

## コイ腹腔滲出細胞からのマクロファージの調製

原 研治, 槌本 六秀, 橘 勝康  
長富 潔, 古場 久代\*1, 石原 忠

Preparation of Macrophage Monolayer from Carp  
Peritoneal Exudate Cells

Kenji HARA, Mutsuhide TSUCHIMOTO, Katsuyasu TACHIBANA,  
Kiyoshi OSATOMI, Hisayo KOBAYASHI\*1, and Tadashi ISHIHARA

We investigated the preparation of macrophage monolayer from carp peritoneal exudate cells (PEC) to clarify the biosynthesis and processing of cathepsins. PEC collected at 24h interval after elicitation with 6% sodium caseinate or thioglycolate medium were transferred to culture dish in RPMI 1640 (RPMI), and the cells were incubated in CO<sub>2</sub> incubator for 2h. To distinguish macrophage and neutrophil, the adherent cells washed with RPMI to remove non-adherent cells were analyzed histochemically by the staining of two different esterase activities. The number of PEC was maximally increased at 3 days after injection with 15 ml of sodium caseinate, whereas that of macrophages was at 4 days after injection. Most (about 90%) of cells cultured for 24h were positive for  $\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase activity but they were not positive for Naphthol AS-D chloroacetate esterase activity, confirming them to be macrophage. They were able to culture for 48h in RPMI containing 5% heat inactivated calf serum. It was possible to prepare two culture dishes of macrophage monolayer ( $1.33 \times 10^5/cm^2$ ) from one carp (800-900g) by this method.

**Key word:** マクロファージ macrophage ; 腹腔滲出細胞 peritoneal exudate cells : 好中球 neutrophil ; コイ carp ; 非特異性エステラーゼ non-specific esterase.

魚類においても、哺乳類同様、その細胞内蛋白分解の役割を担っているのはリソゾーム内のカテプシン群と考えられている。これらリソゾームのカテプシン群は魚類の死後の筋肉蛋白の自己消化にも関与し、その鮮度低下を速めると考えられている。またサケでは筋肉の病的軟化現象の一因ともなる<sup>1, 2)</sup>。魚類は日本人にとって重要な蛋白源であるにもかかわらず、カテプシン群の研究は、これまでのところ精製あるいは酵素学的性質を調べるにとどまっております<sup>3-8)</sup>、陸上動物と比べ活性化機構や機能に関する基礎的研究が明らかに不足している。哺乳動物では腹腔マクロファージ<sup>9, 10)</sup>や肝細胞<sup>11, 12)</sup>などの生きた細胞を用いこれらの研究が行なわれており、著者ら

も初代培養系に移したラット腹腔マクロファージを用いてカテプシンが不活性型プロ酵素で合成され、さらにこのプロ酵素はプロセッシングプロテアーゼによって活性型成熟酵素に変換されることを報告している<sup>9, 10)</sup>。

魚類のカテプシン群においても生理学的・食品学的見地から活性化機構の研究が必要であるが、そのためにはカテプシンに富んだマクロファージのような細胞が、生きた状態で、かつ大量に必要となる。しかしながら魚類のマクロファージに関する研究はこれまでのところ、形態学的研究やファゴサイトーシスの研究<sup>13, 14)</sup>に限られている。

本研究では、コイ腹腔マクロファージを大量に培

\*1活水女子短期大学 (Kwassui Women's Junior College, Higashiyamate, Nagasaki 850 Japan).

養系に移し, この初代培養系を確立することを目的とした。マクロファージは生体の免疫防御機構において異物貪食や抗原認識機構に重要な働きを担っているため, この系が確立できればカテプシン群の研究のみならず魚類の免疫系の実験にも役立つものと考えられる。

なお, 本実験は平成5年度文部省科学研究の一環として行なった。

### 実験方法

**供試魚** 幸田水産(株)より購入した800-900gの養殖コイのうち, サイズが $35\text{cm} \pm 0.5\text{cm}$ のものを選別し, 各試験区について, それぞれ5尾を実験に供した。

**試薬** コイ腹腔浸出細胞(PEC)誘導のための sodium caseinate はナカライテスク社, thioglycolate medium は栄研化学社のもを用いた。細胞の培養液は日水製薬社の RPMI 1640 を, 細胞染色用の May-Grünwald 液と Giemsa 液はメルク社の試薬を用いた。非特異性エステラーゼの基質にはシグマ社の  $\alpha$ -Naphthyl butyrate と Naphthol AS-D chloroacetate を用いた。活性染色にはナカライテスク社の Fast Blue RR を, N, N-ジメチルホルムアミドは和光純薬社のもを用いた。

**培養液の調製** RPMI 1640 10.4g, 炭酸水素ナトリウム1.0g, 抗生物質(ペニシリン 100,000 unit, ストレプトマイシン0.1 g)を1 l の蒸留水に溶かした。使用に際し, 牛胎児血清を5%添加し, ミリポア STERIVEX-GS(0.22 $\mu$ m)で濾過滅菌を行なった。

**サイトスピン** サイトスピンは TOMINAGA WORKS LTD の Model SC-2 を用い, 1,000回転2分間の遠心で行なった。そのスライドグラスに付着した細胞は May-Giemsa 染色を行ない, 顕微鏡で観察した。

**細胞数の測定** 採取した PEC 懸濁液中の細胞数は Thoma の血球計算板を用い, 顕微鏡下で総細胞2000個以上の結果から算出した。

**腹腔浸出細胞(PEC)の誘導と調製** マクロファージを含む PEC の誘導には以後の実験のことを考え, 調製の容易な sodium caseinate あるいは thioglycolate medium を選んだ。コイの腹腔に種々の濃度の滅菌した sodium caseinate あるいは thioglycolate medium を注射器で注入し, 所定の期間飼育後, 内臓を傷つけないよう注意深く開腹し, 1%

生理食塩水35mlで PEC を CORNING Centrifuge Tube に回収した。この PEC 懸濁液を遠心(300 $\times$ g, 2分)し, 沈殿した PEC を生理食塩水で数回洗浄した。ここで得られた細胞を適量量の培養液(RPMI 1640)に懸濁しセル数をカウントした後, 細胞培養に供した。なお, 実験に使用した器具は滅菌したものを用いた。

**マクロファージの選別と初代培養** 採取した PEC をプラスチックシャーレ(35 $\times$ 10mm)に分注し, CO<sub>2</sub>インキュベーター中(25°C)で2時間放置した。次にシャーレを取り出し, 1%生理食塩水で軽く3回洗浄した。マクロファージと好中球はガラスやプラスチックに強く接着するためシャーレに付着しているが, この操作で赤血球やリンパ球などは洗い流されてしまう。この細胞に細胞培養液を添加し, CO<sub>2</sub>インキュベーター中でさらに24時間, 48時間培養しマクロファージの培養状況を観察した。なお, これらの操作は全てクリーンベンチ内で無菌的に行なった。

**マクロファージと好中球の識別** マクロファージと好中球は両者ともプラスチックシャーレに接着し顕微鏡的観察では識別できない。そこで哺乳類の単球やリンパ球の識別によく用いられている非特異性エステラーゼ活性<sup>15, 16)</sup>を測ることにより両者を識別した。さらに好中球の中性顆粒を染色する三酸染色法<sup>17)</sup>による識別も行った。なお, 培養細胞中のマクロファージと好中球の割合は以下に示す細胞染色後, 顕微鏡下で総細胞2000個以上の結果から算出した。

#### a) Naphthyl butyrate esterase と Naphthol

##### AS-D chloroacetate の二重染色による識別

PEC の塗沫標本を乾燥後, 直ちに緩衝アセトンホルマリン固定液で30秒間固定した。この標本を蒸留水で3回以上水洗後室温で10~30分間乾燥した。マクロファージ染色のため, 所定の方法で調製したリン酸緩衝液(pH 6.3)・Fast Garnet GBC・ $\alpha$ -Naphthyl butyrate・エチレンジグリコールモノメチルエーテル反応液に30分浸漬した。なお, この溶液に NaF を添加してマクロファージに特異的な活性阻害を確認した。

次に顆粒球染色のため, 上記塗沫標本を蒸留水で3回洗浄し乾燥後, 所定の方法で調製したリン酸緩衝液(pH 7.4)・Fast Blue RR・N, N-ジメチルホルムアミド反応液に室温で15~60分間浸漬した。その後, 流水で十分に水洗後1%メチルグリーンで2

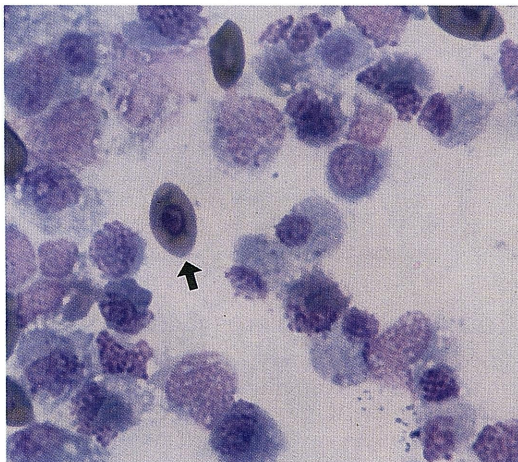
分間染色し、流水洗浄後グリセリンゼリー封入で油浸観察した。この方法で、単球では胞体にびまん性赤褐色反応産物が、好中球系細胞では胞体に顆粒状青色反応産物が見られる。

#### b) Ehrlich-Biondi の<sup>17)</sup> 三酸染色法

定法に従い、三酸染色溶液 (オレンジ G 飽和水溶液、酸フクシン飽和水溶液、メチルグリーン飽和水溶液、無水アルコール) 混合液で10分間染色し、0.5% 酢酸で洗浄後、70% アルコールで脱色・脱水し顕微鏡観察すると中性顆粒は美しい紫紅色を呈する。

### 実験結果

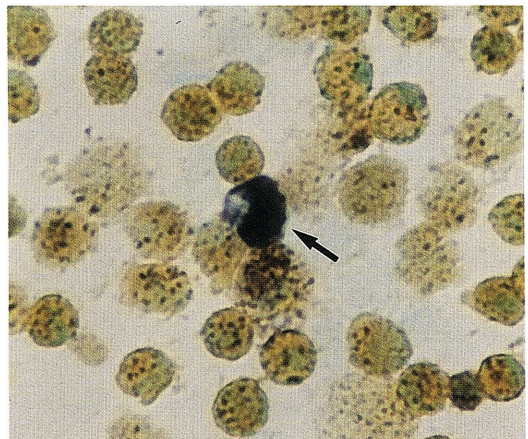
**May-Giemsa 染色による PEC の確認** まず最初に、哺乳動物で行われている誘導剤で<sup>9, 10)</sup>、コイ腹腔から PEC が誘導され、かつ採取が可能かどうかを確認した。すなわちコイ腹腔に sodium caseinate を注入し、4 日目に開腹後、実験方法の項で述べた方法で PEC を採取しサイトスピンの後、May-Giemsa 染色し細胞を確認した。Fig. 1 にその一例を示したが、開腹の仕方によっては多くの赤血球 (矢印) が混在していたが、十分な数の白血球が誘導されることがわかった。



**Fig. 1** May-Grünwald Giemsa stain of peritoneal exudate cells. ( $\times 600$ ) Fifteen ml of 6% sodium caseinate were injected to carp peritoneum to elicit macrophage. Peritoneal exudate cells obtained by peritoneal lavage with physiological saline solution were collected at 4 days after stimulation. The cells were stained by the method of May-Grünwald Giemsa after cytospin. Arrow indicates erythrocyte.

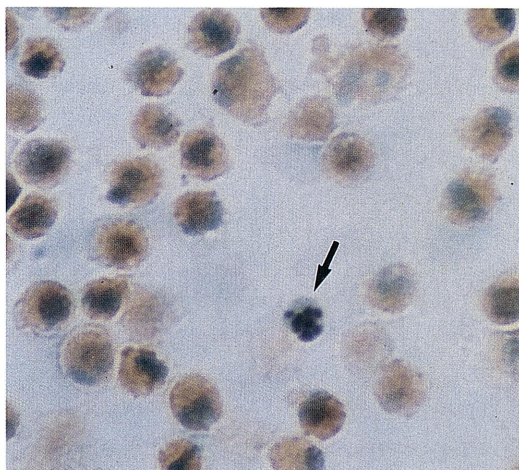
**マクロファージと好中球との識別:** マクロファージと好中球は両者ともプラスチックシャーレに接着し顕微鏡的観察では識別できない。そこで哺乳類の単球やリンパ球の識別によく用いられている非特異性エステラーゼ活性を染色することにより両者を識別した。上記同様 sodium caseinate 注入後 4 日目に開腹し採取した PEC を 5% 牛胎児血清を含んだ RPMI 1640 に  $2 \times 10^6$  / ml となるよう懸濁し、スライドグラスに滴下した。それを  $\text{CO}_2$  インキュベーター中で  $25^\circ\text{C}$ 、2 時間培養後、生理食塩水で 3 回洗い流し、非接着性の細胞を除去した。この標本を用い実験方法の項に示してある方法に従い  $\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase と Naphthol AS-D chloroacetate の二重染色を行った。その結果、Fig. 2 に示したように多くの細胞は胞体にびまん性赤褐色反応産物が見られこれらの細胞はマクロファージと考えられた。一方、この内の 1 細胞 (矢印) は胞体に顆粒状青色反応産物が見られることから、この細胞は好中球と考えられた。

次に上記と同様の標本を用い、常法に従い好中球を確かめるため好中球系細胞の顆粒を染色する三酸染色を行った。その結果、Fig. 3 に示したように、あ



**Fig. 2** Cytochemistry of esterase activities adherent cells. ( $\times 600$ ) Peritoneal exudate cells collected at 4 days after injection of 6% sodium caseinate were adhered for 2h in RPMI 1640. The adherent cells were analyzed histochemically by the staining of two different esterase activity to distinguish macrophage and neutrophil.  $\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase for macrophage: dark- or light-brown; Naphthol AS-D chloroacetate esterase activity for neutrophil: blue (arrow).





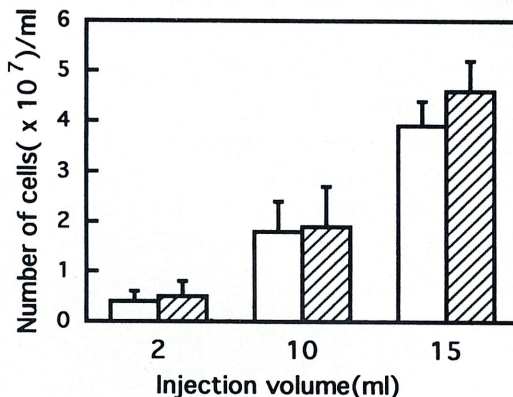
**Fig. 3** Staining of epsilon granule in adherent cells. ( $\times 600$ )  
The adherent cells prepared as the same conditions in Fig. 2 were stained by the method of Ehrlich-Biondi to confirm neutrophil.  
Epsilon granules: dark purple (arrow).

る細胞の顆粒 (矢印) は美しい紫紅色を呈した。この細胞は先の Naphthol AS-D chloroacetate esterase 活性が陽性であった細胞と同じ頻度で出現することからこの細胞は好中球と考えられた。

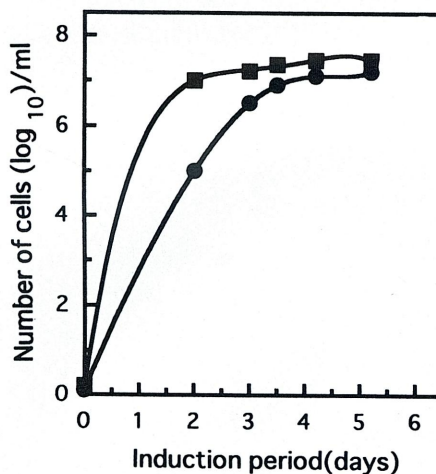
**誘導剤の注入量の検討** 白血球の誘導は刺激剤の種類と量により異なる。そこで哺乳類でよく用いられる thioglycolate medium<sup>18)</sup> あるいは 6% sodium caseinate<sup>9, 10)</sup> を用いて刺激剤の注入量の検討を行った。

コイ腹腔に 2ml, 10ml, 15ml の誘導剤を注入後 4 日目に誘導された PEC を採取し、それぞれの細胞数を血球計算板にて測定し誘導条件を検討した。なお、供試魚は各刺激剤に対し 5 尾用い、細胞数の計算には 1 尾について最低細胞 2000 個を観察し算出した。その結果、Fig. 4 に示したように thioglycolate medium, sodium caseinate とともに 15ml の注入で PEC 量が最大となった。また thioglycolate medium よりも sodium caseinate の方がわずかながら有効であることがわかった。

**誘導期間の検討** 先の実験で最適と考えられた 6% sodium caseinate 15ml をコイ腹腔内に注入後、2日、3日、4日、5日と経時的に開腹後、誘導された PEC 数を測定し、最適誘導期間を検討した。その結果、Fig. 5 に示したように注入後 3 日目で PEC 数がほぼ一定となった。しかしながら非特異的



**Fig. 4** Change in the number of peritoneal exudate cells after injection of different volumes of stimuli.  
Peritoneal exudate cells were collected at 4 day after injection with 6% sodium caseinate or thioglycolate medium, and the number of cells were counted.  
▨ : 6% sodium caseinate;  
□ : thioglycolate medium.



**Fig. 5** Changes in the number of peritoneal exudate cells after injection.  
Peritoneal exudate cells (PEC) were collected at various periods after injection of 6% sodium caseinate, and the number of PEC and macrophage were counted.  
■ : number of PEC;  
● : number of macrophage.

エステラーゼの二重染色法の結果、マクロファージは 4 日目以降で最大となり、マクロファージの採取のためには刺激剤注入後 4 ~ 5 日目に回収するのがよいことがわかった。

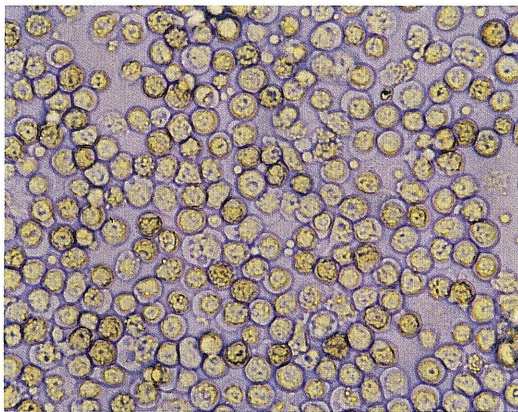
**マクロファージの初代培養** 上記の結果を参考に



コイ腹腔からマクロファージを採取し初代培養が可能であることを検討した。すなわち 6% sodium caseinate 15ml をコイ腹腔に注入後、5日目に PEC を採取した。この PEC を 5% 牛胎児血清を含んだ RPMI 1640 に  $2 \times 10^6$ /ml となるよう懸濁し、そのうち 2.5ml を培養プラスチックシャーレに移し、CO<sub>2</sub> インキュベータ中で培養した。2時間後接着した細胞を先の培養液で 3 回洗浄し、非接着性の細胞を除去した後、同培養液 2.5ml 加えさらに 24 時間、48 時間培養後細胞を観察した。Fig. 6 に 48 時間培養後の顕微鏡写真を示したが、細胞は十分生きており、図には示していないが細胞染色で調べた結果、細胞の約 90% がマクロファージと考えられた。この方法でコイ 1 尾より直径 6 cm の培養シャーレ 2 枚にコンプレント ( $1.33 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup>) なマクロファージが調製可能であった。

### 考 察

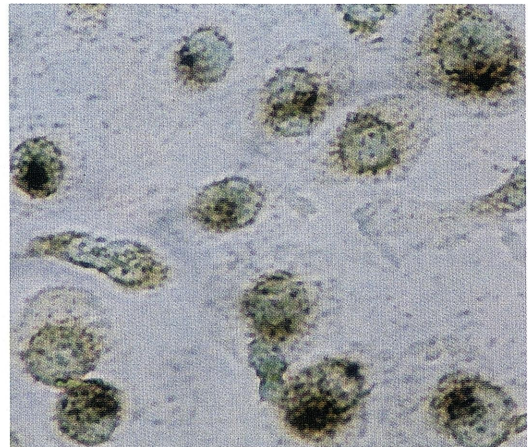
近年の分子生物学の進歩に伴い、生体中の生理活性物質の生理機能を調べるために多種の培養細胞が用いられている。細胞内蛋白の代謝を担っているカテプシン群の酵素も例外ではなく、我々はラットマクロファージを用いて<sup>9, 10</sup>、西村等はラット肝細胞を用いて<sup>11, 12</sup> その活性化機構などを調べている。魚類においても多くの有用細胞株がサケ、マス類をはじめとして報告されている<sup>19</sup>。しかしながらこれら魚類の細胞はヒレや卵巣、繊維芽細胞、上皮細胞のものであり、カテプシン群を多く含むマクロファ



**Fig. 6** Monolayer macrophages in culture dish. ( $\times 200$ )  
The adherent cells described in Fig. 2 were cultured for 48h in RPMI 1640 containing 5% heat inactivated calf serum.

ジ等の培養についての報告はない。このような観点から、本研究ではコイの腹腔マクロファージの初代培養系を確立することを目的として行った。

実験の手始めとして、コイ腹腔からどの程度の PEC 誘導が可能か、また PEC のうち、マクロファージと性質や形態が類似している好中球が非特異性エステラーゼ活性染色で識別可能かどうかを調べた。Fig. 2 に示したように多くの細胞は  $\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase 活性が陽性であり胞体にびまん性赤褐色反応産物が見られた。これらの結果は同時に行ったラット PEC の結果と類似していた (Fig. 7)。染色の程度はラットの結果に比べやや薄い識別は十分可能であり、図には示さなかったが誘導期間とともに徐々に濃くなった。哺乳類の単球やマクロファージはこの活性が常に強陽性であることから<sup>15</sup> この細胞はマクロファージと考えられた。一方、この図の中の 1 細胞は Naphthol AS-D chloroacetate esterase 活性が陽性であり胞体に顆粒状青色反応産物が見られた (Fig. 2 矢印)。哺乳類でも顆粒球がこの活性が陽性であることがわかっており<sup>15</sup>、図には示さなかったが今回のラット PEC でも同様の結果が得られている。さらに、三酸染色法で  $\epsilon$  顆粒を確かめたところ、美しい紫紅色を呈した細胞が認められた (Fig. 3)。この細胞の出現頻度は



**Fig. 7** Cytochemistry of esterase activities of rat macrophage. ( $\times 600$ )  
Peritoneal exudate cells collected at 4 days after injection of 20 ml 6% sodium caseinate were adhered for 2h in RPMI. The adherent cells were analyzed histochemically by the same method in Fig. 2.  $\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase for macrophage: dark- or light-brown.

Naphthol AS-D chloroacetate esterase 活性が陽性な細胞と同等であることからこの細胞は好中球と考えられた。これらの結果から我々は、コイ PEC 中のマクロファージと好中球の識別は非特異性エステラーゼの二重染色法で可能であると考えている。魚類の白血球の分類に関しては種々の研究が行われているが、魚種間で細胞の染色性に大きな差異が認められており、統一的な分類基準は今のところない<sup>14)</sup>。浜口ら<sup>14)</sup>はブリの PEC 中の白血球の識別を猪子および糸賀<sup>20)</sup>の方法に従い、ペルオキシダーゼ染色を行った後、Giemsa 染色を行って分類している。しかしながら、ペルオキシダーゼ活性とギムザ染色ではマクロファージと好中球の分類は困難と思われる。Suzuki<sup>21)</sup>はコイ、フグ血液中の白血球の細胞化学的研究を行っており、その中で好中球は  $\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase および Naphthol AS-D chloroacetate esterase 活性が共に陽性であったと報告している。このことから Fig.2 の Naphthol AS-D chloroacetate esterase 活性が陽性であった細胞 (矢印) は好中球と考えられた。

魚類 PEC は誘導剤の種類や量により異なることが考えられる。そこで哺乳類でよく用いられている<sup>9, 18)</sup> 2 種類の誘導剤を用いて誘導される PEC の量を調べた結果、15ml の 6% sodium caseinate を注入すれば多量のマクロファージが採取できることがわかった。浜口ら<sup>14)</sup>は体重が  $83.1 \pm 1.0$  g ブリを用い *Pasteurella piscicida* ホルマリン不活化菌体 (FKB) とプロテオースペプトン 1ml を刺激剤として、Suzuki<sup>21)</sup>は 200-300 g のテラピアおよびコイに液状パラフィン 0.4-0.6 ml 注入し PEC を採取している。彼等は貪食能や細胞組織化学的な実験が目的のため、採取された全細胞数は少ない。我々は採取した細胞を培養し、ラジオアイソトープを取り込ませるパルス-チェイス実験に供することを目的としているため、できるだけ大きいコイを用いた。しかしながら 18ml 以上の接種は腹腔の容量を越え、かえって赤血球が混入し不都合であった。

PEC は誘導剤注入後の時間によって細胞相が変わることがわかっている。本実験では PEC は誘導剤注入後 3 日目に最大となったがマクロファージは 4 日目に最大となった (Fig.3)。Suzuki<sup>21)</sup>は液状パラフィン注入後 6 日目に PEC を採取している。浜口ら<sup>14)</sup>のブリの場合、誘導時間は *Pasteurella piscicida* FKB は 12 時間、プロテオースペプトンは 24 時間で最高となっており、コイの場合より最大値にな

るのが早い。これは魚種による相違と考えられるが、魚体あるいは刺激剤の違いによる可能性も考えられる。

PEC はマクロファージ以外に数種の白血球が混入しており<sup>14, 21)</sup>、さらに採取時に血液由来の赤血球も混入している (Fig.1)。我々は PEC を培養液とともにプラスチックシャーレに入れ CO<sub>2</sub> インキュベーター中 25°C で 2 時間放置することによって赤血球やリンパ球などの非接着性の細胞を除去した。

カテプシンの生合成や活性化機構の研究のためには直径 6 cm のプラスチックシャーレにマクロファージがモノレイヤーの状態でも最低 24 時間培養しなければならぬ<sup>9, 10)</sup>。我々は上記のシャーレに付着した細胞を洗った後、再び培養液を加え、25°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 24 時間、48 時間培養したが、用いた培養液で 48 時間は培養可能であった (Fig.6)。しかしながら 48 時間以上の培養では若干の細胞が剥がれてきた。筆者らはラットマクロファージの培養を 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで行っていたので、コイの場合も当初 37°C で培養したところ、かなりの細胞が剥がれてしまった。今回は 25°C に下げて培養を行ったが 48 時間以上の培養には CO<sub>2</sub> インキュベーターの温度や培養液の種類などをさらに検討する必要がある。

今回の実験から、約 800 g のコイに 6% sodium caseinate 15ml を腹腔に注入後、4 日目に PEC を採取し CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2 時間培養後、非接着性の細胞を洗い流せば約 90% がマクロファージの細胞が採取できることがわかった。この方法でコイ 1 尾より直径 6 cm の培養シャーレ 2 枚にコンプレント ( $1.33 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup>) なマクロファージが調製でき、さらに、このマクロファージは 48 時間の培養が可能であった。このマクロファージ中のカテプシン量はイムノプロットングで十分検出できることから、今後この細胞を用いてカテプシンの生合成と活性化機構を明らかにする予定である。

## 文 献

- 1) 小長谷史郎: 東海水研報, **109**, 41-52 (1983).
- 2) 小長谷史郎: 東海水研報, **116**, 39-47 (1985).
- 3) Kenji. Hara, A, Suzumatsu, and T, Ishihara: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1243-1252 (1988).
- 4) Ryuji Ueno, Seiji Ikeda, Kazuki Saakanaka, and Yoshishige Horiguchi: *Nippon Suisan*

- Gakkaishi*, **54**, 699-707 (1988).
- 5) Michiaki Yamashita and Shiro Konagaya : *Comp. Biochem. Physiol.*, **96**, 247-252 (1990).
  - 6) Michiaki Yamashita and Shiro Konagaya : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1271-1277 (1990).
  - 7) Michiaki Yamashita and Shiro Konagaya : *Comp. Biochem. Physiol.*, **95 B**, 149-152 (1990).
  - 8) Futoshi Aranishi, Kenji Hara, and Tadashi Ishihara : *Comp. Biochem. Physiol.*, **102 b**, 499-505 (1992).
  - 9) Kenji Hara, Eiki Kominami, and Nobuhiko Katunuma : *FEBS LETT*, **231**, 229-231 (1988).
  - 10) Eiki Kominami, Toshifumi Tsukahara, Kenji Hara, and Nobuhiko Katunuma : *FEBS LETT*, **231**, 225-228 (1988).
  - 11) Yukio Nishimura, Takahiro Kawabata, and Keitaro Kato : *Arch. Biochem. Biophys.*, **261**, 67-71 (1988).
  - 12) Yukio Nishimura, Jun Amano, Hiroshi Sato, Hiroshi Tsuji, and Keitaro Kato : *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**, 159-170 (1988).
  - 13) K. Suzuki : *J. Fish Biol.*, **29**, 349-364 (1986).
  - 14) 浜口昌巳, 田中卓史, 楠田理一 : *日水誌*, **55**, 1511-1515 (1989).
  - 15) 森井外吉, 滝上茂, 友田幸一 : *細胞組織化学(日本組織細胞化学会編)*, 学際企画, 129-148 (1980).
  - 16) 徳永徹 : *マクロファージ, 講談社サイエンティフィック*, 27-31 (1988).
  - 17) 加藤勝治 : *血液学研究法*, 南山堂書店, 446-448 (1948).
  - 18) Katsuyasu Tachibana, Guan-jie Chen, Dennis S. Huang, Philip Scuderi, and Ronald Ross Watson : *J. Leuko. Biol.*, **51**, 251-255 (1992).
  - 19) 黒木登志夫, 小山秀機, 瀬野悍二編 : *動物細胞マニュアル*, 共立出版, 327-336 (1993).
  - 20) 猪子恵司, 糸賀敬 : *九血会誌*, **24**, 1-6 (1974).
  - 21) Yuzuru Suzuki : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 1895-1899 (1986).