

アカエイの好中球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 東川将基, 平山尋暉, 安本信哉, 高橋幸則

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophils from Whip Stingray *Dasyatis akajei*

Masakazu Kondo[†], Shouki Higashikawa, Hiroki Hirayama, Shinya Yasumoto and Yukinori Takahashi

Abstract: Four types of granulocytes, neutrophil, basophil, eosinophil and small eosinophilic granulocyte, were observed in peripheral blood of whip stingray *Dasyatis akajei* (Dasyatidae, Myliobatiformes, Batoidea, Elasmobranchii). The neutrophil is the only phagocytic granulocyte and had two types of chromophobic granules (β G: type A, β G-A; type B, β G-B) with core in the cytoplasm. The β G-A was long-elliptic shape or round (round or oval), and consisted eosinophilic core and chromophobic surrounding. The β G-B was round (round or oval), and both core and surrounding of this granule was chromophobic. Several lysosomal enzymes were detected in β G-B, but the positive site was different among enzymes: Acid phosphatase, α -naphthyl acetate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase were detected in the core, while α -naphthyl butyrate esterase was in the surrounding. The neutrophils lacked alkaline phosphatase, β -glucuronidase and peroxidase. The core of β G-A showed positive reaction to hematoxylin stain (Mayer's).

Key words: stingray, *Dasyatis akajei*, neutrophil, morphology, cytochemistry

緒 言

近藤ら (2016) はこれまでに、多条件下Romanowsky型染色評価法 (Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV) を円口類ならびに各種硬骨魚類の好中球に適用し、好中球顆粒の多様性を明らかにしてきた¹⁾。すなわち、アフリカハイギョ *Protopterus annectens* (肉鰭上綱肺魚四肢動物綱肺魚亜綱) を除いて、円口類のヌタウナギ *Eptatretus burgeri* ならびに条鰭上綱の各種魚類では、好中球の顆粒組成は好酸性顆粒 (α 顆粒)、難染性顆粒 (β 顆粒) および好塩基性顆粒 (γ 顆粒) の組み合わせとして表現されると報告してきた。しかし、これまで α 顆粒と β 顆粒が存在してきたマダイ *Pagrus major* の好中球において²⁾、 α 顆粒は顆粒そのものではなく、難染性顆粒の芯が好酸性を示したものであることが明らかとなった^{3,4)}。また、芯を持たな

い難染性顆粒も認められたことから、マダイの好中球には2種類の β 顆粒が存在することとなり、これまで以上に魚類の好中球顆粒は多様であると考えなくてはならない。

本研究では、軟骨魚類の板鰓亜綱エイ区Batoideaに属するアカエイ *Dasyatis akajei* (トビエイ目Myliobatiformesアカエイ科Dasyatidae) について、好中球の形態学および細胞化学的特性を明らかにし、これまでに著者らが報告した各種魚類の好中球と比較した*。

材料および方法

吉見湾 (下関市) で釣獲したアカエイを水産大学校の飼育施設に搬入し、1週間馴致飼育したのちに実験に供した (水温 $19.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$)。飼育期間中は、マダイの切り身を適宜給餌した。採血時の体重は約8 kgであった。キナルジンで

水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

[†] 別刷り請求先 (corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

*本研究の一部は、平成27年度日本魚病学会秋季大会 (2015年9月25日) において報告した (308: 近藤昌和, 東川将基, 平山尋暉, 安本信哉, 高橋幸則: アカエイの好中球の形態学的特徴 (プログラムおよび講演要旨集, 22))。

麻酔後, 心臓から採血した。血液塗抹標本の作製, MRSV (Table 1) および各種細胞化学染色法は近藤・高橋⁵⁾に,

パン酵母の細胞壁由来のzymosan粒子に対する貪食試験は近藤ら⁶⁾にしたがった。

Table 1. Staining conditions of multiple Romanowsky-type stain valuation

PN	Condition ^{1,2}	PN	Condition ^{1,2}
1	MG : DW	42	G : $1/150$ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min
2	: 5 mM PB, pH5.0	43	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min
3	: 5 mM PB, pH6.0	44	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min
4	: 5 mM PB, pH7.0	45	: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min
5	: 5 mM PB, pH8.0	46	MGG : DW, 1:20, 15 min
6	: $1/15$ M PB, pH5.0	47	: DW, 1:20, 60 min
7	: $1/15$ M PB, pH6.0	48	: DW, 1:100, 15 min
8	: $1/15$ M PB, pH7.0	49	: DW, 1:100, 60 min
9	: $1/15$ M PB, pH8.0	50	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15min
10	G : DW, 1:20, 15 min	51	: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60min
11	: DW, 1:20, 60 min	52	: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min
12	: DW, 1:100, 15 min	53	: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min
13	: DW, 1:100, 60 min	54	: 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15min
14	: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	55	: 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60min
15	: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	56	: 5 mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min
16	: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	57	: 5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min
17	: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	58	: 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15min
18	: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15min	59	: 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60min
19	: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60min	60	: 5 mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min
20	: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min	61	: 5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min
21	: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	62	: 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15min
22	: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15min	63	: 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60min
23	: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60min	64	: 5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min
24	: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	65	: 5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min
25	: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	66	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 15min
26	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	67	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min
27	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	68	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min
28	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	69	: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min
29	: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	70	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:20, 15 min
30	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	71	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:20, 60 min
31	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	72	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min
32	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	73	: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min
33	: $1/150$ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	74	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 15min
34	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:20, 15min	75	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 60min
35	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:20, 60min	76	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min
36	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	77	: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min
37	: $1/150$ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	78	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min
38	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	79	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min
39	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	80	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min
40	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	81	: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min
41	: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min		

¹MG, May-Grünwald stain (after fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the smear was stained again for 10 min in MG diluted (1:1) with various solution); G, Giemsa stain (after fixation with absolute methanol for 5 min, the smear was air-dried and then stained with Giemsa diluted with various solution); MGG, May-Grünwald · Giemsa stain (after staining with MG stain, the smear was stained with diluted Giemsa solution); DW, distilled water; PB, phosphate buffer; 1:20 and 1:100, dilution ratio (Giemsa:diluent); 15 min and 60 min, time of Giemsa stain.

²Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or $1/150$ M PB.

PN, preparation number.

結 果

アカエイの血液中には4種類の顆粒球（好中球, 好塩基球, 好酸球, 小型好酸性顆粒球）が観察された。これらのうち, zymosan粒子に対する貪食は好中球にのみ認められた。好中球にはアルシアンブルー, オイルレッドOおよびズダンIII染色では陽性所見は観察されなかった。また, アルカリ性フォスファターゼ (AIP), β -グルクロニダーゼ (β -Glu) およびペルオキシダーゼ (PO) は検出されなかった。

好中球は長径約20.0 μ mの円形または卵円形であり, 核の染色質網は細かく, 小型の濃縮染色質が散在していた。核は偏在し, 核の輪郭に凹凸が顕著であった。通常単核であったが, 分葉核（最大3分葉）も認められた。好中球には貪食能が認められ, 細胞質には2種類の β 顆粒 (A型, β G-A; B型, β G-B) が観察された (Figs. 1A, 1B)。いずれの条件のRomanowsky型染色標本においても両顆粒は観察された。また, 多くの魚種の好中球に観察されている好塩基性の不定形小体 (Y小体¹⁾) も観察された。本小体の

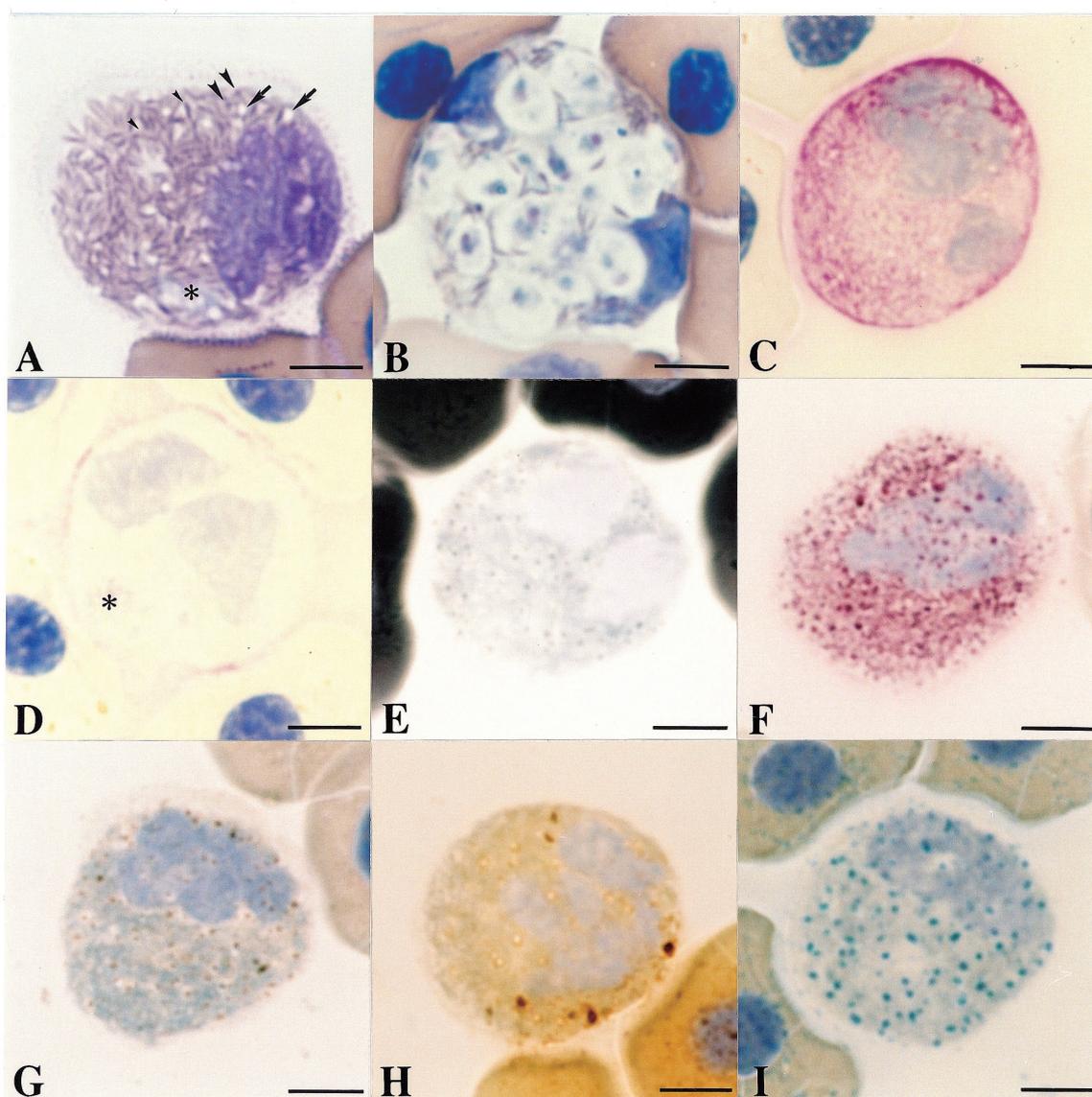


Fig. 1. Neutrophils of whip stingray *Dasyatis akajei*. A, May-Grünwald · Giemsa (MGG; PN=48; small arrowheads, long-elliptic chromophobic granule type A (β G-A) consisted eosinophilic core and chromophobic surrounding of core; large arrowheads, round (round or oval) β G-A; arrows, β G type B (β G-B) consisted with chromophobic core and surrounding; *, Yasumoto body); B, phagocytosis of zymosan particles (MGG; PN=48); C, periodic acid Schiff reaction; D, toluidine blue in distilled water (*, Yasumoto body); E, Sudan black B; F, acid phosphatase; G, α -naphtyl acetate esterase; H, α -naphtyl butyrate esterase; I, naphthol AS-D chloroacetate esterase. Positive reaction of E-I was localized in β G-B (E-G & I, core was positive; H, surrounding was positive). The core of β G-A was stained with hematoxylin (Mayer's; E & G-I). PN, preparation number (See Table 1). Bars=5 μ m.

個数は好中球ごとに異なっていたが, 全く観察されないものは極めて少数であった。

β G-Aは長楕円形(長径 $2.5 \mu\text{m}$ 以下, 短径 $1.0 \mu\text{m}$ 以下)または類円形(円形から卵円形; 長径 $1.0 \mu\text{m}$ 以下)であり, 顆粒内にエオシン好性の芯が認められた。芯の周囲は難染性であった。長楕円形の顆粒の芯は桿形であり(長径 $2.0 \mu\text{m}$ 以下, 短径 $0.4 \mu\text{m}$ 以下), 類円形の顆粒では芯も類円形であった(長径 $0.3 \mu\text{m}$ 以下)。芯は多くの場合, 顆粒の中心線上(長楕円形顆粒)あるいは中央(類円形顆粒)に位置していたが, 稀に顆粒内に偏在する芯も観察された。細胞質内における長楕円形顆粒と類円形顆粒の比率は好中球ごとに異なっており, 多くの好中球には長楕円形の β G-Aのみが観察され, 類円形顆粒のみを有する好中球は少なく, 両者が混在する好中球は稀であった。本顆粒はperiodic acid Schiff (PAS) 反応陰性であり (Fig. 1C; Table 2), トルイジンブルー (TB) 染色およびズダン黒B (SBB) 染色にも陽性反応は認められなかった (Figs. 1D, 1E)。また, 酸性フォスファターゼ (AcP) および各種エステラーゼ (α -ナフチルアセテートエステラーゼ, α -NAE; α -ナフチルプチレートエステラーゼ, α -NBE; ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ, NASDCAE) も検出されなかった (Figs. 1F-1I)。 β G-Aの芯は, 各種細胞化学染色標本において核染色に用いられるヘマトキシリン (マイ

ヤー) に陽性反応を示した。この陽性反応は, SBB, β -Gluおよび各種エステラーゼ染色した標本において認められたが (Figs. 1E, 1G-1I), PAS, AcPおよびPO染色後の標本では認められなかった (Figs. 1C, 1F)。

β G-Bは類円形(円形から卵円形; 長径 $1.3 \mu\text{m}$ 以下)であり, いずれの条件のRomanowsky型染色標本においても難染性であった。Romanowsky型染色標本では識別できないが, SBB, AcPおよび各種エステラーゼ染色の結果, β G-Bに長径 $1.0 \mu\text{m}$ 以下の芯が認められた。 β G-Bの芯は中央に位置し, SBB, AcP, α -NAE およびNASDCAEが検出され (Figs. 1E-1G, 1I; Table 2), これらの染色標本では芯の周囲は陰性像を呈した。また, α -NBEは芯には認められず, 芯の周囲が陽性であった (Fig. 1H)。本顆粒はPASおよびTB染色には陰性であった。 β G-Bにはヘマトキシリン陽性像は認められなかった。

好中球には円形または卵円形のPAS反応陽性顆粒(長径 $0.5 \mu\text{m}$ 以下)が多数観察された (Fig. 1C; Table 2)。また, 細胞質基質も弱陽性を示した。これらの陽性部位は α -アミラーゼ処理によって完全に消失した。TB染色によって核が青染されるとともに, 種々の形態を示す陽性部位が細胞質に少数認められた (Fig. 1D)。

Table 2. Summary of reactions of whip stingray *Dasyatis akajei* neutrophil to cytochemical tests

Test	Positive site (shape and number)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	G (round or oval, many); H
PAS after digestion with α -amylase	—
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidine blue in distilled water	G (amorphous, a few, eq Yb); N
Sudan black B	G (round or oval, many, eq core of β G-B)
Sudan III	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase	G (round or oval, many, eq core of β G-B)
β -Glucuronidase	—
α -Naphthyl acetate esterase	G (round or oval, many, eq core of β G-B)
α -Naphthyl butyrate esterase	G (round or oval, many, eq surrounding of core of β G-B)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	G (round or oval, many, eq core of β G-B)
Peroxidase	—

G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; —, not detected; β G-B, chromophobic granule type B; Yb, Yasumoto body; eq, equivalent to .

考 察

アカエイには4種類の顆粒球が認められたが、貪食能を有する顆粒球は好中球のみであった。好中球には2種類の顆粒が観察され、いずれの顆粒も芯を有することが明らかとなった。これまでに、アミア *Amia calva*、タケノコメバル *Sebastes oblongus* およびマダイの好中球に芯を有する顆粒（有芯顆粒）が報告されており^{1,3,4,7}、芯の染色性はアミアでは難染色性、タケノコメバルでは好塩基性、マダイでは好酸性である。また、これらの魚種においては、芯の周囲（以後、周囲と称する）は難染色性であった。アカエイの好中球に観察される2種類の有芯顆粒のうち、 β G-Aは好酸性の芯を有し、 β G-Bの芯は難染色性であった。また、両顆粒とも周囲は難染色性であった。したがって、Romanowsky型染色性からは、アカエイの β G-Aはマダイの有芯顆粒（ β G-2^{3,4}）に、 β G-Bはアミアのそれ（ β 顆粒¹）に類似すると言える。しかし、細胞化学的特性は魚種間で異なっていた。マダイの β G-2には各種ライソゾーム酵素（AcP, β -Glu, α -NAE, α -NBE, NASDCAE）がその芯に、POとSBB陽性物質が周囲に検出される⁴。一方、アカエイの β G-Aにはこれら酵素およびSBB陽性物質は認められない。また、アカエイの β G-Aの芯はヘマトキシリン陽性であったが、マダイの β G-2の芯には陽性反応は検出されない⁴。アカエイの β G-Bには各種ライソゾーム酵素（AcP, α -NAE, α -NBE, NASDCAE）の活性が認められ、AcP, α -NAEおよびNASDCAEは本顆粒の芯に、 α -NBEは周囲に検出される。しかし、アミアの β 顆粒にはこれらの酵素は検出されず、AIPとPOが周囲に認められる¹。

アカエイの2種類の有芯顆粒はともに難染色性の領域を有していたことから（ β G-A, 周囲; β G-B, 芯と周囲）、本稿では両者を難染色性顆粒（ β 顆粒）に分類した。マダイにおいても2種類の β 顆粒（ β G-1と β G-2）が報告されているが^{3,4}、 β G-1には芯は認められておらず、 β G-1の細胞化学的特性は β G-2の難染色性の周囲と酷似していることから（ともにPO陽性かつSBB陽性）、 β G-2は β G-1に好酸性成分が付加され、これが濃縮して芯となったと推察されている⁴。しかし、アカエイの2種類の β 顆粒の間に、細胞化学的類似性は認められず、両顆粒はそれぞれ異なる種類の顆粒であると考えられる。

アカエイの好中球には α -NBE強陽性顆粒が少数観察された。この陽性顆粒においても顆粒の中心部は陰性または弱陽性様の色調を示した。このことから、 α -NBE強陽

性顆粒も β G-Bに相当すると考えられる。好中球にはPAS陽性顆粒も認められたが、本陽性顆粒は α -アミラーゼにより消失したことから、グリコーゲンを主成分とする構造物であり、 β G-Aと β G-Bのどちらにも相当しないと思われる。また、不定形のTB陽性顆粒はY小体に相当すると思われる。

板鰓類の顆粒球の分類は混乱していたが、現在では一般に好中球は好異球と呼ばれ^{8,9}、顆粒の染色性は好酸性であるとされている⁸。しかし、アカエイの好中球には2種類の顆粒が認められ、好酸性顆粒に見える構造物は顆粒そのものではなく顆粒の芯であった。このことが、板鰓類に広く当てはまるのか否かを明らかにするために、他の板鰓類についても調べなくてはならない。Hine and Wain (1987)はアカエイの近縁種 *D. brevicaudatus* を含む複数種のエイ類の顆粒球を eosinophil, eosinophilic granulocyte および neutrophilic granulocyte の3種類に分類しているが¹⁰、現在の分類基準では eosinophilic granulocyte が好中球に相当すると考えられる。また、Hine and Wain (1987)は *Myliobatis tenuicaudatus*（トビエイ目トビエイ科）に好塩基球を観察しており¹⁰、本種では4種類の顆粒球が存在することとなる。一方、*D. brevicaudatus*には好塩基球を認めおらず、neutrophilic granulocyteには弱好塩基性の顆粒が存在するとしていることから¹⁰、本種の neutrophilic granulocyte は好中球ではないと推察される。同じ著者による板鰓類の顆粒球における細胞化学的方法による研究では、*M. tenuicaudatus* の eosinophilic granulocyte は本研究のアカエイと同様に AIP, β -Glu および PO は陰性であり、 α -NAE 陽性とされている¹¹。しかし、*M. tenuicaudatus* では陰性の AcP が、アカエイでは陽性であった。

アカエイの好中球には2種類の β 顆粒が認められたが、本魚種はこれまでに近藤ら（2016）が設定した好中球顆粒組成に基づく魚類の分類基準¹のいずれにも当てはまらない。この基準には、新たに得られたマダイの好中球顆粒の組成（ β G-1と β G-2）^{3,4}も当てはまらない。さらに、近藤ら（2016）が示した分類基準¹は、好中球が1種類の β 顆粒を有することを前提としており、 β 顆粒が観察されないアフリカハイギョやスタウナギにも適用できない。今後、あらゆる魚種の好中球に適用できる分類基準を設定する必要がある。

文 献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: アミアの顆粒球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **64**, 196-203 (2016)
- 2) 近藤昌和, 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸則: マダイ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **58**, 15-22 (2009)
- 3) Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Two types of granules in neutrophils from red sea-bream *Pagrus major*. *J Nat Fish Univ*, **64**, 269-271 (2016)
- 4) Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Cytochemical characteristics of neutrophil granules from red seabream *Pagrus major*. *J Nat Fish Univ*, **65**, 141-145 (2017)
- 5) 近藤昌和, 高橋幸則: ウナギ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **58**, 1-13 (2009)
- 6) 近藤昌和, 近藤啓太, 高橋幸則: マハタ白血球の形態学および細胞化学的特徴. 水産増殖, **58**, 363-371 (2010)
- 7) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: タケノコメバル好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 234-241 (2013)
- 8) Walsh CJ, Luer CA: Elasmobranch hematology: Identification of cell types and practical applications. *In*: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R (ed) *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives*. Ohio Biological Survey, Ohio, 307-323 (2004)
- 9) Luer CA, Walsh CJ, Bodine AB: Recent advances in Elasmobranch immunology. *In*: Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR (ed) *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, New York, 403-420 (2012)
- 10) Hine PM, Wain JM: Composition and ultrastructure of elasmobranch granulocytes. II. Rays (Rajiformes). *J Fish Biol*, **30**, 557-565 (1987)
- 11) Hine PM, Wain JM: The enzyme cytochemistry and composition of elasmobranch granulocytes. *J Fish Biol*, **30**, 465-475 (1987)