

ヌタウナギ単球の形態学および 細胞化学的特徴

近藤昌和[†], 安本信哉

Morphological and cytochemical characteristics of monocytes from inshore hagfish *Eptatretus burgei*

Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract: Monocytes were observed in the blood of inshore hagfish *Eptatretus burgei*. The monocytes were round or oval, high nucleus/cytoplasm ratio, and have several round or oval eosinophilic granules, which show dark red or blackish red color when stained with May-Grünwald (MG), Giemsa, and MG-Giemsa stain. The granules were positive for alkaline phosphatase, acid phosphatase, and α -naphthyl butyrate esterase. Also, the granules show metachromatic (reddish purple) with toluidine blue. However, β -glucuronidase, α -naphthyl acetate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase and peroxidase were not detected in the monocytes, and negative for periodic acid Schiff reaction, alcian blue, Sudan black B, Sudan III, and oil red O. The monocytes engulfed many yeast particles (zymosan).

Key words: hagfish, *Eptatretus burgei*, monocytes, morphology, cytochemistry

緒 言

一般に脊椎動物の血液中には貪食能を有する白血球として好中球neutrophilと単球monocyteが知られている。前報において著者らは、原始的脊椎動物である円口類のヌタウナギinshore hagfish *Eptatretus burgei* (ヌタウナギ目 Myxiniiformesヌタウナギ科Myxinidae) の血液に、酵母の細胞壁であるzymosan粒子を添加してヌタウナギ好中球の貪食能を調べた¹⁾。その結果、貪食を示した血球は好中球に同定されることを報告した。しかし、この報告はヌタウナギにおける単球の存在を否定するものではない。前報¹⁾ののち、さらに標本観察を行ったところ、稀にzymosan粒子を貪食するとともに細胞質に少数の顆粒を有する血球が認められた。この血球の顆粒はMay-Grünwald・Giemsa (MGG) 染色で濃赤色から黒赤色を呈し、ヌタウナギの好中球の顆粒のような成層構造は観察されなかった。この新たな食細胞を、顆粒の色調と構造を指標にしてzymosan粒

子を添加しなかった標本上で探索したところ、核/細胞質比率が好中球よりも大きく、分葉核を持たない単核の白血球が認められた。

本研究ではこの新たな食細胞をヌタウナギの“単球”であると考え、その形態学および細胞化学的特徴を調べた。

材料および方法

近藤・高橋²⁾で作製した染色標本(種々の条件でMay-Grünwald, GiemsaおよびMGG染色を施した標本および各種細胞化学染色標本)を光学顕微鏡で再度観察した。zymosan粒子に対する貪食像の観察には前報¹⁾で作製した標本を使用した。

結果および考察

各種条件でMay-Grünwald, GiemsaおよびMGG染色を施して染色像を評価する多条件下Romanowsky型染色評価法 (Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV; 文献1のtable 1参照) をスタウナギの単球に適応したところ, 単球の顆粒はいずれの条件においても濃赤色または黒赤色を呈した (Fig. 1A)。顆粒は円形から卵円形であり, 成層構造は認められなかった。細胞体は類円形であり, 大きさは様々で, 円形のリンパ球と同大の小型の単球も観察されたが, 大型の単球は大型の好中球よりは小さかった。細胞に占める核の割合 (核/細胞質比率) は大きく, 核は細胞の中央またはやや偏在し, 類円形であった。核には時に切れ込みnotchが1または2個認められた。核の濃縮クロマチンは好中球のそれよりも小さく, 核内に散在していた。zymosan粒子を貪食した単球にも濃赤色または黒赤色の顆粒が観察された (Fig. 1B)。

スタウナギの単球にはアルカリ性フォスファターゼ (AIP), 酸性フォスファターゼ (AcP) および α -ナフチルプチレートエステラーゼ (NBE) が検出され, これらの陽性顆粒はその大きさと形状から, MRSVの各染色で濃赤色または黒赤色を示す顆粒に相当すると考えられた (Figs. 1C-1E; Table 1)。しかし, 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, ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ (CAE) およびペルオキシダーゼは認められなかった。単球はperiodic acid Schiff反応に陽性反応を示さず, アルシアンブルー染色 (pH1.0および2.5) も陰性であった。しかし, トルイジンブルー (TB) 染色では顆粒が赤味の強い赤紫色となり, 異調染色性を示した (Fig. 1F; Table 1)。各種脂質染色 (ズダン黒B, ズダンIII, オイル赤O) には陰性であった (Table 1)。

スタウナギの好中球には2層構造を有する成層顆粒が2種類 (NG1aとNG2) 知られている¹⁾。MRSVにおいて, NG1aの外層 (L1) とNG2の内層 (L0) はPN=6の条件 (MG染色) のみでエオシン好性であり, その色調は, 前者では淡橙色, 後者では淡赤色であった。また, NG1aのL0とNG2のL1はMRSVのいずれの条件においても難染色性であるが, NG1aのL1とNG2のL0はPN=51の条件 (MGG染色) においてのみ異調アズール好性 (赤紫色) を呈する。また, NG2のL0はPN=6-9および51以外では淡青色を示す (正調メチレンブルー好性)。一方, 本研究におけるスタウナギの単球の顆粒は成層構造を持たず, MRSVのいずれの染色条件

においても濃赤色または黒赤色となるエオシン好性であった。このことから, 単球の顆粒は好中球のそれとは異なると言える。

スタウナギの単球はzymosan粒子を活発に貪食したが (Fig. 1B), 前報¹⁾では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とした。これはzymosan粒子を貪食した単球には非常に少数の顆粒しか残存していないため, 脱顆粒を起こした好中球であると解釈したと考えられる。

単球の顆粒にはAIP, AcPおよびNBEが検出された。また, 顆粒はTB染色で異調染色性を示した。好中球には通常, NBEがNG1aのL0に検出されるが, AIPとAcPは認められず, 顆粒はTB染色に陰性である¹⁾。各種寄生虫に感染したスタウナギでは, 好中球にAcP, Glu, CAEが認められるが (寄生虫の種類によって陽性となる酵素と陽性部位は様々である), AIPは陰性である³⁾。また, NG2のL0がTB染色に陽性となるが, その色調は正調染色性の淡青色である (文献1のtable 5参照)。さらに, 好中球以外の血球にもAIPおよびTB染色による異調染色性は認められなかった (未発表)。これらのことから, AIPおよびTB染色による異調染色性は単球に特有の細胞化学的特徴と考えられる。

ヒトの血液中の単球には赤味の強い赤紫を呈するアズール顆粒が存在する⁴⁾。この色調はアズールBを主体とするメチレンアズールによって異調染色性を示した結果と考えられるが, 本研究における単球の顆粒はメチレンアズールを含まないMay-Grünwald染色においても, メチレンアズールを含むGiemsa染色やMGG染色と同様の色調であった (濃赤色または黒赤色)。このことから, スタウナギの単球はアズール好性ではないこととなる。しかし, 単球顆粒はTBによって異調染色性を示した。したがって, メチレンアズール単独で染色した場合には顆粒が赤紫色を呈する可能性はある。この点については今後の研究で明らかにしたい。

スタウナギ類の血液中には単球が認められないとする報告がある^{5,9)}。一方, 単球もしくは単球と考えられる白血球を観察したとする報告もある^{10,22)}。

Jordan & Speidel¹⁰⁾は*Myxine glutinosa*の血液中に2種類の顆粒球 (好中球と好酸球) 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。単球については単にfig. 16は典型的な単球であるとしか記されていない (単球の図からは細胞内顆粒は読み取れない)。前報¹⁾においてこれら3種類の血球はいずれも好中球であり, 好中球顆

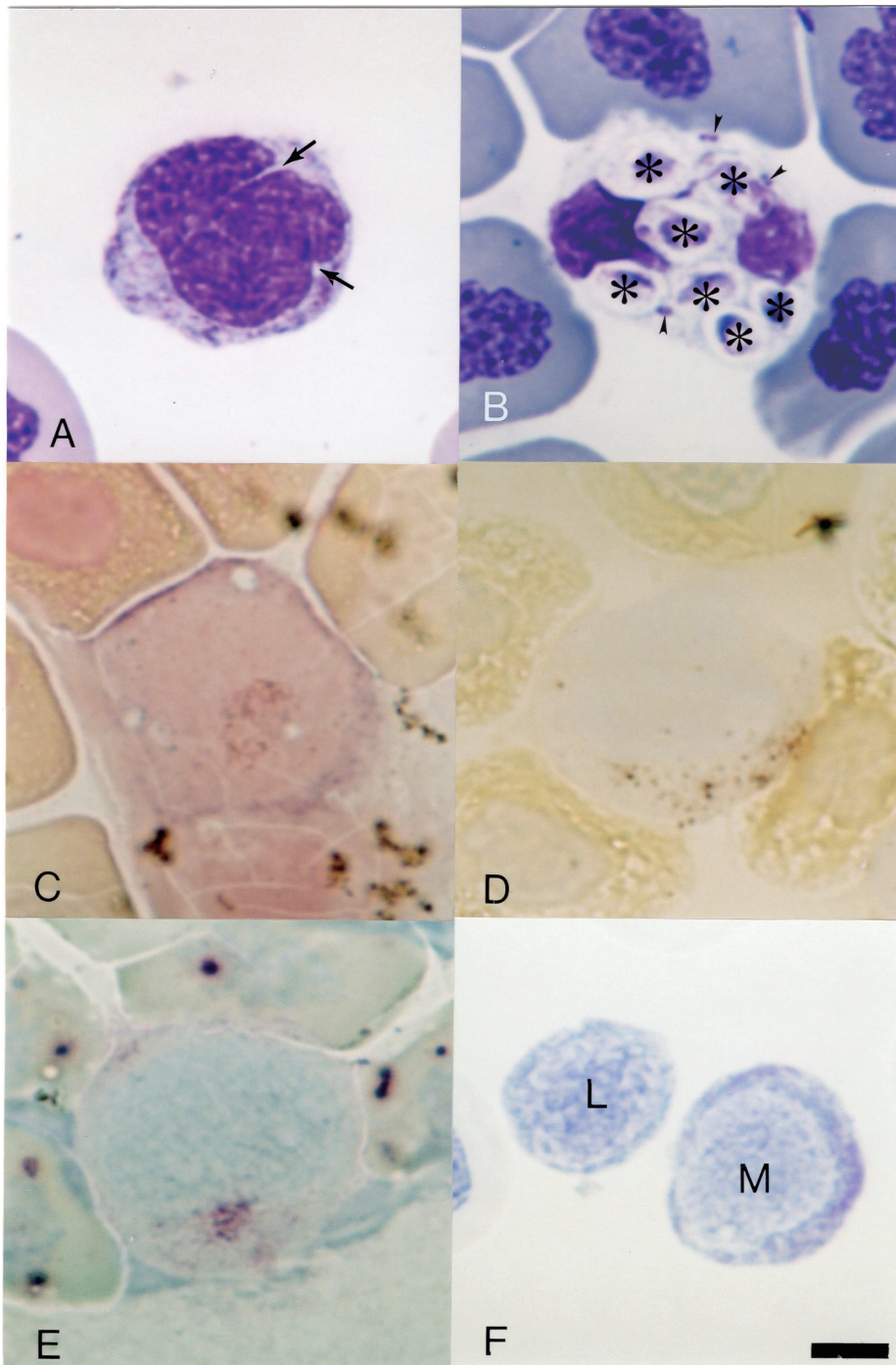


Fig. 1. Monocytes from inshore hagfish blood. (A), May-Grünwald-Giemsa (MGG) stain [PN=51. See table 1 in Kondo & Yasumoto (2023)¹]. Arrows indicate notches; (B), phagocytosis of zymosan particles (*) by monocyte [MGG stain (PN=51)]. Note red or blackish red granules (eosinophilic granules) in (A) & (B; arrowheads). (C), alkaline phosphatase; (D), acid phosphatase; (E), α -naphthyl butyrate esterase; (F), toluidine blue [Note metachromatic granules (reddish purple). M, monocyte; L, lymphocyte]. Positive granules in (C)-(F) are eosinophilic granules in A. Bar (5 μ m) in (F) is adapted to other figures [(A)-(E)] in Fig. 1.

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Jordan & Speidel¹⁰⁾は3種類の血球を分類したと推察した。Goodら¹¹⁾は*M. glutinosa* 血液のWright-Giemsa染色標本上に、哺乳類の単球に似た血球を観察し、round cellと呼んだ。しかし、この血球の形態学的特徴は明記されておらず、図 (fig. 4; 白黒写真) から、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¹⁾。Lama¹²⁾はMGG染色を施した*E. polytrema*血液塗抹標本に2種類の顆粒球とともに単球を観察しているが、前報¹⁾においてこの単球も‘染色むら’が生じた好中球であると推察した。Hineら¹³⁾は*E. cirrhatus*の血液中に単球様の細胞を観察し、様々な大きさのAcP陽性顆粒があるとしている。しかし、形態学的特徴についての記載がなく図もない。

Fänge & Gidholm¹⁴⁾は*M. glutinosa*の血液中または腹腔内にカーミン粒子、酵母あるいは水溶性の色素を注射し、血液中の好中球はこれら異物を活発に貪食するが、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。非顆粒性血球の一般染色像については記述がない(図もない)。

Mattisson & Fänge¹⁵⁾には各種血球のMGG染色像があるが、ここに単球はない。また、Fänge & Gidholm¹⁴⁾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p219にあるが、細胞内の構造については触れておらず、単に貪食性の封入体を有する大型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。

Linthicum¹⁶⁾は*E. stouti*の単球とされる血球の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像を示した (figs. 4-6)。この細胞については前報¹⁾において未熟な好中球であると推察した。図 (figs. 4-6) 中の核は偏在し、細胞質が広い(核細胞質比率が低い)。このことからLinthicumの単球は本稿における単球ではなく、好中球であると考えられる。

勝沼、清野および中院は同時期に共同でヌタウナギ類の血液学に関する研究を行っており、彼らが使用したヌタウナギ類はヌタウナギ*Eptatretus burgei*であると推察されている¹⁾。

勝沼¹⁷⁾はヌタウナギ血液中に単球(組織球と記述)に似た細胞を認めているが、形態学的特徴に関する記述がなく図もない。また、Kiyono¹⁸⁾およびKiyono & Nakanoin¹⁹⁾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、この血球を血液組織球と呼んだ。生体染色像が示されているが (figs. 12-14; fig. 14は組織球か疑わしい細胞とされている)¹⁹⁾、本細胞の一般染色性については記されておらず図もない。生体染色像では核は中央 (fig. 14) または偏在している (figs. 12 & 13)。Kiyono & Nakanoin¹⁹⁾の血液組織球に関する記載は、清野の著書²⁰⁾において詳細に記述され、Kiyono & Nakanoin¹⁹⁾と同様な図も掲載されている(第8図版のfigs. 24-26; fig. 26は組織球に属するのかわ不明な生体染色陽性細胞)。清野²⁰⁾は、明らかな組織球について‘卵円形・腎臓形核が細胞体の一侧に偏在せり。細胞核は淡染性にして核可染質網太く核仁不明瞭なり。原形質は弱塩基性にして内に

Table 1. Summary of reactions of monocytes from the blood of inshore hagfish to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number, and positive site)*
Alkaline phosphatase	G (round or oval, some, eq MoG)
Acid phosphatase	G (round or oval, some, eq MoG)
β-Glucuronidase	—
α-Naphthyl acetate esterase	—
α-Naphthyl butyrate esterase	G (round or oval, some, eq MoG)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	—
Peroxidase	—
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	—
PAS after digestion with α-amylase	—
Toluidine blue in distilled water	G [metachromatic (reddish purple), round or oval, some, eq MoG]; N (orthochromatic)
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Sudan black B	—
Sudan III	—
Oil red O	—

*G, granular; MoG, monocyte granule; N, nucleus; —, not detected; eq, equivalent to.

円形大小異なる色素顆粒を有せり。「アズール」顆粒を欠けり」と記した (p192)。この記述からKiyono & Nakanoin¹⁹⁾はおそらくGiemsa染色などを施した標本も観察したと考えられる (アズール顆粒の有無を調べるには当然メチレンアズールを含む染色を行う必要がある)。清野²⁰⁾の記述中の“色素顆粒”とは、生体染色によって色素を取り込んだ食胞であり、細胞が本来有する顆粒ではない。清野の明らかな組織球は核が偏在し、核内の濃縮クロマチンが粗大であること、図では核細胞質比率が低いことから顆粒の染色性が悪い好中球であると推察される。清野²⁰⁾は組織球に属するのか不明な生体染色陽性細胞についても記述している (p192): “細胞体の大きさは組織球と略相等しきか又は之よりも僅かに小形なれど細胞核は円形にして、比較的小さく、細胞体の中心部に位置し、「クロマチン」に富み核仁は不明瞭なり。原形質は弱塩基性にして少数の「アズール」顆粒を有す”。この細胞は本稿の単球とは核の大きさ (核細胞質比率) が異なるが、細胞内における核の位置や核の形は類似する。また、顆粒を少数有する点も類似する。清野²⁰⁾は顆粒を「アズール」顆粒としたが、本研究では顆粒の色調は、アズール好性ではなく、エオシンによる色調であることを明らかにした。清野は顆粒の色調をアズール好性と判断したと推察される。したがって、Kiyono & Nakanoin¹⁹⁾と清野²⁰⁾の“組織球か疑わしい (生体染色陽性) 細胞”は単球であると言える。清野の著書²⁰⁾は1929年に第2版が出版され²¹⁾、p160に上記の記述がある*1。

Tanakaら²²⁾はヌタウナギの腸 (造血組織) 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、結果に血球のMGG染色性に関する記述がなく図もない。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ようになっており、ある種の白血球はAIPに弱陽性であるとしている。また、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。しかしMGG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。本研究の単球との比較は困難であるが、単球にはAIPとAcPが認められたことから、

Tanakaら²²⁾のAIP陽性白血球とAcP陽性のマクロファージ様細胞は本研究の単球に相当すると思われる。

友永⁸⁾およびTomonagaら⁹⁾はWright染色したヌタウナギ血液標本に単球は観察されないとしている。しかし、血液中に“広い好塩基性の細胞質内にアズールに染色される顆粒を認める前骨髄球”を同定している⁸⁾。この細胞は図 (fig. 16; 白黒写真) からは顆粒の色調は読み取れないが、類円形で細胞質は広くなく (友永⁸⁾は広いと表現しているが)、大きな核を有している。友永⁸⁾の“前骨髄球”は本研究における単球に相当し、顆粒の色調を友永⁸⁾はアズールによるものと考えたと推察される。のちに友永はガラス片に付着した血球が大型化して皺状の細胞質突起を多数有するマクロファージ様細胞に分化したとし、付着した血球は単球であると考えて著書に記した²³⁾。著書では単球から分化したとされるマクロファージと (図8)*2、ラットの赤血球を貪食しているマクロファージ (図9) の走査型電子顕微鏡像が示されている。しかし、光学顕微鏡観察やTEM観察の結果については記述されていない。

ヌタウナギの肝臓の類洞壁と体腔にはマクロファージが存在することが知られており²⁵⁻²⁷⁾、前者は哺乳類のKupffer細胞に相当すると考えられている^{25),*3,*4)}。哺乳類では単球は炎症部位に出現してマクロファージ (滲出マクロファージ) に分化し、正常無刺激状態の組織に存在するマクロファージ (組織マクロファージ) とは異なるとされている²⁹⁾。本研究における単球と、単球から分化したとされるマクロファージ²³⁾の構造と細胞化学的特徴を肝臓や体腔のマクロファージと比較することで、原始的脊椎動物であるヌタウナギにおいても滲出マクロファージと組織マクロファージが異なる系統の細胞であるのかが明らかになると考えられる。

文 献

- 1) 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 (2023)*5 [Kondo M, Yasumoto S: Eosin stainability and

*1 第2版では価格を抑えるために初版に掲載された図版のいくつかが省略されている (初版の第8図版も第2版にはない)。

*2 古田ら²⁴⁾がヌタウナギの腹腔マクロファージとして掲載している写真 (p46の図A4-24a) は、友永博士から提供された単球から分化したと考えられるマクロファージ (文献23の図8) である。

*3 スタウナギの肝臓のマクロファージについては清野^{20,21)}も観察している (p19320, p16121); 図はない)。これに関連した記述がKiyono¹⁹⁾およびKiyono & Nakanoin¹⁹⁾にもあるが、これらでは全ての脊椎動物において肝臓に組織球性内皮が存在するとされ、これにヌタウナギが含まれるのかは不明瞭である。

*4 Hirano²⁸⁾はTomonagaら²⁵⁾を引用して腎臓にマクロファージが存在すると記述しているが (p879)、これは肝臓の間違いである。

- phagocytosis in inshore hagfish neutrophils. *Journal of National Fisheries University*, **71**, 89-108 (2023)*⁵ (in Japanese with English abstract]
- 2) 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)]
 - 3) 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 (2020) [Kondo M, Yasumoto S: Neutrophil granules of the inshore hagfish *Eptatretus burgeri* infested with parasites. *Journal of National Fisheries University*, **68**, 83-91 (2020) (in Japanese with English abstract)]
 - 4) 三輪史朗, 渡辺陽之輔 (共著): 血液細胞アトラス (第5版), 文光堂, 東京, 466pp (2004) [Miwa S, Watanabe Y (co-author): Atlas of Blood Cells (5th edition), Bunkodo, Tokyo, 466pp (2004) (in Japanese)]
 - 5) 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)]
 - 6) Holmgren N: On the pronephros and the blood in *Myxine glutinosa*. *Acta Zoologica (Stockholm)*, **31**, 233-348 (1950)
 - 7) 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)]
 - 8) 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 (1973) [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 (1973) (in Japanese with English abstract)]
 - 9) Tomonaga S, Shinohara H, Awaya K: Fine structure of the peripheral blood cells of the hagfish. *Zoological Magazine*, **82**, 211-214 (1973)
 - 10) Jordan HE, Speidel CC: Blood formation in cyclostomes. *The American Journal of Anatomy*, **46**, 355-391 (1930)
 - 11) 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)
 - 12) 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)
 - 13) 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)
 - 14) Fänge R, Gidholm L: A macrophage system in *Myxine glutinosa* L. *Naturwissenschaften*, **55**, 44 (1968)
 - 15) 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)
 - 16) Linthicum DS: Ultrastructure of Hagfish Blood Leucocytes. In: Hildemann WH, Benedict AA (eds) *Immunologic Phylogeny*, Plenum Press, New York, 241-250 (1975)
 - 17) 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.

*⁵ この論文は2022年に発行されたことになっているが [表紙 (p89) に記載], これは誤りであり, 正しくは2023年である。

- On the leukocytes of blood and tissue.), *Transactiones Societatis Pathologicae Japonicae*, **8**, 9-40 + 2 tables (1 & 2) (1919) (in Japanese)]
- 18) 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)
- 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) 清野謙次: 生體染色研究ノ現況及其検査術式: 特ニ生體色素攝取及組織球性細胞説, 南江堂, 東京, 828pp + 表2枚 (1 & 2) + 図版26枚 (1-26) (1921) [No author name and book title in a foreign language (Kiyono K: Current Status of Vital Staining Research and Its Testing Methods: Especially the Vital Dye Uptake and Histiocytic Cell Theory), Nankodo, Tokyo, 828pp + 2 tables (1 & 2) + 26 plates (1-26) (1921)²⁰⁾ (in Japanese)]
- 21) 清野謙次: 生體染色之研究 (第2版), 南江堂, 東京, 671pp + 表2枚 (1 & 2) + 図版10枚 (4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 22-24) (1929) [No author name and book title in a foreign language (Kiyono K: Research on Vital Staining, 2nd edition), Nankodo, Tokyo, 671pp + 2 tables (1 & 2) + 10 plates (4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 22-24) (1929) (in Japanese. This book is the 2nd edition of Kiyono (1921)²⁰⁾]
- 22) Tanaka Y, Saito Y, Gotoh H: Vascular architecture and intestinal hematopoietic nests of two cyclostomes, *Eptatretus burger* and ammocoetes of *Entosphenus reissneri*: A comparative morphological study. *Journal of Morphology*, **170**, 71-93 (1981)
- 23) 藤井玲子, 劉 存仁, 友永 進: 円口類の生体防御を担う血液細胞. *In*: 和合治久 (編) 動物の血液細胞と生体防御, 菜根出版, 東京, 143-156 (1997) [No author name and title in a foreign language (Fujii R, Liu C, Tomonaga S: Blood Cells that Play a Role in the Host Defense of Cyclostomes). *In*: Wago H (ed & author) Animal Blood Cells and Host Defense, Saikon-shuppan, Tokyo, 143-156 (1997) (in Japanese)]
- 24) 古田恵美子, 中村弘明, 山口恵一郎: マクロファージの系統発生. *In*: 高橋 潔, 内藤 眞, 竹屋元裕 (編) 生命を支えるマクロファージ, 文光堂, 東京, 32-53 (2001) [No author name, title and book name in a foreign language (Furuta E, Nakamura H, Yamaguchi K: Phylogeny of Macrophages. *In*: Takahashi K, Naito M, Takeya M (ed) Macrophages that Support Life, Bunkodo, Tokyo, 32-53 (2001) (in Japanese)]
- 25) Tomonaga S, Yamaguchi K, Ihara K, Awaya K: Mononuclear phagocytic cells (Kupffer cells) in hagfish liver sinusoids. *Zoological Science*, **3**, 613-620 (1986)
- 26) Fujii T, Kunisada S, Tomonaga S, Fujii R, Nakamura T, Sugawara Y, Nakamura K, Kusano T, Sekizawa A: Characterization of the effects of opsonins in normal hagfish serum on the ingestion of rabbit erythrocytes by hagfish macrophages. *Zoological Science*, **14**, 263-270 (1997)
- 27) Arata K, Yamaguchi T, Takamune K, Yasumoto S, Kondo M, Kato S, Yoshikuni, Ohno K, Kato-Unoki Y, Okada G, Fujii T: Pattern recognition receptors involved in the immune system of hagfish (*Eptatretus burgeri*). *Developmental and Comparative Immunology*, **151**, 105065 (2024)
- 28) Hirano M: Evolution of vertebrate adaptive immunity: Immune cells and tissues, and AID/APOBEC cytidine deaminases. *Bioessays*, **37**, 877-887 (2015)
- 29) 内藤 眞: マクロファージの分布と形態. *In*: 高橋 潔, 内藤 眞, 竹屋元裕 (編) 生命を支えるマクロファージ, 文光堂, 東京, 13-31 (2001) [No author name, title and book name in a foreign language (Naito M: Distribution and Morphology of Macrophages. *In*: Takahashi K, Naito M, Takeya M (ed) Macrophages that Support Life, Bunkodo, Tokyo, 13-31 (2001) (in Japanese)]