水産研究・教育機構 機関リポジトリ
FRA Japan Fisheries Research and Education Agency Institutional Repository

スナヤツメ幼生の好酸球における好酸性顆粒の発達

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産研究・教育機構 公開日: 2024-07-25 キーワード (Ja): キーワード (En): lamprey, Lethenteron reissneri; ammocoetes, eosinophil; granules
	作成者: 近藤, 昌和, 安本, 信哉 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.57348/0002010429

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

本論文　Journal of National Fisheries University 72 (3) 75-79 (2024)

スナヤツメ幼生の好酸球における好酸性顆粒の発達

近藤昌和[†]，安本信哉

Development of the eosinophilic granules in the eosinophils from larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri*

Masakazu Kondo[†] and Shinya Yasumoto

Abstract : Structure and development of eosinophilic granules (EG1) in eosinophils from larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lethenteron reissneri* were speculated. EG1 is stratified granules (two-layer) and consists of inner eosinophilic layer (L0) and chromophobic outer layer (L1). Three subtypes of EG1 are identified based on the optical artificial image (OAI) of inclusion structure (IS) in L0: EG1a, EG1b, and EG1c. The EG1a had no OAI (probably no IS). The EG1b and EG1c contain IS in L0. The OAI of both EG1b and EG1c were larger than IS. The former was round or oval chromophobic area (OAI-1), and the latter was expanded and rugged (three-dimensional) image (OAI-2) surrounded with OAI-1. EG1a was thought to be a prototype of EG1, which would develop into EG1b and then EG1c.

Key words : lamprey, *Lethenteron reissneri*, ammocoetes, eosinophil, granules

緒　言

著者らは前報[1)]においてヤツメウナギ類 (円口類) の一種であるスナヤツメ*Lethenteron reissneri* (南方型) の幼生を用い，血液中の好酸球の形態学的および細胞化学的特徴を報告した。好酸球は成熟成魚には観察されず[2)]，幼生に認められ，好酸球の顆粒 (eosinophil granule, EG) は2種類に大別された (1型, EG1; 2型, EG2)。EG1はエオシン好性の内層 (L0) と難染色性の外層 (L1) からなり，EG2は難染色性のL0と好塩基性 (正調メチレンブルー好性) のL1から構成されていた。

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を示す暗い構造体 (封入構造体inclusion structure, IS) が認められた (ISは各種細胞化学染色に陰性である)。この構造体はGiemsa染色等の一般染色では観察されなかった。しかし，一般染色標本では，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認められた (これらは細胞化学染色標本では観察されない)。両者の中央にはISが存在すると考えられ，両者の大きさは，IS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 (前者を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とした)。前報では，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となると考えた。また，EG1bのOAI-1の大きさと，EG1cのOAI-2の大きさの間に関連は認められなかったことから，EG1bとEG1cのISは異なると考えた。

哺乳類成体において，好酸球を含む顆粒性白血球は骨髄中で産生されるが，アズール顆粒を有する前骨髄球の段階ですでに各種顆粒球への分化が始まっており (電子顕微鏡

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

観察による。光学顕微鏡では区別できない[3]，好酸性顆粒(好酸球の特殊顆粒) は前骨髄球のアズール顆粒に各種成分が付加されることで形成される[3]。すなわち，アズール顆粒が成熟して特殊顆粒になる [好塩基球の特殊顆粒も同様であるが，好中球ではアズール顆粒と特殊顆粒は異なる[3,4]]。この過程で顆粒の色調は変化し，アズール好性の赤紫色 (アズール色素による異調染色性) から青紫や青色になり，最終的にエオシン好性の橙色となる[3]。したがって，成熟した好酸球にはアズール好性の色調を示す顆粒は存在しない。スナヤツメの好酸性顆粒 (EG1) の成熟過程を推測するために，前報で作製した標本を再度詳細に観察したところ，前報の記述とは一部異なる点が明らかになった。

本研究では，スナヤツメ好酸球および好酸性顆粒の構造と発達について考察する。

材料および方法

前報[1]で作製した染色標本のうち，1/15Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を希釈液として使用したMay-Grünwald・Giemsa染色 (文献2のtable 1におけるPN=74の染色) を施した標本を観察に供した。なお，採血に使用したスナヤツメ幼生は2021年3月および4月に木屋川の支流（山口県）で採集された個体である。

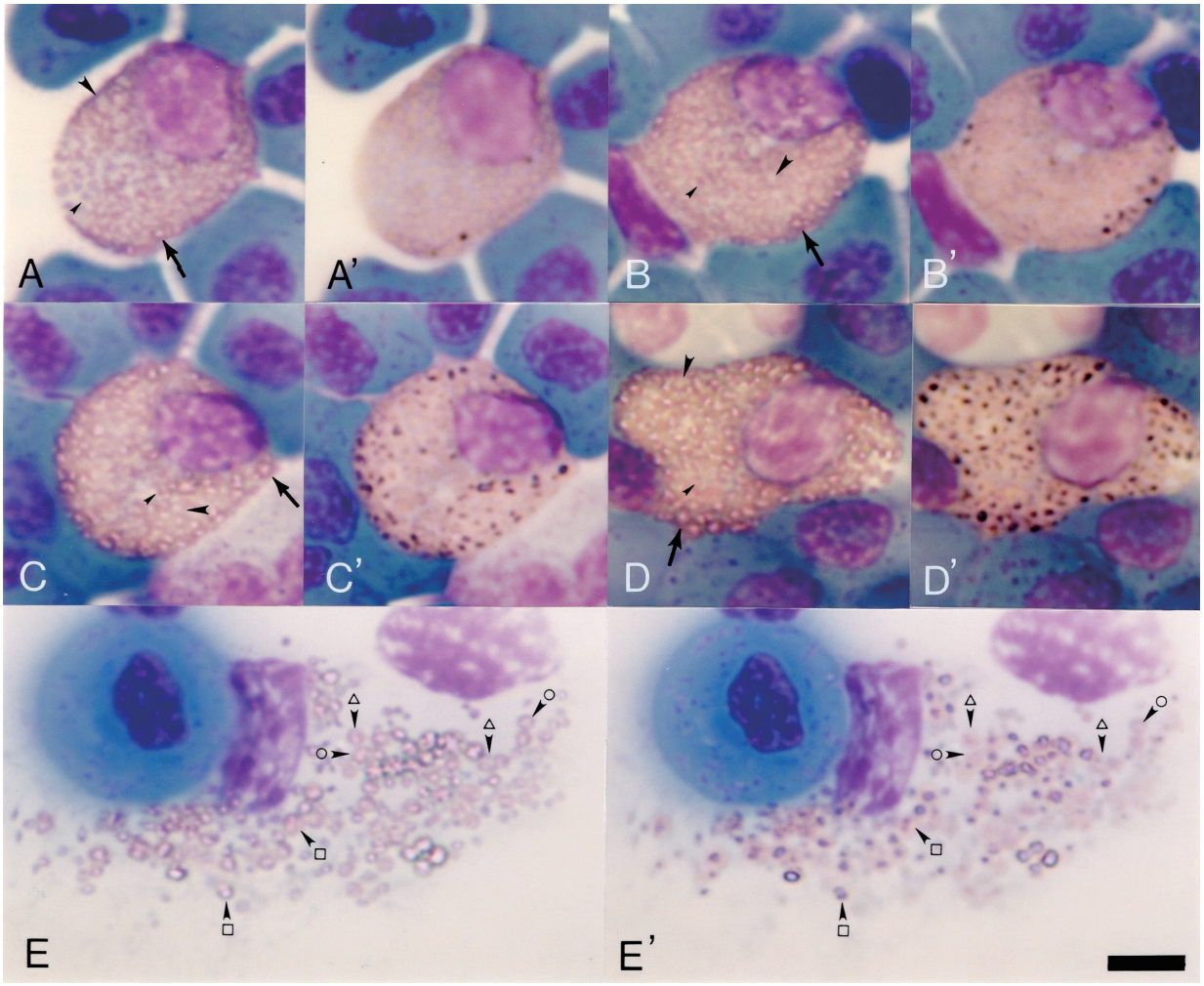

Fig. 1. Eosinophils from ammocoetes of *Lethenteron reissneri*. A-D, development of eosinophils (A→D). A, eosinophil with some EG1a, many EG1b, and a few EG1c; B, eosinophil with a few EG1a, many EG1b, some EG1c; C, eosinophil with a few EG1a, some EG1b, and many EG1c; D, eosinophil with a few EG1a, a few EG1b, and numerous EG1c. A'-D', same cells in A-D with different focus (inner part of inclusion structure (See Fig. 2) show black). Small arrowheads, EG1a; large arrowheads, EG1b; arrows, EG1c. E & E', lysed eosinophil [E' is same cell in E with different focus. Three types of fusing granules are observed: ○, EG1b +EG1b; △, EG1b + EG1c; □, EG1c + EG1c. See Fig. 3). May-Grünwald·Giemsa (PN=74; See table 1 in Kondo & Yasumoto[2]). Bar (5 μm) in E' is adapted to other figures in Fig. 1.

結果および考察

EG1bとEG1cのOAIは，L0がエオシンで染色された場合にのみ認められる[1]。EG1bのOAI-1は光学顕微鏡下で，L0内のISから放射される光がエオシンの色調を無色とすることで難染色性の領域として観察され，EG1cのOAI-2はL0のISが拡大されて立体的に見えたものと考えられている[1]。また，EG1cのOAI-2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。

本研究においてもスナヤツメ幼生の好酸球のEG1は様々な形態を示し (Fig. 1)，EG1a，EG1bおよびEG1cの1細胞中における存在比率も様々であった (Fig. 1の好酸球は1枚の染色標本上に観察された細胞である)。Figures 1A-1Dは壊れていない (intact) 好酸球，Fig. 1Eは崩壊して (lysed) 細胞内顆粒が核周辺に広がった好酸球である。また，Figs. 1A'-1E'はそれぞれFigs. 1A-1Eの好酸球を別の焦点で撮影したものであり，EG1cのOAI-2が黒く見える。Figure 1Aの好酸球にはいくつかのEG1aとともに多くのEG1bと少数のEG1cが認められる。また，Fig. 1Bでは少数のEG1aと多くのEG1bおよびいくつかのEG1cが観察される。Figure 1Cの好酸球は少数のEG1a，いくつかのEG1bおよび多数のEG1cを含み, Fig. DではEG1aとEG1bはともに少数であり，EG1の多くはEG1cとして認められた。これらの好酸球では細胞質に顆粒が充満しており，個々の顆粒の詳細を調べることは困難である。しかし，崩壊した好酸球 (Fig. 1E) の観察によってEG1cのOAI-2の周囲にはEG1bに見られるOAI-1が形成されていることが明らかとなった。前報[1]ではEG1bとEG1cのISは異なるとしたが，この観察結果から，EG1cのISは二重構造をしており，内側の構造がOAI-2を，外側の構造がOAI-1を形成すると考えられる。

崩壊した好酸球には顆粒同士の融合像も観察された。Figure 1Eの“○”はEG1b同士の融合を，“△”はEG1bとEG1cの融合を，“□”はEG1c同士の融合を示す融合途中の

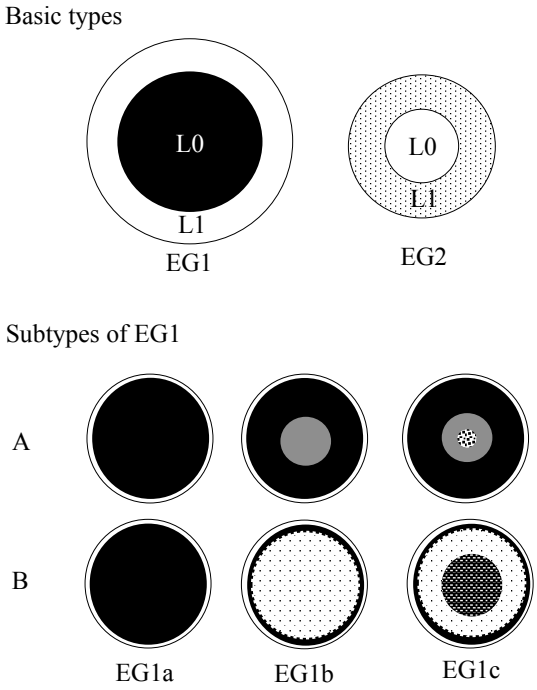

Fig. 2. Structure of eosinophil granules (EG) from ammocoetes of *Lethenteron reissneri*. EG1, type 1; EG2, type 2; L0, layer 0 (inner layer); L1, layer 1 (outer layer); □, chromophobic; ■, eosinophilic; ⊡, basophilic (orthomethylenophilic). Inclusion structure (IS) in L0 of EG1 is not recognized in normal staining preparation, such as May-Grünwald, Giemsa, and May-Grünwald・Giemsa (probably due to the affection of eosin-stained L0), but found in cytochemical staining preparation. The IS is probably not in EG1a. Single (▩) and double structure (▩, inner; ■, outer) of IS are expected in EG1b and EG1c, respectively. The IS occur optical artificial image (OAI) in L0 of EG1b and EG1c: EG1b, chromophobic area (OAI-1; ⊡) in L0; EG1c, OAI-1 and expanded and rugged (three-dimensional) image (OAI-2; ▩). OAI-2 is surrounded with OAI-1. Both OAI are larger than IS. A, expected structure; B, observation image.

顆粒と考えられる。“○”の顆粒は顆粒内にOAI-1が2つ認められる。“△”の顆粒ではOAI-1が2個あるが，そのうち1つにはOAI-2が検出される。また，“□”では2個のOAI-1内にそれぞれ1個のOAI-2が観察される。本研究ではEG1aと他のEG1 (EG1b，EG1c) の融合像は認められなかった。EG1aにISの成分が付加されてEG1bやEG1cになると考えられるが[1]，EG1bとEG1cも融合することから，好酸球のEG1は十分に発達すると全てEG1cになると推察される。このことは，好酸球内のEG1の種類の比率と好酸球の発達が関連していることを示唆している。すなわち，EG1cが多いほど発達した好酸球であると考えられる。したがって，Figs. 1A-1DはA→Dに向かって発達が進んだ好酸球であると言える。

以上の観察結果から推定される成熟した好酸球の顆粒構造の模式図を Fig. 2に，EG1の発達段階の推定図をFig. 3に示す。スナヤツメの好酸球には2層構造を有する成層顆粒が2種類存在し，好酸性領域を有する顆粒はEG1である。一方，EG2は難染色性の内層と好塩基性の外層を有し，内層 (L0) にはアルカリ性フォスファターゼ，酸性フォスファターゼ，β-グルクロニダーゼ，α-ナフチルアセテートエステラーゼおよびナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼが検出されることから[1]，EG2はリソゾームであると考えられる。一方，EG1にはリソゾーム酵素は認められず，種々の糖類染色や脂質染色にも陽性反応を示さないことから[1]，顆粒内の成分については不明である。EG1は観察時の形態によって3種類に細分される。Figure 2の“Subtypes of EG1”における“A”は各EG1の予想される構造であり，“B”では観察時の形態を模式的に描いた。EG1aは内層内にEG1bやEG1cに存在するISがなく，OAIは形成されない。EG1bのISはOAI-1を形成することで，エオシン好性の内層に難染色性の領域が観察されることとなる。EG1cには二重構造を有するISの存在が予想され，外側の

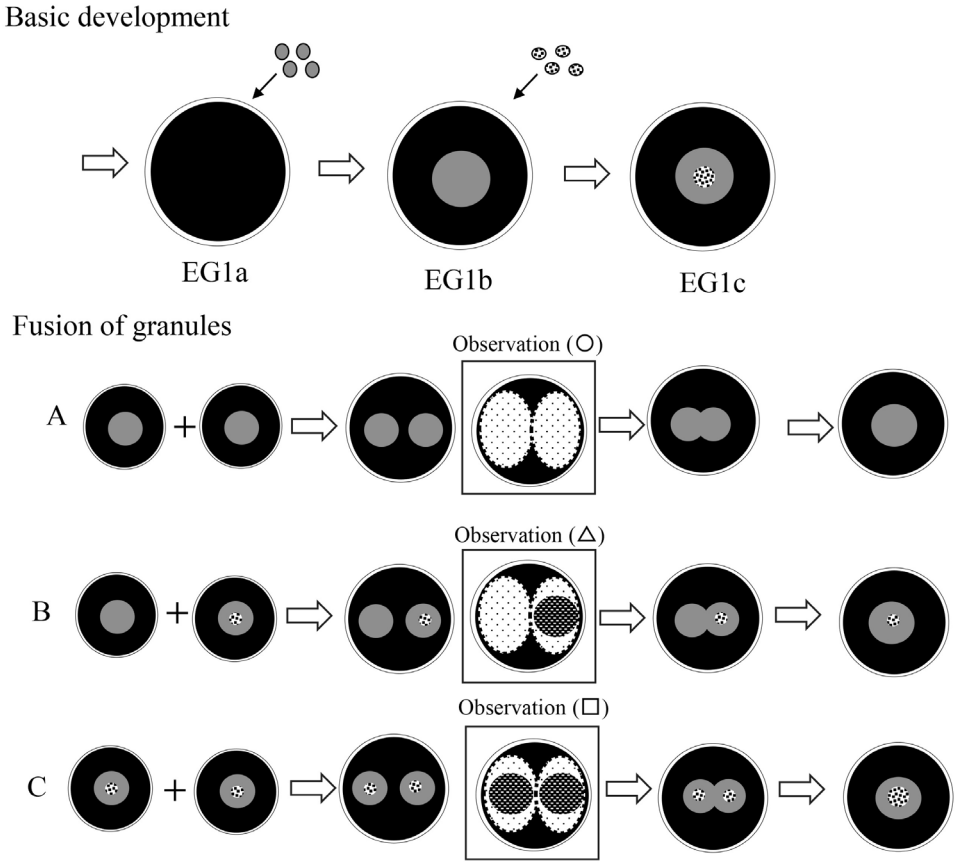

Fig. 3. Development of eosinophil granules type 1 (EG1) from ammocoetes of *Lethenteron reissneri*. In the basic process, vesicles from Golgi body will be fused and firstly formed EG1a. Secondly, vesicles containing the factor of IS, which occur OAI-1, are added to EG1a, and the EG1a change to EG1b. Thirdly, vesicles containing the factor of IS, which occur OAI-2, are added to EG1b, and the EG1c is formed. Other development process is fusion of granules. At least, three types of fusion (A-C) are identified. A, NG1b + NG1b; B, NG1b + NG1c; C, NG1c + NG1c. ○, △, and □ correspond to same diagrams in Figs. 1E & 1E'.

ISからはEG1bのISと同様にOAI-1が，内側のISからはOAI-2が生じ，観察時にはOAI-1内にOAI-2が認められる (Fig. 2)。

EG1aはゴルジ装置からの分泌小胞が融合して形成されると考えられる。将来EG1bのISを構成することとなる因子を含む小胞がEG1aに融合することでEG1bとなる。次いで，EG1cのOAI-2を形成する因子を含む小胞がEG1bに融合することで，ISは二重構造となり，EG1bはEG1cとなる (Fig. 3)。以上がEG1の基本的な発達過程であるが，その他にEG1同士の融合も起こる。EG1b同士が融合する過程には，顆粒内にOAI-1を形成するISが2つ存在する時期があり，この場合，顆粒内にOAI-1が2つ観察される。同様にEG1bとEG1cの融合やEG1c同士の融合においてもそれぞれのISが顆粒内に別々に存在する時期があると考えられ，前者では2個のOAI-1と1個のOAI-2が (OAI-2の周囲にはOAI-1が形成される)，後者では2個のOAI-1それぞれの中にOAI-2が観察される。その後，顆粒内のISは融合し，EG1bおよびEG1cに特有おISを形成する (Fig. 3)。

本稿の緒言にも記したように，哺乳類の好酸球ではメチレンアズールによって赤紫色を呈するアズール顆粒に各種成分が付加されることで好酸性顆粒 (好酸球の特殊顆粒) が形成され[3]，この成熟過程で顆粒の色調は赤紫色から青紫や青色になり，最終的に橙色となる[3]。しかし，ヤツメウナギ類の造血組織中の好酸球において，好酸性顆粒の色調を紫色や青色とした報告はない[1]。また，前報[1]において血液中に観察された未熟な好酸球 (fig. 1A) においても赤紫色や青紫色の顆粒は認められていない (EG2のL1は淡青色を示すが，EG1とは細胞化学的特徴が異なることから，両者は異なる顆粒である)。これらの知見から，スナヤツメを含むヤツメウナギ類の好酸球の発達過程にはアズール顆粒を産生する時期はないと言える。

哺乳類では好中球にもアズール顆粒が形成されるが，アズール顆粒 (一次顆粒) が最初に産生され，次いで好中性骨髄球において特殊顆粒 (二次顆粒) が産生される。両顆粒は異なる顆粒であるが，アズール顆粒は顆粒の発達 (成熟) にともなってアズール好性を失う[4]。ヤツメウナギ類の造血組織および血液中の好中球にもアズール好性の顆粒が報告されている[5]。スナヤツメにおいても幼生と成熟成魚のどちらにもアズール好性の領域を有する2層性の顆粒が2種類観察されている[2,5]。ヤツメウナギ類のアズール好性顆粒を哺乳類のアズール顆粒と相同な顆粒であると仮定すると，そのアズール好性は好中球および顆粒の発達段階で変化 (消失) しないこととなる。ヤツメウナギ類の好中球のアズール好性顆粒は，哺乳類好中球のアズール顆粒の原始型かもしれない。この仮定が正しければ，ヤツメウナギ類の好酸球と好中球の発達過程は哺乳類とは大きく異なると言える。

文　献

1) 近藤昌和，安本信哉: スナヤツメ幼生の好酸球の形態学的および細胞化学的特徴. 水産大学校研究報告, **70**, 149-163 (2022) [Kondo M, Yasumoto S: Morphological and cytochemical characteristics of eosinophils from larva (ammocoetes) of far eastern brook lamprey *Lathenteron reissneri*. *Journal of National Fisheries University*, **70**, 149-163 (2022) (in Japanese with English abstract)]

2) 近藤昌和，安本信哉: スナヤツメ成魚の好中球の形態学的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)]

3) 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)]

4) Parmley RT: Mammals. *In*: Rowley AF, Ratcliffe NA (ed) Vertebrate Blood Cells, Cambridge University Press, Cambridge etc., 337-424 (1988)

5) 近藤昌和，安本信哉: スナヤツメ幼生の好中球の形態学的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)]

*この論文は2022年に発行されたことになっているが [表紙 (p109) に記載]，これは誤りであり，正しくは2023年である。