

ウナギ好中球の形態学のおよび細胞化学的特徴

近藤昌和*, 高橋幸則

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from Japanese Eel, *Anguilla japonica*

Masakazu Kondo* and Yukinori Takahashi

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in Japanese eel, *Anguilla japonica* were examined by light microscopy. The neutrophils were round to oval (9.0-14.5 μ m in diameter) and the nucleus round to lobule-shaped. Granules of the neutrophil were classified into three types; acidophilic granule (α G), chromophobic granule (β G) and basophilic granule (γ G). The α G was round to oval (0.3 μ m in diameter) or rod-shaped (\leq 1.0 μ m in length) and stained with May-Grünwald (MG) stain. This granule was not observed in the preparations stained with Giemsa stain. The β G was round to oval (\leq 0.6 μ m in diameter) and unstained by Romanowsky type stain (MG, Giemsa and MG-Giemsa (MGG)). This granule was peroxidase positive. The γ G was round to oval (\leq 0.3 μ m in diameter) and stained with Giemsa stain. Some enzymes, such as acid phosphatase, α -naphthyl acetate esterase and α -naphthyl butyrate esterase were detected in the γ G. The Yasumoto body (Y-body) was also found in the neutrophil and toluidine blue positive.

Key words : neutrophil, granulocyte, Japanese eel, *Anguilla japonica*, morphology

1 緒 言

著者らはこれまでに、種々の条件下でRomanowsky型染色(メイ-グリュンワルド(MG)染色, ギムザ染色およびMG染色後にギムザ染色を行うMGG染色)を施して, それらの染色標本における染色性の違いから, 形態学的特徴を明らかにする方法(以後, 多条件下Romanowsky型染色評価法(Multiple Romanowsky-type stain valuation, MRSV)と称す)によって, 各種魚類の好中球顆粒の種類数について明らかにしてきた¹⁻¹¹⁾。その結果, 真骨魚類(条鰭綱新鰭亜綱ハレコストム区真骨亜区¹²⁾)は好中球顆粒の種類数の違いから, 3群に大別されることが明らかとなった。I群の好中球(I型好中球)には, 好酸性顆粒(α 顆粒), 難染色顆粒(β 顆粒)および好塩基性顆粒(γ 顆粒)の3種類の顆粒が認められ, 真骨魚類の中で,

祖先種が最も早期に出現したアジアアロワナ*Scleropages formosus*(アロワナ下区アロワナ目)や¹⁾, 真骨魚類からアロワナ下区とカライワシ下区を除いたクルベオセファラ類のうち, 最初に分岐したニシン・骨鰈下区に属するコイ*Cyprinus carpio*(骨鰈上目コイ目)が含まれることから^{2, 3)}, I群の形質は, 真骨魚類好中球の原型であると推察される。II群の好中球には α 顆粒と β 顆粒が認められ, これまでに, トラフグ*Takifugu rubripes*(正真骨下区棘鰭上目フグ目)に観察されている⁶⁾。フグ目は, スズキ目(正真骨下区棘鰭上目)¹²⁾から派生したと考えられているが¹³⁾, トラフグと同様の好中球は, 他魚種には認められておらず, 本群の系統進化上の位置付けは明確ではない。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*(正真骨下区原棘鰭上目カワカマス目)や⁷⁾, 各種スズキ目魚類(メジナ*Girella punctata*, 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.*)^{8,10,11)} およびスズキ目から派生したとされる正真骨下区棘鱗上目カレイ目¹³⁾に属するヒラメ *Paralichthys olivaceus*が含まれることから⁹⁾, 現生真骨魚類のうち, 新顎類¹²⁾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* およびイサキ *Parapristipoma trilineatum* は I 群に属する^{4,5)}。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みて, 多系統ではないかと考えられる。

ウナギ *Anguilla japonica* は真骨魚類の系統上, コイよりも早く, アジアアロワナについて出現したカライワシ下区ウナギ目に属することから, 好中球は I 型好中球の特性を有するのではないかと推察される。本研究では, 魚類における好中球顆粒の多様性を明らかにする研究の一環として, ウナギ好中球の形態学および細胞化学的特性を明らかにし, これまでに報告した各種魚類と比較した。

2 材料および方法

2.1 実験魚

厚狭川の河口 (山口県山陽小野田市) で採捕されたシラスウナギを, 水産大学校小野臨湖実験実習場 (山口県宇部市) に搬入して, 市販の配合飼料を給餌し, 体重約500gにまで育成した。これを水産大学校の飼育施設 (山口県下関市) に搬入し, 水槽 (50ℓ容) に曝気した上水を約30ℓ入れ, これにウナギを1尾ずつ収容した。水温23.0±1.0°Cで1週間馴致飼育したのち実験に供した。なお, 実験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。

2.2 血液塗沫標本の作製

採血には, 注射針 (孔径21gauge, 長さ1.5inch) を装着した1ml容プラスチック製ツベルクリン用注射器を用いた。これにヘパリンナトリウム水溶液 (1,000units/ml, 300mOs) を約90μℓ入れ, キナルジン麻酔したウナギの尾部血管から0.5ml採血した。血液をスライドガラスに滴下し, 引きガラス法で血液の薄膜を作り, 風乾して血液塗沫標本とした。なお, 酵素染色用の標本は, 2時間以内の風乾ののちに染色に供した。

2.3 MRSV

染色に用いる希釈液には, 蒸留水, 5mMリン酸緩衝液

および^{1/15}Mリン酸緩衝液を用いた。各濃度のNa₂HPO₄・12H₂OとNaH₂PO₄・2H₂Oを混合してpH5.0~8.0の緩衝液を作製した。血液塗沫標本上にMG原液 (メタノール溶液, Sigma) を1.5ml載せ, 5分間固定したのち, 各種希釈液を1.5ml滴下・混和して10分間MG染色を行った。なお, MG原液で固定後, 直ちに蒸留水で水洗した標本の観察も行った。また, 血液塗沫標本を無水メタノールで5分間固定して風乾後, ギムザ染色を行った。ギムザ染色液は, 原液 (Merck) を蒸留水または, 蒸留水で10倍希釈した各種緩衝液を用いて, 1:20および1:100の比率 (ギムザ原液:希釈液) で希釈した。なお, 染色時間は, 15および60分間とした。血液塗沫標本にMG染色を施したのち, MG染色に使用した希釈液を用いて作製したギムザ染色液による後染色を施すことによって, MGG染色を行った。なお, ギムザ染色液の作製には, 蒸留水または蒸留水で10倍希釈したリン酸緩衝液を用いた。いずれの染色標本も, 蒸留水で水洗し, 風乾したのち, 合成樹脂 (オイキット) で封入して光学顕微鏡で観察した。

2.4 細胞化学染色

2.4.1 多糖類染色

血液塗沫標本をメタノール・ホルマリン (メタノール:ホルマリン=9:1) を用いて, 室温 (25°C) で30分間固定した。流水水洗後 (5分間), 蒸留水に通したのち, 風乾して各種多糖類染色を室温で行った。なお, periodic acid Schiff反応 (PAS) を施した標本はマイヤーのヘマトキシリン染色液 (和光純薬, 病理研究用) に5分間浸漬したのち, 流水で水洗および色出し (5分間), 核染色を行った。他の染色では核染色を施さなかった。染色標本は風乾後, オイキットで封入して光学顕微鏡で観察した。

2.4.1.1 PAS染色

多糖類の検出のために, PAS染色を行った¹⁴⁾。固定した標本をオルト過ヨウ素酸 (和光純薬) の1%水溶液に15分間浸漬したのち, 蒸留水で3回洗浄した (各回5分間)。シッフ液 (和光純薬, 病理研究用) と40分間反応させたのち, 亜硫酸水素ナトリウム液3槽に浸漬した (各槽10分間)。亜硫酸水素ナトリウム液は, 0.5gの亜硫酸水素ナトリウム (和光純薬) を蒸留水5mlに溶解し, 1M塩酸5mlと混合したのち, 蒸留水を加えて全量100mlとしたものを使用した。流水水洗 (5分間) 後, 蒸留水に通したのち風乾した。

グリコーゲンの鑑別のために, α-amylase消化した標本のPAS染色も行った¹⁵⁾。リン酸ナトリウム緩衝液

(0.1M, pH6.0) に、 α -amylase (Sigma) を 1 % 溶解し、これに標本を37℃で30分間浸漬した。蒸留水で2回洗浄後（各回5分間）、PAS染色を施した。

2.4.1.2 トルイジブルー (TB) 染色とアルシアンブルー (AB) 染色

酸性粘液多糖類の検出には、TB染色¹⁶⁾とAB染色¹⁷⁾を行った。蒸留水にTB (Sigma) を0.01%加え溶解させたのち濾紙 (Advantec, No.2) に通して濾過した。これに標本を30分間浸漬したのち、モレキュラシープス (Nacalai) を用いて無水化したエタノールで洗浄し、風乾した。なお、洗浄には無水エタノール槽を2槽用意した。1槽目では標本を10回上下させ、2槽目には2分間浸漬して洗浄した。

AB染色はpH1.0およびpH2.5で行った。AB (Sigma) を0.1M塩酸に1%加え溶解させたのち、濾過した染色液 (pH1.0) に、標本を30分間浸漬した。0.1M塩酸で2分間洗浄したのち風乾した。AB (pH2.5) 染色液は、3%酢酸水 (氷酢酸3ml, 蒸留水97ml) にABを1%加えて溶解させたのち、濾過して作製した。この染色液に標本を30分間浸漬したのち、3%酢酸水2槽を用いて洗浄した。1槽目では標本を10回上下させ、2槽目には3分間浸漬した。流水で洗浄 (2分間) 後、蒸留水に通したのち、風乾した。

2.4.2 脂肪染色

中性ホルマリン (炭酸カルシウム飽和ホルマリン) を蒸留水と2:3の比率で混合した (40%中性ホルマリン)。濾紙を敷き、底にガラス棒を設置した染色壺に40%中性ホルマリンを1ml入れて10分間密閉し、ホルマリン蒸気を得た。これに染色籠に設置した血液塗沫標本を入れ、密閉状態で10分間固定した。流水水洗 (5分間) 後、蒸留水に通したのち、風乾して各種脂肪染色を室温 (25℃) で行った。脂質の検出にはズダンブラックB染色を、また、中性脂肪の検出にはズダンⅢ染色とオイルレッド O染色を適用した¹⁸⁻²⁰⁾。なお、いずれの染色標本にも核染色は施さなかった。風乾後、グリセリンで封入して光学顕微鏡で観察した。

2.4.2.1 ズダンブラックB (SBB) 染色

室温で1日以上放置したSBB保存液 (0.5g SBB (和光純薬), 100mlエタノール) を、保存緩衝液と3:2の比率で混合したのち、濾過してSBB染色液とした。なお、保存緩衝液は、60℃で加温溶解したフェノール40mlにエタノール (60℃) 75mlと、0.3%Na₂HPO₄·12H₂O水溶液 (60℃) 250mlを混和したのち、室温で保存した。標本をSBB染色

液に1時間浸漬後、70%エタノール2槽を用いて分別した。1槽目では標本を10回上下させ、2槽目には1分間浸漬した。洗浄後、5分間流水水洗し、蒸留水に通したのち、風乾した。

2.4.2.2 ズダンⅢ染色

エタノール (70%) 50mlにズダンⅢ (Sigma) を1g加えて、60℃で1晩放置した。室温に戻したのち、濾過してズダンⅢ染色液とした。これに標本を1時間浸漬したのち、50%エタノールで1分間分別し、蒸留水2槽を用いて水洗後、風乾した。1槽目では標本を10回上下させ、2槽目には1分間浸漬して水洗した。

2.4.2.3 オイルレッドO染色

イソプロピルアルコール50mlにオイルレッドO (Sigma) を0.15g加え、室温で1晩放置して飽和溶液を得た。これと蒸留水を3:2の比率で混合し、30分間放置したのち、濾過して染色液とした。標本を染色液に15分間浸漬したのち、60%イソプロピルアルコールで1分間分別した。蒸留水2槽を用いて水洗後、風乾した。1槽目では標本を10回上下させ、2槽目には1分間浸漬して水洗した。

2.4.3 酵素染色

いずれの染色も室温 (25℃) で行った。染色後、流水水洗 (5分間) し、蒸留水に通したのち、風乾した。アルカリ性ホスファターゼ染色標本はサフラニンO (Sigma) の1%水溶液で5分間核染色を行い、蒸留水で短時間水洗したのち、風乾した。他の染色標本はマイヤーのヘマトキシリン染色液で核染色した。風乾後、いずれの標本もグリセリンで封入して光学顕微鏡で観察した。

2.4.3.1 アルカリ性ホスファターゼ (AIP)

AIP染色はfast blue RR saltを用いたアゾ色素法によった²¹⁾。血液塗沫標本を氷酢酸・ホルマリン・メタノール混液 (0.001:1:9) で-20℃、5秒間固定した。5分間流水水洗し、蒸留水に通したのち、fast blue RR salt (Sigma) を0.001%添加した基質原液 (10mg naphthol AS-MX phosphate sodium salt (Sigma), 4 ml N-N-dimethylformamide (和光純薬), 120ml 蒸留水, 76ml 0.2M Tris-HCl緩衝液 (pH8.6)) で2時間反応させた。

2.4.3.2 酸性ホスファターゼ (AcP)

AcPの検出には、fast garnet GBC法を用いた²²⁾。血液塗沫標本を、1M NaOH水溶液を用いてpH5.4に調整したメタノール・アセトン緩衝液 (630mgクエン酸, 30ml蒸留水, 10mlメタノール, 60mlアセトン) で5℃、30秒間固定した。5分間流水水洗し、蒸留水に通したのち、反応液

(8 mg fast garnet GBC (Sigma), 50 ml 0.1M酢酸緩衝液 (pH5.2), 1 ml基質液 (10mg naphthol AS-BI phosphate (Sigma), 1 ml N-N-dimethylformamide)) で45分間染色した。

2. 4. 3. 3 β -グルクロニダーゼ (β -Glu)

β -Gluの検出にはfast red ITRを用いたアゾ色素法を適用した²³⁾。血液塗沫標本をホルマリン・アセトン・蒸留水混液 (1 : 6 : 3) で室温, 10秒間固定した。5分間流水水洗し, 蒸留水に通したのち, 反応液 (10mg fast red ITR (Sigma), 7.5ml蒸留水, 2.5ml基質液) で3時間染色した。基質 (naphthol AS-BI glucuronide (Sigma)) 28mgを0.05M炭酸水素ナトリウム水溶液1.2mlに懸濁させ, 60°Cで加温溶解したのち, 0.2M酢酸緩衝液 (pH5.0) を100ml加えて基質液とした。

2. 4. 3. 4 各種エステラーゼ

基質に α -naphthyl acetate (α -NA), α -naphthyl butylate (α -NB) およびnaphthol-ASDCLA (NASDCA) を用いたアゾ色素法を適用した²⁴⁾。なお, いずれの基質もSigmaのものを用いた。血液塗沫標本を, 1 M HClを用いてpH6.6に調整した緩衝ホルマリン-アセトン溶液 (20mg Na₂HPO₄, 100mg KH₂PO₄, 30ml蒸留水, 45mlアセトン, 25mlホルマリン) で5°C, 30秒間固定した。5分間流水水洗し, 蒸留水に通したのち, 各種エステラーゼの検出を行った。 α -NAエステラーゼ (α -NAE) 検出のために, 反応液 (15mg fast blue BB salt (Sigma), 9.9mlリン酸緩衝液 (¹/₁₅M, pH7.4), 0.1ml基質液 (10mg α -NA, 1 mlアセトン)) で60分間染色した。 α -NBエステラーゼ (α -NBE) 検出のために, 標本を反応液 (15mg fast garnet GBC salt, 10mlリン酸緩衝液 (¹/₁₅M, pH6.4), 0.1ml基質液 (10 μ l α -NB, 0.5ml エチレンジグリコールモノメチルエーテル)) で40分間染色した。NASDCAエステラーゼ (NASDCAE) の検出は, 標本を反応液 (15mg fast blue BB salt, 10mlリン酸緩衝液 (¹/₁₅M, pH7.4), 0.1ml基質液 (20mg NASDCA, 1 mlアセトン)) で15分間染色する方法によった。

2. 4. 3. 5 ペルオキシダーゼ (PO)

POの検出には, 3-3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 法を適用した²⁵⁾。血液塗沫標本を20%グルタルアルデヒド・エタノール混液 (1 : 4) で5°C, 10秒間固定した。流水水洗 (5分間) し, 蒸留水に通したのち, 反応液 (10mg DAB (同仁化学), 20ml Tris-HCl緩衝液 (50mM, pH7.6), 20 μ l 3%過酸化水素水) で5分間染

色した。

3 結 果

ウナギ好中球の各種Romanowsky型染色像をFigs. 1 ~ 4に示した。ウナギの好中球は長径9.0~14.5 μ mの円形または卵円形であり, 細胞質内には3種類の顆粒 (α 顆粒, β 顆粒および γ 顆粒) とともにY小体が観察された。種々の形態の核が偏在しており, 分葉核 (2分葉まで) も認められた。

α 顆粒は, 淡橙色から赤色に染色される円形, 卵円形, または桿形の顆粒であった。本顆粒の長径は円形または卵円形のもので約0.3 μ mであり, 桿形の顆粒は, 長径1.0 μ m以下, 短径約0.2 μ mであった。メイ-グリユンワルド (MG) 液による固定では, 染色される α 顆粒が少数であった (Fig. 1)。蒸留水および5 mMリン酸緩衝液を用いたMG染色では, 多数の α 顆粒が観察された (Figs. 2-1 ~ 2-3)。また, ¹/₁₅Mリン酸緩衝液を用いたMG染色においても, pH5.0およびpH6.0の場合には, 多数の α 顆粒が観察されたが (Fig. 2-4), pH7.0およびpH8.0においては, 染色される α 顆粒の数が減少した (Figs. 2-5, 2-6)。メタノール固定 (5分間) した標本にギムザ染色を施したところ, いずれの条件においても本顆粒は染色されなかった (Fig. 3)。MG染色後にギムザ染色を施すMGG染色では, 希釈液に蒸留水を用いたところ, ギムザ液の希釈率が1 : 20の場合には, いずれのギムザ染色時間 (15分間および60分間) においても, 染色される α 顆粒は少数であった (Fig. 4-1)。また, 希釈率1 : 100では, 15分間の染色によって, 多数の α 顆粒が観察されたが (Fig. 4-

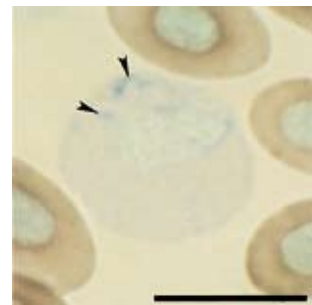


Fig. 1. A Japanese eel neutrophil stained with May-Grünwald concentrated-solution, which served as agents for both fixation and staining. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. Arrowheads show the Y-body. Bar=10 μ m.

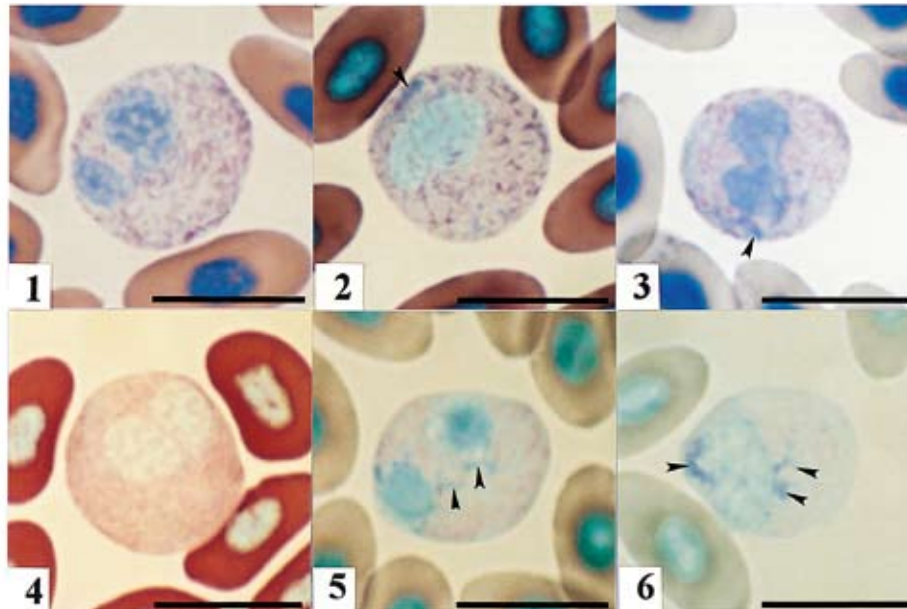


Fig. 2. Japanese eel neutrophil stained with May-Grünwald solution under various conditions. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated-solution, the sample was stained again with May-Grünwald solution diluted with the following solutions : (1)distilled water, (2)phosphate buffer (5 mM, pH5.0), (3)phosphate buffer (5 mM, pH7.0), (4)phosphate buffer ($1/15$ M, pH5.0), (5) phosphate buffer ($1/15$ M, pH7.0), (6)phosphate buffer ($1/15$ M, pH8.0). Arrowheads show the Y-body. Bars= $10\mu\text{m}$.

2), 60分間の染色では, 観察される α 顆粒が減少した。低濃度 (5 mM) のリン酸緩衝液を希釈液に用いたMGG染色では, pH5.0およびpH6.0において, 希釈率および染色時間に拘わらず, 多数の α 顆粒が観察された (Figs. 4-3 ~ 4-6)。しかし, pH7.0では希釈率 1 : 20の場合には, いずれの染色時間においても α 顆粒はほとんど観察されず (Figs. 4-7, 4-8), 希釈率 1 : 100では15分間のギムザ染色によって多数の (Fig. 4-9), また, 60分間の染色では少数の α 顆粒が認められた (Fig. 4-10)。pH8.0では, 希釈率 1 : 20の場合にはpH7.0と同様に, いずれの染色時間においても α 顆粒はほとんど観察されず, 希釈率 1 : 100では, いずれの染色時間においても少数の α 顆粒が観察された。高濃度 ($1/15$ M) のリン酸緩衝液を希釈液として用いた場合には, pH5.0における希釈率 1 : 20では, 染色時間の長短に拘わらず α 顆粒はほとんど観察されなかった (Fig. 4-11)。一方, 希釈率 1 : 100では, 15分間のギムザ染色によって多数の α 顆粒が観察されたが (Fig. 4-12), 60分間の染色では観察される α 顆粒が少数であった。また, pH6.0では染色時間の長短に拘わらず, 希釈率 1 : 20で少数の, 希釈率 1 : 100では多数の α 顆粒が観察された。中性 (pH7.0) の緩衝液を用いた場合

には, 希釈率 1 : 20では染色時間の長短に拘わらず, α 顆粒がほとんど観察されず (Figs. 4-13, 4-14), 希釈率 1 : 100ではギムザ染色の時間の長さにともなって, 観察される α 顆粒数が減少した (Fig. 4-15)。一方, pH8.0の場合には, いずれの希釈率および染色時間においても少数の α 顆粒が観察された。

β 顆粒は, 円形または卵円形で長径が $0.6\mu\text{m}$ 以下であり, いずれの条件のRomanowsky型染色においても明瞭な色調を呈さず, 難染性であった。

γ 顆粒は淡青色を呈し, 円形または卵円形で長径 $0.3\mu\text{m}$ 以下であった。本顆粒は, MG原液では染色されなかった (Fig. 1)。また, いずれの希釈液を用いても, MG染色では観察されなかった (Fig. 2)。一方, ギムザ染色では, いずれの希釈液を用いても, 本顆粒は淡青色顆粒として観察された (Fig. 3)。しかし, 蒸留水を希釈液とし, 希釈率 1 : 100で15分間染色した場合には, 観察される γ 顆粒は少数であった (Fig. 3-2)。また, 低濃度 (5 mM) のリン酸緩衝液を希釈液に用いたところ, pH5.0における希釈率 1 : 20の場合には15分間の染色で少数の, また, 60分間の染色では多数の γ 顆粒が観察された (Figs. 3-3, 3-4)。しかし, 希釈率 1 : 100では, いずれの染

色時間においても, 観察される γ 顆粒は少数であった (Fig. 3-5)。pH6.0の場合も, 希釈率 1 : 100では染色時間に拘わらず, 少数の γ 顆粒が観察されたが, 希釈率 1 : 20の場合には, いずれの染色時間においても多数の γ 顆粒が認められた。一方, pH7.0およびpH8.0では, いずれ

の希釈率および染色時間においても多数の γ 顆粒が観察された (Fig. 3-6)。高濃度 ($1/150$ M) のリン酸緩衝液を希釈液として用いた場合には, pH5.0における希釈率 1 : 20では, 染色時間の長短に関わらず多数の γ 顆粒が観察された (Fig. 3-7)。しかし, 希釈率 1 : 100では低濃度の緩

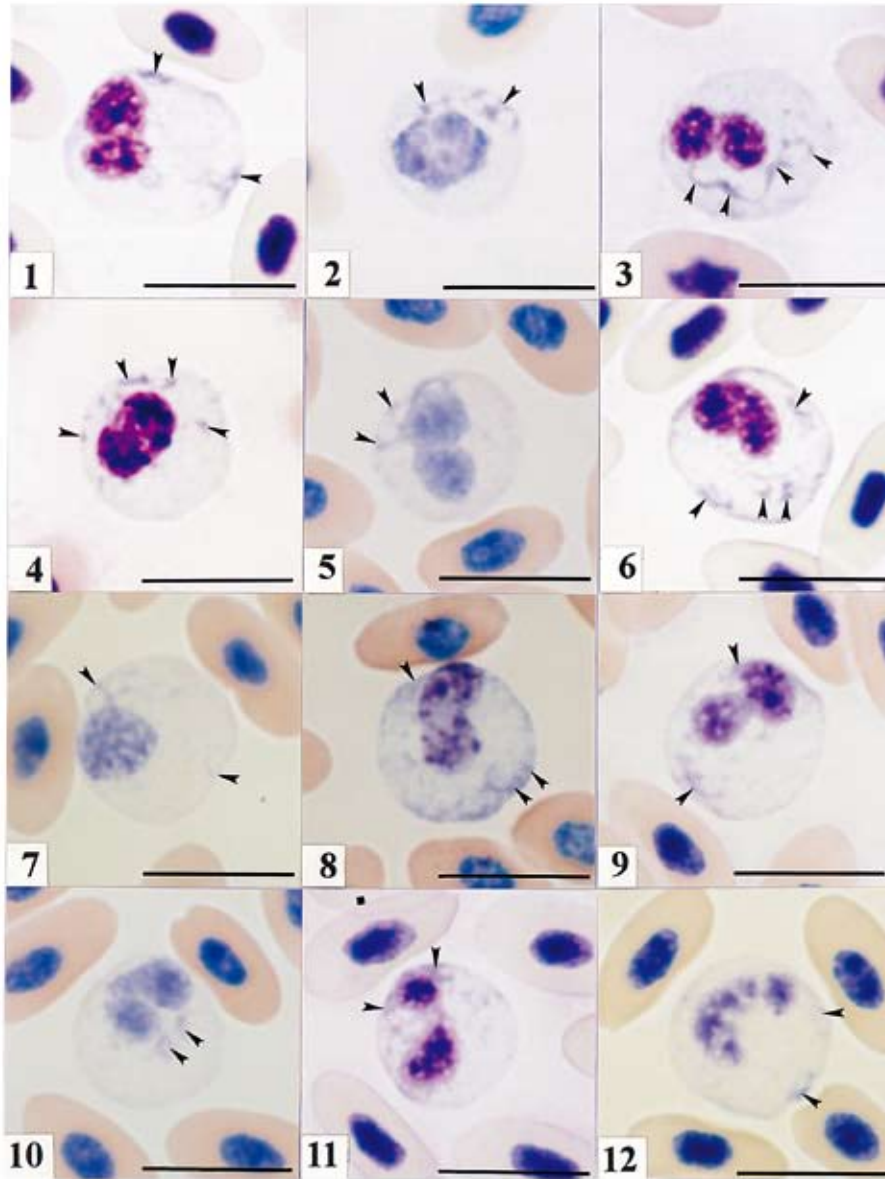


Fig. 3. Japanese eel neutrophil under various staining conditions. Giemsa stain. After fixation for 5 min with methanol, the sample was stained with Giemsa solution diluted with the following solutions : (1) distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2) distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (3) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (4) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (5) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (6) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (7) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (8) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (9) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. The α G is not stained. (10) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (11) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. The α G is not stained. Arrowheads show the Y-body. Bars=10 μ m.

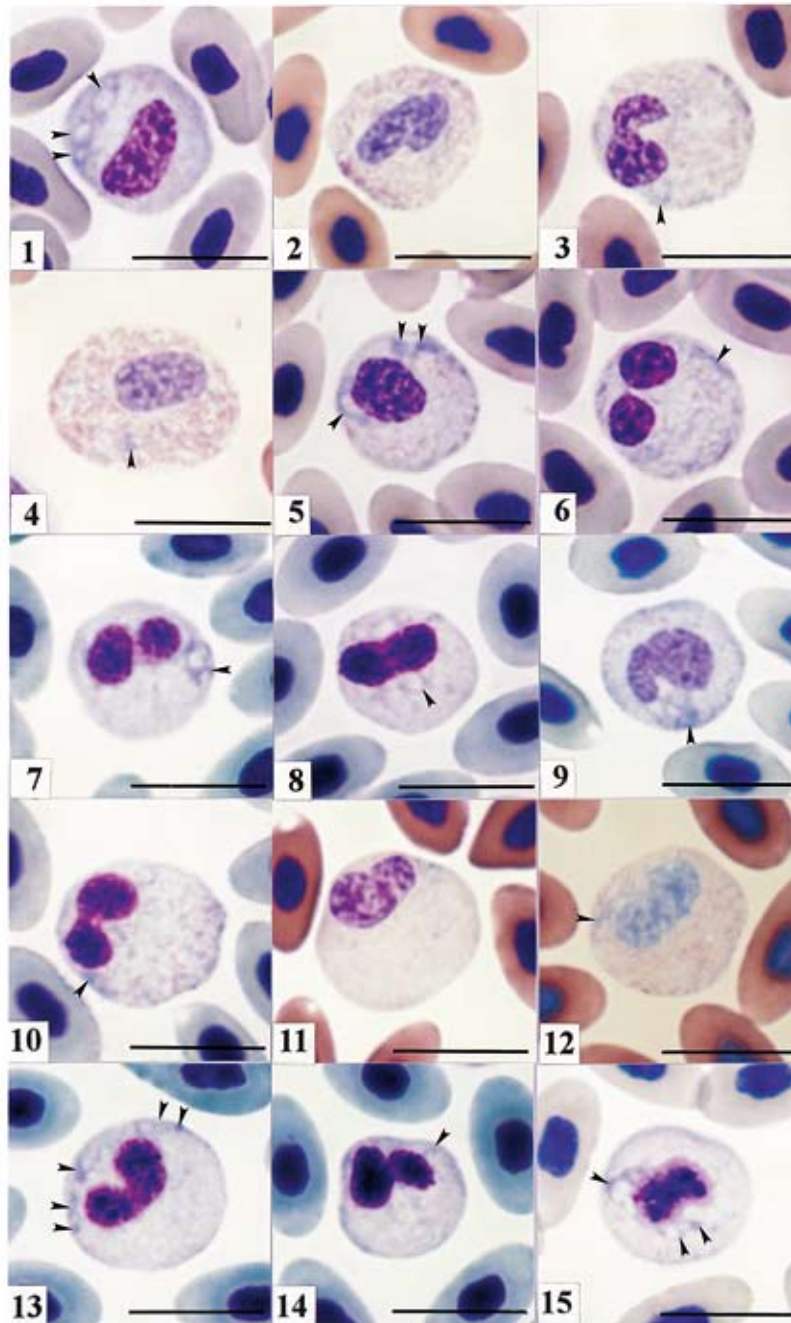


Fig. 4. Japanese eel neutrophil under various staining conditions. May-Grünwald (MG) · Giemsa stain. After fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the sample was stained with MG diluted solution in various solutions for 10 min, followed by staining with Giemsa under the following conditions : (1) distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2), distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (3) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (4) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (5) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (6) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (7) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (8) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (9) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (10) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (11) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (13) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (14) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (15) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. Arrowheads show the Y-body. Bars=10 μ m.

衝液の場合と同様に、いずれの染色時間においても観察される γ 顆粒は少数であった (Fig. 3-8)。また、pH6.0およびpH8.0では、低濃度の緩衝液の場合と同様であったが (Figs. 3-9, 3-10)、pH7.0における希釈率 1:20では、染色時間の長短に拘わらず多数の γ 顆粒が観察されるものの (Fig. 3-11)、希釈率 1:100ではギムザ染色の時間の長さにもなって、観察される γ 顆粒が増加した (Fig. 3-12)。本顆粒のMGG染色性を調べたところ、蒸留水を希釈液として用い、希釈率 1:20の場合には、いずれのギムザ染色時間においても、多数の γ 顆粒が観察された (Fig. 4-1)。しかし、希釈率 1:100では、いずれの染色時間においても、観察される γ 顆粒は少数であった (Fig. 4-2)。低濃度のリン酸緩衝液を希釈液に用いたところ、pH5.0における希釈率 1:20の場合には、いずれの染色時間においても少数の γ 顆粒が観察されたが (Fig. 4-3)、希釈率 1:100では本顆粒は認められなかった (Fig. 4-4)。pH6.0の場合には、希釈率 1:100では染色時間に拘わらず少数の γ 顆粒が観察され、希釈率 1:20の場合には15分間の染色で少数の、また、60分間の染色で多数の γ 顆粒が認められた (Figs. 4-5, 4-6)。一方、pH7.0およびpH8.0では、いずれの希釈率および染色時間においても多数の γ 顆粒が観察された (Figs. 4-7~4-10)。高濃度のリン酸緩衝液を希釈液として用いた場合には、pH5.0およびpH6.0における γ 顆粒の染色性は、低濃度

の緩衝液を用いた場合と同様であったが (Figs. 4-11, 4-12)、pH6.0では、いずれの希釈率および染色時間においても観察される γ 顆粒は少なかった。また、pH7.0およびpH8.0の場合も、低濃度の緩衝液を希釈液に用いた時と同様に、多数の γ 顆粒が観察されたが (Figs. 4-13, 4-14)、pH7.0では希釈率 1:100で15分間染色した場合には、観察される γ 顆粒は少なかった (Fig. 4-15)。

Y小体は、いずれの染色条件においても青色を呈し、形状は円形、紐状、鎖状など多様であった (Figs. 1~4)。また、本小体は核近縁、時には核に接して存在することもあった。

ウナギ好中球の細胞化学的特性をTable 1に示した。AcP, β -Glu, α -NAE, α -NBEおよびNASDCAE活性の存在を示す円形または卵円形の陽性顆粒が観察された (Figs. 5-1~5-5)。いずれの陽性顆粒も、長径 $0.3\mu\text{m}$ 以下であったが、AcP, α -NAEおよび α -NBE陽性顆粒は、細胞質に多数観察されたのに対して (Figs. 5-1, 5-3, 5-4)、 β -GluおよびNASDCAE陽性顆粒は少数であった (Figs. 5-2, 5-5)。PO活性は、円形または卵円形の陽性顆粒 (長径 $0.6\mu\text{m}$ 以下) として認められ、細胞質に充満していた (Fig. 5-6)。AIPは検出されなかった。PASに陽性の顆粒は、細胞質に充満しており (Fig. 5-7)、円形または卵円形で、直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下であった。本顆粒は、 α -アミラーゼ処理によって完全に消失し

Table 1. Summary of reactions of Japanese eel 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 (distilled water)	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)
Sudan black B	Granule (round or oval, a few, $\phi = 0.2\mu\text{m}$)
Sudan III	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3\mu\text{m}$, equivalent to γ G)
β -Glucuronidase	Granule (round or oval, some, $\phi \leq 0.3\mu\text{m}$)
α -Naphthyl acetate esterase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3\mu\text{m}$, equivalent to γ G)
α -Naphthyl butyrate esterase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3\mu\text{m}$, equivalent to γ G)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	Granule (round or oval, some, $\phi \leq 0.3\mu\text{m}$)
Peroxidase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.6\mu\text{m}$, equivalent to β G)

—, non detection.

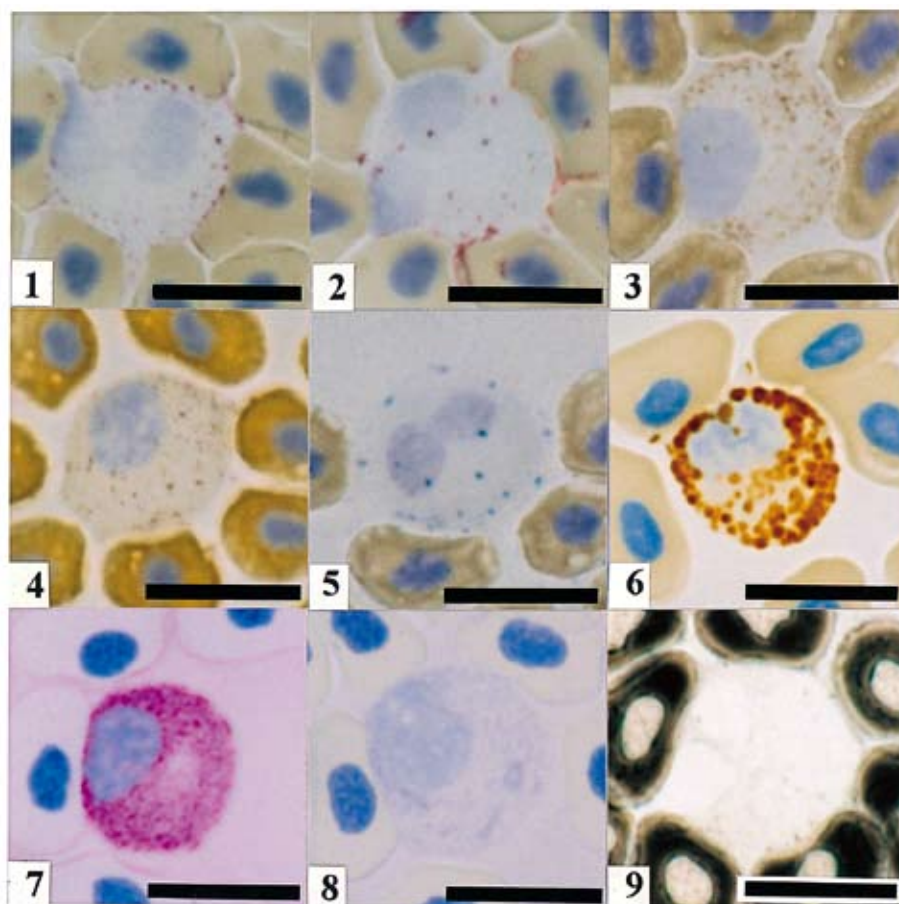


Fig. 5. Cytochemistry of Japanese eel neutrophil. (1), acid phosphatase; (2), β -glucuronidase; (3), α -naphthyl acetate esterase; (4), α -naphthyl butyrate esterase; (5), naphthol AS-D chloroacetate esterase; (6), peroxidase; (7), periodic acid Schiff reaction; (8), toluidine blue in distilled water; (9), sudan black B. Bars=10 μ m.

た。また、細胞質基質もPASに弱陽性であったが、これも α -アミラーゼ処理によって消失した。AB染色では、陽性部位は観察されなかった。TB染色では、種々の形態を示す青色の粗大な構造物が観察された (Fig. 5-8)。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が、SBB染色では直径が約0.2 μ mの円形陽性顆粒が細胞質に少数観察された (Fig. 5-9)。

4 考 察

本研究の結果から、ウナギの好中球には、Romanowsky型染色性において異なる3種類の顆粒 (α 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。

α 顆粒は、これまでに真骨魚類ではアジアアロワナ、コイ、ナイルティラピア、イサキおよびトラフグにおいて報

告されており¹⁻⁶⁾、いずれの魚種においても酸性条件下のMG染色で染まること、ギムザ染色には染色されないこと、およびMG染色で本顆粒を染色したのちにギムザ染色を施すと染色性が低下することが知られている¹⁻⁶⁾。本研究の結果から、ウナギにおいても同様の染色特性が得られたことから、ウナギの α 顆粒は前述の真骨魚類と同等の顆粒であると考えられる。また、 α 顆粒の形状は、アジアアロワナでは桿形または紡錘形¹⁾、コイおよびナイルティラピアでは円形²⁻⁴⁾、イサキでは桿形⁵⁾、トラフグでは円形、卵円形または桿形と多様である⁶⁾。ウナギの α 顆粒の形状はトラフグと同様に、円形、卵円形または桿形であった。

α 顆粒と類似した顆粒は、ウナギの他の種類の血球には観察されなかった。したがって、本顆粒は、ウナギ好中球の同定に有用な指標となると考えられる。

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, コイ, ノーザンパイク, ナイルティラピア, イサキ, メジナ, 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, ヒラメ, トラフグ) で認められている¹⁻¹¹⁾。いずれの魚種においても β 顆粒は円形から卵円形であり, 長径はアジアアロワナで $0.5\ \mu\text{m}$ 以下¹⁾, コイで約 $0.5\ \mu\text{m}$ ³⁾, ノーザンパイクで $0.5\ \mu\text{m}$ 以下⁷⁾, ナイルティラピア, イサキ, オオクチバス, ブルーギルおよびヒラメで $0.5\sim 1.0\ \mu\text{m}$ ^{4, 5, 9, 10)}, メジナで $0.5\sim 1.1\ \mu\text{m}$ ⁸⁾, スズキ, ヒラスズキ, タイリクスズキおよびトラフグで $1.0\ \mu\text{m}$ 以下とされている^{6, 11)}。本研究において, ウナギにおける β 顆粒は, 長径 $0.6\ \mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形顆粒として観察された。

γ 顆粒はアジアアロワナ, コイ, ナイルティラピアおよびイサキの好中球に観察されており, いずれの魚種においても円形または卵円形である^{1, 3-5)}。また, 本顆粒の長径はアジアアロワナで $0.3\ \mu\text{m}$ 以下¹⁾, コイで $0.4\ \mu\text{m}$ 以下³⁾, ナイルティラピアとイサキでは $0.3\ \mu\text{m}$ 以下である^{4, 5)}。ウナギの γ 顆粒も, 円形または卵円形で長径 $0.3\ \mu\text{m}$ 以下であり, 形状および大きさは他魚種の γ 顆粒と類似していた。しかし, 染色性には, 魚種間で違いが認められたことから (Table 2), γ 顆粒の内容物や機能は, 魚種間で異なると考えられる。

コイを除く魚種において, 好塩基性を示す不定形の安本小体 (Y小体) が好中球に観察されている^{1, 4-11)}。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²⁶⁾。ウナギの好中球にも Y小体が観察されたことから, 本小体は, 魚類好中球に共通するものと考えられる。

細胞化学的特性から, ウナギ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。ウナギの好中球には, 円形または卵円形の PAS陽性顆粒 (長径 $0.3\ \mu\text{m}$ 以下) が細胞質に充満していた。しかし, α 顆粒は形態が円形, 卵円形, 桿形と多様であり, 細胞質に多数存在するものの, PAS陽性顆粒のように充満することはない。また, β 顆粒は長径が PAS陽性顆粒よりも大型である。一方, γ 顆粒は長径 $0.3\ \mu\text{m}$ 以下で, PAS陽性顆粒と同様の大きさであったが, PAS陽性顆粒のように細胞質に充満することはない。さらに, PAS陽性顆粒は α -アミラーゼによって完全に消化された。以上のことから, PAS陽性顆粒はグリコーゲンを主成分とする構造物であり, α , β および γ 顆

粒とは異なると考えられる。SBB陽性顆粒は直径約 $0.2\ \mu\text{m}$ であり, α , β および γ 顆粒とは大きさおよび顆粒の数が異なる。AcP, α -NAE および α -NBE陽性顆粒は, 細胞質に多数観察され, 長径 $0.3\ \mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形であることから, これらの酵素活性は γ 顆粒に存在すると考えられる。一方, β -Glu および NASDCAE陽性顆粒も長径 $0.3\ \mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形であるが, 陽性顆粒数が少ないことから, 本酵素の存在部位は確定できない。これまで, ウナギ好中球は POを持つ細胞がほとんどないといわれてきたが²⁷⁾, 本研究の結果から, ウナギにおいても, 他の真骨魚類と同様に, POが検出された。ウナギ好中球の PO陽性顆粒は, 円形または卵円形で細胞質に充満し, 長径が $0.6\ \mu\text{m}$ 以下であることから, β 顆粒に相当すると考えられる。

これまでに, AIPはメジナに⁹⁾, AcPはノーザンパイク, スズキ, ヒラスズキ, メジナ, ヒラメおよびトラフグに^{6, 7, 9, 11)}, β -Gluはノーザンパイクの好中球に観察されており⁷⁾, α -NAEはアジアアロワナ, ノーザンパイク, スズキ, ヒラスズキ, メジナ, ヒラメおよびトラフグに^{1, 6, 7, 9, 11)}, α -NBEはアジアアロワナ, ノーザンパイク, メジナおよびトラフグに^{1, 6, 7, 9)}, NASDCAEはアジアアロワナ, ノーザンパイク, スズキ, ヒラスズキおよびトラフグの好中球で検出されている^{1, 6, 7, 11)}。また, SBB陽性顆粒は, アジアアロワナ, ノーザンパイク, ブルーギル, スズキ, ヒラスズキ, メジナ, ヒラメおよびトラフグの好中球に認められている^{1, 6, 7, 9-11)}。これらのうち, アジアアロワナの NASDCAE活性は γ 顆粒に¹⁾, ノーザンパイク好中球の AcP活性は β 顆粒に局在すると考えられている⁷⁾。一方, POは, アジアアロワナ, ノーザンパイク, ブルーギル, メジナ, スズキ, ヒラスズキ, ヒラメおよびトラフグにおいて観察されており^{1, 6, 7, 9-11)}, 顆粒数, 大きさおよび形状が類似していることから, 本酵素は β 顆粒に局在すると考えられている^{1, 6, 7, 9-11)}。また, アジアアロワナ, ノーザンパイク, ブルーギル, メジナ, スズキ, ヒラスズキ, ヒラメおよびトラフグにおいて, 好中球に TB陽性部位が観察されており^{1, 6, 7, 9-11)}, 形態学的特徴から, Y小体に相当すると考えられている^{1, 6, 7, 9-11)}。また, コイにおいても *A. hydrophila* 感染によって出現した好中球の Y小体は, TBに陽性であることが報告されている²⁶⁾。TB染色によりウナギ好中球に種々の形態を示す青色の粗大な陽性部位が観察された。この陽性部位は形態学的特徴から, Y小体に相当すると思われる。

Table 2-1. Summary of Romanowsky-type staining characteristics of γ granule in actinopterygians neutrophil

Stain ^{2,3}	Number of γ granules observed in each staining preparation ¹				
	<i>Sf</i>	<i>Cc</i>	<i>On</i>	<i>Pt</i>	<i>Aj</i>
MG (both fixation and stain)	NO	NO	NT	NT	NO
MG : DW	NO	NO	NO	NT	NO
: 5mM PB, pH5.0	NO	NO	NO	NO	NO
: 5mM PB, pH6.0	NO	NO	some	NO	NO
: 5mM PB, pH7.0	NO	NO	many	NO	NO
: 5mM PB, pH8.0	many	NO	NT	NT	NO
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0	NO	NO	NO	NO	NO
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0	NO	NO	some	NO	NO
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0	NO	NO	many	NO	NO
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0	some	NO	NT	NT	NO
G : DW, 1:20, 15 min	many	NT	many	NT	many
: DW, 1:20, 60 min	many	many	many	NT	many
: DW, 1:100, 15 min	some	NT	NT	NT	some
: DW, 1:100, 60 min	some	many	NT	NT	many
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	many	NT	some	NT	some
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	some	NT	NT	NT	some
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	some	many	NT	NT	some
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:20, 15min	many	NT	many	NT	many
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min	some	NT	NT	NT	some
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	some
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:20, 15min	many	NT	many	NT	many
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	many
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	many
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	many	NT	NT	NT	many
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	many	NT	NT	NT	many
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	many
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	many	NT	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	many	NT	NO	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	some
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	some
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:20, 15min	many	NT	NO	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	some
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	some
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	many	NT	many	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	many	many	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	some
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	many	NT	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min	many	NT	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	many	NT	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	many	NT	NT	NT	many

¹ *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi (2009)³); *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, Kondo *et al.* (2002)³); *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, Yasumoto *et al.* (2003)⁴); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, Kondo *et al.* (2004)⁵); *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel, present report); NO, not observed; NT, not tested.

²MG, May-Grünwald; G, Giemsa; MGG, May-Grünwald + Giemsa; DW, distilled water; PB, phosphate buffer; 1:20 and 1:100, dilution ratio (Giemsa:diluent); 15 min and 60 min, time of Giemsa stain.

³Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or ¹/₁₅₀ M PB.

Table 2-2. Summary of Romanowsky-type staining characteristics of γ granule in actinopterygians neutrophil

Stain ^{2,3}	Number of γ granules observed in each staining preparation ¹				
	<i>Sf</i>	<i>Cc</i>	<i>On</i>	<i>Pt</i>	<i>Aj</i>
MGG: DW, 1:20, 15 min	some	NO	many	NT	many
: DW, 1:20, 60 min	many	many	many	NT	many
: DW, 1:100, 15 min	some	NO	some	NT	some
: DW, 1:100, 60 min	some	NO	some	NT	some
: 5mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	some	NO	NO	NO	some
: 5mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	many	many	NO	NT	some
: 5mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	some	NO	NT	NT	NO
: 5mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	many	NO	NT	NT	NO
: 5mM PB, pH6.0, 1:20, 15min	some	NO	many	NO	some
: 5mM PB, pH6.0, 1:20, 60min	many	many	many	NT	many
: 5mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min	some	NO	NT	NT	some
: 5mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	many	some	NT	NT	some
: 5mM PB, pH7.0, 1:20, 15min	many	some	many	many	many
: 5mM PB, pH7.0, 1:20, 60min	many	many	many	NT	many
: 5mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	many	some	NT	NT	many
: 5mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	many	some	NT	NT	many
: 5mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	many	NT	NT	NT	many
: 5mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	many	NT	NT	NT	many
: 5mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	many
: 5mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	many	NT	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:20, 15min	some	NO	NO	NO	some
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	some	many	NO	NT	some
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	some	NO	NT	NT	NO
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	some	NO	NT	NT	NO
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:20, 15 min	many	some	many	NO	some
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:20, 60 min	many	many	many	NT	some
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	many	NO	NT	NT	some
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	many	some	NT	NT	some
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:20, 15min	many	many	many	many	many
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:20, 60min	many	many	many	NT	many
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	many	some	NT	NT	some
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	many	NT	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min	many	NT	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	many	NT	NT	NT	many
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	many	NT	NT	NT	many

¹ *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi (2009)³); *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, Kondo *et al.* (2002)³); *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, Yasumoto *et al.* (2003)⁴); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, Kondo *et al.* (2004)⁵); *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel, present report); NO, not observed; NT, not tested.

²MGG, May-Grünwald; G, Giemsa; MGG, May-Grünwald + Giemsa; DW, distilled water; PB, phosphate buffer; 1:20 and 1:100, dilution ratio (Giemsa:diluent); 15 min and 60 min, time of Giemsa stain.

³Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or ¹/₁₅₀ M PB.

本研究によって、ウナギの好中球には3種類の顆粒 (α , β , γ 顆粒)とY小体が存在し、I型好中球に相当することが明らかとなった。また、 γ 顆粒にはAcP, α -NAEおよび α -NBEが、 β 顆粒にはPOが、また、Y小体にはTB陽性物質が存在すると考えられた。

文 献

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 近藤昌和, 高橋幸則, 山元憲一: ノーザンバ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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) Gill A C and Mooi R D: Phylogeny and Systematics of Fishes. In: Hart P J B and Reynolds J D (eds) Handbook of Fish Biology and Fisheries Vol. 1. Blackwell Publishing, Oxford, 15-42 (2002)
- 14) 安達真二: PAS反応, 月刊Medical Technology別冊 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 242-244 (1990)
- 15) 鈴木 裕: α -アミラーゼによるグリコーゲンの消化法, 病理技術研究会編 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 88-89 (1992)
- 16) 林 勇: トルイジン青染色, 病理技術研究会編 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 78-79 (1992)
- 17) 林 勇: アルシアン青染色, 病理技術研究会編 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 82-85 (1992)
- 18) 東 克己: ズダン黒B (SBB) 染色, 月刊Medical Technology別冊 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 239-240 (1990)
- 19) 金田正昭: ズダンII, ズダンIII染色, 病理技術研究会編 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 105-107 (1992)
- 20) 金田正昭: オイルレッドO染色, 病理技術研究会編 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 108-109 (1992)
- 21) 小池 正, 古田理英, 柴田 昭: アルカリ性ホスファターゼ, 月刊Medical Technology別冊 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 207-209 (1990)
- 22) 望野唯明, 片山 勲: 酸ホスファターゼ, 月刊Medical Technology別冊 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 218-221 (1990)
- 23) 木村寿之: β -グルクロニダーゼ染色, 月刊Medical Technology別冊 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 221-224 (1990)
- 24) 斎藤準一, 高久定男, 清水 宏: エステラーゼ染色, 月刊Medical Technology別冊 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 209-213 (1990)
- 25) 亀井喜恵子: ペルオキシダーゼ染色, 月刊Medical Technology別冊 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 213-217 (1990)
- 26) 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)
- 27) 飯田貴次, 若林久嗣: 魚類貪食細胞の特性, 森 勝義, 神谷久男編 水産生物の生体防御. 恒星社厚生閣, 東京, 29-36 (1995)