

コイ好中球のアズール顆粒

近藤昌和*・安本信哉・高橋幸則

Azurophilic granule of Carp Neutrophil

Masakazu Kondo*, Shinya Yasumoto, and Yukinori Takahashi

May-Grünwald Giemsa and Giemsa staining properties of cytoplasmic granules in carp neutrophils were reexamined in this study. Three types of granules; eosinophilic granule (α G), chromophobic granule (β G) and azurophilic (basophilic) granule (γ G) were observed in a single neutrophil. The α G was small ($<0.3\mu\text{m}$ in diameter) and round in shape. The staining pattern of α G was influenced by pH, constituent and concentration of diluent of the staining solution. To estimate the staining condition on α G, five neutrophil types were categorized as follows: type 0, no α G in the cell; type I, α G occupied less than 10% of whole cytoplasm; type II, in 10~40%; type III, in 40~80%; type IV, more than 80%. Eosinophil of α G was disappeared by long-time Giemsa stain after May-Grünwald. The β G was round to oval and was larger ($0.5\mu\text{m}$ in diameter) than α G. The γ G was round to oval, smaller ($<0.4\mu\text{m}$ in diameter) than β G. To estimate the staining condition on γ G, three neutrophil types were classified into as following types as follows: type a, no γ G in the cell; type b, γ G occurred 50% of the whole cytoplasm; type c, in more than 50%. The γ G were observed in Giemsa staining preparation, but not in May-Grünwald. However, this granule type appeared by long-time Giemsa stain after May-Grünwald.

1 緒言

血球の分類はRomanowsky型染色性の違いが基本となっている。本染色の代表として、現在、顆粒などの細胞質をメイ-グリュンワルド (MG) 染色で、核をギムザ染色で染め分けするメイ-グリュンワルド・ギムザ (MGG) 染色が一般に用いられている。

我々は前報¹⁾で、コイ好中球にMGG染色性の異なる2種類の顆粒、すなわちエオシン好性顆粒と難染色性顆粒が存在し、前者の染色性が、染色液の調整に用いる希釈液のpH、組成および濃度に影響されることを明らかにした。前報¹⁾では、メイ-グリュンワルド原液による固定時間を

5分間、希釈液を加えたのちのメイ-グリュンワルド染色時間を10分間、その後のギムザ染色時間を、15分間として染色性の違いを検討した¹⁾。本研究では、MGG染色の各段階の時間を変えた場合の、好中球顆粒の染色性を調べたので報告する。

2 材料および方法

実験動物

実験には前報¹⁾と同様に、水産大学校小野臨湖実験実習場(宇部市)から搬入した平均体重130gのコイを用いた。MS-222 (m-アミノ安息香酸エチルメタンサルホナート、ナカライテスク、0.1g/l) またはキナルジン(和光純薬、

2002年5月22日受付. Received May. 22. 2002.

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

*別刷り請求先(Corresponding author).

20ppm)で麻酔(3分間以内)後、尾柄部血管から注射器を用いて採血し、塗抹標本作製した¹⁾。

メイ-グリュンワルド・ギムザ(MGG)染色

塗抹標本上にメイ-グリュンワルド原液(シグマ)を、固定を兼ねて1.5ml載せて静置した。これに同量の希釈液を滴下・混合してメイ-グリュンワルド染色を行った。次いで、ギムザ染色液で標本を洗浄したのち、同液を標本上に満載してギムザ染色した。ギムザ染色液は原液(メルク)を蒸留水(pH5.2)¹⁾または蒸留水で10倍希釈した各種リン酸緩衝液に滴下・混合したものである。室温(約25℃)で染色後、蒸留水で水洗し、風乾したのち合成封入剤(オイキット)で封入して光学顕微鏡で観察した。

メイ-グリュンワルド原液による固定時の好中球の染色性

メイ-グリュンワルド原液を塗抹標本上に載せ、1、3、5または10分間放置し、蒸留水で洗浄して風乾した。

メイ-グリュンワルド(MG)染色時間が好中球の染色性に及ぼす影響

塗抹標本上にメイ-グリュンワルド原液を載せ、1、3、5または10分間放置した。次いで、蒸留水を滴下・混和して3、5、10または20分間染色し、それぞれの時間の組み合わせによる16通りの染色時間の影響を調べた。

好中球のメイ-グリュンワルド(MG)染色性に及ぼす希釈液の影響

希釈液に蒸留水または KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 の組み合わせからなるリン酸緩衝液(5mMおよび $1/15$ M、pH5、6および7)を用いてMG染色を行った。メイ-グリュンワルド原液を載せて5分間放置したのち、各種希釈液を滴下・混和して10分間染色し、7種類の希釈液の影響を調べた。

ギムザ染色時間が好中球のMGG染色性に及ぼす影響

MGG染色におけるギムザ染色を5、10、15、30または60分間の5通り行い、染色時間が好中球のMGG染色性に及ぼす影響を調べた。なお、希釈液には蒸留水を用いた。

希釈液が好中球のMGG染色性に及ぼす影響

ギムザ染色時間を15または60分間とし、各種希釈液を用

いて14通りのMGG染色を行った。

ギムザ染色液の濃度が好中球のMGG染色性に及ぼす影響

ギムザ原液と各種希釈液の混合比を1:10、1:20、1:50または1:100とし、ギムザ染色時間を15分間としたMGG染色を行った(28通り)。また、ギムザ染色時間を60分間とし、ギムザ原液と各種希釈液との混合比を1:100としたMGG染色も行った(7通り)。

メタノール固定が好中球のMGG染色性に及ぼす影響

無水メタノールに5分間浸漬固定した塗抹標本を30分間風乾した。これに蒸留水を用いてMGG染色を施した。なお、ギムザ染色時間は15または60分間とした。

ギムザ染色

血液塗抹標本を無水メタノール固定(5分間)し、風乾した。これにギムザ染色を60分間行った。ギムザ原液と各種希釈液の混合比は1:10、1:20、1:50または1:100とし、28通りの試験を行った。

好中球の型式

光学顕微鏡(Optiphot-2, Nikon)で、100倍の対物レンズ(Plan Apo, Nikon)を用いて各標本につき100個以上の好中球を観察し、各型の占める割合を求めた。エオシン好性顆粒(以後、 α 顆粒と称す)の分布領域の違いに基づく好中球の型は近藤ら¹⁾にしたがった。すなわち、 α 顆粒が全く観察されない好中球を0型、細胞質の10%以下に見られるものをI型、10~40%に見られるものをII型、40~80%をIII型、80%以上をIV型とした。また、アズール好性顆粒(以後、 γ 顆粒と称する)の分布領域の違いに基づく好中球の型は以下のように設定した。 γ 顆粒が全く観察されない好中球をa型、細胞質の50%未満に認められるものをb型、50%以上をc型とした。

3 結果

麻酔したコイ血液中の好中球の染色性は未麻酔のコイのものと同じであった。

メイ-グリュンワルド原液を塗抹標本上に載せ、1、3、5および10分間放置して固定したところ、いずれの条件でも、好中球の核、細胞質ともに染色性が弱く、詳細な観察

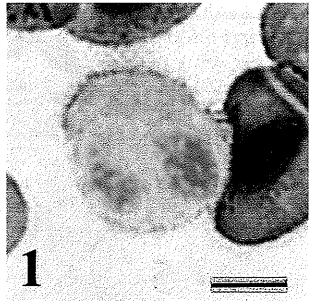


Fig. 1. A carp neutrophil stained with May-Grünwald concentrated solution, serving both as (double as) fixation. After the staining for 1 min, the sample was washed in distilled water. Bar=5 μ m.

は出来なかった (Fig. 1)。メイ-グリュンワルド原液で固定後、同量の希釈液を滴下・混合してメイ-グリュンワルド染色を施した場合、好中球には好酸性顆粒 (α 顆粒) と難染色性顆粒 (好中性顆粒、 β 顆粒) が観察された。また、メイ-グリュンワルド・ギムザ染色では染色条件によっては好中球に3種類の顆粒、すなわち α 顆粒、 β 顆粒および好塩基性顆粒 (アズール顆粒、 γ 顆粒) が認められた。しかし、 α 顆粒と γ 顆粒の最適染色条件が異なるために、同一標本上で両顆粒の全てを染め出すことはできなかった。一方、ギムザ染色のみを施した標本では、 β 顆粒と γ 顆粒が観察されたが、 α 顆粒は染色されなかった。なお、メタノール固定は各種顆粒の染色性に影響しなかった。以下に各顆粒の染色特性を示した。

α 顆粒

本顆粒は好酸性で円形小型である (直径0.3 μ m以下)。蒸留水を希釈液として用いたMG染色では、メイ-グリュンワルド原液による固定時間は好中球の型式に影響しなかった (Fig. 26)。しかし、蒸留水と混和したのちの染色時間が長いほど、多くの α 顆粒が染色され、10および20分間染色したものは90%以上がIV型を示した (Fig. 26)。また、 α 顆粒の色調は多くの実験区でオレンジ色であったが、メイ-グリュンワルド原液による固定を10分間行い、次いで10あるいは20分間染色した場合は、 α 顆粒は濃赤色を呈した (Fig. 2)。

メイ-グリュンワルド原液による固定を5分間行い、次いで各種希釈液を混和して10分間MG染色したところ、蒸留水の場合と同様に、5 mMのリン酸緩衝液 (pH 5 および 6) では90%以上の好中球がIV型を示した (Fig. 27)。しかし、 α 顆粒の色調は蒸留水ではオレンジ色であったの

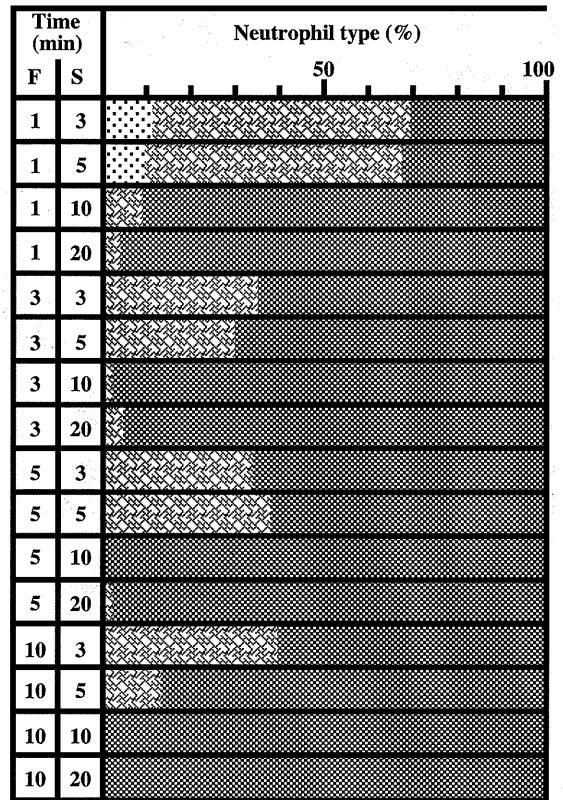
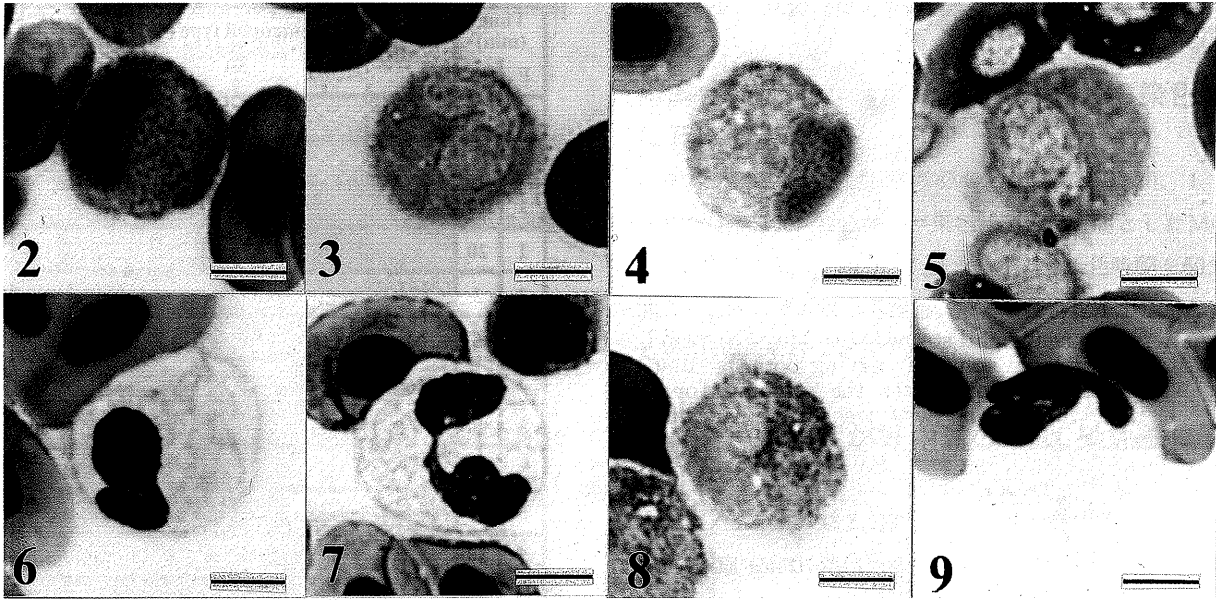


Fig. 26. Effects of fixation- and stain-times on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of α -granule after staining with May-Grünwald. F, fixation; S, stain. Fixation was conducted in May-Grünwald solution. Diluent for May-Grünwald stain was distilled water (pH5.2). , type 0; , type I; , type II; , type III; , type IV.

に対して緩衝液では濃赤色を呈した (Fig. 8)。一方、pH 7の場合、IV型の好中球は約80%であり (Fig. 27)、淡赤色で明瞭な α 顆粒が観察された (Fig. 4)。 $1/15$ Mのリン酸緩衝液 (pH 5 および 6) では α 顆粒の色調は濃赤色を呈したが (Fig. 3)、pH 5 ではIV型の好中球が90%以上であったが、pH 6 ではIII型が約60%を、IV型が約40%を占めていた (Fig. 27)。一方、pH 7の場合、5 mMのリン酸緩衝液と同様に α 顆粒は淡赤色を呈したが、顆粒の輪郭は不明瞭であり (Fig. 5)、IV型の好中球は認められなかった (Fig. 27)。

希釈液に蒸留水を用い、ギムザ染色時間を変えてMGG染色を行ったところ、5、10および15分間の間に差は認められず、いずれも約90%の好中球がIV型であった (Fig. 28)。しかし、30分間ギムザ染色を行うと、IIIおよびIV型の好中球は観察されず、I型が約50%、II型が約40%となり、0型も10%観察された。さらに、ギムザ染色を60分間



Figs. 2 to 25 Carp neutrophils under various staining conditions. Bars=5 μ m.

Fig. 2. May-Grünwald stain. After staining for 10 min by May-Grünwald concentrated solution, doubling as fixation, the sample was stained again by May-Grünwald diluted solution in distilled water (pH5.2) for 20 min. Note many dark red granules (α G, typeIV).

Fig. 3. May-Grünwald stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH5.0) for 10 min. Note many red granules (α G, typeIV).

Fig. 4. May-Grünwald stain. 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 (5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10 min. Note many faint red granules (α G, typeIV).

Fig. 5. May-Grünwald stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10min. Note faint red granules (α G, typeIV).

Fig. 6. May-Grünwald Giemsa stain. After staining for 5 min by May-Grünwald concentrated solution, doubling as fixation, the sample was stained again by May-Grünwald diluted solution in distilled water (pH5.2) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in distilled water (pH5.2) at a rate of 1 : 20. Eosinophilic granule (α G) was not stained. Note many chromophobic granules (β G) and azurophilic granule (γ G, type c).

Fig. 7. May-Grünwald Giemsa stain. 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 (5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer (0.5 mM) at a rate of 1 : 20. Eosinophilic granule (α G) was not stained. Note many azurophilic granule (γ G, type c).

Fig. 8. May-Grünwald stain (10 min). 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 (5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH5.0) for 10 min. Type IV neutrophil. Note many dark red granules (α G, typeIV).

Fig. 9. May-Grünwald Giemsa stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH6.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M) at a rate of 1 : 10. Eosinophilic granule (α G) was not stained (type 0).

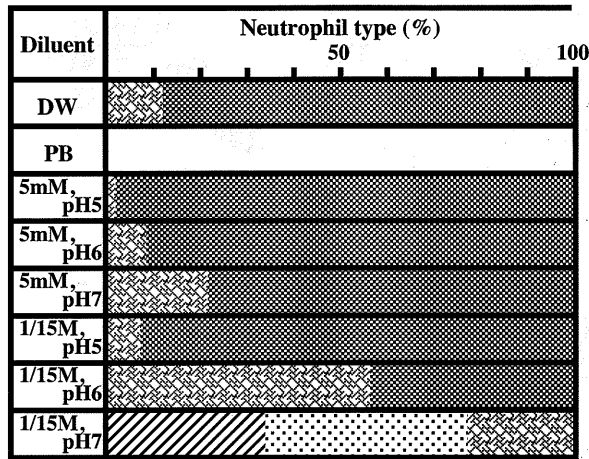


Fig. 27. Effects of diluent on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of α -granule after staining with May-Grünwald. DW, distilled water (pH5.2); PB, phosphate buffer (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4). Fixation and stain were conducted for 5 and 10 min, individually. \equiv , type 0; \diagup , type I; \square , type II; \otimes , type III; \blacksquare , type IV.

行った場合、全ての好中球が0型を呈した (Fig. 6, 28)。

ギムザ染色時間を15または60分間に設定し、各種希釈液を用いてMGG染色を行ったところ、15分間では、pH 5の緩衝液 (5 mMおよび $1/15\text{M}$) の場合、蒸留水と同様に α 顆粒はオレンジ色を呈し、IV型の好中球が90%以上を占めていた (Fig. 29)。pH 6の場合、5 mMの緩衝液ではIV型の好中球が約70%を占めていたが、 $1/15\text{M}$ ではIV型の好中球はわずか5%未満であった (Fig. 29)。また、pH 7では、5 mMの緩衝液を用いた場合、0型の好中球が約60%を、I型が約40%を占めており、 $1/15\text{M}$ では90%以上の好中球が0型であった (Fig. 29)。ギムザ染色を60分間行った場合、いずれの希釈液を用いても好中球は全て0型を示した。

ギムザ原液と希釈液の混合比を変え、ギムザ染色時間を15分間としたMGG染色では、混合比1:10の場合、いずれの好中球にも α 顆粒は観察されなかった (Fig. 9, 30a)。混合比1:20の場合には、蒸留水ではIV型の好中球が約90%を、pH 5の緩衝液では95%以上を占めた (Fig. 30b)。pH 6の場合には、5 mMの緩衝液ではII型とIII型の好中球が約80%を、 $1/15\text{M}$ ではI、IIおよびIII型がそれぞれ約30%を占めていた。また、pH 7ではいずれの緩衝液を用いてもIIIおよびIV型は認められず、5 mMの緩衝液で、0型とI型がそれぞれ約50%を占めていたが、 $1/15\text{M}$ ではほとんどの好中球が0型を示した (Fig. 30b)。混合比1:50および1:100の場合には、pH. 5では、いずれの緩衝

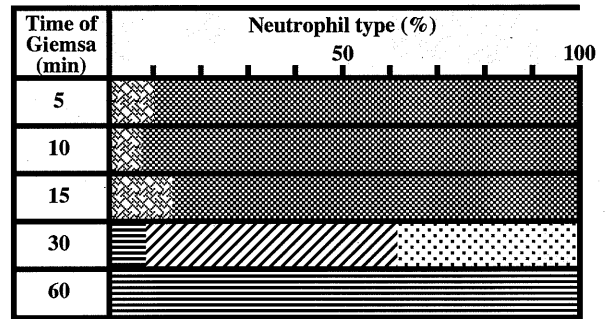


Fig. 28. Effects of Giemsa stain on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of α -granule after staining with May-Grünwald Giemsa. Diluent was distilled water. Fixation and stain with May-Grünwald were conducted for 5 and 10 min, individually. Giemsa was diluted (1:20) with distilled water. \equiv , type 0; \diagup , type I; \square , type II; \otimes , type III; \blacksquare , type IV.

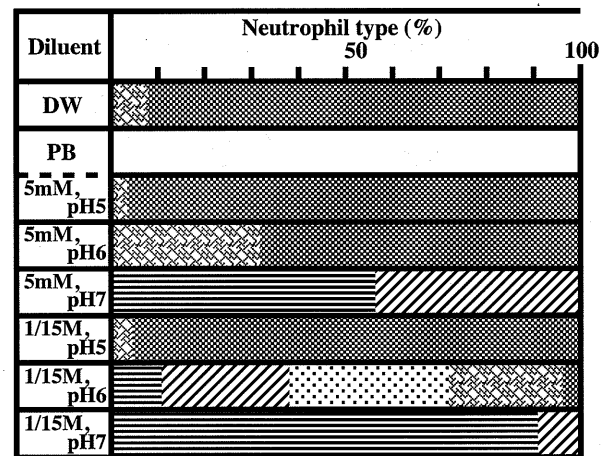


Fig. 29. Effects of diluent on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of α -granule after staining with May-Grünwald Giemsa. DW, distilled water (pH5.2); PB, phosphate buffer (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4). Fixation and stain with May-Grünwald and stain with Giemsa were conducted for 5, 10 and 15 min, individually. Giemsa was diluted (1:20) with each diluents which diluted ($\times 10$) with distilled water. \equiv , type 0; \diagup , type I; \square , type II; \otimes , type III; \blacksquare , type IV.

液も蒸留水と同様に、90%以上の好中球がIV型を示した (Fig. 30c, d)。しかし、1:50の場合には α 顆粒はオレンジ色を呈したが (Fig. 10)、1:100の場合には α 顆粒は濃赤色であった (Fig. 12)。pH 6の緩衝液では1:50の混合比の場合には、II型またはIII型の好中球が90%以上を占め、IV型の好中球は観察されなかった (Fig. 30c)。しかし、1:100の混合比では5 mMの緩衝液の場合、好中球の約80%がIV型であり、III型は約20%となり、II型は観察されなかった (Fig. 30d)。一方、 $1/15\text{M}$ の緩衝液で

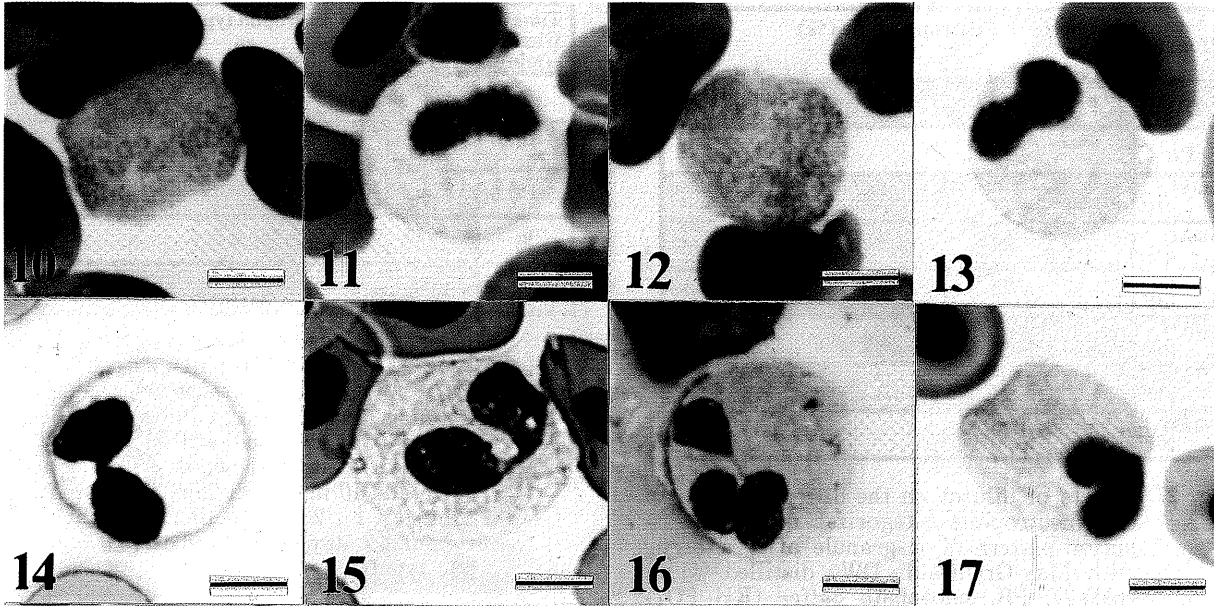


Fig. 10. May-Grünwald Giemsa stain. After staining for 5 min by May-Grünwald concentrated solution, doubling as fixation, the sample was stained again by May-Grünwald diluted solution in distilled water (pH5.2) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in distilled water at a rate of 1 : 50. Note many α G (type IV).

Fig. 11. May-Grünwald Giemsa stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M) at a rate of 1 : 50. Eosinophilic granule (α G) was not stained (type 0).

Fig. 12. May-Grünwald Giemsa stain. After staining for 5 min by May-Grünwald concentrated solution, doubling as fixation, the sample was stained again by May-Grünwald diluted solution in distilled water (pH5.2) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in distilled water at a rate of 1 : 100. Note many α G (type IV).

Fig. 13. May-Grünwald Giemsa stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M) at a rate of 1 : 100. Eosinophilic granule (α G) was not stained. Note the γ G (type c).

Fig. 14. Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH6.0) at a rate of 1 : 20. Eosinophilic granule (α G) was not stained (type 0).

Fig. 15. May-Grünwald Giemsa stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH6.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M) at a rate of 1 : 20. Eosinophilic granule (α G) was not stained. Note many chromophobic granules (β G) and azurophilic granules (γ G, type c).

Fig. 16. May-Grünwald Giemsa stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH5.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M) at a rate of 1 : 10. Chromophobic granules (β G) was not found due to eosinophilic granules (α G, faint red, type IV).

Fig. 17. May-Grünwald Giemsa stain. 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 (5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer (0.5 mM) at a rate of 1 : 100. Note α G (type III), β G and γ G (type b).

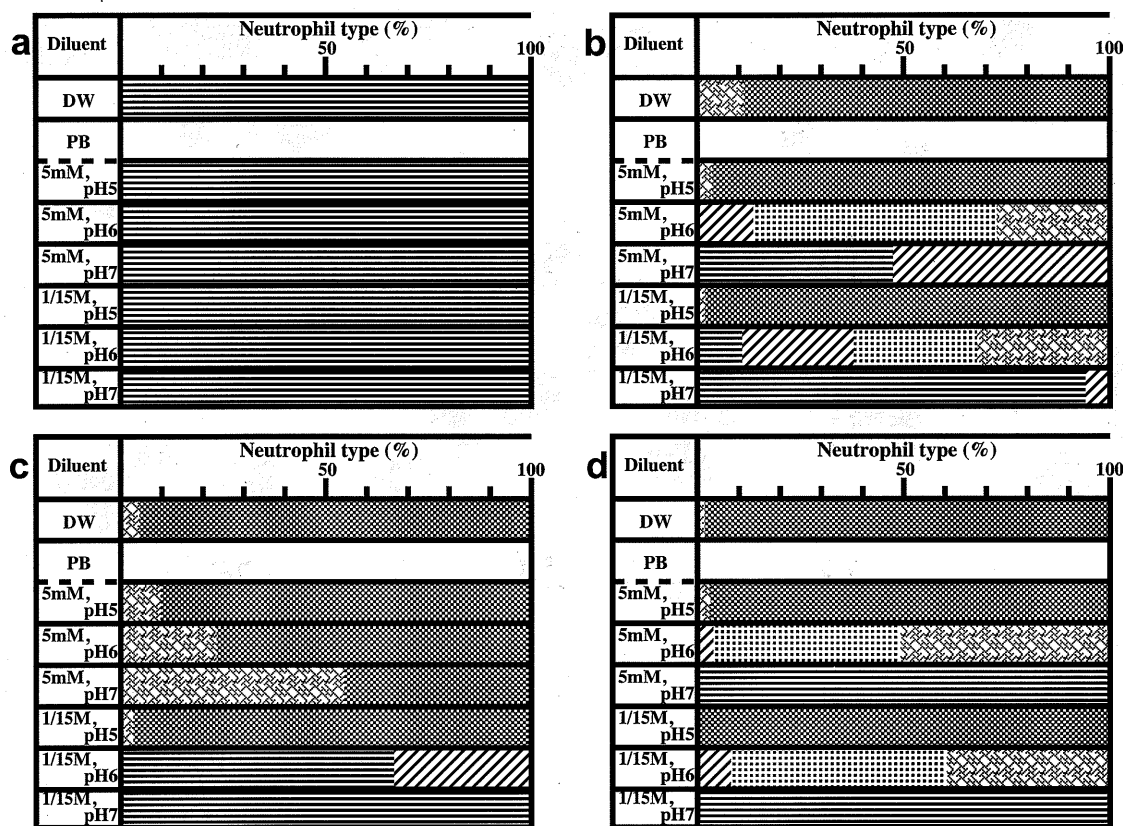


Fig. 30. Effects of diluent and dilution on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of α -granule after staining with May-Grünwald Giemsa. DW, distilled water (pH5.2); PB, phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$). Fixation and stain with May-Grünwald and stain with Giemsa were conducted for 5, 10 and 15 min, individually. Giemsa was diluted (a, 1:10; b, 1:20; c, 1:50; d, 1:100) with each diluents which diluted ($\times 10$) with distilled water. \equiv , type 0; \parallel , type I; \square , type II; \boxtimes , type III; \blacksquare , type IV.

はIII型およびIV型の好中球は認められず、0型が約70%を占めていた (Fig. 30d)。pH 7の緩衝液では1:50の混合比の場合、いずれの好中球も0型であった (Fig. 11, 30c)。同様に、 $1/15\text{M}$ の緩衝液を用いて1:100に混合した場合も全ての好中球が0型であった (Fig. 30d)。しかし、5 mMでは0型の好中球は観察されず、すべての好中球はIII型またはIV型を示した (Fig. 30d)。

ギムザ原液と各種希釈液の混合比を1:100とし、ギムザ染色を60分間行うMGG染色では、 $1/15\text{M}$ でpH 7の緩衝液を除いて α 顆粒が観察された (Fig. 31)。緩衝液のpHが5の場合、蒸留水と同様に好中球の90%以上がIV型を示した (Fig. 31)。しかし、pH 6では、5 mMの緩衝液の場合には、II型またはIII型を示す好中球が80%以上で、 $1/15\text{M}$ の緩衝液ではI型とII型の好中球が95%以上を占め、III型やIV型のは観察されなかった。5 mMの緩衝液の場合には、pH 6とpH 7の間に、顕著な好中球の型式の違いは認められなかった。しかし、 $1/15\text{M}$ の緩衝液ではpH 7で全ての好中球が0型を示し、 α 顆粒は観察されなかった

(Fig. 13, 31)。

各種希釈液を用いて塗抹標本にギムザ染色のみを60分間行ったところ、すべての好中球に α 顆粒は認められなかった (Fig. 14)。

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る (長径約 $0.5\mu\text{m}$)。蒸留水を希釈液として用いたMG染色では、蒸留水混合後の染色時間が3分間の場合、メイグリュンワルド原液による固定時間の長さにかかわらず β 顆粒が観察された。しかし、 α 顆粒の染色性も非常に弱いいため、両顆粒の厳密な区別は困難であった。メイグリュンワルド原液による固定を10分間、MG染色を10または20分間行った場合には、細胞質基質が赤色を呈し、多数の α 顆粒が濃赤色を示すために β 顆粒の観察はできなかった (Fig. 2)。以上の実験区以外では β 顆粒は見られたが、 α 顆粒がオレンジ色を呈し、多数の出現したために、 β の輪郭は不明瞭であった。

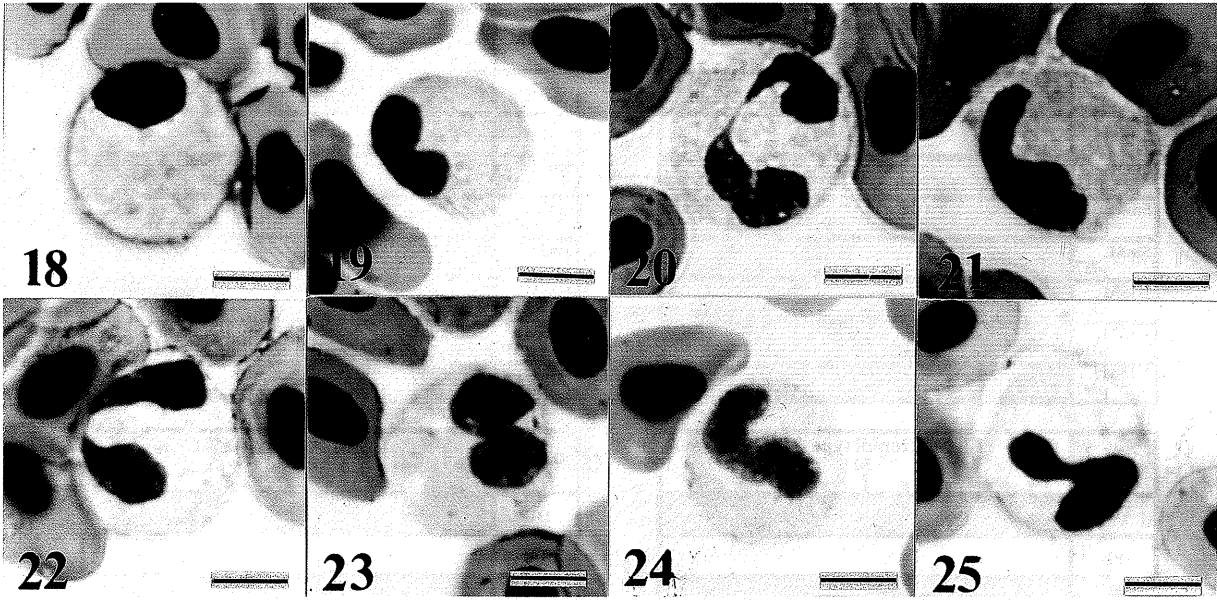


Fig. 18. Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer (0.5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH6.0) at a rate of 1 : 20. Eosinophilic granule (α G) was not stained (type 0). Note the β G.

Fig. 19. May-Grünwald Giemsa stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M) at a rate of 1 : 20. Note the γ G (type c).

Fig. 20. May-Grünwald Giemsa stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M) at a rate of 1 : 20. Note the γ G (type c).

Fig. 21. May-Grünwald Giemsa stain. 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 (5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH5.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer (0.5 mM) at a rate of 1 : 20. Note the γ G (type c).

Fig. 22. May-Grünwald Giemsa stain. 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 (5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer (0.5 mM) at a rate of 1 : 10. Note the γ G (type c).

Fig. 23. May-Grünwald Giemsa stain. 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 (5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH5.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer (0.5 mM) at a rate of 1 : 10. Note the faint γ G (type c).

Fig. 24. May-Grünwald Giemsa stain. 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 ($1/15$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) for 10 min. After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M) at a rate of 1 : 100. Note the γ G (type c).

Fig. 25. Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer (0.5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) at a rate of 1 : 20. Eosinophilic granule (α G) was not stained. Note the γ G (type c).

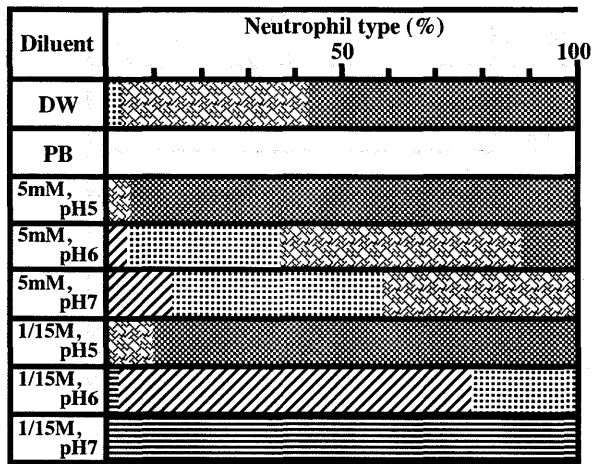


Fig. 31. Effects of diluent and dilution on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of α -granule after staining with May-Grünwald Giemsa. DW, distilled water (pH5.2); PB, phosphate buffer (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4). Fixation and stain with May-Grünwald and stain with Giemsa were conducted for 5, 10 and 60 min, individually. Giemsa was diluted (1:100) with each diluents which diluted ($\times 10$) with distilled water. \equiv , type 0; \diagdown , type I; \square , type II; \square (dotted), type III; \square (cross-hatch), type IV.

メイ-グリンワルド染色に用いる希釈液を変えたところ、pH 5 ではいずれの緩衝液を用いても、多数の α 顆粒のために β 顆粒の観察は困難であった。しかし、他の pH の緩衝液では、染色された α 顆粒が少ないため、 β 顆粒が確認された。しかし、 β 顆粒の輪郭は α 顆粒のために不明瞭であった。

ギムザ染色時間を変えて希釈液に蒸留水を用いた MGG 染色を行ったところ、すべての実験区で β 顆粒が観察された。15 分間以内のギムザ染色では多数の α 顆粒により、 β 顆粒の輪郭は不明瞭であった。しかし、30 または 60 分間ギムザ染色を施した場合には、 α 顆粒が染色されず、細胞質基質が淡青色に染まるため、 β 顆粒が明瞭に観察された。(Fig. 6)。

ギムザ染色時間を 15 または 60 分間に設定し、各種希釈液を用いて MGG 染色を行ったところ、15 分間では、pH 5 の緩衝液 (5 mM および $1/15\text{M}$) の場合、多数の α 顆粒が存在し、また、細胞質基質が淡赤色を示すために、 β 顆粒の識別は困難であった。その他の実験区では、 α 顆粒と分布を異にしている所の β 顆粒は明瞭に観察された。ギムザ染色を 60 分間行った場合には、いずれの希釈液を用いても α 顆粒は全く染色されず、したがって、 β 顆粒の観察は容易であった (Fig. 15)。

ギムザ原液と希釈液の混合比を変えてギムザ染色時間を

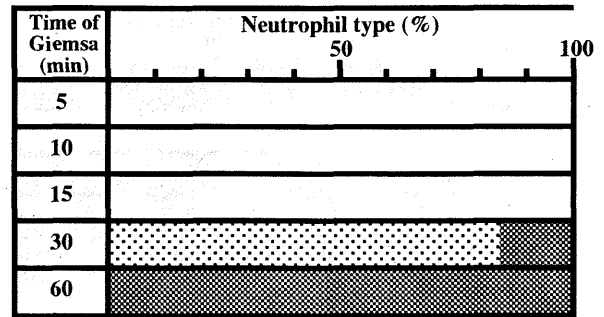


Fig. 32. Effects of Giemsa stain on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of γ -granule after staining with May-Grünwald Giemsa. Diluent was distilled water. Fixation and stain with May-Grünwald were conducted for 5 and 10 min, individually. Giemsa was diluted (1:20) with distilled water. \square , type a; \square (dotted), type b; \square (cross-hatch), type c.

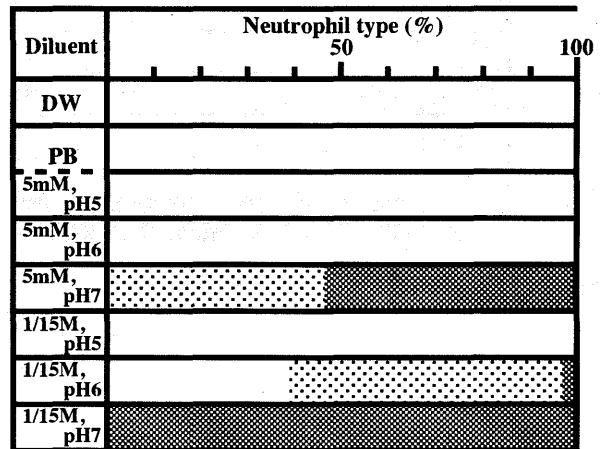


Fig. 33. Effects of diluent on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of γ -granule after staining with May-Grünwald Giemsa. DW, distilled water (pH5.2); PB, phosphate buffer (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4). Fixation and stain with May-Grünwald and stain with Giemsa were conducted for 5, 10 and 15 min, individually. Giemsa was diluted (1:20) with each diluents which diluted ($\times 10$) with distilled water. \square , type a; \square (dotted), type b; \square (cross-hatch), type c.

15 分間とした MGG 染色では、混合比 1 : 10 の場合には、いずれの実験区でも好中球に α 顆粒は観察されず、 β 顆粒の観察は容易であった。しかし、 $1/15\text{M}$ で pH 5 の場合には、細胞質基質が淡赤色を呈するため、 β 顆粒の観察は困難であった (Fig. 16)。混合比 1 : 20 の場合には、 $1/15\text{M}$ の pH 5 以外の実験区で β 顆粒は認められ、特に、pH 7 の緩衝液を用いた場合には、容易に観察された。混合比 1 : 50 および 1 : 100 では pH 5 のいずれの緩衝液においても α 顆粒が多数存在し、細胞質も淡赤色を示すために β 顆粒は観察困難であった。その他の実験区では染色される α 顆粒が少

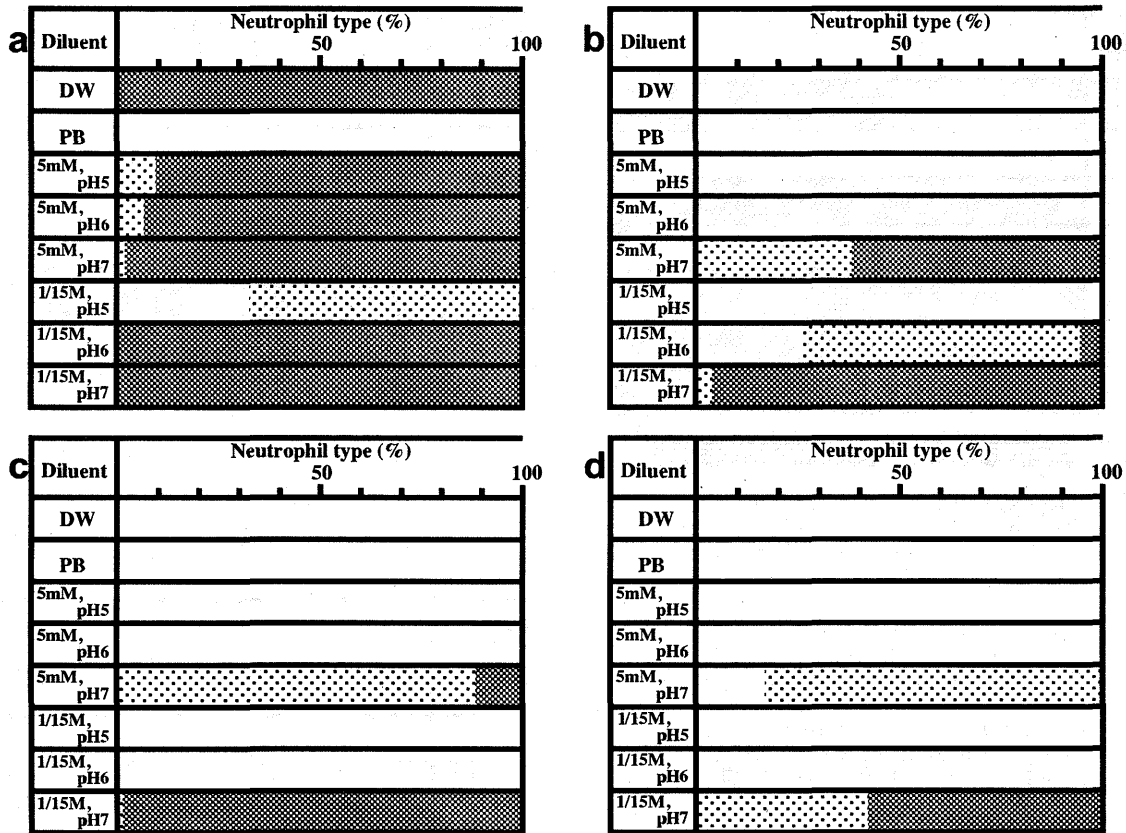


Fig. 34. Effects of diluent and dilution on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of γ -granule after staining with May-Grünwald Giemsa. DW, distilled water (pH5.2); PB, phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$). Fixation and stain with May-Grünwald, and stain with Giemsa were conducted for 5, 10 and 15 min, individually. Giemsa was diluted (a, 1:10; b, 1:20; c, 1:50; d, 1:100) with each diluents which diluted ($\times 10$) with distilled water. □, type a; ▨, type b; ▩, type c.

なく、細胞質基質が淡青色であるため、 β 顆粒は明瞭に観察された。

ギムザ原液と各種希釈液の混合比を 1 : 100 とし、ギムザ染色時間を 60 分間行う MGG 染色では、pH 5 の緩衝液以外の場合には、 α 顆粒が染色されず、したがって、 β 顆粒が観察された (Fig. 17)。

各種希釈液を用いて塗抹標本にギムザ染色のみを 60 分間行ったところ、 α 顆粒は染色されず、細胞質基質が淡青色を呈するため、 β 顆粒が明瞭に観察された (Fig. 18)。

γ 顆粒

本顆粒は好塩基性で円形または卵円形である (直径 0.4 μm 以下)。蒸留水を用いた MGG 染色では、好中球に γ 顆粒は観察されなかった。また、希釈液を変えて同染色を行っても γ 顆粒は認められなかった。

ギムザ染色の時間を変えて蒸留水を用いた MGG 染色を行ったところ、30 および 60 分間で γ 顆粒が観察された (Fig. 32)。30 分間では 80% 以上の好中球が b 型で、60 分

間ではすべての好中球が c 型であった (Fig. 6, 32)。

MGG 染色におけるギムザ染色時間を 15 および 60 分間に設定し、各種希釈液を用いて MGG 染色を行ったところ、15 分間の場合では 5 mM の pH 7 および $1/15\text{M}$ の pH 6 と pH 7 で γ 顆粒が観察された (Fig. 19, 33)。 $1/15\text{M}$ の pH 6 では約 60% が b 型の好中球であり、pH 7 ではすべて c 型であった。また、5 mM の pH 7 では約 50% が b 型あるいは c 型であった。以上の実験区以外では γ 顆粒は観察されなかった。60 分間の場合、いずれの希釈液を用いても、すべての好中球が c 型であったが、pH 5 の緩衝液では γ 顆粒の輪郭が不明瞭であった (Fig. 20, 21)。

ギムザ原液と希釈液の混合比を変えてギムザ染色時間を 15 分間とした MGG 染色では、混合比 1 : 10 の場合には、すべての実験区で γ 顆粒が観察され (Fig. 22, 34a)、 $1/15\text{M}$ の pH 5 では 90% 以上が a 型あるいは b 型の好中球であった。その他の希釈液を用いた場合には、90% 以上が c 型の好中球であった。しかし、pH 5 の緩衝液では、 γ 顆粒の輪郭が不明瞭であった (Fig. 23)。1 : 20 の比率では、5

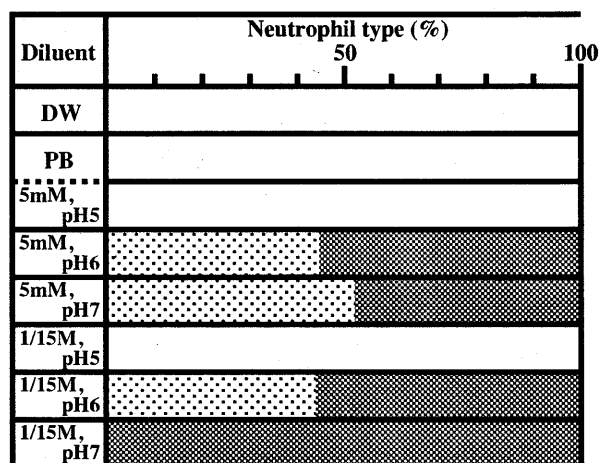


Fig. 35. Effects of diluent and dilution on the different types of carp neutrophils categorized on the distribution pattern of γ -granule after staining with May-Grünwald Giemsa. DW, distilled water (pH5.2); PB, phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$). Fixation and stain with May-Grünwald and stain with Giemsa were conducted for 5, 10 and 60 min, individually. Giemsa was diluted (1:100) with each diluents which diluted ($\times 10$) with distilled water. □, type a; ▨, type b; ■, type c.

mMのpH 7 および $1/15\text{M}$ のpH 6 またはpH 7 の実験区以外では、好中球に γ 顆粒は観察されなかった (Fig. 34b)。5 mMのpH 7 では約60%がc型の好中球であった。 $1/15\text{M}$ の場合、pH 6 では約60%がb型で、pH 7 では90%以上がc型であった (Fig. 34b)。混合比1 : 50の場合、pH 7 の緩衝液以外では γ 顆粒は観察されなかった。5 mMでpH 7 の場合には、90%がb型で、 $1/15\text{M}$ のpH 7 では90%以上がc型であった (Fig. 34c)。混合比1 : 100でも1 : 50の場合と同様に、pH 7 の緩衝液を用いた場合でのみ γ 顆粒が観察された (Fig. 34d)。しかし、5 mMではa型が約20%、b型が約80%であり、 $1/15\text{M}$ ではb型およびc型がそれぞれ約50%であった (Fig. 24, 34d)。

ギムザ原液と各種希釈液の混合比を1 : 100とし、ギムザ染色を60分間行うMGG染色では、 $1/15\text{M}$ のpH 6 または5 mMのpH 6 およびpH 7 の緩衝液を用いた場合には、b型およびc型の好中球がおのおの約50%であった (Fig. 35)。 $1/15\text{M}$ のpH 7 ではいずれの好中球もc型であった (Fig. 13, 40)。また、蒸留水を用いた場合には、約80%がc型であった。これらの希釈液以外では γ 顆粒は観察されなかった (Fig. 35)。

各種希釈液を用いて塗抹標本にギムザ染色のみを60分間行ったところ、すべての好中球に γ 顆粒が観察され、いずれもc型であった (Fig. 25)。

各顆粒の染色特性の比較

α 顆粒はギムザ染色のみを行った好中球には認められず、MG染色のみを施した場合では、染色時間が長いほど、多く観察された。また、染色液調整のための希釈液の種類によって、本顆粒の染色性はさまざまで、低濃度の緩衝液 (5 mM) では、中性から酸性領域で多数の α 顆粒が染色されたが、 $1/15\text{M}$ のリン酸緩衝液ではpHが酸性から中性になるにつれて、染色される α 顆粒の数は減少し、本顆粒の色調もpHによって変化した。MGG染色を行った場合には、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 顆粒が消失した。また、ギムザ染色液中の原液の濃度が高いほど、本顆粒が消失しやすく、原液の濃度の低下に伴って、染色される顆粒の数は減少した。一方、 β 顆粒は α 顆粒が十分に染色されない条件で認められた。 γ 顆粒は α 顆粒とは異なり、MG染色では染まらず、MGG染色のギムザ染色時間を長くするほど染色される顆粒の数が増加した。また、希釈液に用いる緩衝液の濃度が低い場合には、中性で本顆粒が観察され、高濃度では、酸性から中性で観察された。さらに、 γ 顆粒は α 顆粒とは異なり、ギムザ染色のみを施した標本でも観察され、ギムザ染色液中のギムザ原液の濃度が高いほど多数の顆粒が染色された。

4 考 察

コイでは現在、電子密度の高い桿状構造物(類結晶)を有する顆粒を持つ血球が好中球と呼ばれている。しかし、コイ好中球顆粒の染色性については報告によって様々である。Imagawaら²⁾は弱エオシン性から難染性を示す微細な顆粒と分葉核を有す顆粒球をコイ血液中に観察している。彼らはその顆粒球に大型の卵円形(長径0.3~0.6 μm)で、桿状構造物と電子密度の高い物質をもつ顆粒と、小型の円形(直径0.1~0.3 μm)をした電子密度の低い物質を含む顆粒の2種類を観察している²⁾。しかし、その2種類の顆粒の染色性については言及していない。Hendrickら⁸⁾はコイ血液中に桿状構造物を有する顆粒を持つ血球を観察しており、顆粒がライト染色などで赤色に染色されることを報告している。Suzuki⁹⁾は蒸留水を用いたMGG染色により、コイ血液中の好中球の細胞質に微細でわずかに好エオシン性を示す顆粒を観察している。安田ら⁴⁾は、炎症時のコイ好中球の動態を調べており、メイ-グリュンワルド・ギムザ染色標本を観察しているが、顆粒の染色性については述べていない。斉藤⁵⁾もコイに好中球の存在を見ている

が、顆粒の染色性には言及していない。また、小野田⁶⁾は分葉核を持つコイの白血球を両色嗜好球と呼んでおり、そのうち、老熟な細胞に弱嗜酸性から嗜酸塩基性の微細顆粒を観察している。以上のようなコイ好中球の顆粒の染色性に著しい不一致がみられる理由として、我々¹⁾は前報において、染色液の調整に用いる希釈液の影響を調べ、コイ好中球にエオシン好性顆粒と難染性顆粒が存在することを指摘した¹⁾。しかし、本研究の結果では、染色性と大きさから、コイ好中球に、小型のエオシン好性顆粒 (α 顆粒)、大型の難染性顆粒 (β 顆粒) および微細なアズール好性顆粒 (γ 顆粒) の3種類が存在することが明らかとなった。しかし、これら3種類の顆粒の全てを同一標本上で検出することは困難であった。 α 、 β および γ の各顆粒は染色性の違いから、おのおの異なる顆粒であると考えられる。これまでのコイ好中球顆粒に関する報告において、アズール好性顆粒あるいは好塩基性顆粒について述べたものは少ない。小野田^{6, 7)}はMGG染色標本で、細胞質に弱嗜酸性から嗜酸塩基性の微細顆粒を観察している。小野田のMGG染色条件は、メイ-グリュンワルド染色を8分間、ギムザ染色を25分間行っている⁷⁾。本研究でも小野田とほぼ同じ条件(メイ-グリュンワルド染色を10分間、ギムザ染色を30分間)では、エオシン好性の α 顆粒とアズール好性の γ 顆粒の両方の一部が観察された。したがって、小野田はこれら2種類の顆粒を観察したと思われる。Hamers¹¹⁾はコイの顆粒性白血球を4種類(好中球、好異球、好塩基球、好酸球)に分類しており、好中球に3種類の顆粒を認めている。しかし、MGG染色標本では銅色のエオシン好性顆粒と、赤桃色の好中性顆粒を観察しているが、好塩基性顆粒はMGG染色標本には認めておらず、メチレン青染色標本に観察している。したがって、Hamersが観察した好塩基性顆粒と本研究の γ 顆粒が同じものであるか否かは明らかではない。また、Kurataら¹⁰⁾は頭腎(造血組織)から分離したコイ好中球にギムザ染色を施した結果、細胞質がわずかに好エオシン性を示したと報告しているが、顆粒の染色性については述べていない。本研究において、コイ好中球にギムザ染色を施しても、細胞質は好エオシン性を示さず、難染性顆粒(β 顆粒)とアズール好性顆粒(γ 顆粒)が観察された。この矛盾した結果の原因は不明である。

Borregaardら^{12,13)}はヒト好中球の顆粒を、その膜や基質の成分の違いに基づいてアズール(一次)顆粒、特殊(二次)顆粒、ゼラチナーゼ(三次)顆粒および分泌小胞の4種類に分類している。コイ好中球にも各種酵素が検出されているが^{2, 3, 4, 8, 11)}、このうち、細胞内の局在部位が明ら

かになっているのはペルオキシダーゼについてのみであり、少なくとも桿状構造物をもつ顆粒中に存在するとされている⁸⁾。今後、本研究で存在が明らかとなった各顆粒について、その内容物を詳細に調べ、それらの役割を明らかにする必要がある。

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。水大研報, 50, 109-117 (2002).
- 2) T. Imagawa, Y. Hashimoto, H. Kitagawa, Y. Kon, N. Kudo and M. Sugimura: Morphology of blood cells in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51, 1163-1172 (1989).
- 3) Y. Suzuki: Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52, 1895-1899 (1986).
- 4) 安田恒雄・延東 真・境 正・木村正雄：炎症時のコイ顆粒白血球に関する組織化学的研究。日水誌, 50, 1375-1380 (1984).
- 5) 斉藤 要：魚類血液の生化学的研究-I. 血球の形態に就て。日水誌, 19, 1134-1138 (1954).
- 6) 小野田外興治：爬蟲類及び魚類ノ白血球分類ニ就キテ。金澤医科大学十全会雑誌, 40, 51-66 (1935).
- 7) 小野田外興治：白血球ノ核移動ニ關スル研究補遺。其9 魚類両色嗜好性白血球ノ核型ニ就テ。金澤医科大学十全会雑誌, 39, 2427-2440 (1934).
- 8) M. Hendrick, A. DiNapoli, P. Cammarata and S. Pincus: Purification of carp putative eosinophils on metrizamide gradients. *J. Fish Biol.*, 29, 47-51 (1986).
- 9) E. Bielek: Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell Tissue Res.*, 220, 163-180 (1981).
- 10) O. Kurata, N. Okamoto and Y. Ikeda: Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*, possess a spontaneous cytotoxic activity. *Dev. Comp. Immunol.*, 19, 315-325 (1995).
- 11) R. Hamers: Granulation staining and cytochemistry of peripheral blood leucocytes in

- healthy carp (*Cyprinus carpio* L.) I. Granulocytes. *J. Appl. Ichthyol.*, **11**, 86-93 (1995).
- 12) N. Borregaard, L. Kjeldsen, K. Lollike and H. Sengelov : Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin. Exp. Immunol.*, **101**, 6-9 (1995).
- 13) N. Borregaard and J. B. Cowland : Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, **89**, 3503-3521 (1997).