

ヤツメウナギ類の単球の形態学および細胞化学的特徴: スタウナギ単球の同定に関する清野の文献の再評価

近藤昌和[†], 安本信哉

Morphological and cytochemical characteristics of monocytes from lampreys: Reevaluation of Kiyono's literature on the identification of hagfish monocytes

Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract : The monocytes of lampreys [*Lethenteron camtschaticum* (adult), *L. reissneri* (adult), *L. hattai* (adult, ammocoetes)] were round or oval, low nucleus/cytoplasm ratio, and have striated (two-layered) granules (MoG). The MoG consisted of a basophilic inner layer (L0) and a chromophobic outer layer (L1). The L0 were positive for acid phosphatase, α -naphthyl acetate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase and Sudan black B. Also, the L0 showed orthochromatic (blue) with toluidine blue. However, β -glucuronidase, α -naphthyl butyrate esterase and peroxidase were not detected in the monocytes, which were negative for periodic acid Schiff reaction, alcian blue, Sudan III, and oil red O. Kenji Kiyono reported the two types of monocytes (as blood histocytes), real and dubious monocytes, from the blood of hagfish *Eptatretus burgeri*. He observed both monocyte types in grown-up hagfish, but only real monocytes in undeveloped (details not stated) hagfish. His real monocytes in undeveloped hagfish were speculated as the monocytes of lamprey (mistaking the specimen), and the real monocytes in grown-up hagfish as poorly stained neutrophils. The dubious monocytes of Kiyono were considered as the real monocytes of hagfish.

Key words : lamprey, hagfish, monocytes, morphology, Kenji Kiyono

緒言

前報において著者らは、原始的脊椎動物である円口類のスタウナギ *Eptatretus burgeri* の血液中に、単球が存在することを報告した¹⁾。スタウナギの単球はエオジン好性顆粒を有しており、顆粒には成層構造は認められなかった。また、この顆粒にはアルカリ性フォスファターゼ (ALP)、酸性フォスファターゼ (AcP) および α -ナフチルブチレートエステラーゼ (NBE) が検出され、トルイジンブルー (TB) 染色によって顆粒は異調染色性を示した。単球の核細胞質比率 (細胞に占める核の割合) 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。この単球はzymosan粒子を貪食した。

我々の報告以前に、スタウナギに単球が存在するとの記載はKiyono (1918)²⁾, Kiyono & Nakano (1919)³⁾, 勝沼

(1919)⁴⁾, 清野 (1921, 1929)^{5,6)} およびTanakaら (1981)⁷⁾に認められるが、勝沼 (単球を組織球と表記している)⁴⁾とTanakaら (マクロファージと表記している)⁷⁾には形態学的特徴に関する記載がない。

清野謙次は大正から昭和初期にかけて活動した京都帝国大学の病理学者であり、各種生物を用いて生体染色研究を行い、組織球性細胞系統の存在を提唱した^{8,9)}。彼の研究成果はAschoffの網内系学説の基盤にもなっている^{8,9)}。清野は様々な生物を使用した、その中に円口類が含まれていたことは、現代ではほとんど知られていない。

Kiyono (1918)²⁾およびKiyono & Nakano (1919)³⁾には生体染色陽性の (リチウムカーミンを取り込んだ) スタウナギ単球 (血液組織球 Bluthistiozytenと呼んでいる) が記述されている。また、Kiyono & Nakano (1919)³⁾には生体染色像が図示されているが [図版IIのfigs. 12-14; fig. 12 と

fig. 13は清野が明らかな単球と考えた細胞 (以後, 真単球と呼ぶ); fig. 14は単球か否か疑わしい細胞 (以後, 疑単球と呼ぶ)], これら細胞の一般染色性については記載されていない。Kiyono (1918)²⁾およびKiyono & Nakano (1919)³⁾の単球に関する記載は, 清野の著書^{5,6)}において詳細に記述され, Kiyono & Nakano (1919)³⁾と同様な図も掲載されている (第8図版のfigs. 24-26; fig. 26は疑単球)。また, 一般染色性についても記されているが, 図示されていない。なお, 清野 (1929)⁹⁾は清野 (1921)⁵⁾の2版であるが, スタウナギに関する記述には一切変更がないため (初版, p192-194; 2版, p160, 161), 以下では清野 (1921)⁵⁾を参考にする。なお, 初版の第8図版は2版には掲載されていない。

清野の疑単球は近藤・安本¹⁾の単球に相当すると考えられた。一方, 清野の真単球については, 卵円形や腎臓形の核が偏在し, 核内の濃縮クロマチンが粗大であること, 核細胞質比率が低いことから, 顆粒の染色性が悪いスタウナギの好中球であると推察した¹⁾。しかし, 清野 (1921)⁵⁾の記述を再度詳細に検討したところ, 清野がスタウナギの真単球とした血球の一部は, スタウナギの好中球ではなく, ヤツメウナギ類の単球である可能性が考えられた。

本研究では, 各種ヤツメウナギ類の単球の形態学および細胞化学的特徴を調べ, スタウナギの単球¹⁾と比較するとともに, 清野がスタウナギの単球と考えた血球の正体を推測した。

材料と方法

近藤ら (2021)¹⁰⁾および近藤・安本 (2022, 2023)^{11,12)}で作製した各種ヤツメウナギ類 [カワヤツメ *Lethenteron camtschaticum* の成魚¹⁰⁾, シベリアヤツメ *L. reissneri* (*L. kessleri* として) 成魚¹⁰⁾, ミナミスナヤツメ *L. hattai* (*L. reissneri* 南方型として) の幼生¹¹⁾と成魚¹²⁾] の血液の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, 近藤ら (2021)¹⁰⁾で作製したカワヤツメ血液の標本を使用した。

結果および考察

各種ヤツメウナギ類の血液中において単球は少数であった。各種条件でMay-Grünwald (MG), GiemsaおよびMG・Giemsa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 (文献10のtable 1参照) を各種ヤツメウナギ

類の単球に適応したところ, いずれの条件においてもヤツメウナギ類の単球には成層構造を有する顆粒 (単球顆粒 monocyte granules, MoG) が観察された (Fig. 1A)。顆粒は円形から卵円形であり, 微細な好塩基性 (青色) の内層 (L0) の周囲に難染色性chromophobicの外層 (L1) が観察された。したがって, 本顆粒における好染色性chromatophilic層はL0であった。

ヤツメウナギ類の単球は類円形であり, 核細胞質比率は小さかった。核は偏在し, 円形, 楕円形または腎臓 (ソラ豆) 形であり, 核の染色質網は粗かった。また, 細胞質にはリング状や紐状の好塩基性構造がしばしば観察された。この構造体は粗面小胞体の残渣であるデーレ小体Döhle bodyであると考えられた。単球はzymosan粒子を貪食した (Fig. 1B)。

ヤツメウナギ類の単球には, AcP, 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, これらの陽性部位はMoGのL0に相当すると考えられた (Fig. 1C; Table 1)。しかし, AIP, β -グルクロニダーゼ, NBE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) にも陰性であった。しかし, TB染色ではMoGのL0が青色となり, 正調染色性を示した (Fig. 1D; Table 1)。また, デーレ小体もTB染色で濃青色を呈した。各種脂質染色では, ズダン黒BによってMoGのL0が陽性であったが, ズダンIIIとオイル赤Oには陰性であった (Table 1)。

スタウナギの単球の顆粒には成層構造が認められず, エオジン好性であり, 本研究におけるヤツメウナギ類の単球とは異なる (Fig. 2)。また, 細胞化学的特徴にも違いがあり, スタウナギ単球で陽性のAIPとNBEはヤツメウナギ類では陰性であった。さらに, スタウナギの単球顆粒はTB染色によって異調染色性を示すのに対し, ヤツメウナギ類では顆粒の内層が正調染色性を示した (Fig. 2; Table 2)。

清野 (1921)⁵⁾におけるスタウナギの記述はp192中ほど (L12) からp194にかけてあり, 7つの段落で構成されている。清野の真単球に関する記述は最初の段落中にあり, 以下のように記されている: “脊椎動物ノ最下等二位セルめくらうなぎ (円口類) ノ所見ハ甚興味アリ。 (中略)。少数ナレドモ流動性血液中ニ組織球ヲ検出シ得可シ。組織球ノ形態ハ他種動物ニ於ケルト等シク定型性ニシテ卵円形・腎臓形核ガ細胞体ノ一側ニ偏在セリ。細胞核ハ淡染性ニシテ核可染質網太ク核仁不明瞭ナリ。原形質ハ弱塩基性ニシテ内

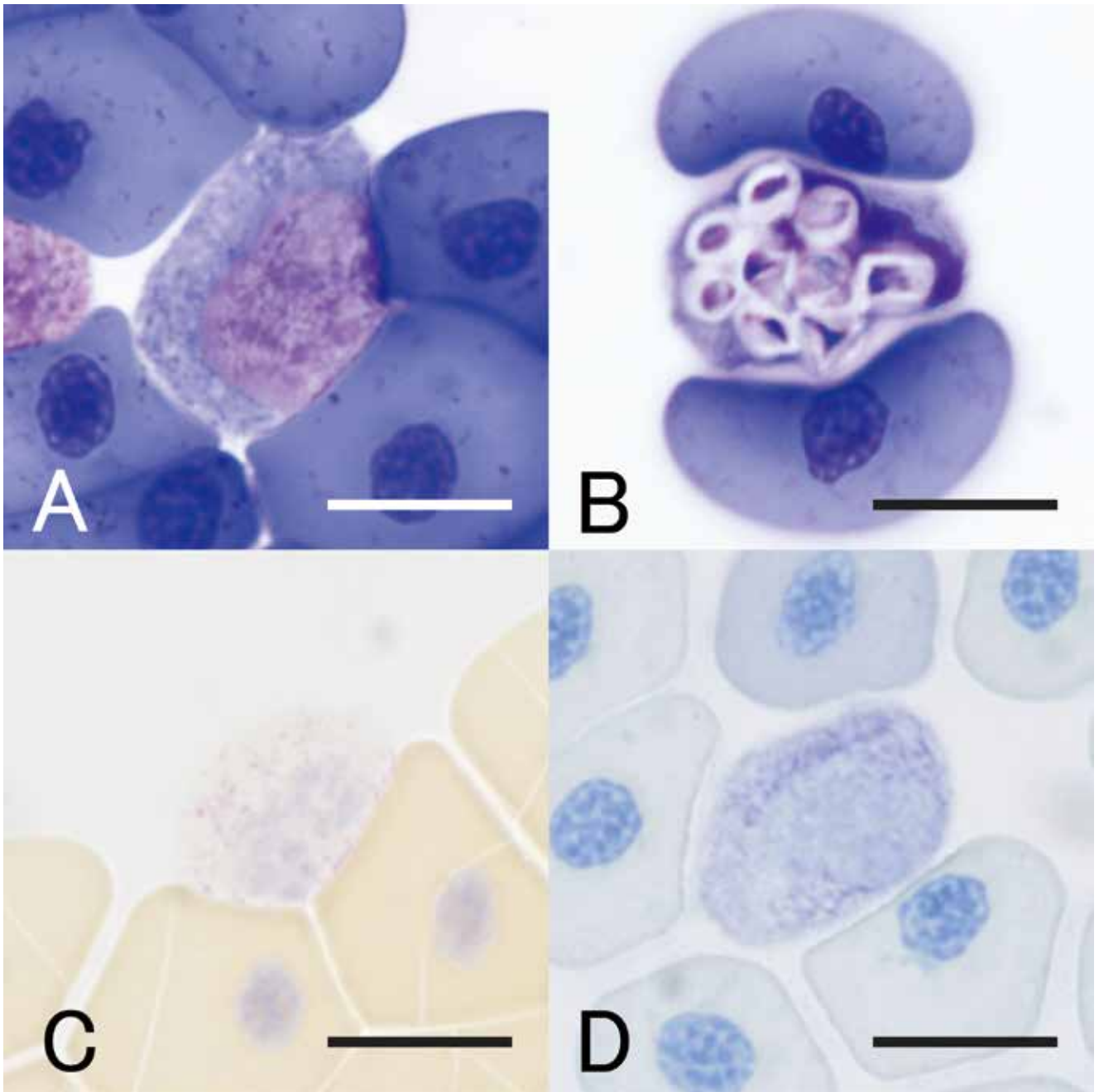


Fig. 1. Monocytes from lampreys, *Lethenteron camtschaticum*. (A), May-Grünwald-Giemsa (MGG) stain [PN=60. See table 1 in Kondo et al. (2021)¹⁰]; (B), phagocytosis of zymosan particles by monocyte [MGG stain (PN=60)]; (C), acid phosphatase; (D), toluidine blue. Bars = 10 μ m.

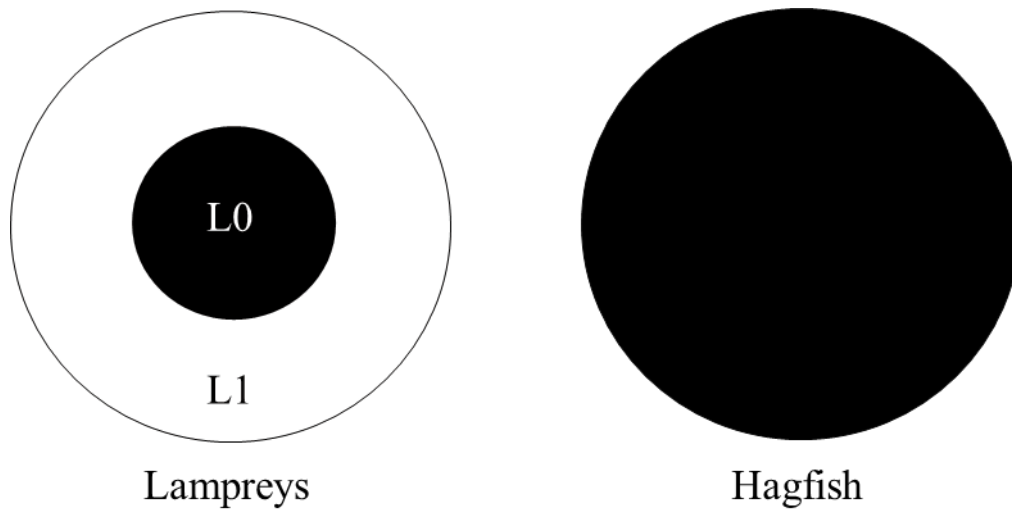


Fig. 2. Structure of monocyte granules from lampreys and hagfish¹⁾. L0, inner layer; L1, outer layer. ○, chromophobic; ●, chromatophilic (lampreys, basophilic; hagfish, eosinophilic).

Table 1. Summary of reactions of monocytes from the blood of lampreys¹ to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number, and positive site) ²
Alkaline phosphatase	—
Acid phosphatase	G (round, some, eq L0 of MoG)
β-Glucuronidase	—
α-Naphthyl acetate esterase	G (round, some, eq L0 of MoG)
α-Naphthyl butyrate esterase	—
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	G (round, some, eq L0 of MoG)
Peroxidase	—
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	—
PAS after digestion with α-amylase	—
Toluidine blue in distilled water	G [orthochromatic (blue): round, some, eq L0 of MoG]; N & DB (orthochromatic)
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Sudan black B	G (round, some, eq L0 of MoG)
Sudan III	—
Oil red O	—

¹⁾*Lethenteron camtschaticum* (adult), *L. reissneri* (as *L. kessleri*; adult), *L. hattai* (as *L. reissneri*; adult & ammocoetes).

²⁾G, granular; MoG, monocyte granule; L0, inner layer; L1, outer layer; N, nucleus; DB, Döhle body; —, not detected; eq, equivalent to.

ニ円形大小不同ナル色素顆粒ヲ有セリ。「アズール」顆粒ヲ欠ケリ”。また、疑単球の記述は2つ目の段落にある (p192L17-p193L2): “成長セシめくらうなぎノ流動血液中ニハ此細胞以外ニ稀少ナレドモ一種ノ生体色素摂取陽性細胞アリ。細胞体ノ大キサハ組織球ト略相等シキカ又ハ之レヨリモ僅カニ小形ナレド細胞核ハ円形ニシテ、比較的小サク、細胞体ノ中心部ニ位置シ、「クロマチン」ニ富ミ核仁ハ不明瞭ナリ。原形質ハ弱塩基性ニシテ少数ノ「アズール」顆粒ヲ有ス。生体可染顆粒ハ円形ニシテ大小不同ナレド、割合ニ小形ノモノ多ク、且一細胞内ニ存在スル数多カラズ。此細胞ハ組織球ト形態ヲ異ニセルモノニシテ高等魚類ニ類例ヲ見ズ。之ガ組織球中ニ算入セラル可キモノナリヤ、或ハ造血前階級細胞ノ残存物、若クハ前段階細胞ガ特殊老成期ニ見ルモノナリヤ、将来ノ研究ヲ要ス”。“めくらうなぎ”はスタウナギのことである。また、第1段落の“色素顆粒”と第2段落の“生体可染顆粒”は同意であり、生体染色によって色素を取り込んだ食胞を指し、細胞が本来有する顆粒ではない¹⁾。さらに、第2段落の「アズール」顆粒とは、前報¹⁾におけるエオジン好性顆粒を指す。

これらの記述からは、疑単球が“成長セシめくらうなぎ”において真単球とともに観察されたことになるが、最初の段落における真単球が、どのような状態の“めくらうなぎ”に観察されたのかは不明である。また、“稀少”な疑単球とともに同一標本上で観察されたはずの真単球が、最初の段落における真単球と同様に、“成長セシめくらうなぎ”の血液中でも“少数”であったのかも不明である。

清野 (1921)⁵⁾の第3段落 (p193L3-9) にあるスタウナギの脾臓は、スタウナギの組織ではなく、ヤツメウナギ類の幼生期の腎臓 (中腎) であり、ヤツメウナギ類の標本をスタウナギのそれと誤認したと考えられている¹³⁾。本研究では、清野 (1921)⁵⁾のスタウナギの真単球も、脾臓と同様に誤ってヤツメウナギ類の標本を観察したのではないかと考え、ヤツメウナギ類の単球の観察を行った。

ヤツメウナギ類の単球にはスタウナギの単球に観察されたエオジン好性の顆粒はなく、細胞質には好塩基性層を有する顆粒が観察され、細胞質基質は弱好塩基性であった。スタウナギの好中球には2種類の成層顆粒 (2層) が存在するが (NG1とNG2)¹³⁾、両顆粒の好染色性層がアズール好性 (異調染色性) を示す染色条件は限られており、多くの条件では内層が好染色性層であるNG2において、本層が青色を示す¹³⁾。この時のNG2は、本研究のヤツメウナギ類の単球に観察された顆粒に類似する。以上のことから、清野 (1921)⁵⁾の第1段落における真単球はヤツメウナギ類の単球であり、第2段落における真単球は、顆粒の染色が悪く、アズール好性を示していないスタウナギの好中球であったと推察され、疑単球がスタウナギの本当の単球であると考えられる。清野はヤツメウナギ類の標本に観察された真単球をスタウナギのそれと誤ったと思われる。

Kiyono & Nakano (1919)³⁾の第2著者の中院は、1920年に単著の論文を発表している¹⁴⁾。そこではスタウナギの単球 (大単核球と呼んでいる) は“鑑別シ得ザルヲ以テ之レガ存否ハ不明ナリ。”としている (p128)。また、p152-154

Table 2. Comparison of reactions of monocyte granules from hagfish and lampreys to cytochemical tests

Staining ^{1,2}	Species ³ and reaction ⁴		
	Hagfish ^a	Lamprey	
		L0	L1
AIP	+	—	—
AcP	+	+	—
NAE	—	+	—
NBE	+	—	—
CAE	—	+	—
TB	+ (MC)	+ (OC)	—
SBB	—	+	—

¹⁾AIP, alkaline phosphatase; AcP, acid phosphatase; NAE, α -naphthyl acetate esterase; NBE, α -naphthyl butyrate esterase; CAE, naphthol AS-D chloroacetate esterase; TB, toluidine blue in distilled water; SBB, Sudan black B.

²⁾All types of granules showed negative reaction to other tests [β -glucuronidase, peroxidase, periodic acid Schiff reaction (PAS), alcian blue (pH1.0, pH2.5), Sudan III, oil red O].

³⁾hagfish, *Eptatretus burgeri* (adult); lamprey, *Lethenteron camtschaticum* (adult), *L. reissneri* (as *L. kessleri*; adult), *L. hattai* (as *L. reissneri*; adult & ammocoetes).

⁴⁾L0, inner layer; L1, outer layer; +, positive; —, not detected; MC, metachromatic; OC, orthochromatic.

^{a)}Kondo & Yasumoto (2024)¹⁾.

に魚類の組織球性白血球に関する考察があるが(中院の観察結果の項には組織球性白血球に関する記述はない), 真単球に相当する細胞の項ではスタウナギに言及していない。さらに, “通常ノ血液学的検査ニ於テハ, 他種血球種ヨリ鑑別シ得ズ。”と記し, 自身が観察したスタウナギの各種血球との異同について触れていない。おそらく, 中院は清野の真単球がスタウナギの単球ではないことに気づいたため, 詳細な記述をしなかったと推察される。清野(1921)⁵⁾の疑単球に関する記述と同様の内容が中院(1920)のp153L14-19にあるが¹⁴⁾, ここでは“「アズール」顆粒”について何も書かれていない。中院は魚類の血球種の一つとして紡錘細胞というカテゴリーを使用しており, これを2種類(第一種紡錘細胞, 第二種紡錘細胞)に分類した¹⁴⁾。このうち, 第一種紡錘細胞には, アズール顆粒と考えられる深紅色の微細円形顆粒が通常多数, 稀に粗大かつ少数存在するとしている。また, 中院は第一種紡錘細胞の幼若型および母細胞も同定しており, 細胞は円形または卵形で核の偏在する側とは反対の側に深紅色または薔薇紅色のアズール顆粒を有すると記述している¹⁴⁾。我々が前報¹⁾で観察したスタウナギの単球は中院の第一種紡錘細胞の幼若型および母細胞に相当すると考えられる。中院は清野の疑単球が自身の第一種紡錘細胞の幼若型および母細胞に相当することに気づいたため, そのことが明らかにならないように, 清野の疑単球に関する記述から, “「アズール」顆粒”を除いたのであろう。

引用文献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉: スタウナギ単球の形態学および細胞化学的特徴. 水産大学校研究報告, **72**, 67-73 (2024) [Kondo M, Yasumoto S: Morphological and cytochemical characteristics of monocytes from inshore hagfish *Eptatretus burgeri*. *Journal of National Fisheries University*, **72**, 67-73 (2024) (in Japanese with English abstract)]
- 2) 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)
- 3) Kiyono K, Nakano 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)
- 4) 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)]
- 5) 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) (in Japanese)]
- 6) 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)⁵⁾]
- 7) Tanaka Y, Saito Y, Gotoh H: Vascular architecture and intestinal hematopoietic nests of two cyclostomes, *Eptatretus burgeri* and ammocoetes of *Entosphenus reissneri*: A comparative morphological study. *Journal of Morphology*, **170**, 71-93 (1981)
- 8) 高橋 潔: マクロファージ研究の歴史. 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, 2-7 (2001) [No author name, title and book name in a foreign language (Takahashi K: History of macrophage studies. In: Takahashi K, Naito M, Takeya M (ed) Macrophages that support life. Bunkodo, Tokyo, 2-7 (2001) (in Japanese)]
- 9) 高橋 潔: マクロファージの起源、発生と分化—メチニコフの食細胞、アショッフ・清野の細網内皮系とファン・ファースの単核性食細胞系の諸学説を踏まえて—. 自費出版, 熊本, 544pp (2008) [Takahashi K: Origin, development, and multiple differentiation pathways of macrophages and their related cells —on the basis of critical reviews on the theories previously proposed as phagocyte theory by Metchnikoff, as reticuloendothelial system by

- Aschoff and Kiyono, and as mononuclear phagocytes system by van Furth - . self-publishing, Kumamoto, 544pp (2008) (in Japanese)]
- 10) 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)]
 - 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) [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) (in Japanese with English abstract)]
 - 13) 近藤昌和, 安本信哉: スナヤツメ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) [Kondo M, Yasumoto S: Eosin stainability and phagocytosis in inshore hagfish neutrophils. *Journal of National Fisheries University*, **71**, 89-108 (2023) (in Japanese with English abstract)]
 - 14) 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)]