

## 学位論文の要旨

論文題目 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

中 田 公 人

アユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) は、我が国内水面漁業の主要な魚種であり、広く種苗放流、養殖が行われてきた。しかし、近年その漁獲量が激減しており、その原因として、河川環境悪化や魚病の蔓延などさまざまな問題が提起されているが、アユ放流事業現場では人工種苗の健苗性が強く求められている。種苗生産、養殖を行う上で魚病対策は重要であり、魚病発生を未然に防止することにより、魚の健康を維持して飼育する必要がある。そのためには現場で魚の健康度をモニターする簡便な測定法の開発が切望される。それには免疫の中心である血液中の白血球を用いたモニタリングが有望といえる。しかし、アユの白血球の詳細な分類学的研究は乏しいことから、アユの血球の分類を行い、それら血球が疾病、ストレス等によりどのような変化を起こすか検討した。

### 材料と方法

試験に用いたアユは、高梁川栽培漁業研究所(岡山県総社市)にて種苗生産、飼育されているアユを用いた。血液試料は Percoll による密度分配により赤血球を除き、白血球、栓球を得た。そして、塗抹用試料は Cytospin 及び擦りガラス法により作成した。塗抹用試料は、Romanowsky の May Grunward Giemsa (MGG) 染色及び Leishman Giemsa (LSG) 染色、Peroxidase(PO) 染色、Alkaline phosphatase (AP) 染色、Esterase 染色  $\alpha$ -naphthyl butyrate(EST  $\alpha$ -NB)法、Acid phosphatase (ACP) 染色、さらに、Periodic acid-Schiff (PAS) 染色、Toluidin blue 染色を行った。血球は光学顕微鏡下で観察、得られた撮影画像は画像解析ソフト Image J により解析した。

養殖アユの血液中の血球組成は、6月～10月の間、月1回、測定した。また、墨粒子及び蛍光ラテックス粒子を腹腔内投与して実験的に炎症を起こすことにより、腹腔内、末梢血で起こる血球組成及び血球の形態学的、細胞化学的变化を調べた。

### 結果及び考察

アユ血液中でみられた血球の MGG 染色の染色性及び形態学的特徴から栓球、白血球の特定を行った。アユ末梢血でみられた血球は、栓球、リンパ球、好中球、好塩基球、単球/マクロファージであった。それらの末梢血での主組成は、栓球、リンパ球、好中球であり、好塩基球、単球/マクロファージの存在は希有であった。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。各血球の特徴は、栓球は核クロマチンが均一な構造を示し、核が濃染された超小型な細胞と核が明るく染まる細胞が存在した。リンパ球は、細胞質が好塩基性に染まり、核周明庭を持っていた。大型のリンパ球は、空胞の存在など単球/マクロファージと似た特徴を持つが核周明庭の有無で判別された。好中球は、細胞質が無染色であり、核が偏在していた。

各血球の核面積(N)、細胞面積(C)を測定し、N/C比を求めた。N/C比によるリンパ球、好中球、単球/マクロファージの分別はある程度可能といえるが、小型の栓球、リンパ球、好中球の核面積/細胞面積比は重複する細胞が一部みられ、その他の特徴と総合的に判断する必要がある。

魚類の特殊染色所見は魚種によりさまざまと異なることが知られている。アユの染色所見は人のものと類似した結果を示した。アユでは、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 染色で陰性であった。

アユ血球組成の経月変化を 6-10 月の間、養殖アユの末梢血中の栓球、白血球を 1 か月毎に調べた。季節、成熟等による血球組成に明瞭な変化を把握することはできなかった。しかし、潰瘍のみられた 7 月のアユの血球組成によると、好中球、リンパ球は小型化、及び全好中球割合が低い状態がみられたが疾病に伴う現象かどうか判断できなかった。

このことから、墨粒子を腹腔内に投与することにより実験的に炎症を起こし、アユの血球動態及び形態学的、細胞化学的变化について検討した。その結果、末梢血、腹腔内ともに墨粒子投与後、好中球は腹腔内では 4 時間で増加、末梢血では 2-3 日目に一時増加がみられたがその後の減少は著しくかった。単球/マクロファージは末梢血では投与まえには検出されなかったが、投与後、1 日目に緩やかな増加が続いてみられ、7 日目においても続いた。また、腹腔内でも投与後、増加がみられ 14 日目まで続いていた。すなわち、炎症部血球組成と末梢血血球組成は類似の推移を示すといえる。

異物(墨粒子、蛍光ラテックス粒子)の血球への取り込み実験は、腹腔内では、単球/マクロファージ、リンパ球は墨粒子、蛍光ラテックス粒子をよく取り込んだが、好中球は墨粒子をわずかに取込んだが、蛍光ラテックス粒子を取込取まなかった。末梢血では、腹腔内とほぼ同様の傾向を示したが、好中球の取込みは腹腔内より末梢血でよかった。そして、末梢血での栓球の取込はみられたが、赤血球はほとんどみられなかった。腹腔内と末梢血共に血球に取り込まれないフリーの粒子がみられ、腹腔内から循環系にフリー粒子の状態での移行が示唆された。

異物投与に伴い腹腔内では好中球の核崩壊細胞が投与後 7-14 日にみられた。また、単球/マクロファージに取り込まれた好中球やその顆粒、両細胞の接着などがみられた。また、腹腔内好中球の PO 染色像は染色様態の異なるさまざまの細胞がみられ、腹腔内では墨粒子投与後、時間経過とともに PO 染色弱陽性好中球の割合は増加、陽性好中球の割合は減少した。そして、PO 染色弱陽性好中球は Percoll 低密度域に、陽性好中球は高密度域にみられ、血球は形態的、機能的変化により密度が変化するといえる。

炎症部位の血球組成変化は末梢血に反映することから、末梢血測定データを蓄積することによりアユの健康度把握が期待される。また、炎症部位で特異的にみられる血球は疾病の指標となりうるか検討する必要がある。