

学 位 論 文 題 名

二枚貝類における血球の分類、形態および機能に関する研究

学位論文内容の要旨

二枚貝の循環系は開放血管系よりなり、循環する血リンパ液は脊椎動物のように血液、リンパ液、組織液の区別はなく、その血液学的研究は著しく立ち遅れている。二枚貝の血球の形態と機能を明らかにすることは血液による生理調節機構を解明するうえで重要であるばかりでなく、二枚貝を養殖管理するための血液検査による健康診断技術の開発に基礎知見を提供するものと期待される。

本研究では、二枚貝の血球を形態学的に分類し、血球が機能を果たすためにもつ諸性質のうち、血球種間における貪食能および走化性の相違を調べるとともに、炎症に際しての血球の挙動を観察して血球の機能について検討した。さらに、アコヤガイを材料として、季節ならびに環境要因の変化にともなう血液学的諸数値の変動を調べ、健康度判定指標について若干の考察を行った。

アカガイ、タイラギ、アコヤガイ、ヒオウギガイ、バカガイおよびイケチョウガイの血球を光顕および電顕で観察した。形態学的特徴に基づいて血球を赤血球、無顆粒血球および顆粒血球に大別し、顆粒血球については顆粒の形態や染色性の異なる細胞が観察される場合は顆粒の大きさの違いにより、大きな顆粒を含む顆粒血球-Iと小さい顆粒を含む顆粒血球-IIに分類した。赤血球はアカガイのみに観察され、細胞の形は円盤または楕円盤状で、核は細胞の中央かやや一方に偏在し、細胞内小器官は少ない。無顆粒血球は全ての二枚貝で観察され、核は円形または類円形で、分葉核も観察され、細胞質中にはミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置、遊離のリボゾームなどが観察された。無顆粒血球には、径 $7\mu\text{m}$ 以下の血球と径 $8\mu\text{m}$ 以上の血球の間にリボゾームの状態や細胞内小器官の分布などに差異が認められたが、これらの中間的な形態を示すものがあり1種類の細胞と同定した。顆粒血球の核は細胞の一方に偏在し、細胞質中には顆粒が密に含まれ、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置などの小器官が観察される。アコヤガイおよびイケチョウガイには、顆粒の形態が異なる2種類の顆粒血球、即ち、顆粒血球-Iと顆粒血球-IIが認められた。タイラギの顆粒血球の細胞質中には種々の形態を示す顆粒が含まれていたが、これらの顆粒が混在する顆粒血球が認められたことから、それらを1種類の細胞と同定した。バカガ

イには1種類の顆粒血球が認められた。

上記6種の二枚貝に加えてクマサルボウガイ、イガイ、マベガイ、モスソアコヤガイ、アズマニシキガイ、イタヤガイ、ホタテガイ、マガキ、スダレガイおよびマルドブガイの合計16種の二枚貝を材料として血球の細胞電気泳動度（EPM）を測定した。赤血球、無顆粒血球および顆粒血球相互間のEPMには全ての二枚貝で有意の差が認められた。2種類の顆粒血球を備えた二枚貝のうち、アコヤガイのみに顆粒血球ⅠとⅡのEPMに有意差が認められた。赤血球を備えたフネガイ科および無顆粒血球1種類のみをもつイタヤガイ科を除く全ての二枚貝で、最も低いEPMを示す種類の血球が血リンパ液中に最も多く出現した。

アコヤガイ、アカガイ、タイラギ、ヒオウギガイ、バカガイおよびイケチョウガイの全てに貪食能を持つ血球が観察され、血球種間で貪食率に相違が認められた。アコヤガイとタイラギでは無顆粒血球が、バカガイとイケチョウガイでは顆粒血球と顆粒血球Ⅱが最も高い貪食率を示した。これら最も高い貪食率を示した血球は最もEPMが低く、しかも血リンパ液中に一番多く出現した。このことは、高い貪食率を示す種類の血球は異物との間に働く電氣的斥力が小さいため、他の血球種より異物と接近しやすく食作用に有利な条件を備えていることを示し、また、二枚貝類が栄養、排泄、生体防御などの機能を血球の食作用に大きく依存していることを反映しているものと考えられた。

血清を加えた大腸菌培養濾液に対するアコヤガイの無顆粒血球と顆粒血球Ⅰの遊走能を調べた。無顆粒血球と顆粒血球Ⅰはともに正の走化性を示した。しかし、顆粒血球Ⅰは不規則運動性が著しく高く、また、化学運動性を示すことで無顆粒血球と明らかに相違した。アコヤガイの外套膜外腔に熱処理した異個体の組織片を挿入すると、組織片に接する外套膜の殻側上皮の細胞間および上皮下の結合組織へ無顆粒血球と顆粒血球Ⅰが浸潤し、さらにそれらは外套膜外腔にも遊出した。遊出した血球は膿汁状の血球塊となって組織片上およびその周辺を覆い、また組織片の中にも侵入した。無顆粒血球と顆粒血球Ⅰの浸潤と遊出は走化性に基づく行動と考えられ、両者ともに貪食能をもつことから炎症に際し異物排除に機能すると考えられた。また、無顆粒血球は上皮組織が崩壊脱落した場合、脱落部位に密集して障壁を形成した。無顆粒血球は内部の組織を保護するとともに新しい上皮がつくられる場を保証することによって組織修復を助けると考えられた。一方、顆粒血球Ⅱは炎症と関連した行動を示さず、無顆粒血球および顆粒血球Ⅰと著しい違いが認められた。

漁場に垂下養殖中のアコヤガイの血球数、血球組成および平均無顆粒血球直径（MAHD）を調べ、それぞれの季節変化の様相を明らかにした。室内実験において、水温15℃、20℃、25℃の

水槽に収容した個体間の血球数と血球組成の差異は漁場に垂下養殖中の同じ水温時期の個体間における変動傾向と同様であったことから、水温は血球数および血球組成を変化させる重要な要因であると考えられた。また、飼育水の溶存酸素量および塩分をアコヤガイの生理活動に障害をおよぼすことが明らかにされている低い濃度域まで低下させると、血球数の増加、顆粒血球－Ⅰの出現率の上昇と無顆粒血球の出現率の相対的な低下が認められた。30日間飢餓状態においた個体では、血球数が有意に低下したが、血球組成および MAHD は変化しなかった。

二枚貝の血球は赤血球、無顆粒血球および顆粒血球に大別される。顆粒血球は細胞質中に形態や染色性が異なる数種類の顆粒が認められても、これらの顆粒が混在する血球が観察される場合は1種類とし、一方、顆粒の形態および染色性が血球間で異なり、血球相互間に形態的な移行が認められない場合は大きい顆粒を含む顆粒血球－Ⅰと小さい顆粒を含む顆粒血球－Ⅱに区別することが適切と思われる。無顆粒血球と顆粒血球の食作用と走化性は血球種間で差異がみられ、アコヤガイの炎症過程に認められるように、血球種間には種によりかなりの機能的な分化があり、生体防御に重要な働きをしていると考えられる。アコヤガイについては血リンパ液中における顆粒血球－Ⅰの出現率の増加と血球数の増減は個体の生理状態を判断するための指標として利用可能と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 田 寿 郎
副 査 教 授 山 崎 文 雄
副 査 助教授 麦 谷 泰 雄

二枚貝の血リンパ中にみられる血球の形態は種により多様であり、その分類は研究者により一定せず、それぞれの機能的特性もよく知られていない。申請者は本論文において、本邦産二枚貝数種についての血球の形態的特徴に基づく分類を行い、さらに各血球種の機能に関連する特性としての細胞電気泳動度、食食能の相違を調べその分類の可否を検証した。また、とくに真珠養殖貝として水産業上重要なアコヤガイについて、血球のそれらの性質および他の重要な特性について検討している。評価される主な成果は以下のとおりである。

淡水種1種（イケチョウガイ）、海産種5種（アカガイ、タイラギ、アコヤガイ、ヒオウギガ

イ、バカガイ)について、血球の光顕・電顕による細胞学的、微形態学的特徴を詳しく記載し、それらの血球を赤血球、無顆粒血球、顆粒血球の3種に大別して、それらの組成の標準値を示した。赤血球はアカガイのみに、無顆粒血球は全ての貝に同定された。ヒオウギガイは無顆粒血球のみを、他の貝は二種またはそれ以上の血球を保有していた。従来の分類では、細胞の大きさ、顆粒の大きさと染色性により無顆粒血球、顆粒血球をさらに細分する例も多くみられるが、それらの間に移行型がみられることを指摘し、移行型のみられないアコヤガイ、イケチョウガイの顆粒血球については、細胞内顆粒の形態によりⅠ型とⅡ型の2型に分けることを妥当とした。上記6種にさらに10種を加えた計16種の二枚貝の血球の細胞電気泳動度を測定し、全ての種で上記3種の血球の移動度が単峰性の分布を示し、かつ、それらの間に有意な差が存在することを認めた。アコヤガイの顆粒血球の2型の移動度の間にも有意差が認められた。この結果は提示した血球分類の適切さを示すものと考えられた。また、複数種の血球を持つどの種においても、赤血球を除き最も低い電気泳動移動度を示す血球種が最大の出現数を示すことを見いだした。

前記6種の貝の血球の *in vitro* の貪食実験において、赤血球を除くどの血球も墨汁粒子とザイモザン粒子に対する貪食能を示したが、最も高い貪食率を示す細胞種は貝によって異なり、同じ種類の血球でも二枚貝の種によって機能的に異なることが示唆された。それぞれの貝で最も低い移動度を示し、かつ最も多く出現した血球種が最も高い貪食率を示した。この結果は、低い移動度で示される細胞表面の荷電状態が、異物との間に働く小さな電氣的斥力を介して高い貪食能を保障するものと解釈され、二枚貝における血球の貪食能が栄養、排泄、生体防御などの多様な生理的機能に大きく貢献していることを裏付けたものである。

アコヤガイの血球のうち、高い貪食能を示す無顆粒血球と顆粒血球－Ⅰについて、大腸菌培養濾液に対する運動性をケモタキシスチェンバーを用いて調べ、また移植組織片による炎症過程における挙動の観察から、両者の機能的相違を検討した。両者はともに大腸菌培養濾液に対する走化性を示したが、顆粒血球－Ⅰには化学運動性が認められ、かつ無顆粒血球に比べて著しく高い不規則運動性が示された。両血球とも炎症部位に多数浸潤したが無顆粒血球は食作用の他に組織修復に関与する点で顆粒血球－Ⅰと異なっていた。顆粒血球－Ⅱは食作用を示さず炎症過程にも関与しないことで対照的であったが、その機能は不明のまま残された。

アコヤガイの血球組成は年間を通じ無顆粒血球が66－98%、顆粒血球－Ⅰと－Ⅱがそれぞれ1－31%、1－2%であった。温度、塩分、溶存酸素など環境要因の変化に伴う血球数と血球組成の変動の様相にはとくに顆粒血球－Ⅰの消長が注目された。すなわち、顆粒血球－Ⅰは貝の生理に不利な条件下で顕著な増加を示すことが明らかにされた。このことから顆粒血球－Ⅰを指標と

する健康度判定の有用性を提案した。

本論文の成果は、従来明確でない二枚貝の血球種の形態的機能的特徴を明らかにするとともに、それぞれの血球の出現と変動に関連する要因を示唆し、有用種の適切な養殖管理に応用し得る血液学的知見を示した。よって、審査員一同は本論文を水産学博士の学位論文として十分な業績と判定した。