

(Memoirs of the Faculty of Education and Human Studies)
 (Akita University (Natural Science))
 70, 89 – 98 (2015)

マボヤとアカボヤの血球と色素について

石井 照久・原田 春美

Blood cells and pigments in the ascidians, *Halocynthia roretzi* and *Halocynthia aurantium aurantium*

Teruhisa ISHII and Harumi HARADA

Division of Biology, Faculty of Education and Human Studies, Akita University, Akita 010-8502, Japan

Abstract

Halocynthia roretzi and *Halocynthia aurantium aurantium* are both common solitary ascidians for foods in Japan and belong to same genus. *H. roretzi* shows allorecognition, allogeneic cytotoxic reaction (allogeneic contact reaction) between allogeneic blood cells. However, *H. aurantium aurantium* does not show allogeneic contact reaction. In this report, we compared blood cells and pigments between these two species. Under right-microscopic observations (including a phase-contrast microscopic and a differential interference contrast microscopic observations), blood cells of two species were almost same in morphology. In *H. roretzi*, two blood cell types, Granular cells type 3 (g3-cells=viriform cells) and Vacuolated cells type 3 (v3-cells) had dopa-quinones and phenoloxidase (PO). In *H. aurantium aurantium*, three blood cell types, Mature morula cells, Immature morula cells and Compartment cells had dopa-quinones and PO. By pigments extraction and thin-layer chromatography of two species, it was cleared that pigments of two species were almost same. Although *H. roretzi* and *H. aurantium aurantium* have almost same blood cells and pigments, in this report, it is not understand that only *H. roretzi* shows allogeneic contact reaction.

Keywords : solitary ascidians, edible ascidians, blood cells, allogeneic contact reaction, allorecognition, PO activity, pigments, *Halocynthia roretzi*, *Halocynthia aurantium aurantium*

はじめに

食材としても馴染み深いホヤ類は、ヒトと同じ脊索動物門の一員である。ただし、同じ門の中でもホヤ類は尾索動物亜門に所属していて、ヒトは脊椎動物亜門に所属している。そしてホヤ類は、系統をあまり反映していないが体制によって単体性のホヤ類、群体性のホヤ類およびその中間のホヤ類（出芽ホヤ類）にわけることができる。ホヤ類に特徴的な構造に被囊（表皮より外側の組織）があるが、一続きの被囊中に複数の個体が共同で生活しているものを群体性のホヤ類（この場合の個体一つ一つを個虫という）、一続きの被囊中に単独の個体だけが存在するものを単体性のホヤ類、一続きの被囊中に単独の個体だけが存在するものの、その個体同士が被囊を介してつながっているものを中間のホヤ類（出芽ホヤ類）と呼んでいる。

群体性のホヤ類の1種であるシモフリボヤの被囊中に

は7種の被囊細胞があり（Hirose *et al.*, 1994b）、その中には貪食被囊細胞も存在する（Hirose *et al.*, 1994a）。貪食被囊細胞は貪食を繰り返すことにより形態を変え他の被囊細胞に変化する（Ishii and Hirose, 2003）。また、被囊の収縮に関与している被囊細胞もいる（Hirose and Ishii, 1995）。もし被囊が傷ついた場合、この被囊細胞が被囊の収縮を起こすことによって傷口を閉じるのに役立つ（Hirose *et al.*, 1997）。さらに、シモフリボヤは、アロ反応（同種異個体拒絶反応）を起こすことがわかっており、貪食被囊細胞が、アロ反応の主役であるらしい（Ishii *et al.*, 2008）。

中間のホヤ類（出芽ホヤ類）では、ミサキマメイタボヤが有名である。このホヤは一続きの被囊中に基本的には1つの個体だけが存在するものの、無性生殖の出芽により生じた子供個虫とその親個虫は被囊を介してつながっている。しかし、つながっている被囊を人為的に切

り離して子供個虫と親個虫を単独にしても互いが生きていけるため、中間のホヤ類（出芽ホヤ類）とされている。ミサキマメイタボヤには色彩2系統が知られている。Ishiiらは、色彩2系統の違いを明らかにした上で (Ishii *et al.*, 1993), 色彩2系統をマーカーとして用いて、正常個虫と実験的に誘導した内臓逆位個虫を組み合わせてキメラ個虫を作成し、前後軸のみならず左右軸がキメラ個虫形態形成へ関与していることを報告している (Ishii *et al.*, 1994)。さらにミサキマメイタボヤの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も議論されている (Ishii *et al.*, 1997)。また、親個虫の左右軸の極性が個虫断片の再生時に関与していることも報告されている (Ishii *et al.*, 1998)。さらに、石井と齊藤 (2012) は、ミサキマメイタボヤの色素について詳細に報告している。

以上、群体性のホヤ類と中間のホヤ類、それぞれ1種についての研究の数例をあげたが、群体性および中間のホヤ類を用いた研究はこの他に沢山行われている。さらには、単体性のホヤ類を使った研究も沢山行われてきている。次からは、単体性のホヤ類のうち、本報告で扱う2種について述べていく。

単体性のホヤ類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とアカボヤである。マボヤは日本の東北地方の太平洋側で盛んに半養殖され、食材として日本全国に広く流通している。アカボヤも食用となり、マボヤよりも美味とされるがまだ半養殖が確立しておらず、また、北海道のみでしか採集できないため、あまり流通していない。

両種ともに赤色が一般的であるが、マボヤには色彩変異が存在する。真っ赤な個体、赤と真っ白の間の色を持った個体（ピンク色）、真っ白な個体、である (Ishii *et al.*, 2004)。真っ白なマボヤ個体は外側の被囊色だけでなく内側の筋膜（表皮+間充織+囲鰓腔上皮）も白い。血液が示すアロ反応性の強さ（同種異個体に対する拒絶反応の強さ）を比べてみると、真っ白な個体群のほうが真っ赤な個体群に比べて弱い。ピンク色の個体群のアロ反応性は真っ赤な個体群と真っ白な個体群の中間程度である (Ishii *et al.*, 2004)。一方、アカボヤでは色彩変異は知られていない。それでは、同じ色に見えるマボヤの真っ赤な個体とアカボヤ（真っ赤な個体のみ）の個体では、構成している色素成分も一緒なのだろうか。

マボヤとアカボヤは同じ *Halocynthia* 属（マボヤ属）に所属している。同じ属の2種であるから、解剖学的な特徴のみならず血球を含む血液などの生理学的な特徴においても類似性は高いと予想される。マボヤの血球の形態や機能についての報告は沢山あり、その一部を紹介すると、Fuke (1980), Fuke and Nakamura (1985),

Sawadaら (1991), Danら (1995), があり、総説としても富家 (1996), 田中・大竹 (1997), 沢田・大竹 (1997) の報告がある。光学顕微鏡レベルで判定できるマボヤの血球種はSawadaら(1991)によると10種である。一方、アカボヤの血球の報告は、Smith (1970) による光学顕微鏡レベルの報告だけであり、それによるとアカボヤにも10種の血球がある。マボヤの血球の研究に比べ、アカボヤの血球の研究は進んでいないのが現状である。

また、マボヤとアカボヤの血球は、それらの機能において決定的な違いが指摘されている。それはアロ認識（自己・非自己認識＝同種異個体認識）に関わることである。マボヤは同種内他個体接触反応といって、マボヤの別個体同士の血球をまぜると互いに喧嘩を起こす性質をもっている、すなわちアロ認識を行い、拒絶反応を起こすのだが (Fuke, 1980; Fuke and Nakamura, 1985), アカボヤの血球はこれらの性質をもっていないらしい。これまでに、血球がアロ認識をするのは、単体性のホヤ類のうちマボヤのみが知られている (富家, 1996)。アカボヤはアロ認識をしないらしい (富家, 1996)。同じ属に所属しているマボヤとアカボヤなのに、なぜこのような違いがあるのだろうか。

本研究では、まずはアカボヤの血球の形態や機能に関する知見を増やすことを目的に、さらにマボヤとアカボヤの血球を形態および機能の面から比較検討することを目的にした。機能については、血球の持つフェノール酸化酵素活性に着目した。そして、Sawadaら (1991) の報告によるマボヤの血球10種と、Smith (1970) の報告によるアカボヤの血球10種の対応関係を検討した。さらに両種の色素についても比較検討を行った。

材料および方法

材料

脊索動物門尾索動物亜門ホヤ綱マボヤ目マボヤ科マボヤ属に所属する、マボヤ *Halocynthia roretzi* と同マボヤ属に所属するアカボヤ *Halocynthia aurantium aurantium* を用いた。マボヤ個体を2004年5月11日、9月24日に秋田市民市場で購入した（産地は太平洋側の東北地方までしかわかっていない）。また、岩手県沖で採集された個体も、2004年5月19日、5月25日、6月10日に漁業者から購入した。さらに、岩手県山田町沖で2004年12月7日に採集されたと思われる個体で岩手大学にて7℃で畜養されていたマボヤ個体を、岩手大学の梶原昌五先生の好意により2004年12月15日に入手した。購入・入手したマボヤ個体は、すぐに実験に使うか、状態のよい個体は、しばらく約5℃に保った低温室内に設置した水槽中で畜養し、実験に使用した。

アカボヤ個体は、北海道紋別市沖合で2004年6月1

日に採集されたとと思われる 11 個体を、北海道立網走水産試験場紋別支場の好意により 2004 年 6 月 3 日に入手し、約 5℃ に保った低温室内に設置した水槽中で畜養し、実験に用いた。マボヤとアカボヤの個体はいずれもおよそ受精後 3 年以上経過していると考えられた。

採血と血球観察

次の 2 通りで採血を行った。1ml のプラスチックシリンジ (25G; 0.50×25mm) を用いて被囊直下のルーズな結合組織から採血した場合と、あらかじめシリンジ中にろ過海水 (0.45 μm の MILLIPORE フィルターでろ過) を含んでおいて 10 倍希釈になるように採血した場合とである。血球観察には光学顕微鏡を用いた。位相差観察法とノルムスキー微分干渉観察法を行い、必要に応じて写真撮影した。

PO (フェノールオキシダーゼ) 活性をもつ血球の同定

L-DOPA-MBTH アッセイ法により PO 活性を有する血球の同定を試みた。以下の方法は、Ballarin ら (1994, 1998), Shirae and Saito (2000) および Shirae ら (2002) を参考にしている。まずは、スライドグラスにダコペンで丸を書き、その中に採血液 100 μl と試薬 100 μl を入れた。スライドグラスは血球がはりつきやすい APS コートのものを用いた。試薬は次の 4 種を用いた。2mM MBTH (3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩-水和物)、10% ドーパ (L-3,4-デヒドロキシフェニルアラニン)、2mM MBTH+10% ドーパおよびコントロール液 (0.45 μm の MILLIPORE フィルターろ過海水) である。スライドグラスを 30 分間湿室においた後、ろ過海水で洗い、150 μl をろ過海水でマウントして検鏡した。

L-DOPA-MBTH アッセイ法は、細胞のフェノールオキシダーゼ活性を調べる方法である。アミノ酸の一種のチロシンは、細胞内で酵素によりドーパに変換されるが、フェノールオキシダーゼという酵素が働いている細胞では、さらにドーパキノンへと変換される。MBTH は、ドーパキノンの存在下で赤紫色化するため、フェノールオキシダーゼ活性をもつ細胞が染色される。フェノールオキシダーゼは、抗菌作用をもつため、その活性をもつ細胞は生体防御に関わっていることが予想される。

色素の観察

色素は、個体を被囊、筋膜、鰓囊の各部分に分け、それぞれを抽出溶媒液に浸して抽出した。抽出溶媒液は、80% エタノール、100% エタノール、メタノール、ジエチルエーテル、1% アンモニア水、10% 海水ホルマリン、酢酸、アセトン、石油ベンジン、石油エーテル、ト

ルエン、クロロホルム、1% HCL 入りメタノール、の 13 種類を用いた。これらの溶媒は、先行研究 (Hirose *et al.*, 1998; 石井と齊藤, 2013) をもとに選択した。抽出した色素は、等量のエチルエーテルを加えてから 10% 食塩水を徐々に加えることで濃縮した。液層は 2 層に分かれ、上層は色素と微量の抽出溶媒液と水を含んだエーテル層、下層は残さの懸濁した抽出溶媒液と食塩水の混液となったので、下層をピペットで吸い取って捨て、食塩水を加えることを 4 回ほど繰り返して洗浄した。上下は逆になることもあった。

色素の分離はシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって行った (メルク社製キーセルゲル 60, 濃縮ゾーン付きを使用)。展開溶媒は、体積比で石油エーテル 7: アセトン 3 の混液を用いた。使用した溶媒によりそれぞれ抽出・濃縮された色素の展開速度は異なったが、展開時間は 30 分から 66 分の範囲であり、温度は 15℃ から 22.3℃ の範囲であった。

結果

血球の形態・種類と PO 活性

血球の名称は、マボヤについては Sawada ら (1991) の報告にある名称を、アカボヤについては Smith (1970) の報告にある名称をそれぞれ用いた。

マボヤ: Sawada ら (1991) の報告にある 10 種類の血球が今回観察できた (表 1, 図 1)。10 種類のうち、L-DOPA-MBTH アッセイ法による 2mM MBTH 単独あるいは 2mM MBTH+10% ドーパの試薬によって染色されたのは Granular cells type 3 (g3-cells) と Vacuolated cells type 3 (v3-cells) の 2 種類であった (図 1)。Granular cells type 3 (g3-cells) は Dan ら (1995) の報告で viriform cell と呼ばれている細胞である。この viriform cell (= Granular cells type 3) については、Ohtake ら (2001) がその微細構造や分布について詳しく報告している。

また 10% ドーパ単独で染色される細胞はなかった。2mM MBTH は PO による産物のドーパキノンと反応して発色する。これら 2 種の細胞に 2mM MBTH を単独に加えた時よりも基質であるドーパも加えた 2mM MBTH+10% ドーパの場合のほうが、発色の程度は濃いように思われた。2mM MBTH 単独でも染色されたこと、基質であるドーパも加えた場合のほうが濃い発色であったこと、から細胞が PO による産物のドーパキノン をすでに保持しているとともに、PO も保持していることが示唆される。よって Granular cells type 3 (g3-cells) と Vacuolated cells type 3 (v3-cells) の 2 種類は、PO 活性とドーパキノン を保持していると考えられる。

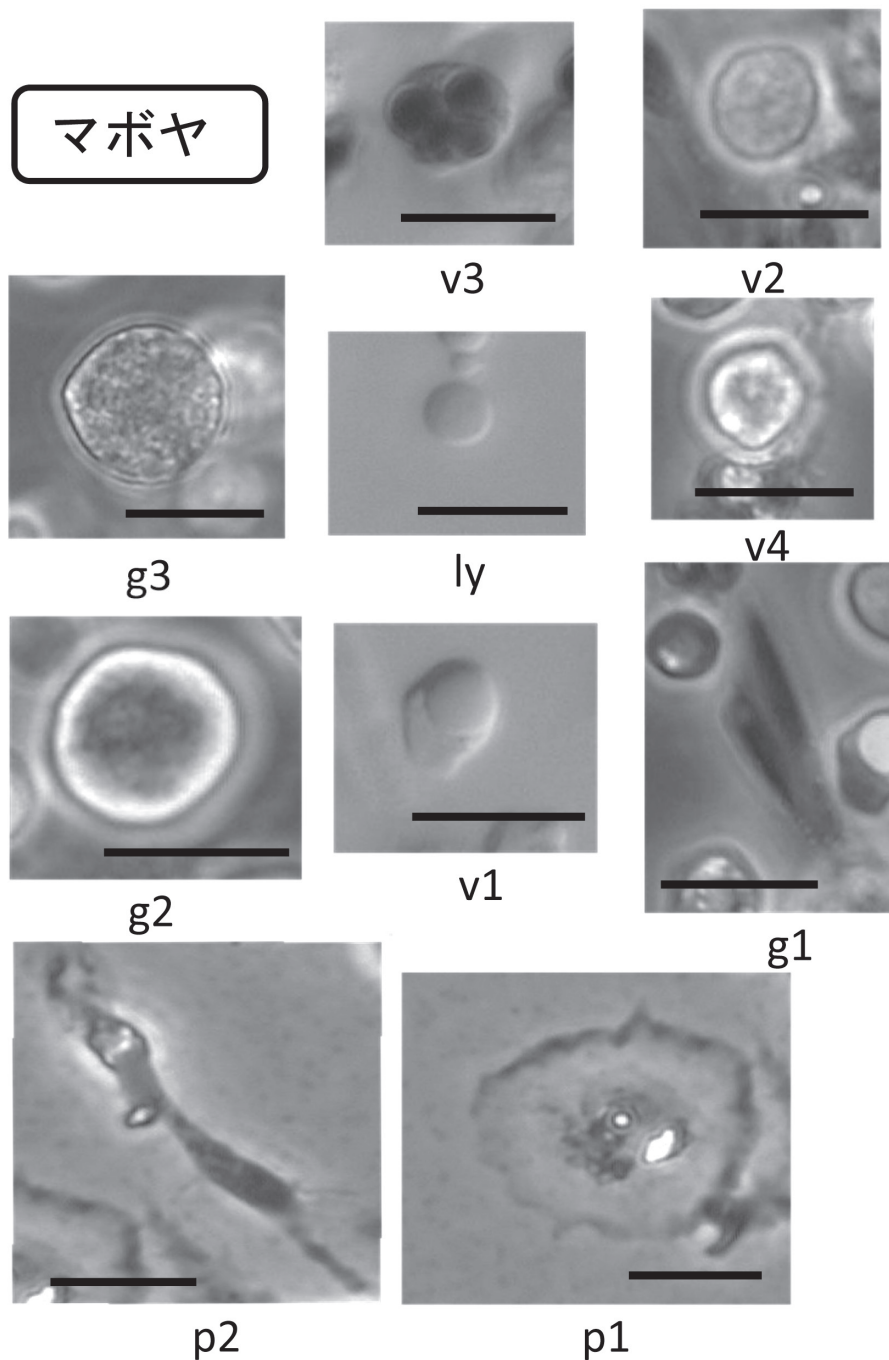


図1 マボヤ (*Halocynthia roretzi*) の血球

10種類の血球種が観察された。すべて光学顕微鏡で観察したものである。スケールバーはすべて10 μm である。v1: Vacuolated cells type 1 (v1-cells) である。ノマルスキー微分干渉法で観察したものである。v2: Vacuolated cells type 2 (v2-cells) である。位相差観察法で観察したものである。v3: Vacuolated cells type 3 (v3-cells) である。MBTH染色を施したものをノマルスキー微分干渉法で観察したものである。細胞の中の数個の液胞全体が赤く染まっていた。v4: Vacuolated cells type 4 (v4-cells) である。位相差観察法で観察したものである。g1: Granular cells type 1 (g1-cells) である。位相差観察法で観察したものである。g2: Granular cells type 2 (g2-cells) である。位相差観察法で観察したものである。g3: Granular cells type 3 (g3-cells) = viriform cells である。MBTH染色を施したものを位相差観察法で観察したものである。細胞中の多数の顆粒全体が赤く染まっていた。p1: Phagocytes type 1 (p1-cells) である。位相差観察法で観察したものである。p2: Phagocytes type 2 (p2-cells) である。位相差観察法で観察したものである。ly: Lymphoid cells (ly-cells) である。ノマルスキー微分干渉法で観察したものである。

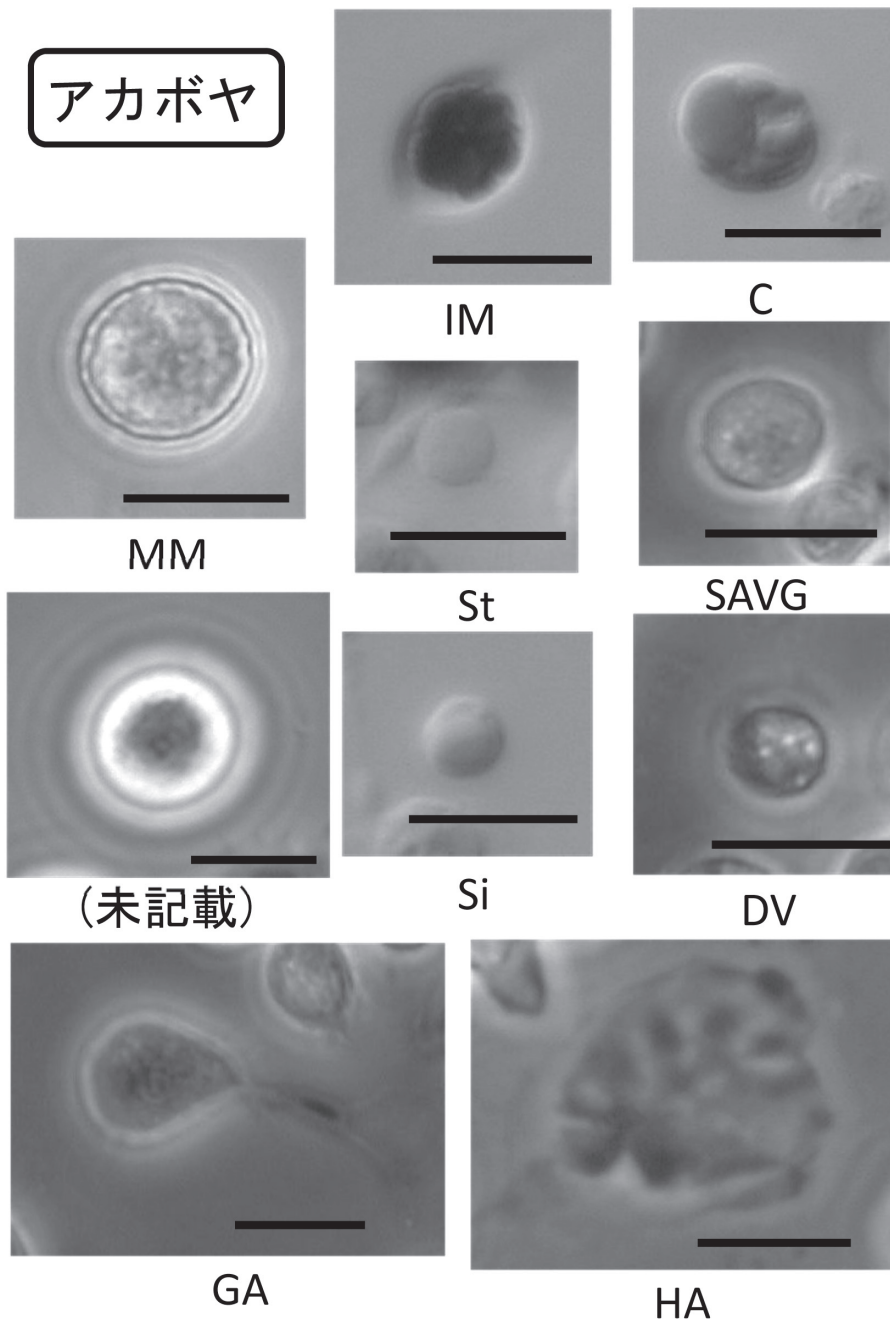


図2 アカボヤ (*Halocynthia aurantium aurantium*) の血球

10種類の血球種が観察された。すべて光学顕微鏡で観察したものである。スケールバーはすべて10 μ mである。図2での各血球の配置は、図1のマボヤの血球にほぼ対応できるように配置した。ただし、互いに対応する血球がない場合があるので(マボヤのg1とアカボヤのDVに対応する細胞はそれぞれなかった)、図1と2は完全には対応していない。また、以下に述べるマボヤで対応する血球種の名前については、図1の中の省略記号を用いている。Si: Signet ring cellsである。ノマルスキー微分干渉法で観察したものである。マボヤのv1に対応すると考えられる。SAVG: Stem cells with acidophilic vacuoles or granulesである。位相差観察法で観察したものである。マボヤのv2あるいはv4に対応すると考えられる。IM: Immature morula cellsである。MBTH染色を施したものをノマルスキー微分干渉法で観察したものである。細胞の中の数多くの液胞全てが赤く染まっていた。マボヤのv3に対応すると考えられる。C: Compartment cellsである。MBTH染色を施したものをノマルスキー微分干渉法で観察したものである。細胞の中の数個の液胞全てが赤く染まっていた。マボヤのv3に対応すると考えられる。(未記載): Smith (1970)の報告に未記載の細胞で今回新たに確認された細胞である。位相差観察法で観察したものである。マボヤのg2に対応すると考えられる。MM: Mature morula cellsである。MBTH染色を施したものを位相差観察法で観察したものである。細胞内全体が赤く染まっていた。マボヤのg3に対応すると考えられる。HA: Hyaline amoebocytesである。位相差観察法で観察したものである。マボヤのp1に対応すると考えられる。GA: Granular amoebocytesである。位相差観察法で観察したものである。マボヤのp2に対応すると考えられる。St: Stem cellsである。ノマルスキー微分干渉法で観察したものである。マボヤのlyに対応すると考えられる。DV: Dispersed vesicular cellsである。位相差観察法で観察したものである。マボヤに対応する細胞はなかった。また、マボヤのg1に対応する細胞もアカボヤでは確認できなかった。

表1 マボヤとアカボヤの血球の観察結果と対応関係

マボヤ (<i>Halocynthia roretzi</i>)				アカボヤ (<i>Halocynthia aurantium aurantium</i>)		
血球名 ^{*1}	観察結果	MBTH 染色結果 ^{*2}	対応 関係 ^{*3}	血球名 ^{*4}	観察結果	MBTH 染色結果 ^{*2}
Vacuolated cells type 1 (v1-cells)	液胞を一つだけもつ	-	⇔	Signet ring cells	液胞を一つもつ	-
Vacuolated cells type 2 (v2-cells)	液胞が多くあり、 v4と似るが位相差下 ^{*5} であまり 光らない	-	⇔	Stem cells with acidophilic vacuoles or granules	Stem cells より大 きく、液胞や顆粒 をもつ	-
Vacuolated cells type 4 (v4-cells)	液胞が多くあり、 v2と似る	-	⇔	同上	同上	同上
Vacuolated cells type 3 (v3-cells)	液胞が少ない	+	⇔	Immature morula cells	液胞を多くもち、 活発に動く	+
同上	同上	同上	⇔	Compartment cells	液胞が少ない	+
Granular cells type 1 (g1-cells)	顆粒をもち、位相 差下で青色、薄く 繊維状に広がって 見える	-	対応なし			
Granular cells type 2 (g2-cells)	顆粒をもち、位相 差下で中心部分が 茶色に見える	-	⇔	文献に未記載の細胞 (今回確認された細 胞) ^{*6}	顆粒をもち、位相 差下で中心部分が 茶色に見える	-
Granular cells type 3 (g3-cells) ^{*7}	顆粒をもつ大型の 細胞で、運動性を もち、位相差下で 青白く光る	+	⇔	Mature morula cells	顆粒をもつ大型の 細胞で、運動性を もち、位相差下で 青白く光る	+
Phagocytes type 1 (p1-cells)	位相差下で薄く広 がって見える	-	⇔	Hyaline amoebocytes	位相差下で薄く広 がって見える	-
Phagocytes type 2 (p2-cells)	位相差下で薄く伸 長して見える	-	⇔	Granular amoebocytes	位相差下で薄く伸 長して見える	-
Lymphoid cells (ly- cells)	無構造で最も小さ い	-	⇔	Stem cells	無構造で小さい	-
			対応なし	Dispersed vesicular cells	位相差下で細胞内 に小胞が浮遊して 見える	-
			対応なし	Giant stem cells	今回、未確認	

*1 マボヤの血球の分類と種類名は、Sawada *et al.* (1991) に準拠している。

*2 MBTH 染色結果での+は染色されたことを示し、-は染色されていないことを示している。MBTH 染色で+の場合は、MBTH にさらにドーパを加えた場合の染色結果も+であり、しかも MBTH 単独よりも濃い染色結果が得られたことから、その血球は細胞内にドーパキノンと PO (フェノールオキシダーゼ) の両方を有していると考えられる。

*3 対応関係では、⇔は、対応していることを意味している。

*4 アカボヤの血球の分類と種類名は、Smith (1970) に準拠している。

*5 位相差下、とは位相差顕微鏡下での観察を意味している。表中にあるすべてが同じ意味である。

*6 今回、Smith (1970) の報告にない細胞が確認され、その細胞はマボヤでの g2-cells に対応していた。

*7 Granular cells type 3 (g3-cells) は、Dan *et al.*, (1995) や Ohtake *et al.*, (2001) では、viriform cells とされている細胞と同じと考えられている。

アカボヤ：Smith (1970) の報告の10種類のうち Giant stem cells は確認できなかったが、Smith (1970) の報告に未記載の1種を含む10種類の血球が観察できた(表1, 図2)。今回新たに確認できた Smith (1970) の報告に未記載の1種は、マボヤの Granular cells type 2 (g2-cells) に類似していた。L-DOPA-MBTH アッセイ法による2mM MBTH単独あるいは2mM MBTH+10%ドーパの試薬によって染色されたのは Mature morula cells, Immature morula cells と Compartment cells の3種類であった(図2)。また10%ドーパ単独で染色される細胞はなかった。これらから Mature morula cells, Immature morula cells と Compartment cells の3種類は、PO活性とドーパキノンを持していると考えられる。

色素の抽出結果と薄層クロマトグラフィーの結果

色素の抽出結果は表2のとおりである。被囊, 筋膜, 鰓囊の全てにおいて色素が抽出された溶液は、マボヤでは、80%エタノール, 100%エタノール, メタノール, ジエチルエーテル, 1%アンモニア水, の5種類であった。また、アカボヤでは、80%エタノール, 100%エタ

ノール, メタノール, ジエチルエーテル, 1%アンモニア水, 酢酸, アセトン, の7種類であった。溶出された色はほとんどが橙色から黄色だったが、マボヤでは、1% HCL入りメタノールで被囊から抽出した液が黄緑色になった。また、アカボヤでは酢酸で筋膜と鰓囊から抽出した際と、1% HCL入りメタノールで筋膜から抽出した際に緑色～青色になった。

薄層クロマトグラフィーによる色素の分離では、マボヤからオレンジ, 橙黄, 黄色が分離した。アカボヤからは、オレンジ, 赤, 橙黄, 黄, 緑色が分離した。分離できたゲル上のスポット数は、抽出に使用した溶媒によって異なっており、マボヤの被囊からは11～0スポット(平均4.22), 筋膜からは1～0スポット(平均0.66), 鰓囊からは4～0スポット(平均1.55), の色素がそれぞれ分離された。一方、アカボヤの被囊からは15～0スポット(平均8.55), 筋膜からは9～3スポット(平均5.77), 鰓囊からは4～0スポット(平均1.55)の色素がそれぞれ分離された。それぞれの溶媒によるRf値の詳細は今回省略する。

表2 色素の溶出実験結果

	マボヤ			アカボヤ		
	被囊	筋膜	鰓囊	被囊	筋膜	鰓囊
80%エタノール	+	(+)	+	+	+	+
100%エタノール	+	(+)	+	+	+	+
メタノール	+	(+)	+	+	+	+
ジエチルエーテル	(+)	(+)	+	(+)	+	+
1%アンモニア水	+	+	+	+	+	(+)
10%海水ホルマリン	-	(+)	-	-	-	-
酢酸	+	-	+	+	+	(+)
アセトン	+	-	+	+	+	+
石油ベンジン	-	-	-	-	-	-
石油エーテル	-	-	-	-	-	-
トルエン	-	-	-	-	+	(+)
クロロホルム	-	-	-	-	+	(+)
1% HCL-メタノール	+	-	-	+	+	-

* 表中の+は色素が抽出されたことを, -は色素が抽出されなかったことを示している。(+)は, わずかではあるが, 色素が抽出されたことを示している。

考察

マボヤとアカボヤのそれぞれの血球は次のように対応することができそうである(表1)。血球の名称と分類については、マボヤについては Sawada ら (1991) の報

告を、アカボヤについては Smith (1970) の報告を基準にして考察する。まず液胞を持つ細胞系では、ノマルスキー微分干渉法観察で立体的に観察したときの液胞の数から、マボヤの Vacuolated cells type 1 (v1-cells) がア

カボヤの Signet ring cells に対応する。また、液胞の様子と位相差法で観察したときの光り方から、マボヤの Vacuolated cells type 2 (v2-cells) または Vacuolated cells type 4 (v4-cells) がアカボヤの Stem cells with acidophilic vacuoles or granules に対応する。MBTH での染色性と液胞を持つことからマボヤの Vacuolated cells type 3 (v3-cells) がアカボヤの Immature morula cells および Compartment cells に対応する。ただしアカボヤの Compartment cells においては液胞の大きさが多少異なっていた。

顆粒を持つ細胞系では、MBTH での染色性や細胞の大きさ、顆粒の様子などからマボヤの Granular cells type 3 (g3-cells) がアカボヤの Mature morula cells と対応する。貪食細胞系では、位相差観察下での光り方や細胞の広がりや薄さから、マボヤの Phagocytes type 1 (p1-cells) がアカボヤの Hyaline amoebocytes に、マボヤの Phagocytes type 2 (p2-cells) がアカボヤの Granular amoebocytes に、それぞれ対応する。マボヤの Lymphoid cells には、アカボヤの Stem cells が対応する。観察結果から以上のように、マボヤの 8 種の細胞がアカボヤの 8 種 (既知) の細胞と対応することが判明した。

しかし、今回は、マボヤの Granular cells type 1 (g-1 cells) に対応するアカボヤの細胞、アカボヤの Dispersed vesicular cells に対応するマボヤの細胞、はそれぞれ確認できなかった。また、Smith (1970) の報告に記載されている Giant stem cells は今回判別できなかった。Smith (1970) の報告に Giant stem cells の写真が掲載されていないのが主な原因である。一方で Smith (1970) の報告には記載されていないが、マボヤの Granular cells type 2 (g-2 cells) に相当すると考えられる細胞が今回初めてアカボヤで観察された。この細胞は Smith (1970) の報告に記載されている Giant stem cells の特徴とあまり一致していないことから、今回新たに観察された未記載の細胞とした (表 1)。

色素の抽出実験では、全体的にアカボヤの方が多く抽出された。また、酢酸と 1% HCL 入りメタノールでは、マボヤで黄色が強く抽出され、アカボヤで緑がかった色が抽出された。これらの違いや濃淡の差はあるものの、ほぼ等しい結果となった。

薄層クロマトグラフィーで分離された色素のスポット数は、被囊と筋膜についてはマボヤよりもアカボヤの方が多いが、鰓嚢ではほぼ等しいという結果だった。アカボヤでは、色彩変異はほとんど知られておらず、真っ赤な個体のみである。今回実験に用いた個体もすべて真っ赤であった。一方、マボヤでは Ishii ら (2004) の報告にあるように真っ白な個体から真っ赤な個体までさまざまであるが、今回の実験で用いた個体には、真っ白な個

体やピンク色の個体は含まれていなかった。

アカボヤからは、酢酸と 1% HCL 入りメタノールでは、緑がかった色が抽出され、さらに薄層クロマトグラフィーでも緑色の色素が分離されたが、他の抽出溶媒からの色素の分離結果の Rf 値と比較すると、黄色の色素の一部が化学反応により変化したものではないかと考えられた。

マボヤの血球同士はアロ認識を行い、さらに拒絶反応を起こす。その時、フェノールオキシダーゼが放出されることが Akita and Hoshi (1995) によって報告されており、Hata ら (1998) はその酵素の性状を詳しく分析している。Sawada and Ohtake (1994) は簡易に、そして Arai ら (2002) は定量的に、それぞれマボヤのアロ反応を検出する方法を開発している。Ishii ら (2004) はマボヤの色彩変異個体間に簡易方法を適用してアロ反応性を調べている。一方、アカボヤの血球同士はアロ認識を行わないという (富家, 1996)。ただし、アカボヤの血球も異種の単体性のホヤ類の血球 (たとえばマボヤの血球) に対しては認識を行い、拒絶反応を起こす (富家, 1996)。もちろんマボヤも異種に対しての拒絶反応も起こす (富家, 1996)。つまりマボヤとアカボヤの血球における機能の決定的な違いは、アロ認識・反応の有無である。

今回の実験結果から、マボヤの 9 種の細胞がアカボヤの 9 種の細胞と対応できることがわかった。マボヤにおいては、10 種のすべての細胞がアロ認識・反応に関わるらしい。今回、その 10 種のうち 9 種について対応する細胞がアカボヤでも確認できたことになる。アカボヤに対応する血球が存在しないのはマボヤの Granular cells type 2 (g-2 cells) だけである。この細胞がマボヤでのアロ認識の要なのかはわからないが、この細胞 1 種の存在の有無がアロ認識の有無をもたらししているとは考えにくい。

さらに、アカボヤでも Mature morula cells, Immature morula cells と Compartment cells の 3 種類の血球が、PO 活性とドーパキノンを持していると考えられた。マボヤでのアロ反応で重要な役割を果たしている PO 活性をアカボヤも持っているのに、アカボヤはアロ認識やアロ反応は示さない。アカボヤでの PO 活性やドーパキノンは、厳密に異種の細胞に対する準備なのだろうか。

もちろん今回は、血球の形態、運動性および PO 活性に注目して比較しただけなので、詳細な生理機能について比較できていない。しかし、今回の比較でマボヤの血球と対応できたアカボヤの 9 種の血球はなぜアロ認識・反応をしないのだろうか。これまでに単体性のホヤ類の中でアロ認識・反応を起こすのはマボヤだけが知られている。とするとマボヤ属のなかのマボヤは特殊な能力を

持ちえた言わば変わりものなのかもしれない。進化の過程で、血球のアロ認識・反応はマボヤ属の中で獲得されたことではなく、マボヤという1種において獲得された特殊な出来事なのかもしれない。このことを明らかにするためにはさらなる詳細な比較研究が必要である。

謝辞

本研究を実施するにあたり、日本大学の竹伸一氏および山口大学の澤田知夫氏に血球分類と同定に関してご示唆をいただきました。ここに感謝申し上げます。また、実験に用いたマボヤ個体の一部を岩手大学の梶原昌五氏のご好意によりいただきました。ここに御礼申し上げます。さらに実験に用いたアカボヤのすべての個体は、北海道立網走水産試験場紋別支場の今村琢磨さんおよび支場の方々のご尽力により送っていただきました。ここに深く御礼申し上げます。

参考文献

- Akita, N., and M. Hoshi (1995); Hemocytes release phenoloxidase upon contact reaction, an allogeneic interaction, in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Cell Struc. Func.* 20: 81-87
- Arai, M., M. Suzuki-Koike, S. Ohtake, H. Ohba, K. Tanaka, and J. Chiba (2002); Mutal and directional allogeneic cytotoxic reaction of hemocytes in the solitary ascidian *Halocynthia roretzi* revealed by one-step quantitative fluorimetric assay. *Zoological Science* 19:263-270.
- Ballarin, L., F. Cima, and A. Sabbadin (1994); Phenoloxidase in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* (Urochordata, Ascidiacea). *Anim. Bool.* 3: 41-48.
- Ballarin, L., F. Cima, and A. Sabbadin (1998); Phenoloxidase and cytotoxicity in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev. Comp. Immunol.* 22: 479-492.
- Dan-Sohkawa, M., M. Morimoto, H. Mishima, and H. Kaneko (1995); Characterization of coelmocytes of the ascidian *Halocynthia roretzi* based on phase-contrast, time-lapse video and scanning electron microscopic observations. *Zoological Science* Vol. 12:289-301.
- Fuke, M. T. (1980); "Contact reaction" between xenogeneic or allogeneic coelomic cells of solitary ascidians. *Biological Bulletin* 158: 304-315
- Fuke, M. T., and I. Nakamura (1985); Pattern of cellular alloreactivity of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*, in relation to genetic control. *Biological Bulletin* 169: 631-637
- 富家雅子 (1996) ; ホヤ類の自己非自己認識 - 単体ボヤを中心に -. ヒトと動植物のディフェンス 日本生体防御学会編 (全 278 頁) 菜根出版 東京都千代田区 pp29-62
- Hata, S., K. Azumi, and H. Yokosawa (1998); Ascidian phenoloxidase: its release from hemocytes, isolation characterization and physiological roles. *Comp. Biochem. Physiol. B* 119: 769-776
- 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.
- Hirose, E., T. Yoshida, T. Akiyama, S. Ito, and Y. Iwanami (1998); Pigment cells representing polychromatic colony color in *Botrylloides simodensis* (Ascidiacea, Urochordata): Cell morphology and pigment substances. *Zoological Science*, Vol. 15:489-497.
- 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 Allorejection 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.
- 石井照久・齊藤康典 (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. 秋田大学教育文化学部研究紀要自然科学第67集 25-33.
- Ohtake, S., T. Ishii, M. Arai, T. Abe, F. Shishikura, J. Chiba, and K. Tanaka (2001); The viriform cell of *Halocynthia roretzi*: fine structure, distribution, and appearance. In "The Biology of Ascidians" Ed by H Sawada, H Yokosawa, CC Lambert, Springer, Tokyo, pp 445-449
- Sawada, T., and S. Ohtake (1994); Mixed-incubation of allogeneic hemocytes in tunicate *Halocynthia roretzi*. *Zoological Science* 11: 817-820
- Sawada, T., Y. Fujikura, S. Tomonaga, and T. Fukumoto (1991); Classification and characterization of ten hemocytes types in the tunicate *Halocynthia roretzi*. *Zoological Science* 8: 939-950
- 沢田知夫・大竹伸一 (1997) ; ホヤの血球の構造と機能. 動物の血液細胞と生体防御 和合治久編著 (全 232 頁) 菜根出版 東京都千代田区 pp117-142
- Shirae, M., and Y. Saito (2000); A comparison of hemocytes and their phenoloxidase activity among botryllid ascidians. *Zoological Science* 17: 881-891.
- Shirae, M., L. Ballarin, A. Frizzo, Y. Saito, and E. Hirose (2002); Involvement of quinines and phenoloxidase in the allorejection reaction in a colonial ascidian, *Botrylloides simodensis*: Histochemical and immunohistochemical study. *Mar. Biol.* 141: 659-665.
- Smith, M. J. (1970); The blood cells and tunic of the ascidian *Halocynthia aurantium* (Pallas). I. Hematology, tunic morphology, and partition of cells between blood and tunic. *Biological Bulletin* 138: 354-378
- 田中邦男・大竹伸一 (1997) ; 原索動物マボヤの同種異個体反応 - 血球による貪食作用と細胞障害作用 -. マクロファージと生体防御 日本生体防御学会編 (全 205 頁) 菜根出版 東京都千代田区 pp1-23