

氏 名(本籍) あお 青 の 野 ひで 英 あき 明

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 5 2 9 号

学位授与年月日 平 成 7 年 7 月 20 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 イセエビの血リンパ凝固系に関する研究

論文審査委員(主査) 教 授 森 勝 義

教 授 竹 内 昌 昭

教 授 秦 正 弘

論文内容要旨

緒言

エビ・カニ等の甲殻類（甲殻綱十脚目）の増養殖技術開発は盛んにおこなわれている。しかし、種苗生産時の初期減耗率は依然高く、大量斃死等の問題も起きている。このような問題の原因を解明し、適切な処置を講ずるためには、甲殻類の生体防御機構に関する知見が必要である。甲殻類の血リンパ凝固反応は重要な生体防御反応であり、侵入異物の封じ込めや創傷部位における体液流出防止の役割をもつ。本研究はイセエビ *Panulirus japonicus* を実験材料とし、血リンパ凝固系において血球と血漿が果たす役割を調べ、その反応機構を明らかにすることを目的とした。

1. イセエビ血球の分類とタイプ分離

初めに、血リンパ採取の際に用いる抗凝固剤の選定と血球タイプの分類をおこない、血球のタイプ別分離を試みた。システインを抗凝固剤として用いた場合に、血球形態が最も良く維持されていた。イセエビの血球は、他の甲殻類の場合と同様に hyaline cell (H細胞), semigranular cell (SG細胞), granular cell (G細胞) の3タイプに分類され (Fig. 1), 血リンパ中には H細胞 69.5%, SG細胞 22.0%, G細胞 8.5% の割合で存在した。また、60% Percoll 溶液を用いた密度勾配遠心により、血球は H細胞と SG細胞の混合 (H / SG細胞) バンドと、G細胞のバンドの2群に分離された。

2. 血球クロット形成 I

血リンパから単離した血球を細菌と混合した際に起こる反応を *in vitro* で調べた。蛍光色素 (FITC) 標識した細菌 *Pseudomonas perolens* と血球を混合したところ、血球は粘着性と弾力性の高い血球塊を形成した。この血球塊は蛍光反応を示したことから、多くの細菌が血球塊中に封じ込められていることがわかった (Fig. 2)。この血球塊形成反応は血漿成分を必要とせず、血球の細胞死を伴う細胞性凝固反応と考えられた。本研究ではこの反応を血球クロット形成と呼び、血リンパ全体がゲル化する反応 (血漿ゲル化) と区別した。

2種のグラム陽性細菌 (*Streptococcus* sp., *Micrococcus lysodeikticus*) と2種のグラム陰性細菌 (*Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*) をそれぞれ血球と混合した際にも血球クロット形成がみられ、細菌種によって血球

クロット形成度に違いがみられた(Fig. 3)。分離したH/S G細胞とG細胞それぞれを*P. perolens*と混合したところ、どちらの血球もクロット形成を起こさなかった。しかし、予めG細胞と*P. perolens*を混合して条件付けた培地をH/S G細胞に添加するとクロット形成が起こったことから、G細胞が細菌の刺激によってH/S G細胞のクロット形成を誘導する因子を放出した可能性が考えられた。

3. 血球クロット形成 II

血球のクロット形成を誘導する外因性物質を調べる目的で、グラム陰性細菌(*Salmonella abortus equi*, *Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida*)細胞壁成分のリポ多糖(LPS)、グラム陽性細菌細胞壁成分のペプチドグリカン、カビ等の細胞壁成分である β -1,3-グルカン(ラミナリン)を血球に添加し、血球クロット形成の有無を調べた。*E. coli*と*A. salmonicida*由来のLPSはクロット形成を誘導したが、*S. abortus equi*のLPSはクロット形成を誘導しなかった(Fig. 4)。 β -1,3-グルカンは血球クロット形成を誘導したが、ペプチドグリカンは誘導しなかった。*A. salmonicida*由来のLPSは分離したH/S G細胞のクロット形成を誘導しなかったが、LPSとG細胞で条件付けた培地はH/S G細胞のクロット形成を誘導した(Fig. 5)。この条件付け培地がH/S G細胞に及ぼす作用を調べるために、培地添加直後のH/S G細胞の形態変化を観察したところ、H/S G細胞の崩壊が観察された。さらに、G細胞ライセートがH/S G細胞の崩壊を誘導した(Fig. 6)。また、H/S G細胞を低浸透圧液中で崩壊させるだけでも血球クロットが形成された。以上の結果から、G細胞内にH/S G細胞の崩壊を誘導する因子が存在し、この因子が異物による刺激によって放出されること、血球クロット形成に関与する凝固物質は全てH/S G細胞に含まれており、H/S G細胞の崩壊によってクロット形成が起こることが明らかになった。

4. 血漿の血球崩壊活性

血リンパを抗凝固剤を用いずに無菌的に採取した場合にも、H/S G細胞の崩壊が観察される。この崩壊反応には血漿が関与している可能性が考えられたので、血漿の血球崩壊活性を調べた。抗凝固剤を用いて採取した血リンパから

血球を取り除き、上清を透析して抗凝固剤を除去し、血漿を調製した。同時に、一旦凝固させた血リンパを碎き遠心して得られた上清である血清の血球崩壊活性も調べた。血球に血漿を添加すると、H/S G細胞が即座に崩壊したが、G細胞は崩壊せずに基質に接着し脱顆粒を起こした(Fig. 7)。このことから、血漿にもH/S G細胞の崩壊を誘導する因子(血球崩壊因子)が含まれていることがわかった。血清もH/S G細胞の崩壊を誘導した。クルマエビとアメリカカロブスターからも血漿を調製し、3種の甲殻類の血漿を各種の血球と混合したところ、血漿はほぼ種特異的にH/S G細胞の崩壊を誘導した。血球崩壊因子は血漿タンパクであり、イセエビ血漿からこの因子が精製された。血球崩壊因子は通常体内では不活性状態にあり、血リンパが体外に出ると因子が活性化されるものと思われた。

5. 凝固酵素トランスグルタミナーゼ

血漿ゲル化は、血漿中の凝固タンパク(コアグュローゲン)が血球由来の凝固酵素(トランスグルタミナーゼ)によって分子間に架橋反応を受ける結果起こると考えられている。しかし、甲殻類血リンパにおけるトランスグルタミナーゼ活性の血球への局在は明確には示されていなかったもので、この点について検討した。血漿からはトランスグルタミナーゼ活性は検出されず、血球から活性が検出された(Table 1)。分離したH/S G細胞とG細胞の活性を測定したところ、同一細胞数あたりでは、H/S G細胞がG細胞の約4倍の活性をもっていた(Table 2)。血リンパ中のH/S G細胞とG細胞の存在比は約10:1である。従って、血リンパ中のトランスグルタミナーゼ活性の大部分は、H/S G細胞に存在していることが明らかになった。

6. *in vitro*における血漿ゲル化反応

抗凝固剤を用いて採取した血リンパから一旦分離して調製した血漿と血球を、*in vitro*で再度混合することで起こるゲル化及びその際に必要とされる条件を検討した。カルシウムを含む血漿は血球崩壊活性を示し、血球との混合により直ちにゲル化した。カルシウムを含まない血漿には血球崩壊活性がなく、血球と混合してもゲル化しなかったが、超音波処理で血球を機械的に破壊し塩化カ

ルシウム溶液を添加するとゲル化した。カルシウムを含む血清は血球崩壊活性をもっていたが、血球と混合してもゲル化しなかった(Fig. 8)。また、H/S G細胞と混合した血漿はゲル化した。G細胞と混合した血漿は、G細胞を機械的に破壊してもゲル化しなかった(Fig. 9)。抗凝固剤を用いずに採取した血リンパを2つに分け、一方を超音波処理して血球を破壊し、他方は無処理のまま放置したところ、超音波処理した血リンパは直ちにゲル化し、そのゲル化時間は無処理区に比べて有意に短かった(Table 3)。これらの結果から、血球崩壊活性と血漿ゲル化反応はともにカルシウム依存性であること、血漿ゲル化に必要な凝固タンパクは血漿由来であること、血漿のゲル化には崩壊したH/S G細胞が必要であること、血漿のゲル化時間は崩壊したH/S G細胞数に依存することが明らかになった。

イセエビを用いた本研究によって、G細胞に細菌等の異物認識能があること、G細胞と血漿にH/S G細胞の崩壊を誘導する活性があること、H/S G細胞の崩壊によってクロット形成物質及びトランスグルタミナーゼが放出され血球クロット形成または血漿ゲル化反応が起こることが明らかになった。

これらの結果と従来からの知見をまとめ、イセエビの血リンパ凝固系の概略を示したのがFig. 10である。体内に侵入した細菌等に接触したG細胞はH/S G細胞に対する血球崩壊因子を放出し、近傍のH/S G細胞を崩壊させて血球クロット形成を誘導してその中に侵入異物を封じ込める。一方、創傷時には血漿の血球崩壊因子が活性化され、H/S G細胞の崩壊が広範囲において起こり、放出されたトランスグルタミナーゼが血漿のゲル化を誘導し、傷口をふさぐ。ただし、両反応ともH/S G細胞の崩壊を伴う反応であるため、クロット形成は崩壊血球の周辺の血漿のゲル化を伴い、血漿ゲル化は血球クロット形成をも伴って、それぞれ、より強固な凝固塊を形成するものと思われる。

本研究の結果は、今後さらに進展すると予想されるイセエビ類の種苗生産時における斃死原因の解明や、親エビの健康度の判定に際して役立つ基礎的知見を提供するものと考えられる。

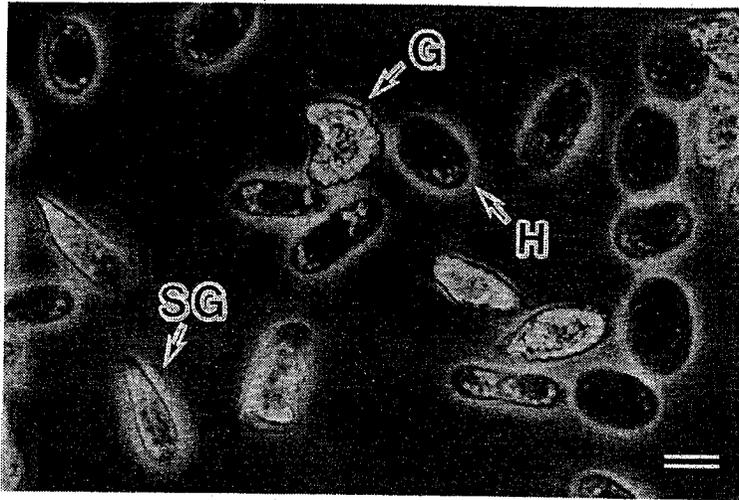


Fig. 1 Three types of hemocytes of *Panulirus japonicus*. H, hyaline cell; SG, semigranular cell; G, granular cell. Bar=10 μ m.

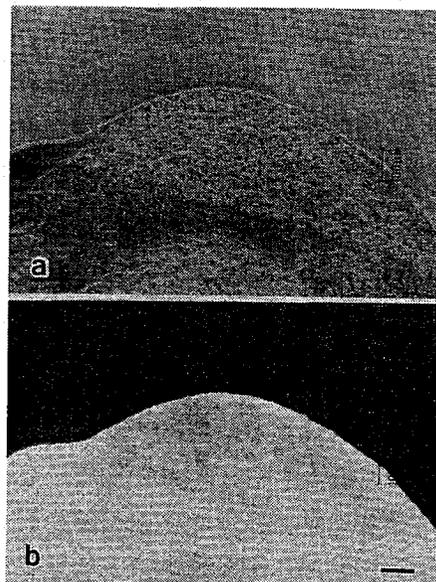


Fig. 2 Hemocyte clot induced by incubation with FITC-labeled *Pseudomonas perolens*. (a) is a light-field and (b) is a dark-field photograph under fluorescent microscope. Bar=100 μ m.

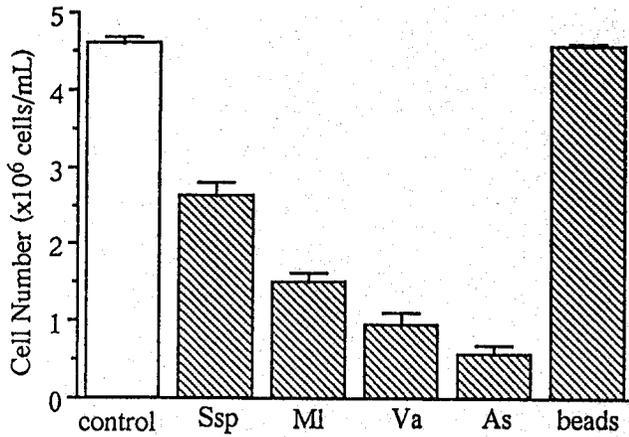


Fig. 3 The relationship between the degree of clotting and bacteria species or polystyrene beads added. The number of bacteria and beads were adjusted to 10^8 /mL. Remaining cell number is inversely related to the strength of the clotting reaction. All the bacteria species induced clotting, and the cell number decreased significantly ($P < 0.001$), but the polystyrene beads did not induce clotting ($P > 0.5$). Ssp, *Streptococcus* sp.; MI, *Micrococcus lysodeikticus*; Va, *Vibrio anguillarum*; As, *Aeromonas salmonicida*. Values show the mean \pm SE of five experiments.

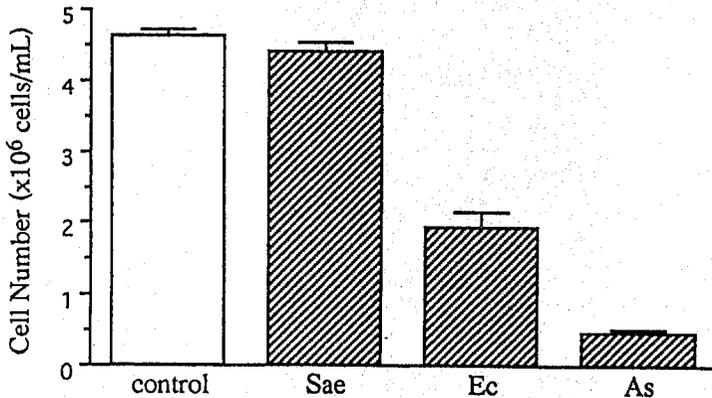


Fig. 4 Effects of LPS on clotting of unseparated whole hemocytes. Remaining cell number is inversely related to the strength of the clotting reaction. Compared with saline (control) group, the cell number decreased significantly ($P < 0.001$) when LPS of *E. coli* (Ec) or LPS of *A. salmonicida* (As) was added. LPS of *S. abortus equi* (Sae) did not induce clotting ($P > 0.2$). Values show the mean \pm SE of five experiments.

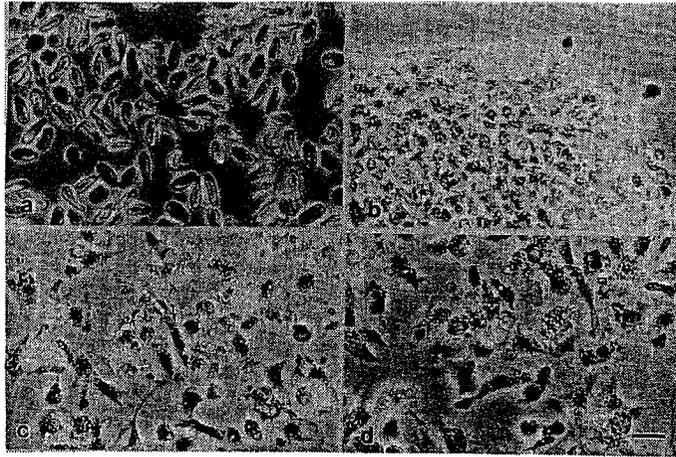


Fig. 5 Phase-contrast micrographs of separated hemocytes (top row, H/SG cells; bottom row, G cells) after incubation with HSL-CM (medium conditioned with both H/SG cells and LPS, left column) or GL-CM (medium conditioned with both G cells and LPS, right column). H/SG cells were not affected by HSL-CM (a), but clotted after incubation with GL-CM (b). G cells degenerated but did not clot after incubation with either HSL-CM (c) or GL-CM (d). Bar=20 μ m.

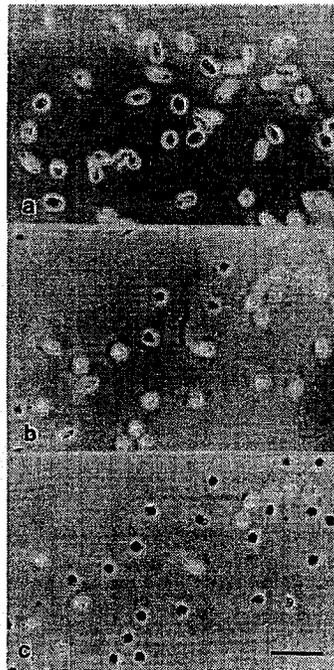


Fig. 6 Cytolysis of H/SG cells induced by G cell lysate. The photographs represent the same field before (a), 10 sec (b) and 30 sec (c) after addition of G cell lysate. Cytolysis is seen in (c). Bar=50 μ m.

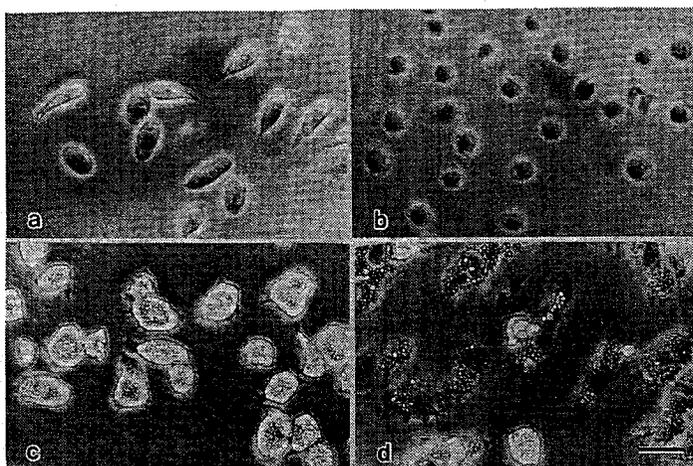


Fig. 7 Effect of plasma on separated hemocytes of *Panulirus japonicus*. (a) and (c), H/SG cells and G cells before addition of plasma, respectively; (b) and (d), 10 min after addition of homologous plasma. Cytolysis of H/SG cells is seen in (b). Bar=20 μ m.

Table 1 Transglutaminase (TGase) activity in hemocytes and plasma of *Panulirus japonicus*.

	TGase activity (unit/0.1mL hemolymph*)
Hemocytes	0.250 \pm 0.032
Plasma	0.000 \pm 0.000

*Hemocytes and plasma of each sample were prepared from 0.1 mL of hemolymph.

Values show the mean \pm SE of eight experiments.

Table 2 Transglutaminase (TGase) activity in separated H/SG and G cells of *Panulirus japonicus*.

	TGase activity (unit/10 ⁷ cells)
H/SG cells	4.04 \pm 0.73
G cells	0.95 \pm 0.15

Values show the mean \pm SE of six experiments.

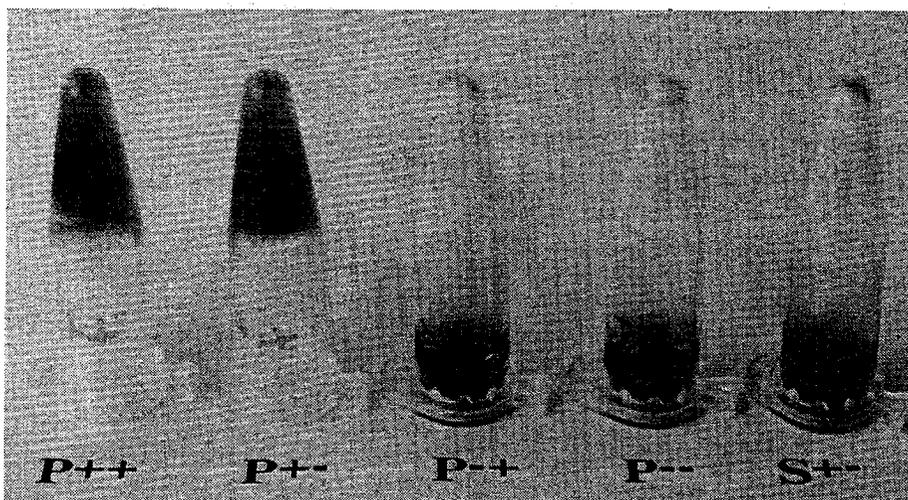


Fig. 8 Gelation test by mixing hemocytes and plasma or serum. Hemocytes were mixed with plasma(+Ca+Mg), plasma(+Ca-Mg), plasma(-Ca+Mg), plasma(-Ca-Mg), or serum(+Ca-Mg) (from left to right). Gelation is seen in the left two tubes.

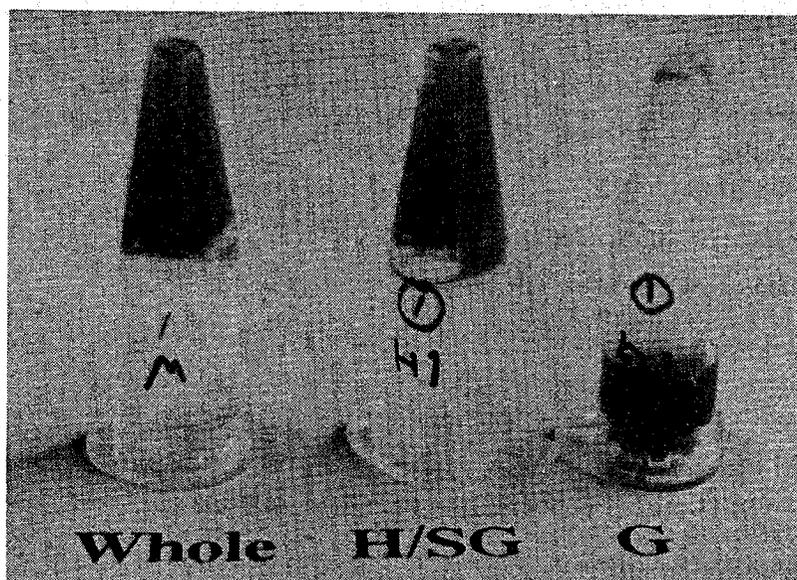


Fig. 9 Gelation test by mixing plasma(+Ca-Mg) with unseparated (whole) or separated hemocytes (H/SG or G cells).

Table 3 Gelation time of untreated and sonicated hemolymph.

	Gelation Time (sec)
untreated hemolymph	1530 ± 225
sonicated hemolymph	78 ± 15

Values show the mean ± SE of five experiments.

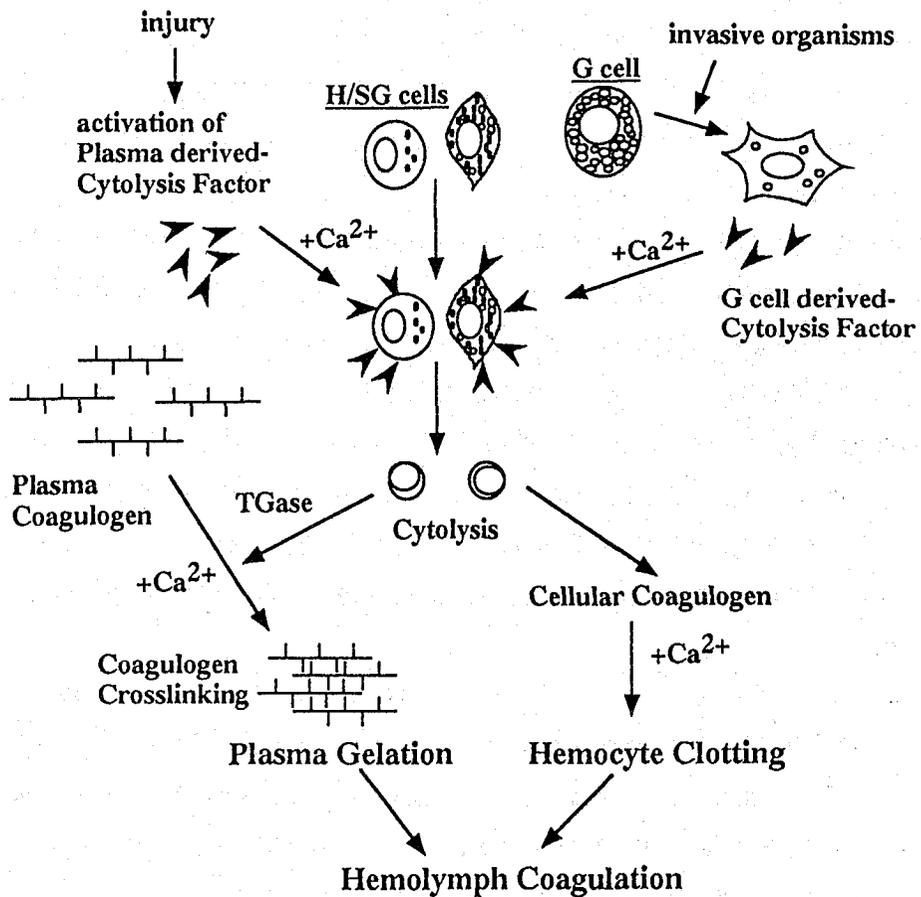


Fig. 10 Schematic cascade of hemolymph coagulation system of *Panulirus japonicus*.

論文審査の要旨

本研究は、水産上重要な甲殻類であるイセエビの生体防御機構の1つである血リンパ凝固系において、血球と血漿それぞれが果たす役割を調べ、血リンパ凝固反応機構を明らかにすることを目的としたものである。

血球は、hyaline cell (H細胞)、semigranular cell (SG細胞)、granular cell (G細胞)の3タイプに分類された。密度勾配遠心によって、血球はH細胞とSG細胞の混合群(H/SG細胞)とG細胞の2群に分離された。

血リンパから単離した血球を細菌と混合すると、血球の細胞死を伴った細胞性凝固である血球クロットが形成された。血球クロット中には多くの細菌が封じ込められていた。また、グラム陰性細菌細胞壁成分であるLPSとカビの細胞壁成分の β -1, 3-グルカンも血球のクロット形成を誘導した。この血球クロット形成は、G細胞が異物を認識してH/SG細胞に対する崩壊因子を放出し、崩壊したH/SG細胞によりクロットが形成されるという、血球タイプ間の相互作用によって起こることが明らかになった。

抗凝固剤溶液中に採取した血リンパから血球を取り除いた後、透析して調製した血漿には、H/SG細胞の崩壊を誘導する活性があった。クルマエビとアメリカロブスターの血漿にも、同種のH/SG細胞の崩壊を誘導する活性があった。この活性をもつタンパク(血球崩壊因子)がイセエビ血漿から単離された。また、血リンパ凝固酵素であるトランスグルタミナーゼ活性はほぼH/SG細胞に局在しており、血漿をH/SG細胞と混合すると、H/SG細胞が崩壊すると同時に血漿がゲル化した。抗凝固剤を用いずに採取した血リンパ中の血球を機械的に破壊すると、血リンパゲル化に要する時間が著しく短縮された。これらの結果から、血漿のゲル化がH/SG細胞の崩壊によって誘導されること、血漿ゲル化反応は血漿と血球間の相互作用によって進むことが解明された。

最後に、以上の結果を総合し、イセエビの血リンパ凝固系において血球クロット形成の血漿ゲル化という2つの反応がもつ生体防御機構における役割を推定した。

このように、本研究によって、甲殻類の血リンパ凝固反応機構における血球と血漿の役割が解明された。本研究の結果は、甲殻類の種苗生産時のへい死原因の解明や健全な種苗の生産に役立つ重要な基礎的知見を提供し得るものである。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。