

アミアの顆粒球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 安本信哉, 高橋幸則

Morphological and Cytochemical Characteristics of Granulocytes from Bowfin *Amia calva*

Masakazu Kondo[†], Shinya Yasumoto and Yukinori Takahashi

Abstract : Four types of granulocytes, neutrophil, basophil, eosinophil and pithy granulocyte, were observed in peripheral blood of bowfin *Amia calva*. The neutrophil had three types of granules, eosinophilic granule (α G; orange), chromophobic granule (β G) and basophilic granule (γ G; light blue) in the cytoplasm. These granules were round or oval, but the maximum diameter was different each other (α G, $\leq 0.5 \mu\text{m}$; β G, $\leq 1.0 \mu\text{m}$; γ G, $\leq 0.3 \mu\text{m}$). Alkaline phosphatase and peroxidase (PO) were detected in the β G, however, central part of the granule was negative. Basophil had round or oval granules ($\leq 1.1 \mu\text{m}$) which show violet. The granules were periodic acid Schiff (PAS) and toluidine blue (TB) positive. Eosinophil had two types of granules. One was major which was large and showed eosinophilic, another was minor with small size and basophilic. Both granules were PO positive (the former was weakly and the latter strongly). The latter was also PAS and TB positive. Pithy granulocyte was occasionally found in the blood. The granulocyte had ovoid granules with eosinophilic rod-shaped core and chromophobic surrounding part of the core.

Key words : bowfin, *Amia calva*, granulocyte, morphology, cytochemistry

緒 言

著者らはこれまでに、多条件下 Romanowsky 型染色評価法 (Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV) を各種魚類の好中球に適用し、好中球顆粒の多様性を明らかにしてきた¹⁻³¹⁾。すなわち、肉鰭綱肺魚亜綱のアフリカハイギョ *Protopterus annectens* を除いて¹⁸⁾、無顎類のヌタウナギ *Eptatretus burgeri*、条鰭綱腕鰭亜綱ポリプテルス目のビキール *Polypterus endlicheri*、同綱軟質鰭亜綱チヨウザメ目のシベリアチヨウザメ *Acipenser baerii* および種々の真骨魚類 (条鰭綱新鰭亜綱ハレコストム区真骨亜区) では、好中球の顆粒組成は、好酸性 (好エオシン性) 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) の組み合わせとして表現されることを示した^{1-17,19-31)}。また、 α 顆

粒と γ 顆粒は多条件下 Romanowsky 型染色特性 (Multiple Romanowsky-type Stain Characteristics, MRSC) の違いから^{28,29)}、 β 顆粒は桿状中心芯とペルオキシダーゼ (PO) 活性の有無によって3種類に大別されることを示した³⁰⁾。

本研究では、真骨魚類と同様にハレコストム区に属するが、異なる亜区 (ハレコモルフ亜区) に分類されるアミア目の唯一の現生種であるアミア *Amia calva* について好中球の形態学および細胞化学的特性を明らかにし、これまでに著者らが報告した各種魚類¹⁻³⁰⁾の好中球と比較した。また、好中球以外の顆粒球も認められたことから、それら顆粒球についても形態学および細胞化学的特徴を明らかにした^{*}。

材料および方法

熱帯魚の輸入業者から購入したアミア稚魚を水産大学校の飼育施設に搬入し, 6ヶ月以上馴致飼育したのちに実験に供した(水温 $23.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$)。飼育期間中は, ラブラ

バ7号(林兼産業)次いでひかりクレストカーニバル(キョーリン)およびひかりFDビタミン淡水エビ(キョーリン)を適宜給餌した。採血時の体重は約280gであった。血液塗抹標本の作製, MRSV (Table 1) および各種細胞化学染色法は近藤・高橋¹⁵⁾にしたがった。

Table 1. Staining conditions of multiple Romanowsky-type stain valuation

PN	Condition ^{1,2}	PN	Condition ^{1,2}
1	MG : DW	42	G : $1/150$ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min
2	: 5 mM PB, pH5.0	43	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min
3	: 5 mM PB, pH6.0	44	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min
4	: 5 mM PB, pH7.0	45	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min
5	: 5 mM PB, pH8.0	46	MGG : DW, 1:20, 15 min
6	: $1/15$ M PB, pH5.0	47	: DW, 1:20, 60 min
7	: $1/15$ M PB, pH6.0	48	: DW, 1:100, 15 min
8	: $1/15$ M PB, pH7.0	49	: DW, 1:100, 60 min
9	: $1/15$ M PB, pH8.0	50	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15min
10	G : DW, 1:20, 15 min	51	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60min
11	: DW, 1:20, 60 min	52	: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min
12	: DW, 1:100, 15 min	53	: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min
13	: DW, 1:100, 60 min	54	: 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15min
14	: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	55	: 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60min
15	: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	56	: 5 mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min
16	: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	57	: 5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min
17	: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	58	: 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15min
18	: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15min	59	: 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60min
19	: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60min	60	: 5 mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min
20	: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min	61	: 5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min
21	: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	62	: 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15min
22	: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15min	63	: 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60min
23	: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60min	64	: 5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min
24	: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	65	: 5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min
25	: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	66	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 15min
26	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	67	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min
27	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	68	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min
28	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	69	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min
29	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	70	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:20, 15 min
30	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	71	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:20, 60 min
31	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	72	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min
32	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	73	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min
33	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	74	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 15min
34	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:20, 15min	75	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 60min
35	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:20, 60min	76	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min
36	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	77	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min
37	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	78	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min
38	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	79	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min
39	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	80	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min
40	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	81	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min
41	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min		

¹MG, May-Grünwald stain (after fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the smear was stained again for 10 min in MG diluted (1:1) with various solution); G, Giemsa stain (after fixation with absolute methanol for 5 min, the smear was air-dried and then stained with Giemsa diluted with various solution); MGG, May-Grünwald・Giemsa stain (after staining with MG stain, the smear was stained with diluted Giemsa solution); DW, distilled water; PB, phosphate buffer; 1:20 and 1:100, dilution ratio (Giemsa:diluent); 15 min and 60 min, time of Giemsa stain.

²Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or $1/150$ M PB.

PN, preparation number.

* 本研究の一部は, 平成26年度日本魚病学会秋季大会(2014年9月22日)において報告した(310: 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: アミヤの好中球の形態学的特徴(プログラムおよび講演要旨集, 26); 311: 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: アミヤの好塩基球と好酸球の形態学的特徴(プログラムおよび講演要旨集, 27)。

結 果

アミアの血液中には4種類の顆粒球(好中球, 好塩基球, 好酸球, 有芯顆粒球)が観察された。これらのうち, 有芯顆粒球については標本上における出現頻度が極めて低く, 詳細な観察は困難であった。なお, 好中球, 好塩基球および好酸球のいずれにおいてもアルシアンブルー, オイルレッドO, ズダンIIIおよびズダンブラックB染色では陽性所見は観察されなかった。また, α -ナフチルアセテートエステラーゼ, α -ナフチルプテ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は, いずれの顆粒球においても検出されなかった。

好中球

好中球は長径約13.0 μm の円形または卵円形であり, 核の染色質網は荒く, 粗大な濃縮染色質が観察された。核は偏在し, 円形, 卵円形, 腎臓形から分葉(最大2分葉)と様々な形態を示した。細胞質には3種類の顆粒(α 顆粒, β 顆粒, γ 顆粒)が観察された(Figs. 1A, 1B)。 α 顆粒と γ 顆粒のMRSCをTable 2に示す。 α 顆粒は長径0.5 μm 以下の円形または卵円形であり, 細胞質に少数散在していた。本顆粒はほとんどの染色条件下では観察されなかったが, pH5.0の $1/15\text{M}$ リン酸緩衝液を用いたMG染色によって淡橙色を呈した。 β 顆粒は円形または卵円形であり(長径1.0 μm 以下), MRSVのいずれの染色条件においても明瞭な色調を示さなかった。 γ 顆粒は長径0.3 μm 以下の円形または卵円形であった。本顆粒はMRSVのいずれの染色条件においても淡青色を示し, 多数観察された。多くの魚種の好中球に観察されている好塩基性の不定形小体(Y小体⁹⁾)も観察された。本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極めて少数であった。本小体はいずれの染色条件においても青色を呈した。

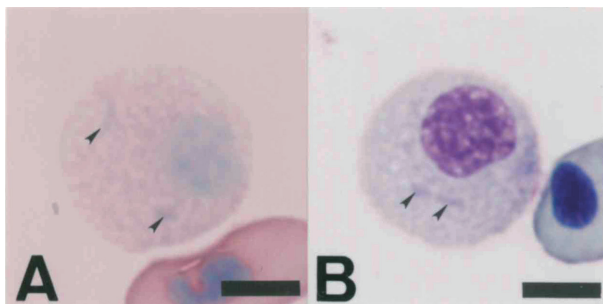


Fig. 1. Neutrophils of bowfin *Amia calva*. A, May-Grünwald (MG; PN=6); B, MG-Giemsa (MGG; PN=48). PN, preparation number (See Table 1). Arrowheads show Y-body. Bars=5 μm .

Table 2. Summary of multiple Romanowsky-type staining characteristics of α and γ granules in the neutrophil of bowfin *Amia calva*

PN	Number	
	α	γ
1-5	—	++
6	+	++
7-81	—	++

PN, preparation number (See Table 1); ++, many; +, some; —, not observed.

好中球には円形または卵円形の periodic acid Schiff (PAS) 反応陽性顆粒(長径0.5 μm 以下)が多数観察された(Fig. 2A; Table 3)。また, 細胞質基質も弱陽性を示した。これらの陽性部位は α -アミラーゼ処理によって完全に消失した。トルイジンブルー(TB)染色によって核が青染されるとともに, 円形または卵円形で淡青色の陽性顆粒(長径0.3 μm 以下)が多数観察された(Fig. 2B)。また, 陽性顆粒とは別に, 種々の形態を示す陽性部位が細胞質に少数認められた。アルカリ性フォスファターゼ(AIP)は, 円形または卵円形(長径1.0 μm 以下)の陽性顆粒として多数観察された(Fig. 2C)。また, 陽性顆粒の中心部は陰性であった。酸性フォスファターゼ(AcP)および β -グルクロニダーゼ(β -Glu)は円形または卵円形(長径0.3 μm 以下)の陽性顆粒として多数認められた(Figs. 2D, 2E)。POは円形または卵円形(長径1.0 μm 以下)の陽性顆粒として多数観察されたが, 陽性顆粒の中心部は陰性であった(Fig. 2F; Table 3)。

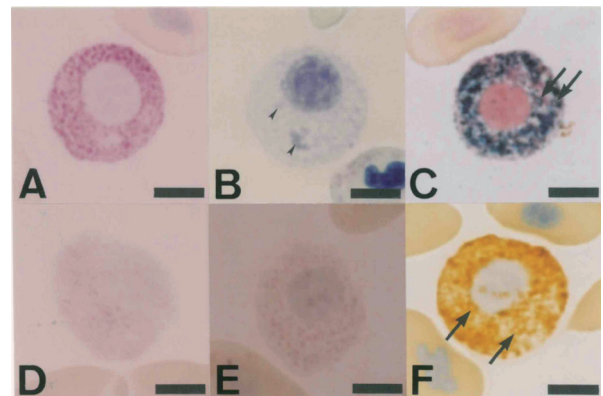


Fig. 2. Cytochemistry of neutrophils from bowfin *Amia calva*. A, periodic acid Schiff reaction; B, toluidine blue in distilled water; C, alkaline phosphatase; D, acid phosphatase; E, β -glucuronidase; F, peroxidase. Arrowheads in B show Y-body. Central core of β granule was negative in C and F (arrows). Bars=5 μm .

好塩基球

好塩基球は長径約8.0 μm の円形または卵円形であり, 核は偏在し, 様々な形態(円形から2分葉)を示した。核の染色質網は荒く, 粗大な濃縮染色質が観察された。細胞

質には円形または卵円形（長径 0.5 μm 以下）の青紫色を呈する顆粒が多数観察された (Fig. 3)。本顆粒は MRSV のいずれの染色条件においても認められた。

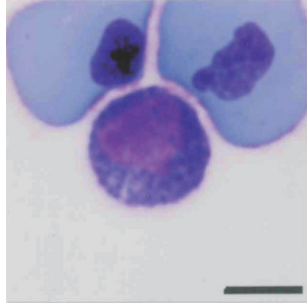


Fig. 3. Basophil of bowfin *Amia calva*. May-Grünwald · Giemsa (preparation number, 60; See Table 1). Cytoplasmic granules show violet. Bar=5 μm .

円形または卵円形（長径 0.5 μm 以下）の PAS 弱陽性顆粒が多数観察された (Fig. 4A; Table 3)。PAS 陽性顆粒は α -アミラーゼによる前処理によって消失しなかった。TB 染色によって核が青染されるとともに円形または卵円形（長径 0.5 μm 以下）の弱陽性顆粒が多数観察された (Fig. 4B)。AcP および β -Glu は円形または卵円形（長径 0.3 μm 以下）の陽性顆粒として多数観察された (Figs. 4C, 4D)。AIP および PO は検出されなかった (Table 3)。

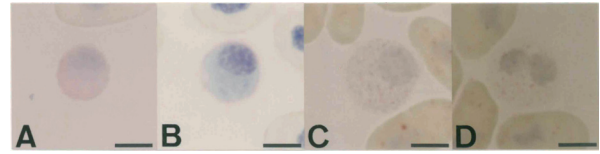


Fig. 4. Cytochemistry of basophils from bowfin *Amia calva*. A, periodic acid Schiff reaction; B, toluidine blue in distilled water; C, acid phosphatase; D, β -glucuronidase. Bars=5 μm .

Table 3. Summary of reactions of bowfin *Amia calva* granulocytes except for pity granulocyte to cytochemical tests

Test ¹	Positive site (shape, number and positive site) ²		
	Neutrophil	Basophil	Eosinophil
PAS	G (r or o, m, 0.5); H	G (r or o, m, 0.5, eq B (weak))	G (r or o, s, 0.3, eq mE)
PAS- α A	—	G (r or o, m, 0.5, eq B (weak))	G (r or o, s, 0.3, eq mE)
AB (pH1.0)	—	—	—
AB (pH2.5)	—	—	—
TB	G (r or o, m, 0.3, eq γ 1 (light blue); am, af, eq Yb); N	G (r or o, m, 0.5, eq B (light blue, weak)); N	G (r or o, s, 0.3, eq mE (light blue)); N
SBB	—	—	—
Sudan III	—	—	—
Oil red O	—	—	—
AIP	G (r or o, m, 1.0, eq β 2b*)	—	—
AcP	G (r or o, m, 0.3, eq γ 1)	G (r or o, m, 0.3)	G (r or o, af, 0.3)
β -Glu	G (r or o, m, 0.3, eq γ 1)	G (r or o, m, 0.3)	G (r or o, af, 0.3)
α -NAE	—	—	—
α -NBE	—	—	—
NASDCAE	—	—	—
Peroxidase	G (r or o, m, 1.0, eq β 2b*)	—	G (r or o, m, 1.0, eq ME (weak); r or o, s, 0.3, eq mE (strong))

¹PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS- α A, PAS after digestion with α -amylase; AB, alcian blue; TB, toluidine blue in distilled water; SBB, sudan black B; 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.

²G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; —, not detected; r, round; o, oval; am, amorphous; m, many; s, some; af, a few; γ 1, γ granule type 1; β 2b, β granule type 2b; B, basophil granule (violet); ME, major eosinophil granule (eosinophilic); mE, minor eosinophil granule (basophilic); Yb, Yasumoto body; eq, equivalent to; Arabic numerals indicate the diameter (\leq ; μm).

*Central core was negative.

好酸球

好酸球は長径約 10.0 μm の円形または卵円形であり、核は細胞の中央部に位置または偏在し、円形から楕円形を示した。核の染色質網は荒く、粗大な濃縮染色質が観察された。細胞質には 2 種類の顆粒が観察された (Fig. 5)。主要な顆粒（主顆粒, major eosinophil granule, MEG）は大型（長径 1.0 μm 以下）の円形または卵円形であり細胞質に多数

観察された。本顆粒は MRSV のいずれの染色条件においても淡橙色を呈した。副顆粒（minor eosinophil granule, mEG）は小型（長径 0.3 μm 以下）の円形または卵円形であり細胞質に少数認められ、MRSV のいずれの染色条件においても淡青色を呈した。

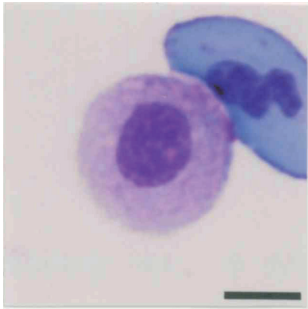


Fig. 5. Eosinophil of bowfin *Amia calva*. May-Grünwald · Giemsa (preparation number, 60; See Table 1). Two types of granules, coarse eosinophilic granules (major) and fine basophilic granules (minor), are observed. Bar=5 μm .

PAS 反応によって長径 0.3 μm 以下の円形または卵円形の陽性像が少数観察された (Fig. 6A; Table 3)。この陽性反応は α -アミラーゼによる前処理によって消失しなかった。TB 染色によって核が青染され、円形または卵円形 (長径 0.3 μm 以下) の陽性顆粒が少数観察された (Fig. 6B)。AcP および β -Glu は円形または卵円形 (長径 0.3 μm 以下) の陽性顆粒として極めて少数観察された (Figs. 6C, 6D)。PO 弱陽性顆粒と PO 強陽性顆粒が観察された (Fig. 6E)。弱陽性顆粒は大型 (長径 1.0 μm 以下) の円形または卵円形であり細胞質に多数観察された。強陽性顆粒は小型 (長径 0.3 μm 以下) の円形または卵円形であり細胞質に少数認められた。AIP は検出されなかった。酵素染色のうち、AcP、 β -Glu および各種エステラーゼ染色標本の好酸球において、核染色に用いたヘマトキシリンによって暗青色を呈する円形または卵円形 (長径 1.0 μm 以下) の顆粒が多数観察された (Figs. 6C, 6D)。しかし、PO 染色標本の好酸球にはヘマトキシリン陽性顆粒は認められなかった (Fig. 6E)。

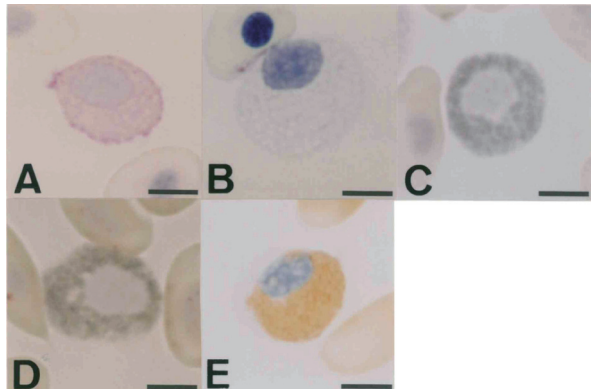


Fig. 6. Cytochemistry of eosinophils from bowfin *Amia calva*. A, periodic acid Schiff reaction; B, toluidine blue in distilled water; C, acid phosphatase; D, β -glucuronidase. Bars=5 μm .

有芯顆粒球

標本中における本顆粒球の出現は極めて稀であった。細胞体は円形または卵円形であり、卵円形の核を有していた。核は偏在し、染色質網は荒く、粗大な濃縮染色質が観察された。細胞質には 1 種類の芯を有する顆粒 (pithy granule) が観察された (Fig. 7)。本顆粒は長径 2 μm 以下の卵円形であり、赤色の桿状芯 (長径 1.0 μm 以下、短径約 0.3 μm) を有していた。芯の周囲にあたる実質は染色されなかった。

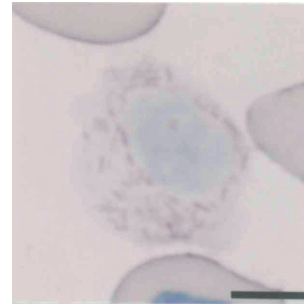


Fig. 7. Pithy granulocyte of bowfin *Amia calva*. The granules composed with eosinophilic rod-shaped core and chromophobic substance surrounding the core. May-Grünwald (preparation number, 1; See Table 1). Bar=5 μm .

考 察

アミアの好中球には α 顆粒、 β 顆粒および γ 顆粒が観察された。 α 顆粒は pH5.0 の $1/15$ M リン酸緩衝液を用いた MG 染色標本にのみ観察され、その染色性は MG+G - と表記されることから、前報²⁹⁾の分類法により、 $\alpha 3$ 顆粒と同定される。また、 γ 顆粒はいずれの染色条件においても観察されることから、MG+G+ の $\gamma 1$ 顆粒²⁸⁾と同定される。これまで β 顆粒は桿状中心芯と PO 活性の有無によって 3 種類に大別されてきた³⁰⁾。すなわち、桿状中心芯が観察されず、PO 活性が検出されない $\beta 0$ 顆粒、桿状中心芯が観察されず、PO 活性が顆粒全体に検出される $\beta 1$ 顆粒、桿状中心芯が Giemsa 染色によって赤紫色に観察され、PO 活性が桿状中心芯には検出されず、桿状中心芯の周囲の実質 (substance) に検出される $\beta 2$ 顆粒に分類される³⁰⁾。しかし、アミアの β 顆粒には桿状中心芯は観察されないものの、顆粒の中心部分は PO 陰性であり、実質に PO 活性が検出された。これらの特徴は前記の分類基準には当てはまらない。顆粒の中心部分が PO 陰性であることは、ここに芯が存在することを示唆している。すなわち、アミアの β 顆粒には PO 陰性の芯が存在するが、その芯は MG 染色や Giemsa 染色では染色されないと考えられる。したがって、これまでの $\beta 2$ 顆粒を $\beta 2a$ 顆粒に、アミアの β 顆粒を $\beta 2b$ 顆粒に

分類することを提唱する。また、芯の形状はタケノコメバル *Sebastes oblongus* では桿状であったが²⁸⁾、アミアでは PO 陰性像から円形と考えられことから、今後、芯は単に

中心芯 (central core) と呼ぶこととする。以上の新たな β 顆粒の分類基準を Table 4 に示した。

Table 4. Staining characteristics of chromophobic granules (β granules)

Staining	Type of β granules							
	$\beta 0$		$\beta 1$		$\beta 2a$		$\beta 2b$	
	Substance	CC	Substance	CC	Substance	CC	Substance	CC
May-Grünwald	—	U	—	U	—	—	—	U
Giemsa	—	U	—	U	—	+(P)	—	U
PO	—	U(—)	+	U(+)	+	—	+	—

PO, peroxidase; CC, central core; +, positive; —, negative; U, unidentified; P, purple.

各種細胞化学染色結果からアミアの好中球の各顆粒を次のように推定した (Table 3)。PAS 陽性顆粒は α -アミラーゼにより消失したことから、グリコーゲンを主成分とする構造物であり、いずれの顆粒にも相当しないと思われる。一方、TB 陽性顆粒のうち、微細な陽性顆粒は形態学的特徴 (形状と大きさ) と顆粒数が $\gamma 1$ 顆粒に類似することから、 $\gamma 1$ 顆粒は TB 陽性であると考えられる。また、不定形の TB 陽性顆粒は Y 小体に相当すると思われる。AIP 陽性顆粒と PO 陽性顆粒は、顆粒数と形態学的特徴、特に顆粒の中心部が陰性であることから、ともに $\beta 2b$ 顆粒に相当し、AcP 陽性顆粒および β -Glu 陽性顆粒は形態学的特徴と顆粒

数が $\gamma 1$ 顆粒に類似することから、 $\gamma 1$ 顆粒には両酵素が存在すると考えられる。

アミアの好中球には $\alpha 3$ 顆粒、 $\beta 2b$ 顆粒および $\gamma 1$ 顆粒が認められることから、本魚種は真骨魚類の I 群に包含することが可能である。しかし、同様の顆粒組成を有する魚類はこれまで認められていないことから新たに I-E 群を設ける。また、PO が β 顆粒 ($\beta 2b$ 顆粒) に検出され、核には活性が認められないことからアミアは I-Ea 群に分類される (Table 5)、その好中球は $\alpha 3\beta 2b\gamma 1$ と表記される I-Ea 型であると言える。

Table 5. Grouping of Chondrostei and Neopterygii based on the granule composition and PO positive site of neutrophil

Group	Subgroup	Granule	PO	Species and references
I	I-Aa	$\alpha 3, \beta 1, \gamma 1$	$\beta 1$	Asian arowana <i>Scleropages formosus</i> ¹²⁾ , Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> ^{3,24)} , jack-mackerel <i>Trachurus japonicus</i> ²⁵⁾
	I-Ba	$\alpha 3, \beta 1, \gamma 2$	$\beta 1$	Japanese eel <i>Anguilla japonica</i> ¹⁵⁾ , common carp <i>Cyprinus carpio</i> ^{1,2,24)} , striped grunt <i>Parapristipoma trilineatum</i> ^{4,24)} , Japanese amberjack <i>Seriola quinqueradiata</i> ¹⁷⁾ , greater amberjack <i>S. dumerili</i> ²⁵⁾ , yellowtail amberjack <i>S. lalandi</i> ²⁵⁾
	I-Ca	$\alpha 2, \beta 1, \gamma 1$	$\beta 1$	devil stinger <i>Inimicus japonicus</i> ²⁹⁾
	I-Dz	$\alpha 1, \beta 0, \gamma 1$	ND	Siberian sturgeon <i>Acipenser baerii</i> ³¹⁾
	I-Ea	$\alpha 3, \beta 2b, \gamma 1$	$\beta 2b^*$	bowfin <i>Amia calva</i> **
	I-Zz	$\alpha 1, \alpha 2, \beta 0, \gamma 1$	ND	threadfin shad <i>Konosirus punctatus</i> ³⁰⁾
II	II-Aa	$\alpha 3, \beta 1$	$\beta 1$	tiger puffer <i>Takifugu rubripes</i> ⁹⁾ , grass puffer <i>T. niphobles</i> ²⁷⁾ , threadsail filefish <i>Stephanolepis cirrhifer</i> ²⁷⁾
	II-Ab	$\alpha 3, \beta 1$	$\beta 1, N$	finepatterned puffer <i>Takifugu poecilonotus</i> ²⁷⁾
	II-Ba	$\alpha 1, \beta 1$	$\beta 1$	red sea-bream <i>Pagrus major</i> ¹⁶⁾
III	III-a	$\beta 1$	$\beta 1$	northern pike <i>Esox lucius</i> ¹¹⁾ , bluegill <i>Lepomis macrochirus</i> ⁶⁾ , Japanese seabass <i>Lateolabrax japonicus</i> ¹⁰⁾ , seabass <i>L. latus</i> ¹⁰⁾ , rudderfish <i>Girella punctata</i> ^{5,7)} , Japanese flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> ⁷⁾ , marbled sole <i>Pleuronectes yokohamae</i> ²³⁾ , barfin flounder <i>Verasper moseri</i> ²³⁾
	III-b	$\beta 1$	$\beta 1, N$	ayu <i>Plecoglossus altivelis</i> ⁸⁾ , gray mullet <i>Mugil cephalus</i> ²⁰⁾ , redlip mullet <i>Liza haematocheila</i> ²¹⁾ , sevenband grouper <i>Epinephelus septemfasciatus</i> ¹⁹⁾
IV	IV-Aa	$\beta 1, \gamma 1$	$\beta 1$	Japanese lates <i>Lates japonicus</i> ²²⁾
	IV-Ba	$\beta 1, \gamma 3b$	$\beta 1$	marbled rockfish <i>Sebastes marmoratus</i> ²⁶⁾
	IV-Cb	$\beta 2a, \gamma 3a$	$\beta 2a^*, N$	oblong rockfish <i>Sebastes oblongus</i> ²⁸⁾

$\alpha 1$, eosinophilic granule (α granule) type 1; $\alpha 2$, α granule type 2; $\alpha 3$, α granule type 3; $\beta 0$, chromophobic granule (β granule) type 0; $\beta 1$, β granule type 1; $\beta 2$, β granule type 2; $\gamma 1$, basophilic granule (γ granule) type 1; $\gamma 2$, γ granule type 2; $\gamma 3a$, γ granule type 3a; $\gamma 3b$, γ granule type 3b; PO, peroxidase; N, nucleus; ND, not detected.

*Central core was negative.

**Present report.

好塩基球には青紫色の顆粒が観察された。細胞化学染色の結果から、本顆粒はPASおよびTB陽性であると考えられる (Table 3)。一方、AcP陽性顆粒と β -Glu陽性顆粒は大きさが好塩基球の青紫色顆粒と異なる。好酸球には2種類の顆粒 (主顆粒, 副顆粒) が観察された。また、AcP, β -Glu およびPO陽性顆粒が認められたが、AcP陽性顆粒と β -Glu陽性顆粒は顆粒数が極めて少なく、これら酵素活性の局在部位については断定できない。PO陽性顆粒は形態学的特徴ならびに陽性強度の違いから、大型の弱陽性顆粒は主顆粒に、小型の強陽性顆粒は副顆粒に相当すると思われる。また、副顆粒はPASおよびTB陽性であると考えられた (Table 3)。

Robeson³²⁾もWright染色を施したアミアの血液塗抹標本中に4種類の顆粒球 (special granulocyte, eosinophil with spheroidal granules, eosinophil with bacillary granules, basophil) を観察しており、これらは本研究における好中球, 好酸球, 有芯顆粒球および好塩基球に相当すると考えられる。しかし、special granulocyteの顆粒の染色性については言及していない。また、basophilはアズール顆粒を含むと述べているが、色調についての記述が無く、本研究との比較は困難である。Robeson³²⁾はeosinophil with bacillary granulesの顆粒を桿状としているが、本研究の結果から、顆粒の芯が桿状であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のメイ-グリュンワルド・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-グリュンワルド・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: 新琵琶湖産アユ冷水病総合対策緊急研究事業報告書 (細胞内病理態様解析, 平成17年度), 滋賀県 (2006)
- 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. 水大校研報, **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. 水大校研報, **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. 水大校研報, **56**, 317-321 (2008)
- 12) 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)
- 13) 近藤昌和, 高橋幸則: ポリプテルス好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **57**, 283-297 (2009)
- 14) 近藤昌和, 高橋幸則: ヌタウナギ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **57**, 299-308 (2009)
- 15) 近藤昌和, 高橋幸則: ウナギ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **58**, 1-13 (2009)
- 16) 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および細胞化学的特徴. 水大校研報, **58**, 15-22 (2009)
- 17) 近藤昌和, 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸則: ブリの好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **58**, 101-111 (2009)
- 18) 近藤昌和, 高橋幸則: アフリカハイギョ *Protopterus annectens* 好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **58**, 207-216 (2010)
- 19) 近藤昌和, 近藤啓太, 高橋幸則: マハタ白血球の形態学および細胞化学的特徴. 水産増殖, **58**, 363-371 (2010)
- 20) 近藤昌和, 林 裕之, 高橋幸則: ポラの白血球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **59**, 163-171 (2011)
- 21) 近藤昌和, 林 裕之, 高橋幸則: メナダの白血球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **59**, 173-182 (2011)
- 22) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: アカメ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **60**, 85-93 (2012)

- 23) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: カレイ類 (マコガレイ, マツカワ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 43-49 (2012)
- 24) 近藤昌和, 安本信哉, 大野美和, 高橋幸則: コイ, ナイルティラピアおよびイサキの好中球顆粒. 水大校研報, **61**, 51-64 (2012)
- 25) 近藤昌和, 安本信哉, 秋吉佑樹, 高橋幸則: アジ科魚類 (マアジ, カンパチ, ヒラマサ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 87-101 (2013)
- 26) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: カサゴ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 103-113 (2013)
- 27) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: カワハギおよびフグ類 (クサフグ, コモンフグ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 226-233 (2013)
- 28) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: タケノコメバル好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 234-241 (2013)
- 29) 近藤昌和, 安本信哉, 池田 至, 高橋幸則: オニオコゼ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **62**, 69-74 (2014)
- 30) 近藤昌和, 仲下 亮, 安本信哉, 高橋幸則: コノシロの顆粒球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **63**, 250-260 (2015)
- 31) 近藤昌和, 酒井麻帆, 安本信哉, 高橋幸則: シベリアアチウザメの顆粒球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **63**, 262-270 (2015)
- 32) Robeson JM Jr: Hemopoiesis in *Amia calva* (Linnaeus). *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, **16**, 305-313 (1932)