トウゴウヤブカ (*Aedes togoi*) 幼虫尾葉の微細構造

北田 仁一* 松谷 幸司** 松本 昭***

* 島根医科大学生物化学教室 (〒 693 出雲市塩治町)

** 大阪府科学教育センター生物学教室, *** 化学教室 (〒 558 大阪市住吉区荻田町)

(受領: 1980年9月19日)

The ultrastructure of the anal papillae of the mosquito, *Aedes togoi* larvae

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

* Department of Biology, Shimane Medical University, Izumo 693, Japan

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

はじめに

蚊科の幼虫の尾葉 (anal papillae) の電子顕微鏡的研究は *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens pallens* などについて次々に行われ (Copeland, 1964; Sohal and Copeland, 1966; 益子・朝倉, 1968) いずれも大体共通した特徴的な微細構造を有することが明らかにされた。しかしこれらの研究で使用されている幼虫は、いずれも一般に淡水に棲息する種類であり、高濃度の海水中で生活することはできない。

トウゴウヤブカ *Aedes togoi* の幼虫は、すぐれた塩分調節能力をもち普通濃度以上の海水から淡水までの、広範囲の塩分濃度をもつ水域で生活することができるが、これらの塩分調節機構については、なお総合的な理解がなされるまでには至っていない。

本報では幼虫の塩分調節に重要な役割を果たしていると考えられるトウゴウヤブカの幼虫の尾葉をとりあげ、異なった塩分濃度で120代にわたって累代飼育中の4種の系統について、尾葉の表皮細胞の微細構造を、電子顕微鏡を使って比較した結果について報告する。

材料および方法

使用した幼虫は、長崎県五島列島の鏡瀬海岸に散在する、海面よりもかなり高い位置にある水たまりで採集されたトウゴウヤブカ *Aedes togoi* (Theobald) (鏡瀬系) の幼虫を100%, 200%, 250%人工海水および淡水に移し

た後それぞれ120代にわたって累代飼育したものである。以後それぞれを100%系, 200%系, 250%系および淡水系と称する。

累代飼育については23°C の恒温飼育室でおこない、幼虫にあたえる餌はマウス用固型飼料とビール酵母 (エビオス) を等量混合したものを用いた。飼育水は採水後3日以上放置した水道水 (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倍の濃度のものを用意しておき、淡水でうすめて各種の濃度の海水を作った。たとえば1/3にうすめたものを100%海水 (塩分濃度34.33%) と称するように、以後百分率でその濃度を表示する。

本実験においては100%, 200%, 250%系および淡水系の4種の系統の4令中期の幼虫を使用した。

これらの幼虫の尾葉を基部より切断し、ただちに6% グルタルアルデヒドまたは、パラフォルムアルデヒドとグルタルアルデヒド混合溶液で1時間、前固定を行ったのち、Dalton 変法による固定液 (ふつう Dalton の固定液では3.4% NaCl を使用するが、本報では昆虫用として3.0% NaCl を使用した。) に移し、1時間固定を行った。また Dalton 変法による固定液の単独固定も併用した。脱水はアセトン系列で行い、包埋はエポン 812樹脂系列で行った。超薄切片は LKB ウルトロームを用い、佐藤法による水酸化鉛で単染、あるいは酢酸ウランとの二重染色を施した。電子顕微鏡は日立 HU-11DS を用いた。

観察結果

1. 200%系幼虫の尾葉の上皮細胞の微細構造

尾葉の表皮細胞は約 $0.3\sim 1.5\mu\text{m}$ の幅を有するクチクラ層により表面がおおわれている。この層にはやや電子密度の高い層と、比較的電子密度の低い層がみられる。このクチクラ層に接する細胞膜が内方に向かって不定方向に幾層にも層状をなして入り込んだ構造がみとめられる。しかしながら Fig. 1 にみられる極端に複雑な構造の発達は、単なる嵌合構造というよりは、むしろ重層構造と称する方が適当ではないかと思われる。Fig. 1 にみられる幅 $0.02\sim 0.03\mu\text{m}$ の曲がりくねった管は、クチクラ層の方向に開口した重層構造のすきまの断面と考えられる。そしてこれらときわめて密接な関連のもとに、多数のミトコンドリアがみられ、これらは“mitochondrial pump”と称された状態 (Copeland, 1964) と同様な配置をなしている。ミトコンドリアは円形、楕円形ないし細長い形を呈し、その数については淡水系、100%系の場合よりも著しく多い (Fig. 1)。また時には Fig. 2 で見られるように、左半分と右半分とではミトコンドリアと重層構造のありかたが、あきらかに異なっている状態がみとめられた。そして特徴的な傾向として、重層構造は細胞間隙に集中して開口しており、その付近に各種の段階の細胞がみとめられる (Fig. 3)。ゴルジ装置についてはほとんどその存在を認めることができず、また粗面小胞体もきわめてまれに存在するにすぎなかった。

2. 250%系幼虫の尾葉の上皮細胞の微細構造

重層構造は200%系よりもさらに顕著な発達を示し、細胞全体に充満している状態がみられた。ミトコンドリアも数はさらに増加の傾向を示すが、その大きさについては小型化する傾向が顕著である。ゴルジ装置および粗面小胞体はほとんど認められなかった (Fig. 4)。

3. 100%系幼虫の尾葉の上皮細胞の微細構造

重層構造の発達は200%、250%系の場合と比べて著しく劣っており、重層構造の細胞質内部への伸長は比較的

短く、またミトコンドリアの数も非常に少なくなっている。それぞれのミトコンドリアについてみると、その形は典型的な卵円形、長楕円形を呈する場合が多く、クリステの発達は顕著である。ゴルジ装置については重層構造となんら関係なく散在しており、その構造は数層からなるラメラと空胞および小果粒の三要素からなる典型的な状態が認められた。しかしラメラの内腔には、とくに電子密度の高い物質の存在は認められなかった。滑面小胞体はほとんど認められず、粗面小胞体がところどころに散見される程度で、顕著な発達はみられなかった (Fig. 5)。

4. 淡水系幼虫の尾葉の上皮細胞の微細構造

淡水は、トウゴウヤブカの幼虫にとって最適環境とはいえないが、重層構造の発達は100%系の幼虫の場合とほぼ同じ程度である。しかし時に内部構造の発達した例もあり多少、個体間の差異がみとめられた。ミトコンドリアおよびゴルジ装置、粗面小胞体については、100%系の場合とほぼ同じ傾向がみとめられた (Fig. 6)。

考 察

トウゴウヤブカの幼虫が多く棲息している海岸の水たまりは、径が40cm以下の小さなものが多く、海面よりかなり高いところにある。そして夏には表面水温が 45°C 以上となり、水分の蒸発濃縮で塩分濃度が100%以上に達することもある。また降雨のときは急速にうすめられてほとんど淡水に近い状態になる。このような水たまりで生活できる動物はトウゴウヤブカの幼虫のほかには橈脚類の *Tigriopus japonicus* のように耐塩性をもつ少数の種類に限られている (Matutani, 1961; 松谷, 1962)。また *Artemia salina* についてすぐれた塩分調節機能をもつことが知られているが (Croghan, 1958a, b, c)、これらは淡水中では生存することができない。この点、本実験で使用したトウゴウヤブカの幼虫は、淡水から250%海水までの濃度で累代飼育が可能であることなどから、よりすぐれた耐塩性と調節能力をもっていることがわかる。この点についてはすでに、体液中のナトリウム

Figs. 1-6 All figures are electron micrographs showing a cross section of an epithelial cell of anal papillae of larvae of *Aedes togoi* in different environmental salinities for 120 generations.

Fig. 1 An epithelial cell of anal papillae of larvae in 200% sea water. $\times 11,000$

Fig. 2 An epithelial cell of anal papillae of larvae in 200% sea water. There are 2 different structural cells. $\times 11,000$

Fig. 3 An epithelial cell of anal papillae of larvae in 200% sea water. The heaping structure opens spaces among the cells. $\times 20,000$

Fig. 4 An epithelial cell of anal papillae of larvae in 250% sea water. $\times 10,000$

Fig. 5 An epithelial cell of anal papillae of larvae in 100% sea water. $\times 15,000$

Fig. 6 An epithelial cell of anal papillae of larvae in fresh water. $\times 25,000$

Scale in the micrograph indicates $1\mu\text{m}$.

Figs. 1-3

Figs. 4-6

および塩素イオンの放射化分析によりあきらかにされた(松本・松谷, 1976a; 松谷・松本, 1976; 松本ほか, 1976b)。

本報告では, トウゴウヤブカにおいて塩分調節に重要な役割を果たしていると考えられる尾葉の微細構造についての検討をおこなった結果, 200%系, 250%系のような高濃度の海水で累代飼育した系統の方が, 100%系, 淡水系の場合よりもミトコンドリアや重層構造などが顕著に発達していることが明らかとなった。

また Fig. 3 であきらかなように, 重層構造が左右に走る細胞間隙に集中して開口しており, それらの付近に液胞の発生段階をうかがわせるようなパターンが存在する。しかし細胞小器官のうち, ゴルジ装置や粗面小胞体については, 物質輸送にさいして重要な働きをになっているという証拠は得られなかった。

以上の組織のほかに, 時には Fig. 2 の右半分にみられるような特殊な構造が存在する。左半分は普通に見られるタイプである。この左側と右側では, ミトコンドリアと重層構造とのありかたが, あきらかに異なっている状態がみとめられる。このことについては, 現在のところ十分にその意味を解釈することはできない。

Sohal and Copeland (1966) は, 一般に淡水に生息している *Aedes aegypti* の幼虫を用いて, 1~4 令の期間のみうすい塩水で飼育し, 飼育塩分濃度と尾葉の微細構造との関係を比較研究した。すなわち 0.039% という非常にうすい NaCl 溶液で飼育した幼虫では, 体液の濃度とほぼ等張の 0.67% NaCl 溶液で飼育した幼虫の場合よりも, 尾葉の表皮細胞における嵌入構造とミトコンドリアがいずれも多い傾向がみとめられた。しかし 1.2% NaCl 溶液で飼育した幼虫では嵌入構造, ミトコンドリアとも少なかったとのべている。この *Aedes aegypti* の実験で, うすい濃度の NaCl 液における幼虫が積極的に尾葉から塩分を吸収するという見地から, 飼育塩分濃度と尾葉の細胞の嵌入構造とミトコンドリアの増減についての明快な相関が示された。そしてこれらの結果は, 細胞の生理的意義を理解するのに重要な例として重視されている。

しかし, 本研究で用いた トウゴウヤブカの幼虫は, *Aedes aegypti* の場合とは異なり 200%系, 250%系のよう, 高濃度の人工海水で, しかも幼虫時代を 120 代にわたって累代飼育されたものである。このような異常な高濃度の海水中で, 幼虫が体液を比較的低濃度に(ほぼ 1/3 海水の濃度)維持するためには, 塩類の積極的な排除が必要であり, このことは生存を続けるための絶対条件でもあろう。

しかしながら, このような調節機構は, かなり複雑で

あり淡水, 海水産の幼虫の種類によっても異なるが一般に尾葉のほかに midgut, Malpighian tubule, rectum, anal canal など重要な役割りを果たしていると考えられている (Clements, 1963; Prosser, 1973; Rockstein, 1974; Asakura, 1980) が完全に解明されたわけではない。

そしてこのたびのトウゴウヤブカの結果をみると, *Aedes aegypti* の場合とは逆に淡水系, 100%系の場合よりも, 高濃度海水飼育の系統ほど Figs. 1~4 にみられるような精緻な尾葉の細胞構造をもつことがあきらかとなった。その機能を直接検討することはいまだできていないけれども, 従来 “mitochondrial pump” といわれている構造の極度の発達, トウゴウヤブカの尾葉が, 塩分排除などに関する調節器官の一部としてきわめて重要な役割を果たしているように思われる。そしてこのたびの結果は, 高濃度海水飼育による幼虫の塩分調節機構解明のための手がかりの一つを得たものと考えられる。

ま と め

異なった塩分濃度で累代飼育中のトウゴウヤブカ幼虫の 4 種の系統 (100%, 200%, 250%系および淡水系) について, 尾葉の表皮細胞の微細構造を, 電子顕微鏡を使って比較検討した。

1. 200%, 250% というような高濃度の海水で累代飼育した幼虫 (200%系, 250%系) の尾葉の表皮細胞では, 細胞膜が内方に向かって幾層にも層状をなして入りこんだ, いわゆる重層構造が顕著に発達しており, これらと密接な関連のもとに, きわめて多数のミトコンドリアが密に分布している (Figs. 1~4)。

2. 淡水または 100% 海水で累代飼育した幼虫 (淡水系, 100%系) の尾葉の表皮細胞では, 重層構造の発達が 200%, 250% 系の場合と比べて著しく劣っており, 重層構造の細胞内部への伸長は比較的短く, ミトコンドリアの数も非常に少ない (Figs. 5~6)。

3. 以上のように, トウゴウヤブカの幼虫を累代飼育した塩分濃度が濃いほど, 尾葉の表皮細胞の重層構造が著しく発達し, またミトコンドリアの数も顕著に増加する傾向があきらかとなった。

トウゴウヤブカの尾葉については, その塩分調節機構を直接検討することはできていないけれども, このたびの結果などから, トウゴウヤブカの尾葉は, 飼育塩分条件と密接な関連をもつ塩分調節器官の一つとしてきわめて重要な役割を果たしているように考えられる。

この研究をすすめるにあたり, 貴重な系統の分与, ならびに種々有益なご助言をいただいた大阪府立公衆衛生

研究所 医動物室の武衛和雄・伊藤寿美代両博士にたいし厚く御礼申し上げる。

引用文献

- Asakura, K. (1980) : The anal portion as a salt-excreting organ in a sea water mosquito larva, *Aedes togoi* Theobald. *J. Comp. Physiol.*, 138 : 59-65.
- Clements, A. N. (1963) : The Physiology of Mosquitoes, 393pp., Pergamon Press, Oxford, London, New York and Paris.
- Copeland, D. E. (1964) : A mitochondrial pump in the cells of the anal papillae of mosquito larvae. *J. Cell Biol.*, 23 : 253-263.
- Croghan, P. C. (1958a) : The survival of *Artemia salina* (L.) in various media. *J. Exp. Biol.*, 35 : 213-218.
- Croghan, P. C. (1958b) : The osmotic and ionic regulation of *Artemia salina* (L.). *J. Exp. Biol.*, 35 : 219-233.
- Croghan, P. C. (1958c) : The mechanism of osmotic regulation in *Artemia salina* (L.) : the physiology of the gut. *J. Exp. Biol.*, 35 : 243-249.
- Hale, L. J. (1958) : Biological Laboratory Data, 132pp., Methuen, London.
- 益子帰来也, 朝倉弘修 (1968) : アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) 幼虫尾鰓の電顕的研究. 能登臨海実験所年報, 8 : 19-27.
- 松本 昭, 松谷幸司 (1976 a) : 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.
- 松本 昭, 松谷幸司, 北田仁一, 岡田 稔 (1976 b) : 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. 衛生動物, 27(4) : 405-410.
- Matutani, K. (1961) : Studies on the heat resistance of *Tigriopus japonicus*. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 9 : 380-411.

- 松谷幸司 (1962) : *Tigriopus* の温度・塩分抵抗性に関する研究. IV. 稀釈海水および濃縮海水に順化した *Tigriopus japonicus* の熱抵抗性と塩度との関係. 生理生態, 10 : 63-67.
- 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 : 167-172.
- Prosser, C. L. (1973) : Comparative Animal Physiology, 3rd ed., 966pp., Saunders, Philadelphia, London and Toronto.
- Rockstein, M. (1974) : The Physiology of Insecta. V, 2nd ed., 648pp., Academic Press, New York and London.
- Sohal, R. S. and D. E. Copeland (1966) : Ultrastructural variations in the anal papillae of *Aedes aegypti* (L.) at different environmental salinities. *J. Insect Physiol.*, 12 : 429-439.

Summary

The ultrastructural studies of the epithelial cells of the anal papillae of larvae of *Aedes togoi* were made by electron microscope. The materials were reared in different salinities for 120 generations.

The epithelial cells of the anal papillae of the larvae reared in 100 % sea water or fresh water have infolded and rough structures (Figs. 5-6).

However, in 200 % and 250 % sea water, the structures become extremely fine. The structure is complicated, consisting of overlapping slices with a great number of mitochondria. The mitochondria are densely distributed, like the bubbles of a crepe cake (Figs. 1-4).

In the larvae of *Aedes togoi*, the denser the salinities, the more complicated the structures of the epithelial cells of anal papillae. We deduce from this observation that the anal papillae of *Aedes togoi* serve as an organ of salt regulation system.