

## タコ類血球の形態

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

### Morphology of Octopus Hemocytes

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

Only one type of hemocyte, granulocyte was observed in the hemolymph of three octopod molluscs (*Octopus vulgaris*, *O. minor* and *O. ocellatus*). The granules of *O. vulgaris* hemocyte were classified into four categories, eosinophilic granules (EG), small basophilic granules (SBG), rod-shaped basophilic granules (RBG) and large basophilic granules (LBG). Both EG and SG were numerous, while RG and LG were few. EG is round or oval in shape and 0.1-0.6  $\mu\text{m}$  in diameter. SBG was similar to EG in shape and diameter. However, EG was observed in the May-Grünwald preparation at a pH range of 1.0-5.5, while SBG was observed at a pH range of 5.0-8.0. RBG (0.8-1.2  $\times$  0.2-0.3  $\mu\text{m}$ ) was found at pH 4.5-8.0. EG, SBG and LBG were also observed in hemocytes of *O. minor* and *O. ocellatus*. By electron microscopy, three distinct granule types, striated granule (SG), feathery granule (FG) and dense granule (DG) were observed in the hemocytes of *O. vulgaris* and *O. minor*. The SG, FG and DG may correspond to EG, SBG and LBG, respectively, due to their size, number and position. FG often caused exocytosis. Cytochemical characteristics of *O. vulgaris* hemocytes were also examined by light microscopy.

#### 1 緒言

近年、疾病対策として生体防御機能を向上させることで、生物に抗病性を持たせる試みが行われている。しかし、生体防御機能に関する研究の多くは、疾病発生後から行われており、防御機能の測定方法がまだ確立されていない生物も多い。タコ類には水産上重要な種が含まれており、マダコでは養殖も試みられ、その成長の早さから養殖対象種として有望視されている。また、近年、種苗生産技術の確立に向けて研究も行われている。日本沿岸でのタコ類の漁獲量は減少傾向にあり、将来、マダコの養殖技術が確立された場合、他のタコ類についても養殖対象となる可能性が高い。あらかじめ、養殖対象種として有望な生物の生体防御機構を明らかにしておくことは、将来の疾病発生時の防除対策に有用であると考えられる。生体防御機構は一般に細胞性防御機構と液性防御機構に大別される。本研究では、タコ類の細胞性防御機構の主体を成すと考えられる血球に

ついて、形態学的特徴を調べたので報告する。

#### 2 材料および方法

##### 2.1 実験動物

マダコ *Octopus vulgaris* (体重約1.5kg) は山口県下関市内の市場から購入した。テナガダコ *Octopus minor* (体重約200g) およびイイダコ *Octopus ocellatus* (体重約80g) は、吉見湾で採取した。いずれのタコも、流水条件下 (約20°C) で、1週間以上予備飼育したのち実験に供した。飼育期間中、冷凍イカナゴを解凍後、1日1回飽食量を与えた。マダコ、テナガダコおよびイイダコには、イカナゴをそれぞれ約100、20および10g投与し、1時間後に残餌を取り除いた。

##### 2.2 血液塗抹標本

2%エタノール海水<sup>1)</sup>中で麻酔したタコから、固定液を

2002年11月8日受付。Received Nov. 8. 2002.

<sup>1</sup> 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagatohonmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

<sup>2</sup> 昇陽学院 (Shouyou Gakuin Inc., Kiwanami, Ube, Yamaguchi 759-0207, Japan).

\* 別刷り請求先 (Corresponding author).

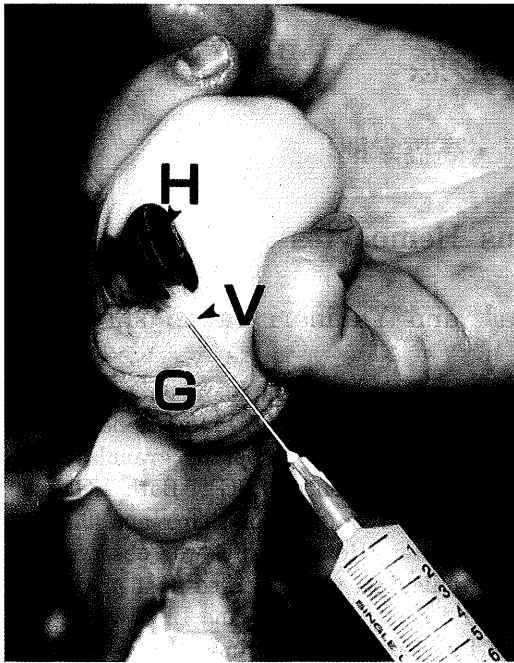


Fig. 1. Blood collection from *Octopus vulgaris*. V, branchial blood vessel; H, branchial heart; G, branchial gill.

入れて氷水中で冷却した注射器を用いて採血した。固定液には以下の様に調整した2%グルタルアルデヒドと2%パラホルムアルデヒドを含む0.2Mカコジル酸緩衝液にサッカロースを10%添加したものをを用いた<sup>2)</sup>。パラホルムアルデヒド (TAAB laboratories) 1.4 gに0.2Mカコジル酸緩衝液 (pH7.45) を約40ml加えて沸騰しない程度に加温溶解し、冷却後、70%グルタルアルデヒド (LADD research industries) を2 ml加え0.2Mカコジル酸緩衝液で全量70 mlとした (pH7.2~7.3)。これにサッカロースを7 g加えて溶解後、孔径0.2 $\mu$ mのミリポアフィルターで濾過した。冷蔵庫(5 $^{\circ}$ C)で保存し、1週間以内に使用した。

採血は、鰓心臓から鰓に向かう血管(鰓輸入静脈)から行った(Fig. 1)。固定液と血液の比率は19:1とした。採血後、プラスチック試験管に移し、氷水中で15分間固定後、Auto Smear CF-12D (Sakura)で遠心し(1,000 rpm, 10分間)、ゼラチン処理スライドガラス<sup>3)</sup>に血球を付着させた。30分間風乾し、蒸留水で3回水洗後(各回10分間)、1時間風乾して血液塗抹標本とした。

### 2.3 メイ-グリュンワルド(MG)染色

MG原液 (Sigma) 1.5mlを塗抹標本上に載せて5分間放置したのち、 $1/15$  Mリン酸緩衝液 (pH4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5および8.0) または、 $1/15$  Mリン酸二

水素カリウム水溶液に1 M塩酸を滴下してpH1.0, 2.0, 3.0および4.0に調整した液を1.5 ml滴下し、混和した。10分間染色したのち、蒸留水で水洗して風乾した。オイキットで封入して光学顕微鏡で観察した。また、pH6.0の緩衝液を用いたMG染色標本から200個以上の血球の写真を撮り、エリアメーター (X-PLAN360d, Ushikata) で細胞と核の大きさを測定した。顆粒の大きさの測定には接眼ミクロメーターを用いた。

### 2.4 位相差顕微鏡観察

ゼラチン処理スライドガラスに付着させた血球を、直ちにグリセリンで封入し、位相差顕微鏡で観察した。

### 2.5 透過型電子顕微鏡観察

氷水中で1時間固定したマダコまたはテナガダコの血球を0.2Mカコジル酸緩衝液で遠心洗浄した。沈殿を、70 $^{\circ}$ Cに保温した0.5%アガロース水溶液に再懸濁したのち遠心し、氷水中でゲル化させた。ゲル中の血球沈殿を細切し、固定液で1時間追加固定した。緩衝液で洗浄し、2%オスミウム酸を含む0.1Mカコジル酸緩衝液で1時間固定したのち、緩衝液で洗浄した。固定液と緩衝液にはサッカロースを10%添加した。エタノール上昇系列で脱水し、プロピレンオキシドに置換後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色後、透過型電子顕微鏡 (JEM-200CM, 日本電子) で観察した。

### 2.6 走査型電子顕微鏡観察

ポリ-L-リシンで皮膜したガラス板(約5 $\times$ 5 mm)を支持板に用いた<sup>4)</sup>。氷水中で1時間固定したマダコ血球を、0.1Mカコジル酸緩衝液 (pH7.4) で遠心洗浄した。同液に再懸濁し、支持板に滴下後、室温で20分間静置した。緩衝液で洗浄したのち、1%グルタルアルデヒドを含む0.1Mカコジル酸緩衝液を用いて室温で1時間固定した。緩衝液で洗浄し、1%オスミウム酸を含む0.1Mカコジル酸緩衝液を用いて5 $^{\circ}$ Cで1時間固定した。これを蒸留水で水洗し、タンニン・オスミウム法<sup>5)</sup>で導電染色した。常法に従って脱水したのち臨界点乾燥した。イオンスパッタリング装置 (HCP-1, 日本電子) で、試料に白金を蒸着して走査型電子顕微鏡 (JSM-T-300, 日本電子) で観察した。

### 2.7 細胞化学的性状試験

氷水中で15分間固定したマダコ血球を、10%サッカロ-

Table 1. Sizes of octopus hemocytes<sup>1, 2</sup>

		<i>Octopus vulgaris</i>	<i>Octopus minor</i>	<i>Octopus ocellatus</i>
Cell	diameter ( $\mu\text{m}$ ) <sup>3</sup>	8.7 $\pm$ 0.9 $\times$ 7.4 $\pm$ 0.6, 6.9~12.2 $\times$ 5.1~9.4, 8.6 $\times$ 7.5	9.7 $\pm$ 0.7 $\times$ 8.2 $\pm$ 0.8, 8.3~12.1 $\times$ 5.7~9.8, 9.7 $\times$ 8.2	6.5 $\pm$ 0.7 $\times$ 5.7 $\pm$ 0.5, 4.6~10.3 $\times$ 4.4~7.0, 6.5 $\times$ 5.7
	area ( $\mu\text{m}^2$ )	51.4 $\pm$ 6.7, 36.9~74.6, 50.9	65.4 $\pm$ 7.8, 53.9~90.9, 65.1	30.8 $\pm$ 3.9, 44.5~17.8, 30.8
Nucleus diameter( $\mu\text{m}$ ) <sup>3</sup>		5.9 $\pm$ 0.7 $\times$ 4.6 $\pm$ 0.6, 4.1~8.5 $\times$ 3.1~5.9, 5.9 $\times$ 4.7	6.7 $\pm$ 0.6 $\times$ 4.8 $\pm$ 0.7, 5.7~7.7 $\times$ 3.2~6.3, 6.6 $\times$ 4.8	4.8 $\pm$ 0.5 $\times$ 3.4 $\pm$ 0.6, 3.6~6.6 $\times$ 1.8~4.8, 4.8 $\times$ 3.4
	area( $\mu\text{m}^2$ )	22.9 $\pm$ 4.0, 14.0~34.4, 22.3	28.6 $\pm$ 4.1, 18.9~40.9, 28.1	14.1 $\pm$ 2.3, 20.1~5.7, 14.0
N/C ratio(%)		44.9 $\pm$ 7.4, 25.4~66.4, 45.9	44.2 $\pm$ 7.2, 26.4~70.8, 43.9	45.9 $\pm$ 7.0, 65.2~19.7, 45.8

<sup>1</sup> Observation was carried out on the preparation stained by May-Grünwald at pH 6.0.

<sup>2</sup> Results were expressed as mean $\pm$ SD, range and median.

<sup>3</sup> Length $\times$ width.

Table 2. Comparison of granules in octopus hemocytes

Type of granules <sup>1</sup>	Shape	Size ( $\mu\text{m}$ )	Number (/cell)	May-Grünwald staining <sup>2</sup> at each pH															
				1	2	3	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8				
<i>O.vulgaris</i>	EG	round or oval	0.1~0.6	>20	R	R	LR	LR	LR	LR	LR	LR	C	C	C	C			
	SBG	round or oval	0.1~0.5	>20	C	C	C	C	C	B	B	B	B	B	B	B			
	RBG	short-rod	0.8~1.2 $\times$ 0.2~0.3	2~4	C	C	C	C	LB	LB	B	B	B	B	B	B			
	LBG	round or oval	1.0~2.5	3~4	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	B		
<i>O.minor</i>	EG	round or oval	0.1~0.6	>20	R	R	R	R	R	LR	LR	C	C	C	C	C			
	SBG	round or oval	0.1~0.6	<20	C	C	C	C	C	B	B	B	B	B	B	B			
	LBG	round or oval	0.7~1.4	3~5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	B		
<i>O.ocellatus</i>	EG	round or oval	0.1~0.4	>20	R	R	R	R	R	R	LR	LR	LR	LR	C	C			
	SBG	round or oval	0.2~0.5	<20	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	B	B	B		
	LBG	round or oval	1.0~2.0	1~4	C	C	C	C	C	C	C	C	LB	LB	LB	B	B		

<sup>1</sup> EG, eosinophilic granule; SBG, small basophilic granule; RBG, rod-shaped basophilic granule; LBG, large basophilic granule.

<sup>2</sup> R, red; LR, light red; B, blue; LB, light blue; C, colorless.

スを含む0.2Mカコジル酸緩衝液 (pH7.4) で、遠心洗浄した。血球を同液に懸濁し、Auto smear CF-12Dを用いて、ゼラチン処理スライドグラスに血球を付着させた。30分間風乾し、蒸留水で水洗後、各種酵素染色を施した。また、蒸留水で水洗後、1時間風乾した標本に多糖類染色と脂肪染色を行った。アルカリ性ホスファターゼ<sup>6)</sup>、酸性ホスファターゼ<sup>5)</sup>、 $\beta$ -グルクロニダーゼ<sup>8)</sup>および各種エステラーゼ<sup>9)</sup>の検出にはアゾ色素法を用いた。ペルオキシダーゼには3,3' diaminobenzidineを用いた<sup>10)</sup>。フェノールオキシダーゼの検出には、L-DOPAを用いたDOPA反応を

適用した<sup>11)</sup>。多糖類の検出のためにはperiodic acid Schiff (PAS) 反応を行った<sup>12)</sup>。また、グリコーゲンの鑑別のために、 $\alpha$ -amylase消化<sup>13)</sup>した標本のPAS反応も行った。酸性粘液多糖類の検出には、トルイジンブルー(TB)染色<sup>14)</sup>とアルシアンブルー (AB) 染色<sup>15)</sup>を用いた。なお、TB染色液には、蒸留水に溶解したもの他に、大野らの鑑別法<sup>16)</sup>にしたがって、pH2.5、4.1および7.0での染色も行った。また、AB染色はpH1.0とpH2.5で行った。脂質の検出にはSudan black B (SBB) 染色<sup>17)</sup>を、中性脂肪の検出にはSudan III染色<sup>18)</sup>とOil red O染色<sup>19)</sup>を適用した。

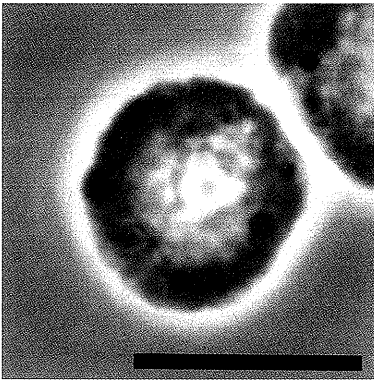


Fig. 2. Phase contrast microscopy of *Octopus vulgaris* hemocyte. Note numerous granules. Bar=10  $\mu$ m.

### 3 結果

位相差顕微鏡で観察したところ、3種類のタコの、いずれの血球にも、様々な大きさの顆粒が認められた (Fig. 2)。顆粒は円形または卵円形であった。顆粒が豊富なために、核の観察は困難であった。

MG染色の結果、いずれのタコの血液中でも、1種類の血球しか観察されなかった。しかし、マダコ血球には4種類の、テナガダコとイダコの血球には3種類の顆粒が観察された (Fig. 3)。Table 1 および Table 2 に3種類のタコの血球の形態学的特性を示した。以下に血球形態を、3種類のタコのそれぞれについて記す。

#### 3.1 マダコ

マダコ血球は、円形または楕円形であり、長径6.9~12.2  $\mu$ m, 短径5.1~9.4  $\mu$ mであった。核は不定型であり、卵円型や楕円型のものから、ソラマメ型、V字型あるいはU字型など様々であった。核の長径は4.1~8.5  $\mu$ m, 短径は3.1~5.9  $\mu$ mであり、ヘテロクロマチンは核膜近くに顆粒状に存在した。血球の面積は36.9~74.6  $\mu$ m<sup>2</sup>, 核の面積は14.0~34.4  $\mu$ m<sup>2</sup>であり、核細胞質比率は、25.4~66.4%であった。

マダコ血球の顆粒はMG染色性の違いから、エオシン好性顆粒 (eosinophilic granule, EG), 小型好塩基性顆粒 (small basophilic granule, SBG), 桿状好塩基性顆粒 (rod-shaped basophilic granule, RBG) および大型好塩基性顆粒 (large basophilic granule, LBG) の4種類に識別された (Fig. 3a, b, Table 2)。

EGは細胞内に豊富に存在し、長径0.1~0.6  $\mu$ mの円形または卵円形であった。本顆粒は、pH1.0~3.0では赤色

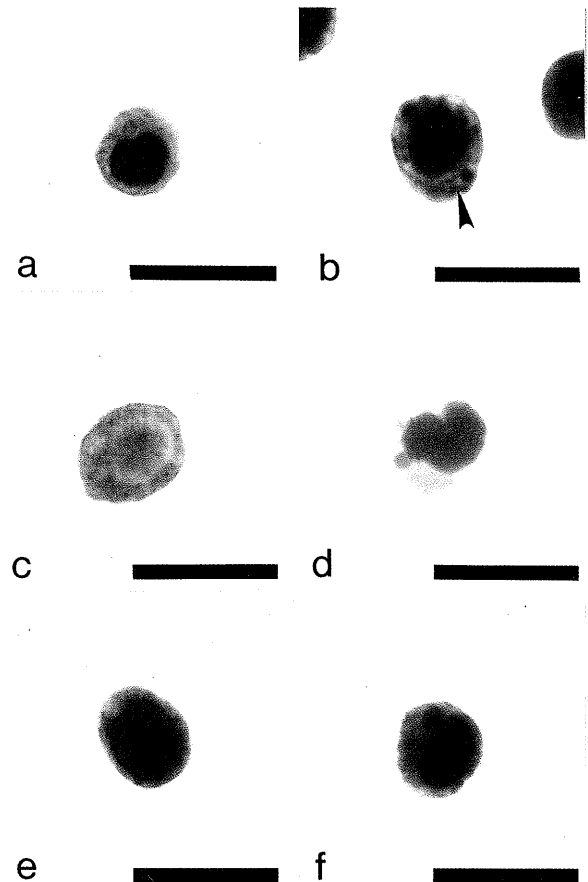


Fig. 3. Light micrographs of hemocytes from *Octopus vulgaris* (a, b), *Octopus minor* (c, d) and *Octopus ocellatus* (e, f). May-Grünwald stain. (a, c, e), pH 4.0; (b, d, f), pH 8.0. Note eosinophilic granule (a, c, e), small basophilic granule (b, d, f), rod-shaped basophilic granule (arrowhead in b) and large basophilic granule (b, d, f). Bars=10  $\mu$ m.

を、pH4.5~5.5では淡赤色を呈したが、pH6.0以上では無色であった。SBGもEGと同様に、細胞内に多数存在し、長径0.1~0.5  $\mu$ mの円形または卵円形であった。pH5.0以上では青色を呈したが、pH1.0~4.5では染色されなかった。RBGは、血球中に2~4個観察され、長径0.8~1.2  $\mu$ m, 短径0.2~0.3  $\mu$ mの桿状であった。pH4.5および5.0では淡青色を、pH5.5以上では青色を呈した。しかし、pH1.0~4.0では、染色されなかった。LBGは血球中に3~4個存在し、長径1.0~2.5  $\mu$ mの円形または卵円形であった。pH1.0~7.0では無色であり、pH7.5~8.0では青色を呈した。EGは細胞質全体に観察されたが、各好塩基性顆粒は、細胞膜に近接していた。

透過型電子顕微鏡で観察したところ、細胞質に微細構造の異なる3種類の顆粒 (S, F および D 顆粒) が観察された (Fig. 4, 5)。S 顆粒 (striated granule) は長径0.8  $\mu$ m以下の円形から卵円形であり、顆粒内には筋状の構造

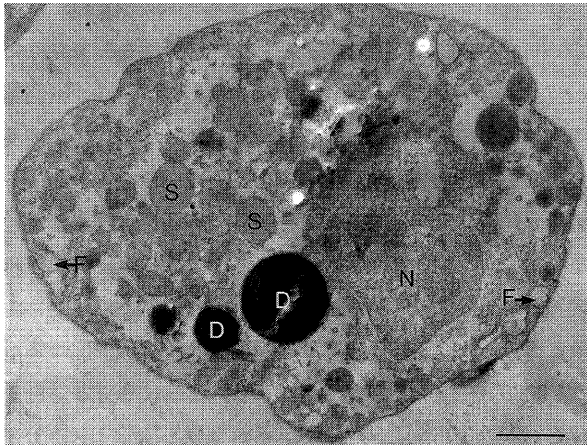


Fig. 4. Transmission electron micrograph of *Octopus vulgaris* hemocyte. Note three types of granules. D, dense granule; F, feathery granule; S, striated granule; N, nucleus. Bar=1 μm.

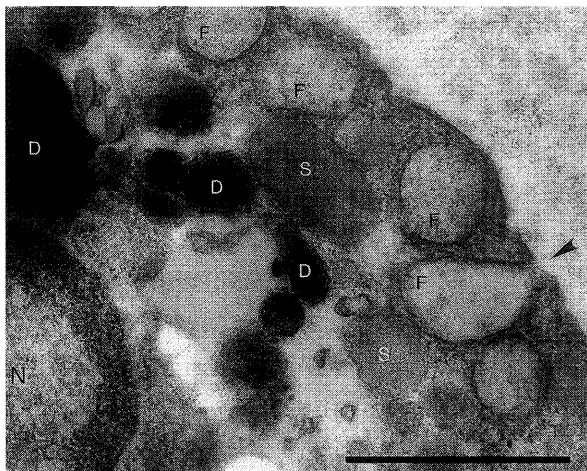


Fig. 5. Higher magnification of granules of *Octopus vulgaris* hemocyte. Note the exocytosis of F granules (arrowhead). D, dense granule; F, feathery granule; S, striated granule; N, nucleus. Bar=1 μm.

が認められた。F 顆粒 (feathery granule) は長径0.5 μm以下の円形から卵円形であり、顆粒内には羽毛状の構造物が観察された。D 顆粒 (dense granule) は1.3 μm以下の円形から卵円形であり、顆粒内には高電子密度の物質が充満していた。S 顆粒は細胞内に散在し、最も多く存在した。F 顆粒は細胞膜の近縁に多数観察された。D 顆粒はS 顆粒と同様に散在していたが、その数はSおよびF 顆粒よりも少なかった。また、しばしばF 顆粒の周囲の膜が細胞膜と融合し、開口している像が観察された (Fig. 5)。走査型電子顕微鏡でも開口部が観察された (Fig. 6)。細胞表面には皺が見られたが、細胞質突起は有していなかった (Fig. 6)。

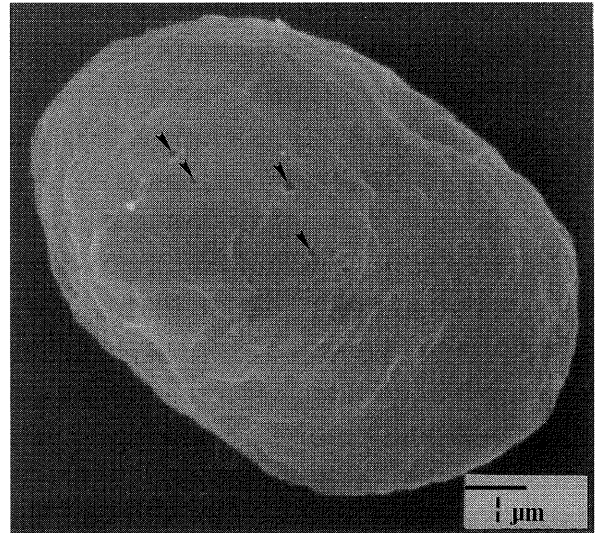


Fig. 6. Scanning electron micrograph of *Octopus vulgaris* hemocyte. Note the holes showing the exocytosis of F granules (arrowheads).

マダコ血球に、酸性ホスファターゼ (AcP)、 $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ ( $\alpha$ -NAE) および $\alpha$ -ナフチルプチレートエステラーゼ ( $\alpha$ -NBE) が検出された (Table 3)。AcPは小型の陽性顆粒として細胞質に散在していた。 $\alpha$ -NAEは細胞質全体が強陽性であり、 $\alpha$ -NBEは細胞質基質が陽性であった。アルカリ性ホスファターゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、ナフトールAS-Dクロロアセテートエステラーゼ、ペルオキシダーゼおよびフェノールオキシダーゼは検出されなかった。PAS反応により細胞質全体が陽性反応を示し、陽性部位の詳細な観察はできなかった。また、 $\alpha$ -amylase消化しても陽性像に変化は認められなかった。AB染色ではpH1.0とpH2.5のいずれの場合も陽性像は見られなかった。TB染色では、いずれの溶液を用いても、顆粒は陰性であった。SBB染色により、小型の陽性顆粒が多数観察され、大型の顆粒では膜のみが染色された。Sudan III染色とOil red O染色では陽性像は認められなかった (Table 3)。

### 3.2 テナガダコ

テナガダコ血球は長径8.3~12.1 μm、短径5.7~9.8 μmの円形または楕円形であった。核は不定型であり、マダコ血球と同様に様々な形態を示した。血球の長径は5.7~7.7 μm、短径は3.2~6.3 μmであり、濃縮クロマチンは核膜近くに顆粒状に存在した。血球の面積は53.9~90.9 μm<sup>2</sup>、核の面積は18.9~40.9 μm<sup>2</sup>であり核細胞質比率は26.4~70.8%であった (Table 1)。

テナガダコ血球には、マダコ血球で見られた顆粒のうち、

RBGは観察されず、他の3種類の顆粒が認められた (Fig. 3c, d, Table 2)。EGは細胞質内に豊富に存在し、長径が0.1~0.6  $\mu\text{m}$ で、円形から卵円形をしており、pH1.0~3.0では赤色を呈し、pH4.0~5.5では淡赤色であった。しかし、pH6.0以上では観察されなかった。SBGはEGよりも少なく、長径0.1~0.6  $\mu\text{m}$ で、円形から卵円形であった。pH5.0以上で青色であったが、pH1.0~4.5では認められなかった。LBGは血球中に3~5個見られ、長径0.7~1.4  $\mu\text{m}$ の円形から卵円形であった。本顆粒はpH7.5および8.0では青色を呈したが、pH1.0~7.0では染色されなかった。EGは細胞質全体に見られるのに対し、SBGおよびLBGは細胞膜に近接していた。

透過型電子顕微鏡ではマダコと同様な3種類の顆粒が観察された。

### 3.3 イイダコ

イイダコ血球は長径4.6~10.3  $\mu\text{m}$ 、短径4.4~7.0  $\mu\text{m}$ の円形または卵円形であった。核はマダコやテナガダコと同様に様々な形態を示した。核の長径は3.6~6.6  $\mu\text{m}$ 、短径は1.8~4.8  $\mu\text{m}$ であった。血球の面積は17.8~44.5  $\mu\text{m}^2$ 、核の面積は5.7~20.1  $\mu\text{m}^2$ であり、核細胞質比率は19.7~65.2%と様々であった (Table 1)。

血球にはテナガダコと同様に、EG、SBGおよびLBGの3種類の顆粒が観察された (Fig. 3e, f, Table 2)。EGは

長径0.1~0.4  $\mu\text{m}$ の正円形または卵円形をしており、pH1.0~5.0で赤色を、pH5.0~7.0では淡赤色を呈したが、pH7.5および8.0では染色されなかった。本顆粒は細胞質中に散在していたが、好塩基性の顆粒よりも細胞質の内側に見られた。SBGは血球中に20個以下であり、長径0.2~0.5  $\mu\text{m}$ の円形または卵円形であった。pH6.5以上で紺色を示したが、pH6.0以下では染色されなかった。本顆粒は細胞膜に近接した場所で観察された。LBGは血球中に1~4個見られ、長径1.0~2.0  $\mu\text{m}$ の円形または卵円形であった。pH6.0~7.0では淡青色を、pH7.5および8.0で青色を呈したが、pH5.5以下では染色されなかった。LBGはSBGと同様に、細胞膜に近接して存在した。

## 4 考察

タコ類を含む軟体動物頭足類の血球はこれまで、1種類とされている<sup>20, 21)</sup>。本研究においても、マダコ、テナガダコおよびイイダコのいずれにも1種類の血球が観察された。しかし、MG染色性の違いから、マダコには4種類の、テナガダコとイイダコには3種類の顆粒の存在が明らかとなった。Cowden and Curtis<sup>21)</sup>はマダコの造血組織 (白体) のスタンブ標本を、azure A-eosin Bで染色し、血球中に塩基性色素 (azure A) で染色される球形の封入物 (顆粒) を確認している。彼らが用いた染色方法の詳細は不明であ

Table 3. Summary of reactions of the *Octopus vulgaris* hemocyte to cytochemical tests

Test	Reaction <sup>1</sup>	
	Intensity	Positive site
Alkaline phosphatase	-	
Acid phosphatase	+	granule
$\beta$ -Glucuronidase	-	
$\alpha$ -Naphthyl acetate esterase	++	cytoplasm
$\alpha$ -Naphthyl butylate esterase	++	hyaloplasm
Naphthol AS-D chloroacetate esterase	-	
Peroxidase	-	
DOPA reaction	-	
Periodic acid Schiff reaction (PAS)	++	cytoplasm
PAS after digestion with $\alpha$ -amylase	++	cytoplasm
Toluidin blue (distilled water)	+	hyaloplasm
Toluidin blue (pH2.5)	-	
Toluidin blue (pH4.1)	-	
Toluidin blue (pH7.0)	++	hyaloplasm
Alcian blue (pH 1.0)	-	
Alcian blue (pH 2.5)	-	
Sudan black B	++	granule
Sudan III	-	
Oil red O	-	

<sup>1</sup> -, not detected; +, weakly positive; ++, strongly positive.

るが、通常、Romanowsky染色液の希釈にはpH6.3~7.3のリン酸緩衝液が使用される。本研究で、3種のタコの血球に共通してこのpH範囲で染まる顆粒はSBGであることから、Cowden and Curtis<sup>21)</sup>の観察した顆粒はSBGであると考えられる。また、Cowden and Curtis<sup>21)</sup>は、スタンブ標本、塗沫標本およびパラフィン包埋切片上で、血球中のいくつかの顆粒、とくに大型のもののみがRomanowsky染色液の塩基性色素に染まると述べている。本研究において、血球中の大型顆粒であるLBGはpH7.5以上で染色されることから、彼らの述べた好塩基性顆粒はLBGではなく、SBGと思われる。一方、Jullien (Cowden and Curtis<sup>21)</sup>から引用)は頭足類に差し込まれた無菌の縫い糸の周囲に、血球の集積を観察しており、縫い糸を血球が包囲するとしている。Jullienはまた、血球中に酸性色素(エオシン)で染色される顆粒を観察している。Cowden and Curtis<sup>21)</sup>はJullienの結果は、彼の用いた染色方法では、多くの細胞質構造物が、塩基性色素よりも酸性色素に結合性を示すために得られたものとしている。しかし、本研究結果から血球中に、エオシン好性顆粒(EG)の存在が認められた。EGは、存在部位が他の顆粒と異なり、また、染色されるpHも5.5以下であることから、通常行われるRomanowsky染色条件では染色されない。したがって、Cowden and Curtis<sup>21)</sup>のJullienの報告に対する考察は適切ではなく、また、彼ら自身の染色方法ではEGを見落としていた可能性が高い。Jullienが用いた染色方法の詳細は不明であるが、本研究で、EGは通常のヘマトキシリン-エオシン染色でもエオシンによって染まることから、Jullienの観察した血球内顆粒はEGに相当すると思われる。

Cowden and Curtis<sup>21)</sup>は*Octopus briareus*白体のプラスチック包埋切片をアルカリ性トルイジンブルーで染色した場合、スタンブ標本のazure A-eosin B染色と同様の顆粒が認められると報告している。また、アルカリ性トルイジンブルー染色で、全ての細胞構造が染まるとしている<sup>21)</sup>。しかし、彼らの示した図からは全ての細胞構造が染色されているようには見えず、むしろ、非染色領域が細胞質内に広く認められ、その多くは顆粒状に見える。

本研究で、マダコには4種類の顆粒が観察されたが、テナガダコとイダコでは、マダコで見られたRBGは確認されなかった。このことは種特異性を示しているのか、あるいは、テナガダコやイダコにもRBGに相当する顆粒があるにもかかわらず、設定した染色条件(pH)では他の顆粒と染め分けられなかったのかもしれない。

本研究では、採血に電子顕微鏡標本用の固定液を用いた。

これにより、光学顕微鏡および電子顕微鏡観察に同じ標本が使用でき、両観察結果の対比が正確にできると考えられる。一方、標本に厚みが生じるために、光学顕微鏡写真の撮影には困難が生じた。しかし、厚みがあるために、焦点を変えることによって、顆粒の存在部位を光学顕微鏡レベルで推測することが可能であった。

透過型電子顕微鏡により、マダコとテナガダコの血球に3種類の顆粒(D, F, S顆粒)が観察された(Fig. 4, 5)。D顆粒は大型のものでは1.3 $\mu$ mに達し、細胞内に散在していたが、その数は他の種類の顆粒よりも少なかった。したがって、D顆粒は、MG染色標本で認められるLBGに相当すると思われる。また、F顆粒は小型で、細胞膜の近縁に多数観察されたことからSBGに、S顆粒は小型で細胞内に散在し、最も多く存在したことから、EGに相当すると思われる。一方、マダコのRBGに相当する顆粒は識別できなかった。F顆粒の周囲の膜が細胞膜と融合し、開口している像がしばしば観察された(Fig. 5)。走査型電子顕微鏡でも細胞膜表面に開口部が観察された(Fig. 6)。このことから、F顆粒、すなわちSBGは体外に取り出す時に、容易に細胞外に放出されると推察される。Cowden and Curtis<sup>21)</sup>は透過型電子顕微鏡観察の結果*Octopus briareus*血球中の顆粒を2種類に分類している。すなわち、均一な電子密度の顆粒と、様々な密度を示す顆粒または電子密度の高い芯を持つ顆粒に大別している。本研究では、電子密度の高い芯を持つ顆粒は認められなかった。一方、*Octopus briareus*血球にはF顆粒は観察されていない。この理由として、F顆粒が容易に細胞外に放出されるために、保存されなかったと推察される。

マダコ血球に、酸性ホスファターゼ、 $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼおよび $\alpha$ -ナフチルブチレートエステラーゼが検出された。これらの酵素はライソゾーム酵素として一般に知られていることから、異物処理に働いていると考えられる。PAS反応により細胞質全体が陽性反応を示し、 $\alpha$ -amylase消化しても陽性像に変化は認められなかった。したがって、マダコ血球内のグリコーゲン是非常に少ないと思われる。MG染色標本上で識別される顆粒と、細胞化学試験の陽性顆粒との間に関連は見いだせなかった。今後、電子顕微鏡レベルでの細胞化学試験により、各顆粒内容の違いを明らかにする必要がある。

多くの軟体動物には、複数種の血球が報告されている<sup>22, 23)</sup>。また、血球は遊走能、食作用、包囲化作用、殺菌能などの機能を有し、創傷治癒や体液凝固にも関与している<sup>22-24)</sup>。タコ類が1種類の血球しか持たないことは、この

血球が様々な機能を有していることを示唆している。また、血球が1種類であることは、血球種の分離を行う必要がなく、血球機能研究の結果を解釈する上で有利である。しかし、本研究結果から、少なくともF顆粒は、生体外で容易に細胞外放出される可能性があることが明らかとなった。このことは、生体外での血球機能測定には限界があることを示している。したがって、血球の生体外機能測定を行う場合には、使用した血球のMG染色性や微細構造を並行して観察し、形態学的特徴を明らかにしておく必要がある。

## 文 献

- 1) S. K. Malham, N. W. Runham and C. J. Secombes: *Eledone cirrhosa* hemocytes: isolation and culture, in *Techniques in Fish Immunology* (ed. by J. S. Stolen, T. C. Fletcher, S. A. Smith, J. T. Zelikoff, S. L. Kaattori, R. S. Anderson, K. Soderhall and B. A. Weeks-Perkins), Vol. 4, SOS Publications, Fair Haven, 1994, pp. 233-240.
- 2) 近藤昌和・友永 進・高橋幸則: エボシガイの血球. 水産大学校研究報告, **50** (2), 67-73 (2002)
- 3) 中河志朗: 実験医学別冊バイオマニユアルシリーズ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.
- 4) 福留初子: 遊離細胞観察法, 医学・生物学領域の走査型電子顕微鏡技術 (田中敬一編), 講談社, 東京, 1993, pp. 80-92.
- 5) 高橋 元: 導電染色法 (その2), 医学・生物学領域の走査型電子顕微鏡技術 (田中敬一編), 講談社, 東京, 1993, pp. 46-58.
- 6) 小池 正・古田理英・柴田 昭: アルカリ性ホスファターゼ. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 207-209.
- 7) 望野唯明・片山 勲: 酸ホスファターゼ. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 218-221.
- 8) 木村寿之:  $\beta$ -グルクロニダーゼ. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 221-224.
- 9) 斎藤準一・高久定男・清水 宏: エステラーゼ染色. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 209-213.
- 10) 亀井喜恵子: ペルオキシダーゼ染色. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 213-217.
- 11) 前田 明: ドーバ反応. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 58-59.
- 12) 安達真二: PAS反応. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 242-244.
- 13) 鈴木 裕:  $\alpha$ -アミラーゼによるグリコーゲンの消化法. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 88-89.
- 14) 林 勇: トルイジン青染色. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 78-79.
- 15) 林 勇: アルシアン青染色. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 82-85.
- 16) 大野 乾・野附 巖・川井忠和: 酸性多糖類の組織化学的研究, ヒアルロン酸の組織化学的確認法. 医学と生物, **19**, 326-328 (1951).
- 17) 東 克己: ズダン黒B (SBB)染色. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 239-240.
- 18) 金田正昭: ズダンⅢ, ズダンⅣ染色. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 105-107.
- 19) 金田正昭: オイルレッドO染色. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 108-109.
- 20) B. U. Budelman, R. Schipp and S. von Boletzky: Cephalopoda, in *Microscopic anatomy of Invertebrates* (ed. by F. W. Harrison and A. J. Kohn), Vol. 6A Mollusca II, Wiley-Liss, New York, 1997, pp. 119-414.
- 21) R. R. Cowden and S. K. Curtis: Cephalopods. in *Invertebrate Blood Cells* (ed. by N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley), Vol. 1, Academic Press, London, 1981, pp. 301-323.
- 22) 古田恵美子: 軟体動物. 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.129-146.
- 23) 鈴木 徹・淡路雅彦: 創傷治癒機構. 水産学会シリーズ104 水産動物の生体防御 (森 勝義・神谷久男編), 恒星社厚生閣, 東京, 1995, pp.83-95.
- 24) 高橋計介・森 勝義: 軟体動物の殺菌機構. 水産学会シリーズ104 水産動物の生体防御 (森 勝義・神谷久男編), 恒星社厚生閣, 東京, 1995, pp.96-107.