水産研究・教育機構 機関リポジトリ
FRA Japan Fisheries Research and Education Agency Institutional Repository

トゲカイエビ(甲殻亜門鰓脚綱貝甲目)の血球

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産大学校 公開日: 2024-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): crustacea; morphology; hemocyte; granulocyte 作成者: 近藤, 昌和, 稲川, 裕之, 友永, 進, 高橋, 幸則 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2011828

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Journal of National Fisheries University 54 (4) 153−157 (2006)

トゲカイエビ（甲殻亜門鰓脚綱貝甲目）の血球

近藤昌和*[1]・稲川裕之[1]・友永　進[2]・高橋幸則[1]

Hemocyte of Clam Shrimp, *Leptestheria kawachieusis* (Conchostraca, Branchiopoda, Crustacea)

Masakazu Kondo*[1], Hiroyuki Inagawa[1], Susumu Tomonaga[2] and Yukinori Takahashi[1]

Morphological and cytochemical characteristics of hemocyte in a clam shrimp, *Leptestheria kawachieusis*, were examined by light microscopy. Only a single type of hemocyte, granulocyte, were observed in the hemolymph. This hemocyte was small (4.0−7.0 μm in diameter), round or oval in shape and characterized by large granule. The granule was round or oval (1.4 μm in diameter) and stained eosinophilic with May-Grünwald using distilled water (pH5.2) or acid phosphate buffer (pH5.0 and pH6.0), basophilic at pH7.0 and pH8.0. Furthermore, the granules were stained with eosin, methylene blue, azure A and safranine O. These results indicate that the granule is amphophilic. Although the granule was stained with toluidine blue and sudan black B, PAS, alcian blue, oil red O and sudan Ⅲ were negative in the granule. Glycogen was not detected in the hyaloplasm. Phenoloxidase activity was observed in the granule.

Key words : Crustacea, Morphology, Hemocyte, Granulocyte

1　緒　　言

甲殻類の血球は生体防御上，重要な働きを担っている。しかし，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乏しい。血球機能の詳細を知るには，まず，血球の種類数を明らかにする必要がある。我々はこれまでに，鰓脚綱無甲目ブラインシュリンプ（*Artemia salina*）[1,2]，同目ホウネンエビ（*Branchinellites kugenumaensis*）[2] および同綱背甲目アジアカブトエビ（*Triops numidicus*）[2] の血球の形態学的特徴について報告した。また，顎脚綱完胸上目有柄目のエボシガイ（*Lepas anatifera*）[3]，同上目無柄目のアカフジツボ（*Megabalanus rosa*）[4] および同綱鰓尾亜綱のチョウ（*Argulus japonicus*）[5] についても同様に，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。また，血球中のフェノールオキシダーゼ活性は顆粒には認められず，細胞質基質に検出されること（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），体外に取り出した場合，血球はガラス面へ付着するとともに，顆粒を細胞外へ放出（脱顆粒）すること（ブラインシュリンプとチョウ）も明らかとなった。しかし，動物種による違いも認められた。例えば，ブラインシュリンプ血球の顆粒は，メイ-グリュンワルド（MG）染色性および大きさから，大型の好エオシン性顆粒と小型の難染性顆粒の2種類に分類されたが，他の動物種では，顆粒は一般に小型であり，難染性であった。また，血球の形状は，ブラインシュリンプ，ホウネンエビ，アジアカブトエビでは円形または卵円形であるのに対して，エボシガイとアカフジツボでは不定形であり，偽足を有していた。また，チョウの血球は紡錘形であった。さらに，ブラインシュリンプとチョウの創傷部位には血球が集積し，それがメラニン化したが，エボシガイ

2006年2月28日受付．Received February 28, 2006.

1　水産大学校生物生産学科（Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

2　昇陽学院（Shouyou Gakuin Inc., Kiwanami, Ube, Yamaguchi 759-0207, Japan).

*　別刷り請求先（Corresponding author).

とアカフジツボにはそれらの反応は認められなかった。以上の観察結果から，我々は，甲殻類の血球には各動物種間において多様性があり，それは動物種の生体防御系の進化と関連していると推察している。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。

トゲカイエビ（*Leptestheria kawachieusis*）はブラインシュリンプ，ホウネンエビおよびアジアカブトエビと同様に，鰓脚綱に属するが，これら動物種とは異なり，貝甲目に分類されている。本研究では甲殻類血球の多様性を明らかにする研究の一環として，トゲカイエビの血球形態を調べたところ，これまでに調べた動物種とは大きく異なることが明らかとなったのでここに報告する。

2 材料および方法

実験動物

トゲカイエビ（全長約5mm）は，山口県宇部市の水田で自然繁殖したものを採取し，水産大学校の飼育施設に搬入後，直ちに実験に供した。

血液塗抹標本の作製

曝気した上水中でトゲカイエビを洗浄後，周囲の水を吸水除去し，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[3]を滴下し，直ちに背甲および胴肢を切除して流出した血液を固定液と混合した。これを前報[5]と同様の方法によって処理し，塗抹標本を作製した。また，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。

普通染色

塗沫標本に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

塗沫標本に，前報[1,3,5]と同様の各種細胞化学染色を施した。また，トルイジンブルー（TB）染色には，蒸留水および各種緩衝液に溶解した染色液とともに，メタノールに1％溶解したものも用いた。アズールA（AA）染色には1％メタノール溶液の他に，各種緩衝液に溶解した色素液[6]も用いた。メチレンブルー染色には，Lofflerのアルカリ性メチレンブルー染色[7]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[7]を用いた。

3 結　果

トゲカイエビ生体を生物顕微鏡で観察したところ，多数の血球が体内を循環していた。

位相差顕微鏡観察

トゲカイエビの血球を位相差顕微鏡で観察したところ，いずれの血球にも粗大な顆粒が多数観察された。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

トゲカイエビの血球を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）。血球は長径4.0～7.0μmの円形または楕円形であり，核は豊富な細胞内顆粒に押しつぶされる状態で存在し，不定形であった。核のクロマチン網は明瞭ではなく，ヘテロクロマチンが豊富であった。顆粒は長径約1.4μmの円形または卵円形であり，いずれの顆粒も，蒸留水または酸性（pH5.0およびpH6.0）のリン酸緩衝液（1/15 M）を用いたMG染色では淡赤色を，pH7.0およびpH8.0の緩衝液では青色を呈した（Fig. 2）。HE染色では，顆粒はエオシンに染色された（Fig. 3 A）。

細胞化学的特性

Periodic acid Schiff反応（PAS）では細胞質基質が弱陽性であり，顆粒は陰性であった（Fig. 3 B）。また，α-アミラーゼ処理してもPAS陽性部位は変化しなかった。まれに，顆粒間に小型粒子状の陽性部位が数個観察されたが，この陽性部位もα-アミラーゼ処理による染色性の変化は認められなかった。アルシアンブルー染色（AB）では，pH1.0およびpH2.5のいずれの場合においても，陽性像は観察されなかった。

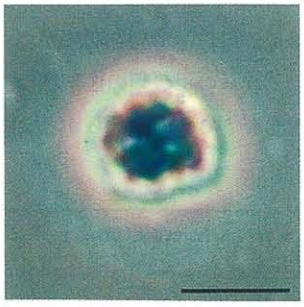

Fig. 1. A hemocyte of clam shrimp. Phase contrast. Note large cytoplasmic granules. The nucleus is not defined. Bar＝5 μm.

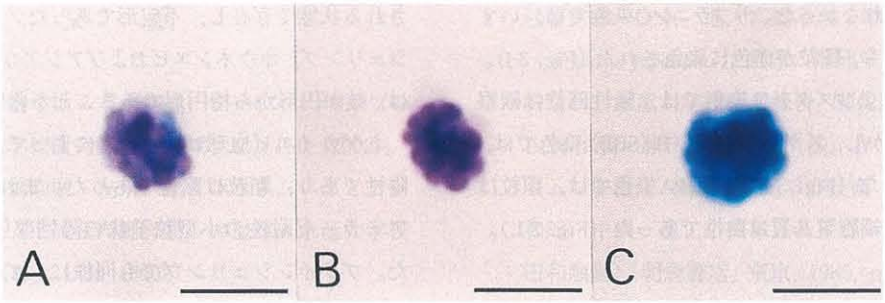

Fig. 2 . Light micrographs of clam shrimp hemocytes stained with May-Grünwald using various solutions. A, distilled water (pH5.2). B, phosphate buffer (1/15 M, pH5.0). C, phosphate buffer (1/15 M, pH7.0). Bars= 5 μm.

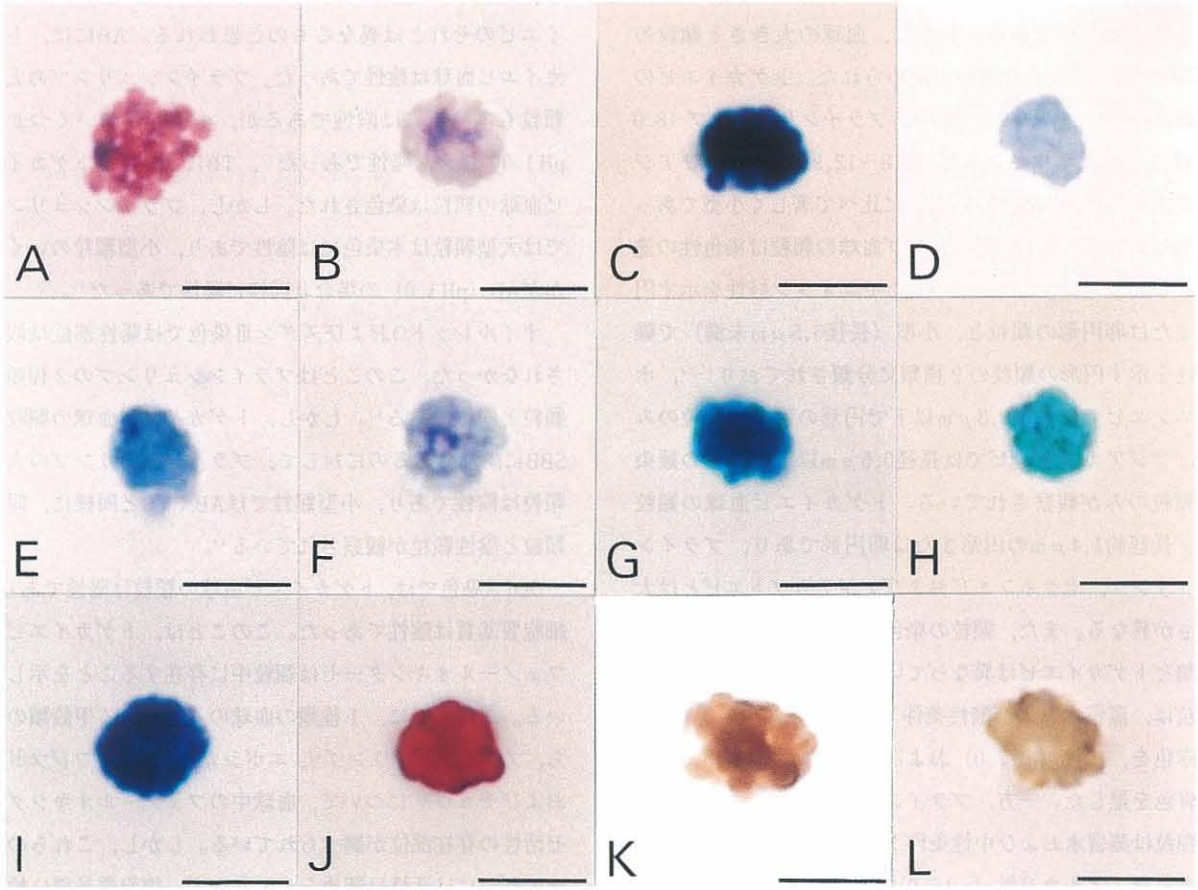

Fig. 3 . Cytochemistry of clam shrimp hemocytes. A, hematoxylin-eosin. B, periodic acid Schiff reaction. C, toluidine blue (TB) in methanol. D, TB in distilled water. E, TB in buffer (pH4.1). F, TB in buffer (pH7.0). G, methylene blue in methanol. H, Löffler's methylene blue. I, azure A in methanol. J, safranine O in methanol. K, sudan black B. L, DOPA reaction. Bars= 5 μm.

メタノールに溶解したTBによって顆粒は紺色に染色され，強陽性であった (Fig. 3 C)。蒸留水に溶解したTBでは，顆粒は淡青色に染色された (Fig. 3 D)。しかし，pH4.1の緩衝液に溶解した場合には，顆粒の染色性は蒸留水の場合よりも強かった (Fig. 3 E)。また，pH7.0の緩衝液では，蒸留水の場合と同様であったが (Fig. 3 F)，pH2.5の緩衝液に溶解した場合には，顆粒は染色されなかった。

メタノールに溶解したメチレンブルーでは，顆粒が濃青色に (Fig. 3 G)，Löfflerのアルカリ性メチレンブルー染色では青色に顆粒が染色された (Fig. 3 H)。また，AAのメタノール溶液を用いても，顆粒は強陽性であり，濃青色に染色された (Fig. 3 I)。しかし，各種緩衝液に溶解したAAで

は，顆粒は染色されなかった。サフラニンO染色では，いずれの溶液を用いても，顆粒が赤色に染色された（Fig. 3J）。

オイルレッドOおよびズダンⅢ染色では，陽性部位は観察されなかった。しかし，ズダンブラックB（SBB）染色では，顆粒は陽性であった（Fig. 3K）。DOPA染色では，顆粒は陽性であったが，細胞質基質は陰性であった（Fig. 3L）。

4 考　察

トゲカイエビの血球をMG染色したところ，血球は1種類の円形または楕円形の顆粒球として識別された。このことは，ブラインシュリンプ，ホウネンエビおよびアジアカブトエビと同様である。しかし，血球の大きさと顆粒のMG染色性には大きな違いが認められた。トゲカイエビの血球は長径4.0～7.0μmであり，ブラインシュリンプ（8.0～13.0μm），ホウネンエビ（7.8～12.9μm）およびアジアカブトエビ（6.8～10.0μm）に比べて著しく小型であった[2]。また，ブラインシュリンプ血球の顆粒は染色性の違いから大型（長径2.0～3.0μm）でエオシン好性を示す円形または卵円形の顆粒と，小型（長径0.5μm未満）で難染性を示す円形の顆粒の2種類に分類されており[1,2]，ホウネンエビでは長径0.3μm以下で円形の難染性顆粒のみが，アジアカブトエビでは長径0.5μm以下で円形の難染性顆粒のみが観察されている。トゲカイエビ血球の顆粒は，長径約1.4μmの円形または卵円形であり，ブラインシュリンプ，ホウネンエビおよびアジアカブトエビとは大きさが異なる。また，顆粒の染色性についても，これら鰓脚類とトゲカイエビは異なっていた。トゲカイエビ血球の顆粒は，蒸留水および酸性条件下（pH5.0，pH6.0）では淡赤色を，中性（pH7.0）およびアルカリ性（pH8.0）では青色を呈した。一方，ブラインシュリンプのエオシン好性顆粒は蒸留水および中性条件下では淡桃色を，酸性では明赤色を，アルカリ性（pH8.0）では難染性を示し，難染性顆粒はいずれの条件下においても染色されない[2]。また，ホウネンエビとアジアカブトエビの難染性顆粒は，いずれの条件においても染色されない[2]。

トゲカイエビ血球の顆粒はAA，メチレンブルー，サフラニンOといった塩基性色素に染色されるとともに，酸性色素であるエオシンにも染色されることから，本顆粒はブラインシュリンプ，ホウネンエビおよびアジアカブトエビの血球の顆粒とは異なり，両染性（amphophilic）であると言える。

トゲカイエビ血球の核は，豊富な細胞内顆粒に押しつぶされる状態で存在し，不定形であった。しかし，ブラインシュリンプ，ホウネンエビおよびアジアカブトエビの血球では，核が円形から楕円形であることが報告されている[1,2]。

トゲカイエビ血球はPAS反応によって，細胞質基質が弱陽性であり，顆粒は陰性であった。まれに，顆粒間にα-アミラーゼ耐性の小型粒子状の陽性部位が数個観察された。ブラインシュリンプでも同様に，2種類の顆粒ともに陰性であり，細胞質基質は陽性で，α-アミラーゼ耐性である[1]。また，粒子状のPAS陽性部位がブラインシュリンプにも観察されている[1]。しかし，ブラインシュリンプではこの粒子状陽性部位が，α-アミラーゼ処理により消失し，グリコーゲン粒子であると考えられており[1]，トゲカイエビのそれとは異なるものと思われる。ABには，トゲカイエビ血球は陰性であった。ブラインシュリンプの大型顆粒も本染色には陰性であるが，小型顆粒のいくつかはpH1.0の場合，陽性であった[1]。TBによって，トゲカイエビ血球の顆粒は染色された。しかし，ブラインシュリンプでは大型顆粒は本染色には陰性であり，小型顆粒のいくつかがAB（pH1.0）の場合と同様に陽性であった[1]。

オイルレッドOおよびズダンⅢ染色では陽性部位は観察されなかった。このことはブラインシュリンプの2種類の顆粒と同様である[1]。しかし，トゲカイエビ血球の顆粒はSBBに陽性であるのに対して，ブラインシュリンプの大型顆粒は陰性であり，小型顆粒ではABやTBと同様に，陽性顆粒と陰性顆粒が観察されている[1]。

DOPA染色では，トゲカイエビ血球の顆粒は陽性であり，細胞質基質は陰性であった。このことは，トゲカイエビのフェノールオキシダーゼは顆粒中に存在することを示している。これまでに，1種類の血球のみを有する甲殻類のうち，ブラインシュリンプ[1]，エボシガイ[3]，アカフジツボ[4]およびチョウ[5]について，血球中のフェノールオキシダーゼ活性の存在部位が調べられている。しかし，これらの血球の顆粒には活性は認められておらず，細胞質基質に検出されている。

以上のようにトゲカイエビの血球形態は，ブラインシュリンプ，ホウネンエビおよびアジアカブトエビといった同じ鰓脚類の血球と大きく異なっていた。鰓脚類は4目に分類されており，これまでの無甲目（ブラインシュリンプ，ホウネンエビ）と背甲目（アジアカブトエビ）に加え，本研究によって，貝甲目（トゲカイエビ）の血球形態が判明した。今後，鰓脚類の中でまだ解析されていない枝角目（ミジンコ類）についても血球形態を明らかにしたい。

文　献

1）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）．

2）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．水産大学校研究報告，51(1)，31-36（2002）．

3）近藤昌和・友永　進・高橋幸則：エボシガイの血球．水産大学校研究報告，50(2)，67-73（2002）．

4）近藤昌和・友永　進・高橋幸則：アカフジツボの血球．水産大学校研究報告，51(3)，73-78（2003）．

5）近藤昌和・友永　進・高橋幸則：甲殻綱鰓尾類チョウ（*Argulus japonicus*）血球の形態学的および細胞化学的性状．水産大学校研究報告，51(2)，45-52（2003）．

6）山田和順・藤田芳和：検出法．Ⅳプロテオグリカン（ムコ多糖）．組織細胞化学の技術（核酸と糖）（小川和朗・中根一穂・小田琢三・平野　寛・藤田哲也・山田和順編），朝倉書店，東京，1985，pp. 223-289.

7）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.