

クルマエビの神経節，造血組織および鰓の固着食細胞

近藤昌和^{1†}，友永 進²，高橋幸則¹

Fixed Phagocytes in the Ganglion, Hematopoietic Tissue and Gill of Kuruma Prawn *Marsupenaeus japonicus*

Masakazu Kondo^{1†}, Susumu Tomonaga² and Yukinori Takahashi¹

Abstract : Morphological characteristics of fixed phagocytes (FP) in the ventral abdominal ganglion, hematopoietic tissue (HT) and gill of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* were examined by electron microscopy. The FP in these tissues did not phagocytose foreign substances such as colloidal carbon and latex beads injected into abdominal muscle of the prawn. However, electron-dense materials which considered as residual body after phagocytosis were observed in the FP. The FP in the ganglion and HT had a few cell processes and small number of fine granules. Podocyte in the gill (branchial podocyte) contained residual body in the large vacuoles. Therefore, the podocyte is fixed phagocyte in the wide sense. After injection of the foreign substances, hemocytes formed mesh structure and phagocytosed the substances in the lumen of gill. This finding indicates that the lumen of gill is the important space for defense mechanism by hemocytes.

Key words : kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, fixed phagocyte, ganglion, hematopoietic tissue, gill

緒 言

十脚甲殻類の細胞性防御機構を担当する細胞として、血球のほかに臓器や組織に定着している細胞が知られている¹⁾。定着型の細胞は飲食性細胞と貪食性細胞に大別され、前者には鰓に存在する足細胞 (branchial podocyte) と触角腺 (antennal gland, 腎臓に相当) の足細胞が含まれる¹⁾。一方、後者には体内の様々な血体腔壁に存在する貪食性貯蔵細胞 (phagocytic reserve cell) と定着性食細胞 (fixed phagocyte) があり、定着性食細胞は肝動脈から分枝した血管の周囲に位置する¹⁾。クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* においても心臓、肝臓および触角腺の血体腔壁に、人為的に注入した異物を貪食する食細胞が存在する^{2,3)}。また、リンパ様器官と称される細血管が分枝した構造体の血管壁に多数の食細胞が認められている^{2,3)}。

心臓の食細胞は通常、小型の顆粒を有する細胞であるが^{2,3)}、電子密度の高い物質を有することがあり、粒子状の異物がこの物質中に認められることがある。したがって、この高電子密度物質は異物を取り込んだ跡 (残渣小体) と考えられる。同様の残渣小体は前述のクルマエビ触角腺の食細胞にも認められている⁴⁾。また、触角腺には人為的に注入した異物に対しては貪食を示さないものの、残渣小体または食胞を有する細胞が3種類観察されている⁴⁾。クルマエビの神経節、造血組織および鰓にも同様の残渣小体を有する細胞が見られたことから、本研究ではそれら細胞の構造について、さらに比較のために再調査を行った心臓の食細胞について報告する。なお、本報告では、血球以外の食細胞を広義の固着食細胞とみなし、単に“固着食細胞”と称することとする。

2011年11月25日受付. Received November 25, 2011.

¹水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

²山口大学医学部保健学科 (Faculty of Health Sciences, Yamaguchi University School of Medicine, Ube, Yamaguchi 755-8554, Japan)

[†]別刷り請求先 (corresponding author) : kondom@fish-u.ac.jp

材料および方法

実験動物

山口県内の養殖場から搬入したクルマエビ（体重約21 g）を水温 $21.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で1週間以上馴致飼育したのち実験に供した。飼育期間中は、市販のクルマエビ用配合飼料を毎日飽食給餌した。

透過型電子顕微鏡観察

鰓、心臓、腹部神経節および第二顎脚基部の筋肉とそれに付着した造血組織（以後、造血組織と呼ぶ）を摘出し、Kondo et al. (1998)²⁾ に準じてパラフォルムアルデヒドとグルタルアルデヒドを含む固定液中で細切し、同液中で1時間固定した。カコジル酸緩衝液（pH7.4）で洗浄し、オスミウム酸で二次固定したのち、エタノール上昇系列で脱水した。プロピレンオキサイドに置換後、神経節と造血組

織はエポキシ樹脂に、鰓はスーパー樹脂に包埋した。超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色を施したのち、透過型電子顕微鏡（JEM-200CM, 日本電子）で観察した。また、厚切片（厚さ $1 \mu\text{m}$ ）のトルイジンブルー染色標本の光学顕微鏡観察も行った⁵⁾。なお、近藤（2003）³⁾ に準じてラテックスビーズ（直径 $1.0 \mu\text{m}$ ）または炭素粒子を筋肉内注射したクルマエビの心臓、神経節、造血組織および鰓の標本も観察した。

結 果

心臓の固着食細胞

心臓の食細胞はクルマエビに注入されたラテックスビーズや炭素粒子に対して貪食を示したが、時に残渣小体と考えられる高電子密度物質を有することがあった（Fig. 1a）。残渣小体中には粒子状の異物（人為的に注入されたもので

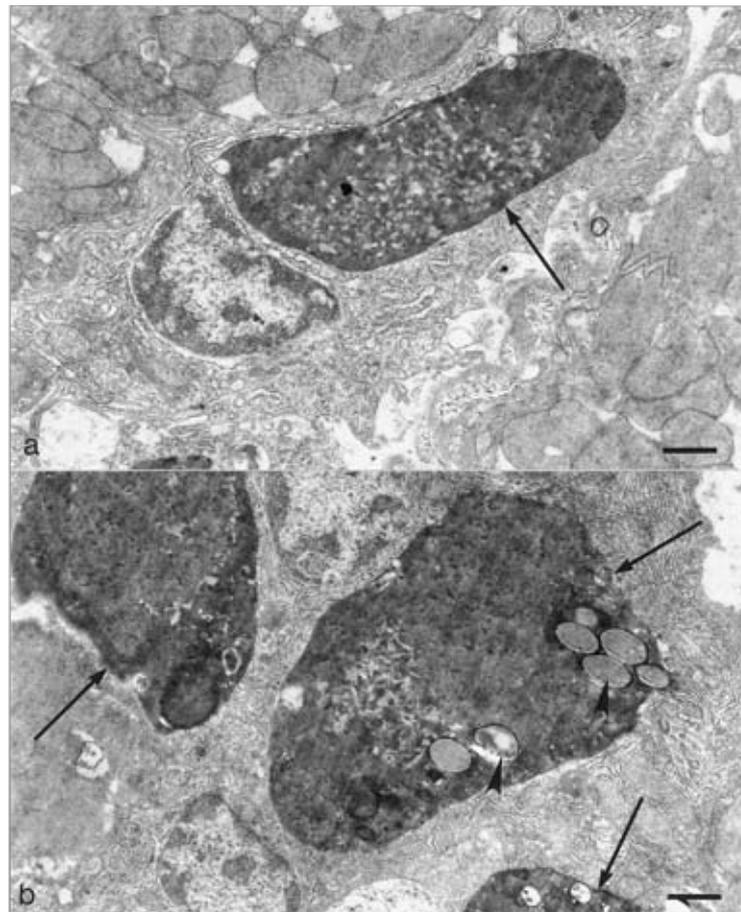


Fig. 1. Transmission electron micrographs of fixed phagocytes with residual body (arrows in a & b) in the heart of kuruma prawn one day after injection of latex beads. Many fixed phagocytes phagocytosed latex beads (phagocytosed latex beads were not observed in these figures). The phagocyte sometimes engulfed unknown particles (arrowheads in b) and stored the particles in the residual body. Bars= $1 \mu\text{m}$.

はない) が観察されることもあった (Fig. 1b)。

神経節の固着食細胞

神経節の神経網中に残渣小体を有する固着食細胞が観察された (Fig. 2a)。細胞内にはミトコンドリアや粗面小胞

体が少数認められ、電子密度が均一な微細顆粒 (直径約 $0.1\mu\text{m}$) も少数観察された (Fig. 2b)。また、本細胞は少数の細胞質突起を有していた。なお、本細胞にはクルマエビに注入されたラテックスビーズや炭素粒子に対する貪食は観察されなかった。

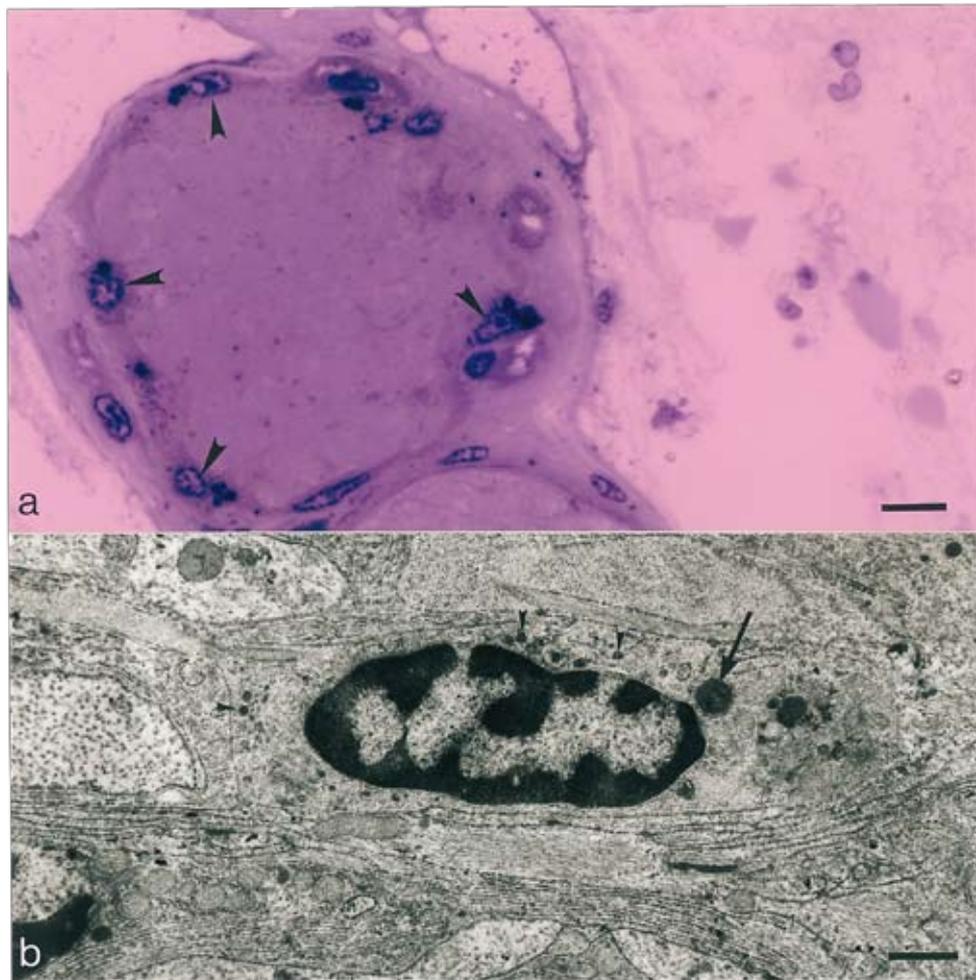


Fig. 2. Fixed phagocytes in the ganglion of kuruma prawn one day after injection of latex beads. a, epon section stained with toluidine blue (bar= $10\mu\text{m}$); b, transmission electron micrograph (bar= $1\mu\text{m}$). The phagocytes (arrowheads in a) contain residual body (arrow in b) and fine granules (arrowheads in b). The latex beads were not phagocytosed in the fixed phagocytes.

造血組織の固着食細胞

造血組織の基本単位は結合組織性の膜で包まれた小葉であり、電子顕微鏡観察によって分類されている3種類の血球^{2,3)}に同定される未成熟な細胞が1小葉内に観察された (Fig. 3a)。また、血液中の血球を分類する形質を有さない細胞 (未分化細胞) も同じ小葉に見られた。まれに残渣小体を有する固着食細胞が小葉内に認められた (Fig. 3b)。

本細胞は少数の細胞質突起を有し、細胞内にはミトコンドリアや粗面小胞体とともに電子密度が均一な微細顆粒 (直径約 $0.1\ \mu\text{m}$) が少数観察された (Fig. 3b)。クルマエビに注入されたラテックスビーズや炭素粒子に対して本細胞は貪食を示さなかった。また、小葉内にもこれら異物は観察されなかった。

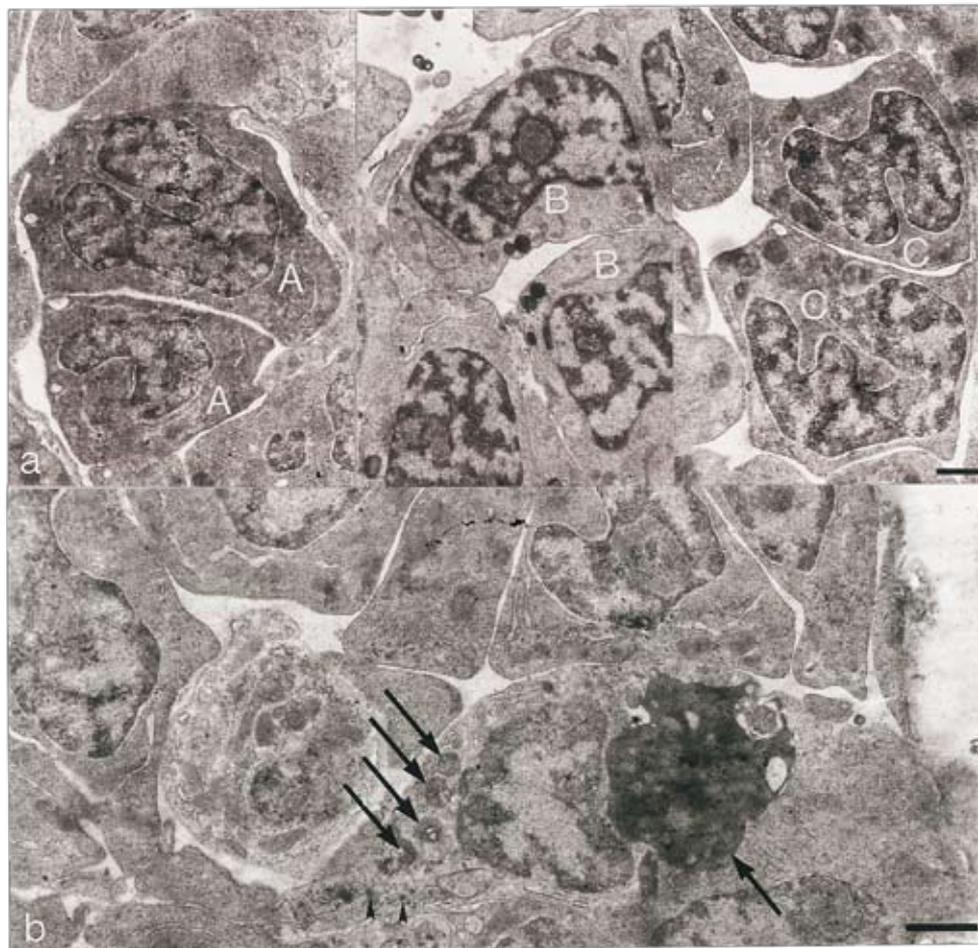


Fig. 3. Transmission electron micrographs of immature hemocytes (a) and fixed phagocyte (b) in the hematopoietic tissue of kuruma prawn one day after injection of latex beads. A, hyaline cell with cytoplasmic deposits (Kondo et al. 1998) (=type A, Kondo 2003) ; B, small granular cell with small-sized granules (Kondo et al. 1998) (=type B, Kondo 2003) ; C, large granular cell with large-sized granules (Kondo et al. 1998) (=type C, Kondo 2003) . The fixed phagocyte contains residual bodies (arrows) and fine granules (arrowheads). The latex beads were not phagocytosed in the fixed phagocytes and immature hemocytes. Bars= $1\ \mu\text{m}$.

鰓の固着食細胞

鰓の足細胞には、被覆小胞、ミトコンドリア、小胞体とともに大型の空胞が存在した (Fig. 4)。空胞内には何も認められないこともあるが、通常、電子密度の高い残渣小体と考えられる物質が観察された (Fig. 4)。クルマエビ

に注入されたラテックスビーズや炭素粒子に対して本細胞は貪食を示さなかった。鰓の血管内には固着食細胞は認められないものの、ラテックスビーズや炭素粒子の注入により、血球が網状構造を形成し、この血球が貪食を示した (Fig. 5)。

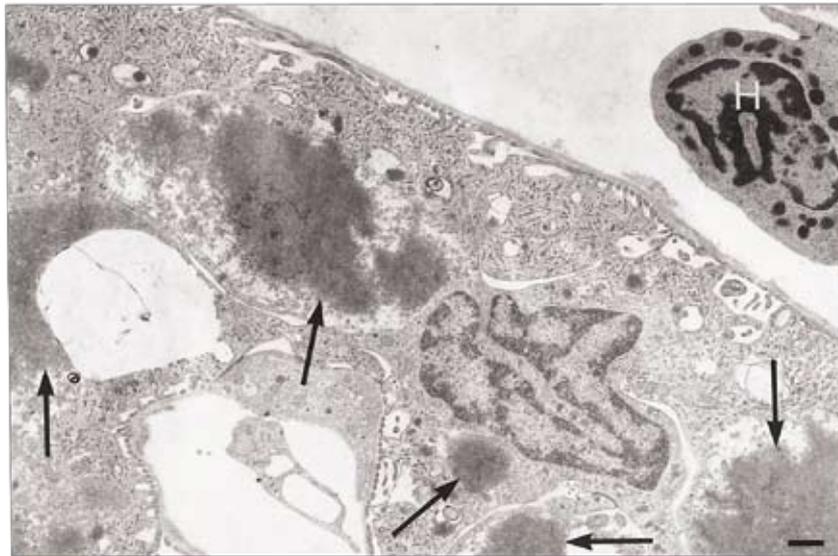


Fig. 4. A transmission electron micrograph of branchial podocytes (fixed phagocytes in the wide sense) in the gill of kuruma prawn one day after injection of latex beads. The vacuoles of podocytes contained electron-dense material (arrows). The latex beads were not phagocytosed in the fixed phagocytes. H, Hemocyte. Bar= 1 μ m.

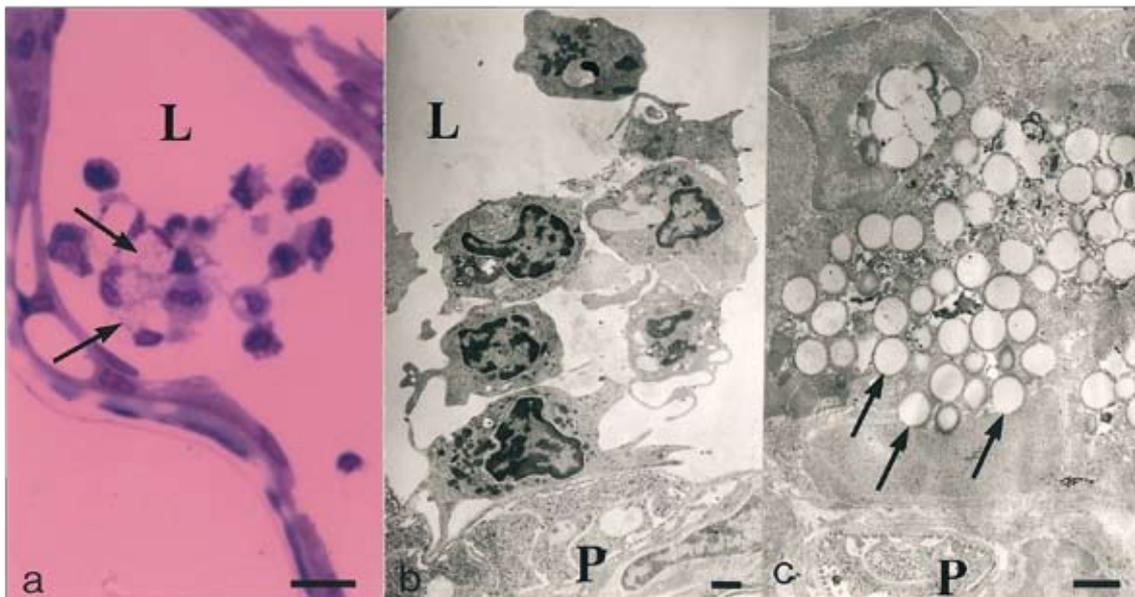


Fig. 5. Phagocytosis of latex beads by hemocytes in the gill of kuruma prawn one day after injection of latex beads. a, epon section stained with toluidine blue (bar=10 μ m) ; b & c, transmission electron micrograph (bars= 1 μ m). Hemocytes formed mesh structure (a, b) in the lumen (L) of gill artery and phagocytosed latex beads (arrows in a, c). P, branchial podocyte.

考 察

これまでに、クルマエビの固着食細胞として、リンパ様器官、心臓、中腸腺および触角腺に存在する食細胞が知られている²⁻⁴⁾。また、触角腺には4種類の固着食細胞(1~4型固着食細胞)が観察されている⁴⁾。これらのうち、リンパ様器官、心臓および中腸腺の食細胞と、触角腺の触角腺管の基底膜上に位置する1型固着食細胞は、クルマエビに人為的に注射された粒子状異物を貪食する^{2,3)}。しかし、触角腺の2~4型固着食細胞は残渣小体または食胞を有するものの、注射された粒子状異物を貪食しない⁴⁾。本研究においても神経節、造血組織および鰓に観察された固着食細胞には残渣小体が認められるものの、注射された粒子状異物を貪食しなかった。注射された異物が固着食細胞に貪食されるには、異物が固着食細胞に接触する必要がある。神経節、造血組織および鰓の固着食細胞も、粒子状異物と接触できなかったために、それら異物に対する貪食を示さなかったと考えられる。しかし、これら固着食細胞には残渣小体と考えられる構造が認められることから、各組織における生体防御に関与していると思われる。

神経節と造血組織の固着食細胞には電子密度が均一な微細顆粒が観察された。同様の顆粒は中腸腺の固着食細胞と触角腺の1型および4型固着食細胞で観察されている^{3,4)}。一方、心臓の固着食細胞の顆粒は、その中心部の電子密度が高く、顆粒を包む膜と中心部の間の領域の電子密度は低いことが知られている^{2,3)}。また、リンパ様器官の固着食細胞と触角腺の2型および3型固着食細胞には顆粒は観察されていない^{2,3)}。

粒子状異物を注射したクルマエビでは、鰓の血管内において血球が網状構造を形成し、粒子状異物を貪食した。網状構造を形成する血球は、血流に乗って鰓の血管内を通過する異物と接触することとなり、異物とともに血液中を循環する場合に比べて効率的に貪食が行えると考えられる。したがって、鰓の血管内は血球の生体防御機能を発揮する場として重要であると言える。

本研究結果と既報²⁻⁴⁾によって、クルマエビではリンパ様器官、心臓、中腸腺、触角腺、神経節、造血組織および鰓に固着食細胞が存在することが明らかとなった。Johnson (1987) は十脚甲殻類の固着食細胞を飲食性細胞と貪食性細胞に大別し、前者には鰓と触角腺の足細胞を、後者には体内の様々な血体腔壁に存在する貪食性貯蔵細胞と、肝動脈から分枝した血管の周囲に位置する定着性食細胞

胞を当てはめた¹⁾。クルマエビの鰓と触角腺にも足細胞が存在するが、それらには残渣小体と考えられる構造が認められることから、飲食性細胞に分類するよりも固着食細胞として扱うべきと考える。クルマエビの心臓^{2,3)}、中腸腺³⁾、触角腺の1型固着食細胞^{3,4)}はJohnson (1987)¹⁾の貪食性貯蔵細胞に相当する。しかし、触角腺の2型および4型固着食細胞⁴⁾、神経節ならびに造血組織に観察された固着食細胞は血体腔に面しておらず、貪食性貯蔵細胞には分類できない。また、クルマエビの肝動脈から分枝した血管の周囲には定着性食細胞は無い³⁾。一方、クルマエビのリンパ様器官は心臓から伸びる一對の触角動脈からそれぞれ分岐した血管が、胃の腹側、中腸腺の前方において複雑に分岐した構造をしており、血管壁中に多数の固着食細胞を有する^{2,3)}。リンパ様器官の固着食細胞は血体腔に面していないことから貪食性貯蔵細胞には分類できない。リンパ様器官の血管の周囲に食細胞が存在することはJohnson (1987)¹⁾の定着性食細胞と類似するが、分岐元の血管が異なる。また、Johnson (1987) の定着性食細胞を有する血管では外周に周皮がなく、食細胞とともに顆粒状層が観察されるが¹⁾、リンパ様器官の血管には周皮があり、顆粒状層は認められない³⁾。さらに、Johnson (1987) の定着性食細胞はほとんど顆粒を有さず、異物貪食時には小型の顆粒が出現するが¹⁾、リンパ様器官の食細胞では異物貪食の有無にかかわらず、顆粒は観察されない^{2,3)}。これらの点から、リンパ様器官の固着食細胞はJohnson (1987)¹⁾の定着性食細胞にも分類できない。

クルマエビ類の「リンパ様器官」は、Oka (1969) によって命名されたが⁷⁾、リンパ様器官と同様に、触角動脈から分岐した血管が胃の下方、中腸腺の前方で分岐した構造がCuénot (1905) によってロウソクエビの一種*Processa edulis*に観察されており⁸⁾、sub-stomachal organと呼ばれている^{1,8)}。また、Cuénot (1905) は*P. edulis*の肝動脈の分枝には食細胞は存在せず、sub-stomachal organの血管を食細胞が囲むとしている^{1,8)}。しかし、その食細胞はJohnson (1987) の定着性食細胞であり¹⁾、クルマエビのリンパ様器官の固着食細胞とは異なる。Cuénot (1905) は食細胞を有する血管からなるsub-stomachal organや肝動脈分枝をphagocytic organ (貪食器官)と呼んでいる^{1,8)}。したがって、クルマエビのリンパ様器官もphagocytic organの一種であると言える。リンパ様器官やCuénot (1905) のphagocytic organはいずれも基本構造は食細胞を有する分岐した血管であることから、これらの血管を貪

食血管 (phagocytic artery) と呼ぶことをここに提唱する。すなわち、クルマエビのリンパ様器官, *P. edulis* の sub-stomachal organ および多くの十脚甲殻類の肝動脈分枝は食細胞を有する貪食器官であり, その基本構造は貪食血管であると言える。クルマエビ上科イシエビ科の *Sicyonia ingentis* にも, 触覚動脈から分岐した血管が分岐してリンパ様器官や sub-stomachal organ と同じ位置に存在する構造が知られており, そこでは血球造血が行われ, 造血小節 (hematopoietic nodule) と呼ばれている⁹⁻¹¹⁾。また, 造血小節の基本構造は分岐した血管であり, その血管は造血細管 (hematopoietic tubule) と命名されている⁹⁻¹¹⁾。さらに, *S. ingentis* に注入された異物は造血細管の血球, 特に small granule hemocyte に貪食される¹²⁾。したがって, 造血小節も貪食血管の一種と考えられるが, 造血小節には血球以外の食細胞は観察されていない。なお, クルマエビのリンパ様器官には血球造血は認められていない^{2,3)}。

以上のように, クルマエビには Johnson (1987)¹⁾ の分類基準には当てはまらない食細胞が複数種あることから, 今後, 十脚甲殻類において, 臓器や組織に存在する血球ではない食細胞を広義の fixed phagocyte とし, 固着食細胞と呼ぶべきと考える。本研究では残渣小体を指標として食細胞を同定し, 神経節, 造血組織および鰓の固着食細胞が体内に注入された粒子状異物を貪食しない理由として, 異物との接触がないことを挙げた。しかし, 残渣小体はオートファジーによっても形成される¹³⁾。神経節, 造血組織および鰓の固着食細胞が外来異物を貪食するのか否かを明らかにするためには, 組織への異物注入や, 固着食細胞を分離して試験管内で異物と接触させるなどの方法を検討する必要がある。

文 献

- 1) Johnson PT: A review of fixed phagocytic and pinocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. *Dev Com Immunol*, 11, 679-704 (1987)
- 2) Kondo M, Itami T, Takahashi Y, Fujii R, Tomonaga S: Ultrastructural and cytochemical characteristics of phagocytes in kuruma prawn. *Fish Pathol*, 33, 421-427 (1998)
- 3) 近藤昌和: クルマエビの血球および定住性食細胞に関する研究. 九州大学大学院博士学位論文, 生資環博乙第40号, 107pp + 正誤表 (2003)
- 4) 近藤昌和, 友永 進, 高橋幸則: クルマエビ触角腺の固着食細胞. 水産増殖, 60, 印刷中
- 5) 水平敏知: 厚切り切片の光学顕微鏡による観察. 医学・生物学領域の電子顕微鏡操作マニュアル. 講談社サイエンティフィク, 講談社, 東京, 72-73 (1986)
- 6) Fingerman M: Glands and Secretion. In: Harrison FW, Humes AG (ed) *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10 Decapod Crustacea*. Wiley-Liss, New York, 345-394 (1992)
- 7) Oka M: Studies on *Penaeus orientalis* Kishinouye-VIII. Structure of the newly found lymphoid organ. *Bull Japan Soc Sci Fish*, 35, 245-250 (1969)
- 8) Cuénot L: L'organe phagocytaire des Crustacés Décapodes. *Arch Zool Exp Gén, Sér 4*, 3, 1-15+Pl I (1905)
- 9) Martin GG, Hose JE, Kim JJ: Structure of hematopoietic nodules in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*: Light and electron microscopic observations. *J Morphol*, 192, 193-204 (1987)
- 10) Martin GG, Hose JE, Corzine CJ: Morphological comparison of major arteries in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*. *J Morphol*, 200, 175-183 (1989)
- 11) Hose JE, Martin GG, Tiu S, McKrell N: Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Biol Bull*, 183, 185-199 (1992)
- 12) Martin GG, Hose JE, Minka G, Rosenberg S: Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis* (Crustacea: Decapoda): Role of hematopoietic tissue. *J Morphol*, 227, 227-233 (1996)
- 13) 吉森 保: オートファジー: 細胞質とリソソームを結びメインロード. 米田悦啓 (編), 細胞内輸送がわかる. 羊土社, 東京, 96-101 (2002)

