

ヌタウナギ好中球のエオシン染色性および貪食能

近藤昌和[†], 安本信哉

Eosin stainability and phagocytosis in inshore hagfish neutrophils

Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract : Two types of stratified (two-layered) granules (type 1, NG1a; type 2, NG2) in the neutrophils of inshore hagfish *Eptatretus burgei* showed eosin-positive (positive site: outer layer (L1) of NG1a and inner layer (L0) of NG2). In contrast, both eosin-positive sites have been reported to be basophilic. From present result, it is clarified that both sites exhibit as follows: L1 of NG1a, eosinophilic and metaazurophilic; L0 of NG2, eosinophilic, orthomethylenophilic and metaazurophilic. The inshore hagfish neutrophils phagocytosed zymosan particles, *in vitro*. All blood cells showing phagocytosis were identified as neutrophil.

Key words : hagfish, *Eptatretus burgei*, neutrophil, phagocytosis

緒言

円口類Cyclostomataにはヌタウナギ類hagfish (ヌタウナギ目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ヌタウナギinshore hagfish *Eptatretus burgei* (ヌタウナギ科Myxinidae) の成魚, カワヤツメArctic lamprey *Lethenteron camtschaticum*とシベリアヤツメSiberian lamprey *L. kessleri*の成魚ならびにスナヤツメfar eastern brook lamprey *L. reissneri* [南方型; *L. sp. S* (southern form)] の幼生 (いずれもヤツメウナギ科Petromyzontidaeカワヤツメ属) の好中球に多条件下Romanowsky型染色評価法 (Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV) を適用した。また, 好中球の細胞化学的特徴を調べ, 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¹⁻³⁾。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Giemsa染色などの一般染色で染色されない (難染色性 chromophobic) 顆粒を1型 (NG1), L0が染色される (好染色

性chromatophilic) 顆粒を2型 (NG2) とした³⁾。また, L1が好染色性を示すNG1をNG1a, L1がL0と同様に難染色性であるNG1をNG1bに分類した³⁾。ヌタウナギとスナヤツメ幼生の好中球はNG1aとNG2を有し, カワヤツメとシベリアヤツメの好中球にはNG1bとNG2が認められる。これらの好中球顆粒のうち, 好染色性層の色調は多様であり, カワヤツメのNG2のL0はMay-Grünwald (MG) 染色で赤色 (エオシン好性eosinophilic) または難染色性を示し, Giemsa染色やMG-Giemsa (MGG) 染色では赤紫色 (異調アズール好性 metaazurophilic) または難染色性を呈する²⁾。シベリアヤツメではNG2のL0はMG染色では難染色性であるが, Giemsa染色やMGG染色では赤紫色または難染色性である²⁾。また, スナヤツメ幼生ではNG1aのL1とNG2のL0は染色条件が同じ場合には同様の色調となり, MG染色では赤色または青色 (正調メチレンブルー好性orthomethylenophilic) を, Giemsa染色では赤色, 橙色 (エオシン好性), 赤紫色または難染色性を, MGG染色では赤色, 赤紫色, 黒赤紫色 (異調アズール好性) または難染色性を示す³⁾。なお, 黒赤紫色は多量の色素 (アズールB) が被染色物に結合したために光の透過量が減少したために生じたと考えられる。一方, ヌ

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

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.

ヌタウナギの好中球顆粒は当初、微細であり多くの染色条件において青色に染色されると考えられていたが⁴⁾(NG2のL0に相当する), その後、特定の条件下のMGG染色によってのみNG1aのL1とNG2のL0が赤紫色に染色されることが明らかとなった¹⁾。すなわち、当初は同一の被染色物が染色条件によっては難染色性を示すことは考えられたが、様々な色調を呈するとは予想していなかった。本研究では近藤・高橋(2009)⁴⁾で用いた染色標本を再度詳細に観察した。その結果、ヌタウナギの好中球顆粒もカワヤツメヤスナヤツメ幼生と同様に染色条件によってはエオシン好性を示すことが明らかとなったのでここに報告する。また、酵母の細胞壁であるzymosan粒子に対するヌタウナギ好中球の貪食能を調べ、既報と比較した。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11月30日)。

材料および方法

近藤・高橋(2009)⁴⁾で用いた染色標本(種々の条件でMG, GiemsaおよびMGG染色を施した標本; Table 1)を光学顕微鏡で観察した。zymosan粒子(zymosan A, Sigma)に対する好中球の貪食能を調べるために、響灘(下関市西方海域)で採集されたヌタウナギを用いた。ヌタウナギを水産大学の飼育施設に搬入し、水温約15°Cで1週間以上馴致飼育したのち実験に供した。馴致期間中は無給餌とした。zymosan粒子を3%NaCl水溶液で、3回遠心洗浄(3,000 rpm, 10分間, 5°C)したのち沈殿を同液に懸濁した(2.3 × 10⁸ cells/ml)。麻酔(MS-222)した体重約50 gのヌタウナギ(n=3)の皮下血洞から注射器を用いて血液を採取した。血

液9容とzymosan粒子懸濁液1容を混合して15°Cで1時間培養した。培養後、塗抹標本作製しTable 1のPN=51の条件でMGG染色を施して顕微鏡観察した。

結果および考察

1/15 Mのリン酸緩衝液(KH₂PO₄-Na₂HPO₄; pH5.0)を希釈液に用いたMG染色標本(Table 1のPN=6)において、NG1aのL1が橙色に、NG2のL0が淡赤色に染色され、細胞質基質は淡橙色であった(Fig. 1)。前報⁴⁾ではこの染色条件における好中球には顆粒が観察されない(not observed, NO)としていた。また、pH6.0~8.0の1/15 Mリン酸緩衝液を用いたMG染色(PN=7-9)においても前報では'NO'としていたが、本研究の観察ではこれらの条件では細胞質基質は淡橙色を呈するが、顆粒は難染色性であった。Table 2に本観察結果とともに近藤・高橋(2009)⁴⁾のtable 2と近藤・安本(2020a)¹⁾のtable 1をまとめた。本結果から、ヌタウナギのNG1aのL1はMG染色ではわずか一つの条件(PN=6)においてエオシン好性を示すが、他の条件では難染色性であり、Giemsa染色ではいずれの条件においても難染色性を示し、MGG染色ではPN=51の条件においてのみ異調アズール好性を呈することが明らかとなった。また、NG2のL0はMG染色ではPN=6の条件でのみエオシン好性であり、他の条件では正調メチレンブルー好性を示し、Giemsa染色ではいずれの条件においても正調メチレンブルー好性を、MGG染色ではPN=51の条件においてのみ異調アズール好性を呈すると考えられた(他の条件のMGG染色では正調メチレンブルー好性; Fig. 2)。

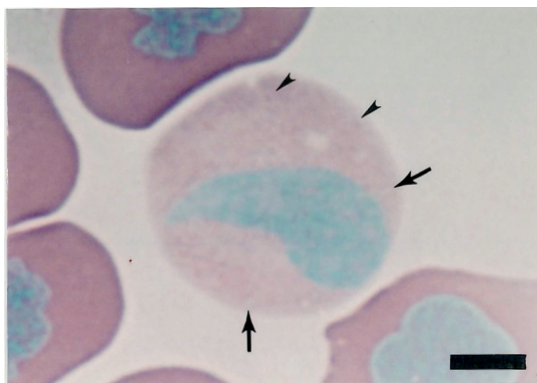


Fig. 1. Eosin stainability of neutrophil from inshore hagfish. May-Grünwald stain (PN=6; See Table 1). Note two types of eosinophilic granules, NG1a (arrows) and NG2 (arrowheads). Bar = 5 μm. Eosin positive site: L1 of NG1a & L0 of NG2.

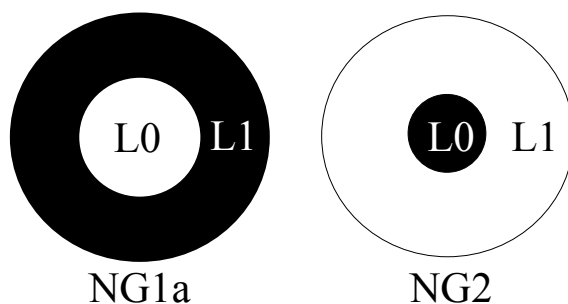


Fig. 2. Two types of neutrophil granules (NG) from inshore hagfish. NG1a, subtype of NG1; NG2, type 2; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer). □, chromophobic (colorless); ■, chromatophilic [L1 of NG1a, eosinophilic (orange) and metaazurophilic (purple); L0 of NG2, eosinophilic (red), orthomethylenophilic (blue) and metaazurophilic (purple)].

Table 2. Summary of multiple Romanowsky-type stain characteristics and cytochemical tests of neutrophil granules from inshore hagfish *Eptatretus burger* [modified and revised from Kondo & Takahashi (2009 ; table 2-1 & 2-2)⁴⁾ and Kondo & Yasumoto (2020a ; table 1)¹⁾]

Staining ^{*1,*2}	Type of granules and reaction ^{*3}			
	NG1a		NG2	
	L0	L1	L0	L1
MG (PN=1-5)	C	C	OM (blue)	C
MG (PN=6)	C	E (orange)	E (red)	C
MG (PN=7-9)	C	C	C	C
Giemsa (PN=10-45)	C	C	OM (blue)	C
MGG (PN=46-50 & 52-81)	C	C	OM (blue)	C
MGG (PN=51)	C	MA (purple)	MA (purple)	C
α -NBE	+	-	-	-

^{*1}MG, May-Grünwald; MGG, May-Grünwald-Giemsa; PN, preparation number (See Table 1); α -NBE, α -naphthyl butyrate esterase.

^{*2}Both types of granules showed negative reaction to other tests (alkaline phosphatase, acid phosphatase, β -glucuronidase, α -naphthyl acetate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase, peroxidase, periodic acid Schiff reaction, alcian blue (pH1.0, pH2.5), toluidine blue in distilled, Sudan black B, oil red O, Sudan III).

^{*3}L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer); C, chromophobic (colorless); E, eosinophilic; OM, orthomethylenophilic; MA, metaazurophilic; +, positive; -, negative (non-detection).

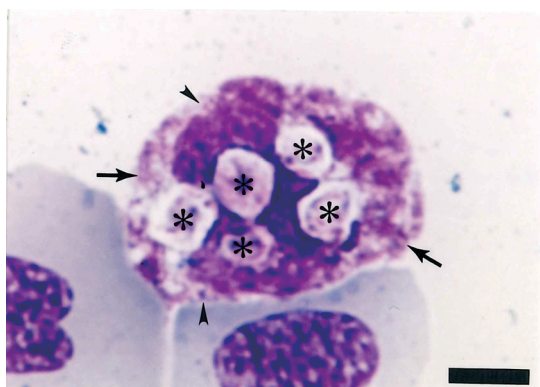


Fig. 3. Phagocytosis of zymosan particles (asterisks) by neutrophil of inshore hagfish, May-Grünwald-Giemsa stain (PN=51; See Table 1). Note two types of granules, NG1a (arrows) and NG2 (arrowheads). Bar = 5 μ m.

ヌタウナギの血液中の好中球はzymosan粒子を活発に貪食した (Fig. 3)。塗抹標本上においてzymosan粒子を貪食した血球は全て好中球に同定され、他の種類の食細胞は観察されなかった。ヌタウナギ類の好中球の貪食能に関する報告としてFänge & Gidholm (1968)⁵⁾、Mattisson & Fänge (1977)⁶⁾、近藤・高橋 (2009)⁴⁾が挙げられる。Fänge & Gidholm (1968)⁵⁾はカーミン粒子、加熱殺菌後にニュートラルレッドで染色した酵母あるいは水溶性の色素を*Myxine glutinosa*の血液中または腹腔内に注射し、血液中の好中球 [Fänge & Gidholm (1968)⁵⁾はgranulocyteと呼んでいる] はこれら異物を活発に貪食するが (figs. 1B & 1D; 白黒ス

ケッチ)、非顆粒性血球non-granulated blood cellによる貪食はわずかであると報告している (fig. 1C; 白黒スケッチ)。また、腹腔内には注射された異物を貪食した食細胞が多数存在し、それらのいくつかは好中球に似るが多くの場合、食細胞は好中球よりも大形で核の形が好中球と異なり、マクロファージと呼ばれるとしている。図 (figs. 1A-1F) の多くはおそらく未染色細胞である [fig. 1E (カーミン粒子を取り込んだ腹腔細胞) のみGiemsa染色標本であると図の説明文中にある]。Fänge & Gidholm (1968)⁵⁾の記載には不明瞭な点が多い。例えば好中球の核についての記述がない [図 (figs. 1B & 1D) にも核は描かれていない]。また、非顆粒性血球が酵母を貪食するのか明らかではない (fig. 1Cはカーミン粒子の貪食像)。腹腔内に観察された好中球に似た食細胞の詳細が記述されていない。この食細胞は腹腔内に注射された異物の刺激によって血液から遊走してきた好中球かもしれない。Mattisson & Fänge (1977)⁶⁾はFänge & Gidholm (1968)⁵⁾と同様に加熱処理した酵母 (染色していない) を*M. glutinosa*の血液中または腹腔内に注射し、血液中の好中球 [Mattisson & Fänge (1977)⁶⁾はgranulocyteと呼んでいる] は酵母を貪食すると記述しているが、観察方法が記されておらず、図も示されていない。また、Fänge & Gidholm (1968)⁵⁾が記した貪食能が低い非顆粒性血球に関連すると思われる血球の記述が、無顆粒球の節における単球/マクロファージの項 (p219) にあるが、細胞内の構造につ

Table 3. Granulocytes from hagfishes

Species	Granulocyte type (—, not observed)		Reference
	Neutrophil	Others	
<i>Myxine glutinosa</i>	special granulocyte, eosinophilic granulocyte & monocyte	—	Jordan & Speidel (1930) ⁸⁾
	polymorph neutrophile (heterophile, special) granulocyte, eosinophile granulocyte, polymorph eosinophile & monocyte	—	Jordan (1938) ¹¹⁾
	Eosinophilous granulocyte (eosinophil, fuchsophilous granulocyte)	Basophilous granulocyte	Holmgren (1950) ¹²⁾
	round cell	—	Good et al. (1966) ¹³⁾
	granulocyte (neutrophilic leucocyte)	—	Johansson (1973) ⁵⁴⁾
	granulocyte (heterophilic granulocyte)	—	Östberg et al. (1976) ¹⁴⁾
<i>Eptatretus burgeri</i>	granulocyte	—	Mattsson & Fänge (1977) ⁶⁾
	granulocyte	—	Fänge (1998) ¹⁵⁾
	granulocyte	—	Icardo et al. (2016) ⁵³⁾
	[granuläre Zellen]	[Eosinophile]	Katsunuma (1919) ^{9), *1, *2}
<i>Eptatretus cirrhatus</i>	Leukozyten mit grobe metachromatische Granula (in German)	Eosinophile (in German)	Katsunuma (1924) ^{17), *2}
	[bichromatophile Granulozyten (in German)]	—	Nakanoin (1920) ^{10), *3}
	[neutrophilic granular leukocyte & acidophilic granular leukocyte] ^h	—	Sugita (1953) ^{32), *4}
	granulocyte	—	Tomonaga (1973a, 1973b) ^{33,43)}
	granulocyte	—	Tomonaga et al. (1973) ^{44,45)}
	neutrophil	—	Tomonaga et al. (1981) ⁴⁶⁾
<i>Eptatretus polytrema</i>	granulocitos de citoplasma celeste, granulocitos de citoplasma rojizo & monocitos (in Spanish)	—	Kondo & Takahashi (2009) ⁴⁾
	granulocyte	—	Kondo & Yasumoto [2020a, 2020b, 2023 (present report)] ^{1,7)}
<i>Eptatretus stoutii</i>	granulocyte & monocyte	—	Hine et al. (1987) ⁴⁷⁾
	granulated cell	—	Icardo et al. (2016) ⁵³⁾
<i>Eptatretus walkeri</i>	protogranulocyte	—	Lama (1944) ⁴⁸⁾
	granulocyte	—	Finstad et al. (1964) ⁴⁹⁾

*1)Katsunuma (1919) did not describe these cells in a foreign language, however, he read eosinophil in German.
 *2)Katsunuma (1919, 1924) reported two types of granulocytes in lamprey (probably *Leihenteron reissneri*) and hagfish (probably *Eptatretus burgeri*), however, he did not describe lamprey granulocytes and hagfish granulocytes separately. Probably he would not observe 'Eosinophile (Katsunuma, 1919) = Leukozyten mit diffus eosinophil gefärbtem Protoplasma (Katsunuma, 1924)' in hagfish, because he did not show the 'Eosinophile' as major cells in hematopoietic tissue (intestine) of hagfish in Katsunuma [1924; fig. 17G (colored sketch; frozen section; Giemsa stain)].
 *3)Nakanoin (1920) did not describe these cells in a foreign language, however, he called the granules of this cell as 'bichromatophile Granula' in German.
 *4)Sugita (1953) did not describe these cells in a foreign language.

いては触れておらず、単に貪食性の封入体を有する大形で球形の細胞としか書かれていない。この細胞は図示されておらず、また酵母を貪食したのかも明記されていない。Mattisson & Fänge (1977)⁶⁾は酵母を貪食した腹腔内マクロファージの透過型電子顕微鏡像を示しており (fig. 14), これに関する記述 (p219) においていくつかのマクロファージは好中球の顆粒に類似した顆粒を少数含むとしている。このマクロファージは腹腔内に遊走してきた好中球が腹腔内で酵母を貪食したものかもしれない。好中球を他の細胞と明瞭に識別できる染色法があれば、前述のFänge & Gidholm (1968)⁵⁾およびMattisson & Fänge (1977)⁶⁾の不明瞭な点を解消できると考えられる。近藤・高橋 (2009)⁴⁾はグラム陰性菌の*Vibrio anguillarum*に対するヌタウナギ好中球の貪食像を示したが、染色条件がPN=77 (Table 1) のMGG染色であるのでNG2のL0のみが淡青色に染まっている。PN=51のMGG染色を施すことで他の種類の血球からの識別が容易になると考えられる。

これまでに種々のヌタウナギ類において好中球に相当する細胞が観察されているが (Table 3), 染色性の異なる2種類の顆粒が存在することを報告したのは近藤・安本 (2020a, 2020b)^{1,7)} だけである。既報における好中球の特徴を考察する (Tables 4 & 5)。Table 4には図版から読み取った情報も示した。

ヌタウナギ類の好中球顆粒

1. 一般染色標本観察

Myxine glutinosa (Atlantic hagfish)

Jordan & Speidel (1930)⁸⁾は血液中に2種類の顆粒球 [好中球 (special granulocyte) と好酸球 (eosinophilic granulocyte)] とともに単球を観察し、着色されたスケッチ (Wright染色像) を示した (好中球, figs. 7-9; 好酸球, figs. 10-13; 単球, fig. 16)。好中球の顆粒は微細でその色調は赤紫 (fig. 7) からより赤味を帯びた色 (fig. 8) あるいはより青味を帯びた色 (fig. 9) としている。一方、好酸球の顆粒は好中球よりも大きいとしているが、顆粒の色調に関する記述がない。また、単球に関する記述では単にfig. 16は典型的な単球であると

しか記されていない。これら3種類の血球はいずれも本稿における好中球であると推察される。すなわち、Jordan & Speidel (1930)⁸⁾の好中球に見られた微細な顆粒はNG2のL0に相当する。また、好酸球の図にはNG1aとNG2が認められ、NG1aのL0とNG2のL0は赤紫色である。単球の図からは細胞内顆粒は読み取れない。Jordan & Speidel (1930)⁸⁾の染色条件では好中球顆粒を十分に染色することができず‘染色むら’が生じ、その程度の違いに基づいて3種類の血球を分類したと推察される。ここで述べた‘染色むら’とはヌタウナギ類の好中球顆粒が有する特徴と考えられる。Jordan & Speidel (1930)⁸⁾は通常、一般染色を施してヌタウナギ類の血球を観察した最初の報告であると考えられているが、彼らの十年ほど前に勝沼 (1919)⁹⁾と中院 (1920)¹⁰⁾がヌタウナギ血球のGiemsa染色標本を観察している (後述)。

Jordan (1938; p715-721)¹¹⁾にはJordan & Speidel (1930)⁸⁾の内容が記載されている [図 (plate I) は白黒で印刷されているがJordan & Speidel (1930)⁸⁾で使用された図である]。

Holmgren (1950)¹²⁾は顆粒球として好酸球 (eosinophilous granulocyte or eosinophil) と少数の好塩基球 (basophilous granulocyte) を認めている (p290)。また、Jordan & Speidel (1930)⁸⁾の好中球も観察されるが、その好中球はGiemsa染色やWright染色によってわずかに淡赤色roseを示すことから好酸球との違いは確信できないとしている。Holmgren (1950)¹²⁾の好酸球の顆粒は微細であるが、粗大な顆粒が見られる好酸球も存在するとしている。顆粒の色調や構造に関する詳細な記述はなく、図 (fig. 38b; 白黒スケッチ; 好酸球が3個描かれている) の顆粒は不鮮明である。Holmgren (1950)¹²⁾の好酸球は本稿の好中球に相当し、微細な顆粒はNG2のL0であり、粗大な顆粒はL1が染色されたNG1aであると考えられる (NG1aの難染色性のL0は認識しなかったと思われる)。Holmgren (1950)¹²⁾はJordan & Speidel (1930)⁸⁾の好中球を観察していること、1個の好酸球に微細な顆粒 (NG2のL0) と粗大な顆粒 (NG1a) が共存することを記していないことから、Holmgren (1950)¹²⁾の染色標本^{*1)}には‘染色むら’が生じていたと考えられる。

なお、Holmgren (1950)¹²⁾は単球が認められなかったとしていることから (p291), ‘染色むら’の程度は Jordan &

^{*1)}染色法は明記されていないが、p286において標本にMG染色、Giemsa染色、Pappenheim染色 (=MGG染色)、Wright染色およびその他 (詳細は不明) を施したと記している。また、Giemsa染色とWright染色ではJordan & Speidel (1930)⁸⁾の好中球が淡赤色を示すとしていることから、Holmgren (1950)¹²⁾が形態学的特徴を記述するために観察した標本は、Jordan & Speidel (1930)⁸⁾の好中球がさらに赤味を増してHolmgren (1950)¹²⁾の好酸球に見える染色 (Giemsa染色やWright染色でない) が施されたと考えられる。おそらくMGG染色標本であろう。

Speidel (1930)⁸よりも軽度であったと思われる。

Goodら (1966)¹³はWright-Giemsa染色標本上に、哺乳類の単球に似た血球を観察し (fig. 4; 白黒写真), round cellと呼んだ (p152)。しかしこの血球の形態学的特徴は明記されていない。図のround cellは大型の円形で、広い細胞質を有し、核は偏在しており粗大な濃縮染色質が認められる。この細胞は顆粒がほとんど染色されていない好中球であると考えられる。

Östbergら (1976)¹⁴は腸の切片 (凍結乾燥した腸をホルマリン蒸気固定したのちに樹脂包埋) に好中球を認め、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色とMGG染色によって顆粒はかすかに赤色からピンク色を呈するとしている (faintly red to pink when stained hematoxylin-eosin and May-Grünwald-Giemsa stain)。この記述ではHE染色とMGG染色の両染色において顆粒が同じ色調を示すことになる。おそらくHE染色ではかすかな赤色に、MGG染色ではピンク色に染色されたと考えられる。HE染色による赤色はエオシンの色調であると言える (図は無い)。ピンク色は淡い赤紫色かもしれないが、MGG染色像が図示されていないので詳細は不明である。また、両染色標本における顆粒の構造については記述がない。

Mattisson & Fänge (1977)⁶には各種血球のMGG染色像があり (fig. 7; 白黒写真), 好中球の細胞質には多数の顆粒が認められる (figs. 7b & 7c)。本文および図の説明文中に顆粒の色調と構造に関する記述はないが、図にはNG1aとNG2が見られる。なお、図の説明文中において、figs. 7b & 7cの好中球顆粒は通常よりも濃く染色されていると記されているが (The granules are more heavily stained than is usually the case.), 通常の染色像は示されていない。

Fänge (1998)¹⁵は総説であり、好中球の顆粒は通常の染色でははっきりとした好酸性でも好塩基性でもないとして記している。このFängeはÖstbergら (1976)¹⁴の第2著者であり、Mattisson & Fänge (1977)⁶の共著者でもあるが、Fänge (1998)¹⁵の記述から、Östbergら (1976)¹⁴とMattisson & Fänge (1977)⁶のMGG染色標本には様々な‘染色むら’が生じた好中球が存在すると考えられる。

スタウナギ *Eptatretus burgeri* (inshore hagfish)

勝沼 (1919)⁹には円口類の血液学に関する記述があり、

スタウナギ類の好中球の一般染色性を記した最初の報告と考えられる。しかし、実験動物を単に‘やつめうなぎ’と‘めくらうなぎ’としか記しておらず、実際に使用した種は不明である。また、‘やつめうなぎ’と‘めくらうなぎ’を区別して記述しておらず、記述内容がどちらの円口類に該当するのか不明である。さらに、勝沼 (1919)⁹には引用文献リストはなく、細胞の図もない。これらの問題点を解消するために、勝沼の著作を収集・解析した。勝沼 (1919)⁹は日本病理学会の日本病理学賞受賞講演 (宿題報告) の和文抄録である。日本病理学会は1911年から1926年の間、欧文誌 [*Verhandlungen der Japanischen Pathologischen Gesellschaft* (以後、*VJPG*と略す); 継続後雑誌 (1921-1926), *Transactions of the Japanese Pathological Society*] と和文誌 (日本病理学会会誌) を発行しており、宿題報告を含む学会発表の内容は、発表が行われた年内に欧文誌に、翌年には和文誌に抄録として掲載されている (発行開始は欧文誌が1年早いので、同じ巻番号であっても欧文誌と和文誌で発行年が異なる)。勝沼 (1919)⁹に対応する欧文抄録 [Katsunuma (1918)¹⁶]にも引用文献リストや図はないが、これらの内容を取りまとめた著書 [Katsunuma (1924)¹⁷]には図と引用文献リストがある。その中で勝沼自身が著者になっている文献 (p219-220; 13編) と、Katsunuma (1924)¹⁷の円口類に関する記述中 (p69-71) に引用された文献 (1編) を入手し精査した。その結果、Katsunuma (1916)¹⁸, Katsunuma (1918)^{16, *2} およびKiyono & Nakanoin (1919)^{19, *3, *4}に円口類に関する記載があった。Katsunuma (1916)¹⁸に対応する和文抄録 [勝沼 (1917)²⁰]も調べた。なお、Katsunuma (1918)¹⁶は前述した勝沼 (1919)⁹に対応する欧文抄録である。Kiyono & Nakanoin (1919)¹⁹の筆頭著者である清野は勝沼と同じ1918年に日本病理学賞を受賞しており、その欧文抄録 [Kiyono (1918)²¹]を通読したところ、スタウナギ類に関する記載があった (引用文献と図はない。これに対応する和文抄録²²には円口類に関する記述がない)。しかし、その内容はKiyono and Nakanoin (1919)¹⁹と全く同じであった [Kiyono and Nakanoin (1919)¹⁹はKiyono (1918)²¹に図版と引用文献を付けた体裁となっている]。スタウナギ類の血球に関する記載がある中院 (1920)¹⁰も参考にした。

Katsunuma (1916)¹⁸および勝沼 (1917)²⁰では実験動物をそれぞれ‘Cyclostomaten’と‘円口類’とのみ記している。

^{*2}Katsunuma (1924)¹⁷の引用文献リストでは掲載誌名が前出文献と同じとなっているが [Ibid: *Zeitschr. f. d. med. Gesellsch. zu Tokio* (東京医学会雑誌)], 正しくは*VJPG*である。

^{*3}Katsunuma (1924)¹⁷の本文中では著者名が“Kiyono”となっている。

^{*4}Katsunuma (1924)¹⁷の引用文献リストでは著者名がKiyono und Nakandinとなっている。

また, Katsunuma (1918)¹⁶⁾にはヤツメウナギ類を示す用語がなく, スタウナギ類を指す 'Mixinen, Cyclostomata' と 'Cyclostomen' がある。一方, 勝沼 (1919)⁹⁾では, 'やつめうなぎ' と 'めくらうなぎ' となっている。Kiyono & Nakanoin (1919)¹⁹⁾では, スタウナギ類を指す 'Mixine, Cyclostoma' がある。中院 (1920)¹⁰⁾では 'めくらうなぎ' と記されており, Katsunuma (1924)¹⁷⁾ではヤツメウナギ類を示す 'Neunaugen' とスタウナギ類を指す 'Inger' が使われている。しかし, いずれの文献においても学名は記されていない。勝沼, 清野および中院の著作を精査する過程で, 彼らが同時期 (1917~1918年) に東京帝国大学 (当時) の三崎臨海実験所 (神奈川県) を拠点にして実験動物 (魚類や海産無脊椎動物) の採集・研究を行っていたことが判明した⁴⁵⁾。中院 (1920)¹⁰⁾は使用した各種魚類を全て三崎海岸で捕獲したと記している (p116)⁴⁶⁾。また, 勝沼と清野は盟友関係に [柴田 (2008)²⁶⁾], 清野と中院は師弟関係にあり [中院 (1956)²⁵⁾], 少なくとも勝沼と清野は共同で研究を行っていたと思われる [勝沼 (1956)²³⁾]。したがって, 彼らの使用したスタウナギ類はいずれも三崎海岸の沿岸水域で採集されたと考えられる。三崎海岸は相模湾に面しており, 同海域には7種のスタウナギ類 [スタウナギ, ムラサキスタウナギ *E. okinoseanus*, クロスタウナギ *E. atami*, *E. moki*, キタクロスタウナギ *E. walkeri*, ホソスタウナギ (旧メクラウナギ) *M. garmani*, オキナホソスタウナギ (旧オキナメクラ) *M. paucidens*] が分布する²⁷⁾。これらのうち生息水深が最も浅いのはスタウナギであり^{27,28)*7)}, 小林ら (1972)³¹⁾も三崎臨海実験所付近でスタウナギを採集している。したがって, 勝沼, 清野および中院が使用したスタウナギ類は標準和名がメクラウナギ (旧名) の *Myxine garmani* ではなく, スタウナギであると推察される。なお, 勝沼 (1919)⁹⁾および Katsunuma (1924)¹⁷⁾の 'やつめうなぎ, Neunaugen' については次報で推察する。勝沼 (1919)⁹⁾は中院 (1920)¹⁰⁾と杉田 (1953)³²⁾に, 中院 (1920)¹⁰⁾は杉田 (1953)³²⁾と友永 (1973a)³³⁾に引用されている。しかし, 杉田 (1953)³²⁾は勝沼 (1919)⁹⁾と中院 (1920)¹⁰⁾が使用したスタウナギ類をメクラウナギ (現在

のホソスタウナギ *M. garmani*) として扱い, 自身のスタウナギの血液像との比較をしていない。スタウナギの血球を調べた友永 (1973a)³³⁾も中院 (1920)¹⁰⁾のスタウナギ類をホソスタウナギ属 (旧メクラウナギ属; *Myxine*) としており, 十分に比較・考察していない。中院 (1920)¹⁰⁾はスタウナギを含む各種魚類の血球にGiemsa染色等を施して観察したが, 勝沼 (1919)⁹⁾からの引用内容にスタウナギ血球のGiemsa染色性に関する記述がない。また, 杉田 (1953)³²⁾による勝沼 (1919)⁹⁾の引用内容は, 後述する原始的脾臓のみである [杉田 (1953)³²⁾は勝沼 (1919)⁹⁾の原始的脾臓を *M. garmani* の粘液腺として扱っている]。

Katsunuma (1916)¹⁸⁾および勝沼 (1917)²⁰⁾には, 円口類の全ての白血球はオキシダーゼ陰性であるとのみ記されている (一般染色性や白血球の種類については述べていない)。勝沼 (1919)⁹⁾には血球の他に, ①腸管に島嶼状に存在するリンパ細胞群および②原始的脾臓に関する記述がある (p25-26)。しかし, 上述したように, 勝沼の記述は 'やつめうなぎ' と 'めくらうなぎ' を区別して記されていない (勝沼の 'めくらうなぎ' を以後, スタウナギと記す)。一方, 勝沼 (1919)⁹⁾の欧文版にあたる Katsunuma (1918)¹⁶⁾では血球の記述はなく, 前述の①と②がスタウナギにおける観察結果として一つの段落内に記されている (p83-84)。また, Katsunuma (1924)¹⁷⁾では勝沼 (1919)⁹⁾と同様に血球のほかに①と②が記されているが (p69-71), ①と②は連続した異なる段落に記述されており (p70), ①を含む段落の第1文でスタウナギ (*Inger*) における観察結果とされている。②の内容もスタウナギにおける記述であろう。したがって, 勝沼 (1919)⁹⁾の血球に関する記述は 'やつめうなぎ' とスタウナギに関する結果であり, ①と②はスタウナギの観察結果であると推察される。ここで①と②について考察する。①の腸管に島嶼状に存在するリンパ細胞群の図は Katsunuma (1924)¹⁷⁾にあり (fig. 17; オキシダーゼ染色像; 着色されたスケッチ), 明らかにスタウナギの腸壁における造血組織 (現代の用語では原始脾 *primitive spleen*) である。血管の周囲に多数の細胞が描かれており, 勝沼 (1919)⁹⁾ではリンパ細

⁴⁵⁾勝沼 (1956)²³⁾では1917年夏と1918年夏に清野と研究したことになっている (勝沼自身は「その3年前から」三崎臨海実験所で夏季に研究をしたと述べている)。また, 清野・勝沼 (1918)²⁴⁾では1917年8月に両名が中院とともに三崎臨海実験所で研究したとされている。中院 (1956)²⁵⁾にも類似の記述があるが, 時期の記述は不明瞭である。

⁴⁶⁾杉田 (1953)³²⁾は中院 (1920)¹⁰⁾が 'めくらうなぎ' を採集した場所を静岡県三崎海岸としているが (p113), 正しくは神奈川県三崎海岸である。

⁴⁷⁾小林 (1963)²⁹⁾は山口県下関市吉見の漁業者が打瀬網で採集した *Myxine garmani* を使用している。採集海域はおそらく吉見沖の響灘と考えられる。本稿の著者らは響灘産のスタウナギを使用しているが, 同海域で *M. garmani* の採集例は小林 (1963)²⁹⁾以外にない。また, Kobayashi (1964)³⁰⁾は日本海に面した山口県沿岸から約2 mile沖合におけるトロール漁で採集された *M. garmani* を使用している。しかし, この海域においても Kobayashi (1964)³⁰⁾以外に *M. garmani* の採集例はない。小林 (1963)²⁹⁾および Kobayashi (1964)³⁰⁾の *M. garmani* はスタウナギあるいはキタクロスタウナギを誤同定したものと考えられる。

胞群の中に組織球、赤血球ならびに顆粒細胞(好中球に相当する)が存在するが、赤血球と顆粒細胞の形成は非常に弱いと記されている。また、Katsunuma (1918)¹⁶⁾では多数のリンパ球のほかに常に一定数の顆粒球(好中球に相当する)を含むとある。さらに、Katsunuma (1924)¹⁷⁾では大部分はリンパ球様細胞であり、少数の顆粒球が産生されるが赤血球は産生されないとされている。このリンパ細胞群を構成する主要な細胞のギムザ染色像がKatsunuma (1924)¹⁷⁾のfig. 17Gに3個描かれている。これらのうち、2個は顆粒球であり、1個はリンパ球様細胞である。このギムザ染色像はおそらく腸壁の凍結切片をギムザ染色したものと考えられる。②の原始的脾臓はKatsunuma (1918, 1924)^{16,17)}では腸間膜の結合組織に多数存在し、動物学者はこれを粘液腺と呼んでいるとしている。また、Katsunuma (1924)¹⁷⁾では組織切片像が図示されており(fig. 18; オキシダーゼ染色像; 着色されたスケッチ)、この組織は蛇行した静脈洞と髄質性の細網細胞からなり、顆粒球やリンパ球様細胞が集団となって濾胞を形成していると記されている。しかし、同様の組織はこれまでヌタウナギ類の腸間膜に認められていない。勝沼 (1919)⁹⁾ではこの組織は‘後腹壁膜ニ左右相並ビテ數十對ノ暗赤色粟粒大ノ臓器’とされており、ヌタウナギの粘液腺が乳白色であるのとは異なる。勝沼 (1919)⁹⁾の記述に合致する組織はヤツメウナギ類の腎臓(後方腎; 中腎)である。ヤツメウナギ類では幼生期中腎でも造血が起こり、変態にともなって幼生期中腎は崩壊し脂肪組織に置き換わるが、幼生期中腎の後方に成魚期中腎が形成される(成魚期中腎では造血は起こらない)³⁴⁾。スナヤツメの場合、変態後間もない成魚では幼生期中腎の泌尿器系は崩壊しているが造血は維持されていることが知られている³⁵⁾。勝沼 (1919)⁹⁾およびKatsunuma (1918, 1924)^{16,17)}の原始的脾臓はヤツメウナギ類の成魚における崩壊過程の幼生期中腎であると考えられ、‘やつめうなぎ’の標本をヌタウナギのそれと誤認したと思われる。ヌタウナギの‘原始的脾臓’はKiyono & Nakanoin (1919)¹⁹⁾にも記載され図示されている(fig. 18; 炭素粒子とリチウムカーミンの混合液を腹腔内に注射して生体染色を施した個体)。この図の標本はおそらく勝沼から提供されたのであろう[勝沼が使用した実験動物に清野が生体染色を施したことが勝沼

(1956)²³⁾に記されている]。Kiyono & Nakanoin (1919)¹⁹⁾にはリチウムカーミンで生体染色したヌタウナギの血球(リチウムカーミンを取り込んだ血球)が記述され、図示されている(figs. 12-14)。彼らはこの血球を血液組織球と呼んだが、一般染色性は記されていない。腸壁に単核球の集団を認め、その大部分はリンパ球であり、少数の顆粒球も産生されていると記述している(図示していない)。また、腎臓の結合組織に発達の弱い造血組織を観察している(図はない)。さらに、炭素粒子とリチウムカーミンの混合液を腹腔内注射した個体の鰓を観察し、基底部の血管洞に炭素粒子とリチウムカーミンを取り込んだ組織球性内皮を認めている(fig. 16)。この知見はヌタウナギにおいてTomonagaら (1973, 1975)^{36,37)}が、キタクロスタウナギにおいて山口 (1979; table 1)^{38),*8)}が再発見しているが、これらの報告にKiyono & Nakanoin (1919)¹⁹⁾は引用されていない。また、最近、Seternesら (2021)⁴⁰⁾が魚類のスカベンジャー内皮細胞に関する総説において、無顎類(円口類)の鰓のスカベンジャー細胞の項でKiyono (1914)⁴¹⁾を2箇所で引用している(p1389)。しかし、引用箇所の文章の内容はKiyono (1914)⁴¹⁾には無く[同項9行目のKiyono (1914)⁴¹⁾はTomonagaら(1973, 1975)^{36,37)}が、最終行のKiyono (1914)⁴¹⁾はYamaguchiら (1979)⁴²⁾が正しい]、Kiyono (1914)⁴¹⁾には無顎類に関する記述は一切無い。中院 (1920)¹⁰⁾については後述する。勝沼 (1919)⁹⁾はヌタウナギとヤツメウナギ類の顆粒細胞は基本1種類であり、異調染色性を示す粗大な顆粒を有し、核は偏在すると述べている(p25)。この顆粒細胞は好中球であると考えられるが、顆粒の形状に関する記述がなく、図もない。また、稀に好酸球が存在するとしているが、この記述がヌタウナギとヤツメウナギ類の両方にかかるのか否かは不明である。一方、Katsunuma (1924)¹⁷⁾には同様の記述のほかに図がある(fig. 17G)。この図はヌタウナギの腸のリンパ細胞群(原始脾)を構成する主要な細胞であり、凍結切片のギムザ染色像と考えられる。図に描かれた3個の細胞のうち、2個には赤紫色の顆粒が見られることから、好中球と思われる(残る1個はリンパ球様細胞)。また、図の好中球には2種類の顆粒が認められ、L1が赤紫色を示すNG1aとL0が赤紫色を呈するLG2に相当すると言える。好酸球は描かれていないことから、上述した稀に観察される好酸球は‘やつめう

*8) 山口 (1979)³⁸⁾は*Paramyxine atami* (*Eptatretus atami*のシノニム)として報告した。日本比較免疫学科第33回学術集会(2022年8月22-23日)のシンポジウム‘血管・リンパ管・内皮細胞の比較生物学’(8月23日)における山口の講演(円口類スナヤツメの鰓海綿体の構造と機能)後の討論で、山口 (1979)³⁸⁾の*P. atami*の採集地を訊ねたところ、同じ研究室の友永 進博士から提供された日本海産であるとの回答を得た(後日、友永博士に訊ねたところ、島根県浜田市沖との回答を得た)。したがって、Kitanoら (2019)³⁹⁾に基づき山口 (1979)³⁸⁾の*P. atami*をキタクロスタウナギとした。

なぎ’に観察されたものと推察される。勝沼 (1919)⁹⁾は血液中に単球 (組織球と記述) に似た細胞を認め、原始脾にはリンパ細胞、組織球、赤血球ならびに好中球が存在するが、赤血球と顆粒細胞の形成は非常に弱いとしている。また、Katsunuma (1918)¹⁶⁾では原始脾は多数のリンパ球のほかに常に一定数の好中球を含むとある。さらに、Katsunuma (1924)¹⁷⁾では大部分はリンパ球様細胞であり、少数の顆粒球が産生されるが赤血球の産生はないとされている。友永 (1973a)⁴³⁾とTomonagaら (1973)⁴⁴⁾はヌタウナギの原始脾の主体は好中球であることを透過型電子顕微鏡観察で明らかにした。したがって、勝沼 (1919)⁹⁾とKatsunuma (1918, 1924)^{16,17)}が原始脾に観察したリンパ球様の細胞と組織球には、‘染色むら’を示した好中球が含まれると考えられる。

中院 (1920)¹⁰⁾はヌタウナギの血液中に顆粒細胞を1種類のみ認め、これを両色嗜好性顆粒細胞と呼んだ (好中球に相当する)。Giemsa染色によって顆粒は淡赤紫色、青紫色あるいは青色を呈するとし (p127)、図版2のfigs. 4 & 5に着色されたスケッチが示されている。fig. 4には淡赤紫色または淡青色の微細な粒子状の構造が認められ、NG2のL0に相当すると考えられる。一方、fig. 5には顆粒は認められず、図の説明文中には‘顆粒ハ不明ナリ’と記されている。中院のGiemsa染色標本の好中球には‘染色むら’があり、fig. 4とfig. 5以外に様々な色調の顆粒 (NG2のL0) が観察されたと推察される。なお、中院 (1920)¹⁰⁾は血液中に単球は認められないとしている。中院 (1920)¹⁰⁾の両色嗜好性顆粒細胞の顆粒 (両色嗜好性顆粒bichromatophile Granula) とは、酸性色素と塩基性色素に同時に染色されることで、色調が紫色を呈する顆粒を指す。この顆粒は、中院らがニワトリやウサギの胎生期における顆粒球の発生を研究していた時に観察された顆粒であり (p121)、好酸球はその発生初期には両色嗜好性顆粒細胞として出現する [両色嗜好性顆粒細胞が分化して好酸球となる] (p138)。中院は脊椎動物の系統発生と個体発生の観点から、以下の観察結果をもとに魚類の血液中の; 内は著者による補足。以下同様; 両色嗜好性顆粒細胞の多くは分化・成熟した細胞と考え; 顆粒が微細で少ない幼若な両色嗜好性顆粒細胞は他の種類の顆粒球に変化できる; 好中球とは異なると結論づけた (p138-139)。すなわち、両生類以上の脊椎動物の血液中) では好中球、好酸球および好塩基球のうち1種類以上の分化した顆粒球が存在する; 両色嗜好性顆粒細胞は認められない。一方、魚類では血液中に; 両色嗜好性顆粒細胞

が出現するとともに、魚種によっては好酸球や好塩基球も観察されるが; 好中球は認められない; 最下等の脊椎動物である円口類では両色嗜好性顆粒細胞のみが認められる。両色嗜好性顆粒細胞のみが認められる魚種が; 円口類以外にも存在することから、この細胞の多くは分化・成熟した細胞であり、顆粒が微細で少ない幼若な両色嗜好性顆粒細胞は他の種類の顆粒球に変化できる。魚類への両色嗜好性顆粒の適用は果たして妥当であるのか? 中院 (1920)¹⁰⁾は魚類の両色嗜好性顆粒についてp139で次の様に記している: ①ギムザ染色等ニ於テ、酸性色素 (「エオゼン」) ト塩基性色素 (「メチレン」青等) トノ両色ヲ同時ニ取ル性質アリ。②而シテ此等染色ニ於ケル塩基性色素ハ「エオゼン」ト異リ、容易ニ水洗又ハ「アルコール」ニヨリテ脱色ス。③従ヒテ染色術式ノ如何ニヨリテ、或ハ青色ノ度勝チテ暗紫色ニ著染シ、或ハ両色略同程度ニ染リテ紫赤色ヲ呈シ、又「デイフェレンチールク」強ケレバ殆ンド赤色ヲ現ハス。これらのうち、第3文の暗紫色とは青紫色ではなく、塩基性色素が多量に顆粒に結合したことで光が透過せず、黒色として認識されることを意味すると思われる [「デイフェレンチールク」はドイツ語のDifferenzierungであり、分化 (英語のdifferentiation) のことである]。これら3つの文章からは、両色嗜好性顆粒がさまざまな色を示す可能性が読み取れる。両色嗜好性顆粒細胞のみが認められるとしたヌタウナギでは、ギムザ染色された顆粒の色について“色ハ灰白紫紅色ナレドモ、往々紫青色又ハ青色ノモノヲ混入ス”と記述されており (p127)、青色の顆粒も両色嗜好性顆粒に分類されている。通常、ギムザ染色によって紫色 (赤紫色と青紫色を問わず) を示す顆粒は、これら染色液中の塩基性色素 (色素そのものは青色) が異調染色性を示したと考える。酸性色素の赤と塩基性色素の青が同時にその色調のまま顆粒を染色し、その結果、混色によって紫色に染色されたと主張するのであれば、単独の色素による染色を行って証明する必要がある。しかし、中院 (1920)¹⁰⁾ではギムザ染色のみによって紫色を示す顆粒を単に両色嗜好性としている。以上のように、中院の両色嗜好性顆粒は観念的であり、この名称を無検討のまま使用するのは適当ではない。

杉田 (1953)²⁹⁾はMGG染色を施した血液塗抹標本に2種類の顆粒性白血球を観察し、好中性顆粒白血球と好酸性顆粒白血球と呼んだ (p114)。前者の顆粒の色調は明記されていないが、細かい顆粒が密に存在するため一見 (細胞質が) 一様に赤く染まって見ると記している。一方、後者の顆

粒は前者よりも大きくまばらであるとしているが色調に関する記述はない。図は白黒スケッチであり、両顆粒性白血球の顆粒は点状または粒状に描かれている。杉田 (1953)³²⁾ はこれらの観察結果はJordanの研究 [*M. glutinosa*について報告したJordan & Speidel (1930)⁸⁾を指すと思われる] に一致していると述べている。しかし、Jordan & Speidel (1930)⁸⁾とは異なり、単球は観察されないとしている。杉田 (1953)³²⁾の好中性顆粒白血球と好酸性顆粒白血球は好中球の‘染色むら’の違いによるものであると考えられる。また、杉田 (1953)³²⁾は赤色と赤紫色を十分識別していなかったと推察される。

友永 (1973a)³³⁾はWright染色した血液塗抹標本上に1種類の顆粒球を観察し、好中球に相当すると考えた。顆粒は非常に小さく染色性に乏しいとのみ記している (色調の記述はない)。図 (figs. 19 & 20; 成熟顆粒球; 白黒写真) からは顆粒の構造は読み取れない。Tomonagaら (1973)⁴⁵⁾にも顆粒球のWright染色像 (fig. 4のaとb; 白黒写真) があるが、顆粒の色調や構造に関する記述がない。友永 (1973a)³³⁾とTomonagaら (1973)⁴⁵⁾は血液中に単球は観察されないとしている。

Tanakaら (1981)⁴⁶⁾は腸のスタンプ標本にMGG染色のほかに各種細胞化学染色を施して観察しているが (p74)、結果に好中球を含む各種細胞のMGG染色性に関する記述がない (図もない)。また、結果では血液塗抹標本も腸のスタンプ標本と同様に染色したことになるが (p86)、白血球のMGG染色性に関する記載が図とともにない。

近藤・高橋 (2009)⁴⁾は血液塗抹標本にMRSV (Table 1) を適用して好中球に微細な淡青色顆粒を観察している。この顆粒は本稿におけるNG2のL0に相当する。近藤・高橋 (2009)⁴⁾では細胞質基質が赤紫色を呈するとした染色条件 (Table. 1のPN=51) の好中球には、近藤・安本 (2020a)¹⁾によって2種類の顆粒が観察されることが明らかとなった。すなわち、赤紫色の細胞質基質と考えられた被染色領域はNG1aのL1に相当する。また、この染色条件ではNG2のL0は淡青色ではなく赤紫色に染色される。近藤・安本 (2020b)⁷⁾は各種寄生虫が感染した個体の血液中の好中球にMGG染色 (PN=51) を施して未感染個体と同様な2種類の顆粒 (NG1aとNG2) を観察している。本稿 [近藤・安本 (2023)] では近藤・高橋 (2009)⁴⁾が見落としていた好中球顆粒の染色性について記述している。

Eptatretus cirrhatus (broadgilled hagfish)

Hineら (1987)⁴⁷⁾は好中球の染色性について、Wright染色では好中性から好塩基性としているが (p9)、顆粒の染色性や構造に関する記述はなく、Wright染色像も示していない。Hineら (1987)⁴⁷⁾は赤血球にシアン耐性のペルオキシダーゼ陽性封入物 (peroxidase inclusion) を観察しており、この封入物はしばしばトリパノソーマの寄生に関連していると述べている。したがって、Hineら (1987)⁴⁷⁾が使用した*E. cirrhatus*は*Trypanosoma. heptatreti* [宿主は*E. cirrhatus*; 近藤・安本 (2020b)⁷⁾を参照] が寄生していた個体と考えられる。なお、単球様の細胞が観察されているが、形態学的特徴についての記載がない。

Eptatretus polytrema (fourteen-gill hagfish)

Lama (1944)⁴⁸⁾はMGG染色を施した血液塗抹標本に2種類の顆粒球 (赤味を帯びた細胞質を有する顆粒球と淡青色の細胞質を有する顆粒球) とともに単球を観察している。2種類の顆粒球の中間型も存在するとしている。顆粒球の顆粒の染色性と構造に関する記述はないが、赤味を帯びた細胞質 (おそらく細胞質基質を意味する) が顆粒を縁取るように見えるとしていることから、この顆粒球ではNG1aのL1が染色されていると考えられる。Lama (1944)⁴⁸⁾の2種類の顆粒球と単球はいずれも‘染色むら’が生じた好中球と思われる。図があるが (白黒スケッチ; 単球, figs. 11 & 12; 顆粒球, fig. 13)、経年劣化のため核以外の構造が見えない (細胞の輪郭も不鮮明)。

Eptatretus stoutii (Pacific hagfish)

Finstadら (1964)⁴⁹⁾は図 (fig. 4; 白黒写真) にWright-Giemsa染色された好中球 (protogranulocyte) を1個示している。顆粒の染色性と構造に関する記述はないが、図にNG1aとNG2が認められる。

キタクロナタウナギ*Eptatretus walkeri* (northern brown hagfish)

Chiba & Honma (1986)^{50),*9)}は視床下部-下垂体域の組織切片を観察し、脳室壁面や神経性下垂体中に遊走してきた細胞を認め、透過電子顕微鏡観察により、この細胞はヌタウナギ類の顆粒球 (= 好中球) と考えた。パラフィン切片のHE染色によって細胞質は弱好酸性を示し、微細な顆粒状であると報告している。しかし、この顆粒の構造についての記述はない、HE染色像も示されていない。

以上のように、過去の報告における好中球顆粒の一般染

^{*9)}Chiba & Honma (1986)⁵⁰⁾は使用したヌタウナギ類を*Paramyxine atami* (*Eptatretus atami*のシノニム) として報告したが、採集地は日本海に面した新潟県の粟島沖である。Kitanoら (2019)³⁹⁾に基づきキタクロナタウナギとした。

色性については様々である。このことはスタウナギ類の好中球顆粒は実際に様々な色素に染色されるが、染色条件によっては本来的に‘染色むら’が生じやすい特性を有するためと思われる。同じ円口類のヤツメウナギ類ではGiemsa染色などのメチレンアズールを含む染色液によって好中球顆粒が紫色を呈することが一般に知られている[近藤・安本 (2022a)³⁾参照]。我々が調べたカワヤツメとシベリアヤツメの成魚およびスナヤツメ幼生においても種々の染色条件におけるGiemsa染色とMGG染色で好中球顆粒が紫色に染色された^{2,3)}。一方、スタウナギではMRSVのわずか1つの条件のMGG染色でのみ顆粒が紫色を呈する¹⁾。

2. 透過型電子顕微鏡観察

*Myxine glutinosa*の好中球顆粒の透過型電子顕微鏡(TEM)像には微細な円形の構造体が多数認められる[Östbergら (1976; figs. 6 & 7)¹⁴⁾; Mattisson & Fänge, (1977; fig. 8)⁶⁾]。しかし、この構造体について論文の著者らは言及していない。同様な構造体はスタウナギ[友永 (1973; fig. 30)³³⁾; Tomonagaら (1973; fig. 4)⁴⁵⁾], *E. stoutii* [Linthicum (1975; fig. 2)⁵¹⁾; Tsuneki & Gorbman (1977; fig. 6)⁵²⁾], キタクロスタウナギ [Chiba & Honma (1986; fig. 4)⁵⁰⁾]にも観察されているが、いずれの著者も顆粒内の円形構造体について記述していない。なお、Tanakaら (1981)⁴⁶⁾にはスタウナギ好中球のTEM像が (fig. 14), Icardoら (2016)⁵³⁾には*E. cirrhatus* (figs. 4b, 4c & 6d) と*M. glutinosa* (fig. 4b inset; 好中球の一部)の好中球のTEM像があるが、図が小さすぎて顆粒内の構造は不明である(本文中に記述もない)。同様の構造体はヤツメウナギ類の好中球顆粒にも観察されており、顆粒子 (granulon) と呼ばれている[近藤・安本 (2022)³⁾参照; 以後、円形構造体を顆粒子と呼ぶ]。また、ヤツメウナギ類の顆粒子は高電子密度の外層、低電子密度の中層および中心付近の高電子密度の内層からなる3層構造であると考えられている。ヤツメウナギ類の好中球顆粒は高電子密度の芯とその周囲の低電子密度層からなり、芯に多数の顆粒子が存在する。また、顆粒子間の領域も芯にふくまれると考えられる。芯はヤツメウナギ類の好中球顆粒のL0に、低電子密度層はL1に相当すると推察されている。近藤・安本 (2022)³⁾は顆粒内の顆粒子以外を顆粒内基質 (intragranular hyaloplasma, IH) と称し、L0には顆粒子とL0のIHが、L1にはL1のIHが存在すると考え、顆粒内における顆粒子の局在性を説明している。すなわち、L0のIHと顆粒子はL1のIHと相互作用するためにL1のIHと混在で

きず、また、L0のIHと顆粒子は互いに作用しないので混在でき、結果として顆粒子を含むL0とその周囲の顆粒子を含まないL1が形成されると考えている。ヤツメウナギ類では通常のTEM観察では2種類の好中球顆粒 (NG1とNG2) は区別できないとされている。スタウナギ類の好中球においてもTEM観察では構造の異なる2種類の顆粒は認められないが、ヤツメウナギ類とは異なり、顆粒内に芯とその周囲の低電子密度体は確認されなかった(スタウナギ類では好中球顆粒の強拡大像が見当たらないので、構造の異なる複数種の顆粒子が存在するの否かは明らかではない)。しかし、一般染色では2層構造を有する2種類の顆粒が認められている(一般染色標本観察の項を参照)。Linthicum (1975)⁵¹⁾には*E. stoutii*の単球とされる血球(以後、単球様細胞と称す)のTEM像がある (figs. 4-6)。細胞質には多数の小胞 (vesicle) が存在するが、拡大像 (fig. 6) では小胞内に顆粒子が認められる (Linthicumは言及していない)。また、顆粒子は集塊状を呈し、小胞の膜との間に低電子密度領域が観察される。さらに、fig. 6の左上方には好中球顆粒に酷似した顆粒がある。単球様細胞の一般染色像は示されていないが、本細胞はLinthicum (1975)⁵¹⁾が図示した未熟な好中球 (fig. 1) よりもさらに未熟な好中球かもしれない。この推察が正しければ、単球様細胞の小胞は成熟途中の好中球顆粒であり、この段階ではL1に顆粒子がないが、成熟にともなってL1にも顆粒子が存在することとなる。このことはL0とL1の顆粒子が互いに異なる種類であることを示唆する。すなわち、L0の顆粒子はL1のIHと、L1の顆粒子はL0のIHと相互作用するが、L0の顆粒子はL0のIHと、L1の顆粒子はL1のIHとは反応しないので混在できると解釈できる。

3. 細胞化学染色標本観察

スタウナギ類の好中球の細胞化学的特徴は*M. glutinosa*, スタウナギ, *E. cirrhatus*およびキタクロスタウナギで報告されている (Table 5)。

Myxine glutinosa (Atlantic hagfish)

Johansson (1973)⁵⁴⁾は好中球にペルオキシダーゼ (PO) は検出されなかったと報告している。また、Östbergら (1976)¹⁴⁾は切片上で好中球の細胞質はPAS陽性であるとしている(陽性部位については言及していない)。図 (fig. 1; 白黒写真)では細胞質が濃染しており、陽性部位の詳細は読み取れない。

Table 4. Descriptions of the neutrophil granules from hagfishes based on the stained preparation

Species*1	References	Description & [Comment]*2
	Jordan & Speidel (1930) ⁸⁾	Blood smear: Wright (All figs. are colored sketches) — two types of granulocytes, special granulocyte and eosinophilic granulocyte. Former: fine (or dust-like in some cells) and various colored granules (purple (fig. 7) to a more reddish (fig. 8) or more bluish (fig. 9)). Latter: coarser granules than those of former [no description of granule color. From the figures of latter (figs. 11-13), the granules are purple]. [Granules of former will be L0 of NG2. In the figures of latter, two types of granules (NG1a and NG2) are observed. Two types of granulocytes and monocyte (fig. 16) will be neutrophils that are not sufficiently stained]
	Jordan (1938) ¹¹⁾	Blood smear: Wright (All figs. are sketches (BW) reproduced from Jordan & Speidel (1930) ¹⁷⁾ — See upper column. [Two types of granulocytes (polymorph neutrophile (heterophile, special) granulocyte and eosinophile granulocyte (polymorph eosinophile)) and monocyte will be neutrophils that are not sufficiently stained]
<i>M. glutinosa</i>	Holmgren (1950) ¹²⁾	Blood smear: probably MGG (fig. 38b; sketch, BW; The figure is indistinct.) — [No description of granule color and structure] [Holmgren described 'The granules are very fine, almost dustlike, but cells have also been found with coarser granules'. The fine granules and the coarser granules will be L0 of NG2 and L1 of NG1a, respectively (L0 of NG1a were probably missed)]
	Good et al. (1966) ¹³⁾	Blood smear: Wright-Giemsa (fig. 4; photograph, BW) — [No description of granule color and structure] [Good et al. described 'their (round cell) morphology is remindful of the monocyte of mammalian blood'. This cell type will be neutrophil that are not sufficiently stained]
	Östberg et al. (1976) ¹⁴⁾	Section of intestine: hematoxylin-eosin & MGG — red to pink [No fig., no description of granule structure]
	Mattisson & Fänge (1977) ⁶⁾	Blood smear: MGG (figs. 7b & 7c; photographs, BW) — [No description of granule color and structure] [Mattisson & Fänge described 'the granules are more heavily stained than is usually the case' in the figure caption. Two types of granules (NG1a and NG2) are found in figs.]
	Fänge (1998) ¹⁵⁾	Review: Fänge described 'The minute cytoplasmic granules are neither distinctly eosinophilic or basophilic by routine stains.' [No fig., no description of granule structure]

*1)*M. Myxine*.

*2)NG1a & NG2, stratified (two-layer) granules (inner layer, L0; outer layer, L1); NG1a, chromophobic L1; NG2, chromatophilic L0 and chromophobic L1 (See Fig. 2); MGG, May-Grünwald-Giemsa; BW, black & white.

Table 4. Cont.

Species ^{*1}	References	Description & [Comment] ^{*2}
	Katsunuma (1919) ⁹⁾	Blood smear: Giemsa—metachromatic coarse granule [No fig., no description of granule color and structure]
	Katsunuma (1924) ¹⁷⁾	Blood smear & frozen section of intestine: Giemsa—metachromatic coarse granule [No description of granule color and structure. Two types of granules (NG1a and NG2) are found in the figure of section (fig. 17G; colored sketch). In this figure, L1 of NG1a and L0 of NG2 are purple]
	Nakanoin (1920) ¹⁰⁾	Blood smear: Giemsa (figs. 4 & 5 in plate 2) — Shape: fine round or rod. Color: purple, violet, or blue (Nakanoin called these color tone as bichromatophilic. His granules are L0 of NG2)
	Sugita (1953) ³²⁾	Blood smear: MGG (leukocyte figs. 1-12 (p126-127), sketches, BW) — two types of granulocytes, neutrophilic granular leukocyte and acidophilic granular leukocyte [No description of granule color and structure. Former: fine and red (probably) granules. Latter: small and red (probably) granules. Both granulocyte types will be neutrophils that are not sufficiently stained. Sugita probably did not distinguish between red and purple]
<i>E. burgeri</i>	Tomonaga (1973a) ³³⁾	Blood smear: Wright (figs. 19-21, photographs, BW) — fine granules with poor stainability, [No description of granule structure]
	Tomonaga et al. (1973) ⁴⁵⁾	Blood smear: Wright (insets (a, b) in fig. 4, photographs, BW) — [No description of granule color and structure]
	Tanaka et al. (1981) ⁴⁶⁾	Blood smear and intestinal touch preparation: MGG [No fig., no description of granule color and structure]
	Kondo & Takahashi (2009) ⁴⁾	Blood smear: MG, Giemsa, MGG—basophilic (blue) granules [The blue granules is L0 of NG2]
	Kondo & Yasumoto (2020a) ¹⁾	Blood smear: MG, Giemsa, MGG—two types of granules (NG1a & NG2); L1 of NG1a was metaazurophilic (purple) and L0 of NG2 was orthomethylenophilic (blue) or metaazurophilic (purple) according to staining conditions.
	Kondo & Yasumoto (2020b) ⁷⁾	Blood smear: MGG (PN-51)—two types of granules (NG1a & NG2): L1 of NG1a and L0 of NG2 were metaazurophilic (purple)
	Kondo & Yasumoto (2023; present report)	Blood smear: MG, Giemsa, MGG—two types of granules (NG1a & NG2); L1 of NG1a was eosinophilic (orange) or metaazurophilic (purple) and L0 of NG2 was eosinophilic (red), orthomethylenophilic (blue) or metaazurophilic (purple) according to staining conditions.
<i>E. cirrhatus</i> ^{*3}	Hine et al. (1987) ⁴⁷⁾	Blood smear: Wright—neutrophilic to basophilic (weak) [No fig., no description of granule color and structure]
<i>E. polytrema</i>	Lama (1944) ⁴⁸⁾	Blood smear: MGG — two types of granulocytes, granulocyte with reddish cytoplasm and granulocyte with light blue cytoplasm (and intermediate type). [No description of granule color and structure. The figures (sketch, BW; fig. 13a-13h) are indistinct. From the description of former type, the reddish cytoplasm is due to the L1 of NG1a. Two types of granulocytes and monocyte (fig. 11; indistinct) will be neutrophils that are not sufficiently stained]
<i>E. stoutii</i>	Finstad et al. (1964) ⁴⁹⁾	Blood smear: Wright-Giemsa (fig. 4; photograph, BW) — [No description of granule color and structure] [Two types of granules (NG1a and NG2) are found in fig.]
<i>E. walkeri</i> ^{*4}	Chiba & Honma (1986) ⁵⁰⁾	Section of hypothalamic-hypophyseal ventricle and neurohypophysis: hematoxylin-eosin — weak acidophil [No fig., no description of granule color and structure]

^{*1}*E. Eptatretus*.^{*2}NG1a & NG2, stratified (two-layer) granules (inner layer, L0; outer layer, L1); NG1a, chromophilic L0 and chromatophilic L1; NG2, chromatophilic L0 and chromophobic L1 (See Fig. 2); MG, May-Grünwald; MGG, MG-Giemsa; BW, black & white.^{*3}Hine et al. (1987) described 'Erythrocytes with cyanide-resistant peroxidase inclusions often associated with trypanosomes'. Therefore, *E. cirrhatus* examined by Hine et al. would be infested with *Trypanosoma hepaitreti*.^{*4}Chiba & Honma (1986) used the hagfish caught in Niigata Prefecture facing the Japan Sea and called *Paramyxine atami*. However, recent report by Kitano et al (2019) revealed that *Paramyxine atami* in the Japan Sea is not this species but *Eptatretus walkeri*.

Table 5. Comparison of reactions of neutrophils from hagfishes to cytochemical tests

Species ^{*1} (preparation ^{*2}) & reference	Test ^{*3}											
	Ox	AIP	AcP	Glu	NAE	NBE	CAE	PO	SBB	PAS	PAS- α A	TB
<i>M. glutinosa</i> (BS) Johansson (1973) ⁵⁴	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	—	NT	NT	NT	NT
<i>M. glutinosa</i> (SI) Östberg et al. (1976) ¹⁴	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	(CP)	NT	NT
<i>E. burgeri</i> (BS) Katsumuma (1919, 1924) ^{9,17}	—	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>E. burgeri</i> (BS, ITP) Tanaka et al. (1981) ⁴⁶	NT	—	—	NT	NT	NT	NT	—	NT	NT	NT	NT
<i>E. burgeri</i> (BS) Kondo & Takahashi (2009) ^{4,44}	NT	—	—	—	—	+	—	—	—	+	(Gr; H)	—
<i>E. burgeri</i> (BS) Kondo & Yasumoto (2020b) ^{7,44}	NT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Infested with:												
<i>Ceratomyxa</i> sp.	NT	—	+	(L0 of NG2)	—	+	(L0 of NG1a)	—	+	(L0 of NG2)	—	+
<i>Myxini docoptyle japonica</i>	NT	—	—	(L0 of NG2)	—	+	(L0 of NG1a)	—	+	(L0 of NG2)	—	+
Nematodes	NT	—	—	(L0 of NG2)	—	+	(L0 of NG1a)	—	+	(L0 of NG2)	—	+
<i>Acanthochondria eptatreti</i>	NT	—	—	(L0 of NG2)	—	+	(L0 of NG1a)	—	+	(L0 of NG2)	—	+
<i>E. cirrhatus</i> (BS) Infested with trypanosomes ^{*5} Hine et al. (1987) ⁴⁷	NT	—	~+	—	—	—	—	—	—	—	—	+
<i>E. walkeri</i> ^{*6} (SHHVN) Chiba & Honma (1986) ⁵⁰	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	(CG) ^{*7}	NT	NT

*¹M., *Myxine*; E., *Eptatretus*.

*²BS, blood smear; SI, section of intestine; SHHVN, section of hypothalamic-hypophyseal ventricle and neurohypophysis; ITP, intestinal touch preparation.

*³Ox, oxidase [Nadi 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; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; PO, peroxidase; SBB, Sudan black B; PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS- α A, PAS after digestion with α -amylase; TB, toluidine blue in distilled water; NT, not tested; —, negative; +, positive; NG1a & NG2, stratified (two-layer) granules (See Fig. 2); L0, inner layer; L1, outer layer; Gr, granular; CG, coarse granule; H, hyaloplasm; CP, cytoplasm; DB, Döhle body; N, nucleus.

*⁴Kondo & Takahashi (2009) and Kondo & Yasumoto (2020b) tested Sudan III & oil red O (negative) and alcian blue (pH1.0 & pH2.5; negative), too.

*⁵Hine et al. (1987) described 'Erythrocytes with cyanide-resistant peroxidase inclusions often associated with trypanosomes'. Therefore, *E. cirrhatus* examined by Hine et al. would be infested with *Trypanosoma heptareti*.

*⁶Chiba & Honma (1986) used the hagfish caught in Niigata Prefecture facing the Japan Sea and called *Paramyxine atami*. However, recent report by Kitano et al (2019)³⁹ revealed that *Paramyxine atami* in the Japan Sea is not this species but *Eptatretus walkeri*.

*⁷Chiba & Honma (1986) described the coarse granules were also positive to aldehyde fuchsin.

ヌタウナギ *Eptatretus burgeri* (inshore hagfish)

勝沼 (1919)⁹⁾とKatsunuma (1924)¹⁷⁾は好中球にはオキシダーゼ (耐久性オキシダーゼと易動性オキシダーゼ) は検出されないとしている。なお, 勝沼 (1919)⁹⁾では血液中のリンパ球様細胞もオキシダーゼ陰性となっているが, Katsunuma (1924)¹⁷⁾では陽性とされている。オキシダーゼの種類は明記されていないが, おそらく易動性オキシダーゼであろう。

Tanakaら (1981)⁴⁶⁾は血液中と腸では好中球にPO, アルカリ性フォスファターゼ (AIP) および酸性フォスファターゼ (AcP) は検出されないと報告している。また, ある種の白血球はAIPに弱陽性であり (図はない), 血液中には少数のAcP陽性細胞があり, おそらくマクロファージに同定されると述べているが図を示していない [上述の通り, Tanakaら (1981)⁴⁶⁾には一般染色性に関する記述と図がないので, AIP陽性白血球とAcP陽性のマクロファージ様細胞の詳細は不明である]。

近藤・高橋 (2009)⁴⁾は好中球にはAIP, AcP, β -グルクロニダーゼ (Glu), α -ナフチルアセテートエステラーゼ (NAE), ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (CAE) およびPOは検出されず, ズダン黒B (SBB), オイルレッドO, ズダンIII, アルシアンブルー染色 (pH1.0と2.5) に陰性であるが, α -ナフチルブチレートエステラーゼ (NBE) に粒子状に陽性であり, PAS染色によって細胞質のグリコーゲンが陽性反応を示すことを報告した。また, トルジンプルー染色では粗面小胞体の残存物であるデーレ小体Döhle bodyが染色されるとしている。NBEの局在部位はNG1aのL0であると考えられている [近藤・安本 (2020a)¹⁾]。近藤・安本 (2020b)⁷⁾は各種寄生虫に感染した個体では, 好中球の細胞化学的特徴が変化することを報告している。

Eptatretus cirrhatus (broadgilled hagfish)

Hineら (1987)⁴⁷⁾はトリパノソーマ (おそらく *T. heptatreti*) が寄生していたと推察される *E. cirrhatus* の好中球にAIP (陰性から陽性) とAcPを認めている。また, PAS陽性であるが, Glu, NAEおよびPOは検出されなかったとしている。AcP陽性像を示しているが (p51; fig. 10; 白黒写真), 陽性部位に関する記述はない。この図には2種類のAcP陽性顆粒が認められる。すなわち, AcP陰性のL0の周囲に陽性のL1が見られる顆粒 (A型と称す) と, AcP陽性のL0の周囲に陰性のL1が存在する顆粒 (B型と称す) である。また, L0の大きさは前者の方が大きい。ヌタウナギの2種類の顆

粒 (NG1aとNG2) では, NG1aのL0は一般にNG2のL0よりも大型である。このことから, Hineら (1987)⁴⁷⁾の好中球のAcP染色像に見られるA型とB型の顆粒はそれぞれNG1aとNG2に相当すると考えられる。

キタクロヌタウナギ *Eptatretus walkeri* (northern brown hagfish)

Chiba & Honma (1986)^{50)*8)}は組織切片上の好中球にPAS陽性の粗大な顆粒を観察している。図 (fig. 1; 白黒写真) には陽性顆粒と考えられる粒子のほかに, 難染色性の粒子状構造が多数認められる。Chiba & Honma (1986)⁵⁰⁾のPAS陽性顆粒がヌタウナギ類の好中球に存在すると考えられる2種類の顆粒のどちらに相当するのか不明である。また, Chiba & Honma (1986)⁵⁰⁾はグリコーゲン消化後のPASを行っていないので, PAS陽性顆粒は一般染色で観察される顆粒ではなく, グリコーゲン顆粒の集積物である可能性が否定できない。なお, Chiba & Honma (1986)⁵⁰⁾はPAS陽性顆粒がアルデヒドフクシンにも陽性であるとしている。

ヌタウナギ類の好中球の細胞化学染色性を一般染色性と比較した報告は近藤・高橋 (2009)⁴⁾および近藤・安本 (2020a, 2020b)¹⁾⁷⁾しかない。このことはヌタウナギ以外では好中球の一般染色性の検討が不十分であることが原因と言える。また, 透過型電子顕微鏡では構造の異なる複数種の顆粒が認められないことも, 一般染色性の検討が行われてこなかった理由と考えられる (複数種の顆粒が観察されれば, それらの違いを調べる実験が企画されたと思われる)。ヌタウナギの好中球には, 2層からなる成層顆粒が2種類 (NG1aとNG2) 存在する。また, 両顆粒内には顆粒子が存在するが, 顆粒子は顆粒内で局在性を示さず, 微細構造からは両顆粒の違いを識別できない。光学顕微鏡による細胞化学染色標本観察によって2種類の顆粒は区別できることから (少なくともNAEはNG1aのL0に局在する)。本酵素の有無を指標とした電子顕微鏡観察によって, 2種類の顆粒の詳細 (例えばNG1aのL0とL1に存在する顆粒子が異なる種類であるのか) が明らかになると考えられる。

付記: ヌタウナギ類の好塩基球

これまでにヌタウナギ類の好塩基球を報告した論文は1編しかない。Holmgren (1950)¹²⁾は一般染色 (おそらくMGG染色) を施した *M. glutinosa* の血液塗抹標本に, 分葉核と粗大な青い顆粒を有する好塩基球を極めて少数観察してと報告している。しかし, 図を示していないので, 詳細は不明である。

文 献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉: スタウナギ好中球の2種類の顆粒. 水産大学校研究報告, **68**, 93-95 (2020a) [Kondo M, Yasumoto S: Two types of granules in neutrophils from the inshore hagfish *Eptatretus burgeri*. *Journal of National Fisheries University*, **68**, 93-95 (2020a) (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. 水産大学校研究報告, **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*). *Journal of National Fisheries University*, **69**, 41-49 (2021) (in Japanese with English abstract)]
- 3) 近藤昌和, 安本信哉: 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. 水産大学校研究報告, **70**, 125-148 (2022) [Kondo M, Yasumoto S: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from larva (ammocoetes) of far eastern brook lampreys *Lathenteron reissneri*. *Journal of National Fisheries University*, **69**, 41-49 (2021) (in Japanese with English abstract)]
- 4) 近藤昌和, 高橋幸則: スタウナギ好中球の形態学および細胞化学的特徴. 水産大学校研究報告, **57**, 299-308 (2009) [Kondo M, Takahashi Y: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophil from hagfish, *Eptatretus burgeri*. *Journal of National Fisheries University*, **57**, 299-308 (2009) (in Japanese with English abstract)]
- 5) Fänge R, Gidholm L: A macrophage system in *Myxine glutinosa* L. *Naturwissenschaften*, **55**, 44 (1968)
- 6) Mattisson AGM, Fänge R: Light- and electronmicroscopic observations on the blood cells of the Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa* (L.). *Acta Zoologica (Stockholm)*, **58**, 205-221 (1977)
- 7) 近藤昌和, 安本信哉: 寄生虫に感染したスタウナギの好中球顆粒. 水産大学校研究報告, **68**, 83-91 (2020b) [Kondo M, Yasumoto S: Neutrophil granules of the inshore hagfish *Eptatretus burgeri* infested with parasites. *Journal of National Fisheries University*, **68**, 83-91 (2020b) (in Japanese with English abstract)]
- 8) Jordan HE, Speidel CC: Blood formation in cyclostomes. *The American Journal of Anatomy*, **46**, 355-391 (1930)
- 9) 勝沼精藏: 第二 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: II. On the leukocytes of blood and tissue.), *Transactiones Societatis Pathologicae Japonicae*, **8**, 9-40 + 2 tables (1 & 2) (1919); Japanese edition of Katsunuma (1918)¹⁶⁾
- 10) 中院孝圓: 魚類ノ血球ニ就キテ. 京都医学雑誌, **17**[(2), (3) & (4)], 115-154 (2) + 280-294 (3) + 付図2葉 (第1図, 第2図) (4) (1920) [No author name, title and journal title in a foreign language (Nakanoin T: On the blood cells of fish. *Kyoto Igaku Zasshi* (=The Kyoto Medical Journal), **17**[(2), (3) & (4)], 115-154 (2) + 280-294 (3) + 2 plates (1 & 2) (4) (1920) (in Japanese)]
- 11) Jordan HE: Comparative Hematology. In: Downey H (ed) Handbook of Hematology, Paul B Hoeber, New York, 699-862 (1938)
- 12) Holmgren N: On the pronephros and the blood in *Myxine glutinosa*. *Acta Zoologica (Stockholm)*, **31**, 233-348 (1950)
- 13) Good RA, Finstad J, Pollara B, Gabrielsen AE: Morphologic studies on the evolution of the lymphoid tissues among the lower vertebrates. In: Smith RT, Miescher PA, Good RA (eds) Phylogeny of Immunity, University of Florida Press, Gainesville, 149-170 (1966)
- 14) Östberg Y, Fänge R, Mattisson A, Thomas NW: Light and electron microscopical characterization of heterophilic granulocytes in the intestinal wall and islet parenchyma of the hagfish, *Myxine glutinosa* (Cyclostoma). *Acta Zoologica (Stockholm)*, **57**, 89-102 (1976)
- 15) Fänge R: Hagfish Blood Cells and Their Formation. In: Jørgensen JM, Lomholt JP, Weber RE, Malte H (eds) The Biology of Hagfishes, Chapman & Hall, London, 277-299 (1998)
- 16) Katsunuma S: II. Referat über die Leukozyten im Blute und im Gewebe. *Verhandlungen der Japanischen Pathologischen Gesellschaft*, **8**, 81-86 + 1 Schema (1918)

- [German edition of Katsunuma (1919)⁹⁾
- 17) Katsunuma S: Intrazelluläre Oxydation und Indophenolblausynthese: Histochemische Studie über die "Oxydasereaktion" im tierischen Gewebe, Gustav Fischer, Jena (1924)
- 18) Katsunuma S: XXXIV. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Indophenoloxydase im tierischen Gewebe. *Verhandlungen der Japanischen Pathologischen Gesellschaft*, **6**, 76-78 (1916) [German edition of Katsunuma (1917)²⁰⁾
- 19) Kiyono K, Nakanoin T: Weitere Untersuchungen über des histiozytären Zellen. *Acta Scholae Medicinalis Universitatis Imperialis in Kioto*, **3**, 55-138 + 4 Tafeln (II-V) + 2 Schema (I & II) (1919)
- 20) 勝沼精蔵: 第三十四「オキシダーゼ」ノ研究續報. 日本病理学会会誌, **6**, 351-357 (1917) [No author name and title in a foreign language (Katsunuma S: Further contributions to the knowledge of indophenol oxidase in animal tissues.), *Transactiones Societatis Pathologicae Japonicae*, **6**, 351-357 (1917) [Japanese edition of Katsunuma (1916)¹⁸⁾
- 21) Kiyono K: I. Referat über die Leukozyten im Blut und im Gewebe, insbesondere über die histiozytären Zellen. *Verhandlungen der Japanischen Pathologischen Gesellschaft*, **8**, 1-80 + 1 Schema (1918) [German edition of Kiyono (1919)²²⁾
- 22) 清野謙次: 第一 血液及組織白血球、特ニ組織球性細胞ニ就テ. 日本病理学会会誌, **8**, 1-7 (1919) [No author name and title in a foreign language (Kiyono K: I. On the leukocytes of blood and tissue, especially histocytes.), *Transactiones Societatis Pathologicae Japonicae*, **8**, 1-7 (1919) [Japanese edition of Kiyono (1918)²¹⁾
- 23) 勝沼精蔵: 連絡研究. 清野謙次先生記念論文集刊行会 (編) 故清野謙次先生記念論文集 第三輯 (隨筆・遺稿), 清野謙次先生記念論文集刊行会, 京都, 79-80 (1956) [No author name, title and book title in a foreign language (Katsunuma S: Liaison research. In: Dr. Kenji Kiyono Memorial Miscellany Publication Group (ed): The late Dr. Kenji Kiyono Memorial Miscellany, Third Series (Essays and Posthumous Drafts)), Kyoto, 79-80 (1956) (in Japanese)]
- 24) 清野謙次, 勝沼精蔵: 章魚ノ體液中ニ寄生セル「ヂチエマ」トニ鰓類 (頭足類) ノ體液細胞トノ生體染色ト「オキシダーゼ」反應ニ就キテ. 京都医学雜誌, **15**, 1-7 + 附圖一枚 (1918) [No author name, title and journal title in a foreign language (Kiyono K, Katsunuma S: On the oxidase reaction of dicyema and cells in the cardiac fluid of dibranchs. *Kyoto Igaku Zasshi* (= *The Kyoto Medical Journal*)), **15**, 1-7 + 1 plate (1918) (in Japanese)]
- 25) 中院孝円: オントゲニー及びフィロゲニーに於ける生體染色の發展期. 清野謙次先生記念論文集刊行会 (編) 故清野謙次先生記念論文集 第三輯 (隨筆・遺稿), 清野謙次先生記念論文集刊行会, 京都, 81-85 (1956) [No author name, title and book title in a foreign language (Nakanoin T: Developmental period of vital staining in ontogeny and phylogeny. In: Dr. Kenji Kiyono Memorial Miscellany Publication Group (ed): The late Dr. Kenji Kiyono Memorial Miscellany, Third Series (Essays and Posthumous Drafts)), Kyoto, 81-85 (1956) (in Japanese)]
- 26) 柴田 昭: 日本における血液学の流れ. 臨床血液, **49**, 1483-1489 (2008) [No author name and title in a foreign language (Shibata A: Hematology in Japan.), *The Japanese Journal of Clinical Hematology*, **49**, 1483-1489 (2008) (in Japanese)]
- 27) McMillan CB, Wisner RL: Review of the hagfishes (Myxinidae, Myxiniformes) of the northwestern Pacific Ocean, with descriptions of three new species, *Eptatretus fernholmi*, *Paramyxine moki*, and *P. walkeri*. *Zoological Study*, **43**, 51-73 (2004)
- 28) Fernholm B: Hagfish Systematics. In: Jørgensen JM, Lomholt JP, Weber RE, Malte H (eds) *The Biology of Hagfishes*, Chapman & Hall, London, 33-44 (1998)
- 29) 小林 博: メクラウナギの痕跡眼に見られる活動電位. 動物学雑誌, **72**, 6-12 (1963) [No author name and title in a foreign language (Kobayashi H: Preliminary report on the action potentials recorded from the rudimentary eye of hagfish, *Myxine garmani*.), *Zoological Magazine*, **72**, 6-12 (1963) (in Japanese)]
- 30) Kobayashi H: On the photo-perceptive function in the eye of the hagfish, *Myxine garmani* Jordan et Snyder.). *The Journal of the Shimonoseki University of Fisheries*, **13**,

- 141-157 (1964)
- 31) 小林英司, 市川友行, 鈴木英雄, 関本 実: スタウナギ *Eptatretus burgeri*の季節的移動について. 魚類学雑誌, **19**, 191-194 (1972) [Kobayashi H, Ichikawa T, Suzuki H, Sekimoto M: Seasonal migration of the hagfish, *Eptatretus burgeri*. *Japanese Journal of Ichthyology*, **19**, 191-194 (1972) (in Japanese with English abstract)]
- 32) 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)]
- 33) 友永 進: 円口類スタウナギの血球と造血組織に関する研究. 1. 循環血中の血球. 山口医学, **22**, 1-19 (1973a) [Tomonaga S: Study on the blood cells and hemocytopoietic tissues of the hagfish, *Eptatretus burgeri*. 1. Peripheral blood cells. *Yamaguchi Medical Journal*, **22**, 1-19 (1973a) (in Japanese with English abstract)]
- 34) Youson JH: The Kidneys. In: Hardisty MW, Potter IC (eds) *The Biology of Lampreys*, Vol. 3, Academic Press, London, 191-261 (1981)
- 35) Tsuneki K, O uji M: Histological changes of several organs during growth of the brook lamprey *Lampetra reissneri*. *Japanese Journal of Ichthyology*, **31**, 167-180 (1984)
- 36) Tomonaga S, Tamechika M, Awaya K: Fine structure and phagocytic activity of the high-walled endothelium in the gill of hagfish, *Eptatretus burgeri*. *Journal of Electron Microscopy*, **22**, 113 (1973)
- 37) Tomonaga S, Sakai K, Tashiro J, Awaya K: High-walled endothelium in the gills of the hagfish. *Zoological Magazine*, **84**, 151-155 (1975)
- 38) 山口和人: 円口類スナヤツメ鰓の動脈系, とくに海綿体の電子顕微鏡的研究. 山口医学, **28**, 257-275 (1979) [Yamaguchi K: Electron microscopic study on the arterial system in lamprey gill, with special reference to the fine structure of cavernous body. *Yamaguchi Medical Journal*, **28**, 257-275 (1979) (in Japanese with English summary)]
- 39) Kitano K, Sasaki K, Ichinoseki S, Umetsu K, Sugiyama H: The northern brown hagfish, *Eptatretus walkeri* (McMillan and Wisner, 2004) (Myxiniiformes: Myxiniidae), is widely distributed in Japanese coastal waters. *Asian Fisheries Science*, **32**, 29-38 (2019)
- 40) Seternes T, Bøgwald J, Dalmo RA: Scavenger endothelial cells of fish, a review. *Journal of Fish Diseases*, **44**, 1385-1397 (2021)
- 41) Kiyono K: Die vitale Karminspeicherung: ein Beitrag zur Lehre von der vitalen Färbung mit besonderer Berücksichtigung der Zelldifferenzierungen im entzündeten Gewebe, Gustav Fischer, Jena (1914)
- 42) Yamaguchi K, Tomonaga S, Ihara K, Awaya K: Electron microscopic study of phagocytic lining cells in the cavernous body of the lamprey gill. *Journal of Electron Microscopy*, **28**, 106-116 (1979)
- 43) 友永 進: 円口類スタウナギの血球と造血組織に関する研究. 2. 原始脾. 山口医学, **22**, 21-35 (1973b) [Tomonaga S: Study on the blood cells and hemocytopoietic tissues of the hagfish, *Eptatretus burgeri*. 2. Primitive spleen. *Yamaguchi Medical Journal*, **22**, 106-116 (1973b) (in Japanese with English abstract)]
- 44) Tomonaga S, Hirokane T, Shinohara H, Awaya K: The primitive spleen of the hagfish. *Zoological Magazine*, **82**, 215-217 (1973)
- 45) Tomonaga S, Shinohara H, Awaya K: Fine structure of the peripheral blood cells of the hagfish. *Zoological Magazine*, **82**, 211-214 (1973)
- 46) 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. *Journal of Morphology*, **170**, 71-93 (1981)
- 47) 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 (1987)

- 48) Lama G: Observaciones hematológicas en la especie *Bdellostoma polytrema*. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción*, **19**, 123-142 + 13 figures (1-13) (1944)
- 49) Finstad J, Papermaster BW, Good RA: Evolution of the immune response. II. Morphologic studies on the origin of thymus and organized lymphoid tissue. *Laboratory Investigation*, **13**, 490-512 (1964)
- 50) Chiba A, Honma Y: Fine structure of the granulocytes occurring in the hypothalamic-hypophyseal ventricle and neurohypophysis of the hagfish, *Paramyxine atami*. *Japanese Journal of Ichthyology*, **33**, 174-179 (1986)
- 51) Linthicum DS: Ultrastructure of Hagfish Blood Leucocytes. *In*: Hildemann WH, Benedict AA (eds) *Immunologic Phylogeny*, Plenum Press, New York, 241-250 (1975)
- 52) Tsuneki K, Gorbman A: Ultrastructure of the testicular interstitial tissue of the hagfish *Eptatretus stoui*. *Acta Zoologica (Stockholm)*, **58**, 17-25 (1977)
- 53) Icardo JM, Colvee E, Schorno S, Lauriano ER, Fudge DS, Glover CN, Zaccone G: Morphological analysis of the hagfish heart. I. The ventricle, the arterial connection and the ventral aorta. *Journal of Morphology*, **277**, 326-340 (2016)
- 54) Johansson ML: Peroxidase in blood cells of fishes and cyclostomes. *Acta Regiae Societatis Scientiarum et Litterarum Gothoburgensis, Zoologica*, **8**, 53-56 (1973)