

ナメクジウオ類 (頭索類) の好中球の形態学的特徴に関する文献上の考察

近藤昌和[†], 安本信哉

Morphological characteristics of neutrophils in amphioxus (Cephalochordata) based on the literature review

Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract : Based on the findings of past literature, we speculated the existence of two types of stratified [two-layer; inner layer (L0) and outer layer (L1)] granules in the neutrophils (granulocytes; blood cells) of amphioxus (Cephalochordata), especially *Branchiostoma japonicum*. Type 1 neutrophil granules (NG1a) consist of chromophobic L0 and chromatophilic L1. Other type (type 2; NG2) have chromatophilic L0 and chromophobic L1. The L1 of NG1a and L0 of NG2 show metaazurophilic (purple to blackish purple) in Giemsa staining preparation. Ultrastructurally, these two granule types will not be separately identified. These granules contain intragranular particles (granulons, g) in the L0 of granules. At least, three types of granulons (g-1, g-2, and g-3) are recognized in a granule and localized in L0. Two of them form an agglomerate with short rod shape and two layers (inner layer consisted by g-2, and outer layer by g-3). The agglomerate have been considered as tubular structure or microtubule (misinterpretation). Neutrophils of cyclostome (hagfish and lamprey) also have NG1 [NG1a or NG1b (chromophobic L0 and L1)] and NG2. Further, neutrophil granules of cyclostome also contain granulons (without forming of agglomerate).

Key words : amphioxus, cyclostome, granulocyte, neutrophil, morphology

緒言

ナメクジウオ類 amphioxus (頭索類 Cephalochordata) にはこれまで3属30種が報告されており、日本近海には3属4種 [ヒガシナメクジウオ *Branchiostoma japonicum*, カタナメクジウオ *Epigonichthys maldivensis*, オナガナメクジウオ *Asymmetron lucayanum*, ゲイコツナメクジウオ *A. inferum*] が分布する^{1,2)}。頭索類は尾索類 Urochordata (ホヤ類などが含まれる) とともに原索動物門 Protochordata に分類されることがあったが、現在では頭索類と尾索類および脊椎動物 Vertebrata をそれぞれ亜門とする脊索動物門 Chordata が設定されている。頭索類は脊椎動物門に最も近縁な無脊椎動物であると考えられてきた。しかし、遺伝子解析の結果、脊椎動物と尾索類が姉妹群を形成することが明らかとなった³⁾。したがって、頭索類は最も原始的な脊索動物と

言える。

本稿執筆の契機は、ヒガシナメクジウオの体液 (血液 blood と体腔液 coelom fluid の混合液) 中に存在する細胞に関する志眞の論文 (1933)⁴⁾ を発見したことによる^{*1,*2)}。志眞 (1933)⁴⁾ の引用文献リストには先行研究として白井 (1922)⁵⁾ が記載されていた^{*2)}。これらの論文はナメクジウオ類の体液細胞を体外に取り出し、血液学的染色を施して観察した第1番目および第2番目の報告である。しかし、これらの報告は大植の著書^{7,9)} への引用を除いてナメクジウオ類の体液細胞に関するこれまでの報告には全く引用されていない^{*3)}。また、Gans & Saiff (1996)¹⁰⁾ が取りまとめたナメクジウオ類に関する文献集にも記載されていない。白井 (1922)⁵⁾ と志眞 (1933)⁴⁾ の報告には両色嗜好性顆粒細胞と表記される顆粒球に関する記載があり、そのギムザ染色像、特に顆粒の染色性はこれまで著者が報告してきた円口類 (最も原始的

な脊椎動物)の好中球に酷似していた^{11,12)}。以後、ナメクジウオ類の顆粒球を好中球と称す。Zhangら (1992)¹³⁾は透過型電子顕微鏡でヒガシナメクジウオの好中球(顆粒球granulocyteと呼んでいる)を組織中(血管内)に観察し⁴⁾、好中球の顆粒内にはマイクロチューブ様の構造microtubule-like structureが存在することを報告している。この構造物は円口類の好中球顆粒に観察される円形の二次構造[近藤・安本 (2022)¹¹⁾は顆粒子granulonと命名した]に類似していた。これまでに、ナメクジウオ類の好中球と円口類の好中球の相違についての議論はおこなわれていない。本稿ではナメクジウオ類の好中球顆粒モデルを考察する。

本稿執筆の過程で精査した多数の文献(本稿の文献リストに記載していないものも多く含む)には全く逆の記載がある(例えば、血球があるとする論文とないとする論文がある)。また、血球と称される構造体の中には細胞ではないものや、血液に存在しない細胞(体腔細胞)が含まれていることがあった。現在までに著者らが到達した解釈について以下に列記する(解釈に至った根拠については後日発表予定の原稿にて報告する)。

①ナメクジウオ類には血管と体腔が存在する。血管には動脈名または静脈名が付けられているが、末梢では結合組織に移行するので完全な閉鎖循環系ではない(開放血管系)。また、ナメクジウオ類には様々な体腔coelomがあるが、全ての体腔が連続しているわけではなく一部は独立している。体腔内は液体(体腔液)で満たされている。なお、ナメクジウオ類では血管と体腔のほかにリンパ腔(lymph-space)と称される管腔が知られているが、現在ではリンパ腔も体腔に含まれている。

②血管内の血液と体腔内の体腔液の間の連絡は、微細な分子では起こるが細胞(血液, 血球; 体腔液, 体腔細胞)は往来しない。

③血球は血液に浮遊した状態と(浮遊型血球floating blood cell), 血管内面に付着した状態で存在する(付着型血球

adherent blood cell)⁵⁾。また、血球はおそらく1種類しかなく、それは顆粒球(=好中球)である。

④体腔細胞には起源が異なる2種類がある。

⑤血液と体腔液には呼吸色素としてヘモグロビンが存在するが、存在部位はそれぞれの漿液plasma(血液では血漿に相当する)中であり、赤血球はない。ヘモグロビンは個体の生育環境中の溶存酸素濃度が低いほど多く生産されると考えられる。

⑥血液と体腔液には体液凝固系が存在し、凝固反応によって不溶性の微細な粒子状構造物が生成される。粒子状構造物同士は凝集して大形の凝集体となる。

⑦ヘモグロビン濃度が高い個体では凝集体は無核の赤血球として誤認されることがある。

以上のうち、③と⑥は本稿における検討を踏まえた解釈である。

本稿で使用した学名はいずれもWoRMS(World Register of Marine Species)に依った(最終閲覧日: 2022年11月30日)。また、和名は窪田(2006)²⁾に準じた。

結果および考察

好中球顆粒のギムザ染色性

白井(1922)⁶⁾と志真(1933)⁴⁾には観察した細胞の採取方法が記されていない。現代の知見から、彼らが記載した細胞は血球と体腔細胞であると考えられることから、体を切断して得られた体液(血液と体腔液が混合したもの)中の細胞を観察したと思われる。彼らが分類した体液の細胞のうち、両色嗜好性顆粒細胞のみが血球である(他の種類は体腔細胞)。彼らを使用した‘両色嗜好性’という用語は観念的であり、この名称をナメクジウオの顆粒細胞の名称や顆粒名に無検討のまま使用するのは適当ではない¹²⁾。白井(1922)⁶⁾および志真(1933)⁴⁾は塗抹標本に様々な染色を行っているが、本稿ではギムザ染色の結果のみを扱う(白井: 蒸留水1 mlに対して原液を1滴混合; 染色時間は2~4時間ま

¹⁾勝沼(1919)³⁾が使用した円口類の詳細を明らかにするために、勝沼に関する文献を探索する過程で志真(1933)⁴⁾の存在を知った。

²⁾白井(1922)⁶⁾は兵庫縣淡路國洲本[現在の兵庫県洲本市(淡路島)]産のナメクジウオを使用しているが、学名の記載がない。しかし、日本産ナメクジウオの分布域から¹²⁾、使用したナメクジウオはヒガシナメクジウオに相当すると考えられる。一方、志真(1933)⁴⁾は有明海産の個体を使用し、学名をナメクジウオ*Branchiostoma japonicum* Willeyとしている。

³⁾大植(1944, 1963)^{7,9)}には主に志真(1933)⁴⁾の報告にしたがった記述がある。なお、大植(1955)⁸⁾ではナメクジウオ類には特に変わった血球は見られないとの記述があるだけで、文献を引用していない。

⁴⁾Zhangら(1992)¹³⁾は黄海で採集された*Branchiostoma belcheri tsingtauense*を使用している(この種名はヒガシナメクジウオのシノニムである)。

⁵⁾Rhodesら(1982)¹⁴⁾は本稿の浮遊型血球と付着型血球に相当する血球をそれぞれfree cellおよびfixed cellと記述している[Rhodesら(1982)¹⁴⁾の報告はニシナメクジウオ*B. lanceolatum*の体腔細胞(体腔球coelomocyte)に関するものであり、本種の血球については調べていない]。

たはそれ以上。志眞: 蒸留水2 mlに対して原液を1滴混合; 染色時間は4~6時間)。また、両者とも体腔に注射したりチウムカーミンの体液細胞による取り込み (生体染色) を調べている (後述する)。

白井 (1922)⁶⁾では好中球は円形ないしやや楕円形の細胞であり、核は常に偏在して円形、楕円形、腎臓形であり、時に馬蹄形をなすとされている。また、核のクロマチン網は微細であり、核小体を有するものもあるとし、細胞質はギムザ染色で弱塩基性ないし両色嗜好性 (赤紫色を意味する) を示すと報告した。細胞質内に赤紫色を呈する微細円形顆粒が観察されると記述されている。しかし、図 (fig.

5; 着色されたスケッチ) には赤紫色の粒子構造とともにこれと同大の黒色に着色された粒子構造が少数認められる。後者は志眞 (1933)⁴⁾が指摘した第2顆粒と考えられる (後述)。また、赤紫色と黒色の粒子構造の周囲には着色されていない領域が見られる。さらに、図には淡赤紫色の指輪状の構造も認められる。白井 (1922)⁶⁾の赤紫色および黒色の粒子構造は、顆粒の内層 (中心を含む領域) であり、それらの周囲の着色されていない領域は、顆粒の外層であると考えられる。また、淡赤紫色の指輪状構造は、内層が染色されず、外層が淡赤紫色に染色された顆粒であると推察される。したがって、白井 (1922)⁶⁾の好中球には染色され

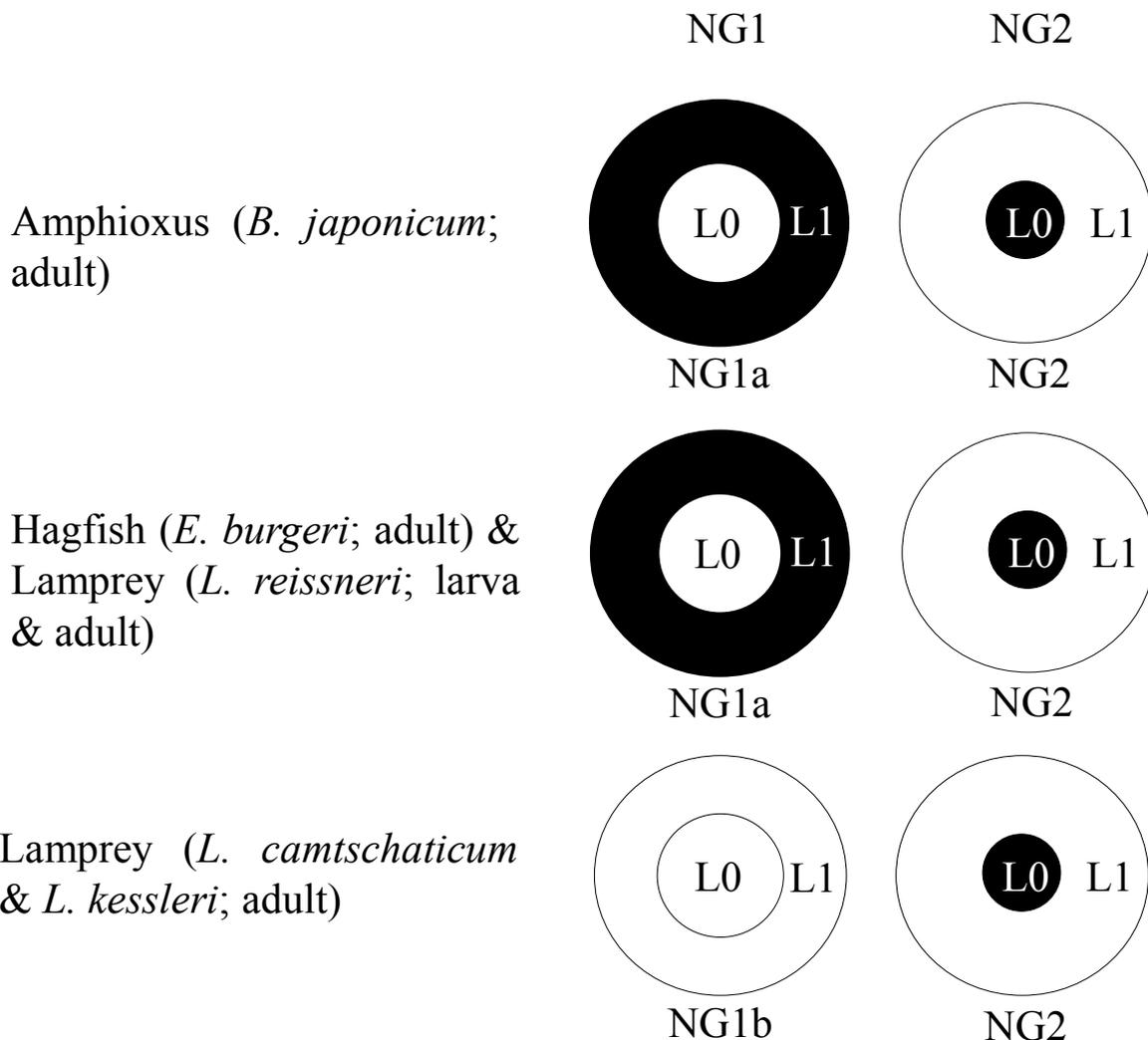


Fig. 1. Comparison of two types of neutrophil granules from amphioxus *Brachiastoma japonicum* [present report; according to Usui (1922)⁶⁾ and Shima (1933)⁴⁾], hagfish *Eptatretus burgeri*¹²⁾ and lampreys [larva (ammocetes) and adult of *Lethenteron reissneri*^{11,16)}; adult of *L. camtschaticum* (*Lc*) and *L. kessleri* (*Lk*)¹⁵⁾]. NG1, type 1 (NG1a & NG1b, subtypes of NG1); NG2, type 2; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer). □, chromophobic; ■, chromatophilic. In the figures (Giemsa stain) of Usui (1922)⁶⁾ and Shima (1933)⁴⁾, L1 of NG1a and L0 of NG2 show purple or blackish prple (metaazurophilic).

る領域が異なる2種類の顆粒が存在すると考えられる。同様の顆粒は円口類の好中球にも知られており^{11,12,15,16}, 顆粒の内層をL0, 外層をL1として, L0が染色されない(難染色性chromophobic) 顆粒は1型好中球顆粒(neutrophil granule type 1, NG1), L0が染色され(好染色性chromatophilic), L1が難染色性を示す顆粒は2型好中球顆粒(NG2)に分類されている。なお, NG1はL1が好染色性のNG1aと, 難染色性のNG1bに細分されている。NG1aとNG2を好中球に有する円口類としてスタウナギンshore hagfish *Eptatretus burger* (スタウナギ目Myxiniiformesスタウナギ科Myxinidae)の成魚と¹², スナヤツメfar eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri* [南方型; *L. sp. S* (southern form); 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)と成魚が報告されている^{11,16}。また, NG1bとNG2をとともに有する好中球はスナヤツメと同じカワヤツメ属のカワヤツメArctic lamprey *L. camtschaticum*とシベリアヤツメSiberian lamprey *L. kessleri*それぞれの成魚で認められている¹⁵。したがって, 白井(1922)⁹のヒガシナメクジウオの好中球にはスタウナギヤスナヤツメと同様なNG1aとNG2が存在し, 白井(1922)⁹のGiemsa染色条件では両顆粒の好染色層が主に赤紫色(異調アズール好性)を示すと言える(Fig. 1)。なお, 黒色を呈したNG2のL0は, 多量の色素(アズールB)が結合したために光の透過量が減少して生じた色調と考えられ^{12,16}, 実際の色調は黒赤紫色であろう。黒赤紫色を呈するNG2のL0はスナヤツメの幼生と成魚の好中球に観察されている^{11,16}。白井(1922)⁹は細胞質の色調を弱塩基好性(青色)ないし赤紫色としたが, この赤紫色は, NG1aのL1を細胞質(細胞質基質)であると考えたことによるものと推察される。志真(1933)⁴が観察した好中球も白井(1922)⁹のそれに類似するが, 細胞質の色調は塩基好性(青色)としており, 2種類の顆粒(第一顆粒と第二顆粒)を認めている。両顆粒はともに微細な小点状であり, 第一顆粒は淡紫赤色を, 第二の顆粒は極めて濃い紫色を呈するとしている。また, 前者の顆粒の存在する部分では細胞質の色調を確認することがほとんどできないと報告した。志真(1933)⁴が示した図(figs. 4-7)にも白井(1922)⁹と同様に2種類の顆粒(NG1aとNG2)が認められるが, L0が黒赤紫色を呈するNG2の方がL0が赤紫色のNG2よりも多い。スナヤツメ幼生では染色条件の違いによって, 両者の比率が変化することが報告されている¹¹。したがって, NG2のL0の主要な色調が白井(1922)⁹と志真(1933)⁴で

異なる理由は, 染色条件が若干違うことであると考えられる。なお, 志真(1933)⁴が指摘した第一顆粒(NG2の紫赤色を呈したL0)周辺の細胞質の色調, すなわち, 第一顆粒が存在する部分では細胞質の色調を確認することがほとんどできないこととは, 難染色性を有するNG2のL1に起因すると考えられる[図では第二顆粒(NG2の黒紫赤色を呈したL0)の周辺も第一顆粒と同じであるが, 志真(1933)⁴はこのことについては言及していない]。志真(1933)⁴はNG1aの存在には気づけなかったと思われる。

これまでに白井(1922)⁹と志真(1933)⁴のほか, 体外に取り出したナメクジウオ類の血球に対してギムザ染色などの一般染色を施した報告はHilton(1943)¹⁷しかない。Hilton(1943)¹⁷は使用したナメクジウオ類の種名を明記しなかったが, 所属がカリフォルニア州のPomona Collegeであることからおそらく*B. californiense* Andrews, 1893を用いたと考えられる。記述からHilton(1943)¹⁷も白井(1922)⁹および志真(1933)⁴と同様に体を切断して流出した体液の塗抹標本を観察したと思われる。Hilton(1943)¹⁷の記載は不明瞭な点が多いが, 好中球に相当すると考えられる細胞を観察している。その細胞にアメーバ運動を認め, 一般染色標本(染色法としてWright染色またはGiemsa染色を行っている)によって染色性の乏しい小さな顆粒を観察している。しかし, 顆粒の色調と構造に関する記述はなく, 図(fig. 6: 白黒スケッチ)では顆粒は輪郭線(始点と終点が一致していない)のみで描かれている。

好中球顆粒の微細構造

好中球と考えられる細胞の透過型電子顕微鏡像は*B. moretonense* [*moretonensis*と記述(誤記); 本種名はWoRMSでは疑問名となっている]でCasley-Smith(1971)¹⁸が, フロリダナメクジウオ*B. floridae*でMoller & Philpott(1973a, 1973b)^{19,20}が, ニシナメクジウオ*B. lanceolatum*でWelsch(1975)²¹, Rähr(1981a, 1981b, 1982)^{22,24}およびMonahan-Earleyら(2013)²⁵が, ヒガシナメクジウオでZhangら(1992)¹³が, *B. platae*でSilvaら(1995)²⁶が, *B. belcheri*(採集地不明)でWelsch & Fang(1996)²⁷が, *B. virginiae*でRuppert(1996, 1997)^{28,29}が示している。現在においてもナメクジウオ類に血球が存在するか否かについて意見の相違がある。すなわち, 血球は無く, 血管内面に脊椎動物とは異なる内皮細胞が存在するという報告(報告A), 内皮細胞ではなく血球に類似した細胞のみ(血球とは呼ばない)が血管内面に付着しているとする報告(報告B)および血球は

2つの状態(血液中に浮遊した状態と血管内面に付着した状態)で存在すると考える報告(報告C)の3つに大別される。前記の文献^{13,18-29}のうち、報告AにはCasley-Smith (1971)¹⁸, Moller & Philpott (1973a, 1973b)^{19,20}およびRuppert (1996, 1997)^{28,29}が該当し、報告BにはWelsch (1975)²¹とMonahan-Earleyら (2013)²⁵が、報告CにはRähr (1981a, 1981b, 1982)²²⁻²⁴とZhangら (1992)¹³が含まれる。なお、Welsch (1975)²¹は観察した細胞の存在状態を明記しなかったが、その細胞は内皮細胞ではないとしており、図 (fig. 3b) に血管壁内面に付着している像を示していることから、報告Bとした。また、Welsch & Fang (1996)²⁷は血球や内皮細胞に関する文献ではなく、たまたま血管内に細胞が映り込んでいるだけである (fig. 8b)。この図では細胞膜の大部分は血管内面から離れているが、本文中にこの細胞の記述がないので判断できない。Silvaら (1995)²⁶については後述する。好中球と考えられる細胞の呼称も文献ごとに異なる。報告AのCasley-Smith (1971)¹⁸とMoller & Philpott (1973a, 1973b)^{19,20}は内皮細胞と呼んでいる。同じく報告AのRuppert (1996)²⁸はこの細胞を、動物の進化における先駆的な内皮細胞 (evolutionary precursor) と仮定したが、名称には無脊椎動物の血球を指す 'hemocyte' を使用している^{28,29}。報告BのWelsch (1975)²¹とMonahan-Earleyら (2013)²⁵はともにアメーバ様細胞 amoebocyteと呼んでいる [Welsch (1975)²¹は顆粒性アメーバ様細胞 granular amoebocyteとも記述している]。報告CのRähr (1981a, 1981b, 1982)²²⁻²⁴は血球 blood cellと、Zhangら (1992)¹³は顆粒球と記した。細胞の名称や想定している細胞種が異なる場合でも、血管内腔に存在する細胞(血管壁内面に付着している細胞も内腔に存在すると言える)は同じ細胞種(好中球)を指していると考えられる。好中球の存在状態が報告ごとに異なるのは(付着型のみ、浮遊型と付着型)、種の違いによるものではなく、採材時のナメクジウオ類の状態によるものと考えられる [ニシナメクジウオを調べたRähr (1981a, 1981b, 1982)²²⁻²⁴は浮遊型と付着型を観察し、Monahan-Earleyら (2013)²⁵は付着型のみを認めている]。

Casley-Smith (1971)¹⁸が示した図のいくつかは、のちにRähr (1981a)²²が指摘したように血管の内腔ではなく体腔の内腔であり、Casley-Smith (1971)¹⁸の記載には誤った箇所がある。p82の微細構造に関する記述は、付着状態の好中球のものではなく、収縮性を有する血管(体腔内や体腔の近くの血管のみ収縮性を有する)の基底膜の外周に存在

する上皮細胞(細胞質に筋繊維を有する)についての記述である。好中球の記述はp85の最終行とp87の1-4行目に認められる。しかし、ここでは好中球の微細構造は記述されておらず、扁平な細胞と、より丸みを呈する細胞があり、どちらも血管の基底膜の内腔面に接着しているように見えるとのみ記している。図 (fig. 7) は小さく、またおそらく固定不良のために細胞質の保存が悪く好中球の微細構造は不明瞭である。Welsch (1975)²¹の図 (figs. 3b, 4b & 7c), Rähr (1981a, 1981b, 1982)²²⁻²⁴の図 (1981a, figs. 6a, 9 & 13; 1981b, figs. 2 & 4; 1982, figs. 11, 14 & 18)²²⁻²⁴, Welsch & Fang (1996)²⁷の図 (fig. 8b)およびRuppert (1996)²⁸の図 (figs. 6 & 7) は小さく、好中球顆粒の詳細は不明である。また、顆粒の微細構造に関する記述もない。顆粒の微細構造の解析に使用可能な記載はMoller & Philpott (1973a, 1973b)^{19,20}, Zhangら (1992)¹³, Monahan-Earleyら (2013)²⁵およびRuppert (1997)²⁹にしかない。

Moller & Philpott (1973a)¹⁹は好中球顆粒内に 'マイクロチューブ microtubule' の短い断片が電子密度の高い基質と混在していると記した。また、この混在している領域(本稿では以後、芯と称する)と顆粒の膜(顆粒膜と称す)との間には空間(以後、低密度領域と呼ぶ)があると図 (figs. 11f & 11g) を示した。fig. 11fは 'マイクロチューブ' の横断面を示していると考えられる(本文中に明記されていない)。この図では 'マイクロチューブ' に高電子密度の外層と、中程度の電子密度の内層が確認できる。一方、fig. 11gは 'マイクロチューブ' がfig. 11fとは異なる角度で切断された像とされており、芯と顆粒膜の間に低密度領域は認められるが、fig. 11fの 'マイクロチューブ' に見られた高電子密度層はなく、円形の構造体が単独または複数個が数珠繋ぎになっているように見える。また、fig. 11fとfig. 11gは同じ倍率であるにもかかわらず、fig. 11fの 'マイクロチューブ' の横断面の直径よりも、fig. 11gの円形構造体の直径の方が小さい(後者は前者の約1/3)。さらに、fig. 11gには2種類の円形構造体が認められる。すなわち、高電子密度の外層と低電子密度の内層からなる構造体と、高電子密度の外層、低電子密度の中層および高電子密度の内層の3層からなる構造体が見られる。Moller & Philpott (1973a)¹⁹の図からは以上の知見しか得られず、'マイクロチューブ' と円形構造体の関係は不明である。Monahan-Earleyら (2013)²⁵も顆粒にMoller & Philpott (1973a)¹⁹の 'マイクロチューブ' に酷似した構造を観察している。彼らはこの構造を単に '管 tubule' と呼び、その大きさから脊椎動物の

内皮細胞に存在するWeibel-Palade小体³⁰や細胞骨格におけるマイクロチューブではないとした。顆粒の強拡大像 (suppl. fig. XXI; 本文中のfig. 5Gの拡大図) から, Moller & Philpott (1973a)¹⁹の図 (figs. 11f & 11g) では不明だった点が明らかとなった (Fig. 2)。すなわち, ①顆粒の芯には円形構造体が存在する (以後, 円口類の好中球顆粒における円形構造体の呼称である‘顆粒子’を使用する)。②顆粒子は3種類存在する (g-1, g-2, g-3)。③g-1は中電子密度の外層, 低電子密度の中層および高電子密度の内層からなる3層構造を有し, g-2は中電子密度の外層と内層および低電子密度の中層からなる (3層構造)。g-3は高電子密度の外層と低電子密度の内層からなる2層構造であり, 外層はg-1

やg-2よりも厚い (Fig. 2A)。④Moller & Philpott (1973a)¹⁹の‘マイクロチューブ’とMonahan-Earleyら (2013)²⁵の‘管’とはg-2が接して (おそらく) 一列に並んだ構造の周囲にg-3が結合した顆粒子の集合体agglomerateである (Fig. 2B)。⑤集合体と集合体の間にはg-1が存在する (Fig. 2B)。

以上の結果はMonahan-Earleyら (2013)²⁵の図を解析して得たものであるが, Monahan-Earleyら (2013)²⁵はこれらの点に全く言及していない。3種類の顆粒子はZhangら (1992)¹³の図 (fig. 6) にも認められるが, その図では集合体は未発達である。前述したMoller & Philpott (1973a)¹⁹のfig. 11gの顆粒も同様であると考えられる。Zhangら (1992)¹³は顆粒内に‘マイクロチューブ様の構造’が存在

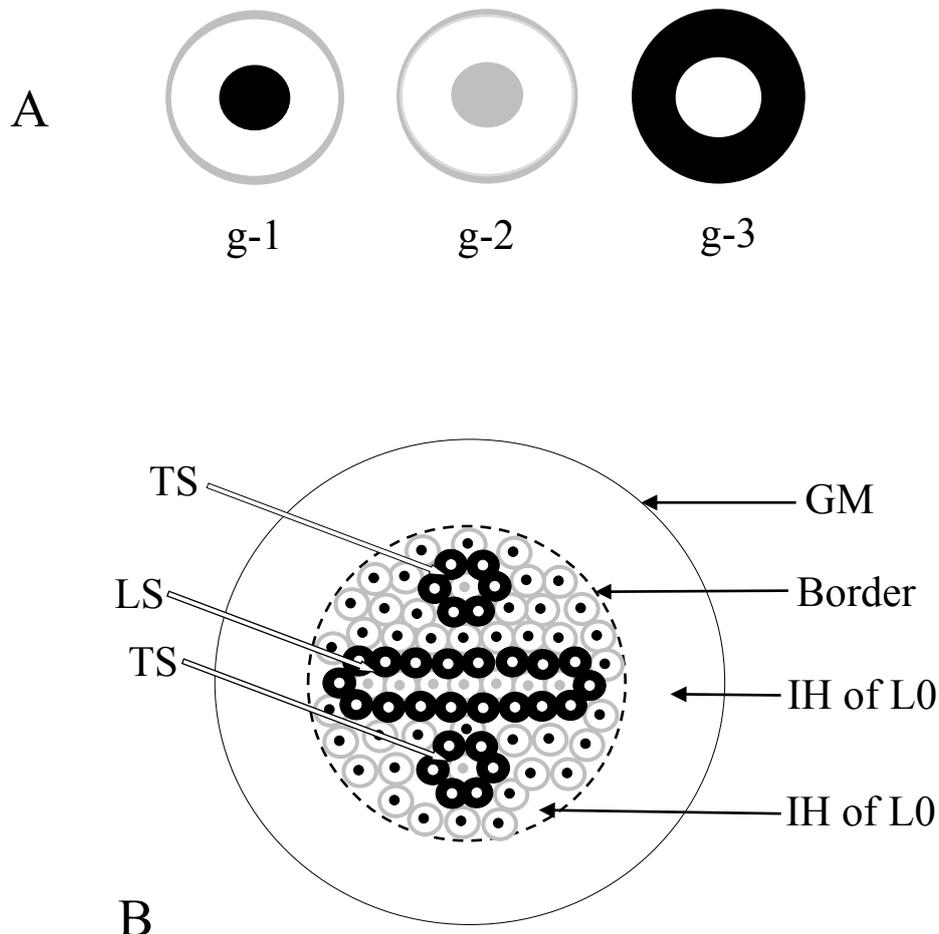


Fig. 2. Schematic illustration of neutrophil granule of amphioxus. A, three type of intragranular particles (granulons). B, arrangement of granulons in the granule. g-1, g-2 & g-3, granulon type 1 to 3 [g-1: high-electron dense (HED) inner layer, low-ED (LED) medium layer, and medium-ED (MED) outer layer. g-2, MED inner and outer layers, and LED medium layer. g-3, LED inner layer and HED outer layer]; TS, transverse section of granulon agglomerate (GA); LS, longitudinal section of GA; GM, granule membrane; Border, border between inner layer (L0) and outer layer (L1) of granule; IH, intragranular hyaloplasm.

すると記述したが、その構造は顆粒子の断面であり、Moller & Philpott (1973a)¹⁹の‘マイクロチューブ’ [前述のように顆粒子 (g-2とg-3) の集合体] とは異なる。Zhangら (1992)¹³はMoller & Philpott (1973a)¹⁹を引用文献に挙げているが、Moller & Philpott (1973a)¹⁹の‘マイクロチューブ’ と‘マイクロチューブ様の構造’の異同について考察していない。なお、Zhangら (1992)¹³の図 (fig. 6) において矢印で示された‘マイクロチューブ様の構造’はいずれもg-3に相当する。Zhangら (1992)¹³の‘マイクロチューブ様の構造’は、ホヤ類 (*Ciona intestinalis*) の血球に関するÖber (1999)³¹の論文では‘マイクロチューブ’になっている。Ruppert (1997)²⁹には好中球の図が多数あるが (figs. 109, 123, 143, 150, 151, 153, 154, 176, 180, 181), その多くは小さく、顆粒の構造は不明である。しかし、fig. 154の顆粒内には顆粒子が認められる (顆粒子の種類を判別するには図が小さい)。この図では顆粒内における顆粒子の集合体の有無は不明瞭であるが、ゴルジ槽の内腔に顆粒子 (少なくともg-1) が認められる。このことから、顆粒子はゴルジ槽内ですでに形成されていると言える。Ruppert (1997)²⁹は顆粒の内容物は血液中に分泌されると考えており、その根拠として血液中に粒子状の構造物が観察されることを挙げている。しかし、Ruppert (1997)²⁹の図では血液中の構造物が常に同様の大きさと密度で存在するわけではない (fig. 151では微細粒子が散在; fig. 150では多数の微細粒子と中等量の小型粒子が混在; fig. 153では多数の小型粒子が血管内に充満)。血液中の粒子状構造物はおそらく血液凝固反応の結果生じた構造と推察する。

ナメクジウオ類の好中球顆粒には芯が存在し、芯と顆粒膜の間には低電子密度層が存在する。Giemsa染色像から、芯はL0に、低電子密度層はL1に相当すると考えられる。しかし、Giemsa染色領域が異なる2種類の顆粒 (NG1aとNG2) に対応する顆粒は、電子顕微鏡像からは認められない (通常の電子顕微鏡観察では2種類の顆粒を識別できない)。円口類においても同様に一般染色で認められる2種類の顆粒は、微細構造からは識別されていない^{11,12}。円口類のうち、ヤツメウナギ類の好中球顆粒には、ナメクジウオ類のそれと同様に芯とその周囲の低電子密度領域が観察されている¹¹。一方、スタウナギ類では低電子密度領域は認められていない¹²。したがって、ナメクジウオ類の好中球顆粒はスタウナギ類よりもヤツメウナギ類のそれに類似すると考えられる。本研究によって、ナメクジウオ類の好中球顆粒内には少なくとも構造の異なる3種類の顆粒子が存

在すると推察された。しかし、これまで円口類では複数種の顆粒子の存在は証明されていない。また、ナメクジウオ類で観察される顆粒子の集合体は、円口類では認められていない。

ナメクジウオ類の好中球顆粒内では顆粒子の集合体が形成され、集合体に含まれる2種類の顆粒子は、それぞれ特徴的に配置する (内層にg-2, 外層にg-3)。また、集合体の内層のg-2は一列に並ぶ。さらに、集合体間にはg-1が分布する。これらの構造的特徴をもとに各顆粒子の性状について考察する。顆粒は内層 (L0) と外層 (L1) から構成され、各層には円口類と同様に顆粒内基質intragranular hyaloplasm (IH) が存在すると考えられる^{11,12}。ナメクジウオ類の好中球顆粒において、いずれの顆粒子も顆粒のL0に分布することから、3種類の顆粒子はいずれもL1のIHと相互作用 (反発) するため、L1に分布できないが、L0のIHとは作用しないために混在できると考えられる。したがって、L0における3種類の顆粒子の分布は、顆粒子間の作用によるものと仮定できる。L0内でg-1同士は作用しないが、g-1とg-2およびg-1とg-3は反発すると考えられる。もしも、同時にL0内に3種類の顆粒子を入れた場合、g-1からなる層とg-2およびg-3からなる層の2層が形成されると思われる。実際にはg-2とg-3からなる集合体が形成され、集合体にはg-2からなる内層とg-3からなる外層が認められることから、L0内に3種類の顆粒子が同時に入ることにはないと考えられる。Zhangら (1992)¹³の図 (fig. 6) では集合体が確認できないが、g-3が少数散在している。また、g-2が一列に並んだ構造が認められる。したがって、顆粒形成の過程において、まずg-1とg-2が存在する状態が生じ、次にg-3が顆粒に付加されると推察される。顆粒内にg-1とg-2が存在し、g-2が列をなすのに必要な特徴は、1個のg-2に他のg-2と結合できる部位が2箇所のみ存在しなくてはならない。この特徴があれば、g-1と反発したg-2が集塊 (層) にならずに列を形成することが可能である。g-2上に他のg-2と結合できる部位が1個しかない場合には、2個のg-2からなる構造しかできない。また、結合部位が3個以上ある時は、g-2は列をなさず集塊となる。g-2上に存在すると予想される2箇所のg-2結合部位は、それぞれ十分に離れていなくてはならない。例えば、g-2の中心から表面に向けて60°の角度となるよう2本の直線を引き、直線と表面の交点に結合部位がある場合、3個のg-2が三角形を形成する可能性があり、列をなさない。次にg-3の特徴を考える。g-3はL0内でg-2が列を形成したのちに顆粒に付加され、g-3はg-1と反発する

がg-2に結合できると思われる。g-2上のg-3結合部位の個数は複数個あっても構わないが、g-3上のg-2結合部位は1個であると推察される。なぜならば、g-3上のg-2結合部位が複数個ある場合、g-2からなる列同士(2本以上)繋いでしまい、本来の集合体の構造にならないからである。g-3上のg-2結合部位が1個存在することで、g-2からなる列の外面をg-3が覆うことが可能となる。また、g-3同士は弱く反発するが、g-2と結合することでこの特性はなくなり、g-2の列表面でもg-3が隣接することができると考えられる。この特性がないと、g-1と反発したg-3が集塊を形成する可能性がある。

好中球顆粒の細胞化学的特徴

ナメクジウオ類好中球の細胞化学的研究はこれまで Moller & Philpott (1973b)²⁰⁾による酸性ホスファターゼ (AcP) 染色しかないが、陽性部位に関する Moller & Philpott (1973b)²⁰⁾の解釈には問題がある。彼らはAcP陽性部位を電子顕微鏡で観察しており(光学顕微鏡観察はしていない)、陽性部位は小胞vesicleとゴルジ槽であると報告した。図 (fig. 8a) にはAcP陽性の小胞とともに2種類の膜で囲まれたAcP陰性の構造が示されている。また、fig. 8b には陽性の小胞とゴルジ槽がある。AcP陽性の小胞の大きさは、2種類の陰性の構造体と同じである。2種類の陰性構造体の大きさも互いに同大で、1種類(図ではAと表記; 本稿ではA顆粒と呼ぶ)は'tubular filled granule'とされており、他の種類は'vesicle containing a naturally occurring endogenous dense material'となっている(図ではBと表記; 本稿ではB小胞と呼ぶ)。彼らは前報¹⁹⁾で、好中球の細胞質に顆粒(上述した)と被覆小胞coated vesicleを観察した。しかし、顆粒と同大の小胞やB小胞に関する記載がない。AcPは好中球が産生した酵素であり、AcP陽性小胞は被覆小胞でありはなし(被覆小胞内には細胞が飲作用によって取り込んだ物質が入っている)。図のAcP陽性小胞には、陽性反応を示す円形構造体が多数集塊を形成している。また、B小胞内のdense materialも円形構造体に見える。AcP陽性小胞とB小胞はともに顆粒であると考えられる。ヤツメウナギ類の好中球においても一部の顆粒がAcP陽性であり、AcPは顆粒に局在する¹¹⁾。本稿ではナメクジウオ類の好中球に2種類の顆粒(NG1とNG2)が存在することを示した。A顆粒とB小胞はそれぞれ2種類の顆粒のどちらかに相当するのかもしれない。AcP陽性小胞は2種類の顆粒のどちらかの一部であると思われる。

Moller & Philpott (1973b)²⁰⁾は血管内に注入した異物[フェリチンと西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)]が好中球に取り込まれたと主張している。しかし、彼らのHRPに関する実験系には問題がある。彼らはHRPの検出に用いる3,3'-diaminobenzidine hydrochlorideと過酸化水素のそれぞれを反応系から除いた区を対照としている。しかし、好中球が内因性のペルオキシダーゼ (PO) を有しているのか記述していない。また、HRPの反応前に内因性POを阻害する処理を行っていない。HRPの検出系では内因性POもHRPと同様の反応産物が形成する。彼らはHRPが小胞に検出されたとして図 (fig. 6) に示した。図の中央とその左側に陽性反応を示す構造が認められる。中央の構造では膜に包まれた構造の中に複数の円形の構造があり、陽性反応はこの円形構造の外層に見られる。また、左側の陽性構造も膜に包まれており、内部に陰性の顆粒と外層が陽性反応を示す顆粒が認められる。図の中央の陽性構造における陽性部位は、顆粒の集合体の外層(構成顆粒はg-3)に相当すると考えられる。この推察が正しければ、図の左の陽性構造における陽性顆粒もg-3となる。Moller & Philpott (1973b)²⁰⁾のfig. 6は内因性POの局在部位を表していると考えられ、好中球によるHRPの取り込み試験は再検討が必要である。

好中球の機能

Hilton (1943)¹⁷⁾が好中球に遊走能(アメーバ運動)を観察したことはすでに述べた[Welsch (1975)²¹⁾とMonahan-Earleyら (2013)²⁵⁾は好中球をアメーバ様細胞とよび、Rähr (1981a)²²⁾もabstractでは好中球をアメーバ様細胞様の細胞(amoeboocyte-like cell)と記しているが、彼らは好中球にアメーバ運動を見ておらず、おそらく血管壁に付着した好中球がアメーバの様に偽足を伸長させていることからアメーバ様と記したと考えられる]。Silvaら (1995)²⁶⁾にも好中球の遊走能を観察したと解釈できる記載がある。Silvaら(1995)²⁶⁾はMetchnikoff (1892)³²⁾の知見の一部、すなわち、ニシナメクジウオでは炎症を起こすことができなかつたことを再検討するために、*B. platyae*を用いたいくつかの試験をしている。その一つとして絹製の縫糸(India inkにあらかじめ浸した縫糸と、無処理の縫糸を使用)を背部の筋肉組織に挿入してこれに対する反応を観察している。縫糸の周りや内部に細長い細胞が集まることであると記し、これらの細胞には炭素粒子(India inkの主成分)が観察されなかつたとしている。縫糸の周囲に集まったとされる細胞の透過型

電子顕微鏡像が図示 (fig. 4b) されているが、記述からこの像はIndia inkに浸されていない縫糸を挿入した個体と考えられる。この図に見える細胞を彼らはMoller & Philpott (1973a, 1973b)^{19,20}によって記述された内皮細胞であるとしているが、彼らは形態学的な類似点については何も記述していない。fig. 4bの細胞はMoller & Philpott (1973a)¹⁹の内皮細胞よりもはるかに粗面小胞体が発達している。また、Moller & Philpott (1973a)¹⁹の内皮細胞を特徴付ける顆粒がfig. 4bには認められない。fig. 4bの細胞が本当にMoller & Philpott (1973a)¹⁹の内皮細胞であるのであれば、この図は好中球 [上述のとおりMoller & Philpott (1973a)¹⁹の内皮細胞は血管内壁に付着した好中球である] が生体に挿入された縫糸 (異物) の周囲に遊走し、そこで縫糸を包囲したこと (包囲化作用) を示していることとなる。Silva ら (1995)²⁶は緒言において、血球を欠くとする報告としてMoller & Philpott (1973a, 1973b)^{19,20}を、血球が存在するとの報告としてRähr (1981a)²²を挙げているが、Moller & Philpott (1973a, 1973b)^{19,20}の内皮細胞が、Rähr (1981a)²²の血球 (=好中球) に相当することを彼らは理解していなかったと思われる [Zhangら (1992)¹³にもMoller & Philpott (1973a)¹⁹の内皮細胞がZhangら (1992)¹³の顆粒球 (=好中球) に相当することが記述されているが、Silvaら (1995)²⁶はZhangら (1992)¹³を引用していない。また、Zhangら (1992)¹³はRähr (1981a, 1981b, 1982)^{22,24}を引用していない]。Silvaら (1995)²⁶の研究目的はMetchinikoff (1892)³²の観察結果を検証することであったが、彼らはMetchinikoffと同じ結論を望んでいたと思われる。挿入した縫糸に‘血球’が集まることはMetchinikoffの観察結果を否定することになる。そのため、彼らは縫糸に集まった細胞は単なる‘内皮細胞’であると結論づけたと思われる。挿入した縫糸に見られた反応は彼らの結論に反して、Metchinikoffの観察結果を否定するものである。

ナメクジウオ類の好中球の貪食能に関する報告がいくつかあるが、いずれも好中球が貪食能を有することを完全には証明していない。白井 (1922)⁹と志真 (1933)⁴は体液細胞に未染色時には黄褐色を呈する顆粒を観察している。彼らは黄褐色顆粒の多少も体液細胞の分類基準として採用し、好中球にもこの顆粒が少数認められるとした。黄褐色顆粒はGiemsa染色によって黒色を示し、志真⁴は本顆粒が貪食された異物の残渣と考えた。白井 (1922)⁹と志真 (1933)⁴は腹腔内にリチウムカーミンを注射して生体染色を行って

る。白井 (1922)⁹は好中球の生体染色性は弱陽性あるいはほとんど陰性に近いとしている。このことは腹腔内に接種されたカーミン粒子の少数が血管内に移行し、好中球に取り込まれたと考えられる。志真 (1933)⁴も生体染色を行っているが好中球は陰性と報告している。白井 (1922)⁹の好中球の図 (fig. 5) には、好中球に貪食されたと考えられる細胞が描かれている。この細胞は変性した体腔細胞と思われる、細胞に重なる好中球顆粒が数個認められる。本文中では細胞質内に数個の空胞を有するものとされており、図の説明文中でも単に‘大サ、23.4 μ 大形両色嗜好性顆粒細胞 (ぎーむさ氏染色)’としか書かれていない。白井 (1922)⁹を参考にした志真 (1933)⁴も白井のこの図に対して何も指摘していない。好中球と体腔細胞は存在する場所が異なるので、通常、好中球と体腔細胞が接することはないと考えられる。したがって、白井 (1922)⁹の図 (fig. 5) は体腔に浸潤した好中球が変性した体腔細胞を貪食したと推察される (好中球が体腔に浸潤することは証明されていない)。Moller & Philpott (1973b)²⁰は血管内に注入されたフェリチンとHRPが好中球に取り込まれるとしている。Moller & Philpott (1973b)²⁰のこの主張はRähr (1981a)²²、Zhangら (1992)¹³、Ruppert (1997)²⁹およびMonahan-Earleyら (2013)²⁵に無批判に引用されてきた。しかし、すでに考察したようにHRPの取り込みは疑わしい。Hanら (2010)³³はヒガシナメクジウオ^{*6}の腸の内腔に接種したグラム陰性細菌*Vibrio parahaemolyticus*が、腸周囲の血管内の内皮細胞によって貪食されると報告した。また、細菌接種前の内皮細胞と接種後の透過型電子顕微鏡像を示している (figs. 3F & 3H)。Hanら (2010)³³の内皮細胞は血管壁内面に付着した好中球に相当すると思われるが、顆粒 [Hanら (2010)³³はリソゾームlysosomeと呼んでいる] の微細構造に関する記述がない。また、図も小さすぎる。Hanら (2010)³³には過去の好中球に関する文献 [例えばMoller & Philpott (1973a, 1973b)^{19,20}、Rähr (1981a)²²、Zhangら (1992)¹³] が一切引用されておらず、体腔には貪食能を有する体腔細胞 (体腔球 coelomocyte) が存在することを証明したRhodesら (1982)¹⁴も引用していない。腸内腔に接種した細菌が血管の付着型好中球に貪食されるということは、この細菌が腸壁を通過して血管内に侵入したことになる。この細菌が血管内に留まるのか、体腔へも侵入するのかは明記されていないが、体腔細胞が血管内に浸潤する可能性が考えられる。好中球顆粒の微細構造は体腔球のライソゾーム様小体¹⁴と異な

*6Hanら (2010)³³は使用したナメクジウオ類を*Branchiostoma belcheri tsingtauense* (ヒガシナメクジウオのシノニム) と表記している。

る。Hanら (2010)³³⁾が図 (fig. 3H) に示した食細胞 [Hanら (2010)³³⁾は細菌を貪食した細胞を食細胞と呼んでいる] の顆粒を詳細に解析することで, 食細胞が好中球なのか浸潤してきた体腔球なのか明らかにできると考える。

文 献

- 1) 安井金也, 窪川かおる: ナメクジウオ 頭索動物の生物学, 東京大学出版会, 東京 (2005) [Yasui K, Kubokawa K: Biology of Cephalochordate Lancelet, University of Tokyo Press, Tokyo (2005) (in Japanese)]
- 2) 窪川かおる: 脊椎動物への進化の生き証人—ナメクジウオ. 学術の動向, **11(9)**, 36-41 (2006) [No author name and title in a foreign language (Kubokawa K: Living witness to the evolution to vertebrates.), *Trends in the Sciences*, **11(9)**, 36-41 (2006) (in Japanese)]
- 3) Putnam NH, Butts T, Ferrier DEK, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, Robinson-Rechavi M, Shoguchi E, Terry A, Yu J-K, Benito-Gutiérrez È, Dubchak I, Garcia-Fernández J, Gibson-Brown JJ, Grigoriev IV, Horton AC, de Jong PJ, Jurka J, Kapitonov VV, Kohara Y, Kuroki Y, Lindquist E, Lucas S, Osoegawa K, Pennacchio LA, Salamov AA, Satou Y, Sauka-Spengler T, Schmutz J, Shin-I T, Toyoda A, Bronner-Fraser M, Fujiyama A, Holland LZ, Holland PWH, Satoh N, Rokhsar DS: The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*, **453**, 1064-1071 (2008)
- 4) 志真秀敏: 「ナメクジウオ」ノ血液淋巴細胞 (Hämolymphezellen) ニ就イテ. 臨床病理学血液学雑誌, **2**, 1771-1779 + 付図2枚 (第1付図, 第2付図) (1933) [No author name, title and journal name in a foreign language (Shima H: On the hemolymph cells of amphioxus. *Rinshou Byourigaku Ketsuekigaku Zasshi (Japanese Journal of Clinical Pathology and Hematology)*), **2**, 1771-1779 +2 plates (1 & 2) (1933) (in Japanese)]
- 5) 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)]
- 6) 臼井計一: なめくちうを血淋巴細胞ノ血液學的研究. 日本微生物學會雜誌, **16**, 1069-1082 + 付図1枚 (1922) [No author name and title in a foreign language (Usui K: Hematological study on the hemolymph cells in amphioxus.), *Zeitschrift der Japanischen Mikrobiologische Gesellschaft*, **16**, 1069-1082 + 1 plate (1922) (in Japanese)]
- 7) 大植登志夫: 血液, 三笠書房, 東京 (1944) [No author name and book name in a foreign language (Ohuye T: Blood, Mikasa Shobo, Tokyo (1944) (in Japanese)]
- 8) 大植登志夫: 無脊椎動物血液実験法. In: 岡田弥一郎 (著者代表) 体液生理実験法 (生物学実験法講座第8巻A), 中山書店, 東京, 1-40 (1955) [No author name, title and book name in a foreign language (Ohuye T: Invertebrate Blood Experiment Methods. In: Okada Y (representative author) Experimental Methods for Body Fluid Physiology (Laboratory Methods in Biology, Vol 8A), Nakayama Shoten, Tokyo, 1-40 (1955) (in Japanese)]
- 9) 大植登志夫: 比較血液学 (無脊椎動物). 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, 65-97 (1963) [No author name, title and book name in a foreign language (Ohuye T: Comparative Hemocytology (Invertebrate). In: The Japanese Society of Hematology (ed) The Complete Collection of Japanese Hematology, Vol 1 (Morphology), Maruzen, Tokyo, 65-97 (1963) (in Japanese)]
- 10) Gans C, Saiff E: Bibliography of the lancelets. *Israel Journal of Zoology*, **42(Supplement)**, S315-S442 (1996)
- 11) 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 lamprey *Lathenteron reissneri*. *Journal of National Fisheries University*, **70**, 125-148 (2022) (in Japanese with English abstract)]
- 12) 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**, 印刷中 [Kondo M, Yasumoto S: Eosin stainability and phagocytosis in inshore hagfish neutrophils. *Journal of National Fisheries University*, **71**, in press (in Japanese)]

- with English abstract]
- 13) Zhang H, Huang Z, Yamaguchi K, Tomonaga S: Granulocytes and macrophages in amphioxus. *Zoological Science*, **9**, 113-118 (1992)
 - 14) Rhodes CP, Ratcliffe NA, Rowley AF: Presence of coelomocytes in the primitive chordate amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *Science*, **217**, 263-265 (1982)
 - 15) 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)]
 - 16) 近藤昌和, 安本信哉: 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. 水産大学校研究報告, **71**, 109-122 [Kondo M, Yasumoto S: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from adult of far eastern brook lamprey *Lathenteron reissneri*. *Journal of National Fisheries University*, **71**, 109-122 (in Japanese with English abstract)]
 - 17) Hilton WA: The blood of Amphioxus (*Branchiostoma*). *Journal of Entomology and Zoology*, **35**, 31-32 (1943)
 - 18) Casley-Smith JR: The fine structure of the vascular system of Amphioxus: Implications in the development of lymphatics and fenestrated blood capillaries. *Lymphology*, **3**, 79-94 (1971)
 - 19) Moller PC, Philpott CW: The circulatory system of amphioxus (*Branchiostoma floridae*). I. Morphology of the major vessels of the pharyngeal area. *Journal of Morphology*, **139**, 389-406 (1973a)
 - 20) Moller PC, Philpott CW: The circulatory system of amphioxus (*Branchiostoma floridae*) II. Uptake of exogenous proteins by endothelial cells. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, **143**, 135-141 (1973b)
 - 21) Welsch U: The Fine Structure of the Pharynx, Cyrtopodocytes and Digestive Caecum of Amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). In: Barrington EJW, Jefferies RPS (eds) Protochordates: The Proceedings of a Symposium held at the Zoological Society of London on 17 and 18 January, 1974 (Symposia of the Zoological Society of London, no. 36), Academic Press, London, 17-41 (1975)
 - 22) Rähr H: The ultrastructure of the blood vessels of *Branchiostoma lanceolatum* (Pallas) (Cephalochordata). I. Relations between blood vessels, epithelia, basal laminae, and "connective tissue". *Zoomorphology*, **97**, 53-74 (1981a)
 - 23) Rähr H: The ultrastructure of the blood vessels of *Branchiostoma lanceolatum* (Pallas) (Cephalochordata). II. Blood vessels of the caudal region. *Zoomorphology*, **97**, 297-308 (1981b)
 - 24) Rähr H: Ultrastructure of gill bars of *Branchiostoma lanceolatum* with special reference to gill skeleton and blood vessels (Cephalochordata). *Zoomorphology*, **99**, 167-180 (1982)
 - 25) Monahan-Earley R, Dvorak AM, Aird WC: Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **11(Supplement 1)**, 46-66 (2013)
 - 26) Silva JRMC, Mendes EG, Mariano M: Wound repair in the Amphioxus (*Branchiostoma platae*), an animal deprived of inflammatory phagocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, **65**, 147-151 (1995)
 - 27) Welsch U, Fang YQ: The reproductive organs of *Branchiostoma*. *Israel Journal of Zoology*, **42(Supplement)**, S183-S212 (1996)
 - 28) Ruppert EE: Morphology of Hatschek's nephridium in larval and juvenile stages of *Branchiostoma virginiae* (Cephalochordata). *Israel Journal of Zoology*, **42(Supplement)**, S161-S182 (1996)
 - 29) Ruppert EE: Chapter 5 Cephalochordata (Acrania). In: Harrison FW, Ruppert EE (eds) Microscopic Anatomy of Invertebrates Vol 15 Hemichordata, Chaetognatha, and the Invertebrate Chordates, Wiley-Liss, New York, 349-504 (1997)
 - 30) 藤本 淳, 上田 宏: Weibel-Parade body. 電子顕微鏡, **24**, 33-39 (1989) [Fujimoto S, Ueda H: Weibel-Parade body. *Electron-microscopy*, **24**, 33-39 (1989) (in Japanese)]
 - 31) Öber A: *Ciona intestinalis* (Tunicata, Ascidiacea) de granular hemositler. *Turkish Journal of Zoology*, **23**, 725-

- 732 (1999)
- 32) Metchnikoff É: Septième Leçon. *In*: Leçons sur la Pathologie Comparée de L'Inflammation: Faites à L'Institut Pasteur en Avril et Mai 1891, Masson, Paris, 111-130 (1892)
- 33) Han Y, Huang G, Zhang Q, Yuan S, Liu J, Zheng T, Fan L, Chen S, Xu A: The primitive immune system of amphioxus provides insights into the ancestral structure of the vertebrate immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, **34**, 791-796 (2010)