

ラメロジスカス症に罹患し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 LamellodiscosisMasakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract : Two types of chromophobic granules [type 1, ordinary type ($\text{o}\beta\text{G-1}^{\text{Ld}}$); type 2, extraordinary type ($\text{eo}\beta\text{G-2}^{\text{Ld}}$)] were observed in the neutrophils of red seabream *Pagrus major* infected with *Lamellodiscus* spp. The $\text{o}\beta\text{G-1}^{\text{Ld}}$ showed similar morphology and cytochemistry to type 1 ordinary chromophobic granule ($\text{o}\beta\text{G-1}$) from non-infected fish: Chromophobic, simple morphology (without stratified structure), positive reaction to peroxidase (PO) and Sudan black B (SBB), and lack of lysosomal enzymes. The $\text{eo}\beta\text{G-2}^{\text{Ld}}$ was stratified granule with two-layer structure [inner eosinophilic layer (L0) and outer chromophobic layer (L1)]. Several lysosomal enzymes [acid phosphatase (AcP), β -glucuronidase, α -naphthyl acetate esterase, α -naphthyl butyrate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase (CAE)] were detected in the L0, however, AcP and CAE were localized in the small central area of L0. These findings indicate that the L0 of $\text{eo}\beta\text{G-2}^{\text{Ld}}$ consists of L0-0 (inner part in L0; AcP and CAE positive) and L0-1 (outer part of L0-0). The L1 showed positive reaction to SBB and PO. Spot formation, a curious phenomenon appeared in PO-stained type 2 ordinary chromophobic granule ($\text{o}\beta\text{G-2}$; positive L1 and negative L0) from non-infected fish, was not observed in $\text{eo}\beta\text{G-2}^{\text{Ld}}$.

Key words : granule, neutrophil, *Pagrus major*, red seabream, lamellodiscosis

マダイ *Pagrus major* の好中球には2種類の通常型顆粒 (ordinary chromophobic granule, $\text{o}\beta\text{G}$; 1型, $\text{o}\beta\text{G-1}$; 2型, $\text{o}\beta\text{G-2}$) が観察され, 感染症に罹患したマダイ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。前報¹⁾において, 多数のタイノエ *Ceratothoa verrucosa* に寄生されたマダイ (超異常寄生魚) では, 好中球に2種類の異常型顆粒 (extraordinary chromophobic granule, $\text{eo}\beta\text{G}$; 1型, $\text{eo}\beta\text{G-1}^{\text{Cv3rd}}$; 2型, $\text{eo}\beta\text{G-2}^{\text{Cv3rd}}$) が観察されることを報告した。 $\text{eo}\beta\text{G-2}^{\text{Cv3rd}}$ 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)] が, 成層構造を有する $\text{eo}\beta\text{G-2}^{\text{Cv3rd}}$ の内層 (L0) 内の狭い領域に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。

本研究ではラメロジスカス症²⁾に罹患したマダイの好中球顆粒の特徴について報告する*。2018年7月に, 水産大学校の屋外水槽で飼育していた体重約75 gのマダイにラメロジスカス症が発生した。キナルジンで麻酔後, 尾柄部血管から採血し (採血時の水温: 23.2°C), 血液塗抹標本を作製した。各種細胞化学染色を施して光学顕微鏡で観察した。

ラメロジスカス症に罹患したマダイの好中球のいずれにも, May-Grünwald-Giemsa染色によって, 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種類の好中球顆粒のうち, 前者は未感染魚の $\text{o}\beta\text{G-1}$ と同じ特徴を示したが ($\text{o}\beta\text{G-1}^{\text{Ld}}$ と表記する), 後者は異常型顆粒 ($\text{eo}\beta\text{G-2}^{\text{Ld}}$) であることが明らかとなった (Table 1)。罹患魚の好中球には

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

*本研究の一部は, 平成30年度日本魚病学会秋季大会[2018年 9月13日; 308: 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 (プログラムおよび講演要旨, 16)]において報告した。

アルカリ性フォスファターゼは検出されず、トルイジンブルー、アルシアンブルー、オイルレッドOおよびズダンIII染色に陽性反応を示さなかった (Table 1)。eoβG-1^{Ld}には各種リゾソーム酵素は検出されなかったが (Figs. 1B-1F)、顆粒全体がペルオキシダーゼ (PO) およびズダン黒B (SBB) 染色に陽性反応を示した (Figs. 1G & 1H)。eoβG-2^{Ld}のL0には各種リゾソーム酵素が認められたが (Figs. 1B-1F)、AcP陽性粒子とCAE陽性粒子はL0よりも小型であった (Figs. 1B & 1F)。一方、他のリゾソーム酵素 (β-Glu, α-NAE, α-NBE) の陽性粒子はL0と同大であった (Figs. 1C-1E)、また、β-Glu陽性粒子数は、未感染魚のeoβG-2よりも増加した。PO活性がeoβG-2^{Ld}のL1に検出されたが、PO染色したeoβG-2に認められる‘斑’は、eoβG-2^{Ld}には形成されなかった。eoβG-2^{Ld}のL1はSBB陽性であった (Fig. 1H)。SBB染色後のヘマトキシリン染色 (核染色) には、L1は染まらなかったが、オイルレッドOおよびズダンIII染色後のそれ

では、L1が青染した (Fig. 1I)。Periodic acid Schiff (PAS) 反応によって、eoβG-2^{Ld}のL1が陽性反応を示すとともに (Fig. 1J), PAS陰性のL0の上方と下方に斑形成が認められた (Fig. 1K)。L1のPAS陽性反応は、染色前にα-アミラーゼ消化を施すことによって陰性となり、斑も形成されなくなった (Table 1)。なお、他の種類の血球 (赤血球, 栓球, リンパ球, 単球) には著変は認められなかった。

タイノエの超異常寄生においては、マダイの好中球に2種類の異常型顆粒 (eoβG-1^{Cv3rd}, eoβG-2^{Cv3rd}) が出現するが、各種リゾソーム酵素はいずれも eoβG-2^{Cv3rd}のL0内の狭い領域 (L0-0) に局在し¹⁾、L0はL0-0とL0-1に区分される。本研究において、ラメロジスカス症に罹患したマダイにおいても、eoβG-2^{Ld}のL0はL0-0とL0-1の2層からなることが明らかとなった。しかし、L0-0に局在する酵素はeoβG-2^{Cv3rd}とは異なり、AcPとCAEであり、他の酵素はL0全体に認められた。eoβG-2^{Cv3rd}ではなんらかの因子が顆粒内に蓄積

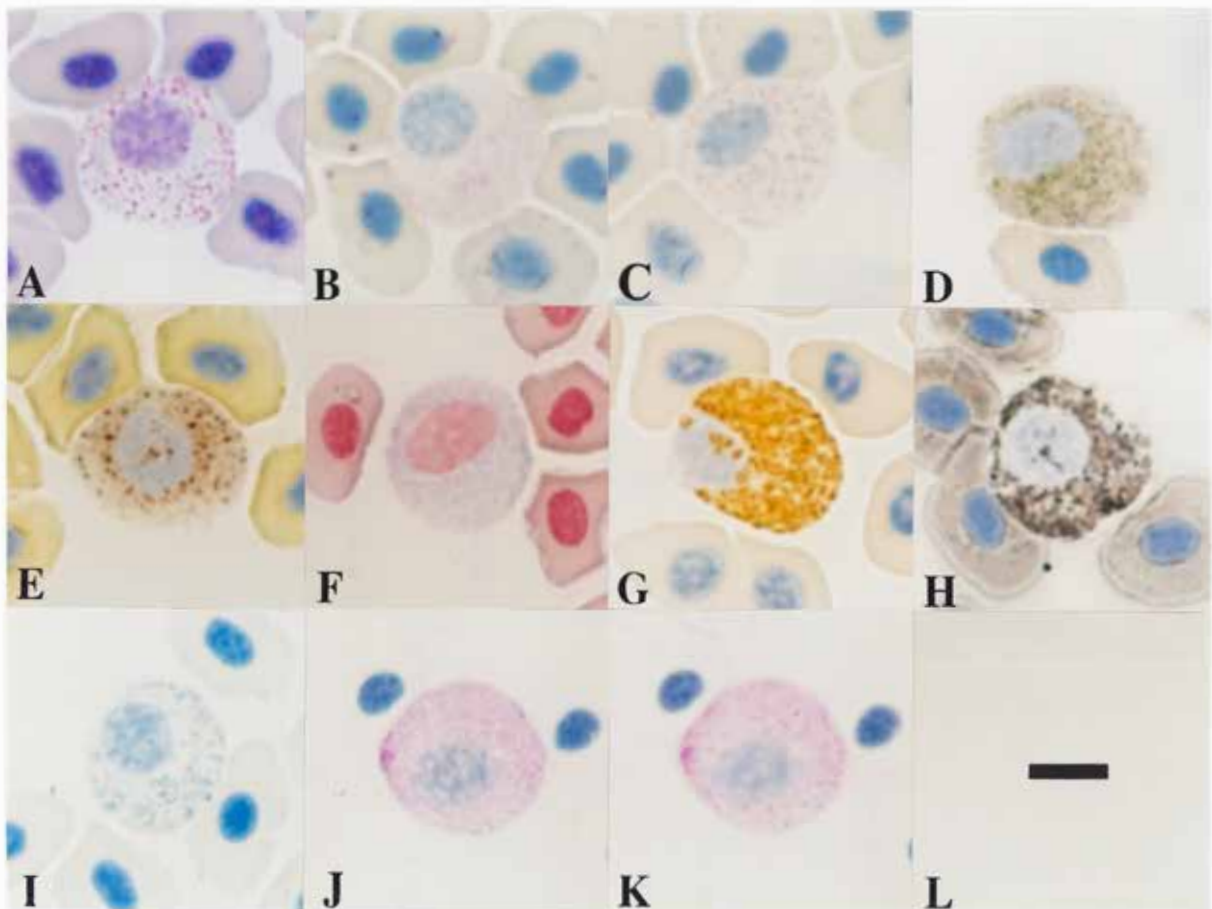


Fig. 1. Neutrophils of red seabream infected with lamellogiscosis. A, May-Grünwald-Giemsa; B, acid phosphatase; C, β-glucuronidase; D, α-naphthyl acetate esterase; E, α-naphthyl butyrate esterase; F, naphthol AS-D chloroacetate esterase; G, peroxidase; H, Sudan black B; I, Sudan III (negative reaction. Note hematoxylin positive L0 of eoβG-2^{LM}); J & K, periodic acid Schiff reaction [same cells in J & K with different focus. L1 of eoβG-2^{LM} show positive reaction. Note spot (brown) formation in K]; L, scale bar (5 μm) which is adapted to all figures (A-K) in Fig. 1. Counter stain: B-E & G-J, hematoxylin (Mayer); F, safranin O. Note small positive particles (L0-0) in B & F.

され、他の顆粒内成分と相互作用することによって、L0内にL0-0とL0-1が形成されると考えられている¹⁾。eoβG-2^{Ld}においても同様であると推察されるが、eoβG-2^{Cv3rd}とeoβG-2^{Ld}では蓄積される因子が異なることが、L0-0に局在する成分の違いに反映されたと考えられる。

eoβG-2^{Ld}のL0はオイルレッドOおよびズダンIII染色後のヘマトキシリン染色によって陽性反応を示したが、SBB染色後のそれには陰性であった。しかし、eoβG-2^{Cv3rd}のL0はSBB、オイルレッドOおよびズダンIIIのいずれの染色においても、ヘマトキシリン陽性であることから¹⁾、eoβG-2^{Cv3rd}とeoβG-2^{Ld}のヘマトキシリン陽性物質は互いに異なる可能性がある。

PO染色されたeoβG-2^{Ld}には斑が観察されないのに対して、eoβG-2^{Cv3rd}には斑が認められる¹⁾。斑形成はL0の微細構造と

関係すると考えられるが¹⁾、詳細は不明である。eoβG-2^{Ld}のL1はPAS陽性であり、その反応はα-アミラーゼ消化によって消失したことから、PAS陽性物質はグリコーゲンであると言える。通常、グリコーゲンは細胞質基質に存在するが、グリコーゲン分解酵素の先天性異常による糖原病の際には、リソゾーム内にグリコーゲンが取り込まれた構造(glycogenosome)が出現する³⁾。ラメロジスカス症に罹患したマダイでは、細胞内にグリコーゲンが過剰に蓄積していると推察される。eoβG-2^{Ld}にはリソゾーム酵素が含まれることから、リソゾームの一種と言える。したがって、PAS陽性を示すeoβG-2^{Ld}は、過剰なグリコーゲンを取り込んでいるのではないかと考えられる。eoβG-2^{Ld}のPAS標本(L1が陽性)には斑が形成されたが、eoβG-2^{Ld}のPO染色標本(L1が陽性)には斑は認められなかった。

Table 1. Comparison of neutrophil granules from red seabream *Pagrus major* infected with numerous *Ceratothoa verrucosa* (super-unusual parasitism) or lamellogiscosis (modified from Kondo and Yasumoto¹⁾)

Staining ^{*1,*2}	Origin of neutrophils, type of granules and reaction ^{*3}								
	Non-infected fish			Fish infected with:					
				<i>Ceratothoa verrucosa</i> ^{*a}			Lamellogiscosis ^{*b}		
	oβG -1	oβG-2 L0	L1	eoβG -1 ^{Cv3rd}	eoβG-2 ^{Cv3rd} L0	L1	oβG -1 ^{Ld}	eoβG-2 ^{Ld} L0	L1
MGG	C	E	C	C	E	C	C	E	C
AIP	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AcP	—	+	—	—	+	(L0-0)	—	+	(L0-0)
β-Glu	—	+ ^{*4}	—	—	+	(L0-0) ^{*4}	—	+↑	—
α-NAE	—	+	—	—	+	(L0-0)	—	+	—
α-NBE	—	+	—	—	+	(L0-0)	—	+	—
CAE	—	+	—	—	+	(L0-0)	—	+	(L0-0)
PO	+	—	+	+	—	+	+	—	+
	(SF: +)			(SF: +)			(SF: —)		
PAS	—	—	—	—	—	—	—	—	+
							(SF: +)		
PAS-αA	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SBB	+	—	+	—	—	—	+	—	+
	(SF: —)						(SF: —)		
Hem	—	—	—	—	+	—	—	—	—
OR, S3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
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; PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS-αA, PAS after digestion with α-amylase; SBB, Sudan black B; OR, oil red O; S-3, Sudan III).

^{*2}All types of granules showed negative reaction to other tests (alcian blue (pH1.0, pH2.5), toluidine blue in distilled).

^{*3}oβG-1, ordinary type 1; oβG-2, ordinary type 2; eoβG-1^{Cv3rd}, extraordinary type 1 observed after infection with (oai) numerous *Ceratothoa verrucosa* (unusual parasitism; oainCv); eoβG-2^{Cv3rd}, extraordinary type 2 oainCv; oβG-1^{Ld}, ordinary type 1 oai lamellogiscosis (oaiLd); eoβG-2^{Ld}, extraordinary type 2 oaiLd; L0, layer 0; L0-0, inner layer of L0; 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.

^aKondo and Yasumoto¹⁾; ^bpresent report.

文 献

- 1) 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 observed in red seabream *Pagrus major* infected with *Ceratomyxa verrucosa*: A case report. *J Nat Fish Univ*, **67**, 223-229 (2019) (in Japanese with English abstract)]
- 2) 小川和夫: ラメロジスカス症. 畑井喜司雄, 小川和夫 (監), 新魚病図鑑 (第2版). 緑書房, 東京, 183 (2011) [Ogawa K: *Lamellodiscus* infection (Lamellodiscosis). In: Hatai K, Ogawa K (ed) *New Atlas of Fish Diseases* (2nd edition). Midori Shobo, Tokyo, 183 (2011) (in Japanese)]
- 3) 武内忠男: 1. 細胞質基質. 小川和朗, 小田琢三, 黒住一昌, 杉野幸夫 (編), 細胞学大系 2 基質・小器官I. 朝倉書店, 東京, 1-29 (1974) [Takeuchi T: 1. Saiboushitsu (Hyaloplasm). In: Ogawa K, Oda T, Kurosumi K, Sugino Y (ed) *Saibougaku Taikei 2 Kishitsu-Shoukikan I* (The Outline of Cytology 2 Plasm and Organelles I). Asakura Shoten, Tokyo, 1-29 (1974) (in Japanese)]