

(Memoirs of the Faculty of Education and Human Studies)
 (Akita University (Natural Science))
 67, 25 – 33 (2012)

出芽ホヤ、ミサキマメイタボヤの色素と白色血球について

石井照久・齊藤康典

Red-orange pigments in epidermal cells and white blood cells in the budding ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*

Teruhisa ISHII¹ and Yasunori SAITO²

¹Division of Biology, Department of Natural and Environmental Sciences, Faculty of Education and Human Studies, Akita University, Akita 010-8502, Japan and ²Shimoda Marine Research Center, University of Tsukuba, Shizuoka 415-0025, Japan

Abstract

There are two different color strains in the budding ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. One is spotless strain and the other is white-spot strain. A zooid of spotless strain has a white-band between branchial and atrial siphons. However, a zooid of white-spot strain has a clear white-spot between branchial and atrial siphons. Ishii *et al.* (1993) revealed that the differences between the color patterns of the two strains were mainly based on the distribution of red pigments in the epidermal cells. The area that lacks red pigments forms a fine white-band in the spotless strain or a circular white spot in the white-spot strain on the dorsal side. In this area, white pigment cells, which are distributed in the mesenchymal space, can be seen through the epidermal layer. In this report, red-orange pigments and white blood cells were examined with TEM. Also, by solubility test, the natures of pigments were studied. By TEM observation, red or orange pigments were thought to be the granules in the epidermal cells and white blood cells were the nephrocytes (one of blood cells). Solubility test revealed that the red-orange pigments are carotenoids and pteridines.

Keywords : budding ascidians, pigment cells, blood cells, white free cells, nephrocytes, epidermal cells, *Polyandrocarpa misakiensis*,

はじめに

ホヤ類は、脊索動物門の尾索動物亜門に属する動物群であり、単体性のホヤと群体性のホヤが知られている。単体性のホヤで馴染みが深いのが、日本でよく食用にされているマボヤである。マボヤの色は普通赤だが、真っ白な個体や赤と真っ白の間の色を持った個体(ピンク色)がいることもわかっており、これらの色彩変異について Ishii ら (2004) は、白の個体は外側の被囊色だけでなく内側の筋膜(表皮+間充織+囲腮腔上皮)も白いこと、白の個体群のほうが赤の個体群に比べてアロ反応性が低いこと、ピンクの個体群のアロ反応性は赤の個体群と白の個体群の間になること、などを明らかにしている。マボヤ以外の単体性のホヤについても発生過程が詳細に研究されていたり、ゲノムが研究されていたりする。一方、群体性のホヤについても多くの研究がなされてきている。群体性のホヤは単体性にない特有な形態および特

性を持っている。たとえば、シモフリボヤという群体性のホヤは、共通の被囊の中に数十の個体(これを個虫という)が共同に生活していて、その被囊中には、貪食能力を持つ被囊細胞(Hirose *et al.*, 1994a)を含む7種類の被囊細胞が存在することが報告されている(Hirose *et al.*, 1994b)。そして、貪食能力を持つ被囊細胞の運命も追跡されている(Ishii and Hirose, 2003)。さらに7種類の被囊細胞のうちの1種は、被囊の収縮に関与しており(Hirose and Ishii, 1995)、被囊が収縮することが傷口の修復にも役立っている、と報告されている(Hirose *et al.*, 1997)。また、シモフリボヤが示すアロ反応(同種異個体拒絶反応)では、7種類の被囊細胞のうち、貪食能力を持つ被囊細胞が主に反応に関与していることがわかっている(Ishii *et al.*, 2008)。このように、ホヤ類では、単体性のホヤ、群体性のホヤ、の両方を用いて多くの研究がなされてきている。

ミサキマメイトボヤ (*Polyandrocarpa misakiensis*) は、1970年に神奈川県三崎で最初に採集され、新種記載された群体性の出芽ホヤである (Watanabe and Tokioka, 1972)。その後、ミサキマメイトボヤは筑波大学下田臨海実験センター (所在地は静岡県下田市) の近くにある鍋田湾内に設置された生け簀において継代飼育されてきた。ミサキマメイトボヤは有性生殖と無性生殖の両方を行うが、継代飼育は高い無性生殖能力によって維持されてきた。ミサキマメイトボヤが示す高い無性生殖力と出芽パターンは Oda and Watanabe (1986) によって報告されている。ミサキマメイトボヤの個虫の色彩は全体に赤く、入水孔と出水孔の間に細い白い帯が認められる。その後、下田においても同種のホヤが採集され、同様に継代飼育されてきている。しかし、下田で発見されたミサキマメイトボヤは三崎で発見されたものと色彩が異なっていた。下田で発見されたミサキマメイトボヤは、個虫全体の色彩は三崎産と同じで赤いが、入水孔と出水孔の間に明瞭な白斑が認められた。そこで、三崎産を spotless 系統、下田産を white-spot 系統として区別している。

ミサキマメイトボヤの無性的な出芽方法は囲鰓腔壁出芽といわれ、囲鰓腔上皮が表皮とともに突出して芽体を作る。芽体は、外側から被囊、表皮、血球 (間充織空間に存在している)、囲鰓腔上皮という構造になっている。すなわち、囲鰓腔上皮と表皮という2層の袋構造が、被囊で包まれたようになっている。出芽した芽体はやがて親個虫から分離して、形態形成を行い機能的な個虫へと成長する。ミサキマメイトボヤの出芽時の2つの上皮や血球の挙動が Kawamura and Watanabe (1982a) により詳細に報告されており、芽体の基部で形態形成が始まること、2つの上皮は色素を持っていることなどがわかっている。さらに Kawamura and Nakauchi (1984) は、芽体で前後軸がどのように形成されるかを調べるとともに将来の後端で最初に囲鰓腔上皮の活性化が起こると報告している。Kawamura and Watanabe (1982b) は、親個虫と芽体における軸性の関係を調べ、芽体は親個虫の極性を引き継ぐことを報告している。親個虫の軸性を芽体が引き継ぐことは、他の群体ホヤ (ウスイトボヤ) でも確認されている (Izzard, 1973)。また Oda and Watanabe (1982) は、実験的にミサキマメイトボヤの芽体を切断することによって内臓逆位個虫や奇形個虫が生じるのを報告している。Kawamura and Watanabe (1982c) は、ミサキマメイトボヤの出芽中の芽体を移植することによって左右軸が逆転することを報告している。さらに Kawamura and Watanabe (1983) は、ミサキマメイトボヤの親個虫の前後軸の極性が芽体の前後軸形成に影響することを、芽体片のさまざまな癒合実験から明らかにしている。

Kawamura (1984a) は、出芽時期の異なる芽体片を癒合させることにより、芽体では前後軸のうち後部の運命決定が前部決定よりも先に起こり、後部がドミナントであることを示した。そして、Kawamura (1984b) は位置値のギャップが後部形成を促すことを位置値の異なるさまざまな芽体片同士を癒合することにより示している。また、Kawamura and Watanabe (1987) は、芽体片の癒合実験から、表皮と間充織が芽体の形態形成に関与していることを述べている。Kawamura and Nakauchi (1986) は芽体のどこで細胞分裂が活発に起こるのかを報告している。近年、Kawamura ら (2008) は、囲鰓腔上皮細胞の分化転換にレチノイン酸が関与していることが、ミサキマメイトボヤの芽体からの形態形成に重要であることを述べている。このようにミサキマメイトボヤの高い出芽能力から生じる芽体を用いた実験が沢山行われてきている。

ミサキマメイトボヤは無性生殖能力に加え、再生能力も非常に高く、その個虫断片を用いた再生実験も数多く行われてきている。Oda and Watanabe (1981) は、個虫を切断すると正常に再生する以外に、奇形個虫が再生すること、さらに奇形個虫の再切断から内臓逆位個虫が再生すること、などを示した。Taneda (1985) は、ミサキマメイトボヤの前断片同士を癒合した場合に形成される重複個虫において、前後軸に沿った極性が再生サイズに関与していることを報告している。さらに種田は前断片同士の癒合による重複個虫を格子変形法で解析したり (種田, 1986)、前断片同士の癒合の際に一方の断片に spotless 系統を他方の断片に white-spot 系統を、それぞれ用いることにより、位置情報を担っている細胞層を検討したりしている (種田, 1987)。Kaneko ら (2010) は、ミサキマメイトボヤの再生においても、出芽時と同様にレチノイン酸が関与していることを報告している。Ishii ら (1994) は、spotless 系統と white-spot 系統という色彩2系統および正常個虫と内臓逆位個虫を組み合わせ、前後軸のみならず左右軸のキメラ個虫形態形成への関与を報告している。さらに Ishii ら (1997) は、個虫断片の再生時とキメラ個虫形態形成時のそれぞれにおける、前後軸と左右軸の安定性を報告し、また Ishii ら (1998) は、個虫断片の再生時においても親個虫の左右軸の極性が関与していることを報告している。

このようにミサキマメイトボヤでは、優れた無性生殖能力・再生能力について沢山の研究がこれまでにされてきているが、Sugino ら (1993)、Koyama (2011)、Koyama ら (in press) のようにミサキマメイトボヤの形態に関する研究報告も多い。

前述の内臓逆位個虫について少し詳しく述べたい。内臓逆位個虫とは内臓の左右の位置が正常のものとは真逆

(鏡像関係)になっているものである。正常な内臓の配置をした正常個虫から、実験的に内臓の配置を左右逆転させた個虫を誘導することができる。群体ホヤで内臓逆位個虫を実験的に初めて誘導したのは、Sabbadin (1956) である。Sabbadin (1956) は、ウスイタボヤという群体ホヤにおいて委縮した左側の芽体以外の元気な芽体を全て除去した。その結果、委縮した左側の芽体が内臓逆位個虫となった。さらに Sabbadin ら (1975) は、どのように極性が決定されるのかを調べ報告している。この内臓逆位個虫は、前述のようにミサキマメイトボヤでも知られている。個虫断片から再生した個虫を再度切断することによったり (Oda and Watanabe, 1981)、芽体の一部を切断したり (Oda and Watanabe, 1982)、親個虫から芽体片を切り出し別の場所に移植したり (Kawamura and Watanabe, 1982c)、芽体片同士をさまざまに癒合させたり (Kawamura and Watanabe, 1983)、することによってミサキマメイトボヤにおいても内臓逆位個虫を誘導することができている。群体ホヤの一種の *Metandrocarpa taylora* では、出芽した個虫の中に自然発生的に内臓逆位個虫が生じることがあり (Watanabe and Newberry, 1976)、ウスイタボヤでもごくごくわずかな頻度で自然発生的に内臓逆位個虫が生じることが報告されている。しかし、ミサキマメイトボヤでは自然発生的に内臓逆位個虫が生じたという報告はこれまでない。コバンイタボヤでは、親個虫から出てくる芽体を全て除去すると、退化した親個虫になってしまうが、そこから新たに出芽した芽体から内臓逆位個虫ができることがある (Nakauchi and Sugino, 1984)。このように、いくつかの種類群体ホヤで実験的に内臓逆位個虫が誘導されている。そして面白いことに、一度実験的に誘導された内臓逆位個虫は、無性生殖で必ず内臓逆位個虫を生じるのである。普通の群体ホヤの場合、無性生殖と有性生殖の両方により繁殖しているため、無性生殖だけで数年に渡り子孫繁栄しているわけではない。また、有性生殖では内臓逆位の性質は維持されない。つまり実験的に誘導された内臓逆位個虫が有性生殖を行うと、その結果生まれてくるのは正常個虫である。そのため、普通の群体ホヤは、有性生殖をさむことにより、長年にわたって内臓逆位個虫を維持するのは困難である。しかし、ミサキマメイトボヤは、無性生殖のみで、40年以上飼育することができているため、一度誘導した内臓逆位という形質を長く維持することができる、という利点がある。

ミサキマメイトボヤのこれらの特徴を生かし、個虫断片を癒合させてキメラ個虫を作成する場合、個虫断片同士に色彩2系統由来の個虫を用いると、できたキメラ個虫の中において、どの領域がどちらの個虫断片に由来するかを色彩マーカーで区別できることになり、大変便利

である (種田, 1987; Ishii *et al.*, 1994)。さらに、キメラ個虫から出芽してくる芽体が、もともとどちらの個虫断片に由来しているのかを追跡することもできる (種田, 1987; Ishii *et al.*, 1994)。もし、癒合させる個虫断片同士を別々の色彩2系統にしておくだけでなく、どちらかの系統を内臓逆位にしたものにしておけば、左右軸の解析を行うことが可能となる (Ishii *et al.*, 1994)。このように、ミサキマメイトボヤは、移植・再生実験やキメラ個虫実験に最適な材料であり、また、色彩2系統は肉眼で確認できる有用なマーカーであり、その形態的な特徴を明らかにすることは重要である。

Ishii ら (1993) は、ミサキマメイトボヤの色彩2系統の違いを明らかにした。すなわち、個虫全体の赤色は表皮細胞層に存在する色素によって現れていること、白色は血球の1種の細胞の色であること、入水孔と出水孔の間に細い白い帯があるか、大きな白斑があるかどうかは、表皮細胞層で赤色素の沈着していない範囲が狭いか広いことによってその直下に存在する白い血球が見えているかどうかによること、などである。さらに Ishii ら (1993) は2系統間で色素を薄層クロマトグラフィーにより比較したところ、系統間に含まれている色素の組成に差がないことも明らかにしている。

本研究では、ミサキマメイトボヤの色彩2系統の色素の組成をさらに詳しく解析した。また被囊・表皮・囲鰓腔上皮を、赤色やオレンジ色の色素に注目して組織学的に解析した。そして、両色彩2系統の表皮細胞層で赤色を呈している部分とそうでない部分を電子顕微鏡像などから比較し、その違いを明らかにするとともに、白色血球の微細構造を観察したので報告する。

材料および方法

材料

筑波大学下田臨海実験センター (所在は静岡県下田市) の近くにある鍋田湾内に設置されている生け簀で継代飼育している、ミサキマメイトボヤ (*Polyandrocarpa misakiensis*) spotless 系統株と white-spot 系統株の両色彩2系統株の芽生個虫 (囲鰓腔壁出芽により生じた個虫) および芽体を用いた。

色素の溶出テスト

ミサキマメイトボヤの色彩2系統株の色素を同定するために、溶出テストを行った。溶出テストに用いた溶媒は、メタノール、エタノール、エチルエーテル、アンモニア水、酢酸、ホルマリン、アセトンおよび硫酸である。2系統株の芽生個虫をそれぞれのテスト液に浸漬し、色素が溶出するかどうかを調べた。

組織学的観察

ミサキマメイタボヤの色彩2系統の芽体あるいは芽生個虫を肉眼あるいは実体顕微鏡を用いて観察した。その後、以下の方法を用いた。

凍結切片観察：ミサキマメイタボヤの色彩2系統の芽体あるいは芽生個虫をそのまま凍結切片作成専用の樹脂であるO.C.T.コンパウンドに包埋し -30°C ～ -25°C 下で凍結後（グリセリンに包埋した場合もあった）、厚さ $12\mu\text{m}$ の凍結切片を -30°C ～ -25°C 下で作成し、顕微鏡で観察を行った。また、海水ホルマリンで固定した場合は、グリセリンに包埋して凍結切片を作成した。

厚切り切片観察・超薄切片観察：ミサキマメイタボヤの色彩2系統の芽体あるいは芽生個虫をろ過海水中に約1時間入れた後、メントールを含むろ過海水中で2時間麻酔を行った。そして2.5%グルタルアルデヒド-0.1Mカコジル酸ナトリウム-0.45Mスクロース (pH7.4)を用いて2時間、氷上で固定した。その後、0.1Mカコジル酸ナトリウム-0.45Mスクロース (pH7.4)で2回リンスした。さらに、後固定を、1%オスミウム酸-0.1Mカコジル酸ナトリウム (pH7.4)を用いて氷上で1時間行った。脱水はエタノールを用いて行い、低粘度エポキシ系の樹脂に包埋した。樹脂包埋の前に、エタノールをn-ブチルグリシジルエーテルで置換した。また、樹脂の包埋時に脱気を行い、樹脂の浸透の促進を図った。樹脂包埋された芽生個虫では、入水孔と出水孔および脳神経節を切片作成の位置目安にして、被囊・表皮・間充織空間が観察できる厚切り切片（厚さ $0.5\mu\text{m}$ ）をまず作成し、トルイジンブルー染色をして観察した。樹脂包埋された芽体も、まず厚切り切片を作成しトルイジンブルーで染色して観察を行った。厚切り切片で観察したい像が得られた場合には、金-銀色の超薄切片を作成し、

酢酸ウラニルと鉛による二重染色を施し（場合によってはこれらの電子染色を行わなかったり、鉛染色を行わなかったりした）、日立HS-9透過型電子顕微鏡で（加速電圧 = 75 kV）観察した。

結果

色素の溶出テスト

ミサキマメイタボヤの色素は、表1で示すように、メタノール、エタノール、エチルエーテル、アンモニア水に溶出した。特にアセトンと酢酸には強く溶出した。ホルマリンには、わずかながら溶出した。色彩2系統株の芽生個虫ともに同じ溶出テスト結果となった。さらに表1では、カロテノイドとプテリジンの溶出テスト結果を文献 (Matsumoto, *et. al.*, 1971) より調べて記載し、ミサキマメイタボヤの色素の溶出テスト結果と比較できるようにした。また、データは示さないが、ミサキマメイタボヤの赤い色素は、硫酸により青色に変化して溶出した。これらの結果から、ミサキマメイタボヤの赤やオレンジの色素は、カロテノイドとプテリジンであると考えられた。

組織学的観察

ミサキマメイタボヤの芽体は、色彩2系統のどちらにおいても、肉眼下あるいは実体顕微鏡下において白い帯や白い斑点は認められず、全体的に赤からオレンジ色をしていて、2系統間に差はなかった。凍結切片の観察においても差が見られず、被囊の表面近く、表皮および囲鰓腔上皮にそれぞれ赤～オレンジ色の着色が見られた。ただし、表皮と被囊では赤色が強く、囲鰓腔上皮はオレンジ色だった。これらの色素沈着の特徴は色彩2系統間

表 1

溶媒	ミサキマメイタボヤ 芽生個虫	カロテノイド*	プテリジン*
アセトン	+++	+++	-
エチルエーテル	++	+++	-
メタノール	++	++	-
エタノール	++		
酢酸	+++	-	
ホルマリン	+	-	
アンモニア水	++	-	++

+++は色素が完全に溶出したことを示している。

++は色素がほぼ溶出したことを示している。

+は色素がわずかに溶出したことを示している。

-は色素が全く溶出しなかったことを示している。

* Matsumoto, *et. al.*, 1971 より引用。

空白は文献でデータが見あたらない部分。

で違いはなかった（データは示さない）。また芽体の厚切り切片を観察しても、色彩2系統間で特に差はなかった。また、表皮細胞中にはトルイジンブルーによく染まる顆粒が多く認められた（図1A）。色彩2系統の芽生個虫（機能している個虫）を凍結切片で観察すると、Ishiiら（1993）が示した通りの違い「spotless系統株では表皮で赤色が沈着している範囲が広く、逆にwhite-spot系統ではその範囲が狭い」が再確認された。そこで厚切り切片（図1B）と超薄切片を観察すると、赤色素の沈着があると思われる表皮細胞と、沈着がないと思われる表皮細胞の違いが認められた（図2）。すなわち、赤色素の沈着があると思われる表皮細胞には、直径0.5 μm -1 μm 程度の電子密度の高い顆粒が多く認められた（図2A, 2B）。それに対して赤色素の沈着がないと思われる表皮細胞には、これらの顆粒は認められなかった（図2C, 2D）。色彩2系統のどちらにおいても、これらの顆粒を持つ表皮細胞と持たない表皮細胞が認められた。表皮細胞で認められた顆粒のサイズは完全には均一ではなく、また電子密度も均一ではなかった。これらの顆粒をまったく持たない表皮細胞が存在すること、および、顆粒を持たない表皮細胞の個虫での位置から判断すると、これらの顆粒が赤色素の正体と考えられた。さらに、これらの顆粒は厚切り切片においてトルイジンブルーによく染まった顆粒と同一と思われた（図1A）。

色彩2系統の芽生個虫の白く見える部分を観察すると、厚切り切片では、表皮細胞層の直下に、結晶構造様の粒をもった細胞が観察された（図1B）。同じ部分を電子顕微鏡観察すると液胞をたくさん持つ血球が観察された（図2C, 2D, 2E, 2F）。さらに、この血球の液胞の中の結晶構造物が切片作成時に脱落し、その影響で切片が破れ、ほとんどの液胞部分が破損して破けたため、細胞中で明るく抜けて観察された。脱落したものは結晶構造をした堅い物質だと思われた。結晶構造が運よく残って観察されたり、液胞が破れずに観察されたりする場合もあった（図2C, 2D, 2E, 2F）。

考察

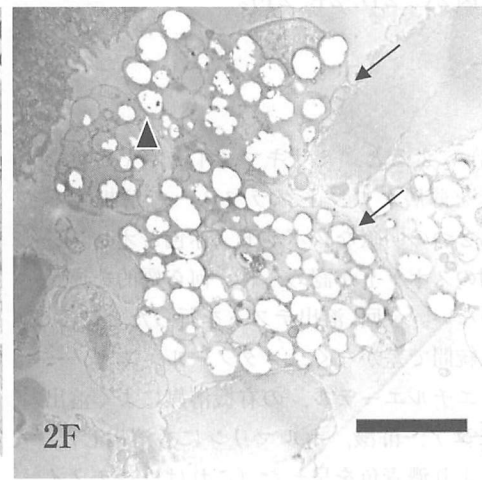
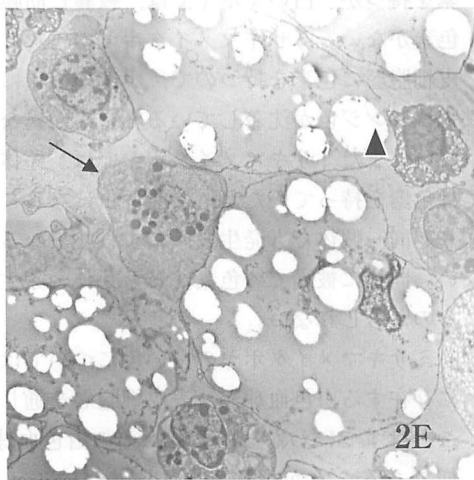
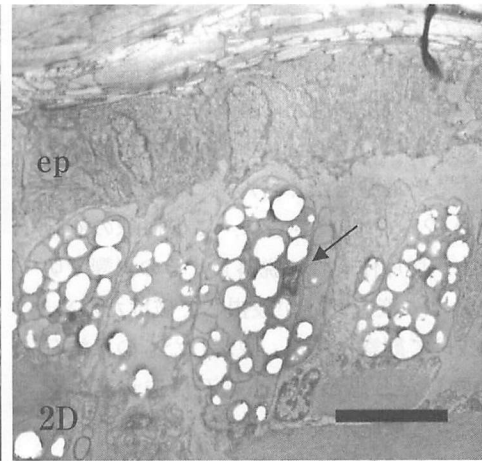
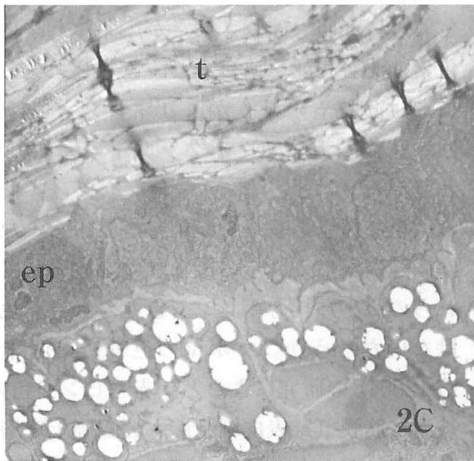
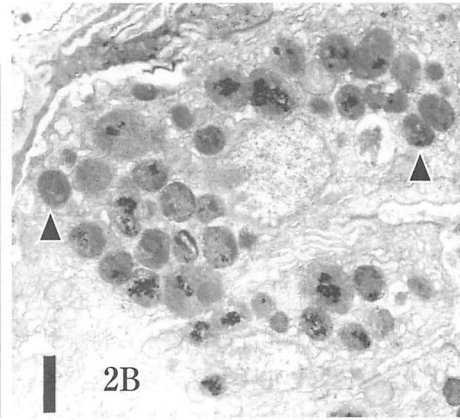
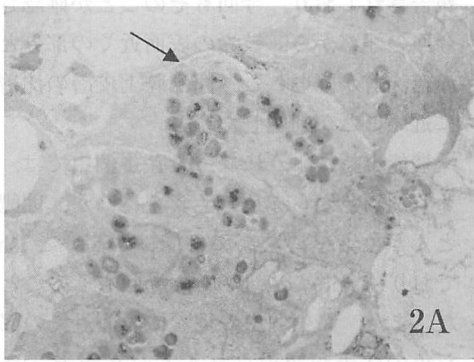
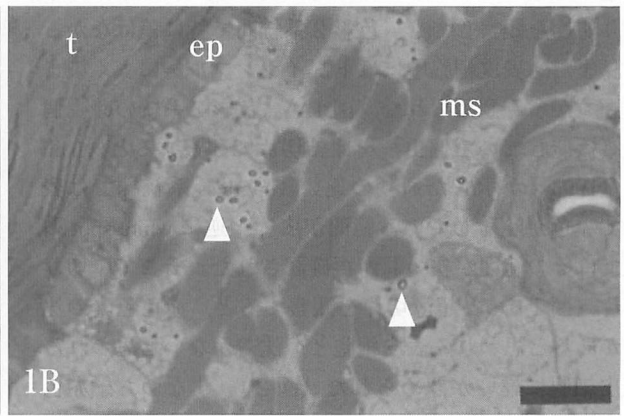
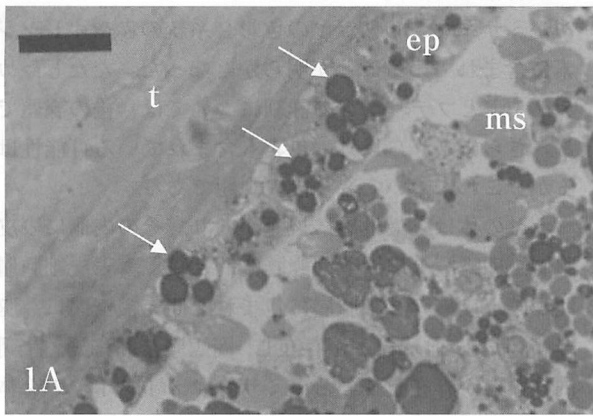
Ishiiら（1993）によると、ミサキマメイタボヤの色彩2系統間の色素を薄層クロマトグラフィーで解析すると、どちらとも2つの明瞭なスポット（赤色とオレンジ色）と弱い数個のスポットが認められ、何ら質的な違いは認められていない。今回、溶出テストを行ったところ、やはり色彩2系統間で差がなく、メタノール、エタノール、アセトン、エチルエーテル、の有機溶媒によく溶出し、またアンモニア、酢酸、ホルマリンにも溶出した。さらに濃硫酸により濃青色を呈した（これはカロテノイ

ドの特徴である）。以上から、カロテノイドとプテリジンがミサキマメイタボヤの色彩2系統の赤やオレンジ色素に含まれていることが明らかとなった。ただし、カロテノイドとプテリジンの詳細については今後の課題である。さらにこれら以外の色素も含まれている可能性はあるが、これについても今後の課題である。

ホヤの体は、最外層に被囊があり、その内側に表皮細胞層、囲鰓腔上皮層、囲鰓腔空間と続く。表皮細胞層と囲鰓腔上皮層の2細胞層に包まれた間充織空間に、脳神経節、筋肉、血球などが存在し、囲鰓腔空間に鰓、胃、腸、内柱などが存在している。ミサキマメイタボヤの芽体では、表皮細胞層、囲鰓腔上皮層ともに、オレンジ色の色素を持つことがKawamura and Watanabe（1982a）により報告されており、今回もそのことが確認された。さらに今回の観察から、被囊の表面近くの部分と表皮細胞層の赤色沈着が強いこと、囲鰓腔上皮層の沈着はオレンジ色に近いことが判明した。

機能を持つようになった芽生個虫では、表皮細胞層はオレンジ色から赤色の色素を持つが、囲鰓腔上皮層はほとんど色素を持たない可能性が高いとIshiiらは報告しており（Ishii *et al.*, 1993）、今回もそのことが追確認された。また、芽生個虫の被囊の表面近くの部分にもオレンジ色の沈着が認められるという報告（Ishii *et al.*, 1993）どおりに今回も確認されたが、芽体と芽生個虫の被囊の色素の沈着程度を比べると、色彩2系統ともに芽生個虫における沈着のほうがよりオレンジ色に近かった。今回、芽体の被囊のクチクラ直下の厚切り切片像をみると（データは示さない）、トルイジンブルーによく染まる微小な顆粒を多く持つ細胞が認められた。今回は電子顕微鏡観察でこれらの微小顆粒を観察していないが、これらの微小顆粒もオレンジ色あるいは赤色の色素なのではないだろうか。マボヤの色彩変異個体に関するIshiiら（2004）の研究によると、赤やピンク色のマボヤでは、被囊と筋膜（=表皮細胞層+囲鰓腔上皮層）が赤色の色素を持つが、白いマボヤでは、被囊と筋膜の両方に赤色素がない。ミサキマメイタボヤの色彩2系統ともに表皮細胞層に色素を持つので、ホヤの種類によって、赤色やオレンジ色が沈着している細胞層が異なるのかもしれない。またミサキマメイタボヤでは、芽体の囲鰓腔上皮は色素を持っていたが、機能個虫になると失うようであり、同一個体でも発生段階によって異なるのかもしれない。同様に被囊での色素沈着も芽体と芽生個虫では異なるのかもしれない。

ミサキマメイタボヤの白い色については、間充織空間に存在する白色血球が、表皮細胞層を通して見えていることはすでにわかっており、その白色血球がnephrocyte様であることが指摘されてきた（Ishii *et al.*, 1993）。今



回、ミサキマメイタボヤの色彩2系統の白色血球の電子顕微鏡観察から、ミサキマメイタボヤの白色血球は、Milanesi and Burighel (1978) がウスイタボヤで記載報告している nephrocyte と同じであると考えられた。また、この白色血球は、Kawamura and Watanabe (1982a) が報告している type H という血球と同じなのかもしれない。ただし、Sugino ら (1993) が報告しているミサキマメイタボヤの8種の血球の中には、該当する血球は見当たらない。今回観察された白色血球は、液胞の内容物が切片作成時に脱落したと思われ、その影響で切片が破れ、液胞部分が穴になっていた。そのため、液胞が明るく観察された。切片で脱落したのは、結晶構造をした堅い物質だと予想され、まさに nephrocyte の中に蓄積されるとされているプリン結晶ではないだろうか。プリン結晶は代謝により加齢とともに蓄積されると考えられる。色彩2系統ともに大きな芽生個虫ほど nephrocyte の数が多いの

が経験的に知られているのは、このことによるのかもしれない。Ishii ら (1993) によると、白色血球が持つ顆粒は、透過光で顕微鏡観察をすると、やや黄色かかった灰色に見えるが、暗視野で顕微鏡観察をすると白色である。また、自家蛍光も持っている。そしてこの顆粒は、顕微鏡観察下でブラウン運動が確認される。これらの特徴は、Milanesi and Burighel (1978) の報告にある nephrocyte に一致していたが、Ishii ら (1993) の報告には微細形態の観察（電顕像）がなく、決め手にかけていた。今回、電子顕微鏡観察によって白色血球の微細形態が明らかになり、白色血球は nephrocyte であると断定してよいと思われた。

今回は、ミサキマメイタボヤの色素にカロテノイドとプテリジンが含まれていること、赤色は表皮細胞の顆粒であること、白色血球が微細構造から nephrocyte であること、などを明らかにした。今後は、色素の詳細を明ら

図1 芽体および芽生個虫の厚切り切片をトルイジンブルーで染色して光学顕微鏡で観察したもの

A: white-spot 系統の芽体の被囊 (t), 表皮 (ep) および間充織空間 (ms) 部分である。この芽体の外見は実体顕微鏡下ではすべて赤で白い部分があった。矢印は表皮細胞に存在する顆粒を示している。この顆粒が赤色の実体と思われる。スケールは 10 μm である。B: white-spot 系統の芽生個虫の白斑 (white-spot) 部分の被囊 (t), 表皮 (ep) および間充織空間 (ms) 部分である。この表皮細胞には A の表皮細胞に見られる顆粒は存在しない。矢頭は間充織空間に存在する白色血球中の結晶構造物を示している。スケールは 10 μm である。

図2 芽生個虫の超薄切片を電子染色して（あるいはしないで）透過型電子顕微鏡で観察したもの（B以外はすべて同じ倍率である）

A: white-spot 系統の芽生個虫のサイフォンの横部分の赤い色をした表皮細胞である。矢印で示した表皮細胞中に電子密度の高い顆粒が多数認められる。この顆粒は図1 A の矢印の顆粒と同一と思われる。B: A の矢印の細胞を拡大したもの。矢頭は表皮細胞中の電子密度の高い顆粒を示している。表皮細胞中の顆粒のサイズは均一ではないものの直径 0.5 μm - 1 μm 程度である。顆粒の中も均一ではない。スケールは 1 μm である。C: white-spot 系統の芽生個虫の白斑 (white-spot) 部分の被囊 (t), 表皮 (ep) および間充織空間部分である。この表皮細胞には A の表皮細胞に見られ

る顆粒は存在しない。被囊中にみられる数本の斜めの黒い筋は切片作成時のしわと思われる。この切片は電子染色を行っていない。D: white-spot 系統の芽生個虫の白斑 (white-spot) 部分の被囊, 表皮 (ep) および間充織空間部分である。この表皮細胞にも A の表皮細胞に見られる顆粒は存在しない。矢印で示しているのは間充織空間に存在する血球の1種で白色血球(正体は nephrocyte)である。nephrocyte のなかで白く抜けているのは、結晶構造物が切片作成過程で抜け落ちて切片が破損した結果である。破損範囲が液胞内でおさまることもあるが、液胞を越えることもある。液胞のなかには破損をまぬがれた液胞もあり矢印の細胞中にも破損していない液胞が認められる。nephrocytes は表皮の直下および間充織空間に存在しており、白斑や白い帯を形成する原因となっている。図の右上にみられる黒い筋は切片作成時のしわと思われる。この切片は酢酸ウラニル染色のみ施している。スケールは 5 μm である。E: white-spot 系統の芽生個虫の白斑 (white-spot) 部分の間充織空間部分である。nephrocytes 以外にも矢印で示す別の血球が存在しているのがわかる。矢頭は nephrocyte 中で運よく切片に残った結晶構造物を示している。この切片は酢酸ウラニル染色のみ施している。F: white-spot 系統の芽生個虫の白斑 (white-spot) 部分の間充織空間部分である。矢印は nephrocytes を示している。矢頭は nephrocyte 中で運よく切片に残った結晶構造物を示している。この切片は電子染色を行っていない。スケールは 5 μm である。

かにするとともに、色彩がどのように決められ表現されて色彩2系統の差異を作り出すのか、白色血球の由来は何か、などの解明が望まれる。そして、ミサキマメイタボヤの色彩2系統を用いて、さらなるキメラ個虫形態形成の研究が望まれる。

謝辞

本研究を実施するにあたり、筑波大学下田臨海実験センターの教職員の方々に大変お世話になりました、ここに深く御礼申し上げます。また本報告は、筑波大学下田臨海実験センター業績No.756です。

参考文献

- Hirose, E., and T. Ishii (1995)**; Microfilament Contraction Promotes Rounding of Tunic Slices: An Integumentary Defense System in the Colonial Ascidian *Aplidium yamazii*. The Biological Bulletin, Vol.189:29-35.
- Hirose, E., T. Ishii, and Y. Taneda (1997)**; Two Modes of Tunic Cuticle Formation in a Colonial Ascidian *Aplidium yamazii*, Responding to Wounding. Developmental and Comparative Immunology, Vol. 21: 25-34.
- Hirose, E., T. Ishii, Y. Saito, and Y. Taneda (1994a)**; Phagocytic Activity of Tunic Cells in the Colonial Ascidian *Aplidium yamazii* (Polyclinidae, Aplousobranchia). Zoological Science, Vol.11, No.2:203-208.
- Hirose, E., T. Ishii, Y. Saito, and Y. Taneda (1994b)**; Seven Types of Tunic Cells in the Colonial Ascidian *Aplidium yamazii* (Polyclinidae, Aplousobranchia): Morphology, Classification, and Possible Functions. Zoological Science, Vol.11, No.5:737-743.
- Ishii, T., and E. Hirose, (2003)**; The Fate of Tunic Phagocytes in the Colonial Ascidian *Aplidium yamazii*. Memoirs of the Faculty of Education and Human Studies Akita University (Natural Science), No. 58:37-41.
- Ishii, T., E. Hirose, and Y. Taneda (2008)**; Tunic Phagocytes Are Involved in Allojection Reaction in the Colonial Tunicate *Aplidium yamazii* (Polyclinidae, Ascidiacea). The Biological Bulletin, Vol.214:145-152.
- Ishii, T., T. Sawada, K. Sasaki, and S. Ohtake (2004)**; Study of Color Variation in the Solitary Ascidian *Halocynthia roretzi*, Collected in the Inland Sea of Japan. Zoological Science, Vol.21, No.8:891-898.
- Ishii, T., Y. Saito, and Y. Taneda (1993)**; Histological Differences between the Color Patterns of Two Strains of the Compound Ascidian *Polyandrocarpa misakiensis*. Zoological Science, Vol.10, No.6:977-982.
- Ishii, T., Y. Saito, and Y. Taneda (1997)**; Stability of Axial Polarities in the Fragments of Ascidian during Regeneration and Chimeric Regeneration. Memoirs of the College of Education Akita University (Natural Science), No. 51:17-24.
- Ishii, T., Y. Saito, and Y. Taneda (1998)**; Regeneration of body fragments in the colonial ascidian *Polyandrocarpa misakiensis* : Effect of left-right axial polarity on reconstruction of the anteroposterior axis. Memoirs of the College of Education Akita University (Natural Science), No. 53:55-62.
- Ishii, T., Y. Taneda, and Y. Saito (1994)**; Polarity and Body Pattern in Ascidian Chimeras Formed Between Normal (Situs Normale Viscerum) and Reversed (Situs Inversus Viscerum) Bodies. The Journal of Experimental Zoology, Vol.269, No.4 :336-348.
- Izzard, C. S. (1973)**; Development of polarity and bilateral asymmetry in the pallear bud of *Botryllus schlosseri* (Pallas). J. Morph., 139:1-26.
- Kaneko, N., Y. Katsuyama, K. Kawamura, and S. Fujiwara (2010)** Regeneration of the gut requires retinoic acid in the budding ascidian *Polyandrocarpa misakiensis*. Develop. Growth Differ., 52:457-468.
- Kawamura, K. (1984a)**; Morphogenetic tissue interactions during posterior commitment in pallear buds of polystyelid ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. Dev. Biol., 106:379-388.
- Kawamura, K. (1984b)**; The mechanism of anteroposterior cell determination in ascidian pallear buds: A gap of positional values triggers posterior formation. Roux's Arch. Dev. Biol., 193:24-35.
- Kawamura, K., and H. Watanabe (1982a)**; Localized morphogenetic activity in the pallear bud of a polystyelid ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. Memoirs of the Faculty of Science of the Kochi University, Series D (Biology), 3:55-69.
- Kawamura, K., and H. Watanabe (1982b)**; Pattern development in pallear buds of botryllid ascidians: Relation between parent and its buds in their body axes. Journal of Morphology, 173:293-304.
- Kawamura, K., and H. Watanabe (1982c)**; Pattern development in pallear buds of the polystyelid ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*: Bud grafting induces bilateral asymmetry conversion through

- polarity reversal. *The Journal of Experimental Zoology*, 224:145-156.
- Kawamura, K., and H. Watanabe (1983)**; The role of parental positional information in the determination of antero-posterior polarity during pallear budding in ascidians. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 192:28-36.
- Kawamura, K., and H. Watanabe (1987)**; Possible role of the epidermis and mesenchyme in the determination of morphogenesis domain during pallear budding in ascidians. *Memoirs of the Faculty of Science of the Kochi University, Series D (Biology)*, 8:15-27.
- Kawamura, K., and M. Nakauchi (1984)**; Changes of the atrial epithelium during the development of anteroposterior organization in pallear buds of the polystyelid ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. *Memoirs of the Faculty of Science of the Kochi University, Series D (Biology)*, 5:15-35.
- Kawamura, K., and M. Nakauchi (1986)**; Mitosis and body patterning during morphallactic development of pallear buds in ascidians. *Dev. Biol.*, 116:39-50.
- Kawamura, K., Y. Sugino, T. Sunanaga, and S. Fujiwara (2008)** Multipotent epithelial cells in the process of regeneration and asexual reproduction in colonial tunicates. *Develop. Growth Differ.*, 50:1-11.
- Koyama, H. (2011)** The Postbranchial Digestive Tract of the Ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis* (Tunicata: Ascidiacea). 1. Oesophagus. *Zoological Science*, Vol.28, No.2:118-125.
- Koyama, H., Y. Taneda, and T. Ishii (in press)** The Postbranchial Digestive Tract of the Ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis* (Tunicata: Ascidiacea). 2. Stomach. *Zoological Science*,
- Matsumoto, J., J. T. Bagnara, and J. D. Taylor (1971)**; Isolation and separation of pteridines from animals. *Experiments in Physiology and Biochemistry*, 4:289-364.
- Milanesi, C., and P. Burighel (1978)** Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus schlosseri*. I. Hemoblast, granulocyte, macrophage, morulla cell and nephrocyte. *Acta. Zool.*, (Stockh.) 59:135-147.
- Nakauchi, M., and Y. Sugino (1984)** Induction of situs inversus viscerum in the colonial ascidian, *Symplegma reptans*. *Acta Embryol. Morphol. Exper. N. s.*, 5(3):161-168.
- Oda, T., and H. Watanabe (1981)** Reversal of polarity and laterality in the polystyelid ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. *Proc. Japan Acad.*, 57, Ser. B:333-336.
- Oda, T., and H. Watanabe (1982)** Induction of malformed zooids and determination of polarity in pallear buds of the polystyelid ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. *J. Exp. Zool.*, 220:21-31.
- Oda, T., and H. Watanabe (1986)** Developmental pattern of colonies in the polystyelid ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. *Inter. J. Invert. Rep. and Dev.*, 10:187-199.
- Sabbadin, A. (1956)** "Situs inversus viscerum" provocato sperimentalmente in *Botryllus schlosseri* (Pallas) (Ascidiacea). *Rend. Accad. Naz. Lincei*, 20:659-666.
- Sabbadin, A., G. Zaniolo, and F. Majone (1975)** Determination of polarity and bilateral asymmetry in pallear and vascular buds of the ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev. Biol.*, 46:79-87.
- Sugino, Y. M., Y. Tsuji, and K. Kawamura (1993)** An ultrastructural study of blood cells in the ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*: Their classification and behavioral characteristics. *Memoirs of the Faculty of Science of the Kochi University, Series D (Biology)*, 14:33-41.
- Taneda, Y. (1985)** Size regulation of regenerated organs in the compound ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. *J. Exp. Zool.*, 233:331-334.
- 種田保穂 (1986)** 複合ホヤ *Polyandrocarpa misakiensis* の前断片の癒合による重複個虫. 横浜国立大学教育学部理科教育実習施設研究報告. 3:11-17.
- 種田保穂 (1987)** 複合ホヤ *Polyandrocarpa misakiensis* の位置情報と囲腮腔上皮. 横浜国立大学教育学部理科教育実習施設研究報告. 4:1-9.
- Watanabe, H., and T. Tokioka (1972)** Two new species and one possibly new race of social styelids from Sagami Bay, with remarks on their life history, especially the mode of budding. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 19:327-345.
- Watanabe, H., and A. T. Newberry (1976)** Budding by oozoids in the polystyelid ascidian *Metandrocarpa taylora* Huntsman. *J. Morphology*, 148:161-176.