

メナダの白血球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 林 裕之, 高橋幸則

Morphological and Cytochemical Characteristics of Leukocytes from Redlip Mullet, *Chelon haematocheilus*

Masakazu Kondo[†], Hiroyuki Hayashi and Yukinori Takahashi

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of leukocytes from redlip mullet (*Chelon haematocheilus*) were examined by light microscopy. Lymphocyte, monocyte and neutrophil were observed in the peripheral blood. Lymphocyte had round to oval nucleus with coarse chromatin-mesh. Cytoplasm was agranular or contained some basophilic (blue) granules (Lymphocyte Basophilic Granule, LBG). Monocyte had round to kidney-shaped nucleus with fine chromatin-mesh. Two types of granules, monocyte major granule (MMG) and monocyte minor granule (MmG) were observed in the monocyte. The MmG were classified into two categories, small MmG (MmSG) and large MmG (MmLG), according to the size and staining characteristics. Neutrophils were round to oval and the nucleus round to lobule-shaped. Only one type of granule, chromophobic granule (β G) was observed in the neutrophils. The β G was round to oval, unstained by Romanowsky type stain and peroxidase positive. The Yasumoto body was also found in the neutrophil and toluidine blue positive (orthochromatically).

Key words : redlip mullet, *Chelon haematocheilus*, leukocyte, morphology, cytochemistry

緒 言

近年、希釈液の種類、希釈比率および染色時間を変えて Romanowsky型染色（メイ・グリウンワルド (MG)、ギムザ (G) およびMGG染色)を血液塗沫標本に施して、染色性の違いから形態学的特徴を評価する「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明らかにされている¹⁻¹⁸⁾。

前報において著者らは、ボラ目ボラ科ボラ属のボラ *Mugil cephalus*について、好中球を含む各種白血球にMRSVを適用し、形態学的特徴を明らかにするとともに細胞化学的特徴について報告した¹⁸⁾。ボラの血液中には、リンパ球、単球および好中球が観察されたが、好酸球と好塩基球は認められなかった¹⁸⁾。また、一部のリンパ球には好

塩基性の顆粒（リンパ球塩基好性顆粒, Lymphocyte Basophilic Granule, LBG）が認められ¹⁸⁾、単球にも好塩基性の顆粒（単球主要顆粒, Monocyte Major Granule, MMG）が観察された¹⁸⁾。さらに、好中球には難染色顆粒（ β 顆粒）のみが認められたことから、ボラはノーザンパイク *Exos lucius*, オオクチバス *Micropterus salmoides*, ブルーギル *Lepomis macrochirus*, スズキ *Lateolabrax japonicus*, ヒラズズキ *L. latus*, タイリクスズキ *L. sp.*, メジナ *Girella punctata* およびヒラメ *Paralichthys olivaceus* とともに^{5-7, 9, 10)}、真骨魚類のⅢ群に含まれることが明らかとなった¹⁸⁾。

メナダ *Chelon haematocheilus* はボラと同じくボラ目ボラ科に属するが、ボラとは異なりメナダ属に分類されている¹⁹⁾。メナダの白血球のMRSV特性を調べたところ、ボラとは異なる形態学的特徴が認められた。また、メナダの白血球の細胞化学的特徴も、ボラとは大きく異なっていたのでここに報告する。

2010年8月30日受付。Received August 30, 2010.

水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595 Japan).

[†]連絡先 (Corresponding author).

Table 1. Staining condition 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, 15min	42
: 5 mM PB, pH5.0	2	: 1/150 M PB, pH8.0, 1:20, 60min	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, 15min	46
: 1/15 M PB, pH5.0	6	: DW, 1:20, 60min	47
: 1/15 M PB, pH6.0	7	: DW, 1:100, 15min	48
: 1/15 M PB, pH7.0	8	: DW, 1:100, 60min	49
: 1/15 M PB, pH8.0	9	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	50
G : DW, 1:20, 15min	10	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	51
: DW, 1:20, 60min	11	: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15min	52
: DW, 1:100, 15min	12	: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60min	53
: DW, 1:100, 60min	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, 15min	56
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15min	16	: 5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60min	57
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60min	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, 15min	60
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 15min	20	: 5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60min	61
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60min	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, 15min	64
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 15min	24	: 5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60min	65
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60min	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, 15min	68
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15min	28	: 1/15 M PB, pH5.0, 1:100, 60min	69
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60min	29	: 1/15 M PB, pH6.0, 1:20, 15min	70
: 1/150 M PB, pH5.0, 1:20, 15min	30	: 1/15 M PB, pH6.0, 1:20, 60min	71
: 1/150 M PB, pH5.0, 1:20, 60min	31	: 1/15 M PB, pH6.0, 1:100, 15min	72
: 1/150 M PB, pH5.0, 1:100, 15min	32	: 1/15 M PB, pH6.0, 1:100, 60min	73
: 1/150 M PB, pH5.0, 1:100, 60min	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, 15min	76
: 1/150 M PB, pH6.0, 1:100, 15min	36	: 1/15 M PB, pH7.0, 1:100, 60min	77
: 1/150 M PB, pH6.0, 1:100, 60min	37	: 1/15 M PB, pH8.0, 1:20, 15min	78
: 1/150 M PB, pH7.0, 1:20, 15min	48	: 1/15 M PB, pH8.0, 1:20, 60min	79
: 1/150 M PB, pH7.0, 1:20, 60min	39	: 1/15 M PB, pH8.0, 1:100, 15min	80
: 1/150 M PB, pH7.0, 1:100, 15min	40	: 1/15 M PB, pH8.0, 1:100, 60min	81
: 1/150 M PB, pH7.0, 1:100, 60min	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.

材料および方法

実験魚には、有明海(熊本県)沿岸で採取したメナダ(体重約2kg)を用いた。投網によって採取したのち、水産大学の飼育施設に搬入して、流水条件下で1週間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(マリン6号, 林兼産業)を適宜給餌した。なお、実験期間中の水温は20.0±1.0°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文献14にしたがった。

結 果

メナダの血液中には3種類の白血球(リンパ球, 単球お

よび好中球)が観察された。しかし、好酸球および好塩基球は認められなかった。メナダ白血球のMRSV特性をTable 2に、細胞化学的特徴をTable 3に示した。

リンパ球

リンパ球は長径5.3~6.2μmの円形または卵円形であった(Fig. 1A)。細胞に占める核の割合は高く、約70%のリンパ球では細胞質に長径0.2~0.7μmの円形(直径0.5μm以下)または卵円形(直径0.7μm以下)の顆粒(LBG)が少数観察された。LBGはほとんどの染色条件において青色を呈したが、蒸留水を用いたG染色において、希釈率を1:20, 染色時間を1時間とした場合にのみ、顆粒は赤紫色を示した。

核は長径4.5~5.8μmの円形または卵円形であり、細胞内にやや偏在していた。核の染色質網は荒く、粗大な異染色

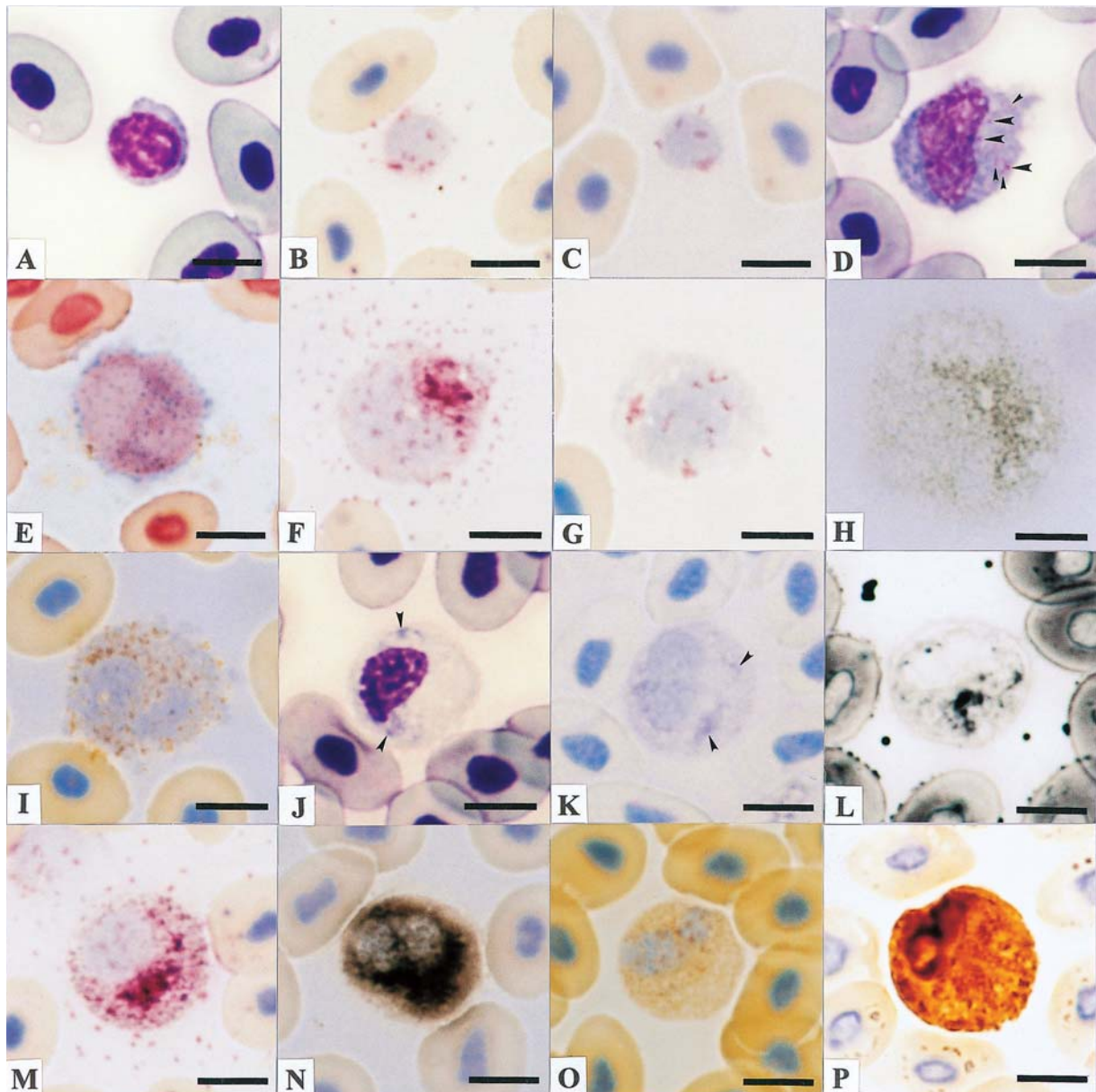


Fig. 1. Leukocytes of redlip mullet. A-C, lymphocyte; D-I, monocyte; J-P, neutrophil. A, D and J; MGG; E, alkaline phosphatase; B, F and M, acid phosphatase; C and G, β -glucuronidase; K, toluidine blue; L, sudan black B; H and N, α -naphthyl acetate esterase; I and O, α -naphthyl butyrate esterase; P, peroxidase. Note monocyte minor large granule (large arrowheads) and monocyte minor small granule (small arrowheads) in D. Arrowheads in J and K show Y-body. Bars=5 μ m.

質が観察された。蒸留水および低濃度（5 mM）のリン酸緩衝液を希釈液に用いたMG染色では、いずれのpHにおいても異染色質は青色を示したが、高濃度（ $1/15$ M）のリン酸緩衝液ではpHに関係なく異染色質は淡青紫色であった。低濃度の緩衝液を希釈液に用いたG染色では、pH5.0の場合、希釈率（G液：希釈液）1：100では、15分間の染色によって異染色質は青色を呈したが、1時間の染色では、異染色質は赤紫色であった。また、pH6.0の場合、希釈率1：100では、15分間の染色によって異染色質は青紫色であったが、1時間の染色では、異染色質は赤紫色を示した。pH7.0

およびpH8.0の低濃度緩衝液を用いた場合には、希釈率1：100で、15分間の染色によって異染色質は青紫色であった。また、高濃度の緩衝液を用いたG染色においても、pH5.0、6.0および8.0の場合、希釈率1：100では、15分間の染色によって異染色質は青紫色であり、pH6.0では、1時間の染色時間においても同様の色調を示した。他の染色条件では、異染色質は赤紫色であった。

細胞質基質はほとんど全ての染色条件において、淡青色を呈したが、蒸留水を用いたG染色において、希釈率1：100の場合、1時間の染色で細胞質基質は淡赤色を呈した。

Table 2. Color of leukocytes from redlip mullet, *Chelon haematocheilus*

SC	Lymphocyte			Monocyte					Neutrophil			
	N	H	LBG	N	H	MMG	MmSG	MmLG	N	H	β G	Yb
1	B	LB	B	B	LB	B	Cl	Cl	B	LB	Cl	B
2	B	LB	B	B	LB	B	Cl	Cl	B	LR	Cl	B
3	B	LB	B	B	LB	B	Cl	Cl	B	LB	Cl	B
4, 5	B	LB	B	B	LB	B	R	Cl	B	LB	Cl	B
6	LB	LB	B	LB	LR	B	Cl	Cl	RP	LR	Cl	B
7	LB	LB	B	LB	LB	B	R	Cl	B	LR	Cl	B
8	LB	LB	B	LB	LB	B	Cl	Cl	B	LB	Cl	B
9	LB	LB	B	LB	LB	B	Cl	Cl	LB	LR	Cl	B
10	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LB	Cl	B
11	RP	LRP	RP	RP	LRP	B	Cl	Cl	RP	LR	Cl	B
12	RP	LB	B	LRP	LRP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
13	RP	LB	B	RP	LRP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
14	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
15	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LR	Cl	B
16	B	LB	B	LBP	LBP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
17	RP	LB	B	LBP	LBP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
18, 19	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
20	BP	LB	B	LBP	LBP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
21-23	RP	LB	B	LRP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
24	BP	LB	B	LBP	LBP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
25	RP	LB	B	LRP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
26, 27	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
28	BP	LB	B	LBP	LBP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
29	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
30	RP	LB	B	LBP	LBP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
31	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
32	BP	LB	B	LBP	LBP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
33, 34	RP	LB	B	LRP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
35	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
36, 37	BP	LB	B	LBP	LBP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
38, 39	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
40	RP	LB	B	LRP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
41-43	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
44	BP	LB	B	LBP	LBP	B	Cl	Cl	BP	LBP	Cl	B
45	RP	LB	B	RP	LBP	B	Cl	Cl	RP	LBP	Cl	B
46-66	RP	LB	B	RP	LBP	B	R	DR	RP	LBP	Cl	B
67	RP	LB	B	RP	LBP	B	R	DR	RP	LRP	Cl	B
68	RP	LB	B	LRP	LBP	B	R	DR	RP	LRP	Cl	B
68	RP	LB	B	RP	LBP	B	R	DR	RP	LRP	Cl	B
70-79	RP	LB	B	RP	LBP	B	R	DR	RP	LBP	Cl	B
80	RP	LB	B	LRP	LBP	B	R	DR	RP	LBP	Cl	B
81	RP	LB	B	RP	LBP	B	R	DR	RP	LBP	Cl	B

SC, staining condition (See Table 1).

N, nucleus; H, hyaloplasm; LBG, lymphocyte basophilic granule; MMG, monocyte major granule; MmSG, monocyte minor small granule; MmLG, monocyte minor large granule; β G, β granule (chromophobic granule); Yb, Yasumoto body; B, blue; BP, bluish purple; Cl, colorless; DR, dark red; LB, light blue; LBP, light bluish purple; LR, light red; LRP, light reddish purple; R, red; RP, reddish purple.

約10%のリンパ球には、periodic acid Schiff反応 (PAS) 陽性顆粒が細胞質に少数散在していた。PAS陽性顆粒は直径0.3 μ m以下の円形であり、 α -アマラーゼ処理 (α -A) によって消失した。細胞質基質はPAS陰性であった。アルシアンブルー (AB) 染色では陽性部位は観察されなかった。蒸留水に溶解したトルイジンブルー (TB) による染色では核および細胞質基質が陽性 (青色) であり、また、約70%のリンパ球において、円形または卵円形で青色の陽性顆粒 (長径0.7 μ m以下) が少数観察された。オイルレッドO (ORO) およびズダン III (SIII) 染色では陽性部位は観察されなかったが、ズダンブラックB (SBB) 染色ではいずれのリンパ球においても、直径0.6 μ m以下の円形の陽性顆粒が少数観察された。また、細胞質基質は弱陽性であった。酸性フォスファターゼ (AcP) は長径1.1 μ m以下の不定形

(円形 (直径0.3 μ m以下), 卵円形 (長径0.4 μ m以下), コンマ形, 三日月形) の陽性顆粒として少~多数観察された (Fig. 1 B)。 β -グルクロニダーゼ (β -Glu) 染色では、約70%のリンパ球に、長径1.5 μ m以下の不定形 (円形 (直径0.4 μ m以下), 卵円形 (長径1.0 μ m以下), コンマ形, 三日月形) の陽性顆粒が少数観察された (Fig. 1 C)。アルカリ性フォスファターゼ (AIP), α -ナフチルアセテートエステラーゼ (α NAE), α -ナフチルプテレートエステラーゼ (α NBE), ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (NASDCAE) およびペルオキシダーゼ (PO) 活性は検出されなかった。

単球

単球は長径13.0~14.3 μ mの円形または卵円形であった

Table 3. Cytochemical reactivities of leukocytes from redlip mullet, *Chelon haematotcheilus*

Test ¹	Positive site (shape and number) ²		
	Lymphocyte	Monocyte	Neutrophil
PAS	G (- or + (10%), r, af)	G (- or + (80%), r, o or rod, af to m); H	G (r or o, m); H
PAS- <i>a</i> A	-	G (- or + (20%), r, o or rod, af to m); H	H (weak)
AB (pH1.0)	-	-	-
AB (pH2.5)	-	-	-
TB	G (- or + (70%), r or o, s, eq LBG); H; N	G (r, o, rod, co, cr or st, m, eq MMG); H; N	G (r, o, rod, co, cr or st, s, eq Yb); H; N
SBB	G (r, s); H (weak)	G (r, o or rod, s); H (weak)	G (r, o, rod, co, cr or st, m); H (weak)
SIII	-	-	-
ORO	-	-	-
AIP	-	-	-
AcP	G (r, o, co or cr, s to m)	G (r or o, m); H (weak)	G (r, o, co, cr or st, m)
β -Glu	G (- or + (70%), r, o, co or cr, s)	G (r, o or rod, m)	G (- or + (30%), r, o, rod, or co, af)
α -NAE	-	G (r or o, m)	G (o, m); H (weak)
α -NBE	-	G (r, o, rod or co, m)	G (r, s); H
NASDCAE	-	G (r, o, rod or o, s)	G (- or + (40%), o, af)
PO	-	-	G (r or o, m, eq β G); N

¹PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS-*a*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.
²G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; r, round; o, oval; co, comma; cr, crescent; st, string; m, many; s, some; af, a few; -, non detection; eq, equivalent to; LBG, lymphocyte basophilic granule; MMG, monocyte major granule; β G, β granule (chromophobic granule); Yb, Yasumoto body.

(Fig. 1 D).細胞に占める核の割合は低く、細胞質には長径0.2~2.3 μ mの不定形(円形(直径0.4 μ m以下)、卵円形(長径0.6 μ m以下)、桿形(長径1.0 μ m以下、短径0.4 μ m以下)、コンマ形、三日月形、紐状(長さ2.3 μ m以下)の顆粒(MMG)がいずれの単球にも多数観察された。本顆粒はいずれの希釈液を用いても、Romanowsky型染色によって青色を呈した。また、約90%の単球には濃赤色顆粒と赤色顆粒も観察された。両顆粒ともに円形または卵円形であったが、顆粒の数は前者(2~8個)の方が後者(7~17個)よりも少なかった。前者は長径0.3~0.6 μ mであり、後者(長径0.1~0.3 μ m)よりも大型であった。以後、濃赤色顆粒を単球二次大顆粒(Monocyte Minor Large Granule, MmLG)、赤色顆粒を単球二次小顆粒(Monocyte Minor Small Granule, MmSG)と称す。MmLGまたはMmSGのいずれかのみを有する単球は観察されなかった。MmLGはいずれの条件においてもMGおよびG染色標本では認められなかった。しかし、MGG染色標本ではいずれの条件においても観察された。MmSGはMmLGと同様にG染色によって染色されなかったが、pH7.0およびpH8.0の低濃度緩衝液およびpH6.0の高濃度緩衝液を用いたMG染色標本で観察された。また、MGG染色では、いずれの条件においてもMmSGを有する単球が認められたが、pHの値が高いほどMmSGを有する単球が多数観察された。MmLGとMmSGはともにMGG染色において、pH8.0の高濃度緩衝液を用いて、希釈率1:100で15分間G染色した場合に多数観察されたが、メタノール固定した標本に、この条件でMGG染色したところ、MmLGとMmSGは全く認められなかった。

核は長径7.0~9.2 μ mの円形からソラ豆形であり、細胞内にやや偏在していた。核の染色質網は細かく、小型の異染色質が観察された。蒸留水および低濃度の緩衝液を用いたMG染色では、異染色質は青色を示したが、高濃度緩衝液では淡青色であった。低濃度緩衝液を用いたG染色では、いずれのpHにおいても、希釈率1:100で、15分間の染色では、異染色質は淡青紫色を示した。また、pH5.0では1時間の染色でも同様の染色性を示した。一方、高濃度緩衝液を用いたG染色では、pH5.0の場合、希釈率にかかわらず、15分間の染色で異染色質は淡青紫色を示した。また、pH6.0の場合、希釈率1:100において、染色時間にかかわらず異染色質は淡青紫色を示した。さらにpH8.0では、希釈率1:100で15分間の染色において、同様の染色性を示した。異染色質が淡赤紫色を示す条件がG染色およびMGG染色においてあり、蒸留水を用いて希釈率1:100で15分間のG染色や、低濃度緩衝液を用いたG染色の場合には、pH6.0で希釈

率1:100の15分間、pH7.0で希釈率1:20およびpH7.0で希釈率1:100の1時間において前述の染色性が認められた。また、高濃度緩衝液を用いたG染色では、pH5.0で希釈率1:100の1時間、pH6.0で希釈率1:20の15分間およびpH7.0で希釈率1:100の15分間において同様の染色性であった。この染色性は、高濃度緩衝液を用いたMGG染色においても、pH5.0およびpH8.0で希釈率1:100の15分間の条件で認められた。他の染色条件では、異染色質は赤紫色を呈した。

細胞質基質は多くの染色条件において、淡青紫色を呈したが、pH5.0の高濃度緩衝液を用いたMG染色では淡赤色を呈した。また、蒸留水を用いたG染色では、希釈率1:20で15分間染色した場合、細胞質基質は淡青紫色を呈し、1時間の染色では淡赤紫色を示したが、希釈率1:100では染色時間にかかわらず淡赤紫色であった。

約80%の単球に、PAS陽性顆粒が観察されたが、顆粒の数は様々であった。PAS陽性顆粒は不定形(円形(直径0.4 μm 以下)、卵円形(長径0.6 μm 以下)、桿形(長径1.0 μm 以下、短径0.4 μm 以下))であり、 α -Aによって、多くの単球で消失した。約20%の単球には、処理後も陽性顆粒が観察されたが、色調は減弱していた。細胞質基質はいずれの単球においてもPAS弱陽性であったが、 α -Aによって消失せず、色調の減弱も見られなかった。AB染色では陽性部位は観察されなかった。TB染色によって、種々の大きさの青色の不定形陽性顆粒(円形(直径0.4 μm 以下)、卵円形(長径0.4 μm 以下)、桿形(長径1.0 μm 以下、短径0.4 μm 以下)、コンマ形、三日月形、紐状(長さ2.3 μm 以下))が多数観察された。また、核および細胞質基質も青色を呈した。OROおよびSⅢ染色では陽性部位は観察されなかった。SBB染色では細胞質基質が弱陽性であり、不定形(円形(直径0.3 μm 以下)、卵円形(長径0.4 μm 以下)、桿形(長径0.6 μm 以下、短径0.3 μm 以下))の陽性顆粒が、いずれの単球にも少数観察された。AIPは多数の円形(直径0.6 μm 以下)または卵円形(長径0.8 μm 以下)の陽性顆粒としていずれの単球にも認められた(Fig. 1 E)。また、細胞質基質も弱陽性であった。AcP染色では不定形(円形(直径0.4 μm 以下)、卵円形(長径0.6 μm 以下)、桿形(長径1.0 μm 以下、短径0.4 μm 以下)の陽性顆粒が多数観察された(Fig. 1 F)。 β -Glu染色では不定形(円形(直径0.4 μm 以下)、卵円形(長径0.4 μm 以下)、桿形(長径0.6 μm 以下、短径0.3 μm 以下)、コンマ形、三日月形、紐状)の陽性顆粒が種々の数観察された(Fig. 1 G)。長径0.3 μm 以下の円形または卵円形の α NAE陽性顆粒が多数観察された(Fig. 1 H)。一方、

α NAE陽性顆粒は不定形であり(円形(直径0.4 μm 以下)、卵円形(長径0.6 μm 以下)、桿形(長径0.8 μm 以下、短径0.3 μm 以下)、コンマ形)、多数観察された(Fig. 1 I)。NASDCAEは円形(直径0.3 μm 以下)または卵円形(長径0.4 μm 以下)の陽性顆粒として少数認められた。POは検出されなかった。

好中球

好中球は、直径9.5~11.0 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、細胞質には1種類の顆粒(難染色性顆粒, chromophobic granule, 以後、 β 顆粒と称す)とY小体(安本小体, Yasumoto body (Y-body))が観察された(Fig. 1 J)。 β 顆粒は円形または卵円形で長径が0.8 μm 以下であり、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、難染色性であった。Y小体は、円形(直径0.4 μm 以下)、卵円形(直径0.4 μm 以下)、桿形(長径1.0 μm 以下、短径0.4 μm 以下)、コンマ形、三日月形、紐状(長さ2.0 μm 以下)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、全く観察されないものは認められなかった。本小体は全ての染色条件において青色を呈した。

核は円形(直径5.0~6.2 μm)から分葉核であり、細胞の中央またはやや偏在して存在した。核の染色質網は細かく、小型の濃縮染色質が観察された。異染色質はpH8.0の高濃度緩衝液を用いたMG染色において淡青色を呈した。また、蒸留水、低濃度緩衝液およびpH6.0とpH7.0の高濃度緩衝液を用いたMG染色では、異染色質は青色を示したが、pH5.0の高濃度緩衝液を用いたMG染色では赤紫色を呈した。蒸留水および低濃度緩衝液を用いたG染色において、希釈率1:100の場合、15分間の染色では、異染色質は青紫色を示した。また、pH5.0の低濃度緩衝液を用い、希釈率1:100で1時間G染色した標本でも青紫色を呈した。pH6.0の場合も、希釈率1:100で15分間G染色したところ、同様の染色性を示した。また、高濃度緩衝液を用いたG染色においても、pH5.0の場合、希釈率にかかわらず15分間の染色では、異染色質は青紫色を呈した。pH6.0で希釈率1:100の場合には、染色時間にかかわらず、pH8.0で希釈率1:100の場合には15分間の染色で、同様の染色性を示した。一方、蒸留水を用いたG染色では、希釈率1:100で15分間の染色によって、異染色質は青紫色を示した。他の条件のG染色およびいずれの条件においてもMGG染色では、異染色質は赤紫色を呈した。

細胞質基質は、蒸留水、pH6.0~8.0の低濃度緩衝液およ

びpH7.0の高濃度緩衝液を用いたMG染色では淡青色を示した。一方、pH5.0の低濃度緩衝液と、pH5.0、6.0および8.0の高濃度緩衝液を用いたMG染色では、細胞質基質は淡赤色であった。G染色においても、蒸留水またはpH5.0の低濃度緩衝液を用い、希釈率1:20で60分間染色した場合に同様の染色性を示した。しかし、他の条件のG染色では、細胞質基質は淡青紫であった。MGG染色では、pH5.0の高濃度緩衝液を用いて、希釈率1:20で1時間の染色および1:100でいずれの染色時間においても細胞質基質は淡赤紫色を呈したが、他の条件では淡青紫色であった。

微細（長径0.4 μ m以下）な円形または卵円形のPAS陽性顆粒が、いずれの好中球にも多数観察された。この陽性顆粒は α -Aによって完全に消失した。細胞質基質もPASで弱陽性であったが、 α -Aによって色調が減弱するものの、完全に消失した好中球は認められなかった。AB染色では陽性部位は観察されなかった。TB染色によって核および細胞質基質が青色を呈するとともに、いずれの好中球にも種々の形態（円形（直径0.4 μ m以下）、卵円形（長径0.4 μ m以下）、桿形（長径1.0 μ m以下、短径0.4 μ m以下）、コンマ形、三日月形、紐状（長さ2.0 μ m以下））を示す青色の陽性顆粒が少数観察された（Fig. 1 K）。OROおよびSⅢ染色では陽性部位は観察されなかった。しかし、SBB染色では不定形（円形（直径0.6 μ m以下）、卵円形（長径0.6 μ m以下）、桿形（長径1.0 μ m以下、短径0.6 μ m以下）、コンマ形、三日月形、紐状（長さ1.6 μ m以下））の陽性顆粒が多数観察された（Fig. 1 L）。また、細胞質基質も弱陽性であった。AIPは検出されなかった。AcPは不定形（円形（直径0.3 μ m以下）、卵円形（長径0.6 μ m以下）、コンマ形、三日月形、紐状（長さ1.6 μ m以下））の陽性顆粒として多数観察された（Fig. 1 M）。 β -Gluは不定形（円形（直径0.8 μ m以下）、卵円形（長径0.8 μ m以下）、桿形（長径0.8 μ m以下、短径0.4 μ m以下）、コンマ形）の陽性顆粒として、約30%の好中球に少数認められた。 α NAE陽性顆粒は長径0.4 μ m以下の卵円形であり多数観察され（Fig. 1 N）、 α NBE陽性顆粒は直径1.2 μ m以下の円形であり少数認められた（Fig. 1 O）。 α NAEは細胞質基質にも陽性反応が認められた。NASDCAEは長径0.7 μ m以下の卵円形陽性顆粒として約40%の好中球に少数認められた。POは円形または卵円形の陽性顆粒（長径0.8 μ m以下）として認められ、細胞質に充満していた（Fig. 1 P）。また、核にもPO陽性反応が検出された。

考 察

メナダの血液中には3種類の白血球（リンパ球、単球および好中球）が観察された。

リンパ球

メナダのリンパ球には顆粒状構造物が少数観察された。この構造物は明瞭な粒子状であったことから、本報告では顆粒（LBG）として扱う。ボラのリンパ球にもLBGが認められており¹⁸⁾、MG染色で青色を示すことから、正調メチレンブルー好性を示すと考えられている¹⁸⁾。一方、メナダのリンパ球のLBGは、ほとんどの染色条件ではボラと同様に青色であったが、蒸留水を用いたG染色において、希釈率を1:20とした場合、1時間の染色で赤紫色を示した。この色調が、G染色液中に含まれるエオシンY、メチレンブルーおよびアズールBのいずれによるものかは不明である。

メナダのリンパ球の約10%には、PAS陽性顆粒が細胞質に少数散在していた。ボラのリンパ球にもPAS陽性顆粒が少数観察される。PAS陽性顆粒は、ボラでは長径0.6 μ m以下の円形または卵円形であるのに対して¹⁸⁾、メナダでは直径0.3 μ m以下の円形であり、形状および大きさが魚種によって異なっていた。しかし、両魚種ともにPAS陽性顆粒は、 α -Aによって消失したことから¹⁸⁾、PAS陽性顆粒はグリコーゲン粒子であり、存在率および大きさからLBGとは異なると考えられる。また、ボラのリンパ球では細胞質基質もPAS陽性であり¹⁸⁾、 α -アミラーゼ処理によって消失しなかったが、メナダのリンパ球の細胞質基質はPAS陰性であった。メナダのリンパ球はボラと同様に¹⁸⁾、TB染色で核および細胞質基質が青色を呈し、約70%のリンパ球に種々の大きさの円形または卵円形陽性顆粒として少数観察された。ボラと同様に¹⁸⁾、TBで染色されるメナダのリンパ球の顆粒は、存在率、形状、大きさおよび数の類似性からLBGに相当すると思われる。SBB染色ではボラのいずれのリンパ球にも不定形の陽性顆粒が少数観察されている¹⁸⁾。一方、メナダではいずれのリンパ球においても、直径0.6 μ m以下の円形のSBB陽性顆粒が少数観察され、両魚種間でSBB陽性顆粒の形状および大きさが異なっていた。メナダのいずれのリンパ球にもSBB陽性顆粒が観察されることから、SBB陽性顆粒はボラと同様に¹⁸⁾、LBGとは異なると考えられる。ボラのリンパ球にはAcP、 β -GluおよびNASDCAE陽性顆粒が観察されるが¹⁸⁾、メナダのリンパ球にはAcPお

よび β -Glu陽性顆粒は見られるものの、NASDCAEは検出されなかった。また、これらの酵素染色に陽性の顆粒は、存在率、大きさ、形状または数がLBGとは異なっていた。

単球

ボラの単球には青色を呈する顆粒 (MMG) が認められているが¹⁸⁾、メナダではMMGとともに、赤色を呈する顆粒 (MmLG, MmSG) が観察された。ボラと同様に¹⁸⁾、メナダのMMGはいずれの希釈液を用いても、Romanowsky型染色によって青色を呈し、G染色標本にも観察されることから、メタノール固定時に溶出しなると言える。

メナダの約90%の単球には、円形または卵円形のMmLGとMmSGが観察された。MmLGまたはMmSGのいずれかのみを有する単球は観察されなかったことから、メナダの単球は、MMGのみを有するタイプと、MMGとともにMmLGとMmSGを有するタイプに区分されると言える。MmLGとMmSGは染色性および大きさから異なる種類の顆粒と考えられる。また、両顆粒ともに、メタノール固定後の染色標本には観察されないことから、いずれの顆粒もメタノール固定時に溶出すると思われる。

ボラでは約20%の単球にPAS陽性顆粒が認められるのに対して¹⁸⁾、メナダでは約80%の単球に陽性顆粒が観察された。陽性顆粒数もボラでは少数であったが¹⁸⁾、メナダでは少~多数と様々であった。また、陽性顆粒の形状も、ボラでは円形、卵円形または紐状であるのに対して¹⁸⁾、メナダでは、円形、卵円形または桿形であり、ボラの陽性顆粒は α -アミラーゼ処理によって消失しないが¹⁸⁾、メナダでは多くの単球で消失した。さらに、細胞質基質はボラでは陰性であるが¹⁸⁾、メナダでは弱陽性であり、 α -アミラーゼ処理によって消失しなかった。TBによる染色性にはボラとメナダの間に顕著な違いは認められず¹⁸⁾、メナダの単球のTB陽性顆粒はボラと同様に¹⁸⁾、MMGに相当すると考えられた。SBB陽性顆粒の形状はボラでは円形、卵円形、桿形、コマ形および三日月形であったのに対して¹⁸⁾、メナダでは円形、卵円形および桿形であった。ボラの単球にはAIPは検出されないが¹⁸⁾、メナダでは多数の円形または卵円形のAIP陽性顆粒がいずれの単球にも認められた。また、細胞質基質も弱陽性であった。また、ボラのいずれの単球にもAcP陽性顆粒が多数観察され、約60%の単球には β -Glu陽性顆粒とNASDCAE陽性顆粒が少数認められる¹⁸⁾。一方、メナダではいずれの単球にもAcPとともに β -Glu、 α NAE、 α NBEおよびNASDCAE陽性顆粒が観察され、魚種間で大きく異なっていた。

好中球

メナダの好中球の顆粒はボラと同様に¹⁸⁾、Romanowsky型染色に明瞭な染色性を示さず、PO陽性の難染色性顆粒 (β 顆粒) のみであった。メナダのいずれの好中球にも円形または卵円形のPAS陽性顆粒が多数観察された。しかし、顆粒の大きさはボラでは長径 $1.0\mu\text{m}$ 以下であったのに対して¹⁸⁾、メナダでは長径 $0.4\mu\text{m}$ 以下と小型であった。PAS陽性顆粒は α -アミラーゼ処理によって消失することから、この陽性顆粒はボラと同様に¹⁸⁾、グリコーゲン粒子と考えられる。また、ボラと同様に¹⁸⁾、メナダの細胞質基質もPASで弱陽性であったが、 α -アミラーゼ処理によって色調は減弱するものの、完全には消失しないことから、細胞質基質にはグリコーゲン以外の多糖類も存在すると思われる。TB染色によって、種々の形状を示す青色の顆粒が、メナダの好中球に少数観察された。この構造物の数は好中球ごとに異なっており、数および形状からY小体に相当すると考えられる。ボラにおいても同様のTB陽性顆粒が観察されており、形態学的特徴からY小体に相当するとされている¹⁸⁾。

ボラでは約80%の好中球に不定形のSBB陽性顆粒が少~多数観察されているが¹⁸⁾、メナダではいずれの好中球にも多数の不定形陽性顆粒が観察された。SBB陽性顆粒は形状および数から β 顆粒およびY小体とは異なると思われる。ボラおよびメナダの好中球にはAcP陽性顆粒が多数観察されたが、陽性顆粒の形状は、ボラでは円形、卵円形および桿形であるのに対して¹⁸⁾、メナダでは円形、卵円形、コマ形、三日月形および紐状と多様であった。 β -Glu陽性顆粒はボラでは約60%の¹⁸⁾、メナダでは約30%の好中球に少数観察され、ボラでは円形、卵円形、桿形、コマ形、三日月形、紐状であるのに対し¹⁸⁾、メナダでは円形、卵円形、桿形およびコマ形であった。ボラと同様に¹⁸⁾、メナダの α NAE陽性顆粒は長径 $0.4\mu\text{m}$ 以下であったが、ボラでは円形または卵円形であり¹⁸⁾、メナダでは卵円形であった。また、陽性顆粒数はボラでは少数であるのに対して¹⁸⁾、メナダでは多数であった。 α NBE陽性顆粒はボラの好中球には観察されないが¹⁸⁾、メナダでは円形の顆粒として少数認められた。NASDCAEはボラでは約80%の¹⁸⁾、メナダでは約40%の好中球に少数認められた。しかし、顆粒の大きさおよび形状には魚種間で違いが認められ、ボラでは直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下の円形であるのに対して、メナダでは長径 $0.7\mu\text{m}$ 以下の卵円形であった。メナダのPO陽性顆粒はボラと同様に¹⁸⁾、円形または卵円形であり、細胞質に充満していた。この陽性顆粒は大きさ、形状および数から β 顆粒に相当すると考えられる。また、核にもPO陽性反応が認められた。

ボラの好中球においても、核にPO陽性反応が検出されている¹⁸⁾。

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、好酸性顆粒 (α 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, 11, 14)}、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¹²⁾。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^{8, 15)}、 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¹⁵⁾。III群の好中球には β 顆粒のみが認められ、ノーザンパイク *Exos lucius* や¹⁰⁾、各種スズキ目魚類^{5, 6, 9)} およびスズキ目から派生したとされるカレイ目のヒラメ *Paralichthys olivaceus* が本群に含まれることから⁷⁾、現生真骨魚類のうち、新顎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ている¹²⁾。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, 16)}、また、マダイは上述のようにII-B群に属する¹⁵⁾。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様ではないかと考えられている¹⁶⁾。メナダの好中球には β 顆粒のみが認められたことからIII群に属すると言えるが、PO活性が顆粒のみならず核にも検出されたことから、メナダはボラと同様に、真骨魚類のIII-B群に属し¹⁸⁾、好中球はIII-B型好中球に相当することが明らかとなった¹⁸⁾。

いずれの真骨魚類においても β 顆粒は円形から卵円形であり、長径は約 $1.0\mu\text{m}$ 以下とされている^{1-11, 14-16, 18)}。メナダの β 顆粒はボラと同様に¹⁸⁾、長径 $0.8\mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形顆粒として観察された。

TB陽性のY小体は、魚類を含む脊椎動物の原始的な系統とされているメナダに属するメナダ *Eptatretus burgeri*、真骨魚類とともに条鰭綱に含まれ、条鰭綱の中で最も祖先的と考えられている腕鰭亜綱ポリプテルス目に属する *Polypterus endlicheri* とともにコイを除く各種真骨魚類の好中球に観察されている³⁻¹⁶⁾。また、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に出現することが報告されている²⁰⁾。したがって、Y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¹²⁾、メナダの好中球にもY小体が観察されたことは、この考えを支持している。

PO陽性顆粒はこれまでに、アジアアロワナ、ウナギ、ノーザンパイク、ブルーギル、スズキ、ヒラスズキ、メジナ、マダイ、ブリ、ボラ、ヒラメおよびトラフグにおいて観察されており、陽性顆粒の数、大きさおよび形状の類似性から、本酵素は β 顆粒に局在すると考えられている^{6-11, 14-16, 18)}。しかし、メナダ、*P. endlicheri* およびアフリカハイギョ類の *Protopterus annectens* の好中球にはPO活性も β 顆粒も認められていない^{12, 13, 17)}。

謝 辞

実験魚を採取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. 水大研報, 53, 203-209 (2005)
- 8) 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. 水大研報, 55, 133-139 (2007)
- 9) 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. 水大研報, 55, 141-147 (2007)
- 10) 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. 水大研報, 56,

- 317-321 (2008)
- 11) 近藤昌和, 高橋幸則: アジアアロワナの好中球顆粒. 水大研報, 57, 219-226 (2009)
 - 12) 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. 水大研報, 57, 283-297 (2009)
 - 13) 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. 水大研報, 57, 299-308 (2009)
 - 14) 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. 水大研報, 58, 1-13 (2009)
 - 15) 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. 水大研報, 58, 15-22 (2009)
 - 16) 近藤昌和, 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸則: ブリの好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 58, 101-111 (2009)
 - 17) 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. 水大研報, 58, 207-216 (2010)
 - 18) 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. 水大研報, 59, 163-171 (2011)
 - 19) 瀬能 宏: ボラ科, 川那部浩哉, 水野信彦, 細谷和海編 山溪カラー名鑑 日本の淡水魚. 山と溪谷社, 東京, 458-464 (2002)
 - 20) 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. 水大研報, 56, 323-327 (2008)