

イサキ好中球の顆粒

近藤昌和*・安本信哉・高橋幸則

Granules of Neutrophil in Striped Grunt *Parapristipoma trilineatum*

Masakazu Kondo*, Shinya Yasumoto, and Yukinori Takahashi

May-Grünwald (MG) and MG・Giemsa (MGG) staining properties of cytoplasmic granules in striped grunt *Parapristipoma trilineatum* neutrophil were examined in this study. Four types of granules; eosinophilic granule (α G), chromophobic (neutrophilic) granule (β G), azurophilic (basophilic) granule (γ G) and amorphous basophilic granule (δ G) were observed in the neutrophil. The α G was rod in shape (0.5~1.0 μ m in length) and observed in MG preparation using acid buffer ($1/15$ M and 5 mM, pH5 and 6) or neutral buffer (5 mM, pH7). The eosinophilicity of α G disappeared by Giemsa stain after MG. The β G was round to oval (0.5~1.0 μ m in diameter). The γ G was round to oval (<0.3 μ m in diameter), and observed in MGG preparations using neutral buffer ($1/15$ M and 5 mM, pH7). The δ G was basophilic, larger than γ G, irregular in shape (rod, comma, crescent or ring) and observed in about 80% of neutrophils of all MG and MGG preparations.

1 緒 言

ヒトの貪食性顆粒球である好中球は、膜や基質の成分の異なる4種類の顆粒を有している¹⁾。魚類にも貪食能を有する顆粒性白血球の存在が報告されているが²⁻⁴⁾、顆粒の分類については不明な点が多い。我々はこれまでに、真骨魚類のコイ *Cyprinus carpio* とナイルティラピア *Oreochromis niloticus* について、好中球のメイ-グリュンワルド・ギムザ (MGG) 染色性を報告した⁵⁻⁷⁾。その結果、コイには3種類の、ナイルティラピアには4種類の顆粒が好中球に存在することが明らかとなった。コイの属する骨鰾上目コイ目は、真骨魚類の中でも比較的原始的なグループとされている⁸⁻¹⁰⁾。また、ナイルティラピアは、棘鰭上目スズキ目に属し、本目魚類は現生真骨魚類のなかで進化の頂点に立っていると考えられている⁹⁻¹⁰⁾。したがって、好中球顆粒の種類数の違いは、魚類の進化に関連していると推察される。本研究では、ナイルティラピアで得られた知見が、他のスズキ目魚種にも当てはまるか否かを明らかにするために、海産スズキ目魚類であるイサキ *Parapristipoma trilineatum* について、好中球顆粒のMGG染色性を調べ、コイ

およびナイルティラピアのそれと比較した。

2 材料および方法

実験動物

実験には体重約200 gのイサキを用いた。イサキ15尾を1000 l水槽に搬入し、流水で1ヵ月以上馴致飼育した(水温20~22℃)。キナルジンで麻酔したイサキの尾部血管から、前報⁵⁾にしたがって採血し、血液塗抹標本を作製した。なお、実験魚には、市販の海産魚用配合飼料(林兼産業)を1日1回体重の約2%量給餌した。

メイ-グリュンワルド・ギムザ (MGG) 染色

塗抹標本上に固定を兼ねてメイ-グリュンワルド原液(Sigma)を1.5 ml 載せ、5分間静置した。これに同量の希釈液を滴下・混和してメイ-グリュンワルド(MG)染色を10分間行った。蒸留水で水洗し、風乾したのちに合成封入剤(オイキット)で封入して光学顕微鏡で観察した。また、MG染色後、ギムザ染色液で洗浄したのち、同液を標本上に滴載して15分間ギムザ染色を施してMGG染色標

2003年5月15日受付。Received May. 15. 2003.

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).

本を作製した。ギムザ染色液は原液 (Merck) を、蒸留水で10倍希釈した希釈液に1:20の割合で滴下・混和したものである。希釈液には、6種類のリン酸緩衝液 (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 5 mMおよび $\frac{1}{15}\text{M}$, pH 5, 6および7) を用いた。

3 結 果

イサキの好中球は円形から卵円形であった (長径9.5~13.0 μm)。核は細胞の中央またはやや偏在しており、卵円形、楕円形、ソラ豆型、ドーナツ型のほかに、3分葉までの分葉核も観察された。好中球顆粒は、エオシン好性顆粒 (以後、 α 顆粒と称する)、難染色性顆粒 (以後、 β 顆粒と称する)、アズール好性顆粒 (以後、 γ 顆粒と称する) および不定形の好塩基性顆粒 (以後、 δ 顆粒と称する) の4種類に識別された。

α 顆粒

本顆粒は好酸性で桿状であった (長径0.5~1.0 μm)。MG染色では、5 mMの緩衝液の場合、いずれのpHでも赤

色の顆粒として多数観察された (Fig. 1 d-f)。同様に、 $\frac{1}{15}\text{M}$ のpH5および6においても、赤色顆粒として多数観察された (Fig. 1)。しかし、 $\frac{1}{15}\text{M}$ のpH7では、本顆粒は観察されなかった。MGG染色標本においても、本顆粒は観察されなかった (Fig. 2)。

β 顆粒

本顆粒は難染色もしくは好中性で、円形または卵円形であった (長径0.5~1.0 μm)。MG染色では、pH7の緩衝液を用いた場合、多数の β 顆粒が観察された (Fig. 1 c, f)。MGG染色においては、いずれの希釈液を用いても、 β 顆粒が容易に観察された (Fig. 2)。

γ 顆粒

本顆粒はアズール好性 (好塩基性) で、円形または卵円形であった (直径0.3 μm 以下)。各希釈液を用いてMGG染色を行ったところ、pH5および6の緩衝液では、本顆粒は観察されなかった (Fig. 2 a, b, d, e)。しかし、pH7ではいずれの緩衝液を用いた場合にも γ 顆粒が認められた (Fig. 2 c, f)。MG染色標本には本顆粒は観察されな

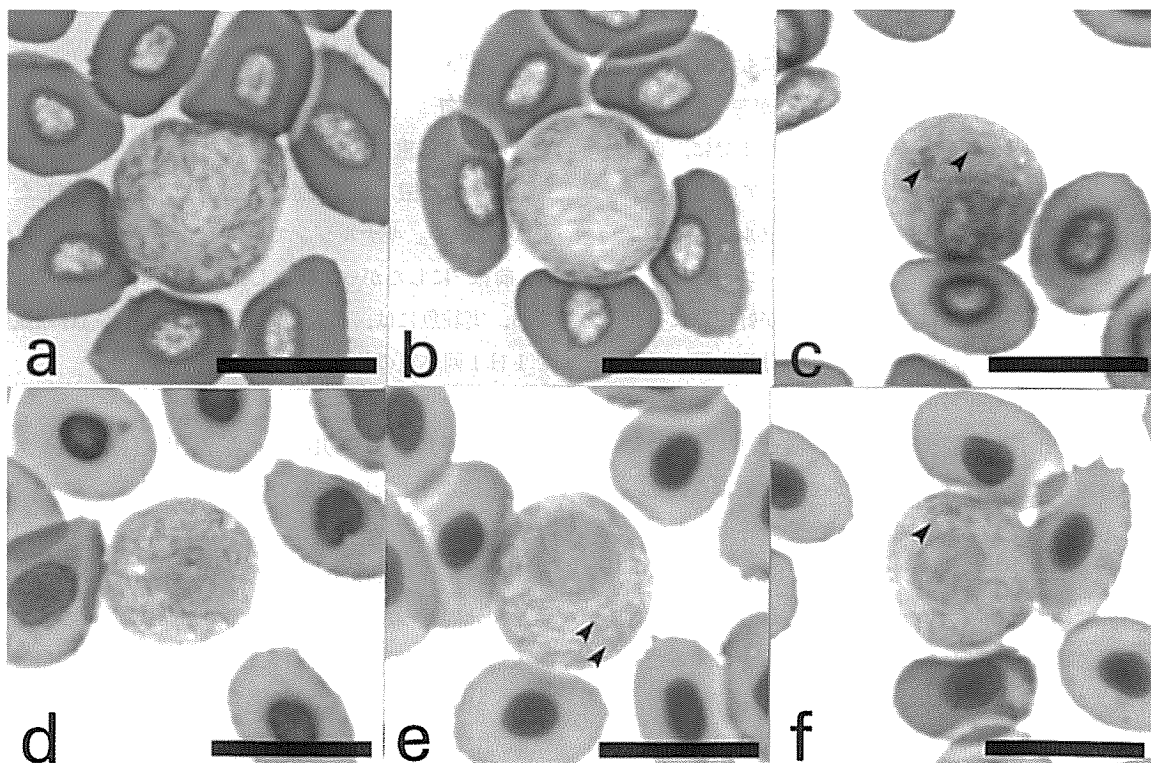


Fig. 1. Striped grunt neutrophils stained with May-Grünwald. After staining for 5 min by May-Grünwald concentrated solution, doubling as fixation, the sample was stained again by May-Grünwald diluted solution in phosphate buffer (1:1) for 10 min. a-c, $\frac{1}{15}\text{M}$; d-f, 5 mM. a and d, pH 5; b and e, pH 6; c and f, pH 7. Rod-shaped eosinophilic granules (α G) were observed in the preparation using acid buffer of both concentration (a, b, d, f) and neutral buffer of low concentration (f), but not neutral high concentrated buffer (c). Amorphous basophilic granules (δ G) were observed in many neutrophil of all preparations (arrowheads). Bars=10 μm .

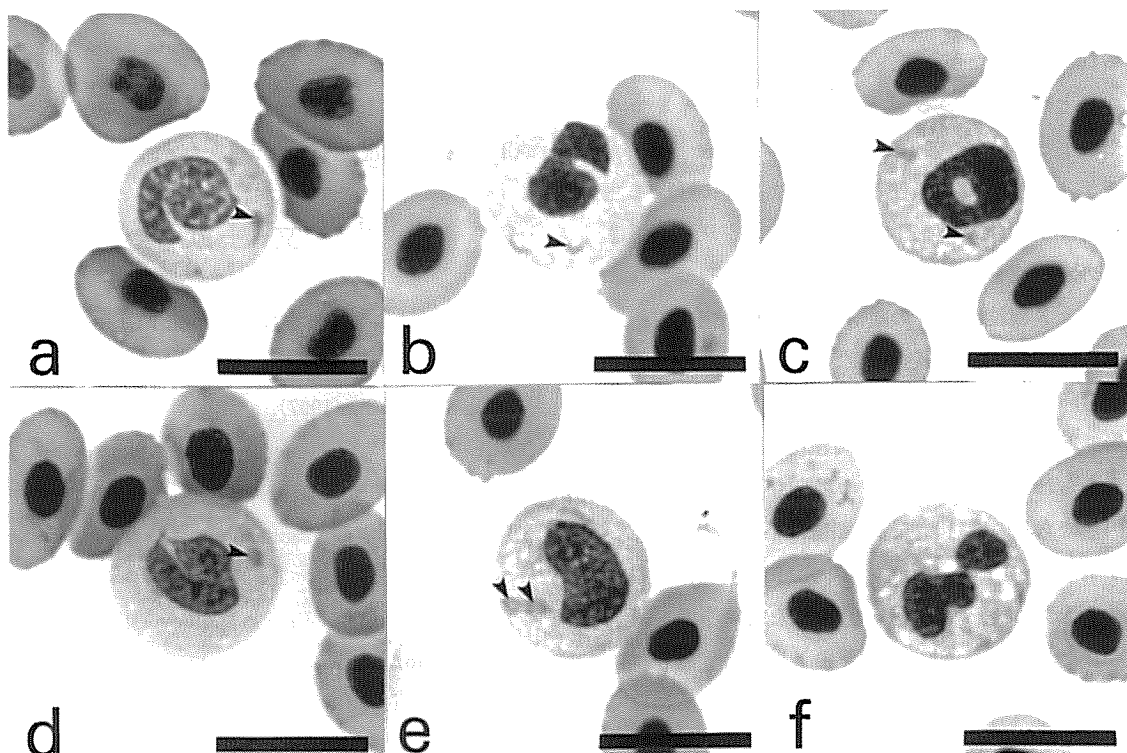


Fig. 2. Striped grunt neutrophils stained with May-Grünwald · Giemsa (MGG). After staining with May-Grünwald as described in fig. 1, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution (1 : 20) in phosphate buffer diluted with distilled water at a rate of 1 : 9. a-c, $\frac{1}{15}$ M; d-f, 5 mM. a and d, pH 5; b and e, pH 6; c and f, pH 7. The α G disappeared by Giemsa stain after MG (a-f). Chromophobic (neutral) granules (β G) were observed in all MGG preparations (a-f). Azurophilic (basophilic) granules (γ G) were observed in the preparation using neutral buffer of both concentration (c, f), but not acid buffer (a, b, d, e). The δ G was observed in some neutrophil of all preparations (arrowheads). Bars = 10 μ m.

かった (Fig. 1)。

δ 顆粒

本顆粒は不定形であり、桿状、コマ状、三日月状あるいはリング状と様々な形態を有し、好塩基性を示した。また、前述の γ 顆粒よりも大型であった。本顆粒は、約80%の好中球に観察されたが、細胞内の数は他の種類の顆粒よりも少なかった。いずれの染色条件でも本顆粒は観察されたが、pH 5のMG染色では、淡青色を示し、顆粒の輪郭は不明瞭であった。

4 考 察

イサキの好中球には、ナイルティラピアの好中球と同様に、4種類の顆粒が観察された。しかし、両魚種の好中球顆粒は、形態や染色性において違いが認められた。

ナイルティラピアの好中球の α 顆粒は、MG染色では酸性領域で染色され、中性では染色されない⁷⁾。しかし、イサキの好中球の α 顆粒は、 $\frac{1}{15}$ Mの緩衝液ではナイルティラピアと同様に、酸性領域で染色され、中性では染色され

ないが、5 mMの緩衝液では酸性から中性で染色された。また、MGG染色では、ナイルティラピアの α 顆粒はpH 5の緩衝液を用いた場合に観察されるが⁸⁾、イサキではいずれの緩衝液を用いても全く認められなかった。一方、コイ α 顆粒は、MG染色においては、5 mMでは中性から酸性領域で多数の α 顆粒が染色され、 $\frac{1}{15}$ Mでは酸性から中性になるにつれて、染色される α 顆粒の数が減少している^{5, 6)}。また、MGG染色では、MG染色後のギムザ染色時間を長くすると、希釈液の種類に関わらず α 顆粒が消失する^{5, 6)}。したがって、イサキ α 顆粒の染色性は、ナイルティラピアよりもコイに類似していることになる。しかし、 α 顆粒の形態は、ナイルティラピアとコイのそれは円形から卵円形であるが^{6, 7)}、イサキでは桿状であった。

イサキの γ 顆粒はMG染色標本では観察されず、MGG染色標本では、pH 7では認められたが、pH 5および6の緩衝液では観察されなかった。一方、ナイルティラピアの γ 顆粒はpH 6および7の緩衝液を用いたMG染色で観察され、MGG染色ではpH 5では観察されず、pH 6およびpH 7において認められている⁷⁾。また、コイ γ 顆粒はイサキと同様に、MG染色では染まらず、pH 5の緩衝液を用いた

MGG染色でも観察されないが、pH 6 および pH 7 においては認められる⁶⁾。したがって、イサキの γ 顆粒のMG染色性は、コイと類似しているが、MGG染色性はナイルティラピアやコイとは異なっている。

ナイルティラピアの γ 顆粒と δ 顆粒はともに好塩基性であり、pH 5 のMGG染色では観察されないが⁷⁾、 δ 顆粒はいずれの希釈液を用いたMG染色においても観察されるのに対して、 γ 顆粒はpH 5 の緩衝液を用いたMG染色や、 $\frac{1}{5}$ MのpH5および6では染色されない⁷⁾。さらに、 γ 顆粒は円形から卵円形であるが、 δ 顆粒は不定形である⁷⁾。これらの形態と染色性の違いから、両顆粒はおのおの異なる顆粒と考えられている⁷⁾。イサキの場合も、 γ 顆粒は円形から卵円形であるのに対して、 δ 顆粒は不定形であった。また、 γ 顆粒はpH 7 の緩衝液を用いたMGG染色においてのみ認められたが、 δ 顆粒はいずれの染色条件でも観察された。したがって、イサキ好中球の γ 顆粒と δ 顆粒は、ナイルティラピアの場合と同様に、おのおの異なる顆粒であると考えられる。また、イサキとナイルティラピアの δ 顆粒は、いずれの染色条件においても観察され、不定形を示すことから、両魚種間には差がないと考えられる。

イサキはイサキ科に、ナイルティラピアはカワスズメ科に属し、ともに4種類の顆粒が観察されたことから、スズキ目魚類の好中球は基本的には4種類の顆粒を有すると推察される。しかし、両魚種間で、 α 顆粒と γ 顆粒の染色性に違いが見られた。このことから、顆粒内容物の物理化学的特性が両魚種間で異なることは明らかである。イサキは海産魚であるのに対して、ナイルティラピアは、耐塩性は高いものの、基本的には淡水魚である。したがって、生息環境の違いが、顆粒成分の性状に影響を及ぼしているのではないかと思われる。また、科が分岐した際に顆粒成分の性状が変化した可能性も考えられる。今後、さらに多くの魚種について調べることによって、魚類好中球の生息環境による差異および系統進化が明らかになると考えている。

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池田 至博士に感謝いたします。

文 献

- 1) N. Borregaard and J. B. Cowland : Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89, 3503-3521 (1997).
- 2) A. E. Ellis : The leucocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.*, 11, 453-491 (1977).
- 3) P. M. Hine : The granulocytes of fish. *Fish & Shellfish Immunol.*, 2, 79-98 (1992).
- 4) A. J. Ainsworth : Fish granulocytes: morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 123-148 (1992).
- 5) 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. 水大研報, 50 (3), 109-117 (2002).
- 6) 近藤昌和・安本信哉・高橋幸則：コイ好中球のアズール顆粒. 水大研報, 51 (1), 17-29 (2002).
- 7) 安本信哉・近藤昌和・高橋幸則：テラピア好中球のメイグリュンワルド・ギムザ染色性. 水大研報, 51 (3), 79-85 (2003).
- 8) J. S. Nelson : Order Cypriniforms, in *Fishes of the world*, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York, 1994, 130-145.
- 9) J. S. Nelson : Order Perciformes, in *Fishes of the world*, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York, 1994, 329-435.
- 10) 谷内 透：魚類の進化. 東京大学公開講座47進化, 東京大学出版会, 東京, 1988, pp.155-191.