コイ鰾組織における血球観察のための固定および染色条件

安本信哉[1†]，岡田　理[2]，近藤昌和[1]

Fixation and staining conditions of leukocytes observation in the koi carp swim bladder

Shinya Yasumoto[1†], Masato Okada[2] and Masakazu Kondo[1]

Abstract : Identification of leukocytes on tissue sections is important to elucidate the mechanism of swim bladder lesions. To determine the best fixative solution for a koi carp swim bladder, the swim bladders were fixed in 10% formalin, Bouin's, MFAA and Davidson's solution. The swim bladders fixed in MFAA or Davidson's solution were severely detached and twisted, whereas those fixed in 10% formalin and Bouin's solution kept their external shape. However, the majority of the 10% formalin-fixed specimens showed detachment of the tunica interna from the tunica externa under the light microscope. Therefore, Bouin's solution was determined to be the most suitable fixing solution for the swim bladder. Imprints (head kidney-touched slides glass were fixed with Bouin's solution) and tissue sections of head kidney fixed in Bouin's solution were stained with Mayer's hematoxylin and eosin (HE) and May-Grünwald-Giemsa (MGG), and the best staining method for leukocytes identification was investigated. In the HE-stained specimens, identification of leukocytes by staining was difficult. On the other hand, MGG-stained specimens could be identified by staining. Fixation with Bouin's solution and MGG staining was determined to be the most suitable method for leukocytes identification in the swim bladder.

Key words : carp, *Cyprinus carpio*, leukocyte, Bouin's solution, May-Grünwald-Giemsa

緒　　言

著者らは潜水病に罹患したニシキゴイ（*Cyprinus carpio*）の外見や剖検所見および基本的な病理組織学的特徴を報告している[1)]。本病は鰾水の貯留により浮力を失い，不活発となって池底で動かなくなる。鰾では内膜の肥厚や炎症，さらには線維化がみられる。しかしながら，これら鰾の病変が鰾水貯留をもたらすのか，それとも鰾水貯留によって引き起こされたものなのか不明であり[1,2)]，鰾水貯留の原因は明らかになっていない。鰾水貯留のメカニズムを解明するには、鰾におけるより詳細な病理組織学的検討が必要であり，そのためには血球の同定が重要となる。組織標本上での血球同定は血球の染色性によって判断されるが，固定や染色の方法によってその染色性が異なるため，統一された見解がない。そのため，組織標本上の血球同定に最適な固定液や染色法を検討する必要がある。さらに，鰾は内部が空洞であることから，形状を保ったまま組織標本を作製することが難しい組織である[3)]。また，硬い組織でないにもかかわらず，固定液によっては脱灰しないと，薄切できない。そこで，本研究では鰾に最適な固定液の検討を行い，血球同定可能な染色条件の検討を行った。

材料と方法

供試魚

本研究には水産大学校で生産した紅白のニシキゴイを用

2024年11月29日受付; 2025年 1月14日受理
[1]水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)
[2]水産大学校水産学研究科学生（Student of Graduate School of Fisheries Science, National Fisheries University）
[†]責任著者 (corresponding author): yasumotos@fish-u.ac.jp

いた。固定液検討の実験には2歳のニシキゴイ4尾（紅白，平均体重 55.7 ± 5.2 g），染色法検討の実験には4歳のニシキゴイ1尾（紅白，体重 220.7 g）を供した。

鰾の固定液の検討

ニシキゴイの鰾を10%ホルマリン液，ブアン液，MFAA液，Davidson液で固定した。固定方法は，キナルジン（2-メチルキノリン，20 ppm）で麻酔したニシキゴイを開腹して鰾を露出させ，注射器を用いて鰾内を固定液で満たしたのち，摘出して固定液に浸漬させた。浸漬24～48時間後，解剖ばさみで輪切りにして状態を確認した。さらに，切り出した固定標本はエタノール系列で脱水後，キシレンで透徹してパラフィン包埋し，定法に従って厚さ4 μmのパラフィン切片を作製してhematoxylin eosin染色 (HE)を施して光学顕微鏡で観察した。なお，10%ホルマリン液で固定した鰾については脱水工程前に10%ギ酸に24時間浸漬し，脱灰操作を行った。

染色法の検討

血球同定に最適な染色法を検討するため，組織標本観察で一般的に用いられているHE染色と血球染色に用いられるMay-Grünwald-Giemsa（MGG）染色を施し，比較検討した。また，健常魚の鰾には血球細胞が少ないため，試料には血球細胞が豊富な頭腎を用い，スタンプ標本と組織標本を作製した。なお，上述の固定液検討実験の結果から固定にはブアン液を採用した。

スタンプ標本は，ニシキゴイの尾部の血管からプラスチックシリンジを用いて脱血したのち，開腹して1対の頭腎を取り出して2分割ずつにした。その断面をスライドガラスにスタンプし風乾した。そして，ブアン液でスライドガラスを満載にした状態で5分静置して固定した。次に，流水水洗を5分間行い，蒸留水へ5分浸漬した後に風乾して，HE染色またはMGG染色を施した。

組織標本については，スタンプ標本に使用した頭腎を用い、ブアン液で固定したのち，上述と同様にパラフィン切片を作成し，同様にHEおよびMGG染色を施して光学顕微鏡で観察した。なお，包埋の際はスタンプを行った面を薄切できるように包埋した。

血球の同定は，以下の特徴に従って行った。好塩基球は類円形細胞であり，核は中心性または遍在性でMGG染色において青紫色に濃染し，細胞質内に難染色性顆粒と好塩基性顆粒がみられる[4,5]。リンパ球は不整形で最小の白血球であり，細胞に占める核の割合が高いのが特徴である[5]。さらに，核および細胞質は好塩基性に染まり，MGG染色で核は青紫色に濃染する[4]。好中球の核は遍在し，形は卵円形，楕円形，ソラ豆型に加え，分葉したものがある。また，MGG染色では細胞質では赤色から橙色の顆粒がみられる[6,7]。単球は最も大きい白血球であり，クロマチン構造が明瞭で類円形または馬蹄形の核を有し，MGG染色で核が赤紫色，細胞質が淡青色に染まるものとした[4,5]。

結果および考察

10%ホルマリン液とブアン液で固定した鰾の組織標本は，肉眼的に内膜の剥離はみられなかったが，Davidson液で固定した鰾は肉眼的に委縮・剥離していた（Fig. 1A）。Davidson液は10%ホルマリン液やブアン液よりも固定力が強いことから，内膜が収縮し剥離したと考える[8-10]。MFAA液の場合については，固定時には問題なかったものの，脱水以降の過程でねじれてしまったが（Fig. 1B），原因は不明である。10%ホルマリン液とブアン液で固定した鰾は，外見的に形を維持したままパラフィン包埋することができたが，光学顕微鏡で観察したところ，10%ホルマリン液では大部分が外膜から内膜が剥離していた（Fig. 1C）。一方でブアン液では，10%ホルマリン液よりも剥離は少なかった（Fig. 1D）。MFAA液とDavidson液で固定

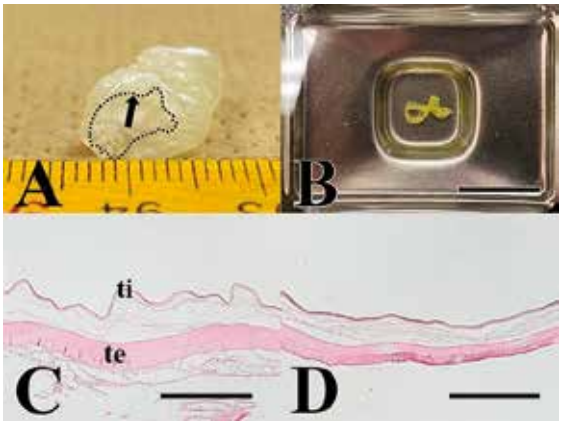

Fig. 1. The swim bladders fixed with 10% formalin, Bouin's, MFAA and Davidson's solution. A: The swim bladder is atrophied and deformed by fixation in Davidson's solution. The tunica interna (black dotted line) and the tunica externa (white dotted line) are detached (arrows). B: Twisted swim bladder by MFAA fixation. C: The swim bladder fixed in formalin solution shows detachment of the tunica interna (ti) and the tunica externa (te). D: Swim bladder fixed in Bouin's solution. Stains: C and D, HE. Bars: B, 1 cm; C and D, 500 μm.

した鰾は，内膜が委縮変形し完全に剥離していた。4つの固定液の中で，肉眼的に組織への影響が少なかったのは10%ホルマリン液とブアン液であったが，組織標本中で剥離が少なかったのは，ブアン液で固定した鰾の組織標本であった。また，ブアン液にはピクリン酸が含まれており，脱灰作用があるため[8,11]，ホルマリン液のようにギ酸で脱灰を行う必要がない。従って，鰾の固定液としてブアン液が最適であると考え，以降の実験ではブアン液を採用した。

ブアン液で固定した頭腎のスタンプおよび組織標本における各種血球のHEおよびMGG染色像をFig. 2に示した。なお，HE染色の標本については同定が困難であったため，血球の大きさや核の構造から推定した。

HE染色を施したスタンプ標本では，すべての血球で核の染まりが弱かった。好塩基球では難染色性顆粒と淡紫色を呈する2種類の顆粒がみられ，核が淡青紫色に染まっていた（Fig. 2A）。リンパ球では，核が淡青色を呈し，顆粒は確認できなかった（Fig. 2B）。好中球と単球は識別が困難であった。核はいずれも薄い青紫色を呈し，顆粒もともに2種類観察され，好中球は難染色性顆粒と淡赤色（Fig. 2C），単球では難染色性顆粒と赤色（好中球の淡赤色の顆粒よりもやや濃い）であった（Fig. 2D）。組織標本の観察では，すべて血球で核は淡い赤から赤紫色を呈し，細胞質

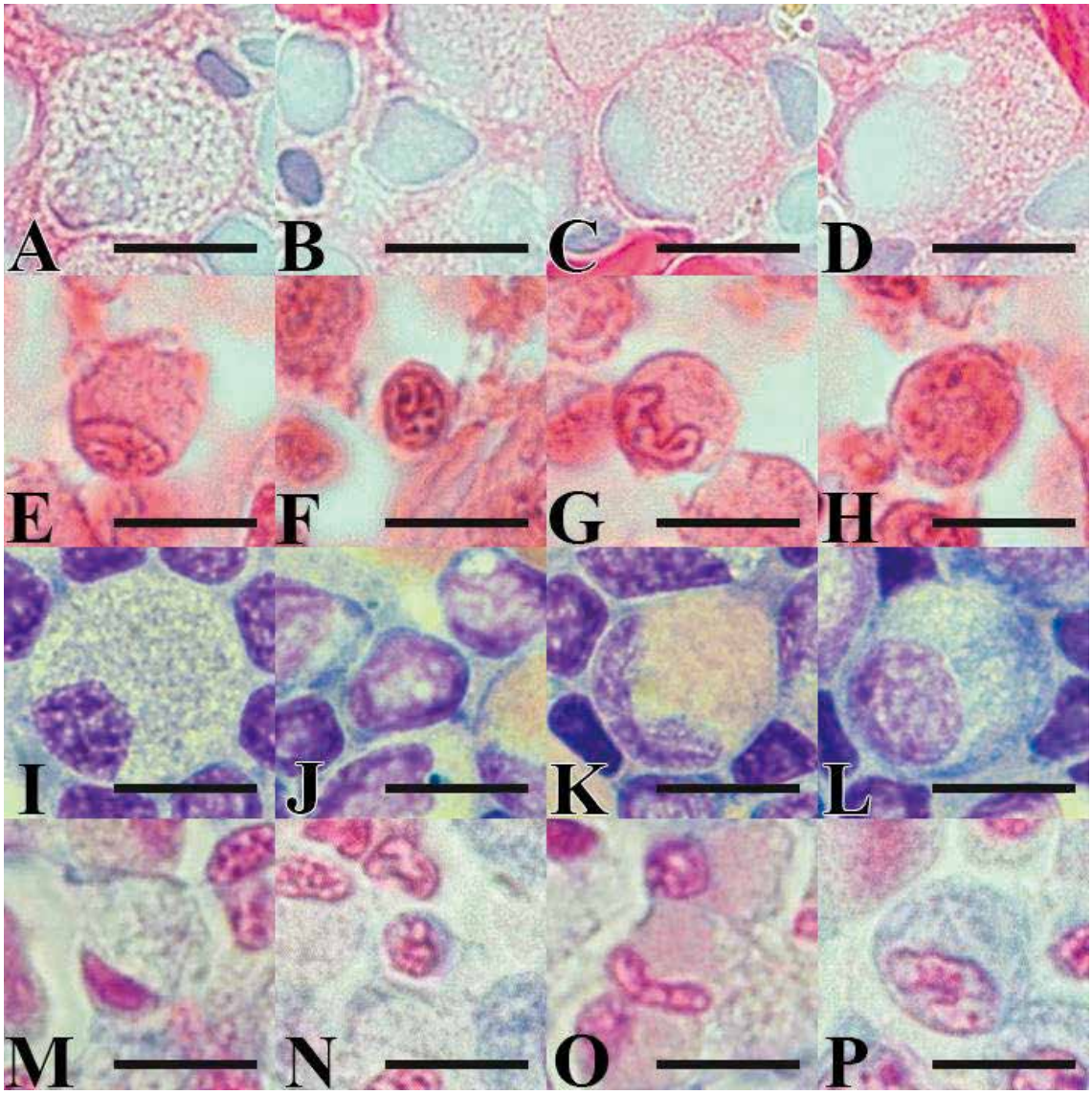

Fig. 2. Leukocytes in head kidney fixed with Bouin's solution. A-D, Imprint of head kidney stained with HE; E-H, Tissue sections of head kidney stained with HE; I-L, Imprint of head kidney stained with MGG; M-P, Tissue sections of head kidney stained with MGG. Leukocytes: A, E, I and M, basophil; B, F, J and N, lymphocyte; C, G, K and O, neutrophil; D, H, L and P, monocyte. Bars = 10 μm.

は淡赤色の顆粒様構造は確認されたものの，染色性による血球の同定は困難であった（Figs. 2E-H）。以上の結果からHE染色は血球の同定には不適であることが明らかとなった。

一方でMGG染色を施したスタンプ標本では，好塩基球に難染色性顆粒が多数みられ，核は濃紫色を呈した（Fig. 2I）。リンパ球では核は紫色を呈し，顆粒は観察できなかったが細胞質は青色に染まっていた（Fig. 2J）。好中球では淡赤または淡橙色の顆粒が多数観察され，核は紫色を呈した（Fig. 2K）。単球は，核が紫色に，細胞質では淡青色の顆粒が無数にみられた（Fig. 2L）。これらは，通常のスタンプ標本と同じ染色態度を示しており，容易に血球同定が可能であった[4-7]。MGG染色した組織標本においてもスタンプ標本とは染色性は異なった。好塩基球の細胞質では難染色性顆粒がみられ，核は濃赤紫色を呈した（Fig. 2M）。リンパ球では核はクロマチン構造が明瞭で赤紫色を呈し，顆粒は観察できなかったが細胞質は淡青色に染まっていた（Fig. 2N）。好中球では淡赤色の顆粒が多数観察され，核は赤紫色を呈し，クロマチン構造も確認できた（Fig. 2O）。単球は，核はクロマチン構造が明瞭で赤紫色を呈し，核小体も確認され，細胞質では顆粒により淡青色を呈していた（Fig. 2P）。好塩基球と好中球については容易に同定可能であったが，リンパ球と単球の核と細胞質の染色性は似ていた。しかし，両者は核の構造，大きさ、細胞質の豊富さで区別できることから[4,5]，MGG染色を施すことによって同定可能であることが明らかとなった。

以上のことから，鰾の血球同定には，ブアン液で固定しMGG染色することが最適であると判断した。また，同じ固定方法でもスタンプ標本と組織標本で染色性が異なること明らかとなった。つまり，脱水・透徹・パラフィン浸透などの工程も染色性に影響をおよぼすことが示唆された。

今後は，この適した条件を用いて鰾の免疫応答を調べ，どのような機構で鰾水が貯留しているのかを明らかにしていきたい。

引用文献

1) Yasumoto S, Okada M, Moroi H, Shimizu H, Kondo M: A preliminary study on sinking disease in koi carp. *Fish Pathology*, **56**, 107-114 (2021)

2) Siri R, Mandrioli L, Zamparo S, Errani F, Volpe E, Tura G, Barbe T, Ciulli S: Swim bladder disorders in koi carp (*Cyprinus carpio*). *Animals*, **10**, 1974 (2020)

3) Takashima F, Hibiya T: Swim bladder. *In*: An atlas of fish histology. Kodansha, Tokyo, 34-35 (1995)

4) 斎藤　要: 魚類血液の生化学的研究— Ⅰ. 血球の形態について. 日本水産学会誌, **19**, 1134-1138 (1954) [Saito K: Biochemical studies on the fish-blood – I. On the morphological property of blood-corpuscles. *Bulletin of the Japanese Scientific Fisheries*, **19**, 1134-1138 (1954) (in Japanese with English abstract)]

5) Cenini P: The ultrastructure of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Zoology*, **204**, 509-520 (1984)

6) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球顆粒のメイ-グリュンワルド・ギムザ染色性. 水産大学校研究報告, **50**, 109-117 (2002) [Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: May-Grünwald · Giemsa staining properties of granules in carp *Cyprinus carpio* neutrophil. *Journal of National Fisheries University*, **50**, 109-117 (2002) (in Japanese with English abstract)]

7) 鈴木　譲, 日比谷　京: コイ炎症における白血球動態. 魚病研究, **23**, 179-184 (1988) [Suzuki Y, Hibiya T: Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp. *Fish Pathology*, **23**, 109-117 (1988) (in Japanese with English abstract)]

8) 小川智史, 佐藤　将, 兵藤則行, 中村　将, 平井俊朗: 魚類組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色に対するブアン液による固定条件の影響. 帝京科学大学紀要, **12**, 121-127 (2016) [Ogawa S, Sato S, Hyodo N, Nakamura M, Hirai T: Influence of fixation condition with Bouin’s solution on hematoxylin and eosin staining of fish tissue sections. *Bulletin of Teikyo University of Science*, **12**, 121-127 (2016) (in Japanese)]

9) 福原　修: ホルマリン固定によるマダイ卵稚仔の収縮について. 水産増殖, **27**, 129-136 (1979) [Fukuhara O: On the shrinkage of eggs larvae of red sea bream, *Chrysophrys major* preserved in the formalin. *The Aquiculture*, **27**, 129-136 (1979) (in Japanese with English abstract)]

10) 大関芳沖, 渡辺良朗, 久慈康支, 高橋章策: サンマ仔稚魚の固定に伴う体長 収縮. 東北区水産研究所研究報告, **53**, 15-21 (1991) [Oozeki Y, Watanabe Y, Kuji Y, Takahashi S: Effect of various preservatives on the body length of saury larvae. *Bulletin of Tohoku National*

Fisheries Researh Institute, **53**, 15- 21 (1991) (in Japanese with English abstract)]

11) 佐野　豊: 固定. 組織学研究法. 南山堂, 東京, 55-57 (1981) [Sano Y: Fixation. *In*: Histological research methods. Nanzando, Tokyo, 55-57 (1981) (in Japanese)]