炎症時のコイ顆粒白血球に関する組織化学的研究^{*1}

安田 恒雄・延 東 真・境 正・木村 正雄

(1984 年 1 月 12 日受理)

Histochemical Study on the Granulocytes in the Inflammation of Carp

Tsunao YASUDA,^{*2} Makoto ENDO,^{*2} Tadashi SAKAI,^{*2}
and Masao KIMURA^{*2}

Histochemical examinations were made on the peroxidase, Mg-ATPase, and malate dehydrogenase activities in the peripheral granulocytes, hematopoietic tissues and inflamed dorsal muscle tissues, using carp *Cyprinus carpio* inflamed with the injection of turpentine (1.0 and 0.1 ml/kg body weight). The results obtained were very similar in the experiments of both the doses.

In the peripheral blood of the inflamed carp, the rate of the total granulocytes to the erythrocytes and the rate of the granulocytes showing intense enzyme activities to those showing low enzyme activities begin to increase at 30 min and are in maxima at 2 days after the injection. In the hematopoietic tissues of the inflamed carp, the rate of the granulocytes showing intense peroxidase activity is in maximum at 2 days after the injection. These results may indicate that the granulocytes produced in the hematopoietic tissues are supplied gradually into the peripheral blood. This supply is slow in comparison to mammals. Therefore, the hematopoietic tissues of carps may not contain large number of the matured granulocytes as seen in mammals.

魚類の炎症に関して、いくつかの報告がある。¹⁻⁴⁾ FINN and NIELSEN⁵⁾ はニジマスを用い、種々の起炎刺激による炎症反応について検討し、以下の2点がニジマスの炎症の特徴であるとしている。1) 多核白血球とマクロファージが起炎後3時間から6時間にかけて血管外に出現し、多核白血球の血管外への出現数は12時間から2日目にかけて最大に達する。2) マクロファージの血管外への出現数は2日目から8日目にかけて最大になる。また鈴木と日比谷⁶⁾ はコイを用いて炎症初期の血管透過性の機序について調べ、起炎後30分以内に血管透過性が亢進することをみている。

しかしながら、炎症時における造血織、末梢血中および炎症部位の顆粒白血球について、その酵素学的変化を経時的に研究した例はほとんどないのが現状である。

そこで、我々は魚類病理学における炎症の重要性を考慮し、コイの炎症時における顆粒白血球の性状の経時的変化を酵素組織化学的手法により検討した。

材料および方法

実験 I 体重 50~185 g の健康なコイ *Cyprinus carpio* 30 尾を使用した。コイの背部筋肉に 1.0 ml/kg 魚体重のテルベン油を注射後、15, 30 分間、1, 3, 6, 12, 24

時間、2, 3 日間経過した時点で、それぞれ 3 尾ずつ取り上げた。その間、平均飼育水温は 25.0°C であった。取り上げ後ただちにヘパリン処理した注射器を用いて、各供試魚の尾柄部から採血し、血液塗抹標本作製して以下の酵素反応に供した。1) Peroxidase 反応 (大川・稲垣法,⁷⁾ 室温で反応液中に 5~10 分間浸漬)、2) Mg-ATPase 反応 (OGAWA and MAYAHARA 法,⁸⁾ 室温で反応液中に 30 分間浸漬)、3) Malate dehydrogenase 反応 (BARKA and ANDERSON 法,⁹⁾ 室温で反応液中に 30 分間浸漬、以下 MDH と略称する)。なお反応液から基質を除いたものに標本を浸漬することにより対照を得た。活性の強さは + (弱い)、++ (中程度) および +++ (強い) の3段階に分けて Fig. 3, 4, 5 に表示した。同時に常法に従ってメイギムザ染色を行ない、赤血球 1000 個に対する全顆粒白血球の出現率と、造血織から末梢血中に動員されて間もない好中球の赤血球 1000 個に対する出現率を計測した。また赤血球 1000 個に占める好中球と好酸球の割合も計測した。

採血後、各供試魚の腎臓と脾臓および注射部位筋肉組織を摘出し、ドライアイス・アセトンで凍結した。その後ただちにクリオスタットで凍結切片 (10 μm) を作製し、Peroxidase 反応を施した。活性の強さを +, ++ お

^{*1} 魚類の炎症に関する研究—I (Studies on inflammation in Fishes-I)

^{*2} 宮崎大学農学部 (Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Funatsuka-3, Miyazaki 880, Japan).

よび卍の3段階に分けて表示した。なお塗抹標本、凍結標本ともに、各種酵素反応に陽性を示す顆粒白血球を好中球、好酸球および好塩基球に分けることはできなかった。

実験 II 50~300 g の健康なコイ 24 尾を用いた。0.1 ml/kg 魚体重のテルペン油を背部筋肉に注射後、15, 30 分間、6, 12, 24 時間、2, 3 日間経過した時点で各 3 尾ずつ取り上げた。その間、平均飼育水温は 25.0°C であった。実験方法は実験 I と同様に行なった。ただし、血液塗抹標本は Peroxidase 反応だけに供した。

結 果

実験 I-1 赤血球に対する顆粒白血球の出現率 Table 1 に示すように赤血球に対する全顆粒白血球の出現率は注射後 30 分から増え始め、2 日目に最大となり、3 日目には減少した。

好中球の出現率は注射後 30 分から増加し始め、注射後 2 日目でその率は最大になり、3 日目には減少した。好酸球についてはその出現率と経過時間の間に有意な関係を示す結果が得られず、また好塩基球は発見できなかった。

実験 I-2 造血織から動員されてもない好中球の出現率 造血織から動員されてもない好中球は核が丸く細胞質が弱好塩基性を示す。一方核が明らかに分葉し、細胞質が弱好酸性を示す好中球は造血織から動員されてから時間の経過したものである。それらを Fig. 1, 2 に示す。注射後の赤血球 1000 個に対する、造血織から動員されてもない好中球の出現率の経時的変化を Table 2 に示す。造血織から動員されてもない好中球の典型

的なものだけを調べ、その判断が困難なものは省いた。造血織から動員されてもない好中球の赤血球 1000 個に対する出現率は注射後 30 分からわずかに増加し始め、2 日目で最高値を示し、3 日目に減少した。

実験 I-3 末梢血中の顆粒白血球の酵素活性の変化

(1) Peroxidase 反応 +, ++ および 卍 の活性をもつ顆粒白血球の注射後における経時的変化を Table 3 に示す。+ 活性をもつ顆粒白血球の出現率は注射後 30 分から減少し始め、24 時間で最低になり、2 日目から増加し始めた。++ 活性をもつ顆粒白血球の出現率は注射後 30 分から増加し始め、注射後 12 時間で最大になり、24 時間から減少し始めた。卍 活性をもつものの出現率は注射後 30 分から増加し始め、注射後 2 日目で最大になり、注射後 3 日目には減少した。

(2) Mg-ATPase と MDH 反応 Mg-ATPase と MDH 反応についても Peroxidase と同様な結果が得られた (Table 3)。

実験 I-4 各組織中の顆粒白血球の Peroxidase 反応の変化 腎臓では ++ の活性をもつ顆粒白血球の出現率が注射後 15 分から増加し始め、24 時間と 2 日目で ++ と 卍 の活性をもつ顆粒白血球の出現率は最大に達し、3 日目には減少した。脾臓と注射部位筋肉組織においても同様な結果を得た (Fig. 6, 7, Table 4)。

実験 II 注射量 0.1 ml/kg 魚体重の場合 1.0 ml/kg 魚体重のテルペン油注射の場合と同じ項目について測定し、Table 5, 6, 7, 8 に示す結果を得た。これらの Table から明らかのように、0.1 ml/kg 魚体重を注射した場合も 1.0 ml/kg 魚体重注射の結果とほとんど同様な傾向を示した。

Table 1. Changes in the rates of the total granulocytes, neutrophils, and eosinophils to 1000 erythrocytes in the peripheral blood of the inflamed carps (1.0 ml/kg body weight)

	Control	15 min	30 min	1 h	3 h
Total granulocytes	3.3±1.0	3.6±2.3	6.3±2.3	8.0±6.1	9.7±1.0
Neutrophils	1.4±1.7	1.6±2.5	5.1±1.2	7.6±5.3	8.7±2.1
Eosinophils	1.8±1.8	1.2±1.2	0.9±2.1	1.1±3.7	1.0±1.2
	6 h	12 h	24 h	2 days	3 days
Total granulocytes	14.0±5.6	15.1±3.0	16.7±9.6	18.3±1.0	15.2±1.0
Neutrophils	12.2±7.1	12.7±1.2	15.3±9.2	17.3±3.7	13.4±3.3
Eosinophils	2.1±1.9	2.0±2.0	0.6±1.0	1.7±1.2	1.6±0.3

Each value is the mean ± the standard deviation on three fish.

Table 2. Changes in the rates of neutrophil stayed in the peripheral blood for short period to 1000 erythrocytes of the inflamed carps (1.0 ml/kg body weight)

Control	15 min	30 min	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	2 days	3 days
1.2±1.1	1.7±1.0	5.0±2.7	7.9±5.0	9.1±1.2	12.4±3.1	13.3±3.4	15.9±1.0	17.2±9.2	10.0±5.2

Each value is the mean ± the standard deviation on three fish.

Table 3. Changes in enzyme activities on the granulocytes of the inflamed carps (1.0 ml/kg body weight)

Enzyme	Degree of the activities	Control	15 min	30 min (%)	1 h	3 h
Peroxidase	Low	56.0±1.5	58.1±0.7	43.0±1.7	43.5±0.7	35.0±1.5
	Moderate	39.3±2.1	40.2±1.0	51.9±2.0	53.2±7.1	59.3±9.2
	High	4.2±3.1	3.3±7.3	8.1±0.9	9.7±1.0	5.1±7.1
Mg-ATPase	Low	58.7±4.2	55.7±7.6	55.7±7.3	51.6±4.2	28.7±10.3
	Moderate	37.7±2.5	39.7±2.6	39.7±1.6	43.7±6.4	68.7±11.4
	High	5.3±3.5	4.6±5.5	4.6±5.3	4.6±2.3	2.7±1.2
MDH*	Low	71.0±4.6	65.0±7.8	52.7±5.0	43.3±6.6	23.0±6.0
	Moderate	29.0±4.6	30.0±7.2	45.0±4.6	49.7±9.2	67.0±5.6
	High	0.7±1.2	3.2±5.0	2.3±5.0	8.0±2.6	10.0±1.0
Degree of the activities		6 h	12 h	24 h (%)	2 days	3 days
Peroxidase	Low	25.1±10.0	15.0±4.1	7.2±9.1	15.2±3.9	29.3±9.8
	Moderate	63.5±4.2	72.3±5.3	65.1±8.5	39.3±2.1	49.2±1.2
	High	11.4±8.1	13.1±6.7	25.1±10.1	45.0±5.1	25.3±7.3
Mg-ATPase	Low	20.1±2.5	20.5±1.7	18.5±2.7	11.4±4.6	16.7±2.8
	Moderate	65.5±7.2	61.3±5.0	57.2±2.1	45.6±3.3	52.3±3.8
	High	13.8±2.5	19.5±2.9	24.3±1.6	43.3±2.2	30.9±5.9
MDH*	Low	18.0±2.0	9.8±5.8	6.6±4.1	13.5±4.0	28.7±1.0
	Moderate	71.5±5.1	70.3±4.3	69.3±2.2	45.0±2.7	52.1±2.9
	High	11.5±6.0	20.1±5.1	25.1±2.1	40.1±5.9	27.0±1.1

Each value is the mean ± the standard deviation on three fish.

* Malate dehydrogenase

Table 4. Changes in peroxidase enzyme activities on the granulocytes of the inflamed carps (1.0 ml/kg body weight)

	Degree of the activities	Control	15 min	30 min (%)	1 h	3 h
Kidney	Low	49.3±1.5	44.7±7.4	46.3±5.8	47.3±2.9	31.3±3.2
	Moderate	40.0±1.0	47.7±5.9	49.7±8.1	46.3±4.7	59.0±2.0
	High	10.0±1.1	7.7±2.9	9.3±8.2	6.3±2.8	9.7±1.5
Spleen	Low	50.3±3.5	51.7±1.5	50.7±5.1	47.3±2.5	42.5±3.5
	Moderate	40.3±1.5	43.7±2.3	43.7±3.2	45.7±3.1	44.0±1.4
	High	9.3±4.7	4.7±1.5	5.7±2.1	7.0±2.6	13.5±2.1
Inflamed site	Low	52.7±0.6	53.0±1.0	46.0±3.6	50.0±1.0	41.6±3.1
	Moderate	42.0±4.0	43.0±2.0	47.0±1.0	47.0±1.1	51.7±2.3
	High	5.3±0.5	4.0±1.3	6.7±1.5	3.0±0.1	6.7±1.2
Degree of the activities		6 h	12 h	24 h (%)	2 days	3 days
Kidney	Low	26.0±4.6	27.0±5.0	20.5±0.9	19.0±2.0	38.2±2.0
	Moderate	59.7±6.8	65.3±3.8	67.0±0.1	69.0±1.0	53.0±0.1
	High	14.3±2.3	11.0±1.0	13.0±0.1	12.0±1.7	9.7±2.1
Spleen	Low	47.0±1.0	48.7±2.1	46.0±6.1	47.0±2.0	51.3±0.6
	Moderate	48.0±1.0	47.0±3.2	48.7±3.2	44.0±4.6	40.7±1.2
	High	5.0±0.1	7.3±2.5	6.7±2.9	9.0±2.6	7.7±1.3
Inflamed site	Low	39.3±6.4	39.3±1.5	31.7±2.2	25.0±2.0	31.0±4.0
	Moderate	53.3±4.0	52.3±4.2	56.3±2.1	57.7±1.5	55.7±3.2
	High	7.3±2.5	8.7±5.1	12.0±1.0	17.3±2.9	13.7±5.1

Each value is the mean ± the standard deviation on three fish.

Table 5. Changes in the rates of the total granulocytes, neutrophils, and eosinophils to 1000 erythrocytes in the peripheral blood of the inflamed carps (0.1 ml/kg body weight)

	Control	15 min	30 min	6 h	12 h	24 h	2 days	3 days
Total granulocytes	3.1±2.2	3.0±1.0	4.3±1.6	4.4±3.4	12.5±6.3	18.7±2.8	21.3±2.7	15.4±2.4
Neutrophils	1.2±1.7	1.4±1.2	4.0±3.1	4.0±3.0	10.2±5.2	14.1±1.9	20.3±3.1	12.0±1.4
Eosinophils	2.0±0.7	2.0±0.9	0.1±0.6	0.5±1.0	1.6±1.6	2.9±3.5	3.1±2.9	3.0±1.2

Each value is the mean ± the standard deviation on three fish.

Table 6. Changes in the rates of neutrophil stayed in the peripheral blood for short period to 1000 erythrocytes of the inflamed carps (0.1 ml/kg body weight)

Control	15 min	30 min	6 h	12 h	24 h	2 days	3 days
2.1±1.9	1.4±1.2	3.3±1.0	3.5±2.2	8.4±4.8	15.2±5.4	18.9±4.6	12.0±0.7

Each value is the mean ± the standard deviation on three fish.

Table 7. Changes in enzyme activities on the granulocytes of the inflamed carps (0.1 ml/kg body weight)

Enzyme	Degree of the activities	Control	15 min (%)	30 min	6 h
Peroxidase	Low	53.4±0.8	53.1±3.0	44.3±4.2	42.2± 8.4
	Moderate	43.9±2.4	44.0± 4.9	52.4±4.0	54.1± 9.6
	High	2.7±1.6	2.6± 2.3	2.9±0.5	3.0±11.4
Enzyme	Degree of the activities	12 h	24 h (%)	2 days	3 days
Peroxidase	Low	26.6±7.1	25.9± 1.9	17.9±5.1	18.1± 5.3
	Moderate	58.9±9.7	59.3± 7.9	62.0±5.4	63.8± 3.7
	High	17.3±9.6	17.5±11.1	20.0±2.2	18.1± 2.0

Each value is the mean ± the standard deviation on three fish.

Table 8. Changes in peroxidase enzyme activities on the granulocytes of the inflamed carps (0.1 ml/kg body weight)

	Degree of the activities	Control	15 min (%)	30 min	6 h
Kidney	Low	45.3±1.3	47.2±8.2	39.3±3.0	30.1±1.6
	Moderate	51.1±1.4	52.3±9.2	59.2±1.9	60.2±4.0
	High	4.3±1.2	4.1±1.2	5.1±0.1	9.3±2.1
Spleen	Low	50.3±0.9	50.1±0.5	48.3±2.9	40.3±9.9
	Moderate	43.2±1.5	45.1±6.2	45.1±0.9	47.9±7.1
	High	5.2±1.4	5.3±2.1	7.2±0.3	12.0±1.1
Inflamed site	Low	49.2±3.1	50.2±2.1	37.2±9.1	35.1±3.0
	Moderate	52.1±1.2	53.2±9.1	56.5±0.1	57.2±0.1
	High	5.8±0.1	5.2±0.9	9.1±0.9	10.3±2.1
	Degree of the activities	12 h	24 h (%)	2 days	3 days
Kidney	Low	29.3±8.2	16.9±0.3	12.5±9.1	25.1±1.9
	Moderate	63.6±4.7	68.2±0.7	69.2±0.6	57.3±6.1
	High	10.0±1.5	17.3±1.1	29.3±1.9	17.3±0.5
Spleen	Low	35.2±5.5	27.0±8.9	24.7±0.9	29.5±2.3
	Moderate	49.1±0.9	55.0±2.3	59.1±3.5	54.2±1.2
	High	16.2±1.0	18.1±1.4	19.3±1.9	17.5±5.2
Inflamed site	Low	22.3±0.4	19.5±1.5	17.2±7.1	32.3±2.1
	Moderate	59.3±1.7	61.7±0.7	64.7±0.9	55.7±2.3
	High	18.1±8.1	20.1±4.9	21.9±5.9	10.2±1.5

Each value is the mean ± the standard deviation on three fish

- Fig. 1.** Neutrophil stayed in the peripheral blood for short period of the inflamed carp. $\times 1200$
Fig. 2. Neutrophil stayed in the peripheral blood for long period of the inflamed carp. $\times 1200$
Fig. 3. Granulocyte showing weak peroxidase activity in the peripheral blood of the inflamed carp. $\times 1200$
Fig. 4. Granulocyte showing moderate peroxidase activity in the peripheral blood of the inflamed carp. $\times 1200$
Fig. 5. Granulocyte showing intense peroxidase activity in the peripheral blood of the inflamed carp. $\times 1200$
Fig. 6. Granulocytes showing intense peroxidase activity in the spleen of the inflamed carp. $\times 170$
Fig. 7. Granulocytes showing weak peroxidase activity in the spleen of the control carp. $\times 170$

考 察

テルベン油注射によりコイに炎症を起すと、末梢血中の赤血球に対する全顆粒白血球の出現率が增加する。この出現率の増加は炎症が起ると、顆粒白血球が造血組織から動員されることを示唆している。また各種酵素反応に強陽性（ $\pm$, $\pm\pm$ ）を示す顆粒白血球の出現率が末梢血中で増加する。この出現率の増加は全顆粒白血球の出現率の増加と時間的によく一致する。したがって、各種酵素反応に強陽性を示す顆粒白血球は造血組織から動員されたものであろう。この造血組織から動員された顆粒白血球は全顆粒白血球の出現率の変動と好中球の出現率の変動によく一致するが、好酸球の出現率の変動はそれに一致しない。したがって、酵素活性の強い顆粒白血球はほとんど好中球と考えられる。ATPaseやMDHはエネルギー産生に関与し、Peroxidaseは殺菌作用に関与している。¹⁰⁾したがって、テルベン油注射により炎症が起ると、造血組織から末梢血中へ活発な消化作用をもつ好中球が動員されると思われる。

この活発な消化作用をもつ好中球が末梢血中へ動員される時間に着目すると、全顆粒白血球と酵素反応に強陽性顆粒白血球の出現率の変動経過から、その動員は30分から始まり2日目まで最大に達することが明らかである。鈴木と日比谷⁹⁾はコイにホルマリン炎症を起すと、30分以内に血管透過性が亢進することを報告している。造血組織から30分で好中球が動員され始めるという今回得られた結果は彼らの結果と時間的によく一致する。

テルベン油を0.1 ml/kg 魚体重注射した時に得られた結果が1.0 ml/kg 魚体重注射した時のそれとほとんど同じであることは、起炎物質の量が少なくとも同様な経緯で、好中球が末梢血中に動員されることを示唆している。

ラットにテルベン油による炎症を起すと、6時間後に

末梢血中への好中球の動員が最大となる。¹¹⁾これは造血組織中に、顆粒白血球の膨大な貯留が存在するためと考えられている。¹²⁾一方コイの場合、起炎後2日目まで末梢血中へ好中球の動員が最大となり、明らかにラットより遅れる。このことはコイの造血組織にはラットのような膨大な顆粒白血球の貯留が存在せず、好中球が末梢血へ徐々に動員されることを示唆している。またコイの造血組織および末梢血中のPeroxidase強陽性顆粒白血球が2日目まで徐々に増加することは、造血組織中に膨大な顆粒白血球の貯留が存在しないことを裏付けている。

文 献

- 1) A. McQUEEN, K. MACKENZIE, R. J. ROBERT, and H. YOUNG: *J. Fish Biol.*, **5**, 241-247 (1973).
- 2) R. W. WARNER and S. C. KATKANSKY: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **27**, 191-193 (1970).
- 3) J. P. FINN and N. O. NIELSEN: *J. Pathol. Bact.*, **105**, 257-268 (1971).
- 4) R. J. ROBERTS, A. McQUEEN, W. M. SHEARER, and H. YOUNG: *J. Fish Biol.*, **5**, 497-503 (1973).
- 5) J. P. FINN and N. O. NIELSEN: *J. Fish Biol.*, **3**, 463-478 (1971).
- 6) 鈴木 譲・日比谷 京: 日水誌, **49**, 555-559 (1983).
- 7) 大川欣一・稲垣 彬・菅原 耕: 医学のあゆみ, **87**, 617-618 (1973).
- 8) K. OGAWA and H. MAYAHARA: *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 487-490 (1969).
- 9) 森 晶彦: 新酵素組織化学 (武内忠男・小川和朗編), 朝倉書店, 東京, 1980, pp. 66-80.
- 10) 竹重公一朗: 血液の病態生化学 (高久史麿・水上茂樹編), 朝倉書店, 東京, 1982, pp. 245-262.
- 11) D. M. WILLIAMS and N. W. JOHNSON: *J. Pathol.*, **118**, 129-141 (1976).
- 12) 高久史麿: 炎症と抗炎症療法 (水島 裕・塩川 優一編), 医歯薬出版, 東京, 1982, pp. 228-230.