スズキ科魚類 (スズキ, ヒラスズキ, タイリクスズキ) の 好中球の形態学的および細胞化学的特徴

近藤昌和 " ・ 稲川裕之 " ・ 高橋幸則 "

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from Percichthyid Fishes, *Lateolabrax japonicus*, *L. latus and L.* sp.

Masakazu Kondo1 , Hiroyuki Inagawa1 and Yukinori Takahashi1

Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in three percichthyid fishes, Lateolabrax japonicus, L. latus and L. sp. (Japanesa name: TA-I-RI-KU-SU-ZU-KI) were examined by light microscopy and the composition of neutrophil granule were inferred in this study. The neutrophils of these fish species were round or oval and the nucleus round to kidney-shaped. The neutrophil possessed the chromophobic granule (β G) and Y-body. The β G was round or oval and peroxidase positive. The Y-body was toluidine blue positive.

Key words: neutrophil, granulocyte, percichthyidae, morphology

1 緒 言

著者らは、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 種数は魚種によって相違することを報告したい。コイ目 のコイCyprinus carpio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 (7顆粒) の3 種類の顆粒を有するが ニ 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 基性小体 (Y小体) ** が認められた ***。また、同じスズキ 目のメジナGirella punctata、オオクチバスMicropterus salmoidesおよびプルーギルLepomis macrochirusでは、 β 顆粒 とY小体は観察されるが、α顆粒とγ顆粒は認められな かった。。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"のヒラメParalichthys olivaceus にも、 分類 粒とY小体のみが観察されているこ。これらの結果から、 著者らは好中球顆粒の形態学的類似性によって、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権から分岐した種または その子孫種であると考えている。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"のトラ フグ $Takifugu\ rubripes$ では、 α 顆粒、 β 顆粒およびY小体 が観察されたが、 γ 顆粒は認められておらず²⁰、トラフグ と同様の顆粒組成を有した魚種は確認されていない。

本研究では、魚類の好中球顆粒の多様性を明らかにする 研究の一環として、前述のように、多様性が認められるス ズキ目に着目し、本目スズキ科魚類(スズキLateolabrax japonicus、とラスズキL.latus、タイリクスズキL.sp.)の 好中球について、Romanovsky 型染色性を調べた。また、 スズキとヒラスズキについては細胞化学的特性も明らかに し、これまでに報告した他魚種と比較した。

2 材料および方法

野外で採取し、水産大学校の飼育施設に搬入した各魚種

2006年11月27日受付, Received November 27, 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).

を,流水条件下で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±1.0℃であった。

血液染沫標本の作製、Romanovsky型染色法および各種 細胞化学染色は前報¹¹に従った。

3 結 果

Romanovsky型染色性

スズキの好中球は直径11.0~13.5μm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)と好塩基性顆粒 (γ顆粒)は観察されなかった。β顆粒は、円形または卵円形で長径が1.0μm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呈さず、離染性であった (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、コンマ形、紐状など、形態および大きさは多様であったが、円形および卵円形のものが主であった。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。また、本小体が、核に接して存在する像も観察された (Fig. 1~19)。

ヒラスズキおよびタイリクスズキにおいても、好中球には1種類の顆粒 (β 顆粒) とY小体が観察され、それらの染色性、大きさ、形態、個数などはスズキと同様であった (Fig. 2-1-24、Fig. 3-1-24)。また、好中球の形状 および大きさもスズキのそれらと違いは認められなかった (Fig. 2-1-24、Fig. 3-1-24)。

細胞化学染色特性

スズキおよびとラスズキの好中球の細胞化学的特性を Table 1 に示した。両無種の細胞化学的特性は非常に類似していた。両無種の好中球には、Periodic acid Schiff反応 (PAS) に陽性の顆粒が細胞質に散在していた (Fig. 4-1,5-1)。PAS陽性顆粒は円形で、直径 0.5μ m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顆粒が観察された (Fig. 4-2,5-2)。この陽性顆粒の数は好中球ごとに異なっていた。オイルレッドのおよびズダン Π 染色では陽性部位は観察されなかった。しか

し、ズダンプラックB染色では直径が約0.5 μ mの円形で、弱陽性の顆粒が観察され、この顆粒は細胞質に散在していた(Fig. 4-3、5-3)。酸性フォスファターゼ染色では、直径0.5 μ m未満の円形陽性顆粒が観察された(Fig. 4-4、5-4)。 α -ナフチルアセテートエステラーゼ染色においても、酸性フォスファターゼ染色と同様に、直径0.5 μ m未満の円形陽性顆粒が観察された(Fig. 4-5、5-5)。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0.5 μ m未満の円形陽性顆粒が少数認められ、細胞質に散在していた(Fig. 4-6、5-6)。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1.0 μ m以下)が認められ、細胞質に充満していた(Fig. 4-7、5-7)。アルカリ性フォスファターゼ、 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対しては、両魚種ともに好中球は除性であった。

4 考 察

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^(6,11)。一方、魚類で は、好中球顆粒の種数に関する報告は少ない。

本研究の結果から、スズキ、ヒラスズキおよびタイリク スズキの好中球には、難染性を示する顆粒と、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、ヒラメおよびト ラフグ)で観察されている! N。また、Y小体はコイでは 観察されていないが いい, 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、ヒラメおよびトラフグ で認められている。このスズキ類のY小体は前述の他の魚 種のそれよりも小型のものが多く、特に円形小型のもので は、コイ、ナイルティラピアおよびイサキの好中球に観察 される円形の好塩基性顆粒 (ア顆粒)***** と形態が類似 する。しかし、γ颗粒は酸性条件下 (pH5.0) のMG染色 では染色されず、いずれの好中球にも多数観察されるのに 対して、スズキ類の小型円形の好塩基性顆粒は、いずれの 染色条件でも認められること、および好中球内の個数が多 様であることから、7顆粒ではなく、Y小体であると考え

スズキ類の好中球顆粒の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

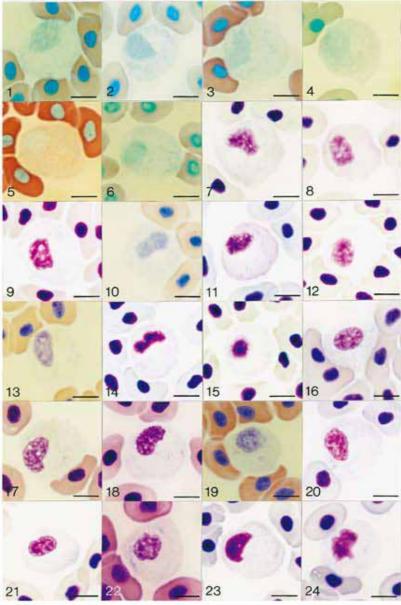


Fig. 1. Neutrophil of Lateolabrax japonicus. (1) May-Grünwald fixation. Sample was fixed and stained with May-Grünwald concentrated-solution. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. (2-6) May-Grünwald stain. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated-solution,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

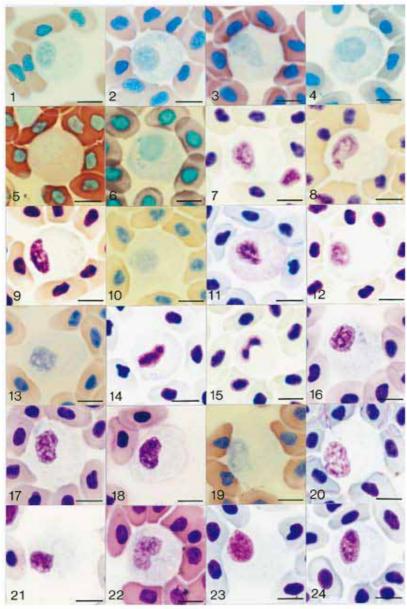


Fig. 2. Neutrophil of Lateolabrax latus. (1) May-Grünwald fixation. Sample was fixed and stained with May-Grünwald concentrated-solution. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. (2-6) May-Grünwald stain. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated-solution,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

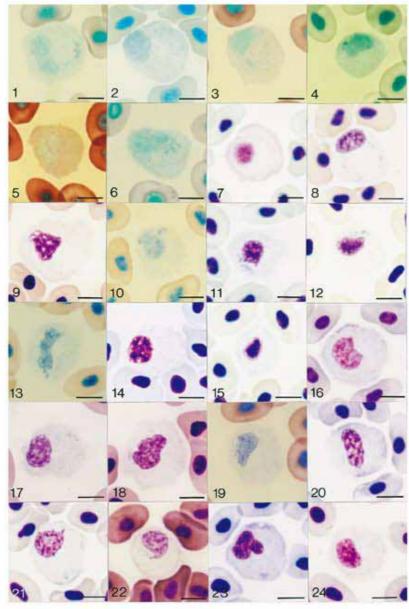


Fig. 3. Neutrophil of Laleolabrax sp.. (1) May-Grünwald fixation. Sample was fixed and stained with May-Grünwald concentrated-solution. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. (2-6) May-Grünwald stain. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated-solution, the sample was stained again for 10min in May-Grünwald diluted with the following solutions: (2) distilled water (pH5.2), (3) phosphate buffer (5 mM, pH5.0), (4) phosphate buffer (5 mM, pH7.0), (5) phosphate buffer (1/15M, pH5.0), and (6) phosphate buffer (1/15M, 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 15min. (8) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20, Giemsa stain was for 15min. (9) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (12) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (12) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (12) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 60min. (13) 1/150M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 60min. (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 10min, followed by staining with Giemsa under the following conditions: (16) distilled water (pH5.2) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (17) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 60min. (18) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (20) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15min. (21) 0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15min. (23) 1/150M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1:20. Giemsa

Test	Positive site (shape, number and size)	
	Lateolabrax japonicus	Lateolabrax latus
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Granule (round, many, φ<0.5μm);	Granule (round, many,
	hyaloplasm	hyaloplasm
PAS after digestion with α-amylase		72
Alcian blue (pH1.0)	~	
Alcian blue (pH2.5)		52 July 101 - 101
Toluidine blue (in distilled water)	Granule (amorphous, various (non ~ some))*	Granule (amorphous, various (non ~ some))*
Sudan black B	Granule (round, many, & 0.5µm)	Granule (round, many, φ (0.5µm)
SudanIII		. BOOL ODWING ADVANTAMENTAL DE THE VICTORIA
Oil red O	Sec	-
Alkaline phosphatase	3 	1 12
Acid phosphatase	Granule (round, many, & 0.5µm)	Granule (round, many, φ <0.5μm)
β-Glucuronidase		The state of the s

Granule (round, some, \$\phi\$ (0.5\mum)

Granule (round, numerous, \$ < 1.0µm)¹

Granule (round, some, φ (0.5μm)

Table 1 . Summary of reactions of neutrophil to cytochemical tests in Laleolabrax japonicus and L. lalus

Peroxidase

α-Naphtyl acetate esterase

α-Naphtyl butyrate esterase Naphthol AS-D chloroacetate esterase

^b equivalent to βG

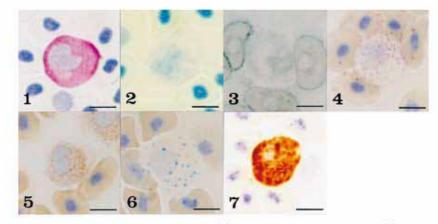


Fig. 4. Cytochemistry of Lateolabrax japonicus neutrophil. (1) periodic acid Schiff reaction, (2) toluidine blue in distilled water, (3) sudan black B, (4) acid phosphatase, (5) α-naphthyl acetate esterase, (6) naphthol AS-D chloroacetate esterase, (7) peroxidase. Bars= 5 μm.

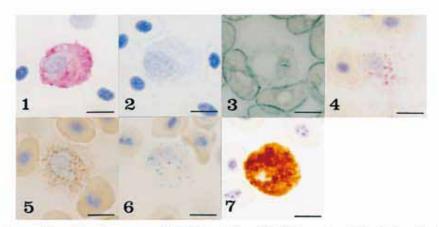


Fig. 5. Cytochemistry of Lateolabrax latus neutrophil. (1) periodic acid Schiff reaction, (2) toluidine blue in distilled water, (3) sudan black B, (4) acid phosphatase, (5) α -naphthyl acetate esterase, (6) naphthol AS-D chloroacetate esterase, (7) peroxidase. Bars= 5 μ m.

^{-,} not detected

^{*}equivalent to Y-body

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、スズキ類の好中球の 3 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陽性颗粒(直径0.5µm以下)が観察されたが、 PAS陽性顆粒数はβ顆粒よりも少なく、また、β顆粒は長 径が1.0µm以下と、PAS陽性顆粒よりも大型であった。 さらに、 α -アミラーゼでPAS陽性顆粒が完全に消化され 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 プラックB陽性顆粒は直径0.5 µm以下であり、酸性フォ スファターゼおよび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 顆粒とは大きさおよび 陽性顆粒数が異なる。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 3 顆粒とは異なる。したがって、これらの陽性顆粒は 3 顆粒とは異なるものであると思われる。一方. ベルオキシ ダーゼ陽性顆粒は円形または楕円形で、細胞質に充満して おり、また、その大きさが類似していることから、 β 顆粒 に相当すると考えられる。同様の観察結果は、ブルーギル、 メジナ、ヒラメおよびトラフグにも認められている。こ

トルイジンブルー染色によりスズキ科3種の好中球に 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。 ブルーギル、メジナ、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。

本研究によって、スズキ類の好中球はβ顆粒とY小体を 有し、前者には少なくとも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。

以上の結果から、コイ、ナイルティラピア、イサキおよびトラフグでは好中球にエオシン好性顆粒(α颗粒)も観察されているが ユー・スズキ類では認められなかった。スズキ科3種と同様に、好中球中にβ顆粒とY小体を有し、他の顆粒が認められない魚種は、メジナ、オオクチバス、ブルーギルおよびヒラメであることから、ブラックバスとブルーギルを含むサンフィッシュ科、メジナを含むメジナ科およびカレイ目ヒラメ科のヒラメと、スズキ目スズキ科は、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る。

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 竹下直彦博士に感謝いたします。

文 献

- 近藤昌和,安本信哉,高橋幸則:コイ好中球のメイー 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)
- 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)
- 3) 安本信哉,近藤昌和,高橋幸則:テラピア好中球顆粒 のメイーグリュンワルド・ギムザ染色性、水産大学校 研究報告,51,79-86 (2003)
- 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)
- 近藤昌和,金丸梭介、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)
- 6) 近藤昌和,柏村直宏,金丸後介,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)
- 7) 近藤昌和,金丸俊介,柏村直宏,福川裕之,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)
- 8) 近藤昌和,稲川裕之,池田 至,山元憲一,高橋幸則 :トラフケ好中球の形態学的および細胞化学的特徴, 水産大学校研究報告,55,133-139(2007)
- 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)
- Borregaard N, Kjeldsen L, Lollike K, Sengelov H: Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. Clin Exp. Immunol, 101, 6-9 (1995)
- Borregaard N, Cowland J B: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte, *Blood*, 89, 3503-3521 (1997)