

論文の内容の要旨

水圏生物学 専攻

平成 15 年度博士課程 入学

氏 名 Do Thi Thanh Huong

指導教員名 會田 勝美

論文題目 Physiological studies on molting and osmoregulation in the giant freshwater prawn,
Macrobrachium rosenbergii and the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*
(オニテナガエビと太平洋白エビにおける脱皮と浸透圧調節に関する生理学的研究)

オニテナガエビと大西洋白エビは市場価値が高いことから、世界各地で盛んに養殖が行われている。オニテナガエビは淡水エビであるが、幼生の育成に塩分が必要なため、産卵時には淡水域から汽水域へ移動する。そのため、オニテナガエビの種苗生産には低塩分濃度の海水が用いられている。一方、大西洋白エビは海産エビであるが、低塩分濃度の海水に耐性であることから比較的淡水に近い条件で養殖が行われている。これらのことから、オニテナガエビと大西洋白エビには高度な浸透圧調節能力が備わっていると推測されている。しかしながら、これら両種のエビの浸透圧に関わる基礎的な知見は皆無に等しいのが現状である。また、浸透圧を高次に調節している内分泌因子の存在の有無も不明である。これらの背景を踏まえ、本研究の第 1 章と第 4 章では、オニテナガエビと大西洋白エビの基礎的な浸透圧調節能力のプロフィールを得ることを目的として、脱皮周期に伴う血リンパ中の浸透圧やイオン濃度の変動を調べた。第 2 章では、浸透圧を調節する内分泌因子の存在の有無を確かめるために、最も主要な内分泌器官である眼柄を切除することで、血リンパ中の浸透圧やイオン濃度が変化するか否かを調べた。第 3 章と第 5 章では、オニテナガエビ稚エビと大西洋白エビの低塩分濃度耐性を調べ、内陸部で行われている淡水化エビ養殖に応用可能な飼育条件を検討した。

第1章 脱皮周期に伴うオニテナガエビの血リンパの浸透圧、イオン濃度および甲殻構造の変化

淡水で飼育したオニテナガエビの血リンパを各脱皮段階ごとに採取し、その浸透圧およびイオン濃

度（ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム）を測定した。脱皮段階は遊泳肢の構造変化を顕微鏡下で観察し、脱皮後期前半(A)、脱皮後期後半(B)、脱皮間期(C)、脱皮前期初期(D0)、脱皮前期中期(D2)、脱皮前期後期(D3)、脱皮直後(E)の7段階に分類した。血リンパの浸透圧はCステージでは440 mOsmであり、ここから緩やかに上昇し、D2ステージで500 mOsmとなり最も高い値を示した。その後、値は減少し、E、A、Bステージではそれぞれ402, 420, 420 mOsmと低い値となった。この浸透圧の変動は、脱皮の際に殻を脱ぎ捨てるために大量の水を吸収することに起因していると考えられた。血リンパ中のイオン濃度はナトリウムが最も高く、脱皮周期を通じた変動のパターンは浸透圧の結果とよく一致した。一方、カリウムおよびマグネシウムイオンの濃度に有意な変動は観察されなかった。これらのことから血液の浸透圧はナトリウムイオンの濃度を反映していると考えられた。血リンパ中のカルシウムイオン濃度は脱皮後に最も低く、脱皮周期が進むにつれ徐々に上昇した。これは、脱皮後には甲殻を形成するために血リンパ中のカルシウムが使われているが、脱皮前には古い甲殻に含まれるカルシウムを再利用するために体内に再吸収しているためと推察された。

走査型電子顕微鏡観察により脱皮周期に伴う甲殻の構造変化を調べた結果、EおよびAステージでは甲殻は65 μm と薄く、Bステージから85 μm と徐々に甲殻が厚くなり、C、D0およびD2ステージにおいては甲殻の厚さが135 μm に達し、D3ステージでは85 μm に減少した。原子吸光光度計により甲殻中のカルシウム量を測定した結果、Aステージのカルシウム量が最も低く、脱皮周期が進むにつれ徐々に増加してCステージで最も高い値となり、その後、脱皮に向かうにつれて減少した。エネルギー分散型X線分析によりカルシウムの局在を調べた結果、Aステージでは殻の外側と内側に高濃度のカルシウムが存在しており、その挟まれた領域にはごく微量しか存在しなかった。Cステージでは甲殻の全体にカルシウムが存在していたが、D2およびD3ステージでは殻の内側のカルシウム量が減少した。これらのことから、脱皮後にカルシウムは殻の外側と内側の両面から沈着をはじめ、徐々に殻全体に広がることで殻が固くなり、脱皮前には殻の内側のカルシウムが体内に再吸収されていると考えられた。

第2章 オニテナガエビの血リンパの浸透圧およびイオン濃度に及ぼす眼柄切除の影響

眼柄切除および未切除のオニテナガエビを淡水、1/3海水、2/3海水、海水中で飼育し、血リンパの浸透圧およびイオン濃度（ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム）を経時的に調べた。その結果、どの実験群においても眼柄切除と未切除のエビの血リンパ浸透圧およびイオン濃度に顕著な差は認められなかった。このことから、眼柄内の内分泌因子は浸透圧調節に関与していないと考えられた。しかしながら、未切除エビを1/3海水および2/3海水で飼育した場合には斃死は観察されな

かったが、眼柄切除エビでは 1/3 海水および 2/3 海水で 2 週間および 1 週間飼育後にすべて死亡した。このことから、眼柄内には浸透圧調節によらない塩分耐性に関与する因子が存在することが示唆された。

第 3 章 オニテナガエビ稚エビの Na/K-ATPase 活性および稚エビ生存率に及ぼす塩分濃度の影響

塩分濃度 12 ppt の海水で飼育したオニテナガエビ稚エビの Na/K-ATPase 活性を孵化直後から 1 ヶ月にわたって経時的に調べた結果、孵化直後のステージ 1 のゾエア幼生では 3.1 ± 0.1 $\mu\text{mol ADP/mg protein/h}$ であったが、孵化 3 日後のステージ 2 のゾエア幼生では 4.4 ± 0.4 $\mu\text{mol ADP/mg protein/h}$ まで上昇し、孵化 13 日後のステージ 6 のゾエア幼生まで高値を維持した (3.9 ± 0.1 $\mu\text{mol ADP/mg protein/h}$)。その後、Na/K-ATPase 活性は発生が進むにつれて徐々に減少し、孵化 29 日後のステージ PL5 のポストラバには 1.3 ± 0.1 $\mu\text{mol ADP/mg protein/h}$ まで減少した。

次に、孵化後、塩分濃度 12 ppt の海水で 1 日、6 日、11 日、16 日、21 日、26 日、31 日間飼育したオニテナガエビ稚エビを、淡水、塩分濃度 6 ppt、12 ppt の希釈海水でそれぞれ 5 日間飼育し、それぞれの生存率を調べた。その結果、オニテナガエビの産卵に最も適した塩分濃度 12 ppt の希釈海水で飼育した稚エビは、孵化後の日数にかかわらず約 90% と生存率が高かった。一方、塩分濃度 6 ppt の希釈海水で飼育した稚エビの生存率は、孵化後 11 日以前では約 70% であったが、16 日以降では約 90% であり、16 日以降の生存率の方が有意に高かった。Na/K-ATPase 活性が孵化後 13 日以降に減少していたことを考慮すると、16 日以降に観察された低塩分濃度に対する耐性は Na/K-ATPase による能動的なイオン輸送によるものではないと考えられた。また、淡水で飼育した稚エビは孵化後の日数にかかわらず 1% 以下と生存率が低かったことから、孵化後 1 ヶ月では淡水適応能はまだ確立されていないと推察された。

第 4 章 脱皮周期に伴う大西洋白エビの血リンパの浸透圧およびイオン濃度、甲殻のカルシウム量の測定

塩分濃度 28 ppt の海水で飼育した大西洋白エビの血液と甲殻を各脱皮段階ごとに採取し、血リンパ中の浸透圧とイオン濃度 (ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム)、甲殻のカルシウム量を測定した。脱皮段階は脱皮後期 (A)、脱皮間期 (C)、脱皮前期 (D) の 3 段階に分類した。血リンパ中浸透圧は A ステージが 780 mOsm、C ステージで 830 mOsm、D ステージで 850 mOsm であり、脱皮周期が進むにつれて高くなった。血リンパ中のイオン濃度はナトリウムが最も高く、変動のパターンは浸透圧の結果とよく一致した。一方、カリウムおよびマグネシウムイオンの濃度に有意な変動は観察さ

れなかった。血リンパ中のカルシウムイオン濃度は D ステージが最も高かった。甲殻のカルシウム量は A ステージがもっとも低く、脱皮周期が進むにつれて高くなった。これら浸透圧に関わる因子の変動パターンはオニテナガエビのものと基本的に一致していたことから、淡水エビと海産エビの脱皮周期を通じた浸透圧調節機構は共通していると考えられた。

第 5 章 低塩分海水飼育が大西洋白エビの血リンパ中の浸透圧およびイオン濃度に及ぼす影響

塩分濃度 30 ppt の海水で飼育していた大西洋白エビを塩分濃度 28 ppt、18 ppt、7 ppt、3 ppt、1 ppt、0.5 ppt の希釈海水でそれぞれ 1 週間飼育し、血リンパの浸透圧およびイオン濃度を経時的に調べた。その結果、塩分濃度 28 ppt (800 mOsm) の希釈海水で飼育したエビの血リンパの浸透圧は実験期間を通して約 800 mOsm で安定しており、飼育水の浸透圧と同じであった。一方、塩分濃度 18 ppt (500 mOsm) の希釈海水で飼育したエビの浸透圧は実験開始 6 時間後に 700mOsm に低下し、その値を実験終了まで維持した。塩分濃度 7 ppt (200 mOsm) および 3 ppt (73 mOsm) の希釈海水で飼育したエビの浸透圧は実験開始 24 時間後に約 560 mOsm にまで低下したが、その後、緩やかに 600 mOsm まで上昇して実験終了までその値が維持された。18 ppt、7 ppt、3ppt の希釈海水で飼育したこれらのエビの浸透圧は飼育水の浸透圧よりも高かったことから、大西洋白エビには高浸透圧調節能力が備わっていると考えられた。また、塩分濃度 1 ppt および 0.5 ppt の希釈海水で飼育したエビは 24 時間後に全て死亡したことから、大西洋白エビが生育するためには、ある程度の塩分が必要と考えられた。また、血リンパのイオン濃度(ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム)を測定したところ、ナトリウムイオンの変動パターンが浸透圧の結果とよく一致していた。このことから、大西洋白エビは能動的にナトリウムイオン濃度を調整することで、血リンパ中の浸透圧を維持していると考えられた。

以上、本研究によりオニテナガエビと大西洋白エビの基本的な浸透圧調節能力のプロフィールを得ることができた。また、オニテナガエビ稚エビおよび大西洋白エビの低塩分濃度耐性を明らかにすることができた。これらの成果は、今後も発展していくと思われる甲殻類の生理学に多くの情報を与えるだけでなく、エビ養殖という応用分野にも大きく貢献するものである。すなわち、海から遠く離れた内陸での養殖現場では、天然海水を調達することが困難なことから高価な人工海水をエビ養殖に使用している。そのため、本研究で明らかにした低塩分海水を用いたエビの飼育条件は、内陸でのエビ養殖のコストダウンに直結するものと期待される。