

## アジアアロワナの好中球顆粒

近藤昌和<sup>†</sup>, 高橋幸則Granules of Neutrophil from Asian Arowana, *Scleropages formosus*Masakazu Kondo<sup>†</sup> and Yukinori Takahashi

**Abstract** : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in asian arowana, *Scleropages formosus* were examined by light microscopy and the composition of neutrophil granule were inferred in this study. The neutrophils were round or oval (12.0~17.0  $\mu\text{m}$  in diameter) and the nucleus round to three lobule-shaped. Three types of granules; acidophilic (eosinophilic) granule ( $\alpha\text{G}$ ), chromophobic granule ( $\beta\text{G}$ ) and basophilic granule ( $\gamma\text{G}$ ) were observed in neutrophil. The  $\alpha\text{G}$  was rod to spindle in shape (1.0 $\times$ 0.3  $\mu\text{m}$ ) and observed in May-Grünwald (MG) preparation using distilled water and low molar (5 mM) buffer. The acidophilicity of  $\alpha\text{G}$  disappeared by Giemsa stain after MG. The  $\beta\text{G}$  was round to oval (< 0.5  $\mu\text{m}$  in diameter) and peroxidase positive. The  $\gamma\text{G}$  was round to oval (< 0.3  $\mu\text{m}$  in diameter) and observed in MG preparation using alkaline (pH8.0) buffer and in Giemsa preparation. The  $\gamma\text{G}$  was naphthol AS-D chloroacetate esterase positive. Yasumoto body (Y-body) was also observed in neutrophil. The Y-body was toluidine blue positive.

**Key words** : neutrophil, granulocyte, arowana, morphology

## 緒 言

真骨魚類 (条鰭綱新鰭亜綱ハレコストム区真骨亜区<sup>1)</sup>) は, 好中球顆粒の存在様式 (種類数の違い) によって, 少なくとも3群に大別される<sup>2-11)</sup>。すなわち, ①好酸性顆粒 ( $\alpha$ 顆粒), 難染色顆粒 ( $\beta$ 顆粒) および好塩基性顆粒 ( $\gamma$ 顆粒) の3種類の顆粒が好中球に認められる魚種 (コイ *Cyprinus carpio*, ナイルティラピア *Oreochromis niloticus*, イサキ *Parapristipoma trilineatum*)<sup>2-5)</sup>, ② $\alpha$ 顆粒と $\beta$ 顆粒が認められる魚種 (トラフグ *Takifugu rubripes*)<sup>10)</sup> および③ $\beta$ 顆粒のみが認められる魚種 (ノーザンパイク *Exos lucius*, 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.*, ヒラメ *Paralichthys olivaceus*)<sup>6,7,9)</sup> の3群に大別される。③群については, 系統進化上, 祖先種が早期に出現したノーザンパイク (正真骨下区原棘鰭上目カワカマス目) から, メジナ,

オオクチバス, ブルーギル, スズキ, ヒラスズキ, タイリクスズキなどのスズキ目 (正真骨下区棘鰭上目) を経て, スズキ目から派生したとされるヒラメ (正真骨下区棘鰭上目カレイ目)<sup>13)</sup> にまで認められることから, 現生真骨魚類の広範囲に渡って受け継がれている形質と考えられる。しかし, ノーザンパイクよりも早期に祖先種が出現したグループのコイ (ニシン・骨鰈下区骨鰈上目コイ目) では, 3種類の顆粒が認められ, スズキ目のナイルティラピアとイサキにおいても同様であることから, ①群と③群の関連は不明である。また, ②群のトラフグは, 正真骨下区棘鰭上目フグ目に属し, ヒラメと同様にスズキ目から派生したと考えられているが<sup>13)</sup>, 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, 本群と他の群との関係は明らかではない。さらに, 好中球顆粒の種類数の違いと機能の関係も不明である。

上記のコイを除く魚種では, 顆粒の他に好塩基性を示す不定形の安本小体 (Y小体) (Yasumoto body, Y-body) が

2008年9月24日受付. Received September 24, 2008.

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

<sup>†</sup> 別刷り請求先 (Corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

好中球に観察されている。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<sup>12)</sup>。Y小体は, トルイジンプルーに陽性であるが, PAS染色やアルシアンブルー染色では陰性であり, 種々の脂肪染色や酵素染色でも染まらないことが明らかにされている<sup>7-12)</sup>。また, Y小体はヘマトキシリンで染色されること, しばしば核に隣接して観察されることから, 本小体は粗面小胞体であり, 細菌感染時における, 好中球の生体防御機能の上昇や活性化に関連するのではないかと推察されている<sup>12)</sup>。

本研究では, 真骨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, 真骨亜区に属する最も原始的な魚類の1種であるアジアアロワナ *Scleropages formosus* (アロワナ下区アロワナ目) の好中球について, Romanowsky型染色性<sup>11)</sup>を調べるとともに, 細胞化学的特性を明らかにし, これまでに報告されている他魚種と比較した。

## 材料および方法

下関市内の熱帯魚店で購入した全長約30cmのマレーシア産アジアアロワナ (Tag number: 0 A00595526) を水産大学校の飼育施設に搬入し, 1年以上馴致飼育したのちに実験に供した (水温23.0±1.0℃)。飼育期間中は, 市販の配合飼料を適宜給餌した。

血液塗沫標本の作製, Romanowsky型染色法および各種細胞化学染色は前報<sup>4)</sup>に従った。

## 結 果

### Romanowsky型染色性

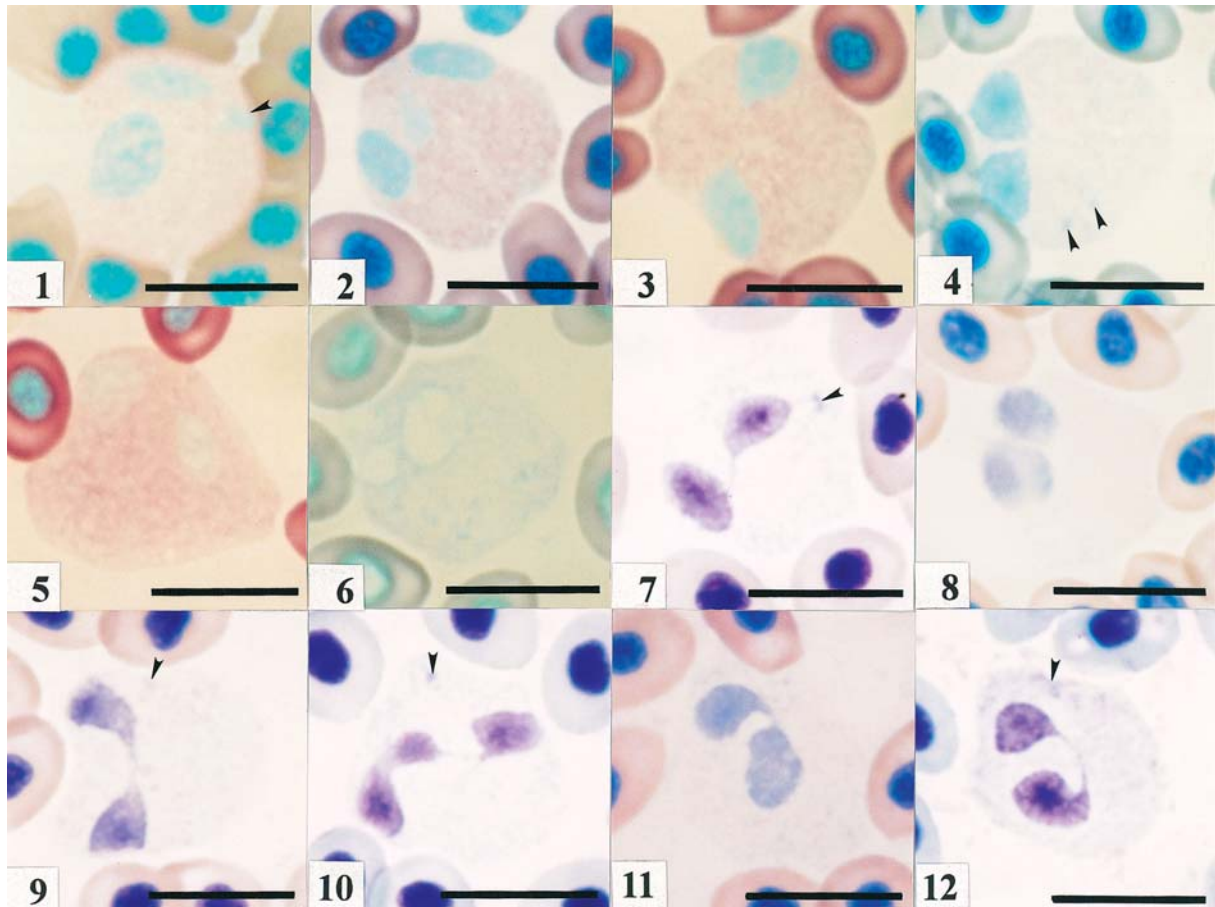
アジアアロワナの好中球は, 直径12.0~17.0 μmの類円形であり, 細胞質には3種類の顆粒 (α, βおよびγ顆粒) とY小体が観察された。核は一般に2または3分葉を示し, 稀に楕円形のものもあった。

α顆粒は, 長径約1 μm, 短径約0.3 μmの桿形または紡錘形であった。本顆粒は, メイグリュンワルド (MG) 原液 (メタノール溶液) で5分間固定後, 水洗した場合においても細胞質に多数観察されたが, その色調は淡赤色であった (Fig. 1-1)。蒸留水を希釈液に用いたMG染色では, 赤色顆粒として多数認められた (Fig. 1-2)。また, リン酸緩衝液を希釈液に用いたところ, 低濃度 (5 mM) では pH5.0~8.0の条件領域で多数のα顆粒が観察されたが, 色調はpHの上昇に従って低下した (Fig. 1-3, 1-4)。

一方, 高濃度 ( $1/15$  M) のリン酸緩衝液を希釈液に用いた場合, いずれのpHにおいてもα顆粒は認められなかった (Fig. 1-5, 1-6)。種々の希釈液を用い, 希釈率および染色時間を変えてギムザ染色を施したところ, いずれの条件においても, 本顆粒は全く観察されなかった (Fig. 1-7~1-12)。本顆粒のMG-ギムザ (MGG) 染色性を調べたところ, 希釈液に蒸留水を用い, ギムザ液の希釈率を1:20 (ギムザ原液:蒸留水), ギムザ染色時間を15分間とした場合, 少数の淡橙色顆粒として観察されたが (Fig. 2-1), 染色時間を60分間にしたところ, 本顆粒は観察されなかった (Fig. 2-2)。しかし, 希釈率を1:100にしたところ, 染色時間に拘わらず多数の淡赤色顆粒として観察された (Fig. 2-3, 2-4)。また, 5 mMのリン酸緩衝液を希釈液に用いたところ, pH5.0では, いずれの希釈率においてもギムザ染色時間を15分間とした場合, 多数の淡赤色顆粒として観察されたが (Fig. 2-5, 2-7), 染色時間を60分間にしたところ, 少数の淡赤色顆粒として認められた (Fig. 2-6, 2-8)。しかし, pH6.0では, ギムザ染色液の希釈率を1:20にしたところ, いずれの染色時間においても本顆粒は観察されず (Fig. 2-9), 希釈率1:100では, 15分間染色した場合には少数の淡赤色顆粒が認められたが (Fig. 2-10), 60分間の染色では本顆粒は観察されなかった (Fig. 2-11)。また, 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本顆粒は見られなかった。 (Fig. 2-12~2-15)。 $1/15$  Mのリン酸緩衝液を希釈液に用いたところ, いずれのpH, ギムザ染色液の希釈率および染色時間においても, 本顆粒は認められなかった。 (Fig. 2-16~2-20)。

β顆粒は, 円形または卵円形で長径が0.5 μm以下であり, 細胞質に充満していた (Fig. 1, 2)。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 (Fig. 1, 2)。

γ顆粒は, 円形または卵円形で長径0.3 μm以下であった (Fig. 1, 2)。本顆粒は, MG原液で5分間固定後, 水洗した場合には観察されず (Fig. 1-1)、蒸留水を希釈液に用いたMG染色においても認められなかった (Fig. 1-2)。また, リン酸緩衝液を希釈液に用いたところ, いずれの濃度においてもpH5.0~7.0の範囲では観察されなかったが (Fig. 1-3, 1-5), pH8.0では低濃度 (5 mM) において多数の, 高濃度 ( $1/15$  M) では少数の淡青色顆粒として観察された (Fig. 1-4, 1-6)。本顆粒のギムザ染色性を種々の希釈液を用いて調べたところ, 希釈液に蒸留水を用いた場合, 希釈率1:20では, いずれの染色時間 (15およ



**Fig. 1.** Neutrophil of asian arowana, *Scleropages formosus*. (1) May-Grünwald (MG) fixation. Sample was fixed and stained with MG concentrated-solution. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. (2-6) MG stain. 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: (2) distilled water (pH5.2), (3) phosphate buffer (5 mM, pH5.0), (4) phosphate buffer (5 mM, pH8.0), (5) phosphate buffer ( $1/15$  M, pH5.0), and (6) phosphate buffer ( $1/15$  M, pH8.0). (7-12) Giemsa stain. After fixation for 5 min with methanol, the sample was stained with Giemsa solution diluted with the following solutions: (7) distilled water (pH5.2) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (8) distilled water (pH5.2) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15 min. (9) 0.5 mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (10) 0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (11)  $1/150$  M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (12)  $1/150$  M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. Note  $\alpha$  G (1-3),  $\gamma$  G (4, 6, 9-12) and Y-body (arrowheads). Bars=10  $\mu$ m.

び60分間)においても多数の淡青色顆粒として観察された (Fig. 1-7)。しかし, 1:100では, いずれの染色時間においても少数しか観察されなかった (Fig. 1-8)。5 mMのリン酸緩衝液を希釈液に用いたところ, pH5.0では希釈液に蒸留水を用いた場合と同様であった (Fig. 1-9)。また, pH6.0の場合も, 希釈率 1:20では, いずれの染色時間においても多数の淡青色顆粒として観察され, 希釈率 1:100では15分間の染色では少数しか観察されなかった。しかし, 60分間染色したところ, 多数の淡青色顆粒が観察された。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淡青色顆粒が認められた (Fig. 1-10)。 $1/15$  Mのリン酸緩衝液を希釈液に用いたところ, いずれのpH, ギムザ染色液の希釈率および染色時間においても多

数の淡青色顆粒が観察された。(Fig. 1-11, 1-12)。本顆粒のMG-ギムザ (MGG) 染色性を調べたところ, 希釈液に蒸留水を用い, ギムザ液の希釈率を 1:20, ギムザ染色時間を15分間とした場合, 少数の淡青色顆粒として観察されたが (Fig. 2-1), 染色時間を60分間にしたところ, 本顆粒は多数観察された (Fig. 2-2)。しかし, 希釈率を 1:100にした場合には, 染色時間に拘わらず少数の淡青色顆粒が観察された (Fig. 2-3, 2-4)。5 mMのリン酸緩衝液を希釈液に用いたところ, pH5.0およびpH6.0では, いずれの希釈率においてもギムザ染色時間を15分間とした場合には少数の, 60分間では多数の淡青色顆粒として観察された (Fig. 2-5~2-11)。しかし, pH7.0およびpH8.0では, ギムザ染色液の希釈率および染色時間に拘わらず多

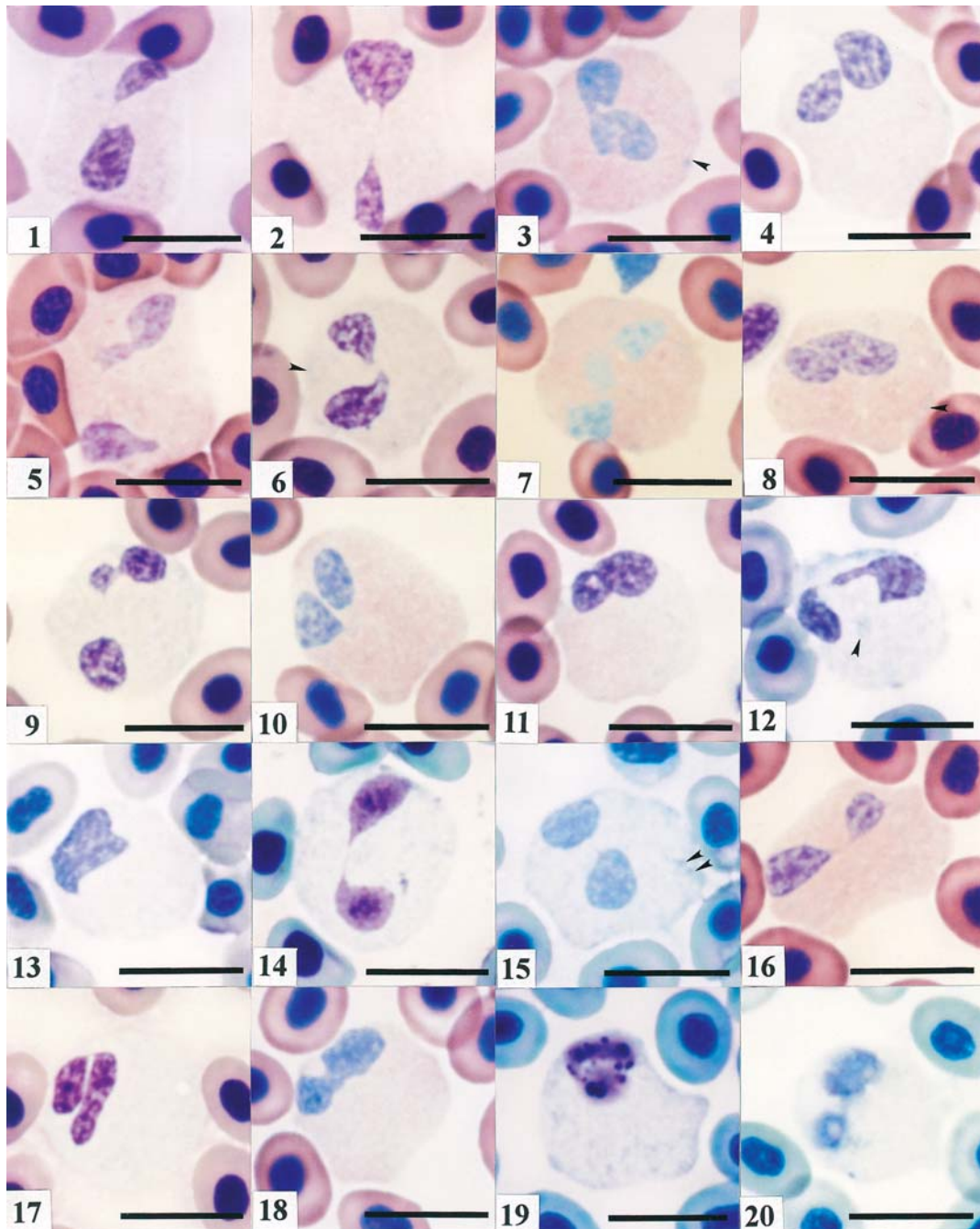


Fig. 2. Neutrophil of asian arowana, *Scleropages formosus*. May-Grünwald (MG) • Giemsa stain. After fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the sample was stained with MG diluted solution in various solutions for 10 min, followed by staining with Giemsa under the following conditions : (1) distilled water (pH5.2) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (2) distilled water (pH5.2) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 60 min. (3) distilled water (pH5.2) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15 min. (4) distilled water (pH5.2) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 60 min. (5) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (6) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 60 min. (7) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15 min. (8) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 60 min. (9) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (10) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15 min. (11) 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 60 min. (12) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (13) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15 min. (14) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (15) 0.5mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15 min. (16)  $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (17)  $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 60 min. (18)  $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15 min. (19)  $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (20)  $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15 min. Note  $\alpha$  G (3, 5, 7, 8),  $\gamma$  G (2, 6, 12-15, 17-20) and Y-body (arrowheads). Bars=10  $\mu$ m.

数の淡青色顆粒が認められた (Fig. 2-12~2-15)。また、 $1/15$  M のリン酸緩衝液を希釈液に用いたところ、pH5.0では、いずれの希釈率および染色時間においても本顆粒は少数見られた (Fig. 2-16)。しかし、pH6.0~8.0では、いずれの条件においても多数の淡青色顆粒が観察された (Fig. 2-17~2-20)。

Y小体は、いずれの染色条件においても少数観察された (Fig. 1, 2)。本小体は、円形、卵円形、コマ形、紐状などを呈し、形態および大きさにおいて多様であった。ま

た、Y小体が全く観察されない好中球も観察された。

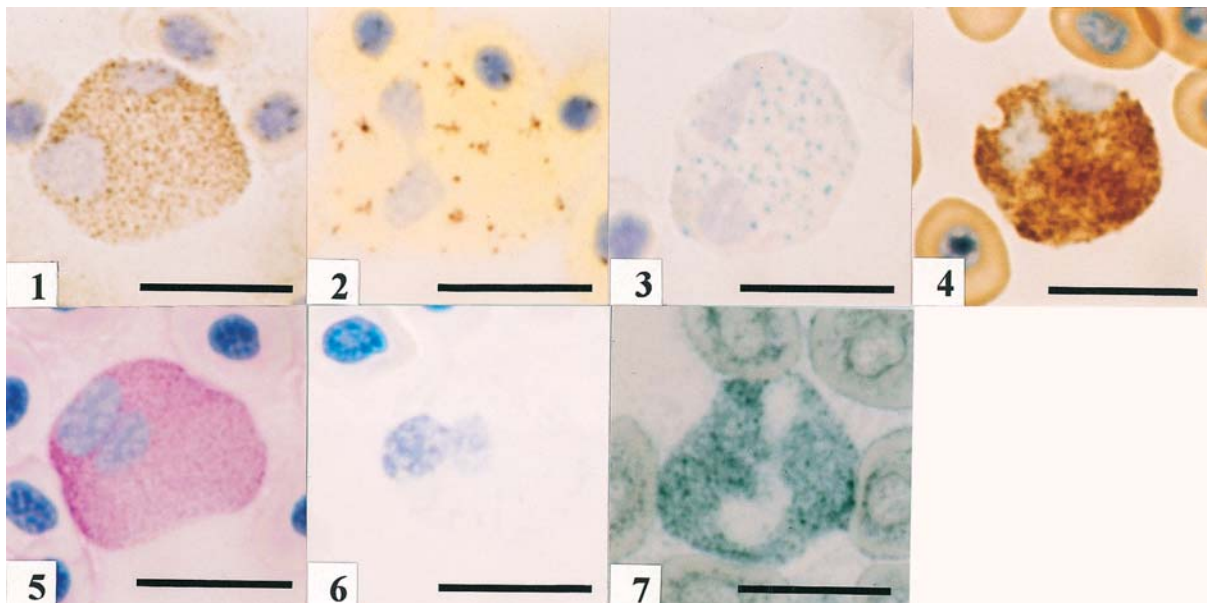
### 細胞化学染色特性

アジアアロワナ好中球の細胞化学的特性をTable 1に示した。 $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ ( $\alpha$  NAE) 染色では、直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下の円形の陽性顆粒が多数観察された (Fig. 3-1)。 $\alpha$ -ナフチルブチレートエステラーゼ ( $\alpha$  NBE) 染色では、少数の円形陽性顆粒 (直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下) が観察された (Fig. 3-2)。ナフトールAS-Dク

**Table 1** Summary of reactions of asian arowana, *Scleropages formosus* neutrophil to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number and size)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Granule (round, many, $\phi < 0.3\mu\text{m}$ ); Hyaloplasm
PAS after digestion with $\alpha$ -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, many, $\phi < 0.3\mu\text{m}$ )
Sudan III	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase	—
$\beta$ -Glucuronidase	—
$\alpha$ -Naphthyl acetate esterase	Granule (round, many, $\phi < 0.3\mu\text{m}$ )
$\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase	Granule (round, a few, $\phi < 0.3\mu\text{m}$ )
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	Granule (round, some, $\phi < 0.3\mu\text{m}$ , equivalent to $\gamma$ G)
Peroxidase	Granule (round or oval, many, $\phi < 0.5\mu\text{m}$ , equivalent to $\beta$ G)

—, non detection.



**Fig. 3.** Cytochemistry of of asian arowana, *Scleropages formosus* neutrophil. (1)  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase, (2)  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase, (3) naphthol AS-D chloroacetate esterase, (4) peroxidase, (5) periodic acid Schiff reaction, (6) toluidine blue in distilled water, (7) sudan black B. Bars= $10\mu\text{m}$ .

クロロセテートエステラーゼ (NASDCAE) 染色では、直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下の円形陽性顆粒が認められたが、陽性顆粒数は $\alpha$  NAE陽性顆粒数よりも少なく、 $\alpha$  NBE陽性顆粒数よりは多かった (Fig. 3-3)。ペルオキシダーゼ染色では、円形または卵円形の陽性顆粒 (直径 $0.5\mu\text{m}$ 以下) が認められ、細胞質に充満していた (Fig. 3-4)。アルカリ性フォスファターゼ、酸性フォスファターゼおよび $\beta$ -グルクロニダーゼは検出されなかった。 $\alpha$ -アミラーゼ処理によって完全に消失するperiodic acid Schiff反応 (PAS) 陽性顆粒 (円形、直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下) が細胞質に多数散在していた (Fig. 3-5)。細胞質基質もPASで弱陽性であったが、これも $\alpha$ -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、種々の形態を示す青色の構造物が観察された (Fig. 3-6)。この構造物の数は好中球ごとに異なっていた。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) 染色では直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下の円形の陽性顆粒が観察され、この顆粒は細胞質に多数散在していた (Fig. 3-7)。

## 考 察

アジアアロワナの好中球には、好酸性顆粒 ( $\alpha$  顆粒)、難染色顆粒 ( $\beta$  顆粒) および好塩基性顆粒 ( $\gamma$  顆粒) の3種類の顆粒と、好塩基性のY小体が観察された。

$\alpha$  顆粒はコイ、ナイルティラピア、イサキおよびトラフグで報告されており、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<sup>2-5,9)</sup>。アジアアロワナにおいても同様の染色性が得られたことから、アジアアロワナの $\alpha$  顆粒はコイ、ナイルティラピア、イサキおよびトラフグのそれと同等の顆粒であると考えられる。しかし、顆粒の形態には相違が認められた。コイおよびナイルティラピアの $\alpha$  顆粒は円形であり<sup>2-4)</sup>、イサキでは桿形である<sup>5)</sup>。また、トラフグの $\alpha$  顆粒は円形、卵円形または桿形と多様である<sup>9)</sup>。一方、アジアアロワナでは、桿形または紡錘形であった。このことは、アジアアロワナでは $\alpha$  顆粒の染色性は、前記の魚種と同じであっても、その内容物や機能に違いがあることを示しているのかもしれない。

$\beta$  顆粒は、これまでに著者らが報告した全ての魚種 (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) で認められており<sup>2-11)</sup>、いずれの魚種においても円形から卵円形であり、長径はコイで約 $0.5\mu\text{m}$ 、ノーザンパイクで $0.5\mu\text{m}$ 以下、イサキ、ナイルティラピア、オオクチバス、ブルーギルおよびヒラメで $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ 、メジナで $0.5\sim 1.1\mu\text{m}$ 、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。

$\gamma$  顆粒はコイ、ナイルティラピアおよびイサキで観察されており<sup>3-5)</sup>、コイでは長径 $0.4\mu\text{m}$ 以下の、ナイルティラピアとイサキでは長径 $0.3\mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形である。アジアアロワナにおいても、本顆粒は長径 $0.3\mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形であった。しかし、Romanowsky型染色性に違いが認められた。コイおよびナイルティラピアでは、蒸留水およびpH5.0~7.0のリン酸緩衝液を用い、イサキではpH5.0~7.0のリン酸緩衝液を用いて本顆粒のRomanowsky型染色性が調べられている<sup>3-5)</sup>。コイ好中球の $\gamma$  顆粒はMG染色では染まらず、MGG染色のギムザ染色時間が長いほど染色される顆粒の数が増加する<sup>3)</sup>。また、リン酸緩衝液の濃度が低い (5 mM) 場合には、pH7.0で染色されるのに対して、高濃度 ( $1/15\text{M}$ ) ではpH6.0およびpH7.0で染色される<sup>3)</sup>。さらに、ギムザ染色のみを施した標本にも本顆粒は観察され、ギムザ染色液中のギムザ原液の濃度が高いほど多数の顆粒が染色される<sup>3)</sup>。ナイルティラピアにおいても、本顆粒はコイと同様に、蒸留水を用いたMG染色には染まらない<sup>4)</sup>。しかし、リン酸緩衝液を用いたMG染色では、いずれの濃度の緩衝液においてもpH6.0および7.0で染まり、MGG染色ではpH5.0では観察されず、pH6.0と7.0で染色される<sup>4)</sup>。また、ギムザ染色では蒸留水を用いた場合、本顆粒が多数観察されるが、低濃度のリン酸緩衝液ではpH5.0で少数の、pH6.0および7.0では多数の $\gamma$  顆粒が観察され、高濃度の緩衝液ではpH5.0および6.0において、本顆粒は認められず、pH7.0では多数観察されている<sup>4)</sup>。一方、イサキではMG染色には染まらず、MGG染色では、いずれの濃度の緩衝液を用いてもpH7.0では観察されるが、pH5.0と6.0では染色されない<sup>5)</sup>。本研究の結果から、アジアアロワナにおいても蒸留水およびpH5.0~7.0のリン酸緩衝液を用いたMG染色では、コイおよびイサキと同様に本顆粒は認められなかった。しかし、MGG染色では、いずれの濃度およびpHのリン酸緩衝液を用いてもギムザ染色時間を長くすることによって、多数の $\gamma$  顆粒が観察された。さらに、コイと同様にギムザ染

色のみを施した標本にも本顆粒は観察され、ギムザ染色液中のギムザ原液の濃度が高いほど多数の顆粒が染色された。このように、アジアアロワナ好中球の $\gamma$ 顆粒はコイおよびイサキとはMG染色性が類似し、ギムザ染色性もコイと同様であるが、MGG染色性はコイ、ナイルティラピアおよびイサキとは異なっていた。このことは、アジアアロワナの $\gamma$ 顆粒の内容物や機能が、コイ、ナイルティラピアおよびイサキとは異なることを示唆していると考えられる。

Y小体は、これまでに著者らが報告した魚種(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)のうち、コイ以外で認められている<sup>2-11)</sup>。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明らかとなっている<sup>12)</sup>。

細胞化学的特性から、アジアアロワナ好中球の顆粒およびY小体の成分を以下のように推定した。好中球にはPAS、SBB、 $\alpha$ NAE、 $\alpha$ NBEおよびNASDCAE染色によって、直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下で円形の陽性顆粒が観察された。これらの陽性顆粒は $\alpha$ 顆粒とは形状が、 $\beta$ 顆粒とは大きさが異なる。一方、 $\gamma$ 顆粒とは大きさおよび形状が類似するが、PAS、SBBおよび $\alpha$ NAE陽性顆粒は細胞質に充満しており、 $\gamma$ 顆粒よりも多数観察される。また、 $\alpha$ NBE陽性顆粒数は $\gamma$ 顆粒よりも少ない。従って、これらの陽性顆粒は $\gamma$ 顆粒とは異なると考えられるが、存在部位については明らかではない。なお、PAS陽性顆粒数は $\alpha$ -アミラーゼによって完全に消化されることから、本顆粒はグリコーゲンを主成分とする構造物であり、Romanowsky型染色によって識別される顆粒とは異なると考えられる。一方、NASDCAE陽性顆粒は好中球内に $\gamma$ 顆粒と同程度観察されることから、 $\gamma$ 顆粒に相当すると考えられる。NASDCAE陽性顆粒はノーザンパイク、スズキ、ヒラスズキおよびトラフグにおいて検出されているが<sup>9-11)</sup>、これらの魚種では $\gamma$ 顆粒は観察されていない<sup>9-11)</sup>。また、ブルーギル、メジナおよびヒラメにはNASDCAE陽性顆粒も $\gamma$ 顆粒も認められていない<sup>7,8)</sup>。アジアアロワナ好中球には、ペルオキシダーゼ陽性顆粒が多数存在し、その大きさ、形状が類似していることから、 $\beta$ 顆粒に相当すると考えられる。これまでに、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も、ペルオキシダーゼ陽性顆粒は $\beta$ 顆粒に相当すると考えられている<sup>7-11)</sup>。ノーザンパイクでは酸性フォスファターゼ活性も $\beta$ 顆粒に観察されている

が<sup>11)</sup>、本酵素活性は、アジアアロワナ好中球には検出されなかった。TB染色により、アジアアロワナの好中球に種々の形態を示す青色の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。これまでに、ノーザンパイク、ブルーギル、メジナ、スズキ、ヒラスズキ、タイリクスズキ、ヒラメおよびトラフグにおいても、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<sup>7-11)</sup>。また、コイにおいても*Aeromonas 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<sup>12)</sup>。

本研究によって、アジアアロワナの好中球は3種類の顆粒とY小体を有し、 $\beta$ 顆粒にはペルオキシダーゼが、 $\gamma$ 顆粒にはNASDCAEが、またY小体にはトルイジンブルー陽性物質が存在することが示唆された。これまでに、アジアアロワナと同様に、好中球に3種類の顆粒を有する魚種としてコイ(ニシン・骨鰈下区骨鰈上目コイ目)、ナイルティラピアとイサキ(正真骨下区棘鱗上目スズキ目)が知られている<sup>5-7,9)</sup>。従って、好中球に3種類の顆粒を有する真骨魚種の起源は、アロワナ下区にまで遡り、この形質は、コイ目を通じて、一部のスズキ目魚類にまで受け継がれているといえる。

## 文 献

- 1) 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)
- 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，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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 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. 水大研報, 56, 317-321 (2008)
- 12) 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)
- 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)