魚類の血球組成—IV.

血液塗抹標本にみられる「核影」について

結 城 了 伍

(1960 年 2 月 29 日受理)

BLOOD CELL CONSTITUENTS IN FISH—IV.

ON THE “NUCLEAR SHADOW” FOUND IN BLOOD
SMEAR PREPARATION

Ryôgo Yûki*

1) In smear preparations of fish blood, the formless bodies are often observed, which are different from any of the blood elements such as erythrocytes, leucocytes and spindle cells. These bodies are not provided with any fundamental structure like that of the usual blood cell; they are colored light purplish red by Wright-Giemsa staining (Fig. 1a~d). The reason why the author calls this special body a “Nuclear shadow” and its origin are described in the present paper.

2) It is presumable that the blood cell which has become easily broken down by some factors disintegrates at the time of smear preparation leaving its nucleus to be a nuclear shadow.

3) Blood cells in the senescent state are considered to be one sort of the cells which are easily broken down by smear preparation. Judging from the constituent ratio of the circulating blood cells, almost all of the nuclear shadows owe their origin to erythrocytes. Therefore, it may be said that the degree of the occurrence of nuclear shadows in the smear preparation indicates indirectly the content of senescent erythrocytes in the circulating blood.

4) Abnormally there are found a number of nuclear shadows when a smear preparation is made using the blood which has partly clotted (Fig. 5). Such a phenomenon may be correlated with the clotting factor of fish erythrocytes, the existence of which has been demonstrated by the author.¹⁵⁾

5) As is clear from the above findings, that must be justified in judging whether or not the nuclear shadows observed were caused by physiological changes of fish.

魚類の血球組成が、飼育水に含まれているごく微量の酢酸鉛によつて影響を受けることを DAWSON¹⁾は指摘している。また、彼は微量鉛の影響判断に、体液や組織の化学分析によるよりも、循環血液中の赤血球にみられる損傷の程度を調べることの方が、より満足すべき結果の得られたことを、*Necturus* で観察している。²⁾ 最近、OSTROUMOVA³⁾ はニジマス、コイ、サケの血球を観察し、その組成と環境要因との関係について興味深い報告をしている。このように下等脊椎動物においても、血球組成と生体機能との間に密接な関係がみられ、しかも生体の受けた影響が血球組成にきわめて鋭敏に反映することは、この反応を生物学的指標として、病態生理の研究に応用できる可能性を示している。しかし、そのためには血液塗抹標本上での血球

* 北海道大学水産学部 (Fac. Fish., Hokkaido Univ., Japan).
(印刷費負担)

像について、正確な観察と、その組成比の変動についての適確な見解をもつことが必要であるが、現在、なお多くの問題が残されている。たとえば、血液塗抹標本上において、しばしば観察されるにもかかわらず、いまだに明解な解答が与えられていない像の1つに、本論文に記述する「核影」の問題がある。この論文においての「核影」とは、塗抹標本の May-Giemsa あるいは Wright-Giemsa 染色において、明るい赤紫色に染まる形態不定の瀰漫性の像である。森下⁴⁾はガマ血液においてかかる像を観察し、これは赤血球から放出された細胞質であり、将来、白血球の核となるもので、lymphoid element と称すべきであると論じている。筆者は本論文において、このような赤紫色に染まる形態不定の像を、「核影」と呼称するのが適当である理由と、その成因について記述した。

実験材料および方法

この研究に用いた魚種は養殖されたニジマス成魚である。採血は尾柄部切断によつたが、切断に先立ち、乾布でぬぐつた尾柄部は、更に 70% アルコールで消毒した。血液は塗抹後直ちに乾燥し、Wright-Giemsa 染色および FEULGEN-ROSSENBECK の核反応の方法を直ちに施行した。Wright-Giemsa 染色は前報⁵⁾と同様、Wright 染色液で 2 分間固定し、Mc JUNKIN-HADEN の緩衝液で先の液を 2 倍に稀釈して 5 分間染色、その後 SÖRENSEN の pH 6.8 磷酸緩衝液 5 容に、蒸溜水 95 容を加えた稀釈液 9 容に対し、Giemsa 原液 1 容を含む稀釈 Giemsa 液でさらに 10 分間染色した。FEULGEN-ROSSENBECK の核反応は LISON⁶⁾の記載にしたがつた。なお、細胞質を明確にするため、70% アルコールに溶した 0.5% light green で後染した。

観察および論議

「核影」と呼称する理由

ここに「核影」と呼ぶ塗抹標本において観察される像は、緒論にも簡単に述べたように、Wright-Giemsa 染色で、明るい赤紫色に染まるエオジン強染性を示すものである。その形態は、Fig. 1a~d に示すように極めて変化に富み、特定の形態を示さない。周縁は不鮮明で明確な輪廓をもたず、膜層はみられない。内部は均一な相をなしているが明るく見える小さい空隙に富み、しかも細胞としての一般的構造はみられない。しかし、これらの像には FEULGEN-ROSSENBECK の核反応が認められるから、DNA の存在が考えられる (Fig. 2a, b)。このような点から、この形態不定のエオジン強染性の像は、細胞核と何らかの関係があるものと推察される。なお、その形態あるいは染色性 (Wright-Giemsa 染色) から移行形をトレースすると、Fig. 3a~d に示すような像になるものと推察される。この段階では、形態不定の像の周辺には淡褐色に染まつた、あたかも赤血球細胞質に類似する影像がみられる。さらにつぎの段階では、Fig. 4a~d の形態を経て、成熟赤血球に連続するものと考えられる。この成熟状態の赤血球の核は、濃紫色に染り、核網は粗である。それでは、Figs. 3, 4 のような現象はなぜ生ずるのであろうか。これについて著者は、破壊されやすくなっていた赤血球が、塗抹標本作成時の物理的衝撃によつて形態がゆがめられ、あるいはまた破壊されて、その甚だしい状態が核のみの残影として留まつたものであろうと推察している。この破壊されやすくなつた状態の赤血球とは、核の染色状態から、老化赤血球ではないかと考えられる。すなわち、細胞核の染色性は、その退行性変化に際して、染色質は好酸性と塩基性とに分離するとともに、好酸性染色質は暫時増加し、死滅時には核は全く好酸性となる。⁷⁾たとえば、Fig. 4 の段階における核の染色性は、すでに好酸性を呈している。つまり、赤血球の老化の程度によつて破壊される状態も異なり、図示したような各段階の像が観察されるものと考えられる。

以上の諸点から、この形態不定の Wright-Giemsa 染色によつて、赤紫色に染色される像は、血球核由来の残存物であるといえよう。魚類のように、造血器官の機能的分化が遅れている動物では、成熟個体においても循環血液中に常時未熟血球が観察される。^{3,8)}しかし、これとは逆に、老化血球の廃棄処理を行なう器官もまた不完全ではないかと考えられる。このため老化血球が、循環血中に常時出現し、それらが塗抹標本作成時の物理的衝撃によつて破壊されたものであろう。あるいはまた、Fig. 1 のような完全な核のみの残

影は、恐らく循環血液中にあつてすでに血球膜は消失していたものか、あるいは採血時における圧の変化によつて、血球膜が破壊されたものではないかと考えられる。これらの諸点から、この像は老化血球の核の残影と推察し、これを「核影」と呼称したい。人血では、これに類似した血液像が急性および慢性の淋巴性白血病患者で観察される。これは破壊した淋巴球核の残影で、この像を「グンプレヒト氏核影 (Gumprechtsche Kernschatten)」と呼んでいる。⁹⁾ しかし、魚類のような下等脊椎動物の場合には、これはただ単に「核影」と称するのが適当である*。

細胞退化の際に起る核崩壊の過程については、多くの観察があるが、これらはすべて動物の体表皮・腸・神経細胞あるいは間質細胞等の切片標本^{10,11)}であるため、これらの観察結果は塗抹標本による血球核のそれとは必ずしも一致しているとはいえない。しかし、「核影」に FEULGEN-ROSSENBECK の核反応が認められることから、白上・吉松¹⁰⁾が指摘しているように、これらの「核影」は核退化過程の初期段階にあるものが、塗抹標本上で観察されたものと考えられる。なお、森下⁴⁾はgamma血液の塗抹標本で、Giemsa 液に赤染する瀰漫性の像について、これは赤血球の細胞質が放出されたもので、これは globule を形成し、淋巴球の核となるものであるから、この像は lymphoid element と呼び得るものであると論じている。この Giemsa 液に赤染する像は、カラー写真で提示しているが、著者がここで指摘する「核影」と全く同一像であると認められる。しかし著者の観察では、既述のように「核影」とみるのが妥当であると思う。

OSTROUMOVA³⁾はニジマスおよびサケの血液塗抹標本において、核のない、不整形で赤味がかったスミレ色に染まる像を観察している。この像について、彼女は恐らく哺乳動物の血小板に類似するものであろうと推察しているが、その記載内容から推察して、この像は著者が指摘する「核影」と同一像であろうと判断される。

赤血球以外の「核影」

上述の「核影」は赤血球に由来するものであるが、赤血球以外の血球に由来する核影の存在ももちろん考えられる。Figs. 3, 4 のような状態においては、細胞質は淡い橙色を呈しているが、多くの標本につき観察を行なうと、時としてこのような段階において、明るい淡い青色に染色されている崩壊形の血球がまれにみられる。これは恐らく、monocyte あるいは lymphocyte の老化過程にあつた細胞が、塗抹時に変形されたものであろう。正常形態におけるこれら白血球の細胞質は、前報⁵⁾に示したように Wright-Giemsa 染色によつて、lymphocyte では濃い青色、monocyte ではやや薄い青色である点から、これら白血球の崩壊像ではないかと推定される。さらに紡錘型細胞の特性^{12,13)}から、この種の細胞に由来する「核影」も当然存在するものと考えられる。

なお、「核影」とは純然たる核の残影のみを指すのであるから、どの血液細胞に由来する「核影」であるかの断定は不可能であるが、血球組成の比率を前報¹⁴⁾に述べたような方法によつて計測した場合、成熟赤血球 10,000 に対する各種細胞の数量は、monocyte 7~10, lymphocyte 340~380, 紡錘型細胞 30~40 である点から、これらに由来する「核影」はむしろまれであつて、大多数のものは赤血球に由来するものとみなされる。

「核影」の異常増多現象

「核影」の成因については既述のような点が考えられるが、異常に「核影」が多数みられる場合がある (Fig. 5)。このような現象については、下記の2つの原因があげられる。

その1つは、塗抹標本作成時に、血液採取後塗抹までに時間がかかり過ぎたため、部分的に凝血を起した場合である。このような条件下にできた標本上には、肉眼的にも明らかに一部の血液がかたまつて塗抹された形跡がみられる。あるいは、肉眼的にはそのような形跡のない場合でも、採血後塗抹までに時間がかかり過

* これらの見解、呼称については東京医大加藤勝治教授の助言を頂いた。ここに深甚の謝意を表する。

きた標本では、紡錘型細胞特有の異常な凝集態がみられる (Fig. 6a, b)。このような条件下にできた塗抹標本には、必ず「核影」がおびただしく多数みられる (Fig. 5)。この「核影」の異常増多現象は、別報¹⁵⁾に述べた魚類赤血球にみられる凝血因子と密接な関連性があるものと考えられる。すなわち、ニジマス、サケ、カラフトマスの赤血球にみられる凝血因子とは、トロンボプラスチン形成能ならびにフィブリン形成促進能である。赤血球のこのような作用能は、血球のままの状態において発揮される点より考えて、血球膜と何んらかの関係があるものとみなされる。したがって、上記のような凝血過程が進行した条件下の血液塗抹標本で「核影」が異常に増加する現象は、赤血球が凝血に関与したため、血球膜に変質を来し、塗抹時の物理的衝撃によつて崩壊され、その結果「核影」が増多したのではないかと考えられる。

「核影」異常増多現象の他の原因として考えられることは、造血器官の障害あるいは環境要因によつて受けた魚体の生理的障害にもとづく老化赤血球の異常増加である。たとえば、X線照射による造血器官の障害にとともに、幼若赤血球の補給が減少し、引き続いて起る「核影」増多現象、あるいはまた、絶食にとまなう「核影」増多現象は、明らかに魚体生理の障害によるものと考えられる。しかし、この魚体生理と「核影」との関係については改めて報告することとする。

以上述べたように、「核影」のできる直接的原因は、崩壊しやすい状態にあつた血球が、塗抹時の物理的衝撃によつて崩壊するのであるが、この根本的原因の1つとして、血液凝固に関連した問題が介在するから、それと魚体の生理状態にもとづく「核影」増多現象とを混同しないようにする注意が必要である。特に魚類のように血液凝固が速やかに起る血液においては、¹⁶⁾ 塗抹標本作成時における「核影」の存在意義についても、十分な考慮を払つて検討されなければならない。

摘 要

- 1) Wright-Giemsa 染色による魚血塗抹標本にみられる、明るい赤紫色に染色される形態不定の像を、「核影」と呼称する理由と、その成因について記述した。
- 2) 「核影」は崩壊しやすい状態にあつた血球が、塗抹標本作成時の物理的衝撃によつて崩壊した血球核の残影とみなされる。
- 3) 崩壊しやすい状態の血球とは、老化した血球とみなされる。血球の組成比率からみると、「核影」の主体をなすものは赤血球である。したがって、「核影」の出現率の大小は老化赤血球の含有の程度を示す指標となる。
- 4) 塗抹標本作成時に、すでに血液凝固が進行している場合には、「核影」が異常に増加する。これは赤血球にみられる凝血2因子と関係があるものと考えられる。それ故、「核影」の存在意義については、それが魚体の生理にもとづくものであるか、凝血に関連するものであるかの判定が重要である。

終りに、終始御指導御助言を賜つた小林新二郎教授ならびに山本喜一郎教授に厚く感謝の意を表する。なお、本研究の出費は文部省試験研究費によつた。

文 献

- 1) DAWSON, A. B.: *Biol. Bull.*, **68**, 335 (1935).
- 2) —————: *J. Morph.*, **55**, 349 (1933).
- 3) OSTROUMOVA, I. N.: *Известия ВНИОРХ*, **43**, 1 (1957).
- 4) 森下敬一: 歯科学報, **57**, 441 (1957).
- 5) YŪKI, R.: *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, **8**, 36 (1957).
- 6) LISON, L.: *Histochimie et cytochimie animales, principes et méthodes. Paris, Gauthier-Villars* (1953).
- 7) 浜崎幸雄: 細胞核の生理と病理, 永井書店, 大阪 (1955).
- 8) DAWSON, A. B.: *Biol. Bull.*, **64**, 33 (1933).

- 9) 小宮悦造・古庄乙彦: 臨床血液図説, 克誠堂, 東京 (1942).
- 10) 白上謙一・吉松広延: 動維, **51**, 597 (1939).
- 11) WEEL, P. B.: *Z. Zellf.*, **27**, 65 (1937).
- 12) NAGATANI, Y.: *Yamaguchi J. Science*, **8**, 45 (1957).
- 13) 結城了伍: 動維, **68**, 111 (1959).
- 14) YŪKI, R.: *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, **8**, 264 (1958).
- 15) ———: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **26**, (1960).
- 16) 斎藤 要: 本誌, **19**, 1139 (1954).

PLATE I.

Explanation of figures

Excepting Fig. 2, all figures were photomicrographed from the Wright-Giemsa staining of the circulating blood in the rainbow trout.

Fig. 1a~d. Various forms of nuclear shadow, ca. 710 $\times$.

Fig. 2a and b. Nuclear shadow tested with Feulgen-Rossenbeck's nuclear reaction. The shadows are positive to this reaction, being stained pink similarly as are the nuclei of the erythrocytes, ca. 710 $\times$.

Figs. 3a~d and 4a~d. Various forms of the senescent erythrocytes transformed by the usual method of smear preparation, ca. 710 $\times$.

Fig. 5. An abnormal instance in which a number of nuclear shadows were found in a smear prepared purposely from partly coagulated blood, ca. 330 $\times$.

Fig. 6a and b. These figures were obtained from the same preparation as Fig. 5. In such an abnormal preparation, the spindle cells are usually found in clusters, several cells cohering with one another, ca. 710 $\times$.

PLATE I.