

## カスザメの非貪食性顆粒球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和<sup>†</sup>, 前川幸平, 安本信哉

### Morphological and Cytochemical Characteristics of Non-phagocytic Granulocytes from Japanese Angelshark *Squatina japonica*

Masakazu Kondo<sup>†</sup>, Kouhei Maekawa and Shinya Yasumoto

**Abstract** : Two types of non-phagocytic granulocytes, type B and C granulocytes were observed in peripheral blood of Japanese angelshark *Squatina japonica* (Squatinidae, Squatiniformes, Squalimorphii, Elasmobranchii). Type B granulocyte (GB) had three types of granules (GBG-A, -B and -C) in the cytoplasm. The GBG-A was coarse, round and consisted of three layers (L0, chromophobic inner; L1, eosinophilic middle; L2, chromophobic outer). The GBG-B had similar shape, size and structure of GBG-A except for the staining character of middle layer (basophilic). The GBG-C was round, small and made up of two layers: Amphophilic inner (L0) and outer (L1) layers. The L1 of GBG-A and/or GBG-B showed positive reaction to toluidine blue (TB), Sudan black B (SBB),  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase ( $\alpha$ -NAE),  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase ( $\alpha$ -NBE) and naphthol AS-D chloroacetate esterase (NASDCAE). On the other hand, in the GBG-C, SBB, acid phosphatase (AcP),  $\alpha$ -NAE and NASDCAE were detected in L0,  $\alpha$ -NBE in L1 and TB in both L0 and L1. Type C granulocyte (GC) had one type of granules (GCG) which show two-layer structure: Eosinophilic inner (L0) and outer (L1) layers. Several enzymes (AcP,  $\alpha$ -NBE, NASDCAE) were detected in L0. Both types of non-phagocytic granulocytes lacked alkaline phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase and peroxidase.

**Key words** : shark, *Squatina japonica*, granulocyte, morphology, cytochemistry

## 緒 言

前報において著者らは、軟骨魚綱板鰓亜綱サメ区に属するカスザメ *Squatina japonica* の好中球の形態学および細胞化学的特徴を明らかにし、既報の板鰓類と比較した<sup>1)</sup>。その結果、カスザメの好中球はアカエイの好中球と顆粒の種類や構造が類似していたが、細胞化学的特徴においては相違が認められた。カスザメの血液中には好中球以外に2種類の顆粒球が観察されるが、貪食能は好中球にのみ認められた<sup>1)</sup>。カスザメにおける好中球以外の貪食能を示さない(非貪食性)顆粒球の形態学および細胞化学的特徴は、アカエイのそれらと大きく異なっていたことから、カスザメの好中球をA型顆粒球とし、2種類の非貪食性顆粒球をB

型およびC型顆粒球としてここに報告する\*。

## 材料および方法

カスザメ2尾(体重: 個体番号1, 4.8 kg; 個体番号2, 2.0 kg)を水産大学の飼育施設に搬入し、1週間馴致飼育したのちに実験に供した。飼育期間中は無給餌とした。採血時の水温は19.0°C(個体番号1)および23.0°C(個体番号2)であった。キナルジンで麻酔後、尾部血管から採血した。血液塗抹標本の作製、多条件下Romanowsky型染色評価法(MRSV; Table 1)および各種細胞化学染色法は前報<sup>1)</sup>にしたがった。

水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

<sup>†</sup>別刷り請求先 (corresponding author): kondom@fish.u.ac.jp

\*本研究の一部は、平成29年度日本魚病学会春季大会(2017年3月11日)において報告した[320: 近藤昌和, 前川幸平, 安本信哉: カスザメの非貪食性顆粒球の形態学的特徴(プログラムおよび講演要旨, 43)]。

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

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

<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.

PN, preparation number.

## 結 果

カスザメの血液中の2種類の非貪食性顆粒球 (B型顆粒球, C型顆粒球) には, アルシアンブルー, オイルレッドOおよびズダンIII染色では陽性所見が観察されず, アルカリ性フォスファターゼ (AIP),  $\beta$ -グルクロニダーゼ ( $\beta$ -Glu) およびペルオキシダーゼ (PO) は検出されなかった。また, periodic acid Schiff (PAS) 反応, ズダン黒B (SBB), 酸性フォスファターゼ (AcP),  $\beta$ -Glu, 各種エステラーゼおよびPO染色後の核染色 (マイヤーのヘマトキシリン染色) にはB型・C型顆粒球のいずれの顆粒も染色されなかった。

### B型顆粒球

B型顆粒球 (granulocyte type B, GB) は長径約20.0  $\mu\text{m}$  の円形または卵円形であった, 核は偏在しており, 染色質網は荒く, 粗大な濃縮染色質が観察された。分葉核は認められなかった (Fig. 1)。B型顆粒球の顆粒 (GB granule, GBG) はいずれも円形または卵円形であったが, 染色性および構造の違いから3種類 (A型, GBG-A; B型, GBG-B; C型, GBG-C) に大別された。GBG-AとGBG-Bはともに長径1.5  $\mu\text{m}$  以下であり, 3層構造を有していた。すなわち, 顆粒の中心部に存在する難染色性の層 (L0), L0を取り囲む好染色性の層 (L1) およびL1の周囲に存在する難染色性の層 (L2) から構成されていた。L1がエオシン好性の顆粒をGBG-Aとし, L1が塩基好性の顆粒をGBG-Bとした。両顆粒のL0は崩壊していない細胞 (intact cell) ではほとんど観察されず, 両顆粒は好染色性層とその周囲の難染色性層からなる2層構造として認められる (Figs. 1A & 1B; この場合の好染色層の大きさは長径0.5  $\mu\text{m}$  以下であった)。しかしながら, 崩壊した細胞 (lysed cell) では顆粒が伸展するため, 難染色性のL0が認識された (Figs. 1C & 1D)。また, MRSVのいくつかの条件では, 崩壊していない細胞においても, いくつかのGBG-AとGBG-Bでは好染色性のL1が顆粒内に拡散することで, L0が認められた (Fig. 1E; Table 2)。GBG-Cは長径0.3  $\mu\text{m}$  以下であり, 染色条件によって顆粒全体がエオシン好性または塩基好性を示し (両染色, amphophilic; Figs. 1A-1D; Table 2), 成層構造は確認できなかった。しかし, 後述するように各種細胞化学染色の結果から, 本顆粒は2層構造 [顆粒の中心部に存在する層 (L0) とL0を囲む層 (L1)] を有していた。

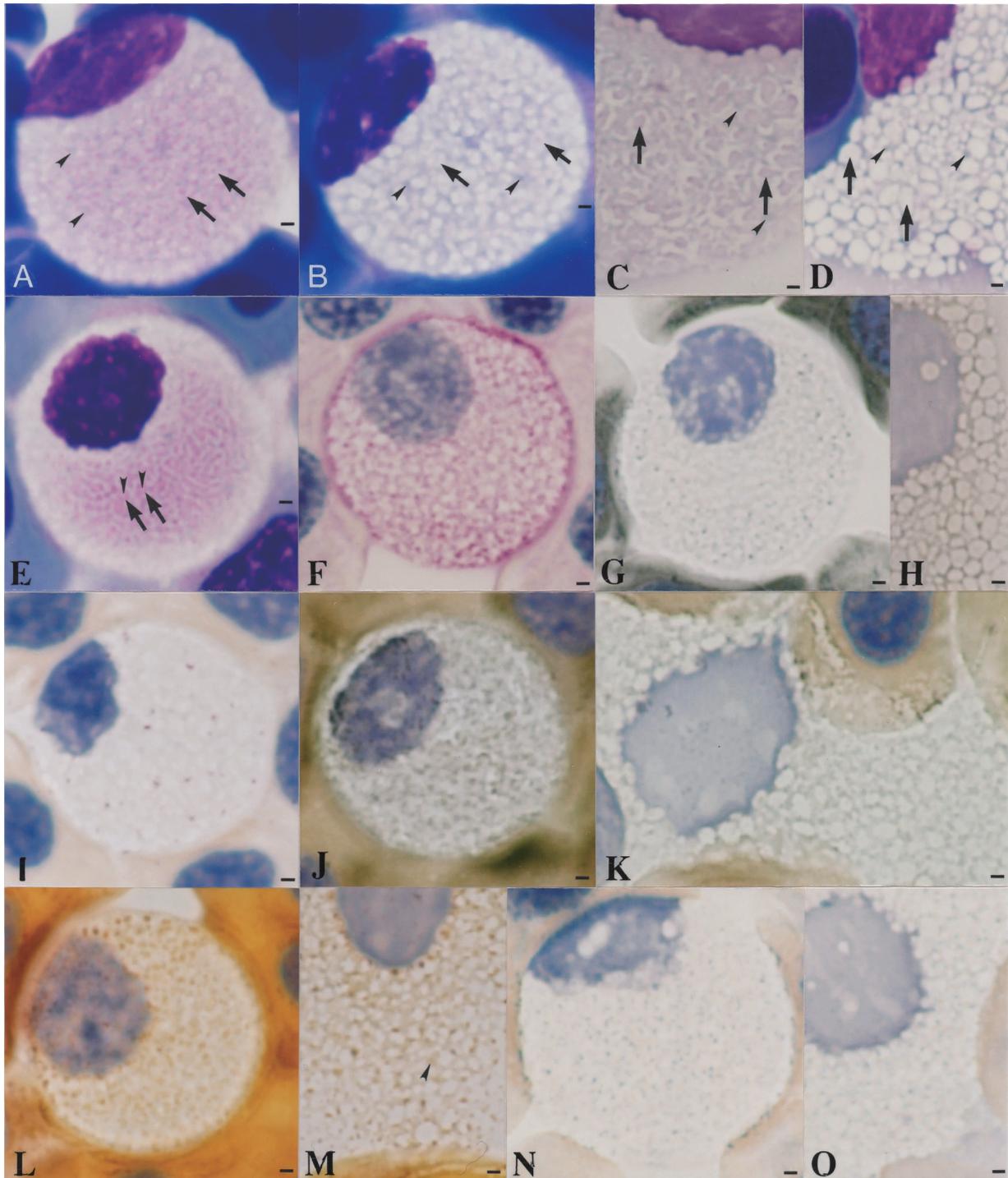
B型顆粒球にはPAS反応によって多数の陽性顆粒が観察され, 細胞質基質も陽性であったが (Fig. 1F; Table 4),

$\alpha$ -アミラーゼ消化によって陽性反応は顆粒, 細胞質基質ともに完全に消失した。トルイジンブルー (TB) 染色によって粒子状の陽性部位が多数観察された。TB陽性粒子の周囲に陰性領域が存在するものと同領域が認められない陽性粒子が存在した。陽性粒子を含む陰性領域の大きさは, 同領域を持たない陽性粒子よりも大型であった。また, 崩壊した細胞では, 指輪状のTB陽性部位と粒子状の陽性部位が観察され, 前者の内外には陰性領域が見られた。SBB染色においてもTB染色と同様に粒子状の陽性部位が多数観察されたが, いずれの陽性粒子もその周囲に陰性領域が認められた (Fig. 1G)。また, 崩壊した細胞では, 指輪状の陽性部位と粒子状の陽性部位が観察され, 前者の内外と後者の外周に陰性領域が認められた (Fig. 1H)。細胞の崩壊の有無にかかわらず, AcP陽性粒子の周囲には狭い陰性領域が存在した (Fig. 1I)。 $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ ( $\alpha$ -NAE) と ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (NASDCAE) 陽性部位はSBB陽性部位と一致した (Figs. 1J, 1K, 1N, 1O)。しかし,  $\alpha$ -ナフチルプチレートエステラーゼ ( $\alpha$ -NBE) 染色では, SBB,  $\alpha$ -NAEおよびNASDCAEと同様の陽性部位のほか, 外側に陰性領域を持たない小型で指輪状の陽性像も少数観察された (Figs. 1L & 1M)。

### C型顆粒球

本顆粒球 (granulocyte type C, GC) は長径約18.0  $\mu\text{m}$  の円形または卵円形であり, 他の顆粒球に比べて血液中に少なく小型であった。核は偏在し, 様々な形態 (円形から3分葉) を示した。核の染色質網は荒く, 粗大な濃縮染色質が観察された。細胞質には1種類の顆粒 (GC granule, GCG) が認められた。本顆粒は長径0.8  $\mu\text{m}$  以下の円形または卵円形であり, ともにエオシン好性の2層構造を有していた [顆粒の中心部に存在する層 (L0) とL0を囲む層 (L1)]。染色条件によって, 外周に難染色性領域 (L1に相当) を有するエオシン好性粒子 (L0に相当) または, 内側に粒子状の難染色性領域 (L0に相当) を含む指輪状のエオシン好性粒子 (L1に相当) として観察された (Fig. 2A & 2B; Table 3)。L0とL1がともにエオシン好性を示す条件は認められなかった。

PAS反応によって多数の陽性粒子が観察され, 細胞質基質も弱陽性であったが,  $\alpha$ -アミラーゼ消化によっていずれの部位においても陽性反応は消失した (Fig. 2C; Table 4)。TB染色とSBB染色では細胞質は陰性であり,  $\alpha$ -NAEは検



**Fig. 1.** Type B granulocytes of Japanese angel shark. A, Giemsa (PN=27); B, May-Grünwald-Giemsa (MGG; PN=79); C, Giemsa (PN=26); D, MGG (PN=79); E, Giemsa (PN=11). A, B & E, intact cell; C & D, lysed cell. This granulocyte had three types of granules (granule of type B granulocyte, GBG): GBG type A [GBG-A; arrows in A; consist of eosinophilic core (correspond to eosinophilic middle layer, L1) and chromophobic surrounding (correspond to outer layer, L2)], GBG type B [GBG-B; arrows in B; consist of basophilic core (correspond to basophilic middle layer, L1) and chromophobic surrounding (correspond to outer layer, L2)] and GBG type C [GBG-C; arrowheads in A-D; amphophilic inner layer (L0) and outer layer (L1)]. The ratio between GBG-A and GBG-B in each cell is various. The core of both GBG-A and GBG-B is made up of chromophobic inner layer (L0) and chromatophilic layer (L1). In the lysed cells, inner layer (arrows in C & D) is visible because of extension of granules. Under several staining conditions, components of chromatophilic layer diffuses in GBG-A and GBG-B even though in intact cell (arrows in E). As the result, chromatophilic inner layer (arrowheads in E) is visible. F, periodic acid Schiff reaction (All positive sites disappeared after  $\alpha$ -amylase digestion); G & H, Sudan black B (G, intact cell; H, lysed cell. L1 of GBG-A and/or GBG-B (weakly) and L0 of GBG-C (strongly) are positive); I, acid phosphatase (L0 of GBG-C are positive); J & K,  $\alpha$ -naphtyl acetate esterase (J, intact cell; K, lysed cell); L & M,  $\alpha$ -naphtyl butyrate esterase ( $\alpha$ -NBE; L, intact cell; M, lysed cell); N & O, naphthol AS-D chloroacetate esterase (N, intact cell; O, lysed cell). These esterase activities are detected in L1 of GBG-A and/or GBG-B (weakly) and L0 of BG-C (strongly)). Alpha-NBE activity is also observed in L1 of a few GBG-C (L0 is negative in these GBG-C; arrowhead in M). PN, preparation number (See Table 1). Bars=1  $\mu$ m.

**Table 2.** Summary of multiple Romanowsky-type staining characteristics of the granules (A, eosinophilic middle layer (L1) of GBG-A; B, basophilic middle layer (L1) of GBG-B; C, entire GBG-C) in intact type B granulocyte from Japanese angelshark

PN	Color and Number			PN	Color and Number			PN	Color and Number		
	A	B	C		A	B	C		A	B	C
1	—	B3	D3	28	R (0-1)	B (1-3)	B3	55	R (0-3)*	B3*	D3
2	—	B3	D3	29	R (0-1)	B3	B3	56	R (0-1)	B3*	B3
3	—	B3	D3	30	R (1-3)	B (0-1)	B3	57	R (0-1)	B3*	B3
4	—	B3	D3	31	R3	B (0-1)	D3	58	R (2-3)*	B (1-2)	D3
5	—	B3	D3	32	R (0-1)	B3	B3	59	R (2-3)*	B (1-2)	D3
6	—	B3	O3	33	R (0-1)	B3	B3	60	R (0-1)	B3*	B3
7	—	B3	B3	34	R (0-3)	B (1-3)	B3	61	R (0-3)*	B (2-3)	B3
8	—	B3	B3	35	R (2-3)	B (0-3)	D3	62	R (0-2)*	B3*	D3
9	—	B3	B3	36	R (0-1)	B3	B3	63	R (2-3)*	B (0-1)	D3
10	R (0-3)	B (0-1)	D3	37	R (0-1)	B3	B3	64	R (0-1)	B3*	B3
11	R3*	B (0-1)	D3	38	R (1-2)	B (2-3)	D3	65	R (0-3)	B (2-3)	D3
12	R (0-1)	B (0-3)	D3	39	R3*	B (0-2)	D3	66	R (0-1)	B3	B3
13	R (0-1)	B (1-3)	D3	40	R (0-1)	B3	B3	67	R (0-1)	B3	D3
14	R (0-1)	B (1-3)	B3	41	R (0-1)	B3	D3	68	O (0-1)	B (1-3)	B3
15	R (0-1)	B (1-3)	D3	42	R (0-1)	B (2-3)*	D3	69	O (0-1)	B (1-3)	B3
16	R (0-1)	B (0-3)*	B3	43	R (1-3)*	B (2-3)*	D3	70	R (0-1)	B3	D3
17	R (0-2)	B (0-3)*	B3	44	R (0-1)	B3	B3	71	R (0-1)	B3	D3
18	R (1-3)	B (0-3)	D3	45	R (0-1)	B3	D3	72	R (0-1)	B3	B3
19	R3*	B (0-3)	D3	46	R3	B (1-2)	D3	73	R (0-1)	B3	B3
20	R (0-1)	B (1-3)*	B3	47	R3	B (1-2)	D3	74	R (0-1)	B3	D3
21	R (0-1)	B (1-3)*	B3	48	R (0-1)	B3	D3	75	R (0-1)	B (2-3)	D3
22	R3*	B (0-3)	D3	49	R (0-3)	B (0-3)	D3	76	R (0-1)	B3	B3
23	R3*	B (1-3)	D3	50	R (0-2)	B (2-3)	B3	77	R (0-1)	B3	D3
24	R (0-2)	B (1-3)	B3	51	R (0-2)	B (2-3)	D3	78	R (0-1)	B3	D3
25	R (0-1)	B (1-3)	B3	52	O (0-1)	B3*	B3	79	R (0-1)	B3	D3
26	R (0-3)	B (1-3)*	D3	53	O (0-1)	B3*	D3	80	R (0-1)	B3	B3
27	R (1-3)	B (0-1)	D3	54	R (0-2)*	B (2-3)	B3	81	R (0-1)	B3	D3

PN, preparation number (See Table 1).

Color: B, light blue (basophilic); D, dark blue (basophilic); O, orange (eosinophilic); R, red (eosinophilic); —, not stained (=not observed).

Number: 3, many; 2, some; 1, a few; 0, not observed.

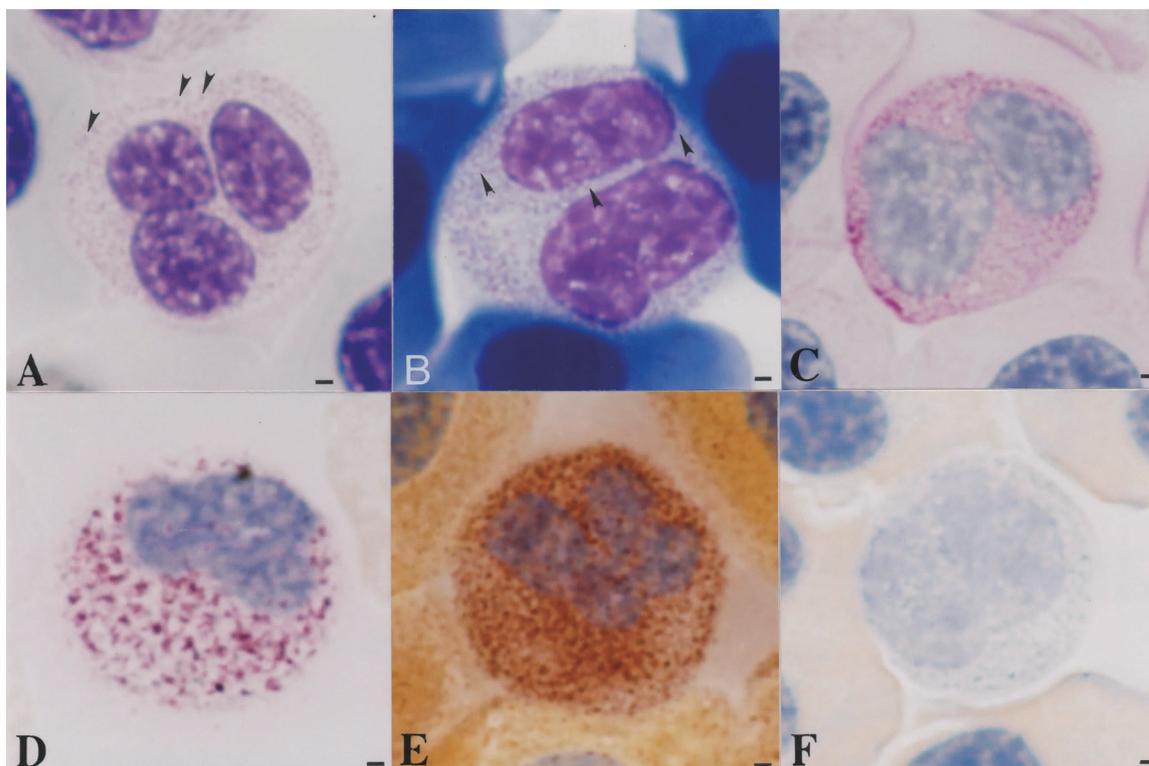
\*Diffusion of the chromatophilic components of middle layer.

出されなかった。AcP,  $\alpha$ -NBEおよびNASDCAEがGCGに認められ、これら酵素活性は外周に陰性領域をとまう粒子状の陽性部位として観察された (Figs. 2D-2F; Table 4)。

## 考 察

カスザメには2種類の非貪食性顆粒球 (B型顆粒球, C型顆粒球) が認められた。両顆粒球ともに顆粒は成層構造を有しており, B型顆粒球では3層構造を示す2種類の顆粒 (GBG-AとGBG-B) と2層構造の顆粒 (GBG-C) が, C型顆粒球には2層構造の顆粒 (GCG) のみが観察された。GBG-AとGBG-Bは大きさで構造がともに類似し, 唯一,

好染色性層 (L1) の染色性のみが異なること, GBG-AとGBG-Bの存在比率はB型顆粒球間で様々であることから, 両顆粒の細胞化学染色特性の違いは断言できないが, GBG-Aおよび (または) GBG-BのL1にTB陽性物質, SBB陽性物質, 各種エステラーゼが存在すると考えられた。GBG-Cは顆粒全体 (L0とL1) がTB陽性であり, L0にはSBB陽性物質,  $\alpha$ -NAEおよびNASDCAEが検出された。また,  $\alpha$ -NBEの局在性の違いから, GBG-CはL0が $\alpha$ -NBE陽性の顆粒とL1が陽性の顆粒に細分された。さらに, GBG-CはAcPをL0に有する顆粒とAcP陰性の顆粒に区別された。C型顆粒球の顆粒 (GCG) では, L0にAcP,  $\alpha$ -NBEおよびNASDCAEが局在すると考えられた。B型およびC



**Fig. 2.** Type C granulocytes of Japanese angelshark. A, Giemsa (PN=17); B, May-Grünwald-Giemsa (PN=60). The granules of this granulocyte (granule of type C granulocyte, GCG) consist of eosinophilic inner layer (L0; arrowheads in A) and eosinophilic outer layer (L1; arrowheads in B). C, periodic acid Schiff reaction (All positive sites disappeared after  $\alpha$ -amylase digestion); D, acid phosphatase; E,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; F, naphthol AS-D chloroacetate esterase. These enzyme activities are detected in the L0 of GCG. PN, preparation number (See Table 1). Bars=1  $\mu$ m.

**Table 3.** Summary of multiple Romanowsky-type staining characteristics of the granules (GCG) composed of eosinophilic inner (L0) and outer layer (L1) in type C granulocyte from Japanese angelshark

PN	Color		PN	Color		PN	Color	
	L0	L1		L0	L1		L0	L1
1-9	R	—	28-33	O	—	54-65	—	O
10	—	O	34, 35	—	O	66-69	O	—
11-17	O	—	36, 37	O	—	70, 71	—	O
18, 19	—	O	38-43	—	O	72, 73	O	—
20	O	—	44	O	—	74, 75	—	O
21	—	O	45	—	O	76	O	—
22	O	—	46	—	O	77-81	—	O
23-27	—	O	47-53	O	—			

PN, preparation number (See Table 1).

Color: O, orange (eosinophilic); R, red (eosinophilic); —, not stained.

**Table 4.** Summary of reactions of Japanese angelshark granulocytes to cytochemical tests

Test <sup>1,2</sup>	Type A granulocyte (Neutrophil) <sup>4</sup>	Positive site (shape, number and positive site) <sup>3</sup>	Type B granulocyte	Type C granulocyte
PAS	G (r or o with or without negative surrounding, many); H		G (r or o, many); H	G (r or o, many); H
PAS- $\alpha$ A	G (r or o with negative surrounding, some, eq L0 of NG-B around nucleus)		—	—
TB	N	G (two types: r or o in intact cell (ring in lysed cell) with negative surrounding, many, eq L1 of BG-A and/or BG-B; r or o, many, eq entire GBG-C); N		N
SBB	G (long-spindle with negative surrounding, many, eq L0 and L1 of NG-A)	G (two types: r or o in intact cell (ring in lysed cell) with negative surrounding, many, eq L1 of GBG-A and/or GBG-B; r or o with negative surrounding, many, eq L0 of GBG-C)		—
AcP	G [three types: r or o with negative surrounding, many, eq L0 of NG-B; r or o with negative core, many, eq L1 of NG-B; r or o consist of positive core (strongly) and surrounding, eq entity NG-B around nucleus]	G (r or o with negative surrounding, some, eq L0 of GBG-C)		G (r or o with negative surrounding, many, eq L0 of GCG)
$\alpha$ -NAE	G (r or o with negative surrounding, many, eq L0 of NG-B)	G (two types: r or o in intact cell (ring in lysed cell) with negative surrounding, many, eq L1 of GBG-A and/or GBG-B; r or o with negative surrounding, many, eq L0 of GBG-C)		—
$\alpha$ -NBE	G (r or o with negative surrounding, many, eq L0 of NG-B)	G (three types: r or o in intact cell (ring in lysed cell) with negative surrounding, many, eq L1 of GBG-A and/or GBG-B; r or o with negative surrounding, many, eq L0 of BG-C; ring with negative core, a few, eq L1 of GBG-C)		G (r or o with negative surrounding, many, eq L0 of GCG)
CAE	G (two types: r or o with negative surrounding, many, eq L0 of NG-B; long-spindle with negative surrounding, many, eq L0 and L1 of NG-A)	G (two types: r or o in intact cell (ring in lysed cell) with negative surrounding, many, eq L1 of GBG-A and/or GBG-B; r or o with negative surrounding, many, eq L0 of GBG-C)		G (r or o with negative surrounding, many, eq L0 of GCG)

<sup>1</sup>PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS- $\alpha$ A, PAS after digestion with  $\alpha$ -amylase; TB, toluidine blue in distilled water; SBB, Sudan black B; AcP, Sudan black B; AcP, acid phosphatase;  $\alpha$ -NAE,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase;  $\alpha$ -NBE,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase.

<sup>2</sup>All types of granulocytes showed negative reaction to other tests (alcian blue (pH1.0, pH2.5), oil red O, Sudan III, alkaline phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase, peroxidase).

<sup>3</sup>G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; —, not detected; r, round; o, oval; eq, equivalent to; NG-A, neutrophil granule type A with three-layer structure [L0 (inner, eosinophilic), L1 (middle, eosinophilic) and L2 (outer, basophilic)]; NG-B, neutrophil granule type B with two-layer structure [L0 (inner, chromophobic) and L1 (outer, chromophobic)]; GBG-A, type A granule of granulocyte type B with three-layer structure [L0 (inner, chromophobic), L1 (middle, eosinophilic) and L2 (outer, chromophobic)]; GBG-B, type B granule of granulocyte type B with three-layer structure [L0 (inner, chromophobic), L1 (middle, basophilic) and L2 (outer, chromophobic)]; GBG-C, type C granule of granulocyte type B with two-layer structure [L0 (inner, amphiphilic) and L1 (outer, amphiphilic)]; GCG, granule of granulocyte type C with two-layer structure [L0 (inner, eosinophilic) and L1 (outer, eosinophilic)].

<sup>4</sup>Kondo et al.<sup>1)</sup>

型顆粒球にはPAS陽性顆粒が観察されたが、 $\alpha$ -アミラーゼ消化により陽性顆粒は認められなくなることから、PAS陽性顆粒はグリコーゲン粒子が集積したものと考えられる。

アカエイには3種類の非貪食性顆粒球(好塩基球, 好酸球, 小型好酸性顆粒球)が存在し、好塩基球には成層構造が認められていない染色性が異なる4種類の顆粒が、好酸球には成層構造(3層)を有する顆粒と同構造を持たない顆粒の2種類が、小型好酸性顆粒球には成層構造が認められていない2種類の顆粒が報告されている<sup>3,4)</sup>。これらの顆粒球のいずれにもTB, SBB, AcP, 各種エステラーゼ染色によって顆粒状の陽性部位が観察されており<sup>3)</sup>、カスザメのB型顆粒球においても同様であることから、B型顆粒球がアカエイの非貪食性顆粒球のいずれに相当するの判断することは困難である。しかし、顆粒の大きさと構造を比較すると、カスザメのB型顆粒球のGBG-AとGBG-Bは、アカエイ好酸球の成層顆粒(EG-A)と類似していると思われる。すなわち、EG-Aは難染色性のL0の周囲に好染色性(EG-Aではエオシン好性)のL1が存在し、その周囲に難染色性のL2が認められている<sup>4)</sup>。この構造はGBG-AとGBG-Bと同じである。アカエイ好酸球には塩基好性の顆粒は観察されていないが<sup>3)</sup>、アカエイには好塩基球が存在する。一方、カスザメには好塩基球と称することが適切な顆粒球は認められないが、B型顆粒球のGBG-Bの好染色性層(L1)は塩基好性であった。これらのことから、カスザメのB型顆粒球は、アカエイにおける好酸球と好塩基球の両方の機能を併せ持った顆粒球ではないかと推察される。この推察が正しければ、カスザメのC型顆粒球はアカエイの小型好酸性顆粒球に相当すると予想されるが、C型顆粒球には1種類の成層顆粒しか認められず(小型好酸性顆粒球では成層構造を持たない2種類の顆粒)、TB, SBBおよび $\alpha$ -NAEは陰性であった(小型好酸性顆粒球では陽性)。しかし、C型顆粒球の顆粒のL0に検出されるAcP,  $\alpha$ -NBE およびNASDCAEは、小型好酸性顆粒球では、2種類ある顆粒のうち難染色性顆粒(SEG-B)に局在し、エオシン好性顆粒(SEG-A)には認められていない<sup>3)</sup>。これらのことから、C型顆粒球の顆粒とは小型好酸性顆粒球のSEG-Bの内容物の周囲にSEG-Aの成分が付加され成層構造となり、さらにSEG-Bの内容物からなる領域にもエオシン好性成分が含まれるようになった顆粒であると推察される。

アカエイでは、2種類存在する好中球顆粒のうち、エオシン好性領域を有する成層顆粒(NG-A)において、エオシン好性のL1がヘマトキシリンによって青染される(エ

オシン好性のL0は陰性)。また、好酸球と小型好酸性顆粒球それぞれのエオシン好性領域を有する顆粒においても(好酸球のEG-AのL1, 小型好酸性顆粒球のSEG-A), 同領域はヘマトキシリンによって青染される<sup>2,4)</sup>。しかし、カスザメにおいては好中球を含むいずれの顆粒球においてもヘマトキシリン陽性顆粒は観察されなかった<sup>1)</sup>。

Hine and Wain (1987)はカスザメ目が含まれるグループ(ツノザメ上目)に属するツノザメ目のサメ類6科10種について血液中の顆粒球を観察し、eosinophil, eosinophilic granulocyteおよびneutrophilic granulocyteの3種類に分類している<sup>5)</sup>。前報<sup>1)</sup>に記したように、現在の分類基準ではeosinophilic granulocyteが好中球に相当すると考えられる。Hine and Wain (1987)のneutrophilic granulocyteの顆粒は球形で、塩基好性から紫色(purple)を示すとされているが<sup>5)</sup>、カスザメの血液中には同様の顆粒を有する顆粒球は認められなかった。Hine and Wain (1987)では、eosinophilは粗大なエオシン好性顆粒を有するとされ<sup>5)</sup>、前記のツノザメ目サメ類のうち、アイザメ科のヘラツノザメ *Deania calcea*とモミジザメ *Centrophorus squamosus*にのみ血液中にeosinophilが認められるとされている<sup>5)</sup>。しかし、本文中にはモミジザメに関する詳細な記述はなく、ヘラツノザメについては簡単な記述はあるものの<sup>5)</sup>、顕微鏡像が示されていないことから、カスザメの顆粒球との比較はできない。Hine and Wain (1987)は前述の10種のツノザメ目サメ類のうち5種について、顆粒球を電子顕微鏡で観察し(観察に用いた臓器は魚種によって様々である)、3種類の顆粒球(type DA cell, type DB cell, type DC cell)を認めている<sup>5)</sup>。電子顕微鏡観察に用いた5種のツノザメ目サメ類のうち、血液中にeosinophilが認められなかった *Etmopterus baxteri*(カラスザメ科)のライディッヒ器官Leydig's organ(造血組織)にeosinophilが観察され、その構造に関する詳細な記述が顕微鏡像とともに示されている<sup>5)</sup>。同種(*E. baxteri*)のeosinophil(type DC cell)の顆粒は大型卵型で、均一な電子密度を有するとされており<sup>5)</sup>、カスザメの非貪食性顆粒に認められた成層構造は観察されていない。しかし、ライディッヒ器官のスタンプ標本の染色像<sup>5)</sup>はカスザメのB型顆粒球に類似し、顆粒内に濃淡が見られ、いくつかの顆粒では顆粒内に指輪状の暗部が認められる。したがって、カスザメのB型顆粒球と *E. baxteri*のeosinophilは同系統の細胞であり、後者においても3層からなる成層構造を有する顆粒を持つのではないかと考えられる。

同じ著者による板鰐類の血液中に存在する顆粒球の細胞化学的染色特性に関する報告では、ツノザメ目サメ類（ヘラツノザメとモミジザメ）のeosinophilには兩種ともにAcPと $\alpha$ -NAEは検出されるが、NASDCAEは陰性とされている<sup>6)</sup>。また、eosinophilのAcP活性は顆粒と顆粒の間隙にあり、顆粒を縁取るように陽性反応が認められ、 $\alpha$ -NAEは顆粒と顆粒の間隙に検出される<sup>6)</sup>。一方、カスザメのB型顆粒球にはAcPと $\alpha$ -NAEとともにNASDCAEも認められ、AcP活性は粒子状の陽性部位を示し、ツノザメ目サメ類のeosinophilとは異なる。しかし、eosinophilの顆粒と顆粒の間隙に検出される $\alpha$ -NAEは、ヘラツノザメのeosinophilの染色像<sup>6)</sup>では粒子状に見える。このことは、ツノザメ目サメ類のeosinophilには粗大な顆粒のほかに、カスザメのB型顆粒球のGBG-Cのような小型の顆粒が存在することを示唆していると思われる。

の好中球顆粒と好酸球顆粒の構造について。水大校研報, **66**, 195-197 (2018) [Kondo M, Higashikawa S, Yasumoto S, Takahashi Y: On the structure of neutrophil granules and eosinophil granules from whip stingray *Dasyatis akajei*. *J Nat Fish Univ*, **66**, 195-197 (2018) (in Japanese with English abstract)]

- 5) Hine PM, Wain JM: Composition and ultrastructure of elasmobranch granulocytes. I. Dogfishes (Squaliformes). *J Fish Biol*, **30**, 547-556 (1987)
- 6) Hine PM, Wain JM: The enzyme cytochemistry and composition of elasmobranch granulocytes. *J Fish Biol*, **30**, 465-475 (1987)

## 文 献

- 1) 近藤昌和, 前川幸平, 安本信哉: カスザメの好中球の形態学および細胞化学的特徴。水大校研報, **66**, 123-129 (2018) [Kondo M, Maekawa K, Yasumoto S: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from Japanese angelshark *Squatina japonica*. *J Nat Fish Univ*, **66**, 123-129 (2018) (in Japanese with English abstract)]
- 2) 近藤昌和, 東川将基, 平山尋暉, 安本信哉, 高橋幸則: アカエイの好中球の形態学および細胞化学的特徴。水大校研報, **65**, 189-194 (2017) [Kondo M, Higashikawa S, Hirayama H, Yasumoto S, Takahashi Y: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from whip stingray *Dasyatis akajei*. *J Nat Fish Univ*, **65**, 189-194 (2017) (in Japanese with English abstract)]
- 3) 近藤昌和, 東川将基, 平山尋暉, 安本信哉, 高橋幸則: アカエイの非貪食性顆粒球の形態学および細胞化学的特徴。水大校研報, **65**, 195-201 (2017) [Kondo M, Higashikawa S, Hirayama H, Yasumoto S, Takahashi Y: Morphological and cytochemical characteristics of non-phagocytic granulocytes from whip stingray *Dasyatis akajei*. *J Nat Fish Univ*, **65**, 195-201 (2017) (in Japanese with English abstract)]
- 4) 近藤昌和, 東川将基, 安本信哉, 高橋幸則: アカエイ