

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

近藤昌和[†], 安本信哉

Morphological and cytochemical characteristics of eosinophils from larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri*

Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract : Two types of stratified granules (two-layer) were observed in the eosinophils (eosinophil granule, EG: type 1, EG1; type 2, EG2) of larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri* collected in a tributary of the Koyagawa River in Yamaguchi Prefecture. The EG1 consisted of inner eosinophilic layer (L0) and chromophobic outer layer (L1). Dark (low light transmittance) inclusion structure (IS), which was various size and morphology (round, oval, rod, or spindle), was observed in the L0 of many EG1 (only one IS in a EG1). The IS was found in the cytochemical staining preparation, but not in the preparation stained with May-Grunwald (MG), Giemsa and MG•Giemsa. Therefore, recognition of IS was affected with the eosin-stained L0 of EG1. The EG1 classified into three subtypes (EG1a, EG1b and EG1c) based on the optical artificial image (OAI) of IS in L0. The EG1a had no OAI (probably no IS). The OAI of both EG1b and EG1c were larger than IS. The former was round or oval chromophobic area (OAI-1), and latter was expanded and rugged (three-dimensional) image (OAI-2; chromophobic; round, oval, or rod). The EG1a may be prototype of EG1. The EG1 showed no positive reaction by various cytochemical stains. The EG2 had chromophobic inner layer (L0) and basophilic (orthomethylenophilic) outer layer (L1). Some enzymes (alkaline phosphatase, acid phosphatase, β -glucuronidase, α -naphthyl acetate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase) were detected in L0 of EG2. The eosinophils lacked α -naphthyl butyrate esterase and peroxidase.

Key words : lamprey, *Lethenteron reissneri*, ammocoetes, granulocyte, morphology, cytochemistry

緒言

著者らは前報において円口類のヤツメウナギ類の一種であるスナヤツメ *Lethenteron reissneri* の幼生を用い、血液中の好中球の形態学および細胞化学的特徴を調べ、既報と比較して報告した¹⁾。スナヤツメ血液中には好中球の他に好酸球も観察された。本報告では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を報告する。

これまでにヤツメウナギ類の顆粒性白血球（顆粒球）は、ヤツメウナギ科の *Lampetra* 属の *L. planeri* と *L. fluviatilis*、同科カワヤツメ属の *L. appendix*、カワヤツメ *L. camtschaticum*、シベリアヤツメ *L. kessleri* およびスナヤツメ、同科

Petromyzon 属のウミヤツメ *P. marinus*、ミナミヤツメ科 Geotriidae フクロヤツメ属 *Geotria* のフクロヤツメ *G. australis* で報告されており、好酸球は *L. planeri*、*L. fluviatilis*、*L. appendix*、カワヤツメ、スナヤツメおよびウミヤツメで認められている（文献1のtable 5参照）。これらのうち、染色標本上で好酸球を観察した報告では、好酸球の顆粒（eosinophil granule; EG）は顆粒全体が好酸性であると考えられている。しかし、本稿においてスナヤツメ幼生のEGは2種類に大別され（1型, EG1; 2型, EG2）、EG1はさらに3種類に細分された（EG1a, EG1b, EG1c）。EG1は好酸性（エオシン好性）の内層（L0）と難染色性の外層（L1）からなる2層構造を有し、EG2は難染色性の内層

(L0) と好塩基性の外層 (L1) から構成されていた。EGの成層構造に関する記載は既報にはない。本稿ではヤツメウナギ類の好酸球に関するこれまでの報告の記述と図を解析して、本稿のスナヤツメ幼生の好酸球と比較した。なお、スナヤツメ幼生には好塩基球は観察されなかったが、好中球および好酸球との比較のために本稿の考察の最後にこれまでの好塩基球に関する報告を付記した。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2月3日)。

材料および方法

木屋川の支流 (山口県) で2021年3月および4月に採集されたスナヤツメの幼生 (ammocoetes) 9尾 (体重 1.0 - 4.0 g, 全長9.3 - 15.0 cm) を水産大学の飼育施設に搬入し、水

温10°Cで2日間馴致飼育したのちに実験に供した。キナルジンで麻酔後、尾部切断によって流出した血液に少量のヘパリンNa水溶液を添加し、血液塗抹標本を作製した。各種染色を施して光学顕微鏡で観察した。

結果および考察

スナヤツメ幼生の好酸球は類円形であり、細胞質には2種類の顆粒 (1型, EG1; 2型, EG2) が観察された (Figs. 1 & 2)。両顆粒とも2層からなる成層構造を有していた。

EG1は円形、卵円形または桿形であり、内層 (L0) は好酸性 (エオシン好性)、外層 (L1) は難染色性であった。L0はMRSVのいずれの染色条件 (文獻1のtable 1参照) においてもエオシン好性であった。L1はMRSVの染色標本では難染色性を示したが、後述する各種細胞化学染色標本

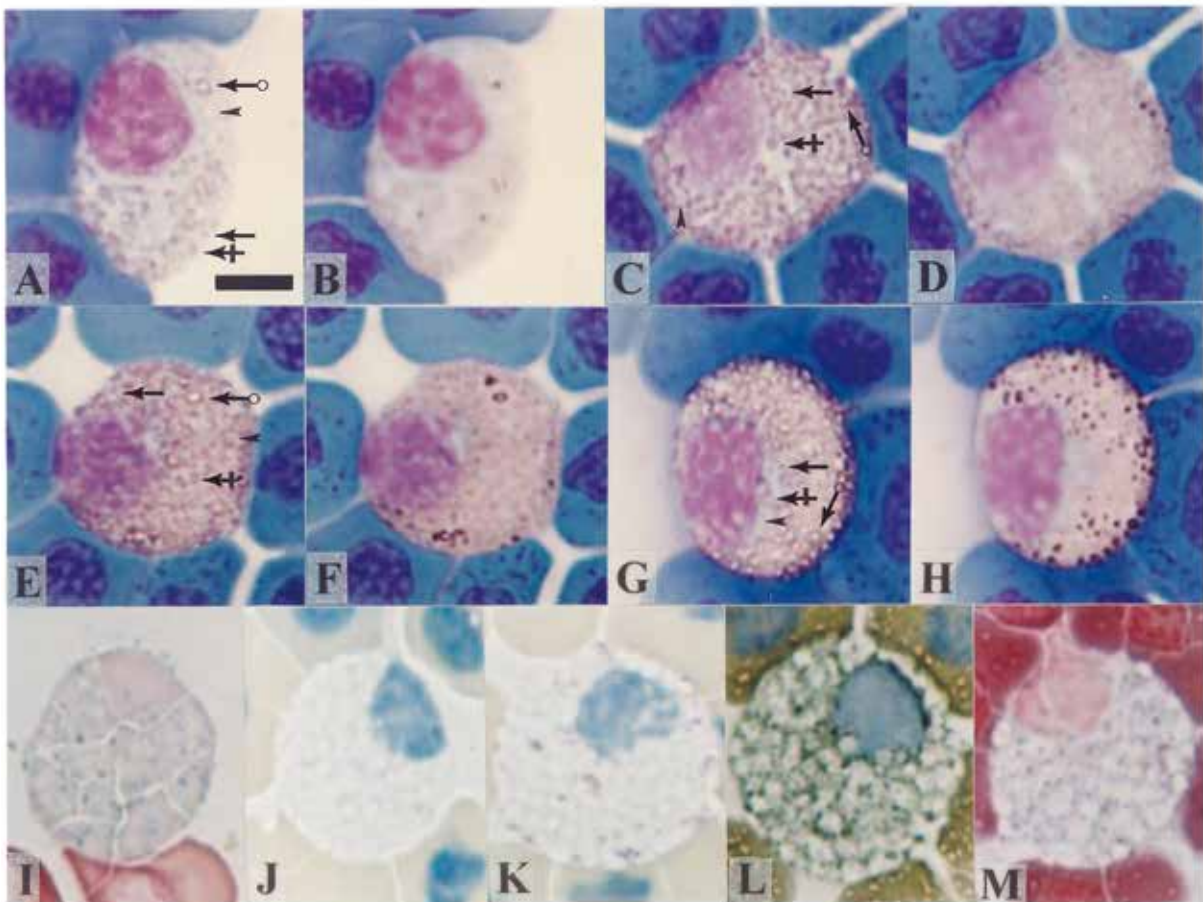
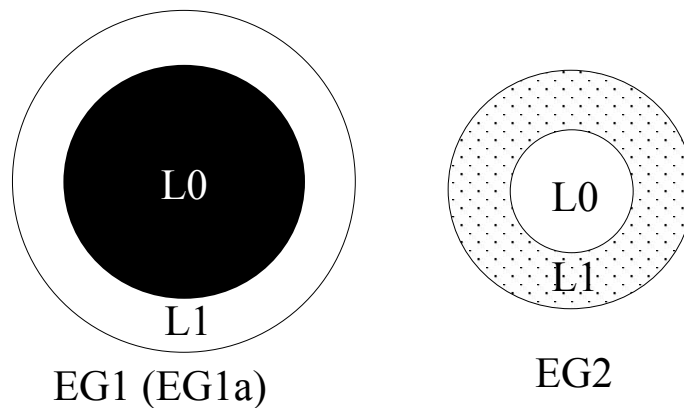


Fig. 1. Eosinophils from ammocoetes of *Lethenteron reissneri*. A-H, May-Grünwald · Giemsa (PN=74; See table 1¹⁾). A & B, immature eosinophil; C-H, mature eosinophils (C & D, with a few EG1c; E & F, with some EG1c; G & H, with many EG1c). B, D, F & H, same cells in A, C, E & H, respectively, with different focus (Note black OAI-2 in B, D, F & H). Arrows, EG1a; cross arrows, EG1b; ring arrows, EG1c; arrowheads, EG2. I, alkaline phosphatase; J, acid phosphatase; K, β -glucuronidase; L, α -naphthyl acetate esterase; M, naphthol AS-D chloroacetate esterase. All enzymes were detected in the L0 of EG2. Note dark inclusion structure (IS) in the L0 of many EG1 in I-M (especially in L; IS is negative in I-M). Counter stain: I & M, safranin O; J-L, hematoxylin (Mayer). Bar (5 μ m) in A is adapted to other figures (B-M) in Fig. 1.



IS in L0 of subtypes of EG1

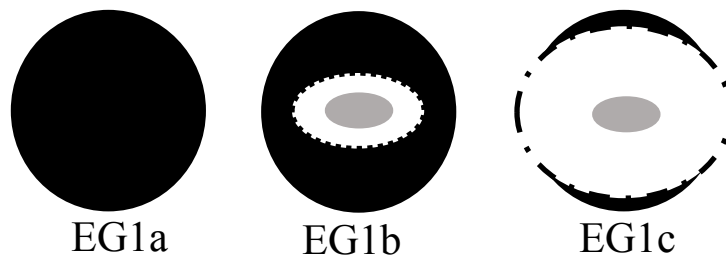


Fig. 2. Structure of eosinophil granules (EG) from larva of lamprey (MRSV preparation). EG1, type 1; EG2, type 2; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer); , inclusion structure [IS; IS itself is not recognized in MRSV preparation (probably due to the affection of eosin-stained L0), but found in cytochemical staining preparation. □, chromophobic; ■, eosinophilic; ■, basophilic (orthomethylenophilic). Optical artificial image (OAI) of IS in L0 of EG1: EG1a, no OAI (probably no IS); EG1b, chromophobic area (OAI-1; larger than IS) in L0; EG1c, expanded and rugged (three-dimensional) image (OAI-2; larger than IS).

Table 1. Summary of reactions of eosinophils from larva (ammocoetes) of *Lethenteron reissneri* to cytochemical tests

Test	Positive site (shape, number and positive site)
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	—
PAS after digestion with α -amylase	—
Alcian blue (pH1.0)	—
Alcian blue (pH2.5)	—
Toluidine blue in distilled water	N
Sudan black B	—
SudanIII	—
Oil red O	—
Alkaline phosphatase	G (round or oval, some, eq L0 of EG2)
Acid phosphatase	G (round or oval, a few (rare), eq L0 of EG2)
β -Glucuronidase	G (round or oval, some, eq L0 of EG2)
α -Naphthyl acetate esterase	G (round or oval, some, eq L0 of EG2)
α -Naphthyl butyrate esterase	—
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	G (round or oval, some, eq L0 of EG2)
Peroxidase	—

G, granular; N, nucleus; —, not detected; EG2, eosinophil granule type 2 with two-layer structure [chromophilic L0 and basophilic (orthomethylenophilic) L1]; eq, equivalent to.

Table 2. Descriptions on the eosinophil granules from lampreys based on the stained preparation

Species	References	Description & Comment
<i>Lampetra planeri</i>	Giglio-Tos (1896) ²	Blood smear (larva & adult): acid fuchsin (fig. 35; sketch, BW)—round, red [No description of granule structure] [Unpainted round area is found in the painted particle. There is almost constant spacing between coarse granules. The granule of Giglio-Tos is identified as L0 of EG1b (unpainted area, OAI-1; spacing between granules, L1)]
	Raunich (1947) ³	Blood smear (larva): MGG (fig. 22; colored sketch)—red; hematoxylin & eosin [no fig.]—red; acid fuchsin [no fig.]—vermillion [No description of granule structure] [There is almost constant spacing between coarse round particles. The granule of Raunich is identified as L0 of EG1a (spacing between granules, L1)]
	Potter et al. (1982) ⁵	Metamorphosing: Blood smear: MGG (fig. 6-c2, sketch, BW) [No description of the color and structure] [There is spacing between coarse round particles. The granule of Potter et al. is identified as L0 of EG1a (spacing between granules, L1)]
	Babudieri (1930) ⁶	Blood smear (larva): MGG [No fig.] —In some eosinophils, the granules are large and rather sparse, in others they are small and very numerous [no description of granule color and structure]
	Potter et al. (1982) ⁵	Larva: Section of hemopoietic tissue (Typ): eosin-azure (fig. 7-g & h, sketch, BW) [No description of the color and structure]. [Eosinophil granules are drawn as round particles. This fig. is a modified version of fig. 5 in Percy & Potter (1976). In fig. 7, all particles are painted black. There is spacing between granules. The granule of Potter et al. is identified as L0 of EG1a (spacing between granules, L1)]
<i>Lampetra fluviatilis</i>	Larva:	Blood smear: Wright or Leishman [No fig., no description of granule color and structure]. Section of hemopoietic tissue (Typ): eosin-azure (fig. 5-g & h, sketch, BW)—eosinophilic [no description of the color and structure].
	Percy & Potter (1976) ⁷	[Eosinophil granules are drawn as round particles. In this fig. some particles contain unpainted area. There is spacing between coarse round particles. The granules of Percy & Potter are identified as L0 of EG1a and L0 of EG1b (spacing between granules, L1 of EG1a & EG1b; unpainted area, OAI-1 of EG1b)]
	Percy & Potter (1981) ⁸	Metamorphosing: Blood smear: Leishman (plate III-d; photographs, BW) [No description of granule color and structure]. The eosinophil contains around its perimeter black particles which it has phagocytosed. [This fig. is poorly focused. The black particles will be the OAI-2 in L0 of EG1c] Larva: Touch preparation of hemopoietic tissue (Typ): Leishman (plate III-e; photographs, BW) [No description of granule color and structure]. Coarser granules were observed in the eosinophils. [In fig., two types of granules, EG1a and EG1b, are recognized. The granules of Percy & Potter are identified as L0 of both EG1a and EG1b]
<i>L. planeri</i> & <i>L. fluviatilis</i>	Percy & Page (1985) ⁹	Blood smear (larva): Wright or Giemsa—coarse, red/orange. [No description of granule structure. In figs. 1 & 3 (Giemsa; BW), two types of granules, EG1a and EG1b, are recognized. The granules of Rowley & Page are identified as L0 of EG1a]

*EG1a, EG1b & ED1c, stratified eosinophil granules [two-layer: eosinophilic inner layer (L0), chromatophilic outer layer (L1)]. See Fig. 2]; IS, inclusion structure; OAI, optical artificial image [type 1, OAI-1 (in L0 of EG1b); type 2, OAI-2 (in L0 of EG1c)]; Typ, typhlosole; MGG, May-Grünwald-Giemsa; BW, black & white.

Table 2. Cont.

Species	References	Description	[comment]
<i>Lethenteron appendix</i>	Jordan & Speidel (1930) ¹⁰	Blood smear (larva): Wright [no description of granule color and structure]. [Jordan & Speidel described that immature eosinophil contained mixed blue and red granules (no fig.). The older neutrophil (fig. 63) is not neutrophil, but eosinophil because of the existence of eosinophilic particles which are resemble to that of eosinophil (fig. 64). All figs. are colored sketches. In fig. 64, eosinophilic particle is surrounded with chromophobic layer. The granule of Jordan & Speidel is identified as L0 of EG1a]	
<i>Lethenteron camischaticum</i>	Katsunuma (1919) ¹¹ Kanesada (1956) ¹²	Blood smear (adult): Giemsa [No fig., no description of granule color and structure] Blood smear (adult): Giemsa or MGG [No fig., no description of granule color and structure] Adult: Blood smear: Giemsa or MGG [No fig., no description of granule color and structure]	
<i>Lethenteron reissneri</i>	Kanesada (1956) ¹² Kondo & Yasumoto (2022; present report)	Larva: Blood smear and touch preparation of hemopoietic tissue (Typ): Giemsa or MGG—much coarser than those of the neutrophils [No fig. of blood smear, no description of granule color and structure] [Fig. 8 (photograph, BW) is touch preparation of Typ. It is difficult to comment on the granule color and structure due to small and poorly focused photograph] Blood smear (larva): MG, Giemsa, MGG—two types of stratified granules (EG1 & EG2); EG1 classified into three subtypes (EG1a, EG1b & EG1c).	
<i>Petromyzon marinus</i>	Piavis & Hiatt (1971) ¹⁴ George & Beamish (1974) ¹⁹	Blood smear (adult): Wright-Giemsa (fig. 1-E, colored photograph)—tiny, sparse, eosinophilic [no description of granule structure] [It is difficult to comment on the granule structure due to small and poorly focused photograph] Squash preparation of hemopoietic tissue (FB; adult): MGG [no description of granule color and structure]. [In fig. 4 (No. 18-21; photographs, BW), George & Beamish show eosinophils (No. 18 & 19, eosinophilic myeloblast; No. 20 & 21, eosinophilic metamyeloblast). It is difficult to comment on the granule color and structure due to poorly focused photograph]	

*EG1a, EG1b & ED1c, stratified eosinophil granules [two-layer: eosinophilic inner layer (L0), chromatophilic outer layer (L1)]. See Fig. 2; IS, inclusion structure; OAI, optical artificial image [type 1, OAI-1 (in L0 of EG1b)]; type 2, OAI-2 (in L0 of EG1c)]; Typ, typhlosole; FB, fat body; MG, May-Grünwald; MGG, May-Grünwald-Giemsa; BW, black & white.

では暗い領域（光の透過率が低い）として観察された（細胞化学染色には陰性）。また、細胞化学染色標本では多くのEG1の中央付近に種々の大きさおよび形状（円形、卵円形、桿形、紡錘形）を示す暗い構造体が認められたが（1つのEG1にこの構造体は1個）、MRSVの染色標本ではこの構造体は観察されなかった。しかし、MRSVの染色標本では、多くのEG1においてエオシン好性のL0内に難染色性の領域または無色の立体的な構造が1つのEG1につき1領域または1個見られた（両者は細胞化学染色標本では観察されない）。前者は円形または卵円形であり、後者は円形、卵円形または桿形であった。両者の中央には細胞化学染色標本で見られる構造体が存在すると考えられる。両者の大きさは様々であるが、細胞化学染色標本で見られる構造体よりも大型であることから、両者はこの構造体の光学的な人工像（optical artificial image, OAI）であると解釈した。すなわち、L0がエオシンで染色された場合、光学顕微鏡下でL0内の構造体からエオシンの色調を無色とする波長の光が放射されて難染色性の領域として観察されたものが前者であり、同様にL0の構造体が拡大され立体的に見えたものが後者と考えられる。今後、前者のOAIをOAI-1、OAI-1が観察されるEG1をEG1b、後者をOAI-2、OAI-2が見られるEG1をEG1cとし、両者が認められないEG1をEG1aとする。また、細胞化学染色標本で観察されるL0内の構造体を封入構造体（inclusion structure, IS）と称することとする。各種EG1はEG1aが基本形であり、EG1aのL0内にISが形成されることでEG1bまたはEG1cとなると考えられる。EG1bのL0内に見られる難染色性領域の大きさと、EG1cの立体的な構造の大きさの間に関連は認められないことから、EG1bとEG1cのISは異なると考えられる。EG1cのOAI-2のうち小型のものは、顕微鏡の焦点をOAI-2の上方（対物レンズ側）に移動させることで、黒色の粒子として観察される。また、大型のOAI-2では、同様の操作によってOAI-2の周囲が黒色に見える。好酸球における各種EG1の存在比率は様々であった。EG2は円形または卵円形であり、EG1よりも一般に小型であり、MRSVのいずれの染色条件においてもL0は難染色性、L1は淡青色（好塩基性）を示した。L1の色調はMay-Grunwald (MG) 染色でも認められたことから、L1は正調メチレンブルー好性であると言える。

好酸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）、 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）が検出されたが（Figs. 1I-1M）、いずれの酵素もEG2のL0に認められた。AcP陽性のEG2は非常に少なく、AcP陰性の好酸球もしばしば観察された。好酸球には α -ナフチルブチレートエステラーゼ（NBE）とペルオキシダーゼ（PO）は検出されなかった（Table 1）。また、トルイジンブルー（TB）染色では核のみが染色され、periodic acid Schiff (PAS) 反応、アルシアンブルー、ズダン黒B（SBB）、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。いずれの細胞化学染色においてもEG1には陽性反応は認められなかった（Table 1）。

これまでに、種々のヤツメウナギ類において好酸球が観察されているが（文献1のtable 5参照）、染色性の異なる2種類の成層顆粒（EG1とEG2）は報告されていない。また、エオシン好性領域を有する顆粒において複数種（EG1a, EG1b, EG1c）の存在も言及されていない。以下に既報における好酸球の顆粒の特徴を魚種ごとおよび報告ごとに述べるとともに（Table 2）、それらの報告で観察された好酸球顆粒について考察する。なお、Table 2にはそれぞれの著者の記載のほか、図版から読み取れた情報についても示した。

ヤツメウナギ類の好酸球顆粒

1. 一般染色標本観察

Lampetra planeri

ヤツメウナギ類の好酸球を、染色標本上で観察したのは好中球の場合と同様にGiglio-Tos (1896)²⁾が最初であると思われる。Giglio-Tos (1896)²⁾は*L. planeri*の幼生と成魚の血液中に好酸球を認め、幼生と成魚の間に違いはないとしている。この好酸球の顆粒は、塩基性色素であるメチレンアズールでは染色されず（文献1の後注2を参照）、酸性フクシン（酸性色素）で赤色に染色される。本文中に顆粒の形状に関する記述はなく、図 [白黒のスケッチ（染色法は明記されていないが、おそらく酸性フクシン染色）；成魚と幼生のどちらの好酸球であるのかは不明] では大型の類円形粒子として描写されている。粒子間にはほぼ一定の間隔がある。また、この粒子のいくつかでは、内部は完全に塗りつぶされておらず、染色性が薄い粒子状の領域が認められる。Giglio-Tos (1896)²⁾が顆粒と考えた粒子は、本稿のEG1bのL0（OAI-1が見られる）に相当すると考えられる。すなわち、粒子内部の染色性が薄い粒子状の領域は

OAI-1を、その周囲の塗りつぶされた領域がL0を示すと思われる。EG1bの難染色性のL1がGiglio-Tos (1896)²⁾の顆粒の周囲にもあるために、顆粒と顆粒の間に間隔があるように見えたと推察される。Giglio-Tos (1896)²⁾はL1の存在を認識していなかったと考えられる。また、EG1bのOAI-1については言及していない。

Raunich (1947)³⁾も幼生と成魚の血球を調べたが、成魚には好酸球はないと考えている。幼生の好酸球顆粒はMG・Giemsa (MGG) 染色 (文献1の後注3を参照) によって赤色に染まり、エオシンでも赤色を、フクシンでは朱色を呈するとしている。Raunich (1947)³⁾はヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色も行っているため、このエオシンによる色調はHE染色像のものと考えられる (図は示していない)。また、Raunich (1947)³⁾はフクシンを含む染色としてEhrlichの三酸染色とナイルブルー・フクシン・オレンジ染色を行っており (ここのオレンジとはオレンジGと思われる)、前者には酸性フクシンが含まれることから、フクシンによる色調はEhrlichの三酸染色像における色調と考えられる (後者のフクシンの詳細は不明である)。なお、両染色に含まれるオレンジG (酸性色素) の好酸球顆粒に対する染色性については記述されていない。本文中に顆粒の形状に関する記述はないが、図 (着色されたスケッチ) では小型の類円形粒子として描写されており、その大きさは先のGiglio-Tos (1896)²⁾の図よりも小さいが、細胞内の粒子数はGiglio-Tos (1896)²⁾よりも多い。粒子間にはGiglio-Tos (1896)²⁾と同様にほぼ一定の間隔がある。Raunich (1947)³⁾が顆粒とした粒子は小さいため、内部が完全には塗りつぶされているのか否かは判断できない。しかし、明瞭なOAI-1とOAI-2が認められないことから、Raunich (1947)³⁾が顆粒と考えた粒子はEG1aのL0と推察される。エオシン好性のL0の周囲に難染色性のL1が存在するためにRaunich (1947)³⁾が顆粒と考えた粒子間に間隔があるように見えたと考えられる。

Fey (1966)⁴⁾は幼生と成魚の血液中に好酸球を認め、細胞化学的特徴を記述している (後述)。しかし、好酸球の一般染色性は記述されておらず、図も示されていない。なお、Fay (1966)⁴⁾は好酸球顆粒の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察結果を記述している (後述)。

Potterら (1982)⁵⁾には変態期の血液中の好酸球 (MGG染色) が図示されている (fig. 6のc2; 白黒のスケッチ)。好酸球顆粒は小型で類円形の粒子として描かれており、その内部は塗りつぶされている。多くの場合、粒子と粒子の

間に間隔がある (稀に粒子同士が接している)。本文中に顆粒の染色性と形状についての記述はないが、彼らが顆粒と考えた粒子はEG1aのL0に同定される。

Lampetra fluviatilis

Babudieri (1930)⁶⁾は幼生 (文献1を参照) の血液中に好酸球を認め、顆粒が大きくてまばらな場合もあれば、小さくて非常に多い場合もあるとしている。Babudieri (1930)⁶⁾は複数の染色を行っているが (文献1の後注8参照)、この所見を得た染色法を記しておらず、顆粒の色調と形状も記述していない。また、図も示していない。Babudieri (1930)⁶⁾が指摘した「顆粒が大きくてまばらな場合」と「顆粒が小さくて非常に多い場合」はそれぞれGiglio-Tos (1896)²⁾の図とRaunich (1947)³⁾の図の好酸球に相当するのかもしれない。

Potterら (1982)⁵⁾には幼生の腸内縦隆起 (造血組織) の切片 (eosin-azure染色; 文献1の後注9参照) に見られる好酸球が図示されており (fig. 7-g & h; 白黒のスケッチ)、好酸球顆粒は類円形の小型粒子として描かれており、多くの場合、粒子間に間隔があるが稀に粒子同士が接している。本文中に顆粒の染色性と形状についての記述はない。この図は後述するPercy and Potter (1976)⁷⁾のfig. 5を改変したものとされているが、好酸球の顆粒の描き方が異なっている。Potterら (1982)⁵⁾の図については以下の項目 (*Lampetra planeri*と*L. fluviatilis*) のPercy and Potter (1981)⁸⁾の考察で議論する。

*Lampetra planeri*と*L. fluviatilis*

Percy and Potter (1976, 1981)^{7,8)}は*L. planeri*と*L. fluviatilis*の好酸球を観察しているが、本文中でこれら2種を分けて記述していない。また、Rowley and Page (1985)⁹⁾は*L. planeri*または*L. fluviatilis*の幼生 (あるいは両種の幼生が混合されたもの) を用いている (以後、*Lampetra* spp.と称す)。ここではこれらの文献における好酸球の記載を考察する。

Percy and Potter (1976)⁷⁾は幼生の腸内縦隆起の切片にeosin-azure染色を施して好酸球を認めており、成熟した好酸球の顆粒はエオシン好性であるとしている。図 (fig. 5-g & h; 白黒のスケッチ) には類円形の小型粒子として描かれており、粒子の半数程度では、内部に塗りつぶされていない領域が存在する。Percy and Potter (1976)⁷⁾の図については以下のPercy and Potter (1981)⁸⁾の考察で議論する。

Percy and Potter (1981)⁸⁾には変態期の血液塗抹標本

と幼生の腸内縦隆起のスタンブ標本の染色像（ともにLeishman染色）があり、前者の好酸球はplate IIIのdに、後者の好酸球はplate IIIのeに示されている（白黒の写真）。Percy and Potter (1981)⁸⁾は本文中で、変態期の血球では、赤芽球と赤血球を除いていずれの種類の血球（栓球やリンパ球も含む）も貪食能を有すると推察し、その根拠として細胞質に黒い粒子が観察されることを挙げている[健全な幼生では黒い粒子は見られない、もしくは稀であるとしている。Percy and Potter (1981)⁸⁾は採血前に人為的に黒い粒子を注入したわけではなく、黒い粒子の正体は不明である]。図の血液中の好酸球（plate IIIのd）では、好酸球の周辺（細胞質中の細胞膜に近い領域の意味）に貪食された黒い粒子を含むとしている。同じ図中の右側には偽足と貪食された粒子を有するとされる血球（種類は述べていないが、リンパ球と思われる）がある。図の好酸球に見られる黒い粒子とリンパ球と考えられる血球の黒い粒子は大きさが異なっている（好酸球の粒子の方が小さい）。また、好酸球の焦点は黒い粒子に合っており、核や中央の顆粒は不鮮明である。本稿のスナヤツメ幼生の好酸球のEG1cにおいて、小型のOAI-2は、焦点を変えることで黒い粒子として観察される。したがって、Percy and Potter (1981)⁸⁾が好酸球に見た黒い粒子とは、EG1cのOAI-2であると考えられる[彼らが好酸球以外の血球に観察した黒い粒子については判断できない]。一方、幼生の腸内縦隆起のスタンブ標本の図（plate IIIのe）には好酸球が2個あり、これらには2種類の顆粒、すなわちEG1aとEG1bが認められる。しかしながら、彼らは好酸球顆粒の形状について何も記していない。なお、この図（plate IIIのe）には黒い粒子を貪食した好中球が1個あるが、粒子の大きさは変態期の血液の図（plate IIIのd）のそれよりも大型である。また、この図には細胞間に貪食されていない黒い粒子が認められるが、2個の好酸球には貪食像は観察されない。

前述の*L. fluviatilis*の項のPotterら(1982)⁵⁾の図と本項のPercy and Potter (1976)⁷⁾の図では彼らが好酸球の顆粒と考えた粒子の描き方が異なる。前述のようにPercy and Potter (1981)⁸⁾のplate IIIのeの好酸球には2種類の顆粒が認められた。Percy and Potter (1976)⁷⁾の図では内部が塗りつぶされた粒子と、内部に塗りつぶされていない領域がある粒子の2種類が描かれている。前者はEG1aのL0に、後者はEG1bのL0とその内部のOAI-1に相当すると考えられる。Percy and Potter (1976; 1981)^{7,8)}はEG1aとEG1bのL1を顆粒の構成要素として認識していなかったと言える

が、Percy and Potter (1976)⁷⁾の図は彼らが観察した標本において彼らが顆粒と考えた構造を忠実に描写していると思われる。一方、Potterら(1982)⁵⁾の図ではいずれの粒子の内部も塗りつぶされているが、これはPercy and Potter (1976)⁷⁾の塗りつぶされていない領域がある粒子を改変時に単に塗りつぶしたのではなく、作図に用いた*L. fluviatilis*幼生の腸内縦隆起の切片にはEG1aのみを有する好酸球が認められたために塗りつぶしたと考えられる。

Rowley and Page (1985)⁹⁾は*Lampetra* spp.の幼生の血液塗抹標本をWright染色またはGiemsa染色し、好酸球に赤色または橙色の顆粒を観察している。図[figs. 1 (未熟な好酸球) & 3 (成熟好酸球); 白黒写真; Giemsa染色像]には2種類の顆粒が見られる。すなわち、染色された粒子の周囲に難染色層が認められる顆粒と、難染色粒子の周囲に染色された層がある顆粒が図から読み取れる。これらの顆粒はそれぞれEG1aとEG1bに相当すると思われるが、EG1bのL1は図が不鮮明なため認識できない。染色された粒子はEG1aのL0に相当すると考えられる。Rowley and Page (1985)⁹⁾は幼生に炭素粒子または加熱処理した細菌（イガイ類*Mytilus*の鰓から分離したグラム陽性桿菌; 種名は不明）を静脈注射したのちに採血し、その塗抹標本にWright染色またはGiemsa染色を施して好酸球の貪食能を調べている。好酸球は炭素粒子を貪食しないが、細菌を貪食すると報告している（同時に調べた好中球は炭素粒子も細菌も貪食するとし、好中球の方が貪食率は高く、貪食された粒子数も好中球の方が多いとしている）。しかし、貪食像を示しておらず、好酸球に貪食されたとされる細菌が本当に細菌なのかは不明である（本稿ではすでにPercy and Potter (1981)⁸⁾が好酸球に貪食されたとした粒子は貪食像ではない可能性を示している）。Rowley and Page (1985)⁹⁾は好酸球をTEM観察している（後述）。

Lethenteron appendix

Jordan and Speidel (1930)¹⁰⁾は幼生の血液中に好酸球を観察し、着色されたスケッチ（Wright染色像）を示している（fig. 64）。顆粒の染色性と形状についての記述はないが、図では赤色の類円形粒子とその周囲の難染色性層が認められ、EG1aに相当すると考えられる。Jordan and Speidel (1930)¹⁰⁾は未熟な好酸球には青色と赤色の顆粒が混在すると報告しているが図はない。

カワヤツメ

勝沼 (1919)¹¹⁾はカワヤツメ成魚と考えられるヤツメウナギ類の血液塗抹標本にGiemsa染色を施して好酸球を観

察しているが、顆粒の染色性や形状は記しておらず図もない。

Kanesada (1956)¹²⁾はスナヤツメ(成魚と幼生)とともにカワヤツメ成魚の血球をGiemsa染色またはMGG染色して観察し、好酸球を認めているが染色性や形状に関する記載はなく図もない。

スナヤツメ

Kanesada (1956)¹²⁾は幼生と成魚の血液塗抹標本に好酸球を観察し、幼生の好酸球の顆粒は好中球の顆粒よりも粗大であるとのみ記述している(図は示していない; 成魚の好酸球に関する記述はない。Giemsa染色かMGG染色か不明)。また、Kanesada (1956)¹²⁾は幼生の腸内縦隆起のスタンプ標本にも好酸球を見ており、好酸球に血液中の好酸球と同様の顆粒を観察している。染色されたスタンプ標本の図(白黒写真; Giemsa染色かMGG染色か不明)は不鮮明であり、好酸球顆粒の形状については不明である。

Fujii and Hayakawa (1983)¹³⁾は幼生における同種皮膚移植片拒絶反応の過程において、移植片に宿主の好中球とともにファゴリソゾーム[食胞(ファゴゾーム)とリソゾームが融合したもの]を多数有する好酸球が浸潤すると報告している。彼らは好酸球を同定するために塗抹標本を観察しているが何の塗抹であるのかは記述されておらず(染色法も不明)、観察結果を過去の報告[Jordan and Speidel (1930)¹⁰⁾やPiavis and Hiatt (1971)¹⁴⁾]と比較して好酸球に同定しているが、観察結果は示されていない。また、彼らはブアン固定した移植片の切片にヘマトキシリン・エオシン染色を施して観察しているが、その切片上における好酸球の特徴についても言及していない。Fujii and Hayakawa (1983)¹³⁾には本稿と直接比較できる染色標本と記述はないが、TEM観察用のエボン樹脂包埋標本の厚切り切片にTB染色を施した図(fig. 2a; 白黒写真)とTEM像(figs. 3a & 3b)およびTEM像の観察結果の記述(p308)を本稿の好酸球と比較することは可能と考える(次項のTEM標本観察において考察する)。

スナヤツメには遺伝的に分化した二型(北方型と南方型)が存在し^{15,16)}、前報¹⁾においてKanesada (1956)¹²⁾が用いたスナヤツメ(幼生と成魚)は南方型に、Fujii (1982)¹⁷⁾に使用されたスナヤツメ(幼生)は北方型であると推察した。また、Tanakaら(1981)¹⁸⁾とFujii and Hayakawa (1983)¹³⁾では両型の分布域が重なる地域産のスナヤツメ(ともに幼生)を使用しているためその型は不明とした。本稿のスナヤツメ幼生は南方型であり、血液中に好酸球が観察された。

Kanesada (1956)¹²⁾も南方型と考えられるスナヤツメを用いて成魚の血液と幼生の血液および腸内縦隆起に好酸球を認めている。一方、北方型を使用したFujii (1982)¹⁷⁾は腸内縦隆起に好酸球を観察していない。これらのことから、南方型は好酸球を有するが、北方型には好酸球がないのではないかと推察される。また、血液と腸内縦隆起に好酸球を観察していないTanakaら(1981)¹⁸⁾と好酸球を認めたFujii and Hayakawa (1983)¹³⁾の用いたスナヤツメ幼生は、分布域が重なるものの、それぞれ北方型と南方型に相当するのではないかと考えられる。

ウミヤツメ

Piavis and Hiatt (1971)¹⁴⁾は成魚の血液塗抹標本にWright-Giemsa染色を施して好酸球に小さくまばらなエオシン好性顆粒を観察しているが顆粒の形状に関する記述はなく、図(カラー写真)は小さく不鮮明である。

George and Beamish (1974)¹⁹⁾は成魚の脂肪体(造血組織)の押しつぶし標本にMGG染色を施して好酸球を観察しているが、好酸球の特徴に関する記述はなく、図(白黒写真)も不鮮明である。

Potterら(1982)⁵⁾には幼生の好酸球のTEM像がある。また、Ardavin and Zapata (1987)²⁰⁾は幼生の各種造血組織のTEM像に好酸球を示している。しかし、これらの報告では好酸球の染色像はない。

以上のように、既報ではエオシン好性の粒子状構造(EG1のL0)のみを好酸球の顆粒としており、本稿で示したL0の周囲にある難染色性のL1を見落としていたと考えられる。また、L0内にOAI-1やOAI-2が観察されても、既報ではこれらについて何ら考察されていないと思われる[Percy and Potter (1981)⁸⁾はOAI-2を貪食された粒子と考えた]。さらに、エオシン好性ではないEG2はいずれの報告においても言及されていない。

2. 透過型電子顕微鏡観察

Fay (1966)⁴⁾には*L. planeri*の好酸球の顆粒のTEM観察結果が記述されており(幼生か成魚かは不明)、好酸球顆粒は平均250×80 nmであり、内側にはっきりとした明るい部分があるとしているが図はない。

Potterら(1982)⁵⁾はウミヤツメの好酸球顆粒には不定形の物質(amorphous material)が含まれるが、結晶体(crystalloid)は認められないとしている(p247)。不定形の物質の詳細は記述されていないが、図(fig. 10)にはウミ

Table 3. Comparison of reactions of eosinophils from lampreys to cytochemical tests

Species ^{*1} , stage ^{*2} , origin & reference	Test ^{*3}										
	Ox	AIP	AcP	Glu	NAE	NBE	CAE	PO	SBB	PAS	PAS-d
<i>Lp</i> (L & A; blood) Fey (1966) ⁴	NT	+	-	NT	+	NT	NT	± (A) ^{*4} - (L)	NT	+	+ (G) - ^{*5}
<i>Lp</i> & <i>Lf</i> (L; blood) Rowley & Page (1985) ⁹	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT
<i>Lc</i> (A; blood): probably Katsunuma (1919) ¹¹	LO ± ^{*7} SO -	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Lr</i> (L; blood) Kondo & Yasumoto (2022; present report) ^{*8}	NT	+	(L0 of EG2)	+	(L0 of EG2)	-	+	(L0 of EG2)	-	-	- ^{*5}
<i>Pm</i> (L; unknown) Potter et al. (1982) ^{5, *9}	NT	NT	+	(G)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

^{*1}*Lp*, *Lampetra planeri*; *Lf*, *Lampetra fluviatilis*; *Lc*, *Lethenteron camtschaticum*; *Lr*, *Lethenteron reissneri*; *Pm*, *Petromyzon marinus*.

^{*2}L, larva (ammocoetes); A, adult.

^{*3}Ox, oxidase [Nadi reaction: labile oxidase (LO); cytochrome oxidase and stable oxidase (SO)]; 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-d, PAS after digestion with enzyme; NT, not tested; -, negative; +, positive; ±, negative and positive result shown; G, granule; EG2, type 2 stratified (two-layer) eosinophil granule; L0, inner layer.

^{*4}Fey (1966) described as follow: In adult *L. planeri*, a weak, inconstant positivity was detected in isolated cases.

^{*5}Fey (1966) and Kondo & Yasumoto (2022) used diastase and α-amylase, respectively.

^{*6}Rowley & Page (1985) described that matrix of granules contain electron-dense matrix of varying density but without distinct substructure) were positive.

^{*7}Katsunuma (1919) described as follow: In rare cases, eosinophils have many labile oxidase, but not clear.

^{*8}Kondo et al. (2022) tested Sudan III & oil red O (for neutral lipid; negative), alcian blue (pH1.0 & pH2.5; negative) and toluidine blue in distilled water [nucleus was positive].

^{*9}According to unpublished data.

ヤツメの好中球顆粒と同様な2種類の円形構造体が認められ、好中球の場合と同様に切片上に高電子密度の内層が出ているかいないかの違いで2種類あるように見えると考えられる [円形構造体は高電子密度の内層と外層およびこれらの間の低電子密度層 (中層) からなる]。また、Potterら (1982)⁵⁾は好酸球顆粒の微細構造の特徴と光学顕微鏡標本でAcPが顆粒に検出されることから、顆粒はリソゾームであると推察している。しかし、根拠となる微細構造について述べていない (AcPについては、事項で述べる)。

Ardavin and Zapata (1987)²⁰⁾はウミヤツメ幼生の各種造血組織のTEM像を示しているが、好酸球顆粒の構造に関する記述はなく、図の好酸球は小さすぎて構造は読み取れない。

Fujii and Hayakawa (1983)¹³⁾のスナヤツメ幼生の好酸球に関する図 (fig. 2a, TB染色を施した樹脂切片; figs. 3a & 3b, TEM像) およびTEM像の観察結果の記述 (p308) から、彼らの好酸球について以下のように考察した。TB染色した切片の好酸球には白い (TB染色には染まらない) 粗大な類円形構造が多数見られ、彼らは図の説明文中で好酸球は多数のファゴリソゾームを有しているとしていることから (本文中では触れていない)、この類円形構造がファゴリソゾームに相当すると考えられる。類円形構造の周囲には黒い層 (TB陽性か否かは白黒写真のため判断できない) が認められる (彼らがこの黒い層を認識していたのか、また、彼らのファゴリソゾームに黒い層が含まれるのかは不明である)。また、図ではいくつかの類円形構造の内部に小型のやや黒い構造体が認められる (TB陽性か否かは白黒写真のため判断できない)。Fujii and Hayakawa (1983)¹³⁾の類円形構造はEG1のL0に、黒い層はL1に、類円形構造内のやや黒い構造体はISに相当すると考えられる。Fujii and Hayakawa (1983)¹³⁾は移植片に浸潤してきた好中球のいくつかに食胞とファゴリソゾームを観察している (fig. 3b; 高倍率のTEM像)。一方、fig. 3a (低倍率のTEM像) には浸潤してきた白血球としてプラズマ細胞1個と好中球4個とともに好酸球が1個載っている。この図の好中球には食胞もファゴリソゾームもないにもかかわらず、好酸球には彼らがファゴリソゾームとする構造がある [図中にはどれがファゴリソゾームなのか矢印などで示しておらず、図の説明文中にもこの好酸球がファゴリソゾームを有していることを記していないが、本文p308で 'a distinct phagolysosome of various features (Fig. 3a)' と記述している]。しかし、この好酸球には食胞は示されて

いない。ファゴリソゾームは食胞にリソゾームが融合した構造であり、ファゴリソゾームの形成に先立って食胞が形成されるが、Fujii and Hayakawa (1983)¹³⁾には好酸球の食胞についての記述がない。彼らは浸潤してくる前の好酸球 (ファゴリソゾームが形成される前の好酸球) についても記述しておらず図も示していないので、彼らのファゴリソゾームが本当にファゴリソゾームなのかの判断は困難である。おそらく類円形構造内に様々な特徴 (この特徴についての記載はない) が見られたことから、類円形構造を好酸球が本来有する構造ではなくファゴリソゾームと考えたと思われる。Fujii and Hayakawa (1983)¹³⁾がfig. 3aに認めた 'a distinct phagolysosome of various features' は、好酸球の細胞質内の上方にある電子密度の低い領域とその周囲の高電子密度領域からなる巨大な構造体と思われる。この巨大な構造体内の低電子密度領域は類円形ではなく不定であり、fig. 2aに見られるTB陰性の類円形構造とは異なる。また、低電子密度領域は小型の粒子からなる集塊のように見える。低電子密度領域の粒子にはそれぞれ低電子密度の内層と薄い外層および両層の間の非常に電子密度の低い層が認められる。また、高電子密度領域にはPotterら (1982)⁵⁾の好酸球顆粒の図に見られる円形構造体も認められる。Fujii and Hayakawa (1983)¹³⁾が観察した低電子密度領域はEG1bやEG1cのISであると推察される。Fujii and Hayakawa (1983)¹³⁾は好酸球に小型で電子密度の低い顆粒を観察しており (彼らは 'smaller, less osmiophilic granules' と記している; p308)、リソゾームではないかと推察している。この顆粒の微細構造は本文中に記述されておらず図も示されていないが、本稿のEG2に相当するのではないかとと思われる。

Rowley and Page (1985)⁹⁾は*Lampetra* spp.の幼生の好酸球顆粒を染色標本では粗大で赤色または橙色としており、TEM観察結果から、顆粒の直径 (長径) は0.3-0.6 μm と報告している (染色像における顆粒の大きさの記載はない)。2枚のTEM像 [fig. 2 (未熟な好酸球) & 4 (成熟好酸球)] のうち、最大の顆粒はfig. 4にあり、この像の倍率 (図中にスケールはなく、図の説明文中に倍率が記されている) から計算したところ、この顆粒は長径約0.6 μm であり、記述と一致した。また、染色像 (fig. 3) ではその倍率から、長径0.6 μm の顆粒は先の一般染色標本観察の項で述べた染色された粒子に含まれる。しかしながら、TEM像と染色像それぞれに見られる顆粒と粒子の数には大差がない。TEMでは超薄切片上の顆粒が観察されるのに対して、染色

像では細胞に含まれる全ての顆粒が観察される(対物レンズの焦点深度の影響で全ての顆粒に焦点が合うわけではない)。したがって、染色像にはRowley and Page (1985)⁹⁾が顆粒とは認識していない顆粒が存在すると言え、それはEG1bであると考えられる。また、染色された粒子と粒子の間隔は、TEM像における顆粒間よりも広い。これらのことから、TEM像の説明文中の倍率は、染色された粒子の大きさをもとに算出された可能性があり、TEM観察結果から得られたとする顆粒の大きさは正しくないかもしれない。Rowley and Page (1985)⁹⁾はTEM観察によって、好酸球顆粒の基質には明らかな二次構造はないものの、基質内に様々な電子密度の存在を認めている。しかし、その詳細は記述されていない。好酸球顆粒のTEM像 (fig. 5; 顆粒の拡大図) では基質内に、Potterら (1982)⁵⁾とFujii and Hayakawa (1983)¹³⁾の図から読み取れる円形構造体が認められ、同様の構造体はfig. 4のやや大型の顆粒にも観察される。また、fig. 4のやや大型の顆粒には電子密度の低い不定形領域が認められ、この領域はFujii and Hayakawa (1983)¹³⁾と同様に、粒子が集積したように見える。Rowley and Page (1985)⁹⁾は基質内のこれらの構造体(円形構造体と低電子密度領域)について言及していない。Rowley and Page (1985)⁹⁾は顆粒の膜と芯の間には低電子密度帯があるとしている。しかし、fig. 5の顆粒では低電子密度帯は芯の周囲を完全には取り巻いていない。Rowley and Page (1985)⁹⁾は好酸球顆粒がAcP陽性であるとしてTEM像を示している。これについては次項(3. 細胞化学染色標本観察)で考察する。

Fey (1966)⁴⁾は図示していないものの、TEM観察によって好酸球顆粒の内側に明るい(電子密度の低い)領域を観察しているが、これはFujii and Hayakawa (1983)¹³⁾およびRowley and Page (1985)⁹⁾の図における低電子密度領域に相当すると考えられ、EG1bおよびEG1cのISを観察したと思われる。Potterら (1982)⁵⁾の好酸球顆粒には低電子密度領域は読み取れないが、これはPotterら (1982)⁵⁾がTEM観察した好酸球のEG1がEG1aだったことによるのかもしれない。Rowley and Page (1985)⁹⁾が存在を主張する好酸球顆粒の膜と基質の間の低電子密度帯は、Potterら (1982)⁵⁾の好酸球顆粒の図からは少数の顆粒に部分的にしか認められない(Potterらは低電子密度帯について言及していない)。また、Fey (1966)⁴⁾とFujii and Hayakawa (1983)¹³⁾では低電子密度帯に関する記述はない。以上の

ことから、低電子密度帯は人工産物である可能性が考えられる。Potterら (1982)⁵⁾, Rowley and Page (1985)⁹⁾およびFujii and Hayakawa (1983)¹³⁾の好酸球顆粒の基質(高電子密度領域)には共通して円形構造体が見られた。また、Rowley and Page (1985)⁹⁾およびFujii and Hayakawa (1983)¹³⁾の好酸球顆粒の低電子密度領域では粒子が集塊を成していた。この粒子にも層構造が認められたことから、前者と同様に円形構造体の一種と考えられる。前報¹⁾において、ヤツメウナギ類の好中球をTEM観察した報告では共通して、顆粒の芯に円形構造体が認められることを指摘し、この構造体を顆粒子granulonと呼び、顆粒子間の領域を顆粒内基質intragranular hyaloplasma (IH)と称することを提唱した。好中球顆粒の顆粒子は好酸球顆粒(少なくともEG1)の高電子密度領域の円形構造体と微細構造が類似していた。今後、EG1内の円形構造体も顆粒子と呼び、低電子密度領域の顆粒子を1型顆粒子(granulon type 1, g-1)、高電子密度領域のそれを2型顆粒子(granulon type 2, g-2)とする(次項においてEG2にも顆粒子が存在することを述べる)。g-1は低電子密度の内層、非常に電子密度が低い中層および低電子密度で薄い外層からなる3層構造を有し、EG1のISを形成すると考えられる。また、EG1bとEG1cはOAIが互いに異なることからISの特徴も異なると考えられ、EG1bのISを構成するg-1をg-1a、EG1cのそれをg-1bとする。g-2は高電子密度の内層と外層および低電子密度の中層からなり(3層構造)、外層の厚さはg-1よりも厚い。顆粒内におけるg-2の配列に層構造は認められないことから、染色標本におけるEG1の各層の染色性(エオシン好性のL0および難染色性のL1)はg-2と関連がなく、g-2自身は難染色性であると思われる。したがってEG1の各層の染色性は顆粒子間の領域であるIHの特性と推察される。EG1は2種類のIH(L0とL1を構成するIH)と1種類(EG1aの場合g-2)または2種類(EG1bとEG1cではg-1とg-2)の顆粒子から構成される。g-2はL0とL1に存在するが、g-1はL0内の中央付近に局在する(ISの存在部位に相当)。これらのことから、g-2はL0とL1のIHの成分とは相互作用せずに共存できるが、g-1はこれらIHの成分との相互作用の結果、L0の中央に移動することとなり、そこでg-1同士が密に接することでISが形成されると推察される。

Rowley and Page (1985)⁹⁾は哺乳類の好酸球顆粒に認められる結晶体の芯(crystallin core)はヤツメウナギ類の好酸球には認められないとしている。本稿のスナヤツメ幼生の好酸球顆粒には細胞化学染色標本においてISが観察

された。ISは顆粒の中央に位置し、OAIを形成することから結晶体様の構造物と考えられ、哺乳類における結晶体の芯と相同であると推察される。ヤツメウナギ類の好酸球に結晶体の芯が形成されない理由は、ISが顆粒子の集積物であるからと思われる。

3. 細胞化学染色標本観察

ヤツメウナギ類の好酸球においてこれまで報告された細胞化学的特性をTable 3に示した。

Raunich (1947)³⁾は*L. planeri*の幼生と成魚の好中球はペルオキシダーゼ陰性であり、まれに脂質染色に陽性の顆粒が認められるとしているが、両染色標本に存在するはずの好酸球についてはこれらの染色についての記述がない。

Fey (1966)⁴⁾は*L. planeri*の幼生と成魚の好酸球にはAIPとNAEが認められるが、好酸球の顆粒には両酵素は検出されないとしている。また、AcPは陰性であり、幼生ではPOは検出できなかったが、成魚では弱陽性反応が不定的に認められることがあるとしている。また、PAS反応に陽性でありとし、好酸球の顆粒には陽性反応が認められるとしている（顆粒以外に陽性部位があるのかは明記されていない）。PAS陽性反応はジアスターゼ消化後の標本では陰性であるとしている。Fey (1966)⁴⁾は好中球にはかなりの量のグリコーゲンが存在するとし、その根拠として唾液による消化によってPAS陽性部位が消失することをあげている（PAS陽性部位に関する記述はない）。また、付記にあるように、*L. planeri*の幼生と成魚の好塩基球では顆粒にPAS陽性反応が認められ、この陽性反応はジアスターゼ消化後も消失しないことからグリコーゲンではないとしている。すなわち、好中球と好塩基球では、消化試験の結果によってグリコーゲンの有無を判断している。好酸球においても好中球と同様に消化後の標本では顆粒がPAS陰性となるが（好中球では唾液を、好酸球ではジアスターゼを用いているが）、顆粒におけるグリコーゲンの有無については触れていない。いずれの染色像も示されていない。

Rowley and Page (1985)⁹⁾は*Lampetra* spp.の幼生の血液中の好酸球にAcPとPOの検出を試みている。好酸球にはPOは検出されず、AcPが顆粒の基質に存在するとし、陽性顆粒のTEM像 (fig. 7) を示している（光学顕微鏡像はない）。この図には陽性顆粒のみが1個あり（図の右端には別の陽性顆粒の一部と思われる像があるが）、好酸球における陽性顆粒の数については不明である（低倍率のTEM像や陽性顆粒数に関する記述はない）。図の陽性顆粒

内には、陽性であることを示す電子密度の高い領域と陰性の低電子密度領域がある。前者は類円形で顆粒内に2つあり、それぞれの外縁の一部は顆粒の膜に接している。また、顆粒の中央では2つの領域の外縁同士が接している。一方、後者は2つの高電子密度領域の外縁と顆粒の膜に仕切られた領域である。高電子密度領域には顆粒子が認められ、その構造は通常のTEM観察において顆粒の高電子密度領域に見られる顆粒子 (g-2) に類似する。低電子密度領域には顆粒子が認められない。Rowley and Page (1985)⁹⁾は陽性顆粒におけるこれらの構造について何も記述していない。図の陽性顆粒は融合途中のEG2であると思われる。すなわち、陽性の高電子密度領域はEG2のL0に、陰性の低電子密度領域はL1に相当し、図では2個のEG2の膜の融合が完了しており、陽性部位である双方のL0が接触して、これからL0の融合（一体化）が始まると考えられる。また、図では陽性のL0に陽性反応を示す顆粒子が認められることから（L0のIHは陰性）、EG2のL0にはAcP陽性の顆粒子（以後、g-3とする）が存在すると言える。さらに、陽性の顆粒子に3層構造が認められることから、顆粒子の高電子密度層（内層と外層）にAcPが局在すると考えられる。図のL1（AcP陰性）には顆粒子はなく、L0の融合にともなってL0を取り巻くと思われる。Rowley and Page (1985)⁹⁾の図 (fig. 7) の解析から、EG2の構造はEG1とは異なると考えられる。すなわち、EG2のL0にはg-3とg-3間のIHが存在するのに対して、L1には顆粒子は存在せずIHのみとなると推察される。顆粒子はヤツメウナギ類の好中球と好酸球の顆粒に観察される。したがって、顆粒子を内在する顆粒の形成はヤツメウナギ類の顆粒球に共通する特徴であると考えられる。

ヤツメウナギ類の好酸球における細胞化学的研究は好中球と同じく勝沼 (1919)¹¹⁾に始まると考えられる。彼はカワヤツメと考えられるヤツメウナギ類の血球にオキシダーゼ染色を施して、稀ではあるが易動性オキシダーゼ [labile oxidase; cytochrome oxidaseに相当する（文献1の後注18を参照）] を有する好酸球が存在するとしている。一方、耐久性オキシダーゼ (stable oxidase) は検出されない。

Potterら (1982)⁵⁾は未発表データに基づいてウミヤツメ幼生の好酸球顆粒にはAcPが検出されるとしているが詳細は不明である。

これまでにヤツメウナギ類の好酸球の細胞化学的特徴を調べた報告は少なく、試験した項目数も少ないため (Table

3), 好酸球に共通する特徴を示すことは困難である。本研究の結果, スナヤツメ幼生の好酸球には2種類の顆粒 (EG1とEG2) が存在し, EG2に各種酵素が検出されたことから, EG2はリソゾームであると言える。スナヤツメ幼生のEG2にはAIP, AcP, Glu, NAEおよびCAEが検出された。Rowley and Page (1985)⁹⁾は*Lampetra* spp.の幼生の好酸球に, Potterら (1982)⁵⁾はウミヤツメ幼生の好酸球にAcPの存在を認めているが, Fey (1966)⁴⁾は*L. planeri*の幼生と成魚の好酸球はAcP陰性としている。Fey (1966)⁴⁾は本研究と同様にAIPとNAEを検出しており, その存在部位は好酸球の顆粒 (おそらくEG1を指す) ではないとしている (スナヤツメ幼生でもEG1ではない)。しかし, スナヤツメ幼生で陰性であったPAS反応については, Fey (1966)⁴⁾は顆粒に陽性反応を認めている。

付 記

ヤツメウナギ類の好塩基球

これまでにヤツメウナギ類の好塩基球を報告した論文は2編しかない。

Fey (1966)⁴⁾は*L. planeri*の幼生と成魚の血液中に好塩基球を認め, その細胞化学的特徴を報告しているが, 染色像は示さなかった。好塩基球にはPOは検出されず, AIP, AcPおよびNAEが認められるが, 好塩基球の顆粒にはこれらの酵素は検出されないとしている。また, PAS反応に陽性でありとし, 好塩基球の顆粒には陽性反応が認められる報告している (顆粒以外に陽性部位があるのかは明記されていない)。顆粒のPAS陽性反応はジアスターゼ消化後の標本でも陽性であることから, グリコーゲンが存在しないとしている。TEM観察結果も記述しているが (好塩基球顆粒は縦長の楕円形, 時には丸みをおびた顆粒であり, 最大で300×150 nm), 図は示されていない

Piavis and Hiatt (1971)¹⁴⁾は成魚の血液塗抹標本にWright-Giemsa染色を施して好塩基球を観察しているが, その出現は稀であり, 顆粒は中毒性顆粒 (toxic granule) に相当すると述べている。顆粒の染色性や形状に関する記述はなく, 図 (カラー写真) は小さく不鮮明であるが, 中毒性顆粒は炎症性疾患や感染症に罹患したヒトの好中球に見られる大型の赤紫色または濃青色の顆粒であることから, Piavis and Hiatt (1971)¹⁴⁾が観察した好塩基球の顆粒もこれらの色調であったと推察される。

謝 辞

スナヤツメの幼生を提供していただいた水産大学校名誉教授 酒井治己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. 水大校研報, **70**, 125-148 (2022) [Kondo M, Yasumoto S: Morphological and cytochemical characteristics of neutrophils from larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lathenteron reissneri*. *J Nat Fish Univ*, **70**, 125-148 (2022) (in Japanese with English abstract)]
- 2) Giglio-Tos E: Sulle cellule del sangue della lampreda. *Mem R Accad Scienze Torino, Ser II*, **46**, 219-252 + 1 tavola (1896)
- 3) Raunich L: Ricerche sulla morfologia del sangue nella Lampreda di ruscello (*Petromyzon planeri*). *Pubbl Stn zool Napoli*, **20**, 289-332 + 2 tavole (X & XI) (1947)
- 4) Fey F: Vergleichende hämozytologie niederer Vertebraten III. Granulozyten. *Folia Haematol*, **86**, 1-20 (1966)
- 5) Potter IC, Percy R, Barber DL, Macey DJ: Chapter 32 The morphology, development and physiology of blood cells. *In: Hardisty MW, Potter IC (eds) The Biology of Lampreys Vol. 4A*, Academic Press, London, 233-292 (1982)
- 6) Babudieri B: Studi di ematologia comparata. Ricerche sui pesci, sugli anfibi e sui rettili. *Haematologica (Archivio)*, **11**, 199-255 + 1 tavola (1930)
- 7) Percy LR, Potter IC: Blood cell formation in the River lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *J Zool, London*, **178**, 319-340 (1976)
- 8) Percy LR, Potter IC: Further observations on the development and destruction of lamprey blood cells. *J Zool, London*, **193**, 239-251 (1981)
- 9) Rowley AF, Page M: Ultrastructural, cytochemical and functional studies on the eosinophilic granulocytes of larval lampreys. *Cell Tissue Res*, **240**, 705-709 (1985)
- 10) Jordan HE, Speidel CC: Blood formation in

- cyclostomes. *Am J Anat*, **46**, 355-391 (1930)
- 11) 勝沼精藏: 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: On the leukocytes of blood and tissue), *Trans Soc Pathol Jpn*, **8**, 9-40 + 2 attached tables (1 & 2) (1919) (In Japanese)]
 - 12) Kanesada A: A phylogenetical survey of hemocytopoietic tissues in submammalian vertebrates, with special reference to the differentiation of the lymphocyte and lymphoid tissue. *Bull Yamaguchi Med School*, **4**, 1-35 (1956)
 - 13) Fujii T, Hayakawa I: A histological and electron-microscopic study of the cell types involved in rejection of skin allografts in ammocoetes. *Cell Tissue Res*, **231**, 301-312 (1983)
 - 14) Piavis GW, Hiatt JL: Blood cell lineage in the sea lamprey, *Petromyzon marinus* (Pisces: Petromyzontidae). *Copeia*, **1971**, 722-728 (1971)
 - 15) 山崎裕治, 後藤 晃: ヤツメウナギ類における系統分類と種分化研究の現状と課題. 魚類学雑誌, **47**, 1-28 (2000) [Yamazaki Y, Goto A: Present status and perspectives on the phylogenetic systematics and speciation of lampreys. *Japan J Ichthyol*, **47**, 1-28 (2000) (in Japanese with English abstract)]
 - 16) Yamazaki Y, Yokoyama R, Nishida M, Goto A: Taxonomy and molecular phylogeny of *Lethenteron* lampreys in eastern Eurasia. *J Fish Biol*, **68(Supplement B)**, 251-269 (2006)
 - 17) Fujii T: Electron microscopy of the leucocytes of the typhlosole in ammocoetes, with special attention to the antibody-producing cells. *J Morph*, **173**, 87-100 (1982)
 - 18) 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. *J Morphol*, **170**, 71-93 (1981)
 - 19) George JC, Beamish FWH: Haemocytology of the supraneural myeloid body in the sea lamprey during several phases of life cycle. *Can J Zool*, **52**, 1585-1589 + 5 plates (I-V) (1974)
 - 20) Ardavin CF, Zapata A: Ultrastructure and changes during metamorphosis of the lympho-hemopoietic tissue of the larval anadromous sea lamprey *Petromyzon marinus*. *Dev Comp Immunol*, **11**, 79-93 (1987)