

メナダの単球二次顆粒の染色性

近藤昌和[†], 林 裕之, 高橋幸則

Staining Properties of Monocyte Minor Granules in Redlip Mullet, *Chelon haematocheilus*

Masakazu Kondo[†], Hiroyuki Hayashi and Yukinori Takahashi

Abstract : Staining characteristics of two types of monocyte minor granules (MmSG, MmLG) in monocyte from redlip mullet (*Chelon haematocheilus*) were examined by light microscopy. MmSG were stained orange with eosin Y (EY) and reddish purple with methylene blue (MB). Therefore, the color of MmSG (red) which stained with May-Grünwald · Giemsa (MGG) may be formed with both dyes. On the other hand, MmLG were not stained with EY and MB, but dark blue with azure B (AB). The color (dark red) of MmLG stained with MGG reappeared on the smear stained with the mixture of EY and AB.

Key words : redlip mullet, *Chelon haematocheilus*, monocyte, granule, staining characteristics

哺乳類, 鳥類, 爬虫類および両生類の単球には, 赤紫色のアズール顆粒が観察されるが¹⁻⁵⁾, 魚類では一般に, 単球にはアズール顆粒は認められていない⁶⁾。しかし, メナダの多くの単球には2種類の赤色顆粒が観察され, 大型の顆粒は単球二次大顆粒 (Monocyte Minor Large Granule, MmLG), 小型のものは単球二次小顆粒 (Monocyte Minor Small Granule, MmSG) と称されている⁷⁾。両顆粒の大きさ, 個数および染色条件は異なっており (Table 1), MmLG またはMmSGのいずれかのみを有する単球は観察されないことから, 両顆粒はそれぞれ異なる種類の顆粒と考えられている⁷⁾。両顆粒はともにpH8.0の $1/15$ Mリン酸緩衝液を用いたメイ-グリュンワルド・ギムザ (MGG) 染色において, ギムザ (G) 染色液の希釈率を1 : 100, 染色時間を15分間とした場合に多数観察される⁷⁾。しかし, 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は全く認められない⁷⁾。MmLGとMmSGを有する単球が多数観察される条件において, 両顆粒が染色液中のいかなる色素で染色されるのかを調べたところ, 赤紫色に染色される顆粒をアズール顆粒と称することは不適当であることが明らかとなったのでここに報告する。

ヘパリンを入れた注射器を用いてメナダの尾柄部から採血し, 血液塗沫標本を作製した。エオシンY (EY), メチレンブルー (MB) およびアズールB (AB) それぞれの1% 無水メタノール溶液を作成し, 濾過したのち染色に供した。EYまたはMB液を標本上に1.5 ml載せて5分間固定したのち, pH8.0の高濃度緩衝液を同量追加混和して10分間染色した。また, EY, MBまたはABを, 蒸留水で10倍希釈した緩衝液に1 : 100の割合で混合し, これらを, 前述のEYまたはMB染色標本上に載せて15分間染色した。さらに, 希釈した緩衝液とEYおよびABを混合し (EY : AB : 緩衝液 = 1 : 1 : 100), MB染色標本上に載せて15分間染色した。EYまたはMB液を標本上に載せて固定したのち, 緩衝液を同量追加混和して染色したところ, MmSGはEYでは橙色を, MBでは赤紫色を示した。一方, MmLGはどちらの色素にも染色されなかった。EYまたはMB染色標本上に, 緩衝液で希釈したEY, MBまたはABを載せて染色したところ, EY-EYの組み合わせでは, MmSGとMmLGは, 前述のEY染色標本と同様の染色性を示し (Fig. 1 A), EY-MBではMmSGは赤色を呈したが, MmLGは染色されなかった (Fig. 1 B)。また, EY-ABではMmSGは橙色呈し, MmLG

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. Morphological characteristics of two types of monocyte minor granules in redlip mullet monocyte*

Type	Color	Shape	Size (μm)	Number (/cell)	Staining condition
MmSG	Red	R to O	≤ 0.3	7-17	MG (5 mM, pH7.0 and 8.0; $1/15$ M, pH6.0), MGG
MmLG	DR	R to O	0.3-0.6	2-8	MGG

MmSG, monocyte minor small granule; MmLG, monocyte minor large granule; DR, dark red; R, round; O, oval; MG, May-Grünwald stain; MGG, MG-Giemsa stain; 5 mM and $1/15$ M, concentration of phosphate buffer.

*Kondo *et al.* (2010)⁷.

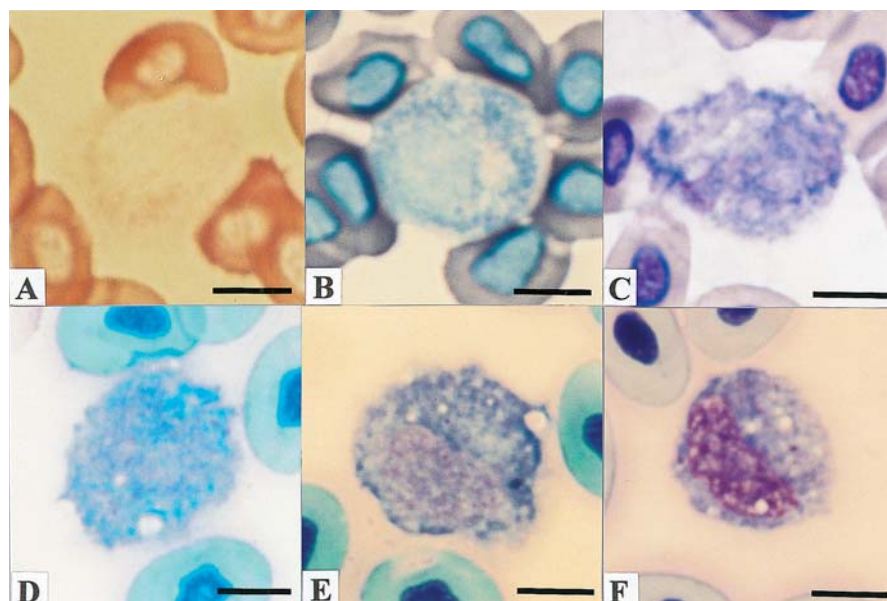


Fig. 1. Staining characteristics of MmSG and MmLG in monocyte from redlip mullet. A, eosin Y (EY)-EY; B, EY-methylene blue (MB); C, EY-azure B (AB); D, MB-MB; E, MB-AB; F, MB-(EY+AB). MmSG are stained orange (A, C), red (B, F) or reddish purple (D). MmLG show colorless (A, B, D), dark blue (C, E) or dark red (F). Bars=5 μm .

Table 2. Staining characteristics of two types of monocyte minor granules in redlip mullet monocyte

Dye in MG	Stain with	Dye in G	MmSG	Color of	MmLG
EY		Non	O		Cl
MB		Non	RP		Cl
EY		EY	O		Cl
EY		MB	R		Cl
EY		AB	O		DB
MB		EY	R		Cl
MB		MB	RP		Cl
MB		AB	RP		DB
MB		EY+AB	R		DR

MG, May-Grünwald solution; G, Giemsa splution; MmSG, monocyte minor small granule; MmLG, monocyte minor large granule; EY, eosin Y; MB, methylene blue; AB, azure B; Cl colorless; DB, dark blue; DR, dark red; O, orange; R, red; RP, reddish purple.

は濃青色をであった (Fig. 1 C)。一方, MB-EYではEY-MBと, MB-MBは上述のMB染色標本と同様であった (Fig. 1 D)。しかし, MB-ABではMmSGは赤紫色であり, MmLGは濃青色を呈した (Fig. 1 E)。希釈した緩衝液にEYとABを混合し, MB染色標本上に載せて染色したところ, MmSGは赤色に, MmLGは濃赤色となり, MGG染色標本と同様の色調を示した (Fig. 1 F, Table 2)。

これらの染色結果から, MmSGはエオシン好性かつ異調

メチレンブルー好性であり, EYでは橙色を, MBでは赤紫色を示すが, ABはこれらの色調に影響しないことから, MmSGの赤色はEYとMBの色調が混合されて生じたものと推察される。一方, MmLGはEYのみでは染まらず, 正調染色性を示すABと混在した条件で, 両色素 (EY, AB) に染色され, 両色素の色調が混合されることで濃赤色を呈すると考えられる。G染色液中にはEY, MBおよびABが存在するが, MmLGはメタノール固定した標本にG染色を

施した場合には観察されない⁷⁾。また、MmLGはメタノール固定した標本にMGG染色を施した場合にも認められない⁷⁾。本研究において、メタノールに溶解したMBによる染色を施したのちにEYとABの混合液で染色した場合に、MmLGが濃赤色を呈した。しかし、MBのみではMmLGは染色されなかった。したがって、MmLGはMBのメタノール溶液では染色されないものの、その成分が固定され、これがEYとABの混合液によって染色されると考えられた。哺乳類、鳥類、爬虫類および両生類の単球には、赤紫色のアズール顆粒が観察されるが¹⁻⁵⁾、魚類では一般に、単球にはアズール顆粒は認められていない⁶⁾。アズール顆粒の赤紫色は、ABによるものとされているが⁸⁾、ABは水溶液中では青色の色素である⁹⁾。したがって、ABによって生ずる赤紫色は、ABが異調染色性を呈したものと言える。被染色物によっては、MBも異調染色性を示す¹⁰⁾。メナダ単球のMmSGもMBで赤紫色を呈した。また、MmLGはABによって正調染色性を示した。これらのことから、染色標本上の赤紫色の顆粒を、アズール顆粒と称することには注意を要すると言える。

文 献

- 1) Parmley R T : Mammals. In: Rowley A F, Ratcliffe N A (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 337-424 (1988)
- 2) Dieterlen-Lièvre F : Birds. In: Rowley A F, Ratcliffe N A (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 257-336 (1988)
- 3) Sypek J, Borysenko M : Reptiles. In: Rowley A F, Ratcliffe N A (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 211-256 (1988)
- 4) Turner R J : Amphibians. In: Rowley A F, Ratcliffe N A (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 129-209 (1988)
- 5) 古田恵美子, 中村弘明, 山口恵一郎 : マクロファージの系統発生, 高橋 潔, 内藤 眞, 竹屋元裕編 生命を支えるマクロファージ. 文光堂, 東京, 32-53 (2001)
- 6) Rowley A F, Hunt T C, Page M, Mainwaring G : Fish. In: Rowley A F, Ratcliffe N A (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 19-127 (1988)
- 7) 近藤昌和, 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. 水大研報, 59, 173-182 (2011)
- 8) 三輪史朗, 渡辺陽之輔 : 2. 血液細胞の基本構造. 血液細胞アトラス (第5版), 文光堂, 東京, 4-6 (2004)
- 9) The Merck Index (12th ed.) : Azure B. Merck & Co., Inc., NJ, 159 (1996)
- 10) 西 国広, 阿南健一, 須田正洋 : 染色法 - 普通染色または Romanowsky 染色による形態の違いについて -. Medical Technology, 19, 630-636 (1991)