

滑走細菌 *Tenacibaculum maritimum* に感染させた マダイの好中球顆粒

近藤昌和[†], 渡邊里帆, 橋本啓人, 木村雄大, 安本信哉

Neutrophil Granules of Red Seabream *Pagrus major* Infected with Gliding Bacterium *Tenacibaculum maritimum*

Masakazu Kondo[†], Riho Watanabe, Keito Tachibanagi,
Takehiro Kimura 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 *Tenacibaculum maritimum*. Both extraordinary granule types (eoG1[™], eoG2[™]) had similar morphologies but different cytochemical characteristics to those of ordinary granules (oG1^N, oG2^N) from non-infected fish. The eoG1[™] showed chromophobic, simple morphology (without stratified structure), peroxidase positive and lack of lysosomal enzymes. The eoG2[™] was stratified granule with three-layer structure [inner eosinophilic layer (L0-0), middle chromophobic layer (L0-1) and outer chromophobic layer (L1)]. Acid phosphatase, β -glucuronidase (β -Glu), α -naphthyl acetate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase were detected in L0-0, but α -naphthyl butylate esterase was in L0 (L0-0 and L0-1). Peroxidase (PO) were localized in L1. Both extraordinary types were Sudan black B (SBB) negative. Spot formation, a curious phenomenon appeared in PO-stained oG2^N (positive L1 and negative L0), was not observed in eoG2[™]. Inducible granule (iG[™]) was consisted of two chromophobic layers (inner L0 and outer L1). The L0 of iG[™] showed positive reaction to PO.

Key words : granule, neutrophil, red seabream, *Pagrus major*, tenacibaculosis, *Tenacibaculum maritimum*

緒言

健全なマダイ *Pagrus major* の好中球には2種類の通常型顆粒 (ordinary granule, oG; 1型, oG1^N; 2型, oG2^N) が存在するが^{1,2)}, 細菌感染によってそれら顆粒の細胞化学的特徴が変化することがある [この場合の顆粒を異常型顆粒 extraordinary granule (eoG) と呼ぶ]³⁾。また, 健全魚の好中球には観察されない顆粒 (誘導型顆粒 inducible granule, iG) が出現する^{3,4)}。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 (oG1^{Eu} と oG2^{Eu}) 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^{Eu}) が観察される⁴⁾。一方, ビブリオ病の原因細菌の一種である *Vibrio harveyi* に感染させたマダイ

の好中球には2種類の異常型顆粒 (eoG1[™] と eoG2[™]) の他に, AIP とペルオキシダーゼ (PO) が陽性かつズダン黒B (SBB) 陽性の誘導型顆粒 (iG[™]) が認められる³⁾。

Tenacibaculum maritimum はグラム陰性の長桿菌であり, マダイの滑走細菌症の原因菌である。本菌はマダイの皮膚や鰭に感染して発赤や糜爛を引き起こす⁵⁻⁷⁾。本研究ではマダイに *T. maritimum* (以後, 滑走細菌と称す) 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。

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。滑走細菌には種苗生産場で沖出し後に滑走細菌症を発症したマダイ稚魚から2018年2月に分離した株 (TMK株) を使用した。本菌

株は海水サイトファーガ寒天培地⁷⁸⁾[70%海水1 L, エルリッヒ肉エキス(極東製薬工業) 0.2 g, トリプトン(ナカライテスク) 0.5 g, 乾燥酵母エキス(ナカライテスク) 0.5 g, 酢酸ナトリウム(無水; 和光純薬工業) 0.2 g, 寒天(和光純薬工業) 10 g] で分離・株化後, 海水サイトファーガ液体培地で25°C, 48時間培養し, 滅菌グリセリンと混合して(菌液: 滅菌グリセリン=8:2) 冷凍保存した(-80°C)。実験には培地中の寒天量を10 g⁸⁾ から15 gに増量した海水サイトファーガ寒天培地を用いた。滑走細菌を本培地で25°C, 48時間培養後, 滅菌海水中に懸濁した。懸濁液の菌濃度は1回目の試験では 1×10^9 cfu/ml, 2回目では 2.5×10^8 cfu/mlとした*。浸漬感染時にはこれらの懸濁液を海水で100倍希釈した。

1回目の試験では秋に生産された種苗を育成した当歳魚(平均体重30.7 g, 最小23.9 g, 最大37.1 g) 20尾を2群(①群と②群)に分け, 滑走細菌を懸濁した海水(1×10^7 cfu/ml) 2 L中で25°C, 30分間浸漬した(10尾/2 L)。浸漬感染後, 各群をそれぞれ60 cmガラス製水槽(水量45 L)に收容して25°Cで飼育した。飼育期間中は市販の配合飼料(マリン3号, 林兼産業)を飽食給餌した。感染5日後に①群を收容した水槽から生残魚を2尾取り上げ実験に供した。採材時まで①群を收容した水槽では2尾死亡し(死亡率20%), ②群では5尾死亡した(死亡率50%)。2回目の試験には春に生産された種苗を育成した当歳魚(平均体重66.0 g, 最小54.7 g, 最大79.1 g) 20尾を使用した。滑走細菌懸濁液(2.5×10^6 cfu/ml) 4 Lに20尾を入れ, 25°Cで30分間浸漬感染した。浸漬後, 60 cmガラス製水槽2基に10尾ずつ收容し(①群と②群), 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。感染2日後までに①群は全滅したが, ②群では感染3日後までに7尾が死亡した。感染4日後にこの水槽から生残魚3尾を取り上げて実験に供した(②群の死亡率は70%)。採材時の感染魚の体重は, 1回目の試験では36.7 gと31.4 g, 2回目の試験では62.5 g, 61.8 gおよび65.8 gであった。いずれの供試魚においても体表の表皮に糜爛と発赤が認められた。

供試魚をキナルジンで麻酔し(20 ppm, 1分間), 尾部血管から採血した。血液塗抹標本の作製し, 前報¹⁴⁾と同様にMay-Grünwald-Giemsa (MGG) 染色, 酵素染色, 多糖類染色および脂質染色を施して光学顕微鏡で観察した。

結果および考察

本研究で行った2回の感染試験では, 2回目の方が魚体は大きく, 感染時の菌濃度が低いにもかかわらず, 死亡率は1回目よりも高かった。この原因として, 試験魚のロットの違いが考えられる。しかしながら, 滑走細菌に感染させたいずれのマダイ(以後, 感染魚と称す)の血液にも大型の好中球が多数観察された。いずれの好中球にも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)。これらのうち1種類のMGG染色性は健常魚のoG1^N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(eoG1^m)。また, 健常魚のoG2^Nと同様にエオシン好性の芯様構造を有する顆粒が観察されたが(Fig. 1A), エオシン陽性部位がoG2^Nとは異なり, 細胞化学染色性も健常魚とは異なることから異常型顆粒であると判断した(eoG2^m)。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(iG^m)。

eoG1^mは, oG1^N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. E), 各種リソゾーム酵素は検出

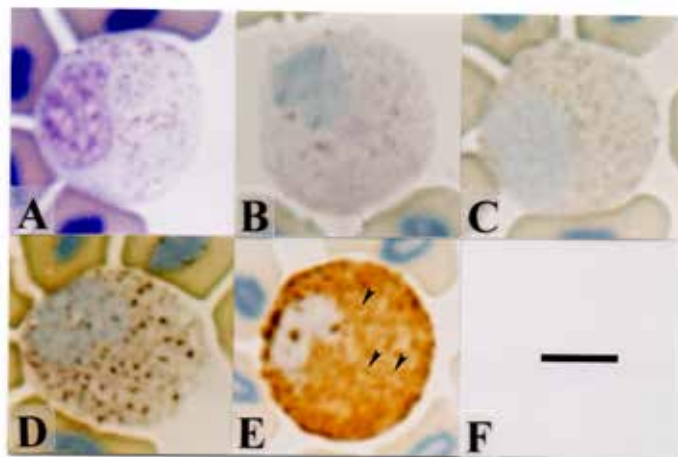


Fig. 1. Neutrophils from red seabream infected with *Tenacibaculum maritimum*. A, May-Grünwald-Giemsa [Note eosinophilic particles (L0-0 of eoG2^m); B, acid phosphatase; C, α -naphthyl acetate esterase; D, α -naphthyl butyrate esterase; E, peroxidase [poitive reaction was detected in eoG1^m, L1 of eoG2^m and L0 of iG^m (arrowheads)]; F, scale bar (5 μ m) which is adapted to all figures (A-E) in Fig. 1. Note small positive particles (L0-0 of eoG2^m) in B & C and larger in D [L0 (L0-0 + L0-1) of eoG2^m]. Counter stain in B-E, hematoxylin (Mayer).

*滑走細菌懸濁液の600 nmにおける吸光度(光路長1 cm)が1の場合, 滑走細菌の濃度は 1.1×10^9 cfu/mlであった。この値は培養24時間後でも同じであった。

されなかった。しかし、oG1^Nが陽性反応を示すSBB染色に対しては陰性であった。eoG2Tmはエオシン好性の内層、難染色性の中層および難染色性の外層から構成されていた。健康魚のoG2^Nはエオシン好性のL0とその周囲の難染色性層(L1)から構成されているが、eoG2Tmの内層はoG2^NのL0よりも小型であった。eoG2Tmの内層にはoG2^NのL0と同様に各種リゾソーム酵素が検出され(Figs. 1B-1D)、β-グルクロニダーゼ(Glu)陽性の内層の数は、oG2^NのGlu陽性L0よりも多かった。各種リゾソーム酵素のうち、α-ナフチルプテレートエステラーゼ(NBE)は中層にも検出され、内層と中層を合わせた陽性部位の大きさはoG2^NのL0(NBE陽性)のそれと同程度であった(Fig. 1D)。また、POがeoG2Tmの外層に検出されたが(Fig. 1E)、oG2^NのPO染色標本で観察される‘斑’はeoG2Tmでは形成されなかった。これらの観察結果から、eoG2Tmの外層はoG2^NのL1に、内層と中層を合わせた領域がL0に相当すると考えられる。以後、内層をL0-0、中層をL0-1、外層をL1と呼ぶこととする。なお、oG2^NのL1が陽性を示すSBB染色には、eoG2Tmは陰性であった。iGTmはともに難染

色のL0とL1から構成され、L0にはPOが検出された(Fig. 1E)。しかし、AIPや各種リゾソーム活性は認められず、SBB陰性であった。eoG1Tm、eoG2TmおよびiGTm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、滑走細菌に感染したマダイの好中球には2種類の異常型顆粒(eoG1Tm, eoG2Tm)と誘導型顆粒(iGTm)が存在することが明らかとなった。*Edwardsiella anguillarum*および*V. harveyi*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(Table 2)^{3,4}。しかし、*E. anguillarum*感染魚では3種類の顆粒のうち2種類は健康魚のoG1^NおよびoG2^Nと同じ特徴を示す正常型顆粒(oG1^{En}, oG2^{En})である⁴。また、誘導型顆粒(iG^{En})は難染色性の2層からなる成層顆粒であり、AIP活性がL0に検出されている。一方、*V. harveyi*感染魚では2種類の異常型顆粒(eoG1Th, eoG2Th)と誘導型顆粒(iGTh)が認められ、eoG1ThのL0はoG1^NやoG1^{En}とは異なりSBB陰性である³。eoG2ThのPO染色標本には斑が観察されず、L1はSBB陰性である。また、iGThのL0はAIP、POおよびSBB陽性であり、L1には各種エステラー

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

Test ^{*1}	Type of granules and reaction ^{*2}					Other positive site (shape, number and size) ^{*3}
	eoG1 Tm	eoG2 Tm		iG Tm		
		L0	L1	L0	L1	
MGG	C	E+C	C	C	C	
AIP	—	—	—	—	—	—
AcP	—	+ ^{*4}	—	—	—	—
Glu	—	+ ^{*4}	—	—	—	—
NAE	—	+ ^{*4}	—	—	—	—
NBE	—	+	—	—	—	—
CAE	—	+ ^{*4}	—	—	—	—
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; Glu, β-glucuronidase; NAE, α-naphthyl acetate esterase; NBE, α-naphthyl butyrate esterase; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS-αA, PAS after digestion with α-amylase; AB, alcian blue; TB, toluidine blue in distilled water; SBB, Sudan black B.

^{*2}eoG1Tm, extraordinary granule type 1 observed after infection with *T. maritimum* (oaiTm); eoG2Tm, extraordinary granule type 2 oaiTm [consist of eosinophilic inner layer (L0-0), chromophobic middle layer (L0-1) and chromophobic outer layer (L1)]; iGTm, inducible granule oaiTm [consist of chromophobic inner layer (L0) and chromophobic outer layer (L1)]; +, positive; —, negative (non-detection); SF, spot formation.

^{*3}G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; Yb, Yasumoto body; eq, equivalent to.

^{*4}Activity was limited in the small central area of L0 (L0-0).

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

ぜが検出されている³⁾。滑走細菌に感染したマダイの eoG1TmはeoG1^{1h}と同様にSBB陰性であった。また, eoG2TmもeoG2^{1h}と同様にSBB陰性であり, POがL1に認められ (PO染色標本上に斑は形成されない), 各種リソゾーム酵素も検出された。しかし, それらの酵素活性はNBEを除いてL0-0に局在していた (eoG2^{1h}ではL0)。iGTmにはiG^{1h}と同様にPOがL0に認められたが, iG^{Ea}とiG^{1h}で検出されるAIPは検出されなかった。また, iG^{1h}のL0がSBB陽性, L1が各種エステラーゼ陽性なのに対して, iGTmにはこれらの陽性反応は見られなかった (Table 2)。前報において, *E. anguillarum*と *V. harveyi*はともにグラム陰性菌であることから, グラム陰性菌の感染によってAIP陽性のiGが出現するのではないかと推察した³⁾。滑走細菌もグラム陰性菌であるが, iG (iGTm) はAIP陰性であったことから, 前報の推察は正しくないと言える。しかし, 滑走細菌の感染・増殖部位は体表であるのに対して^{5,7)}, *V. harveyi*を用いた試験では腹腔接種している³⁾。また, *E. anguillarum*の感染は浸漬法で行ったが⁴⁾, 体表における本菌の増殖は知られていない。したがって, iGの特徴は感染・増殖部位の違いによって異なるのかもしれない。

滑走細菌感染魚のeoG2TmではL0-0がエオシン好性であ

り, L0-1とL1は難染色性であった。また, NBEはL0 (L0-0とL0-1) に, 他のライソゾーム酵素はL0-0に局在した。これまでもタイノエが寄生したマダイなどで各種リソゾーム活性がL0-0に局在することが知られているが [例えば近藤・安本 (2021)⁹⁾], エオシン好性領域がL0-0のみに限定されることはなかった (L0-0とL0-1がエオシン好性)。この現象の説明には, 滑走細菌感染によって好中球内で産生され, eoG2Tmに蓄積される新たな因子を導入する必要がある。また, この因子 (Tm因子とする) を用いた説明には2通り考えられる。すなわち, L0-0のエオシン好性物質 (E因子) とL0-1のE因子が同じものであるのか否かによって説明が異なる。説明①: L0-0とL0-1のE因子が同じである場合, Tm因子はeoG2Tm内でE因子およびNBE以外のライソゾーム酵素と反応してこれら存在部位をL0全体からL0-0に変化させる。説明②: L0-0とL0-1のE因子が異なる場合, 滑走細菌感染によって, L0-1のE因子が産生されず, Tm因子はeoG2Tm内でNBE以外のライソゾーム酵素と反応してこれら存在部位をL0全体からL0-0に変化させる。Tm因子がL0-1にあることは間違いないと思われるが, Tm因子がPOと反応しないのであればL1にも存在するであろう。

病原微生物に感染した時に出現する好中球は, その原因

Table 2. Comparison of neutrophil granules from red seabream infected with pathogenic bacteria

Staining ^{*1,*2}	Origin of neutrophils, type of granules and reaction ^{*3}																			
	Non-infected fish ^{*a}			Fish infected with:																
				<i>Edwardsiella anguillarum</i> ^{*b}						<i>Vibrio harveyi</i> ^{*c}						<i>Tenacibaculum maritimum</i> ^{*d}				
	oG1 ^N	oG2 ^N		oG		oG2 ^{Ea}		iG ^{Ea}		eoG		eoG2 ^{1h}		iG ^{1h}		eoG		eoG2 Tm		iG Tm
	L0	L1	1 ^{Ea}	L0	L1	L0	L1	1 ^{1h}	L0	L1	L0	L1	1 Tm	L0	L1	L0	L1			
MGG	C	E	C	C	E	C	C	C	C	E	C	C	C	C	C	C	E+C	C	C	C
AIP	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
AcP	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Glu	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	↑	-	-	-	-	-	+	↑	-	-
NAE	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
NBE	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
CAE	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
PO	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
SBB	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

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

^{*3}oG1^N, ordinary granule type 1; oG2^N, ordinary granule type 2; oG1^{Ea}, ordinary granule type 1 observed after infection with atypical *Edwardsiella anguillarum* (aiEa); oG2^{Ea}, ordinary granule type 2 observed aiEa; iG^{Ea}, inducible granule induced aiEa; eoG1^{1h}, extraordinary granule type 1 observed after infection with *Vibrio harveyi* (ai1h); eoG2^{1h}, extraordinary granule type 2 observed ai1h; iG^{1h}, inducible granule induced ai1h; eoG1Tm, extraordinary granule type 1 observed after infection with *Tenacibaculum maritimum* (aiTm); eoG2Tm, extraordinary granule type 2 observed aiTm; iGTm, inducible granule induced aiTm; L0, layer zero; 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.

^{*5}Activity was limited in the small central area of L0 (L0-0).

^{*a}Kondo et al. (2017)³⁾; ^{*b}Kondo et al. (2017)⁷⁾; ^{*c}Kondo et al. (2020)⁷⁾; ^{*d}present report.

微生物の排除に効果的に働くと考えられる。今後、この点について検討していきたい。

謝 辞

菌種の同定に協力し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, 原田宗幸, 安本信哉: *Vibrio harveyi*に感染させたマダイの好中球顆粒. 水大校研報, **68**, 79-82 (2020) [Kondo M, Harada M, Yasumoto S: Neutrophil granules of red seabream *Pagrus major* infected with *Vibrio harveyi*. *J Nat Fish Univ*, **68**, 79-82 (2020) (in Japanese with English abstract)]
- 4) 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)
- 5) 畑井喜司雄: 滑走細菌症. 畑井喜司雄, 小川和夫 (監), 新魚病図鑑 (第2版). 緑書房, 東京, 176 (2011) [Hatai K: Gliding bacterial disease. In: Hatai K, Ogawa K (ed) New Atlas of Fish Diseases (2nd edition). Midori Shobo, Tokyo, 176 (2011) (in Japanese)]
- 6) 高橋幸則: 海産魚の細菌感染症と診断法. 青木 宙 (編), 魚介類の微生物感染症の治療と予防. 恒星社厚生閣, 東京, 29-61 (2013) [Takahashi Y: Kaisangyo no saikinkansenshou no chiryou to yobou (Diagnosis and bacterial infection in marine fish). In: Aoki T (ed) Diagnosis, Treatment and Prevention of Pathogenic Microorganisms of Fish and Shellfish. Koseishakoseikaku, Tokyo, 1-29 (1974) (in Japanese)]
- 7) 若林久嗣: タイ類, プリ, ヒラメの滑走細菌症. 江草周三 (編), 改訂増補 魚病学 [感染症・寄生虫病篇]. 恒星社厚生閣, 東京, 129-131 (1988) [Wakabayashi H: Tairui, buri, hirame no kassousaikinshou (Gliding bacterial disease in seabream, yellowtail and Japanese flounder). In: Egusa S (ed) Kaiteizouho Gyobyougaku [kansenshou・kiseichuubyou hen] (Fish Disease (Infection and Parasitic disease), revised and expanded edition). Koseishakoseikaku, Tokyo, 129-131 (1988) (in Japanese)]
- 8) 若林久嗣: カラムナリス病. 江草周三 (編), 改訂増補 魚病学 [感染症・寄生虫病篇]. 恒星社厚生閣, 東京, 122-128 (1988) [Wakabayashi H: Karamunarusubyou (Columnaris disease). In: Egusa S (ed) Kaiteizouho Gyobyougaku [kansenshou・kiseichuubyou hen] (Fish Disease (Infection and Parasitic disease), revised and expanded edition). Koseishakoseikaku, Tokyo, 122-128 (1988) (in Japanese)]
- 9) 近藤昌和, 安本信哉: タイノエに寄生されたマダイにおける新たな2種類の好中球: 症例報告 水大校研報, **69**, 59-64 (2021) [Kondo M, Yasumoto S: New two neutrophil types in red seabream *Pagrus major* infested with *Ceratomyxa verrucosa*: A case report *J Nat Fish Univ*, **69**, 59-64 (2021) (in Japanese with English abstract)]