

甲殻綱鰓尾類チヨウ (*Argulus japonicus*) 血球の 形態学のおよび細胞化学的性状

近藤昌和^{1*}・友永 進²・高橋幸則¹

Morphological and Cytochemical Properties of Hemocyte of *Argulus japonicus* (Arguloidea, Branchiura, Crustacea)

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

Only a single type of hemocyte, chromophobic granulocyte, was observed in the hemolymph of the fish louse, *Argulus japonicus* (Branchiura, Crustacea). This cell was ellipsoid or spindle-shaped one and characterized by numerous round granules ($<0.5\mu\text{m}$ in diameter). The granules were not stained with May-Grünwald or hematoxylin-eosin. Some granules were PAS-, alcian blue (pH2.5)-, toluidine blue- and sudan black B- positive. Glycogen was detected in the hyaloplasm. Phenoloxidase (PO) activity was observed in the hyaloplasm, but not in the granules. Lipofusutin-like granules were also found in the hyaloplasm, strongly suggesting that the hemocyte has a phagocytic ability. The hemocytes aggregated and degranulated *in vitro*, but gelation of the hemolymph and clot formation were not induced. Clump of hemocytes was also observed in the wounded site. The process of melanin formation was proceeded in the hemocyte clump. These results suggested that the fish louse has the fundamental cellular immune system of crustaceans such as phagocytosis and PO, but not blood coagulation.

Based on the present results on *Argulus japonicus* and those of other crustaceans previously examined, we make a speculation about the evolutionary process of cellular immune system of crustaceans as follows.

1. In the primitive crustaceans like the branchiopods, a single type of hemocyte is present, which has an ability of the phagocytosis. The hemocyte has agglutinated, if they are wounded, and the melanin formation occurs due to the phenoloxidase activity in the hyaloplasm. However, a gelation of the hemolymph and a clot formation are not induced. The branchiurans in the class Maxillopoda also have a single hemocyte type and immune system like the branchiopods.
2. In advanced crustaceans like the decapods, the hemocytes differentiate into some types. One of them is a modified hemocyte with a phagocytic ability. The system of the blood coagulation are completed due to the gelation of the hemolymph and the clot formation. Moreover, more effective immune system is developed in some more advanced malacostracans, taking the system of phenoloxidase activity in the granules of some hemocytes.
3. Some intermediate types are observed in other crustaceans. The cirripedia in the class Maxillopoda obtains an ability of the system of the blood coagulation, but the other systems remain those like the branchiurans. In the Pedunculata of the same class, however, the hemocyte is a single type and the gelation of the hemolymph and the clot formation do not occur, though with the aggregation of the granular substance, on the other hand, another subclass Apedunculata has an ability of the clot formation and two kinds of hemocytes.

2002年6月28日受付. Received Jun. 28. 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).

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が^{2,4)}, その研究の多くは軟甲綱十脚目を対象としたものであり, 他のグループでの知見は少ない。

チョウ類は鰓尾亜綱に属し魚類に寄生することが知られている^{5, 6)}。本亜綱はフジツボ類を含む鞘甲亜綱, ヒゲエビ亜綱, カイアシ亜綱などとともに顎脚綱を構成する¹⁾。現生甲殻類のうち, 顎脚綱と高等甲殻類である軟甲綱は系統発生上, 共通の祖先から分岐したものと考えられている⁷⁾。一方, 顎脚類の祖先からは, ヒゲエビ類とカラヌス類の共通の祖先と, 他亜綱の祖先がまず分岐し, 後者からは鰓尾亜綱が出現するとともに, ウミホタルを含む貝(形)虫亜綱と鞘甲亜綱の共通祖先がのちに分岐したと考えられている⁷⁾。さらに, 顎脚綱と軟甲綱の共通の祖先は, ブラインシュリンプが属す鰓脚綱と共通の祖先から分岐したとされている⁷⁾。したがって, チョウ類と, 軟甲類, 鞘甲類および鰓脚類の生体防御機構を比較することにより, 甲殻類における防御システムの進化と多様性を予測することができると思われる。

しかし, チョウ類の生体防御機構には不明な点が多く, 血球の構造と機能に関する報告もDebaisieux⁸⁾以後ほとんど見られない。本研究では, チョウ *Argulus japonicus* の血球について形態学的特徴を明らかにするとともに, 細胞化学的性状を調べ, 甲殻類の細胞性防御機構の進化について考察した。

2 材料および方法

実験動物

実験にはコイ (*Cyprinus carpio*) に寄生したチョウの雌成体200個体(背甲長4~5 mm)を用いた。チョウが寄生したコイを屋内水槽(1000 l)に移し, 上水を少量注水しながら通気して飼育した(水温約23°C)。チョウは水槽内で産卵孵化し, 3世代以上の飼育が可能であった。コイをキナルジン(和光純薬, 20 ppm)で麻酔し, 遊離したチョウを実験に用いた。

生体内の血球観察

チョウをホールスライドガラスに載せ, 曝気した上水を濾過滅菌した水(滅菌水)で封入して光学顕微鏡で観察した。

血液塗抹標本の作製

滅菌水でチョウを洗浄後, ゼラチン処理したスライドガラス上に載せ, 周囲の水を吸水除去した。これにグルタールアルデヒドとパラフォルムアルデヒドを含む固定液⁹⁾を1滴滴下して直ちにメスで腹部末端を切除し, 血液を流出させた。チョウを取り除き, この流出血液と固定液をスライドガラス上で混合し, 湿潤箱中で室温にて30分間固定した。これをスライドガラス上に広げて30分間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を位相差顕微鏡で観察した。

普通染色

塗抹標本はメイ-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)染色を行い光学顕微鏡で観察した。

細胞化学的性状検査

塗抹標本に近藤ら^{10, 11)}と同様に各種染色を施し, 血球の細胞化学的性状を調べた。糖質の存否についてはPAS反応, トルイジンブルー(TB)染色およびアルシアンブルー(AB)染色により, 脂質の有無についてはsudan black B(SBB)染色, sudan III染色およびoil red O(ORO)染色で調べた。PAS反応は α -アミラーゼで消化した血球についても行った。また, フェノールオキシダーゼ(PO)の検出はDOPA反応によって行った。

血液凝固の有無と血球の形態変化

腹部末端から流出した血液にカバーガラスを載せ, 位相差顕微鏡により経時的に血液凝固の有無と血球形態の変化を観察した。

損傷部位におけるメラニン形成の観察

損傷部位における血球の防御機能とメラニン色素形成を明らかにするために, 腹部末端を切除後, 水を入れたピーカーに移し, 経時的に採集して損傷部位の顕微鏡観察を行った。

3 結果

チョウの血液中に楕円形または紡錘形の血球が光学顕微鏡下で観察された(Fig. 1)。固定液中に採取した血球も同様の形状であった。位相差顕微鏡観察により, その細胞質には小型の円形顆粒が豊富に観察された(Fig. 2)。血球は, MG染色性に基づいて1種類に分類された(Fig. 4, Table 1)。血球の大きさは, 長径8.5~13.0 μ m, 短径2.5

* 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。

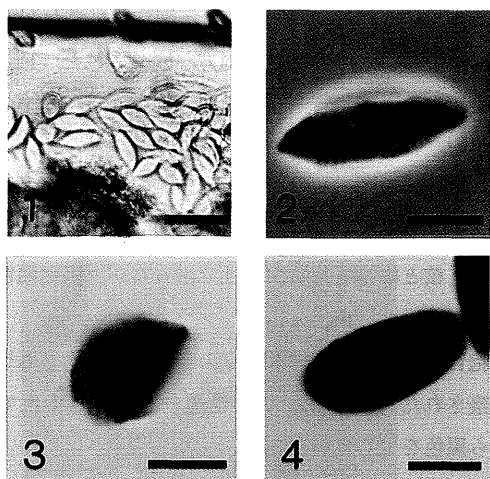


Fig. 1. Many hemocytes in abdomen. Bar=10 μ m.

Fig. 2. Hemocyte, fixed immediately after removal from circulation showing small granules. Bar=5 μ m.

Fig. 3. Hemocyte stained with hematoxylin-eosin. Granules are not stained. Bar=5 μ m.

Fig. 4. Hemocyte stained with May-Grünwald. Granules are chromophobic. Bar=5 μ m.

~6.0 μ mであり、核は卵円形または短楕円形で長径4.3~5.3 μ m、短径1.8~4.0 μ mであり、細胞の中央またはやや偏在していた。核内には顆粒状のヘテロクロマチンが多数散在していたが、核膜近縁への顕著な集合は認められなかった。また、明瞭な核小体も見られなかった。MG染色によって細胞質基質は好塩基性を示し、細胞質に難染性顆粒 (chromophobic granule, CG) が観察された (Fig. 3, Table 1)。CGは直径0.5 μ m以下の円形顆粒であり、

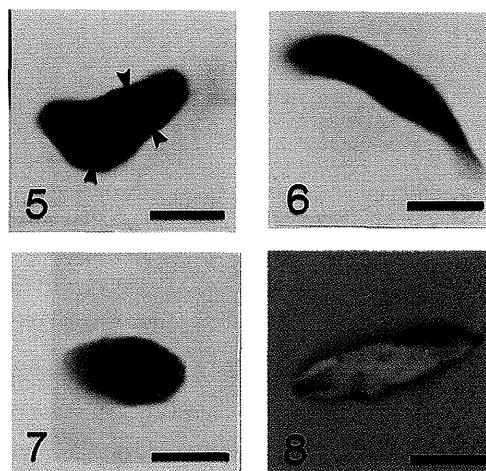


Fig. 5. Hemocyte stained with May-Grünwald containing lipofusutin-like granules (arrowheads). Bar=5 μ m.

Fig. 6. Hemocyte stained with PAS. Bar=5 μ m.

Fig. 7. Hemocyte stained with PAS after α -amylase digestion. Bar=5 μ m.

Fig. 8. Hemocyte stained with alcian blue (pH2.5). Bar=5 μ m.

細胞質全体に豊富に観察されたが、HE染色でもその顆粒は染色されなかった (Fig. 3)。

Table 2にチョウ血球の細胞化学的特徴を示した。血球にPAS染色を施したところ、細胞質全体が陽性であり、陽性部位の詳細は観察できなかった (Fig. 6)。 α -アミラーゼで消化した血球では、比較的細胞膜に近い細胞質のPAS染色性が低下し、陰性顆粒が観察された (Fig. 7)。一方、核周辺ではPAS染色性の低下はわずかであり、陽性

Table 1. Comparison of morphological characteristics of *Argulus japonicus*, *Lepas anatifera** and *Artemia salina** hemocytes stained with May-Grünwald.

	<i>Argulus japonicus</i>	<i>Lepas anatifera</i>	<i>Artemia salina</i>
Cell shape	oval to spindle	round to oval, with filopodia	oval to ellipsoid
size (length \times width, μ m)	8.5~13.0 \times 2.5~6.0	4.9~16.2 \times 4.8~11.9	8.0~13.0 \times 5.0~9.0
Granule staining, shape and size (diameter)	One granule type chromophobic, round, <0.5 μ m	One granule type chromophobic, round, <0.5 μ m	Two granule types eosinophilic, round (2 μ m) or oval (2~3 \times 1~2 μ m) chromophobic, round, <0.5 μ m
Nucleus shape	oval to ellipsoid	irregular (round, oval, kidney, V-shape)	oval to ellipsoid
size (length \times width, μ m)	4.3~5.3 \times 1.8~4.0	4.3~8.1 \times 2.7~5.4	3.0~6.0 \times 2.5~4.0

* Kondo *et al.* (2002)¹⁰⁾.

* Kondo *et al.* (2002)¹¹⁾.

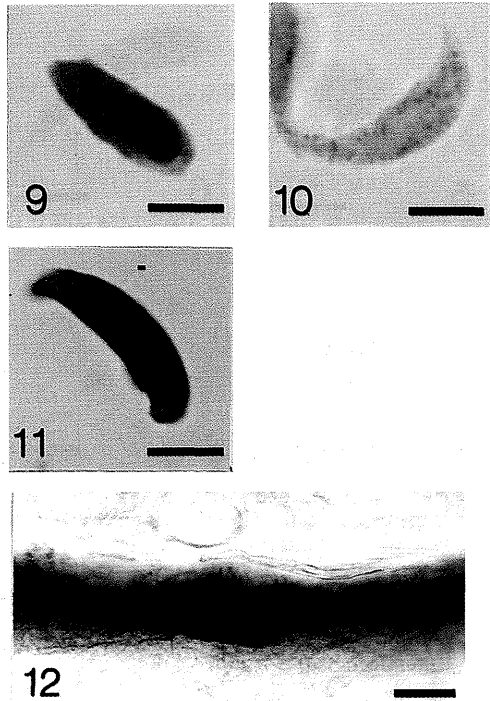


Fig. 9. Hemocyte stained with toluidin blue. Bar= 5 μ m.

Fig.10. Hemocyte stained with sudan black B. Bar= 5 μ m.

Fig.11. Hemocyte stained with DOPA reaction (phenoloxidase detection). Bar= 5 μ m.

Fig.12. Wound repair of posterior part of abdomen one day after injury. Melaniformation of hemocyte clump. Bar=10 μ m.

顆粒も観察された (Fig. 7)。pH1.0でのAB染色では血球は全く染色されなかったが、pH2.5では陽性顆粒が少数観

察された (Fig. 8)。TB染色では、細胞質基質が弱陽性であり、陽性顆粒と陰性顆粒の両方が観察された (Fig. 9)。SBB染色により細胞質基質が微弱に染色され、小型の陽性顆粒が細胞質に散在していた (Fig. 10)。さらに、sudan III染色とORO染色ではそれらの陽性部位は全く観察されなかった。フェノールオキシダーゼを検出するDOPA反応では、核と細胞質基質が陽性であったが、陽性顆粒は観察されなかった (Fig. 11)。

細胞質中に、リポフスチン様の顆粒状構造物をもつ血球も観察された (Fig. 5)。この構造物は、MG染色で濃紺色から黒色を呈していた。

流出血液のゲル化や血餅形成は認められなかった。流出した血球は、体外で円形になり、次いでガラス面に付着して金平糖状に変化した (Fig. 13)。付着1時間後には膜状偽足を伸展し始め (Fig. 14)、2時間後には膜状偽足 (膜状突起, lamellapodia) が細胞全周に広がり、核は細胞の中央に位置していた (Fig. 15)。細胞質には顆粒と脱顆粒した痕跡と考えられる空胞が観察され、膜状偽足には鬚部と考えられる構造も認められた。さらに、血球同士の凝集像も見られ (Fig. 16)、この凝集塊の周囲にも膜状偽足の伸展が観察された (Fig. 17)。

傷口における血球の役割を調べるために、腹部末端を切除したところ、その直後から、傷口に血球が集まり始め、30分後には血球が集塊を形成して傷口を完全に塞いだ。切除6時間後までは集塊に変化は認められなかった。しかし、12時間後には血球集塊が褐色を呈し、メラニン化が進行していることが観察された。この状態は少なくとも5日後ま

Table 2. Comparison of cytochemical characteristics among hemocytes of *Argulus japonicus*, *Lepas anatifera** and *Artemia salina**.

Test*	<i>Argulus japonicus</i>		<i>Lepas anatifera</i>		<i>Artemia salina</i>		
	CG	Hyaloplasm	CG	Hyaloplasm	EG	CG	Hyaloplasm
PAS	ND	+	ND	+	-	-	hyaline + granular
PAS- α A	- or +	- or +	- or +	-	-	-	hyaline + granular -
AB (pH1.0)	-	-	-	-	-	- or +	-
AB (pH2.5)	- or +	-	-	-	-	-	-
TB	- or +	+	-	+	-	- or +	+
SBB	- or +	+	+	+	-	- or +	+
SIII	-	-	-	-	-	-	-
ORO	-	-	-	-	-	-	-
PO	-	+	-	+	-	-	+

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

EG, eosinophilic granule; CG, chromophobic granule.

ND, not distinguished granule from hyaloplasm due to strong positive cytoplasm. -, negative; +, positive.

* Kondo *et al.* (2002)¹⁰.

* Kondo *et al.* (2002)¹¹.

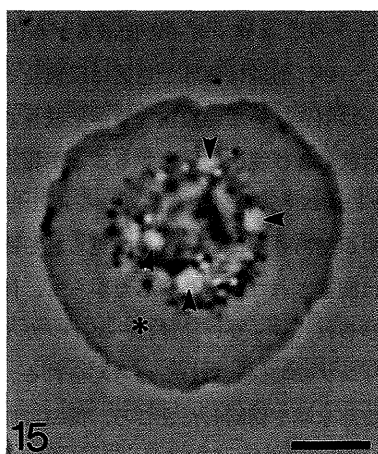
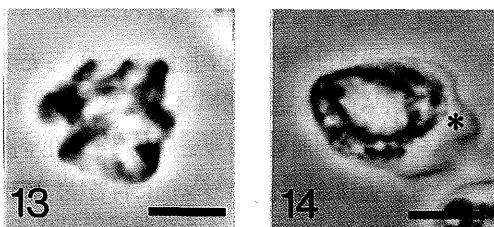


Fig.13. Hemocyte transformed to confetti-shape 30 min after adhesion on glass. Phase contrast. Bar= 5 μ m.

Fig.14. Hemocyte with spread lamellapodia (asterrisk) 1 h after adhesion. Phase contrast. Bar= 5 μ m.

Fig.15. Hemocyte showing lamellapodia (asterrisk) and degranulation (arrowheads) 2 h after adhesion. Phase contrast. Bar= 5 μ m.

で続いた (Fig. 12)

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、Bauchau⁹⁾による総説以後、ほとんどの研究者が血球を3種類に分類している。この分類法は、同綱のトゲエビ亜綱口脚目(シャコ類)や真軟甲亜綱フロエビ上目等脚目といった他の甲殻類にも適用されている^{12, 13)}。しかし、3種類の血球が、1種類の血球の分化成熟過程を示しているのか、全く異なる血球種であるのかについては明らかにされてこなかった。

本研究により、チョウ *Argulus japonicus* には1種類の血球のみが観察されることが明らかとなった。また、血球にはMG染色に難染性の顆粒が観察された。Debaisieux⁸⁾は、ブアン-アルコール固定した *Argulus foliaceus* の組織切片に、ヘマトキシリン-エオシン染色を施して血球を

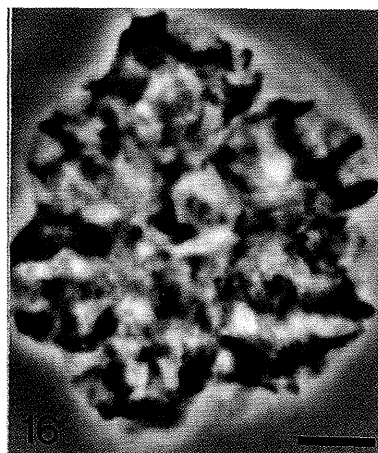


Fig.16. Aggregated hemocytes 1 h after adhesion. Phase contrast. Bar= 5 μ m.

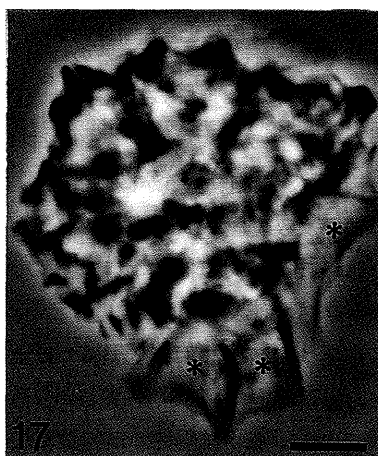


Fig.17. Aggregated hemocytes with spread lamellapodia (asterrisks) 2 h after adhesion. Phase contrast. Bar= 5 μ m.

観察しているが、血球の種類数や顆粒の染色性については触れていない。また、Overstreetら⁵⁾は透過型電子顕微鏡を用いて *Argulus maculosus* の結合組織に血球(顆粒血球, granular hemocyte)を観察し、血球は円滑で紡錘形または西洋ナン型であること、その形状は固定や存在場所(組織間または血洞)に依存すること、血球のいくつかは多形核(polymorphic nucleus)を有することを報告している。しかし、顆粒の形態学的特徴については言及していない。これまでに、1種類の血球のみを持つ甲殻類としては、鰓脚類のブラインシュリンプ *Artemia salina* と鞘甲類のエボシガイ *Lepas anatifera* が知られている^{10, 11, 14)}。ブラインシュリンプの血球はMG染色性と大きさの異なる2種類の顆粒(大型の好エオシン性顆粒と小型の難染性顆粒)を有するが¹¹⁾、エボシガイの血球には難染性顆粒のみが存在する¹⁰⁾。チョウの血球も難染性の顆粒のみを持つことから、エボシガイの血球に類似していると考えられる。

チョウの血球にPAS染色を施したところ、細胞質全体が陽性に、 α -アミラーゼで消化した血球では、細胞質の比較的細胞膜に近い領域で、陰性顆粒が観察された。ブラインシュリンプの血球には微細なPAS陽性顆粒が見られるが、これはグリコーゲン粒子が多数集合したものと考えられており、 α -アミラーゼ耐性のPAS陽性顆粒は観察されていない¹⁰⁾。一方、エボシガイの血球にも細胞質に豊富なグリコーゲンの存在が知られているが、顆粒状の陽性部位は認められておらず、PAS陽性顆粒とPAS陰性顆粒の2種類が存在し、陽性顆粒は核周囲にのみ認められている¹⁰⁾。したがって、PAS染色性からも、チョウの血球はエボシガイの血球に類似していると思われる。しかし、SBB染色では、チョウ血球の細胞質基質が微弱に染色され、小型の陽性顆粒が細胞質に散在しているのに対して、エボシガイ血球の顆粒はSBB陽性であるが、陰性顆粒の存在は報告されていない¹⁰⁾。一方、ブラインシュリンプの血球はチョウの血球と同様に、細胞質基質が微弱に染色され、小型のSBB陽性顆粒が多数観察されている¹¹⁾。したがって、SBB染色性からは、チョウの血球はエボシガイの血球よりもブラインシュリンプの血球に類似していると思われる。

チョウの血球はAB染色では、pH1.0では全く染色されなかったが、pH2.5では小型の陽性顆粒が少数観察された。また、TB染色では、核が強陽性、細胞質基質が弱陽性であり、小型の陽性顆粒と陰性顆粒の両方が観察された。ブラインシュリンプの血球にはpH2.5ではAB陽性部位は見られず、pH1.0で小型の陽性顆粒が観察されている¹¹⁾。また、ブラインシュリンプの血球には小型のTB陽性顆粒も観察されているが、陰性の小型顆粒も観察されている¹¹⁾。一方、エボシガイの血球にはABおよびTB陽性顆粒は認められていない¹²⁾。したがって、チョウ、ブラインシュリンプおよびエボシガイは、ともに、1種類の血球を有するが、そのABおよびTB染色性は互いに異なると言える。

細胞質中に茶色の顆粒状物質を持つ血球も観察された。この物質はリポフスチン様物質と考えられ、血球の貪食作用の結果、血球が取り込んだ異物などの残渣小体に相当するものと思われる。Debaisieux⁸⁾も*A. foliaceus*の組織切片上で、食細胞のように見える血球を観察しているのでチョウの血球は貪食能を有すると推察される。リポフスチン様物質はブラインシュリンプやエボシガイの血球にも見られているので^{10, 11)}、1種類の血球を持つ甲殻類では、血球は貪食能を有するものと考えられる。一方、高等甲殻類である十脚類では動物種によって貪食性血球の種類は様々であり¹⁵⁻²¹⁾、統一を見ない。このことは、十脚類内の系統

進化と関連しているのかもしれない。

チョウの流出血液は、ゲル化や血餅形成といった多くの甲殻類で知られる血液凝固反応²²⁾を起こさなかった。ブラインシュリンプの血液もチョウと同様にゲル化や血餅形成を起こさず、血球は体外でガラス面に付着後、膜状偽足を伸展させ、緩やかに顆粒を消失(脱顆粒)することが知られている¹¹⁾。一方、エボシガイの血液もゲル化、血餅形成を起こさないが、血球は体外で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¹⁰⁾。チョウの血球も、体外では脱顆粒を起こしたが、その反応は緩やかであり、エボシガイで見られる様な顆粒状物質の形成は観察されなかった。したがって、体外での形態変化の面からは、チョウの血球は、エボシガイよりもブラインシュリンプに類似していると考えられる。

チョウの腹部末端を切除したところ、傷口に血球が凝集塊を形成して傷口を完全に塞ぐとともに、血球凝集塊のメラニン化が観察された。しかし、その色調は褐色であった。ブラインシュリンプでも傷口に血球が凝集塊を形成し、メラニン化を起こすことが知られているが¹¹⁾、形成された色素は黒色である。チョウとブラインシュリンプとの間にこのような色調の違いが見られた理由は明らかではないが、損傷部位における治癒機構は両動物で類似していると考えられる。一方、エボシガイでは切除部分にメラニン形成は認められていない¹⁰⁾。このことから、チョウの損傷治癒過程は同じ顎脚綱に属するエボシガイよりも鰓脚綱のブラインシュリンプに近いと考えられる。

POは節足動物で特に発達した生体防御を担う酵素であり、甲殻類では十脚目で詳細に調べられている²²⁾。DOPA反応において、チョウ血球の細胞質基質が陽性であったが、陽性顆粒は観察されなかった。ブラインシュリンプとエボシガイの血球にも細胞質基質中にも酵素反応が認められるが、顆粒中には検出されていない^{10, 11)}。したがって、1種類の血球を持つ甲殻類では、POは細胞質基質に局在していると推察される。十脚目のPO陽性部位は研究者や動物種の違いによって様々である^{9, 16, 19, 23-26)}。このことは、前述の十脚類における貪食性血球の多様性と同様に、十脚類の系統進化に関連していると推察される。また、多くの研究者は、十脚類のPOおよびその活性化系が血球の脱顆粒にともなって血球外に放出され、液相中で反応が起こると考えている^{22, 27, 28)}。しかし、全ての十脚類または甲殻類でその仮説が成り立つか否かは明らかではない。チョウやブラインシュリンプの損傷治癒過程において、血球凝集塊が

メラニン化したのは血球内のPOが働いているためと考えられる。したがって、POが血球外に放出されることは、これらの生物にとって生体防御上有益ではない。このことは、PO活性が血球の細胞質基質に限定されることと関連があると思われる。すなわち、顆粒中にPOが存在しないのであれば脱顆粒にともなうPOの放出はあり得ない。Kondoら⁹⁾および Tsing ら²⁶⁾はクルマエビのPO活性を顆粒細胞の細胞質基質にのみ認めている。クルマエビは十脚目の中では原始的なグループに属すと考えられており²⁹⁾、PO活性がチョウやブラインシュリンプなどの原始的甲殻類と同様に細胞質基質中にのみ見られることは、クルマエビにおけるPOの役割も原始的な側面を強く持つと推察される。

甲殻類における血球の種類数の違いは血球機能の進化に関連すると予測される。特に、血液凝固の有無とその反応様式、肉食性血球の種類およびPOの存在部位はこの予測を検証する上で有用な指針となると考えられる。チョウならびに既報の甲殻類の血球のこれらの特性から推測して、甲殻類全体の生体防御機構の進化に関する次のような仮説を提案したい。

1. 原始的な甲殻類は1種類の血球しか持たず、血球は食食能を有するとともに、体の損傷部位には血球凝集塊が形成され、血球の細胞質基質中のPOによるメラニン化が起こるが、血液のゲル化や血餅形成は起こさない。

2. 顎脚綱の鰓尾亜綱においては、1のような原始的防御機構を有するが、同綱鞘甲亜綱の蔓脚類では血球機能に新たに血液凝固系が加わる。しかし、原始的蔓脚類であるエボンガイでは血球種は1種類であり、顆粒状凝集物の形成はあるものの血液のゲル化や血餅形成は起こさない。一方、高等蔓脚類のフジツボでは血餅形成能を有し³⁰⁾、血球数の複数化(2種類)が起こる³⁰⁾。

3. 高等甲殻類の軟甲類では専門的食食性血球の出現、体液のゲル化や血餅形成などの血液凝固能の獲得、血球種類数の複数化が起こる。さらに、軟甲類内の進化とともにPOおよびその活性化系を顆粒内に含み、より効率的な液性防御機構として利用するようになった。

以上の仮説を証明するために、他の甲殻類についてさらに研究を行っていく考えである。

5 謝 辞

仏語の文献を翻訳していただいた入江珠子氏にお礼申し上げます。

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) R. M. Overstreet, I. Dykova and W. E. Hawkins: Branchiura. in "Microscopic Anatomy of Invertebrates Vol. 9" (ed. by F. W. Harrison and A. G. Humes), Wiley-Liss, New York, pp. 385-413 (1992).
- 6) R. J. G. Lester and F. R. Roubal: Phylum Arthropoda. in *Fish Disease and Disorders Vol. 1* (ed. By P. T. K. Woo), CAB International, Wallingford, 1995, pp. 475-598.
- 7) 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).
- 8) P. Debaisieux: Histologie et histogenese chez *Argulus foliaceus* L. (crustace, branchiure). *La Cellule*, **55**, 245-290 (1953).
- 9) M. Kondo, T. Itami, Y. Takahashi, R. Fujii and S. Tomonaga: Ultrastructural and cytochemical characteristics of phagocytes in kuruma prawn. *Fish Pathol.*, **33**, 421-427 (1998).
- 10) 近藤昌和・友永 進・高橋幸則: エボンガイの血球. 水産大学校研究報告, **50(2)**, 67-73 (2002).
- 11) 近藤昌和・高橋幸則・友永 進: ブラインシュリンプの血球. 水産大学校研究報告, **50(4)**, 141-150 (2002).

- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) J. H. Lochhead and M. S. Lochhead : Studies on the blood and related tissues in artemia (crustacea anostraca). *J. Morph.*, **68**, 593-632 (1941).
- 15) V. J. Smith and K. Söderhäll : Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell Tissue Res.*, **233**, 295-303 (1983).
- 16) M. W. Johansson and K. Söderhäll : Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiol.*, **156B**, 175-181 (1985).
- 17) K. Söderhäll, V. J. Smith and M. W. Johansson : Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.*, **245**, 43-49 (1986).
- 18) J. E. Hose and G. G. Martin : Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **53**, 335-346 (1989).
- 19) J. E. Hose, G. G. Martin and A. S. Gerard : A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol. Bull.*, **178**, 33-45 (1990).
- 20) H. H. Sung, P. A. Kou and W. Y. Kao : Effect of lipopolysaccharide on *in vitro* phagocytosis by hemocytes from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Fish Pathol.*, **35**, 109-116 (2000).
- 21) 近藤昌和・松山博子・矢野友紀 : クルマエビ血球の貪食作用に及ぼすレクチンのオプソニン効果. 魚病研究, **27**, 217-222 (1992).
- 22) K. Sritunyalucksana and K. Söderhäll : The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, **191**, 53-69 (2000).
- 23) J. E. Hose, G. G. Martin, V. A. Nguyen, J. Lucas and T. Rosenstein : Cytochemical features of shrimp hemocytes. *Biol. Bull.*, **173**, 178-187 (1987).
- 24) T. Unestam and J.-E. Nylund : Blood reactions in vitro in crayfish against a fungal parasite, *Aphanomyces astaci*. *J. Invertebr. Pathol.*, **19**, 94-106 (1972).
- 25) H. Lanz, V. Tsutsumi and H. Aréchiga : Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Dev. Comp. Immunol.*, **17**, 389-397 (1993).
- 26) A. Tsing, J.-M. Arcier and M. Brehélin : Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry, and hemograms. *J. Invertebr. Pathol.*, **53**, 64-77 (1989).
- 27) K. Adachi, T. Hirata, K. Nagai, S. Fujisawa, M. Kinoshita and M. Sakaguchi : Purification and characterization of prophenoloxidase from kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fisheries Science*, **65**, 919-925 (1999).
- 28) K. Adachi, T. Hirata, S. Fujisawa, K. Nagai and M. Sakaguchi : Effects of β -1,3-glucan on the activation of prophenoloxidase cascade in *Penaeus japonicus* hemocyte. *Fisheries Science*, **65**, 926-929 (1999).
- 29) B. E. Felgenhauer and L. G. Abele : Phylogenetic relationships among shrimp-like decapods, in "Crustacean issues 1, Crustacean phylogeny" (ed. by F. S. Schram), A. A. Balkema, Rotterdam, 1983, pp. 291-311.
- 30) R. T. Fitzgerald : Calcium and pH dependency in the clotting of the blood of *Balanus nubilus* (Darwin, 1854). *Comp. Biochem. Physiol.*, **24**, 1055-1059 (1968).
- 31) M. E. Waite and G. Walker : The haemocytes of balanomorph barnacles. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **68**, 391-397 (1988).