

ウナギ好中球の形態学的および細胞化学的特徴

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): neutrophil. granulocyte; Japanese eel;
	Anguilla japonica; morphology
	作成者: 近藤, 昌和, 高橋, 幸則
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2011920
	This work is licensed under a Creative Commons

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



ウナギ好中球の形態学的および細胞化学的特徴

近藤昌和*, 高橋幸則

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from Japanese Eel, Anguilla japonica

Masakazu Kondo* and Yukinori Takahashi

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in Japanese eel, Anguilla japonica were examined by light microscopy. The neutrophils were round to oval $(9.0-14.5 \,\mu$ m in diameter) and the nucleus round to lobule-shaped. Granules of the neutrophil were classified into three types; acidophilic granule (a G), chromophobic granule (β G) and basophilic granule (γ G). The a G was round to oval $(0.3 \,\mu$ m in diameter) or rod-shaped ($\leq 1.0 \,\mu$ m in length) and stained with May-Grünwald (MG) stain. This granule was not observed in the preparations stained with Giemsa stain. The β G was round to oval ($\leq 0.6 \,\mu$ m in diameter) and unstained by Romanowsky type stain (MG, Giemsa and MG-Giemsa (MGG)). This granule was peroxidase positive. The γ G was round to oval ($\leq 0.3 \,\mu$ m in diameter) and stained with Giemsa stain. Some enzymes, such as acid phosphatase, a-naphtyl acetate esterase and a-naphtyl butyrate esterase were detected in the γ G. The Yasumoto body (Y-body) was also found in the neutrophil and toluidine blue positive.

Key words : neutrophil, granulocyte, Japanese eel, Anguilla japonica, morphology



著者らはこれまでに,種々の条件下でRomanowsky型染 色(メイーグリュンワルド(MG)染色,ギムザ染色およ びMG染色後にギムザ染色を行うMGG染色)を施して,そ れらの染色標本における染色性の違いから,形態学的特徴 を明らかにする方法(以後,多条件下Romanowsky型染色 評価法(Multiple Romanowsky-type stain valuation, MRSV)と称す)によって,各種魚類の好中球顆粒の種類 数について明らかにしてきた¹⁻¹¹⁾。その結果,真骨魚類 (条鰭綱新鰭亜綱ハレコストム区真骨亜区¹²⁾)は好中球顆 粒の種類数の違いから,3群に大別されることが明らかと なった。I群の好中球(I型好中球)には,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3種類の顆粒が認められ,真骨魚類の中で, 祖先種が最も早期に出現したアジアアロワナScleropages formosus (アロワナ下区アロワナ目)や¹⁾, 真骨魚類から アロワナ下区とカライワシ下区を除いたクルペオセファラ 類のうち,最初に分岐したニシン・骨鰾下区に属するコイ *Cyprinus carpio* (骨鰾上目コイ目)が含まれることから^{2.} ³⁾, I群の形質は,真骨魚類好中球の原型であると推察さ れる。II群の好中球には a 顆粒と β 顆粒が認められ,これ までに、トラフグ*Takifugu rubripes* (正真骨下区棘鰭上 目フグ目)に観察されている⁶⁾。フグ目は、スズキ目(正 真骨下区棘鰭上目)¹²⁾から派生したと考えられているが ¹³⁾,トラフグと同様の好中球は、他魚種には認められてお らず、本群の系統進化上の位置付けは明確ではない。II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* (正真骨下区原棘鰭上目カワカマス目)や⁷⁾, 各種スズキ目魚類 (メジナ*Girella punctata、オオクチ*バ

2009年1月27日受付. Received January 27, 2009.

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).

ス*Micropterus salmoides*, ブルーギル*Lepomis macrochirus*, スズキ*Lateolabrax japonicus*, ヒラスズキ *L. latus*, タイリクスズキ*L*. sp.)^{8.10,11)} およびスズキ目か ら派生したとされる正真骨下区棘鰭上目カレイ目¹³⁾ に属 するヒラメ*Paralichthys olivaceus*が含まれることから⁹⁾, 現生真骨魚類のうち,新顎類¹²⁾ に広範囲にわたって受け 継がれている形質と考えられる。しかし,スズキ目のナイ ルティラピア*Oreochromis niloticus*およびイサキ *Parapristipoma trilineatum*は I 群に属する^{4.5)}。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みて、 多系統ではないかと考えられる。

ウナギAnguilla japonicaは真骨魚類の系統上, コイより も早く, アジアアロワナについで出現したカライワシ下区 ウナギ目に属することから, 好中球は I 型好中球の特性を 有するのではないかと推察される。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研究の一環とし て, ウナギ好中球の形態学的および細胞化学的特性を明ら かにし, これまでに報告した各種魚類と比較した。

2 材料および方法

2.1 実験魚

厚狭川の河口(山口県山陽小野田市)で採捕されたシラ スウナギを,水産大学校小野臨湖実験実習場(山口県宇部 市)に搬入して,市販の配合飼料を給餌し,体重約500g にまで育成した。これを水産大学校の飼育施設(山口県下 関市)に搬入し,水槽(50ℓ容)に曝気した上水を約30ℓ 入れ,これにウナギを1尾ずつ収容した。水温230±1.0℃ で1週間馴致飼育したのち実験に供した。なお,実験期間 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。

2.2 血液塗沫標本の作製

採血には、注射針(孔径21gauge,長さ1.5inch)を装着 した1ml容プラスチック製ツベルクリン用注射器を用い た。これにヘパリンナトリウム水溶液(1,000units/ml, 300mOs)を約90μl入れ、キナルジン麻酔したウナギの尾 部血管から0.5ml採血した。血液をスライドガラスに滴下 し、引きガラス法で血液の薄膜を作り、風乾して血液塗沫 標本とした。なお、酵素染色用の標本は、2時間以内の風 乾ののちに染色に供した。

2.3 MRSV

染色に用いる希釈液には、蒸留水、5mMリン酸緩衝液

および¹/15Mリン酸緩衝液を用いた。各濃度のNa₂HPO 4 · 12H₂OとNaH₂PO₄ · 2H₂Oを混合してpH5.0~8.0の 緩衝液を作製した。血液塗沫標本上にMG原液(メタノー ル溶液, Sigma) を1.5ml載せ、5分間固定したのち、各種 希釈液を1.5ml滴下・混和して10分間MG染色を行った。な お、MG原液で固定後、直ちに蒸留水で水洗した標本の観 察も行った。また、血液塗沫標本を無水メタノールで5分 間固定して風乾後、ギムザ染色を行った。ギムザ染色液 は、原液(Merck)を蒸留水または、蒸留水で10倍希釈し た各種緩衝液を用いて、1:20および1:100の比率(ギ ムザ原液:希釈液)で希釈した。なお、染色時間は、15お よび60分間とした。血液塗沫標本にMG染色を施したの ち、MG染色に使用した希釈液を用いて作製したギムザ染 色液による後染色を施こすことによって, MGG染色を 行った。なお、ギムザ染色液の作製には、蒸留水または蒸 留水で10倍希釈したリン酸緩衝液を用いた。いずれの染色 標本も、蒸留水で水洗し、風乾したのち、合成樹脂(オイ キット)で封入して光学顕微鏡で観察した。

2.4 細胞化学染色

2.4.1 多糖類染色

血液塗沫標本をメタノール・ホルマリン(メタノール: ホルマリン=9:1)を用いて、室温(25℃)で30分間固 定した。流水水洗後(5分間),蒸留水に通したのち、風 乾して各種多糖類染色を室温で行った。なお、periodic acid Schiff反応(PAS)を施した標本はマイヤーのヘマト キシリン染色液(和光純薬、病理研究用)に5分間浸漬し たのち、流水で水洗および色出しし(5分間)、核染色を 行った。他の染色では核染色を施さなかった。染色標本は 風乾後、オイキットで封入して光学顕微鏡で観察した。

2.4.1.1 PAS染色

多糖類の検出のために、PAS染色を行った¹⁴⁾。固定した 標本をオルト過ヨウ素酸(和光純薬)の1%水溶液に15分 間浸漬したのち、蒸留水で3回洗浄した(各回5分間)。 シッフ液(和光純薬,病理研究用)と40分間反応させたの ち、亜硫酸水素ナトリウム液3槽に浸漬した(各槽10分 間)。亜硫酸水素ナトリウム液は,0.5gの亜硫酸水素ナト リウム(和光純薬)を蒸留水5mlに溶解し、1M塩酸5ml と混合したのち、蒸留水を加えて全量100mlとしたものを 使用した。流水水洗(5分間)後、蒸留水に通したのち風 乾した。

グリコーゲンの鑑別のために、 a-amylase消化した標本 のPAS染色も行った¹⁵⁾。リン酸ナトリウム緩衝液

(0.1M, pH6.0) に、 a -amylase (Sigma) を 1 % 溶解
 し、これに標本を37℃で30分間浸漬した。蒸留水で2回洗
 浄後(各回5分間)、PAS染色を施した。

 2.4.1.2 トルイジンブルー(TB)染色とアルシアン ブルー(AB)染色

酸性粘液多糖類の検出には、TB染色¹⁶⁾とAB染色¹⁷⁾を 行った。蒸留水にTB(Sigma)を0.01%加え溶解させたの ち濾紙(Advantec, No.2)に通して濾過した。これに標 本を30分間浸漬したのち、モレキュラシーブス

(Nacalai)を用いて無水化したエタノールで洗浄し,風 乾した。なお,洗浄には無水エタノール槽を2槽用意し た。1槽目では標本を10回上下させ,2槽目には2分間浸 漬して洗浄した。

AB染色はpH1.0およびpH2.5で行った。AB(Sigma)を 0.1M塩酸に1%加え溶解させたのち、濾過した染色液 (pH1.0)に、標本を30分間浸漬した。0.1M塩酸で2分間 洗浄したのち風乾した。AB(pH2.5)染色液は、3%酢酸 水(氷酢酸3ml,蒸留水97ml)にABを1%加えて溶解さ せたのち、濾過して作製した。この染色液に標本を30分間 浸漬したのち、3%酢酸水2槽を用いて洗浄した。1槽目 では標本を10回上下させ、2槽目には3分間浸漬した。流 水で洗浄(2分間)後、蒸留水に通したのち、風乾した。

2.4.2 脂肪染色

中性ホルマリン(炭酸カルシウム飽和ホルマリン)を蒸 留水と2:3の比率で混合した(40%中性ホルマリン)。 濾紙を敷き,底にガラス棒を設置した染色壷に40%中性ホ ルマリンを1ml入れて10分間密閉し,ホルマリン蒸気を得 た。これに染色籠に設置した血液塗沫標本を入れ,密閉状 態で10分間固定した。流水水洗(5分間)後,蒸留水に通 したのち,風乾して各種脂肪染色を室温(25℃)で行っ た。脂質の検出にはズダンブラックB染色を,また,中性 脂肪の検出にはズダンゴラックB染色を,また,中性 脂肪の検出にはズダンゴラックB染色を,また,中性 脂肪の検出にはズダンロ染色とオイルレッド O染色を適 用した¹⁸⁻²⁰⁾。なお,いずれの染色標本にも核染色は施さな かった。風乾後,グリセリンで封入して光学顕微鏡で観察 した。

2.4.2.1 ズダンブラックB (SBB) 染色

室温で1日以上放置したSBB保存液(0.5g SBB(和光純 薬),100mℓエタノール)を,保存緩衝液と3:2の比率で 混合したのち,濾過してSBB染色液とした。なお,保存緩 衝液は,60℃で加温溶解したフェノール40mℓにエタノール (60℃)75mℓと,0.3%Na₂HPO₄・12H₂O水溶液(60℃) 250mℓを混和したのち,室温で保存した。標本をSBB染色 液に1時間浸漬後,70%エタノール2槽を用いて分別した。1槽目では標本を10回上下させ,2槽目には1分間浸 漬した。洗浄後,5分間流水水洗し,蒸留水に通したのち,風乾した。

2.4.2.2 ズダン田染色

エタノール(70%) 50mlにズダンⅢ(Sigma)を1g加 えて,60℃で1晩放置した。室温に戻したのち,濾過して ズダンⅢ染色液とした。これに標本を1時間浸漬したの ち,50%エタノールで1分間分別し,蒸留水2槽を用いて 水洗後,風乾した。1槽目では標本を10回上下させ,2槽 目には1分間浸漬して水洗した。

2.4.2.3 オイルレッドO染色

イソプロピルアルコール50mlにオイルレッドO (Sigma)を0.15g加え,室温で1晩放置して飽和溶液を得 た。これと蒸留水を3:2の比率で混合し,30分間放置し たのち,濾過して染色液とした。標本を染色液に15分間浸 漬したのち,60%イソプロピルアルコールで1分間分別し た。蒸留水2槽を用いて水洗後,風乾した。1槽目では標 本を10回上下させ,2槽目には1分間浸漬して水洗した。 2.4.3 酵素染色

いずれの染色も室温(25℃)で行った。染色後,流水水 洗(5分間)し,蒸留水に通したのち,風乾した。アルカ リ性ホスファターゼ染色標本はサフラニンO(Sigma)の 1%水溶液で5分間核染色を行い,蒸留水で短時間水洗し たのち,風乾した。他の染色標本はマイヤーのヘマトキシ リン染色液で核染色した。風乾後,いずれの標本もグリセ リンで封入して光学顕微鏡で観察した。

2.4.3.1 アルカリ性ホスファターゼ (AIP)

AlP染色はfast blue RR saltを用いたアゾ色素法によっ c^{21} 。血液塗沫標本を氷酢酸・ホルマリン・メタノール混液 (0.001:1:9) で -20℃,5秒間固定した。5分間流水水洗 し、蒸留水に通したのち、fast blue RR salt (Sigma) を0.001 %添加した基質原液 (10mg naphthol AS-MX phosphate sodium salt (Sigma), 4 ml N-N-dimethylformamide (和 光純薬), 120ml 蒸留水, 76ml 0.2M Tris-HCl緩衝液 (pH8.6)) で2時間反応させた。

2.4.3.2 酸性ホスファターゼ (AcP)

AcPの検出には, fast garnet GBC法を用いた²²⁾。血液 塗沫標本を, 1 M NaOH水溶液を用いてpH5.4に調整した メタノール・アセトン緩衝液(630mgクエン酸, 30me基留 水, 10meメタノール, 60meアセトン)で5℃, 30秒間固定 した。5分間流水水洗し,蒸留水に通したのち,反応液 (8 mg fast garnet GBC (Sigma), 50m ℓ 0.1M酢酸緩衝 液 (pH5.2), 1 mℓ基質液 (10mg naphthol AS-BI phosphate (Sigma), 1 mℓ N-N-dimethylformamide)) で45分間染色 した。

2.4.3.3 β-グルクロニダーゼ (β-Glu)

β-Gluの検出にはfast red ITRを用いたアゾ色素法を適 用した²³⁾。血液塗沫標本をホルマリン・アセトン・蒸留水 混液(1:6:3)で室温,10秒間固定した。5分間流水 水洗し,蒸留水に通したのち,反応液(10mg fast red ITR (Sigma),7.5ml蒸留水,2.5ml基質液)で3時間染色 した。基質 (naphthol AS-BI glucuronide (Sigma))28mg を0.05M炭酸水素ナトリウム水溶液1.2mlに懸濁させ,60℃ で加温溶解したのち,0.2M酢酸緩衝液 (pH5.0)を100ml 加えて基質液とした。

2.4.3.4 各種エステラーゼ

基質にa-naphthyl acetate(a-NA), a-naphthyl butylate (a-NB) およびnaphthol-ASDCLA (NASDCA) を用い たアゾ色素法を適用した²⁴⁾。なお、いずれの基質もSigma のものを用いた。血液塗沫標本を、1M HClを用いて pH6.6に調整した緩衝ホルマリン-アセトン溶液(20mg Na 2HPO4, 100mg KH2PO4, 30ml 蒸留水, 45ml アセト ン, 25mlホルマリン) で5℃, 30秒間固定した。5分間流 水水洗し, 蒸留水に通したのち, 各種エステラーゼの検出 を行った。 a-NAエステラーゼ (a-NAE) 検出のため に、反応液 (15mg fast blue BB salt (Sigma), 9.9mlリン 酸緩衝液 (1/15M, pH7.4), 0.1ml 基質液 (10mg a -NA, 1 mlアセトン)) で60分間染色した。 a-NBエステラーゼ (α-NBE) 検出のために,標本を反応液 (15mg fast garnet GBC salt, 10mlリン酸緩衝液 (1/15M, pH6.4), 0.1ml 基質液 (10µℓ a-NB, 0.5mℓエチレングリコールモノメ チルエーテル)) で40分間染色した。NASDCLAエステ ラーゼ (NASDCAE) の検出は,標本を反応液 (15mg fast blue BB salt, 10mlリン酸緩衝液 (1/15M, pH7.4), 0.1ml基質液 (20mg NASDCA, 1mlアセトン) で15分間 染色する方法によった。

2.4.3.5 ペルオキシダーゼ (PO)

POの検出には、3-3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 法を適用した²⁵⁾。血液塗沫標本を20%グルター ルアルデヒド・エタノール混液(1:4)で5℃,10秒間 固定した。流水水洗(5分間)し、蒸留水に通したのち, 反応液(10mg DAB(同仁化学),20mℓ Tris-HCl緩衝液 (50mM, pH7.6),20μℓ 3%過酸化水素水)で5分間染 色した。

3 結 果

ウナギ好中球の各種Romanowsky型染色像をFigs.1 ~ 4 に示した。ウナギの好中球は長径9.0~14.5 μ mの円形または卵円形であり、細胞質内には3種類の顆粒(a 顆粒, β 顆粒および γ 顆粒)とともにY小体が観察された。種々の形態の核が偏在しており、分葉核(2分葉まで)も認められた。

a 顆粒は、淡橙色から赤色に染色される円形、卵円形、 または桿形の顆粒であった。本顆粒の長径は円形または卵 円形のもので約0.3 umであり、桿形の顆粒は、長径1.0 u m以下, 短径約0.2μmであった。メイ-グリュンワルド (MG) 液による固定では、染色される a 顆粒が少数で あった(Fig.1)。蒸留水および5mMリン酸緩衝液を用い たMG染色では、多数の a 顆粒が観察された(Figs. 2-1 ~ 2-3)。また, ¹/15Mリン酸緩衝液を用いたMG染色に おいても、pH5.0およびpH6.0の場合には、多数のa顆粒が 観察されたが (Fig. 2-4), pH7.0およびpH8.0において は、染色される a 顆粒の数が減少した(Figs. 2-5, 2-6)。メタノール固定(5分間)した標本にギムザ染色を 施したところ、いずれの条件においても本顆粒は染色され なかった (Fig. 3)。MG染色後にギムザ染色を施すMGG 染色では、希釈液に蒸留水を用いたところ、ギムザ液の希 釈率が1:20の場合には、いずれのギムザ染色時間(15分 間および60分間)においても、染色されるα顆粒は少数で あった (Fig. 4-1)。また, 希釈率1:100では, 15分間 の染色によって、多数のa顆粒が観察されたが(Fig. 4-



Fig. 1. A Japanese eel neutrophil stained with May-Grünwald concentrated-solution, which served as agents for both fixation and staining. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. Arrowheads show the Y-body. Bar=10 μ m.

ウナギの好中球顆粒



Fig. 2. Japanese eel neutrophil stained with May-Grünwald solution under various conditions. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated solution, the sample was stained again with May-Grünwald solution diluted with the following solutions : (1) distilled water, (2) phosphate buffer (5 mM, pH5.0), (3) phosphate buffer (5 mM, pH7.0), (4) phosphate buffer (1/15 M, pH5.0), (5) phosphate buffer (1/15 M, pH7.0), (6) phosphate buffer (1/15 M, pH8.0). Arrowheads show the Y-body. Bars=10 μ m.

2),60分間の染色では、観察される a 顆粒が減少した。 低濃度(5mM)のリン酸緩衝液を希釈液に用いたMGG 染色では、pH5.0およびpH6.0において、希釈率および染色 時間に拘わらず、多数の a 顆粒が観察された(Figs. 4-3 ~4-6)。しかし、pH7.0では希釈率1:20の場合には、 いずれの染色時間においても a 顆粒はほとんど観察されず

(Figs. 4-7, 4-8),希釈率1:100では15分間のギムザ 染色によって多数の (Fig. 4-9),また,60分間の染色 では少数の a 顆粒が認められた (Fig. 4-10)。pH8.0で は,希釈率1:20の場合にはpH7.0と同様に,いずれの染 色時間においても a 顆粒はほとんど観察されず,希釈率 1:100では,いずれの染色時間においても少数の a 顆粒 が観察された。高濃度 ($^{1}/_{15}$ M)のリン酸緩衝液を希釈液 として用いた場合には,pH5.0における希釈率1:20で は,染色時間の長短に拘わらず a 顆粒はほとんど観察され なかった (Fig. 4-11)。一方,希釈率1:100では,15分 間のギムザ染色によって多数の a 顆粒が観察されたが (Fig. 4-12),60分間の染色では観察される a 顆粒が少 数であった。また,pH6.0では染色時間の長短に拘わら ず,希釈率1:20で少数の,希釈率1:100では多数の a 顆粒が観察された。中性 (pH7.0)の緩衝液を用いた場合 には,希釈率1:20では染色時間の長短に拘わらず, a 顆 粒がほとんど観察されず (Figs. 4-13, 4-14),希釈率 1:100ではギムザ染色の時間の長さにともなって, 観察さ れる a 顆粒数が減少した (Fig. 4-15)。一方, pH8.0の場 合には, いずれの希釈率および染色時間においても少数の a 顆粒が観察された。

 β 顆粒は、円形または卵円形で長径が 0.6μ m以下であ り、いずれの条件のRomanowsky型染色においても明瞭な 色調を呈さず、難染性であった。

y 顆粒は淡青色を呈し、円形または卵円形で長径0.3 μ m以下であった。本顆粒は、MG原液では染色されなかっ た(Fig. 1)。また、いずれの希釈液を用いても、MG染 色では観察されなかった(Fig. 2)。一方、ギムザ染色で は、いずれの希釈液を用いても、本顆粒は淡青色顆粒とし て観察された(Fig. 3)。しかし、蒸留水を希釈液とし、 希釈率1:100で15分間染色した場合には、観察される y 顆粒は少数であった(Fig. 3-2)。また、低濃度(5 mM)のリン酸緩衝液を希釈液に用いたところ、pH5.0に おける希釈率1:20の場合には15分間の染色で少数の、ま た、60分間の染色では多数の y 顆粒が観察された(Figs. 3-3、3-4)。しかし、希釈率1:100では、いずれの染 色時間においても、観察される y 顆粒は少数であった
(Fig. 3-5)。pH6.0の場合も、希釈率1:100では染色
時間に拘わらず、少数の y 顆粒が観察されたが、希釈率
1:20の場合には、いずれの染色時間においても多数の y
顆粒が認められた。一方、pH7.0およびpH8.0では、いずれ

の希釈率および染色時間においても多数の y 顆粒が観察さ れた(Fig. 3-6)。高濃度($^{1}/_{15}$ M)のリン酸緩衝液を希 釈液として用いた場合には, pH5.0における希釈率1:20 では,染色時間の長短に関わらず多数の y 顆粒が観察され た(Fig. 3-7)。しかし,希釈率1:100では低濃度の緩



Fig. 3. Japanese eel neutrophil under various staining conditions. Giemsa stain. After fixation for 5 min with methanol, the sample was stained with Giemsa solution diluted with the following solutions : (1) distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2) distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (3) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. J5min. (4) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. J5min. (4) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (5) 0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15min. (7)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (8)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (9)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (10)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (11)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (11)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (11)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (11)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (20)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (20)¹/₁₅₀M phos



Fig. 4. Japanese eel neutrophil under various staining conditions. May-Grünwald (MG)

Giemsa stain. After fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the sample was stained with MG diluted solution in various solutions for 10 min, followed by staining with Giemsa under the following conditions: (1) distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2), distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2), distilled water at a rate of 1 : 100. 15 min. (3)0.5mM phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. 15 min. (5)0.5mM phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (6)0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (7)0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (7)0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (10)0.5mM phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 60 min. (11)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (14)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (14)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (14)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (14)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. 15 min. (12)¹/₁₅₀M

衝液の場合と同様に、いずれの染色時間においても観察される y 顆粒は少数であった(Fig. 3-8)。また、pH6.0およびpH8.0では、低濃度の緩衝液の場合と同様であったが(Figs. 3-9, 3-10)、pH7.0における希釈率1:20では、

染色時間の長短に拘わらず多数の y 顆粒が観察されるもの の(Fig. 3-11), 希釈率1:100ではギムザ染色の時間の 長さにともなって、観察される y 顆粒が増加した(Fig. 3-12)。本顆粒のMGG染色性を調べたところ、蒸留水を 希釈液として用い、希釈率1:20の場合には、いずれのギ ムザ染色時間においても、多数の y 顆粒が観察された (Fig. 4-1)。しかし、希釈率1:100では、いずれの染 色時間においても、観察される y 顆粒は少数であった (Fig. 4-2)。低濃度のリン酸緩衝液を希釈液に用いた ところ、pH5.0における希釈率1:20の場合には、いずれ の染色時間においても少数の y 顆粒が観察されたが (Fig. 4-3), 希釈率1:100では本顆粒は認められなかった (Fig. 4-4)。pH6.0の場合には、希釈率1:100では染色 時間に拘わらず少数の y 顆粒が観察され、希釈率1:20の 場合には15分間の染色で少数の、また、60分間の染色で多 数の y 顆粒が認められた (Figs. 4-5, 4-6)。一方, pH7.0およびpH8.0では、いずれの希釈率および染色時間に おいても多数の y 顆粒が観察された (Figs. 4-7~4 -10)。高濃度のリン酸緩衝液を希釈液として用いた場合に は、pH5.0およびpH6.0における y 顆粒の染色性は、低濃度 の緩衝液を用いた場合と同様であったが(Figs. 4-11, 4 -12), pH6.0では, いずれの希釈率および染色時間におい ても観察される y 顆粒は少なかった。また, pH7.0および pH8.0の場合も, 低濃度の緩衝液を希釈液に用いた時と同 様に, 多数の y 顆粒が観察されたが(Figs. 4-13, 4 -14), pH7.0では希釈率1:100で15分間染色した場合には, 観察される y 顆粒は少なかった(Fig. 4-15)。

Y小体は、いずれの染色条件においても青色を呈し、形状は円形、紐状、鎖状など多様であった(Figs. 1~4)。 また、本小体は核近縁、時には核に接して存在することも あった。

ウナギ好中球の細胞化学的特性をTable 1 に示した。 AcP、 β -Glu、a-NAE、a-NBEおよびNASDCAE活性の 存在を示す円形または卵円形の陽性顆粒が観察された (Figs. 5-1~5-5)。いずれの陽性顆粒も、長径0.3 μ m以下であったが、AcP、a-NAEおよびa-NBE陽性顆粒 は、細胞質に多数観察されたのに対して(Figs. 5-1、5-3、5-4)、 β -GluおよびNASDCAE陽性顆粒は少数で あった(Figs. 5-2、5-5)。PO活性は、円形または卵円 形の陽性顆粒(長径0.6 μ m以下)として認められ、細胞 質に充満していた(Fig. 5-6)。AlPは検出されなかっ た。PASに陽性の顆粒は、細胞質に充満しており(Fig. 5-7)、円形または卵円形で、直径0.3 μ m以下であっ た。本顆粒は、a-アミラーゼ処理によって完全に消失し

Test	Positive site (shape, number and size)			
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu m$); Hyaloplasm			
PAS after digestion with α -amylase	_			
Alcian blue (pH1.0)				
Alcian blue (pH2.5)	_			
Toluidine blue (distilled water)	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)			
Sudan black B	Granule (round or oval, a few, $\phi = 0.2 \ \mu m$)			
SudanIII				
Oil red O	_			
Alkaline phosphatase				
Acid phosphatase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu m$, equivalent to γG)			
β-Glucronidase	Granule (round or oval, some, $\phi \leq 0.3 \mu m$)			
α-Naphtyl acetate esterase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu m$, equivalent to γG)			
α-Naphtyl butyrate esterase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu m$, equivalent to γG)			
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	Granule (round or oval, some, $\phi \leq 0.3 \mu m$)			
Peroxidase	Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.6 \mu m$, equivalent to βG)			
Oil red O Alkaline phosphatase Acid phosphatase β-Glucronidase α-Naphtyl acetate esterase α-Naphtyl butyrate esterase Naphthol AS-D chloroacetate esterase Peroxidase	$-$ Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu m$, equivalent to γG) Granule (round or oval, some, $\phi \leq 0.3 \mu m$) Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu m$, equivalent to γG) Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.3 \mu m$, equivalent to γG) Granule (round or oval, some, $\phi \leq 0.3 \mu m$) Granule (round or oval, some, $\phi \leq 0.3 \mu m$) Granule (round or oval, many, $\phi \leq 0.6 \mu m$, equivalent to βG)			

Table 1. Summary of reactions of Japanese eel neutrophil to cytochemical tests

-, non detection.



Fig. 5. Cytochemistry of Japanese eel neutrophil. (1), acid phosphatase; (2), β -glucronidase; (3), α -naphthyl acetate esterase; (4), α -naphthyl butyrate esterase; (5), naphthol AS-D chloroacetate esterase; (6), peroxidase; (7), periodic acid Schiff reaction; (8), toluidine blue in distilled water; (9), sudan black B. Bars=10 μ m.

た。また、細胞質基質もPASに弱陽性であったが、これも α-アミラーゼ処理によって消失した。AB染色では、陽性 部位は観察されなかった。TB染色では、種々の形態を示 す青色の粗大な構造物が観察された(Fig. 5-8)。オイ ルレッドOおよびズダン皿染色では、陽性部位は観察され なかったが、SBB染色では直径が約0.2μmの円形陽性顆粒 が細胞質に少数観察された(Fig. 5-9)。

4 考 察

本研究の結果から、ウナギの好中球には、Romanowsky 型染色性において異なる3種類の顆粒(a顆粒、 β 顆粒、 y顆粒)と、Y小体が存在することが明らかとなった。

α 顆粒は、これまでに真骨魚類ではアジアアロワナ、コ イ、ナイルティラピア、イサキおよびトラフグにおいて報 告されており¹⁻⁶⁾,いずれの魚種においても酸性条件下の MG染色で染まること、ギムザ染色には染色されないこ と、およびMG染色で本顆粒を染色したのちにギムザ染色 を施すと染色性が低下することが知られている¹⁻⁶⁾。本研 究の結果から、ウナギにおいても同様の染色特性が得られ たことから、ウナギのa顆粒は前述の真骨魚類と同等の顆 粒であると考えられる。また、a顆粒の形状は、アジアア ロワナでは桿形または紡錘形¹⁾、コイおよびナイルティラ ピアでは円形²⁻⁴⁾、イサキでは桿形⁵⁾、トラフグでは円 形、卵円形または桿形と多様である⁶⁾。ウナギのa顆粒の 形状はトラフグと同様に、円形、卵円形または桿形であっ た。

a 顆粒と類似した顆粒は、ウナギの他の種類の血球には 観察されなかった。したがって、本顆粒は、ウナギ好中球 の同定に有用な指標となると考えられる。 β 顆粒は、これまでに著者らが報告した全ての真骨魚類 (アジアアロワナ、コイ、ノーザンパイク、ナイルティラ ピア、イサキ、メジナ、オオクチバス、ブルーギル、スズ キ、ヒラスズキ、タイリクスズキ、ヒラメ、トラフグ)で 認められている¹⁻¹¹⁾。いずれの魚種においてもβ 顆粒は円 形から卵円形であり、長径はアジアアロワナで0.5 μ m以 下¹⁾、コイで約0.5 μ m³⁾、ノーザンパイクで0.5 μ m以下⁷⁾、 ナイルティラピア、イサキ、オオクチバス、ブルーギルおよ びヒラメで0.5~1.0 μ m^{4.5.9.10)}、メジナで0.5~1.1 μ m⁸⁾、 スズキ、ヒラスズキ、タイリクスズキおよびトラフグで 1.0 μ m以下とされている^{6.11)}。本研究において、ウナギに おけるβ 顆粒は、長径0.6 μ m以下の円形または卵円形顆 粒として観察された。

γ顆粒はアジアアロワナ,コイ,ナイルティラピアおよ びイサキの好中球に観察されており、いずれの魚種におい ても円形または卵円形である^{1.3-5)}。また、本顆粒の長径 はアジアアロワナで 0.3μ m以下¹⁾,コイで 0.4μ m以下³⁾, ナイルティラピアとイサキでは 0.3μ m以下である^{4.5)}。ウ ナギのγ顆粒も、円形または卵円形で長径 0.3μ m以下で あり、形状および大きさは他魚種のγ顆粒と類似してい た。しかし、染色性には、魚種間で違いが認められたこと から(Table 2)、γ顆粒の内容物や機能は、魚種間で異 なると考えられる。

コイを除く魚種において、好塩基性を示す不定形の安本 小体(Y小体)が好中球に観察されている^{1,4-11)}。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²⁶⁾。ウナギの好中球にもY小体が観察 されたことから、本小体は、魚類好中球に共通するものと 考えられる。

細胞化学的特性から、ウナギ好中球の各顆粒およびY小体の成分を次のように推定した。ウナギの好中球には、円形または卵円形のPAS陽性顆粒(長径0.3 μ m以下)が細胞質に充満していた。しかし、a顆粒は形態が円形、卵円形、桿形と多様であり、細胞質に多数存在するものの、PAS陽性顆粒のように充満することはない。また、 β 顆粒は長径がPAS陽性顆粒よりも大型である。一方、 γ 顆粒は長径のAS陽性顆粒としてある。一方、 γ 顆粒は長径のAS陽性顆粒のように細胞質に充満することはない。さらに、PAS陽性顆粒はa-アミラーゼによって完全に消化された。以上のことから、PAS陽性顆粒はグリコーゲンを主成分とする構造物であり、a、 β および γ 顆

粒とは異なると考えられる。SBB陽性顆粒は直径約0.2 μ m であり、a、 β および γ 顆粒とは大きさおよび顆粒の数が 異なる。AcP、a-NAEおよびa-NBE陽性顆粒は、細胞質 に多数観察され、長径0.3 μ m以下の円形または卵円形で あることから、これらの酵素活性は γ 顆粒に存在すると考 えられる。一方、 β -GluおよびNASDCAE陽性顆粒も長径 0.3 μ m以下の円形または卵円形であるが、陽性顆粒数が 少ないことから、本酵素の存在部位は確定できない。これ まで、ウナギ好中球はPOを持つ細胞がほとんどないとい われてきたが²⁷⁾、本研究の結果から、ウナギにおいても、 他の真骨魚類と同様に、POが検出された。ウナギ好中球 のPO陽性顆粒は、円形または卵円形で細胞質に充満し、 長径が0.6 μ m以下であることから、 β 顆粒に相当すると 考えられる。

これまでに、AlPはメジナに⁹⁾、AcPはノーザンパイ ク,スズキ,ヒラスズキ,メジナ,ヒラメおよびトラフグ ており⁷⁾, a-NAEはアジアアロワナ, ノーザンパイク, スズキ、ヒラスズキ、メジナ、ヒラメおよびトラフグに ^{1.6.7.9.11)}, α-NBEはアジアアロワナ, ノーザンパイク, メジナおよびトラフグに^{1.6.7.9)}, NASDCAEはアジアア ロワナ、ノーザンパイク、スズキ、ヒラスズキおよびトラ フグの好中球で検出されている^{1.6.7.11)}。また、SBB陽性 顆粒は、アジアアロワナ、ノーザンパイク、ブルーギル、 スズキ, ヒラスズキ, メジナ, ヒラメおよびトラフグの好 中球に認められている^{1.6.7.9-11)}。これらのうち、アジア アロワナのNASDCAE活性は y 顆粒に¹⁾. ノーザンパイク 好中球のAcP活性はβ顆粒に局在すると考えられている⁷⁾。 一方, POは, アジアアロワナ, ノーザンパイク, ブルー ギル、メジナ、スズキ、ヒラスズキ、ヒラメおよびトラフ グにおいて観察されており^{1,6,7,9-11)}. 顆粒数. 大きさお よび形状が類似していることから,本酵素はβ顆粒に局在 すると考えられている^{1,6,7,9-11)}。また、アジアアロワ ナ、ノーザンパイク、ブルーギル、メジナ、スズキ、ヒラ スズキ, ヒラメおよびトラフグにおいて, 好中球にTB陽 性部位が観察されており^{1.6.7.9-11)},形態学的特徴から, Y小体に相当すると考えられている^{1.6.7.9-11)}。また、コ イにおいてもA. hydrophila感染によって出現した好中球 のY小体は、TBに陽性であることが報告されている²⁶⁾。 TB染色によりウナギ好中球に種々の形態を示す青色の粗 大な陽性部位が観察された。この陽性部位は形態学的特徴 から、Y小体に相当すると思われる。

· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Number of γ granules observed in each staining preparation ¹					
Stain ^{2,3}	Sf	Cc	On	Pt	Aj	
MG (both fixation and stain)	NO	NO	NT	NT	NO	
MG : DW	NO	NO	NO	NT	NO	
: 5mM PB, pH5.0	NO	NO	NO	NO	NO	
: 5mM PB, pH6.0	NO	NO	some	NO	NO	
: 5mM PB, pH7.0	NO	NO	many	NO	NO	
: 5mM PB, pH8.0	many	NO	NT	NT	NO	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0	NO	NO	NO	NO	NO	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0	NO	NO	some	NO	NO	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0	NO	NO	many	NO	NO	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0	some	NO	NT	NT	NO	
G : DW, 1:20, 15 min	many	NT	many	NT	many	
: DW, 1:20, 60 min	many	many	many	NT	many	
: DW, 1:100 , 15 min	some	NT	NT	NT	some	
: DW, 1:100 , 60 min	some	many	NT	NT	many	
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	many	NT	some	NT	some	
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many	
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	some	NT	NT	NT	some	
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	some	many	NT	NT	some	
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:20, 15min	many	NT	many	NT	many	
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many	
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min	some	NT	NT	NT	some	
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	some	
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:20, 15min	many	NT	many	NT	many	
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many	
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	many	
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	• NT	many	
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	many	NT	NT	NT	many	
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	many	NT	NT	NT	many	
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	many	
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	many	NT	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	many	NT	NO	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	some	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	some	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:20, 15min	many	NT	NO	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:20, 60min	many	many	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	some	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	some	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	many	NT	many	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	many	many	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	some	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	many	NT	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min	many	NT	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	many	NT	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅₀ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	many	NT	NT	NT	many	

Table 2-1. Summary of Romanowsky-type staining characteristics of γ granule in actinopterygians neutrophil

²MG, May-Grünwald; G, Giemsa; MGG, May-Grünwald · Giemsa; DW, distilled water; PB, phosphate buffer; 1:20 and 1:100, dilution ratio (Giemsa:diluent); 15 min and 60 min, time of Giemsa stain.

³Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or $^{1}/_{150}$ M PB.

	Number of γ granules observed in each staining preparation ¹					
Stain ^{2,3}	Sf	Сс	On	Pt	Aj	
MGG: DW, 1:20, 15 min	some	NO	many	NT	many	
: DW, 1:20, 60 min	many	many	many	NT	many	
: DW, 1:100 , 15 min	some	NO	some	NT	some	
: DW, 1:100 , 60 min	some	NO	some	NT	some	
: 5mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	some	NO	NO	NO	some	
: 5mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	many	many	NO	NT	some	
: 5mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	some	NO	NT	NT	NO	
: 5mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	many	NO	NT	NT	NO	
: 5mM PB, pH6.0, 1:20, 15min	some	NO	many	NO	some	
: 5mM PB, pH6.0, 1:20, 60min	many	many	many	NT	many	
: 5mM PB, pH6.0, 1:100 , 15 min	some	NO	NT	NT	some	
: 5mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	many	some	NT	NT	some	
: 5mM PB, pH7.0, 1:20, 15min	many	some	many	many	many	
: 5mM PB, pH7.0, 1:20, 60min	many	many	many	NT	many	
: 5mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	many	some	NT	NT	many	
: 5mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	many	some	NT	NT	many	
: 5mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	many	NT	NT	NT	many	
: 5mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	many	NT	NT	NT	many	
: 5mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	many	NT	NT	NT	many	
: 5mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	many	NT	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:20, 15min	some	NO	NO	NO	some	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	some	many	NO	NT	some	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	some	NO	NT	NT	NO	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	some	NO	NT	NT	NO	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:20, 15 min	many	some	many	NO	some	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:20, 60 min	many	many	many	NT	some	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	many	NO	NT	NT	some	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	many	some	NT	NT	some	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:20, 15min	many	many	many	many	many	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:20, 60min	many	many	many	NT	many	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	many	some	NT	NT	some	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	many	many	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	many	NT	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min)	many	NT	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	many	NT	NT	NT	many	
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	many	<u>NT</u>	NT	NT	many	

Table 2-2. Summary of Romanowsky-type staining characteristics of γ granule in
actinopterygians neutrophil

¹ Sf, Scleropages formosus (Asian arowana, Kondo and Takahashi (2009¹); Cc, Cyprinus carpio (common carp, Kondo et al. 37, Scieropages formosis (Asian atowana, Kondo and Takanashi (2003)); *Ce*, *Cyprints carpto* (common carp, Kondo *et al.* (2002)³); *On Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, Yasumoto *et al.* (2003)⁴); *Pt, Parapristipoma trilineatum* (striped grunt, Kondo *et al.* (2004)⁵); *Aj, Anguilla japonica* (Japanese eel, present report); NO, not observed; NT, not tested.
 ²MG, May-Grünwald; G, Giemsa; MGG, May-Grünwald · Giemsa; DW, distilled water; PB, phosphate buffer; 1:20 and 1:100,

dilution ratio (Giemsa:diluent); 15 min and 60 min, time of Giemsa stain.

³Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or $^{1}/_{150}$ M PB.

本研究によって、ウナギの好中球には3種類の顆粒 (a, β , y顆粒)とY小体が存在し、I型好中球に相当 することが明らかとなった。また、y顆粒にはAcP, a-NAEおよびa-NBEが、 β 顆粒にはPOが、また、Y小体 にはTB陽性物質が存在すると考えられた。

文 献

- 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)
- 2)近藤昌和,安本信哉,高橋幸則:コイ好中球のメイー グリュンワルド・ギムザ染色性.水大研報,50,109-117 (2002)
- 3)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)
- 4)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.水大研報, 51,79-86 (2003)
- 5)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)
- 6)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的および細胞化学的特
 徴.水大研報,55,133-139 (2007)
- 7)近藤昌和,高橋幸則,山元憲一:ノーザンパイク好中
 球の形態学的および細胞化学的特徴.水大研報,56,317-321 (2008)
- 8)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)
- 9)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)
- 10)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)
- 11) 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 学的および細胞化学的特徴.水大研報,55,141-147 (2007)
- 12) 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)
- 13) Gill A C and Mooi R D : Phylogeny and Systematics

of Fishes. In: Hart P J B and Reynolds J D (eds) Handbook of Fish Biology and Fisheries Vol. 1. Blackwell Publishing, Oxford, 15-42 (2002)

- 14) 安達真二: PAS反応, 月刊Medical Technology別冊染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 242-244 (1990)
- 15) 鈴木 裕: a-アミラーゼによるグリコーゲンの消化
 法,病理技術研究会編 病理標本の作り方,文光堂, 東京, 88-89 (1992)
- 16)林 勇:トルイジン青染色,病理技術研究会編 病理 標本の作り方,文光堂,東京,78-79 (1992)
- 17)林 勇:アルシアン青染色,病理技術研究会編 病理 標本の作り方,文光堂,東京,82-85 (1992)
- 18)東 克己:ズダン黒B(SBB)染色,月刊Medical
 Technology別冊 染色法のすべて,医歯薬出版,東
 京,239-240 (1990)
- 19)金田正昭:ズダンⅡ,ズダンⅢ染色,病理技術研究
 会編 病理標本の作り方,文光堂,東京,105-107
 1992)
- 20)金田正昭:オイルレッドO染色,病理技術研究会編病 理標本の作り方,文光堂,東京,108-109(1992)
- 小池 正,古田理英,柴田 昭:アルカリ性ホスファ ターゼ,月刊Medical Technology別冊 染色法のす べて,医歯薬出版,東京,207-209 (1990)
- 22) 望野唯明, 片山 勲:酸ホスファターゼ, 月刊
 Medical Technology別冊 染色法のすべて, 医歯薬
 出版,東京, 218-221 (1990)
- 23) 木村寿之: β-グルクロニダーゼ染色、月刊Medical Technology別冊 染色法のすべて、医歯薬出版、東 京、221-224 (1990)
- 24) 斎藤準一, 高久定男, 清水 宏:エステラーゼ染色,
 月刊Medical Technology別冊 染色法のすべて, 医 歯薬出版, 東京, 209-213 (1990)
- 25) 亀井喜恵子:ペルオキシダーゼ染色,月刊Medical
 Technology別冊 染色法のすべて,医歯薬出版,東
 京,213-217 (1990)
- 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)
- 27)飯田貴次,若林久嗣:魚類貪食細胞の特性,森 勝義,神谷久男編 水産生物の生体防御. 恒星社厚生閣,東京, 29-36 (1995)