

氏名・(本籍)	じょう　づか　けん　じ 定　塚　謙　二
学位の種類	理　学　博　士
学位記番号	理　第　2　8　4　号
学位授与年月日	昭和45年9月24日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和29年3月 金沢大学理学部生物学科卒業
学位論文題目	硬骨魚類の鰓におけるイオン調節機構の研究
論文審査委員	(主査) 教授 青　木　　廉 教授 加　藤　陸奥雄 教授 樋　渡　宏　一

論　文　目　次

序　　論	
第Ⅰ章	浸透圧調節作用に対するCa ⁺⁺ の作用
第Ⅱ章	粘液細胞と塩細胞
第Ⅲ章	フナの鰓におけるイオン調節機構
第Ⅳ章	メダカの塩細胞の電子顕微鏡的観察
総　　括	

論文内容要旨

序 論

硬骨魚類の鰓が呼吸器官としてのみでなく、腎臓外 (extra-renal) の浸透圧あるいはイオン調節器官としても重要であることが近年多くの研究者により注目されている。現在は、淡水産硬骨魚類は環境水より高い体内浸透圧の恒常性維持のため、鰓を通して能動的に無機塩類を摂取し腎臓により低張尿を排出するのに対し、海水産硬骨魚は環境水より低い浸透圧を維持するため、鰓その他体表の一部及び腸を通して選択的に摂取した塩分、及び水分のうち過剰の塩類は鰓や腎臓等から排出すると考えられている。また広塩性魚は外界塩濃度の変化により前述の両様の機構を示すことが知られている。しかしこれらの場合において、鰓の能動的な塩の摂取・排出機構には未だ不明の点が多く、なお外圍の条件との連関についても残されている問題が多い。

本研究は鰓の粘液細胞および塩細胞についての一連の実験から、鰓における浸透圧調節機構について考察したものである。結果は次の4部に大別される。

第I章 浸透圧調節作用に対する Ca^{++} の作用

メダカ *Oryzias latipes* を90%人工海水または3%食塩水に移した場合、 Ca^{++} の存在は耐塩性増加即ち高張環境水における生存時間延長に著しい効果を示したが、 Mg^{++} および K^{+} にはこのような効果は全く認められなかった。また ^{36}Cl をトレーサーとして用いた実験の結果、環境水に Ca^{++} による生体膜の透過性の低下によるものと説明されてきた。しかし生体膜の透過性抑制に対し程度の差はあれ同様の効果がある Mg^{++} がほとんど影響を与えないと言う実験結果からみて、上述の Ca^{++} の保護作用は単に Ca^{++} が生体膜の透過性を低下させるということのみで簡単に説明できない。何か特異的に Ca^{++} によって影響される何等かの過程が含まれていると考えられる。

上記の実験において Ca^{++} 欠除の高張環境水においては体表の粘液が剝離・溶出して屢々液が白濁することが観察された。このような Ca^{++} と粘液との関係を考慮して、淡水産および海水産硬骨魚類を種々の濃度の稀釈海水に移した場合、鰓弁上皮のPAS陽性の粘液細胞に如何なる変化が現れるかを組織学的に調べた。一般に粘液細胞は鰓弁上皮の表層に単層をなして配列している。フナ *Carassius auratus* を淡水から30~45%海水に移した場合、鰓弁上皮の基底膜近くに多数の粘液細胞が新たに出現する。 Ca^{++} 欠除の稀釈海水に移した場合にはこの傾向は更に顕著となり、この場合の特徴として上皮表層の粘液細胞のPASに対する反応は非常に弱くなっている。これらのことから粘液細胞の分泌物は外界の浸透圧的影響に対して緩衝的役割を果しており、環境水の Ca^{++} が欠除した場合には粘液の液化が促され、結果として浸透圧の影響を直接受けることになり障害が現れるものと思われる。これは浸透圧変化に対する防禦作用における Ca^{++} の一つの重要な作用である。

第II章 粘液細胞と塩細胞

鰓におけるイオンの能動的排出には塩細胞が重要な働きをしていると考えられるが、この細胞の塩調節機能に疑問をもつ学者も少くない。著者は広塩性硬骨魚のウナギ *Anguilla japonica* およびマハゼ *Acanthogobius flavimanus* について実験を行い、淡水適応状態では鰓弁の輸入血管側上皮には極めて少数の萎縮した塩細胞が認められるのみで、それらはミトコンドリア染色に対する反応も極めて弱く、またClの組織化学的検出反応 ($\text{AgNO}_3/\text{HNO}_3$ test)にも陰性の結果を示すことを明らかにした。しかし海水に移して2~4日後にはこの細胞はやゝ肥大する傾向を示し、7~10日後にはその数・大きさ共に増大し、ミトコンドリア染色およびCl検出反応にも比較的強い反応を示すようになり、明らかに能動的な塩排出機能をもつようになる。またこの細胞の塩排出に対する機能的活性を示すと見られる apical pit は海水に適応するにつれて顕著になってくる。更に、1ヶ月後には塩細胞の数及び大きさ並びにミトコンドリア染色・Cl検出反応に対する反応の強さは最大に達する。この場合の塩細胞は長径30~35 μ 、短径10~15 μ で、鰓弁上皮表面から基底膜に達する円柱状を呈し、他の上皮細胞と容易に区別し得る。

粘液細胞は、淡水適応ウナギでは上皮表層に密に存在しPASやmucicarmineに濃染する。海水に移して2~4日後においては粘液細胞は淡水適応のものと同数か、あるいは若干多くなるが、7~10日後即ち塩細胞が増加し始めるに伴って、輸入血管側上皮において次第に減少する傾向を示し、1ヶ月後にはほとんどが消失する。以上の結果からウナギの鰓においては、海水に対する浸透圧調節の完成にはほぼ1ヶ月を要するものと思われ、粘液細胞はその間において環境水の浸透圧の影響に対する緩衝的機能を果たすものと考えられる。

マハゼを海水に移した場合の塩細胞における変化はウナギの場合と同様であるが、粘液細胞は海水に移してから1ヶ月後もウナギにおけるような著しい減少を示さない。この相違はマハゼが通常塩分変化の激しい河口域に棲む純塩性魚であるのに対し、ウナギは降河性魚であるという生態的相違に関係しているものと考えられる。

第III章 フナの鰓におけるイオン調節機構

一般に硬骨魚の鰓におけるイオン調節作用はすべて塩細胞に依ると説明されている。しかしこのような能動的な塩調節機能をもつ著しく分化した細胞がすべての硬骨魚の鰓に普遍的に出現するものではない。狭塩性淡水魚の代表種とみなされるフナでは鰓に塩細胞は全く認められず、1ヶ月間 $1/2$ 海水に飼育しても出現しない。このことは高張環境水中においては、腎臓の塩調節機能の増大あるいは鰓における他の塩排出機構の存在を示唆するものである。 $1/3 \sim 1/2$ 海水に適応したフナの鰓にCl検出反応を施した結果、淡水適応のフナの粘液細胞にはみられなかったCl反応が明らかに認められるようになった。しかし粘液細胞に塩排出機能があるとしても、それは塩細胞に比較して劣ることはそれらの細胞学的特性から明らかであり、これがフナの耐塩性に乏しい重要な一因と考えられる。

一方、フナの鰓における塩の能動的摂取については、Maetz and Garcia Romeu (1964)が Na^+

と NH_4^+ 、 Cl^- と HCO_3^- の交換機構が重要であることを報告し、この際、炭酸脱水酵素が重要な役割を果たしていることを述べている。著者はフナの鰓についてこの酵素の組織化学的検出をHAUSLER (1958)法により行い、この酵素活性が鰓薄板上皮に局在することを明らかにした。

第Ⅳ章 メダカの塩細胞の電子顕微鏡的観察

メダカは極めて耐塩性の高い特殊な淡水魚であり、淡水適応の場合にも海水適応の場合と同様に豊富な塩細胞が鰓に存在する。この点ウナギの場合とは著しく異なる。淡水適応・海水適応ならびに10日間海水飼育後再び淡水に戻した場合の塩細胞の微細構造を電子顕微鏡で観察比較した。その結果、塩細胞には多数のミトコンドリアがあり、管状構造の滑面小胞体が樹枝状に著しく発達している。また自由表面近くには比較的電子密度の高いmicrovesicleが多数存在する。これらの細胞内微細構造については淡水ならびに海水適応の塩細胞の間で明らかな相違は認められなかった。しかし塩細胞の構造における最も大きな特徴は、その自由表面に顕著なapical pitを有することである。海水適応の塩細胞がすべてこのpitを有するのに対し、淡水適応のものでは稀にしか見られない。淡水適応の多くの塩細胞ではこのようなpitを形成することなく環境水に接しているが、その自由表面にはmicrovilliの発達が著しい。淡水から海水に移すと2日後には多数のpitが認められるようになる。また海水適応後再び淡水に戻した場合、次第にpitが消失し淡水適応のそれに近い形態を示すようになることから、この変化は塩濃度の変化に伴って起る可逆的のものと思われる。このようにメダカにおいては、淡水適応の状態でも鰓には多数の塩細胞が存在し、それらは外界浸透圧の変化により形態的にも機能的にも変化するものと認められる。

総 括

環境水の Ca^{++} が魚類の耐塩性増加に著しい影響をもつことを確め、 Ca^{++} が欠除した場合は、体表特に鰓において緩衝の効果を有すると考えられる粘液もしくは粘液層の液化を促し、結果として環境水の浸透圧の影響を直接受けることになることを明らかにした。この粘液を安定に保つのが Ca^{++} の一つの重要な作用である。またウナギを淡水より海水に移した場合には、塩細胞の数が増し機能を活発に営むようになるまでの間、まず粘液分泌が高まり、その粘液が環境水の浸透圧の影響に対する緩衝的作用を演じていると思われる。

ウナギやマハゼ等の広塩性魚では、海水適応の程度に伴って鰓弁上皮に塩細胞が増加し、ミトコンドリア染色ならびに塩検出反応にも強く反応するようになる。これは鰓における塩の能動的排出機構を示唆するものである。メダカの鰓では特に淡水適応状態でも、その機能は低下していることが常に多数の塩細胞が認められ、海水に移されると速やかにapical pitを形成し塩排出機能が活発になる。これはメダカの強耐塩性の重要な一因であるとともに、純淡水魚として進化して来たメダカの海水移行に対する一種の前適応とも考えられる。これらの結果から広塩性魚は外囲の塩濃度の変化に伴って速やかに機能を適応させ得る塩細胞を鰓に有しているか、または必要に応じて作り出すことができるものであると考えられる。フナ等の狭塩性淡水魚では環境塩濃度の増大にかかわらず塩細胞は出現せず、環境水の高張

化に伴って粘液細胞が塩排出機能を示すようになる。

淡水魚におけるイオンの能動的摂取に関連してフナの 薄板上皮に炭酸脱水酵素の活性が局在することを明らかにしたが、これは鰓薄板上皮が Na^+ 及び Cl^- をそれぞれ NH_4^+ 及び HCO_3^- との交換機構によって摂取する一つの重要な経路であることを示すものである。

後 記

この論文のうち、第 I 章は

魚類の鰓における粘液分泌細胞

益子帰来也・定塚謙二, 金沢大能登臨海実験所年報 2 (1962), 1-8。

メダカの耐塩性及び⁴⁶Cl 摂取に対するCaの影響

定塚謙二・二塚征五郎, 金沢大教養部論集 1 (1964), 27-32。

第 II 章は

Chloride-excreting and mucus-secreting cells in the gills of the Japanese common eel, *Anguilla japonica* Jozuka, K. Annot. Zool. Japon., 39 (1966), 202-210。

第 III 章は

Chloride regulation by the gill of the freshwater teleost, *Carassius auratus*. Jozuka, K. Annot. Zool. Japon., 40 (1967), 205-210。

に発表されている。

参 考 論 文

1. 九十九湾プランクトン・ファウナの予察的研究
定塚謙二・西川務・益子帰来也 金沢大能登臨海実験所年報 1 (1961), 33-35。
2. 魚類におけるCa摂取と排出の経路
益子帰来也・定塚謙二 陸水雑, 22 (1961), 217-224。
3. 再生魚鱗における⁴⁶Caの沈着
定塚謙二・定塚喜久子・益子帰来也, 動雑 71 (1962), 269-273。
4. Studies on the calcium uptake by teleost fishes I. ⁴⁶Ca uptake by the crucian carp
Mashiko, K. and K. Jozuka Sci. Rep. Kanazawa Univ., 8 (1962), 107-126。
5. ベラ科魚類によるCaの摂取
定塚謙二・森田修行・安藤晴美・山辺鉄也・益子帰来也 金沢大能登臨海実験所年報 3 (1963), 11-16。
6. Absorption and excretion of calcium by teleost fishes with special reference to routes followed
Mashiko, K. and K. Jozuka Annot. Zool. Japon., 37 (1964), 41-50。
7. フナの鱗における⁴⁶Caの回転
益子帰来也・定塚謙二・森田修行 金沢大能登臨海実験所年報 4 (1964), 53-58。

8. アメリカザリガニによる ^{45}Ca の摂取と回転

宮崎光二・定塚謙二 金沢大能登臨海実験所年報4(1964), 111-120。

9. 金魚の Ca 摂取に対する外界 Ca 濃度の影響

益子帰来也・定塚謙二 金沢大能登臨海実験所年報5(1965), 17-21。

論文審査結果の要旨

魚類の体内塩分調節は複雑な機構で行われている。鰓もその一部として重要な働きをしているが、未だに不明の問題を多数残している。本研究はタイプを異にする2種の広塩性魚のメダカとウナギ及び狭塩性のフナについて、主として、鰓に存在する塩細胞及び粘液細胞の外界の塩濃度の変化に対する反応を比較検討したものである。

淡水適応のメダカを高調塩溶液(海水)に移すと、外囲に Ca^{++} を欠く場合には抵抗性は減少し生存日数は短くなる。また狭塩性のフナを30~45%海水に移すと粘液細胞の数は増加し、しかもそのPAS反応も強くなるが、 Ca^{++} を欠く30~45%人工海水中では逆に弱くなり、粘液は外部に分散してしまう。つまり塩濃度の変化に対し緩衝的役割を有する粘液質の安定剤として働くことが Ca^{++} の一つの大きな役割であることを示した。

広塩性の一つのタイプであるウナギでは、淡水適応のもの鰓には塩細胞を欠く。しかし海水に移されると塩細胞が出現しはじめ、次第に数を増し、 Cl^- 反応も強くなり一ヶ月位でその変化は最高に達する。これらの塩細胞の変化と逆に、淡水適応の鰓に多数存在している粘液細胞は海水に適応するにつれて、その数を減少し、またPAS反応も弱くなり、一ヶ月後にはほとんど消失してしまう。塩細胞の機能が完成するまでの間、粘液細胞が調節の一部を補償していると考えられる。

狭塩性のフナの鰓には塩細胞は存在しない。しかし $1/3$ - $1/2$ 海水に移されると、粘液細胞に Cl^- 反応が強くなり現われるようになる。然しその調節能は弱いと見え、外囲塩濃度がこれ以上高くなると死んでしまう。

広塩性の他のタイプのメダカでは淡水適応の鰓にも塩細胞が明らかに存在する。これらの塩細胞は発達した滑面小胞体に満たされ、またミトコンドリアも多い。この微細構造は海水に適応しても基本的にはほとんど変わらない。唯海水に適応したものでは外面に明瞭な apical pit が現われる点が違うのみである。

以上の結果から高調塩環境において魚の体内塩分調節には腎臓等による調節の他に鰓の塩細胞の働きによるものが相当大きな比重を有することを明らかにした。

以上地味な実験を積み重ねた定塚の研究成果は今後の魚類の体内塩分調節機構の研究に寄与するところが大きいと考える。よって定塚謙二提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。