

ボラの白血球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 林 裕之, 高橋幸則

Morphological and Cytochemical Characteristics of Leukocytes from Gray Mullet, *Mugil cephalus*

Masakazu Kondo[†], Hiroyuki Hayashi and Yukinori Takahashi

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of leukocytes from gray mullet (*Mugil cephalus*) were examined by light microscopy. Lymphocyte, monocyte and neutrophil were observed in the peripheral blood. Lymphocyte had round to oval nucleus with coarse chromatin-mesh. Cytoplasm was agranular or contained some basophilic (blue) granules (Lymphocyte Basophilic Granule, LBG). Monocyte had round to kidney-shaped nucleus with fine chromatin-mesh and monocyte major granule (MMG) in the cytoplasm. Neutrophil were round to oval and the nucleus round to lobule-shaped. Only one type of granule, chromophobic granule (β G) was observed in the neutrophil. The β G was round to oval, unstained by Romanowsky type stain and peroxidase positive. The Yasumoto body was also found in the neutrophil and toluidine blue positive (orthochromatically).

Key words : gray mullet, *Mugil cephalus*, leukocyte, morphology, cytochemistry

緒 言

血液塗抹標本の観察から、魚類の生理状態について多くの情報が得られることが知られている¹⁾。標本の染色には、メイ・グリュンワルド-ギムザ (MGG) 染色が常用されているが、この染色方法では、1種類の希釈液を用いて染色が行われきた。近年、希釈液の種類、希釈比率および染色時間を変えてRomanowsky型染色 (メイ・グリュンワルド (MG), ギムザ (G) およびMGG染色) を血液塗抹標本に施して染色性の違いから形態学的特徴を評価する「多条件下Romanowsky型染色評価法 (Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV)」によって、各種魚類の好中球顆粒の種類数および染色性が調べられており、魚類の好中球顆粒は、魚種によって多様であることが明らかにされている²⁻¹⁷⁾。

ボラ目魚類は刺身などに利用され、特に、ボラ *Mugil cephalus* の卵巣からはカラスミが製造される¹⁸⁾。ボラ目の系統的な位置については様々な説があり、スズキ目の1亜目として扱われることもあるが、棘鱗類の中で祖先的な1

群であるという考え方が支配的である¹⁹⁾。

本研究では、魚類における好中球顆粒の多様性を明らかにするために、ボラ目ボラ科に属するボラ (ボラ属) の好中球の形態学的特徴を明らかにし、これまでに報告した各種魚類と比較した。また、MRSVを好中球以外の白血球にも適用し、それらの形態学的特徴について明らかにしたのでここに報告する。

材料および方法

実験魚

実験魚には、西田川 (山口県下関市) の河口で採取した平均体重32.3 gのボラを用いた。投網によって採取したのち、水産大学校の飼育施設に搬入して、流水条件下で1週間以上飼育したのち実験に供した。飼育期間中は市販の配合飼料を適宜給餌した。なお、実験期間中の水温は20.0 ± 1.0℃であった。

採血および血液塗抹標本

2010年8月30日受付。Received August 30, 2010.

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

[†]連絡先 (Corresponding author).

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

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

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.

³Preparation number.

ヘパリンを入れた注射器を用いて採血し、血液塗沫標本を作製するとともに、血液を0.9%NaClで希釈して血球計算盤により赤血球濃度を算出した。MGG染色を施した塗沫標本を観察し、赤血球2,000個以上に対する白血球数の割合と、白血球200個以上における各白血球種の割合を求め、各白血球種の濃度を算出した。MRSV (Table 1) および各種細胞化学染色法は文献5にしたがった。

貪食試験

Zymosan A (Sigma) を0.9%NaCl水溶液に懸濁し、3回遠心洗浄した(3,000 rpm, 10分間, 5℃)。沈殿を0.9%NaCl水溶液に 2.3×10^8 cells/mlとなるよう懸濁した。採取したボラ血液9容とZymosan A懸濁液1容を混合し、23℃で1時間培養後、塗沫標本を作製し、MGG染色を施して顕微鏡観察した。

結 果

ボラの血液中には3種類の白血球(リンパ球, 単球および好中球)が観察された。しかし、好酸球および好塩基球は認められなかった。ボラ血液中の白血球濃度(cells/ml)は、 $0.4 \sim 1.3 \times 10^8$ であり、白血球に占めるリンパ球, 単球および好中球の比率は、80.1% (70.1~87.6%), 7.2% (4.0~10.8%) および12.7% (8.5~19.1%)であった($n=7$)。ボラ白血球のMRSVによる染色特性をTable 2に、細胞化学的特徴をTable 3に示した。ボラの単球および好中球にはZymosan Aに対する貪食能が見られたが、リンパ球には貪食能は認められなかった(Fig. 1)。また、貪食を示す単球および好中球の割合はともに約10%であった。

Table 2. Color of leukocytes from gray mullet, *Mugil cephalus*

Staining condition*	Lymphocyte			Monocyte			Neutrophil			Yb
	N	H	LBG	N	H	MMG	N	H	β G	
1	LRP	LB	B	LRP	LB	B	RP	LB	Cl	B
2, 3	LRP	LRP	B	LRP	LRP	B	RP	RP	Cl	B
4, 5	LRP	LB	B	LRP	LB	B	RP	LB	Cl	B
6, 7	LBP	LRP	B	LBP	LRP	B	LB	RP	Cl	B
8, 9	LBP	LB	B	LBP	LB	B	B	LB	Cl	B
10	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
11	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
12, 13	BP	LB	B	BP	LB	B	B	LB	Cl	B
14, 15	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
16-18	BP	LB	B	BP	LB	B	B	LB	Cl	B
19-23	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
24	RP	LB	B	RP	LB	B	B	LB	Cl	B
25-29	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
30	BP	LB	B	BP	LB	B	B	LB	Cl	B
31	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
32	BP	LB	B	BP	LB	B	B	LB	Cl	B
33	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
34	BP	LB	B	BP	LB	B	B	LB	Cl	B
35	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
36	BP	LB	B	BP	LB	B	B	LB	Cl	B
37-43	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
44	BP	LB	B	BP	LB	B	B	LB	Cl	B
45	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
46-66	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B
67-69	RP	LB	B	RP	LRP	B	RP	LB	Cl	B
70-81	RP	LB	B	RP	LB	B	RP	LB	Cl	B

N, nucleus; H, hyaloplasm; LBG, lymphocyte basophilic granule; MMG, monocyte major granule; β G, β granule (chromophobic granule); Yb, Yasumoto body; B, blue; BP, bluish purple; Cl, colorless; LB, light blue; LBP, light bluish purple; LRP, light reddish purple; RP, reddish purple.

*See Table 1.

リンパ球

リンパ球は長径5.3~7.0 μ mの円形または卵円形であった (Fig. 2A)。細胞に占める核の割合は高く、約70%のリンパ球において、長径0.2~1.2 μ mの円形または卵円形の顆粒が観察された。この顆粒はいずれの染色条件においても青色を呈した。以後、リンパ球に観察される顆粒をリンパ球塩基好性顆粒 (Lymphocyte Basophilic Granule, LBG) と称す。

核は長径4.5~5.8 μ mの円形または卵円形であり、細胞内にやや偏在していた。核の染色質網は荒く、粗大な異染色質が観察された。異染色質は蒸留水および低濃度 (5 mM) のリン酸緩衝液を希釈液に用いたMG染色では、いずれのpHにおいても淡赤紫色を示したが、高濃度 ($1/15$ M) のリン酸緩衝液ではpHに関係なく淡青紫色であった。蒸留水を希釈液に用いたG染色では、希釈率 (G液: 希釈液) を1:20とした場合、染色時間 (15分間, 1時間) にかかわらず、異染色質は赤紫色を呈したが、希釈率1:100では青紫色であった。低濃度の緩衝液を希釈液に用いたG染色では、pH5.0の場合、希釈率1:20では異染色質は赤紫色を示し、1:100では、15分間の染色によって青紫色を呈したが、1時間の染色では赤紫色であった。一方、pH6.0~8.0の場合、低濃度の緩衝液を用いたG染色では、希釈率および染色時間にかかわらず、異染色質は赤紫色を呈した。高濃度の緩

衝液を用いたG染色では、pH5.0およびpH6.0の場合、希釈率にかかわらず、15分間の染色では異染色質は青紫色を呈し、1時間の染色では赤紫色であった。また、pH7.0の場合、希釈率および染色時間にかかわらず、異染色質は赤紫色を呈したが、pH8.0では、希釈率1:20の場合は、pH7.0と同様であるものの、1:100では15分間の染色によって青紫色呈し、1時間の染色では赤紫色であった。MGG染色では、いずれの希釈液を用いてもG液の希釈率および染色時間にかかわらず異染色質は赤紫色を示した。

細胞質基質はほとんど全ての染色条件において淡青色を呈したが、pH5.0およびpH6.0の緩衝液を用いたMG染色では、濃度にかかわらず淡赤紫を示した。

約10%のリンパ球には、periodic acid Schiff反応 (PAS) に陽性の顆粒が細胞質にまれに少数散在していた。PAS陽性顆粒は長径0.6 μ m以下の円形または卵円形であり、 α -アマラーゼ処理 (α -A) によって消失した。また、いずれのリンパ球においても細胞質基質がPAS陽性であったが、 α -Aによって消失せず、色調も減弱しなかった。アルシアンブルー (AB) 染色では陽性部位は観察されなかった。蒸留水に溶解したトルイジンブルー (TB) によって、核および細胞質基質が青色を呈し、約70%のリンパ球には種々の大きさの青色の陽性顆粒 (円形または卵円形, 長径0.2~1.2 μ m) が少数観察された。オイルレッドO (ORO) および

Table 3. Cytochemical reactivities of leukocytes from gray mullet, *Mugil cephalus*

Test ¹	Positive site (shape and number) ²		
	Lymphocyte	Monocyte	Neutrophil
PAS	G (- or + (10%), r or o, s); H	G (- or + (20%), r, o or st, s)	G (r or o, m); H
PAS- <i>α</i> A	H	G (- or + (20%), r, o or st, s)	H (weak)
AB (pH1.0)	-	-	-
AB (pH2.5)	-	-	-
TB	G (- or + (70%), r or o, s, eq LBG); H; N	G (r, o, rod, co, cr or st, m, eq MMG); H; N	G (r, o, rod, co, cr or st, s, eq Yb); H; N
SBB	G (r, o, or rod, s); H (weak)	G (r, o, rod, co or cr, s); H (weak)	G (- or + (80%), r, o, rod, co or cr, s to m); H (weak)
SIII	-	-	-
ORO	-	-	-
AIP	-	-	-
AcP	G (r, o or rod, s)	G (r, o, rod, co or cr, m)	G (r, o or rod, m)
<i>β</i> -Glu	G (- or + (80%), r, o or rod, af)	G (- or + (60%), r, o, co or cr, af to s); H (weak)	G (- or + (60%), r, o, rod, co, cr or st, af)
<i>α</i> -NAE	-	-	G (o or o, s); H (weak)
<i>α</i> -NBE	-	-	-
NASDCAE	G (- or + (60%), r or o, af)	G (- or + (60%), r, o or rod, af)	G (- or + (80%), r, af)
PO	-	-	G (r or o, m, eq <i>β</i> G); N

¹PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS-*α*A, PAS after *α*-amylase digestion; AB, alcian blue; TB, toluidine blue; SBB, sudan black B; SIII, sudan III; ORO, oil red O; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; *β*-Glu, *β*-glucuronidase; *α*-NAE, *α*-naphthyl acetate esterase; *α*-NBE, *α*-naphthyl butyrate esterase; NASDCAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase.

²G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; r, round; o, oval; co, comma; cr, crescent; st, string; m, many; s, some; af, a few; -, non detection; eq, equivalent to; LBG, lymphocyte basophilic granule; MMG, monocyte major granule; *β*G, *β* granule (chromophobic granule); Yb, Yasumoto body.

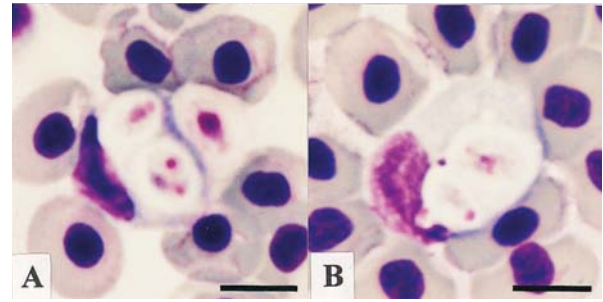


Fig. 1. Phagocytosis of Zymosan A by monocyte (A) and neutrophil (B) from gray mullet. MGG. Bars=5 μ m.

ズダンⅢ (SIII) 染色では陽性部位は観察されなかった。ズダンブラックB (SBB) 染色では、不定形 (円形 (直径0.3 μ m以下), 卵円形 (長径0.4 μ m以下), 桿形 (長径0.6 μ m以下, 短径0.3 μ m以下)) の陽性顆粒がいずれのリンパ球にも少数観察された。また, 細胞質基質も弱陽性であった。アルカリ性フォスファターゼ (AIP) は検出されなかった。酸性フォスファターゼ (AcP) 染色によって, 不定形 (円形 (直径0.4 μ m以下), 卵円形 (長径0.8 μ m以下), 桿形 (長径0.6 μ m以下, 短径0.2 μ m以下)) の陽性顆粒がいずれのリンパ球にも少数観察された (Fig. 2B)。約80%のリンパ球において, 不定形 (円形 (直径0.4 μ m以下), 卵円形 (長径0.6 μ m以下), 桿形 (長径1.6 μ m以下, 短径0.6 μ m以下)) の *β*-グルコニダーゼ (*β*-Glu) 陽性顆粒が少数観察された (Fig. 2C)。*α*-ナフチルアセテートエステラーゼ (*α*NAE) および *α*-ナフチルブチレートエステラーゼ (*α*NBE) は検出されなかった。ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (NASDCAE) 染色では, 約60%のリンパ球に長径0.5 μ 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。ペルオキシダーゼ (PO) は検出されなかった。

単球

単球は長径9.2~11.2 μ mの円形または卵円形であった (Fig. 2D)。細胞に占める核の割合は低く, 細胞質には直径0.6 μ m以下の円形または卵円形顆粒とともに, 桿形 (長径1.2 μ m以下, 短径0.6 μ m以下) やコマ形, 三日月形および紐状 (長さ3.2 μ m以下) の顆粒が多数観察された。本顆粒はいずれの条件のRomanowsky型染色によっても青色を呈した。本顆粒を以後, 単球主要顆粒 (Monocyte Major Granule, MMG) と称す。

核は長径7.8~8.2 μ mの円形からソラ豆形であり, 細胞内にやや偏在していた。核の染色質網は細かく, 小型の異染色質が観察された。染色質のMRSV特性はリンパ球と同様

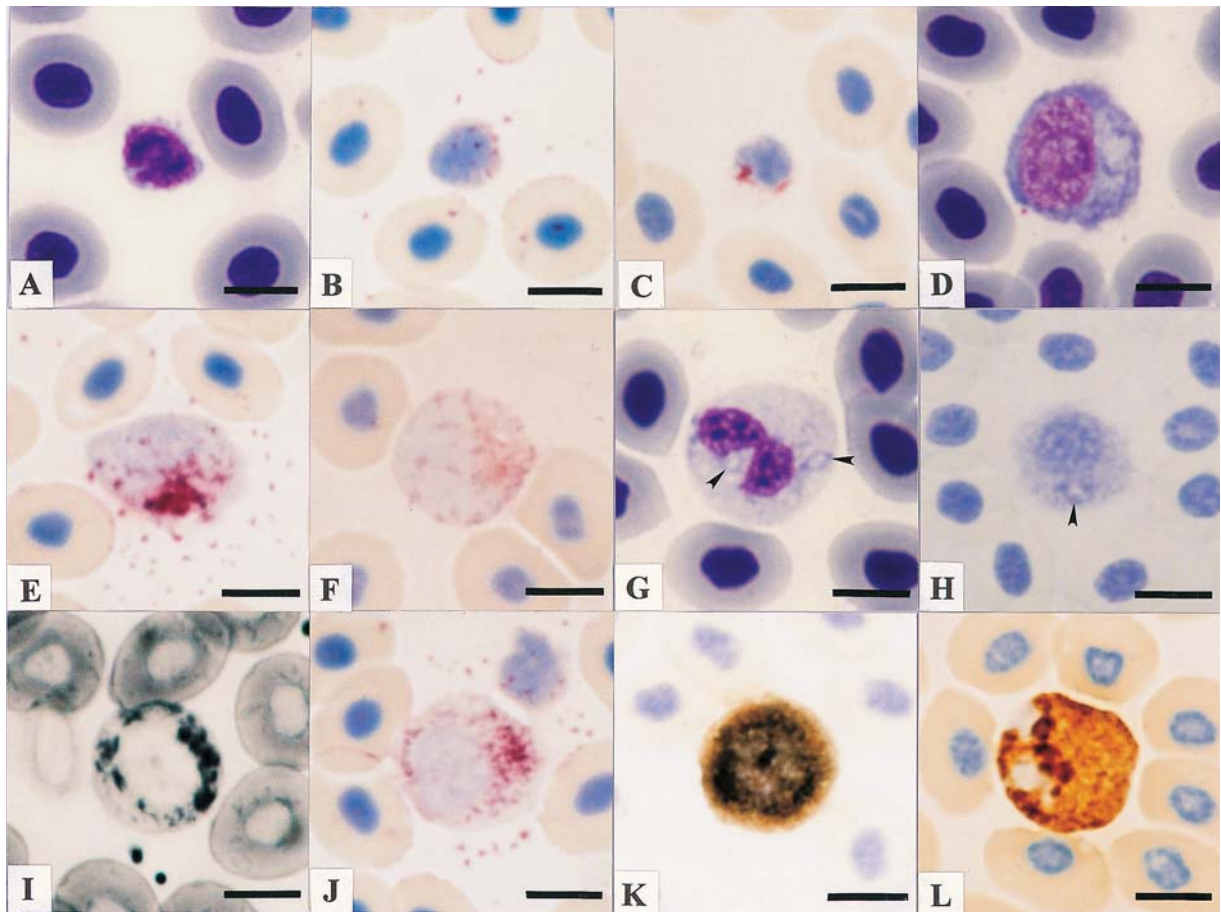


Fig. 2. Leukocytes of gray mullet. A-C, lymphocyte; D-F, monocyte; G-L, neutrophil. A, D and G, MGG; B, E and J, acid phosphatase; C and F, β -glucuronidase; H, toluidine blue; I, sudan black B; K, α -naphthyl acetate esterase; L, peroxidase. Arrowheads show Y-body. Bars=5 μ m.

であった。

細胞質基質は多くの染色条件において淡青色を呈したが、pH5.0およびpH6.0の緩衝液を用いたMG染色では、緩衝液の濃度にかかわらず淡赤紫色を示した。また、pH5.0の高濃度の緩衝液を用いたMGG染色において、G液の希釈率が1:20では1時間の染色で、1:100では染色時間にかかわらず細胞質基質は淡赤紫色を示した。

単球の約20%に少数のPAS陽性顆粒が観察された。この陽性顆粒は長径0.6 μ m以下の円形または卵円形、あるいは紐状(長さ1.2 μ m以下)であり、 α -Aによって消失しなかった。細胞質基質はPAS陰性であった。AB染色では陽性部位は観察されなかった。TB染色では、いずれの単球においても、核および細胞質基質とともに種々の大きさおよび形状の多数の顆粒(円形(直径0.6 μ m以下)、卵円形(長径0.6 μ m以下)、桿形(長径1.2 μ m以下、短径0.6 μ m以下)、コマ形、三日月形、紐状(長さ3.2 μ m以下))がTB陽性であり、青色を呈した。OROおよびSⅢ染色では陽性部位は観察されなかった。しかし、SBB染色では不定形(円形

(直径0.6 μ m以下)、卵円形(長径0.6 μ m以下)、桿形(長径1.0 μ m以下、短径0.4 μ m以下)、コマ形、三日月形)の陽性顆粒が、いずれの単球においても少数観察された。また、細胞質基質もSBBに弱陽性であった。AIPは検出されなかった。AcP染色では、不定形(円形(直径0.4 μ m以下)、卵円形(長径0.6 μ m以下)、桿形(長径1.2 μ m以下、短径0.6 μ m以下)、コマ形、三日月形)の陽性顆粒が、いずれの単球にも多数観察された(Fig. 2E)。 β -Glu陽性顆粒は、長径0.6 μ m以下の円形または卵円形あるいは不定形(コマ形、三日月形)であり、約60%の単球に少数観察された(Fig. 2F)。また、いずれの単球においても細胞質基質が弱陽性であった。 α NAEと α NBEはいずれの単球においても認められなかった。NASDCAEは、長径0.6 μ m以下の円形または卵円形あるいは桿形(長径0.8 μ m以下、短径0.6 μ m以下)の陽性顆粒として、約60%の単球に少数認められた。POは検出されなかった。

好中球

好中球は直径7.4~10.3 μm の円形または卵円形であり、細胞に占める核の割合は低く、細胞質には1種類の顆粒(難染性顆粒, chromophobic granule, 以後, β 顆粒と称す)とY小体(安本小体, Yasumoto body (Y-body))が観察された(Fig. 2G)。 β 顆粒は、円形または卵円形で長径0.8 μm 以下であり、細胞質に充満していた。本顆粒は、いずれの条件のRomanowsky型染色においても明瞭な色調を示さず難染性であった。一方、Y小体はいずれの染色条件においても青色を呈し、円形(直径0.4 μm 以下)、卵円形(直径0.6 μm 以下)、桿形(長径1.0 μm 以下、短径0.4 μm 以下)、コマ形、三日月形、紐状(長さ2.6 μm 以下)など、形状および大きさは多様であった。Y小体の個数は少なく、好中球ごとに異なっていたが、全く観察されない好中球は認められなかった。

核は円形(直径4.8~6.3 μm)から分葉核であり、細胞の中央またはやや偏在して存在した。核の染色質網は細かく、小型の異染色質が観察された。異染色質はpH5.0およびpH6.0の高濃度緩衝液を用いたMG染色において淡青色を呈した。一方、pH7.0およびpH8.0の高濃度緩衝液を用いたMG染色では、異染色質は青色を呈した。蒸留水を希釈液に用いたG染色では、希釈率1:100の場合、染色時間にかかわらず異染色質は青色を呈した。また、低濃度の緩衝液を用いたG染色では、pH5.0で希釈率1:100の場合に、染色時間にかかわらず異染色質は青色を呈した。しかし、希釈率1:20では、15分間の染色において異染色質は青色に染色されたが、1時間の染色では赤紫色を呈した。一方、高濃度の緩衝液を用いたG染色では、pH5.0およびpH6.0の場合、いずれの希釈率においても、15分間の染色では異染色質は青色を呈したが、pH8.0の場合、希釈率1:100において、15分間の染色では青色を呈し、1時間の染色では赤紫色を示した。他の染色条件では、異染色質は赤紫色であった。

細胞質基質のMRSV特性はリンパ球と同様であった。

長径0.3 μm 以下の円形または卵円形のPAS陽性顆粒がいずれの好中球においても細胞質に多数観察された。この陽性顆粒は α -Aによって消失した。また、細胞質基質もPASで弱陽性であったが、 α -Aによって色調は減弱するものの、完全には消失しなかった。AB染色では陽性部位は観察されなかった。TB染色によって、種々の形態(円形(直径0.4 μm 以下)、卵円形(直径0.6 μm 以下)、桿形(長径1.0 μm 以下、短径0.4 μm 以下)、コマ形、三日月形、紐状(長さ2.6 μm 以下))を示す青色の顆粒が少数観察された

(Fig. 2H)。この顆粒の数は好中球ごとに異なっていた。また、核および細胞質基質もTB陽性であり、青色を呈した。OROおよびSIII染色では陽性部位は観察されなかった。約80%の好中球において、不定形(円形(直径0.3 μm 以下)、卵円形(長径0.9 μm 以下)、桿形(長径0.9 μm 以下、短径0.4 μm 以下)、コマ形、三日月形)の様々な数のSBB陽性顆粒が観察された(Fig. 2I)。また、いずれの好中球においても、細胞質基質が弱陽性であった。AIPは検出されなかった。AcPは不定形(円形(直径0.5 μm 以下)、卵円形(長径0.7 μm 以下)、桿形(長径0.8 μm 以下、短径0.3 μm 以下))の陽性顆粒として多数観察された(Fig. 2J)。約60%の好中球において、不定形(円形(直径1.1 μm 以下)、卵円形(長径1.1 μm 以下)、桿形(長径1.4 μm 以下、短径0.8 μm 以下)、コマ形、三日月形、紐状(長さ2.1 μm 以下))の β -Glu陽性顆粒が少数認められた。 α NAE陽性顆粒は、長径0.4 μm 以下の円形または卵円形であり、いずれの好中球にも少数観察された(Fig. 2K)。また、細胞質基質も陽性であった。 α NBEは検出されなかった。NASDCAEは、約80%の好中球において、直径0.3 μm 以下の円形陽性顆粒として少数認められた。PO陽性顆粒(長径0.8 μm 以下)は円形または卵円形であり、細胞質に充満していた(Fig. 2L)。また、核にもPO陽性反応が認められた。

考 察

ボラの血液中には3種類の白血球(リンパ球、単球および好中球)が観察された。中院(1919)はボラの血液中にリンパ球、単球および3種類の顆粒球(エオジン嗜好性白血球、塩基嗜好性白血球、両色嗜好性白血球)を観察している^{20,21)}。一方、池田ら(1986)は、著書にボラの各白血球種の比率および血中濃度(pp. 240-241)を記しており²²⁾、白血球種としてリンパ球、単球および好中球の存在を認めているが、好酸球と好塩基球については言及していない。本研究においても、ボラの血液中に好酸球と好塩基球は認められなかった。池田ら(1986)²²⁾は、ボラの血液中に単球の存在を記しているが、血液像(p. 51)は提示しておらず、その理由は不明である。

リンパ球

哺乳類、鳥類、爬虫類および両生類のリンパ球には、時にアズール顆粒が少数観察されるが²³⁻²⁷⁾、魚類では一般に、リンパ球にはアズール顆粒は認められておらず²⁸⁾、池田ら(1986)も、112種の魚類のうち、キュウセン*Halichoeres*

poecilopterus (スズキ目ベラ科) とナイルティラピア *Oreochromis niloticus* のみに赤紫色の顆粒を有するリンパ球を観察し、この顆粒を「アズール顆粒」と呼んでいる²²⁾。本研究においてボラのリンパ球には顆粒状構造物が少数ながら観察された。この構造物は明瞭な粒子状であったことから、本報告では顆粒 (LBG) として扱う。LBGは、MG染色では青色を示した。この色調は、MG染色液中のエオシン酸メチレンブルーが水溶液中で解離して形成されたEYとMBのうち、MBによるものと思われる。MBは被染色物によっては異調染色性を示すこともあるが²⁹⁾、MG染色でLBGは青色であったことから、本顆粒はMBによって正調染色性を示したと考えられる。LBGはG染色によっても青色を示した。G液は、エオシン酸メチレンブルー、エオシン酸アズールB、アズールB (AB) およびMBを含むが、水溶液中では、エオシン酸メチレンブルーとエオシン酸アズールBがそれぞれ解離してEY、MBおよびABとなるので、染色時にはこれら3種類の色素によって染色が起こる。G染色液中にもMBが存在することから、LBGはG染色においてもMG染色と同様に、MBによって染色されると推察される。

リンパ球にはPAS陽性顆粒がまれに少数散在していた。この顆粒は、長径 $0.6\mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形であり、 α -Aによって消失した。このことから、PAS陽性顆粒はグリコーゲン粒子であり、存在率および大きさからLBGとは異なると考えられる。細胞質基質もPAS陽性であったが、 α -Aによって消失しなかったことから、グリコーゲンは異なる多糖類が存在すると考えられる。約70%のリンパ球に種々の大きさの円形または卵円形陽性顆粒が少数観察された。この顆粒は、存在率、形状、大きさおよび数の類似性からLBGに相当すると思われる。SBB陽性顆粒は不定形であり、いずれのリンパ球にも観察されることから、LBGとは異なると考えられる。リンパ球にはAcP、 β -GluおよびNASDCAE陽性顆粒が観察されたが、これらの陽性顆粒は、存在率、大きさ、形状または数がLBGとは異なる。

単球

哺乳類、鳥類、爬虫類および両生類の単球には、アズール顆粒が観察されるが²³⁻²⁷⁾、魚類では一般に、単球にはアズール顆粒は認められておらず²⁸⁾、池田ら (1986) も、112種の魚類のいずれの単球にもアズール顆粒を観察していない²²⁾。また、魚類の単球の細胞質には光学顕微鏡観察では顆粒は認められず、電子顕微鏡観察において、ゴルジ装置起源の小胞や顆粒が観察されるとされている²⁸⁾。しかし、

その小胞や顆粒が染色標本上で全く染まらないのか否かについては言及されていない。本研究では、ボラの単球に青色を呈する顆粒状構造物 (MMG) が認められた。MMGはMG染色によっても青色を示すことから、リンパ球のLBGと同様に、正調MB好性であると考えられる。

約20%の単球にPAS陽性顆粒が少数認められたが、 α -Aによって消失しなかった。したがって、単球のPAS陽性顆粒はリンパ球や好中球 (後述) のPAS陽性顆粒とは異なりグリコーゲン粒子ではないと推察される。また、単球のPAS陽性顆粒は、存在率および形状から、MMGとは異なると思われる。一方、TB陽性顆粒はいずれの単球にも観察され、形状および大きさが類似することから、MMGに相当すると考えられた。SBB陽性顆粒はいずれの単球において観察されたが、陽性顆粒数がMMGよりも少なく、また、顆粒の形状および大きさがMMGと一致しない。AcP陽性顆粒がいずれの単球にも多数観察され、約60%の単球に β -Glu陽性顆粒とNASDCAE陽性顆粒が少数認められた。これら酵素陽性顆粒は、存在率、形状、大きさまたは数などから、MMGとは異なると考えられる。

好中球

好中球の顆粒は、Romanowsky型染色に明瞭な染色性を示さず、PO陽性の難染性顆粒 (β 顆粒) のみであった。また、好中球には好塩基性を示す不定形構造物であるY小体が存在することが明らかとなった。

いずれの好中球にも円形または卵円形のPAS陽性顆粒が多数観察された。この陽性顆粒は α -Aによって消失したことからグリコーゲン粒子と考えられる。細胞質基質もPAS弱陽性であったが、 α -Aによって色調は減弱するものの完全には消失しなかった。したがって、細胞質基質にはグリコーゲン以外の多糖類も存在すると思われる。TB染色によって、種々の形状を示す青色の顆粒が好中球に少数観察された。この顆粒の数は好中球ごとに異なっており、数および形状からY小体に相当すると思われる。約80%の好中球に不定形のSBB陽性顆粒が少~多数観察されたが、存在率、形状および数からSBB陽性顆粒は β 顆粒およびY小体とは異なると思われる。好中球にはAcP陽性顆粒が多数観察されたが、陽性顆粒の形状は、円形、卵円形および桿形であった。また、 β -Glu陽性顆粒は約60%の好中球に少数観察され、円形、卵円形、桿形、コマ形、三日月形、紐状であった。 α NAE陽性顆粒は長径 $0.4\mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形であり、陽性顆粒数は少数であった。また、NASDCAEは約80%の好中球に少数認められた。これらの酵素

陽性顆粒は、形状、大きさ、存在率または数の違いから β 顆粒およびY小体とは異なると思われる。一方、PO陽性顆粒はいずれの好中球にも観察され、大きさ、形状および数から β 顆粒に相当すると考えられる。

真骨魚類は好中球内顆粒の種類数の違いから3群に大別され、好酸性顆粒(α 顆粒)、 β 顆粒および好塩基性顆粒(γ 顆粒)の3種類の顆粒が好中球に認められるI群には、アジアアロワナ*Scleropages formosus*、ウナギ*Anguilla japonica*およびコイ*Cyprinus carpio*といった原始的な魚類が含まれることから⁴⁻⁷⁾、I群の好中球は、真骨魚類好中球の原型であると推察されている³⁾。また、II群の好中球には α 顆粒と β 顆粒が認められ、トラフグ*Takifugu rubripes*とマダイ*Pagrus major*に観察されているが^{8,9)}、 α 顆粒の染色性が両魚種間で異なることから、II-A群(トラフグ)とII-B群(マダイ)に細分されている⁹⁾。フグ目は、スズキ目のニザダイ科やマトウダイ目から派生したと考えられているが³⁰⁾、II-A群とII-B群の好中球形態に基づく系統進化上の位置づけは明確ではない。III群の好中球には β 顆粒のみが認められ、ノーザンパイク*Exos lucius*や¹⁰⁾、各種スズキ目魚類¹¹⁻¹³⁾およびスズキ目から派生したとされるカレイ目のヒラメ*Paralichthys olivaceus*が本群に含まれることから¹⁴⁾、現生真骨魚類のうち、新顎類³¹⁾に広範囲にわたって受け継がれている形質と考えられている³⁾。しかし、スズキ目のナイルティラピア、イサキ*Parapristipoma trilineatum*およびブリ*Seriola quinqueradiata*はI群に¹⁵⁻¹⁷⁾、また、マダイは上述のようにII-B群に属する⁹⁾。したがって、スズキ目魚類は、好中球内の顆粒の種類数から見て多様ではないかと考えられている⁹⁾。ボラの好中球には β 顆粒のみが認められたことから、ボラは真骨魚類のIII群に属し、その好中球はIII型好中球に相当することが明らかとなった。

いずれの真骨魚類においても β 顆粒は円形から卵円形であり、長径は約 $1.0\mu\text{m}$ 以下とされている⁴⁻¹⁷⁾。ボラの β 顆粒も長径 $0.8\mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形顆粒として観察された。

TB陽性のY小体は、魚類を含む脊椎動物の原始的な系統とされているスタウナギ類³¹⁾に属するスタウナギ*Eptatretus burgeri*や、真骨魚類とともに条鰭綱に含まれ、条鰭綱の中で最も祖先的と考えられている腕鰭亜綱ポリプテルス目³¹⁾に属する*Polypterus endlicheri*およびコイを除く各種真骨魚類の好中球に観察されている^{2-5,8-17)}。また、コイにおいても、病原細菌*Aeromonas hydrophila*に人為感染させることで、本小体を有する好中球が血液中に出現することが

報告されている³²⁾。したがって、Y小体は魚類の好中球に共通する構造物と考えられており²⁾、ボラの好中球にもY小体が観察されたことは、この考えを支持している。

スタウナギの好中球では γ 顆粒に α -NBEが検出されている²⁾。また、*P. endlicheri*の α 1顆粒にSBB陽性物質、AIP、AcP、 β -Glu、 α -NAE、 α -NBEおよびNASDCAEが認められており³⁾、アジアアロワナでは γ 顆粒にNASDCAEが⁴⁾、ウナギの γ 顆粒にはAcP、 α -NAEおよび α -NBEが⁵⁾、ノーザンパイクの β 顆粒にAcP活性が¹⁰⁾、マダイの α 顆粒にAcP、 α -NAEおよびNASDCAEが、 β 顆粒にSBB陽性物質が⁹⁾、ブリでは、 β 顆粒にAIPとSBB陽性物質が、 γ 顆粒に α -NAEが存在すると考えられている¹⁷⁾。一方、PO陽性顆粒はこれまでに、アジアアロワナ、ウナギ、ノーザンパイク、ブルーギル*Lepomis macrochirus*、スズキ*Lateolabrax japonicus*、ヒラスズキ*L. latus*、メジナ*Girella punctata*、マダイ、ブリ、ヒラメおよびトラフグにおいて観察されており、陽性顆粒の数、大きさおよび形状の類似性から、本酵素は β 顆粒に局在すると考えられている^{4,5,8-12,14,17)}。ボラ好中球の β 顆粒にもPOが検出され、また、好中球の核にも陽性反応が認められたが、上述の他の魚種では、PO活性は核には検出されていない。このことから、ボラをIII群から独立させてIII-B群とし、ボラの好中球をIII-B型好中球とするとともに、他のIII群魚類(ノーザンパイク、オオクチバス*Micropterus salmoides*、ブルーギル、スズキ、ヒラスズキ、タイリクスズキ*L. sp.*、メジナおよびヒラメ)のうち、核にPO活性が認められないノーザンパイク、ブルーギル、スズキ、ヒラスズキ、メジナおよびヒラメをIII-A群、これら魚種の好中球をIII-A型好中球と呼ぶことを提案する。なお、オオクチバスとタイリクスズキは、好中球のPO染色性が明らかでないことから、当面、単にIII群として扱うこととしたい。

文 献

- 1) 舞田正志, キロン ヴイスワナス: 魚類の栄養と健康, 渡邊 武編 改訂 魚類の栄養と飼料, 恒星社厚生閣, 東京, 251-269 (2009)
- 2) 近藤昌和, 高橋幸則: スタウナギ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 57, 299-308 (2009)
- 3) 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. 水大研報, 57, 283-297 (2009)
- 4) 近藤昌和, 高橋幸則: アジアアロワナの好中球顆粒. 水大研報, 57, 219-226 (2009)

- 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. 水大研報, 58, 1-13 (2009)
- 6) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のメイ-グリェンワルド・ギムザ染色性. 水大研報, 50, 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, 17-29 (2002)
- 8) 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. 水大研報, 55, 133-139 (2007)
- 9) 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. 水大研報, 58, 15-22 (2009)
- 10) 近藤昌和, 高橋幸則, 山元憲一: ノーザンバイク好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 56, 317-321 (2008)
- 11) 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. 水大研報, 53, 197-202 (2005)
- 12) 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. 水大研報, 55, 141-147 (2007)
- 13) 近藤昌和, 金丸俊介, 高橋幸則: メジナの好中球顆粒. 水大研報, 52, 67-71 (2004)
- 14) 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. 水大研報, 53, 203-209 (2005)
- 15) 安本信哉, 近藤昌和, 高橋幸則: テラピア好中球顆粒のメイ-グリェンワルド・ギムザ染色性. 水大研報, 51, 79-86 (2003)
- 16) 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, 45-48 (2004)
- 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. 水大研報, 58, 101-111 (2009)
- 18) 瀬能 宏: ボラ科, 川那部浩哉, 水野信彦, 細谷和海編 山溪カラー名鑑 日本の淡水魚. 山と溪谷社, 東京, 458-464 (2002)
- 19) 甲斐嘉晃: 条鰭類, 谷内 透代表編 魚の科学事典. 朝倉書店, 東京, 39-68 (2005)
- 20) 中院孝圓: 魚類ノ血球ニ就キテ. 京都医学雑誌, 17, 115-154 (1919)
- 21) 中院孝圓: 魚類ノ血球ニ就キテ (承前). 京都医学雑誌, 17, 280-294 附図2葉 (1919)
- 22) 池田彌生, 尾崎久雄, 瀬崎啓次郎: 魚類血液図鑑. 緑書房, 東京, 361pp. (1986)
- 23) Parmley RT: Mammals. In: Rowley AF, Ratcliffe NA (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 337-424 (1988)
- 24) Dieterlen-Lièvre F: Birds. In: Rowley AF, Ratcliffe NA (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 257-336 (1988)
- 25) Sypek J, Borysenko M: Reptiles. In: Rowley AF, Ratcliffe NA (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 211-256 (1988)
- 26) Turner RJ: Amphibians. In: Rowley AF, Ratcliffe NA (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 129-209 (1988)
- 27) 古田恵美子, 中村弘明, 山口恵一郎: マクロファージの系統発生, 高橋 潔, 内藤 眞, 竹屋元裕編 生命を支えるマクロファージ. 文光堂, 東京, 32-53 (2001)
- 28) Rowley AF, Hunt TC, Page M, Mainwaring G: Fish. In: Rowley AF, Ratcliffe NA (eds) Vertebrate Blood Cells. Cambridge University Press, Cambridge, 19-127 (1988)
- 29) 西 国広, 阿南健一, 須田正洋: 染色法-普通染色またはRomanowsky染色による形態の違いについて-. Medical Technology, 19, 630-636 (1991)
- 30) 松浦啓一: 多様性と統一性 フグ目魚類の系統関係, 松浦啓一, 宮 正樹編 魚の自然史-水中の進化学-. 北海道大学図書刊行会, 札幌, 76-95 (1999)
- 31) 矢部 衛: 魚類の多様性と系統分類, 松井正文編 脊椎動物の多様性と系統. 裳華房, 東京, 46-93 (2006)
- 32) 近藤昌和, 高橋幸則: 病原細菌*Aeromonas hydrophila*に感染したコイの好中球の安本小体. 水大研報, 56, 323-327 (2008)

