

コイ好中球顆粒のメイ-グリュンワルド・ギムザ染色性

メタデータ	言語: Japanese
	出版者: 水産大学校
	公開日: 2024-10-11
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 近藤, 昌和, 安本, 信哉, 高橋, 幸則
	メールアドレス:
URL	所属:
	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2011741

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



コイ好中球顆粒のメイ-グリュンワルド・ギムザ染色性

近藤昌和*・安本信哉*・高橋幸則*

May-Grünwald • Giemsa Staining Properties of Granules in Carp *Cyprinus carpio* Neutrophil

Masakazu Kondo*, Shinya Yasumoto*, and Yukinori Takahashi*

May-Grünwald • Giemsa staining properties of granules in carp neutrophil were examined in this study. Two types of granules, eosinophilic granule (α G) and chromophobic granule (β G) were observed in one neutrophil. The α G was small ($<0.3\mu\text{m}$ in diameter) and round in shape, and β G was round to oval and was larger than α G. The distribution pattern of α G was influenced by pH, constituent and concentration of diluent of the staining solution. To estimate the influence of diluent, five neutrophil types were established as follows: type 0, no α G in the cell; type I, α G was observed in less than 10%; type II, in 10~40%; type III, in 40~80%; type IV, in more than 80% area of cytoplasms. From type IV to type I, α G disappeared from perinuclear area to epicyte. When distilled water was used as a diluent, pH did not influence on α G staining, but in the case of phosphate buffer, pH was important factor for staining of α G. At low concentration of phosphate buffer, pH did not influence in α G staining. These variations of α G staining may be due to the maturation of the granules. Furthermore, we expected that the granule is constantly secreted from the neutrophil, because the distribution patterns do not relate to nucleus shape.

1 緒 言

魚類は脊椎動物の中でも系統発生的に下位に属することから、その免疫機構を解明することは、脊椎動物の免疫系の進化を理解する上で重要である。また、養殖魚類の疾病対策としてのワクチンや免疫活性化物質の作用機序を明らかにするためにも、免疫機構の解明研究は不可欠である。魚類の免疫は特異的免疫と非特異的免疫に大別され、後者には、補体系やリゾチームといった液性因子と、好中球などの細胞性因子が含まれる。コイ (*Cyprinus carpio*) にも好中球と呼ばれる血球の存在が報告されている¹⁻⁵⁾。

一般に、血球の分類同定にはRomanowsky型染色と称

される染色法が適用されている。しかし、コイ好中球の本染色に関する報告には矛盾がみられ、特に顆粒については好酸性とする報告から、難染性とするものまで様々である^{1-5, 8-10, 14, 17, 18)}。このことは、コイの好中球に及ぼす疾病や環境変化の影響を調べる上で混乱を生じさせる。本染色法は、あまりにも一般的であり、染色の手順および染色液の調製などの詳細については改めて記述されないことが多い。したがって、追試が困難である。本研究では、現在常用されているRomanowsky染色であるメイ-グリュンワルド・ギムザ染色に対するコイ好中球の染色性のうち、特にその顆粒について、標本の乾燥から染色に至る過程の種々の条件を細かく変えて最適染色法を検討した。

2 材料および方法

2.1 実験動物

実験には平均体重40gのコイを用いた。上面ろ過槽を設置した水槽(1,000ℓ)に、コイを200尾収容し、25~26℃で1カ月間以上予備飼育したのち、実験に供した。飼育期間中は、市販の配合飼料(鯉育成用P-3、林兼産業製)を1日1回、体重の約2%量給餌した。各実験には3尾以上のコイを用いた。

2.2 血液塗抹標本の作製

採血には注射針(口径21 gauge、長さ1.5インチ)を装着した1ml容のプラスチック製ツベルクリン用注射器を用いた。死腔部(約90μℓ)に市販のヘパリンナトリウム水溶液(1,000単位/ml、300 mOs)を入れ、コイ尾部血管から0.5ml採血した。針先から少量の血液をスライドガラスに滴下して引きガラス法で血液の薄膜を作り、2時間送風乾燥(風乾)して血液塗抹標本とした。

2.3 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(シグマ社)を1.5ml載せて5分間静置した。これに同量の希釈液を滴下混合し、10分間染色した。ギムザ染色液で標本を洗浄したのち、同染色液を標本上に満載して15分間染色した。ギムザ染色液は1容の原液(メルク社)を20容の希釈液に滴下混合して調整した。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)で封入した。なお、本研究で用いた蒸留水は、原水(上水)を1回蒸留したのち、純粋製造装置(Simpli Lab、Millipore)を通した水である(pH5.2)。各実験の染色条件を付表として、本論文の最後に附した(Appendix I~VIII)。また、Fig. 1にMGG染色法の手順と、付表の数字を記した。

2.4 乾燥条件が染色性に及ぼす影響

塗抹標本作製時およびMGG染色後の乾燥を1、2、4、6および24時間行った。また、乾燥時間を2時間として、塗抹標本作製時およびMGG染色後の乾燥を室温または温風(55℃)で行った場合の染色性を調べた。なお、MGG染色には蒸留水を希釈液として用いた。

2.5 メタノール前固定の影響

塗抹標本を無水メタノールで1、5および5分間×2回

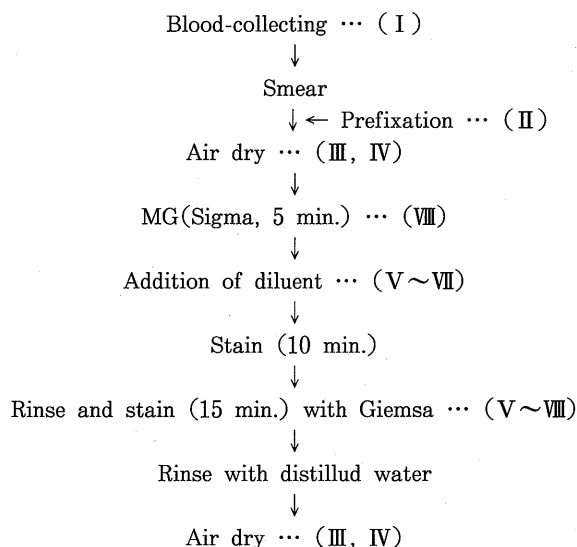


Fig. 1. Staining procedure of May-Grünwald-Giemsa (MGG). Blood (0.5ml) was collected into a syringe containing 90μℓ of heparin solution (1,000 units/ml, 300 mOs). Giemsa solution was diluted at a rate of 1:20. MG, May-Grünwald. The numbers in the parentheses indicate the appendix numbers.

浸漬固定した。30分間風乾後、蒸留水を用いたMGG染色を施した。

2.6 蒸留水のpHがMGG染色性に及ぼす影響

蒸留水(pH5.2)のpHを1M水酸化ナトリウム水溶液を用いて6.0、6.5および7.0に調整した。これらを希釈液としてMGG染色を行った。

2.7 リン酸緩衝液の組成とpHがMGG染色性に及ぼす影響

リン酸塩としてKH₂PO₄(以後Kと称す)、K₂HPO₄(以後K₂と称す)、NaH₂PO₄(以後Nと称す)およびNa₂HPO₄(以後N₂と称す)を用い、酸と塩基の組み合わせから4種類のリン酸緩衝液(リン酸として1/15M)を作製した(I, K-K₂; II, N-N₂; III, N-K₂; IV, K-N₂)。各緩衝液について、pHを5.0~7.0としたものを用いてMGG染色を行った。また、IV型(Sørensenのリン酸緩衝液⁶⁾)については、pH6.0から6.5まで0.1ずつpHを変えた場合の染色性についても調べた。なお、ギムザ染色液は、蒸留水で10倍希釈した各リン酸緩衝液で調整した。

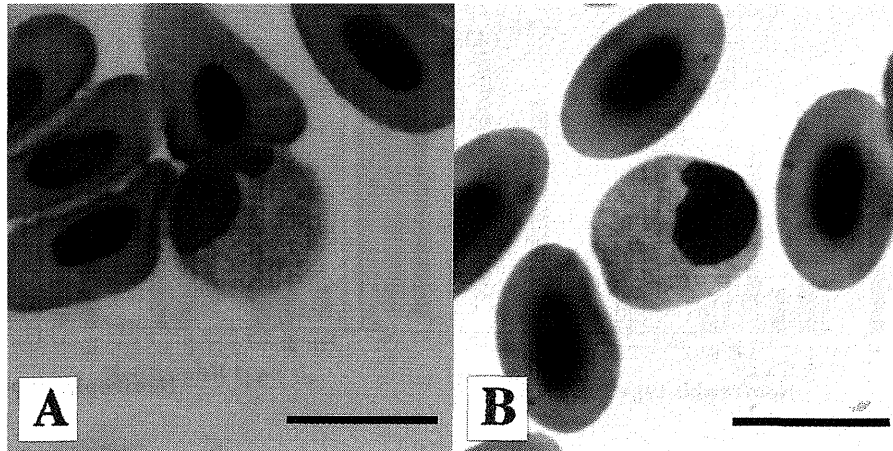


Fig. 2. Carp neutrophil stained with May-Grünwald • Giemsa using distilled water (pH5.2, A) or 5 mM phosphate buffer (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH7.0, B). Note eosinophilic granules (α -granule) and chromophobic granules (β -granule). Bars=10 μm .

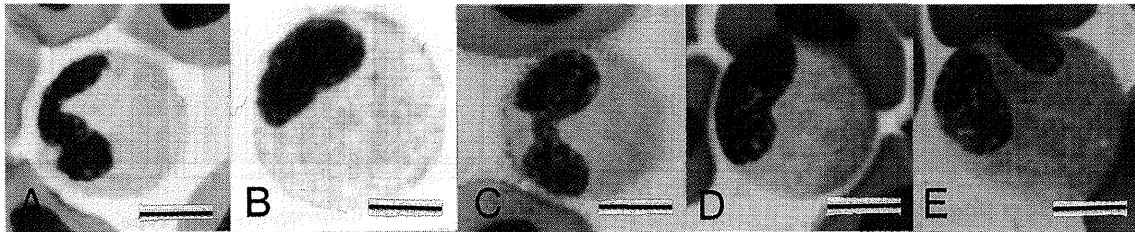


Fig. 3. Five neutrophil types in carp. May-Grünwald • Giemsa stain. A, type 0; B, type I; C, type II; D, type III; E, type IV. Diluents for stain were: A, 1/15 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH7.0); B, 1/15 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH6.0); C, 0.1 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH5.0); (D), distilled water (pH 5.2); (E), 1/15 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH5.0). Bars=5 μm .

2.8 リン酸緩衝液のモル濃度とpHがMGG染色性に及ぼす影響

KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 の組み合わせで、リン酸基の濃度を5、10、100mMおよび1/15Mに調整し、pHを5.0～7.0とした各緩衝液を用いてMGG染色を行った。

2.9 採血時の温度がMGG染色性に及ぼす影響

採血に用いる注射器を0、5および26℃に調整して採血した。直ちに塗抹標本を作製してMGG染色を施した。また、採血時の温度で採血後、10、30および60分間静置した場合の染色性も調べた。染色には蒸留水を希釈液として用いた。

2.10 異なる製造元の染色剤を用いたMGG染色性

和光、メルクおよびシグマの各社の染色剤を用いて9通りの組み合わせによるMGG染色を行った。染色液の希釈には蒸留水を用いた。なお、シグマ社のギムザ液は粉末か

らLillie and Fullmerの報告⁷⁾にしたがって調製した。

2.11 観察

光学顕微鏡 (Optiphot-2, Nikon) で、100倍の対物レンズ (Plan Apo, Nikon) を用いて観察した。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。

3 結果

3.1 好中球の形態

蒸留水を希釈液としてメイ-グリュンワルド・ギムザ (MGG) 染色を行ったところ、コイ好中球に2種類の顆粒が観察された (Fig. 2A)。すなわち、小型な円形 (直径0.3 μm 以下) でオレンジ色に染色される顆粒と、大型な円形および卵円形 (長径約0.5 μm) で無色の顆粒である。本論文では前者を α 顆粒、後者を β 顆粒と呼ぶことにした。好中球は長径10.0～16.0 μm (平均12.6 μm)、短径8.0～13.0 μm (平均11.4 μm) の円形または卵円形であっ

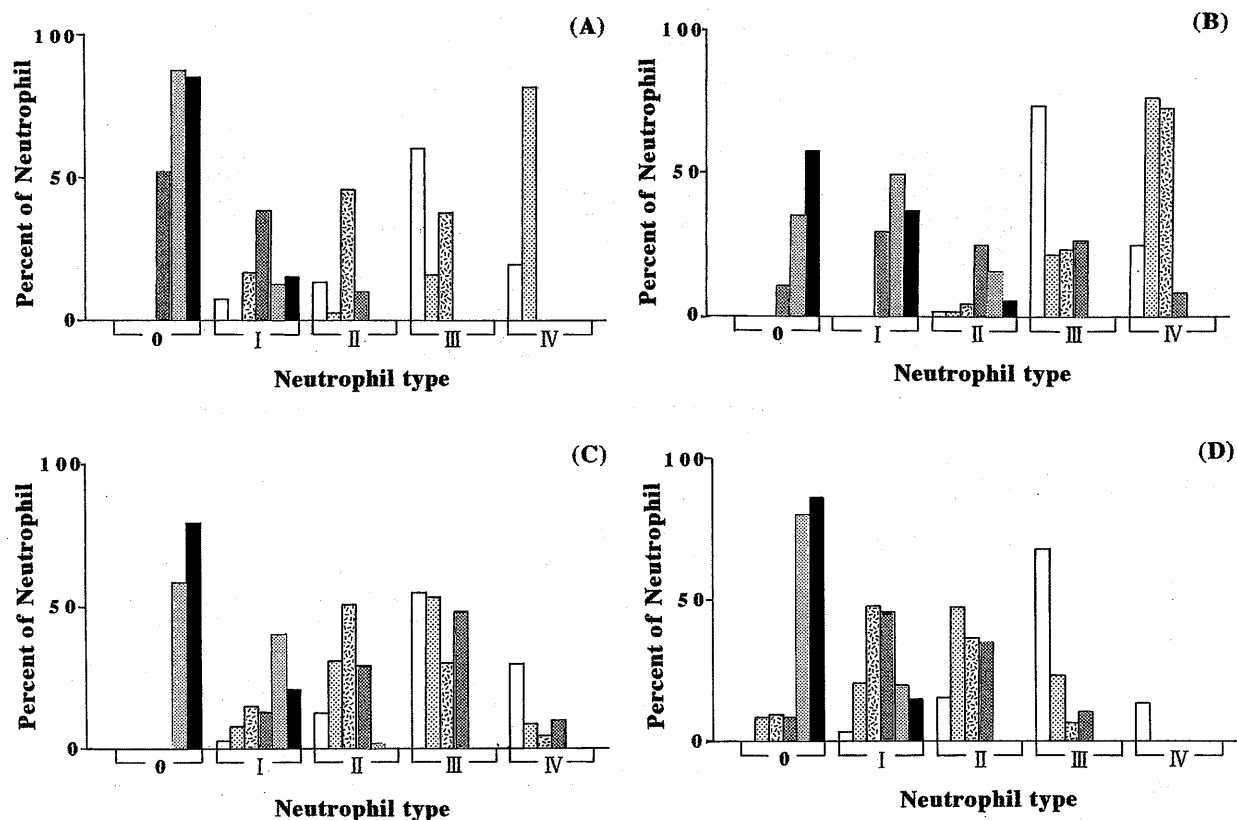


Fig. 4. Population of carp neutrophil types categorized on the distribution pattern of α -granule after staining with May-Grünwald-Giemsa using four types of 1/15 M phosphate buffers. (A), buffer I (KH_2PO_4 - K_2HPO_4); (B), buffer II (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4); (C), buffer III (NaH_2PO_4 - K_2HPO_4); (D), buffer IV (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4). □, control (distilled water, pH5.2); ▨, pH5.0; ▩, pH5.5; ▪, pH6.0; ▫, pH6.5; ■, pH7.0.

た。核は偏在し、その形は卵円形、楕円形、ソラマメ型、V字型、棍棒状のほか、3分葉までに分葉したものが観察された。

α 顆粒の分布領域が異なる好中球が、同一標本上で見られることから、好中球の型を以下の様に分けた。すなわち、 α 顆粒が全く観察されないものを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 (Fig. 3)。各型と核の形との間に関連は認められなかった。しかし、 α 顆粒は核の近縁には求められず、I型ではやや偏在している核に対して反対側の細胞質のわずかな部分にのみ α 顆粒が観察された。蒸留水を用いたMGG染色では、0型は観察されず、I型は0~10%、II型は0~20%、III型は5~75%、IV型は10~95%となり、個体によって様々であった。

3. 2 乾燥条件が染色性に及ぼす影響

塗抹標本作製時の送風乾燥を室温で行った場合には、6時間後までは好中球の染色性に変化は認められなかったが、24時間乾燥したものでは α 顆粒の染色性が低下し、淡橙色

を呈した。しかし、いずれの標本においても α 顆粒の分布と密度には差はみられなかった。一方、染色後の乾燥(室温)は少なくとも24時間後までは好中球の染色性に影響がなかった。

塗抹標本作製時と染色後の乾燥を室温または温風(55°C)で行った場合では、 α 顆粒の染色性と存在領域に変化は認められなかった。しかし、塗抹標本作製時の乾燥を温風で行うと、核と細胞質基質が青染した。

3. 3 メタノール前固定の影響

メタノールで1分間または5分間固定した好中球のMGG染色性は、未固定のものと同じであった。しかし、5分間の固定を2回続けて行った好中球では、核クロマチンと α 顆粒の染色性が低下し、前者は濃青色を、後者は淡橙色を示した。しかし、 α 顆粒の分布と密度には標本間に差が認められなかった。

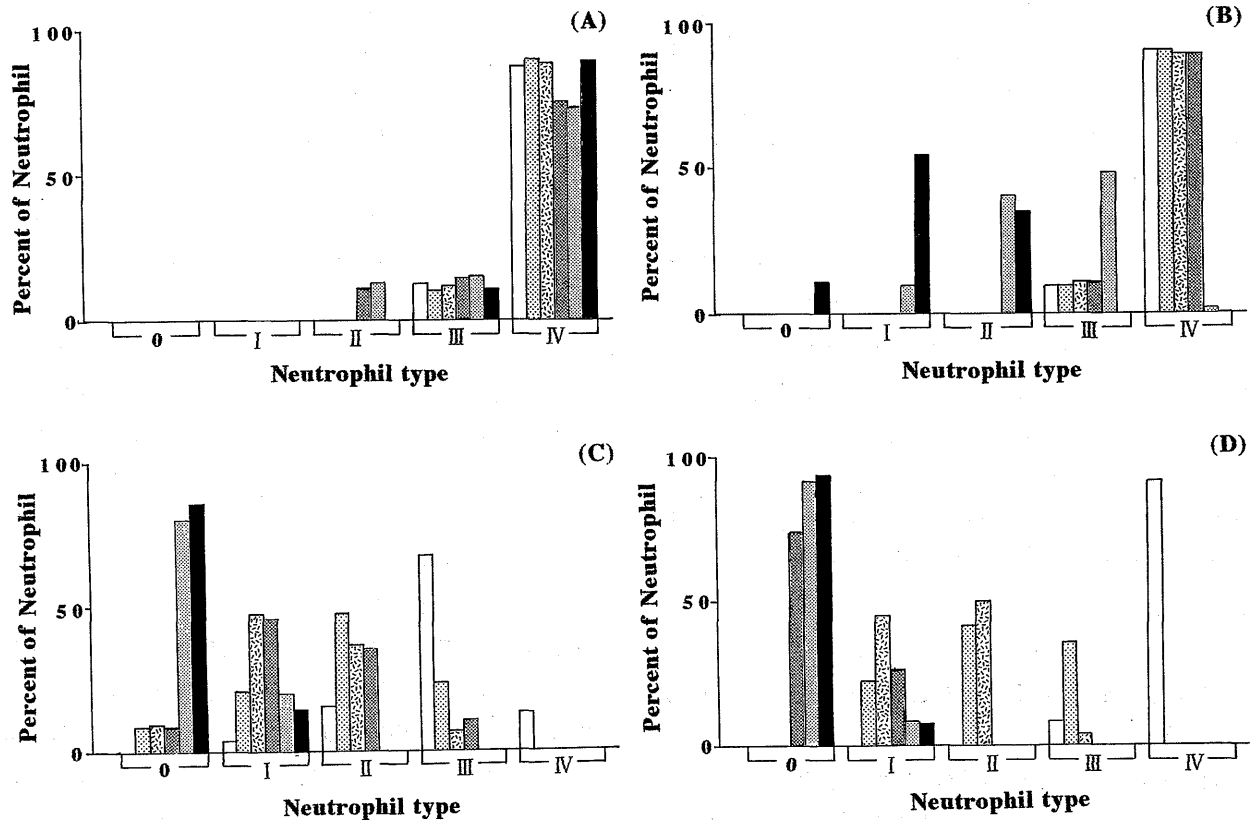


Fig. 5. Influence of concentration and pH of phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) on the population of carp neutrophil categorized on the distribution pattern of α -granule after staining with May-Grünwald • Giemsa. (A), 5 mM; (B), 10 mM; (C), 1/15 M; (D), 100 mM. □, control (distilled water, pH5.2); ▤, pH5.0; ▨, pH5.5; ■, pH6.0; ▩, pH6.5; ■, pH7.0.

3. 4 蒸留水のpHがMGG染色性に及ぼす影響

pHの異なる蒸留水を用いても、 α 顆粒の分布、密度および染色性に変化は認められなかった。しかし、pHの上昇に伴って核が濃染した。

3. 5 リン酸緩衝液の組成とpHがMGG染色性に及ぼす影響

組成の異なる1/15Mリン酸緩衝液を用いてMGG染色を行ったところ、いずれの緩衝液でもpHの上昇にともない、II～IV型が減少し、0およびI型の割合が増加する傾向がみられた (Fig. 4)。しかし、緩衝液の種類による差異も認められた。緩衝液Iの場合、pH5.0ではII型が2.5%、III型が16%、IV型が82%であったのに対して、0型およびI型は観察されなかった。pH5.5では、IV型が見られず、IIおよびIII型の割合が増加し、I型も17%観察されたが0型はpH5.0と同様に観察されなかった。しかし、pH6.0では0型が52%出現し、I型が38%を占め、II型が10%出現したが、IIIおよびIV型は認められなかった。pH6.5および7.0では0型がそれぞれ87.5、85%を、I型がそれぞれ12.5、

15%を占めたが、II、IIIおよびIV型は観察されなかった。緩衝液IIではpH5.0と5.5の間に差異はなく、pH6.0においても、すべての型の好中球が観察された。また、pH6.5および7.0では緩衝液Iと同様にIIIおよびIV型が観察されなかったが、II型は認められ、I型の割合は緩衝液Iよりも高かった。緩衝液IIIでは、pH5.0～6.0では、各型の好中球の割合に大きな違いはみられず、0型は観察されなかった。pH6.5ではIIIおよびIV型の好中球が認められず、0型が58%を占め、pH7.0では緩衝液Iと同様に、0型が79%、I型が21%を占め、他の型の好中球は観察されなかった。緩衝液IVではpH5.0～7.0の間でIV型は観察されず、IIおよびIII型はpH6.5以上では観察されなかった。I型はいずれのpHでも観察されたが、pH5.5と6.0ではその割合が高く、45%前後であった。0型はいずれのpHでも観察されたが、5.0～6.0の条件下では10%以下であったのに対して、pH6.5および7.0では80%以上を占めた。

3. 6 リン酸緩衝液のモル濃度とpHがMGG染色性に及ぼす影響

緩衝液IVに用いたリン酸塩のリン酸基のモル濃度とpH

を変えてMGG染色を行ったところ、モル濃度が高いほど、同じpHで観察される α 顆粒の数が減少した (Fig. 5)。すなわち、5 mMではいずれのpHにおいてもⅢおよびⅣ型の占める割合が85%以上であった。しかし、10mMではpH6.5以下の場合には0型は認められず、pH7.0では、ⅢおよびⅣ型は観察されず、0型は約11%を占めていた。100mMではいずれのpHでも1/15Mと同様にⅣ型は観察されなかった。一方、1/15MではⅡおよびⅢ型はpH6.5以上で認められないのに対して、100mMではpH6.0以上で観察されなくなった。また、5 mMの場合には、pH7.0では α 顆粒が濃赤色を示した (Fig. 2B)。100mMではいずれのpHでも標本全体が赤染し、 α 顆粒は淡赤色を、核クロマチンは濃青色を呈した。他のモル濃度とpHでは蒸留水を用いたMGG染色の場合と同様に α 顆粒はオレンジ色であった。

3. 7 採血時の温度がMGG染色性に及ぼす影響

採血時の温度は α 顆粒の分布と密度に影響しなかった。しかし、0℃で採血した場合、他のものよりも α 顆粒が濃染し、濃赤色を呈した。また、0℃で採血後、10分以上静置した場合には収縮した好中球が観察された。

3. 8 異なる製造元の染色剤を用いたMGG染色性

いずれの製造元のメイグリュンワルド液を用いても、その後のギムザ染色をシグマ社のもので行うと、標本全体が濃染され、 α 顆粒は赤色を呈した。シグマ社のメイグリュンワルド液と和光社のギムザ液を用いた場合、 α 顆粒は濃赤色であった。他の組み合わせでは α 顆粒はオレンジ色であった。

4 考 察

多くの動物では、光学顕微鏡観察による血球の同定は、Romanowsky染色による標本が用いられている。同染色に用いられる試薬としては、ギムザ液、ライト液およびメイグリュンワルド(MG)液などがあげられる。一般に、ギムザ染色では核の染め分けが、MG染色では顆粒などの細胞質の染め分けができることから、現在、MG染色とギムザ染色を組み合わせたMG-ギムザ(MGG)染色が常用されている。魚類の血球に関しては、池田ら¹⁾による成書があるが、染色方法がライシュマン・ギムザ染色であり、

染色前にメタノール固定を行っていることから、MGG染色標本を用いた報告との対比は困難である。コイの顆粒性白血球の種類数は、1～3の間で様々な報告がある^{1-5, 8-16)}。しかし、末梢血中または造血組織(頭腎)の電子顕微鏡観察から、顆粒内に電子密度の高い桿状構造物(類結晶)を有する血球を、一般に好中球と呼んでいる。好中球は末梢血中では分葉核も観察されているが¹⁻⁵⁾、造血組織では分葉の程度は低く、腎臓型(kidney-shape)であるとされている^{12,15)}。Suzuki²⁾は蒸留水を用いたMGG染色により、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。Imagawaら³⁾はメタノール固定したコイ血液塗抹標本にMGG染色を施して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る顆粒球を観察しており、これをⅠ型顆粒球としている。安田ら⁵⁾および斉藤⁴⁾も分葉核を有する好中球をコイに見ているが、顆粒の染色性については言及していない。本研究結果から、コイ好中球に好エオシン性顆粒(α 顆粒)と難染性顆粒(β 顆粒)が観察された。両者は染色性のみならず、その大きさと形も異なり、前者は小型(直径0.3 μ m以下)で円形なのに対して、後者は円形および卵円形(長径約0.5 μ m)であった。Suzuki²⁾は好中球に微細なエオシン好性顆粒が存在することを述べているが、難染性顆粒の存在についてはふれていない。一方、Imagawaら³⁾の報告したⅠ型顆粒球は微細で弱エオシン性から難染性を示す顆粒を持つとしており、電子顕微鏡観察では2種類の顆粒を観察している。すなわち、大型の卵円形(長径0.3～0.6 μ m)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 μ m)をした電子密度の低い物質を含む顆粒である。しかし、彼らは、その2種類の顆粒のMGG染色性については言及していない。本研究で見られた2種類の顆粒(α 顆粒と β 顆粒)は、その大きさと形から、それぞれImagawaら³⁾が報告した小型顆粒と大型顆粒に相当すると考えられる。彼らはメタノール固定(3～5分間)した標本にMGG染色を施して、弱エオシン性から難染性を示す顆粒を観察している。本研究でも、5分間のメタノール固定は α 顆粒の染色性と分布に影響を与えなかった。しかし、彼らがMGG染色に用いた希釈液が何であるかは不明であることから、彼らの述べた難染性を示す顆粒が、本研究の β 顆粒なのか、あるいは染色されなかった α 顆粒であるのかは明らかではない。石塚ら¹⁶⁾もコイ好中球(彼らは好異球と名付けているが)に桿状構造物をもつ小顆粒と、微細顆粒を観察している。また、Suzuki¹⁷⁾は、腹腔内に誘導した好中球の電子顕微鏡観察で、前述と同様な2種類

の顆粒を認めているが、MGG染色による顆粒の染色性については述べていない。一方、Temmink and Bayne¹⁵⁾はコイ頭腎内の好中球について、桿状構造物を持つ顆粒にのみ言及している。コイ頭腎のスタンプ標本のMGG染色においても、好中球に2種類の顆粒が認められる(未発表)。このことから、Temmink and Bayne¹⁵⁾は小型の顆粒を見落としていたと思われる。

Hendrickら¹⁸⁾はコイ血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から、この血球を好酸球と呼んでいる。彼らは電子顕微鏡で1種類の顆粒のみを観察しており、染色像との対比から、この顆粒が赤色に染まると考えている。しかし、彼らの染色方法の詳細は記載されておらず、我々の観察したエオシン好性顆粒との比較はできない。

好中球の β 顆粒球は種々の染色条件のいずれにおいても難染性を示したが、 α 顆粒は染色液の調整に用いる希釈液のpH、モル濃度および組成によって、観察される α 顆粒の分布に変化が認められた。染色される顆粒の分布の違いに基づいて好中球の型式を設定し、その定量化を試みた。通常、MGG染色には KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 からなる1/15 Mリン酸緩衝液(Sørensenのリン緩衝液)が用いられ、そのpHも6.4~6.8といった弱酸性条件が採用されている¹⁹⁾。しかし、この条件では、多くの好中球に α 顆粒が認められなかった。安田ら⁵⁾および斉藤⁴⁾が好中球に、エオシン好性顆粒の存在を指摘していないのは、染色に、このpH範囲の緩衝液を用いたためかもしれない。

Sørensenのリン緩衝液のpHを低下させると、染色される α 顆粒の分布が広がったが、他の組成、特に、 KH_2PO_4 と K_2HPO_4 および NaH_2PO_4 と Na_2HPO_4 の組み合わせでこの傾向が顕著であった。しかし、 NaH_2PO_4 と K_2HPO_4 の組み合わせではSørensenのリン緩衝液を用いたときと同様であった。このことは、 α 顆粒の染色には、単一の塩類のみからなる緩衝液が最適であることを示している。Sørensenのリン緩衝液に使用されている KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 を用いて、リン酸基のモル濃度が異なるリン酸緩衝液で染色を行った場合、低モル濃度では、pHの影響を受けず、多数の α 顆粒が観察された。同様に、蒸留水のpHを変化させても α 顆粒の出現には影響を及ぼさなかった。これらのことは、 α 顆粒が染色液中のリン酸塩のモル濃度上昇により、染色されるpHが低下することを示している。

蒸留水を染色に用いた場合も多数の α 顆粒が観察されるが、蒸留水よりも、リン酸緩衝液を使用した方が、 α 顆粒

の出現が高い例もあった(Fig. 3b)。これらのことからコイ好中球の α 顆粒の観察には、5mMでpH5.0のリン酸緩衝液を用いるのが最適と考えられる。

染色条件の違いによる α 顆粒の分布は特徴的であり、我々が設定した型式ではIV~0の順に、 α 顆粒は核の近縁から細胞膜の内縁に向けて染色されなくなった。また、好中球の核の形状と α 顆粒の分布に関連は認められなかった。通常、造血組織から末梢血中に動員されたばかりの好中球の核は分葉の程度が低く、時間の経過したものでは分葉核を持つようになる⁵⁾。これらのことから、 α 顆粒が核の近縁で作られ、細胞質内の輸送によって核から遠ざかるにつれて顆粒の内容物が物理化学的变化を受けて成熟するために染色特性が変化し、最終的に分泌顆粒として、その内容物を細胞外に恒常的に放出しているのではないかと推察される。

コイ好中球にはペルオキシダーゼ、酸性ホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、 α -ナフチルアセテートエステラーゼ、 α -ナフチルブチレートエステラーゼ、ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ、Mg-ATPase、リンゴ酸脱水素酵素などが検出されている^{2, 3, 5, 12, 18)}。このうち、ペルオキシダーゼについては細胞内の局在部位も調べられ、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¹²⁾。今後、 α 顆粒の内容物についても詳細に調べ、その役割を明らかにする必要がある。

文 献

- 1) 池田弥生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎：魚類血液図鑑。緑書房，東京，1986，pp. 188-191.
- 2) Y. Suzuki : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 1895-1899 (1986).
- 3) T. Imagawa, Y. Hashimoto, H. Kitagawa, Y. Kon, N. Kudo and M. Sugimura : *Jpn. J. Vet. Sci.*, **51**, 1163-1172 (1989).
- 4) 斉藤 要：日水誌，**19**, 1134-1138 (1954).
- 5) 安田恒雄・延東 真・境 正・木村正雄：日水誌，**50**, 1375-1380 (1984).
- 6) 東京大学医科学研究所学友会編：微生物学実習提要(第6版)。丸善株式会社，東京，1993，p. 56.
- 7) C. George : *Staining procedures*, Ed. 4, ed. by C. George, Williams & Wilkins, Baltimore, 1981 (金子勝治・新井義夫訳)，藤田企画出版株式会社，弘前，1994，p. 137.

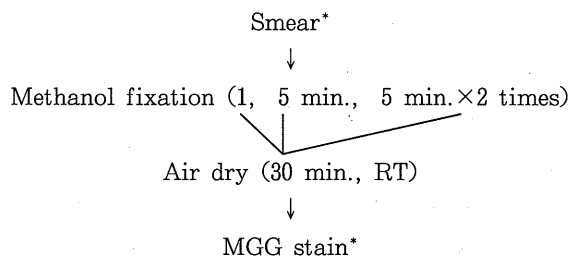
- 8) H. Dombrowski : *Biol. Centralbl.*, **72**, 182-195 (1953).
- 9) D. L. Barber and J. E. L. Westermann : *J. Fish Biol.*, **12**, 35-43 (1978).
- 10) R. S. Hines and D. T. Spira : *J. Fish Biol.*, **5**, 527-534 (1973).
- 11) E. Bielek : *Zool. Jahrb. Abt. Anat. Ontog. Tiere.*, **103**, 105-121 (1980).
- 12) E. Bielek : *Cell Tissue Res.*, **220**, 163-180 (1981).
- 13) P. Cenini : *J. Zool.*, **204**, 509-520 (1984).
- 14) 小野田外興治 : 金沢医科大学十全会雑誌, **40**, 51-66(1935).
- 15) J. H. M. Temmink and C. J. Bayne : *Dev. Comp. Immunol.*, **11**, 125-137 (1987).
- 16) 石塚 寛・土屋宏正・木村朋彦 : 動物学雑誌, **86**, 503 (1977).
- 17) K. Suzuki : *J. Fish Biol.*, **29**, 349-364 (1986).
- 18) M. Hendrick, A. DiNapoli, P. Cammarata and S. Pincus : *J. Fish Biol.*, **29**, 47-51 (1986).
- 19) 丹羽欣正 : 新染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1999, pp. 264-269.

付 表 (Appendix)

I. Temperature and time of blood-collecting and preservation on MGG staining of carp neutrophil (experiment 2.9). Blood was collected into the heparin-containing syringe adjusted at each temperatures. Giemsa solution (Merck) were diluted (1:20) with distilled water. *RT, room temperature.

Blood-collecting		Preservation	
Temperature (°C)		Temperature (°C)	Time (min.)
0	_____	0	immediately
5	_____	5	10
26*	_____	26*	30
			60

II. Effect of prefixation in absolute methanol on MGG staining of carp neutrophil (experiment 2.5). Diluent was distilled water. RT, room temperature. *Air dry was for 2 h at RT.



III. Effect of drying time on MGG staining of carp neutrophil (experiment 2.4). Giemsa solution (Merck) was diluted (1:20) with distilled water. RT, room temperature. Air dry was at RT.

Air dry before stain	Air dry after stain
1 h	1 h
2 h	2 h
3 h	3 h
24 h	24 h

IV. Effect of drying temperature on MGG staining of carp neutrophil (experiment 2.4). Giemsa solution was diluted (1:20) with distilled water. RT, room temperature.

Air dry before stain (2 h)	Air dry after stain (2 h)
RT	RT
55°C	55°C

V. Diluents of experiment 2.6 (effect of pH of distilled water on MGG staining of carp neutrophil). Adjusting of pH was conducted by addition of 1 M NaOH. Giemsa solutions (Merck) were diluted (1:20) with distilled water.

Diluents: distilled water (pH)
6.0
6.5
7.0

VI. Diluents of experiment 2.7 (effect of phosphate buffer on MGG staining of carp neutrophil). Giemsa solutions (Merck) were diluted (1:20) with 1/150 M PB. RT, room temperature.

Diluents: 1/15 M phosphate buffer			
Type I	Type II	Type III	Type IV
$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$
(pH: 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0)			

VII. Diluents of experiment 2.8 (effect of concentration and pH of phosphate buffer on MGG staining of carp neutrophil). Giemsa solution (Merck) were diluted (1:20) with phosphate buffer which diluted at ten times with distilled water. RT, room temperature.

Diluents: phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$)			
5 mM	10 mM	1/15 M	100 mM
(pH: 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0)			

VIII. Combination of reagents from different manufactures (experiment 2.10). All MG and Giemsa from Merck (German) and Wako (Japan) were commercial solutions. Giemsa solution of Sigma (USA) was prepared according to the procedure of Lillie and Fullmer⁷⁾. Giemsa solutions were diluted (1:20) with distilled water.

MG	Giemsa
Sigma	Sigma
Merck	Merck
Wako	Wako