蚊類幼虫の塩分調節機構に関する研究

第2報 海水による体液濃度の変動と調節

松本 昭* 松谷 幸司** 北田 仁一***
岡田 稔**

* 大阪府科学教育センター化学教室 (〒558 大阪市住吉区菟田町)

** 大阪府科学教育センター生物学教室 (〒558 大阪市住吉区菟田町)

*** 大阪府立大学生物学教室 (〒590 堺市梅町)

(受領: 1976年8月29日)

Studies on the mechanisms of ionic regulation in mosquito larvae

II. The changes and regulation of the concentrations of Na and Cl in the haemolymph of larvae kept in various sea waters

Akira MATSUMOTO,* Kôzi MATUTANI,** Jin-ichi KITADA***
and Minoru OKADA**

* *Department of Chemistry, Science Education Institute of Osaka
Prefecture, Karitacho, Sumiyoshi-ku, Osaka 558*

** *Department of Biology, Science Education Institute of Osaka
Prefecture, Karitacho, Sumiyoshi-ku, Osaka 558*

*** *Department of Biology, University of Osaka Prefecture, Ume-
machi, Sakai 590*

まえがき

蚊類幼虫の体液におよぼす環境水濃度の影響についての研究が, Wigglesworth (1938), Beadle (1939) などによって開始されて以来, 今日まで, 塩分調節機構についての研究を中心に, 数多くの業績が発表されてきた。そして, これらの多くは Clements (1963), Prosser (1973), Rockstein (1974) などにより集約されているが, これらのうち特に海水域から採集された幼虫についての報告はきわめて少く, 現在でもなお総合的な理解がなされるまでには至っていない。

われわれは, 原子炉による放射化分析によって幼虫における体液中の Na と Cl の濃度を測定する方法を開発し, アカイエカ, チカイエカ, ヒトスジシマカ, トウ

ゴウヤブカの体液について測定した結果を第1報 (松本・松谷, 1976) に報告した。また幼虫を海水に移した場合に, 体液濃度が上昇することについても簡単にのべた。

本報では, 各種濃度の海水中で, 体液の Na, Cl の濃度の上昇と調節が, 4種の蚊についてことなった様相を呈することを報告し, 特にトウゴウヤブカでは, 高濃度海水中における順応現象についても検討した。

なおこの実験は, 京都大学原子炉実験所 (大阪府泉南郡熊取町) における共同利用実験として実施したものの一部である。

実験材料および方法

実験材料, 実験方法とも第1報 (松本・松谷, 1976) とほぼ同じである。使用したアカイエカ *Culex pipiens pallens* Coquillett (G系: 以下 *Cpp* と略す), チカイ

*** 現在: 国立島根医科大学医学部生物学教室
(〒693 出雲市大津町 1134)

エカ *Culex pipiens molestus* Forskal (予研系: *Cpm*), ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* (Skuse) (河内長野系: *Aalb*), トウゴウヤブカ *Aedes togoi* (Theobald) (鑑瀬-淡水系: *At-FW*) はいずれもわれわれの研究室において 23°C で累代飼育中のものである。このたびの実験では、以上の4種のストックの4令初期の幼虫を使用した。幼虫にあたえる餌は、ビール酵母(エビオス)とマウス用固型飼料を等量混合したものをもちい、飼育水は、くみおきの水道水(淡水)と各種濃度の人工海水を使用した。人工海水は Barnes の処方(Hale, 1958)の3倍の濃度のものを淡水でうすめて各種の濃度の海水を作った。人工海水の濃度は、たとえば $\frac{1}{3}$ にうすめたものを100%海水(塩分34.33‰)と称するように、以後百分率でその濃度を表示する。

幼虫の飼育条件の変化: 淡水飼育の *Cpp*, *Cpm*, *Aalb*, *At-FW* の4令初期の幼虫を集め、15, 30, 45, 60, 140%などの海水の入ったガラス容器(直径10cm, 深さ5cm)に移し、所定の温度で必要時間たもった後、体液を採取した。これらの処理中には餌はあたえていない。

体液の採取と放射化分析: 以上のように準備された4令幼虫は、第1報に記述した方法によって、幼虫の胸部(胃盲嚢の外部)から体液を集め、この1 μ lを1cm角の濾紙に着点乾燥する。このようにして準備された試料を、京都大学の原子炉の圧気送管において熱中性子束

2.34×10^{13} n/cm²·sec で15分間照射ののち、NaI ガンマ線波高分析器で ²⁴Na の1.37MeV, ³⁸Cl の1.62MeV のピークを測定することにより体液中の Na と Cl の濃度を決定した。

実験結果

Fig. 1 は、23°C の淡水で飼育中の *Cpp* の4令幼虫を15, 30, 45, 60%海水に移し2.5時間および5時間後に体液中の Na と Cl の濃度を測定した結果である。たとえば、45%海水中では2.5時間後に Na が、対照(淡水飼育)の約1.8倍(194mM), Cl は約3.6倍(140mM)であるが、5時間後には Na は2.3倍(244mM), Cl は4.9倍(192mM)となった。このように、時間の経過とともに、急速に体液中の Na, Cl の濃度が高くなる。この濃度変化の際、Na よりも、Cl の濃度変化の速度が速い。60%海水中では、2.5時間後に Na と Cl の濃度が接近している。体液がこのような状態になると、一般にその個体は生存が困難になる。5時間後には脱水がはげしく、体液の採取は不可能になり、死ぬ個体が出はじめる。

Fig. 2 は、Fig. 1 と同じ方法によって *Cpm* について2.5, 5, 16時間後に体液中の Na と Cl の濃度をしらべた結果である。Na についてみると、45%海水までは2.5時間もほぼ同じくらいの濃度で、この間、塩分調節

Fig. 1 The changes of concentrations of Na and Cl in the haemolymph of *C. p. pallens* (*Cpp*) larvae which had been reared in fresh water, and then kept in various sea waters for 2.5 and 5 hours

Fig. 2 The changes of concentrations of Na and Cl in the haemolymph of *C. p. molestus* (*Cpm*) larvae which had been reared in fresh water, and then kept in various sea waters for 2.5, 5 and 16 hours

がおこなわれているように見える。この点 *Cpp* と様子が異なる。しかし、さらに長時間になると15%よりも濃い海水では、体液濃度を一定に保てなくなる。60%海水中では *Cpm* は5時間では死ぬ個体はみとめられないが、16時間後には、次第に脱水が進み採血が不可能になった。グラフ全体を通じてみても、同じ条件のもとで、*Cpm* は *Cpp* より体液の Na, Cl が低濃度にたもたれている。

Fig. 3 は、Fig. 1 と同じ方法によって *Aalb* について2.5時間、5時間および16時間後に体液中の Na と Cl の濃度を測定したものである。45%海水中では2.5時間後に Na が対照の約1.3倍 (150mM), Cl が約2.5倍 (113mM) となる。そして16時間後においても、Na が1.6倍 (184mM), Cl が3.7倍 (167mM) というような比較的低い濃度を維持している。特に45, 60%のようなやや高濃度側において、塩分調節能力が *Cpp*, *Cpm* よりもはるかにすぐれていることがわかる。しかし、*Cpm* (Fig. 2) と同様に、60%海水中では、16時間後の体液採取は困難であった。

Fig. 3 The changes of concentrations of Na and Cl in the haemolymph of *A. albopictus* (*Aalb*) larvae which had been reared in fresh water, and then kept in various sea waters for 2.5, 5 and 16 hours

Fig. 4 は、淡水系の *At-FW* を150%迄の海水に移し5時間、16時間後の測定結果である。約60%海水程度までは、体液の濃度がわずかに高くなるだけである。100%をこえて、ようやくはっきりした濃度変化がみとめら

Fig. 4 The changes of concentrations of Na and Cl in the haemolymph of *A. togoi* (*At*) larvae which had been reared in fresh water, and then kept in various sea waters for 5 and 16 hours

Fig. 5 The changes of concentrations of Na and Cl in the haemolymph of *A. togoi* (*At*) larvae which had been reared in fresh water, and then kept in 140% sea water during 22 hours at 25 and 30°C

れる。しかもこの場合には、さらに長期間実験を続けても生長を続けることができ、前出の他種の幼虫でみとめられたような脱水はおこらなかった。

そこで、140%海水中での変化を、より長時間にわたり、温度を変えて追跡した結果が Fig. 5 である。4令初期の幼虫を30°Cの140%海水に移した場合、7時間後に Na の濃度は対照の約1.9倍 (220mM), Cl は2.81倍 (180mM) となった。そして、11時間後には Na の濃度は約2倍 (235mM), Cl は3.12倍 (200mM) とい

ように、時間の経過とともに体液中の Na と Cl は著しく濃くなっている。しかし、22 時間後には、急激な Na と Cl の濃度の低下がおこり、Na は対照の 1.47 倍 (170 mM)、Cl は 2.51 倍 (161mM) にまで回復した。25°C の 140% 海水に移した時も、30°C の場合とよく似た傾向がみとめられるが、しかし Na, Cl とも 30°C の場合よりも濃度変化は小さい。このような Na, Cl の回復がおこるまでには、約 10 時間以上という、かなりながい時間を必要とするとともに、水温も、かなり体液の濃度変化に重要な役割りを果していることがあきらかとなった。

Fig. 6 は、1 令から 4 令まで 20% 海水で飼育した *Cpp* (*Cpp*-20%) と、淡水で飼育した *Cpp* (*Cpp*-FW) の 4 令幼虫をいずれも 45% 海水に移し、体液濃度の変化を比較したものである。*Cpp*-20% の幼虫を 45% 海水に移すと、2.5 時間後に Na の濃度は 230mM, Cl は 161mM というように、体液中の Na と Cl は著しく濃くなっている。しかし 5 時間後には濃度の急激な低下がおこり、Na は 190mM, Cl は 133mM にまで回復した。しかし、同様にして *Cpp*-FW を 45% 海水に移したが、*Cpp*-20% で 5 時間後にみられたような濃度の低下はみとめられなかった。*Cpp* は、今回使用した 4 種の蚊の中では、最

も塩分調節能力にとぼしく、Fig. 1 では、ほとんど調節らしいものはみられなかった。しかし、以上の結果から、20% 海水飼育による塩分調節機能の向上がみとめられたが、45% 海水中では、このあたりまでが限度でこれ以上長時間、正常な生育を続けることはできない。

考 察

今回の報告にもみられるように、環境水濃度による体液成分の変化は予想外に大きく、また調節能力についても、蚊の種類による特異性が、かなり明確にあらわれている。

この分野の研究については、*Culex pipiens* (無吸血生殖群) と *Aedes aegypti* を用いたもの (Wigglesworth, 1938)、および海水産の *Aedes detritus* を使用した研究 (Beadle, 1939) が比較引用されることが多い。これらの実験はいずれも種々の濃度の食塩水に幼虫を移してのち、体液の浸透圧と Cl 濃度の変化を追跡したものであるが、測定した個体数がきわめて少く、個体差も著しく大きい。そして Na の測定はなされていない。したがって、環境水濃度の変化に伴って体液中の Na と Cl の濃度の変化速度が異なる (Figs. 1 ~ 3) ことや、そしてわれわれが従来から測定を続けている種々の蚊の幼虫における体液の浸透圧の測定値などからも、体液のイオン・浸透圧の変化は、Beadle (1939) などの言うほど簡明な現象ではなく、したがって Cl の測定のみで浸透圧や、物質輸送を論じることには、かなり無理があるように思われる。

蚊の幼虫における塩分の調節様式については、一般に、淡水産の幼虫は淡水中では、外部からの水の浸入により、体液がうすまりやすい。そこで絶えず塩分を体内に吸収、保持するための努力がマルピーギ管、尾突起、直腸などによって続けられる (Ramsay, 1953; Stobart, 1971)。したがって、塩水による体液濃度の上昇に対しては、有効な調節を期待することはできない。

しかし、海水産の幼虫の調節様式は、淡水産の幼虫とは逆に、体液中の塩分を積極的に排除することなどにより、体液を低濃度に維持することができると考えられている。

したがって、このたびの実験においても、海水に幼虫を移した場合、以上のべた調節様式のちがいによって、もとはロックプールから採集した *At*-FW (Figs. 4, 5) と、淡水産の *Cpp*, *Cpm*, *Aalb* (Figs. 1 ~ 3) との間に顕著な調節能力の差がみとめられたものと思われる。

このたび使用した *At*-FW は、もとは五島列島の鏡瀬海岸のロックプールの塩水から採集されたもので、淡水に移して約 150 代にわたって累代飼育されたものであ

Fig. 6 The changes of concentrations of Na and Cl in the haemolymph of *C. p. pallens* (*Cpp*) larvae which had been reared in fresh water and 20% sea water, and then kept in 45% sea water during 5 hours

るが, Figs. 4, 5 でもあきらかなように, かなり強い調節能力が現在でもなお保持されていることがわかる。

今迄に, 海水産の幼虫を使用した報告は, 淡水産のものに比べて きわめて少い。たとえば直腸に関する実験で, *Aedes detritus* を海水に移すと, 直腸液が, 海水とほぼ等張になるが, これは体液のほぼ3倍の浸透圧に相当する (Ramsay, 1950)。また直腸の前部と末端を結紮した *Aedes taeniorhynchus* の幼虫を海水に移して, 直腸における Na, Cl の変化を追跡したところ, 分泌された直腸液に含まれている Na, Cl の濃度が, 海水中に含まれているこれらの濃度と, ほぼ同じであるとの報告がなされている (Bradley and Phillips, 1975)。そして直腸以外からの塩分の排出については, *Aedes campestris* の幼虫の尾突起から Cl が排出されることなどがいわれている (Phillips and Meredith, 1969)。しかしながら, トウゴウヤブカについては, 松本・松谷 (1976), 松谷・松本 (1976) の体液に関する報告以外には, くいしいものがみあたらない。

つぎに, Fig. 5 でわかるように, *At*-FW の4令幼虫を, 140%海水に移してのち, 11時間までは Na, Cl とも濃度が著しく増大したが, その後, 強力な調節がおこり, 22時間後には Na, Cl とも濃度が再び低下した。この事実は, 環境水の濃度変化に対し, 「生理的順応」が起ったことを示すものであり, これらは, *At*-FW の塩分調節機構を解明するための重要な手がかりとなるものと考ええる。そして, このような順応現象の発現には, 前記の直腸, 尾突起などによる体外への塩分の排除なども, かなり大きな役割りを果していると思われるが, 他にも種々特徴的な現象が見出されていることから, トウゴウヤブカにおける塩分調節機構は, かなり複雑なものであることが推定される。

摘 要

1. 23°C の淡水で累代飼育中の *Cpp*, *Cpm*, *Aalb* および *At*-FW の4令幼虫を, 種々の濃度の人工海水に移し, 体液中の Na, Cl の濃度の変化をしらべた。

2. 体液濃度の維持についてみれば, *At* は異常にすぐれた調節能力を持っている。他は *Aalb*, *Cpm*, *Cpp* の順に, 塩分調節能力が弱くなり, *Cpp* ではほとんど調節がみられない (Figs. 1~4)。

3. 淡水飼育の *At*-FW を 25°C, 30°C で140%海水中で, 22時間の変化を追跡してみると, 10時間ぐらいいまで, 体液濃度が高くなった後, 22時間後にはかなり回復する。この間に強力な塩調節機能が形成されるものと考えられる。またこの際, 水温の影響をかなり強く受ける (Fig. 5)。

4. Na と Cl の濃度変化の速度は, すべての場合に Na よりも Cl の方が大きい (Figs. 1~5)。

5. 体液濃度の増大に伴って Na, Cl 濃度の接近した場合は, 幼虫の生存上, きわめて危険な状態となる。

文 献

- Beadle, L. C. (1939) : Regulation of the haemolymph in the saline water mosquito larva *Aedes detritus* Edw. *J. Exp. Biol.*, **16** : 346-362.
- Bradley, T. J. and J. E. Phillips (1975) : The secretion of hyperosmotic fluid by the rectum of a saline-water mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *J. Exp. Biol.*, **63** : 331-342.
- Clements, A. N. (1963) : The physiology of mosquitoes. 393p., Pergamon Press, Oxford, London, New York and Paris.
- Hale, L. J. (1958) : Biological laboratory data. 132p., Methuen, London.
- 松本昭, 松谷幸司 (1976) : 蚊類幼虫の塩分調節機構に関する研究。第1報。放射化分析による体液中のナトリウムおよび塩素濃度の測定。衛生動物, **27** (2) : 91-95.
- 松谷幸司, 松本昭 (1976) : 放射化分析による蚊類幼虫の塩分調節に関する研究。生理生態, **17** (1・2) : 167-172.
- Phillips, J. E. and J. Meredith (1969) : Active sodium and chloride transport by anal papillae of a salt water mosquito larva (*Aedes campestris*). *Nature*, **222** : 168-169.
- Prosser, C. L. (1973) : Comparative animal physiology. 3rd ed., 966p., Saunders, Philadelphia, London and Toronto.
- Ramsay, J. A. (1950) : Osmotic regulation in mosquito larvae. *J. Exp. Biol.*, **27** : 145-157.
- Ramsay, J. A. (1953) : Exchanges of sodium and potassium in mosquito larvae. *J. Exp. Biol.*, **30** : 79-89.
- Rockstein, M. (1974) : The physiology of insecta. V. 2nd ed., 648p., Academic Press, New York and London.
- Stobbart, R. H. (1971) : Factors affecting the control of body volume in the larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes detritus* Edw. *J. Exp. Biol.*, **54** : 67-82.
- Wigglesworth, V. B. (1938) : The regulation of osmotic pressure and chloride concentration in the haemolymph of mosquito larvae. *J. Exp. Biol.*, **15** : 235-249.

Summary

The changes of concentrations of Na and Cl in the haemolymph of fourth instar larvae of *Culex pipiens pallens* Coquillett, *Culex pipiens molestus* Forskal, *Aedes albopictus* Skuse and *Aedes togoi* Theobald, which were caused by

treatment with artificial sea waters of various concentrations, were measured by radioactivation analysis.

C. p. pallens showed no salt regulation (Fig. 1), but those reared in 20% sea water from first to fourth instar acquired a little ability of the salt regulation (Fig. 6). *C. p. molestus* was superior a little to *C. p. pallens* in salt regulation (Fig. 2), and *A. albopictus* was much more superior than the formers (Fig. 3). *A. togoi* reared in fresh water has an excellent ability of salt regulation (Fig. 4). In the highly con-

centrated 140% sea water, Na and Cl increased to the maximum values in about 10 hours. After 22 hours they decreased to ordinary concentrations (Fig. 5). This phenomenon shows that the additional strong function of salt regulation is prepared in 10 hours by their acclimation to the highly concentrated sea water. Water temperature renders much influence for the larvae to acquire this function.

The concentrations of Na and Cl changed at different rates, and Cl always changed faster than Na.