

アマゴ, *Oncorhynchus rhodurus* J.,
ニジマス, *Salmo gairdnerii irideus* G.,
の初期赤血球造血について

松 里 寿 彦

Primitive Erythropoese in early development
of Amago *Oncorhynchus rhodurus* J., and
Rainbow Trout *Salmo gairdnerii irideus* G.,

Toshihiko MATSUSATO

Studies on blood cell formation-Hemopoiesis-have been recognized as the method for to diagnosis of diseases in animals.

In fish, the development of researches on hemopoiesis and the practical application to diagnosis of fish diseases are highly desired to advance the treatment techniques of the diseases.

Recently, the fish farming and aqua-culture have been expanded and the fundamental information of hematological studies including the hemopoiesis are important for the expansion, especially, for the seedling production, it is valuable to carry out the research on the mechanisms for young stage of fishes.

The studies of primitive erythropoese on early developmental stages of "Amago" *Oncorhynchus rhodurus* J., and "Rainbow trout", *Salmo gairdnerii irideus* G., have been carried out, since 1968. The zygotes and young fry of both species used in this experiment were obtained from a commercial fish farm at the suburbs of Hiroshima city. The fertilization was done under usual method in the farm and two zygotes were reared in runningwater at approximately 12°C of water temperature. The fresh samples were brought in the laboratory to observe macroscopically at first, and then, they were fixed in Bouin's fluid, 10% of neutral formalin solution and Zenker's fluid respectively for microscopic histological observations. The smeared samples were stained with May-Giemsa solution, Wright solution and supervitally with Janus green-neutral red solution.

The results obtained in this experiment are as follows;

1. In "Amago" and "Rainbow trout", the primitive erythropoeses in yolk sac wall was observed as the first blood formation.
2. The primitive erythrocyte is spherical in shape, acidophilic, peroxydase reaction positive and has a spherical nucleus.
3. The primitive erythrocytes increase in number till hatching stage and then decrease gradually after hatch out.

魚類を含めて、動物の血球形成機構に関しては、現在なお不明な点が残され、多くの説が鋭く対立している。^{1),2)}

魚類の造血に関する研究は、主として比較組織学的見地、もしくは、概括的な系統発生学的見地から取り

* 昭和47年4月15日受理南西海区水産研究所業績31号

上げられる場合が多い。3,4)

魚類の側からの研究においても、主として扱われていたのは、成魚および幼魚の末梢血血球組成、造血機構であり、個体発生に沿った造血機構の研究は、ほとんどなされていない。5),6),7)

最近、魚類の養殖および種苗生産が盛んになり、各種疾病が大きな問題となっている。

魚類の場合も血液学的検討は疾病診断のための検査として優れているが、その基礎的知見は必ずしも十分ではない。魚類血液の本態を明らかにすることは、魚病診断技術の基礎として重要なものであり、現在のよりに、魚類の種苗生産に対する期待がたかまるにつれ、その重要性は魚類の発生初期、稚仔魚期における、各組織の発達過程を把握することと同様に重要な条件となっている。

著者は、昭和43年より魚類の造血、特に、初期造血機構解明のための研究を行ってきた。昭和44年、45年にわたり、アマゴ *Oncorhynchus rhodurus* J., ニジマス *Salmo gairdnerii irideus* G., の受精卵、稚仔魚を用いての研究から若干の知見を得たのでここに報告する。

材料および方法

実験に用いたアマゴの卵、ならびに稚仔魚は、昭和44年11月、および昭和45年10月から12月にわたり、広島県佐伯郡佐伯町、山本養魚場で採卵、受精、飼育したものである。受精卵の一部は実験室に持ち帰って飼育し、染色方法、固定方法などの基礎的な検討に用いた。ニジマスの卵、稚仔魚もアマゴと同様に行なった。また、同時に親魚の血液についても検討した。

一般的観察は、すべて、上記養魚場で飼育した卵、および稚仔魚を用いた。養魚場での飼育水温は、全期間を通じて11~13°C、(平均12°C)であった。

卵黄のうについては、低倍率でそのまま観察したほか、注射器を用いて卵黄を吸出後、生理的食塩水中で卵殻を除き、卵黄のう片をスライドグラス上に伸展し、観察した。稚仔魚は、MS-222 溶液(40ppm)で麻醉後、体表面を濾紙で拭い、尾柄部を切断し、滴下する血液をカバーグラス上に塗抹、乾燥後、May-Giemsa 染色、Wright 染色により観察に供した。必要に応じパーオキシダーゼ (Peroxydase) 反応、⁸⁾ ヤーヌスグリーン、中性赤による超生体染色⁹⁾ などを行なった。また、卵および稚仔魚は、Zenker 氏ホルマリン液、Helly 氏液、Bouin 氏液で固定し、組織切片材料とした。

血球の計測には、May-Giemsa 染色標本を用いた。細胞長径、短径、核長径、短径は油浸、1,000倍で、各採取日毎、数個体の塗抹標本から無作為に200~500個を計測した。細胞面積、核面積は、それぞれを楕円とみなし、測定した長径、短径から計算によって求めた。各期の血球組成は、赤血球細胞1,000個に対する各種血球出現個数(率)を用いて検討した。

結果および考察

ニジマスの卵内発生、ふ化、ふ化仔魚の成長などは、アマゴの場合と同様であり、また、造血機構に関しても基本的な差異は認められない。したがって、ここでは主としてアマゴの卵、稚仔魚での観察結果について述べる。アマゴ、ニジマスなど鮭鱒類の卵の卵内発生、ふ化と水温の関係については、すでに多くの研究がなされている。また、これらは卵径が大きく、卵内発生期間が長く、段階的变化をとらえやすいことなどから、初期造血機構の研究材料として、優れているといえよう。

アマゴ卵は、水温12°Cにおいて、受精後約5日で眼胞原基が形成され、8日余で心臓、消化管の形成が始まり、12~15日余で眼胞の色素層が発達し、肛門も完成する。その後さらに発生が進み、25~30日でふ化する。

卵黄のうに血島 (Blood Island) 原基が観察されるのは、受精後、4~5日頃からである。血島形成は胚体周辺部に始まり、しだいに植物極側にも拡大する。血島の構造は、Bloom(1938)¹⁰⁾、天野(1948)¹¹⁾ がそれぞれ哺乳動物胎児、ニワトリ卵内胚体で述べているものに酷似し、基本的構造は同じである。すなわち、血

島は卵黄のうの上に形成され、由来胚葉は確認できないが、血管原基様空所ができ、その内部に不定形で巨大な原始赤芽球様血球が現われる。初期の血島は巨大な核を持つ十数個の、多数の細胞突起を持った強塩基好性の赤芽球 (Plate I. Fig. 1,2) によって満たされている。血島内間隙が拡大するにしたがって、ほぼ円形の巨大な核を持つ好塩基性の大型の赤芽球 (Plate I. Fig. 3,4) (細胞長径18~20 μ , 短径16~17 μ , 核直径13~15 μ) が増加する。

受精後7~8日、心臓搏動が始まる頃、血島の大きさも数も増大し、血島間が連絡し、やがて胚体の血管と結合し、いわゆる卵黄血管系 (Vitelline-vein, Artery, Yolksac reticulum) を形成し、血島内血球は、体循環血に移行する。この段階での胚体由来と思われる血球は、ほぼ真円の好塩基性の赤芽球であり、核も比較的大きい。(Plate I. Fig. 5,6) この血球は CATTON (1951)⁷⁾ の報告にある Large lymphoid hemoblast に酷似している。血島由来の赤芽球 (第一次前赤芽球) は、細胞分裂の後、ほぼ円形で、しばしば小突起を有し、クロマチン構造が比較的大きい円形の核を持つ第一次赤芽球となる。この血球はやや塩基性で核も比較的大きい。(Plate I. Fig. 7,8)

受精後25~30日のふ化前胚体血液中の赤血球系細胞の約98%は、後述する第一次赤血球によって占められている。(Plate I. Fig. 9,10)

ここで第一次赤血球と呼ぶ血球は、血島由来と考えられ、ほぼ円形で、広い細胞質を持つ大型の正染色性の赤血球である。(Plate I. Fig. 11) (細胞長径14~17 μ , 短径11~13 μ) 核は円形でしばしば偏在し、クロマチン網目は比較的大きい、核の直径は5~6 μ である。この血球の形態は、天野 (1948)¹¹⁾ の報告にあるニワトリの卵内胚体血中にみられる第一次赤血球に非常に良く似ている。

この細胞は超生体染色では特殊な染色は示さないが、パーオキシダーゼ (Peroxydase) 反応は弱陽性である。(Plate I. Fig. 12) 一般に赤血球はパーオキシダーゼ陰性であるが、この血球は弱陽性であり、やや特異である。パーオキシダーゼの本態については現在もなお不明な点が多いが、ヘモグロビンとの関連が指摘されている¹¹⁾。YUKI (1957, 1958)^{12), 13)} はこの反応を利用し、魚類の白血球系細胞の分類を試みているが本血球の由来とも関連し興味深い。この血球は、ふ化前後をピークに、仔魚の成長が進むにしたがって減少する。

ふ化時の循環血中には、これら第一次赤血球以外に、いわゆる塩基好性赤芽球 (Plate II. Fig. 1), 白血球 (Plate II. Fig. 2,3), 不規則な突起を持ったリンパ芽球, リンパ球 (Plate II. Fig. 4,5,6) などみられるが主体は第一次赤血球である。ふ化後、日数の経過とともに、細胞、核ともに円形の幼若赤血球 (Plate II. Fig. 7) が増え、さらに成魚にみられる、細胞、核ともに楕円形の第二次赤血球が主体となる。(Plate II. Fig. 8)

ふ化後8~10日の稚仔魚の末梢血塗抹標本には種々の老成した第一次赤血球の崩壊像が見られる。老成した血球は、核が濃縮し、原形質に空胞化や亀裂が観察される。また、数パーセントの割合で脱核した血球 (Plate II. Fig. 9) も見られる。このように第一次赤血球は仔魚の初期段階において速やかに崩壊、消滅していくものと推察される。この過程の概略を表1に示す。表1から明らかのように、ふ化後3日の仔魚では、赤血球系細胞の約88%が第一次赤血球 (赤芽球を含む) で、第二次赤血球 (赤芽球, 幼若赤血球を含む) は、わずか12%余にすぎない。ふ化後17日で第一次赤血球と第二次赤血球の割合がほぼ逆転する。ふ化後24日では第一次赤血球は数パーセントにすぎない。また、ふ化直後から白血球 (多分葉核白血球を含む) リンパ球, リンパ芽球などが出現している。

各時期の赤血球系細胞の細胞面積, 核面積それぞれの頻度の経時的変化を図1に示した。また、細胞面積に対する核面積の割合の経時的変化を図2に示した。

図1から明らかのように、細胞面積, 核面積ともに、ふ化前後で大きく変化している。ふ化前後までは、細胞面積, 核面積ともに縮小の傾向が見られるが、ふ化後、日数の経過とともに逆に拡大する傾向が認められる。図2においては、図1よりさらにそれが明確となり、ふ化後9日目を境に、二系統の血球の交代を認めることができる。

Table 1 Variation of the blood Cell Constituents. (Amago)

Constituents of the blood Cells	Larvae					Adult
	Days after hatch out					3-yearold fish
	3	9	17	24		
Primitive erythrocytes (erythroblast)	879	461.2	169.1	26.9		0
non-nuclear Cells	2	3.2	7.8	32.4		0
Secondary erythrocytes (erythroblast) reticulocytes	119	535.6	814.1	940.7		1,000 (5.8)*
Leukocytes		2.1	0.8	0.9		5.8
Polymorpho nuclear. L.	2.6					
Lymphocytes	0.8	2.1	2.4	21.1		1.9
Lymphoblast	2.6	0.5				
Spindle cells	5.5	0.5	6.4	1.9		1.0
Unidentified cells	3.5	0	0	0		1.0**

Remark : Each number shews the ratio to one thousand erythrocytes

*Reticulocyte

**monocyte

以上のことから、アマゴ、ニジマスでは、発生の極く限定された期間、赤血球系を中心に一過性に第一次造血が行なわれているものと推察される。このことは MINOT が脊椎動物の造血形態を Ichthio-type (魚類型造血), Sauroid-type (哺乳類型造血) に大別して以来の比較血液学の常識に反するものである。また、魚類における赤血球造血は、鳥類、哺乳類に比較し単純であり、各期毎に特異な造血巣を形成することはなく、主として循環血内造血とされているが、この点についても、血島造血以降の造血巣の有無について再検討する必要があると思われる。

尾曾越(1963)³⁾が顆粒球造血の系統発生について述べているなかで「終生第一次赤血球造血しか行なわない魚類が何故、第二次造血の特徴でもある、顆粒球造血を行なっているか」といった疑問点については、今後、白血球系、その他血球の初期造血機構を明らかにするなかで解明されるものと思われるが、アマゴ、ニジマスなどにおいては、血島を中心とした第一次造血が認められ、したがって、第二次造血の始まるふ化直後の段階から、これら魚種が白血球系血球を持つことはあり得ることである。

今後は、血島形成過程、構造などをさらに明らかにするとともに、他血球種の形成過程、造血巣などについても検討し、また他魚種、とりわけ、低次発生段階でふ化するマダイなどの浮遊卵の造血機構を明らかにし、魚類の初期造血機構の把握に努めたい。

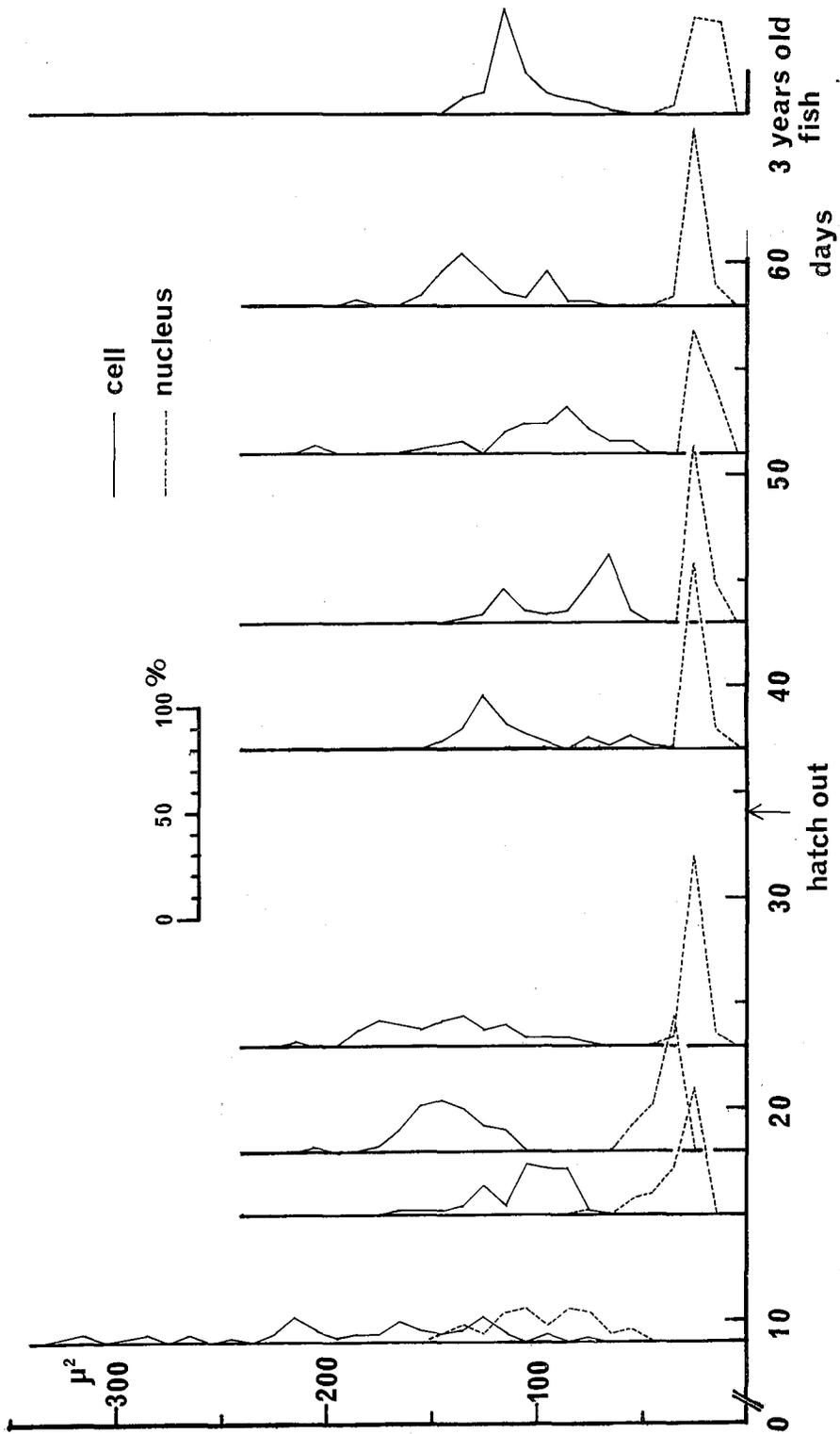


Fig. 1. Daily Variation of Cell Area and Nucleus Area of Erythrocyte-Series. (Amago)

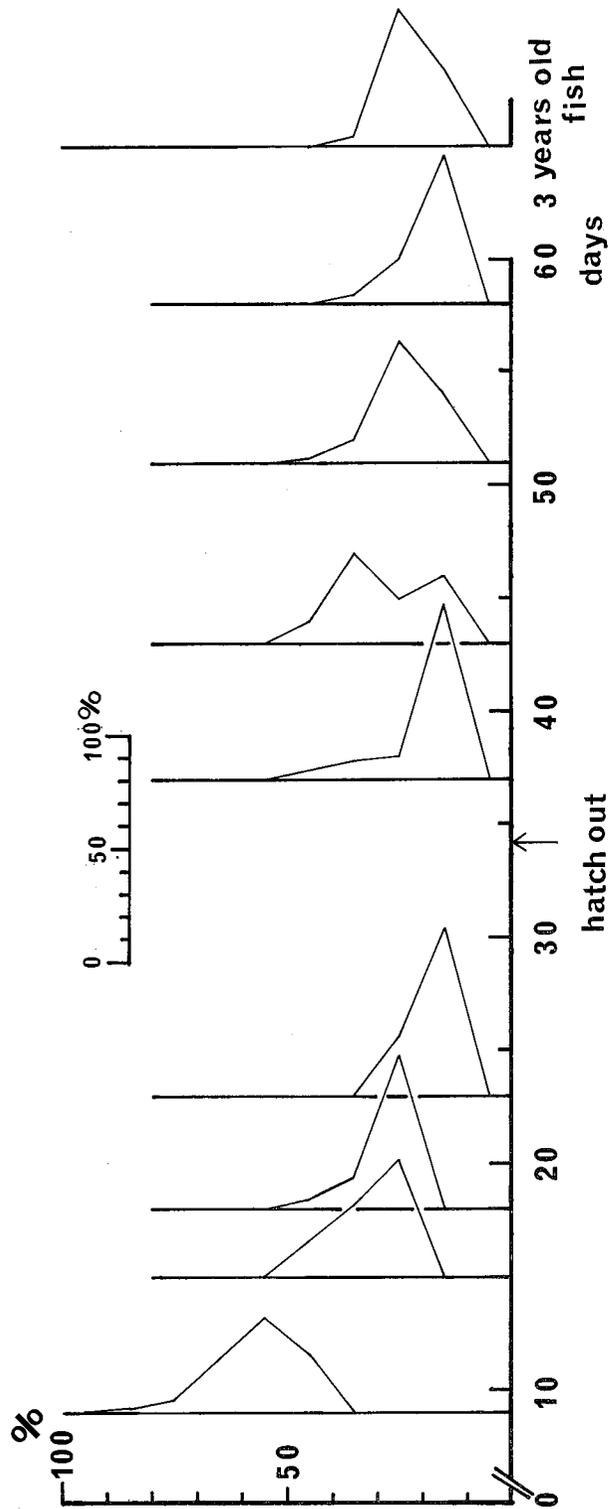


Fig. 2. Frequency of Nucleus Area-Cell Area Ratio in Erythrocyte Series. (Amago)

要 約

アマゴ *Oncorhynchus rhodurus* J., ニジマス *Salmo gairdnerii irideus* G., の卵内発生期, 稚仔魚期における, 赤血球造血について検討し, 次の点を明らかにした。

1. アマゴ, ニジマスは卵黄のう造血過程(血島造血)を持つ。
2. 血島由来と思われる第一次赤血球は, ほぼ円形, 正染色の大形赤血球で, 真円の核を持つ。パーオキシダーゼ弱陽性であり, 第二次赤血球とは形態とともに明らかに異なる。
3. 第一次赤血球の出現のピークは, ふ化前後であり, ふ化後, 速やかに消滅する。

謝 辞

報告に際し, 御指導を賜った, 南西海区水産研究所齊藤雄之助増殖部長, 同藤谷超栄養生理研究室長に厚く御礼申上げる。

また, 本研究の端緒を与えて下さり, 貴重な文献を御提供下さった, 淡水区水産研究所横手元義技官に厚く御礼を申上げる。

実験に際し, 研究材料を心よく御提供下さった, 山本雛一氏に心から感謝する。

研究に際し, 協力を頂いた南西海区水産研究所職員各位に感謝する。

文 献

- 1) 天野重安, 1948: 血液学の基礎(上巻), 東京; 丸善.
- 2) JORDAN, E., 1938: Comparative Hematology. Hand book of Hematology. New York. Medical book Department of Haepet. & Brothers.
- 3) 尾曾越文亮, 1963: 系統発生と造血(脊椎動物), 日本血液学全書1形態, 東京; 丸善.
- 4) 同, 1953: 骨髄の系統発生. 血液学討議会報告, 第5輯, 日本血液学会.
- 5) JORDON, E. and C. SPEIDEL, 1924: Studies on Lymphocytes. Jour. Morphology. Vol. 38.
- 6) TOPP, W., 1955: Die Blutbildung und die Blutbildungsstätten beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). zeit. Fischerei. Band IV Hert I.
- 7) CATTON, W., 1951: Blood Cell Formation in Certain Teleost Fishes. Blood (Jour. Hematology). Vol. VI, New York, Grune & Stratton.
- 8) 結城了伍, 1963: 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. 昭和38年度日本水産学会シンポジウム. 魚類血液学の水産への応用, 日水誌, 29.
- 9) 小宮正文, 1964: 図説血球の見方, 東京; 南山堂.
- 10) BLOOM, W., 1938: Embryogenesis of Mammalian blood. Handbook of Hematology. New York. Medicalbook Department of Haepet & Brothers.
- 11) 三井俣夫, 他, 1956: ヘモグロビンによる附加的パーオキシダーゼ反応について 1. 医学と生物学, 第40巻, 3号.
- 12) YUKI, R.; 1957: Blood Cell Constituents in Fish. 1. Peroxidase staining of the Leucocytes in Rainbow Trout (*Salmo irideus*). Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ. VIII, 1. 1957.
- 13) ; 1958: ibid., VIII, 4. 1958.

Explanation of the plates

Plate I.

- Fig. 1. Primitive erythroblasts in the blood island. x400 Amago M-G stain.
- Fig. 2. Cytoplasmic projection on primitive erythroblasts. x1000 Amago M-G stain.
- Fig. 3. Large basophilic erythroblasts. x1000 Amago M-G stain.
- Fig. 4. Large erythroblasts. x1500 Rainbow trout M-G stain.
- Fig. 5. Small erythroblasts. x1500 Rainbow trout M-G stain.
- Fig. 6. Small erythroblasts and basophilic erythroblast. x1500 Rainbow trout M-G stain.
- Fig. 7. Primitive erythroblast. x1500 Amago M-G stain.
- Fig. 8. Hook-shape projection on primitive erythroblast. x1500 Amago M-G stain.
- Fig. 9. Primitive erythrocytes and basophilic erythroblasts. x400 Amago M-G stain.
- Fig. 10. Primitive erythrocytes. x400 Amago M-G stain.
- Fig. 11. Developed erythrocytes. x1000 Amago M-G stain.
- Fig. 12. Peroxydase reaction positive leukocyte and slight positive primitive erythrocytes. x1500 Rainbow trout.

Plate II.

- Fig. 1. Secondary basophilic erythroblast and small erythroblast. x1500 Rainbow trout M-G stain.
- Fig. 2. Leukocyte. x1500 Rainbow trout M-G stain.
- Fig. 3. Leukocyte. x1500 Rainbow trout M-G stain.
- Fig. 4. Lymphoblast. x1500 Rainbow trout M-G stain.
- Fig. 5. Division of Lymphoblast. x1000 Amago M-G stain.
- Fig. 6. Lymphocyte. x1000 Amago M-G stain.
- Fig. 7. Reticulocyte and primitive erythrocytes. x1500 Rainbow trout M-G stain.
- Fig. 8. Primitive and secondary erythrocytes. x1000 Amago M-G stain.
- Fig. 9. Anuclear cells of primitive erythrocyte. x400 Amago M-G stain.
- Fig. 10. Normal appearance of circulation blood in adult fish. (3 year old). x400 Amago M-G stain.
- Fig. 11. Secondary erythrocytes and leukocyte of adult fish blood. x1000 Amago M-G stain.

PLATE I

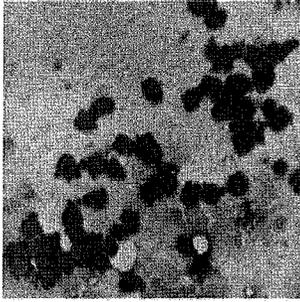


Fig. 1.

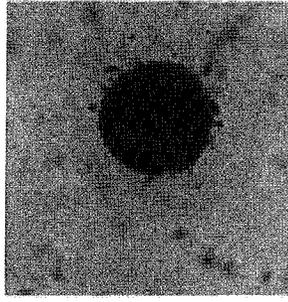


Fig. 2.

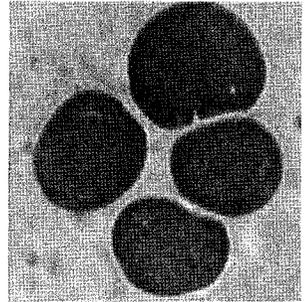


Fig. 3.

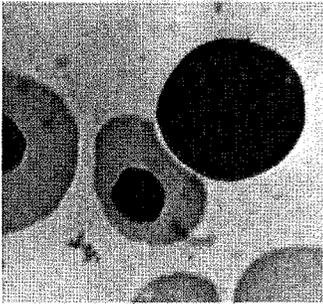


Fig. 4.

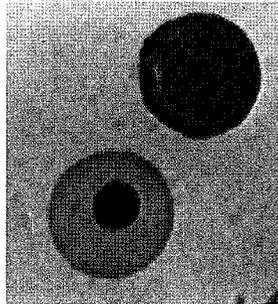


Fig. 5.

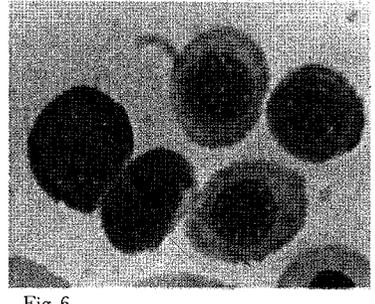


Fig. 6.

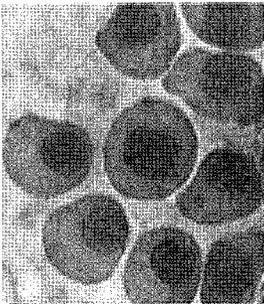


Fig. 7.

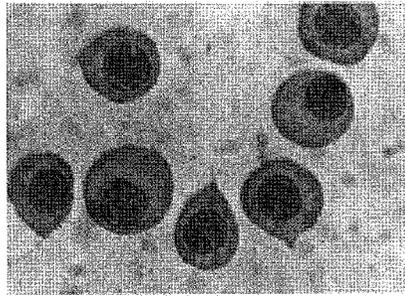


Fig. 8.

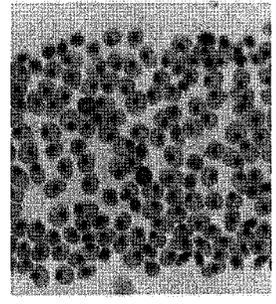


Fig. 9.

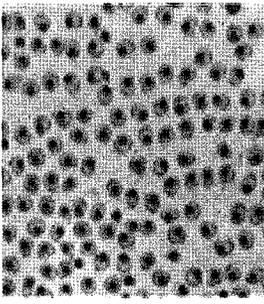


Fig. 10.

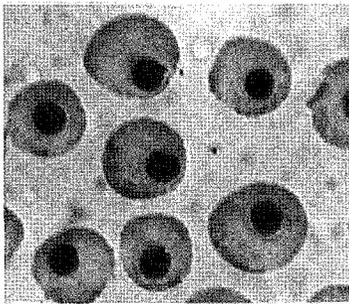


Fig. 11.

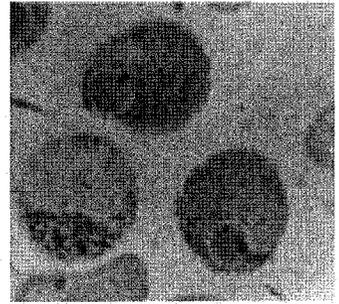


Fig. 12.

PLATE II

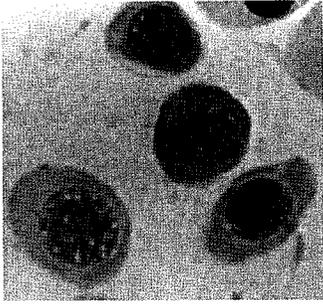


Fig. 1.



Fig. 2.

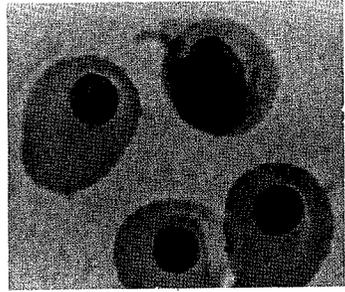


Fig. 3.

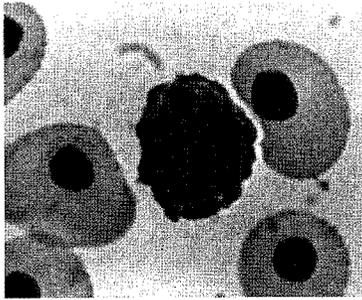


Fig. 4.

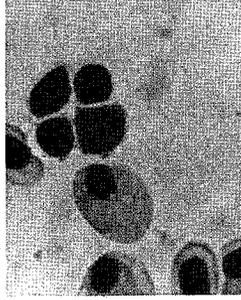


Fig. 5.

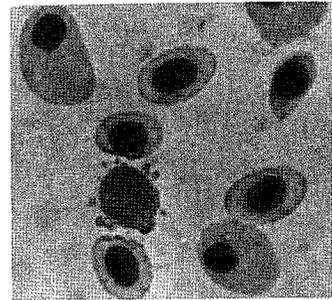


Fig. 6.

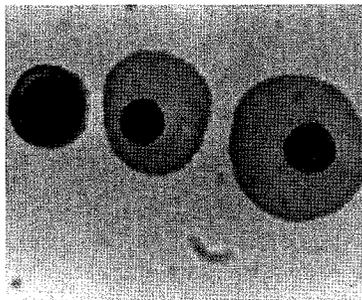


Fig. 7.

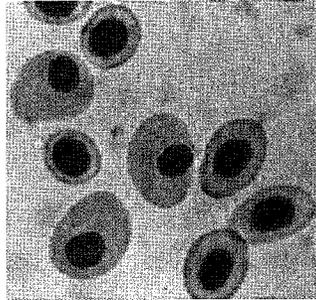


Fig. 8.

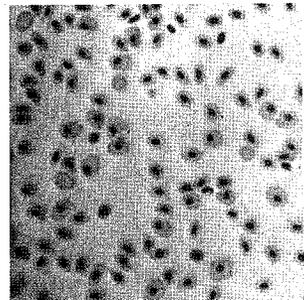


Fig. 9.

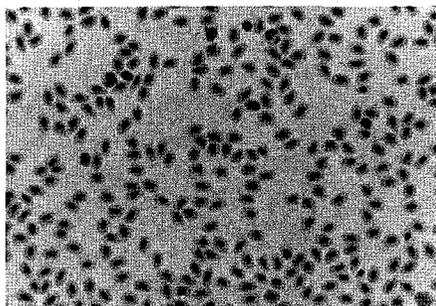


Fig. 10.

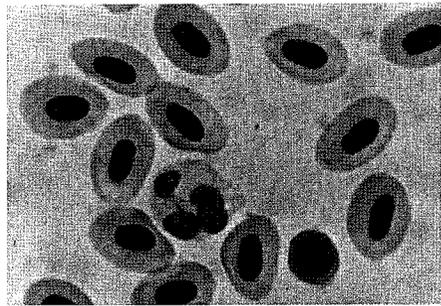


Fig. 11.