

発眼期シシャモの卵黄囊上皮に存在する塩類細胞

誌名	北海道立水産孵化場研究報告 = Scientific reports of the Hokkaido Fish Hatchery
ISSN	02866536
著者	隼野, 寛史 小島, 博 村上, 豊
巻/号	53号
掲載ページ	p. 67-72
発行年月	1999年3月

発眼期シシャモの卵黄囊上皮に存在する塩類細胞

隼野 寛史*¹・小島 博*²・村上 豊*¹・金子 豊二*³

Chloride cells in the yolk-sac membrane of eyed-stage embryos of long-finned smelt, *Spirinchus lanceolatus* (Hikita)

Hirofumi Hayano*¹, Hiroshi Kojima*², Yutaka Murakami*¹, and Toyoji Kaneko*³

Abstract

For the detection of chloride cells (CCs), whole-mount preparations of the yolk-sac membrane of long-finned smelt, *Spirinchus lanceolatus* (Hikita), were immunocytochemically stained with an antiserum specific for Na⁺, K⁺-ATPase. A large number of immunoreactive chloride cells with immunonegative nuclei were detected in the epithelia covering the outer surface of the yolk-sac membrane. To assess the activity of the CCs in different salinities, changes in sectional area of the chloride cells were examined after transfer to 12 (BW) and 34 (SW) ‰ sea water. The area of the chloride cells was significantly increased 14 days after transfer to SW, whereas such increase was not observed in the embryos exposed with fresh water and BW. Some CCs appeared to be closely associated with each other to form a cellular complex, as evidenced by the presence of more than one immunonegative nucleus. The activated CCs in the yolk-sac membrane in the SW group probably function in place of the gills as ion-extruding sites during embryonic stages of long-finned smelt.

Key words : シシャモ, 発眼期, 卵黄囊上皮, 塩類細胞, 海水適応能

シシャモ *Spirinchus lanceolatus* (Hikita) は北海道の太平洋沿岸域のみに分布する遡河性回遊魚で、漁業上重要な魚種である。シシャモの生物学的な研究に関して、これまで生態(例えば、疋田, 1913; 伊藤, 1958, 1963, 1964; 尾身, 1978 b) や卵発生(疋田, 1958; 岡田・佐々木, 1960; 尾身, 1978 a) に関する報告は比較的多く見られるものの、生理学的な知見は少ない。

一般に、硬骨魚類の鰓、腎臓および腸は浸透圧調節器官として重要な役割を果たしている(平野, 1991)。中でも、鰓に存在する塩類細胞は様々なイオン環境へ

の適応に大きく貢献しており、海産魚では体液中の過剰な Na⁺ や Cl⁻ を排出する役割を担っている(Zadunaisky, 1984)。一方、これらの器官が十分に発達していない胚期や仔魚期でも、体液のイオン組成や浸透圧は一定に維持されている(Alderdice, 1988)。シシャモと同様な生活史を有するサケやその他いくつかの魚種では、胚期や仔魚期の卵黄囊上皮にも塩類細胞が発見され(Ayson *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1995; Sasai *et al.* 1998)、未発達な鰓の機能に代わって体液の浸透圧調節に深く関わっていることが報告さ

*¹北海道立水産孵化場 (Hokkaido Fish Hatchery, Kitakashiwagi 3-373, Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan)

*²北海道水産林務部 (Hokkaido Government, Department of Fisheries and Forestry, Kita 3, Nishi 6, Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8588, Japan)

*³東京大学海洋研究所 (Ocean Research Institute, University of Tokyo 1-15-1, Minamidai, Nakano, Tokyo 164-8639, Japan)

れている (Kaneko *et al.*, 1995)。

ふ化間近なシシャモ卵は淡水から海水へ移行しても死亡せず、ふ化することが知られている (尾身, 1978 a; 北海道立水産孵化場, 1994)。このことは、胚期のシシャモにおいても、何らかの機能が海水中での体液の浸透圧調節に関与している可能性を示唆している。

本研究では、塩類細胞がシシャモ卵の浸透圧調節に関与しているとの仮説を持ち、 Na^+ 、 K^+ -ATPase に対する抗体を用いて免疫組織化学的に塩類細胞の検出を試みた。

材料および方法

海水移行実験

供試卵は、1997年11月に北海道日高地方の鷓川に遡上したシシャモ親魚から得た受精卵で、発眼後に北海道恵庭市にある北海道立水産孵化場へ輸送した。海水移行実験は、供試卵を2群に分割して、1群をそのまま淡水中で培養し、他の2群を12%、あるいは34%の人工海水中へ移行して行った(以下、淡水をFW, 12%をBW, 34%をSWと記す)。供試卵は実験期間中2°Cで培養し、移行前(以下、FW 0群と記す)および移行後14日目(以下、各移行群を、FW 14群、BW 14群、SW 14群と記す)に、室温の4% paraformaldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) で24時間固定後、70%のアルコール中に保存した。

塩類細胞の免疫組織化学染色

塩類細胞の検出は、抗体の希釈率および反応時間を若干変更した以外は、基本的に Shiraishi *et al.* (1997) および Sasai *et al.* (1998) の方法に従った。すなわち、免疫組織化学染色用に市販されている Vectastain ABC キット (Vector Laboratories, Burlingame, CA) と Na^+ 、 K^+ -ATPase に対する抗体を用いて Whole-mount 免疫組織化学試料 (Ohtani *et al.*, 1989) を作成し、染色された塩類細胞を光学顕微鏡で観察した(各群10個)。なお、本研究に用いた Na^+ 、 K^+ -ATPase に特異的な抗体は Ura *et al.* (1996) の方法に従い、ウサギで作成した。

以下に手順を簡単に示す。

- 1) 70%アルコール中に保存した試料を 0.01 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 中に置き換え、卵殻を除去する。
- 2) 0.1% sodium cyanoborohydride in 0.01 M PBS 中で試料を 30 分間攪拌する。
- 3) anti- Na^+ 、 K^+ -ATPase を 0.05%, Triton X-100, 10% normal goat serum, 0.1% bovine serum albumin, 0.01% sodium azide 含有 PBS (TPBS) で 1,000 倍に希釈し、この中に試料を浸漬して 4°C で一晚反応させる。
- 4) 試料を PBS で 3 回洗浄 (各回 15 分間) し、TPBS で 200 倍に希釈した BA (biotinylated anti-rabbit IgG) に浸漬して 4°C で一晚反応させる。
- 5) 試料を PBS で 3 回洗浄 (各回 15 分間) し、TPBS で 100 倍に希釈した ABC (avidin-biotin-peroxidase の複合体) と 4°C で一晚反応させる。
- 6) 試料を 0.03% 4-Cl-1-naphthol in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.003% H_2O_2 に浸漬し、室温で 8 分間発色させた後、PBS で、3 回洗浄 (各回 15 分間) して発色を止める。
- 7) 試料をスライドグラスにのせグリセリンで封入して、発色した塩類細胞を顕微鏡で観察する。

塩類細胞の形態比較

海水中の塩類細胞は複合体を形成し、立体的に発達した構造を有する (Shiraishi *et al.*, 1997) ため、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (Zeiss, LSM 310) の連続断面像を用いると、平面的にその大きさを把握することができる。LSM による塩類細胞の観察は、基本的には Shiraishi *et al.* (1997) の方法に基づいて次の手順で行った。

- 1) 70%アルコール中に保存した試料 (各群 10 個) を PBS 中に置き換え、卵殻を除去する。
- 2) FITC (fluorescein isothiocyanate) で標識された anti- Na^+ 、 K^+ -ATPase を TPBS で 500 倍に希釈し、この中に試料を浸漬して約 3 時間反応させる。
- 3) 染色後、各群からそれぞれ 3 個体を抽出し、LSM で塩類細胞の形態を観察するとともに、その連続断面像から面積を測定する (1 個体につき 10 細胞)。

検定

塩類細胞の面積は、FW 0 群と FW 14, BW 14, SW 14 群間、および SW 14 群と FW 14, BW 14 群間の分散を比較した後、Cochran-Cox 法によって平均値を比較した。

結 果

シシャモ胚体の両背側付近の卵黄嚢上皮に多数の染色された塩類細胞と、その中に未染色の核が検出された (Fig. 1A)。光学顕微鏡による観察では、塩類細胞は FW 0, FW 14 および BW 14 群で小さく、SW 14 群で大きかった。SW 14 群で検出された大型の塩類細胞の中には、細胞が連結して複合体を形成しているものが認められ、この様な細胞では核が複数存在した (Fig.

1E)。しかし、光学顕微鏡では複合体を形成している塩類細胞を全て正確に識別することは困難であった。

塩類細胞の大きさを比較するため、LSM による連続断面像 (Fig. 2) から細胞毎の面積を測定した。塩類細胞の面積の平均値±標準誤差は、FW 0 群で $170 \pm 10 \mu\text{m}^2$ (n=30), FW 14 群で $188 \pm 6 \mu\text{m}^2$ (n=30), BW 14 群で $179 \pm 5 \mu\text{m}^2$ (n=30), SW 14 群で、 $296 \pm 12 \mu\text{m}^2$ (n=30) であった。FW 0 群と FW 14 および BW 14 群間で面積の平均値に有意差はなかったが ($P > 0.05$), SW 14 群と FW 0, FW 14, および BW 14 群間では、

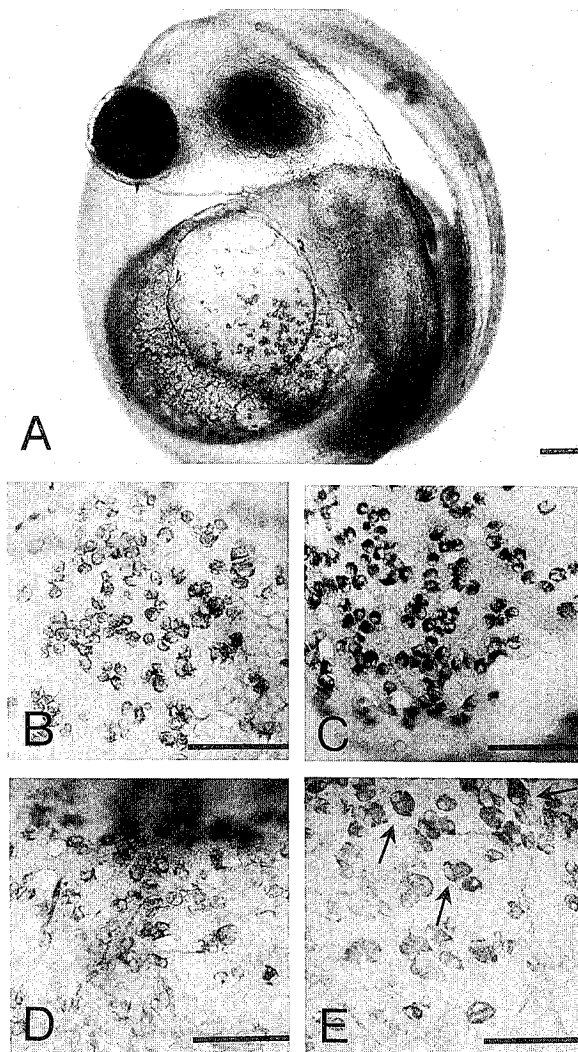


Fig. 1. Chloride cells in the yolk-sac membrane of long-finned smelt embryos before transfer (A, B) and 14 days after transfer to FW (C), BW (D) and SW (E). Chloride cells were detected by whole-mount immunocytochemistry with anti- Na^+ , K^+ -ATPase. chloride cell complexes are frequently observed in SW (arrows in E). Bar, $25\mu\text{m}$.

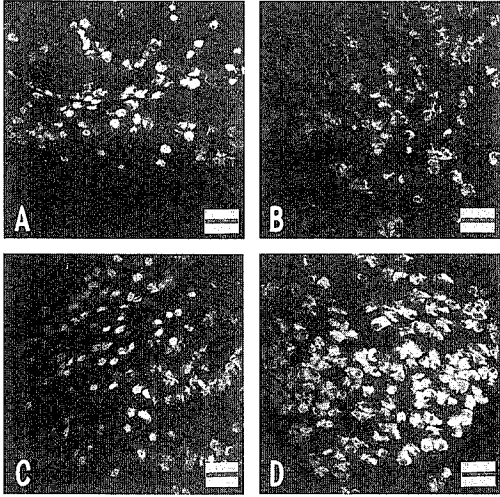


Fig. 2. Confocal laser scanning micrographs of FITC-positive chloride cells in the yolk-sac membrane of long-finned smelt embryos before transfer (A) and 14 days after transfer to FW (B), BW (C) and SW (D). Bar, 25 μ m.

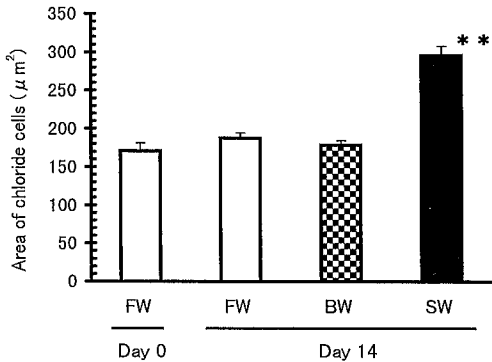


Fig. 3. Changes in sectional areas of chloride cells in the yolk-sac membrane following transfer from fresh water (FW) to 12 (BW) and 34‰ (SW) sea water. Data expressed as the mean \pm SEM ($n=30$ from three embryos). **Significantly different from the initial value (FW 0, FW 14, BW14) at $P<0.01$.

SW 14 群の塩類細胞が有意に大きかった ($P<0.01$) (Fig. 3)。

考 察

塩類細胞は魚類の鰓などに多く見られるミトコンドリアに富んだ大型の好酸性細胞で、海産魚の成魚では体液中の過剰な Na^+ や Cl^- を体外へ排出する役割を

担っている (Zadunaisky, 1984)。また、 Na^+ 、 K^+ -ATPase は、海産魚の塩類細胞の主要な機能である、塩類排出の中心的な役割を果たす酵素の 1 種であり (McCormick, 1995)、塩類細胞の細胞質に密に分布する管状構造の膜上に存在する (金子, 1997)。そのため、 Na^+ 、 K^+ -ATPase に対する抗体を用いて免疫組織化学的に鰓の切片を染色すると、塩類細胞が特異的に検出できる (Ura *et al.*, 1996)。

胚期や仔魚期の魚類では、未発達な鰓の機能に代わって、卵黄囊上皮に存在する塩類細胞が体液の浸透圧調節に深く関わっていることが知られている。すなわち、発眼期のシロサケを海水中に移行するとすぐには死亡せず、卵黄囊上皮の塩類細胞が顕著に大型化するという (Kaneko, 1995)。また、広塩性魚のティラピアでも、浸透圧調節器官が十分に発達していない発眼期や仔魚期には卵黄囊上皮に存在する多くの塩類細胞がイオン輸送や浸透圧調節に重要な役割を果たしており、海水中では大型、淡水中では小型の細胞へと変化する (Ayson *et al.*, 1994; Shiraishi *et al.*, 1997)。このような、塩類細胞の形態学的観察結果と海水移行に伴う Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性の上昇 (McCormick, 1995) は良く一致する (金子, 1997)。

本研究では、発眼期のシヤマモを Na^+ 、 K^+ -ATPase に対する抗体で免疫組織化学的に染色したところ、卵黄囊上皮に多くの塩類細胞が検出され、海水移行 (SW 14 群) に伴って顕著に大型化した。このことは、未発達な鰓の機能に代わって塩類細胞が海水中での主要な塩類排出の場となっていることを示唆するものであり、発眼期のシヤマモが海水適応能を有している証拠となり得る。

海水中における塩類細胞には、その他にもいくつかの形態的特徴が知られている。Shiraishi *et al.* (1997) は LSM による連続断面像の解析から、海水中の塩類細胞が 1 つの発達した塩類細胞と 1 個ないし 2 個のアクセサリ細胞 (accessory cell) との複合体 (complex) を形成すると報告しており、海水中で発達する複合体が、体内に過剰となる Na^+ や Cl^- の排出の場であると考えられている (金子, 1997)。本研究においても、明瞭ではなかったが複数の核を有する大型の塩類細胞が認められ、塩類細胞複合体が検出された。また、海水へ移行したシロサケやティラピアでは、塩類細胞の大型化に伴い、外部環境に接する細胞頂部において開口

部 (apical pit) の拡張が観察される (Ayson *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1995; Shiraiishi *et al.*, 1997)。しかし、今回は走査電子顕微鏡で観察しなかったので開口部は検出できなかった。本研究で、BW 14 群には塩類細胞の形態変化は認められなかった。BW 14 群の塩分濃度は 12% で、体液とほぼ等張であることから、生体内外においてイオン濃度の勾配が生じず、塩類細胞が活性化されなかったものと考えられる。

シシャモは河口から数キロメートル上流の浅瀬で産卵し (伊藤, 1964; 尾身, 1978a; 北海道開発局室蘭開発建設部・北海道立水産孵化場, 1978), 受精卵はふ化するまで河床の砂礫に付着している (疋田, 1958)。発眼期のシシャモに海水適応能が認められたことから、産卵場の形成される下流域は海水の影響を受けるのではないかと予想されるが、北海道日高地方の鶴川, 新冠川, 静内川, および沙流川において、明瞭な塩分濃度の分布は認められていない (北海道開発局室蘭開発建設部・北海道水産孵化場, 1978)。一方、尾身 (1978a) は北海道東部太平洋沿岸の河川に産卵されたシシャモ卵の分布状態を調べ、卵が川底の砂礫に付着した状態で、常時水流によって下流へ移動していることを観察した。これに従えば、着床したシシャモ受精卵は秋の降雨や春先の融雪増水などにより、一部が海水域や混合域まで流下してしまう可能性も考えられる。今のところ、シシャモ卵が沿岸で採集された報告はなく、胚期の海水適応能に直接結びつくような資料は得られていない。しかし今回の結果から、発眼期に達したシシャモ卵が、仮に海水域や混合域に流下した場合にも、塩分環境に適応し、資源に貢献しうる可能性を有していることが示唆された。

要 約

1. 塩分耐性を有する発眼期のシシャモ卵において塩類細胞の検出を試みた。
2. Na^+ , K^+ -ATPase に対する抗体を用いて Whole-mount 免疫組織化学的に発眼期のシシャモを染色したところ、卵黄嚢上皮に多くの塩類細胞が検出された。
3. 塩類細胞の形態は、淡水中および 1/3 海水中で変化が認められず、海水中では顕著に大型化した。
4. 海水移行群の塩類細胞の中には、複数の核を有す

る塩類細胞複合体が認められた。

5. 海水中で大型化した塩類細胞は、未発達な鰓の機能に代わって、塩類排出の場になっている可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、塩類細胞の検出は東京大学海洋研究所海洋生物生理部門において行い、研究室の皆様のご協力を賜ったことに対して深謝の意を表す。また、供試卵の入手に際して、鶴川町漁業協同組合、並びに北海道立水産孵化場楠田聡氏のご配慮を賜ったことに感謝申し上げる。

貴重なご意見と文献を提供していただいた、北海道立水産孵化場大久保進一氏に感謝の意を表す。

文 献

- Alderdice, D. F. (1988). Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae. In Fish physiology. Volume 11A. (W. S. Hoar and D. J. Randall, eds.), pp.163-251. Academic Press, New York.
- Ayson, F. G., Kaneko, T., Hasegawa, S., and Hirono, T. (1994). Development of mitochondrion-rich cells in the yolk-sac membrane of embryos and larvae of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, in fresh water and seawater. *The Journal of Experimental Zoology*, **270**, 129-135.
- 疋田豊治 (1913). 本邦産 Argentinidae の一新種について、動物学雑誌, **25** (293), 1-3.
- 疋田豊治 (1958). 柳葉魚 (シシャモ) *Spprinchus Lanceolatus* (Hikita) の発生について、北海道立水産孵化場研究報告, **13**, 39-49.
- Hirano, T. (1991). Marine Biology. (J. Mauchline, T. Nemoto, eds.), p.3 Kokusen-Sha.
- 北海道開発局室蘭開発建設部・北海道立水産孵化場 (1978). 沙流川におけるシシャモ資源と漁業の実態調査報告書, 1-173.
- 北海道立水産孵化場 (1994). シシャモ資源増大緊急対策試験. 平成 4 年度北海道立水産孵化場事業成績

- 書, 61-75.
- 伊藤小四郎(1958). 柳葉魚の生殖巣並びに孕卵数について. 魚類学雑誌, **7**(2/3/4), 57-60.
- 伊藤小四郎(1963). シシヤモの生態調査II. 地域性について. 北海道立水産孵化場研究報告, **18**, 27-40.
- 伊藤小四郎(1964). シシヤモの生態調査III. 天然産卵について. 北海道立水産孵化場研究報告, **19**: 17-26.
- 金子豊二(1997). 魚類におけるイオン調節の塩類細胞. 様々なイオ環境への適応と塩類細胞の機能の多様性. 化学と生物, **35**(5), 376-377.
- Kaneko, T., Hasegawa, S., Takagi Y., Tagawa, M., and Hirano, T. (1995). Hypoosmoregulatory ability of eyed-stage embryos of chum salmon. *Marine Biology*, **122**, 165-170.
- McCormick, S. D. (1995). Hormonal control of gill Na^+ , K^+ -ATPase and chloride cell function. In *Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*. (C. M. Wood, T. J. Shuttleworth, eds.), pp.285-315. Academic Press, San Diego.
- Ohtani, R., Kaneko, T., Kline, L. W., Labedz, T., Tang, Y., and Pang, P.K.T. (1989). Localization of calcitonin generelated peptide in the small intestine of various vertebrate species. *Cell and Tissue Research*, **258**, 35-42.
- 岡田雋・佐々木武男 (1960). 釧路川に遡上するシシヤモの人工ふ化について. 北水試月報, **17**(2): 14-19.
- 尾身東美(1978). 釧路地方の河川におけるシシヤモの卵分布状態とふ出仔魚の降海について. 北水試月報, **35**(1): 12-28.
- 尾身東美(1978). シシヤモの卵発生と卵発生速度に及ぼす水温の影響. 北水試月報, **35**(2): 10-20.
- Sasai, S., Kaneko, T., and Tsukamoto, K. (1998). Extrabranchial chloride cells early life stages of the Japanese eel, *Anguilla Japonica*. *Ichthyological Research*, **45**(1), 95-98.
- Shiraishi, K., Kaneko, T., Hasegawa, S., and Hirano, T. (1997). Development of multicellular complexes of chloride cells in yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae in seawater. *Cell and Tissue Research*, **288**, 583-590.
- Ura, K., Soyano, K., Omoto, N., Adachi, S., and Yamauchi, K. (1996). Localization of Na^+ , K^+ -ATPase in tissues of rabbit and teleosts using an antiserum directed against a partial sequence of the α -subunit. *Zoological Science*, **13**, 219-227.
- Zadunaisky, J. A. (1984). The chloride cell In *Fish physiology*. Volume 10B. The active transport of chloride and the paracellular pathways. (W. S. Hoar, D. J. Randall, eds.), pp.129-176. Academic Press, New York.