

メジナ的好中球顆粒

近藤昌和*・金丸俊介・高橋幸則

Granules of Neutrophil in Rudderfish, *Girella punctata*

Masakazu Kondo*, Shunsuke Kanamaru and Yukinori Takahashi

Morphology of neutrophil (phagocytic granulocyte) in the rudderfish, *Girella punctata* was examined by light microscopy. Granules of the neutrophil were classified into two types; chromophobic (neutrophilic) granule (β G) and amorphous basophilic granule (δ G) based on the May-Grünwald (MG), Giemsa and MG · Giemsa (MGG) staining properties. Eosinophilic granule (α G) and azurophilic (basophilic) granule (γ G) were not observed in the neutrophil. The β G was round to oval (0.5~1.1 μ m in diameter) and many in a cell. The δ G was basophilic and irregular in shape (rod, comma, crescent, ring), and observed in many neutrophils (80~90%). The staining of this granule was weak in MGG and MG using acid buffer (pH5.0). The number of δ G in the hemopoietic tissue (head kidney) neutrophil was lower than in blood neutrophil.

1 緒言

魚類的好中球は、哺乳類と同様に、非特異的防御機構を担うと考えられている¹⁻³⁾。ヒト的好中球には、4種類の顆粒(アズール顆粒, 特殊顆粒, ゼラチナーゼ顆粒および分泌小胞)が存在する^{4,5)}。一方、魚類好中球の顆粒種数についての報告は少ない。

著者らは、これまでに、コイ *Cyprinus carpio*, ナイルティラピア *Orthochromis niloticus* およびイサキ *Parapristipoma trilineatum* の好中球顆粒を Romanowsky 染色性の違いから分類した⁶⁻⁹⁾。その結果、コイの好中球顆粒はエオシン好性顆粒 (eosinophilic granule, α 顆粒), 難染性顆粒 (chromophobic granule, β 顆粒) およびアズール好性顆粒 (azurophilic granule, γ 顆粒) の3種類に識別されること^{6,7)}、ナイルティラピアではそれら3種類の顆粒の他に、粗大で不定形的好塩基性顆粒 (amorphous basophilic granule, δ 顆粒) が認められること⁸⁾を明らかにした。また、イサキにもナイルティラピアと同様に4種類の顆粒が存在するが、 α 顆粒の形態は、ナイルティラピアでは円形から卵円形であるのに対して、イサキでは桿形であるこ

とを報告した⁹⁾。ナイルティラピアとイサキは、同じスズキ目の魚種であるが、それぞれカワスズメ科、イサキ科と異なる科に属し、ともにコイ目よりも進化した魚類である。したがって、好中球顆粒の種数がコイよりもスズキ目魚類に多いことは、好中球の進化を表していると推察される⁹⁾。また、ナイルティラピアとイサキの間における α 顆粒の形態の違いは、科の水準での違いであると考えられる⁹⁾。

スズキ目魚類は11,000種以上存在し、脊椎動物の中でも最大のグループである¹⁰⁾。したがって、スズキ目魚類には現在までに調べられているナイルティラピアやイサキとは異なる好中球顆粒種組成を有する魚種の存在が考えられる。

本研究では、魚類好中球顆粒の多様性を明らかにする研究の一環として、スズキ目メジナ科のメジナ *Girella punctata* における好中球顆粒の種類について調べた。

2 材料および方法

2.1 実験動物

実験には平均体重650gのメジナを用いた。メジナ30尾を

2003年8月21日受付. Received August. 21. 2003.

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).

1000l 容水槽に搬入し、流水条件下で1ヵ月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 17 ± 1 ℃とし、市販の配合飼料（マリン6号、林兼産業）を1日1回体重の約2%量給餌した。メジナの尾部血管から前報⁶⁾にしたがって採血し、引きガラス法で血液塗抹標本を作製して各種染色を施した。

2.2 染色

メイ-グリーンワルド (MG)、ギムザおよびMG・ギムザ (MGG) の各染色法は、前報⁹⁾に準じた。MG染色の希釈液には蒸留水 (pH5.2)⁹⁾、または KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 の組み合わせからなるリン酸緩衝液 (5 mMおよび $1/15$ M, pH5.0, 6.0, 7.0および8.0) を用いた。ギムザ染色液の調整には蒸留水、または蒸留水で10倍希釈した各リン酸緩衝液を用いて、1:20または1:100の割合に調整したギムザ染色液により、15および60分間染色した。

2.3 頭腎のスタンプ標本

尾部から十分脱血したメジナから頭腎を摘出し、メスを用いて2分割し、その切断面をスライドガラスに押し当ててスタンプ標本とした。風乾後、蒸留水を用いたMG染色を施した。

2.4 好中球の貪食能

好中球の貪食能の有無を明らかにするために、メジナの尾部血管からインク (Fount India, Perikan) を注入した。インク原液9容に9%NaCl液1容を混合し、その1 mlを麻酔を施したメジナに注入したのち水槽に戻した。24時間後に採血して前述と同様に血液塗抹標本を作製し、蒸留水

を用いたMGG染色を施した。なお、ギムザ染色液の希釈は1:100、染色時間は15分間とした。

3 結果

メジナの好中球は円形または卵円形であった (長径9~14 μm)。核は細胞の中央またはやや偏在しており、円形、卵円形、楕円形のほか、ソラマメ型のもも認められたが、分葉核は観察されなかった。メジナ好中球はインク粒子を貪食した (Fig. 1)。好中球顆粒は、難染色性顆粒 (β 顆粒) と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⁶⁻⁹⁾にしたがった。

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0.5~1.1 μm)。蒸留水を用いたMG染色では、多数の顆粒が観察された (Fig. 2 a)。また、各緩衝液を用いたMG染色では、いずれの濃度においても、pH6.0およびpH7.0の場合に多数の顆粒が観察された (Fig. 2 b)。しかし、pH5.0の緩衝液では細胞質全体が淡橙色に染まり、顆粒の観察が困難であった (Fig. 2 c)。

MGG染色では、MG染色の場合と同様に、pH5.0の緩衝液では本顆粒の観察が困難であった。他の希釈液を用いた場合には、ギムザ染色液の濃度およびギムザ染色時間に関わらず本顆粒が観察された (Fig. 2 d)。

蒸留水を用いたギムザ染色では、ギムザ染色液の濃度およびギムザ染色時間に関わらず、本顆粒が観察された (Fig. 2 e)。また、いずれの緩衝液を用いた場合にも、蒸留水と同様に本顆粒が観察されたが、特に、pH7.0の緩衝

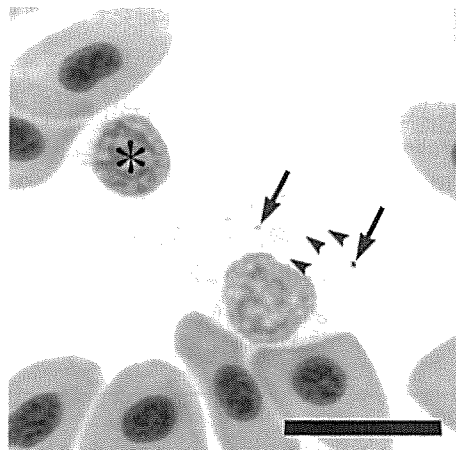


Fig. 1. Phagocytosis by rudderfish neutrophil. Note phagocytized colloidal carbon (arrows) and vacuoles (arrowheads). *, neutrophil showing non-phagocytosis. May-Grünwald · Giemsa stain using distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1:20. Giemsa stain was for 15 min. Bar=10 μm .

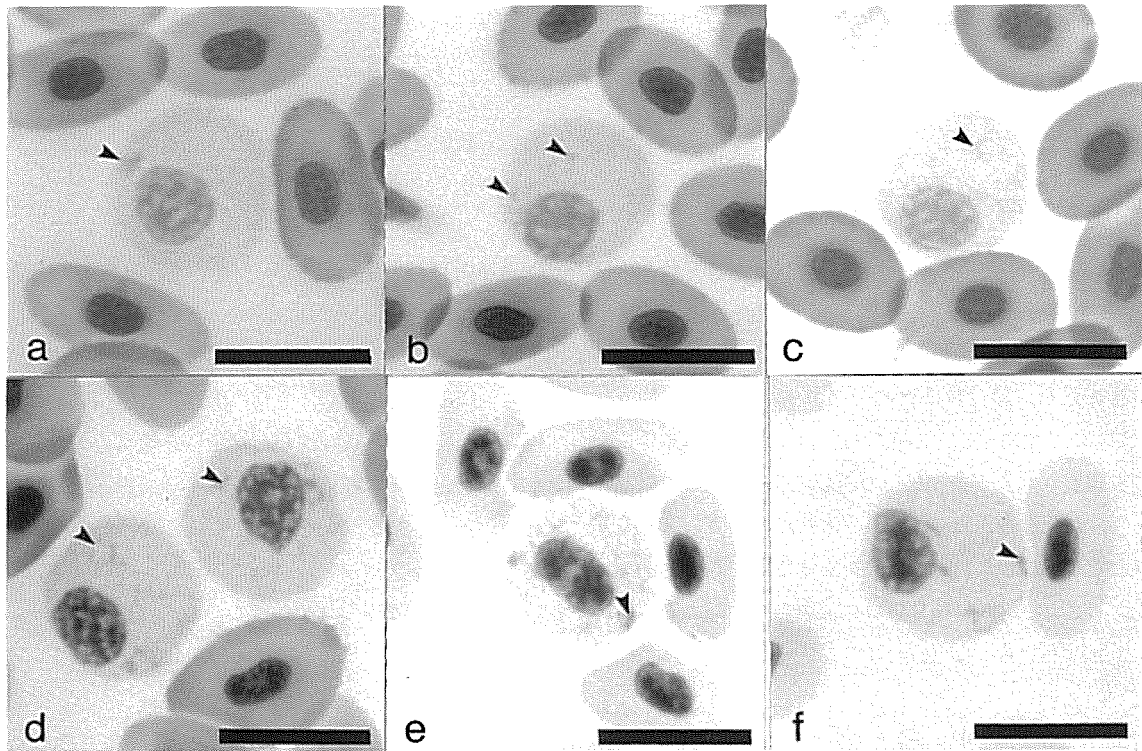


Fig. 2. Rudderfish neutrophils under various staining conditions. a, May-Grünwald stain using distilled water (pH5.2). b, May-Grünwald stain using phosphate buffer (5 mM, pH6.0). c, May-Grünwald · Giemsa stain using phosphate buffer ($\frac{1}{15}$ M, pH7.0). Giemsa solution was diluted in $\frac{1}{150}$ M phosphate buffer at a rate of 1:100. Giemsa stain was for 15 min. 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 15 min. e, Giemsa stain (15 min) using distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1:100. f, Giemsa stain (15 min) using phosphate buffer ($\frac{1}{15}$ M, pH7.0). Giemsa solution was diluted in $\frac{1}{150}$ M phosphate buffer at a rate of 1:100. Note β G (a, b, d, e, f) and δ G (arrowheads). It was difficult to observe β G on the MGG or MG preparation using acid (pH5.0) buffer (c). Bars=10 μ m.

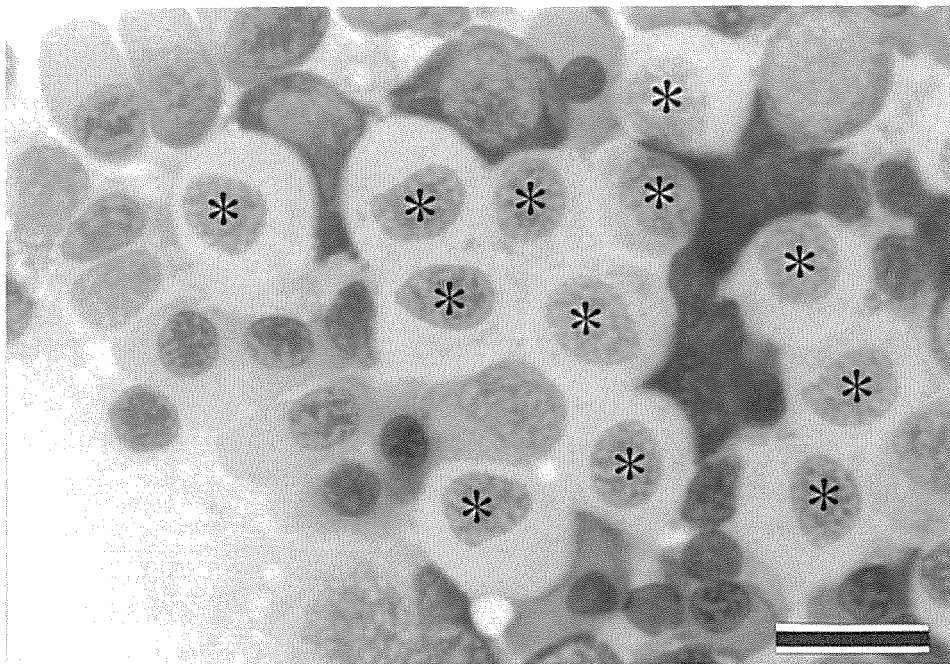


Fig. 3. Rudderfish neutrophils (*) in the hemopoietic tissue (head kidney). Touch preparation. May-Grünwald stain using distilled water. The number of δ G in one neutrophil is lower than in blood neutrophil. Bar=10 μ m.

液を使用した場合に、顆粒の観察が容易であった (Fig. 2 f)。

本顆粒は頭腎のスタンプ標本上でも多数観察された (Fig. 3)

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の多様な形態を有し、好塩基性を示した。また、大きさも様々であった。本顆粒は、80~90%の好中球に観察されたが、顆粒数はβ顆粒よりも少なく、1細胞あたり6個以下であった。本顆粒は、いずれの染色条件においても観察されたが、pH5.0の緩衝液を用いたMG染色では染色性が低かった (Fig. 2 c)。本顆粒は頭腎のスタンプ標本上でも観察されたが、顆粒を有する好中球は約60%であり、1細胞あたりの顆粒数は血液中の好中球よりも少なく、3個以下であった (Fig. 3)。

4 考 察

メジナの好中球は貪食能を有し、細胞質には難染色顆粒 (β顆粒) と不定形の好塩基性顆粒 (δ顆粒) の2種類の顆粒のみが観察された。β顆粒とδ顆粒はメジナと同じスズキ目に属するイサキとナイルティラピアの好中球にも観察されている^{8,9)}。しかし、イサキやナイルティラピアで認められるエオシン好性顆粒 (α顆粒) とアズール好性顆粒 (γ顆粒) はメジナでは観察されなかった。

イサキのα顆粒は1/16 Mの緩衝液では酸性領域で、5 mMの緩衝液では酸性から中性で染色され⁹⁾、ナイルティラピアのα顆粒はMG染色では、酸性領域で染色される⁸⁾。また、MGG染色の場合、イサキではいずれの緩衝液を用いても全く認められないが⁹⁾、ナイルティラピアではpH5.0の緩衝液を用いた場合に観察される⁸⁾。しかし、メジナでは、前述の各魚種で染色されたいずれの条件下においても、α顆粒が観察されなかったことから、メジナの好中球はα顆粒を持たないものと考えられる。

また、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、pH7.0で認められる⁹⁾。また、ナイルティラピアのγ顆粒は、pH6.0および7.0の緩衝液を用いたMG染色およびMGG染色で観察される⁸⁾。しかし、メジナでは、いずれの条件下においてもγ顆粒が観察されな

かった。

イサキと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るが、形態と染色性の違いから、おのおの異なる顆粒と考えられている^{8,9)}。メジナでは、δ顆粒は存在するものの、γ顆粒は認められなかった。このことは、ナイルティラピアとイサキで観察されたγ顆粒とδ顆粒は異なる顆粒であることを示唆しているものと考えられる。

中院¹¹⁾はメジナの血液塗抹標本を、ギムザ染色の代用液 (船橋氏液) で染色し、2種類の顆粒細胞 (エオジン嗜好性顆粒細胞と両色嗜好性顆粒細胞) を観察している。このうちの両色嗜好性顆粒細胞は、好中球に相当すると考えられている¹²⁾。中院¹¹⁾は両色嗜好性顆粒細胞に深赤紫色の円形および短棒状顆粒を観察しているが、本研究では、そのような顆粒は認められなかった。池田ら¹²⁾はメジナの血液塗抹標本のライシュマン・ギムザ染色像を示しているが、好中球顆粒については言及していない。しかし、彼らの示した血球像の中にも本研究で明らかにしたβ顆粒とδ顆粒が認められる。

メジナのδ顆粒は造血組織中の好中球よりも、血液中の好中球に多数観察された。このことは、δ顆粒は好中球の成熟にともなって産生されることを示唆している。

メジナ、イサキおよびナイルティラピアは、おのおのメジナ科、イサキ科およびカワスズメ科に属し、ともにスズキ目魚類である。前報⁹⁾において、イサキとナイルティラピアが4種類の顆粒を有すことから、スズキ目魚類の好中球は基本的に4種類の顆粒を有するのではないかと推察した。また、イサキとナイルティラピアの間で、α顆粒とγ顆粒の染色性に違いが見られた理由として、生息環境に適應した生理条件の違いによる可能性と、科が分岐した際に顆粒成分が変化した可能性を指摘した。しかし、本研究の結果から、スズキ目魚類の好中球顆粒の種類数は必ずしも4種類だけではなく、2種類の場合もあることが明らかとなった。また、メジナはイサキと同様に海産魚であることから、顆粒の染色性の違いや顆粒の種数の違いは、単なる生息環境に適應した生理条件の違いによるものではなく、科や種に分岐、すなわち、系統進化と関連した方向性のあるものであると考えられる。

最近、著者ら⁸⁾はスズキ目アジ科のブリ *Seriola quinqueradiata*、同目タイ科のマダイ *Pagrus major*、フグ目フグ科の

※ 近藤昌和・坂口隆亮・安本信哉・高橋幸則：真骨魚類の系統と好中球の形態。平成15年度日本水産学会中国・四国支部大会研究発表プログラム、2。

トラフグ *Takifugu rubripes* およびカレイ目ヒラメ科のヒラメ *Paralichthys olivaceus* について、好中球顆粒の染色性と顆粒種数について報告した。すなわち、ブリではイサキと同様に、紡錘形の α 顆粒を含む 4 種類の顆粒が認められるのに対して、マダイでは γ 顆粒は認められず、大きさと染色性の異なる 3 種類の α 顆粒と、 β 顆粒および δ 顆粒が観察される。また、スズキ目から派生したトラフグとヒラメにも β 顆粒と δ 顆粒は認められるが、両魚種ともに γ 顆粒は存在せず、トラフグには α 顆粒が見られるのに対して、ヒラメには本顆粒は観察されない。

メジナには β および δ 顆粒のみが観察されたが、このことは、ヒラメにも当てはまり、ヒラメがスズキ目から派生したのであれば、メジナとヒラメ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。

以上のブリ、マダイ、トラフグおよびヒラメと、既報のコイ^{6,7)}、ナイルティラピア⁸⁾、イサキ⁹⁾ならびに本研究報告のメジナの各魚種の好中球顆粒の多様性から、魚類の好中球顆粒の進化に関して以下の仮説を提案する。

魚類の好中球顆粒は、コイ目魚類（コイ）の出現時にはすでに 3 種類（ α 、 β および γ 顆粒）であり、この形質は、スズキ目魚類の一部（ナイルティラピア、イサキ、ブリ）にも受け継がれたが、スズキ目魚類ではさらに、 δ 顆粒を獲得した。ついで、スズキ目魚類の中に γ 顆粒を失った種（未知種 A）が出現し、これからフグ目魚類（トラフグ）が派生した。また、未知種 A からは α 顆粒が細分化されたグループ（マダイ）と同顆粒を消失したグループ（メジナ）が現れ、後者からはカレイ目魚類（ヒラメ）が派生した。

今後、他の多くの魚類について調べ、魚類における好中球の機能的分化や進化を明らかにできればと考えている。

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教授 山元憲一博士に感謝いたします。

文 献

- 1) A. E. Ellis : The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.* 11, 453-491 (1977).
- 2) P. M. Hine : The granulocytes of fish. *Fish & Shellfish Immunol.* 2, 79-98 (1992).
- 3) A. J. Ainsworth : Fish granulocytes: morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 123-148 (1992).
- 4) N. Borregaard, L. Kjeldsen, K. Lollike and H. Sengelev : Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin. Exp. Immunol.* 101, 6-9 (1995).
- 5) N. Borregaard and J. B. Cowland : Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89, 3503-3521 (1997).
- 6) 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).
- 7) 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 (2003).
- 8) 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. 水大研報, 51(3), 79-86 (2003).
- 9) 近藤昌和・安本信哉・高橋幸則 : イサキ好中球の顆粒. 水大研報, 52(1), 45-48 (2004).
- 10) A. C. Gill and R. D. Mooi: Phylogeny and systematics 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.
- 11) 中院孝圓 : 魚類ノ血球ニ就キテ. 京都医学雑誌, 17(2), 115-154 (1919).
- 12) 池田弥生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎 : メジナ. 魚類血液図鑑, 緑書房, 東京, 1986, pp. 68-69.