

アカメ好中球の形態学のおよび細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 安本信哉, 高橋幸則Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from Japanese Lates, *Lates japonicus*Masakazu Kondo[†], Shinya Yasumoto and Yukinori Takahashi

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in Japanese lates, *Lates japonicus* were examined by light microscopy. The shape of neutrophils was round to oval (8.0-12.0 μm in diameter) and the nucleus round to lobule-shaped. Granules of the neutrophil were classified into two types, chromophobic granule (βG) and basophilic granule (γG). The βG was round to oval ($\leq 0.5 \mu\text{m}$ in diameter), unstained by Romanowsky type stain (May-Grünwald (MG), Giemsa and MG-Giemsa) and peroxidase positive. The γG was round to oval ($\leq 0.3 \mu\text{m}$ in diameter) and stained light blue with Romanovsky type stain under various conditions. This granule was alkaline phosphatase and toluidine blue (TB) positive. The Yasumoto body was also found in the neutrophil and TB positive.

Key words : Japanese lates, *Lates japonicus*, 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種類数および染色性が調べられており, 魚類の好中球顆粒は, 魚種によって多様であることが報告されている¹⁻²¹⁾。

真骨魚類は好中球内顆粒の種類数の違いから3群に大別され, 好酸性 (好エオシン性) 顆粒 (α 顆粒), 難染色性顆粒 (β 顆粒) および好塩基性顆粒 (γ 顆粒) の3種類の顆粒が好中球に認められるI群には, アジアアロワナ *Scleropages formosus*, ウナギ *Anguilla japonica* およびコイ *Cyprinus carpio* といった原始的な魚類が含まれることから^{2,12,15)}, I群の好中球は真骨魚類好中球の原型であると推察されている¹⁵⁾。また, II群の好中球には α 顆粒と β 顆粒が認められ, トラフグ *Takifugu rubripes* とマダイ *Pagrus major* に観察されているが^{9,16)}, α 顆粒の染色性が両魚種

間で異なることから, II-A群 (トラフグ) とII-B群 (マダイ) に細分されている¹⁶⁾。III群の好中球には β 顆粒のみが認められ, アユ *Plecoglossus altivelis*, ノーザンパイ ク *Exos lucius*, ボラ目魚類 (ボラ *Mugil cephalus*, メナダ *Chelon haematocheilus*), 各種スズキ目魚類 (オオクチバス *Micropterus salmoides*, ブルーギル *Lepomis macrochirus*, スズキ *Lateolabrax japonicus*, ヒラスズキ *L. latus*, タイリク スズキ *L. sp.*, メジナ *Girella punctata*, マハタ *Epinephelus septemfasciatus*) およびスズキ目から派生したとされるカレイ目²²⁾ のヒラメ *Paralichthys olivaceus* が本群に含まれることから^{5-8,10,11,19-21)}, β 顆粒のみをもつ点は, 現生真骨魚類のうち正真骨下区²³⁾ の魚類に広範囲にわたって受け継がれている形質と考えられる。しかし, スズキ目のナイ ルティラピア *Oreochromis niloticus*, イサキ *Parapristipoma trilineatum* およびブリ *Seriola quinqueradiata* はI群に^{3,4,17)}, また, マダイは上述のようにII-B群に属する¹⁶⁾。したがって, スズキ目魚類は, 好中球内の顆粒の種類数から見て多

2011年5月30日受付. Received May 30, 2011

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

[†]別刷り請求先 (corresponding author) : kondom@fish-u.ac.jp

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

Condition ^{1,2}	PN ³	Condition ^{1,2}	PN ³
MG: DW	1	G : $1/150$ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	42
: 5 mM PB, pH5.0	2	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min	43
: 5 mM PB, pH6.0	3	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	44
: 5 mM PB, pH7.0	4	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	45
: 5 mM PB, pH8.0	5	MGG: DW, 1:20, 15 min	46
: $1/15$ M PB, pH5.0	6	: DW, 1:20, 60 min	47
: $1/15$ M PB, pH6.0	7	: DW, 1:100 , 15 min	48
: $1/15$ M PB, pH7.0	8	: DW, 1:100 , 60 min	49
: $1/15$ M PB, pH8.0	9	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	50
G : DW, 1:20, 15 min	10	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	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, 15min	54
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	14	: 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60min	55
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	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, 15min	58
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15min	18	: 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60min	59
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60min	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, 15min	62
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15min	22	: 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	63
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60min	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	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 15min	66
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	26	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	67
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	27	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	68
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	28	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	69
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	29	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:20, 15 min	70
: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	30	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:20, 60 min	71
: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	31	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	72
: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	32	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	73
: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	33	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 15min	74
: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:20, 15min	34	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 60min	75
: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:20, 60min	35	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	76
: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	36	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	77
: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	37	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	78
: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	48	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min	79
: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	39	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	80
: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	40	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	81
: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	41		

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.

³Preparation number.

様ではないかと考えられている¹⁶⁾。

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、スズキ目スズキ亜目アカメ科に属するアカメ *Lates japonicus*²⁴⁾ の好中球の形態学的特徴をMRSV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。その結果、既報の各種魚類の好中球とは異なる新たな形態学的特徴が認められたのでここに報告する。

材料および方法

実験魚には、平均全長 45.5 cm のアカメを用いた。アカメは水産大学校の飼育施設に搬入後、流水条件下で1年以上飼育したのち実験に供した。飼育期間中は市販の配合飼料または生餌（甲殻類）を適宜給餌した。なお、実験時の水温は17°Cであった。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)¹⁵⁾ にしたがった。

結 果

アカメの好中球には β 顆粒と γ 顆粒が観察されたが (Fig. 1A), α 顆粒は見られなかった。また、いずれの好中球にもY小体（安本小体, Yasumoto body (Y-body)) が認められた。アカメ好中球の細胞化学的特徴を Table 2 に示す。

好中球は直径 8.0 ~ 12.0 μm の円形または卵円形であり、細胞に占める核の割合は低く、核は円形から分葉核（2分葉まで）であり、細胞内にやや偏在していた。核の染色質網は細かく、小型の濃縮染色質が観察された。濃縮染色質はMG染色では淡青色を呈したが、G染色およびMGG染色では、赤紫色を示した。ほとんど全ての染色条件において細胞質基質は灰白色または淡青色を呈したが、1/15 M のリン酸緩衝液を用いたMG染色では、pH5.0およびpH6.0の場合、細胞質基質は淡橙色であった (Fig. 1B)。

β 顆粒は円形または卵円形で長径が0.5 μm 以下であ

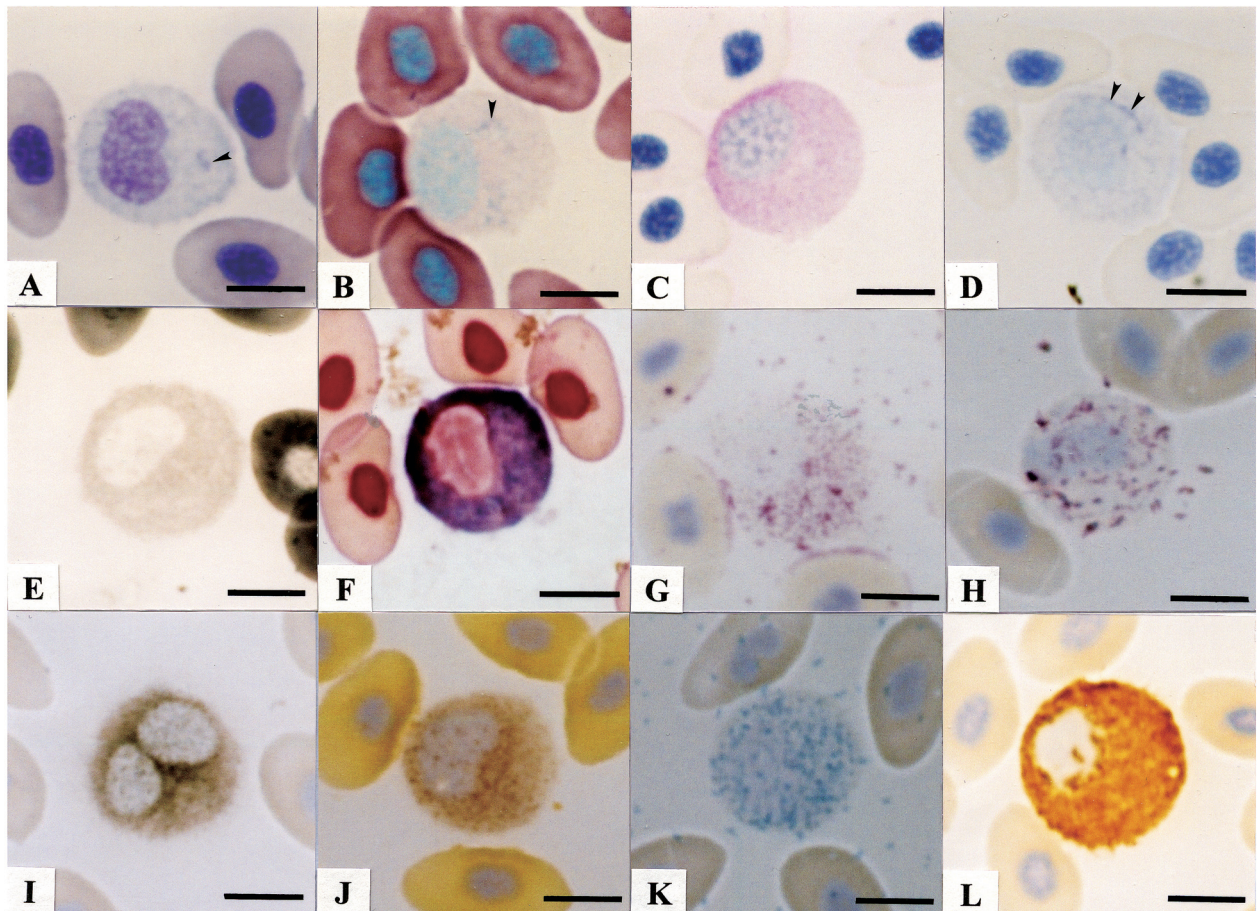


Fig. 1. Neutrophils of Japanese lates. A, May-Grünwald (MG) · Giemsa stain (PN 72; See Table 1); B, MG stain (PN 6; See Table 1); C, periodic acid Schiff reaction; D, toluidine blue; E, sudan black B; F, alkaline phosphatase; G, acid phosphatase; H, β -glucuronidase; I, α -naphthyl acetate esterase; J, α -naphthyl butyrate esterase; K, naphthol AS-D chloroacetate esterase; L, peroxidase. Arrowheads show Y-body. Bars=5 μm .

り、細胞質に充満していた。本顆粒はいずれの条件の Romanowsky 型染色においても明瞭な色調を示さず難染性であった。 γ 顆粒は円形または卵円形で長径が $0.3 \mu\text{m}$ 以下であり、細胞質に多数散在していた。本顆粒はいずれの条件の Romanowsky 型染色においても淡青色を呈した。Y 小体は円形、卵円形、桿形、コマ形、三日月形、紐状など形態および大きさは多様であり、個数は好中球ごとに異なっていたが、Y 小体が全く観察されない好中球は認められなかった。同小体はいずれの染色条件においても他魚種と同様に青色を呈した。

微細（長径 $0.3 \mu\text{m}$ 以下）な円形または卵円形の periodic acid Schiff 反応 (PAS) 陽性顆粒が、いずれ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 (Fig. 1C)。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。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、いずれの好中球にも種々の形態（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 (Fig. 1D)。また、円形または卵円形の陽性顆粒（長径 $0.3 \mu\text{m}$ 以下）が多数認められるとともに、核

も青染された。オイルレッド O およびズダンⅢ染色では陽性部位は観察されなかった。しかし、ズダンブラック B (SBB) 染色では円形または卵円形（長径 $0.3 \mu\text{m}$ 以下）の弱陽性顆粒が多数観察され (Fig. 1E)、細胞質基質も弱陽性であった。アルカリ性フォスファターゼ (AIP) は円形または卵円形（長径 $0.3 \mu\text{m}$ 以下）の陽性顆粒として多数観察された (Fig. 1F)。また、細胞質基質も AIP 弱陽性であった。酸性フォスファターゼ (AcP) は円形または卵円形（長径 $0.5 \mu\text{m}$ 以下）の陽性顆粒として多数観察された (Fig. 1G)。 β -グルクロニダーゼ (β -Glu) は長径 $0.6 \mu\text{m}$ 以下の円形、卵円形または桿形の陽性顆粒として認められた (Fig. 1H)。 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 (NASDCAE) はいずれも長径 $0.3 \mu\text{m}$ 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 (Figs. 1I-1K)。ペルオキシダーゼ (PO) は円形または卵円形の陽性顆粒（長径 $0.5 \mu\text{m}$ 以下）として認められ、細胞質に充満していた (Fig. 1L)。核には PO 陽性反応は検出されなかった。

Table 2. Summary of reactions of Japanese lates neutrophil to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number and size)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$); Hyaloplasm
PAS after digestion with α -amylase	—
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidine blue (in distilled water)	Granule (amorphous (a few, equivalent to Y-body), round or oval (many, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$, equivalent to γ G)); Nucleus
Sudan black B	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$); Hyaloplasm
Sudan III	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$, equivalent to γ G); Hyaloplasm
Acid phosphatase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$)
β -Glucuronidase	Granule (round, oval or rod, many, $\phi \leq 0.6 \mu\text{m}$)
α -Naphthyl acetate esterase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$)
α -Naphthyl butyrate esterase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$)
Peroxidase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$, equivalent to β G)

—, non detection.

Table 3. Summary of Romanowsky-type staining characteristics of γ granule in hagfish and actinopterygians neutrophil

PN	Fish and number of γ granules observed in each staining preparation ^{1,2}								
	<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>
1	+++	-	-	-	-	+++	-	NT	-
2	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-
3	+++	-	-	-	-	+++	+	-	-
4	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-
5	+++	-	+++	-	-	+++	NT	NT	-
6	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
7	-	-	-	-	-	+++	+	-	-
8	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-
9	-	-	+	-	-	+++	NT	NT	-
10	+++	+	+++	+++	NT	+++	+++	NT	+++
11	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	NT	+++
12	+++	-	+	+	NT	+++	NT	NT	+++
13	+++	+	+	+++	+++	+++	NT	NT	+++
14	+++	+	+++	+	NT	+++	+	NT	+++
15	+++	+	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++
16	+++	-	+	+	NT	+++	NT	NT	+++
17	+++	+	+	+	+++	+++	NT	NT	+++
18	+++	+	+++	+++	NT	+++	+++	NT	+++
19	+++	+	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++
20	+++	-	+	+	NT	+++	NT	NT	+++
21	+++	+	+++	+	+++	+++	NT	NT	+++
22	+++	+	+++	+++	NT	+++	+++	NT	+++
23	+++	+	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++
24	+++	-	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
25	+++	+	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++
26	+++	+	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
27	+++	+	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
28	+++	-	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
29	+++	+	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
30	+++	+	+++	+++	NT	+++	-	NT	+++
31	+++	+	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++
32	+++	-	+++	+	NT	+++	NT	NT	+++
33	+++	+	+++	+	+++	+++	NT	NT	+++
34	+++	+	+++	+++	NT	+++	-	NT	+++
35	+++	+	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++
36	+++	-	+++	+	NT	+++	NT	NT	+++
37	+++	+	+++	+	+++	+++	NT	NT	+++
48	+++	+	+++	+++	NT	+++	+++	NT	+++
39	+++	+	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++
40	+++	-	+++	+	NT	+++	NT	NT	+++
41	+++	+	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++

¹*Eb*, *Eptatretus burgeri* (hagfish, Kondo and Takahashi 2009¹⁴); *Pe*, *Polypterus endlicheri* (Kondo and Takahashi 2009¹³); *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi 2009¹²); *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel, Kondo and Takahashi 2009¹⁵); *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, Kondo et al. 2002²); *Laj*, *Lates japonicus* (Japanese lates, present report); *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, Yasumoto et al. 2003³); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, Kondo et al. 2004⁴); *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack, Kondo et al. 2009¹⁷).

²+++ , many; + , some; - , not observed; NT , not tested.

PN, preparation number (See Table 1).

Table 3. Cont.

PN	Fish and number of γ granules observed in each staining preparation ^{1,2}								
	<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>
42	+++	+	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
43	+++	+	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
44	+++	-	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
45	+++	+	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
46	+++	-	+	+++	-	+++	+++	NT	+++
47	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	NT	+++
48	+++	-	+	+	-	+++	+	NT	+++
49	+++	-	+	+	-	+++	+	NT	+++
50	+++	-	+	+	-	+++	-	-	+++
51	+++	-	+++	+	+++	+++	-	NT	+++
52	+++	-	+	-	-	+++	NT	NT	+++
53	+++	-	+++	-	-	+++	NT	NT	+++
54	+++	-	+	+	-	+++	+++	-	+++
55	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	NT	+++
56	+++	-	+	+	-	+++	NT	NT	+++
57	+++	-	+++	+	+	+++	NT	NT	+++
58	+++	-	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
59	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	NT	+++
60	+++	-	+++	+++	+	+++	NT	NT	+++
61	+++	-	+++	+++	+	+++	NT	NT	+++
62	+++	-	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
63	+++	-	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
64	+++	-	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
65	+++	-	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
66	+++	-	+	+	-	+++	-	-	+++
67	+++	-	+	+	+++	+++	-	NT	+++
68	+++	-	+	-	-	+++	NT	NT	+++
69	+++	-	+	-	-	+++	NT	NT	+++
70	+++	-	+++	+	+	+++	+++	-	+++
71	+++	-	+++	+	+++	+++	+++	NT	+++
72	+++	-	+++	+	-	+++	NT	NT	+++
73	+++	-	+++	+	+	+++	NT	NT	+++
74	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NT	+++
76	+++	-	+++	+	+	+++	NT	NT	+++
77	+++	-	+++	+++	+++	+++	NT	NT	+++
78	+++	+++	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
79	+++	+++	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
80	+++	-	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++
81	+++	-	+++	+++	NT	+++	NT	NT	+++

¹*Eb*, *Eptatretus burgeri* (hagfish, Kondo and Takahashi 2009¹⁴); *Pe*, *Polypterus endlicheri* (Kondo and Takahashi 2009¹³); *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi 2009¹²); *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel, Kondo and Takahashi 2009¹⁵); *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, Kondo et al. 2002²); *Laj*, *Lates japonicus* (Japanese lates, present report); *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, Yasumoto et al. 2003³); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, Kondo et al. 2004⁴); *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack, Kondo et al. 2009¹⁷).

²+++ , many; + , some; - , not observed; NT , not tested.

PN, preparation number (See Table 1).

考 察

本研究の結果から、アカメの好中球には2種類の顆粒(β 顆粒, γ 顆粒)とY小体が存在することが明らかとなった。

β 顆粒はこれまでに著者らが報告した全ての真骨魚類(アジアアロワナ, ウナギ, コイ, アユ, ノーザンパイク, ナイルティラピア, イサキ, ボラ, メナダ, オオクチバス, ブルーギル, スズキ, ヒラスズキ, タイリクスズキ, メジナ, マハタ, マダイ, ブリ, ヒラメ, トラフグ)で認められているが^{1-12,15-17,19-21)}, 魚類を含む脊椎動物の原始的な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* や, 肉鱗綱肺魚亜綱のアフリカハイギョ *Protopterus annectens* および真骨魚類とともに条鱗綱に含まれ, 条鱗綱の中で最も祖先的と考えられている腕鱗亜綱ポリプテルス目に属する *Polypterus endlicheri* の好中球には β 顆粒は観察されていない^{13,14)}。

γ 顆粒は真骨魚類ではアジアアロワナ, ウナギ, コイ, ナイルティラピア, イサキおよびブリの好中球に観察されている^{1-4,12,15,17)}。また, γ 顆粒はヌタウナギと *P. endlicheri* にも認められている^{13,14)}。しかし, 本顆粒の染色性は魚種間で異なることから (Table 3), γ 顆粒の内容物や機能は魚種間で異なると考えられる¹⁷⁾。アカメの好中球にも γ 顆粒が観察されたが, その染色性は前述のいずれの魚種の γ 顆粒とも異なっていた (Table 3)。

Y小体はヌタウナギや *P. endlicheri* とともに各種真骨魚類の好中球に観察されていることから^{3-17,19-21)}, 同小体は魚類の好中球に共通する構造物と考えられており²¹⁾, アカメの好中球にもY小体が観察されたことはこの考えを支持している。

細胞化学的特性からアカメ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。PAS陽性顆粒は β 顆粒とは大きさが異なり, γ 顆粒とは数が異なる。また, PAS陽性顆粒は α -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。SBB陽性顆粒は形状および大きさから β 顆粒とは異なり, γ 顆粒よりも数が多いことから, 両顆粒がSBB陽性顆粒であるとは言えない。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とともに, 微細な淡青色の陽性顆粒が観察された。これらの陽性部位は形態学的特徴から, 前者はY小体に, 後者は γ 顆粒に相当すると思われる。AIP陽性顆粒は形状, 大きさおよび顆粒数が γ 顆粒と類似していることから, 本酵素は γ 顆粒に存在すると思われる。AcP陽性顆粒は γ 顆粒とは形状が, β 顆粒と数が異なり,

β -Glu陽性顆粒は γ 顆粒や β 顆粒とは形状と大きさが異なる。また, α -NAE, α -NBEおよびNASDCAE陽性顆粒の大きさおよび形状は γ 顆粒と類似しているが, γ 顆粒よりも数が多いことから, これら酵素の存在部位は確定できない。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から, β 顆粒に相当すると考えられる。

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 4), 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, β 顆粒を有する魚種(アジアアロワナ, ウナギ, アユ, ノーザンパイク, ボラ, メナダ, ブルーギル, スズキ, ヒラスズキ, メジナ, マハタ, マダイ, ブリ, ヒラメ, トラフグ)では, 本顆粒がPO陽性であると考えられている^{6-12,15-17,19-21)}。アカメにおいても β 顆粒にPOが検出された。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)とⅢ-B群(アユ, ボラ, メナダ, マハタ)に細分されており²¹⁾, 前者ではPO活性は β 顆粒に, 後者ではPO活性が β 顆粒のみならず核にも検出されている。アカメの好中球の核はPO陰性であった。

Y小体を有する魚種(ヌタウナギ, *P. endlicheri*, アジアアロワナ, ウナギ, アユ, ノーザンパイク, ボラ, メナダ, ブルーギル, スズキ, ヒラスズキ, メジナ, マハタ, マダイ, ブリ, ヒラメ, トラフグ)では, 同小体はTB陽性であると考えられている^{6-17,19-21)}。アカメにおいてもY小体はTB陽性であったが, γ 顆粒にも陽性反応が認められた。しかし, γ 顆粒を有するヌタウナギ, *P. endlicheri*, アジアアロワナ, ウナギおよびブリでは, γ 顆粒にTB陽性反応は認められていない^{12-15,17)}。

本研究によって, アカメの好中球には2種類の顆粒(β 顆粒, γ 顆粒)とY小体が存在すること, β 顆粒にはPOが, γ 顆粒にはAIPとTB陽性物質が, Y小体にはTB陽性物質が存在することが明らかとなった。これまでに, 著者らは真骨魚類を好中球内顆粒の種類数の違いから3群に大別してきたが, アカメはいずれの群にも属さないことから, アカメが所属する新たな群としてIV群を設けたい。

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。

Table 4. Comparison of cytochemical characteristics of neutrophils from various fish species

Test ¹	Fish and type of cytoplasmic granule ²																	
	<i>Eb</i>	<i>Pa</i>	<i>Pe</i>	<i>Sf</i>	<i>Aj</i>	<i>Pla</i>	<i>El</i>	<i>Mc</i>	<i>Ch</i>	<i>Laj</i>	<i>Lm</i>	<i>Lj, Ll</i>	<i>Es</i>	<i>Sq</i>	<i>Gp</i>	<i>Pm</i>	<i>Po</i>	<i>Tr</i>
PAS	+	(P)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)
PAS- α A	+	(P)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(H, G)
AB pH1.0	—	—	—	—	—	—	±(H)	±(H)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AB pH2.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
TB	+	(N, Y)	+	(N, Y)	+	(N, Y)	+	(H, N, Y)	+	(N, Y, Y)	+	(N, Y)	+	(H, N, Y)	+	(N, Y)	+	(N, Y)
SBB	—	—	+	(α 1)	+	(G)	+	(H, G)	±(H, G)	±(H, G)	+	(G)	+	(H, G)	+	(β)	+	(G)
SIII	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ORO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AIP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AcP	—	+	(α 1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	(H, G)	—	—
β -Glu	—	+	(α 1)	—	+	(γ)	+	(G)	+	(G)	+	(G)	+	(G)	+	(G)	+	(G)
α -NAE	—	—	+	(α 1)	—	+	(G)	+	(G)	+	(G)	—	+	(G)	—	+	(G)	—
α -NBE	+	(P)	+	(α 1)	+	(γ)	+	(H, G)	+	(H, G)	+	(G)	+	(H, G)	+	(γ)	+	(G)
NASDCAE	+	(P)	+	(α 1)	+	(γ)	+	(G)	+	(H, G)	+	(G)	+	(H, G)	—	+	(G)	—
PO	—	—	—	+	(β)	+	(N, β)	+	(N, β)	+	(β)	+	(N, β)	+	(β)	+	(β)	+

¹PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS- α A, 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.

²*Eb*, *Epiplatys burgeri* (hagfish, Kondo and Takahashi 2009¹⁴); *Pa*, *Protopterus amietensis* (African lungfish, Kondo and Takahashi 2010¹⁸); *Pe*, *Polypterus endlicheri* (Kondo and Takahashi 2009¹³); *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi 2009¹²); *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel, Kondo and Takahashi 2009¹⁵); *Pla*, *Plecoglossus atrovirens* (Ayu, Kondo 2006⁹); *El*, *Exocoetis lucius* (northern pike, Kondo et al. 2008¹¹); *Mc*, *Mugil cephalus* (gray mullet, Kondo et al. 2011²⁰); *Ch*, *Chelon haematocheilus* (redlip mullet, Kondo et al. 2011²¹); *Laj*, *Lates japonicus* (Japanese lates, present report); *Lm*, *Lepomis macrochirus* (bluegill, Kondo et al. 2005⁶); *Lj*, *Lateolabrax japonicus* (Japanese seabass, Kondo et al. 2007¹⁰); *Es*, *Epinephelus septemfasciatus* (sevenband grouper, Kondo et al. 2010¹⁹); *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack, Kondo et al. 2009¹⁷); *Gp*, *Girella punctata* (rudderfish, Kondo et al. 2005^{5,7}); *Pm*, *Pagrus major* (red sea-bream, Kondo et al. 2009¹⁶); *Po*, *Paralichthys olivaceus* (Japanese flounder, Kondo et al. 2005⁷); *Tr*, *Takifugu rubripes* (tiger puffer, Kondo et al. 2007⁸); α , eosinophilic granule; α 1, α type 1; α 2, α type 2; β , chromophobic granule; γ , basophilic granule; P, panchromatophilic granule; H, hyaloplasm; G, granular; N, nucleus; —, negative; \pm , weakly positive; +, positive.

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: ポリプテルス好中球の形態学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) Gill AC, Mooi RD: Phylogeny and Systematics of Fishes. In: Hart PJB, and Reynolds JD (ed) Handbook of Fish Biology and Fisheries Vol. 1. Blackwell Publishing, Oxford, 15-42 (2002)
- 23) 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)
- 24) 宮原 一: アカメ科. 岡村 収, 尼岡邦夫 (編), 山溪カラー名鑑 日本の海水魚 (3 版). 山と溪谷社, 東京, 246 (2002)