

ニシアフリカハイギョの好中球顆粒の 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 neutrophil granules from West African lungfish *Protopterus annectens*

Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract: Neutrophil granules (NG) of West African lungfish *Protopterus annectens* were classified into two types of stratified [two-layer; inner layer (L0) and outer layer (L1)] granules (type A, NG-A; type B, NG-B). The L1 of NG-A and both layers of NG-B were chromophobic, and L0 of NG-A showed polychromatophilic [eosinophilic or basophilic (orthomethylenophilic or metaazurophilic)]. The L0 of NG-A showed metachromatic (reddish purple) with toluidine blue. On the other hand, L0 of NG-B were positive for acid phosphatase, α -naphthyl acetate esterase, α -naphthyl butyrate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase. Both types of granules were negative in periodic acid Schiff reaction, alcian blue, Sudan black B, Sudan III, and oil red O. Alkaline phosphatase, β -glucuronidase, and peroxidase were not detected in either granule.

Key words: lungfish, *Protopterus annectens*, neutrophil, morphology, cytochemistry

緒 言

著者らは以前、ニシアフリカハイギョ *Protopterus annectens* (肉鰭綱肺魚亜綱) の血液中に存在する好中球の形態学および細胞化学的特徴を報告した¹⁾。この報告後、板鰓類(軟骨魚類; 文献2参照) や円口類(スタウナギ類, ヤツメウナギ類)³⁻⁶⁾の好中球を調べたところ、好中球顆粒は成層構造を有していることが判明した。また、真骨魚類のマダイ *Pagrus major*においても好中球に成層顆粒が認められたことから⁷⁾、ニシアフリカハイギョの好中球顆粒の構造を再検討する必要があると考えた。

前報ではニシアフリカハイギョの好中球は1種類の顆粒を有し、Giemsa染色などの一般染色において染色条件を変えることで、酸性色素または塩基性色素に染まり、後者の場合、色素と同じ色調(正調)または異なる色調(異調)に染色されることを報告した¹⁾。すなわち、ニシアフリカ

ハイギョの好中球顆粒はエオシン好性、正調メチレンブルー好性または異調アズール好性を示すとした¹⁾。また、この顆粒はperiodic acid Schiff (PAS) 反応に陽性であり、その陽性反応はアミラーゼ消化で変化しないと、トルイジンブルー (TB) 染色によって異調染色性を示すと報告した¹⁾。さらに顆粒には酸性フォスファターゼ (AcP), α -ナフチルアセテートエステラーゼ (NAE), α -ナフチルブチレートエステラーゼ (NBE) 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) が検出されると述べた¹⁾。しかし、本研究において詳細な観察、特に崩壊した好中球の観察結果から、ニシアフリカハイギョには2種類の顆粒が存在し、前報¹⁾において顆粒と考えた構造は、ある顆粒の芯様構造であることが明らかとなった。また、前報¹⁾で示した細胞化学的特徴にも訂正が必要となったのでここに報告する。

2023年11月29日受付, 2024年2月16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

材料および方法

前報¹⁾で作製した多条件下Romanowsky型染色評価法用の染色標本ならびに各種細胞化学染色標本を光学顕微鏡で再度観察した。多条件下Romanowsky型染色評価法(Multiple Romanowsky-type Stain Valuation, MRSV; Table 1)とは種々の条件でMay-Grünwald (MG), Giemsa およびMG・Giemsa (MGG) 染色を施して被染色物の染色性を総合評価する方法である。

結果および考察

ニシアフリカハイギョの好中球は大型類円形であり, 細胞質には2種類の好中球顆粒neutrophil granules (NG; NG-AとNG-B)が観察された(Figs. 1A & 1B)。これら顆粒の名称(NG-AとNG-B)は後述する板鰓類のNGとの類似性に基づいて命名した。両顆粒とも2層からなる成層構造を有していた(Figs. 1 & 2)。NG-Aの内層(L0)はMRSVの各種染色条件によって難染色性chromophobic, 淡橙色(エオシン好性eosinophilic), 淡青色(塩基好性; 正調メチレンプ

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.

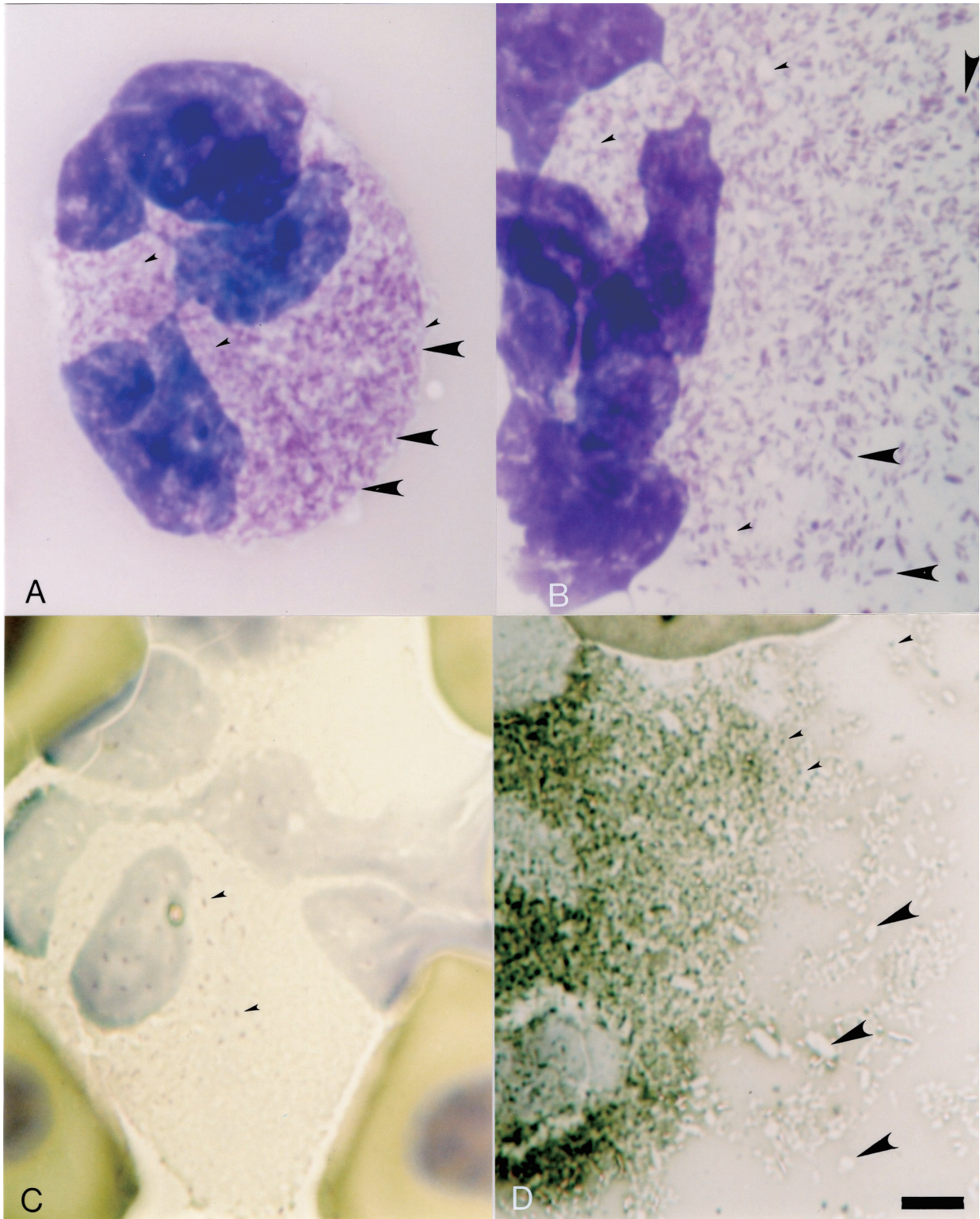


Fig. 1. Neutrophils from West African lungfish. A & B, May-Grünwald-Giemsa (PN=46; See Table 1. A, intact cell; B, lysed cell); C, acid phosphatase (intact cell); D, α -naphthyl acetate esterase (lysed cell). Note two types of granules, type A (NG-A; large arrowheads) and type B (NG-B; small arrowheads). Positive reaction in C & D: LO of NG-B. Bar in D (5 μ m) is adapted to other figures (A-C) in Fig. 1.

ルー好性orthomethylenophilic) または赤紫色 (塩基好性; 異調アズール好性metaazurophilic) を示した (Figs. 1A & 1B; Table 2)。NG-Aの外層 (L1) はMRSVのいずれの染色条件においても難染色性であった。NG-Bも2層構造を有していることが後述する細胞化学染色によって明らかとなったが, MRSVの各種染色条件ではL0とL1の両方が難染色

性であった (Figs. 1 & 2)。NG-Aは円形, 卵円形あるいは桿形であり, L0も同様の形状であった。一方, NG-Bは円形, 卵円形あるいは短桿形であり, NG-Aと同様にL0も同形であった。

細胞化学染色の結果, AcP, NAE, NBEおよびCAEはいずれもNG-BのL0に検出され, NG-Aでは陰性であった

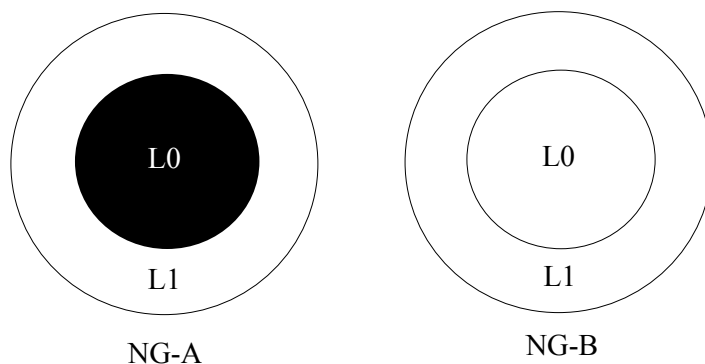


Fig. 2. Structure of neutrophil granules (NG) from West African lungfish. NG-A, type A; NG-B, type B; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer). □, chromophobic; ■, chromatophilic (See Table 2).

Table 2. Summary of multiple Romanowsky-type stain characteristics of inner layer (L0) of neutrophil granules type A from West African lungfish [modified from Kondo & Takahashi¹⁾]

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

^{*1}PN, preparation number (See Table 1).

^{*2}B, blue (orthomethylenophilic); O, orange (eosinophilic); C, colorless (chromophobic); P, purple (metaazurophilic).

WE(Figs. 1C & 1D; Table 3)。AcP陽性のNG-Bは他の酵素染色陽性のNG-Bよりも少なかった。両顆粒はPAS反応に陰性であり、顆粒間の細胞質基質が陽性であった。この陽性部位はアミラーゼ消化後のPAS反応では陰性となり、ニシアフリカハイギョ好中球のPAS陽性物質は細胞質に散在するグリコーゲン粒子であると考えられた。前報¹⁾では顆粒(本研究におけるNG-AのL0に相当する)がPAS陽性であり、アミラーゼで消化されないと記述していた。これは顆粒間の陽性反応を顆粒であると見間違えたものである。また、PAS陽性顆粒がアミラーゼ耐性とした原因は、アミラーゼを添加していない緩衝液に浸漬した標本(アミラーゼ消化標本の対照)の観察結果を誤ってアミラーゼ消化標本のそれと誤認したことによると考えられる。本研究では、アミラーゼ消化処理した標本であることを確認して観察し直した。好中球にはTB染色によって赤紫色(異調染色性)を呈する粒子が観察された。これを前報¹⁾では顆粒であると考えたが、本研究においてこの陽性粒子はEG-AのL0であることが明らかとなった(Table 3)。

板鰓類の好中球にも2種類の成層顆粒があり、NG-AおよびNG-Bと表記した²⁾。板鰓類のNG-Aはニシアフリカハイギョのそれとは異なり3層構造(内層のL0、中層のL1および外層のL2からなる)を示す。また、各層の染色性は魚種によって異なり、トビエイ目アカエイ科のアカエイ *Hemirygion akajei*^{*1}とツノザメ上目カスザメ目カスザメ科

のカスザメ *Squatina japonica*ではともにL0とL1はエオシン好性であるが、L2はアカエイでは難染色性であるのに対してカスザメでは正調メチレンブルー好性である。一方、ネズミザメ上目メジロザメ目ドチザメ科のドチザメ *Triakis scyllium*、ホシザメ *Mustelus manazo*およびシロザメ *M. griseus*ではL0とL2が難染色性であり、L1はエオシン好性を示す²⁾。しかし、これら板鰓類のNG-Aはニシアフリカハイギョで見られた異調アズール好性を示さない。ニシアフリカハイギョと同様に各種酵素は一般に板鰓類のNG-Aに検出されず(カスザメのNG-AにはL0とL1にCAE陽性反応が認められ、ドチザメ科3種ではNG-AのL2にNAEが検出される)、酵素反応の多くはいずれの板鰓類においても2層構造(L0とL1はともに難染色性である)を有するNG-BのL0に局在する(例外としてアカエイのNBEはNG-BのL1に、カスザメのAcPはNG-BのL0とL1に検出される)。ニシアフリカハイギョにおいても各種酵素はNG-BのL0に認められた。以上の比較から、ニシアフリカハイギョと板鰓類の好中球顆粒は類似していると考えた。しかし、ニシアフリカハイギョ好中球のNG-AのL0における異調アズール好性は板鰓類には認められない。このことから、軟骨魚類と硬骨魚類(肉鰭綱のハイギョ類は硬骨魚類である)の共通祖先では、好中球顆粒は異調アズール好性を示し、軟骨魚類ではその形質を失ったと推察される。この推察は、原始的脊椎動物である円口類との比較からも支持される。円口類のスタウナ

Table 3. Summary of reactions of neutrophils from West African lungfish to cytochemical tests (revised form Kondo & Takahashi¹⁾)

Test	Positive site (shape, number, and positive site)*
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase	G (round, oval or short rod, many, some, eq L0 of NG-B)
β-Glucuronidase	—
α-Naphthyl acetate esterase	G (round, oval or short rod, many, eq L0 and of NG-B)
α-Naphthyl butyrate esterase	G (round, oval or short rod, many, eq L0 of NG-B)
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	G (round, oval or short rod, many, eq L0 of NG-B)
Peroxidase	—
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	H
PAS after digestion with α-amylase	—
Toluidine blue in distilled water	G [metachromatic (purple), round, oval or rod, some, eq L0 of NG-A]; N (orthochromatic)
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Sudan black B	—
Sudan III	—
Oil red O	—

*G, granular; NG-A, neutrophil granule (NG) type A; NG-B, NG type B; L0, inner layer; L1, outer layer; H, hyaloplasm; N, nucleus; —, not detected; eq, equivalent to.

*1 文献2ではアカエイの学名を *Dasyatis akajei* と記したが、これは *Hemirygion akajei* のシノニムである。

ギ類とヤツメウナギ類の好中球顆粒は異調アズール好性を示す^{3,6)}。円口類においても好中球顆粒は2種類あり (NG1とNG2), とともに2層からなる成層構造を有するが, スタウナギ *Eptatretus burgeri* と³⁾, スナヤツメ *Lethenteron reissneri* では2種類の好中球顆粒のどちらにも異調アズール好性層がある (NG1のL1とNG2のL0)^{5,6)}。ただし例外もあり, カワヤツメ *L. camtschaticum* とシベリアヤツメ *L. kessleri* の成魚ではNG1の2層はともに難染色性である⁴⁾。これらの知見から, 円口類では異調アズール好性を示す顆粒に様々な因子が異なる時期に付加されることで異調アズール好性部位の異なる2種類の顆粒が形成されるが (基本型), カワヤツメとシベリアヤツメでは異調アズール好性を示す顆粒が形成される前に他のNG1の構成成分を含む小胞が融合することで異調アズール好性部位を持たないNG1が形成されたと考えられる (スナヤツメ, カワヤツメおよびシベリアヤツメのNG1にはともにアルカリ性フォスファターゼが認められる)。また, ヤツメウナギ類のNG2のL0には各種リソゾーム酵素が検出されていることから^{4,6)}, ニシアフリカハイギョや板鰓類のNG-Bとの関連が示唆される。すなわち, ニシアフリカハイギョや板鰓類のNG-Bとは, ヤツメウナギ類において異調アズール好性顆粒の形成前に, 異調アズール好性成分を除く他のNG2構成成分を含む小胞が融合することで形成された顆粒 (異調アズール好性部位を持たない) であると考えられる。

脊椎動物は頭索動物と尾索動物とともに脊索動物門を形成する。円口類の好中球に類似した顆粒球が頭索動物のナメクジウオ類にも存在し, 細胞内顆粒は円口類と同様にL1が異調アズール好性のNG1と, L0が異調アズール好性のNG2である⁸⁾。また, 異調アズール好性の顆粒を有する血球は半索動物のギボシムシ類や^{9,10)}, 棘皮動物のウニ類およびナマコ類にも認められている¹¹⁾。これらのことから, 異調アズール好性顆粒を有する好中球 (好中球様の細胞) の起源は少なくとも後口動物の祖先種にまで遡ると考えられる。

ニシアフリカハイギョが属する肉鰭綱には両性類, ハ虫類および哺乳類からなる四肢動物亜綱が含まれる。両生類においても血液中の好中球に異調アズール好性を示す顆粒が知られている^{12,13)}。また, ハ虫類では一般に造血組織と血液中の好中球に異調アズール好性顆粒は認められていないが¹²⁾, 例外も報告されている¹⁴⁾。哺乳類の好中球にも異調アズール好性を示す顆粒 (アズール顆粒) が存在するが, 本顆粒の異調アズール好性は顆粒の成熟とともに失われ,

十分に成熟した好中球 (血液中に遊出した好中球) ではアズール顆粒は異調アズール好性を示さない¹²⁾。哺乳類におけるアズール顆粒の異調アズール好性成分は硫酸基を有するグリコサミノグリカンであると考えられており, 硫酸基にメチレンアズール (主成分はアズールB) が結合して異調染色性を示すと考えられている。この硫酸基がアズール顆粒に付加された塩基性タンパク質と結合することでメチレンアズールに対する結合が阻害されるとされている¹²⁾。本研究において, ニシアフリカハイギョの好中球顆粒はPAS陰性であり, 硫酸基を有するグリコサミノグリカン (以後, 単にグリコサミノグリカンと称す) を染色するアルシアンブルー染色にも陽性反応を示さなかった。同様の反応はスタウナギとヤツメウナギ類の好中球顆粒でも報告されている^{3,6)}。このことから, 円口類とニシアフリカハイギョの好中球顆粒に存在する異調アズール好性成分はグリコサミノグリカンではないと推察される。哺乳類におけるアズール顆粒の成熟過程は, グリコサミノグリカンの硫酸基と塩基性タンパク質の両方を透過型電子顕微鏡で検出し, その検出シグナルの変化から導出されたものであり, グリコサミノグリカンの硫酸基にメチレンアズールが結合する直接的な証明はない。仮にグリコサミノグリカンにメチレンアズールが結合して異調アズール好性を示すとしても, 円口類とニシアフリカハイギョの好中球顆粒のグリコサミノグリカンとは異なる異調アズール好性成分が哺乳類の好中球にないとは断言できない。この成分が塩基性タンパク質と結合してメチレンアズール好性を失えば, アズール顆粒の異調アズール好性は失われることとなる。

軟骨魚類の好中球は造血組織でも血液中でも一般に異調アズール好性の顆粒 (アズール顆粒) は認められない¹²⁾。一方, 硬骨魚類の条鰭類では, アズール顆粒の存否については様々である^{12,19)}。今後は真骨魚類を含む条鰭類におけるアズール顆粒の探索を行う予定である。

文 献

- 1) 近藤昌和, 高橋幸則: アフリカハイギョ *Protopterus annectens* 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, **58**, 207-216 (2010) [Kondo M, Takahashi Y: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from African lungfish, *Protopterus annectens*. *Journal of National Fisheries University*, **58**, 207-216 (2010) (in Japanese with English abstract)]

- 2) 近藤昌和, 立石航平, 平山尋暉, 安本信哉, 高橋幸則: ドチザメ科サメ類 (ドチザメ, ホシザメ, シロザメ) 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, **67**, 141-151 (2019) [Kondo M, Tateishi K, Hirayama H, Yasumoto S, Takahashi Y: Morphological and Cytochemical Characteristics of Neutrophils from Triakidae Sharks (Banded Houndshark *Triakis scyllium*, Starspotted Smooth-hound *Mustelus manazo* and Spotless Smooth-hound *M. griseus*). *Journal of National Fisheries University*, **67**, 141-151 (2019) (in Japanese with English abstract)]
- 3) 近藤昌和, 安本信哉: ヌ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)^{*2} [Kondo M, Yasumoto S: Eosin stainability and phagocytosis in inshore hagfish neutrophils. *Journal of National Fisheries University*, **71**, 89-108 (2023)^{*2} (in Japanese with English abstract)]
- 4) 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)]
- 5) 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)]
- 6) 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 (2023)^{*2} [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 (2023)^{*2} (in Japanese with English abstract)]
- 7) Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Two types of granules in neutrophils from red sea-bream *Pagrus major*. *Journal of National Fisheries University*, **64**, 269-271 (2016)
- 8) 近藤昌和, 安本信哉: ナメクジウオ類 (頭索類) の好中球の形態学の特徴に関する文献上の考察. 水産大学校研究報告, **71**, 123-134 (2023)^{*2} [Kondo M, Yasumoto S: Morphological characteristics of neutrophils in amphioxus (Cephalochordata) based on the literature review. *Journal of National Fisheries University*, **71**, 123-134 (2023)^{*2} (in Japanese with English abstract)]
- 9) 大植登志夫: 血液, 三笠書房, 東京, 264 pp (1944) [No author name and book name in a foreign language (Ohuye T: Blood), Mikasa Shobo, Tokyo, 264 pp (1944) (in Japanese)]
- 10) 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, volume 1 (Morphology)), Maruzen, Tokyo, 65-97 (1963) (in Japanese)]
- 11) 清野謙次, 中院孝圓: 無脊椎動物ノ血淋巴細胞ニ就キテ. 京都医学雑誌, **17**[(3), (4) & (8)], 295-315 (2) + 333-359 (3) + 付図3葉 (其1~其3) (8) (1920) [No author name, title and journal title in a foreign language (Kiyono K, Nakano T: On the hemolymph cells of invertebrates. *Kyoto Igaku Zasshi (=The Kyoto Medical Journal)*, **17**[(3), (4) & (8)], 295-315 (2) + 333-359 (3) + 3 plates (1-3) (8) (1920) (in Japanese)]
- 12) Rowley AF, Ratcliffe NA (ed): Vertebrate Blood Cells, Cambridge University Press, Cambridge etc., 444pp (1988)
- 13) 白井計一: 両棲類ノ血液ニ就テ. 日本微生物學會雑誌, **16**, 1173-1214 + 付図1枚 (1922) [No author name and title in a foreign language (Usui K: On the blood cells of amphibians). *Zeitschrift der Japanischen Mikrobiologische Gesellschaft*, **16**, 1173-1214 + 1 plate (1922) (in Japanese)]

^{*2} これらの論文 (3, 6, 8) はいずれも表紙では2022年に発行されたことになっているが, これは誤りであり, 正しくは2023年である。

- 14) 白井計一: 爬蟲類ノ血液ニ就テ. 日本微生物學會雜誌, **17**, 589-617 + 付図1枚 (1923) [No author name and title in a foreign language (Usui K: On the blood cells of reptiles). *Zeitschrift der Japanischen Mikrobiologische Gesellschaft*, **17**, 589-617 + 1 plate (1923) (in Japanese)]
- 15) Flerova EA, Balabanova LV: Ultrastructure of granulocytes of teleost fish (Salmoniformes, Cypriniformes, Perciformes). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **49**, 223-233 (2013)
- 16) Boomker J: The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of South African freshwater fish. III. The leucocytes, plasma cells and macrophages of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **48**, 185-193 (1981)
- 17) 鈴木 謙, 日比谷 京: コイの実験的炎症における白血球の動態. 魚病研究, **23**, 179-184 (1988) [Suzuki Y, Hibiya T: Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp. *Fish Pathology*, **23**, 179-184 (1988) (in Japanese with English abstract)]
- 18) Ueda IK, Egami MI, Sasso WS, Matushima ER: Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) – Part II. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **38**, 273-277 (2001)
- 19) Fijan N: Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *Journal of Fish Biology*, **60**, 999-1014 (2002)