

トビハゼ浮遊期仔魚の皮膚の微細構造

鈴木 伸洋・萩原 清司

Epidermal Ultrastructure of Pelagic Larvae of the Mudskipper, *Periophthalmus modestus* (Gobiidae)

Nobuhiro Suzuki and Kiyoshi Hagiwara

The epidermal ultrastructure of pelagic larvae of the mudskipper, *Periophthalmus modestus*, was examined by transmission electron microscope. The epidermis is not well endowed with mucous or granular cells. In the postflexion larval stage, 10 day old, 5.4 mm in total length (TL), the epidermal filament-containing cells are flattened cells in a single stratum and have a large number of the cell organelles such as mitochondria, well-developed Golgi apparatus, highly convoluted lamellar endoplasmic reticula. Intraepithelial blood capillaries which may be used during air-breathing organ respiration, were also observed. Type I cells of surface epidermis are flat forming in a single stratum. The outermost layer is composed of a free surface of Type I cells with numerous microridges. The middle layer contains several strata of Type II cells. The rather unique thick, special corky structure of Type II cells is thought to play an important role in thermal insulation and protection against ultraviolet light for existence out of water. The basal layer comprises of a stratum of filament-containing cells, generally long and either ovoid or spindle shaped. Differentiation in the surface layer of the epidermis occurred at 30 day old, 11.4 mm TL. In the benthic larval stage, 46 day old, 17.5 mm TL, the Type II cells are characterized by having an large vacuole in the cytoplasm. This vacuole enlarges by the fusion of plasma membranes of adjacent cells and a considerable number of dense, fibrous bodies aggregate around the lamellated cisternae of endoplasmic reticula.

These observation suggest that differentiation of the epidermis of *Periophthalmus modestus* seem to be occur just before migration to the terrestrial habit.

Key words: epidermal differentiation, larval skin, epidermal evolution

干潟はそこに生息する生物の生育や繁殖などの場として生態的に重要であるだけでなく、漁業や水域浄化あるいはリクリエーションの場としても貴重な地位にある海域環境のひとつである。しかし、近年干潟は開発等による諸工事により著しく狭められている。

このような背景から、水域生物の生息環境の

保全・再生を行うにあたっては場の研究のほか産業上の有用種であるなしに関わらず、その水域を代表する生物の生理・生態的研究を行う必要がある。

ハゼ科魚類のトビハゼ *Periophthalmus modestus* (Cantor) は、東京湾以南の河口域に広がる泥質干潟に生息する (内田 1932)。トビハゼ

を泥質干潟の生物指標の一つとして、その生物環境の保全と種の保存・増殖技術の開発について調査・研究が実施されてきた(柵瀬ほか 1991, Suzuki 1992, 萩原ほか 1993)。

トビハゼは、干潟の泥土中に巣穴を掘りそこに産卵する(小林ほか 1971)。巣穴で孵化した仔魚は海洋で約40日の浮遊生活を送った後、河口域に接岸回遊して干潟上で生活を開始し、干潮の泥質干潟上で活発な跳躍によって摂餌のため移動する特殊な習性を持つ(小林ほか 1972)。このため、本種は水陸両棲生活をする魚類として、皮膚の分化や空気呼吸機能の獲得などの生物進化上の興味から多くの生理学的な研究が行われてきた(Tamura *et al.* 1976, Iwata 1988, Ogasawara *et al.* 1991, etc.)。

一般に、陸上脊椎動物は水中から陸上へと生活圏をひろげた際に、皮膚からの水分の蒸発と皮膚の物理的損傷を防ぐため、表皮細胞に角化という分化能を発達させた。それゆえ、すべての陸上脊椎動物の表皮は特殊な階層構造を持つ。すなわち、表皮最内層には基底細胞が位置し、これが絶えず増殖を繰り返し、一部は基底細胞として基底膜上に留まるが、その他は上層へ移動しながら順次分化の過程を経て、最終的には細胞内にケラチン線維が多量に集合した不溶性の膜を発達させた角化細胞となり、皮膚最外部において保護層としての役割を果たす。そして、この構造は表皮の分化や発生のメカニズムまでが進化を通して保存されていることが明らかになっている(Nishikawa *et al.* 1990, Nishikawa and Miler. 1991, 1992)。しかし、魚類における表皮の階層分化に関する研究は少なく、陸上適応している魚類のうち、トビハゼの表皮に毛細血管が存在することを光学顕微鏡で観察した報告のみみられるだけであった(Harms 1935, 前川ほか 1968)。Suzuki (1992) は、本種の表皮

には、魚類特有の粘液細胞が観察されず、扁平単層な表層細胞 (Type I cell)、立方多層な中層細胞 (Type II cell)、そして立方単層な基底細胞の3層構造を成し、各層の細胞は微細線維を含有するいわゆる filament-containing cellで、Type I cellとType II cellの両細胞は基底細胞から分化することを報告した。しかし、本種におけるこの2型の表皮細胞の分化時期および皮膚呼吸に極めて合目的とされる表皮内毛細血管網(前川ほか 1968, Suzuki 1992)の成因については不明であった。そこで、トビハゼの海洋浮遊期から陸上生活移行直前までの仔魚の表皮の微形態学的構造を発育段階を追って電子顕微鏡を用いて観察することにより、本種にみられる上記の特異的皮膚構造の分化と発達過程を生態的適応の観点から追究した。

材料及び方法

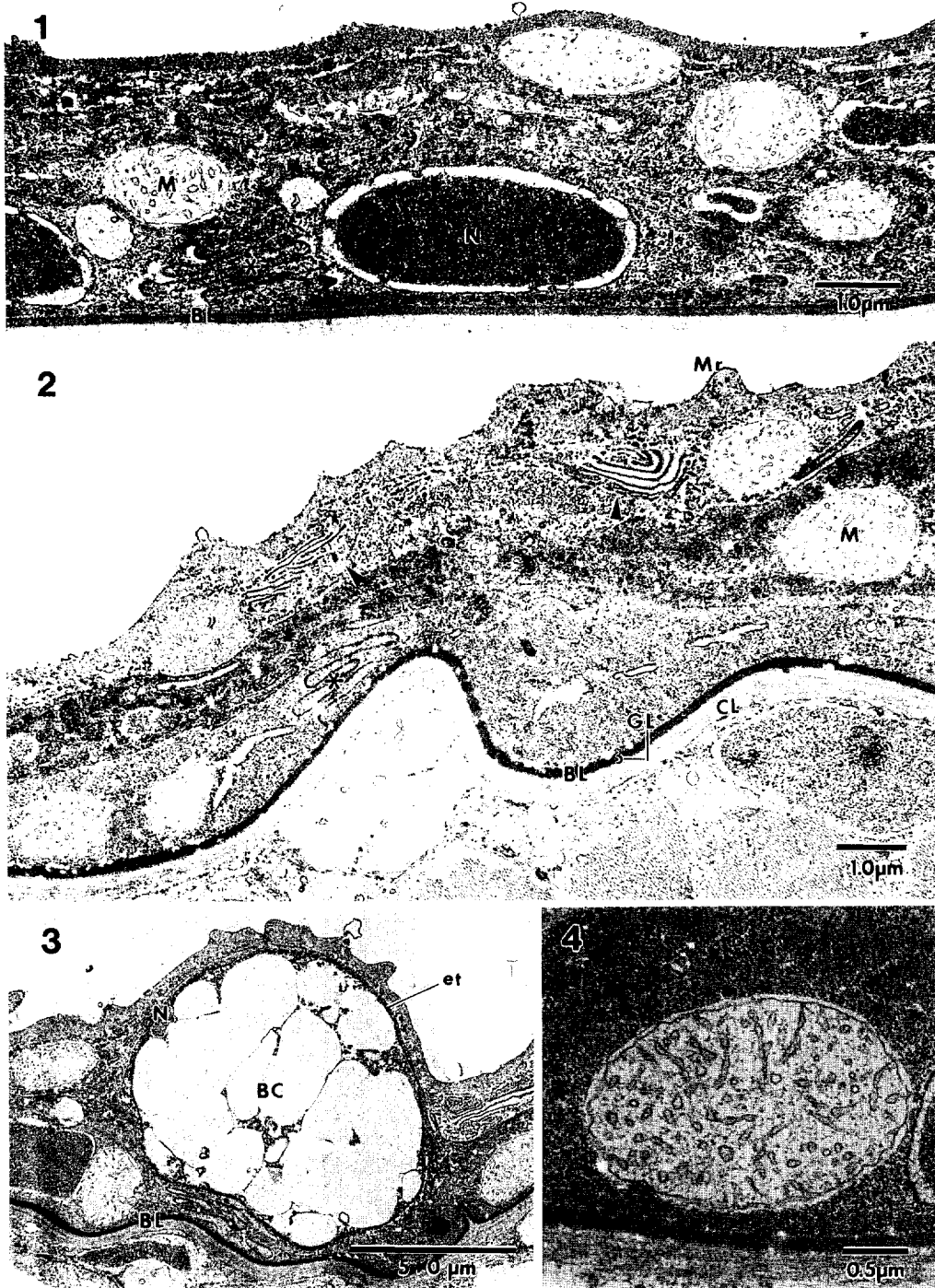
トビハゼの天然の浮遊期仔魚を採集することは極めて困難であるため、ここでは人工授精により得られた仔魚を材料とした。人工授精に用いた親魚は、1990年10月4日に東京湾の江戸川放水路河口(塩分濃度12)において採集した体長25~30 mmの当歳魚を約1年半飼育した養成魚である。親魚の養成は、60 cm アクリル製角型水槽の底面から約5 cmの高さまで塩分20に調整した飼育水を入れ、水槽内に約10 cm角の発泡スチロール製の餌場を設置してアユ用配合飼料(日本配合飼料)と乾燥オキアミ(テトラ社製クリル)を練り餌状にした餌料で飼育して行った。排卵誘発および人工授精は、鈴木ほか(1989)の方法に準拠し、1992年7月6日から31日にかけて実施した。

トビハゼ浮遊期仔魚の固定は、日齢10(全長5.4~5.6 mmの後屈曲期仔魚)、日齢30(全長

Figs. 1, 2, 3, 4. Ultrastructure of the skin in the postflexion larval stage. BL: basal lamina, M: mitochondrion, N: nucleus.

Fig. 1. The epidermal filament-containing cells are flattened cells in a single stratum. Note highly convoluted lamellar endoplasmic reticula (asterisk) are observed in the basal region of the epidermis.

Fig. 2. Numerous microridges (Mr) developed in the outermost layer of epidermis. Highly convoluted lamellar endoplasmic reticula (astrisk) and well-developed Golgi apparatus (arrow



heads) are observed in the basal and the surface regions of the epidermis, respectively. The basal lamina (BL) always being reinforced by granular layer (GL) and underdeveloped collagenous lamella (CL) in the apical region of the dermis.

Fig. 3. Large intraepithelial blood capillary (BC) with its endothelium (et) is clearly seen.

Fig. 4. Large number of cristae mitochondriales are seen in the epidermis.

11.4~11.5 mmの底生生活移行期仔魚) および日齢46 (全長 13.8~17.5 mmの底生生活期仔魚) に行った。固定および電子顕微鏡用試料の作製は Suzuki (1992) に準拠して行い、また皮膚の観察部位はすべて第1背鰭直下の体側背面とした。トビハゼの発育段階区分は、萩原ほか (1993) に従った。すなわち、後屈曲期とは、第2背鰭、臀鰭および尾鰭の各鰭条が現れて腹鰭の原基が形成されるまでの、水槽の中表層を遊泳する時期である。底生生活移行期とは、第1背鰭が出現し、仔魚の遊泳層は主として水槽の底層域であるが、まだ完全に水底に着底しない時期である。そして、底生生活期とは、水底に着底するが、天然水域ではまだ陸上生活に移行していない時期である。なお、トビハゼの同定は Murdy (1989) に従った。

結 果

後屈曲期仔魚の表皮の厚さは、約 3~4 μm で、扁平な線維細胞で構成されており、表皮の階層構造は明瞭ではなかった。表皮線維細胞の核は扁平で大きく、細胞質には多数のミトコンドリアが認められた (Fig. 1)。しかし、個体によっては表皮の表層域と基底層がやや電子密度が低い場合が認められた。このような場合には、表皮の最外縁の自由表面に微小堤が存在し、表層域には発達したゴルジ様装置が観察された (Fig. 2)。基底層には幅が約 20 nm の一定間隔の互いに平行に走る層板状の単位膜構造がアコーディオンのじゃばら状に連続して存在していた (Fig. 1, 2の*印)。基底膜は明瞭で、その直下には電子密度の高い顆粒層が基底膜を裏打ちしているが、真皮のコラーゲン線維層は未発達であった (Fig. 2)。また、表皮線維細胞内には毛細血管が認められ、この部分では表皮が全体的に肥厚していた。その表皮内血管は内径が 10 μm 以下のものがほとんどであったが、血管内皮細胞を備えており、血管内孔には電子密度

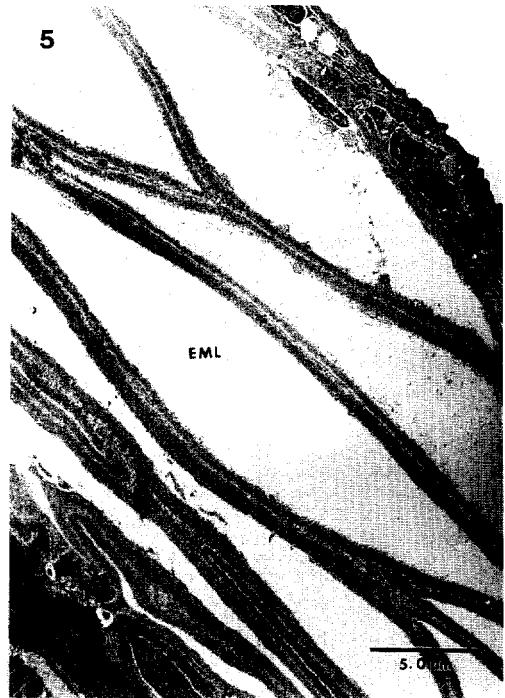
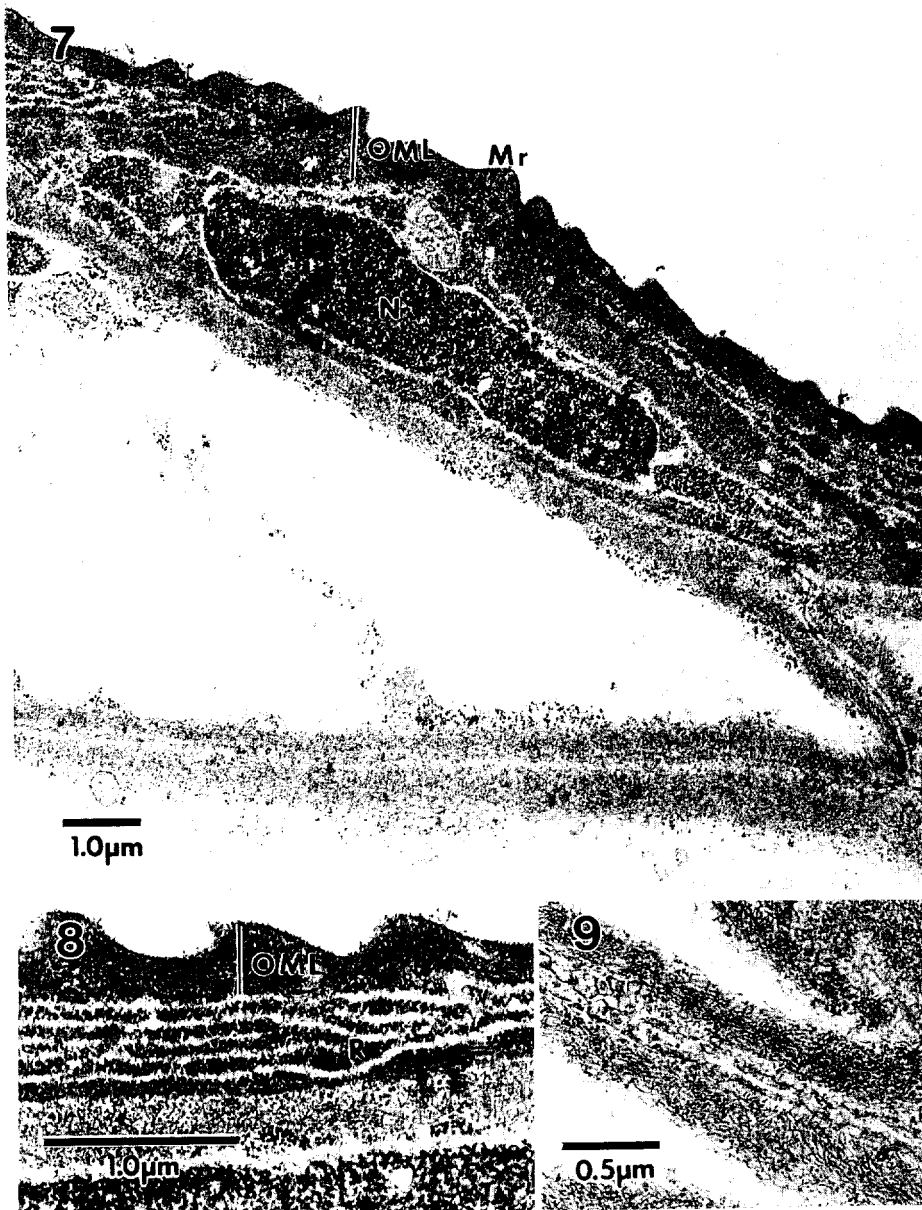


Fig. 5. Ultrastructure of the skin in the larval stage of transition to the benthic life style. Note three distinct layers of surface (ESL), middle (EML) and base (EBL) are identified in the epidermis. BL: basement lamella.



Fig. 6. Ultrastructure of apical region of the dermis in the larval stage of transition to the benthic life style. The basal layer of the epidermis (EBC) comprises a stratum of

filament-containing cells. Bundles of collagen fibrils (CL) developed in the dermis, and fibroblast (Fb) usually found in the uppermost layer of the dermis. BL: basement lamella.

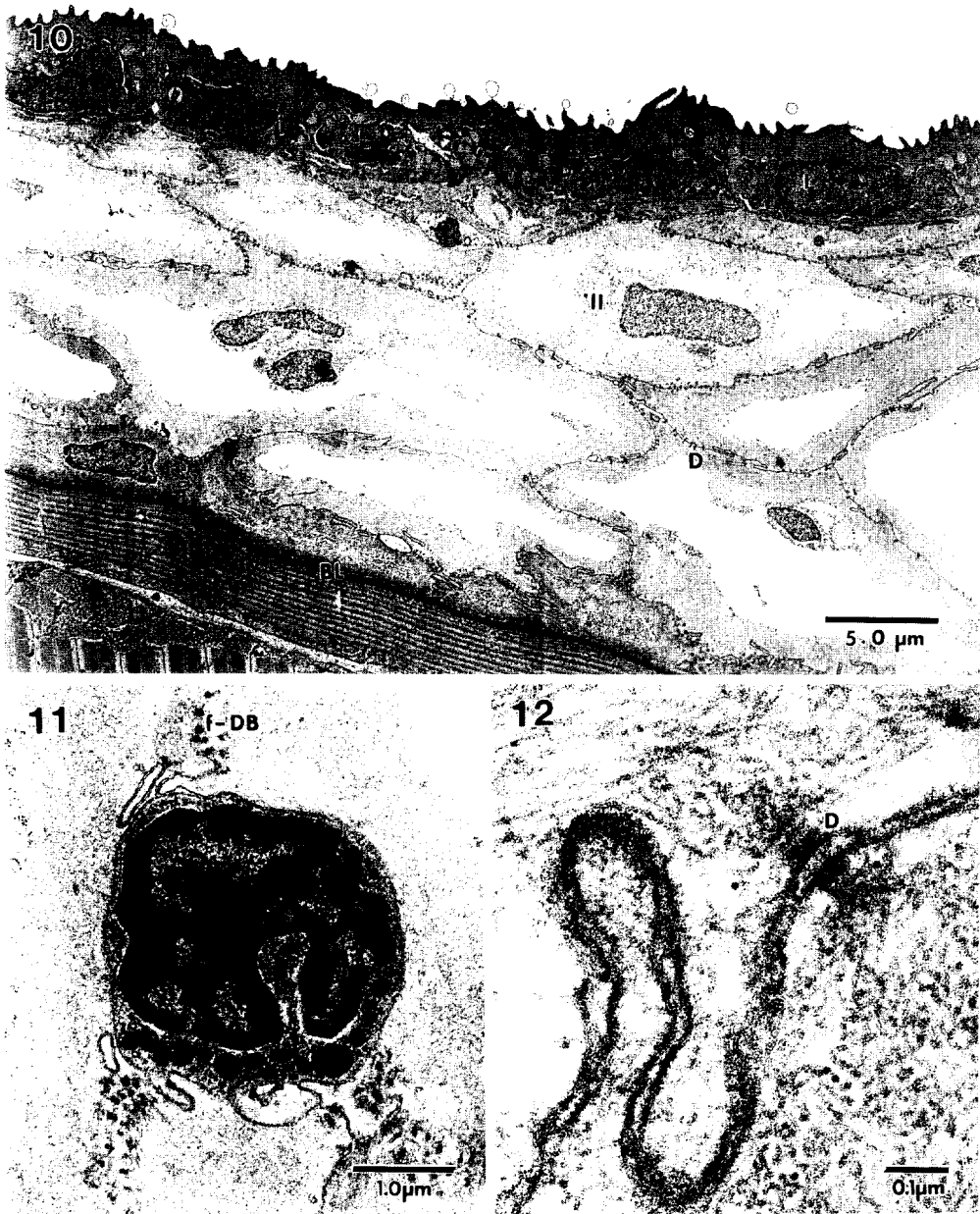


Figs. 7, 8, 9. Ultrastructure of the surface and middle layers of the epidermis found in larval stage of transition to the benthic life style. N: nucleus.

Fig. 7. The surface layer of the epidermis is subdivided into two characteristic cell phases, i.e., the one characterized by having numerous microridges (Mr) in the outermost layer (OML) of a free surface and the other by having a well-developed convoluted lamellar endoplasmic reticula in the cytoplasm.

Fig. 8. Cells are characterized by having a well-developed convoluted lamellar endoplasmic reticula in the cytoplasm. Note microridges of the outermost layer (OML) of the epidermis develop and ribosomes (R) aggregate around the endoplasmic reticula.

Fig. 9. The peripheral cytoplasm near the plasma membrane is filled with numerous microfilaments in the middle layer of the epidermis.



Figs. 10, 11, 12. Ultrastructure of the skin in the benthic larval stage. BL, basement lamella, D, desmosome.

Fig. 10. Perfect epidermal differentiation as found in adult stage. The outermost layer is composed of a free surface of Type I cells (I) with well-developed microridges. The middle layer contains several strata of Type II cells (II) characterized by having the unique thick and special corky structure.

Fig. 11. Cytoarchitectures of fused Type II cells. Note a number of fibrous dense bodies (f-DB) gather around the lamellar endoplasmic reticula with a lymphocyte like cell.

Fig. 12. Tonofilaments collected around the interdigitation of the epidermis.

の低い液性物質を含有していた (Fig. 3)。表皮内のミトコンドリアは長径が約 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ で、この時期の表皮の厚さに比べて非常に大型であった。そして、その細胞質には膜状のクリスタがよく発達していた (Fig. 4)。

底生生活移行期仔魚の表皮は、偏平単層な表層細胞、立方多層の中層細胞および立方単層な基底細胞の3層構造を成した線維細胞の階層構造分化が認められた (Fig. 5)。また、真皮層のコラーゲン線維層は前段階に比べてよく発達しており、その直下には線維芽細胞が分布していた (Fig. 6)。この時期には、基底細胞は順次上層へ移行して表層域に達し、その細胞の自由表面に微小堤を備えた電子密度の高い表皮最外縁層を形成した (Fig. 7)。また、表層域に達した基底細胞のなかには後屈曲期に認められたアコーディオン型の層板状単位膜構造を細胞質に持つ細胞も観察され (Figs. 5, 7)、その単位膜の周囲にリボゾームが多数集合していることが認められた (Fig. 8)。表皮の中層域には細胞質が空洞化した立方多層の細胞群が存在し (Fig. 5)、その細胞膜の周囲には微細線維が無数に集合していた (Fig. 9)。しかし、その細胞群の細胞膜間には細胞接着装置の存在は認められなかった (Figs. 5, 9)。

底生生活期仔魚の表皮の表層には、成魚同様の発達した3層の表皮の階層構造が完成していた。すなわち、表層域には起伏の著しい微小堤を備えた表皮最外縁層を持つ表層細胞 (Type I cell) が一層に配列し、中層域には細胞質が中空で、細胞膜の周囲に微細線維の束が集合して一種の細胞壁様構造を持つ多層な細胞群 (Type II cell)、そして基底域には未分化な線維細胞である基底細胞が認められた (Fig. 10)。中層域の中空細胞の細胞壁様構造領域には、線維性の高電子密度体 (fibrous dense body) と連続した単位膜構造の指状嵌合が発達し、核が不定形で、細胞質には顆粒を含有したリンパ球様細胞の存在がところどころに観察された (Fig. 11)。また、細胞壁様構造を形成している微細線維は、その太さが約 7 nm の張原線維で、その線維束の一部分はデスモゾームと架橋構造を成して単位膜と接続していた (Fig. 12)。

考 察

トビハゼの成魚の表皮にみられる3層の階層構造は、底生生活移行期の日齢30の仔魚においてはじめて認められた。しかし、後屈曲期仔魚 (日齢10) の表皮にはすでに表皮最外縁の微小堤と表皮内毛細血管の存在、表層域のゴルジ様装置の発達ならびに基底層のアコーディオン型層板状単位膜構造の出現など、本種の成魚に認められる Type I cell と Type II cell の表皮細胞の分化にとって必要な細胞小器官の存在が観察された。このことから、後屈曲期が表皮の階層構造分化の開始期であると考えられた。また、今回の本種の浮遊期仔魚の皮膚の発達過程の観察から、基底細胞の Type I cell と Type II cell への分化の過程はつぎのように推定された。すなわち、表皮最内層には未分化の基底線維芽細胞が位置し、これが増殖を繰り返しながら一部は基底細胞として留まるものの、その他多くは上層へ移動して表層域にまで達する。表層域にまで達した基底細胞は、細胞の最外縁の自由表面に微小堤を発達させながらその部分を肥厚させ、偏平単層の表皮細胞 (Type I cell) に分化する。また、基底細胞のなかには後屈曲期に形成したアコーディオン型層板状単位膜構造を保有したまま表層域に到達し、そこで単位膜の周囲に遊離のリボゾームを集合させる。そして、滑面小胞体から粗面小胞体の膜構造に変化しつつ再び下方へと移動しながら指状嵌合を発達させて単位膜間の間隔を広げ、細胞質が中空の中層細胞 (Type II cell) に分化する。また、底生生活期仔魚の表皮の中層細胞にみられた線維性高電子密度体および単位膜と張原線維束のデスモゾームによる細胞接着は、成魚における中層細胞同士の融合現象に重要な役割を果たしていることが知られている (Suzuki 1992)。加えて、この時期の表皮の厚さは約 $40 \mu\text{m}$ で、これは成魚の表皮の厚さ (鈴木・平木 1991) と同じである。以上のことから、水・陸両棲的生活形態を有する本種の特異的表皮構造の特殊化は、浮遊生活期の表皮の階層分化を通して、内湾の河口域に接岸回遊して陸上生活に移行する直前

までの底生生活期には完成するものと考えられた。

トビハゼの表皮内毛細血管網は、すでに浮遊期仔魚の表皮に分化していることが明らかになった。仔魚期のうちでも鰓が未分化な時期には、左後主静脈になるキュービエ管に循環血液が流れ込み、酸素分圧の低い静脈血が皮膚を通過する時に外界から酸素を取り入れると同時に皮膚は二酸化炭素を排出するので、毛細血管網が皮膚の表面に分布することはガス交換を効率よく行うためには極めて都合がよい(鈴木・平木1991)。Tamura *et al.* (1976) は、トビハゼが陸上のみならず、水中においても48%量の酸素を皮膚から呼吸していることを報告している。従って、本種は仔魚期の表皮内毛細血管網をそのまま残存させて陸上生活のみならず、水中生活においても機能させていると考えられる。

血管系の表皮への侵入は、トビハゼにのみ認められる極めて稀な構造とされてきた(前川ほか1968)。しかし、魚類では本種のほかにも表皮に毛細血管が分布する種類が見い出され、これらの種類がすべて水・陸両棲の生態を示すとは限らない(鈴木・平木1991)。このことは、少なくとも今までに考えられていたような表皮内毛細血管網の存在だけではトビハゼの陸上生活への適応を説明するには不十分であることを示している。トビハゼ表皮の最も特徴的な構造として、Type II cell のコルク様構造がいわゆる断熱材のような機能を果たし、これによって陸上生活で生じる乾燥や紫外線障害に対処しているものの、本種の表皮には角質層が存在しないので皮膚からの水分の蒸発に対する適応度は陸上動物に比べれば高くない(Suzuki 1992)。事実、本種は干潟の上を転がって、湿った泥を体に塗りつけるいわゆる泥シャワー行動が頻繁に観察される(道津・的場1977)。従って、皮膚の生態的適応から推定してトビハゼは、皮膚の分化や発生調整のメカニズムを通じて、皮膚呼吸には不都合な表皮の厚い角質化という分化能を発達させず、幼期の皮膚呼吸に合目的な皮膚血管構造を保持しながら、表皮細胞の中酸化による階層分化を獲得して干潟という湿地帯での水・陸両棲の生活に適応しているものと解釈

される。

要 約

トビハゼ浮遊期仔魚の表皮の微細構造を發育段階を追って電子顕微鏡を用いて観察することにより、本種の特異的皮膚構造の分化と発達過程を生態的適応の観点から追究した。後屈曲期が表皮の階層構造分化の開始期で、内湾の河口域に接岸回遊して陸上生活に移行する直前までの底生生活移行期に3層の階層分化が完了するものと考えられた。表層細胞と中層細胞はいずれも基底細胞から分化するものと考えられ、その分化過程は次のように推定された。表皮最内層には未分化の基底線維芽細胞が位置し、これが増殖を繰り返しながら一部は基底細胞として留まるものの、その他多くは上層へ移動して表層域にまで達する。表層域にまで達した基底細胞は、細胞の最外縁の自由表面に微小堤を発達させながらその部分を肥厚させ、扁平単層の表皮細胞(Type I cell)に分化する。また、基底細胞のなかには後屈曲期に形成したアコーディオン型層板状単位膜構造を保有したまま表層域に到達し、そこで単位膜の周囲に遊離のリボゾームを集合させる。そして、滑面小胞体から粗面小胞体の膜構造に変化しつつ再び下方へと移動しながら指状嵌合を発達させて単位膜間の間隔を広げ、細胞質が中空の中層細胞(Type II cell)に分化する。加えて、本種は仔魚期の表皮内毛細血管網をそのまま残存させて陸上生活のみならず、水中生活においても機能させていると考えられる。これらのことから、皮膚の生態的適応から推定してトビハゼは、皮膚の分化や発生調整のメカニズムを通じて、皮膚呼吸には不都合な表皮の厚い角質化という分化能を発達させず、幼期の皮膚呼吸に合目的な皮膚血管構造を保持しながら、表皮細胞の中酸化による階層分化を獲得して、干潟という湿地帯での両棲の生活に適応しているものと解釈された。

文 献

道津善衛・的場 実, 1977: 有明海に跳ねる「ムツ

- ゴロウとトビハゼの行動」. アニマ, (53), 15-23.
- 萩原清司・柵瀬信夫・北島洋二・越川義功・町田実, 1993: 干潟の生態に関する研究 (その3) —トビハゼの種苗生産技術の開発—鹿島技術研究所年報, (41), 343-349.
- Harms, J. W., 1935: Die Reablisition von Genen und die Cosectio Adaptation. 4. Experimentall hervorgerufenen Medienwechsel: Wasser zu Feuvhtluft biz zu Trocknluft bei Gobuformes (*Gobius*, *Baleophthalmus* und *Periophthalmus*). *Z. Wiss. Zool.*, 140, 1-114.
- Iwata, K., 1988: Nitrogen metabolism in the mudskipper, *Periophthalmus cantonensis*: Changes in free amino acids and related compounds in various tissues under conditions of ammonia loading. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91A, 499-508.
- 小林知吉・道津善衛・田北 修, 1971: 有明海産トビハゼの巣について. 長崎大学水産学部研究報告, (32), 27-39.
- 小林知吉・道津善衛・三浦信男, 1972: トビハゼの卵発生および稚魚の飼育. 長崎大学水産学部研究報告, (33), 49-62.
- Nishikawa, A. K. S. Nishikawa and L. Miller, 1990: Isolation, characterization, and *in vitro* culture of larval and adult epidermal cells of the frog *Xenopus laevis*. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 26, 1128-1134.
- Nishikawa, K. and L. Miller, 1991: Calcium regulation of epidermal cell differentiation in the frog *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.*, 260, 165-169.
- Nishikawa, K. and L. Miller, 1992: Hormonal regulation of adult type keratin gene expression in larval epidermal cells of the frog *Xenopus laevis*. *Differentiation*, 49, 77-83.
- 前川久太郎・福田芳生・岡田仁一・今井 薫, 1968: 魚類の空気呼吸器に見られる上皮内血管について. 東医大誌, 26(5), 793-799.
- Murdy, E.O., 1989: A taxonomic revision and cladistic analysis of the oxudercine gobies (Gobiidae: Oxudercinae). *Rec. Austral. Mus.* (1989), Supplement 11, 1-93.
- Ogasawara, T., Y.K. IP, S. Hasegawa, Y. Hagiwara and T. Hirano, 1991: Changes in prolactin cell activity in the mudskipper, *Periophthalmus chrysospilos*, in response to hypotonic environment. *Zool. Sci.*, 8, 89-95.
- 柵瀬信夫・鈴木伸洋・萩原清司・北島洋二, 1991: 干潟の生態に関する研究 (その1) —トビハゼの生息環境特性—鹿島技術研究所年報, (39), 335-342.
- Suzuki, N., 1992: Fine structure of the mudskipper, *Periophthalmus modestus* (Gobiidae). *Japan J. Ichthyol.*, 38 (4), 379-396.
- 鈴木伸洋・柵瀬信夫・杉原拓郎, 1989: 人工ふ化飼育によるマハゼの卵発生と仔稚魚の発育過程. 水産増殖, 36 (4), 277-289.
- 鈴木伸洋・平木雅之, 1991: 魚類数種の表皮に見られた上皮内血管について. 神奈川自然保全研究会報, (10), 1-11.
- Tamura, O. S., H. Morii and M. Yuzurihara, 1976: Respiration of the amphibious fishes *Periophthalmus cantonensis* and *Boleophthalmus chinensis* in water and on land. *J. Exp. Biol.*, 65, 97-107.
- 内田恵太郎, 1932: ムツゴロウおよびトビハゼの生活史. 日本学術協会報告, (7), 109-117.

1994年12月1日受理 (Accepted December 1, 1994)

南西海区水産研究所業績A第35号 (Contribution No. A 35 from the Nansei National Fisheries Research Institute)

鈴木伸洋: 南西海区水産研究所 〒739-04 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (N. Suzuki: Nansei National Fisheries Research Institute, 2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-04, Japan)

萩原清司: 鹿島建設技術研究所 〒240-01 神奈川県三浦郡葉山町一色2415 (K. Hagiwara: Hayama Marine Science Lab., Kajima Technical Research Institute, 2415 Isshiki, Hayama, Miura, Kanagawa 240-01, Japan)