

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

安本信哉・近藤昌和*・高橋幸則

May-Grünwald・Giemsa Staining Properties of Granules in Tilapia *Oreochromis niloticus* Neutrophil

Shinya Yasumoto, Masakazu Kondo*, and Yukinori Takahashi

May-Grünwald・Giemsa (MGG) staining properties of cytoplasmic granules in tilapia *Oreochromis niloticus* 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 curious basophilic granule (δ G) were observed in neutrophil. The staining pattern of α G and γ G was strongly influenced by pH and concentration of diluent of the staining solution. The α G was small ($<0.3\mu\text{m}$ in diameter) and round in shape. Eosinophil of α G was disappeared by long-time Giemsa stain after May-Grünwald (MG). The β G was round to oval and was larger ($0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ in diameter) than α G. The γ G was round to oval ($<0.3\mu\text{m}$ in diameter), and observed in MGG and in Giemsa staining preparations (distilled water and neutral buffer as diluent) and in MG using buffer (pH6 and 7). The δ G was basophilic, larger than γ G, irregular in shape (rod, comma, crescent, ring) and observed in 50-80% of neutrophil. This granule was not found in MGG and MG using acid buffer (pH5).

1 緒言

魚類の好中球は、哺乳類と同様に異物食食や活性酸素産生などの非特異的防御機構を担っている¹⁻³⁾。ヒトの好中球顆粒は、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種類に分類されている^{4,5)}。我々は前報^{6,7)}で、コイ好中球のメイ-グリュンワルド・ギムザ(MGG)染色性を調べ、好中球に染色性の異なる3種類の顆粒、すなわち、エオシン好性顆粒、難染色顆粒およびアズール好性顆粒が存在することを明らかにした。また、エオシン好性顆粒の染色性は、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、メイ-グリュンワルド染色後のギムザ染色を長時間行うことで、本顆粒の染色性が低下・消失することを報告した^{6,7)}。

本研究では、他の魚類の好中球にも複数種の顆粒が存在するか否かを明らかにする研究の一環として、熱帯地方で重要な淡水養殖対象種であるテラピア *Oreochromis niloticus* の好中球について、その顆粒のMGG染色性を調べ、コイ好中球とそれと比較したのでここに報告する。

2 材料および方法

実験動物

実験には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450gのテラピアを用いた。テラピアは上面濾過槽を設置した50 l容ガラス水槽に1尾ずつ入れ、25°Cで1ヶ月以上予備飼育した。飼育期間中は、市販の配合飼料(鯉浮き餌M、林兼産業)を1日1回体重の約2%量給餌した。頭部殴打したテラピアの尾部血管から、近藤ら⁶⁾の報告にしたがって採血し、血液塗沫標本を作成した。

2002年9月2日受付。Received Sep. 2. 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).

メイ-グリュンワルド・ギムザ (MGG) 染色

塗沫標本上に固定を兼ねてメイ-グリュンワルド原液 (シグマ) を1.5ml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10分間染色を行った。ギムザ染色液で洗浄したのち、同液を標本上に満載して15分間ギムザ染色を施した。ギムザ染色液は原液 (メルク) を蒸留水 (pH5.2)⁶⁾ または蒸留水で10倍希釈した各種リン酸緩衝液に1:20の割合で滴下・混和したものである。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。

MGG染色性と乾燥、前固定および採血時の温度

近藤ら⁶⁾の報告にしたがって、標本の乾燥条件、メタノール前固定および採血時の温度が、顆粒のMGG染色性に及ぼす影響を調べた。なお、MGG染色の希釈液には蒸留水を用いた。

MGG染色性とギムザ染色時間および濃度

ギムザ原液と蒸留水の混合比を1:10、1:20、1:50および1:100とし、ギムザ染色時間を15または60分間としてMGG染色を行った。

MGG染色性と希釈液

ギムザ染色時間を15または60分間としてMGG染色を行った。希釈液には蒸留水または、 KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 を組み合わせたリン酸緩衝液 (5 mMおよび $1/15$ M、pH 5、6および7) を用いた。

メイ-グリュンワルド (MG) 染色性

塗沫標本上にメイグリュンワルド原液を載せて1、3、5および10分間静置した。次いで、蒸留水を滴下・混和して3、5、10および20分間染色し、顆粒のMG染色性を調べた。また、メイグリュンワルド原液を載せて5分間放置したのち、前述の各種希釈液を滴下・混和して10分間染色して希釈液が顆粒のMG染色性に及ぼす影響を調べた。

ギムザ染色性

無水メタノールで5分間固定した塗沫標本に、蒸留水を用いて5、15、30および60分間ギムザ染色を行った。また、各希釈液を用いて15分間ギムザ染色を行った。

3 結果

テラピア好中球は、長径約 $10\mu\text{m}$ の円形または卵円形の血球であった。核は卵円形または楕円形であり、分葉核もまれに観察された。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。細胞質には空胞もしばしば観察された。各乾燥条件とメタノール前固定は顆粒のMGG染色性に影響しなかった。同様に、採血時の温度も、顆粒のMGG染色性に影響を及ぼさなかった。以下に、各顆粒の形態と染色性について述べる。

α 顆粒

本顆粒は好酸性で円形小型である (直径 $0.3\mu\text{m}$ 以下)。各希釈液を用いたMGG染色標本では、希釈液としてpH 5のリン酸緩衝液を用いたときにのみ本顆粒が観察された (Fig. 1)。しかし、本顆粒は、ギムザ染色を60分間行ったMGG染色および蒸留水やpH 6および7の緩衝液を用いたMGG染色標本では認められなかった。

蒸留水を希釈液に用いたMG染色では、いずれの実験区でも、赤色の α 顆粒が多数観察された。また、蒸留水を混合して20分間染色した標本では、顆粒は濃赤色を呈した。各種希釈液を用いたMG染色では、5 mMのpH 5では赤色の α 顆粒が多数観察された (Fig. 2)。同様に、 $1/15$ MのpH 5およびpH 6でも赤色を呈する顆粒が多数観察された (Fig. 3)。しかし、5 mMのpH 6およびpH 7と、 $1/15$ MのpH 7では、 α 顆粒は観察されなかった。

ギムザ染色のみを行った標本では、 α 顆粒は全く認められなかった。

β 顆粒

本顆粒は難染性もしくは好中性で、円形または卵円形であった (長径 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$)。ギムザ染色液の濃度およびギムザ染色時間を変え、蒸留水を用いたMGG染色を行うと、混合比1:10および1:20での15分間のギムザ染色で、 β 顆粒が多数観察された (Fig. 4)。各希釈液を用いたMGG染色では、pH 7の緩衝液を用いると多数の β 顆粒が観察された (Fig. 5, 6)。

各種希釈液を用いてMG染色のみを施したところ、蒸留水およびpH 5の緩衝液では、多数の α 顆粒が染色され、そのために β 顆粒の観察は困難であった。

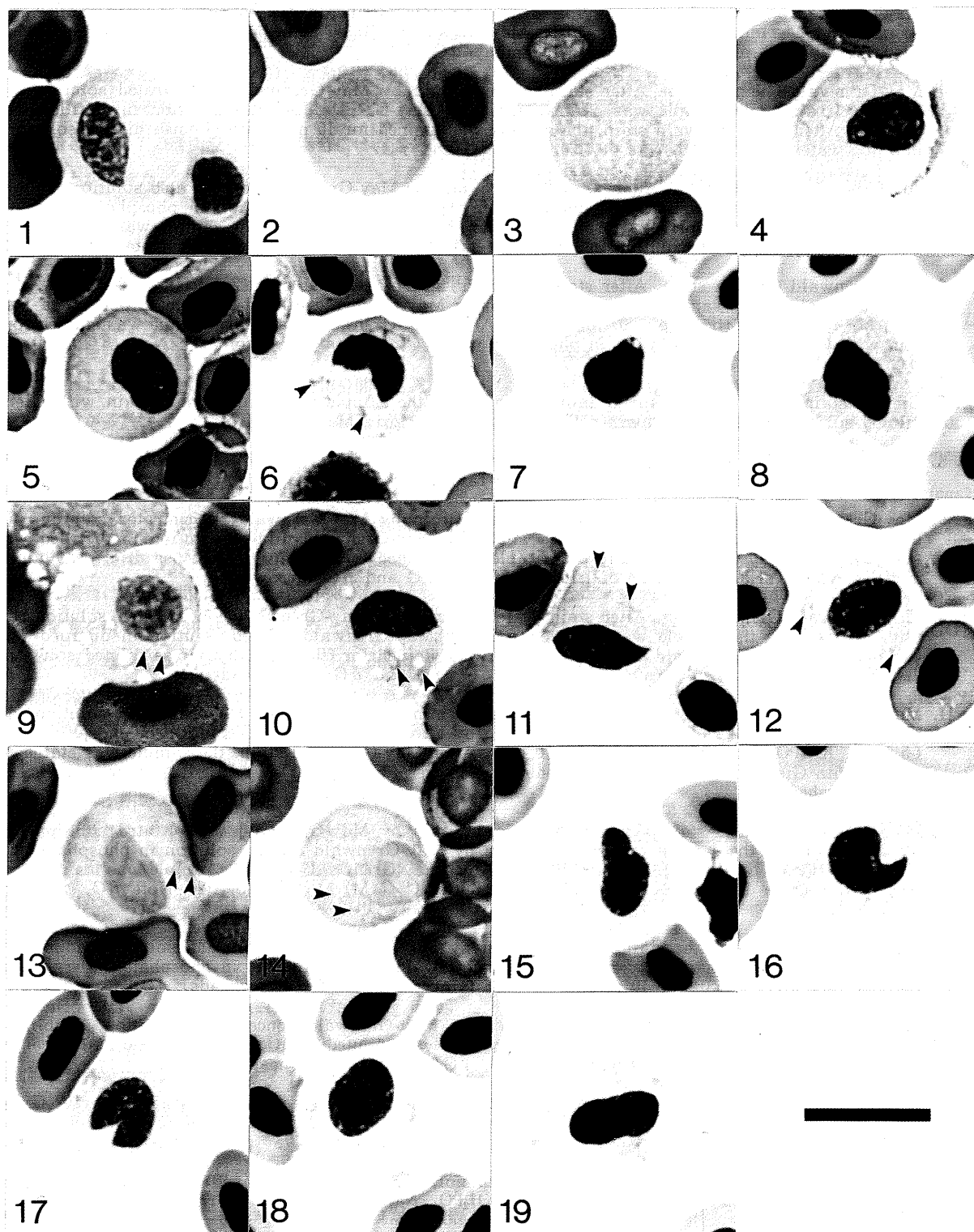


Fig. 1 to 19. Tilapia neutrophils under various staining conditions. Bar=10 μ m.

Fig. 1. 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 1:20. Note α G and β G.

Fig. 2. 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 , pH5.0) for 10 min. Note α G and β G.

- 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 α G.
- Fig. 4.** 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). After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in distilled water (pH5.2) at a rate of 1:20. Note β G and γ G.
- Fig. 5.** 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 1:20. Note β G and γ G.
- 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 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 β G, γ G and δ G (arrowheads).
- Fig. 7.** Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 30 min with Giemsa diluted solution in distilled water (pH5.2) at a rate of 1:20. Note β G and γ G.
- Fig. 8.** Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 30 min with Giemsa diluted solution in distilled water (pH5.2) at a rate of 1:20. Note β G and γ G.
- 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 distilled water (pH5.2). After May-Grünwald stain, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in distilled water (pH5.2) at a rate of 1:100. Note β G, γ G and δ G (arrowheads).
- 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). After May-Grünwald stain, the sample was stained for 60 min with Giemsa diluted solution in distilled water (pH5.2) at a rate of 1:10. Note β G, γ G and δ G (arrowheads).
- 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 (5 mM, 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 (0.5 mM) at a rate of 1:20. Note β G, γ G and δ G (arrowheads).
- 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 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 1:20. Note β G, γ G and δ G (arrowheads).
- Fig. 13.** 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 , pH6.0) for 10 min. Note β G, faint γ G and δ G (arrowheads).
- Fig. 14.** 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 β G, γ G and δ G (arrowheads).
- Fig. 15.** Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer (0.5 mM, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH5.0) at a rate of 1:20. Note β G and γ G.
- Fig. 16.** Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 15 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. Note β G and γ G.
- Fig. 17.** Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH5.0) at a rate of 1:20. γ G was not stained. Note δ G.
- Fig. 18.** Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 15 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. γ G was not stained. Note δ G.
- Fig. 19.** Giemsa stain. After fixation for 5 min by methanol, the sample was stained for 15 min with Giemsa diluted solution in phosphate buffer ($1/150$ M, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0) at a rate of 1:20. Note many γ G.

蒸留水を用いてギムザ染色のみを行ったところ、15、30および60分間では、核周囲の細胞質が淡赤色を呈し、 β 顆粒が容易に観察された (Fig. 7, 8)。各希釈液を用いたギムザ染色では、いずれの場合も、 β 顆粒は観察された。特に、 $1/15$ MでpH 7の緩衝液を用いた場合には、容易に識別することができた。

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 $0.3\mu\text{m}$ 以下)。ギムザ染色液の濃度およびギムザ染色時間を変えてMGG染色を施したところ、混合比1:10および1:20で、ギムザ染色を15分間行った場合に、 γ 顆粒が多数観察された (Fig. 4)。混合比1:100で15分間の場合には、少数の γ 顆粒が観察された (Fig. 9)。また、混合比1:10でギムザ染色が60分間の場合には、細胞質が淡青色を呈し、濃青色の γ 顆粒が観察された (Fig. 10)。なお、混合比1:20および1:100でギムザ染色を60分間行った場合は、15分間行ったときと同様であった。

各希釈液を用いてMGG染色を行ったところ、pH 5の緩衝液では、本顆粒は観察されなかった。5 mMのpH 6では細胞質は淡青色を呈し、 γ 顆粒が観察された (Fig. 11)。同様に、 $1/15$ MのpH 6でも γ 顆粒が多数観察された (Fig. 12)。pH 7の緩衝液でも γ 顆粒は観察されたが顆粒の輪郭は不明瞭であった (Fig. 5, 6)。蒸留水を用いた場合でも輪郭の不明瞭な γ 顆粒が観察された。

蒸留水を用いたMG染色ではいずれの条件でも本顆粒は観察されなかった。また、pH 5の緩衝液を用いたMG染色でも本顆粒は認められなかった。pH 6の場合には、 γ 顆粒は観察されたが、輪郭が不明瞭であった (Fig. 13)。一方、pH 7では、 γ 顆粒が多数観察された (Fig. 14)。

時間を変えてギムザ染色のみを行ったところ、5分間では細胞質が青染され濃青色を呈する γ 顆粒が観察された。15および30分間では核周辺が淡赤色を呈し、 γ 顆粒が観察された (Fig. 7)。60分間でも多数の γ 顆粒が観察された (Fig. 8)。各希釈液を用いてギムザ染色のみを施したところ、5 mMのpH 5の場合には、淡青色の γ 顆粒が少数観察された (Fig. 15)。一方、5 mMのpH 6および7では多数の γ 顆粒が観察された (Fig. 16)。 $1/15$ MのpH 5および6では γ 顆粒は認められなかったが (Fig. 17, 18)、 $1/15$ MのpH 7では γ 顆粒が多数観察された (Fig. 19)。

δ 顆粒

本顆粒は桿状、コマ状、三日月状、リング状と不定形

であり、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、50~80%の好中球で観察され、顆粒は1細胞あたり、1~10個と、他の種類の顆粒に比べて少数であった。また、ほとんどすべての実験区で観察されたが、pH 5の緩衝液を用いたMGG染色やMG染色では、本顆粒の染色性が非常に弱く、観察困難であった。

4 考 察

テラピアの好中球に4種類の顆粒が観察された。すなわち、エオシン好性顆粒 (α 顆粒)、難染性顆粒 (β 顆粒)、アズール好性顆粒 (γ 顆粒) および不定形の好塩基性顆粒 (δ 顆粒) の4種類である。これまでに、テラピアおよびその近縁種の好中球には、染色性の異なる複数種の顆粒の存在は報告されていない。Wittenら⁸⁾は*O. niloticus*好中球の細胞質に、小型で透明から明青色を示す空胞を認め、これに小型の好塩基性顆粒の存在を観察している。しかし、彼らはエオシン好性顆粒 (α 顆粒) は認めていない。本研究結果から、 α 顆粒はpH 5の緩衝液を用いたMGG染色で多数観察され、pHが酸性から中性になるにつれて、染色される顆粒の数は減少することが明らかとなった。Wittenら⁸⁾は、5 mMでpH 7のリン酸緩衝液を用いてMGG染色を行ったために、 α 顆粒を観察できなかったと考えられる。彼らは、本研究で示した難染性顆粒についても触れていないが、染色条件 (5 mM、pH 7) から、彼らの述べている空胞は難染性顆粒であると考えられる。また、彼らの染色条件でも本研究の γ 顆粒および δ 顆粒が観察できることから、彼らの観察した好塩基性顆粒とは、 γ 顆粒と δ 顆粒の両顆粒を分けずにひとまとめにして示していると考えられる。したがって、Wittenら⁸⁾が述べている小型の好塩基性顆粒を有する空胞とは、難染性顆粒に γ 顆粒または δ 顆粒が重なったものと推察される。Suzuki⁹⁾は電子顕微鏡観察により、*O. niloticus*の好中球に、様々な大きさと電子密度を有する顆粒を認め、そのいくつかには、繊維状構造を観察している。このことから、異なる微細構造を有した複数種の顆粒を観察していると推察される。しかし、Suzuki⁹⁾は顆粒のMGG染色性には言及していない。

*O. niloticus*と近縁の*O. mossambicus*では、MGG染色 (pH 6.9) 標本上で、2種類の顆粒球 (type Iとtype II) が観察されている¹⁰⁾。これらのうち、type I顆粒球は細胞質に数個の微細な青色顆粒と空胞を有していることから、好中球であると考えられる。しかし、*O. mossambicus*好中球の青色顆粒が本研究における γ 顆粒または δ 顆粒の

いずれの顆粒に相当するのかわかりません。また、Doggettら¹⁰⁾は、*O. mossambicus*のtype I顆粒球に、平行に配列した電子密度の高い芯を中央に有する顆粒を、細胞質に多数観察している。しかし、彼らは、Suzuki⁹⁾が*O. niloticus*の好中球に見出した、様々な大きさと電子密度の顆粒については言及していない。

コイの好中球には、エオシン好性顆粒(α 顆粒)、難染色顆粒(β 顆粒)およびアズール好性顆粒(γ 顆粒)の3種類の顆粒が観察されている^{6,7)}。コイ 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、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、 $1/15$ 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 顆粒の数は減少する^{6,7)}。テラピア好中球の α 顆粒もギムザ染色のみでは認められなかったが、MG染色のみを施した場合では、酸性領域で多数の α 顆粒が染色され、中性では α 顆粒は染色されなかった。一方、MGG染色を行った場合には、コイ α 顆粒は、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^{6,7)}。しかし、テラピア α 顆粒はpH 5の緩衝液を用いた時のみ観察され、60分間のギムザ染色により消失した。このことは、テラピア α 顆粒はコイよりも、ギムザ染色の時間やその他の条件の違いによる影響を受けやすいことを示している。

テラピアの β 顆粒はコイの場合と同様に α 顆粒が十分に染色されない条件で認められた。

コイ γ 顆粒はMG染色では染まらないが⁷⁾、テラピア γ 顆粒はpH 6および7の緩衝液を用いたMG染色で染色されていた。また、両魚種の γ 顆粒はpH 5の緩衝液を用いたMGG染色では染色されなかった。コイ γ 顆粒はいずれの希釈液を用いてもギムザ染色のみを施した標本で染色されるのに対して⁷⁾、テラピア γ 顆粒は、 $1/15$ MでpH 5および6では染色されなかった。このことは、 γ 顆粒への染色液の親和性が両魚種間で異なることを示している。

テラピアの γ 顆粒と δ 顆粒はともに好塩基性であり、pH 5のMGG染色では染色されなかった。しかし、 δ 顆粒はいずれの希釈液を用いたMG染色とギムザ染色でも染色されたが、 γ 顆粒は、蒸留水またはpH 5の緩衝液を用いたMG染色や、 $1/15$ MでpH 5および6では染色されなかった。さらに、 γ 顆粒は円形から卵円形であるが、 δ 顆粒は不定形であった。これらの形態および染色性の違いから、両顆粒はおのおの異なる顆粒と考えられる。 δ 顆粒は、コイでは観察されていない^{6,7)}。

コイとテラピアの間で α 顆粒および γ 顆粒の染色性に違いが見られた理由として、顆粒内容物の物理化学的特性の違いが考えられる。今後、顆粒内容物の詳細を調べると同時に、好中球顆粒の型の違いを魚類の系統進化の関係からも明らかにしていこうと考えている。

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. Sengelov : 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. 水大校研報, **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. 水大校研報, **51** (1), 17-29 (2002).
- 8) P. E. Witten, W. Villwock and L. Renwranz : Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. *Can. J. Zool.*, **76**, 310-319 (1998).
- 9) K. Suzuki : Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L.. *J. Fish Biol.*, **29**, 349-364 (1986).
- 10) T. A. Doggett, A. B. Wrathmell and J. E. Harris : A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *J. Fish Biol.*, **31**, 147-153 (1987).

11) T. A. Doggett and J. E. Harris : Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of

Oreochromis mossambicus. *J. Fish Biol.*, **33**, 747-756 (1989).