

タイノエに寄生されたマダイの第3の好中球: 症例報告

近藤昌和[†], 安本信哉

Third Neutrophil Type in Red Seabream *Pagrus major* Infected with *Ceratothoa verrucosa*: A Case Report

Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract : We report that the morphology and cytochemistry of neutrophils from a red seabream *Pagrus major* infected with numerous *Ceratothoa verrucosa* (Cv). First, the host was artificially infected with two Cv (adults; usual parasitism), however, finally with 34 Cv (26 Cv were located in gill cavity) except for adults (super-unusual parasitism). By observation of blood smear from the host, we noticed the appearance of new type of neutrophil 'third type; neutrophil-3rd'. The neutrophil-3rd 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-3rd extraordinary chromophobic granules (type 1, eoβG-1^{Cv3rd}; type 2, eoβG-2^{Cv3rd}). The eoβG-1^{Cv3rd} showed chromophobic, simple morphology (without stratified structure), peroxidase positive and lack of lysosomal enzymes. On the other hand, the eoβG-2^{Cv3rd} was stratified granule with two-layer structure [inner eosinophilic layer (L0) and outer chromophobic layer (L1)]. Lysosomal enzymes (acid phosphatase, β-glucuronidase and esterases) and peroxidase (PO) were localized in L0 and L1, respectively. However, the lysosomal enzymes were limited in the small central area of L0. Therefore, L0 was interpreted as two-layer structure: L0-0 (inner part in L0) and L0-1 (outer part in L0). Spot formation, a curious phenomenon appeared in PO-stained oβG-2 (positive L1 and negative L0), was also observed in eoβG-2^{Cv3rd}. Both types of extraordinary granules showed negative reaction to Sudan black B, oil red O and Sudan III, however, entire L0 of eoβG-2^{Cv3rd} was stained blue with hematoxylin for counter stain in these preparations.

Key words : Cymothoidae, *Ceratothoa verrucosa*, red seabream, *Pagrus major*, neutrophil, morphology

緒言

タイノエ *Ceratothoa verrucosa* が口腔に1または2個体寄生しているマダイ *Pagrus major* (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含む; 以後, 通常寄生魚と称す) では, 未寄生魚とは異なる特徴を有する好中球 (第1種好中球) が血液中出现し¹⁾, この好中球は造血組織である頭腎で産生される²⁾。また, 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には, 通常寄生魚とは異なる好中球 (第2種好中球) が認められることを報告した³⁾。第2種好中球が観察される寄生魚では通常寄生魚よりも多くのタイノエが寄生するが, 寄生は口腔に限定されていた。この

寄生魚を異常寄生魚と呼ぶこととする。異常寄生魚から遊出したマンカ幼生を用いて, 未寄生魚に人為寄生させたところ, 1尾のマダイの口腔に2個体のタイノエが寄生した。この人為寄生魚はその後, 当初からのタイノエ2個体の他に34個体のタイノエが寄生することとなり, それら34個体のうち, 26個体は口蓋内面や鰓葉上などを含む鰓腔に寄生していた。この異常なタイノエの寄生が起こった寄生魚 (超異常寄生魚) の好中球を調べたところ, 第1種および第2種好中球とは異なる特徴が認められたので, 第3種好中球としてここに報告する。

材料および方法

前報³⁾に用いた3尾の異常寄生魚のうち、宿主No. 2 (下記のA-2) からマンカ幼生が遊出した。この幼生を用いた人為寄生によって、タイノエが2個体寄生したマダイが1尾得られ、最終的に超異常寄生魚となり、本研究に用いられた。前報³⁾と一部重複するが、超異常寄生魚が得られた経緯を以下に述べる。

近藤ら (2018b)³⁾ の異常寄生魚におけるタイノエの寄生状況

近藤ら (2018a)²⁾ の採材時 (2017年6月) にタイノエが2個体寄生するマダイ3尾はその後円形ポリプロピレン製水槽内で20℃で飼育されていたが、2017年7月6日から水温を1℃ずつ上昇させて25℃で飼育したところ、7月17日にマンカ幼生の遊出が認められた (幼生の採材はしなかった)。その後も25℃で飼育を継続したが、いずれも異常寄生魚となり、近藤ら (2018b)³⁾ の研究に使用された。これら3尾については近藤ら (2018b)³⁾ の報告内で用いられている個体番号 [No. 1 (体重530 g), No. 2 (体重860 g), No. 3 (体重780 g); 体重はそれぞれの最初の採血時の値] の前にAを付けて宿主番号とする (宿主番号: A-1, A-2, A-3)。2017年9月下旬の最初の採血時に (宿主A-1はこの時解剖され、タイノエが宿主に寄生した状態でDavidson液⁴⁾ で固定された。10日間固定したのち、70%エタノールに置換した)、宿主A-1には大型と中型の個体のほかに、小型個体が12個体寄生していた。また、宿主A-2とA-3にはともに大型個体、中型個体および3個体の小型個体が最初の採血時に寄生していたが、A-3では最初の採血の翌日に大型個体が水槽の底に脱落していた (死亡していたが、回収して70%エタノールで固定した)。いずれの宿主においても大型個体は口蓋に寄生していたが、中型個体は宿主A-1では大型個体の右に接して、宿主A-2とA-3では中型個体は大型個体の左に接して、それぞれ宿主の左および右口腔壁 (側壁) に寄生していた。最初の採血から14日後の2回目の採血時にはA-2およびA-3から小型個体がそれぞれ1個体いなくなっていた (脱落したと考えられる)。30日後の採血時 (3回目) の朝に宿主A-2は死亡しており、大型個体、中型個体および2個体の小型個体を回収し (これらのタイ

ノエはいずれも生きていた)、70%エタノールで固定した。また、同時に宿主A-2を収容していた水槽内にはマンカ幼生が遊出していたので、一部 (40個体) を70%エタノールで固定した。宿主A-3は3回目の採血後直ちに解剖され、中型個体と小型個体2個体が回収された (70%エタノールで固定)。宿主A-1, A-2およびA-3の大型個体をそれぞれA-1a, A-2a, A-3aとし、中型個体をA-1b, A-2bおよびA-3bと表記する。また、宿主A-1からの小型個体はA-1c ~ A-1n, A-2およびA-3からの小型個体はA-2cとA-2dおよびA-3cとA-3dとする。

宿主A-1からの小型個体12個体の寄生部位は以下の通りであった: A-1c, 大型個体の前方で口蓋に腹面を向けて寄生し、背面は上顎の口腔弁が覆う; A-1d, 上顎の口腔弁腹側の面に腹面を向けて寄生; A-1e, 左口腔壁に寄生; A-1f, 舌上に寄生; A-1g, 下顎口唇左の内側に寄生; A-1h, 下顎口腔弁上 (左側) に寄生; A-1i, 下顎口腔弁上 (中央) に寄生; A-1j, 右口腔壁に寄生; A-1k, 右口腔壁に寄生 (A-1jよりも腹側); A-1l, 舌の右側面に寄生; A-1m, 下顎口腔弁上 (右側) に寄生; A-1n, 下顎口唇右上に寄生。また、A-2cとA-2dはともに舌上に、A-3cとA-3dはともに右口腔壁に寄生していた。

タイノエに人為寄生させたマダイにおけるタイノエの超異常寄生

近藤ら (2018b)³⁾ の宿主No. 2 (本報告ではA-2) は最終採材日に死亡していたが、水槽内にはマンカ幼生が遊出していたので、この多くを遊出当日 (2017年10月22日) に、未寄生魚81尾 (体重約20 g)*が飼育されていた屋外水槽 (回流式FRP水槽; 水槽の内壁面は青色に塗装されている) に投入した (投入された幼生数は不明)。回流水槽の上面直線部分は遮光ネットで覆われていたが、多くの幼生が投入直後から遮光ネットに覆われていない (太陽光が照らす) 箇所的水槽壁を登り始め、乾燥して死亡した。同年11月6日に全尾をキナルジンで麻酔して、タイノエの寄生状況を調べたところ (水温19.2℃), 81尾中2尾にタイノエの寄生が認められたが (10月22日から11月6日の間にマダイの斃死はなかった)、タイノエが2個体寄生するマダイは1尾であった (体重26 g (タイノエが寄生した状態), 全長12.1 cm)。この寄生魚では、タイノエの大きさに差が認められた (大

*この81尾は2017年8月30日以降に響灘沿岸で釣獲し、水産大学の屋外水槽に搬入後育成していた個体であり、タイノエが寄生していないことを確認済み。なお、マンカ幼生投入時までに82尾釣獲したが (10月31日までに釣獲したマダイは100尾に達したが)、タイノエの寄生は僅か1尾にしか認められなかった (8月30日釣獲; タイノエ2個体寄生; 釣獲時の体重は11 g, 全長は8.7 cm)。

型個体と中型個体)。大型個体は口蓋に腹面を向け、宿主と同じ方向を向いていた。中型個体は大型個体の左側面に接して宿主の右口腔壁に位置し、大型個体と同じ方向を向いていたが体の前端は大型個体よりも少し後ろにあった。この寄生魚を以後、人為寄生魚と呼び(宿主B-1)、そのタイノエをB-1a(大型個体)とB-1b(中型個体)とする。宿主B-1を屋内のガラス製水槽(55 L容; 水量45 L)に搬入し、23°Cで飼育した。飼育期間中はマリン3号(林兼産業)を適宜給餌した。宿主B-1は2018年3月5日に口が常時開放状態になり、同年4月20日には右眼球が、4月26日には左眼球が突出するとともに(眼球内には気泡が生じていた)、寄生魚は水平を保てなくなり、斜め下方を向いて遊泳するか、あるいは前方を水面に浮上させる行動をとるようになった(この行動により、後述する5月5日のマンカ幼生の産出が確認可能となった)。これは、突出した眼球内の気泡によって、浮力が体前方において増したためと思われる。この行動は採材日(5月24日)まで続いた。口が開放状態になってからは、摂餌時には頭を下にして(時に逆立ち状態になり)水槽の底に落下した餌に口を押し付けるようにして吸い込んだ。5月5日10:00に、マンカ幼生が宿主B-1の口腔の内壁面に6個体寄生しているのが開放状態の口越しに観察された(この6個体が本当にマンカ幼生であることの確認はしていないが、ここではマンカ幼生とする)。宿主B-1の口腔の左側には3個体、すなわち、上顎の口腔弁上に1個体(個体B-1c)、口腔壁の腹側の舌中央に近い位置に1個体(個体B-1d)、舌と口床(本報告では、口腔の腹側を口床とする。口床の大部分を舌が占めるが、舌が覆わない口床の領域を口床と定義する)が形成する溝上(口床上)に1個体観察された(個体B-1e; この個体の位置は、個体B-1dよりも口唇に近い)。宿主の口腔右側では、口腔壁中央の口唇に近い場所において、宿主の背腹方向に3個体が横列に並び寄生していた(宿主の背側から個体B-1f、B-1gおよびB-1hとする)。これら6個体はいずれも宿主と同じ方向を向いていた。

5月15日に宿主B-1の突出した右眼球の背面に幼体(マンカ幼生に比べて体高が高く見えることから、幼体と呼ぶこととする)が観察され、採材日までほぼ同じ場所に留まっていた(付着位置が眼球背面を多少前後することはあったが、幼体の向きは宿主と同じであった)。同時に上述の個体B-1cが見られなくなり、水槽内にも観察されなかったことから、眼球上の個体は個体B-1cが移動したものと推察された。5月23日10:00に、水槽の底に複数個の微小な脱皮殻

とともに微小な個体が1個体脱落して斃死しており、個体B-1eが寄生部位に認められなくなった(脱落した個体は個体B-1eであると判断した)。脱落した個体を70%エタノールで固定した。翌24日8:30には微小な脱皮殻とともに幼体が1個体脱落し斃死していた(70%エタノールで固定した)。口腔の幼体の数に変化は認められなかったことから、この脱落した幼体は口腔に寄生していた個体ではないと考えられ、個体B-1iと呼ぶこととする。個体B-1iが口腔以外の場所に寄生していたと推察されることから、同日10:00に宿主B-1を取り上げてキナルジンで麻酔後採血して塗抹標本作製し各種染色を施した。採材時の宿主B-1の体重は37 g、尾又長12.9 cm(全長14.2 cm)であった。なお、マンカ幼生(あるいは生きている幼体)の飼育水中への遊出ならびに脱落は採材時まで確認されなかった。採血後、口腔、鰓蓋ついで鰓の順に観察を行ったところ、幼体は口腔以外に鰓蓋内面や鰓弁上などにも認められたが、鰓蓋の観察中に幼体が寄生部位から移動し始めたため、宿主B-1の胸鰭以降を切除してDavidson液に投入・固定した。固定中に宿主からの幼体の脱落はなかったが、10日間固定後、70%エタノールに置換したのちに、標本瓶の底に2個体の脱落が認められた。この2個体は突出した右眼球上に付着していた個体B-1cと、右口腔壁に寄生していた個体B-1hであった。また、固定前の観察時に、宿主の左頬骨の下に頭部と胸節の右側を潜り込ませている幼体が1個体認められた(これを個体B-1jとする)。固定後アルコール置換した標本では、本来の寄生部位を反映しているとは断言できないが(幼体の移動開始後に固定したため)、個体B-1jは固定標本上においても固定前と同じ位置に認められた。口腔には大型個体と小型個体の他に幼体が4個体観察され、うち3個体は上述の個体B-1d、B-1fおよびB-1gに相当すると考えられたが、残る1個体(個体B-1-1)は中型個体の後端左側に接して位置し(右口腔壁)、固定前の口腔の観察時には認められなかったことから、個体B-1-1は鰓蓋や鰓葉などから移動してきたと思われる。固定した宿主B-1の口腔や鰓腔には、固定前の口腔の観察時には認められなかった幼体が26個体存在した。なお、いずれのタイノエにも第7胸節に胸脚が認められた。

結果および考察

超異常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。好中球には2種類の顆粒、すなわ

ちMay-Grünwald-Giemsa染色によって難染色性を示す顆粒と、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) からなる成層顆粒が認められた (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, $\alpha\beta\text{G}$; 1型, $\alpha\beta\text{G}$ -1; 2型, $\alpha\beta\text{G}$ -2)^{6,7}や、タイノエに通常寄生および異常寄生されたマダイの好中球 (第1種好中球 first neutrophil type, neutrophil-1st および第2種好中球 second neutrophil type, neutrophil-2nd) に観察される2種類の異常型顆粒 (異常型難染色性顆粒 extraordinary chromophobic granule, $\alpha\beta\text{G}$; 1型, $\alpha\beta\text{G}$ -1; 2型, $\alpha\beta\text{G}$ -2) に類似していた^{1,3}。しかし、超異常寄生魚のいずれの好中球にも見られる2種類の顆粒は、未寄生魚の $\alpha\beta\text{G}$ -1 と $\alpha\beta\text{G}$ -2 および通常寄生魚ならびに異常寄生魚の $\alpha\beta\text{G}$ -1 と $\alpha\beta\text{G}$ -2 とは細胞化学的特徴が異なっていた (Table 1)。このことから、超異常寄生魚の好中球を第3種好中球 (third neutrophil type, neutrophil-3rd) と呼ぶこととする。

第3種好中球の2種類の $\alpha\beta\text{G}$ のうち、未寄生魚の $\alpha\beta\text{G}$ -1 に類似した顆粒 ($\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv3rd}) には成層構造は観察されず、各種リゾチーム酵素は認められなかった (Figs. 1B-1D)。また、顆粒全体がペルオキシダーゼ (PO) 陽性であった (Fig. 1E)。これらの特徴は $\alpha\beta\text{G}$ -1 や通常寄生魚の $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv1st} および異常寄生魚の $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv2nd} と同じである^{1,3}。しかし、

$\alpha\beta\text{G}$ -1 の顆粒全体が陽性反応を示すズダン黒B (SBB) 染色に対しては⁷, $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv3rd} は $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv1st} および $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv2nd} と同様に陰性であった。一方、第3種好中球の $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv3rd} の L0 には $\alpha\beta\text{G}$ -2, $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv1st} および $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv2nd} と同様に各種リゾチーム酵素が検出されたが^{1,3,7}, その局在性には違いが認められた (Figs. 1B-1D; Table 1)。 $\alpha\beta\text{G}$ -2, $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv1st} および $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv2nd} は L0 全体に酵素活性が検出されるのに対して^{1,3,7}, $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv3rd} では、L0 内の L0 よりも狭い領域に酵素活性が限定されていた (Table 1)。このことは、 $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv3rd} L0 が 2層構造を有していることを示唆している。すなわち、L0 はその中心付近の L0-0 と、その周囲の L0-1 に区別されると考えられる。第3種好中球の $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv3rd} は SBB 陰性であり、L1 は PO 陽性であった (Fig. 1E)。未寄生魚の $\alpha\beta\text{G}$ -2 は L1 が SBB 陽性かつ PO 陽性であり^{6,7}, $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv1st} および $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv2nd} ではともに SBB 陰性かつ L1 が PO 陽性であることから^{1,3}, $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv3rd} は $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv1st} や $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv2nd} に類似していると言える。しかし、PO 染色された $\alpha\beta\text{G}$ -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^{6,7}, $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv1st} や $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv2nd} には認められないのに対して^{1,3}, $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv3rd} には観察された (Fig. 1F; Table 1)。

未寄生魚の $\alpha\beta\text{G}$ -1 と $\alpha\beta\text{G}$ -2 はともにオイルレッド O (ORO) およびズダン III とした脂肪染色に陽性反応を示さない⁷ (Table 1)。このことは $\alpha\beta\text{G}$ -1^{Cv1st}, $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv2nd} および $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv3rd}

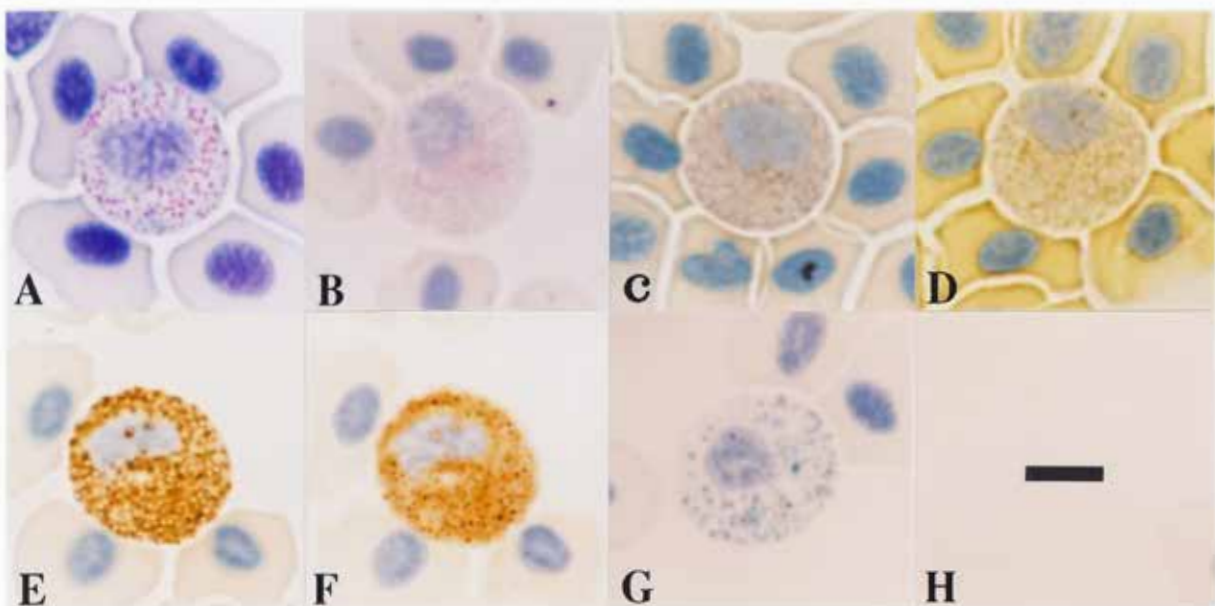


Fig. 1. Neutrophils of red seabream infected with numerous *Ceratothoa verrucosa*. A, May-Grünwald-Giemsa; B, acid phosphatase; C, α -naphthyl acetate esterase; D, α -naphthyl butyrate esterase; E & F, peroxidase [same cells in G & H with different focus. L1 of $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv3rd} show positive reaction. Note spot (brown) formation in H]; G, Sudan III (negative reaction. Note hematoxylin positive L0 of $\alpha\beta\text{G}$ -2^{Cv3rd}); H, scale bar (5 μm) which is adapted to all figures (A-G) in Fig. 1. Counter stain in B-G, hematoxylin (Mayer). Note small positive particles (L0-0) in B-D.

においても同じである^{1,3)}。しかし、eoβG-2^{Cv3rd}ではeoβG-2^{Cv2nd}と同様に³⁾、SBB染色や前記2種類の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、L0全体が青染された(Fig. 1G)。L0のヘマトキシリン陽性像はoβG-2およびeoβG-2^{Cv1st}には認められていない^{1,7)}(Table 1)。

PO染色された成層顆粒(oβG-2や各種eoβG-2)における斑の出現の有無は、顆粒のL0内の成分が異なることによるL0の構造の違いが関与すると推察されている^{1,3)}。eoβG-2^{Cv1st}で斑が認められない理由として、(斑が形成される)oβG-2のL0に存在する酸性ホスファターゼ(AcP)がeoβG-2^{Cv1st}では陰性になり、少数のoβG-2のL0にのみ認められるβ-グルクロニダーゼ(β-Glu)が、多くのeoβG-2^{Cv1st}のL0に検出されることが挙げられている¹⁾(Table 1)。しかし、この推察はeoβG-2^{Cv2nd}に斑が形成されない理由にはならない。eoβG-2^{Cv2nd}のAcPとβ-Gluの陽性像はoβG-2と同様であるにもかかわらず、斑は形成されない³⁾。eoβG-2^{Cv2nd}のL0はヘマトキシリン陽性であり(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)、oβG-2とeoβG-2^{Cv1st}ではヘマトキシリン陰性であることから^{1,7)}(Table 1)、eoβG-2^{Cv2nd}に斑が観察されない理由として、ヘマトキシリン陽性物質による構造変化が考えられている³⁾。しかし、

本研究によって、超異常寄生魚のeoβG-2^{Cv3rd}には斑形成が起り、L0はeoβG-2^{Cv2nd}と同様にヘマトキシリン陽性であった。このことは、ヘマトキシリン陽性物質の存在のみでは、斑形成不全を説明できないことを示している。eoβG-2^{Cv3rd}のAcPとβ-Glu(および各種エステラーゼ)陽性粒子数はoβG-2やeoβG-2^{Cv2nd}と同様であったが、それら酵素活性の局在部位がoβG-2やeoβG-2^{Cv1st}およびeoβG-2^{Cv2nd}ではL0全体であるのに対して^{1,3,7)}、eoβG-2^{Cv3rd}ではL0の内部構造領域であるL0-0であった。これらのことから、eoβG-2^{Cv3rd}では通常L0全体に存在する物質が、L0の中心付近に局在化されることで、L0の内部構造が変化したために、斑が形成されたと考えられる。超異常寄生魚のL0内にL0-0とL0-1が形成される原因として、タイノエの超異常寄生によって好中球内で産生されたなんらかの因子の関与が考えられる。この因子が顆粒内に蓄積されながら他の顆粒内成分と相互作用することで、L0内にL0-0とL0-1が形成されたと推測される。すなわち、この因子はL0内の各種リゾソーム酵素と相互作用し、これらの酵素がL0の中心付近に押しやられることで、L0-0が形成されたとと思われる。

未寄生魚のoβG-2における斑の形成にも、L0内にさらなる層の存在が必要であると考えられているが^{8,9)}、その実在については明らかにされていない。しかし、タイノエに超

Table 1. Comparison of neutrophil granules from red seabream infected with *Ceratothoa verrucosa* (modified from Kondo et al.³⁾)

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>											
				First type: Neutrophil-1 st *a						Second type: Neutrophil-2 nd *b			Third type: Neutrophil-3 rd *c		
	oβG	oβG-2		eoβG	eoβG-2 ^{Cv1st}		iβG ^{Cv1st}		eoβG	eoβG-2 ^{Cv2nd}		eoβG	eoβG-2 ^{Cv3rd}		
-1	L0	L1	-1 ^{Cv1st}	L0	L1	L0	L1	-1 ^{Cv2nd}	L0	L1	-1 ^{Cv3rd}	L0	L1		
MGG	C	E	C	C	E	C	C	E	C	E	C	C	E	C	
				(SF: +)											
AIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AcP	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
β-Glu	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
α-NAE	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
α-NBE	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
CAE	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
PO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	
	(SF: +)			(SF: -)						(SF: -)			(SF: +)		
SBB	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	(SF: -)														
Hem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
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; CAE, 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}oβG-1, ordinary chromophobic granule type 1; oβG-2, ordinary chromophobic granule type 2; eoβG-1^{Cv1st}, extraordinary chromophobic granule type 1 of neutrophil-1st observed after infection with *Ceratothoa verrucosa* (oaiCv); eoβG-2^{Cv1st}, extraordinary chromophobic granule type 2 of neutrophil-1st oaiCv; iβG^{Cv1st}, inducible chromophobic granule of neutrophil-1st oaiCv; eoβG-1^{Cv2nd}, extraordinary chromophobic granule type 1 of neutrophil-2nd oaiCv; eoβG-2^{Cv2nd}, extraordinary chromophobic granule type 2 of neutrophil-2nd oaiCv; eoβG-1^{Cv3rd}, extraordinary chromophobic granule type 1 of neutrophil-3rd oaiCv; eoβG-2^{Cv3rd}, extraordinary chromophobic granule type 2 of neutrophil-3rd oaiCv; 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.

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

^{*}Kondo et al. ¹⁾; ^{*}Kondo et al. ³⁾; ^{*}present report.

異常寄生されたマダイのL0内に層 (L0-0, L0-1) の存在が認められたことから, さらなる検討によって未寄生魚の α G-2にもL0-0とL0-1が確認されると考える。

本研究によって, タイノエに超異常寄生されたマダイには第3の好中球 (第3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種好中球および第2種好中球との関係は不明である。前報³⁾において第2種好中球が出現した異常寄生魚では, 口の開閉が不全になっていることを指摘した。本研究の超異常寄生魚も, 超異常寄生が起こる前 (通常寄生の時期) に, 口が完全に開放状態になった。したがって, 通常寄生時になんらかの要因 (例えば, 宿主の成長速度とタイノエのそれとのアンバランス) によって, 宿主の骨格等に障害が起こり, 口が開閉不全となることで, 異常な寄生が起こると推察される。

タイノエの寄生部位は一般に口腔とされ, 雌は宿主の口蓋 (上蓋) に, 雄は雌のやや後部の側方に位置する¹⁰⁾。しかし, 異常寄生魚では舌上や口腔弁上などにもタイノエが寄生し, 超異常寄生魚では鰓腔にも寄生していた。これらの一般とは異なる場所に寄生したタイノエが成熟し, 世代交代を行うのか否かは不明であるが, タイノエの寄生が必ずしも口腔 (特に口蓋) に限らないと考えられる。上述したように, 一般とは異なる場所へのタイノエの寄生は, 宿主であるマダイの口の開閉不全と関連すると思われる。すなわち, 正常に口が開閉するマダイでは, 仮にマンカ幼生が一般とは異なる場所に付着しても, それを口腔内面の動きや, 呼吸水の勢いなどで外すことが出来ると考えられる。タイノエの寄生部位が口腔に限定されないのであれば, タイノエが既知の宿主 (マダイやチダイ *Eyynnys tumifrons*¹¹⁾) 以外に寄生する (あるいは寄生している) 可能性は十分あると思われる。

未寄生魚を収容した水槽にマンカ幼生を投入することで通常寄生魚を得て, これの育成中に超異常寄生が起こった。低い寄生率 (81尾の未寄生魚から通常寄生魚が2尾) は, 幼生の投入時間と水槽壁の特徴によると考えられる。水槽に投入された幼生の多くは, 光が当たっているFRP製水槽の壁を登り, 乾燥して死亡した。このことから, 幼生は太陽光に対して正の走光性を示し, FRP水槽の壁を容易に登ることができると言える。屋内で飼育されていた通常寄生魚や異常寄生魚からの幼生が, 水槽壁を登ることは観察されていない。屋内で使用していた水槽はポリプロピレン製であったことから, 幼生は同水槽の壁を登ることができな

いと思われる。未寄生魚を収容したポリプロピレン製水槽に, 暗条件で幼生を投入することで高い寄生率になると推察される。

タイノエに関するこれまでの知見や問題点については山内ら (2004), 長澤 (2017) および長澤・福田 (2018) によって簡潔に整理されており^{5,10,12)}, これらの論文はタイノエに関する種々の研究を行う上で基礎的な情報を提供すると考えられる。現在, 著者 (近藤) の手元には, これまでの著者らのタイノエに関する研究等で得られたタイノエの液浸標本があり, これら標本の予備観察から, すでに新たな知見が得られている。近い将来, 取りまとめて報告する。

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) 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 (2018a) [Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: On the granulocytes observed in head kidney and spleen of red seabream *Pagrus major* parasitized with *Ceratomyxa verrucosa*. *J Nat Fish Univ*, **66**, 199-201 (2018a) (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に観察される第2の好中球. 水大校研報, **66**, 209-214 (2018b) [Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Second neutrophil type observed in red seabream *Pagrus major* with parasitized *Ceratomyxa verrucosa*. *J Nat Fish Univ*, **66**, 209-214 (2018b) (in Japanese with English abstract)]
- 4) Bell TA, Lightner DV: Techniques. In: A Handbook of Normal Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Louisiana, 2-5 (1988)
- 5) 長澤和也, 福田 穰: 大分県産マダイから得たタイノエ *Ceratomyxa verrucosa* (等脚目ウオノエ科) とタイノエに関する文献追補. *Nature of Kagoshima*, **45**, 15-19 (2018) [Nagasawa K, Fukuda Y: *Ceratomyxa verrucosa* (Isopoda:

- Cymothoidae), a buccal-cavity parasite of red seabream *Pagrus major* from Oita Prefecture, Kyushu, Japan, with supplemental references on the isopod. *Nature of Kagoshima*, **45**, 15-19 (2018) (in Japanese with English abstract)]
- 6) 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)
- 7) Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Cytochemical characteristics of neutrophil granules from red seabream *Pagrus major*. *J Nat Fish Univ*, **65**, 141-145 (2017)
- 8) 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)]
- 9) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: マダイ好中球の成層顆粒からの光の放射. 水大校研報, **66**, 227-228 (2018) [Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Radiation of light from stratified granules of neutrophils in red seabream *Pagrus major*. *J Nat Fish Univ*, **66**, 227-228 (2018) (in Japanese with English abstract)]
- 10) 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)]
- 11) Nagasawa K, Isozaki S: Crimson seabream *Evyinnis tumifrons* (Temminck & Schlegel, 1843) (Perciformes, Sparidae), a new host for *Ceratothoa verrucosa* (Schioedte & Meinert, 1883) (Isopoda, Cymothoidae). *Crustaceana*, **89**, 1229-1232 (2016)
- 12) 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*, **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)]