キンギョの異物貪食系に関する研究—I.

腹腔内注射した炭粉の貪食*

森 真 朗**

(昭和 55 年 5 月 28 日受理)

Studies on the Phagocytic System in Goldfish—I. Phagocytosis of Intraperitoneally Injected Carbon Particles

Masaaki MORI

*Tokyo Metropolitan Fisheries Experiment Station,
Katsushika-ku, Tokyo, Japan*

(Received May 28, 1980)

The phagocytic system in goldfish was studied through intraperitoneal injection with India ink. Fish were killed at intervals ranging from 30 min to 50 days after injection. Histological research was performed on spleen, kidney, heart, liver, gills and blood.

On the first day after injection, the spleen and kidney became black. Phagocytosis of carbon particles was performed from the first day after injection by the sheath cells in the sheathed artery of the spleen, by the reticuloendothelial cells throughout the haematopoietic tissue of the kidney, and by the endothelial cells in the ventricle of the heart. Carbon phagocytizing macrophages in the kidney and spleen formed aggregates within pre-existing aggregates of melano-macrophage on the fourth day after injection. Those aggregates were observed for 50 days. There was no phagocytosis of carbon particles observed in the liver and gills.

Two types of mononuclear phagocytes phagocytizing carbon particles were observed in smears of blood. The large phagocytes measured between 14 and 16 μ in diameter and the nucleus occupied almost half of the cell. The small phagocytes measured between 6 and 7 μ in diameter and the nucleus occupied almost all of the cell. Although the small phagocytes were observed in smears during the period from the first day to the thirty-sixth day after injection, the large ones were only observed from the first day to the seventh day.

The significance of the phagocytic system in fish is discussed.

魚体内に侵入した異物の処理に関与する細胞、組織を明らかにすることは、比較病理学的にも、魚類病理学的にも意義あることと考えられる。この問題をとり扱った研究はこれまでもいくつか報告されている (MACK-MULL, 1932; ROBERTS, 1975; ELLIS *et al.*, 1976; FERGUSON, 1976; BACH *et al.*, 1978)。今回、著者はキンギョの腹腔内に墨汁を注射し、経時的にとり上げ、組織学的、血液学的手法を用い、異物処理に関与する細

胞、組織を調べ若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

市販の墨汁 (開明墨汁) を生理食塩水で 2 倍に希釈し、滅菌後、外観的に異常の認められないキンギョ (ワキン、平均体重 20 g) の腹腔内に 0.1 ml/尾の割合で注射した。注射後、30 分、1, 2, 4, 7, 10, 14 日目に 2 尾ずつ、25, 36, 50 日目に 1 尾ずつとり上げた。対照として滅菌生理食塩水のみを同量腹腔内に注射し、同時時間隔で 1~2 尾をとって比較検討の材料とした。飼育水槽として 120 l 容の底面ろ過式ガラス水槽を用い、実験期間

* 本研究の一部は昭和 54 年度日本水産学会春季大会において発表した。

** 東京都水産試験場

中の水温は 19.6~22.9°C であった。

血液塗抹標本の作製：供試魚をとり上げ後、尾柄部を切断し、ヘパリン処理したガラス毛细管をあて流出する血液を採取し、常法に従い血液塗抹標本を作製、ギムザ染色を施し観察に供した。

組織標本の作製：解剖後、内臓諸器官を肉眼的に観察し 10% 中性ホルマリン水で固定した。常法に従い厚さ 5 μ のパラフィン切片を作製し、H-E 染色、その他、目的に応じ各種染色を施し観察に供した。

結 果

内臓諸器官の肉眼的所見：墨汁注射 30 分、1 日、2 日後にとり上げた供試魚では、開腹時に腹腔内に貯留していた墨汁が体外へあふれ出たが、4 日目以降その量は次第に少なくなり黒色の微小斑点が腹膜全域に散在的に認められた。臓器別の肉眼的観察結果は次のようであった。脾臓：供試魚の脾臓は注射 1 日後より著しく黒変し、それは 36 日ないし 50 日後も明瞭であった (図 1)。腎臓：脾臓と同様に注射 1 日後より著しく黒変し、50 日後においても明瞭であった (図 2)。心臓その他：心臓は脾臓、腎臓と異なり、実験期間を通して肉眼的にほとんど黒変が認められなかった (図 3)。肝臓 (図 4) と鰓は実験期間を通して黒変が認められなかった。

内臓諸器官の組織学的所見：内臓諸器官の組織学的観察結果は次のようであった。脾臓：キンギョの脾臓英組織は、極めて狭い管腔をもつ茨動脈とその管腔をつつんで存在する英大円形細胞から成り、血液細胞は一列になってこの管腔を通過している。炭粉は注射 1 日後からこの英大円形細胞内およびそこにある細網構造に認められた (図 5)。4 日後には英組織ばかりでなく、メラノ・マクロファージ・センター (ROBERTS, 1975, 以下 MMC と略記) にも炭粉が存在していた。以後日数の経過とともに英組織の炭粉は少なくなり、同時に MMC の炭粉が増加の傾向を示した。この英組織から MMC への移行は炭粉が単独に移行することではなく、マクロファージに炭粉がとられて、マクロファージとともに移行していた。50 日後にはほとんどの炭粉が MMC に集まっていた (図 6)。上記の MMC を強拡大で観察した結果、炭粉はすべてマクロファージの細胞内にとり込まれており、集塊となっていた。腎臓：炭粉は注射 1 日後の造血組織中に散在的に貪食された状態で認められた (図 7)。4 日後には炭粉が腎臓の MMC に集まる傾向が認められた。こうした傾向は以後継続し、50 日後にはほとんどの炭粉が MMC に集まっていた (図 8)。その MMC

を強拡大で観察したところ、脾臓と同様、炭粉はマクロファージの細胞内にとり込まれており、集塊となっていた。心臓：墨汁注射 1 日後、心室の内皮細胞が炭粉を貪食していた (図 8)。また、血液中にも炭粉を貪食したマクロファージおよびマクロファージと前記の内皮細胞との中間型の細胞がみられた。このことから、内皮細胞からマクロファージへの移行も判断された。事実、36~50 日後には心室の炭粉を貪食した内皮細胞の数は著しく減少していた。心臓では MMC は形成されず、したがって炭粉をとり込んだマクロファージの集簇現象も認められなかった。肝臓：肝臓では炭粉のとり込みは認められなかった (図 10)。しかし、類洞毛细血管の血流中に炭粉をとり込んだマクロファージがしばしば観察された。鰓：鰓では炭粉のとり込みは認められなかった。

血液塗抹標本の観察結果：炭粉は大小 2 種類の細胞にとり込まれていた。そのうちの 1 つは大型の円形~楕円形の細胞で、直径、14~16 μ 、核は円形で細胞のほぼ半分を占めギムザ染色で赤紫色に染まり細胞質は淡青染していた。この細胞が炭粉をとり込んでいる例では、細胞質にしばしば空胞が形成されていた (図 11)。この炭粉を貪食した大型細胞は、墨汁注射 1, 2, 4, 7 日後に作製した血液塗抹標本に認められ、4 日後の標本が最も高い出現率を示し、それは全白血球数の約 6% を占めていた。他の 1 種類は前者よりも小型の細胞で、円形を示し、直径 6~7 μ 、核は円形で桃紫色に染まり細胞の大部分を占めていた (図 12)。この炭粉を貪食した小型細胞は、注射 1 日後から 36 日後まで常に血液塗抹標本中に認められた。

考 察

キンギョの腹腔内に注射した墨汁中の炭粉は、脾臓、腎臓、心臓で捕捉されることが明らかになったが、この結果は他の魚種を用いてこれまでに行われた研究報告 (MACKMULL, 1932; ELLIS *et al.*, 1976) と一致している。

魚類の脾臓の異物貪食機能については、ELLIS *et al.* (1976), FERGUSON (1976), BACH *et al.* (1978) の研究があり、脾臓の英組織にはそこを通過する異物を捕捉する強力な機能が存在し、英組織の固定型マクロファージが遊走型となり英組織から MMC へ遊走し、その遊走過程で遊走経路に配列した免疫担当細胞に接触する可能性があると報告されている。キンギョの脾臓においても、英組織を構成する英大円形細胞には、墨汁注射後比較的早い時期に旺盛な炭粉の貪食が認められ、血流に乗って

運ばれて来た炭粉がここで処理されるものと考えられる。また、注射4日目以後英組織からMMCへ炭粉が移行する傾向が認められ、36~50日後にはMMCに炭粉が集まったが、この現象は上述のマクロファージの遊走によるものであった。しかし、ヒトおよび哺乳動物の脾臓におけるマクロファージの由来は、赤崎(1952)によると脾臓の細網細胞と組織球であると記載されており、考え方に相違がある。この相違が動物種の違いによるものか、意見の相違によるものか、今後比較検討しなければならぬ問題である。

キンギョの脾臓、腎臓に存在するMMCは炭粉を貪食した細胞の集簇する部位であることがわかったが、FERGUSON(1976)は硬骨魚類のMMCが鳥類と哺乳類の抗原集中の場である胚中心と類似の機能を有している可能性のあることを報告している。抗原集中の場は一般に免疫現象と深い関連があり、キンギョにおいても脾臓、腎臓に存在するこの特異な細胞集塊について、さらに検討する必要がある。

キンギョでは高等脊椎動物と異なり、心室内皮細胞に炭粉を捕捉する機能が認められた。ELLIS *et al.* (1976)は魚類の心臓の炭粉貪食細胞が細網内皮細胞であり、通常は伸長した形をしているが、炭粉を貪食すると球形化し、遊走型となって血流に乗り腎臓へ到達するのであろう、と推測している。本実験の結果でも、この推論は間違っていないと思われたが、ELLISの記述によると血流中の炭粉を貪食したマクロファージは心臓由来と判断される。しかし、血流中のマクロファージにも当然炭粉貪食機能があるし、腎臓の造血組織類洞の細網内皮細胞などの貪食細胞の炭粉貪食後の血流中への離脱も考えられることである。事実、宮崎ら(1975, 1977)はアマゴの癰瘍病では病原菌を貪食した細網内皮細胞が、ニホンウナギの赤点病では腫大した細網内皮細胞が、いずれも類洞中に離脱し血流に乗ることを証明している。このことから、炭粉を貪食した細網内皮細胞が血流中に離脱しマクロファージとなることが考えられるので、今後この点を検討する必要がある。

血液塗抹標本と内部臓器組織標本の観察結果について興味あることは、大型の炭粉貪食細胞が血流中から消失し始める時期と脾臓、腎臓のMMCに炭粉を貪食したマクロファージが集簇する時期とが、いずれも墨汁注射4~7日後にかけてみられ一致している点である。このことは血流中の炭粉貪食細胞が脾臓、腎臓に到達しMMCに集簇することを意味していると思われるが、同時に脾臓の英組織の英大円形細胞や腎臓の類洞細網内皮

細胞がそれらの局所から離脱しMMCに集簇する可能性もある。その点についてはさらに今後の検討を必要とする。

塗抹標本にみられる2種類の炭粉貪食細胞については、その形態から大型のものは大単核細胞と類推されるが、小型の細胞については細胞の種の同定が未了である。

魚類の異物食食系の分布、機能、変遷および分類に関する研究は、魚類病理学の基礎としてもっとも重要なものであり、今後研究を重ねる必要がある。

要 約

1. キンギョの腹腔内に墨汁を注射し経時的にとり上げ異物食食系について組織学的に検討した。
2. 墨汁中の炭粉は脾臓英組織の英大円形細胞、腎臓造血組織の細網内皮細胞、心室の内皮細胞に貪食された。脾臓、腎臓では炭粉を貪食したマクロファージがメラノ・マクロファージ・センターに集簇した。肝臓と鰓では炭粉のとり込みは認められなかった。
3. 血液塗抹標本の観察では大単核細胞と類推される大型貪食細胞と同定未了の小型貪食細胞に炭粉が貪食されていた。

終りに本報告のご校閲を賜った三重大学水産学部窪田三朗教授、ならびに有益なご助言を賜った宮崎照雄助手に対し厚くお礼申し上げます。

文 献

- 赤崎兼義(1952): 細網内皮系統とその腫瘍. 日本病理学会誌, 41, 1-26.
- BACH, R., P. K. CHEN and G. B. CHAPMAN (1978): Changes in the spleen of the channel catfish *Ictalurus punctatus* RAFINESQUE induced by infection with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 1, 205-217.
- ELLIS, A. E., A. L. S. MUNRO and R. J. ROBERTS (1976): Defence mechanisms in fish 1. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Journal of Fish Biology*, 8, 67-78.
- FERGUSON, H. W. (1976): The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centres in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Comparative Pathology*, 86, 377-380.
- MACKMULL, G. and N. A. MICHELS (1932): Absorption of colloidal carbon from the peritoneal

cavity in the teleost, *Tautoglabrus abspersus*.
Am. J. Anat., 51, 3-45.

宮崎照雄・窪田三朗 (1975): アマゴ癰瘍病の病理組織学的研究—II. 経鰓感染について. 魚病研究, 9 (2), 204-212.

宮崎照雄・江草周三 (1977): ニホンウナギの *Pseudomonas anguilliseptica* 感染症の病理組織学的研

究—I. 自然感染. 魚病研究, 12 (1), 39-49.

ROBERTS, R. J. (1975): Melanin containing cells of teleost fish and their relation to disease. In *The Pathology of Fishes*, ed. RIBELIN W. E. and G. MİGAKI, 399-428, Madison, Wis.: University of Wisconsin Press.

図 の 説 明

- 図 1. 脾臓。墨汁注射 1 日後から黒変。T: 墨汁注射魚。C: 対照魚。
- 図 2. 腎臓。墨汁注射 1 日後から黒変。T: 墨汁注射魚。C: 対照魚。
- 図 3. 心臓。黒変は認められない。T: 墨汁注射魚。C: 対照魚。
- 図 4. 肝臓。黒変は認められない。T: 墨汁注射魚。C: 対照魚。
- 図 5. 墨汁注射 1 日後の脾臓。莢動脈の莢大円形細胞が炭粉を貪食している。HE 染色。実線, 20 μ 。
- 図 6. 注射 50 日後の脾臓。炭粉を貪食したマクロファージがメラノ・マクロファージ・センターに集まっている。HE 染色。実線, 20 μ 。
- 図 7. 1 日後の腎臓。造血組織の細網内皮細胞が炭粉を貪食している。HE 染色。実線, 20 μ 。
- 図 8. 50 日後の腎臓。炭粉を貪食したマクロファージがメラノ・マクロファージ・センターに集まっている。HE 染色。実線, 20 μ 。

Explanation of Figures

- Fig. 1. Spleen. The spleen from the treated fish become black from the first day after injection with India ink. T: Treated fish. C: Control fish.
- Fig. 2. Kidney. The kidney from the treated fish become black from the first day after injection. T: Treated fish. C: Control fish.
- Fig. 3. Heart. There is no difference in color between T and C. T: Treated fish. C: Control fish.
- Fig. 4. Liver. There is no difference in color between T and C. T: Treated fish. C: Control fish.
- Fig. 5. Section of spleen from the fish one day after injection. The carbon particles are phagocytosed by the sheath cells in the sheathed artery. H & E. Bar, 20 μ m.
- Fig. 6. Section of spleen from the fish 50 days after injection. The macrophages phagocytizing the carbon particles aggregate within pre-existing aggregates of melano-macrophage. H & E. Bar, 20 μ m.
- Fig. 7. Section of kidney from the fish one day after injection. The carbon particles are phagocytosed by the reticuloendothelial cells throughout the haematopoietic tissue. H & E. Bar, 20 μ m.
- Fig. 8. Section of kidney from the fish 50 days after injection. The macrophages phagocytizing the carbon particles aggregate within pre-existing aggregates of melano-macrophage. H & E. Bar, 20 μ m.

図 の 説 明

- 図 9. 4 日後の心臓。心室の内皮細胞が炭粉を貪食している。Azan 染色。実線, 10 μ 。
 図 10. 4 日後の肝臓。炭粉の貪食は認められない。HE 染色。実線, 20 μ 。
 図 11. 4 日後の血液塗抹標本に認められた大型炭粉貪食細胞。細胞質は空胞化している。Giemsa 染色。実線, 10 μ 。
 図 12. 4 日後の血液塗抹標本に認められた小型炭粉貪食細胞。Giemsa 染色。実線, 10 μ 。

Explanation of Figures

- Fig. 9. Section of heart from the fish 4 days after injection. The carbon particles are phagocytosed by the endothelial cells of the ventricle. Azan. Bar, 10 μ m.
 Fig. 10. Section of liver from the fish 4 days after injection, showing no phagocytosis. H&E. Bar, 20 μ m.
 Fig. 11. Blood smear from the fish 4 days after injection, showing a large phagocyte phagocytizing the carbon particles. Giemsa. Bar, 10 μ m.
 Fig. 12. Blood smear from the fish 4 days after injection, showing small phagocytes phagocytizing the carbon particles. Giemsa. Bar, 10 μ m.