

3倍体サクラマスリンパ球および好中球の大きさと流動パラフィン投与による循環血中の細胞数の変化

大津 順
(1993年1月25日受理)

Size Distribution of Neutrophils and Lymphocytes in Triploid Masu Salmon, *Oncorhynchus masou*, and Changes in their Number in Circulating Blood after Administration of Liquid Paraffin

Jun OHTSU*

Sizes and numbers of neutrophils and lymphocytes in circulating blood in the triploid masu salmon, *Oncorhynchus masou*, were investigated. The numbers of neutrophils and lymphocytes in circulating blood were determined and compared with those found in diploid fish before and after an intraperitoneal injection of liquid paraffin.

The long and short diameters of both neutrophils and lymphocytes in triploid fish were significantly larger than those in the diploids. The number of neutrophils in 1 mm³ of blood of the triploids was significantly less than in the diploids.

One to 14 days after the injection of liquid paraffin, the number of neutrophils in 1 mm³ of blood in the triploid fish increased significantly. In the control diploid fish, on the other hand, significant increases in neutrophils were found only after 3 to 7 days. Lymphocytes in the diploids showed a significant increase in number per 1 mm³ of blood at 7 and 14 days, but in the triploids, the number decreased significantly at days 1 and 3, and increased at day 7, after the injection.

Key words: cell size, immune response, lymphocytes, neutrophils, *Oncorhynchus masou*, triploid

3倍体魚は染色体が一組増加するために、赤血球の核と細胞の大きさが増加するとともに血液の単位容積あたりの赤血球数の減少が多く、魚種で知られている (Beck and Biggers 1983; Sezaki *et al.* 1983; Benfey and Sutterlin 1984)。同様な変化は網膜細胞の大きさとも認められており (Aliah *et al.* 1990)、また、著者は3倍体サクラマスの筋肉細胞の核の長径が2倍体サクラマスのそれと比較して有意に大きくなることを報告した (大津 1992)。しかし、3倍体サクラマスについて、生体防御に関わる白血球の大きさと、細胞性免疫の反応性について調べた報告はない。

細胞性免疫反応は魚の感染に対する防御機構の一つとして重要な役割をはたしている。

* 富山県水産試験場 (Toyama Prefectural Fisheries Experiment Station, Namerikawa, Toyama 936, Japan)
富山県水産試験場業績A第25号

多くの無脊椎動物や脊椎動物の血液や組織内には、細菌や無機物の粒子、細胞の破片などを食食し消化する機能を持つ食細胞と呼ばれる細胞が存在し、これらは生体防御に重要な役割をはたしていると考えられている。硬骨魚類においても、哺乳類と同様に、循環血中の白血球のうち好中球と単球が食作用を持つことが知られており (Suzuki 1986)、感染防御にこれらの食細胞が関与していることが示唆されている。魚類の生体防御に果たす食細胞の役割は哺乳類におけるほど明らかにされていないが、哺乳類のそれと大差ないものと考えられている (Corbel 1975)。また、リンパ球は魚類においても免疫反応の上で抗体産生など重要な役割をもち、その反応性も魚類の感染防御機構に大きな意味を持っていると考えられている (Ellis 1977, 池田ら 1986)。本研究は3倍体サクラマス *Oncorhynchus masou* の細胞性免疫の反応性の特徴を知ることが目的とし、食食能を持つとされる好中球と抗体産生に関わるリンパ球について、循環血中におけるそれらの細胞径を計測し、さらに腹腔内へ異物として流動パラフィンを投与した場合のそれらの数の変化を経時的に調べた。

材料と方法

供試魚は、富山県水産試験場で養成した性転換雄サクラマスから得た精液を神通川産雌サクラマスから得た卵に媒精し、30℃ 6分間の高温度処理で作出した3倍体雌サクラマスである。仔魚は13±1℃の地下水で飼育し、ふ化後約1年の幼魚を1月下旬に実験に用いた。対照実験には同じ時期に通常雄と媒精し、同様の条件で飼育した2倍体サクラマスの稚魚を用いた。

3倍体魚 (体重24.6~53.6g) と2倍体魚 (体重25.6~78.6g) の腹腔内に流動パラフィンを注射器により体重1gあたり0.2ml注入し、無給餌で飼育した。投与前及び投与後1, 3, 7及び14日目に尾柄部より採血を行い、赤血球数を血球算定盤で計測し、血液1mm³あたりの赤血球数を計算するとともに、常法により塗抹標本を作成した。

塗抹標本にギムザ染色を施し、投与前の3倍体魚と2倍体魚のリンパ球と好中球の短径と長径を光学顕微鏡により接眼マイクロメーターを用いて測定した。また、光学顕微鏡により投与前後の3倍体魚と2倍体魚の栓球以外の白血球系細胞と赤血球の数を無作為に25視野以上計測し、赤血球1,000個あたりの白血球系細胞数を計算した。計測中、リンパ球と好中球以外の白血球系細胞はまれにしか認められなかったため、計測から除外した。さらにリンパ球、好中球の数を合計200個以上計数してリンパ球と好中球の比を求め、赤血球1,000個あたりの白血球系細胞数にリンパ球と好中球の比を乗じて赤血球1,000個あたりのリンパ球、好中球の数とした。また、血液1mm³あたりの赤血球数と赤血球1,000個あたりのリンパ球、好中球の数から血液1mm³あたりのそれぞれの数を求めた。3倍体魚は、赤血球の長径が通常魚より大きいことにより、それぞれの個体が3倍体であることを確認した。

有意差検定は、独立2試料のt検定を行い、有意水準5%未満を有意とした。

結 果

Table 1に3倍体魚のリンパ球と好中球のそれぞれの短径と長径を示した。3倍体魚のリンパ球と好中球の短径と長径を2倍体魚のそれらと比較すると、3倍体魚のリンパ球及び好中球の短径、長径ともに有意に大きかった。

流動パラフィンを腹腔内に注射した場合の3倍体魚と2倍体魚の好中球数の血液1㎖あたりおよび赤血球1,000個あたりの経時的変化をそれぞれFig. 1とFig. 2に示した。流動パラフィン投与前の赤血球1,000個あたりの好中球の数は、3倍体魚と2倍体魚との間で有意な差はなかった。また、3倍体魚の血液1㎖あたりの好中球の数は2倍体魚のそれと比較して有意に少なかった。

3倍体魚の好中球数は、流動パラフィン投与前と比較すると、赤血球1,000個あたりと血液1㎖あたりのいずれも投与後1日目から有意に増加し、7日目まで増加して14日目では7日目よりも減少したものの、投与前と比較すれば有意に多かった。2倍体魚の好中球の数は赤血球1,000個あたりと血液1㎖あたりとも3、7日目のみ投与前より有意に多かった。好中球数を3倍体魚と2倍体魚との間で比較すると、血液1㎖あたりでは投与後3日目に3倍体魚が有意に少なく、1、7、14日目には有意な差を示さなかった。赤血球1,000個あたりの好中球数は投与後7日目には3倍体魚が有意に多かった。

流動パラフィンを腹腔内に注射した場合の3倍体魚と2倍体魚のリンパ球数の血液1㎖あたりおよび赤血球1,000個あたりの経時的変化をそれぞれFig. 3とFig. 4に示した。流動パラフィン投与前の赤血球1,000個あたりのリンパ球数は、3倍体魚と2倍体魚との間では有意な差はなかった。また、3倍体魚の血液1㎖あたりのリンパ球数は2倍体魚のそれと比較して有意差がなかった。

3倍体魚のリンパ球数は、流動パラフィン投与前と比較すると、赤血球1,000個あたりと血液1㎖あたりとも投与後1、3日目で有意に減少し、7日目には有意に増加し、14日目には投与前とほぼ同じとなって有意な差を示さなくなった。2倍体魚のリンパ球数は、投与前と比較すると赤血球1,000個あたりと血液1㎖あたりとも投与後7日目ではじめて有意な差を示し、14日目でも有意に多かった。リンパ球数を3倍体魚と2倍体魚との間で比較すると、血液1㎖あたりでは1日目と14日目で3倍体魚が有意に少なかったが、3、

Table 1. Short and long diameters of lymphocytes and neutrophils in circulating blood of triploid and diploid masu salmon

	lymphocyte		Neutrophile	
	Short (μ)	Long (μ)	Short (μ)	Long (μ)
Diploid	9.2±0.4	9.8±0.4	11.5±0.6	12.0±0.6
Triploid	10.2±0.4*	10.9±0.4*	13.1±0.7*	14.1±0.7*

*significantly different at P<0.01

(mean±S. E.)

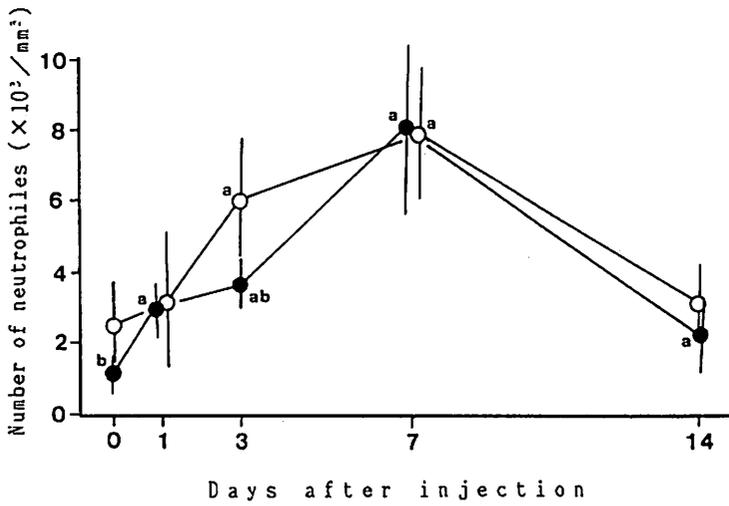


Fig. 1 Changes in number of neutrophiles in 1mm^3 circulating blood in juvenile masu salmon after an intraperitoneal injection of liquid paraffin.

Open circle: diploid fish, closed circle: triploid fish.

Bar: standard deviation.

a: significantly different from 0 day ($p < 0.05$);

b: significantly different from diploid fish ($p < 0.05$).

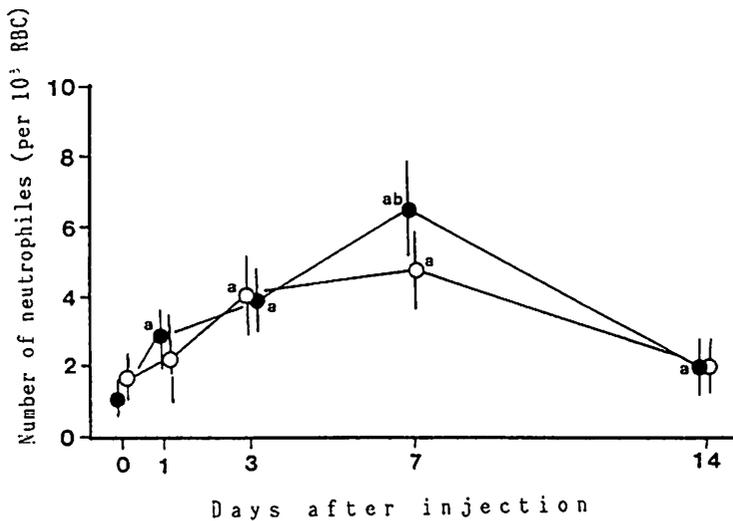


Fig. 2 Changes in the ratio of neutrophiles to red blood cells in juvenile masu salmon after an intraperitoneal injection of liquid paraffin.

Open circle: diploid fish, closed circle: triploid fish.

Bar: standard deviation,

a: significantly different from 0 day ($p < 0.05$);

b: significantly different from diploid fish ($p < 0.05$).

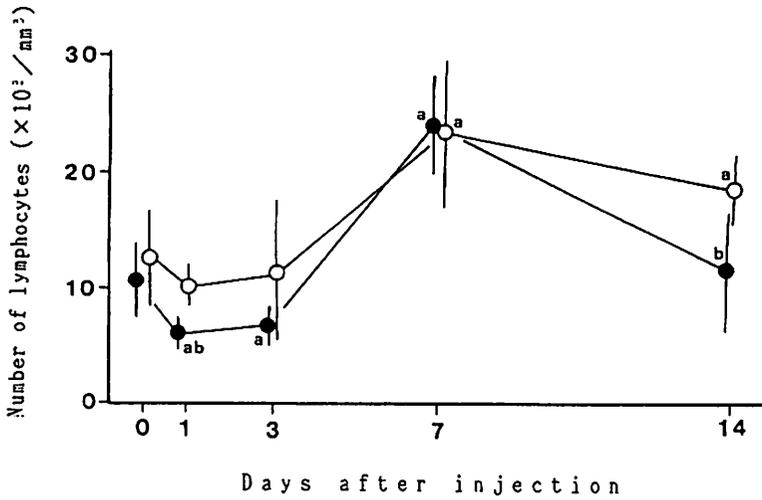


Fig. 3 Changes in number of lymphocytes in 1mm³ circulating blood in juvenile masu salmon after an intraperitoneal injection of liquid paraffin. Open circle: diploid fish, closed circle: triploid fish. Bar: standard deviation. a: significantly different from 0 day (p<0.05); b: significantly different from diploid fish (p<0.05).

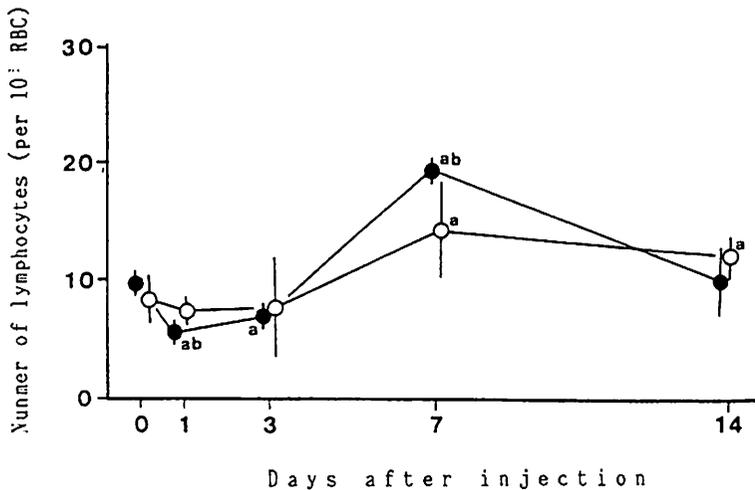


Fig. 4 Changes in the ratio of lymphocytes to red blood cells in juvenile masu salmon after an intraperitoneal injection of liquid paraffin. Open circle: diploid fish, closed circle: triploid fish. Bar: standard deviation, a: significantly different from 0 day (p<0.05); b: significantly different from diploid fish (p<0.05).

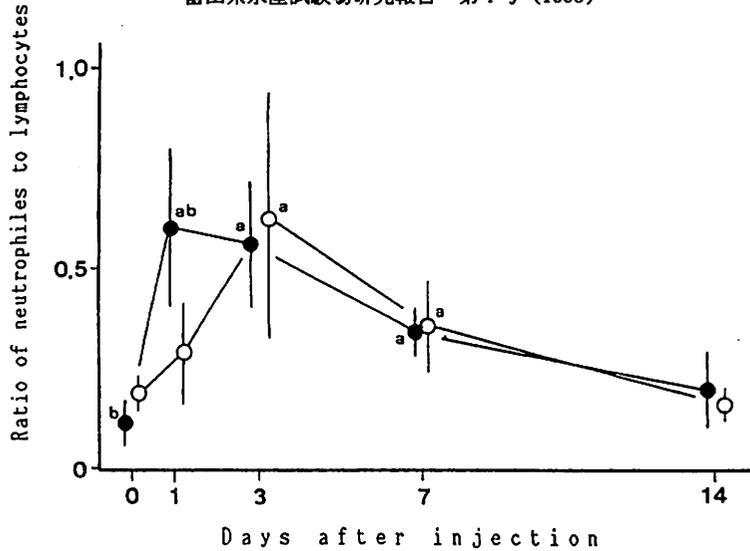


Fig. 5 Changes in the ratio of neutrophils to lymphocytes in circulating blood in juvenile masu salmon after an intraperitoneal injection of liquid paraffin.

Open circle: diploid fish, closed circle: triploid fish.

Bar: standard deviation,

a: significantly different from 0 day ($p < 0.05$);

b: significantly different from diploid fish ($p < 0.05$).

7日目には有意な差を示さなかった。赤血球1,000個あたりのリンパ球数は1日目に3倍体魚が有意に少なく、7日目には3倍体魚が有意に多かった。

リンパ球数に対する好中球数の比の経時的变化をFig. 5に示した。流動パラフィン投与前には3倍体魚のリンパ球数に対する好中球数の比は、2倍体魚よりも有意に小さかった。流動パラフィン投与後には、この比が3倍体魚では投与前と比較して1日目から7日目まで有意に増加したのに対し、2倍体魚では3日目と7日目に有意な増加が認められた。3倍体魚と2倍体魚の間では、投与前と投与後1日目のみで有意差が認められた。

考 察

3倍体魚は2倍体よりもリンパ球、好中球ともに細胞の大きさが有意に大きくなっていた。また、赤血球1,000個あたりではリンパ球数、好中球数ともに3倍体魚と2倍体魚との間で差がなかったが、血液1mlあたりの好中球数は3倍体魚が2倍体魚よりも有意に少なく、リンパ球数も小さい傾向を示していた。このことは、3倍体魚のリンパ球や好中球においても、赤血球や筋肉細胞、3倍体アユにおける網膜細胞などの場合と同様に (Aliah *et al.* 1990; 大津 1991, 1992), 細胞の大きさの増加とそれにもなう細胞数の減少がおこっていることを示している。異物を貪食するという細胞性免疫機構の生体内での意味を考えると、血液1mlあたりの貪食能を持つ細胞の数が重要である。魚類においては好中球と単球-マクロファージが食作用を持つことが知られており (Suzuki 1986), 異物

の侵入に対する感染防御や炎症応答にこれらの細胞が関与していると考えられている。3倍体魚において異物の侵入以前に好中球が少ないことは、3倍体魚が異物の侵入に対する防御をおこなう上で不利であると考えられる。

流動パラフィン投与前の3倍体魚の血液1 μ lあたりの好中球数は2倍体魚と比較して有意に少なかったが、流動パラフィン投与によって、3倍体魚、2倍体魚ともリンパ球数、好中球数のいずれも異物に反応して増加し、投与後7日目では血液1 μ lあたりではほぼ同程度になった。このことは、3倍体魚は細胞性免疫機構に関して2倍体魚と同様の反応性を持つことを示している。また、3倍体魚では、投与後1日目にリンパ球数に対する好中球数の比が2倍体魚のそれよりも有意に大きくなったが、3日目以降はその比は3倍体魚と2倍体魚との間で有意差を示さなかった。このことは好中球とリンパ球の数の変化は3倍体魚と2倍体魚とではほぼ同様であるが、異物の侵入初期の応答性に差があることを示している。さらに、流動パラフィン投与により血液1 μ lあたりのリンパ球数と好中球数が増加する一方、赤血球1,000個あたりでは投与7日目で3倍体魚のリンパ球数と好中球数とともに2倍体魚よりも有意に多くなったのは、3倍体魚が2倍体魚よりも赤血球数が少ないことによると考えられる。

3倍体魚の血液1 μ lあたりの好中球数の流動パラフィン投与後の増加は2倍体魚よりも顕著であった。3倍体魚と2倍体魚の間で赤血球1,000個あたりの好中球数に有意差がみられたのは投与後7日目のみであったことから、3倍体魚では投与前の血液1 μ lあたりの好中球数が少ないために異物に反応しての好中球数の増加がより顕著にあらわれたものと考えられる。

3倍体魚のリンパ球数は流動パラフィン投与後1、3日目に血液1 μ lあたりと赤血球1,000個あたりの両方とも有意な減少を示した。これは造血器官からの供給が行われるよりも先に循環血から異物の侵入した腹腔内へのリンパ球の移行が起こったためと考えられる。投与後7日目での3倍体魚の血液1 μ lあたりのリンパ球数は2倍体魚のそれとほぼ同様となったが、投与後14日目では、2倍体魚のリンパ球数は赤血球1,000個あたりと血液1 μ lあたりの両方とも投与前より有意に増加したままであったのに対して、3倍体魚のリンパ球数はいずれも減少して投与前と差がなかった。循環血中の白血球の数は造血器官（魚類では脾臓と頭腎）からの新しい細胞の移入による増加と細胞の死及び組織への移行による減少のバランスによって決まると考えられる。3倍体魚のリンパ球数の減少が2倍体魚のそれよりも顕著な原因は明らかではないが、染色体量が多いために造血器官における産生量が少ない可能性が考えられる。また、リンパ球は免疫反応の上で重要な役割をもっているために、その数が感染症やその他のストレスなどに対して大きく変動するとされている（池田ら 1986）。本研究でみられた3倍体魚のリンパ球数の変化の特徴についてはさらに検討の必要があろう。

3倍体魚では2倍体魚より好中球の数が有意に減少している一方で、好中球とリンパ球の大きさが有意に大きい。好中球は異物をその侵入の場で貪食することによって生体を防御する働きを持っており、その防御機能は数だけではなく遊走能、貪食能、殺菌・消化能などの能力によって大きく左右されると考えられる。今回は腹腔内への白血球系細胞の浸出と白血球の貪食能の観察を行っていないが、好中球の大きさが、貪食能にどのように影響しているかは今後の検討課題である。

要 約

3倍体サクラマス1歳魚のリンパ球と好中球のそれぞれの長径、短径、出現頻度を調べ、2倍体魚のそれと比較した。また、腹腔内に流動パラフィンを投与し、リンパ球数と好中球数の経時的变化を調べた。その結果、3倍体魚のリンパ球と好中球のそれぞれの短径と長径は2倍体魚のそれと比較して有意に大きかった。また、流動パラフィン投与前の3倍体魚の血液1㎖あたりの好中球数は2倍体魚のそれより有意に少なかった。流動パラフィン投与によって3倍体魚の好中球数は、赤血球1,000個あたり、血液1㎖あたりとも2倍体魚と同様の変化を示したが、3倍体魚の好中球数は流動パラフィン投与後1日目から14日目まで有意な増加を示したのに対し、2倍体魚のそれは3日目と7日目に有意な増加を示したにとどまった。リンパ球数も、3倍体魚は赤血球1,000個あたりと血液1㎖あたりとも2倍体魚のそれと同様の変化を示したが、投与後14日目には2倍体魚が投与前よりも有意に多かったのに対して、3倍体魚では有意差がみられなかった。

謝 辞

本研究の遂行に当たり様々な御協力、御支援をいただいた富山県水産試験場の研究員、職員の皆様には厚く御礼申し上げます。また、本論文をまとめるに当たり、御助言、御校閲をいただいた山田寿郎博士と当水産試験場長正木康昭博士に深謝の意を表する。

文 献

- Aliah R. S., K. Yamaoka, Y. Inada, and N. Taniguchi 1990. Effects of triploidy on tissue structure of some organs in Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56, 569-575.
- Beck M. L. and C. J. Biggers 1983. Erythrocyte measurements of diploid and triploid *Ctenopharyngodon idella* × *Hypophthalmichthys nobilis* hybrid. *J. Fish Biol.*, 22, 497-502.
- Benfey T. J. and A. M. Sutterlin 1984. The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *ibid.* 24, 333-338.
- Corbel M. J. 1975. The immune response in fish: a review. *ibid.* 7, 539-563.
- Ellis A. E. 1977. The leucocytes of fish: a review. *ibid.* 11, 453-492.
- 池田彌生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎 1986. リンパ球, pp. 299-301, 魚類血液学図鑑, 緑書房, 東京.
- 大津 順 1991. 平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書 染色体操作によるサクラマスの不稔3倍体大量生産技術開発研究 34pp. 富山県水産試験場.
- 大津 順 1992. 13℃から18℃の水槽に移したときの3倍体サクラマスのRNA/DNA比の変化. 富山県水産試験場研究報告 3, 7-14.

Suzuki K. 1986. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Biol., 29, 349-364.