

アフリカハイギョ *Protopterus annectens* 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 African Lungfish, *Protopterus annectens*

Masakazu Kondo[†] and Yukinori Takahashi

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil from African lungfish, *Protopterus annectens*, were examined by light microscopy. The neutrophils were round to oval (35–40 μ m in diameter) and the nucleus round to lobule-shaped. Only one type of granule, panchromatophilic granule (PG) was observed in the neutrophil. The PG was round to rod-shaped and stained panchromatophilic according to staining conditions. The PG was eosinophilic or methylenophilic (methylene blue positive) with May-Grünwald (MG). And further, the PG showed reddish purple with Giemsa stain. This color tone may be due to the metachromatic reaction by azure B in Giemsa (metaazurophilic). This granule was acid phosphatase, *a*-naphthyl acetate esterase, *a*-naphthyl butyrate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase, PAS (*a*-amylase digestion resistance) and toluidine blue (metachromatic) positive.

Key words : African lungfish, *Protopterus annectens*, Neutrophil, Morphology, Cytochemistry

緒 言

ハイギョ類(肺魚亜綱)はシーラカンス類(シーラカンス亜綱)とともに肉鱗綱に分類されている¹⁾。同綱には四肢動物(四肢動物亜綱)も含まれることから¹⁾、四肢動物への進化を知るうえでハイギョは興味深い魚類である。ハイギョ類の血球の分類は、ともに1属1種のオーストラリアハイギョ *Neoceratodus forsteri* (ケラトドス目ケラトドス科ネオケラトドス属)²⁻⁴⁾ とミナミアメリカハイギョ *Lepidosiren paradoxa* (レピドシレン目レピドシレン科レピドシレン属)⁵⁻⁹⁾ ならびにアフリカハイギョ類(レピドシレン目プロトプテルス科プロトプテルス属)の *Protopterus aethiopicus*^{10,11)}, *P. dolloi*¹²⁾ および *P. annectens*^{13,14)} において報告されている。しかし、分類基準や用語は混乱している。

著者らはこれまでに、多条件下Romanowsky型染色評価法¹⁵⁾を各種魚類の好中球に適用し、好中球顆粒の多様性について明らかにしてきた¹⁵⁻³⁰⁾。その結果、魚類を含む脊椎動物の原始的な系統とされているスタウナギ類¹⁾に属するスタウナギ *Eptatretus burgeri* では、好中球に好塩基性顆粒(γ 顆粒)のみが観察され¹⁶⁾、真骨魚類(新鱗亜綱ハレコストム区真骨亜区¹⁾)とともに条鱗綱に含まれ、条鱗綱の中で最も祖先的と考えられている腕鱗亜綱ポリプテルス目^{1,31)}に属する *Polypterus endlicheri* の好中球には、2種類の好酸性顆粒(α 顆粒)と γ 顆粒が認められた¹⁷⁾。また、真骨魚類は好中球の顆粒の種類数の違いから3群(I~III群)に大別され、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¹⁾)では、 α 顆粒、難染色顆粒(β 顆粒)および γ 顆粒の3種類の顆粒が観察され、I群に属

2009年9月17日受付. Received September 7, 2009.

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

[†]連絡先 (Corresponding author) : kondom@fish-u.ac.jp (M. Kondo).

する¹⁸⁾。真骨魚類のI群には、アロワナ下区に次いで出現したカライワシ下区¹⁾のウナギ*Anguilla japonica* (ウナギ目)や¹⁵⁾、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ベオセファラ類¹⁾のうち、最初に分岐したニシン・骨鰈下区¹⁾に属するコイ*Cyprinus carpio* (骨鰈上目コイ目)が含まれることから^{19,20)}、I群の好中球は、真骨魚類好中球の原型であると考えられている¹⁷⁾。以上のことから、魚類好中球の γ 顆粒の起源は脊椎動物の共通の祖先にまで遡り、 α 顆粒は少なくとも真骨亜綱と腕鰭亜綱の共通の祖先の出現時に、 β 顆粒は真骨魚類の出現時にそれぞれ得られた形質であると推察されている^{15,16)}。

真骨魚類のII群にはトラフグ*Takifugu rubripes* (正真骨下区棘鱗上目正棘鱗魚類スズキ形類フグ目¹⁾)とマダイ*Pagrus major* (スズキ形類スズキ目タイ科¹⁾)が含まれ、これら魚種の好中球には α 顆粒と β 顆粒が認められている^{21,29)}。しかし、両魚種間で α 顆粒の染色性が異なることから、本群は、II-A群(トラフグ)とII-B群(マダイ)に細分されている²⁹⁾。III群の好中球には β 顆粒のみが認められ、ノーザンバイク*Exos lucius* (正真骨下区原棘鱗上目カワカマス目¹⁾)や²²⁾、各種スズキ目魚類(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*)とともに²³⁻²⁶⁾、スズキ目から派生したとされる棘鱗上目カレイ目³²⁾のヒラメ*Paralichthys olivaceus*が含まれることから²⁴⁾、現生真骨魚類のうち、新顎類¹⁾に広範囲に渡って受け継がれている形質と考えられている¹⁶⁾。しかし、スズキ目のナイルティラピア*Oreochromis niloticus* (カワスズメ科)、イサキ*Parapristipoma trilineatum* (イサキ科)およびブリ*Seriola quinqueradiata* (アジ科)はI群に^{27,28,30)}、また、タイ科のマダイは上述の様にII-B群に属する²⁹⁾。したがって、スズキ目魚類は、好中球内の顆粒の種類数から見て、多様であると考えられている³⁰⁾。

本研究では、アフリカハイギョ*P. annectens*の好中球の形態学および細胞化学的特性を明らかにし、既報^{2-14,33)}の各種ハイギョ類の好中球と比較するとともに、これまでに著者らが報告した各種魚類¹⁵⁻³⁰⁾の好中球との相違点について明らかにした。

材料および方法

山口県宇部市内の熱帯魚店で購入した全長約30 cmの*P.*

*annectens*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に実験に供した(水温 $23.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$)。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。血液塗沫標本の作製、多条件下Romanowsky型染色評価法および各種細胞化学染色法は文献15にしたがった。

結 果

*P. annectens*の好中球は、長径30~45 μm の円形または卵円形であり、核は偏在し、楕円形、ドーナツ形、分葉核など様々な形態が観察された。顆粒は長径0.4~0.5 μm の円形、卵円形または桿形(長径1.0~1.5 μm 、短径約0.5 μm)であり、染色条件の違いによって、淡橙色(エオシン好性)、淡青色(塩基好性、正調メチレンブルー好性)または赤紫色(異調アズール好性)を呈した(Table 1-1, 1-2, Figs. 1-1~1-3)。これらの染色性から、本顆粒を以後、汎染色性顆粒(P顆粒, panchromatophilic granule (PG))と称することとする。

P顆粒は、メイ-グリュンワルド(MG)液による固定では、染色されず、希釈液として蒸留水を用いたMG染色では、多数の淡青色顆粒として観察された。一方、低濃度(5 mM)のリン酸緩衝液で希釈したMG染色では、pH5.0の場合、多数の淡橙色顆粒として認められたが(Fig. 1-1)、pH6.0では蒸留水を用いた場合と同様に、P顆粒は淡青色を呈し(Fig. 1-2)、pH7.0では、少数の淡青色顆粒が観察された。しかし、pH8.0では、P顆粒は染色されなかった(難染性)。高濃度($1/15\text{M}$)のリン酸緩衝液を用いたMG染色においても、pH5.0の場合には多数の、pH6.0では少数の淡橙色顆粒が観察されたが、pH7.0およびpH8.0においては、P顆粒は難染性であった。メタノール固定(5分間)後風乾した標本に、ギムザ染色を施したところ、いずれの希釈液を用いてもP顆粒は赤紫色または難染性を示した。MG染色後にギムザ染色を施すMGG染色においても、P顆粒はギムザ染色と同様の染色性を示したが、希釈液に蒸留水または5 mMのリン酸緩衝液(pH5.0~7.0)を用いた場合には、多数のP顆粒が赤紫色を呈した(Fig. 1-3)。

*P. annectens*の好中球の細胞化学的特性をTable 2に示した。酸性フォスファターゼ(AcP)、 α -ナフチルアセテートエステラーゼ(α -NAE)、 α -ナフチルブチレートエステラーゼ(α -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)活性の存在を示す円形、卵円

形または桿形の陽性顆粒が多数観察された (Figs. 1-4~1-7)。一方、アルカリ性フォスファターゼ (AIP), β -グルクロニダーゼ (β -Glu) およびペルオキシダーゼ活性は検出されなかった。Periodic acid Schiff反応 (PAS) に陽性の顆粒が細胞質に多数観察されたが (Fig. 1-8), 細胞質基質には陽性反応は認められなかった。PAS陽性顆粒は円形, 卵円形または桿形であり, α -アミラーゼ処理に

よって消失しなかった。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) 染色では, 円形, 卵円形または桿形の陽性顆粒が少数観察され, その色調は淡赤紫色であった (Fig. 1-9)。ズダンブラックB (SBB), ズダンⅢおよびオイルレッドO染色では, 陽性部位は観察されなかった。

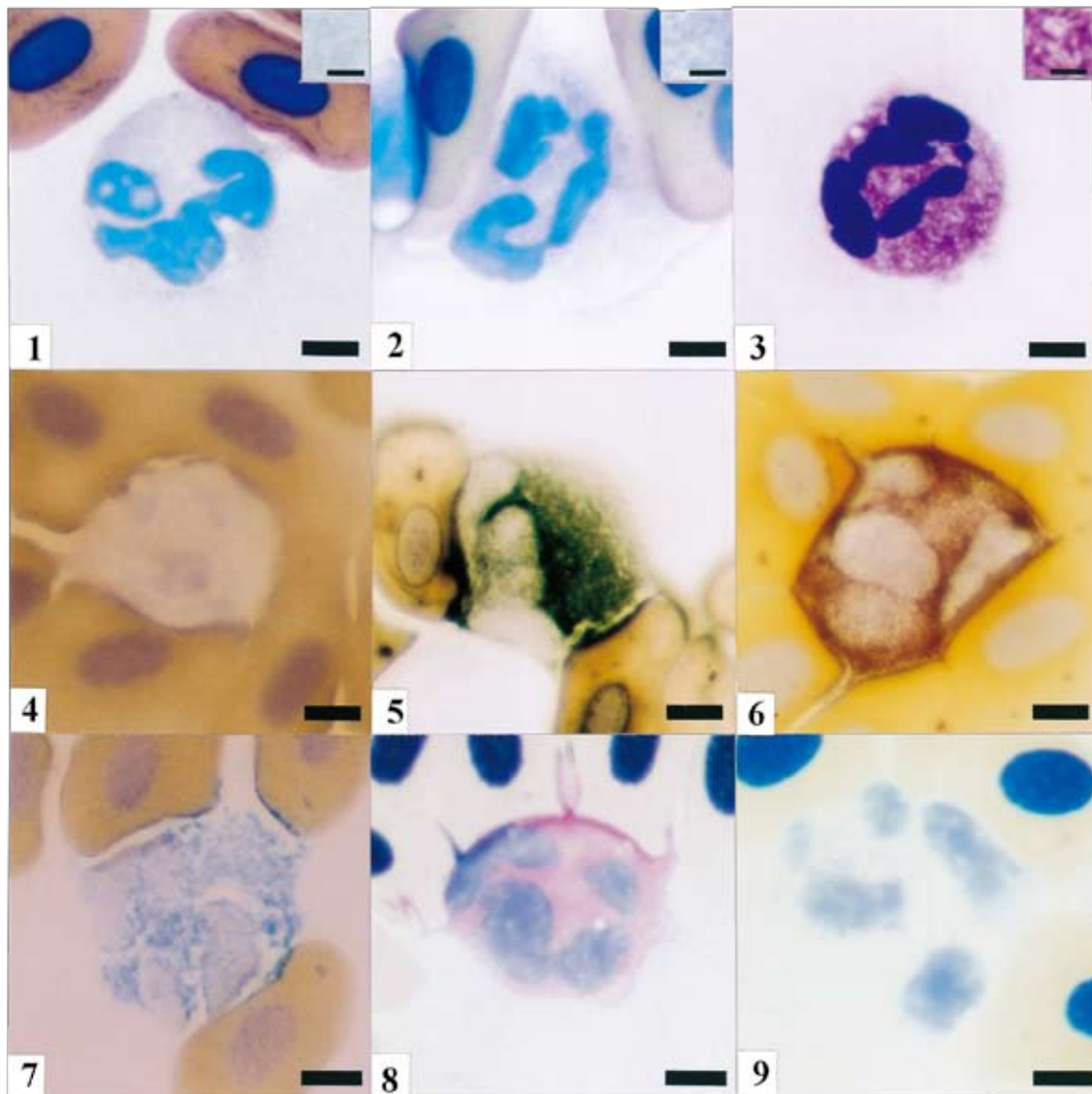


Fig. 1. Neutrophil from African lungfish, *Protopterus annectens*. 1, May-Grünwald (MG) using 5 mM phosphate buffer (pH5.0) ; 2, MG using 5 mM phosphate buffer (pH6.0) ; 3, MG · Giemsa using distilled water ; 4, acid phosphatase ; 5, α -naphthyl acetate esterase ; 6, α -naphthyl butyrate esterase ; 7, naphthol AS-D chloroacetate esterase ; 8, periodic acid Schiff reaction ; 9, toluidine blue in distilled water. Bars 10 μ m, insets 2.5 μ m.

Table 1-1. Romanowsky-type staining characteristics of panchromatophilic granule (PG) in neutrophil from African lungfish, *Protopterus annectens*

Staining condition ¹	Color and number of PG ²
MG (both fixation and stain)	NS (N)
MG : DW	B (N)
: 5 mM PB, pH5.0	O (N)
: 5 mM PB, pH6.0	B (N)
: 5 mM PB, pH7.0	B (S), NS (M)
: 5 mM PB, pH8.0	NS (N)
: $\frac{1}{15}$ M PB, pH5.0	O (N)
: $\frac{1}{15}$ M PB, pH6.0	O (S), NS (M)
: $\frac{1}{15}$ M PB, pH7.0	NS (N)
: $\frac{1}{15}$ M PB, pH8.0	NS (N)
G : DW, 1:20, 15 min	RP (S), NS (M)
: DW, 1:20, 60 min	RP (N)
: DW, 1:100, 15 min	NS (N)
: DW, 1:100, 60 min	RP (S), NS (M)
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15 min	RP (M), NS (S)
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60 min	RP (M), NS (S)
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	NS (N)
: 0.5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	RP (S), NS (M)
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15 min	RP (M), NS (S)
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60 min	RP (M), NS (S)
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min	RP (S), NS (M)
: 0.5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	RP (S), NS (M)
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15 min	RP (M), NS (S)
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60 min	RP (M), NS (S)
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	NS (N)
: 0.5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	RP (M), NS (S)
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15 min	RP (S), NS (M)
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60 min	RP (M), NS (S)
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	NS (N)
: 0.5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	RP (M), NS (S)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH5.0, 1:20, 15 min	RP (M), NS (S)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	RP (N)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	NS (N)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	RP (S), NS (M)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH6.0, 1:20, 15min	RP (N)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH6.0, 1:20, 60min	RP (N)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	RP (S), NS (M)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	RP (M), NS (S)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH7.0, 1:20, 15 min	RP (N)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH7.0, 1:20, 60 min	RP (N)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	RP (M), NS (S)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	RP (N)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	RP (S), NS (M)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min	RP (S), NS (M)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	RP (S), NS (M)
: $\frac{1}{150}$ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	RP (S), NS (M)

¹MG, May-Grünwald; G, 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.

²B, blue; O, orange; RP, reddish purple; NS, not stained; N, numerous; M, moderate; S, some.

Table 1-2. Romanowsky-type staining characteristics of panchromatophilic granule (PG) in neutrophil from African lungfish, *Protopterus annectens*

Staining condition ^{1,2}	Color and number of PG ³
MGG : DW, 1:20, 15 min	RP (N)
: DW, 1:20, 60 min	RP (N)
: DW, 1:100, 15 min	RP (N)
: DW, 1:100, 60 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 15 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH5.0, 1:20, 60 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 15 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH5.0, 1:100, 60 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 15 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH6.0, 1:20, 60 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH6.0, 1:100, 15 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH6.0, 1:100, 60 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 15 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH7.0, 1:20, 60 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH7.0, 1:100, 15 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH7.0, 1:100, 60 min	RP (N)
: 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 15 min	RP (S), NS (M)
: 5 mM PB, pH8.0, 1:20, 60 min	RP (M), NS (S)
: 5 mM PB, pH8.0, 1:100, 15 min	RP (S), NS (M)
: 5 mM PB, pH8.0, 1:100, 60 min	RP (S), NS (M)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:20, 15min	RP (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:20, 60min	RP (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:100, 15 min	RP (M), NS (S)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH5.0, 1:100, 60 min	RP (M), NS (S)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:20, 15 min	RP (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:20, 60 min	RP (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:100, 15 min	RP (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH6.0, 1:100, 60 min	RP (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:20, 15min	NS (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:20, 60min	NS (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:100, 15 min	NS (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH7.0, 1:100, 60 min	NS (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:20, 15 min	NS (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:20, 60 min	NS (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:100, 15min	NS (N)
: ¹ / ₁₅ M PB, pH8.0, 1:100, 60min	NS (N)

¹MGG, 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.

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

³B, blue; O, orange; RP, reddish purple; NS, not stained; N, numerous; M, moderate; S, some.

Table 2. Cytochemical reactivities of neutrophil from African lungfish, *Protopterus annectens*

Test	Positive site (shape and number)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	Granule (round or rod, many, equivalent to PG)
PAS after digestion with α -amylase	Granule (round or rod, many, equivalent to PG)
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidine blue (distilled water)	Granule (round or rod, some, equivalent to some PG)
Sudan black B	—
Sudan III	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase	Granule (round or oval, many, equivalent to PG)
β -Glucuronidase	—
α -Naphthyl acetate esterase	Granule (round or rod, many, equivalent to PG)
α -Naphthyl butyrate esterase	Granule (round or rod, many, equivalent to PG)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	Granule (round or rod, many, equivalent to PG)
Peroxidase	—

—, non detection.

考 察

*P. annectens*の好中球には、種々の染色性を示す1種類の顆粒(P顆粒)が観察された。本顆粒は、MG染色では淡橙色または淡青色を示した。これらの色調は、MG染色液中のエオシン酸メチレンブルーが水溶液中で解離して形成されたエオシンおよびメチレンブルーによると思われる。メチレンブルーは被染色物によっては異調染色性を示すこともあるが³⁴⁾、MG染色でP顆粒は淡青色であったことから、本顆粒はメチレンブルーによって正調染色性を示したと考えられる。ギムザ染色液は、エオシン酸メチレンブルー、エオシン酸アズールB、アズールBおよびメチレンブルーを含むが、水溶液中ではエオシン酸メチレンブルーとエオシン酸アズールBがそれぞれ解離してエオシン、メチレンブルーおよびアズールBとなるので、染色時にはこれら3種類の色素によって染色が起こる。アズールBもメチレンブルーと同様に水溶液中では青色であり、被染色物によっては異調染色性を示す。P顆粒は、ギムザ染色によって赤紫色を呈した。この色調は、メチレンブルーまたはアズールBによる異調染色性を示していると思われるが、メチレンブルーは、上述の様に、P顆粒を正調に染める。したがって、P顆粒の赤紫色は、アズールBによる異調染色の結果生じたと推察される。

ハイギョ類の顆粒球の分類は混乱しているが、これまで

に、オーストラリアハイギョとアフリカハイギョ類において「好中球(neutrophil)」と称される血球が観察されている^{2-4,11,14)}。Ward(1969)がオーストラリアハイギョで観察した好中球は、メタノール固定した塗沫標本にライト染色を施したものであり、細胞質は多くの微細なピンク色を帯びた顆粒によって満たされるが、時にはそれらは観察困難であると述べている²⁾。また、Hine *et al.*(1990)が観察したオーストラリアハイギョの好中球には、ライト染色によって顆粒は存在しないか、あるいは微細なアズール好性顆粒が中程度見られるとしている³⁾。本研究においても、*P. annectens*の好中球は、染色条件によって、様々な色調を示し、また、染色されない場合もあったことから、オーストラリアハイギョにおいて報告された好中球は、本研究の好中球と同じ種類の顆粒球と考えられる。しかし、DeLaney *et al.*(1976)がアフリカハイギョ類の*P. aethiopicus*で観察した好中球は、ライト-ギムザ染色標本上で、微細な赤い顆粒を有しており¹¹⁾、彼らの示した図(白黒写真)からは、顆粒の形状は円形または卵円形である。また、Champy and Louvel(1939-1940)が本研究と同じ魚種で観察した好中球も、顆粒は好酸性を示すとされており¹⁴⁾、彼らの示した図(白黒イラスト)では顆粒の形状は円形または卵円形である。したがって、これらの報告における好中球は、形状および染色性から、本研究において*P. annectens*に観察された好中球とは異なる種類の顆粒球であると考えられ

る。一方、Barber and Westermann (1978) がアフリカハイギョ類（種名不明）に観察した好異球（heterophil）は、MGG染色によってほのかに灰色がかった藤色（faint grey-mauve）を呈する顆粒を有することから³³⁾、本研究の好中球と同じ顆粒球と思われる。Champy and Louvel (1939-1940) が報告している骨髓球性好中球（myelocytic neutrophil）は、Romanowsky染色によって好塩基性を示す顆粒を有し、好塩基球とは区別されている¹⁴⁾。本研究の好中球も、染色条件によっては、顆粒が正調メチレンブルー好性を呈することから、彼らの骨髓球性好中球は、本研究の好中球と同一の種類かもしれない。また、da S Ribeiro *et al.* (2007) がミナミアメリカハイギョに観察した多形核無顆粒球（polymorphonuclear agranulocyte）は、メタノール固定した塗沫標本にギムザ染色を施して観察されており、彼女らは、無顆粒球としているが電子顕微鏡観察では、顆粒を認めている⁹⁾。本研究においても、好中球の顆粒は、染色条件によっては染まらないことから、彼女らが観察した多形核無顆粒球は好中球ではないかと推察される。

これまで、著者が報告した魚種において、好中球内の同一顆粒が、種々の色調に染まることは認められていない¹⁵⁻³⁰⁾。また、好中球内に異調アズール好性を示す顆粒も観察されていない¹⁵⁻³⁰⁾。

各種魚類の好中球において、好塩基性を示す不定形の安本小体（Y小体）（Yasumoto body, Y-body）が観察されている^{15-18, 21-30)}。本小体はヌタウナギにも観察されていることから、本小体は少なくとも魚類に共通するものと考えられている¹⁶⁾。しかし、*P. annectens*の好中球には、Y小体は観察されなかった。コイの好中球にもY小体は認められていない^{19, 20)}、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³⁵⁾。したがって、アフリカハイギョも、細菌などの感染によってY小体出現するかもしれない。

細胞化学的特性から、*P. annectens*好中球のP顆粒の成分を次のように推定した。AcP, α -NAE, α -NAEおよびNASDCAE陽性顆粒は、形状および顆粒数がP顆粒と類似していたことから、これら酵素はP顆粒に存在すると思われる。また、PAS陽性顆粒も形態学的特徴から、P顆粒に相当すると考えられる。TB陽性顆粒の数はP顆粒よりも少ないが、形状が類似することから、P顆粒のいくつかはTB陽性であると推察される。また、TB陽性顆粒は、赤紫

色を呈したことから、異調染色性を示していると言える。オーストラリアハイギョでは、好中球の詳細な細胞化学的性状が明らかとなっており⁴⁾、好中球には、AIP, AcP, α -NAEおよびNASDCAEが検出され、AcPは顆粒に存在するとされている⁴⁾。また、好中球顆粒はPASによって染色されると報告されている⁴⁾。一方、この好中球には、N-acetyl- β -glucosaminidase, β -galactosidase, acetyl-L-tyrosine- α -naphthyl esterase, tosyl-L-lysine- α -naphthyl esterase, β -Glu, α -NBEおよびペルオキシダーゼのいずれも検出されていない⁴⁾。本研究においても、*P. annectens*の好中球顆粒はPASおよびAcP陽性であった。また、 α -NAEとNASDCAEも顆粒に陽性反応が認められた。さらに、 β -Gluとペルオキシダーゼ活性は*P. annectens*の好中球にも見られなかった。しかし、 α -NBE活性は*P. annectens*の好中球のP顆粒に陽性反応が検出され、AIP活性は認められなかった。したがって、ハイギョ類の間で、これら一部の酵素活性の有無に違いがあると考えられる。なお、AcPはミナミアメリカハイギョの多形核無顆粒球にも検出されている⁹⁾。

これまで、著者が調べた各種魚類の好中球において、種々の酵素が検出されているが（Table 3）、存在部位が推定されているものは少なく、ヌタウナギ好中球では γ 顆粒が α -NBE陽性であり¹⁶⁾、*P. endlicheri*好中球では、 α -1顆粒にAIP, AcP, β -Glu, α -NAE, α -NBEおよびNASDCAEが存在すると考えられている¹⁷⁾。また、アジアアロワナ好中球では γ 顆粒にNASDCAEが¹⁸⁾、ウナギの γ 顆粒にはAcP, α -NAEおよび α -NBEが¹⁵⁾、ノーザンパイクの β 顆粒にAcP活性が²²⁾、マダイの α 顆粒にAcP, α -NAEおよびNASDCAEが²⁹⁾、ブリでは β 顆粒にAIPが、 γ 顆粒に α -NAEが存在するとされている³⁰⁾。一方、ペルオキシダーゼはこれまで、アジアアロワナ、ウナギ、ノーザンパイク、ブルーギル、スズキ、ヒラスズキ、メジナ、マダイ、ブリ、ヒラメおよびトラフグにおいて観察されており、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^{15, 18, 21-23, 25, 26, 29, 30)}。また、ヌタウナギ、*P. endlicheri*、アジアアロワナ、ウナギ、ノーザンパイク、ブルーギル、スズキ、ヒラスズキ、メジナ、マダイ、ブリ、ヒラメおよびトラフグにおいて、好中球にPAS陽性部位とTB陽性部位が観察されている。これらのPAS陽性部位は α -アミラーゼで消化されることから、グリコーゲンに相当し、顆粒とは異なるとされている^{15-18, 21-26, 29, 30)}。しかし、*P. annectens*で

Table 3. Comparison of cytochemical characteristics of neutrophils from various fish species

Test ¹	Fish and type of cytoplasmic granule ²													
	<i>Eb</i> γ	<i>Pa</i> P	<i>Pe</i> $\alpha 1, \alpha 2, \gamma$	<i>Sf</i> α, β, γ	<i>Aj</i> α, β, γ	<i>El</i> β	<i>Lm</i> β	<i>Lj, Ll</i> β	<i>Sg</i> α, β, γ	<i>Gp</i> β	<i>Pm</i> α, β	<i>Po</i> β	<i>Tr</i> α, β	
PAS	H&G: +	G: + (P)	H&G: +	H&G: +	H&G: +	H&G: +	H&G: +	H&G: +	H&G: +	H&G: +	H&G: +	H&G: +	H&G: +	H&G: +
PAS- αA	H&G: -	G: + (P)	H&G: -	H&G: -	H&G: -	H&G: -	H&G: -	H&G: -	H&G: -	H&G: -	H&G: -	H&G: -	H&G: -	H&G: -
AB (pH1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB (pH2.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TB	+ (Y)	+ (P)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)	+ (Y)
SBB	-	-	+ ($\alpha 1$)	+	+	+	+	+ (β)	+	+ (β)	+	+	+	+
SIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AIP	-	-	+ ($\alpha 1$)	-	-	-	-	+ (β)	-	-	-	-	-	-
AcP	-	+ (P)	+ ($\alpha 1$)	-	+ (γ)	+ (β)	-	+	+	+ (α)	+	+	+	+
β -Glu	-	-	+ ($\alpha 1$)	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
α -NAE	-	+ (P)	+ ($\alpha 1$)	+	+ (γ)	+	-	+ (γ)	+	+ (α)	+	+	+	+
α -NBE	+ (γ)	+ (P)	+ ($\alpha 1$)	+	+ (γ)	+	-	-	-	+	-	-	+	+
NASDCAE	-	+ (P)	+ ($\alpha 1$)	+ (γ)	+	+	+	-	-	+ (α)	-	-	+	+
PO	-	-	-	+ (β)	+ (β)	+ (β)	+ (β)	+ (β)	+ (β)	+ (β)	+ (β)	+ (β)	+ (β)	+ (β)

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

²*Eb*, *Eptaretus burgeri* (hagfish, Kondo and Takahashi (2009)¹⁶); *Pa*, *Protopterus annectens* (African lungfish, present report); *Pe*, *Polypterus endlicheri* (Kondo and Takahashi (2009)¹⁷); *Sf*, *Scleropages formosus* (Asian arowana, Kondo and Takahashi (2009)¹⁸); *Aj*, *Anguilla japonica* (Japanese eel, Kondo and Takahashi (2009)¹⁵); *El*, *Exocoelacanthus* (northern pike, Kondo et al. (2008)²²); *Lm*, *Lepomis macrochirus* (bluegill, Kondo et al. (2005)²⁵); *Lj*, *Lateolabrax japonicus* (Japanese seabass, Kondo et al. (2007)²⁶); *Ll*, *Lateolabrax latius* (seabass, Kondo et al. (2009)²⁹); *Sg*, *Seriola quinqueradiata* (Japanese amberjack, Kondo et al. (2009)³⁰); *Gp*, *Girella punctata* (ruddfish, Kondo et al. (2005)²⁴); *Pm*, *Pagrus major* (red sea-bream, Kondo et al. (2009)²⁹); *Po*, *Paralichthys olivaceus* (Japanese flounder, Kondo et al. (2005)²⁴); *Tr*, *Takifugu rubripes* (tiger puffer, Kondo et al. (2007)²¹); α , eosinophilic granule; $\alpha 1$, α type 1; $\alpha 2$, α type 2; β , chromophobic granule; γ , basophilic granule; P, panchromatophilic granule; H, hyaloplasm; G, granular; -, negative; +, positive; Y, Yasumoto body.

は、P顆粒がPAS陽性であり、 α -アミラーゼで消化されなかった。また、TB陽性部位は、前述の各種魚類では、形態学的特徴からY小体に相当するとされている^{15-18, 21-26, 29, 30}。しかし、*P. annectens*では、一部のP顆粒が染色された。

本研究によって、*P. annectens*の好中球には1種類の顆粒(P顆粒)が存在し、顆粒中には、AcP、 α -NAE、 α -NBEおよびNASDCAEが認められるとともに、PAS陽性であり、一部のP顆粒はTBによって異調染色性を呈することが明らかとなった。

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) Ward J W：Hematological studies on the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Copeia*, 1969(3), 633-635 (1969)
- 3) Hine P M, Lester R J G, Wain J M：Observations on the blood of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* Klefft. I. Ultrastructure of granulocytes, monocytes and thrombocytes. *Aust J Zool*, 38, 131-144 (1990)
- 4) Hine P M, Wain J M, Lester R J G：Observations on the blood of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* Klefft. II. Enzyme cytochemistry of blood cells, peritoneal macrophages and melano-macrophages. *Aust J Zool*, 38, 145-154 (1990)
- 5) Bryce T H：Histogenesis of the blood in larval forms of *Lepidosiren*. *Lancet*, 167, 406 (1904)
- 6) Bryce T H：The histology of the blood of the larva of *Lepidosiren paradoxa*. Part I. Structure of the resting and dividing corpuscles. *Trans Roy Soc Edin*, 41, 291-310 plus 5 plates (I to V) (1905)
- 7) Bryce T H：On the histology of the blood of the larva of *Lepidosiren paradoxa*. Part II. Hæmatogenesis. *Trans Roy Soc Edin*, 41, 435-467 plus 4 plates (I to IV) (1906)
- 8) Bielek E, Strauss B：Ultrastructure of the granulocytes of the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*：morphogenesis and comparison to other leucocytes. *J Morphol*, 218, 29-41 (1993)
- 9) da S Ribeiro M L, DaMatta R A, Diniz J A P, de Souza W, do Nascimento J L M, de Carvalho T M U：Blood and inflammatory cells of the lungfish *Lepidosiren paradoxa*. *Fish Shellfish Immunol*, 23, 178-187 (2007)
- 10) Jordan H E, Speidel C C：Blood formation in the African lungfish, under normal conditions and under conditions of prolonged estivation and recovery. *J Morphol Physiol*, 51, 319-371 (1931)
- 11) DeLaney R G, Shub C, Fishman A P：Hematologic observations on the aquatic and estivating African lungfish, *Protopterus aethiopicus*. *Copeia*, 1976(3), 423-434 (1976)
- 12) Dustin P：Recherches sur les organes hématopoiétiques du *Protopterus dolloi*. *Archives de Biologie*, 45, 1-26 plus 2 plates (I and II) (1934)
- 13) Parker W N：On the anatomy and physiology of *Protopterus annectens*. *The trans Roy Irish Acad*, 30, 109-230 plus 11 plates (VII to XVII) (1892)
- 14) Champy Ch, Louvel J：Recherches sur l'hématopoièse chez *Protopterus annectens*. *Arch D'anat Micr*, 35, 243-281 plus 1 plate (IX) (1939-1940)
- 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。水大研報，58，1-13 (2009)
- 16) 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。水大研報，57，299-308 (2009)
- 17) 近藤昌和，高橋幸則：ポリプテルス好中球の形態学および細胞化学的特徴。水大研報，57，283-297 (2009)
- 18) 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)
- 19) 近藤昌和，安本信哉，高橋幸則：コイ好中球のメイグリユンワルド・ギムザ染色性。水大研報，50，109-117 (2002)
- 20) 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)
- 21) 近藤昌和，稲川裕之，池田 至，山元憲一，高橋幸則：トラフグ好中球の形態学および細胞化学的特徴。水大研報，55，133-139 (2007)
- 22) 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。水大研報，56，317-321 (2008)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) 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)
- 26) 近藤昌和, 稲川裕之, 高橋幸則: スズキ科魚類 (スズキ, ヒラスズキ, タイリクスズキ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 55, 141-147 (2007)
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 近藤昌和, 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸則: マダイ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 58, 15-22 (2009)
- 30) 近藤昌和, 坂口隆亮, 金丸俊介, 柏村直宏, 高橋幸則: ブリの好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大研報, 58, 101-111 (2009)
- 31) 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)
- 32) Gill A C, Mooi R D: Phylogeny and Systematics of Fishes. In: Hart P J B, Reynolds J D (eds) Handbook of Fish Biology and Fisheries Vol. 1. Blackwell Publishing, Oxford, 15-42 (2002)
- 33) Barber D L, Westermann J E M: Occurrence of the periodic acid-Schiff positive granular leucocyte (PAS-GL) in some fishes and its significance. *J Fish Biol*, 12, 35-43 (1978)
- 34) 西 国広, 阿南健一, 須田正洋: 染色法 - 普通染色またはRomanowsky染色による形態の違いについて-. *Medical Technology*, 19, 630-636 (1991)
- 35) 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)