

## ポリプテルス好中球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和<sup>†</sup>, 高橋幸則

### Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophil from *Polypterus endlicheri*

Masakazu Kondo<sup>†</sup> and Yukinori Takahashi

**Abstract** : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil in *Polypterus endlicheri* were examined by light microscopy and the composition of neutrophil granule were inferred in this study. The neutrophils were round or oval (14.0~23.0  $\mu\text{m}$  in diameter) and the nucleus round to two lobule-shaped. Three types of granules; two types of acidophilic granules ( $\alpha$ -1 G and  $\alpha$ -2 G), and basophilic granule ( $\gamma$  G) were observed in neutrophil. Chromophobic granule ( $\beta$  G) was not observed. The  $\alpha$ -1 G was round (0.3  $\mu\text{m}$  in diameter) or rod (0.8  $\mu\text{m}$  in length) in shape and observed in May-Grünwald (MG), Giemsa and MG-Giemsa (MGG) preparations. The  $\alpha$ -1 G was alkaline phosphatase, acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase and sudan black B positive. On the preparation fixed with formalin vapor, the  $\alpha$ -1 G was stained with eosin. The  $\alpha$ -2 G was round (0.3  $\mu\text{m}$  in diameter) and observed in MG and MGG preparations using  $1/15\text{M}$  phosphate buffer (pH 7.0 and pH 8.0). The  $\alpha$ -2 G was stained with eosin on the preparation fixed with formalin-methanol. The  $\gamma$  G was round to oval (<0.5  $\mu\text{m}$  in diameter) and stained with Giemsa and MGG using  $1/15\text{M}$  phosphate buffer (pH 7.0 and pH 8.0). Yasumoto body (Y-body) was also observed in neutrophil and stained with toluidine blue, methylene blue, azure A and safranin O.

**Key words** : neutrophil, granulocyte, *Polypterus endlicheri*, morphology

## 緒 言

魚類は、両生類、爬虫類、哺乳類などと同列の一つの動物群であると考えられてきた。しかし、単系統群ごとに分類群を認識する分岐分類学では、魚類だけからなる分類群を認めず、脊椎動物のうち両性類から始まる四肢動物を除いた残りのグループ、すなわち側系統群であるとされる<sup>1)</sup>。したがって、魚類とは分類群ではなく、鰭を有し、鰓呼吸をする魚形の脊椎動物の総称ということになる<sup>1)</sup>。現在、魚類は無顎上綱(メクラウナギ綱、頭甲綱)と顎口上綱に大別され、顎口上綱には、軟骨魚綱(全頭亜綱、板鰓亜綱)、肉鰭綱(シーラカンス亜綱、肺魚亜綱)および条鰭綱(腕鰭亜綱、軟質亜綱、新鰭亜綱)が含まれる<sup>1)</sup>。また、四肢動物は、肉鰭綱の四肢動物亜綱に分類される<sup>1)</sup>。

著者らは真骨魚類(条鰭綱新鰭亜綱ハレコストム区真骨亜区<sup>1)</sup>)について、好中球内顆粒の種類数の違いから、少なくとも以下の3群に大別されることを明らかにした<sup>2-12)</sup>。

I群: 好酸性顆粒( $\alpha$ 顆粒)、難染色顆粒( $\beta$ 顆粒)および好塩基性顆粒( $\gamma$ 顆粒)の3種類の顆粒が好中球に認められる魚種(アジアアロワナ *Scleropages formosus*, コイ *Cyprinus carpio*, ナイルティラピア *Oreochromis niloticus*, イサキ *Parapristipoma trilineatum*)<sup>2-6)</sup>。

II群:  $\alpha$ 顆粒と $\beta$ 顆粒が認められる魚種(トラフグ *Takifugu rubripes*)<sup>10)</sup>。

III群:  $\beta$ 顆粒のみが認められる魚種(ノーザンパイク *Exos lucius*, メジナ *Girella punctata*, 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

2008年12月3日受付. Received December 3, 2008.

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

キL. sp., ヒラメ *Paralichthys olivaceus*)<sup>7-9, 11, 12)</sup>。

I群には、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 (アロワナ下区アロワナ目) や、III群の中で最も早期に出現したノーザンバイク (正真骨下区原棘鱗上目カワカマス目) よりも原始的なコイ (ニシン・骨鰈下区骨鰈上目コイ目) が含まれることから、I群の形質 (好中球に $\alpha$ ,  $\beta$ および $\gamma$ の3種類の顆粒が存在) は、真骨魚類好中球の原型であると推察される。スズキ目 (正真骨下区棘鱗上目) のナイルティラピアとイサキもI群に含まれ、III群にもメジナ、オオクチバス、ブルーギル、スズキ、ヒラスズキ、タイリクスズキといったスズキ目魚類が含まれるが、I群とIII群の関連は不明である。また、III群にはノーザンバイク (正真骨下区原棘鱗上目カワカマス目) や、スズキ目から派生したとされるヒラメ (正真骨下区棘鱗上目カレイ目)<sup>14)</sup> が含まれることから、現生真骨魚類のうち、新顎類<sup>1)</sup> に広範囲に渡って受け継がれている形質と考えられる。一方、II群のトラフグは正真骨下区棘鱗上目フグ目に属し、ヒラメと同様にスズキ目から派生したと考えられているが<sup>14)</sup>、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、本群と他の群との関係は明らかではない。また、各群内および各群間における好中球機能の類似性や相違も不明である。

上記のコイを除く魚種では、好塩基性を示す不定形の安本小体 (Y小体) (Yasumoto body, Y-body) が好中球に観察されている<sup>2, 5-12)</sup>。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出现することが報告されている<sup>13)</sup>。Y小体はトルイジンブルーに陽性であるが、PAS染色やアルシアンブルー染色には陰性であり、種々の脂肪染色や酵素染色にも染まらないことが明らかにされている<sup>2, 8-13)</sup>。また、Y小体はヘマトキシリンで染色されること、しばしば核に隣接して観察されることから、本小体は粗面小胞体であり、細菌感染時における、好中球の生体防御機能の上昇や活性化に関連するのではないかと推察されている<sup>13)</sup>。

腕鰭亜綱ポリプテルス目<sup>1)</sup> は、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であると考えられている<sup>15)</sup>。本研究では、真骨魚類における各種好中球顆粒の起源を明らかにするために、ポリプテルス目 に属するポリプテルス エンドリケリー *Polypterus endlicheri* について、好中球のRomanowsky型染色性を調べるとともに、細胞化学的特徴を明らかにし、これまでに報告した各種真骨魚類と比較した。

## 材料および方法

熱帯魚店で購入した全長約30cmの *P. endlicheri* を水産大学の飼育施設に搬入し、1年以上馴致飼育したのち実験に供した (水温 $23.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ )。飼育期間中は、ブリ用配合飼料 (マリン6号, 林兼産業) を適宜給餌した。

血液塗抹標本の作製およびRomanowsky型染色法は前報<sup>3)</sup> に、各種細胞化学染色は文献8および文献16に従った。

## 結 果

### Romanowsky 型染色性

*P. endlicheri* の好中球は、長径 $14.0 \sim 23.0 \mu\text{m}$ の円形または卵円形であり、細胞質には好酸性顆粒 ( $\alpha$  顆粒) と好塩基性顆粒 ( $\gamma$  顆粒) およびY小体が観察された。また、 $\alpha$  顆粒は、形状と染色性の違いから、2種類 ( $\alpha-1$  顆粒と $\alpha-2$  顆粒) に区別された (Table 1)。核は一般に円形からソラ豆形を示し、稀に分葉核 (2分葉まで) も認められた。

$\alpha-1$  顆粒は淡赤色から赤色を示し、直径約 $0.3 \mu\text{m}$ の円形または長径約 $0.8 \mu\text{m}$ の短桿形であった (Table 1)。本顆粒は、メイ-グリュンワルド (MG) 原液 (メタノール溶液) で固定後に水洗した場合において、細胞質に淡赤色顆粒として多数観察された (Fig. 1)。各種希釈液 (蒸留水, 5 mMおよび $1/15$  Mのリン酸緩衝液 (pH5.0~8.0)) を用いたMG染色においても多数認められた (Fig. 2)。蒸留水および5 mMリン酸緩衝液 (pH5.0~8.0) を用い場合には、淡赤色顆粒として観察されたが (Fig. 2-1~2-5),  $1/15$  Mリン酸緩衝液では、いずれのpHにおいても $\alpha$  顆粒の

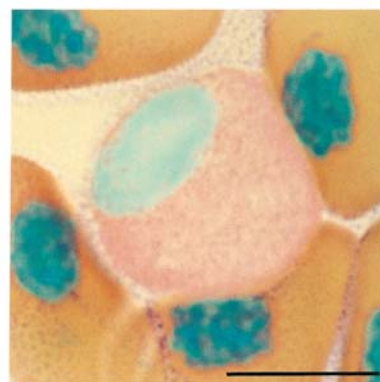


Fig. 1. A *Polypterus endlicheri* neutrophil stained with May-Grünwald concentrated-solution, which served as agents for both fixation and staining. After the staining for 5 min, the sample was washed with distilled water. Note many acidophilic granules ( $\alpha-1$  G). Bar =  $10 \mu\text{m}$ .

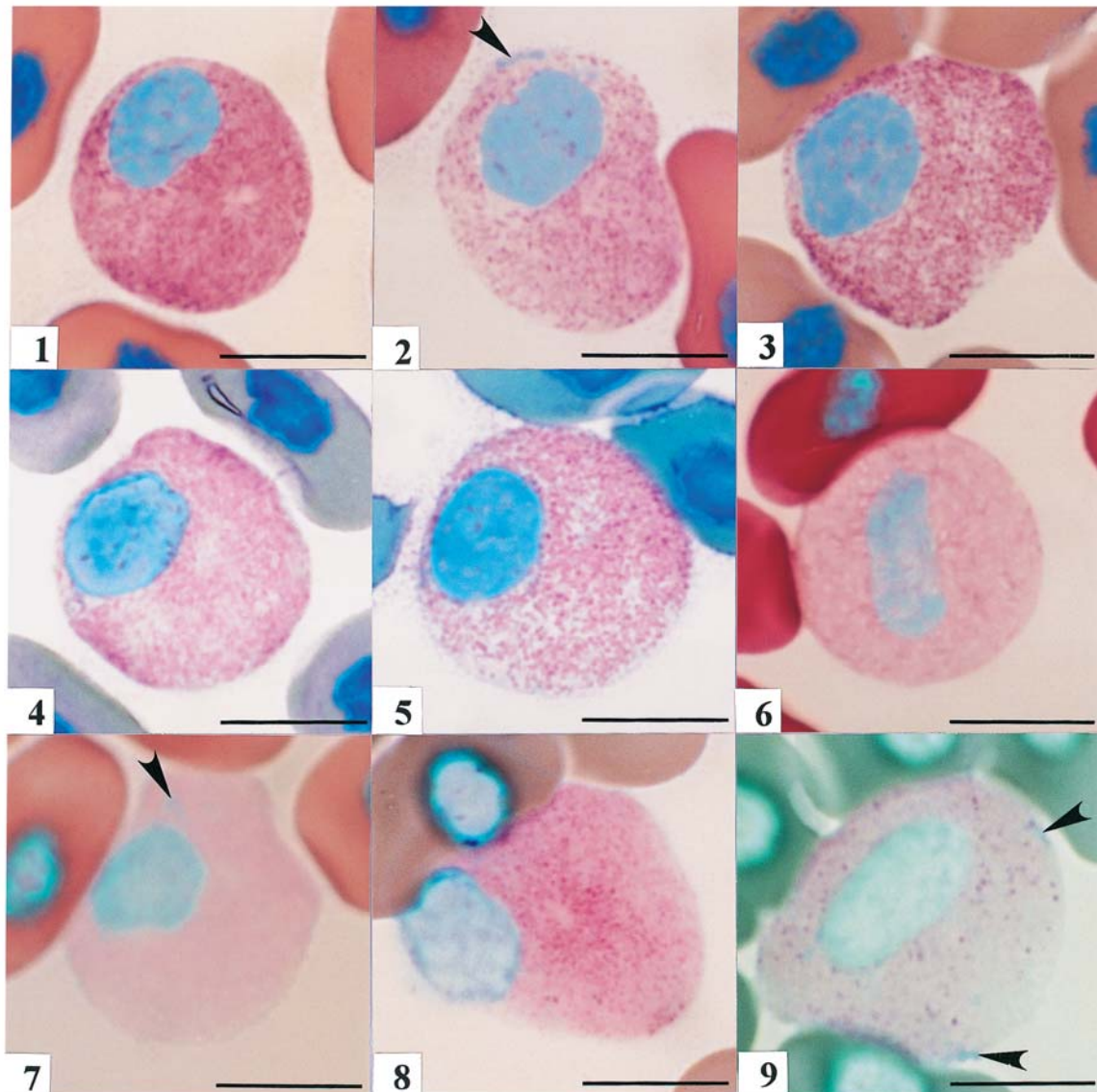
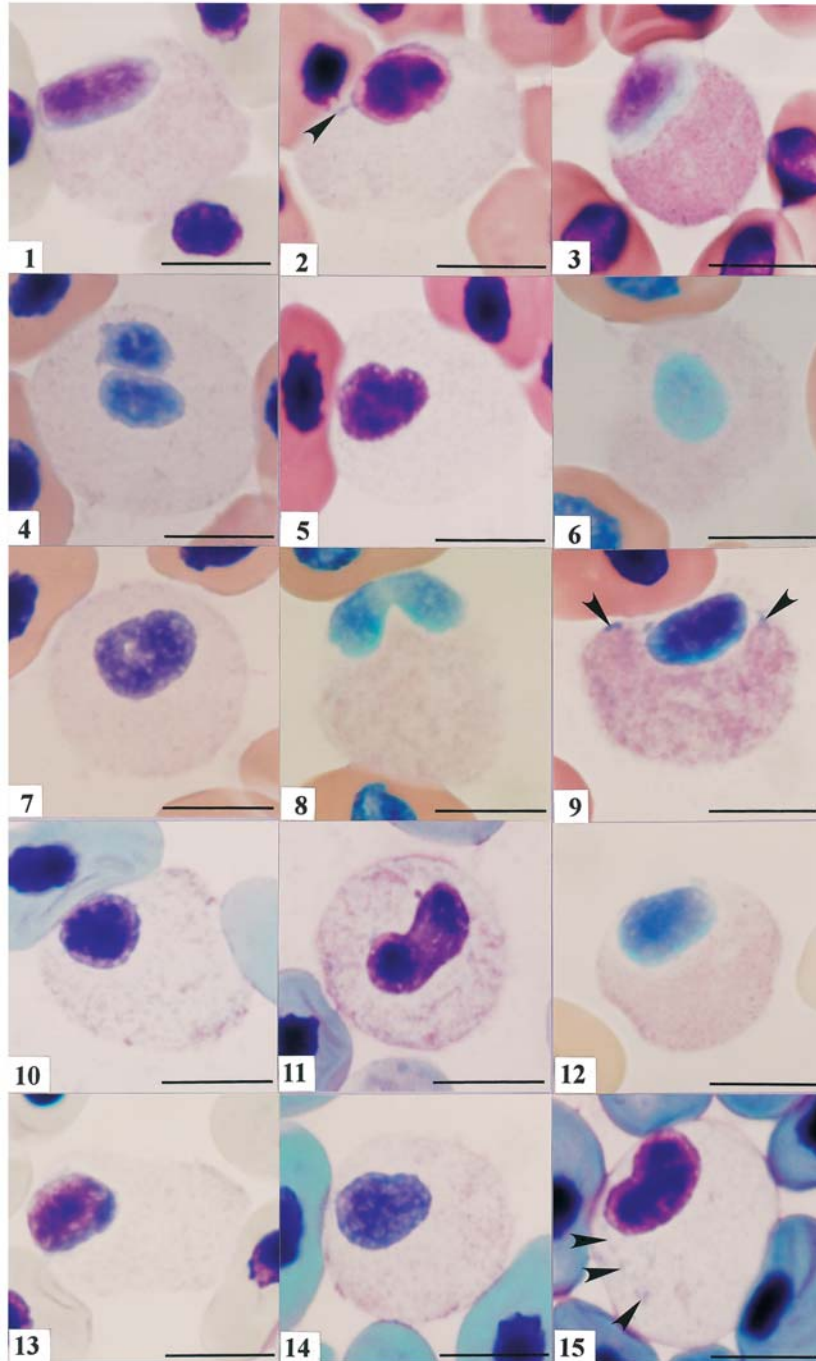


Fig. 2. *Polypterus endlicheri* neutrophil stained with May-Grünwald solution under various conditions. After fixation and staining for 5 min with May-Grünwald concentrated-solution, the sample was stained again for 10 min in May-Grünwald diluted with the following solutions: (1) distilled water, (2) phosphate buffer (5 mM, pH5.0), (3) phosphate buffer (5 mM, pH6.0), (4) phosphate buffer (5 mM, pH7.0), (5) phosphate buffer (5 mM, pH8.0), (6) phosphate buffer ( $1/15$  M, pH5.0), (7) phosphate buffer ( $1/15$  M, pH6.0), (8) phosphate buffer ( $1/15$  M, pH7.0) and (9) phosphate buffer ( $1/15$  M, pH8.0). Arrowheads show Y-body. Bars=10  $\mu$ m.

色調は弱かった (Fig. 2-6 ~ 2-9)。メタノール固定 (5分間) した標本に、種々の希釈液を用いて、希釈率 (ギムザ原液: 蒸留水 = 1:20, 1:100) および染色時間 (15分間, 60分間) を変えてギムザ染色を施し、本顆粒の染色性を調べた。蒸留水を用い、希釈率を 1:20, 15分間染色したところ、多数の淡赤色顆粒として観察されたが (Fig. 3-1), 60分間では本顆粒が少数観察された (Fig. 3-2)。希釈率 1:100 では、いずれの染色時間においても、多数の淡赤色顆粒が観察された (Fig. 3-3)。また、5 mM リン酸緩衝液を蒸留水で 10 倍希釈したものを用いたところ、

pH5.0 および pH6.0 では、いずれの希釈率においても 15 分間の染色で、少数の淡赤色顆粒が観察された (Fig. 3-4, 3-6, 3-8)。しかし、60 分間の染色では、希釈率 1:20 においては本顆粒は観察されず (Fig. 3-5), 1:100 では少数の淡赤色顆粒が認められた (Fig. 3-9)。また、pH7.0 および pH8.0 においても、1:20 では 15 分間の染色によって多数の淡赤色顆粒が観察されたが (Fig. 3-10, 3-14), 60 分間では本顆粒が観察されず (Fig. 3-11, 3-15), 1:100 では、いずれの染色時間においても多数の淡赤色顆粒が認められた (Fig. 3-12, 3-13, 4-1, 4-2)。 $1/150$  M リン酸緩衝液を用いたところ、



**Fig. 3.** *Polypterus endlicheri* neutrophil under various staining conditions. Giemsa stain. After fixation for 5 min with methanol, the sample was stained with Giemsa solution diluted as follows: (1) Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2) Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (3) Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (4) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (5) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (6) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 5.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (7) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (8) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (9) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (10) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (11) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (12) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (13) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 7.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (14) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 8.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (15) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH 8.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. Arrowheads show Y-body. Bars = 10  $\mu$ m.

ン酸緩衝液を希釈液に用いたところ、pH5.0およびpH6.0では、いずれの希釈率ならびに染色時間においても、本顆粒は見られなかった (Fig. 4-3~4-10)。しかし、pH7.0では、希釈率1:20では本顆粒は観察されないものの (Fig. 4-11)、1:100では、いずれの染色時間においても多数の淡赤色顆粒が観察された (Fig. 4-12, 4-13)。また、pH8.0では、希釈率1:20においては本顆粒が少数観察され (Fig. 4-14)、1:100では15分間の染色で多数の、また、60分間では少数の淡赤色顆粒が観察された (Fig. 4-15)。本顆粒のMG-ギムザ (MGG) 染色性を調べたところ、希釈液に蒸留水または5 mMリン酸緩衝液を用いた場合には、ギムザ液の希釈率およびギムザ染色時間に関わらず、本顆粒が多数観察された (Fig. 5)。一方、 $1/15$  Mリン酸緩衝液を用いたところ、pH5.0では、希釈率1:20で15分間ギムザ染色を行った場合、多数の淡赤色顆粒が観察されたが (Fig. 6-1)、60分間では少数の顆粒が認められた (Fig. 6-2)。また、1:100では、いずれの染色時間においても少数の淡赤色顆粒が観察された (Fig. 6-3)。pH6.0では、希釈率1:20において、いずれの染色時間においても少数の淡赤色顆粒が観察されたが (Fig. 6-4, 6-5)、1:100では、いずれの染色時間においても多数の淡赤色顆粒が観察された (Fig. 6-6, 6-7)。一方、pH7.0では1:20で15分間ギムザ染色を行ったところ、少数の淡赤色顆粒が観察されたが (Fig. 6-8)、60分間では多数の顆粒が認められた (Fig. 6-9)。また、1:100では、いずれの染色時間においても淡赤色顆粒を多数含む好中球と、少数しか含まない好中球が混在していた (Fig. 6-10, 6-11)。pH8.0では、いずれの希釈率および染色時間においても本顆粒はほとんど観察されなかった (Fig. 6-12~6-15)。

$\alpha$ -2顆粒は、直径約0.3  $\mu$ mの円形であり、濃赤色から赤褐色を呈した (Table 1)。本顆粒は、MG原液には染色されなかった (Fig. 1)。また、蒸留水および5 mMリン酸緩衝液を用いたMG染色においても認められなかった (Fig. 2-1~2-4)。一方、 $1/15$  Mリン酸緩衝液を用いた場合、pH5.0およびpH6.0では観察されなかったが (Fig. 2-5, 2-6)、pH7.0およびpH8.0では本顆粒が認められた (Fig. 2-7, 2-8)。種々の希釈液を用い、希釈率および染色時間を変えてギムザ染色を施したところ、いずれの条件においても、本顆粒は全く観察されなかった (Fig. 3, 4)。本顆粒のMGG染色性を調べたところ、蒸留水および5 mMリン酸緩衝液を希釈液に用いた場合、本顆粒は観察されなかった (Fig. 5)。また、 $1/15$  Mリン酸緩衝液を用いたところ、pH5.0およびpH6.0では観察されず (Fig.

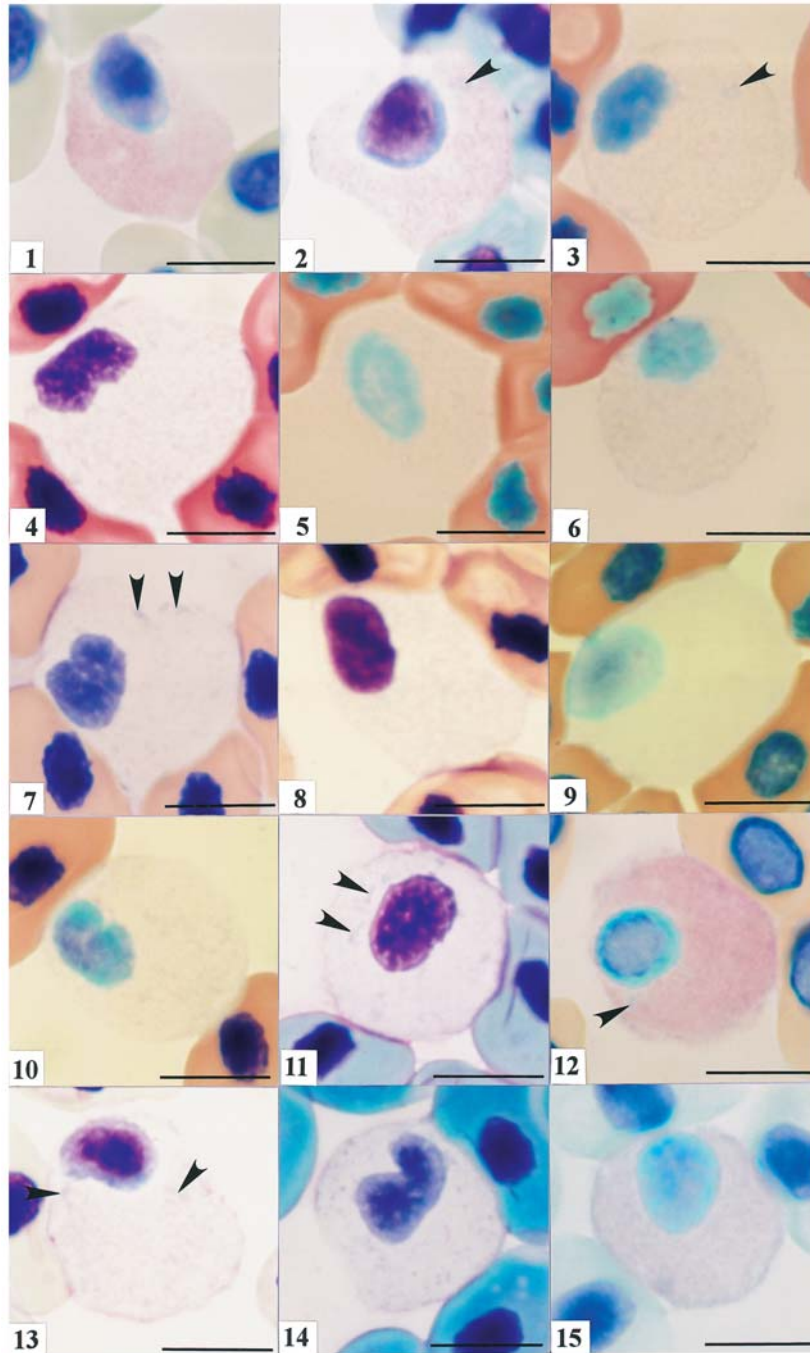
6-1~6-7)、pH7.0においても希釈率1:20では観察されなかったが (Fig. 6-8, 6-9)、1:100では、いずれの染色時間においても、本顆粒が観察される好中球と、全く観察されない好中球が混在していた (Fig. 6-10, 6-11)。また、pH8.0においても希釈率1:20では観察されず (Fig. 6-12, 6-13)、1:100における15分間の染色では本顆粒が観察される好中球と全く観察されない好中球が混在していたが (Fig. 6-14)、60分間では本顆粒が観察されなかった (Fig. 6-15)。

$\gamma$ 顆粒は、円形または卵円形で長径約0.5  $\mu$ m以下であり、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たMG染色においても本顆粒は認められなかった (Fig. 2)。本顆粒のギムザ染色性を調べたところ、いずれの希釈液を用いても少数しか観察されなかった (Fig. 3, 4)。また、希釈率1:100における15分間の染色では認められなかった (Fig. 3-6, 3-8, 3-12, 4-1, 4-5, 4-9, 4-12, 4-15)。本顆粒のMGG染色性を調べたところ、蒸留水および5 mMリン酸緩衝液を希釈液に用いた場合には本顆粒が観察されず (Fig. 5)、 $1/15$  Mリン酸緩衝液を用いた場合、pH5.0およびpH6.0では、いずれの条件においても本顆粒が認められなかった (Fig. 6-1~6-7)。pH7.0およびpH8.0では、希釈率1:20において、いずれの染色時間においても本顆粒が多数観察された (Fig. 6-8, 6-9, 6-12, 6-13)。しかし、1:100ではほとんど認められなかった (Fig. 6-10, 6-11, 6-14, 6-15)。

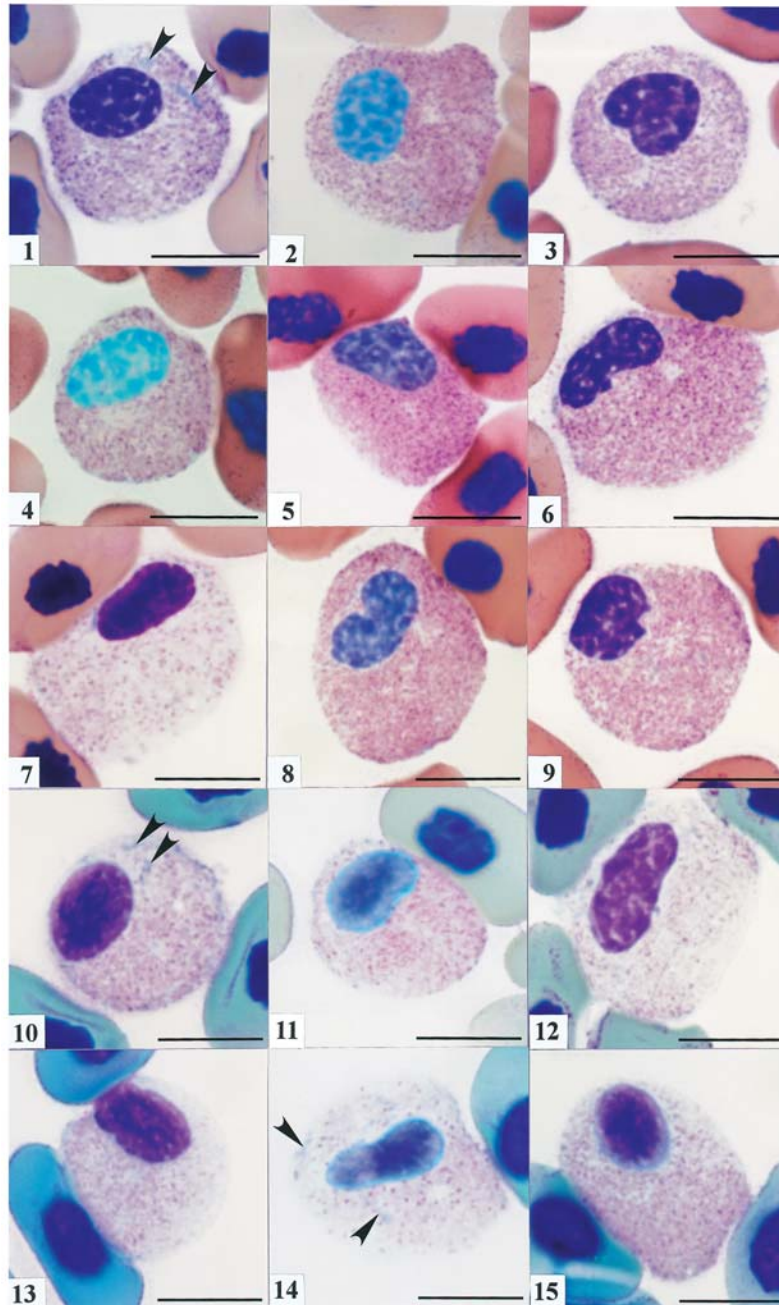
Y小体は、いずれの染色条件においても少数観察された (Fig. 1~6)。本小体は、円形、卵円形、コマ形、紐状など、形態および大きさが多様であった。また、Y小体が全く観察されない好中球も観察された。

## 細胞化学染色特性

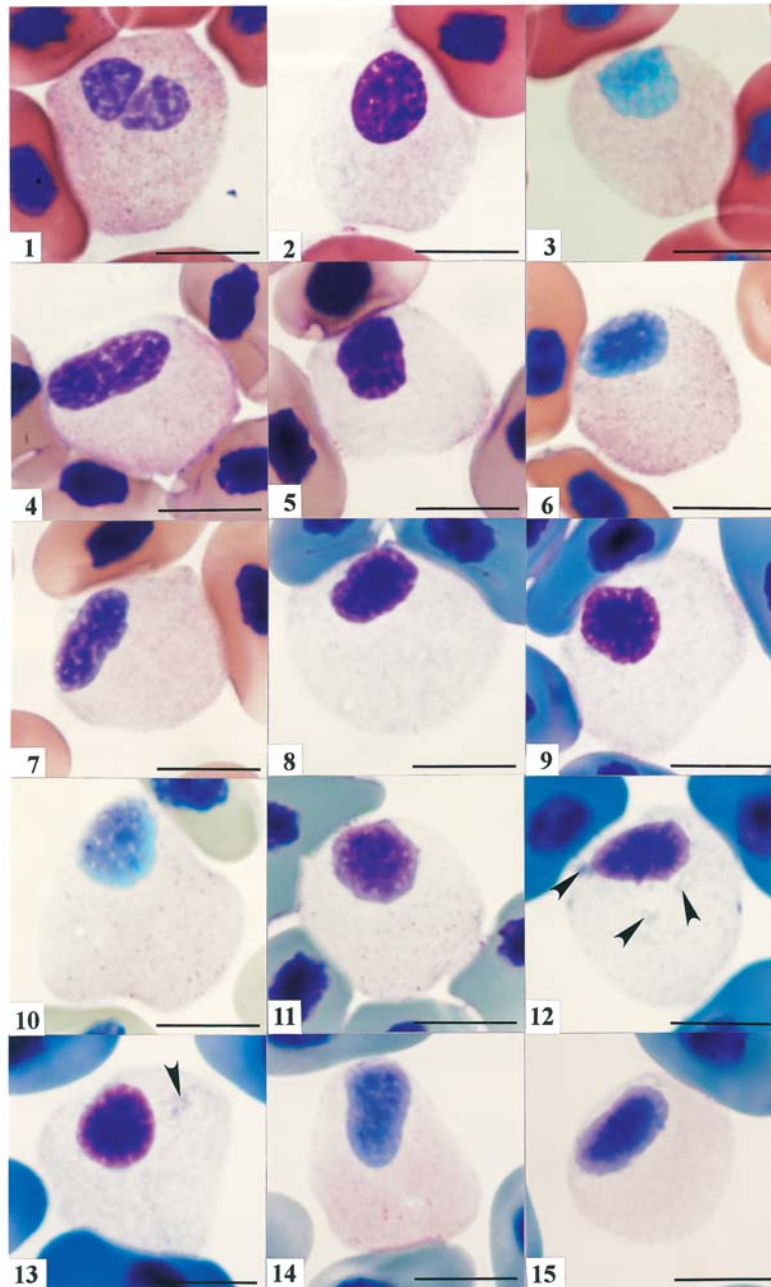
*P. endlicheri*好中球の細胞化学的特性をTable 2に示した。各種酵素染色を行ったところ、アルカリ性フォスファターゼ (ALP)、酸性フォスファターゼ (AcP)、 $\beta$ -グルクロニダーゼ ( $\beta$ -Glc)、 $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ ( $\alpha$ NAE)、 $\alpha$ -ナフチルブチレートエステラーゼ ( $\alpha$ NBE) およびナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (NASDCAE) が検出された (Fig. 7-1~7-6)。しかし、ペルオキシダーゼ活性は認められなかった。いずれの酵素染色においても、陽性顆粒は直径約0.3  $\mu$ mの円形または長径約0.8  $\mu$ mの短桿形であり、細胞質に多数観察された (Fig. 7-1~7-6)。オイルレッドOおよびズダンIII染色では陽性部位が観察されなかったが、ズダンブラッ



**Fig. 4.** *Polypterus endlicheri* neutrophil under various staining conditions. Giemsa stain. After fixation for 5 min with methanol, the sample was stained with Giemsa solution diluted as follows: (1) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (2) Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (3) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (4) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (5) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (6) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH5.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (7) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (8) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (9) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (10) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH6.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (11) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (12) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (13) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH7.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (14) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (15) Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer (pH8.0) at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. Arrowheads show Y-body. Bars=10  $\mu$ m.



**Fig. 5.** *Polypterus endlicheri* neutrophil under various staining conditions. May-Grünwald • Giemsa stain. (1) distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2) distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (3) phosphate buffer (5 mM, pH5.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (4) phosphate buffer (5 mM, pH5.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (5) phosphate buffer (5 mM, pH5.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (6) phosphate buffer (5 mM, pH6.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (7) phosphate buffer (5 mM, pH6.0). Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (8) phosphate buffer (5 mM, pH6.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (9) phosphate buffer (5 mM, pH6.0). Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (10) phosphate buffer (5 mM, pH7.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (11) phosphate buffer (5 mM, pH7.0). Giemsa solution was diluted in 0.5 mM phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (12) phosphate buffer (5 mM, pH7.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (13) phosphate buffer (5 mM, pH8.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (14) phosphate buffer (5 mM, pH8.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (15) phosphate buffer (5 mM, pH8.0). Giemsa solution was diluted in 0.5mM phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. Arrowheads show Y-body. Bars=10  $\mu$ m.



**Fig. 6.** *Polypterus endlicheri* neutrophil under various staining conditions. May-Grünwald · Giemsa stain. (1) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 5.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (2) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 5.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (3) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 5.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (4) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 6.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (5) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 6.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (6) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 6.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (7) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 6.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (8) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 7.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (9) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 7.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (10) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 7.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (11) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 7.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. (12) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 8.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 15 min. (13) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 8.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 20. Giemsa stain was for 60 min. (14) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 8.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. (15) phosphate buffer ( $1/150$ M, pH 8.0). Giemsa solution was diluted in  $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 60 min. Arrowheads show Y-body. Bars =  $10 \mu\text{m}$ .



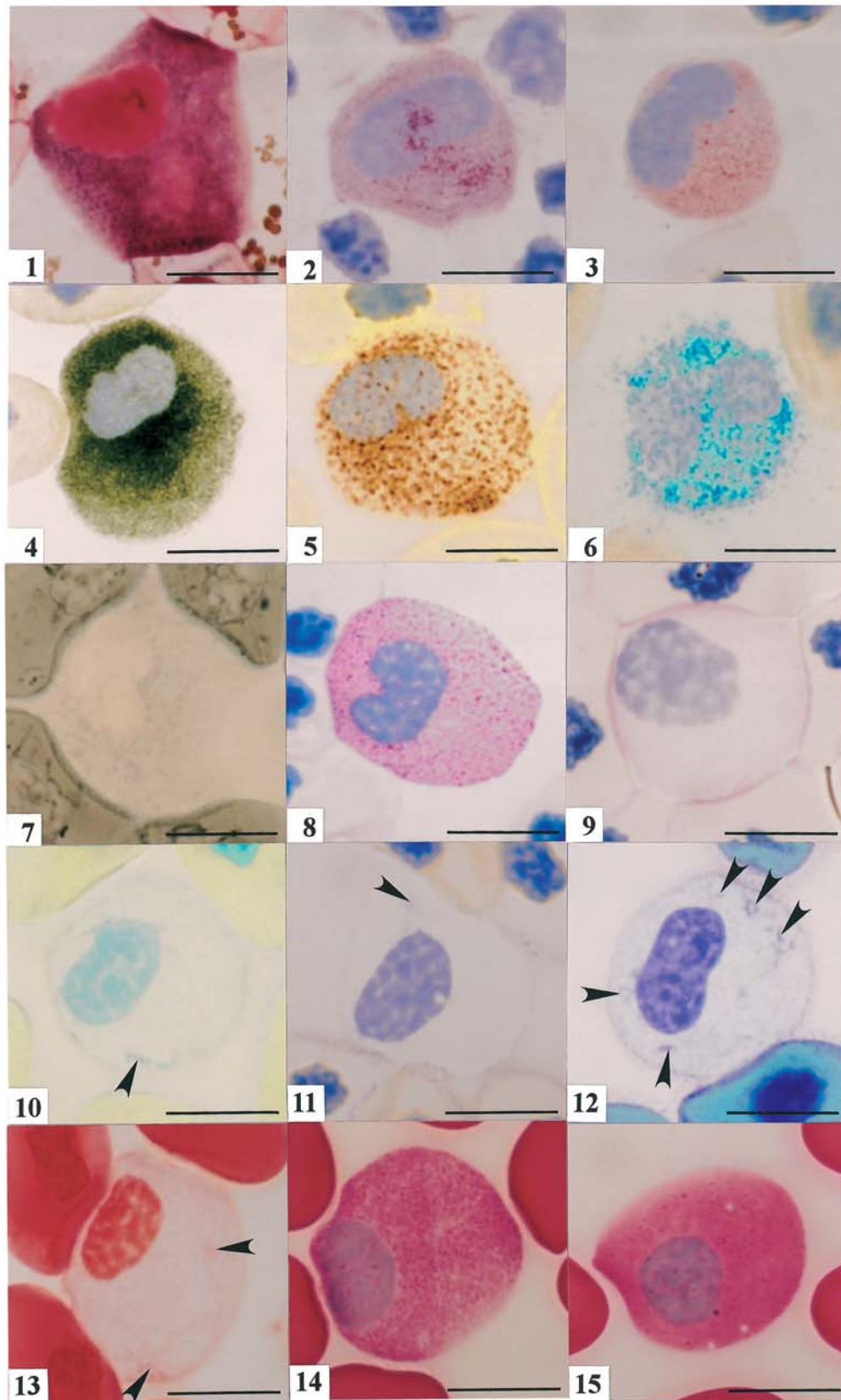


Fig. 7. Cytochemistry of *Polypterus endlicheri* neutrophil. (1) alkaline phosphatase, (2) acid phosphatase, (3)  $\beta$ -glucuronidase, (4)  $\alpha$ -naphtyl acetate esterase, (5)  $\alpha$ -naphtyl butyrate esterase, (6) naphthol AS-D chloroacetate esterase, (7) sudan black B, (8) periodic acid Schiff reaction (PAS), (9) PAS after digestion with  $\alpha$ -amylase, (10) toluidine blue in distilled water, (11) toluidine blue in methanol, (12) azure A in methanol, (13) safranin O in methanol, (14) hematoxylin-eosin (HE). Blood smear was fixed with formalin vapor before stain., (15) HE. Blood smear was fixed with formalin-methanol before stain. Bars=10  $\mu$ m.

**Table 1.** Summary of morphological and staining characteristics of two types of  $\alpha$  granule ( $\alpha$ -1 G and  $\alpha$ -2 G) in *Polypterus endlicheri* neutrophil

	$\alpha$ -1 G	$\alpha$ -2 G
Shape and size ( $\mu$ m)	round (0.3) or rod (0.8)	round (0.3)
Color	light red to red	dark red to reddish brown
Number in a neutrophil	many	some
Number of granules observed in each staining preparation <sup>1,2</sup>		
MG (both fixation and stain)	many	NO
MG : DW or 5mM PB	many	NO
: $1/15$ M PB (pH5.0 and 6.0)	many	NO
: $1/15$ M PB (pH7.0 and 8.0)	many	some
G : DW, 1:20, 15 min	many	NO
: DW, 1:20, 60 min	some	NO
: DW, 1:100 (15 or 60 min)	many	NO
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:20, 15min	some	NO
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:20, 60min	NO	NO
: 0.5mM PB, pH5.0, 1:100 (15 or 60 min)	some	NO
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:20, 15min	some	NO
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:20, 60min	NO	NO
: 0.5mM PB, pH6.0, 1:100 (15 or 60 min)	some	NO
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:20, 15min	many	NO
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:20, 60min	NO	NO
: 0.5mM PB, pH7.0, 1:100 (15 or 60 min)	many	NO
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:20, 15min	many	NO
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:20, 60min	NO	NO
: 0.5mM PB, pH8.0, 1:100 (15 or 60 min)	many	NO
: $1/150$ M PB, pH5.0 or 6.0 (1:20 or 1:100, 15 or 60 min)	NO	NO
: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:20 (15 or 60 min)	NO	NO
: $1/150$ M PB, pH7.0, 1:100 (15 or 60 min)	many	NO
: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:20 (15 or 60 min)	some	NO
: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	many	NO
: $1/150$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	some	NO
MGG: DW or 5 mM PB (1:20 or 1:100, 15 or 60 min)	many	NO
: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 15min	many	NO
: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	some	NO
: $1/15$ M PB, pH5.0, 1:100 (15 or 60 min)	some	NO
: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:20 (15 or 60 min)	some	NO
: $1/15$ M PB, pH6.0, 1:100 (15 or 60 min)	many	NO
: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 15min	some	NO
: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:20, 60min	many	NO
: $1/15$ M PB, pH7.0, 1:100 (15 or 60 min)	many or some	some or NO
: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:20 (15 or 60 min)	NO	NO
: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	NO	some or NO
: $1/15$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	NO	NO

<sup>1</sup>MG, 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; NO, not observed.

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

**Table 2.** Summary of reactions of *Polypterus endlicheri* neutrophil to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number and size)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Granule (round, many, $\phi$ 0.3 $\mu$ m); Hyaloplasm
PAS after digestion with $\alpha$ -amylase	—
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidine blue in distilled water	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)
Toluidine blue in methanol	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)
Methylene blue (Löffler's methylene blue)	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)
Methylene blue in methanol	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)
Azure A in methanol	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)
Safranin O (for Gram stain)	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)
Safranin O in methanol	Granule (amorphous, a few, equivalent to Y-body)
Eosin (smear fixed with formalin vapor)	Granule (round (many, $\phi$ =0.3 $\mu$ m) or rod (many, length=0.8 $\mu$ m), equivalent to $\alpha$ -1G)
Eosin (smear fixed with formalin-methanol)	Granule (round, some, $\phi$ =0.3 $\mu$ m, equivalent to $\alpha$ -2G)
Sudan black B	Granule (round (many, $\phi$ =0.3 $\mu$ m) or rod (many, length=0.8 $\mu$ m), equivalent to $\alpha$ -1G)
Sudan III	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	Granule (round (many, $\phi$ =0.3 $\mu$ m) or rod (many, length=0.8 $\mu$ m), equivalent to $\alpha$ -1G)
Acid phosphatase	Granule (round (many, $\phi$ =0.3 $\mu$ m) or rod (many, length=0.8 $\mu$ m), equivalent to $\alpha$ -1G)
$\beta$ -Glucuronidase	Granule (round (many, $\phi$ =0.3 $\mu$ m) or rod (many, length=0.8 $\mu$ m), equivalent to $\alpha$ -1G)
$\alpha$ -Naphthyl acetate esterase	Granule (round (many, $\phi$ =0.3 $\mu$ m) or rod (many, length=0.8 $\mu$ m), equivalent to $\alpha$ -1G)
$\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase	Granule ((round (many, $\phi$ =0.3 $\mu$ m) or rod (many, length=0.8 $\mu$ m), equivalent to $\alpha$ -1G)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	Granule (round (many, $\phi$ =0.3 $\mu$ m) or rod (many, length=0.8 $\mu$ m), equivalent to $\alpha$ -1G)
Peroxidase	—

—, non detection.

クB (SBB) 染色では直径約 $0.3\mu\text{m}$ の円形または長径約 $0.8\mu\text{m}$ の短桿形の陽性顆粒が多数観察された (Fig. 7-7)。 $\alpha$ -アミラーゼ処理によって完全に消失するperiodic acid Schiff反応 (PAS) 陽性顆粒 (円形, 直径約 $0.3\mu\text{m}$ ) が細胞質に多数散在していた (Fig. 7-8, 7-9)。細胞質基質もPASで弱陽性であったが, これも $\alpha$ -アミラーゼ処理によって消失した (Fig. 7-8, 7-9)。アルシアンブルー染色では, 陽性部位が観察されなかった。蒸留水およびメタノールに溶解したトルイジンブルー (TB) による染色では, 種々の形態を示す青色の構造物が観察された (Fig. 7-10, 7-11)。メタノールに溶解したメチレンブルー (MB), アズールA, サフラニンOやLöfflerのMB液およびグラム染色用のサフラニン液を用いてもTBと同様の構造物が染色された (Fig. 7-12, 7-13)。また, この構造物の数は好中球ごとに異なっていた。エオシンによって多数の顆粒が染色されたが, 固定方法によって陽性顆粒の形状, 染色性および陽性顆粒数が異なった。ホルマリン蒸気固定したのちに水洗した標本では, 陽性顆粒は直径約 $0.3\mu\text{m}$ の円形または長径約 $0.8\mu\text{m}$ の短桿形であり, 赤色を呈し, 細胞質に多数観察された (Fig. 7-14)。一方, ホルマリン-メタノール (ホルマリン:メタノール=1:9) 固定したのちに水洗した標本では, 直径約 $0.3\mu\text{m}$ の円形赤褐色顆粒が少数観察された (Fig. 7-15)。

## 考 察

*P. endlicheri*の好中球には, 3種類の顆粒 (2種類の好酸性顆粒 ( $\alpha$ -1顆粒と $\alpha$ -2顆粒) と好塩基性顆粒 ( $\gamma$ 顆粒) と好塩基性のY小体が観察された。

$\alpha$ 顆粒は, これまでにアジアアロワナ, コイ, ナイルティラピア, イサキおよびトラフグで報告されており<sup>2-6, 10</sup>, 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, ギムザ染色で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<sup>2-6, 10</sup>。また, 顆粒の形状は, アジアアロワナでは桿形または紡錘形<sup>2</sup>, コイおよびナイルティラピアでは円形<sup>2-4</sup>, イサキでは桿形<sup>5</sup>, トラフグでは円形, 卵円形または桿形と多様である<sup>10</sup>。しかし, これら真骨魚類の好中球には一種類の $\alpha$ 顆粒しか存在しない。一方, *P. endlicheri*には2種類の $\alpha$ 顆粒が観察された。 $\alpha$ -1顆粒は, いずれの希釈液を用いたMG染色において多数認められた。また, ギムザ染色においても本顆粒は観察されたことから,  $\alpha$ -1顆粒は真骨魚類の $\alpha$ 顆粒とは成分が

異なると考えられる。また,  $\alpha$ -2顆粒がギムザ染色標本上に全く観察されないことは, 真骨魚類の $\alpha$ 顆粒と類似するが, 蒸留水および5mMリン酸緩衝液を用いたMG染色には染まらず,  $1/15$ Mリン酸緩衝液のpH5.0およびpH6.0では本顆粒が観察されず, pH7.0およびpH8.0において認められたことから, 本顆粒も真骨魚類の $\alpha$ 顆粒とはその成分が異なると思われる。

*P. endlicheri*のいずれの好中球にも, 多数の $\alpha$ -1顆粒と, 少数の $\alpha$ -2顆粒が存在するが, pH7.0の $1/15$ Mリン酸緩衝液を希釈液として用いたMGG染色では, 多数の $\alpha$ -1顆粒を有する好中球と, 少数の本顆粒を有する好中球が観察された。また, 本染色条件では,  $\alpha$ -2顆粒が少数観察される好中球と, 全く認められない好中球が見られ, 両 $\alpha$ 顆粒の多寡によって, 好中球は4通りの $\alpha$ 顆粒染色像 ( $\alpha$ -1顆粒数: $\alpha$ -2顆粒数=多:少, 多:無, 少:少, 少:無) を呈した。このことから, 両 $\alpha$ 顆粒は, それぞれ異なった顆粒であり, 一方の顆粒が成熟して他方になるわけではないと考えられる。本染色条件で4通りの $\alpha$ 顆粒染色像が得られたことは, 本条件において染色される両 $\alpha$ 顆粒内の物質の有無が好中球ごとに異なることを示していると思われる。このことが, 機能的特性が異なる好中球サブセットの存在を示唆しているのか否かは不明である。

これまでに, 著者らが報告した全ての真骨魚種 (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) では, 好中球に難染性顆粒 ( $\beta$ 顆粒) が認められており<sup>2-12</sup>, いずれの魚種においても円形から卵円形であった。しかし, *P. endlicheri*好中球には本顆粒が観察されなかった。

$\gamma$ 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に観察されており<sup>2, 4-6</sup>, アジアアロワナでは長径 $0.3\mu\text{m}$ 以下の<sup>2</sup>, コイでは長径 $0.4\mu\text{m}$ 以下の<sup>4</sup>, ナイルティラピアとイサキでは長径 $0.3\mu\text{m}$ 以下の円形または卵円形である<sup>5, 6</sup>。*P. endlicheri*の $\gamma$ 顆粒も円形または卵円形であり, 長径約 $0.5\mu\text{m}$ 以下であった。しかし, 蒸留水およびpH5.0~8.0のリン酸緩衝液を用いて本顆粒のRomanowsky型染色性を調べたところ, 前述の真骨魚類とは染色性に違いが認められた。アジアアロワナでは蒸留水およびpH5.0~8.0のリン酸緩衝液を用いて, コイおよびナイルティラピアでは蒸留水およびpH5.0~7.0のリン酸緩衝液を用いて, また, イサキではpH5.0~7.0のリン酸緩衝液を用いて, 本顆粒のRomanowsky型染色性が調べられている<sup>2, 4-6</sup>。アジアアロワナでは, 蒸留水およびpH5.0~7.0

のリン酸緩衝液を用いたMG染色では、本顆粒が認められない<sup>2)</sup>。しかし、pH8.0では低濃度（5 mM）において多数の、高濃度（ $1/15$  M）では少数の $\gamma$ 顆粒が観察される<sup>2)</sup>。MGG染色では、いずれの濃度およびpHのリン酸緩衝液を用いた場合にも、ギムザ染色時間を長くすることによって多数の $\gamma$ 顆粒が観察される<sup>2)</sup>。さらに、ギムザ染色のみを施した標本にも本顆粒が観察され、ギムザ染色液中のギムザ原液の濃度が高いほど多数の顆粒が染色される<sup>2)</sup>。コイの $\gamma$ 顆粒はMG染色では染まらず、アジアアロワナと同様に、MGG染色のギムザ染色時間を長くするほど染色される顆粒の数が増加する<sup>4)</sup>。また、リン酸緩衝液の濃度が低い（5 mM）場合にはpH7.0で染色されるのに対して、高濃度（ $1/15$  M）ではpH6.0およびpH7.0で染色される<sup>4)</sup>。さらに、アジアアロワナと同様に、ギムザ染色のみを施した標本にも本顆粒が観察され、ギムザ染色液中のギムザ原液の濃度が高いほど多数の顆粒が染色される<sup>4)</sup>。ナイルティラピアにおいても、本顆粒は、アジアアロワナやコイと同様に、蒸留水を用いたMG染色には染まらない<sup>5)</sup>。しかし、リン酸緩衝液を用いたMG染色では、いずれの濃度の緩衝液においても、pH6.0および7.0で染まり、MGG染色では、pH5.0では観察されず、pH6.0と7.0では染色される<sup>5)</sup>。また、ギムザ染色では、蒸留水を用いた場合、本顆粒が多数観察されるが、低濃度のリン酸緩衝液ではpH5.0で少数の、pH6.0および7.0では多数の $\gamma$ 顆粒が観察され、高濃度の緩衝液では、pH5.0および6.0においては本顆粒が認められず、pH7.0では多数観察されている<sup>5)</sup>。一方、イサキの $\gamma$ 顆粒はMG染色には染まらず、MGG染色では、いずれの濃度の緩衝液を用いてもpH7.0では観察されるが、pH5.0およびpH6.0では染色されない<sup>6)</sup>。本研究結果から、*P. endlicheri*の $\gamma$ 顆粒は、いずれの希釈液を用いたMG染色においても認められなかった。このことは、真骨魚類の $\gamma$ 顆粒と類似している。しかし、真骨魚類とは異なり、*P. endlicheri*の $\gamma$ 顆粒は、いずれの希釈液を用いてもギムザ染色では少数しか染色されなかった。また、MGG染色では、蒸留水および5 mMリン酸緩衝液を用いた場合には本顆粒が観察されず、 $1/15$  Mリン酸緩衝液においてもpH5.0およびpH6.0では認められず、pH7.0およびpH8.0で多数観察された。本顆粒が*P. endlicheri*に観察されたことから、その起源は、腕鰭亜綱と新鰭亜綱の共通の祖先にまで遡ると考えられる。しかし、染色性の違いから、*P. endlicheri*好中球の $\gamma$ 顆粒の内容物や機能は、アジアアロワナ、コイ、ナイルティラピアおよびイサキとは異なると思われる。

Y小体は、これまでに著者らが報告した真骨魚種（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）のうち、コイ以外で認められている<sup>2, 5-12)</sup>。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出现することが明らかとなっている<sup>13)</sup>。*P. endlicheri*の好中球にもY小体が観察されたことから、本小体を好中球内に形成する性質は、少なくとも腕鰭亜綱と新鰭亜綱の共通の祖先にまで遡ると考えられる。

細胞化学的特性から、*P. endlicheri*好中球の各種顆粒およびY小体の成分を以下のように推定した。AIP、AcP、 $\beta$ -Glc、 $\alpha$ NAE、 $\alpha$ NBEおよびNASDCAE陽性の顆粒は、いずれも直径約0.3  $\mu$ mの円形または長径約0.8  $\mu$ mの短桿形であり、細胞質に多数観察されたことから、 $\alpha$ -1顆粒に相当すると考えられる。SBB陽性顆粒も円形から短桿形であり、多数観察されたことから、 $\alpha$ -1顆粒に相当すると考えられる。好中球には、PAS陽性顆粒が多数観察された。しかし、PAS陽性顆粒は円形であることから、 $\alpha$ -1顆粒とは形状が異なる。また、 $\alpha$ -2顆粒とは形状および大きさが類似するが、 $\alpha$ -2顆粒よりも多数存在すること、 $\gamma$ 顆粒とは形状は類似するが大きさが異なること、およびPAS陽性顆粒が $\alpha$ -アミラーゼによって完全に消化されることから、本陽性顆粒はグリコーゲンを主成分とする構造物であり、 $\alpha$ 顆粒および $\gamma$ 顆粒とは異なると考えられる。TB、MB、アズールAおよびサフランin O染色によって、種々の形態を示す青色の構造物が観察された。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。ホルマリン蒸気固定した標本におけるエオシン陽性顆粒は、直径約0.3  $\mu$ mの円形または長径約0.8  $\mu$ mの短桿形で赤色を呈し、細胞質に多数観察されたことから、この陽性顆粒は $\alpha$ -1顆粒に相当すると思われる。また、ホルマリン-メタノール固定標本に観察されるエオシン陽性顆粒は、形状、大きさ、数および染色性から、 $\alpha$ -2顆粒に相当すると考えられる。

これまでに、AIPは、メジナの好中球で検出されているが<sup>7)</sup>、メジナ好中球は $\beta$ 顆粒のみを有し、AIP陽性顆粒とは大きさが異なることから、AIPの局在部位は確定していない<sup>7)</sup>。また、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、ヒラメおよびトラフグではAIP活性は検出されていない<sup>2, 8-12)</sup>。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の好中球にはAcP活性が検出されており<sup>9-12)</sup>、ノーザンパイクで

は、本酵素活性は $\beta$ 顆粒に存在するとされている<sup>12)</sup>。しかし、他の真骨魚類では、陽性顆粒の形態学的特徴および数と一致する顆粒がなく、存在部位は不明である<sup>9-11)</sup>。また、アジアアロワナとブルーギルではAcP活性は検出されていない<sup>2, 8)</sup>。 $\beta$ -Glcはノーザンパイク好中球に検出されているが<sup>12)</sup>、好中球は $\beta$ 顆粒のみを有し、 $\beta$ -Glc陽性顆粒とは大きさが異なることから、 $\beta$ -Glcの局在部位は明らかではない<sup>12)</sup>。また、アジアアロワナ、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では $\beta$ -Glc活性は検出されていない<sup>2, 8-11)</sup>。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の好中球には $\alpha$  NAEが<sup>2, 9-12)</sup>、アジアアロワナ、ノーザンパイク、メジナおよびトラフグの好中球には $\alpha$  NBEが検出されているが<sup>2, 9, 10, 12)</sup>、いずれの酵素についても、その陽性顆粒はRomanowsky型染色によって認識される顆粒とは大きさや形状が異なることから、本酵素の局在部位は確定していない<sup>2, 9-12)</sup>。また、ブルーギルとトラフグでは $\alpha$  NAE活性は検出されておらず<sup>8, 10)</sup>、ブルーギル、スズキ、ヒラスズキ、ヒラメでは $\alpha$  NBE活性が認められていない<sup>8, 9, 11)</sup>。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に検出されており<sup>2, 10-12)</sup>、アジアアロワナにおいては、この陽性顆粒は $\gamma$ 顆粒に相当すると考えられている<sup>2)</sup>。しかし、他の魚種では、本酵素の局在部位は明らかではない<sup>10-12)</sup>。また、ブルーギル、メジナ、ヒラメでは本酵素活性が検出されていない<sup>8, 9)</sup>。

*P. endlicheri*好中球にはペルオキシダーゼ活性が認められなかった。これまでに、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、好中球にペルオキシダーゼ陽性顆粒が観察されており、顆粒数、大きさおよび形状が類似していることから、 $\beta$ 顆粒に相当すると考えられる<sup>2, 8-12)</sup>。*P. endlicheri*好中球に本酵素活性が認められなかった理由として、*P. endlicheri*好中球に $\beta$ 顆粒が存在しないことがあげられる。

SBB陽性顆粒は、真骨魚類（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）の好中球にも観察されているが<sup>2, 8-12)</sup>、いずれの魚種においても、陽性顆粒はRomanowsky型染色によって認識される顆粒とは大きさや形状が異なっている<sup>2, 8-12)</sup>。

塩基性色素によって染色され、種々の形態を示す青色の構造物が*P. endlicheri*好中球に観察され、形態学的特徴から、Y小体に相当すると思われた。これまでに、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、タイリクスズキ、ヒラメおよびトラフグにおいても、好中球にTB陽性部位が観察されており、形態学的特徴からY小体に相当すると考えられている<sup>2, 8-12)</sup>。また、コイにおいても、*Aeromonas 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<sup>13)</sup>。

本研究によって、*P. endlicheri*の好中球は3種類の顆粒（ $\alpha$ -1顆粒、 $\alpha$ -2顆粒および $\gamma$ 顆粒）とY小体を有し、 $\alpha$ -1顆粒にはAIP、AcP、 $\beta$ -Glc、 $\alpha$  NAE、 $\alpha$  NBEおよびNASDCAEが存在するとともに、SBB陽性の脂質を有することが明らかとなった。また、 $\alpha$ -1顆粒はホルマリン蒸気で固定され、 $\alpha$ -2顆粒はホルマリン-メタノールで固定されるエオシン好性物質を含んでいた。さらに、Y小体にはトルイジンブルーなどの塩基性色素で染色される物質が存在することが示唆された。これまでに、*P. endlicheri*と同様に、好中球に2種類の好酸性顆粒（ $\alpha$ -1顆粒、 $\alpha$ -2顆粒）と好塩基性顆粒（ $\gamma$ 顆粒）を有する真骨魚類は知られていない。また、真骨魚類では、好中球にペルオキシダーゼ陽性の $\beta$ 顆粒が存在するが<sup>2, 8-12)</sup>、*P. endlicheri*にはペルオキシダーゼ活性や $\beta$ 顆粒が観察されなかった。このことから、同じ条鰭綱に属する魚類であっても、新鰭亜綱の真骨魚類と腕鰭亜綱の*P. endlicheri*の好中球の機能は異なると推察される。

上述したように、pH7.0の $1/15$  Mリン酸緩衝液を希釈液として用いたMGG染色における2種類の好酸性顆粒（ $\alpha$ -1顆粒、 $\alpha$ -1顆粒）の染色性からは、*P. endlicheri*の好中球にサブセットが存在するの否かを、明らかにすることは困難である。しかし、 $\gamma$ 顆粒は各種染色条件において、いずれの好中球にも同様な染色性を示したことから、 $\gamma$ 顆粒の存在の多寡は、好中球サブセットの指標にはならないと考える。さらに、上述の4通りの $\alpha$ 顆粒染色像と、Y小体の存在の有無との間に、関連が見られなかったことから、本小体の有無と好中球サブセットの存在について言及することはできないと思われる。今後、*P. endlicheri*好中球について貪食能や遊走能などの機能を調べ、機能発現している好中球の形態学的特徴を明らかにすることで、好中球サブセットと4通りの $\alpha$ 顆粒染色像との関連が明らかになると考える。

本論文ならびに著者らがこれまでの報告において行ったRomanowsky型染色法は、魚類や哺乳類を含む他の脊椎動物の好中球に関する報告とは異なり、種々の条件下で、MG、ギムザおよびMGG染色を施すものである。したがって、他の報告との単純な比較は困難である。今後、魚類の

みならず、他の脊椎動物の好中球についても種々の条件下で各種Romanowsky型染色を行い、脊椎動物における好中球顆粒の系統進化ならびに多様性について明らかにしていく予定である。

## 謝 辞

本論文中における好中球サブセットと好中球顆粒との関連に関する記述は、本論文を査読していただいた外部査読者の指摘に基づくものであり、外部査読者に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 近藤昌和，金丸俊介，高橋幸則：メジナの好中球顆粒。水大校研報，52，67-71 (2004)
- 8) 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)
- 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。水大校研報，53，203-209 (2005)
- 10) 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)
- 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) の好中球の形態学および細胞化学的特徴。水大校研報，55，141-147 (2007)
- 12) 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)
- 13) 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。水大校研報，56，323-327 (2008)
- 14) 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)
- 15) 甲斐嘉晃：ポリプテルス目。魚の科学事典，朝倉書店，東京，41 (2005)
- 16) 近藤昌和，稲川裕之，友永 進，高橋幸則：トゲカイエビ (甲殻亜門鰓脚綱貝甲目) の血球。水大校研報，54，153-157 (2006)