

ハウネンエビとアジアカブトエビ(甲殻亜門鰓脚類)の血球

近藤昌和^{1*}・高橋幸則¹・友永 進²

Hemocytes of *Branchinellites kugenumaensis* and *Triops numidicus* (Crustacea, Branchiopoda)

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

We examined the morphological features of hemocytes of two branchiopod crustaceans; one is the fairy shrimp, *Branchinellites kugenumaensis* and the other is the tadpole shrimp, *Triops numidicus*. These results were compared with those of another anostracan, *Artemia salina* reported in the previous paper. Only a single type of hemocyte, granulocyte, was observed in the hemolymph of these three species. The hemocyte of fairy shrimp was oval or ellipsoid ($7.8\sim 12.9\times 4.5\sim 9.0\mu\text{m}$) in shape and characterized by small round chromophobic granules ($\leq 0.3\mu\text{m}$). The round or elliptic nucleus ($3.8\sim 7.5\times 3.0\sim 5.0\mu\text{m}$) was euchromatin-rich. Similarly to fairy shrimp, the hemocyte of tadpole shrimp was characterized by round chromophobic granules ($\leq 0.5\mu\text{m}$). The hemocyte was round or oval ($6.8\sim 10.0\times 4.6\sim 7.0\mu\text{m}$), and the nucleus was oval ($3.3\sim 4.8\times 2.0\sim 3.8\mu\text{m}$), euchromatin-rich, and has one or two nucleoli. Lipofusutin-like granules or phagocytosed bacteria were also observed in hemocyte from normal individuals, suggesting the involvement of the granulocyte in phagocytosis.

1 緒言

甲殻類*の血球は生体防御に関与することが知られている²⁻⁴⁾。しかし、研究の多くは軟甲綱十脚目に関する内容であり、他の動物群での報告は少ない。鰓脚綱は、甲殻類の系統進化上、比較的初期に出現したグループと考えられている^{5, 6)}。本綱の化石はデボン紀以降で知られており、地質時代に栄えたグループを含めて3亜綱7目に分類されており、現存種はサルソストラカ亜綱無甲目、双殻亜綱の貝甲目と枝角目およびカルマノストラカ亜綱背甲目の4目に含まれる^{1, 7)}。我々は前報で無甲目のブラインシュリン

プ *Artemia salina* の血球について形態学的特徴を明らかにした⁸⁾。本研究では、無甲目の別種であるハウネンエビ *Branchinellites kugenumaensis*⁹⁾ と背甲目アジアカブトエビ *Triops numidicus*⁹⁾ の血球についてその一般の形態をメイ-グリュンワルド染色によって明らかにし、ブラインシュリンプ血球との比較を行ったので、ここにその結果を報告する。

2 材料および方法

2.1 実験動物

本実験には無甲目のブラインシュリンプ *Artemia*

2002年5月22日受付。Received May. 22. 2002.

- 1 水産大学校生物生産学科(Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagatahonmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).
- 2 山口大学医学部保健学科(Faculty of Health Sciences, Yamaguchi University School of Medicine, 1144 Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8554, Japan).

*別刷り請求先(Corresponding author).

* 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。

Table 1. Summary of morphological characteristics of *Artemia salina*, *Branchinellites kugenumaensis* and *Triops numidicus* hemocytes stained with May-Grünwald

	<i>A. salina</i> *	<i>B. kugenumaensis</i>	<i>T. numidicus</i>
Cell shape	oval or ellipsoid	oval or ellipsoid	round or oval
size (length×width, μm)	8.0~13.0×5.0~9.0	7.8~12.9×4.5~9.0	6.8~10.0×4.6~7.0
Granule	Two types	One type	One type
shape and size (diameter)	Eosinophilic round (2 μm) or oval (2~3×1~2 μm) Chromophobic round, <0.5 μm	Chromophobic round, $\leq 0.3 \mu\text{m}$	Chromophobic round, $\leq 0.5 \mu\text{m}$
Nucleus shape	oval or ellipsoid	round, oval or ellipsoid	round or oval
size (length×width, μm)	3.0~6.0×2.5~4.0	3.8~7.5×3.0~5.0	3.3~4.8×2.0~3.8
chromatin	heterochromatin rich	euchromatin rich	euchromatin rich

*Kondo *et al.* (2002)⁹⁾.

salina とホウネンエビ *Branchinellites kugenumaensis*、背甲目のアジアカブトエビ *Triops numidicus* の3種類の成体を用いた。ブラインシュリンプの成体は近藤ら⁹⁾の方法により飼育したものを用いた。ホウネンエビは水産大学校小野臨湖実験実習場（山口県宇部市）の養鯉池で、アジアカブトエビは山口県長門市の水田で自然繁殖したものを採集し、直ちに実験に供した。

2. 2 血液塗抹標本の作製

ブラインシュリンプの血液塗抹標本は近藤ら⁹⁾の方法にしたがって作製した。ホウネンエビおよびアジアカブトエビについては、曝気した上水を濾過滅菌した水で洗浄後、尾部背面を注射針で刺し、傷口から流出した血液を直ちに多量の固定液⁹⁾と混合した。この固定血球懸濁液をAuto Smear CF-12D (Sakura) で遠心し、ゼラチン処理したスライドガラスに血球を付着させたのち風乾して血液塗抹標本とした。また、風乾せずに少量のグリセリンで封入した標本の位相差顕微鏡観察も行った。

2. 3 メイ-グリーンワルド (MG) 染色

塗抹標本を蒸留水で水洗し、風乾した。これにメイ-グリーンワルド液を1.5ml載せて5分間静置した。次いで同量の希釈液を追加混和して10分間染色した。蒸留水で洗浄後、風乾して合成封入剤 (オイキット) で封入し、光学顕微鏡で観察した。希釈液には $1/15$ M リン酸緩衝液 (Sørensen のリン酸緩衝液、pH4.5~8.0)、 $1/15$ M リン酸二水素カリウム水溶液に1 M塩酸を滴下してpH3.0またはpH4.0に調整した液および蒸留水 (pH5.2)¹⁰⁾ を用いた。

3 結果

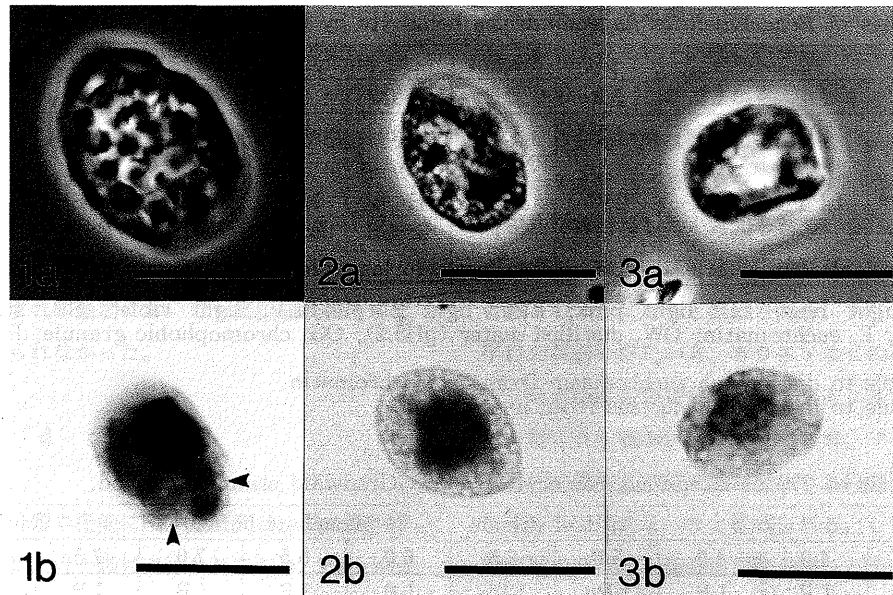
3. 1 ブラインシュリンプの血球

前報⁹⁾と同様に、位相差顕微鏡観察により、ブラインシュリンプの血球には大小様々な大きさで、円形または卵円形の顆粒が豊富に観察された (Fig. 1a)。また、MG染色性から血球は1種類に分類された (Fig. 1b, Table 1)。Table 2に各希釈液を用いた場合のブラインシュリンプ血球のMG染色性を示した。細胞質基質はpH3.0~5.0では淡桃色を呈した。pH5.5およびpH6.0では細胞質基質は淡青を示し、pH6.5~8.0では青色であった。また、蒸留水では淡桃色であった。核は蒸留水を用いたMG染色では全体が濃赤紫色であり、ヘテロクロマチン (以後Hと称す) とオイクロマチン (以後Eと称す) の識別ができなかった。pH3.0ではHが青紫色を、Eが淡赤紫色を示し、pH4.0ではHが青色を、Eが淡青色を呈した。pH4.5~6.5ではHが濃青色に、Eが青色に染色され、pH7.0~8.0ではHが暗青色を、Eが濃青色を呈した。

一方、ブラインシュリンプ血球の細胞質には好酸性顆粒 (EG) と難染色性顆粒 (CG) が観察された (Fig. 1b, Table 1, 2)。EGはpH3.0~6.0では明赤色を示し、pH6.5では淡赤色を、pH7.0では淡桃色を呈したが、pH7.5および8.0では染色されず、無色であった。また、蒸留水を用いたMG染色ではEGは淡桃色であった。CGはいずれの希釈液を用いても染色されず無色であった (Table 2)。

3. 2 ホウネンエビの血球

ホウネンエビの血球には位相差顕微鏡観察により、小型の円形顆粒が豊富に観察された (Fig. 2a)。MG染色性か



Figs. 1-3. Light micrographs of hemocytes from *Artemia salina* (Fig. 1), *Branchinellites kugenumaensis* (Fig. 2), and *Triops numidicus* (Fig. 3). a, phase contrast; b, May-Grünwald stain (pH6.0). Note the eosinophilic granule and chromophobic granule (arrowheads) in *A. salina* hemocyte (Fig. 1b), and chromophobic granule in the hemocytes of *B. kugenumaensis* (Fig. 2b) and *T. numidicus* (Fig. 3b). Perinuclear area in the hyaloplasm of *B. kugenumaensis* hemocyte was eosinophilic (light pink). Bars=10 μm.

Table 2. Properties of *Artemia salina* hemocyte by May-Grünwald staining method.

	pH of diluent (¹ / ₁₅ M phosphate buffer)										
	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	DW
Hyaloplasm	LP	LP	LP	LP	LB	LB	B	B	B	B	LP
Nucleus H	H: V	H: B	H: SB	H: SB	H: SB	H: SB	H: SB	H: DB	H: DB	H: DB	SPu*
E	E:LPu	E: LB	E: B	E: B	E: B	E: B	E: B	E: SB	E: SB	E: SB	
EG	BR	BR	BR	BR	BR	BR	LR	LP	colorless	colorless	LP
CG	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless

B, blue; BR, bright red; DB, dark blue; LB, light blue; LP, light pink; LPu, light purple; LR, light red; SB, strong blue; SPu, strong purple; V, violet; H, heterochromatin; E, euchromatin; DW, distilled water (pH5.2); EG, eosinophilic granule; CG, chromophobic granule.

*It was impossible to distinguish euchromatin from heterochromatin.

ら血球は1種類に分類された (Fig. 2b, Table 1)。血球は、長径7.8~12.9 μm、短径4.5~9.0 μmの卵円形または楕円形であり、核は円形または短楕円形であり、長径3.8~7.5 μm、短径3.0~5.0 μmであった。また、核は細胞の中央または偏在していた。核細胞質比率は様々であったが、多くの場合、核の占める割合が細胞全体の約3割を占めていた。核のクロマチン比 (ヘテロクロマチン(H) : オイクロマチン(E)) は3 : 7~5 : 5であり、E領域が広がった。顆粒状のHが核内に散在していたが、核膜近縁への顕著なHの集合は認められなかった。Table 3に各希釈液を用いたMG染色性を示した。細胞質基質はpH3.0~5.0では淡桃色を示した。pH5.5および6.0では核近縁や核周囲が淡桃色を、その外側の領域は淡青色を呈した。pH6.5~8.0

では細胞質基質はいずれの領域においても淡青色であった。また、蒸留水では淡青紫色を呈した。pH3.0では細胞全体が桃色となり、核と細胞質の区別が困難であった。核全体がpH4.0では淡赤紫色を、pH4.5および5.0では淡青紫色を呈したために、HとEの識別ができなかった。pH5.5~7.0および蒸留水ではHが青色を、Eが淡青色を呈し、pH7.5および8.0ではHが濃青色を、Eが青色を示した。ハウネンエビ血球の細胞質には難染性顆粒 (CG) が観察された (Fig. 2b, Table 1, 3)。CGは直径0.3 μm以下の円形顆粒であり、細胞質全体に密に存在した。CGはいずれの希釈液を用いても染色されず無色であった (Table 3)。

Table 3. Properties of *Branchinellites kugenumaensis* hemocyte by May-Grünwald staining method.

	pH of diluent (¹ / ₁₅ M phosphate buffer)											
	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	DW	
Hyaloplasm	LP	LP	LP	LP	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LV
Nucleus	H: LP(?)** E: LP(?)**	H: LPu* E: LPu*	H: LV* E: LV*	H: LV* E: LV*	H: B E: LB	H: B E: LB	H: B E: LB	H: B E: LB	H: SB E: B	H: SB E: B	H: SB E: B	H: B E: LB
CG	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless

B, blue; LB, light blue; LP, light pink; LPu, light purple; LV, light violet; SB, strong blue; H, heterochromatin; E, euchromatin; DW, distilled water (pH5.2); CG, chromophobic granule; PNA, perinuclear area.

*It was impossible to distinguish euchromatin from heterochromatin.

**It was impossible to distinguish nucleus from hyaloplasm.

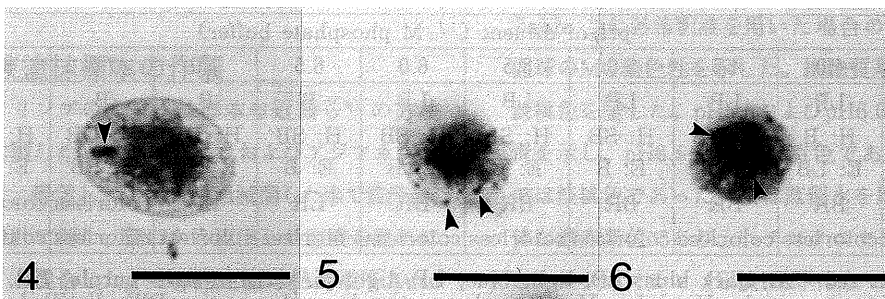
Table 4. Properties of *Triops numidicus* hemocyte by May-Grünwald staining method.

	pH of diluent (¹ / ₁₅ M phosphate buffer)											
	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	DW	
Hyaloplasm	LP	LP	LP	LPu	LPu	LB	LB	LB	LB	LB	LB	LB
Nucleus*	H: LP(?)# E: LP(?)#	H: LP(?)# E: LP(?)#	H: LP(?)# E: LP(?)#	H: N: B E: LB	H: N: B E: LB	H: N: B E: LB	H: N: B E: LB	H: N: B E: LB	H: N: B E: LB	H: N: B E: LB	H: N: B E: LB	H: N: B E: LB
CG	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless

B, blue; LB, light blue; LP, light pink; LPu, light purple; N, nucleolus; DW, distilled water (pH5.2).

*It was impossible to distinguish nucleus from hyaloplasm.

*Almost all chromatin was euchromatin.



Figs. 4-6. Light micrographs of hemocytes from *Branchinellites kugenumaensis* (Fig. 4, 5), and *Triops numidicus* (Fig. 6). May-Grünwald stain (Figs. 4 and 5, pH6.0; Fig. 6, pH6.5). Note phagocytosed bacteria in phagosome (arrowhead in Fig. 4) and lipofusutin-like granules (arrowheads in Figs. 5 and 6). Bars=10 μm.

3. 3 アジアカブトエビの血球

位相差顕微鏡観察により、アジアカブトエビの血球には小型の円形顆粒が豊富に観察された (Fig. 3a)。MG染色性から血球は1種類に分類された (Fig. 3b, Table 1)。血球は、長径6.8~10.0 μm、短径4.6~7.0 μmの円形または卵円形であり、核は円形または卵円形で長径3.3~4.8 μm、短径2.0~3.8 μmであり、細胞の中央またはやや偏在していた。核細胞質比率は様々であったが、多くの細胞では核の占める割合が細胞全体の2~3割ほどを占めていた。核のほとんどがオイクロマチンであり、顆粒状のヘテロクロマチンはまれであった。核内には1~2個の核小

体が観察された (Fig. 3b)。Table 4に各希釈液を用いた場合のMG染色性を示した。細胞質基質はpH3.0~4.5では淡桃色を示した。pH5.0および5.5では淡赤紫色を、pH6.0~8.0および蒸留水では淡青色であった。核はpH3.0~4.5では細胞全体が淡桃色となり、細胞質との区別が困難であった。pH5.0~8.0および蒸留水ではEは淡青色を呈し、核小体は青色であった。アジアカブトエビ血球の細胞質には難染色性顆粒 (CG) が観察された (Fig. 3b, Table 1, 4)。CGは直径0.5 μm以下の円形顆粒であり、細胞質全体に密に存在した。CGはいずれの希釈液を用いても染色されず無色であった (Table 4)。

3. 4 血球の食食作用

いくつかの血球の細胞質中にリポフスチン様の顆粒状構造物が観察された (Fig. 5, 6)。この構造物は、MG染色に染まらず、茶色から褐色を呈した。また、細菌様の粒子を食胞内に含む血球も観察された (Fig. 4)。

3. 5 血液凝固の有無

実験に供したいずれの動物においても流出血液のゲル化や血餅形成は認められなかった。

4 考 察

甲殻類の血球の分類や機能に関する研究は、主に軟甲綱真軟甲亜綱ホンエビ上目十脚目で行われており、Bauchauによる総説²⁾以後、ほとんどの研究報告では種や分類群を問わず^{11,12)}、血球を3種類に分類している。しかし、3種類の血球が、1種類の血球の分化成熟段階を示しているのか否かは明らかではない。Bauchauは原始的な甲殻類と考えられるブラインシュリンプ *Artemia salina* が1種類の血球しか持たないとの報告¹³⁾から、十脚目も同様であると推論し、これを証明するにはさらなる研究が必要であることを指摘している²⁾。しかしながら、甲殻類において血球の種類数が系統進化の過程で保存されてきたか否かは明らかにされていない。

我々も前報でブラインシュリンプ *Artemia salina* に、1種類の血球のみを観察した⁸⁾。また、血球にはMG染色性と大きさの異なる、少なくとも2種類の顆粒が存在することを示した⁸⁾。最近、我々は、コイ *Cyprinus carpio* 好中球顆粒のメイ-グリュンワルド・ギムザ染色性が、染色液の調製に用いる希釈液によって変化することを明らかにした¹⁰⁾。本研究では、染色条件を変えたMG染色を各鰓脚類血球に施して染色性の変化を調べた。その結果、ブラインシュリンプには異なる染色性を示す2種類の顆粒が認められた。また、ホウネンエビとアジアカブトエビはブラインシュリンプと同様にただ1種類の血球のみを有することが明らかとなった。このことは両動物種がブラインシュリンプと同じ鰓脚類に属することからも予想された結果である。しかし、血球の形態学的特徴はブラインシュリンプとは異なっていた。ブラインシュリンプとホウネンエビはともにサルソストラカ亜綱無甲目に属するが、ブラインシュリンプでは2種類の顆粒が観察されたのに対してホウネンエビでは、いずれのMG染色条件においても難染性を示す1種類の顆粒のみが存在した。また、興味深いことに、カ

ルマノストラカ亜綱背甲目アジアカブトエビの血球の顆粒も、ホウネンエビと同様にいずれの条件のMG染色にも難染性であった。このことから、ホウネンエビとアジアカブトエビの血球形態は類似していると言える。

アルテミア (ブラインシュリンプ) とカブトエビは共通の祖先から分岐したと考えられている⁶⁾。しかし、本研究が示すように、血球形態の相違に基づいた場合、系統進化は以下になると推察される。すなわち、背甲目と無甲目の共通の祖先から、ホウネンエビの祖先種とアジアカブトエビの祖先種が分岐し、ホウネンエビはその祖先の血球形態である難染性顆粒を有するが、ブラインシュリンプは進化の過程で血球形態が変化し、好酸性顆粒と難染性顆粒を持つようになったと推察される。したがって、原始的鰓脚類の血球は、難染性顆粒を持つと予想される。これまでに、1種類の血球のみを持つ甲殻類としては、鰓脚綱エボンガイ *Lepas anatifera* が知られており、血球には難染性顆粒のみが観察されている¹⁴⁾。これらのことから、想像上の原始甲殻類では、血球は難染性顆粒球ただ1種類を有し、系統進化の過程で少なくとも鰓脚類まではこの種類の血球が基本型であると予想される。

細胞質中にリポフスチン様の顆粒状物質を持つ血球も観察された。この物質は、血球の食食作用の結果、血球が取り込んだ異物などの残査小体に相当するものと思われる。また、細菌様の粒子が明瞭な食胞内に観察された。このことから鰓脚類の血球は食食能を有すると考えられるが、今後、異物注入実験を行い、食食能を直接調べる必要がある。リポフスチン様物質はエボンガイの血球にも観察されている¹⁴⁾。

十脚甲殻類では、血球から放出されたトランスグルタミナーゼが血漿中の凝固タンパク質 (clottable protein) を架橋して血液はゲル化や血餅形成を引き起こすことが知られている¹⁵⁾。エボンガイの血液はゲル化や血餅形成を起こさないが、体外で血球は急速に脱顆粒と崩壊を起こし、それらに引き続いて顆粒状物質が形成され、それが連鎖状、網目状および塊状に集合することが報告されている¹⁴⁾。しかし、鰓脚類では血液のゲル化や血餅形成は起こらず、また、顆粒状物質の形成も観察されなかった。このことから、想像上の原始甲殻類は血液凝固能を持たなかったと考えられる。

文 献

- 1) 原色検索日本海岸動物図鑑 [II] (西村三郎編), 保育社, 大阪, 1995, pp. 1-490.
- 2) A. G. Bauchau : Crustaceans, in *Invertebrate Blood Cells* (ed. by N.A. Ratcliffe and A. F. Rowley), Vol. 2, Academic Press, New York, 1981, 386-420.
- 3) G. G. Martin and J. E. Hose : Vascular Elements and Blood (Hemolymph), in *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (ed. by F. W. Harrison and A. G. Humes), Vol. 10, Wiley-Liss, New York, 1992, 117-146..
- 4) M. W. Johansson, P. Keyser, K. Sritunyalucksana and K. Söderhall : Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, **191**, 45-52 (2000).
- 5) 椎野季雄 : 節足動物(I) 総説・甲殻類, “動物系統分類学7(上)” (内田 亨監修), 中山書店, 東京, 1964, pp. 86-91.
- 6) M. A. Wills, D. E. G. Briggs and R. A. Fortey : Disparity as an evolutionary index: a comparison of cambrian and recent arthropods. *Paleobiology*, **20**, 93-130 (1994).
- 7) J. W. Martin : Branchiopoda, in *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (ed. by F. W. Harrison and A. G. Humes), Vol. 9, Wiley-Liss, New York, 1992, 25-224.
- 8) 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** (4), 141-150 (2002).
- 9) 長縄秀俊 : 現世の「大型鰓脚類」の分類. 陸水学雑誌, **62**, 75-86 (2001).
- 10) 近藤昌和・安本信哉・高橋幸則 : コイ好中球顆粒のメイ・グルンワルド-ギムザ染色性. 水大校研報, **50** (3), 109-117 (2002).
- 11) M. A. Baracco and G. A. Amirante : Morphological and cytochemical studies of the hemocytes of *Squilla mantis* (stomatopoda). *J. Crustacean Biol.*, **12**, 372-382 (1992).
- 12) L. R. Benjamin and B. L. James : Light and electron microscopy of the hemocytes of *Ligia oceanica* (L.) (crustacea: isopoda). *J. Invertebr. Pathol.*, **49**, 19-25 (1987).
- 13) J. H. Lochhead and M. S. Lochhead : Studies on the blood and related tissues in *artemia* (crustacea: anostraca). *J. Morphol.*, **68**, 593-632 (1941).
- 14) 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** (2), 67-73 (2002).
- 15) K. Sritunyalucksana and K. Söderhall : The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, **191**, 53-69 (2000).