

学 位 論 文 題 名

Studies on the ultrastructure and growth of skeletons of the test and spines in the sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*

（エゾバフンウニにおける殻および棘の骨格の
成長に関する微細構造学的研究）

学位論文内容の要旨

近年、日本におけるウニ漁業の生産高は沿岸漁業に大きな役割を占めるようになってきている。北海道においても、エゾバフンウニ（*Strongylocentrotus intermedius*）は沿岸漁業の重要な漁獲対象種であり、ウニ資源の重要性の増大に伴い、その人工種苗生産及び育成技術は急速に発達、普及し、各地で種苗生産が行なわれている。このような栽培漁業技術の発展に伴い、ウニの成長生理に関する基礎的な知見の必要性が高まっている。エゾバフンウニの成長に関しては資源学のおよび生態学的見地からの研究は多いが、個体レベルでの殻組織の成長に注目した研究は少い。

ウニの対外郭をなす殻は真皮に由来する多くの石灰化した小殻板の組合せで構築されており、その接合部は縫合線として殻表面に認められる。殻全体の成長は各殻板の成長（大きさと厚さ）と殻板数の増加による。それ故、ウニ個体の成長は、個々の殻板の形成と成長に依存し、その機構を明かにすることは個体の成長生理の理解に必須である。殻板とこれに付属する棘はカルサイト結晶からなる骨柱の網目構造とその網目を満たす有機質構造により構成されており、その成長は骨柱の増加、伸長によりもたらされる。また、有機質構造には細胞および繊維成分が含まれ、骨柱形成に関与していると考えられる。骨柱構造に注目して殻板の成長を論じた研究は数種のウニ類で多くみられるが、有機質構造に注目した研究は少く、エゾバフンウニでの研究は全くない。

本研究では、エゾバフンウニの殻板の形成および成長機構に関する基礎的知見を得る目的で、稚ウニおよび成体ウニ（殻長：5－72mm）の正常殻、ならびに成体ウニの殻と棘の再生組織を用い、主として有機質構造に注目して、殻板、棘および関連組織の細胞ならびに繊維成分について光顕・電顕（走査型、透過型）による形態学的観察を行なった。また、殻板組織の細胞成分の由来とその殻板形成に関連する機能を検討するため、体腔液中の細胞（体腔球）についての直接観

察,あるいは対外培養による挙動の観察を光顕・電顕を用い行なった。

殻板有機質構造中の繊維成分は主として殻板縁辺部に分布し、特に縫合線部に多く見られた。この繊維はコラーゲン繊維様の染色性を示し、酸性粘液多糖類、糖蛋白質および脂質等と結合していることが組織化学的に証明された。同様の繊維は、棘では棘を殻板上に固定している支持組織の結合組織に囲口膜では島状石灰化部位の周囲を満たしている結合組織に認められた。殻板内奥部、棘内部及び囲口膜石灰化部の有機質構造には認められなかった。これらの繊維は電顕的に哺乳類のコラーゲン繊維と類似の横縞模様を示し、前コラーゲン繊維と考えられる細い繊維とともに存在していたことからコラーゲン繊維と判断された。殻板縫合線部では、これらの繊維は膜状構造を織りなして骨柱表面を緊密に覆っていた。コラーゲン繊維は脱灰された骨柱の空所には認められず、骨柱基質としての石灰化への関与はないものと思われた。殻板及び棘の再生組織でもコラーゲン繊維に初期 Ca 塩結晶の沈着は認められなかった。これからの観察から、ウニ殻組織中のコラーゲン繊維は石灰化に適した微小環境を形成するが、それ自身は骨柱の基質とはならず、石灰化を誘導するよりはむしろ形成過程の骨柱表面を覆うことにより、骨柱の形や大きさを規制している可能性が考えられた。

殻板有機質構造には、5型の細胞群が認められた。その一つは伸長した細胞突起を有する小形的好塩基性細胞である。この細胞は特徴的な瘤状の肥厚部を有する多数の細胞突起を骨柱表面に緊密に接して伸長し、微細構造的にウニ殻における石灰化細胞と同定された。殻板有機質構造には、他に殻組織に遊走してきた体腔球と考えられる顆粒細胞(spherule cell)、貪食細胞(phagocytic cell)、細胞質が比較的均質な細胞(均質細胞)等が認められた。均質細胞は振動細胞(vibratile cell)が変形したものと思われた。これらの細胞が骨柱形成に直接関係している像は観察されなかった。

走査型電顕による観察では、多くの伸長した細胞突起により緊密に骨柱に接している石灰化細胞が殻板の最も活発な成長部位である縫合線付近に集中して多数認められた。その瘤状肥厚を有する細胞突起は成長しつつある骨柱付近で蜘蛛の巣様の網目構造を形成し骨柱を取り囲んでいた。一方、吸収を受けていると思われる骨柱表面あるいはその周囲に、時に複雑な形態を示す扁平細胞が認められた。特に複雑な形態をした扁平細胞の周囲は骨柱が欠損していた。これらの像から扁平細胞は骨柱吸収細胞と考えられた。

エゾバフンウニの体腔液には、貪食白血球、顆粒球、振動細胞、ガラス様細胞(hyaline cell)および腎形細胞(reniform cell)等の体腔球が同定された。*in vitro*の観察で、貪食白血球は凝集塊形成に主要な役割を演じ、凝集に際しその細胞突起から放出される包被が特徴的網目構造を形成しながら他の体腔球を包み込み、殻の有機質構造に類似の形成をすることが明らかに示さ

れた。また、酸性粘液多糖類や糖蛋白を多く含有する振動細胞も凝集塊形成に密接に関与しているものと考えられた。体腔液では貧食白血球のみが組織化学的に Ca 陽性反応を示した。以上のことから、貧食白血球は殻組織の有機質構造の形成に必須であり、石灰化細胞の先駆細胞となると考えられた。

再生殻及び再生棘での最初の石灰化は、石灰化細胞の細胞内空胞への微小 Ca 結晶の沈着として認められた。再生組織においてもコラーゲン繊維への Ca 結晶の沈着は認められなかった。成長した結晶は伸長した薄い細胞質あるいは断片化した細胞質で包まれていたが、ルテニウムレッド (RR) を含む液で固定すると、結晶の一部の表面に RR 粒子が直接沈着して認められたことから、結晶は細胞外で成長することが示された。また、結晶の周囲には新たな石灰化細胞群が取り囲み、この細胞質突起を結晶を直接包摂する細胞に伸ばし、時にそれ等と合胞体を形成した。以上のことから、両再生組織における石灰化に関し次のような過程が考えられた。まず、一次石灰化細胞、の細胞内空胞に小 Ca 結晶が生じ、その成長に伴い一次石灰化細胞の細胞質はそれを被うように伸長する。その過程で結晶を包む細胞質は部分的に破れ、結晶は細胞外へ露出する。このような結晶および一次石灰化細胞、の周囲には二次石灰化細胞、が集まり、その細胞突起は一次石灰化細胞の細胞質に接し、時に合胞体を形成して Ca 結晶の成長を促進する。

以上の観察結果から、ウニ殻および棘の骨柱成長においては、体腔球の貧食白血球に由来する石灰化細胞が骨柱成長部位に集積し、カルサイト結晶を細胞外沈着の様式で成長させるものと思われる。しかし、再生殻板における最初の石灰化は石灰化細胞の空胞内で起こることから、幼生における骨片形成や殻板新生における初期の石灰化は細胞内石灰化の様式をとることが推定された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	山 田 寿 郎
副 査	教 授	高 橋 裕 哉
副 査	助教授	麦 谷 泰 雄

ウニ類の殻およびこれに付属する棘はカルサイト結晶の柱状骨格が複雑な立体構造をとる無脊椎動物ではユニークな中胚葉性外骨格である。その結晶学的構造や形成機構は生物硬組織の進化

の面から興味が持たれている。一方、ウニ類は沿岸漁業において重要性を増しつつある水産資源として、近年、種苗生産による増殖事業が各地で進められているが、それに伴う疾病による大量への死や成長障害など多くの問題が発生している。体重の大部分を占める殻や棘の成長機構はウニ個体の成長に重要な関わりを有し、また疾病の予防治療の基礎として重要であるにも拘らず、その構造上の顕微鏡標本作成の困難のため骨格形成過程やそれに関与する細胞組織の微細構造学的研究は少なく、骨格細胞の起源や分化に関する知見も乏しい現状にある。

申請者は本論文において、エゾバフンウニの殻の成長過程および殻と棘の再生過程について、特に骨格の軟組織に注目して超微構造を中心とする形態学的観察を行い、骨柱成長に関与する細胞の分化、骨組織の形成様式を明らかにしようとした。さらに、体腔球の培養時の挙動の観察から骨格組織細胞の先駆細胞となる体腔球の特定についても検討を加えている。評価される主な内容は概ね以下の通りである。

1. 光顕、電顕（透過型、走査型）および軟X線観察により成長中の各殻板縫合線付近の縁辺成長部に豊富な繊維束を見出し、それが組織化学的、微細構造的にコラーゲン繊維に極めて類似する繊維であることを確かめた。しかし、それらは脊椎動物の多くの硬組織にみられる基質コラーゲンのように骨質自体の有機基質となって石灰化を誘導することではなく、むしろ骨柱表面を覆ってその形状を規制することを指摘し、脊椎動物硬組織におけると同様に基質コラーゲンの石灰化への関与を主張する Travis 説を明確に否定する結果を得た。

2. 骨柱間の空間を満たす軟組織に5種類の細胞群を同定した。これらのうち、複雑な細胞突起を伸ばして成長部位の骨柱表面を被覆する多数の好塩基性細胞が石灰化細胞であることを明らかにしてその特異な形態的特徴を記載した。また、骨柱表面にみられる吸収面上に特殊な扁平細胞を見出し、これが骨柱吸収細胞であることを示して骨柱の成長がその吸収を伴いながら進行することを明らかにした。

3. 体腔球の微細構造および培養時における挙動を観察し、これを概ね5種の細胞群に分類した。そのうち貧食白血球は形態および凝集塊形成の挙動が石灰化細胞に極めて類似することから、貧食白血球は殻板に侵入して石灰化細胞の先駆細胞に分化するものと推定した。

4. 殻板と棘の切除実験により再生過程を観察し、初期石灰化は再生芽に集合する一次石灰化細胞のゴルジ装置由来の細胞内空泡で起こり、次いで形成された結晶は細胞外に出て新たにそこに集合する二次石灰化細胞に囲まれ細胞外で成長するという、二段階石灰化モデルを提唱した。これはウニ幼生の骨片形成における細胞内石灰化、成体の棘における細胞外石灰化の従来の観察例に基づく論争を統一的に理解する新たな説として評価される。

以上の成果は、ウニ外骨格の成長機構について形態学的に貴重な多くの新事実を明らかにしたもので、ウニ個体の成長生理の基礎として水産増殖学に寄与するところが大きく、また、生物硬組織学への貢献の面からも高く評価される。よって、審査員一同は本論文を博士学位論文として相当の業績であると認定した。