

台灣蓄養蠶的血細胞量季節性變化

謝明昌¹·蔡惠萍^{1*}·黃丁士²·張志堅¹·張錦宜¹
陳其欽²·黃信仁²·蔡萬生²·林金榮¹

¹行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

²行政院農業委員會水產試驗所澎湖海洋生物研究中心

摘 要

本研究對從野外捕獲經人工馴養的三棘蠶，於 2010 年隨機取樣採雄蠶 10 隻、雌蠶 10 隻，每月每隻蠶重複各採集 30 mL 血，為重複採血組；另於 2011 年每月不分雌雄隨機挑選蠶 20 隻，但各月所採蠶檢體不得重複，每隻各採 30 mL 蠶血，為不重複採血組。所採蠶血加入抗凝劑後，以 10 倍的福馬林固定，再以人工血球計數器計算血細胞數量，分析每月蠶血細胞量的變化。重複與不重複採血組有類似的結果，血細胞量與性別、季節有關，雄蠶平均血細胞數 (20,445/ μ L 及 24,191/ μ L) 量較雌蠶 (17,865/ μ L 及 20,067/ μ L) 多，夏季與秋季的平均血細胞數 (23,334/ μ L 及 25,141/ μ L) 較春、冬兩季的平均血細胞數高，而其中以 5 至 9 月平均血細胞量 (25,051/ μ L) 為最多，可做為製作三棘蠶試劑的採血適期。

關鍵詞：蠶、三棘蠶、血細胞

前 言

蠶存活於地球上超過 4 億年，有活化石之稱 (劉, 1991; Rudkin *et al.*, 2009)。1956 年 Bang 自美洲蠶發現受革蘭氏陰性菌感染後引發全身性血液凝固機制 (Bang, 1953, 1956; Levin *et al.*, 1964)，而後開發成為蠶試劑，以應用做為各種醫療器材細菌性內毒素的診斷試劑，並陸續為歐美、日本各國所採用 (US Department Health and Human Services, 1987; European Pharmacopoeia Commission, 1987; The Pharmacopoeia of Japan, 1992; US Pharmacopoeia, 1995)，其原料均來自美洲蠶 (*Limulus polyphemus*)，採血時機皆利用美洲蠶每年 5~7 月上岸產卵的繁殖季節 (Smith, 2006)。由於中國東南沿海所生產的三棘蠶 (*Tachypleus tridentatus*) 的血淋巴中含有類似美洲蠶的凝集顆粒 (Yoshihiro *et al.*, 1991; 歐陽等, 2004)，近年來，

已利用三棘蠶血生產蠶試劑，並訂定為中國國家內毒素檢驗標準 (國家藥典委員會, 1993)。蠶試劑廣泛應用於藥物檢驗、臨床淋病、腦膜炎等檢驗，並利用蠶的其他部分作為環保、食品衛生、保健食品、魚撈誘餌等方面的利用 (Rudle and Rudle, 1981; Botton and Ropes, 1987; 謝等, 2010)，未來將有許多可研發利用空間，因此對蠶的需求也相對增加。

由於近年來經常發生火山爆發、地震海嘯及油輪漏油等事件，再加上人為海洋環境汙染及大量捕捉蠶的結果，已經開始逐漸危及蠶的生存。為保障人及動物生命安全，未來醫療用品應用蠶試劑的依賴性將日益增加，對於人體的生命安全有間接相對的保護，有鑑於此，有識之士遂開始倡議積極保育與繁養殖，藉以降低野生蠶族群生存危機，期望能讓蠶得以永續利用 (譚等, 1997; Liao *et al.*, 2001; 黃等, 2009; Chen *et al.*, 2009)，因此，相關人士積極展開對蠶棲地的保育、保種、人工繁養殖等相關研究。

人工飼養蠶如果能提供生產蠶試劑的蠶血，則蠶血可隨時採用，對於蠶試劑的生產將有很大

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: hptsai@mail.tfrin.gov.tw

的幫助。然而因為甲殼類血細胞量常有不穩定的情形 (陳等, 2002; 杭等, 2007), 人工飼養的蟹其蟹血細胞量是否會隨季節變動, 其相關的探討, 過去並沒有人做過類似研究, 本研究以固定每月採血一次, 分析每月採取相同蟹及不同蟹之血細胞量季節變化, 藉以推估蟹的採血適期, 建立利用人工飼養蟹開發蟹試劑的基本資料。

材料與方法

一、蟹

(一) 來源

供試之三棘蟹係漁民於澎湖海域利用底刺網採捕螃蟹時偶然捕獲; 或是在 4~9 月蟹的產卵期間, 漁民於澎湖各地的潮間帶拾獲, 由行政院農業委員會水產試驗所澎湖海洋生物研究中心 (以下簡稱澎湖中心) 收購蓄養。

(二) 檢疫處理

蟹收購後先蓄養於檢疫預備槽, 經用淡水沖洗身上之寄生蟲及汙泥, 並使用 30 ppm 福馬林浸泡 30 分鐘, 以去除身上之各種寄生蟲後再移入蓄養桶, 經馴養 2 個月後, 植入身分別晶片。

(三) 飼養環境

澎湖中心 4 mt FRP 玻璃纖維桶, 水深 90~100 cm, 養殖用水取自澎湖青灣海域, 海水經過濾淨化、蛋白除沫後使用, 鹽度為 29~35 psu。

(四) 水溫量測

每日早午各量測一次, 每月平均水溫值為採血前 10 日內的水溫平均值。

(五) 飼料及投餵

每 2 天投餵 1 次解凍的生餌, 包括下雜鮮魚、小卷、烏賊、牡蠣、文蛤及帶殼的蝦子等飼料。

(六) 採血

取自澎湖中心所馴養的三棘蟹, 分兩年進行本試驗, 其一為重複採血組: 於 2010 年, 隨機取雌蟹 10 隻, 體重介於 1,200~3,870g, 雄蟹 10 隻, 其體重介於 1,020~1,620g 間, 此 20 隻每個月各

採血 1 次, 每次每隻各採血 30 mL。不重複採血組: 2011 年每月不分性別隨機採捕 20 隻, 共計雌蟹檢體 90 隻, 體重介於 1,190~4,590g, 雄蟹 150 隻, 其體重介於 670~2,220 g, 採樣前先判讀並記錄身分別晶片資料, 確認未重複, 始選為供試蟹, 每隻各採血 30 mL。

二、玻璃儀器之處理

本實驗配製藥品所使用的玻璃容器, 先以界面活性劑清洗後, 次用超音波震盪清洗 1 h, 再以自來水沖洗數次, 復經過二次蒸餾水沖洗、瀝乾, 以鋁箔紙包好, 於 180°C 乾熱滅菌 4 h 後備用。

三、血液處理

(一) 採血前準備

以 50 mL 之無菌無熱原可棄式塑膠針筒 (Terumo, 日製), 先吸取 20 mL 0.02 M theophylline (WAKO, Japan) 抗凝劑, 再裝上 1 1/2" 18G 無菌針頭備用。

(二) 採血部位與保定

採血部位為蟹頭胸甲部與腹甲背部交接關節韌帶中央。採血時先將腹甲貼於保定架, 將頭胸甲與腹甲間關節折屈, 兩手扣壓住蟹頭胸甲背部前緣保定, 使蟹不致掙脫, 露出交接關節韌帶中央, 針頭穿透韌帶膜即可直達蟹圍心腔。

(三) 採血方式

採血部位先以優碘及 70% 酒精 (以無熱原水配製, LAL reagent water, cape cod, U.S.A.) 的棉棒消毒, 俟蟹體圍心腔關節韌帶表面乾後, 再以前述 (一) 備妥之針頭潤濕後刺穿韌帶膜進入圍心腔採血 30 mL, 上下溫和搖盪針筒 3 分鐘, 使蟹血與抗凝劑均勻混合, 再緩緩注入 50 mL 無熱原離心管中。

(四) 血球固定

取上述含抗凝劑的 40 μ L 蟹血, 加入 360 μ L 的 10% 中性福馬林 (formalin dehyde solution, 10% (v/v) in aqueous phosphate buffer, OSAKA, Japan), 溫和混合均勻, 稀釋固定後進行血細胞計

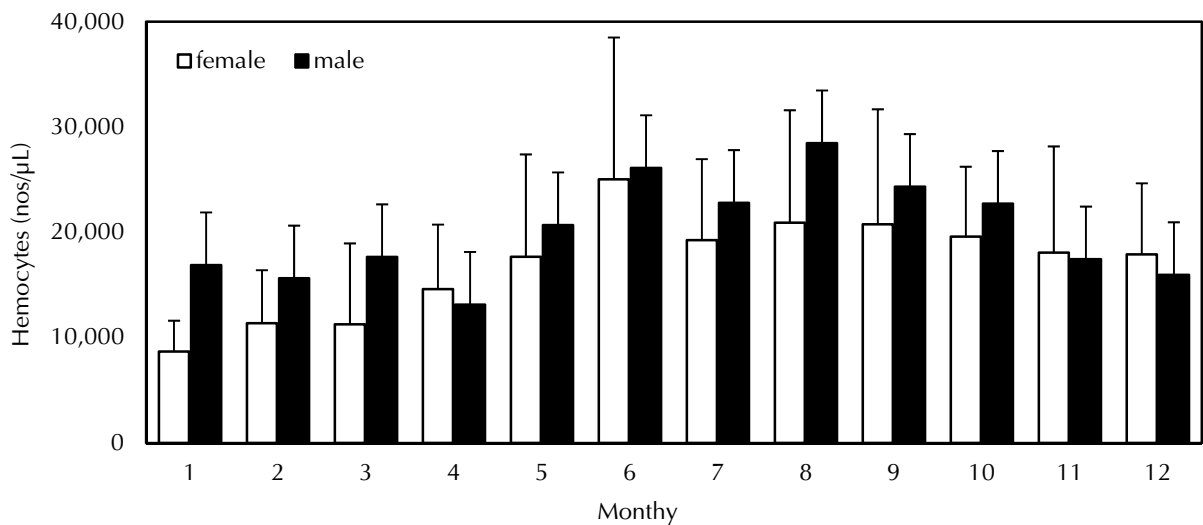


Fig. 1 Numbers of hemocytes of *Tachypleus tridentatus* (each had drawn blood once every month).

Table 1 Numbers of hemocytes of *Tachypleus tridentatus* (each had drawn blood once every month)

Sex Month	Female (N = 20)	Male (N = 20)	Total	°C*
1	8,685 ± 2,935 (14,085 ~ 4,885)	16,893 ± 9,350(39,300 ~ 4,885)	14,298 ± 8,700	18.1
2	11,375 ± 50,332 (20,243 ~ 4,255)	15,642 ± 8,581(30,933 ~ 3,360)	14,574 ± 8,070	20.1
3	11,270 ± 7,684 (30,813 ~ 6,125)	17,666 ± 7,617(30,813 ~ 7,100)	13,288 ± 7,119	21.5
4	14,620 ± 6,123 (26,540 ~ 6,488)	13,141 ± 5,769(21,300 ~ 6,088)	14,009 ± 5,775	21.8
5	17,680 ± 9,725 (36,940 ~ 2,020)	20,694 ± 9,290(31,300 ~ 5,160)	20,521 ± 10,394	24.0
6	25,042 ± 13,458 (47,500 ~ 1,2400)	26,120 ± 13,249(58,150 ~ 12,970)	27,404 ± 13,079	25.6
7	19,261 ± 7,692 (31,500 ~ 7,170)	22,810 ± 8,875(35,040 ~ 8,950)	22,146 ± 7,885	27.2
8	20,915 ± 10,685 (34,160 ~ 9,360)	28,470 ± 15,867(66,640 ~ 5,780)	26,491 ± 15,081	28.9
9	20,766 ± 10,920 (35,030 ~ 9,820)	24,332 ± 12,459(48,600 ~ 7,220)	23,403 ± 12,035	29.5
10	19,602 ± 6,635 (24,293 ~ 14,910)	22,725 ± 23,180(66,600 ~ 2,860)	22,204 ± 21,098	28.0
11	18,074 ± 10,089 (41,867 ~ 10,573)	17,450 ± 10,699(33,280 ~ 10,773)	18,447 ± 10,039	21.3
12	17,912 ± 6,749 (23,700 ~ 10,600)	15,960 ± 5,873(24,150 ~ 8,600)	16,980 ± 5,629	20.0
Total	17,865 ± 8,617 (47,500 ~ 2,020)	20,455 ± 11,041(66,600 ~ 2,860)	19,952 ± 10,563	

Mean ± sd (max ~ min)/μL

*Average temperature

數。剩下的血液移作他用。

(五) 血細胞計數

取前項固定混和液 10uL 注入無熱原拋棄式血球計數盤 (Disposable Hemocytometer, Digital Bio C-Chip, South Korea), 置於光學顯微鏡下 (Measuring microscope mm-800, Nikon, Japan) 計算細胞數量, 依說明書還原每 mL 細胞數量。

結 果

重複採血組之血細胞量月變化情形如 Table 1、Fig. 1, 雌蠶的血細胞數在 1~3 月份較低, 平均血細胞量為 11,743/μL; 4~6 月份逐月增加, 平均值 19,114/μL, 6 月份達最高為 25,042/μL, 7~9 月份平均值 20,314/μL; 10~12 月緩慢下降, 血細胞量平均值為 18,529/μL。同組的雄蠶的血細胞數

Fig. 2 The liner regression between water temperature and hemocytes of *Tachypleus tridentatus* (each one had drawn blood once every month).

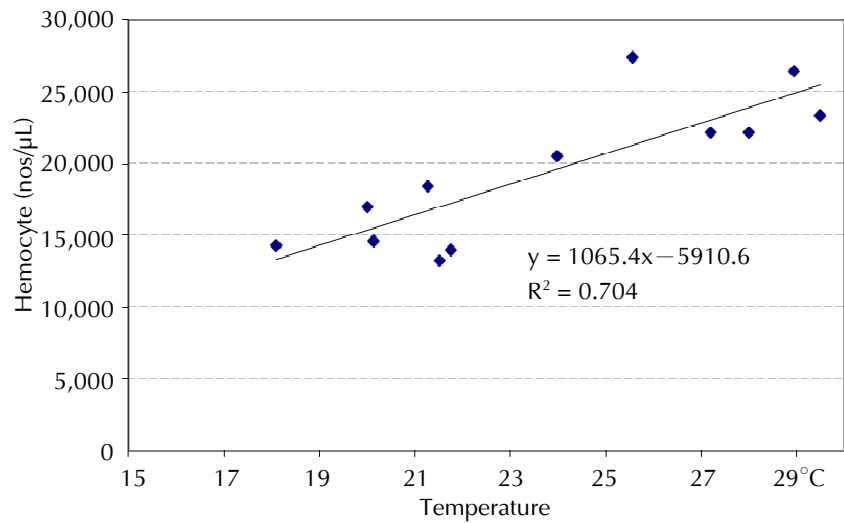


Table 2 Numbers of hemocytes of *Tachypleus tridentatus* (each one had drawn blood only once during the 12 months)

Sex Month	Female (N = 20)	Male (N = 20)	Total	°C*
1	15,889 ± 6,424 (24,750 ~ 4,125)	21,131 ± 8,400 (36,900 ~ 8,400)	18,219 ± 7,622	18.2
2	14,304 ± 6,191 (26,094 ~ 7,789)	16,553 ± 8,928 (31,154 ~ 4,236)	15,851 ± 7,712	17.2
3	21,103 ± 5,645 (29,790 ~ 14,464)	22,457 ± 9,757 (38,267 ~ 11,689)	21,979 ± 8,360	18.2
4	24,854 ± 5,850 (30,764 ~ 16,142)	26,282 ± 8,318 (39,577 ~ 10,132)	25,925 ± 7,655	17.9
5	20,557 ± 5,534 (30,946 ~ 13,481)	23,336 ± 7,821 (41,724 ~ 12,379)	22,185 ± 6,798	21.8
6	27,722 ± 4,192 (30,741 ~ 19,954)	32,678 ± 11,169 (49,021 ~ 8,637)	29,559 ± 9,251	24.0
7	29,657 ± 6,045 (35,738 ~ 23,650)	27,361 ± 9,625 (3,9631 ~ 8,365)	27,705 ± 9,087	25.3
8	25,568 ± 8,143 (36,871 ~ 14,609)	23,849 ± 6,598 (34,206 ~ 11,869)	24,365 ± 6,920	26.6
9	18,736 ± 4,327 (25,164 ~ 13,560)	32,828 ± 7,381 (45,442 ~ 22,340)	26,733 ± 8,843	28.0
10	15,694 ± 5,782 (25,751 ~ 5,679)	19,802 ± 7,753 (31,749 ~ 6,720)	17,748 ± 6,982	25.9
11	11,928 ± 4,275 (20,313 ~ 6,247)	16,314 ± 4,221 (23,514 ~ 8,335)	13,795 ± 4,599	24.9
12	11,486 ± 7,455 (25,700 ~ 3,776)	24,646 ± 3,274 (28,854 ~ 20,867)	17,335 ± 8,894	20.1
Total	20,146 ± 5,767 (36,871 ~ 3,776)	24,191 ± 7,713 (49,021 ~ 4,236)	22,107 ± 7,736	

Mean ± sd (max-min)/μL

*Average temperature

在 1~3 月份較低，平均 16,893/μL；4 月份為最低值，平均值為 13,141/μL，4~6 月份逐月增加，平均值為 19,985/μL；7~9 月份平均 25,204/μL，在 8 月份達最高，達 28,470/μL；10~12 月下降至平均值為 18,711/μL。

重複採血組全年的平均血細胞量為 19,952 ± 10,563/μL，雌性為 17,865 ± 8,617/μL，雄性為 20,455 ± 11,041/μL，除了 4 月、11 月、12 月外，雄蟹的血細胞量平均值都比雌蟹多，但除了 1 月

份外，雌雄蟹的血細胞量在統計學上並無顯著差異。不論雌雄蟹，其個體間血細胞量差異很大，雌性最高與最低相差 23.5 倍，雄性相差 23.3 倍。蟹重複採血時的血細胞量平均值與水溫平均值的線性關係為 $y = 1065.4x - 5910.6$ ， $R^2 = 0.704$ ，如 Fig. 2。

不重複採血組血細胞量月變化情形如 Table 2、Fig. 3，雌蟹的血細胞數在 1~3 月份較低，平均值為 17,099/μL；4~6 月份平均值增加到

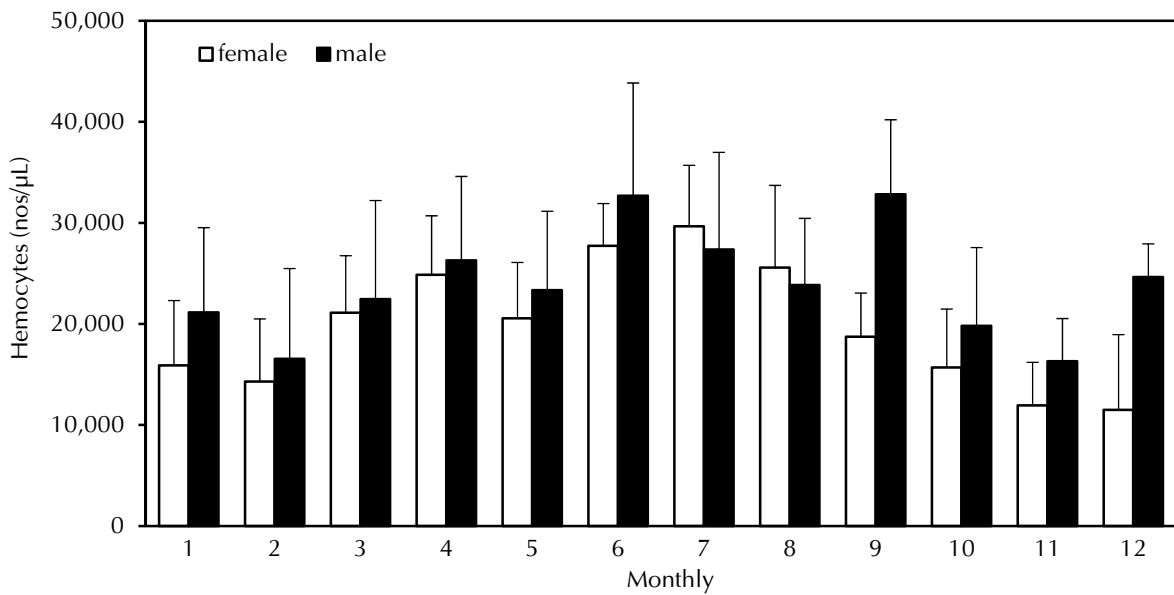


Fig. 3 Numbers of hemocytes of *Tachypleus tridentatus* (each one had drawn blood only once during the 12 months).

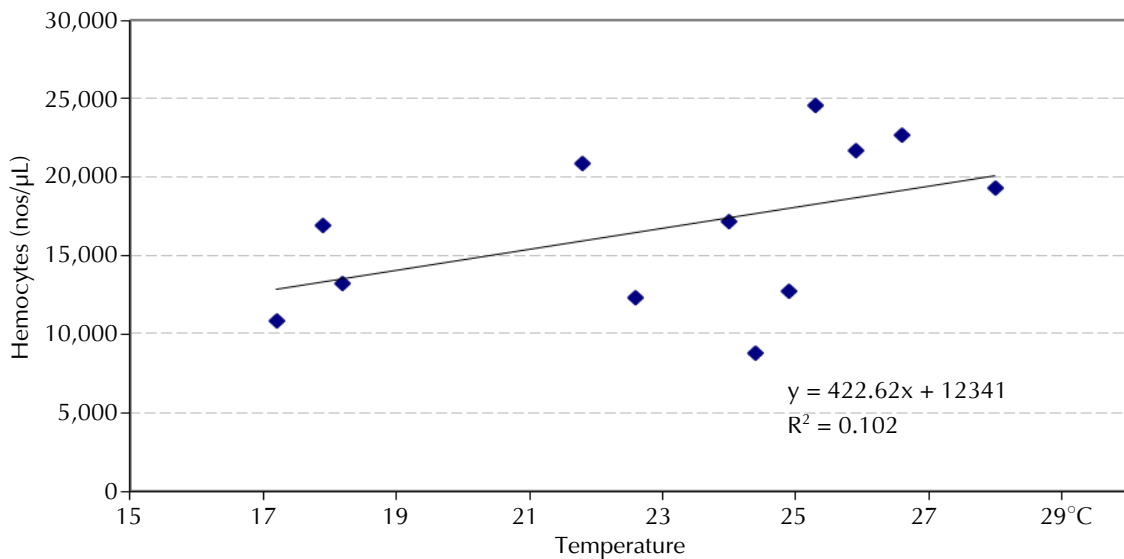


Fig. 4 The liner regression between water temperature and hemocytes of *Tachypleus tridentatus* (each one had drawn blood only once during the 12 months).

24,378/ μL ；到7月份達最高29,657/ μL ，爾後快速下降，7~9月份平均值為24,654/ μL ；10~12月下降至平均值為16,293/ μL 。雄鰲的血細胞數在1~3月份較低，平均值為20,047/ μL ；4~6月份平均值增加至27,432/ μL ；7~9月份均超過25,000/ μL ，平均值達28,012/ μL ，9月份達最高，平均值為32,828/ μL ；10~12月下降至平均值為20,254/ μL ，以11月份為最低值，平均值為16,314/ μL 。

不重複採血組全年的平均血細胞量為22,107 \pm 7,736/ μL ，雌性為20,146 \pm 5,767/ μL ，雄性為24,191 \pm 7,713/ μL ，雄鰲血細胞量平均較雌鰲多約20%。個體間血細胞量差異大，不分雌雄血細胞量最高與最低值間相差13倍，雌性最高與最低相差9.8倍，而雄性相差11.6倍。不重複採血組之血細胞量平均值與水溫平均值的線性關係為 $y = 422.62x + 12341$ ， $R^2 = 0.102$ (Fig. 4)。

討 論

蟹為甲殼類動物，壽命長，血量多，被抽血體重的 1/3 ~ 1/2 仍可存活下來，故有無脊椎動物捐血冠軍之稱 (Armstrong *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1996)。美洲蟹經過大量採血後，再釋回海中，經過一年時間的調查，發現死亡率為 11% (Rudloe, 1983)。而 Hurton (2003) 進行美洲蟹全血量研究，蟹全血量約佔體重的 25%，並比較不同採血量採血後兩週內的死亡率，發現採血量為體重的 10% 與未採血的蟹死亡率均為 2.5%，採血量 20% 為 5.1%，30% 為 10.3%，40% 則為 15.4%。本試驗供試蟹重複採血組體重介於 1020g 至 3870g，全血量推估為 255g 以上，每月採血 30mL，全年僅有 1 隻死亡，死亡率為 5%；而未重複採血組體重介於 670 ~ 4,590 g，個體全血量重 167.5 ~ 1237.5 g，採血後 2 週內死亡有 6 隻，死亡率為 2.5%，且體重均超過 1200 g。因此，本試驗每次採血 30 mL，結果與 Hurton 試驗結果相同，對試驗蟹無影響。

吳 (1983) 及吳等 (1983) 統計從野外捕獲的雌雄蟹各 350 隻的血細胞量，發現雄性較雌性的血細胞數目較多，雄性平均血細胞數為 43,000/ μ L，雌蟹則為 35,000/ μ L。其於人工養殖蟹於不同月份雌雄各採 15 隻，雌蟹血細胞數介於 30,000 ~ 41,000/ μ L，雄蟹血細胞數介於 42,000 ~ 46,000/ μ L，且採血月份不同而有所差異。Chen *et al.* (1989) 曾取 8 隻不分雌雄的蟹，初次大量採血 (放血) 時細胞數為 9,450/ μ L，隨後於第 1、3、6 個月後重複採血分別得 6,740/ μ L、9,280/ μ L、11,650/ μ L，他們認為蟹血細胞於放血後 3 ~ 6 個月可恢復。本試驗結果血細胞數量 2,020 ~ 66,600/ μ L，平均值為 21,030/ μ L 與吳等 (1983) 及 Chen *et al.* (1989) 有相當差異。本試驗採血計數法採用謝等 (2010) 方法，蟹在養殖區撈起後直接採血，無脫水之虞，加入抗凝劑降低採血時產生自發性凝集，血細胞經 10 倍中性福馬林固定，避免血細胞溶解破裂，是以血細胞數應能穩定呈現。吳等認為從野外捕獲經過運輸過程，蟹容易脫水導致血液濃縮情形，導致平均血細胞量較多。Chen *et al.* (1989) 採取大量放血方式採血，採血蟹估計血細胞需要 3 個月恢復，其血細胞平均值較本試驗結果低。

杭等 (2007) 對二種蝦蛄血淋巴數研究中，發現平均血細胞密度為 $1.755 \pm 1.086 \times 10^3$ /mL 和 $1.149 \pm 0.832 \times 10^3$ /mL，雄蝦蛄較雌蝦蛄量多。陳等 (2002) 指出中國對蝦 (*Penaeus chinensis*) 血細胞量為 1.032×10^7 /mL，克氏原螯蝦 (*Procambarus clarki*) 的血細胞量為 7.02×10^6 /mL。謝等 (2010) 檢查 2 ~ 3 月間台灣人工飼養蟹的血細胞量，雄蟹為 $24,955 \pm 15,968$ / μ L，雌蟹為 $19,004 \pm 13,755$ / μ L。由此可見，不同的甲殼類其血細胞量個體間差異很大，本試驗中兩組雄性蟹血細胞平均為 $20,455 \pm 11,041$ / μ L 及 $24,191 \pm 7,713$ / μ L，雌性 $17,865 \pm 8,617$ / μ L 及 $20,146 \pm 5,767$ / μ L，且個體差異比達 20 倍以上，血細胞量雄性較雌性多，同樣有個體間差及雄性較多的特性。

傳染性表皮與造血組織壞死症病毒 (IHHNV) 感染藍蝦及白蝦之後，可能終身帶原，並伺機透過垂直感染途徑感染子代蝦苗，或是透過病蝦間互食、或透過含有病毒的水質污染而引起水平感染其他健康的蝦隻 (Kalagayan *et al.*, 1991; OIE, 2000)。曾受 IHHNV 感染的藍蝦在觸角、頭胸甲等外骨骼處發生變形的現象。本試驗中，筆者曾就 21 個蟹血檢體進行幾種甲殼類病毒性疾病檢測，其中有 7 個檢體的傳染性表皮與 IHHNV PCR 呈陽性反應，而其中部分蟹同樣呈現頭胸甲兩側尖端畸形變鈍或步足畸形情形，其間是否有相關，待進一步驗證。另 Moullac *et al.* (1997) 表示蝦類於脫殼期間其血淋巴球的數量會減少，而降低對弧菌的抵抗力，Chang *et al.* (1999) 則發現蝦感染白點病病毒 (WSSV) 會使草蝦血淋巴球的數量減少，造成草蝦大量死亡。蟹血細胞量個體差異頗大，是否曾受疾病感染而影響蟹的造血機能導致蟹血細胞數偏低，有待進一步探討。

重複採血組血細胞數平均值和水溫平均值的線性關係 $y = 1E + 06x - 6E + 06$ ，決定係數 $R^2 = 0.7026$ ，而不重複採血組的關係式 $y = 669,193x + 6E + 06$ ，決定係數 $R^2 = 0.2186$ 。兩者之決定係數差異很大，原因為重複採血組所取檢體為相同的蟹，而非重複採血組所取檢體係隨機採樣且不重複，血細胞量因受個體間的差異及所採蟹檢體雌雄比例不同而變動很大，因而造成決定係數 R^2 降低。

蔡等 (2000) 對日本沼蝦的研究發現, 飢餓七天組與對照組平均血細胞量相差 2 倍, 推測當甲殼類營養狀態發生變化時, 可能會因為造血原粒不足, 導致造血機能下降所致。田等 (2005) 研究中國對蝦生長與水溫關係, 發現平均水溫在 22°C、25°C、28°C、31°C, 其攝餌量隨溫度增加而增加, 本試驗中發現蟹的攝食量亦隨水溫的升高而增加, 低於 15°C 時, 幾近不食, 當水溫升高時, 攝食增加而有充足的造血原粒, 血細胞數因而增加且隨水溫、季節產生變動。

目前市面上的商用蟹試劑多使用美洲蟹製成, 其製成蟹試劑的採血時機為 5~7 月, 當美洲蟹集結於岸邊產卵時捕獲 (Ehlinger and Tankersley, 2009)。本研究發現三棘蟹的蟹血細胞量在 3~10 月平均值超過 20,000/ μ L, 以 5~9 月份數量較多, 較適合製作蟹試劑之採血期。依據 Brokmann *et al.* (2009) 調查, 自然界雌雄個體美洲蟹 1.07:5, 三棘蟹非正式調查 1:1; 從本所澎湖海洋生物研究中心所購得的蟹中雌雄蟹比為 1:1.67 (N = 240), 雄蟹較多; 而就血細胞量來看, 雄蟹的血細胞數又比雌蟹多, 為保育天然蟹資源, 建議採蟹血製作試劑應以雄蟹為主。

謝 辭

感謝屏東縣家畜疾病防治所林文惠小姐協助進行蟹檢體甲殼類重要疾病白點病 (WSSV)、傳染性表皮與造血組織壞死症病毒 (IHHNV)、桃拉病毒 (TSV)、黃頭病 (YHV) 等四種病毒性疾病 PCR 的篩檢, 使本研究得以順利完成, 在此表達由衷謝意。

參考文獻

- 田相利, 董雙林, 吳立新, 王芳 (2005) 恆溫和變溫下中國對蝦生長和能量收支的比. 生態學報, 25(11): 2811-2817.
- 吳傳洪 (1983) 蟹試劑質量和中和試驗工藝研究. 蟹與蟹試驗法論文匯編(二), 廈門市醫藥研究所蟹研究室, 中國, 廈門, 25-27.
- 吳傳洪, 魏達成 (1983) 用人工飼養的蟹製備蟹試劑. 蟹與蟹試驗法論文匯編, 廈門市醫藥研究所蟹研究室, 中國, 廈門, 25-27.
- 杭小英, 陳惠群, 葉雪平, 羅毅志, 施傳達 (2007) 2 種蝦血淋巴的初步研究. 浙江海洋學院學報, 26(2): 155-159.
- 陳孝煊, 吳志新, 蔡燦東 (2002) 克氏原螯蝦與紅螯蝦血相的比較研究. 華中農業大學學報, 21(5): 458-461.
- 蔡雪峰, 羅琳, 李權 (2000) 日本沼蝦血細胞的初步研究. 水生生物學報, 24(3): 289-292.
- 翁朝紅, 謝仰杰, 洪水根 (2003) 蟹血淋巴系統的特點及其功能. 集美大學學報, 8(1): 16-21.
- 國家藥典委員會 (1993) 細菌內毒素檢查法. 中國藥典 (1990 年版第二版增補本), 化學工業出版社, 中國北京, 57.
- 劉瑞玉 (1991) 蟹. 中國大百科全書, 中國大百科全書出版社, 中國北京, 562-563.
- 歐陽高亮, 鮑仕登 (2004) 蟹血淋巴中先天性免疫系統. 海洋科學, 28(9): 66-69.
- 謝明昌, 黃丁士, 陳彥伶, 張志堅, 陳其欽, 蔡萬生, 陳文義, 林金榮 (2011) 台灣人工飼養蟹血細胞相, 水產研究, 19(1):45-53.
- 謝明昌, 黃丁士, 陳彥伶, 張志堅, 陳其欽, 蔡萬生, 陳文義, 林金榮 (2011) 蟹的研究與應用. 水試專訊, 33: 11-15.
- 譚志宜, 陳朝金, 陳章波 (1997) 蟹. 金門(國家公園)濱海潮間帶動物相調查研究期末報告, 6-1-18.
- Armstrong, P. B., R. Melchior and J. P. Quigley (1996) Humoral immunity in long-lived Arthropods. *J. Insect Physiol.*, 42(1): 53-64.
- Bang, F. B. (1953) The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. *Bio. Bull. (Woods Hole)*, 105: 361-362.
- Bang, F. B. (1956) A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 98: 325-351.
- Botton, M. L. and J. W. Ropes (1987) The horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, fishery and resource in the United States. *Mar. Fish. Rev.*, 43(3): 57-61.
- Brokmann, H. J. and M. D. Smith (2009) Reproductive competition and selection in horseshoe crabs. *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs*, 149-162.
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen, C. F. Lo, G. H. Kou and I. C. Liao (1999) Effect of dietary of dietary β -1,3-glucan on white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Dis. Aquatic Organisms*, 36: 163-168.
- Chen, I. J., S. J. Hwang and Y. M. Chen (1991) Studies on anti-aggregating drugs of horseshoe crab hemocytes. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 7: 376-381.
- Chen, S. S., H. Y. Chen and Y. Yang (1989) Cultivation of horseshoe crab hemocytes. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 5: 516-521.

- Chen, I. J., Y. J. Fang, J. J. Cheng and H. Y. Hsu (1985) Limulus test for detection of endotoxin in C.S.F. Kaohsiung J. Med. Sci., 2: 168-174.
- Chen, C. P., H. L. Hsieh, A. Chen, H. Y. Yeh, P. F. Lin and W. Wang (2009) The Conservation Network of horseshoe crabs in Taiwan. Biology and Conservation of Horseshoe Crabs, 543-557.
- Ehlinger G. S. and R. A. Tankersley (2009) Ecology of horseshoe crabs in microtidal lagoons. Biology and Conservation of Horseshoe Crabs, 149-162.
- European Pharmacopoeia Commission (1987) Bacteria endotoxins. European Pharmacopoeia Copcea, 2.1.9.
- Hurton, L. (2003) Reducing post-bleeding mortality of horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) used in the biomedical industry. Master Thesis, Virginia polytechnic Institute and State Univ., 53-60.
- Kalagayan H., G. David, R. Kanna., G. Hagino, J. Sweeney, J. Wyban and J. Brock (1991) IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *penaeus vannamei* cultured in Hawaii. J. World Aquacul. Soc., 22(4): 135-243.
- Levin, J and F. B. Bang (1964) The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Hopkins Hosp., 115: 265-274.
- Moullac, G. L., M. L. Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard, P. Levy (1997) Hematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish Shellfish Immunol., 7: 227-234.
- Office International des Epizooties (2000) Diagnostic Manual for Aquatic Animal Disease (3rd ed.), 235-266.
- Peter, B. A., R. Melchior and J. P. Quigley (1996) Humoral immunity in long-lived Arthropods. J. Insect Physiol., 42(1): 53-64.
- Rudkin, D. M and G. A. Young (2009) Horseshoe crabs - an ancient ancestry revealed. Biology and Conservation of Horseshoe Crabs, Springer Pub., New York, USA, 25-44.
- Rudloe, A. (1981) Aspects of the biology of juvenile horseshoe crab, *Limulus polyphemus* (L.). Biol. Bull., 157: 494-505.
- Rudloe, A. (1983) The effect of heavy bleeding on mortality of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, in the natural environment. J. Invert. Pathol., 42(2): 167-176.
- Smith, D. R and S. F. Michels (2006) Seeing the elephant: Importance of spatial and temporal coverage in large scale volunteer-based program to monitor horseshoe crabs. Fisheries, 31: 485-491.
- The Pharmacopoeia of Japan (1992) Bacteria endotoxins test. The Society of Japanese Pharmacopoeia, Tokyo, 21-22.
- US Department Health and Human Services (1987) Guideline on the validation of the *Limulus* hemocytess lysate test as an end-product endotoxins test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices.
- US pharmacopoeia (1995) Bacteria endotoxins test 23. NF 18: 1696.
- Yoshihiro, T., A. Mizutani and F. Tokunaga (1991) Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substance. Cell Tissue Res., 266: 137-147.

Seasonal Change of Hemocyte Counts of Captive Horseshoe Crab (*Tachypleus tridentatus*) in Taiwan

Ming-Chang Hsieh¹, Hui-Ping Tsai^{1*}, Ting-Shih Huang², Chih-Chien Chang¹, Chin-I Chang¹
Chi-Kin Chang², Shing-Jen Huang², Wann-Sheng Tasi² and King-Jung Lin¹

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Penghu Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The domesticated horseshoe crabs (*Tachypleus tridentatus*) were collected from outdoor habitats and used on this study. In 2010, 10 males and 10 females were randomly picked and each was repeatedly drawn blood 30 mL every month. In 2011, 20 horseshoe crabs were randomly picked every month. Sampled horseshoe crab was drawn blood 30 ml each and had no extra blood drawing for the rest of months. The blood samples were mixed with anticoagulant and fixed by 10 times of formalin. The hemocytes were counted by the blood cell counter and used for analysis of monthly changes. Results showed that the numbers of hemocyte were correlated with sex and seasons. The means of number of hemocyte for male horseshoe crabs (20,445/ μ l and 24,191/ μ l, sampled in 2010 and 2011, respectively) were more than for those of female (17,865/ μ l and 20,067/ μ l, sampled in 2010 and 2011, respectively). The blood samples collected in summer and autumn had more hemocytes (23,334/ μ l and 25,141/ μ l, respectively) than other seasons. The mean of hemocytes sampled from May to September (25,051/ μ L) was higher than rest periods of the year. Considering to have more hemocytes in blood, the applicable period to harvest horseshoe crab blood for making *Tachypleus* hemocytes lysate could be from May to September.

Key words: horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*, hemocytes

*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-lh Rd, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: hptsai@mail.tfrin.gov.tw