

ドチザメ科サメ類（ドチザメ，ホシザメ，シロザメ）の好中球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和[†]，立石航平，平山尋暉，安本信哉，高橋幸則

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophils from Triakidae Sharks (Banded Houndshark *Triakis scyllium*, Starspotted Smooth-hound *Mustelus manazo* and Spotless Smooth-hound *M. griseus*)

Masakazu Kondo[†], Kohei Tateishi, Hiroki Hirayama, Shinya Yasumoto and Yukinori Takahashi

Abstract : Two types of granulocytes were observed in peripheral blood of three species (banded houndshark *Triakis scyllium*, starspotted smooth-hound *Mustelus manazo* and spotless smooth-hound *M. griseus*) of Triakidae sharks (Carcharhiniformes, Galeomorphii, Elasmobranchii). The neutrophil of each shark was the only phagocytic granulocyte and had two types of granules (neutrophil granule, NG; type A, NG-A; type B, NG-B) with stratified structure. The NG-A was consisted of three layers: chromophobic inner layer (L0), eosinophilic middle layer (L1) with chromophobic outer layer (L2). A round eosinophilic particle was observed in L1 of some NG-A. The NG-B was round or oval, and both inner (L0) and outer (L1) layers of this granule was chromophobic. Several lysosomal enzymes were detected in L0 of NG-B. The L0 of *T. scyllium* NG-B was β -glucuronidase (β -Glu) positive, but acid phosphatase (AcP) negative. Conversely, the L0 of NG-B from *M. manazo* and *M. griseus* was β -Glu negative (AcP positive). The L2 of NG-A also alpha-naphthyl acetate esterase positive. The neutrophils lacked alkaline phosphatase and peroxidase. In this report, morphological and cytochemical similarities of neutrophils among elasmobranchs were discussed.

Key words : shark, *Triakis scyllium*, *Mustelus manazo*, *Mustelus griseus*, granulocyte, morphology, cytochemistry

緒 言

著者らは前報までに軟骨魚綱板鰐類のアカエイ *Dasyatis akajei* (トビエイ目アカエイ科) とカスザメ *Squatina japonica* (ツノザメ上目カスザメ目カスザメ科) について、好中球の形態学および細胞化学的特性を報告した¹⁻³⁾。アカエイには4種類の、カスザメでは3種類の顆粒球が観察されたが、両魚種において貪食能を有する顆粒球は好中球のみであった^{1,3,5)}。両魚種ともに好中球には2種類 (A型とB型) の顆粒 (好中球顆粒 neutrophil granule, NG; A型, NG-A; B型, NG-B) が存在し、両顆粒ともに成層構造を有していた。NG-Aは3層からなり、両魚種ともに顆粒の中心を取り囲む

層 (L0) はエオシン好性であり、L0の周囲の層 (L1) もエオシン好性であるのに対して、L1を覆う層 (L2) は、アカエイでは難染色性を^{1,2)}、カスザメでは塩基好性を示した³⁾。NG-Bは両魚種ともに2層からなり、いずれの層も難染色性であった。また、NG-Bには各種リゾソーム酵素が検出されたが、それらの局在様式には違いが認められた^{1,3)}。

板鰐類はエイ区とサメ区に大別され、後者はネズミザメ上目とツノザメ上目に二分される¹⁾。本研究では、板鰐類における好中球形態の多様性を明らかにする研究の一環として、ネズミザメ上目 Galeomorphii 目 ジロザメ目 Carcharhiniformes ドチザメ科 Triakidae に属するドチザメ *Triakis scyllium*、ホシザメ *Mustelus manazo* およびシロザメ *M.*

*griseus*について, 好中球の形態学および細胞化学的特性を報告する^{*1}。

材料および方法

響灘で刺網によって捕獲されたドチザメ3尾(体重: No. 1, 2.2 kg; No. 2, 7.0 kg; No. 3, 4.0 kg) とホシザメ3尾(体重: No. 1, 420 g; No. 2, 960 g; No. 3, 2.5 kg) およびシロザメ1尾(体重: 1.3 kg) を水産大学の飼育施設に搬入し, 流水条件で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。採血時の水温はドチザメでは20.5°C (No. 1, No. 2) および22.0°C (No. 3), ホシザメでは18.0°C (No. 1, No. 2) および22.0°C, シロザメでは19.5°C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), 各種細胞化学染色およびパン酵母の細胞壁由来のzymosan粒子に対する貪食試験は前報^{1,3)}と同様の方法で行った。

結 果

いずれのドチザメ科サメ類の血液中でも2種類の顆粒球が観察されたが, zymosan粒子に対する貪食は好中球のみ認められた。好中球は類円形であり, 細胞体の大きさは様々であった(長径約10-20 μm)。細胞内顆粒(後述するA型顆粒)の形状も多様であったが(円形, 卵円形, 桿状, 紡錘形), 一般に小型の好中球では小型の, 大型の好中球では大型の円形または卵円形であり, 中型の好中球では桿状または紡錘形であった。また, 円形または卵円形顆粒と桿状または紡錘形顆粒が混在する好中球も認められた。核の染色質網は粗く, 大型の濃縮染色質が散在していた。核は偏在し, 核の輪郭に凹凸が顕著であった。通常単核であったが, 分葉核(最大3分葉)も認められた。ドチザメ (Fig. 1), ホシザメ (Fig. 2) およびシロザメ (Fig. 3) のいずれにおいても好中球の細胞質には2種類の顆粒(好中球顆粒neutrophil granule, NG)が観察された (Figs. 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B)。好中球顆粒のうち, 顆粒内にエオシン好性の芯様構造を有するA型顆粒 (NG-A) は3層からなる成層構造を有していた。エオシン好性の芯様構造は, 顆粒

の中心を囲む層 (L0) と, L0を囲むL1から構成されており, L0はいずれの条件のRomanowsky型染色標本においても難染色性であった。また, L1はエオシン好性を示したが, 染色条件によっては難染色性であった (Table 2)。L1の周囲には難染色性を示すL2が観察された (Figs. 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B)。いずれのドチザメ科サメ類においても, いくつかのNG-AのL1にエオシン強陽性で円形の粒子状構造物 (inner granular eosinophilic particle; IGEP) が1つ観察された (Figs. 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B)。類円形のB型顆粒 (NG-B) は, いずれの条件のRomanowsky型染色標本においても難染色性であった。Romanowsky型染色標本では識別できないが, 各種細胞化学染色の結果, NG-Bには2層からなる成層構造が認められた(顆粒の中心を囲むL0とその周囲のL1)。好中球に貪食されたzymosan粒子はしばしば淡橙色を呈した (Figs. 1C, 2C, 3C)。

ドチザメではNG-BのL0に β -グルクロニダーゼ (β -Glu) 活性が検出されたが (Fig. 1D), ホシザメとシロザメでは β -Gluは認められなかった (Table 3)。しかし, ドチザメでは陰性の酸性フォスファターゼ (AcP) がホシザメとシロザメにおいてNG-BのL0に局在した (Figs. 2D, 3D)。いずれのドチザメ科サメ類においても, α -ナフチルアセテートエステラーゼ (α -NAE), α -ナフチルブチレートエステラーゼ (α -NBE), およびナフトールAS-DクロロアセテートエステラーゼがNG-BのL0に認められた (Figs. 1E-1G, 2E-2G, 3E-3G)。なお, α -NAE活性はNG-AのL2にも検出された (Figs. 1E, 2E, 3E)。好中球には円形または卵円形のperiodic acid Schiff (PAS) 反応陽性顆粒が少数観察され, 細胞質基質も弱陽性を示したが (Figs. 1H, 2H, 3H), これらの陽性部位は α -アミラーゼ処理によって完全に消失した (Table 3)。

好中球にはアルシアンブルー, オイルレッドO, ズダンIIIおよびズダン黒B (SBB) 染色では陽性所見は観察されなかった。また, アルカリ性フォスファターゼとペルオキシダーゼは検出されなかった。また, アカエイの好中球に観察されている好塩基性の不定形小体 (Y小体)¹⁾は認められなかった。

NG-AのL1およびIGEPは, いずれの魚種においても β -Glu, 各種エステラーゼおよびSBB染色後の核染色 (マイヤーのヘマトキシリン染色) に陽性反応を示したが,

*1本研究の一部は, 平成30年度日本魚病学会春季大会[2018年 3月 3日; 317: 近藤昌和, 立石航平, 平山尋暉, 安本信哉, 高橋幸則: ドチザメとホシザメの好中球の形態学的特徴 (プログラムおよび講演要旨, 43)]および同秋季大会[2018年 9月13日; 307: 近藤昌和, 安本信哉: シロザメの好中球の形態学的特徴 (プログラムおよび講演要旨, 16)]において報告した。

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

PN	Condition ^{1,2}	PN	Condition ^{1,2}
1	MG : DW	42	G : $1/150$ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min
2	: 5 mM PB, pH5.0	43	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min
3	: 5 mM PB, pH6.0	44	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min
4	: 5 mM PB, pH7.0	45	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min
5	: 5 mM PB, pH8.0	46	MGG : DW, 1:20, 15 min
6	: $1/15$ M PB, pH5.0	47	: DW, 1:20, 60 min
7	: $1/15$ M PB, pH6.0	48	: DW, 1:100, 15 min
8	: $1/15$ M PB, pH7.0	49	: DW, 1:100, 60 min
9	: $1/15$ 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	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 15min
26	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	67	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min
27	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	68	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min
28	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	69	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min
29	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	70	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:20, 15 min
30	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	71	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:20, 60 min
31	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	72	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min
32	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	73	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min
33	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	74	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 15min
34	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:20, 15min	75	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 60min
35	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:20, 60min	76	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min
36	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	77	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min
37	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	78	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min
38	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	79	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min
39	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	80	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min
40	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	81	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min
41	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min		

¹MG, 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.

²Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or $1/150$ M PB.

PN, preparation number.

Table 2. Summary of multiple Romanowsky-type stain characteristics of L1 of NG-A from Triakidae sharks neutrophils

PN	Species ¹ and color of L1 ²			PN	Species ¹ and color of L1 ²			PN	Species ¹ and color of L1 ²		
	<i>Ts</i>	<i>Mm</i>	<i>Mg</i>		<i>Ts</i>	<i>Mm</i>	<i>Mg</i>		<i>Ts</i>	<i>Mm</i>	<i>Mg</i>
1	E	E	E	28	E	E	E	55	E	E	E
2	E	E	E	29	—	E	—	56	E	E	E
3	E	E	E	30	E	E	E	57	E	E	E
4	E	E	E	31	E	E	E	58	E	E, —	E
5	E	E	E	32	E	E	E	59	E	E, —	E
6	E	E	E	33	E	E	E	60	E	E, —	E
7	E	E	E	34	E	E	E	61	E	E, —	E
8	E	E	E	35	E	E	E	62	E	E, —	E, —
9	E	E	E	36	E	E	E	63	—	E, —	E, —
10	—	E	E	37	E	E	E	64	E, —	E, —	E
11	E	E	E	38	—	E	—	65	E, —	E, —	E
12	E	E	E	39	—	E, —	—	66	E	E	E
13	E	E	E	40	E	E	E	67	E	E	E
14	E	E	E	41	E, —	E	E	68	E	E	E
15	E	E	E	42	—	E	—	69	E	E	E
16	E	E	E	43	—	E, —	—	70	E	E	E
17	E	E	E	44	E	E	E	71	E	E	E
18	E	E	E	45	—	E	—	72	E	E	E
19	E	E	E	46	E	E	E	73	E	E	E
20	E	E	E	47	E	E	E	74	E, —	E	E
21	E	E	E	48	E	E	E	75	E, —	E, —	E
22	E	E	E	49	E	E	E	76	E	E	E
23	E	E	—	50	E	E	E	77	E	E	E
24	E	E	E	51	E	E	E	78	E, —	E, —	E
25	E	E	E	52	E	E	E	79	—	E, —	E, —
26	—	E	—	53	E	E	E	80	E	E	E
27	—	E, —	—	54	E	E	E	81	E, —	E, —	E

PN, preparation number (See Table 1).

¹*Ts*, *Triakis scyllium*; *Mm*, *Mustelus manazo*; *Mg*, *Mustelus griseus*.

²E, eosinophilic; —, not stained.

Table 3. Summary of reactions of neutrophils from Triakidae sharks to cytochemical tests

Test	Species and positive site (shape, number and positive site) ¹		
	<i>Triakis scyllium</i>	<i>Mustelus manazo</i>	<i>Mustelus griseus</i>
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	G (r or o, some); H	G (r or o, some); H	G (r or o, some); H
PAS after digestion with α -amylase	—	—	—
Alcian blue (pH1.0)	—	—	—
Alcian blue (pH2.5)	—	—	—
Toluidine blue in distilled water	N	N	N
Sudan black B	—	—	—
Sudan III	—	—	—
Oil red O	—	—	—
Alkaline phosphatase	—	—	—
Acid phosphatase	—	G (r/o with NS, some, eq L0 of NG-B)	
β -Glucuronidase	G (r/o with NS, some, eq L0 of NG-B)		
α -Naphthyl acetate esterase	G (two types: r/o with NC, many, eq L2 of NG-A; r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)		
α -Naphthyl butyrate esterase	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)		
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)		
Peroxidase	—	—	—

¹G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; —, not detected; r, round; o, oval; NG-A, neutrophil granule type A with three-layer structure (L0, L1 and L2); NG-B, neutrophil granule type B with two-layer structure (L0 and L1); NC, negative core; NS, negative surrounding; eq, equivalent to.

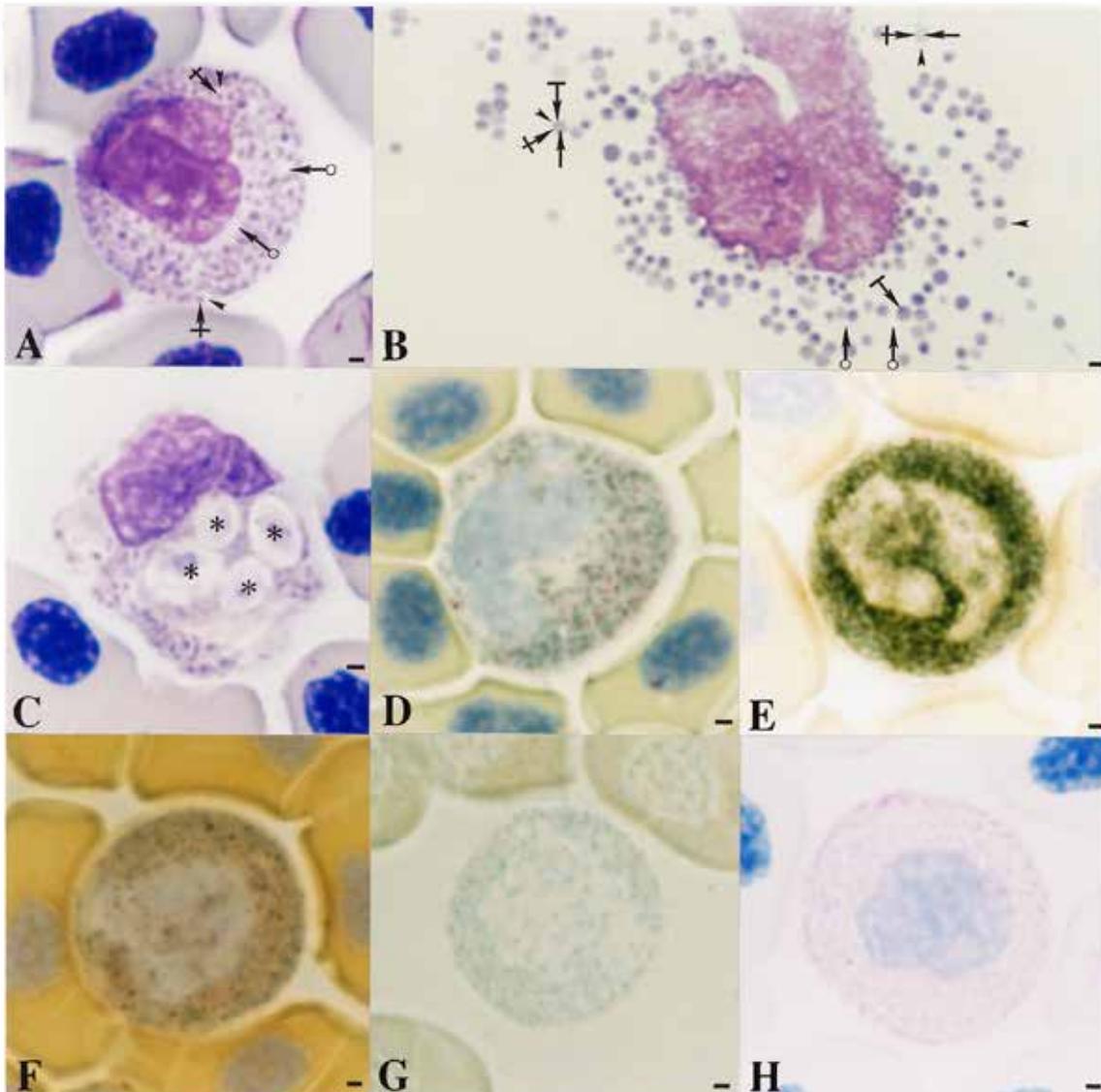


Fig. 1. Neutrophils of banded houndshark *Triakis scyllium*. A & B, May-Grünwald-Giemsa (MGG; PN=53; A, intact cell; B, lysed cell). Note two types of neutrophil granules [type A (NG-A) and type B (NG-B; ringed arrows)]. NG-A consists of chromophobic inner layer (L0; arrows), eosinophilic middle layer (L1; crossed arrows) and chromophobic outer layer (L2; arrowheads). Some NG-A contain an inner granular eosinophilic particle (tailed arrows) in L1. NG-B consists of chromophobic inner and outer layers (L0 and L1, respectively). C, phagocytosis of zymosan particles (MGG; PN=53; *, zymosan particle); D, β -glucuronidase; E, α -naphthyl acetate esterase (α -NAE); F, α -naphthyl butyrate esterase; G, naphthol AS-D chloroacetate esterase (without counter stain). Except for α -NAE (D), enzyme activities are localized in L0 of NG-B. The α -NAE activity is detected in L2 of NG-A and L0 of NG-B; H, periodic acid Schiff reaction (PAS). Counter stain in D-F & H, hematoxylin (Mayer). PN, preparation number (See Table 1). Bars=1 μ m.

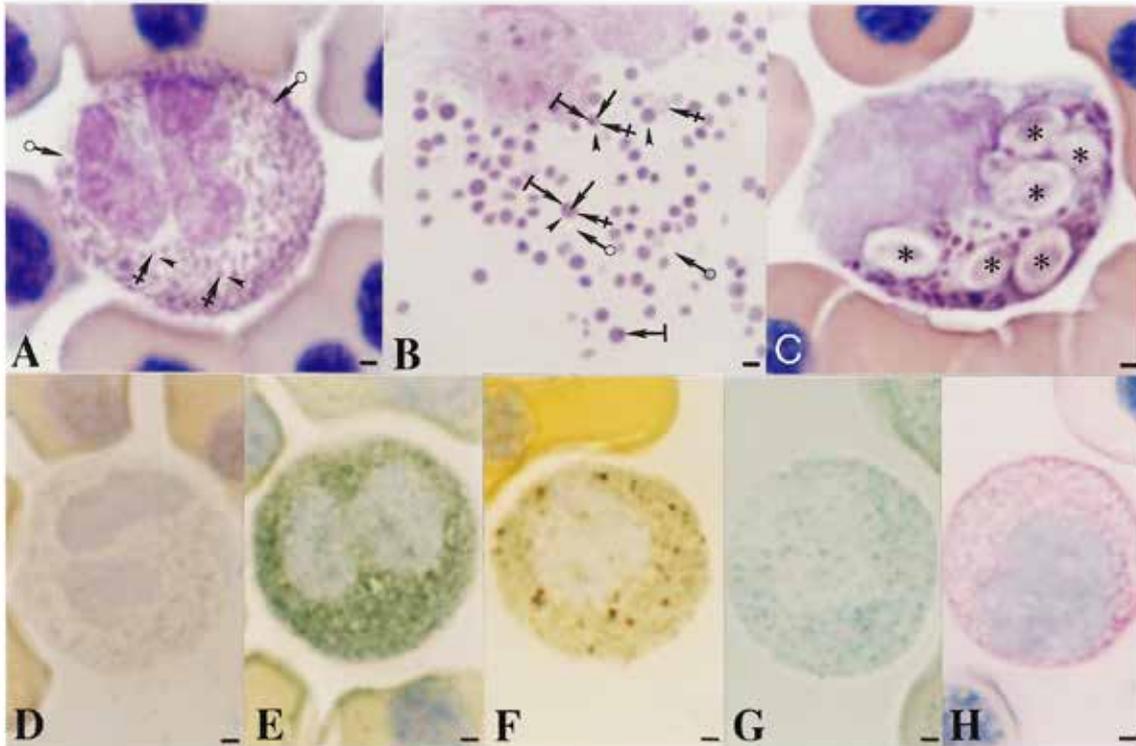


Fig. 2. Neutrophils of starspotted smooth-hound *Mustelus manazo*. A & B, May-Grünwald-Giemsa (MGG; PN=53; A, intact cell; B, lysed cell). Note two types of neutrophil granules [type A (NG-A) and type B (NG-B; ringed arrows)]. NG-A consists of chromophobic inner layer (L0; arrows), eosinophilic middle layer (L1; crossed arrows) and chromophobic outer layer (L2; arrowheads). Some NG-A contain an inner granular eosinophilic particle (tailed arrows) in L1. NG-B consists of chromophobic inner and outer layers (L0 and L1, respectively). C, phagocytosis of zymosan particles (MGG; PN=53; *, zymosan particle); D, acid phosphatase; E, α -naphthyl acetate esterase (α -NAE); F, α -naphthyl butyrate esterase; G, naphthol AS-D chloroacetate esterase (without counter stain). Except for α -NAE (E), enzyme activities are localized in L0 of NG-B. The α -NAE activity is detected in L2 of NG-A and L0 of NG-B; H, periodic acid Schiff reaction (PAS). Counter stain in D-F & H, hematoxylin (Mayer). PN, preparation number (See Table 1). Bars=1 μ m.

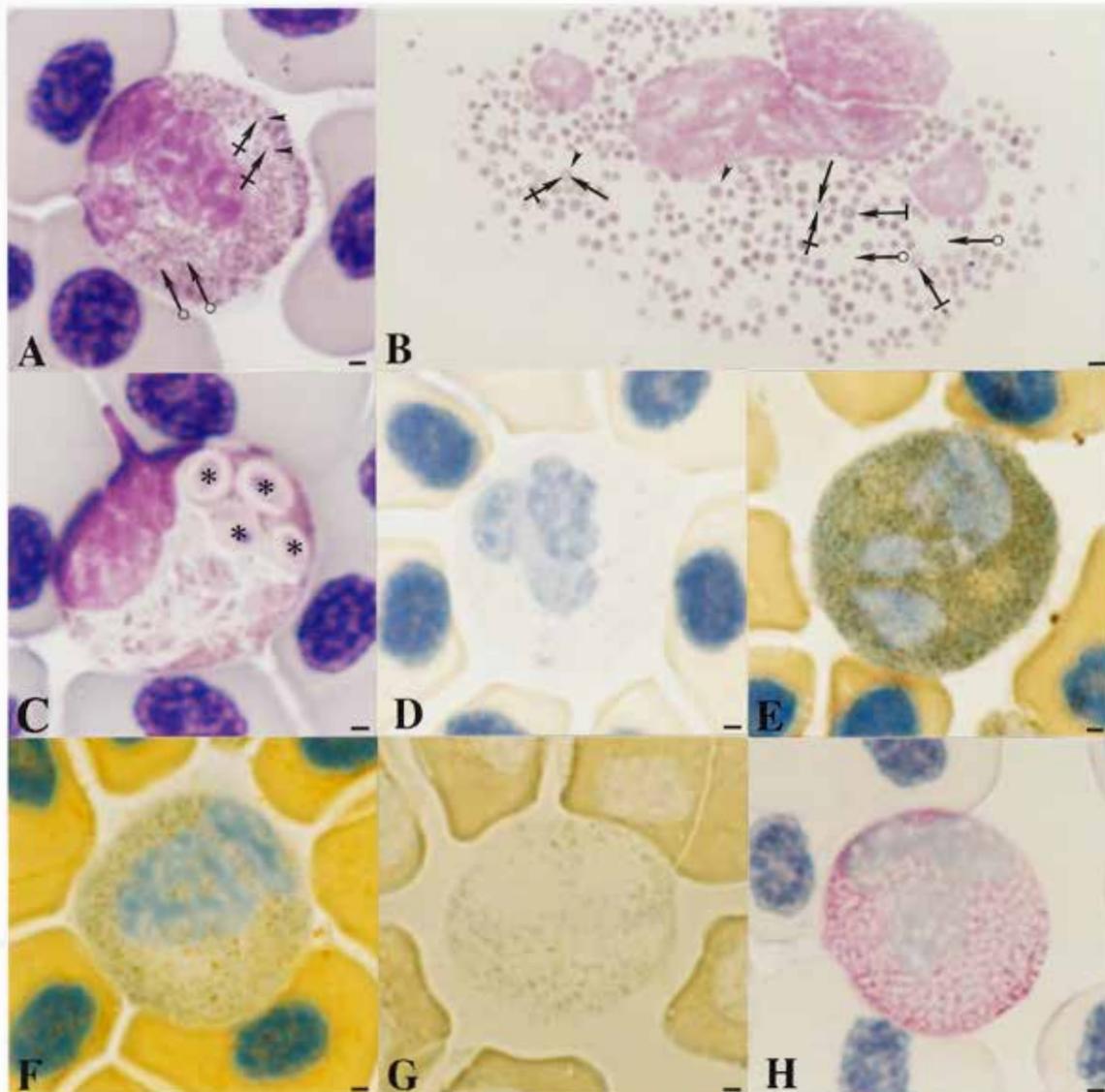


Fig. 3. Neutrophils of spotless smooth-hound *Mustelus griseus*. A & B, May-Grünwald-Giemsa (MGG; PN=53; A, intact cell; B, lysed cell). Note two types of neutrophil granules [type A (NG-A) and type B (NG-B; ringed arrows)]. NG-A consists of chromophobic inner layer (L0; arrows), eosinophilic middle layer (L1; crossed arrows) and chromophobic outer layer (L2; arrowheads). Some NG-A contain an inner granular eosinophilic particle (tailed arrows) in L1. NG-B consists of chromophobic inner and outer layers (L0 and L1, respectively). C, phagocytosis of zymosan particles (MGG; PN=53; *, zymosan particle); D, acid phosphatase; E, α -naphthyl acetate esterase (α -NAE); F, α -naphthyl butyrate esterase; G, naphthol ASD chloroacetate esterase (without counter stain). Except for α -NAE (E), enzyme activities are localized in L0 of NG-B. The α -NAE activity is detected in L2 of NG-A and L0 of NG-B; H, periodic acid Schiff reaction (PAS). Counter stain in D-F & H, hematoxylin (Mayer). PN, preparation number (See Table 1). Bars=1 μ m.

POおよびPAS反応後の核染色には陰性であった。また、ドチザメとホシザメではAcP染色後の核染色によってもNG-AのL1とIGEPが染色されたが、シロザメでは陽性反応を示さなかった。

考 察

ドチザメ科サメ類3種にはそれぞれ2種類の顆粒球が認められたが、貪食能を有する顆粒球は好中球のみであった。また、好中球には2種類の顆粒 (NG-AとNG-B) が観察され、いずれも成層構造を有する顆粒 (成層顆粒) であることが明らかとなった。アカエイでは4種類の顆粒球が^{1,2,4)}、カスザメには3種類の顆粒球が認められているが^{3,5)}、いずれの魚種においても貪食能を有する顆粒球は好中球のみであり^{1,3)}、ドチザメ科サメ類と同様に2種類の成層顆粒が観察されている^{1,2,4)}。しかし、魚種間で違いも認められた。ドチザメ科サメ類のNG-Aは難染色性のL0、エオシン好性のL1および難染色性のL2の3層からなるが、アカエイではL0とL1がともにエオシン好性である (L2は難染色性)^{1,2)}。また、カスザメのNG-Aはエオシン好性のL0とL1および塩基好性のL2から構成されている (Fig. 4)。ドチザメ科サメ類のNG-Aでは α -NAEがL2に検出されるが、同活性はアカエイおよびカスザメのNG-Aには認められていない (Table 4)^{1,3)}。カスザメのNG-AのL0とL1にはNASDCAEが検出されるとともに、SBB陽性であるが³⁾、アカエイとドチザメ科サメ類のNG-Aではともに陰性である (Table 3)¹⁾。難染色性の2層からなるNG-Bにも魚種間で違いがあり、カスザメにおいて、いくつかのNG-BのL0に存在するアミラーゼ消化耐性のPAS陽性物質は³⁾、アカエイとドチザメ科サメ類には認められず^{1,2)}、アカエイのNG-BのL0がSBB陽性であるのに対して^{1,2)}、カスザメとドチザメ科サメ類では陰性である³⁾。また、カスザメのNG-BはAcPの局在部位の違いから3種類に分類されているが³⁾、アカエイとドチザメ科サメ類のホシザメとシロザメではNG-BのL0がAcP陽性であり^{1,2)}、ドチザメにはAcP活性は検出されない。一方、 β -GluはドチザメのNG-BのL0に認められるが、アカエイ^{1,2)}、カスザメ³⁾、ホシザメおよびシロザメには本酵素活性は検出されない。 α -NBEがアカエイのNG-BのL1に局在するが^{1,2)}、同活性はカスザメおよびドチザメ科サメ類ではNG-BのL0に検出される³⁾。ドチザメ科サメ類のNG-AのL1およびIGEPは、AcP、 β -Glu、各種エステラーゼおよびSBB染色後の核染色 (マイヤーのヘマトキシリン染色) に陽性反応を示した

(シロザメにおけるAcP染色後の核染色では陰性)。アカエイにおいても β -Glu、各種エステラーゼおよびSBB染色後の核染色によってNG-AのL1が陽性反応を示し、AcP、POおよびPAS反応後のそれには染色されない^{1,2)}。一方、カスザメのNG-Aはいずれの染色後の核染色によっても陽性像は認められない³⁾。

以上の違いが認められるものの、前述の5種類 (3上目) の板鰓類では好中球は2種類の顆粒を有すること、NG-Aは3層からなり、L1はエオシン好性であること、NG-Bは難染色性の2層からなりリソゾーム酵素を有していることが共通していた。したがって、板鰓類の好中球は魚種を問わず類似していると言える。

板鰓類の好中球は一般に好異球と呼ばれており^{7,8)}、顆粒の染色性は好酸性 (エオシン好性) であるとされている⁷⁾。前報¹⁻³⁾および本研究結果から、板鰓類の好中球において好酸性顆粒と認識されてきた構造物は顆粒ではなく層であると推察される。

中院はドチザメとホシザメの血液塗抹標本をメタノール固定したのち、ギムザ原液を蒸留水に1:100の割合で希釈した染色液を用いて染色し (染色時間は不明)、標本上に2種類の顆粒球 (第一種、エオジン嗜好性白血球; 第二種、両色嗜好性白血球) を観察しており、両魚種のエオジン嗜好性白血球にエオシン好性顆粒を認めている^{9,10)}。さらに中院はエオジン嗜好性白血球をドチザメで4種類 (イ、ロ、ハ、ニ) に、ホシザメでは3種類 (イ、ロ、ハ) に細分し、両色嗜好性白血球をドチザメで2種類 (イ、ロ) に、ホシザメでは3種類 (イ、ロ、ハ) に分類している^{9,10)}。池田らはドチザメの血液塗抹標本をメタノール固定したのち、ライシュマン・ギムザ染色を施して観察し、4種類の顆粒球 (好中球、第一種好酸球、第二種好酸球、第三種好酸球) を認め¹²⁾、中院が観察した顆粒球との関係を議論している。すなわち、池田らの第二種好酸球は朱赤色に染まる棒状の顆粒を有し、第三種好酸球には嗜塩基性の原形質と少数の粗大円形の薄赤色顆粒が認められることから、これら2種類の顆粒球は中院も観察していると言及している¹²⁾。しかし、中院が分類したどの顆粒球に相当するのかわかっている。中院のエオジン嗜好性白血球のうち、(イ)には棒状朱赤色の顆粒が、(ロ)と(ハ)には粗大円形朱赤色の顆粒が、(ニ)には少数の粗大円形淡薔薇赤色の顆粒が強塩基好性の原形質に存在する^{9,10)}。したがって、池田らの第二種好酸球と第三種好酸球はそれぞれ中院のエオジン嗜好性白血球の(イ)と(ニ)に相当すると考えられる。池田

Table 4. Comparison of reactions of neutrophils from five elasmobranchs to cytochemical tests

Test	Species and positive site (shape, number and positive site) ¹		
	<i>Da</i> ^a	<i>Sj</i> ^b	<i>Ts, Mm, Mg</i> ^c
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	G (r/o, many); H	G (r/o with/without NS, many); H	G (r/o, some); H
PAS after digestion with α -amylase	—	G (r/o with NS, some, eq L0 of NG-B around nucleus)	—
Alcian blue (pH1.0)	—	—	—
Alcian blue (pH2.5)	—	—	—
Toluidine blue in distilled water	G (amorphous, a few, eq Yb); N	N	N
Sudan black B	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)	G (long-spindle with NS, many, eq L0 & L1 of NG-A)	—
Sudan III	—	—	—
Oil red O	—	—	—
Alkaline phosphatase	—	—	—
Acid phosphatase	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)	G (three types: r/o with NS, many, eq L0 of NG-B; r/o with NC, many, eq L1 of NG-B; r/o consist of positive core and surrounding, some, eq entity NG-B around nucleus)	G (r/o with NS, some, eq L0 of NG-B) in <i>Mn</i> & <i>Mg</i> ; — in <i>Ts</i>
β -Glucuronidase	—	—	G (r/o with NS, some, eq L0 of NG-B) in <i>Ts</i> ; — in <i>Mn</i> & <i>Mg</i>
α -Naphthyl acetate esterase	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)	G (two types: r/o with NC, many, eq L2 of NG-A; r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)
α -Naphthyl butyrate esterase	G (r/o with NC, many, eq L1 of NG-B)	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)	G (two types: r/o with NS, many, eq L0 of NG-B; long-spindle with NS, many, eq L0 & L1 of NG-A)	G (r/o with NS, many, eq L0 of NG-B)
Peroxidase	—	—	—

¹*Da*, *Dasyatis akajei*; *Sj*, *Squatina japonica*; *Ts*, *Triakis scyllium*; *Mm*, *Mustelus manazo*; *Mg*, *Mustelus griseus*; G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; Yb, Yasumoto body; —, not detected; r, round; o, oval; NG-A, neutrophil granule type A with three-layer structure (L0, L1 and L2); NG-B, neutrophil granule type B with two-layer structure (L0 and L1); NC, negative core; NS, negative surrounding; eq, equivalent to.

^a, Kondo et al. (2017)^{1,2}; ^b, Kondo et al. (2018)³; ^c, present report.

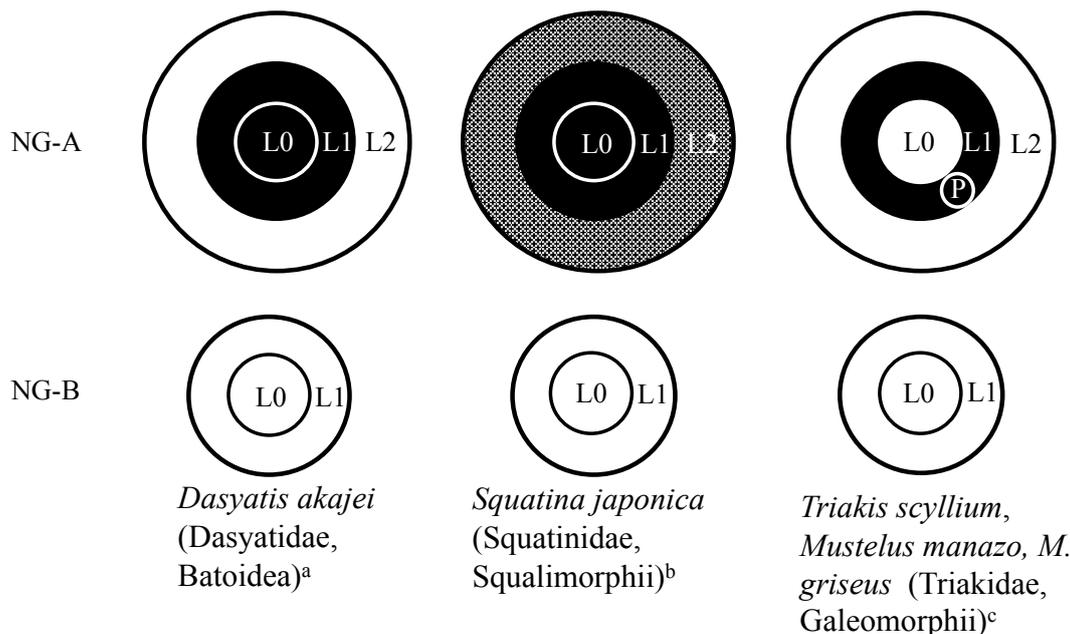


Fig. 4. Comparison of the structure of neutrophil granules (NG) from five elasmobranchs. NG-A, NG type A; NG-B, NG type B; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (middle layer); L2, layer 2 (outer layer); P, inner granular eosinophilic particle. □, chromophobic; ■, eosinophilic; ▨, basophilic. ^a, Kondo et al. (2017)^{1,2}; ^b, Kondo et al. (2018)³; ^c, present report.

らは第一種好酸球（薄赤い丸形の中等大顆粒を有する）が中院の4種類のエオジン嗜好性白血球のいずれにも該当しないと述べているが¹²⁾、第一種好酸球（および好中球）と両色嗜好性白血球との関連については触れていない。また、中院のエオジン嗜好性白血球の（ロ）と（ハ）を池田らは同定していない。本研究においてドチザメとホシザメの好中球顆粒は種々の形態を示し、明瞭なエオシン好性部位（L1）を示すことから、著者らの好中球は中院のドチザメおよびホシザメのエオジン嗜好性白血球の（イ）、（ロ）および（ハ）に相当すると考えられる。また、池田らの第二種好酸球も著者らの好中球に含まれると言える。我々の観察では、中院のエオジン嗜好性白血球の（ニ）、すなわち、池田らの第三種好酸球はドチザメ科サメ類3種に認められなかった。なお、中院の両色嗜好性白血球と池田らの第一種好酸球および好中球については次報で考察するが、著者らが本研究において存在を指摘した貪食能を示さない顆粒球が、これらの顆粒球に相当すると考える。

Hine and Wain (1987)^{12,13)} および Hine et al. (1987)¹⁴⁾ はネズミザメ上目のうち、ネズミザメ目サメ類1種（ネズミザメ科）とメジロザメ目サメ類6種（トラザメ科2種、ドチザメ科2種、チヒロザメ科1種、メジロザメ科1種）の顆粒球を、eosinophil, eosinophilic granulocyte および neutrophilic granulocyte^{12,13)}（あるいは前述の3種類をそれぞれ coarse eosinophilic granulocyte, fine eosinophilic granulocyte および neutrophilic granulocyte¹⁴⁾ と称している）の3種類のカテゴリーを用いて分類しており^{12,14)}、顆粒球組成は魚種によって異なるものの、いずれのサメ類にも eosinophilic granulocyte (= fine eosinophilic granulocyte) を同定している。この eosinophilic granulocyte は本研究における好中球に相当すると考えられる。また、Hine and Wain (1987)¹³⁾ および Hine et al. (1987)¹⁴⁾ は前述のネズミザメ上目サメ類7種の細胞化学的特徴についても調べ、いずれのサメ類も eosinophilic granulocyte はアルカリ性フォスファターゼとペルオキシダーゼが陰性であること、AcP陽性の魚種と陰性の魚種が存在することを報告している。これらのことは、本研究のドチザメ科サメ類にも当てはまる。特に、ニュージーランドホシザメ *Mustelus lenticulatus* では AcP陽性、 β -Glu陰性、エステラーゼ (α -NAE, α -NBE) 陽性であり^{13,14)}、本研究におけるホシザメとシロザメの結果と一致している。

文 献

- 1) 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)]
- 2) 近藤昌和, 東川将基, 安本信哉, 高橋幸則: アカエイ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)]
- 3) 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)]
- 4) 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)]
- 5) 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および細胞化学的特徴. 水大校研報, **66**, 131-139 (2018) [Kondo M, Maekawa K, Yasumoto S: Morphological and cytochemical characteristics of non-phagocytic granulocytes from Japanese angelshark *Squatina japonica*. *J Nat Fish Univ*, **66**, 131-139 (2018) (in Japanese with English abstract)]
- 6) Heinicke MP, Naylor GJP, Hedges SB: Cartilaginous fishes (Chondrichthyes). In: Hedges SB, Kumar S (ed) *The Timetree of Life*. Oxford University Press,

- Oxford, 320-327 (2009)
- 7) Walsh CJ, Luer CA: Elasmobranch hematology: Identification of cell types and practical applications. *In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R (ed) The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives. Ohio Biological Survey, Ohio, 307-323 (2004)*
- 8) Luer CA, Walsh CJ, Bodine AB: Recent advances in Elasmobranch immunology. *In: Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR (ed) Biology of Sharks and Their Relatives. CRC Press, New York, 403-420 (2012)*
- 9) 中院孝圓: 魚類ノ血球ニ就キテ. 京都医学雑誌, **17**, 115-154 (1920) ['Nakanoin T: On the blood cells of fish., *Kyoto Igaku Zasshi*, **17**, 115-154 (1920) (in Japanese)]
- 10) 中院孝圓: 魚類ノ血球ニ就キテ (承前). 京都医学雑誌, **17**, 280-294付図2葉 (1920) ['Nakanoin T: On the blood cells of fish (continued), *Kyoto Igaku Zasshi*, **17**, 280-294+2 plates (1920) (in Japanese)]
- 11) 池田彌生, 尾崎久雄, 瀬崎啓次郎: 1ドチザメ. 魚類血液図鑑. 緑書房, 東京, 34-39 (1986) [Ikeda Y, Ozaki H, Sezaki K: 1 *Triakis scyllia*. Blood Atlas of Fishes. Midori-shobou, Tokyo, 34-39 (1986) (in Japanese)]^{*2}
- 12) Hine PM, Wain JM: Composition and ultrastructure of elasmobranch granulocytes. III. sharks (Lamniformes). *J Fish Biol*, **30**, 567-576 (1987)
- 13) Hine PM, Wain JM: The enzyme cytochemistry and composition of elasmobranch granulocytes. *J Fish Biol*, **30**, 465-475 (1987)
- 14) Hine PM, Wain JM, Boustead NC: The Leucocyte Enzyme Cytochemistry of Fish. New Zealand Fisheries Research Bulletin No. 28, New Zealand: Ministry of Agriculture and Fisheries, Wellington, 75pp (1987)

^{*2} *Triakis scyllia*は*Triakis scyllum*のシノニム名である。