

氏名(本籍)	いし かわ はる ひこ 石 川 春 彦
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 5 8 4 号
学位授与年月日	平 成 11 年 9 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科水産学専攻 (博士課程)
学位論文題目	マガキの性成熟および産卵に伴う生体防御機能の動態に関する研究 ( Effects of sexual maturation and spawning on bio-defense functions in the Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> )
論文審査委員	(主 査) 教 授 森 勝 義 教 授 木 島 明 博 教 授 秦 正 弘 助教授 尾 定 誠

# 論文内容要旨

## 序 論

二枚貝の生体防御機構は他の無脊椎動物と同様に、哺乳類等の脊椎動物にみられる免疫グロブリンを介した識別と記憶を柱とする特異性の高い免疫系を有していない。すなわち、二枚貝の生体防御機構は非特異的な防御反応を示す因子群から構成されていると考えられている。生体防御因子は細胞性防御因子と体液性防御因子の2つに大別され、細胞性防御因子としては、貪食能を有する血球、体液性防御因子としては、凝集因子や殺菌因子が挙げられる。そして、これら生体防御因子群が協同することでより強固な生体防御機構が成立すると考えられる。また、二枚貝においては生殖時に大量のエネルギーを消費し、性成熟の進行や産卵(本論文中では放卵・放精と同義語として扱う)に伴ってエネルギー源となるグリコーゲン含量が低下すること、鰓の繊毛運動をはじめとして、様々な生理活性が低下することが考えられている。これらのことから、性成熟の進行や産卵が二枚貝の示す重要な生理活性の1つである生体防御活性に影響をおよぼしていることが推定される。しかしながら、これまで生体防御活性に影響を与える要因として、性成熟や産卵といった内的要因が検討されたことはない。

そこで、本研究ではマガキを材料として生体防御活性におよぼす性成熟や産卵の影響について明らかにすることを目的とした。すなわち、実験に供するマガキ各個体の性成熟段階を把握した上で生体防御活性の季節変動を調べることにより、生体防御活性におよぼす性成熟や産卵の影響について検討した。本研究では生体防御活性として、細胞性防御因子として重要な血球の密度および貪食能、体液性防御因子として重要な殺菌因子の活性を対象とした。

## マガキにおける性成熟段階の判別

詳細な組織学的な観察の結果、マガキの性成熟段階を生殖巣の発達程度や間質結合組織(Interstitial Connective Tissue以下ICT)の増減から発達期、成熟期、回復期、休止期の4期に区分した。判別の基準は以下のとおりである。

発達期：1次および2次生殖細管に雄では精細胞が(Fig. 1-A)、雌では1次卵母細胞がみられはじめ(Fig. 1-B)、雌雄判別が可能となる。生殖細胞の増殖に伴い、2次生殖細管は発達し、ICTの割合が小さくなる。

成熟期：雄では精細胞が精子に変態し(Fig. 1-C)、雌では1次卵母細胞が十分生長しており(Fig. 1-D)、自然産卵が可能な状態である。このとき、2次生殖細管は十分に発達しており、ICTはほとんど観察されなくなり、視野によっては全くみられない。

回復期：産卵が終了し、2次生殖細管およびICTの修復が進行している(Fig. 1-E)。未産卵の生殖細胞が観察される時以外は、雌雄判別は不可能である。

休止期：2次生殖細管およびICTの修復が完了しており、2次生殖細管は完全に退縮している。性成熟は休止の状態であり(Fig. 1-F)、光学顕微鏡による組織像の観察では雌雄判別は完全に不可能である。

### 性成熟及び産卵に伴うマガキ血球の密度と貪食活性の動態

本研究では、マガキの血リンパの血球密度、貪食活性の指標として全血球における貪食している血球の割合を示す貪食率、そして貪食能を持つ血球の異物処理能力を示す貪食指数をもとめた。各々は以下の式で表される。

貪食率 = 酵母を貪食している血球数 / 観察した総血球数

貪食指数 = 貪食された総酵母数 / 酵母を貪食している血球数

さらに、マガキの生体内における異物排除能を評価するために、単位血リンパ量あたりの血球による異物処理量を推定するクリアランス指数を設定した。クリアランス指数は以下の式で表される。

クリアランス指数 = 血球密度 × 貪食率 × 貪食指数

性成熟が急速に進行する5月から6月にかけては、同一時期に採取された群の中で性成熟段階がより進行している個体において、血球密度(Fig. 2)、血球の貪食率(Fig. 3)および貪食指数(Fig. 4)のいずれも高くなる傾向がみられた。そして、クリアランス指数では性成熟段階ごとの差は明確であり、6月の成熟期の個体で最高値を示した(Fig. 5)。また、産卵の影響は、産卵終了直後と推定される9月にみられ、血球密度(Fig. 2)や血球の貪食活性(Figs. 3&4)は低下する傾向が認められた。特に、貪食指数の低下は顕著であった(Fig. 4)。これらの結果、血球密度や血球の貪食活性は性成熟や産卵によって大きく変動することが明らかとなり、生殖は細胞性防御能に影響する要因の一つであることが示唆された。

## 性成熟及び産卵に伴うマガキ組織における殺菌活性の動態

本研究では、はじめにマガキの殺菌因子の構成成分について検討し、殺菌因子にはリゾチーム様因子およびそれとは性質が異なる殺菌因子の2つが存在することを明らかにした。すなわち、消化盲嚢部組織抽出液を試料としてリゾチーム活性およびディスク拡散法によって検出される殺菌活性の温度耐性を調べた。その結果、消化盲嚢部組織抽出液のリゾチーム活性は100℃で30分の処理で50%以上の活性を残し、酸性条件下で温度耐性が高いことが明らかになったが、121℃で15分のオートクレーブ処理では完全に失活した(Fig. 6)。一方の殺菌活性は高い温度耐性を示し、酸性条件下でオートクレーブ処理しても活性が全く減少しなかった(Fig. 6)。これらのことから、消化盲嚢部組織抽出液にはリゾチーム様成分以外にも酸性条件下で極めて高い温度耐性を示す殺菌成分が存在することが考えられた。次いで、硫酸アンモニウムを用いた塩析による分画の結果、温度耐性の高い殺菌成分は総活性の78.7%が0-40%飽和画分に含まれ、リゾチームでは全体の69.4%が40-60%飽和画分に含まれていた(Table 1)。さらに、0-40%飽和画分を試料としてSP-Toyopearlをイオン交換体とする陽イオン交換クロマトグラフィーにより高温耐性を示す殺菌成分とリゾチーム成分の分離を試みた結果、それぞれの最大活性を示す画分を分離することができた(Fig. 7)。すなわち、マガキの殺菌因子として、リゾチーム様成分と温度耐性の高い殺菌成分の2成分が存在することが明らかになった。

リゾチーム活性の組織分布を調べた結果、消化盲嚢部で最も高く、次いで外套膜が高かった(Table 2)。消化盲嚢部におけるリゾチーム活性は大きく季節的に変動し、5月から6月にかけて活性は最低水準となり、9月から10月にかけて活性は最高水準となった(Fig. 8)。性成熟に伴った変動は認められなかったが、産卵後の回復期で高い値を示した。外套膜では消化盲嚢部のような大きな変動は観察されず、性成熟や産卵の影響は明確でなかった(Fig. 9)。

一方、高温耐性殺菌因子の活性は消化盲嚢部で最も高い活性を示し、外套膜、鰓でも強い活性が検出された(Table 3)。高温耐性殺菌因子が示す殺菌活性はリゾチーム活性に比べて個体差や時期による変動の幅が小さかったが、消化盲嚢部では回復期の個体で高くなる傾向が認められ(Fig. 11)、外套膜では逆に成熟期と回復期の個体で低くなる傾向がみられた(Fig. 12)。しかし、これらの活性の変動

に性成熟や産卵が影響しているのかどうかは明確ではなかった。

## 総 括

本研究では、マガキの細胞性因子である血球の密度および貪食能、体液性因子である殺菌因子の生体防御活性の季節変動について明らかにした。そして、それらの季節変動におよぼす性成熟の進行や産卵という生殖に関連した内的要因の影響を検討した。血球の密度や貪食活性は性成熟の進行に伴って高くなり、また、産卵直後の回復期では大きく低下した。すなわち、血球密度や血球の貪食活性は性成熟の進行や産卵によって大きく変動することが明らかとなった。一方、殺菌因子の活性は消化盲嚢部のリゾチーム活性に大きな季節変動がみられた以外、特に顕著な変動はなく、性成熟や産卵の影響は明確ではなかった。

本研究は、これまで未解明であった二枚貝の性成熟および産卵に伴う生体防御機能の動態について、初めて体系的かつ総合的な検討を加えたものであり、その結果、二枚貝の生体防御活性が生殖によって顕著に変動する現象など、今後の研究展開に資する注目すべき新知見が得られた。

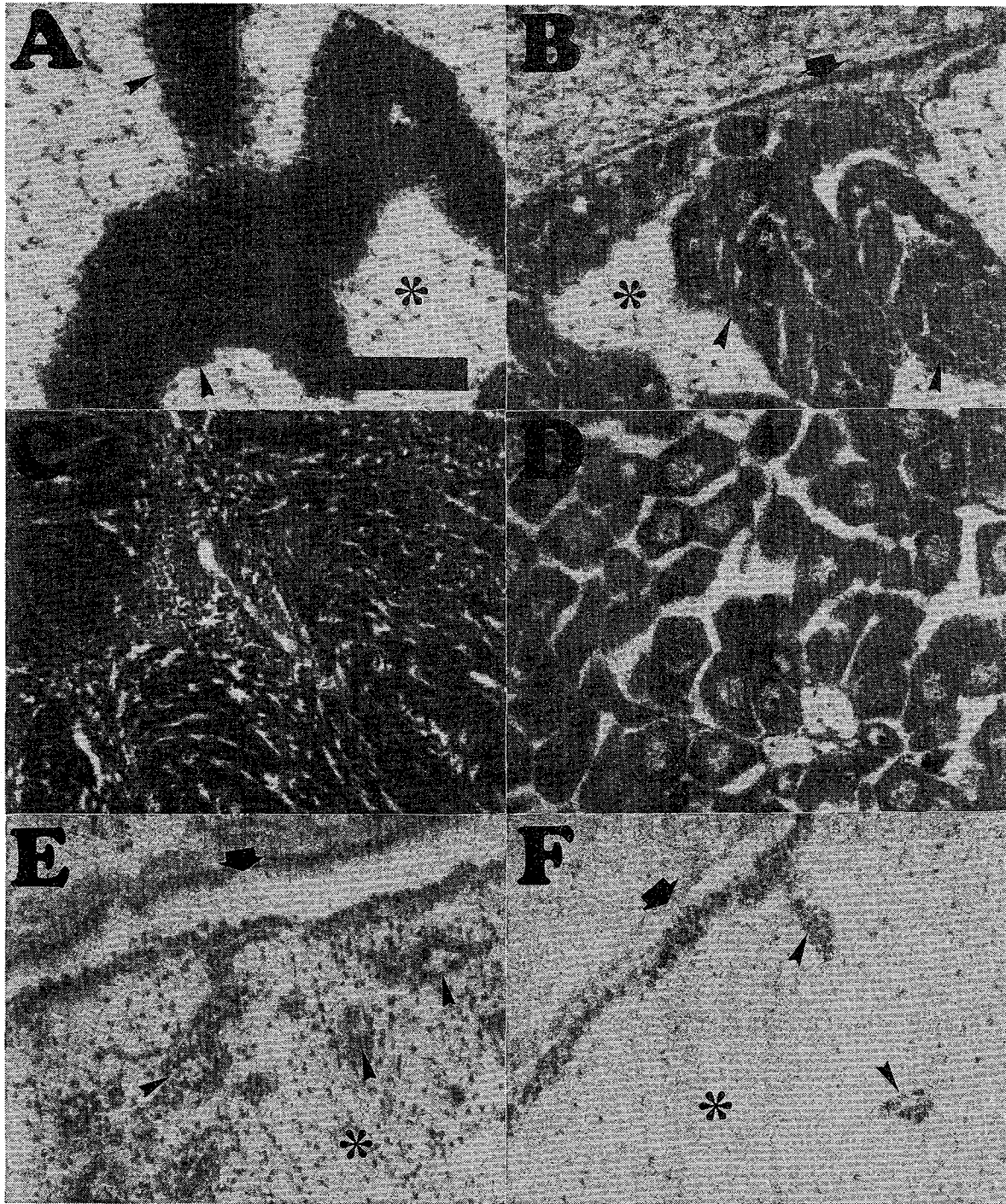


Fig. 1 Microscopic photographs of transversal section of the gonad of *C. gigas*. A, male developmental stage; B, female developmental stage; C, male mature stage; D, female mature stage; E, recovery stage; F, resting stage. Bar indicates a scale of 100  $\mu\text{m}$ . Asterisks indicate interstitial connective tissue (ICT). Arrows and arrow heads indicate primary and secondary genital tubules, respectively.

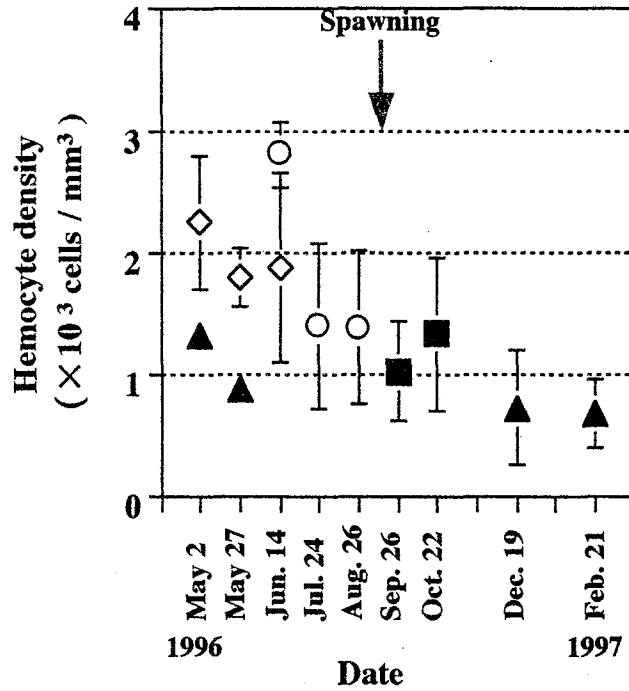


Fig. 2 Hemocyte density in the hemolymph from *C. gigas* at each sampling time. ◇ , developmental stage; ○ , mature stage; ■ , recovery stage; ▲ , resting stage. Data show means  $\pm$  SD. Five individuals were collected at each sampling time. Arrow indicates the spawning period.

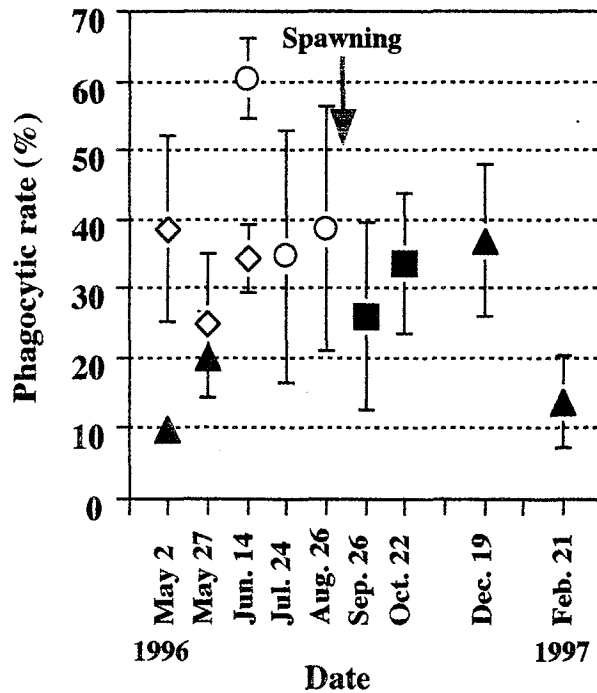


Fig. 3 Phagocytic rate of hemocytes from *C. gigas* at each sampling time. ◇ , developmental stage; ○ , mature stage; ■ , recovery stage; ▲ , resting stage. Data show means  $\pm$  SD. Five individuals were collected at each sampling time. Arrow indicates the spawning period.

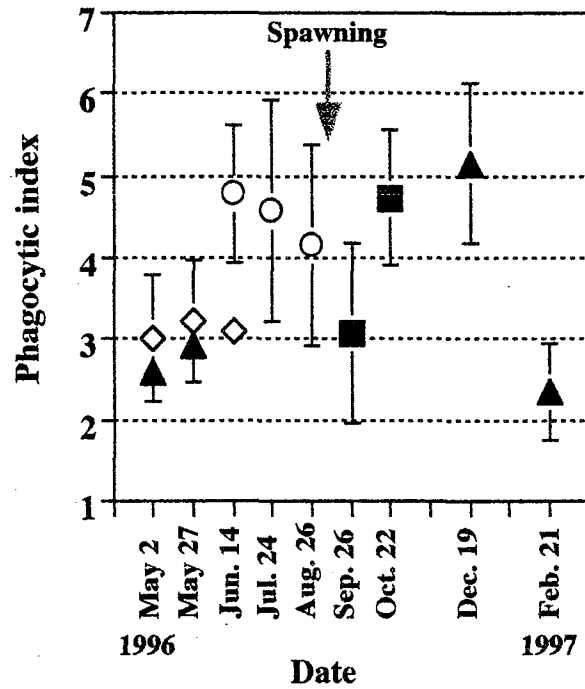


Fig. 4 Phagocytic index of hemocytes from *C. gigas* at each sampling time. ◇ , developmental stage; ○ , mature stage; ■ , recovery stage; ▲ , resting stage. Data show means ± SD. Five individuals were collected at each sampling time. Arrow indicates the spawning period.

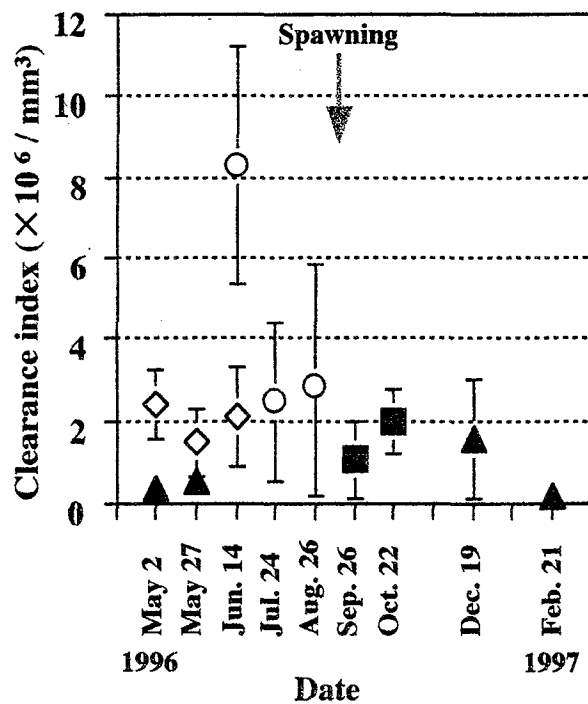


Fig. 5 Clearance index of the hemolymph from *C. gigas* at each sampling time. ◇ , developmental stage; ○ , mature stage; ■ , recovery stage; ▲ , resting stage. Data show means ± SD. Five individuals were collected at each sampling time. Arrow indicates the spawning period.



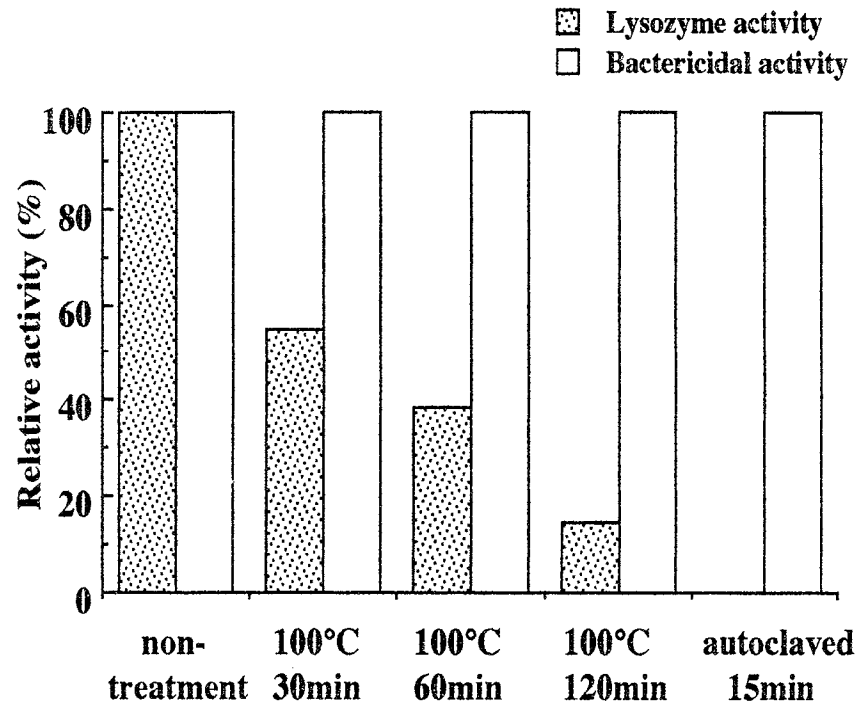


Fig. 6 Effects of treatments for heating and for autoclaving on lysozyme and bactericidal activities in extract of *C. gigas* digestive diverticula.

Table 1 Lysozyme and bactericidal activities in extract of the digestive diverticula of *C. gigas* at each fraction separated by salting out

Fraction	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Lysozyme activity		Bactericidal activity	
			Specific activity (UL / mg)	Total activity (kUL)	Specific activity (UB / mg)	Total activity (kUB)
0%-40%	13.5	593.3	6.63	3.94	115.3	68.4
40%-60%	9.0	488.2	35.43	17.30	37.8	18.5
60%-80%	3.5	68.4	53.95	3.69	0	0

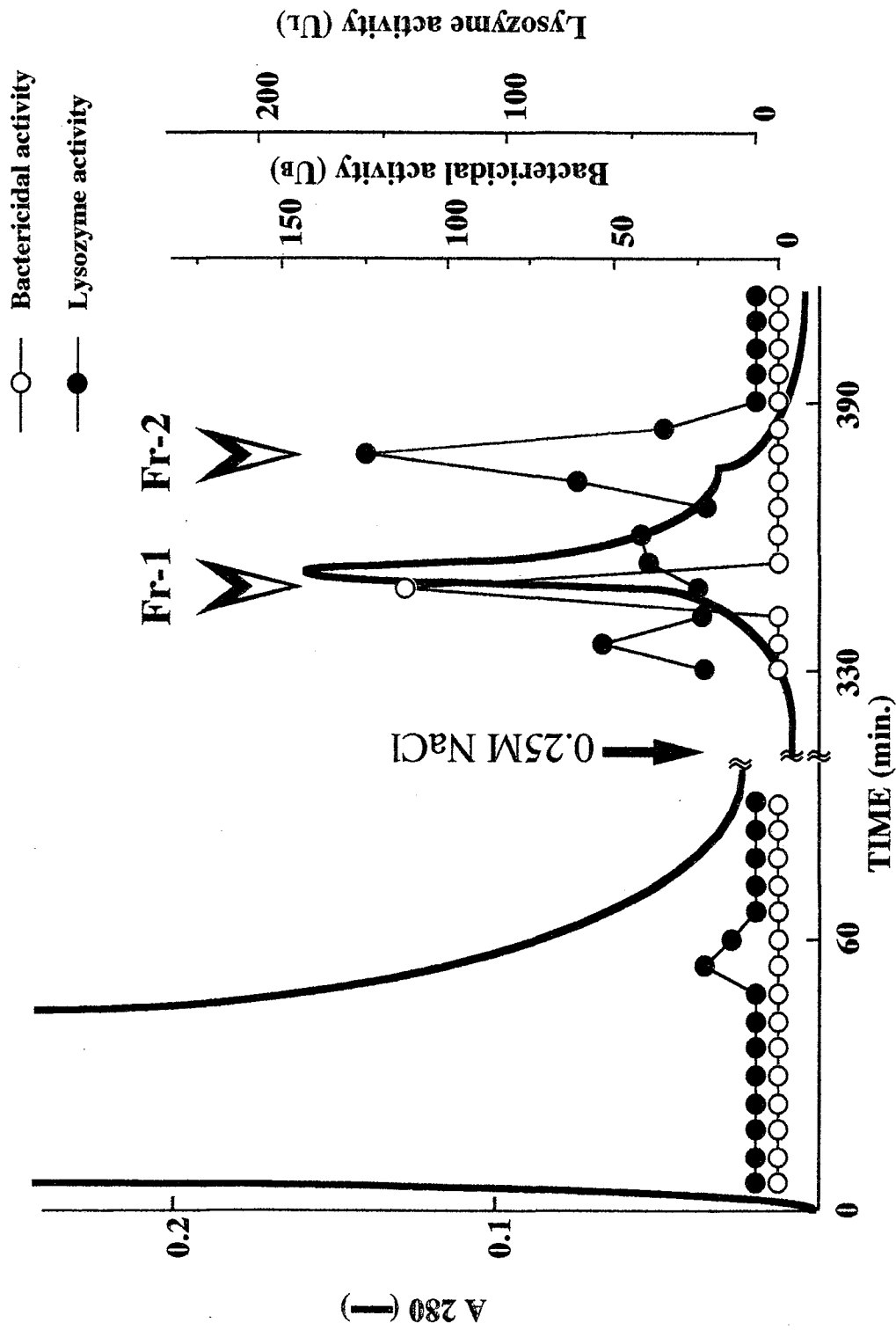


Fig. 7 SP-Toyopearl column chromatography of the zero to forty % salting out fraction separated from extract of the digestive diverticula of *C. gigas*. Arrow indicates the start point of elution with Sörensen phosphate buffer (pH6.2) containing 0.25M NaCl. The arrow heads located on the two separated fractions; **Fr-1** including bactericidal factor and **Fr-2** including lysozyme.

Table 2 Lysozyme activity in the various tissues of *C. gigas*

Tissues	Lysozyme activity
Digestive diverticula	<b>3.06 ± 0.33</b> (kUL / g wet wt.)
Adductor muscle	<b>N. D.</b> (kUL / g wet wt.)
Mantle	<b>2.32 ± 0.28</b> (kUL / g wet wt.)
Gill	<b>0.11 ± 0.04</b> (kUL / g wet wt.)
Labial palp	<b>0.19 ± 0.05</b> (kUL / g wet wt.)
Hemolymph	<b>N. D.</b> (kUL / ml)

Each value shows the mean ± standard error (n = 45). N. D.: not detected.

Table 3 Bactericidal activity in the various tissues of *C. gigas*

Tissues	Bactericidal activity
Digestive diverticula	<b>22.77 ± 1.03</b> (kUB / g wet wt.)
Adductor muscle	<b>12.86 ± 0.84</b> (kUB / g wet wt.)
Mantle	<b>17.94 ± 0.77</b> (kUB / g wet wt.)
Gill	<b>16.36 ± 2.47</b> (kUB / g wet wt.)
Labial palp	<b>10.20 ± 0.79</b> (kUB / g wet wt.)
Hemolymph	<b>0.94 ± 0.20</b> (kUB / ml)

Bactericidal activity was measured by the disk diffusion test using *M. luteus* as a substrate. Each value shows the mean ± standard error (n = 45).

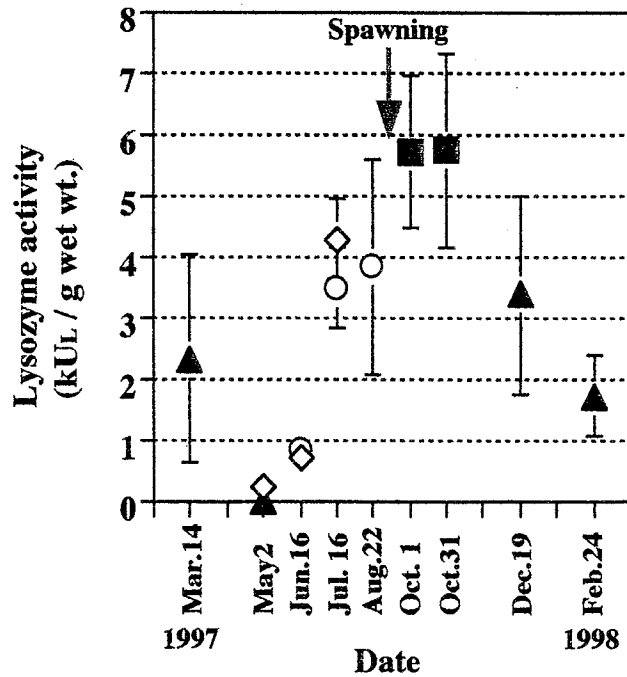


Fig. 8 Lysozyme activity in extract of the digestive diverticula of *C. gigas* at each sampling time. ◇ , developmental stage; ○ , mature stage; ■ , recovery stage; ▲ , resting stage. Data show means  $\pm$  SD. Five individuals were collected at each sampling time. Arrow indicates the spawning period.

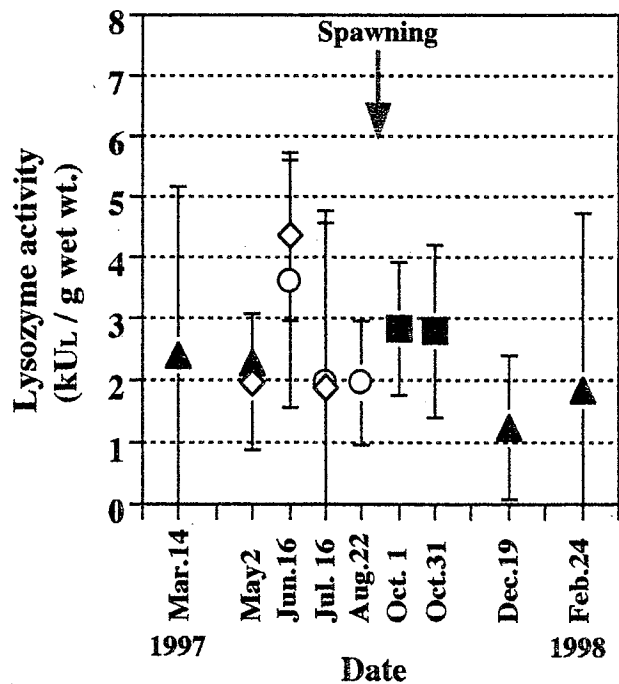


Fig. 9 Lysozyme activity in extract of the mantle of *C. gigas* at each sampling time. ◇ , developmental stage; ○ , mature stage; ■ , recovery stage; ▲ , resting stage. Data show means  $\pm$  SD. Five individuals were collected at each sampling time. Arrow indicates the spawning period.

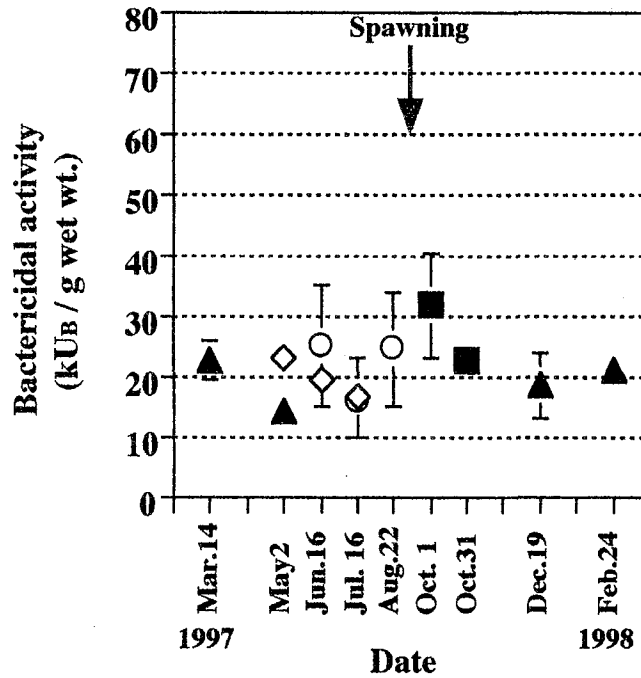


Fig. 10 Bactericidal activity in extract of the digestive diverticula of *C. gigas* at each sampling time. ◇ , developmental stage; ○ , mature stage; ■ , recovery stage; ▲ , resting stage. Data show means  $\pm$  SD. Five individuals were collected at each sampling time. Arrow indicates the spawning period.

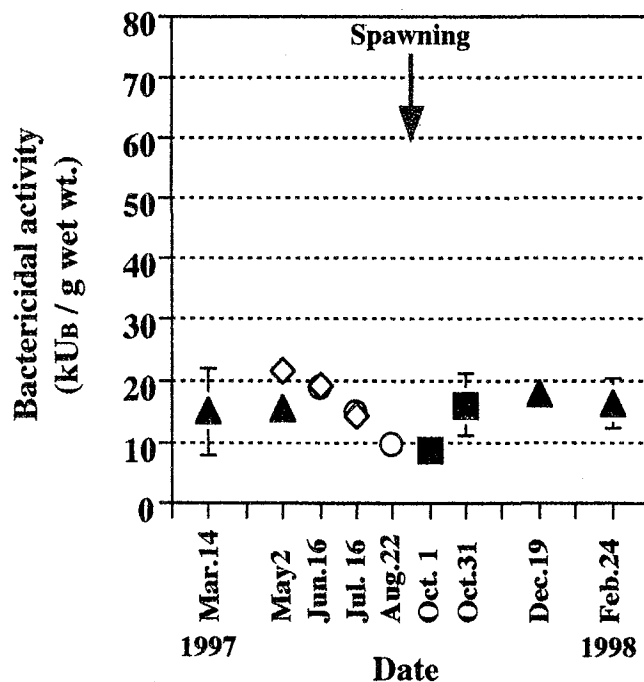


Fig. 11 Bactericidal activity in extract of the mantle of *C. gigas* at each sampling time. ◇ , developmental stage; ○ , mature stage; ■ , recovery stage; ▲ , resting stage. Data show means  $\pm$  SD. Five individuals were collected at each sampling time. Arrow indicates the spawning period.

# 論文審査結果要旨

海産二枚貝は他の無脊椎動物と同様に、免疫グロブリンを介した識別と記憶を柱とする特異性の高い免疫系を有していない。すなわち、海産二枚貝の生体防御機構は非特異的な防御反応を示す因子群から構成されていると考えられている。しかし、これらの生体防御を担う因子群の活性に対し、影響をおよぼす要因については不明な点が多く、特に性成熟や産卵といった内的要因については検討された例がない。

本研究では、海産二枚貝の代表的な養殖対象種であるマガキ*Crassostrea gigas*の生体防御活性におよぼす性成熟や産卵の影響について検討した。マガキの性成熟段階を生殖巣の組織学的な観察から発達期、成熟期、回復期、休止期の4期に区分し(第1章)、実験に供するマガキ各個体の性成熟段階を把握した上で、生体防御活性の季節変動を解析した。

細胞性防御因子である血球の密度および貪食活性について検討した。性成熟が急速に進行する5月から6月にかけては、同一時期に採取された群の中で性成熟がより進行した段階にある個体において、血球の密度および貪食活性は高くなる傾向が認められた。また、産卵終了直後に、血球の密度および貪食活性は低下し、特に、貪食指数の低下は顕著であった。これらの結果から、血球の密度および貪食活性は性成熟や産卵によって大きく変動することが明らかとなり、生殖は細胞性防御因子の活性に影響する要因の一つであることが示された(第2章)。

体液性防御因子である殺菌因子について検討した。まず、マガキの殺菌因子として、リゾチーム様成分と温度耐性の高い殺菌成分の2成分が存在することを明らかにした。そして、これらの殺菌因子の活性の変動を解析した結果、消化盲嚢部のリゾチーム活性以外に顕著な変動は認められず、血球の密度および貪食活性とは対照的に、殺菌因子に対する性成熟や産卵の影響は明確ではなかった(第3章)。

以上のように本研究は、これまで未解明であった海産二枚貝の性成熟および産卵に伴う生体防御機能の動態について、初めて体系的かつ総合的な検討を加えたものであり、その結果、マガキの生体防御活性、特に血球の貪食活性が生殖によって顕著に変動する現象など、海産二枚貝の生体防御研究の展開に資する注目すべき新知見が得られた。よって審査委員一同は、本論文の著者が博士(農学)の学位を授与されるに値するものと判定した。