

トラフグ好中球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和^{1†}・稲川裕之¹・池田 至¹・山元憲一¹・高橋幸則¹

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from Tiger Puffer, *Takifugu rubripes*

Masakazu Kondo^{1†}, Hiroyuki Inagawa¹, Itaru Ikeda¹, Ken-ichi Yamamoto¹ and Yukinori Takahashi¹

Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in tiger puffer, *Takifugu rubripes* were examined by light microscopy and the components of neutrophil granule were inferred in this study. The neutrophil were round and the nucleus round to kidney-shaped. Granules of the neutrophil possessed a large number of eosinophilic granule (α G), chromophobic granule (β G) and a few of amorphous basophilic body (Yasumoto (Y)-body: formerly amorphous basophilic granule (δ G)¹⁻³⁾). The α G was round to rod-shaped and the Romanovsky type staining pattern of the granule was influenced by pH and concentration of diluent of the staining solution. The β G was round to oval, unstained by Romanovsky type stain and peroxidase positive. The Y-body was toluidine blue positive.

Key words: neutrophil, granulocyte, tiger puffer, morphology

1 緒 言

ヒト好中球の細胞内顆粒は、その膜や基質の成分の違いに基づいて、4種類に分類されている⁴⁻⁷⁾。一方、脊椎動物の中でも早期に祖先種が出現したとされる魚類では、好中球顆粒の種数に関する報告は少ない。近年、我々は、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、しかも顆粒の多様性は魚種によって相違することを示した^{1, 2, 8-10)}。すなわち、コイ目のコイ *Cyprinus carpio* の好中球はエオシン好性顆粒 (α 顆粒)、雑染性顆粒 (β 顆粒) および好塩基性顆粒 (γ 顆粒) の3種類の顆粒を有するが^{8, 9)}、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、これら3種類の顆粒とともに、粗大で不定形の好塩基性顆粒 (δ 顆粒) が認められた¹⁻³⁾。また、同じスズキ目のメジナ *Girella punctata*、オオクチバス *Micropterus salmoides* およびブルーギル *Lepomis macrochirus* では、 β 顆粒と δ 顆粒は観察されるが、 α 顆粒と γ 顆粒は認めら

れなかった^{3, 11)}。さらに、スズキ目から派生したと考えられているカレイ目¹²⁾ のヒラメ *Paralichthys olivaceus* でも、 β 顆粒と δ 顆粒のみが観察されている³⁾。以上のような魚種間の違いには、系統進化と関連した方向性があるのではないかと著者らは考えているが¹⁰⁾、各種顆粒の成分に関しては不明な点が多い。なお、 δ 顆粒は、最初、ナイルティラピアで観察され¹⁾、これまで顆粒の一種としてきたが¹⁻³⁾、好中球全てに観察されるわけではなく、形態も多様であることから、本来的に好中球が有する顆粒とするには疑問がある。そこで、本顆粒の呼称は、これを最初に記述した報告¹⁾の著者名を採ってY小体 (Yasumoto body (Y-body)) とし、以後の記述に用いることとしたい。

本研究では、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に属し、産業上重要魚種であるトラフグ *Takifugu rubripes* の好中球についてRomanovsky型染色性および細胞化学的特性を調べ、これまでに報告した他魚種と比較した。

2006年11月14日受付。Received November 14, 2006.

1 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

† 別刷り請求先 (Corresponding author).

2 材料および方法

実験には山口県内の種苗生産場から水産大学の飼育施設に搬入したトラフグの稚魚を、体重約500gに育成したのち使用した。トラフグの育成には市販の配合飼料を給餌した。なお、実験期間中の水温は、 $24.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ であった。

血液塗抹標本の作製、Romanowsky型染色法および各種細胞化学染色は前報¹⁾に従った。

3 結果

Romanovsky型染色特性

トラフグ好中球の各種Romanovsky型染色像をFig. 1～4に示した。トラフグの好中球は直径 $8.0\sim 10.5\ \mu\text{m}$ の円形であり、細胞質内には2種類の顆粒(α , β)とともにY小体が観察された。

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(Fig. 2 b, 2 d, 4 b)。本顆粒の長径は円形または卵円形のもので約 $0.5\ \mu\text{m}$ であり、桿形の顆粒は、長径 $1.5\ \mu\text{m}$ 以下、短径約 $0.3\ \mu\text{m}$ であった。May-Grünwald液(メタノール溶液)による固定では、 α 顆粒は染色されず(Fig. 1)、また、蒸留水を用いたMay-Grünwald(MG)染色でも染まらなかった(Fig. 2 a)。リ

ン酸緩衝液を用いたMG染色では、いずれの濃度(5 mMまたは1/15M)およびpH(5, 6, 7および8)においても本顆粒が観察された。しかし、緩衝液のいずれの濃度においても、pH5.0およびpH6.0では多数の α 顆粒が赤色に染色されたのに対して(Fig. 2 b, d), pH7.0および8.0では淡橙色に染まる α 顆粒が少数のみ観察された(Fig. 2 c, e)。本顆粒はGiemsa染色ではいずれの条件においても染色されなかった(Fig. 3)。

MG染色後にGiemsa染色を施したMGG染色では、希釈液に蒸留水を用いた場合、Giemsa液の希釈率(1:20または

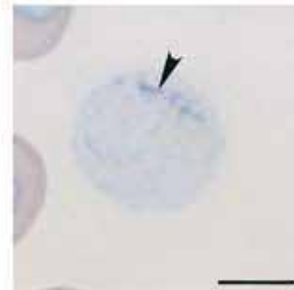


Fig. 1. A tiger puffer neutrophil stained with May-Grünwald concentrated-solution, which served as agents for both fixation and staining. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. An arrowhead shows the Y-body. Bars = $5\ \mu\text{m}$.

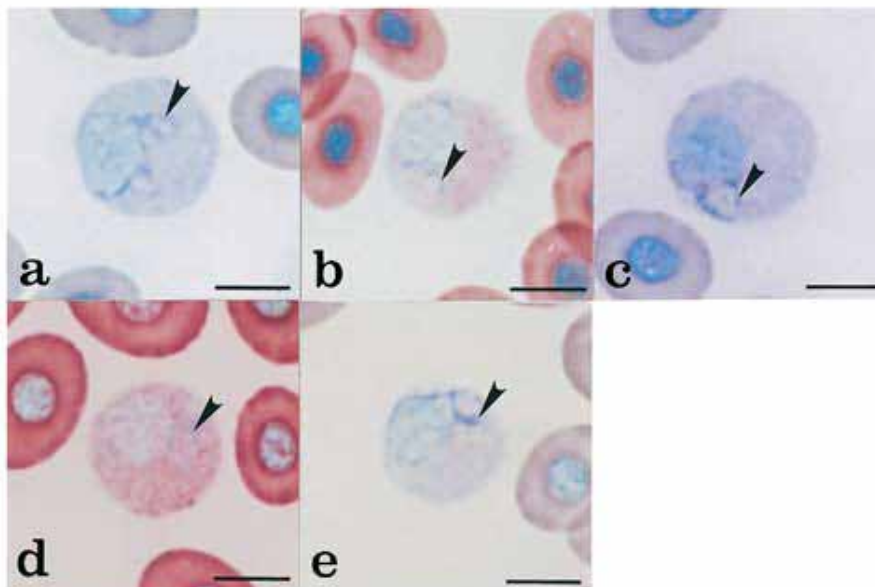


Fig. 2. Tiger puffer neutrophil stained with May-Grünwald solution under various conditions. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated-solution, the sample was stained again with May-Grünwald solution diluted with the following solutions: (a) distilled water (pH5.2), (b) phosphate buffer (5 mM, pH5.0), (c) phosphate buffer (5 mM, pH7.0), (d) phosphate buffer (1/15M, pH5.0), (e) phosphate buffer (1/15M, pH7.0). Note α G in (b) and (d), β G and Y-body shown by arrowheads. Bars = $5\ \mu\text{m}$.

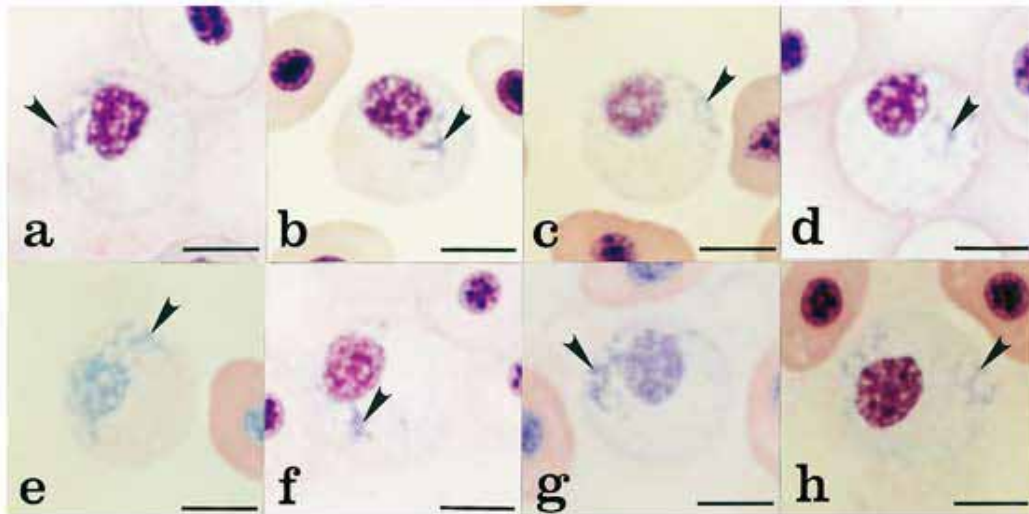


Fig. 3. Tiger puffer neutrophil under various staining conditions. Giemsa stain. After fixation for 5 min with methanol, the sample was stained with Giemsa solution diluted as follows: (a), Giemsa solution was diluted in distilled water (pH5.2) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (b), Giemsa solution was diluted in distilled water (pH5.2) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 60 min. (c), Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 60min. (d), Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (e), Giemsa solution was diluted in 1/150M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15min. (f), Giemsa solution was diluted in 1/150M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (g), Giemsa solution was diluted in 1/150M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15min. (h), Giemsa solution was diluted in 1/150M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 60min. The α G is not stained. Note β G and Y-body (arrowheads). Bars = 5 μ m.

1:100) およびGiemsa染色時間 (15分間または60分間) のいずれを変えても、淡橙色の α 顆粒が少数観察された (Fig. 4 a)。低濃度 (5 mM) のリン酸緩衝液を希釈液として用いたMGG染色では、pH5.0で希釈率1:20の場合、15分間のGiemsa染色では淡橙色の α 顆粒が多数観察されたが (Fig. 4 b)、染色時間を60分間にしたところ、染色される α 顆粒の数が減少した (Fig. 4 c)。同じpH5.0の緩衝液を用いて、希釈率を1:100にした場合には、染色時間が15分間では α 顆粒が橙色に染まり、それらが多数観察された。また、染色を60分間行ったところ、多数の α 顆粒が認められたが、色調は淡橙色であった。これらの変化はpH6.0の場合も同様であった。しかし、pH7.0の緩衝液を用いた場合には、いずれの希釈率においても15分間の染色では、多数の淡橙色の α 顆粒が観察され (Fig. 4 d, e, f)、60分間の染色では少数のみが認められた。また、pH8.0ではいずれの希釈率においても、15分間の染色では淡橙色の α 顆粒が少数観察され、60分間の染色では本顆粒は認められなかった。高濃度 (1/15M) のリン酸緩衝液を希釈液として使用した場合には、pH5.0および6.0のいずれの場合においても、希釈率1:20では、染色時間の長短に関わらず α 顆粒は観察されなかった (Fig. 4 g)。なお、pH5.0では細胞質基質が橙色に染まるため、これが顆粒状に見える

が、 α 顆粒ではない (Fig. 4 g)。一方、希釈率1:100ではpH5.0および6.0の場合、いずれの染色時間においても多数の淡橙色を呈する α 顆粒が観察された (Fig. 4 h)。pH7.0および8.0の場合、いずれの希釈率および染色時間においても α 顆粒は認められなかった (Fig. 4 i)。

β 顆粒は、円形または卵円形で長径が1.0 μ m以下であり、いずれの条件のRomanovsky型染色においても明瞭な色調を呈さず、難染性であった。

Y小体は、いずれの染色条件においても観察され、形状は円形、紐状、鎖状など多様であった (Fig. 1, 2, 3, 4)。また、本顆粒は核近縁、時には核に接して存在することもあった (Fig. 4 f)。

細胞化学染色特性

トラフグの好中球の細胞化学的特性をTable 1 に示した。いずれの好中球にもPeriodic acid Schiff反応 (PAS) に陽性の顆粒が細胞質に充満していた (Fig. 5 a)。陽性顆粒は円形で、直径0.5 μ m未満であった。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部位は

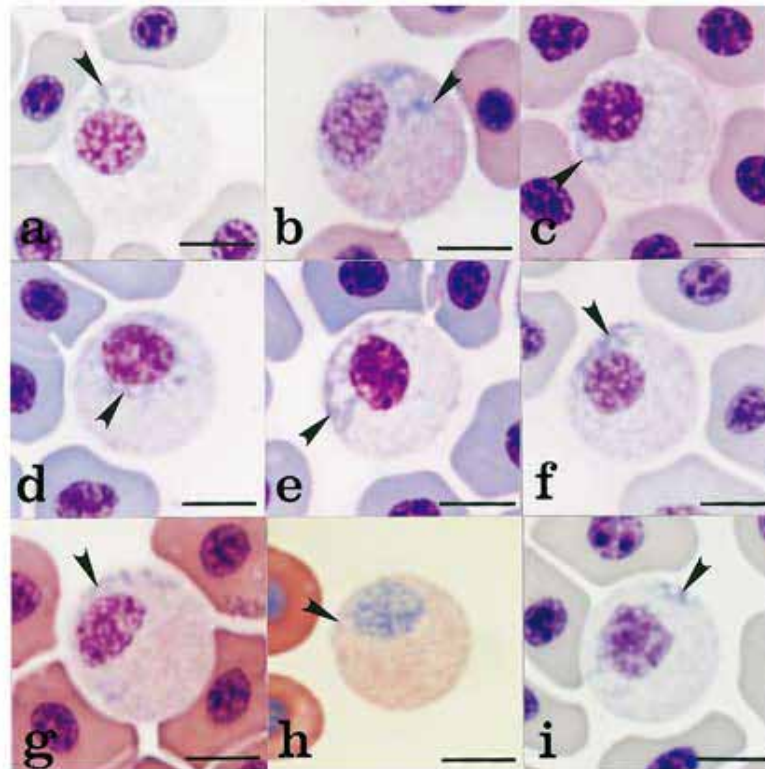


Fig. 4. Tiger puffer neutrophil under various staining conditions, May-Grünwald • Giemsa stain. (a), distilled water (pH5.2). Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (b), phosphate buffer (5 mM, pH5.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (c), phosphate buffer (5 mM, pH5.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 60 min. (d), phosphate buffer (5 mM, pH7.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. (e), phosphate buffer (5 mM, pH7.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 60min. (f), phosphate buffer (5 mM, pH7.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15min. (g), phosphate buffer (1/15M, pH5.0). Giemsa solution was diluted in 1/150M phosphate buffer at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (h), phosphate buffer (1/15M, pH5.0). Giemsa solution was diluted in 1/150M phosphate buffer at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15min. (i), phosphate buffer (1/15M, pH7.0). Giemsa solution was diluted in 1/150M phosphate buffer at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15min. Note α G (in b and h), β G and Y-body (arrowheads). The eosinophilic part in g is not α G but hyaloplasm. Bars = 5 μ m.

Table 1. Summary of reactions of tiger puffer neutrophil to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number and size)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Granule (round, many, $\phi < 0.5\mu\text{m}$); 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, $\phi = 0.2\mu\text{m}$)
Sudan III	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase	Granule (round, many, $\phi < 0.5\mu\text{m}$)
β -Glucuronidase	—
α -Naphthyl acetate esterase	Granule (round, many, $\phi = 0.2\mu\text{m}$)
α -Naphthyl butyrate esterase	Granule (round, many, $\phi = 0.2\mu\text{m}$)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	Granule (round, many, $\phi = 0.2\mu\text{m}$)
Peroxidase	Granule (round or oval, many, $\phi = 0.5 \sim 0.7\mu\text{m}$, equivalent to β G)

—, non detection.

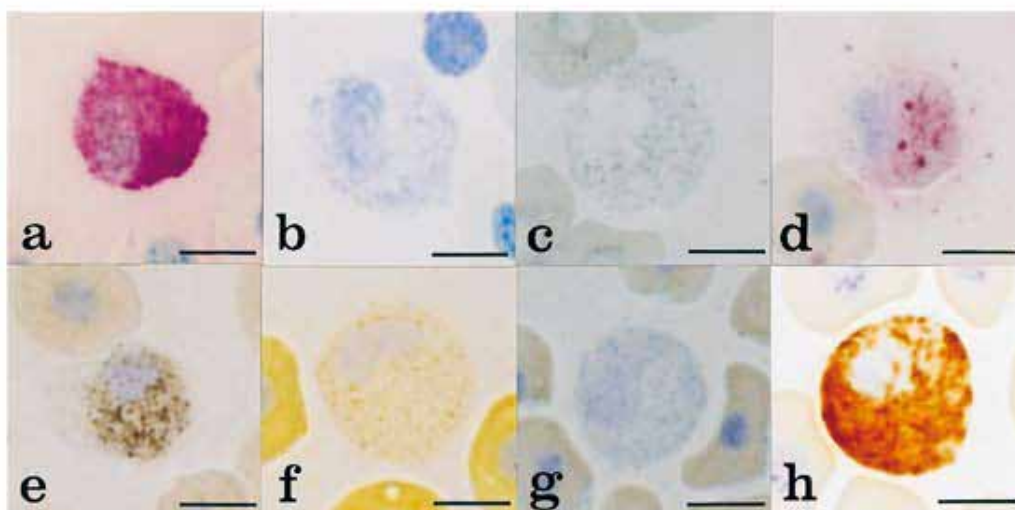


Fig. 5. Cytochemistry of tiger puffer neutrophil. (a) periodic acid Schiff reaction, (b) toluidine blue in distilled water, (c) sudan black B, (d) acid phosphatase, (e) α -naphthyl acetate esterase, (f) α -naphthyl butyrate esterase, (g) naphthol AS-D chloroacetate esterase, (h) peroxidase. Bars = 5 μ m.

観察されなかった。蒸留水に溶解したトルイジンブルー染色では、いずれの好中球にも種々の形態を示す青色の粗大な顆粒が少数観察された (Fig. 5 b)。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、ズダンブラックB染色では直径が約0.2 μ mの円形陽性顆粒が細胞質に均一に観察された (Fig. 5 c)。酸性フォスファターゼ染色では、円形で種々の大きさの陽性顆粒 (直径0.5 μ m以下) が観察された (Fig. 5 d)。 α -ナフチルアセテートエステラーゼ、 α -ナフチルブチレートエステラーゼおよびナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼでは、いずれも円形陽性顆粒 (直径約0.2 μ m) が細胞質に均一に観察された (Fig. 5 e, f, g)。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0.5–0.7 μ m) が多数認められた (Fig. 5 h)。アルカリ性フォスファターゼおよび β -グルクロニダーゼ染色に対しては陰性であった。

4 考 察

これまでに、池田ら¹⁴⁾はフグ目フグ科のショウサイフグ、コモンフグ、ヒガンフグおよびモヨウフグ、同日ハコフグ科のハコフグとコンゴウフグ、同日カワハギ科のカワハギ、ウマヅラハギおよびウスバハギの血液像を著書に記載しているが、好中球顆粒に関する記述はない。また、Suzuki¹⁵⁾はショウサイフグの好中球のMGG染色性および細胞化学的特性について報告しており、好中球の染色されない細胞質は微細で、わずかにエオシン好性を示す顆粒が充満しているとしている。一方、浜口ら¹⁶⁾はトラフグと

クサフグの血球をペルオキシダーゼ・Giemsaの二重染色性から分類し、両フグの好中球はそのほとんどがペルオキシダーゼ陽性であると報告している。このように、トラフグ好中球の顆粒の種類数についてはこれまで触れられていない。しかし、本研究の結果から、トラフグの好中球には、Romanovsky型染色性の異なる2種類の顆粒 (α 顆粒、 β 顆粒) と、Y小体が存在することが明らかとなった。

α 顆粒はこれまでにコイ、ナイルティラピアおよびイサキで報告されており、いずれの魚種においても低pH条件下のMay-Grünwald染色で染まること、Giemsa染色では染色されないこと、May-Grünwald染色で本顆粒を染色したのちに、Giemsa染色を施すと、染色性が低下することが知られている^{17,18,21)}。トラフグにおいても同様の染色性が得られたことから、トラフグの α 顆粒はコイ、ナイルティラピアおよびイサキのそれと同等の顆粒であると考えられる。しかし、顆粒の形態には違いが認められた。コイおよびナイルティラピアの α 顆粒は円形であり、イサキでは桿形であるのに対して^{17,18,21)}、トラフグの α 顆粒は円形、卵円形または桿形であった。このことは、トラフグでは α 顆粒の染色性は同じであっても、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。

α 顆粒と類似した顆粒は、トラフグ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、トラフグ好中球の観察・同定に有用な指標となると考えられる。本顆粒が明瞭に染色される条件は、酸性 (pH5.0あるいはpH6.0) のリン酸緩衝液 (5 mMあるいは1/15M) を希釈液として用いるMay-Grünwald染色であった。

β 顆粒は、これまでに我々が報告した全ての魚種(コイ、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)で観察されており^{1,2,6,9}、本研究において、トラフグにも認められた。

コイ、ナイルティラピアおよびイサキでは円形の好塩基性顆粒(γ 顆粒)も観察されているが^{1,2,9}、トラフグでは認められなかった。

Y小体はナイルティラピア、イサキ、メジナ、オオクチバス、ブルーギルおよびヒラメで見られるが^{1,9}、コイでは観察されていない^{1,9}。本研究でY小体がトラフグにも観察されたことから、本小体は少なくともコイよりも新しく出現した真骨魚類に共通するものと思われる。

細胞化学的特性から、各顆粒およびY小体の成分を次のように推定した。トラフグの好中球には、円形のPAS陽性顆粒(直径 $0.5\mu\text{m}$ 以下)が細胞質に充滿していた。しかし、トラフグの α 顆粒は形態が多様であり、豊富に存在するものの、PAS陽性顆粒のように充滿することはない。また、 β 顆粒は、長径が $1.0\mu\text{m}$ 以下とPAS陽性顆粒よりも大型である。さらに、 α -アミラーゼで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、 α 顆粒および β 顆粒とは異なると考えられる。ズダンブラックB陽性顆粒は直径約 $0.2\mu\text{m}$ であり、 α -ナフチルアセテートエステラーゼ、 α -ナフチルプチレートエステラーゼおよびナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼの陽性顆粒と、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。また、酸性フォスファターゼ陽性顆粒も顆粒の大きさには幅があるが(直径 $0.5\mu\text{m}$ 以下)、分布や陽性顆粒数は類似していることから、本酵素もズダンブラックB陽性顆粒内に存在すると考えられる。しかし、これらの酵素およびズダンブラックBに陽性の顆粒と、 α 顆粒および β 顆粒との間に、密接な関連性は認められなかった。

ペルオキシダーゼ陽性顆粒は円形または楕円形で、細胞質に充滿していることから、 β 顆粒に相当すると考えられる。また、トルイジンブルー染色によりトラフグの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。同様の観察結果は、ブルーギル、メジナおよびヒラメにも認められている^{4,5}。

本研究によって、トラフグ好中球の β 顆粒には少なくともペルオキシダーゼが豊富に存在し、Y小体はTB陽性物質に満たされていることが明らかとなった。しかし、 α 顆粒

の成分については不明である。

トラフグが属するフグ目は、ヒラメが属するカレイ目と同様に、スズキ目から派生したと考えられている¹⁰。好中球顆粒の形態学的類似性から、ブラックバスとブルーギルを含むサンフィッシュ科と、メジナを含むメジナ科は、ヒラメと共通の祖先種から分岐した種またはその子孫種であると考えられている¹¹。しかし、トラフグと同様の顆粒組成を有した魚種はまだ確認されていない。

今後、さらに多種類の真骨魚類、とくにスズキ目魚類について調べ、トラフグと同様の好中球顆粒を有する魚種を特定し、好中球の魚種間における機能的類似点を明らかにする必要がある。

謝 辞

本研究は、水産大学校特別研究プロジェクト(下関を中心としたフグ産業の高度化事業)の安心・安全、健康なフグの生産技術の開発試験の一環として行った。記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) 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, 水産大学校研究報告, 51, 79-86 (2003)
- 2) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: イサキ好中球の顆粒, 水産大学校研究報告, 52, 45-48 (2004)
- 3) 近藤昌和, 金丸俊介, 高橋幸則: メジナの好中球顆粒, 水産大学校研究報告, 52, 67-71 (2004)
- 4) 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, 水産大学校研究報告, 53, 197-202 (2005)
- 5) 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, 水産大学校研究報告, 53, 203-209 (2005)
- 6) Borregaard N, Kjeldsen L, Løllike K, Sengelov H: Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin Exp Immunol*, 101, 6-9 (1995)
- 7) Borregaard N, Cowland J B: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89, 3503-3521 (1997)
- 8) 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. 水産大学校研究報告, 50, 109-117 (2002)
- 9) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のアズール顆粒. 水産大学校研究報告, 51, 17-29 (2002)
- 10) Gill A C, Mooi R D: Phylogeny and Systematics of Fishes. In: Hart P J B, Reynolds J D (eds) Handbook of Fish Biology and Fisheries Vol. 1. Blackwell Publishing, Oxford, 15-42 (2002)
- 11) 池田彌生, 尾崎久雄, 瀬崎啓次郎: 34カワハギ~41ヒガンフグ. 魚類血液学図鑑. 緑書房, 東京, 94-107 (1986)
- 12) Suzuki Y: Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Bull Japan Soc Sci Fish*, 52, 1895-1899 (1986)
- 13) 浜口昌巳, 薄 浩則, 石岡宏子: トラフグおよびクサフグの血球細胞の分類. 南西区水産研究所研究報告, 25, 51-58 (1992)