

国立真珠研究所報告

11

昭和41年(1966)11月

Bulletin of the National Pearl Research Laboratory

II

November 1966

国立真珠研究所報告 11 (1966)

内 容

- 和田浩爾 軟体動物の石灰化組織の鈹物化に関する研究
XIII. 外套における粘液細胞の分布状態とその内容の組織化学的研究……1283
- 沢田保夫・上野福三 海底泥およびアコヤガイの排泄物のアセトン抽出物について
I. アセトン抽出物の吸収曲線……1298
- 桑谷幸正・西飯保 アコヤガイの水槽飼育にともなう水質の変化と貝の成長について……1308
- 蓮尾真澄 母貝仕立における生理状態の変化と生殖腺の状態……1334
- 山口一登 “あとづけ” に関する研究
V. 挿核からピース挿入までの養生について……1348
- 沢田保夫・谷口宮三郎 真珠の品質におよぼすピースの特性について……1355
- 船越将二 空中露出がアコヤガイに与える影響について……1362
- 水本三朗 アコヤガイ貝殻の病害に関する研究
II. アコヤガイ貝殻に出現する主要加害種 *Polydora ciliata* (Johnston)
の季節的消長について……1368

学会誌発表論文

- 和田浩爾 貝殻コンキオリンのアミノ酸組成にみられる分類学的差異
- 和田浩爾 軟体動物石灰化組織の鈹物化に関する研究. XI. calcite および aragonite
層中に含まれるコンキオリンのアミノ酸組成の比較生化学的研究
- 和田浩爾 軟体動物石灰化組織の鈹物化に関する研究. XII. 非鈹物化層コンキオリ
ンのアミノ酸組成の特徴 (英文)
- 阪口清次 アコヤガイに寄生する二世吸虫に関する研究. III. 第2中間宿主から人工
感染によって得たメタセルカリア
- 阪口清次 アコヤガイに寄生する二世吸虫に関する研究. IV. 2種の *Caranx* から見
出された *Bucephalus* 属の吸虫について
- 和田浩爾 真珠層の渦巻成長 (英文)

軟体動物の石灰化組織の鉱物化に関する研究

XIII. 外套における粘液細胞の分布状態とその 内容の組織化学的研究^{*,**}

和田 浩 爾

国立真珠研究所

外套の外側面に発達している腺細胞が貝殻の形成に直接関与しているかについては非常に多くの議論がかわされてきた（例えば、Biedermann, 1902；Hayashi, 1938, 1939；Bevelander and Benzer, 1949；小島, 1949；Ojima, 1952；Beedham, 1958a；Tsuji, 1960；中原, 1962）。その結果、腺細胞は染色性から酸性色素に好染する内容を含むものと、塩基性色素に好染する内容を含むものの2種類に区別できるが、機能的に専らコンキオリンあるいはカルシウムのいずれか一方を分泌する特殊な腺は発達していないことが確認されている。このうち、塩基性色素に好染する内容を含む細胞は粘液細胞であり、外套の内外両面に広く分布していることが明らかにされている。しかし、貝殻の形成における粘液細胞の機能的な役割については2つの説に現在わかれている。Bevelander and Benzer (1948) は数種の斧足類の外套を観察し、粘液細胞は外套に普遍的に分布しており、それが貝殻の形成に関与していると考えた。中原 (1961, 1962) は真珠ならびに貝殻形成の過程にみられる粘液物質の行動をメタクロマジーを指標として詳細に追跡した結果、真珠層に含まれるメタクロマジー物質は真珠袋上皮や外套外面上皮の基底部にある粘液細胞の内容をその起源としていることを確認し、粘液細胞が真珠層の形成に直接関与していると結論した。一方、Beedham (1958a) は *Anodonta* の外套における粘液細胞の分布状態と貝殻形成との関係、ならびに貝殻の破損にともなう破損部の貝殻形成とそこに接する外套の上皮細胞の形態変化と粘液細胞の消長を観察し、上皮細胞は貝殻形成に直接関係しているが、粘液細胞は本質的には関与しておらず、貝殻と外套の間に分泌された粘液は外套の運動をなめらかにするための潤滑油の役割をしているにすぎないと考えた。その後、Tsuji (1960) は真珠袋上皮の組織学的観察から同じ結論を下した。以上のことから、著者は貝殻の鉱物化と関連して *extrapallial fluid* の物理化学特性を明らかにする必要性を感じ、外套の内面と外面に発達する粘液細胞の分布状態ならびにその内容と *extrapallial fluid* との化学成分の研究を進めている。今回はその方向にそって斧足類と腹足類との数種の

* Koji Wada. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—XIII. Histological and histochemical studies of mucous cells on the inner and shell surfaces of mantle of some bivalve and gastropod molluscs. With English summary, p. 1295. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 11: 1283—1297. 1966.

** 国立真珠研究所業績 No. 146. (国立真珠研究所報告11: 1283—1297. 昭和41年11月)

外套について組織化学的に観察して得られた結果を主に報告する。

本文に入るに先立ち、この研究の機会を与えられた国立真珠研究所太田繁所長、本文の校閲と助言を賜ったテキサス大学歯学部中原皓博士、英文を校閲下さった G. Bevelander 教授、ならびに有益な助言をいただいた東京教育大学鉱物学教室須藤俊男教授、京都大学理学部水渡英二教授、波多野博行教授、国立真珠研究所町井昭技官に厚く感謝する。なお、観察材料としてイケチョウガイ、メンカラスガイ、ドブガイなどの貴重な多数の淡水貝を提供くださった大阪府水産試験場寝屋川養魚場川村厚生場長、ならびに材料の一部の採集に協力いただいた国立真珠研究所山村豊所員に感謝する。

材 料 お よ び 方 法

この研究に使用した種類は次に示した腹足類 3 種と斧足類 12 種である。

腹 足 類

前 鰓 類

古 腹 足 目

ウシノツメ *Cellana nigrolineata*

サザエ *Turbo cornutus*

新 腹 足 目

テングニシ *Hemifusus terneatanus*

斧 足 類

糸 鰓 目

ナミマガシワ *Anomia lischkei*

ワシノハ *Arca navicularis*

カリガネエガイ *Barbatia obtusoides*

擬 鰓 目

ウミギク *Spondylus barbatus*

ヒオウガ *Chlamys nobilis*

ハナイタヤ *Pecten (Notovola) laqueatus*

マガキ *Crassostrea gigas*

アコヤガイ *Pinctada martensii*

ハボウキガイ *Pinna attenuata*

真 弁 鰓 目

ドブガイ *Anodonta japonica*

イケチョウガイ *Hyriopsis schlegeli*

メンカラスガイ *Cristaria plicata spatiosa*

ドブガイ、イケチョウガイ、メンカラスガイなどの淡水産二枚貝は大阪府水産試験場寝屋川養魚場の飼育池に飼育してあった 3 年生貝で、固定は 1965 年 10 月 8 日におこなった。海産二枚貝のうちアコヤガイは国立真珠研究所多徳島漁場に養殖してあった 3 年生貝を使用し、海産巻貝のうちウシノツメは英虞湾御産の磯で、またほかの海産種は英虞湾賢島および多徳島周辺水域で採集した年令不明の親貝を使用し、固定は 1965 年 10 月 4 日から 11 日

までの間におこなった。

固定液としては Gender 液, Zenker 液, 10%中性ホルマリンなどを使用した。包埋剤にはパラフィンを使用し, 5—10 μ の切片を作った。固定と包埋に当っては特に外套の内外面をおおう粘液層が失なわれないように注意を払った。

粘液細胞の内容および外套の内外面をおおう粘液層の性質を決定するために, ムコ多糖類, ムコ蛋白およびグリコ蛋白のための次のような組織化学的方法を使用した; (1) 過沃度酸—Schiff (PAS 反応) (Lillie et al., 1947), (2) 唾液消化後の PAS 反応, (3) Alcian blue (pH 2.2) (Lison, 1954) (4) 0.01% Toluidine blue (pH 7.0, pH 3.4, pH 2.1), (5) メチル化後の0.01% Toluidine blue (pH7.0) (Fischer et Lillie, 1954), (6)メチル化および鹼化後の0.01% Toluidine blue (pH 7.0) (Lillie, 1958), および(7)ヒアルロニダーゼ (2400 TRU/cc. で 37°C, 12—24時間処理) 消化後の 0.01% Toluidine blue (pH 7.0)。

観 察

軟体動物の外套に分布する腺細胞は塩基性色素に好染する内容をもつものと酸性色素に好染する内容をもつものの2つに大別できる。前者は粘液細胞の特徴をそなえており, 後者は小島(1949)によって大果粒細胞と呼ばれた。粘液細胞と大果粒細胞の染色態度は生物種により, また外套の部分によりそれぞれ多少の差異が認められる場合もあるが, 染色性ならびに組織化学反応はよく類似しているのので, アコヤガイのそれらについて比較して Table 1 に示した。

Table 1. Comparison of staining reactions of mucous cells and cells with large secretory granules on the mantle of *Pinctada martensii*.

Staining methods	Mucous cells	Cells with large secretory granules
Haematoxylin-eosin	purple	red
Azan	blue	deep-red
PAS	+	++
PAS after salivary digestion	+	++
Alcian blue (pH 2.2)	+++	—
Metachromasia with toluidine blue pH 2.1	+++	—
" " pH 3.4	+++	—
" " pH 7.0	+++	—
Toluidine blue metachromasia after methylation	—	—
Toluidine blue metachromasia after methylation and saponification	±	—
Toluidine blue metachromasia after hyaluronidase digestion	++	—

粘液細胞は Alcian blue に好染し, Toluidine blue によって美しい紫色のメタクロマジーを呈するので, 大果粒細胞と容易に区別できる。粘液細胞は外套の内外面にある上皮細胞間ならびに上皮細胞下の結合組織中に散在しており (Figs. 1—8), その分布状態や数は外套の内外面あるいは膜縁, 縁膜, 中心域などの間で変動し, 生物種ごとに特徴づけら

れている。いま粘液細胞の分布状態を調べ、便宜的に分類してみると次のようになる。

A. 粘液細胞が外套の内外面に非常によく発達している種類。

この種類は外褶外側面における粘液細胞の相対的な分布状態から更に次の3つにわけられる。

A-1. 粘液細胞が比較的均一に分布する種類。

マガキ, ハボウキガイ

A-2. 粘液細胞が膜縁から縁膜に特に多く分布する種類。

テングニシ, ワシノハ, メンカラスガイ

A-3. 粘液細胞が中央域に特に多く分布する種類。

サザエ, アコヤガイ

B. 粘液細胞は外套の内面あるいは外面のいずれかで他面よりも非常によく発達している種類。

B-1. 粘液細胞が外套の内面に特によく発達している種類。

ナミマガシワ, カリガネエガイ, イタヤ, ドブガイ, イケチョウガイ

B-2. 粘液細胞が外套の外面によく発達している種類。

ヒオウギ

C. 粘液細胞の存在が光顕的に確認できなかった種類。

ウシノツメ

しかし、A-1 に分類したものでも、粘液細胞はハボウキガイで高密度に発達していたのにたいし、マガキでは散在して発達しており、分布密度を考慮すると更に区分できる。今回の光顕的観察では粘液細胞の存在がウシノツメで決定できなかったが、外套外面および内面にその存在を暗示するような像が認められた。またウミギクの外面上皮の全域にわたって多数の空胞の細胞が均一に存在していたが、その染色態度は今回は確認できなかった。なお巻貝の外套膜縁はウシノツメで3つの褶にわかれ、サザエで内外2つにわかれ、殻皮はそれぞれ外褶と中褶との間および外褶と内褶との間に認められた。しかし、テングニシでは褶にわかれず、粘液細胞は膜縁より少し内方に位置する外面にかなり集結していたが、二枚貝の外套のように貝殻との関連においてその部分を指定することが困難であった。

外套内側面に発達する粘液細胞の内容は、その染色性と組織化学反応がこの研究に使用した全種類においてよく類似しているが、アコヤガイやハボウキガイのようにA群に属するものでは赤紫色の非常に強いメタクロマジーを呈し、イケチョウガイやメンカラスガイのようにB群に属するものでは紫色の弱いメタクロマジーを呈する (Table 2)。一方、外套外褶の外側面に発達する粘液細胞の内容もその染色性と組織化学反応において生物種で互いによく類似しているが、Toluidine blue の異なる pH に対するメタクロマジー反応に差を生じ、呈色の強さを考慮すると、A, B, C の3群にわけられる (Table 3)。すなわち、A群ではその内容は各種の pH の Toluidine blue に対して赤紫色の非常に強いメタクロマジーを呈し、外套内側面の粘液細胞の内容と全く類似する種類で、テングニシ、アコヤガイ、ハボウキガイなどがこれに属する。B群ではその内容は Toluidine blue の各種の pH に対して紫色のメタクロマジーを呈するが、その強さが外套内側面の粘液細胞のそれより一般に弱い種類で、サザエ、ワシノハ、ヒオウギ、ハナイタヤ、マガキなどがこれに属する。これに対してC群ではその内容は pH が3.4以下の Toluidine blue によ

Table 2. Data showing staining reactions of the mucous cells on the inner surface of mantle.

Staining methods	Species	A type <i>T. cornutus</i> , <i>H. terneatanus</i> , <i>A. navicularis</i> , <i>B. obtusoides</i> , <i>S. barbatus</i> , <i>P. martensii</i> , <i>P. attenuata</i> , <i>A. japonica</i>	B type <i>P. (N.) laqueatus</i> , <i>C. gigas</i> , <i>H. schlegeli</i> , <i>C. plicata spatiosa</i>
		blue	blue
Azan			
PAS		+ ~ ++	+ ~ ++
PAS after salivary digestion		+ ~ ++	+ ~ ++
Alcian blue (pH 2.2)		+++	++ ~ +++
Toluidine blue metachromasia	pH 2.1	+++	± ~ +
"	" pH 3.4	+++	+ ~ ++
"	" pH 7.0	+++	+ ~ ++
Toluidine blue metachromasia after methylation	pH 7.0	—	—
Toluidine blue metachromasia after methylation and saponification	pH 7.0	± ~ +	
Toluidine blue metachromasia after hyaluronidase digestion	pH 7.0	+ ~ +++	+ ~ ++

Table 3. Data showing staining reactions of the mucous cells on the outer surface of mantle.

Staining methods	Species	A type <i>H. terneatanus</i> , <i>P. martensii</i> , <i>P. attenuata</i>	B type <i>T. cornutus</i> , <i>A. navicularis</i> , <i>C. nobilis</i> , <i>C. gigas</i> , <i>P. (N.) laqueatus</i>	C type <i>B. obtusoides</i> , <i>A. japonica</i> , <i>H. schlegeli</i> , <i>C. plicata spatiosa</i>
		blue		
Azan				
PAS		+ ~ ++	+ ~ ++	+ ~ ++
PAS after salivary digestion		+ ~ ++	+ ~ ++	+ ~ ++
Alcian blue (pH 2.2)		+++	+ ~ +++	± ~ +
Toluidine blue metachromasia	pH 2.1	+++	± ~ ++	±
"	pH 3.4	+++	± ~ +	± ~ +
"	pH 7.0	+++	+ ~ ++	+
Toluidine blue metachromasia after methylation	pH 7.0	—	—	—
Toluidine blue metachromasia after methylation and saponification	pH 7.0		±	
Toluidine blue metachromasia after hyaluronidase digestion	pH 7.0	++ ~ +++	+ ~ ++	±

って染色されない種類で、カリガネエガイ、ドブガイ、イケチョウガイ、メンカラスガイなどがこれに属する。しかし、粘液細胞の内容は1% Alcian blue 8G と 0.5% Chlorantine fast red 5B の2重染色をおこなった一枚の標本でも外套の部分によってその染色態度に多少の変化を生じ (Figs. 2, 6, 7), 青色に着色する内容をもった粘液細胞と緑色に着色する内容をもったそれとが隣接して分布したり (Fig. 7), 一つの粘液細胞が部分的に青色および緑色に染まる内容を含むこともある (Fig. 6)。ここで観察した青色あるいは緑色の着色変化は組織化学反応に対して本質的な差をもたらしていないようである。

中原 (1962) が指摘したように、外面上皮細胞の間隙を通して分泌された粘液細胞の内容は粘液層となって外套の外面上皮と貝殻との間を占めている。粘液層の染色性と組織化学反応は対応する外套外面上皮にある粘液細胞の内容と類似しているが (Figs. 2, 4-8), 粘液層の呈色は1% Alcian blue 8G と 0.5% Chlorantine fast red 5B の2重染色をおこなった標本で外面上皮細胞から貝殻へ向って変化することがある (Fig. 7)。

外套中褶と外褶との間に形成された殻皮の前身と考えられる膜状の分泌物の染色態度と組織化学反応を Table 4 に示した。分泌物はドブガイ、イケチョウガイ、メンカラスガイなどでは肥厚した膜となっており、Haematoxylin-eosin 染色や Azan 染色によって全く染まらないし、PAS 反応に陰性で、メタクロマジーを呈さない。サザエ、ワシノハ、カリガネエガイ、ヒオウギ、カキ、ハボウキガイなどでは Azan 染色によって赤色に染まり、PAS 反応に陽性であるが、各種の pH の Toluidine blue に染まらない。一方、ウミギク、ハナイタヤ、アコヤガイでは Azan 染色で赤色に染まり、PAS 陽性反応を示して前者と類似するが、各種の pH の Toluidine blue に対してメタクロマジーを呈する。

考 察

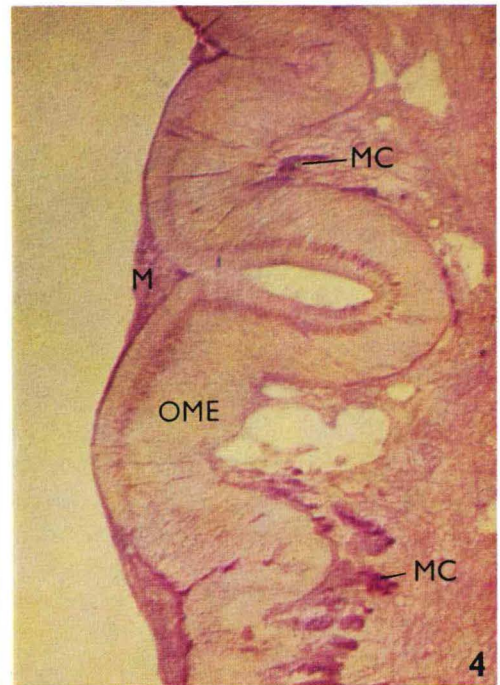
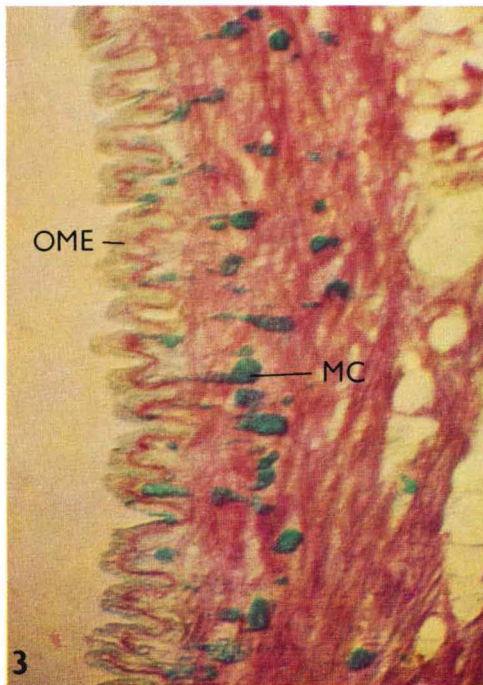
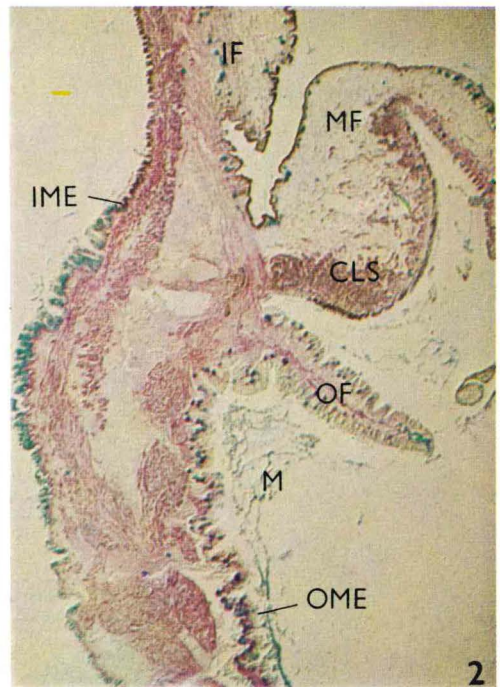
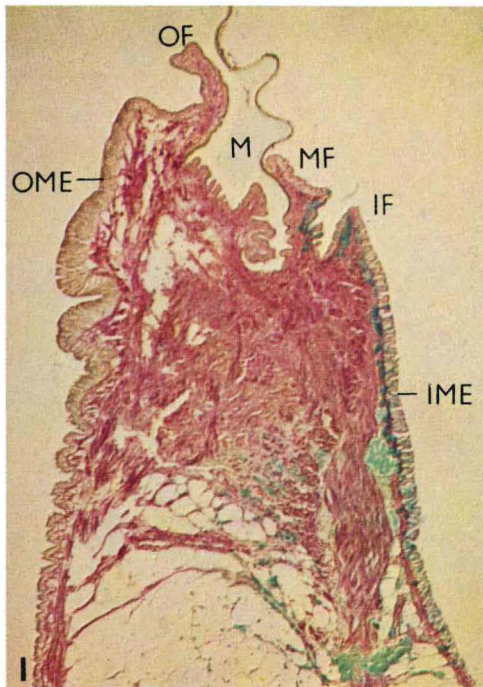
アコヤガイやイケチョウガイの外套の粘液中に存在する硫酸基をもった酸性ムコ多糖類あるいはムコ蛋白 (田中・波多野, 1956; 堀口, 1956; 古橋, 未発表) は莫大なカルシウムと結合を保ちながら行動していることから、貝殻形成に必要なカルシウムの運搬体として重要な役割を演じていると想像されている (田中・波多野, 1956)。この Sulfomucopolysaccharides の構成成分は生物種によって差異を生じている (堀口, 1956) ので、カ

Fig. 1 Transverse section of the mantle of *Hyriopsis schlegeli*, showing an abundance of mucous cells on the inner side of mantle edge. IF, inner mantle fold; IME, inner mantle epithelium; M, mucus; MF, middle mantle fold; OF, outer mantle fold; OME, outer mantle epithelium. x 27. Stained with 1% alcian blue 8G and 0.5% chlorantine fast red 5B.

Fig. 2 Transverse section of the mantle of *Pinctada martensii*, showing distribution of mucous cells on the inner and shell surfaces of pallial zone. CLS, cell with large secretory granules. x 27. Stained with 1% alcian blue 8G and 0.5% chlorantine fast red 5B.

Fig. 3 Mucous cells suspended in subepithelial tissues of the mantle of *Hemifusus termatanus*, showing the affinity for alcian blue. They pass through outer epithelium and open on the shell side. MC, mucous cell x 27.

Fig. 4 Outer epithelium of the mantle edge of *Anodonta japonica*. The secreted after organic substance and mucous cells were positive to PAS reaction salivary digestion. x 140.



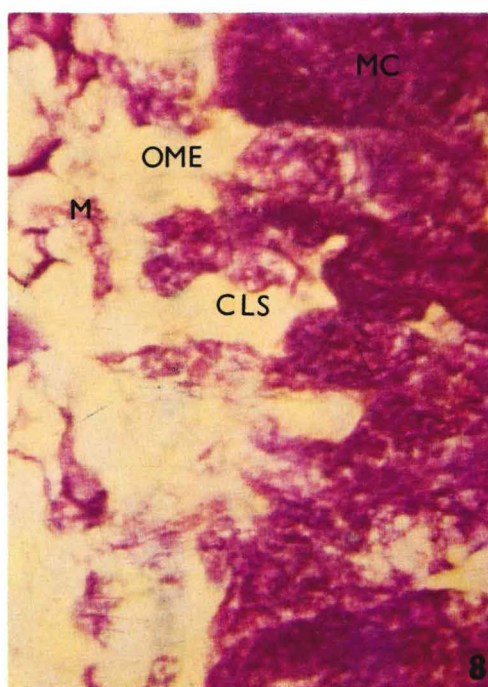
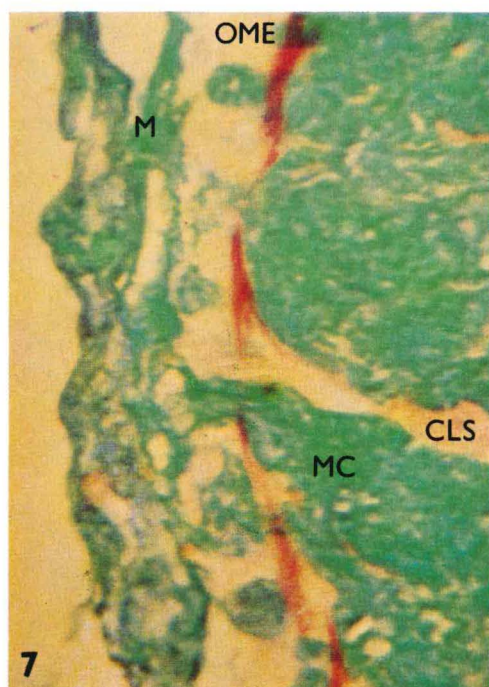
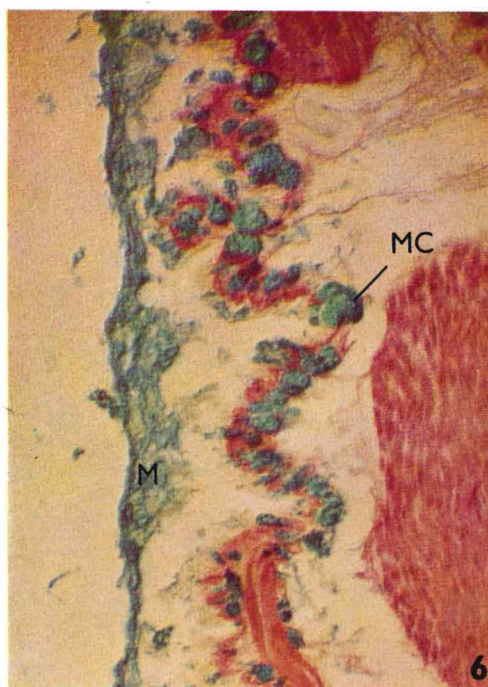
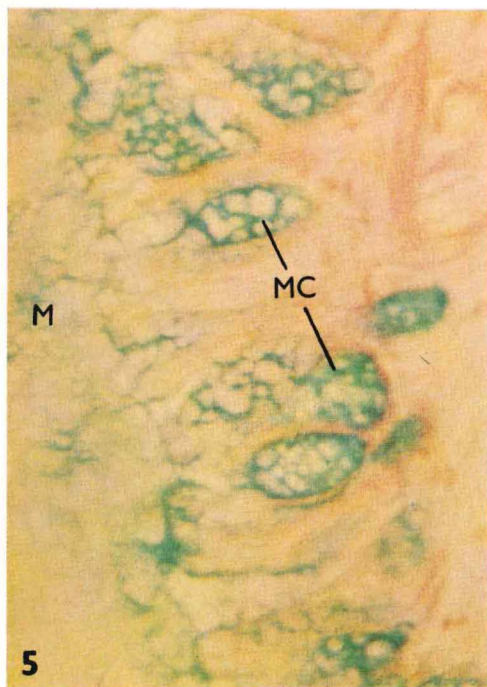


Table 4. Staining reactions of the membranous organic substance in a periostracal groove.

Staining methods	Species	A type	B type	C type
		<i>S. barbatus</i> , <i>P.</i> (<i>N.</i>) <i>laqueatus</i> , <i>P. martensii</i>	<i>T. cornutus</i> , <i>A.</i> <i>navicularis</i> , <i>B. ob-</i> <i>usoides</i> , <i>C. gigas</i> , <i>P. attenuata</i>	<i>A. japonica</i> , <i>H.</i> <i>schlegeli</i> , <i>C. pli-</i> <i>cata sapatiosa</i>
Azan		red	red	—
PAS		+ ~ ++	+ ~ ++	—
PAS after salivary digestion		+ ~ ++	+ ~ ++	—
Alcian blue (pH 2.2)		++ ~ +++	— ~ +	—
Toluidine blue metachromasia	pH 2.1	+ ~ ++	—	—
"	pH 3.4	+ ~ ++	—	—
"	pH 7.0	+ ~ ++	—	—
Toluidine blue metachromasia after methylation	pH 7.0	—	—	—
Toluidine blue metachromasia after methylation and saponification	pH 7.0	±		
Toluidine blue metachromasia after hyaluronidase digestion	pH 7.0	+ ~ ++		—

ルシウムの代謝には sulfate が関与していると考えられている (堀口, 1956; Tanaka and Hatano, 1963)。de Waele (1930) が extrapallial fluid と呼んだ外套と貝殻との間に存在する分泌物は PAS 陽性物質や蛋白のほかに、これと結合したヒアルロン酸様物質や硫酸基をもった酸性ムコ多糖類を含んでいる (Kobayashi, 1964a, b)。また硫酸エステルが蛋白とともにアコヤガイやヒオウギの extrapallial fluid に含まれており (古橋・和田, 未発表), アコヤガイの外套の内側面に分泌された粘液のアミノ酸組成 (Wada, 印刷中) ならびに糖成分 (古橋・和田, 未発表) は extrapallial fluid のそれらと全くよく類似している。これらの結果に加えて、貝殻のコンキオリンにアミノ糖 (堀口, 1959), sulfated polysaccharide (Simkiss, 1965), 硫酸エステル (古橋・和田, 未発表) などが決定され、また sulfatase の特異的に強い活性が軟体動物の外套の粘液物質に認められる (左右田・

Fig. 5 Secreted mucous substances and mucous cells on the shell side of the mantle of *Pinna attenuata*. x 420. Stained with 1% alcian blue 8G and 0.1% chlorantine fast red 5B.

Fig. 6 The organic substances in the extrapallial fluid and mucous cells stained in different colours on the shell side of pallial zone of the mantle of *Pinctada martensii*. Both of them take up alcian blue. x 140.

Fig. 7 The extrapallial fluid parallel to the inner shell surface and the mucus coming out from mucous cells suspended in the subepithelial tissue of central area of the mantle of *Pinctada martensii*. The extrapallial fluid far off outer epithelium was stained blue, but the mucus in cells and in contact with the outer epithelium in greenish blue. Cells with large secretory granules stained with 0.5% chlorantine fast red 5B were unstained with 0.01% toluidine blue of pH 2.1. x 420.

Fig. 8 Outer epithelium of central area of the mantle of *Pinctada martensii*. Both organic substances in the extrapallial fluid and mucous cells show metachromasia with 0.01% toluidine blue of pH 2.1, but outer epithelial cells are slightly stained blue. x 420.

小山, 1935; 左右田・川松, 1936) ことは, 外套および *extrapallial fluid* の粘液物質には硫酸基に起因するメタクロマジー陽性の酸性ムコ多糖類が含まれており, 少なくともその一部は貝殻コンキオリンに移行している (中原, 1962; Wada, 1964b) ことを暗示している。中原 (1962) は *extrapallial fluid* 中に含まれる粘液物質は外套の外側面にある粘液細胞によって分泌されたメタクロマジー陽性の粘液果粒に由来しており, 貝殻真珠層の有機質を形成することを観察し, 粘液細胞が貝殻形成に直接関与すると報告した。一方 Beedham (1958a) は *Anodonta cygnea* の外套内側面にある粘液細胞の内容は硫酸基をもつ酸性ムコ多糖類であるのに, その外側面にある粘液細胞の内容と *Ostrea edulis* や *Mytilus* の外套に発達している粘液細胞の内容は中性ムコ蛋白あるいはムコ多糖類であることを組織化学的に示し, とともに外套の運動をなめらかにする潤滑油であり, 貝殻形成には本質的に関与していないと報告した。Tsujii (1960) はメタクロマジーを呈する粘液細胞の分布状態を調べ, また外面上皮細胞と貝殻コンキオリンはメタクロマジーを呈さないとして, 外面上皮細胞が貝殻形成に関与するのであって, 外面粘液細胞の生理的機能についても Beedham (1958a) の結論を支持している。

今回の観察によれば, 外套内側面の粘液細胞の内容は Alcian blue に濃染し, メタクロマジーを呈しており, 硫酸基をもった酸性ムコ多糖類の存在を暗示したが, 生物種間で呈色に強弱を生じていた。これに対して, メタクロマジーを指標とすると貝殻面の粘液細胞の内容は生物種間でかなり変動している。C群に属するイケチョウガイでは pH 3.4 以下の Toluidine blue にはメタクロマジーを呈さなかったが, イケチョウガイの貝殻真珠層のコンキオリンには硫酸エステルが含まれている (古橋・和田: 未発表) ことから, イケチョウガイの *extrapallial fluid* 中にも硫酸基をもった酸性ムコ多糖類が存在すると想像できる。貝殻面にある粘液細胞の内容がコンキオリンの前駆物質であるかどうかは確証できなかったが, 上皮細胞間をとって分泌され, 少なくとも *extrapallial fluid* の 1 成分となるのが認められた。メタクロマジーはアルコール固定をしたり, 脱パラフィン過程でアルコールを通すと, 一般に非常に弱くなり, 全く認められなくなったことがしばしば生じた。

extrapallial fluid 中に存在する有機物質が貝殻コンキオリンの前駆物質であると假定して, 著者 (1964 c, d) が観察した organic crystals と今回観察した *extrapallial fluid* とのメタクロマジーの呈色の強さの変化をそのコンキオリン化* と鉱物化との過程を追って

Table 5. Change of toluidine blue metachromasia of the organic substance in the *extrapallial fluid* during the process of formation and mineralization of conchiolin.

Species \ Stage	The precursor of conchiolin in the <i>extrapallial fluid</i>	Prem mineralized matrix (=Organic crystal)	Mineralization of the matrix	Etched mineral crystals and mineralized layer
<i>P. martensii</i>	+++ →	+	++ →	++ → -
<i>P. attenuata</i>	+++ →	+	++ →	++ → -
<i>C. nobilis</i>	+	+	++ →	++ → -
<i>C. gigas</i>	+	+	++ →	++ → -

* 著者は *extrapallial fluid* 中の可溶性蛋白が一定の構造をもった不溶性蛋白, すなわちコンキオリンに変性することにこの用語をあてた。

Table 5 に示した。すなわち、前鉾物化基質である *organic crystals* はその形成当初は弱いメタクロマジーを呈するが、鉾物結晶が生成する直前にはかなり強いメタクロマジーを呈するようになり、鉾物結晶が成長するとその部分はやがてメタクロマジーを呈さなくなる。しかし、脱灰した鉾物結晶の残渣は明らかにメタクロマジーを呈する。コンキオリンの形成とその鉾物化の過程におこるメタクロマジーの強弱は有機物質の単位体積あたりのメタクロマジー陽性物質の増減を意味しているかどうか明らかでないが、*extrapallial fluid* 中の可溶性蛋白が一定の構造をもった不溶性蛋白に変性し、それが鉾物化する過程において全硫黄 (Tanaka and Hatano, 1963) や硫酸エステル (古橋・和田, 未発表) の著しい減少がみられる。それと同時に *extrapallial fluid* 中に含まれる有機成分のアミノ酸組成はそれと接する貝殻鉾物化層のコンキオリンのそれと著しく異なる (Wada, 印刷中) ことから、コンキオリン化とその鉾物化の過程で *extrapallial fluid* 中の有機成分の一部は脱脚すると想像できる。この点で今回観察した *extrapallial fluid* の染色態度の変化は興味深い。

コンキオリンのアミノ酸組成は鉾物化層と非鉾物化層とで著しく異なり (Hare, 1963; Wada, 1966a), 生物種間で多少異なるがそれぞれ特徴づけられている (Wada, 1966b)。また染色態度も対照的で鉾物化層のコンキオリンは塩基性色素に好染し, *Toluidine blue* によってメタクロマジーを呈するが、非鉾物化層のそれは酸性色素に好染し, *Toluidine blue* によって淡く青緑色に染まるか、まったく染色されない (Wada, 1964)。これらの結果から、彼等は軟体動物において有機基質が貝殻鉾物の結晶核生成を触媒していると想像している。すなわち、Hare (1963) はコンキオリンの酸性あるいは塩基性アミノ酸の遊離した酸性または塩基性側鎖がそれぞれ負あるいは正に荷電した場をつくり、 Ca^{++} イオンあるいは CO_3^- イオンを引きつけ、結晶核生成を誘起するに充分な初期濃度がそこにつくられると考えた。一方、Wada (1964a, c, 1966, 印刷中) は或る構造をもった蛋白質の特有のアミノ酸残基に結合したメタクロマジー陽性部分—多分硫酸基をもった酸性ムコ多糖類 (Wada, 1964d)—が熱力学的に安定な結晶核を生成するのに必要な活性化エネルギーを引き下げており、また充分な初期濃度をつくるのにより効果的な電氣的場として活性化していると想像した。ここでメタクロマジーは鉾物化層のコンキオリンに必ず認められるが、アミノ酸組成には系統分類学的意義が強く反映されている (Wada, 1964b, 1966b)。しかるに今回の結果は、ウミギク、ハナイタヤ、アコヤガイなどでは殻皮溝中に形成された殻皮の前身と思われる膜状の分泌物が酸性フクシンに好染して他種の殻皮と類似した染色性を示すにもかかわらず、強いメタクロマジーを呈した。この結果は、さきに述べたアコヤガイの外套の内側面に分泌された粘液と貝殻面に分泌された粘液とがアミノ酸組成と糖成分において全く類似しているのにもかかわらず、貝殻面にある分泌液からは貝殻鉾物が生成してくる現象とともに矛盾している。しかし de Waele (1930) は環境水が殻皮溝中に形成されている殻皮の前身をとって内側に入り、その部分で *extrapallial fluid* が稀釈されていることを推測し、また Simkiss (1964) は天然海水は炭酸カルシウムの結晶化を阻害する物質を含んでおり、また *alkaline phosphatase* は結晶毒として作用する代謝産物の除去に関与していることを指摘し、外套は *extrapallial fluid* から干渉イオンを排除する障壁として役立ち、そこで有機基質の石灰化がおこる (Simkiss, 1965) と考えて、軟体動物における石灰化に対し“結晶毒の説”を提出した。しかるに、有機基質のすべてが鉾物化するのではない。すなわち、正常状態では生息環境水が絶対に入らないと考えられる貝殻

の中心域に挿入したカバーガラス上で鉋物化を追及すると、鉋物結晶はメタクロマジーを示す有機基質に成長することが知られている (Wada, 1961, 1964a, c)。これらのことは、まず第1に外套と殻皮のように高度にキノン化した蛋白とによって生息環境水と結晶成長の場とが分離され、結晶毒として作用するイオンが *extrapallial fluid* から除去されると同時に、*extrapallial fluid* 中のコンキオリン前駆物質がコンキオリンに変性し、コンキオリンの鉋物化に必要な $\text{aca}^{++} \cdot \text{aco}_3^-$ が生理的につくられねばならないことを暗示しているであろう。かかる晶出環境が生物によってつくられ、そこに炭酸カルシウムの結晶が全く存在しない場合には、軟体動物がつくることのできる、しかも炭酸カルシウムの結晶に親和性の最も強い状態にあるメタクロマジー陽性のコンキオリンが鉋物結晶の核生成を誘起するのに有効に働くことを意味しており、外套外褶の内側面と若い殻皮との間を占める *extrapallial fluid* にはメタクロマジー陽性のコンキオリンですら鉋物化できないような晶出環境しか生理的にはつくりだせないことを意味しているであろう。ここで鉋物化しない殻皮のようなコンキオリンは鉋物化するコンキオリンの形成の土台としても働くと考えられる。上に説明したように軟体動物の貝殻鉋物化におけるメタクロマジー陽性のコンキオリンによる“結晶核生成に必要な活性化エネルギーの引き下げ理論”を著者はここに提出する (和田, 印刷中)。またこの理論は現在 *in vitro* で実験的に追及中である。

アコヤガイの殻皮がメタクロマジーを呈するとの今回の結果は、小島 (1949) や Tsujii (1960) によるアコヤガイの外套中褶の外側面にある大果粒細胞に含まれているエオジン好性で、しかもメタクロマジーを呈さない果粒が殻皮溝に分泌され、殻皮となるとの考察や、アコヤガイの貝殻鱗片状突起を脱灰して得た殻皮がメタクロマジーを呈さなかったとの著者の前回の観察 (1964b) と一致しない。Beedham (1958b) と Dunachie (1962—63) は *Mytilus edulis* の殻皮の外層は殻皮溝に形成された当初は酸性フクシンでよく染まるが、固化すると好酸性と複屈折性を失うと報告している。アコヤガイでもこのようなことが起こるかを別の機会に追及したい。

粘液細胞の生理的機能については、外套におけるその分布状態と数を系統分類学的ならびに生理生態学的分野に立って考察するならば、その分泌物は外套の運動をなめらかにするだけの単なる潤滑油の役割のほかにも生理的あるいは分類学的な意義を有していると考えられる。粘液細胞の内容が貝殻形成に本質的に関与しているかは確かめえなかったが、少なくとも *extrapallial fluid* の1成分である。*extrapallial fluid* に含まれる有機成分はその一部が脱脚して、一定の構造をもったコンキオリンに変性すると考えられるが、コンキオリンの染色性はそれに接している *extrapallial fluid* のそれとよく一致していた。

摘 要

- 1) 粘液細胞の分布状態と数は外套の内外面あるいは部分によって異なり、生物種ごとに特徴づけられている。
- 2) 今回の観察に使用したすべての種類において、外套の内外面にある粘液細胞の内容は酸性ムコ多糖類を含んでいると思われるが、メタクロマジーの強さは生物種によっても、また外套の内外面でも著しく異なっていることがある。生化学的分析と比較すると、Toluidine blue の pH 2.1 および 3.2 に対してメタクロマジーを呈した粘液物質は少なくとも

も硫酸基をもった酸性ムコ多糖類を含んでいると考えられる。

- 3) 粘液細胞の内容は分泌されて、extrapallial fluid の1成分となる。両者は染色性と組織化学的反應でよく類似しており、蛋白、PAS陽性物質、酸性ムコ多糖類を含む。
- 4) 貝殻の鈣物化層のコンキオリンは extrapallial fluid の有機物質と類似した染色性と組織化学的反應を示すが、反應の強さは両者でかなり異なり、コンキオリンの形成と鈣物化の過程で酸性ムコ多糖類のための反應は弱くなる。
- 5) ウミギク、ハナイタヤ、アコヤガイにおいて、殻皮溝中に形成された若い殻皮は強いメタクロマジーを呈したが、他の全種類のそれは Toluidine blue の各 pH にたいして全く染まらないか、わずかに青緑に染まる程度でメタクロマジーを呈さなかった。
- 6) 軟体動物の石灰化組織の鈣物化機構を討論した。

Summary

1) Histochemical investigations were made on mucous cells of the mantle of some molluscs (Gastropoda and Bivalvia), young periostracum formed in periostracal groove, and the extrapallial fluid between the mantle and shell valve.

2) The distribution and number of mucous cells which show a marked difference between the inner and shell sides, or various areas of a mantle, appear to have taxonomic significance (Figs. 1 and 2).

3) In all species used in the present observation, mucous substance in the mucous cells on the inner and shell mantle surfaces seems to contain acid mucopolysaccharides, one of which appears to be sulfated mucopolysaccharide in the substances metachromatically stained with pH 2.1 and 3.4 of toluidine blue, but the intensity of metachromasia varies according to molluscan species and local area of a mantle (Tables 2 and 3).

4) Secreted mucous substances are incorporated in the extrapallial fluid between the mantle and shell valve (Figs. 5, 6, 7 and 8). The staining and histochemical properties of the organic substances in the fluid agree well with those of the mucous substance in the cells (Figs. 5, 6, 7 and 8).

5) The organic substances in the extrapallial fluid are similar to the organic matrix "conchiolin" of mineralized layers of a shell in staining and histochemical reactions. However, changes of the intensity of those reactions indicate that acid mucopolysaccharides in the organic substances may decrease but are not lost in the process of formation and mineralization of conchiolin (Table 5). Biochemical investigations by Tanaka and Hatano (1963), Wada (in press), and Furuhashi and Wada (in press) also suggest that a part of the organic substances in the fluid may be lost, later proteins concentrate in the shell matrix during those processes.

6) In *Spondylus barbatus*, *Pecten* (*Notovola*) *laqueatus*, and *Pinctada martensii*, young periostracum formed between the shell and middle folds of a mantle shows metachromasia (Table 4), but that of all other species used in this study is unstained or slightly greenish blue in colour when stained with toluidine blue.

文 献

- Beedham, G.E. 1958a. Observations on the mantle of the Lamellibranchia. Quart. Jour. micr. Sci. 99: 181-197.
- 1958b. Observations on the non-calcareous component of the shell of the Lamellibranchia. Quart. Jour. micr. Sci. 99: 341-357.
- Beverander, G. and Benzer, P. 1948. Calcification in marine molluscs. Biol. Bull. 94: 176-183.
- Biedermann, W. 1902. Über die Bedeutung von Kristallisationsprozessen bei der Bildung der Skeletten wirbelloser Tiere, namentlich der Mollusken. Zeitschr. f. allgem. Physiol. 1: 154-208.
- Dunachie, J.F. 1962-63. The periostracum of "*Mytilus edulis*". Roy. Soc. Edin. LXV: 383-411.
- Hare, P.E. 1963. Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. Science 139: 216-217.
- Hayashi, K. 1938. Detection of calcium in molluscan mantles. I. *Anodonta* and *Cristaria*. Annot. Zool. Japon. 17:95-103.
- 1939. Detection of calcium in molluscan mantles. II. *Euhadra callizona amaliae* Kobelt. Annot. Zool. Japon. 18: 1-9.
- 堀口吉重 1956. アコヤガイ及びイケチョウガイの生化学的研究—II. アコヤガイとイケチョウガイの各組織より Sulfomucopolysaccharides の分離. 日水誌 22: 463-466.
- 1959. アコヤガイおよびイケチョウガイの生化学的研究—IX. 貝殻の微量成分について (その2). 日水誌 25: 397-401.
- Kobayashi, S. 1964a. Studies on shell formation. X. A studies of the proteins of the extrapallial fluid in some molluscan species. Biol. Bull. 126: 414-422.
- 1964b. Calcification in fish and shell-fish—II. A paper electrophoretic study on the acid mucopolysaccharides and PAS-positive materials of the extrapallial fluid in some molluscan species. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 30: 893-907.
- Lison, L. 1960. Histochimie et cytochimie Animales. Principes et Méthodes. (3eéd). Bauthier-Villars & Co., Paris (今泉正訳, 白水社).
- 中原 皓 1961. 真珠袋の組織学的研究. VII. メタクロマジー物質の行動. 国立真珠研報 6: 541-545.
- 1962. アコヤガイとハボウキガイの外とう膜における粘液物質の行動について. 国立真珠研報 8: 871-878.
- 小島吉雄 1949. アコヤガイ外套膜の組織学的研究. 特に腺細胞に関する観察. 生物 4: 201-205.
- Ojima, Y. 1952. Histological studies on the mantle of pearl oyster (*Pinctada martensii* Dunker). Cytologia 17: 134-143.
- Simkiss, K. 1964. Phosphates as crystal poisons of calcification. Biol. Revs. 39: 487-505.
- 1965. The organic matrix of the oyster shell. Comp. Biochem. Physiol. 16: 427-435.
- 左右田徳郎・小山誠太郎 1935. グルコスルファターゼ (第13報). 種々の貝類に於けるグルコスルファターゼとフォスファターゼの含有量. 日化56: 1388-1391.
- 左右田徳郎・川松俊治 1936. グルコスルファターゼ (第14報). 日化57:597-598.
- 田中正三・波多野博行 1956. ^{45}Ca を使用する真珠および貝殻形成の化学機構の研究. アイソトープ研究利用総覧307-311.
- Tanaka, S. and Hatano, H. 1963. Formation of conchiolin in molluscs. Report No. 73 of The Nippon Institute for Scientific Research on Pearls 1-8.
- Tsujii, T. 1960. Studies on the mechanism of shell- and pearl-formation in mollusca. Jour. Fac. Fish. Pref. Univ. Mie 5: 1-70.
- Wada, K. 1961. Crystal growth of molluscan shells. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 7: 703-828.
- 1964a. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—IV. Selective fixation of ^{45}Ca into or onto the metachromatic matter in the processes of shell mineralization. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 30: 393-399.
- 1964b. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—VII. Histological and histochemical studies of organic matrices in shells. Bull. Natl. Pearl Res.

- Lab. 9: 1078—1086.
- 1964c. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—VIII. Behavior of eosinophil granules and of organic crystals in the process of mineralization of secreted organic matrices in glass coverslip preparations. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 9: 1087—1098.
- 1964d. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—X. Histochemical determination of the nature of acid mucopolysaccharide in organic crystals. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 30: 993—998.
- 1966a. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—XII. Specific patterns of non-mineralized layer conchiolin in amino acid composition. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 32: 304—311.
- 和田浩爾 1966b. 貝殻コンキオリンのアミノ酸組成にみられる分類学的差異. 日水誌 32: 253—259.
- 硬組織シンポジウム 1. 軟体動物の貝殻形成機構, 特に鉱物化について. 医歯薬出版印刷中.
- Wada, K. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—XIV. Modification of amino acid pattern of the protein in the extrapallial fluid during the process of formation and mineralization of nacreous conchiolin in some Bivalves. (in press).
- Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—XVI. Amino acids of the mucous substance secreted on the inner surface of mantle of some Bivalves. (in press).
- de Waele, A. 1930. Le sang d'*Anodonta cygnea* et la formation de la coquille. Mém. Acad. R. Belg., Cl. Sci. 10: 1—52.

海底泥およびアコヤガイの排泄物の アセトン抽出物について I.

アセトン抽出物の吸収曲線* **

沢 田 保 夫 ・ 上 野 福 三

国立真珠研究所

三重県立大学水産学部

真珠養殖においては、近年密殖あるいは漁場老化によって真珠の生産性の低下が起こり、極端なばあいには底泥の悪化に起因する環境水中の溶存酸素量が急激に低下し、養殖中のアコヤガイの異常斃死が発生するという現象が各所に起こっている。この現象を解明し、その具体的な改良方法を求めることは、真珠業界の当面している重要な問題の一つである。

著者らは漁場老化の機構を解明し、漁場改良の方法を求める目的で密殖あるいは老化漁場の底泥および環境水の諸化学成分の消長や分布を追究してきた^{6,8)}。この結果、漁場の老化現象はアコヤガイとその餌料・環境水および底泥を巡る物質循環の異常にあると推論され、その漁場における密殖化が底泥を悪化させ、環境水をへて養殖中のアコヤガイの生育に影響を与えるものであると考えられた。しかしながら、現在各漁場の密殖度を示す指標となるものは認められず、老化機構の解明といった面からの究明が望まれている。

一方、底泥および草食性の動物プランクトンの排泄物中のクロロフィル分解物については古くから研究され、ことに前者について Vallentyne⁹⁾ は豊富な文献をあげてクロロフィル分解物の存在および底泥中での数千年にわたる蓄積について述べている。また、飯塚¹⁾ は植物プランクトンのクロロフィルの吸収曲線について、短波長と長波長側の吸収位置の吸光度の比からプランクトンの型を類別している。また、飯塚²⁾ は暗所保存海水中の植物プランクトンの主吸収帯の減衰率とその顕微鏡的観察を行なっている。Gorham⁴⁾ は硅藻を用いて、その生きているものと死んだもののアセトン抽出物の吸収位置がずれることを認め、これをクロロフィル a がフェオフィチン a に変化した結果であると報告している。さらに、いろいろの湖水の底泥のアセトン抽出物を分光学的に研究し、短波長側の吸収曲線の変化が湖水の栄養度の差に関係のあることを報告している。Currie³⁾ は橈脚類を植物プランクトンで飼育し、その排泄物のアセトン抽出物の吸収位置が植物プランクトンからの抽出物と異なることを報告している。

最近著者らはアコヤガイの排泄物とそれが沈積する漁場底泥のアセトン抽出物（クロロフィル分解物）がアコヤガイの餌料である海水中の小型懸濁質（主として植物プランクト

* Yasuo Sawada and Fukuzo Uyen. Studies on the acetone extracts from marine mud and faeces of pearl oyster (*Pinctada martensi*) I. On the absorption spectra of acetone extracts. With English summary, p. 1306. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 11: 1298—1307. 1966.

** 国立真珠研究所業績 No. 147 (国立真珠研究所報告11: 1298—1307昭和41年11月)

ン)のそれと密接な関係があり、その量の多寡が漁場の老化や密殖の度合の指標になると推定されるにいたったので、その一部を報告する。

報告にあたり、本研究の機会を与えられた国立真珠研究所太田繁所長ならびに培養プラクトンを提供された当所桑谷幸正博士に感謝の意を表する。

試料および実験方法

漁場の底泥・アコヤガイの排泄物および海水中の小型懸濁質の採取は、主として英虞湾立神浦で行なった。

底泥の採取は、できるだけ自然に近い状態で採取するために、ナウマン採泥器を用いて直径 16mm の円柱状に採泥し、上部の約 5 mm ぐらいの褐色あるいは黒色の浮泥層とその他に分離して抽出試料に用いた。

アコヤガイの排泄物は、漁場内で採取するばあいには 2 年生貝 40 個体を金網平籠 (45×45×10 cm, 網目約 4 cm) に収容して木筏に垂下養殖したものを採糞 2 日前に貝掃除を行なって付着物を除去し、新しい籠に入れ替え、この籠が入るように作成した角型プラクトンネット (50×50 cm, XX 13) を用いて採糞した。また、実験室内での採糞は、飼育水槽で 5 ℓ の浜過海水に通気しながら貝掃除を行なった 3 年生貝 5 個体を入れ約 20 時間放置して十分に排糞させた後、新しい浜過海水 5 ℓ を満した別の水槽に移し、培養した *Chaetoceros simplex* を与えて通気しながら飼育し、排泄物を駒込ピペットで採取して浜過乾燥して試料とした。

海水中の小型懸濁質は、約 4 ℓ の海水をミユラーガーゼ (XX 13) で浜過して 100 μ 以上のものを浜別した後、ミリポアフィルター (AAWP) で浜過して乾燥し試料とした。

培養プラクトンはそのままミリポアフィルターで浜過して用いた。

その他比較試料として、アオサ (*Ulva pertusa*)・タデ (*Polygonum sp.*) の新鮮物および標準試料として日本葉緑素 K.K. 製のフェオフィチンを用いた。

抽出は Strickland and Parsons⁷⁾ によりすべて 90% アセトンを用いて冷暗所で 20 時間抽出し、遠心分離後日立自記分光光度計 EPS-II 型を用いて吸収曲線を求めた。この測定に用いた 350—700 m μ の範囲での波長精度は 1—3 m μ であった。測定は試料濃度の高いものについては、10 mm の標準試料槽を用い、海水中のプラクトンのような濃度の低いものについては、50 mm, 8 ml 容のステンレス製の試料槽を用いた。

実験結果および考察

1. 底泥・アコヤガイの排泄物および植物プラクトンのアセトン抽出物の吸収曲線
第 1 図に示したように底泥・アコヤガイの排泄物の 90% アセトン抽出物の吸収曲線は植物プラクトンのアセトン抽出物と異なった吸収位置を示している。

飼育水槽に餌料として用いた *Chaetoceros simplex* (培養による) のアセトン抽出物は、クロロフィル特有の 430, 665 m μ に顕著な吸収を示し、その他 415, 458, 540, 590, 620 m μ にそれぞれ吸収が認められる。しかしながら、海水中の微細な植物プラクトンを含む懸濁質を摂取したと考えられる餌料投与前のアコヤガイの排泄物や、*Ch. simplex* を投与し

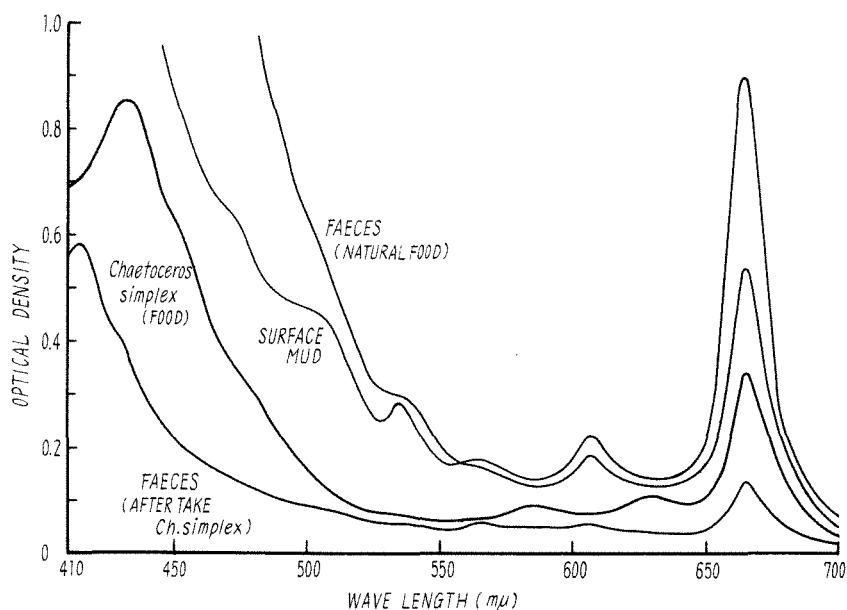


Fig. 1 Absorption spectra of acetone extracts from *Ch. Simplex*, faeces of pearl oyster (*P. martensi*) and surface mud.

て飼育した後に得られた排泄物のアセトン抽出物の吸収曲線は、 $665m\mu$ の吸収のみクロロフィルのそれと一致するが、他の吸収位置は全く異なり $410, 470-475, 506, 535, 565, 607m\mu$ に吸収が認められる。Gorham⁴⁾ は硅藻で、死んだもののアセトン抽出物の吸収位置が、 $430m\mu$ から $410m\mu$ に、また、 $620m\mu$ が $605m\mu$ に移動することを認めており、Currie³⁾ も橈脚類を植物プランクトンで飼育したばあいの排泄物と餌料の植物プランクトンとのアセトン抽出物の吸収位置を比較して、排泄物では $435m\mu$ が $410m\mu$ に、 $625m\mu$ が $610m\mu$ に移動するのを認めている。いずれのばあいにおいても、波長に少しの差はあるが、ほぼ近似値で短波長に移動していることが一致している。また、Currie³⁾ や Odum⁵⁾ はこのばあい $665m\mu$ の吸収が長波長側に移動することを認めているが、著者らの測定では分光器の精度内での波長の移動は認められなかった。

以上の実験結果から、アコヤガイが餌料として摂取した植物プランクトンなどからのクロロフィルが貝の体内で分解し排泄されるものと考えられる。

漁場の海底泥のアセトン抽出物は、アコヤガイの排泄物あるいは死んだプランクトンと同じ吸収位置を示すことが認められるので、この成因も植物プランクトンなどのクロロフィルであり、アコヤガイなどの動物をへて沈積したものやプランクトン自身の残骸が蓄積された結果であると推定される。

2. 植物プランクトンおよび植物のクロロフィルとその分解物

アコヤガイの排泄物や海底泥のアセトン抽出物が植物プランクトンのクロロフィルの

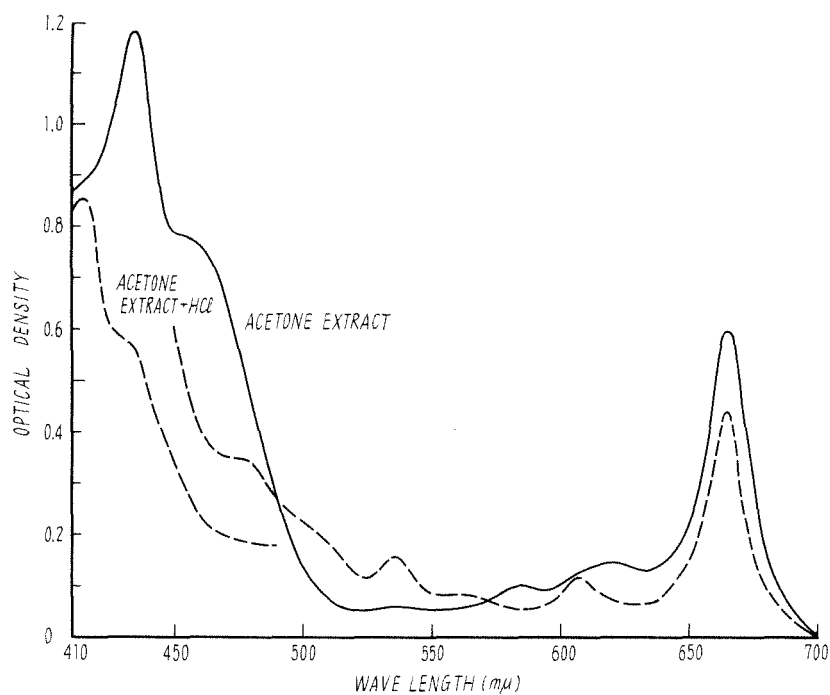


Fig. 2 Absorption spectra of acetone extract from smartweed (*Polygonum sp.*) and its decomposed substance by HCl.

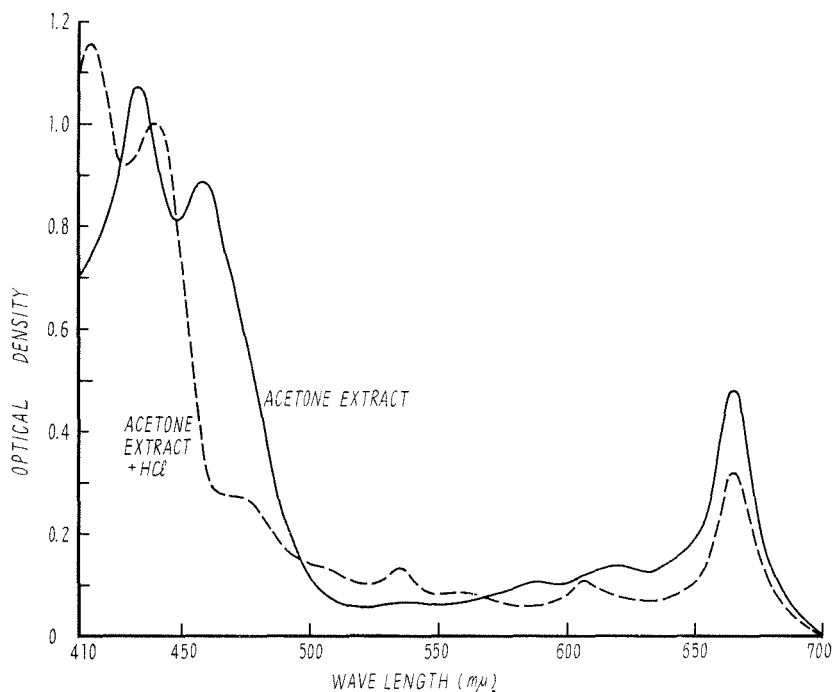


Fig. 3 Absorption spectra of acetone extract from *Ulva pertusa* and its decomposed substance by HCl.

分解産物ではないかと推定されるので、海水から汙別した混合プランクトン・培養の *Ch. simplex* および植物から抽出したクロロフィルとこれらの酸分解物の分光特性を比較検討した。

クロロフィルの分解は、各試料から抽出したクロロフィルの90%アセトン溶液 10ml に 8N-HCl を 0.1 ml 加えて行なった。酸を添加し混合すると、直ちに溶液は帯緑黄色に変化するが、この分解は分光光度計で吸収位置の変化を測定していくと、酸添加後約15分で完全に行なわれることが認められた。

分光光度計による吸収の測定結果は、第2図、第3図に示したように、クロロフィルが最初に示した 665m μ の吸収位置は酸分解後も移動が認められないが、その他の吸収帯はすべて消滅し、酸分解物には 410, 470—475, 506, 535, 557, 607m μ の新しい吸収帯が現われた。海水中の混合プランクトンでも同じ現象が認められるが、これらの吸収位置は前述のアコヤガイの排泄物や海底泥のアセトン抽出物と全く同じであり、また第4図に示したようにアコヤガイの排泄物のアセトン抽出物に酸を加えても吸収位置の変化が認められないことから、これらの色素は同一物質であると認められた。

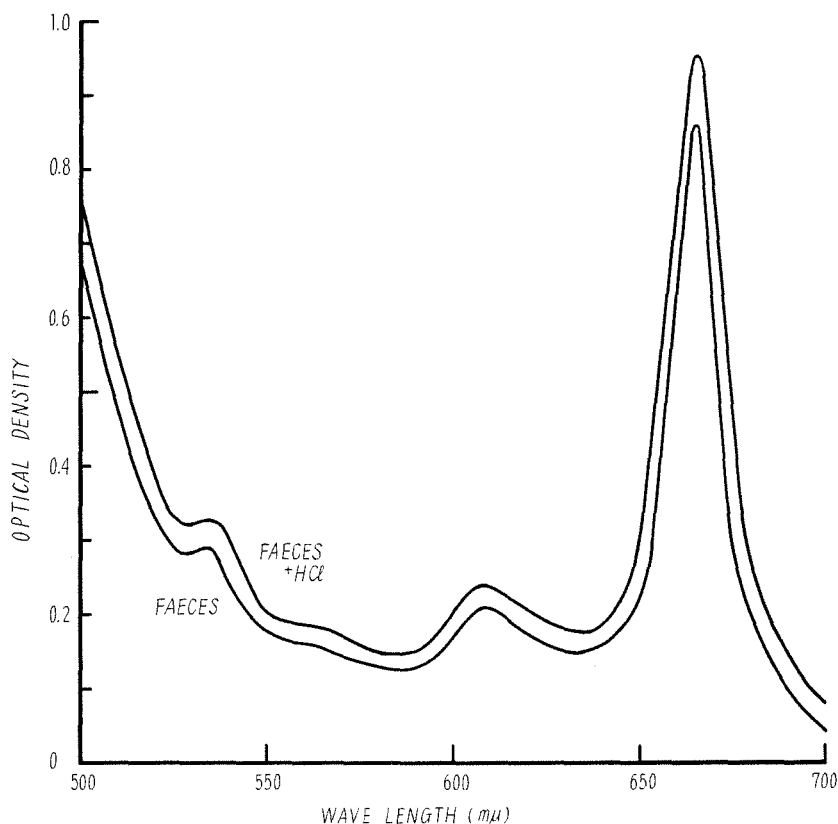


Fig. 4 Absorption spectra of acetone extract from faeces of *P. martensi* and mixture of the faeces extract and HCl.

3. 試料から抽出したクロロフィルの酸分解物とフェオフィチンの吸収曲線の比較

クロロフィルは塩酸や蓚酸のような酸類によって分子内の Mg を放出して H_2 と置換し、それぞれクロロフィル a, b に相当するフェオフィチンに変化することが知られているので各試料から得たアセトン抽出液の酸分解物がフェオフィチンであるかどうかを確認するために、各試料から抽出したクロロフィルの酸分解物とフェオフィチンおよび両者の混合溶液の吸収位置を比較した。その結果は第 5 図, 第 6 図, 第 7 図に示した。

フェオフィチンの 90% アセトン溶液における吸収は第 5 図に示したように、410, 470, 475, 506, 535, 555, 607, 665 $m\mu$ に認められ、このうち 410, 506, 535, 607, 665 $m\mu$ の吸収は顕著である。

第 6 図には *Ch. simplex* クロロフィルとこれの酸分解物および酸分解物にフェオフィチンを添加したものの吸収曲線を示した。図からも明かなように、クロロフィルの酸分解物はクロロフィルと全く吸収位置が異なっており、これにフェオフィチンを加えても吸収位置の変化が認められない。また、第 7 図はタデから抽出したクロロフィルの酸分解物とアコヤガイの排泄物のアセトン抽出液をフェオフィチンと比較したものであるが、各吸収位置が全く同じであることが認められる。

この実験結果から、海底泥やアコヤガイの排泄物および各試料から得たアセトン抽出物の酸分解物はフェオフィチンであると考えられる。海底泥のアセトン抽出物については飯塚ら¹⁾は第 1 主吸収帯は 400—420 $m\mu$ で植物プランクトンから得た抽出物の 430—445 $m\mu$ とは異なっているが、第 2 主吸収帯が 665 $m\mu$ にあるので、海底泥中にはクロロフィルが存在すると指摘しているが、著者らの実験結果では、各吸収位置から考えて海底泥中には

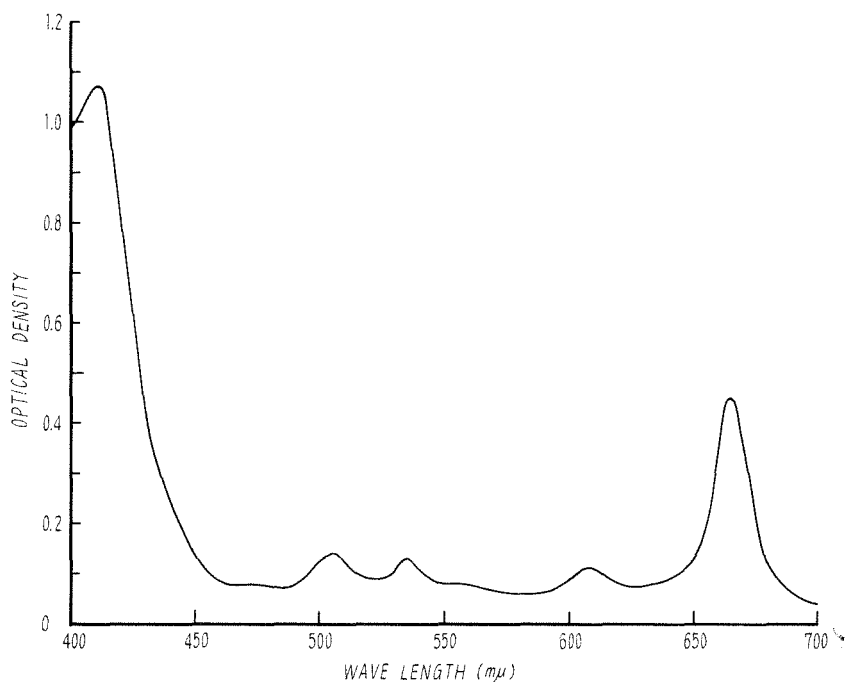


Fig. 5 Absorption spectra of phaeophytin. (90% acetone solution)

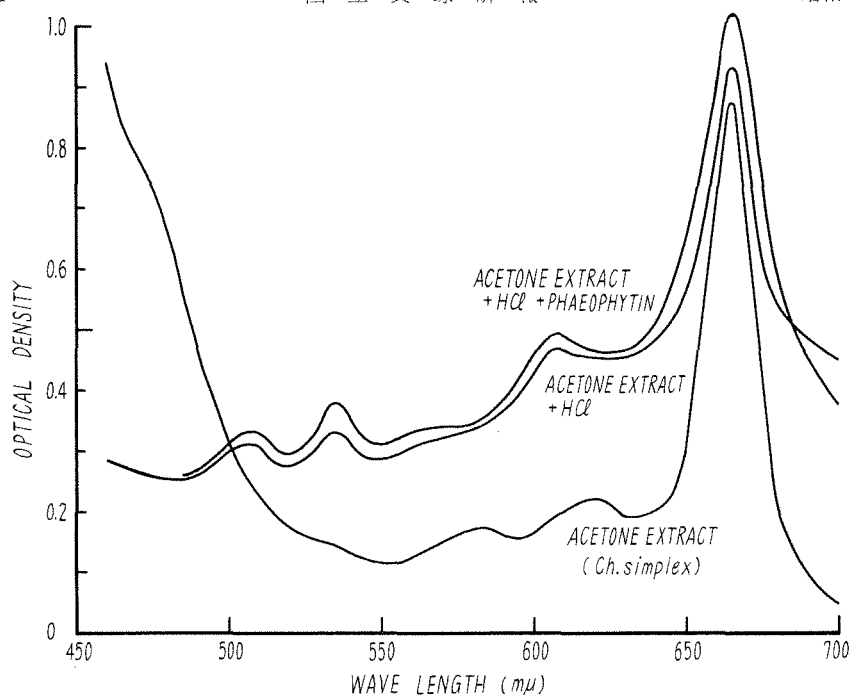


Fig. 6 Absorption spectra of acetone extract from *Ch. simplex*, its decomposed substance by HCl and mixture of decomposed substance and phaeophytin.

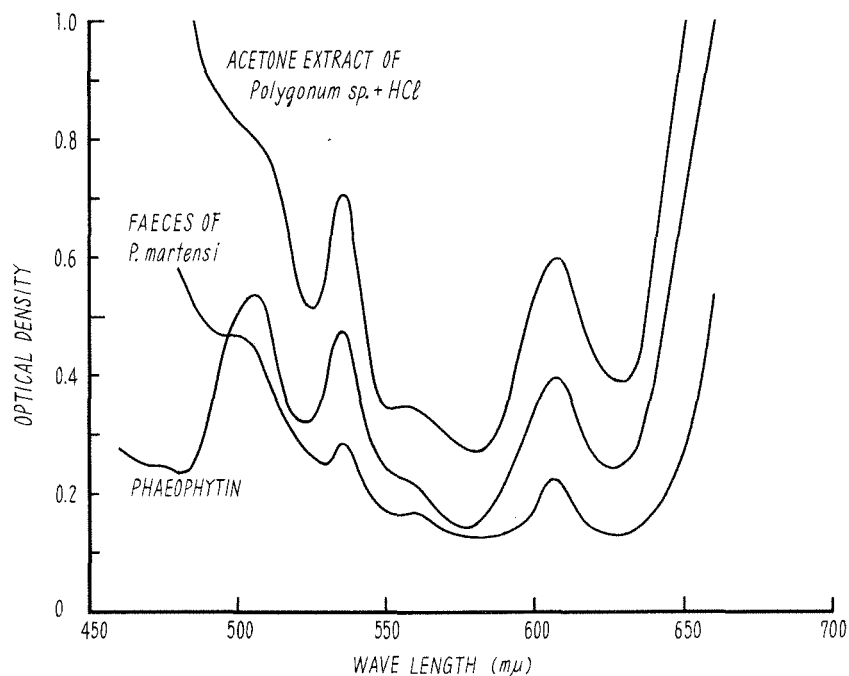


Fig. 7 Absorption spectra of acetone extracts from smartweed (*Polygonum sp.*), faeces of pearl oyster (*P. martensii*) and phaeophytin.

クロロフィルの存在が認められず、フェオフィチンの存在することが認められた。

また、フェオフィチンは90%アセトンで抽出したばあい、分光光度計 EPS—II 型では吸光度は 0.1—0.9 の範囲においてフェオフィチンと直線関係にある。この検量線は第 8 図に示したが、これによって吸光度の測定から直ちにフェオフィチンの量を知ることができる。

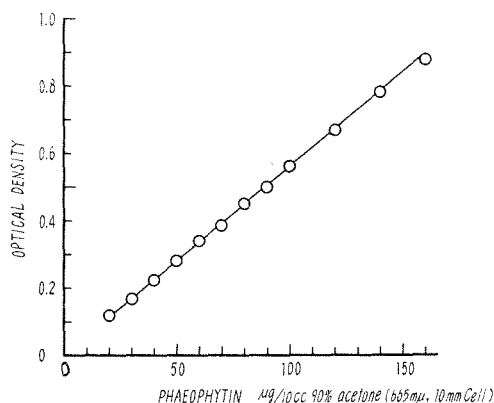


Fig. 8 Calibration curve of phaeophytin (90% acetone solution)

4. 真珠漁場の海底泥中のフェオフィチンの分布

前述の結果から、真珠漁場においては、アコヤガイが海水中から摂取した植物プランクトンのクロロフィルは、貝の体内においてフェオフィチンに変化し、排泄物中に含まれて海底に落下すると考えられる。真珠漁場として利用されている海域は、地形が複雑な上水深が比較的浅く、海水の流動が少ないのが普通であるので、アコヤガイの排泄物はあまり遠方に運ばれずその近辺に落下するものと考えられる。したがって、漁場の底泥中のフェオフィチンの量は、漁場の密殖度に比例して増減するものと推定されるので、英虞湾鵜方浦の真珠漁場と未利用海域の底泥中のフェオフィチン量を比較した。結果は第 1 表に示したように、海底泥中のフェオフィチンの鉛直分布は、浮泥層に極めて多量に存在するが、海底下数センチメートルのところでは急激に減少しているのが認められる。鵜方浦奥部のような密殖や老化の進んでいる漁場では、その量の減少は少ないが、海底下 5 cm 内外では

Table 1. Vertical distribution of phaeophytin in pearl oyster farms at Ugata inlet in Ago bay in June 30. 1966.

station \ layer	0~0.5 cm		0.5~2.5cm		2.5~4.5cm		4.5~6.5cm	
	µg/g dry mud	µg/ml wet mud	µg/g dry mud	µg/ml wet mud	µg/g dry mud	µg/ml set mud	µg/g dry mud	µg/ml wet mud
Mouth (uncultivated)	41	15	18	8	13	9	—	—
Middle area	44	76	26	10	14	9	16	11
Inner most	107	95	64	28	48	25	18	12

すでに他の漁場と大差なく、乾泥 1g 当り $18\mu\text{g}$ という低い値を示すことから、著者らがすでに指摘したように^{6,8)} 漁場酷使の結果として起こる底泥の悪化は極く上層部に強く起こることが認められる。

さらに、フェオフィチン量の水平的分布をみると、未利用海域では浮泥層 1g 当り $41\mu\text{g}$ ($15\mu\text{g/ml}$ 湿泥) という値に対し、やや密殖と考えられる鵜方浦中部では $44\mu\text{g}$ ($76\mu\text{g/ml}$ 湿泥) と高い値を示している。また、鵜方浦奥部の大量異常斃死の発生しやすい漁場では、浮泥層が 1g 当り $107\mu\text{g}$ ($95\mu\text{g/ml}$ 湿泥) という異常に高い値を示すだけでなく、約 4.5 cm の下層までは他に比べて 3 倍もの高い値が認められた。

このように、漁場の底泥中のフェオフィチン量は漁場の密殖や老化の指標となると推定される。このことについては各真珠漁場の底泥についてその季節的变化を比較検討して続報する。

要 約

海底泥およびアコヤガイ排泄物のアセトン抽出物（クロロフィル分解物）の分光特性を検討した。

(1) 植物プランクトンから抽出したクロロフィルおよびその酸分解物の吸収曲線をフェオフィチンのそれと比較した結果、底泥やアコヤガイの排泄物中にはクロロフィルの存在が認められずフェオフィチンが存在することを認めた。

(2) 真珠漁場の底泥中のフェオフィチン量は、未利用漁場に比べると密殖漁場に極めて多いことから、漁場の密殖や老化の指標となり得ることを認めた。

Abstract

Absorption spectra of acetone extracts (chlorophyll derivatives) in surface bottom mud of pearl oyster farm and in faeces of pearl oyster (*Pinctada martensi*) has been estimated.

(1) Absorption spectra of both chlorophyll and its derivatives were compared with the one of phaeophytin. It was found that phaeophytin is in the surface mud and faeces of pearl oyster and chlorophyll is not in them.

(2) As the chlorophyll derivatives in the surface mud of farms were very rich in the mud of overcrowded farms compare with in the one of uncultivated inlet, it can be said that the amount of accumulation of chlorophyll derivatives on surface mud is a good indicator of overcrowded cultivation of pearl oyster or superannuation of pearl farm.

文 献

- (1) 飯塚昭二・清水千秋・梶原武・入江春彦 1960. 分光光度計によるプランクトン色素の研究—I. アセトン抽出液における吸収曲線の型について. 長崎大学水産学部研究報告9: 54—57.
- (2) 飯塚昭二 1963. 暗所保存海水水中の植物プランクトンの性状変化と吸収曲線クズレ現象の解析. 長崎大学水産学部研究報告15: 100—115.
- (3) Currie, R.I. 1962. Pigments in zooplankton faeces. Nature 193: 956—957.
- (4) Gorham, E. 1960. Chlorophyll derivatives in surface muds from the English lake.

- Limnology and Oceanography 5: 29—33.
- (5) Odum, H.T., McConnel, W. and Abbott, W. 1958. The chlorophyll "A" of communities. Publications Institute of Marine Science, University of Texas 5: 66—96.
 - (6) 沢田保夫・谷口宮三郎 1965. 真珠養殖漁場の養殖海洋学的研究Ⅲ. 老化漁場における海水ならびに底質の性状の季節変化について. 国立真珠研報10: 1213—1227.
 - (7) Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R. 1960. A manual of sea water analysis. Published by the Fisheries Research Board of CANADA, OTTAWA. Bulletin No. 125: 107—112.
 - (8) 上野福三 1964. 真珠漁場における餌料基礎生産と漁場の海洋構造についてⅡ. 海水並に底泥の性状の季節変化と海底耕耘の効果について. 三重県立大学水産学部紀要 6 (2):145—169.
 - (9) Vallentyne, J.R. 1957. The molecular nature of organic matter in lakes and oceans, with lesser reference to sewage and terrestrial soils. J. Fisheries Research Board of CANADA 14: 33—82.

アコヤガイの水槽飼育にともなう 水質変化と貝の成長について^{*, **}

桑 谷 幸 正 ・ 西 飯 保

国 立 真 珠 研 究 所

真珠養殖は他の魚貝類養殖業と異なり、真珠生産のための挿核手術、それに伴なうところの貝の生理的管理、また良質な真珠を生産するための高度な育成管理が必要とされている。しかしながら、天然における気象・海況条件の変動は貝の生理条件に著しい影響をもたらし、しばしば適正な管理を不可能とし、さらには生産された真珠の品質低下の一因となっている。このような状況下において、例えば農産業における温室礫耕栽培のように、貝を水槽あるいは池中で育成することが可能となれば、現在の養殖管理面において非常に重要であり、また困難な技術的問題点の解決に役立ち、真珠養殖業のより高度な発展が期待されると思われる。

また最近、漁場に対する養殖適正密度、都市、工場廃水および浚渫埋立事業にともなう公害防止対策などが業界において問題となっているが、これらに対する研究の一方法として水槽内の水質的諸条件を人為的に変化させることによって、それらの条件が貝に与える影響を知ることが望まれるが、このためにも水槽内飼育法の技術を確立する必要がある。

これまでの水槽飼育に関する研究の大部分は魚類に対するものであって、二枚貝についてはその摂餌機構が特殊 (filter feeding) であり、投餌と水質保持の両者を同時に満足させることが困難であったためにほとんどなされていなかった。著者の一人桑谷は、これらの問題を明らかにするため、まず、投餌と濾過を交互に行なうところの交互循環飼育装置を工夫して貝の飼育を可能ならしめ、また、アコヤガイの摂餌機能を解剖学的に⁶⁾、また炭素粒子を投与することにより組織学的に⁷⁾ 解明し、さらにまた、水槽内のアコヤガイに *Skeletonema*⁴⁾ および大豆・米・魚粉の磨砕懸濁液⁵⁾ を与え、その成長からそれぞれの餌料効果の検討を試みた。

濾過循環式飼育水槽においては同一の海水を長期間にわたって使用するために、その間における水質の変化が貝の生理および成長を著しく左右する原因となるものと考えられる。しかしながら、これまでの研究の大部分は単に生体を維持生存させるための最低条件を調

* Yukimasa Kuwatani and Tamotsu Nishii. Changes in the qualities of breeding water and the growth of the pearl oyster using the aquarium with closed circulating system. With English summary, p. 1328. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 11: 1308—1333. 1966.

** 国立真珠研究所業績 No. 148 (国立真珠研究所報告11: 1308—1333. 昭和41年11月)

べたものであって、これを増重あるいは成長させるための基準は全く明らかにされていない。そこで今回、アコヤガイの成長に対する適正水質基準を求めるために本実験を行なった。結果として、多くの問題点を残したが、それらについてはそれぞれ今後検討を重ねる予定である。

本報告を行なうに先立ち、本研究の機会を与えられた国立真珠研究所長 太田 繁氏、貝殻真珠層の溶解像に関する調査に御指導をいただいた同所 和田浩爾博士、および英文の御校閲をいただいたテキサス大学 Dr. G. Bevelander および中原 皓博士に厚く感謝する。

材 料 お よ び 方 法

供 試 貝

満2年生アコヤガイについて、まず全数200個体中より肉眼的に均等の大きさで、しかも成長のよいと思われるもの80個体を選び、ついでそれらの空中重量と水中重量とを測定し、空中重量15~20 g、水中重量5.6~6.7 gの範囲内にあるもの63個体を選出し、各群の平均水中重量がなるべく均等になるよう10個（無投餌）および2, 5, 10, 15, 21個（投餌）の6群に分けた。

飼育装置および方法

Fig. 1 に示すとおりスチロール製水槽（25×25×30cm）3個を1組として、餌料槽、飼育槽および濾過槽とし、送気により攪拌と餌料供給および濾過のための循環とを行なった。餌料槽および飼育槽には約15ℓの海水を満し飼育槽には供試貝を入れたビニール製の網籠を垂下し、濾過槽には約9ℓの海水と排水量約6ℓ（重量14.5kg、容積10600cm³）の2~5mm径の砂を海水で十分に洗滌したものを入れた。この様な飼育装置7組* を作製

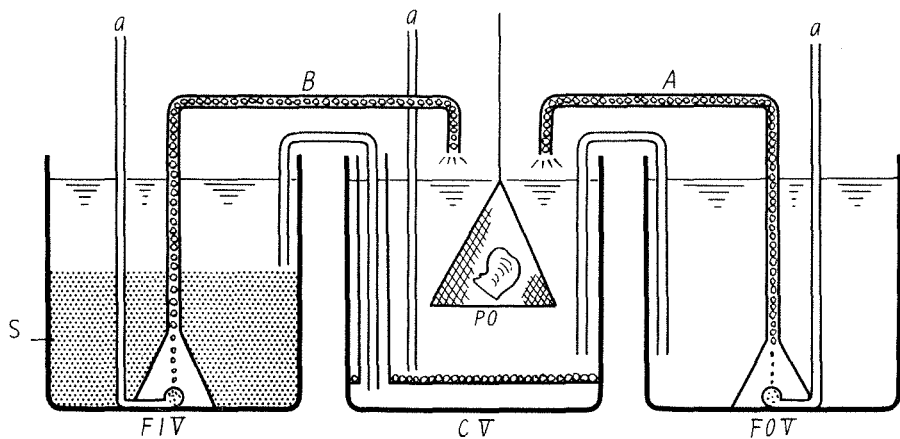


Fig. 1 Scheme of the apparatus used for breeding the pearl oyster. FiV: Filter vessel, CV: Culture vessel, FoV: Food-supplying vessel, A and B: Glass tube to circulate water, PO: Test pearl oyster in vinyl cage, a: Air, S: Filter sand.

* 上記無投餌および投餌貝群に対する装置6組のほかに、対照として投餌10個群と同量の餌料のみを投与する装置1組を加えた。

し、各槽の水温の調節ならびに附着珪藻などの発生を防止するために、温度調節装置付暗箱内に設置した。

餌料は精白米を1昼夜以上、淡水中に浸漬し、その後、ホモゲナイザーをもってその最大粒径が 10μ 以下となるよう調製した⁵⁾。餌料の投与は1日2回とし、1回1貝当りの投与量は $10\text{mg}^{5)}$ とした。

飼育水循環回路のうち、餌料投与回路 (Fig. 1,A) は休みなく作動しているが、濾過回路 (Fig. 1,B) は1日2回の餌料投与時間 (8~12時および16~20時) には自動的に休止する。各回路の循環水量はいずれも1分間約 0.5ℓ の割合であった。

各水槽の収容貝数および投与餌料量を Table 1 に示す。

Table 1. Average weight of test animals and quantity of diet supplied*

Content in an aquarium**	Average underwater weight	Quantity of diet per time $\times$ 2 time=per day
A	— (g)	$100 \times 2 = 200$ (mg)
B	6.045 ± 0.357	—
2	5.945 ± 0.498	$20 \times 2 = 40$
5	5.934 ± 0.237	$50 \times 2 = 100$
10	5.951 ± 0.138	$100 \times 2 = 200$
15	5.992 ± 0.236	$150 \times 2 = 300$
21	5.936 ± 0.233	$200 \times 2 = 400$

* The diet consists the particles of less than 10μ made from the polished rice.

** A : Non-animal but supplied the same quantity of diet as that for 10 pearl oysters.

B : 10 pearl oysters starved, 2-21: Number of pearl oyster contained in an aquarium.

実験期間および水質・貝成長度の調査

貝の飼育は1966年4月11日から6月25日まで通算75日間行なった。この間に計10回、水質および貝の水中重量の測定を行なった。

水質：各測定日の投餌前 (8~9時) に採水し*、つぎの項目・方法にしたがって分析した。

pH 値、ガラス電極 pH 計を使用して測定した。

アルカリ度、Dibromo-o-cresolsulphone phthalein (B.C.P.) を指示薬として N/100塩酸により滴定した。

COD、強アルカリ性の下における KMnO_4 消費量を定量した。

アンモニア-N、Witting の沈澱法を用い、Nessler 試薬による呈色を Dubroccq 比色計または光電光度計 (波長 $430\text{m}\mu$ における吸光度) により測定した。

亜硝酸-N、Griess-Romijn 試薬を用い Dubroccq 比色計または光電光度計 (波長 $500\text{m}\mu$) により測定した。

硝酸-N、H.W. Harvay 法による還元ストリキニン試薬を用い、Dubroccq 比色計または光電光度計 (波長 $530\text{m}\mu$) により測定した。測定値は亜硝酸-Nを含む。

* 1組の飼育装置からの1回の採水量は約 750cc であり、その量だけ新しい海水を補給した。

供試貝の成長：各水質調査日ごとに水槽別貝群の全水中重量を測定した。水中重量の測定法およびその意味するところのものについては西飯 (1965)⁹⁾, 桑谷・西飯 (1966)⁹⁾に詳述されている。また、飼育終了時、供試貝の全湿重量、貝殻湿重量、肉質湿重量（剥身重量）、貝殻乾燥重量、肉質乾燥重量を測定した。なお、水中重量の減量現象を理解する一助として各群の貝殻真珠層表面の溶解像の出現率を調べた（調査および計数方法については後述する）。

実 験 結 果

飼育水の水質の変化

各測定日の水温、pH 値、アルカリ度、COD、アンモニア-N、亜硝酸-N、硝酸-N の測定値は Appendix Table I に示す。

1) 水温 (Fig. 2)

各飼育装置は恒温箱内に設置されたが、試験期間が冷暖房の切り換え時期に当り、また送気による外気温の影響を受けて 19~24°C と予期以上の変化を示した。

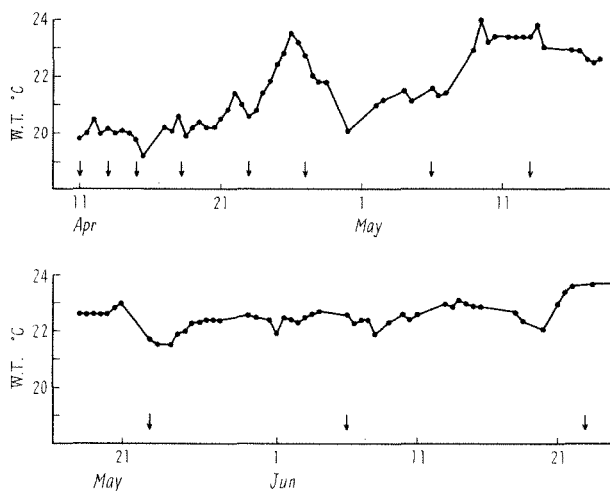


Fig. 2 Water temperature in culture vessel during the test. Arrows show the work days of present experiment.

2) pH 値 (Fig. 3)

いずれの水槽も飼育開始後32~42日目ごろまでは急激に下降するが、それ以後は次第に constant になる傾向がみられる。それらは下降の程度により 2つのグループに分けられる。1つは餌料のみを投入した水槽水と貝 2 個群の飼育水であって、73日目の pH 値はそれぞれ 8.02 および 7.92 と高い。他は無投餌 10 個群を含むその他の群の飼育水であって、73日目の pH 値は 7.65~7.72 と低い。ただし、後者のうちとくに 5 個群は他の群と比較するとき常に最も高い値を示している。

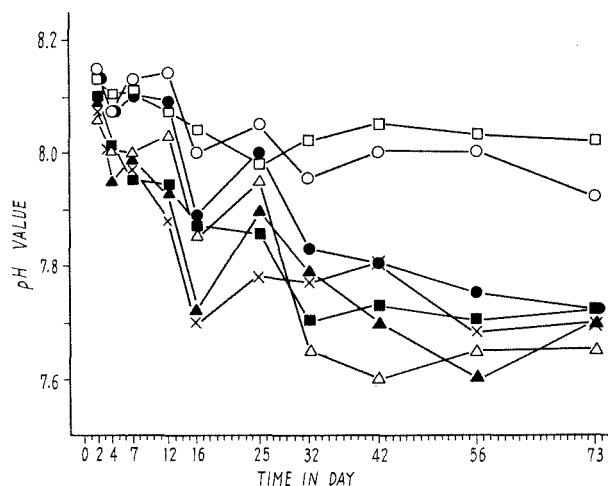


Fig. 3 Change in pH value of the breeding water. Open squares: Food materials only without any animals. Solid squares: 10 oysters starved. Open circles, solid circles, open triangles, solid triangles and cross marks: respective groups of 2, 5, 10, 15 and 21 oysters supplied the diet. (The same marks are used in Figs. 4-11 and 14)

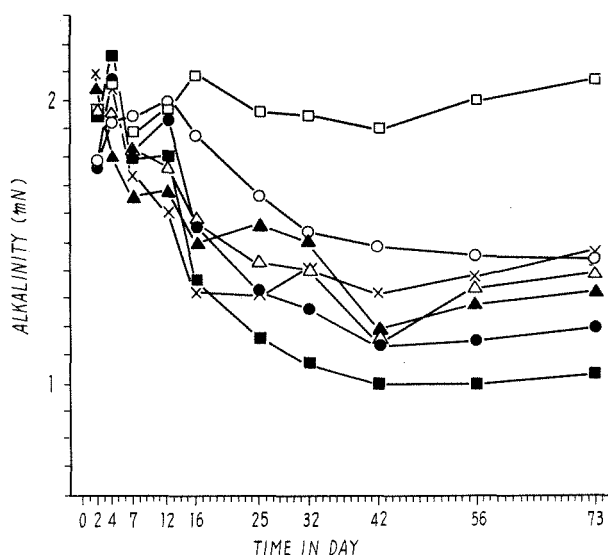


Fig. 4 Change in Alkalinity of the breeding water.

3) アルカリ度 (Fig. 4)

アルカリ度も pH 値とはほぼ同様に、全般的に32~42日目頃までは急激に下降するが、その後次第に constant になる傾向を示している。pH 値では餌料のみを投入した水槽水と2個群の飼育水とが高かったが、アルカリ度では2個群も次第に下降し、73日目には他の群の飼育水に近い値にまで達している。なお、その他の5群の飼育水を比較すると、それ

らのうち無投餌群および5個群のそれらは12日目ごろまでは比較的高い値を示すが、それ以後逆に低くなっているのが注目される。

4) COD (Fig. 5)

COD に関して各飼育水は大きく2つのグループに分けることができる。1つは10個、15個、21個の3群の飼育水で、73日目において2.4~2.9 mg/L と高く、他は“餌料のみ”無投餌・2個・5個の4群のそれらで 1.3~1.8 mg/L と低い。各飼育水はそれぞれ期間内に2~3回の peak を形成しており、貝の代謝活動の変化あるいは溶存有機物量と有機物分解細菌との消長を暗示するようである。

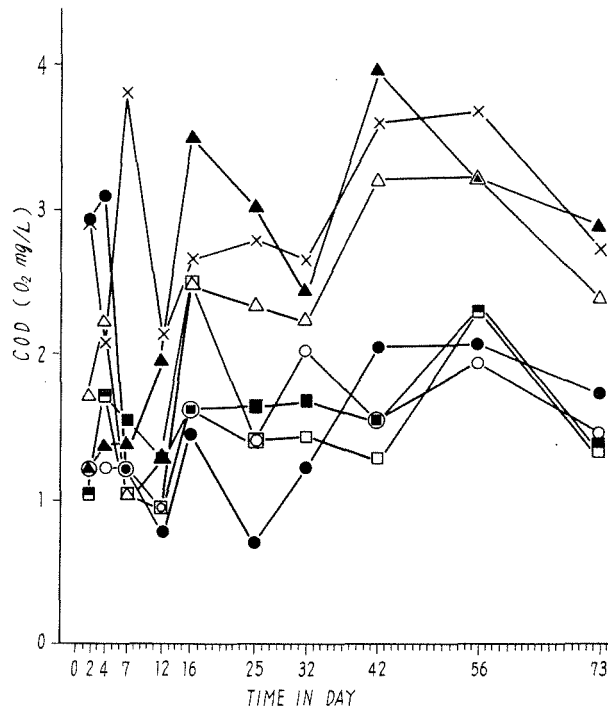


Fig. 5 Change in COD of the breeding water.

5) アンモニア-N (Fig. 6)

全般的にみると、各飼育水のアンモニア-Nは前半期にその peak をもっており、以降、急に減少して、56日目以後にはいずれも $10\mu\text{g-atoms/L}$ の前後かあるいはそれ以下の値になっている。溶存有機物量の多かった10個・15個・21個の3群の飼育水はアンモニア-N量においてもその他の群を引き離して多く、21個群のそれは4日目に $60\mu\text{g-atoms/L}$ および32日目に $30\mu\text{g-atoms/L}$ と2回、15群では32日目に $30\mu\text{g-atoms/L}$ 、10個群では16日目に $40\mu\text{g-atoms/L}$ と各1回の peak を形成している。なお、15個群では COD、亜硝酸-N および硝酸-N の出現時期からみて、おそらく12~16日目頃に第1回の peak が形成されていたのではないかと想定される。また、その他の群のうち無投餌群の飼育水が7日目に $14\mu\text{g-atoms/L}$ と比較的高い値を示しているのが注目される。

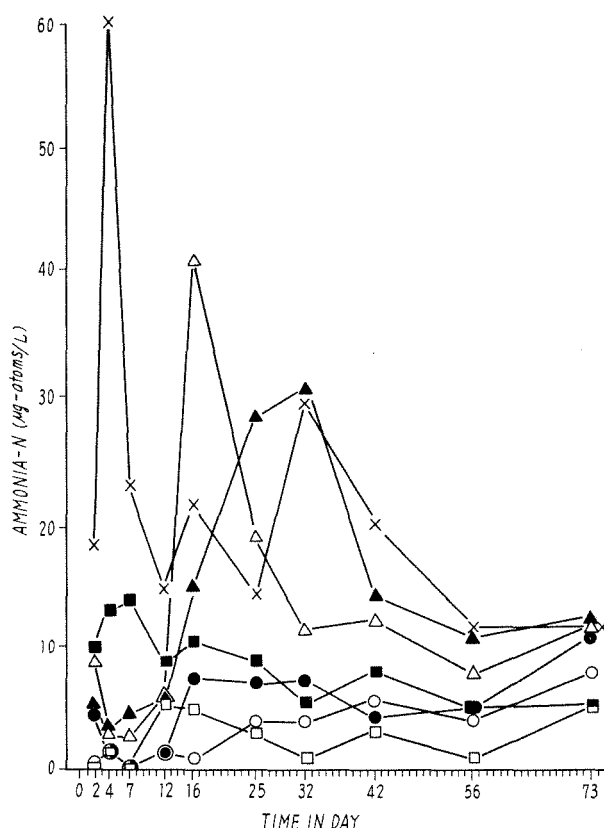


Fig. 6 Change in Ammonia-N of the breeding water.

6) 亜硝酸-N (Fig. 7)

アンモニア-Nと同様、前半期に peak があり、以降急激に減少して、42日目以後はいずれも $4 \mu\text{g-atoms/L}$ 以下を示している。21個・15個および無投餌の3群の peak が比較的高く、21個群では7日目に $50 \mu\text{g-atoms/L}$ 、無投餌群では12日目に $17 \mu\text{g-atoms/L}$ 、15個群は16日目に $10 \mu\text{g-atoms/L}$ となっている。10個群は25日目および42日目に peak がみられるが、その値はいずれも $3 \mu\text{g-atoms/L}$ 以下できわめて低い。15個群飼育水のアンモニア-Nの peak の出現時期には前述のように問題があるのでこれを除き、10個・21個・無投餌の3群についてアンモニア-Nと亜硝酸-Nとの peak の出現時を対示すると、10個群では16日目と25日目、21個群では4日目と7日目、無投餌群では7日目と12日目であって、アンモニア-Nの peak にひきつづいて亜硝酸-Nの peak がみられている。

7) 硝酸-N (Fig. 8)

硝酸-Nの蓄積量について、前半期にはおおむね収容貝数に比例して直線的に増加するが、後半期には種々の変化を示し、それらは大きく3つの型に分けられる。その一つは“餌料のみ”・2個・5個の3群の飼育水で、いずれもその量は多くないが実験終了時

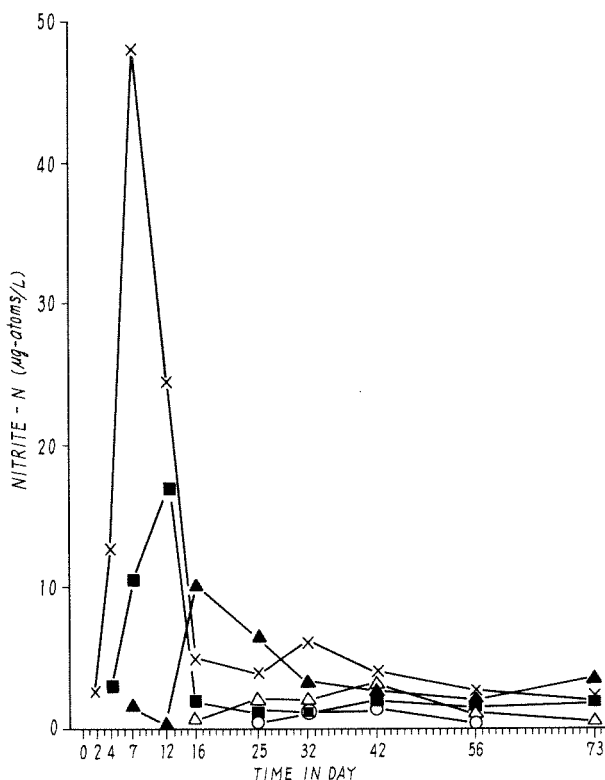


Fig. 7 Change in Nitrite-N of the breeding water.

で徐々に増加している。いま 1 つは 10 個・21 個の両群で、いずれも peak に達した後一時的に減量し、後ふたたびゆるやかな増量を示している。他の 1 つは無投餌群および 15 個群であってそれらは前述 2 型の間中型あるいは変型とも考えられる。無投餌群は 42 日目まではほぼ直線的に増加し、56 日目に peak を形成し以後減量している。15 個群は 25 日目に peak を形成し 32 日目に一時的に減量するが、後ふたたび増加している。

各貝群の水中重量の変化

各測定日における各群の水中重量の増加量（累積値）を水質諸要因の測定値とともに Appendix Table I に示す。5 月 6 日（25 日目）に 21 個群のうちの 1 個が斃死しているのが発見され、そのときすでにその肉質部は失なわれていた。西飯⁹⁾によれば全水中重量に対して肉質部水中重量の占める割合は約 3.5 % であり、1 個の貝の肉質部の有無は全水中重量に対して 0.2079g、(21 個群の平均水中重量 5.94 g) の増減となる。本実験における全水中重量の測定およびその後の計算はすべてその死殻を含めて行なった。

実験期間内の各槽貝群の水中重量の変化（増減量の累積値）を Fig. 9 に示す。2 個群を除く各群は実験開始直後に急激に増重して peak に達し、その後次第に減量している。各群の peak 出現時を比較すると、21 個群と 15 個群とが逆になっているが、概して個体数の多い群ほど早い傾向にあり、それはまた減量の始まるのが早いことをも意味している。2 個群は実験終了時まで増量が続けるが 5 個群は 56 日目に減量しはじめ、10 個・15 個・21

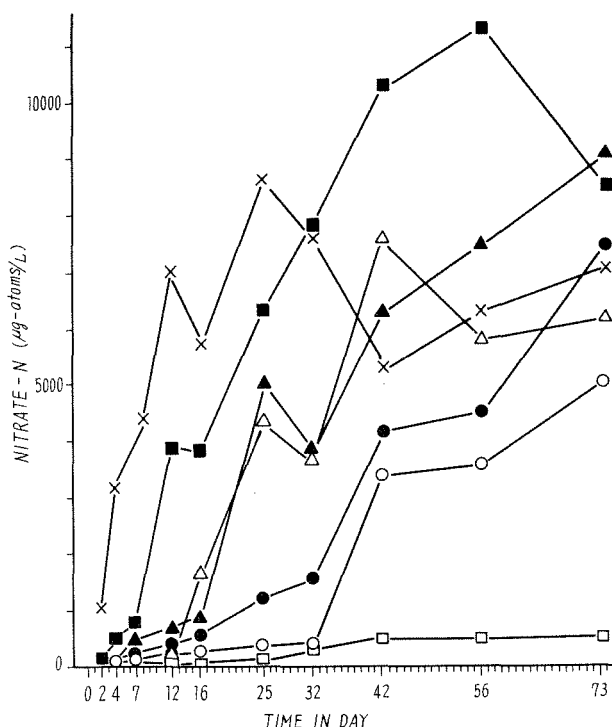


Fig. 8 Change in Nitrate-N of the breeding water.

個および無投餌の4群はそれぞれ42日目・16日目・25日目および32日目に減量しはじめ、実験終了時にはいずれも実験開始時以下の重量となっている。

各群の貝1個当り平均増重量の累積経過を Fig. 10 に示す。図によれば2個群は他の群を引き離して実験終了時まで著しく良好な成長を示し、5個群は当初は2個群と同様な成長を示すが次第に衰えて実験終了時には2個群と他の4群の中間に位置し、10個・15個・21個の3群の成長は無投餌群のそれと大差なく極めて低位にある。2個群の成長*は、1963年5月13日から6月13日までの1か月間、非常に好条件の下に海中で養殖した殻高2.5～2.6cmの貝の水中重量の平均増加量0.178g⁽⁴⁾よりも良好であり、1964年5月28日から6月30日までの1か月間、精白米を餌料として水槽中で飼育した殻高2.9～3.6cmの貝の平均増重量0.241g⁽⁵⁾とほぼ等しい値を示した**。

各群の1個当り1日平均増重量の変化を Fig. 11 に示す。まず、無投餌群についてその変化をみると、4日目まではほとんど成長しないが4～7日の間に peak を形成し、それ以後次第に衰えて25～32日の間に減量が始まっている。つぎに、各投餌群の成長量の変化をみると、それらはいずれも前期と後期の2期に区分される。2個群では明らかに実験開始後12～16日目と42～56日目の2回に成長の peak がみられ、そして25～32日目に成長休止

* 2個群の平均1個当り1か月間における水中重量の増加量は0.236gと計算される。

** 1963年5月13日～6月13日における多徳島養殖場2m層水温は18～20°Cであり、1964年5月8日～6月30日の水槽飼育実験における水温は20～24.5°Cであった。

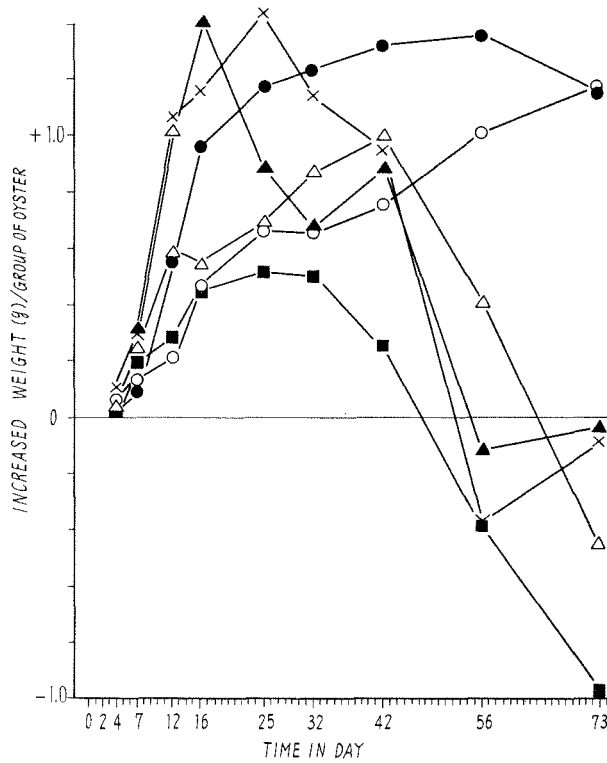


Fig. 9 Cumulative increased weight per oyster group during the test period, which weight is weighed in the sea water (the same also Figs. 10 and 11).

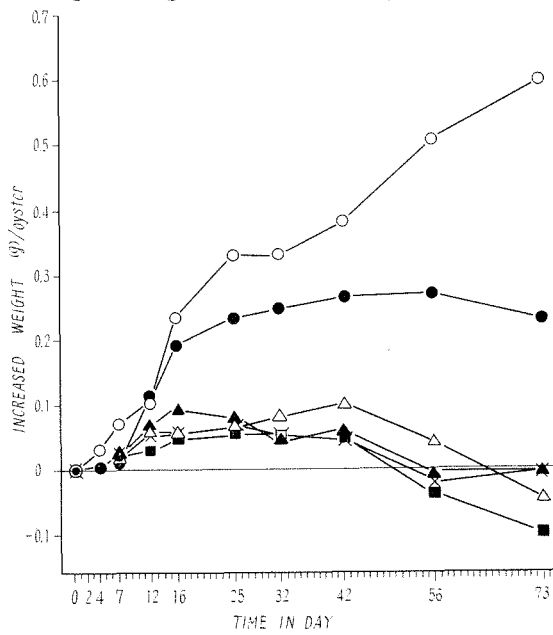


Fig.10 Cumulative increased weight per oyster.

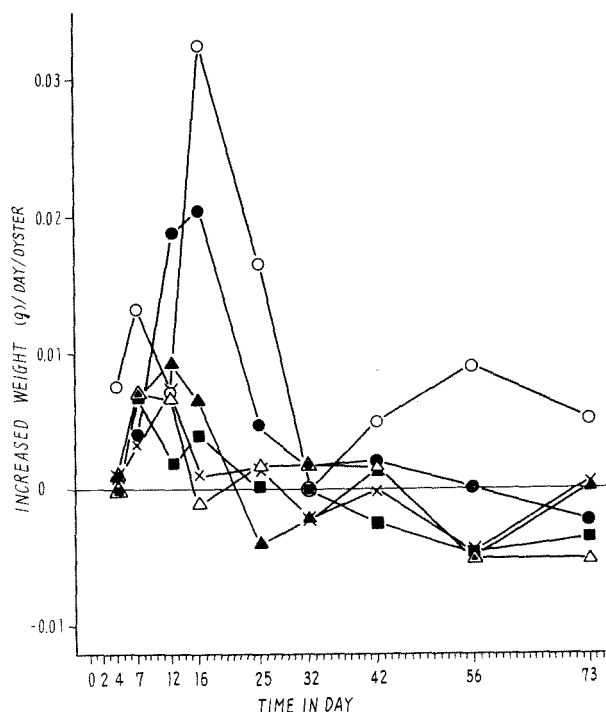


Fig. 11 Change in the increased weight per oyster per day by oyster groups during the test period.

期がみられる。5個群では12～16日目に peak がみられるが、32日目以降の後期の成長はほとんど横這いであり、56～73日目に減量が認められる。10個群は4～12日と32～42日目、15個群は7～12日と32～42日目、21個群は7～12日と32～42日目とにそれぞれ2回の peak がみられる。そしていずれも前期が後期にくらべて著しく成長がよい。

各貝群の実験終了時における諸測定値

実験終了時における各貝群の1個当り全湿重量、貝殻湿重量、計算肉質重量（全湿重量－貝殻湿重量）、肉質湿重量、貝殻乾燥重量および肉質乾燥重量を Appendix Table II, Fig. 12 に示す。

図にみるように、2個群がいずれの測定項目においても群を抜いて成長がよいことを示しているが、その他の各群相互間における差は検定の結果いずれも有意（5%以下）ではない。

貝殻について、2個群のものは貝殻縁辺部に発達した鱗片状突起を形成し、良好な成長を示しているが、その他の群のものには全くみられない。とくに5個群を除く他の4群のものは貝殻縁辺稜柱層部がもろくなり、単に開口器で殻を開くだけで容易に破損離脱し、また貝殻の外表面が著しく褪色しているのが観察された。（Appendix Fig. I）。

なお、水中重量の減量が単に肉質部重量の減少のみでなく、貝殻の腐蝕溶解による減量を加えられているものと考え、実験終了後肉質部をとり除き洗滌乾燥した貝殻について、その真珠層域表面の腐蝕溶解像¹²⁾の出現率を調査した。方法としては Fig. 13 に示すよう

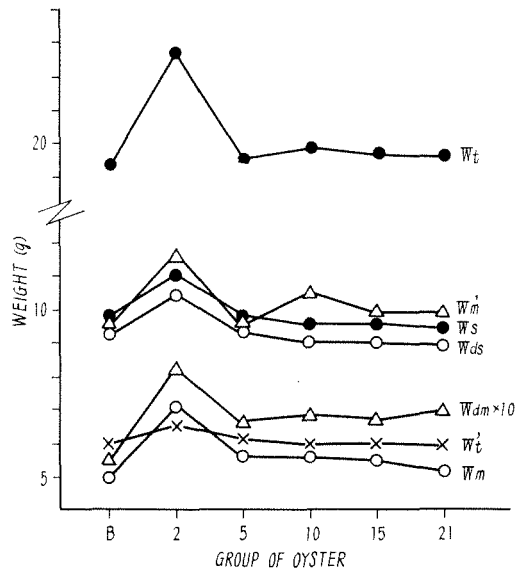


Fig.12 Weight of the parts of test animals immediately after the breeding experiment's end. Wt, Ws and W'm: Wet whole weight, wet shell weight and wet meat weight respectively. Wm: Meat weight calculated by (whole weight-shell weight), Wds and Wdm: Dry shell and meat weight. W't: Whole weight weighed in the sea water.

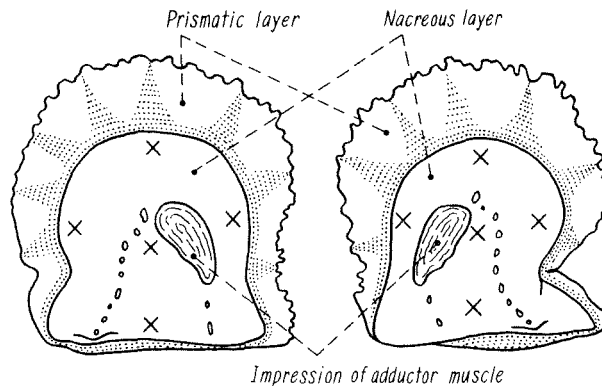


Fig.13 5 fixed points on each valve for observation and computation on the pictures of growing and etching or dissolving processes on the nacreous surface of shell.

に左右両殻に真珠層域全体を代表するようにそれぞれ5点を定め、それらの点を Leitz 製 Panphot 顕微鏡の垂直投光管を使用して直接観察し、その表面構造からみて、(1)結晶成長が継続されているものおよび明らかな溶解像のみられないものと、(2)溶解が行なわれているものおよびその時点においては再結晶が行なわれているがそれまでに著しい溶解が行なわれたと認められるもの、との2つに区分し、それぞれ貝群別に集計した。結果は Table 2 に示すとおり、腐蝕溶解像の出現率は2個群では全くなく、5個群では40%、10個・15

Table 2. Appearance rate between the microscopic pictures of growing and etching or dissolving processes detected on the surface of nacreous layer of the shell (see Fig. 13).

Content in an aquarium*	Percentage	
	Picture of growing process	Picture of etching or dissolving process
B	39	61
2	100	0
5	60	40
10	33	67
15	35	65
21	30	70

* The same as Table 1.

個・21個群では大差なく65～70%，無投餌群では61%となっている。無投餌群が10個・15個・21個の3群より若干よい結果を示しているが、投餌群については腐蝕溶解像の出現率と前述の各群1個当たり累積増重量 (Fig. 9) との間には明らかな相関性が認められる。

考 察

水質の悪化について

各投餌群には2個群と同様に1日1貝当たり20mgの餌料(精白米)が投与しており、2個群の成長がこれまでの実験と比較してかなり良好な結果を示していることからみても、2個群を除く他の投餌群の減量が、餌料の質的あるいは量的不足によるものではなく、水質的な障害に起因することは明らかである。ただし、水質的な障害にも通念的な水質の悪化によるものと、何らかの必要成分の欠乏によるものとの2つの原因があると考えられる。例えば、飼育水中の溶存カルシウムが欠乏した場合には、おそらくそれは貝体内の生理的な balance を崩し、代謝活動を低下させることが考えられる。この点については今後改めて実験を行なう予定である。今回は投餌各群の減量が餌料残滓および貝の代謝生産物にもとづくところの通念的な水質の悪化により生じたものとして検討を進める。

対照群の水質と成長について

Fig. 11 に示したように無投餌群の1日当たり平均増重量は4～7日目の間に peak を形成し、それ以後次第に衰えて25～32日目の間に減量が始まっている。無投餌群のこのような成長は供試貝が海中で養殖されていたときに蓄積された栄養あるいは生理的 activity が水槽飼育当初において貝の成長をもたらしたのと考えられ、これを“残留効果”と呼称する。各群は前期と後期の2回、成長の peak を形成しており、前期の peak は前述の残留効果と飼育開始当初における水質の好条件が重なって形成されたものと考えられる。

なお水質について、“餌料のみ”の水槽水の pH 値、アルカリ度は実験終了時まで開始時と同様な値を示しており、アンモニア-N、亜硝酸-N、硝酸-N の値はいずれも最も低い。一方、無投餌群の飼育水の pH 値、アルカリ度は10個・15個・21個群と同様に低く、アンモニア-N の値はこれら3群について高く、亜硝酸-N の値は21個群について高く、

とくに硝酸-N は21個群について早期に増加し、その peak はいずれの群よりも高くなっている。両者のこのような差異は、餌料としての精白米の投与による水質の悪化が極めてわずかであり、その大部分が貝の代謝生産物にもとづくものであることを示している。とくに無投餌群飼育水のNの値が大きいのは、無投餌条件下においても貝の代謝活動が長期間活発であり、また無投餌のために体蛋白質の分解が他の群より著しく多かったものと推察される。

実験群の水質と成長について

平山(1966)²⁾ はマダコの飼育について、硝酸塩が害作用を有し、とくに pH およびアルカリ度の低下した海水中では呼吸に影響を与え、溶存酸素の少ない場合にはその影響が著しいと述べている。おそらくこのように pH 値、アルカリ度の低下、COD、アンモニア-N、亜硝酸-N、硝酸-N の増加は、それぞれ単要因であっても害作用をもつであろうが、それらが複合して作用するときにはより大きな障害を対象動物に与えるものと考えられる。また、実際の飼育の場合には微生物学的にまた化学的に各要因が相互に関連し合ってそこにそれぞれの値が生れるのであって、ある単要因のみが独立して増減することは考えられない。そこで今回はすべての要因について総合的な検討を試みた。

まず、飼育水の水質的基準を設定するために、実験期間中、良好な成長を示した2個群および、当初は2個群と同様にかなりの成長を示したが、その後次第に衰えて貝体を維持するに過ぎなかったと考えられる5個群との成長と水質とについて比較検討した。Fig. 11によれば2個群の1日平均増重量は12~16日目と42~56日目の2回の peak を形成しており、25~32日目に成長休止期、56~73日目に成長の減衰期がみられる。25~32日目の成長休止の原因は残留効果の減退と浜過槽の未熟成によるものと考えられた。この時期の水質は pH 値が一時的にかなり下降し、COD の値も期間中最高を示したが、その他の要因はむしろ後期の方が悪化している。56~73日目の成長減衰期における水質は、とくに pH 値の下降、アンモニア-N および硝酸-N の増加があつて、73日目におけるそれらの値は期間中最悪の値を示している。これらのことから、おそらく、2個群飼育水における56日目までの諸要因の最悪の値が貝体に正常な成長をもたらすところの水質的限界であると考えられる。5個群の1日平均増重量は12~16日目に peak を形成し、その後若干の増減はあるが次第に成長は衰え、56~73日目には減量を示している。水質的には peak 前後に pH 値およびアルカリ度の下降、アンモニア-N の増加がみられるが、いずれも期間内最悪の値ではない。56日目から73日目にかけてさらに pH 値の下降、アンモニア-N および硝酸-N

Table 3. Critical qualities of the breeding water which brought oysters increase, maintenance, and decrease in weight.

Factor	Lowest limit of factor's value	
	for growth	for maintenance
pH value	≥ 7.95	≥ 7.75
Alkalinity mN	≥ 1.45	≥ 1.13
COD O ₂ mg/L	$2.04 \geq$	$3.10 \geq$
NH ₃ -N μ g-atoms/L	$5.60 \geq$	$7.30 \geq$
NO ₂ -N μ g-atoms/L	$1.27 \geq$	$1.27 \geq$
NO ₃ -N μ g-atoms/L	$3610 \geq$	$4520 \geq$

Table 4. Diagnosis table on the basis of the water quality criteria in Table 3 to the qualities of breeding water in every work days and oyster groups. Double circle, cleircle and crosses mark show the range affiliated by the factor's value each breeding water, in which range the oyster might continues its growth, maintains its body weight and reduces its body weight, respectively.

Time in day	Number of oyster	pH	Alkalinity	COD	Ammonia -N	Nitrite-N	Nitrate-N	Total ◎= 2 ○= 1 ×= 0
2	2	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	5	◎	◎	○	◎	◎	◎	11
	10	◎	◎	◎	×	◎	◎	10
	15	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	21	◎	◎	○	×	×	◎	7
4	2	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	5	◎	◎	○	◎	◎	◎	11
	10	◎	◎	○	◎	◎	◎	11
	15	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	21	◎	◎	○	×	×	◎	7
7	2	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	5	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	10	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	15	◎	◎	◎	◎	×	◎	10
	21	◎	◎	×	×	×	○	5
12	2	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	5	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	10	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	15	○	◎	◎	◎	◎	◎	11
	21	○	◎	○	×	×	×	4
16	2	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	5	○	◎	◎	○	◎	◎	10
	10	○	◎	○	×	◎	◎	8
	15	×	◎	×	×	×	◎	4
	21	×	○	○	×	×	×	2
25	2	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	5	◎	○	◎	○	◎	◎	10
	10	◎	○	○	×	×	○	5
	15	○	◎	○	×	×	×	4
	21	○	○	○	×	×	×	3
32	2	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	5	○	○	◎	○	◎	◎	9
	10	×	○	○	×	×	○	3
	15	○	◎	○	×	×	○	5
	21	○	○	○	×	×	×	3

Time in day	Number of oyster	pH	Alkalinity	COD	Ammonia -N	Nitrite-N	Nitrate-N	Total ◎= 2 ○= 1 ×= 0
42	2	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	5	○	○	○	◎	◎	○	8
	10	×	○	×	×	×	×	1
	15	×	○	×	×	×	×	1
	21	○	○	×	×	×	×	2
56	2	◎	◎	◎	◎	◎	◎	12
	5	○	○	○	◎	◎	○	8
	10	×	○	×	×	◎	×	3
	15	×	○	×	×	×	×	1
	21	×	○	×	×	×	×	1
73	2	○	○	◎	×	◎	×	6
	5	×	○	◎	×	◎	×	5
	10	×	○	◎	×	◎	×	5
	15	×	○	◎	×	×	×	3
	21	×	○	◎	×	×	×	3

の急増があり、73日目にはそれぞれ期間内で最悪の値を示している。つまり、5個群の56日目までの諸要因の最悪の値が貝体の現状を維持するための最低条件であると考えられる。

以上の考えに基づき、上記両群のそれぞれの値を Table 3 に示した。これらの値は、アコヤガイの水槽飼育における成長と体維持に対する水質的基準を示すものと考えられる。

つぎに、これらの値を基準として、Appendix Table I に示した各水質要因の値について、貝が成長できる範囲にあるものを◎、体を維持することのできる範囲にあるものを○、貝に著しい害を及ぼす範囲にあるものを×とし、さらにそれらを数値的にとり扱うために◎を2、○を1、×を0として、測定日別・貝群別に単純合計するとその結果は Table 4, Fig. 14 に示すようになる。各要因のそれぞれの範囲が貝におよぼす影響を単純に2, 1, 0で示すことには問題があるが、Fig. 14 に示した水質条件の変動傾向と貝の1個当り累積増重量 (Fig. 10) あるいは平均日間成長量 (Fig. 11) との間にはかなりの相関性がみいだされる。まず全体としては Fig. 10 と同様に、2個群の飼育水が他を引き離して良好であり、5個群が中間的な位置を占め、その他の3群はいずれも著しく悪条件にあることを示している。また Fig. 11 の日間成長量と対比すると、2個群は56日目から73日目にかけて成長および水質ともに急激に悪化し、5個群は成長および水質ともに16日目から次第に悪化し、56日目から73日目にかけて急激に悪化している。他の3群はいずれも12日目から16日目かけて成長の減衰がみとめられ、水質的にも同期に急激な悪化がみられる。またその後、10個群では42日目以降に減量がみられるのに対して水質は42日目に最悪となっており、15個および21個群では42～56日目の間に最も著しい減量がみられるが、水質的にも

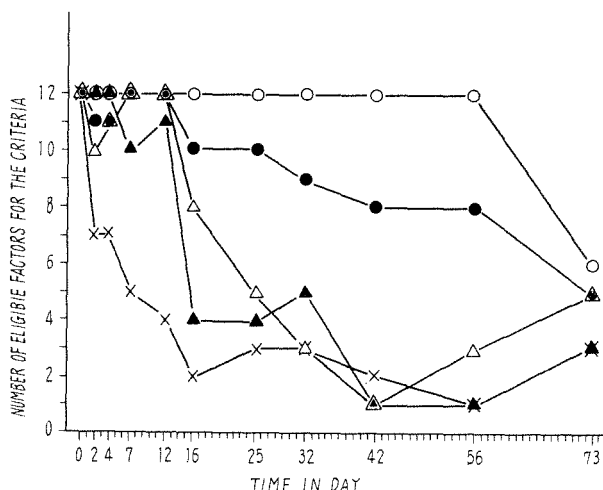


Fig.14 Graphic presentation of the diagnostic results to the qualities of breeding water in the respective work days and oyster groups on the basis of the criteria shown in Table 3.

同期が最悪の条件を示している。このような相関性は、上記の水質基準とこの方式による水質の総合的診断がかなりの信頼性をもつものであることを示している。ただし、各単要因が貝に与える影響は必ずしも均一でなく、またそれぞれ同じ数値（◎＝2，○＝1，×＝0）としてとり扱った範囲内のもでもそれらの値には著しい差異があり、さらにまた、ある時点における貝の成長あるいは衰弱には、それまでの水質条件が貝に与えた影響が何らかの形で加味されるものと考えられ、これらの点については今後さらに検討が必要と思われる。

汙過砂の熟成期間について

河合ら(1964)³⁾は、飼育動物の排泄物や餌料の分解によって水中に遊離されたアンモニウム塩が亜硝酸を経て硝酸塩に酸化されるところの硝酸化成作用が十分な能力をもつようになった状態を熟成(ripened)といい、また新しい砂を用いて飼育を始めた場合の汙過砂の熟成期間は約2か月近くを要する、と述べている。

本実験における各群飼育水のアンモニア-Nおよび亜硝酸-Nの変動(Figs. 6・7)からそれぞれの汙過砂の熟成期間を求めると、5個群のみが例外(42日目)となるが他はいずれも飼育開始後56日目で熟成の状態に達したと認めることができる。しかしながら、概念的に汙過砂の熟成といってもその過程には各種の型および段階が含まれている。貝数および投餌量の少ない飼育水(2個・5個群)では、アンモニア-N、亜硝酸-Nは若干の増減をともないながら漸増する傾向を示している。このような傾向は硝酸化成細菌が貝の排泄物および餌料残滓の分解にともなって漸増的に繁殖していることを示すと同時に、それらの能力を著しく越えた餌料の投入・貝の排泄がなされていないことを物語っている。一方、貝数および投餌量の多い飼育水(10個以上の各群)では、当初アンモニア-N、亜硝酸-Nが著しく増加するが、その後数回の増減をくりかえしながら次第に減少し、遂には constant となる傾向がみられる。このような増減はおそらく水質の変化にともなう貝の代謝生産物の量的な変動によるものではなく、汙過砂および水中に分布する細菌の種相互間の

数的なあるいは能力的な **balance** の不安定に起因するものと思われる。とくにこれらの初期における著しい増加は細菌による硝酸化成能に対して貝数および投与餌料量が過大であることを物語っている。熟成にいたる上記両者の過程をアンモニア-N を例として模式化すると Fig. 15 に示すとおりとなる。

以上のことから、汙過砂における微生物の繁殖速度またはそれによる有機物分解能および硝酸化成能の発達速度に対応する程度の代謝生産物を排泄するところの貝数を飼育（餌料の投与を含む）する場合には必ずしもある熟成期間を必要としないが、それ以上の貝数を飼育する場合には2か月近く（56日前後）の熟成期間を必要とすると考えられる。また、熟成促進のために当初に過剰な有機物を投入し一応の熟成（例えば21個群の第1回のアンモニア-N、亜硝酸-Nの減量期）をみた後、適当数の貝を飼育する場合にはその熟成期間

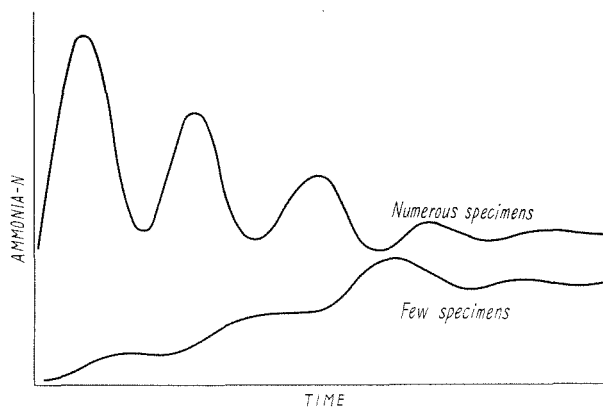


Fig. 15 Diagrammatic representation of the ripening process of filter sand using the fluctuation in quantity of Ammonia-N in breeding water as an example.

Table 5. Comparison between the present plan and Saeki's standard plan (1958) of the aquarium with closed-circulating system.

	Weight		
	Present plan		Saeki's plan
Culturing oyster (21 oysters)	420 g	a	a
Culture water			
Culture vessel	15 ℓ	36 a	1-10 a
Food-supplying vessel	15 ℓ	36 a	
Filter vessel	9 ℓ	21 a	
Filter sand			
Volume	10600 cm ³		
Weight	14.5 kg	35 a	30 a
Displacement	6 ℓ		
Total		129 a	32~41 a
Rate of circulation	Once per 78 minutes		30-120 minutes
Rate of aeration	2~3 times in volume of circulating water		

は約半月（16日前後）で充分である、と考えられる。

なお、本実験に用いた飼育装置を佐伯（1958）¹⁰⁾ による飼育装置設計の基準と比較すると、Table 5 に示すとおりいずれの条件もその基準に適合している。それにもかかわらず当初において著しい減量がみられたのは汙過砂の未熟成のための水質の悪化（pH 値およびアルカリ度の低下とアンモニア-N の増加）に起因するもので、汙過砂熟成後における減量は、それ以前の衰弱に加え、より以上の pH 値・アルカリ度の低下と硝酸-N の蓄積とに起因するものと考えられる。closed-circulating system においては pH 値およびアルカリ度の低下は石灰あるいは重炭酸ソーダの適量投入により調整することができるが¹⁾、硝酸-N の蓄積については植物水槽の併設などの工夫が必要である。

貝の水中重量の減少について

すでに述べたように 2 個群を除く各群はいずれも実験期間内において水中重量の減少をきたしている。水質の悪化が貝の生理に影響をおよぼし、さらに水中重量の減少をもたらすところの経過についての生理学的な解析は現段階では不明の点が少なくない。実験終了時における各群の諸測定値について、これら各群の全重量に対する貝殻・肉質および計算肉質重量の比をみると（Table 6）、2 個群と 10、15、21 個群との貝殻および計算肉質重量の比は極めて近似しているが、無投餌および 5 個群では貝殻の比が大きく、計算肉質のそ

Table 6. The ratio between shell and meat weight in each group of the pearl oyster cultured in aquarium.

Number of Oyster	per cent on weight in the air					
	B*	2 (x)	5 (y)	10	15	21 (z)
Total weight	100	100	100	100	100	100
Shell weight	50.5	48.6	50.3	48.2	48.9	48.7
Meat weight	25.5	31.2	28.4	28.3	27.9	26.4
Calculated meat weight*	49.5	51.4	49.7	51.8	51.1	51.3

	Comparison between groups							
	Weight in the air				Weight in the sea water***			
	(x) — (y)		(x) — (z)		(x) — (y)		(x) — (z)	
	g.	%	g.	%	g.	%	g.	%
Total weight	3.292	100	3.232	100	0.837	100	0.946	100
Shell weight	1.265	38.4	1.555	48.1	0.624	74.6	0.767	81.1
Meat weight	1.561	47.4	1.937	59.9				
Calculated meat weight	2.027	61.6	1.677	51.9	0.213	25.4	0.179	18.9

* 10 oysters starved.

** Total weight-Shell weight=Calculated meat weight.

*** Exchange rate of weight in the sea water to weight in the air was calculated from the same in culture farm, 12 Jul. 1966: Shell weight, $\times 0.493$; Calculated meat weight, $\times 0.105$.

れは小さい。無投餌群を除き、成長が極めて良好であった2個群と著しい減量を示した他の3群との重量比が全く近似していることおよびそれらの中間的存在であった5個群が貝殻に比して計算肉質重量の減が著しいことから、おそらく、水質悪化にもとづく貝の衰弱時には、まず肉質の減量が先行し、ついで貝殻の減量がこれにしたがい、最終的には低位におけるもとの重量比に到達するものと想定される。

また、計算肉質重量の比が比較的安定しているのに対して肉質重量（実測）の比が収容個数の増加に従って小さくなるのは、収容個数の多い群ほど剥身時における脱水現象が著しいことを意味し、貝体の衰弱とこのような脱水現象はある関連をもつものと考えられる。なお各群の重量差を水中重量に換算すると、その差の約75～81%を貝殻が占めており、水中重量の減少は主として貝殻の減量に左右されるものであることが理解される。

貝殻の減量については、すでにTable 2で示したように水中重量の減少の著しかった群ほど貝殻真珠層の腐蝕溶解像の出現率も高く、おそらく主として貝殻石灰質の溶解によりこのような減量をもたらされたものと判断される。

要 約

汙過循環式飼育水槽を用い、アコヤガイを75日間飼育して、その間の水質の変化および貝の成長量の変化を調査した。調査結果からつぎのことが考察される。

(1) 2個群の成長量がこれまでの実験結果と比較してかなり良好であることから、2個群を除く各投餌群の成長休止あるいは減量は水質の悪化に起因するものと判断される。

(2) 飼育開始直後の1日当り平均成長量の peak は供試貝が海中で養殖されていたときに蓄積された栄養あるいは生理的 activity による残留効果によるものであり、peak 後の成長の減衰は残留効果の減退と汙過砂の未熟成による水質の悪化に起因するものと考えられる。

(3) 餌料のみを投入した水槽水と無投餌群（貝10個）飼育水との水質の比較により、精白米を餌料として投与した場合における水質悪化の原因は主として貝の代謝生産物に起因すると考えられる。

(4) 2個群飼育水の56日目までの水質各要因の値を貝の成長をもたらすための最低条件とし、また5個群飼育水の56日目までの水質要因の値を貝体を維持し得る最低条件（水質基準）として、各群飼育水の水質の総合的診断を試みた。結果として、この水質の診断値と貝の成長量とはかなりの相関性が認められ、上記の水質基準とこの方式による診断とがある程度の信頼性をもつことが明らかになった。

(5) 汙過砂の熟成期間について、汙過砂の有機物分解能および硝酸化成能の発達速度に対応するところの代謝生産物を排泄する貝数を飼育する場合には必ずしもある熟成期間を必要としないが、それ以上の貝を飼育する場合には約2か月を必要とし、また、当初に過多な有機物の投入により熟成を促進させた後に適当数の貝を飼育する場合にはその熟成期間は約半月で充分であると考えられる。

(6) 貝の水中重量の減少は主として貝殻の減量によるものであり、貝の衰弱の場合、まず肉質の減量が先行し、ついで貝殻の溶解が起り、最終的には低位における当初の重量比に復するものと思われる。また、貝殻の減量は真珠層の腐蝕溶解像の各群出現頻度からみ

て、貝殻石灰質の溶出によるものと判断される。

Summary

In order to make clear a relation between the property of breeding water and the growth of the pearl oyster, *Pinctada martensii*, some groups varying in number of oysters were cultured (Table 1) using aquaria with a closed circulating system (Fig. 1) during a period of 75 days. The results which were obtained are shown Appendix Tables I, II, Appendix Fig. I, Table 2 and Figs. 2-12.

From the results obtained the following conclusions are drawn:

(1) Since a group of 2 oysters on diet of the pulverized rice grew with satisfactory progress in comparison with those of the previous experiments (Y. Kuwatani, 1964 a and b), the losses in weight of the other groups on diet of the same quality and volume must be caused by deterioration in the quality of breeding water (Figs. 9, 10 and 11).

(2) The peaks of average daily growth in the earlier term of the period of the present experiment may occur owing to both the potential growth originated in the nutritive substances or the physiological activity stocked when they were being cultured in the farm and the superior quality of water in the earlier term. The peaks in the later term may be attributed to the purification of breeding water caused by the treatment of filter sand, and after that the diminution of growth to the deterioration by accumulation of some substance which are not removed by the filter sand (Fig. 9, 10 and 11).

(3) The synthetic diagnosis of the qualities of breeding water in the respective work days and oyster groups were tried on the basis of the criteria of Table 3 (Table 4 and Fig. 14). From the result these criteria and diagnostic form seem to be available for determination of the qualities of breeding water, because a mutual relationship between the diagnostic results (Fig. 14) and the changes of growth of the oyster (Fig. 9, 10 and 11) was recognized fairly well.

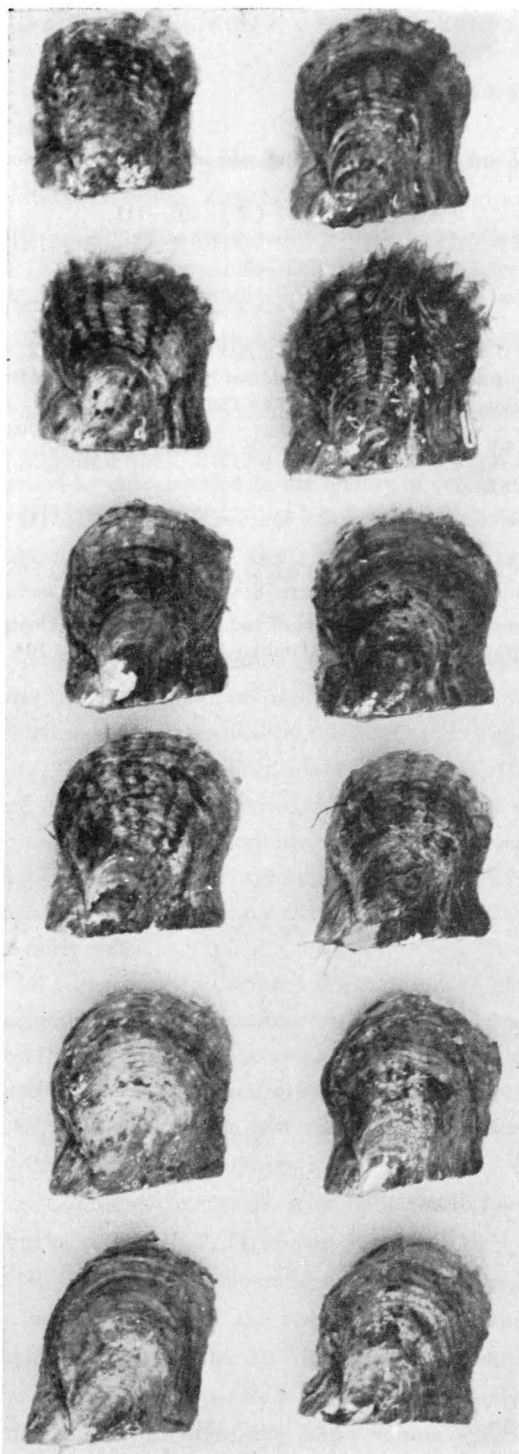
(4) In the case in which a limited number of the oysters are bred, the volume and its accumulation of their excrements corresponding to the hydrolysing and nitrifying activities and the velocity of the development in the filter sand, a ripening period does not appear necessary for success in breeding. In case however more oysters than above number are bred, it is necessary to take about 2 months for ripening of filter sand. However if an optimum number of oysters are cultured after promoting the ripening by supplying the excess of organic materials, it is sufficient to take about a half month for the ripened of filter sand (Figs. 6, 7, 14, 15 and Table 4).

(5) The losses in the under-water weight, weighed in the sea water, of the oysters may be mainly caused by the reduction of their shell weight, that is by the dissolution of shell (Fig. 13 and Table 2). In a process by which the oyster grows weak, it seems that the reduction is preceded by the meat weight followed by the shell weight and the ratio of the former to the latter ultimately returns to the initial one (Fig. 12 and

Table 6).

文 献

- 1) Breder, C.M. et al. 1932. On the use of sodium bicarbonate and calcium in the restification of seawater. J.M.B.A. 18: 199.
- 2) 平山和次 1966. 海水中の硝酸塩のマダコに与える影響。日水誌32(2): 105—111.
- 3) 河合章・吉田陽一・木俣正夫 1964. 循環濾過式飼育水槽の微生物化学的研究—I. 魚の飼育に伴う水質ならびに微生物相の変化について。日水誌30(1): 55—62.
- 4) 桑谷幸正 1964 a. *Skeletonema costatum* を餌料とするアコヤガイの飼育について。日水誌30(2): 104—113.
- 5) ——— 1964 b. 人工餌料によるアコヤガイの飼育について。国立真珠研報9: 1135—1142.
- 6) Kuwatani, Y. 1965a. On the anatomy and function of stomach of Japanese pearl oyster, *Pinctada martensii* (Dunker). Jap. Soc. Sci. Fish. 31(3): 174—186.
- 7) 桑谷幸正 1965 b. 炭素粒子投与によるアコヤガイの摂餌機構の解明。日水誌31(10): 789—798.
- 8) ———・西飯保 1966. アコヤガイの成長測定法。各種測定法の検討および水中重量の測定法とその応用について。全真連技術会報54: 52—69.
- 9) 西飯保 1965. アコヤガイを測定するために用いた水中重量についての検討。国立真珠研報10: 1264—1282.
- 10) 佐伯有常 1958. 魚介類の循環濾過式飼育法の研究。基礎理論と装置設計基準。日水誌23(11): 684—695.
- 11) Sacki, A. 1963. The composition and some chemical control of the sea water of the closed circulating aquarium. Bull. Mar. Biol. St., Asamushi Tohoku Univ. 11(3): 99—104.



Appendix Fig. I Two samples from each group of pearl oyster.

10 pearl oysters starved.

2 pearl oysters on a diet of pulverized rice. The shells have scale-like processes at their marginal part, which processes show that the oysters are growing fairly well.

5 pearl oysters on the same quantity of diet per oyster as that of a group of 2 oysters.

10 pearl oysters on the same quantity of diet as above. The shells have no-process.

15 pearl oysters on the same quantity of diet as above. Outer side of the shells are grown dull in colour especially.

21 pearl oysters on the same quantity of diet as above. The colour of the shells are same state as above.

Appendix Table I Data on quality of breeding water and growth of the pearl oyster in the present experiment.

* A: Non-animal but supplied the same quantity of diet as that for 10 pearl oysters, B: 10 pearl oysters but non-diet, 2~21: number of pearl oyster contained.

** Whole weight weighted in the sea water (the underwater weight).

Date Elapsed day WT °C	Content in an aquari- um*	pH	Alkali- nity mN	COD O ₂ mg/L	Ammono- nia-N μg-atoms/L	Nitrite -N μg-atoms/L	Nitrate -N μg-atoms/L	Increase of the oyster weight**	
								Total g	per Oyster g
13 Apr. 2 days 20.0 - 20.15	A	8.13	1.96	1.03	0.0	0.05	5	—	—
	B	8.10	1.94	1.03	9.8	0.78	148	—	—
	2	8.15	1.79	1.21	0.7	0.10	56	—	—
	5	8.13	1.77	2.93	4.2	0.14	14	—	—
	10	8.06	1.96	1.72	8.6	0.39	15	—	—
	15	8.09	2.04	1.21	5.3	0.55	71	—	—
	21	8.07	2.09	2.93	18.1	2.71	1060	—	—
15 Apr. 4 days 19.2 - 19.8	A	8.10	2.07	1.72	1.6	0.10	9	—	—
	B	8.01	2.15	1.72	12.7	2.90	495	0.00	0.000
	2	8.07	1.92	1.21	1.4	0.00	74	+0.06	+0.030
	5	8.07	2.06	3.10	1.1	0.14	66	+0.02	+0.004
	10	8.00	1.95	2.24	2.7	0.44	64	+0.04	+0.004
	15	7.95	1.80	1.38	3.2	0.68	92	0.00	0.000
	21	8.00	2.04	2.07	60.2	12.75	3200	+0.11	+0.005
18 Apr. 7 days 19.9 - 20.6	A	8.11	1.88	1.03	0.0	0.00	54	—	—
	B	7.95	1.79	1.55	13.6	10.50	800	+0.20	+0.020
	2	8.13	1.94	1.21	0.0	0.00	90	+0.14	+0.070
	5	8.10	1.82	1.21	0.0	0.29	259	+0.08	+0.016
	10	8.00	1.82	1.03	2.7	0.72	189	+0.25	+0.025
	15	7.99	1.66	1.38	4.5	1.60	480	+0.32	+0.021
	21	7.97	1.73	3.79	22.7	47.99	4396	+0.31	+0.015
23 Apr. 12 days 20.6 - 20.8	A	8.07	1.97	0.94	5.0	0.00	60	—	—
	B	7.94	1.80	1.28	8.5	17.00	3880	+0.29	+0.029
	2	8.14	1.99	0.94	1.4	0.00	220	+0.21	+0.105
	5	8.09	1.93	0.77	1.1	0.12	390	+0.55	+0.110
	10	8.03	1.76	1.28	5.6	0.62	200	+0.59	+0.059
	15	7.93	1.68	1.97	5.3	0.41	700	+1.02	+0.068
	21	7.88	1.60	2.14	14.5	24.58	7018	+1.07	+0.051
27 Apr. 16 days 22.0 - 22.7	A	8.04	2.08	2.48	4.8	0.09	74	—	—
	B	7.87	1.36	1.62	10.3	1.80	3820	+0.45	+0.045
	2	8.00	1.87	1.62	0.7	0.00	250	+0.47	+0.235
	5	7.89	1.57	1.45	7.3	0.26	550	+0.96	+0.192
	10	7.85	1.55	2.48	40.9	0.59	1640	+0.55	+0.055
	15	7.72	1.49	3.50	14.8	10.10	900	+1.41	+0.094
	21	7.70	1.32	2.65	21.4	4.80	5660	+1.16	+0.055

Date Elapsed day WT °C	Content in an aquari- um*	pH	Alkali- nity mN	COD O ₂ mg/L	Ammono- nia-N μg- atoms/L	Nitrite -N μg- atoms/L	Nitrate -N μg- atoms/L	Increase of the oyster weight**	
								Total g.	per Oyster g
6 May	A	7.98	1.95	1.40	2.8	0.00	130	—	—
25 days	B	7.83	1.15	1.63	8.7	1.20	6320	+0.52	+0.052
21.4 - 21.6	2	8.05	1.66	1.40	3.9	0.21	340	+0.66	+0.330
	5	8.00	1.42	0.70	6.9	0.57	1200	+1.17	+0.234
	10	7.95	1.32	2.33	18.7	2.10	4370	+0.70	+0.070
	15	7.90	1.56	3.02	28.4	6.50	5000	+0.89	+0.059
	21	7.78	1.31	2.79	12.8	3.90	8670	+1.43	+0.068
13 May	A	8.02	1.94	1.43	0.8	0.00	270	—	—
32 days	B	7.70	1.07	1.67	5.2	1.10	7850	+0.50	+0.050
22.8 - 23.4	2	7.95	1.53	2.04	3.7	1.05	402	+0.66	+0.330
	5	7.83	1.40	1.22	7.2	0.65	1570	+1.23	+0.246
	10	7.65	1.26	2.24	11.1	1.98	3670	+0.88	+0.082
	15	7.79	1.50	2.45	30.7	3.28	3850	+0.68	+0.045
	21	7.77	1.40	2.65	29.3	6.00	7580	+1.14	+0.054
23 May	A	8.05	1.89	1.28	2.9	0.00	515	—	—
42 days	B	7.73	0.99	1.54	7.9	1.86	10320	+0.25	+0.025
21.5 - 21.7	2	8.00	1.48	1.54	5.6	1.27	3406	+0.76	+0.380
	5	7.80	1.13	2.05	4.2	0.65	4160	+1.32	+0.264
	10	7.60	1.15	3.21	12.0	3.06	7640	+1.00	+0.100
	15	7.70	1.18	3.97	14.0	2.83	6320	+0.89	+0.059
	21	7.80	1.31	3.59	19.7	3.87	5280	+0.95	+0.045
6 Jun.	A	8.03	1.99	2.30	7.7	0.00	500	—	—
56 days	B	7.70	0.99	2.30	4.9	1.56	11350	-0.39	-0.039
22.3 - 22.6	2	8.00	1.45	1.95	4.0	0.38	3610	+1.01	+0.505
	5	7.75	1.14	2.07	4.7	0.70	4520	+1.35	+0.270
	10	7.65	1.34	3.22	7.7	1.15	5830	+0.41	+0.041
	15	7.60	1.28	3.22	10.7	1.92	7550	-0.11	-0.007
	21	7.68	1.37	3.68	11.2	2.56	6350	-0.37	-0.018
23 Jun.	A	8.02	2.07	1.30	5.1	0.00	540	—	—
73 days	B	7.72	1.03	1.38	5.1	1.85	8580	-0.98	-0.098
23.7	2	7.92	1.44	1.45	7.9	0.50	5000	+1.18	+0.590
	5	7.72	1.19	1.73	10.7	0.93	7500	+1.15	+0.230
	10	7.65	1.39	2.39	11.5	0.27	6240	-0.45	-0.045
	15	7.70	1.32	2.88	11.4	3.60	11700	-0.03	-0.002
	21	7.70	1.46	2.72	11.7	2.00	9300	-0.09	-0.004

Appendix Table II Whole, shell and meat weights of test animals immediately after the present breeding experiment's end.

group of Oyster	Wet Whole weight g.	Wet Shell weight g.	Calculated Meat weight g.	Wet Meat weight g.	Dry Shell weight g.	Dry Meat weight g.
10 oysters non - food	19.368 ±2.180	9.785 ±0.798	9.583 ±1.501	4.946 ±1.267	9.286 ±0.840	0.547 ±0.169
2 oysters	22.710 ±1.683	11.035 ±0.148	11.650 ±1.876	7.085 ±0.898	10.490 ±0.126	0.825 ±0.106
5 oysters	19.418 ±1.128	9.770 ±0.536	9.648 ±0.690	5.524 ±0.557	9.322 ±0.536	0.600 ±0.062
10 oysters	19.781 ±1.758	9.531 ±0.549	10.250 ±1.362	5.602 ±0.777	9.039 ±0.500	0.686 ±0.175
15 oysters	19.571 ±1.609	9.574 ±0.517	9.996 ±1.222	5.469 ±0.680	8.996 ±0.459	0.676 ±0.158
21 oysters	19.478 ±1.146	9.480 ±0.549	9.998 ±0.927	5.148 ±0.828	8.931 ±0.532	0.694 ±0.185

母貝仕立における生理状態の変化と 生殖腺の状態^{*,**}

蓮 尾 真 澄

国立真珠研究所

真珠の品質は、母貝の健康状態によって大きく支配されることは容易に推察されるが、真珠の歩留りを良くするとともに良質真珠の生産率を高めるための手段として、挿核手術前に母貝の生理状態を核入れに適した状態にまで調整する作業が行なわれる。これについての一連の作業は“母貝仕立て”と呼ばれ、その主体をなすのは“卵止め”，“卵抜き”と稱する作業過程である。

蓮尾¹⁾は、卵抜き操作の相違によって貝の健康状態に差異をきたすことを明らかにし、母貝の活力の差異によって真珠の色および巻きに有意の差を認めているが、これは、活力の調整にもおのずから限度のあることを意味しているといえることができる。また、仕立ての限度については、植本²⁾は、貝殻形態、足糸分泌、軟体部色調、粘液分泌などの状況と生殖腺の状態を総合したものから判定すべきであるとしているが、業者間においては多くの場合、抑制の限度を生殖腺の色彩や状態によって判断しているようである。そこで、貝の生理状態の程度を推察する上において、生殖腺についての肉眼的観察の結果が、どれだけ役立っているか、その意義を時期別に検討し、さらに養殖試験による裏付けを試みたので、その概要を報告する。報告にさきだち、供試貝の管理に御協力をいただいた当所村上、出口両技官に深謝する。

試 験 方 法

試験Ⅰ．——試験材料として大村湾産養殖満2年生アコヤガイ（1961年採苗）を使用し、1963年6月上旬から同年10月下旬までの間において、第1表のとおりⅠ：1963年6月3日～7月22日，Ⅱ：7月1日～8月5日，Ⅲ：7月29日～9月2日，Ⅳ：9月3日～10月8日，Ⅴ：9月23日～10月28日の5回にわたって、次のような操作による卵抜き作業を実施した。すなわち、貝そうじを済ませた母貝の中からほぼ同程度の大きさのものを試験貝と

* Masumi Hasuo. On the relation between change of physiological condition and appearance of the gonad in so called “Shitate” (control of physiological condition of the pearl oyster *Pinctada martensii* for the operation). Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 11: 1334—1347. 1966.

** 国立真珠研究所業績 No. 149. (国立真珠研究所報告 11: 1334—1347. 昭和41年11月)

して選り出し、生殖腺の成熟を促進させるため、ハイゼックス製丸かごに50個（収容量としては少ない状態）ずつ収容して竹筏に10日間、水深1m層に垂下養成した後、卵抜き用竹かごに移しかえ、容量の7分目程度収容した。これを水深3m層（試験地の水深は干潮時約3.20m）に5～7日間垂下し、晴天、上げ潮時を見はからって海中より引き上げ、足糸を切断しながら貝を入れかえ混合し、数時間水深30cmに浅づりした後、再び海底近くにつり下げる。このような操作をくり返し、主として生殖腺の状態からみて、試験貝の70%以上が挿核手術に相当と認められるに至った時期をもって卵抜きの終了時とした。なお、本試験では、その性質上、5回の卵抜き作業はすべて同一の方法により実施した。

第1表 試験Ⅰにおける卵抜き作業の区分

区 分	卵抜き作業期間	1 かごの収容貝数	供試かご数
I	6月 3日～ 7月22日	2 0 0 個	4 かご
II	7. 1 ～ 8. 5	2 0 0	3
III	7. 29 ～ 9. 2	1 9 0	3
IV	9. 3 ～10. 8	1 8 0	3
V	9. 23 ～10. 28	1 8 0	3

試料の採取は、第2表のとおり作業期間中1週間の間隔で行なった。まず、竹かごからとり出した貝について、1個ずつ開口器で開殻して、肉眼により生殖腺の色彩や状態を観察し、次のA、B、Cの3段階に分類した。

A. ——生殖腺の色彩が認められずに、全般的に白色透明かあめ色を呈しているもの、および背側部に極めて薄く、小範囲に生殖腺の色彩が認められるのみで、挿核に相当とされている状態のもの。

B. ——生殖腺は相当程度に縮小しているが、背側部や腹部突起附近には、まだかなり濃い生殖腺の色彩が認められる状態で、通常、挿核には使用されない場合が多い。

C. ——生殖腺の色彩が内臓部の全面にわたって認められるもの、および足の基部、収足筋の周囲がいくらか縮小しているのみで、挿核に不適の状態のもの。

次に、各段階の中から30個体の標本を無作為に抽出し、その残りはよく混合して元の竹かごに戻し、また補充により1かごの収容貝数を一定に保った（この補充貝は化せん網にて包み、試験貝と混同しないようにした）。抽出した各標本は殻長をノギスで測定した後、閉殻筋を切断、開殻して貝の内臓部をメスで切り開き、ピンセットで杆晶体を損傷しないように留意しながらとり出し、濾紙上にて付着汚物をとり除いて、その重量をトーションバランスではかった。杆晶体の平均重量をもって、それぞれの段階に属する貝の群としての活力の程度を示す指標とし、平均値の差の検定（F-検定、危険率5%）を行ない、卵抜き作業期間中における貝の生理状態の変化と生殖腺の状態との関係について検討した。なお、標本測定の際は、卵抜きにかけぬ貝30個体についても、同じ要領で殻長、杆晶体重量の測定を実施した。

試験Ⅱ. ——1963年度における試験の結果から得られたいくつかの知見が、終局的には、生産される真珠の品質へどのように関連し、影響を与えるものであるか、その裏付けを得るために、1964年度から1965年度にかけて、次のような養殖試験を実施した。

第2表 試験Ⅰにおける試料の採取

区 分	試 料 採 取 日							
I	6月3日	10	17	24	7.1	8	15	22
II	7.1	8	15	22	29	8.5		
III	7.29	8.5	12	19	26	9.2		
IV	9.3	10	17	24	10.1	8		
V	9.23	30	10.7	14	21	28		

試験材料として三重県産養殖満2年生アコヤガイ（1962年採苗）を使用し、第3表のとおり1964年6月上旬から10月中旬までの間に区分Ⅰ～Ⅳの仕立て作業を行なった。卵抜きは1963年度と同様な浅づり深づり法を用い、養生期間5日を設けた。経験によれば、同じ時期に同一の仕立て作業を行なっても、年によって、生殖腺の状態の変化していく速度に遅速の差が認められるが、実験を実施した1964年においては、いかなる原因によるのか不明であるが、生殖腺の状態は例年にくらべて急速に変化していくような傾向が認められ、挿核の時点においてA・B・Cの3段階に属するそれぞれの貝の必要量を同時に確保することができなかった。すなわち、生殖腺の状態がC段階のものについては、出現個数が少なくて、供試用とするだけの充分なる個数を得ることができなかったもので、C群についての挿核を断念し、第4表のとおり段階AおよびBに属する群のみについての挿核手術を実施した。なお、仕立て作業の開始時と挿核手術時には、1963年と同一の要領により、30個体について殻長および杆晶体重量を測定した。区分Ⅰ、Ⅱについては1965年1月中旬に真珠を採取し、ⅢおよびⅣは1964年11月下旬から1965年4月下旬まで長崎県北松浦郡江迎町地先の漁場に避寒させた後、再び真珠研究所大村支所地先で養成し、1965年12月中旬に真珠を採取した。真珠の品質の比較は、仕立て作業によってとくに強く支配されるといわれる“きずだま”、“しみだま”の出現状態について χ^2 -検定法により行なった（危険率5%）。

第3表 試験Ⅱにおける仕立て作業の区分

区 分	仕立て作業期間	1かごの収容貝数	供試かご数
I	6月4日～7月9日 7.16	} 220 個	4 かご
II	7.1 ～ 7.17 7.23	} 215	4
III	9.5 ～ 9.23 9.29 ～ 10.5	} 220	4
IV	9.23 ～ 10.2 10.8 ～ 10.15	} 200	4

第4表 試験Ⅱにおける挿核手術の実施経過

区 分	手術月日	生殖腺 の状態	手術貝数	核のサイズ・個数
Ⅰ	7月10日	A	8 3 個	$4.75 \pm 0.03\text{mm}$, 2 個入れ
		B	8 4	
	7. 17	A	1 0 0	
		B	1 0 1	
Ⅱ	7. 18	A	1 0 0	$4.75 \pm 0.03\text{mm}$, 2 個入れ
		B	9 7	
	7. 24	A	8 3	
		B	7 5	
Ⅲ	9. 24	A	1 2 2	$4.75 \pm 0.03\text{mm}$, 2 個入れ
		B	1 1 3	
	9. 30	A	1 2 0	
	10. 6	A	1 2 1	
Ⅳ	10. 3	A	1 1 1	$4.65 \pm 0.03\text{mm}$, 2 個入れ
		B	1 1 2	
	10. 9	A	1 0 6	
		B	1 1 1	
	10. 16	A	1 0 0	

結 果

試験Ⅰ.

1. 卵抜き作業期間中における杆晶体重量の変化

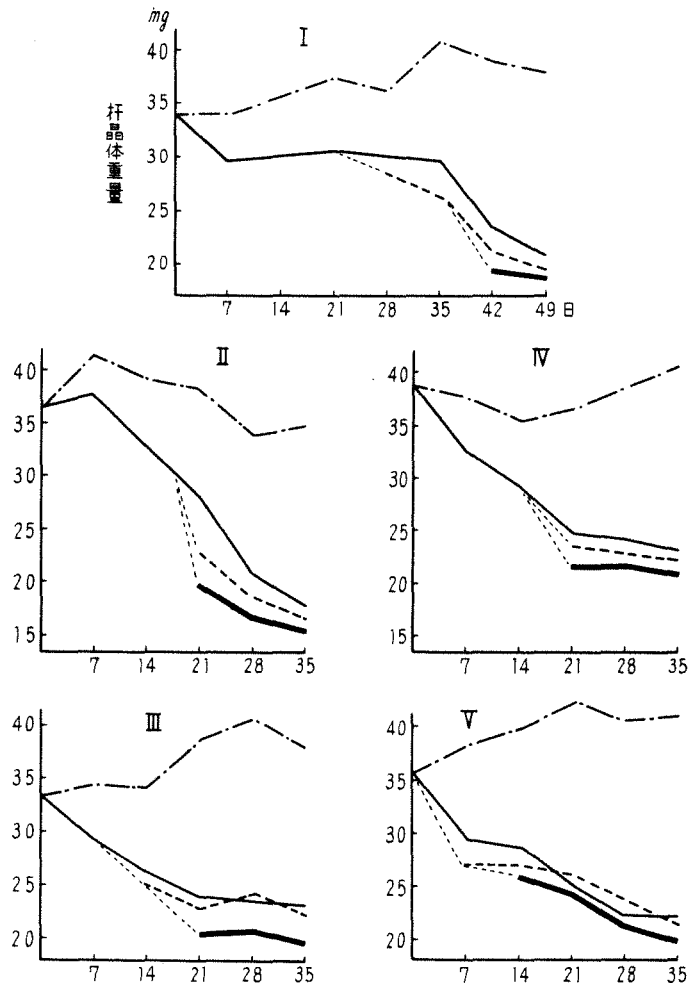
第5表は、生殖腺の状態によって分類した各段階の貝と卵抜きにかけぬ貝の平均殻長および杆晶体の平均重量を作業区分、測定期日別に表示したもので、第1図には杆晶体重量の変化の推移を示した。

第5表、第1図によると、杆晶体重量は卵抜き作業を開始してからの日数の経過とともに次第に減少しており、貝の生理状態の低下を示しているが、それには作業を実施した時期によつての相違が認められ、とくに区分Ⅰ、Ⅱにおいては、それぞれの特色ともいふべきものがあらわれているようである。第1図をみると、段階B、Aの出現する期間は割合に短くて、比較するのは困難であるため、卵抜き作業の全期間を通じてあらわれているC段階について杆晶体重量の変化していく状態をみると、区分Ⅰでは、7日目にはすでに重量は減少しているが、それより以降35日目頃まではほとんど変化のないままで経過し（この期間中、無操作貝の杆晶体重量は増加しているので、作業による抑制は加わったものと考えられる）、それを過ぎると比較的明瞭に下降の状態を示している。すなわち、この時期においては、卵抜き作業による生理状態への影響の現われ方が比較的に緩慢であったといふことができよう。区分Ⅱの期間は、大村湾では例年、産卵の盛期を迎える時期であり、過去の調査資料によると、7月下旬から8月上旬までが、その最盛期にあっており、無操作貝においても生理状態の低下が認められるが、試験貝の杆晶体も作業開始後7日目頃より急傾斜の下降線をたどっており、生理状態の急激なる低下を示している。すなわち、季節的な生理水準の低下も加わるので、ほかの作業区分にくらべて卵抜きによる抑制の影

第5表 卵抜き（試験Ⅰ）作業期間中における杆晶体重量の変化

区分	生殖腺の 状 態	卵 抜 き 開 始 時	7 日 目	14日 目	21日 目	28日 目	35日 目	42日 目	49日 目
Ⅰ	C	34.0mg (44.52 _{mm})	29.6 (45.07)	30.2 (44.54)	30.6 (45.50)	30.1 (43.89)	29.8 (45.53)	23.5 (47.12)	20.8 (47.04)
	B		—	—	—	28.8 (45.46)	26.6 (46.24)	21.1 (45.93)	19.4 (47.47)
	A		—	—	—	—	—	19.4 (44.91)	18.8 (46.51)
	無操作員		34.1 (44.05)	35.5 (44.60)	37.4 (45.75)	36.3 (43.69)	40.8 (45.98)	39.1 (48.37)	38.1 (49.07)
Ⅱ	C	36.3 (43.69)	37.4 (46.58)	32.4 (47.21)	27.6 (47.49)	20.6 (47.45)	17.5 (48.34)		
	B		—	—	22.6 (46.42)	18.3 (46.60)	16.5 (48.24)		
	A		—	—	19.2 (45.86)	16.7 (45.69)	15.0 (46.97)		
	無操作員		40.8 (45.98)	39.1 (48.37)	38.1 (49.07)	33.6 (47.20)	34.5 (47.14)		
Ⅲ	C	33.6 (47.20)	29.7 (46.71)	26.3 (48.53)	24.2 (48.41)	23.9 (47.42)	23.6 (47.50)		
	B		—	25.6 (48.13)	23.7 (47.71)	23.9 (46.97)	22.9 (47.81)		
	A		—	—	20.6 (47.42)	20.9 (47.13)	19.9 (46.02)		
	無操作員		34.5 (47.14)	34.3 (47.56)	38.8 (46.51)	40.7 (47.45)	38.2 (49.07)		
Ⅳ	C	38.2 (49.07)	32.2 (47.53)	28.8 (48.17)	24.0 (48.59)	23.8 (47.87)	22.9 (48.15)		
	B		—	—	23.1 (47.30)	22.6 (47.07)	22.5 (47.47)		
	A		—	—	21.3 (47.70)	21.0 (46.92)	20.8 (47.72)		
	無操作員		37.0 (49.96)	34.9 (48.82)	35.7 (49.76)	38.5 (49.56)	40.0 (50.56)		
Ⅴ	C	35.7 (49.76)	29.5 (48.90)	28.6 (48.48)	25.0 (50.56)	23.3 (47.39)	22.1 (47.95)		
	B		27.0 (48.39)	27.3 (48.30)	26.2 (49.85)	24.3 (48.67)	21.8 (48.28)		
	A		—	26.1 (47.93)	24.3 (49.10)	22.8 (47.85)	19.5 (47.69)		
	無操作員		38.5 (49.56)	40.0 (50.56)	42.6 (51.55)	40.5 (52.35)	40.8 (51.31)		

() 内は殻長を示す。



第1図 卵抜き(試験I)作業期間中における杆晶体重量の変化
実線(太線)…A, 破線…B, 実線(細線)…C, 鎖線…無操作

響が最も強くあらわれており、とくに区分Iとは極めて対照的である。Ⅲ, Ⅳ, Ⅴは似たような下降の経過を示しているが、ⅣはⅢよりも減量の程度が大きく、またⅤでは他の区分にくらべて、早期にB, Aの段階があらわれている。

2. 生殖腺の状態と杆晶体重量との関係

卵抜き作業の過程において、経過日数が同じであっても、個体によって生殖腺の成熟度が異なり、抑制も不均一となりがちであるため、比較的に早く生殖腺が縮小していくものとおそいものなどその状態には種々の段階が認められる。この生殖腺の状態と杆晶体重量との関連性、つまり、生殖腺の縮小と杆晶体の減量とは比例的に進むものであるかどうかを検討するため、第5表のうち、C・B・Aの全段階が出現しているものについて検定し、さらにこまかく分析するためにC・B, B・A, C・Aの各組み合わせをつくり検定す

第6表 生殖腺の状態と杆晶体重量との関係

組合わせ	区 分	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目	49日目
C, B, A	I					○	×
	II		○	○	○		
	III		○	○	○		
	IV		×	○	×		
	V	×	×	×	×		

○ 有意の差あり

× 有意の差なし

第7表 生殖腺の状態と杆晶体重量との関係

区 分	組合わせ	7日目	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目	49日目
I	C, B				×	○	○	×
	B, A						×	×
	C, A						○	○
II	C, B			○	○	×		
	B, A			○	○	×		
	C, A			○	○	○		
III	C, B		×	×	×	×		
	B, A			○	○	○		
	C, A			○	○	○		
IV	C, B			×	×	×		
	B, A			×	×	×		
	C, A			×	○	×		
V	C, B	×	×	×	×	×		
	B, A		×	×	×	×		
	C, A		×	×	×	×		

○ 有意の差あり

× 有意の差なし

ると、それぞれ第6表、第7表のような結果となる。

第6表、第7表から次のようなことがいえるようである。

1) 区分I, II, IIIにおいては、卵抜き作業開始後の経過日数は同じであっても、生殖腺の状態が異なっていれば、杆晶体重量に差異の認められる場合が多く、生殖腺の縮小した段階に進むにつれて杆晶体は軽量となっているか、またはその傾向がうかがわれる。すなわち、一応、生殖腺の縮小の程度は生理状態の低下の度合を示しているといえることができる。とくに、段階Aにおいては、いずれの場合も段階Cより軽量となっており、通常、挿核に使用される貝は、挿核に不適当とされているものより生理状態は低下しているといえることができる。

2) 区分Ⅳにおいては、有意の差の認められる場合は少なく、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲに比較すれば、生殖腺の状態と杆晶体重量との関連性は明確ではない。すなわち、生殖腺の縮小した状態がそのまま生理状態を示しているときと、無関係である場合とがある。

3) 区分Ⅴについても、Ⅳと同様にAの数値はB、Cよりも小さいような傾向はみられるが、いずれの組合わせについても有意の差は認められない。すなわち、この期間においては、生殖腺の状態から生理状態を推察することは困難であることを意味している。

3. 段階Aの出現状況と杆晶体重量

生殖腺の色彩や状態を肉眼観察することによって、貝が挿核に適しているかどうかを判断する場合には、生殖腺が段階Aの状態になるまでの期間やその出現率が関心事とされているが、卵抜き作業を開始してから段階Aに属する貝が群として現われるまでの期間は、作業を実施する時期によっても異なることが経験的にも知られている。本試験においても、A群の出現が比較的早く認められた時期とかなりの長期間を要した時期とがあって、Ⅰでは42日目、Ⅱ・Ⅲ・Ⅳにおいては21日目、Ⅴの場合には14日目に至って、それぞれの作業区分から所定の測定個数である30貝を求めることができた。いま、各作業区分において、A群がはじめて現われたときの杆晶体重量をみると、Ⅰ……19.4mg、Ⅱ……19.2mg、Ⅲ……20.6mg、Ⅳ……21.3mg、Ⅴ……26.1mg となっているが、これら杆晶体重量が作業区分によって差があるかどうかをみるため、F-検定をすると、 $V > I = II = III = IV$ となる。すなわち、ⅠとⅡ・Ⅲ・Ⅳとの間には、A群が出現するまでの期間にかなりの差異が認められるにもかかわらず、杆晶体は同程度の重量にまで減少しており、一方、Ⅴにおいては、最も早期にA群が現われて、重量は他のいずれの作業区分よりも大きい数値を示しているが、これは季節的な一つの特色としてとりあげ得るようである。

第8表 試験Ⅱにおける生殖腺の状態と杆晶体重量との関係

区 分	仕立て開始日	杆晶体の 平均重量	手術月日	生殖腺の状態	杆晶体の 平均重量	F-検定の結果
Ⅰ	6月 4日	28.4 mg	7月10日 (1)	A B	19.8mg 23.6	有意の差あり
			7. 17 (2)	A B	18.7 21.2	有意の差あり
Ⅱ	7. 1	28.3	7. 18 (1)	A B	21.5 24.6	有意の差あり
			7. 24 (2)	A B	19.8 22.9	有意の差あり
Ⅲ	9. 5	30.7	9. 24 (1)	A B	24.9 25.3	有意の差なし
			9. 30 (2)	A B	21.1 —	—
			10. 6 (3)	A B	19.6 —	—
Ⅳ	9. 23	30.4	10. 3 (1)	A B	24.4 26.1	有意の差なし
			10. 9 (2)	A B	23.9 24.1	有意の差なし
			10.16 (3)	A B	20.7 —	—

試験Ⅱ.

1. 杆晶体重量の変化について

第8表は、仕立て作業開始時および挿核手術時における杆晶体の平均重量を示すとともに、肉眼的観察による生殖腺の状態と杆晶体重量との関係を見るために行なった F -検定（危険率5%）の結果を示したものである。

第8表によれば、7月に手術を行なった区分ⅠおよびⅡについては、いずれも有意の差が認められ、生殖腺がより縮小しているように観察される群の方が杆晶体重量は軽量となっていて、生理状態はより低下していることを示している。一方、9月下旬から10月上旬、10月上旬から中旬にかけてそれぞれ挿核手術をしたⅢとⅣにおいては、いずれの場合にも有意の差は認められない。すなわち、生殖腺の状態と杆晶体重量との間には相関を認めることができなくて、生殖腺の縮小した群の方がかならずしも生理状態が低下しているとはいえないようである。これは、1963年度において実施した試験の結果と大体において同じような傾向を示している。

2. 真珠の品質

採取したたまの中から白だまを除いたものを作業区分ごとに手術月日、生殖腺の状態別に“きず”の有無，“しみだま”に占める“きず”の程度などによって6種のたまに分類し、その出現数、比率を挿核部位別に示すと第9表(1)、(2)のとおりになる。

第9表(1)、(2)より、挿核手術時における生殖腺の状態が異なることによって“きずだま”，“しみだま”の出現率に差があらわれるかどうかをみるため、A・Bの組合わせについて挿核部位別に χ^2 -検定をすると、第10表のような結果となる（異常真珠は出現個数が少ないため、これを除いて検定した）。

第9表 (1) 試験Ⅱにおける真珠の品質、ふくろ

区 分			無 き ず 1 点 き ず	2 点 き ず	3 点以上きず	しみ・小きず	しみ・大きず	有機質 稜柱層	計
Ⅰ	(1)	A	14個(24.56%)	7 (12.28)	20 (35.09)	13 (22.81)	2(3.51)	1(1.75)	57(100)
		B	5 (9.80)	6 (11.76)	19 (37.26)	10 (19.61)	8(15.69)	3(5.88)	51(100)
	(2)	A	10 (14.29)	13 (18.57)	23 (32.86)	17 (24.28)	6(8.57)	1(1.43)	70(100)
		B	3 (3.90)	12 (15.58)	24 (31.17)	18 (23.38)	16(20.78)	4(5.19)	77(100)
Ⅱ	(1)	A	7 (10.29)	14 (20.59)	28 (41.18)	11 (16.18)	8(11.76)	0	68(100)
		B	7 (9.21)	6 (7.90)	33 (43.42)	19 (25.00)	9(11.84)	2(2.63)	76(100)
	(2)	A	8 (13.11)	10 (16.39)	22 (36.07)	14 (22.95)	5(8.20)	2(3.28)	61(100)
		B	3 (6.00)	8 (16.00)	20 (40.00)	13 (26.00)	4(8.00)	2(4.00)	50(100)
Ⅲ	(1)	A	5 (6.94)	7 (9.72)	30 (41.67)	22 (30.56)	6(8.33)	2(2.78)	72(100)
		B	2 (3.51)	3 (5.26)	31 (54.39)	17 (29.82)	4(7.02)	0	57(100)
	(2)	A	5 (8.62)	11 (18.96)	28 (48.28)	9 (15.52)	5(8.62)	0	58(100)
		B	—	—	—	—	—	—	—
	(3)	A	4 (7.27)	13 (23.64)	27 (49.09)	7 (12.73)	4 (7.27)	0	55(100)
		B	—	—	—	—	—	—	—
Ⅳ	(1)	A	5 (7.81)	5 (7.81)	27 (42.19)	18 (28.13)	7(10.94)	2(3.12)	64(100)
		B	2 (4.44)	3 (6.67)	20 (44.45)	13 (28.89)	5(11.11)	2(4.44)	45(100)
	(2)	A	11 (20.76)	6 (11.32)	21 (39.62)	9 (16.98)	5(9.43)	1(1.89)	53(100)
		B	5 (7.46)	6 (8.96)	29 (43.28)	12 (17.91)	11(16.42)	4(5.97)	67(100)
	(3)	A	6 (10.71)	6 (10.71)	20 (35.72)	11 (19.64)	10(17.86)	3(5.36)	56(100)
		B	—	—	—	—	—	—	—

第9表 (2) 試験Ⅱにおける真珠の品質, うかし

区 分			無 1 点 き ず	2 点 き ず	3 点以上きず	しみ・小きず	しみ・大きず	有機質 稜柱層	計
Ⅰ	(1)	A	3個(8.82%)	5 (14.71)	8 (23.53)	11 (32.35)	5(14.71)	2(5.88)	34(100)
		B	3 (9.09)	3 (9.09)	6 (18.18)	15 (45.46)	3(9.09)	3(9.09)	33(100)
	(2)	A	4 (11.11)	4 (11.11)	9 (25.00)	14 (38.89)	4(11.11)	1(2.78)	36(100)
		B	3 (6.12)	3 (6.12)	12 (24.49)	18 (36.74)	8(16.33)	5(10.20)	49(100)
Ⅱ	(1)	A	1 (2.86)	7 (20.00)	12 (34.28)	8 (22.86)	4(11.43)	3(8.57)	35(100)
		B	2 (4.88)	8 (19.51)	12 (29.27)	12 (29.27)	5(12.19)	2(4.88)	41(100)
	(2)	A	8 (19.51)	7 (17.08)	6 (14.63)	11 (26.83)	6(14.63)	3(7.32)	41(100)
		B	1 (3.33)	5 (16.67)	8 (26.67)	9 (30.00)	4(13.33)	3(10.00)	30(100)
Ⅲ	(1)	A	2 (4.65)	2 (4.65)	11 (25.58)	18 (41.86)	10(23.26)	0	43(100)
		B	1 (2.78)	1 (2.78)	9 (25.00)	19 (52.78)	6(16.66)	0	36(100)
	(2)	A	2 (5.26)	2 (5.26)	8 (21.05)	16 (42.12)	8(21.05)	2(5.26)	38(100)
		B	—	—	—	—	—	—	—
	(3)	A	2 (5.00)	1 (2.50)	9 (22.50)	17 (42.50)	9(22.50)	2(5.00)	40(100)
		B	—	—	—	—	—	—	—
Ⅳ	(1)	A	3 (5.56)	3 (5.56)	16 (29.62)	17 (31.48)	12(22.22)	3(5.56)	54(100)
		B	2 (4.45)	3 (6.66)	16 (35.56)	16 (35.56)	7(15.55)	1(2.22)	45(100)
	(2)	A	3 (6.38)	4 (8.51)	15 (31.92)	14 (29.79)	8(17.02)	3(6.38)	47(100)
		B	2 (4.17)	6 (12.50)	17 (35.41)	12 (25.00)	9(18.75)	2(4.17)	48(100)
	(3)	A	3 (6.82)	6 (13.64)	16 (36.36)	5 (11.36)	9(20.46)	5(11.36)	44(100)
		B	—	—	—	—	—	—	—

第10表 生殖腺の状態と真珠の品質

区 分	組合わせ	χ^2 - 検 定 の 結 果	
		ふ く ろ	う か し
I	(1) A, B	AはBよりも無きず, 1点きずだまの出現率が高く, しみ・大きずだまの出現率が低い。	有意の差なし
	(2) A, B	AはBよりも無きず, 1点きずだまの出現率が高く, しみ・大きずだまの出現率が低い。	有意の差なし
II	(1) A, B	AはBよりも2点きずだまの出現率が高い。	有意の差なし
	(2) A, B	有意の差なし	AはBよりも無きず, 1点きずだまの出現率が高い。
III	(1) A, B	有意の差なし	有意の差なし
IV	(1) A, B	有意の差なし	有意の差なし
	(2) A, B	AはBよりも無きず, 1点きずだまの出現率が高い。	有意の差なし

第10表から, 区分Ⅰ, Ⅱにおける計4の組合わせについては, いずれも「ふくろ」か「うかし」のどちらかに有意の差を認められ, A群はB群よりも品質がすぐれているが, 区分Ⅲでは有意の差はない。また, Ⅳにおいては2組のうち1組は有意の差があり, 他の1組については有意の差は認められない。これは, 生殖腺の状態の異なる母貝に挿核したときは, 時期によって品質に差の現われることもあれば, 影響のない場合もあることを示している。

次に、同一の作業内において、生殖腺の状態が肉眼的には同じような程度に観察されても仕立て日数の異なるときは、それによって品質の差が現われるかどうかを検討するため、第11表のとおり作業区分別に組合わせをつくり、挿核部位別に χ^2 -検定を行なった。

第11表によれば、計22群のうち6群については、有意の差が認められ、いずれも仕立て日数の長い場合が短いものよりも“しみだま”、“きずだま”の出現率が低く、とくにIVにおいては、その現象が顕著に認められるようである。

また、生殖腺の状態が肉眼的には挿核に適していると認められる貝を使用したとしても、挿核手術の時期が異なるがために、真珠の品質に差異が現われるかどうかをみるため、A群から採取した真珠を各作業区分の挿核部位別に分類項目ごとに集計し、その個数、出現率を示したのが第12表(1)、(2)であり、これらの表から作業区分による組合わせをつくり、それぞれについての検定の結果を示したのが第13表である。

第13表によれば、IとII、IとIVの各組合わせには、いずれも有意の差は認められないが、IとIII、IIとIIIおよびIV、IIIとIVの各組合わせにおいては、それぞれ有意の差が認められる。すなわち、挿核手術に際して、肉眼的観察による生殖腺の色彩や状態からみれば、

第11表 仕立て期間と真珠の品質

区 分	組合わせ	χ^2 - 検 定 の 結 果	
		ふ く ろ	う か し
I	A (1),(2)	有意の差なし	有意の差なし
	B (1),(2)	有意の差なし	有意の差なし
II	A (1),(2)	有意の差なし	(2)は(1)よりも、無きず、1点きずだまの出現率が高く、3点以上きずだまの出現率が低い。
	B (1),(2)	有意の差なし	有意の差なし
III	A (1),(2)	(2)は(1)よりも、しみ・小きずだまの出現率が低い。	有意の差なし
	A (1),(3)	(3)は(1)よりも、2点きずだまの出現率が高く、しみ・小きずだまの出現率が低い。	有意の差なし
	A (2),(3)	有意の差なし	有意の差なし
IV	A (1),(2)	(2)は(1)よりも、無きず、1点きずだまの出現率が高い。	有意の差なし
	A (1),(3)	有意の差なし	(3)は(1)よりも、しみ・小きずだまの出現率が低い。
	A (2),(3)	有意の差なし	(3)は(2)よりも、しみ・小きずだまの出現率が低い。
	B (1),(2)	有意の差なし	有意の差なし

第12表 (1) 挿核時期と真珠の品質、ふくろ

区 分	無 き ず 1 点 き ず	2 点 き ず	3 点 以上 き ず	し み ・ 小 き ず	し み ・ 大 き ず	有 機 質 稜 柱 層	計
I	24個(18.90%)	20(15.75)	43(33.86)	30(23.62)	8(6.30)	2(1.57)	127(100)
II	15 (11.63)	24(18.60)	50(38.76)	25(19.38)	13(10.08)	2(1.55)	129(100)
III	14 (7.57)	31(16.76)	85(45.94)	38(20.54)	15(8.11)	2(1.08)	185(100)
IV	22 (12.72)	17(9.83)	68(39.30)	38(21.96)	22(12.72)	6(3.47)	173(100)

第12表 (2) 挿核時期と真珠の品質, うかし

区 分	無 き ず 1 点 き ず	2 点 き ず	3 点 以 上 き ず	し み ・ 小 き ず	し み ・ 大 き ず	有 機 質 稜 柱 層	計
I	7個(10.00%)	9(12.86)	17(24.29)	25(35.71)	9(12.86)	3(4.28)	70(100)
II	9 (11.84)	14(18.42)	18(23.68)	19(25.00)	10(13.16)	6(7.90)	76(100)
III	6 (4.96)	5(4.13)	28(23.14)	51(42.15)	27(22.31)	4(3.31)	121(100)
IV	9 (6.21)	13(8.96)	47(32.41)	36(24.83)	29(20.00)	11(7.59)	145(100)

第13表 挿核時期と真珠の品質

組合わせ	χ^2 検 定 の 結 果	
	ふ く ろ	う か し
I, II	有意の差なし	有意の差なし
I, III	IはIIIよりも無きず, 1点きずだまの出現率が高い。	IはIIIよりも2点きずだまの出現率が高い。
I, IV	有意の差なし	有意の差なし
II, III	有意の差なし	IIはIIIよりも2点きずだまの出現率が高く, しみ・小きずだまの出現率が低い。
II, IV	有意の差なし	IIはIVよりも2点きずだまの出現率が高い。
III, IV	有意の差なし	IIIはIVよりも, しみ・小きずだまの出現率が高い。

第14表 生殖腺が挿核に最適の状態にある場合の挿核時期による真珠品質の比較

区分	手術月日	生殖腺の状態	杆晶体の重量 mg	無 き ず 1 点 き ず 個 %	2 点 き ず	3 点 以 上 き ず	し み ・ 小 き ず	し み ・ 大 き ず	有機質 稜柱層	計
I	7月10日 (1)	A	19.8	17(18.68)	12(13.19)	28(30.77)	24(26.37)	7(7.69)	3(3.30)	91(100)
	7. 17 (2)	A	18.7	14(13.21)	17(16.04)	32(30.19)	31(29.24)	10(9.43)	2(1.89)	106(100)
II	7. 24	A	19.8	16(15.69)	17(16.67)	28(27.45)	25(24.51)	11(10.78)	5(4.90)	102(100)
III	9. 30 (1)	A	21.1	7(7.29)	13(13.54)	36(37.50)	25(26.04)	13(13.54)	2(2.09)	96(100)
	10. 6 (2)	A	19.6	6(6.32)	14(14.74)	36(37.89)	24(25.26)	13(13.68)	2(2.11)	95(100)
IV	10. 16	A	20.7	9(9.00)	12(12.00)	36(36.00)	16(16.00)	19(19.00)	8(8.00)	100(100)

挿核に適していると判断した母貝であっても, 手術の時期が異なれば, それらから生産された真珠の品質には, 優劣の差があらわれる場合もあり得ることを意味している。そして, 本試験の結果を概括すれば, 7月に挿核手術を行なった貝から採取した真珠の品質は, 9月下旬以降の手術によるものよりもすぐれているといえるようである。

さらに, 上述の結果を貝の生理状態との関係から検討するために, 第9表(1), (2)の作

業区分ごとに検定を行ない、その各々から比較的に“きずだま”、“しみだま”の出現率の低い手術群をとり出し、手術時の杆晶体重量とともに示すと第14表のとおりになる。

各作業区分の中で比較的に品質のすぐれているのは、第14表のとおりいずれも生殖腺の状態はAであり、杆晶体重量は20mg前後の数値を示しており、重量についての有意の差は認められない。しかしながら、6組の手術群を2組ずつ組合わせて検定すると、I (1)およびI (2)とII、III (1)およびIII (2)とIVの間には、それぞれ有意の差は認められないが、前3者は後3者よりも“きずだま”、“しみだま”の出現率は低いか、またはその傾向がどうかかわれ、大体において品質がすぐれているといえることができるようである。すなわち、生理状態が同じ程度にまで調整された母貝を使用した場合でも、季節によっての品質の差異があらわれる傾向が強いようである。

考 察

試験結果によれば、同一方法による仕立て作業を行なったとしても、実施の時期によって、種々と異なる現象が認められる。すなわち、時期が変われば、貝の生理状態の変化していく状態とその程度が異なり、また、生殖腺が挿核手術に適したような状態になるまでの期間には、かなりの差異が認められる。これらは、仕立て作業がそれぞれの時期における貝の生理水準によって大きな影響を受けていることを示しているが、反面、仕立てによって貝の生活機能を抑制し、生理状態を調整するためには、時期や手段の上で配慮する必要のあることを意味している。一方、生殖腺の色彩の濃淡や縮小の程度によって貝の生理状態の調整度合を推察する場合においても、季節的な考慮を払うべきであり、本試験の範囲では、6月下旬以前と9月中旬については言及することはできないが、一応、7月上旬から9月上旬頃までの間においては、貝の生理状態は生殖腺の状態から判断してもさしつかえないのではないかと考えられるが、9月下旬以降においては生殖腺の状態を指標とするのは適当ではないようである。

次に、生殖腺の状態が異なる群についてそれぞれ挿核手術をした場合には、季節によって真珠の品質に差が現われる場合と、現われない場合が認められた。すなわち、生殖腺の縮小の程度が生理状態の低下の度合を示していると判断された7月においては、四つの組合わせのうち3組については、有意の差が認められ、いずれも生殖腺のより縮小している群の方に“きずだま”、“しみだま”の出現率は低く、品質がすぐれているという結果が得られた。しかしながら、生殖腺の状態と生理状態との関連性がはっきりしていない9月下旬以降においては、手術時の生殖腺の状態は異なっているように観察されたにもかかわらず、三つの組合わせのうち2組については有意の差は認められなかった。このことは、挿核に適当な生理状態の範囲内ならば、より低く調整された方により多くの良質真珠を期待できることを示すのではないかと考えられ、また、品質に差の現われたのは、生殖腺の状態の相違によると解するよりは、生殖腺の状態が生理状態の差異を示していて、しかもよりよく調整されていた結果によるものと解するのが妥当のようである。つまり、生殖腺の状態よりは生理状態の程度いかに、品質に対してより強い影響を与えていることを示しているようである。

さらに、同一の時期において、生殖腺が同じような状態に観察されても、仕立ての日数が異なることによって真珠の品質に差を認められるものがあつたが、この場合はいずれも

日数の長い方が品質はすぐれていた。これは、仕立て過剰にならぬような限度においては、日数の長い場合がより適切な調整の状態に近づくためであろうか。

次に、生殖腺の状態は挿核手術に適していると判断した貝を使用しても、手術の時期がそれぞれ異なる場合には、生産された真珠の品質には優劣の差を認められることが本試験によっても明らかにされたが、大体において7月に手術をした貝から採取した真珠の品質は、9月下旬以降の手術によるものよりもすぐれていた。この事実は、業者間においても一般に経験されているところではあるが、その解明のための手がかりを本試験の結果からつかむことは困難のようである。

また、各作業区分の中から比較的品質のすぐれている群をとり出してみると、いずれも挿核時の杆晶体重量が20mg前後の数値を示しているが、それら生理状態が同程度の群から得られた真珠には、品質の差異を認められるものがある。このことは、貝の生理状態の調整限度は季節によっても異なるべきであるという一つの理由を提起しているようである。

要 約

1) 母貝仕立てによる生理状態の変化と生殖腺の状態との関係を検討するために、1963年度において5回の卵抜き作業を実施し、1964年度から1965年度にかけて4回の養殖試験を実施した。杆晶体重量はF-検定法、真珠の品質は χ^2 -検定法によってそれぞれ比較した(危険率5%)。

2) 卵抜き作業開始後、貝の生理状態の低下していく状態やその程度は、作業を実施した時期によって異なる。これは、生理状態の調整手段には時期的な配慮が必要であることを意味している。

3) 一応、7月上旬頃から9月上旬頃までは、生理状態は生殖腺の状態から判断してもさしつかえないと考えられるが、9月下旬以降においては適用が困難のようである(6月下旬以前と9月中旬については、本試験の範囲では言及することができない)。

4) 生殖腺の状態が異なる群に挿核手術をし、真珠品質を比較すると、7月手術のものでは生殖腺のより縮小している群の方がすぐれている傾向が強いが、9月下旬以降では差の認められない場合が多い。これは、生殖腺の状態よりは生理状態の程度いかに品質に対して強い影響を与えていることを示しているようである。

5) 仕立て過剰にならぬような限度においては、日数の長い場合が、より適切な調整の状態に近づくのではないかと考えた。

6) 7月手術の真珠品質は、9月下旬以降の手術によるものより大体において品質がすぐれているが、本試験の結果からは、原因解明のための手がかりをつかむことは困難のようである。

7) 生理状態は同程度に調整されていても、時期が異なれば、品質に優劣の差を認められるものがある。これは、貝の生理状態の調整限度は、季節によって異なるべきであるという一つの理由になるであろう。

文 献

- 1) 蓮尾真澄 1961. 母貝・ピース貝の健康状態が真珠の品質に及ぼす影響について. 国立真珠研報 6: 663—669.
- 2) 植本東彦 1962. 仕立及び養生について. 真珠研究会伊勢部会々報 1(2): 1—16.

“あとづけ”に関する研究

V. 挿核からピース挿入までの養生について* **

山 口 一 登

国立真珠研究所

“あとづけ”による挿核手術では、核だけを先に挿入しておき、一定の養生期間をおいてピースを挿入するのであるが、これは生産された真珠品質の面からみて一つの利点とされている。著者は前報³⁾において、この養生期間の決定を目的として組織学的な面から検討を試みたのであるが、この期間中における養生方法の技術的な点については、まだ確立されていないようであり、“あとづけ”を実施する当業者間でもその方法はまちまちである。

そこで今回は、挿核からピース挿入までの期間中の貝の生理状態の推移を把握することによって、この期間中の養生方法に対する技術的な面での改良に資するものがあるのではないかと考え、実験を実施したのでその概要を報告する。

報告に先だち、助言をいただいた蓮尾真澄支所長に深謝する。

実 験 方 法

実験は1964, '65年の2か年にわたって3回実施した。

実験 I ——1964年7月に行なった。供試貝は大村湾産満3年生アコヤガイを使用した。5月18日に母貝仕立てを開始し、7月2日に挿核(直径 5.4mm の核を「ふくろ」に1個入れ)を実施した。挿核した貝は3群に分けて、ピース挿入までの13日間を次のような処理方法によって垂下した。

I -a. 丸型クレモナ網籠(普通の養殖籠)に50貝収容、沖合(比較的潮流の流通の良好な場所)のいかなから深さ 2m 層に垂下した。

I -b. 養生籠(竹製で大きさは40cm×25cm×高さ13cm, 底は目が非常に細かく、側面およびふたは目がある程度大きい)に、100貝収容し I -a と同じ層に垂下した。

I -c. 養生籠に100貝収容し、真珠研究所大村支所地先(比較的潮流の流通が悪い場所)のいかなから底層に垂下した。

* Kazuto Yamaguchi. Studies on the technique so called “Atozuke” (one of the methods of nuclear insertion in pearl culture). V. On the control of physiological condition from nuclear insertion to mantle piece insertion. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 11: 1348—1354. 1966.

** 国立真珠研究所業績 No.150. (国立真珠研究所報告11: 1348—1354. 昭和41年11月)

各群とも挿核後13日目の7月15日にピースの挿入を行ない、その後は3群とも同じように養生籠に100貝収容し、地先のいかだから底層に垂下して養生を行ない、7月24日に養成に移した。

仕立て開始から挿核、ピース挿入、養成までの経過による貝の生理状態の推移をみるためにこの間10回にわたって各処理群から30貝あて抽出して杆晶体重量の測定を行なった。

実験Ⅱ——1964年9月に実施。三重県産満2年生アコヤガイを使用して、8月12日に母貝仕立てを開始した。9月11日に挿核（直径5.1mmの核を「ふくろ」に1個入れ）を行ない、挿核した貝を2群に分けて、ピース挿入までの11日間を次の処理方法によって垂下した。

Ⅱ-d. 丸型籠に50貝収容し、地先のいかだから2m層に垂下した。

Ⅱ-e. 養生籠に100貝収容し、地先のいかだから底層に垂下した。

ピースの挿入は9月22日に施し、その後は2群とも同じ方法（養生籠に100貝収容し、地先のいかだから2m層に垂下した）で養生を行ない、10月2日に養成に移した。

仕立開始から養成までの間に10回にわたって、各群から30貝あて抽出して杆晶体重量の測定を行なった。

実験Ⅲ——1965年7月下旬から8月上旬にかけて実施した。実験に供した貝は愛媛県産満2年生アコヤガイであり、6月2日に母貝仕立てを始め、7月29、30日に挿核を行なった。挿核にあたって真珠品質の比較を行なうものは直径4.8mmの核を、また杆晶体の重量を測定するものおよび核周辺組織の観察を行なうものは直径約5mmのパラフィン核をそれぞれ「ふくろ」に1個あて挿入した。挿核した貝は3群に分けて、ピース挿入までの12日間を次のような処理方法によって垂下した。

Ⅲ-f. 養生籠に120貝収容し、地先のいかだから底層に垂下した。

Ⅲ-g. 卵抜籠（竹製で母貝仕立てに用いるもの）に120貝収容し、地先のいかだから底層に垂下した。

Ⅲ-h. 丸型籠に60貝収容し、地先のいかだから2m層に垂下した。

真珠品質の比較を行なうものは、各群とも挿核後12日目の8月10日にピースの挿入を実施した。その後は3群とも同じ方法で養生を行ない、8月20日に養成に移した。

挿核からピース挿入までの期間中における処理方法の違いによる貝の生理状態の変化をみるために、挿核後2、6(7)、10日および12日目にそれぞれ30貝を抽出して、杆晶体重量の測定を行なった。また核周辺組織の状態を観察するために、挿核後2、4、6、8、10日および12日目にそれぞれ5～6貝を取りあげて、核周囲の組織をホルマリン10%液で固定し、パラフィン切片を作り、マイエルのヘマトキシリン—エオシン染色およびハイデンハイン・アザン染色を施し観察した。一方、真珠品質の比較を行なうために養成したものは10月4日に貝そうじを実施し、1966年1月11日に真珠を採取した。

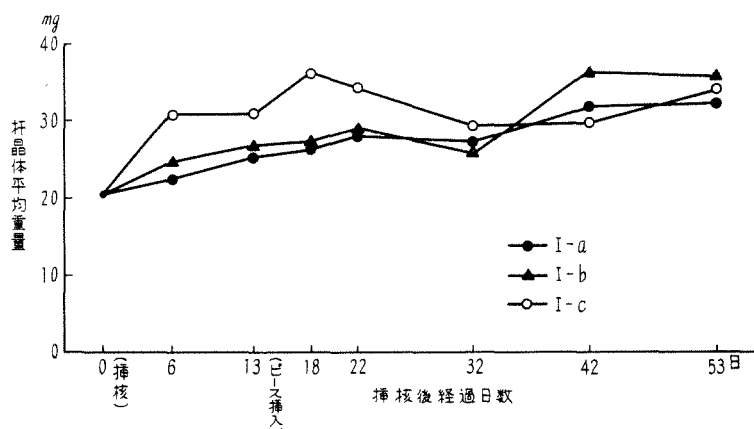
結 果

実験Ⅰ——仕立て開始時（5月18日）から挿核後53日目までの杆晶体重量の変化を平均値で示したのが、第1表、第1図である。

母貝仕立てによって杆晶体の重量は挿核時には仕立て開始時の重量の約65%にまで減少

第1表 杆晶体重量の変化

試料採取日	処理区分	I-a	I-b	I-c
仕立開始時(5月18日)		31.41mg		
仕立終了時(6月26日)		20.80		
挿核時(7月2日)		20.31		
挿核後6日目		22.87	24.79	30.59
〃13日目(ピース挿入)		25.03	26.63	30.70
〃18日目		26.28	27.17	36.14
〃22日目		28.07	28.83	34.27
〃32日目		27.23	25.73	29.22
〃42日目		31.89	36.26	29.71
〃53日目		32.12	35.67	34.04



第1図 杆晶体重量の変化

しているが、挿核後は3群とも直ちに重量は増加している。特にI-cはその傾向が著しい。挿核後6日目および13日目(ピース挿入時)において、他の2群と比較した場合、平均値の差の検定によって危険率5%で有意の差が認められる。I-aおよびI-bでは挿核後の杆晶体重量の増加はゆるやかである。ピース挿入後においても重量の増加は認められるが、I-cはやや不安定な経過をたどっている。

実験Ⅱ——杆晶体重量の変化を平均値で示すと第2表、第2図のようになる。

挿核時の杆晶体重量は仕立て開始時の約48%にまで減少しているが、挿核後の変化は2群とも直ちに増加の傾向をたどっている。ピース挿入後において一時的に重量の増加が停止した状態がみられるが、減少の傾向を示すことはないようである。その後再び増加して行く。この場合、処理による差はみられず、2群ともほぼ同じような経過をたどっている。

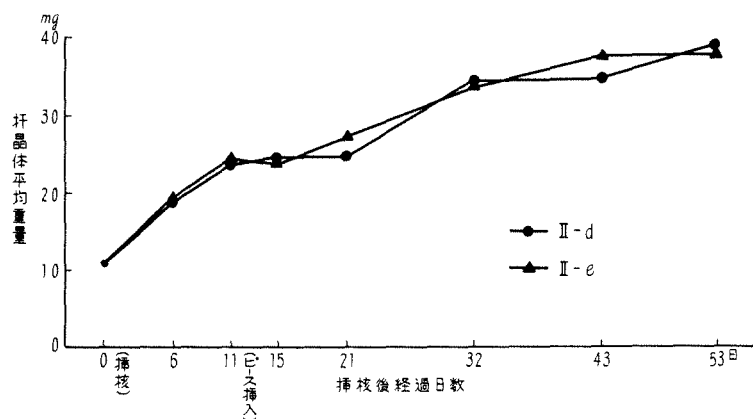
実験Ⅲ

(1) 杆晶体重量の変化

杆晶体重量の変化を示したのが第3表、第3図である。

第2表 杆晶体重量の変化

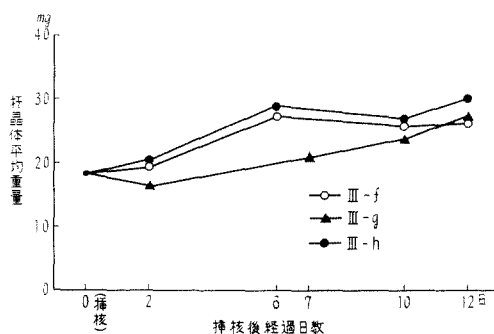
試料採取日	処理区分	Ⅱ—d	Ⅱ—e
仕立開始時(8月12日)		22.60mg	
仕立終了時(9月4日)		11.07	
挿核時(9月11日)		10.83	
挿核後6日目		18.70	19.20
〃11日目(ピース挿入)		23.63	24.03
〃15日目		24.11	23.72
〃21日目		24.58	27.15
〃32日目		34.21	33.23
〃43日目		34.61	28.04
〃53日目		38.94	37.73



第2図 杆晶体重量の変化

第3表 杆晶体重量の変化

試料採取日	処理区分	Ⅲ—f	Ⅲ—g	Ⅲ—h
仕立開始時(6月2日)		25.25mg		
仕立終了時(7月26日)		17.73		
挿核時(7月30日)		18.35		
挿核後2日目		19.35	16.39	20.37
〃6日目		27.30	—	29.00
〃7日目		—	20.80	—
〃10日目		25.86	23.63	27.00
〃12日目		26.25	27.15	30.19



第3図 殻晶体重量の変化

挿核時の殻晶体重量は仕立て開始時の約73%に減少している。挿核後処理方法 III-f, h の2群は直ちに増加して行くが、III-gは最初一時的に重量の減少がみられ、その後増加して行くが、この傾向は他の2群に較べてゆるやかである。しかしながら、ピース挿入時（挿核後12日目）には3群とも同じ程度の重量まで増加していて、平均値の差の検定の結果では危険率5%で有意の差は認められない。

(2) 真珠の品質

採取した真珠の品質を処理方法別に表わすと第4表のようになる。

第4表 真珠の品質

処理区分 \ 真珠の品質	無キズ	小キズ	大キズ	シミ	有機質珠	稜柱層珠
III-f	38.46%		23.08%	30.77%	5.13%	2.56%
III-g	41.27		34.92	22.22	0.00	1.59
III-h	40.35		26.32	24.56	0.00	8.77

真珠の品質を、無キズ、小キズ、大キズ、シミおよび有機質珠、稜柱層珠に分類して、その出現率の差について検定を試みれば、3群間に危険率5%で有意の差は認められない。次に有機質珠および稜柱層珠をまとめて、その出現率の差について Yates の修正を施し（出現個数少量のため）検定すれば、

$$Pr.\{t > 1.38\} = \int_{1.38}^{\infty} \Phi(t) dt = 0.083$$

となり有意の差は認められない。

(3) 組織の観察

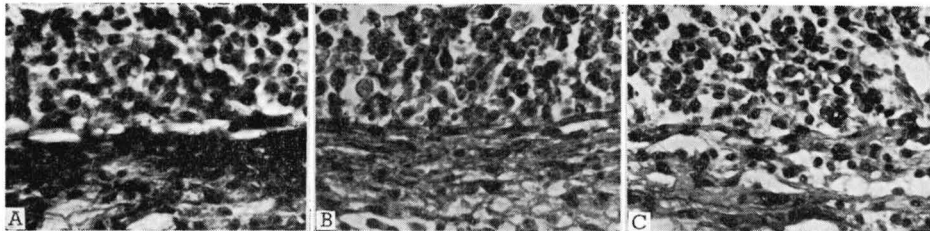
挿核後2日目における核周辺の組織像は、3群とも同じような状態が観察された。すなわち、挿入されたパラフィン核と宿主の生殖腺組織との間には遊走細胞が網目状あるいは層状になって集まっているが、一部では核と宿主組織が直接に接しているところもある。遊走細胞は網目状に集まっている場合は仮足を出したものが多く観察された。

4～6日目になると、遊走細胞の数が多くなり積み重なったような状態で層状になって並んでいる像が多く観察される。

8～10日目になると、核面と宿主組織との間には1～数層、厚いところでは10～20層に

積み重なり、層状に並んだ遊走細胞がみられる。これら遊走細胞は仮足によって宿主組織との結びつきがみられるところがある。

挿核後12日目における状態は、層状に並んだ遊走細胞の仮足の部分にアザン染色で青く染まっているところがみられ、また宿主組織との間には青く染まった繊維が観察された(第4図)。



第4図 挿核後12日目の核周辺組織の状態。アザン染色×200
A: III-f B: III-g C: III-h

挿核からピース挿入までの期間中における核周囲の組織の状態は以上のような経過をたどって変化しているが、この変化の過程には個体差もみられ、処理方法別の3群の間には大差は認められなかった。

考 察

今回の実験ⅠおよびⅡの結果から総括的にみれば、挿核時の貝の生理状態は母貝仕立てによって正常な状態より低下している。ここで“あとづけ”手術によって核だけを挿入した場合、その後は処理方法によって回復の速さに差はみられるが一応回復への経過をたどっていて、ピースを挿入する時期においては生理状態は回復途上にあつて、挿核時に比較して高くなっている。しかしながら、正常な状態に較べればまだ低いようであり、ここでピースの挿入を施しても生理状態の回復が処理方法によっては、一時的に停止した現象がみられるものもあったが、再び低下の傾向をたどるようなものは認められなかった。ただし、Ⅰ-cにおいてはピース挿入時の生理的機能が他の2群に較べてやや高い状態にあつたためか、その後における生理的状态の回復がやや不安定であつた。

植本^{1,2)}は貝に対して手術侵襲を加えた場合、生体反応を阻止するための生理的抑制の必要性について述べているが、このことは“あとづけ”手術におけるピース挿入に際しても当然考えなければならないことである。すなわち、“あとづけ”手術を行なう場合ピース挿入時においても、挿核時と同様に貝は生理的に抑制状態におかなければならないものと思われるが、実験結果からみてピース挿入における生体反応阻止のための生理的抑制の水準と挿核時におけるそれとの間に差があるものと推察される。

“同時づけ”手術においては、手術後の生理的回復を目的とした養生手段が取られているが、“あとづけ”手術の場合は挿核後の養生はピース挿入の手術に際して、そのための生体反応を阻止できるような生理状態に調整するような方向にもって行くようにするべきで、目的および方法が自づから前者とは異なってくるものと考えられる。

次に、前報³⁾において挿核からピース挿入までの期間をピース挿入時の核周辺組織の状態から決定したのであるが、ピース挿入時の生理状態を考慮に入れた場合、挿核後の生理的変動の推移と核周辺組織の変化の過程との間の関連性を見出す必要があると思われたので、実験Ⅲを実施したのであるが、明確な結論を出すまでには至らなかった。しかしながら、挿核からピース挿入までの期間を核周辺組織の状態からみて決めた場合、この期間中にピース挿入に適した生理的状态に調整するような方法を取ることができるものとすれば、適確な養生方法を確立させることは容易なことではないかと思われる。このためには、ピース挿入時の生理的状态の水準を究明することが急務であると考えられる。

要 約

- 1) “あとづけ”手術における挿核からピース挿入までの期間中の養生方法について検討するため、いくつかの異なる養生処理を施し、杆晶体重量を指標として生理的状态の推移を調べた。
- 2) いずれの処理群もピース挿入時の生理的状态は挿核時のそれに比較して高い水準にあった。
- 3) ピース挿入後生理的状态の低下はみられなかった。
- 4) 以上の結果から、ピース挿入時における生体反応阻止のための生理的抑制水準と、挿核時におけるそれとの間には差があるものと推察された。

文 献

- 1) 植本東彦 1961. アコヤガイのそう核手術に関する生理学的研究Ⅰ—Ⅲ. 国立真珠研報 6 : 619—635.
- 2) ————— 1962. アコヤガイの挿核手術に関する生理学的研究Ⅳ. 術後の養生について. 国立真珠研報 8 : 896—903.
- 3) 山口一登 1964. “あとづけ”に関する研究Ⅳ. そう核からピースそう入までの期間について. 国立真珠研報 9 : 1128—1134.

真珠の品質におよぼすピースの 特性について^{*,**}

沢田 保夫・谷口宮三郎

国立真珠研究所

真珠の品質を決定する条件の一つとして真珠の色調が重要な要素であることは周知のことである。しかし、真珠の色調は養殖過程において人為的に調節することが不可能であり、漁場の環境条件やアコヤガイの生理的条件に起因するものと考えられている。環境条件については、漁場の地域的な特性^{2,9)} や同一漁場においても垂下深度の深浅^{4,6,7)} によって真珠の色調に差異の生じることが報告されている。また、アコヤガイの生理に関しては、挿核手術に用いる母貝の仕立が真珠の品質を決定する重要な作業とされ、その方法等について多くの研究^{5,8)} が行なわれているが、挿核時に核と共に挿入する外套膜切片（以下ピースと呼ぶ）を採取するピース貝の選定やその仕立については考慮されていないのが現状である。

蓮尾¹⁾ は母貝およびピース貝の健康状態の差異によって生産される真珠品質について検討し、ピース貝よりも母貝の健康状態が真珠の色調および巻に与える影響が強いと報告している。著者らは、すでに、ピース貝ごとに施術貝を区別して養殖した結果、使用する母貝を同一群から選んだばあい、真珠の色調の出現が挿核者の個人差や筏一台内のような微細海域の差よりも強く現われることを観察した。このことから、真珠の色調の出現が母貝の性質によるのか、あるいはピース貝の性質が強く影響するのかを確かめる目的で、ピース貝の処理別による真珠の色調の出現と巻について検討したので、その結果を報告する。

試料および実験方法

試料として用いたアコヤガイは1964年4月から1965年6月まで英虞湾神明浦で育成された3年生貝である。

実験は、竹簗を用いて約50日間仕立を行なった母貝に、処理方法の異なる3種類のピース貝を用いて挿核した3群の施術貝を作って、ピース貝の処理別による真珠の色調と巻を検討した。同時に各実験群内でもピース貝別に生産される真珠の色調を検討するために、1個のピース貝から切り取られた35—40片のピースを用いて挿核した施術貝を一簗に収容し、1群につき9簗計27簗の施術貝を実験に用いた。

* Yasuo Sawada and Miyasaburo Taniguchi. The influence on the quality of cultured pearl by the character of "piece" (piece of mantle membrane). Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 11: 1355—1361. 1966.

** 国立真珠研究所業績 No. 151 (国立真珠研究所報告11: 1355—1361 昭和41年11月)

ピース貝の処理は、貝に生理的な差をつけるために、挿核前の約50日間竹籠で仕立を行なった母貝の中から選んだもの、金網平籠に50個収容して貝の周囲にシダの葉を入れて2週間垂下養成したもの、および、金網平籠に50個収容し普通に養成した3群である。これらの各操作によって著しく健康度の低下したと認められるもの以外をピース貝として用いた。

挿核に用いた核は直径4.5mmの核から1mgの精度で秤量した151mgおよび152mgのもので、1965年6月上旬にいわゆる「ふくろ」におのおの1個挿核した。施術後の貝は金網平籠に収容し、2m層で垂下養殖した。試料真珠の採取は同年12月上旬に各籠別にわけて行なった。

真珠の測色は、多徳島で以前に採取した真珠を白色から濃黄色までの10段階に分類した標準真珠を数種類作成し、北向の窓の下でこれと比較して視覚的に決定した。真珠色の表現方法はC1を白色度の最も高いものとし、順次黄色度が加わってC10で濃黄色となるようにした。

真珠の巻は重量で表わし、トーションバランスで正確に1mgの単位まで測定した。

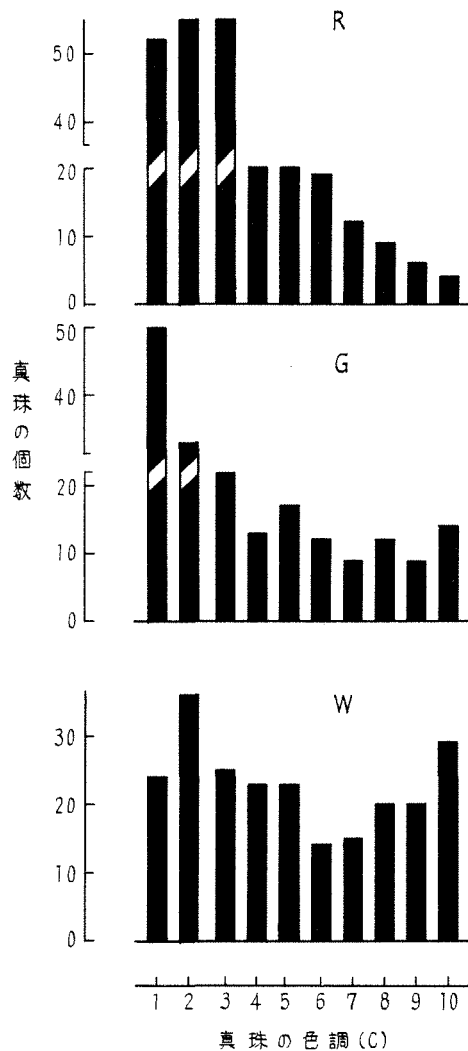
実験結果および考察

1. ピース貝の処理別による真珠の色調の出現傾向

ピース貝の処理別による3群の試験結果は第1図に示したように、金網平籠で普通に養成したピース貝を用いた試験群の真珠の色調は、白色から濃黄色にわたって一様に分布しており、全体としてみたばあいの視覚印象は標準色による分類の中央値に相当するような黄色度の強いものであることが認められた。これにくらべて、竹籠で仕立を行なった母貝から選んだピース貝を用いた実験群では、標準色にしたがって分類すると、真珠の色調の分布は白色度の強い方に傾き、黄色度の増加するにしたがって出現率が低下しており全体から受ける色調は前者に比べるとはるかに白色の域にある。さらに、金網平籠でシダの葉を入れて仕立てたピース貝の実験群では、色調の出現傾向は竹籠で仕立てたピース貝の実験群と似ているが、全体から受ける視覚印象は上述の2群の間にあることが認められた。以上のことをさらに検討してみると、1%の危険率で出現率に有意の差が認められるのが、普通に養成したピース貝と竹籠で仕立を行なったピース貝の実験群間では、C1, C2, C3, C10、普通に養成したピース貝とシダの葉を入れて仕立てたピース貝との実験群間ではC1のみに、また、竹籠で仕立てたピース貝とシダの葉を入れて仕立てたピース貝の実験群間ではC2, C3にある。このことから、白色系真珠の出現の多いのは竹籠で仕立てたピース貝の実験群、シダの葉を入れて仕立てたピース貝の実験群、普通に養成したピース貝の実験群の順になり、普通に養成したピース貝の実験群は黄色度の強い真珠の出現率の高いことが認められた。

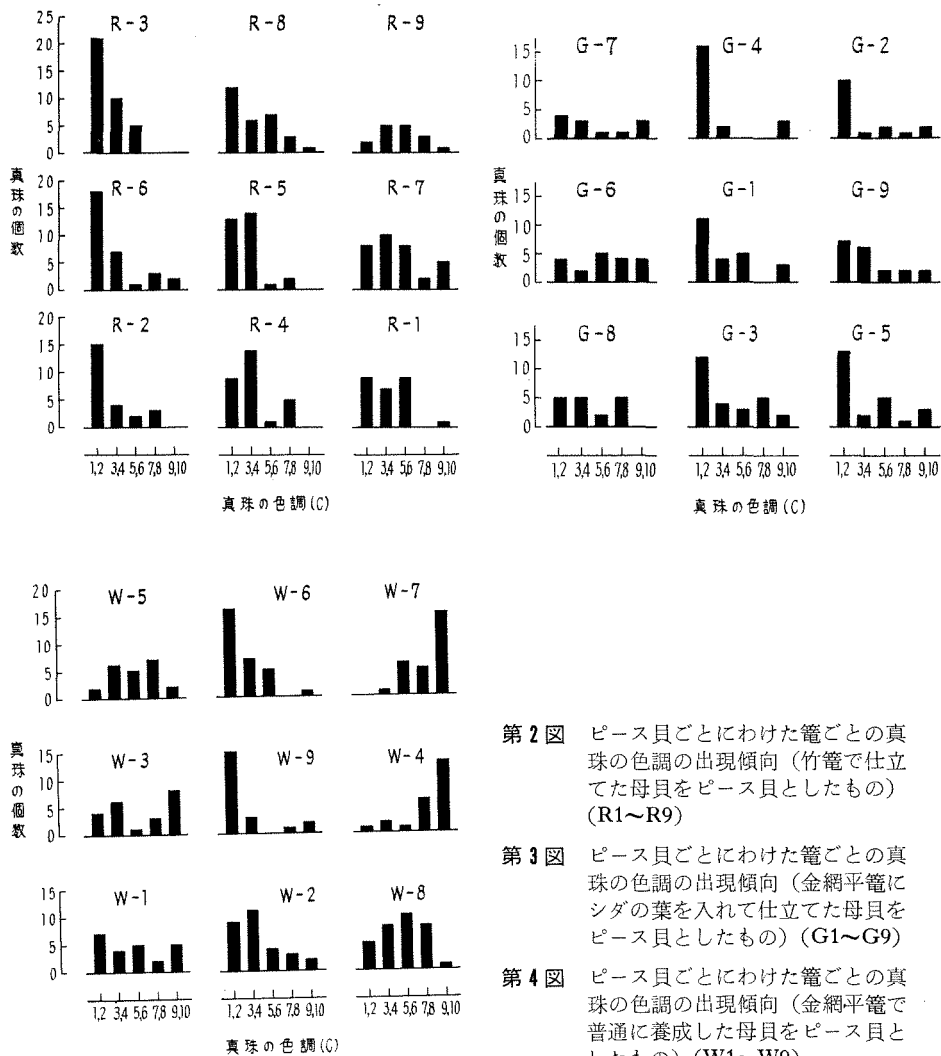
2. ピース貝別による真珠の色調

前述のように、ピース貝の仕立方法によって、真珠の色調の出現率の異なることが認められたが、同じ仕立処理を行なった実験群内においてもピース貝ごとに分けた籠間の真珠の色調が一樣でないのが認められる。結果は第2～4図に示したが、籠ごとの真珠の色調の出現傾向は、普通に養成したピース貝の実験群内では、白色にかたよった出現傾向を示



第1図 ピース貝の処理別による真珠の色調の出現傾向

すものが3籠 (W-2, W-6, W-9), 黄色にかたよっているものが2籠 (W-4, W-7), 色調が全体に分布しているものが4籠 (W-1, W-3, W-5, W-8) に分かれているのが認められる。竹籠で仕立を行なったピース貝を用いた実験群内では, 白色にかたよったものが6籠 (R-2, R-3, R-4, R-5, R-6, R-8), 全体に分布しているものが3籠 (R-1, R-7, R-9) で, 黄色にかたよっているものはこの実験群では認められない。また, シダの葉を入れて仕立てたピース貝を用いた実験群内では, 白色にかたよったものは6籠 (G-1, G-2, G-3, G-4, G-5, G-9), 全体に分布しているものは3籠 (G-6, G-7, G-8) に分かれ, 黄色にかたよっているものは認められない。このように各実験群内でも真珠の色調の出現傾向が籠によ



第2図 ピース貝ごとにわけた簗ごとの真珠の色調の出現傾向 (竹簗で仕立てた母貝をピース貝としたもの) (R1~R9)

第3図 ピース貝ごとにわけた簗ごとの真珠の色調の出現傾向 (金網平簗にシダの葉を入れて仕立てた母貝をピース貝としたもの) (G1~G9)

第4図 ピース貝ごとにわけた簗ごとの真珠の色調の出現傾向 (金網平簗で普通に養成した母貝をピース貝としたもの) (W1~W9)

って変化していることは、同一処理によってもピース貝の受ける処理程度に差があったためと考えられる。また、普通の養成によるピース貝の実験群内でも真珠の色調の出現傾向が3群に分かれた事実は、ピース貝の個性に原因するものであろう。

また、普通一般の方法で行なわれた真珠養殖の浜揚時においても、真珠の色調をブルー系とかその他の色調を挿核技術や養殖管理による影響が強いと考えて、著者の一人が発表³⁾した真珠の黄色色素に起因する真珠色 (黄色か白色かということ) のみで分類すると、いわゆる「ふくろ」と「うかし」の2個挿核のばあいには、同一施術員から取り出される真珠の色調が類似していることの多いのが観察される。このことは、同一母貝に挿入される2個のピースが35—40片に切り取られた同じピース貝からのものである可能性の強いことからして当然のことであろう。

3. ピース貝の処理別による真珠の巻

ピース貝の処理別による実験群の真珠の巻は、第1～3表に示したように、普通に養成したピース貝の実験群では巻の平均値が 211.0mg、竹籠で仕立を行なったピース貝の実験群では 214.5mg、シダを入れて仕立てたピース貝の実験群では 207.6mg である。この3群の巻の差を検定した結果、重量に顕著な差が認められなかった。

また、各実験群内で籠ごとの真珠の重量の差を検定すると、普通に養成したピース貝の実験群内では巻の差はほとんど認められないが、竹籠で仕立てたピース貝の実験群内では

第1表 竹籠で母貝の仕立と同様に行なったピース貝による真珠の品質

籠番号	浜揚数 (個)	色 調 (C)	重 量 (mg)	キズ珠 (個)			シミ珠 (個)			クズ珠 (個)	シラ珠 (個)	ハナ珠 (個)
				小	中	大	小	中	大			
R-1	39	3.2	209.6	11	1	0	12	6	0	2	2	14
R-2	34	2.5	219.6	11	0	0	12	5	1	2	3	8
R-3	38	2.5	206.4	3	1	0	15	6	1	1	2	10
R-4	38	3.7	223.8	6	1	0	15	2	1	8	4	5
R-5	36	3.0	203.3	2	2	0	9	5	2	7	0	11
R-6	38	3.3	215.4	4	1	0	17	3	0	5	3	9
R-7	38	4.5	220.0	6	0	1	12	5	0	10	1	7
R-8	33	3.6	212.0	2	2	0	13	2	0	6	1	11
R-9	37	4.5	220.5	9	0	0	11	5	2	7	4	8
計	331			54	8	1	116	39	7	48	20	83
平均値		3.4	214.5									
百分率				16.3	2.4	0.3	35.1	11.8	2.1	11.5	6.4	21.1

注：キズ珠、シミ珠は1個の真珠で各項目ごとに記載したので重複したものもある。

第2表 金網平籠で仕立を行なったピース貝による真珠の品質

籠番号	浜揚数 (個)	色 調 (C)	重 量 (mg)	キズ珠 (個)			シミ珠 (個)			クズ珠 (個)	シラ珠 (個)	ハナ珠 (個)
				小	中	大	小	中	大			
W-1	29	5.0	217.3	3	0	0	10	4	0	3	3	9
W-2	37	3.8	212.3	1	0	0	10	0	0	6	1	20
W-3	32	6.0	209.3	5	1	0	9	4	1	5	4	7
W-4	29	8.0	210.3	5	0	0	8	1	2	6	2	9
W-5	32	5.5	209.0	1	0	0	4	0	0	8	2	17
W-6	31	2.8	220.8	5	0	0	10	2	0	2	0	11
W-7	32	7.5	192.1	2	0	0	10	4	0	7	2	9
W-8	37	5.0	214.2	7	0	0	6	7	0	6	2	13
W-9	30	3.0	214.0	5	0	0	9	4	1	6	4	6
計	289			34	1	0	76	26	4	49	20	101
平均値		5.2	211.0									
百分率				11.8	0.4	0	26.3	9.0	1.4	20.2	10.1	18.1

注：キズ珠、シミ珠は1個の真珠で各項目ごとに記載したので重複したものもある。

第3表 金網平箆にシダの葉を入れて仕立を行なったピース貝による真珠の品質

箆番号	浜揚数 (個)	色 調 (C)	重 量 (mg)	キズ珠 (個)			シミ珠 (個)			クズ珠 (個)	シラ珠 (個)	ハナ珠 (個)
				小	中	大	小	中	大			
G-1	29	3.7	204.2	10	0	0	8	7	1	5	3	1
G-2	33	4.1	204.4	4	0	0	10	1	0	9	4	7
G-3	34	3.8	223.3	5	0	0	13	2	0	3	5	9
G-4	33	3.7	214.2	4	0	0	12	1	2	6	4	8
G-5	29	2.6	205.7	6	0	0	9	9	0	4	3	4
G-6	30	5.8	212.2	2	1	0	7	3	1	8	2	9
G-7	16	4.6	209.3	4	2	0	7	3	0	2	3	1
G-8	28	4.4	195.7	2	4	0	6	7	0	8	3	4
G-9	26	4.0	199.6	6	0	0	9	5	1	7	0	4
計	258			43	7	0	71	38	5	52	27	47
平均値		4.1	207.6									
百分率				16.7	2.7	0	27.5	14.7	1.9	20.0	10.5	18.2

注：キズ珠、シミ珠は1個の真珠で各項目ごとに記載したので重複したものもある。

9 箆の間に 1 % の危険率で有意の差が認められる。また、この 2 実験群の中間的な処理であるシダの葉を入れて仕立てたピース貝の実験群内では、9 箆の間に 5 % の危険率で有意の差が認められる。このことは、前項で述べたように、同じ仕立処理を行なってもピース貝個々の受ける処理程度が一樣でないで、その程度の強弱の差が真珠の色調と巻の両者に現われたものと推定される。

以上の結果を総合すると、この実験に用いた方法でのピース貝の仕立は、真珠の巻には顕著な差異は認められないが、色調におよぼす影響の大きいことが認められる。したがって一般の真珠養殖においても、ピース貝の仕立方法によっては生産される真珠の巻に差が現われなくても商品価値の高い白色系の真珠の出現率が高いことから考えて、ピース貝の仕立の方法やその割合について研究することは、母貝の仕立と同様に企業として重要な問題であろう。

また、真珠の色調を論ずるような目的での試験養殖を計画するにあいには、ピース貝の特性が真珠の色調におよぼす影響が大きいので母貝だけでなくピース貝の選定についても充分に考慮する必要があるものと考えられる。

要 約

ピース貝に生理的な差をつけるために行なった処理別による真珠の色調と巻について比較した。同時に真珠の色調の決定要因が挿核する母貝の性質によるのか、あるいはピース貝の個性によるものかを検討した。

(1) ピース貝の処理別によって真珠の色調に差異が認められた。真珠の色調は、金網平箆で普通に養成したピース貝の実験群に最も黄色度が強く、次に金網平箆にシダの葉を入れて仕立てたピース貝の実験群となり、竹箆で母貝仕立を行なった貝をピース貝とした

実験群は白色系の真珠の出現率の高いものが認められた。

(2) ピース貝ごとに区別した試験養殖では、真珠の色調の出現に特徴が認められ、ピース貝の選定の重要なことが判明した。

(3) ピース貝の処理別によって生産される真珠の巻には差異が認められなかった。

文 献

- (1) 蓮尾真澄 1961. 母貝・ピース貝の健康状態が真珠の品質に及ぼす影響について 国立真珠研報 6: 663—669.
- (2) 沢田保夫・丹下孚 1959. 真珠養殖場の養殖海洋学的研究Ⅱ. 英虞湾内の4点において生産される真珠品質の比較と海況について. 国立真珠研報 5: 459—480.
- (3) 沢田保夫 1961. 真珠の黄色色素の研究. 国立真珠研報 7: 865—869.
- (4) 沢田保夫・谷口宮三郎 1962. 真珠貝の生化学的研究Ⅶ. 真珠養殖における垂下深度と真珠品質および母貝の化学組成との関係. 国立真珠研報 8: 908—912.
- (5) 植本東彦 1961. アコヤガイのそう核手術に関する生理学的研究Ⅰ—Ⅲ. 国立真珠研報 6: 619—635.
- (6) 渡部哲光・岡田弥一郎・宮村光武・井上義雄 1957. アコヤガイの養殖真珠の品質と養殖深度との関係—Ⅱ. 日水誌 23: 235—240.
- (7) 山口一登 1956. 真珠養殖における垂下様式と真珠の巻及び色について. 国立真珠研報 2: 137—141.
- (8) 山口一登 1961. “あとづけ”に関する研究Ⅱ. 卵抜き の程度と真珠袋形成との関係. 国立真珠研報 6: 636—641.
- (9) 山口一登・太田繁・丹下孚・片田清次 1957. 養殖環境と挿核部位による真珠の色及び巻きの差異について. 国立真珠研報 2: 137—141.

空中露出がアコヤガイに 与える影響について****

船 越 将 二

国立真珠研究所

貝の乾式輸送、貝そうじ等の操作は、程度の差はあるが、貝に対して生理的に好ましくない影響を与える。これらの操作の貝に対する影響要因の1つとしては空中露出があげられ、これに関しては太田・清水⁵⁾による貝そうじのための空中露出時間が真珠品質に及ぼす影響の研究、またカキに関しては Kokubo³⁾、横田・広吉⁷⁾の報告がある。

生活の場である海中から空中という生活不能な場に置かれた場合、貝にはどういうふうに影響があらわれるか、その程度はどれくらいのものであるか、また輸送や貝そうじ等の後、次の養殖上の操作を行なうまでに生理状態の回復期間として何日くらい必要かという問題が起ってくる。著者は、空中露出にともなう貝の生理状態の変化を研究したので報告する。

報告にあたり助言をいただいた蓮尾真澄支所長に感謝の意を表する。

材料および方法

実験に用いたアコヤガイは真珠研究所大村支所地先で養殖した大村湾産および大分県産の満2年生アコヤガイ(35~40g)で、実験は1965、'66年の9、10月の2回にわたっておこなった。

試験貝は2組に分け、1組は屋外の日陰に24時間空中露出した後海水中に戻した。他の1組は空中露出を行わず対照とした。

各測定はいずれも日週変化をさけるため一定時間(午前9時30分)に行なった。

血液 pH: 1回に8個体を使用し、心臓から注射筒で採血後45秒以内に微量電極を用いて pH メーターで測定した。

血清 Ca: 1回に10個体を使用し、Sobel 法で測定した。

心臓はく動数: 1回に5個体を使用し、開殻後2分間放置して計数した。

酸素消費量: 海水 8.75ℓ を入れた円形ガラスバットに貝を6個体入れ、流動パラフィンで水面をおおい、サイフォンにより流水式(200~300 cc/min.)とし測定時のみ閉鎖し、その前後の溶存酸素量の差から消費量を求めた。測定はウインクラ法を用い、測定

* Shoji Funakoshi. On the influence of air exposure upon the pearl oyster, *Pinctada martensii*. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 11: 1362—1367. 1966.

** 国立真珠研究所業績 No. 152. (国立真珠研究所報告11: 1362—1367. 昭和41年11月)

中海水の溶存酸素量は 3 cc/l 以上に保った。

杆晶体重量： 1 回に15~20個体を使用し、採取後トーションバランスで秤量した。

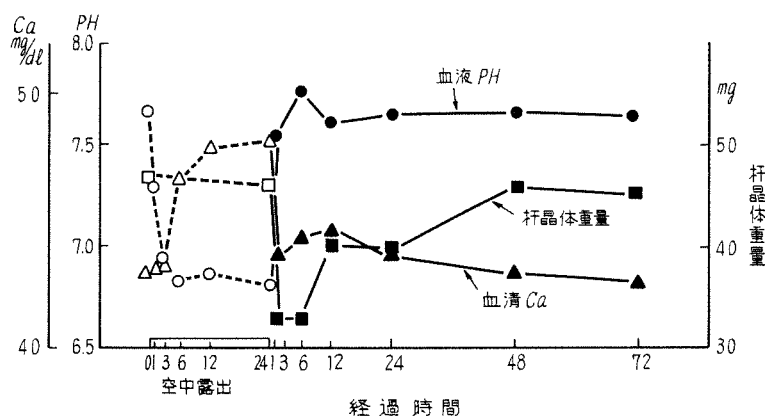
閉殻筋乳酸量： 閉殻筋採取後、直ちにドライアイスで冷却したアルコール中に入れて凍結させ、すみやかに秤量した後10%トリクロール酢酸とともにホモゲナイザーにかけて固定後濾過し、Barker-Sammerson 法で定量した。1 回に 8 個体を使用した。

血糖： 1 回の測定に10個体を使用し、採血後90秒以内に除蛋白し、Hargendorn-Jensen 法で測定した。

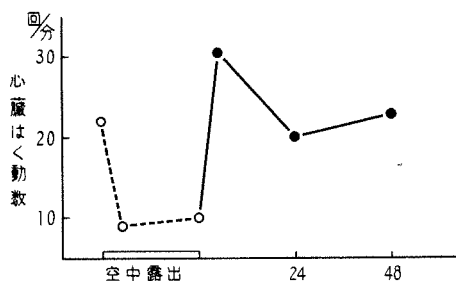
結果および考察

全項目について同時に測定を行ったのではないが、空中露出による測定項目の変化の状態を見るにはさしつかえないものとする。

血液 pH (第1図, 第1表)



第1図 空中露出中およびその後の血液 pH, 血清 Ca, 杆晶体重量の変化



第2図 空中露出およびその後の心臓はく動数の変化

血液 pH は空中露出にともなって短時間で急激に低下した。これは空中露出によってアカヤガイの有機酸が減少する¹⁾ ことと、Kokubo³⁾ がカキの空中露出実験で論じているのと同じように炭酸ガスの蓄積による低下と考えられる。また、海水中に戻してから1時間後にみられる pH の急上昇は、血液中からのすみやかな炭酸ガスの拡散を示すものと

第1表 空中露出中およびその後の血液 pH, 血清 Ca, 杆晶体重量, 酸素消費量, 心臓はく動数の変化

測定事項 経過時間		血液 pH	血清 Ca mg/dl	杆晶体重量 mg	酸素消費量 cc/g/h	心臓はく動数 回/分
空 中 露 出	0	7.66	42.96	47		21.8
	1	7.29	43.04			
	3	6.94	43.04			9.0(5時間)
	6	6.83	46.68			
	12	6.86	47.88			
	24	6.81	48.14	46		10.2
海 水 中	1	7.53	43.62	33	0.05 0.06 (0~30分)	
	3				0.07	
	6	7.76	44.36	33	0.09	30.5
	12	7.61	44.72	40	0.03 0.08 (9時間)	
	24	7.65	43.90	40	0.04	19.6
	48	7.66	43.02	46	0.04	22.5
	72	7.64	42.76	45	0.03	
	96				0.04	
	120					
	144				0.04	
備 考		実験期間 1965年10月28日~11月1日 空中露出時気温 12.0~21.2°C 水温 20.0~20.2°C				実験期間 1965年 9月7日~11日 空中露出時気温 13.8~27.0°C 水温 25.5~26.6°C

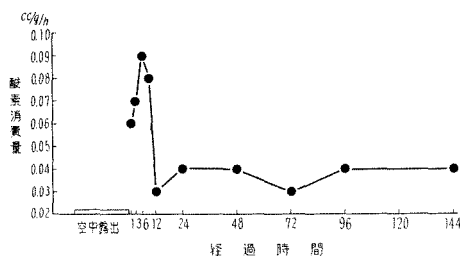
推定される。さらに6時間後にはpHが上昇して露出前の値よりも一旦高くなり、24時間以後は露出前のpHとほぼ同じ値を示すのが認められた。

血清Ca(第1図, 第1表)

空中露出の3時間後まではほとんど変化しないが、6時間後には急に増加し、その後徐々に増加して24時間後に最高値となった。空中露出後海水中に戻してから1時間後に血清Ca量は急激に減少し、その後48時間後には露出前と同程度の値となった。

露出中の貝の血清Ca量と血液pHとは負の相関を示しており、これはpHの低下に対して血液中に緩衝作用としてCa量が増加したものと考えられる。

心臓はく動数(第2図, 第1表)



第3図 海水中に戻した後の酸素消費量の変化

空中露出後5時間では貝の心臓はく動数は約 $\frac{1}{2}$ に減少し、この状態が空中露出24時間まで続くが、その後海水中に戻して6時間後には逆に露出前の値の1.4倍と高くなっている。これは空中露出という生活不適當な抑圧された生理状態におかれていたものが、再び生活の場である海水中に戻されたために一時的に生理状態が亢進したためと考えられる。その後はく動数は減少し24時間後には露出前と同程度になった。

酸素消費量（第3図，第1表）

空中露出後海水中に戻した直後（0～30分）の酸素消費量は0.06cc/g/hと高い値を示し、その後しだいに増加して6時間後には0.09cc/g/hと最高値を示している。しかし12時間後には0.03cc/g/hと急に低下し、24時間目以後はほとんど変化が認められない。

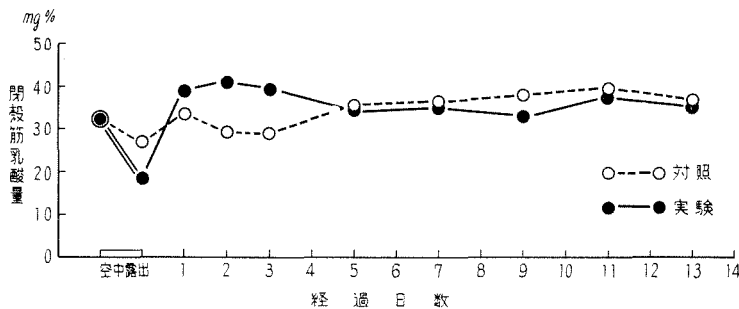
アコヤガイの酸素消費量には日週期のあることが認められており、その最小は6～12時にあらわれ、最大は18～24時すなわち前夜半にあらわれる⁴⁾ことが報告されている。本実験における海水中に戻してから高い酸素消費量、およびその後増加して最高値に達したのは6時間後の15時であることから、日週期にもとづく酸素消費量の増加とは考えがたく、心臓はく動数にみられたのと同様に一時的な生理的亢進と考えられる。

杆晶体重量（第1図，第1表）

空中露出においては杆晶体重量はほとんど減少していないが、24時間後にはほとんどの個体の杆晶体の一部が溶解状態にあるのが認められた。海水中に戻してから杆晶体の重量は1時間目に急に減少し、その後増加して2日目には露出前と同程度となった。

杆晶体は一般に生理状態を示す指標となりうるとされており、この重量の減少は生理状態の低下を示すものと考えられている。したがって杆晶体重量からみたかぎりでは、2日目には生理状態に異常は認めがたいことになる。

閉殻筋乳酸量（第4図，第2表）



第4図 空中露出中およびその後の閉殻筋乳酸量の変化

実験期間 1966年9月30日～10月14日

空中露出時気温 10.6～23.0°C

水温 23.0～24.7°C

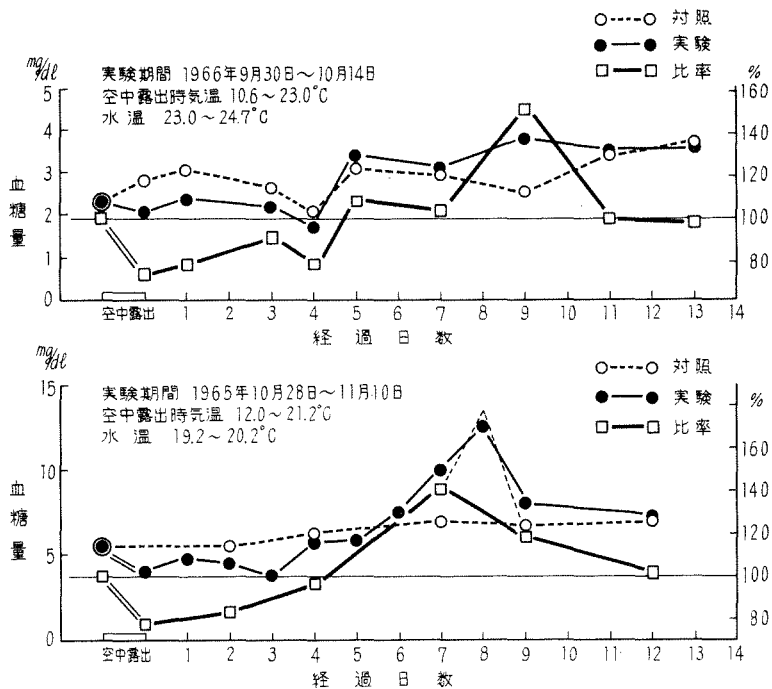
24時間の空中露出によって乳酸含量は露出前の56%に減少し、海水中に戻してからは、1日目から数日間対照より高い値を示し、5日以後は対照より低い値となり、13日後には同程度となった。

カキの閉殻筋に対抗した力を加えた場合、その乳酸含量が増す²⁾こと、またアコヤガイの閉殻筋乳酸量の日週変化が活動のそれとよく合致する¹⁾こと等閉殻筋の運動によりその乳酸含量が増すことが知られている。5日目より後にあらわれる対照より低い乳酸含量は、

第2表 空中露出中およびその後の血糖、閉殻筋乳酸量の変化

測定事項 経過日数		血 糖 mg/dl						乳 酸 量 mg %		
		実 験	対 照	%	実 験	対 照	%	実 験	対 照	%
空 中 露 出	0	2.30			5.4			32.51		
	1	2.05	2.80	73	4.0		74	18.35	27.28	56
海 水 中	1	2.40	3.08	78	4.8			39.15	33.72	116
	2				4.5	5.5	82	41.09	29.48	139
	3	2.20	2.66	90	3.6			39.35	28.61	138
	4	1.65	2.11	78	6.0	6.2	96			
	5	3.40	3.13	108	5.9			35.38	35.57	99
	6				7.4					
	7	3.08	2.97	104	9.9	7.0	141	35.16	37.30	94
	8				12.7					
	9	3.82	2.51	152	8.0	6.7	119	32.78	38.72	85
	10									
	11	3.45	3.40	101				36.60	40.22	91
	12				7.1	6.9	102			
	13	3.60	3.65	99				36.20	37.20	97

注：％は対照値に対する実験値の比率



第5図 空中露出中およびその後の血糖値の変化

まだ貝に空中露出の影響が残っており、生理状態の低下が閉殻筋運動量の低下による乳酸含量の低下としてあらわれたものと考えられる。

血糖（第5図，第2表）

漁場環境の変化により貝の血糖値が変化することはすでに植本⁶⁾が認めており，本実験でも変化の大きいことが認められた。

24時間の空中露出により露出前の値の約73%に減少し，海水中に戻してから徐々に増加し，5～6日目から対照値より高くなり，7～9日目に最高値となり，11～13日目には対照と同程度となった。

1965年の実験では杆晶体において空中露出の影響は2日目にはすでに認められないが，血糖はその後に変化して12日目ごろに対照と同程度となった。1966年の実験でも血糖は11日目ごろに対照と同程度になっており，同時に測定した乳酸量が対照と同程度になる時期とほぼ同じであるのが認められた。このことから空中露出による貝の生理状態に与える影響は杆晶体の変化からみると2日後ではすでに認められないが，閉殻筋乳酸量や血糖値の変化から考察すると，空中露出の影響はまだ続いているものと考えられる。

要 約

1) 9月～10月に24時間の空中露出を与えて，空中露出中および海水に戻した後に起こるアコヤガイ体内における生理的变化を血液 pH，血清 Ca，心臓はく動数，酸素消費量，杆晶体重量，閉殻筋乳酸量および血糖について調べた。

2) 空中露出中において血液 pH，心臓はく動数，閉殻筋乳酸量および血糖は減少し，血清 Ca は血液 pH と逆の動向を示した。

3) 海水中に戻した後，心臓はく動数および酸素消費量において一時的な生理的亢進を認め，また血糖において杆晶体では認めることができない比較的長期（11～13日間）の変化を認めた。

文 献

- 1) 堀口吉重 1960. アコヤガイおよびイケチョウガイの生化学的研究—XI. 貝の各組織における有機酸について. 日水誌16(7): 695—700.
- 2) Kobayashi, S. 1928. Lactic acid and glycogen in the adductor muscles of the oyster, *Ostrea circumpecta* Pils. Sci. Rept. Tohoku Imp. Univ. 4. Fas. 2: 193—205.
- 3) Kokubo, S. 1929. Studies on the pH and the CO₂-content of the blood, pericardial fluid, and the body fluid of the oyster with special reference to their response to the altered condition of sea water. Sci. Rept. Tohoku Imp. Univ. 4: 207—258.
- 4) 森主一 1948. アコヤガイの日週期活動. 貝類学雑誌15(1—4): 46—51.
- 5) 太田繁・清水進平 1961. 真珠の品質に及ぼす貝掃除のための空中露出時間の影響. 国立真珠研報 6: 688—694.
- 6) 植本東彦 1961. アコヤガイのそう核手術に関する生理学的研究 1—Ⅲ. 国立真珠研報 6: 619—635.
- 7) 横田竜雄・広吉正昭 1949. マガキ稚貝の空中活力について. 日水誌 15(11): 632—634.

アコヤガイ貝殻の病害に関する研究

II. アコヤガイ貝殻に出現する主要加害種 *Polydora ciliata* (Johnston) の季節的消長について*, **

水 本 三 郎
国 立 真 珠 研 究 所

海産二枚貝の貝殻内面に腫物状隆起あるいは黒斑の異常分泌を形成する病害については、数種類の貝について古くから研究されているが^{2, 3, 4, 6, 8)} その加害種としては多毛類 *spio* 科の 1 種 *Polydora sp.* によるものであるとされている。

真珠養殖母貝のアコヤガイにおいても数年来この種の貝殻の病害が発生し、最近においては全国各地の養殖漁場にみとめられるようになり、本業にとってもきわめて憂慮される状態にたちいたっている。この病害の対策をはかるため、さきにアコヤガイ貝殻の病害の実態、病原虫の種類およびこの駆除法について研究した結果、アコヤガイにおける主要加害種は *Polydora ciliata* であり、本種の貝殻への穿孔、潜棲によってひき起こされる疾病であることを明らかにした。また当面する本病虫の駆除方法としては濃食塩水への浸漬法がきわめて有効な処理であることを究明し、最近においてはこれにもとづいた駆除処理が各地の真珠養殖漁場で実施されるようになった。しかしこのような当面する駆除処理の実施やさらには漁場環境を主体とした予防方法の確立をはかるためには、病害虫の繁殖期や侵入期等の季節的な関連を明らかにすることがきわめて重要な問題となる。この意味から今回アコヤガイ貝殻を生息の場とする本種の周年にわたる消長、とくに幼生付着期、組成群の変化、虫体の成長について研究し、当面する駆除処理や防除の対策をはかる上に、2, 3 の知見を得たので、その概要を報告する次第である。報告にあたり終始指導と助言を賜わった国立真珠研究所太田繁所長に感謝の意を表する。また本研究を進めるに当たって、資料の提供、管理ならびに運搬等について、三重県真珠貝養殖漁業協同組合長協専一氏、同組合山口菊男氏はじめ組合員の諸氏に一方ならぬ配慮と協力をいただいた。ここに記して深謝する次第である。

材料および研究方法

供試したアコヤガイは三重県五ヶ所湾産母貝で、罹虫、病害の少ない満 1 年 (1部2年)

* Saburo Mizumoto. Studies on the disease of the shells of pearl oyster (*Pinctada martensii*).
II. On the seasonal variation in occurrence *Polydora ciliata* in shells of pearl oyster. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 11: 1368—1377. 1966.

** 国立真珠研究所業績 No. 153 (国立真珠研究所報告 11: 1368—1377. 昭和41年11月)

生貝1,500個である。これらを1965年7月中旬本病の被害の多い三重県鳥羽湾に搬入し、以後初年度(1965)は7月下旬から10月下旬まで、次年度(1966)は6月中旬から9月下旬までそれぞれ同湾で養殖した(この間冬期を中心とした11月から5月までの期間については避寒のため、三重県南島町古和へ移殖した)。これらの資料について毎月1回、各年令貝につき5~10個体ずつを採取し、貝殻に生息する *Polydora ciliata* の出現消長、体節組成、虫体の抱卵状況、ならびに産着卵の状態を観察測定した。なお経続的な調査の対象とした資料は主として満1年貝から2年貝にいたる母貝であるが、このほか罹虫、罹病の状況を補足的に調査するため、漁場実際に養殖中の満2年以上の貝についても適宜供試した。

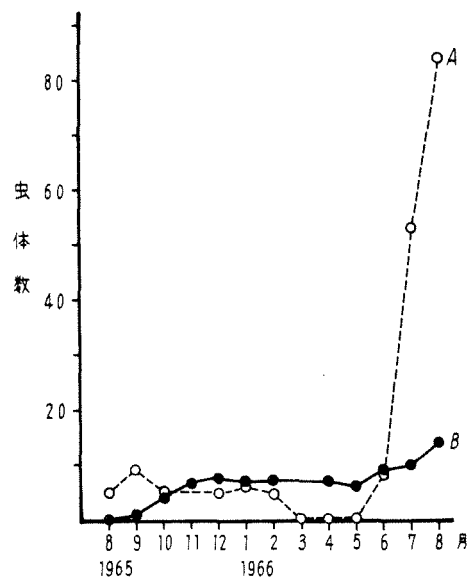
虫体の採集は貝殻外面の場合は検鏡により殻面上に生息するすべての虫体を、貝殻内の場合は疾病部の貝殻を破断し、泥管内の虫体を採取した。採取した虫体は生体のまま体節数(大きさの表現は体節数によった)、抱卵の状況を、また泥管内に egg sac のある場合は sac の数、sac 内の卵数を計測した。

観察および結果

1. 虫体の着生数の変化

Polydora ciliata のアコヤガイ貝殻外面における着生は必ず何らかの遮蔽物の陰にその生息の場をかまえている。この貝殻面の着生拠点はおもに鱗片状薄片であり、通常この薄片内側面の基底部に沿った貝殻面上に細長い泥管を造巢して生息している。しかしときには他の付着生物、フジツボ *Balanus* sp., カサネカンザシ *Hydroides norvegica*, ウズマキゴカイ *Spirorbis* sp., などの側板、棲管の側面や貝殻との付着下面に泥管を作り生息しているのも比較的多くみとめられた。着生当初の幼虫はこの鱗片状薄片間に泥管を幾分長めに突き出した状態で着生しているが、次第に泥管を伸長し、着生基盤を貝殻面上に移動する。このような状態になると泥管と貝殻とが密着している部分には虫によって侵蝕された溝道が作られ、泥管はこの中に埋没した状態となっている。一方完全に貝殻内に穿孔、潜入した状態のものでは貝殻外面の溝が孔道の口となり、これより泥管の主体は完全に貝殻内に埋没している。

いまこのような貝殻外面、貝殻内のそれぞれに生息する *Polydora ciliata* について、継続調査資料の満1年貝から2年貝にわたる周年を通じての生息虫数の変化をみると第1図のとおりとなる。図は母貝10個あたり(1966年7月、8月のみ5個体)の平均生息虫数で示してあるが、これによると虫体数は試験開始当初の8月(平均4尾)、9月(平均9尾)にかけて1つの山が見られる。ついで10月になりこの外面生息数は急に減少し、これにかかわって貝殻内の生息虫数(平均4~5尾)が次第に増加している。このことは8月以後着生した虫体がこの時期を中心として逐次貝殻内に侵入したことを示している。11月以後は貝殻内の虫数は僅かずつ増加しながら越冬するが、これに対し外面生息虫数は3月(平均5尾)から5月にかけて減少し、年間を通じて最小の生息数(平均1尾)となる。事実この時期の貝殻外面には、虫体の生息がみられない侵蝕溝が多数観察されており、この生息数の減少の原因が冬期間の自然的減耗か、着生場所の環境の不適による他の場所への脱出、移動によるものか、今のところ明らかでない。6月にいたり生息虫は外面、貝殻内ともに



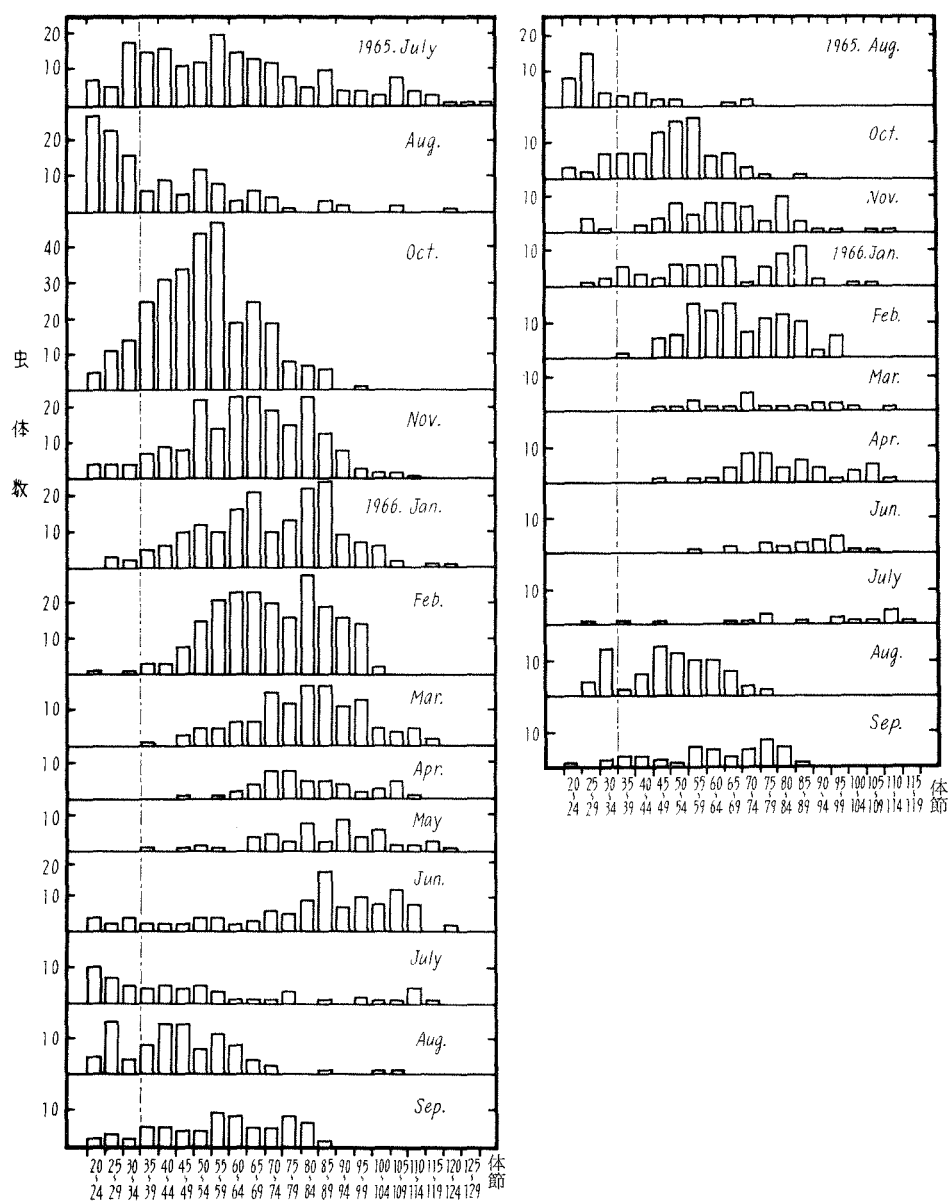
第1図 アコヤガイ貝殻に出現する *Polydora ciliata* の周年変化
A, 貝殻外面生息数 B, 貝殻内の生息数

再び増加しはじめるが、とくに外面の生息虫数は6月から8月にかけて急増し、なかでも6月（平均8尾）から7月（平均53尾）にいたる虫体の出現は特徴的である。したがって両年を通じともに8～9月に生息数の最大がみられる。これに対し貝殻内生息虫数は6月（平均11尾）以後逐次増加を示し、とくに8月にいたりその数が増加する傾向がみとめられた。これは6月～7月にかけて急激に出現した外面の生息虫が貝殻内に逐次侵入移動したものと考えられる。これらの生息虫数は漁場により、貝の年令により著しい差がみとめられるが今回の資料の貝殻外面虫数についてみると、満1年生貝（1965年9月）で貝1個体4～16尾、平均9尾に対し満2年生貝（1966年8月）では65～105尾、平均83尾となり、約8倍の着生をみており、高年次貝になるほど着生量が増加する傾向がみとめられた。

2. 幼虫の出現時期

1965年7月より1966年9月までの間、継続して試験養殖した満1年生貝を主体とし、これに同じ漁場で実際に養殖している満1年～3年生貝の資料を加えて、これらの貝殻に出現する *Polydora ciliata* の体節を毎月測定した。その経月的な組成分布の詳細は第2図に示したとおりである。図の右側は周年を通じて資料の整った主として満1年生貝から2年生貝にわたる経年的な月別体節組成の結果を示したものであり、左側は満1～3各年令貝の虫体を一諸にして月ごとにまとめたものである。

なお大きさの指標として体節数をもちいたが全体長 (Lmm) と体節数 (S) との関係は $L = 1.952 \times 0.00775^S$ の式で現わすことができる（第3図）。第2図からまず体節35節以下の幼虫の出現傾向をみると、6月頃より若干の幼虫が出はじめるが、とくに7～8月の夏季を中心とした時期に集中して、かなり大量に出現する。以後次第に減少するが、2月までの冬季を中心とした期間にも継続的に少数の幼虫の出現がみられる。この間の幼虫の出

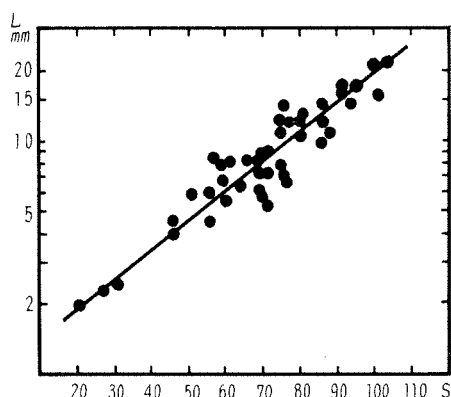


第2図 体節組成の月別変化

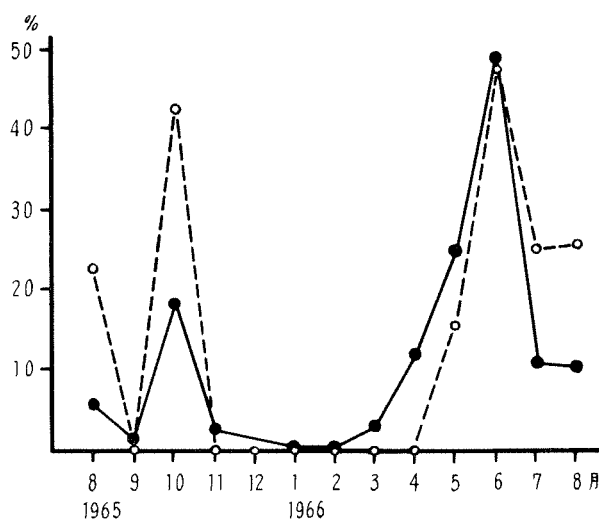
左図、満1年～3年生貝の貝殻に出現した虫体

右図、満1年生貝の貝殻に出現した虫体

現率を各月の組成分布からみると、冬期11～2月の幼虫の出現は7～8月のそれに比べるとはるかに小さく、7～8月には20～52%に対し、11～2月ではわずかに1～6%にすぎない。その他の3～5月の時期では幼虫の出現は皆無に近い状態となる。



第3図 全体長と体節との関係
L……全体長 S……体節



第4図 抱卵虫体, egg sac の月別出現率
● 抱卵虫体 ○ egg sac

以上のことから貝殻への幼虫の着生は6月から2月までの期間継続的に行なわれているようであるが、とくに幼虫の着生期としては夏季7～8月の大量な着生期と、冬季を中心とした11～2月の継続的な少量着生期との2回に大きく分けられるようである。

3. 産卵期と産卵および着生幼虫群

さきに *Polydora ciliata* の産卵期は⁵⁾4～8月の間で、盛期は5月中旬から7月中旬であるが、10月下旬頃までは軽度の産卵が行なわれると述べたが、今回虫体組成の季節的变化とともにこれら虫体の抱卵状況, egg sac の産着状況の季節的变化について調査した結果, 第4図, 第1表に示すとおり, 抱卵虫体および泥管内の egg sac の出現経過からみて, 本種の産卵期は5月(平均水温 19.4°C)～7月(22.5°C), とくに6月で前報と一致するが,

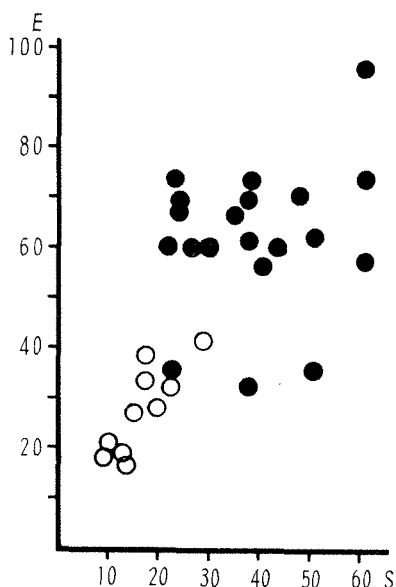
第1表 抱卵虫体, egg sac の月別出現変化

体 節 \ 月	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8
20 ~ 24												
25 ~ 29												
30 ~ 34												
35 ~ 39												
40 ~ 44	2	1	2									
45 ~ 49			1									
50 ~ 54			1									2
55 ~ 59			5							2		1
60 ~ 64	1		1	2								4
65 ~ 69			8					1	1	1		
70 ~ 74	1	1	7	1								
75 ~ 79	2						1		1	4	1	
80 ~ 84			1	1				1	2			
85 ~ 89	1			1				1	1	10	1	
90 ~ 94						1			1	6		
95 ~ 99								1	1	4	1	
100 ~ 104							2	1	2	4	1	
105 ~ 109								1	3	5	2	
110 ~ 114	1						1		1	7	2	
115 ~ 119										1		
120 ~ 124												
125 ~ 129	1											
130 ~ 134												
135 ~ 139										2		
抱卵虫体数	9	2	26	5	0	1	4	6	13	46	8	7
egg sac の数	2	0	11	0	0	0	0	0	2	22	2	2
調査虫体数	196	128	203	209	180	213	129	49	55	95	42	109
平均水温 (°C)	22.5	22.6	20.4	19.5	13.5	15.6	16.3	16.1	19.4	21.6	22.5	24.3

□… egg sac を泥管内に産着していた虫体の範囲。

さらに秋季10月 (20.4°C) の小さな産卵の山が確かめられた。いまこの産卵期と前述した着生幼虫の出現経過とを対比すると, 7~8月の大量の着生幼虫群は6月の産卵個体群に由来し, 11~2月の少量な幼虫の出現は10~11月の産卵個体群に由来するものと推定される。したがって貝殻上には常にこの2つの産卵個体群に由来する虫体が混在して生息していると考えられる。

これら2つの産卵期における抱卵虫体を体節別にみると(第1表), 5~7月の夏季における産卵盛期の虫体は, 55~139体節, とくに egg sac をもっていた虫体は 75~114 節と, 比較的大型の虫体群であるが, 8月以後引き続き継続的な産卵では次第に小型の虫体となり, 秋季10月の産卵群では 40~84 節, egg sac のある虫体は 55~74 節となって, 前者に比し小型となっている。したがって泥管内に産着される egg sac も 5~6月産卵群



第5図 産卵期別の虫体の産卵比較

● 6月産卵群 S..... sac 数
○ 10月産卵群 E.....1 sac の卵数

のものでは sac 数 23~61, 1 sac 内卵数 32~95粒に対し, 10月産卵群は sac 数 9~29, 1 sac 内卵数 17~41 粒となり, 10月産卵群は小さい産卵量となっている (第5図)。このように年2回の産卵期は同一の個体群によるものでなく, 夏季に産卵期を有する個体群, 秋季に産卵期を有する個体群とは, 体型および産卵量によって区分がみとめられる。

4. 群 組 成

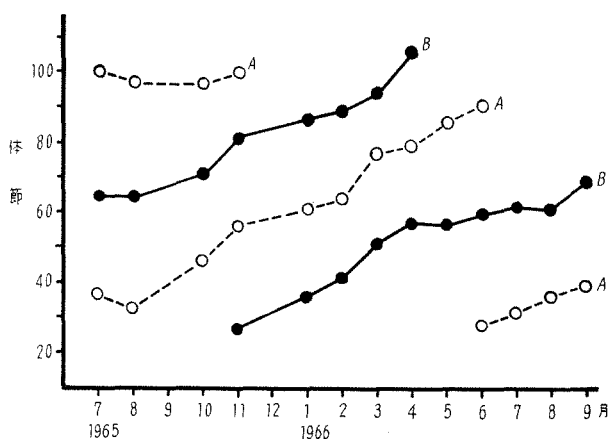
ここで前述した各産卵群および着生幼虫群の虫体組成に基づいて, 第2図(左図)から経月的に組成群を追跡してみることにする。まず1965年7月における組成分布資料では, 20~49節, 50~89節, そして90節以上と3つの群に大きく分けられるようである。このうち20~49節の小型の虫群はあきらかに当年発生の幼虫群であり, 86節以上の大型の虫群は夏季抱卵虫体の体節範囲からみて, 前年夏の発生群で, 一部の個体ではなお産卵中のものと考えられる。この両者の中間にある50~84節の群は, 後の組成分布の経月移動および産卵虫体の体節範囲などからみて, 前年秋の産卵群を主体とし, これに当年の早期発生(春季)群が添加した群と考えられる。これらの各群について以後の経月的な虫群の移動をみると, 8月の当年発生群の多量な着生期を経て10月にいたり, 前年6月発生した大型群は産卵後次第に貝殻から姿を消し, 貝殻の虫体群は主として当年発生群(20~55節)と前年秋季および当年早期(春季)の混成群の2群となり, これらが重複して大きな1つの山となって出現する。このうち55節以上の大型群には抱卵虫体がみとめられ, 泥管内には egg sac が出現して秋季の産卵が開始される。11月以後になると前年秋季および当年早期発生の混成群は次第にその組成割合が減少し, かわって当年夏発生群が主体となってくる。これとともに当年秋季発生の幼虫群(35節以下)が以後2月頃まで少量ながら継続的にみとめられ

るようになる。4～5月の間は貝殻に出現する虫体数は年間を通じて最小となる。前年秋季を主体とした発生群はこの時期にはいまだわずかながらみとめられるが、5月以後貝殻からまったく姿を消してしまう。6月に至り前年秋季の発生群は40～70節、前年夏の発生群は70～110節とそれぞれ成長し、このうち70節以上の大型群が夏季の産卵に関与する。これとともに当年早期発生 of 幼虫群の着生が始まり、以後7月、8月の大量な幼虫着生期へ入る。ここで特異的なのは7～9月にかけての前年秋季発生群を主体とした中型個体（55～89節）の急激な出現である。この群は3～5月の資料ではきわめて小さな出現率を示していたが、6～10月、とくに7～9月にかけて急激に増加する。この傾向は両年にわたってみとめられ、とくに満2年貝において著しいことが観察される。

以上のようにアコヤガイ貝殻における *Polydora ciliata* の組成群の経月変化から考えると、アコヤガイ貝殻には年2回の産卵に由来する虫体群、1つは6月の産卵に由来する主体群、いま1つは秋季10～11月の産卵に起因するもの（この群はとくに6～9月に急激に貝殻に出現する）ならびにこれに一部その年早期に発生した虫が添加した群、の2つの構成群が存在するものと考えられる。

5. 成 長

前述の各月の構成群はその体節組成分布の経月移動によってかなり明瞭な成長過程を推察することができる。第2図から各群別の体節の平均値を求め、その経月移動を見ると第6図のような成長傾向がみとめられる。これによると *Polydora ciliata* の体節成長は夏季



第6図 アコヤガイ貝殻における *Polydora ciliata* の成長度
A, 7～8月着生群 B, 11～2月および春早期着生との混在群

発生群では生後1年で平均91節、秋季を主体とした発生群では平均81節となり、全体長に換算してそれぞれ 14.0mm, 10.9mm となる。

考 察

Polydora ciliata の繁殖とくに周年にわたる 虫体組成の変動（産卵群や成長）に関しては、Dorset¹⁾ (1961) が Whitstable 海岸の London Clay 中に生息する本種について報

告し、同地においては3月下旬の着生幼虫群 (early-breeding group) と5月の着生幼虫群 (later-breeding group) との2つの群からなり、これらの2群には形態上の特徴はなく、産卵期と産卵量の相違によって区別されたとのべている。今回のアコヤガイ貝殻における本種の出現消長にも6月の産卵に由来し7～8月に着生する群と、10～11月の産卵に由来し11～2月に着生したものに一部早期(春季)に発生したものが添加した群の2群の存在が推定された。しかしこれらのうち年間を通じ貝殻に生息するのは主として7～8月の着生群であり、後者の群は6～9月の間に急激に出現し、前者より比較的短期間に減少して行く傾向がみられたのが特徴的であった。このような貝殻への急激な、しかも多量な出現は、アコヤガイ以外の他の生息場所から時期的に多数の転居が行なわれていることを暗示している。アコヤガイ以外の貝、カキ、ヒオオギなどに生息しているものを多数採取したことから、時期的に移動してアコヤガイ貝殻に転居するのではないかとも思われるが、このような本種の他の発生原とアコヤガイへの罹虫関係を明らかにすることは、病害防除対策を行なう上で、きわめて重要な点となるので引き続いて研究を行なう予定である。

幼虫の着生期については前述のとおり6～2月にかけて継続的にみられ、このうちとくに多量な着生を見るのは7～8月である。これにつづく11～2月の着生は前者に比べきわめて低い出現率を示している。これは産着 egg sac の数および卵数の減少による産卵量の低下やまたこの時期における貝殻外面上の付着生物相、とくにフサコケムシ *Bugula* sp. や海藻が繁茂期にあるため、幼虫の着生基盤としての貝殻が不適な状態を形成していることによるためではないかと考えられる。

ここで当面する駆虫方法として各地で実施されている濃食塩水処理の実施時期について検討すれば、以上のようなアコヤガイ貝殻への虫体の着生期、出現消長から考慮して、加害主体となる虫体が、多数出現する6～9月に行なうのが妥当ではないかと考えられる。

要 約

アコヤガイ貝殻に出現する *Polydora ciliata* の季節的消長を調査した。

- 1) 本種の周年にわたる生息数の変化は8～9月に最も多く出現し、3～5月では最小となる。
- 2) 幼虫の貝殻への着生期は夏季7～8月と冬季11～2月の2回見られるが、前者は6月の産卵群に由来し、後者は10～11月の産卵群に由来するものと推定され、かつ後者の貝殻への着生量はきわめて少ない。
- 3) 貝殻に出現する虫体は夏季6月の産卵に起因する群、秋季10～11月の産卵によるものに一部春季に発生した虫が添加した群、の2つの虫体群が生息するものと推定されるが、後者は7～9月にかけて急激に出現するのが特徴的である。
- 4) このような貝殻への時期による急激な出現は本種がアコヤガイ以外の他の発生原から生息場所を移動するのではないかと考えられる。
- 5) 本種の成長を虫体組成の経月移動から群別にみて、7～8月の着生群は発生後満1年で平均91節、全体長に換算して14.0mm、11～2月と春季早期に着生した群は平均81節、10.9mmになる。
- 6) 以上の貝殻における本種の出現経過から考えて、駆除処理の適期としては6～9月が

妥当と考えられる。

参 考 文 献

- 1) Dorset, D.A. 1961. The reproduction and maintenance of *Polydora ciliata* (Johnston) at Whitstable. Jour. Mar. Biol. Assoc. U.K. 41: 383—396.
- 2) 木下虎一郎 1949. ホタテガイの増殖に関する研究 56—65.
- 3) Korringa, P. 1951. The shell of *Ostrea edulis* as a habitat. Arch. Neerl. Zool. 10: 99—135.
- 4) 正垣幸男 1936. 赤貝の真珠核 Polychaeta. 科学 6: 275—276.
- 5) 水本三朗 1964. アコヤガイ貝殻の病害に関する研究 I. 貝殻に侵入する多毛類の種類および病害の状況とその駆除法について. 国立真珠研報 9: 1143—1154.
- 6) Takahashi, K. 1937. Notes on the polychaeta Annelid, *Polydora pacifica* n.sp. which bores holes in *Pinctada margaritifera* (Linne). Palao Torropical Biological Station. Studies I: 155—167.
- 7) Wilson, D.P. 1928. The larvae of *Polydora ciliata* Johnston and *Polydora hoplura* Claparede. Jour. Mar. Biol. Assoc. 15: 567—596.
- 8) Yonge, C.M. 1960. Oyster. Collins London.

貝殻コンキオリンのアミノ酸組成にみられる 分類学的差異*

和田 浩 爾

(1965 年 12 月 13 日受理)

TAXONOMIC MODIFICATION OF AMINO ACID COMPOSITION IN THE PROTEINS OF MOLLUSCAN SHELLS.

Koji WADA**

A comparison of amino acid composition was made on the proteins from different structural units of two shells of Cephalopoda, of three shells of Gastropoda, and of five shells of Bivalvia for exploring the taxonomic and ecological modifications in the amino acid pattern. The conchiolin matrix obtained from a decalcified shell was put in a glass tube containing 2 ml. of a 6N hydrochloric acid solution, sealed and then hydrolysed for 22 hours at 110°C. The hydrolyzate of conchiolin was treated according to an usual way for an automatic amino acid analysis.

The conchiolin of any given species appears to have a specific amino acid pattern, though the pattern varied considerably between non-mineralized and mineralized layers of a same shell (Fig. 1). They may be clearly classified in amino acid composition under the three groups of Cephalopoda, Gastropoda and Bivalvia.

Such ecological elements as food habits and environments do not seem to disturb the proper amino acid patterns which the groups of animals possess.

コンキオリンは貝殻中に含まれる蛋白質の通称で、おそらく貝殻形成組織の上皮によつて生合成され、分泌後変性して形成された外胚葉性生成物である。17世紀中期より、その性質が組織化学的あるいは生化学的に分析され、近年に至つてペーパークロマトグラフィーによりアミノ酸組成の全容が明らかにされ、コンキオリンはスクレロプロテインの一種であることが示された (ROCHE *et al.*, 1951; GRÉGOIRE *et al.*, 1955; TANAKA *et al.*, 1960)。GRÉGOIRE *et al.* (1955) は頭足類、腹足類および斧足類の貝殻 (真珠層) 蛋白質の比較生化学的および形態学的研究をおこない、コンキオリンは水溶性蛋白、ペプチッドおよびスクレロプロテインからなるレース状構造の膜で、そのレース状枠取は分類学的特徴をあらわすと報告している。また TANAKA *et al.* (1960) はアコヤガイ貝殻真珠層コンキオリンの N 末端および C 末端アミノ酸をそれぞれ DNP 法およびヒドラジン分解法で調べた結果、いずれもグリシンが多く、このほか N 末端にセリンとアスパラギン酸の少量を、また C 末端にはセリンとトレオニンの少量を検出している。その後イオン交換樹脂カラムをもつたアミノ酸自動分析装置の開発利用によつてその分析結果の精度は飛躍的にあがつている (HARE, 1963; TANAKA *et al.*, 1963)。

一方、コンキオリンのアミノ酸組成が単一種の貝殻構造単位間 (BEEDHAM, 1958)、単一貝殻殻皮層の異なる位置間 (HARE, 1963)、鉱物相の異質層間 (ROCHE *et al.*, 1951; HARE, 1963; TANAKA *et al.*, 1963; WADA, 1966 a, b)、および斧足類の異種間 (RUCKER, 1965) でそれぞれ部分的に変動することが指摘されている。

* 国立真珠研究所業績 第 143 号

** 国立真珠研究所 (National Pearl Research Laboratory, Mie, Japan)

筆者は軟体動物石灰化組織における炭酸石灰の同質異形形成機構および鉱物結晶核生成開始機構の研究の一環として、先報¹⁰⁾および先々報⁹⁾において頭足類、腹足類および斧足類の貝殻コンキオリンの氨基酸組成を調べ、蛋白質質の鉱物化におよぼす機能的役割を追究した。その際、これら3群間および異種間における氨基酸組成の部分的変化に分類学的意義を認めたので、ここに改めて報告する。

材料および方法

アミノ酸定量分析に使用した材料および方法は先報および先々報のとおりである。すなわち頭足類2種、腹足類3種および斧足類5種の貝殻コンキオリンで、その分類学的位置、食性、分析した貝殻部分と鉱物相および採集地を列挙してみると下記のごとくである。

種	類	食性	分析部分	鉱物相	採集地
頭足類					
カ イ ダ コ	<i>Argonauta argo</i>	肉食性	貝殻全体*	カルサイト	若狭湾
コ ウ イ カ	<i>Sepia esculenta</i>	肉食性	{horny plate spongy body}	非鉱物 アラゴナイト	三重県
腹足類					
テ ン グ ニ シ	<i>Hemifusus terneatanus</i>	肉食性	殻皮層	非鉱物	英虞湾
ア ワ ビ	<i>Haliotis discus</i>	植食性	{殻皮層 真珠層}	非鉱物 アラゴナイト	三重県
ウ シ ノ ツ メ	<i>Cellana nigrolineata</i>	植食性	calcitrostracum	カルサイト	英虞湾口
斧足類					
ハ マ グ リ	<i>Meretrix meretrix lusolia</i>	プランクトン	殻皮層	非鉱物	三重県
イケチョウガイ	<i>Hyriopsis schlegeli</i>	プランクトン	{殻皮層 真珠層}	非鉱物 アラゴナイト	ビワ湖
ハボウキガイ	<i>Pinna attenuata</i>	プランクトン	真珠層	アラゴナイト	英虞湾
マ ガ キ	<i>Ostrea gigas</i>	プランクトン	calcitrostracum	カルサイト	英虞湾
ナミマガシワ	<i>Anomia lischkei</i>	プランクトン	calcitrostracum	カルサイト	英虞湾

貝殻は軟体部を除いて出来るかぎり十分に附着物を除去し、淡水で洗い自然乾燥した。この貝殻の薄片を切りとり、脱灰前あるいは後にそれぞれ必要とするところの構造単位 (horny plate, spongy body, calcitrostracum, 殻皮層および真珠層) を注意深く分離した。脱灰は 3M の氷酢酸で室温にて 1~3 日間おこない、その間 1~3 回脱灰液を交換した。脱灰して得たコンキオリンは蒸留水で数回洗滌し、乾燥後約 5mg になるように精秤し、2ml の 6N 塩酸の入っている試験管にとり、封管して 110°C の恒温器で 22 時間加水分解をおこなった。加水分解物は湯煎上で 3 回蒸発乾固した後、正確に 5ml の 0.2N クエン酸緩衝液 (pH 2.2) に溶かし、分析に供した。

アミノ酸分析は KLA-2 型日立アミノ酸分析計を使用しておこなった。

実験結果

分析結果は先報¹⁰⁾および先々報⁹⁾の Table 1 にそれぞれ示してある。これらの Table 中に示した全残基数 1000 あたりのアミノ酸残基数をもつて、各種類の貝殻コンキオリンに含まれる各アミノ酸残基数の多少関係を鉱物相別に不等号で示すと下記ようになる。

I. 脂肪属モノアミノモノカルボン酸

1. グリシン

i) 非鉱物化層: *Hyriopsis* > *Meretrix* > *Haliotis* > *Hemifusus* > *Sepia*

* 殻皮層を含むと思われる。

- ii) アラゴナイト層: *Hyriopsis* > *Pinna* > *Haliotis* > ***Sepia***
 - iii) カルサイト層: *Anomia* > *Cellana* > *Ostrea* > ***Argonauta***
2. アラニン
- i) 非鉄物化層: ***Sepia*** > ***Hemifusus*** > *Haliotis* > *Meretrix* > *Hyriopsis*
 - ii) アラゴナイト層: *Pinna* > *Hyriopsis* > *Haliotis* > ***Sepia***
 - iii) カルサイト層: *Anomia* > ***Argonauta*** > *Cellana* > *Ostrea*
8. バリン
- i) 非鉄物化層: ***Sepia*** > ***Hemifusus*** > *Hyriopsis* > *Meretrix* = *Haliotis*
 - ii) アラゴナイト層: ***Sepia*** > *Haliotis* > *Pinna* > *Hyriopsis*
 - iii) カルサイト層: ***Argonauta*** > *Anomia* > *Ostrea* ÷ *Cellana*
4. ロイシン
- i) 非鉄物化層: ***Hemifusus*** > ***Sepia*** > *Hyriopsis* > *Meretrix* > *Haliotis*
 - ii) アラゴナイト層: *Hyriopsis* > ***Sepia*** > *Pinna* > *Haliotis*
 - iii) カルサイト層: *Anomia* > *Cellana* > ***Argonauta*** > *Ostrea*
5. イソロイシン
- i) 非鉄物化層: ***Hemifusus*** > ***Sepia*** = *Haliotis* > *Hyriopsis* > *Meretrix*
 - ii) アラゴナイト層: ***Sepia*** > *Pinna* > *Hyriopsis* > *Haliotis*
 - iii) カルサイト層: ***Argonauta*** > *Anomia* > *Cellana* > *Ostrea*
- II. 脂肪族オキシアミノ酸
1. セリン
- i) 非鉄物化層: ***Sepia*** > ***Hemifusus*** > *Hyriopsis* > *Meretrix* > *Haliotis*
 - ii) アラゴナイト層: ***Sepia*** > *Pinna* > *Hyriopsis* > *Haliotis*
 - iii) カルサイト層: *Ostrea* > *Anomia* > ***Argonauta*** > *Cellana*
2. トレオニン
- i) 非鉄物化層: ***Sepia*** > ***Hemifusus*** > *Haliotis* > *Meretrix* > *Hyriopsis*
 - ii) アラゴナイト層: ***Sepia*** > *Hyriopsis* ÷ *Haliotis* > *Pinna*
 - iii) カルサイト層: ***Argonauta*** > *Anomia* > *Ostrea* > *Cellana*
- III. 芳香族アミノ酸
1. フェニルアラニン
- i) 非鉄物化層: *Meretrix* > ***Hemifusus*** > *Hyriopsis* > *Haliotis* > ***Sepia***
 - ii) アラゴナイト層: *Hyriopsis* > *Haliotis* > *Pinna* > ***Sepia***
 - iii) カルサイト層: ***Argonauta*** > *Cellana* > *Anomia* > *Ostrea*
2. チロシン
- i) 非鉄物化層: *Hyriopsis* > *Haliotis* > *Meretrix* > ***Sepia*** > ***Hemifusus***
 - ii) アラゴナイト層: ***Sepia*** > *Pinna* > *Hyriopsis* ÷ *Haliotis*
 - iii) カルサイト層: *Cellana* > *Ostrea* > ***Argonauta*** > *Anomia*
- IV. イミノカルボン酸
1. プロリン
- i) 非鉄物化層: ***Sepia*** > *Haliotis* > *Meretrix* > *Hyriopsis* > ***Hemifusus***
 - ii) アラゴナイト層: ***Sepia*** > *Haliotis* > *Pinna* > *Hyriopsis*
 - iii) カルサイト層: *Ostrea* > ***Argonauta*** > *Cellana* > *Anomia*
- V. 塩基性アミノ酸
1. リジン

- i) 非 鈣 物 化 層: *Hemifusus* > *Sepia* > *Haliotis* > *Hyriopsis* > *Meretrix*
- ii) アラゴナイト層: *Sepia* > *Hyriopsis* > *Haliotis* > *Pinna*
- iii) カルサイト層: *Argonauta* > *Anomia* > *Cellana* > *Ostrea*

2. アルギニン

- i) 非 鈣 物 化 層: *Meretrix* > *Hemifusus* > *Haliotis* > *Hyriopsis* > *Sepia*
- ii) アラゴナイト層: *Haliotis* > *Hyriopsis* > *Pinna* > *Sepia*
- iii) カルサイト層: *Cellana* > *Anomia* > *Ostrea* > *Argonauta*

3. ヒスチジン

- i) 非 鈣 物 化 層: *Sepia* > *Hyriopsis* > *Hemifusus* > *Haliotis* > *Meretrix*
- ii) アラゴナイト層: *Sepia* > *Hyriopsis* > *Haliotis* > *Pinna*
- iii) カルサイト層: *Argonauta* > *Cellana* > *Ostrea* > *Anomia*

VI. 酸性アミノ酸

1. アスパラギン酸

- i) 非 鈣 物 化 層: *Haliotis* > *Hemifusus* > *Sepia* > *Meretrix* > *Hyriopsis*
- ii) アラゴナイト層: *Haliotis* > *Sepia* > *Pinna* > *Hyriopsis*
- iii) カルサイト層: *Ostrea* > *Cellana* > *Anomia* > *Argonauta*

2. グルタミン酸

- i) 非 鈣 物 化 層: *Haliotis* > *Hemifusus* > *Sepia* > *Meretrix* > *Hyriopsis*
- ii) アラゴナイト層: *Sepia* > *Haliotis* > *Hyriopsis* > *Pinna*
- iii) カルサイト層: *Argonauta* > *Anomia* > *Ostrea* > *Cellana*

VII. 含硫アミノ酸

1. メチオニン

- i) 非 鈣 物 化 層: *Meretrix* > *Sepia*
- ii) アラゴナイト層: *Hyriopsis* ≡ *Haliotis* > *Sepia* > *Pinna*
- iii) カルサイト層: *Argonauta* > *Ostrea* • *Cellana*

2. シスチン

Argonauta にもみ相対的に多量に認められた。

3. システイン

- i) 非 鈣 物 化 層: *Meretrix* > *Sepia* > *Hemifusus* > *Hyriopsis* > *Haliotis*
- ii) アラゴナイト層: *Sepia* > *Pinna* > *Haliotis* > *Hyriopsis*
- iii) カルサイト層: *Ostrea* > *Argonauta* > *Cellana* > *Anomia*

また頭足類、腹足類および斧足類の3群間における各アミノ酸の含有量の相対的大小の関係を比較して図示すると Fig. 1 のようになる。

前記の不等式から貝殻蛋白質は種特有のアミノ酸像を持っていることは明らかであるが、同一環境に生息する異種間にアミノ酸像の何らの類似も認められなかつた。例えば *S. esculenta* は他種とは著しく異なるアミノ酸組成を示し、*A. argo* はシスチンの、*M. meretrix lusolia* の殻皮層はメチオニン、アルギニンおよびシステインの相対的に大きな含有量によつてそれぞれ特徴づけられている。また *C. nigrolineata* の *calcitostacum* のアミノ酸組成は相対的に多量のグリシンおよび相対的に少量のグルタミン酸を含んでいる点で他の腹足類のアミノ酸組成と異なるという特徴があり、*H. terneatanus* の殻皮層はトレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびリジンの相対的に大きな量を含んでいる点で他の腹足類と区別されており、またチロシンが非常に少ないので他種の殻皮層と著しい差を生じている。

以上のようにコンキオリンのアミノ酸組成は種特有の像を示しているが、頭足類、腹足類および斧足類の

* 太字の種は肉食性である。

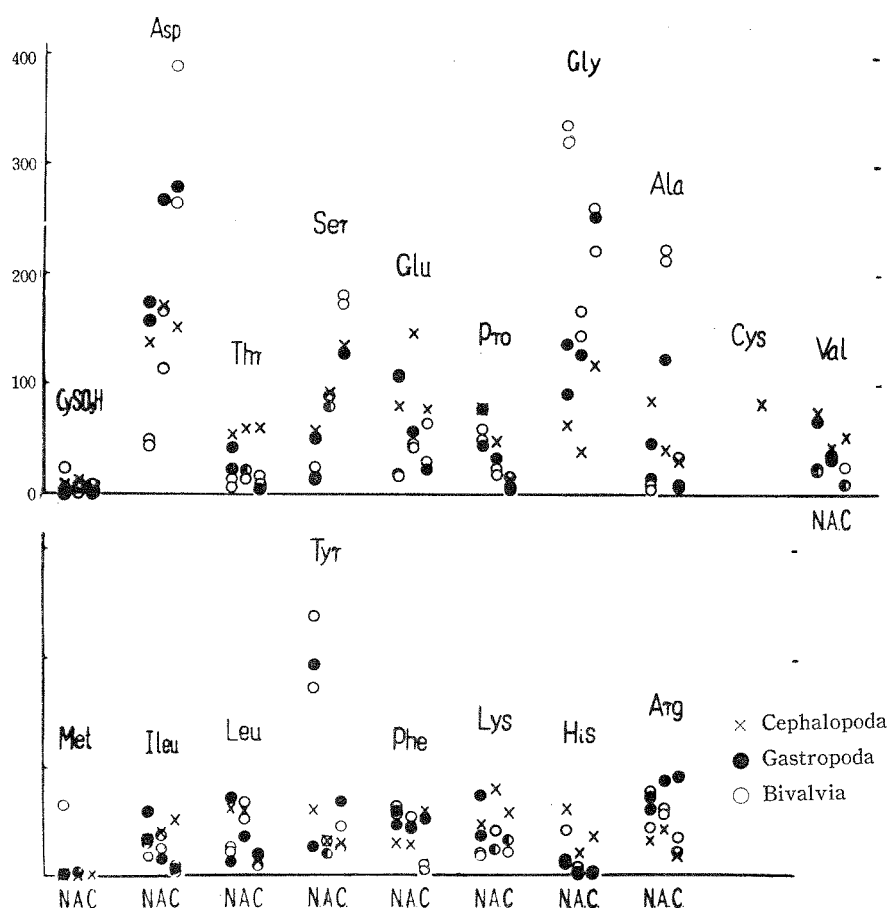


Fig. 1. Comparison of the relative amounts of 18 amino acids determined in the hydrolyzate of conchiolin among the three groups of Cephalopoda, Gastropoda and Bivalvia. The value on the ordinate represents the number of amino acid residues per 1000 total residues, and A., C. and N. on the abscissa aragonitic, calcitic and non-mineralized layer conchiolin, respectively.

各群においては次のようなことが認められる。すなわち頭足類のコンキオリンは他の2群に比較して相対的に大きなトレオニン、グルタミン酸、プロリン、バリン、イソロイシン、リジンおよびヒスチジンと相対的に小さいグリシンとアルギニン含有量を有し、腹足類はアスパラギン酸、グルタミン酸およびアルギニンを相対的に多く含み、ヒスチジンの比較的小さい点で、また斧足類は多量のグリシンを含むことおよびリジンが小さい点でそれぞれ特徴づけられている (Fig. 1)。

しかし同一種あるいは同一群の貝殻、特に斧足類において、コンキオリンのアミノ酸組成が鉱物相によってかなりの変動を示すのが認められる。例えばセリンやプロリンの含有量は種類による差よりも鉱物相による差が顕著に認められ、このほか斧足類ではアスパラギン酸、グリシン、アラニン、ロイシン、チロニンおよびフェニルアラニンにおいて、腹足類ではアスパラギン酸およびグルタミン酸において、また頭足類ではグリシン、リジン、ヒスチジンおよびアルギニンにおいて鉱物相による変動が強く現われている (Fig. 1)。

食性とコンキオリンのアミノ酸組成との関係については今回は分析試料が少なすぎたため論じ得なかつたが、トレオニン、グリシン、バリン、イソロイシンおよびリジンを除いた他のアミノ酸の間には何らの相関

も認められないように思われる。

考 察

BEEDHAM (1958) は *Anodonta cygnea*, *Mytilus edulis* および *Ostrea edulis* の貝殻および靱帯の内外層より得た蛋白質のアミノ酸組成を比較研究した結果、殻皮層にフェノール核をもつたアミノ酸、特にチロシンの多量を認め、また靱帯内層にプロリンおよびメチオニンの非常に高含有量を認めて、殻皮層はキノン化した蛋白質からなり、靱帯内層の特有なアミノ酸像は貝殻における靱帯の特殊化した機能を暗示していると報告した。WADA (1966 b) は非鈣化物層と鈣化物層の蛋白質のアミノ酸組成を比較して同様にそれぞれの特化した像を認め、両者が形成される場所における特殊化した生化学的条件を重視し、チロシンの含有量についてはメラニン色素の多少と正相関を示すと報告した。鈣物相とコンキオリンのアミノ酸組成については、ROCHE *et al.* (1951) は *Pinctada margaritifera* の稜柱層と真珠層を、HARE (1963) は *Mytilus californianus* の稜柱層と真珠層を、TANAKA *et al.* (1963) は *Pinctada martensii* の稜柱層と真珠層を、また WADA (1966 a) は頭足類2種、腹足類2種および斧足類4種の貝殻を使用して比較生化学的に研究した結果、鈣物相の差によつてアミノ酸組成の一部に差を生ずることを指摘している。しかし RUCKER (1965) は *Crassostrea virginica* の6地方型および斧足類6種から得たコンキオリンのアミノ酸分析をおこない、アミノ酸組成は種特有の像を示すが、生息環境や鈣物相の差によつて変化しないと報告している。一方、頭足類、腹足類および斧足類の真珠層コンキオリンの電子顕微鏡的観察によると、レース状構造の粹取はこれら3群の間で特異性を示している (GRÉGOIRE *et al.*, 1955)。

貝殻蛋白質の比較生化学的研究で得られた今回の結果は、(1) アミノ酸組成は種特有の像を示すと同時に、(2) 頭足類、腹足類および斧足類の間にそれぞれ群特有の像が認められる。この事実は貝殻蛋白質のアミノ酸組成の点からも軟体動物における系統分類学的意義を裏付けているように思われる。また今回の分析試料が少ないため厳密に論ずることはできないが、(3) 生息環境や(4) 食性とコンキオリンのアミノ酸組成との間に明瞭な関係が認められなかつたことは、群としてのアミノ酸組成の特徴を乱すほどにはこれらの要素が影響していないことを意味していると考えられる。

今回の分析結果はその分析精度 ($\pm 3\sim 5\%$) からみて、アミノ酸組成の微少な差を云々するに十分であると考えられ、今後は試料の純度を如何にして良くするか問題が残されていると言えよう。

要 約

1) 頭足類2、腹足類3種および斧足類5種の貝殻蛋白質のアミノ酸組成を比較生化学的に研究し、これら動物の貝殻アミノ酸組成とそれらの分類学的および生態学的関係を追究した。

2) 貝殻蛋白質は種特有のアミノ酸組成をもっているのみならず、これら3群はそれぞれ群特有の像をもっていると考えられる。

3) 生息環境や食性の貝殻アミノ酸組成におよぼす影響は分類学的意義を混乱させない程度と思われる。

謝 辞

終りに臨み、本研究に対して終始懇篤なる御指導と有意義な御助言を賜り、また本論文の校閲の労を煩わせた京都大学理学部化学教室波多野博行教授に対して勤んで感謝の意を表する。また有益なる討論を下さつた本研究所太田繁所長および町井昭技官、食性について御指導下さつた国立科学博物館波部忠重先生、並びに *A. argo* の貝殻を提供下さつた本研究所桑谷幸正技官に深謝する。

文 献

- 1) BEEDHAM, G.E.: *Quart. J. micr. Sci.*, **99**, 341 (1958).
- 2) GRÉGOIRE, Ch., DUCHALEAU, G. and FLORKIN, M.: *Ann. inst. Océanogr. (Paris)*, **31**, 1 (1955).

- 3) HARE, P. E.: *Science*, **139**, 216 (1963).
- 4) ROCH, J., RANSON, G. and EYSSERIC-LAFON, M.: *C. R. Soc. Biol.*, **145**, 1474 (1951).
- 5) RUCKER J. B.: *Can. J. Zool.*, **43**, 351 (1965).
- 6) TANAKA, S., HATANO, H. and SUZUE, G.: *Jour. Biochem.*, **47**, 117 (1960).
- 7) ———, ———, and ITASAKA, O.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **33**, 182 (1960).
- 8) ———, ———. and GANNO, S.: *Rep. No. 74 of Nippon Inst. sci. Res. Pearls*, 1 (1962).
- 9) WADA, K.: This bull. (Printing).
- 10) ———: *ibid.* (Printing).

STUDIES ON THE MINERALIZATION OF THE CALCIFIED TISSUE
IN MOLLUSCS—XI.
COMPARATIVE BIOCHEMICAL STUDY ON THE AMINO ACID
COMPOSITION OF CONCHIOLINS FROM CALCITIC
AND ARAGONITIC LAYERS*

Koji WADA**

(Received December 13, 1965)

In most of invertebrate calcareous tissues, carbonate is mainly precipitated as the crystal of calcium carbonate in calcite or aragonite form. From a long time ago, the mechanism of polymorphic formation of carbonate in organisms has been exploring by many researchers in the fields of biochemistry, biomineralogy and biogeochemistry (SAYLOR¹⁾, STOLKOWSKI²⁾, CHAVE³⁾, LOWENSTAM⁴⁾, KITANO⁵⁾).

CHAVE³⁾ and LOWENSTAM⁴⁾ have made the very interest investigations on relationships between the environmental conditions under which organisms lived, and the formation of aragonite, high-magnesium calcite and low-magnesium calcite in their calcareous tissues. Recently, a particular attention comes to be paid on the nature of protein which is termed "conchiolin" by FREMY⁶⁾ may involve the formation of calcite and aragonite in molluscan shells (ROCHE *et al.*⁷⁾, WATABE and WILBUR⁸⁾, HARE⁹⁾, WILBUR and WATABE¹⁰⁾, KOBAYASHI^{11), 12)}). Similarly, certain organic materials seem to play an important part of formation of calcite under definite conditions provided in a laboratory (KITANO and HOOD¹³⁾). In his biochemical study on amino acids in the conchiolin from nacreous and prismatic layers of the *Mytilus* shell, HARE⁹⁾ pointed out that the ratio of acidic to basic amino acid residues is different between the proteins present in calcite and aragonite. WATABE and WILBUR⁸⁾ have demonstrated experimentally the specific property of conchiolin influencing the polymorphic formation of carbonate in *in vivo* calcification of demineralized conchiolin in molluscs.

In 1961, the present author¹⁴⁾ has assumed that the nature of conchiolin may involve the polymorphic formation of calcium carbonate in molluscan shells. It will be probably expected that the significant difference of amino acid composition may arise throughout between the proteins from calcitic and aragonitic layers which are assumed to have respectively proper amino acid patterns in all molluscs, if an important factor influencing the formation of calcite and aragonite is the chemical and structural properties of conchiolin and its precursor, though the content of the amino acids present in smaller amounts may also vary widely among different species as in invertebrate collagens by GROSS and PIEZ¹⁵⁾. In this problem, the present author would try

* Contribution No. 136 from National Pearl Res. Lab.

** National Pearl Res. Lab. (和田浩爾, 国立真珠研究所).

here to make clear whether conchiolin acts as a controlling factor of the polymorphic formation of carbonate in calcareous tissues of molluscs, based on the comparative biochemical study on amino acid composition of conchiolins from calcitic and aragonitic layers.

Materials and Methods

Suitable shell constituents of the following species for this study were chosen as a material taking account of taxonomy, mineral composition and layer structure, and summarized in Table 1 comparing the staining property of decalcified organic matrix of the materials by Azan Staining.

Table 1. Mineral phase and staining property of materials used for amino acid analysis.

Species	Materials	Mineral phase	Azan staining
Cephalopoda			
<i>Sepia esculenta</i>	spongy body	aragonite	blue
<i>Argonauta argo</i>	whole shell*	calcite	blue~purple
Gastropoda			
<i>Haliotis discus</i>	nacre	aragonite	purplish blue
<i>Cellana nigrolineata</i>	calcitostacum	calcite	blue
Bivalvia			
<i>Hyriopsis schlegeli</i>	nacre	aragonite	purplish blue
<i>Pinna attenuata</i>	nacre	aragonite	purplish blue
<i>Ostrea gigas</i>	calcitostacum	calcite	blue
<i>Anomia lischkei</i>	calcitostacum	calcite	blue

* The shell consists of non-mineralized and mineralized layers.

The amino acid analysis of protein was automatically performed using the KLA-2 type Hitachi Amino Acid Analyzer according to the method reported by SPACKMAN *et al.*¹⁶⁾.

Conchiolins used in the amino acid analyses were prepared as follow: The layers with mineral phase and structure as shown in Table 1 were isolated from other constituents of individual shells, which were removed from soft tissues, as carefully as possible except the *Argonauta* shell, a small piece of them then was washed with distilled water and demineralized in 3M acetic acid for 1 to 3 days. 5.0 ± 0.5 mg. of the dried conchiolin was hydrolysed in a sealed tube containing 2 ml. of a 6N hydrochloric acid solution for 22 hours at 110°C. The hydrolyzate of conchiolin was dried repeatedly on a water bath and dissolved in 0.2N citrate buffer, pH 2.2, for the automatic amino acid analysis, according to the method of TANAKA *et al.*¹⁷⁾.

Results

An example of the automatic amino acid analysis curve is shown in Fig. 1. The

peak C seen in Fig. 1 is found only in the *Sepia* and *Cellana* conchiolins, and takes place near that of hydroxyproline but appears to differ from that of the amino acid because the unknown peak is absorbed maximally at the wavelength of 570 m μ contrary to the peak of hydroxyproline. The small peak corresponded approximately to that of tryptophane in Fig. 1 was not determined in this study. Amino acid composition

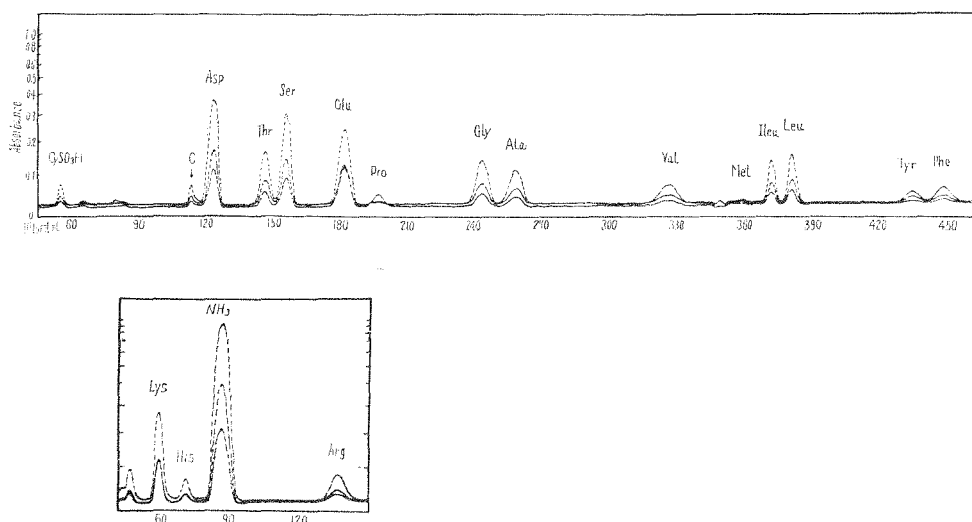


Fig. 1. The amino acid analysis curve given by the conchiolin of spongy body of *Sepia esculenta*.

calculated from such analysis curves is summarized in Table 2 for the conchiolins from calcitic and aragonitic layers of shells in Cephalopoda, Gastropoda and Bivalvia.

Table 2 indicates that both calcitic and aragonitic conchiolins have relatively high concentrations of aspartic acid, serine and glycine residues, respectively, and in each group of animals the larger amounts of these amino acids may be generally contained in the calcitic proteins than in the aragonitic ones. Especially, one could find that a significant difference appears to occur in the content of serine, alanine, leucine and proline between calcitic and aragonitic conchiolins, regardless of taxonomical or ecological pattern. That is, aragonitic conchiolin contains relatively larger amounts of alanine, leucine and proline residues than calcitic conchiolin, and calcitic conchiolin has higher contents of serine residues but only few number of alanine residues, 10 to 37 residues per 1000.

The ratio of acidic to basic amino acid residues is shown in Table 3, indicating no significant difference between calcitic and aragonitic conchiolins. In Bivalvia the ratio may be always much higher in calcitic conchiolin than in aragonitic conchiolin, but rather inverse relation appears to reveal in Gastropoda. Furthermore it is evident that the sum of the nonpolar amino acids are always larger in aragonitic conchiolin (Table 3).

The conchiolin of Cephalopoda, especially *Sepia esculenta*, may be distinguishable

Table 2. Amino acid composition of calcitic and aragonitic conchiolins (amino acid residues per 1000 total residues).

Materials Mineral phase*	Cephalopoda		Gastropoda		Bivalvia			
	<i>S. esculenta</i> arag.	<i>A. argo</i> cal.	<i>H. discus</i> arag.	<i>C. nigro-lineata</i> cal.	<i>H. schlegeli</i> arag.	<i>P. attenuata</i> arag.	<i>O. gigas</i> cal.	<i>A. lischkei</i> cal.
CySO ₃ H	12.6	5.2	6.2	3	1.5	8.3	9.1	1.9
Asp	178.5	153.3	267.2	279.9	116.4	167.7	392.9	270.5
Thr	61.9	60	22.7	5.9	22.9	14.6	10.7	18.1
Ser	96	134.4	80.9	128.6	81.5	90.6	183.9	178.1
Glu	152.8	78.8	58	24.3	48.7	43.4	31.8	67.2
Pro	51.5	14.8	33.4	7	19	24.9	17.1	5.2
Gly	41.9	118	129	253.6	170.4	146.2	224.9	259
Ala	43.5	30.1	124.5	11.3	216.6	225.4	10	37
Cys		82.9						
Val	44.5	52.1	37.1	10	32.9	33.3	10.5	26.7
Met	1.1	1.1	3.9	+	4	+	+	
Ileu	41.6	51.8	15.3	6.6	25.6	34.4	4	8.1
Leu	60	13.4	35.6	18	68.3	50.7	8	20.3
Tyr	83.3	30.4	22	68.5	22.2	31.4	45.9	26.4
Phe	30	59.9	46.3	53.3	55.5	44.8	5.2	10.6
Lys	83.7	58.8	25	33.4	42.5	24.6	22.6	34.5
His	22.4	37.2	4.1	4	8.3	2.2	1.7	+
Arg	44.6	18.5	88.9	92.7	63.6	57.5	22	36.4
NH ₃	(22.3)	(16.7)	(13.8)	(9.0)	(8.7)	(10.7)	(15.3)	(13.1)

* arag.: aragonite, cal.: calcite.

** Corrections for the destruction of threonine, serine and tyrosine were not made in this study.

Table 3. Conchiolin in mineralized layers of molluscan shells (residues of amino acid per 1000 total residues)

	Calcite				Aragonite			
	<i>A. argo</i>	<i>C. nigro-lineata</i>	<i>O. gigas</i>	<i>A. lischkei</i>	<i>S. esculenta</i>	<i>H. discus</i>	<i>H. schlegeli</i>	<i>P. attenuata</i>
Nonpolar amino acids (Pro+Met+Val+Leu +Ileu+Ala+Phe)	223.4	106.2	54.8	107.9	272.2	295.6	421.9	413.5
Acidic residues (Asp+Glu)	231.1	304.2	424.7	337.7	331.3	325.2	165.1	211.1
Basic residues (Lys+His+Arg)	114.4	130.1	46.3	70.9	150.7	118.0	114.4	84.3
Ratio of acidic /basic residues	2.020	2.338	9.173	4.763	2.198	2.756	1.443	2.504

from those of the other groups used in this study; i.e., the conchiolin from the spongy body of *Sepia esculenta* does not have glycine and alanine in such large amounts as seen in the other aragonitic conchiolins but contains a relatively large amounts of threonine, glutamic acid and lysine residues, and the conchiolin from a whole shell of *Argonauta argo* appears to differ in a rather higher number of cystine residues from the other conchiolins. The conchiolin from mineralized layers of Gastropoda, on the other hand, appears to be characterized by the high concentrations of arginine and aspartic acid residues in no relation to the mineral phase of them, though arginine is higher in aragonitic conchiolin than in calcitic one in the other groups. The content of basic amino acids also may be somewhat varied respectively in close relation to taxonomical or ecological pattern of shell-fishes. It will be noted that the high tyrosine content is found in the conchiolin from the calcitostracum of *Cellana nigrolineata*.

The above-mentioned pattern of amino acid composition between calcitic and aragonitic conchiolins would be more clearly illustrated in Fig. 2.

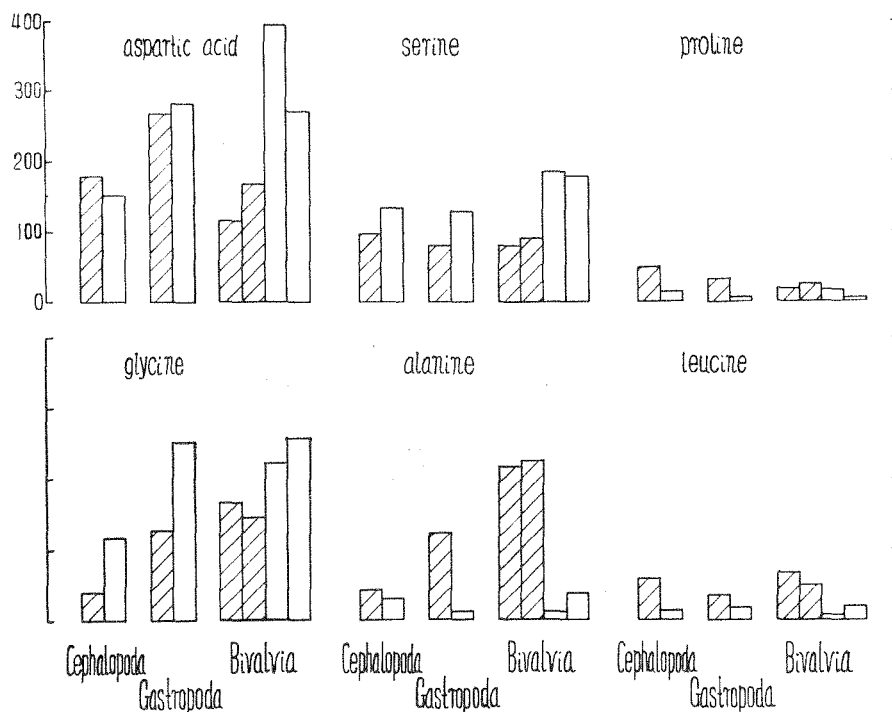


Fig. 2. Histograms showing the relative amounts of aspartic acid, serine, proline, glycine, alanine and leucine between calcitic and aragonitic conchiolins, which are indicated by white and oblique line, respectively. The values on the ordinate represent the number of amino acid residues per 1000 total residues.

Discussion

For a long time, it has been considered that conchiolin may be involved the

mechanism of polymorphic formation of carbonate in molluscan shells, but we do not have still enough of fundamental investigations for this problem in organisms. ROCHE *et al.*⁷⁾ demonstrated on the base of amino acid analysis that the conchiolin from prismatic layer differs conspicuously from that of nacreous layer, in *Pinctada margaritifera*, and assumed that the proteins are the factor controlling a crystal form of calcium carbonate. The difference of amino acid composition was also recognized between the conchiolins in prismatic and nacreous layers of shell of *Pinctada martensii* (TANAKA *et al.*¹⁷⁾). In their experimental studies on the mineralization of decalcified calcitic and aragonitic conchiolins in *in vivo* and *in vitro* calcification, WATABE and WILBUR⁸⁾ suggested the role of the protein matrix to play as the controlling factor on biological occurrence of aragonite or calcite, and thereafter they¹⁰⁾ have found the difference between X-ray diffraction patterns given by the proteins. According to HARE's biochemical studies⁹⁾ on the amino acid composition of conchiolins from prismatic and nacreous layers of the shells of *Mytilus californianus*, the ratio of acidic to basic residues may be higher in calcitic conchiolin (prismatic) than in aragonitic conchiolin (nacreous). The present author, however, thinks that conchiolins included within some prismatic layers are not always the suitable material to clarify this problem in the study because of experimental errors due to the mixture of different structural proteins which may be attended with the danger of some confusion and mistake in interpreting analytical data, as suggested by GRÉGOIRE¹⁸⁾ and WADA¹⁹⁾. Accordingly, prismatic conchiolins would be not preferred to use as a material for exploring the mechanism of polymorphic formation of carbonate if one could not completely isolate different structural proteins within the layers.

The results obtained in the present investigation indicates that the conchiolin from the calcitic layers, all calcitostracum except the *Argonauta* shell, in the three groups has appreciably large amounts of aspartic acid, serine and glycine residues and very few residues of alanine, though BEEDHAM²⁰⁾ reported high alanine content in the conchiolin from outer region of the *Ostrea* shell, while the conchiolin from the aragonitic layers with at least one exception of the conchiolin from spongy body of *Sepia esculenta* contains aspartic acid, glycine and alanine in large amounts. The most characteristic patterns are that the aragonitic conchiolin has larger amounts of alanine, leucine and proline but smaller amount of serine than the calcitic conchiolin has. The higher number of nonpolar amino acids also appears to be present in aragonitic conchiolin. The above-mentioned distinction of amino acid composition between calcitic and aragonitic conchiolins will be found in the analysis made by BEEDHAM²⁰⁾ who had not pointed out the pattern. Such the relation as pointed out by HARE⁹⁾ in the ratio of acidic to basic amino acid residues may however occur only in the conchiolins from the calcitic and aragonitic layers of Bivalvia. The fact suggests that the ratio of acidic to basic residues may rather depend on the taxonomically specialized characteristic. It is moreover found that the feature of amino acid composition between

calcitic and aragonitic proteins is correlated rather well with the staining property of them in Azan preparation (Table 1 and 2).

The specialized patterns of the composition of conchiolins, as found in the present investigation, appear to be maintained consistently in close relation to mineral phase, irrespective of taxonomical, ecological and environmental elements, which must mean probably that (1) the physicochemical conditions provided by certain specific amino acids in conchiolins or the precursor of them, (2) the stereochemical structure of the protein, or (3) both of these may play in some ways as one of the important factors influencing polymorphic formation of carbonate in certain processes of the mineralization of shells of molluscs.

As described by TANAKA *et al.*²¹⁾, BEEDHAM²⁰⁾, PIEZ²²⁾ and HARE⁹⁾, the proper pattern of amino acid composition of conchiolins does not resemble to those of collagens and keratins. In submicroscopic structures (GRÉGOIRE *et al.*²³⁾) and X-ray diffraction diagrams (WADA¹⁴⁾, WILBUR and WATABE¹⁰⁾, FUJIWARA²⁴⁾), conchiolins do not have the characteristic axial periodicity of collagens, 640 to 700 Å, as well as the striation along the fiber axis.

The conchiolin of the spongy body in *Sepia esculenta* appears to differ in amino acid composition from those in the groups of Gastropoda and Bivalvia. The relationships between the amino acid composition of conchiolin and the taxonomical or ecological patterns of animals will be reported in a separated paper.

Summary

1. For exploring whether the protein matrix involved shell mineralization of molluscs also plays as one of the important factors influencing polymorphic formation of carbonate, the amino acid composition of conchiolins from the calcitic and aragonitic layers of some shells of Cephalopoda, Gastropoda and Bivalvia was done automatically by the KLA-2 type Hitachi Amino Acid Analyzer.

2. Aragonitic conchiolin with at least one exception of the conchiolin of spongy body in *Sepia esculenta* appeared to be characterized by the relatively high concentrations of aspartic acid, serine, glycine and alanine.

3. The large number of aspartic acid, serine and glycine residues and the few number of alanine may be the characteristic amino acid pattern of calcitic conchiolin or the conchiolin of calcitostracum.

4. It was consistently probable that the larger amounts of alanine, leucine and proline but the smaller amounts of serine are present in aragonitic conchiolin, irrespective of taxonomical groups.

5. In a group, the number of aspartic acid and glycine residues of calcitic proteins was higher, though there was a confusion in aspartic acid of Cephalopoda. Similarly, the higher arginine contents were contained in aragonitic protein. except Gastropoda.

6. Judging from the above results, it is possible that the protein matrix may involve directly or indirectly in some ways with the mechanism of polymorphic formation of carbonate in the mineralization of shells of molluscs. It was also suggested that certain distinction of amino acid composition among conchiolins appears to occur in correlation with taxonomical groups.

The present author expresses his sincere thanks to Director S. OTA of National Pearl Research Laboratory for his kindness and to Prof. H. HATANO of Kyoto University and Prof. T. SUDO of Tokyo University of Education for their useful advices and kind guidances.

References

- 1) SAYLOR, C. H.: *J. Phys. Chem.*, **32**, 1441 (1928).
- 2) STOLKOWSKI, J.: *Ann. Inst. Océanog.*, **26**, 1 (1951).
- 3) CHAVE, K. E.: *J. Geol.*, **62**, 266 (1954).
- 4) LOWENSTAM, H. A.: *J. Geol.*, **62**, 284 (1954).
- 5) KITANO, Y.: in "*Recent Researches in the Fields of Hydrosphere, Atmosphere and Nuclear Geochemistry*" Maruzen (Tokyo), 305 (1964).
- 6) FREMY, E.: *Ann. Chem. Phys., Ser. 3*, **43**, 96 (1955).
- 7) ROCHE, J., RANSON, G. and EYSSERIC-LAFON, M.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **145**, 1474 (1951).
- 8) WATABE, N. and WILBUR, K. M.: *Nature*, **188**, 334 (1960).
- 9) HARE, P. E.: *Science*, **139**, 216 (1963).
- 10) WILBUR, K. M. and WATABE, N.: in "*Comparative Biology of Calcified Tissue*" *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **109**, 82 (1963).
- 11) KOBAYSHI, S.: *Biol. Bull.*, **126**, 414 (1964a).
- 12) ———: *This Bull.* **30**, 893 (1964b).
- 13) KITANO, Y. and HOOD, D. W.: *Geochim. Cosmochim. Acta*, **29** (1965).
- 14) WADA, K.: *Bull. Natl. Pearl. Res. Lab.*, **7**, 703 (1961).
- 15) GROSS, J. and PIEZ, K. A.: in "*Calcification in Biological Systems*" *Amer. Assoc. Advance. Sci.*, **64**, 395 (1960).
- 16) SPACKMAN, D. H., STEIN, W. and MOORE, S.: *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
- 17) TANAKA, S., HATANO, H. and GANNO, S.: *Rep. Nippon Inst. Sci. Res. Pearls*, **4** (74), 1 (1963).
- 18) GRÉGOIRE, Ch.: *Bull. Inst. royal. Sc. natur. Belgique*, **37**, 1 (1961).
- 19) WADA, K.: *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, **9**, 1078 (1964).
- 20) BEEDHAM, G. E.: *Quart. J. micro. Sci.*, **99**, 341 (1958).
- 21) TANAKA, S., HATANO, H., KIYASU, R. and TAKAGI, Y.: *Jour. Chem. Soc. Japan*, **74**, 193 (1953).
- 22) PIEZ, K. A.: *Science*, **134**, 841 (1961).
- 23) GRÉGOIRE, Ch., DUCHATEAU, D. and FLORKIN, M.: *Ann. Inst. Océanog., Paris*, **31**, 1 (1955).
- 24) FUJIWARA, T.: *Miscel. Rep. Res. Inst. Nat. Resources*, **62**, 71 (1964).

STUDIES ON THE MINERALIZATION OF THE CALCIFIED
TISSUE IN MOLLUSCS—XII.
SPECIFIC PATTERNS OF NON-MINERALIZED LAYER
CONCHIOLIN IN AMINO ACID COMPOSITION

Koji WADA

日本水産学会誌
第三十二卷 第四号 別刷
昭和四十一年四月二十五日発行

Reprinted from the Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 32, No. 4, April 1966.

STUDIES ON THE MINERALIZATION OF THE CALCIFIED
TISSUE IN MOLLUSCS—XII.
SPECIFIC PATTERNS OF NON-MINERALIZED LAYER
CONCHIOLIN IN AMINO ACID COMPOSITION*

Koji WADA

(Received Dec. 13, 1965)

Conchiolin seems probably to be formed in the course of denaturation of mucous substances secreted by the glandular epithelium of shell-forming tissues and to be a scleroprotein with a small amount of mucopolysaccharides. One could find two groups of different features of conchiolin in the calcification of shells of molluscs; namely, the one conchiolin such as the horny plate of Cephalopoda and the periostracum of Gastropoda and Bivalvia is never mineralized themselves during the process of shell formation and may serve as a back-plate and substratum for the another which could induce nuclei formation and subsequent growth of mineral phase. How does the nucleation of mineral phase occur in organic phase in the mineralization of molluscan shells? To answer this question, one must first try to investigate the specific property of conchiolin which is capable for the opening of mineralization *in vivo*.

It is possible that critical nuclei of mineral crystals may be induced in specialized sites of organic matrices through heterogeneous nucleation in calcified tissues of organisms (SOBEL¹⁾, NEUMAN and NEUMAN²⁾, GLIMCHER³⁾, WADA⁴⁾). Many workers have paid a great attention to certain amino acids of proteins themselves (NEUMAN and NEUMAN²⁾, GLIMCHER³⁾, HARE⁵⁾), to certain acid mucopolysaccharides bound with appropriate parts of proteins (SOBEL¹⁾, ABOLINS-KROGIS⁶⁾, WADA⁴⁾), or to acid mucopolysaccharide itself (RUBIN and HOWARD) in the mineralization of calcified tissues of vertebrates and invertebrates.

The present author^{4), 5), 9)} has found the characteristic differences in stainability and histochemical reaction between conchiolins of non-mineralized and mineralized layers of molluscan shells and demonstrated that the metachromatic substance which seems to be due to sulfuric ester may involve in some ways the initiation of nucleation of mineral crystals *in vivo*. It was furthermore suggested that the nature of protein matrix may differ between non-mineralized and mineralized layers. For exploring the functional role of protein in the initiation of shell mineralization, this paper will describe the characteristic pattern of amino acid composition of conchiolins from non-mineralized layer compared with those from mineralized layers of molluscan shells reported in the preceding paper¹⁰⁾.

* Contribution No. 157 from National Pearl Res. Lab.

** National Pearl Res. Lab. (和田浩爾: 国立真珠研究所)

Materials and Methods

Materials were conchiolins from non-mineralized layers of some of the same specimens used in the preceding investigation¹⁰⁾ and of the other species, and isolated carefully from mineralized layers by a razor under a magnifying glass before or after decalcification. Prior to the isolation, periostracal conchiolins of Gastropoda and Bivalvia could be possibly cleared of sessile animals, weeds and mud.

Hydrolysis and amino acid analysis of conchiolin were carried in the same ways described in the preceding paper¹⁰⁾.

Results

Fig. 1 shows a typical example of automatic amino acid analysis curve of the periostracal conchiolin of Bivalvia. The peak C seen in Fig. 1 of the preceding paper¹⁰⁾ also appears in the hydrolyzate of non-mineralized layers of *Sepia esculenta*, *Haliotis discus* and *Hemifusus ternatanus*, the peak D in Fig. 1 in that of the perio-

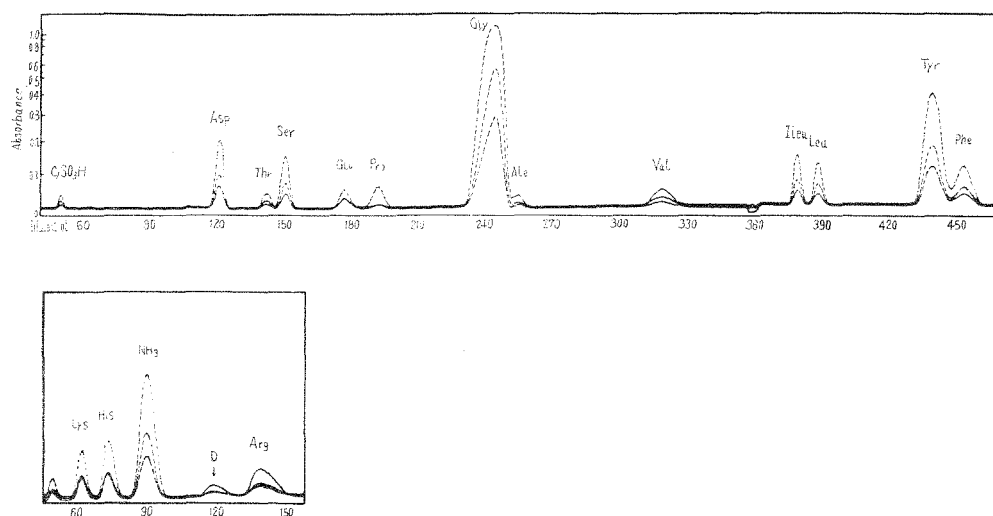


Fig. 1. The automatic amino acid analysis curve of the periostracal conchiolin of *Hyriopsis schlegeli*.

stracum of *Hyriopsis schlegeli*, and the peak Z (not shown in Fig. 1) between the peaks of tryptophane and lysine in that of the periostracum of *Hemifusus ternatanus*. These peaks are not determined to correspond respectively to some kinds of amino acids in this paper. The results obtained are summarized as the number of amino acid residues per 1000 total residues in Table 1.

Tables 1 and 2 indicate that all non-mineralized layers consist of the conchiolin having similar composition which differ conspicuously from that of mineralized layer conchiolin, though the pattern modifies rather widely with taxonomical groups or species. The conchiolin of non-mineralized layers has relatively higher concentrations

of proline but consistently lower serine contents than the conchiolin of mineralized layers has, regardless of taxonomical patterns. In a single group, the smaller amount of aspartic acid and the larger amount of histidine are always present in non-mineralized layer conchiolin. Although there is found at least one exception of the perio-

Table 1. Amino acid composition of non-mineralized layer conchiolin
(amino acid residues per 1000 total residues)

Materials Amino acid	Cephalopoda	Gastropoda		Bivalvia	
	<i>S. esculenta</i> horny plate	<i>H. ternatanus</i> periostracum	<i>H. discus</i> periostracum	<i>M. meretrix</i> <i>luseria</i> periostracum	<i>H. schlegeli</i> periostracum
CySO ₃ H	8.8	4.7	1.5	24.5	4.1
Asp	142.2	158.5	178	50.8	45.9
Thr	56	43.4	24.1	15.4	8.1
Ser	59.3	51.1	14.2	16.3	26.1
Glu	82.5	107.8	111.4	19.7	18
Pro	82.7	46	80.9	61	52.3
Gly	65.6	92.7	140	322.5	343.7
Ala	87.8	48.1	16.9	10.9	5.7
Val	76	67.1	23.6	23.6	25.7
Met	2.2		+	66.8	
Ileu	33.7	58.7	33.7	17.3	29.3
Leu	62.7	71.5	11.8	21.1	24.8
Tyr	62.5	25.8	199	174.5	244.1
Phe	31.3	59.8	48.2	64.9	58.7
Lys	49.1	75.2	38.1	19.6	23
His	64.2	15.5	14.3	11.6	43.8
Arg	33.3	74	62.7	79.5	46.7
NH ₃	(29.5)	(17.0)	(17.4)	(8.3)	(10.9)

* Corrections for the destruction of threonine, serine and tyrosine were not made in this study.

stracal conchiolin of *Hemifusus ternatanus*, 25.8 residues per 1000, the tyrosine content of non-mineralized layer conchiolin is in remarkably high concentrations; 174.5 and 244.1 residues in Bivalvia, 199 residues in *Haliotis discus* (Gastropoda), and 62.5 residues in *Sepia esculenta* (Cephalopoda) per 1000, respectively. One could find that the number of tyrosine residues may increase with increasing amount of melanin. Glycine is similarly more abundant in non-mineralized layer conchiolins in a species, especially puts up about one-third of the total residues in the periostracum of the *Hyriopsis* and *Meretrix* shells (both Bivalvia) in which the aspartic acid and alanine contents are generally lower compared with mineralized layer conchiolins, though both amino acids are much higher in the conchiolin from the periostracum of Gastropoda and from the horny plate of *Sepia esculenta* than in that of the periostracum of Bivalvia. These differences of amino acid composition between the proteins of non-mineralized

and mineralized layers appears to occur most largely in the periostracum of Bivalvia, as shown in Table 2 and as illustrated in Fig. 2. Besides it is evident that the relatively high numbers of methionine and cysteic acid residues are contained in the periostracal conchiolin of *Meretrix meretrix lusoria* (Table 1). The amino acid com-

Table 2. The comparison of several amino acids between non-mineralized and mineralized layer conchiolins of a shell of the same species (amino acid residues per 1000 total residues).

Materials Mineral phase*	<i>Sepia esculenta</i>		<i>Haliotis discus</i>		<i>Hyriopsis schlegeli</i>	
	horny plate non	Spongy body arag.	periostracum non	nacre arag.	periostracum non	nacre arag.
Amino acid						
Asp	142.2	178.5	178	267.2	45.9	116.4
Ser	59.3	96	14.2	80.9	26.1	81.5
Pro	82.7	51.5	80.9	33.4	52.3	19
Gly	65.6	41.9	140	129	343.7	170.4
Ala	87.8	43.5	16.9	124	5.7	216.6
Tyr	62.5	33.3	199	22	244.1	22.2
His	64.2	22.4	14.3	4.1	43.8	8.3
Acidic amino acids	224.7	331.3	289.4	325.2	63.9	165.1
Basic amino acids	146.6	150.7	115.1	118	113.5	114.4
Acidic/basic residues	1.533	2.198	2.514	2.756	0.563	1.443

* non: non-mineral, arag.: aragonite.

position of the protein from a horny plate of *Sepia esculenta* appears to differ from that of the periostracal protein of the other shells used in this study.

The ratio of acidic to basic residues is smaller in the protein of non-mineralized layers than in that of mineralized layers of the same species investigated but does not always appear to show such the tendency on the whole of molluscs (Table 2).

The periostracum covered on the external surface of shells of Gastropoda and Bivalvia, especially in the nappy periostracum of *Hemifusus ternatanus*, however, will be in the larger danger of contamination of the rest of sessile animals, weeds and other organic matters.

Discussion

After FREMY⁽¹¹⁾ had found the presence of the protein "conchiolin" in molluscan shells, amino acid analysis of conchiolin was mainly made in Bivalvia by many researchers (VOIT⁽¹²⁾, WETZEL⁽¹³⁾, FRIGA⁽¹⁴⁾, TANAKA *et al.*⁽¹⁵⁾) who were and are trying to determine the nature of the protein. Recently, biologists, biochemists and biogeologists are actively investigating the nature and functional roles of conchiolin on the fields of them (ROCHE *et al.*⁽¹⁶⁾ GRÉGOIRE *et al.*⁽¹⁷⁾, ABELSON⁽¹⁸⁾, BEEDHAM⁽¹⁹⁾, PIEZ⁽²⁰⁾,

HARE⁵⁾, TANAKA *et al.*²¹⁾, AKIYAMA²²⁾, DEGENS and LOVE²³⁾, WADA¹⁰⁾). Their results indicated that conchiolin may differ in amino acid composition from collagens and keratins, and that they undergo some modifications associated with the mineralization (HARE⁵⁾, WADA¹⁰⁾) and with the locally specialized function of periostracum and

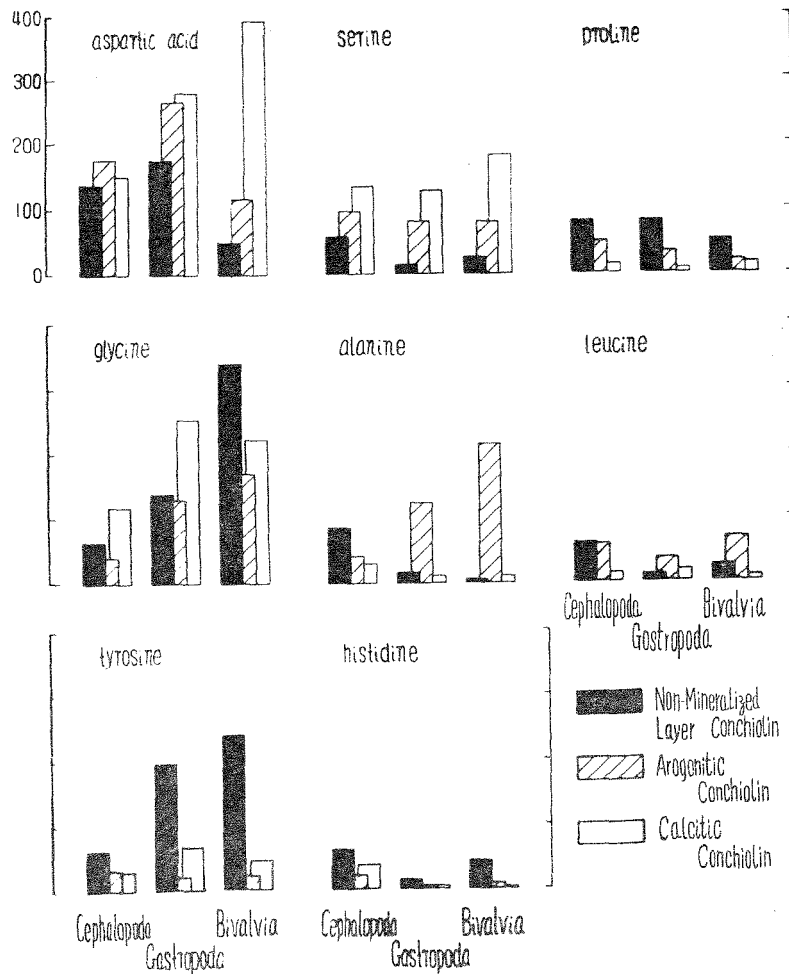


Fig. 2. Histograms showing the relative amounts of 8 amino acids between the proteins of non-mineralized and mineralized layers. The number of amino acid residues per 1000 total residues were plotted on the ordinate. The comparison was made between *Sepia esculenta* and *Argonauta argo* in Cephalopoda, between *Haliotis discus* and *Cellana nigro-lineata* in Gastropoda, and between *Hyriopsis schlegeli* and *Ostrea gigas* in Bivalvia, respectively.

ligament (BEEDHAM¹⁹⁾). BEEDHAM¹⁹⁾ and HILLMAN²⁴⁾ reported that the conchiolin of periostracum of some Bivalvia contains the large concentration of phenolic amino acids, especially tyrosine, and glycine, which is characteristic of a quinone-tanned protein. As described above, it would be noted that the periostracum of Bivalvia

consists mainly of a quinon-tanned protein produced by the epithelial and secretory cells on the inner surface of an outer mantle fold and differ in composition from the protein formed by the cells on the other regions (BROWN²³), BEEDHAM¹⁹), HILLMAN²⁴).

The most interest discussion for the mechanism of nucleation of mineral crystal in the opening of mineralization in molluscan shells has been made by HARE⁵) who obtained based on his comparative biochemical investigation of amino acid composition of conchiolin from non-mineralized and mineralized parts of the *Mytilus* shell the result that the non-mineralized units of the valve and ligament have the very low content of the acidic residues, and stated that the side chains of the acidic residues such as aspartic and glutamic acids could provide within protein itself negatively charged sites to would attract calcium ions, the basic side chains could similarly act as sites for the concentration of carbonate ions, and thus these side groups in the protein matrix provide appropriate initial concentration of Ca^{++} and CO_3^{--} for the nucleation of shell minerals.

The findings demonstrate conclusively that the protein of non-mineralized layers of molluscan shells may differ in amino acid composition from that of mineralized layers, and also that some modification of composition appears to occur in relation to the taxonomical significance. For example, the high concentrations of proline and tyrosine in non-mineralized layer conchiolin appear to be probably brought about under biochemical conditions locally specialized in the process of formation of the layer but may not be the specific pattern of the layer as suggested by the low tyrosine content of the periostracal conchiolin of *Hemifusus ternatanus*. Serine is consistently lower in all groups, and the lower aspartic acid content and the higher histidine content are found in single groups and species. The number of glycine, alanine and glutamic acid residues, on the other hand, may be correlated with the taxonomical pattern.

Although it is probably expected that conchiolins of non-mineralized and mineralized layers of all groups of molluscs are respectively characterized by specific patterns, in the comparative study based only on amino acid composition of them it is difficult to suppose whether certain amino acid groups themselves provide in the protein appropriate sites for initiating the nucleation of mineral crystals and then involve the mechanism of crystal nucleation in such ways described by HARE⁵). But it is likely that some segments of conchiolin charge negatively or positively and then attract Ca^{++} or CO_3^{--} . According to WADA's histological and histochemical observations^{4), 8)} of the organic matrix of molluscan shells, the matrix of non-mineralized alyers (or eosinophil granules) shows affinity for acidic dye and is not metachromatic with toluidine blue, whereas the matrix of mineralized layers (or organic crystals) affinity for basic dye and metachromatic. He⁹⁾ demonstrated histochemically that the metachromasia of the organic crystal is due to the presence of sulfuric ester. Further the present amino acid analysis seems to suggest that conchiolin may be classified under at least two groups of non-mineralized and mineralized layer

ones in the stereochemical structure. Considering the significant difference of serine and aspartic acid contents between the conchiolins, it is probable that these residues may involve in the mechanism of attachment of acid mucopolysaccharides to conchiolin, as has been known in chondroitin sulfate-protein complexes^{26), 27)}, and acid mucopolysaccharides must be in the active configuration which can capture basic dyes and cations in a surrounding solution, in the process of mineralization of conchiolin. Therefore the present author proposes the hypothesis that when any stable nuclei of mineral crystals do not exist in shell mineralization *in vivo*, the segment of conchiolin, chondroitin sulfate-protein complex or acid mucoprotein with sulfate groups, which is positive to the metachromatic reaction may be endowed with the more effective affinity depended on thermodynamics or electrostatics for nucleation of calcium carbonate crystals, and then either locally reduces the value of the critical supersaturation or locally increases the concentration of $\text{Ca} \times \text{CO}_3$ under some physicochemical and enzymatic factors of the extrapallial fluid. Accordingly, it seems that any stable nuclei of aragonite or calcite could not be induced in the conchiolin of non-mineralized layers and eosinophil granules under lower supersaturation provided by animals. In all cases, this problem will be resolved in the further experiments of *in vivo* and *in vitro* mineralization of conchiolin.

The proteins localized in non-mineralized layers appear to be distinguishable in amino acid composition from collagens and keratins, as in the proteins of mineralized layers, because of the specific patterns of conchiolin. The conchiolin of the periostracum is probably hardened by quinone-tanning, except the nappy one of *Hemifusus ternatanus*.

Summary

1. Amino acid analysis was made on the conchiolin of non-mineralized layers of molluscan shells, and the results obtained were compared with those in mineralized layer conchiolin.

2. The relatively lower serine content as well as the higher tyrosine and proline contents were contained in the conchiolin of non-mineralized layers, irrespective of the taxonomical pattern, though there was at least one exception of the periostracal conchiolin of *Hemifusus ternatanus* in which tyrosine was very low.

3. As to aspartic acid, glycine and histidine residues, the similar differences of these amino acids between the conchiolins of non-mineralized and mineralized layers appeared to occur respectively in single species and groups. Similarly, the sum of acidic amino acids was consistently smaller in non-mineralized layer conchiolin in single species, though such the tendency was confused on the whole of molluscs.

4. The pattern of amino acids of the most periostracum indicates the characteristic of a quinone-tanned protein.

5. The conchiolin of mineralized layers and organic crystals probably appears to

be chondroitin sulfate-protein complex or acid mucoprotein with sulfate groups.

6. The characteristic pattern of the composition of non-mineralized layer conchiolin may suggest the specialized physiological conditions of formation of conchiolin in the regions of these layers.

7. The taxonomical significance also appeared to be found in some modification of amino acid composition of the proteins.

8. The mechanism of crystal nucleation in shell mineralization *in vivo* was discussed in the comparison of the nature of the organic matrix between non-mineralized and mineralized layers.

The present author expresses his sincere thanks to Prof. T. SUDOU of Tokyo University of Education and Prof. H. HATANO of Kyoto University for their useful advices.

References

- 1) SOBEL, A.E.: *Metabolic Interrelations. Josiah Macy, Jr. Foundation, New York.* **4**, 113 (1952).
- 2) NEUMAN, W.F. and NEUMAN, M.W.: "*The Chemical Dynamics of Bone Mineral*" Univ. Chicago press (1958).
- 3) GLIMCHER, M.J.: in "*Calcification in Biological Systems*" Amer. Assoc. Advance. Sci., **64**, 421 (1960).
- 4) WADA, K.: *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, **9**, 1087 (1964 b).
- 5) HARE, P.E.: *Science*, **139**, 216 (1963).
- 6) ABOLINS-KROGIS, A.: *Acta Univ. Uppsaliensis*, **20**, 5 (1963).
- 7) RUBIN, P.S. and HOWARD, J.E.: *Metabolic Interrelations. Josiah Macy, Jr. Foundation, New York.* **4**, 113 (1952).
- 8) WADA, K.: *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, **9**, 1078 (1964 a).
- 9) WADA, K.: *This Bull.*, **30**, 993 (1964 c).
- 10) ———: *ibid.*, **32**, 295 (1966).
- 11) FREMY, E.: *Ann. Chem. et Phys. Ser. III*, **43**, 96 (1855).
- 12) VOIT, C.: *Zeits. f. wiss. Zool.*, **10**, 158 (1860).
- 13) WETZEL, G.: *Zeits. Physiol. Chem.*, **29**, 386 (1900).
- 14) FRIGA, F.: *Biochem. Zeits.*, **246**, 29 (1932).
- 15) TANAKA, S., HATANO, H., KIYASU, R. and TAKAGI, Y.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **74**, 193 (1953).
- 16) ROCHE, J., RANSON, G. and EYSSERIC-LAFON, M.: *Compt. rend. Soc. Biol.*, **145**, 1474 (1951).
- 17) GRÉGOIRE, Ch., DUCHALEAU, G. and FLORKIN, M.: *Ann. inst. Océanogr.*, **31**, 1 (1955).
- 18) ABELSON, P.H.: *Sci. Amer.*, **3** (1956).
- 19) BEEDHAM, G.E.: *Quart. J. micr. Sci.*, **99**, 341 (1958).
- 20) PIEZ, K.A.: *Science*, **134**, 841 (1961).
- 21) TANAKA, S., HATANO, H. and GANNO, S.: *Rep. Nippon Inst. Sci. Res. Pearls*, NO. **74**, 1 (1963).
- 22) AKIYAMA, M.: *Jour. Geol., Soc. Japan*, **70**, 508 (1964).
- 23) DEGENS, E. T. and LOVE, S.: *Nature*, **205**, 876 (1965).
- 24) HILLMAN, R.E.: *Science*, **134**, 1754 (1961).
- 25) BROWN, C.H.: *Quart. J. micr. Sci.*, **93**, 487 (1952).
- 26) MUIR, H.: *Biochem. J.*, **69**, 195 (1958).
- 27) YAMASHITA, I. and MAKINO, M.: *J. Biochem.*, **51**, 359 (1962).

アコヤガイに寄生する二世吸虫に関する研究一Ⅲ.

第2 中間宿主から人工感染によつて得たメタセルカリア

阪 口 清 次

日 本 水 産 学 会 誌

第三十二卷 第 四 号 別 刷

昭和四十一年四月二十五日発行

Reprinted from the Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 32, No. 4, April 1966.

アコヤガイに寄生する二世吸虫に関する研究—Ⅲ.

第2中間宿主から人工感染によつて得たメタセルカリア*

阪 口 清 次

(1965 年 12 月 17 日受理)

STUDIES ON A TREMATODE PARASITE OF THE PEARL OYSTER,
PINCTADA MARTENSII—III.THE METACERCARIA OBTAINED FROM THE SECOND INTERMEDIATE
HOST ARTIFICIALLY INFECTED WITH THE
CERCARIA, *BUCEPHALUS MARGARITAE*

Seiji SAKAGUCHI**

Several species of fish expected to the second intermediate host of the trematode were artificially infected with the cercaria, *Bucephalus margaritae*, which was parasitic on the pearl oyster. The metacercariae were successfully obtained from the infected fishes.

The specimens of metacercaria were observed morphologically in detail and compared with other species of genus *Bucephalus* reported by other authors.

Morphological observation proved that the metacercaria obtained is classified as *Bucephalus varicus* MANTER, 1940.

アコヤガイにセルカリアがみられることは、1932 年に妹尾¹⁾によつて初めて報告され、その後 1934 年に尾崎(佳)ら²⁾によつて *Bucephalus margaritae* と命名された。このセルカリアの寄生をうけたアコヤガイは発育が悪く、環境条件の変化にたいして斃死を起こし易く、また挿核に際しても手術後の斃死率が異常に高いうに、それらから産出される真珠はほとんどが不良品である。したがつて本虫の寄生は真珠養殖業にとつて憂慮すべき問題となつて³⁾いる。

著者はこの吸虫の生活史を明らかにするために、人工感染実験により真珠養殖場の付近で採集される多くの魚類が第2中間宿主となる可能性のあること、とくに天然においてはトウゴロウイワシ *Atherina bleekeri* などが第2中間宿主の主体をなしていることを報告し⁴⁾、さらにその後の調査により本虫の寄生が著しい真珠養殖場の水域においてはキビナゴ *Spratelloides japonicus*、カタクチイワシ *Engraulis japonica* などの稚魚もその中間宿主になつて⁵⁾いることを明らかにした。

本報はこれらの第2中間宿主に寄生するメタセルカリアの形態について述べるとともに成体との類縁関係について検討を行なつた。

稿を草するにあたり、研究の機会を与えられ終始御鞭撻下さつた国立真珠研究所太田繁所長ならびに御指導を賜つた東京大学大島泰雄教授、江草周三助教授、東京水産大学保科利一教授に深謝する。

供試材料ならびに方法

第2中間宿主としてはトウゴロウイワシならびに比較的飼育の容易なマハタ *Epinephelus septemfasciatus*、アミメハギ *Rudarius ercodes*、マハゼ *Acanthogobius flavimanus* などを用いた。セルカリアの寄

* 国立真珠研究所業績 第134号 (Contribution No. 134 from National Pearl Research Laboratory.)

** 国立真珠研究所 (National Pearl Research Laboratory.)

生したアコヤガイ（以下罹病貝という）を水温 28°C の水槽中で飼育し、セルカリアを成熟させて自然に泳出したものを上記の魚類へ寄生させた。寄生後約 1 カ月間水槽中で飼育した後にメタセルカリアをその被囊からとりだして観察に供した。観察は主として生体標本について行なつたが、SCHAUDINN および ZENKER 液で固定、DELAFIELD'S haematoxyline, および alum-carmin によつて染色した標本についても行なつた。

メタセルカリアの形態

メタセルカリアは第 2 中間宿主内において主として筋肉中に被囊体を形成している。その形態は楕円形を呈し、大きさは $195 \sim 295 \times 124 \sim 160 \mu$ である。被囊から摘出した虫体は盛んに伸縮運動を行なう。10% 温ホルマリンで固定した虫体の大きさは $230 \sim 312 \times 84 \sim 140 \mu$ であつた。

虫体は体表面に短かい剛毛を備えており、体の前後にある剛毛は小さく、中央部にあるものは大きい。口

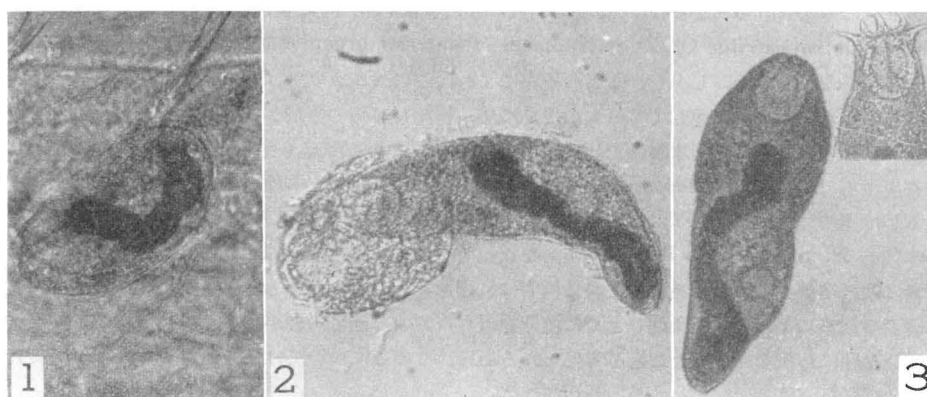


Fig. 1. A metacercaria developed from the cercaria, *Bucephalus margaritae* parasitic on the pearl oyster. ($\times 150$)

- 1: An encysted metacercaria found in the musculature of a second intermediate host.
- 2: A metacercaria forcibly induced from the cyst.
- 3: Ventral view of a metacercaria and its extended tentacles.

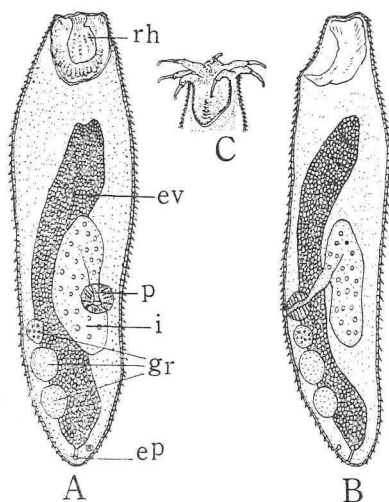


Fig. 2. General anatomical features of the metacercaria developed from *Bucephalus margaritae* ($\times 200$)

- A: ventral view,
 B: lateral view,
 C: extended tentacles
 ep; excretory pore,
 ev; excretory vesicle
 gr; genital rudiments,
 i; intestine,
 p; pharynx, rh; rhynchus

は体の後方腹面正中線上にみられ、 $20 \times 27 \mu$ のよく発達した咽頭を備えている。食道は咽頭より前走し、まもなく後転、咽頭より後方へ拡がっている袋状の腸管に連なっている。排泄嚢は前端的吸着器官 (rhynchus) の近くまで拡がっており、体の末端部近くの腹面に開口している。腹面正中線に対し体の左側後方に3個の生殖腺原基が縦列してみられる。精巢の原基と思われる後方の2個はほぼ同大で ($20 \sim 27 \times 15 \sim 20 \mu$)、おそらく卵巢のそれと思われる前方の1個は卵形で $15 \times 10 \mu$ を算する。なお、右側後方にも陰茎嚢の原基と推察されるものがかすかに観察される。体の前端部に位置する吸着器官はよく発達し $38 \sim 48 \times 39 \sim 54 \mu$ を算し、7個の触手を有する。触手は通常引込めているが、生体標本をカバーガラスで圧すると容易に伸出する。触手は Fig. 1-3, 2-C に示すように幅広い基部と先細の先端部からなっている。背面に3個、側面に2個、腹側面に2個が配列されている。

考 察

本セルカリアは尾崎(佳)らにより *Bucephalus* 属に分類されたが、その後、尾崎(弘)⁶⁾は「真珠貝に寄生する *Bucephalus margaritae* OZAKI et ISHIBASHI は anterior organ が吻であるので *Prosorhynchus* 属に移すべきである」とした。しかし、著者の観察によればこのセルカリアはメタセルカリアになると前端的の付着器官の一部に触手が発達してくるものであつて、尾崎(佳)らの分類が正しいと考えられる。

Bucephalus 属の既報の種類と本種とを比較検討すると次のようになる。

カキに寄生する *Bucephalus haimeanus* LACAZE-DUTHIERS, 1854 と本種のセルカリアは形態的には類似しているが、尾崎(佳)ら²⁾は咽頭の位置、尾部の発達およびその形態において異つていると指摘している。

さらに本種と *B. polymorphus* BAER, 1827⁷⁾を比較すると種々の点で類似しており近縁のものと思われるが、後者は最終宿主が淡水魚であることから両者は別種とみられる。しかし、アコヤガイに寄生するセルカリアは著者の観察によれば環境条件（とくに塩分濃度）に対する適応範囲が極めて広く、第2中間宿主への寄生も広い範囲にわたつて可能なことが考えられるから、この点については今後検討したいと思つている。

Table 1. Morphological comparisons between metacercariae developed from *Bucephalus margaritae* and *Bucephalus varicus*.

Species Items	<i>B. varicus</i> MANTER, 1940	Metacercariae developed from <i>B. margaritae</i> OZAKI et ISHIBASHI, 1934
Mouth	Posterior part of midbody	Posterior-ventral surface of midbody
Intestine	Sac-shaped	Oesophagus extends anteriorly a short distance, then turns posteriorly beyond the level of pharynx. Sac-shaped
Excretory vesicle	I-shaped, extending almost to anterior sucker	I-shaped, extending almost to anterior rhynchus, pore on ventral surface in posterior extremity of body
Tentacles	Seven, usually retracted, each tentacle with a large basal and small distal prong	Rhynchus having seven muscular retractile tentacles, each tentacle with a large basal and small distal part. Three dorsal, two lateral, and two ventrio-lateral
Genital organs	Testes tandem in left posterior side of body, ovary ovoid, directly anterior to anterior testis, cirrus sac in right posterior side of body	Three tandem rudiments of genital organ in left posterior side of body, the situation of cirrus sac probably same as that of <i>B. varicus</i>

B. varicus は MANTER⁸⁾ がアメリカの太平洋、大西洋両岸の数種の *Caranx* から発見した成虫であるが、本邦では山口⁹⁾ が那覇産カイワリ *Caranx equua* からこれを見出している。本種をこの種と比較するとすべての点において酷似しており (Table 1.), 両者は同一種と認むべきものと考えられる。

要 約

アコヤガイに寄生するセルカリアを第2中間宿主へ人工感染させてメタセルカリアを得て、既知の *Bucephalus* 属吸虫と比較検討した。

その結果、このメタセルカリアは *B. varicus* MANTER, 1940 (成虫) に同定することが妥当と考えられた。

文 献

- 1) 妹尾秀実: 本誌, **1**, 62 (1932).
- 2) OZAKI, Y. and ISHIBASHI, C.: *Proc. Imp. Acad. Sci.*, **10** (7), 439~441 (1943).
- 3) 阪口清次: 国立真珠研報, **9**, 1161~1169 (1964).
- 4) 阪口清次: 同上, **8**, 1060~1063 (1962).
- 5) 阪口清次: 未発表.
- 6) 尾崎弘行: 広島大学医学部解剖学第一講座業績集, **10**, 77~84 (1960).
- 7) DAWES, B.: *The Trematoda, Univ. Press. Cambridge, London*, 190~193 (1956).
- 8) MANTER, H. W.: *Allan. Hancock. Pacif. Exped.*, **2** (14), 335~337 (1940).
- 9) YAMAGUTI, S.: *Trans. Biogeogr. Soci. Japan*, **3**, 330~331 (1942).

アコヤガイに寄生する二世吸虫に関する研究—Ⅳ.

2種の *Caranx* から見出された *Bucephalus* 属
の吸虫について

阪 口 清 次

日 本 水 産 学 会 誌

第三十二巻 第 四 号 別 刷

昭和四十一年四月二十五日発行

Reprinted from the Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 32, No. 4, April 1966.

アコヤガイに寄生する二世吸虫に関する研究—Ⅳ.

2 種の *Caranx* から見出された *Bucephalus* 属
の吸虫について*

阪 口 清 次

(1965 年 12 月 17 日受理)

STUDIES ON A TREMATODE PARASITE OF THE PEARL OYSTER,
PINCTADA MARTENSII—IV.ON THE TREMATODA OF GENUS *BUCEPHALUS* FOUND IN THE
FISHES, *CARANX SEXFASCIATUS* AND *C. IGNOBILIS*

Seiji SAKAGUCHI**

In order to elucidate the developmental stages of the cercaria belonging to genus *Bucephalus* commonly found in Japanese pearl oysters, many kinds of fish living in pearl oyster farms, where the pearl oysters were heavily infected with the cercaria, were collected and examined for the presence of trematoda.

1) A species of trematoda was found in the digestive organs of the fishes, *Caranx sexfasciatus* and *C. ignobilis*, and its specific name was identified as *Bucephalus varicus* MANTER, 1940¹⁾.

2) This species bears characteristic similar to those of the metacercaria which could be brought up in the body of some other small fishes or its second intermediate hosts by artificial infection of the cercaria as reported in a previous paper⁴⁾.

3) The trematoda was frequently found in the carangid fish caught in pearl oyster farms heavily infected with the cercaria belonging to genus *Bucephalus*, while the fish obtained from cercaria-uninfected farms were always free from the trematoda.

4) The season when carangid fish heavily infected with this trematoda is closely related to the maturing season of the cercariae, especially to the time when they leave the host bivalves.

Judging from the above-mentioned facts, it can be said that the trematoda, *Bucephalus varicus*, found in the carangid fish may be identical with the adult form of the cercaria living in pearl oyster, which has been reported before as *Bucephalus margaritae* OZAKI et ISHIBASHI, 1934²⁾.

著者はアコヤガイに寄生するセルカリアの生活史を究明する目的で本種の寄生が多くみられる真珠養殖場を中心にその付近の水域に棲息する各種の魚類について *Bucephalus* 属吸虫の検出を試みた。その結果、*Caranx* 属の 2 種にそれが発見された。

本報ではこの吸虫がアコヤガイに寄生するセルカリアを実験的に第 2 中間宿主に寄生させて得たメタセルカリアと形態上類縁関係にあることおよびその養殖場水域における出現状態その他からアコヤガイに寄生するセルカリアの成虫にちがいないとの結論を得るに至つたのでここに報告する。

稿を草するにあたり、研究の機会を与えられ、終始御鞭撻下さつた国立真珠研究所太田繁所長ならびに御

* 国立真珠研究所業績 第 135 号 (Contribution No. 135 from National Pearl Research Laboratory.)

** 国立真珠研究所 (National Pearl Research Laboratory.)

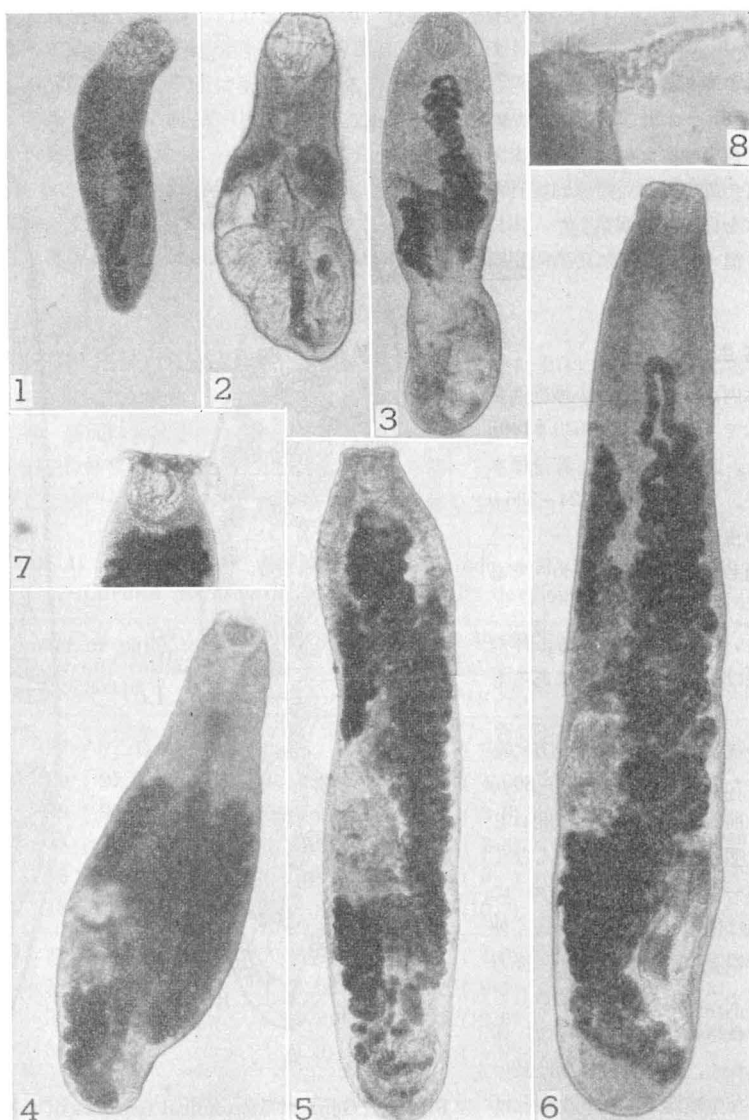


Fig. 1. Trematode obtained from *Caranx sexfasciatus* ($\times 80$).

1~6: Each stage in development

7: Showing the tentacles extended

8: A tentacle extended in large magnification

指導を賜わった東京大学大島泰雄教授，江草周三助教授，東京水産大学保科利一教授に心からお礼申上げる。研究材料の蒐集については愛媛真珠株式会社高山活夫氏，白浜真珠株式会社小川勝氏，向田真珠向田純一郎氏ならびに業界の多くの方々の御協力を戴いた。あわせて感謝する。

供試材料ならびに方法

研究に供した魚類は和歌山県西牟婁郡田辺湾，愛媛県南宇和郡御荘湾，高知県宿毛湾，三重県度会郡五ヶ所湾，同志摩郡英虞湾ならびに的矢湾（飯浜）から得たナガエバ *Caranx sexfasciatus* 78 尾，マルエバ

C. ignobilis 23 尾であつて、これらは 1963 年 10 月 2 日から 1965 年 1 月 29 日までに採集したものである (年令 2 才未満, 体長 9.7~20.2 cm, 体重 22.5~250.0 g)。

寄生虫の形態観察は主として生体標本を用い, 内部器官の詳細については固定材料の連続切片標本を作成して観察した。体長の測定は 10% 温ホルマリンによる固定標本を使用した。

寄生虫の形態

虫体は寄主体内において著しい伸縮性を示し, 同一虫体で $1240 \times 420 \sim 3640 \times 140 \mu$ の変化を示した。魚体から採集した全標本を測定した結果, $496 \sim 2360 \times 124 \sim 336 \mu$ の各發育段階の虫体を得た。

これらに共通した特徴は次のとおりである。

体表には短かい剛毛を有している。体の前後にある剛毛は小さく, 中央部にあるものは大きい。

口は常に体の後半分より少しく後方にあり, よく発達した咽頭 ($56 \times 96 \times 52 \sim 80 \mu$) を備え, 短かい前咽頭を以て腹面に開口している。食道は咽頭から前走し, まもなく後転, 袋状の単一の腸管 ($430 \sim 450 \mu$) に連なる。排泄囊は体の長軸に沿って長く伸び, 前端的吸着器官の近くまで達し, 後方へは体の末端部まで達して腹面に開口している。陰茎囊の長さは $270 \sim 420 \mu$ で, 体長の $1/5$ よりも長く, 袋状の貯精囊, 長い摂護腺部, 大きな生殖窩をもち, 生殖孔は後方末端部よりやや離れた腹面に開口している。睪丸は 2 個あつてその径は $100 \sim 170 \times 80 \sim 150 \mu$, 体の咽頭の位置する付近から少しく後方へ沿って左側に縦列をなしてみられる。卵巣は常に前睪丸の直前に位置し, その大きさは $80 \times 120 \sim 80 \times 110 \mu$ である。卵黄腺は体の背面側にあつて, 左右両側に 14~17 個が縦列している。卵黄輸管は後方へのび, 通常睪丸付近で互に連絡している。ラウレル氏管は前睪丸付近で背面に開いている。受精囊の存在は認められ

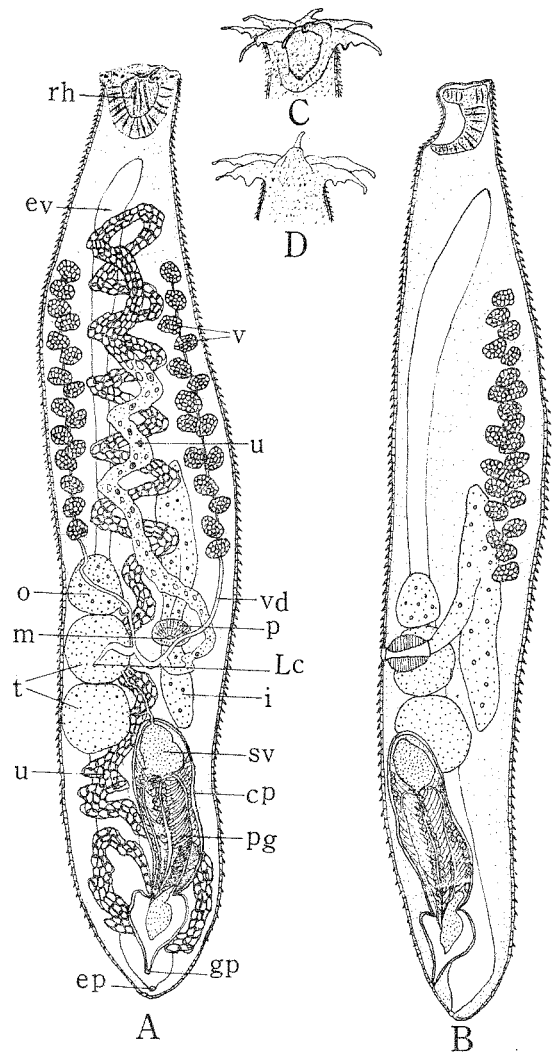


Fig. 2. General anatomical features of the trematoda obtained from *Caranx* ($\times 80$)

A: ventral view, B: lateral view, C: ventral view of tentacles extended, D: dorsal view of tentacles extended, D: dorsal view of tentacles extended

cp; cirrus pouch, ep; excretory pore, ev; excretory vesicle, gp; genital pore, i; intestine, Lc; Laurel canal, m; mouth, o; ovary, p; pharynx, pg; glandula prostatica, rh; rhynchus, sv; seminal vesicle, t; testis, u; uterus, v; vitellaria, vd; vitelloduct

ない。子宮はよく発達して卵黄腺の前方まで拡がり、迂曲しながら後方へむかい、末端の生殖窩に開く。子宮内の卵数は極めて多く、成熟卵の大きさは $18 \sim 24 \times 10 \sim 17 \mu$ で黄橙色を呈している。なお、前端的吸着器官に備えている7個の触手は通常は引込めているが、未成熟の個体ではそれらを盛んに伸縮しながら運動しているのがみられる。触手は幅広い基部と先細の先端部から成っている。

本虫の以上の特徴をアコヤガイに寄生するセルカリアを実験的に第2中間宿主に寄生させて得たメタセルカリア⁴⁾と比較すると、体表面の剛毛、咽頭の位置、腸管および排泄囊の形態、生殖器官ならびに体の前端的吸着器官に備えている触手の諸形質およびその配列状態など全く一致している。

本虫はこれらの特徴から *Bucephalus varicus* MANTER, 1940¹⁾ と同定し得る。

寄主内における寄生部位

五ヶ所湾で採集(10月および12月)したナガエバに寄生していた虫体の大きさとその寄生部位の関係は Fig. 1 のとおりであつて、成熟した虫体は主として幽門垂にみられ、比較的発育の遅れているものおよび未成熟の個体は胃、腸部に発見された。

このことから宿主に捕食されたメタセルカリアは胃から腸に至る間に被囊から脱し、腸内にくだり、ふたたび腸内を上行して幽門垂に至り、そこで成熟するものと推察される。

Table 1. Infestation of the parasitic trematode in the internal organs of *Caranx sexfasciatus* in relation to its developmental stages.

No.	Items	Number of parasites in pyrolic caeca > 800 μ *	Number of parasites in stomach and intestine		Total	Date and Locality
			> 800 μ	800 μ <		
1		27 (87.1)	0 (0)	4 (2.9)	31	Oct. 28, 1963. Recess of Gokasyo Bay.
2		20 (91.0)	1 (4.5)	1 (4.5)	22	
3		49 (96.1)	0 (0)	2 (3.9)	51	
4		38 (95.0)	1 (2.5)	1 (2.5)	40	
5		18 (100)	0 (0)	0 (0)	18	
6		48 (85.7)	2 (3.6)	6 (10.7)	56	
7		22 (88.0)	2 (8.0)	1 (4.0)	25	Dec. 16, 1963. Central area of Gokasyo Bay.
8		19 (86.4)	1 (4.5)	2 (9.1)	22	
9		20 (83.3)	1 (4.2)	3 (12.5)	24	
10		52 (96.2)	1 (1.9)	1 (1.9)	54	

* Parasites over 800 μ in body length produce eggs in the uterus.

ナガエバ、マルエバにおける寄生率

本虫のナガエバおよびマルエバに対する寄生率を漁場別にみると Table 2 のとおりで、セルカリアの多く寄生する真珠養殖場の付近で採集したものには本虫の寄生率が高く、セルカリアの寄生のほとんどみられない水域ではその寄生率が低く、真珠養殖場として利用されていない水域で採集したものには本虫の寄生は全くみられない。

また、各養殖場についてナガエバの採集時期別に本虫の寄生数を示すと Table 3 のとおりである。すなわち、同一湾内でもナガエバの採集時期によつてその1尾当りの寄生虫数に変動がみられる。いま、田辺湾のナガエバについて採集時期別の寄生虫数と第2中間宿主に対するメタセルカリアの自然感染率³⁾を図示すると Fig. 3 のようになる。これで見ると、セルカリアの泳出が盛期に向うにともない第2中間宿主に対するセルカリアの侵入度合が高まつてき、その直後にナガエバの寄生虫数が増加してくるという関係が認めら

Table 2. Infection rates of *Caranx sexfasciatus* and *C. ignobilis* in different localities.

Items Locality	Appearance of pearl oysters infected with the cercaria*	Data of collection	Number of fish examined	Number of fish infected	Percent of infected fish	Fish species
Tanabe Bay	CC	Oct. 24, '63 ~ Jan. 29, '65	18	18	100	<i>Caranx sexfasciatus</i>
Hirajo Bay	CC	Oct. 2, '63 ~ Oct. 4, '63	7	7	100	
Sukumo Bay	CC	Oct. 2, '64	8	8	100	
Gokasyo Bay	C	Oct. 28, '63 ~ Dec. 16, '64	10	10	100	
Ago Bay	R	Nov. 14, '63 ~ Oct. 8, '64	24	7	29.2	
Matoya Bay (Iihama)	N	Oct. 28, '63	11	0	0	
Hirajo Bay	CC	Oct. 3, '63 ~ Oct. 4, '63	7	7	100	<i>Caranx ignobilis</i>
Gokasyo Bay	C	Oct. 28, '63 ~ Oct. 31, '63	8	4	50.0	
Ago Bay	R	Nov. 14, '63	8	0	0	

* Infection rates in 4 years old pearl oysters.

CC: over 30%, C: 10~30%, R: under 10%, N: nothing.

Table 3. Number of the trematode found in an individual of *Caranx sexfasciatus* in different seasons.

Items Locality	Date	Number of fish examined	Number of fish infected	Number of parasites		Location in the bay
				Range	Mean	
Tanabe Bay	Oct. 24, '63	3	3	20~89	46.0	Interior
	Dec. 16, '63	2	2	145~181	163.0	
	Jan. 30, '64	8	8	156~325	256.6	
	Sept. 20, '64	1	1	15	15	
	Oct. 15, '64	2	2	38~45	41.5	
	Jan. 27, '65	1	1	156	156	
	Jan. 29, '65	2	2	169~206	187.5	Entrance
	Jan. 30, '64	1	1	4	4	
Hirajo Bay	Oct. 2, '63 ~ Oct. 4, '63	7	7	66~273	157.3	Interior
Gokasyo Bay	Oct. 28, '63	6	6	18~56	36.3	Interior
	Dec. 16, '63	4	4	19~54	28.7	Central
Ago Bay	Nov. 14, '63 ~ Nov. 29, '63	13	6	1~9	3.7	Entrance
	Aug. 11, '64	4	0	0	0	Central
	Sept. 10, '64	2	0	0	0	"
	Sept. 21, '64	2	0	0	0	Entrance
	Oct. 15, '64	3	1	3	3	Central

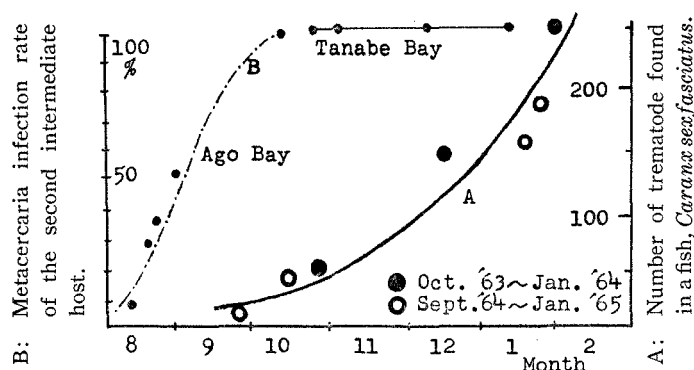


Fig. 3. Number of trematode found in a fish, *Caranx sexfasciatus*, and metacercaria infection rate of the second intermediate hosts.

ナガエバおよびマルエバに *Bucephalus* 属吸虫が寄生していることを認めた。採集したナガエバからは各发育段階の虫体が得られ、これらの形態的特徴はアコヤガイに寄生するセルカリアの人工感染実験によつて得たメタセルカリアの形態と全く一致していることから、これがアコヤガイに寄生するセルカリアの成虫であると同定した。

なお、Table 2 に示されるようにセルカリアの多く寄生する真珠養殖場付近の水域から採集したナガエバのすべてには本虫が見出され、英虞湾のように罹病貝の出現率の低い水域においてはその寄生率が低く、的矢湾奥部（飯浜）のように真珠養殖業が行なわれていない水域では寄生が全くみられないことは、本虫が真珠養殖場における罹病貝の出現率と深い関連をもっていることを示すものである。また、Table 3 および Fig. 2 に示すとおり、セルカリアの泳出初期に採集されたナガエバには本虫の寄生が少なく、泳出盛期になつて第2中間宿主に対するメタセルカリアの感染率が高まるとその直後から寄生虫数が多くなっていることも、本虫がアコヤガイに寄生するセルカリアと密接な関係があることを示している。

以上のことから、本虫がアコヤガイに寄生するセルカリアの成体であることはほとんど疑う余地がないと考える。

要 約

セルカリアの多く寄生する真珠養殖場付近の水域に棲息する魚類について *Bucephalus* 属吸虫の寄生状態を調査し、以下の結果を得た。

- 1) ナガエバおよびマルエバに目的の吸虫が発見され、本種は *Bucephalus varicus* MANTER, 1940 と同定された。
- 2) 本虫はアコヤガイに寄生するセルカリアを人工感染させ得たメタセルカリアの形態的特徴を具備する。
- 3) 本虫のナガエバ、マルエバにおける寄生率はその漁場における罹病貝の出現率と深い関係をもっている。
- 4) ナガエバに対する本虫の寄生はアコヤガイに寄生するセルカリアの泳出時期と密接な関係がある。

以上の諸点からアコヤガイに寄生するセルカリアの成体は *Bucephalus varicus* MANTER, 1940 と査定される。

文 献

- 1) MANTER, H. W.: *Allan. Hancock Pacif. Exped.*, 2 (14), 335~337 (1940).
- 2) OZAKI, Y. and ISHIBASHI, C.: *Proc. Imp. Acad. Sci.*, 10 (7), 439~441 (1943).
- 3) 阪口清次: 国立真珠研報, 8, 1060~1063 (1962).
- 4) 阪口清次: 本誌, 32 (4), 312~315 (1966).

れる。

考 察

著者は前報⁴⁾においてアコヤガイに寄生するセルカリアの人工感染実験によつて得たメタセルカリアの形態を既報告のそれと比較検討してその成虫を *Bucephalus varicus* MANTER, 1940 と推定した。

本研究では別の立場からセルカリアの多く寄生する真珠養殖場付近の水域に棲息する魚類に寄生する吸虫を調査し、

Spiral Growth of Nacre

INTERESTING spiral patterns (Fig. 1) were found on the growing inner surface of nacre when the fresh inner surface of pelecypod shells was observed under a microscope using a vertical illuminator. The pattern was explained by invoking the theory of Liesegang's rings^{1,2}. This communication deals with the phenomenon as an aspect of spiral growth.

It has been considered that the shells of molluscs crystallize in complicated ways from a specific solution ("extrapallial fluid") which is below the critical supersaturation required for homogeneous nucleation. They are built up from an organic substance "conchiolin" combined with microcrystals of calcium minerals. Investigations using Laue photographs and polarizing and electron microscopes revealed that the nacre of pelecypod shells was not a single crystal but consisted of mosaic aggregates of aragonite microcrystals having *b* and *c* axes nearly parallel to the horizontal and vertical directions of growth and with the (001) plane of aragonite nearly parallel to the growing inner surface of the nacre. Spiral patterns in the genus *Pinctada* are more often found in the anterio-ventral regions and the inside regions along the pallial impressions, where the vectors³ indicating the direction of growth are usually deflected, than in other flat ventral regions.

The spiral pattern is observed at the edges of mineral lamellae which emerge on the growing surface of the nacre. Generally speaking, the highest point is the top of the spiral from which a ledge descends step by step outwards. The height of each step of the spirals is in the range 1000–5000 Å, which is equal to the thickness of one lamella, except near the central parts of the spirals, where the step height is less than 1000 Å. The spirals are usually nearly circular; their precise shape, however, varies with the species and physiological condition of the animal, and from region to region in a single shell. It was further shown³ that the density of spirals per unit area, the distance between two steps, and the number of steps in one spiral depend on the precipitation rate of calcium carbonate.

Nacre grows by the advance of growth fronts of mineral terraces which begin from deformed, misfitting or boundary portions on the nacreous surface. Spiral growth hills are concentrated in particular portions of the surface of the nacre. For example, in the genus *Pinctada*, growth of spirals starts in the narrow parts along the pallial impression where curvature of nacre occurs during the

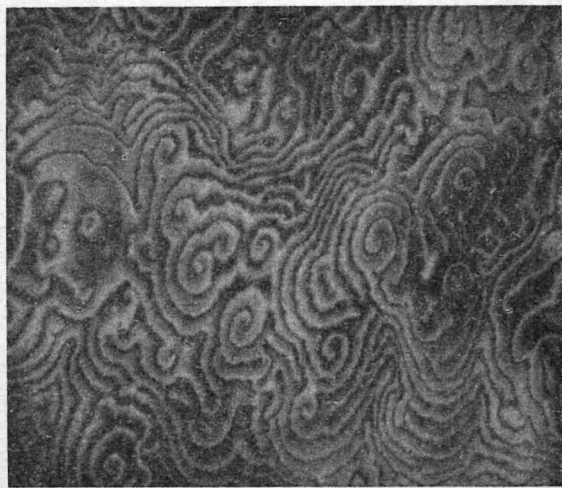
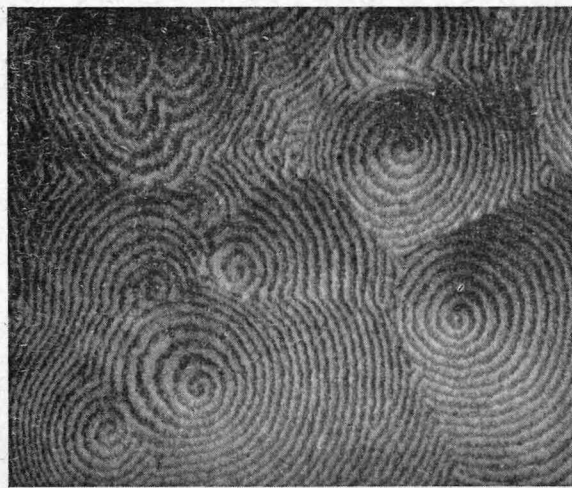


Fig. 1. Typical spiral growth of nacre in *Pinctada martensii* (left, $\times 85$) and in *Hyriopsis schlegeli* (right, $\times 50$).

morphogenesis of the shell and where misfit occurs between two groups of microcrystals of different orientations at small angles. In the nacre of *Pinctada martensii*, new microcrystals tend to grow on the boundary between two underlying microcrystals, though this does not always occur in the nacre of *Pinna attenuata*. It is thought that a small amount of conchiolin condenses along these boundary regions.

It is interesting to note that the ratios of right-handed to left-handed spirals in anterior and posterior regions of a shell tend to bear an inverse relationship to each other where the vector of the shell growth in the anterior region is opposite in direction to that in the posterior region. When two adjacent spirals have the same sign they tend to develop into a superior spiral, whereas if they have opposite signs a closed loop is developed.

These observations show that tilted or twisted boundaries at small angles tend to occur between two microcrystals or between any two blocks with slightly different vectors of shell growth which interfere with each other during the morphogenesis of a shell. Screw dislocations then develop, giving rise to spiral growth hills on the nacreous surface. It should be emphasized that the spiral pattern of nacre can be reasonably explained by Frank's screw dislocation theory⁴ of the spiral growth of single crystals.

I thank Prof. T. Sudo for encouragement and useful discussion and Prof. E. Suito and Dr. I. Sunagawa for their helpful advice.

KOJI WADA

National Pearl Research Laboratory,
Mie Prefecture, Japan.

¹ Schmidt, W. J., *Zool. Jahrb.*, 45, 1 (1924).

² Watabe, N., *Shinju no kenkyu (Japan)*, 1, No. 2 (1950).

³ Wada, K., *Bull. Nat. Pearl Res. Lab.*, 7, 703 (1961).

⁴ Frank, F. C., *Disc. Farad. Soc.*, 5, 48 (1949).

昭和 41 年 11 月 1 日 印刷
昭和 41 年 11 月 5 日 発行

三重県志摩郡阿児町賢島

発行所 **国立真珠研究所**

発行者 太 田 繁

印刷者 古 門 龍 雄

大阪市東淀川区下新庄町 4 丁目 167

印刷所 国際印刷工業株式会社

Bulletin of the National Pearl Research Laboratory

II

November 1966

CONTENTS

Wada, K.	Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs. XIII. Histological and histochemical studies of mucous cells on the inner and shell surfaces of mantle of some bivalve and gastropod molluscs.....	1283
Sawada, Y. and Uyeno, F.	Studies on the acetone extracts from marine mud and faeces of pearl oyster (<i>Pinctada martensi</i>). I. On the absorption spectra of acetone extracts	1298
Kuwatani, Y. and Nishii, T.	Change in the qualities of breeding water and the growth of the pearl oyster using the aquarium with closed circulating system	1308
Hasuo, M.	On the relation between change of physiological condition and appearance of the gonad in so called "Shitate" (control of physiological condition of the pearl oyster <i>Pinctada martensii</i> for the operation)	1334
Yamaguchi, K.	Studies on the technique so called "Atozuke" (one of the methods of nuclear insertion in pearl culture). V. On the control of physiological condition from nuclear insertion to mantle piece insertion.	1348
Sawada, Y. and Taniguchi, M.	The influence on the quality of cultured pearl by the character of "piece" (piece of mantle membrane)	1355
Funakoshi, S.	On the influence of air exposure upon the pearl oyster, <i>Pinctada martensii</i>	1362
Mizumoto, S.	Studies on the disease of the shells of pearl oyster (<i>Pinctada martensii</i>). II. On the seasonal variation in occurrence <i>Polydora ciliata</i> in shells of pearl oyster	1368

The originals published in other journals

Wada, K.	Taxonomic modification of amino acid composition in the proteins of molluscan shells
Wada, K.	Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs. XI. Comparative biochemical study on the amino acid composition of conchiolins from calcitic and aragonitic layers
Wada, K.	Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs. XII. Specific patterns of non-mineralized layer conchiolin in amino acid composition
Sakaguchi, S.	Studies on a trematode parasite of the pearl oyster, <i>Pinctada martensii</i> . III. The metacercaria obtained from the second intermediate host artificially infected with the cercaria, <i>Bucephalus margaritae</i>
Sakaguchi, S.	Studies on a trematode parasite of the pearl oyster, <i>Pinctada martensii</i> . IV. On the trematoda of genus <i>Bucephalus</i> found in the fishes, <i>Caranx sexfasciatus</i> and <i>C. ignobilis</i>
Wada, K.	Spiral growth of nacre

National Pearl Research
Laboratory
Kashikojima, Ago-cho, Shima-gun
Mie Prefecture, Japan