

博 士 論 文

アユ生体防御機構解明を目的とした  
アユ白血球の分類とその変化

平成 26 年 3 月

中 田 公 人

博 士 論 文

アユ生体防御機構解明を目的とした  
アユ白血球の分類とその変化

平成 26 年 3 月

中 田 公 人

# 目次

第 I 章	アユの種苗生産をとりまく問題	1
第 II 章	アユ白血球の形態学的及び組織化学的研究	11
第 III 章	アユ血球の疾病因子に対する応答に関する研究	50
第 IV 章	総合考察	89
結 論		94
謝 辞		97
引用文献		98

## I 章

### アユの種苗生産をとりまく問題

アユ, *Plecoglossus altivelis altivelis* は、サケ目、サケ亜目、アユ科、アユ属に分類される魚類であり、分類学上、アユ科はアユ属の一属一種で形成されている<sup>1)</sup>。アユは東アジアに分布し、主な生息域は日本である<sup>1)</sup>。アユには、海に下らずに一生を淡水域で過ごす陸封型もあるが、一般的には春に海から河川に遡上し、秋に下流へ下り、産卵して一生を終える年魚である。つまり、一般的なアユは両側回遊型で、性成熟を迎え始めると河川を流下して下流域に下り、そこで性成熟したのものから順次産卵放精を行なう。卵は直径約 1 mm 程度であるが、15～20 日で孵化した仔魚は約 6～7 mm 程度になる。仔魚は、数日で河口域や海まで流下し、汽水域、あるいは塩分濃度の低い海域を回遊する。孵化後 2～3 日目では、黄卵からの栄養に依存するが、その後、3～4 カ月までは動物プランクトンを捕食しながら成長し、砕波帯を移動する。春から夏にかけて体長 5 cm 程度に成長した稚魚は河川を遡上し、食性をプランクトンから付着藻類食に変化させる。陸封型アユでは流入する河川で産卵し、稚魚期を淡水である湖等で過ごし、一般的なアユと同様に春から夏にかけて流入河川に遡上する。

全国の主な都道府県にはアユの種苗生産センターや漁業協同組合による生産施設が設置され、地域のニーズに合った種苗が生産されて放流されている。また、陸封型のアユとして琵琶湖由来のアユも各県の河川に移動放流されているのが現状である。このようなアユの生産現状は、岡山県高梁川を例にとると以下の如くなる。

高梁川は、岡山県西部に位置し、その源を新見市千屋の花見山（標高 1,188 m）に発し、吉備高原を蛇行しながら流れ、高梁市、総社市を経て、倉敷市で水島灘に注ぐ流域面積 2,670 km<sup>2</sup>、長さ 111 km の一級河川である<sup>2)</sup>。高梁川は豊かな水量と水質に恵まれ、約 38 種類の魚類が生息している。その中でもアユは全国的に有名であり、アユ釣りのシーズンになると多くの釣り人が集まってくる。高梁川漁業協同組合は、高梁市、総社市、倉敷市を貫流する高梁川において、主にアユの生産、放流、販売を行っている。生産を行っている高梁川漁協の施設である高梁川栽培漁業研究所では、6,397 m<sup>2</sup> の敷地に、稚魚水槽 48 m<sup>2</sup>×10 面、飼育水槽 78 m<sup>2</sup>×5 面、飼育水槽 120 m<sup>2</sup>×5 面、飼料栽培水槽 28 m<sup>2</sup>×9 面、蓄養水槽 9 m<sup>2</sup>×2 面を擁し、深さ 40 m の井戸からの高梁川の伏流水を使い、毎年約 350 万尾のアユを飼育し生産している。

本研究所で育てた親魚から 10 月初旬に採卵し、受精、孵化を行い、海水の 70 t 水槽（水量 40t）で飼育を始める。10 月 10 日頃孵化した稚魚は、体長 6~7 mm で比重 1.008 に希釈調整した海水の水槽で、2,500 尾 / t の密度に収容、飼育される。21℃ の自然水温で動物性プランクトンのワムシを与える。10 月末からワムシに加えて配合飼料を与え水温は 20℃ に保つ。当初 40 t の水量は 3 週間かけて 70 t まで水量を増やししながら飼育するので、水槽の稚魚の密度は成長と共に下がる。12 月になると水温が低下するため、加温を開始し 15℃ に保つ。11 月中旬からワムシに代わり冷凍コペポーダ（ミジンコの一種）を与える。体長は 20 mm 程度に成長するため水槽を分けて 5,000 尾 / t にする。水温はボイラー加温により、15℃ に保ちながら 1 月から配合飼料のみに切り替え、塩分濃度は比重 1.004 に下げ、2 月の淡水飼育まで、徐々に淡水馴致する。そして 3 月に稚魚は 50 mm 程度に成長し、その頃には完全淡水飼育となり、水温も 17℃ に上

昇するため、加温を停止し、河川への放流に備える(図 I-1, I-2)。その後、4月から高梁川流域 50カ所に毎年約 120万尾のアユを放流している。高梁川漁業協同組合の場合、高梁川だけでなく県内の他河川や近隣他県の各河川にも放流を行っている。また、親魚は出荷せずに10月の採卵にむけて飼育を継続するのが1年間のサイクルである。高梁川漁業協同組合では稚アユの放流事業だけでなく、天然遡上のアユを増やす試みとして、マブシに約 2,500万粒の受精卵を付けて、孵化直前に河口に沈め、孵化した稚魚を流下させる孵化放流を行っている。

アユは我が国のほぼ全土に分布し、古くから広く食用に供されてきた。また、河川で漁獲されることから日本では馴染み深い魚である。このアユの生息域であった多くの河川は、戦後継続して行われてきた治水、利水等の開発事業や、河川の水質汚濁などの環境変化により、アユの再生産が妨げられ、河川での資源維持が困難な状況になってきている。岡山県のアユ漁獲量は、1970年代には 300-400tであったものが、1980年代には増加し、500tを上回る年もあった<sup>3)</sup>。これは天然および人工アユの種苗放流を積極的に続けてきた結果と考えられる。、1990年代には漁獲量は減少に転じ、2000年代にはさらに減少し、2003年以降は 100t以下にまで激減した<sup>3)</sup>(図 I-3)。

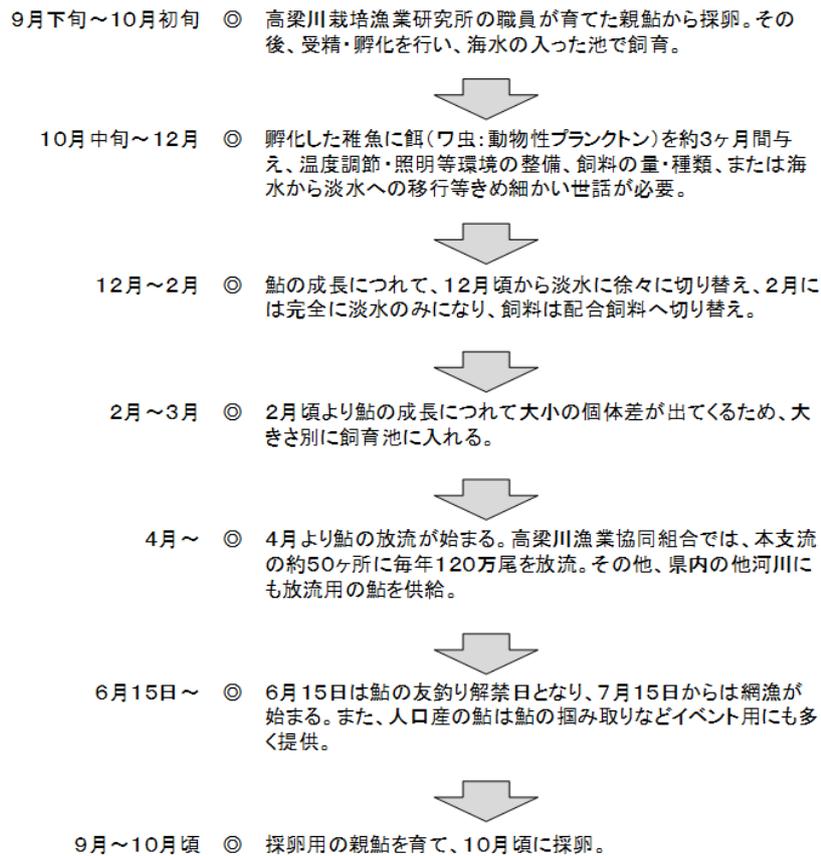
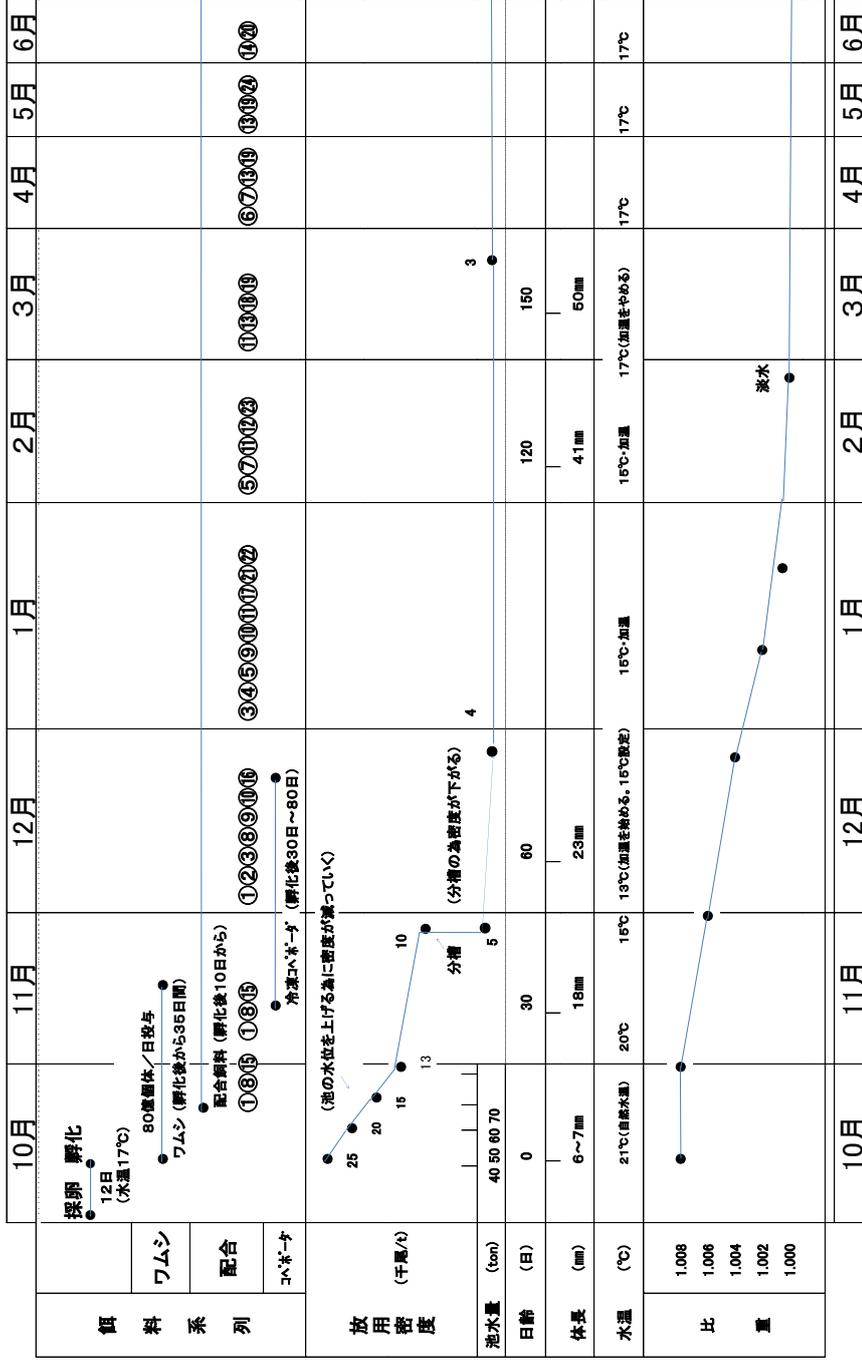


図 I -1 高梁川漁業協同組合のアユ, *Plecoglossus altivelis altivelis* 養殖事業のサイクル



配合飼料

- ① ゴールドNo.0
- ② ゴールドNo.1
- ③ ゴールドNo.2
- ④ ゴールドNo.3
- ⑤ PCシルバー
- ⑥ EPC No.1
- ⑦ EPC No.2
- ⑧ ノーサン初期1号
- ⑨ ノーサン初期2号
- ⑩ ノーサン初期3号
- ⑪ 餌付 S
- ⑫ ソフト 1号
- ⑬ ソフト 2号
- ⑭ ソフト 3号
- ⑮ 日配 初期 1号
- ⑯ 日配 初期 2号
- ⑰ 日配 初期 3号
- ⑱ アルファメガ1C
- ⑲ アルファメガ2C
- ⑳ アルファメガ3C
- ㉑ アユ初期S
- ㉒ アユ初期M
- ㉓ アユ稚魚1号
- ㉔ アユ稚魚2号

図 I-2 高梁川漁業協同組合の種苗生産過程の概要

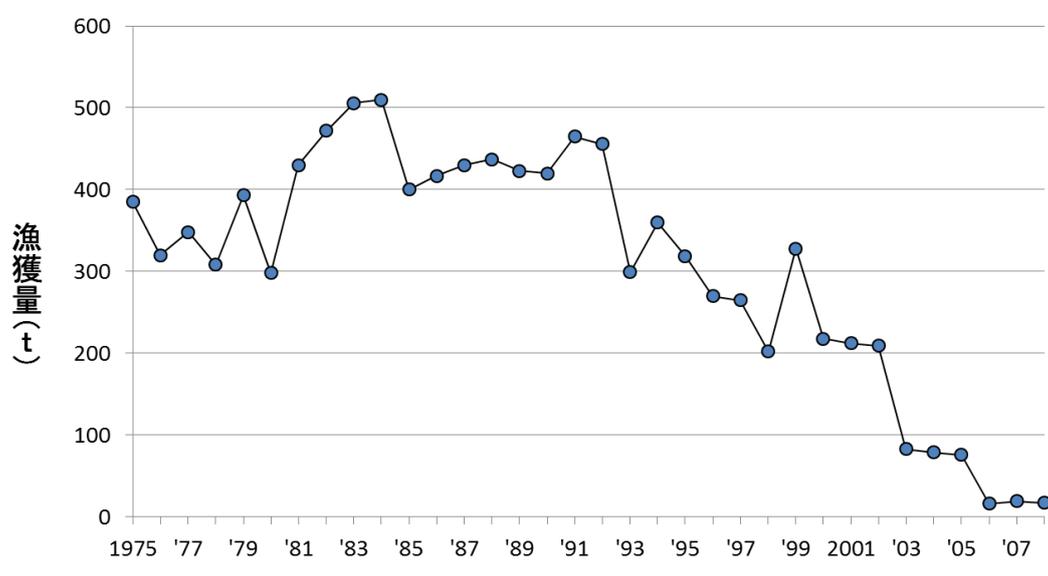


図 I -3 岡山県下のアユ漁獲量の推移 <sup>3)</sup>

その大きな原因として、1987年徳島県の養殖場で発生した冷水病の全国的な拡散と、それに伴う冷水病によるアユの大量死があげられる<sup>4)</sup>。アユ冷水病とは、冷水病菌、*Flavobacterium psychrophilum* というグラム陰性桿菌によって引き起こされる細菌感染症であり、感染発病したアユは体表の白濁、鰓蓋下部の出血の他、体表の潰瘍等の穴あき、糜爛、貧血等により死亡する。アユに甚大な被害を与える冷水病対策として、2001年に「アユ冷水病対策協議会」が組織され<sup>4,5)</sup>、さらに、2009年にアユ疾病に関する防疫指針<sup>6)</sup>も示された。高梁川栽培漁業研究所は県内及び近県の河川に種苗放流を行っているが、放流河川には冷水病の発生事例のある河川も含まれている。そのため、冷水病菌の侵入に対して厳重な防疫対策が講じられてきた。

しかし、同研究所では2008年に飼育池で冷水病が発生し、117,500尾(670 kg)のアユが焼却処分にされた(表 I-1)。アユ種苗生産、養殖現場では既定の期間に、健全なアユを確保することが求められている。稚魚は過密飼育によるストレス、疾病の危険に晒されながら飼育されており、岡山県内のアユ養殖場でも魚病発生は減少してきているが、冷水病をはじめとした細菌や寄生虫による疾病などが発生している(表 I-2)。

アユ冷水病の対策としてワクチンが開発されているが<sup>4,7)</sup>、実用化には至っていないのが現状である。魚類には非特異的生体防御と特異的生体防御の機構が存在する<sup>8,9)</sup>。アユの疾病の早期発見や未然防止には、細菌感染などの初期感染防御機構、すなわち非特異的生体防御の中で主要な役割を演じている<sup>10)</sup>食細胞を中心とした免疫担当細胞の挙動を把握することが重要である。

Table I -1 高梁川漁協栽培漁業研究所におけるアユ総生産量

	2002年		2003年		2004年		2005年		2006年	
	Kg	尾数								
種苗放流用	15,550	2,375,500	17,590	3,014,600	14,920	2,487,000	21,716	3,307,179	21,815	3,053,300
養殖販売用	12,500	728,500	10,900	420,400	14,530	1,027,000	7,041	239,634	4,512	464,800
合計	28,050	3,104,000	28,490	3,435,000	29,450	3,514,000	28,757	3,546,813	26,327	3,518,100
	2007年		2008年*		2009年		2010年		2011年	
	Kg	尾数								
種苗放流用	22,531	3,266,400	20,240	3,370,100	19,790	2,544,630	20,355	3,200,200	20,981	2,945,300
養殖販売用	8,100	385,000	9,200	415,000	5,851	334,100	4,800	305,000	6,140	236,000
合計	30,631	3,651,400	29,440	3,785,100	25,641	2,878,730	25,155	3,505,200	27,121	3,181,300

\* 2008年5月13日 冷水病発生により670kg(117500尾)焼却処分

表 I -2 岡山県内養殖場におけるアユの魚病診断件数

病名	年度	1986	1987	1992	1995	2000	2010
ビブリオ菌		6	4	3	3		
連鎖球菌症		2	1				
細菌性鰓病		5	7	1		1	
カラムナリス病		2	2	1		4	
冷水病					2	3	1
水カビ病		4					
ギロダクチルス症		1	5	2		2	1
グルゲア症		1	1			1	
チョウチン病		4	1	1			1
異常なし			1				
不明		6	9	8	3	7	1
計		31	31	16	8	18	4

(岡山県農林水産総合センター水産研究所資料)

アユ疾病対策の研究を行う上で免疫応答機構の中で中心的な役目を担っている白血球の分類学的、機能的知見の蓄積は重要であるが、アユ白血球の詳細な分類学的知見は極めて乏しい。そこで本研究では、アユ血球の分類及び疾病に至る過程での血球の動態について検討を行い、疾病の早期把握及び防御機構の解明に結びつく因子について検討する。

## II 章

### アユ血球の形態学的及び組織化学的研究

アユは、我が国内水面漁業の主要な魚種であり、毎年、種苗放流の対象となってきた。放流種苗は人為的に孵化させて育てる人工種苗が主流となっており、本論文の1章で述べた高梁川のある岡山県下を例にとっても同様である<sup>11)</sup>。種苗生産や成魚の養成過程において、魚は高密度飼育によるストレス、水質悪化、夏期の高水温にさらされ、疾病に陥る機会も多い。魚病の成因は内因性として、品種、系群、年齢、性、遺伝等機能欠損によるものがあり、外因性として、水温、水質等の環境因子、細菌、寄生虫等の寄生体因子によるものがある<sup>9)</sup>。これらの因子は免疫系その他、内分泌系、神経系等に影響を及ぼし、免疫機能低下を招く<sup>9,12,13)</sup>。魚病発生防止対策として、疾病を起こす因子をできるだけ取り除くことはもとより、発病以前から飼育魚の健康度を常時把握しながら飼育する必要がある。宿主の健全性を保つためには宿主の免疫系が鍵となるが、免疫系において機能している細胞は主に血球細胞内のリンパ球などの白血球である。それゆえ、健康度評価法の一つとして血液像変化により免疫機能を把握する方法が考えられる。そのためには正常魚の血液像、中でも白血球の形態学的知見が必要である。代表的な魚種については魚種全体を見渡すための比較血液学的研究がなされている<sup>12)</sup>。しかし、白血球の形態は魚種によっても異なっており、アユについての詳細な情報は無いのが現状である<sup>12)</sup>。このことから、基礎的なデータを得るためにアユ血球の分類を行った。なお、生産者である漁協や種苗センターでは簡便な測定法が求められているため、白血球は赤血球から密度分離する方法で採取した。

## 方法

### 試験魚

試験には岡山県総社市高梁川栽培漁業研究所にて種苗生産され、屋内養殖水槽 (70 t) で飼育されたアユを用いた。飼育水は地下水を用い、流水飼育にした。水槽内の水温は 17~21℃とした。試験に用いたアユは試験 1 週間前に屋内養殖池から 20~30 尾取り上げ、17~18℃の小型水槽 (1.3 kl 容) 内で流水飼育後、試験に供した。使用したアユは、雌雄 4 尾 (平均体長 19.5 cm、平均重量 74.6 g) を用いた。

### 密度勾配液の調整

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-), 日水製薬) は、蒸留水で溶解調製した。Percoll (GC Healthcare Life Science) の原液に 10 倍濃度の PBS(10×PBS とする) を Percoll : 10×PBS = 9 : 1 (V/V) の割合で混合したものを 100% Percoll とした。さらに Skim Milk (SM), (雪印乳業) 1 g を 100 ml の PBS に溶解し、1% SM PBS とした。100% Percoll は 1% SM PBS で希釈し、各段階の密度溶液を作成した。つまり、100% Percoll : 1% SM PBS = 7 : 3 (V/V) の希釈液は 30% Percoll となり、以下同様に希釈して、適宜濃度の密度液を作成した。

### 血球等試料調製

アユ末梢血は、尾部血管からノボヘパリン (持田製薬) 1,000 単位 / ml を 0.1 ml を含むツベルクリン用 1 ml シリンジ (TERUMO) を用いて、0.9 ml 採血した。4 尾からの血液は、混合処理した。脾臓組織は、ヘパリン添加 1% SM PBS を少量入れたペトリ皿に入れ、2 枚のスライドガラスのスリガラス部でこれら組織をすり潰して懸濁させた。脾臓摩砕懸濁液は、極少量の脱脂綿を詰めたパスツールピペットで素早く濾過させ、凝集塊や死細胞を除き、脾臓細胞懸濁液を得た。

## 密度液による血球の分離

Percoll 密度液は、試験管に 62% Percoll を入れ、その上層に試料(血液ないし脾臓細胞懸濁液)を添加した。試験管の下層より 2% 間隔で 62~32% となるよう密度液を重層し、その上層に試料を添加した。その後、冷却遠心分離機にて、 $388\times g$ 、30 分、 $6^{\circ}\text{C}$  の条件下で遠心分離した。各密度勾配層より分取した細胞分画を 15 ml スピッツ試験管に分取し、1%SM PBS を加えて攪拌洗浄し、 $209\times g$  で 10 分間遠心分離した。上清を除去した沈査は、1%SM PBS で懸濁し、再度 1%SM PBS を加えて  $110\times g$  で 10 分間遠心させて攪拌洗浄を行った。最終的に血球は 0.5 ml に再懸濁させ、改良 Neubauer 型血球計数盤にて血球濃度を計測し、適宜希釈して塗抹用試料とした。

## 塗抹方法

塗抹用試料は、CYTOSPIN 4 (Thermo Electron Co.) にて、 $113\times g$ 、10 分間の条件下にてスライドガラスに塗抹した。また、採血後、直ちに引きガラスによりスライドガラスに血液を塗抹した。

## 染色

普通染色として、Romanowsky 染色の May-Grunward Giemsa (MGG) 染色を用い、白血球全般、Leishman Giemsa (LSG) 染色<sup>12)</sup>により栓球の検索を行った。

酵素化学的染色は、顆粒球の検索として 3,3'-diaminobenzidine を用いた DAB 法による peroxidase (PO) 染色後、ギムザ染色を行った。好中球同定の目安として alkaline phosphatase (ALP) 染色、単球・マクロファージ同定の目安として  $\alpha$ -naphthyl butyrate を用いた  $\alpha$ -NB 法による非特異的 esterase (EST  $\alpha$ -NB) 染色、また、acid phosphatase (ACP) 染色、periodic acid Schiff (PAS) 染色も行った。Leishman 染色液 (Merck KGaA) 以外はすべて武藤化学薬品の染色液及び染色キットを用い、添付の染色法に従った。

さらに、好塩基球検索のため、toluidin blue(SIGMA ALDRICH)で染色し、塩酸 pH 1.5、3.0、4.5 の水溶液で洗浄した<sup>14)</sup>。

### 検鏡及び撮影

顕微鏡は、OLIMPAS BX51 を用い、塗抹標本に出現した血球画像は、OLIMPAS DP71 にて撮影した。血球観察には油浸 100 倍の対物レンズで、10 倍の接眼レンズを用いた。

### 画像解析

得られた画像を用い、血球細胞及びその核それぞれの面積と長径は Image J (National Institutes of Health の open source 画像解析ソフト) により測定した。なお、細胞化学的染色試験における判定法は、陽性顆粒の数に応じて 0 型～V 型に分類し、0 型を (-)、I 型を (±)、II～V 型を (+) とした。一方、顆粒が認められず微慢性に染まる場合は、陰性、弱陽性・強陽性とする分類<sup>15)</sup>を参考にして、陰性を (-)、微弱陽性を (±)、弱陽性・強陽性を (+) とした。また、核クロマチン網工の表現法は平野ら<sup>7)</sup>を参考にした。

## 結果

### 1. アユ血球の形態及び染色性

アユ末梢血及び脾臓から密度分離した血球 (赤血球を除いたすべての血球) の塗抹標本を用い、MGG 染色で得られた血球画像を分別整理した。末梢血中には、大別すると、小型で核クロマチンが一様な A 群と、細胞質が好塩基性に染まり、核周明庭を持つ B 群、及び淡青灰色の細胞質、不染性顆粒を持つ C 群の 3 群の血球があり、細胞面積の小さい方から順に、A 群は A1、A2、B 群は B1、B2、B3、C 群は C1、C2、C3 に細分した (図 II -1 a, b, e, f, g, h, i, j)。その他、希にしか見られない血球としては、好塩基性の大型顆粒を持つ D 群

(図 II -1 k)、大型細胞、淡青紫色細胞質に空胞を持つ E 群がみられた (図 1-1)。また、脾臓からは大型細胞で E 群に類似した F 群が観察された (図 II -1 m, n)。また、引きガラスによる塗抹標本から球形細胞の Aa、桿状形細胞の Ab が得られた (図 II -1 c, d)。それら血球の細胞及び核の面積と長径、核面積/細胞面積比、それぞれの範囲と平均値±標準偏差は表 II -1 に、また、栓球を含めた全血球に対する各血球の出現率は表 II -2 に示した。なお、C 群でみられた分葉核出現率は、表 II-3 のとおりである。

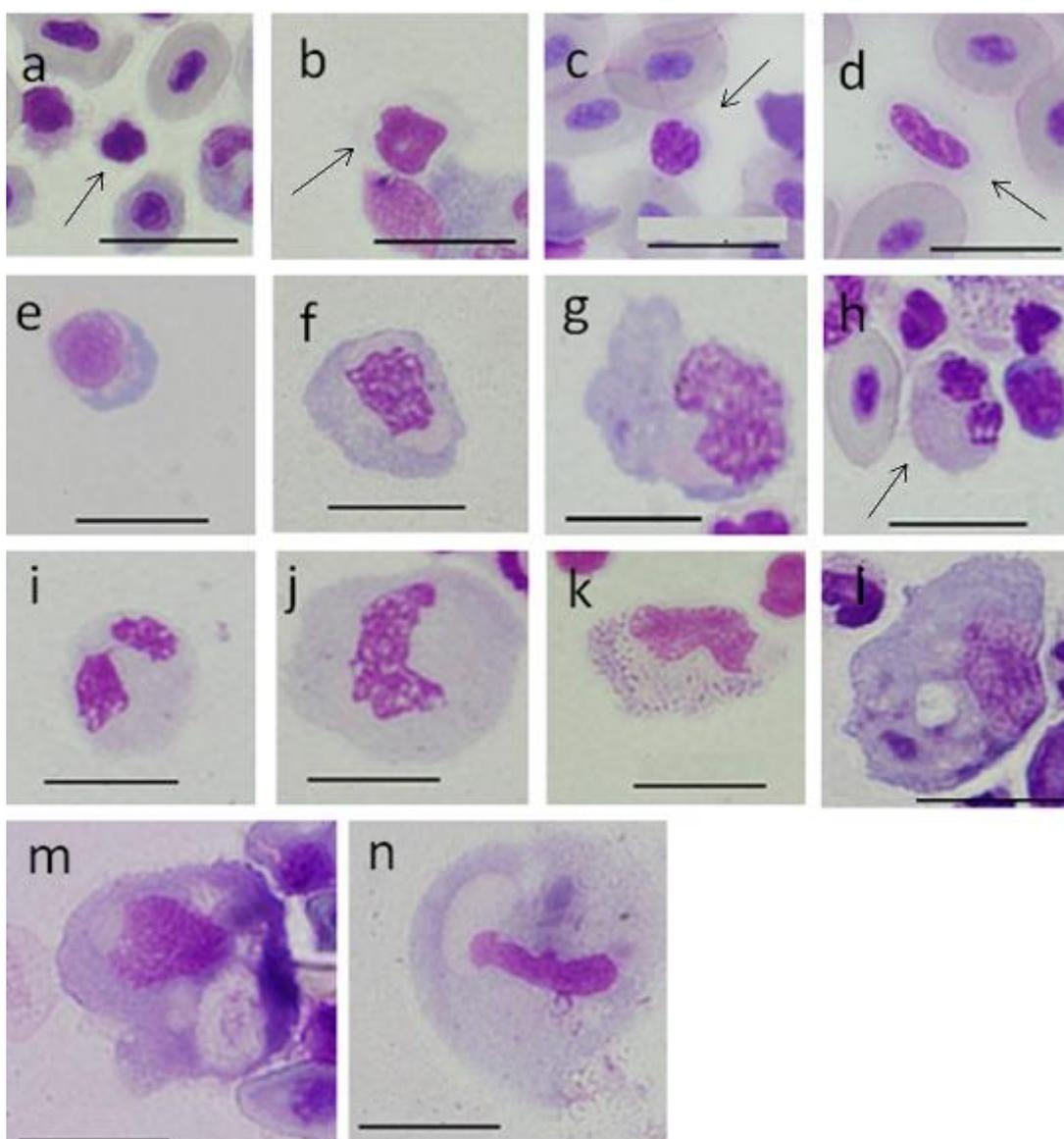


図 II -1 アユ末梢血 ( a - i ) 及び脾臓 ( m, n ) でみられた血球  
 の May-Grunward Giemsa 染色画像 ( 矢印は当該細胞 ) ,  
 Bar = 10  $\mu$ m

a : A1 type, b : A2 type, c : Aa type, d : Ab type, e : B1 type,  
 f : B2 type, g : B3 type, h : C1 type, I : C2 type, j : C3 type,  
 k : D type, i : E type, m, n : F type

表 II -1 アユの末梢血及び脾臓でみられた血球の細胞と核の大きさ及び核/細胞面積比

分類	血球採集部位	測定血球数	細胞面積( $\mu m^2$ )		核面積( $\mu m^2$ )		細胞長径( $\mu m$ )		核長径( $\mu m$ )		核面積/細胞面積比	
			範囲	平均(標準偏差)	範囲	平均(標準偏差)	範囲	平均(標準偏差)	範囲	平均(標準偏差)	範囲	平均(標準偏差)
Aa	末梢血 <sup>a)</sup>	29	17 ~ 28 22 ± 4		12 ~ 18 14 ± 2		5 ~ 7 6 ± 1		4 ~ 6 5 ± 1		0.55 ~ 0.81 0.68 ± 0.09	
Ab	末梢血 <sup>a)</sup>	34	22 ~ 34 27 ± 3		14 ~ 19 16 ± 2		6 ~ 10 8 ± 1		5 ~ 8 7 ± 1		0.53 ~ 0.66 0.60 ± 0.04	
A1	末梢血	85	8 ~ 22 13 ± 3		4 ~ 14 9 ± 2		4 ~ 6 5 ± 0.6		3 ~ 5 4 ± 0.5		0.54 ~ 0.85 0.68 ± 0.07	
A2	末梢血	770	16 ~ 59 35 ± 9		9 ~ 32 18 ± 4		5 ~ 10 8 ± 1		4 ~ 8 6 ± 1		0.35 ~ 0.78 0.52 ± 0.10	
B1	末梢血	79	22 ~ 77 44 ± 11		14 ~ 40 23 ± 5		6 ~ 12 9 ± 1		5 ~ 10 7 ± 1		0.37 ~ 0.83 0.54 ± 0.09	
B2	末梢血	54	71 ~ 118 100 ± 24		27 ~ 43 34 ± 6		11 ~ 17 14 ± 2		7 ~ 12 9 ± 1		0.25 ~ 0.43 0.35 ± 0.09	
B3	末梢血	11	124 ~ 147 135 ± 8		32 ~ 47 39 ± 4		15 ~ 19 17 ± 1		8 ~ 11 10 ± 1		0.25 ~ 0.36 0.29 ± 0.03	
C1	末梢血	50	39 ~ 60 51 ± 7		13 ~ 25 19 ± 3		7 ~ 10 9 ± 1		5 ~ 8 7 ± 1		0.27 ~ 0.56 0.38 ± 0.06	
C2	末梢血	269	60 ~ 120 94 ± 16		9 ~ 45 28 ± 6		10 ~ 21 13 ± 2		5 ~ 13 9 ± 1		0.14 ~ 0.49 0.30 ± 0.05	
C3	末梢血	62	120 ~ 201 140 ± 15		23 ~ 48 35 ± 5		13 ~ 22 16 ± 2		6 ~ 13 10 ± 1		0.15 ~ 0.38 0.25 ± 0.04	
D	末梢血	1	109		35		16		10		0.32	
E	末梢血	1	193		48		21		11		0.25	
F	脾臓	19	124 ~ 308 216 ± 46		16 ~ 47 28 ± 8		15 ~ 24 20 ± 2		6 ~ 12 9 ± 2		0.09 ~ 0.21 0.13 ± 0.04	

a) ウェッジ法にて塗抹

表 II -2 アユの末梢血中の血球の分類別出現率 (%)

分類	出現細胞割合 (%)
A1	6.1
A2	55.5
B1	5.7
B2	3.9
B3	0.8
C1	3.6
C2	19.4
C3	4.5
D	0.1
E	0.1

表 II -3 アユの末梢血白血球のC群でみられた分葉核(2分葉)の出現率 (%)

分類	分葉核出現率(%)	
	mean	SD
C1	16	± 8
C2	13	± 5
C3	27	± 43

## A 群血球

A1 は細胞面積  $8\sim 22\ \mu\text{m}^2$  (長さは  $4\sim 6\ \mu\text{m}$ ) の小型の細胞であり、赤血球を除いたすべての血球に対する出現率は 6.1 % である (表 II -1, II -2)。細胞は類円形あるいは紡錘形であり、細胞質は淡紫青色であり、細胞質を判別し難いものもある。核は、類円、紡錘形、暗赤紫色を呈し、核クロマチンは均一である。また、細胞の凝集も認められた (図 II -1a)。

A2 は細胞面積  $16\sim 59\ \mu\text{m}^2$  (長さは  $5\sim 10\ \mu\text{m}$ ) と、A1 と比べて大きく、出現率は 55.5 % と多かった (表 II -1, II -2)。細胞は、円形あるいは類円形であった。細胞質は透明ないし灰色、淡紫青色であるが、淡青色を呈する細胞もみられ、偽足のみられる細胞が多かった。核色は A1 細胞とは異なり、明るく、淡赤紫色～赤紫色を呈した。核形は類円形、腎形、馬蹄形と様々な形の細胞がみられた。核クロマチンは均一であった (図 II -1 b)。

Aa は細胞面積  $17\sim 28\ \mu\text{m}^2$  (長さは  $5\sim 7\ \mu\text{m}$ ) の小型の細胞であった (表 II -1, II -2)。細胞は円形あるいはソラマメ形であり、細胞質は淡紫青色。核は類円形を示し、一端に切れ込みのみられる核が多く認められた。なお、核は濃赤紫色であり、クロマチンは均一であるが粗剛な面が残っていた (図 II -1 c)。

Ab は細胞面積  $22\sim 34\ \mu\text{m}^2$  (長さは  $6\sim 10\ \mu\text{m}$ ) であった (表 II -1, II -2)。細胞は桿状形であり、細胞質は透明ないし淡紫青色。核クロマチンは Aa と同様に均一であるが粗剛な面が残っていた (図 II -1 d)。

## B 群血球

B1 は細胞面積  $22\sim 77\ \mu\text{m}^2$  (長さは  $6\sim 12\ \mu\text{m}$ ) であり、出現率は 5.7 % であった (表 II -1, II -2)。細胞は円形、類楕円形、腎形であり、

偽足はほとんどみられなかった。細胞質周辺部が青色に濃染され、明瞭な核周明庭がみられた。核は円形、類楕円形、腎形であり、暗赤紫色を呈していた。ほとんどの細胞で核は偏在していた。核クロマチンは不鮮明であるが粗剛であった (図 II -1 e)。

一方、B2、B3 は  $120 \mu\text{m}^2$  で中細胞と大細胞に区分した。B2 は細胞面積  $71 \sim 118 \mu\text{m}^2$  (長さは  $11 \sim 17 \mu\text{m}$ )、出現率は 3.8%、B3 は細胞面積  $124 \sim 147 \mu\text{m}^2$  (長さは  $15 \sim 19 \mu\text{m}$ )、出現率は 0.8%であった (表 II -1, II -2)。共に細胞の輪郭は類円形、類楕円形であり、偽足のみみられる細胞も存在した。細胞質周辺部は青色から青灰色に染まり、核周明庭もみられるほか空胞もみられた。核は類円形、腎形、馬蹄形、さらに不定形もみられ、核クロマチンは粗剛であった (図 II -1 f, g)。

### C 群血球

C 群は細胞面積  $36 \sim 200 \mu\text{m}^2$  (長さは  $7 \sim 21 \mu\text{m}$ ) であり、便宜上、 $60 \mu\text{m}^2$  以下 (以下 C1 とする)、 $60 \sim 120 \mu\text{m}^2$  (以下 C2 とする)、 $120 \mu\text{m}^2$  (以下 C3 とする) 以上に分類された。C1 の出現率は 3.6%、C2 の出現率は 19.2%、C3 の出現率は 4.5% である (表 II -1, II -2)。細胞はいずれも輪郭は円形あるいは楕円形を示した。細胞質は広く、淡青灰、淡桃灰色に薄く染まり、染色顆粒はまったく認められなかった。核は円形あるいは腎形、桿形である。核クロマチンは粗剛であるが、C1 の小型細胞は均一を示す細胞も多くみられた (図 II -1 h, i, j)。桿状核幅の括れ部分が  $1/3$  以下となっている核を含めて分葉核としたが、約 20% が分葉核であり、ほとんどが 2 分葉であった (表 II -3)。

### D 群血球

D は細胞面積  $109 \mu\text{m}^2$ (長さは  $14 \mu\text{m}$ )であり、末梢血中に検出されたのは本細胞のみであり、出現比率は 0.1%であった(表 II -1, II -2)。細胞は楕円形を示した。細胞質は淡青灰色であるが、部位によって淡桃灰色を呈し、青紫色の顆粒( $0.3 \sim 0.4 \mu\text{m}$ )がみられるが、一部、脱顆粒を起こしていた。核は腎形であり、赤紫色を呈し、核クロマチンは不鮮明であった。また、核に重なって青紫色の顆粒が認められた(図 II - 1 k)。

### E 群血球

E は細胞面積  $193 \mu\text{m}^2$ (長径  $21 \mu\text{m}$ )と大型の細胞であり、希有な点では D と同様に末梢血中での出現比率は 0.1%と少なく、核/細胞質面積比は 0.25 と小さい(表 II -1, II -2)。細胞は類楕円形を呈し、偽足様細胞突起がみられた。細胞質は淡青灰色を呈し、青色顆粒が散在しており、約  $3 \mu\text{m}$  の空胞も認められた。また、暗赤紫の着色塊が数個散在していた。核は腎形であり、クロマチンは繊細線状を示す(図 II -1)。

### F 群血球

F 群血球は脾臓に存在しており、細胞面積が  $124 \sim 308 \mu\text{m}^2$ (長さは  $15 \sim 24 \mu\text{m}$ )の大型の細胞であり、核面積/細胞質面積比は  $0.09 \sim 0.21$  と極めて小さかった(表 II -1)。細胞は類円、楕円形(図 II -1 m, n)であり、偽足様突起もみられた。細胞質は淡青紫色の好塩基性を示し、大小の空胞、黒青色塊や黒褐色の着色塊がみられ、細胞内には捕食されたと思われる赤血球が認められた(図 II -1 m)。核は類円形、桿状形(図 II -1 m, n)で、クロマチンは不鮮明ながら繊細網状(図 II -1 m)ないし均一(図 II -1 n)であった。F のうち、核の類円形の細胞(図 II -1 m)は E 細胞に酷似していた(図 II -1 n)。

### 血球の Percoll 密度勾配分画

Percoll 密度勾配分離法により、アユ血球は Percoll 32～60%(比重 1.042～1.075)の 2%間隔の密度層に分画された。なお、赤血球は 62%層以下に沈殿した。各分画でみられた 60～300 個の血球は、A、B、C、D および E 群として分類され、各層毎に各血球の割合(%)を計算した(表 II -4)。

A 群では、A1 と A2 の出現比重範囲は 1.042～1.056 に集中していた。B 群では、B1 が 1.052～1.063、1.059～1.063、B2 と B3 が 1.056～1.061 に集中していた。しかしながら、B1 と B2 は 1.073～1.075 でもみられた。C 群は高い密度層の中にあり、C2 と C3 が 1.059～1.075 でみられ、C1 は 1.056～1.059 と 1.070～1.075 でみられた。C1 と C3 は一部 1.042～1.045 でもみられた。D は 1.066、E は 1.063 でみられた。

表 II -4 Percoll 密度勾配分離法により分けられたアユの血球  
の分配率

percoll(%)	比重	:出現血球種									
		A1	A2	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D	E
32	1.042	8	13	0	3	0	6	2	8	0	0
34	1.045	16	11	1	4	0	0	4	8	0	0
36	1.047	16	18	1	0	0	0	0	0	0	0
38	1.049	22	17	3	0	0	2	0	0	0	0
40	1.052	18	13	12	2	0	0	1	2	0	0
42	1.054	1	15	7	1	0	0	2	3	0	0
44	1.056	19	9	11	4	23	11	3	2	0	0
46	1.059	0	2	18	10	20	16	6	10	0	0
48	1.061	0	0	17	13	36	4	11	7	0	0
50	1.063	0	1	19	7	0	3	5	4	0	100
52	1.066	0	0	0	10	0	2	17	10	100	0
54	1.068	0	0	0	7	0	0	10	22	0	0
56	1.070	0	0	0	8	21	13	13	12	0	0
58	1.073	0	0	3	12	0	31	15	4	0	0
60	1.075	0	0	10	19	0	14	11	9	0	0

## 血球の核面積／細胞面積比

血球の細胞面積に対する核面積／細胞面積比を図 II -2 に示す。

図 II -2 a は A1,A2,Aa,Ab をプロットしている。図でも明らかのようにプロット群は、細胞の大きさに反比例して核面積／細胞面積比が小さくなる逆比例の関係を示し、Aa, Ab は A2 のプロット上で重なった。一方、A1 は最も小さい血球であり、同じ大きさの細胞面積でも、核面積／細胞面積比の値の幅が大きかった。

図 II -2 b は B1,B2,B3,E,F をプロットしている。Fを除き、図 II -2 a と同様の逆比例の関係が認められた。B1 と B2、B3 の境界あたりで勾配が変化していた。同じ図中に表した E は B2、B3 のプロットの勾配延長線にみられたが、細胞面積の大きさで B2、B3 の細胞集団と隔離していた。また、F は、核面積／細胞面積比の値は B、E より小さく、細胞面積の大きさの違いに対してもその変化はほとんどみられなかった。

図 II -2 c は C1,C2,C3,D をプロットしている。C1、C2、C3 は、図 II -2 a , 2 b と同様に逆比例の関係がみられ、C1、C2、C3 を細胞の大きさによって分別したことから、プロットには継続性がみられた。また、D は C2 のプロット群に重なっている。

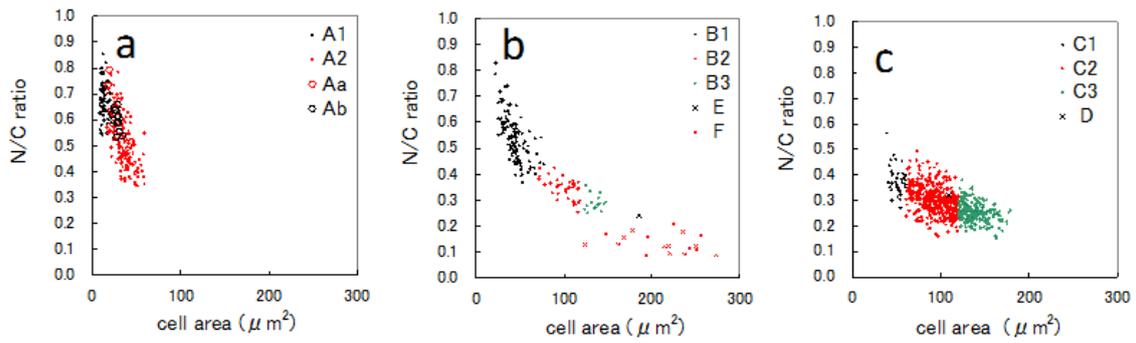


図 II -2 アユ末梢血及び脾臓でみられた血球の細胞面積に対する核面積 / 細胞面積比の分布

a 図 : A1 type, A2 type, Aa type, Ab type,

b 図 : B1 type, B2 type, B3 type Et ype, F type

c 図 : C1 type, C2 type, C3 type, D type

### **Leishman-Giemsa 染色 (LSG)**

MGG 染色と同様 Romanowsky 染色であり、MGG 染色と同様の染色性が得られ、LSG 染色では、MGG 染色と比べて、好塩基性がやや強く、鮮やかに濃染されていた。A1 の染色性は、細胞質が紫青色であり、核が暗赤紫色であった。A2 の染色性についてみると、細胞質が紫青色であり、核が赤紫色を呈していた(図 II -3 a, b)。

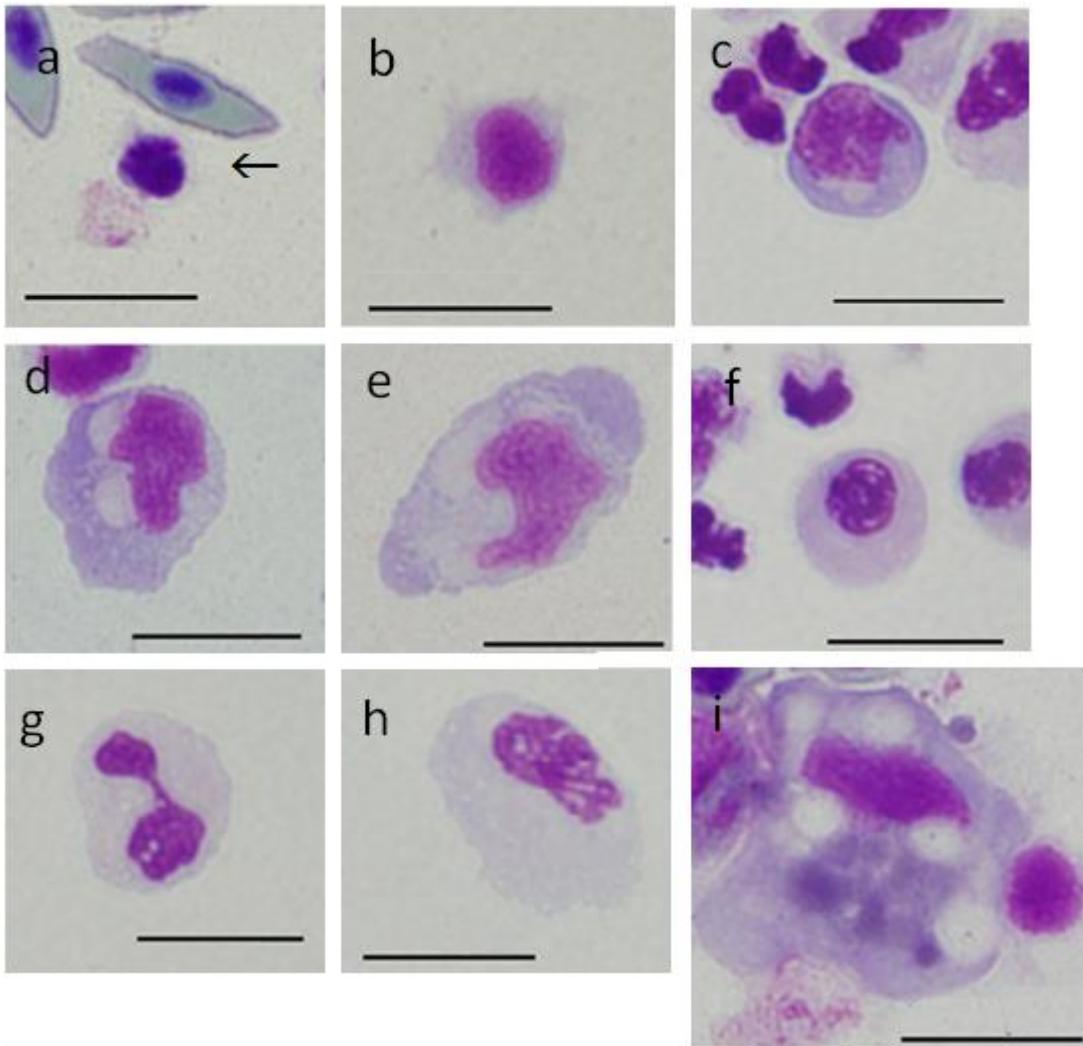


図 II-3 アユ末梢血及び脾臓でみられた血球の Leishman-Giemsa  
染色画像, Bar = 10  $\mu$ m

a : A1 type, b : A2 type, c : B1 type, d : B2 type, e : B3 type,  
f : C1 type, g : C2 type, h : C3 type, i : F type

### **Toluidine blue 染色**

Toluidine blue 染色後、pH 1.5、pH 3.0、pH 4.5 の酸性水溶液で濯いだ。pH 4.5 で濯いだ処理の画像のみを示した(図 II -4)。いずれも極めて着色は薄く、*metachromasia* を示す細胞は検出できなかった。

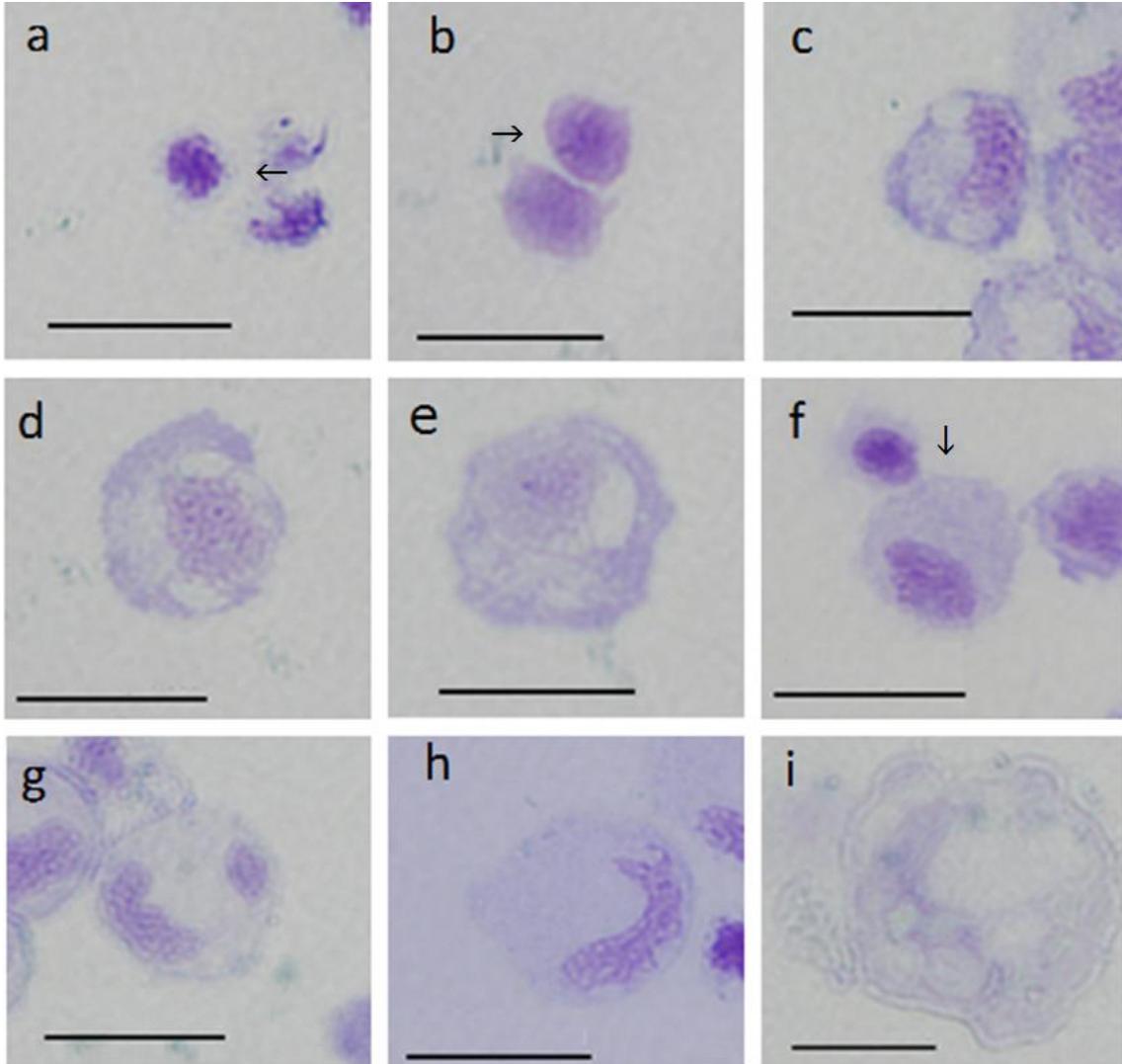


図 II-4 アユ末梢血及び脾臓でみられた血球の toluidine blue 染色画像, (矢印は当該細胞), Bar = 10  $\mu$ m

a : A1 type, b : A2 type, c : B1 type, d : B2 type, e : B3 type,  
 f : C1 type, g : C2 type, h : C3 type, i : F type

## 2. アユ血球の細胞化学的検査

アユ末梢血及び脾臓でみられた血球の細胞化学的検査を行い、得られた各酵素染色の染色像について以下に述べる。なお、D、E細胞は本検査の際、末梢血中からは検出できなかった。

### **Peroxidase 染色 (PO)**

A、B群はいずれも陰性であり、後染色がギムザ染色であることから MGG 染色とほぼ同様な染色性を示した (図 II -5 a, b, c, d, e)。C群細胞はいずれも陽性であり、全体が褐色の微慢性に着色しており、C1>C2>C3の順に活性が強かった。C1は強陽性を示し、黒褐色の活性顆粒が認められる細胞もあった。C2、C3は中陽性であり、細胞質に淡褐色～褐色がまだらになった大小の無着色空胞が認められた。核は濃紫赤色ないし黒褐色に着色、核周辺に帯状ないし塊状に黒褐色着色がみられる細胞もあった (図 II -5 f, g, h)。脾臓で観察された F細胞は、核周辺で薄く茶褐色の痕跡が認められる細胞もみられ、陰性～微弱陽性であった (図 II -5 i)。

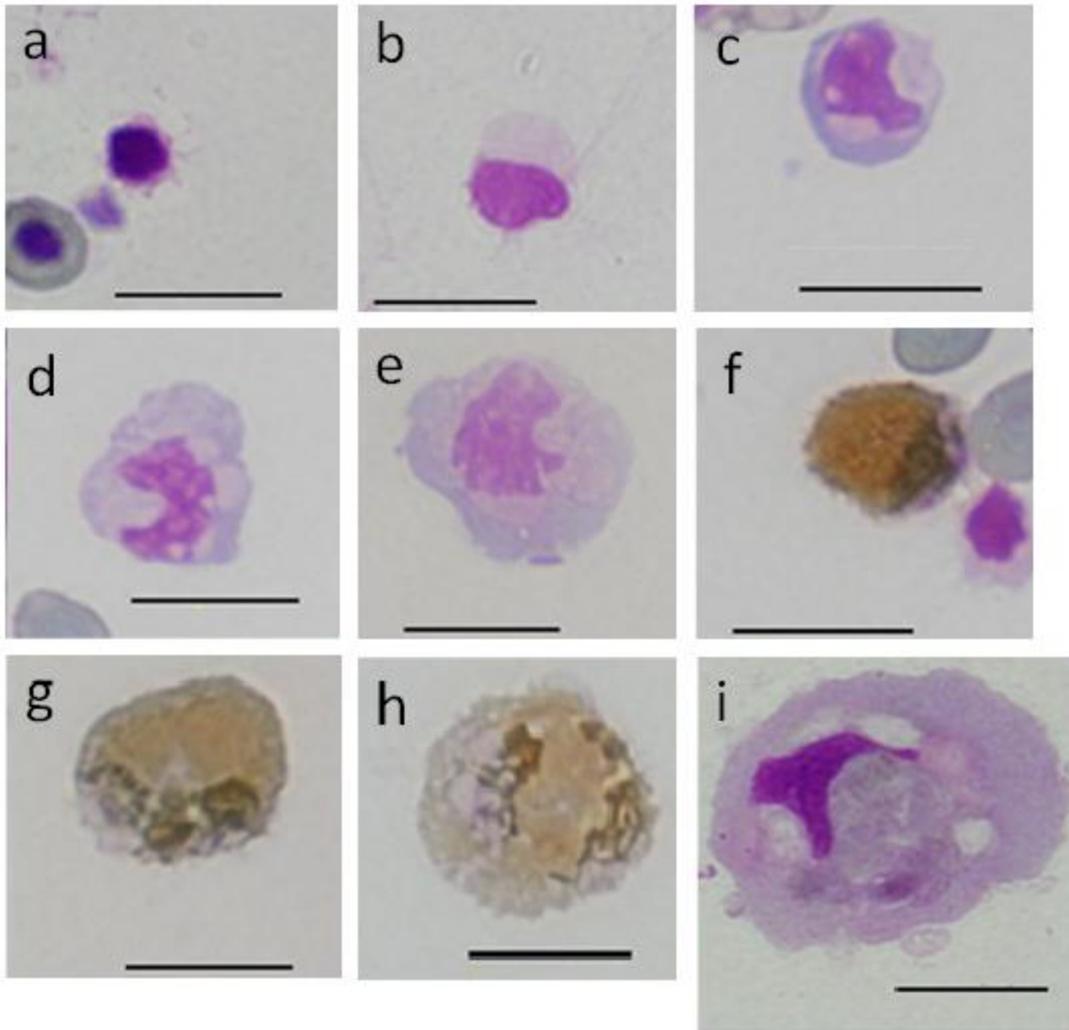


図 II-5 アユ末梢血及び脾臓でみられた血球の

3,3'diaminobenzidine 法による peroxidase 染色画像

a : A1 type, b : A2 type, c : B1 type, d : B2 type, e : B3 type,  
 f : C1 type, g : C2 type, h : C3 type, i : F type

### **Alkaline Phosphatase 染色 (ALP)**

A1、A2 は陰性であった (図 II -6 a, b)。B1、B2、B3 では核近傍に数個の青色の活性顆粒 (I 型) が認められた (図 II -6 c, d, e)。C1、C2 では細胞質に青色の大小の活性顆粒がみられた。(IV 型)、C3 はやや弱く、着色した活性顆粒はまばら(III 型)であった。PO 染色と同様に C1>C2>C3 の順に高い活性がみられた(図 II -6 f, g, h)。一方、F 細胞は陰性(0 型)であった(図 II -6 i)。

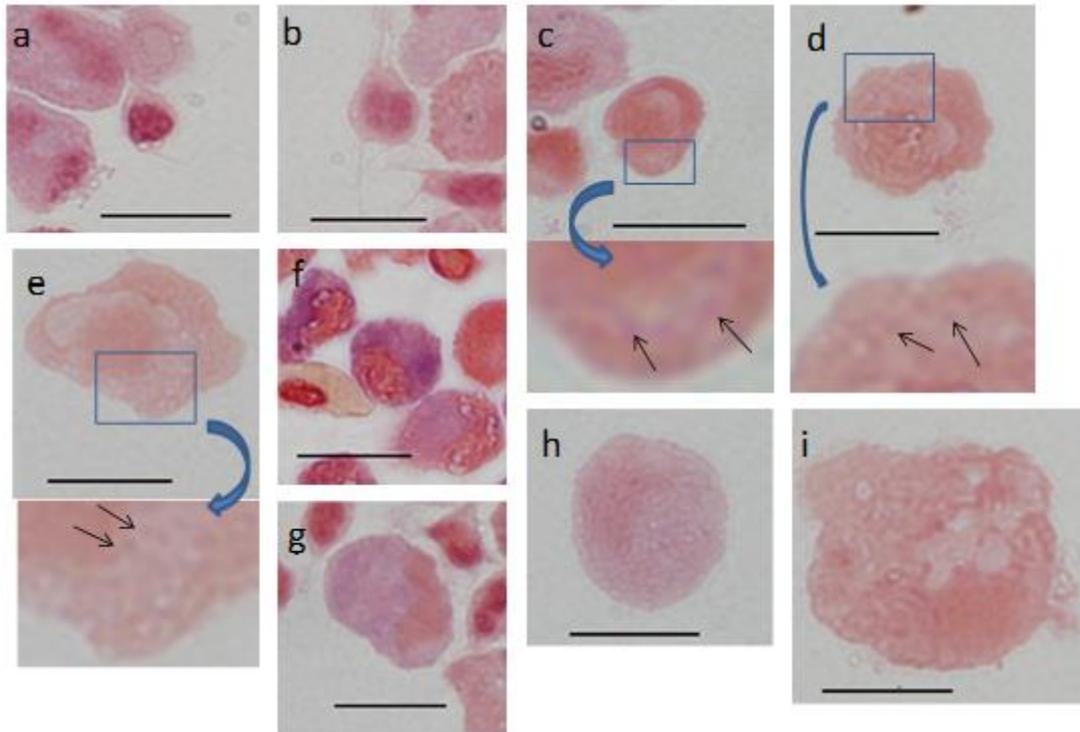


図 II - 6 アユ末梢血及び脾臓でみられた血球の alkaline phosphatase 染色画像 (拡大図中の矢印は青色顆粒),  
Bar = 10  $\mu$ m

a : A1 type, b : A2 type, c : B1 type, d : B2 type, e : B3 type,  
f : C1 type, g : C2 type, h : C3 type, i : F type

### **Acid phosphatase 染色 (ACP)**

A1、A2 は細胞質に赤紫色の顆粒が、また、核に重なって数個顆粒状の濃赤紫色の着色 (I 型) が認められた (図 II -7 a, b, c)。B 群は細胞質の一部が赤紫色に着色 (III 型) していた (図 II -7 d, e, f)。C 群は細胞質全体が微細な活性顆粒による着色 (IV 型) がみられた (図 II -7 g, h, i)。脾臓で観察された F 細胞は細胞質の約半分を赤紫色の大型活性顆粒 (III 型) で占められていた (図 II -7 j)。

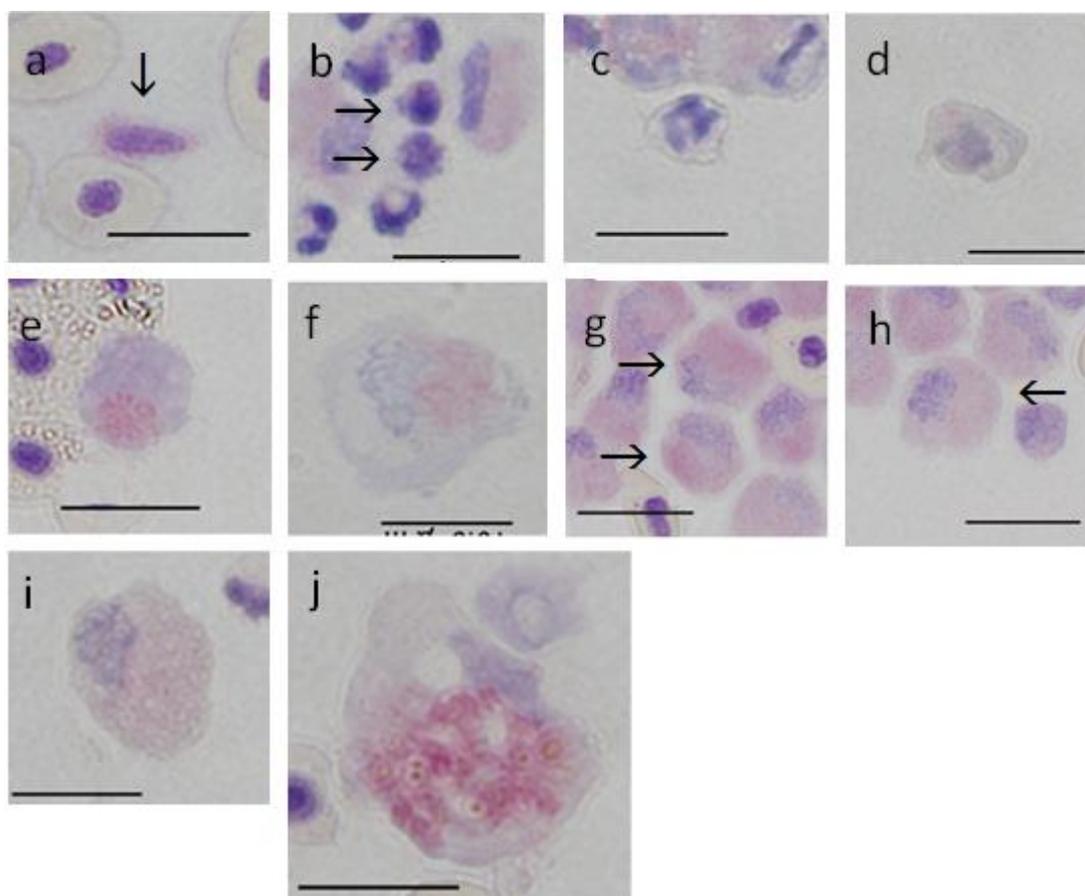


図 II-7 アユ末梢血及び脾臓でみられた血球の acid phosphatase 染色画像(矢印は当該細胞), Bar = 10  $\mu$ m

a : Ab type, b : A1 type, c : A2 type, d: B1 type, e : B2 type,  
 f : B3 type, g : C1 type, h : C2 type, I : C3 type, j : F type

### **Esterase 染色 (EST $\alpha$ -NB)**

A、B 群はいずれも陰性(0 型)であった (図 II -8 a, b, c, d, e)。C 群は共に淡褐色顆粒が数個 (I 型) みられた (図 II -8 f, g, h)。F 細胞は、黒褐色の活性塊、活性顆粒が散在しており、さらに細胞質が広く淡赤褐色に染まっている部分(III 型)が認められた(図 II -8 i)。

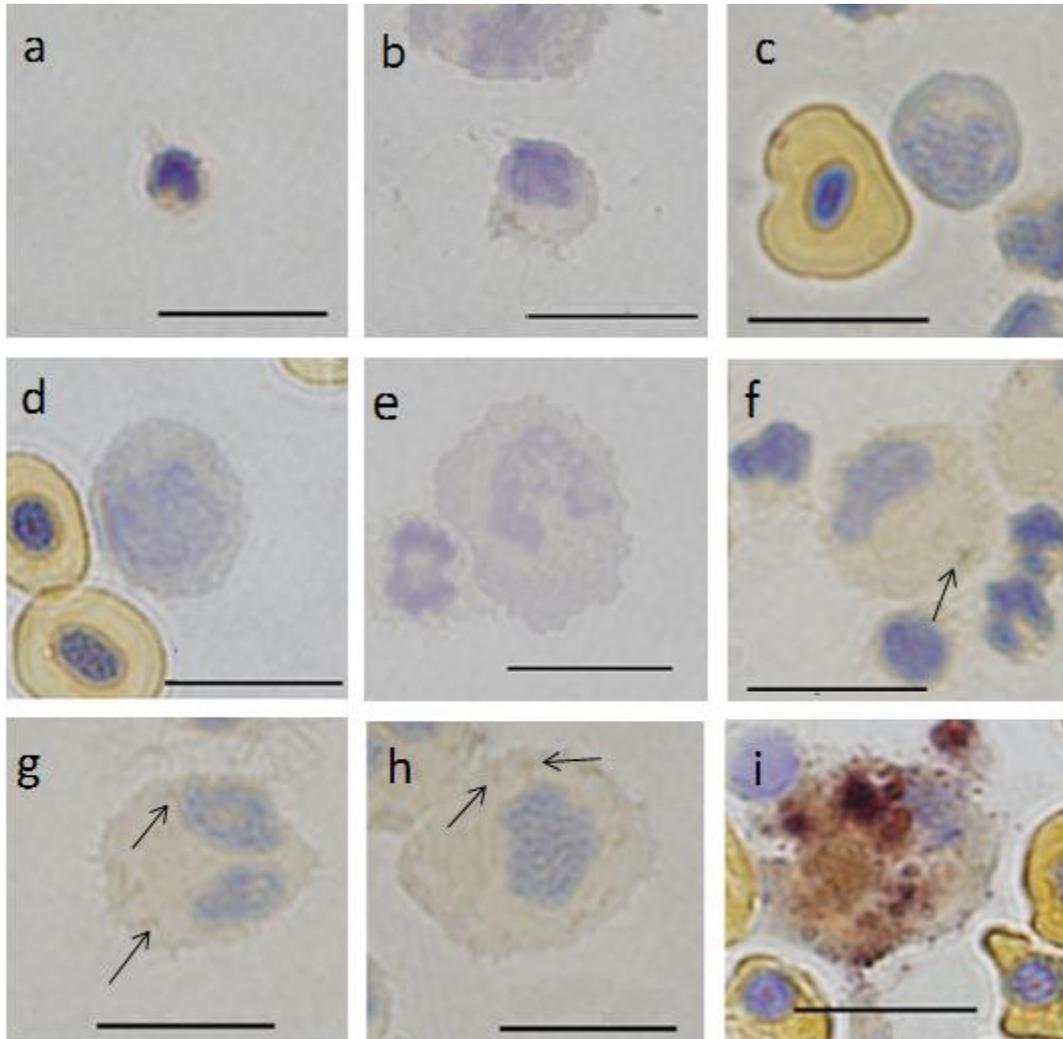


図 II -8 アユ末梢血及び脾臓でみられた血球の  $\alpha$ -naphthyl butyrate  
 法による esterase 染色画像 (矢印は褐色顆粒), Bar = 10  $\mu$ m  
 a : A1 type, b : A2 type, c : B1 type(右), d :B2 type, e : B3 ty  
 f : C1 type, g : C2 type, h : C3 type, i : F type

### **Periodic acid Schiff 染色 (PAS)**

A1、A2 群は陰性(0型)であった(図 II-9 a, b)。B1、B2、B3 群では後染色のヘマトキシリンによる青色に染まった細胞質縁辺部に赤紫色の弱い活性(I型)が認められた(図 II-9 c, d, e)。C 群は細胞質全体が微慢性に着色、細胞縁辺は帯状に濃く着色していた(III型)(図 II-9 f, g, h)。F 細胞は核近傍に赤紫色の大型活性顆粒が密集していた(II型)(図 II-9 i)。

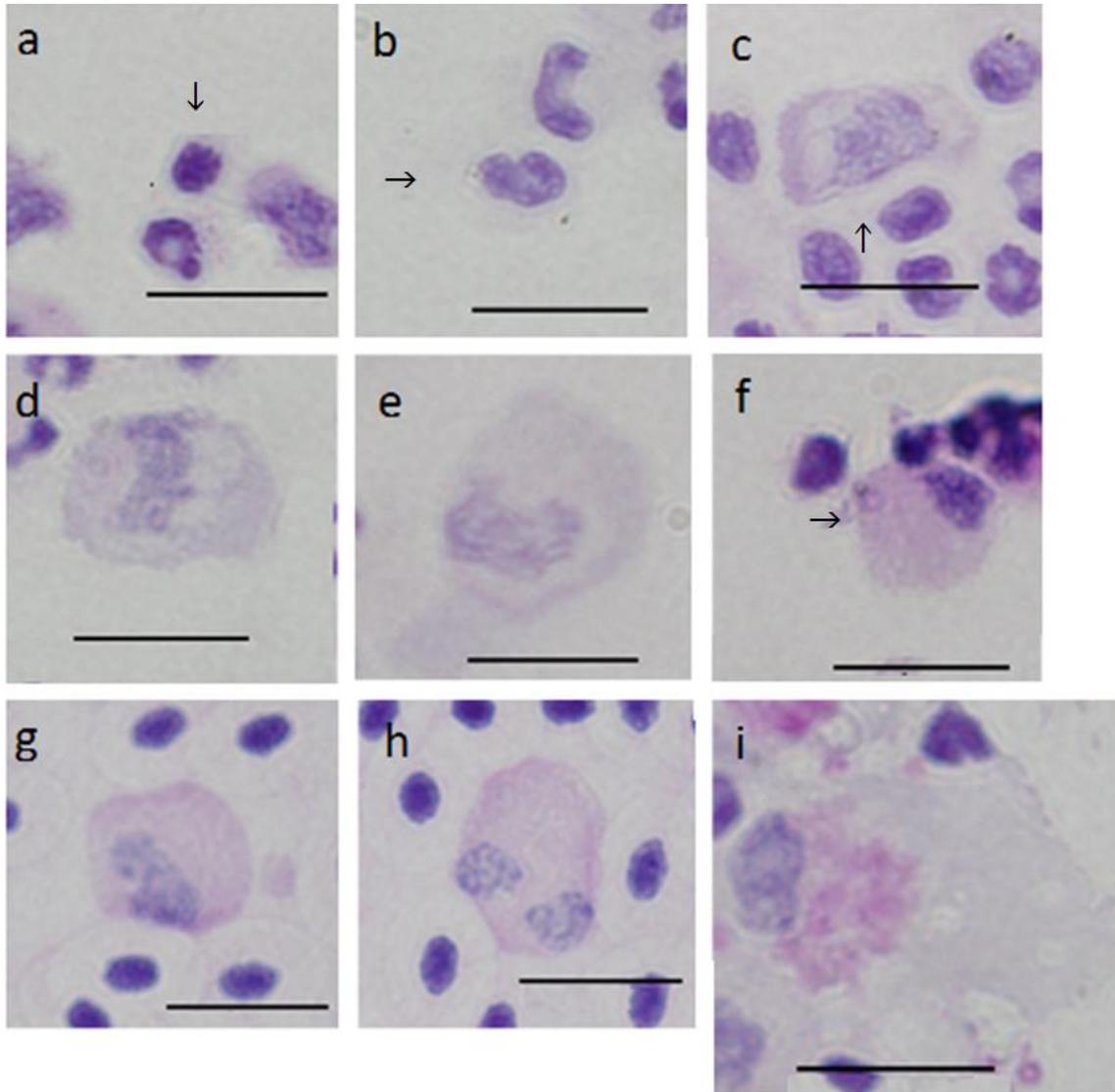


図 II -9 アユ末梢血及び脾臓でみられた血球の periodic acid Schiff 染色画像, (矢印は当該細胞), Bar = 10  $\mu$ m

a : A1 type, b : A2 type, c : B1 type, d : B2 type, e : B3 type,  
 f : C1 type, g : C2 type, h : C3 type, i : F type

## 考察

魚類の白血球の形態、染色性は哺乳類白血球と類似している事実から、哺乳類血液学の知見が魚類血球にも適用されてきた<sup>12,17)</sup>。

Romanowsky 染色による魚類白血球・栓球でみられる形態、染色性(表 II -5)<sup>12,17,18)</sup> を参考にして、アユでみられた血球の形態及び染色性(表 II -6) からその帰属を検討した。

表 II - 5 魚類栓球・白血球の形態及び染色性<sup>12,17,18)</sup>

血球	形状	細胞質	核	備考
栓球	<ul style="list-style-type: none"> <li>桿状形、紡錘形、楕円</li> <li>人為操作により形態変化</li> <li>刺激により偽足</li> <li>複数種の報告</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>未熟青色、成熟灰色、青灰色</li> <li>顆粒は若い細胞は濃塩基性、中間は淡い塩基性</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>リブの付いたクロマチン</li> <li>核を横切る窪みのあるヘテロクロマチン</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>形態変化の進んだ栓球はリンパ球との分別困難</li> </ul>
リンパ球	<ul style="list-style-type: none"> <li>円、楕円形</li> <li>大きさは小～大</li> <li>刺激により偽足</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>狭い細胞質</li> <li>青、青灰、淡青色、幼弱形は濃染</li> <li>アズール顆粒の報告例あり</li> <li>核周明庭</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>クロマチンは粗大粗荒、網工不鮮明</li> <li>円形</li> <li>切れ込み、括れ核多い</li> <li>まれに核小体</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ヒトに酷似</li> <li>プラズマ細胞が多くの魚の末梢血にみられる</li> </ul>
好中球	<ul style="list-style-type: none"> <li>円形、類円形*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>幼弱形は好塩基性、淡青、青灰、淡赤色細胞質</li> <li>不染性顆粒、暗灰、灰色顆粒、淡赤、青赤、赤紫色微小顆粒</li> <li>2タイプの小粒は未熟、成熟した金魚</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>円、楕円、lobe、腎形馬蹄形核</li> <li>分葉核(2-5)*</li> </ul>	
好塩基球	<ul style="list-style-type: none"> <li>円形*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>細胞質は好塩基性、好塩基性淡褐色(コイ、フナ)</li> <li>濃紫色粗大顆粒(コイ、フナ)[12]</li> <li>淡赤色、能青紫色顆粒*[12]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>核は濃染</li> <li>クロマチン不明瞭</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>出現は希有</li> <li>顆粒は水、アルコールに溶けやす</li> </ul>
好酸球	<ul style="list-style-type: none"> <li>円形、類円*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>朱赤色大型顆粒*[12]</li> <li>淡水魚ベージュ色顆粒[12]</li> <li>海産魚赤色系(朱赤色)顆粒[12]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ソーセイジ形で二分葉した偏在核</li> <li>クロマチンは粗大粗荒、網目状*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>標本作製操作不適で安易に顆粒破壊</li> </ul>
単球/マクローファージ	<ul style="list-style-type: none"> <li>白血球中最大*</li> <li>類円形、不整形、遊走形*</li> <li>偽足様突起</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>好塩基性灰色紫青色*</li> <li>幼弱なものは好塩基性で濃染</li> <li>紫赤色顆粒散在*</li> <li>無顆粒で灰青色の細胞質</li> <li>小胞、液胞、含有物あり</li> <li>核周明庭みられない*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>円、腎形、不規則分葉核*</li> <li>クロマチン線状荒い網状*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ヒトに類似[12]</li> </ul>

\* : ヒト血球の特徴に類似

表 II-6 アユの末梢血及脾臓でみられた栓球・白血球の種類と性状

血球	分類	形状	細胞質	核	血球採集部位
栓球1 栓球2 栓球a 栓球b	A1 A2 Aa Ab	A1:類円、紡錘形 A2:円、類円形 Aa:類円形、ビーン Ab:桿状形 A1:凝集 A1,A2:偽足	・A1:灰、淡紫青色 ・A2:灰、淡紫青、淡青色 ・Aa:淡紫青色 ・Ab:透明、淡紫青色	・核色はA1:暗赤紫色、Aa:濃赤紫色、A2,Ab:淡赤紫色 ・核形は、A1:類円紡錘、A2:円、腎、馬蹄形、Aa:円腎形で切れ込み核あり、Ab:桿状形 ・A1、A2:クロマチンは均一 ・Aa、Ab:クロマチンは棒状、粗剛濃縮	尾静脈
小リンパ球	B1	・円、楕円、腎形 ・小型血球	・濃青色 ・核周明庭	・核形は類円形、半月形 ・クロマチンは粗剛濃縮、やや不鮮明	尾静脈
中リンパ球 大リンパ球	B2 B3	・類円、類楕円形 ・中・大血球 ・偽足	・細胞質は青色、淡青灰色 ・空胞のみられる細胞あり ・核周明庭	・核形は類円形、腎形、馬蹄形、不定形核 ・クロマチンは粗剛濃縮	尾静脈
小好中球 中好中球 大好中球	C1 C2 C3	・円形、類円形 ・小～大細胞	・細胞質は淡青灰色、淡桃灰色 ・顆粒は認められない	・円形、腎形、桿状形 ・二分葉核あり ・クロマチンは粗剛濃縮 ・C1はやや粗剛濃縮	尾静脈
好塩基球	D	・楕円形	・細胞質は淡青灰色、一部淡桃灰色 ・青紫顆粒、一部脱顆粒	・核は腎形 ・核上に青紫色顆粒 ・クロマチン不鮮明	尾静脈
単球/マクロファージ	E	・大型細胞 ・楕円形 ・偽足様突起	・細胞質は淡青灰色 ・核周明庭みられない ・青色顆粒散在、暗赤紫着色塊、空胞	・核は腎形 ・クロマチンは線状繊細	尾静脈
単球/マクロファージ	F	・大型細胞 ・楕円形 ・偽足様突起	・細胞質は淡青紫色 ・核周明庭みられない ・空胞、黒青、黒褐色着色塊、捕食含有物あり	・類円、腎、桿状、不定形 ・クロマチンは線状、不鮮明で均一もみられる	脾臓

栓球としての A 群：A 群は小型の血球であり、偽足のみられる細胞が多いこと、核クロマチンが均一と栓球の特徴を示す(表 II -5, II -6)。栓球は採血後、人為的な操作で形態変化しやすく、池田<sup>12)</sup>は栓球の形態変化の進行を模式図に示している。Aa (栓球 a), Ab (栓球 b) は採血直後にスライドに塗布した栓球の画像であり、模式図から栓球 b は桿状形で形態変化は進んでいない栓球といえ、栓球 a はある程度形態変化した栓球に似ている。栓球 a, 栓球 b のクロマチンは均一ながら粗剛な構造を残しているが、A1 (栓球 1), A2 (栓球 2) は人為的操作の過程で形態変化が進んだ染色像といえ、核クロマチンも粗剛から均一へと変化したものと推察される。池田ら<sup>12)</sup>は集合、凝集した栓球の染色像を呈しており、それらを活性化した栓球としている。栓球 1 はそれらの画像に酷似しており、核色は暗赤紫色を呈することから他血球と明らかに区別される。一方、栓球 2 は栓球 1 と比べて明るい核色をしている。Saunders<sup>19)</sup>も栓球に 2 つの染色性のあることを報告している。池田ら<sup>3)</sup>は LSG 染色により栓球は他の血球と区別可能としているが、LSG 染色で得られた栓球は MGG 染色より鮮やかな染色像が得られたものの、核は MGG 染色と同様依然 2 つの染色性を示した。栓球 1、栓球 2 (図 II -2 a) は核/細胞面積比が小型の B1 さらに C1 と接近しており、その区別が困難である。しかし、密度勾配分離においては、A1、A2(栓球 1、栓球 2)が比重 1.042~1.047 に集中しているが、B1 と C1 のセルは A1、A2 から離れた分画にみられた(表 II -4)。Ellis<sup>20)</sup>はヨーロッパ産ツノガレイ、*Pleuronectes platessa* の栓球を 4 つの主な形態に分割しており、lone 形の多い場合、栓球をリンパ球として見誤ることから計数に使用されるべきでないと述べている。ヨーロッパ産ツノガレイの Lone 形の栓球の核は類円形で核が偏在しており、アユ栓球 2 にも同様の細胞がみられた (図 II -5 b, 8 b)。

リンパ球としての **B 群** : B1 血球ではほとんどの核が偏在しているが、これは密度選別等の人為操作により変形したものと考えられる。また、血球の形も円形より楕円形のものが多い。しかし、細胞質は青色に濃染し、核周明庭がみられるなど、B1 は典型的なリンパ球の特徴を有していた(表 II -5, II -6)。なお、B1(小リンパ球)の核クロマチンは粗剛であり、栓球 1、栓球 2 の均一な核クロマチンと異なる点で、両者は分別が可能といえる。一方、B2、B3 は小リンパ球と同様に形態変化のみられる細胞が多かった。さらに、細胞は類円形、類楕円形であり、偽足のみられる細胞、細胞質に空胞のみられる血球もみられた。核は腎形、馬蹄形、変形核である。核クロマチンは粗剛であり、細胞質周辺部は青灰色に染まり、核周明庭がみられた(表 II -6)。単球/マクロファージと一致する特徴もあるが、核周明庭がみられることから B2(中リンパ球)、B3(大リンパ球)とした。

**顆粒球としての C、D 群** : C 群血球は細胞質が灰色、淡青色、淡赤色を呈するが、顆粒は無染色であり、さらに分葉核がみられるなどの特徴を有していることから好中球に分類された(表 II -5, II -6)。これらの特徴は C1(小好中球)、C2(中好中球)、C3(大好中球)血球のいずれにも共通して認められた。小好中球は細胞面積が小さくなるに従って、いずれの血球も相対的に細胞質が小さくなり(図 II -2 a)、細胞種の判定は核の違いが重要であった。好中球の核クロマチンは粗剛であるが、小好中球の核クロマチンは均一な細胞もみられ、栓球との区別を困難にしている。そのため、MGG 染色に加え、PO 染色を実施することにより分別が容易となる<sup>21)</sup>。一方、好塩基球、好酸球の識別は好塩基性ないし好酸性顆粒の存在を確認することが必須である。塩基性染料と結合した好塩基性物質は、極端に希釈した電解液でさえたやすく放出すると言われ<sup>14)</sup>、本試験での染色操作にお

いてもリン酸緩衝液でなく、蒸留水を用いた。しかし、顆粒のみられた血球は D 群の細胞のみであり、顆粒が好塩基性を有することから好塩基球としたが、アユの血中には好塩基球は極めて少ないといえる。なお、toluidine blue 染色では metachromasia を示す細胞は認められなかった。また、好酸性顆粒を持つ血球は認められなかった。

**単球/マクロファージとしての E 細胞：**魚類単球/マクロファージの特徴は、白血球中で最大の細胞であり、細胞質は淡青灰色、核周明庭はみられない。また、核周辺に顆粒、空胞が存在する。アユ血液中でみられた E、F 細胞はこれらの特徴を持っており(図 II -1-1 m, n)、核周明庭がみられないことからリンパ球と区別される。アユ末梢血での出現は少なく(表 II -2)、Ellis の報告<sup>20)</sup>でも、ヨーロッパ産ツノガレイの血液中の単球は、白血球中で約 0.1%と少ない。ヨーロッパ産ツノガレイの単球の細胞サイズは幅があり、偏在核は細胞の半分未満で、核形は V 字型ないし馬蹄形、クロマチンは fairly loose、しばしば半月状核が細胞膜に接しており、塩基性細胞質に時々液胞を含んでいた。さらに、マクロファージは主として腎臓、脾臓でみられた。遊離マクロファージの特徴は、単球の特徴とほぼ似ているが、異なる点として、核は特徴ある円形であり、広い細胞質は Romanowsky 染料でわずかに好塩基性を示す。また、捕食残渣と思われる包含物が暗染色を呈するといわれる<sup>20)</sup>。アユ脾臓でみられた単球/マクロファージもヨーロッパ産ツノガレイの遊離マクロファージと同様な特徴を持ち、核の形態は類円形以外に紡錘形、不定形もみられ、いずれの細胞も広い細胞質をもっていた。

## 細胞化学的染色

栓球（A1, A2, Ab）、リンパ球（B1, B2, B3）、好中球（C1, C2, C3）、単球/マクロファージ F の細胞化学的染色の活性度を基にアユの染色所見を整理した。そして、硬骨魚でみられた栓球・白血球の染色所見を統合して表 II-7 にまとめた。細胞化学的染色は臨床血液学として血液関連の疾病検査として用いられているが、血球種の判別の補助手段としても用いられている。本研究では、ヒトの細胞化学的染色所見<sup>22)</sup>を参考に、PO は顆粒球、ALP は好中球、EST  $\alpha$ -NB は一部の顆粒球、単球・マクロファージ、ACP、PAS は全血球を対象に染色を行ってきた。アユ血球の染色性はヒトの血球の染色性とよく似た結果を示した(表 II -7, II -8)<sup>14,20,23-29)</sup>。一方、アユと硬骨魚の血球の染色性には魚種間で同じ反応を示すものが多いが、一部で異なる反応を示すものがみられた。PO では、栓球、リンパ球がアユを含めたすべての魚種で陰性、好中球がすべての魚種で陽性と同じ染色態度を示した。ALP は、ヒトでは **neutrophile alkaline phosphatase** とも表現されており、好中球に特異的な反応である。これはアユでも好中球が陽性となっているが、他の硬骨魚では好中球も陰性の魚種が多くみられる。栓球、リンパ球、単球/マクロファージについても魚種により異なった染色態度を示している。ACP は、栓球、リンパ球を除いて魚種による違いはなく、アユを含めてすべての魚種で陽性の染色態度を示している。EST  $\alpha$ -NB は、測定例が少ないが、好中球はほとんどの魚種で陽性ないし弱陽性を示す。アユは単球/マクロファージで陽性を示したが陰性の魚種もみられる。PAS は、いずれの魚種、血球についても陽性、弱陽性である。アユもほぼ同様の染色態度を示すが、栓球が他の硬骨魚で陽性、弱陽性を示す一方でアユは陰性であった。

表 II-7 アユ及び数種の硬骨魚栓球、白血球の特殊染色

所見 (14, 20, 23-29)

染色法	魚種	栓球	リンパ球	好中球	好塩基球	好酸球	単球
		C.R. [ Ref. ]	C.R. [ Ref. ]	C.R. [ Ref. ]	C.R. [ Ref. ]	C.R. [ Ref. ]	/マクロファージ C.R. [ Ref. ]
PO	<i>Plecoglossus altivelis altiveliss</i>	-	-	+			-~±
	<i>Cyprinus carpio</i>	- [ 23 ]	- [ 24,25 ]	+ [ 14 ]	- [ 14 ]		-,+ [ 14,25 ]
	<i>Carassius auratus</i>	- [ 23 ]	- [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Carassius carassius</i>	- [ 23 ]					+ [ 24 ]
	<i>Ictalurus punctatus</i>	- [ 26 ]		+ [ 26 ]			- [ 26 ]
	<i>Salmo irideus</i>	- [ 23 ]	- [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Anguilla anguilla</i>	- [ 23 ]	- [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Takifugu vermicularis</i>			+ [ 14 ]	- [ 14 ]		
	<i>Takifugu niphobles</i>			+ [ 27 ]		- [ 27 ]	
	<i>Takifugu rubripes</i>			+ [ 27 ]		- [ 27 ]	
	<i>Lates japonicus</i>		- [ 29 ]	+ [ 29 ]		- [ 29 ]	- [ 29 ]
	<i>Chelon haematocheilus</i>		- [ 28 ]	+ [ 28 ]			- [ 28 ]
	<i>Pleuronectes platessa L.</i>			+ [ 20 ]			
	ALP	<i>Plecoglossus altivelis altiveliss</i>	-	±	+		
<i>Cyprinus carpio</i>		- [ 23 ]	- [ 24 ]	- [ 14 ]	- [ 14 ]		± [ 24 ]
<i>Carassius auratus</i>		- [ 23 ]	- [ 24 ]				- [ 24 ]
<i>Carassius carassius</i>							- [ 24 ]
<i>Salmo irideus</i>		- [ 23 ]	- [ 24 ]				± [ 24 ]
<i>Anguilla anguilla</i>		+ [ 23 ]	+ [ 24 ]				- [ 24 ]
<i>Takifugu vermicularis</i>				- [ 14 ]	- [ 14 ]		
<i>Lates japonicus</i>			± [ 29 ]	+ [ 29 ]		- [ 29 ]	± [ 29 ]
<i>Chelon haematocheilus</i>			- [ 28 ]	- [ 28 ]			+ [ 28 ]
<i>Pleuronectes platessa L.</i>				+ [ 20 ]			
ACP	<i>Plecoglossus altivelis altiveliss</i>	±	+	+			+
	<i>Cyprinus carpio</i>	+ [ 23 ]		+ [ 14 ]	+ [ 14 ]		+ [ 24 ]
	<i>Carassius auratus</i>	± [ 23 ]	± [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Carassius carassius</i>	± [ 23 ]	± [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Salmo irideus</i>	+ [ 23 ]	- [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Anguilla anguilla</i>	- [ 23 ]	- [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Takifugu vermicularis</i>			+ [ 14 ]	+ [ 14 ]		
	<i>Lates japonicus</i>		± [ 29 ]	+ [ 29 ]		± [ 29 ]	+ [ 29 ]
	<i>Chelon haematocheilus</i>		+ [ 28 ]	+ [ 28 ]			+ [ 28 ]
	<i>Pleuronectes platessa L.</i>	+ [ 20 ]		+ [ 20 ]			+ [ 20 ]
ES α-NB	<i>Plecoglossus altivelis altiveliss</i>	-	-	±			+
	<i>Cyprinus carpio</i>			+ [ 14 ]	± [ 14 ]		
	<i>Takifugu vermicularis</i>			+ [ 14 ]	- [ 14 ]		
	<i>Lates japonicus</i>		- [ 29 ]	+ [ 29 ]		- [ 29 ]	- [ 29 ]
	<i>Chelon haematocheilus</i>		- [ 28 ]	± [ 28 ]			+ [ 28 ]
PAS	<i>Plecoglossus altivelis altiveliss</i>	-	±	+			+
	<i>Cyprinus carpio</i>	+ [ 23 ]			+ [ 14 ]		+ [ 24 ]
	<i>Carassius auratus</i>	+ [ 23 ]	+ [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Carassius carassius</i>	+ [ 23 ]	+ [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Salmo irideus</i>	+ [ 23 ]	+ [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Anguilla anguilla</i>	+ [ 23 ]	+ [ 24 ]				+ [ 24 ]
	<i>Takifugu vermicularis</i>				- [ 14 ]		
	<i>Lates japonicus</i>		± [ 29 ]	+ [ 29 ]		± [ 29 ]	± [ 29 ]
	<i>Chelon haematocheilus</i>		± [ 28 ]	+ [ 28 ]			+ [ 28 ]
	<i>Pleuronectes platessa L.</i>	± [ 20 ]	± [ 20 ]	+ [ 20 ]			+ [ 20 ]

PO : Peroxidase, ALP : Alkaline phosphatase, ACP : Acid phosphatase, EST (α-NB) : Esterase (α-naphthyl butyrate)

PAS : Periodic acid Schiff reaction C.R. : Cytochemical Reactivity Ref. : References

表 II-8 ヒトの白血球の細胞化学的染色所見<sup>22)</sup>

	粒球 <sup>a)</sup>	リンパ球 <sup>b)</sup>	好中球	好塩基球	好酸球	単球
MPO		-	+	-~+	+	-~+
NAP		-	+	-	-	-
ACP		±~+	+	+	+	+
EST (α-NB)		-~+	-	+	-~+	+
PAS		±	+	+	+	+

MPO : Myeloperoxidase, NAP : Neutrophyl alkaline phosphatase, ACP : Acid phosphatase,  
 EST (α-NB) : Esterase (α-naphthyl butyrate), PAS : Periodic acid Shiff reaction

a) 粒球は該当なし b) リンパ球はT,B,NK細胞をまとめて表記

アユ好中球の細胞化学的染色の染色性は、他の血球と異なって PO、ALP、ACP、PAS に対して強い陽性反応を示した。アユ脾臓単球/マクロファージは EST  $\alpha$ -NB が特異的な陽性反応を示し、ALP、PAS 陽性、PO が微弱陽性である。Neumann ら<sup>30)</sup>はキンギョ腎臓白血球培養に由来した 3 つの亜母集団の R1、R2 および R3 タイプのマクロファージを選別した。マクロファージの分化は progenitors から単球を経て成熟マクロファージに至る classical pathway と中間の単球段階がなく AP-macrophages に成熟する alternate pathway (AP) がある<sup>22)</sup>。R1 タイプ・マクロファージは小型で核細胞質比は高く、ACP は陽性であるが、PO、EST( $\alpha$ -NB)は陰性であり、R2 は哺乳類成熟組織マクロファージに類似、R3 タイプは腎形核を有し、哺乳類単球に類似する。R2、R3 は共に PO、ACP、EST 陽性である<sup>30,31)</sup>。アユ末梢血単球/マクロファージの測定例はないが、アユ脾臓単球/マクロファージで得られた結果と同様な結果が得られるものといえる。ただし、脾臓単球/マクロファージで得られた PO の微弱陽性は捕食物質に起因する可能性もある<sup>32)</sup>。アユ栓球、リンパ球の細胞化学的染色では陽性を示す項目は少なく、また、栓球ないしリンパ球に特異的な染色性を示す項目はない。栓球では ACP が微弱陽性、リンパ球では ACP が陽性、ALP、PAS が微弱陽性を示すのみである。わずかな染色態度の違いからいずれに属するかを推定することは可能かもしれないが、得られた染色像が不鮮明な場合もあり、さらなる検討が必要である。

..

## III 章

### アユ血球の疾病因子に対する応答に関する研究

アユの血液中には栓球、リンパ球、好中球、単球/マクロファージ、好塩基球がみられた。魚の免疫応答は水温、水質などの外部環境要因、性成熟などの内部環境要因、さらにストレスや餌などの飼育条件等の要因の影響を受けて低下する。免疫の主体である白血球は、免疫応答の低下に伴い組成変化や機能の低下を招くといわれる<sup>9)</sup>。養殖場で飼育されている魚は高密度飼育によるストレス、水質悪化、夏期の高水温を受け、たえず疾病の危険に晒されている。養殖現場の疾病対策では、養殖魚の免疫機能低下を早期に把握することにより疾病を未然に予防することが最も重要である。本章ではまず、免疫機能低下を把握するため、飼育アユ末梢血中の組成変化のモニタリングと実験的炎症により起こるアユ血球の動態及び形態変化等について試験した。

#### 第 1 節 飼育アユ血球組成変化

##### 方法

##### 試験魚

高梁川漁業協同組合の養魚場で孵化、屋内水槽（70 t）で飼育されたアユを試験に用いた。養殖池の水温は 6 月で 17℃だが、7 月下旬～8 月で 20℃、9 月が 21℃、そして 10 月が 21℃である。2011 年 6 月 24 日、7 月 26 日、8 月 25 日の供試魚は養殖池から取り上げたの

ち、直ちに採血を行った。9月21日、10月24日の供試魚は9月の試験1週間前に移送して、試験水槽(1.3 t: 17℃)で飼育したのち採血した。10月のサンプルはそのまま試験水槽で飼育したアユを用いた。

### 採血

採血は尾部血管からヘパリン(持田製薬ノボヘパリン 5000 単位/5 ml) 0.1 mlを含む1 mlシリンジ(TERUMO 1 ml ツベルクリン用)で0.9 ml採血した。

### 血液処理

白血球の分離、塗抹方法は第II章の方法に準じた。なお、塗抹標本は、MGG染色及びPO染色(DAB法)を行い、それぞれ出現血球の測定を行った。

## 結果

### 試験魚

試験に用いたアユの大きさは表 III-1 のとおりである。6月24日の試験魚は平均体長16 cmとまだ小さい。7月26日の魚は平均体長19 cmであり、ほぼ成魚といえるまで成長しているが、体量は60 g前後であった。そして、測定アユは冷水病に似た症状(図 III-1)がみられた。冷水病の症状としては、鰓部の出血や体表の潰瘍とそれに伴う穴あきや体表の白濁、貧血などがみられるが、供試魚でも潰瘍はあるものの斃死はほとんどなかった。また、このような症状を呈しているにも関わらず、冷水病菌は検出されなかった(岡山県農林水産センター水産研究所内水面研究室検査)。そのため、投薬を行わず

に飼育した。その後、8月25日に供試魚は平均体長20 cmを越え、生殖巣も見え始めた。そして、9月21日には生殖巣も発達し、生殖腺重量指数(GSI)も平均11.4%に、さらに10月24日には19.1%に達した。

表 III -1 血球組成に用いたアユの体長、重量及び生殖腺重量指数

測定 年月日	例数	体長			重量			GSI		
		Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD
110624	6	15.8	±	0.3	37.7	±	1.6			
110726	6	19.3	±	3.0	63.4	±	11.9			
110825	6	20.8	±	1.2	83.4	±	12.1	1.3	±	0.6
110921	6	22.4	±	1.1	106.7	±	13.2	11.4	±	4.0
111024	6	21.6	±	0.8	91.0	±	12.4	19.1	±	6.9

SD: standard diviation

GSI : gonad somatic index



図 III -1 皮膚潰瘍のみられたアユ (2011年7月26日)

## 血球組成変化

7月は感染魚からのデータであり、その他の月のデータは外見上異常がみられないことから正常魚として取り扱った。7月の病魚を除いた血球組成の特徴は以下のとおりである(図 III -2)。栓球2が6、8、10月は54%台と安定しているが、9月が67%と高い。なお、栓球1は凝集活性したものであり出現率は極めて低くかった。小リンパ球は8月が3%と低い、6、9、10の月は5~8%である。中リンパ球は10月が8%と高く、その他の月は4%であった。大リンパ球は6月が0.8%であるが、8~10月が0.2~0.5%と低くなっていた。小好中球は9、10月に7%と低く、中好中球は9月に15%と低かったが、他の月は21~22%であった。大好中球は8月が1.4%であり、他の月が0.6~0.7%と低い値であった。単球マクロファージは8、9月には出現はなく、0%であり、6、10月にわずかに0.04%みられた。

一方、7月病魚の血球組成は他の月とは異なった組成を示した(図 III -2)。栓球2は他の月と比べて70%と高い値を示した。また、小型リンパ球が12%と他の月と比べて高く、反対に中リンパ球、大リンパ球は低かった。好中球では中好中球が5%と極めて少なく、大好中球の出現はみられなかった。

リンパ球と好中球の総細胞(大・中・小)の出現率(図 III -3)をみると、リンパ球は、8、9月に低い値となっており、7月は8、9月と比べて高い値を示し、7月の組成をみると小型リンパ球が極端に多くなっていた。好中球は、7月に最も低く、次いで9、10月が低かった。分葉核を持つ好中球の割合を図 III -4に示した。小好中球は7月が12%と低い、その他の6、8、9、10月は、22~27%であった。中

好中球も同様に7月が14%と10月が19%と低く、その他の6、8、9月は、20～33%であった。大好中球は7月にはみられなかったものの、6月が43%と最も高く、8、9、10月が16～28%であった。

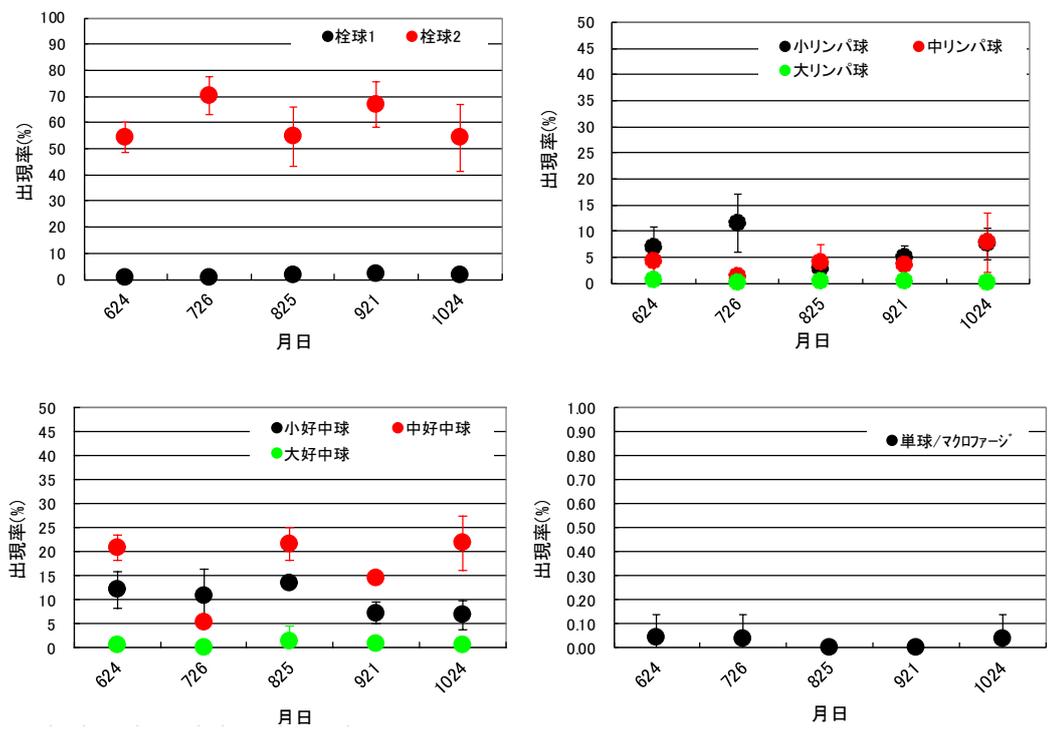


図 III -2 アユ末梢血の血球組成の経月変化 (2011年測定)

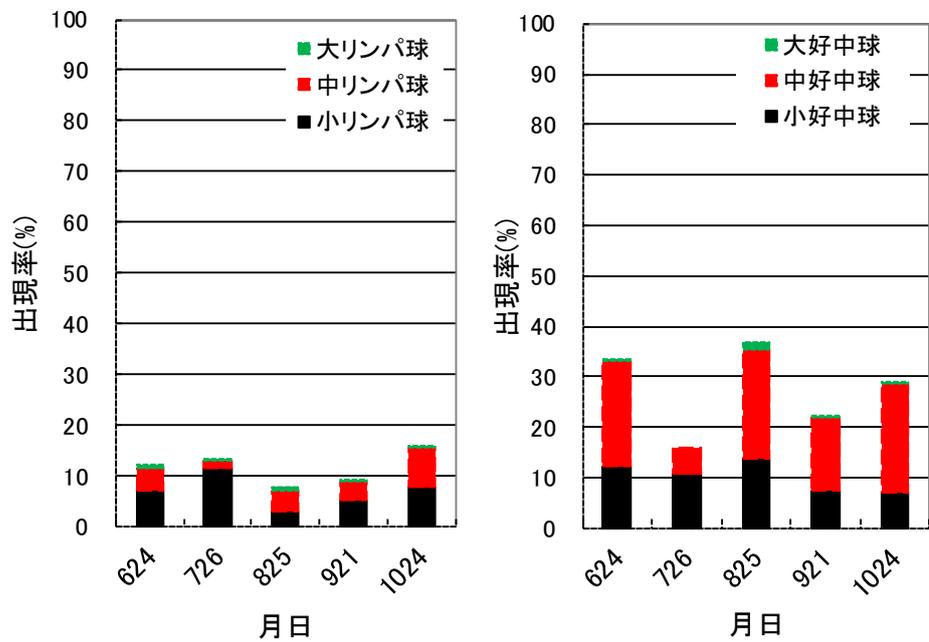


図 III -3 アユ末梢血でみられたリンパ球及び好中球の出現割合の経月変化 (2011年測定)

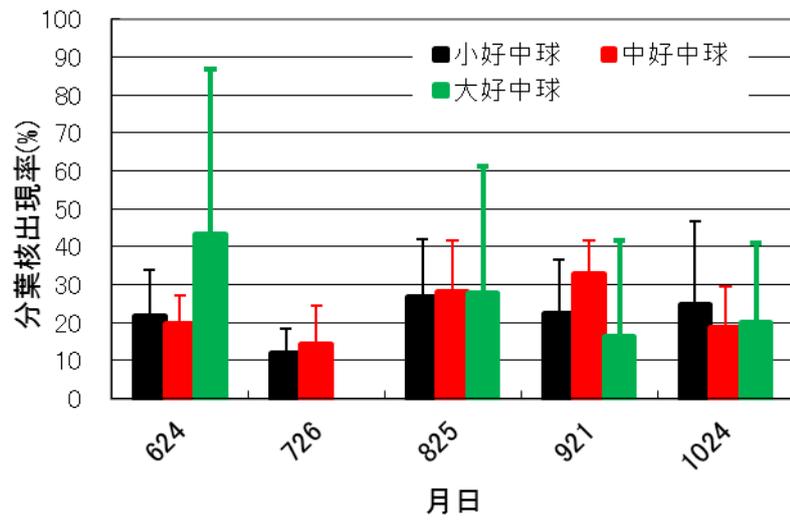


図 III -4 アユ末梢血の分葉核を持つ好中球の出現割合  
(2011年測定)

## 考察

養殖場で飼育されている魚は高密度飼育によるストレス、水質悪化、夏期の高水温等にさらされる機会が多い。高梁川漁業協同組合の養魚場も長年魚病の脅威にさらされてきた。このような環境下で飼育されている養殖アユの末梢血の血球組成変化を飼育期間を通して定期的に調べた。

病魚のみられた7月以前の6月のデータを正常魚としたが、8月以降のアユも外見上異常がないことから正常魚とみなした。8、9月のサンプルのリンパ球の出現率が低い状態にあったことは疾病耐過魚であった可能性もある。9月のデータは栓球、好中球の組成が7月の病魚の組成に近い値を示しており、ごく初期の病魚の可能性も考えられた。また、9月末から10月にかけてGSIが増加しており、9月、10月は性成熟の影響を考慮する必要がある。なお、この間の飼育期間の水温が17～21℃の間にあり、水温変化の影響は無視していいものと言える。9月のデータは初期の病魚の可能性もあるため、性成熟のより進んだ10月のデータをみると小好中球が低くなっている。しかしながら、血球組成は6月のデータに近いことから、性成熟の血球組成に及ぼす影響は小さいのではなかろうか。Pickering<sup>33)</sup>は3シーズンの間、ニジマス, *Salmo trutta* L. を飼育して未成魚、成魚の血球組成をモニターしたが、性成熟の明瞭な影響を抽出することはできず、むしろ水温による影響が強いことを報告している。

7月の病魚では、栓球の増加、好中球の減少、リンパ球の小型化がみられた。さらに分葉核を持つ好中球の割合の低下は成熟の進んだ好中球の減少を示すものといえ、疾病による好中球の消耗が関与

していることが考えられた。上述してきた病魚における血球組成変化が実験的に再現できるか調べるため、次節において異物投与試験を行った。

## 第 2 節 異物腹腔内投与試験

### 方法

#### 異物粒子懸濁液の調製

墨を硯内で PBS を加えて擦り、得られた墨粒子懸濁液を No. 2 濾紙で濾過した。墨粒子懸濁液は PBS で希釈した。また、蛍光ラテックス粒子は、0.03, 0.5  $\mu\text{m}$  粒子 (Spherotech Inc.), 2  $\mu\text{m}$  粒子 (Polysciences Com.) を PBS で希釈した。

#### 試験魚

試験に用いたアユは、高梁川漁業協同組合の養魚場で孵化飼育した成魚を移送し、第 1 節と同様に試験水槽に移し、配合飼料を与えて馴致飼育した。

#### 顕微鏡観察

OLYMPUS BX51 を用い、塗抹標本に出現した血球画像は、OLYMPUS DP71 にて撮影した。血球観察には、油浸 100 倍の対物レンズで、10 倍の接眼レンズを用いた。血球中の蛍光ラテックス粒子の観察は蛍光/明視野法で行った。

#### 腹水採取

アユ腹腔に PBS を 5 ml を投与した。その後、10 分後にアユ腹側の腹鰭中間から 18G $\times$ 1 $\frac{1}{2}$  (TERUMO) 注射針を接合したツベルクリン用 1 ml シリンジ (TERUMO) で腹水を採取した。

### 実験 1 異物腹腔内投与試験

墨粒子懸濁液 0.2 ml を腹鰭の腹側よりアユ腹腔内に注射した。腹水試料は投与後、4 時間、1、7、14 日目にそれぞれ採取して直接塗抹した。末梢血、腎臓は投与後、4 時間、1、2、4、7、14 日目に取上げて、第 II 章と同様の方法で白血球の分離、塗抹した。そして MGG 及び PO 染色 (DAB 法) を行った。

## 実験 2

墨粒子及び蛍光ラテックス粒子懸濁液 0.2 ml を腹鰭の腹側よりアユ腹腔内に注射した。投与後、1 日目に取上げて、腹水、末梢血を採取し、上記同様に処理し、MGG, PO 染色した。

## 結果

### 実験 1 墨粒子腹腔内投与に伴う末梢血中及び腹腔内の血球動態

**末梢血中血球組成変化** 腹腔内に墨粒子懸濁液を投与後 4 時間、1、2、4、7、14 日目のアユ末梢血中に出現した血球の出現率を示した (図 III-5)。栓球 2 (II 章分類 A2) は投与後 4 時間で低下し始め、1 日目に最低となり、それ以後に増加して、7 日目には投与前のレベルにもどった。なお、栓球 1 (II 章分類 A1) は非常に低い値で推移した。小リンパ球は投与後 4 日目に一時 13% とやや増加がみられた。中リンパ球は投与後 1、2 日目さらに 14 日目にやや増加しているが、大きな変化はみられなかった。大リンパ球は 0~3% と非常に少ない値で推移した。好中球は、投与後 4 時間で中好中球が増加し始めた。そして、小好中球と中好中球が 1 日目にそれぞれ 22%、44% と最高値

となった。その後、小好中球、中好中球は減少して7、14日目にはほぼ投与前の値となった。大好中球は出現率が低く、2日目にやや増加傾向がみられた。単球/マクロファージは投与前には検出されなかったが、投与後、4時間から増加し始めて2日目にかけて上昇していた。また、4日目には出現はなかったが、その後、7、14日目においても検出が続いた。

分葉核を持つ好中球は投与後1、4日目に小好中球、中好中球、大好中球共に分葉核出現率は低下していた(図 III-6)。

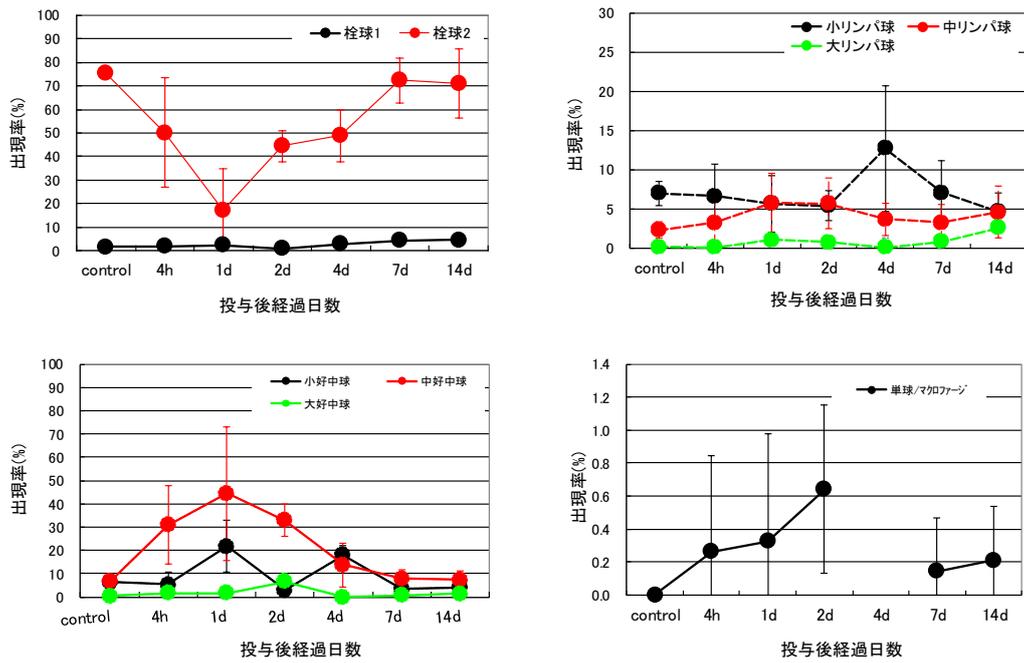


図 III -5 墨粒子懸濁液を腹腔内投与したアユ末梢血でみられた血球組成の変化

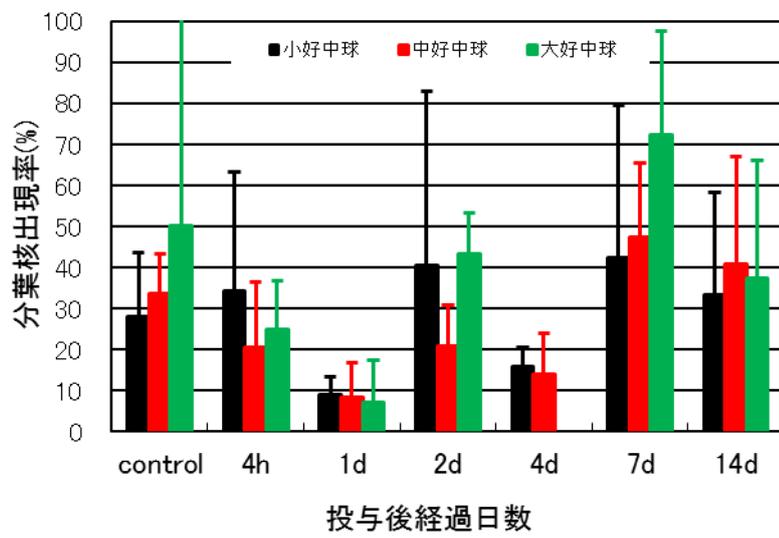


図 III -6 墨粒子懸濁液を腹腔内投与したアユ末梢血の分葉核を持つ好中球の出現割合

### 腹水内血球組成変化

正常アユの腹腔内には、リンパ球、好中球、単球/マクロファージがみられた。その他、わずかながら赤血球、栓球もみられる試料があった。これらは腹水採取時における血液の混入によるものと思われる、赤血球、栓球がほとんどみられないサンプルもみられた。墨粒子投与後の腹腔内でみられた血球の出現率(図 III-7)をみると、小リンパ球と大リンパ球は投与後、4時間、1日後に、中リンパ球は4時間後に減少していた。しかし、その後、リンパ球はほぼ投与前の水準にもどった。小好中球は4時間、1日後に、中好中球は4時間後にそれぞれ増加しているが、7, 14日目に減少しており、投与前より低くなっていた。単球/マクロファージは投与後、徐々に7～14日にかけて増加した。

腹腔内での分葉核を持つ好中球の出現率の変化を図 III-8 に示した。投与前の小好中球の分葉核出現率は中好中球、大好中球と比べてかなり低く、投与4時間後に最も低い値を示した。しかし、1日以降は増加した状態が続いていた。中好中球も4時間後に低下、その後、やや低めで推移した。なお、大好中球の分葉核出現率は50%以上の値が続いている。なお、大好中球は1日目では該当細胞がなかった

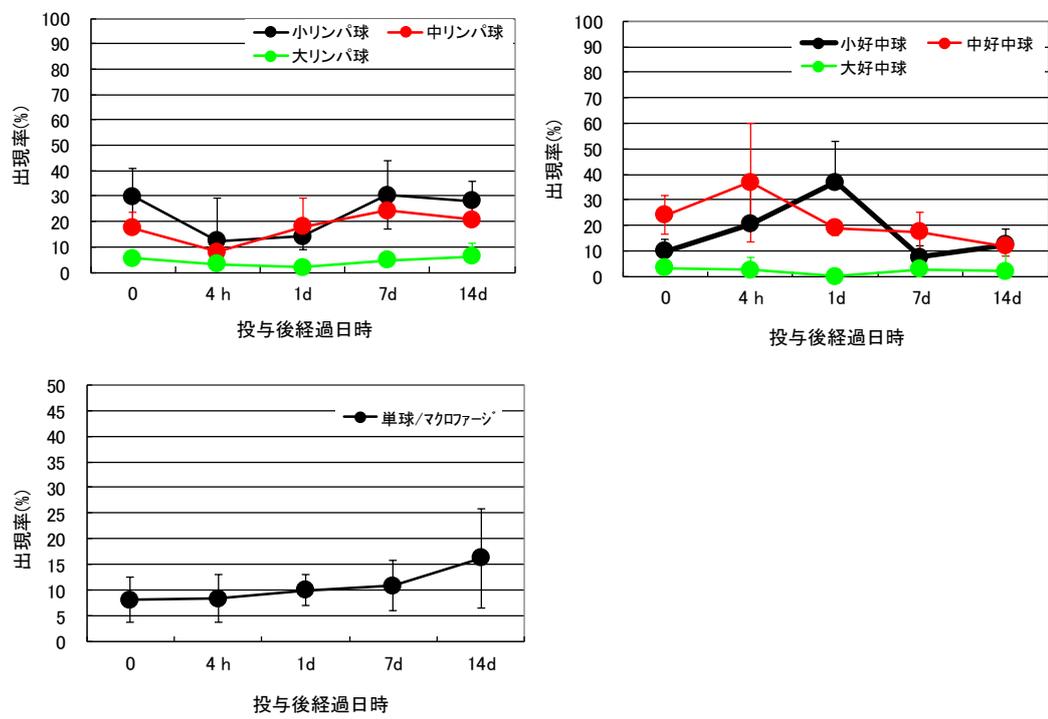


図 III -7 墨粒子懸濁液を腹腔内投与したアユの腹腔内でみられた血球組成の変化

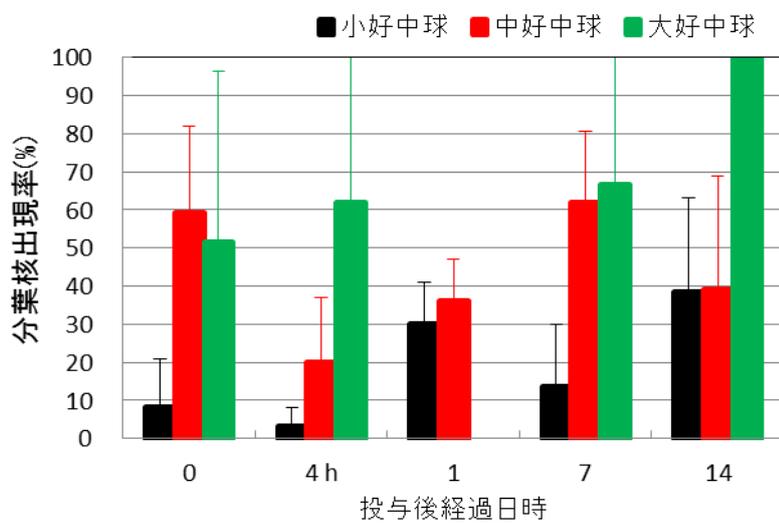


図 III -8 墨粒子懸濁液を腹腔内投与したアユの腹腔内でみられた分葉核を持つ好中球の割合 (%)

## 実験 2 墨粒子腹腔内投与に伴う腹腔内血球動態

### 血球内墨粒子分布

末梢血中の血球の墨粒子の取込みはいずれの血球にもみられた(図 III-9)。墨粒子の取込みは、単球/マクロファージ>リンパ球>好中球>栓球の順に多い傾向がみられた。取り込まれた粒子は macro-pinocytosis によると思われる液滴状を呈す墨粒子がみられた(図 III-9c, d, e)。赤血球はほとんどの細胞に黒色粒子様黒斑がみられたが、墨粒子投与前の赤血球でも同様にみられた。そこで墨粒子投与後の末梢血中の赤血球無染色画像(図 III-10)で見ると、墨粒子は細胞周囲に集まっているが、細胞内にはみられなかった。

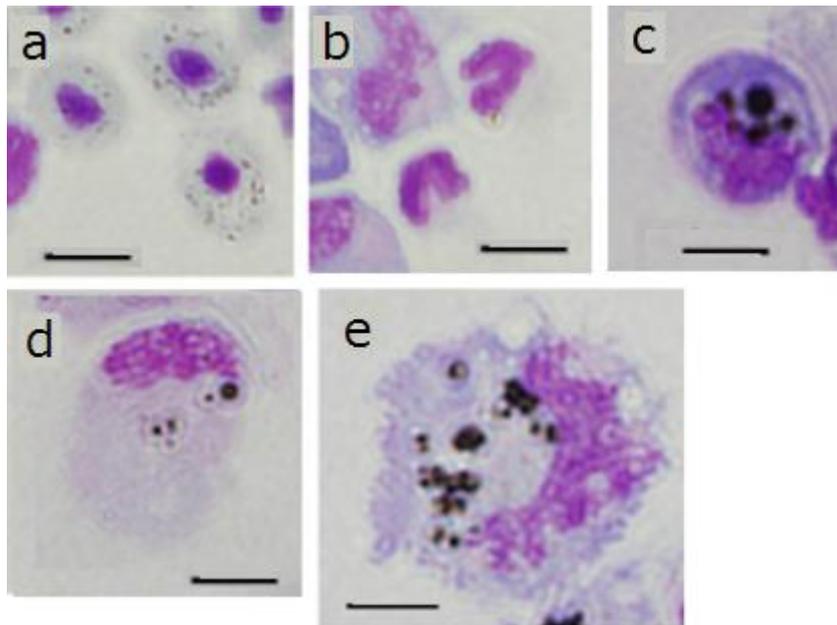


図 III-9 アユ末梢血でみられた血球中の墨粒子(MGG染色),

Bar = 5  $\mu$ m

a: 赤血球, b: 栓球, c: リンパ球, d: 好中球,

e: 単球/マクロファージ

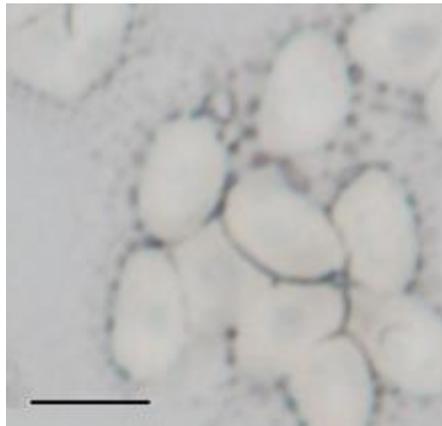


図 III -10 アユ末梢血の赤血球末染色画像で  
みられた墨粒子, Bar = 10  $\mu$ m

### 血球内蛍光ラテックス粒子分布

腹腔内では 0.5  $\mu\text{m}$  蛍光ラテックス粒子を取り込んだ白血球を図 III-11 に、また、末梢血中の栓球を図 III-12 に示した。蛍光粒子の血球への取込も墨粒子とほぼ同様であり、単球/マクロファージ>リンパ球>栓球>好中球 の順に多い傾向がみられた。小リンパ球の取込は極めて多く、細胞形態が不明であるが、細胞質が DO 染色陰性であることからリンパ球と判断した。

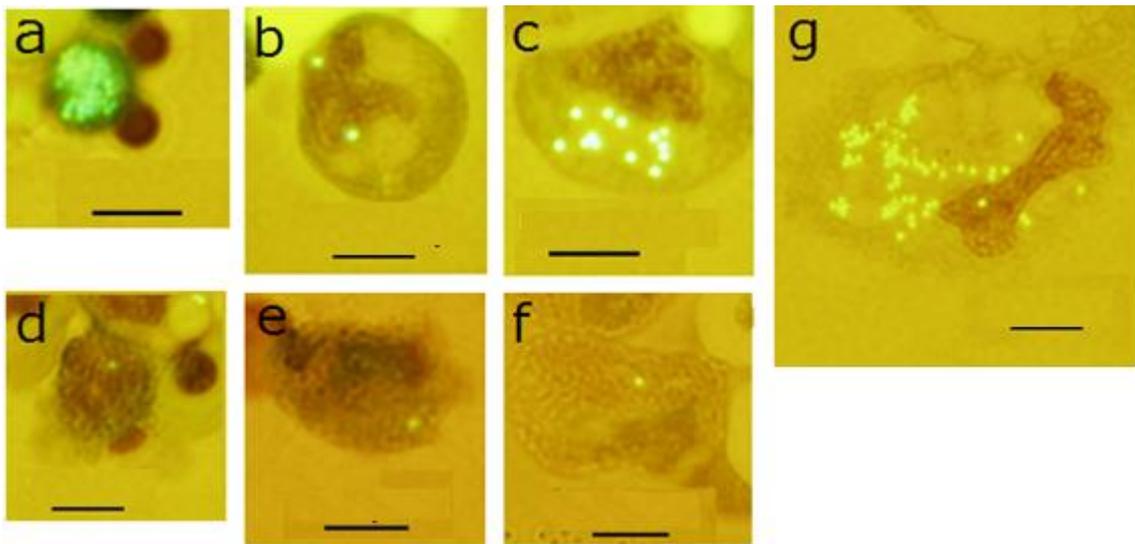


図 III -11 蛍光ラテックス粒子(0.5  $\mu\text{m}$ )を腹腔内投与したアユの腹腔内の血球に取り込まれた粒子(PO染色DAB法),  
Bar=5  $\mu\text{m}$

a, b, c : リンパ球, d, e, f : 好中球, g : 単球/マクロファージ

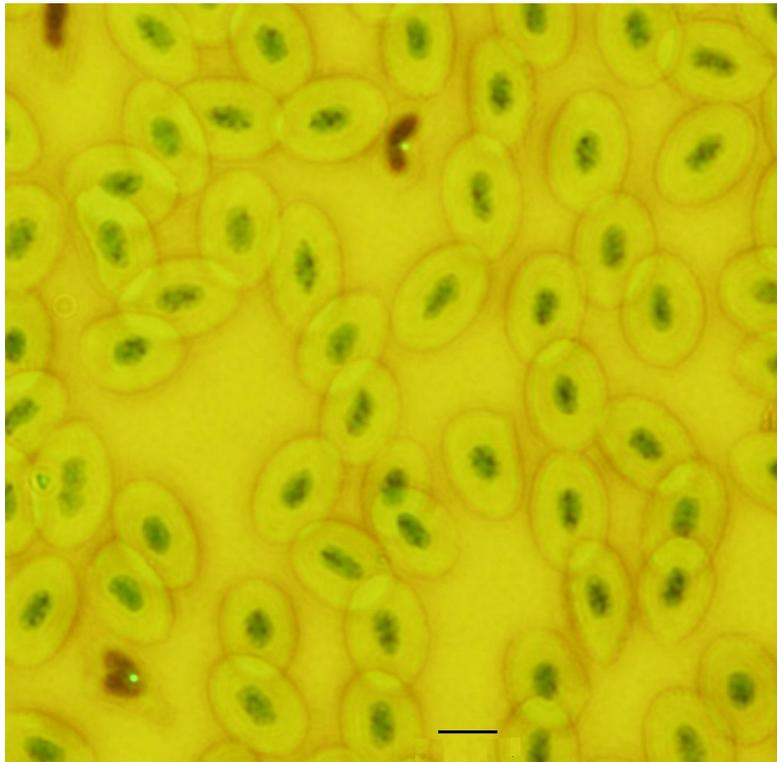


図 Ⅲ -12 蛍光ラテックス (0.5  $\mu\text{m}$ ) を腹腔内投与したアユの末梢血  
でみられた栓球に取り込まれた粒子 (MGG 染色),  
Bar = 5  $\mu\text{m}$

## 血球の異物貪食実験

腹腔内、末梢血中でみられた血球への墨粒子及び 0.03, 0.5, 2  $\mu\text{m}$  粒子の取込み粒子量の度合いを表 III -2 に示した。腹腔内では、墨粒子及び各サイズの蛍光ラテックス粒子の取込みは共通して単球/マクロファージ > 小リンパ球 > 中リンパ球、大リンパ球の順に多かった。小好中球、中好中球、大好中球では墨粒子がわずかに取り込まれるが、0.03、2  $\mu\text{m}$  粒子はほとんどみられず、0.5  $\mu\text{m}$  粒子だけは単一粒子を取込んだ細胞が希にみられた。また、血球に取り込まれてないフリーの血球は、いずれの粒子でも多く、粒子同士が凝集して存在しているものが多くみられた。なお、0.03  $\mu\text{m}$  粒子は粒子塊として視認できるが、単独の粒子の蛍光顕微鏡下での検出は困難であった。一方、末梢血中の血球の取込みは腹腔内血球の取込みとほぼ類似するが、好中球への取込みは腹腔内と異なって比較的良好であった。そして、腹腔内と同様に墨粒子の取込みが最もよかった。末梢血中の栓球 1 はいずれの粒子も取り込まないが、栓球 2 は 2  $\mu\text{m}$  粒子を除いて 0.03, 0.5  $\mu\text{m}$  の取り込みがみられた(表 III -2)。引きガラス法で塗抹した末梢血試料から赤血球はいずれの粒子もほとんど取り込まなかったが、0.03  $\mu\text{m}$  粒子投与では赤血球に弱い蛍光発光が赤血球にみられたことから±と表記した(表 III -2)。

表 III-2 異物粒子懸濁液を腹腔内投与したアユの腹腔内及び末梢  
 血中の血球に取り込まれた粒子の分布(投与後1日目)

	フリー粒子	赤血球	粒球1	粒球2	小リンパ球	中リンパ球	大リンパ球	小好中球	中好中球	大好中球	単球/マクロファージ
腹腔内 墨粒子	+++				+++	+++	++	+	+	+	+++
蛍光ラテックス粒子(0.03μm)	++				+++	++	++	-	-	-	+++
蛍光ラテックス粒子(0.5μm)	++				++	++	+	±	±	±	+++
蛍光ラテックス粒子(2μm)	++				+++	++		-	-	-	+++
末梢血 墨粒子	++	±	-	+	++	++	+	++	++	++	+++
蛍光ラテックス粒子(0.03μm)	++	+	±	+	++	++	++	+	+	+	++
蛍光ラテックス粒子(0.5μm)	++	±	-	++	++	++	++	+	++	+	+++
蛍光ラテックス粒子(2μm)	++	±	-	++	++	+	++	+	+	+	++

- : 細胞内に取り込まれた粒子を認めず, ±: 非常にまれにみられた,  
 +, ++, +++ : 取込が認められ、取込量に応じて示す

## 血球の形態変化

墨粒子投与後の末梢血中及び腹腔内の血球の形態変化として、いずれも投与後 7,14 日目に多分葉核を持つ好中球(図 III -13a)や崩壊核を持つ好中球(図 III -13b) がみられた。これらの細胞の PO 染色像から好中球細胞質は弱陽性を示す細胞が多かった。また、単球/マクロファージが好中球やその顆粒を取り込んだ細胞、さらに単球/マクロファージと好中球の接着したような細胞が認められた(図 III -14)。

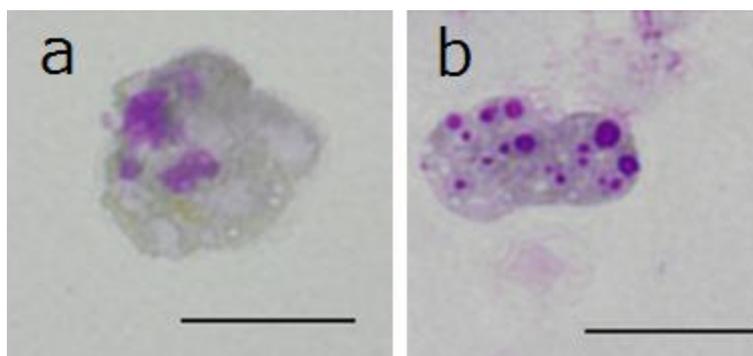


Fig III -13 墨粒子懸濁液を腹腔内投与したアユ腹腔内でみられた多分葉核(a)及び崩壊核(b)を持つ好中球(PO染色DAB法), Bar=10  $\mu$ m

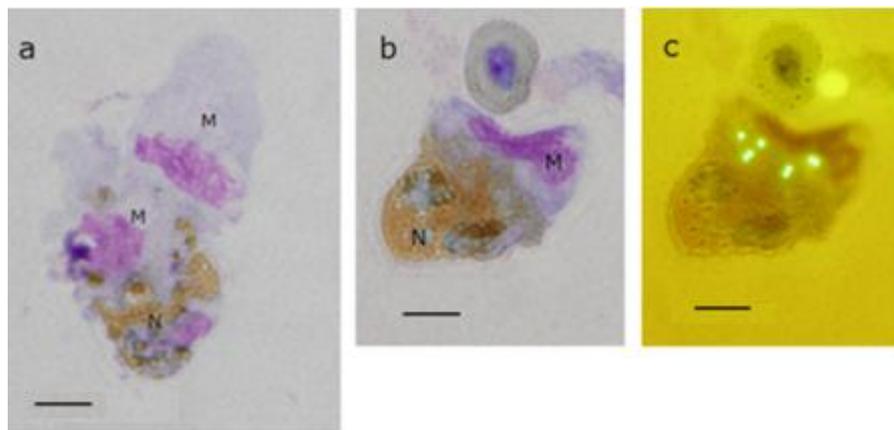


図 III -14 異物粒子懸濁液を腹腔内に投与したアユの腹腔内でみられた単球/マクロファージ(M)による好中球(N)の取り込み画像(a)及び好中球の接着画像(b, c) (PO 染色 DAB 法) ,Bar = 5  $\mu$ m

a : 墨粒子投与, b, c : 蛍光ビーズ投与

## 細胞化学的变化

好中球の PO 染色像から、細胞質及び核の陽性度合いが異なる染色像が得られた。なお、PO 染色(PO)陰性細胞の出現は少数であった(図 III -15)。末梢血中及び腹腔内の PO 陰性を含む PO 弱陽性細胞の出現率の推移を示した(図 III -16A ,III -16B)。末梢血では、PO 弱陽性細胞は墨粒子投与後 4 時間後にみられ始め、1、2 日目にはほとんど見られなくなるが、4 日目より出現率は増加して 7 日目をピークに 14 日目まで続いていた。有意差検定の結果は、4 時間後との間に、小好中球で 7 日目、中好中球で 7、14 日目に有意差( $p < 0.05$ )が見られた。腹腔内では、投与後、徐々に増加して末梢血中と同様 7 日後にピークがみられた。有意差検定の結果は、4 時間後、1 日目との間に、小好中球で 7 日目に有意差( $p < 0.05$ )が見られた。なお、弱陽性の好中球は Percoll 密度勾配分離法による画分の 1.042 ~ 1.045 の低密度領域にみられ、反対に強陽性の細胞は 1.070 ~ 1.075 の高密度領域にみられた(表 II -2)。

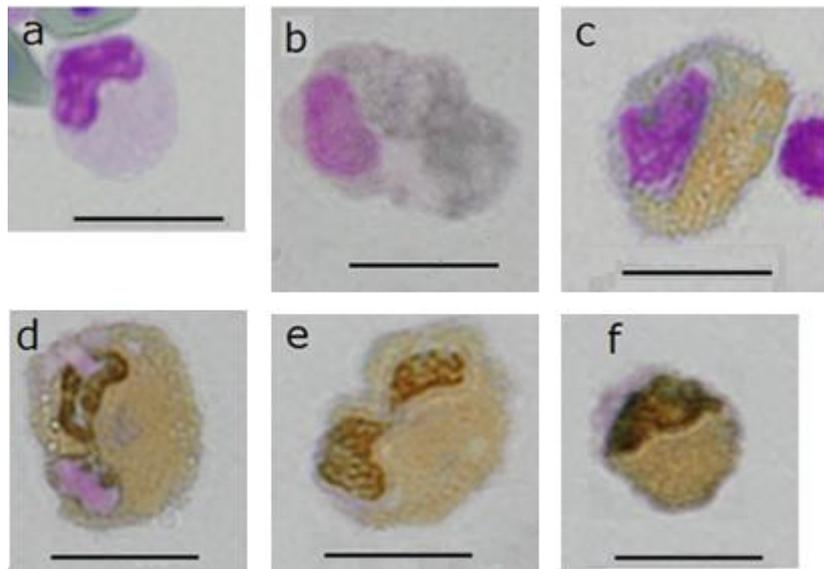
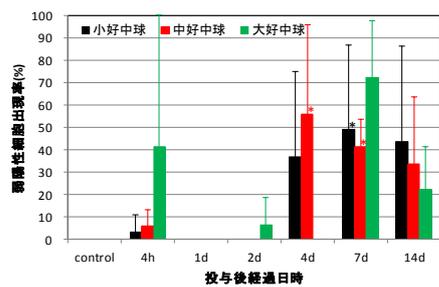


図 III -15 アユ好中球の PO 染色(DAB 法)による染色性の変化,

Bar = 5  $\mu$ m

- a : 細胞質・核陰性, b : 細胞質弱陽性・核陰性,  
 c : 細胞質部分陽性・核陰性, d : 細胞質陽性,核部分陽性,  
 e : 細胞質陽性,核陽性, f :細胞質強陽性,核強陽性

A



B

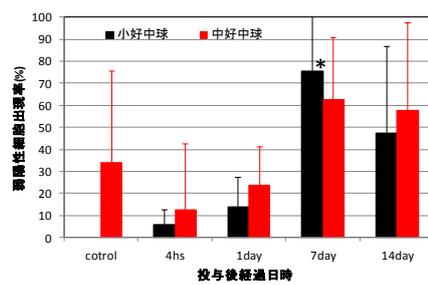


図 III -16 墨粒子懸濁液を腹腔内投与したアユの末梢血(A)及び腹腔内(B)でみられた好中球の PO 染色(DAB 法)弱陽性細胞出現率の推移

A : \*印は 4 時間(4h)との間に有意差あり ( $p < 0.05$ )

B : \*印は 4 時間(4h)、1 日目(1d)との間に有意差あり ( $p < 0.05$ )

## 考察

Ellis<sup>34)</sup> はコロイド炭素粒子をヨーロッパ産ツノガレイ, *Pleuronectes platessa* の腹腔内に注射、単球が 2-3 日をピークに増加することを報告している。Weinreb & Weinreb<sup>35)</sup> はキンギョ, *Carassius auratus* の腹腔内に Thorotrast を投与し、末梢血のリンパ球減少と好中球増加症が 6 時間持続し、その反応は 12 時間の後に減少することを報告した。また、血液像は 18 時間の後に投与前にもどり始めたことを報告している。Toida ら<sup>36)</sup> はマダイ, *Pagrus major* の背筋に *Edwardsiella tarda* を接種し、人工感染したマダイの末梢血中の顆粒細胞は 1 日後に著しく増加、リンパ球は炎症の始めで急速に減少し、数日間は低レベルに留まることを示した。この時、単球数は 5 日後から増加し始め、15 日後でピークに達したという。Hines ら<sup>37)</sup> は、コイ, *Cyprinus carpio* に白点病 *Ichthyophthirius multifiliis* を人工感染させた実験で好中球の上昇とリンパ球の一時的低下を測定している。Nakayasu ら<sup>38)</sup> はヒラメ, *Paralichthys olivaceus* に単生目, *Neoheterobothrium hirame* を寄生させた血液中の血球数の推移を測定している。それによると、寄生により単球/マクロファージおよび顆粒球は増加の一方、リンパ球、栓球は減少、特に飢餓状態で著しい減少を観察している。本炎症実験においても、一時的な栓球、リンパ球の低下と好中球の増加が起こり、単球/マクロファージが遅れて徐々に増加してことが捉えられた(図 III-5, III-9)。アユにおいても炎症により上記の既報と同様の血球変化を示すものと言える。一方、7 月にみられた病魚は炎症実験結果と異な

り、好中球の減少と栓球の増加がみられた。ただし、病魚の発症からの経過日数は不明である。炎症実験から推察すると、炎症過程が進むと一端増加した好中球が減少し、栓球の低下からの上昇という動的变化の断面を測定した結果ではなかろうか。特に栓球については、Espelid ら<sup>39)</sup>はタイセイヨウサケ, *Salmo salar* L.の腹腔内にcortisol を投与して末梢血の顆粒球と栓球の測定している。投与後2~5日目に顆粒球と栓球はともに増加する結果を得ており、本研究と同様に敏感に変動する血球といえる。炎症実験でみられた単球/マクロファージの末梢血中での増加は病魚でみられていないことから病態は軽微な状態であった可能性もある。

好中球は成熟が進むと分葉核を呈するが、末梢血中(図 III-6)及び腹腔(図 III-10)での分葉核を持つ好中球の割合は起炎後に低下が進んでいる。一時、好中球は起炎後に造血器官である頭腎から炎症部位に遊走する<sup>40)</sup>と言われており、このプールからの補給により炎症部位で増えた幼若な単核好中球が増えて、相対的に分葉核の割合を低下させたものと考えられる。炎症部位への補給により、腹腔内では、小好中球、中好中球は一時増加した後の7、14日目には墨投与前より低くなっている。そして、7、14日目には好中球の核崩壊細胞(図 III-13)が多くみられることなどから、好中球の減耗が補給を上回っていることが考えられた。この好中球は起炎後にアユ末梢血中及び腹腔内において、PO弱陽性細胞(図 III-15 a b)の割合が徐々に増加している(図 III-16A, B)。末梢血では1~2日の間、弱陽性細胞がみられないのはこの間はプールからの補給が大きかったためと考える。一方、造血器の頭腎の好中球のPO染色像には弱陽性細胞はみられず、陽性細胞が大半であった(図 III-17)。このこ

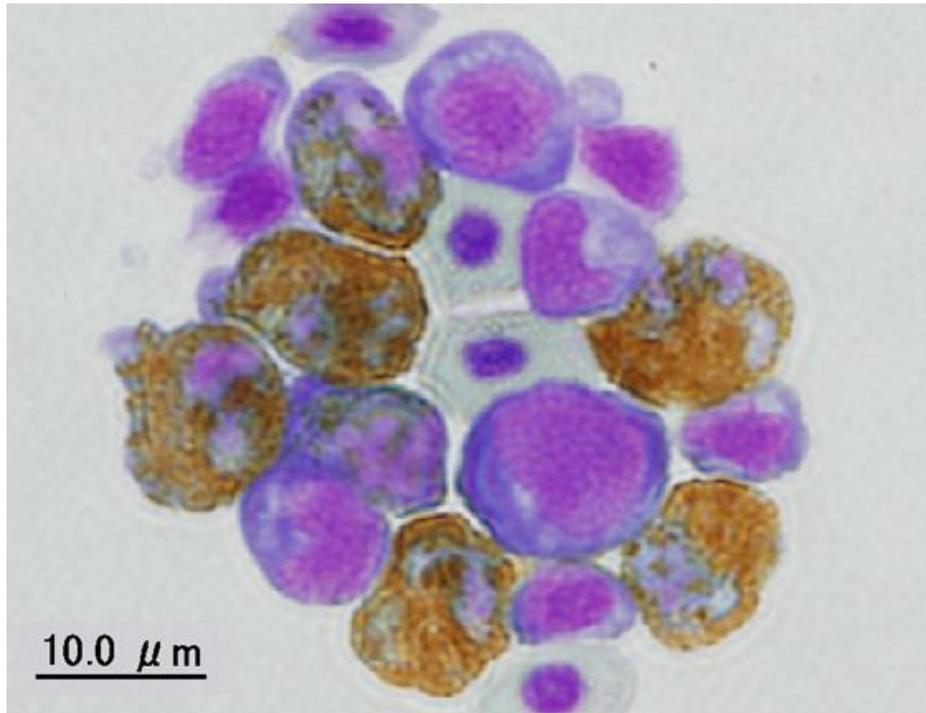


図 Ⅲ -17 墨粒子懸濁液を腹腔内投与 14 日目のアユ  
の頭腎でみられた血球の PO 染色 (DAB 法) 像,  
Bar : 10 μm

と関連するか明らかでないが、アユ頭腎中の好中球の respiratory burst activity はコイと異なり、すでに強い状態にあるといわれる<sup>41)</sup>ことは興味深い点である。

好中球の PO 弱陽性細胞は顆粒内 PO 活性の低下か脱顆粒した細胞と考えられた。脱顆粒は貪食に伴って起こるといわれる<sup>42)</sup>が、アユ好中球の貪食作用は弱いこと(表 III -2)を考えると、脱顆粒を促進させるメカニズムを検討する必要もある。サイトカラシン B で貪食作用を抑制した条件化でも顆粒内酵素の放出が認められるという知見もある<sup>42)</sup>。このような PO 活性が低下した好中球の蓄積は生体防御能を低下させるといえよう。椎橋・飯田<sup>12)</sup>は魚類好中球の生体防御能がストレスなどでも抑制されることを述べている。

白血球の機能検査として異物による貪食試験を行った。粒子間の取込を比較すると、墨粒子は蛍光ラテックス粒子より血球への取込は良く、これは粒子表面構造の違いが原因<sup>42)</sup>している可能性もある(表 III -2)。また、蛍光ラテックス粒子の大きさにより取り込まれ易さが異なるようであり、これは取込のメカニズム<sup>42,43)</sup>に起因することが考えられた。単球/マクロファージ、リンパ球による粒子の取込は腹腔内血球、末梢血血球ともに、いずれの粒子にもみられた。Ellis<sup>36)</sup> はヨーロッパツノガレイ血球の貪食能は単球/マクロファージだけであると報告している。Liら<sup>44)</sup> はニジマス、*Onchorhynchus mykiss* の血球の貪食能は単球/マクロファージ以外にリンパ球の B 細胞にあることを報告している。一方、好中球による粒子の取込は少なく、末梢血中の好中球の取込はわずかで、腹腔内ではほとんど取り込まれない。腹腔内の異物に接触する機会は末梢血中より多いといえるが、原因については不明である。その他、腹腔内、末梢血

中ではすべての粒子でフリーの粒子がみられたが、腹腔内では投与された粒子が凝集状態でもみられたが、末梢血中には凝集状態は少なかった。このことから、いずれの粒径の粒子も腹腔からの移動はフリーの単体粒子の状態と推察された。栓球の貪食能について、長沢ら<sup>45)</sup>は透過型電子顕微鏡による観察でコイ栓球が仮足を伸ばして菌体を取り込む様子を確認し、光学顕微鏡下で紡錘状の栓球が異物の刺激を受け活性化、貧食細胞様の動態を示す様子を観察している。本実験では、末梢血(引きガラス法による)中の栓球による蛍光ラテックス粒子の取込が認められた(図 III-12)ことから、貪食能を有しているといえる。一方、赤血球の貪食能の報告例はみられていないが、0.03 μm 粒子投与で赤血球にみられたによる弱い蛍光発光は理由史によるものかどうか確認できなかった。

腹腔内では単球/マクロファージに好中球とその PO 陽性顆粒の取込みや両細胞の接着した細胞などがみられた(図 III-14)。Afensoら<sup>32)</sup>は、ニジマス 好中球は単なる食細胞でなく、単球/マクロファージと協調して防御機構に関わっていると述べている。また、起炎後の腹腔内を中心に PO 活性の低下した好中球や崩壊核を持つ好中球さらに好中球顆粒断片などもみられた。このような細胞や細胞間の関わりを示す現象は炎症を捉える指標となりうる。近藤ら<sup>46)</sup>が報告している好中球は、冷水病に感染したアユでみられた豊富な粗面小胞体や自由リボゾームがみられ、貪食能を持つという。しかし、これに該当する好中球は本実験では検出されなかった。好中球のような生体防御の第一相となる自然免疫に関わる細胞の詳細な機能を明らかにすることが疾病初期の魚病対策に有益になるといえる。

## IV 章

### 総合考察

日本の内水面生産において、アユは主要な魚種であり、長年、全国の河川への種苗放流や成魚養殖が広く行われてきた。近年、河川におけるアユの漁業生産量の低下は著しく、その原因として冷水病の発生し、河川環境の悪化、カワウやブラックバスの食害などがあげられており<sup>1)</sup>、中でも冷水病による被害は甚大である。1987年徳島県の養魚場で冷水病が発生した。その後、全国のアユ養殖場、天然河川に蔓延し、甚大な被害を与えてきた<sup>4)</sup>。さらに2009年には新たに天然河川で *Edwardsiella ictaluri* の発生による被害もみられるようになり、養殖場への侵入が懸念されている。アユ冷水病の発生を受けて1994年以降、国、都道府県さらに内水面漁業団体による共同研究及び蔓延防止策の検討がなされてきた<sup>4-6)</sup>。それによりアユ種苗生産や養殖の現場では健康な種苗の確保、適正な飼育環境の確保や施設・飼育用具類の消毒等の防疫対策が行われている<sup>6)</sup>。冷水病を経験したアユは冷水病に対する免疫を獲得するという知見から、浸漬ワクチン、注射ワクチンや経口ワクチンのワクチン開発がなされてきた。また、飼育継代されているアユ系統間には、アユ冷水病に対する耐病性形質が異なることが報告されており、耐病性形質を保持するアユ系統の効率的な育種技術研究が進められている<sup>4)</sup>。しかし、ワクチンについてはその効き方が不明であること、つまり、抗体価がどうなっているかも不明であり、防御力を高める方法を手探りでやっているのが実態であり<sup>4)</sup>、また、耐病性形質の異

なるアユについても免疫学的研究が不足している。それゆえ、アユの防御能力の実態の解明するためには、それに関与するであろう細胞の同定を行っておく必要がある。病態解析を行うためにもアユ白血球の基礎的な研究を行うことが欠かせないことから本研究に着した。

アユの血球については詳細な報告が乏しいことから、まず、アユ血球の同定を形態的、細胞化学的方法により行った。その結果、栓球、リンパ球、好中球、好塩基球、単球/マクロファージを検出した。赤血球を除く血球組成は主として栓球、リンパ球、好中球であり、好塩基球、単球/マクロファージは非常に少なかった。栓球は栓球 1 と栓球 2 に分けられたが、栓球 1 は凝集して状態でみられることから活性化した細胞であり、採血操作によるものと思われた。リンパ球は小リンパ球、中リンパ球、大リンパ球に細分したが、中リンパ球、大リンパ球は単球/マクロファージの形態的特徴もみられ、同定には Romanowsky 染色だけでなく、細胞化学的染色による判断が必要であった。好中球は小好中球、中好中球、大好中球に細分した。顆粒球は好中球だけといって過言ではなく、好塩基球は極めて少なく、好酸球は検出されなかった。Lewley ら<sup>18)</sup>は硬骨魚の *heterogeneity* をまとめており、その中で好酸球、好塩基球はほとんど魚種で検出されてない。しかし、同一魚種でも異なる結果の報告例もあり、魚類顆粒球は染色操作に対して不安定である可能性もある。

魚病の成因は内因性因子として、品種、系群、年齢、性、遺伝等機能欠損によるものがあり、外因性として、水温、水質等の環境因子、細菌、寄生虫等の寄生体因子によるものがある<sup>9)</sup>。これらの要因のいずれかが、または複合的に関わって生体防御機能の低下が起

こり発病するものといえる。同定されたアユ血球がこれらの因子に対してどのような動態を示すか、またそれらが形態学的、細胞化学的变化を起こすか検討した。これらの変化等を把握することは疾病の予兆を把握すること、すなわち疾病モニタリングに結びつくといえる。このことから、まず養殖アユの末梢血の血球組成変化について飼育期間を通して定期的に調べた。皮膚潰瘍のみられたアユでは、栓球の増加、好中球の減少、リンパ球の小型化さらに分葉核を持つ好中球の割合は低下していた。病魚が共通してこれらの組成変化を示す特徴があるとすると、外見上異常がなく正常魚としたサンプルに病魚に近い血球組成を示すものがあり、初期の病魚の可能性が考えられた。季節変化では、水温が血球組成に影響を与える点を考慮する必要がある。しかし、飼育期間中の水温変化が 17～21℃の間と極めて小さかったことから、水温による血球組成変化は測定することができなかった。性成熟については、GSI 値増加のみられた9月のデータは初期病魚として除外して、性成熟のより進んだ10月のデータをみると小好中球が低くなっているものの、血球組成は疾病以前の正常魚のデータに近いことから、性成熟が細胞組成に及ぼす影響は小さいものといえよう。

養殖魚にみられた病魚の血球組成の変化を検証するため、実験的炎症による再現実験を行った。それによると、血球組成では一時的な栓球、リンパ球の低下と好中球の増加が起り、単球/マクロファージが遅れて徐々に増加しており、さらに分葉核を持つ好中球の割合が低下することが捉えられた。同様な血球組成変化は異物投与や細菌、寄生虫などによる感染実験の報告<sup>33-38, 40, 47)</sup>にみられ、魚類に共通して起こるものと考えられる。そして、アユ末梢血中の血球変化

は炎症部位である腹腔内の変化を反映しており、リンパ球の変化は不鮮明ながら、一時的な好中球の増加と単球/マクロファージの増加がみられ、末梢血中の血球変化による疾病モニタリングの妥当性が確認された。

炎症実験結果と養殖の病魚と比較してみると、分葉核を持つ好中球は共通して一時低下しているが、栓球と好中球の動きが両者で異なっていた。病魚では栓球が増加しており、栓球の増加例はcortisol投与によるストレスを起こさせた試験結果<sup>39)</sup>でみられ、病魚がストレス状態にあった可能性も考えられた。好中球は炎症実験で一時的に増加するがその後減少するが、病魚はこの減少した時点に測定されたとも考えられる。さらに炎症実験でみられた単球/マクロファージの末梢血中での増加は病魚でみられていない。伝染性疾病では白血球の増加や単球、好酸球の増加がみられ、ストレスによる血球変化と区別されると言われ<sup>48)</sup>、飼育病魚の病態は軽微な状態であった可能性もある。疾病に至る前の魚の生体防御能の低下を捉えるには、正常魚の範囲やストレス状態を把握することも疾病モニタリングを行う上で重要と考える。

貪食能検査の意義は白血球の好中球や単球/マクロファージの機能を検査するものである。簡易的な機能検査にはサンプリングした血液が使用できることから *in vitro* の貪食試験が疾病モニタリングとして期待される。しかし、予備試験では血球の粒子の取込が極めて少なかった。異物投与実験で好中球の貪食作用が弱いことや末梢血中に単球/マクロファージがほとんど存在しないことが原因と考えられた。異物投与実験で血球に起こる形態学的、細胞化学的変化は好中球でみられた。好中球の炎症部位への浸潤は早期に起こる

が貪食作用が弱いことは好中球の役目が貪食、殺菌以外に単球/マクロファージなどと協調して働いているのではなかろうか。また、末梢血中、炎症部位共に異物投与後、一時増加した好中球はその後減少してゆき、炎症部位では投与前より低い値になった。このことから、造血器からの好中球の末梢血、炎症部位への浸潤が緩慢であることを示す。この好中球の減少に伴いP0活性の低下した細胞が増加している。造血器の頭腎での好中球は異物投与前後を通じてP0活性は維持されていることから、P0活性低下は末梢血中や炎症部位の好中球で起きているといえる。アユ好中球の貪食作用が弱いことから脱顆粒以外のP0活性の機能低下要因について検討する必要があると考える。このようなP0活性低下した細胞や核崩壊のみられる細胞の増加、さらに造血器からの供給が追いつかない状態は疾病を加速する要因となっていると考える。細胞性免疫の初期の段階で働く血球の機能を明らかにすることにより、疾病に至る過程の解析などが飛躍的に向上することが期待できよう。

養殖現場の課題としては、アユ血球組成の動的变化や血球の形態学的、細胞化学的变化の断片は捉えられたが詳細な変化は不明であることから、診断例数を蓄積することにより、初期疾病把握のための血球モニタリングの精度を上げてゆく必要があるだろう。

## 結 論

1. 近年のアユの種苗生産、養殖は冷水病の養殖場と天然河川における蔓延により甚大な被害を被ってきた。アユ冷水病の発生を受けて防疫対策やワクチンの開発研究などが進められてきた。しかしながら、ワクチンについてもその効き方が不明であるなどアユの防御能力の実態は明らかでない。アユ免疫学的研究に欠かせない白血球の基礎的な研究も進んでおらず、血球についても詳細な報告は乏しい。このことからアユ血球の同定に着手し、それら血球の免疫応答を把握するため、疾病初期に起こる初期感染防御を担う非特異的防御機構についての検討を行った。

2. アユ血球の同定は形態学的、細胞化学的方法によって行なわれた。その結果、末梢血中から栓球、リンパ球、好中球、好塩基球、単球/マクロファージを検出した。血球の主組成は赤血球を除くと栓球、リンパ球、好中球であり、好塩基球、単球/マクロファージは非常に少なかった。また、末梢血でみられた単球/マクロファージと形態的に類似した細胞が脾臓でみられた。同定された血球の細胞化学的染色性については、リンパ球が ACP、PAS、好中球が DAB、NAP、ACP、PAS、脾臓単球/マクロファージが ACP、EST  $\alpha$ -NB、栓球が ACP で陽性であった。なお、アユ栓球は PAS 染色で陰性を示した。

3. アユ血球が養殖期間中どのような動態を示すか、末梢血の血

球組成変化を定期的に調べた。この間に出現した病魚の血球組成は、栓球が増加、リンパ球が小型化、好中球が減少しており、成熟好中球の割合が減少した。病魚の血球組成によく似た組成を示すサンプルもみられ、初期の病魚である可能性も考えられた。さらに潜在的に異常と考えられるサンプルには正常魚と比べリンパ球が低い状態がみられた。性成熟魚の血球組成は正常魚のデータに近いことから性成熟による血球組成変化は小さいことが考えられた。

4. 養殖魚でみられた病魚の血球組成の変化を検証するため、実験的炎症による再現実験を行った。その結果、血球組成変化は一時的な栓球、リンパ球の低下と好中球の増加が起こり、単球/マクロファージが遅れて徐々に増加し、さらに分葉核を持つ好中球の割合が低下することが捉えられた。そして、アユ末梢血の血球変化は炎症部位である腹腔内の変化を反映していた。

5. 炎症実験結果と養殖の病魚と比較してみると、栓球と好中球の組成が両方で反対となっている。病魚では栓球が増加していることから病魚がストレス状態にあった可能性が考えられた。さらに炎症実験でみられた単球/マクロファージの末梢血中での増加は病魚でみられていないことから、病魚の病態は軽微な状態であった可能性もある。

6. 起炎後に炎症部位への好中球の浸潤は早期に起こり、一時増加した好中球は減少してゆき、炎症部位では起炎前より低い値になっており、造血器からの好中球の末梢血、炎症部位への浸潤が

緩慢であることがわかれた。そして、起炎後徐々に PO 活性の低下した細胞の増加がみられた。墨粒子、蛍光ラテックス粒子による貪食試験から、単球/マクロファージ、リンパ球はよく取込むが、好中球による貪食作用は極めて低い結果を得た。好中球の貪食作用が弱いことから、好中球の脱顆粒のメカニズムに疑問が生じる。好中球の貪食、殺菌以外の単球/マクロファージとの関わりなども考えられた。

7. 本研究において、詳細に同定されていなかったアユ血球が同定された。そして、実験的炎症からこれら血球の動態は既存の研究と似た変化を起こすことが分かり、新たに好中球が形態学的、細胞化学的に変化することが見い出された。養殖場で血球の動態をモニタリングすることで疾病に至る初期の異変を捉えることにより、健康魚の飼育管理が向上することに期待したい。

## 謝 辞

稿を終わるにあたり、終始、御懇篤なる御指導御校閲を賜りました広島大学大学院 生物圏科学研究科 古澤修一教授に深甚なる謝意を表すとともに、本研究の遂行にあたり、種々の面にわたり御助言をいただきました広島大学大学院生物圏科学研究科、堀内浩幸教授、飯島憲章教授、河合幸一郎教授及び 海野徹也准教授に深謝いたします。また、種々の面にわたり御援助いただきました高梁川漁業協同組合の各位に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 谷口順彦, 池田 実(2009) アユ学, 築地書館, 東京, 271pp.
- 2) 宗田克巳(1974) 高梁川, 岡山文庫, 59, 日本文教出版, 岡山, 174pp.
- 3) 中国四国農政局統計部(1975 - 2008) 岡山農林水産統計年報, 昭和50年-平成20年, 農林水産省.
- 4) アユ冷水病対策協議会(2008) アユ冷水病対策協議会取りまとめ, 農林水産省, 23pp.
- 5) アユ冷水病対策協議会(2008改訂)アユ冷水病防疫に関する指針, 農林水産省, 17pp.
- 6) アユ疾病対策協議会(2011) アユ疾病に関する防疫指針, 農林水産省, 35pp.
- 7) 大島俊一郎(2010) 魚類冷水病に対する実用的なワクチンの開発(中・四国地方におけるアユ増殖の課題と展望公開シンポジウム), 平成19年度日本水産学会中国・四国支部大会講演要旨集.
- 8) 古澤修一(2010) 脊椎動物の免疫系からみたアユの生体防御機構(中・四国地方におけるアユ増殖の課題と展望公開シンポジウム), 平成19年度日本水産学会中国・四国支部大会講演要旨集.
- 9) 中西照幸(2012) 魚類の生体防御, 魚病学概論(小川和夫, 室賀清邦編), 恒星社厚生閣, 東京, pp 9-26.
- 10) 椎橋 孝, 飯田貴次(2003) 顆粒球, 魚類好中球の活性酸素産生機構を中心として, 水産学シリーズ 135, 魚類の免疫学(渡辺翼編), 恒星社厚生閣, 東京, pp87-102.
- 11) 佐藤二郎, 泉川晃一(2011) 平成22年度内水面養殖の技術指導, 岡山県水産試験場報告, 26, 74-75.

- 12) 池田彌生, 尾崎久雄, 瀬崎啓次郎 (1986) 魚類血液図鑑, 緑書房, 東京, 361pp.
- 13) 古澤修一 (2011) アユの生体防御を考える, アユ学最前線, アユの科学と釣り (片野修, 海野徹也, 谷口順彦編), 学報社, 東京, pp58-60.
- 14) Suzuki, Y. (1986) Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer, Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 52, 11, 1895-1899.
- 15) 阿南健一 (1991) エステラーゼ染色, 酵素染色, II 血液検査, 新染色法のすべて, Medical Technology 別冊, 医歯薬出版株式会社, pp. 272-275.
- 16) 平野正美, 勝田逸郎, 井野晃夫, 岡本昌隆, 池本敏行, 秋山秀彦, 溝口良順, 郡司昌治 (2006) ビジュアル臨床血液形態学, 南江堂, 386pp.
- 17) Ellis, A. E. (1977) The leucocytes of fish, A review. J. Fish Biol., 11, 453-491.
- 18) Rowley, A. F., Hunt, T. C., Page, M. & Mainwaring, C. (1988) Fish, In Vertebrate Blood Cells (Rowley, A. F. and Ratcliffe, N. A.) pp. 19-127.
- 19) Saunders, D. C. (1968) Variations in thrombocytes and small lymphocytes found in the circulating blood of marine fishes, Trans. Amer. Microsc. Soc., 87, 39-43.
- 20) Ellis, A. E. (1976) Leucocytes and related cells in the plaice, *Pleuronectes platessa*, J. Fish Biol., 8, 143-156.
- 21) 結城了伍 (1963) 魚類の血液細胞に関する諸問題特にその顕微鏡的検査の吟味, 日水誌, 29, 1098-1103.

- 22) 松野一彦 (2004) 白血球, 血液検査法, スタンダード検査血液学日本検査血液学会, 医歯薬出版株式会社, pp26-34.
- 23) Fey, F. (1965) Vergleichende hamozytologie niederer Vertebraten II. Thrombozyten. Folia Haematol., 85, 205-217.
- 24) Fey, F. (1966) Vergleichende hamozytologie niederer Vertebraten IV. Monozyten-plasmozyten-lymphozyten, Folia Haematol. , 86, 133-147.
- 25) Bielek, E. (1981) Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinea tinea* L.; *Salmo gairdneri* Richardson), Cell & Tissue Res., 220, 163-80.
- 26) Cannon, M. S., Mollenhauer, H. H., Cannon, A. M., Eurell, T. E. & Lewis, D. E. (1980) Ultrastructural localization of peroxidase activity in neutrophil leukocytes of *Ictalurus punctatus*, Can. J. Zool. , 58, 1139-43.
- 27) 浜口昌巳, 薄 浩則, 石岡宏子 (1992) トラフグおよびクサフグの血球細胞の分類. 南西海区水産研究所報告, 25, 51-58.
- 28) 近藤昌和, 林 裕之, 高橋幸則 (2011) メナダの白血球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 59, 173-178.
- 29) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則 (2012) アカメのリンパ球, 単球および好酸球の染色特性, 水大研報, 60, 2, 95-102.
- 30) Neumann, N. F., Barreda, D. R. & Belosevic, M. (2000) Generation and functional analysis of distinct macrophage subpopulations from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney leukocyte culture, Fish & Shellfish Immunol., 10, 1-20.

- 31) Belosevic, M., Hanington, P. C. & Barreda, D. R. (2006) Development of goldfish macrophages in vitro, *Fish & Shellfish Immunol.*, 20, 152~171.
- 32) Afonso, A., Silvia, J., Lousada, S., Ellis, A. E. & Silva, M. T. (1998) Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish & Shellfish Immunol.*, 8, 319-338.
- 33) Pickering, A. D. (1986) Changes in blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season, *J. Fish Biol.*, 29, 335-347.
- 34) Ellis, A. E. & Munroe, A. L. S. (1976) Defense mechanisms in fish, 1. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.), *J. Fish Biol.*, 8, 67-78.
- 35) Weinreb, E. L., & Weinreb, S. (1969) A study of experimentally induced endocytosis in a teleost. I. Light microscopy of peripheral blood cell response. *Zoologica* (NY), 54, 25-34.
- 36) Toida, S., Kanai, K. & Yoshikoshi, K. (2003) The kinetics of leukocytes and histopathology of red sea bream in artificial infection of *Edwardsiella tarda*, *Fish Pathology*, 38(4), 137-142.

- 37) Hines, R. & Spira, D.T. (1973) Ichthyophthiriasis in the mirror carp. III. Leukocyte response, J. Fish Biol. 5 , 527-534.
- 38) Nakayasu, C., Tsutsumi, N., Yoshitomi, T., Yoshinaga, T. & Kumagai, A. (2011) Identification of Japanese flounder leucocytes involved in the host response *Neoheterobothrium hirame*, Fish Pathology, 38 (1), 9-14,
- 39) Espelid, S., Løkken, G.B., Steiro, K. & Bøgwald, J. (1996) Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.), Fish & Shellfish Immunology, 6, 95-110.
- 40) 鈴木 讓, 日比谷京 (1988) コイの実験的炎症における白血球の動態, 魚病病究, 23(3), 179-184.
- 41) Serada, K., Moritomo, T., Teshirogi, K. & Itou, T. (2005) Comparison of respiratory burst activity of inflammatory neutrophils in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and carp (*Cyprinus carpio*), Fish & Shellfish Immunology , 19, 363-373.
- 42) 高野達也, 峰尾千恵子 (1990) 食作用, 白血球の運動, 白血球と生体防御 (水上茂樹, 柿沼カツ子, 竹重公一郎編), 講談社サイエンティフィク, 東京, pp64-75.
- 43) Geiser, M., Rother-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Hof, V.I., Heyder, J. & Gehr, P. (2005) Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells , Environ. Health Perspect., 2005 , 113,

- 11, 1555-1560.
- 44) Li, J., Barreda, D. R., Yong-An Zhang, Y. A., Boshra, H., Gelman, A. E., LaPatra, S., Tort, L. & Sunyer, J. O. (2006) B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities, *Nature Immunology*, 7, 1116-1124.
- 45) 長沢貴宏、中易千早、松山知正、柚本智軌、中尾実樹(2011), 魚類栓球の貪食作用とその活性化に伴う形態変化, 日本比較免疫学会第23回学術集会講演要旨, p27
- 46) 近藤昌和、稲川裕之、高橋幸則(2007) アユのスーパー好中球, 日本水産学会大会講演要旨集, p221.
- 47) Weinreb, E.L. (1958) Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri iridius*. I. Haematology under normal and experimental conditions of inflammation, *Zoologica N.Y.*, 43, 145-154.
- 48) Davis, A. K., Maney, D. L. and Maerz, J. C. (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists, *Functional Ecology*, 22, 5, 760-772.