

## コイ、ナイルティラピアおよびイサキの好中球顆粒

近藤昌和<sup>†</sup>, 安本信哉, 大野美和, 高橋幸則

### Granules of Neutrophils from Common Carp (*Cyprinus carpio*), Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Striped Grunt (*Parapristipoma trilineatum*)

Masakazu Kondo<sup>†</sup>, Shinya Yasumoto, Miwa Oono and Yukinori Takahashi

**Abstract** : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in common carp (*Cyprinus carpio*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and striped grunt (*Parapristipoma trilineatum*) were examined by light microscopy. Three types of granules, eosinophilic granule ( $\alpha$ G), chromophobic granule ( $\beta$ G) and basophilic granule ( $\gamma$ G) were observed in the neutrophils of these fish species. Multiple Romanowsky-type stain valuation revealed that  $\alpha$ G of these fish species were stained eosinophil with May-Grünwald (MG), but not with Giemsa. Eosinophil of the  $\alpha$ G was disappeared by Giemsa after MG. The  $\beta$ Gs were unstained by Romanowsky-type stain and peroxidase positive. The  $\gamma$ G of common carp and striped grunt were stained light blue with Giemsa, but not MG. On the other hand, the  $\gamma$ Gs of Nile tilapia were stained not only with Giemsa, but also with MG. Furthermore, the  $\gamma$ Gs of Nile tilapia were toluidine blue positive, but those of common carp and striped grunt were negative.

**Key words** : *Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus*, *Parapristipoma trilineatum*, neutrophil, morphology, cytochemistry

## 緒 言

近年、多条件下Romanowsky型染色評価法 (Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV) によって各種魚類の好中球内顆粒の染色性が調べられており、魚類の好中球顆粒の種類は、魚種によって多様であることが報告されている<sup>1-23)</sup>。

魚類を含む脊椎動物の原始の系統とされているヌタウナギ類に属するヌタウナギ *Eptatretus burgeri* の好中球には好塩基性顆粒 ( $\gamma$ 顆粒) のみが観察されており<sup>14)</sup>、肉鱗綱肺魚亜綱のアフリカハイギョ *Protopterus annectens* では染色条件によって好酸性 (好エオシン性)、好塩基性 (正調メチレンブルー好性) または異調アズール好性を示す汎染色性顆粒 (P顆粒) が認められている<sup>18)</sup>。また、真骨魚類とともに条鱗綱に含まれる腕鰭亜綱ポリプテルス目に属する *Polypterus endlicheri* の好中球には、2種類の好酸性 (好エオシン性) 顆粒 ( $\alpha$ 1顆粒,  $\alpha$ 2顆粒) と  $\gamma$ 顆粒が存在することが報告されている<sup>13)</sup>。一方、真骨魚類は好中

球内顆粒の種類の違いから4群に大別されている。すなわち、好酸性 (好エオシン性) 顆粒 ( $\alpha$ 顆粒)、難染色顆粒 ( $\beta$ 顆粒) および  $\gamma$ 顆粒の3種類の顆粒が好中球に認められるI群<sup>1-4, 12, 15, 17)</sup>、 $\alpha$ 顆粒と  $\beta$ 顆粒が認められるII群<sup>9, 16)</sup>、 $\beta$ 顆粒のみが認められるIII群<sup>5-8, 10, 11, 19-21, 23)</sup> および  $\beta$ 顆粒と  $\gamma$ 顆粒が認められるIV群に分類されている<sup>22)</sup>。MRSVという用語は、ウナギ *Anguilla japonica* の好中球に関する報告で初めて用いられたが<sup>15)</sup>、それと同じ染色評価法はメジナ *Girella punctata* の好中球に関する報告から採用されている<sup>5)</sup>。しかし、一連の研究の初期に調べられたコイ *Cyprinus carpio*、ナイルティラピア *Oreochromis niloticus* およびイサキ *Parapristipoma trilineatum* はいずれもI群に分類されているが、これらの魚種では限られた条件のMRSVが適用されており<sup>1-4)</sup>、他の魚類の報告との比較が十分にできない。また、コイ、ナイルティラピアおよびイサキの好中球顆粒に関する報告では、細胞化学的特徴も調べられていない<sup>1-4)</sup>。

本研究では、魚類における好中球顆粒の多様性をさらに

探求するために、コイ、ナイルティラピアおよびイサキの好中球の形態学的特徴をMRSVおよび細胞化学染色によって解析し、これまでに報告した各種魚類と比較した。

### 材料および方法

実験魚には、水産大学の飼育施設で繁殖・育成したコイ（マゴイ、体重約 600g）とナイルティラピア（体重約

200 g）および吉母港（下関市）で釣獲されたイサキ（体重約20 g）を用いた。イサキは水産大学の飼育施設に搬入した。いずれの魚種も23℃で1ヶ月以上馴致飼育したのち実験に供した。飼育期間中はコイとナイルティラピアにはコイ浮餌M（林兼産業）を、イサキにはマリン6号（林兼産業）を適宜給餌した。血液塗沫標本の作製、MRSV（Table 1）および各種細胞化学染色法は近藤・高橋（2009）<sup>15)</sup>に従った。

**Table 1.** Staining conditions in multiple Romanowsky-type stain valuation

Condition <sup>1,2</sup>	PN <sup>3</sup>	Condition <sup>1,2</sup>	PN <sup>3</sup>
MG: DW	1	G : <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	42
: 5 mM PB, pH5.0	2	: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH8.0, 1:20, 60 min	43
: 5 mM PB, pH6.0	3	: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH8.0, 1:100, 15 min	44
: 5 mM PB, pH7.0	4	: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH8.0, 1:100, 60 min	45
: 5 mM PB, pH8.0	5	MGG: DW, 1:20, 15 min	46
: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0	6	: DW, 1:20, 60 min	47
: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0	7	: DW, 1:100, 15 min	48
: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0	8	: DW, 1:100, 60 min	49
: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH8.0	9	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15 min	50
G : DW, 1:20, 15 min	10	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60 min	51
: DW, 1:20, 60 min	11	: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	52
: DW, 1:100, 15 min	12	: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	53
: DW, 1:100, 60 min	13	: 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15 min	54
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15 min	14	: 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60 min	55
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60 min	15	: 5 mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min	56
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	16	: 5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	57
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	17	: 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15 min	58
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15 min	18	: 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60 min	59
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60 min	19	: 5 mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	60
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min	20	: 5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	61
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	21	: 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15 min	62
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15 min	22	: 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60 min	63
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60 min	23	: 5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	64
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	24	: 5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	65
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	25	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	66
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15 min	26	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0, 1:20, 60 min	67
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60 min	27	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	68
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	28	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	69
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	29	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 15 min	70
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	30	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 60 min	71
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH5.0, 1:20, 60 min	31	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	72
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	32	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	73
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	33	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	74
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 15 min	34	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	75
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 60 min	35	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	76
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	36	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	77
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	37	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	78
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	38	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH8.0, 1:20, 60 min	79
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	39	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH8.0, 1:100, 15 min	80
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	40	: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH8.0, 1:100, 60 min	81
: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	41		

<sup>1</sup>MG, May-Grünwald stain (after fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the smear was stained again for 10 min in MG diluted (1:1) with various solution); G, Giemsa stain (after fixation with absolute methanol for 5 min, the smear was air-dried and then stained with Giemsa diluted with various solution); MGG, May-Grünwald · Giemsa stain (after staining with MG stain, the smear was stained with diluted Giemsa solution); DW, distilled water; PB, phosphate buffer; 1:20 and 1:100, dilution ratio (Giemsa:diluent); 15 min and 60 min, time of Giemsa stain.

<sup>2</sup>Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or <sup>1</sup>/<sub>150</sub> M PB.

<sup>3</sup>Preparation number.

## 結 果

コイ、ナイルティラピアおよびイサキの好中球の $\alpha$ 顆粒と $\gamma$ 顆粒の多条件下Romanowsky型染色特性 (Multiple Romanowsky-type Stain Characteristics, MRSC)を Table 2に示す。なお、いずれの魚種の $\beta$ 顆粒も、MRSV

のいずれの染色条件においても明瞭な色調を示さなかった。また、ナイルティラピアとイサキの好中球にはY小体 (安本小体, Yasumoto body (Y-body)) が認められたが、コイには観察されなかった。ナイルティラピアとイサキの好中球のY小体は、MRSVのいずれの染色条件においても青色から淡青色を呈した。

**Table 2.** Summary of multiple Romanowsky-type staining characteristics of  $\alpha$  and  $\gamma$  granules in the neutrophils of common carp (*Cyprinus carpio*, Cc), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, On) and striped grunt (*Parapristipoma trilineatum*, Pt)

PN	Number of granules observed in preparation						PN	Number of granules observed in preparation					
	Cc		On		Pt			Cc		On		Pt	
	$\alpha$	$\gamma$	$\alpha$	$\gamma$	$\alpha$	$\gamma$		$\alpha$	$\gamma$	$\alpha$	$\gamma$	$\alpha$	$\gamma$
1	+++	-	+++	-	+++	-	42	-	+++	-	+++	-	+++
2	+++	-	+++	-	+++	-	43	-	+++	-	+++	-	+++
3	+++	-	-	+	+++	-	44	-	+++	-	+++	-	+++
4	+++	-	-	+++	+++	-	45	-	+++	-	+++	-	+++
5	-	-	-	+++	-	-	46	+++	-	-	+++	-	+
6	+++	-	+++	-	+++	-	47	+	+++	-	+++	-	+++
7	+++	-	+++	+	+++	-	48	+++	-	-	+	+	+
8	+	-	-	+++	-	-	49	+++	-	-	+	-	+
9	-	-	-	+++	-	-	50	+++	-	+	-	-	-
10	-	+++	-	+++	-	-	51	+	+++	-	-	-	+
11	-	+++	-	+++	-	+++	52	+++	-	+	-	+	-
12	-	+	-	+	-	+	53	+++	-	-	-	-	-
13	-	+++	-	+	-	+	54	+	-	-	+++	-	-
14	-	+	-	+	-	-	55	-	+++	-	+++	-	+
15	-	+++	-	+	-	+	56	+	-	-	+	+	-
16	-	+	-	+	-	-	57	+	+	-	+	-	-
17	-	+++	-	+	-	-	58	+	+	-	+++	-	+++
18	-	+++	-	+++	-	-	59	-	+++	-	+++	-	+++
19	-	+++	-	+++	-	+	60	+	+	-	+	+	+++
20	-	+	-	+	-	-	61	+	+	-	+	-	+++
21	-	+++	-	+	-	-	62	-	+	-	+++	-	+++
22	-	+++	-	+++	-	+++	63	-	+++	-	+++	-	+++
23	-	+++	-	+++	-	+++	64	-	+	-	+++	-	+++
24	-	+++	-	+	-	+++	65	-	+	-	+++	-	+++
25	-	+++	-	+	-	+++	66	+++	-	+	-	-	-
26	-	+++	-	+++	-	+++	67	+	+++	-	-	-	+
27	-	+++	-	+++	-	+++	68	+++	-	+	-	+	-
28	-	+++	-	+++	-	+++	69	+++	-	-	-	-	-
29	-	+++	-	+++	-	+++	70	+	+	-	+++	-	-
30	-	+++	-	-	-	-	71	-	+++	-	+++	-	+
31	-	+++	-	+++	-	+	72	+	-	-	+	+	-
32	-	+	-	-	-	-	73	+	+	-	+	-	-
33	-	+++	-	+	-	-	74	-	+++	-	+++	-	+++
34	-	+++	-	-	-	-	75	-	+++	-	+++	-	+++
35	-	+++	-	+	-	+	76	-	+	-	+	-	+++
36	-	+	-	-	-	-	77	-	+++	-	+++	-	+++
37	-	+++	-	-	-	-	78	-	+++	-	+++	-	+++
38	-	+++	-	+++	-	+++	79	-	+++	-	+++	-	+++
39	-	+++	-	+++	-	+++	80	-	+++	-	+++	-	+++
40	-	+	-	+	-	+++	81	-	+++	-	+++	-	+++
41	-	+++	-	+++	-	+++							

+++ , many; + , some; - , not observed.

PN, preparation number (See Table 1).

### α顆粒のMRSC

コイ好中球のα顆粒は、蒸留水およびpH5.0と6.0のリン酸緩衝液を希釈液に用いたMay-Grunwald (MG) 染色標本で多数観察された。また、pH7.0の緩衝液を用いたMG染色では、低濃度 (5 mM) で多数の、高濃度 ( $1/15$  M) では少数のα顆粒が認められた。しかし、pH8.0の緩衝液を用いたMG染色標本には緩衝液の濃度にかかわらずα顆粒は認められなかった。ナイルティラピア好中球のα顆粒は、蒸留水およびpH5.0のリン酸緩衝液を希釈液に用いたMG染色標本で多数観察された。また、pH6.0の緩衝液を用いたMG染色では、低濃度では認められなかったが、高濃度では多数のα顆粒が観察された。しかし、pH7.0および8.0の緩衝液を用いたMG染色では、いずれの濃度においてもα顆粒は認められなかった。イサキ好中球のα顆粒のMG染色性は、コイ好中球と類似していたが、pH7.0の高濃度緩衝液を用いた場合には、コイでは少数のα顆粒が観察されるのに対して、イサキではα顆粒は認められなかった。

いずれの魚種においてもα顆粒はGiemsa染色では染色されなかった。また、MG染色後にGiemsa染色を施すMG-Giemsa (MGG) 染色では、MG染色によって染色されたα顆粒は、Giemsa染色によって、染色される(観察される)顆粒数が減少した。この現象は、ナイルティラピアとイサキにおいて顕著であった。

### γ顆粒のMRSC

コイおよびイサキの好中球のγ顆粒はMG染色標本には観察されなかった。しかし、ナイルティラピア好中球のγ顆粒は、緩衝液を希釈液に用いた場合、緩衝液の濃度にかかわらず、pH6.0で少数、pH7.0および8.0で多数認められた。

いずれの魚種においてもGiemsa染色によってγ顆粒が観察され、Giemsa原液の希釈率が低いほど、染色時間が長いほど多数のγ顆粒が認められる傾向があった。しかし、ナイルティラピアでは、pH5.0の低濃度緩衝液を用いた場合には、希釈率および染色時間にかかわらず少数のγ顆粒が観察され、pH6.0の高濃度緩衝液を用いた場合には、低希釈率・長時間染色においてのみ少数のγ顆粒が認められた。イサキでは、pH7.0および8.0の緩衝液を用いた場合に、緩衝液の濃度、Giemsa原液の希釈率および染色時間にかかわらず多数のγ顆粒が観察された。しかし、他の条件では、希釈液に蒸留水を用いて希釈率1:20で60分

間染色した場合を除き、γ顆粒は認められないか、または少数のみ観察された。

MGG染色標本におけるγ顆粒の観察結果は、イサキでは、Giemsa染色標本のそれと類似していた。しかし、コイでは希釈液に蒸留水、低濃度緩衝液およびpH5.0とpH6.0の高濃度緩衝液を用いた場合、Giemsa原液の希釈率を1:20、Giemsa染色時間を60分間とした条件を除いて、Giemsa染色のみを施した標本と異なり、γ顆粒は認められないか、または少数のみ観察された。ナイルティラピアにおいても、pH5.0の緩衝液を用いたMGG染色標本では、Giemsa染色標本よりも観察されるγ顆粒の数は少なかった。しかし、pH6.0の高濃度緩衝液を用いた場合には、Giemsa染色標本よりも多数のγ顆粒が観察された。

### 細胞化学的特徴

コイ、ナイルティラピアおよびイサキの好中球の細胞化学的特徴をTable 3に示す。アルカリ性フォスファターゼ (AIP) はいずれの魚種の好中球にも検出されなかった。酸性フォスファターゼ (AcP) はコイでは円形または卵円形 (長径0.5 μm以下)、ナイルティラピアでは円形 (直径0.3 μm以下)、イサキでは円形 (直径0.2 μm以下) の陽性顆粒として多数観察された (Figs. 1A, 2A, 3A)。β-グルクロニダーゼ (β-Glu) もいずれの魚種の好中球に検出され、陽性顆粒数は少なく、顆粒の形状はコイおよびイサキでは円形、卵円形または桿形であったのに対して、ナイルティラピアでは円形または卵円形であった (Figs. 1B, 2B, 3B)。α-ナフチルアセテートエステラーゼ (α-NAE) はコイおよびイサキの好中球には検出されず、ナイルティラピアでは円形 (直径0.2 μm以下) の陽性顆粒として多数観察された (Fig. 2C)、α-ナフチルブチレートエステラーゼ (α-NBE) はコイおよびナイルティラピアに認められ、前者では直径0.2 μm以下の円形陽性顆粒として多数 (Fig. 1C)、後者では長径0.3 μm以下の円形または卵円形の陽性顆粒として少数観察された (Fig. 2D)。イサキではα-NBEは検出されなかった。ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (NASDCAE) はコイにのみ長径0.5 μm以下の円形または卵円形の陽性顆粒として多数観察された (Fig. 1D)。ペルオキシダーゼ (PO) はいずれの魚種においても円形または卵円形の陽性顆粒 (コイ、長径0.5 μm以下; ナイルティラピアとイサキ、長径1.0 μm以下) として認められ、細胞質に充満していた (Figs. 1E, 2E, 3C)。核にはPO陽性反応は検出されな

かった。

微細（長径0.2 μm以下）な円形のperiodic acid Schiff反応（PAS）陽性顆粒が、いずれの魚種の好中球にも多数観察され、細胞質基質もPAS弱陽性であった（Figs. 1F, 2F, 3D）。いずれのPAS陽性部位もα-アミラーゼ処理によって完全に消失した。いずれの魚種においてもアルシアンブルー染色では陽性部位は観察されなかった。トルイジ

ンブルー（TB）染色によって、いずれの魚種の好中球も核が青染され、ナイルティラピアおよびイサキでは種々の形状（円形、卵円形、桿形、コマ形、三日月形、紐状）を示す青色の陽性顆粒が少数観察された（Figs. 2G, 3E）。また、ナイルティラピアでは円形または卵円形のTB陽性顆粒（長径0.3 μm以下）が多数認められた（Fig. 2G）。オイルレッドOおよびズダンⅢ染色ではいずれの魚種においても陽性部位は観察されなかった。コイおよびイサキではズダンブラックB（SBB）染色においても陽性部位は観察されなかったが、ナイルティラピアでは円形（長径0.2 μm以下）の陽性顆粒が多数観察された（Fig. 2H）。

考 察

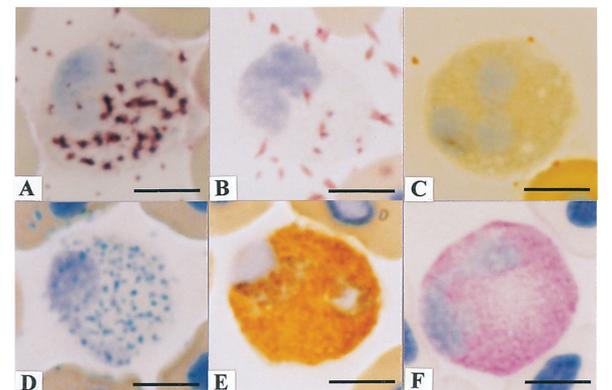
コイ、ナイルティラピアおよびイサキの好中球には3種類の顆粒（α顆粒、β顆粒、γ顆粒）が存在することが既に報告されているが<sup>1-4</sup>、本研究ではこれら魚種の各顆粒のMRSCを詳細に調べ、既報<sup>5-23</sup>と比較した。

コイ、ナイルティラピアおよびイサキの好中球のα顆粒は、魚種によって条件は異なるものの、いずれの魚種においてもMG染色によって好染された。また、いずれの魚種においてもα顆粒はGiemsa染色では染色されず、MGG染色では観察されるα顆粒の数が減少した。同様の染色性はアジアアロワナ*Scleropages formosus*、ウナギ、ブリ*Seriola quinqueradiata*およびトラフグ*Takifugu rubripes*のα顆粒にも認められている（Table 4）<sup>9,12,15,17</sup>。しかし、マダイ*Pagrus major*のα顆粒はMG染色のみならずGiemsa染色でも染色される（Table 4）<sup>16</sup>。α顆粒は*P. endlicheri*の好中球にも観察されており<sup>13</sup>、本魚種のα顆粒は、

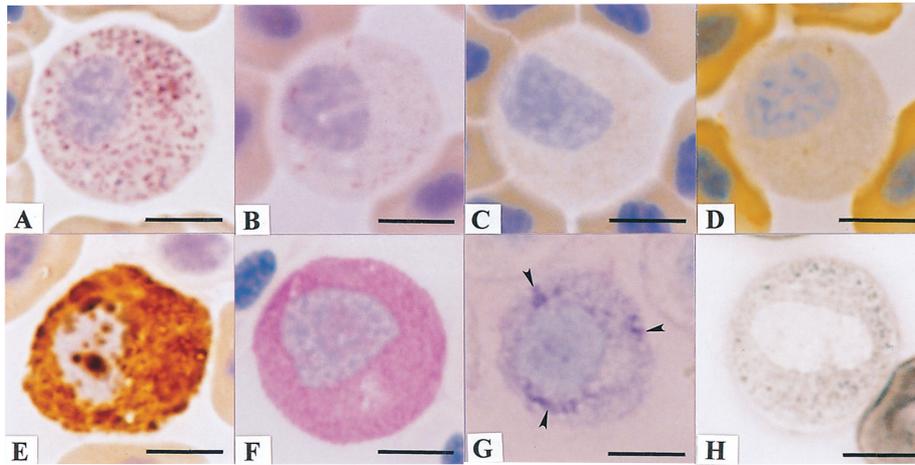
**Table 3.** Summary of reactions of neutrophil to cytochemical tests in common carp *Cyprinus carpio*, Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and striped grunt *Parapristipoma trilineatum*

Test <sup>1</sup>	Fish and positive site (shape and number) <sup>2</sup>		
	<i>C. carpio</i>	<i>O. niloticus</i>	<i>P. trilineatum</i>
PAS	G (r, m, φ ≤ 0.2 μm); H	G (r, m, φ ≤ 0.2 μm); H	G (r, m, φ ≤ 0.2 μm); H
PAS-αA	—	—	—
AB pH1.0	—	—	—
AB pH2.5	—	—	—
TB	N	G (am, af, eq Y-body; r or o, m, φ ≤ 0.3 μm, eq γG); N G (r, m, φ ≤ 0.2 μm)	G (am, af, eq Y-body); N
SBB	—	—	—
SIII	—	—	—
ORO	—	—	—
AIP	—	—	—
AcP	G (r or o, m, φ ≤ 0.5 μm)	G (r, m, φ ≤ 0.3 μm, eq αG)	G (r, m, φ ≤ 0.2 μm)
β-Glu	G (r or o, s, φ ≤ 0.3 μm; rod, s, ≤ 1.0 μm in length)	G (r or o, s, φ ≤ 0.3 μm)	G (r or o, s, φ ≤ 0.3 μm; rod, s, ≤ 1.3 μm in length)
α-NAE	—	G (r, m, φ ≤ 0.2 μm)	—
α-NBE	G (t, m, φ < 0.2 μm)	G (r or o, s, φ ≤ 0.3 μm)	—
NASDCAE	G (r or o, m, φ ≤ 0.5 μm, eq βG)	—	—
PO	G (r or o, m, φ ≤ 1.0 μm, eq βG)	G (r or o, m, φ ≤ 1.0 μm, eq βG)	G (r or o, m, φ ≤ 1.0 μm, eq βG)

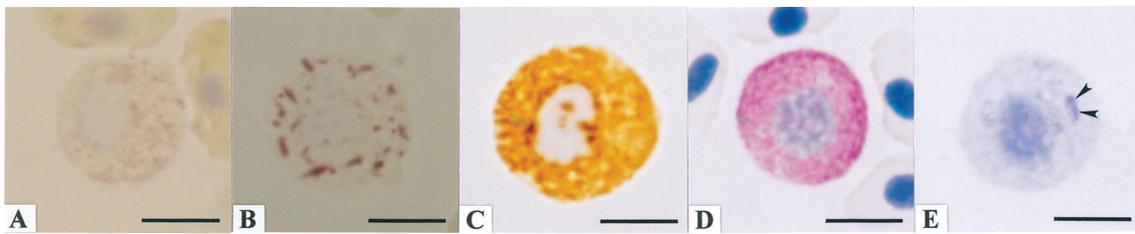
<sup>1</sup>PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS-αA, PAS after α-amylase digestion; AB, alcian blue; TB, toluidine blue; SBB, sudan black B; SIII, sudan III; ORO, oil red O; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; β-Glu, β-glucuronidase; α-NAE, α-naphthyl acetate esterase; α-NBE, α-naphthyl butyrate esterase; NASDCAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase; ? —, non detection; G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; Y-body, Yasumoto body; αG, α granule; βG, β granule; γG, γ granule; r, round; o, oval; am, amorphous; m, many; s, some; af, a few; eq, equivalent to.



**Fig. 1.** Cytochemistry of common carp neutrophil. A, acid phosphatase; B, β-glucuronidase; C, α-naphthyl butyrate esterase; D, naphthol AS-D chloroacetate esterase; E, peroxidase; F, periodic acid Schiff reaction. Bars = 5 μm.



**Fig. 2.** Cytochemistry of Nile tilapia neutrophil. A, acid phosphatase; B,  $\beta$ -glucuronidase; C,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase; D,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; E, peroxidase; F, periodic acid Schiff reaction; G, toluidine blue in distilled water; H, sudan black B. Arrowheads show Y-body. Bars = 5  $\mu$ m.



**Fig. 3.** Cytochemistry of striped grunt neutrophil. A, acid phosphatase; B,  $\beta$ -glucuronidase; C, peroxidase; D, periodic acid Schiff reaction; E, toluidine blue in distilled water. Arrowheads show Y-body. Bars = 5  $\mu$ m.

MRSCの違いから2種類 ( $\alpha 1$  顆粒,  $\alpha 2$  顆粒) に分類されている (Table 4)<sup>13)</sup>。このうち,  $\alpha 1$  顆粒はマダイの $\alpha$  顆粒と同様にMG染色でもGiemsa染色でも染まる<sup>13)</sup>。また,  $\alpha 2$  顆粒はMG染色で染まるが, Giemsa染色標本では観察されない (Table 4)<sup>13)</sup>。以上のことから, *P. endlicheri* の $\alpha 1$  顆粒 (狭義) とマダイの $\alpha$  顆粒をとともに,  $\alpha 1$  顆粒 (広義) とし, *P. endlicheri* の $\alpha 2$  顆粒 (狭義) と, アジアアロワナ, ウナギ, コイ, ナイルティラピア, イサキ, ブリおよびトラフグの $\alpha$  顆粒をいずれも $\alpha 2$  顆粒 (広義) に分類することを提唱する (Table 4)。

コイおよびイサキの好中球の $\gamma$  顆粒はMG染色標本には観察されなかった。しかし, ナイルティラピアの $\gamma$  顆粒は, 限られた条件ではあるもののMG染色標本に認められた。また, いずれの魚種においてもGiemsa染色によって $\gamma$  顆粒が観察された。ナイルティラピアの $\gamma$  顆粒のMRSCは, スタウナギ, アジアアロワナおよびアカメ*Lates japonicus* の $\gamma$  顆粒と<sup>12,14,22)</sup>, コイおよびイサキの $\gamma$  顆粒のMRSCは, *P. endlicheri*, ウナギおよびブリの $\gamma$  顆粒と類似している (Table 5)<sup>13,15,17)</sup>。このことから, MG染色に

もGiemsa染色でも染まる $\gamma$  顆粒を $\gamma 1$  顆粒に, MG染色では染まらずGiemsa染色で染まる $\gamma$  顆粒を $\gamma 2$  顆粒に分類することを提唱したい (Table 5)。

$\alpha 1$  顆粒,  $\alpha 2$  顆粒,  $\gamma 1$  顆粒ならびに $\gamma 2$  顆粒の形状および大きさには, 魚種間で関連性は認められなかった (Table 6)。また,  $\alpha$  顆粒および $\gamma$  顆粒の種類と $\beta$  顆粒の形状および大きさの間にも関係は認められなかった (Table 6)。

$\gamma$  顆粒を $\gamma 1$  顆粒と $\gamma 2$  顆粒に細分することで, 真骨魚類のI 群は2つのグループに分けられる。すなわち,  $\alpha 2$  顆粒と $\gamma 1$  顆粒を有するグループには, アジアアロワナとナイルティラピアが,  $\alpha 2$  顆粒と $\gamma 2$  顆粒を有するグループには, ウナギ, コイ, イサキおよびブリが含まれる。今後, 前者をI-A群, 後者をI-B群と称することとする。なお, I-A群とI-B群の各群内およびI-A群とI-B群の間には, 好中球の細胞化学的特徴に明瞭な類似点または相違点は認められない (Table 7)。

コイ, ナイルティラピアおよびイサキの好中球の3種類の顆粒は, 魚種間で形状や大きさが異なることが知られて

いる (Table 6)<sup>1-4)</sup>。すなわち、コイとナイルティラピアの $\alpha$ 顆粒は直径0.3  $\mu\text{m}$ 以下の円形であるのに対して<sup>1-3)</sup>、イサキでは長径0.5~1.0  $\mu\text{m}$ の桿形である<sup>4)</sup>。また、いずれの魚種においても $\beta$ 顆粒は円形または卵円形であるが、コイでは長径約0.5  $\mu\text{m}$ <sup>1,2)</sup>、ナイルティラピアおよびイサキでは長径0.5~1.0  $\mu\text{m}$ とされている<sup>3,4)</sup>。 $\gamma$ 顆粒はいずれ

の魚種においても円形または卵円形であり、その長径はコイで0.4  $\mu\text{m}$ 以下<sup>2)</sup>、ナイルティラピアとイサキで0.3  $\mu\text{m}$ 以下と報告されている<sup>3,4)</sup>。これらの形状と大きさおよび数をもとに、細胞化学的特性から各魚種の好中球の各顆粒およびY小体の成分を次のように推定した (Table 3)。

いずれの魚種においてもPAS陽性顆粒は $\alpha$ 顆粒、 $\beta$ 顆

**Table 4.** Summary of multiple Romanowsky-type staining characteristics of  $\alpha$  granule in fish neutrophils

PN	Fish, type and number of $\alpha$ granules observed in each staining preparation <sup>1-3</sup>									
	<i>Pe</i>		<i>Sf</i>	<i>Aj</i>	<i>Cc</i>	<i>On</i>	<i>Pt</i>	<i>Sq</i>	<i>Pm</i>	<i>Tr</i>
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 1$	$\alpha 2$						
1	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
2	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
4	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+
5	+++	-	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+
6	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
8	+++	+	-	+	+	-	-	+	+++	+
9	+++	+	-	+	-	-	-	+	+++	+
10	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
11	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
12	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
13	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
17	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
18	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
20	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
21	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
22	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
24	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
25	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
26	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
28	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
29	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
40	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
41	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-

<sup>1</sup>*Pe*, *Polypterus endlicheri*<sup>13)</sup>; *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana)<sup>12)</sup>; *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel)<sup>15)</sup>; *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, present report); *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, present report); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, present report); *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack)<sup>17)</sup>; *Pm*, *Pagrus major* (red sea-bream)<sup>16)</sup>; *Tr*, *Takifugu rubripes* (tiger puffer)<sup>9)</sup>.

<sup>2</sup> $\alpha$ ,  $\alpha$  granule (eosinophilic granule);  $\alpha 1$ ,  $\alpha$  type 1;  $\alpha 2$ ,  $\alpha$  type 2.

<sup>3</sup>+++; many; +, some; -, not observed.

PN, preparation number (See Table 1).

粒,  $\gamma$  顆粒とは大きさが異なる。また, PAS陽性顆粒は  $\alpha$ -アミラーゼにより完全に消化されることから, グリコーゲンを主成分とする構造物であると考えられる。ナイルティラピアとイサキの好中球において, TB染色によって種々の形態を示す青色の粗大な陽性部位が観察された。この陽性部位は形態学的特徴からY小体に相当すると思わ

れる。また, ナイルティラピアの好中球にはTB陽性の微細な顆粒が観察された。この陽性顆粒は形態上の特徴から  $\gamma$  顆粒に相当すると思われる。ナイルティラピアの好中球に観察されたSBB陽性顆粒は  $\alpha$  顆粒とは大きさが,  $\beta$  顆粒および  $\gamma$  顆粒とは形状および大きさが異なる。

コイ好中球のAcP陽性顆粒は  $\alpha$  顆粒とは形状および大き

Table 4. Cont.

PN	Fish and number of $\alpha$ granules observed in each staining preparation <sup>1-3</sup>																	
	<i>Pe</i>		<i>Sf</i>		<i>Aj</i>		<i>Cc</i>		<i>On</i>		<i>Pt</i>		<i>Sq</i>		<i>Pm</i>		<i>Tr</i>	
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 1$	$\alpha 2$														
42	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
44	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
45	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
46	+++	-	+	+	+++	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+
47	+++	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+	+
48	+++	-	+++	+++	+++	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+
49	+++	-	+++	+	+++	-	-	+	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+	+
50	+++	-	+++	+++	+++	+	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
51	+++	-	+	+++	+	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+
52	+++	-	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
53	+++	-	+	+++	+++	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
54	+++	-	-	+++	+	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
55	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+	+
56	+++	-	+	+++	+	-	+	+	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
57	+++	-	-	+++	+	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
58	+++	-	-	+	+	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
59	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+
60	+++	-	-	+++	+	-	+	+	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
61	+++	-	-	+	+	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+
62	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+	+
63	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	-	-
64	+++	-	-	+	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+
65	+++	-	-	+	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
66	+++	-	-	+	+++	+	-	-	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
67	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
68	+	-	-	+++	+++	+	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
69	+	-	-	+	+++	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
70	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
71	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
72	+++	-	-	+++	+	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
73	+++	-	-	+++	+	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
74	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
75	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
76	+++	+	-	+	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
77	+++	+	-	+	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
78	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
79	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
80	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-
81	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	-

<sup>1</sup>*Pe*, *Polypterus endlicheri*<sup>13</sup>; *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana)<sup>12</sup>; *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel)<sup>15</sup>; *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, present report); *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, present report); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, present report); *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack)<sup>17</sup>; *Pm*, *Pagrus major* (red sea-bream)<sup>16</sup>; *Tr*, *Takifugu rubripes* (tiger puffer)<sup>9</sup>.

<sup>2</sup> $\alpha$ ,  $\alpha$  granule (eosinophilic granule);  $\alpha 1$ ,  $\alpha$  type 1;  $\alpha 2$ ,  $\alpha$  type 2.

<sup>3</sup>+++ , many; + , some; - , not observed.

PN, preparation number (See Table 1).

さが,  $\beta$  顆粒とは数が,  $\gamma$  顆粒とは大きさが異なる。 $\beta$ -Gluおよび $\alpha$ -NBE陽性顆粒はいずれの種類の顆粒ともそれぞれ形状, 数および大きさが異なる。また, NASDCAE陽性顆粒の大きさおよび形状は $\beta$ 顆粒と類似しているが,  $\beta$ 顆粒よりも数が少ないことから, 本酵素の存在部位は確定できない。ナイルティラピア好中球において, AcP陽性

顆粒は $\alpha$ 顆粒と形状, 大きさおよび数が類似することから,  $\alpha$ 顆粒がAcP陽性であると考えられる。 $\beta$ -Gluおよび $\alpha$ -NBE陽性顆粒はともに形状と大きさが $\gamma$ 顆粒に類似しているが, 数が $\gamma$ 顆粒よりも少ない。また,  $\alpha$ -NAE陽性顆粒の大きさはいずれの種類の顆粒よりも小さい。イサキ好中球のAcPおよび $\beta$ -Glu陽性顆粒はいずれの顆粒より

**Table 5.** Summary of multiple Romanowsky-type staining characteristics of  $\gamma$  granule in fish neutrophils

PN	Fish, type and number of $\gamma$ granules observed in each staining preparation <sup>1-3</sup>								
	<i>Eb</i>	<i>Pe</i>	<i>Sf</i>	<i>Aj</i>	<i>Cc</i>	<i>Laj</i>	<i>On</i>	<i>Pt</i>	<i>Sq</i>
	$\gamma$ 1	$\gamma$ 2	$\gamma$ 1	$\gamma$ 2	$\gamma$ 2	$\gamma$ 1	$\gamma$ 1	$\gamma$ 2	$\gamma$ 2
1	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-
2	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-
3	+++	-	-	-	-	+++	+	-	-
4	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-
5	+++	-	+++	-	-	+++	+++	-	-
6	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
7	-	-	-	-	-	+++	+	-	-
8	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-
9	-	-	+	-	-	+++	+++	-	-
10	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
11	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12	+++	-	+	+	+	+++	+	+	+++
13	+++	+	+	+++	+++	+++	+	+	+++
14	+++	+	+++	+	+	+++	+	-	+++
15	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+++
16	+++	-	+	+	+	+++	+	-	+++
17	+++	+	+	+	+++	+++	+	-	+++
18	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
19	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
20	+++	-	+	+	+	+++	+	-	+++
21	+++	+	+++	+	+++	+++	+	-	+++
22	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
23	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
24	+++	-	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
25	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
26	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
27	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
28	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
29	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
30	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	-	+++
31	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
32	+++	-	+++	+	+	+++	-	-	+++
33	+++	+	+++	+	+++	+++	+	-	+++
34	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	-	+++
35	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+++
36	+++	-	+++	+	+	+++	-	-	+++
37	+++	+	+++	+	+++	+++	-	-	+++
38	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
39	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
40	+++	-	+++	+	+	+++	+	+++	+++
41	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

<sup>1</sup>*Eb*, *Eptatretus burgeri* (hagfish)<sup>14</sup>; *Pe*, *Polypterus endlicheri*<sup>13</sup>; *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana)<sup>12</sup>; *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel)<sup>15</sup>; *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, present report); *Laj*, *Lates japonicus* (Japanese lates)<sup>22</sup>; *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, present report); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, present report); *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack)<sup>17</sup>.

<sup>2</sup> $\gamma$  granule, basophilic granule;  $\gamma$ 1,  $\gamma$  granule type 1;  $\gamma$ 2,  $\gamma$  granule type 2.

<sup>3</sup>+++ , many; +, some; -, not observed.

PN, preparation number (See Table 1).

も, 前者は小さく, 後者は形状, 数および大きさが異なる。いずれの魚種においてもPO陽性顆粒は円形または卵円形で細胞質に充満していること, 大きさが $\beta$ 顆粒に類似することから, PO活性は $\beta$ 顆粒に存在すると考えられる。

本研究において, コイの好中球には, AcP,  $\beta$ -Glu,  $\alpha$ -NBE, NASDCAEおよびPO活性が検出されたが, AIPと

$\alpha$ -NAE活性は認められなかった。Suzuki<sup>27)</sup>も本研究と同様に, コイの好中球にAcP,  $\beta$ -Glu,  $\alpha$ -NBE, NASDCAEおよびPOを認めており, AIPは陰性であると報告している。Hammers<sup>28)</sup>はコイの顆粒性白血球を4種類(好中球, 好異球, 好酸球, 好塩基球)に分類しており, 好中球にのみ顆粒状 (granular reaction) のPO活性を認

Table 5. Cont.

PN	Fish and number of $\gamma$ granules observed in each staining preparation <sup>1-3</sup>								
	<i>Eb</i>	<i>Pe</i>	<i>Sf</i>	<i>Aj</i>	<i>Cc</i>	<i>Laj</i>	<i>On</i>	<i>Pt</i>	<i>Sq</i>
	$\gamma$ 1	$\gamma$ 2	$\gamma$ 1	$\gamma$ 2	$\gamma$ 2	$\gamma$ 1	$\gamma$ 1	$\gamma$ 2	$\gamma$ 2
42	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
43	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
44	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
45	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
46	+++	-	+	+++	-	+++	+++	+	+++
47	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
48	+++	-	+	+	-	+++	+	+	+++
49	+++	-	+	+	-	+++	+	+	+++
50	+++	-	+	+	-	+++	-	-	+++
51	+++	-	+++	+	+++	+++	-	+	+++
52	+++	-	+	-	-	+++	-	-	+++
53	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	+++
54	+++	-	+	+	-	+++	+++	-	+++
55	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
56	+++	-	+	+	-	+++	+	-	+++
57	+++	-	+++	+	+	+++	+	-	+++
58	+++	-	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
59	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
60	+++	-	+++	+++	+	+++	+	+++	+++
61	+++	-	+++	+++	+	+++	+	+++	+++
62	+++	-	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
63	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
64	+++	-	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
65	+++	-	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
66	+++	-	+	+	-	+++	-	-	+++
67	+++	-	+	+	+++	+++	-	+	+++
68	+++	-	+	-	-	+++	-	-	+++
69	+++	-	+	-	-	+++	-	-	+++
70	+++	-	+++	+	+	+++	+++	-	+++
71	+++	-	+++	+	+++	+++	+++	+	+++
72	+++	-	+++	+	-	+++	+	-	+++
73	+++	-	+++	+	+	+++	+	-	+++
74	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
76	+++	-	+++	+	+	+++	+	+++	+++
77	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
78	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
79	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
80	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
81	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

<sup>1</sup>*Eb*, *Eptatretus burgeri* (hagfish)<sup>14)</sup>; *Pe*, *Polypterus endlicheri*<sup>13)</sup>; *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana)<sup>12)</sup>; *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel)<sup>15)</sup>; *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, present report); *Laj*, *Lates japonicus* (Japanese lates)<sup>22)</sup>; *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, present report); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, present report); *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack)<sup>17)</sup>.

<sup>2</sup> $\gamma$  granule, basophilic granule;  $\gamma$ 1,  $\gamma$  granule type 1;  $\gamma$ 2,  $\gamma$  granule type 2.

<sup>3</sup>+++ , many; +, some; -, not observed.

PN, preparation number (See Table 1).

めている。また、Hamers<sup>28)</sup> は好中球に顆粒状のNASDCAE活性とともに、顆粒状および拡散した (diffuse reaction) AcP活性とPAS陽性部位を観察しているが、AIP,  $\beta$ -Glu,  $\alpha$ -NAEおよび $\alpha$ -NBEは陰性であるとしている。しかし、Suzuki<sup>27)</sup> は酵素活性の検出部位ならびにその形状について、Hamers<sup>28)</sup> は陽性顆粒の形態について述べていない。Bielek<sup>29)</sup> はコイの顆粒性白血球を電子顕微鏡で観察し、好異球、好酸球および好塩基球の3種類に分類しており、好異球に強い、好酸球に弱いPO活性を認めている。Suzuki<sup>27)</sup> はコイに好中球と好塩基球の存在を認めているが、好酸球は観察されなかったと報告している。本研究においても、標本中に好塩基球は認められた

が、好酸球は観察されなかった。したがって、Bielek<sup>29)</sup> の好異球はSuzuki<sup>27)</sup> および本研究の好中球に相当すると考えられる。Bielek<sup>29)</sup> は、コイの好異球に小型の顆粒または小胞の他に、大型のPO陽性顆粒を観察しており、その顆粒中に桿状の封入物を認めている。Imagawa et al.<sup>30)</sup> もBielek<sup>29)</sup> の好異球と同様の顆粒球 (type 1 granulocyte) を電子顕微鏡観察しているが、その顆粒球の顆粒は光学顕微鏡観察によってPO陽性であるとともにPAS陽性であると報告している。しかし、本研究の結果、コイ好中球のPAS陽性顆粒はPO陽性顆粒とは異なることが明らかとなった。Bielek<sup>29)</sup> およびImagawa et al.<sup>30)</sup> が観察した封入物を有する大型の顆粒は、本研究ならびに既報<sup>1,2)</sup> におけ

**Table 6.** Comparison of morphological characteristics (shape and diameter ( $\mu$ m)) of neutrophil granules in various fish species

Fish <sup>1</sup>	Type of cytoplasmic granule <sup>2,3</sup>					
	$\alpha$ 1	$\alpha$ 2	$\beta$	$\gamma$ 1	$\gamma$ 2	P
<i>Eb</i>	—	—	—	r or o ( $\leq 0.5$ )	—	—
<i>Pa</i>	—	—	—	—	—	r or o (0.4-0.5), rod (1.0-1.5)*
<i>Pe</i>	r (0.3), rod (0.8)*	r (0.3)	—	—	r or o ( $\leq 0.5$ )	—
<i>Sf</i>	—	rod or s (1.0)*	r or o ( $\leq 0.5$ )	r or o ( $\leq 0.3$ )	—	—
<i>Aj</i>	—	r or o (0.3), rod ( $\leq 1.0$ )*	r or o ( $\leq 0.6$ )	—	r or o ( $\leq 0.3$ )	—
<i>Cc</i>	—	r ( $\leq 0.3$ )	r or o (0.5)	—	r or o ( $\leq 0.4$ )	—
<i>Pla</i>	—	—	r or o ( $\leq 0.5$ )	—	—	—
<i>El</i>	—	—	r or o ( $\leq 0.5$ )	—	—	—
<i>Mc</i>	—	—	r or o ( $\leq 0.8$ )	—	—	—
<i>Ch</i>	—	—	r or o ( $\leq 0.8$ )	—	—	—
<i>Laj</i>	—	—	r or o ( $\leq 0.5$ )	r or o ( $\leq 0.3$ )	—	—
<i>Ms, Lm</i>	—	—	r or o (0.5-1.0)	—	—	—
<i>Lj, Ll, Lsp</i>	—	—	r or o ( $\leq 1.0$ )	—	—	—
<i>Es</i>	—	—	r or o ( $\leq 1.0$ )	—	—	—
<i>On</i>	—	r ( $\leq 0.3$ )	r or o (0.5-1.0)	r or o ( $\leq 0.3$ )	—	—
<i>Pt</i>	—	rod (0.5-1.0)*	r or o (0.5-1.0)	—	r or o ( $\leq 0.3$ )	—
<i>Sq</i>	—	rod (0.5-1.0)*	r or o ( $\leq 0.5$ )	—	r or o ( $\leq 0.3$ )	—
<i>Gp</i>	—	—	r or o (0.5-1.1)	—	—	—
<i>Pm</i>	r or o ( $\leq 0.4$ )	—	r or o ( $\leq 0.5$ )	—	—	—
<i>Py</i>	—	—	r or o ( $\leq 0.5$ )	—	—	—
<i>Vm</i>	—	—	r or o ( $\leq 0.5$ )	—	—	—
<i>Po</i>	—	—	r or o (0.5-1.0)	—	—	—
<i>Tr</i>	—	r or o (0.5), rod ( $\leq 1.5$ )*	r or o ( $\leq 1.0$ )	—	—	—

<sup>1</sup>*Eb*, *Eptatretus burgeri* (hagfish)<sup>14)</sup>; *Pa*, *Protopterus annectens* (African lungfish)<sup>18)</sup>; *Pe*, *Polypterus endlicheri*<sup>13)</sup>; *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana)<sup>12)</sup>; *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel)<sup>15)</sup>; *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp)<sup>12)</sup>; *Pla*, *Plecoglossus altivelis* (ayu)<sup>8)</sup>; *El*, *Exos lucius* (northern pike)<sup>11)</sup>; *Mc*, *Mugil cephalus* (gray mullet)<sup>20)</sup>; *Ch*, *Chelon haematocheilus* (redlip mullet)<sup>21)</sup>; *Laj*, *Lates japonicus* (Japanese lates)<sup>22)</sup>; *Ms*, *Micropterus salmoides* (large mouth bass)<sup>6)</sup>; *Lm*, *Lepomis macrochirus* (bluegill)<sup>6)</sup>; *Lj*, *Lateolabrax japonicus* (Japanese seabass)<sup>10)</sup>; *Ll*, *Lateolabrax latus* (seabass)<sup>10)</sup>; *Lsp*, *Lateolabrax* sp. (seabass, TA-I-RI-KU-SU-ZU-KI (Japanese name)<sup>10)</sup>; *Es*, *Epinephelus septemfasciatus* (sevenband grouper)<sup>19)</sup>; *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia)<sup>3)</sup>; *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt)<sup>4)</sup>; *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack)<sup>17)</sup>; *Gp*, *Girella punctata* (rudderfish)<sup>5,7)</sup>; *Pm*, *Pagrus major* (red sea-bream)<sup>16)</sup>; *Py*, *Pleuronectes yokohamae* (marbled sole)<sup>23)</sup>; *Vm*, *Verasper moseri* (barfin flounder)<sup>23)</sup>; *Po*, *Paralichthys olivaceus* (Japanese flounder)<sup>7)</sup>; *Tr*, *Takifugu rubripes* (tiger puffer)<sup>9)</sup>.

<sup>2</sup> $\alpha$ , eosinophilic granule;  $\alpha$ 1,  $\alpha$  type 1;  $\alpha$ 2,  $\alpha$  type 2;  $\beta$ , chromophobic granule;  $\gamma$ , basophilic granule;  $\gamma$ 1,  $\gamma$  type 1;  $\gamma$ 2,  $\gamma$  type 2; P, panchromatophilic granule; —, not observed; r, round; o, oval; s, spindle.

\*Diameter in length.



これまでに、各種魚類の好中球の細胞化学的特徴が調べられているが (Table 6), 陽性反応の存在部位が推定されているものは少ない。しかし、 $\beta$ 顆粒を有する魚種 (アジアアロワナ, ウナギ, アユ *Plecoglossus altivelis*, ノーザンパイク *Exos lucius*, ボラ *Mugil cephalus*, メナダ *Chelon haematocheilus*, アカメ, ブルーギル *Lepomis macrochirus*, スズキ *Lateolabrax japonicus*, ヒラスズキ *Lateolabrax latipes*, メジナ, マハタ *Epinephelus septemfasciatus*, マダイ, ブリ, ヒラメ *Paralichthys olivaceus*, マコガレイ *Pleuronectes yokohamae*, マツカワ *Verasper moseri*, トラフグ) では、本顆粒がPO陽性であると考えられている<sup>6-12, 15-17, 19-21</sup>。コイ, ナイルティラピアおよびイサキにおいても本研究の結果から $\beta$ 顆粒がPO陽性であると推測された。PO活性の局在部位の違いから、真骨魚類のⅢ群はⅢ-A群 (ノーザンパイク, ブルーギル, スズキ, ヒラスズキ, メジナ, ヒラメ, マコガレイ, マツカワ) とⅢ-B群 (アユ, ボラ, メナダ, マハタ) に細分されており<sup>21</sup>, 前者ではPO活性は $\beta$ 顆粒に、後者ではPO活性が $\beta$ 顆粒と核に検出されている。コイ, ナイルティラピアおよびイサキの好中球の核はPO陰性であった。 $\beta$ 顆粒はスタウナギ, アフリカハイギョおよび *P. endlicheri* の好中球には観察されておらず、これら魚種の好中球はPO陰性である<sup>13, 14, 18</sup>。したがって、魚類では好中球がPOを有するようになったときに、 $\beta$ 顆粒が出現したのではないかと推察され、その時期は、原始的な真骨魚類であるアジアアロワナにPOを有する $\beta$ 顆粒が観察されることから<sup>12</sup>, 少なくとも真骨魚類が出現したときにまで遡ると考えられる。

これまでに、アフリカハイギョとコイを除く魚種の好中球にY小体が観察されている<sup>3-17, 19-23</sup>。コイにおいても、病原細菌 *Aeromonas hydrophila* に人為感染させることで、本小体を有する好中球が血液中出现することが報告されている<sup>26</sup>。Y小体を有する魚種では、同小体はTB陽性であると考えられている (Table 6)<sup>6-17, 19-21</sup>。また、*A. hydrophila* に人為感染させることで出現したコイのY小体もTB陽性である<sup>26</sup>。本研究の結果、ナイルティラピアとイサキのY小体もTB陽性であることが明らかとなった。アカメでは $\gamma$ 顆粒 ( $\gamma$  1 顆粒) もTB陽性であると報告されている<sup>22</sup>。ナイルティラピアの $\gamma$ 顆粒 ( $\gamma$  1 顆粒) もTB陽性であった。しかし、 $\gamma$ 顆粒を有するスタウナギ ( $\gamma$  1 顆粒), *P. endlicheri* ( $\gamma$  2 顆粒), アジアアロワナ ( $\gamma$  1 顆粒), ウナギ ( $\gamma$  2 顆粒) およびブリ ( $\gamma$  2 顆粒) では、 $\gamma$ 顆粒にTB陽性反応は認められておらず<sup>12-15, 17</sup>, 本研

究においてもコイとイサキの $\gamma$ 顆粒 ( $\gamma$  2 顆粒) はTB陰性であった。

本研究ではコイ, ナイルティラピアおよびイサキの好中球に観察される3種類の顆粒のMRSCを詳細に調べ、既報<sup>5-23</sup>と比較し、魚類の $\alpha$ 顆粒は $\alpha$  1 顆粒と $\alpha$  2 顆粒に、 $\gamma$ 顆粒は $\gamma$  1 顆粒と $\gamma$  2 顆粒に細分でき、真骨魚類のⅠ群は $\alpha$  2 顆粒と $\gamma$  1 顆粒を有するグループ (Ⅰ-A群) と $\alpha$  2 顆粒と $\gamma$  2 顆粒を有するグループ (Ⅰ-B群) に分類できることを示した。

## 謝 辞

実験魚を提供していただいた水産大学校生物生産学科准教授 竹下直彦博士に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のメイ-グリュンワルド・ギムザ染色性. 水大校研報, 50, 109-117 (2002)
- 2) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のアズール顆粒. 水大校研報, 51, 17-29 (2002)
- 3) 安本信哉, 近藤昌和, 高橋幸則: テラピア好中球顆粒のメイ-グリュンワルド・ギムザ染色性. 水大校研報, 51, 79-86 (2003)
- 4) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: イサキ好中球の顆粒. 水大校研報, 52, 45-48 (2004)
- 5) 近藤昌和, 金丸俊介, 高橋幸則: メジナの好中球顆粒. 水大校研報, 52, 67-71 (2004)
- 6) 近藤昌和, 柏村直宏, 金丸俊介, 稲川裕之, 高橋幸則: サンフィッシュ科魚類 (オオクチバス, ブルーギル) の好中球顆粒. 水大校研報, 53, 197-202 (2005)
- 7) 近藤昌和, 金丸俊介, 柏村直宏, 稲川裕之, 高橋幸則: ヒラメおよびメジナ好中球顆粒の細胞化学的特徴. 水大校研報, 53, 203-209 (2005)
- 8) 近藤昌和: 新琵琶湖産アユ冷水病総合対策緊急研究事業報告書 (細胞内病理態様解析, 平成17年度), 滋賀県, 1-15 (+表1, 図1-20) (2006)
- 9) 近藤昌和, 稲川裕之, 池田 至, 山元憲一, 高橋幸則: トラフグ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, 55, 133-139 (2007)
- 10) 近藤昌和, 稲川裕之, 高橋幸則: スズキ科魚類 (スズ

- キ, ヒラスズキ, タイリクスズキ)の好中球の形態学  
 的および細胞化学的特徴. 水大校研報, 55, 141-147  
 (2007)
- 11) 近藤昌和, 高橋幸則, 山元憲一: ノーザンパイク好中  
 球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報,  
 56, 317-321 (2008)
  - 12) 近藤昌和, 高橋幸則: アジアアロワナの好中球顆粒.  
 水大校研報, 57, 219-226 (2009)
  - 13) 近藤昌和, 高橋幸則: ポリプレルス好中球の形態学  
 的および細胞化学的特徴. 水大校研報, 57, 283-297  
 (2009)
  - 14) 近藤昌和, 高橋幸則: スタウナギ好中球の形態学  
 的および細胞化学的特徴. 水大校研報, 57, 299-308  
 (2009)
  - 15) 近藤昌和, 高橋幸則: ウナギ好中球の形態学  
 的および細胞化学的特徴. 水大校研報, 58, 1-13 (2009)
  - 16) 近藤昌和, 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸  
 則: マダイ好中球の形態学および細胞化学的特徴.  
 水大校研報, 58, 15-22 (2009)
  - 17) 近藤昌和, 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸  
 則: プリの好中球の形態学および細胞化学的特徴.  
 水大校研報, 58, 101-111 (2009)
  - 18) 近藤昌和, 高橋幸則: アフリカハイギョ *Protopterus*  
*annectens* 好中球の形態学および細胞化学的特徴.  
 水大校研報, 58, 207-216 (2010)
  - 19) 近藤昌和, 近藤啓太, 高橋幸則: マハタ白血球の形態  
 学および細胞化学的特徴. 水産増殖, 58, 363-371  
 (2010)
  - 20) 近藤昌和, 林 裕之, 高橋幸則: ボラの白血球の形  
 態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, 59, 163-  
 171 (2011)
  - 21) 近藤昌和, 林 裕之, 高橋幸則: メナダの白血球の形  
 態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, 59, 173-  
 182 (2011)
  - 22) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: アカメ好中球の形態  
 学および細胞化学的特徴. 水大校研報, 60, 85-93  
 (2012)
  - 23) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: カレイ類 (マコガレ  
 イ, マツカワ) の好中球の形態学および細胞化学  
 的特徴. 水大校研報, 61, 43-49 (2012)
  - 24) Gill A C and Mooi R D: Phylogeny and Systematics  
 of Fishes. *In*: Hart P J B and Reynolds J D (eds)  
 Handbook of Fish Biology and Fisheries Vol. 1,  
 Blackwell Publishing, Oxford, 15-42 (2002)
  - 25) 矢部 衛: 魚類の多様性と系統分類, 松井正文編 脊  
 椎動物の多様性と系統. 裳華房, 東京, 46-93 (2006)
  - 26) 近藤昌和, 高橋幸則: 病原細菌 *Aeromonas*  
*hydrophila* に感染したコイの好中球の安本小体. 水大  
 校研報, 56, 323-327 (2008)
  - 27) Suzuki Y: Cytochemistry of basophil granulocyte in  
 carp and puffer. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 52, 1895-1899  
 (1986)
  - 28) Hamers R: Granulation staining and cytochemistry of  
 peripheral blood leucocytes in healthy carp (*Cyprinus*  
*carpio* L.) I. Granulocytes. *J Appl Ichthyol*, 11, 86-93  
 (1995)
  - 29) Bielek E: Developmental stages and localization of  
 peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost  
 species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo*  
*gairdneri* Richardson). *Cell Tissue Res*, 220, 163-180  
 (1981)
  - 30) Imagawa, T, Hashimoto Y, Kitagawa H, Kon Y, Kudo  
 N, Sugimura M: Morphology of blood cells in carp  
 (*Cyprinus carpio* L.). *Jpn J Vet Sci*, 56, 1163-1172  
 (1989)
  - 31) Witten PE, Renwranz L, Villwock W: Haematogram  
 of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae,  
 Teleostei) and application of a putative phenoloxidase  
 for differentiating between neutrophilic granulocytes  
 and monocytes. *Can J Zool*, 76, 310-319 (1998)