

スナヤツメ成魚の好中球の形態学および細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 安本信哉**Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from adult of far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri***Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract : Neutrophil granules (NG) of adult (mature) far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri* [L. sp. S (souther form)] were classified into two types of stratified [two-layer; inner layer (L0) and outer layer (L1)] granules (type 1, NG1a; type 2, NG2), like as larva (ammocoetes) of this species. The L0 of NG1a and L0 of NG2 in adult neutrophils were chromophobic, and L1 of NG1a and L0 of NG2 showed chromatophilic. The stainability of those chromatophilic layers with May-Grünwald (MG), Giemsa, or MG-Giemsa were varied [chromophobic, eosinophilic or basophilic (orthomethylenophilic or metaazurophilic)] with a slight difference to larva. As seen in larval neutrophils, these layers were positive for alkaline phosphatase, α -naphthyl acetate esterase and Sudan black B, and some enzymes (acid phosphatase, β -glucuronidase, and naphthol AS-D chloroacetate esterase) were detected in the L0 of NG2. Alpha-naphthyl acetate esterase was positive in L0 of NG2 of adult neutrophils. Both larval and adult neutrophils lacked peroxidase.

Key words : lamprey, *Lethenteron reissneri*, neutrophil, morphology, cytochemistry

緒言

前報^{1,2,*1}において著者らはスナヤツメ far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri* [南方型; L. sp. S (souther form)³]; ヤツメウナギ目 Petromyzontiformes ヤツメウナギ科 Petromyzontidae カワヤツメ属の幼生 (ammocoetes) の血液中に存在する2種類の顆粒球 (好中球と好酸球) の形態学および細胞化学的特徴を報告した。スナヤツメ幼生の好中球には2種類の顆粒 (好中球顆粒 neutrophil granule, NG) が認められ, Giemsa染色などの一般染色像から両顆粒は2層からなる成層構造を有していることが明らかと

なった [中心を囲む層を内層 (L0), L0を囲む領域を外層 (L1) と呼ぶ¹]。また, スナヤツメ幼生の2種類の好中球顆粒はL0が一般染色で染色されず (難染色性 chromophobic), L1が好染色性 chromatophilicを示す1型顆粒 (NG1a) と, 好染色性のL0と難染色性のL1から構成される2型顆粒 (NG2) に分類された¹。NG1aとNG2の両方を有する好中球はスタウナギ inshore hagfish *Eptatretus burgeri* (スタウナギ目 Myxiniiformes スタウナギ科 Myxinidae) にも認められている^{4,5}。一方, スナヤツメと同じカワヤツメ属のカワヤツメ Arctic lamprey *L. camtschaticum*の成魚およびシベリアヤツメ Siberian lamprey *L. kessleri*の成魚の好中球には

2022年11月30日受付, 2023年2月13日受理

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

[†]責任著者 (corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

*¹近藤・安本 (2022a, 2022b)^{1,2} にはいくつかの誤りがあったのでここで訂正する。近藤・安本 (2022a)¹: p128左段L3, L0 → L1; 同L5, NG1a → NG2; p129 table 2, PN62-65, PN70-79およびPN81においてL1 of NG1aとL0 of NG2の記述が逆になっている (本稿のTable 2が正しい); p130 table 4脚注2, distilled → distilled water; p130右段L7, L. planeri → *L. planeri*; p132 table 5のSugita (1953) におけるneutrophilの呼称, [neutrophilic leukocyte] → [neutrophilic leukocyte]; p142右段L4, Raunich (1896) → Raunich (1947); p143 table 7表中, Kondo & Yasumoto (2022)*8,9 → Kondo & Yasumoto (2022)*8,9; 同表中, Hine et al. (1987)^{10,11} → Hine et al. (1987)^{10,11}; 同表脚注7, staine → stain; p145後注5, *Ammocoetes* → *Ammocoetes*; p146文献1のL4-5, 69, 41-49 (2021) → 68, 93-95 (2020)。近藤・安本 (2022b)²: p149 abstractのL1, (eosinophil granule. → (eosinophil granule.; p151 fig. 2の説明文のL5, ■, basophilic → □, basophilic; L155左段L13, ものの考えられる → ものと考えられる; p157右段下から2行目, 認められない → 認められない; p159左段L9, 事項 → 次項。

L0とL1がともに難染色性のNG1bと、スナヤツメ幼生やヌタウナギと同様のNG2が観察されている⁹⁾。ヤツメウナギ類において好中球の一般染色性を幼生と成魚で比較した報告は*Lampetra* 属で知られており、European brook lamprey *L. planeri*に対するGiglio-Tos (1896)⁷⁾とRaunich (1947)⁸⁾およびEuropean river lamprey *L. fluviatilis*を用いたWerzberg (1911)⁹⁾があるが、彼らはヤツメウナギ類の好中球に2種類の顆粒が存在することを認識していなかった[近藤・安本 (2022a)¹⁾を参照]。また、好中球の細胞化学的特徴を幼生と成魚で比較した研究は*L. planeri*におけるRaunich (1947)⁸⁾とFey (1966)¹⁰⁾およびフクロヤツメ pouched lamprey *Geotria australis* (ミナミヤツメ科Geotriidae)を調べたHineら (1987)¹¹⁾があるが、これらの報告は陽性部位の局在性について考察していない。本研究ではスナヤツメ成魚の好中球の形態学および細胞化学的特徴を調べ、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

2021年11月29日に木屋川の支流(山口県; 同所で前報¹⁾に使用した幼生を採集した)で採集されたスナヤツメの雄成魚2尾を水産大学の飼育施設に搬入し、10時間明期(室内の蛍光灯を点灯)、水温10°Cで同年12月29日まで飼育した(翌日から10時間明期、水温8°C)。また、2022年1月25日に木屋川の本流(雄成魚が採集された支流と本流との合流点よりも上流)で採集された雌成魚1尾を、翌日水産大学の飼育施設に搬入し、10時間明期、水温8°Cで飼育した。なお、雌雄は当初同じ水槽に収容したが[50 L容水槽; 水量約40 L; 水槽の底には川砂(粒径約1 mm)を約3 cmの厚さとなるように敷いた]、2月9日からは雌雄を別々の水槽で飼育した(雄2尾は同一水槽に収容した)。1月29日に水温10°C(10時間明期)に、2月28日には水温12°C(12時間明期)に設定した。3月22日に雄を収容した水槽の水温を10°C(12時間明期)に変更し(雌の水槽は変更しなかった)、3月25日に雄2尾から採血を行った。雌を収容した水槽ではその後、4月9日に13時間明期に設定し(水温は12°C)、4月22日に水温13°C(13時間明期)に、4月27日に水温10°C(13時間明期)に変更して、4月30日に採血を行った。飼育期間中は無給餌とし(ヤツメウナギ類の成魚は摂餌しないため)、1週間おきに飼育水を約半量換水した。なお、飼育水には曝気した水道水を用いた。採血時にはキナルジンによる麻酔を行

い、尾部切断によって流出した血液に少量のヘパリンナトリウム水溶液(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¹⁾と同様の方法で行った。なお、採血後に腹部を圧迫したところ、雄からは精液が、雌からは卵が搾出されたことから、採血に用いた成魚は雌雄とも成熟個体であると判断した。採血時の成魚の体重は雄では1.4 g(全長10.5 cm)と2.0 g(全長11.3 cm)であり、雌は体重6.2 g(全長14.8 cm)であった。採取された血液は淡赤色またはほとんど無色であった。

結果および考察

スナヤツメ成魚の好中球は類円形であり、細胞質には幼生の好中球と同様に2種類の顆粒(NG1aとNG2)が観察された(Figs. 1 & 2)。なお、スナヤツメ成魚の血液中には好酸球は認められなかった。NG1aのL1はMRSVの各種染色条件によって難染色性、淡赤色(酸好性=エオシン好性 eosinophilic)、淡青色(塩基好性; 正調メチレンブルー好性 orthomethylenophilic)または赤紫色(塩基好性; 異調アズールB好性 metaazurophilic)を示した(Fig. 1A; 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少数のNG1aにおいてL0が黒赤紫色を呈した(Fig. 1A; 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。Table 2に幼生と成魚のMRSVの各条件における染色性を示す(以後、NG1aのL1とNG2のL0を好染色性層と称す)。MG染色における成魚の好染色性層の染色性は幼生のそれと同様であった。しかし、Giemsa染色ではいくつかの条件において成魚と幼生の間に違いが認められた(PN=16, 17, 20, 24, 28, 36, 40, 44)。すなわち、pH5.0の低濃度(5 mM)緩衝液をGiemsa原液の希釈液として用いた場合(実際は0.5 mM緩衝液で希釈している)、希釈率が高い(原液:希釈液=1:100)時には幼生で橙色(PN=16; 染色時間15分間)または赤紫色(PN=17; 染色時間15分間)を呈した好染色性層は染色されず難染色性であった。一方、pH6.0, 7.0および8.0の低濃度緩衝液および高濃度緩衝液(1/15 M)を希釈液に用いた場合(PN=20, 24, 28, 36, 40, 44)、希釈率が高い時の短時間(15分間)の染色では、幼生の好染色性層は難染色性であるのに対して、成魚

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

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

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

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

PN, preparation number.

では赤紫色を示した。また、幼生の好染色性層が赤色に染まるMGG染色の条件 (PN=48, 52, 53, 56, 68) では、成魚の好染色性層が赤紫色であり、幼生の好染色性層が難染色性を示すMGG染色の条件 (PN=68, 80) の成魚の好染色性層は赤紫色であった。幼生のNG2のL0はいくつかの条件におけるMGG染色によって、赤紫色または黒味がかかった赤紫色 (黒赤紫色) を呈するが (Table 2; PN=62-65, 70-79, 80), それらの条件において成魚のNG2のL0は赤紫色のみを示すか (PN=62-65, 70-73, 76), あるいは黒赤紫色のL0の数が少なかった (PN=74, 75, 77-79, 80)。しかし、PN=80では、幼生のNG2のL0が難染色性であるのに対し、成魚では赤紫色または黒赤紫色であった。なお、幼生と成魚で同じ色を呈する場合、成魚の方が淡かった。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色調と考えられている⁹⁾。スナヤツメの幼生と成魚の間における染色性の違いは、好染色性層を構成する好染色性成分の違いを反映していると考え

られる。スナヤツメ成魚の2種類の好中球顆粒における好染色性層はスナヤツメ幼生¹⁾やスタウナギ^{4,5)}と同じであり、好中球顆粒はNG1aとNG2に同定される (Fig. 2)。一方、カワヤツメとシベリアヤツメの成魚における好中球顆粒にはL1が難染色性のNG1bと、L0が好染色性を示すNG2が報告されており⁶⁾、スナヤツメ成魚と異なる (Fig. 2)。また、カワヤツメとシベリアヤツメの成魚では、NG2のL0はスナヤツメのそれよりもGiemsa染色などの一般染色における色調が単調である。カワヤツメ成魚ではいくつかの条件のMG染色でNG2のL0が赤色を、多くの条件におけるGiemsa染色とMGG染色で赤紫色を示す⁶⁾。一方、シベリアヤツメ成魚のNG2のL0はMG染色では難染色性であり、カワヤツメ成魚と同様にGiemsa染色とMGG染色で赤紫色を呈するが、難染色性と示す条件がカワヤツメ成魚よりも多い⁶⁾。

本研究に使用したスナヤツメ成魚には好酸球が観察されなかった。Table 3にスナヤツメの顆粒球に関する報告とそれらにおける顆粒球の呼び名をまとめた。勝沼 (1919)¹²⁾

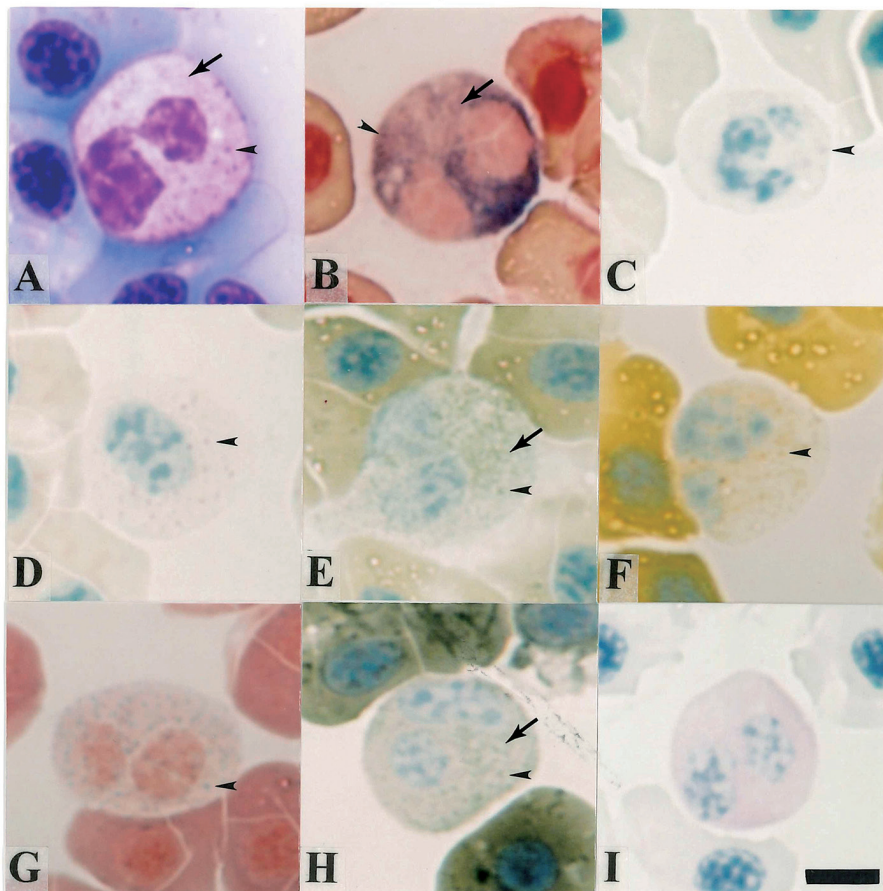


Fig. 1. Neutrophils from adult (mature) of *Lethenteron reissneri*. A, May-Grünwald-Giemsa (PN=75; See Table 1). B, alkaline phosphatase; C, acid phosphatase; D, β -glucuronidase; E, α -naphtyl acetate esterase; F, α -naphtyl butyrate esterase; G, naphthol AS-D chloroacetate esterase; H, Sudan black B; I, periodic acid Schiff reaction. Note two types of granules, type 1 (NG1a; arrows) and type 2 (NG2; arrowheads). Positive reaction: B, E & H, L1 of NG1a & L0 of NG2; C, D, F & G, L0 of NG2. Counter stain: B & G, safranin O; C-F, H & I, hematoxylin (Mayer). Bar in I (5 μ m) is adapted to other figures (A-H) in Fig. 1.

とKatsunuma (1924)¹³を除いて他の報告では幼生を使用しているが [Kanesada (1956)¹⁴は幼生と成魚を使用している; 勝沼 (1919)¹²とKatsunuma (1924)¹³が使用したヤツメウナギ類については後述する], 幼生に好酸球を認めた報告^{2,3,14-16}と好酸球が観察されていない報告^{17,18}がある。前報においてこの違いは、スナヤツメに存在する遺伝的に分化した二型 (北方型と南方型)³に関連するのではないかと指摘した¹。すなわち、幼生に好酸球が観察されている報告では、使用した幼生が南方型と考えられ、好酸球を認めていない

報告の幼生は北方型であると考察した。尾曾越 (1963)¹⁵には使用した幼生の採集地に関する情報がないが、Kanesada (1956)¹⁴の指導教官であり、引用文献にKanesada (1956)¹⁴があることから、尾曾越 (1963)¹⁵の記載は南方型における知見と考えられる。本研究のスナヤツメ成魚には好酸球が認められなかった。一方、勝沼 (1919)¹²、Katsunuma (1924)¹³およびKanesada (1956)¹⁴では成魚にも好酸球が存在することになっている。ここで勝沼 (1919)¹²およびKatsunuma (1924)¹³が使用したヤツメウナギ類につ

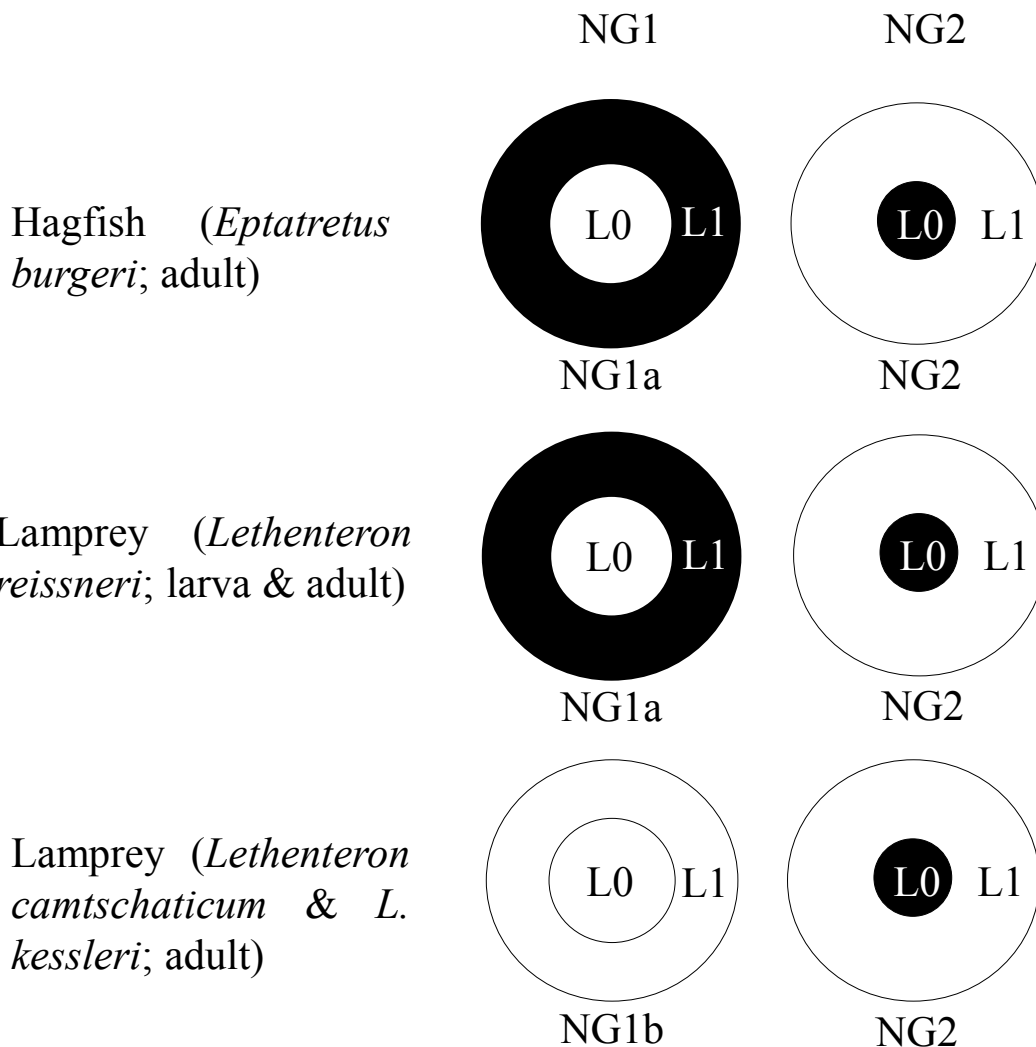


Fig. 2. Comparison of two types of neutrophil granules from hagfish *Eptatretus burger* (*Eb*)^{4,5} and lampreys [*Lethenteron reissneri* (*Lr*; larva (ammocetes)¹ and adult (present report), *L. camtschaticum* (*Lc*; adult)⁹ and *L. kessleri* (*Lk*; adult)⁶]. NG1, type 1 (NG1a & NG1b, subtypes of NG1); NG2, type 2; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer). □, chromophobic; ■, chromatophilic [*Eb*: L1 of NG1a, eosinophilic (orange) and metaazurophilic (purple); L1 of NG2, eosinophilic (red), orthomethylenophilic (blue) and metaazurophilic (purple). *Lr* (larva and adult): L1 of NG1a & L0 of NG2, eosinophilic (red or orange), orthomethylenophilic (blue) and metaazurophilic (purple). *Lc* (adult): L0 of NG2, eosinophilic (red) and metaazurophilic (*Lc* and *Lk*; purple). *Lk* (adult): L0 of NG2, metaazurophilic (purple)].

いて考察する。勝沼 (1919)¹²⁾には円口類の血液学に関する記述があり、日本において円口類の血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った [近藤・安本 (2022a, 2022b)¹²⁾では勝沼 (1919)¹²⁾の‘やつめうなぎ’を、一般に食用として流通されているカワヤツメと考えた]。Katsunuma (1924)¹³⁾には勝沼 (1919)¹²⁾の円口類に関する記述があるが、ここでもヤツメウナギ類を示すドイツ語の‘Neunaugen’とヌタウナギ類を指す‘Inger’が使われており、学名は記されていない。近藤・安本 (2023)⁵⁾は勝沼の著作を収集・解析し、勝沼 (1919)¹²⁾の‘めくらうなぎ’はヌタウナギであると推察した。この過程で、勝沼が東京

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を採集・研究していたことが明らかとなった⁵⁾。また、勝沼 (1919)¹²⁾およびKatsunuma (1924)¹³⁾がヌタウナギの原始的脾臓と考えた臓器はヤツメウナギ類の幼生期の腎臓 (後方腎; 中腎) であることが判明した⁵⁾。勝沼 (1919)¹²⁾およびKatsunuma (1924)¹³⁾はヤツメウナギ類の成魚を使用したと考えられることから、原始的脾臓とはヤツメウナギ類の変態にもなって崩壊しつつある幼生期中腎 (造血組織; 成魚期中腎は幼生期中腎の後方に形成され、造血は起こらない) であると言える [近藤・安本 (2023)⁵⁾参照]。勝沼 (1919)¹²⁾およびKatsunuma (1924)¹³⁾がヤツメウナギ類を採集したと考えられる神奈川県はカワヤツメの分布域に入っておらず^{19,20)}、南方型のスナヤツメが分布する³⁾。また、

Table 2. Summary of multiple Romanowsky-type stain characteristics of L1 of NG1a and L0 of NG2 in neutrophils from larva (ammocoetes, L) and adult (mature, A) of *Lethenteron reissneri* [modified and revised from Kondo & Yasumoto (2022a)¹⁾

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

*1PN, preparation number (See Table 1).

*2R, red (eosinophilic); O, orange (eosinophilic); B, blue (orthomethylenophilic); P, purple, (metaazurophilic); BP, blackish purple (metaazurophilic); —, not stained.

^aP or BP (P>BP).

^bP or BP (BP>P).

変態後間もないスナヤツメ成魚 (採集地が鳥取県なのでから南方型と考えられる³⁾) では幼生期の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²¹⁾。これらのことから勝沼 (1919)¹²⁾およびKatsunuma (1924)¹³⁾のヤツメウナギ類は変態後間もないスナヤツメ南方型であると推察される。Tsuneki & O uji (1984)²¹⁾はスナヤツメ成魚 (南方型) において崩壊しつつある幼生期の中腎 (造血は維持されている) の構成細胞種を記述しなかったが [図 (fig. 26) があるが、白黒写真なので詳細は不明である]、おそらく好酸球が存在すると思われる。勝沼 (1919)¹²⁾およびKatsunuma (1924)¹³⁾がヤツメウナギ類 (スナヤツメ南方型) 成魚の血液中に観察した好酸球は、幼生期の造血組織に由来すると考えられる。スナヤツメ成魚 (南方型) に好酸球を観察したKanesada (1956)¹⁴⁾も同様に変態間もない個体を使用したのかもしれない。以後、勝沼 (1919)¹²⁾およびKatsunuma (1924)¹³⁾のヤツメウナギ類をスナヤツメと表記する。

これまでに、種々のヤツメウナギ類において好中球と好酸球が報告されているが、幼生と成魚における好酸球の存否に関する報告は少ない。Gigliot-Tos (1896)⁷⁾は*L. planeri*の幼生と成魚に好中球と好酸球を認めた。また、Raunich (1947)⁹⁾も*L. planeri*の幼生と成魚を調べているが、成魚には好酸球がないと考えている (幼生には好中球と好酸球がある)。Fey (1966)¹⁰⁾も幼生と成魚の血液中に好中球と好酸球 (および好塩基球) を認めている。Werzberg (1911)⁹⁾は*L. fluviatilis*の幼生と成魚の血液中に好中球を観察しているが、幼生と成魚のどちらにも好酸球はないとしている。Page & Rowley (1983)²²⁾は*L. fluviatilis*の成魚には好中球のみを認め、幼生 (*L. planeri*と*L. fluviatilis*が混在) には好酸球と好中球を観察している²³⁾。Kanesada (1956)¹⁴⁾はカワヤツメ成魚に好中球と好酸球を認めているが、杉田 (1953)²⁴⁾は好中球しかないとしている。Piavis & Hiatt (1971)²⁵⁾はウミヤツメsea lamprey *Petromyzon marinus*成魚の血液に好酸球、好中球および稀ではあるが好塩基球を観察した。Hineら (1987)¹¹⁾はフクロヤツメの幼生、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。これらのうち、幼生

Table 3. Granulocytes from *Lethenteron reissneri* [modified and revised from Kondo & Yasumoto (2022a)]¹⁾

Stage & origin	Granulocyte type (—, not observed)			References
	Neutrophil	Eosinophil	Basophil	
Probably this species ^{*1} (adult, blood)	[granuläre Zellen] ^{*6}	[Eosinophile] ^{*6}	—	Katsunuma (1919) ¹²⁾
Probably this species (adult, blood)	Leukozyten mit grobe metachromatische Granula (in German)	Leukozyten mit diffus eosinophil gefärbtem Protoplasma (in German)	—	Katsunuma (1924) ¹³⁾
Larva ^{*2} , blood & typhlosole; adult ^{*3} , blood	special granulocyte (neutrophil)	eosinophil	—	Kanesada (1956) ¹⁴⁾
Larva ^{*2} , blood & typhlosole	heterophil ([neutrophil] ^{*7} , special leukocyte)	[eosinophil] ^{*7}	—	Osogoe (1963) ¹⁵⁾
Larva ^{*4} , blood & typhlosole	granulocyte (polymorphonuclear leukocyte)	—	—	Tanaka et al. (1981) ¹⁷⁾
Larva ^{*5} , typhlosole	polymorphonuclear leukocyte	—	—	Fujii (1983) ¹⁸⁾
Larva ^{*5} , skin allograft	polymorphonuclear leucocyte	eosinophilic granulocyte	—	Fujii & Hayakawa (1983) ¹⁶⁾
Larva, blood	neutrophil	eosinophil	—	Kondo & Yasumoto (2022a) ¹⁾
Adult (mature), blood	neutrophil	—	—	Kondo & Yasumoto (2023) ^{*8)}

^{*1}In previous reports^{1,2)}, we speculated that the lamprey examined by Katsunuma (1919) was *Lethenteron camtschaticum*.

^{*2-5}Reported as follows: ^{*2}*Ammocoetes branchialis*, ^{*3}*Lampetra planeri*, ^{*4}*Entosphenon reissneri*, ^{*5}*Lampetra reissneri*.

^{*6}Katsunuma (1919) did not describe these cells in a foreign language, however, he read eosinophil in German.

^{*7}Osogoe (1919) did not describe these cell name in a foreign language.

^{*8}Present report.

Table 4. Descriptions of the neutrophil granules from *Lethenteron reissneri* based on the stained preparation [modified and revised from Kondo & Yasumoto (2022a)¹⁾]

References	Description & [Comment]*
Katsunuma (1919) ^{12),*2}	Blood smear (adult): Giemsa—metachromatic coarse granule [No fig., no description of granule color and structure] Blood smear: Giemsa—metachromatic coarse granule [No fig., no description of granule color and structure] [In this literature, Katsunuma described same characteristics in hagfish (probably <i>Epiplatys burgeri</i>) neutrophils (blood smear & frozen section of intestine) and showed the figure of section (fig. 17G; colored sketch; Giemsa stain). Two types of granules (NG1a and NG2) are found in the hagfish neutrophils (L1 of NG1a and L0 of NG2 are purple). He did not point out the difference between hagfish and lamprey. Therefore, lamprey neutrophils are speculated to be the same as hagfish neutrophils]
Katsunuma (1924) ¹³⁾	Adult: Blood smear: Giemsa or MGG [No fig., no description of granule color and structure] Larva: Blood smear and touch preparation of typhlosole: Giemsa or MGG—fine, either purple or reddish (amphophi) [No fig. of blood smear, no description of granule structure] [Fig. 8 (photograph, BW) is touch preparation of typhlosole. It is difficult to comment on the granule structure due to small and poorly focused photograph]
Kanesada (1956) ¹⁴⁾	Larva: Blood smear and section of typhlosole: Giemsa—fine, either ‘Purple’ or reddish (neutrophilic or amphophilic) [No fig. of blood smear, no description of granule structure. It is unclear whether ‘Purple’ refers to red-purple (purple) or blue-purple (violet)]. [Fig. I-1 (photograph, color) is section of typhlosole. It is difficult to comment on the granule structure due to small photograph]
Osogoe (1963) ¹⁵⁾	Larva: Blood smear and touch preparation of typhlosole: MGG [No fig., no description of granule color and structure].
Tanaka et al. (1981) ¹⁷⁾	Larva: Blood smear: 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.
Kondo & Yasumoto (2022a) ¹⁾	Adult (mature): Blood smear: MG, Giemsa, MGG—two types of granules (NG1a & NG2); L1 of NG1a and L0 of NG2 were chromophobic, eosinophilic (red) orthomethylenophilic (blue) or metaazurophilic (purple or blackish purple) according to staining conditions.

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

*2)In previous reports^{1,2)}, we speculated that the lamprey examined by Katsunuma (1919) was *Lethenteron camtschaticum*.

*3)Present report.

と成魚に好酸球が認められた報告では、勝沼 (1919)¹²⁾およびKatsunuma (1924)¹³⁾と同様に変態直後の成魚を使用したのかもしれない。また、フクロヤツメには幼生、稚魚および成魚のいずれにも好酸球が観察されていないが¹⁴⁾、これはスナヤツメの北方型で予想されている様に²⁾、本来的に好酸球を有さないヤツメウナギ類が存在することを示唆している。さらに *L. fluviatilis* では、幼生にも成魚にも好酸球が認められないとする報告と⁹⁾、好酸球が幼生にはあるが成魚には存在しないとする報告がある(22,23)。このことは、*L. fluviatilis* においてもスナヤツメと同様に遺伝的に異なる二型が存在することを示していると思われる。

Table 4にスナヤツメ好中球の一般染色性に関する過去の報告を示した。勝沼 (1919)¹²⁾はヌタウナギとスナヤツメの好中球に異調染色性を示す粗大な顆粒を認めた。しかし、顆粒の色と形状に関する記述がなく、図もない。一方、Katsunuma (1924)¹³⁾には同様の記述のほか図がある (fig. 17G)。この図はヌタウナギの腸の造血組織 (現代の用語では原始脾) を構成する主要な細胞であり、原始脾の凍結切片にギムザ染色を施したものと考えられる。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。また、図の好中球には2種類の顆粒が描かれており、L1が赤紫色のNG1aとL0が赤紫色を呈するLG2に相当すると言える。Katsunuma (1924)¹³⁾はこのことについて言及していない。しかし、スナヤツメの好中球との違いも記していないことから、勝沼 (1919)¹²⁾およびKatsunuma (1924)¹³⁾が観察したスナヤツメの好中球にも2種類の顆粒 (NG1aとNG2) が存在したと考えられる。なお、スナヤツメの好酸球について [おそらくヌタウナギには好酸球を観察していない; 近藤・安本 (2023)⁵⁾参照]、勝沼 (1919)¹²⁾では「稀ニ「エオヂノフィール」ニテ多クノ易動性「オ」ヲ有スルモノ存スルガ如キモ明ナラズ」とのみ記しているが (「オ」はオキシダーゼの略記)、Katsunuma (1924)¹³⁾では好酸球に豊富な易動性オキシダーゼ顆粒と光屈折性を示す液滴様物質 [lichtbrechenden tropfigen Substanzen (=light-refracting droplet-like substances)] が認められるとしている。図示されていないので詳細は不明であるが、液滴様物質は近藤・安本 (2022b)²⁾においてスナヤツメ幼生の好酸球顆粒に認められた光学的人工像optical artificial image (p154) に相当するのかもしれない。

Kanesada (1956)¹⁴⁾はスナヤツメの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purpleまたは赤色reddishのどちらかに染まる

とし、顆粒の染色性は両染色性amphophilであるとした (図示していない; 成魚の好中球に関する記述はない)。近藤・安本 (2022a)¹⁾ではKanesada (1956)¹⁴⁾の記述のamphophilを「両染色球」と訳したが、後述する尾曾越 (1963)¹⁵⁾の記載からamphophilを「両染色性」とする (amphopilicの方が良いと考えられる)。Kanesada (1956)¹⁴⁾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。Kanesada (1956)¹⁴⁾が行った染色条件は不明であるが、この記述に関して近藤・安本 (2022a)¹⁾ではMGG染色をした場合とGiemsa染色をした場合に分けて考察している。Kanesada (1956)¹⁴⁾は幼生の腸内縦隆起のスタンプレ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たとしている。染色されたスタンプレ本は図示されているものの、それは不鮮明な白黒写真であり、好中球顆粒および好酸球顆粒の色調と形状については不明である。

尾曾越 (1963)¹⁵⁾にもスナヤツメ幼生の好中球と好酸球に関する記載がある。前述の通り、尾曾越はKanesadaの指導教官であったことから、記載はKanesada (1956)¹⁴⁾に類似する。しかし、好中球をKanesada (1956)¹⁴⁾が「special granulocyte」あるいは「neutrophil」としているのに対して、尾曾越 (1963)¹⁵⁾では「好異球heterophil」、好中球または「特殊白血球special leukocyte」と呼んでいる。また、好中球顆粒を「ギムザ染色で紫色または赤色を帯びる (すなわち好中性または両好色性amphophil) の微細な顆粒」と記述している (amphopilicの方が良い)。尾曾越 (1963)¹⁵⁾の「紫色」が赤紫色なのか青紫色なのかは不明である。したがって、Kanesada (1956)¹⁴⁾の「purple」が赤紫色を指すのか否かも断定できない。尾曾越 (1963)¹⁵⁾には腸内縦隆起の切片 (ギムザ染色標本) が図I-1にあり (カラー写真)、細胞質が赤色を呈する好酸球が確認できるが、図の細胞は小さく、好中球顆粒や好酸球顆粒の詳細は読み取れない。

Tanakaら (1981)¹⁷⁾は幼生の血液塗抹標本と腸内縦隆起のスタンプレ本上における好中球の各種酵素染色性を調べている。Tanakaら (1981)¹⁷⁾は材料と方法の項で腸内縦隆起のスタンプレ本に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。

ヤツメウナギ類の幼生と成魚における好中球の一般染色性の違いは*L. planeri*と*L. fluviatilis*で知られており、Giglio-Tos (1896)⁷⁾は*L. planeri*の好中球顆粒の染色性 (メチレンア

ブルーおよび酸性フクシン染色性)には幼生と成魚の間に違いがないとしている。一方, Raunich (1947)⁸⁾は*L. planeri*の幼生の好中球顆粒はMGG染色によって淡い紫色に染まり, Ehrlichの三酸染色でも紫色に染まるが不明瞭としている。しかし, 成魚では両染色で明瞭に紫色に染色されると報告した。Werzberg (1911)⁹⁾は*L. fluviatilis*の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に染まるとしている。本稿においてスナヤツメの成魚においても, 染色条件によっては幼生との間に染色性の違いが認められた (Table 2)。Werzberg (1911)⁹⁾と同様の知見は, Table 2のPN=69と80において観察され, これらの条件のMGG染色では, 幼生の好中球顆粒は染色されないが, 成魚では赤紫色を呈する。

スナヤツメ成魚の好中球では, NG2のL0に各種酵素 [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), 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)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 (Figs. 1B-1E & 1G), ズダン黒B (SBB) 陽性であった (Fig. 1H; Table 5)。一方, NG1aのL1はAIP, NAEおよびSBB陽性であった (Figs. 1B, 1E & 1H)。これらの細胞化学染色性は幼生の好

中球と同じである。しかし, 幼生では陰性の α -ナフチルブチレートエステラーゼ (NBE) が成魚のNG2のL0に検出された (Fig. 1F)。ペルオキシダーゼ (PO) は幼生と同様に成魚においても好中球に検出されなかった (Table 5)。好中球には小型で円形または卵円形のperiodic acid Schiff (PAS) 反応陽性粒子が少数観察され, 細胞質基質も弱陽性を示したが, これらの陽性部位は α -アミラーゼ処理によって完全に消失した (Fig. 1I; Table 5)。また, トルイジンプルー (TB) 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。成魚の好中球のPAS, TB, アルシアンブルー, オイルレッドOおよびズダンIII染色性は幼生のそれと同じであった (Table 5)。

カワヤツメとシベリアヤツメの成魚の細胞化学染色性はスナヤツメ幼生のそれに類似しているが¹⁶⁾, 陽性部位が異なる (Table 6)。また, スナヤツメ成魚においてNG2のL0に検出されたNBEは, カワヤツメとシベリアヤツメの成魚では陰性である⁶⁾。スナヤツメと同様に好中球にNG1aとNG2を有するスタウナギ成魚では, スナヤツメ成魚と同様にNBE陽性であるが¹⁵⁾, 局在部位がスナヤツメ成魚ではNG2のL0であるのに対してスタウナギ成魚ではNG1aのL0

Table 5. Summary of reactions of neutrophils from larva (ammocoetes) and adult (mature) of *Lethenteron reissneri* to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number, and positive site)* ¹	
	Larva* ²	Adult
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	G (round or oval, some)* ³ ; H	
PAS after digestion with α -amylase	—*	
Alcian blue (pH1.0)	—	
Alcian blue (pH2.5)	—	
Toluidine blue in distilled water	G [amorphous, a few (rare), eq Db]; N	
Sudan black B	G (round or oval, many, eq L0 of NG2; ring, some, eq L1 of NG1a)	
Sudan III	—	
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)	G (round or oval, a few, eq L0 of NG2)
β -Glucuronidase	G (round or oval, some, eq L0 of NG2)	
α -Naphthyl acetate esterase	G (round or oval, many, eq L0 of NG2; ring, some, eq L1 of NG1a)	
α -Naphthyl butyrate esterase	—	G (round or oval, some, eq L0 of NG2)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	G (round or oval, many, eq L0 of NG2)	
Peroxidase	—	

*¹G, 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); Db, Döhle body; eq, equivalent to.

*²Kondo & Yasumoto (2022a)¹⁾.

*³PAS-positive granule was accumulation of glycogen particles because the positive reaction of the granule disappeared after digestion with α -amylase.

である⁴⁵⁾。また、NBEを除いて、スナヤツメ (幼生と成魚)、カワヤツメ成魚およびシベリアヤツメ成魚に検出される各種酵素はヌタウナギでは陰性であり⁴⁵⁾、SBBにも陽性反応を示さなかった (Table 6)。

スナヤツメの好中球に対する細胞化学的研究は少なく、勝沼 (1919)¹²⁾、Katsunuma (1924)¹³⁾、Tanakaら (1981)¹⁷⁾および近藤・安本 (2022a)¹⁾がある (Table 7)。勝沼 (1919)¹²⁾およびKatsunuma (1924)¹³⁾はスナヤツメ成魚 (上述のように変態間もない成魚と考えられる) の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。Tanakaら (1981)¹⁷⁾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は陰性であると報告している (図示していない)。近藤・安本 (2022a)¹⁾の観察結果をTable 6にも示した。

ヤツメウナギ類において好中球の細胞化学的特徴を幼生と成魚で比較した報告としてRaunich (1947)⁸⁾、Fey (1966)¹⁰⁾

およびHineら (1987)¹¹⁾があるが、Raunich (1947)⁸⁾は*L. planeri*の好中球にPO染色とGoldmann染色 [Sudan IIIと α -naphtholを用いた類脂質の染色法] を施して、これらの染色性は幼生と成魚で違いがなかったとしている。Fey (1966)¹⁰⁾も*L. planeri*の幼生と成魚の好中球を調べ、幼生では検出できなかったPOが、成魚では大部分の好中球に陽性であるとしている。Hineら (1987)¹¹⁾は成長段階の異なるフクロヤツメの好中球を調べ、幼生と成魚では陰性のPOが、変態期の稚魚には認められるものの、陽性反応を示す構造は崩壊した (lysed) 好中球由来の顆粒の凝集物としている。また、AcPとCAEは成魚に検出され (幼生と稚魚は陰性)、NAEは幼生と稚魚では陽性であるが (幼生では陰性の場合もある)、成魚では陰性であると報告している。NBEは幼生と変態期の稚魚では陰性であり (成魚はnot determined)、PAS染色は幼生と成魚で陽性としている (稚魚はnot determined)。本研究のスナヤツメではNBEが幼生で陰性なのに対して成魚では陽性となったが、他の細胞化学染色性は幼生と成魚で同じであった。フクロヤツメとスナヤツ

Table 6. Comparison of reactions of granules in blood neutrophils from hagfish and lampreys to cytochemical tests [modified after Kondo & Yasumoto (2022a)¹⁾]

Staining ^{*1, *2}		Stage, species, granule type ^{*3} and reaction ^{*4}															
		Hagfish (<i>Eptatretus</i>)				Lamprey (<i>Lethenteron</i>)											
		Adult				Larva (ammocoetes)				Adult							
		<i>E. burgeri</i> ^a				<i>L. reissneri</i> ^b				<i>L. reissneri</i> ^c				<i>Lc</i> and <i>Lk</i> ^{*5, d}			
		NG1a		NG2		NG1a		NG2		NG1a		NG2		NG1b		NG2	
L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1		
AIP	—	—	—	—	—	+	+	—	—	+	+	—	+	—	—	—	
AcP	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	
Glu	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	
NAE	—	—	—	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	—	+	—	
NBE	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	
CAE	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	
SBB	—	—	—	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	—	+	—	

^{*1}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; SBB, Sudan black B.

^{*2}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].

^{*3}NG1a, NG1b & NG2, stratified (two-layer) granules (inner layer, L0; outer layer, L1): NG1a, chromophobic L0 and chromatophilic L1; NG1b, chromatophilic L0 and L1; NG2, chromatophilic L0 and chromophobic L1 (See Fig. 2)

^{*4}+, positive; —, negative (non-detection).

^{*5}*Lc, L. camtschaticum; Lk, L. kessleri.*

^aKondo and Yasumoto (2020)⁴⁾; ^bKondo and Yasumoto (2022a)¹⁾; ^cpresent report; ^dKondo et al. (2021)⁶⁾.

Table 7. Comparison of reactions of neutrophils from *Lethenteron reissneri* to cytochemical tests [modified and revised from Kondo & Yasumoto (2022a)¹⁾]

Stage, origin & reference	Test ^{*1}										
	Ox	AIP	AcP	Glu	NAE	NBE	CAE	PO	SBB	PAS	PAS- α A
Adult ²⁾ , blood Katsunuma (1919) ¹²⁾	–	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Adult, blood Katsunuma (1924) ¹³⁾	–	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Larva, blood & typhlosole Tanaka et al. (1981) ¹⁷⁾	NT	+	–	NT	NT	NT	NT	–	NT	NT	NT
Larva, blood Kondo & Yasumoto (2022a) ¹⁾ , ^{*3}	NT	+ (L1 of NG1a, L0 of NG2)	+ (L0 of NG2)	+ (L0 of NG2)	+ (L1 of NG1a, L0 of NG2)	–	+ (L0 of NG2)	–	+ (L1 of NG1a, L0 of NG2)	+ (Gr ^{*5} ; H)	–
Adult, blood Kondo & Yasumoto (2023) ^{*3,*4}	NT	+ (L1 of NG1a, L0 of NG2)	+ (L0 of NG2)	+ (L0 of NG2)	+ (L1 of NG1a, L0 of NG2)	+ (L0 of NG2)	+ (L0 of NG2)	–	+ (L1 of NG1a, L0 of NG2)	+ (Gr ^{*5} ; H)	–

^{*1}Ox, 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; NT, not tested; –, negative; +, positive; NG1a & NG2, stratified (two-layer) granules (See Fig. 2); L0, inner layer; L1, outer layer; Gr, granular; H, hyaloplasm.

^{*2}In previous reports¹²⁾, we speculated that the lamprey examined by Katsunuma (1919) was *Lethenteron camischaticum*.

^{*3}Kondo & Yasumoto (2022a, 2023) 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 Döhle body were positive].

^{*4}Present report.

^{*5}PAS-positive granule was accumulation of glycogen particles because the positive reaction of the granule disappeared after digestion with α -amylase.

メの間の違いは種の違いによると思われる。細胞化学的特徴の変化が好中球の機能の違いと関連するのか今後明らかにする必要がある。

謝 辞

スナヤツメ雄成魚の採集・提供ならびに雌成魚の搬送をしていただいた水産大学校名誉教授 酒井治己博士ならびに雌成魚を採集していただいた豊田ホテルの里ミュージアム(下関市)学芸員 川野敬介博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 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 (2022a) [Kondo M, Yasumoto S: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri*. *Journal of National Fisheries University*, **70**, 125-148 (2022a) (in Japanese with English abstract)]
- 2) 近藤昌和, 安本信哉: スナヤツメ幼生の好酸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**, 149-163 (2022b) [Kondo M, Yasumoto S: Morphological and cytochemical characteristics of eosinophils from larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri*. *Journal of National Fisheries University*, **70**, 149-163 (2022b) (in Japanese with English abstract)]
- 3) Yamazaki Y, Goto A, Byeon H-K, Jeon S-R: Geographical distribution patterns of the two genetically divergent forms of *Lethenteron reissneri* (Pisces: Petromyzontidae). *Biogeography*, **1**, 49-56 (1999)
- 4) 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 (2020) [Kondo M, Yasumoto S: Two types of granules in neutrophils from the inshore hagfish *Eptatretus burgeri*. *Journal of National Fisheries University*, **68**, 93-95 (2020) (in Japanese with English abstract)]
- 5) 近藤昌和, 安本信哉: スタウナギ好中球のエオシン

- 染色性および貪食能. 水産大学校研究報告, **71**, 89-108 [Kondo M, Yasumoto S: Eosin stainability and phagocytosis in inshore hagfish neutrophils. *Journal of National Fisheries University*, **71**, 89-108 (in Japanese with English abstract)]
- 6) 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)]
- 7) Giglio-Tos E: Sulle cellule del sangue della lampreda. *Memorie della Reale Accademia delle Scienze di Torino, Serie II*, **46**, 219-252 + 1 tavola (1896)
- 8) Raunich L: Ricerche sulla morfologia del sangue nella Lampreda di ruscello (*Petromyzon planeri*). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, **20**, 289-332 + 2 tavole (X & XI) (1947)
- 9) Werzberg A: Studien zur vergleichenden Hämozytologie einiger poikilothermer Vertebraten. *Folia Haematologica*, **11**, 17-193 + 4 Tafeln (I-IV) (1911)
- 10) Fey F: Vergleichende hämozytologie niederer Vertebraten III. Granulozyten. *Folia Haematologica*, **86**, 1-20 (1966)
- 11) 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)
- 12) 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) (in Japanese)]
- 13) Katsunuma S: Intrazelluläre Oxydation und Indophenolblausynthese: Histochemische Studie über die "Oxydasereaktion" im tierischen Gewebe, Gustav Fischer, Jena (1924)
- 14) Kanesada A: A phylogenetical survey of hemocytopoietic tissues in submammalian vertebrates, with special reference to the differentiation of the lymphocyte and lymphoid tissue. *The Bulletin of the Yamaguchi Medical School*, **4**, 1-35 (1956)
- 15) 尾曾越文亮: 系統発生と造血 (脊椎動物). *In: 日本血液学会 (編) 日本血液学全書第1巻 形態学*, 丸善, 東京, 23-64 (1963) [No author name, title and book title in a foreign language (Osogoe B: Phylogeny and Hematopoiesis (Vertebrate). *In: The Japanese Society of Hematology (ed) The Complete Collection of Japanese Hematology, Vol 1 (Morphology)*), Maruzen, Tokyo, 23-64 (1963) (in Japanese)]
- 16) Fujii T, Hayakawa I: A histological and electron-microscopic study of the cell types involved in rejection of skin allografts in ammocoetes. *Cell and Tissue Research*, **231**, 301-312 (1983)
- 17) 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)
- 18) Fujii T: Electron microscopy of the leucocytes of the typhlosole in ammocoetes, with special attention to the antibody-producing cells. *Journal of Morphology*, **173**, 87-100 (1982)
- 19) 中坊徹次, 甲斐嘉晃: カワヤツメ. *In: 中坊徹次 (編) 日本産魚類検索 全種の同定 (第3版) I*, 東海大学出版会, 神奈川, 145 (2013) [Nakabo T, Kai Y: *Lathenteron japonicum* (Martens, 1868). *In: Nakabo T (ed) Fish of Japan with Pictorial Keys to the Species (3rd edition) I*, Tokai University Press, Kanagawa, 145 (2013) (in Japanese)]
- 20) 尼岡邦夫, 仲谷一宏, 矢部 衛: 北海道の魚類 全種図巻, 北海道新聞社, 北海道, 26 (2020) [Amaoka K, Nakaya K, Yabe M: Pictorial Guide to the Fishes of Hokkaido, The Hokkaido Shimbun Press, Hokkaido, 26 (2020) (in Japanese)]
- 21) Tsuneki K, Ouji M: Histological changes of several organs during growth of the brook lamprey *Lampetra reissneri*. *Japanese Journal of Ichthyology*, **31**, 167-180

- (1984)
- 22) Page M, Rowley AF: A cytochemical, light and electron microscopical study of the leucocytes of the adult river lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L. Gray). *Journal of Fish Biology*, **22**, 503-517 (1983)
- 23) Rowley AF, Page M: Ultrastructural, cytochemical and functional studies on the eosinophilic granulocytes of larval lampreys. *Cell and Tissue Research*, **240**, 705-709 (1985)
- 24) 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)]
- 25) Piavis GW, Hiatt JL: Blood cell lineage in the sea lamprey, *Petromyzon marinus* (Pisces: Petromyzontidae). *Copeia*, **1971(4)**, 722-728 (1971)