

## スナヤツメ幼生の好中球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和<sup>†</sup>, 安本信哉

### Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri*

Masakazu Kondo<sup>†</sup> and Shinya Yasumoto

**Abstract** : Two types of stratified [two-layer; inner layer (L0) and outer layer (L1)] granules were observed in the neutrophils (neutrophil granule, NG: type 1, NG1a; type 2, NG2) of larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri* collected in a tributary of the Koyagawa River in Yamaguchi Prefecture. The NG1a consisted of chromophobic L0 and chromatophilic L1. On the other hand, the NG2 had chromatophilic L0 and chromophobic L1. The L1 of NG1a and L0 of NG2 showed a variety of colors [eosinophilic or basophilic (orthomethylenophilic or metaazurophilic)] depending on the staining conditions. These layers were positive for alkaline phosphatase,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase and Sudan black B. Some enzymes, such as acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase, and naphthol AS-D chloroacetate esterase were detected in the L0 of NG2. The neutrophils lacked  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase and peroxidase.

**Key words** : lamprey, *Lethenteron reissneri*, ammocoetes, granulocyte, morphology, cytochemistry

## 緒言

現生の無顎類Agnathaである円口類Cyclostomataにはスタウナギ類hagfish (スタウナギ目Myxiniformes) とヤツメウナギ類lamprey (ヤツメウナギ目Petromyzontiformes) が含まれる。著者らはこれまでにスタウナギ*Eptatretus burgeri* (スタウナギ科Myxinidae) の成魚およびヤツメウナギ科Petromyzontidaeカワヤツメ属*Lethenteron*のカワヤツメArctic lamprey *L. camtschaticum*とシベリアヤツメSiberian lamprey *L. kessleri*の成魚の好中球を調べ、これらの好中球には2種類の顆粒が存在することを報告した<sup>1,2)</sup>。これらの円口類において、2種類の好中球顆粒はともに2層からなる成層構造を有しており [中心を囲む層を内層(L0)、L0を囲む領域を外層(L1)と呼ぶ]、L0がギムザ染色などの一般染色で染色されない顆粒を1型(G-1)、L0が染色される顆粒を2型(G-2)とした<sup>1,2)</sup>。スタウナギのG-1のL1は一般染色によって染色されるが(好染色性

chromatophilic)、カワヤツメとシベリアヤツメではG-1のL1は染色されない(難染色性chromophobic)。

これまでにヤツメウナギ類の顆粒性白血球(顆粒球)は、ヤツメウナギ科*Lampetra*属のEuropean brook lamprey *L. planeri*とEuropean river lamprey *L. fluviatilis*<sup>3-16)</sup>、同科カワヤツメ属のAmerican brook lamprey *L. appendix*<sup>17)</sup>、カワヤツメ<sup>2,18-21)</sup>、シベリアヤツメ<sup>2)</sup>およびスナヤツメ*L. reissneri*<sup>20,22-24)</sup>、同科*Petromyzon*属のウミヤツメsea lamprey *P. marinus*<sup>6,25-27)</sup>、ミナミヤツメ科Geotriidaeフクロヤツメ属*Geotria*のフクロヤツメpouched lamprey *G. australis*<sup>28)</sup>で報告されている。ヤツメウナギ類の顆粒球の種類とその名称は、魚種あるいは研究者によって様々であるが(本稿のTable 5参照)、Rowleyら(1988)<sup>29)</sup>はヤツメウナギ類の顆粒球には好中球系の細胞が含まれるとしている。しかし、ヤツメウナギ類の好中球において複数種の成層顆粒が存在することを指摘したのは、著者らの報告<sup>2)</sup>が最初である。

2021年11月30日受付、2022年2月14日受理

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

<sup>†</sup>別刷り請求先 (corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

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

PN	Condition <sup>1,2</sup>	PN	Condition <sup>1,2</sup>
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		

<sup>1</sup>MG, 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.

<sup>2</sup>Diluent for Giemsa of MGG stain were DW, 0.5 mM PB or 1/150 M PB.

PN, preparation number.

最近、著者らはスナヤツメの幼生の血液中に2種類の顆粒球（好中球と好酸球）を観察した。本報告ではスナヤツメ幼生の好中球の形態学および細胞化学的特徴を報告する。なお、本研究では好中球の顆粒をNG（neutrophil granule）とし、1型をNG1、2型をNG2と表記する。また、スタウナギのNG1に類似した顆粒をNG1a、カワヤツメとシベリアヤツメの成魚で認められたNG1をNG1bとする。本稿で使用した学名はいずれもFishBaseに依った（最終閲覧日: 2022年2月3日）。

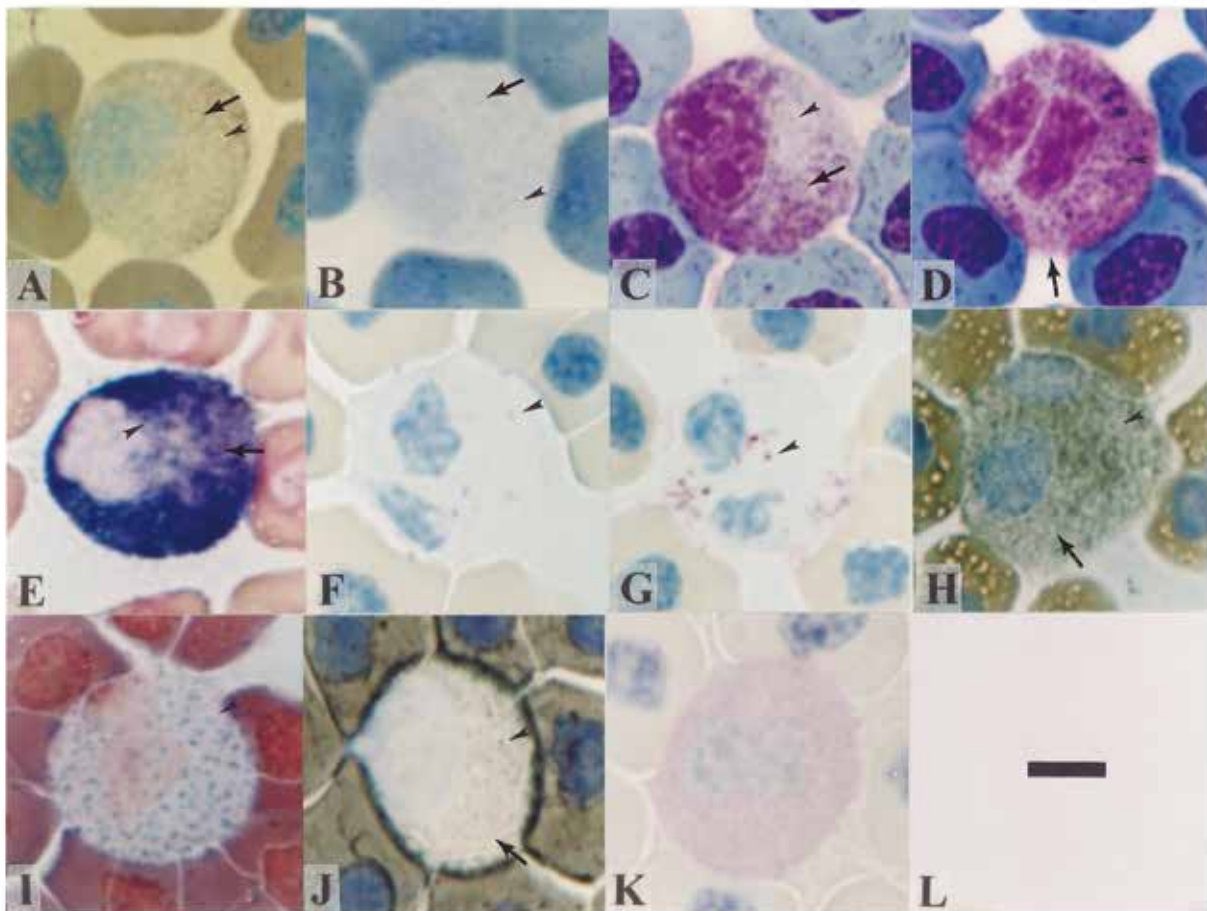
### 材料および方法

2021年3月および4月に木屋川の支流（山口県）で採集されたスナヤツメの幼生（ammocoetes）9尾（体重 1.0 - 4.0 g, 全長9.3 - 15.0 cm）を水産大学の飼育施設に搬入し、水

温10℃で2日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、尾部切断によって流出した血液に少量のヘパリンNa水溶液（1,000 units/ml）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（Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV; Table 1）、各種細胞化学染色は前報<sup>2)</sup>と同様の方法で行った。

### 結果および考察

スナヤツメ幼生の好中球は類円形であり、細胞質には2種類の顆粒（NG1aとNG2）が観察された（Figs. 1 & 2）。NG1aのL1はMRSVの各種染色条件によって淡赤色（酸好性 = エオシン好性 eosinophilic）、淡青色（塩基好性; 正調



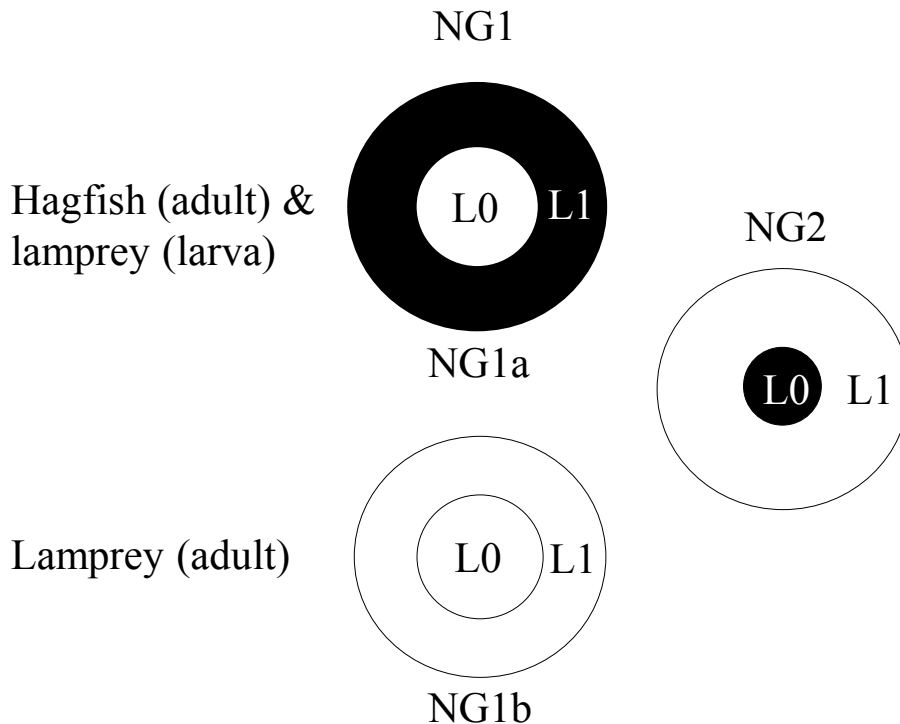
**Fig. 1.** Neutrophils from ammocoetes of *Lethenteron reissneri*. A & B, May-Grünwald (A, PN=1; B, PN=8); C & D, May-Grünwald · Giemsa (C, PN=71; D, PN=75). Note two types of granules, type 1 (NG1a, arrows) and type 2 (NG2, arrowheads). E, alkaline phosphatase; F, acid phosphatase; G,  $\beta$ -glucuronidase; H,  $\alpha$ -naphtyl acetate esterase; I, naphthol AS-D chloroacetate esterase; J, Sudan black B; K, periodic acid Schiff reaction; L, scale bar (5  $\mu$ m). Positive reaction: E, H & J, L1 of NG1a & L0 of NG2; F, G & I, L0 of NG2. Counter stain: E & I, safranin O; F-H & J, hematoxylin (Mayer). PN, preparation number (See Table 1). Bar in L is adapted to other figures (A-J) in Fig. 1.

メチレンブルー好性(orthomethylenophilic), 赤紫色(塩基好性; 異調アズールB好性metaazurophilic)を示した(Figs. 1A-1C; Table 2)。NG2のL0もNG1aのL0と同様の染色性であったが, May-Grünwald (MG)・Giemsa (MGG) 染色のいくつかの条件ではNG1aのL0が黒赤紫色を呈した(Fig. 1D; Table 2)。なお, 両顆粒は円形, 卵円形あるいは桿形であり, それぞれのL0も同様の形状であったが, NG1aのL0の方が一般に大型であった。

NG2のL0にはアルカリ性フォスファターゼ(AIP), 酸性フォスファターゼ(AcP),  $\beta$ -グルクロニダーゼ(Glu),  $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ(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-1I)。また, NG2のL0はズダン黒B(SBB)陽性であった(Fig. 1J)。一方, NG1aのL1はAIP, NAEおよびSBB陽性であったが(Figs. 1E, 1H & 1J), AcP, GluおよびCAEはNG1aに認められなかった。 $\alpha$ -ナフチルプテレートエステラーゼ(NBE)とペルオキシダーゼ(PO)

は好中球に検出されなかった(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 $\alpha$ -アミラーゼ処理によって完全に消失した(Fig. 1K; Table 3)。また, トルイジンプール染色では, 不定形の陽性小体(Y小体=デーレ小体)が稀に少数認められたが, アルシアンブルー(pH1.0 & pH2.5), 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。

スナヤツメ幼生の好中球で陽性反応を示した細胞化学染色は, カワヤツメとシベリアヤツメの成魚においても陽性であった(Table 4)。しかし, 陽性部位は異なり, スナヤツメ幼生においてNG1aのL1とNG2のL0に検出されたAIPは, カワヤツメとシベリアヤツメの成魚ではNG1bのL0にのみ認められている<sup>2)</sup>。また, カワヤツメとシベリアヤツメの成魚でNG2のL0が陽性となるNAEとSBBは, スナヤツメ幼生ではNG1aのL1とNG2のL0に検出された。これら



**Fig. 2.** Comparison of two types of neutrophil granules from hagfish *Eptatretus burgeri*<sup>1)</sup> and lampreys [larva (ammocetes), *Lethenteron reissneri* (present report); adult, *L. camtschaticum* (*Lc*) and *L. kessleri* (*Lk*)<sup>2)</sup>]. NG1, type 1 (NG1a & NG1b, subtypes of NG1); NG2, type 2; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer). □, chromophobic; ■, chromatophilic [Hagfish: L1 of NG1a, metaazurophilic (purple); L0 of NG2, orthomethylenophilic (blue) and metaazurophilic (purple). Lamprey (larva): L1 of NG1a & L0 of NG2, eosinophilic (red or orange), orthomethylenophilic (blue) and metaazurophilic (purple). Lamprey (adult): L0 of NG2, eosinophilic (*Lc*; red) and metaazurophilic (*Lc* and *Lk*; purple)].

**Table 2.** Summary of multiple Romanowsky-type stain characteristics of L1 of NG1a and L0 of NG2 in neutrophils from larva (ammocoetes) of *Lethenteron reissneri*

PN <sup>1</sup>	Color <sup>2</sup>		PN	Color		PN	Color	
	L1 of NG1a	L0 of NG2		L1 of NG1a	L0 of NG2		L1 of NG1a	L0 of NG2
1	E (R)	E (R)	28	—	—	55	MA (P)	MA (P)
2	E (R)	E (R)	29	MA (P)	MA (P)	56	E (R)	E (R)
3	E (R)	E (R)	30	MA (P)	MA (P)	57	MA (P)	MA (P)
4	OM	OM	31	MA (P)	MA (P)	58	MA (P)	MA (P)
5	OM	OM	32	—	—	59	MA (P)	MA (P)
6	E (R)	E (R)	33	—	—	60	MA (P)	MA (P)
7	E (R)	E (R)	34	MA (P)	MA (P)	61	MA (P)	MA (P)
8	OM	OM	35	MA (P)	MA (P)	62	MA <sup>a</sup>	MA (P)
9	OM	OM	36	—	—	63	MA <sup>a</sup>	MA (P)
10	MA (P)	MA (P)	37	MA (P)	MA (P)	64	MA <sup>a</sup>	MA (P)
11	MA (P)	MA (P)	38	MA (P)	MA (P)	65	MA <sup>a</sup>	MA (P)
12	E (R)	E (R)	39	MA (P)	MA (P)	66	MA (P)	MA (P)
13	MA (P)	MA (P)	40	—	—	67	MA (P)	MA (P)
14	MA (P)	MA (P)	41	MA (P)	MA (P)	68	E (R)	E (R)
15	MA (P)	MA (P)	42	MA (P)	MA (P)	69	—	—
16	E (O)	E (O)	43	MA (P)	MA (P)	70	MA <sup>a</sup>	MA (P)
17	MA (P)	MA (P)	44	—	—	71	MA <sup>a</sup>	MA (P)
18	MA (P)	MA (P)	45	MA (P)	MA (P)	72	MA <sup>a</sup>	MA (P)
19	MA (P)	MA (P)	46	MA (P)	MA (P)	73	MA <sup>a</sup>	MA (P)
20	—	—	47	MA (P)	MA (P)	74	MA <sup>b</sup>	MA (P)
21	MA (P)	MA (P)	48	E (R)	E (R)	75	MA <sup>b</sup>	MA (P)
22	MA (P)	MA (P)	49	MA (P)	MA (P)	76	MA <sup>b</sup>	MA (P)
23	MA (P)	MA (P)	50	MA (P)	MA (P)	77	MA <sup>b</sup>	MA (P)
24	—	—	51	MA (P)	MA (P)	78	MA <sup>b</sup>	MA (P)
25	MA (P)	MA (P)	52	E (R)	E (R)	79	MA <sup>b</sup>	MA (P)
26	MA (P)	MA (P)	53	E (R)	E (R)	80	—	—
27	MA (P)	MA (P)	54	MA (P)	MA (P)	81	MA <sup>b</sup>	MA (P)

<sup>1</sup>PN, preparation number (See Table 1).<sup>2</sup>E, eosinophilic (R, red; O, orange); OM, orthomethylenophilic (blue); MA, metaazurophilic (P, purple; BP, blackish purple); —, not stained.<sup>a</sup>P or BP (P>BP).<sup>b</sup>P or BP (BP>P).**Table 3.** Summary of reactions of neutrophils from larva (ammocoetes) of *Lethenteron reissneri* to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number, and positive site)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	G (round or oval, some)*; H
PAS after digestion with $\alpha$ -amylase	—*
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidine blue in distilled water	G [amorphous, a few (rare), eq Yb]; N
Sudan black B	G (round or oval, many, eq L0 of NG2; ring, some, eq L1 of NG1a)
SudanIII	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	G (round or oval, many, eq L0 of NG2; ring, some, eq L1 of NG1a)
Acid phosphatase	G (round or oval, some, eq L0 of NG2)
$\beta$ -Glucuronidase	G (round or oval, some, eq L0 of NG2)
$\alpha$ -Naphthyl acetate esterase	G (round or oval, many, eq L0 of NG2; ring, some, eq L1 of NG1a)
$\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase	—
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	G (round or oval, many, eq L0 of NG2)
Peroxidase	—

G, granular; H, hyaloplasm; N, nucleus; —, not detected; NG1a, neutrophil granule type 1a with two-layer structure (chromophobic L0 and chromatophilic L1); NG2, neutrophil granule type 2 with two-layer structure (chromatophilic L0 and chromophobic L1); Yb, Yasumoto body (= Döhle body); eq, equivalent to.

\*PAS-positive granule was accumulation of glycogen particles because the positive reaction of the granule disappeared after digestion with  $\alpha$ -amylase.

の違いが同属のヤツメウナギ類においても種の違いによるのか、あるいは幼生と成魚の違いによるのかは現時点では不明である。この点については今後、スナヤツメの成魚やカワヤツメあるいはシベリアヤツメの幼生を用いた研究によって明らかにしたい。スナヤツメ幼生とヌタウナギ成魚の好中球顆粒はともにNG1aとNG2の2種類であったが、細胞化学的特徴は大きく異なっていた (Table 4)。すなわち、スナヤツメ幼生の好中球において陽性反応を示す各種染色は、いずれもヌタウナギでは陰性であり、スナヤツメ幼生で陰性のNBEがヌタウナギのNG1aのL0に検出される。

これまでに、種々のヤツメウナギ類において好中球が観察されているが (Table 5)、染色性の異なる2種類の顆粒が報告されているのは、近藤らによるカワヤツメとシベリアヤツメの成魚においてのみである<sup>3)</sup>。以下に既報における好中球、特に好中球顆粒の特徴を魚種および報告ごとに述べるとともに (Table 6)、それらの報告で観察された好中球顆粒について考察する。なお、Table 6にはそれぞれの著者の記載のほか、図版から読み取った情報についても示した。

## ヤツメウナギ類の好中球顆粒

### 1. 一般染色標本観察

#### *Lampetra planeri*

ヤツメウナギ類の好中球を染色した塗抹標本上で最初に観察したのはGiglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>であると考えられる。Giglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>は*L. planeri*の幼生と成魚の血液中に、好酸球とともに好中球に相当する白血球を認めた。この好中球の顆粒は、塩基性色素であるメチレンアズール<sup>4)</sup>でわずかに藤色 (赤紫色と考えられる) を呈し<sup>2)</sup>、酸性フクシン (酸性色素) ではかすかにピンク色に染色される。本文中に顆粒の形状に関する記述はないが、図 [白黒のスケッチ (染色法は不明); 成魚と幼生のどちらの好中球であるのかは不明] では2種類の顆粒、すなわち、本稿におけるNG1aとNG2が見られる。しかし、Giglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>がNG1aを顆粒として認識していたか否かは不明であり、おそらくNG2のL0を顆粒と考えていたと思われる。なお、Giglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>は幼生と成魚の間に違いはないとしている。

Raunich (1947)<sup>4)</sup>も幼生と成魚の血球を調べ、好中球

**Table 4.** Comparison of reactions of granules in blood neutrophils from hagfish and lampreys to cytochemical tests

Staining <sup>1,2</sup>	Species, stage, granule type <sup>3</sup> and reaction <sup>4</sup>											
	Hagfish ( <i>Eptatretus burgeri</i> ) <sup>a</sup>				Lamprey ( <i>Lethenteron</i> )							
	Adult				Larva ( <i>L. reissneri</i> ) <sup>b</sup>				Adult ( <i>L. camtschaticum</i> and <i>L. kessleri</i> ) <sup>c</sup>			
	NG1a		NG2		NG1a		NG2		NG1b		NG2	
L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	
AIP	—	—	—	—	—	+	+	—	+	—	—	—
AcP	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—
Glu	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—
NAE	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	+	—
NBE	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CAE	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—
SBB	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	+	—

<sup>1</sup>AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; Glu,  $\beta$ -glucuronidase; NAE,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase; NBE,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; SBB, Sudan black B.

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

<sup>3</sup>NG1a, NG1b & NG2, stratified (two-layer) granules (inner layer, L0; outer layer, L1): NG1a, chromophobic L0 and chromatophilic L1; NG1b, chromophobic L0 and L1; NG2, chromatophilic L0 and chromophobic L1 (See Fig. 2)

<sup>4</sup>+, positive; —, negative (non-detection).

<sup>a</sup>Kondo and Yasumoto (2020)<sup>1)</sup>; <sup>b</sup>present report; <sup>c</sup>Kondo et al. (2021)<sup>2)</sup>.

Table 5. Granulocytes from lampreys

Species <sup>a</sup> , stage <sup>b</sup> & origin <sup>c</sup>	Granulocyte type (—, not observed)			References
	Neutrophil	Eosinophil	Basophil	
<i>Lampetra planeri</i>				
L <sup>*1</sup> & A <sup>*2</sup> ; b	leucociti a nucleo polimorfo (in Italian; L & A)	cellule eosinofile (in Italian; L & A)	—	Giglio-Tos (1896) <sup>3)</sup>
L & A <sup>*2</sup> ; b	granulociti neutrofilii (in Italian; L & A)	granulociti eosinofili (in Italian; L)	—	Raunich (1947) <sup>4)</sup>
L & A; b	Heterophile <sup>d</sup> (in German)	Eosinophile <sup>d</sup> (in German)	Basophile <sup>d</sup> (in German)	Fey (1966) <sup>5)</sup>
M; b	neutrophil	eosinophil	—	Potter et al. (1982) <sup>6)</sup>
<i>Lampetra fluviatilis</i>				
probably A <sup>*3</sup> ; b	No name	—	—	Meinertz (1902) <sup>7)</sup>
L <sup>*1</sup> & A <sup>*3</sup> ; b	Neutrophile <sup>c</sup> (in German)	—	—	Werzberg (1911) <sup>8)</sup>
A <sup>*3</sup> ; b	Leukozyten (in German)	—	—	Krause (1923) <sup>9)</sup>
L <sup>*4</sup> ; b	leucociti neutrofilii (in Italian)	leucociti eosinofili (in Italian)	—	Babudieri (1930) <sup>10)</sup>
L & A <sup>*3</sup> ; b	Hämatoblasten (in German)	—	—	Komocki (1935) <sup>11)</sup>
A, b & h (FB)	neutrophil granulocyte <sup>f</sup>	—	—	Kelényi & Larsen (1976) <sup>12)</sup>
L, b & h (Typ)	neutrophil	eosinophil	—	Potter et al. (1982) <sup>6)</sup>
A, b	granulocyte	—	—	Page & Rowley (1983) <sup>13)</sup>
<i>L. planeri</i> & <i>L. fluviatilis</i>				
L, b & h (Typ)	neutrophil	eosinophil	—	Percy & Potter (1976) <sup>14)</sup>
L, b & h (Typ)	neutrophil, neutrophil granulocyte	eosinophil, eosinophilic granulocyte	—	Percy & Potter (1981) <sup>15)</sup>
L, b	neutrophilic granulocyte	eosinophilic granulocyte	—	Rowley and Page (1985) <sup>16)</sup>

<sup>a</sup>Reported as follows: <sup>\*1</sup>*Ammocoetes branchialis*, <sup>\*2</sup>*Petromyzon planeri*, <sup>\*3</sup>*Petromyzon fluviatilis*, <sup>\*4</sup>*Petromyzon (Ammocoetes) fluviatilis*.

<sup>b</sup>L, larva; A, adult; M, metamorphosing (macrophthalmia).

<sup>c</sup>b, blood; t, tissues; h, hematopoietic tissues [FB, fat body (=fat column, supraneural organ, supraneural myeloid body); Typ, typhlosole (=diffuse splenic tissue in gut, spiral valve of gut)].

<sup>d</sup>Fey (1966) called these cells heterophilic Granulozyten, eosinophilen Granulozyten and basophilen Granulozyten, respectively (in German), too.

<sup>e</sup>Werzberg (1911) called this cell 'Neutrophile' in figure caption, but other names (neutrophil gekörnten Zellen, polynukleären neutrophilen Granulozyten, polymorphkernigen, polynukleären Leukozyten) in text (in German).

<sup>f</sup>Kelényi & Larsen (1976) called this cell azutrophil granulocyte in abstract.

Table 5. Cont.

Species <sup>a</sup> , stage <sup>b</sup> & origin <sup>c</sup>	Granulocyte type (—, not observed)		References
	Neutrophil	Eosinophil	
<i>Lethenteron appendix</i> L & A <sup>*5</sup> ; b & h (Typ)	special granulocyte	eosinophil	Jordan & Speidel (1930) <sup>17)</sup>
<i>Lethenteron camischaticum</i> probably this species (A?, b) A <sup>*6</sup> , b A <sup>*7</sup> , b A <sup>*8</sup> , b A, b	[granuläre Zellen] <sup>g</sup> [neutrophilic leukocyte] <sup>h</sup> special granulocyte (neutrophil) polymorphonuclear leucocyte neutrophil	[Eosinophile] <sup>g</sup> — eosinophil — —	Katsunuma (1919) <sup>18)</sup> Sugita (1953) <sup>19)</sup> Kanesada (1956) <sup>20)</sup> Fujii (1981) <sup>21)</sup> Kondo et al. (2021) <sup>2)</sup>
<i>Lethenteron kessleri</i> A, b	neutrophil	—	Kondo et al. (2021) <sup>2)</sup>
<i>Lethenteron reissneri</i> L <sup>*1</sup> , b & h (Typ); A <sup>*9</sup> , b L <sup>*10</sup> , b & h (Typ) L <sup>*11</sup> , h (Typ) L <sup>*11</sup> , skin allograft L, b	special granulocyte (neutrophil) granulocyte granulocyte (polymorphonuclear leucocyte) polymorphonuclear leucocyte neutrophil	eosinophil — — eosinophilic granulocyte eosinophil	Kanesada (1956) <sup>20)</sup> Tanaka et al. (1981) <sup>22)</sup> Fujii (1983) <sup>23)</sup> Fujii & Hayakawa (1983) <sup>24)</sup> Kondo & Yasumoto (2022; present report)
<i>Petromyzon marinus</i> A, b & h (FB) A, h (FB) L, b & h (Typ) L, h (Typ & Opi) <i>Geotria australis</i> L, M & A; b	neutrophil polymorphonuclear neutrophil neutrophil heterophilic granulocyte granulocyte	eosinophil eosinophil (eosinophilic myeloblast, eosinophilic metamyeloblast) eosinophil eosinophilic granulocyte —	Piavis & Hiatt (1971) <sup>25)</sup> George & Beamish (1974) <sup>26)</sup> Potter et al. (1982) <sup>6)</sup> Ardavin & Zapata (1987) <sup>27)</sup> Hine et al. (1987) <sup>28)</sup>

<sup>a</sup>Reported as follows: <sup>\*1</sup>*Ammocoetes branchialis*, <sup>\*5</sup>*Lampetra wilderi*, <sup>\*6</sup>*Lampetra floviatilis major* [*floviatilis* is miswriting of *floviatilis*], <sup>\*7</sup>*Entosphenus japonicus*, <sup>\*8</sup>*Lampetra japonica*, <sup>\*9</sup>*Lampetra planeri*, <sup>\*10</sup>*Entosphenus reissneri*, <sup>\*11</sup>*Lampetra reissneri*.

<sup>b</sup>L, larva; A, adult; M, metamorphosing (macrophthalmia).

<sup>c</sup>b, blood; t, tissues; h, hematopoietic tissues [FB, fat body (=supraneural organ)]; Typ, typhlosole (=diffuse splenic tissue in gut, spiral valve of gut); Opi, opisthonephros].

<sup>g</sup>Katsunuma (1919) did not describe these cells in a foreign language, however, he read eosinophil in German.

<sup>h</sup>Sugita (1953) did not describe this cell in a foreign language.



**Table 6.** Descriptions of the neutrophil granules from lampreys based on the stained preparation

Species	References	Description & [Comment]
<i>Lampetra planeri</i>	Giglio-Tos (1896) <sup>3)</sup>	Blood smear (larva & adult): methylene azure—lilac [purple]; acid fuchsin—pink. [No description of granule structure. Two types of granules (NG1a and NG2) are found in figs. 29-34 (sketches, BW). Giglio-Tos would not recognize NG1a and L1 of NG2]
	Raunich (1947) <sup>4)</sup>	Blood smear (larvae & adult): MGG (figs. 8-12 & 16-18)—Violet* [purple in figs.]; Ehrlich's triple acid stain (fig. 19)—Violet [violet in fig.]. [No description of granule structure. All figs. are colored sketches. NG2 is found in all figs. Raunich would not recognize L1 of NG2]
	Potter et al. (1982) <sup>6)</sup>	Metamorphosing: Blood smear: MGG (fig. 6-d2, sketch, BW) [No description of granule color and structure]. [Neutrophil granules are drawn as dots]
	Meinertz (1902) <sup>7)</sup>	Blood smear (adult): Ehrlich's triple acid stain (figs. 118 & 119): resemblance to human neutrophil [No description of granule color and structure. Purple in fig.]; Triple glycerin mixture stain (fig. 121)—red; hematoxylin-eosin glycerin stain (fig. 122)—red; methylene blue (fig. 126)—blue mesh-like structure in cytoplasm. [No description of granule structure. All figs. are colored sketches. Two types of granules (NG1a and NG2) are found in figs. 118, 119, 122 & 126. Meinertz would not recognize NG1a and L1 of NG2. In fig. 121, only red particles are observed (probably L0 of NG2)]
<i>Lampetra fluviatilis</i>	Werzberg (1911) <sup>8)</sup>	Blood smear: Larva: MGG—not stained; Ehrlich's triple acid stain (figs. 82 & 83)—Violet [purple in figs.]; Triple glycerin mixture stain (no fig.)—blackish (small number of granules). Adult: MGG (figs. 80 & 81)—Violet [purple in figs.]. [No description of granule structure. All figs. are colored sketches. NG2 is found in figs. 80-83. Werzberg would not recognize L1 of NG2]
	Krause (1923) <sup>9)</sup>	Blood smear (adult): azure-eosin (Giemsa) (fig. 463, sketch, BW)-blue or Violet, rarely red. [No description of granule structure. Granule is not clear due to small figure]
	Babudieri (1930) <sup>10)</sup>	Blood smear (larva): MGG (fig. 9, colored sketch) —coarse, Violet [purple in fig.]. [No description of granule structure. Two types of granules (NG1a and NG2) are found in fig. Babudieri might recognize both granule types, however, not describe the structure of these granules in text]
	Komocki (1935) <sup>11)</sup>	Blood smear (larvae & adult): MGG (figs. 25 & 31, sketches, BW)—azure granule [No description of granule color and structure]. [Neutrophil granules are drawn as small particles]

\*\*Violet\* contain purple (reddish) and violet (bluish); NG1a, NG1b & NG2, stratified (two-layer) granules (inner layer, L0; outer layer, L1); NG1a, chromophobic L0 and chromatophilic L1; NG1b, chromophobic L0 and L1; NG2, chromatophilic L1 (See Fig. 2); MGG, May-Grünwald-Giemsa; BW, black & white.

Table 6. Cont. 1

Species	References	Description & [Comment]
<i>Lampetra fluviatilis</i>	Adult: Kelényi & Larsen (1976) <sup>(12)</sup>	Blood smear: MGG [No fig., no description of granule color and structure]. Touch preparation of hemopoietic tissue (FB): MGG (fig. 3, photograph, BW)—azure granule [No description of granule color and structure]. [In fig., the azure granule is L0 of NG2. Chromophobic particles are also observed in the fig., however, it is difficult to judge whether the particles are NG1b or L0 of NG1a due to small figure]
	Potter et al. (1982) <sup>(6)</sup>	Larva: Section of hemopoietic tissue (Typ): eosin-azur (fig. 7-1, sketch, BW) [No description of granule color and structure]. [Neutrophil granules are drawn as dots. This fig. is a modified version of fig. 5 in Percy & Potter (1976) <sup>(14)</sup> ]
	Page & Rowley (1983) <sup>(13)</sup>	Blood smear (adult): Wright or Giemsa—blue-lilac [violet]. [No description of granule structure. Stained particles and chromophobic particles are found in the figs. 1 & 3 (Giemsa, photographs, BW), however, it is difficult to judge whether the stained particles are L0 of NG2 or not, and whether the chromophobic particles are NG1b or L0 of NG1a, due to poorly focused photographs]
<i>L. planeri &amp; L. fluviatilis</i>	Larva: Percy & Potter (1976) <sup>(14)</sup>	Blood smear: Wright or Leishman [No fig., no description of granule color and structure]. Section of hemopoietic tissue (Typ): eosin-azur (fig. 5-1, sketch, BW)—neutrophilic [No description of granule color and structure]. [Neutrophil granules are drawn as dots]
	Percy & Potter (1981) <sup>(15)</sup>	Larva: Touch preparation of hemopoietic tissue (Typ): Leishman (plate III-e & f; photographs, BW) [No description of granule color and structure]. The neutrophil in both figs. is phagocytes (Black phagocytized particles are observed in the neutrophils). In f, the neutrophil has undergone degranulation and enlargement. [Normal neutrophil is not shown]
	Rowley & Page (1985) <sup>(16)</sup>	Blood smear (larva): Wright or Giemsa. The structure of the larval neutrophil is identical to that of the adult (Page & Rowley, 1983). [No fig.]
<i>Lethenteron appendix</i>	Jordan & Speidel (1930) <sup>(17)</sup>	Blood smear (larva): Wright—cytoplasm was basophilic [No description of granule color and structure]. [Chromophobic granules are found in fig. 62. Jordan & Speidel showed two figures and described that fig. 62 was immature cell and fig. 63 was older cell. However, eosinophilic granules which are resemble to eosinophil granule (fig. 64) are observed in fig. 63. The cell in fig. 63 will not be neutrophil, but eosinophil. All figs. are colored sketches]

\*'Violet' contain purple (reddish) and violet (bluish); NG1a, NG1b & NG2, stratified (two-layer) granules (inner layer, L0; outer layer, L1); NG1a, chromophobic L0 and chromatophilic L1; NG1b, chromophobic L0 and L1; NG2, chromatophilic L1 (See Fig. 2); FB, fat body; Typ, typhlosole; MGG, May-Grünwald-Giemsa; BW, black & white.

Table 6. Cont. 2

Species	References	Description & [Comment]
	Katsunuma (1919) <sup>18)</sup>	Blood smear (adult): Giemsa—metachromatic [Violet] coarse granule [No fig., no description of granule color and structure]
	Sugita (1953) <sup>19)</sup>	Blood smear (adult): MGG (leukocyte figs. 1-10 (p129-130), sketches, BW)—fine, red (probably) [No description of granule color and structure]. [Neutrophil granules are drawn as dots. Sugita probably did not distinguish between red and purple]
<i>Lethenteron camischaticum</i>	Kanesada (1956) <sup>20)</sup>	Blood smear (adult): Giemsa or MGG [No fig., no description of granule color and structure]
	Fujii (1981) <sup>21)</sup>	Smear of separated blood neutrophils (adult): Giemsa (fig. 2, photograph, BW)—azure granule (reddish-purple) & fine and weakly chromatophilic granule. [In fig., the azure granule is L0 of NG2. Coarse chromophobic granules (probably G1b) are also observed in the fig. Fine chromatophilic granule of Fujii will be hyaloplasma among the granules]
	Kondo et al. (2021) <sup>2)</sup>	Blood smear (adult): MG, Giemsa, MGG—two types of granules (NG1b & NG2); L0 of NG2 was chromophobic, eosinophilic (red) or metaazurophilic (purple) according to staining conditions.
<i>Lethenteron kessleri</i>	Kondo et al. (2021) <sup>2)</sup>	Blood smear (adult): MG, Giemsa, MGG—two types of granules (NG1b & NG2); L0 of NG2 was chromophobic or metaazurophilic (purple) according to staining conditions.
	Kanesada (1956) <sup>20)</sup>	Adult: Blood smear: Giemsa or MGG [No fig., no description of granule color and structure] Larva: Blood smear and touch preparation of hemopoietic tissue (Typ): Giemsa or MGG—fine, either purple or reddish (amphophil) [No fig. of blood smear, no description of granule structure]. [Fig. 8 (photograph, BW) is touch preparation of Typ. It is difficult to comment on the granule structure due to small and poorly focused photograph]
<i>Lethenteron reissneri</i>	Tanaka et al. (1981) <sup>22)</sup>	Larva: Blood smear and touch preparation of hemopoietic tissue (Typ): MGG [No fig., no description of granule color and structure].
	Kondo & Yasumoto (2022; present report)	Blood smear (larva): MG, Giemsa, MGG—two types of granules (NG1a & NG2); L1 of NG1a and L0 of NG2 were chromophobic, eosinophilic (red or orange) orthomethylenophilic (blue) or metaazurophilic (purple or blackish purple) according to staining conditions.
	Piavis & Hiatt (1971) <sup>25)</sup>	Blood smear (adult): Wright-Giemsa (fig.1, colored photograph)—extremely fine and dust-like neutrophilic granule. [It is difficult to comment on the granule color and structure due to small and poorly focused photograph]
<i>Petromyzon marinus</i>	George & Beamish (1974) <sup>26)</sup>	Squash preparation of hemopoietic tissue (FB; adult): MGG [No description of granule color and structure]. [In plate III (=fig. 4), George & Beamish show neutrophil (No. 25; photograph, BW). It is difficult to comment on the granule color and structure due to poorly focused photograph]
<i>Geotria australis</i>	Hine et al. (1987) <sup>28)</sup>	Blood smear (larva, macrophthalmia & adult): Wright—neutrophilic to basophilic (weak) [No description of granule color]. Two neutrophil types: with fine granules and with coarse granules (not easily differentiated). [Two types of granules (NG1a and NG2) are found in fig. 1 (photograph, BW). Hine et al. would identify L0 of NG1a and L0 of NG2 with granules]

\*'Violet' contain purple (reddish) and violet (bluish); NG1a, NG1b & NG2, stratified (two-layer) granules (inner layer, L0; outer layer, L1); NG1a, chromophobic L0 and chromatophilic L1; NG1b, chromophobic L0 and L1; NG2, chromatophilic L1 (See Fig. 2); FB, fat body; Typ, typhlosole; MG, May-Grünwald; MGG, MG-Giemsa; BW, black & white.

と好酸球を認めているが、成魚には好酸球がないと考えている。また、好中球は幼生と成魚では異なる特徴を有しているとし、幼生の好中球顆粒はMGG染色<sup>3)</sup>によって淡い紫色に染まり、Ehrlichの三酸染色(色素として塩基性色素のメチルグリーンと、酸性色素である酸性フクシンとオレンジGを含む)でも紫色に染まるが不明瞭としている<sup>4)</sup>。一方、成魚では両染色で明瞭に紫色に染色される。本文中に顆粒の形状に関する記述はないが、図(着色されたスケッチ)では中央が紫色(MGG染色像では赤紫色、Ehrlichの三酸染色では青紫色)であり、その周囲に難染色性の層が認められる(NG2に相当すると思われる)。しかし、NG1aに相当する顆粒は図には確認できない。Raunich (1947)<sup>4)</sup>はNG2のL0を顆粒と考えていたと考えられる。

Fey (1964)<sup>30)</sup>は幼生の造血器官[器官名は不明だが、幼生であることから腸内縦隆起typhlosple(螺旋弁spiral valveなどとも呼ばれる)と思われる]の好中球を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察しているが(後述)、染色像はなく、顆粒の色調と形状は不明である。また、Fey (1966)<sup>5)</sup>では幼生と成魚の血液中に3種類の顆粒球(好中球、好酸球および好塩基球)を認め、それらの細胞化学的特徴を記述している[Fey (1966)<sup>5)</sup>の材料と方法はFey (1965)<sup>31)</sup>に記述されている]。しかし、ここでもこれらの顆粒球の染色像は示されていない。なお、Fey (1966)<sup>5)</sup>では3種類の顆粒球(血液由来)の顆粒のTEM観察結果が記述されているが(幼生か成魚かは不明)、図はない。

Potterら(1982)<sup>6)</sup>には変態期の血液中の好中球(MGG染色)が図示されており(白黒のスケッチ)、好中球顆粒は微細な点状の粒子として顆粒が描かれているが、顆粒の染色性と形状については記述されていない。

### *Lampetra fluviatilis*

Meinertz (1902)<sup>7)</sup>は成魚の血液中に<sup>5)</sup>、Ehrlichの三酸染色によってヒトの好中球顆粒に類似した色調を示す顆粒を有する細胞が認められるとしているが、顆粒の色調に関する記述がない[Meinertz (1902)<sup>7)</sup>はこの細胞に命名していない]。しかし、図(着色されたスケッチ)では顆粒は赤紫色である<sup>4)</sup>。また、この細胞の顆粒はトリプルグリセリン混合物による染色[塩基性色素のインズリン(indulin)と、酸性色素であるアウランシア(aurantia)とエオシンを含む]とヘマトキシリン・エオシングリセリン染色では赤色を示すとしている。Meinertz (1902)<sup>7)</sup>はいずれの染色標本についても顆粒の形状については言及していないが、Ehrlichの三酸染色標本の図とヘマトキシリ

ン・エオシングリセリン染色標本の図では2種類の顆粒(NG1aとNG2)が認められる。一方、トリプルグリセリン混合物による染色標本の図では円形の赤色粒子しか見られない。この粒子はNG2のL0に相当すると考えられる。また、メチレンブルー染色では核と細胞質の区別が困難な小型の円形細胞が観察され、細胞内には青色に染色される網目構造が認められるとしている。この細胞の種類についてMeinertz (1902)<sup>7)</sup>は言及していないが、図では2種類の顆粒(NG1aとNG2)が認められる。したがって、メチレンブルー染色標本上で観察された細胞は好中球であると考えられる。Meinertz (1902)<sup>7)</sup>は他の種類の顆粒球について報告していない。Meinertz (1902)<sup>7)</sup>はNG2のL0のみを顆粒と考えたと思われる。

Werzberg (1911)<sup>8)</sup>は幼生と成魚の血液中に好中球を観察しているが、両者の間では好中球のMGG染色性が異なるとしている。すなわち、幼生の好中球顆粒はMGG染色で染まらないのに対して、成魚では円形で紫色[図(着色されたスケッチ)では赤紫色]に染まるとしている。Werzberg (1911)<sup>8)</sup>は成魚ではMGG染色のみを行っているが、幼生では他にEhrlichの三酸染色とトリプルグリセリン混合物による染色も行っている。前者では好中球に微細な紫色(図では赤紫色)の顆粒が観察され<sup>4)</sup>、後者では少数の好中球に黒味を帯びた円形の顆粒が多数観察されるとしている(図示していない)。また、この顆粒が染色液中のインズリンに染色されると考えられることから、好中球をインズリン好性顆粒球とも呼んでいる。Werzberg (1911)<sup>8)</sup>が示した図では微細な類円形の粒子が描かれており、NG1aに相当する顆粒は認められない。しかし、着色された粒子の周囲には着色されていない層が見られることから、この粒子はNG2のL0に相当すると考えられる。Werzberg (1911)<sup>8)</sup>はNG2のL0を顆粒としていると推察される。

Werzberg (1911)<sup>8)</sup>は、自身が観察した好中球はMeinertz (1902)<sup>7)</sup>が同種の成魚の好中球に認めた好中球と同様に、Ehrlichの三酸染色によって発見されたことを強調している(p183; 顆粒が染色されることを意味していると思われる)。また、トリプルグリセリン混合物による染色性がWerzberg (1911)<sup>8)</sup>の好中球とMeinertz (1902)<sup>7)</sup>のそれとの間で異なることを指摘している[前者では顆粒がインズリン好性であるのに対して後者ではエオシン好性(Meinertz (1902)<sup>7)</sup>の好中球顆粒はヘマトキシリン・エオシングリセリン染色でもエオシン好性を示す]<sup>6)</sup>。しかし、

Meinerz (1902)<sup>7)</sup>の好中球は成魚由来であるのに対して、Werzberg (1911)<sup>8)</sup>のそれは幼生由来である [Werzberg (1911)<sup>8)</sup>は成魚の好中球にはトリプルグリセリン混合物による染色を行っていない]。したがって、この染色性の違いは幼生と成魚の間の違いかもしれない。

Werzberg (1911)<sup>8)</sup>は本文中でGiglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>とMeinertz (1902)<sup>7)</sup>の研究結果を詳細に記しているが、Giglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>に関する記述は不正確である。Werzberg (1911)<sup>8)</sup>はGiglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>の好中球を polymorphkernige ungekörnte Leukozyten (多形核無顆粒白血球) と記し (p174), p178では「(顆粒球については) Giglio-Tosは多形核好酸性顆粒球のみを記載しており、MeinertzはEhrlichの三酸染色によって多形核および多核の好中性顆粒球のみを観察している。また、Meinertzの好中球顆粒はヘマトキシリン・エオシングリセリン染色やトリプルグリセリン混合物による染色によって赤く染まる」と記述した<sup>47)</sup>。

Krause (1923)<sup>9)</sup>は成魚の血液中にAzur-Eosin (Giemsa) 染色によって青色または紫色 (赤紫か青紫かは不明)、まれに赤色を呈する微細顆粒を持つ白血球を報告している<sup>48)</sup>。この白血球は好中球に相当すると考えられるが顆粒の形状については言及されておらず、図 (白黒のスケッチ) も小さいため詳細は不明である。

Babudieri (1930)<sup>10)</sup>は幼生 [材料の項で *Petromyzon (Ammocoetes) fluviatilis* と表記していることから幼生と考えられる] の血液中に好中球と好酸球を認め、前者にMGG染色<sup>49)</sup>によって紫色 [図 (着色されたスケッチ) では赤紫色] を示す顆粒を観察している。図にはNG1aとNG2が認められ、Babudieri (1930)<sup>10)</sup>は顆粒を「やや大きな顆粒」と述べていることから、NG1aとNG2を顆粒として認識していたのではないかと推察されるが、顆粒の形状については言及していない。

Komocki (1935)<sup>11)</sup>は成魚と幼生を調べ、血液には白血球は含まれておらず、いずれの血球も赤芽球から成熟赤血球に至る一連の過程に属すると考えている。Komocki (1935)<sup>11)</sup>はMGG染色標本上にアズール顆粒を持つ血球も観察しているが、この血球は赤芽球hematoblastであるとし、アズール顆粒はクロマチンからなる粒子であり、ヘモグロビン合成に関与していると推察している。Komocki (1935)<sup>11)</sup>の学説は現代の知見からは受け入れられるものではなく、図 (白黒のスケッチ; 成魚か幼生のどちら由来かは不明) のアズール顆粒を有する血球は好中球に相当す

ると考えられる。この顆粒の色調と形状に関する記述はなく、図では微細な類円形の黒色粒子として描かれており、この粒子の周囲に染色されない領域は読み取れない。

Kelényi and Larsen (1976)<sup>12)</sup>は成魚の血液と造血組織 (脂肪体 fat body; fat column, supraneural organ, supraneural myeloid bodyとも呼ばれる) の好中球を観察し (他の種類の顆粒球は認めていない)、脂肪体の好中球にMGG染色によって多数のアズール顆粒を観察している (方法では血液塗抹標本にも同染色を施したとあるが、血液中の好中球に関する染色性は記されていない)。脂肪体の好中球のMGG染色像は図示されているが (fig. 3)、白黒写真のために色調は分からないものの、近藤ら (2021)<sup>2)</sup>は紫色であると推察している。図中のいくつかのアズール顆粒の周囲には染色されない領域が見られることから、このアズール顆粒はNG2のL0に相当すると推察される。また、図中の好中球には難染色性の顆粒も認められるが、図が小さいのでこの顆粒がNG1aのL0なのかNG1bに相当するのかは不明である。

Potter ら (1982)<sup>6)</sup>には幼生の腸内縦隆起の切片 (eosin-azure染色<sup>410)</sup>) に見られる好酸球と好中球が図示されており (fig. 7-I; 白黒のスケッチ)、好中球顆粒は微細な点状の粒子として顆粒が描かれている。この図は後述するPercy and Potter (1976)<sup>14)</sup>のfig. 5を改変したものとされているが、好酸球の顆粒以外はほとんど変わらない。

Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>は成魚の血液塗抹標本をWright染色またはGiemsa染色し、顆粒性白血球として好中球のみが認められることを報告した。好中球顆粒は染色法を問わず青紫色 (blue-lilac) であるとしているが、顆粒の形状については言及していない。図 (白黒写真) はGiemsa染色された好中球であるが、青紫色の顆粒へ焦点が合っていないため、この顆粒の周囲に染色されない領域が存在するか否かは不明である。図中には難染色性の顆粒も認められ、そのいくつかには周囲に染色された層が見られるが、不鮮明なためこの層がNG1aのL1に相当するのかが判断できない。

### *Lampetra planeri* と *L. fluviatilis*

Percy and Potter (1976, 1981)<sup>14,15)</sup>は *L. planeri* と *L. fluviatilis* の顆粒球を観察しているが、本文中でこれら2種を分けて記述していない。また、Rowley and Page (1985)<sup>16)</sup>は *L. planeri* または *L. fluviatilis* の幼生 (あるいは両種の幼生が混合されたもの) を用いている。ここではこれらの文献における記載を考察する。

Percy and Potter (1976)<sup>14)</sup>は種々の成長段階の*L. planeri*と*L. fluviatilis*を使用して様々な造血組織を含む各種臓器を観察している。この中で、臓器の切片と対比するために、血液塗抹標本をWright染色またはLeishman染色したとしているが、観察結果を示していない。彼らは幼生の腸内縦隆起の切片にeosin-azure染色を施して好酸球と好中球を認めており、成熟した好中球の顆粒は好中性であるとしている。eosin-azure染色された好中球の写真はなく、図(白黒のスケッチ)には微細な点状の粒子として顆粒が描かれている。

Percy and Potter (1981)<sup>15)</sup>には幼生の血液塗抹標本と腸内縦隆起のスタンプ標本の染色像(ともにLeishman染色)があり、前者では好酸球が(plate IIIのd)、後者では好酸球と好中球(plate IIIのe)および好中球(plate IIIのf)が示されている(いずれも白黒写真)。これらの好中球の細胞質には貪食されたと考えられる多数の黒い粒子があり、また、plate IIIのfの好中球では脱顆粒と細胞の巨大化が認められるとしている。しかし、通常の好中球については言及されていない(図もない)。

Rowley and Page (1985)<sup>16)</sup>は幼生の血液塗抹標本をWright染色またはGiemsa染色し、好酸球と好中球を観察している。この論文では好酸球に焦点を当てているため、好中球に関する記述はほとんどないが(図もない)、幼生の好中球の構造は*L. fluviatilis*の成魚と全く同じであると述べている。彼らは前報[Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>]でもTEM観察を行っていることから、「好中球の構造」とはTEM観察による結果を示していると思われる。しかし、染色標本も観察しているので、幼生と成魚の好中球に染色性の違いがあればそれに気付くはずである。したがって、好中球は染色性においても成魚と幼生の間で違いがないと考えられる。

### ***Lethenteron appendix***

Jordan and Speidel (1930)<sup>17)</sup>は幼生の血液中に好中球と好酸球を観察し、着色されたスケッチ(Wright染色像)を示している(好中球, figs. 62 & 63; 好酸球, fig. 64)。これらのうちfig. 62の好中球の色調は好塩基性であるとし、核の特徴から未熟な細胞としている。一方、fig. 63は老いた好中球としている。両図の好中球の顆粒についての記述はないが、fig. 62では好塩基性の細胞質中に染色されていない粗大な顆粒(難染色性顆粒)が認められる。しかし、fig. 63では細胞質の細胞膜に近い領域に赤色に着色された粒子(この粒子の周囲には難染色性の領域が認められる)

が描かれており、同様の粒子がfig. 64の好酸球にも見られる。したがって、fig. 63は好中球ではなく、好酸球であると考えられる。彼らは成魚については、血液塗抹標本ではなく、組織切片をeosin-azure染色して血球を観察している。切片上において成魚の組織に見られる血球は切片上の幼生のそれと同じであるとしている<sup>\*11</sup>。近藤ら(2021)<sup>2)</sup>は、Jordan and Speidel (1930)<sup>17)</sup>の図から読み取れる難染色性顆粒はNG1bとNG2であると推察したが[Jordan and Speidel (1930)<sup>17)</sup>の染色条件ではNG2のL0は染色されず難染色性を示したと考えた]、本稿のスナヤツメ幼生の結果からNG1aとNG2がともに染色されていない可能性も考えられる。

### **カワヤツメ**

勝沼(1919)<sup>18)</sup>は種々の動物の白血球におけるオキシダーゼ反応の特徴を報告する中で、「やつめうなぎ」と「めくらうなぎ」の血液中に2種類の顆粒細胞、すなわち、Giemsa染色で異調染色性を示す粗大な顆粒を有する単核細胞と好酸球が存在することを指摘している。前者の顆粒細胞は好中球を指していると考えられるが血球の図がなく、顆粒の形状は不明である。勝沼(1919)<sup>18)</sup>が使用した「めくらうなぎ」と「やつめうなぎ」の種名は不明であるが、「やつめうなぎ」は日本で一般に食用にされるカワヤツメではないかと推測される。

杉田(1953)<sup>19)</sup>は成魚<sup>\*12</sup>の血液中の好中球(好中性白血球と表記)にはMGG染色<sup>\*13</sup>で細かい中性顆粒が瀰漫性に拡がっていると記して図示している(白黒のスケッチ)。杉田(1953)<sup>19)</sup>は好中球顆粒の色調について記述していないが、同論文にはヌタウナギ(ぬたうなぎ*Bdellostoma birgeri*と表記)の血球についても記載されており、ヌタウナギの好中球(好中性顆粒白血球と表記)について、「塵埃と云つてもいい程の細かい顆粒が密に群がっており、そのために一見一様に赤くそまつ見える」と記した。このことから、杉田(1953)<sup>19)</sup>はヌタウナギの好中球顆粒を赤色と認識しており、この色調はカワヤツメの好中球顆粒にも適用されることが考えられる。近藤ら(2021)<sup>2)</sup>はカワヤツメ成魚の好中球に2種類の顆粒を観察し(NG1bとNG2)、NG2のL0はMG染色で赤色に、MGG染色では赤紫色に染色されると報告した。また、近藤ら(2020)<sup>1)</sup>はヌタウナギ好中球の2種類の顆粒(NG1aとNG2)の染色性について報告し、限られた条件のMGG染色においてNG1aのL1とNG2のL0が赤紫色を呈し、NG2のL0は多くの染色条件において淡青色を示すとしている。杉田(1953)<sup>19)</sup>の用いた染色

法はMGG染色と考えられることから<sup>13</sup>、杉田 (1953)<sup>19</sup>は赤色と赤紫色を区別しなかったと思われる。カワヤツメの好中球顆粒の形状について杉田 (1953)<sup>19</sup>は言及しておらず、図では微細な類円形の黒色粒子として読み取れるが、この粒子の周囲には染色されない領域領域は見られない。杉田 (1953)<sup>19</sup>の本文中には不正確な引用・記述がある<sup>14</sup>。

Kanesada (1956)<sup>20</sup>はスナヤツメ (成魚と幼生) とともにカワヤツメ成魚の血球を観察し<sup>15</sup>、好中球と好酸球を認めているが染色性や形状に関する記載はない。

Fujii (1981)<sup>21</sup>は成魚の血液から好中球を分離し、これのGiemsa染色標本上に2種類の顆粒、すなわち赤紫色のアズール顆粒と、染色性が弱く微細な顆粒を観察している。図には難染色性顆粒が見られる。近藤ら (2021)<sup>2</sup>はFujii (1981)<sup>21</sup>のアズール顆粒は近藤ら (2021)<sup>2</sup>がカワヤツメ成魚の好中球に観察したNG2のL0に相当すると報告した。また、図中に見られる難染色性顆粒はNG1bであり、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している<sup>2</sup>。

近藤ら (2021)<sup>2</sup>は成魚の好中球にNG1bとNG2を認め、NG2のL0は染色条件によってエオシン好性、アズール好性 (赤紫色) または難染色性を示すことを報告した。すなわち、MG染色ではエオシン好性または難染色性を、Giemsa染色およびMGG染色ではアズール好性 (赤紫色) または難染色性であるとしている。

### シベリアヤツメ

近藤ら (2021)<sup>2</sup>はシベリアヤツメ成魚の好中球はカワヤツメ成魚の好中球に類似しているが、MRSVにおける染色性、とくにMG染色性に違いがあり、カワヤツメではMG染色によってNG2のL0がエオシン好性を示すが、シベリアヤツメでは難染色性であるとしている。

### スナヤツメ

スナヤツメには遺伝的に分化した二型 (北方型と南方型) が存在し、北方型は北海道および本州中部以北に分布する。また、南方型は本州のほぼ全域、四国、九州および朝鮮半島南部に生息するとされている<sup>35,36</sup>。本稿で用いたスナヤツメは山口県産なので南方型と考えられる。Kanesada (1956)<sup>20</sup>は採集地を明記していないが、山口医科大学 (現在の山口大学医学部) の所属であることから採集地は山口県周辺と思われる。用いたスナヤツメは南方型と考えられる。また、Fujii (1982)<sup>23</sup>に使用されたスナヤツメは北海道産であることから北方型と推察されるが、Tanakaら (1981)<sup>22</sup>とFujii and Hayakawa (1983)<sup>24</sup>ではそれぞれ秋田県産

および新潟県産の個体を使用しており、両県は両型の分布域が重なる地域であるため、使用したスナヤツメの型は不明である。

Kanesada (1956)<sup>20</sup>は幼生と成魚の血液塗抹標本に好酸球と好中球を観察し、幼生の好中球の顆粒は微細で赤紫色または赤色のどちらかに染まるとし、顆粒の染色性は両染球amphophilであるとした (図は示していない; 成魚の好中球に関する記述はない)。Kanesada (1956)<sup>20</sup>の記述では、赤紫色に染まる顆粒と赤色に染色される顆粒が1個の好中球に存在することとなる。一方、本稿のスナヤツメ幼生の好中球顆粒は染色条件によって赤紫色または赤色 (時に橙色) に染色されたが、赤紫色の顆粒と赤色の顆粒が混在することはなかった。Kanesada (1956)<sup>20</sup>が行った染色の条件は不明であるが<sup>15</sup>、記述に用いた標本がMGG染色標本とすると、例えば本稿のMRSVの条件48では顆粒は赤色を示し、条件49では赤紫色を呈したが、両条件の違いはGiemsa染色時間だけである。また、条件3 (MG染色)、20および21 (ともにMG染色) を比較すると、MG染色 (条件3) で赤色に染色された顆粒が、その後のGiemsa染色によって難染色性となり (条件20)、さらにGiemsa染色を続けることで顆粒が赤紫に染色される (条件21)。このことは顆粒に結合したエオシンがGiemsa染色時に顆粒から解離することを示している。Kanesada (1956)<sup>20</sup>が行った染色の条件は不明であるが<sup>15</sup>、その条件では赤色に染色された一部の顆粒からエオシンが解離し、ついでメチレンアズールが結合して赤紫色 (異調染色性) を呈したと考えられる。一方、Kanesada (1956)<sup>20</sup>がGiemsa染色標本の観察結果に基づいて記述した場合には、条件12と13 (いずれもGiemsa染色) を用いて説明できる。すなわち、短時間 (条件12) のGiemsa染色では顆粒は赤色に染まるが、長時間 (条件13) では赤紫色を呈することから、顆粒への結合はエオシンの方が早く、時間の経過にともなってエオシンが解離し、メチレンアズールが結合して異調染色性を示したと推察される。Kanesada (1956)<sup>20</sup>は顆粒の染色性を両染色性としているが、本来、両染色性とはある対象が条件によって酸好性や塩基好性を示す場合に使用するべきであり、Kanesada (1956)<sup>20</sup>の用法は正しくない。Kanesada (1956)<sup>20</sup>は幼生の腸内縦隆起のスタンプ標本にも好酸球と好中球を見ており、好中球に血液中の好中球と同様の顆粒を観察している<sup>15</sup>。染色されたスタンプ標本は図示されているものの (白黒写真)、不鮮明であり、好中球顆粒の形状については不明である。

Tanakaら (1981)<sup>22)</sup>は幼生の腸内縦隆起をTEM観察し、1種類の顆粒球 (好中球に相当) を認め (顆粒の構造に関する記述はない)、血液塗抹標本と腸内縦隆起のスタンブ標本上における好中球の各種酵素染色性も調べている。Tanakaら (1981)<sup>22)</sup>は材料と方法の項では腸内縦隆起のスタンブ標本にMGG染色を施したと記述しているがその観察結果が本文中になく (血液塗抹標本に関してもない)、好中球顆粒のMGG染色性と顆粒の形状は不明である<sup>\*16)</sup>。

Fujii (1982)<sup>23)</sup>は幼生の腸内縦隆起をTEM観察し、スナヤツメ幼生の好中球の微細構造は、カワヤツメ成魚の血液中の好中球<sup>21)</sup>のそれと全く同じであると述べている。Fujii (1982)<sup>23)</sup>では血液塗抹標本や造血組織のスタンブ標本の観察は行っていない。また、好酸球は観察されていない。

Fujii and Hayakawa (1983)<sup>24)</sup>は幼生における同種皮膚移植片拒絶反応の過程において、移植片に宿主の好中球が浸潤し、浸潤した好中球には食胞やファゴリソゾーム (phagolysosome) が観察されるとしている。浸潤した細胞の中には多数のファゴリソゾームを有する好酸球も認められるとし、その細胞が好酸球であることを確認するために塗抹した細胞を観察したと結果の項に記している (p308)。この塗抹が何の塗抹であるのかは記述されておらず、また染色法も不明である。もしも、血液の塗抹標本であれば好中球も観察されるはずであり、移植片の塗抹ならば浸潤した好中球も見られるはずであるが、Fujii and Hayakawa (1983)<sup>24)</sup>には好中球 (と好酸球) の染色性に関する記述が全くない。また、彼らはブアン固定した移植片の切片にヘマトキシリン・エオシン染色を施して観察しているが、その切片上における好中球と好酸球の染色性についても言及していない。

### ウミヤツメ

Piavis & Hiatt (1971)<sup>25)</sup>は成魚の血液塗抹標本にWright-Giemsa染色を施して好酸球、好中球および稀ではあるが好塩基球を観察した。好中球には極めて微細な粉塵様の (extremely fine and dust-like) 顆粒が存在し、その色調は好中性であるとしている。図 (カラー写真) は小さく不鮮明なため詳細は不明である。

George & Beamish (1974)<sup>26)</sup>は成魚の造血組織 (脂肪体) の押しつぶし標本にMGG染色を施して好中球を観察しているが、好中球の特徴に関する記述はなく、図 (白黒写真) も不鮮明である。

Potterら (1982)<sup>6)</sup>には幼生の好酸球と好中球のTEM像

がある (由来は不明)。また、Ardavin & Zapata (1987)<sup>27)</sup>は幼生の各種造血組織のTEM像に好酸球と好中球を示している。しかし、これらの報告では染色像はない<sup>\*17)</sup>。

### フクロヤツメ

Hineら (1987)<sup>28)</sup>は幼生、変態期の稚魚 (macrophthalmia) および成魚それぞれの血液中に顆粒性白血球として好中球のみを認めている。Wright染色によって好中球の顆粒は好中性から弱好塩基性を示し、微細な顆粒を有する好中球と粗大な顆粒を持つ好中球が存在するが、両好中球は容易には区別できないとしている。顆粒の染色性が好中性から弱好塩基性を示すとされていることから、この好中性とは難染色性であると考えられる。前報<sup>2)</sup>では好中球顆粒が難染色性を示すと解釈し、顆粒は*L. appendix*と同様にNG1bとL0が染色されていないNG2であると推察した。本稿ではHineら (1987)<sup>28)</sup>の図をさらに解析し、以下の結論を得た。彼らのfig. 1 (白黒写真) は成魚の好中球のWright染色像であり、大型で類円形の細胞が2個ある。図の説明文では「fine and coarse granules」としかなく、この記述と図の2個の細胞との関連は不明であるが、fig. 4とfig. 5に成魚の好中球のAIP染色像があり、fig. 4ではfine granules、fig. 5ではcoarse granulesと説明されている。これらのAIP染色像における陽性粒子の大きさから、fig. 1の右側の細胞が粗大な顆粒を持つ好中球に相当すると考えられる。したがって左側の細胞は微細な顆粒を有する好中球であろう。左側の好中球の細胞質は濃染しており、顆粒の詳細は読み取れない。しかし、右側の細胞には微細な染色された円形の粒子があり、その周囲には染色されていない領域がある。また、染色されない類円形の構造体 (大きさは様々) も細胞質に多数見え、その周囲には染色された領域が認められる。Hineら (1987)<sup>28)</sup>は後者の染色されない類円形の構造体を粗大な顆粒と考えたと推察される (前者の微細な染色された円形の粒子には気が付かなかったのかもしれない)。上述の様に彼らの微細な好中球顆粒の詳細はfig. 1の左側の好中球からは不明であるが、fig. 4が微細な顆粒を有する好中球のAIP染色像であり、微細な顆粒はAIP陽性であるとしていることから、fig. 4に示されたAIP陽性粒子をWright染色像で見られる微細な顆粒とみなすことができると考える。fig. 4のAIP陽性粒子の多くは類円形であり、その周囲には陰性の領域が認められる。また、少数ながらAIP陰性の粒子の周囲に弱陽性の領域を有する小型の顆粒も見られる [Hineら (1987)<sup>28)</sup>はこの顆粒を見落としたと考えられる]。一方、fig. 5の粗大なAIP陽性粒子の中央



付近には円形の陰性領域あり [Hineら (1987)<sup>28)</sup>は言及していない], fig. 4で見られる多くの陽性顆粒 (中央が陽性でその周囲が陰性)も fig. 5に少数認められる。したがって, Hineら (1987)<sup>28)</sup>の微細な顆粒と粗大な顆粒はそれぞれ本稿のNG1aのL0とNG2のL0に相当すると考えられる。Hineら (1987)<sup>28)</sup>は好中球の顆粒は好中性から弱好塩基性としているが, 弱好塩基性の場合の色調は述べられていない。

以上のように, *L. planeri*の成魚と幼生 [Giglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>, *L. fluviatilis*の成魚 [Meinertz (1902)<sup>7)</sup>と幼生 [Babudieri (1930)<sup>10)</sup>およびフクロヤツメ成魚 [Hineら (1987)<sup>28)</sup>]の好中球の図には本稿のスナヤツメ幼生の好中球に観察されたNG1aとNG2に類似する2種類の顆粒が確認された。これらの文献の著者らはいずれもNG1aとNG2を正確には記述していないが, 上述したようにBabudieri (1930)<sup>10)</sup>はNG1aとNG2をともに顆粒として認識していたかもしれない。また, Hineら (1987)<sup>28)</sup>はNG1aのL0とNG2のL0を顆粒本体と考えていたと思われる。Jordan and Speidel (1930)<sup>10)</sup>, Hineら (1987)<sup>28)</sup>および近藤ら (2021)<sup>2)</sup>を除いて, ヤツメウナギ類の好中球を観察した研究者の多くはNG2の染色されたL0のみが顆粒の本体であると認識していたと推察される。

## 2. 透過型電子顕微鏡観察

ヤツメウナギ類の好中球の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察は, *L. planeri*<sup>5,30)</sup>, *L. fluviatilis*<sup>12,13)</sup>, カワヤツメ<sup>21)</sup>, スナヤツメ<sup>22,23)</sup>およびウミヤツメ<sup>6,27)</sup>で行われているが, 一般染色で見られる顆粒とTEM観察で認められる顆粒の関連は議論されてこなかった。

### *Lampetra planeri*

Fey (1964)<sup>30)</sup>は幼生の造血器官 [腸内縦隆起と思われる]の好中球をTEM観察し, 顆粒の最大径 (250×180 nm)のみを記述しており, 顆粒の構造については記していない [Fey (1964)<sup>30)</sup>の図の好中球は固定不良のため, 詳細は読み取れない]。Fey (1966)<sup>9)</sup>でも好中球顆粒の大きさを250×180 nmとしているだけで, 構造に関する記述はなく, ここでは図示していない。なお, Fey (1966)<sup>9)</sup>では血液中の好中球を観察したことになっている。

### *Lampetra fluviatilis*

Kelényi and Larsen (1976)<sup>12)</sup>は成魚の脂肪体の好中球をTEM観察し, 好中球顆粒に電子密度の高い芯を認め,

その中にはさまざまな構造 (リング状, 杆状, 針状など)を有する封入物を観察している。リング状の封入物 (以後, 円形構造体と呼ぶ) は彼らが示した図において一般に認めることができ, 芯内に多く見られる。また, 構造の違いから2種類に分類できる [低電子密度の内層と高電子密度の外層からなる構造体 (1型円形構造体) と, 高電子密度の内層と低電子密度の中層およびその周囲の高電子密度層からなる構造体 (2型円形構造体)]。両円形構造体の違いは高電子密度の内層の有無であること, 両構造体は顆粒内に混在していることから, 1型円形構造体はTEM観察用の超薄切片上に高電子密度の内層が出ていない2型円形構造体ではないかと考えられる。一方, 杆状や針状の封入物には層構造は見られず, 電子密度が高い場合と低い場合があるが, 顆粒内に認められる場合には1個である。TEM観察した顆粒の多くには, 顆粒の膜と芯の間に電子密度の低い領域が観察される [これについてKelényi and Larsen (1976)<sup>12)</sup>は言及していない]。

Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>は成魚の血液中の好中球をTEM観察し, 顆粒を3種類 (Type 1-3) に分類している。いずれの種類の顆粒にも, 電子密度の高い芯が存在し, 芯と顆粒の膜の間に低電子密度の領域 (以後, 低電子密度層と呼ぶ) を認めている。また, Type 3には芯の中に高電子密度または低電子密度の杆状構造体 (crystalline rod) が観察される (顆粒内に認められる場合には1個)。この杆状構造体はKelényi and Larsen (1976)<sup>12)</sup>の杆状または針状の封入物に相当すると思われる。Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>はKelényi and Larsen (1976)<sup>12)</sup>のリング状の封入物 (円形構造体) を認めていないが, 図 (fig. 7) のいずれの種類の顆粒にも, 芯内に円形構造体が見られる。

### カワヤツメ

Fujii (1981)<sup>21)</sup>は成魚の血液から好中球を分離してTEM観察しているが, 顆粒内にKelényi and Larsen (1976)<sup>12)</sup>の封入物やPage and Rowley (1983)<sup>13)</sup>の杆状構造体の存在を認識しておらず, 顆粒は膜で包まれていると述べている。しかし, 図では顆粒に芯が見られ, 芯と膜との間に低電子密度層が認められる。また, 芯には少なくとも円形構造体が見られる。

### スナヤツメ

スナヤツメ幼生の腸内縦隆起中の好中球においても, 顆粒の芯とその周囲の低電子密度層が図から読み取れるが, Tanakara (1981)<sup>22)</sup>の図 (fig. 37) は小さく, 芯の微細構造は不明である。また, Fujii (1982)<sup>23)</sup>の図 (fig. 9) は切

片が厚く固定もやや不良なため顆粒の詳細は読み取れないが、スナヤツメの好中球はカワヤツメのそれ [Fujii (1981)<sup>21)</sup>] に類似するとしている。

### ウミヤツメ

Potterら (1982)<sup>6)</sup>には幼生の好中球のTEM像があり(由来は不明)、顆粒の特徴はKelényi and Larsen (1976)<sup>12)</sup>のそれに酷似している。図 (figs. 8 & 9) の顆粒には膜の内側に低電子密度層が認められるが、Potterら (1982)<sup>6)</sup>はこれについて言及していない。Ardavin and Zapata (1987)<sup>27)</sup>は幼生の各種造血組織のTEM像を示しているが、好中球顆粒の構造に関する記述はなく、図の好中球は小さすぎて構造は読み取れない。

ヤツメウナギ類の好中球顆粒は魚種にかかわらず高電子密度の芯とその周囲の低電子密度層からなり、芯には多数の円形構造体と時には杆状構造体が存在するとともに、これらの構造物の間の領域も芯に含まれると考えられる。芯と低電子密度層はそれぞれ成層顆粒のL0とL1に相当すると言える。微細構造の違いから好中球顆粒をNG1とNG2に識別することは困難と思われる。

円形構造体は成層構造を有しており、これが顆粒内で自発的に多数形成されるとは考え難い。円形構造体はゴルジ小胞内で1個形成され、小胞同士の融合時に円形構造体同士は融合せず顆粒内に蓄積すると推察される。一方、杆状構造体が顆粒内に存在する場合でも1つであることから顆粒内で濃縮されたある成分が結晶化したと考えられる。今後、円形構造体を顆粒内の粒子として顆粒子granulonと呼び、顆粒内の顆粒子以外を顆粒内基質intragranular hyaloplasma (IH) と称することとする。IHの成分が相互作用することでL0 (のIH) とL1が形成され、L0のIHのある成分が濃縮して杆状構造体を形成すると考えられる。また、L0のIHの成分は顆粒子と混在できるが、L1の成分は顆粒子と相互作用して顆粒子をL0に局在化させると言える。

### 3. 細胞化学染色標本観察

ヤツメウナギ類の好中球に対する細胞化学的研究は勝沼 (1919)<sup>18)</sup>に始まると思われ、これまでに*L. planeri*<sup>4,5)</sup>、*L. fluviatilis*<sup>12,13)</sup>、カワヤツメ<sup>2,18)</sup>、シベリアヤツメ<sup>2)</sup>、スナヤツメ<sup>22)</sup>およびフクロヤツメ<sup>28)</sup>で行われてきた (Table 7)。一般染色で見られる顆粒と細胞化学染色で認められる陽性顆粒の関連はHineら (1987)<sup>28)</sup>と近藤ら (2021)<sup>2)</sup>において

議論されている。また、*L. fluviatilis*ではAcP陽性部位がTEMで観察されている<sup>13)</sup>。

#### *Lampetra planeri*

Raunich (1896)<sup>4)</sup>は幼生と成魚の好中球はベルオキシダーゼ陰性であり、まれに脂質染色 [Sudan IIIと  $\alpha$ -naphtholを用いたGoldmannの方法; 本稿のSBB染色と同様に類脂質の染色法だが、本稿のSudan III染色とは目的 (中性脂肪染色) が異なる] に陽性の顆粒が認められるとしている (図示していない)。しかし、この陽性顆粒とMGG染色標本に見られる赤紫色の顆粒との関連は記述していない。

Fey (1966)<sup>5)</sup>は幼生と成魚の好中球にはAIPとNAEが認められるが、AcPは陰性であり、幼生ではPOは検出できなかったが、成魚では大部分の好中球がPO陽性であるとしている。また、PAS反応に陽性であるとし (陽性部位は記していない)、その陽性反応は唾液消化後の標本では陰性であるとしている。Fey (1966)<sup>5)</sup>はPAS反応性から好中球にはかなりの量のグリコーゲンが存在するとしているが、これは唾液による消化によってPAS陽性部位が消失することに基づいている [Fey (1966)<sup>5)</sup>の血液塗抹標本には好中球の他に好酸球と好塩基球が混在するが、好中球の記述では消化試験に唾液を用いており、好酸球と好塩基球の項では唾液ではなくジアスターゼを使用している]。いずれの染色像も示されていない。

#### *Lampetra fluviatilis*

Kelényi and Larsen (1976)<sup>12)</sup>は成魚の血液中の好中球はPAS反応とAIPに強陽性であるが、腸内縦隆起の好中球はこれらの染色に弱陽性であるとしている。また、血液と腸内縦隆起の好中球はPO、CAE、SBBに陰性であり、NAE、ナフトールASアセテートエステラーゼおよびAcPに弱陽性としている。血液中の好中球のPAS反応像とAIP染色像のみが図示されており (白黒写真; fig. 4)、PAS反応像では陽性の小型円形の顆粒が多数認められるが、 $\alpha$ -amylaseや唾液による消化後のPAS染色を行っていない。したがって、PAS陽性顆粒がグリコーゲン粒子の集積したものか否かは判断できない。また、AIP染色像では細胞質が濃染しており、陽性顆粒の形状は不明である。

Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>は成魚の血液中の好中球はAcPとGluに強陽性であるがPOは陰性であるとし、AcP染色した好中球の光学および電子顕微鏡像を示している (白黒写真; figs. 9-11)。彼らは通常のTEM観察で構造の異なる3種類の顆粒を認め、これらの構造の違いは顆粒の成熟

**Table 7.** Comparison of reactions of neutrophils from lampreys to cytochemical tests

Species <sup>*1</sup> , stage <sup>*2</sup> , origin <sup>*3</sup> & reference	Test <sup>*4</sup>														
	Ox	AIP	AcP	Glu	NAE	NBE	AAE	CAE	PO	GS	SBB	PAS	PAS-d		
<i>Lp</i> (L & A; b) Raunich (1947)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	—	+	(G; rare)	NT	NT		
<i>Lp</i> (L & A; b) Fey (1966)	NT	+	—	NT	+	NT	NT	NT	+	(A) — (L)	NT	NT	+		
<i>Lf</i> (A; b & h <sup>*5</sup> ) Kelényi & Larsen (1976) <sup>*7</sup>	NT	+	(b, s; h, w)	NT	+	(w)	+	—	—	—	NT	—	+	(G; b, s; h, w)	
<i>Lf</i> (A; b) Page & Rowley (1983)	NT	NT	+	(G <sup>*6</sup> , s)	NT	NT	NT	NT	—	—	NT	NT	NT	NT	
<i>Lc</i> (A; b): probably Katsunuma (1919)	—	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
<i>Lc</i> & <i>Lk</i> (A; b) Kondo et al. (2021) <sup>*8</sup>	NT	+	(L0 of NG1b)	+	(L0 of NG2)	+	(L0 of NG2)	+	(L0 of NG2)	—	NT	+	(L0 of NG2)	+	(Gr; H)
<i>Lr</i> (L; b & h <sup>*6</sup> ) Tanaka et al. (1981)	NT	+	—	NT	NT	NT	NT	NT	—	—	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Lr</i> (L; b) Kondo & Yasumoto (2022) <sup>*8,9</sup>	NT	+	(L1 of NG1a, L0 of NG2)	+	(L0 of NG1a, L0 of NG2)	+	(L1 of NG1a, L0 of NG2)	+	(L0 of NG2)	—	NT	+	(L1 of NG1a, L0 of NG2)	+	(Gr; H)
<i>Ga</i> (L, M, A; b) Hine et al. (1987) <sup>*10,11</sup>	NT	+	—	—	—	—	—	—	—	—	NT	—	—	—	—
Larva	NT	+	—	—	—	—	—	—	—	—	NT	—	—	—	—
Macrophthalmia	NT	+	—	—	—	—	—	—	±	±	NT	—	—	—	—
Adult	NT	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

<sup>\*1</sup>*Lp*, *Lamprocyba planeri*; *Lf*, *Lamprocyba fluviatilis*; *Lc*, *Lethenteron camtschaticum*; *Lk*, *Lethenteron kessleri*; *Lr*, *Lethenteron reissneri*; *Ga*, *Geotria australis*.

<sup>\*2</sup>L, larva (ammocoetes); A, adult; M, macrophthalmia (juvenile).

<sup>\*3</sup>b, blood; h, hemopoietic tissue (<sup>#</sup>fat body; <sup>#</sup>typhlosole).

<sup>\*4</sup>Ox, oxidase [Nad: reaction: labile oxidase (cytochrome oxidase) and stable oxidase]; AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; Glu, β-glucuronidase; NAE, α-naphthyl acetate esterase; NBE, α-naphthyl butyrate esterase; AAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase; CAE, naphthol AS acetate esterase; PO, peroxidase; GS, Goldmann stain for lipid (Sudan III + α-naphthol); SBB, Sudan black B; PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS-d, PAS after digestion; NT, not tested; ND, not determined; —, negative; +, positive; ±, negative and positive result shown; s, strongly; w, weakly; G, granule; NG1a, NG1b & NG2, stratified (two-layer) granules (See Fig. 2); L0, inner layer; L1, outer layer; Gr, granular; H, hyaloplasm.

<sup>\*5</sup>Fey (1966) and Kondo et al. (2021) & Kondo and Yasumoto (2022) used saliva and α-amylase, respectively.

<sup>\*6</sup>Page & Rowley (1983) described that most of granules (ultrastructurally classified into three types) were positive.

<sup>\*7</sup>Kelényi & Larsen (1976) tested diamminobenzidine staine, too (negative).

<sup>\*8</sup>Kondo et al. (2021) and Kondo & Yasumoto (2022) tested Sudan III & oil red O (for neutral lipid; negative), alcian blue (pH1.0 & pH2.5; negative) and toluidine blue in distilled water [nucleus and Yasumoto body (=Döhle body) were positive].

<sup>\*9</sup>Present report.

<sup>\*10</sup>Hine et al. (1987) observed two types of neutrophils (with fine granules and with coarse granules), although described 'not easily differentiated'.

<sup>\*11</sup>Positive site: AIP, fine granules in larva but in both fine and coarse granules in adult; AcP, both granule types; PO, clumped granules from lysed neutrophils.

段階を示していると推察し, 3種類の顆粒の多くにAcPが検出されることもこの推察を補強すると報告している。顆粒中のAcPの局在については言及していないが, 図 (figs. 10 & 11) からは, 各種の顆粒の芯が陽性を示していると考えられる。彼らは多くの顆粒にAcPが見られるとしているが, 通常のTEM像 (figs. 2 & 4) に見られる顆粒の数よりも, AcP染色像 (fig. 10) の陽性顆粒の方が明らかに少ない。これらのことから, *L. fluviatilis*には構造が類似する2種類の顆粒 (AcP陽性顆粒と陰性顆粒) が存在すると考えられる。また, 図ではAcPは芯の顆粒に検出されているが (桿状構造体は陰性), 彼らはそのことに言及していない。顆粒は通常のTEM観察では3層構造を示すが, AcPは内層と外層に見られ, 中層は陰性である。

### *Lampetra planeri*と*L. fluviatilis*

Rowley and Page (1985)<sup>16)</sup>は*L. planeri*または*L. fluviatilis*の幼生 (あるいは両種の幼生が混合されたもの) を用いて, 血液中の顆粒球にAcPとPOの検出を試みている。この論文は好酸球に焦点を当てているため, 好中球のAcPとPOに関する記述が図とともにない。

### カワヤツメとシベリアヤツメ

勝沼 (1919)<sup>18)</sup>はカワヤツメと考えられるヤツメウナギ類の血球に  $\alpha$ -naphtholとN-dimethylparaphenyldiaminを用いたオキシダーゼ染色を施して, 好中球には耐久性オキシダーゼ (stable oxidase) も易動性オキシダーゼ (labile oxidase) も検出されないことを報告した<sup>\*18)</sup>。

近藤ら (2021)<sup>2)</sup>はカワヤツメとシベリアヤツメの成魚の好中球の細胞化学的特徴は同じであり, 両種で観察される2種類の顆粒 (NG1bとNG2) のうち, NG1bのL0にAIPが検出され, NG2のL0にはAcP, Glu, NAEおよびCAEが検出されるとともにNG2のL0はSBB陽性であるとしている。また, PAS染色では細胞質が弱陽性であり, 陽性粒子も認められるものの, いずれもアミラーゼ消化後のPAS染色では陰性となる。このことはPAS陽性粒子が集積したグリコーゲン粒子であることを示している。両種の好中球にはNBEとPOは検出されない<sup>\*19)</sup>。

### スナヤツメ

Tanakaら (1981)<sup>22)</sup>は幼生の血液と腸の造血組織に存在する好中球はAIP陽性であるがPOとAcPは陰性と報告している (図示していない)。

### フクロヤツメ

Hineら (1987)<sup>28)</sup>は成長段階の異なるフクロヤツメ (幼生, 変態期の稚魚および成魚) の好中球を調べ, 幼生と成

魚ではPO陰性であり, 変態期の稚魚では崩壊した (lysed) 好中球からの顆粒の凝集物 (clump) に陽性像が認められることがあるとしている。AIPはいずれの成長段階でも陽性であるが, AcPとCAEは成魚にのみ検出される [AcPは2種類の顆粒とも弱陽性であり (図はない), 陰性の場合もある]。一方, NAEは幼生と変態期の稚魚では陽性であるが (幼生では陰性の場合もある。図はない), 成魚では陰性である。NBEは幼生と変態期の稚魚では陰性である (成魚はnot determinedとしている)。Gluは成長段階を問わず陰性である。PAS染色は幼生と成魚で陽性である (変態期の稚魚はnot determinedとしている)。これらのうち, AIPは幼生の場合, 微細な顆粒に検出され, 成魚では微細な顆粒と粗大な顆粒の両方が陽性であるとしている (変態期の稚魚については記述がない)。成魚のAIP陽性顆粒についてはすでに「1.一般染色標本観察」で考察した。幼生のAIP染色像 (fig. 3) にもAIP陽性の粒子の周囲に陰性の領域を有する顆粒と, AIP陰性粒子の周囲に陽性領域ある顆粒が認められる。成魚のCAE染色像 (fig. 6) が微細な顆粒を有する好中球なのか, 粗大な顆粒を持つ好中球なのかは明記されていないが, 陽性部位は成魚における前者のAIP染色像 (fig. 4) に類似し, 2種類の陽性顆粒が認められる (粗大な顆粒を持つ好中球が陽性か陰性かは不明)。粗大な顆粒を持つ好中球のAIP染色像 (fig. 5) とPAS染色像 (成魚; fig. 8) の陽性顆粒は類似していることから, fig. 8は粗大な顆粒を持つ好中球と考えられる (微細な顆粒を持つ好中球における染色性は不明。また, 幼生の場合の記述はない)。Hineら (1987)<sup>28)</sup>はアミラーゼ消化後のPAS染色を行っていないが, fig. 8では2層構造を有する2種類の顆粒がともに陽性である (内層が陽性で外層が陰性の顆粒と, 内層が陰性で外層が陽性の顆粒)。このことは, 本稿のスナヤツメ幼生や前報<sup>2)</sup>のカワヤツメとシベリアヤツメ (ともに成魚) の好中球と大きく異なる (これらでは2種類の顆粒はともにPAS陰性である)。

ヤツメウナギ類の好中球に共通した細胞化学的特徴は, AIP陽性であることと考えられる (Table 7)。前項 (2. TEM観察) において, ヤツメウナギ類の好中球顆粒の微細構造は魚種にかかわらず類似しており, 通常のTEM観察では2種類の顆粒 (NG1aとNG2またはNG1bとNG2) を区別できないと推察した。Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>が使用した*L. fluviatilis*成魚の血液中の好中球は項目1 (一般染色標本観察) において, 本稿のスナヤツメ幼生と同様に

NG1aとNG2の2種類の顆粒を有すると考えられた。また、Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>の*L. fluviatilis*と本稿のスナヤツメはともにAcPとGlu陽性であり、POは陰性であった。さらに、Page and Rowley (1983) 13)の*L. fluviatilis*ではTEM観察によってAcPがいくつかの顆粒の芯に存在し、彼らの図から芯内の顆粒子にAcP局在する像が読み取れた。本稿のスナヤツメにもAcPがNG2のL0に検出された。これらのことから、Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>の*L. fluviatilis*と本稿のスナヤツメの好中球は微細構造と細胞化学的特徴が類似していると思われ、Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>のAcP陰性顆粒はNG1aに相当すると推察される。Page and Rowley (1983)<sup>13)</sup>と本稿の結果から、スナヤツメ幼生の好中球顆粒の特徴を以下のように推察する。好中球のEG1aのL1とEG2のL0はともに好染色性であり、染色条件の違いによる色調の変化が類似していた(Table 2)。また、ともにAIP、NAEおよびSBB陽性であった(Table 7)。EG1aのL1には顆粒子が存在しないと考えられることから、

これらの染色性はEG1aのL1のIHの特徴であり、EG2のL0のIHとEG1aのL1のIHは同じと言える。EG1aのL0とEG2のL0には顆粒子が存在するが、前者の顆粒子はAcP陰性であり、後者はAcP陽性である。したがって、EG1aの顆粒子(AcP陰性)とEG2の顆粒子(AcP陽性)はそれぞれの顆粒のL1のIHと相互作用してL1に留まれないが、L0のIHとは作用せずにL0に混在できる。EG1aのL0のIHとEG2のL1のIHはともに難染色性であるが、染色性が好染色性であるEG1aのL1のIHとEG2のL0のIHとの配置は両顆粒で逆になっている。このことは、EG1aのL0のIHとEG2のL1のIHは互いに異なる成分から構成されていることを示唆している。

## 謝 辞

スナヤツメの幼生を提供していただいた水産大学校名誉教授 酒井治己博士に感謝いたします。

## 後 注

- <sup>\*1</sup> アズールIとも呼ばれ、アズールBを得る過程でアズールAが混入したもの。現在ではアズールBのみを得ることができるのでアズールBをアズールIと呼ぶ。Giglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>が用いたメチレンアズールの組成やこれを用いた染色法の詳細は不明である。
- <sup>\*2</sup> 結果の項ではメチレンブルーでわずかに藤色を呈するとしているが(p. 246)、方法の項ではメチレンアズールを使用したと記述している(p.224)。後述するように他の多くの研究者もメチレンアズールが含まれる染色液(例えばGiemsa染色液)を用いてヤツメウナギ類の好中球に紫色の顆粒を観察していることから、ここではメチレンアズールが正しいと判断した。
- <sup>\*3</sup> Raunich (1947)<sup>4)</sup>はMG染色、Giemsa染色およびMGG染色を施しているが(材料と方法の項, p291)、結果ではGiemsa染色としている(p308)。しかし、図にはMGG染色像を示していることからここではMGG染色とした。
- <sup>\*4</sup> Ehrlichの三酸染色によって生じた紫色が、この染色液に含まれる3種類の色素のいずれによるものかは明らかになっていない。
- <sup>\*5</sup> Meinertz (1902)<sup>7)</sup>が使用した*L. fluviatilis*が成魚か幼生なのかは不明であるが、Meinertz (1902)<sup>7)</sup>の前後に出版された論文[Giglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>とWerzberg (1911)<sup>8)</sup>]では成魚の種類に関係なく幼生に*Ammocoetes branchialis*の学名を与えている(Table 5参照)。したがって、Meinertz (1902)<sup>7)</sup>が使用した*L. fluviatilis*は成魚であると考えられる。
- <sup>\*6</sup> これらの記述はメクラウナギ類(「メクラウナギ」)を調べたとしているが、種名は不明)の血球を調べた中院 (1920a)<sup>32)</sup>によって3箇所(p137, p138, p139)で引用されている。なお、Werzberg (1911)<sup>8)</sup>の記述<sup>\*7)</sup>はおそらく中院 (1920a, 1920b)<sup>32,33)</sup>を通して杉田 (1953)<sup>19)</sup>に引用されている。
- p137の「八目鰻ノ幼蟲Petromyzon」は「八目鰻Petromyzonノ幼蟲」が正しい。p138はWerzbergの記述<sup>\*6)</sup>に基づく文章である。p139の「トリアチド」と「トリアチッド」はともに、本稿の「Ehrlichの三酸染色」であり、「トリヂリセリン、ゲミッシュ」と「ヘマトキシリン、エオジン、グリセリン」はそれぞれ本稿の「トリプルグリセリン混合物による染色」と「ヘマトキシリン・エオジングリセリン染色」に相当する。また、「エールリッヒ、ハンゼン氏染色法」はトリプルグリセリン混合物による染色を行ったのちにハンゼンのヘマトキシリン染色で核を染色するものである[Werzberg (1911)<sup>8)</sup>は方法の項でこの染色法を記しているが(p24)、結果の項では単に「トリヂリセリン、ゲミッシュ」としている。なお、Meinerz (1902)<sup>7)</sup>はトリプルグリセリン混合物による染色後に核染色を行っていない]。p139のMeinerz (1902)<sup>7)</sup>に関する記述は、Werzberg (1911)<sup>8)</sup>の記述<sup>\*7)</sup>を意識したものであり、Meinerz自身は好中球に相当する細胞は中性および酸性色素に染まる顆粒を有するとし記述していない(p380)。ただし、Meinerz (1902)<sup>7)</sup>が使用した各種染色液に含まれる色素は塩基性色素と酸性色素である。また、p139のWerzberg (1911)<sup>8)</sup>に関する記述にある「エオジン嗜好性」についてはWerzberg (1911)<sup>8)</sup>の記述<sup>\*7)</sup>の誤訳である[エオジン嗜好性を示すのはMeinerz (1902)<sup>7)</sup>の好中球顆粒である]。p139の「インドリン」はトリプルグリセリン混合物中の色素であるインズリンである。
- <sup>\*8</sup> Krause (1923)<sup>9)</sup>は使用した染色液をAzur-Eosin (Giemsa)と記述している。これはGiemsa液に含まれるazure II-eosinのことと考えられるが[azure II (azure I<sup>1)</sup>とメチレンブルーの等量混合物)の各色素にeosinが結合したもの]、染色法の詳細は記されていない。
- <sup>\*9</sup> Babudieri (1930)<sup>10)</sup>は使用した染色液について、材料の項(p200)では一般にMGG染色を、稀にLeishman染色、ヘマトキシリン・エオジン染色、鉄ヘマトキシリンあるいはメチレンブルーを使用したとしている。Babudieri (1930)<sup>10)</sup>の観察結果がどの染色標本をもにしたものかは明らかではないが、図はMGG染色標本をもとに描かれているので(p255)、ここではMGG染色とした。
- <sup>\*10</sup> eosin-azure染色とは使用直前にeosin水溶液とazure II水溶液を混合して使用するNacht-Maximow染色のことと思われる。
- <sup>\*11</sup> Jordan and Speidel (1930)<sup>17)</sup>にはAtlantic hagfish *Myxine glutinosa*の血球も記載されており、plate 1 (p383)のfig. 1-53は*M. glutinosa*の、残りのfig. 54-94は*L. appendix*の幼生の血球である(figs. 54-70は血液塗抹標本, figs. 71-94は腸内縦隆起の切片中に見ら

れた血球)。これらのうち, figs. 1-40についてはp356の脚注で描写したと記されているが, plate 1の他の図については論文中に示していない。他の図もfigs. 1-40と同様に描写したものと考えられる。

- \*12 杉田 (1953)<sup>19)</sup>は使用したヤツメウナギ類を「やつめうなぎ*Lampetra fluoiatilis major*」と表記した。杉田の指導を行った工藤が筆頭著者となっている論文<sup>34)</sup>に基づいてカワヤツメとした。なお, *fluoiatilis*は*fluviatilis*の誤植と思われる。
- \*13 染色法について杉田 (1953)<sup>19)</sup>は「ギムザ及びメイグリンワルド染色」としているが, ギムザ染色性とメイグリンワルド染色性のそれぞれを分けて記していない。したがって, 杉田が用いた染色はMGG染色と考えられる。
- \*14 ①杉田 (1953)<sup>19)</sup>は緒論で勝沼 (1919)<sup>18)</sup>のp26の記述を引用しているが, 本稿で示した勝沼の知見 (p25) には触れていない。②杉田 (1953)<sup>19)</sup>はp114で「ぬたうなぎでは研究者によりて (白血球の; 杉田は顆粒性白血球のみを白血球としている) 種類がまちまちである。今これを概説すると」に続いてMeinertz, Werzberg, Giglio-Tos, Jordanおよび中院の主張を記している。しかし, 各論文の発行年は記されておらず [中院の論文はp111で中院 (1920, 京都) とされている], Meinertz, Giglio-Tosおよび中院の論文は引用文献にない。また, 引用文献にあるWerzbergの論文 [Werzberg (1910)] には円口類の顆粒性白血球に関する記述がない。我々が調べた限り, Meinertz, Werzberg, Giglio-Tosの著作に「ぬたうなぎ」類の顆粒性白血球に関するものはない。JordanはJordan and Speidel (1930)<sup>17)</sup>であろう。おそらく杉田は中院 (1920a)<sup>32)</sup>のp138の記述<sup>46,7)</sup>を読み, その文中の「八目鰻」に気づかず, 中院が「メクラウナギ」の血球を調べていることから, p138の記述を「ぬたうなぎ」(ヌタウナギ類hagfishの意味で使用しているのである) に関するものと誤解したと思われる。なお, 中院の2つの論文 [中院 (1920a)<sup>32)</sup>と中院 (1920b)<sup>32)</sup>] は連続しており, 図や引用文献は中院 (1920b) に示されている。また, 中院 (1920b) の引用文献にはMeinertz (1902)<sup>7)</sup>とWerzberg (1911)<sup>8)</sup>はあるが, Giglio-Tos (1896)<sup>3)</sup>は記載されていない。
- \*15 Kanesada (1956)<sup>20)</sup>は血液塗抹標本とスタンプ標本にGiemsaまたはMGG染色を施して観察しているが, 観察結果がどちらの染色標本に依るのかは明記していない。
- \*16 Tanakaら (1981)<sup>22)</sup>は緒言でヤツメウナギ類の幼生における血球造血が腸内縦隆起で起こることを述べ, その文献として杉田 (1953)<sup>19)</sup>も引用しているが, 杉田 (1953)<sup>19)</sup>は幼生を実験に用いていない。また, Tanakaら (1981)<sup>22)</sup>は考察において, 幼生の赤血球・栓球造血は血管で起こるとし, 他の著者ととも杉田 (1953)<sup>19)</sup>を引用しているが, 杉田 (1953)<sup>19)</sup>はそのようなことは述べていない。さらに, 引用文献における杉田 (1953)<sup>19)</sup>の表記は正しくない [著者名が異なる (正しくはSugita K)。タイトルが異なる [杉田 (1953)<sup>19)</sup>にはページ番号のない表紙があり, そこに英文タイトルがある]。雑誌名が正しくない [杉田 (1953)<sup>19)</sup>が発行された当時は掲載雑誌の外国語表記がなく, 継続後の雑誌名もTanakaら (1981)<sup>22)</sup>の記載と異なる]。Tanakaら (1981)<sup>22)</sup>による杉田 (1953)<sup>19)</sup>の誤引用 (腸内縦隆起における血球造血と引用文献の記載) はArdavin & Zapata (1987)<sup>27)</sup>にも引き継がれている。
- \*17 Ardavin & Zapata (1987)<sup>27)</sup>の結果の項には, 彼らの引用文献21 [Ardavin & Zapata: submitted to Acta. Zool. (Stockh.) for publication] でウミヤツメの循環血中の細胞について述べているとしている (p81)。しかし, この文献はActa. Zool. (Stockh.)に掲載されていない。
- \*18 勝沼 (1919)<sup>18)</sup>の行った酵素染色ではオキシダーゼ反応によってindophenol blueが形成され (Nadi反応), 易動性オキシダーゼはcytochrome oxidaseに相当する<sup>37)</sup>。
- \*19 近藤ら (2021)<sup>2)</sup>はtable 4でカワヤツメとシベリアヤツメのNG2のL0をPO陽性と記しているが, これは誤記載であり, 正しくは陰性である (table 3が正しい)。

## 文 献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉: ヌタウナギ好中球の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*, **69**, 41-49 (2021) (in Japanese with English abstract)]
- 2) 近藤昌和, 安本信哉, 松原 創: 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. 水大校研報, **69**, 41-49 (2021) [Kondo M, Yasumoto S, Matsubara H: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from lampreys (Arctic lamprey *Lathenteron camtschaticum* and Siberian brook lamprey *L. kessleri*). *J Nat Fish Univ*, **69**, 41-49 (2021) (in Japanese with English abstract)]
- 3) Giglio-Tos E: Sulle cellule del sangue della lampreda. *Mem R Accad Scienze Torino, Ser II*, **46**, 219-252 + 1 tavola (1896)
- 4) Raunich L: Ricerche sulla morfologia del sangue nella Lampreda di ruscello (*Petromyzon planeri*). *Pubbl Stn zool Napoli*, **20**, 289-332 + 2 tavole (X & XI) (1947)
- 5) Fey F: Vergleichende hämozytologie niederer Vertebraten III. Granulozyten. *Folia Haematol*, **86**, 1-20 (1966)
- 6) Potter IC, Percy R, Barber DL, Macey DJ: Chapter 32 The morphology, development and physiology of blood cells. In: Hardisty MW, Potter IC (eds) *The Biology of Lampreys Vol. 4A*, Academic Press, London, 233-292 (1982)
- 7) Meinertz J: Beiträge zur vergleichenden Morphologie der farblosen Blutzellen. *Virchows Archiv*, **168**, 353-398 + 1 Tafel (XI) (1902)
- 8) Werzberg A: Studien zur vergleichenden

- Hämozytologie einiger poikilothermer Vertebraten. *Folia Haematol*, **11**, 17-193 + 4 Tafeln (I-IV) (1911)
- 9) Krause R: Das Blut. *In*: Krause R: Mikroskopische Anatomie der Wirbeltiere in Einzeldarstellungen IV. Teleostier, Plagiostomen, Zyklostomen und Leptokardier, Walter de Gruyter, Berlin und Leipzig, p852 (1923)
- 10) Babudieri B: Studi di ematologia comparata. Ricerche sui pesci, sugli anfibi e sui rettili. *Haematologica (Archivio)*, **11**, 199-255 + 1 tavola (1930)
- 11) Komocki W: Ueber die Blutbildung beim Neunauge (*Petromyzon fluviatilis*). Zugleich ein Beitrag zur Kritik der Zellenlehre. *Arch Biol*, **46**, 315-338 + 1 Tafel (IX) (1935)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) Percy LR, Potter IC: Blood cell formation in the River lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *J Zool, London*, **178**, 319-340 (1976)
- 15) Percy LR, Potter IC: Further observations on the development and destruction of lamprey blood cells. *J Zool, London*, **193**, 239-251 (1981)
- 16) Rowley AF, Page M: Ultrastructural, cytochemical and functional studies on the eosinophilic granulocytes of larval lampreys. *Cell Tissue Res*, **240**, 705-709 (1985)
- 17) Jordan HE, Speidel CC: Blood formation in cyclostomes. *Am J Anat*, **46**, 355-391 (1930)
- 18) 勝沼精藏: 血液及び組織ノ白血球ニ就テ. 日本病理学会会誌, **8**, 9-40 + 附表 2枚 (第1, 第2) (1919) [No author name and title in a foreign language (Katsunuma S: On the leukocytes of blood and tissue), *Trans Soc Pathol Jpn*, **8**, 9-40 + 2 attached tables (1 & 2) (1919) (In Japanese)]
- 19) 杉田賢郎: 円口類の血球及び血球生成組織並びに血球発生論に関する知見補遺. 新潟医科大学解剖教室輯報, **(26)**, 111-133 + 表紙 (1p) + 目次 (1p) (1953) [Sugita K: A supplementary note on the blood cells and hemocytopoietic tissues, with remarks on the origin and interrelationship of the blood cells of cyclostomes. *Niigata Ikadaigaku Kaibougaku-kyoushitsu Shuuhou* (No journal title in a foreign language. After continuation: *Acta anatomica Niigata'ensia Sectionis Anatomicae Universitatis*), **(26)**, 111-133 + cover (1p) and contents (1p) (1953) (in Japanese)]
- 20) Kanesada A: A phylogenetical survey of hemocytopoietic tissues in submammalian vertebrates, with special reference to the differentiation of the lymphocyte and lymphoid tissue. *Bull Yamaguchi Med School*, **4**, 1-35 (1956)
- 21) Fujii T: Antibody-enhanced phagocytosis of lamprey polymorphonuclear leucocytes against sheep erythrocytes. *Cell Tissue Res*, **219**, 41-51 (1981)
- 22) Tanaka Y, Saito Y, Gotoh H: Vascular architecture and intestinal hematopoietic nests of two cyclostomes, *Eptatretus burger* and ammocoetes of *Entosphenus reissneri*: A comparative morphological study. *J Morphol*, **170**, 71-93 (1981)
- 23) Fujii T: Electron microscopy of the leucocytes of the typhlosole in ammocoetes, with special attention to the antibody-producing cells. *J Morph*, **173**, 87-100 (1982)
- 24) Fujii T, Hayakawa I: A histological and electron-microscopic study of the cell types involved in rejection of skin allografts in ammocoetes. *Cell Tissue Res*, **231**, 301-312 (1983)
- 25) Piavis GW, Hiatt JL: Blood cell lineage in the sea lamprey, *Petromyzon marinus* (Pisces: Petromyzontidae). *Copeia*, **1971**, 722-728 (1971)
- 26) George JC, Beamish FWH: Haemocytology of the supraneural myeloid body in the sea lamprey during several phases of life cycle. *Can J Zool*, **52**, 1585-1589 + 5 plates (I-V) (1974)
- 27) Ardavin CF, Zapata A: Ultrastructure and changes during metamorphosis of the lympho-hemopoietic tissue of the larval anadromous sea lamprey *Petromyzon marinus*. *Dev Comp Immunol*, **11**, 79-93 (1987)

- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) Fey F: Untersuchungen zur vergleichenden Hämatologie niederer Wirbeltiere. *Folia Haematol*, **81**, 21-29 (1964)
- 31) Fey F: Vergleichende Hämozytologie niederer Vertebraten II. Erythrozyten. *Folia Haematol*, **84**, 271-282 (1965)
- 32) 中院孝圓: 魚類ノ血球ニ就キテ. 京都医学雑誌, **17**, 115-154 (1920a) [No author name, title and journal title in a foreign language (Nakanoin T: On the blood cells of fish. *Kyoto Igaku Zasshi* (= *Kyoto Med J*), **17**, 115-154 (1920)) (in Japanese)]
- 33) 中院孝圓: 魚類ノ血球ニ就キテ (承前). 京都医学雑誌, **17**, 280-294 + 付図2葉 (第1図, 第2図) (1920) [No author name, title and journal title in a foreign language (Nakanoin T: On the blood cells of fish (continued). *Kyoto Igaku Zasshi* (= *Kyoto Med J*), **17**, 280-294 + 2 plates (1 & 2) (1920)) (in Japanese)]
- 34) 工藤得安, 浅田豊磨: ヤツメの双態に就て. 動物学雑誌 (動雑), **48**, 521-533 (1936) [Kudô T, Asada T: Über den Dimorphismus des in Japan einheimischen Neunauges. *Zool Mag (Japan)*, **48**, 521-533 (1936) (In Japanese with German abstract)]
- 35) 山崎裕治, 後藤 晃: ヤツメウナギ類における系統分類と種分化研究の現状と課題. 魚類学雑誌, **47**, 1-28 (2000) [Yamazaki Y, Goto A: Present status and perspectives on the phylogenetic systematics and speciation of lampreys. *Japan J Ichthyol*, **47**, 1-28 (2000) (in Japanese with English abstract)]
- 36) Yamazaki Y, Yokoyama R, Nishida M, Goto A: Taxonomy and molecular phylogeny of *Lethenteron* lampreys in eastern Eurasia. *J Fish Biol*, **68(Supplement B)**, 251-269 (2006)
- 37) 森 昌 彦: 1. 3. 3 Cytochrome oxidase (1. 9. 3. 1, Ferrocycytochrome C: oxygen oxidoreductase). 武内忠男, 清水信夫, 小川和朗 (編), 酵素組織化学. 朝倉書店, 東京168-170 (1967) [Mori M: 1. 3. 3 Cytochrome oxidase (1. 9. 3. 1, Ferrocycytochrome C: oxygen oxidoreductase). In: Takeuchi T, Shimizu N, Ogawa K (eds) Enzymehistochemistry. Asakura-shoten, Tokyo, 168-170 (1967) (In Japanese)]