

サケ稚魚の白血球と栓球の分化について

武田重秀

Observations on the Differentiation of Leucocytes and Thrombocytes in Blood of Chum Salmon Fry (*Oncorhynchus keta*).

Shigehide Takeda

The present study was carried out to get more knowledge in detail on development and differentiation of the leucocytes and thrombocytes of the chum salmon fry (*Oncorhynchus keta*).

The observation under microscope has been continued for thirty-three days beginning from the stage of three days prior to hatch out, using embryonal body fluid of the fish got out of the section at the caudal peduncle. The samples were stained with May-Giemsa and Sørensen's phosphate solution (pH 6.2-6.3) was used as buffer.

The results obtained were as follows:

1) Large lymphocytes (larger than 10 micron in diameter) were recognized to transpose and differentiate into leucocytes, while small ones (smaller than 10 micron) into thrombocytes. But the process of differentiation into erythroblast from small lymphocytes could not be recognized yet in the present observation.

2) There was observed the presence of acidophile or eosinophilic leucocytes and also neutrophilic leucocytes in the fluid, but no basophilic leucocytes were observed in their matured form.

3) Acidophilic leucocytes have two types; fine granulocytes and rough granulocytes. Only rough granulocytes, get out of the shell of leucocytes, were observed to have positive reaction of peroxidase.

4) Neutrophilic leucocytes was observed to have two types; monocytes and segmented leucocytes. The number of the segments in the normal and healthy condition was observed from four to one, while the number more than four was observed unusually. The Principle of Arneith's (1904) "System for differential counting" on the human neutrophilic leucocytes could be also adopted in the case of the chum salmon fry by the author.

5) Process of the differentiation is shown in Figure 5. Lymphocytes, both of small and large, were recognized that these are able to transpose each other. Lymphocytes, both small and large, were recognized that these are a stem cell.

ま え が き

さけの健康状態を白血球の組成変化によって予知することができるならば、調査範囲の縮小ができると思い、その手始めとして白血球の種類と、その分化過程を知ることが必要であったので、この観察をおこなった。

魚の血液中の白血球の分類及びその生成について、これといて定説のない現況である。例えば

Catton	リンパ球, 細, 粗粒白血球
Dowbrowski, Toph.	リンパ球, 白血球(単核球)
Schaperclaus	リンパ球, 単核球
Putschakaw et al	リンパ球, 白血球
Lajman et al	リンパ球, 単核球, 白血球

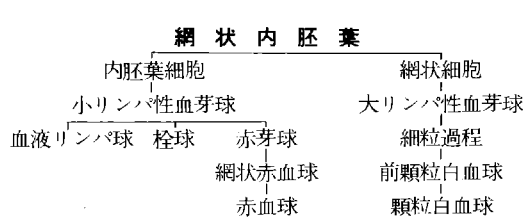
と分類しており、結城(1957)はペルオキシダーゼ(Peroxydase)反応を用いてニジマス (*Salmo irideus*) の白血球の分類を試み、この陽性反応球は単核球と顆粒白血球の両群であることを認めている。そして白血球をペルオキシダーゼ陽性球、円形リンパ球、リンパ球とに分類し、尾崎、鎌田(1958)はニジマスで人血の単核球や分葉好中性球にそっくりなものを観察している。またBecker et al(1958)は細かに白血球を次のように分類している。

分葉核好中性白血球, 桿状核好中性白血球, 変態骨髓細胞, 骨髓細胞, 好酸性球, 好塩基性球, リンパ球, 単核球。

分類は上記の如く様々であり、また白血球の生成には魚類を含む脊椎動物に共通した問題として論じられてきている。

造血順序を大別すると総べての血球は唯一種の幹細胞(Stem cell) から生ずるという一元説と二種以上の幹細胞から生ずるものであるという二元説或は多元説などがある。

一元説は環境によって血球の種類が決定されるというのに対して新一元説では、血球には各々に定められた能力を持っており、それによって別々な血球に発達して行くので、環境は重要でないという考え方である。Cattonは新一元説に基いて、次のように魚の血液について考えた。



Cattonはまた、大リンパ性白血球が幹細胞であることを次の考察に基いて想定した。

1. 網状細胞に核構造が似ている。
2. 網状細胞の間に移行型がある。
3. 大リンパ性細胞は有糸分裂を行うがこれによって小リンパ性細胞を生ずるであろうと考える。
4. 大リンパ性血芽球は哺乳類の単一幹細胞である。

血芽細胞によく似ている。顆粒形成で顆粒は大細胞にみられるなどから考察を行い、その一部について取纏めたものである。

この報告を取纏めるに際し、機会を与えられた北海道さけ・ますふ化場、逸見場長、助言を戴いた東京水産大学助教授、尾崎久雄博士、調査課、徳井課長、西野室長、疋田技官及び研究中種々協力を戴いた根室支場各位並に曾て操作について御指導を戴いた北海道立函館水産試験場(元北大水産学部講師)、結城了伍博士に対し深甚の謝意を表します。

方法及び材料

観察期間及び場所：この試験は昭和46年3月7日から4月10日までの期間中北海道さけ・ますふ化場根室支場内根室事業場に収容した卵、稚魚より標本を抽出し、支場で実施した。

供試卵及び稚魚の決定は、ふ化3日前とは、採血した卵と同じ群の卵の大部分が3日後にふ化したので、採血した卵をふ化3日前とした。また、ふ化を待って、同時刻にふ化した個体を選んで特別なバスケットに収容して他の群と区別しておき、その中から毎日数尾を取揚げ採血し塗抹標本を作った。

ふ化時の稚魚の臍のうはふ化後10分間位は真円であるがその後時間の経過とともに階円形になるので真円の

さけ稚魚の白血球と栓球の分化について

もののみを採取し計500尾を供試魚とした。観察期間中の水温は5.2~8.2℃で平均7.8℃であった。

卵の採血は割管の先に木綿針を取付け、その針で卵膜を破り、胚体を摘出し、漏紙に軽く尾柄部を接触させて水分を除き、呼吸をもって瞬間的に局部を速乾し、鋭利な鋏で尾柄を切断し、直ちに予め処理してあるスライドグラスに直角に手速く塗抹し、振り動かして空気で速かに乾燥させる。稚魚の採血は、ふ化直後の標本では、卵の場合と同様、ふ化1週間後の稚魚では血液量が稍々多くなるので同様に水分を除き尾柄部の切断をした後直接切断部を接触させてスライドグラスに数列塗抹し、更に血液量の増加するふ化2週間後には厚さ0.7mmのカバークラスの一辺中央部に1滴血液を付け、通常の塗抹をする。

染色はメイ・ギムザ(May-Giemsa)染色で次の順序で行った。

1) 空気乾燥した塗抹標本にメイ、グリーンワルド液(May-Grünwald sol.)を注ぎ大型シャーレの中で2分間染色 2) この上に等量のゼレーゼン(Sörensen)のリン酸緩衝液PH6.2~6.3の液を注ぎ5分間染色する。3) この液を捨て、直ちにギムザ稀釈液(緩衝液5ccに対しギムザ原液7滴の割に稀釈)で30分間染色する。4) 染色後一方より静かに緩衝液を注ぎギムザ染色液を一旦浮上流出させてそのまま1分間染色の調整をしてから水洗、乾燥、封入した。

血液中の各細胞の染色状態は、赤血球では細胞質がピンク色、核は濃赤紫色、白血球は紅色で濃赤紫色の粗粒のあるものと極く細粒のあるものがある。これらはエオジン好性球(好酸球)である。単核球と分節(葉)球は核のみ濃青褐色で好中性球である。栓球は普通濃褐色であるが、幼若細胞は濃青色である。リンパ球には大小あり、いずれも濃青色に染まるが、直径10 μ を境にして、大小に識別し10 μ 以上は大リンパ球、10 μ 以下を小リンパ球とした。また過酸化酵素反応(Peroxydase reaction)、即ち血球が過酸化酵素を持っているか否やを検査する方法で、いろいろな方法がある。結城の行った佐藤、関谷原法を採用している方法もあるが筆者はMc Junkin変法を用いて観察した。同法の方が染色が明るく内部の状態がよく見えるためである。Mc Junkin氏法の変法は、指薬として80%のメチルアルコール(Methanol20+蒸留水5)25ccに0.1gのベンジジン(Benzidineメルク製)と過酸化水素(Oxydol)2滴を加え褐色瓶に入れる。

操作は、塗抹標本に試薬10滴を加え大型シャーレ内に密閉して30秒放置、更に蒸留水20滴を追加して3分間軽く振る。水道水で強く水洗、乾燥。これをギムザ稀釈液(緩衝液1ccに原液1.5滴)で染色20分、その後水洗、乾燥するが、この場合は封入は避け油浸はグリセリンを使用する。この方法で原形質内に黄褐色顆粒を認める時は陽性である。

また白血球系だけ染分けできるかと思い超染色を人血同様に行ってみた。ピクトリヤブルー4Rとダイヤモンドフクシンの各1%水溶液を作りpH6.2にした緩衝液5ccに対しピクトリヤブルー液5滴、ダイヤモンドフクシン液20滴の混合液で30分染色(原法は20分であるが染まらない)した処、赤血球は青味がかかったピンク色、核は暗赤色に黒く顆粒が見え白血球は全体藤色に、更に濃い藤色の顆粒が見られ、脱殻したものは濃い藤色。栓球は細胞質が暗赤色に濃青色の核が見えた。緩衝液のpHと両液の混合比をいろいろ変えて見たが超染色はできなかった。次にSimpson-Sabin法、即ちニュートラルレッド(Neutral red)とヤーマスグリーン(Janus green)を用いてみた。ニュートラルレッド0.125gを50mlの純アルコール溶液^(a)、ヤーマスグリーン0.125gを62.5gの純アルコールに溶かし、使用時に純アルコール10ml+(a)1.1ml+(b)0.15mlを傾斜したスライドに混合液を滴下し色素膜を作り、これに血滴をカバーグラスにとり色素膜にかぶせ血液の拡散を見てからワセリンで罫りを封じ数分後鏡検する。全細胞が緑色になり、両液混合比を変えても超染色は出来なかった。

栓球(Thrombocyte)は従来血小板と呼ばれていたが現在は栓球と呼ばれている。栓球は出血時破壊する性質があるので、破壊を防止するためフォニオ(Fonio)の方法を併用して栓球の種々な像を観察したFonio法は14%の硫酸マグネシウム(MgSO₄)液で行うが、さけの血球はこの濃度では破壊されるので、逐次濃度を上げて27%として観察した。操作はザーリー血色素計用のメラングジュールの小さい1目盛りだけ硫酸マグネシウム液を入れて置き、稚魚の尾柄切断による血液を同量の1目盛り入れ、スライド上で吸上げたり、出したりして攪拌し、この混合液を他のスライドに塗抹して、染色すると栓球は破壊されずにいろいろな形態のものが観察される。

最後にリンパ球の超染色をメチレンブルー、ピロニンを使用して、人血要領で染色したけれどこれは失敗に終わった。

観 察 結 果

- 1) 大リンパ球は分化してエオジン好性球と好中性球となる。エオジン好性球には細粒白血球と粗粒白血球とがあり、また好中性球には単核球と分節球があり、分節球は正常の健康状態のときは2分葉から4分葉まで観察された。
- 2) 大リンパ球からエオジン好性球、好中性球に移行する前の幼若時代は好塩基性が強い。
- 3) 大リンパ球の中に有糸分裂のようなものを認められた。
- 4) ペルオキシダーゼ反応陽性球は粗粒白血球の脱殻後のもので、脱殻しないものは陰性であった。
- 5) 大リンパ球の白血球になる前に脱殻がある。
- 6) 小リンパ球は栓球に移行する。

考 察

Cattonの大リンパ球から白血球に移行する考え方は筆者の観察結果と一致する。尾崎、鎌田が人血の好中球と同様なものを発見しているが、これは人血の好中球と同じ働きをするものであることを筆者も他の試験結果と併せて再確認した。感染症の魚では単核球のみとなって分葉した細胞が少くなり、貧血の場合は非常に過分葉となり、Arneth (1904) の核影移動説(System for differential counting)はさけにも適用できることを確認した。またCattonのいうリンパ球は幹球であるという意見と一致する。ただBeckerが好塩基性球と分けたのは、大リンパ球からそれぞれの白血球に移行する前の未熟時代が好塩基性が強いのでこの時代の細胞を称したものと思う。

結城のいうペルオキシダーゼ反応陽性球は粗粒白血球の脱殻後のものであることを確めた。また、第1次赤血球は早期にその細胞質にペルオキシダーゼ反応陽性を示しているのは、ふ化3週前後までの白血球が、未発達時代に赤血球が白血球の作用を、ある期間代行するものではないかと考える。また大リンパ球の、あるものに時として有糸分裂ではないかと思われるものが見られたが(3図)、これはCattonの指摘した血芽細胞に似た細胞ではなからうか。栓球は小リンパ球から分化するとCattonが想定しているが、筆者もこの確認を行った。ただ大リンパ球の有糸分裂したのから赤芽球の生成する過程については今回の観察では明確にできなかったため、この点今後の研究に期待する。

摘 要

1. 直径 10μ を境として、大小リンパ球を識別できることが明らかになった。(1図)。
2. 大リンパ球は白血球に移行する(一部有糸分裂のような細胞が見えるので、もしそれが赤芽球だとすると赤血球に移行するものもあるものと考え)(6図)。
3. 白血球にはエオジン好性球と好中性球があり、エオジン好性球には細粒白血球と粗粒白血球があり、好中性球には単核球と分節球があり、分節球の分葉数は2~4葉あるのが正常の健康魚である。(No.6図)。
4. 好中球は人血の好中球と働きが同様でArnethの核形移動説が適用される。
5. ペルオキシダーゼ反応陽性球は粗粒白血球の脱殻細胞に見られる。(2図)。
6. 小リンパ球は栓球に移行するが(No.1図)小リンパ球が赤芽球を生成するというCattonの学説があるが、この過程について現在までの観察では確認できなかった。
7. 大、小リンパ球はそれぞれに分化する途上にある幹球であることは明らかである(5図)。

文 献

- 尾崎久雄 1965. 魚類生理学講座(血液循環). 緑書房, 1~326, 東京
加藤勝治 1950. 血液研究法. 南山堂, 1~596, 東京
川本信之 1962. 魚類生理学. 石崎書店, 1~318, 東京

さけ稚魚の白血球と粒球の分化について

- 小宮悦造 1950, 臨床血液学, 南山堂, 1~289, 東京
小宮悦造 1969, 臨床検査法提要, 金原出版KK, 1~950, 東京
結城了伍 1963, 魚類血液学の水産への応用に関するシンポジウム, 日本水産学会誌, Vol29, No.12, 1098~1103,
藁島 高 1949, 新撰生理学, 玄文社, 1~438, 東京
Michael W. Elves (阿部由明訳), 1966, リンパ球岩本書店, 1~322, 東京

1 図 ふ化3日前の血球像

1. 幼若赤血球
- 2～3. 第1次赤血球 長さ15.5 μ
4. 好塩基性赤血球
5. 第1次赤血球の核分裂
- 6～7. 幼若赤血球
- 8～9. 第1次赤血球の核分裂 9—長さ12.4 μ 巾18.6 μ
10. 幼若赤血球
11. 白血球幹細胞(大リンパ球)長さ18.6 μ
- 12～14. 分節白血球 12—長さ18.6 μ , 巾18.6 μ
- 15～16. 粗粒白血球
17. 幼若粗粒白血球 長さ15.5 μ , 巾15.5 μ
18. 白血球の幹球(大リンパ球)
- 19～21. 分節球
22. 幼若粗粒白血球
23. 栓球幹球(小リンパ球)
- 24～29. 栓球 28—長さ9 μ
- 30～31. 幼若栓球
32. 栓球の分裂

概況: 1) この時代に既に大リンパ球から白血球に移行していることが解る。
2) 白血球が既に脱殻しているものがある。
3) 栓球には最終形態の桿状のものが見える。栓球には脱殻がない。
4) 赤血球は赤芽球から第2次血球の幼若のものまで見られる。

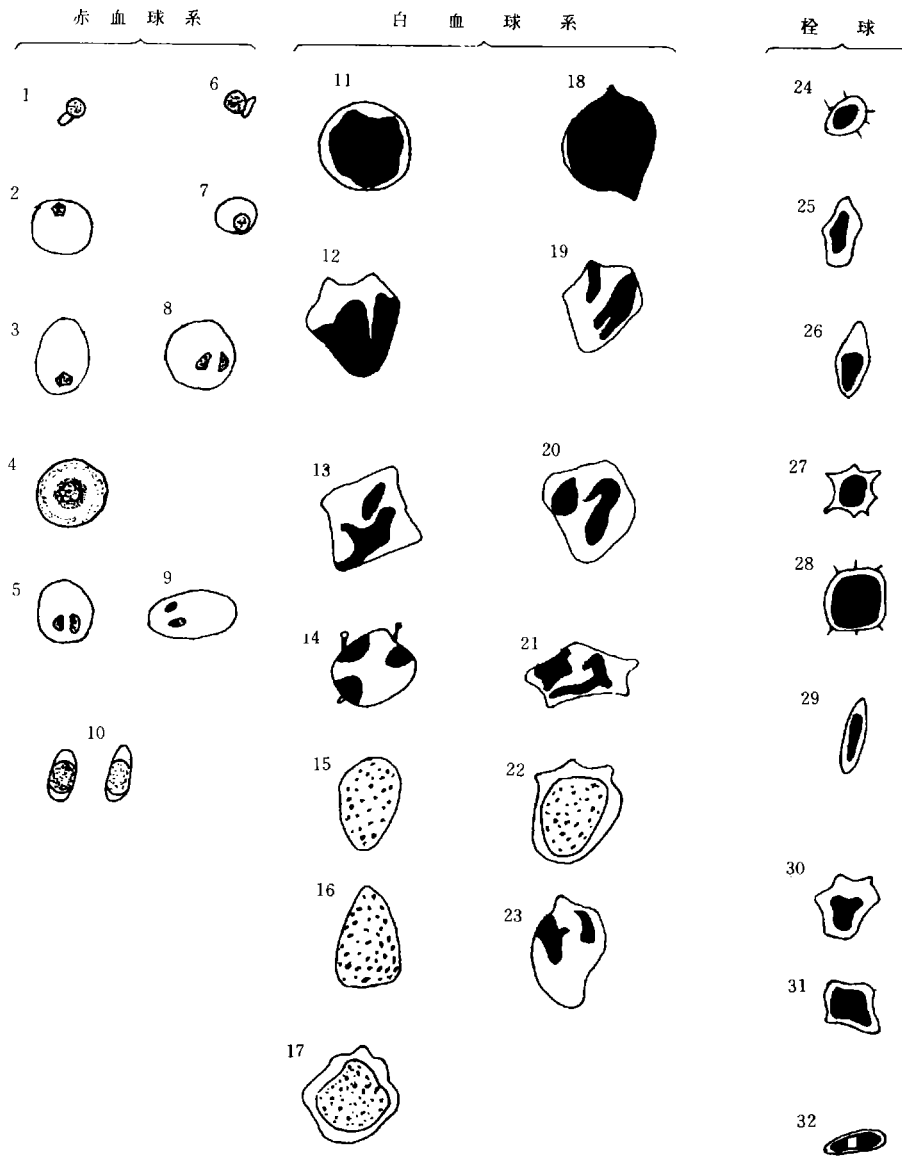
(注) 幼若赤血球(Erythroblast); 第1次赤血球(1st. erythrocyte);
好塩基性赤血球(Basophilic erythrocyte); 大リンパ球(Large leucocyte);
白血球幹細胞(Undifferentiated leucocyte); 小リンパ球(Small leucocyte);
栓球(Thrombocyte); 単核球(Monocyte);
粗粒白血球(Granulocyte); 細粒白血球(Rough granulocyte);
分節球(Segmented leucocyte);

さけ稚魚の白血球と栓球の分化について

(Cells of Erythrocytic series)

(Cells of leucocytic series)

(Cells of thrombocytic series)

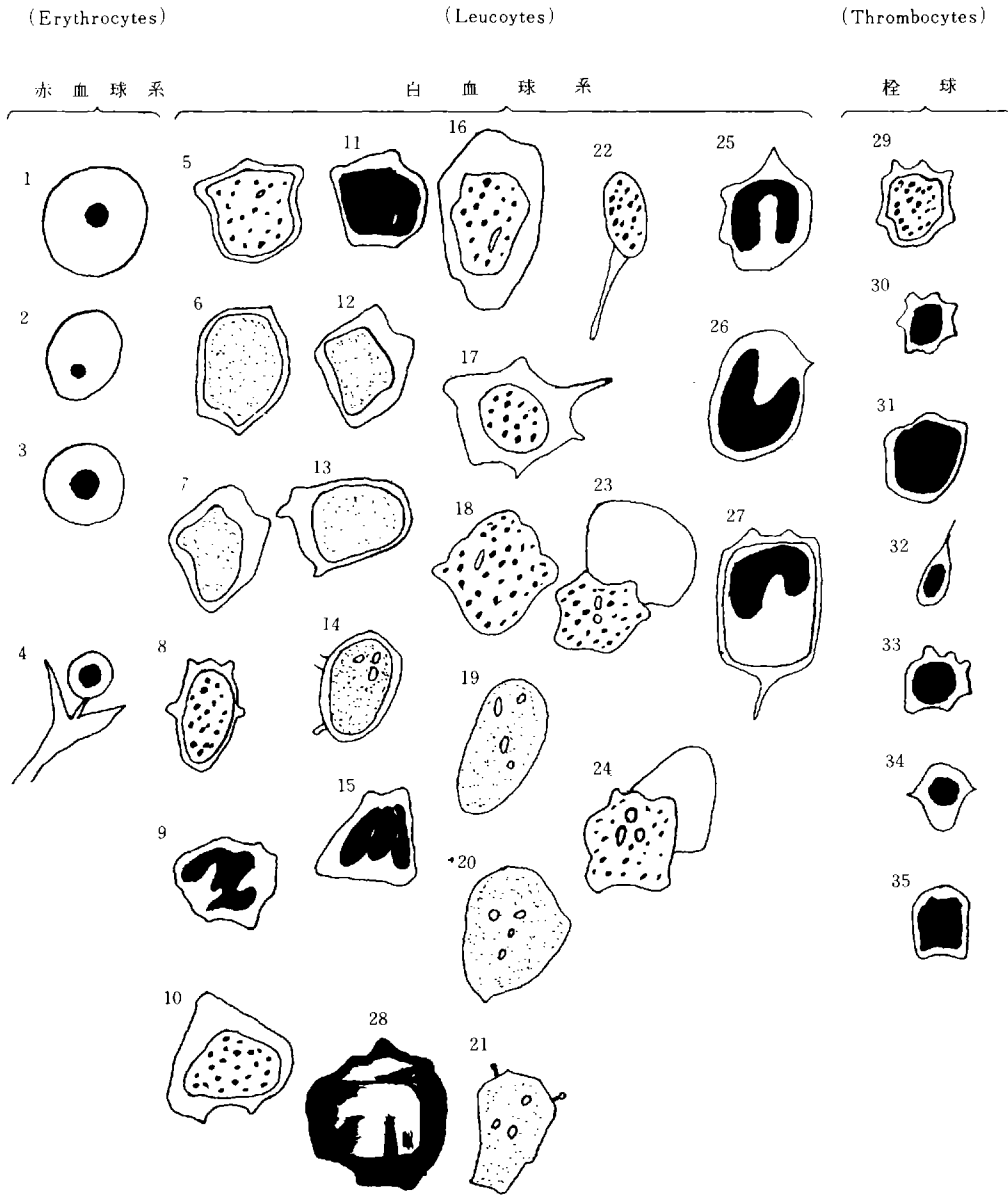


2 図 ふ化直後の血球像

1. 核が中心部にある第1次赤血球
2. 核が外側に偏している第1次赤血球
- 3～4. 第2次赤血球（好塩基性球）
5. 粗粒白血球
- 6～7. 細粒白血球
8. 粗粒白血球
9. 中性好性分節白血球
10. 粗粒白血球
- 11～14. 幼若細粒白血球
15. 好中性分節球
- 16～17. 粗粒白血球
18. 脱殻した粗粒白血球
- 19～21. 脱殻した細粒白血球
- 22～24. 脱殻途上の粗粒球
- 25～27. 単核球
28. 過染色の幼若白血球
- 29～35. 栓 球

概 況 No.1 より分化した白血球が増加している。

さけ稚魚の白血球と栓球の分化について



3 図 ふ化後14日目の稚魚の血球像

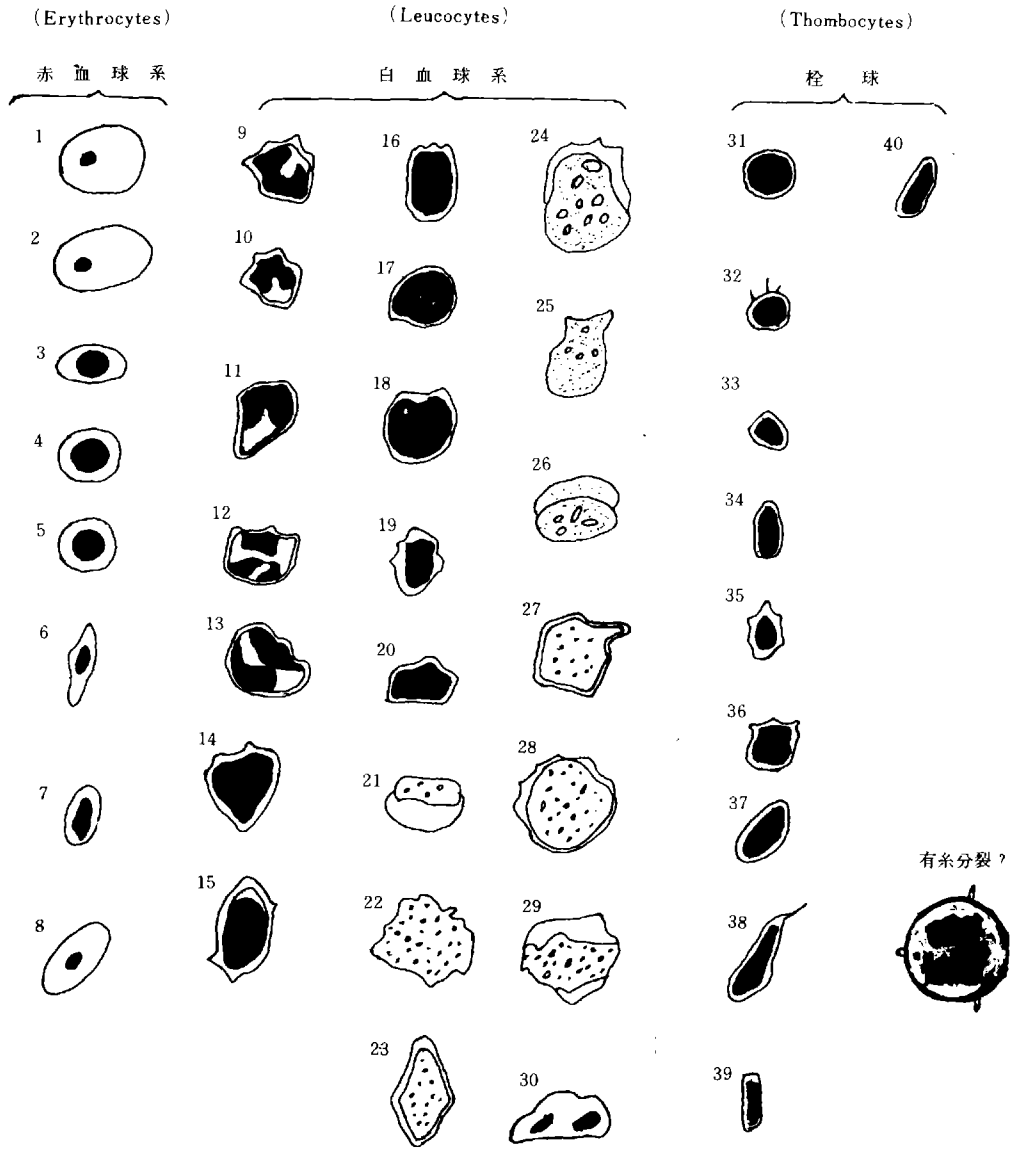
- 1~2 第1次赤血球 1—大きさ(長さ 12.4μ , 巾 15.5μ), 2—(15.5μ , 18.6μ)
3 幼若第2次赤血球(6.2μ , 9.3μ)
4~5 第2次赤血球(好塩基性球) 4—(9.3μ), 5—(12.4μ)
6~7 幼若第2次赤血球 6—(15.5μ , 6.2μ), 7—(12.4μ , 7.7μ)
8 第2次赤血球 (24.8μ , 9.3μ)
9~13 単核球 9—(12.4μ , 12.4μ), 10—(9.3μ , 9.3μ) 11—(12.4μ , 9.3μ)
12—(9.3μ , 15.5μ), 13—(12.4μ , 15.5μ)
14~18 白血球
14~16 幼若 17~18大リンパ球 14—(18.6μ , 15.5μ), 15—(15.5μ , 10.8μ), 16—(10.9μ , 10.0μ)
17—(9.5μ , 12.5μ), 18—(12.4μ , 12.4μ)
19~20 幼若白血球 19—(12.4μ , 9.3μ), 20—(12.0μ , 12.4μ)
21~23 粗粒白血球 21—(18.6μ , 21.7μ), 22—(21.7μ , 21.0μ), 23—(15.5μ , 10.8μ)
22~23 脱殻後
24~26 細粒白血球 24—(18.6μ , 18.6μ), 25—(27.9μ , 15.5μ), 26—(18.6μ , 21.7μ)
24. 26 脱殻途上 25 脱殻後
27~29 粗粒白血球 27—(15.5μ , 15.5μ), 28—(18.6μ , 21.7μ), 29—(28.0μ , 28.0μ)
30 分節球 (15.5μ , 18.6μ)
31~32 小リンパ球
31 栓球に分化する 31—(9.3μ), 32—(6.2μ)
33~40 栓球 33—(9.3μ , 8.0μ)
35. 36 幼若 35—(9.3μ , 7.7μ), 36—(6.2μ , 6.2μ), 37—(18.6μ , 9.3μ)
38—(18.6μ , 9.3μ), 39—(15.5μ , 6.2μ), 40—(9.3μ , 4.6μ)

概況

分化した白血球が多くなる。

末尾の有糸分裂ではないかと思われるものが時々見えるが、もしこれが有糸分裂であれば赤芽球になるも可能性が多いものとする。

さけ稚魚の白血球と栓球の分化について



4 図 ふ化後30日目の稚魚の血球像

- 1 好塩基性赤血球 長さ(12.4 μ)
- 2 幼若赤血球 (15.5 μ)
- 3~4 第1次赤血球 3-(15.5 μ), 4-(12.4 μ)
- 5~9 幼若白血球 5~8-(12.4 μ), 9-(13.9 μ)
- 10 殻内にある粗粒白血球 (21.7 μ , 30.1 μ)
- 11 大リンパ球 (12.4 μ)
- 12 細粒白血球 (31.0 μ , 21.7 μ)
- 13 殻内にある単核球 (12.4 μ , 15.5 μ)
- 14 粗粒白血球 (12.4 μ)
- 15 細粒白血球 (24.8 μ , 27.9 μ)
- 16~20 種々様相を呈する粒球 17-(6.2 μ , 6.0 μ), 18-(9.3 μ , 6.2 μ), 19-(9.3 μ , 6.4 μ)
20-(6.2 μ)

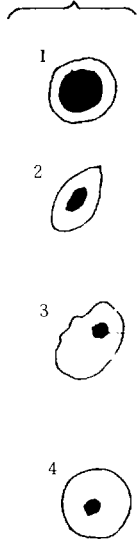
概況

特に幼若白血球を多く図示したがNo.3時代より成熟白血球が多くなり、粒球も桿状のものが多くなる。

さけ稚魚の白血球と栓球の分化について

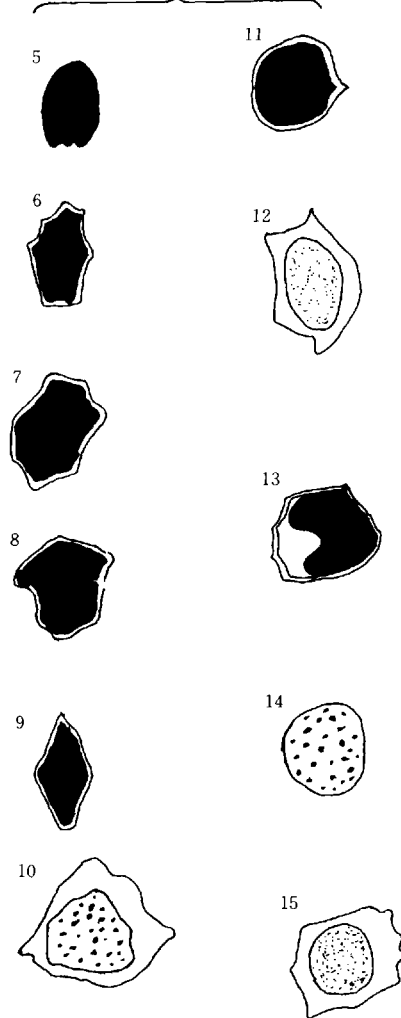
(Erythrocytes)

赤血球系



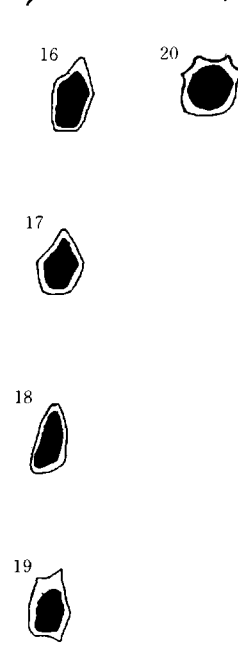
(Leucocytes)

白血球系



(Thrombocytes)

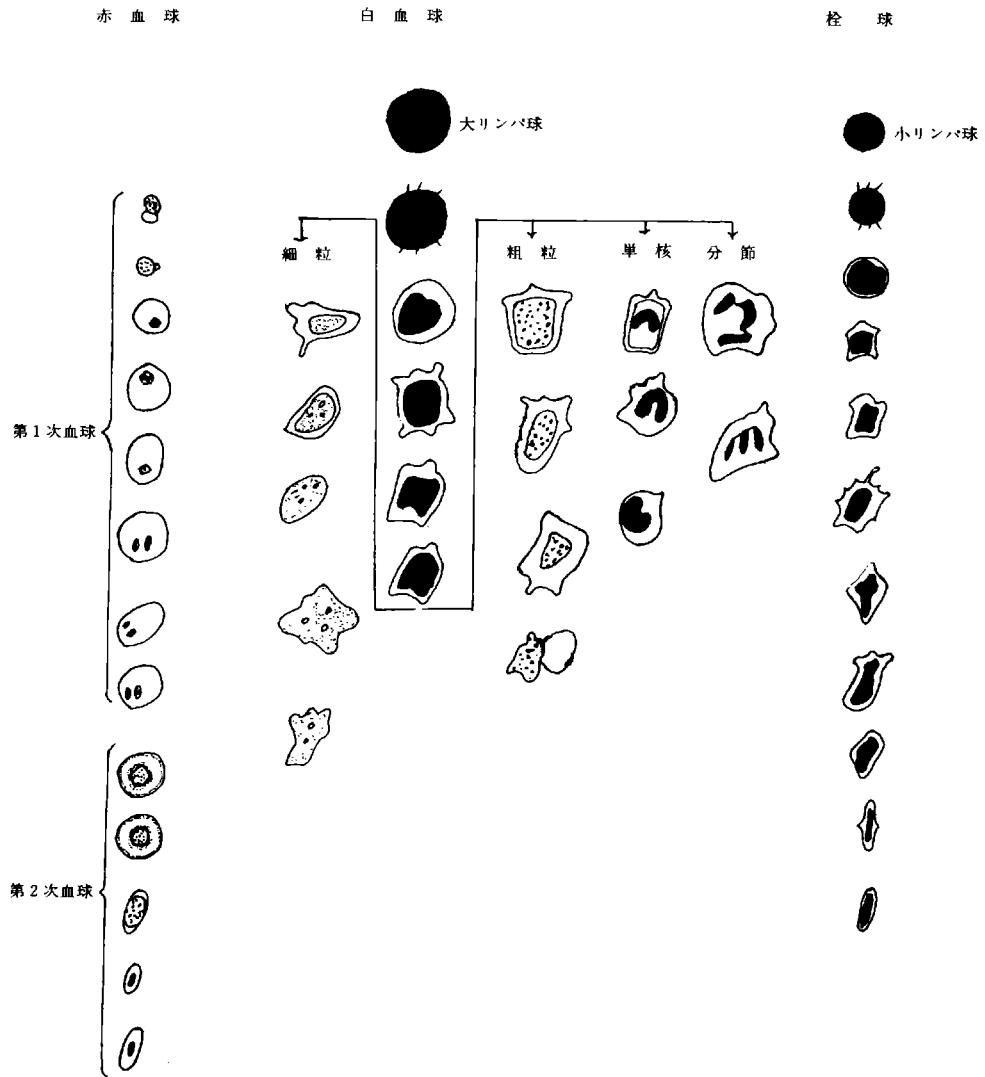
栓球



5 図 白血球及び栓球の分化過程

- 1) 大リンパ球が好塩基性の白血球幼若時代を経て細粒球, 粗粒球, 単核球, 分節球とにそれぞれ分化する。
- 2) 幼若白血球のどの段階から, どの白血球に分化するかは明確でないが, 好塩基性の幼若白血球の後半から核の染色と形とで識別可になる。
- 3) 栓球は小リンパ球から分化する。栓球も亦イボ状突起を出す時代があり, その後いろいろな形を示すが最終の形は桿状である。
- 4) 赤血球は, 観察中に出現した一部を参考にした。

さけ稚魚の白血球と粒球の分化について



6 図 白血球の分化

- 1) 大リンパ球は白血球に移行する幹球
- 2) 大リンパ球
- 2) 最初大リンパ球から繊毛状突起物が出て、やがてイボ状になり、逐次核は形を変える。図の(1)辺りから以後にいずれの白血球とも識別できない時代があり、好塩基性であり、これは白血球の幼若時代である。Beckerが好塩基性球と分類したのはこの時代の細胞と推定される。
- 3) 大リンパ球が白血球に移行後脱殻がある。
- 4) エオジン好性球には細粒と粗粒白血球があり、粗粒白血球が脱殻するとペルオキシダーゼ反応で陽性を示す。
- 5) 中性好性白血球には単核球と分節球があり、分節球は健康なときはII～IV分葉まで分布している。この白血球は、健康状態に変化が起ると組成に変化が起り、Arneth(1904)の核形移動説はさけにも適用できる。
- 6) 図の右上にある大リンパ球の赤道部位に有糸分裂と思われるものが時に見えるが、もし有糸分裂であるとするとこれから赤芽球が成生される可能性があるものと推測される。

