

## カワハギおよびフグ類(クサフグ, コモンフグ)の好中球の形態学的および細胞化学的特徴

|       |                                                                                                                                                                                                  |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 水産大学校<br>公開日: 2024-10-11<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En): threadsail filefish; puffer; neutrophil; morphology; cytochemistry<br>作成者: 近藤, 昌和, 安本, 信哉, 高橋, 幸則<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2012012">https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2012012</a>                                                                                              |

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



## カワハギおよびフグ類(クサフグ, コモンフグ)の 好中球の形態学のおよび細胞化学的特徴

近藤昌和<sup>†</sup>, 安本信哉, 高橋幸則

### Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from Threadsail Filefish *Stephanolepis cirrhifer* and Puffers (Grass Puffer *Takifugu niphobles*, Finepatterned Puffer *Takifugu poecilonotus*)

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

**Abstract :** Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils in the threadsail filefish *Stephanolepis cirrhifer* and puffers (grass puffer *Takifugu niphobles*, finepatterned puffer *T. poecilonotus*) were examined by light microscopy. Two types of granules, eosinophilic granule ( $\alpha$ G) and chromophobic granule ( $\beta$ G) were observed in the neutrophils of these fish. Multiple Romanowsky-type stain valuation revealed that  $\alpha$ Gs of these fish neutrophils were not stained with Giemsa, but stained with May-Grünwald (MG). The  $\beta$ G was unstained by Romanowsky-type stain and peroxidase (PO) positive. In finepatterned puffer, nucleus of the neutrophils was also PO positive.

**Key words :** threadsail filefish, puffer, neutrophil, morphology, cytochemistry

## 緒 言

魚類の好中球における顆粒の種類は、多様であることが報告されている<sup>1-26)</sup>。著者らは前報<sup>9)</sup>において、トラフグ *Takifugu rubripes* の好中球の形態学のおよび細胞化学的特徴を調べ、トラフグの好中球には好酸性(好エオシン性)顆粒( $\alpha$ 顆粒)と難染色性顆粒( $\beta$ 顆粒)の2種類の顆粒が存在することを明らかにした。トラフグの $\alpha$ 顆粒はMay-Grünwald (MG) 染色標本、特に酸性条件下のMG染色標本に多数観察されるが、Giemsa染色では染まらず、MG-Giemsa (MGG) 染色では染色性が低下するとともに、観察される顆粒数が減少する傾向が認められた<sup>9)</sup>。また、 $\beta$ 顆粒にはペルオキシダーゼ(PO)活性が検出された<sup>9)</sup>。

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、トラフグと同属のクサフグ *T. niphobles* とコモンフグ *T. poecilonotus* (ともにフグ科) およびフグ目カ

ワハギ科のカワハギ *Stephanolepis cirrhifer* の好中球の形態学の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。

## 材料および方法

下関市沿岸で釣獲したカワハギ(体重約65 g)、クサフグ(体重約36 g)およびコモンフグ(体重約50 g)を、水産大学校の飼育施設に搬入し、1週間以上馴致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(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23.0±1.0℃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>に従った。

<sup>1)</sup>水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

<sup>†</sup>別刷り請求先 (Corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

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, 15 min |
| 4  |    | : | 5 mM PB, pH7.0                                           | 45 |     | : | <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH8.0, 1:100, 60 min |
| 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, 15 min                             |
| 10 | G  | : | DW, 1:20, 15 min                                         | 51 |     | : | 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60 min                             |
| 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, 15 min                             |
| 14 |    | : | 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15 min                           | 55 |     | : | 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60 min                             |
| 15 |    | : | 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60 min                           | 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, 15 min                             |
| 18 |    | : | 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15 min                           | 59 |     | : | 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60 min                             |
| 19 |    | : | 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60 min                           | 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, 15 min                             |
| 22 |    | : | 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15 min                           | 63 |     | : | 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60 min                             |
| 23 |    | : | 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60 min                           | 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, 15 min   |
| 26 |    | : | 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15 min                           | 67 |     | : | <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH5.0, 1:20, 60 min   |
| 27 |    | : | 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60 min                           | 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, 60 min  | 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, 15 min   |
| 34 |    | : | <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 15 min  | 75 |     | : | <sup>1</sup> / <sub>15</sub> M PB, pH7.0, 1:20, 60 min   |
| 35 |    | : | <sup>1</sup> / <sub>150</sub> M PB, pH6.0, 1:20, 60 min  | 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, 15 min  |
| 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, 60 min  |
| 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.

結 果

カワハギ, クサフグおよびコモンフグの好中球は円形または卵円形であり, カワハギでは長径 8.0 ~ 12.0 μm( 短径 7.0 ~ 10.0 μm), クサフグでは長径 8.0 ~ 10.5 μm( 短径 6.5 ~ 9.0 μm), コモンフグでは長径 8.0 ~ 12.5 μm( 短径 7.0 ~ 9.5 μm) であった。いずれの魚種の好中球にも 2 種類の顆粒 (α 顆粒, β 顆粒) と Y 小体<sup>9)</sup>が認められた。これら魚種の α 顆粒の MRSV による染色特性 (Multiple Romanowsky-type

Stain Characteristics, MRSC) を Table 2 に示す。いずれの魚種においても, β 顆粒は長径 0.5 μm 以下の円形または卵円形であり, 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。また, Y 小体は種々の形態 (円形, 卵円形, 桿形, コンマ形, 三日月形, 紐状) を示し, MRSV のいずれの染色条件においても青色から淡青色を呈した。なお, 種々の形態の核が偏在しており, コモンフグでは分葉核 (二分葉まで) も認められたのに対して, カワハギとクサフグでは分葉核は観察されなかった。

**Table 2.** Summary of multiple Romanowsky-type staining characteristics of eosinophilic granule ( $\alpha$  granule) in the neutrophils of threadsail filefish *Stephanolepis cirrhifer* (Sc) and puffers (grass puffer *Takifugu niphobles* (Tn), finepatterned puffer *T. poecilonotus* (Tp))

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

++, many; +, some; -, not observed.

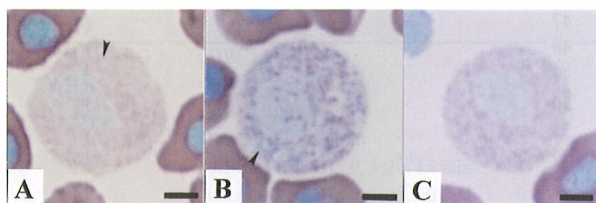
PN, preparation number (See Table 1).

#### $\alpha$ 顆粒の MRSC

カワハギ、クサフグおよびコモンフグの  $\alpha$  顆粒は淡橙色から橙色を呈する顆粒であり、いずれの魚種においても長径  $0.3 \mu\text{m}$  以下の円形または卵円形であった (Fig. 1)。カワハギの  $\alpha$  顆粒は、蒸留水を希釈液に用いた MG 染色標本には認められなかったが、pH5.0 のリン酸緩衝液を希釈液に用いた MG 染色標本で多数観察された。また、pH6.0 と pH7.0 の高濃度 ( $1/15 \text{ M}$ ) 緩衝液を用いた MG 染色では、少数の  $\alpha$  顆粒が認められた。しかし、pH6.0 ～ 8.0 の低濃度 (5 mM) および pH8.0 の高濃度緩衝液を用いた MG 染色標

本には  $\alpha$  顆粒は認められなかった。クサフグの  $\alpha$  顆粒は蒸留水および pH5.0 のリン酸緩衝液を希釈液に用いた MG 染色標本に多数観察された。また、pH6.0 の低濃度および pH6.0 ～ 8.0 の高濃度緩衝液を用いた MG 染色では、少数の  $\alpha$  顆粒が認められた。しかし、pH7.0 および pH8.0 の低濃度緩衝液を用いた MG 染色標本には  $\alpha$  顆粒は認められなかった。コモンフグの  $\alpha$  顆粒は蒸留水、pH5.0 のリン酸緩衝液および pH6.0 の高濃度緩衝液を希釈液に用いた MG 染色標本に多数観察された。また、pH6.0 と pH7.0 の低濃度および pH7.0 と pH8.0 の高濃度緩衝液を用いた MG 染色で

は、少数の  $\alpha$  顆粒が認められた。しかし、pH8.0 の低濃度緩衝液を用いた MG 染色標本には  $\alpha$  顆粒は認められなかった。いずれの魚種においても  $\alpha$  顆粒は Giemsa 染色標本には認められなかった。また、MGG 染色では、染色される  $\alpha$  顆粒の数が減少する傾向がいずれの魚種においても認められた。

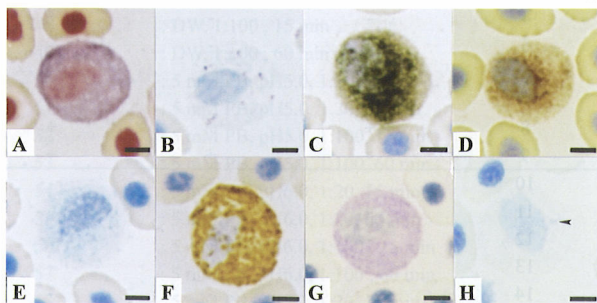


**Fig. 1.** Neutrophils of threadsail filefish *Stephanolepis cirrifer* (A), grass puffer *Takifugu niphobles* (B) and finepatterned puffer *T. poecilonotus* (C). May-Grünwald stain (PN=6, See Table 1). Note eosinophilic granules. Arrowheads show Y-body. Bars=2.5  $\mu$ m.

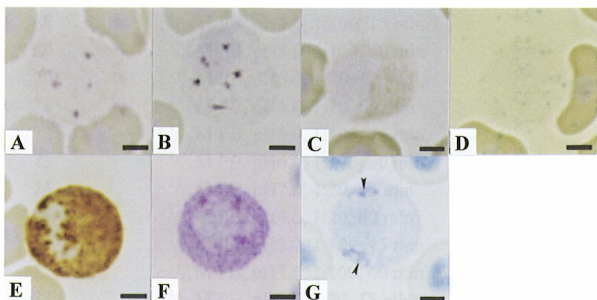
#### 細胞化学的特徴

カワハギ、クサフグおよびコモンフグの好中球の細胞化学的特徴を Table 3 に示す。アルカリ性フォスファターゼ (AIP) はクサフグとコモンフグには検出されなかったが、カワハギでは、細胞質基質に陽性反応が認められた (Fig. 3A)。酸性フォスファターゼ (AcP) はカワハギには検出されず、クサフグとコモンフグでは、陰性または円形ないし卵円形の陽性顆粒 (クサフグ、長径 0.5  $\mu$ m 以下; コモンフグ、長径 0.3  $\mu$ m 以下) が少数観察された (Figs. 4A, 5A)。 $\beta$ -グルクロニダーゼ ( $\beta$ -Glu) は、カワハギでは円形ないし卵円形の陽性顆粒 (長径 0.3  $\mu$ m 以下) として少数検出され (Fig. 3B), クサフグとコモンフグでは、陰性の好中球と、円形または卵円形 (長径 0.5  $\mu$ m 以下) ないし桿形 (長径 1.5  $\mu$ m 以下, 短径 0.5  $\mu$ m 以下) の陽性顆粒を少数有する好中球が観察された (Figs. 4B, 5B)。 $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ ( $\alpha$ -NAE) は、いずれの魚種の好中球にも多数の円形または卵円形の陽性顆粒として観察されたが、カワハギでは長径 0.5  $\mu$ m 以下であったのに対して (Fig. 2C), クサフグとコモンフグでは、長径 0.3  $\mu$ m 以下であった (Figs. 3C, 4C)。 $\alpha$ -ナフチルブチレートエステラーゼ ( $\alpha$ -NBE) はクサフグとコモンフグには認められず、カワハギでは長径 0.3  $\mu$ 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た (Fig. 2D)。ナフトール AS-D クロロアセテートエステラーゼ (NASDCAE) はいずれの魚種においても円形または卵円形の陽性顆粒として多数検出され、カワハギとコモンフグでは長径 0.3  $\mu$ m 以下であったのに対して (Figs. 2E, 4D), クサフグでは長径 0.5  $\mu$ m 以下であった (Fig. 3D)。PO

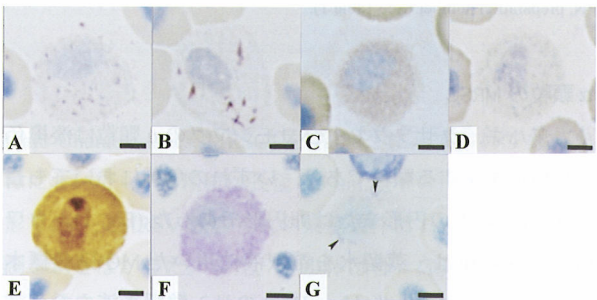
はいずれの魚種においても長径 0.5  $\mu$ m 以下の円形または卵円形の陽性顆粒として認められ、細胞質に充満していた (Figs. 2F, 3E, 4E)。また、コモンフグでは核にも PO 陽性反応が検出された。



**Fig. 2.** Cytochemistry of neutrophil in threadsail filefish *Stephanolepis cirrifer*. A, alkaline phosphatase; B,  $\beta$ -glucuronidase; C,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase; D,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; E, naphthol AS-D chloroacetate esterase; F, peroxidase; G, periodic acid Schiff reaction; H, toluidine blue in distilled water. Arrowhead shows Y-body. Bars=2.5  $\mu$ m.



**Fig. 3.** Cytochemistry of neutrophil in grass puffer *Takifugu niphobles*. A, acid phosphatase; B,  $\beta$ -glucuronidase; C,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase; D, naphthol AS-D chloroacetate esterase; E, peroxidase; F, periodic acid Schiff reaction; G, toluidine blue in distilled water. Arrowheads show Y-body. Bars=2.5  $\mu$ m.



**Fig. 4.** Cytochemistry of neutrophil in finepatterned puffer *Takifugu poecilonotus*. A, acid phosphatase; B,  $\beta$ -glucuronidase; C,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase; D, naphthol AS-D chloroacetate esterase; E, peroxidase; F, periodic acid Schiff reaction; G, toluidine blue in distilled water. Arrowheads show Y-body. Bars=2.5  $\mu$ m.

**Table 3.** Summary of reactions of neutrophil to cytochemical tests in threadsail filefish *Stephanolepis cirrhifer* and puffers (grass puffer *Takifugu niphobles*, finepatterned puffer *T. poecilonotus*)

| Test <sup>1</sup> | Fish and positive site (shape and number) <sup>2</sup>   |                                                                |                                                                |
|-------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|                   | <i>S. cirrhifer</i>                                      | <i>T. niphobles</i>                                            | <i>T. poecilonotus</i>                                         |
| PAS               | G (r or o, m, $\phi \leq 0.4 \mu\text{m}$ ); H           | G (r or o, m, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$ ); H                 | G (r or o, m, $\phi \leq 0.4 \mu\text{m}$ ); H                 |
| PAS- $\alpha$ A   | —                                                        | —                                                              | —                                                              |
| AB pH1.0          | —                                                        | —                                                              | —                                                              |
| AB pH2.5          | —                                                        | —                                                              | —                                                              |
| TB                | G (am, af, eq Y); N                                      | G (am, af, eq Y); N                                            | G (am, af, eq Y); N                                            |
| SBB               | —                                                        | —                                                              | —                                                              |
| SIII              | —                                                        | —                                                              | —                                                              |
| ORO               | —                                                        | —                                                              | —                                                              |
| AIP               | H                                                        | —                                                              | —                                                              |
| AcP               | —                                                        | — or G (r or o, af, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$ )              | G (r or o, s or af, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$ )              |
| $\beta$ -Glu      | G (r or o, s, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$ )              | — or G (r, o or rod, af, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$ (r or o)) | — or G (r, o or rod, af, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$ (r or o)) |
| $\alpha$ -NAE     | G (r or o, m, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$ ), H           | G (r or o, m, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$ , eq $\alpha$ )      | G (r or o, m, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$ , eq $\alpha$ )      |
| $\alpha$ -NBE     | G (r or o, m, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$ )              | —                                                              | —                                                              |
| NASDCAE           | G (r or o, m, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$ )              | G (r or o, s, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$ )                    | G (r or o, m, $\phi \leq 0.3 \mu\text{m}$ , eq $\alpha$ )      |
| PO                | G (r or o, m, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$ , eq $\beta$ ) | G (r or o, m, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$ , eq $\beta$ )       | G (r or o, m, $\phi \leq 0.5 \mu\text{m}$ , eq $\beta$ ), N    |

<sup>1</sup>PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS- $\alpha$ A, PAS after  $\alpha$ -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;  $\beta$ -Glu,  $\beta$ -glucuronidase;  $\alpha$ -NAE,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase;  $\alpha$ -NBE,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; NASDCAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase.

<sup>2</sup>—, non detection; G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; Y, Yasumoto body;  $\alpha$ , eosinophilic granule;  $\beta$ , chromophobic granule; r, round; o, oval; am, amorphous; m, many; s, some; af, a few; eq, equivalent to.

いずれの魚種にも円形または卵円形の periodic acid Schiff 反応 (PAS) 陽性顆粒が多数観察され, 細胞質基質も PAS 弱陽性であった (Figs. 2G, 3F, 4F)。陽性顆粒の長径は, カワハギとコモンフグで 0.4  $\mu\text{m}$  以下であり, クサフグでは 0.5  $\mu\text{m}$  以下であった。いずれの PAS 陽性部位も  $\alpha$ -アミラーゼ処理によって完全に消失した。いずれの魚種においても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, いずれの魚種の好中球も核が青染され, 種々の形態 (円形, 卵円形, 桿形, コンマ形, 三日月形, 紐状) を示す青色の陽性顆粒が少数観察された (Figs. 2H, 3G, 4G)。オイルレッド O, ズダンⅢおよびズダンブラック B (SBB) 染色ではいずれの魚種においても陽性部位は観察されなかった。

考 察

近年, MRSV によって, 魚類の好中球顆粒の種類は魚種によって多様であることが報告されている<sup>1-26)</sup>。肉鰭綱肺魚亜綱のアフリカハイギョ *Protopterus annectens* では染色条件の違いによってエオシン好性, 正調メチレンブルー好性または異調アズール好性を示す汎染色性顆粒のみが認められている<sup>18)</sup>。しかし, 魚類を含む脊椎動物の原始

の系統の現生種であるヌタウナギ *Eptatretus burgeri* や, 真骨魚類とともに条鰭綱に含まれ, 条鰭綱の中で最も早期に出現したとされる腕鰭亜綱ポリプテルス目のビキール *Polypterus endlicheri* および種々の真骨魚類では好中球顆粒は  $\alpha$  顆粒,  $\beta$  顆粒および好塩基性顆粒 ( $\gamma$  顆粒) の組み合わせからなる<sup>1-17,19-26)</sup>。 $\alpha$  顆粒は MRSC の違いから 2 種類に大別され<sup>24)</sup>, MG 染色で染まるが, Giemsa 染色では染色されない  $\alpha 1$  顆粒と, MG 染色と Giemsa 染色のどちらでも染まる  $\alpha 2$  顆粒に分類されている (Table 4)<sup>24)</sup>。また,  $\gamma$  顆粒は MG 染色にも Giemsa 染色にも染まる  $\gamma 1$  顆粒, MG 染色では染まらず Giemsa 染色で染まる  $\gamma 2$  顆粒および MG 染色では染まるが, Giemsa 染色では染まらない  $\gamma 3$  顆粒の 3 種類に分類されている (Table 5)<sup>24,26)</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>, ビキールでは, 好中球に 2 種類の  $\alpha$  顆粒 ( $\alpha 1$  顆粒,  $\alpha 2$  顆粒) と  $\gamma 2$  顆粒が存在する<sup>13)</sup>。一方, 真骨魚類は好中球顆粒の種類数の違いから 4 群に大別される (Table 6)。すなわち,  $\alpha$  顆粒,  $\beta$  顆粒および  $\gamma$  顆粒の 3 種類の顆粒が好中球に観察される I 群 (アジアアロワナ *Scleropages formosus*, ウナギ *Anguilla japonica*, コイ *Cyprinus carpio*, ナイルティラピア *Oreochromis niloticus*, イサキ *Parapristipoma trilineatum*, マアジ *Trachurus japonicus*, ブリ *Seriola quinqueradiata*, カ

Table 4. Staining characteristics of eosinophilic granules ( $\alpha$  granules)

| Staining     | Type of $\alpha$ granules |            |
|--------------|---------------------------|------------|
|              | $\alpha 1$                | $\alpha 2$ |
| May-Grünwald | +                         | +          |
| Giemsa       | +                         | -          |

+, positive; -, negative.

Table 5. Staining characteristics of basophilic granules ( $\gamma$  granules)

| Staining     | Type of $\gamma$ granules |            |            |
|--------------|---------------------------|------------|------------|
|              | $\gamma 1$                | $\gamma 2$ | $\gamma 3$ |
| May-Grünwald | +                         | -          | +          |
| Giemsa       | +                         | +          | -          |

+, positive; -, negative.

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    | $\alpha 2$ , $\beta$ , $\gamma 1$ | $\beta$     | 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    | $\alpha 2$ , $\beta$ , $\gamma 2$ | $\beta$     | 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. dumerilii</i> <sup>25)</sup> , yellowtail amberjack <i>S. lalandi</i> <sup>25)</sup>                                                                                     |
| II    | II -Aa   | $\alpha 2$ , $\beta$              | $\beta$     | tiger puffer <i>Takifugu rubripes</i> <sup>9)</sup> , grass puffer <i>T. niphobles</i> *, threadsail filefish <i>Stephanolepis cirrhifer</i> *                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|       | II -Ab   | $\alpha 2$ , $\beta$              | $\beta$ , N | finepatterned puffer <i>Takifugu poecilonotus</i> *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|       | II -Ba   | $\alpha 1$ , $\beta$              | $\beta$     | red sea-bream <i>Pagrus major</i> <sup>16)</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| III   | III -a   | $\beta$                           | $\beta$     | 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>3,7)</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   | $\beta$                           | $\beta$ , 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   | $\beta$ , $\gamma 1$              | $\beta$     | Japanese lates <i>Lates japonicus</i> <sup>22)</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|       | IV -Ba   | $\beta$ , $\gamma 3$              | $\beta$     | marbled rockfish <i>Sebastes marmoratus</i> <sup>26)</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

$\alpha 1$ , eosinophilic granule ( $\alpha$  granule) type 1;  $\alpha 2$ ,  $\alpha$  granule type 2;  $\beta$ , chromophobic granule;  $\gamma 1$ , basophilic granule ( $\gamma$  granule) type 1;  $\gamma 2$ ,  $\gamma$  granule type 2;  $\gamma 3$ ,  $\gamma$  granule type 3; PO, peroxidase; N, nucleus.

\*Present report.



ンパチ *S. dumerili*, ヒラマサ *S. lalandi*)<sup>1-4,12,15,17,24,25</sup>,  $\alpha$  顆粒と  $\beta$  顆粒が認められる II 群 (トラフグ *Takifugu rubripes*, マダイ *Pagrus major*)<sup>9,16</sup>,  $\beta$  顆粒のみを有する III 群 (アユ *Plecoglossus altivelis*, ノーザンパイク *Exos lucius*, ボラ *Mugil cephalus*, メナダ *Chelon haematocheilus*, オオクチバス *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.*, メジナ *Girella punctata*, マハタ *Epinephelus septemfasciatus*, ヒラメ *Paralichthys olivaceus*, マコガレイ *Pleuronectes yokohamae*, マツカワ *Veraspermoseri*)<sup>5-8,10,11,19,20,21,23</sup>,  $\beta$  顆粒と  $\gamma$  顆粒が存在する IV 群 (アカメ *Lates japonicus*, カサゴ *Sebastiscus marmoratus*) に分類されている<sup>22,26</sup>。また, I 群は  $\alpha 2$  顆粒と  $\gamma 1$  顆粒を有する I -A 群と,  $\alpha 2$  顆粒と  $\gamma 2$  顆粒を有する I -B 群に細分される<sup>24,25</sup>。さらに, 真骨魚類の II 群では  $\alpha 1$  顆粒を有する II -B 群 (マダイ) と  $\alpha 2$  顆粒を持つ II -A 群 (トラフグ) に細分され<sup>24</sup>, IV 群は  $\gamma 1$  顆粒を有する IV -A 群 (アカメ) と  $\gamma 3$  顆粒を有する IV -B 群 (カサゴ) に分類されている<sup>26</sup>。カワハギ, クサフグおよびコモンフグの好中球の  $\alpha$  顆粒は, 魚種によって条件は異なるものの, いずれの魚種においても MG 染色によって染色されたが, Giemsa 染色では染色されず, MGG 染色では観察される  $\alpha$  顆粒の数が減少した。これらの染色性から, カワハギ, クサフグおよびコモンフグの  $\alpha$  顆粒は  $\alpha 2$  顆粒に同定される。従って, これらのフグ目魚類はトラフグと同様に II -A 群に分類される。

カワハギ, クサフグおよびコモンフグの好中球は PAS, TB,  $\beta$ -Glu,  $\alpha$ -NAE, NASDCAE および PO 陽性であり, カワハギでは AIP と  $\alpha$ -NBE も検出され, クサフグおよびコモンフグでは AcP も陽性であった。いずれの魚種においても PAS 陽性顆粒は  $\alpha$ -アミラーゼにより完全に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ると考えられ,  $\alpha$  顆粒および  $\beta$  顆粒とは異なると思われる。また, TB 陽性部位は形態学的特徴から Y 小体に相当すると考えられる。各種酵素染色における陽性顆粒のうち, クサフグおよびコモンフグの  $\alpha$ -NAE 陽性顆粒ならびにコモンフグの NASDCAE 陽性顆粒は, 大きさ, 形状および数の類似性から  $\alpha$  顆粒に相当すると推察される。また, 各魚種の PO 陽性顆粒は  $\beta$  顆粒に相当すると考えられる。トラフグの好中球は PAS, TB, AcP,  $\alpha$ -NAE,  $\alpha$ -NBE, NASDCAE および PO 陽性であり, カワハギ, クサフグおよびコモンフグでは検出されなかった SBB 陽性顆粒も認められている。しかし, カワハギ, クサフグおよびコモンフグで認められた  $\beta$ -Glu は検出されていない。

各種魚類の好中球の細胞化学的特徴が調べられているが, 陽性反応の存在部位が推定されているものは少ない<sup>6-26</sup>。しかし, Y 小体を有する魚種では, 同小体が TB 陽性であると考えられている<sup>6-17,19-26</sup>。また,  $\beta$  顆粒を有する魚種では, 本顆粒は PO 陽性であると考えられている<sup>6-12,15-17,19-26</sup>。カワハギ, クサフグおよびコモンフグにおいても Y 小体は TB 陽性であり,  $\beta$  顆粒は PO 陽性であると推測された。

PO 活性の局在部位の違いから, 真骨魚類の III 群は III -A 群と III -B 群に細分されており<sup>20,21,23</sup>, 前者では PO 活性は  $\beta$  顆粒のみに<sup>6,7,10,11,23</sup>, 後者では PO 活性が  $\beta$  顆粒と核に検出されている<sup>8,19-21</sup>。カワハギとクサフグの核は PO 陰性であったが, コモンフグの好中球の核には PO が検出された。これまでに III 群以外に PO 活性が核に検出された魚種はなく, コモンフグを他の II -A 群 (カワハギ, クサフグ, トラフグ) と区別するために, PO 活性の局在部分の違いを “a” と “b” で表すことを提唱する。すなわち, PO 活性が  $\beta$  顆粒のみに認められる場合を a とし, PO 活性が  $\beta$  顆粒と核に検出される場合を b とする。また, この表現方法を今後, 各群 (I ~ IV) に適用し, a や b は下位群を表す大文字のアルファベット (A や B) に続いて記すこととする (Table 6)。この方法により, 群は  $\alpha$  顆粒,  $\beta$  顆粒および  $\gamma$  顆粒の組み合わせの違いを, 下位群は  $\alpha$  顆粒や  $\gamma$  顆粒の種類の違いを表すこととなる。なお, III 群は  $\beta$  顆粒のみを有するが, これまでに  $\beta$  顆粒に複数の種類が認められていないことから, 下位群を示す A と B (III -A 群, III -B 群) を使用せず, III -A 群を III -a 群に, III -B 群を III -b 群と表記することを提案する。

本研究では, カワハギとクサフグはトラフグとともに II -Aa 群に, コモンフグは II -Ab 群に分類されること示した。

## 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: メジナ的好中球顆粒. 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, 1-15 (+ 表 1, 図 1-20), (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: プリ的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: ボ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)
- 22) 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)