

ノーザンパイク好中球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 高橋幸則, 山元憲一

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from Northern Pike, *Exos lucius*

Masakazu Kondo[†], Yukinori Takahashi and Ken-ichi Yamamoto

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in the northern pike, *Exos lucius* were examined by light microscopy and the composition of neutrophil granule were inferred in this study. The neutrophils were round or oval, and the nucleus round to three lobule-shaped. The neutrophil possessed the chromophobic granule (β G) and Y-body. The β G was acid phosphatase and peroxidase positive. The Y-body was toluidine blue positive.

Key words : northern pike, neutrophil, granulocyte, morphology

緒 言

各種真骨魚類の好中球には、Romanovsky型染色性と形状が異なる複数種の顆粒が存在し、しかも顆粒の種数は魚種によって相違することが報告されている¹⁻⁹⁾。コイ目のコイ *Cyprinus carpio* およびスズキ目魚類のナイルティラピア *Oreochromis niloticus* とイサキ *Parapristipoma trilineatum* では、エオシン好性顆粒 (α 顆粒)、難染性顆粒 (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たが^{1, 2, 3, 4)}、スズキ目メジナ科のメジナ *Girella punctata*、同目サンフィッシュ科のオオクチバス *Micropterus salmoides* とブルーギル *Lepomis macrochirus* および同目スズキ科のスズキ *Lateolabrax japonicus*、ヒラスズキ *L. latus* およびタイリクスズキ *L. sp.* では、 β 顆粒は観察されているが、 α 顆粒と γ 顆粒は認められていない^{5, 6, 9)}。さらに、系統発生において、スズキ目から派生したと考えられているカレイ目¹⁰⁾ のヒラメ *Paralichthys olivaceus* でも、 β 顆粒しか観察されない⁷⁾。一方、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フグ目¹⁰⁾ のトラフグ *Takifugu rubripes* では、 α 顆粒および β 顆粒が観察されているが、 γ 顆粒は認められていない⁸⁾。すなわち、好中球内の顆粒の多様性

は、魚類の分類群とある程度の相関を示すようだが、明確な関係を結論づけるには至っていない。そこで、本研究では、これまで検討例にない真骨魚類分類群 (条鰭綱新鰭亜綱ハレコストム区真骨亜区¹¹⁾) 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、スズキ目魚類よりも系統進化上、早期に出現したグループ (正真骨下区原棘鰭上目カワカマス目) に属するノーザンパイク *Exos lucius* の好中球について、Romanovsky型染色性を調べるとともに、細胞化学的特性も明らかにし、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

全長約40cmのノーザンパイクを用いて、特定外来生物法施行 (2005年) 以前に実験を行った。中華人民共和国から入手した受精卵を孵化させたのち、ミジンコ *Daphnia pulex*、ついでコイ *C. carpio* の仔稚魚を初期餌料として与えて育成したのち、順次、市販の配合飼料に馴致させた。なお、実験期間中の水温は、 $17.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ であった。

血液塗沫標本の作製、Romanovsky型染色法および各種細胞化学染色は前報¹²⁾ に従った。

2007年11月22日受付。Received November 22, 2007.

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

[†] 別刷り請求先 (Corresponding author) : kondom@fish-u.ac.jp

結 果

Romanovsky型染色性

ノーザンパイクの好中球は、直径8.0~11.0 μm の円形または卵円形であり、細胞質内には、1種類の顆粒(β 顆粒)とY小体が観察された(Fig. 1-1~24)。しかし、エオシン好性顆粒(α 顆粒)や、好塩基性顆粒(γ 顆粒)は全く認められなかった。 β 顆粒は、円形または卵円形で直径が0.5 μm 以下であり、細胞質に充満していた(Fig. 1-1~24)。本顆粒は、いずれの条件のRomanovsky型染色においても明瞭な色調を示さず、難染色であった(Fig. 1-1~24)。

Y小体は、いずれの染色条件においても観察された(Fig. 1-1~24)。本小体は、円形、卵円形、コマ形、紐状、鎖状など、形態および大きさは多様であった。Y小体の個数は、好中球ごとに異なっていたが、全く観察されないものは稀であった。

細胞化学染色特性

ノーザンパイクの好中球の細胞化学的特性をTable 1に示した。好中球には、Periodic acid Schiff反応(PAS)に陽性の顆粒が細胞質に多数散在していた(Fig. 2-1)。PAS陽性顆粒は直径0.3 μm 以下の円形で、 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. 2-2)。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染色では直径0.3 μm 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. 2-3)。酸性フォスファターゼ染色では、直径約0.5 μm の円形陽性顆粒が観察され、細胞質に充満していた(Fig. 2-4)。 β -グルクロニダーゼ染色では、直径0.3 μm 以下の円形の陽性顆粒が少数観察された(Fig. 2-5)。 α -ナフチルアセテートエステラーゼ(α NAE)染色では、PASやズダンブラックB染色と同様に、直径0.3 μm 以下の円形の陽性顆粒が多数観察された(Fig. 2-6)。 α -ナフチルブチレートエステラーゼ染色では、数個の円形陽性顆粒(直径0.3 μm 未満)が観察された(Fig. 2-7)。ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ染色では、直径0.3 μm 未満の円形陽性顆粒

が認められたが、陽性顆粒数は、 α NAE陽性顆粒数よりも少なかった(Fig. 2-9)。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 μm)が認められ、細胞質に充満していた(Fig. 2-9)。アルカリ性フォスファターゼは検出されなかった。

考 察

本研究の結果から、ノーザンパイクの好中球には、難染色を示す β 顆粒と、Y小体が存在することが明らかとなった。 β 顆粒は、これまでに著者らが報告した全ての魚種(コイ、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)で観察されている¹⁻⁹⁾。また、Y小体はコイではこれまでに観察されていないが^{1,2)}、前述の他魚種のいずれにおいても認められている³⁻⁹⁾。

ノーザンパイクの好中球顆粒のRomanovsky型染色性に、各種条件による大きな違いは認められなかった。また、いずれの条件の染色においても、好中球は、他の血球種と明瞭に区別することができた。したがって、好中球の鑑別のための特別な条件は設定する必要はないと考えられる。

細胞化学的特性から、ノーザンパイクの好中球の β 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、円形のPAS陽性顆粒(直径0.3 μm 以下)が多数観察された。しかし、PAS陽性顆粒数は β 顆粒よりも小型であり、さらに α -アミラーゼによってPAS陽性顆粒は完全に消化されることから、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、 β 顆粒とは異なると考えられる。ズダンブラックB陽性顆粒は直径0.3 μm 以下であり、 α -ナフチルアセテートエステラーゼ陽性顆粒と、形態(円形)、大きさ、分布および陽性顆粒数が類似していることから、同一顆粒がこれらの染色に陽性であると考えられる。しかし、 β 顆粒とは大きさが異なる。 β -グルクロニダーゼおよび α -ナフチルブチレートエステラーゼ染色に陽性の顆粒は、 β 顆粒とは大きさと顆粒数が異なる。また、ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ陽性顆粒も、大きさおよび陽性顆粒数が β 顆粒とは異なる。したがって、これらの陽性顆粒は β 顆粒とは異なる構造物が染色されたものと思われる。一方、酸性フォスファターゼおよびペルオキシダーゼ陽性顆粒は、細胞質に充満しており、両陽性顆粒の大きさは、0.5 μm であることから、 β 顆粒に相当すると思われる。これまでに、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では、ペルオキシダー

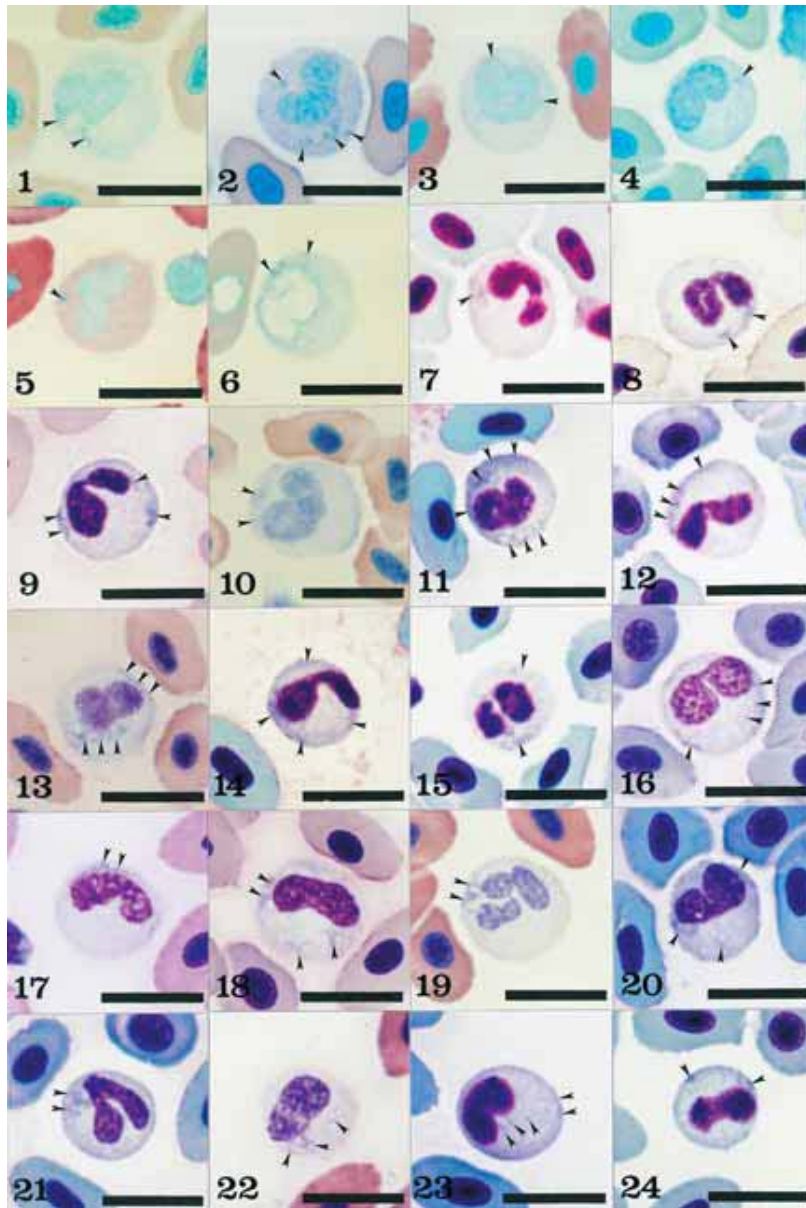
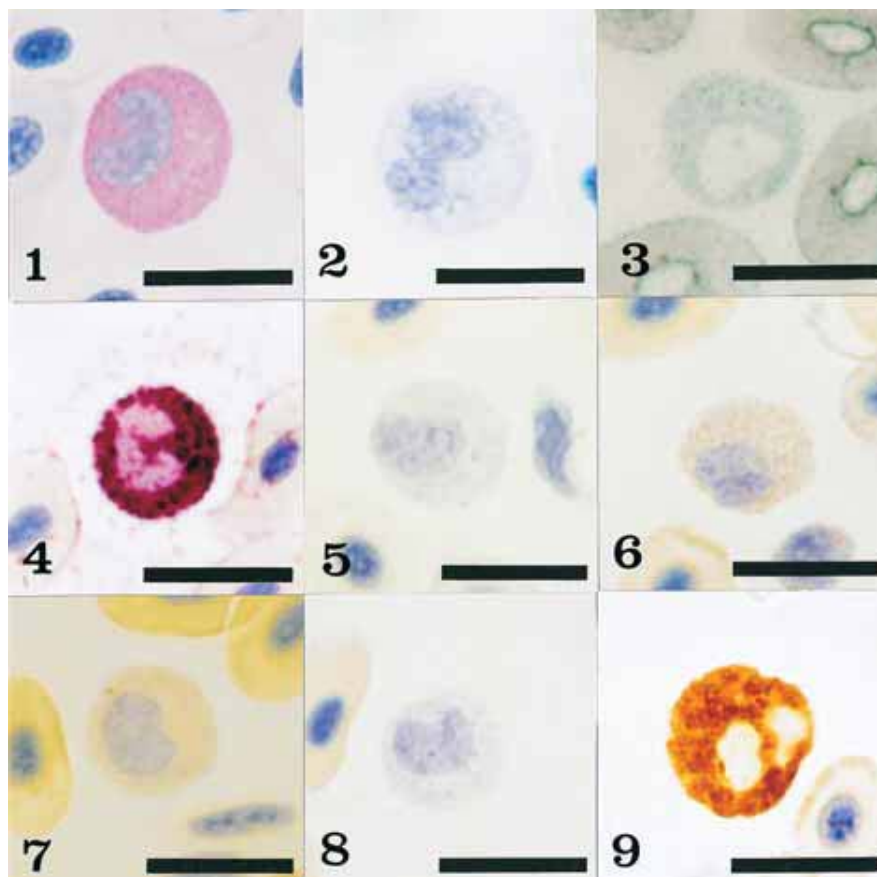


Fig. 1. Neutrophil of *Exos lucius*. (1) May-Grünwald fixation. Sample was fixed and stained with May-Grünwald concentrated-solution. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. (2-6) May-Grünwald stain. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated-solution, the sample was stained again for 10 min in May-Grünwald diluted with the following solutions: (2) distilled water (pH5.2), (3) phosphate buffer (5 mM, pH5.0), (4) phosphate buffer (5mM, pH7.0), (5) phosphate buffer ($1/15$ M, pH5.0), and (6) phosphate buffer ($1/15$ M, pH7.0). (7-15) 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) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (9) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (10) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (11) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (12) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 60 min. (13) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (14) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (15) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (16-24) May-Grünwald • Giemsa stain. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated-solution, the sample was stained with May-Grünwald diluted solution in various solutions for 10 min, followed by staining with Giemsa under the following conditions: (16) distilled water (pH5.2) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (17) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (18) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (19) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (20) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (21) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (22) $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (23) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (24) $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. Note β G and Y-body (arrowheads). Bars=10 μ m.

Table 1. Summary of reactions of *Exos lucius* 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 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, many, $\phi < 0.3\mu\text{m}$)
SudanIII	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase	Granule (round, many, $\phi = 0.5\mu\text{m}$, equivalent to βG)
β -Glucuronidase	Granule (round, some, $\phi < 0.3\mu\text{m}$)
α -Naphthyl acetate esterase	Granule (round, many, $\phi < 0.3\mu\text{m}$)
α -Naphthyl butyrate esterase	Granule (round, a few, $\phi < 0.3\mu\text{m}$)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	Granule (round, many, $\phi < 0.3\mu\text{m}$)
Peroxidase	Granule (round or oval, many, $\phi = 0.5\mu\text{m}$, equivalent to βG)

—, non detection.

**Fig. 2.** Cytochemistry of *Exos lucius* neutrophil. (1) periodic acid Schiff reaction, (2) toluidine blue in distilled water, (3) sudan black B, (4) acid phosphatase, (5) β -glucuronidase, (6) α -naphthyl acetate esterase, (7) α -naphthyl butyrate esterase, (8) naphthol AS-D chloroacetate esterase, (9) peroxidase. Bars = $10\mu\text{m}$.

ゼ陽性顆粒は β 顆粒に相当すると考えられているが、酸性フォスファターゼ陽性顆粒は β 顆粒とは異なるとされている⁶⁻⁸⁾。

トルイジンブルー染色によりノーザンパイク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、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、トルイジンブルー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⁶⁻⁹⁾。

本研究によって、ノーザンパイクの好中球は β 顆粒とY小体を有し、前者には酸性フォスファターゼとベルオキシダーゼが、後者にはトルイジンブルー陽性物質が存在することが明らかとなった。

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)およびトラフグ(正真骨下区棘鱗上目フグ目)では好中球にエオシン好性顆粒(α 顆粒)も観察されているが^{1-4, 8)}、ノーザンパイクには認められなかった。ノーザンパイクと同様に、好中球に β 顆粒とY小体を有し、他の顆粒が認められない魚種は、スズキ目のメジナ、オオクチバス、ブルーギル、スズキ、ヒラスズキ、タイリクスズキおよび正真骨下区棘鱗上目カレイ目のヒラメである^{3-7, 9)}。したがって、好中球に β 顆粒とY小体を有す魚種の起源は、少なくとも正真骨下区原棘鱗上目カワカマス目にまで遡ると考えられる。

文 献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のメイ-グリユンワルド・ギムザ染色性. 水大校研報, 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. 水大校研報, 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-グリユンワルド・ギムザ染色性. 水大校研報, 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. 水大校研報, 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. 水大校研報, 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. 水大校研報, 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. 水大校研報, 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. 水大校研報, 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. 水大校研報, 55, 141-147 (2007)
- 10) 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)
- 11) 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)

1) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のメイ-