

## エボシガイの血球

近藤昌和\*<sup>1</sup>・友永 進\*<sup>2</sup>・高橋幸則\*<sup>1</sup>

### Hemocyte of Ship Barnacle *Lepas anatifera*

Masakazu Kondo\*<sup>1</sup>, Susumu Tomonaga\*<sup>2</sup>, and Yukinori Takahashi\*<sup>1</sup>

Only a single type of hemocyte, chromophobic granulocyte, was observed in the hemolymph of the ship barnacle, *Lepas anatifera*. This cell was round or oval in shape and characterized by cytoplasmic filopodia and numerous granules ( $<0.5\mu\text{m}$  in diameter). The granules were not stained with May-Grünwald or hematoxylin-eosin. Some granules around the nucleus were PAS-positive. The nucleus was central or eccentric and varied in shape from round to kidney-shaped. One nucleolus was found in the nucleus of some cells. Glycogen was detected in the cytoplasm, while lipofusutin-like granules were frequently observed there. These findings suggested that this hemocyte type has a phagocytic ability. Phenoloxidase (PO) activity was also observed in the hyaloplasm, but not in the granule. The PO activity value in the serum of the ship barnacle was much lower than that of the kuruma prawn. Gelation of the hemolymph, clot formation and cell agglutination did not occur. However, a chain-, mesh- or cluster-like structure possibly originating from the granular materials was formed after degranulation and lysis of the hemocytes *in vitro*, probably suggesting the occurrence of a primitive blood coagulation system. Thus, these observations suggested that the ship barnacle has the fundamental cellular immune system of crustaceans, including phagocytosis, PO involvement and blood coagulation.

## 1 緒 言

甲殻類の血球は体液凝固、創傷治癒、異物貪食などに関与することが知られているが<sup>1,2)</sup>、それらに関する研究は主に軟甲亜綱十脚目で行われており、他のグループでの知見は少ない。エボシガイ *Lepas anatifera* Linnaeus は蔓脚亜綱に属し、甲殻類の系統進化上、十脚目とは大きく異なるグループと考えられている<sup>3)</sup>。また、蔓脚類は石灰質からなる殻を持つために化石として残りやすく、介虫類と並んでグループ内の系統進化が詳しく調べられており<sup>4,30)</sup>、免疫系(生体防御系)の進化を探究する上でも有用な動物群であると考えられる。しかし、蔓脚類の生体防御

機構については、レクチンについて詳しく報告されているにすぎず<sup>5,6)</sup>、血球に関しては Waite and Walker<sup>7)</sup> によるフジツボ類 *Balanus hameri* の2種類の血球についての報告を除いてほとんど知られていない。そこで本研究では、蔓脚類の中でも原始的とされる完胸超目エボシガイ亜目のエボシガイについて、その血球の形態学的特徴を明らかにするとともに、血球機能について調べたので、その結果を報告する。

## 2 材料および方法

### 実験動物

実験に供したエボシガイ(頭上部長約2.5cm)は、山口県

2001年7月13日受付。Received Jul. 13, 2001

\* 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).

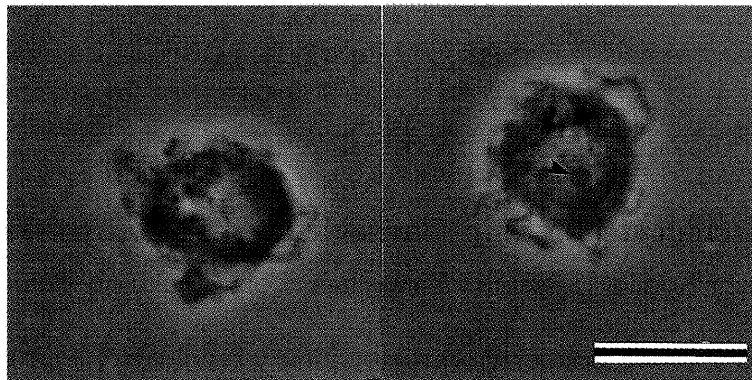


Fig. 1. Phase contrast micrographs of two *Lepas anatifera* hemocytes. Note cytoplasmic granules, filopodia, and nucleolus (arrowhead). Bar=10  $\mu$ m.

下関市吉母の海岸で採集した。プラスチック製器具に付着し、海岸に漂着していた約100個体を屋内の100  $\ell$ 水槽に搬入し、流水条件下(22~25 $^{\circ}$ C)で飼育した。飼育期間中、クルマエビ用配合飼料(エビアン、協和発酵製)を粉砕したものを給餌した。

### 血液塗抹標本の作製

固定液<sup>8)</sup>を入れたプラスチック注射器を用いて柄部中央付近から採血した。固定液と血液(血リンパ液)の比率は19:1とした。この固定血球懸濁液をAuto Smear CF-12D(Sakura)で遠心し、ゼラチン処理したスライドガラス<sup>9)</sup>に血球を付着させて血液塗抹標本とした。

### 光学顕微鏡観察

塗抹標本にメイ・グリーンワルド(MG)およびヘマトキシリン・エオシン(HE)染色を施して光学顕微鏡で観察した。また、位相差顕微鏡による観察も行った。

### 細胞化学的性状検査

塗抹標本にPAS反応<sup>10)</sup>、トルイジンブルー(TB)染色<sup>11)</sup>およびアルシアンブルー(AB)染色<sup>12)</sup>を施して血球中の糖質の有無を調べた。PAS反応は $\alpha$ -アミラーゼ消化<sup>13)</sup>した血球についても行った。脂質染色としてSudan Black B(SBB)染色、Sudan III染色およびOil red O(ORO)染色を行った<sup>14)</sup>。また、フェノールオキシダーゼ<sup>15)</sup>の検出も試みた。

### 血球数の算出

血球計算盤(トーマ型)の小室に、固定血球懸濁液を15  $\mu$   $\ell$ 入れ、小室内の全血球数を測定し、血液中の血球数を算出した。

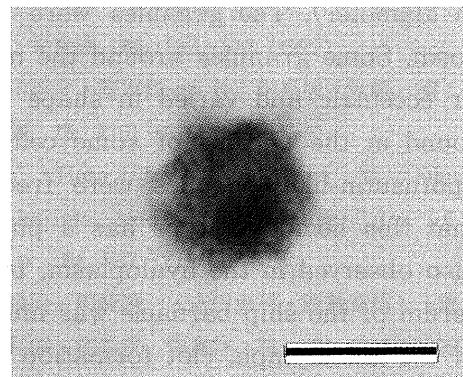


Fig. 2. A hemocyte of *Lepas anatifera* stained with May-Grünwald. Granules show chromophobic. Bar=10  $\mu$ m.

### 血液凝固の有無と血球の形態変化

固定液を用いずに採取した血液をプラスチック試験管に移し、25 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。血液凝固の有無を確認したのち、固定液を入れて25 $^{\circ}$ Cで15分間固定した。メイ・グリーンワルド染色標本を観察するとともに、位相差顕微鏡による観察も行った。また、血液を血球計算盤の小室に入れて、位相差顕微鏡による経時的観察も行った。

### フェノールオキシダーゼ(PO)活性の測定

25 $^{\circ}$ Cで1時間静置した血液をホモジナイズしたのちに遠心分離した。得られた上清(血清)中のPO活性は近藤ら<sup>16)</sup>の方法を以下のように改変して測定した。塩化カルシウム(5mM)と塩化マグネシウム(5mM)を含む50mM HEPES緩衝液(CMH緩衝液、pH7.0)にL-ジヒドロキシフェニールアラニン(L-DOPA)を0.1%添加したものを基質液とした。血清1容と基質液9容を混合して40 $^{\circ}$ Cで1時間反応させたのち、ドーパクロムの生成を490nmにおける吸光度より測定した。その値から基質液9容とCMH緩衝液1容を反応させたもの(以後、基質液のみと称す)

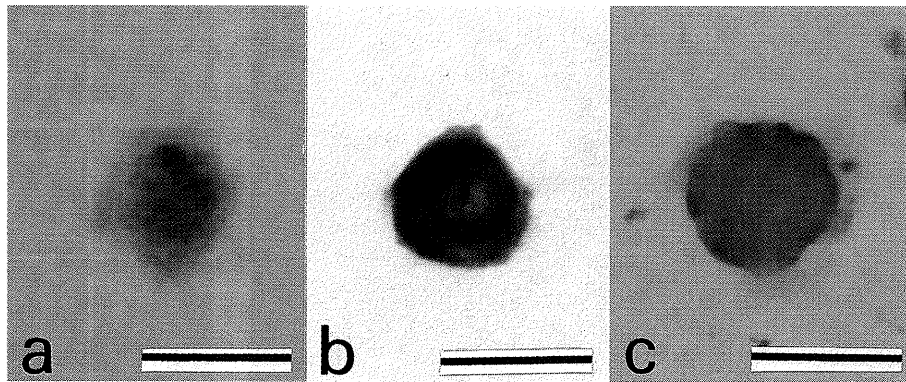


Fig. 3. Cytochemistry of *Lepes anatifera* hemocytes. (a), PAS after  $\alpha$ -amylase digestion; (b), Sudan black B; (c), DOPA reaction (phenoloxidase detection). Bars=10  $\mu$ m.

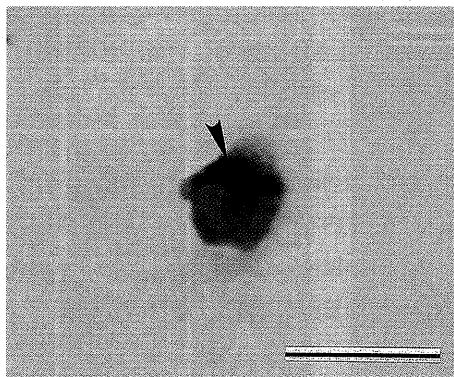


Fig. 4. Lipofusutin-like granules (arrowhead) in *Lepes anatifera* hemocytes. May-Grünwald stain. Bar=10  $\mu$ m.

と、CMH緩衝液9容と血清1容を反応させたもの(以後、血清のみと称す)の両値を差し引いてPO活性値とした。同様に調整したクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* 血清中のPO活性についても測定し、エボシガイの値と比較した。また、エボシガイの柄部中央を切断し、経目的に切断面を観察してPOによる反応産物であるメラニン色素形成の有無を調べた。

### 3 結果

エボシガイの血液(血リンパ液)中には、1種類の血球のみが観察された (Fig. 1)。血球は糸状の細胞質突起を有しており、突起の先端は広がらず鋭角となっていた。細胞質突起を除いた細胞体は円形から卵円形であり、長径4.9~16.2  $\mu$ m、短径4.8~11.9  $\mu$ mであった。細胞質内に、微細な正円形の顆粒が多数観察された。顆粒の大きさは、直径0.5  $\mu$ m以下であり、MG染色に難染性を示した (Fig. 2)。また、顆粒はHE染色にも染色されなかった。細胞質基質はMG染色で淡青色を、HE染色でオレンジ色を呈し

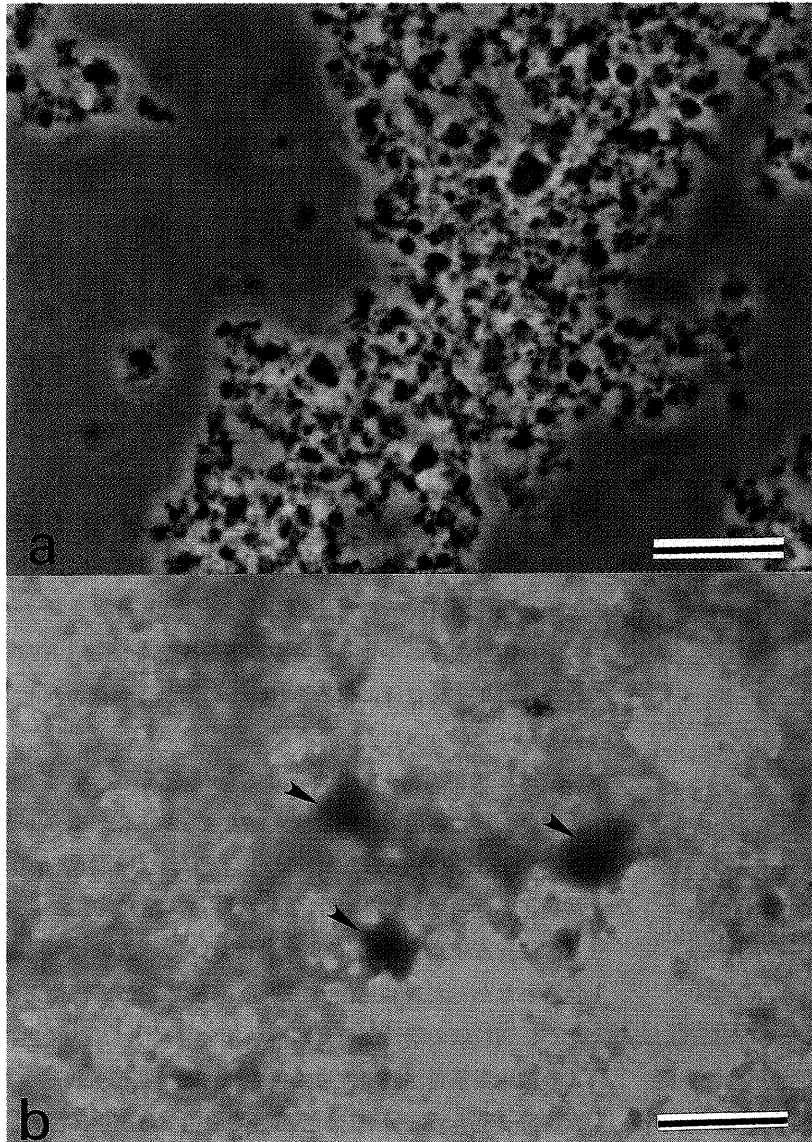
た。核は円形、卵円形、ソラ豆形、V字形と様々であり、核膜に凹凸のあるものも観察された。核の長径は4.3~8.1  $\mu$ m、短径は2.7~5.4  $\mu$ mであり、粒子状の濃縮クロマチンが核内に散在しているものや、濃縮核をもつものも観察された。核小体は稀に認められ、その数は1細胞あたり1個であった (Fig. 1, 矢頭)。

血球にPAS染色を施したところ、細胞質全体が強陽性となり、陽性部位の詳細な観察ができなかった。しかし、 $\alpha$ -アミラーゼ消化により、細胞質基質はPAS陰性となり、核周辺の顆粒はPAS陽性であった (Fig. 3a)。AB染色では、pH1.0およびpH2.5のいずれにおいても血球は全く染色されなかった。TB染色では、細胞質基質が陽性であったが、顆粒状の陽性部位は観察されなかった。SBB染色により細胞質基質が弱陽性に染色され、陽性顆粒も観察された (Fig. 3b)。Sudan III染色とORO染色では陽性部位は全くみられなかった。フェノールオキシダーゼ染色では、細胞質基質が弱陽性であり、顆粒状の陽性部位は認められなかった (Fig. 3c)。

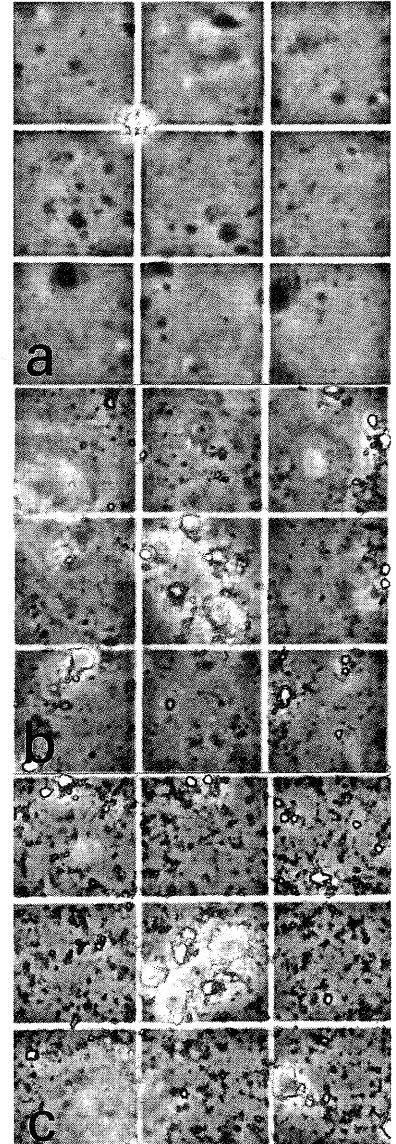
細胞質中に、リポフスチン様の顆粒状構造物をもつ血球も観察された (Fig. 4)。この構造物は正円形であり、未染色標本では褐色から黒褐色を、MG染色では濃紺色を呈した。また、HE、PAS、TB、AB、Sudan IIIおよびORO染色には染まらず、フェノールオキシダーゼ染色でも陰性であったが、SBB染色では黒色を呈した。

血液中の血球数は1.6~14  $\times 10^5$  cells/mlであった。

固定液を用いずに採血したところ、採血直後の血液は血球数が少ないために、ほぼ透明な淡桃色を示した。しかし、時間の経過に伴って白濁が起り、採血1時間後では多量の白色物質が形成された。この物質は、様々な大きさのほぼ円形の粒子状構造物からなり、塊状や数珠状に集合していた (Fig. 5a)。MG染色では淡青色を呈し、集合物中に



**Fig. 5.** Formation of cluster consisted of granular materials after 1 h *Lepes anatifera* hemolymph collecting. (a), phase contrast; (b) May-Grünwald stain. Note the nucleus (arrowheads) of degenerated hemocyte. Bars=10  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Phase contrast microscopy of *Lepes anatifera* hemocytes *in vitro*. (a), <5 min; (b), 15 min; (c), 1 h. Note the degranulation of hemocytes and formation of cluster. Square=50 $\times$ 50  $\mu$ m.

は血球の核と思われるものが認められた (Fig. 5b)。血球同士の凝集像、血餅および血液のゲル化は認められなかった。白色物質は、遠心分離によって白色の沈殿となり、その上清は、採血直後と同様の透明な淡桃色であった。血球計算盤内で経時的に観察したところ、採血直後では、すでに多くの血球の崩壊が始まっており (Fig. 6a)、15分後では、血球は観察されず、粒子状物質が多数観察され (Fig. 6b)、1時間後では粒子が塊状や連鎖状に集合していた (Fig. 6c)。

エボシガイの血清中にPO活性が検出された。吸光度は、血清のみでは0.009~0.010であったが、基質液を添加した

血清では0.335~0.391と高値を示し、PO活性値は約0.35であった。一方、クルマエビの血清のみの値は0.227~0.232であり、基質液を添加した血清では1.645~1.931となり、平均値は約1.60と、エボシガイの約5倍であった。柄部を切断したエボシガイは少なくとも3日間は生存しており、10日間生存するものもあった。切断面には明瞭なメラニン色素の形成は認められなかった。

#### 4 考 察

甲殻類の血球の分類は、主に軟甲亜綱十脚目で行われて

おり、一般的に3種類に分類されている。すなわち、小型の細胞で、細胞に占める核の割合が高く、細胞質に顆粒をほとんど持たない無顆粒細胞（または透明細胞）と、細胞質に豊富な顆粒を有する顆粒細胞、および無顆粒細胞と顆粒細胞の中間型と考えられる小顆粒細胞（または半顆粒細胞）の3種類である<sup>1)</sup>。この分類基準は、同亜綱の等脚目<sup>17)</sup>や口脚目<sup>18)</sup>といった他の甲殻類にも適用されている。特に、Bauchauによる総説<sup>1)</sup>以後、ほとんどの研究者は無条件に血球を3種類に分類している。しかし、これらの血球が1種類の血球の分化成熟段階を示しているのか、異なる血球種を指しているのかは明らかではない。原始的な甲殻類と考えられる鰓脚亜綱無甲目のブラインシュリンプ *Artemia salina*では1種類の血球のみを有する<sup>19,20)</sup>ことから、Bauchauは十脚目も同様であるものと推論し、これを証明するにはさらなる研究が必要であることを指摘している<sup>1)</sup>。

本研究からエボシガイには、1種類の血球のみが観察された。固定液中に採取した血球は生体内での形態を保存していると思われ、血球に細胞質突起が認められた。甲殻類において循環血中の血球に明瞭な細胞質突起が観察されているのは、フジツボ類<sup>7)</sup>のみである。エボシガイやフジツボ類を含む蔓脚類には心臓がないとされ<sup>21)</sup>、恒常的な血液循環が乏しいと考えられる。したがって、エボシガイの血球は血液が接触する組織に細胞質突起を伸長して緩やかに結合しているものと推察される。血液中の血球数は $1.6 \sim 14 \times 10^5$  cells/ml であり、フジツボ類の *Balanus hameri* ( $2.5 \times 10^8$  cells/ml)<sup>7)</sup>よりは多かった。しかし、前述のように、エボシガイ血球が組織に緩やかに附着している可能性があるため、本研究結果で得られた血球数は生体内における実数よりも少ないものと思われる。

エボシガイ血球の細胞質内顆粒はMG染色に難染性であった。*B. hameri*ではBauchauの分類基準<sup>1)</sup>に相当する2種類の血球が報告されている<sup>7)</sup>。すなわち、普通に観察される細胞質突起を持った透明細胞 (hyaline cell) と、卵円形で様々な形の核と少量の顆粒性物質を持つ半顆粒細胞 (semi-granular cell) である。また、いわゆる顆粒細胞は見られなかったとしている。しかし、*B. hameri*の血球観察は染色標本のみで行われており、位相差顕微鏡観察はしておらず、無顆粒細胞に顆粒が少ないかあるいは存在しないかは不明である。

細胞質中に褐色でSBB陽性の顆粒状物質を持つ血球も観察された。この物質はリポフスチン様物質と考えられ、血球の貪食作用の結果、血球が取り込んだ異物などの残渣小

体に相当するものと思われる。*B. hameri*では無顆粒細胞に貪食作用が確認されているが<sup>7)</sup>、半顆粒細胞に見られる顆粒性物質の染色性についての記述はなく、エボシガイ血球に見られたリポフスチン様物質との比較はできない。

細胞化学的染色により、エボシガイ血球は細胞質に豊富なグリコーゲンと多糖類を含む顆粒を持つことが明らかとなった。しかし、陽性顆粒は核周囲にのみ見られたことから、少なくとも、エボシガイ血球にはPAS陽性顆粒とPAS陰性顆粒の2種類が存在すると考えられる。Hoseら<sup>15)</sup>はイセエビの1種 *Sicyonia ingentis*の血球の顆粒はPAS陽性であり、無顆粒細胞の細胞質基質に $\alpha$ -アミラーゼ耐性の陽性物質があると報告している。一方、ザリガニ類の1種 (*Orconectes virilis*)の血球はPASにより細胞質が染色されるが、顆粒は染まらないとされている<sup>22)</sup>。

エボシガイ血球は細胞質基質がSBB染色に弱陽性であり、顆粒も陽性であった。*S. ingentis*の無顆粒細胞は細胞質基質がSBB陽性であり、顆粒球では顆粒の周り核膜が染まる<sup>15)</sup>。同様に、ザリガニ類の1種 (*Orconectes virilis*)でもSBB陽性部位は顆粒間や顆粒を包む膜であるとされている<sup>22)</sup>。さらに、イセエビの1種 *Panulirus interruptus*と短尾類の *Loxorhynchus grandis*の顆粒細胞はSBBに染まらず、アメリカンロブスター *Homarus americanus*の顆粒球では顆粒の膜が染まるが、それら3種ともに無顆粒細胞の細胞質は陽性であると報告されている<sup>23)</sup>。

POは節足動物で特に発達した生体防御を担う酵素であり、甲殻類では十脚目で詳細に調べられている<sup>24)</sup>。本研究から、エボシガイの血液にもPO活性が検出された。また、血球の細胞質基質中の酵素反応が認められた。*S. ingentis*ではPO活性が顆粒細胞の顆粒に<sup>15)</sup>、*P. interruptus*、*L. grandis*およびアメリカンロブスターの顆粒細胞では多数の顆粒と細胞質に陽性像が観察されている<sup>23)</sup>。また、ザリガニ類におけるPO陽性部位は、顆粒<sup>25)</sup>、小胞<sup>26)</sup>、細胞質基質<sup>27)</sup>と様々である。Kondoら<sup>8)</sup>およびTsingら<sup>28)</sup>は、エボシガイと同様に、クルマエビのPO活性を顆粒細胞の細胞質基質にのみ認めている。エボシガイ血清のみのPO活性 (490nmにおけるドーパクロムの吸光度より測定)は、クルマエビのそれに比べて非常に低かった。このことから、エボシガイ血液中の基質濃度は低いと考えられる。エボシガイの柄部切断部位に明瞭なメラニン色素の沈着が観察されなかったことは、低基質濃度と関連していると思われる。

エボシガイの血液はゲル化、血餅形成および血球凝集といった甲殻類一般に知られる血液凝固反応を起こさなかつ

た。しかし、血球の脱顆粒と崩壊が起こり、引き続いて顆粒状物質が形成され、それが連鎖状、網目状および塊状に集合することが明らかとなった。前述のようにエボシガイの血液循環は緩やかであると考えられることから、このような顆粒状物質による損傷部位の閉塞だけでも血液の流失が防げるものと考えられる。フジツボ類の血液では、血餅の形成が起り、その中には血球が認められないとされている<sup>7,29)</sup>。エボシガイでは顆粒状物質中に崩壊した血球の核が認められたことから、本物質形成に血球が関わっていることは明白である。

十脚目では、血球から放出されたトランスグルタミナーゼが血しょう中のフィブリノーゲン様タンパク質を架橋してゲル化を引き起こし、節足動物門鋏角亜門剣尾綱のカブトガニでは凝固関連物質の全てが血球に存在することが知られている<sup>30)</sup>。エボシガイで観察された顆粒状物質の形成に血しょう成分が関与しているか否かは明らかではない。しかし、採血直後の血液がほぼ透明であるのに対して、顆粒状物質形成後は血液が白濁していたことから、崩壊した血球の内容物のみが単純に凝集したとは考えにくい。

蔓脚類内の系統進化は化石からも調べられており、エボシガイ亜目ミョウガイ科のカメノテ類からフジツボ類が進化したと考えられている<sup>4,30)</sup>。エボシガイとフジツボ類における血球種類数の違いと血液凝固反応の違いは、蔓脚類における生体防御の系統進化を反映しているものと考えられ、興味深い。さらに、他の蔓脚類の血球について調べることにより、蔓脚類における生体防御の系統進化の流れを明らかにできるものと思われる。

## 文 献

- 1) A. G. Bauchau : Crustaceans, in *Invertebrate Blood Cells* (ed. by N.A. Ratcliffe and A. F. Rowley), Vol. 2, Academic Press, New York, 1981, 386-420.
- 2) G. G. Martin and J. E. Hose : Vascular Elements and Blood (Hemolymph), in *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (ed. by F. W. Harrison and A. G. Humes), Vol. 10, Wiley-Liss, New York, 1992, 117-146.
- 3) 椎野季雄 : 節足動物(I) 総説・甲殻類, “動物系統分類学7(上)” (内田 亨監修), 中山書店, 東京, 1964, pp. 86-91.
- 4) 池谷仙之・山口寿之 : 進化古生物学入門, 初版, 東京大学出版会, 東京, 1993, pp.15-33.
- 5) H. Kamiya and K. Ogata : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 983 (1983).
- 6) M. R. F. Marques and M. A. Barracco : *Aquaculture*, **191**, 23-44 (2000).
- 7) M. E. Waite and G. Walker : *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **68**, 391-397 (1988).
- 8) M. Kondo, T. Itami, Y. Takahashi, R. Fujii and S. Tomonaga : *Fish Pathol.*, **33**, 421-427 (1998).
- 9) 中河志朗 : 実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ9 : 蛋白質・核酸分子のin situ同定法 (遠山正彌・塩坂貞夫・木山博資編), 羊土社, 東京, 1994, pp. 24-25.
- 10) R. D. Lilli and P. Pizzolate : *Stain Technol.*, **47**, 587-590 (1972).
- 11) 林 勇 : 病理標本の作り方 (病理技術研究会編), 文光堂, 東京, 1992, pp.78-79.
- 12) 羽山正義 : 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1988, pp.104-107.
- 13) 鈴木 裕 : 病理標本の作り方 (病理技術研究会編), 文光堂, 東京, 1992, pp.88-89.
- 14) 川島 徹 : 新染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1999, pp.42-49.
- 15) J. E. Hose, G. G. Martin, V. A. Nguyen, J. Lucus and T. Rosenstein : *Biol. Bull.*, **173**, 178-187 (1987).
- 16) 近藤昌和・伊丹利明・高橋幸則 : 魚病研究, **27**, 185-189 (1992).
- 17) L. R. Benjamin and B. L. James : *J. Invertebr. Pathol.*, **49**, 19-25 (1987).
- 18) M. A. Baracco and G. A. Amirante : *J. Crustacean Biol.*, **12**, 372-382 (1992).
- 19) J. H. Lochhead and M. S. Lochhead : *J. Morph.*, **68**, 593-632 (1941).
- 20) J. W. Martin : Branchiopoda, in *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (ed. by F. W. Harrison and A. G. Humes), Vol. 9, Wiley-Liss, New York, 1992, 25-224.
- 21) 椎野季雄 : 節足動物(I) 総説・甲殻類, “動物系統分類学7(上)” (内田 亨監修), 中山書店, 東京, 1964, pp. 133-152.
- 22) P. Wood, and L. P. Visentin : *J. Morph.*, **123**, 559-568 (1967).

- 23) J. E. Hose, G. G. Martin and A. S. Gerard :  
*Biol. Bull.*, **178**, 33-45 (1990).
- 24) K. Sritunyaluksana and K. Söderhäll : *Aqua-  
culture*, **191**, 53-69 (2000).
- 25) T. Unestam and J.-E. Nylund : *J. Invertebr.  
Pathol.*, **19**, 94-106 (1972).
- 26) M. W. Johansson and K. Söderhäll : *J. Comp.  
Physiol.*, **156B**, 175-181 (1985).
- 27) H. Lanz, V. Tsutsumi and H. Aréchiga : *Dev.  
Comp. Immunol.*, **17**, 389-397 (1993).
- 28) A. Tsing, J.-M. Arcier and M. Brehélin : *J.  
Invertebr. Pathol.*, **53**, 64-77 (1989).
- 29) R. T. Fitzgerald : *Comp. Biochem. Physiol.*, **24**,  
1055-1059 (1968).
- 30) 牟田達史・岩永貞昭 : 無脊椎動物の生体防御 (名取俊  
二・野本亀久雄・古田恵美子・村松 繁・(財)水産無  
脊椎動物研究所編), 学会出版センター, 東京, 1992,  
pp.81-109.
- 31) H. Glenner, M. J. Grygier, J. T. Hoeg, P. G.  
Jensen and F. R. Schram : *Zoological J.  
Linnean Soc.*, **114**, 365-404 (1995).