

**寄生性カイアシ類 *Acanthochondria eptatreti*
(ポエキロストマ目ツブムシ科) の血球の形態学的特徴
および響灘産ヌタウナギ *Eptatretus burgeri* における
寄生状況**

近藤昌和^{*}, 安本信哉, 高橋幸則

**Morphological Characterization of Hemocytes of Parasitic
Copepod *Acanthochondria eptatreti* (Poecilostomatoida:
Chondracanthidae) and Infection of *Acanthochondria eptatreti*
on Hagfish *Eptatretus burgeri* from Hibiki-Nada**

Masakazu Kondo^{*}, Shinya Yasumoto and Yukinori Takahashi

Abstract : Morphological characteristics of hemocytes in parasitic copepod *Acanthochondria eptatreti* (Chondracanthidae, Poecilostomatoida) from hagfish *Eptatretus burgeri* off Shimonoseki (Hibiki-Nada), Japan, were histologically examined by light microscopy. Only a single type of hemocyte, basophilic granulocyte, was observed not only in the hemal space, but also on/in the connecting tissue of *A. eptatreti*. The morphology of the hemocytes, especially cytoplasmic granules, were similar to those of other parasitic copepods, *Pseudocaligus fugu* (Siphonostomatoida) and anchor worm *Lernaea cyprinacea* (Cyclopoida), hemocyte-like granular cells of the copepods with free life style (*Tigriopus japonicus* (Harpacticoida) and *Cyclops vicinus* (Cyclopoida)) in which lack circulating hemocytes. About 12% of hagfish were infected with *A. eptatreti*. This is the first recorded occurrence of *A. eptatreti* infection on hagfish in Japan.

Key words : *Acanthochondria eptatreti*, Copepoda, Crustacea, hemocyte, morphology

緒 言

著者らは前報¹⁾において、甲殻類^{2),3)}を血球の種類数に基づいて、3つのグループに分けることを提案した。すなわち、血液中を循環する血球を持たない甲殻類を無血球型甲殻類 hemocyteless crustacean とし、1種類の血球のみを有する甲殻類を単血球型甲殻類 monohemocytic crustacean、複数の血球種を有する甲殻類を多血球型甲殻類 polyhemocytic crustacean とした¹⁾。無血球型甲殻類は偽無

血球型甲殻類 pseudohemocyteless crustacean と真無血球型甲殻類 euhemocyteless crustacean に細分され、前者には循環血球は観察されないが、組織上や組織中に細胞の系譜としては血球に相当すると考えられる血球様の顆粒細胞が認められる。偽無血球甲殻類には血液循環が乏しいと考えられるカイアシ類（顎脚綱 Maxillopoda カイアシ亜綱 Copepoda）が含まれる。一方、後者には血球も血球様顆粒細胞も観察されず、体制が極端に退化したウンモンフクロムシ *Sacculina confragosa*（顎脚綱蔓脚綱 Cirripedia 根

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

^{*}別刷り請求先 (corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

¹⁾ 本論文における甲殻類の分類体系は大塚と駒井²⁾に依った。

頭上目 Rhizocephala ケントロゴン目 Kentrogonida) が属す。単血球型甲殻類は真単血球型甲殻類 eumonohectic crustacean と偽単血球型甲殻類 pseudomonohectic crustacean に分類され, 前者には鰓脚類 (鰓脚綱 Branchiopoda) や顎脚類のほかには原始的な軟甲類 (軟甲綱 Malacostraca) であるコノハエビ類 (コノハエビ亜綱 Phyllocarida 薄甲目 Leptostraca) が属し, 後者には真軟甲類 (軟甲綱真軟甲亜綱 Eumalacostraca) に属するニホンイサザアミ *Neomysis japonica* (フクロエビ上目 Peracarida アミ目 Mysida) とカクレエビ *Conchodytes nipponensis* (ホンエビ上目 Eucarida 十脚目 Decapoda) が含まれる。多血球型甲殻類は, 血球種の組成に基づいて型分けされ (血球型 hemocyte-type), これまで5つの型 (I~V型) が報告されており, 軟甲類のシャコ類 (トゲエビ亜綱 Hoplocarida 口脚目 Stomatopoda) と真軟甲類が属する。

以上のグループに属する甲殻類の分類学的位置から, 甲殻類の系統と血球の種類の関係について次の仮説を提唱した¹⁾。すなわち, ①甲殻類の祖先種は1種類の血球を有する真単血球型甲殻類であった。②軟甲綱トゲエビ亜綱と同綱真軟甲亜綱の共通の祖先種において「血球の種類数の増加 (血球種の複数化)」が起こり, その血球型はI型であった。③I型の祖先種から分岐した各動物群において, 「血球の種類数の減少 (血球種の単純化)」が起こり, 血球の種類数に多様性が生じた。これらの仮説を検証するためには, さらに多くの甲殻類について調べる必要がある。

カイアシ類は原始前脚綱 Progympnoplea と新カイアシ下綱 Neocopepoda に大別され, 前者はプラティコピア目 Platycopioidea のみからなる。一方, 後者はカラヌス目 Calanoida のみが属する前脚上目 Gymnoplea と, キクロプス目 Cyclopoida, ハルバクチクス目 Harpacticoida, シフォノストム目 Siphonostomatoida, ポエキロストマ目 Poecilostomatoida などの9目からなる後脚上目 Podoplea に分けられる。著者らはこれまでにキクロプス目のオナガケンミジンコ *Cyclops vicinus* とイカリムシ *Lernaea cyprinacea*, ハルバクチクス目のシオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* およびシフォノストム目の *Pseudocaligus fugu* について血球形態を調べ, シオダマリミジンコとオナガケンミジンコは偽無血球型甲殻類に, イカリムシと *P. fugu* は真単血球型甲殻類に分類されることを明らかにした¹⁾。本研究では,

ポエキロストマ目ツブムシ科 Chondracanthidae に属する *Acanthochondria eptatreti*³⁾ の血球形態について報告する。また, 日本産ヌタウナギ *Eptatretus burgeri* における *A. eptatreti* の寄生についてはこれまで報告がないことから⁴⁾, 寄生状況についてもあわせて報告する²⁾。

材料および方法

実験動物

山口県下関市の沖合 (響灘) にて, 2014年5月上旬にアナゴ筒漁法によって採集されたヌタウナギ200尾を, 同年5月15日に水産大学の屋内飼育施設に搬入した。濾過槽 (容量約80 l; 濾材, 観賞魚用スーパーろ過用ウール, 株式会社クハラ) と冷却装置を設置した1,000 l 容角型水槽 (水量約800 l) にヌタウナギを収容し, 通気して飼育した (水温 $15 \pm 1^\circ\text{C}$)。飼育水は濾過槽および冷却装置にそれぞれ別の水中ポンプ (Rio1400, カミハタ) を用いて連続通水した。飼育間中は無給餌とし, 一日おきに飼育水の2/3量を換水した。同年7月4日にヌタウナギ1尾を解剖したところ, 咽頭壁に *A. eptatreti* の寄生が認められたことから, 7月6日と7日に計83尾のヌタウナギを解剖した。ヌタウナギを ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonic acid salt (MS-222; 0.01%; Aldrich) で不動化したのち, 腹面を正中線に沿って切開し, 咽頭, 咽頭後半部に位置する咽頭嚢 (鰓嚢) および咽頭からつながる腸を露出させた。ついで, 口腔腹側に切り込みを入れ, 咽頭腹側および腸左側面を切り開いた。

観察方法

Acanthochondria eptatreti を宿主からはずさず10%ホルマリン-蒸留水, 10%ホルマリン-海水またはDavidson液⁵⁾で固定したのち (ホルマリン固定では7日間, Davidson液では30日間), 70%エタノールに置換して虫体の観察に供した。また, Davidson液で固定した標本を宿主からはずして定法にしたがってパラフィン包埋し, 厚さ4 μm の切片を作製した。脱パラフィン後, 親水化した。近藤ら¹⁾の方法にしたがってMay-Grünwald (MG) 染色を施したのち光学顕微鏡で観察した。

¹⁾ 本研究の一部は, 日本水産増殖学会第13回大会 (2014年10月18日) (P-04: 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: 日本産ヌタウナギにおける *Acanthochondria eptatreti* の寄生 (講演要旨集, 9); P-15: 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: 甲殻類における血球種の変化 (講演要旨集, 15)) において報告した。

結 果

Acanthochondria eptatreti の血体腔内に 1 種類の血球が少数観察された。血球は卵円形または楕円形であり、細胞質内には MG 染色によって青色を呈する好塩基性顆粒が多数観察された (Fig. 1A)。顆粒は円形または卵円形であり、長径 $0.5 \mu\text{m}$ 以下であった。核は円形または楕円形であり、細胞内に偏在していた。核内に染色質網はほとんど認められず、少数の小型粒子状の濃縮染色質が稀に観察された。また、核内には青色を呈する円形または卵円形の核小体が 1 個存在した。これらの特徴を有する細胞は、発達した結合組織 (*A. eptatreti* の消化管と外被を連絡し、消化管を懸垂する) の表面や (Fig. 1B)、結合組織内にも観察された (Figs. 1C & 1D)。これらの細胞には細胞質突起の伸長が認められるとともに、稀に異物食食の結果生じると考えられるリポフスチン様顆粒を有する細胞も存在した (Fig. 1D)。これら細胞は結合組織内では広範囲に少数散在し、周囲には疎な線維状構造物が観察されたが、線維細胞との間の接着は認められなかった (Fig. 1C; 細胞の左斜め下に線維細胞が存在する。線維細胞の核内には染色性の弱い複数個の核小体が認められる)。また、結合組織表面への細胞の付着は稀であり、細胞質突起は血体腔側のみならず結合組織の線維状構造物内にも伸長していた (Fig. 1B)。

ヌタウナギ 84 尾 (7 月 4 日解剖の 1 尾と、7 月 6 日ならびに 7 月 7 日に解剖した 83 尾の合計) 中 10 尾に *A. eptatreti* の寄生が認められ、計 15 個体の *A. eptatreti* (雌) が得られた。このうち 14 個体では体色は乳白色を呈し、体中央前後方向に伸びる深緑色の消化管が外被を通して観察され (Fig. 2A)、腹面後端には乳白色の矮雄が付着して

いた (Fig. 2B)。頭部背面には sclerotised bar が認められ (Fig. 2C)、頭部前端に第 1 触角 (antennule)、頭部腹面前方に鉤爪状の第 2 触角 (antenna) ならびに口器が観察された (Figs. 2D & 2E)。また、頸部には 2 対の二又型肢 (leg) を有していた (Fig. 2D)。この 14 個体のうち 13 個体では体後端から一対の卵囊が伸びていたが、1 個体では卵囊は 1 本であった。15 個体のうち 1 個体では卵囊は無く、他の 14 個体に見られた深緑色の消化管は認められず、体は赤褐色を呈していた (Fig. 2F)。また、矮雄も観察されなかった。*Acanthochondria eptatreti* の寄生部位は、咽頭の左右に位置し、前後方向に走行する血管に接する咽頭壁であり、寄生部位では咽頭壁が壁外に向けて肥厚し瘤状を呈するとともに淡赤色を呈していた (Fig. 2G)。

Acanthochondria eptatreti が 1 個体寄生していたヌタウナギは 6 尾、2 個体寄生は 3 尾、3 個体寄生は 1 尾であった。ヌタウナギの咽頭は長い筒状であり、咽頭の後部両側には鰓囊が並ぶ。また、鰓囊と咽頭は流入管により連絡する。15 個体の *A. eptatreti* のうち、12 個体は第一鰓囊の流入管開口部よりも体前方の咽頭壁に寄生していたが、2 個体寄生しているヌタウナギ 1 尾において 1 個体が、3 個体寄生しているヌタウナギにおいて 2 個体が第一鰓囊の流入管開口部よりも体後方の咽頭壁に寄生していた (Fig. 2H)。

各種固定液中における *A. eptatreti* の体色および消化管の色調 (深緑色) は生時とほとんど変わらなかった。しかし、Davidson 液中では卵囊が破裂する個体があった (Fig. 2I)。また、10% ホルマリン - 海水で固定した標本においては、固定後に 70% エタノールに置換したところ、いずれの個体においても体色が茶色に変化した (Fig. 2H)。また、卵囊が破裂する個体も認められた。

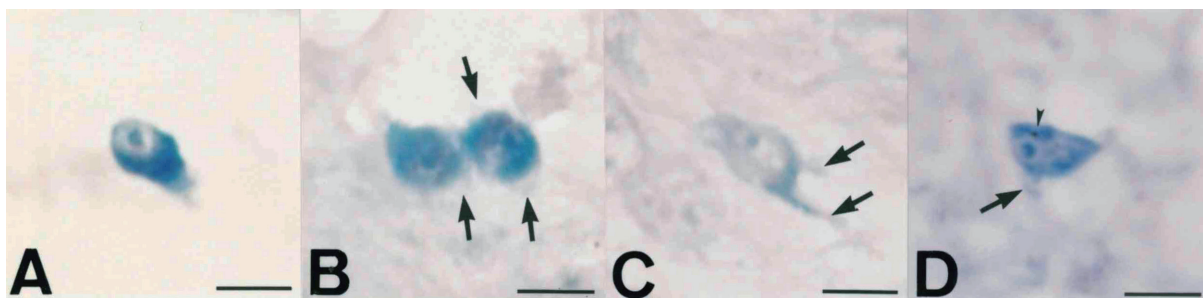


Fig. 1. Hemocytes of *Acanthochondria eptatreti*. Note basophilic granules and one nucleolus in the nucleus. A, hemocyte in hemal space; B, hemocytes adhere to connective tissue; C & D, hemocytes in connective tissue (arrowhead in D indicates lipofuscin-like particle). Arrows, pseudopods. May-Grünwald stain. Bars=5 μm .

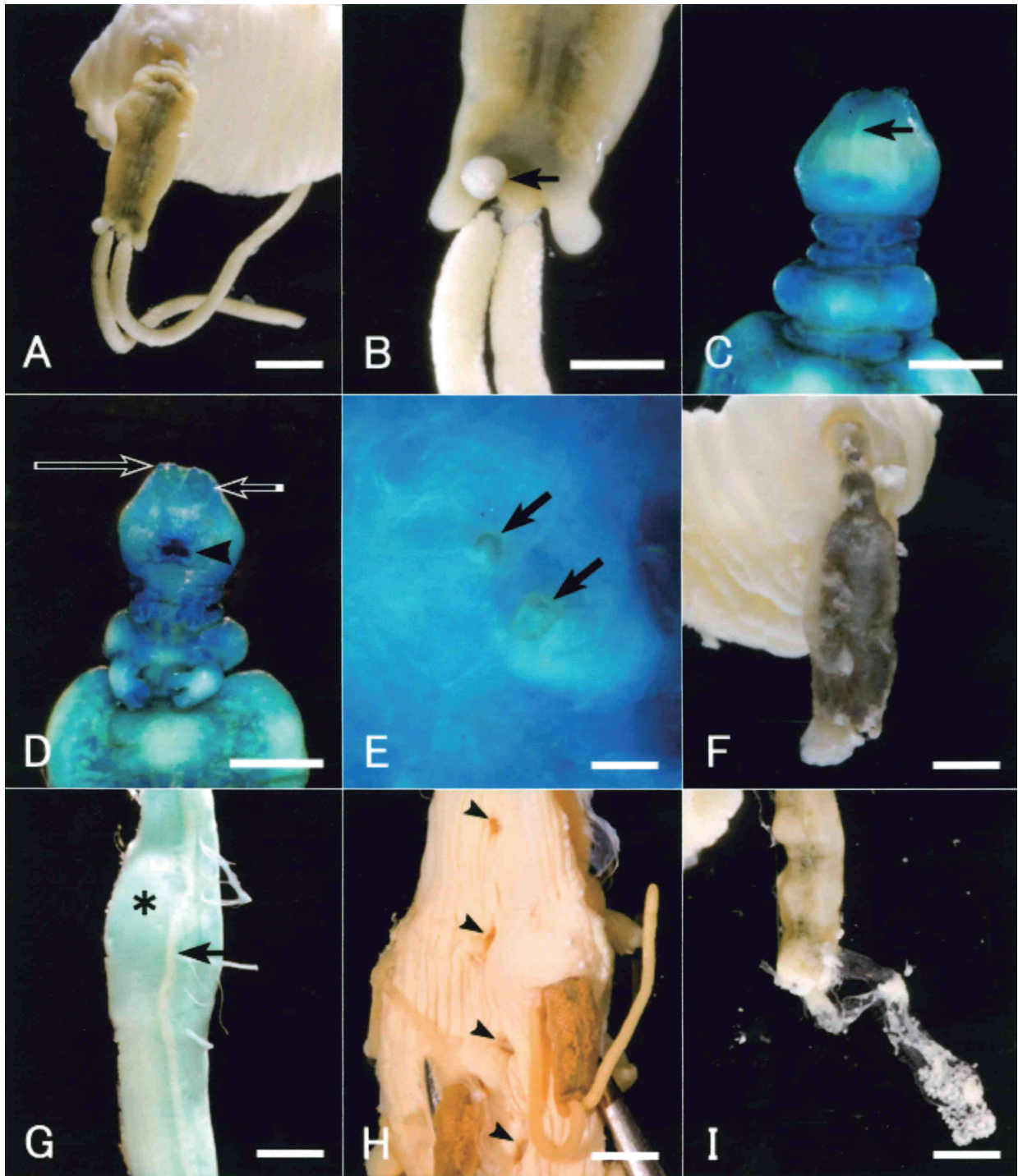


Fig. 2. *Acanthochondria eptatreti* from the pharynx of hagfish. All specimens were fixed with 10% formalin in distilled water (A-F), 10% formalin in sea water (H) or Davidson's solution⁹⁾ (G & I). A & B, female in the dissected pharynx (A, dorsal view; B, ventral view; arrow in B, dwarf male); C & D, head and neck of female (methylene blue stain; C, dorsal view (arrow, median longitudinal sclerotized); D, ventral view (Note two pairs of legs; long arrow, antennule; short arrow, trace of antenna (Most of antenna were torn off and remained in the pharynx wall (arrows in E)); arrowhead, oral part)); F, dead *A. eptatreti* (?) which lack egg sac and male, change the body color from opalescent to brick red; G, pharynx of hagfish infected with *A. eptatreti* (Infection was occurred in the pharynx wall beneath the blood vessel (arrow) and lump (*) was formed in the infected wall; methylene blue stain); H, two *A. eptatreti* in the pharynx between the openings (arrowheads) of branchial baskets; I, burst of egg sac in the fixative. Bars: A, F-I, 3 mm; B-E, 1 mm.

考 察

Acanthochondria eptatreti の血体腔内に好塩基性顆粒を有する顆粒球 (好塩基性顆粒球) が観察され, 血球は1種類であると考えられた。したがって, *A. eptatreti* は単血球型甲殻類¹⁾に分類される。また, *A. eptatreti* の結合組織の表面や結合組織内に, 血球と同様の形態学的特徴 (好塩基性顆粒と核小体) を有する細胞が観察された。したがって, *A. eptatreti* の血球は循環状態と組織定着状態の2つの存在様式を有すると思われる。*Acanthochondria eptatreti* の組織定着状態の血球は, 循環血球が認められないカイアシ類 (シオダマリミジンコとオナガケンミジンコ) において組織に付着した状態または組織中に存在し, 好塩基性顆粒を有する細胞 (血球様顆粒細胞)⁶⁾に相当すると考えられる。

これまでに寄生性カイアシ類である *P. fugu* とイカリムシには循環型の好塩基性顆粒球が認められているが, 定着型の血球は観察されていない⁶⁾。また, 前述のようにシオダマリミジンコとオナガケンミジンコには循環血球は認められないものの, 組織に定着した血球様顆粒細胞が観察されている⁶⁾。循環血球の有無については血液の循環 (= 血液の攪拌) の程度の違いが推察されている。すなわち, 血液循環の弱いシオダマリミジンコとオナガケンミジンコでは血球を浮遊させた状態で血液を循環することができず, 血球は血液中に浮遊する代わりに組織上や組織中に血球様顆粒細胞として存在していると考えられている⁶⁾。したがって, 血球様顆粒細胞は細胞の系譜としては血球に相当するのではないかと推察されている⁶⁾。本研究において *A. eptatreti* の血球は循環型と組織定着型の2型を示すことが明らかとなった。このことは, シオダマリミジンコとオナガケンミジンコの血球様顆粒細胞が血球であるとの推察, すなわち偽無血球型甲殻類の血球様顆粒細胞は血球であることを支持する。一方, *P. fugu* とイカリムシに定着型の血球は観察されていない理由としては, *A. eptatreti* に見られたような発達した結合組織がないことから, 存在を見落としていた可能性があり再検討が必要と考える。

本稿緒言にも記した仮説¹⁾では無血球型甲殻類と偽単血球型甲殻類の位置付けが不明瞭であることから, 以下のように変更する。仮説: ①甲殻類の祖先種は1種類の血球を有する真単血球型甲殻類であった。②現生の甲殻類において血液循環の乏しい種では循環血球を有さず, 血球は組織上または組織中に血球様顆粒細胞として存在し (偽無血球型甲殻類), 体制が極端に退化した種では血球も血球様顆粒細胞も持たない (真無血球型甲殻類)。③軟甲綱トゲエ

ビ亜綱と同綱真軟甲亜綱の共通の祖先種において「血球の種類数の増加 (血球種の複数化)」が起こり, その血球型はI型であった (多血球型甲殻類の出現)。④I型の祖先種から分岐した各動物群において, 「血球の種類数の減少 (血球種の単純化)」が起こり, 血球の種類数に多様性が生じた (各型の多血球型甲殻類と偽単血球型甲殻類の出現)。

日本産ヌタウナギへの *A. eptatreti* の寄生率は約12%であり, 台湾産の同種への寄生率62.8%³⁾よりも低かった。この違いはヌタウナギを採取した時期が異なることによるのかもしれない。すなわち, 本研究における日本産ヌタウナギは5月に採取されたのに対して, 台湾産ヌタウナギは11月から3月にかけて採取されている³⁾。本研究で得られた15個体の *A. eptatreti* のうち, 1個体では卵嚢と矮雄を欠くとともに他の個体で見られる深緑色の消化管は認められず, 体色は赤褐色を呈していた。この個体は産卵後斃死したと考えられる。また, *A. eptatreti* は存在しないものの *A. eptatreti* の寄生によって形成される咽頭壁の瘤が認められるヌタウナギが存在した。これらのことから, 本研究においてヌタウナギを解剖した時期 (7月) は *A. eptatreti* の産卵期の終盤にあたると思われる。固定液中または固定後に70%エタノールに置換した場合に卵嚢が破裂する個体が認められた。これら個体では卵嚢卵が孵化直前であるのかもしれない。

文 献

- 1) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: 甲殻類における血球形態の多様性. 水大校研報, **63**, 33-48 (2014)
- 2) 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)
- 3) Cheng Y-R, Luo H-Y, Dai C-F, Shih H-H: A new species of chondracanthid copepod parasitic in the pharynx of hagfishes (Myxiniiformes: Myxinidae) from off Taiwan. *Syst Parasitol*, **88**, 281-287 (2014)
- 4) 長澤和也, 上野大輔, 何 汝諧: 日本産魚類に寄生するツブムシ科カイアシ類の目録 (1918-2013年). 生物圏科学, **52**, 117-143 (2013)
- 5) Bell TA, Lightner DV: Techniques. In: A Handbook of Normal Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Louisiana, 2-5 (1988)
- 6) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: カイアシ類の血球の形態学的特徴. 水大校研報, **62**, 129-135 (2014)