

ウミホタル (甲殻亜門貝虫類) の血球

近藤昌和^{1†}, 友永 進², 高橋幸則¹

Hemocyte of Seed Shrimp, *Vargula hilgendorffii* (Ostracoda, Crustacea)

Masakazu Kondo^{1†}, Susumu Tomonaga² and Yukinori Takahashi¹

Abstract : Morphological and cytochemical characteristics of hemocyte in the seed shrimp, *Vargula hilgendorffii*, were examined by light microscopy. Only a single type of hemocyte (granulocyte) was observed in the hemolymph. This hemocyte was large (18-40 μ m in diameter) and irregular in shape. Two types of round granules, large granule (LG) and small granule (SG) were observed in a hemocyte. The LG was not stained with May-Grünwald nor with HE. The SG was stained with eosin, safranin, methylene blue, toluidine blue, PAS, sudan black B. Phenoloxidase activity (DOPA reaction) was detected in both SG and hyaloplasm. However, the LG was not stained with these stains. These morphological and tinctorial characteristics are compared with those of other crustacean hemocytes.

Key words : crustacea, ostracoda, morphology, hemocyte, granulocyte

緒 言

甲殻類*の血球に関する研究の多くは、軟甲綱真軟綱亜綱十脚目を対象としており、他の動物群における知見は少ない。著者らはこれまでに、鰓脚綱サルソストラカ亜綱無甲目のブラインシュリンプ (*Artemia salina*)^{2,3)}、同目のハウネンエビ (*Branchinellites kugenummaensis*)³⁾、同綱葉脚亜綱背甲目のアジアカブトエビ (*Triops numidicus*)³⁾ および同亜綱双殻目カイエビ亜目のトゲカイエビ (*Leptostheria kawachiensis*)⁴⁾ の血球の形態学的特徴について報告した。また、鰓脚綱鞘甲亜綱蔓脚下綱完胸上目有柄目のエボシガイ (*Lepas anatifera*)⁵⁾、同上目無柄目のアカフジツボ (*Megabalanus rosa*)⁶⁾ および同綱鰓尾亜綱のチョウ (*Argulus japonicus*)⁷⁾ についても、血球の形態を明らかにした。以上の研究の結果から、これらの甲殻類の血球種は1種類であり、細胞質中に顆粒を有することが明らかとなった。しかし、動物種による違いも認められた。血球の形状は、ブラインシュリンプ、ハウネンエビ、アジ

アカブトエビおよびトゲカイエビでは円形または卵円形であるのに対して²⁻⁴⁾、チョウの血球は紡錘形であり⁷⁾、エボシガイとアカフジツボでは偽足を有していた^{5,6)}。また、ブラインシュリンプでは、大型の好酸性顆粒と小型の難染色性顆粒が1血球内に観察されるが^{2,3)}、トゲカイエビでは両染色性顆粒のみが⁴⁾、他の動物種では難染色性顆粒のみが、血球に認められている^{3,5-7)}。さらに、血球中のフェノールオキシダーゼ活性が細胞質基質にのみ検出されるものと(ブラインシュリンプ、エボシガイ、アカフジツボおよびチョウ)^{2,5-7)}、顆粒中のみ認められるもの(トゲカイエビ)⁴⁾が存在した。以上の観察結果から、甲殻類の血球形態および機能は、動物種間において多様であると推察されるが、この仮説を証明するには、さらに多くの動物種について調べる必要がある。

本研究では、鰓脚綱貝虫亜綱ミオドコパ上目に属するウミホタル *Vargula hilgendorffii* の血球形態を明らかにしたのでここに報告する。

2008年9月12日受付。Received September 12, 2008.

※ 本論文における甲殻類の分類体系および用語は文献1に依った。

1 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

2 昇陽学院 (Shouyou Academy, 1614-9 Kiwanami, Ube, Yamaguchi 759-0207, Japan).

† 別刷り請求先 (Corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

材料および方法

実験動物

水産大学校前の吉見湾において2008年5月に冷凍イワシを餌にして採取したウミホタル(全長約4 mm)を用いた。これを水産大学校の飼育施設に搬入し、水温23℃で1週間馴致飼育したのち、実験に供した(12時間明期・12時間暗期)。飼育中は、2日おきに飼育水を半量交換するとともに、市販のブリ用配合飼料(マリン6号, 林兼産業)を給餌した。

生体内の血球観察

ウミホタルをホールスライドガラスに載せ、濾過海水で封入して光学顕微鏡で観察した。

血液塗抹標本の作成

ウミホタルを滅菌海水で洗浄後、ゼラチン処理したスライドガラス上に載せた。これに固定液(2%グルタルアルデヒドと2%パラフォルムアルデヒドを含む0.2Mカコジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)にスクロースを10%添加し、氷冷したものを滴下し、直ちに背甲心臓付近にメスで切り込みを入れ、流出した血液を固定液と混合した。これを前報⁴⁾と同様の方法によって処理し、塗抹標本を作製した。

また、風乾せずに少量のグリセリンで封入した標本を位相差顕微鏡によって観察した。

普通染色

塗抹標本にメイ-グリュンワルド(MG)染色またはヘマトキシリン-エオシン(HE)染色を施して、光学顕微鏡で観察した。

細胞化学的性状

塗抹標本に、前報⁴⁾と同様にして各種細胞化学染色を施した。トルイジンブルー(TB)染色には、蒸留水に溶解した染色液とともに、メタノールに1%溶解した染色液を用いた。メチレンブルー(MB)染色には、Löfflerのアルカリ性MB染色⁸⁾とともに、メタノール溶液(1%)による染色も行った。また、サフラニン染色には、メタノール溶液(1%)と、グラム染色における対比染色に用いるサフラニン液⁸⁾を用いた。フェノールオキシダーゼ検出のためのDOPA反応には、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)にL-β-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine(L-DOPA)を

0.1%溶解した染色液を用いた。これに塗抹標本を23℃で16時間浸漬したのち水洗し、風乾後、合成樹脂で封入した。

結果

生体内の血球観察

ウミホタル生体を生物顕微鏡で観察したところ、体内を循環する血球が認められた。血球形態は卵円形、紡錘形など様々であり、血球周縁は平滑なものから細胞質突起を有するものまで様々であった。また、循環血球が組織に付着する像や、付着している細胞が血液中に遊離する像がしばしば観察された。

位相差顕微鏡観察

流出血液を固定後、位相差顕微鏡で観察したところ、いずれの血球にも多数の顆粒が観察された。しかし、核は識別されなかった(Fig. 1)。

普通染色性および一般形態

ウミホタル血球をMG染色したところ、血球はただ1種類の顆粒球として識別された(Fig. 2-1~2-5)。血球は生体内で観察される場合と同様に不定形であり、長径18.0~40.0 μmと大型であった。核は長径9.0~18.0 μm、短径5.0~9.5 μmの円形または楕円形であり、血球のほぼ中央に位置した。稀に、核膜に凹部が観察された。核内には粒子状のヘテロクロマチンが散在していた。血球中に2種類の顆粒(大型顆粒と小型顆粒)が観察された。大型顆粒は長径約1.0 μmの円形または卵円形であり、蒸留水または種々のpH(pH5.0, 6.0, 7.0, 8.0)のリン酸緩衝液(1/15M)



Fig. 1. A hemocyte of seed shrimp. Phase contrast. Note many cytoplasmic granules. The nucleus is not defined. Bar=10 μm.

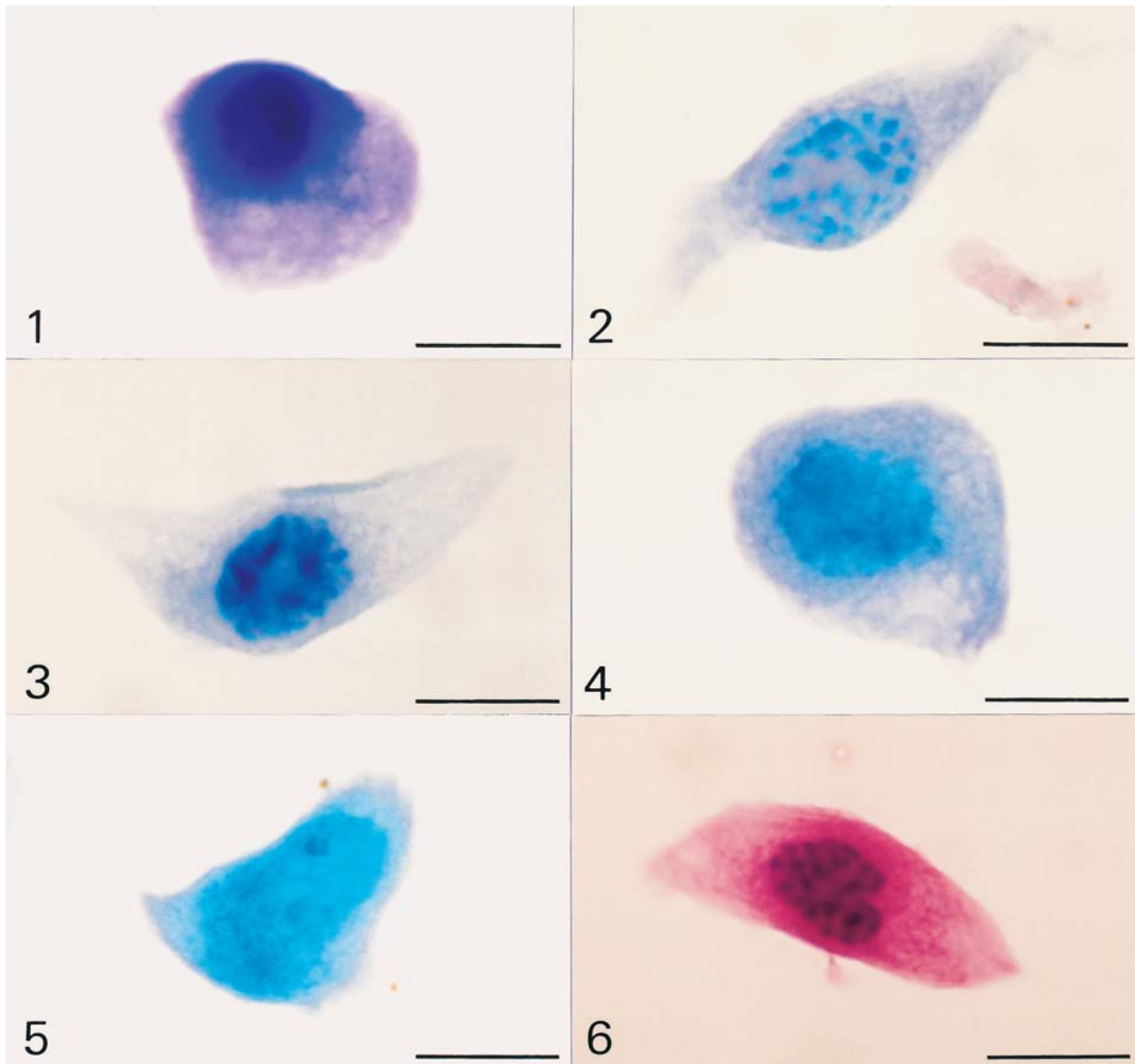


Fig. 2. Light micrographs of seed shrimp hemocytes stained with May-Grünwald (MG) using various solutions (1 - 5) and hematoxylin-eosin (HE) (6). 1, distilled water (pH5.2). 2, phosphate buffer ($1/15$ M, pH5.0). 3, phosphate buffer ($1/15$ M, pH6.0). 4, phosphate buffer ($1/15$ M, pH7.0). 5, phosphate buffer ($1/15$ M, pH8.0). Two types of round granules, large granule (LG) and small granule (SG) were observed in a hemocyte. The SG was stained with MG and HE. However the LG was not stained with these stains. Bars=10 μ m.

を用いたMG染色では明瞭な染色性を示さず、難染色であった。本顆粒はHE染色では、染色されなかった (Fig. 2-6)。小型顆粒は、いずれの条件のMG染色においても淡青色を呈し、直径0.5 μ m未満 (約0.3 μ m) の円形であった。また、HE染色では淡赤色を呈した (Fig. 2-6)。

細胞化学的特性

ウミホタル血球にサフラニン、TBおよびMB染色を施したところ、いずれの溶液を用いても、細胞質基質および小型顆粒が染色されたが、大型顆粒は陽性像を示さなかった

(Fig. 3)。また、periodic acid Schiff反応 (PAS) においても、細胞質基質と小型顆粒が陽性であり、大型顆粒は陰性であった (Fig. 4-1)。 α -アミラーゼ処理したところ、細胞質基質はPAS陰性になったが、小型顆粒には変化は認められなかった (Fig. 4-2)。ズダンブラックB (SBB) 染色でも同様に、大型顆粒は染まらず、細胞質基質および小型顆粒が陽性であった (Fig. 4-3)。DOPA染色では、細胞質基質および小型顆粒が染色されたが、大型顆粒は陽性像を示さなかった (Fig. 4-4)。

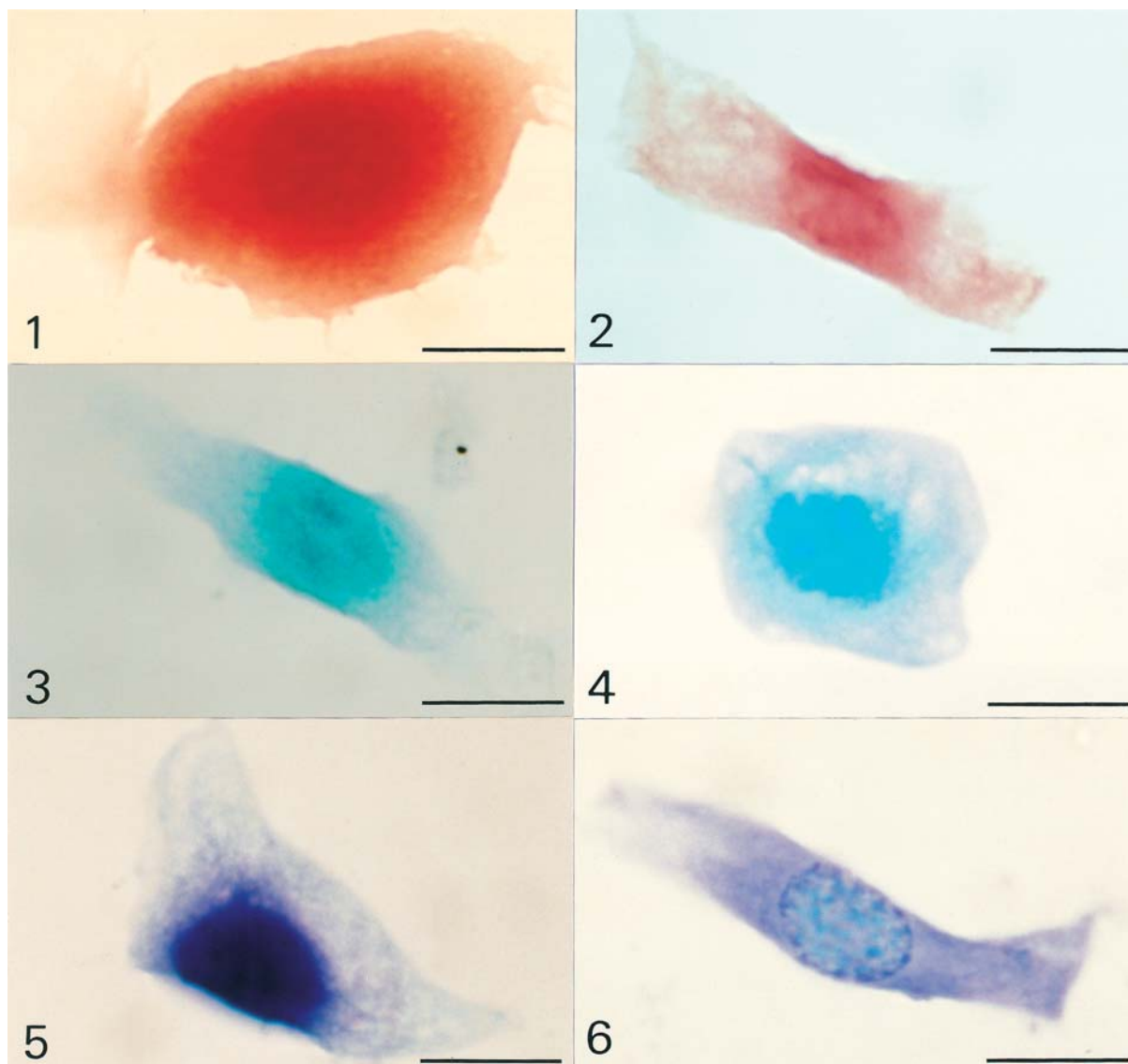


Fig. 3. Cytochemistry of seed shrimp hemocytes. 1, safranin for Gram stain. 2, safranin in methanol. 3, Löffler's methylene blue. 4, methylene blue in methanol. 5, toluidine blue in distilled water. 6, toluidine blue in methanol. The small granule was stained with safranin, methylene blue and toluidine blue. However, the large granule was not stained with these stains. Bars=10 μ m.

考 察

ウミホタルの血球をMG染色したところ、血球は1種類の顆粒球として識別された。このことは、鰓脚綱甲殻類（ブラインシュリンプ、ハウネンエビ、アジアカブトエビ、トゲカイエビ）²⁻⁴ および顎脚綱甲殻類（エボシガイ、アカフジツボ、チョウ）⁵⁻⁷ と同様であった。しかし、他の動物種との違いも認められた（Table 1, 2）。

ウミホタル血球の形状は、時に偽足を有し、不定形であった。ブラインシュリンプ、ハウネンエビ、アジアカブトエビおよびトゲカイエビの血球は、円形から楕円形であ

り²⁻⁴、チョウでは紡錘形である⁷。一方、エボシガイでは、糸状の細胞質突起を有する円形または卵円形であり⁵、アカフジツボでは、偽足を有する不定形である⁶。したがって、ウミホタル血球の形状は、エボシガイやアカフジツボと類似しているといえる。ウミホタル血球の大きさは長径18.0~40.0 μ mであり、ブラインシュリンプ（8.0~13.0 μ m）^{2,3}、ハウネンエビ（7.8~12.9 μ m）³、アジアカブトエビ（6.8~10.0 μ m）³、トゲカイエビ（4.0~7.0 μ m）⁴、エボシガイ（4.9~16.2 μ m）⁵ およびチョウ（8.5~13.0 μ m）⁷ に比べて大型であった。一方、アカフジツボの血球は、長径40 μ mに達すると考えられ⁶、形状だけでなく、

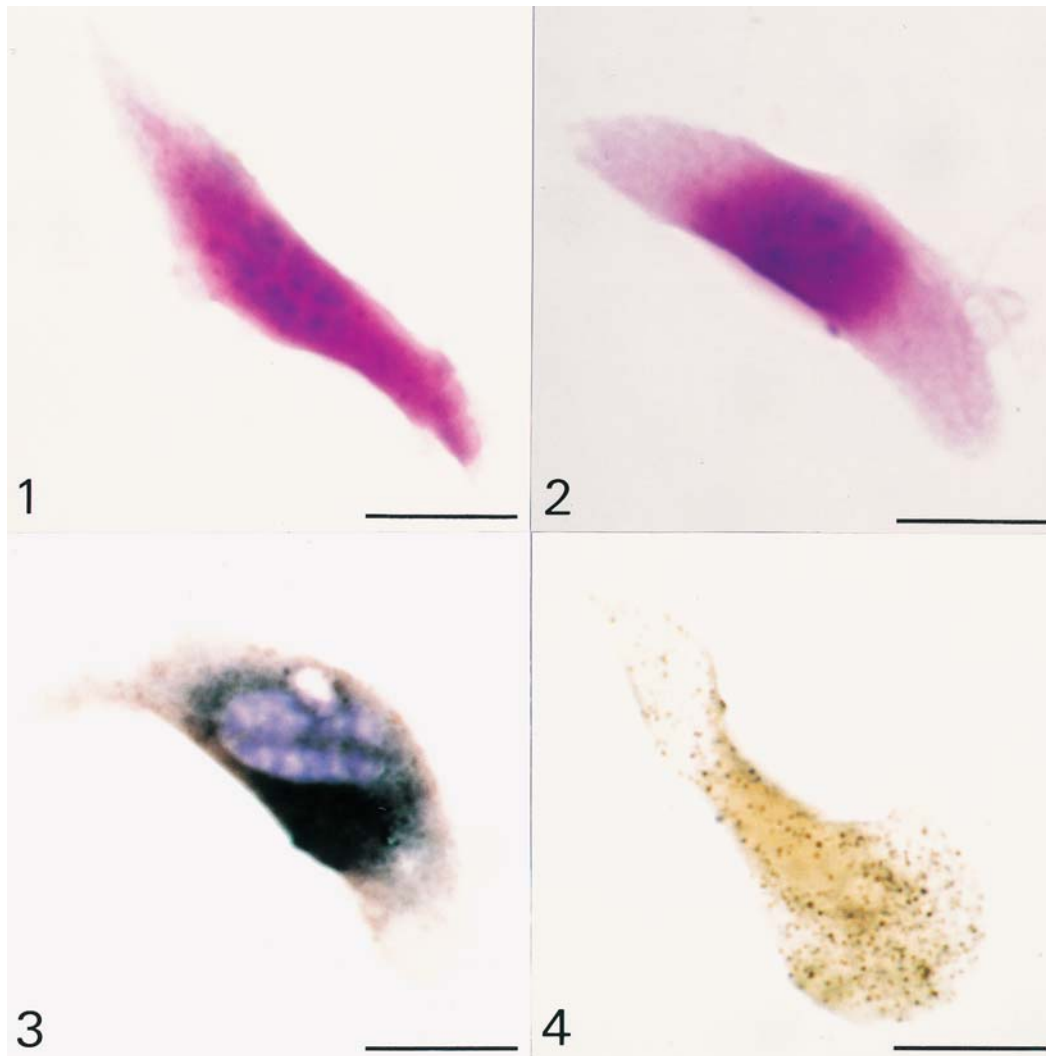


Fig. 4. Cytochemistry of seed shrimp hemocytes. 1, periodic acid Schiff reaction (PAS). 2, PAS after α -amylase digestion. 3, sudan black B. 4, DOPA reaction. The small granule (SG) was stained with PAS and sudan black B. However, the large granule (LG) was not stained with these stains. Phenoloxidase activity (DOPA reaction) was detected in both SG and hyaloplasm, but not in LG. Bars=10 μ m.

大きさからも、ウミホタルとアカフジツボの血球は類似していると思われる。しかし、血球内顆粒の形態学および細胞化学的特徴は、アカフジツボや他の顎脚甲殻類および鰓脚甲殻類と異なっていた。ウミホタル血球には2種類の顆粒（大型顆粒と小型顆粒）が観察された。大型顆粒は、種々の条件下におけるMG染色では明瞭な染色性を示さず、酸性色素にも塩基性色素にも染色されなかったことから、難染性であるといえる。一方、小型顆粒は酸性色素および塩基性色素に染色されることから、両染性であると考えられる。しかし、小型顆粒はMG染色ではいずれの条件下においても好塩基性に染色された。ウミホタルと同様に、顎脚類に属するエボシガイ、アカフジツボおよびチョ

ウの血球は、直径0.5 μ m以下の円形の難染性顆粒のみを有し、顆粒はエオシンで染色されない⁵⁻⁷⁾。また、エボシガイでは、顆粒はTB陰性であり⁵⁾、チョウでは一部の顆粒がTB陽性である⁷⁾。ブラインシュリンプ血球には2種類の顆粒が観察されているが、大型顆粒は長径2.0~3.0 μ mの円形または卵円形で、好酸性を示す^{2,3)}。また、小型顆粒は直径0.5 μ m未満の円形で、TBによって、いくつかの小型顆粒が陽性を示すが、MG染色では難染性である^{2,3)}。ハウネンエビでは長径0.3 μ m以下の、またアジアカブトエビでは直径0.5 μ m以下の円形の難染性顆粒のみが観察されている³⁾。一方、トゲカイエビ血球の顆粒は長径約1.4 μ mの円形または卵円形であり、ウミホタル血球の小型顆粒と

Table 1. Comparison of morphological characteristics of crustaceans hemocytes stained with May-Grünwald

	<i>Vargula hilgendorffii</i> ¹	<i>Argulus japonicus</i> ²	<i>Lepas anatifera</i> ³	<i>Megabalanus rosa</i> ⁴	<i>Artemia salina</i> ⁵	<i>Branchinella kugenumaensis</i> ⁶	<i>Triops numidicus</i> ⁷	<i>Leptostheria kawachiensis</i> ⁸
Cell shape	irregular	oval to spindle	round to oval, with filopodia	irregular, with pseudopodia	oval to ellipsoid	oval to ellipsoid	round to oval	round to oval
size (μm)	18.0~40.0 in length	8.5 ~ 13.0 × 2.5 ~ 6.0	4.9 ~ 16.2 × 4.8 ~ 11.9		8.0 ~ 13.0 × 5.0 ~ 9.0	7.8~12.9 × 4.5~9.0	6.8 ~ 10.0 × 4.6 ~ 7.0	4.0~7.0 in length
Granule staining, shape and size (μm)	Two granule type Small (basophilic), round (<0.5) Large (chromophobic), round (1.0)	One granule type Chromophobic, round (<0.5)	One granule type Chromophobic, round (<0.5)	One granule type Chromophobic, round (0.5)	Two granule type Eosinophilic, round (2) or oval (2~3 × 1~2) Chromophobic, round (<0.5)	One granule type Chromophobic, round (≦0.3)	One granule type Chromophobic, round (≦0.5)	One granule type Amphophilic, round to oval (1.4 in length)
Nucleus Shape	round to ellipsoid	oval to ellipsoid	irregular (round to V-shape)	round to ellipsoid	oval to ellipsoid	round to ellipsoid	round to oval	irregular
Size (μm)	9.0~13.0 × 5.0~9.5	4.3 ~ 5.3 × 1.8 ~ 4.0	4.3 ~ 8.1 × 2.7 ~ 5.4	6.0 ~ 8.0 × 4.5 ~ 6.0	3.0 ~ 6.0 × 2.5 ~ 4.0	3.8~7.5 × 3.0~5.0	3.3~4.8 × 2.0 ~ 3.8	

¹seed shrimp (myodocopa, ostracoda, maxillopoda), present report.²fish louse (arguloida, branchiura, maxillopoda), Kondo *et al.* (2003)⁷.³ship barnacle (pedunculata, thecostraca, maxillopoda), Kondo *et al.* (2002)⁵.⁴balanomorph barnacle (sessilia, thecostraca, maxillopoda), Kondo *et al.* (2003)⁶.⁵brine shrimp (anostraca, sarosostraca, branchiopoda), Kondo *et al.* (2002)².⁶fairy shrimp (anostraca, sarosostraca, branchiopoda), Kondo *et al.* (2002)³.⁷toadpole shrimp (notostraca, phyllopoda, branchiopoda), Kondo *et al.* (2002)³.⁸clam shrimp (diplosthraca, phyllopoda, branchiopoda), Kondo *et al.* (2006)⁴.

Table 2. Comparison of cytochemical characteristics of crustaceans hemocytes

Test*	<i>Vargula hilgendorffii</i> ¹		<i>Argulus japonicus</i> ²		<i>Lepas anatifera</i> ³		<i>Megabalanus rosa</i> ⁴			<i>Artemia salina</i> ⁵			<i>Leptestheria kawachiensis</i> ⁶	
	LG [#]	SG [#]	H [#]	CG [#]	H	CG	H	CG	H	EG [#]	CG	H	AG [#]	H
PAS	— ^s	+	+	ND ^s	+	ND	+	NT	NT	—	—	hyaline + granular +	—	hyaline + granular +
PAS- α A	—	+	—	— or +	— or +	— or +	—	NT	NT	—	—	hyaline + granular —	—	hyaline + granular +
AA	NT ^s	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	—
AB (pH1.0)	NT	NT	NT	—	—	—	—	NT	NT	—	— or +	—	—	—
AB (pH2.5)	NT	NT	NT	— or +	—	—	—	NT	NT	—	—	—	—	—
MB	—	+	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	—
SO	—	+	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	—
TB	—	+	+	— or +	+	—	+	NT	NT	—	— or +	+	+	—
E	—	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	NT	+	—
SBB	—	+	+	— or +	+	+	+	NT	NT	—	— or +	+	+	—
SIII	NT	NT	NT	—	—	—	—	NT	NT	—	—	—	—	—
ORO	NT	NT	NT	—	—	—	—	NT	NT	—	—	—	—	—
PO	—	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	+	+	—

*PAS, periodic acid Schiff reaction; PAS- α A, PAS after α -amylase digestion; AA, azure A; AB, alcian blue; MB, methylene blue; SO, safranin O; TB, toluidine blue; E, eosin; SBB, sudan black B; SIII, sudan III; ORO, oil red O; PO, phenoloxidase (DOPA reaction).

[#]LG, large granule; SG, small granule; CG, chromophobic granule; EG, eosinophilic granule; AG, amphiphilic granule; H, hyaloplasm.

¹NT, not tested; ND, not distinguished granule from hyaloplasm due to strong positive cytoplasm; —, negative; +, positive.

²seed shrimp (myodocopa, ostracoda, maxillopoda), present report.

³fish louse (arguloida, branchiura, maxillopoda), Kondo *et al.* (2003)⁷.

⁴ship barnacle (pedunculata, thecostraca, maxillopoda), Kondo *et al.* (2002)⁵.

⁵balanomorph barnacle (sessilia, thecostraca, maxillopoda), Kondo *et al.* (2003)⁶.

⁶brine shrimp (anostraca, sarosostraca, branchiopoda), Kondo *et al.* (2002)².

⁷clam shrimp (diplostroaca, phyllopoda, branchiopoda), Kondo *et al.* (2006)⁴.

同様に、酸性色素（エオシン）にも塩基性色素（サフラン、TB, MB）にも染色され、両染色であることが報告されている⁷⁾。しかし、トゲカイエビ血球の顆粒は、MG染色に使用する希釈液のpHを変えることによって、好酸性または好塩基性を示すのに対して⁴⁾、ウミホタル血球の小型顆粒は、いずれの条件においてもMG染色では好塩基性に染色されることから、トゲカイエビ血球の両染色顆粒とは異なる。

ウミホタル血球の小型顆粒はPAS陽性であり、大型顆粒は陰性であった。また、 α -アミラーゼ処理しても、小型顆粒の陽性像に変化は認められなかった。一方、ブラインシュリンプの2種類の顆粒はともにPAS陰性であり²⁾、トゲカイエビ血球の顆粒もPAS陰性である⁴⁾。

ウミホタル血球の大型顆粒はSBBによって染色されず、小型顆粒が陽性であった。ブラインシュリンプの大型顆粒は陰性であり、小型顆粒の一部に陽性像が観察されている²⁾。また、トゲカイエビ血球の顆粒はSBBに陽性である⁴⁾。さらに、エボシガイ血球の顆粒はSBB陽性であるが⁵⁾、チョウでは一部の顆粒が陽性である⁷⁾。

ウミホタル血球の小型顆粒と細胞質基質はDOPA染色に陽性であり、大型顆粒は陰性であった。このことは、ウミホタル血球の小型顆粒と細胞質基質中に、フェノールオキシダーゼが存在することを示している。ブラインシュリンプ、エボシガイ、アカフジツボおよびチョウでは、本酵素活性は顆粒には認められておらず、細胞質基質に検出されている^{2, 5-7)}。また、トゲカイエビでは顆粒が陽性であり、細胞質基質は陰性である⁴⁾。

以上のように、ウミホタルの血球は形状および大きさが同じ顎脚綱のアカフジツボに類似するが、血球内顆粒の特性の多くがアカフジツボや他の顎脚甲殻類（エボシガイ、チョウ）および鰓脚甲殻類（ブラインシュリンプ、ハウネンエビ、アジアカブトエビ、トゲカイエビ）とは異なっていた。

ウミホタルを含む貝虫類は、一般に貝虫亜綱として顎脚綱に含まれるが、本綱の単系統性については議論が続いており、貝虫亜綱を独立の綱として扱う考え方もある¹⁾。本

研究結果からも、ウミホタル血球は他の顎脚甲殻類と異なり、2種類の顆粒を有することや、他の顎脚甲殻類血球のDOPA反応陽性部位が細胞質基質であるのに対して、ウミホタルでは細胞質基質と小型顆粒が陽性であること、および鰓脚甲殻類のトゲカイエビ血球の顆粒もDOPA反応陽性であり、ウミホタル血球の小型顆粒と同様に酸性色素と塩基性色素に染まることから、貝虫類と他の顎脚甲殻類は血球形態からも異なる系統と考えられる。

本研究によって、甲殻類における血球形態の多様性がさらに明らかとなった。しかし、形態の違いと血球機能の関係については不明な点が多く残されており、今後明らかにする必要がある。

文 献

- 1) 大塚 攻, 駒井智幸: 甲殻亜門, 石川良輔編 節足動物の多様性と系統. 裳華房, 東京, 172-275 (2008)
- 2) 近藤昌和, 高橋幸則, 友永 進: ブラインシュリンプの血球. 水大校研報, 50, 141-150 (2002)
- 3) 近藤昌和, 高橋幸則, 友永 進: ホウネンエビとアジアカブトエビ (甲殻亜門鰓脚類) の血球. 水大校研報, 51, 31-36 (2002)
- 4) 近藤昌和, 稲川裕之, 友永 進, 高橋幸則: トゲカイエビ (甲殻亜門鰓脚綱貝目) の血球. 水大校研報, 54, 153-157 (2006)
- 5) 近藤昌和, 友永 進, 高橋幸則: エボシガイの血球. 水大校研報, 50, 67-73 (2002)
- 6) 近藤昌和, 友永 進, 高橋幸則: アカフジツボの血球. 水大校研報, 51, 73-78 (2003)
- 7) 近藤昌和, 友永 進, 高橋幸則: 甲殻綱鰓尾類チョウ (*Argulus japonicus*) 血球の形態学および細胞化学的性状. 水大校研報, 51, 45-52 (2003)
- 8) 天児和暢: 顕微鏡的技術と形態学的検査. I 細菌. 微生物学実習提要第2版 (東京大学医科学研究所学友会編), 丸善株式会社, 東京, 1998, pp.7-27.