Japanese Journal of Ichthyology
Vol. 25, No. 3 1978

魚類学雑誌
25巻3号 1978年

マダイ仔魚の皮ふにみられる塩類細胞について

山下金義

Chloride Cells in the Skin of the Larval Red Seabream *Pagrus major*

Kaneyoshi Yamashita

(Received March 22, 1978)

In order to clarify the mechanism of osmoregulation of the larval red seabream *Pagrus major* (Temminck et Schlegel), chloride cells of the larvae were observed from immediately after hatching to 15 days using the silver staining technique. Numerous silver-stained cells, round or elliptical in shape and 7.5～14.9 μ in diameter, were noticed as black small bodies on the whole integument of larvae. The cross section indicated that these cells were found within the epithelium. The central part of silver-stained cells was more blackly stained, where a lip or rent-like structure was found as an orifice. The network binding the silver-stained cells was also observed on the body surface.

The fluctuation of the number of silver-stained cells with different developmental stages was summarized as follows: The cells were already found on the all body surface in larvae immediately after hatching. Silver-stained cells increased in number up to 5 days, then decreased after about 8 days, and disappeared around 15 days after hatching.

Silver-stained cells are likely to be chloride cells, according to previous findings. If this assumption is true, seabream larvae are provided with chloride cells in the epithelium of the skin to regulate osmotic pressure.

(Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Matsugae-machi, Nagasaki 850, Japan)

マダイ *Pagrus major* (Temminck et Schlegel) の正常な受精卵は比重 (δ_{15}) 24.50 なので普通海水に浮く．より低い比重の海水では卵は沈下し，やがて発生が止ることが知られている．原因は明らかでないが，浸透圧の差の影響もその一つと考えられる．

発生途上の卵と同じく，器官の形態や機能が未分化の状態にある仔魚の発育にも，浸透圧調節は重要であり，とくにふ化後間もない幼弱な仔魚においてはいっそう関心がもたれる．現にマダイの種苗生産において，仔魚の膀胱および輸尿管など尿路系に異物が出現する"結石症"の発現頻度は飼育海水の塩分濃度と関係があるといわれており (南西水研育種研究室，1969; 上田他，1970; 山下，1967)，仔魚の飼育環境要因として塩分濃度の重要性を示唆している．

既往の研究によれば，海産硬骨魚の体液の浸透圧は海水のそれに比べて小さく，この状態を維持するために体内に侵入する過剰の塩類は塩類細胞 (chloride cell) によって排出されることが明らかにされている (Keys and Willmer, 1932; 川本，1962)．この細胞は鍍銀染色による Copeland (1948, 1950) の chloride test により特異的に染色されるが，筆者は，マダイ種苗生産における飼育海水の至適塩分濃度を検討するに先だって，仔魚期における浸透圧調節機構を明らかにすることを目的として，該法を応用してふ化後種々なる時期の仔魚について塩類細胞の検出を試みた．

材料および方法

供試魚 池中で自然受精された卵を比重 (δ_{15}) 25.00 の清海水でふ化させ，ふ化仔魚を 23.80 の海水に移し，シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis*, 天然産コペポーダ類で飼育しながら，ふ化直後から 15 日まで各時期の健全と思われる仔魚を 20 尾ずつ抽出採取して供試した．

塩類細胞の検出 供試魚は MS 222 で麻酔し，このうち 10 尾は Copeland (1948) の Leschke 改良法に従って，麻酔魚は直ちに，$AgNO_3+HNO_3$ 液に入れ，暗所で 18 時間放置した．引き続き蒸溜水で約 30 分間水洗，さらに，現像処理 5 時間，定着処理 2 時間と一連の鍍銀染色処理を行ったのち，明所で約 1 時間水道水で水洗，6% gluteraldehyde 液で固定し，そのまま 4°C 冷

Fig. 1. Photomicrograph showing the gland cells as numerous small bodies in the skin of a 3 day-larval red seabream *Pagrus major* (Temminck and Schlegel). (Live specimen).

蔵庫に保存して供試した．塩類細胞の検索に当っては，鍍銀染色処理魚をそのままグリセリンで封じ鏡検した．また，処理魚の一部はパラフィン切片標本とし，体表ならびに体内の器官，特に鰓，偽鰓および腎臓におけるCl反応についても調べた．一方，他の10尾はホルマリン・アルコール液で固定し，常法によりパラフィン切片標本とし，ヘマトキシリン・エオジンおよびアザン染色を施して塩類細胞観察の参考にした．また，麻酔後一部の魚は顕微鏡下で生体観察を行った．

本研究は1969年から1970の2年間にわたって，神奈川県横須賀市の観音崎水産生物研究所において行ったもので，1969年は予備実験，1970年は本実験とした．

結　果

皮ふの外部形態　マダイ仔魚の皮ふは薄く透明で，皮下組織間隙は極めて広い．ことに後頭部から尾部にわたる背側と，肛門から尾部にわたる腹側では顕著である．また，皮ふの全域には比較的密に分布する点状のものが多数みられるが (Fig. 1)，これは一種の腺細胞と思われる (後述参照)．

皮ふの"四散現象"　麻酔した仔魚を海水と共にスライドグラスにのせ顕微鏡下で観察中に，皮ふの表面が一見ばらばらにとび散るような現象がみられた．この現象は仔魚の体長測定時にもしばしば遭遇することで，突然にしかも瞬間的に進行するため細かい観察は難しく，また仔魚膜の形には特に変化はないので見落しやすい．しかし，この現象が起ると，尾部は例外なく背方へ彎曲しはじめ，体は徐々に萎縮して，仔魚は間もなくへい死する．このような魚を横断切片標本にして鏡検すると，正常魚に比べて皮ふは極度に皺を形成し，皮下組織と筋組織の間隙は極端に縮小して，体液が異常に体外へ失われたと思われる様相を示している．さらに表皮は局部的に真皮から剝離または脱落しているのが注意されたが，真皮には特に損傷は見出されなかった．このような所見から，麻酔した生体観察時の皮ふの"四散現象"は表皮の局部的な剝離または脱落に係るものと推察される．

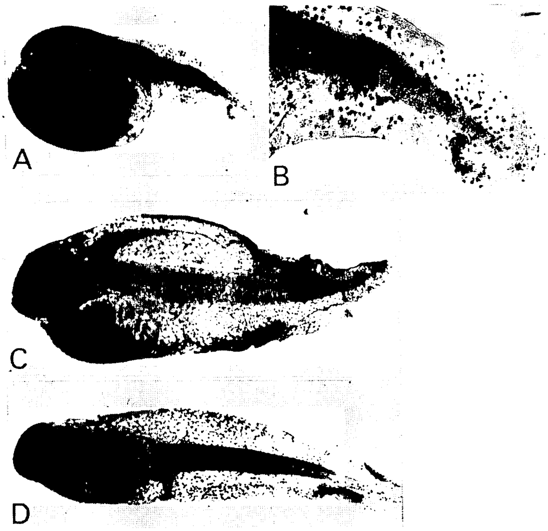

Fig. 2. Silver-stained cells in the skin of a larval red seabream. A: Larva immediately after hatching. B: Enlargement of marginal fin in A. C: Larva 20 hrs after hatching. D: Larva 24 hrs after hatching.

皮ふの組織構造　皮ふは極めて薄い2層の膜からなる．上層は扁平単層の表皮で，下層は真皮である．表皮には大型の腺細胞が散在し，とくに前頭部と下腹部では密である．これらの腺細胞はヘマトキシリン・エオジン染色ではエオジンに良く染まり，その形は円形，紡錘形などがあり，また，中には細胞質が自由面より外部に突き出た状態のものもあって，一定でない．しかし，細胞の形状や染色状態からみると，いずれも粘液細胞とみなされる．アザン染色では赤，青およびその中間色に染まる．アザン染色による染色性のちがいはおそらく粘液組胞の老若によるものと考えられる．

表皮にはこれらの粘液細胞の他に，扁平長大な腺細胞が所々に見出される．この細胞はヘマトキシリン・エオジン染色では比較的不明瞭であるが，アザン染色では細胞質は淡赤色または淡紫色に染まり，中に顆粒様物質が認められる．核は濃い赤色に染まって細胞の側端に扁在している場合が多い．一方，このような表皮に分布する大型の腺細胞と形状および染色状態が酷似した細胞がふ化後間もない仔魚の口腔奥部上縁 (Fig. 4 A, B) や，ふ化後8日の鰓上皮に見出されている (山下，1978)．

皮ふの黒色小体　ふ化直後および20時間の鍍銀染色処理魚 (以下処理魚と呼ぶ) の鏡検によれば，尾部体表には径 7.5〜14.9μ の円形または楕円形の黒色小体が多数認められた (Figs. 2A, B, C and 5C)．これらは鍍銀染色による Cl 反応とみなされる．なお，組織の厚い体

前部では小体の存在はやや不明瞭であったが，横断切片標本によって，体表全域にわたって分布すること，ならびにその出現部位は表皮中であることが確められた (Fig. 5A, B)．さらに，小体を強拡大で鏡検すると，内部に黒色の顆粒が密に分布しており，小体の黒化はこれによるものと判断された．しかし，黒色顆粒の分布はかならずしも均一ではなく，概して，小体の中央部では密，周縁部では疎である．小体の中央部には開口部とみられる唇状または不規則な裂孔状の構造が認められ，裂孔の内部は一段と黒化が強い (Fig. 5D)．

黒色小体の消長　体表に見出された黒色小体の消長について，ふ化直後から 15 日までの各期処理魚について観察した．

ふ化直後：　尾部では小体の存在は明瞭である (Fig. 2A, B)．同期の横断切片標本では卵黄嚢上面の表皮全域にも認められた (Fig. 5A, B)．

ふ化後 20 時間：　体表に分布する小体の数および密度は，多少の個体差はあるが，ふ化直後に比べて明らかに増加している (Fig. 2C)．さらに，ふ化直後では認められなかった黒色の網目構造が見出された．この網目構造は小体相互を連結するような形で分布し，網目を構成する“すじ”は顕著な Cl 反応を示している (Fig. 5C)．

ふ化後 1～5 日：　ふ化後 1 日では，ふ化直後に比べて小体数は大差ないが，網目構造の Cl 反応は一層鮮明となって体表の広い範囲に出現する (Fig. 2D)..　その後，5 日頃までは，小体，網目構造ともさしたる変化はみられない (Fig. 3A)．

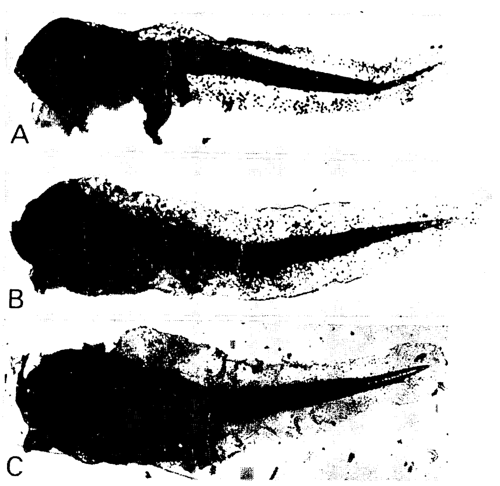

Fig. 3.　Silver-stained cells in the skin of a larval red seabream.　A: Larva 5 days after hatching.　B: Larva 8 days after hatching.　C: Larva 15 days after hatching.

ふ化後 8～15 日：　小体の分布密度は 8 日では明らかに減少している (Fig. 3B)．この減少は同期の処理個体 5 尾についても共通して認められることから，artifact とは認められ難い．さらに，ふ化後 15 日では体表の一部に網目構造は認められるが，黒色小体はほとんど見出されなくなる (Fig. 3C)．

一方，処理個体のパラフィン切片標本では，ふ化後 8 日の偽鰓周辺の口腔上皮に分布する大型の腺細胞に Cl 反応が認められた (Fig. 6A)．これらの腺細胞はアザン

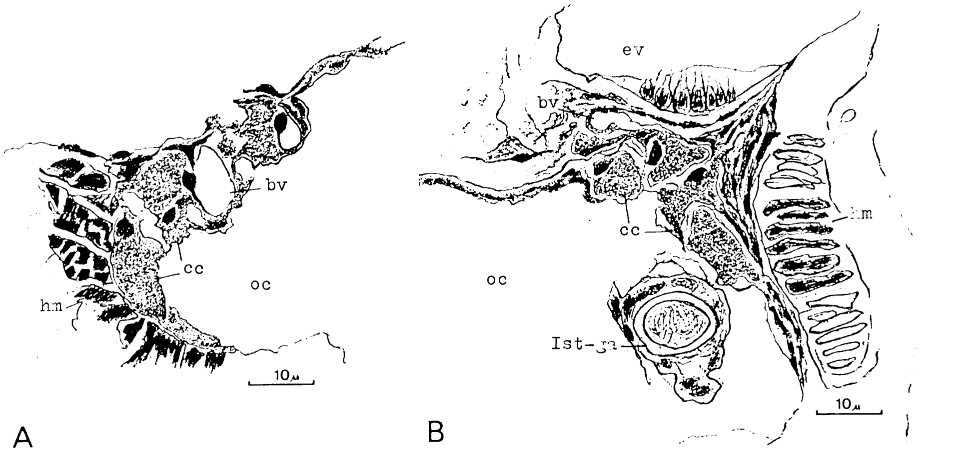

Fig. 4.　Diagramtic drawings showing chloride cells in the epithelium of the oral cavity of a larval red seabream, illustrated through cross section (azan-stained).　A: 20 hrs after hatching.　B: 3 days after hatching.　cc, chloride cell; hm, hyomandibulare; oc, oral cavity; bv, blood vessel; Ist ga, 1st gill arch; ev, ear vesicle.

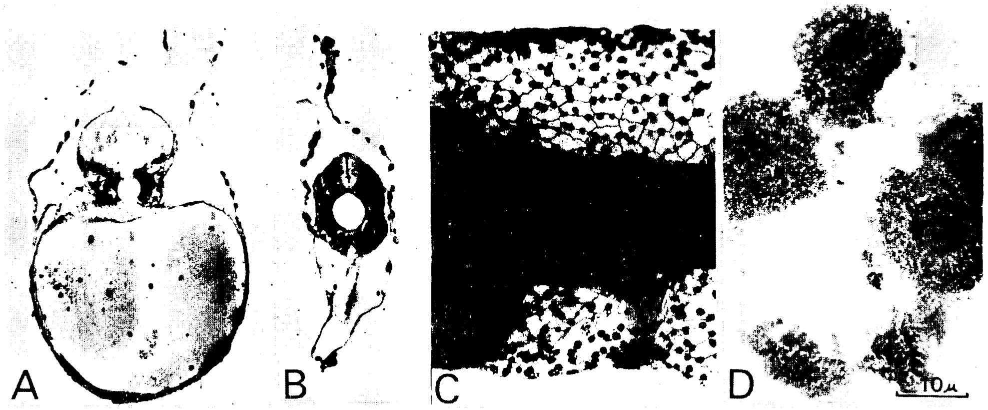

Fig. 5. Photomicrographs showing chloride cells and network in the skin of a larval red seabream (silver-stained). A: Cross section at the abdomen (yolk sac) of newly hatched larva. B: Cross section at the trunk in A. C: Larva 24 hrs after hatching. D: Enlargement of chloride cells in C.

Fig. 6. Photomicrographs showing chloride cells in the epithelium of oral cavity of larval red seabream. Cross section through the median part of head. A: 8 days after hatching (silver-stained). B: 5 days after hatching (azan-stained). C and D: Showing Cl-reaction in the epithelium of the nephron, 13 day-old larval red seabream, cross section through the trunk (silver-stained).

染色標本で観察された顆粒物質を有する大型の腺細胞 (Figs. 4A, B and 6B) と形状および出現部位が一致しており，おそらく同一細胞とみられる．また，ふ化後 13 日には細尿管上皮細胞の基底部に強い Cl 反応が認められた (Fig. 6C, D).

考　察

麻酔生体の観察で認められた皮ふの“四散現象”は表皮の局部的な剝離または脱落によることはすでに述べた通りであるが，その原因はおそらく麻酔魚をスライドグラスに移すさいに表皮を損傷したか，あるいは，鏡検中に強い人工照明の熱によってスライド上の海水が過度に高張になり，仔魚の表皮がこれに耐えられなかったためと考えられる．岩井 (1969) は一般に仔魚は飼育中に皮ふの外傷によって死亡することが少なくなく，体内の水分を保持するうえで皮ふの重要性を指摘しているが，本観察はこのような例と思われる．

鍍銀染色によって検出された塩類細胞の性状について Copeland (1948, 1950) および Burns and Copeland (1950) は塩類細胞は外界に接する面に開口部 (apical vesicle or pit) をもち，細胞全体，とくに pit の周辺に強い Cl 反応が出ると述べ，また，Shelbourne (1957) はタラ (cod), カレイ類 (dab and plaice) 仔魚の表皮中に網目構造と Cl を含む小体を認めている．さらに，電子顕微鏡観察では，Lasker and Threadgold (1968) はマイワシ *Sardinops caerulea* Girard の仔魚で，岩井 (1969) はクサフグ *Fugu niphobles* Jordan et Snyder の仔魚でそれぞれ表皮中に塩類細胞を認め，浸透圧調節面での皮ふの重要性を指摘している．

本観察で見出されたマダイ仔魚表皮の黒色小体は，上

記塩類細胞の性状と極めて類似しており，塩類細胞とみてまず間違いないと考えられる (Fig. 5A～D). もしそうだとすれば，マダイ仔魚はタラ，カレイ類，マイワシおよびクサフグと同様，表皮中に塩類細胞をそなえ，その皮ふは浸透圧調節器官として重要な役割りをはたしているものと思われる.

一般に，海産硬骨魚の浸透圧は鰓，腎臓および腸によって調節されていることはすでによく知られているところであり，マダイもその例外ではなかろう．一方，タラ，カレイ類，マイワシおよびクサフグの仔魚では皮ふが重要な浸透圧調節器官であること，そして，マダイ仔魚もその可能性が大きいことは，すでに述べた．このことは，鰓や腎臓などの浸透圧調節に直接関係のある器官の発達が不充分な仔魚期においては，皮ふは主要な代行性器官であることを示している.

そこで，次の関心は浸透圧調節機能が成魚にみられるような器官に移行する機構と時期である。このことは生物学的興味はもとより，仔魚の飼育技術の上からも注意される課題と思われる.

本研究はこのことを考慮して実験，観察を試みたが，観察検体が少なく (平均4尾)，その上，ふ化後7日以降は流水飼育にしたため飼育条件，特に塩分濃度が一定でないので，詳細な比較検討はできなかった．それでも，ふ化直後から5日頃までの "浮遊期" とみなすべき時期に体表の黒色小体は増加傾向を示すのに対し (Fig. 2A～D, 3A)，遊泳ならびに摂餌行動に顕著な随意性が発達しはじめるふ化後8日頃から減少傾向がみられること (Fig. 3B, C)，さらに，この頃より鰓とその周辺の上皮，偽鰓組織周辺の口腔上皮などに分布する塩類細胞 (Fig. 6A, B)，さらには細尿管上皮細胞の基底部 (Fig. 6C, D) など，体内部の器官または組織に強い Cl 反応が認められたことから，マダイ仔魚における浸透圧調節機能の移行期がふ化後8日から 15 日の間という見方もできる.

網目構造の機能についての詳細は明らかでないが，網目は黒色小体を連結し，強い Cl 反応を示していること，そして，その消長は小体のそれとほぼ一致していることなどから推察すると，仔魚の浸透圧調節機能に何らかの形で関与しているものと思われる.

謝　辞

本研究を進めるにあたり，塩類細胞検出法に関する文献の御指示と有益な御助言をいただいた金沢大学教養部教授定塚謙二博士，御指導と本稿の御校閲をいただいた東海大学海洋学部教授四竈安正博士に心から感謝の意を表する.

引 用 文 献

Burns, J. and D. E. Copeland. 1950. Chloride excretion in the head region of *Fundulus heteroclitus*. Biol. Bull., 99: 381～385.

Copeland, D. E. 1948. The cytological basis of chloride transfer in the gills of *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol., 82: 201～227, figs. 1～32, pls. 1～4.

Copeland, D. E. 1950. Adaptive behavior of the chloride cell in the gill of *Fundulus heteroclitus*. J. Morphol., 87: 368～380, figs. 1～10, 1 pl.

岩井　保. 1969. クサフグ仔魚の皮ふにみられる塩類細胞 "Chloride cells" について. La mer (日・仏海洋学会誌), 7(2): 26～29, figs. 1～4.

Key, A. B. and E. N. Willmer. 1932. "Chloride-secreting cells" in the gills of fishes with special reference to the common eel. J. Physiol., 76: 368～378.

川本信之. 1966. 新版魚類生理生態学. 恒星社厚生閣，東京，374 pp.

Lasker, R. and L. T. Threadgold. 1968. "Chloride cells" in the skin of the larval sardine. Exp. Cell. Res., 52: 582～590, figs. 1～5, 1 pl.

南西水研増殖部育種研究室. 1969. 水産生物の病害防除に関する研究. 海産仔魚の疾病に関する研究. 水産増殖研究推進会議資料，6 pp.

Shelbourne, J. E. 1957. Site of chloride regulation in marine fish larvae. Nature, 180: 920～922, figs. 1～2.

上田和夫・石岡宏子・岡本　亮・福原　修. 1970. 種苗生産に関する基礎的研究. 第一報. マダイ仔魚期における膀胱内異物成形と成長・死亡との関係について. 南西海区水産研究所報告，(3): 1～9, figs. 1～9.

山下金義. 1967. マダイ養殖の基礎的研究. V. 稚仔の疾病について (3) 膀胱結石. 日本水産学会年会要旨，40.

山下金義. 1978. マダイ仔魚の鰓形態の分化について. 魚類学雑誌，25(2): 141～148, figs. 1～5.

(850 長崎市松ケ枝町　長崎県水産試験場)