

한국산 바지락(*Ruditapes philippinarum*) 혈구의 분류

강선구·박성우[†]·김영길

군산대학교 해양생명의학과

한국산 바지락(*Ruditapes philippinarum*) 혈구에 의한 생체 방어 기작의 과정을 이해하기 위해 혈구의 분류와 혈구의 계절적 변동을 조사하였다. 바지락은 1998년 6월부터 1년간 전북 고창군 줄포만에서 채집하여 실험에 사용하였다. 후패각근에서 채혈한 혈구를 형태학적 관찰과 탐식능을 조사한 결과 과립을 가진 호염기성과립구, 호산성과립구 그리고 노쇠한 세포인 fibrocyte의 3종류와 과립이 없는 무과립구로 구분되었다. 초미세구조의 관찰에 의한 과립구의 특징으로는 전자밀도가 높은 공포가 무과립구보다 훨씬 많았다. 무과립구는 작은 액상 공포가 세포질내에 산재해 있었다. 광학현미경적 식작용 관찰에서는 zymosan을 탐식한 혈구의 핵은 세포질의 가장 자리로 편재되었으며 식작용 비율에서는 호산성과립구가 호염기성과립구보다 높은 비율을 나타내었고 무과립구는 거의 탐식하지 않았다. 월별 혈구수에서 총혈구수는 4~7월이 많았으며 10~12월에 적게 나타났다. 각 혈구수의 조성은 호염기성과립구가 50-60%로 가장 높았고 호산성과립구는 25-40%, 무과립구는 10-20%의 순으로 나타났다.

Key words: *Ruditapes philippinarum*, Hemocyte, Classification, Granulocyte, Hyalinocyte

이매패류(bivalve)의 순환계는 개방혈관계로 혈구세포가 심장이나 혈관뿐만 아니라 모든 조직 사이를 순환하면서 상처의 치유(wound repair), 패각 복원(shell repair), 영양분의 소화와 운반(nutrient digestion and transport) 및 이물질들을 탐식함으로써 침입병원체에 대한 생체방어의 중요한 역할을 수행하고 있다(Cheng, 1981). 패류 혈구의 분류는 형태학적, 세포화학적 및 기능적 특성을 기준으로 granulocyte와 hyalinocyte의 2종류로 구분하고 있는데(Cheng, 1981), 대부분이 굴(*Crassostrea virginica*), 가리비(*Patinopecten yessoensis*), 포르투갈 바지락(*Ruditapes decussatus*), 담치(*Mytilus galloprovincialis*), 백합(*Mercenaria mercenaria*), 넙적굴(*Ostrea edulis*) 등에서 행하여 졌을 뿐(Foley & Cheng, 1972; Bachere et al., 1991; Tripp, 1992; 장, 1993; Lopez et al., 1997A; Carballal et al., 1997A), 바지락에 관한 연구는 없다.

바지락의 주산지인 서해안 연안은 환경오염과 간척사업 등의 환경변화로 대량의 폐사가 유발되고 있는데 그 원인으로서 기생충인 *Perkinsus* sp. (Choi, 1997; Choi et al., 1998)의 감염에 의한

것으로 보고되어지고 있지만 감염증과 혈구의 방어기작의 상관관계는 검토된 바 없다.

본 연구는 바지락의 혈구에 의한 생체 방어 기작을 이해하기 위하여 혈구의 형태학적 특징과 식작용을 기준으로 바지락의 혈구를 분류하고 계절별 혈구 조성의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

바지락

1998년 6월부터 매월 바지락(*R. philippinarum*)을 전북 고창 줄포만에서 채집하여 비닐봉지에 넣어 실험실로 이송하여 해수로 패각을 세척하고 각 장과 각고를 썬 다음, 30 cm×90 cm의 유리수조에 군산대학교 천해 양식 실습장에서 채수한 여과해수를 채워 수심 45 cm로 한 다음 통기하면서 25°C에 2~3일간 순치한 후 사용하였다.

채혈

패각에 칼을 삽입하여 바지락의 후패각근이 상하지 않도록 패각에 근접하게 절단하여 개각하고 후패각근(posterior adductor muscle) 일부를 절취하여 Davidson액에 24시간 고정된 다음 12시간 수세하고 상법에 따라 파라핀 절편을 만들어 H-E

[†]Corresponding author

염색 후 광학현미경으로 혈구의 존재 유무를 관찰하였다. 혈구의 채취를 위해서 후폐각근 주변 부위를 70% 알콜면으로 소독한 다음 쇠줄로 폐각에 I 자형의 홈집을 내어 항응고제(Modified anti-aggregant solution, MAS: glucose 20.8 g, sodium citrate 8 g, EDTA 3.36 g, sodium chloride 22.5 g, distilled water 1 l, pH 7.5, Bachere *et al.*, 1991)로 내부를 적신 1 ml의 멸균 플라스틱주사기에 23G 주사침을 부착하여 폐각의 홈집을 통해 후폐각근에 삽입하여 채혈하였다.

형태학적 관찰

바지락 4마리에서 채혈한 혈구를 미리 준비해 둔 슬라이드글라스에 한방울 적하시키고 무염색 상태로 위상차현미경으로 관찰하였다.

또 채혈한 혈구를 슬라이드글라스에 적하시키고 습윤상자에 넣어 25°C에서 30분간 방치한 다음 여과멸균해수(0.25 μm filtered seawater, FSW)로 미부착 혈구를 제거한 다음 2.5% glutaraldehyde-seawater액으로 5분간 고정 한 후 Giemsa액에 25분간 염색하여 혈구의 크기와 형태를 측정하였다.

형태적 관찰을 위한 또 다른 방법으로 채취한 혈구를 MAS와 1:3으로 혼합하여 실리콘 코팅된 시험관(직경 13 mm)에 옮겨 Pasteur pipette으로 흡인 분출을 반복하여 혼합한 후 부유세포수집기(Tomy Seiko Co., Japan)로 800 rpm, 2분간 실온에서 원심하여 슬라이드글라스에 부착시킨 다음 May-Grunwald Giemsa로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

초미세구조의 관찰

혈구를 MAS액과 1:1로 혼합하여 실리콘 코팅된 시험관에 옮기고 원심분리(3,000 rpm, 5 min)하여 상청액을 버린 다음, 상법에 따라 6.25% glutaraldehyde액과 1% osmium tetroxide액으로 전고정과 후고정을 한 다음 0.1 M cacodylate buffer액으로 원심세척을 하여 혈구의 침전부분만 남기고 상청액을 버렸다. 혈구를 2% 한천 내에서 고화시키고 알콜계열로 탈수한 다음 침투작업을 실시하고 60°C, 3일간 중합을 실시하였다. 제작된 block은 ultramicrotome(Reicher tultract E, Leica Co., Austria)로 초박편을 만든 다음 uranyl acetate와 lead citrate의 이중염색을 실시한 후 투과전자현

미경(TEM, JEM-1200EX-II, JEOL Co., Japan)으로 초미세구조를 관찰하였다.

식작용

4마리의 바지락에서 채혈한 혈구를 MAS와 1:3의 비율로 혼합하고 혈구계산판으로 계수하여 혈구의 농도가 1×10^6 cell/ml가 되도록 조정하였다. 1,200 rpm, 10 min간 원심분리하여 MAS를 제거한 다음 여과멸균해수(FSW)를 가하였다(Bachere *et al.*, 1991). FSW에 40 mg/ml의 농도로 부유시킨 Zymosan(Sigma, USA)을 100°C에서 30분간 가열한 후 원심세척한 다음 동량의 FSW에 재부유시켜 냉동실(-20°C)에 보관하고 사용시에 FSW로 희석하여 2×10^6 cell/ml로 조정하였다. 혈구부유액(1×10^6 cell/ml)과 Zymosan 현탁액(2×10^6 cell/ml) 각 1 ml를 혼합하여 혈구와 zymosan의 비율이 1:2가 되게 한 다음(Bachere *et al.*, 1991), 진탕배양기에서 25°C, 30분간 반응시켰다. 반응 후 다량의 저온 MAS를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 1,200 rpm, 10분간 원심분리하여 상청을 제거하고 적당량의 MAS에 재부유시켜 부유세포수집기로 800 rpm, 2분간 실온에서 원심하여 슬라이드글라스에 부착시킨 다음 May-Grunwald Giemsa염색을 하고 광학현미경으로 탐식 유무를 조사하였다.

월별 혈구 수

MAS로 내부를 코팅한 주사기로 4마리의 바지락에서 채혈하여 실리콘 코팅된 시험관에 옮긴 다음 MAS로 희석시킨 후 혈구계산판으로 세포수를 계수하였다. 계수 후 MAS로 희석한 다음, 부유세포수집기로 800 rpm, 2분간 원심하여 슬라이드글라스에 부착시키고 May-Grunwald Giemsa염색을 실시하였다. 염색된 혈구를 광학현미경하에서 무작위로 200개를 계수하여 각 혈구의 조성을 전체 혈구 중에 차지하는 각 혈구의 %로써 나타내었다.

결 과

혈구 채취

바지락은 심장이 매우 소형이기 때문에 주사침이 심장을 관통하여 채혈이 불가능하므로 효과적인 채혈법을 강구하기 위하여 후폐각근을 조직학적으로 조사한 결과 Fig. 1과 같이 폐각근의 근섬

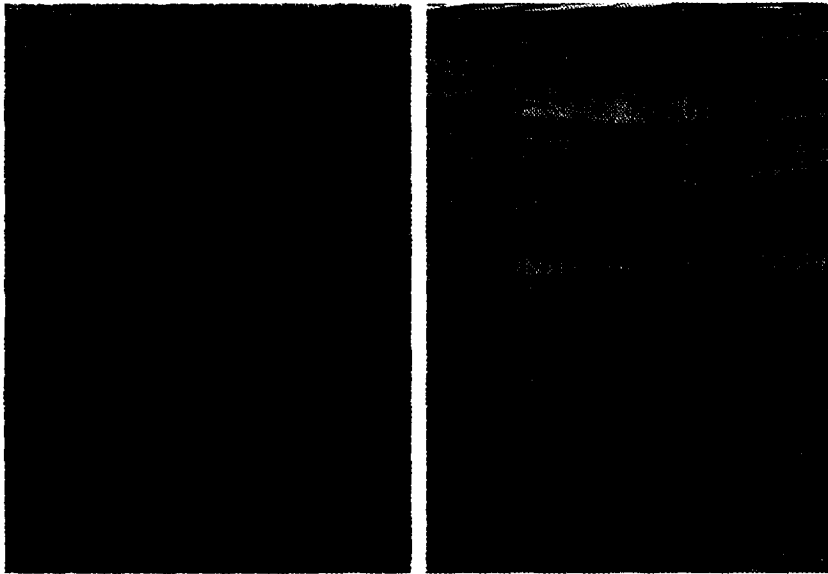


Fig. 1. Microscopic photograph showing the presence of hemocyte (arrows) between the muscle fibers and in the connective tissue of clam (*Ruditapes philippinarum*). H-E, Bar = 0.1 mm

유와 결합조직 사이에는 혈구세포가 다량으로 모여 있음이 확인되었다.

형태학적 관찰

무염색 표본을 위상차 현미경으로 관찰한 결과 3종류의 세포로 대별되었다. 하나는 13 μm 정도의 원형 또는 불규칙의 난원형으로 중앙에 원형의 핵이 있으며 세포질의 바깥쪽으로 위족을 내고 있었다. 위족의 길이는 세포체의 1/3~1/2 정도의 길이

로 매우 투명하였다(Fig. 2). 다른 하나는 9.4 μm 정도의 원형 또는 반구형의 세포와 핵을 가지고 있으며 핵은 세포질의 한 쪽에 편재되어 있었고 핵이 세포의 대부분을 차지하여 세포질은 매우 적었으며 위족의 발달이 매우 미약하고 길이도 짧아 관찰하기 어려운 경우가 많았다(Fig. 3). 또 다른 형태의 세포는 14 μm 이상의 크기로 다른 세포에 비해 크기가 컸으며 내형질 안에 핵과 굴절성의 공포가 관찰되는 것이 특징적이었으며, 위족을 내고 있었다(Fig. 3).

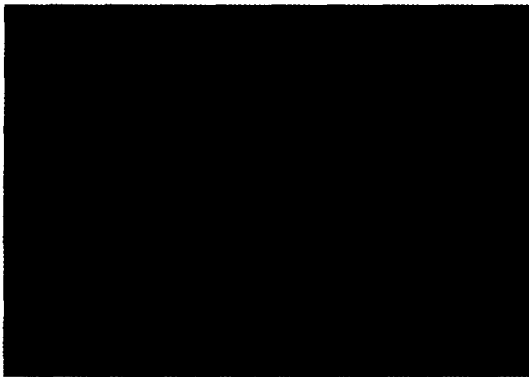


Fig. 2. Photomicrograph of living hemocytes of *Ruditapes philippinarum*. ec: ectoplasm; en: endoplasm; m: nucleus; ps: pseudopodia. (Phase contrast). Bar = 10 μm

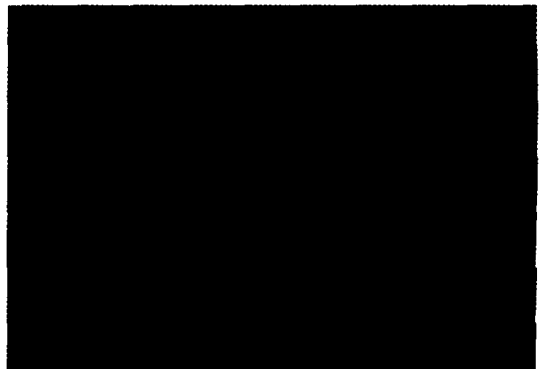


Fig. 3. Photomicrographs of living hemocytes of *Ruditapes philippinarum*. c: cytoplasm; f: filopodia; n: nucleus; v: vesicle. (Phase contrast). Bar = 10 μm



Fig. 4. Photomicrograph of *Ruditapes philippinarum* hemocytes. 1. Basophilic granulocyte, 2. Acidophilic granulocyte. 3. Hyalinocyte. ag: acidophilic granule; bg: basophilic granule; c: cytoplasm; n: nucleus; ps: pseudopodia (Glutaraldehyde fixed, Giemsa stain). Bar = 10 μ m.

염색 표본에서는 세포질내 과립의 유무에 의해 과립이 있는 과립구와 과립이 없는 무과립구로 구분이 되었다(Fig. 4). 과립구는 약 12~14 μ m이며 세포질내에 과립을 가지고 있는 것이 특징이고 내형질과 외형질의 구분이 명확하였으며 과립은 내형질내에 존재하나 외형질에는 존재하지 않았다(Fig. 4). 위족을 생성하였으나 다핵세포는 관찰되지 않았다. 무과립구는 약 10 μ m의 크기이고 세포질에는 과립이 관찰되지 않았다. 핵은 약 6~8 μ m의 크기로 원형 또는 난원형이었으며(Fig. 4), 세포의 중심부에 위치하고 있었고, 무과립구는 과립구에 비해 수가 적었고 크기도 적었다(Fig. 4). 과립구는 과립의 염색성에 의해 호염기성과립구, 호산성과립구와 fibrocyte로 구분되었다(Fig. 4, Fig. 5). 호염기성과립구는 약 12 μ m의 크기이고 세포질내에 호염기성 과립을 가지고 있었다. 핵은 약 7 μ m의 크기로 타원형 또는 원형이었으며 세포의 중심부 또는 가장자리로 편재되어 있었다(Table 1,

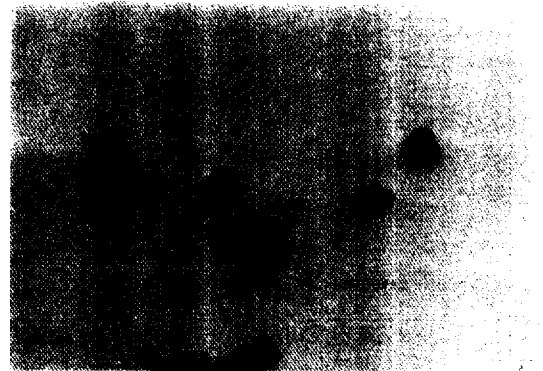


Fig. 5. Photomicrograph of *Ruditapes philippinarum* fibrocyte (Glutaraldehyde fixed, Giemsa stain). Bar = 10 μ m.

Fig. 4). 호산성과립구는 약 14 μ m의 크기이고 내형질내에 호산성 과립을 가지고 있었다. 핵의 크기는 약 7.5 μ m이고 세포질의 가장자리로 편재되어 있었다(Table 1, Fig. 4). Fibrocyte는 약 16~17 μ m의 크기이고 핵과 세포질의 염색성이 다른 세포보다 떨어졌다(Fig. 5).

부유세포수집기로 슬라이드글라스에 부착시킨 혈구를 May-Grunwald Giemsa 염색한 결과, 호염기성과립구와 호산성과립구는 위족을 내 놓았지만 무과립구는 위족을 거의 내지 않았으며 원형의 혈구형태에 세포질은 거의 없고 핵이 거의 대부분을 차지하여 세포질의 비율이 매우 적었다(Fig. 6).

이상과 같이 무염색표본과 도말표본에 의한 바지락의 혈구는 혈구의 모양과 세포질내의 과립의 유무와 염색성에 따라 과립구와 무과립구로 대별되며 과립구는 다시 호염기성과립구, 호산성과립구와 fibrocyte의 3종류로 구분되어졌다.

혈구의 초미세구조 관찰에서 과립구는 원형 또는 난원형이고 핵은 원형 또는 타원형이며 전자 밀도가 높은 공포가 많은 것이 특징이고, 지방액

Table 1. Cell size, nuclear diameters, and nuclear/cytoplasmic ratio (N/C) of *R. philippinarum* hemocytes

	(N=50) Basophilic Gr.	(N=50) Acidophilic Gr.	(N=50) Hyalinocyte	(N=50) Fibrocyte
Cell diameter	12.24 \pm 0.30 μ m (6~14 μ m)	13.74 \pm 0.59 μ m (7~26 μ m)	9.45 \pm 0.17 μ m (5~10 μ m)	16.26 \pm 0.83 μ m (12~20 μ m)
Nuclear diameter	6.80 \pm 0.16 μ m (5~9 μ m)	7.46 \pm 0.25 μ m (6~12 μ m)	6.56 \pm 0.09 μ m (4~8 μ m)	9.92 \pm 0.32 μ m (7~12 μ m)
N/C	0.55 \pm 0.02 (0.51~0.58)	0.54 \pm 0.17 (0.41~0.65)	0.69 \pm 0.01 μ m (0.62~0.73)	0.61 \pm 0.21 (0.58~0.64)



Fig. 6. Photomicrograph of *Ruditapes philippinarum* hemocytes attached onto a slideglass by cytospin. A: adhesion part.; AG: acidophilic granulocyte; BG: basophilic granulocyte; H: hyalinocyte (May-Grunwald Giemsa stain). Bar = 10 μ m.



Fig. 8. Electron micrograph of *Ruditapes philippinarum* hyalinocyte. GL: glycogen granule; M: mitochondria; N: nucleus; RER: rough endoplasmic reticulum; SLV: small lucid vesicle; V: electron-dense vesicle. Bar = 0.5 μ m.



Fig. 7. Electron micrograph of *Ruditapes philippinarum* granulocyte. C: centrosome; L: lipid droplet; M: mitochondria; N: nucleus; V: electron-dense vesicle. Bar = 0.5 μ m.



Fig. 9. *Ruditapes philippinarum* granulocytes phagocytosed zymosan particles (ZY). (Glutaraldehyde fixed, Giemsa stain). Bar = 10 μ m.

포, 위족 및 중심체도 관찰이 되었다(Fig. 7). 무과립구는 원형 또는 타원형이고 핵은 과립구에 비해 크고 핵은 편재되어 있으며 전자밀도가 높은 공포는 과립구보다 적었으나 작은 액상 공포들이 세포질 내에 산재해 있었으며 글리코겐 과립과 조면소포체가 세포질 내에서 관찰되었다(Fig. 8). 무염색표본과 도말표본에서 관찰되었던 fibrocyte는 초미세포본에서는 발견하기 어려웠다.

식작용

과립구는 활발한 탐식능을 가지고 있었는데 혈구당 탐식하는 zymosan 입자의 수는 일정하지 않았고, 같은 계열의 과립구에서도 탐식하는 입자의

수에는 차이가 났다. 한편 무과립구는 탐식능이 매우 미약하였다. 또 호산성과립구가 호염기성과립구보다 활발한 탐식능을 가지고 있었다. Zymosan을 탐식하고 있는 혈구의 핵은 원래의 형태인 타원형이 아닌 편재되어져 관찰되었다(Fig. 9).

월별 혈구 수

총혈구수는 혈액 1 ml당 $1.2\sim 2.1 \times 10^6$ cells가 관찰되었으며 계절별로는 4~7월이 높게 나타났으며, 10~12월이 적어지는 경향이었다. 각 혈구의 조성을 보면 호염기성과립구가 50~60%, 호산성과립구가 25~40%, 무과립구는 8~20%로 호염기성과립구의 비율이 가장 많았으며 다음으로 호산성과립구, 무과립구의 순이었다(Fig. 10). Fibrocyte는 관찰하기 매우 힘들었다.

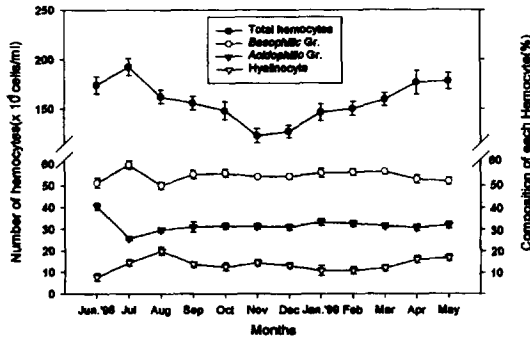


Fig. 10. Changes in hemocyte number and composition of each hemocyte.

고 찰

대형패류나 무척추동물의 혈구는 심장에서 채혈하는 것이 보통이다(Fisher *et al.*, 1987; Alvarez *et al.*, 1989; Bachere *et al.*, 1991; Le Gall *et al.*, 1991). 그러나 바지락과 같은 소형 패류에서는 주사침이 심장을 관통하여 채혈이 불가능하였다. 그래서 효과적인 채혈방법을 찾기 위해 후폐각근을 조직학적으로 조사한 결과 굴(Galtsoff, 1964)과 마찬가지로 혈구가 근섬유와 결합조직 사이에 모여 있어 후폐각근 부위에 주사기를 삽입하여 채혈하는 방법이 가장 효과적이었다. 또 이러한 방법은 칼로 후폐각근을 절단하여 후폐각근을 노출시킨 후 채혈하는 것보다 바지락에 스트레스를 주지 않을 뿐만 아니라 개각시에 유출되는 혈구의 양을 최소화시킬 수 있는 효과적인 채혈방법이라 생각되었다.

패류 혈구의 분류는 Feng *et al.*(1971)이 버지니아굴의 혈구를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 과립성백혈구와 무과립성백혈구로 나누었고, Cheney(1971)는 *Ruditapes semidecussata*의 혈구를 조사하여 2종류의 혈구인 hyaline leucocyte와 granular leucocyte로 구분하였다. 그리고 Foley & Cheng(1972)은 버지니아굴의 혈구를 크기와 운동성을 기준으로 대형과 소형의 2가지로 분류하였고 대형은 다시 과립구와 fibrocyte로 세분하고 소형의 혈구는 무과립이거나 과립이 약간 존재하는 무과립구(hyalinocyte)로 명명하고 있다. 이처럼 패류의 혈구의 분류는 연구자에 따라 상이한 분류의 기준과 명명을 하고 있었으나 Cheng(1981)이 굴의 혈구를 과립의 유무와 과립의 염색성에 따라 과립구와 무과립구로 나누며 과립구는 다시 호염기성과

립구, 호산성과과립구 및 fibrocyte의 세 종류로 구분한 이후 이 기준에 따라 분류가 행해지고 있다. 본 연구에서도 과립의 유무, 세포의 크기에 따라 과립구, 무과립구 및 fibrocyte로 구분되었으며 과립구는 세포질내의 과립의 염색성에 따라 호염기성과과립구와 호산성과과립구로 구분하였다.

이매패류 혈구의 초미세구조 형태 분류 연구는 버지니아굴(*Crassostrea virginica*), 가리비(*Patinopecten yessoensis*), 포르투갈산 바지락(*R. decussatus*), 담치(*Mytilus galloprovincialis*), 백합(*M. mercenaria*), 넙적굴(*Ostrea edulis*) 등이 연구되어졌다(Foley & Cheng, 1972; Bachere *et al.*, 1991; Tripp, 1992; 장, 1993; Carballal *et al.*, 1997A; Lopez *et al.*, 1997A). 바지락 과립구는 원형 또는 난원형으로 핵은 원형 또는 타원형이었고 전자밀도가 높은 공포가 현저하게 많았으며 지방액포, 위축 및 중심체가 관찰되었다. 이것은 Cheng & Foley(1975)와 Lopez *et al.*(1997A)의 결과가 동일하였다. 전자밀도가 높은 공포는 Cheng & Foley(1975)의 연구보다 더 많았고 핵의 크기 또한 더 컸으나 지방액포는 적었다. 무과립구는 핵이 세포체에 비해 상당히 컸으며 과립구에서 관찰되었던 전자밀도가 높은 공포는 현저하게 적었다. 그리고 소형액상공포가 세포질내에 산재하고 있었으며, 글리코겐 입자가 관찰된 것과 조면소포체가 관찰된 것도 과립구와의 차이점이었다. 이와 같이 무과립구도 Cheng & Foley(1975)의 결과와 동일하였으나 큰지방액포는 관찰되지 않았다.

식작용은 과립구 중에서 호산성과과립구가 호염기성과과립구보다 활발한 탐식능을 가지고 있으며 무과립구는 미약하다는 결과는 Carballal *et al.*(1997B)와 마찬가지로 바지락에 있어서도 식작용에 관여하는 세포는 과립구이며 그 중에서도 호산성과과립구라 생각된다. 이는 Cheng(1981)이 고찰하고 있는 것처럼 호산성과과립구는 호염기성과과립구보다 성숙된 세포로써 생체의 과립구 계열 중에서 방어능력에 중추적인 역할을 담당하는 세포로써 활발한 탐식능력을 하였다고 생각된다.

월별 혈구수의 변화는 수온과 저질온도의 변화가 심한 여름철에 혈구수도 가장 심하게 변했지만 각 혈구의 조성에서 과립구인 호염기성과과립구와 호산성과과립구가 언제나 높은 비율로 나타나 식작용의 능력을 가진 세포가 생체방어의 중추적 역할을

수행한다고 추정되지만 산란기에는 혈구의 탐식능력이 저하된다고(Santarem *et al.*, 1994) 보고되어지고 있기 때문에 계절별의 혈구의 탐식능력에는 차이가 있을 것으로 생각되어진다.

이러한 과립구의 탐식능력과 계절별 혈구의 조성을 통털어 고찰하여 보면 조직 속에서 미숙의 호염기성과과립구가 호산성과과립구보다 적게 나타나는 것은 미숙의 상태에서 조직속으로 들어가 외부의 자극에 의해 기능적 강화를 위해 성숙이 촉진되어질 것으로 추정된다.

이상과 같이 바지락의 혈구는 과립구와 무과립구로 구분되었고, 과립구는 호염기성과과립구, 호산성과과립구 및 fibrocyte의 3종류로 구분할수 있으며, 탐식능이 활발한 과립구가 항상 무과립구보다 많은 양으로 조직내에 존재하기 때문에 이 세포들이 이물질의 배제에 중요한 역할을 수행할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Alvarez, M. R., Friedl, F. E., Johnson, J. S., and Hinsch, G. W.: Factors affecting in vitro phagocytosis by oyster hemocytes. *J. Invert. Pathol.*, 54: 233-241, 1989.
- Auffret, M.: Bivalve hemocyte morphology. *American Fisheries Society Special Publication*, 18: 169-177, 1988.
- Bachere, E., Hervio, D., and Mialhe, E.: Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, 11: 173-180, 1991.
- Carballal, M. J., Lopez, C., Azevedo, C. and Villalba, A.: Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.*, 29 : 127-135, 1997A.
- Carballal, M. J., Lopez, C., Azevedo, C., and Villalba, A.: *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish & Shellfish Immunol.*, 7: 403-416, 1997B.
- Cheney, D. P.: A summary of invertebrate leucocyte morphology with emphasis on blood elements of the manila clam, *Tapes semidecussata*. *Biol. Bull.*, 140: 353-368, 1971.
- Cheng, T. C.: Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 266: 343-379, 1975.
- Cheng, T. C.: Invertebrate blood cells I. Bivalves, Academic Press, New York, 233-300. 1981. Cheng, T. C. and Foley, D. A.: Hemolymph cells of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*: An electron microscopical study. *J. Invert. Pathol.*, 26: 341-351, 1975.
- Choi, K.-S.: Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. in the manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *J. Aquaculture*, 10(3): 227-237, 1997.
- Choi, D.-L., Kwon, J.-N., and Park, S.-W.: Infection and rapid detection of *Perkinsus* sp. in cultured babyneck clam, *Ruditapes philippinarum* from western coast of Korea. *J. Fish Pathol.*, 11(1): 69-76, 1998.
- Feng, S. Y., Feng, J. S., Burke, C. N., and Khairallah, L. H.: Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica*(Mollusca: Pelecypoda). *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 120: 222-245, 1971.
- Fisher, W. S., Auffret, M., and Balouet, G.: Response of European flat oyster(*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture*, 67: 179-190, 1987.
- Foley, D. A. and Cheng, T. C.: Interaction of molluscs and foreign substances: The morphology and behavior of hemolymph cells of the American oyster, *Crassostrea virginica*, in vitro. *J. Invert. Pathol.*, 19: 383-394, 1972.
- Galtsoff, P. S.: The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Chapter VIII. The adductor muscle. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife service*, 64: 152-180, 1964.
- Le Gall, G., Bachere, E., Mialhe, E.: Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific rickettsiales-like organisms. *Dis. Aquat. Org.*, 11: 181-186, 1991.
- Lopez, C., Carballal, M. J., Azevedo, C. and Villalba, A.: Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus*(Mollusca: Bivalvia). *J. Invert. Pathol.*, 69: 51-57, 1997A.
- Lopez, C., Carballal, M. J., Azevedo, C., and Villalba, A.: Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus*(Mollusca: Bivalvia). *Fish & Shellfish Immunol.*, 7: 595-608, 1997B.
- Santarem, M. M., Robledo, J. A., and Figueras, A.: Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. aquat. Org.*, 18: 217-222, 1994.
- Tripp, M. R.: Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invert. Pathol.*, 59: 222-227, 1992.
- 장영진: 가리비, *Patinopecten yessoensis* 혈구의 형태학적 동정과 기능. *한국양식학회지*, 6(1): 1-12, 1993.

The Morphology of the Hemocytes of the Clam, *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia)

Sun-Gu Kang, Sung-Woo Park and Young-Gill Kim

Department of Marine Biomedical Sciences, Kunsan National University, Chunbuk 573-702, Korea

To understand host-defence mechanism of clam(*Ruditapes philippinarum*) hemocyte against foreign materials, classification and their seasonal change in the number were performed. clams collected from a farm in Julpo Bay, Gochang, Chollabuk-Do were used in this experiment. Lots of hemocytes were found between the muscle fibers and connetive tissue of posterior adductor muscle. Hemocytes of *R. philippinarum* were classified into granulocytes and agranulocytes. Granulocytes were composed of three types, basophilic granulocyte, acidophilic granulocyte and fibrocyte in accordance with the staining affinities of their cytoplasmic granules. Fibrocyte has filopodia and vesicle in endoplasm and bigger than other granulocytes in size. Agranulocytes were less in the number and smaller in the size compared to those of granulocytes. Hyalinocytes had no granule in their cytoplasm. The nucleus located in the center of the cell was oval or spherical shaped. In electron microscopic observation, granulocytes and hyalinocytes contained electron-dense vesicles and some small lucid vesicles in their cytoplasm, respectively. Granulocytes phagocytosed more zymosan particles than hyalinocytes. Acidophilic granulocytes showed higher phagocytic ratio than basophilic granulocytes. Total hemocyte numbers showed the highest at April to August and the lowest at October to December. In the composition of each hemocyte, basophilic granulocytes were always more than acidophilic granulocytes and hyalinocytes.

Key words : *Ruditapes philippinarum*, Hemocyte, Classification, Granulocyte, Hyalinocyte