コイの実験的炎症における白血球の動態

鈴木 譲^{*1}・日比谷 京^{*2}

(1988 年 3 月 11 日受付)

Dynamics of Leucocytic Inflammatory Responses in Carp

Yuzuru SUZUKI^{*1} and Takashi HIBIYA^{*2}

^{*1}Dept. of Fish., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo,
Bunkyo, Tokyo 113, Japan

^{*2}Fac. of Agr. and Vet. Med., Nihon Univ.,
Setagaya, Tokyo 154, Japan

(Received March 11, 1988)

Sequential changes of leucocytes infiltration were studied quantitatively in orbital inflammation of carp caused by injection of 30% gum arabic solution (0.25 ml/each orbit). Inflammatory exudates together with orbital tissues were collected and treated with 5 mg of collagenase (125-200 U/mg) to prepare leucocytes suspension. The volume of the suspension was made up for 1 ml by adding Hanks solution, then the total number of leucocytes was counted with a hemocytometer. Number of each type of leucocyte was calculated as the product of percentage of the leucocyte type on a smear and the total number. Differential leucocytes counts in the peripheral blood were estimated on the smear preparations. From stamp preparation of head-kidney, ratio of three maturational stage of neutrophils i.e. mature, immature type I and type II was also estimated. The latter two may be comparable with myelocytes and promyelocytes.

Infiltration of neutrophils into the orbital tissue occurred rapidly within one day after the injection of the gum arabic. In advance of the migration, neutrophils showed acute increase in the peripheral blood and decrease in the head kidney. These results indicate that neutrophils stored generally in the head kidney are released to the peripheral blood before the migration to the inflamed lesion. Migrations of monocytes, basophils and lymphocytes were not so active as neutrophils and reached a maximum in about 4 to 6 days. Together with them, blood monocytes and basophils showed some increase, although blood lymphocytes decreased markedly in 6 hours.

白血球遊走は血管透過性亢進に続いて起こる炎症急性期を特徴づける最も顕著な反応である。魚類においても感染症や実験的炎症について、各種白血球遊走の観察がなされているが、定量的研究はあまりない。FINN and NIELSEN (1971 a, b) は炎症巣組織なすりつけ標本観察により、PHROMSUTHIRAK (1977) は創傷治癒過程の電顕観察により、各種白血球の数量比算定を試み、その経過を調べている。また哺乳類でしばしば行われている皮膚窓法も試みられている (SOMMER and BARTOS, 1981)。しかしこれらの研究では白血球の実数を算定している訳ではないので、各白血球の消長を正確に捉えるに至っていない。

い。他方、炎症巣に出現する白血球の実数を算定した研究には MACARTHUR *et al.* (1984) による plaice の腹腔を利用した実験がある。閉じられた体腔の利用は炎症における白血球遊走の研究に有効であるが、コイ科魚では腹腔が大きく、内臓が脆弱なため必ずしも適しているとはいえない。そこで本研究においては眼窩の利用を試みた。すなわち、コイの眼窩内組織にアラビアゴムで起炎させた後、炎症巣に遊走してきた白血球を採取し、各白血球の総数を算定しその経時的变化を調べた。さらに血液中や造血管管内での白血球の分布をも同時に調べ、それらの相互関係について検討を加えた。

^{*1} 東京大学農学部

^{*2} 日本大学農獣医学部

材料と方法

炎症実験

体重 60~80 g のコイ, *Cyprinus carpio*, を業者から購入して実験材料とした。実験は水温 24°C で行ない、実験中はコイ用飼料を与えた。

30% アラビアゴム溶液 (ハンクス液中, 1 N NaOH により pH 7.4 に調整) 0.25 ml ずつを左右の眼窩内に注射し起炎させた。6, 12 時間, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 30, 45 日の各時点で 5 尾ずつ取り上げた。取り上げ後, 背大動脈から採血 (0.3~0.5 ml) を行い, 血液中白血球算定に供した。次いで炎症巣白血球数算定用に眼球を摘出し眼窩内組織を採集した。さらに片方の頭腎を取り出し, 造血器中白血球検査に供した。

血液中白血球数算定

血液をハイエム液で 20 倍に希釈後, トーマの血球計算盤上で白血球数を算定し, 1 mm³ 当たりの総白血球数を計算した。別に血液塗抹標本を作成し, メイグリュンワルト・ギムザ染色を施して検鏡し, 白血球 500 個中の各種類毎, すなわち粒球, リンパ球, 単球, 好中球, 好塩基球の比率を求め, これと総白血球数とから各白血球数を算出した。塗抹標本上の白血球の分類は神代 (1955) によったが, 偽好酸球についてはより一般的な好中球という呼称を用いた。

炎症巣白血球数算定

眼窩周囲の皮膚をメスで切り開き, 注射器およびピンセットを用いて滲出液や眼窩内組織 (眼筋, 視神経は除く) をすべて集め, シリコン塗付した目盛付共栓試験管に取った。5 mg のコラーゲナーゼ (Sigma; 125-200 U/mg) を加え, ハンクス液で全量を 1 ml にした。随時軽く攪拌しながら室温に 1~3 時間放置し, 結合組織の塊が

十分溶解するを待って激しく攪拌し白血球を均一に懸濁させた。この懸濁液の一部をトーマの血球計算盤上にとって検鏡し, 大型の白血球すなわち単球, 好中球, 好塩基球の総数を求めた。残りの懸濁液は遠心し (3000 rpm 5 分), 沈殿にヘパリン添加コイ血清を加えて再懸濁させた後, 塗抹標本を作成した。標本はメイグリュンワルト・ギムザ染色を施して検鏡し, 白血球 100 個中の各白血球の比率を求め, 前記白血球総数とから各白血球数を算出した。なおマクロファージは区別せず単球に含めた。また小型血球のうち明らかなリンパ球以外のものは識別困難な場合もあり, 粒球および不明としたため粒球数は算定しなかった。

なお白血球算定は一方の眼球についてのみ行った。

頭腎内の成熟・未熟好中球の分類および比率算定

頭腎をスライド上に取り, 肉厚カバーガラスを用いて少量のヘパリン添加コイ血清と共に十分均一になるように押し潰した後, 一部を別のスライド上に塗抹した。これに猪子・糸賀 (1974) の方法によりベルオキシダーゼ染色を施したものとメイグリュンワルト・ギムザ染色したものと比較検討を行い, 頭腎内好中球を成熟段階に応じた分類を試み, 後述のように 3 段階, すなわち成熟好中球, 未熟好中球 type I, 未熟好中球 type II に分けることにした。

炎症経過中, 頭腎における各段階の好中球の比率は, 同様に作成した標本について, メイグリュンワルト・ギムザ染色を施して検鏡し, 3 者の合計 100 個の血球について求めた。

結 果

頭腎内好中球の発達段階に基づく分類

ベルオキシダーゼ反応は好中球のみに認められたの

Fig. 1. Neutrophils of the head-kidney. ($\times 1850$). A: Mature neutrophil with rod-shaped nucleus and unstained cytoplasm. B: Immature neutrophil type I. The azure granules (arrows) are scattered in the unstained cytoplasm. C and D: Immature neutrophil type II. The cytoplasm is stained basophilically. The azure granules (arrows) are scattered (C) or concentrated (D) in the cytoplasm.

で、これを指標に未熟好中球を他の未熟血球と区別することが出来た。その結果頭腎内で明らかに好中球系と考えられる血球について成熟好中球、未熟好中球 type I、未熟好中球 type II の 3 つに分けることが出来た。それぞれの特徴は以下のようになる。

成熟好中球 (Fig. 1A): やや粗大なクロマチン網工を示し、桿状または分葉した核をもつ血球でペルオキシダーゼ陽性顆粒が細胞質に充満している。メイグリュンワルト・ギムザ染色では細胞質は不染性でわずかにエオンで染まる微細な顆粒が認められる。

未熟好中球 type I (Fig. 1B): 大きさおよびペルオキシダーゼ陽性顆粒の分布は成熟好中球と同様であるが、核は楕円形で比較的大きく、クロマチンが微細な網状である。メイグリュンワルト・ギムザ染色では同様の核の特徴と、不染性の細胞質中にアズール顆粒が散在していることで他と識別される。

未熟好中球 type II (Fig. 1C and 1D): 微細網状のクロマチン網工をもつ楕円形ないし円形の大きな核と、塩基好性の細胞質をもつのが特徴で、ペルオキシダーゼ陽性顆粒は比較的少なく、しばしば細胞質の一部に凝集している。メイグリュンワルト・ギムザ染色でも同様の核、細胞質の特徴が見られ、type I と同様アズール顆粒が認められる。type II は type I に比べより未熟な段階とみなされる。

炎症巣・血液中白血球、頭腎内好中球の量的変動

炎症巣、血液中には赤血球、栓球、リンパ球、単球、好中球、好塩基球が見られた。これらの内赤血球、栓球を除いた各血球数の経時の変化は Fig. 2-6 に示した。

リンパ球 (Fig. 2) は、炎症巣ではかなり変動が大きい、3~10 日後の増加は明らかに認められた。また 30 日後にもかなり多数見られた。血液中リンパ球は白血球中最も多い成分であったが、起炎後急速に減少し、6 時間~3 日後にはかなり低レベルであった。

単球 (Fig. 3) はかなり緩やかな変化を示した。炎症巣での増加は 1 日後で認められるようになり、5 日後に最大となった。減少も遅く、30 日後でもかなりの数が見られた。血液中単球数は 1~7 日後に若干の上昇が認められた。

好中球 (Fig. 4) は炎症巣に最も急速かつ大量に出現した。1 日後には最高となり、その数は単球の最高値を上回っている。その後、出現時ほどではないがかなり速やかに減少した。血液中好中球の変化はさらに急激で、12 時間後には最高となり、その数は平常時の約 10 倍に達していた。2~3 日後には急速に元のレベルへと減少し

Fig. 2. Changes in the lymphocyte counts in the inflamed orbital tissue and in the peripheral blood after injury. Each point with vertical bars represents the mean and SEM.

Fig. 3. Changes in the monocyte counts in the inflamed orbital tissue and in the peripheral blood after injury. Each point with vertical bars represents the mean and SEM.

Fig. 4. Changes in the neutrophil counts in the inflamed orbital tissue and in the peripheral blood after injury. Each point with vertical bars represents the mean and SEM.

た。

頭腎内好中球の変化では (Fig. 5) 成熟好中球の急速な減少が顕著で、12 時間で最低のレベルに達し、数日間低

Fig. 5. Changes in the ratio of three maturational stages of neutrophil in the head kidney, mature, immature type I and type II after injury. Each point with vertical bars represents the mean and SEM.

Fig. 6. Changes in the basophil counts in the inflamed orbital tissue and in the peripheral blood after injury. Each point with vertical bars represents the mean and SEM.

レベルが続いた。未熟好中球 type I は 1 日後までに急増したがすぐ元のレベルに戻り、以後安定していた。type II は 2 日後までに増加、以後高いレベルで安定しており、回復は 15 日以後であった。

好塩基球 (Fig. 6) は反応が遅く、炎症巣への遊走のピークは 6 日後であった。その後 10~20 日後でもかなり高いレベルに留まった。血液中好塩基球は変動が大きい、6 時間後の一時的減少、12 時間~10 日後の増加が見られた。

考 察

本研究の基礎となるべき魚類の白血球の分類については数多くの研究がなされているが、用語の不統一など多くの問題が残されている。

今回の実験ではコイの血球として、赤血球、栓球、リンパ球、単球、好塩基球が認められた。好酸球は FEY (1966) の報告と同様認められなかったが、神代 (1955)、池田ら (1986) はその存在を報告している。魚の系統による違いもあるかもしれないが、分類基準の違いによる可能性も高い。好塩基球についてもこれまで様々な名称で呼ばれていることから混乱を生じているが、既報 (SUZUKI, 1986a) のようにこの名称が正しいと考えられる。

好中球の幼若型はペルオキシダーゼ反応を分類の基礎に用いたが、硬骨魚では好中球のみが強陽性を示すことから (神代, 1955; FEY, 1966; BIELEK, 1981)、指標として有効であった。未熟好中球 type II→type I→成熟好中球という成熟段階で見られた変化は以下のようにまとめることが出来る。核については大きさの減少、円形→楕円形→桿状→分葉という形態の変化、微細→粗大というクロマチン網工の変化、細胞質では塩基好性→不染色性という染色性の変化、そしてアズール顆粒の消失である。これらの変化は哺乳類における中性好性前骨髄球→未熟骨髄球→骨髄球→後骨髄球→好中球という成熟過程における変化によく一致しており、我々の分類は十分信頼できるものとする。これらの諸性状の変化、あるいは有糸分裂能力の有無などを詳しく調べれば発達段階をさらに細かく分けることも可能と思われる。

BIELEK (1981) は電顕による顆粒の詳しい観察を基に、哺乳類の分類に準じて骨髄芽球 (myeloblast)、前骨髄球 (promyelocyte)、骨髄球 (myelocyte) に分けている。我々の type I, type II はおそらく前骨髄球、骨髄球に相当するものと思われるが、より詳細な検討が必要であり、ここではあえて type I, type II と呼んでおいた。

ELLIS (1976) は Plaice の腎臓中の幼若顆粒球を調べ programuloblast と granuloblast を区別して報告しているが、我々の未熟好中球 type I, type II は granuloblast をさらに分けたものと考えられる。我々はペルオキシダーゼを指標としたが、骨髄芽球あるいは programuloblast に相当する血球にはその酵素がないため他の血球、例えば赤血球、単球、好塩基球の幼若型との識別は出来なかった。

SOVENYI and KUSUDA (1987) は好中球の発達段階を 5 つに分けているが、その基準は核と細胞質の面積比だけであり、各段階での質的差異が明瞭でないため、我々の分類との関係は明らかでない。

魚類の炎症における血球の遊走は、哺乳類の場合と同様、好中球、単球の順で起こることが組織学的観察などにより確認されている (WEINREB, 1958; FINN and NIEL-

SEN, 1971a, b; PHROMSUTHIRAK, 1977; SOMMER and BARTOS, 1981)。それに伴い血液中の好中球, 単球が増加するとの報告もなされている (FINN and NIELSEN, 1971a)。今回の実験ではこれらの変化を時間的にも数量的にもより明確に捉えることができ, さらに造血器との関係についても新たな知見を得ることが出来た。

炎症巣, 血液, 頭腎の各部における好中球の変化を比較して見ると, 起炎 12 時間後には頭腎内の成熟好中球の減少, 血液中好中球の急増が認められ, 同時に炎症巣の好中球の増加が見られる。これらの変化から, 好中球は造血器官である頭腎に貯蔵されていたものが起炎刺激に伴い血液中に放出され, 炎症巣へ遊走していくという経路をたどることが考えられ, 造血組織での顆粒白血球の貯留は少ないとする安田ら (1984) の報告とは異なる結論となった。血液中好中球の増加量は血液総量が体重の 5%, 3~4 ml 程度と仮定すると, 6 時間後に $4 \sim 5 \times 10^6$, 12 時間後に $12 \sim 16 \times 10^6$ 程度となり, 炎症巣での増加, すなわち一方の眼窩で 3×10^6 程度という値に比べて急速かつかなり多量なものであった。

この好中球の出現は, MACARTHUR *et al.* (1984) の plaice の実験的炎症に比べても極めて急速なものであった。すなわち, plaice において, グリコーゲンまたは *Vibrio alginolyticus* で起炎した時の好中球のピークは 2~3 日後であるという。これは魚種, 刺激物質, 水温 (plaice では 11°C) の違いによるものと考えられる。

好中球の炎症巣への動員機構については, 白血球遊走因子の面から研究が進められており, 魚類でもいくつかの報告がなされている (GRIFFIN, 1984; MACARTHUR *et al.*, 1985; SUZUKI, 1986b)。しかし前述の様な血液中での急速な増加についてはそのような遊走因子だけで説明できない。炎症急性期には好中球の代謝系変化 (NAGAMURA and WAKABAYASHI, 1985) をはじめ, 様々な因子による複雑な反応が起こっていることが考えられる。血中白血球増多因子のようなものを考えることが必要なかもしれない。

単球やマクロファージは好中球に続いて出現する。この両者には明確な区別はなく, ELLIS (1977) は血管内にあるものをマクロファージの前駆細胞として単球と呼んでいる。今回の実験においてもその考えに基づき, 両者を区別することなく単球という呼称に統一して扱っている。結合組織中には組織球と呼ばれるマクロファージが平常時にも若干存在しているが, 血液中の単球の変化から考えて, 炎症巣のマクロファージは大部分血液単球由来と考えられる。

好中球と単球の出現時間の差は運動能力の差による部分もあるものと思われる。しかし HAYASHI *et al.* (1984) によれば, モルモット皮膚の炎症局所における主なマクロファージ遊走因子はいずれも好中球プロテアーゼと関連があるという。この事は先行する好中球浸潤がマクロファージ遊走の鍵を握っていることを示すものであり, 炎症巣への出現時間の差を説明するものである。これらの血球の炎症における意義は, 第一に活発な貪食能があり, 起炎物質や組織破壊産物の処理に当たっているが, 出現時間の差はその中での役割の違いにもつながるものと考えられる。

血中リンパ球数は個体差や算定誤差が大きく病気の指標とはなりにくいと考えられてきた (McCARTY *et al.*, 1973; BLAXHALL and DAISLEY, 1973)。しかし今回の実験では炎症の影響により明らかに急速かつ長期間にわたる減少が認められた。一方炎症巣へのリンパ球遊走は単球とほぼ同時期に見られるが数は少ない。リンパ球の機能は抗原の認知, 抗体産生など免疫系の中心であり, 炎症と免疫とは極めて密接かつ複雑な関係にあることから, リンパ球数の変動にも様々な要因がからんでいるものと思われる。

好塩基球もリンパ球, 単球とほぼ同時期に見られるがその数は少ない。血液中的増加はここでも炎症巣での増加に対応する形で若干認められた。起炎 6 時間後一時的に血液中的の著しい減少が見られたが, すぐ回復しており, その意味は明らかではない。

哺乳類では好塩基球の機能として, ヘパリンやヒスタミンの産生が知られている。しかし BARBER and WESTERMAN (1978) によれば, ここでいう好塩基球に相当する PAS 陽性顆粒球はヒスタミンを産生しないという。また好塩基顆粒の組織化学的性状の違いからヘパリンもないと考えられる (SUZUKI, 1986a)。さらに比重が極めて大きいという際だった特徴をもっている (SUZUKI, 1988)。しかしその機能は全く分かっておらず炎症における役割についても今後の検討課題である。

炎症機構の解明のためには優れた実験的炎症モデルが必要である。今回の実験では炎症の場として眼窩を用いたが, この方法は FINN and NIELSEN (1971b) も試みており, その利点として一つの閉鎖した体腔であること, 腹腔のように脆弱な臓器がなく実験操作が用意であることが上げられる。比較的高等な魚種ではコイ目, サケ目などとは異なり, 左右の眼窩が独立せずにつながっているためこの方法の適用は難しいかもしれないが, 魚類の炎症における白血球の研究には優れた方法と考えられ

る。

参考文献

- BARBER, D. L. and J. E. M. WESTERMAN (1978): Observations on development and morphological effects of histamine liberator 48/80 on PAS-positive granular leukocytes and heterophils of *Catostomus commersoni*. *J. Fish Biol.*, **13**, 563-573.
- BIELEK, E. (1981): Developmental stages and localization of peroxidase activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* RICHARDSON). *Cell Tissue Res.* **220**, 163-180.
- BLAXHALL, P. C. and K. W. DAISLEY (1973): Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.*, **5**, 771-781.
- ELLIS, A. E. (1976): Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. *ibid.*, **8**, 143-156.
- ELLIS, A. E. (1977): The leucocytes of fish: A review. *ibid.*, **11**, 453-491.
- FEY, F. (1966): Vergleichende Hämozytologie niederer Vertebraten III. Granulzyten. *Folia Haematol.* (Leipzig), **86**, 1-20.
- FINN, J. P. and N. O. NIELSEN (1971a): The inflammatory response of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, **3**, 463-478.
- FINN, J. P. and N. O. NIELSEN (1971b): The effect of temperature variation on the inflammatory response of rainbow trout. *J. Pathol.*, **105**, 257-268.
- GRIFFIN, B. R. (1984): Random and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leukocytes: activation by antibody, complement, and normal serum components. *Dev. Comp. Immunol.*, **8**, 589-597.
- HAYASHI, H., M. HONDA, Y. SHIMOKAWA and M. HIRASHIMA (1984): Chemotactic factors associated with leukocyte emigration in immune tissue injury: their separation, characterization, and functional specificity. In: International Review of Cytology, Vol. 89 (ed. by G. H. BOURNE and J. F. DANIELLI). Academic Press, New York, pp. 179-250.
- 池田弥生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎 (1986): 「魚類血液図鑑, 緑書房, 東京」188-191.
- 猪子恵司・糸賀 敬 (1974): オトリジン使用による白血球 Peroxidase 反応の検討. 九血会誌, **24**, 1-6.
- 神代惟俊 (1955): 魚類の白血球に関する研究. 京都大学医学部解剖学第2講座論文集, **3**, 1-43.
- MACARTHUR, J. I., T. C. FLETCHER, B. J. S. PIRIE, R. J. L. DAVIDSON and A. W. THOMSON (1984): Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. *J. Fish Biol.*, **25**, 69-81.
- MACARTHUR, J. I., A. W. THOMSON and T. C. FLETCHER (1985): Aspects of leucocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa* L., *ibid.*, **27**, 667-676.
- MCCARTY, D. H., J. P. STEVENSON and M. S. ROBERTS (1973): Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). I. The Kamloops variety. *ibid.*, **5**, 1-8.
- NAGAMURA, Y. and H. WAKABAYASHI (1985): Changes in glycogen content of neutrophils in eel, *Anguilla japonica* by bacterial infection. *Fish Pathol.*, **20**, 389-394.
- PHROMSUTHIRAK, (1977): Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. *ibid.*, **11**, 193-206.
- SOMMER, C. V. and J. M. BATOS (1981): *In vivo* leukocyte migration assay in rainbow trout with a flexible silicone coverslip. *J. Comp. Pathol.*, **91**, 443-445.
- SOVENYI, J. F. and R. KUSUDA (1987): Kinetics of *in vitro* phagocytosis by cells from head-kidney of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, **22**, 83-92.
- SUZUKI, Y. (1986a): Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 1895-1899.
- SUZUKI, Y. (1986b): Neutrophil chemotactic factor in eel blood plasma. *ibid.* **52**, 811-816.
- SUZUKI, Y. (1988): Demonstration of heavy basophils in carp peripheral blood by Percoll density gradient centrifugation. *ibid.* **54**, 1257.
- WEINREB, E. L. (1958): Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Hematology: under normal and experimental conditions of inflammation. *Zoologica N.Y.*, **43**, 145-154.
- 安田恒雄・延東 真・境 正・木村正雄 (1984): 炎症時のコイ顆粒白血球に関する組織化学的研究, 日水誌, **50**, 1375-1380.