

トラフグおよびクサフグの血球細胞の分類

浜口 昌巳・薄 浩則・石岡 宏子

Classification of Blood Cells of Tiger Puffer, *Takifugu rubripes*, and Grass Puffer, *Takifugu niphobles*

Masami HAMAGUCHI, Hironori USUKI and Hiroko ISHIOKA

Classification of blood cells of tiger puffer and grass puffer was performed by morphological characterization on peroxidase-Giemsa staining and phagocytosis against sheep red blood cells. The morphological study on both puffers revealed: thrombocytes of spindle shape, oval nuclei and light pink cytoplasm; small lymphocytes of round shape, round nuclei and dark gray cytoplasm; large lymphocytes of round shape, round nuclei and dark gray cytoplasm; neutrophils of round or oval shape, oval and bilobed nuclei and whitish cytoplasm; granulocytes-1 of round or oval shape, round or oval nuclei and dark gray cytoplasm with granules of dark blue; granulocytes-2 of round or oval shape, round or oval nuclei and whitish cytoplasm with degranules; monocytes of round or oval shape, round or oval nuclei and light to dark gray cytoplasm. Sizes of white blood cells of tiger puffer were smaller than those of grass puffer. The rate of peroxidase positive cells amounts to 90-96% of all neutrophils and to 0-2% of all monocytes. Phagocytosis was observed in neutrophils and monocytes.

Key words: *Takifugu rubripes*, *Takifugu niphobles*, blood cells

近年、西日本の養殖場ではフグ類の養殖が盛んになってきており飼育尾数が増加してきている。それともなって、口白症（中内他 1985, 和田他 1985）などの新たな病害が発生してくるなど様々な問題が生じてきている。現在、トラフグ養殖において最も被害の大きい口白症の原因としてはウイルス感染が疑われている。このような疾病の予防には抗生物質による治療が困難であることから、ワクチンなどの免疫学的療法が期待されている。しかし、フグ類の生理学および免疫学的特性に関する研究は少なく、ワクチンの開発が困難であるのが現状である。このような生理学および免疫学的特性の解明には血球細胞を用いた検討が必要であると思われるが、トラフグおよびクサフグの血液細胞に関する知見は少ない。

そこで、本研究ではフグ類の生理学および免疫学的特性を解明する手始めとして、感染防御において重要な役割をはたすと考えられる血球細胞の分類を行うとともに、貪食活性について検討したので報告する。

実 験 方 法

供試魚

トラフグ *Takifugu rubripes* は1991年日本栽培漁業協会屋島事業所で種苗生産されたのち、広島県尾道市沖で飼育されていたものを用いた。クサフグ *Takifugu niphobles* は1987年に山口県光市沖で採捕された天然魚から採取した卵および精子を用いて、当所で人工授精して得た稚魚を1 m×1 m×1 mおよび1 m×1 m×2 mの網いけすに収容して、毎日1回オキアミにハマチエード S (武田薬品工業) を混合したものを投与して飼育した。

採 血

ヘパリン処理した1 mlのデスポーザブルシリンジ (テルモ) を用いて尾動脈から採取した。

血球数の算定

採取した血液を Turk 液を用いて200倍に希釈して、トーマの血球計算盤 (Erma) を用いて算定した。

血液塗抹標本の作製

採血後ただちに常法によって作製した。

染 色

猪子・糸賀 (1974) のペルオキシダーゼとギムザの2重染色を行った。

貪食性試験

グルタルアルデヒドで固定したヒツジ赤血球を滅菌したダルベッコのリン酸緩衝食塩水に 1×10^8 cells/ml の濃度となるように調製した懸濁液 0.01 ml と血液 0.49 ml を混合して 25°C で1時間反応させた。そして、前述の方法で塗抹標本を作製して染色を行ったのちに検鏡して貪食性の有無を判定した。

結 果

トラフグおよびクサフグの供試尾数、血液中の赤血球数および赤血球以外の血球数は Table 1 に示すとおりである。血球数はトラフグでは $270.6 \pm 26.4 \times 10^4$ cells/mm³、クサフグでは $360.2 \pm 142.5 \times 10^4$ cells/mm³ となった。赤血球以外の血球数はトラフグでは $22.0 \pm 4.2 \times 10^5$ cells/mm³、クサフグでは $30.8 \pm 12.6 \times 10^5$ cells/mm³ となった。

Table 1. Number of red blood cells and white blood cells in blood of tiger puffer, *Takifugu rubripes*, and grass puffer, *Takifugu niphobles*

Fish	No. of fish	No. of red blood cells mean (S.D.) ($\times 10^4$ cells/mm ³)	No. of white blood cells mean (S.D.) ($\times 10^4$ cells/mm ³)
Tiger puffer	10	270.7 (26.4)	22.0 (4.2)
Grass puffer	11	360.2 (142.6)	30.8 (12.6)

トラフグおよびクサフグの血液塗抹標本上に認められた血球像は染色形態には差異は認められなかったため、両魚種の血球の分類は同一の分類基準で行った。分類基準に用いた血球像は Fig. 1 に示すとおりである。そのうち、Aは栓球、Bは小リンパ球、CとDは大リンパ球、Eはペルオキシダーゼ陽性好中球、Fはペルオキシダーゼ陰性好中球とした。Gは大型の、Hは小型の好塩基性顆粒をもった細胞でIはその顆粒が脱落した血球であり、これらを顆粒球-1とした。JとKは顆粒が脱落した血球であるが顆粒球-1とは細胞質の染色性が異なることから顆粒球-2とした。LとMは単球系血球、NおよびOはその他の血球とした。なお、Pは核のない赤血球と思われた未同定の血球を示している。

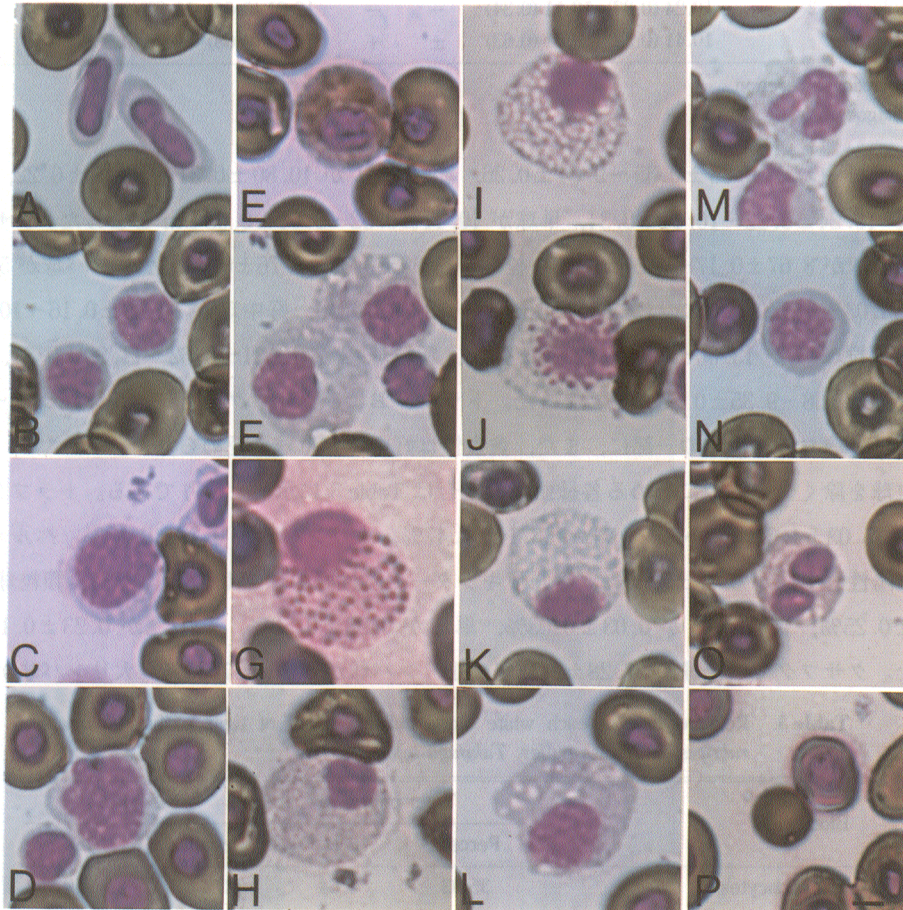


Fig. 1. Morphological characteristics of tiger puffer (A-E, I, J, L, O, P), *Takifugu rubripes*, and grass puffer (F, G, H, K, M, N), *Takifugu niphobles*. Peroxidase-Giemsa stain; scale shows 2 μ m. A: Thrombocytes, B: Small lymphocytes, C and D: Large lymphocytes, E and F: Neutrophils, G, H and I: Granulocytes-1, J and K: Granulocytes-2, L and M: Monocytes, N and O: Others, P: unidentified red blood cells.

それぞれの血球の直径、ペルオキシダーゼ反応性および貪食性を測定した結果は Table 2 に示すとおりである。各血球の直径はトラフグでは赤血球が $9.07 \pm 0.21 \sim 6.93 \pm 0.35$ 、栓球が $9.36 \pm 0.34 \sim 3.81 \pm 0.38$ 、小リンパ球が $4.45 \pm 0.26 \sim 4.03 \pm 0.31$ 、大リンパ球が $8.17 \pm 0.31 \sim 7.89$

Table 2. Principal characteristics of the blood cells in tiger puffer, *Takifugu rubripes*, and grass puffer, *Takifugu niphobles*

Blood cells	Tiger puffer				Grass puffer		
	Diameter (μm) mean (S.D.)	POX*	PH**	Diameter (μm) mean (S.D.)	POX	PH	
Erythrocyte	9.07 (0.21)– 6.93 (0.35)	–	–	8.67 (0.17)– 6.24 (0.19)	–	–	
Thrombocyte	9.36 (0.34)– 3.81 (0.38)	–	–	9.60 (0.37)– 4.76 (0.63)	–	–	
Small lymphocyte	4.45 (0.26)– 4.03 (0.31)	–	–	5.49 (0.47)– 5.03 (0.52)	–	–	
Large lymphocyte	8.17 (0.31)– 7.89 (0.42)	–	–	8.56 (0.41)– 8.29 (0.49)	–	–	
Neutrophil	9.85 (0.35)– 9.04 (0.26)	+	+	10.89 (0.16)–10.23 (0.26)	+	+	
Granulocytes-1	10.80 (0.31)–10.15 (0.22)	–	–	13.60 (0.96)–12.35 (1.06)	–	–	
Granulocytes-2	10.24 (0.22)–10.11 (0.34)	–	–	12.31 (0.62)–11.99 (0.54)	–	–	
Monocyte	10.41 (0.52)– 9.01 (0.63)	±	+	10.58 (0.68)– 9.35 (0.50)	±	+	

* Peroxidase reaction.

** Phagocytosis.

±0.42, 好中球が 9.85 ± 0.35 ~ 9.04 ± 0.26, 顆粒球-1 が 10.80 ± 0.31 ~ 10.15 ± 0.22, 顆粒球-2 が 10.24 ± 0.22 ~ 10.11 ± 0.34, 単球が 10.41 ± 0.52 ~ 9.01 ± 0.63 μm となった。クサフグでは赤血球が 8.67 ± 0.17 ~ 6.24 ± 0.19, 栓球が 9.60 ± 0.37 ~ 4.76 ± 0.63, 小リンパ球が 5.49 ± 0.47 ~ 5.03 ± 0.52, 大リンパ球が 8.56 ± 0.41 ~ 8.29 ± 0.49, 好中球が 10.89 ± 0.16 ~ 10.23 ± 0.26, 顆粒球-1 が 13.60 ± 0.96 ~ 12.35 ± 1.06, 顆粒球-2 が 12.31 ± 0.62 ~ 11.99 ± 0.54, 単球が 10.58 ± 0.68 ~ 9.35 ± 0.50 μm となった。トラフグおよびクサフグともにペルオキシダーゼ反応性は好中球および単球の一部に, また, 貪食性は好中球と単球に認められた。

赤血球を除く全血球中にしめる各種血球の割合は Table 3 に示すとおりである。トラフグでは栓球が 35.03 ± 4.64%, 小リンパ球が 56.14 ± 4.47%, 大リンパ球が 0.23 ± 0.17%, ペルオキシダーゼ陽性好中球が 6.17 ± 2.31%, ペルオキシダーゼ陰性好中球が 0.28 ± 0.25%, 顆粒球-1 が 1.17 ± 0.25%, 顆粒球-2 が 0.03 ± 0.03%, 単球が 0.98 ± 0.56%, その他が 0.23 ± 0.17% となった。クサフグでは栓球が 27.28 ± 2.59%, 小リンパ球が 60.63 ± 7.35%, 大リンパ球が 0.87

Table 3. Relative rate of each white blood cells in blood of tiger puffer, *Takifugu rubripes*, and grass puffer, *Takifugu niphobles*

Blood cells	Tiger puffer		Grass puffer	
	Percent	S.D.*	Percent	S.D.
Thrombocytes	35.03	4.64	27.28	2.59
Small lymphocytes	56.14	4.47	60.63	7.35
Large lymphocytes	0.23	0.17	0.87	0.31
Neutrophila (POX** -positive)	6.17	2.31	3.84	1.50
(POX-negative)	0.28	0.25	0.42	0.23
Granulocytes-1	1.17	0.25	2.83	1.94
Granulocytes-2	0.03	0.03	0.19	0.10
Monocytes	0.98	0.56	3.34	2.58
Others	0.23	0.17	1.01	0.43

* Standard deviation.

** Peroxidase.

±0.31%, ペルオキシダーゼ陽性好中球が $3.84 \pm 1.50\%$, ペルオキシダーゼ陰性好中球が $0.42 \pm 0.23\%$, 顆粒球-1 が $2.83 \pm 1.94\%$, 顆粒球-2 が $0.19 \pm 0.10\%$, 単球が $3.34 \pm 2.58\%$, その他が $1.01 \pm 0.43\%$ となった。

考 察

魚類の赤血球数は尾崎 (1968) によると円口類や軟骨魚類と比較して硬骨魚類のほうが多いとしている。また、赤血球数は運動の活発な魚で多いとされているがトラフグおよびクサフグの今回の値はカツオやサバなどで報告されている値に近く、本魚種の活発な遊泳性が示唆される。トラフグおよびクサフグの赤血球以外の血球細胞数はきわめて多い結果となった。この値から塗抹標本上の血球の構成比率によって栓球の数を除外しても赤血球数の5%程度となり尾崎 (1968) が記載している他の硬骨魚の値よりも多くなる。白血球の数については魚体の健康状態や感染症 (保科 1962, 池田他 1976, 楠田他 1989) および季節により (EZZAT *et al.* 1974) 変化することが知られている。これらのことから、用いる供試魚の状態や採血時期が問題となると思われる。今回用いたクサフグには外見上とくに問題は認められなかったが、トラフグにはかみつきによると思われる尾鰭の損傷が認められた。このような原因による可能性もあるが、白血球数が多いことはこれらの魚種の特徴の一つではないかと思われる。

魚類の血球の分類については種々の研究が行われているが、魚類の多様性から魚種間の細胞の染色性に大きな差異が認められており、統一的な分類は不可能ではないかと考えられる。また、ヒトなどは乳類とは染色形態や機能の異なった血球の存在が知られており、ほ乳類での分類基準をそのまま適用するのも問題がある。くわえて、フグ類の血球の分類に関する知見は、池田他 (1986) の魚類血液図鑑にはショウサイフグ、ハコフグ、コモンフグ、コンゴウフグ、ヒガンフグ、モヨウフグの血球像が記載されているがトラフグおよびクサフグなど産業上有用な種の血球分類は充分ではない。そこで、本研究では血球の分類に際して、浜口他 (1989) の報告中で述べられている分類基準に基づいて、栓球、リンパ球、好中球、単球、好塩基球、好酸球およびその他の血球に分類した。その結果、この基準に基づくトラフグおよびクサフグの血球細胞としては栓球、小リンパ球、大リンパ球、好中球および単球が認められたが、顆粒球には好酸球および好塩基球への同定が困難なものがあつた。これらの血球については細胞質の染色性の差異から、便宜上それぞれ顆粒球-1 および顆粒球-2 と区別した。フグ類の顆粒球の一種である好塩基球については池田他 (1986) の魚類血液図鑑のなかで述べられているように、様々な染色形態のものがある。また、SUZUKI (1986) はショウサイフグの好塩基球の顆粒の性質や各種染色法による染色を試みており、フグ類の好塩基球の顆粒は水溶性の顆粒を持つものがあり、容易に脱落することからこの細胞の同定に際しての基準になるとしている。本報の顆粒球-1 は好塩基性の顆粒を持つものが認められたことから好塩基球の一部である可能性がある。また、顆粒球-2 は顆粒が残存しているものが確認されなかったことから、容易に顆粒が脱落する血球ではないかと考えられ、この特徴から好塩基球の一部である可能性もある。池田他 (1986) はフグ類では好塩基球が多い

と記載しているが、トラフグおよびクサフグでも好塩基球に近いと考えられる顆粒球-1 および 2 の出現率が高く、これらの血球はフグ類に特徴的な血球ではないかと思われる。好塩基球はヒトでは直径 10~15 μm で 2~3 分葉の不明瞭な核を持ち、細胞質は青灰色を呈し、黒紫色の粗大顆粒を持つ細胞と記載されている (野村 1985)。その機能は顆粒内にヘパリン、ヒスタミン、ロイコエリトリンおよびヒアルロン酸などを保有し、細胞表面に IgE に高親和性をもつリセプターを持つことから、生体のアレルギー反応に関与する細胞とされている (田所 1990)。しかし、魚類ではアレルギー反応は観察されておらず、ヒトなどの好塩基球の定義がそのまま適用できるかどうか疑問であるので、今回認められた顆粒球-1 および 2 については、今後さらにこの血球の機能面の検討が必要ではないかと考えられる。

各細胞の大きさについては KUSADA and IKEDA (1986) のウナギの血球の測定値と類似していた。また、好塩基球の直径については SUZUKI (1986) はショウサイフグで 10~12, コイで 13~15 μm であったとしている。本研究においてもこれに近い顆粒球-1 についてはトラフグはショウサイフグの、クサフグはコイの範囲内にあり、クサフグの血球はトラフグよりやや大きい値であった。

ほ乳類の食細胞には好中球を中心とした多形核白血球と、マクロファージなどの単核食細胞があり、これらの細胞は貪食や殺菌能に差異が認められるが生体内に侵入した異物の排除に役立っていることが知られている (野本 1988)。魚類でも好中球およびマクロファージが存在し、ほ乳類と同様に貪食および殺菌を行うことが知られている (入江 1932, 松田 1937, ELLIS 1977, FURGUSON 1976, MCKINNEY *et al.* 1979, LESTER and BUDD 1979, 森 1981, SUZUKI 1984, KUSADA and IKEDA 1986)。今回トラフグおよびクサフグでは貪食性が認められた血球は好中球と単球のみであり、栓球や小リンパ球などその他の血球では認められなかった。魚類の栓球および小型リンパ球の貪食能については多数報告がある (FURGUSON 1976, MCKINNEY *et al.* 1979, 森 1981, SUZUKI 1984, KUSADA and IKEDA 1986) がトラフグおよびクサフグではこのような報告例とは異なっていた。また、貪食細胞は貪食した粒子を処理する酵素の 1 種としてペルオキシダーゼを保有していることが知られているが、トラフグおよびクサフグでは好中球および単球に認められた。SUZUKI (1986) はショウサイフグの好中球にペルオキシダーゼの反応性を認めている。今回、トラフグおよびクサフグでは好中球の 90~96% がペルオキシダーゼ陽性であったが単球では 0~2% であったことから、ペルオキシダーゼ染色は本魚種において好中球の判別に有効ではないかと思われる。

赤血球以外の血球の構成比率についてはトラフグおよびクサフグともに栓球と小リンパ球の両者が 90% ちかくを占め、それ以外の血球ではトラフグでは好中球および好塩基球、クサフグでは好中球および単球が多かった。今回の値を池田他 (1986) に記載されている他の魚種と比較すると栓球やリンパ球の血球全体に対する構成比率は同様であった。しかし、トラフグおよびクサフグではこれらの細胞の絶対数は他の硬骨魚と比較して多く、他の硬骨魚と比較してリンパ球の絶対数は差異が認められた。リンパ球は生体の特異免疫に関与し、抗体産生や直接異物排除に役立つことが知られている (ELVES 1972)。このことはフグ類の免疫学的特性を考えるうえで、重要

ではないかと思われる。

以上の結果からトラフグおよびクサフグの血球についての特徴はまず白血球数が多いことであり、そのほとんどを小型のリンパ球が占めていた。ついで、トラフグおよびクサフグでは便宜上顆粒球-1 および 2 と分類した血球の多様性や数の多さが際だっている。フグ類の生理および免疫学的特性の解明のために、魚体の状態に応じたこれらの各細胞の機能について検討を進めるとともに、さらに細部にわたった研究が必要ではないかと考えられる。

要 約

トラフグおよびクサフグの血球数、血球細胞の分類および貪食性について検討した。トラフグおよびクサフグの赤血球数は他の硬骨魚類で報告されているのと同様であったが、白血球数は多く赤血球数の5%程度となった。トラフグおよびクサフグの血球には栓球、小リンパ球、大リンパ球、ペルオキシダーゼ陽性好中球、ペルオキシダーゼ陰性好中球、2種類の顆粒球、単球が認められた。このうち貪食性は好中球および単球に認められた。

謝 辞

本研究に供試したトラフグの提供ならびに採取にご協力頂いた南西海区水産研究所内海資源研究室長佐藤良三博士、同主任研究官小川泰樹博士および阪地英男研究員に深謝致します。

文 献

- ELLIS, A. E., 1977: The leucocytes of fish. *J. Fish Biol.*, **11**, 453-491.
- ELVES, M. W., 1972: "The Lymphocytes", Lloyd-Luke Ltd, London 606 pp.
- EZZAT, A. A., M. B. SHABANA and A. M. FARGHALY, 1974: Studies on the blood characteristics of *Tilapia zilli* (Gervais). *J. Fish Biol.*, **6**, 1-12.
- FURGUSON, H. W., 1976: The ultrastructure of plaice (*Pleuronectes platessa*) leucocytes. *J. Fish Biol.*, **8**, 139-142.
- 畑井喜司雄, 1972: 魚における血流中接種細菌の動態に関する研究—II. ウナギの血流中における *Aeromonas* 菌の消長に伴う白血球の変動. 魚病研究, **7**, 34-43.
- 浜口昌巳・田中卓史・楠田理一, 1989: プリ腹腔内浸出細胞からの好中球およびマクロファージの採取. 日水誌, **55**, 1511-1515.
- 保科利一, 1962: ウナギの鱗赤病に関する研究. 東京水産大学特別研究報告, **6**, 1-104.
- 池田弥生・尾崎久雄・早山萬彦・池田静徳・見奈美輝彦, 1976: ノカルジア菌を接種したハマチの血液成分に関する診断学的研究. 日水誌, **42**, 1055-1064.
- 池田弥生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎, 1986: "魚類血液図鑑". 緑書房, 東京, 361 pp.
- 猪子恵司・糸賀 敬, 1974: o-トリジン使用による白血球 Peroxidase 反応の検討. 九血会誌, **24**, 1-6.
- 入江 亮, 1932: 鮎白血球ノ分類, 遊走速度, 並ニ貪食性ニ就テ. 十全会雑誌, **37**, 1605-1622.
- KUSUDA, R. and Y. IKEDA, 1986: Studies on classification of eel leucocytes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 205-209.
- 楠田理一・木村喜洋・浜口昌巳, 1989: *Nocardia kampfachi* で免疫したブリの血液中および腹腔内の白血球の

- 動態. 日水誌, 55, 1183-1188.
- LESTER, R. J. G. and J. BUDD, 1979: Some changes in blood cells of diseased coho salmon. *Can. J. Zool.*, 57, 1458-1464.
- 松田 正, 1937: 生体外ニ於ケル白血球ノ細菌貪食機能ニ関スル研究. 其27 総括編. 十全会誌, 42, 3703-3720.
- McKINNEY, E. C., S. B. SMITH, H. G. HAINES and M. M. SHIGEL, 1979: Phagocytosis by fish cells. *J. Reticuloendothel., Soc.*, 21, 89-95.
- 森 真朗, 1981: キンギョの異物貪食系に関する研究- II. 白血球のペルオキシダーゼ反応と食作用について. 魚病研究, 16, 91-96.
- 中内良介・宮崎照雄・塩満捷夫, 1985: トラフグの口白症の病理組織学的研究. 魚病研究, 20, 475-479.
- 野本亀久雄, 1988: PMN, Mφの食菌と生体防御. 日細菌誌, 43, 899-910.
- 野村武夫, 1985: 血球検鏡トレーニング. 中外医学社, 東京, 261 pp.
- 尾崎久雄, 1968: “魚類生理学講座 1. 血液・循環”. 緑書房, 東京, 326 pp.
- SUZUKI, Y., 1986: Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 1895-1899.
- SUZUKI, K., 1984: Light and electron microscope study on the phagocytosis of leucocytes in rockfish and rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50, 1305-1315.
- 田所憲治, 1990: マスト細胞と好塩基球の最近の知見. 生体防御, 7, 223-231.
- 和田新平・藤巻由起夫・畑井喜司雄・窪田三郎・磯田政恵, 1985: 養殖トラフグの口白症自然発生の病理組織学的所見. 魚病研究, 20, 495-500.