

ブラインシュリンプの血球

近藤昌和^{1*}・高橋幸則¹・友永 進²

Hemocyte of Brine Shrimp *Artemia salina*

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

Only a single type of hemocyte, granulocyte, was observed in the hemolymph of the brine shrimp, *Artemia salina*. This cell was oval or ellipsoid in shape and characterized by two types of granules, eosinophilic granule (EG) and chromophobic granule (CG). The former was round or oval in shape, large and eosinophilic, while the latter was round, small and not stained with May-Grünwald stain. All granules were PAS-negative. Granulated glycogen was detected in the hyaloplasm. Although EG was not stained with alcian blue, toluidine blue and sudan black B, some CG were positive in these stains. Phenoloxidase (PO) activity was observed in the hyaloplasm, but not in the granule. Lipofusutin-like granules were also found in the hyaloplasm, strongly suggesting that the hemocyte has a phagocytic ability. Gelation of the hemolymph and clot formation did not occur. However, clump of hemocytes was observed in the wounded site of brine shrimp. These results suggested that the brine shrimp has the fundamental cellular immune system of crustaceans such as phagocytosis and PO, but not blood coagulation.

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, 3}、研究の多くは軟甲綱十脚目で行われており、他のグループでの知見は少ない。ブラインシュリンプ *Artemia salina* は魚介類の種苗生産において初期餌料として水産増養殖上重要な動物である。本種は鰓脚綱に属し、甲殻類の系統進化上、比較的初期に出現したグループの一員と考えられている^{4, 5}。ブラインシュリンプ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 Lochhead and Lochhead⁶ 以後ほとんど見られない。本研究では、甲殻類の血球による生体防御機構の進化と多

様性を解明する研究の一環として、ブラインシュリンプ血球の形態学的特徴と機能について調べたので報告する。

2 材料および方法

実験動物

実験にはブラインシュリンプの成体を用いた (Fig. 1)。耐久卵 (ミヤコ化学) を28℃の90%海水に入れ、通気により24時間攪拌してふ化幼生を得た。これを海水の入った透明水槽 (500 l) に移し、成体になるまで飼育した。飼育期間中、山元ら⁷ の報告にしたがって自然繁殖させた海産植物プランクトンを、常に少量注水した。飼育期間中の水温は平均23℃あった。

2002年1月7日受付。Received Jan. 7. 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。

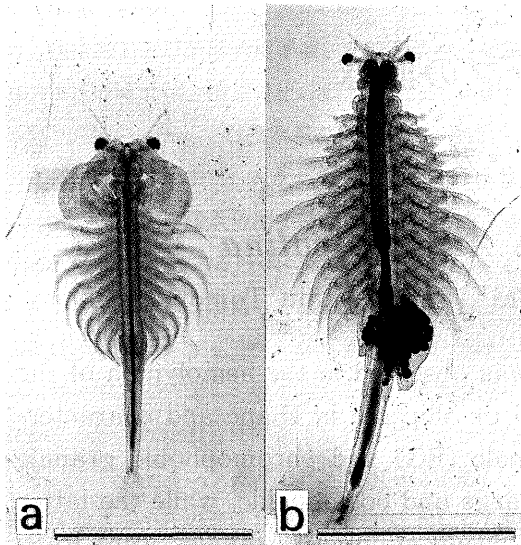


Fig. 1 *Artemia salina*, (a), male; (b), female. Bars=5 mm.

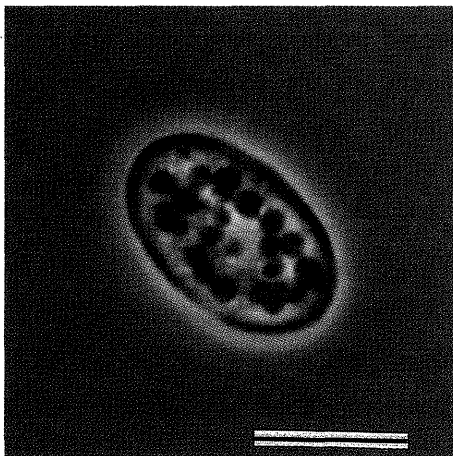


Fig. 2 A hemocyte of *Artemia salina*, fixed immediately after removal from circulation, are characterized by two types granules, large granules and small granules. Phase contrast microscopy. Bar=10 μ m.

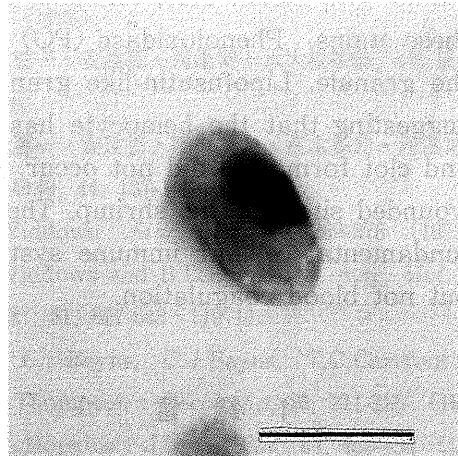


Fig.3 A hemocyte of *Artemia salina* stained with May-Grünwald. Large granules were eosinophilic and small granules were chromophobic. Bar=10 μ m.

Table 1 Summary of morphological characteristics of *Artemia salina* and *Lepas anatifera** hemocytes stained with May-Grünwald

	<i>Artemia salina</i>	<i>Lepas anatifera</i>
Cell		
shape	oval or ellipsoid	round or oval (with filopodia)
size (length×width, μ m)	8.0~13.0×5.0~9.0	4.9~16.2×4.8~11.9
Nucleus		
shape	oval or ellipsoid	irregular (round, oval, kidney, V-shape)
size (length×width, μ m)	3.0~6.0×2.5~4.0	4.3~8.1×2.7~5.4
Granule		
shape	Two granule types Eosinophilic granule	One granule type Chromophobic granule
size (diameter)	round (2 μ m) or oval (2~3×1~2 μ m) Chromophobic granule round, <0.5 μ m	round, <0.5 μ m

*Kondo *et al.* (2002)⁹⁾.

生体内の血球観察

ブラインシュリンプを濾過滅菌した海水（滅菌海水）またはグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドを含む固定液⁹⁾で封入し、光学顕微鏡で観察した。

血液塗抹標本の作製

滅菌海水でブラインシュリンプを洗浄後、中河⁹⁾の方法にしたがって作製したゼラチン処理スライドガラス上に載せ、周囲の水を吸水除去した。これに固定液を1滴滴下して直ちにメスで胸肢先端を切除した。ブラインシュリンプを取り除き、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。

一般染色

塗抹標本にメイ・グリュンワルド (MG) 染色を施して光学顕微鏡で観察した。

細胞化学的性状検査

塗抹標本に各種染色を施して血球の細胞化学的性状について調べた。PAS反応¹⁰⁾、トルイジンブルー (TB) 染色¹¹⁾ およびアルシアンブルー (AB) 染色¹²⁾ により糖質の有無を、sudan black B (SBB) 染色、sudan III 染色および oil red O (ORO) 染色で脂質の有無を調べた¹³⁾。PAS反応は α -アミラーゼ消化¹⁴⁾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) の検出をDOPA反応により行った¹⁵⁾。

血液凝固の有無と血球の形態変化

胸肢先端からの流出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

損傷部位における血球の防御機能を明らかにするために、胸肢先端を切除後、海水を入れたビーカーに移し、経時的に採集して顕微鏡観察を行った。

3 結果

ブラインシュリンプの体内に、直径約10 μ mの卵円形または楕円形の血球が観察された。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、細胞質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. 2)。MG染色性に基づいて血球は1種類に分類された (Fig. 3, Table 1)。血球の大きさは、長径8.0~13.0 μ m、短径5.0~9.0 μ mであり、核は卵円形または短楕円形で長径3.0~6.0 μ m、短径2.5~4.0 μ m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面積が細胞全体の面積の3割ほどを占めていた。核のクロマチン比 (ヘテロクロマチン: オイクロマチン) は約7:3であり、顆粒状のヘテロクロマチンが散在しているためオイクロマチン領域は網状に観察された。核膜近縁への顕著なヘテロクロマチンの集合は認められなかった。MG染色によって細胞質基質は好塩基性を示し、細胞質に好酸性顆粒 (EG) と難染色顆粒 (CG) の両方が観察された (Fig. 3, Table 1)。EGは直径約2 μ mの円形または長径2~3 μ m、短径1~2 μ mの卵円形の顆粒であり、細胞質全体に密に存在した。一方、CGはEGよりも小型で円形の顆粒であり、直径約0.5 μ mであった。本顆粒は血球の細胞膜近縁やEG間に豊富に観察された。

血球にPAS染色を施したところ、EGは陰性であったが、小型で顆粒状の陽性部位が細胞質に多数観察された (Fig. 4a)。この陽性部位は α -アミラーゼ消化によって消失した (Fig. 4b)。また、PAS陰性の小型顆粒が認められた。 α -

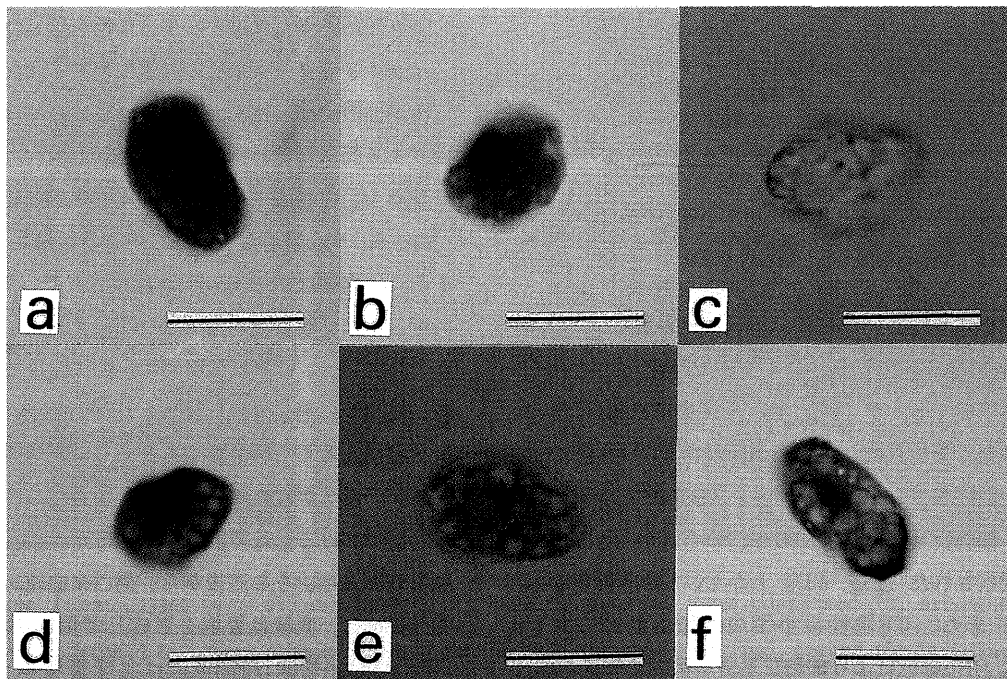


Fig. 4 Cytochemistry of hemocytes from *Artemia salina*. (a), PAS ; (b), PAS after α -amylase digestion; (c), alcian blue (pH1.0); (d), toluidin blue ; (e), sudan black B; (f), DOPA reaction (phenoloxidase detection). Bars=10 μ m.

Table 2 Summary of cytochemical characteristics of *Artemia salina* and *Lepas anatifera** hemocytes

Test ^{*1}	<i>Artemia salina</i>			<i>Lepas anatifera</i>	
	EG ^{*2}	CG ^{*2}	Hyaloplasm	CG ^{*2}	Hyaloplasm
PAS	— ^{*3}	—	hyaline + granular +	—~+ (two types)	+
PAS- α A	—	—	hyaline + granular —	—~+	—
AB (pH1.0)	—	—~+ ^{*3} (two types)	—	—	—
AB (pH2.5)	—	—	—	—	—
TB	—	—~+ (two types)	+	—	+
SBB	—	—~+ (two types)	+	+	+
SIII	—	—	—	—	—
ORO	—	—	—	—	—
PO	—	—	+	—	+

*¹ 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).

*² EG, eosinophilic granule; CG, chromophobic granule.

*³ —, negative; +, positive.

*Kondo *et al.* (2002)⁸⁾.

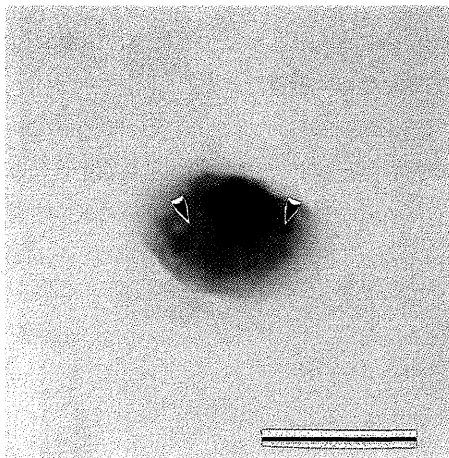


Fig. 5 Lipofuscin-like granules (arrowheads) in *Artemia salina* hemocyte. May-Grünwald stain. Bar=10 μ m.

アミラーゼ消化耐性のPAS陽性顆粒は観察されなかった。細胞質基質のPAS染色性は α -アミラーゼ消化後も変化が見られず弱陽性であった (Fig. 4b)。AB染色では、pH2.5では血球は全く染色されなかったが、pH1.0では小型の陽性顆粒が少数観察された (Fig. 4c)。TB染色では、核が強陽性で、細胞質基質は陽性であり、いくらかの小型の陽性顆粒が観察された (Fig. 4d)。しかし、EGは染色されなかった。また、TB陰性の小型の顆粒も認められた (Fig. 4d)。SBB染色により細胞質基質が微弱に染色され、小型の陽性顆粒も観察された (Fig. 4e)。しかし、PAS陽性の小型顆粒のような細胞膜近縁の陽性像はほとんど認められず、EGも染色されなかった。Sudan III染色とORO

染色では陽性部位は全く観察されなかった。DOPA染色では、核と細胞質基質が陽性であったが、顆粒は陰性であった (Fig. 4f)。Table 2にブラインシュリンプ血球の細胞化学的特徴を示した。

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)。この構造物は正円形であり、MG染色やPAS染色に染まらず、茶色を呈した。また、フェノールキシダーゼ染色では濃褐色であった。

流出血液のゲル化や血餅形成は認められなかった。血球はガラス面に付着、二通りの形態変化をおこした (Fig. 6)。すなわち、付着直後には、ほとんど形態の変わらない血球 (Fig. 6a)や、付着して1分以内に舌状偽足の伸長と収縮をおこす血球 (Fig. 6d-i) が観察された。前者は付着後1時間以内に、核濃縮が起こり (Fig. 6b)、次いで脱核した (Fig. 6c)。後者は最終的に、膜状偽足を伸展させ、顆粒は緩やかに消失 (脱顆粒) した (Fig. 6j-l)。膜状偽足には鬚部と考えられる構造も認められた (Fig. 6j-l)。また、わずかながら血球同士の凝集像も見られた。

傷口における血球の役割を調べるために、胸肢先端を切除したところ、その直後から、傷口に血球が集まりだし、30分後には、血球は集塊を形成して傷口を完全に塞いだ (Fig. 7a)。切除1時間後には血球集塊の一部に黒色化 (メラニン化) が観察された (Fig. 7b)。黒色化は時間の経過とともに血球集塊に広がり、1日後には集塊のほぼ全体が黒色化していた (Fig. 7c)。この状態は少なくとも3

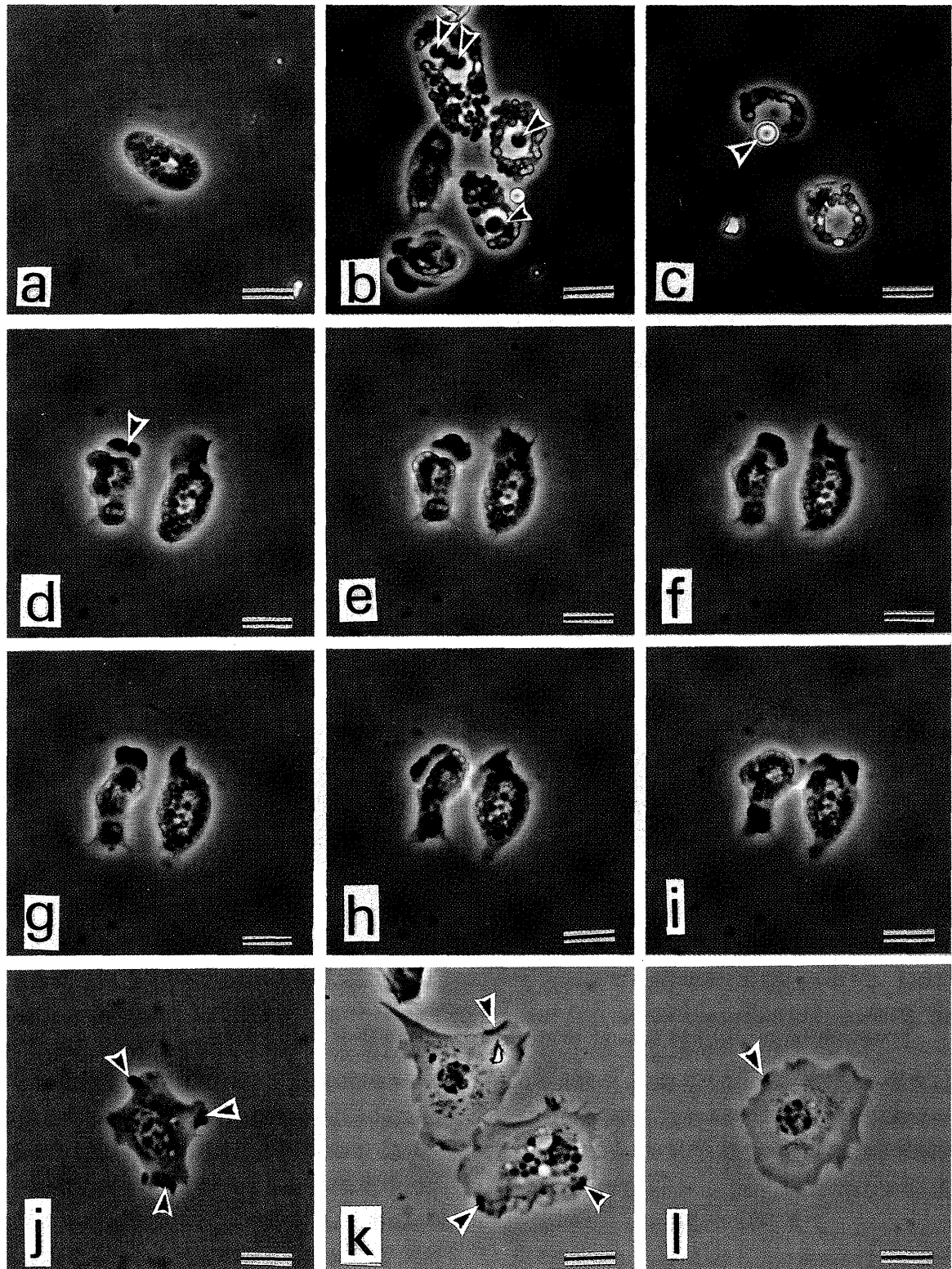


Fig.6 Phase contrast microscopy of hemocytes from *Artemia salina* *in vitro*. (a, d-i), <5 min; (b, c, j-l), <1 h. Type I hemocytes (a-c) did not spread (a), and the nucleus were condensed (b, arrowheads) and finally denucleated (c, arrowhead). Type II hemocytes (d-l) moved with tongue-like pseudopodia (arrowhead in d; from d to i were within 1 min; note the movement of granules), spread the lamellapodia and gradually degranulated (j-l). Ruffles were also observed in the lamellapodia of hemocytes (arrowheads in j-l). Bars=10 μ m.

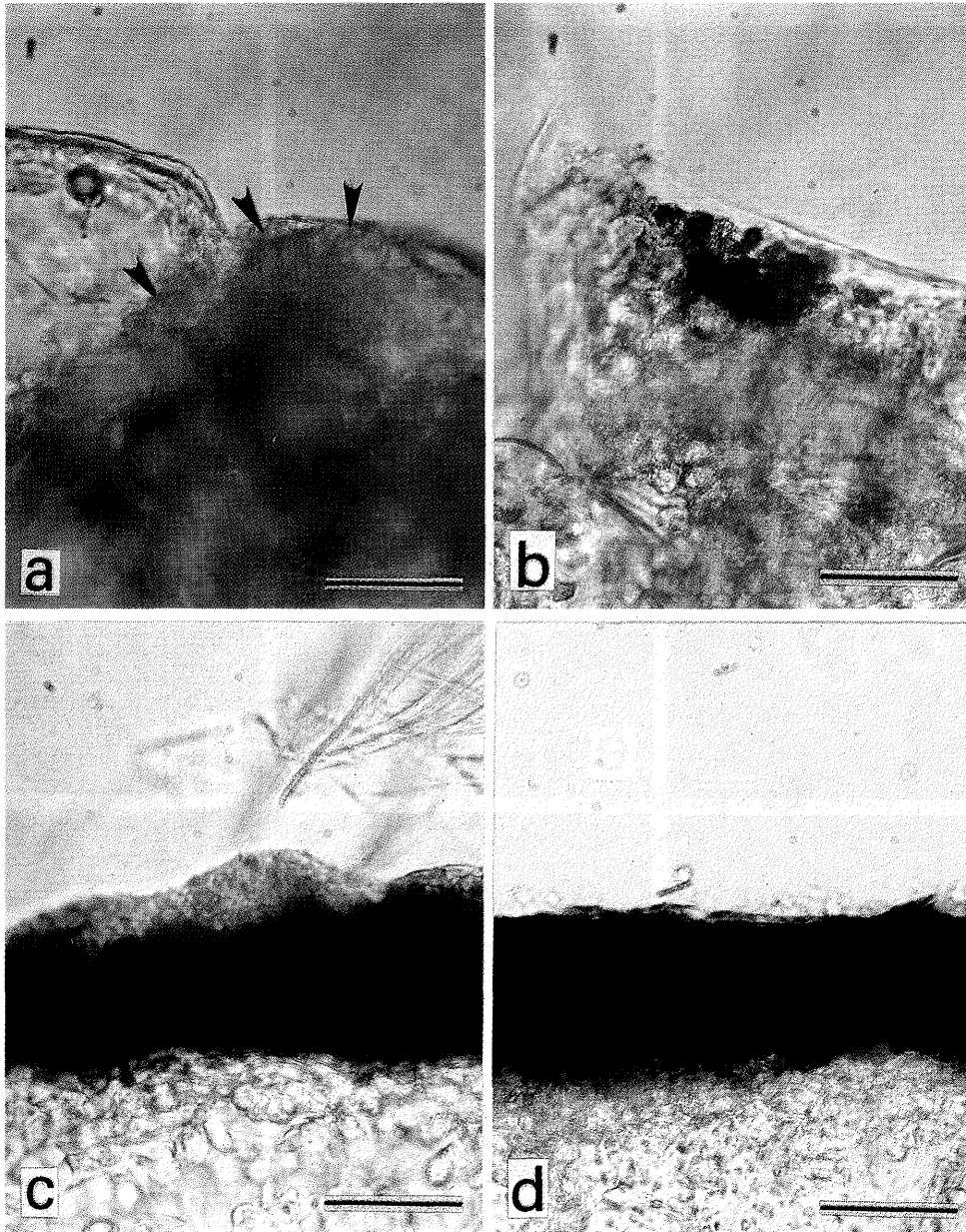


Fig.7 Wound repair in *Artemia salina*. (a), 30 min; (b), 1 h; (c), 1 d; (d), 3 d. Note the clump formation by hemocytes (a, arrow) and melaniformation in the clump (b-d). Bars=50 μ m.

日後まで続いた (Fig. 7d)。また、脱皮した個体では、メラニン塊が切除部位には認められず、脱皮殻に観察され、切除部位の形状は切除前の状態には戻っていなかった。

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、Bauchau²⁾による総説以後、ほとんどの研究報告では血球を3種類に分類している。すなわち、小型の細胞で、細胞に占める核の割合が高く、細胞質に顆粒をほとんど持たない無顆粒細胞 (または透明細胞) と、細胞質に豊富な顆粒

を有する顆粒細胞、および無顆粒細胞と顆粒細胞の中間型とも考えられる小顆粒細胞 (または半顆粒細胞) の3種類である。この分類基準は、同綱のトゲエビ亜綱口脚目 (シャコ類)¹⁶⁾ や真軟甲亜綱フクロエビ上目等脚目¹⁷⁾ といった他の甲殻類にも適用されている。しかし、上記の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。Bauchau²⁾ 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⁹⁾ 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。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。

本研究結果からブラインシュリンプ *Artemia salina* には、1種類の血球のみが観察された。このことは Lochhead and Lochhead⁶⁾ の報告を支持している。しかし、血球には MG染色性と大きさの異なる、少なくとも2種類の顆粒が観察された (Fig. 3, Table 1)。Lochhead and Lochhead⁶⁾ は組織切片、湿潤な塗抹標本または懸滴標本に各種染色を施して、ブラインシュリンプの血球を観察しているが、大型の顆粒にのみ言及しており、複数種の顆粒の存在には触れていない。これまでに、1種類の血球のみを持つ甲殻類としては、エボシガイ *Lepas anatifera* が知られている⁸⁾。しかし、エボシガイ血球に、MG染色性と大きさの異なる複数種の顆粒の存在は知られていない (Table 1)。

細胞質中に茶色の顆粒状物質を持つ血球も観察された (Fig. 5)。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査小体に相当するものと思われる。このことからブラインシュリンプの血球は貪食能を有すると推察されるが、これまでにブラインシュリンプの血球に貪食能の存在を直接的に証明した報告は見られない。Tyson¹⁸⁾ はスピロヘータに感染したブラインシュリンプの血球腔に、スピロヘータを貪食している細胞を観察しており、変形細胞 (amebocyte) と命名している。ブラインシュリンプには組織定着型の貪食細胞 (貪食性貯蔵細胞、phagocytic storage cell) の存在が知られているが^{6, 19)}、Tyson¹⁸⁾ が観察した変形細胞は、スピロヘータに感染した個体にのみ観察されている。本研究結果から、血球は体外でガラス面に付着後、顆粒を消失して変形細胞様に変化することが明らかになった。したがって、Tyson¹⁸⁾ が観察した変形細胞は、スピロヘータの感染による刺激により、脱顆粒した血球であると考えられる。十脚目の血球も、細菌や真菌の成分により脱顆粒を起こすことが知られている^{20, 21)}。なお、リポフスチン様物質はエボシガイの血球にも見られている⁸⁾。

細胞化学的染色により、ブラインシュリンプの血球に微細なPAS陽性顆粒が豊富に観察された (Fig. 4a, b, Table 2)。この顆粒は α -アミラーゼ消化により消失したことから、グリコーゲン粒子が多数集合したのと考えられる。Lochhead and Lochhead⁶⁾ はブラインシュリンプの血球にはグリコーゲンが検出されないとしている。エボシガイの血球の細胞質にも豊富なグリコーゲンの存在が知られているが、顆粒状の存在は認められていない (Table 2)⁸⁾。また、ブラインシュリンプには α -アミラーゼ耐性のPAS

陽性顆粒は観察されないが、エボシガイ血球には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 (Table 2)⁸⁾。Hoseら¹⁵⁾ はイセエビ類 *Sicyonia ingentis* の血球の顆粒はPAS陽性であり、無顆粒細胞の細胞質基質に α -アミラーゼ耐性の陽性物質があると報告している。一方、ザリガニ類の1種 (*Orconectes virilis*) の血球はPASにより細胞質が染色されるが、顆粒は染まらないとされている²²⁾。

ブラインシュリンプ血球にはTB陽性顆粒が観察された (Fig. 4d, Table 2)。陽性顆粒は小型であり、CGに相当すると考えられるが、陰性の小型顆粒も観察されることから、CGはTB染色に対して異質性を持った少なくとも2種類からなる顆粒群と推察される。また、ブラインシュリンプ血球にはAB (pH1.0) 陽性顆粒が少数観察された (Fig. 4c, Table 2)。この陽性顆粒も小型であり、CGに相当すると考えられるが、TB染色性と同様に、全てのCGが染色されるわけではない。さらに、ブラインシュリンプ血球にはSBB陽性顆粒が多数観察された (Fig. 4e, Table 2)。この陽性顆粒は主にEG間に観察され、細胞膜近縁にはほとんど見られないことから、CGはSBB染色に対しても異質性を持っていると考えられる。Lochhead and Lochhead⁶⁾ はブラインシュリンプ血球の顆粒はTBで青色に染まり、SBBには染色されないとしている。ブラインシュリンプと同様に、1種類の血球を持つエボシガイでは、血球にはTBおよびAB陽性顆粒は認められていない (Table 2)⁸⁾。また、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 (Table 2)⁸⁾。十脚目の *S. ingentis* の無顆粒細胞は細胞質基質がSBB陽性であり、顆粒球では顆粒の周り核膜が染まる¹⁵⁾。同様に、ザリガニ類の1種 (*Orconectes virilis*) でもSBB陽性部位は顆粒間や顆粒を包む膜であるとされている²²⁾。さらに、イセエビの1種 *Panulirus interruptus* と短尾類の *Loxorhynchus grandis* の顆粒細胞はSBBに染まらず、アメリカンロブスター *Homarus americanus* の顆粒球では顆粒の膜が染まるが、それら3種ともに無顆粒細胞の細胞質は陽性であると報告されている²³⁾。

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²⁴⁾。本研究から、ブラインシュリンプ血球の細胞質基質中に酵素反応が認められたが、顆粒中には検出されなかった (Fig. 4f, Table 2)。エボシガイの血球においても同様に、顆粒は陰性であり、細胞質基質が陽性である (Table 2)⁸⁾。十脚目では、陽性部位は、研究者や動物種の違いによってさま

ざまである。*S. ingentis* ではPO活性が顆粒細胞の顆粒に¹⁵⁾、*P. interruptus*、*L. grandis*およびアメリカンロブスターの顆粒細胞では多数の顆粒と細胞質に陽性像が観察されている²³⁾。また、ザリガニ類におけるPO陽性部位は、顆粒²⁵⁾、小胞²⁰⁾、細胞質基質²⁶⁾と様々である。Kondoら²⁷⁾およびTsingら²⁸⁾は、ブラインシュリンプやエボシガイと同様に、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。

ブラインシュリンプの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を起こさなかった。十脚目では、血球から放出されたトランスグルタミナーゼが血しょう中のフィブリノーゲン様タンパク質を架橋してゲル化を引き起こすことが知られている²⁹⁾。エボシガイの血液もブラインシュリンプと同様に、ゲル化、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³⁾。ブラインシュリンプの血球も、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。エボシガイでは血液循環は緩やかであり、血球濃度も低いことから、顆粒状物質による損傷部位の閉塞により血液の流失を防いでいると推察されている³⁾。一方、ブラインシュリンプには豊富な血球が存在し、その循環も急速であることから、損傷部位に多数の血球が迅速に到達し、そこで、血球同士が凝集して出血を防ぐと考えられる。さらに、血球内のPOによるメラニン形成により、凝集塊は強固になるとともに、外界からの異物進入を防いでいると推察される。

甲殻類における血球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、貪食能の有無、およびPOの存在部位はこの予測を検証する上で有用なパラメーターとなると考えられる。

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) 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.
- 5) 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).
- 6) J. H. Lochhead and M. S. Lochhead: Studies on the blood and related tissues in artemia (crustacea anostraca). *J. Morphol.*, **68**, 593-632 (1941).
- 7) 山元憲一・半田岳志・中村真敏・橘川和正・北 靖史・滝本真一・西川 智: アコヤガイの呼吸に及ぼすオゾン処理海水の影響. 水産増殖, **47**, 241-248 (1999).
- 8) 近藤昌和・友永 進・高橋幸則: エボシガイの血球. 水大校研報, **51(2)**, (2002), 印刷中.
- 9) 中河志朗: 実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ9: 蛋白質・核酸分子のin situ同定法 (遠山正彌・塩坂貞夫・木山博資編), 羊土社, 東京, 1994, pp. 24-25.
- 10) R. D. Lillie and P. Pizzolate: Histochemical use of borohydrides as aldehyde blocking reagents. *Stain Technol.*, **47**, 587-590 (1972).
- 11) 林 勇: トルイジン青染色. 病理標本の作り方(病理技術研究会編), 文光堂, 東京, 1992, pp.78-79.
- 12) 羽山正義: アルシアン青染色. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1988, pp.104-107.
- 13) 鈴木 裕: α -アミラーゼによるグリコーゲンの消化法. 病理標本の作り方(病理技術研究会編), 文光堂, 東京, 1992, pp.88-89.
- 14) 川島 徹: 脂肪染色. 新染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1999, pp.42-49.
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) G. E. Tyson: Phagocytosis and digestion of

- spirochetes by amebocytes of infected brine shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **26**, 105-111 (1975).
- 18) 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.
- 19) M. W. Johansson and K. Söderhäll : Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiol.*, **156B**, 175-181 (1985).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) P. Wood, and L. P. Visentin : Histological and histochemical observations of the hemolymph cells in the crayfish, *Orconectes virilis*. *J. Morph.*, **123**, 559-568 (1967).
- 23) 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).
- 24) K. Sritunyalucksana and K. Söderhäll : The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, **191**, 53-69 (2000).
- 25) 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).
- 26) H. Lanz, V. Tsutsumi and H. Aréchiga : Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Dev. Comp. Immunol.*, **17**, 389-397 (1993).
- 27) 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).
- 28) 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).
- 29) 牟田達史・岩永貞昭 : 生体防御としての体液凝固. 無脊椎動物の生体防御 (名取俊二・野本亀久雄・古田恵美子・村松 繁・(財)水産無脊椎動物研究所編), 学会出版センター, 東京, 1992, pp.81-109.