

## コノシロの顆粒球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和<sup>†</sup>, 仲下 亮, 安本信哉, 高橋幸則

### Morphological and Cytochemical Characteristics of Granulocytes from Threadfin Shad *Konosirus punctatus*

Masakazu Kondo<sup>†</sup>, Ryo Nakashita, Shinya Yasumoto and Yukinori Takahashi

**Abstract** : Three types of granulocytes, neutrophil, basophil and small eosinophilic granulocyte were observed in peripheral blood of threadfin shad *Konosirus punctatus*. The neutrophil had four types of granules, two types of eosinophilic granules ( $\alpha$ G), chromophobic granule ( $\beta$ G) and basophilic granule ( $\gamma$ G) in the cytoplasm. The  $\alpha$ G was classified into two types, rod-shaped  $\alpha$ G and round  $\alpha$ G. The former was stained with various condition of May-Grünwald (MG), Giemsa and MG-Giemsa (MGG). On the other hand, the latter was stained with Giemsa and MGG, but not with MG. Acid phosphatase (AcP) and  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -Glu) were detected in the round  $\alpha$ G. Some esterases were also positive, however, alkaline phosphatase and peroxidase activity was not observed in the neutrophil. Basophil had three types of granules, type A, B and C granule. All types of granules were round or oval. The AG ( $\leq 0.7 \mu\text{m}$ ) was the largest granules (BG and CG,  $\leq 0.3 \mu\text{m}$ ) and stained purple with MGG under a few conditions. The BG was not detected on the MG staining preparation, but stained purple with Giemsa and MGG. The CG showed light blue after MG, Giemsa and MGG stain. In basophil, AcP,  $\beta$ -Glu and some esterases were positive. Small eosinophilic granulocyte was small sized cell with condensed nucleus. The cell was round to oval, and had high nuclear to cytoplasmic ratio. Three types of granules, one major (eosinophilic granule) and two minor (chromophobic granule, basophilic granule), were observed in the cell. The AcP was detected in the granulocyte. Phagocytosis against zymosan particles was observed in only neutrophil.

**Key words** : threadfin shad, *Konosirus punctatus*, granulocyte, morphology, cytochemistry

### 緒 言

著者らはこれまでに、魚類における好中球顆粒の種類や存在様式は魚種によって多様であることを報告してきた<sup>1-29)</sup>。肉鰭綱肺魚亜綱のアフリカハイギョ *Protopterus annectens* を除いて<sup>18)</sup>、無顎類のヌタウナギ *Eptatretus burgeri*、条鰭綱腕鰭亜綱ポリプテルス目のピキール *Polypterus endlicheri* および種々の真骨魚類(条鰭綱)では、好中球の顆粒組成は、好酸性(好エオシン性)顆粒( $\alpha$ 顆

粒)、難染色顆粒( $\beta$ 顆粒)および好塩基性顆粒( $\gamma$ 顆粒)の組み合わせとして表現される<sup>1-17,19-29)</sup>。 $\alpha$ 顆粒は多条件下 Romanowsky 型染色特性(Multiple Romanowsky-type Stain Characteristics, MRSC)の違いから3種類に大別され、May-Grünwald (MG)染色でもGiemsa染色でも染色される(以後、MG+G+と略記。以下、染色性の違いを同様の略記法により記す。)  $\alpha 1$ 顆粒と、MG - G+の  $\alpha 2$ 顆粒およびMG+G -の  $\alpha 3$ 顆粒に分類されている<sup>29)</sup>。また、 $\beta$ 顆粒はGiemsa染色によって赤紫色の桿状中心芯を有する  $\beta 2$

顆粒と、桿状中心芯が認められない  $\beta 1$  顆粒に細分される<sup>28)</sup>。さらに、 $\gamma$  顆粒は MG+G+ の  $\gamma 1$  顆粒, MG - G+ の  $\gamma 2$  顆粒および MG+G - の  $\gamma 3$  顆粒の 3 種類に大別されているが<sup>28)</sup>,  $\gamma 3$  顆粒は, MG 染色と MG-Giemsa (MGG) 染色で青色を呈する  $\gamma 3a$  顆粒と, MG 染色では青色を, MGG 染色では条件によって青色または赤紫色を呈する  $\gamma 3b$  顆粒に細分されている<sup>28)</sup>。

ヌタウナギの好中球には  $\gamma 1$  顆粒のみが観察されており<sup>14)</sup>, ピキールでは, 好中球に 2 種類の  $\alpha$  顆粒 ( $\alpha 1$  顆粒と  $\alpha 3$  顆粒) と  $\gamma 2$  顆粒が存在する<sup>13,29)</sup>。一方, 真骨魚類は  $\alpha$  顆粒,  $\beta$  顆粒および  $\gamma$  顆粒の組み合わせの違いから 4 群に大別され (I 群,  $\alpha$  顆粒 +  $\beta$  顆粒 +  $\gamma$  顆粒; II 群,  $\alpha$  顆粒 +  $\beta$  顆粒; III 群,  $\beta$  顆粒のみ; IV 群,  $\beta$  顆粒 +  $\gamma$  顆粒)<sup>29)</sup>, 上述した  $\alpha$  顆粒や  $\gamma$  顆粒の種類の違いによって複数の下位群に分類されている<sup>29)</sup>。また, 好中球におけるペルオキシダーゼ (PO) 活性の局在部位の違いも下位群を分類する指標とされている<sup>28)</sup>。

コノシロ *Konosirus punctatus* (ニシン目ニシン科) の好中球の形態学および細胞化学的特性を調べたところ, これまでに著者らが報告した各種真骨魚類の好中球とは異なり, 2 種類の  $\alpha$  顆粒が観察され, 好中球に PO 活性が認められなかった。コノシロには好中球以外に 2 種類の顆粒球が認められたことから, それら顆粒球についても形態学および細胞化学的特徴を報告する\*。

### 材料および方法

下関市沿岸で釣獲されたコノシロ (体重約 120 g) を実験に用いた。飼育期間中は, 市販の配合飼料 (マリン 6 号, 林兼産業) を適宜給餌した。なお, 実験時の水温は  $20.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  であった。血液塗抹標本の作製, 多条件下 Romanowsky 型染色評価法 (Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV; Table 1) および各種細胞化学染色法は近藤・高橋<sup>15)</sup> 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<sup>19)</sup> にしたがった。

### 結 果

コノシロの血液中には 3 種類の顆粒球 (好中球, 好塩基球, 小型好酸性顆粒球) が観察され, 好酸球は認められなかった。また, 小型好酸性顆粒球は稀にしか観察されなかった。好中球には 4 種類の, 好塩基球には 3 種類の, 小

型好酸性顆粒球には 3 種類の顆粒が認められた。Zymosan に対する各種顆粒球の貪食能を調べたところ, 好中球には貪食能が認められたが, 好塩基球と小型好酸性顆粒球の貪食像は観察されなかった。

### 好中球

好中球は円形または卵円形 (長径約  $9 \mu\text{m}$ ) であった。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, 円形, 卵円形, 馬蹄形など様々な形状を示し, 分葉核 (3 分葉まで) も認められた。細胞質には 4 種類の顆粒 (2 種類の  $\alpha$  顆粒,  $\beta$  顆粒,  $\gamma$  顆粒) が観察された (Figs. 1A, 1B)。 $\alpha$  顆粒と  $\gamma$  顆粒の MRSC を Table 2 に示す。 $\alpha$  顆粒は形状と染色性の違いから, 桿形の顆粒 (桿形  $\alpha$  顆粒, rod-shaped  $\alpha$  granule) と円形または卵円形の顆粒 (円形  $\alpha$  顆粒, round  $\alpha$  granule) に細分された。前者は長径  $0.8 \mu\text{m}$  以下, 短径  $0.2 \mu\text{m}$  以下であり, 後者は長径  $0.3 \mu\text{m}$  以下であった。桿形  $\alpha$  顆粒はいずれの条件の MG 染色標本にも橙色の顆粒として観察された。また, 多条件下の Giemsa 染色および MGG 染色標本上にも認められた (Table 2)。一方, 円形  $\alpha$  顆粒は Giemsa 染色および MGG 染色によって橙色を呈したが, MG 染色標本には認められなかった (Table 2)。 $\beta$  顆粒は円形または卵円形であり (長径  $0.5 \mu\text{m}$  以下), MRSV のいずれの染色条件においても明瞭な色調を示さなかった。 $\gamma$  顆粒は円形または卵円形 (長径  $0.3 \mu\text{m}$  以下) であり, 淡青色を呈した。本顆粒は, Giemsa 染色では全ての染色条件において, MGG 染色では多くの染色条件において少数観察された (Table 2)。しかし, MG 染色では希釈液に蒸留水, pH5.0 ~ 7.0 の低濃度 (5 mM) リン酸緩衝液および pH5.0 の高濃度 ( $1/15$  M) リン酸緩衝液を用いた場合には認められなかった (Table 2)。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<sup>9)</sup>) も観察された。本小体の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稀であった。本小体はいずれの染色条件においても青色を呈した。

酸性フォスファターゼ (AcP) と  $\beta$ -グルクロニダーゼ ( $\beta$ -Glu) 活性はいずれも長径  $0.3 \mu\text{m}$  以下の円形または卵円形の陽性顆粒として多数認められた (Figs. 2A, 2B)。 $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ ( $\alpha$ -NAE),  $\alpha$ -ナフチルブチレートエステラーゼ ( $\alpha$ -NBE) およびナフトール AS-D クロロアセテートエステラーゼ (NASDCAE) はい

\*本研究の一部は, 平成 26 年度日本魚病学会春季大会 (2014 年 3 月 30 日) (311: 近藤昌和, 仲下 亮, 安本信哉, 高橋幸則: コノシロの顆粒球の形態学的特徴 (プログラムおよび講演要旨集, 42) において報告した。

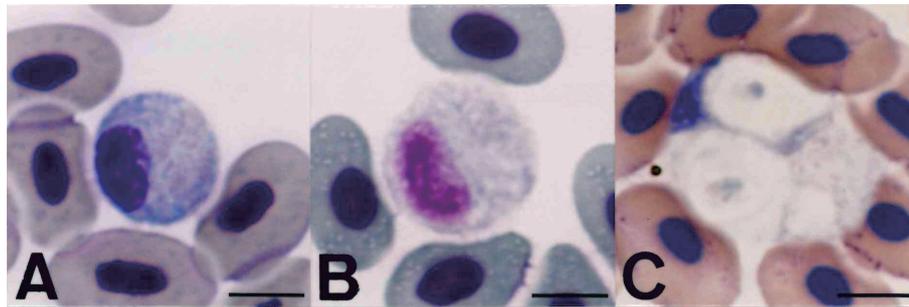
**Table 1.** Staining conditions of multiple Romanowsky-type stain valuation

PN		Condition <sup>1,2</sup>	PN		Condition <sup>1,2</sup>
1	MG	: DW	42	G	: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH8.0, 1:20, 15 min
2		: 5 mM PB, pH5.0	43		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH8.0, 1:20, 60 min
3		: 5 mM PB, pH6.0	44		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH8.0, 1:100, 15min
4		: 5 mM PB, pH7.0	45		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH8.0, 1:100, 60min
5		: 5 mM PB, pH8.0	46	MGG	: DW, 1:20, 15 min
6		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0	47		: DW, 1:20, 60 min
7		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0	48		: DW, 1:100, 15 min
8		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0	49		: DW, 1:100, 60 min
9		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> 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		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0, 1:20, 15min
26		: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	67		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0, 1:20, 60min
27		: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	68		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0, 1:100, 15 min
28		: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	69		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0, 1:100, 60 min
29		: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	70		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 15 min
30		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	71		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 60 min
31		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH5.0, 1:20, 60min	72		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0, 1:100, 15 min
32		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	73		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH6.0, 1:100, 60 min
33		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	74		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0, 1:20, 15min
34		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 15min	75		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0, 1:20, 60min
35		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 60min	76		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0, 1:100, 15 min
36		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	77		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0, 1:100, 60 min
37		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	78		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH8.0, 1:20, 15 min
38		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	79		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH8.0, 1:20, 60 min
39		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	80		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH8.0, 1:100, 15min
40		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	81		: <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH8.0, 1:100, 60min
41		: <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH7.0, 1:100, 60 min			

<sup>1</sup>MG, 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.

<sup>2</sup>Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or <sup>1</sup>/<sub>150</sub> M PB.

PN, preparation number.



**Fig. 1.** Neutrophils of threadfin shad *Konosirus punctatus*. A, May-Grünwald · Giemsa (MGG; PN=70); B, MGG (PN=64); C, phagocytosis of zymosan particles (MGG; PN=48). PN, preparation number (See Table 1). Bars=5  $\mu$ m.

**Table 2.** Summary of multiple Romanowsky-type staining characteristics of rod-shaped  $\alpha$  granule (R), round  $\alpha$  granule (r) and  $\gamma$  granules in the neutrophil of threadfin shad *Konosirus punctatus*

PN	Number			PN	Number			PN	Number		
	R	r	$\gamma$		R	r	$\gamma$		R	r	$\gamma$
1	++	-	-	28	++	-	+	55	++	-	+
2	++	-	-	29	++	-	+	56	++	-	+
3	++	-	-	30	++	-	+	57	++	-	+
4	++	-	-	31	++	-	+	58	++	-	+
5	++	-	+	32	++	-	+	59	++	-	+
6	++	-	-	33	++	-	+	60	++	-	+
7	++	-	+	34	-	++	+	61	++	-	+
8	++	-	+	35	-	++	+	62	-	++	+
9	++	-	+	36	++	-	+	63	-	++	+
10	-	++	+	37	++	-	+	64	-	++	+
11	-	++	+	38	-	++	+	65	-	++	+
12	++	-	+	39	-	++	+	66	++	-	$\pm$
13	++	-	+	40	++	-	+	67	++	-	+
14	++	-	+	41	++	-	+	68	++	-	$\pm$
15	++	-	+	42	-	++	+	69	++	-	+
16	++	-	+	43	-	++	+	70	++	-	+
17	++	-	+	44	-	++	+	71	++	-	+
18	++	-	+	45	-	++	+	72	++	-	+
19	++	-	+	46	++	-	$\pm$	73	++	-	+
20	++	-	+	47	++	-	$\pm$	74	++	-	+
21	++	-	+	48	++	-	$\pm$	75	++	-	+
22	-	++	+	49	++	-	$\pm$	76	++	-	+
23	-	++	+	50	++	-	$\pm$	77	-	++	+
24	++	-	+	51	++	-	$\pm$	78	-	++	+
25	++	-	+	52	++	-	$\pm$	79	-	++	+
26	-	++	+	53	++	-	$\pm$	80	++	-	+
27	-	++	+	54	++	-	+	81	++	-	+

PN, preparation number (See Table 1); ++, many; +, some;  $\pm$ , a few or not observed; -, not observed.

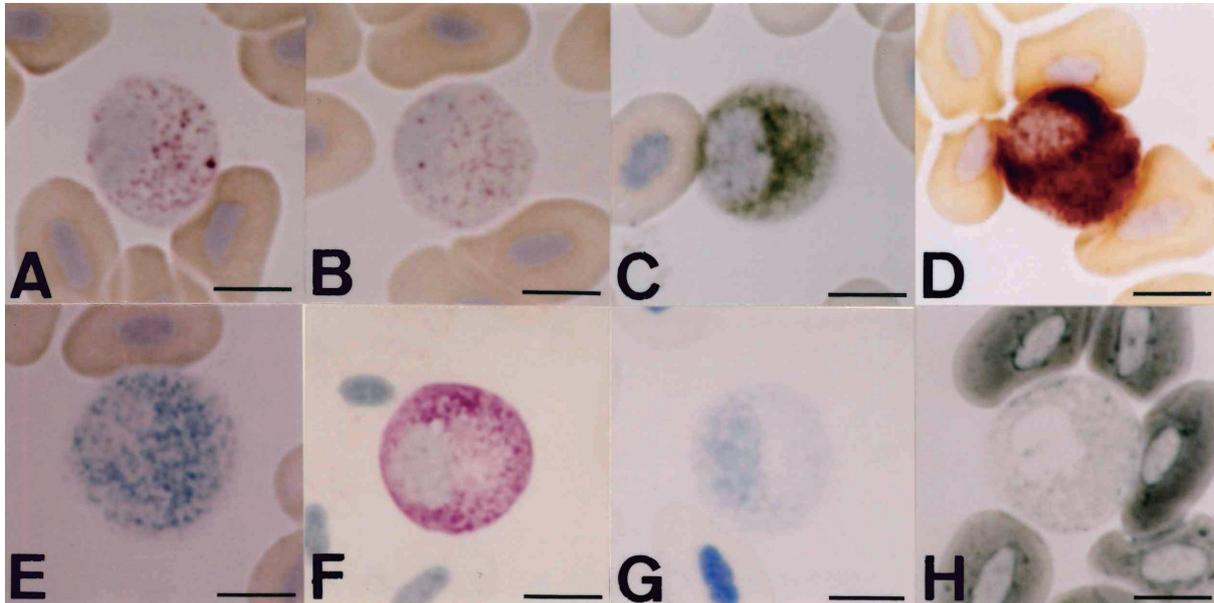


Fig. 2. Cytochemistry of neutrophils from threadfin shad *Konosirus punctatus*. A, acid phosphatase; B,  $\beta$ -glucuronidase; C,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase; D,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; E, naphthol AS-D chloroacetate esterase; F, periodic acid Schiff reaction; G, toluidine blue in distilled water; H, sudan black B. Bars=5  $\mu$ m.

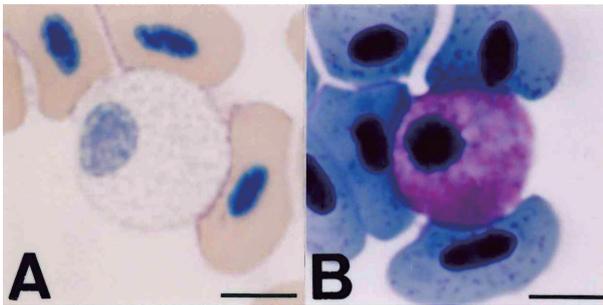
いずれも円形または卵円形（長径 0.4  $\mu$ m 以下）の陽性顆粒として多数観察され、細胞質基質も弱陽性を示した (Figs. 2C-2E)。アルカリ性フォスファターゼ (AIP) と PO はいずれも好中球に検出されなかった。好中球には円形または卵円形の periodic acid Schiff 反応 (PAS) 陽性顆粒（長径 0.4  $\mu$ m 以下）が多数観察され、細胞質基質も弱陽性を示した (Fig. 2F; Table 4)。いずれの陽性部位も  $\alpha$ -アミラーゼ処理によって完全に消失した。アルシアンブルー染色では陽性部位は観察されなかった。トルイジンブルー (TB) 染色によって核が青染され、種々の形態（円形、卵円形、桿形、コマ形、三日月形、紐状）を示す陽性部位が少数認められた (Fig. 2G)。また、円形または卵円形の陽性顆粒（長径 0.3  $\mu$ m 以下）が少数観察された (Fig. 2G)。オイルレッド O およびズダンⅢ染色では陽性部位は観察されなかったが、ズダンブラック B (SBB) 染色によって円形または卵円形の陽性顆粒（長径 0.3  $\mu$ m 以下）が少数観察された (Fig. 2H; Table 4)。

好中球に zymosan に対する貪食能が認められた (Fig. 1C)。

### 好塩基球

好塩基球は長径約 10  $\mu$ m の円形または卵円形であり、偏在した円形から卵円形の核を有していた。核内には小型の濃縮染色質が充満していた。細胞質には 3 種類の顆粒 (A 顆粒, B 顆粒, C 顆粒) が観察された (Fig. 3)。いずれの顆粒も円形または卵円形であり、長径は A 顆粒では 0.7  $\mu$ m 以下、B 顆粒と C 顆粒では 0.3  $\mu$ m 以下であった。A 顆粒は好塩基球の主要な顆粒であり、細胞質に充満していた。本顆粒は、ほとんど全ての染色条件において明瞭な色調を示さなかった (Fig. 3A; Table 3)。しかし、MGG 染色において、希釈液に pH7.0 または pH8.0 の高濃度リン酸緩衝液を用いて Giemsa 原液の希釈率を 1:20 とした場合に、Giemsa 染色時間にかかわらず赤紫色を示した (Fig. 3B; Table 3)。B 顆粒と C 顆粒は細胞質に少数存在し、前者は MG 染色標本には認められず、Giemsa および MGG 染色標本では赤紫色の顆粒として観察された。一方、後者は全ての染色条件において淡青色を示した (Table 3)。

AcP は円形または卵円形（長径 0.3  $\mu$ m 以下）の陽性顆粒として多数観察された (Fig. 4A)。 $\beta$ -Glu 染色を施した

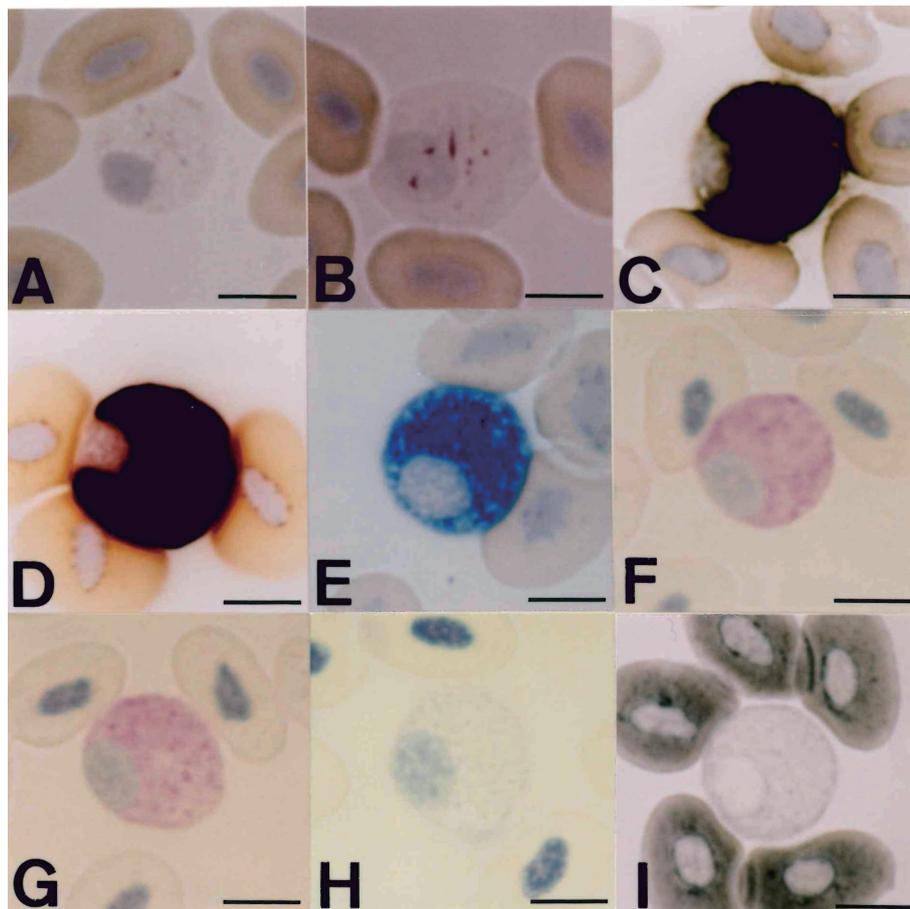


**Fig. 3.** Basophils of threadfin shad *Konosirus punctatus*. A, Giemsa (PN=12); B, May-Grünwald · Giemsa (PN=79). PN, preparation number (See Table 1). Bars=5 µm.

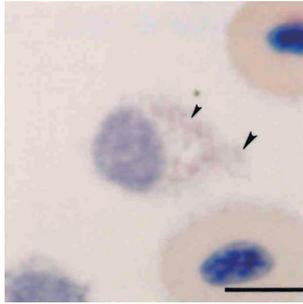
**Table 3.** Color of basophil granules from threadfin shad *Konosirus punctatus*

PN	Type of granules		
	AG	BG	CG
1-9	Cl	N	LB
10-45	Cl	P	LB
46-73	Cl	P	LB
74, 75	P	P	LB
76, 77	Cl	P	LB
78, 79	P	P	LB
80, 81	Cl	P	LB

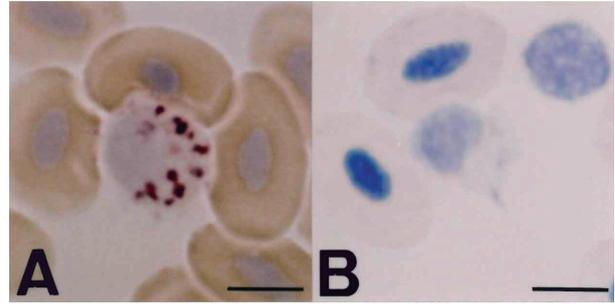
PN, preparation number (See Table 1); Cl, colorless; LB, light blue; P, purple; N, not detected.



**Fig. 4.** Cytochemistry of basophils from threadfin shad *Konosirus punctatus*. A, acid phosphatase; B,  $\beta$ -glucuronidase; C,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase; D,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; E, naphthol AS-D chloroacetate esterase; F, periodic acid Schiff reaction (PAS); G, PAS after  $\alpha$ -amylase digestion; H, toluidine blue in distilled water; I, sudan black B. Bars=5 µm.



**Fig. 5.** Small eosinophilic granulocyte of threadfin shad *Konosirus punctatus*. Giemsa (preparation number, 12; See Table 1); Note eosinophilic granule, chromophobic granule (small arrowhead) and basophilic granule (large arrowhead). Bar=5  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Cytochemistry of small eosinophilic granulocytes from threadfin shad *Konosirus punctatus*. A, acid phosphatase; B, toluidine blue in distilled water. Bars=5  $\mu$ m.

**Table 4.** Summary of reactions of threadfin shad *Konosirus punctatus* granulocytes to cytochemical tests

Test <sup>1</sup>	Positive site (shape, number and positive site) <sup>2</sup>		
	Neutrophil	Basophil	Small eosinophilic granulocyte
PAS	G (r or o, m, 0.4); H	G (r or o, m, 0.7, eq AG); H	—
PAS- $\alpha$ A	—	G (r or o, m, 0.7, eq AG)	—
AB (pH1.0)	—	—	—
AB (pH2.5)	—	—	—
TB	G (r or o, s, 0.3, eq $\gamma$ G; am, af, eq Yb); N	G (r or o, s, 0.3, pr BG or CG); N	G (r or o, af, 0.5); N
SBB	G (r or o, s, 0.3, eq $\gamma$ G)	G (r or o, s, 0.3, pr BG or CG)	—
Sudan III	—	—	—
Oil red O	—	—	—
AIP	—	—	—
AcP	G (r or o, m, 0.3, eq $\alpha$ G)	G (r or o, af, 0.3)	G (r or o, s, 0.7)
$\beta$ -Glu	G (r or o, m, 0.3, eq $\alpha$ G)	G (— or + (80%), r to o (0.3) or sp (2.0 $\times$ 0.5), s to af)	—
$\alpha$ -NAE	G (r or o, m, 0.4); H	ND <sup>3</sup>	—
$\alpha$ -NBE	G (r or o, m, 0.4); H	ND	—
NASDCAE	G (r or o, m, 0.4); H	G (r or o, m, 0.3); H	—
Peroxidase	—	—	—

<sup>1</sup>PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS- $\alpha$ A, PAS after digestion with  $\alpha$ -amylase; AB, alcian blue; TB, toluidine blue in distilled water; SBB, sudan black B; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase;  $\beta$ -Glu,  $\beta$ -glucuronidase;  $\alpha$ -NAE,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase;  $\alpha$ -NBE,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; NASDCAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase.

<sup>2</sup>G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; —, not detected; r, round; o, oval; am, amorphous; sp, spindle; m, many; s, some; af, a few;  $\alpha$ G, round  $\alpha$  granule;  $\gamma$ G,  $\gamma$  granule; AG, A granule; BG, B granule; CG, c granule; Yb, Yasumoto body; eq, equivalent to; pr, probably eq; Arabic numerals indicate the diameter ( $\phi \leq$ ;  $\mu$ m).

<sup>3</sup>ND, not distinguished granule from hyaloplasm due to strong positive cytoplasm.

ところ, 陽性の好塩基球と陰性の好塩基球が認められ, 約 80% の好塩基球が陽性であった。陽性顆粒は円形から卵円形 (長径  $0.3 \mu\text{m}$  以下) または紡錘形 (長径  $2.0 \mu\text{m}$  以下, 短径  $0.5 \mu\text{m}$  以下) など様々であり, 陽性顆粒数は 1 細胞当たり 1 ~ 10 個であった (Fig. 4B)。 $\alpha$ -NAE と  $\alpha$ -NBE 染色では細胞質全体が強陽性であり, 陽性部位の確定はできなかった (Figs. 4C, 4D)。NASDCAE は長径  $0.3 \mu\text{m}$  以下の円形または卵円形の陽性顆粒として多数観察され, 細胞質基質にも陽性反応が見られた (Fig. 4E)。AIP と PO は検出されなかった (Table 4)。好塩基球には円形または卵円形 (長径  $0.7 \mu\text{m}$  以下) の PAS 陽性顆粒が多数観察された (Fig. 4F)。この陽性顆粒は  $\alpha$ -アミラーゼ処理によって消失しなかった (Fig. 4G)。細胞質基質も PAS 弱陽性であったが, 陽性反応は  $\alpha$ -アミラーゼ処理によって陰性となった。アルシアンブルー, オイルレッド O およびズダン III 染色では陽性部位は観察されなかったが, TB および SBB 染色によって長径  $0.3 \mu\text{m}$  以下の円形または卵円形の陽性顆粒が少数観察された (Figs. 4H, 4I; Table 4)。

### 小型好酸性顆粒球

本顆粒球は長径  $6 \sim 10 \mu\text{m}$  の円形から楕円形であり, 円形または卵円形の核を有していた (Fig. 5)。核の染色質網は荒く, 粗大な濃縮染色質が認められた。核は偏在し, 核細胞質比率は高かった。標本上における本顆粒球の割合は極めて低く, 本顆粒球が観察された標本は Table 1 に示す 81 の条件中 25 種類 (標本番号: 1, 6-9, 12, 17, 25, 32, 33, 36, 44, 46, 53, 55, 56, 58, 61, 65, 66, 69, 71, 74, 77, 79) であった。細胞質には 3 種類の顆粒 (a 顆粒, b 顆粒, c 顆粒) が観察された。a 顆粒は赤橙色を呈する長径  $0.5 \mu\text{m}$  以下の円形または卵円形の顆粒であり, 本顆粒球の主要な顆粒であった。b 顆粒は細胞内に少数散在する円形または卵円形の顆粒 (長径  $0.4 \mu\text{m}$  以下) であり, 前述の 25 種類の標本のいずれにおいても明瞭な色調を示さず難染性であった。c 顆粒は小型 (長径  $0.2 \mu\text{m}$  以下) の円形または卵円形の顆粒であり, 多くの染色条件において淡青色を呈したが, 標本番号 1, 6 および 7 では本顆粒は観察されなかった。本顆粒球には, 円形または卵円形の AcP 陽性顆粒 (長径  $0.7 \mu\text{m}$  以下) と TB 陽性顆粒 (長径  $0.5 \mu\text{m}$  以下) が少数認められた (Figs. 6A, 6B; Table 4)。

## 考 察

コノシロの好中球には 2 種類の  $\alpha$  顆粒 (桿形  $\alpha$  顆粒,

円形  $\alpha$  顆粒),  $\beta$  顆粒および  $\gamma$  顆粒が観察された。桿形  $\alpha$  顆粒は MG 染色標本で認められ, 限られた条件ではあるものの, Giemsa 染色および MGG 染色標本でも観察された。このことから, 桿形  $\alpha$  顆粒は  $\alpha 1$  顆粒<sup>29)</sup> に同定される。また, 円形  $\alpha$  顆粒は Giemsa 染色および MGG 染色標本で認められるが, MG 染色標本には観察されなかった。したがって, 円形  $\alpha$  顆粒は  $\alpha 2$  顆粒<sup>29)</sup> に分類される。これまでに 2 種類の  $\alpha$  顆粒を好中球に有する魚種としてピキールが報告されている<sup>13)</sup>。しかし, ピキールの  $\alpha$  顆粒は  $\alpha 1$  顆粒と  $\alpha 3$  顆粒であり, コノシロとは異なる。コノシロ好中球の  $\gamma$  顆粒は Giemsa 染色と MGG 染色では, MRSV のいずれの染色条件においても認められ, 限られた条件ではあるものの MG 染色においても観察されたことから,  $\gamma 1$  顆粒<sup>28)</sup> に同定された。

コノシロ好中球の  $\beta$  顆粒には, タケノコメバル *Sebastes oblongus* の好中球で観察された桿状中心芯<sup>28)</sup> は認められなかった。このことから, コノシロ好中球の  $\beta$  顆粒は  $\beta 2$  顆粒<sup>28)</sup> ではないと言える。しかし,  $\beta$  顆粒には PO 活性が検出されなかった。これまでの研究によると,  $\beta$  顆粒は真骨魚類の好中球に認められ, PO 陽性である<sup>6-12, 15-17, 19-29)</sup>。したがって, コノシロ好中球の  $\beta$  顆粒を  $\beta 1$  顆粒<sup>28)</sup> に同定することは困難と考える。以上の点から,  $\beta$  顆粒の新たな分類基準を提案したい (Table 5)。すなわち, 桿状中心芯を持たず, PO 活性が認められない  $\beta$  顆粒を  $\beta 0$  顆粒とする。

各種細胞化学染色結果から, コノシロ好中球の各顆粒を次のように推定した (Table 4)。PAS 陽性顆粒は, 2 種類の  $\alpha$  顆粒 ( $\alpha 1$  顆粒,  $\alpha 2$  顆粒),  $\beta 0$  顆粒および  $\gamma 1$  顆粒とは, その大きさにおいて異なる。また,  $\alpha$ -アミラーゼにより消化されることから, グリコーゲンを主成分とする構造物であり, 顆粒ではないと考えられる。円形または卵円形の TB 陽性顆粒および SBB 陽性顆粒は形態学的特徴と顆粒数が  $\gamma 1$  顆粒に類似することから,  $\gamma 1$  顆粒は TB および SBB 陽性であると考えられる。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。AcP 陽性顆粒と  $\beta$ -Glu 陽性顆粒は形態学的特徴と顆粒数が  $\alpha 2$  顆粒に類似することから,  $\alpha 2$  顆粒に両酵素活性が存在すると推察される。一方, 各種エステラーゼ陽性顆粒はいずれも MRSV によって認識される顆粒とは大きさが異なることから, これら酵素の存在部位は確定できない。

コノシロの好中球には  $\alpha$  顆粒,  $\beta$  顆粒および  $\gamma$  顆粒が認められることから, 本魚種は真骨魚類の I 群に分類される。しかし,  $\alpha$  顆粒は既報の魚種とは異なり 2 種類存在した。

**Table 5.** Staining characteristics of chromophobic granules ( $\beta$  granules)

Staining	Type of $\beta$ granules					
	$\beta 0$		$\beta 1$		$\beta 2$	
	Substance	RCC	Substance	RCC	Substance	RCC
May-Grünwald	—	U	—	U	—	—
Giemsa	—	U	—	U	—	+ (P)
PO	—	U(—)	+	U(+)	+	—

PO, peroxidase; RCC, rod-shaped central core; +, positive; —, negative; U, unidentified; P, purple.

このことから他の I 群魚類と区別するために I-Z 群の新設を提案する。また、PO が好中球に検出されず、これまでの PO 活性存在部位による細分方法 ( $\beta$  顆粒のみが PO 陽性の場合に a,  $\beta$  顆粒と核が PO 陽性の場合に b) には当てはまらないことから、あらたに PO 活性が検出されないことを示す z を設定する。これにより、コノシロは I-Zz 群に分類され (Table 6), その好中球は  $\alpha 1\alpha 2\beta 0\gamma 1$  と表記される I-Zz 型であると言える。

コノシロの好塩基球には A 顆粒, B 顆粒および C 顆粒が観察された。主要な顆粒である A 顆粒はほとんど全て

の染色条件において明瞭な色調を示さなかった。しかし、一部の MGG 染色では赤紫色に染色された。このことから、この顆粒球を好塩基球と呼ぶことは妥当であると考えられる。各種細胞化学染色の結果、好塩基球の PAS 陽性顆粒は形態学的特徴と顆粒数が類似することから A 顆粒に相当すると考えられる (Table 4)。この PAS 陽性顆粒は  $\alpha$ -アミラーゼにより消化されなかったことから、A 顆粒内にはグリコーゲンとは異なる多糖類が含まれると思われる。TB 陽性顆粒と SBB 陽性顆粒は形態学的特徴と顆粒数が B 顆粒および C 顆粒に類似することから、B 顆粒および C 顆粒は TB および (または) SBB 陽性であると推察される。AcP 陽性顆粒は形態学的特徴において B 顆粒および C 顆粒に類似するが、顆粒数が少ないことから陽性部位は確定できない。 $\beta$ -Glu 陽性顆粒も形態学的特徴において B 顆粒および C 顆粒に類似するが、陽性細胞と陰性細胞が存在するため陽性部位の確定は困難である。各種エステラーゼ活性のうち、NASDCAE 陽性顆粒は形態学的特徴において B 顆粒および C 顆粒に類似するが、顆粒数が異なる。

**Table 6.** Grouping of teleostei fishes based on the granule composition and PO positive site of neutrophil

Group	Subgroup	Granule	PO	Species and references
I	I-Aa	$\alpha 3, \beta 1, \gamma 1$	$\beta 1$	Asian arowana <i>Scleropages formosus</i> <sup>12)</sup> , Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> <sup>3,24)</sup> , jack-mackerel <i>Trachurus japonicus</i> <sup>25)</sup>
	I-Ba	$\alpha 3, \beta 1, \gamma 2$	$\beta 1$	Japanese eel <i>Anguilla japonica</i> <sup>15)</sup> , common carp <i>Cyprinus carpio</i> <sup>1,2,24)</sup> , striped grunt <i>Parapristipoma trilineatum</i> <sup>4,24)</sup> , Japanese amberjack <i>Seriola quinqueradiata</i> <sup>17)</sup> , greater amberjack <i>S. dumerili</i> <sup>25)</sup> , yellowtail amberjack <i>S. lalandi</i> <sup>25)</sup>
	I-Ca	$\alpha 2, \beta 1, \gamma 1$	$\beta 1$	devil stinger <i>Inimicus japonicus</i> <sup>29)</sup>
	I-Zz	$\alpha 1, \alpha 2, \beta 0, \gamma 1$	ND	threadfin shad <i>Konosirus punctatus</i> <sup>**</sup>
II	II-Aa	$\alpha 3, \beta 1$	$\beta 1$	tiger puffer <i>Takifugu rubripes</i> <sup>9)</sup> , grass puffer <i>T. niphobles</i> <sup>27)</sup> , threadsail filefish <i>Stephanolepis cirrhifer</i> <sup>27)</sup>
	II-Ab	$\alpha 3, \beta 1$	$\beta 1, N$	finepatterned puffer <i>Takifugu poecilonotus</i> <sup>27)</sup>
	II-Ba	$\alpha 1, \beta 1$	$\beta 1$	red sea-bream <i>Pagrus major</i> <sup>16)</sup>
III	III-a	$\beta 1$	$\beta 1$	northern pike <i>Exos lucius</i> <sup>11)</sup> , bluegill <i>Lepomis macrochirus</i> <sup>6)</sup> , Japanese seabass <i>Lateolabrax japonicus</i> <sup>10)</sup> , seabass <i>L. latus</i> <sup>10)</sup> , rudderfish <i>Girella punctata</i> <sup>5,7)</sup> , Japanese flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> <sup>7)</sup> , marbled sole <i>Pleuronectes yokohamae</i> <sup>23)</sup> , barfin flounder <i>Verasper moseri</i> <sup>23)</sup>
	III-b	$\beta 1$	$\beta 1, N$	ayu <i>Plecoglossus altivelis</i> <sup>8)</sup> , gray mullet <i>Mugil cephalus</i> <sup>20)</sup> , redlip mullet <i>Chelon haematocheilus</i> <sup>21)</sup> , sevenband grouper <i>Epinephelus septemfasciatus</i> <sup>19)</sup>
IV	IV-Aa	$\beta 1, \gamma 1$	$\beta 1$	Japanese lates <i>Lates japonicus</i> <sup>22)</sup>
	IV-Ba	$\beta 1, \gamma 3b$	$\beta 1$	marbled rockfish <i>Sebastes marmoratus</i> <sup>26)</sup>
	IV-Ca	$\beta 2, \gamma 3a$	$\beta 2^*, N$	oblong rockfish <i>Sebastes oblongus</i> <sup>28)</sup>

$\alpha 1$ , eosinophilic granule ( $\alpha$  granule) type 1;  $\alpha 2$ ,  $\alpha$  granule type 2;  $\alpha 3$ ,  $\alpha$  granule type 3;  $\beta 0$ , chromophobic granule ( $\beta$  granule) type 0;  $\beta 1$ ,  $\beta$  granule type 1;  $\beta 2$ ,  $\beta$  granule type 2;  $\gamma 1$ , basophilic granule ( $\gamma$  granule) type 1;  $\gamma 2$ ,  $\gamma$  granule type 2;  $\gamma 3a$ ,  $\gamma$  granule type 3a;  $\gamma 3b$ ,  $\gamma$  granule type 3b; PO, peroxidase; N, nucleus; ND, not detected.

\*Rod-shaped central core was negative.

\*\*Present report.

小型好酸性顆粒球には3種類の顆粒が認められたが、TB陽性顆粒は形態学的特徴においてa顆粒に類似するものの、陽性顆粒数はa顆粒よりも少ない。また、AcP陽性顆粒はいずれの顆粒とも形態学的特徴が異なっていた。

コノシロはニシン目ニシン科に属するが、これまでにニシン科魚類としてマイワシ *Sardinops melanostictus*<sup>30)</sup>, *S. neopilchardus*<sup>31)</sup>, *Sprattus antipodum*<sup>31)</sup> の、同目カタクチイワシ科のカタクチイワシ *Ergraulis japonicus*<sup>30)</sup> と *E. australis*<sup>31)</sup> の顆粒球について報告があり、マイワシとカタクチイワシではメタノール固定後に Leishman-Giemsa 染色を施した染色像が示されており、*S. neopilchardus*, *S. antipodum* および *E. australis* では染色像はないものの Wright 染色標本に基づく顆粒球分類と PO 活性について報告されている。マイワシとカタクチイワシには好酸球が、カタクチイワシには好塩基球と考えられる顆粒球が観察されているが、好中球は同定されていない<sup>30)</sup>。しかし、マイワシとカタクチイワシの好酸球には淡橙色の微小顆粒が観察されていることから<sup>30)</sup>、本研究におけるコノシロの好中球に相当すると考えられる。また、カタクチイワシにおいて好塩基球と考えられた顆粒球の主要な顆粒は明瞭な色調を示しておらず、脱顆粒したものではないかとされている<sup>30)</sup>。コノシロにおいても好塩基球の主要な顆粒は限られた条件でのみ赤紫色を呈した。このことから、カタクチイワシの好塩基球様の顆粒球は、確かに好塩基球であると考えられる。一方、*S. neopilchardus*, *S. antipodum* および *E. australis* では好中球と好酸球が認められているが、好塩基球は観察されていない<sup>31)</sup>。また、これら3魚種いずれにおいても好酸球には PO 活性は検出されていないが、*S. neopilchardus* のみにおいていくつかの好中球に PO 活性が認められている<sup>31)</sup>。*Sardinops neopilchardus*, *S. antipodum* および *E. australis* では染色像が示されていないことから、コノシロとの比較は困難であるが、これら魚種の好中球は主要な顆粒が染色されていない好塩基球に、一方、好酸球はコノシロの好中球にそれぞれ相当する可能性があるのかもしれない。

## 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. 水大校研報, **50**, 109-117 (2002)
- 2) 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**, 17-29 (2002)
- 3) 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. 水大校研報, **51**, 79-86 (2003)
- 4) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: イサキ好中球の顆粒. 水大校研報, **52**, 45-48 (2004)
- 5) 近藤昌和, 金丸俊介, 高橋幸則: メジナの好中球顆粒. 水大校研報, **52**, 67-71 (2004)
- 6) 近藤昌和, 柏村直宏, 金丸俊介, 稲川裕之, 高橋幸則: サンフィッシュ科魚類 (オオクチバス, ブルーギル) の好中球顆粒. 水大校研報, **53**, 197-202 (2005)
- 7) 近藤昌和, 金丸俊介, 柏村直宏, 稲川裕之, 高橋幸則: ヒラメおよびメジナ好中球顆粒の細胞化学的特徴. 水大校研報, **53**, 203-209 (2005)
- 8) 近藤昌和: 新琵琶湖産アユ冷水病総合対策緊急研究事業報告書 (細胞内病理態様解析, 平成17年度), 滋賀県 (2006)
- 9) 近藤昌和, 稲川裕之, 池田 至, 山元憲一, 高橋幸則: トラフグ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **55**, 133-139 (2007)
- 10) 近藤昌和, 稲川裕之, 高橋幸則: スズキ科魚類 (スズキ, ヒラスズキ, タイリクスズキ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **55**, 141-147 (2007)
- 11) 近藤昌和, 高橋幸則, 山元憲一: ノーザンパイク好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **56**, 317-321 (2008)
- 12) 近藤昌和, 高橋幸則: アジアアロワナの好中球顆粒. 水大校研報, **57**, 219-226 (2009)
- 13) 近藤昌和, 高橋幸則: ポリプテルス好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **57**, 283-297 (2009)
- 14) 近藤昌和, 高橋幸則: ヌタ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, **57**, 299-308 (2009)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 近藤昌和, 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸則: ブリの好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **58**, 101-111 (2009)
- 18) 近藤昌和, 高橋幸則: アフリカハイギョ *Protopterus annectens* 好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水

- 大校研報, **58**, 207-216 (2010)
- 19) 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)
- 20) 近藤昌和, 林 裕之, 高橋幸則: ポラの白血球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **59**, 163-171 (2011)
- 21) 近藤昌和, 林 裕之, 高橋幸則: メナダの白血球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **59**, 173-182 (2011)
- 25) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: アカメ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **60**, 85-93 (2012)
- 23) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: カレイ類 (マコガレイ, マツカワ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 43-49 (2012)
- 24) 近藤昌和, 安本信哉, 大野美和, 高橋幸則: コイ, ナイルティラピアおよびイサキの好中球顆粒. 水大校研報, **61**, 51-64 (2012)
- 25) 近藤昌和, 安本信哉, 秋吉佑樹, 高橋幸則: アジ科魚類 (マアジ, カンパチ, ヒラマサ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 87-101 (2013)
- 26) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: カサゴ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 103-113 (2013)
- 27) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: カワハギおよびフグ類 (クサフグ, コモンフグ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **61**, 226-233 (2013)
- 28) 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)
- 29) 近藤昌和, 安本信哉, 池田 至, 高橋幸則: オニオコゼ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, **62**, 69-74 (2014)
- 30) 池田彌生, 尾崎久雄, 瀬崎啓次郎: 4 マイワシ~5 カタクチイワシ, 魚類血液図鑑. 緑書房, 東京, 45-47 (1986)
- 31) Hine PM, Wain JM: Observations on the granulocyte peroxidase of teleosts: A phylogenetic perspective. *J Fish Biol*, **33**, 247-254 (1988)