

ヤツメウナギ類（カワヤツメ、シベリアヤツメ）の好中球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 安本信哉, 松原 創

Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophils from Lampreys (Arctic Lamprey *Lethenteron camtschaticum* and Siberian Brook Lamprey *L. kessleri*)

Masakazu Kondo^{1,†}, Shinya Yasumoto¹ and Hajime Matsubara^{2,3}

Abstract : Two types of stratified (two-layer) granules (type 1, G-1; type 2, G-2) were observed in the neutrophils of lampreys, *Lethenteron camtschaticum* and *L. kessleri*. The G-1 consisted of chromophobic inner layer (L0) and outer layer (L1). On the other hand, the G-2 had chromatophilic L0 [eosinophilic and basophilic (metaazurophilic) in *L. camtschaticum*, basophilic (metaazurophilic) in *L. kessleri*] and chromophobic L1. Both lamprey species had same cytochemical characteristics. The L0 of G-1 showed positive reaction to alkaline phosphatase. Some lysosomal enzymes, such as acid phosphatase, β -glucuronidase, α -naphthyl acetate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase were detected in the L0 of G-2. The L0 of G-2 was also Sudan black B positive. The neutrophils lacked α -naphthyl butyrate esterase and peroxidase.

Key words : granule, neutrophil, lamprey, morphology, cytochemistry

緒 言

著者らはこれまでに、魚類の好中球に多条件下 Romanowsky型染色評価法 (Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV) を適用し、各種魚類における好中球顆粒の特徴を報告してきた (近藤ら^{1,2)} を参照)。前報³⁾ では、MRSVを現生の無顎類Agnatha (円口類 Cyclostomata) の一種であるヌタウナギ *Eptatretus burgeri* (ヌタウナギ目 Myxiniiformesヌタウナギ科 Myxinidae) の好中球に適用し、好中球には2種類の顆粒が存在すること、それらの顆粒はともに2層からなる成層

構造を有することを明らかにした。円口類にはヌタウナギ類 hagfish の他にヤツメウナギ類 lamprey (ヤツメウナギ目 Petromyzontiformes) が含まれ、現生種は3科10属47種 [ミナミヤツメ科 Geotriidae (1属1種), モルダキア科 Mordaciidae (1属3種), ヤツメウナギ科 Petromyzontidae (8属43種)] に分類されている^{*1}。

ヤツメウナギ類の顆粒性白血球 (顆粒球) はこれまでに、ヤツメウナギ科カワヤツメ属 *Lethenteron* の American brook lamprey *L. appendix*^{4),*2} とカワヤツメ Arctic lamprey *L. camtschaticum*^{5),*2}, 同科 *Lampetra* 属の European brook lamprey *L. planeri*^{6,7)} と European river lamprey *L. fluviatilis*⁷⁻¹⁰⁾,

¹水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

²東京農業大学アクアバイオ学科 (Department of Aquatic Biology, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture)

³現所属: 金沢大学理工研究域生命工学系 (present address: Faculty of Biological Science and Technology, Institute of Science and Engineering, Kanazawa University)

[†]別刷り請求先 (corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

*¹ FishBaseによる (previsionally accepted種の2種を含む)。

*² Jordan and Speidel (1930)⁴⁾ の *Lampetra wilderi* と Fujii (1981)⁵⁾ の *Lampetra japonica* はそれぞれ *Lethenteron appendix* と *Lethenteron camtschaticum* のシノニムである (FishBaseによる)。

同科 *Petromyzon* 属の sea lamprey *P. marinus*^{8,11)}, ミナミヤツメ科 フクロヤツメ属の フクロヤツメ pouched lamprey *Geotria australis*¹²⁾ で観察されている。また, *L. planeri* の幼生 (Ammocoetes) や⁶⁾, *L. fluviatilis* あるいは *L. planeri* の幼生¹³⁾ および フクロヤツメの幼生でも報告されている¹²⁾。ヤツメウナギ類の顆粒球の種類数とその名称は, 魚種あるいは研究者によって様々であるが⁴⁻¹²⁾, Rowleyら (1988) はヤツメウナギ類の顆粒球には好中球系の細胞 (neutrophilic/heterophilic granulocyte) が含まれるとしている¹⁴⁾。しかし, ヤツメウナギ類の好中球顆粒の染色性については報告によって異なり, カワヤツメの好中球には Giemsa染色によって染色性の異なる2種類の顆粒 (染色性が弱く微細な顆粒と赤紫色の大型顆粒) が観察されているが⁵⁾, *L. fluviatilis* では Wright染色あるいは Giemsa染色した好中球に薄青紫色 (blue-lilac) の顆粒⁹⁾ あるいは May-Grünwald・Giemsa染色でアズール好性を示す顆粒が認められている¹⁰⁾。一方, *P. marinus* とフクロヤツメの好中球顆粒は明瞭な染色性を示さず好中性とされている^{11,12)}。

本研究ではヤツメウナギ科カワヤツメ属のカワヤツメ (回遊性¹⁴⁾) とシベリアヤツメ *L. kessleri* (淡水で一生を過ごす¹⁴⁾) の好中球の形態学および細胞化学的特徴を報告する。

材料および方法

北海道内の河川で採集されたカワヤツメ成魚2尾 (体重約120 g, 全長約40 cm) とシベリアヤツメ成魚6尾 (体重約6 g, 全長約16 cm) をそれぞれ2017年4月および5月に水産大学の飼育施設に搬入し, 水温10°Cで1週間馴致飼育したのちに実験に供した。飼育水には曝気した水道水を用い, 飼育期間中は無給餌とした。キナルジンで麻酔後, カワヤツメは尾部血管からヘパリンNa水溶液 (1,000 units/ml) を少量入れた注射器を用いて採血した。シベリアヤツメからの採血は, 尾部切断によった。流出血液に少量のヘパリンNa水溶液を添加した。血液塗抹標本の作製, 多条件下Romanowsky型染色評価法 (MRSV; Table 1), 各種細胞化学染色およびカワヤツメ好中球のzymosan粒子に対する貪食試験は前報²⁾と同様の方法で行った。なお, 貪食試験は10°Cで実施した。

結果および考察

いずれのヤツメウナギ類の血液中にも1種類の顆粒球が観察され (Figs. 1A & 1B), zymosan粒子に対する貪食が認められた (Fig. 1C)。両種の好中球はともに類円形であり, 細胞質には2種類の顆粒 (1型, G-1; 2型, G-2) が観察された (Figs. 1A & 1B, 2)。G-1はMRSVのいずれの染色条件においても難染色性を示した。一方, G-2の顆粒内には好染色性 (chromatophilic) の芯様構造が観察された。この芯様構造を顆粒の中心を囲む層 (L0) とし, L0を囲む領域をL1とする。L1はいずれの条件のRomanowsky型染色標本においても難染色性であった。一方, L0はカワヤツメでは染色条件によって赤色, 赤紫色あるいは難染色性であり (Table 2), シベリアヤツメでは赤紫色あるいは難染色性であった (Table 2)。両魚種のG-1には, Romanowsky型染色標本では識別できないが, 各種細胞化学染色の結果, アルカリ性フォスファターゼ (AIP) 陽性のL0が観察された (L0の周囲のL1はAIP陰性; Figs. 1D)。したがって, カワヤツメとシベリアヤツメの好中球はともに2種類の成層顆粒を有すると言える。なお, G-1のL0とG-2のL0はともに円形から卵円形であったが, 前者の方が大型であった (G1のL0, <0.5 μ m; G-2のL0, <0.3 μ m)。

AIP以外の細胞化学染色性についても種間に違いはなく, G-2のL0には酸性フォスファターゼ (AcP), β -グルクロニダーゼ (β -Glu), α -ナフチルアセテートエステラーゼ (α -NAE) およびナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (CAE) が検出された (Figs. 1E-1H)。また, G-2のL0はズダン黒B (SBB) 陽性であった (Fig. 1I)。 α -ナフチルプテレートエステラーゼ (α -NBE) とペルオキシダーゼ (PO) は検出されなかった (Table 3)。好中球には小型で円形または卵円形のperiodic acid Schiff (PAS) 反応陽性粒子が少数観察され, 細胞質基質も弱陽性を示したが, これらの陽性部位は α -アミラーゼ処理によって完全に消失した (Table 3)。また, トルイジンブルー染色では, 不定形の陽性小体 (Y小体) が少数認められたが, アルシアンブルー, オイルレッドOおよびズダンIII染色では陽性所見は観察されなかった。

これまでに, *Lethenteron appendix* には2種の顆粒球 (special granulocyteとeosinophil) が観察されているが⁴⁾,

Table 1. Staining conditions of multiple Romanowsky-type stain valuation

PN	Condition ^{1,2}	PN	Condition ^{1,2}
1	MG : DW	42	G : 1/150 M PB, pH 8.0, 1:20, 15 min
2	: 5 mM PB, pH 5.0	43	: 1/150 M PB, pH 8.0, 1:20, 60 min
3	: 5 mM PB, pH 6.0	44	: 1/150 M PB, pH 8.0, 1:100, 15 min
4	: 5 mM PB, pH 7.0	45	: 1/150 M PB, pH 8.0, 1:100, 60 min
5	: 5 mM PB, pH 8.0	46	MGG : DW, 1:20, 15 min
6	: 1/15 M PB, pH 5.0	47	: DW, 1:20, 60 min
7	: 1/15 M PB, pH 6.0	48	: DW, 1:100, 15 min
8	: 1/15 M PB, pH 7.0	49	: DW, 1:100, 60 min
9	: 1/15 M PB, pH 8.0	50	: 5 mM PB, pH 5.0, 1:20, 15 min
10	G : DW, 1:20, 15 min	51	: 5 mM PB, pH 5.0, 1:20, 60 min
11	: DW, 1:20, 60 min	52	: 5 mM PB, pH 5.0, 1:100, 15 min
12	: DW, 1:100, 15 min	53	: 5 mM PB, pH 5.0, 1:100, 60 min
13	: DW, 1:100, 60 min	54	: 5 mM PB, pH 6.0, 1:20, 15 min
14	: 0.5 mM PB, pH 5.0, 1:20, 15 min	55	: 5 mM PB, pH 6.0, 1:20, 60 min
15	: 0.5 mM PB, pH 5.0, 1:20, 60 min	56	: 5 mM PB, pH 6.0, 1:100, 15 min
16	: 0.5 mM PB, pH 5.0, 1:100, 15 min	57	: 5 mM PB, pH 6.0, 1:100, 60 min
17	: 0.5 mM PB, pH 5.0, 1:100, 60 min	58	: 5 mM PB, pH 7.0, 1:20, 15 min
18	: 0.5 mM PB, pH 6.0, 1:20, 15 min	59	: 5 mM PB, pH 7.0, 1:20, 60 min
19	: 0.5 mM PB, pH 6.0, 1:20, 60 min	60	: 5 mM PB, pH 7.0, 1:100, 15 min
20	: 0.5 mM PB, pH 6.0, 1:100, 15 min	61	: 5 mM PB, pH 7.0, 1:100, 60 min
21	: 0.5 mM PB, pH 6.0, 1:100, 60 min	62	: 5 mM PB, pH 8.0, 1:20, 15 min
22	: 0.5 mM PB, pH 7.0, 1:20, 15 min	63	: 5 mM PB, pH 8.0, 1:20, 60 min
23	: 0.5 mM PB, pH 7.0, 1:20, 60 min	64	: 5 mM PB, pH 8.0, 1:100, 15 min
24	: 0.5 mM PB, pH 7.0, 1:100, 15 min	65	: 5 mM PB, pH 8.0, 1:100, 60 min
25	: 0.5 mM PB, pH 7.0, 1:100, 60 min	66	: 1/15 M PB, pH 5.0, 1:20, 15 min
26	: 0.5 mM PB, pH 8.0, 1:20, 15 min	67	: 1/15 M PB, pH 5.0, 1:20, 60 min
27	: 0.5 mM PB, pH 8.0, 1:20, 60 min	68	: 1/15 M PB, pH 5.0, 1:100, 15 min
28	: 0.5 mM PB, pH 8.0, 1:100, 15 min	69	: 1/15 M PB, pH 5.0, 1:100, 60 min
29	: 0.5 mM PB, pH 8.0, 1:100, 60 min	70	: 1/15 M PB, pH 6.0, 1:20, 15 min
30	: 1/150 M PB, pH 5.0, 1:20, 15 min	71	: 1/15 M PB, pH 6.0, 1:20, 60 min
31	: 1/150 M PB, pH 5.0, 1:20, 60 min	72	: 1/15 M PB, pH 6.0, 1:100, 15 min
32	: 1/150 M PB, pH 5.0, 1:100, 15 min	73	: 1/15 M PB, pH 6.0, 1:100, 60 min
33	: 1/150 M PB, pH 5.0, 1:100, 60 min	74	: 1/15 M PB, pH 7.0, 1:20, 15 min
34	: 1/150 M PB, pH 6.0, 1:20, 15 min	75	: 1/15 M PB, pH 7.0, 1:20, 60 min
35	: 1/150 M PB, pH 6.0, 1:20, 60 min	76	: 1/15 M PB, pH 7.0, 1:100, 15 min
36	: 1/150 M PB, pH 6.0, 1:100, 15 min	77	: 1/15 M PB, pH 7.0, 1:100, 60 min
37	: 1/150 M PB, pH 6.0, 1:100, 60 min	78	: 1/15 M PB, pH 8.0, 1:20, 15 min
38	: 1/150 M PB, pH 7.0, 1:20, 15 min	79	: 1/15 M PB, pH 8.0, 1:20, 60 min
39	: 1/150 M PB, pH 7.0, 1:20, 60 min	80	: 1/15 M PB, pH 8.0, 1:100, 15 min
40	: 1/150 M PB, pH 7.0, 1:100, 15 min	81	: 1/15 M PB, pH 8.0, 1:100, 60 min
41	: 1/150 M PB, pH 7.0, 1:100, 60 min		

¹MG, May-Grünwald stain (after fixation and staining for 5 min with MG concentrated-solution, the smear was stained again for 10 min in MG diluted (1:1) with various solution); G, Giemsa stain (after fixation with absolute methanol for 5 min, the smear was air-dried and then stained with Giemsa diluted with various solution); MGG, May-Grünwald-Giemsa stain (after staining with MG stain, the smear was stained with diluted Giemsa solution); DW, distilled water; PB, phosphate buffer; 1:20 and 1:100, dilution ratio (Giemsa:diluent); 15 min and 60 min, time of Giemsa stain.

²Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or 1/150 M PB.
PN, preparation number.

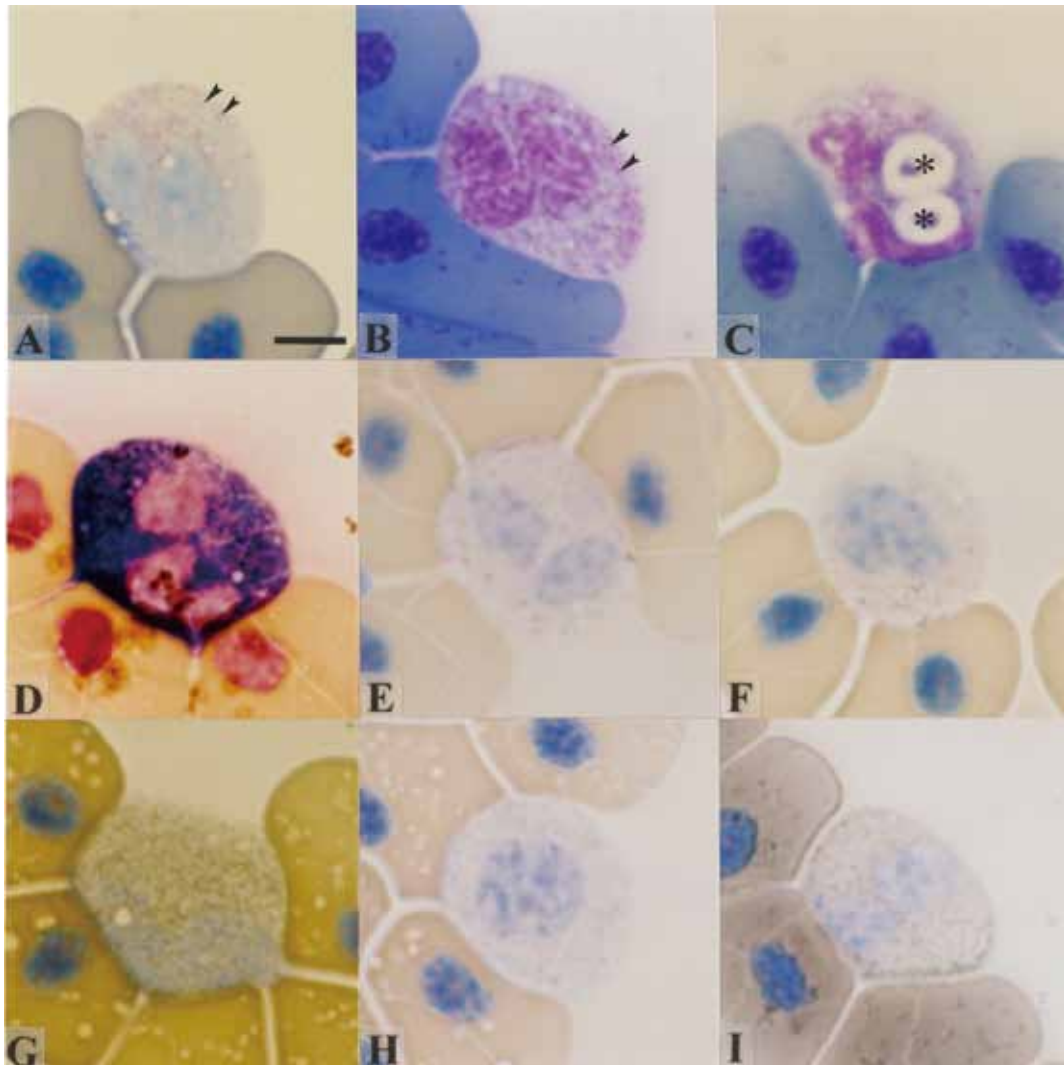


Fig. 1. Neutrophils from lamprey (*Lethenteron camtschaticum*). A, May-Grünwald (PN=2); B, May-Grünwald-Giemsa (PN=60). Note two types of granules, type 1 (G-1) and type 2 (G-2). The G-2 consist of chromatophilic inner layer (L0; arrowheads in A & B) and chromophobic outer layer (L1); C, phagocytosis of zymosan particles (PN=60; *, zymosan particle); D, alkaline phosphatase; E, acid phosphatase; F, β -glucuronidase; G, α -naphtyl acetate esterase; H, naphthol AS-D chloroacetate esterase; I, Sudan black B. Positive reaction: D, L0 of G-1; E-I, L0 of G-2. Counter stain: D, safranin O; E-I, hematoxylin (Mayer). PN, preparation number (See Table 1). Bar (5 μ m) in A is adapted to other figures (B-I) in Fig. 1.

同属のカワヤツメには1種類の顆粒球（多形核白血球 polymorphonuclear leucocyte, PMN）しか認められていない⁵⁾。また, *L. planeri* には2種類 (neutrophilと eosinophil)⁶⁾ あるいは 3種類 (neutrophil, eosinophil, basophil) の顆粒球が⁷⁾, *L. fluviatilis* には1種 (granulocyte⁹⁾ あるいは azurophil¹⁰⁾ または2種類 (neutrophilと eosinophil) の顆粒球が観察されている^{7, 8)}。さらに, *Petromyzon marinus* の顆粒球は2種類 (neutrophilと eosinophil)⁸⁾ または3種類 (neutrophil, eosinophil, basophil) に¹¹⁾, フクロヤツメでは1種類 (granulocyte) に分類されている¹²⁾。これらの

顆粒球のうち, 少なくともカワヤツメのPMN⁵⁾, *L. planeri* のneutrophil^{6, 7)}, *L. fluviatilis*のneutrophil^{7, 8)}, granulocyte⁹⁾ およびazurophil¹⁰⁾ ならびに*P. marinus* のneutrophil^{8, 11)} はいずれも好中球であると考えられている¹⁴⁾ (Rowleyら (1988)¹⁴⁾ には*L. appendix*とフクロヤツメの顆粒球に関する報告^{4, 12)} は引用されていない)。しかし, 各種ヤツメウナギ類の好中球の染色性 (特に顆粒の染色性) は様々であり, *L. appendix* のspecial granulocyte [*L. appendix*にはspecial granulocyte とeosinophilが観察されていることから, special granulocyteが好中球に相当する

Table 2. Summary of multiple Romanowsky-type stain characteristics of L0 of G-2 in neutrophils from two species of lampreys [*Lethenteron camtschaticum* (*Lc*) and *L. kessleri* (*Lk*)]

PN ¹	Species and color ² of L0		PN ¹	Species and color ² of L0		PN ¹	Species and color ² of L0	
	<i>Lc</i>	<i>Lk</i>		<i>Lc</i>	<i>Lk</i>		<i>Lc</i>	<i>Lk</i>
1	R	—	28	P	—	55	P	P
2	R	—	29	P	P	56	—	—
3	R	—	30	P	—	57	P	P
4	R	—	31	P	P	58	P	P
5	—	—	32	—	—	59	P	P
6	R	—	33	—	—	60	P	P
7	R	—	34	P	—	61	P	P
8	—	—	35	P	P	62	P	P
9	—	—	36	—	—	63	P	P
10	P	P	37	P	P	64	P	P
11	P	P	38	P	P	65	P	P
12	P	—	39	P	P	66	P	—
13	P	P	40	P	—	67	P	—
14	P	P	41	P	—	68	P	—
15	P	P	42	P	P	69	P	—
16	—	—	43	P	P	70	P	—
17	P	P	44	P	—	71	P	—
18	P	P	45	P	—	72	P	—
19	P	P	46	P	—	73	P	—
20	P	—	47	P	—	74	P	P
21	P	P	48	P	—	75	P	P
22	P	P	49	P	—	76	P	P
23	P	P	50	P	—	77	P	P
24	P	—	51	P	—	78	P	P
25	P	P	52	—	—	79	P	P
26	P	P	53	P	—	80	P	P
27	P	P	54	P	P	81	P	P

¹PN, preparation number (See Table 1).²R, red; P, purple; —, not stained.**Table 3.** Summary of reactions of neutrophils from two species of lampreys [*Lethenteron camtschaticum* (*Lc*) and *L. kessleri* (*Lk*)] to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number and positive site)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	G (round or oval, many); H
PAS after digestion with α -amylase	—
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidine blue in distilled water	G (amorphous, a few, eq Yb); N
Sudan black B	G (round or oval, many, eq L0 of G-2)
Sudan III	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	G (round or oval, many, eq L0 of G-1)
Acid phosphatase	G (round or oval, many, eq L0 of G-2)
β -Glucuronidase	G (round or oval, some, eq L0 of G-2)
α -Naphthyl acetate esterase	G (round or oval, many, eq L0 of G-2)
α -Naphthyl butyrate esterase	—
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	G (round or oval, many, eq L0 of G-2)
Peroxidase	—

G, granular ; H, hyaloplasm ; N, nucleus ; Yb, Yasumoto body; —, not detected; G-1, neutrophil granule type 1 with two-layer structure (chromophobic L0 and L1); G-2, neutrophil granule type 2 with two-layer structure (chromatophilic L0 and chromophobic L1); eq, equivalent to.

と考えられる]の顆粒はWright染色によって塩基好性(basophilia)を示すとされている⁴⁾。しかし, Jordan (1930)⁴⁾の図 [fig. 62 (着色されたスケッチ)]では顆粒は着色されておらず, 細胞質基質が弱塩基好性を示していることから, 顆粒は染色されないと考えられる [一般に明瞭な好酸性あるいは好塩基性を示さない場合, 好中性(neutrophilic)と呼ばれるが, 実際には染色されていないので, 本報告では難染色性chromophobicと呼ぶ]。一方, カワヤツメの好中球にはGiemsa染色によって染色性の異なる2種類の顆粒が観察されているが(染色性が弱く微細な顆粒と赤紫色の顆粒)⁵⁾, Fujii (1981)⁵⁾の染色像 [fig. 2 (白黒写真)]には難染色性顆粒が見られる。*Lampetra fluviatilis*の好中球顆粒は, Wright染色あるいはGiemsa染色によって薄青紫色(blue-lilac)⁹⁾あるいはMay-Grünwald・Giemsa染色でアズール好性を示すとされている¹⁰⁾。Kelényi and Larse (1976)¹⁰⁾にはアズール好性顆粒の色調は記述されていないが, 一般にアズール色素を含む染色液(Wright染色やGiemsa染色)によって紫色を呈する顆粒では(青紫色か赤紫色かは問わない), アズール色素が異調染色性(メタクロマジー)を示したと考え, アズール顆粒と呼ぶ。したがって, *L. fluviatilis*のアズール好性顆粒は紫色であると考えられる。しかし, Page and Rowley (1983)⁹⁾の染色像 (figs. 1 & 2) とKelényi and Larse (1976)¹⁰⁾の染色像 (fig. 3)には染色されていない顆粒が認められる。さらに, *P. marinus*とフクロヤツメの好中球顆粒は明瞭な染色性を示さず好中性(=難染色性)である^{11, 12)}。本研究の結果, カワヤツメとシベリアヤツメの好中球には2種類の顆粒(G-1とG-2)が存在し, G-1は難染色性あり, G-2の芯様構造(L0)は染色条件によって赤色(カワヤツメ)や赤紫色(カワヤツメとシベリアヤツメ)を示すことが明らかとなった。このことから, Fujii (1981)⁵⁾がカワヤツメの好中球に観察した赤紫色の顆粒と, Fujii (1981)⁵⁾のfig. 2に認められる難染色性顆粒はそれぞれ本研究のG-2のL0とG-1に相当すると考えられる。同様に*L. fluviatilis*の薄青紫色顆粒⁹⁾やアズール好性顆粒¹⁰⁾はG-2のL0であり, *L. fluviatilis*の好中球の染色像に見られる難染色性顆粒はG-1であると思われる。G-2のL0は条件によっては染色されなかった(Table 2)。したがって, G-2のL0が難染色性を示す場合には, G-1とG-2を区別できない。このことから, *L. appendix*のspecial granulocyte, *P. marinus*およびフクロヤツメの難染色性顆粒は, L0が染色されていないG-2とG-1の両方に相当する

と言える。Fujii (1981)⁵⁾がカワヤツメの好中球に観察した染色性が弱く微細な顆粒とは, 顆粒間の細胞質基質が粒子状に見えたのではないかと推察される。

カワヤツメ, *L. fluviatilis*および*P. marinus*の好中球顆粒には電子顕微鏡によって芯様の構造が観察されている^{5, 8-10)}。これら魚種の芯様構造は本研究のG-1およびG-2それぞれのL0に相当すると考えられる。

スタウナギの好中球にも2種類の成層顆粒が観察されており, 難染色性のL0と好染色性のL1からなるG-1と, 好染色性のL0と難染色性のL1からなるG-2に分類されている(Fig. 2)³⁾。また, G-1のL0はG-2のL0よりも大きい³⁾。本研究におけるヤツメウナギ類の好中球顆粒の分類には, 前述のスタウナギ好中球の顆粒の特徴を反映させた(G-1のL0がスタウナギでは好染色性, ヤツメウナギ類では難染色性である点を除く; Fig. 2)。ヤツメウナギ類のG-2のL0は, カワヤツメでは赤色または赤紫色を, シベリアヤツメでは赤紫色を呈した(Table 2)。カワヤツメのG-2のL0が赤色を示すのは, May-Grünwald染色におけるいくつかの条件においてである。May-Grünwald液(原液)はエオシン(酸性色素)とメチレンブルー(塩基性色素)が結合したエオシン酸メチレンブルーをメタノールに溶解したものである。染色時に緩衝液等で原液を希釈することでエオシンとメチレンブルーが解離する。したがって, カワヤツメのG-2のL0の赤色はエオシンによるものである。カワヤツメとシベリアヤツメのG-2のL0は, Giemsa染色およびMay-Grünwald・Giemsa染色のいくつかの条件下において赤紫色を示した(Table 2)。Giemsa原液は使用時に緩衝液等で希釈されるが, 希釈後の染色液中にはエオシン, メチレンブルーおよびアズールB(塩基性色素)がイオン化した状態で存在する。メチレンブルーとアズールBは溶液中で青色であるが, これらの塩基性色素が被染色物に結合した時に, 本来の色素の色を示す場合に正調染色性(オルソクロマジー)を, 紫色を呈する場合には異調染色性を示したとされる。カワヤツメとシベリアヤツメのG-2のL0はMay-Grünwald染色によって青色を示さないことから, メチレンブルーには染色されないと推察される。また, 赤紫色のL0はMay-Grünwald染色標本には観察されず, Giemsa染色標本およびMay-Grünwald・Giemsa染色標本のいくつかの条件下において認められることから, G-2のL0の赤紫色はGiemsa染色液中のアズールBが異調染色性を示したことによると考えられる。また, カワヤツメ好中球のMay-Grünwald・Giemsa染色標本のうち, G-2のL0が赤色に

染色される条件のMay-Grünwald染色後に Giemsa染色を施した場合には、Giemsa染色時間が短い（15分間）とL0が染色されず、染色時間が長い（60分間）場合に赤紫色を呈することがあった（Table 2のPN52と53, PN56と57）。このことは、May-Grünwald染色時にL0に結合したエオシンが、Giemsa染色時にL0から解離することを示唆している。カワヤツメのG-2のL0はエオシンに結合するとともにアズールBにも結合すると考えられることから、両染色性（amphophilic）であるとも言える。ヌタウナギのG-1のL1はPN51の条件のMay-Grünwald-Giemsa染色標本でのみ赤紫色に染色され、G-2のL0もPN51では赤紫色を、他の条件では淡青色を示す。また、G-2のL0はMay-Grünwald染色によっても淡青色を呈することから、ヌタウナギのG-1のL1もアズールBによって赤紫色（異調染色性）を示し、G-2のL0はメチレンブルーで青色（正調染色性）に、アズールBによって赤紫色（異調染色性）に染まると推察される（Fig. 2）。

カワヤツメとシベリアヤツメの好中球にはAIP, AcP, β -Glu, α -NAE, CAEが検出され、SBB陽性であった。AIPとAcPは*L. planeri*⁶⁾, *L. fluviatilis*^{9,10)} およびフクロヤツメ¹²⁾にも検出されている。しかし、 β -Gluと α -NAE活性

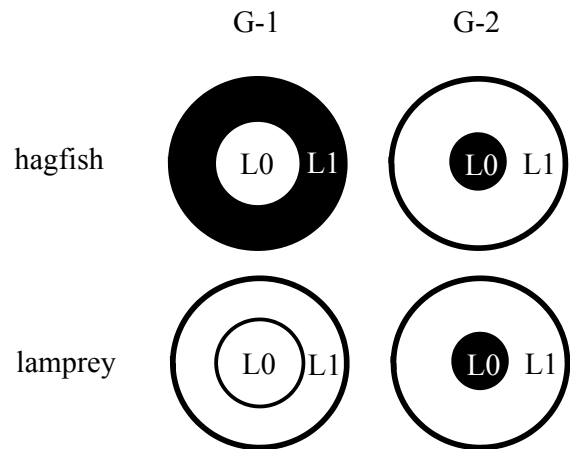


Fig. 2. Comparison of two types of neutrophil granules from hagfish *Eptatretus burgeri*³⁾ and lampreys [*Lethenteron camtschaticum* (*Lc*) and *L. kessleri* (*Lk*)]. G-1, type 1; G-2, type 2; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer). □, chromophobic; ■, chromatophilic [hagfish: L1 of G-1, metaazurophilic (purple); L0 of G-2, orthomethylenophilic (blue) and metaazurophilic (purple). lamprey: L0 of G-2, eosinophilic (red; *Lc*) and metaazurophilic (purple; *Lc* and *Lk*). L0 of G-2 of *Lc* is amphophilic.

Table 4. Comparison of reactions of neutrophil granules from hagfish and lampreys to cytochemical tests

Staining ^{1,2}	Species ³ , type of granules and reaction ⁴							
	Hagfish ^a				Lamprey			
	G-1		G-2		G-1		G-2	
	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1
AIP	-	-	-	-	+	-	-	-
AcP	-	-	-	-	-	-	+	-
β -Glu	-	-	-	-	-	-	+	-
α -NAE	-	-	-	-	-	-	+	-
α -NBE	+	-	-	-	-	-	-	-
CAE	-	-	-	-	-	-	+	-
PO	-	-	-	-	-	-	+	-
SBB	-	-	-	-	-	-	+	-

¹AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; β -Glu, β -glucuronidase; α -NAE, α -naphthyl acetate esterase; α -NBE, α -naphthyl butyrate esterase; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase; SBB, Sudan black B.

²All types of granules showed negative reaction to other tests [periodic acid Schiff reaction, alcian blue (pH1.0, pH2.5), toluidine blue in distilled, oil red O, Sudan III].

³hagfish, *Eptatretus burgeri*; lamprey, *Lethenteron camtschaticum* and *L. kessleri*.

⁴G-1, neutrophil granule type 1; G-2, neutrophil granule type 2; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer); +, positive; -, negative (non-detection).

⁵Kondo and Yasumoto (2020)³⁾.

は*L. fluviatilis*では認められるものの^{9,10}, フクロヤツメでは陰性である¹²。逆に, CAEは*L. fluviatilis*では陰性^{9,10}, フクロヤツメでは陽性である¹²。また, カワヤツメとシベリアヤツメで陽性であったSBBは*L. fluviatilis*では陰性であり^{9,10}, カワヤツメとシベリアヤツメで陰性であったPOは*L. fluviatilis*とフクロヤツメにおいても陰性であるが^{9,10,12}, *L. planeri*では不定的 (inconstant) に陽性である⁶。スタウナギの好中球には α -NBE活性がG-1のL0に検出されているが³, AIP, AcP, β -Glu, α -NAE, CAEおよびPOは陰性であり, SBB染色も陰性である (Table 4)。しかし, 各種寄生虫に感染されたスタウナギでは, 好中球の細胞化学的特徴が変化することが報告されている¹⁵。ヤツメウナギ類の種間における細胞化学的特徴の違いが, 単に魚種が異なることによるのか, あるいは供試魚に何らかの寄生体が感染していたことによるのかは明らかではない。本研究に用いたヤツメウナギ類の外観には異常は認められなかったが, 詳細な寄生体検査はしていない。今後, 寄生体感染とヤツメウナギ類の好中球の関連を明らかにしていきたい。

文 献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: アミアの顆粒球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, 64, 196-203 (2016) [Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Morphological and cytochemical characteristics of granulocytes from bowfin *Amia calva*. *J Nat Fish Univ*, 64, 196-203 (2016) (in Japanese with English abstract)]
- 2) 近藤昌和, 立石航平, 平山尋暉, 安本信哉, 高橋幸則: ドチザメ科サメ類 (ドチザメ, ホシザメ, シロザメ) の好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水大校研報, 67, 141-151 (2019) [Kondo M, Tateishi K, Hirayama H, Yasumoto S, Takahashi Y: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from Triakidae sharks (banded houndshark *Triakis scyllium*, starspotted smooth-hound *Mustelus manazo* and spotless smooth-hound *M. griseus*). *J Nat Fish Univ*, 67, 141-151 (2019) (in Japanese with English abstract)]
- 3) 近藤昌和, 安本信哉: スタウナギ好中球の2種類の顆粒. 水大校研報, 68, 93-95 (2020) [Kondo M, Yasumoto S: Two types of granules in neutrophils from the inshore hagfish *Eptatretus burgeri*. *J Nat Fish Univ*, 68, 93-95 (2020) (in Japanese with English abstract)]
- 4) Jordan HE, Speidel CC: Blood formation in cyclostomes. *Am J Anat*, 46, 355-391 (1930)
- 5) Fujii T: Antibody-enhanced phagocytosis of lamprey polymorphonuclear leucocytes against sheep erythrocytes. *Cell Tissue Res*, 219, 41-51 (1981)
- 6) Fey F: Vergleichende hämozytologie niederer Vertebraten III. Granulozyten. *Folia Haematol*, 86, 1-20 (1966)
- 7) Percy LR, Potter IC: Blood cell formation in the River lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *J Zool, Lond*, 178, 319-340 (1976)
- 8) Potter IC, Percy R, Barber DL, Macey DJ: Chapter 32 The morphology, development and physiology of blood cells. In: Hardisty MW, Potter IC (ed) *The Biology of Lampreys Vol. 4A*, Academic Press, London, 233-292 (1982)
- 9) Page M, Rowley AF: A cytochemical, light and electron microscopical study of the leucocytes of the adult river lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L. Gray). *J Fish Biol*, 22, 503-517 (1983)
- 10) Kelényi G, Larsen LO: The haematopoietic supraneural organ of adult, sexually immature river lampreys (*Lampetra fluviatilis* [L.] Gray) with particular reference to azurophil leucocytes. *Acta biol Acad Sci hung*, 27, 45-56 (1976)
- 11) Piavis GW, Hiatt JL: Blood cell lineage in the sea lamprey, *Petromyzon marinus* (Pisces: Petromyzontidae). *Copeia*, 1971 (4), 722-728 (1971)
- 12) Hine PM, Wain JM, Boustead NC: The Leucocyte Enzyme Cytochemistry of Fish. New Zealand Fisheries Research Bulletin No. 28, New Zealand: Ministry of Agriculture and Fisheries, Wellington, 75pp (1987)
- 13) Rowley AF, Page M: Ultrastructural, cytochemical and functional studies on the eosinophilic granulocytes of larval lampreys. *Cell Tissue Res*, 240, 705-709 (1985)
- 14) Rowley AF, Hunt TC, Page M, Mainwaring G: 2 Fish. In: Rowley AF, Ratcliffe NA (ed) *Vertebrate Blood Cells*. Cambridge University Press, Cambridge, 19-

- 127 (1988)
- 15) 近藤昌和, 安本信哉: 寄生虫に感染したヌタウナギの好中球顆粒. 水大校研報, 68, 83-91 (2020) [Kondo M, Yasumoto S: Neutrophil granules of the inshore hagfish *Eptatretus burgeri* infested with parasites. *J Nat Fish Univ*, 68, 83-91 (2020) (in Japanese with English abstract)]

