

文章编号:1000-0615(2009)06-1011-07

牙鲆免疫相关组织特征及抗体阳性细胞的免疫组化定位

迟恒, 绳秀珍, 唐小千, 战文斌

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:应用抗牙鲆免疫球蛋白单克隆抗体(2D8、1H1)对牙鲆外周血系统、肾、脾、肝、胰、肠道组织中抗体阳性细胞进行了定位观察,并对其组织学特征进行了描述。两株单抗均能在外周血滴片和组织切片中成功地检测到抗体阳性细胞。外周血系统中的抗体阳性细胞主要为淋巴细胞,没有发现抗体阳性的巨噬细胞;牙鲆头肾中没有肾单位,肾小管、肾小球等主要存在于后肾中,脾脏和肾脏都含有巨噬细胞、粒细胞、淋巴细胞等免疫相关细胞,抗体阳性细胞存在方式也极为相似,成簇或单独分布于黑色素巨噬细胞中心和血管周围;牙鲆的胰组织镶嵌在肝上,形成肝胰脏,也参与免疫应答,抗体阳性细胞单个存在,分布于肝组织中,胰组织中没有发现抗体阳性细胞;肠道抗体阳性细胞主要存在于固有层中,有成簇存在现象,在上皮层也可见到单个存在的抗体阳性细胞。

关键词:牙鲆;单克隆抗体;抗体阳性细胞;免疫组织化学

中图分类号:S 917

文献标识码:A

鱼类虽然是低等的脊椎动物,但它仍具有与高等脊椎动物类似的较完善的免疫系统,包括肾脏、脾、消化道免疫系统(GALT)等,能够产生细胞、体液及粘液免疫应答^[1]。在过去的20年中,有关鱼类免疫球蛋白(Ig)单克隆抗体的研制国外已有较多报道,如金鱼(*Carassius auratus*)^[2]、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)^[3]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[4]、大西洋鲑(*Salmo salar* L.)^[5]、河豚(*Takifugu rubripes*)^[6]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[7]、大西洋牙鲆(*Hippoglossus hippoglossus*)^[8]、黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[9]等,国内有牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[10]、鳎(*Siniperca chuatsi*)^[11]、欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)^[12]、紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)^[13]、银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[14]等关于Ig单克隆抗体的报道。其中仅大西洋鲑^[5]、大菱鲆^[7]、银鲫^[14]等进行了免疫器官中抗体阳性(Ig⁺)细胞分布的研究。

牙鲆在中国北方、日本、朝鲜等作为一种重要的海水养殖品种,加强其免疫学基础研究对健康

养殖、病害防治有重要意义。本文利用本研究室研制的抗牙鲆免疫球蛋白单克隆抗体,应用免疫细胞化学及免疫组织化学技术,对牙鲆外周血系统、肾、脾、肝、胰、肠道免疫系统中的抗体阳性细胞进行了定位观察,并对其组织特征进行了描述。为研究免疫细胞的分类及牙鲆免疫相关器官的功能、发生、分化打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用牙鲆取自山东省日照市牙鲆养殖基地,健康无病,体长30.1~35.4 cm,体重475~530 g,共5尾。实验用抗体为本研究室研制的抗牙鲆免疫球蛋白单克隆抗体2D8和1H1^[10];生物素标记的羊抗小鼠IgG、氨基三乙氧基硅烷(APES)、牛血清白蛋白,购自Sigma公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素,购自北京中杉公司。

1.2 外周血滴片

使用含有5 mL抗凝剂(65% RPMI-1640、

收稿日期:2009-04-09

修回日期:2009-06-09

资助项目:国家自然科学基金(30771648);国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100306)

通讯作者:战文斌, Tel:0532-82032284, E-mail:wbzhan@ouc.edu.cn

1%胎牛血清、1%NaN₃、20 IU/mL肝磷脂)的10 mL注射器,从牙鲆尾静脉取血约5 mL,得到的细胞悬液在4℃下680×g离心15 min,沉淀用pH 7.4含有20 IU/mL肝磷脂和1%NaN₃的PBS洗涤3次,用血球计数板计数,调整细胞浓度为5×10⁵/mL,将细胞悬液25 μL滴到干净的经APES处理后的载玻片上,室温沉降45 min后除去液滴,干燥5 min后,用丙酮固定15 min。每尾牙鲆制作血滴片10张为1组,共制作5组,50张滴片,在-20℃冰箱中保存。用于苏木精-曙红(H.E)染色和免疫细胞化学实验。

1.3 石蜡切片

将5尾鱼解剖,取前肾、后肾、脾、肝胰脏、肠道组织,切成大小为1.0 cm×1.0 cm×0.2 cm的小块,Bouin氏液固定,经常规方法进行石蜡包埋,制作5~7 μm连续切片,用经APES处理的载玻片捞片,37℃烘片过夜,每尾鱼每种组织制作10张切片为1组,共25组,250张切片,用于H.E染色与免疫组织化学实验。

1.4 H.E染色及免疫组织化学染色

将石蜡切片每组取3张脱蜡水化后与血细胞滴片(每组3张)进行H.E染色^[15]。首先入爱氏苏木精染液染色约15 min,自来水冲洗至蓝色,梯度乙醇脱水至95%后,0.25%曙红染色30 s,经100%乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,Olympus显微镜观察并拍照。

将其余210张切片和滴片进行免疫组织化学实验^[16]。首先,在脱蜡水化后的切片与血细胞滴片上加3% H₂O₂-甲醇溶液室温下孵育10 min,以消除内源性过氧化物酶,PBS(pH 7.4)漂洗5 min×3次;然后将石蜡切片样品进行抗原修复(pH 6.0的柠檬酸缓冲液中120℃、7 min,自然冷却到室温),PBS漂洗5 min×3次;在切片及血细胞滴片上滴加3%胎牛血清白蛋白封闭液37℃孵育30 min,甩去封闭液,滴加适量鼠抗牙鲆免疫球蛋白单克隆抗体4℃孵育过夜,PBS漂洗5 min×3次;滴加生物素标记的羊抗小鼠IgG,于37℃孵育45 min,PBS漂洗5 min×3次;滴加HRP标记的链霉亲和素37℃孵育45 min,PBS漂洗5 min×3次;3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染5 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察并拍照。设两组阴性对照:第一组,将鼠抗牙鲆免疫球蛋白单克隆抗

体用骨髓瘤上清代替;第二组,羊抗鼠IgG用PBS代替。

2 结果

使用抗牙鲆免疫球蛋白单克隆抗体2D8和2H1均能够在外周血滴片(图版-1),前肾(图版-3)、后肾(图版-5)、脾(图版-7)、肝胰脏(图版-9)、肠道(图版-11)切片中检测到抗体阳性细胞。5尾牙鲆同一组织间没有出现明显差异,两组阴性对照均未出现非特异性显色。

2.1 外周血系统

牙鲆的外周血中含有巨噬细胞、淋巴细胞等免疫相关细胞。巨噬细胞形状不规则,长椭圆形、带状或分叶,细胞核大、偏位、形状多样;淋巴细胞呈圆形,数量相对较少,直径约5~12 μm(图版-2)。免疫细胞化学染色显示出了Ig⁺的淋巴细胞(图版-1),色素沉淀位于细胞质中,没有发现Ig⁺的巨噬细胞。

2.2 肾

牙鲆的肾脏呈深棕色,位于腹膜后,紧贴于脊椎下方,由头肾和后肾两部分组成,头肾分为左右两叶并在基部与后肾相连。切片H.E染色观察表明,头肾中的细胞比较松散,由网状细胞、粒细胞、单核细胞、巨噬细胞等细胞组成,头肾实质中没有肾单位(图版-4)。后肾实质有许多肾小球、肾小管和集合小管组成(图版-6)。头肾和后肾都具有黑色素巨噬细胞中心(MMCs),其大小不一,无规则分布,大量被标记的Ig⁺细胞(图版-3,图版-5)单独或成簇存在于黑色素巨噬细胞中心和毛细血管周围。

2.3 脾

牙鲆脾脏呈深褐色,位于肝脏下方,外被一层结缔组织被膜。脾脏主要由红细胞、淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞组成,可区分为红髓和白髓,黑色素巨噬细胞中心与肾脏中的相似(图版-8),散布在组织中。大量被标记的Ig⁺细胞(图版-7)全部分布在脾组织的实质区,单独或成簇存在,并且Ig⁺细胞更倾向集中分布在黑色素巨噬细胞中心和血管周围。

2.4 肝胰脏

牙鲆的胰腺组织镶嵌在肝脏中,形成肝胰脏,肝组织中没有肝小叶结构,细胞排列紧密,呈索状,细胞索间有窦状间隙(肝窦),肝板清晰(图版

-10)。肝组织中存在一定数量的 Ig⁺ 细胞(图版-9),主要分布在血管周围,以单个细胞存在,没有成簇存在现象,分布没有规律性,细胞比其它器官的要大,说明肝组织在机体免疫中也有一定的作用,而在胰组织中没有发现 Ig⁺ 细胞。

2.5 肠道

肠道主要有粘膜层、基层和浆膜三层,粘膜层分为上皮层和固有层(图版-12),上皮层中可以观察到柱状细胞、杯状细胞、淋巴细胞和游走细胞。固有层由胶原纤维和弹性纤维及一些网状纤维交织成细密的网状结构,此层中也可观察到血管、淋巴管和游走细胞。牙鲆自幽门盲囊到后肠各个部分均可以观察到明显标记的 Ig⁺ 细胞,且自前向后数量有增加趋势,在肠道皱褶的固有层中发现成簇存在的 Ig⁺ 细胞,在上皮层的基部也可见到 Ig⁺ 细胞,但数量较少(图版-11)。

3 讨论

本文免疫组织化学部分应用三步 ABC 法生物素放大发色,色素有扩散,而免疫细胞化学没有出现此现象,这可能与抗原高温复性有关,一般经高温修复后胞浆会被破坏出现抗原移位导致色素扩散;对细胞核也有影响,出现苏木素淡染现象。本文经过优化条件及比较,发现经高温高压进行抗原复性后,石蜡切片中 Ig⁺ 细胞的阳性率明显比未复性和酶消化复性样品要高,效果优于后两者。

胸腺作为大多数硬骨鱼类的中枢免疫器官,如鳊^[11]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[17]、齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)^[18]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[19]等,在整个生命周期中都发挥着重要作用。但牙鲆随着生长,胸腺逐渐退化,Liu 等^[20]发现在牙鲆生长到 7 月龄时胸腺基本上退化完全。本实验用鱼为一龄鱼,没有发现胸腺。对于牙鲆幼鱼时期胸腺中抗体阳性细胞的分布情况还有待于进一步研究。

外周血中含有 Ig⁺ 细胞已有很多文献报道,Li 等^[10]应用免疫荧光方法研究活的外周血白细胞,结果显示为细胞表面 Ig 阳性;Fournier 等^[21]用乙醇作为固定剂,可以同时细胞表面和细胞质中产生色素沉淀,而用甲醇和丙酮作为固定剂,只标记细胞质中的 Ig,这与本文外周血中的 Ig⁺ 细胞的色素沉淀存在于细胞质中而非细胞表面吻

合。至于固定剂对细胞中 Ig 分布的影响还需进一步研究。Bermúdez 等^[23]免疫染色观察到抗体阳性的巨噬细胞,这可能与鱼的生理状况有关,Bermúdez 用的实验材料为黏孢子虫感染的大菱鲆,其抗体分泌量要比健康鱼大,巨噬细胞具有呈递抗原的作用,抗体与巨噬细胞表面的抗原结合,从而观察到含有抗体的巨噬细胞。本实验所用的为健康牙鲆,没有发现抗体阳性的巨噬细胞。

脾与肾在免疫功能上有相似之处,都具有黑色素巨噬细胞中心,且牙鲆的黑色素巨噬细胞中心比其它鲆鳕鱼类^[7,8,23]的色素颜色更深且面积要大,其主要用来吞噬外来异物及细胞碎屑。脾和肾中 Ig⁺ 细胞更趋向于分布在黑色素巨噬细胞中心和毛细血管周围区域,这与其他学者对大菱鲆的研究结果一致^[21,23],本实验表明,牙鲆脾和肾组织中丰富的 Ig⁺ 细胞协同黑色素巨噬细胞中心来完成特异性免疫应答。

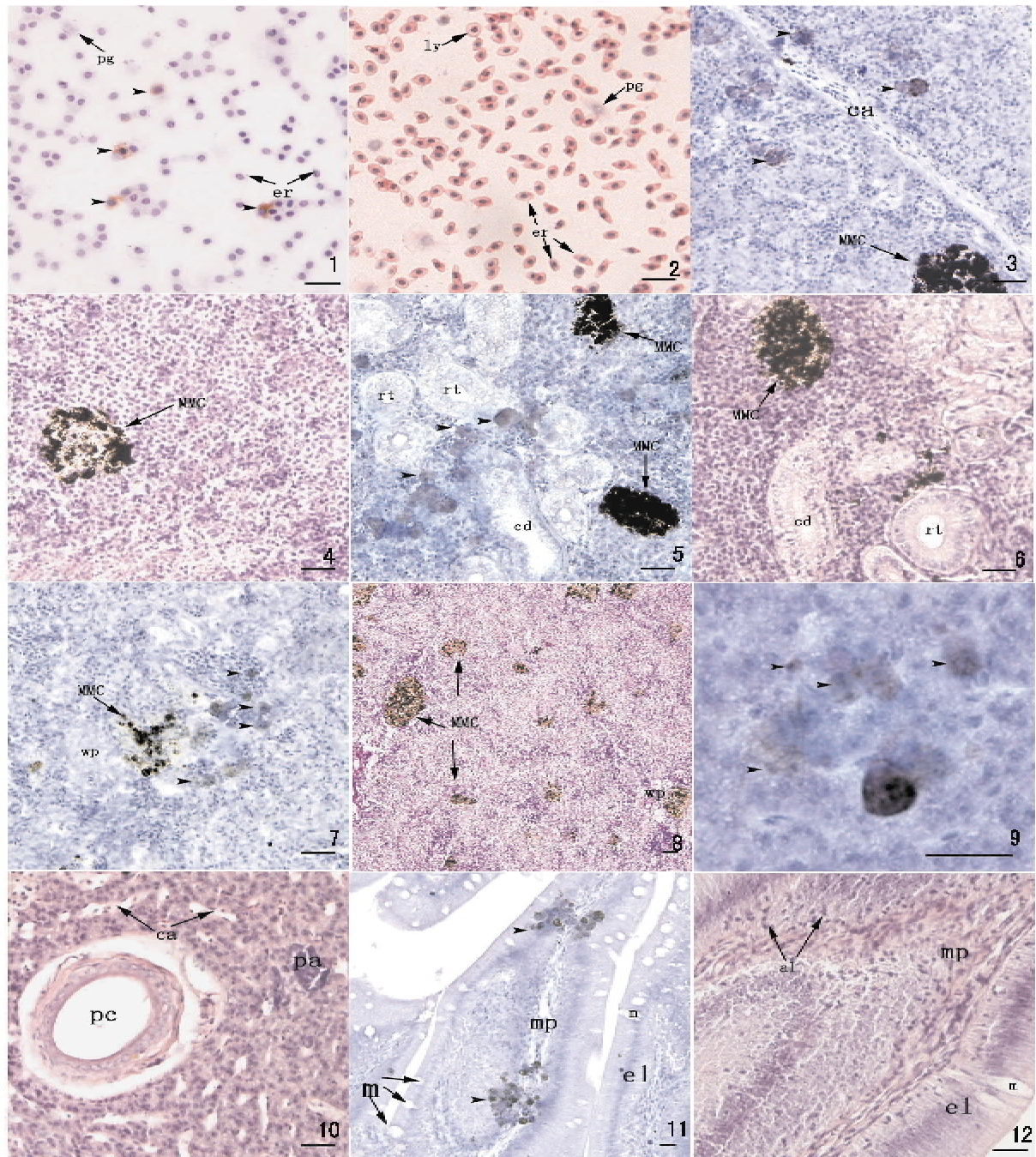
肠道作为鱼类粘膜免疫的重要组织,同样存在 Ig⁺ 细胞,具备一定的免疫细胞学基础,且由前向后肠道组织的 Ig⁺ 细胞的数量有增加趋势,说明其免疫功能逐渐增强,该结果与一些学者对银鲫^[14]、大菱鲆^[21,23]、黑鲈^[24-25]的研究结果一致。

肝脏是重要的消化和解毒器官,本文发现牙鲆肝脏中含有 Ig⁺ 细胞,说明其有一定的免疫功能。冯建军等^[22]研究欧洲鳊未发现有 Ig⁺ 阳性细胞,与牙鲆比较,可能因为欧洲鳊更为低等的软骨鱼类。牙鲆肝脏中 Ig⁺ 细胞及其免疫功能机理还需要更深入的研究。

参考文献:

- [1] 战文斌. 水产动物病害学 [M]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [2] Siwicki A K, Vergnet C, Charlemagne J, et al. Monoclonal antibodies against gold fish (*Carassius auratus*) immunoglobulin: application to the quantification of immunoglobulin antibody-secreting cells by ELISPOT and seric immunoglobulin and antibody level by ELISA in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Vet Res, 1994, 25(5): 458-467.
- [3] Ainsworth A J, Dexiang C, Greenway T. Characterization of monoclonal antibodies to catfish, *Ictalurus punctata*, leucocytes [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1990, 26(1): 81-92.
- [4] Secombes C J, van Groningen J J M, Egberts E. Separation of lymphocyte subpopulations in carp

- Cyprinus carpio* L. by monoclonal antibodies; immunohistochemical studies [J]. *Immunology*, 1983, 48(1): 165-175.
- [5] Fausa P E, Bjerknæs R, Wergeland H I. Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10(8): 695-710.
- [6] Toshiaki M, Maki O, Daisuke T, et al. Monoclonal antibodies recognizing serum immunoglobulin and surface immunoglobulin-positive cells of puffer fish, torafugu (*Takifugu rubripes*) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2004, 17(3): 211-222.
- [7] Fournier-betz V, Quentel C, Lamour F, et al. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10(2): 187-202.
- [8] Grove S, Johansen R, Reitan L J, et al. Immune- and enzyme histochemical characterisation of leukocyte populations within lymphoid and mucosal tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2006, 20(5): 693-708.
- [9] Breuil G, Vassiloglou B, Pepin J F, et al. Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 1997, 7(1): 29-43.
- [10] Li Q, Zhan W B, Xing J, et al. Production, characterization, and applicability of monoclonal antibodies to immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2007, 23(5): 982-990.
- [11] 马红, 常藕琴, 石存斌, 等. 鳎胸腺组织学结构及抗体分泌细胞的免疫组织化学 [J]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(6): 518-523.
- [12] 林天龙, 陈强, 龚晖, 等. 欧洲鳎免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性 [J]. *水产学报*, 2001, 25(6): 532-537.
- [13] 冯娟, 胡超群. 抗紫红笛鲷血清免疫球蛋白单克隆抗体的制备 [J]. *热带海洋学报*, 2002, 21(4): 14-21.
- [14] 李新华, 沈锦玉, 尹文林, 等. 银鲫口服嗜水气单胞菌疫苗的免疫和免疫组化研究 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(1): 125-131.
- [15] 绳秀珍. 生物实验技术 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007.
- [16] 纪小龙. 新编免疫组织化学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2005.
- [17] 卢全章. 草鱼胸腺组织学研究 [J]. *水生生物学报*, 1991, 15(4): 327-331.
- [18] 潘康成. 齐口裂腹鱼胸腺组织学研究 [J]. *四川农业大学学报*, 2002, 20(9): 262-266.
- [19] 黄艳青. 黄颡鱼胸腺显微结构的观察 [J]. *华中农业大学学报*, 2004, 23(4): 236-240.
- [20] Liu Y, Zhang S C, Jiang G L, et al. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2004, 16(5): 621-632.
- [21] Fournier-betz V, Quentel C, Lamiur F, et al. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10(2): 187-202.
- [22] 冯建军, 关瑞章, 郭松林. 欧洲鳎免疫球蛋白阳性细胞的组织化学定位与分布特点 [J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(4): 500-505.
- [23] Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A. Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): A histopathological and immunohistochemical study [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2006, 21(5): 501-512.
- [24] Picchietti S, Renata F, Mastrolia T L. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. *Anat Embryol*, 1997, 196(6): 457-463.
- [25] Scapigliati G, Romano N, Abelli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes [J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1): 3-28.



图版 Plate

图版说明

1. 外周血免疫细胞化学 HRP 发色, 苏木精衬染。pg: 巨噬细胞; er: 血细胞; 无尾箭头示 Ig⁺ 细胞。标尺: 20 μm;
2. 外周血 H. E 染色。pg: 巨噬细胞; ly: 白细胞; er: 血细胞。标尺: 20 μm;
3. 前肾免疫组织化学 HRP 发色, 苏木精衬染。ca: 毛细血管; MMC: 黑色素巨噬细胞中心; 无尾箭头示 Ig⁺ 细胞。标尺: 20 μm;
4. 前肾 H. E 染色。MMC: 黑色素巨噬细胞中心。标尺: 20 μm;
5. 后肾免疫组织化学 HRP 发色, 苏木精衬染。MMC: 黑色素巨噬细胞中心; rt: 肾小管; cd: 集合小管; 无尾箭头示 Ig⁺ 细胞。标尺: 20 μm;
6. 后肾 H. E 染色。MMC: 黑色素巨噬细胞中心; rt: 肾小管; cd: 集合小管。标尺: 20 μm;
7. 脾脏免疫组织化学 HRP 发色, 苏木精衬染。MMC: 黑色素巨噬细胞中心; wp: 白髓; 无尾箭头示 Ig⁺ 细胞。标尺: 20 μm;
8. 脾脏 H. E 染色。MMC: 黑色素巨噬细胞中心; wp: 白髓。标尺: 20 μm;
9. 肝胰脏免疫组织化学 HRP 发色, 苏木精衬染。无尾箭头示 Ig⁺ 细胞;
10. 肝胰脏 H. E 染色。pc: 肝门管; ca: 肝中血细胞; pa: 胰组织。标尺: 20 μm;
11. 肠道免疫组织化学 HRP 发色, 苏木精衬染。m: 粘液细胞; mp: 固有层; el: 粘膜上皮; 无尾箭头示成簇的 Ig⁺ 细胞。标尺: 20 μm;
12. 肠道 H. E 染色。m: 粘液细胞; mp: 固有层; el: 粘膜上皮; al: 游走细胞。标尺: 20 μm

Explanation of Plates

1. Immunocytochemical staining of peripheral blood. pg: macrophages; er: erythrocyte; arrow head indicates Ig-positive cell. Bar: 20 μm;
2. H. E staining of Peripheral blood. ly: leukocyte; pg: macrophages; er: erythrocyte. Bar: 20 μm;
3. Immunohistochemical staining of head kidney. ca: capillary; MMC: melanamorphage center; arrow head indicates Ig-positive cell. Bar: 20 μm;
4. H. E staining of head kidney. MMC: melanamorphage center. Bar: 20 μm;
5. Immunohistochemical staining of trunk kidney. MMC: melanamorphage center; rt: renal tubules; cd: collecting tubule; arrow head indicates Ig-positive cell. Bar: 20 μm;
6. H. E staining of trunk kidney. MMC: melanamorphage center; rt: renal tubules; cd: collecting tubule. Bar: 20 μm;
7. Immunohistochemical staining of spleen. MMC: melanamorphage center; wp: white pulp; arrow head indicates Ig-positive cell. Bar: 20 μm;
8. H. E staining of spleen. MMC: melanamorphage center; wp: white pulp. Bar: 20 μm;
9. Immunohistochemical staining of hepatopancreas. Arrow head indicates Ig-positive cell. Bar: 20 μm;
10. H. E staining of hepato-pancreas. pc: portal canal; ca: erythrocyte; pa: pancreatic. Bar: 20 μm;
11. Immunohistochemical staining of GALT. m: mucous cell; mp: lamina propria; el: lamina epithelialis; arrow head indicates Ig-positive cell in cluster. Bar: 20 μm;
12. H. E staining of GALT. m: mucous cell; mp: lamina propria; el: lamina epithelialis; al: aletocyte. Bar: 20 μm

Studies on immunoglobulin-positive cells and immunologic tissues in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using histological and immunohistochemical methods

CHI Heng, SHENG Xiu-zhen, TANG Xiao-qian, ZHAN Wen-bin

(Laboratory of Mariculture Ministry of Education of China, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Knowledge about the cells and organs involved in the fish immune system is important to improve fish immunoprophylaxis. Teleosts lack bone marrow and lymph nodes and the major lymphoid organs are thymus, kidney, spleen and gut-associated lymphoid tissue (GALT). In this paper, monoclonal antibodies (mabs, 2D8 and 1H1) raised against Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) serum IgM were applied as probes. Histological, immunocytochemical and immunohistochemical detection of immunoglobulin-positive cells in the peripheral blood cells, kidney, liver-pancreas, spleen and gut associated lymphoid tissues of the Japanese flounder were successfully performed. Results showed that immunoglobulin-positive cells were found in all the sampled tissues. Immunoglobulin-positive cells with diffusely stained cytoplasmic were observed in the peripheral blood, but immunoglobulin-positive macrophages were not found. There were many macrophages, granulocytes, lymphocytes and other immune-related cells in spleen and kidney, immunoglobulin-positive cells were mostly present around the melanomacrophage centers (MMCs) and blood vessels in the spleen; the lymphoid immunoglobulin-positive cells in the kidney were also closely associated with the MMCs and existed in groups or dispersedly. The pancreas was surrounded with liver in flounder and formed liver-pancreas, immunoglobulin-positive cells were separately distributed in the hepatic tissue, but not in the pancreas tissue. Additionally, immunoglobulin-positive cells in the gut associated lymphoid tissue were rarely detected in the epithelial layer although many lymphocytes were observed, yet they were frequently present in the lamina propria in groups or separately, presumably as a part of the intestine involved in mucosal immune responses. The thymus of Japanese flounder degenerates with age and no thymus could be found about 12 months old in this study.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; monoclonal antibodies; immunoglobulin-positive cells; immunohistochemistry