

ブリの好中球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸則

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from Japanese Amberjack, *Seriola quinqueradiata*

Masakazu Kondo[†], Takasuke Sakaguchi, Shunsuke Kanamaru, Naohiro Kashiwamura and Yukinori Takahashi

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in Japanese amberjack, *Seriola quinqueradiata* were examined by light microscopy. The neutrophils were round to oval (7.0–11.0 μm 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 rod-shaped (0.5–1.0 μm in length, 0.2 μm in width) and stained with May-Grünwald (MG) stain. This granule was not observed in the preparations stained with Giemsa stain. The MG-Giemsa (MGG) staining pattern of the granule was influenced by pH and concentration of diluent of the staining solution. The β G was round to oval ($\leq 0.5 \mu\text{m}$ in diameter) and unstained by Romanovsky type stain (MG, Giemsa and MGG). This granule was alkaline phosphatase, peroxidase and sudan black B positive. The γ G was round to oval ($\leq 0.3 \mu\text{m}$ in diameter) and stained with Giemsa and MGG, but not with MG. This granule was α -naphthyl acetate esterase positive. The Yasumoto body (Y-body) was also found in the neutrophil and toluidine blue positive.

Key words : neutrophil, Japanese amberjack, *Seriola quinqueradiata*, morphology

緒 言

著者らはこれまでに、各種魚類の好中球内顆粒の種類数および染色性について調べ、その多様性について明らかにした¹⁻¹⁵⁾。

魚類を含む脊椎動物の原始の系統とされているヌタウナギ類¹⁶⁾に属するヌタウナギ *Eptatretus burgeri* では、好中球に好塩基性顆粒 (γ 顆粒) のみが観察され¹⁾、真骨魚類とともに条鰭綱に含まれる腕鰭亜綱ポリプテルス目¹⁶⁾に属する *Polypterus endlicheri* の好中球には、2種類の好酸性顆粒 (α 顆粒) と γ 顆粒が認められている²⁾。また、真骨魚類 (条鰭綱新鰭亜綱ハレコストム区真骨亜区¹⁶⁾) は好中球内顆粒の種類数の違いから3群に大別され、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¹⁶⁾) では、 α 顆粒、難染色顆粒 (β 顆粒) および γ 顆粒の3種類の顆粒が認められている³⁾。以上のことから、魚類好中球の γ 顆粒の起源は、脊椎動物の共通の祖先にまで遡り、 α 顆粒は少なくとも真骨亜綱と腕鰭亜綱の共通の祖先の出現時に、 β 顆粒は真骨魚類の出現時にそれぞれ得られた形質であると推察されている^{1, 2)}。

真骨魚類のうち、好中球に3種類の顆粒が認められるI群には、アジアアロワナのほかに、ウナギ *Anguilla japonica* (カライワシ下区ウナギ目¹⁶⁾)⁴⁾ や、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ペオセファラ類¹⁶⁾のうち、最初に分岐したニシン・骨鰈下区¹⁶⁾に属するコイ *Cyprinus carpio* (骨鰈上目コイ目) が含まれることから^{5, 6)}、I群の形質は、真骨魚類好中球の原型であ

ると推察されている²⁾。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* (正真骨下区棘鱗上目フグ目) とマダイ*Pagrus major* (スズキ目タイ科) に観察されているが^{7,15)}, 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⁾。フグ目は, スズキ目から派生したと考えられているが¹⁷⁾, II-A群とII-B群の好中球形態に基づく系統進化上の位置づけは明確ではない。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* (正真骨下区原棘鱗上目カワカマス目¹⁶⁾) や⁸⁾, 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*)⁹⁻¹²⁾ 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¹⁷⁾ のヒラメ*Paralichthys olivaceus*が含まれることから¹⁰⁾, 現生真骨魚類のうち, 新顎類¹⁶⁾ 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²⁾。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^{13,14)}, 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る。

本研究では, スズキ目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, アジ科に属するブリ*Seriola quinqueradiata*の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。

材料および方法

水産大学の飼育施設に搬入した体重約1kgのブリを, 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, 市販の配合飼料を適宜給餌した。なお, 実験期間中の水温は, $17.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ であった。

血液塗抹標本の作製, 多条件下Romanowsky型染色評価法および各種細胞化学染色法は文献4にしたがった。

結果

ブリ好中球の各種Romanowsky型染色像をFigs. 1~4に示した。ブリの好中球は長径 $7.0 \sim 11.0 \mu\text{m}$ 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, 好塩基性を示す不定形の安本小体 (Y小体) (Yasumoto body, Y-body) が観察された。種々の形態の核が偏在しており, 2分葉を呈する核も認められた。

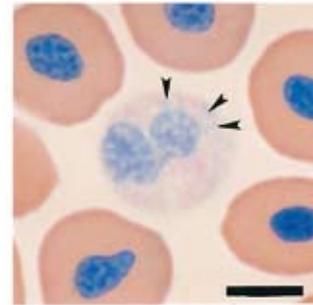


Fig. 1. A Japanese amberjack neutrophil stained with May-Grünwald concentrated-solution, which served as agents for both fixation and staining. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. Arrowheads show Y-body. Bar = $5 \mu\text{m}$.

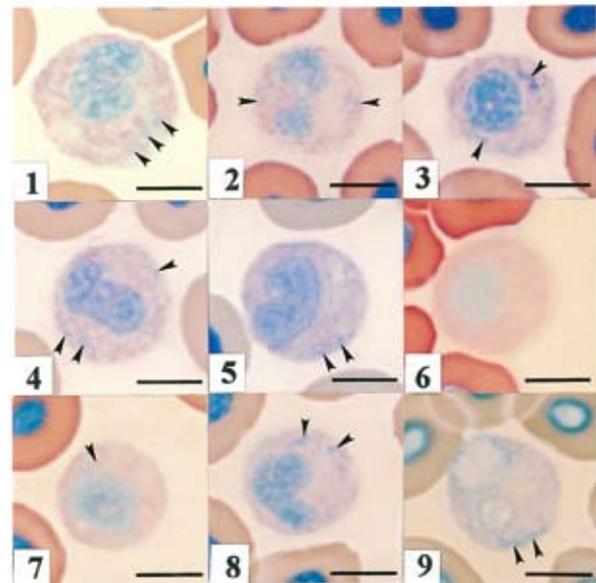


Fig. 2. Japanese amberjack neutrophil stained with May-Grünwald (MG) solution under various conditions. After fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the sample was stained again for 10 min in MG diluted with the following solutions: (1)distilled water, (2) phosphate buffer (5mM, pH5.0), (3)phosphate buffer (5mM, pH6.0), (4)phosphate buffer (5mM, pH7.0), (5)phosphate buffer (5mM, pH8.0), (6)phosphate buffer ($1/15\text{M}$, pH5.0), (7) phosphate buffer ($1/15\text{M}$, pH6.0), (8)phosphate buffer ($1/15\text{M}$, pH7.0) and (9)phosphate buffer ($1/15\text{M}$, pH8.0). Arrowheads show Y-body. Bars = $5 \mu\text{m}$.

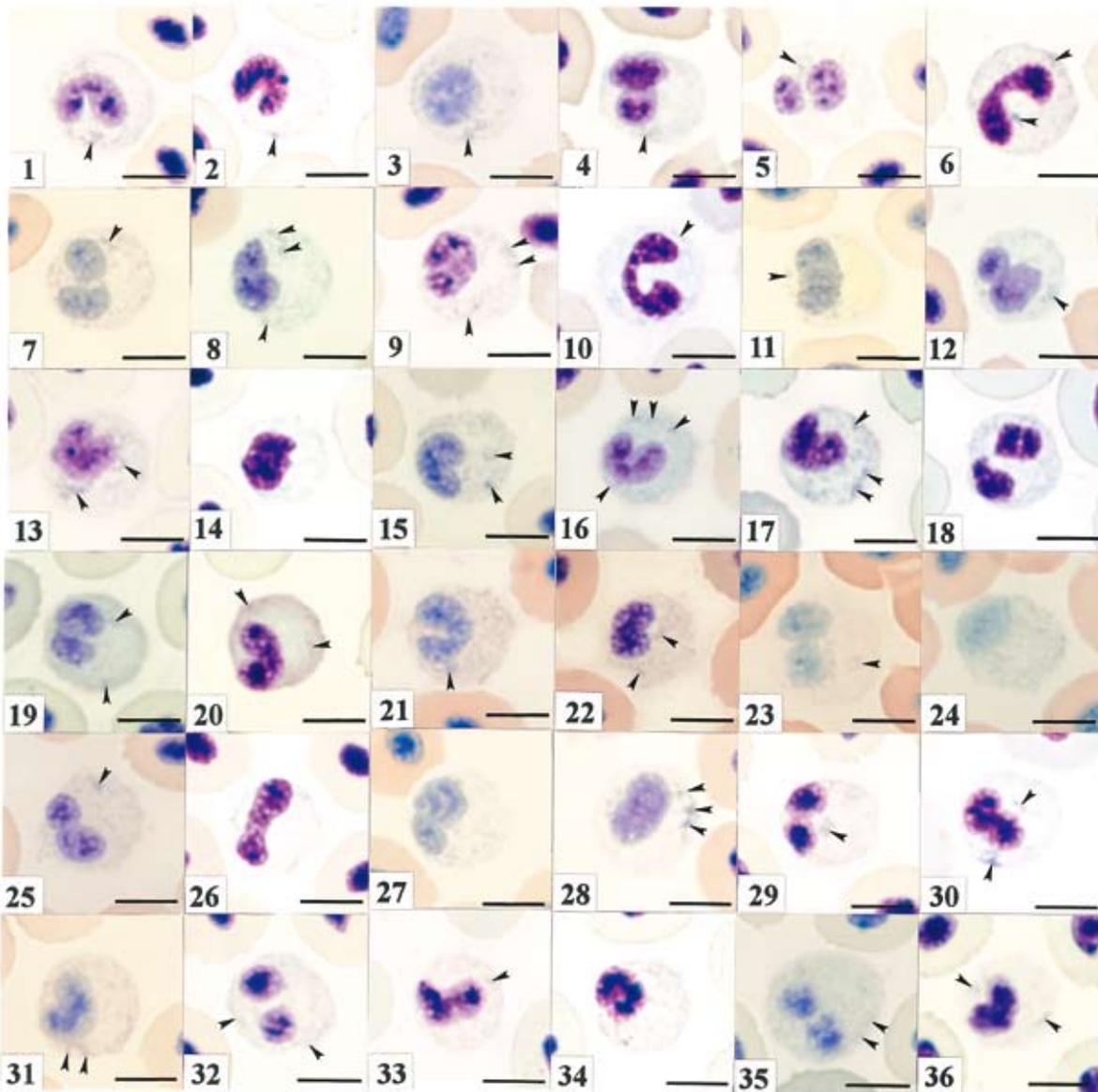


Fig. 3. Japanese amberjack neutrophil under various staining conditions. Giemsa stain. After fixation for 5 min with methanol, the sample was stained with Giemsa solution diluted with the following solutions : (1)distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2)distilled water at a rate of 1 : 20. 60 min. (3)distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (4)distilled water at a rate of 1 : 100. 60 min. (5)0.5 mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (6)0.5 mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (7)0.5 mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (8)0.5 mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (9)0.5 mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (10)0.5 mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (11)0.5 mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (12)0.5 mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (13)0.5 mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (14)0.5 mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (15)0.5 mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (16)0.5 mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (17)0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (18)0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (19)0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (20)0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (21)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (22)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (23)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (24)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (25)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (26)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (27)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (28)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (29)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (30)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (31)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (32)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (33)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (34)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (35)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (36)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. Arrowheads show Y-body. Bars = 5 μ m.

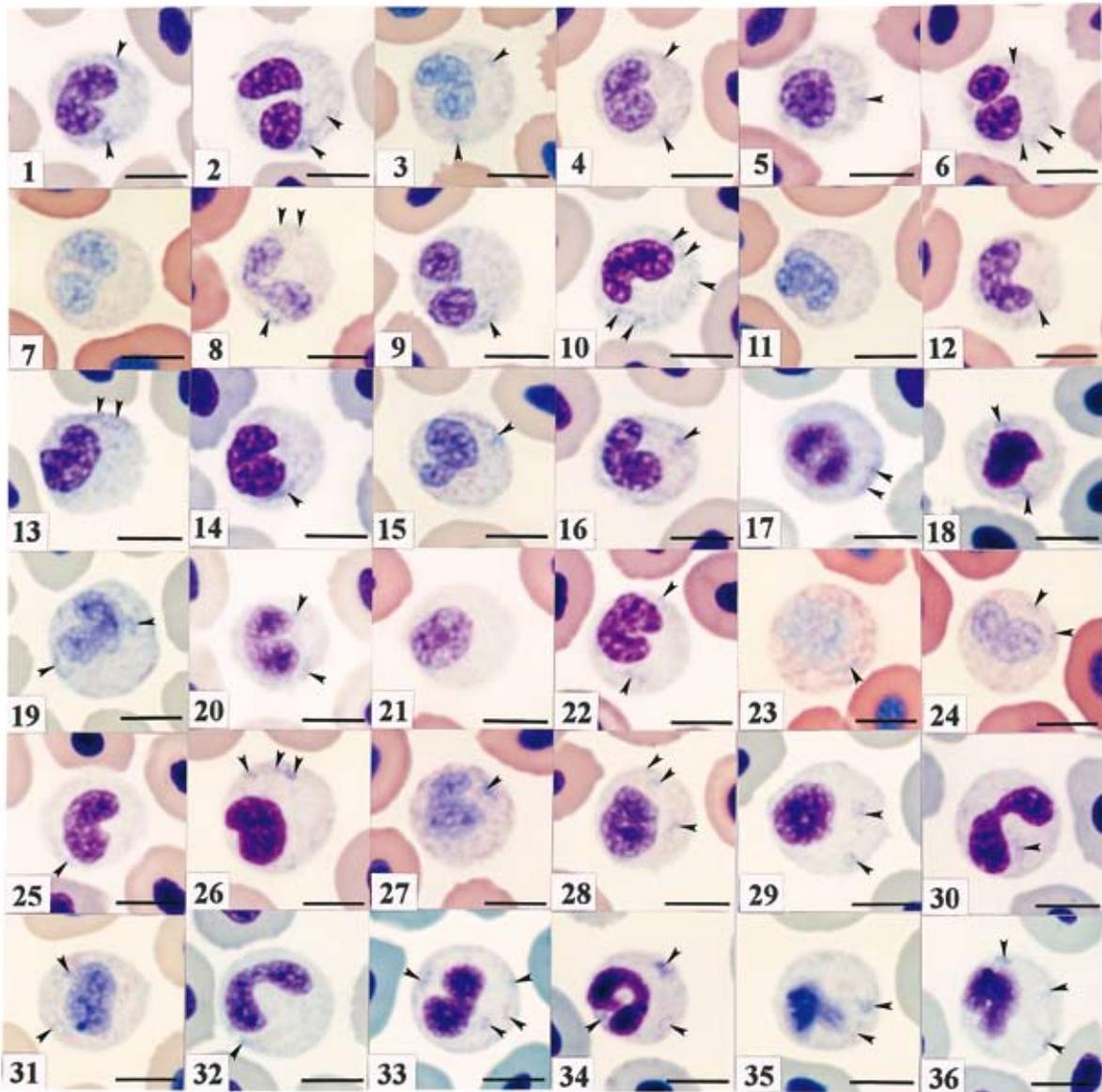


Fig. 4. Japanese amberjack neutrophil under various staining conditions. May-Grünwald (MG) · Giemsa stain. After fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the sample was stained with MG diluted solution in various solutions for 10 min, followed by staining with Giemsa under the following conditions : (1) distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2) distilled water at a rate of 1 : 20. 60 min. (3) distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (4) distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (5) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (6) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (7) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (8) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (9) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (10) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (11) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (12) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (13) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (14) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (15) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (16) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (17) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (18) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (19) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (20) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (21) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (22) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (23) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (24) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (25) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (26) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (27) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (28) $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (29) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (30) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (31) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (32) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. (33) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (34) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (35) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (36) $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. 60 min. Arrowheads show Y-body. Bars = 5 μ m.

α 顆粒は、長径0.5~1.0 μm 、短径約0.2 μm の桿形顆粒であった。メイ-グリュンワルド (MG) 液による固定では、染色される α 顆粒は少数であった (Fig. 1)。蒸留水および低濃度 (5 mM) の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. 2-1~2-5)。また、高濃度 ($1/15\text{M}$) のリン酸緩衝液を用いたMG染色においても、pH5.0の場合には、多数の α 顆粒が観察されたが (Fig. 2-6)、pH6.0~pH8.0においては、染色される α 顆粒の数が減少した (Figs. 2-7~2-9)。メタノール固定 (5分間) 後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 顆粒が少数であった (Figs. 4-1, 4-2)。また、希釈率1:100では、15分間の染色によって、多数の α 顆粒は観察されたが (Fig. 4-3)、60分間の染色では、観察される α 顆粒は減少した。低濃度の緩衝液を希釈液に用いたMGG染色では、pH5.0において、15分間の染色では、希釈率1:20の場合には少数の、希釈率1:100では多数の α 顆粒が観察されたが (Figs. 4-5, 4-7)、60分間の染色では、いずれの希釈率においても、観察される α 顆粒は減少した (Figs. 4-6, 4-8)。また、pH6.0~8.0における15分間の染色では、いずれの希釈率においても、少数の α 顆粒が観察され (Figs. 4-9, 4-11, 4-13, 4-15, 4-17, 4-19)、60分間の染色では、希釈率1:20の場合には本顆粒は観察されず (Figs. 4-10, 4-14, 4-18)、希釈率1:100では観察される α 顆粒が減少した (Figs. 4-12, 4-16, 4-20)。高濃度の緩衝液を希釈液として使用した場合には、いずれのpHにおいても、希釈率1:20では、染色時間の長短にかかわらず α 顆粒は観察されなかった (Figs. 4-21, 4-22, 4-25, 4-26, 4-29, 4-30, 4-33, 4-34)。一方、希釈率1:100では、pH5.0およびpH6.0の緩衝液を用いた場合、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 (Figs. 4-23, 4-27)、60分間の染色では観察される α 顆粒は少数であった (Figs. 4-24, 4-28)。また、pH7.0およびpH8.0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 (Figs. 4-31, 4-32, 4-35, 4-36)。なお、MGG染色によって観察される α 顆粒は淡赤色であった。

β 顆粒は、円形または卵円形で長径が0.5 μm 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 (Figs. 1~4)。

γ 顆粒は淡青色を呈し、円形または卵円形で長径0.3 μm 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、ギムザ染色およびMGG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多数観察された (Figs. 3, 4)。

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、本小体は核近縁に、ときには核に接して存在することもあった。

ブリ好中球の細胞化学的特性をTable 1に示した。アルカリ性フォスファターゼ (AIP)、酸性フォスファターゼ (AcP) および α -ナフチルアセテートエステラーゼ (α -NAE) 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. 5-1~5-3)。AIP陽性顆粒は長径0.5 μm 以下であり、細胞質に充満していた (Fig. 5-1)。一方、AcPおよび α -NAEはいずれも長径0.3 μm 以下であったが、AcP陽性顆粒の数は少なく、 α -NAE陽性顆粒は多数観察された (Figs. 5-2, 5-3)。ペルオキシダーゼ活性は、円形または卵円形の陽性顆粒 (長径0.5 μm 以下) として認められ、細胞質に充満していた (Fig. 5-4)。 β -グルクロニダーゼ (β -Glc)、 α -ナフチルプ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) は検出されなかった。Periodic acid Schiff反応 (PAS) に陽性の顆粒が細胞質に多数観察された (Fig. 5-5)。PAS陽性顆粒は円形または卵円形で、直径0.3 μm 以下であった。PAS陽性顆粒は、 α -アミラーゼ処理によって完全に消失した。また、細胞質基質もPASで弱陽性であったが、これも α -アミラーゼ処理によって消失した。アルシアンブルー染色では、陽性像は観察されなかった。トルイジンブルー (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. 5-6)。ズダンブラックB (SBB) 染色では、長径0.5 μm 以下の円形または卵円形の陽性顆粒として認められ、細胞質に充満していた (Fig. 5-7)。しかし、オイルレッドOおよびズダンIII染色では、陽性像は観察されなかった。

考 察

本研究の結果から、ブリの好中球には、Romanowsky型染色性の異なる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, ウナギ, コイ, ナイルティラピア, イサキ, マダイおよびトラフグにおいて報告されており^{3-6, 7, 13-15)}, マダイ以外の魚

種 (I群およびII-A群) においては, いずれも酸性条件下のMG染色で染まること, ギムザ染色で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^{3-6, 7, 13, 14)}。本研究の結果から, ブリの α 顆粒の染色性はI群およびII-A群と同様であったことから, ブリの α 顆粒は, これら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³⁾, コイお

Table 1. Summary of reactions of Japanese amberjack 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, many, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$, equivalent to βG) |
| Sudan III | — |
| Oil red O | — |
| Alkaline phosphatase | Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$, equivalent to βG) |
| Acid phosphatase | Granule (round or oval, some, $\phi \leq 0.3\mu\text{m}$) |
| β -Glucuronidase | — |
| α -Naphthyl acetate esterase | Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3\mu\text{m}$, equivalent to γG) |
| α -Naphthyl butyrate esterase | — |
| Naphthol AS-D chloroacetate esterase | — |
| Peroxidase | Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.5\mu\text{m}$, equivalent to βG) |

—, non detection.

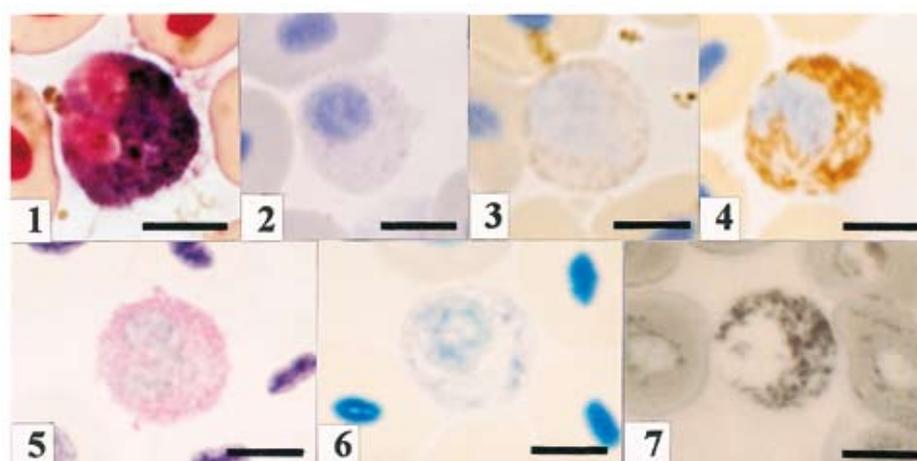


Fig. 5. Cytochemistry of Japanese amberjack neutrophil. (1)alkaline phosphatase, (2) acid phosphatase, (3) α -naphthyl acetate esterase, (4)peroxidase, (5)periodic acid Schiff reaction (PAS), (6)toluidine blue in distilled water, (7)sudan black B. Bars = $5 \mu\text{m}$.

よびナイルティラピアでは円形^{5, 6, 13)}、イサキでは桿形¹⁴⁾、ウナギおよびトラフグでは円形、卵円形または桿形と多様である^{4, 7)}。ブリの α 顆粒の形状はイサキと同様に桿形であった。

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、ノーザンパイク、ナイルティラピア、イサキ、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、マダイ、ヒラメ、トラフグ）で認められている³⁻¹⁵⁾。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³⁾、ウナギで $0.6\mu\text{m}$ 以下⁴⁾、コイで約 $0.5\mu\text{m}$ ^{5, 6)}、ノーザンパイクおよびマダイで $0.5\mu\text{m}$ 以下^{8, 15)}、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 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ ^{10, 11, 13, 14)}、メジナで $0.5\sim 1.1\mu\text{m}$ ⁹⁾、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^{7, 11)}。本研究によって、ブリにおいても β 顆粒は長径 $0.5\mu\text{m}$ 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^{1-6, 13, 14)}。また、本顆粒の長径はアジアアロワナ、ウナギ、ナイルティラピアおよびイサキで $0.3\mu\text{m}$ 以下^{3, 4, 13, 14)}、コイで $0.4\mu\text{m}$ 以下である^{5, 6)}。ブリの 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、本顆粒の染色性には、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。

これまでに、コイを除く魚種の好中球において、Y小体が観察されている^{1-4, 7-15)}。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出现することが報告されている¹⁸⁾。ブリの好中球にもY小体が観察されたことから、本小体は少なくとも真骨魚類に共通するものと考えられる。

細胞化学的特性から、ブリ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。 α -NAE陽性顆粒は、形状、大きさおよび顆粒数が γ 顆粒と類似していたことから、本酵素は γ 顆粒に存在すると思われる。一方、AcP陽性顆粒は数が少ないことから、本酵素の存在部位は確定できない。AIP陽性顆粒、ペルオキシダーゼ陽性顆粒および

SBB陽性顆粒は、いずれも円形または卵円形で細胞質に充満し、長径が $0.5\mu\text{m}$ 以下であることから、 β 顆粒に相当すると考えられる。PAS陽性顆粒は、 α 顆粒とは形状において、 β 顆粒とは大きさにおいて異なるが、 γ 顆粒とは形状および大きさにおいて類似していた。しかし、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り、 γ 顆粒とは異なると考えられる。これまでに、真骨魚類の好中球において、各種の酵素が検出されているが（Table 3）、存在部位が推定されているものは少なく、アジアアロワナ好中球では γ 顆粒にNASDCAEが³⁾、ウナギの γ 顆粒にはAcP、 α -NAEおよび α -NBEが⁴⁾、ノーザンパイクの β 顆粒にAcP活性が⁸⁾、マダイの α 顆粒にAcP、 α -NAEおよびNASDCAEが存在すると考えられている¹⁵⁾。一方、ペルオキシダーゼはこれまでに、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、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^{3, 4, 7, 8, 10-12, 15)}。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、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、形態学的特徴から、Y小体に相当すると考えられている^{1-4, 7, 8, 10-12, 15)}。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¹⁸⁾。TB染色によって、ブリ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。

本研究によって、ブリの好中球には3種類の顆粒（ α 、 β 、 γ 顆粒）とY小体が存在すること、これらの存在様式から本魚種はI群に属し、好中球はI型好中球に相当することが明らかとなった。また、 β 顆粒にはAIP、ペルオキシダーゼおよびSBB陽性物質が、 γ 顆粒には α -NAEが、Y小体にはTB陽性物質が存在すると考えられた。

謝 辞

実験魚を分与していただいた水産大学校生物生産学科教授 山元憲一博士に感謝いたします。

Table 2-1. Comparison of Romanowsky-type staining characteristics of γ granule in fish neutrophil

| Stain ³ | Fish ^{1,2} | | | | | |
|--|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | <i>Sf</i> | <i>Aj</i> | <i>Cc</i> | <i>On</i> | <i>Pt</i> | <i>Sq</i> |
| MG (both fixation and stain) | NO | NO | NO | NT | NT | NO |
| MG : DW | NO | NO | NO | NO | NT | NO |
| : 5mM PB, pH5.0 | NO | NO | NO | NO | NO | NO |
| : 5mM PB, pH6.0 | NO | NO | NO | + | NO | NO |
| : 5mM PB, pH7.0 | NO | NO | NO | +++ | NO | NO |
| : 5mM PB, pH8.0 | +++ | NO | NO | NT | NT | NO |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0 | NO | NO | NO | NO | NO | NO |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0 | NO | NO | NO | + | NO | NO |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0 | NO | NO | NO | +++ | NO | NO |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0 | + | NO | NO | NT | NT | NO |
| G : DW, 1:20, 15 min | +++ | +++ | NT | +++ | NT | +++ |
| : DW, 1:20, 60 min | +++ | +++ | +++ | +++ | NT | +++ |
| : DW, 1:100, 15 min | + | + | NT | NT | NT | +++ |
| : DW, 1:100, 60 min | + | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH5.0, 1:20, 15min | +++ | + | NT | + | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH5.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min | + | + | NT | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min | + | + | +++ | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH6.0, 1:20, 15min | +++ | +++ | NT | +++ | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH6.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min | + | + | NT | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min | +++ | + | +++ | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH7.0, 1:20, 15min | +++ | +++ | NT | +++ | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH7.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min | +++ | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH8.0, 1:20, 15min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH8.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : 0.5mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:20, 15 min | +++ | +++ | NT | NO | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min | +++ | + | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min | +++ | + | +++ | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:20, 15min | +++ | +++ | NT | NO | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min | +++ | + | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min | +++ | + | +++ | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:20, 15 min | +++ | +++ | NT | +++ | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:20, 60 min | +++ | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min | +++ | + | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min | +++ | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:100, 15min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:100, 60min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |

¹Number of γ granules observed in each staining preparation; +, some; +++, many; NO, not observed; NT, not tested.

²*Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi (2009)³); *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel, Kondo and Takahashi (2009)⁴); *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, Kondo *et al.* (2002)⁶); *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, Yasumoto *et al.* (2003)¹³); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, Kondo *et al.* (2004)¹⁴); *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack, present report).

³MG, May-Grünwald; G, 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.

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

| Stain ^{3,4} | Fish ^{1,2} | | | | | |
|---|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | <i>Sf</i> | <i>Aj</i> | <i>Cc</i> | <i>On</i> | <i>Pt</i> | <i>Sq</i> |
| MGG: DW, 1:20, 15 min | + | +++ | NO | +++ | NT | +++ |
| : DW, 1:20, 60 min | +++ | +++ | +++ | +++ | NT | +++ |
| : DW, 1:100, 15 min | + | + | NO | + | NT | +++ |
| : DW, 1:100, 60 min | + | + | NO | + | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH5.0, 1:20, 15min | + | + | NO | NO | NO | +++ |
| : 5mM PB, pH5.0, 1:20, 60min | +++ | + | +++ | NO | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min | + | NO | NO | NT | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min | +++ | NO | NO | NT | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH6.0, 1:20, 15min | + | + | NO | +++ | NO | +++ |
| : 5mM PB, pH6.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | +++ | +++ | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min | + | + | NO | NT | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min | +++ | + | + | NT | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH7.0, 1:20, 15min | +++ | +++ | + | +++ | +++ | +++ |
| : 5mM PB, pH7.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | +++ | +++ | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min | +++ | +++ | + | NT | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min | +++ | +++ | + | NT | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH8.0, 1:20, 15min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH8.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : 5mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:20, 15min | + | + | NO | NO | NO | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:20, 60min | + | + | +++ | NO | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min | + | NO | NO | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min | + | NO | NO | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:20, 15 min | +++ | + | + | +++ | NO | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:20, 60 min | +++ | + | +++ | +++ | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min | +++ | + | NO | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min | +++ | + | + | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:20, 15min | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:20, 60min | +++ | +++ | +++ | +++ | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min | +++ | + | + | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min | +++ | +++ | +++ | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:100, 15min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |
| : ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:100, 60min | +++ | +++ | NT | NT | NT | +++ |

¹Number of γ granules observed in each staining preparation; +, some; +++, many; NO, not observed; NT, not tested.

²*Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi (2009)³); *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel, Kondo and Takahashi (2009)⁴); *Cc*, *Cyprinus carpio* (common carp, Kondo *et al.* (2002)⁶); *On*, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, Yasumoto *et al.* (2003)¹³); *Pt*, *Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, Kondo *et al.* (2004)¹⁴); *Sq*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack, present report).

³MGG, 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.

⁴Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or ¹/₁₅₀ M PB.

Table 3. Comparison of cytochemical characteristics of fish neutrophil

| Test ¹ | Fish and type of cytoplasmic granule ^{2,3} | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|---|---|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------------|--|--|
| | Fish | Sf (α G, β G, γ G) | Aj (α G, β G, γ G) | El (β G) | Lm (β G) | Lj (β G) | Li (β G) | Gp (β G) | Pm (α G, β G) | Po (β G) | Tr (α G, β G) | | |
| PAS | | H: + G: + | H: + G: + | H: + G: + | H: + G: + | H: + G: + | H: + G: + | H: + G: + | H: + G: + | H: + G: + | H: + G: + | | |
| PAS- α A | | H: - G: - | H: - G: - | H: - G: - | H: - G: - | H: - G: - | H: - G: - | H: - G: - | H: - G: - | H: - G: - | H: - G: - | | |
| AB (pH1.0) | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| AB (pH2.5) | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| TB | | + , eq Yb | + , eq Yb | + , eq Yb | + , eq Yb | + , eq Yb | + , eq Yb | + , eq Yb | + , eq Yb | + , eq Yb | + , eq Yb | | |
| SBB | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| SIII | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| ORO | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| AIP | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| AcP | | - | + , eq γ G | + , eq β G | - | + | + | + | + , eq α G | + | + | | |
| β -Glu | | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | | |
| α -NAE | | + | + , eq γ G | + | - | + | + | + | + , eq α G | + | + | | |
| α -NBE | | + | + , eq γ G | + | - | - | - | - | + | - | + | | |
| NASDCAE | | + , eq γ G | + | + | - | + | + | + | + , eq α G | - | + | | |
| PO | | + , eq β G | + , eq β G | + , eq β G | + , eq β G | + , eq β G | + , eq β G | + , eq β G | + , eq β G | + , eq β G | + , eq β G | | |

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.

²Sf, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi (2009)³); Aj, *Anguilla japonica* (Japanese eel, Kondo and Takahashi (2009)⁴); El, *Exocoetis lucius* (northern pike, Kondo et al. (2008)⁵); Lm, *Lepomis macrochirus* (bluegill, Kondo et al. (2005)¹¹); Lj, *Lateolabrax japonicus* (Japanese seabass, Kondo et al. (2007)¹²); Li, *Lateolabrax latius* (seabass, Kondo et al. (2007)¹²); Gp, *Girella punctata* (ruddlefish, Kondo et al. (2005)¹⁰); Pm, *Pagrus major* (red sea-bream, Kondo et al. (2009)¹³); Po, *Paralichthys olivaceus* (Japanese flounder, Kondo et al. (2005)¹⁰); Tr, *Takifugu rubripes* (tiger puffer, Kondo et al. (2007)⁷); α G, eosinophilic (acidophilic) granule; β G, chromophobic granule; γ G, basophilic granule.

³H, hyaloplasm; G, granular; -, negative; +, positive; eq, equivalent to; Yb, Yasumoto body.

文 献

- 1) 近藤昌和, 高橋幸則: スタウンナギ好中球の形態学のおよび細胞化学的特徴. 水大校研報, 57, 299-308 (2009)
- 2) 近藤昌和, 高橋幸則: ポリプテルス好中球の形態学のおよび細胞化学的特徴. 水大校研報, 57, 283-297 (2009)
- 3) 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)
- 4) 近藤昌和, 高橋幸則: ウナギ好中球の形態学のおよび細胞化学的特徴. 水大校研報, 58, 1-13 (2009)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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のおよび細胞化学的特徴. 水大校研報, 55, 133-139 (2007)
- 8) 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のおよび細胞化学的特徴. 水大校研報, 56, 317-321 (2008)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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) の好中球の形態学のおよび細胞化学的特徴. 水大校研報, 55, 141-147 (2007)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 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のおよび細胞化学的特徴. 水大校研報, 58, 15-22 (2009)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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. 水大校研報, 56, 323-327 (2008)