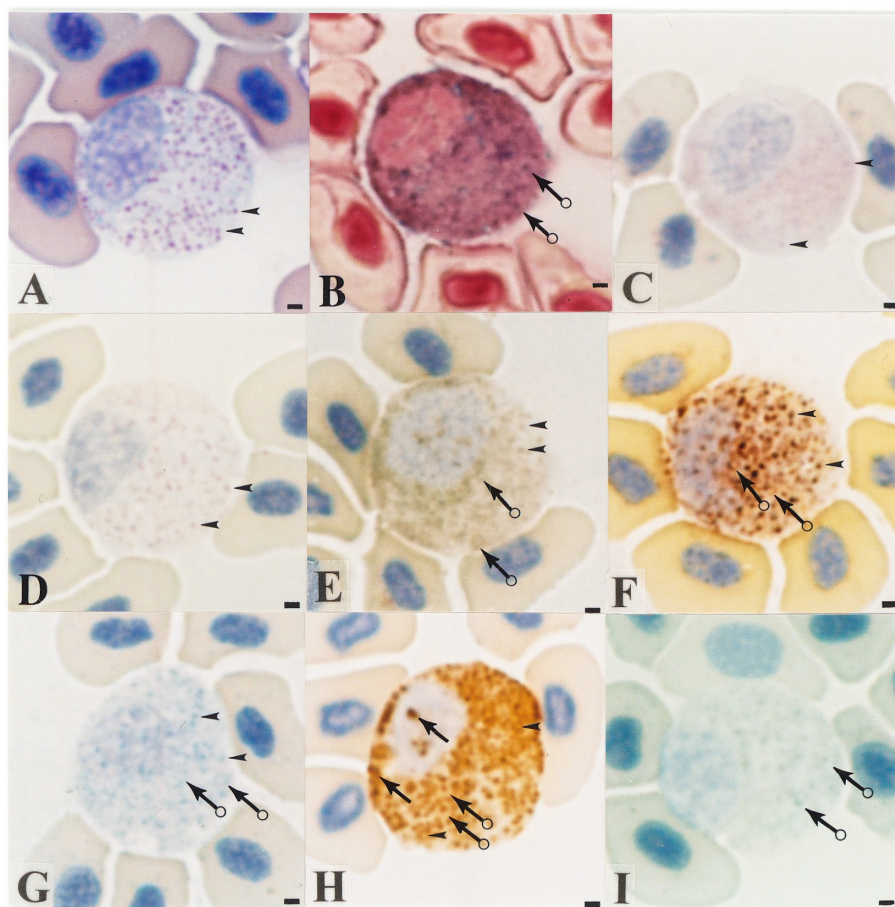


Fig. 1. Neutrophils from red seabream infected with *Vibrio harveyi*. A, May-Grünwald-Giemsa; B, alkaline phosphatase; C, acid phosphatase; D, β -glucuronidase; E, α -naphtyl acetate esterase; F, α -naphtyl butyrate esterase; G, naphthol AS-D chloroacetate esterase; H, peroxidase; I, Sudan black B. Arrows, eoG-1th; arrowheads, eoG-2th; ringed arrows, iGth. Bars=1 μ m.

Table 1. Summary of reactions of neutrophil from red seabream infected with *Vibrio harveyi* to cytochemical tests

Test ^{*1}	Type of granules and reaction ^{*3}					Other positive site (shape, number and size) ^{*4}
	eoG-1 ^{Vh}	eoG-2 ^{Vh}		iG ^{Vh}		
		L0	L1	L0	L1	
AIP	-	-	-	+	-	-
AcP	-	+	-	-	-	-
β-Glu	-	+ ↑	-	-	-	-
Esterases ^{*2}	-	+	-	-	+	-
				(SF: -)		
Peroxidase	+	-	+	+	-	-
		(SF: -)				
PAS	-	-	-	-	-	G (round or oval, a few) ^{*5} ; H
PAS-αA	-	-	-	-	-	-
AB (pH1.0)	-	-	-	-	-	-
AB (pH2.5)	-	-	-	-	-	-
TB	-	-	-	-	-	G (amorphous, a few, eq Yb); N
SBB	-	-	-	+	-	-
Oil red O	-	-	-	-	-	-
Sudan III	-	-	-	-	-	-

^{*1}AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; β-Glu, β-glucuronidase; PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS-α A, PAS after digestion with α-amylase; AB, alcian blue; TB, toluidine blue in distilled water; SBB, Sudan black B.

^{*2}Esterases: α-naphthyl acetate esterase, α-naphthyl butyrate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase.

^{*3}eoG-1^{Vh}, extraordinary granule type 1 observed after infection with *V. harveyi* (oai^{Vh}); eoG-2^{Vh}, extraordinary granule type 2 oai^{Vh} [consist of eosinophilic inner layer (L0) and chromophobic outer layer (L1)]; iG^{Vh}, inducible granule oai^{Vh} [consist of chromophobic inner layer 0 (L0) and chromophobic outer layer (L1)]; +, positive; -, negative (non-detection); ↑, increase of positive site; SF, spot formation.

^{*4}G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; Yb, Yasumoto body; eq, equivalent to.

^{*5}PAS-positive granule was accumulation of glycogen particles because the positive reaction of the granule disappeared after digestion with α-amylase.

Table 2. Comparison of neutrophil granules from red seabream

Staining ^{*1-3}	Origin of neutrophils, type of granules and reaction ^{*4}												
	Non-infected fish ^{*3}			Fish infected with:									
				Atypical <i>Edwardsiella tarda</i> ^{*b}					<i>Vibrio harveyi</i> ^{*c}				
	oG-1	oG-2		oG-1 ^{Et}	oG-2 ^{Et}		iG ^{Et}		eoG-1 ^{Vh}	eoG-2 ^{Vh}		iG ^{Vh}	
	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	
MGG	C	E	C	C	E	C	C	C	C	E	C	C	C
AIP	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
AcP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
β-Glu	-	+ ^{*5}	-	-	+ ^{*5}	-	-	-	-	+ ↑	-	-	-
Esterases	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
													(SF: -)
Peroxidase	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
		(SF: +)			(SF: +)					(SF: -)			
SBB	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
		(SF: -)			(SF: -)								

^{*1}MGG, May-Grünwald-Giemsa; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; β-Glu, β-glucuronidase; SBB, Sudan black B.

^{*2}Esterases: α-naphthyl acetate esterase, α-naphthyl butyrate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase.

^{*3}All types of granules showed negative reaction to other tests (periodic acid Schiff reaction, alcian blue (pH1.0, pH2.5), toluidine blue in distilled, oil red O, Sudan III).

^{*4}oG-1, ordinary granule type 1; oG-2, ordinary granule type 2; oG-1^{Et}, ordinary granule type 1 observed after infection with atypical *Edwardsiella tarda* (ai^{Et}); oG-2^{Et}, ordinary granule type 2 observed ai^{Et}; iG^{Et}, inducible granule induced ai^{Et}; eoG-1^{Vh}, extraordinary granule type 1 observed after infection with *Vibrio harveyi* (ai^{Vh}); eoG-2^{Vh}, extraordinary granule type 2 observed ai^{Vh}; iG^{Vh}, inducible granule induced ai^{Vh}; L0, layer zero; L1, layer 1; C, chromophobic; E, eosinophilic; +, positive; -, negative (non-detection); ↑, increase of positive site; SF, spot formation.

^{*5}A few of L0 were positive.

^{*a}Kondo et al. (2017)²; ^{*b}Kondo et al. (2017)⁷; ^{*c}present report.

を有しており [エオシン好性のL0とその周囲の難染色性層 (L1)] (Fig. 1A), 各種リゾソーム酵素がL0に検出されたが (Figs. 1C-1G), β -グルクロニダーゼ陽性のL0はoG-2よりも多かった (Fig. 1D)。また, POがeoG-2^{fn}のL1に検出されたが (Fig. 1H), oG-2のPO染色標本で観察される '斑' はeoG-2^{fn}では形成されなかった。さらに, oG-2のL1が陽性を示すSBB染色には, eoG-2^{fn}は陰性であった。iG^{fn}はともに難染色性のL0とL1から構成され, L0にはPOとAIPが検出された (Figs. 1B & 1H)。また, L1には各種エステラーゼ活性が認められ (Figs. 1E-1G), L0はSBB陽性であった (Fig. 1I)。eoG-1^{fn}, eoG-2^{fn}およびiG^{fn}のいずれにおいても核染色に用いたヘマトキシリン染色 (Mayerの処方) による陽性反応像は観察されなかった。

本研究の結果, *V. harveyi*に感染したマダイの好中球には2種類の異常型顆粒 (eoG-1^{fn}, eoG-2^{fn}) と誘導型顆粒 (iG^{fn}) が存在することが明らかとなった。マダイのエドワジエラ症の原因菌である非定型*Edwardsiella tarda* (= *E. anguillarum*)⁹⁾に感染したマダイにおいても好中球顆粒は3種類観察されている⁷⁾。しかし, そのうち2種類の顆粒 (oG-1^{Et}, oG-2^{Et}) は健常魚のoG-1およびoG-2と同様の特徴を示す正常型顆粒である (Table 2)⁷⁾。また, 誘導型顆粒 (iG^{Et}) はiG^{fn}と同様に成層構造を有する難染色性顆粒であり, ともにL0にAIP活性が検出されるが, iG^{fn}のL0がPOおよびSBBに陽性であるのに対して, iG^{Et}はどちらも陰性である (Table 2)⁷⁾。さらに, iG^{fn}のL1には3種類のエステラーゼ活性が認められたが, iG^{Et}にはこれらの酵素活性は検出されていない (Table 2)⁷⁾。これらの違いが感染に用いた細菌種の何に起因するのかは明らかではないが, *Edwardsiella*属細菌と*Vibrio*属細菌はともにグラム陰性細菌であることから, 少なくともグラム陰性細菌による感染によって, AIP陽性の誘導型顆粒が出現すると推察される。

謝 辞

菌株の同定を行っていただいた水産大学校食品科学科准教授 古下 学博士に感謝いたします。

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) 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)]
- 4) 近藤昌和, 安本信哉: 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. 水大校研報, **67**, 167-169 (2019) [Kondo M, Yasumoto S: Neutrophil granules of red seabream *Pagrus major* infected with *Clavellotis dilatata*. *J Nat Fish Univ*, **67**, 167-169 (2019) (in Japanese with English abstract)]
- 5) 近藤昌和, 安本信哉: タイノエに寄生されたマダイの第3の好中球: 症例報告. 水大校研報, **67**, 223-229 (2019) [Kondo M, Yasumoto S: Third neutrophil type in red seabream *Pagrus major* infected with *Ceratothoa verrucosa*: A case report. *J Nat Fish Univ*, **67**, 223-229 (2019) (in Japanese with English abstract)]
- 6) 近藤昌和, 安本信哉: ラメロジスカス症に罹患したマダイの好中球顆粒. 水大校研報, **67**, 269-272 (2019) [Kondo M, Yasumoto S: Neutrophil granules of red seabream *Pagrus major* infected with lamellogiscosis. *J Nat Fish Univ*, **67**, 269-272 (2019) (in Japanese with English abstract)]
- 7) 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)
- 8) 石丸克也, 中井敏博: ビブリオ病. 魚病研究, **52**, 120-125 (2017) [Ishimaru K, Nakai T: Vibriosis of fish and shellfish in Japan. *Fish Pathol*, **52**, 120-125 (2017) (in Japanese with English abstract)]
- 9) 飯田貴次, 坂井貴光, 高野倫一: エドワジエラ症. 魚病研究, **51**, 87-91 (2016) [Iida T, Sakai T, Takano T: Edwardsiellosis in fish. *Fish Pathol*, **51**, 87-91 (2016) (in Japanese with English abstract)]