

ヒラメおよびメジナ好中球顆粒の細胞化学的特徴

近藤昌和*・金丸俊介・柏村直宏・稲川裕之・高橋幸則

Cytochemical Characteristics of Granules in Neutrophil from Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* and Rudderfish, *Girella punctata*

Masakazu Kondo*, Shunsuke Kanamaru, Naohiro Kashiwamura, Hiroyuki Inagawa and Yukinori Takahashi

Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in rudderfish, *Girella punctata* and Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* were examined by light microscopy and the components of neutrophil granule were inferred in this study. The neutrophil of both fishes were round or oval and the nucleus round to kidney-shaped. Granules of the neutrophil in both fishes possessed a large number of chromophobic granule (β G) and a few of amorphous basophilic granule (δ G). The β G was round or oval and peroxidase positive. The δ G was toluidin blue positive.

1 緒 言

ヒトの好中球では、細胞内顆粒の膜や基質の成分が詳細に調べられ、顆粒成分の違いから、4種類に細分されている^{1, 2)}。一方、系統進化において、脊椎動物の中でも早期に祖先種が出現した魚類では、好中球顆粒の種類に関する報告は少ない。近年、各種真骨魚類の好中球には、Romanowsky型染色性と形状が異なる複数種の顆粒が存在し、顆粒の種類は魚種によって2~4種類と相違があることが示されている³⁻⁸⁾。コイ目のコイ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種類の顆粒の存在が報告されている^{3, 4, 8)}。スズキ目魚類のナイルティラピアとイサキでは、 α 、 β および γ 顆粒とともに、粗大で不定形の好塩基性顆粒(δ 顆粒)が認められている^{5, 6)}。また、同じスズキ目のメジナ、オオクチバスおよびブルーギルでは、 β 顆粒と δ 顆粒は観察されるものの、 α 顆粒と γ 顆粒は認められていない^{7, 8)}。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と著者らは考えている⁷⁾。しかし、Romanowsky型染色によって認められる各種顆粒の成分に関しては不明な点が多い。

各種細胞化学染色性から、真骨魚類の好中球顆粒の成分を推察する上で、 β 顆粒と δ 顆粒の2種類の顆粒のみが好中球に観察されるメジナ型魚種について調べることは、3種類の顆粒を有するコイや、4種類の顆粒を有するナイルティラピアやイサキを調べるよりも結果の解釈が容易であると考えられる。前報において、 β 顆粒と δ 顆粒を有するブルーギルの好中球に各種細胞化学染色を施して、両顆粒の成分について検討した結果、 β 顆粒にはペルオキシダーゼが検出され、 δ 顆粒はトルイジンブルーに陽性であることが明らかとなった⁸⁾。しかし、試験に用いた酵素染色法では、両顆粒のみならず、好中球内の他の部位も陰性のものがあつたことから、 β および δ 顆粒の構成成分の解明についてはさらなる検討が必要であつた。

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、カレイ目ヒラメ科に属するヒラメ*Paralichthys olivaceus*の好中球顆粒の種類について調べたところ、スズキ目のメジナ、オオクチバスおよびブルーギルと同様に、 β 顆粒と δ 顆粒は観察されるものの、 α 顆粒と γ 顆粒は認められなかった。本研究では、重要な養殖対象種であるヒラメの好中球のRomanowsky型染色性について調べるとともに、各種の染色を施して、各顆粒の成分を推定したので報

2005年1月18日受付。Received January 18, 2005.

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

* 別刷り請求先 (Corresponding author).

告する。また、ブルーギルと同様に、2種類の顆粒のみを好中球に有するメジナについても細胞化学的特性を調べ、ヒラメおよびブルーギルと比較して β および δ 顆粒の成分について考察したので報告する。

2 材料および方法

2.1 実験動物

実験には平均体重98.3gのメジナ *Girella punctata* と、大分県の養殖場より入手した平均体重310.0gのヒラメを用いた。それぞれ1000ℓ水槽に搬入後、一週間以上馴致飼育したのち実験に供した。飼育期間中の水温は、 $20.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ であった。また、飼育期間中は市販の配合飼料（マリン6号、林兼産業）を1日1回、体重の1%量投与した。

2.2 Romanowsky型染色および細胞化学染色

血液塗沫標本の作製、Romanowsky型染色および各種細胞化学染色は前報³⁾にしたがった。また、100個の好中球を観察し、細胞や核の大きさを測定した。

3 結果

3.1 ヒラメ好中球のRomanowsky型染色性

ヒラメの好中球は円形または卵円形であった。長径 $7.5 \sim 10.0 \mu\text{m}$ 、短径 $6.5 \sim 9.0 \mu\text{m}$ であり、核は細胞の中央またはやや偏在していた。核の大きさは長径 $4.0 \sim 7.5 \mu\text{m}$ 、短径 $3.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$ であった。核は円形、卵円形、楕円形またはソラマメ型であり、分葉核は認められなかった。好中球顆粒は難染色性顆粒（ β 顆粒）と、粗大で不定形の好塩基性顆粒（ δ 顆粒）の2種類に識別された。なお、顆粒の呼称は前報⁷⁾にしたがった。

3.1.1 ヒラメ好中球の β 顆粒

本顆粒は難染色もしくは好中性で、いずれの魚種においても長径 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$ の円形または卵円形であった。本顆粒はいずれの好中球にも多数観察された。

メイ-グリュンワルド（MG）染色およびMG・ギムザ（MGG）染色では、いずれの希釈液を用いても本顆粒が容易に観察された（Fig. 1 a-d）。しかし、ギムザ染色では、

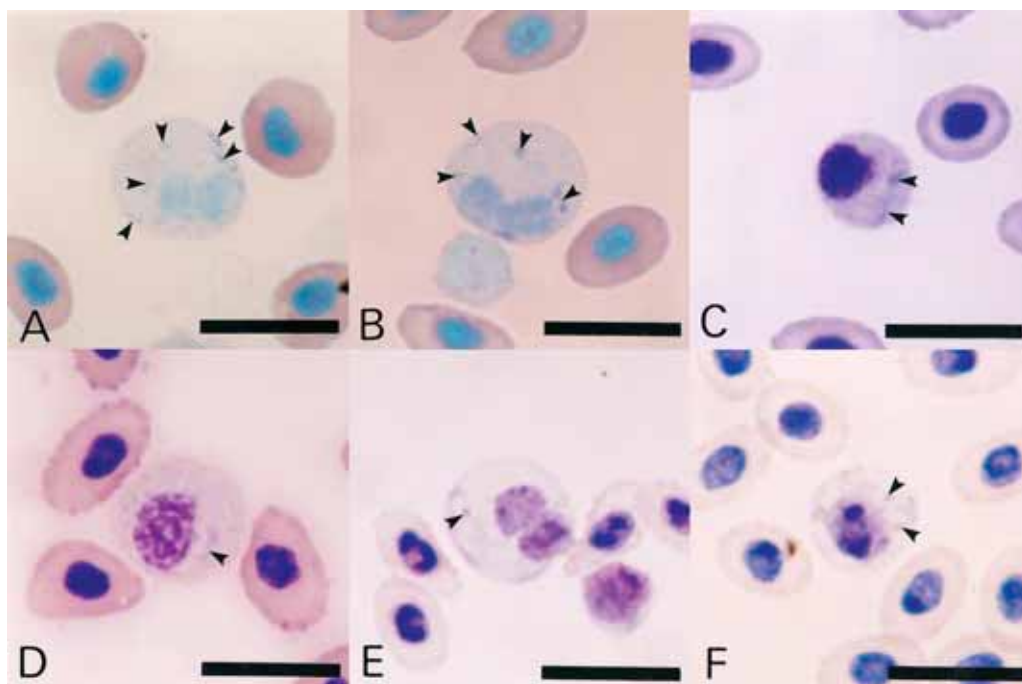


Fig. 1. Japanese flounder neutrophil under various staining conditions. a, May-Grünwald stain using distilled water (pH5.2). b, May-Grünwald stain using phosphate buffer (5 mM, pH6.0). c, May-Grünwald・Giemsa stain using phosphate buffer ($1/150\text{M}$, pH7.0). Giemsa solution was diluted in $1/150\text{M}$ phosphate buffer at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15min. d, May-Grünwald・Giemsa stain using distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15min. e, Giemsa stain (15min) using distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1:100. f, Giemsa stain (15min) using phosphate buffer ($1/150\text{M}$, pH7.0). Giemsa solution was diluted in $1/150\text{M}$ phosphate buffer at a rate of 1:100. Note β G and δ G (arrowheads). Bars = $10 \mu\text{m}$.

いずれの希釈液を用いても、ギムザ染色液の濃度および染色時間に関わらず、本顆粒は不明瞭であった (Fig. 1 e, 1 f)。

3.1.2 ヒラメ好中球の δ 顆粒

本顆粒は不定形であり、桿状、コンマ状、三日月状、リング状などの多様な形態を有し、好塩基性 (淡青色) を示した。また、大きさも様々であった。本顆粒の数は β 顆粒よりもはるかに少なかったが、いずれの好中球にも観察された。また、本顆粒はいずれの染色条件においても観察されたが、ギムザ染色標本では不明瞭であった。

3.2 細胞化学的特性

ヒラメとメジナの好中球の細胞化学的特性をそれぞれ Table 1 と Table 2 に示した。

3.2.1 ヒラメ

いずれの好中球にも多数のPeriodic acid Schiff反応 (PAS) に陽性の顆粒が細胞質に均一に分布していた

(Fig. 2 A)。陽性顆粒は円形で、大きさが均一であった (直径 $0.2\mu\text{m}$ 未満)。また、種々の形態を示す粗大な顆粒状の陰性部位が観察され、細胞質基質は淡赤色を示した。緩衝液中でインキュベートした標本ではPAS陽性顆粒数の減少とともに陽性顆粒の色調が減弱した (Fig. 2 B)。一方、基質の染色性に変化は認められなかった。しかし、 α -アミラーゼ処理によって、PAS陽性部位は完全に消失した。アルシアンブルー (AB) 染色では陽性部位が観察されなかった。蒸留水に溶解したトルイジンブルー (TB) 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. 2 C)。また、pH7.0, pH4.1 およびpH2.5のいずれの場合も同様であったが、pHの低下にともない色調は減弱した。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が、ズダンブラックB (SBB) 染色では直径 $0.2\mu\text{m}$ 未満の円形陽性顆粒が細胞質に均一に観察された (Fig. 2 D)。酸性フォスファターゼ (ACP) 染色では円形で種々の大きさの陽性顆粒 (直径 $0.3\sim 0.5\mu\text{m}$) が観察された (Fig. 2 E)。酒石酸阻害試験によって、90%程度の好中球では陽性顆粒が完全に消失し

Table 1 . Summary of reactions of Japanese flounder neutrophil to cytochemical tests

Test	Shape, number, size and intensity* of positive site
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Hyaloplasm (+); Granule (round, some, $\phi < 0.2\mu\text{m}$, ++)
PAS after incubation in buffer	Hyaloplasm (+); Granule (round, some, $\phi < 0.2\mu\text{m}$, +)
PAS after digestion with α -amylase	—**
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidin blue (distilled water)	Granule (amorphous, a few, ++)
Toluidin blue (pH7.0)	Granule (amorphous, a few, ++)
Toluidin blue (pH4.1)	Granule (amorphous, a few, +)
Toluidin blue (pH2.5)	Granule (amorphous, a few, +)
Sudan black B	Granule (round, many, $\phi < 0.2\mu\text{m}$, ++)
SudanⅢ	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase (ACP)	Granule (round, some, $\phi 0.3\sim 0.5\mu\text{m}$, ++)
ACP + tartaric acid	Granule (round, 0~10, $\phi 0.3\sim 0.5\mu\text{m}$, +)
β -Glucuronidase	—
α -Naphthyl acetate esterase	Granule (round, some, $\phi 0.5\sim 0.7\mu\text{m}$, +)
α -Naphthyl butyrate esterase (α NBE)	—
α NBE + NaF	—
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	—
Peroxidase	Granule (round, many, $\phi 0.5\sim 0.7\mu\text{m}$, +)

* +, weakly positive; ++, moderately positive.

** —, not detected.

Table 2. Summary of reactions of rudderfish neutrophil to cytochemical tests

Test	Shape, number, size and intensity* of positive site
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Hyaloplasm (+); Two types of round granules (large type: some, ϕ 0.5 μ m, +++; small type: many, ϕ 0.2 μ m, ++)**
PAS after incubation in buffer	Hyaloplasm, +; Small round granule (0~10, ϕ 0.2 μ m, +)
PAS after digestion with α -amylase	—**
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidin blue (distilled water)	Granule (amorphous, a few, ++)
Toluidin blue (pH7.0)	Granule (amorphous, a few, ++)
Toluidin blue (pH4.1)	Granule (amorphous, a few, +)
Toluidin blue (pH2.5)	Granule (amorphous, a few, +)
Sudan black B	Two types of round granules in a cell (large type: many, ϕ 0.5 μ m, ++; small type: many, ϕ 0.2 μ m, ++)
Sudan III	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	Hyaloplasm (+++); Granule (round, many, ϕ 0.5 μ m, ++)
Acid phosphatase (ACP)	Two types of round granules in a cell (large type: some, ϕ 0.5 μ m, ++; small type: some, ϕ 0.3 μ m, +)
ACP + tartaric acid	Granule (round, 0~10, ϕ 0.3 μ m, +)
β -Glucuronidase	—
α -Naphthyl acetate esterase	Granule (round, some, ϕ 0.2 μ m, +)
α -Naphthyl butyrate esterase (α NBE)	Granule (round, some, ϕ 0.5 μ m, +)
α NBE + NaF	—
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	—
Peroxidase	Oval granule (many, 1.0~1.2 \times 0.5~0.7 μ m, +)

* +, weakly positive; ++, moderately positive; +++, strongly positive.

**—, not detected.

*** two types of cells (one contain two types of positive granules, another only small granule).

たが、陽性顆粒を10個以下のみ有する好中球も少数観察された (Fig. 2 F)。 α -ナフチルアセテートエステラーゼ (NA) 染色では好中球に少数の円形陽性顆粒 (直径0.5~0.7 μ m) が散在していた (Fig. 2 G)。ペルオキシダーゼ (PO) 染色では、円形の陽性顆粒 (直径0.5~0.7 μ m) が多数認められた (Fig. 2 H)。アルカリ性フォスファターゼ (ALP), β -グルクロニダーゼ (β -Glc), α -ナフチルブチレートエステラーゼ (α -NB) およびナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (NASDCAE) 染色には陰性であった。

3.2.2 メジナ

PAS染色では、いずれの好中球にも多数の円形陽性顆粒が細胞質に均一に分布して観察された (Fig. 3 A)。しかし、陽性顆粒は大きさや色調の違いから2種類に区別された。

大型の顆粒は直径約0.5 μ mであり、濃赤色であった。小型の顆粒は直径約0.2 μ mで赤色であった。この2種類の顆粒の両方を有する細胞と (Fig. 3 A 1), 小型顆粒のみを有する細胞が観察された (Fig. 3 A 2)。また、種々の形態を示す粗大な顆粒状の陰性部位も観察された。細胞質基質は弱陽性であった。緩衝液中でインキュベートした標本では基質の染色性には変化は認められなかった (Fig. 3 B)。しかし、陽性顆粒が全く認められない細胞と、小型の陽性顆粒を種々の数有する細胞が観察された。大型の陽性顆粒は認められなかった。また、陽性顆粒の色調には変化は見られなかったが、 α -アミラーゼ処理によって、陽性部位は完全に消失した。ABでは陽性部位は観察されなかった。TB染色では蒸留水の場合、いずれの好中球にも種々の形態を示す青色の粗大な陽性顆粒が少数観察された (Fig. 3 C)。pH7.0およびpH4.1の場合も同様であったが、

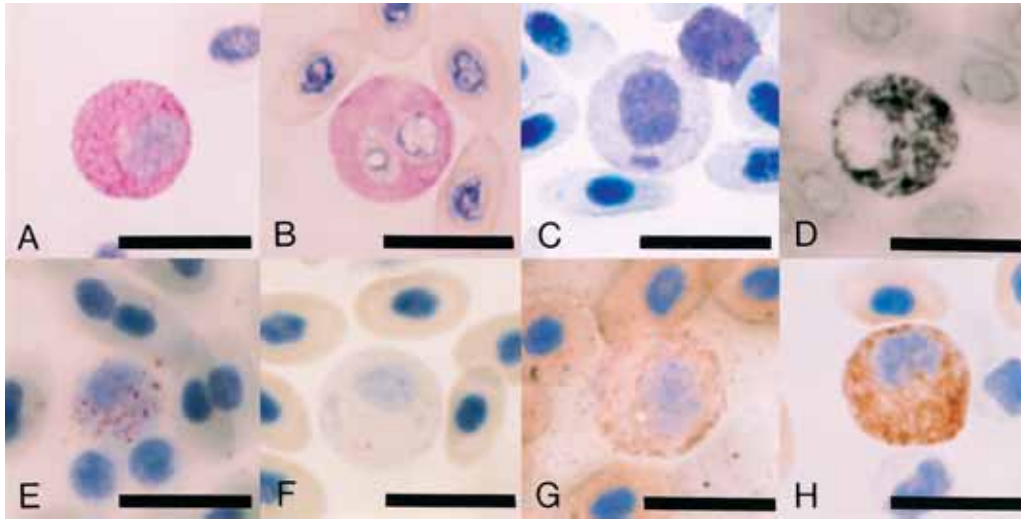


Fig. 2. Cytochemistry of Japanese flounder neutrophil. (A), periodic acid Schiff reaction (PAS). (B), PAS after incubation in buffer. (C), toluidin blue in distilled water. (D), sudan black B. (E), acid phosphatase (ACP). (F), ACP with inhibitor (tartaric acid). (G), α -naphthyl acetate esterase. (H), peroxidase. Bars=10 μ m.

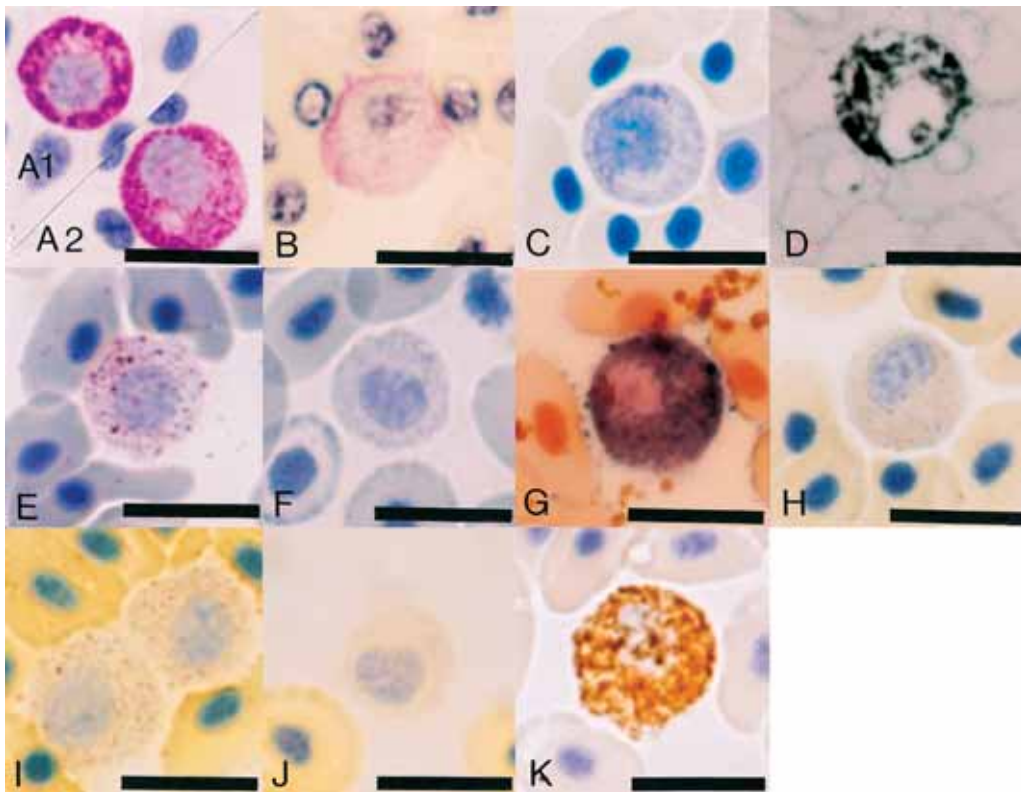


Fig. 3. Cytochemistry of rudderfish neutrophil. (A), periodic acid Schiff reaction (PAS). (B), PAS after incubation in buffer. (C), toluidin blue in distilled water. (D), sudan black B. (E), acid phosphatase (ACP). (F), ACP with inhibitor (tartaric acid). (G), alkaline phosphatase. (H), α -naphthyl acetate esterase. (I), α -naphthyl butyrate esterase (α -NBE). (J), α -NBE with inhibitor (NaF). (K), peroxidase. Bars=10 μ m.

pH4.1では淡青色であった。しかし、pH2.5では陽性顆粒数は減少し、色調も低下した。オイルレッドOおよびズダンIIIでは陽性部位が観察されなかった。一方、SBBではいずれの好中球にも多数の円形陽性顆粒が細胞質に均一分

布して観察された (Fig. 3 D)。しかし、陽性顆粒は大きさの違いから2種類に区別された。大型の陽性顆粒は直径約0.5 μ mであり、小型の陽性顆粒は直径約0.2 μ mであった。いずれの好中球にもこれら2種類の顆粒が観察され

た。ACP染色では好中球の細胞質基質中に円形小型（直径約0.3 μm ）と円形大型（直径0.5 μm ）の2種類の陽性顆粒が散在していた（Fig. 3 E）。酒石酸阻害試験における好中球の陽性顆粒は、少数の細胞に10個以下の小型顆粒が残存していたものの、大型顆粒は認められず、90%程度の好中球では陽性顆粒が完全に消失した（Fig. 3 F）。ALP染色では好中球濃青色の陽性顆粒（直径約0.5 μm ）が細胞質に充満しており、細胞質基質も強陽性を示した（Fig. 3 G）。 α -NA染色では好中球の細胞質に微細な円形陽性顆粒（直径約0.2 μm ）が散在していた（Fig. 3 H）。 α -NB染色では好中球の細胞質に円形陽性顆粒（直径0.5 μm ）が散在していた（Fig. 3 I）。NaFの添加で本酵素活性は完全に阻害された（Fig. 3 J）。PO染色では好中球の細胞質に楕円形の陽性顆粒（長径約1.0~1.2 μm 、短径約0.5~0.7 μm ）が充満していた（Fig. 3 K）。 β -GluおよびNASDCAE染色には陰性であった。

4 考 察

これまでに、Romanowsky型染色の特性から、メジナ、オオクチバスおよびブルーギルの好中球には、 β 顆粒と δ 顆粒のみが観察されている^{7, 8)}。本研究から、ヒラメにも β 顆粒と δ 顆粒の2種類の顆粒のみが観察されることが明らかとなった。ヒラメが属するカレイ目はスズキ目から派生したと考えられており⁹⁾、好中球顆粒の形態学的類似性から、オオクチ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る。今後、 β 顆粒と δ 顆粒の2種類の顆粒のみを有する好中球については、メジナ型好中球と呼び、この型の好中球を有する魚類をメジナ型魚類と称したい。

本研究の目的は、各種の細胞化学染色性から、メジナ型魚類の β および δ 顆粒の成分を推察することである。このための前提条件は、「各種染色に陽性の顆粒における大きさ、形状、数および分布が各々のメジナ型魚類の好中球の β または δ 顆粒と同様であれば、各顆粒の構成成分は同等の質からなると判断する」ものとした。

4.1 β 顆粒の成分推定

ヒラメとメジナの好中球には多数のPAS陽性顆粒が観察された。しかし、ヒラメとメジナの β 顆粒は、長径が0.5 μm 以上であるのに対して、PAS陽性顆粒は、ヒラメでは

直径0.2 μm 以下と小型であり、メジナでは大小2種類のPAS陽性顆粒が観察されたが、大型の陽性顆粒であっても直径0.5 μm であり、メジナの β 顆粒（0.5~1.1 μm ）⁸⁾よりも小型であった。また、両魚種の β 顆粒は円形または卵円形であるのに対して、PAS陽性顆粒は円形であること、さらに、緩衝液中でインキュベートすることによって、PAS陽性顆粒は消失または染色性が低下するとともに、残存する陽性顆粒が α -アミラーゼで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。SBB陽性顆粒は、両魚種においてPAS陽性顆粒と同様の大きさ、形状および分布を示したことから、SBBとPASは同じ構造物を染色しており、 β 顆粒とは異なると思われる。ブルーギルの好中球にも、PAS陽性顆粒とSBB陽性顆粒が観察されているが、同様の理由から、PASおよびSBB陽性顆粒は β 顆粒とは異なると考えられている⁸⁾。

PO陽性顆粒は大きく、円形または楕円形であること、陽性顆粒は細胞質に充満していることから、 β 顆粒に相当すると考えられる。同様の観察結果は、ブルーギルにも認められている⁸⁾。しかし、他の酵素については、陽性顆粒と β 顆粒との緊密な関連は見出せなかった。ALPはメジナで検出されたが、陽性顆粒は円形で、直径0.5 μm 以下と β 顆粒よりも小型であり、ヒラメでは観察されなかった。ACPは両魚種ともに検出されたが、その陽性顆粒は円形で、直径0.5 μm 以下と小型であり、細胞質内に散在していたことから、 β 顆粒の成分であるとは断定できない。また、 α -NAEも両魚種ともに検出され、ヒラメでは β 顆粒と同じ大きさを示したが、細胞質内に散在しており、メジナでは陽性顆粒の直径が0.2 μm と、 β 顆粒よりも小型で、細胞質内に散在していたことから、 α -NAEが β 顆粒の成分であるとは断定できない。 α -NABについても、メジナでは認められたが、大きさと細胞質内分布が β 顆粒とは異なり、また、ヒラメには検出されないことから、本酵素を β 顆粒の成分であるとは言えない。しかしながら、陽性顆粒の大きさが β 顆粒と異なる点については、これらの酵素が顆粒内で偏在している可能性があり、陽性顆粒数（分布）の違いは、顆粒の成熟度に比例することも予想される。また、魚種間で反応性が異なる酵素については、各種酵素の染色至適条件が異なることが考えられる。したがって、本研究で検討したPO以外の酵素が、 β 顆粒には存在しないとは断定できず、さらなる研究、とくに電子顕微鏡を用いた酵素反応観察が必要である。

4.2 δ顆粒の成分推定

TB染色によりイサキとヒラメの好中球に種々の形態を示す青色の粗大な陽性顆粒が少数観察された。この顆粒は形態学的特徴から、 δ 顆粒に相当すると思われる。一般にTBは酸性粘液多糖を染めるが、 δ 顆粒は各種多糖類を染めるPAS染色と、酸性粘液多糖を染めるABのいずれの染色にも陰性であることから、本顆粒のTB陽性物質は多糖類とは異なる。これらの観察結果は、ブルーギルの好中球にも当てはまる⁸⁾。試験した全ての酵素染色に、 δ 顆粒は陰性であったが、前述の β 顆粒の場合と同様に、酵素が δ 顆粒内で偏在している可能性は、本研究結果からは否定できない。

本研究によって、メジナ型好中球の β 顆粒には少なくともPOが豊富に存在し、 δ 顆粒は多糖とは異なるTB陽性物質に満たされていることが明らかとなった。

謝 辞

実験魚（メジナ）を提供していただいた水産大学校食品化学科助教授 宮崎泰幸博士に感謝いたします。

文 献

- 1) N. Borregaard, L. Kjeldsen, K. Lollike and H. Senge-
lov : Granules and secretory vesicles of the human
neutrophil. *Clin. Exp. Immunol.*, 101, 6-9 (1995).
- 2) N. Borregaard and J. B. Cowland : Granules of the
human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte.
Blood, 89, 3503-3521 (1997).
- 3) 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. 水産大学校研究報
告, 50 (3), 109-117 (2002).
- 4) 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 (1), 17-29 (2002).
- 5) 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. 水産大学校
研究報告, 51 (3), 79-86 (2003).
- 6) 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 (1), 45-48 (2004).
- 7) 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 (2), 67-71 (2004).
- 8) 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 (4), 197-202
(2005).
- 9) A. C. Gill and R. D. Mooi : Phylogeny and systema-
tics of fishes, in *Handbook of Fish Biology and
Fisheries* (ed. By P. J. B. Hart and J. D. Reynolds),
Vol. 1, Blackwell Publishing, Oxford, 2002, pp.
15-42.