1) 魚類の血液細胞に関する諸問題、特にその顕微鏡的検査の吟味

結 城 了 伍*

血液細胞の顕微鏡的検査として、今回は血球数の算定と血球組成の比率測定との2項目について話を進めたい。そもそも、血球数や血球組成の比率というものは、正常健康魚でも生理的範囲内で常に動揺しているが、特定の実験条件下や環境条件の下、あるいは疾病時にはかなり鋭敏に、しかも複雑な変動を示すものである。この変動の中より、生理的意義を見出すことは必ずしも容易ではないが、一定の基準に基づいて、当を得た測定を行ない、基礎的資料を蓄積することによつて、この検査よりかなり解析的見解を下すこともできる。今までにも、魚類の血液細胞が生理的反応の指標として観察された例^{1)~12)}は多々あるが、測定方法や測定値の表現方法に統一を欠いているのが現状である。特に、血球の名称と分類は不統一である。そこで、魚類に即応した、しかも生物学的指標として用いるのに都合の良い血球の分類、測定法などを確立し、研究者相互の情報交換を便にすることが望ましい。このような見解のもとに、すでに発表されている幾多の研究者の報告^{1)~29)}、並びに尾崎³⁰⁾、天野³¹⁾の見解を参考として、筆者の観察^{32)~37)}を含めて総括したが、今後の討論の資料ともなれば幸である。

I. 塗抹標本による血球組成の測定

後述するように、Hayem 液使用によつて赤血球、白血球および栓球の実数は求められるが、各系に属する各種血球の詳細な消長を知ることは不可能である。この詳細な消長の中に、生理学的に意義のある情報を提供する場合が多々あるが、このような現象は塗抹染色標本によつて、初めて明らかにされるので、血球計算とともに、塗抹標本の観察は重要なものである。

1) 血球の分類 従来の報告にみられる魚類の血球の分類と名称は、一部の例外^{3) 9) 25) 26)}を除いてはほとんど人血球のそれにならっているが、適切でない点も多々ある。特に、血球組成の変動を、生物現象の指

Table 1. Classification of the blood cells for estimating the changes of their constituents in fish blood.

CELLS OF ERYTHROCYTIC SERIES 赤血球系細胞

Mature erythrocyte	成熟赤血球
Polychromatic erythrocyte	多染性赤血球
Basophilic erythrocyte	好塩基性赤血球
Senile erythrocyte	老化赤血球
Deformed type	膨潤形
Disintegrated type	崩壊形

Each cell group is indicated as % of the total in this series, respectively.

CELLS OF LEUCOCYTIC SERIES 白血球系細胞

Lymphocyte	リンパ球
Round lymphocyte	円形リンパ球
Peroxidase positive-leucocyte	ペルオキシダーゼ陽性白血球

Each cell group is indicated as a value relative to 10,000 cells of erythrocytic series, respectively.

CELLS OF THROMBOCYTIC SERIES 栓球系細胞

Fusiform thrombocyte	紡錘状栓球
Baculiform thrombocyte	桿状栓球

NUCLEAR SHADOW 核影

OTHER CELLS その他

* 北海道大学水産学部生理生態学教室 (Fac. Fish., Hokkaido Univ., Hakodate, Hokkaido).

標として用いるような場合は、その組成に適した分類が必要であらう。著者は Table 1 に示したように、魚類の血球組成を整理している。これに基づいて、これらの変動を実測しているが、合理的にその変動の実体を表現することができる。この方法は May-Giemsa 染色*とペルオキシダーゼ染色**の2標本を用いて行なうもので、これらの染色方法は脚註のように原法を多少変えることによつて、魚血に安定した良い染色が施こされる。

赤血球系細胞には成熟赤血球の外に未成熟赤血球（多染性および好塩基性）と老化赤血球とが属している。老化赤血球は循環血液中では正常形態を保っていたものと考えられるが、老化期に入つた血球は強靱性を失い、塗抹標本上では作成時の物理的衝撃によつて形態がゆがみ、Figs. 3 および 4 のように観察されるものと考えられる。

白血球系細胞はリンパ球と円形リンパ球以外の白血球をペルオキシダーゼ陽性白血球に一括しているが、この理由は YÜKI³²⁾を参照されたい。なお、実験条件下でのリンパ球と円形リンパ球の増減関係より推察して、後者は前者の未成熟細胞とみなされる。

栓球系細胞には紡錘状栓球と桿状栓球との2形態がみられるが、両者はいずれも崩壊しやすく、新鮮血の薄層標本を vital condition で観察すると崩壊する過程を見ることができ³⁴⁾。また、脱線維処理をした血液中には両者は完全に消失している³⁴⁾。このような共通点より、この2種を同一系統の血球とみなした。なお、前者の栓球には粘着性があり、採血状態や塗抹操作が悪いときは数個が粘着して観察される (Fig. 12)。それゆえ、この粘着性や前述の崩壊性より、作成した塗抹標本の良否が、この細胞の状態より判別できる。この細胞は、従来、spindle cell (紡錘形細胞)⁴⁾¹⁷⁾²⁰⁾³²⁾, thrombocyte (栓球)⁶⁾¹⁰⁾¹⁵⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁵⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾, gekernte Blutplättchen⁴⁰⁾などの名称で呼ばれているが、すべて同意語で、同一種の血球を指しているものとみなされる³⁰⁾³¹⁾。この細胞を白血球系に属するものとして観察している報告⁸⁾もあるが、人血の血小板 (blood platelet) に相当する独立した系統とみなすことには異論はないものと考えられる¹⁵⁾¹⁷⁾²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾³⁴⁾⁴⁰⁾。なお、前述の2形態は魚種によつて、あるいは年令によつて一方のみ存在することもある。

核影の成因および出現の意義については既報³⁷⁾の通りである。

その他の血球として、血液芽細胞 (hemocytoblast), 形質細胞 (plasmocyte), 組織球 (histocyte) が極くまれに観察される。

2) 血球組成の比率測定方法 測定を容易にするため、接眼レンズ (×10) に測定盤 (4×6 mm 短形を中央に刻したガラス板) を入れ、対物レンズには油浸系を用いて検鏡すると、測定盤に刻した区画は 65×

* May-Giemsa 染色³⁸⁾: 空気乾燥した塗抹標本に May-Grünwald 氏液 (あるいは Wright 氏液) を注ぎ2分間固定、この上にほぼ等量の McJunkin-Haden の緩衝液 (K_2HPO_4 6.63 g., $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.56 g., 蒸溜水 100 ml.) を注ぎ5分間染色、この液を捨て、ただちに稀釈 Giesma 氏液 (Sörensen の pH 6.8 磷酸緩衝液5容に蒸溜水 95 容を加えた液9容に、Giemsa 氏液1容を混合) でさらに10分間染色、水洗一乾燥—パルサム封入。

染色状態: 核はいずれの血球も濃赤紫色。ただし、老化赤血球の核は酸性色素に染まり、赤みを帯びている。細胞質は、成熟赤血球では橙赤色、多染性赤血球は暗い橙赤色、好塩基性赤血球は青みを帯びた橙色ないしは青色に外縁部程濃く染色。リンパ球および円形リンパ球ではわずかに見える細胞質は青藍色に、紡錘状栓球では淡青色、桿状栓球は薑色に染色。核影は明るい赤桃色。

** 佐藤・関谷のペルオキシダーゼ染色³⁹⁾: 空気乾燥した塗抹標本に1%硫酸銅水溶液を注ぎ数秒間固定。これを捨てただちに0.1%ベンチジン液 (E. Merck 社製ベンチジン粉末を乳鉢ですり、少量の蒸溜水でねりながら必要量を加え、加熱溶解後濾過、褐色瓶に保存。使用に際し必要量を温浴加熱し、結晶を溶し30~40°C に冷えてから3% H_2O_2 を100 ml に2滴の割合で加える) を満載すると、硫酸銅と反応してベンチジン青が形成される。2分間作用させた後強い水流で水洗、1%サフラニン水溶液で2分間対比染色。水洗一乾燥—暗所に保存。パルサムで封ざると陽性反応は消失する。検鏡時にグリセリンを滴下して油浸レンズを用いて観察。

染色状態: ペルオキシダーゼ陽性白血球の細胞質には鮮やかな青色ないしは青緑色の顆粒が一带にみられ、核は赤色に染まる。他の血球はすべて陰性反応を示し、サフラニンに染まるだけで、核は濃い赤色に、細胞質は淡赤色。

95 μ の面積となる。この区画内に入つた血球はすべて数えるのであるが、観察視野の抽出は次のようにする。予め低倍率で標本を調べ、測定に適した場所をなるべく広範囲に選び、この範囲を複式メカニカルステージの移動目盛によつて決定しておく。この範囲の一边を等間隔に 20 列以上、目盛上で決定する。これに基づいて各列毎に微動装置の目盛に従つて等間隔に標本を移動させ 10 視野を検鏡する。このようにして測定してゆくと、ほとんどの場合 100 視野以内の観察で、次の規定血球数を数えることができる。測定視野の抽出を上述のように機械的に行なう理由は、顕微鏡を覗きながら行なうと、どうしても稀有の細胞や特殊な細胞が出現したときに、その視野を測定してしまうので、これを防ぐためである。

3) 数えるべき血球数 上述のようにして、血球組成の比率を求める場合、どの位血球数を数えれば良いかである。たとえ 1 個体について莫大な血球数を数え、極めて正確な数値を求めたとしても、その個体の属していた集団を代表しているとはいきれない。個体差を考えると、1 個体の測定時間をなるべく短縮して、なるべく多くの個体を調査した方が好ましい。そこで、人血での白血球組成の測定⁴¹⁾や、他の研究者の測定例⁸⁾¹¹⁾などを考え合せ、筆者は次のような基準を設けている。

前述のように抽出した視野の血球は種類別に計上してゆき、白血球系細胞が 100 個以上に達するまで検鏡する。しかし、白血球減少症 (leucopenia) の場合は、たとえ白血球系細胞が 100 個に達しなくとも、成熟赤血球が 5,000 個に達したら計測を終了する。

このようにして、同一個体の May-Giemsa 染色標本とペルオキシダーゼ染色標本とについて計測するが、始めに前者の標本で測定を行ない、次いで後者の標本で、赤血球系細胞総数が前者の標本とほぼ同数になるまで検鏡し、その間に出現したペルオキシダーゼ陽性白血球だけを計上する。

4) 血球組成の比率の表示法 赤血球系細胞内の各血球は、数えたこの系の細胞総数の百分率で表示し、これ以外の血球は赤血球系細胞 10,000 に対する数値に換算して表現する (Table 1 参照)。このような表示法の理由は、後述の Hayem 液によつて測定した赤血球数の中には、塗抹標本上で観察された未成熟赤血球と老化赤血球とが含まれているものとみなされるからである。また、赤血球数は通常万単位 ($\times 10^4/\text{mm}^3$) で示すから、赤血球数のみを測定した場合でも、他の血球数をただちに算出できて都合が良い。

II. 血球計算盤による血球数の算定について

魚類の血液稀釈液として専用のものは報告されていないが、8 種の稀釈液について検討した結果, Darcel⁴²⁾ および Hayem³⁸⁾ の 2 種の稀釈液はいずれも赤血球、白血球および栓球の 3 種血球を完全に識別できる状態で固定できることを確認した (Fig. 14)。これは同一血についての塗抹標本との対比検討による結果である。なお、Hayem 液は単一液であるから、使用に際して手間がかからないゆえ、筆者は専らこの液を用いている。

Hayem 液はニジマス赤血球を崩壊すると報告¹¹⁾³⁰⁾されている。しかし、同液による稀釈血液を計算盤に封入後蒸発を防いで放置した結果、Fig. 16 に示したように、24 時間を経過しても 3 種の血球はいずれも完全に保存されていた。それゆえ、この液による血球破壊作用の心配はないものと考えられる。しかし、メランジュールに入れた状態で放置すると、血球は一側に沈殿し、時間の経過とともに血球は相互に粘着する (Fig. 15)。一度粘着した血球はメランジュールをいくら振盪しても分離されず、そのため測定結果を極めて不正確にするゆえ、専用のゴム製ホルダーをかけ、時折り振盪して検鏡時まで保存すると、この欠点は防ぐことができる。

使用器具は、日本血液検査器械検定協会の検定証付きを使用すべきである。また、計算盤にはいろいろの形式があるが、いずれにしても規定のカバーガラスを固定する器具の付いたものを用いると安定した測定値が得られる。筆者は Bürker-Türk の複式計算盤を 2 枚用い、1 本の赤血球用メランジュールより測定室 4 つを満して計測している。そして、白血球と栓球は測定盤の四隅にある 1 mm^2 全面積を 4 カ所測定し、赤血球は中央の 1 mm^2 の中、250 μ^2 の区画 5 カ所を計測して、それぞれ単位容積 (血液 1 mm^3) 当りの血球数を算出している。

なお、血球計算に際しては、些細な測定技法の誤りによつて、大きい誤差を招くから、専門書⁸⁹⁾⁴¹⁾による正しい操作が望まれる。

以上述べた方法によつて、各種実験例より得た血球組成の変動にみられる一般的傾向と、変動の意義については、他の機会に譲りたい。

文 献

- 1) MARSH, M. C. and F. P. GORHAN: *Science, New series*, **23**, 666 (1906).
- 2) SCHAEFER, A. A.: *J. Gen. Physiol.*, **7**, 341~343 (1925).
- 3) REZNIKOFF, P. and D. G. REZNIKOFF: *Biol. Bull.*, **66**, 115~132 (1934).
- 4) DAWSON, A. B.: *Ditto*, **68**, 335~346 (1935).
- 5) PHILLIPS, A. M.: *Progr. Fish-Bull.*, **48**, 11~13 (1940).
- 6) BONHAM, K., L. R. DONALDSON, R. F. FOSTER, A. D. WELANDER and A. H. SEYMOUR: *Growth*, **12**, 107~121 (1948).
- 7) OSTROUMOVA, I. M.: *Izvestia Vniorkh*, **43**, 1~64 (1957).
- 8) WEINREB, E. L.: *Zoologica*, **43**, 145~154 (1958).
- 9) 尾崎久雄・鎌田淡紅郎: 滋賀県醒井養鱒試験場報告, **1**, 43~54 (1958).
- 10) SLICHER, A. M.: *Bull. Bingham Ocean. Coll.*, **17**, Arti. 3 (1961).
- 11) 田村 正・富士 昭・結城了伍: 水産増殖資料, **39**, 1~35, 水産庁 (1961).
- 12) 佐野徳夫: 本誌, **29**, 17~22 (1963).
- 13) CULLEN, E. K.: *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **153**, 352~356 (1903).
- 14) HARRIS, D. F.: *J. Physiol.*, **30**, 319~321 (1904).
- 15) WERZBERG, A.: *Folia Haem.*, **10**, 301~390 (1910).
- 16) LANINE, P.: *Arch. Biol.*, **27**, 525~574 (1912).
- 17) 中院考円: 京都医学雑誌, **17**, 115~154, 280~294 (1920).
- 18) JORDAN, H. E. and C. C. SPEIDEL: *J. Morph.*, **38**, 529~549 (1924).
- 19) 川本信之: 水産研究報告, **26**, 1~3 (1931).
- 20) 入江 亮: 十全会雑誌, **37**, 1605~1622 (1932).
- 21) JORDAN, H. E.: *Amer. J. Anat.*, **51**, 215~251 (1932).
- 22) DAWSON, A. B.: *Biol. Bull.*, **64**, 33~43 (1933).
- 23) 小野田外与治: 十全会雑誌, **40**, 51~66 (1935).
- 24) 三輪清治: 同上誌, **43**, 73 (1938).
- 25) DUTHIE, E. S.: *J. Anat.*, **73**, 396~412 (1939).
- 26) CATTON, W. T.: *Blood*, **6**, 39~60 (1951).
- 27) TOPF, W.: *Z. Fisch.*, **4**, 257~288 (1955).
- 28) 斎藤 要: 本誌, **19**, 1194~1138 (1954).
- 29) NAGATANI, Y.: *Yamaguchi J. Science*, **8**, 45~54 (1957).
- 30) 尾崎久雄: 水産生理学, 魚類, **I**, 448頁., 東京: 金原出版 (1960).
- 31) 天野重安: 血液学の基礎, 上巻, 血球の発生と機能, 753頁., 東京: 丸善 (1948).
- 32) YŪKI, R.: *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, **8**, 36~44 (1957).
- 33) ———: *Ditto*, **8**, 264~269 (1958).
- 34) ———: 動物学雑誌, **68**, 111~112 (1959).
- 35) ———: 日血誌, **22**, 122~123 (1959).
- 36) ———: *Bull. Jap. Soci. Sci. Fish.*, **26**, 486~489 (1960).
- 37) 結城了伍: 同上誌, **26**, 490~495 (1960).
- 38) 加藤勝治: 血液学研究法, 596頁., 東京: 南山堂 (1950).
- 39) SATO, A. and S. SEKIYA: *Tohoku J. Exp. Med.*, **7**, 111~115 (1926).
- 40) BIZZOZERO, J.: *Vircho's Arch.*, **90**, 261~332 (1882).
- 41) 福武勝博・高橋 進: 臨床検査技術講座, 第I輯, 血液学, 179頁., 東京: 金原出版 (1958).
- 42) DARCEL, C. LE Q.: *Stain Tech.*, **26**, 57~59 (1951).

PLATE 1

Explanation of figures

All figures were photomicrographed from preparations of the circulating blood in the rainbow trout. Excepting Fig. 7 (peroxidase staining preparation), all figures from 1 to 13 were photographed from the preparations of May-Giemsa's stain.

Cells of erythrocytic series (Figs. 1~4).

Fig. 1, a and b. Various forms of both mature and polychromatic erythrocytes (*M. E.* and *P. E.*). Fig. 2, a and b. Basophilic erythrocytes (*B. E.*). Fig. 3, a and b. Deformed type in senile erythrocytes (*Se. E.*). Fig. 4, a and b. Disintegrated type in senile erythrocytes (*Se. E.*).

Cells of leucocytic series (Figs. 5~9).

Fig. 5, a and b. Various forms of lymphocytes (*Ly.*). Fig. 6, a and b. Round lymphocytes (*R. Ly.*). Fig. 7, a and b. Peroxidase positive-leucocyte (*P. P. L.*) and other negative cells. Figs. 8 and 9. Neutrophils and monocytes show positive reaction to the peroxidase stain.

Cells of thrombocytic series (Figs. 10~12).

Fig. 10, a and b. Various forms of fusiform thrombocytes (*F. Thr.*). Fig. 11, a and b. Baculiform thrombocytes (*B. Thr.*). Fig. 12, a and b. Note that fusiform thrombocytes cohere easily with one another; such a state is often seen in some inadequate smear preparations.

Various forms of nuclear shadow (*N. S.*) (Fig. 13, b and b).

Blood cells in Hayem's solution (Figs. 14~16).

Fig. 14, a~c. *M. E.* and *I. E.*: mature and immature erythrocyte; (*E.*): side view of erythrocyte; *Lu.*: leucocyte; *F. Thr.*: fusiform thrombocyte; *B. Thr.*: baculiform thrombocyte. Fig. 15. Showing that erythrocytes are apt to cohere with one another when left in pipette after blood was diluted by Hayem's solution; shaking of the pipette should be done at regular intervals. Fig. 16, a and b. (a) showing the blood cells which have just been set on a hemocytometer. (b) showing the same cells observed after 24 hours. Hayem's solution never destroy the blood cells at all.

(Figs. 1~13: $\times 850$, Fig. 14: $\times 500$, Figs. 15 and 16: $\times 200$)

PLATE 1