

国立真珠研究所報告

17

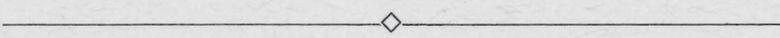
昭和48年(1973)8月

Bulletin of the National Pearl Research Laboratory

17

August 1973

国立真珠研究所報告 17 (1973)



内 容

和田浩爾 外套膜中心部の外面上皮が変則的に分泌した物質のアミノ酸組成について……………2053

和田浩爾 外套膜の酵素組織化学による研究……………2059

和田克彦 三種類の微細藻類を与えたアコヤガイ幼生の生長……………2075

学会誌等発表論文

和田浩爾・古橋 保 軟体動物の石灰化組織の鈣物化に関する研究—XVII
イケチヨウガイ貝殻における酸性多糖体の分布

和田浩爾・古橋 保 軟体動物の石灰化組織の鈣物化に関する研究—XVIII
外套膜が分泌する粘液の酸性多糖体

和田浩爾 貝殻・真珠の形成機構

Amino acid composition of organic matrices in anomalous matters secreted by the epithelium on the outer mantle surface inside pallial line*[†]

Koji Wada

Such various structural units of a shell as pellicle, periostracum, prismatic layer, nacre and ligament are secreted by different parts of a mantle during normal shell growth, respectively, and are conspicuously different from each other in organic and inorganic constituents. The outer mantle epithelium, which is commonly responsible for the formation of nacre, sometimes produces periostracum-like organic sheet in *Hyriopsis schlegelii*. If a shell was broken in bivalved molluscs, the broken part could be repaired by the molluscs. Experiments (Rassbach, 1912; Tsujii, 1960; Beedham, 1965) have suggested that the secretive function of the outer mantle epithelium does not be specific and is alterable in the process of shell repair. Similarly, it has been reported that the outer mantle epithelium regenerating pearl sac epithelium produces organic matters, prismatic and nacreous layers in the process of pearl formation (Rubbel, 1911; Kawakami, 1952; Tsujii, 1960).

The purpose of the present paper is to solve (1) whether the secretive function of the outer mantle epithelium which is responsible for the formation of nacre and calcitostracum during normal shell growth is alterable in certain circumstances and (2) whether the organic matters contained in the anomalous layers produced according to the alternation of the secretive function of the epithelium would be corresponded with that of natural periostracum and natural prismatic layer of the shell, if the secretive function of the epithelium changed.

Materials and Method

Materials used in this study were as follows:

Periostracum-like sheet In the shell of the freshwater bivalve *Hyriopsis schlegelii*, periostracum-like sheet is sometimes secreted during the growth of the nacreous layer. The sheet is thick and light brown. The sheet which was formed near the

* Koji Wada. Amino acid composition of organic matrices in anomalous matters secreted by the epithelium on the outer mantle surface inside pallial line. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 17: 2053-2058. 1973.

† Contribution No. 201 from the National Pearl Research Laboratory, Japan.

inner surface of the nacre inside the pallial line was analyzed in this study.

Deposits A glass coverslip was put in the central area between mantle and shell valve in *Crassostrea gigas*. The coverslip was taken out 16 days after operation, which was done in Ago Bay on the 22th December, 1968. Hard light brown sheet formed on the coverslip was used as materials.

Regenerated sheet A small piece of shell, 2 x 5 millimeters square, was cut off from the shell inside the pallial line by using a fret saw without damage of mantle tissue in *Pinctada fucata*. The mantle which covers the broken part does not shrink, as the mantle tissue is firmly fixed on the shell with pallial muscles. The operated oysters contained in a cultured basket were hung from a raft at depth of 2 meters for 40 days. The pearl oyster repaired the broken part with soft yellow-brown sheet by about 40 days after operation. The first regenerated sheet repairing the broken part was used as materials. This experiment was carried out in Ago Bay from September to October in 1970, when the sea water temperature of 2 meters depth varied in a range from 21.6 to 26.9 °C.

The above-mentioned materials were decalcified with 3M acetic acid and were hydrolyzed according to the same procedures as that reported in the preceding paper (Wada, 1966). Amino acid composition of the hydrolyzates was automatically determined using a KLA-3 type Hitachi Amino Acid Analyser.

Results

Amino acid composition is shown in Table 1 for the periostracum-like sheet, the deposits and the regenerated sheet as compared with the organic matrices of some structural units of each parent shell.

In *Hyriopsis schlegelii* the amino acid composition of periostracum-like sheet formed by the epithelium on the outer mantle surface inside the pallial line during the growth of the shell nacre indicates the pattern just like the periostracum secreted by the mantle edge. That is, large amounts of glycine, tyrosine and proline but small amounts of aspartic acid, serine and alanine are found in the organic matrix of the sheet. The light brown sheet was not mineralized.

Deposits secreted on inserted glass coverslips are mineralized in most specimens and differ in appearance from the structural units of the normal shell of *Crassostrea gigas*. Figs. 1A and B show the surface of different parts of the deposits, indicating that the part in Fig. 1B is developing in the honeycomb structure similar to the prismatic layer produced by the mantle edge (Fig. 1C). The prismatic layer-like deposits consist of organic substances having large amount of aspartic acid, glycine and alanine. In *Crassostrea gigas* the amino acid pattern suggests that the deposit is

Table 1. Amino acid composition of the organic matrices in the shells, periostracum-like sheet, deposits, and regenerated sheet (amino acid residues per 1000 total residues)

Materials Amino acids	<i>Hyriopsis schlegelii</i>		<i>Crassostrea gigas</i>			<i>Pinctada fucata</i>		
	Periostracum	Periostracum-like sheet	Prismatic layer	Calcitost-racum	Deposits	Prismatic layer	Nacre*	Regenerated sheet
Cysteic acid	4.1	+	9.6	9.1	16.2	14.0	15.4	28.1
Aspartic acid	45.9	27.8	129.1	392.9	121.0	71.9	140.5	110.8
Threonine	8.1	7.9	24.7	10.7	31.8	20.7	10.1	38.9
Serine	26.1	29.6	92.0	183.9	81.5	64.5	55.5	53.1
Glutamic acid	18.0	11.8	52.5	31.8	82.4	31.7	44.7	68.4
Proline	52.3	90.1	53.7	17.1	54.7	59.5	15.0	93.5
Glycine	343.7	338.9	121.5	224.9	91.2	230.0	217.2	104.4
Alanine	5.7	10.2	197.6	10.0	166.0	35.8	203.3	35.4
Cystine					+			
Valine	25.7	38.2	38.7	10.5	44.3	57.2	21.7	63.6
Methionine	+	+	+	+	4.5	15.5	8.6	8.6
Isoleucine	29.3	54.7	33.1	4.0	39.5	60.2	15.3	59.9
Leucine	24.8	15.5	38.6	8.0	44.3	63.5	72.2	63.6
Tyrosine	244.1	180.2	71.6	45.9	55.5	122.5	44.6	57.6
Phenylalanine	58.7	82.7	62.2	5.2	70.3	44.9	34.9	42.5
Lysine	23.0	31.8	20.8	22.6	29.6	48.6	32.7	47.3
Histidine	43.8	38.5	16.3	1.7	18.7	20.3	+	18.7
Arginine	46.7	41.8	38.1	22.0	48.5	39.3	68.3	105.3

* The nacre was obtained from the central part of the shell inside the pallial line.

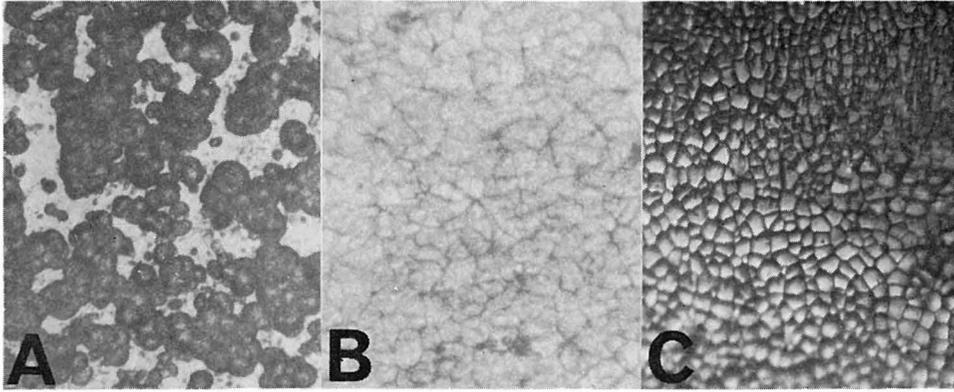


Fig. 1 The comparison of the superficial structure of deposits and normal prismatic layer. $\times 170$

- A. Unmature sheet of deposits.
- B. Mature sheet of deposits.
- C. Prismatic layer produced by the epithelium on outer surface of the outer mantle fold.

the prismatic layer, as seen in Table 1. The prismatic layer of *Crassostrea* shell possesses the same structure as the prismatic layer of *Pinctada* shell but differs markedly in amino acid composition from the latter. As to the amount of aspartic acid, glycine and alanine, the organic matrix of the prismatic layer of *Crassostrea* shell is rather similar to that of the nacre of *Pinctada* shell.

The regenerated sheet which is not calcified has large amounts of aspartic acid and glycine residues. These amino acids are rich in the natural organic matrix called conchiolin from molluscan shells. The most conspicuous pattern of the regenerated sheet is the larger contents of arginine and proline, and is different from any organic matrices of the normal shell of *Pinctada fucata*.

Discussion

Histological (Rassbach, 1912; Tsujii, 1960) and histochemical (Beedham, 1965) studies indicated that the outer mantle epithelium to form nacre in a normal shell secretes yellow-brown or brown periostracum-like organic substance in the early stages of shell repair, as often found in the initial stages of pearl formation and during the normal growth of shell nacre of freshwater bivalves. Beedham (1965) and Tsujii (1960) have therefore stated on the base of the regeneration experiments that the secretory properties of the outer mantle epithelial cells are not specific between the different parts of the mantle in *Anodonta* and is alterable in some conditions.

The following considerations may be allowed from the present study. The epithelium lined on the outer mantle surface, which forms nacre for *Hyriopsis schlegelii* and calcitostracum for *Crassostrea gigas*, secretes periostracum-like organic matrix during normal growth of the layer in the former and prismatic layer on glass coverslips put between shell and mantle of the latter. These possess large amounts of a quinone-tanned protein. In *Pinctada fucata* the outer mantle epithelium, which is responsible for the formation of nacre, secretes neither periostracum nor prismatic layer in the initial stage of repair of the damaged shell. Instead of these shell matters, the damaged part is repaired with yellow-brown organic substance which is rather similar in amino acid composition to organic pearls cultivated by the parent oyster (Wada, 1970). But Wada (1964) has reported that eosinophil organic granules similar in staining property to the interprismatic matrix deposit on glass coverslips put inside the pallial line between the shell and the mantle in *Pinctada fucata*. Moreover it is well known that a few of compound pearls*, which are sometimes produced in pearl culture of *Pinctada fucata*, is composed of alternation of nacreous and prismatic layers deposited around an inserted pearl nucleus. Accordingly, it is not affirmable that the outer mantle epithelium of the speices secretes nacre in every condition.

Acknowledgements

The author expresses his sincere thanks to Director T. Hayashi of National Pearl Research Laboratory for his kindness and to Professor H. Hatano of Kyoto University for his useful advices and kind guidances.

Summary

To investigate whether the epithelium lined on outer mantle surface is specific in secretion properties, amino acid analyses were made on periostracum-like sheet anomalously formed in the shell nacre of *Hyriopsis schlegelii*, deposits occured on glass coverslips inserted between the shell and the mantle in *Crassostrea gigas*, and early regenerated sheet repairing a damaged part of shell in *Pinctada fucata*.

The amino acid pattern of the periostracum-like sheet formed anomalously in the nacre inside the pallial line of *Hyriopsis* shell is similar to that of the organic matrix of periostracum formed by the mantle edge. The epithelium which is responsible for the formation of calcitostracum inside the pallial line of *Crassostrea* shell secretes the

* The pearls consist of two or three of organic matters, prismatic and nacreous layers.

prismatic layer on glass coverslips put between the shell and the mantle. On the other hand, the regenerated sheet repairing initially a broken part of shell inside the pallial line in *Pinctada fucata* is very similar in amino acid composition to the organic matters of organic pearls produced by the parent oyster, which are appeared to occur in pathological states of a pearl sac epithelium.

References

- Beedham, G. E. 1965. Repair of the shell in species of *Anodonta*. Proc. Zool. Soc. Lond. **145**: 107-124.
- Kawakami, I. K. 1952. Studies on pearl-sac formation. I. On the regeneration and transplantation of the mantle piece in the pearl oyster. Mem. Fac. Sci., Kyushu University, Ser. E, **1**: 83-88.
- Rassbach, R. 1912. Beiträge zur Kenntnis der Schale und Schalenregeneration von *Anodonta cellensis* Schröt. Z. wiss. Zool. **103**: 363-399.
- Rubbel, A. 1911. Über Perlen und Perlbildung bei *Margaritana margaritifera* nebst Beiträgen zur Kenntnis ihrer Schalenstruktur. Zool. Jahrb. **32**: 287-366.
- Tsujii, T. 1960. Studies on the mechanism of shell- and pearl-formation in the mollusca. J. Fac. Fish. Univ. Mie **5**: 1-70.
- Wada, K. 1964. 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. **9**: 1087-1098.
- Wada, K. 1966. 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. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **32**: 295-303.
- Wada, K. 1970. The structure and formation of pearl. in 'Profiles of Japanese Science and Scientists 1970' Kodansha (Tokyo), 228-244.

外套膜の酵素組織化学による研究^{*,†}

和田 浩 爾

国立真珠研究所

真珠養殖は軟体動物が貝殻を形成する特性を利用した特徴ある水産養殖業である。第二次世界大戦後の真珠養殖技術は、戦前に一応の確立をみた真円真珠養殖技術を土台として、多彩な分化と長足の進歩をなすとげた。たとえば、母貝の採苗育成、漁場の利用形態の分化、養殖作業の省力化に必要な機械化などがあげられる。しかしながら、多様な品質の真珠を需要量にみあって計画的に生産できる養殖技術を体系的に確立しようとする時、従来の養殖技術研究において企画された実験と観察では、真珠袋の分泌機能あるいは貝の生活の中での真珠袋の分泌代謝を通して、真珠の品質が形成されていく過程を解明するのにおのずと限界がある。

この新しい技術を体系化するにあたって、(1)生体内で鈹物化がおこる必要条件、(2)鈹物化を直接調整する場所の分泌代謝機構、(3)分泌代謝を調整する因子、および(4)分泌代謝を支える代謝的諸問題などを生鈹物学的視角から研究して得られる結果は、有効な知見を与える。ところで、真珠の形成機構は、外套膜小片の移植にともなう外套膜外面上皮細胞の真珠袋上皮細胞への再生、真珠袋に再生した上皮細胞の本来の分泌機能の発揮など複雑な問題も含むが、貝殻の形成機構を解明すれば、以上に述べた4つの基本的な問題については明らかにできる。

貝殻を形成する外套膜は、貝殻および真珠の形成機構と関連して、種々な方法を用いて多くの研究がなされてきている。外套膜の外面上皮細胞、内面上皮細胞、および粘液腺細胞の貝殻形成での役割を知るために、alkaline phosphatase (Manigault, 1939; Bevelander and Benzer, 1948; Kado, 1954, 1960; Beedham, 1958; Tsujii, 1960) や acid phosphatase (Kado, 1960; Bevelander and Nakahara, 1966) が酵素組織化学的ないし生化学的に研究され、また外套膜の貝殻形成機能を支える代謝が生化学 (Jodrey and Wilbur, 1955; Maroney et al., 1957) や組織生理学 (東・河合, 1959; 河合, 1957, 1958, 1959; 辻井・磯野, 1963) の面から研究されている。

それらの研究によると、外套膜上皮細胞に分布する alkaline phosphatase は貝殻蛋白質の合成と分泌に関与する酵素系の1つであり (Kado, 1954, 1960; Beedham, 1958; Tsujii, 1960), 分泌代謝を支える代謝は糖代謝 (Maroney et al., 1957; Wilbur, 1960) と呼吸代謝

* Koji Wada. Enzyme histochemistry of mantle tissue of some bivalves. With English summary, p. 2073. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 17 : 2059-2074. 1973.

† 国立真珠研究所業績 No. 202. (国立真珠研究所報告 17 : 2059-2074. 昭和48年8月)

(Jodrey and Wilbur, 1955; 東・河合, 1959; 河合, 1957, 1958, 1959; 辻井・磯野, 1962) であろうことが指摘されている。しかし, 2, 3の酵素を除いて, 外套膜に酵素がどのように分布しているかは調べられていない。

この研究は外套膜の分泌代謝機構を理解するためにおこなったもので, 各種の酵素が外套膜にどんな分布をしているかを数種の二枚貝について酵素組織学によって観察したものである。

実験材料と方法

実験には2~3年生のアコヤガイ *Pinctada fucata*, 1~2年生のムラサキイガイ *Mytilus edulis*, 2~3年生のマガキ *Crassostrea gigas* および2~3年生のヒオウギ *Chlamys nobilis* を用いた。動物は三重県英虞湾にある真珠研究所多徳島臨海実験場前の筏から海面下約2m層に垂下して養成してあったアコヤガイ, ヒオウギと浮樽やつり線に付着していたムラサキイガイ, マガキを1971年10月12日と1972年7月24日とに採集した。

閉殻筋を切断して開殻し, 外套膜を中央腹側縁より放射方向に長く, 約2×6mmの帯状に切り取り, 長辺を汚紙につけて立て, ドライアイス・アセトンで冷やした *n*-hexane 中に投入し, 急速に凍結した。凍結した材料を試料台に固定し, 約-20°C に保ってある cryostat 内で, 厚さ約5~8 μ の連続新鮮凍結切片とし, スライドガラス上に貼布, 室温で乾燥した。

Table 1. Incubating mixtures and procedures for the demonstration of various enzymes.

Enzyme	Incubating mixture	Procedure
Alkaline phosphatase	5.0mg naphthol AS-MX phosphate 0.25ml DMF 25ml distilled water 25ml 0.2M tris buffer (pH 8.5) 30mg Fast Red Violet LB salt	Fixed for 10 min. with 10% formalin and incubated for 30-60 min. at room temperature
Acid phosphatase	5.0mg naphthol AS-TR phosphate 0.25ml DMF 25ml distilled water 25ml 0.2M acetate buffer (pH 5.2) 30mg Fast Red Violet LB salt	Fixed for 10 min. with 10% formalin and incubated for 2-3 hours at 37°C.
Succinate dehydrogenase	1.0ml 0.06M sodium succinate 2.5ml 0.2% Nitro-BT 1.0ml 0.2M phosphate buffer (pH 7.4) 0.5ml Ringer's solution	Incubated for 1-2 hours at 37°C and fixed for 10 min. with 10% formalin.
Lactate dehydrogenase	0.1ml 0.5M sodium DL-lactate 0.3ml 0.5% NAD 0.3ml 0.5% Nitro-BT 1.0ml 0.2M phosphate buffer (pH 7.4) 1.3ml distilled water	Incubated for 2 hours at 37°C and fixed for 10 min. with 10% formalin.
NADH dehydrogenase	0.7ml NADH solution (2-3mg/ml) 2.5ml 0.2% Nitro-BT 1.0ml 0.2M phosphate buffer (pH 7.4) 0.8ml Ringer's solution	Incubated for 30 min. at room temperature and fixed for 10 min. with 10% formalin.

これらの切片について、Table 1 に示した方法によって、加水分解酵素として alkaline phosphatase (Burstone, 1962) および acid phosphatase (Burstone, 1962), また脱水素酵素として succinate dehydrogenase (Barka-Anderson, 1963), lactate dehydrogenase (Nachlas-Walker-Seligman, 1958) および NADH dehydrogenase (Barka-Anderson, 1963) の証明をおこなった。また、一部の切片は10%ホルマリンで10分間固定し、hematoxyline-eosin および alcian blue (pH 2.2) 染色をおこない、各種酵素の証明切片と比較検鏡した。

観 察

観察に供した4種類ともに、外套膜の先端は内褶、中褶および外褶の3つに分かれる。褶の形態および発達程度は種間で異なる。アコヤガイの外套膜は内褶の形態が最も大きく、hematoxyline によく染まり、alcian blue で濃染する粘液細胞は外套膜内外両面の全域にわたって非常によく発達し、外套膜の中心域では結合組織中に深く懸垂する。茶褐色の色素果粒をもった上皮細胞が内褶と中褶の内外両面および外褶の内面をおおい、また eosin に好染し、alcian blue に染まらない果粒をもつ腺細胞が中褶外面上皮下、褶の基部より中央にかけて特異的に密集する。ムラサキガイの外套膜では、内褶が最も大きく、中褶

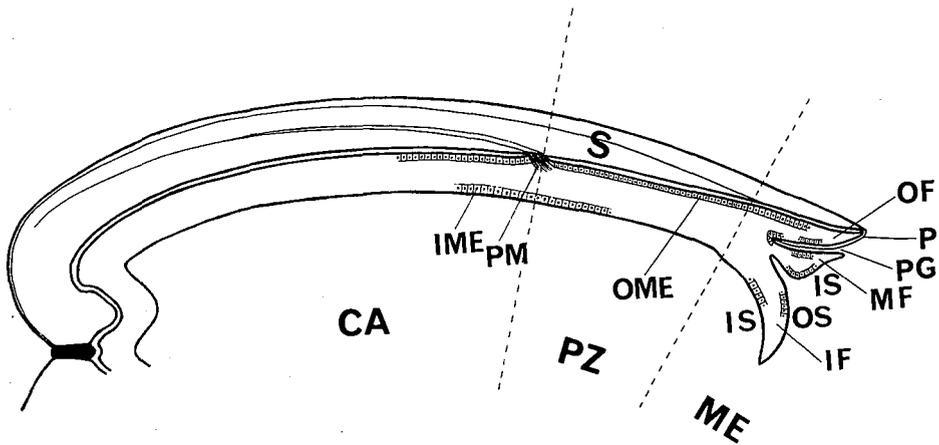
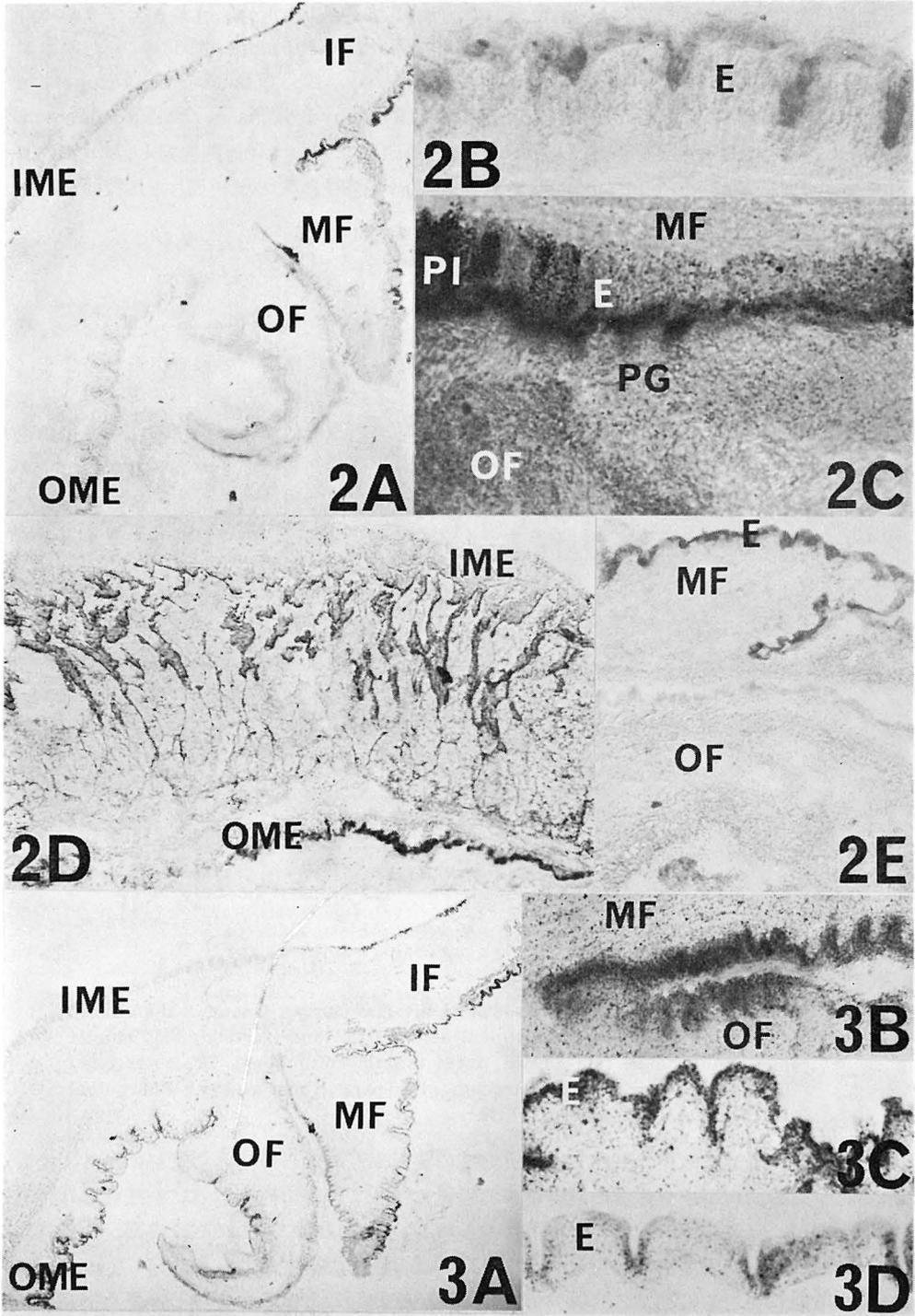


Fig. 1. Anatomy of the mantle tissue of bivalved molluscs. CA, central area; IF, inner fold; IME, inner mantle epithelium; IS, inner surface; ME, mantle edge; MF, middle fold; OME, outer mantle epithelium; OF, outer fold; OS, outer surface; P, periostracum; PG, periostracal groove; PM, pallial muscle; PZ, pallial zone; S, shell.

の外面は中央付近で細長く突出し、殻皮がこの突起部先端から殻皮溝の基部にかけて密着する。多数の筋肉が中褶外面の殻皮との密着面に沿って背腹方向に走る。粘液細胞は外套膜内面によく発達し、内褶では上皮下にみられる。色素果粒をもつ細胞は内褶、中褶（ただし突起部と殻皮との密着部を除く）および外褶の内外両面をおおって分布し、eosin に好染する果粒をもつ細胞が外套膜内外両面の上皮細胞間にまばらに介在し、また内褶およ



び中褶の上皮下にかなり認められる。マガキでは、3つの褶は互いに同等度に発達し、アコヤガイのそれらに比べて細長い。粘液細胞は外套膜の全域にわたって散在する。色素果粒をもつ細胞は内褶の内外両面、中褶と外褶の内面をおおう。ヒオウギの外套膜は、内褶が非常に大きく発達し、筋肉質からなる。中褶には目が一定の間隔で外套膜周縁に沿って1列に並び、いくつかの小さい褶ないし突起が生じている。粘液細胞は外套膜外面によく発達している。色素果粒をもつ細胞が内褶の内外両面、および中褶の内面をおおう。

Alkaline phosphatase (ALP)

本研究に使用した二枚貝の外套膜では、ALPの反応は上皮細胞にのみ明瞭で、その強度の反応は主に外套膜縁で認められたが、種によってその様子を異にする。

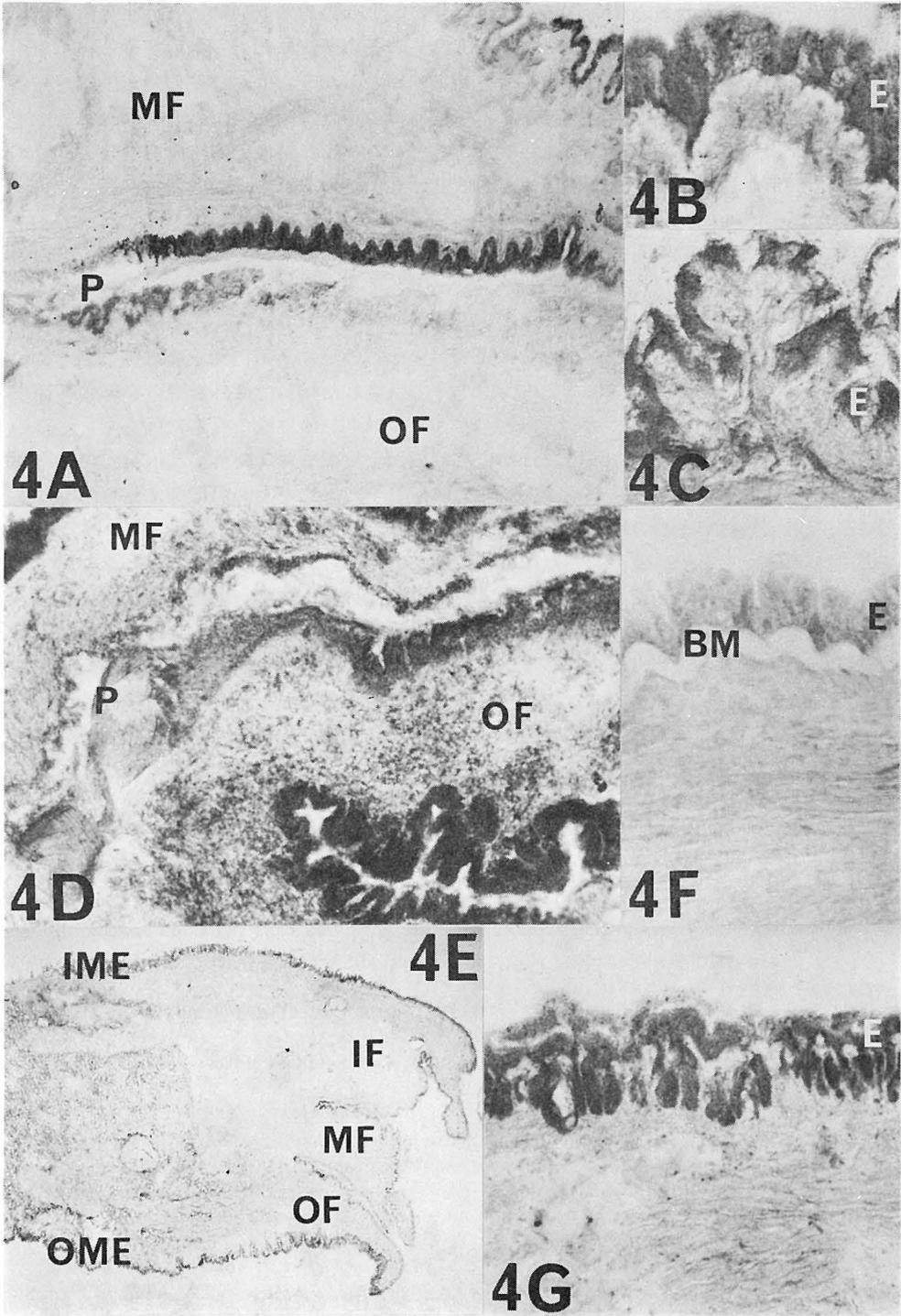
アコヤガイの外套膜では、中褶外面上皮細胞、特に褶の中央から基部にかけて分布する上皮細胞、および内褶の基部から外套縁膜部への移行部分にある内面上皮細胞(Fig. 1)にALPの強い反応がみられ(Fig. 2 A, B), 7月に採集した材料では外套膜中心部の外面上皮細胞にも強い反応がみられた(Fig. 2 D)。Basal Cellの位置の反応は強くない。このほか、外褶の内外両面の上皮細胞とこれに続く外面上皮細胞および外套膜内面上皮細胞に弱い反応が認められたが、粘液細胞、eosinに好染する果粒をもつ腺細胞、結合組織および筋肉組織は陰性である。Fig. 2 Cはアコヤガイの外套膜中褶外面上皮細胞におけるALPの局在を示したもので、酵素活性は細胞の遠心端に認められる。7月に採集した材料では酵素活性が不明瞭であったが、ムラサキガイの外褶外面上皮細胞とこれに続く外套膜外面上皮細胞に中等度の活性がみられ、これらの部分を除く他の上皮細胞では反応は極く弱いか、不明瞭である。マガキの外套膜では、内褶の内外両面の上皮細胞や中褶内面上皮細胞(Fig. 2 E)で強い活性がみられ、中褶外面上皮細胞や外褶の内外両面の上皮細胞の活性は中等度ないし軽度であり、Basal Cellの位置は軽度の反応を示す。これらの部分を除

Fig. 2 Alkaline phosphatase activity.

- A. The mantle of *Pinctada fucata*, indicating positive reactions of the enzyme in the epithelium. x 30
- B. High activity in the distal edge of the epithelial cells (E) on the inner surface of mantle of *Pinctada fucata*. x 240
- C. Strong activity in the distal edge of the epithelial cells (E) lined on the outer surface of middle fold of *Pinctada fucata*. PI, brown pigments contained in the epithelium. x 450
- D. Strong activity of the outer epithelium in the central area of mantle of *Pinctada fucata*. x 120
- E. Strong activity of the inner epithelium (E) of middle fold of *Crassostrea gigas*. x 240

Fig. 3 Acid phosphatase activity.

- A. The mantle of *Pinctada fucata*. Note higher activity in the outer mantle epithelium (OME) than in the inner mantle epithelium (IME). x 30
- B. The bottom of periostracal groove formed between middle (MF) and outer (OF) folds of *Pinctada fucata*, indicating high degrees of enzyme activity in the epithelium of the folds. x 240
- C. Strong activity in the outer mantle epithelium (E) of *Pinctada fucata*. x 240
- D. The inner epithelium (E) of inner fold of *Chlamys nobilis*. x 240



く外套膜上皮細胞の活性は極く弱いか不明瞭で、粘液細胞、結合組織および筋肉組織は陰性である。上皮細胞における ALP 活性はアコヤガイの場合と同様に細胞の遠心端にみられる。ヒオウギの外套膜では、外褶内面の中央から基部にある上皮細胞に強い活性がみられ、その他の部分の上皮細胞にも中等度ないし弱い活性がみられるが、外套膜内面上皮細胞の反応は外面上皮細胞の反応に比べて強い傾向がみられる。なお、観察した4種類の殻皮は陰性である。

Acid phosphatase (ACP)

観察に使用した二枚貝の外套膜での ACP の反応は、上皮細胞で強陽性を示すが、種によって様子はかなり異なる。

アコヤガイの外套膜では、中褶の外面上皮細胞、特に中央から基部にかけて分布する上皮細胞 (Fig. 3 B), 外褶外面上皮細胞とこれに続く上皮細胞 (Fig. 3 C) (ただし中心部に近づくにつれ中等度になる) で反応は強く、外套膜内面上皮細胞の活性はやや強い。外褶内面上皮細胞に中等度ないしやや弱い活性がみられ、内褶の内外面の上皮細胞、中褶内面上皮細胞、および外套膜中心部の外面上皮細胞の反応は弱い (Fig 3 A)。上皮細胞における ACP の活性は、外套膜外面では細胞の遠心端とその付近の原形質で強陽性、中褶外面や外套膜内面ではほぼ均等の反応が原形質全体にみられる。ムラサキガイの外套膜では、外褶外面上皮細胞の反応は明瞭であったが、この部分を除く上皮細胞の活性は極く弱く不明瞭である。マガキでは、外套膜内面上皮細胞の活性が最も強く、外面上皮細胞および3つの褶の内外面の上皮細胞の反応は極めて弱い。ヒオウギの外套膜では、内褶の内外面の上皮細胞 (Fig. 3 D), 外褶内面基部の上皮細胞、および外套膜内面上皮細胞の反応が最も強く、中褶の内外面の上皮細胞、外褶外面上皮細胞や外套膜外面上皮細胞の活性は極く弱い。なお、観察した4種類の粘液細胞、筋肉組織、結合組織、および殻皮は陰性である。

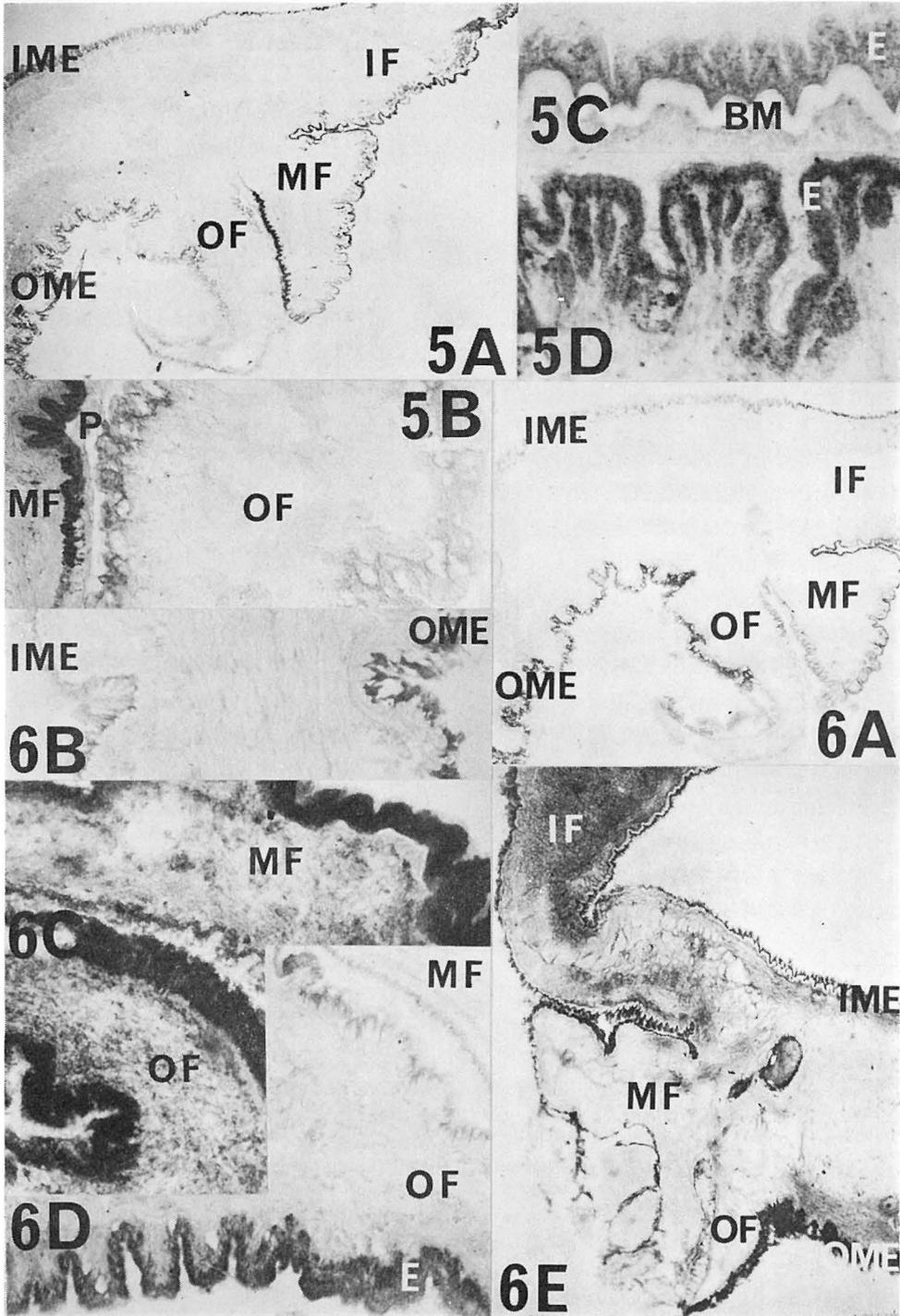
Succinate dehydrogenase (SDH)

外套膜における SDH の活性も種によって様子はかなり異なる。

アコヤガイの外套膜では、中褶外面の中央から先端にある上皮細胞で非常に強い活性を示し、基部に向かって反応は弱くなる (Fig. 4 A)。内褶の内外面の上皮細胞、中褶内面上

Fig. 4 Succinate dehydrogenase activity.

- A. Strong activity in the outer epithelium of middle fold (MF) of *Pinctada fucata*. x 120
- B. The inner mantle epithelium (E) of *Pinctada fucata*. x 240
- C. The outer mantle epithelium (E) of *Pinctada fucata*. x 240
- D. Strong activity in the epithelium lined on the inner and outer surfaces of middle (MF) and outer (OF) folds of *Mytilus edulis*. x 120
- E. High degrees of enzyme activity in the epithelium of mantle of *Crassostrea gigas*. x 30
- F. The inner mantle epithelium (E) of *Chlamys nobilis*. Note no activity in the basement membrane (BM). x 240
- G. The outer mantle epithelium (E) of *Chlamys nobilis*. Note cells with strong activity under the epithelium. x 240



皮細胞, 外套膜内面上皮細胞 (Fig. 4 B), および遊走細胞と思われる細胞などの活性は中等度で, 外褶の内外両面上皮細胞, 外套膜外面上皮細胞 (Fig. 4 C) や筋肉組織は弱陽性を示す。粘液細胞の反応は極く弱く不明瞭で, eosin に好染する腺細胞は陰性である。上皮細胞における SDH の活性は, 中褶外面の強陽性部分で遠心端付近の原形質と基底側原形質でやや強く, 外套膜の内外両面ではほぼ均等の反応が原形質全体にみられる。ムラサキガイでは, 外褶外面上皮細胞で最も強い活性を示し (Fig. 4 D), 内褶内面上皮細胞, 中褶の内外両面上皮細胞 (Fig. 4 D), 外褶内面上皮細胞 (Fig. 4 D), および筋肉組織でやや強い陽性を示す。外套膜内面上皮細胞の活性は軽度ないし極く弱い。上皮細胞における酵素活性は, 外褶外面では強い活性が原形質全体にみられ, 外褶および中褶の内面では基底により強い活性がみられる。マガキでは, 外褶外面上皮細胞とこれに続く外套膜外面上皮細胞で最も強い反応がみられ (Fig. 4 E), その他の部分の上皮細胞および筋肉組織の活性はやや弱く, 酵素活性は10月に採集した材料よりも7月に採集した材料でやや強い。ヒオウギでは, 外褶外面上皮細胞とこれに続く外套膜外面上皮細胞 (Fig. 4 G) は強陽性で, その他の部分の上皮細胞 (Fig. 4 F) および筋肉組織の反応は中等度ないしやや弱く, 粘液細胞には極く弱い反応がみられるが, 基底膜は陰性である。上皮細胞における SDH の活性は基底側原形質ないし基底で強い。なお, 殻皮はすべての種類で陰性である。

Lactate dehydrogenase (LDH)

外套膜および上皮細胞における LDH の反応像は SDH のそれと基本的にほぼ同じであるが, 種によっては活性の程度に差を生ずる。

すなわち, アコヤガイ (Figs. 5, A B) やヒオウギ (Figs. 5 C, D) の場合, LDH の反応像は SDH のそれと全く一致するのに対し, ムラサキガイとマガキでは, 酵素分布は基本的にほぼ同じであるが, 外套膜のどの部分についても SDH の活性が LDH の活性より相対的に強い傾向がみられる。なお, 殻皮は観察したすべての種類で陰性である。

Fig. 5 Lactate dehydrogenase activity.

- A. Strong activity in the epithelium of mantle of *Pinctada fucata*. x 30
- B. Positive reactions in the epithelium of middle (MF) and outer (OF) folds of *Pinctada fucata*. x 120
- C. The inner mantle epithelium (E) of *Chlamys nobilis*. Note negative reaction in the basement membrane (BM). x 240
- D. The outer mantle epithelium (E) of *Chlamys nobilis*. Note cells with strong activity under the epithelium. x 240

Fig. 6 NADH dehydrogenase activity.

- A. The mantle of *Pinctada fucata*, showing strong activity in the outer mantle epithelium (OME). x 30
- B. Higher activity in the outer mantle epithelium (OME) than in the inner mantle epithelium (IME) of *Pinctada fucata*. x 120
- C. Strong activity in the epithelium of middle (MF) and outer (OF) folds of *Mytilus edulis*. x 120
- D. High activity in the epithelium (E) on the outer surface of outer fold (OF) of *Crassostrea gigas*. x 120
- E. Strong reaction in the outer epithelium of outer fold (OF) and outer mantle epithelium (OME) of *Chlamys nobilis*. x 30

Table 2. Activity of the various enzymes in the mantle tissue of marine bivalves.

A. *Pinctada fucata*

	Enzyme				
	Alkaline phosphatase	Acid phosphatase	Succinate dehydrogenase	Lactate dehydrogenase	NADH dehydrogenase
Epithelium of outer mantle surface					
Central area	##	+	+	+	#
Pallial zone	+	+~##	+	+	#
Outer fold					
Outer epithelium	+	##	+	+	#~##
Inner epithelium	+~+	+~+	+	+	+~##
Middle fold					
Outer epithelium	##~##	##~##	+~##	+~##	+
Inner epithelium	±	+	+	+	+
Inner fold					
Outer epithelium	±	+	+	+	+
Inner epithelium	±~##	+	+	+	+
Epithelium of inner mantle surface					
Pallial zone	±~##	##	##	##~##	##
Central area	+	+	+	+	##
Mucous cell	-	-	±	±	+
Muscle	-	-	+	+	+

B. *Mytilus edulis*

	Enzyme				
	Alkaline phosphatase	Acid phosphatase	Succinate dehydrogenase	Lactate dehydrogenase	NADH dehydrogenase
Epithelium of outer mantle surface					
Pallial zone	±~##	±~+	##	+	##~##
Outer fold					
Outer epithelium	##	+	##	##	##
Inner epithelium	±	±~+	##	+~##	##
Middle fold					
Outer epithelium	±	±	##	+~+	##
Inner epithelium	±	±	##	+	##
Inner fold					
Outer epithelium	±	±	##	+	##
Inner epithelium	±	±	##	+~##	##~##
Epithelium of inner mantle surface					
Pallial zone	±	±	+~±	+	##
Mucous cell	-	-	+	±	+
Muscle	-	-	##	+~##	##

C. *Crassostrea gigas*

	Enzyme				
	Alkaline phosphatase	Acid phosphatase	Succinate dehydrogenase	Lactate dehydrogenase	NADH dehydrogenase
Epithelium of outer mantle surface					
Pallial zone	± ~ +	+	##	±	##
Outer fold					
Outer epithelium	+ ~ ##	+	##	±	##
Inner epithelium	+	±	±	+	+ ~ ##
Middle fold					
Outer epithelium	+ ~ ±	+	±	+	+
Inner epithelium	## ~ ##	±	±	+	+
Inner fold					
Outer epithelium	##	+	±	+	+
Inner epithelium	##	+	±	±	+
Epithelium of inner mantle surface					
Pallial zone		+ ~ ##	±	±	+
Mucous cell	-	-	±	±	±
Muscle	-	-	±	+ ~ ±	##

D. *Chlamys nobilis*

	Enzyme				
	Alkaline phosphatase	Acid phosphatase	Succinate dehydrogenase	Lactate dehydrogenase	NADH dehydrogenase
Epithelium of outer mantle surface					
Pallial zone	± ~ +	+	##	##	##
Outer fold					
Outer epithelium	+	±	##	##	##
Inner epithelium	+ ~ ##	+ ~ ##	±	±	##
Middle fold					
Outer epithelium	±	+	±	±	##
Inner epithelium	±	+	±	±	±
Inner fold					
Outer epithelium	+ ~ ±	##	±	±	##
Inner epithelium	+	##	±	±	##
Epithelium of inner mantle surface					
Pallial zone	±	±	± ~ ##	±	##
Mucous cell	-	-	±	±	±
Muscle	-	-	± ~ ##	±	±

Keys: ##=Strong activity; ±=Moderate activity; +=Weak activity; -=No activity; ±=Indistinct

NADH dehydrogenase (NADH)

外套膜および上皮細胞における NADH の分布は前述の2つの脱水素酵素のそれと基本的にはほぼ同じであるが、活性の程度はかなり異なる。

アコヤガイの外套膜では、外褶外面上皮細胞とこれに続く外套膜外面上皮細胞の活性が非常に強く (Figs. 6 A, B), その他の部分の上皮細胞も外套膜中心部を含めて強陽性を示す。筋肉組織や結合組織の反応はやや強いから中等度、粘液細胞は極く弱い反応を示し、eosin に好染する腺細胞と基底膜は陰性である。上皮細胞における酵素活性は、外套膜外面ではほぼ均等の反応が原形質全体にみられ、中褶外面や外套膜内面では基底側原形質でより強い陽性を示す。ムラサキガイの外套膜では、どの部分でも上皮細胞で強い活性を示すが、なかでも外褶外面上皮細胞の活性が最も強い (Fig. 6 C)。筋肉組織も強陽性を示す。上皮細胞における NADH の活性は、基底側原形質でより強い。マガキでは、外套膜外面上皮細胞で最も強い活性を示し、これより外褶先端に至る外面上皮細胞も強い反応を示す (Fig. 6 D)。これら以外の部分の上皮細胞の反応は中等度ないし軽度で、筋肉組織はやや強い活性を示す。上皮細胞における NADH の活性は、外褶外面や外套膜の内外面ではほぼ均等の反応が原形質全体にみられ、外褶内面では遠心側で、中褶外面では遠心側と基底でそれぞれ活性が強い。ヒオウギの外套膜では、外褶外面上皮細胞とこれに続く外套膜外面上皮細胞で最も強い活性がみられ、その他の部分の上皮細胞の反応も強い (Fig. 6 E)。筋肉組織の活性は中等度、粘液細胞は極く弱く、基底膜は陰性である。上皮細胞における酵素活性は、外套膜外面ではほぼ均等の反応が原形質全体にみられ、外套膜内面で反応は基底で強い。なお、観察した4種の殻皮は陰性である。

以上の観察結果を一括して Table 2 に示す。

考 察

貝殻形成に関連して、外套膜に分布する酵素の役割が以前から報告されている。なかでも、ALP についてはかなりの報告があり、本酵素は蛋白質 (Kado, 1954, 1960; Beedham, 1958) や Ca (Manigault, 1839; Bourne, 1843; Kado, 1954) の代謝に関与することが論じられ、同様のことが真珠袋でも指摘されている (小島・生長, 1954; Tsujii, 1960)。Beedham による数種の二枚貝の外套膜についての組織化学的研究 (1958) は、殻皮や ligament の非石灰化部分を分泌する上皮細胞や有機基質を多量に分泌する外套膜外面上皮細胞が ALP の強い活性を示し、豊富なりボ核酸を含むこと、また ALP 活性は細胞の遠心端で強いのに反してリボ核酸が細胞の基底側に沢山あることを明らかにし、外套膜上皮細胞に分布する ALP は Ca の分泌や貝殻鈹物の沈着と関連するのではなく、蛋白質の分泌に関与することを暗示した。Kado (1960) は ALP の阻害剤を与えた *Ostrea gigas* の外套膜の ^{45}Ca の代謝量の変化を実験的に調べ、ALP は外界水より細胞内へ Ca を直接吸収するのに関係するのではなく、外套膜より貝殻側へ蛋白質や Ca を分泌するのに関連した酵素系の1つであると指摘している。外套膜外面上皮細胞の ACP の役割については、Bevelander and Nakahara (1966) の報告がある。それによると、extrapallial fluid 中にカーミン粒

子を注入した場合、外面上皮細胞はカーミンを細胞内に摂取して lysosome に集積し、lysosome が存在する原形質部分に ACP の活性を認めている。一方, Jodrey and Wilbur (1955) は *Crassostrea virginica* の外套膜組織の homogenates の上清について呼吸酵素の活性を調べ、外套膜組織に TCA 回路の主要な酵素が存在すること、および組織の呼吸代謝が貝殻の石灰沈着量に影響することを示した。

今回の観察によれば、貝の種類や外套膜の位置によって活性の程度はかなり異なっているが、ALP や ACP などの加水分解酵素の活性は外套膜の上皮細胞にかぎって認められ、しかも上皮細胞は脱水素酵素の強い反応を示し、外套膜の上皮細胞は貝殻形成にあたって分泌および吸収の面で活発な働きを営んでいると結論できる。

すなわち、観察した二枚貝の外套膜における ALP の活性はどちらかと言えば弱く、その分布は上皮細胞にかぎられている。しかも、ALP の活性は上皮細胞の遠心端に巾狭く認められる。外套膜内面の上皮細胞は粘液様物を分泌し、上皮の表面をおおった薄い分泌物層を介して外界水と接する。この上皮細胞の自由表面には多数の microvilli が発達しており、アイソトープによる研究 (Wilbur and Jodrey, 1952; 堀口・他, 1954; 田中・波多野, 1956) はこの表面を通して外界水から多量の Ca を急速に細胞内へ吸収することを示唆している。一方、外套膜外面の上皮細胞は extrapallial fluid を分泌し、貝殻鈣物はこの粘液状の溶液から生成することから、蛋白質、ムコ多糖類および鈣物成分が外面上皮細胞の自由表面を通して分泌されていると言える。このように物質の吸収、透過の盛んな上皮細胞の自由表面付近で ALP の強い活性が認められたことは、貝殻形成という観点で論ずるならば、外套膜内面上皮細胞の自由表面に分布する ALP は外界水より細胞内への Ca (一般的には電解質、特に 2 価陽イオン) の輸送に、外面上皮細胞の自由表面に分布する ALP は細胞より貝殻鈣物化の場へ貝殻物質を分泌するのに関連する酵素系の 1 つと思われる。

Lysosomal enzyme としての ACP のアコヤガイ外套膜外面の位置による活性の程度は、中原(1962)の実験で明らかにされた外面上皮細胞のカーミン摂取量の外套膜の位置による差とはほぼ正の相関を示しながら変化する。Golgi zone が観察され、摂取されたカーミン粒子の大部分がみられる上皮細胞の遠心側原形質に ACP の強い活性が本研究で認められ、また細胞表面より摂取されたコロイド金が lysosome へ最終的に集められる (Nakahara and Bevelander, 1967) ことなどから、外套膜外面上皮細胞は貝殻物質の分泌だけでなく、貝殻鈣物化の場から水、水溶性成分、あるいは固形成分を細胞内に再び吸収、除去する働きを営み、ACP は少なくとも摂取した固形成分の細胞内での処理に関連していると考えられる。

TCA 回路に属する SDH、解糖系の酵素である LDH、および電子伝達体として細胞呼吸に関与する NADH などの脱水素酵素の活性が外套膜の上皮細胞 (原形質中における mitochondria の数や分布は貝の種類や外套膜上の位置でかなり異なる) で非常に強いことは、分泌代謝をはじめ細胞が営む生理活動に必要なエネルギーを供給する土台の代謝は上皮細胞自体で営まれる糖代謝と呼吸代謝であることを意味するであろう。しかも、ここで生ずる代謝性 CO₂ は貝殻鈣物の炭酸基の重要な供給源であろうことが Wilbur (1960)

の報告から示唆できる。

このほか、次のような結果が今回の観察から得られた。観察した全種類において、ACPの活性はALPの活性より相対的には強く、Kado (1960) が *Ostrea gigas* の外套膜で得た生化学的研究結果と一致している。貝殻物質を分泌する上皮細胞のALPとACPの活性は、貝殻に含まれる有機物量（主として蛋白質）の多いアコヤガイで有機物量の少ないマガキやヒオウギより強く、また同一種では有機物の分泌量が多い外套膜上の位置で強い傾向がみられた。しかし、ALPとACPの活性が酸性ムコ多糖体を主成分とする粘液を盛んに分泌している粘液腺細胞にみられなかったことは意外であった。なお、調べた酵素のすべてについて言えることとして、外套膜上の位置による酵素活性の相対的な強さは種によってかなり異なっており、種によっては材料採集時でも異なっていた。これらの観察結果を充分に説明するには、これらの結果が実像であるかどうかを貝の生活活動との関連で調べ、単なる貝殻形成の問題としてではなく、水中に生活する軟体動物が生理調整する場所としての外套膜上皮細胞の機能を明らかにすることが残された重要な問題の1つである。

要 約

1) アコヤガイ、ムラサキイガイ、マガキ、およびヒオウギの外套膜の連続クリオスタット切片を作り、外套膜組織における alkaline phosphatase, acid phosphatase, succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, および NADH dehydrogenase の分布と活性の程度を組織化学的に調べた。

2) Alkaline phosphatase と acid phosphatase の反応は外套膜上皮細胞にかぎられて認められ、acid phosphatase の活性は alkaline phosphatase の活性よりも相対的には強かった。

3) Alkaline phosphatase の活性は上皮細胞の遠心端に中狭く認められ、外套膜上の位置による酵素活性の程度は貝の種類によってかなり異なる。

4) 貝殻形成に直接関与する上皮細胞の acid phosphatase の活性は細胞の遠心側原形質で強く、本酵素は少なくとも細胞内消化に関連していると考えられる。

5) Succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, および NADH dehydrogenase の強い反応が外套膜の上皮細胞、特に貝殻に面した、に認められた。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究に多大の便宜とその発表の機会を与えられた国立真珠研究所林知夫所長、並びに終始暖かい指導と本稿の校閲を賜った日本歯科大学須賀昭一教授に謹んで感謝の意を表す。また、標本作成にあたって絶大な援助と指導を下された日本歯科大学青山勇先生に深謝する。

Summary

The localization and activity of various enzymes in the mantle tissue of *Pinctada fucata*, *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas* and *Chlamys nobilis* were investigated by histochemical methods.

Fresh frozen sections were prepared in the cryostat at -20°C . The demonstration of alkaline phosphatase (Burstone, 1962), acid phosphatase (Burstone, 1962), succinate dehydrogenase (Barka and Anderson, 1963), lactate dehydrogenase (Nachlas et al., 1958) and NADH dehydrogenase (Barka and Anderson, 1963) was carried out following the methods shown in Table 1.

Alkaline and acid phosphatases are present only in the epithelium of mantle tissue of the marine bivalves, though the degree of activity differs remarkably between species and even between parts of a mantle. Strong activity of alkaline phosphatase is found in the distal end of the epithelial cell (Figs. 2 B, C), and acid phosphatase activity is high in the distal cytoplasm.

The activity of such oxidative enzymes as succinate, lactate and NADH dehydrogenases tends to be much higher in the epithelium of outer mantle surface than in the epithelium of inner mantle surface (Figs. 4, 5 and 6), in all species examined.

The results obtained in the present investigation are roughly summarized in Table 2.

文 献

- Barka, T. and Anderson, P. J. 1963. Histochemistry. Hoeber Medical Division. Harper & Row (New York).
- Beedham, G. E. 1958. Observations on the mantle of the lamellibranchia. Quart. J. micr. Sci. 99 : 188-197.
- Bevelander, G. and Benzer, P. 1948. Calcification in marine molluscs. Biol. Bull. 94 : 176-183.
- Bevelander, G. and Nakahara, H. 1966. Correlation of lysosomal activity and ingestion by the mantle epithelium. Biol. Bull. 131 : 76-82.
- Bourne, G. 1943. The distribution of alkaline phosphatase in various tissues. Quart. Jour. Exp. Physiol. 32 : 1-21.
- Burstone, M. S. 1962. Enzyme histochemistry. Academic Press (New York).
- 東怜・河合清三 1959. 淡水産二枚貝組織の呼吸代謝について, 日水誌 25 : 222-227.
- 堀口吉重・三宅正人・吉井義一・岡田弥一郎・井上義雄・宮村光武 1954. 放射性同位元素によるアコヤガイ及びイケテフガイの生化学的研究—I. Ca^{45} によるイケテフガイの Ca 代謝, 日水誌 20 : 101-106.
- Kado, Y. 1954. The distribution of alkaline phosphatase in mantle tissue of bivalves. Jour. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, 15 : 183-188.
- Kado, Y. 1960. Studies on shell formation in molluscs. Jour. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, 19 : 163-210.
- 河合清三 1957. アコヤガイの物質代謝に関する研究—III. 組織呼吸について, 日水誌 22 : 626-630.

- 河合清三 1958. 海産二枚貝組織の末端酸化系について. 日水誌 23 : 738-742.
- Kawai, K. 1959. The cytochrome system in marine lamellibranch tissue. Biol. Bull. 117 : 125-132.
- Manigault, P. 1939. Recherches sur le calcaire chez les mollusques. Phosphatase et precipitation calcaique histochimie du calcium. Ann. Inst. Oceanogr. 18 : 331-426.
- Maroney, S. P., Barber, Jr. A. and Wilbur, K. M. 1957. Studies on shell formation. VI. The effects of dinitrophenol on mantle respiration and shell deposition. Biol. Bull. 112 : 92-96.
- Nachlas, M. M., Walker, D. G. and Seligman, A. M. 1958. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4. 武内忠男, 清水信夫, 小川和朗 1970. 「酵素組織化学」(朝倉書店) p 113より引用.
- 中原皓 1962. アコヤガイ外とう膜と真珠袋の上皮細胞におけるカーミン粒子の摂取について. 国立真珠研報 8 : 879-883.
- Nakahara, H. and Bevelander, G. 1967. Ingestion of particulate matter by the outer surface cells of the mollusc mantle. J. Morph. 122 : 139-146.
- 小島吉雄・生長清三 1953. イケチョウガイ (*Hyriopsis schlegelii*) の外套膜及び真珠袋に於ける Alkaline phosphatase 分布 (予報). 動雑誌 62 : 26-29.
- 田中正三・波多野博行 1957. ^{45}Ca を使用する真珠および貝殻形成の化学機構の研究. アイソトプ研究利用総覧 : 307-311.
- Tsujii, T. 1960. Studies on the mechanism of shell- and pearl-formation in mollusca. J. Fac. Fish., Mie Pref. Univ. 5 : 1-70.
- 辻井禎・磯野治 1963. 貝殻及び真珠形成機序の研究 VII. 外套膜の組織呼吸, 特に正常時と再生時について. 三重県立大学水産学部記要 5 : 371-377.
- Wilbur, K. M. and Jodrey, L. H. 1952. Studies on shell formation. I. Measurement of the rate of shell formation using Ca^{45} . Biol. Bull. 103 : 269-276.
- Wilbur, K. M. 1960. Shell structure and mineralization in molluscs. in 'Calcification in Biological System' Amer. Assoc. Advance. Sci. : 15-40 (Washington, D. C.)

三種類の微細藻類を与えた

アコヤガイ幼生の生長^{*†}

和田 克彦

国立真珠研究所

アコヤガイ *Pinctada fucata* (Gould) の幼生の飼育実験を行なった報告は、小林・結城 (1952) が無色鞭毛虫 *Monas* sp. を用いて飼育し付着まで到らしめた例以来みあたらない。幼生の人工飼育は天然採苗、人工採苗などの種苗生産研究や育種研究のうち交雑実験にとって不可欠であることはいうまでもない。二枚貝幼生の人工飼育には飼育条件に関連して種々の困難な面があるが、技術的に最も問題になるのは餌料であろう。平野・大島 (1963) は海産動物幼生の餌料条件として、a) 幼生の捕食または摂餌機構に関するものと、b) 餌料が幼生の体内にとり入れられた後のものにわけられるとした。この考え方からすると、餌料価値の研究を進めるには、a) に主眼を置けば実際の投餌実験による摂餌状態や生長および生存率を観察する方法がとられることになるし、b) に主眼を置くとすると、幼生の体内の消化吸收機構および栄養代謝の解明による必要栄養成分の究明とそれに見合う構造や成分を有し、かつ捕食条件にかなう餌料の探索の道が選ばれることになろう。もちろん、研究の進展状況などによって両者が並行して行なわれるべきものであろう。これまでのところ、二枚貝の場合、成体における研究ですら後者の方法をとることが困難な段階であるから、幼生についても前者の方法をとらざるを得ない状態である。

現在までに二枚貝幼生の餌料としてよく用いられて来たものは diatom, green algae および naked flagellates などの単細胞微細藻類である (平野・大島, 1963)。今回はこれらの代表種として *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella* sp. および *Monochrysis lutheri* を用いてアコヤガイ幼生への投餌実験を行ない、その生長を観察することによりこれまで他の二枚貝種幼生の餌料価値について報告されている諸点がアコヤガイ幼生にもあてはまることを確認し、また他種との比較を行ない若干の考察を行なった。

報告を行なうに当り本研究の機会を与えられた淡水区水産研究所企連室長桑谷幸正博士および御協力、討議をいただいた国立真珠研究所所員各位に深謝するとともに、*Chlorella* sp. を譲っていただいた和歌山県水産増殖試験場難波武雄技官にお礼申し上げる。

材料および方法

餌料に用いた藻類種 餌料生物としては 1) *Monochrysis lutheri*, 2) *Chaetoceros calcitrans* および 3) *Chlorella* sp. を用いた (Table I)。培養液は 1) と 2) については PES

* Katsuhiko T. Wada. Growth of Japanese pearl oyster larvae fed with three species of microalgae. With English summary, p. 2082. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 17: 2075-2083. 1973.

† 国立真珠研究所業績 No. 203. (国立真珠研究所報告17: 2075—2083, 昭和48年8月)

Table I. Micro-organisms used in feeding experiments with larvae of the Japanese pearl oyster.

Species	Approximate size(μ)	Cell walls
<i>Monochrysis lutheri</i>	7×2.5	No
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	4×2	Yes
<i>Chlorella sp.</i>	2-4	Yes

培地を多少修正したものを, 3) については海水クロレラ用培地を用いた (Tables II, III)。

1) および 2) についての栄養分析を Table IV に示す (Persons et al, 1961; Ogino, 1963;

Table II. Composition of culture medium used for *Monochrysis* and *Chaetoceros*.

Ingredient	Amount
NaNO ₃	100 mg
NaHPO ₄	14 mg
Na ₂ SiO ₃	10 mg
NaHCO ₃	12.6 mg
Clewat 32*	500 mg
EDTA-2Na	18.1 mg
Vitamin B ₁₂	2 μ g
Vitamin B ₁	80 μ g
Biotin	0.2 μ g
Sea Water	1000 ml

* Clewat 32, 1 g; (Fe, 3.8 mg; Mn, 7.7 mg; Zn, 1.6 mg; Cu, 0.07 mg; Mo, 6.3 mg; B, 24.7 mg; Co, 0.17 mg; EDTA, Some)

Table III. Composition of culture medium used for *Chlorella*

Ingredient	Amount
Ammonium sulfate	100 mg
Calcium Superphosphate	15 mg
Urea	11 mg
Clewat 32*	25 mg
Sea Water	1000 ml

* See Table II.

金沢, 1969)。培養液は70~80°Cで30分間加熱により, また培養容器の5l 丸型フラスコおよび10l 木口ビンに70%アルコールにより滅菌した。培養はいづれの種も20~25°Cに調整された恒温室で3000~5000ルクスの昼光色蛍光灯による照射のもとに行なった。これらの藻類をそれぞれ単独あるいは混合して投与した場合の餌料効果を比較した。餌料濃度は飼育水中で10⁴cells/mlとし, 受精後13日以後は2×10⁴cells/mlに増量した。混合して投

Table IV. Chemical composition of micro-organisms (%)

Species	Protein	Carbohydrate	Fat	Ash	Authors
<i>Monochrysis lutheri</i>	49	31.4	11.6	6.4	Parsons et al, '61
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	34.3	—	6.0	32.5	Ogino, '63
<i>Chaetoceros simplex</i>	22.8	21.8	18.1	35.2	Kanazawa, '69
<i>Chaetoceros sp.</i>	35.0	6.6	6.9	28.0	Parsons et al, '61

与する場合はそれぞれの藻類種が等量になるようにし、その合計がこの値になるように与えた。餌料は培養液とともに飼育水中に加えた。餌料効果は幼生の生長度によって調べた。

幼生の飼育方法 産卵誘発および人工受精により得たアコヤガイ幼生を用いた。受精後約24時間経過したD状ヴェリジャーを2ℓビーカーに水量1ℓ密度20個体/mlで収容し、前述の濃度で餌料を投与して実験を開始した。受精後3日目に飼育水を2ℓに増量し（最終幼生密度はしたがって10個体/ml）、同5日目以後は1日おきに全飼育水をNo. 25プランクトンネットを用いて交換し、その際に投餌を行なった。飼育海水は砂濾過してから一週間以上汲み置いたものを、カートリッジ式濾過筒（約5μ）および紫外線流水殺菌器（15W 2本）を通してから使用した。飼育水中には換水ごとに抗生物質カナマイシンを100 ppm添加した。飼育容器のビーカーは水温調節されたウォーターバス中に半ばまで浸し、ウォーターバス全体を水温より2~3°C低い恒温室に収容して飼育水が攪拌されるよう配慮した。通気はまったく行なわず、飼育容器はできるだけ暗黒に保った。飼育水温は26~28°Cであった。幼生の生長は4日毎に調べたが、換水の際、飼育水中からスポイドを用いて無作為に各区より5個体づつ採取してマイクロメーターで殻高、殻長を測定した。なお測定個体数は実験終了時のみ、実験1では各区20個体、実験2では各区10個体とした。実験は最も生長の早い区が付着期に入った日に終了した。

結 果

実験1（1971年7月29日~8月22日） 各飼料区の生長経過を殻長についてみたのがFig. 1である。殻高については殻長とほぼ同様な生長傾向を示したので以下殻長について述べることにする。なお *Chaetoceros* 区の21日目のデータは欠測したものである。測定個体数が少ないことと生長に個体変異が大きいためスムーズな生長曲線になっていないが、餌料種によって生長度に相違がみられる。これらの結果を測定日間の生長量を区別して表わすとFig. 2のようになる。まず単独で投与した場合についてみると、*Monochrysis* と *Chaetoceros* を与えた場合はよく似た生長を示したが、全体を通じては *Monochrysis* の方がやや生長量が多い。 *Chlorella* は使用した3種のうちで最も生長が悪かった。次に混合して投与した場合をみると、最も生長のよかったのは *Monochrysis* と *Chaetoceros* の混合投餌区で各期間ともに順調な生長ぶりを示した。次いで *Monochrysis* と *Chlorella* の混合したものがよく、3種類全てを等量づつ混合した場合、 *Chaetoceros* と *Chlorella* の混合区が続く。 *Monochrysis*+*Chlorella* 区および *Monochrysis*+*Chaetoceros*+*Chlorella* 区の両区での21日までの生長は全体を通じて最も生長のよかった *Monochrysis*+*Chaetoceros* 区と大差が

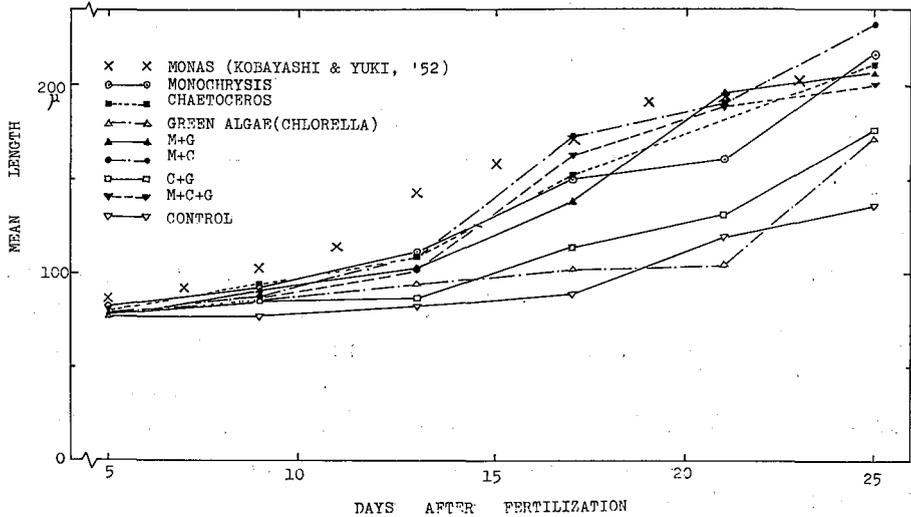


Fig. 1 Growth curves of larvae in cultures receiving different micro-organisms (Experiment 1, 1971. Jul.-Aug.). Plots were based on mean length of 5 larvae from each culture with exception of 20 larvae at 25th day.
M: *Monochrysis lutheri*, C: *Chaetoceros calcitrans*, G: *Chlorella sp.*, Control: Unfed Culture.

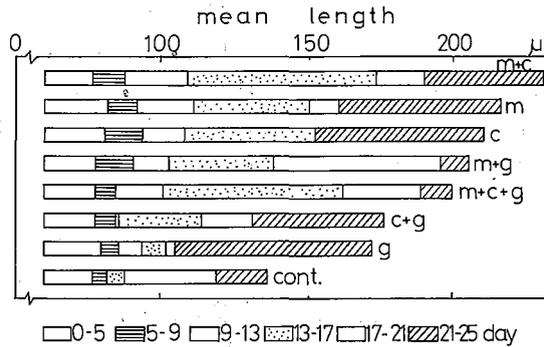


Fig. 2 Growth of larvae in Experiment 1. All data and letters are same as in Fig. 1.

みられず、最終的な結果では差が開いている。これは21日目までは5個体、25日目の終了時には20個体と測定個体数が異なるため、個体変異と測定方法に帰因するものとみられ、全般的な生長傾向は実験終了時までの生長結果からうかがうことができると思われる。実験終了時での結果から全般的にみると *Monochrysis* の入った区の生長がよく、逆に *Chlorella* の混合区あるいは単独区は生長が悪い。また *Chaetoceros* については両者の中間的な成績となっている。なお小林・結城 (1952) が無色鞭毛虫 *Monas* を用いて飼育した際の最も生長のよい Culture No.1 の結果を Fig. 1 に同時に示してある。これはコンクリートタンクでの大量飼育であり、飼育方法も今回の実験と大きく異なり比較するには問題があるが、

初期の生長にやや違いがみられ、飼育後期には今回の実験のうち生長のよかったものとよく似た結果となっている。

実験2 (1972年8月17日~9月11日) 実験1と同様殻長について各区の生長の違いをみて

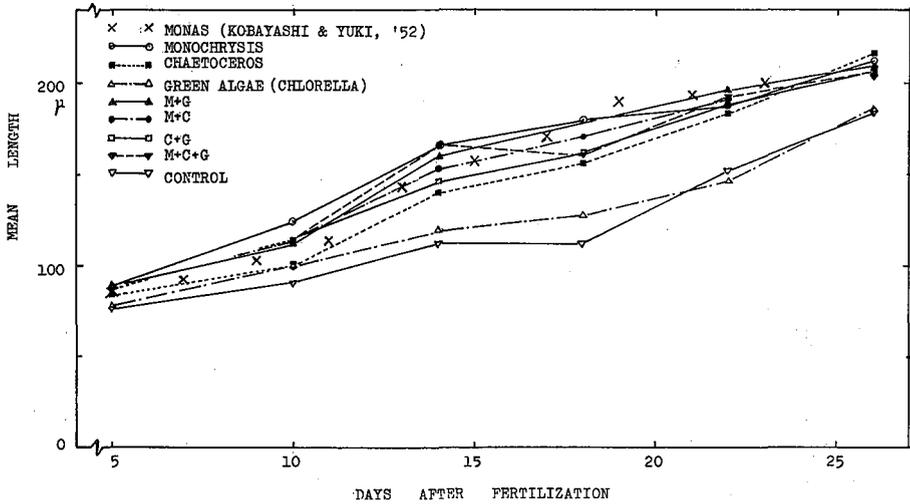


Fig. 3 Growth curve of larvae in cultures receiving different micro-organisms (Experiment 2, 1972. Aug.-Sept.). Plots at the 26th day were based on mean length of 10 larvae from each culture. Other conditions and letters are same as in Fig. 1.

みよう (Figs. 3, 4)。実験1でみられた程の差はみられないが飼育初期には *Monochrysis* 区の生長がよく、*Chaetoceros* 区の生長が悪い。しかしこれら両区の生長も飼育後期になると逆転し、終了時には *Chaetoceros* 区の方が大きく生長している。*Chlorella* 単独区および無投餌区以外の区はこの *Monochrysis* や *Chaetocercs* 区と大差ない生長を示している。実験終了時での結果から順位をつければ、Fig. 4 に並べたような順になり、全般的な傾向

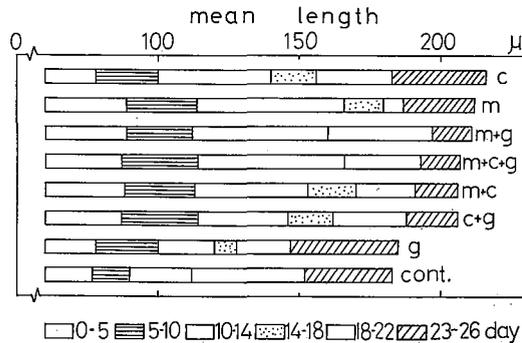


Fig. 4 Growth of larvae in Experiment 2. All data are as in Fig. 3 and the letters as in Fig. 1.

として *Monochrysis* および *Chaetoceros* そしてそれらの混合投餌区の生長がすぐれており、*Chlorella* 区の生長が悪い。また Fig. 3 にみられるように小林・結城 (1952) の *Monas* の飼育例と比較してみると飼育の全期間を通じて今回の生長のよかった区と近似した生長曲線を描いている。

なお生存率については特に計数しなかったが、成長測定の際の観察では、実験 1, 2 を通じて特に個体数の急減した区はみられなかった。

考 察

実験 1 と実験 2 ではできるだけ条件を同じになるように努めたが、まったく同じ結果を得ることができなかった。これは今まで二枚貝幼生の飼育実験で数多く指摘されて来たように (Davis and Guillard, 1958; 平野・大島, 1963; Walne, 1963; Bayne, 1965), 供試幼生の親の違い, 使用海水の水質のわずかの相違および餌料藻類の増殖段階により栄養価や代謝生成物に差があることなど, 今回の実験では配慮できなかった点に帰因しているものと思われる。特に無投餌対照区の幼生が実験終了時に実験 1 では約 140μ , 実験 2 では約 180μ にまで生長しており, 使用海水中に栄養成分を含んだ幼生にとって利用可能な物質が存在していた疑いがある。さらにそれら供試海水の水質などの特性に両実験で相違があったと考えることもできる (Davis, 1953; Walne, 1964)。

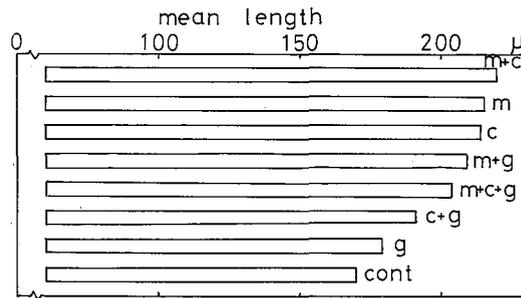


Fig. 5 Mean growth of larvae in Experiment 1 and Experiment 2. Plots are based on mean length of larvae at the time when each culture in two experiments was finished.

このように実験 1 と実験 2 では厳密な意味での実験条件が異なっていた疑いがあるが, これらの結果はきわめておおまかにみてアコヤガイ幼生の餌料価値を表わしていると考えて両実験の結果を平均化してみた。すなわち実験 1 と実験 2 の実験終了時までの成長量の平均値を各餌料区別に計算した (Fig. 5)。実験期間が両実験で 1 日間違うが, 一応最も生長のよい区が付着時期に達した時点までの各区の平均生長量ということで考察を進める。

Fig. 5 にみられるように, 実験終了時までの生長結果からすると餌料区別の順位は実験 1 の結果 (Fig. 2) とまったく同じになる。すなわち単独投与法では *Monochrysis*, *Chaetoceros*, *Chlorella* の順であり, 混合投与法では *Monochrysis*+*Chaetoceros* 区が最もよく, *Chaetoceros*+*Chlorella* 区が最も悪い。これらの結果からすると, *Monochrysis* の入った

区の生長のよいのが目立っており、次いで *Chaetoceros* の成績がよく、*Chlorella* の入った区はいずれも生長が悪い。

Davis and Guillard (1958) は *Venus mercenaria* と *Crassostrea virginica* の幼生に10属12種の微細藻類を与えた飼育実験から、*Monochrysis* と *Isochrysis* が単独餌料としてはよく、混合した場合はこの2種に *Dunaliella*, *Platymonas* を加えたものがよりよい結果を示したと報告している。*Monochrysis* については日本でもその後、種々の二枚貝幼生の餌料として用いられ、その価値が認められている(小川等, 1968; 伊丹・他, 1970; 田中, 1969; 田中・他, 1970; 西川, 1971; 伊藤・他, 1973)。今回のアコヤガイの実験でも *Monochrysis* は優秀な餌料であることが確かめられた。

二枚貝幼生の餌料条件としてこれまで調べられたところでは、1) 捕食される適当な大きさの光合成藻類であること、2) 栄養要求を満たす成分を有すること、3) 細胞膜をもたないかあっても薄いこと、4) 毒性物質を生成しないこと、などがあげられている(Davis and Guillard, 1958; Ukeles, 1971)。これらのうち 3) については二枚貝の種による差異や幼生の生長段階による違いがあるようで、Davis (1953) や Loosanoff and Davis (1963) によれば、*Chlorella* などの細胞膜を有する藻類でも生長する *Mercenaria* のような二枚貝種もあり、またそれを利用できない *Crassostrea* のような種でも約110 μ 以上に大きく生長すれば消化吸収することができるものがあるという。今回のアコヤガイでの実験では、細胞膜をもった餌料のうち *Chaetoceros* はそれをもたない *Monochrysis* に少し劣るがすぐれた餌料価値を示し、*Chlorella* は餌料価値が低かった。しかしながら Fig. 2, Fig. 4 にみられるように、飼育の後半期すなわち幼生が大きくなってからは、特に実験1 (Fig. 2) において、*Chaetoceros* や *Chlorella* を与えた区では他の区に劣らない生長がみられた。このことから細胞膜の有無、その厚さなどの観点からすると、発生初期のアコヤガイ幼生はこれら二種の藻類特に *Chlorella* の消化吸収能力は少ないが、大きくなって幼生後期には利用することができると考えられる。これらの問題は幼生がセルラーゼなどの消化酵素を有しているかどうかの違いによるものと思われるが、それらについて二枚貝種あるいは幼生の生長段階による差異などが今後究明されるべきであろう。

田中・他 (1970) はクロチョウガイ幼生に数種の微細藻類を与えてその摂取状態と生長の観察より *Monochrysis lutheri* が最もよく摂取され *Chaetoceros calcitrans* などの硅藻類はあまりよく摂取されなかったとし、二枚貝幼生に広くその餌料価値が認められている *Chaetoceros* が摂取されないのは幼生の摂餌機構の差異に帰因すると考えた。また彼等は Loosanoff and Davis (1963) のいう二枚貝種による餌料要求範囲の差異も摂餌機構の相違で多少説明されることができると述べている。本実験の結果では *Chaetoceros calcitrans* を与えたアコヤガイ幼生はクロチョウガイの場合と異なりよく生長した。アコヤガイは分類学的にクロチョウガイに近い種ではあるが、生態的に棲息場所などに違いがあり、あるいは田中・他 (1970) のいう幼生の摂餌機構に差異がこの両種の間にあるのかも知れない。

要 約

3種の単細胞微細藻類を餌料として、アコヤガイ幼生を付着時期まで飼育し、その生長

を觀察した。与えた餌料は 1) *Monochrysis lutheri*, 2) *Chaetoceros calcitrans* および 3) *Chlorella sp.* で、それらをそれぞれ単独あるいは混合して投与した。最も生長のよかった餌料区の付着期までの生長量で比較すると *Monochrysis* 単独あるいは混合した区の生長がよく、次いで *Chaetoceros*, *Chlorella* の順であった。細胞膜を有する後二者特に *Chlorella* を与えた区の生長がよくないのは、生長の模様などから推察して、幼生初期の段階で消化吸收能力に欠けていることに帰因すると思われた。

Summary

Larvae of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata* (Gould)) were fed with 3 species of micro-algae to determine their relative value as foods. The algae used were the naked flagellate *Monochrysis lutheri*, a diatom *Chaetoceros calcitrans* and a green algae *Chlorella sp.* (Table I). Twenty thousand D-shaped larvae were reared in a 2 l glass beaker in a water bath in a dark room. Aged sea water used in all cultures was filtered (Ca. 5 μ), treated by ultra-violet light and received about 100 ppm of antibiotic kanamycin. The culture water was replaced every second day by straining off the larvae with a plankton net. The water was enriched either with a single species of food or with a mixture of different species. The foods were supplied at a concentration of 10^4 cells per ml (1st-12th day) or 2×10^4 cells per ml (13th-25th or 26th day). A mixture of different foods consisted of approximately equal number of each species. The algal cells were not separated from their culture medium (Tables II, III) when added to the larval culture. The larvae were sampled for growth measurement every 4th day. Each culture was finished when the larvae with the best growth rate in a series of experiments reached the full grown stage.

The results of experiments are shown in Figs. 1-5. There is a difference in the results between Experiment 1 and 2. This may be due to a difference in the larval broods, the quality of sea water and physiological state of the food algae. These effects are difficult to reduced. A mixture of *Monochrysis lutheri* and *Chaetoceros calcitrans* provided slightly better growth rate than did any of these foods singly or any other mixture of foods. *Monochrysis* and *Chaetoceros* were also shown to be the good single foods for larvae. The larvae fed with *Chlorella sp.* showed the poorest growth rate among larvae in all cultures. It was estimated from the growth curve that, although the Japanese pearl oyster larva at the first developmental stage cannot utilize algae such as *Chlorella* with a cell wall, these foods can be fed and digested by the older larvae.

I wish to express my sincere thanks to Dr. P. Walne, Fisheries Experiment Station, Conway, U. K., for his correction of this English manuscript.

文 献

- Bayne, B. L. 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia* 2 (1) : 1—47.
- Davis, H. C. 1953. On food and feeding of larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull., Woods Hole* 104 : 334—350.
- Davis, H. C. and R. P. Guillard 1958. Relative value of ten genera of microorganism as foods for oyster and clam larvae. *Fish. Bull.* 136 : 293—304.
- 藤田征作・塩溝捷夫・山中邦洋 1966. マベ *Pteria penguin* (Roding) の増殖に関する基礎的研究—X. 小型水槽における高密度飼育及び沖出し後の歩留りについて. 鹿児島水試事業報告 (昭和40年度) : 517—541.
- 平野礼次郎・大島泰雄 1963. 海産動物幼生の飼育とその餌料について. 日水誌 29 (3) : 282—297.
- 伊丹宏三・丹下勝義・山内幸児・竹田文弥・浜口 章 1970. アカガイの種苗生産に関する研究—I. 水槽採苗について. 水産増殖 18 (1) : 25—34.
- 伊藤 進・直江春三・佐藤宇紀子 1973. 餌料生物大量培養技術研究 (各種餌料生物の二枚貝類に対する餌料効果試験). 青森県水産増殖センター事業概要 第2号 (昭和45, 46年度) : 106—112.
- 金沢昭夫 1969. 餌料生物としての硅藻 *Chaetoceros simplex* のビタミンB群について. 鹿児島大研報 18 : 93—97.
- 菅野 尚 1965. ホッキガイ *Spisula sachalinensis* (SCHRENK) の水槽内採苗に関する二・三の実験. 東北水研報 (25) : 131—141.
- 小林新二郎・結城了吾 1952. アコヤガイ (*Pinctada martensii*) のタンク内人工飼育. 日水誌 17 (8,9) : 65—72.
- Loosanoff, V. L. and H. C. Davis 1963. Rearing of bivalve mollusks. in "Advances in Marine Biology,, (Academic Press, New York and London) 1 : 1—136.
- 難波武雄・見奈美輝彦・西山 保 1972. ヒオウギ種苗生産試験. 和歌山県水産増殖試験場事業報告 (4) : 48—65.
- 西川信良 1971. 二枚貝の幼生飼育とその採苗. 浅海完全養殖 (恒星社厚生閣, 東京) : 420—437.
- 小川弘毅・横山勝幸・佐藤 敦・伊藤進 1972. ホタテガイの種苗生産. 青森県水産増殖センター事業概要 第1号 (昭和43, 44年度) : 110—118.
- 萩野珍吉 1963. 数種天然餌料の化学的組成について. 日水誌 29 (5) : 459—462.
- Parsons, T. R., K. Stephens and J. D. H. Strickland 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 18 (6) : 1001—1006.
- 瀬戸口勇 1964. クロチョウガイ *Pinctada margaritifera* (L.) の増殖に関する基礎試験—VI 幼生飼育の餌料生物について. 鹿児島水試事業報告 (昭和38年度) : 253—258.
- 瀬戸口勇 1966. くろちょうがい室内採苗試験. 鹿児島水試事業報告 (昭和40年度) : 277—281.
- Stickney, A. P. 1964. Salinity, temperature, and food requirements of soft-shell clam larvae in laboratory culture. *Ecology* 45 : 383—291.
- 田中弥太郎 1969. チョウセンハマグリ増殖に関する研究—I. 人工飼育. 東海水研報 (58) : 163—168.
- 田中弥太郎・伊野波盛二・嘉数 清 1970. 沖縄におけるクロチョウガイの種苗生産に関する基礎研究—II. 餌料生物の選定. 東海水研報 (63) : 79—85.
- Ukeles, R. 1971. Nutritional requirements in shellfish culture. in "Proceedings of the National Shellfisheries Symposium on the Artificial Propagation of Commercially Valuable Species,, (Univ. Delaware Publ.) 43—64.
- Waine, P. R. 1956. Experimental rearing of larvae of *Ostrea edulis* L. in the laboratory. *Fish. Invest., Lond., Ser. II*, 20 : 1—23.
- 1963. Observations on the food value of seven species of algae to the larvae of *Ostrea edulis*. I. Feeding experiments. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 43 : 767—784.
- 1964. The culture of marine bivalve larvae. in "Physiology of Mollusca,, (Academic Press, New York and London) 1 : 197—210.

軟体動物の石灰化組織の鉍物化に関する研究—XVII.

イケチ ヨ ウガイ貝殻における酸性多糖体の分布

和田浩爾・古橋 保

日本水産学会誌

第三十六巻 第十一号 別刷

昭和四十五年十一月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 36, No. 11, November 1970

軟体動物の石灰化組織の鉍物化に関する研究—XVII.

イケチョウガイ貝殻における酸性多糖体の分布*

和田浩爾・古橋 保

(1970年7月25日受理)

Studies on the Mineralization of the Calcified Tissue in Molluscs—XVII.

Acid Polysaccharide in the Shell of *Hyriopsis schlegeli*

Koji WADA** and Tamotsu FURUHASHI***

It has suggested histochemically that acid mucopolysaccharide-protein complex participates in the initiation of mineralization of some bivalve and gastropod shells at the time when there is no shell mineral^{4,5}. As a further study for elucidating the significance of acid polysaccharide in shell mineralization, the chemical composition and distribution of it were examined on the shell of *Hyriopsis schlegeli*.

The periostracum and organic matrix of nacre obtained from decalcified shells were digested with "pronase" at pH 8.0 and 50°C for 6 days and subsequently with trypsin at pH 7.5 and 37°C for 5 days, respectively. Acid polysaccharide was then separated from the digested organic matrices by the cetyl pyridinium chloride treatment as shown in Fig. 1.

Fraction A which contains acid polysaccharide has a large amount of protein but little amount of hexose (Table 2) and it seems to be an acid glycoprotein with sulfuric ester. The acid glycoprotein is detected in the organic matrix of the nacre (mineralized layer) but not in the periostracum (non-mineralized layer) as seen in Table 1. From the above results, it is supposed that the sulfate group of the matrix is in some way involved in the start of mineralization of molluscan shells.

生物界には硬組織が広く分布している。そのうちあるものは鉍物化しており、他のものは鉍物化していない。硬組織が鉍物化する機構は先覚者によって生化学や組織化学の分野から研究され、鉍物化する硬組織に含まれる有機基質は鉍化しない硬組織の有機基質と組成が異なり、また鉍物化にあたって有機基質の蛋白質が量的にも質的にも変化し、酸性ムコ多糖体の消長も重要視されている。

軟体動物の貝殻でも例外ではなく、殻皮のように鉍物化しない層の有機基質の蛋白質と真珠層のように鉍物化する層に含まれる有機基質の蛋白質とは互いに異なることが生化学的^{1,2}) に示唆され、また酸性ムコ多糖類が鉍物化する層に含まれる有機基質に必ず存在していることが組織化学的³) に示され、細胞の働きで作られたある有機基質は貝殻鉍物の結晶核生成を誘起するのに効果的に働くと思像されている^{1,2,4,5})。

近年、殻皮および真珠層に含まれる蛋白質のミノ酸組成はかなり報告されている^{1,2,6})。しかし、酸性多糖類については組織化学的にその存在と意義が推定されているに過ぎない。著者らは WADA³) の組織化学的研究結果を参考にし、殻皮が多量に収集でき、しかも付着物が混じる危険性の少ないイケチョウガイ貝殻を実験材料に選び、殻皮と真珠層について酸性多糖体の存在と同定とを行なったので報告する。

* 国立真珠研究所業績 No. 184

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

*** 生化学工業株式会社 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd., Kurihama, Kanagawa-ken, Japan)

実験材料および方法

実験材料 実験に供した材料は滋賀県琵琶湖に生息するイケチョウガイ *Hyriopsis schlegeli* 貝殻の殻皮および真珠層の有機成分である。貝殻内外面を流水できれいに洗い、蒸留水で十分洗った後室温で乾燥した。貝殻の脱灰は 3 M 酢酸でおこない、毎日脱灰液を交換し、2日ごとに脱灰部に残った真珠層の有機成分をピンセットで剥ぎとり、真珠層内に形成されていた殻皮を分離除去した。収集した真珠層の有機成分は2日間蒸留水に漬けて(途中1回換水)脱灰液を十分に除いてから、デシケーターに入れ乾燥した。一方、脱灰にともなって剥離し易くなった殻皮を貝殻外面より剥がし、殻皮内面に密着している稜柱層の有機成分をカミソリでできるだけよく剥ぎ落とし、殻皮を分離した。分離した殻皮は蒸留水で十分に洗って脱灰液を除いてから乾燥した。

酸性多糖体の抽出 乾燥した殻皮および真珠層の有機成分から Fig. 1 の順序にしたがって酸性多糖体を含む分画を得た。すなわち、各乾燥物の 2 g を乳鉢で磨碎し、それぞれ 100 ml の脱塩水に懸濁し、蛋白分解酵素「プロナーゼ」(科研化学製)を 2 mg ずつ加えてとかし、pH 8.0 で 50°C に 6 日間保温、100°C で 10 分間加熱、冷却後さらに市販トリプシン各 4 mg を加え、pH 7.5 で 37°C に 5 日間保温した。これらの酵素処理はいずれもトルオールを随時添加して行なつた。次いで不溶物を遠心除去し、ビスキングチューブに入れて流水および脱塩水に対してそれぞれ 2 日間ずつ透析、透析内液を減圧濃縮して 50 ml にした。

酸性多糖体の分離 得られた各貝殻有機成分の抽出液についてセチル・ピリジニウム・クロリド (cpc) を用いる酸性多糖体の分離⁷⁾を行なつた (Fig. 1)。すなわち、各抽出液 50 ml に 5% cpc 水溶液を攪拌しつつ加え、もはや沈澱を生じなくなつた時蒸留水で全容を 100 ml とし、最終濃度が 0.03 M になるように塩化ナトリウムを加えて十分攪拌した後 37°C で 1 時間放置した。沈澱物を遠心分離 (10,000×g) して集め、0.1% cpc を含む 2.1 M 塩化ナトリウム溶液の 50 ml で 30 分間処理、冷室に放置して生ずる cpc の沈澱を浮別した。沈澱をさらに 50 ml の 2.1 M 塩化ナトリウムの溶液 (0.1% cpc 含有) に入れて繰り

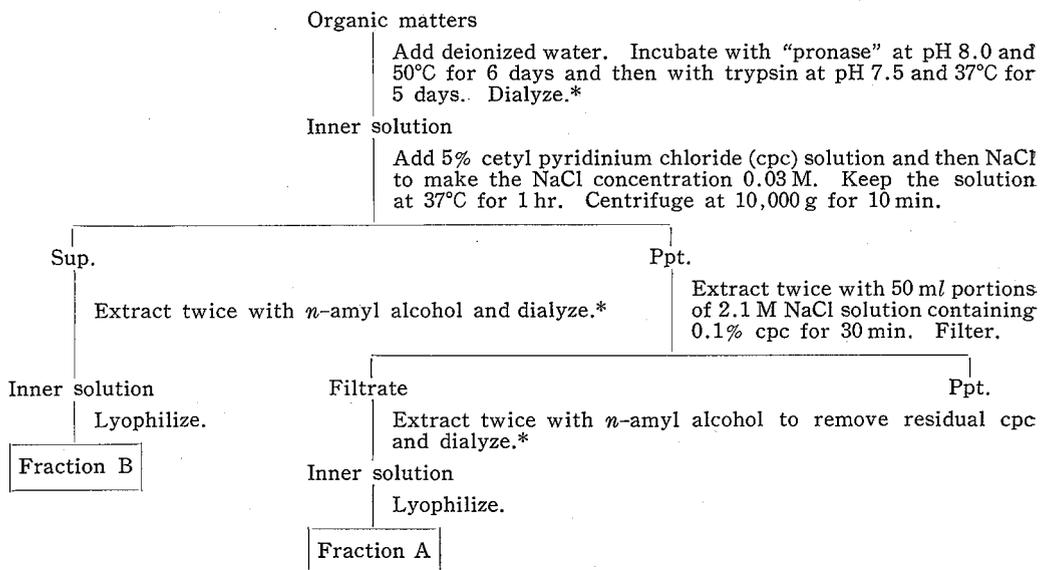


Fig. 1. Separation and purification of acid polysaccharide from organic matters of the shell.

* Dialysis was carried out against running tap water and then against deionized water each for 2 days.

返し処理した。両滲液を合し、なお残存する cpc を除去するために *n*-アミルアルコールの等容と共に数分間激しく振盪し、冷室に 30 分間放置した後水層をとり、再び *n*-アミルアルコールで処理を繰り返した。水層部はビスキング膜に入れ、流水および脱塩水に対して各 2 日間透析し、内液を減圧濃縮して数 ml とし、凍結乾燥した (Fr. A)。

一方、0.03 M 食塩溶液の上清を冷室に放置して生じる析出物を滲別し、*n*-アミルアルコールで上記と同様に振盪処理を 2 回おこなった後、水層を Fr. A と同様に透析、濃縮、凍結乾燥した (Fr. B)。

このようにして得た Fr. A は酸性多糖体を多量に含むと考えられるので、この画分について滲紙電気泳動と糖のペーパークロマトグラフィーを行なった。

分析方法

1. 定量法: 蛋白質の定量は Folin 法⁸⁾により、標準物質には牛血清アルブミンを用いた。ヘキソースは Anthrone 法⁹⁾により、グルコースとして測定した。ヘキソサミンは Elson-Morgan 法¹⁰⁾により、グルコサミンとして測定した。ガラクトサミンの定量には Cessi 法¹¹⁾を用い、また硫酸エステルは Ba-chloranilate 法¹²⁾によつて定量した。

2. 滲紙電気泳動法: 水平型 (東洋科学産業 KK 製) を使い、0.1 M 酢酸-ピリジン溶液 (pH 6.1) で 12 v/cm で 90 分間泳動し、風乾して 0.125% トルイジンブルーのエチルアルコール溶液で染色した。滲紙は東洋滲紙 No. 51 を使用した。

3. ペーパークロマトグラフィー: 構成糖の定性は次のとおり行なつた。Fr. A を 1 N H₂SO₄ で 100°C、6 時間加水分解後 BaCO₃ で中和、遠心分離して得られる上清を真空デシケーターに入れ P₂O₅ 上で濃縮、*n*-ブタノール・ピリジン・蟻酸・水 (50:30:2:18) を展開剤として下降法で 40 時間展開、風乾後硝酸銀で発色させた。

Table 1. Amounts of fractions A and B obtained by cpc treatment from the periostracum and organic matrix of the nacre of *Hyriopsis* shell (mg/2g dry material).

Fraction	Material	
	Periostracum	Nacreous organic matrix
A	trace	17.4
B	3.6	31.9

結 果

上記の方法によつてイケチョウガイ貝殻の殻皮および真珠層の有機成分から得た食塩画分 Fr. A と Fr. B の収量を Table 1 に、これらの画分の化学組成を Table 2 にそれぞれ示した。真珠層の有機成分より 0.87% の Fr. A と約 1.6% の Fr. B を分離したのに比べ、殻皮では両画分とも非常に少なく、痕跡の Fr. A と 0.18% の Fr. B を得たに過ぎない。それぞれの画分はいずれも蛋白質を含むが、

Table 2. Composition of fractions A and B from the periostracum and organic matrix of the nacre of *Hyriopsis* shell (per cent on dry basis of each fraction).

Component	Material		
	Periostracum	Organic matrix of nacre	
	Fr. B	Fr. A	Fr. B
Crude protein (as BSA*)	8.52	28.60	66.00
Hexose (as Glucose)	13.80	0.11	6.31
Hexosamine (as Glucosamine)	5.11	2.78	1.57
Galactosamine	0.67	1.32	
Sulfuric ester		3.31	
Inorganic sulfate		1.50	

* Bovine serum albumin.

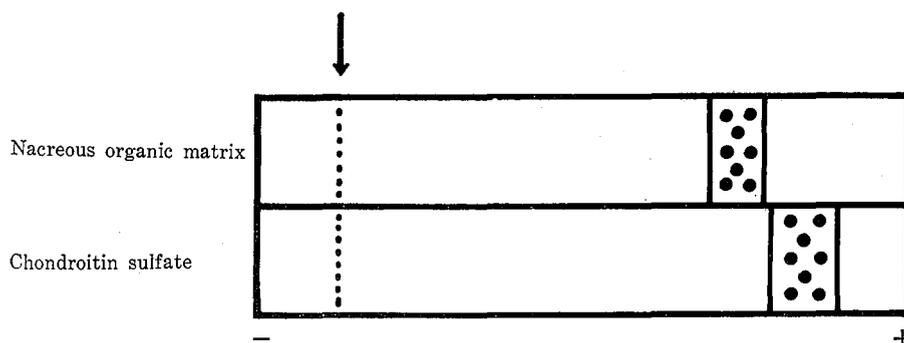


Fig. 2. Schematic electrophoretic pattern of the acid polysaccharide separated from organic matrix of the nacre of *Hyriopsis* shell. The arrow indicates the position where samples were applied.

Table 3. Determination of carbohydrate in the periostracum and organic matrix of the nacre of *Hyriopsis* shell by paper chromatography.

Material	Galactosamine	Glucosamine	Galactose	Glucose
Periostracum Fr. B	+	+		+
Nacreous organic matrix Fr. A	+	+	±	

真珠層の有機成分は蛋白質の含有量が非常に高く、ヘキソースをほとんど含まないのに対し、殻皮の Fr. B は相当量のヘキソースとヘキソサミンを含有し、真珠層の有機成分に比べると非常に少ないが蛋白質を含む。

沝紙電気泳動の結果 (Fig. 2), 真珠層の有機成分の Fr. A にはトルイジンブルーで鮮やかなメタクロマジー陽性のスポットがみられたが、いずれの成分も Fr. B にはメタクロマジーを呈するスポットはない。真珠層の有機成分の Fr. A でみられたメタクロマジーは硫酸エステルに基づくと考えられるが (Table 2), そのスポットは市販のコンドロイチン硫酸に比べて易動度がやや低い。

それぞれの成分の Fr. A と Fr. B の糖をペーパークロマトグラフィーで同定した結果を Table 3 に示した。真珠層の Fr. A にはガラクトサミン, グルコサミン, ガラクトースがあり, 殻皮の Fr. B にはガラクトサミン, グルコサミン, グルコースが含まれる。

考 察

本実験から, セチル・ピリジニウム・クロリド (cpc) 処理によつて得た Fr. A には酸性高分子体が存在しており, これは蛋白質含有量が非常に高く, ヘキソースをほとんど含まない硫酸含有グリコプロテインと考えられ, 沝紙電気泳動の結果からコンドロイチン硫酸とは異なると思われる。コンドロイチン硫酸がイケチョウガイの貝殻有機成分に存在しないとの結果は, この貝の外殻膜にコンドロイチン硫酸がほとんどないという堀口¹⁸⁾の実験結果からも想像できる。一方, Fr. B は酸性多糖体様の挙動を示さず, その主成分はヘキソースと蛋白質であり, 真珠層有機成分の Fr. B は非常に多量の蛋白質を含むのに対し, 殻皮の Fr. B は相当量のヘキソサミンを含有する。しかし, いずれの Fr. B も単一成分ではなく, 多糖類, 蛋白質などの混合物と考えられる。

以上の考察から, 硫酸基を有するグリコプロテインは真珠層の有機成分に存在するが, 殻皮には存在しないと言える。この結果は WADA⁹⁾ が行なつたイケチョウガイの貝殻有機成分の組織化学的研究結果と良く一致している。すなわち, 酸性多糖体は真珠層のように鉍物化した層に含まれる有機基質には必ず存在し, 鉍物化しない殻皮のような層の有機基質には 2, 3 の例外を除けば存在しない。なお, 貝殻中の硫酸多糖体

の分離と同定は、SIMKISS¹⁴⁾ によつて *Crassostrea virginica* の貝殻鈣物化層の有機成分ですでに報告されている。

現在、貝の Ca 代謝において、硫酸基は次のような重要な役割を演じていると想像されている。すなわち、田中・波多野¹⁵⁾の研究によつて、硫酸基を有するムコ蛋白は多量の Ca と結合し、外套膜から分泌され、貝殻鈣物化に必要な Ca を供給することが示唆された。一方、ABOLINS-KROGIS⁴⁾ は貝殻再生実験から、WADA⁵⁾ は貝殻と外套膜との間に挟んだカバーガラス上での貝殻鈣物化の観察から、Ca 代謝の最終過程である鈣物化にあつて、硫酸基を有する基質蛋白は貝殻鈣物の核生成を誘起するのに重要な役割を演ずると推定している。しかし、この有機基質のどの部分が核生成に直接役立つかについては、歯骨の鈣物化と同様に種々の説^{1,4,16)}がある。ところで、本実験で得た硫酸基を有するグリコプロテインが組織化学的研究から推定されるように軟体動物の貝殻鈣物化層に必ず含まれているとすると、この種の基質蛋白に含まれる硫酸が貝殻鈣物化に直接関与している可能性を否定できないであろう。

要 約

1. イケテウガイ貝殻を 3 M の酢酸で脱灰して得た殻皮および真珠層の有機成分から、セチル・ピリジニウム・クロリド処理により酸性多糖体を分離、同定した。
2. 硫酸基を有するグリコプロテインは真珠層の有機基質中に存在したが、殻皮にはほとんど存在しない。
3. 殻皮より得た食塩分画はメタクロマジー陰性で、その主成分はヘキソースと蛋白質からなり、相当量のヘキソサミンを含有するが、これは単一成分ではなく、多糖類、蛋白質などの混合物と考えられる。
4. 真珠層の有機基質は硫酸含有グリコプロテインのほか、多量の蛋白質と多糖類などからなる混合物と考えられる。

文 献

- 1) P. E. HARE: *Science*, **139**, 216~217 (1963).
- 2) K. WADA: *This Bull.*, **32**, 304~311 (1966).
- 3) K. WADA: *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, **9**, 1078~1086 (1964).
- 4) A. ABOLINS-KROGIS: *Acta Univ. Upsaliensis*, **5**, 1~22 (1963).
- 5) K. WADA: *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, **9**, 1087~1098 (1964).
- 6) V. R. MEENAKSHI, P. E. HARE, and K. M. WILBUR: *Symposium on Mollusca (India)*, 44~45 (1968).
- 7) S. SCHILLER, G. A. SLOVER, and A. DORFMAN: *J. Biol. Chem.*, **236**, 983~987 (1961).
- 8) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. T. RANDALL: *ibid.*, **193**, 265~275 (1951).
- 9) T. A. SCOTT and E. H. MELVIN: *Anal. Chem.*, **25**, 1656~1661 (1953).
- 10) R. BELCHER, A. J. NUTTEN, and C. M. SAMBROOK: *Analyst*, **79**, 201~208 (1954).
- 11) C. CESSI and FRANCA SERAFIM-CESSI: *Biochem. J.*, **88**, 132~136 (1963).
- 12) B. SPENCER: *ibid.*, **75**, 435~440 (1960).
- 13) 堀口吉重: 本誌, **22**, 463~466 (1956).
- 14) K. SIMKISS: *Comp. Biochem. Physiol.*, **16**, 427~435 (1965).
- 15) 田中正三・波多野博行: アイソトープ研究利用総覧, 307~311 (1956).
- 16) 和田浩爾: 「硬組織研究」(荒谷真平編), 399~430, 医歯薬出版, 東京 (1969).

軟体動物の石灰化組織の鉱物化に関する研究—XVIII.

外套膜が分泌する粘液の酸性多糖体*

和田浩爾・古橋 保

(1970年7月25日受理)

Studies on the Mineralization of the Calcified Tissue
in Molluscs—XVIII.Acid Polysaccharide of Mantle Mucus of
Some Marine Bivalves

Koji WADA** and Tamotsu FURUHASHI***

Sulfomucopolysaccharide or acid mucoprotein with sulfate group is detected in mantle mucus of some bivalves⁴⁻⁷⁾, and is considered to act as a calcium carrier and provide calcium concentration high enough for the growth of shell minerals at the site of mineralization⁴⁾. Histochemical and biochemical studies have suggested that the inner and outer mucus of the mantle of *Pinctada fucata* show metachromasia on staining with toluidine blue and are very similar to each other in their amino acid composition¹⁾. If the acid mucous substances play the above-mentioned functional role in the calcium metabolism of molluscs, the mucus does not always form a shell. To answer this question, biochemical analysis of the acid polysaccharide was made on the inner and outer mucus of the mantle of *Pinctada fucata* and *Chlamys nobilis*.

Inner mucus adhered on the inner surface of the mantle and outer mucus secreted between the mantle and shell were collected with an injector. In each case the dry mucus obtained by addition of ethyl alcohol was digested with "pronase" at pH 8.0 and 50°C for 72 hours and subsequently with trypsin at pH 7.5 and 37°C for 72 hours. Acid polysaccharide was then separated by the cetyl pyridinium chloride treatment and analysed as described in the preceding paper²⁾.

The amount and chemical composition of fraction A containing acid mucopolysaccharide are shown in Tables 1 and 2. The fraction contains a relatively large amount of sulfuric ester and a little amount of protein, but not chondroitine sulfate, as shown by paper electrophoresis. Galactosamine, glucosamine, galactose and glucose are detected in fraction A of both the inner and outer mantle mucus of *Pinctada fucata* by paper chromatography (Table 3). The fraction seems to be composed of sulfomucopolysaccharide or sulfated polysaccharide-protein complex.

From these results, it may be concluded that the presence of the acid mucous substance with sulfate group is necessary to induce shell mineralization though it does not always induce it.

貝殻は外套膜外側面上皮が分泌する粘液 extrapallial fluid から生成するが、内側面上皮が分泌する粘液からは生成しない。外套膜の内外側面にそれぞれ分泌される粘液の組成は全く異なるのか、両粘液の組成は

* 国立真珠研究所業績 No. 185

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

*** 生化学工業株式会社 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd., Kurihama, Kanagawa-ken, Japan)

全く類似しているが外套膜内側面は粘液が貝殻になるための必要条件を満たしていないのか、あるいはどんな条件がそろって生体で鉱物化がおこるのかという諸問題は、生鉱物学にとって最も基本的な課題であり、ひいては病的な結石の生成を解明する上でも重要な基礎研究課題である。

ところで、外套膜外側面上皮の粘液から生成する貝殻鉱物は、多くの貝類でアラレ石、ごく少数の貝類で方解石であり、いずれの結晶形になるかは貝の種類によって決っている。また、アコヤガイの仲間のように、外套膜縁からの分泌液からは方解石が生成し、その他の外套膜外側面上皮の分泌液からはアラレ石が晶出する種類もある。生体で生じる炭酸カルシウム鉱物の同質多像形形成は多くの研究者によって論じられており、硬組織の形成に関与する細胞の複雑な代謝によって制約因子がつくられ、あるいは決められると考えられている。

著者の一人である WADA¹⁾ は外套膜分泌液の全アミノ酸組成を調べたが、著者らは生物系における鉱物化のある過程において局所因子として作用すると考えられる酸性多糖体の分離を行ない、その種類と存在形態を明らかにすることをここに試みた。

実験材料および方法

実験材料 英真湾にある真珠研究所多徳島臨海実験場前の筏からつり下げて飼育しておいたアコヤガイ *Pinctada fucata* の外套膜内外側面およびヒオウギガイ *Chlamys nobilis* の外套膜外側面に分泌されていた粘液をそれぞれ集めて実験に供した。外套膜外側面粘液は、長い注射針を貝殻内側面に沿わせて外套膜と貝殻との間に挿入、外套膜組織片が混入しないように注意しながら外套膜中央域（アコヤガイではアラレ石からなる真珠層域、ヒオウギガイでは方解石からなる葉片構造層域）から注射器で採液した。外套膜内側面粘液は注射針を使わずに組織片やプランクトンなどが混入しないように注意して外套膜内側面に粘着していた粘液を外套縁膜域から注射器で採液した。

酸性多糖体の抽出 集めた各粘液にそれぞれ3倍容エチルアルコールを加えて得られる沈殿物を遠心分離、無水エチルアルコールで洗滌、真空デシケーターに入れ、無水リン酸上で乾燥してから、前報²⁾にしたがって酸性多糖体を含む分画を得た。すなわち、各乾燥物をそれぞれ50 mlの脱塩水と攪拌、乾燥物の1/1000重量の蛋白酵素「プロナーゼ」（科研化学製）を加えて溶解、pH 8.0で50°Cに72時間保温、100°Cで10分間加熱、冷却後さらに市販トリプシンを乾燥物の2/1000重量加え、pH 7.5で37°Cに72時間保温した。これらの酵素処理は前報²⁾と同様にいずれもトルオールを随時添加して行なつた。この反応液をビュスキングチューブに入れ、流水および脱塩水に対してそれぞれ2日間透析、透析内液を減圧濃縮して50 mlにした。

酸性多糖体の分離 前報²⁾と同様に、得られた各粘液の抽出液についてセチル・ピリジニウム・クロリド (cpc) を用いる酸性多糖体の分離³⁾を行なつた。なお、分画した Fr. A および Fr. B については前報²⁾と同様の方法と条件で定量分析、沪紙電気泳動、ペーパークロマトグラフィーを行なつた。

結 果

上記の方法によつて、アコヤガイの外套膜内外側面粘液とヒオウギガイの外套膜外側面粘液とから得られた

Table 1. Amounts of fractions A and B obtained by cetyl pyridinium chloride treatment from mantle mucus (mg/g dry material).

Material Fraction	<i>Pinctada fucata</i>		<i>Chlamys nobilis</i>
	Inner mucus	Outer mucus*	Outer mucus*
A	45.24	50.34	10.41
B	88.18	33.04	16.74

* outer mucus = extrapallial fluid.

食塩画分 Fr. A と Fr. B の収量とその組成を Table 1 および 2 に示した。実験に供した試料量が十分でなかつたので、Fr. A の細かい分画を行なえなかつた。それぞれの試料の Fr. A は共にムコ物質の存在を示す指標となるヘキソサミンを含み、その含有量はヒオウギガイでアコヤガイの約 1/2 から 1/3 と少ない。

Table 2. Composition of fractions A and B of mantle mucus (per cent on dry basis of each fraction).

Component	Material	<i>Pinctada fucata</i>				<i>Chlamys nobilis</i>	
		Inner mucus		Outer mucus		Outer mucus	
		Fr. A	Fr. B	Fr. A	Fr. B	Fr. A	Fr. B
Crude protein (as BSA*)		5.85	4.97	5.52	2.50	9.51	4.04
Hexose (as Glucose)		9.75	42.90	14.80	75.94	2.46	10.63
Hexosamine (as Glucosamine)		12.59	2.54	18.55	1.93	6.66	1.22
Galactosamine		1.27	—	5.00	—	1.22	—
Sulfuric ester				19.04			
Inorganic sulfate				4.96			

* Bovine serum albumin.

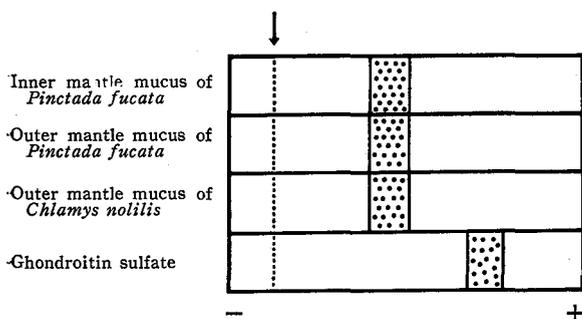


Fig. 1. Schematic electrophoretic patterns of the acid mucopolysaccharide of mantle mucus. Arrow: Origin of electrophoresis.

Table 3. Carbohydrate of the acid mucopolysaccharide of mantle mucus of *Pinctada fucata* detected by paper chromatography.

Material	Galactosamine	Glucosamine	Galactose	Glucose
Inner mucus	+	+	+	+
Outer mucus	+	+	+	+

側面および外側面に分泌されていた粘液は共にガラクトサミン、グルコサミン、ガラクトース、グルコースなどを含有し、類似の構成糖からなることがわかる。なお、アコヤガイの外殻膜粘液はヘキソース、特にグルコースが相当量みられるが、これが粘液採取時に軟体部から流入したグリコーゲン様物質に由来するのか、粘液の固有成分であるかは明らかでない。

考 察

貝殻の石灰化機構と関連して、二枚貝の外殻膜粘液の化学組成が分析され、硫酸ムコ多糖体ないし硫酸基を有するムコ蛋白の存在が報告されている。すなわち、田中・波多野^{4,5)}は Ca と結合した硫酸基を有する

また、この画分はいずれも蛋白質を含む。

Fig. 1 は Fr. A と市販のコンドロイチン硫酸をワ紙電気泳動で比較した結果である。コンドロイチン硫酸にかなり遅れて移動するトルイジンブルーで鮮やかなメタクロマジー陽性を示すスポットは、ヒオウギガイの外殻膜外側面粘液で tailing しているのを除けば、それぞれの試料で互によく似た挙動を示す。しかし、同時に泳動させた Fr. B はいずれの外殻膜粘液でもメタクロマジー陰性であった。Table 2 の分析結果およびワ紙電気泳動の挙動から、外殻膜粘液の Fr. A でみられるトルイジンブルーによるメタクロマジーは硫酸エステルによると考えられる。

一次元ペーパークロマトグラフィーにより、アコヤガイの外殻膜内外側面粘液の Fr. A の糖を決定し、その結果を Table 3 に示した。外殻膜内

複合蛋白質がアコヤガイの外套膜粘液中に多量に存在し、この蛋白質が Ca と結合していることを明らかにした。堀口^{6,7)} もアコヤガイの外套膜粘液およびイケテウガイの外套膜に硫酸ムコ多糖体が多量に存在し、その構成成分は両種間で相違するが、硫酸基が軟体動物の Ca 代謝に関係する可能性を同様に指摘した。方、左右田・小山⁹⁾ は軟体動物の粘液に強いグルコシルターゼ活性を認め、後に左右田⁹⁾ は粘液の硫酸基と結合した Ca がスルファターゼの作用を受けて遊離し貝殻石灰化に寄与すると報告した。ところで、上述の研究はいずれも外套膜内外側面のいずれに分泌された粘液であるかを区別して分析を行なっていない。すでに緒言で指摘したように、粘液は外套膜内外両側面に分泌されるにもかかわらず、貝殻は外套膜外側面のみ形成される事実を考慮すると、外套膜の分泌液から貝殻が形成される機構をさらに解析するためには、外套膜内側面および外側面粘液をそれぞれ分離し、その化学組成を明らかにする必要がある。

今回の実験は、外套膜から放出された分泌物だけを内側面と外側面とから注射器で別々に採取して実験に供した。また、酸性多糖体の分離にあたってセチル・ピリジニウム・クロリド (cpc) を用い、酸性多糖体を一度 cpc との複合体とし水不溶物として沈殿、後に cpc を除去する方法で分離した。その結果、アコヤガイの外套膜内側面粘液と外側面粘液は共に類似の硫酸ムコ多糖体ないし硫酸ムコ多糖体と結合した蛋白質——多分、後者と考えられる——を含み、グルコサミン、硫酸を構成成分とすると考えられる。同様に、ヒオウギガイの外套膜外側面粘液にも量的な差はあるが硫酸多糖体様物質ないし硫酸ムコ多糖体と結合した蛋白質が存在するが、これらの二枚貝の外套膜粘液中にコンドロイチン硫酸が存在しているかどうかは、電気泳動の結果、構成糖の組成から疑わしい。

今回の実験結果とアコヤガイの外套膜内外側面粘液の amino 酸組成が互いに全く類似しているとの WADA¹⁾ の報告とを比較すると、少なくともアコヤガイにおいては外套膜の内側面に分泌される粘液と外側面に分泌される粘液とは互いに良く類似した成分からなると想像できる。もし分泌物の成分が全く同じであったと仮定するならば、分泌物の有機成分が貝殻有機基質として固化し、貝殻が形成されるために必要な条件はなにかということが問題となる。ところで、アコヤガイの外套膜内側面上皮と外側面上皮とは機能に差があるとの町井¹⁰⁾ の研究から、固化条件は細胞の働きによつて分泌物の有機成分に与えられると考えられる。一方、分泌物の有機成分が固化条件を備えていたとしても、分泌物の有機成分の固化を阻害する因子が外界に存在するならば、分泌物の有機成分は外界と直接接触する外套膜内側面では固化できず、殻皮によつて外界と分離されている外套膜外側面で固化するであろう。あるいは、この両方が問題になるのではなからうか。

かかる固化条件が満たされ、その阻害因子が除かれて有機基質が形成され、そこに炭酸カルシウムの過飽和濃度が作られた場合、WADA^{1,11)} が示唆したように、貝殻鉱物が全くそこに存在していない時には、メタクロマジン陽性の基質蛋白質——硫酸基を有するグリコプロティン²⁾——が貝殻鉱物の結晶核生成を誘起するのに有効に働くと思像できる。

要 約

1. アコヤガイ、ヒオウギガイの外套膜から分泌された粘液を注射器で採取し、セチル・ピリジニウム・クロリドを用いて酸性多糖体を分離した。
2. アコヤガイ、ヒオウギガイの外套膜より分泌される粘液は、いずれも硫酸ムコ多糖体ないしそれと結合した蛋白質を含むほか、多糖類や蛋白質を含む混合物である。
3. アコヤガイの外套膜内外側面粘液の Fr. A よりガラクトサミン、グルコサミン、ガラクトース、グルコースなどの糖が検出された。
4. アコヤガイの外套膜内側面粘液と外側面粘液は全く類似した成分からなると想像できる。

文 献

- 1) K. WADA: This Bull., 33, 1007~1012 (1967).
- 2) 和田浩爾・古橋 保: 本誌, 36, 1122~1126 (1970).

- 3) S. SCHILLER, G. A. SLOVER, and A. DORFMAN: *J. Biol. Chem.*, **236**, 983~987 (1961).
- 4) 田中正三・波多野博行: アイソトープ研究利用総覧, 307~311 (1956).
- 5) S. TANAKA and H. HATANO: *Rep. Nippon Inst. Sci. Res. Pearls*, **4**, Rep. No. 73, 1~8 (1963).
- 6) 堀口吉重: 本誌, **22**, 463~466 (1956).
- 7) 堀口吉重: 三重県大水産紀要, **3**, 399~406 (1959).
- 8) 左右田徳郎・小山誠太郎: 日化誌, **56**, 1388~1391 (1935).
- 9) 左右田徳郎: 科学, **7**, 101~103 (1937).
- 10) 町井 昭: 国立真珠研報, **8**, 884~890 (1962).
- 11) 和田浩爾: 「硬組織研究」(荒谷真平編), 399~430, 医歯薬出版, 東京 (1969).

貝殻・真珠の形成機構

和田 浩 爾

(国立真珠研究所)

Shell and Pearl Formation

Koji WADA

硬組織形成機構研究グループ会報

第 8 号 別 刷

昭和47年3月31日発行

Reprinted from

Biological Mineralization Newsletter, No. 8

March, 1972

貝殻・真珠の形成機構*

和田 浩 爾

(国立真珠研究所)

Shell and Pearl Formation

Koji WADA

硬組織の石灰化という専門的研究分野は水産増養殖における生産的技術研究や水産生物資源における生活履歴の解析および年令査定にとって強力な理論的支柱となる。このような特殊な専門分野を水産研究で一般化するには、生物の生活をとをしておこる石灰化の生理を明らかにすると同時に、石灰化の研究を水産研究において意識的に位置づける必要がある。例えば、真珠の品質向上を目的としておこなわれた養殖試験は、幾多の試向錯誤をくりかえしながらも一面において養殖技術の著しい発展をもたらした。しかし、技術研究を単に養殖実験としてとどめている限り、貝が真珠をつくる生理を解明するものではないから、測定法や記載がいくら精密化したとしても、真珠の品質(物性)形成を高度に生産管理する養殖技術を体系化するのにおのずと限界がある。この行きずまりを打破するには、生体内で鉱物化がどのような機構でおこるかという基本的な生理学的問題にたちかえらねばならない。

こうした問題のとりあげ方をする時、真珠の品質形成を調節するための基本的な研究は(1)真珠の成分、(2)真珠の実体色、および(3)真珠の成長などと真珠の品質形成との関係を真珠形成の具体的なない手である真珠袋上皮細胞の分泌代謝ならびに貝の遺伝、生理、生態、環境などとの実際のふれあいの中でおこなう必要がある。このうち、(1)は真珠袋上皮細胞における基質代謝の変化であり^{1,2)}、(2)は真珠袋上皮細胞に再生した移植片をとった貝の外套膜外面上皮細胞が黄色色素を代謝する性質—多分遺伝的な—をもっているかどうかによって決まること³⁾が報告されている。一方、(3)については貝の生活をとおして真珠袋のCa代謝がどのように変化し、真珠の成長や物性に影響するかが少しずつ明らかになってきた⁴⁾。したがって、これらのテーマについては上記の論文にゆずり、ここでは硬組織の鉱物化機構を理解することが硬組織中に刻み込まれた条紋から生物の生活履歴や生活環境を解説したり、年令を査定するのにいかに有意義であるかを述べる。

1 真珠層の条紋の性状

貝殻や真珠は層状に積み重なった沢山の薄い鉱物板からなり、これらの組織中に成長と関連した条紋が刻まれる。条紋は構造的にみて幾つかのタイプに区別でき、例えば真珠層は次のような構造的変化をしながら成長すると条紋を生ずる。

i) それぞれで均一な鉱物薄板からなる層(単一体⁵⁾)が重畳する場合。条紋となって現われるそれぞれの単一体は互いの間で構造に次のような差を生じていることがアコヤガイの貝殻と真珠、アワビやサザエの貝殻で知られている⁶⁾。

- 単結晶の結晶学的配向はほぼ同じであるが、それぞれで鉱物薄板の厚さが異なる単一体の重畳。
- 鉱物薄板の厚さは大差ないが、それぞれで単結晶の結晶学的配向に多少のずれを生じた単一体の重畳。
- 鉱物薄板の厚さも、単結晶の結晶学的配向もそれぞれで異なる単一体の重畳。

ii) 隣接する鉱物薄板の厚さが乱れた層と単一体が重畳する場合。イケチョウガイの真珠では単一体は光沢のある透明帯となり、乱れた層は光沢のにおい不透明帯となる⁷⁾。

iii) 均一な鉱物薄板の重畳中に特殊層が形成される場合。特殊層としてイケチョウガイ貝殻と真珠では殻皮様の有機質シートが形成され、アコヤガイの貝殻と真珠では厚い有機基質シートや非常に厚い鉱物薄板が形成され、また腐蝕溶解面であることも考えられる。

* 国立真珠研究所業績 No. 196

2 貝殻条紋形成と貝の生活

生物はその生息する環境の無機的条件の変化に対して種独特の抵抗性なり、適応性なり、また独立性なりを示しながら生活する。貝もまた例外ではない。環境の変化に対し生活を保持せんがために、あるいは保持したのために、貝殻や真珠形成の具体的なない手である外套膜外面上皮や真珠袋の分泌代謝が変動し、無機元素や結晶の成長と溶解との過程をとおして層状構造に変化を生じ、貝の生活の記録が貝殻や真珠の組織中に無機元素の分布変化としてあるいは条紋として刻み込まれる。したがって貝の生理生態や生活環境と形成細胞の分泌代謝や硬組織の鉱物化との関係を明らかにし、硬組織中の無機元素の分布状態や条紋形成との関係を解説できるようになれば、硬組織を使って対象生物種の生理生態および生活環境の変化を時間経過に従って追跡することができる。言い換えるならば、生物の生活をとおした硬組織形成を研究することであり、そのためには生物種ごとにその硬組織の鉱物化機構の特徴をまず知っておかねばならない。

ところで、鉱物化機構や生息環境が同じであっても条紋形成には生物種の特徴が反映され、また同一生物種でも生活環境が異なったり年齢にともなって生態が変化すると条紋形成に差を生じ、個体が異なると同じ生活環境に対して条紋形成に差を生ずることも知られている。Pannella and MacClintock⁸⁾は*Mercenaria mercenaria*や*Tridacna squalosa*などの貝殻組織中に年周期、産卵周期、太陰月周期、潮汐周期、日2回周期、日周期などに相当する種々のリズムを示す条紋が刻み込まれることを、またClark II⁹⁾は*Cardium edule*の貝殻外面に日周期性の縞模様、大潮に関連した29日周期の条紋、冬期の成長率の減少を示す条紋、潮流や強風に関連して不規則に乱れた条線などが形成されることを報告した。アコヤガイでは貝殻や真珠の成長面が冬期に溶解し、真珠層中に冬の休止線がかなり明瞭に形成されることが知られている⁷⁾。

3 貝殻・真珠形成細胞の分泌機能

生殖線中に移植された外套膜小片の外面上皮細胞は真珠核を完全に包んで真珠袋を形成して宿主組織と癒着する。貝殻を形成していた外套膜外面上皮細胞はこの新しい有機的環境のもとで袋の内側に真珠を形成する。したがって、真珠形成の具体的なない手は真珠袋に再生した上皮細胞であり、真珠袋は外套膜外面上皮細胞と同じように (1)有機基質の前駆物質の合成、(2)Caの濃縮、(3)炭酸の供給、および(4)これら貝殻・真珠物質の分泌などの機能をもつということには異論がない。

i) 形成細胞の微細構造

真珠層を形成する外套膜や真珠袋の上皮細胞の自由表面には微絨毛が密生し、核は円形ないし卵円形で細胞

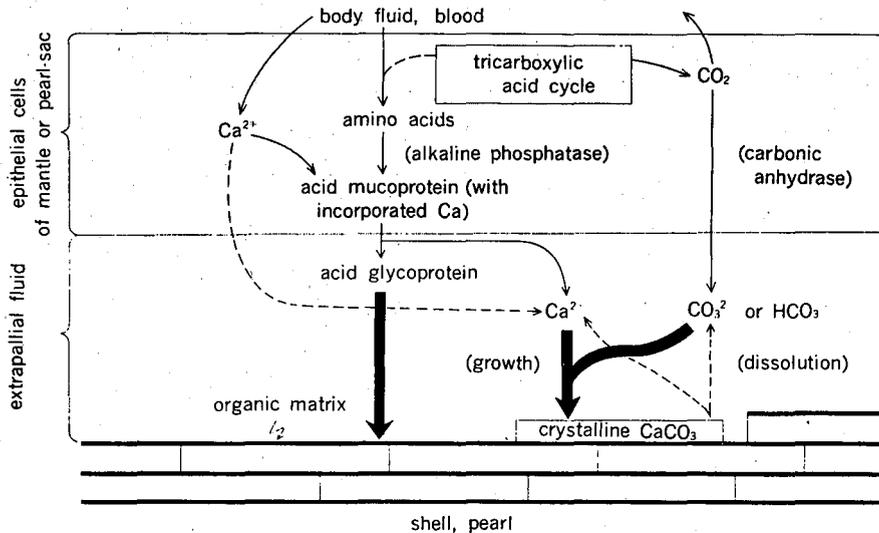


Fig. 1: Schema showing metabolic processes involved in shell and pearl nacre formation.

の中央かやや基底部に位置する。粗面小胞体は核周辺、特に核と基底部との間に散在し、分泌活動が盛んな時期には内腔は広く拡張し、冬期分泌活動が停止ないし低下した時期には内腔はきわめて狭く圧平されている。多数の遊離したリボソームが細胞質中を充たし、ゴルジ装置は核の上縁側の細胞質中にみられ、少数の糸粒体が上縁部に散在する。また分泌活動が盛んな時期には小胞や空胞が上縁側に多数認められ、冬期には不定形の大きな空胞を生ずる。このように外套膜と真珠袋の上皮細胞の微細構造は他の動物の蛋白分泌腺細胞のそれに類似しており、外套膜や真珠袋の上皮細胞は蛋白、多糖体あるいはその複合体などの高分子物質を合成・濃縮そして放出すると考えられる。生化学的研究¹⁰⁾や細胞化学的研究^{11,12)}から、また上皮細胞間に粘液腺細胞は観察されてもCa分泌腺として特に分化した細胞のないことなどから、上皮細胞はCaも分泌すると考えられる。このほか外套膜外面上皮細胞は分泌と同時に再吸収を行なっている可能性も示された^{13,14)}。

ii) 貝殻・真珠物質の代謝図式の作成

貝殻・真珠物質の代謝は多くの先覚者によって研究され、その代謝図式はWilbur¹⁵⁾およびTanaka and Hatan¹⁰⁾によって作成された。前者は主に炭酸基と有機基質の代謝経路について、後者は主にCaの代謝経路について論じている。この両者の図式に筆者^{2,16)}の考えを加えて作成した模式図をFig. 1に示す。これによると外套膜外面上皮細胞や真珠袋は貝殻鈣物塩の濃縮、有機基質前駆物質の合成と分泌などを司どり、分泌物は上皮細胞のタイプによって質的ならびに量的に調整され、鈣物化の場に放出された分泌物の化学的および物理的性状は上皮細胞のタイプ別に基本的には恒常性を示す。この分泌機能の質的ならびに量的調整は貝殻・真珠形成に関与する細胞で営まれる糖代謝の差であり、中間代謝産物であるピルビン酸のクエン酸回路へのとり入れとミトコンドリア電子伝達系による酸化還元反応を基盤としているであろう。クエン酸回路から放出されたCO₂の一部は炭酸脱水酵素の触媒作用により加速的に貝殻・真珠形成に必要な大部分の炭酸基を供給する。形成細胞におけるこうした一連の代謝活動は貝の生理状態や生息環境の影響を敏感に受けて変化し、この変化は生成した貝殻・真珠の組織中に記録される。

4 貝殻・真珠の成長と溶解

以上に述べたようにして貝殻・真珠の前駆物質は合成、濃縮され、貝体外あるいは体内に形成された鈣物化の場に放出されると、或る条件を充たせば貝殻・真珠はこの分泌物から一定の機構を介して成長し、条件によっては一方的に溶解する。貝殻・真珠の成長と溶解の現象は結晶成長の立場から考察すると、溶液からの結晶成長の問題として一般化して扱ひ得るが、生物学的因子の関与により非常に複雑化し特殊化した問題となる。

i) 貝殻鈣物の成長

結晶成長は結晶核の生成と核の成長という過程を経ておこる。安定な結晶核が自然核生成機構を通して生ずるためには高過飽和濃度を必要とするが、細胞の生理的調節によって作られた溶液に貝殻鈣物塩の高過飽和濃度は期待できない。もし鈣物の結晶核生成にとって触媒的に作用する固相が生物的に作られるならば、石灰化組織の鈣物化は不均一核生成機構を介してかかる溶液からでも誘起される。鈣物化の場に鈣物相が全くないとき、触媒として作用する固相は細胞によって合成された有機物であろうと想像できる。軟体動物の貝殻鈣物化の場合、かかる役割を演

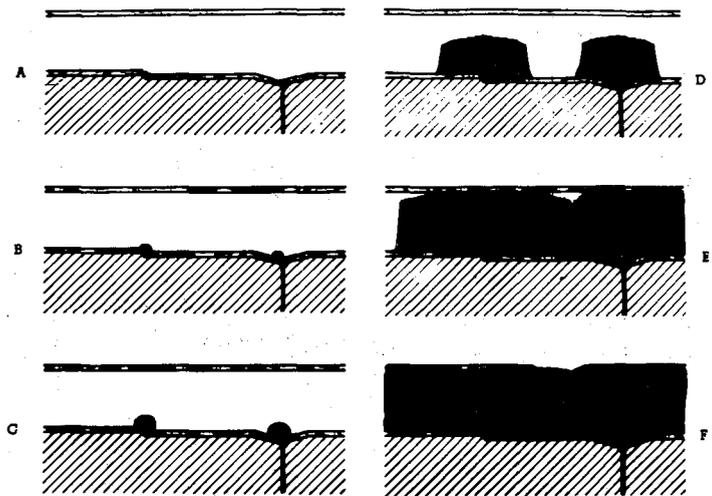


Fig. 2 : Schema showing the process of crystal formation in nacre.

ずる有機物はAbolins-Krogis¹⁷⁾やWada^{6,18)}によって発見され、メタクロマジア陽性の酸性グリコ蛋白を基質とした有機物であることが示唆された。

一方、Bevelander and Nakahara¹⁹⁾やWada^{2,20)}はmantle-shell preparationおよびpearl sac-nacre preparationの薄切を作成、鉱物化の場に鉱物相が存在する場合の結晶形成を二枚貝の真珠層について詳細に観察し、Wada²⁰⁾は真珠層形成における結晶核生成とその成長の過程をFig.2のように図説した。それによると、同様に結晶形成に先だつて分泌物の

一部が重合してメタクロマジア陽性の有機基質を形成する。この有機基質は真珠層の成長過程では形成細胞の自由表面にほぼ平行なシートとして生じ、真珠層表面に平行な薄い層状の部屋を作る (Fig.3)。この重合過程で、有機物と錯塩をつくっていたCaが遊離し、 $[Ca^{2+}] \cdot [CO_3^{2-}]$ の濃度が部屋の中で増加する。新しい結晶は部屋の中ですでに形成された結晶の(001)面に吸着した有機質シートに基本的構造として存在する孔の中で結晶の(001)面に密着しておこる (Fig.2A)。孔の底で生成した新しい結晶は孔に沿って成長し (Fig.2B)、やがて吸着した有機質シートの表面にあらわれて次の層板 (鉱物薄板) の一員となる (Fig.2C)。新しい結晶は下の結晶とエピタクシアに成長し、interlamellar matrix に沿って成長する際その表面の構造や性質に影響されながら成長する。新しい結晶は最初は球状で、やがて結晶の基底面はその中央から外へ向って拡がる薄層の成長により垂直方向に急速に成長する (Fig.2D)。そのうちの或るものは消失し、また或るものは互いに融合し、下の層板の結晶の境界、結晶縁および(001)

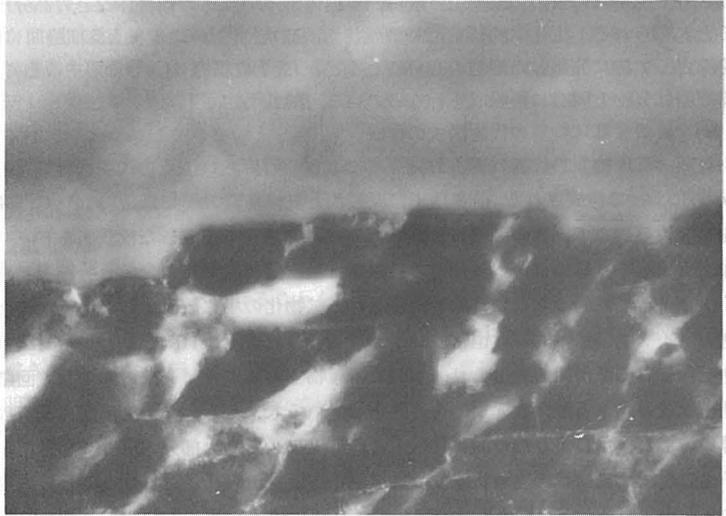


Fig.3 : An electron micrograph of an ultrathin cross-section of pearl sac-nacre preparation showing the mineralization front of the nacre in *Pinctada fucata* collected in August. Organic sheets are generated in the secreted fluid and are nearly parallel to mineral lamellae in the layer. x 29,000

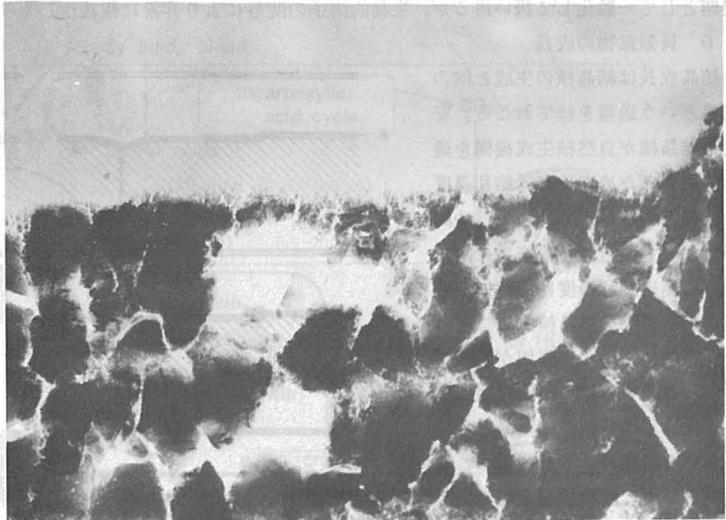


Fig.4 : An electron micrograph of an ultrathin cross-section of pearl sac-nacre preparation. No organic sheet is formed in the secreted fluid in hibernation and the mineralization front of the nacre is breaking by dissolution. x 21,000

面に残っているステップに生成した少数のものだけが平均二軸直径が 1.5μ 以上に大きくなる。有機質シートが(001)面に吸着すると結晶の厚化は中止し(Fig.2E), 結晶はintercrystalline matrix を挟んで隣接結晶と接合するまで側面方向に成長し続ける(Fig.2F)。その結果, 大きい平坦な(001)面をもった板状単結晶に成長する。この成長過程で単結晶はラセン転位を含むようになり, 薄層の集束によって厚い渦巻層となって(001)面にしばしば顕われる。結晶は鉱物薄板に閉じ込められるにいたって本来の形を失なう。

ii) 貝殻鉱物の溶解

冬期生活活動が低下すると貝殻・真珠鉱物は溶解し, 貝殻・真珠の重量は減少する。この時期には形成細胞と真珠層との間を充たしている分泌物中に有機質シートの生成は認められない(Fig.4)。それだけでなく真珠層表面の破壊像が認められる。

5 む す び

貝殻・真珠の鉱物化を制御する形成細胞の分泌代謝系, 分泌物からの有機基質の重合, 結晶核生成, 結晶の成長と溶解などの関係がかなり明らかになってきた。現在, 生物の生活をとおして硬組織の鉱物化機構を明らかにしようとする努力が各専門分野で払われており, やがて硬組織に刻みこまれた条紋, 無機元素の分布状態および有機物の質的あるいは量的変化から対象生物の生理・生態を時間をおってひもとける時代がくるであろう。言うまでもなく, こうした基礎学門分野における科学的認識は真珠養殖における高度生産管理技術を体系化するために必要で欠かせない基本的な知見を与えている。

文 献

- 1) H. Nakahara: *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI*, 13, 268~270 (1957).
- 2) K. Wada: in "Profiles of Japanese Science and Scientists" (H. Yukawa, ed.), 227~244, Kodansha, Tokyo (1970).
- 3) 和田浩爾: 国立真珠研報, 14, 1765~1820 (1969).
- 4) 和田浩爾: 国立真珠研報, 16, 1949~2027 (1972).
- 5) 内田洋一・上田正康: 生理生態, 1, 171~177 (1947).
- 6) K. Wada: *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, 7, 703~828 (1961).
- 7) 和田浩爾: 国立真珠研報, 8, 948~1059 (1962).
- 8) G. Pannella and C. MacIntock: *J. Paleontology*, 42, 64~80 (1968).
- 9) G. R. Clark II: *Science*, 161, 800~802 (1968).
- 10) S. Tanaka and H. Hatano: *Rep. Nippon Inst. Scient. Res. Pearl*, No. 73, 1~8 (1963).
- 11) 辻井 禎: 「硬組織研究」(荒谷真平・他編), 431~442, 医歯薬出版, 東京 (1969).
- 12) E. Kniprath: *Histochemie*, 25, 45~51 (1971).
- 13) 中原 皓: 国立真珠研報, 8, 879~883 (1962).
- 14) G. Bevelander and H. Nakahara: *Biol. Bull.*, 131, 76~82 (1966).
- 15) K. M. Wilbur: in "Calcification in Biological Systems" (R. F. Sognnaes, ed.), 15~40, AAAS (1960); in "Physiology of Mollusca I" (K. M. Wilbur and C. M. Yonge, ed.), 243~282, Academic Press (1964).
- 16) 和田浩爾: 「硬組織研究」(荒谷真平・他編), 399~430, 医歯薬出版, 東京 (1969).
- 17) A. Abolins-Krogis: *Acta Univ. Upsal.*, 20, 1~22 (1963).
- 18) K. Wada: *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, 9, 1087~1098 (1964).
- 19) G. Bevelander and H. Nakahara: *Calc. Tissue Res.*, 3, 84~92 (1968).
- 20) K. Wada: *Biom mineralisation* (in print).

昭和48年8月20日印刷
昭和48年8月25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 林 知 夫

印刷者 山 形 健 雄

大阪市東住吉区桑津町4-58

印刷所 アテネ出版印刷株式会社

Bulletin of the National Pearl Research Laboratory

17

August 1973



CONTENTS

- Wada, K. Amino acid composition of organic matrices in anomalous matters secreted by the epithelium on the outer mantle surface inside pallial line2053
- Wada, K. Enzyme histochemistry of mantle tissue of some bivalves.....2059
- Wada, K. T. Growth of Japanese pearl oyster larvae fed with three species of micro-algae2075

The originals published in other journals

- Wada, K. and Furuhashi, T. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—XVII
Acid polysaccharide in the shell of *Hyriopsis schlegelii*
- Wada, K. and Furuhashi, T. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs—XVIII
Acid polysaccharide of mantle mucus of some marine bivalves
- Wada, K. Shell and pearl formation

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