

国立真珠研究所報告

20

昭和51年(1976)8月

Bulletin of the National Pearl Research Laboratory

20

August 1976

国立真珠研究所報告 20 (1976)

内 容

- 和田 浩 爾 アコヤガイの各種養殖真珠に含まれる有機基質のアミノ酸組成……………2209
- 和田 浩 爾 多毛虫食害貝殻内面に分泌された異常有機物質のアミノ酸組成……………2214
- 和田 浩 爾 X線マイクロアナライザによる二枚貝貝殻中の元素濃度分布
須賀 昭 一 パタンの観察……………2219
- 矢野 勲 アコヤガイ外套膜の縁膜部に含まれる色素……………2241
- 和田 克 彦 採卵成績の年変動などからみたアコヤガイの成熟と積算水温
の関係……………2244
- 伊藤 克 彦 異なる水温条件下におけるアコヤガイの酸素消費量ならびに
アンモニア態窒素排泄量と肉重量との関係……………2254

学会誌発表論文

- 和田 克 彦 アコヤガイ *Pinctada fucata* (Gould) 2 地方型の染色体数と概形
- 矢野勲・町井昭 アコヤガイ外套膜の器官培養から得た分泌物のアミノ酸組成
- 矢野 勲 カニ甲殻の石灰化に関する電子顕微鏡的研究

Amino acid composition of organic matrices in various pearls cultured by *Pinctada fucata**,[†]

Koji Wada

Nacreous, prismatic and organic pearls (Nakahara and Machii, 1956; Wada, 1970), which are formed in pearl cultivation of *Pinctada fucata*, are very different from each other in chemical composition and appearance. Of the pearls, the latter two are without commercial value. Each of them is formed through a peculiar secretive function of epithelial cells of pearl sac with different histological appearance (Nakahara and Machii, 1956; Tsujii, 1960; Wada, 1970). We have not yet known exactly what factors are involved in the formation of different kinds of pearl and whether different secretions are produced by identical epithelial cell in different conditions.

In the pearl cultivation, there are many interesting problems to be solved from a biomineralogical viewpoint. Mechanism of crystal nucleation, polymorphism formation of calcium carbonate and differentiation of shell structure are examples of such problems. Besides, it is suspected that transplantation of a small piece of mantle is one of very useful techniques to study the calcification in biological systems of the mollusc.

The present paper describes the results of a comparative study of amino acid composition of the organic matrices in the different kinds of cultured pearl and different structural units of the normal shell of *Pinctada fucata*.

Materials and Method

Pearls and shells of the pearl oyster, *Pinctada fucata*, which was cultivated at a pearl farm in Ago Bay, were used as materials. Organic matrices of nacreous, prismatic and organic pearls were prepared by demineralizing the pearls in 3 M acetic acid solutions for 1 to 3 days. Organic matrices of nacre, prismatic layer and ligament of the shells were isolated by the similar procedures. Periostracum was obtained from mantle edges of the oysters.

* Koji Wada. Amino acid composition of organic matrices in various pearls cultured by *Pinctada fucata*. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 20: 2209—2213. 1976.

[†] Contribution No. 221 from the National Pearl Research Laboratory, Japan.

About 4 mg of each organic matrix was put in a glass tube containing 2 ml of 6 N hydrochloric acid. The glass tube was sealed, and the matrices were hydrolyzed at 110 °C for 22 hr. The hydrolyzates were dried repeatedly on a water bath and dissolved in 0.2 N citrate buffer of pH 2.2 for automatic amino acid analysis which was carried out with a KLA-3 Hitachi Amino Acid Analyzer according to the usual method.

Results

Amino acid composition determined is summarized in Table 1.

Table 1 Amino acid composition of the organic matrices in the cultured pearls and shell of *Pinctada fucata* (amino acid residues per 1000 total residues)

Materials Amino acids	Pearl				Shell			
	Organic* (1)	Organic* (2)	Pris- matic	Nacreous	Peri- ostracum	Prismatic layer	Nacre	Ligament
Cysteic acid	9.5	22.3	7.6	11.9	+	14.0	11.1	21.9
Aspartic acid	86.7	99.9	51.6	133.8	81.8	71.9	128.7	118.3
Threonine	37.9	47.6	27.1	7.5	41.5	20.7	8.2	21.4
Serine	58.3	60.7	75.5	57.5	81.2	64.5	56.0	34.1
Glutamic acid	63.7	84.8	35.2	30.4	64.8	31.7	32.5	33.7
Proline	68.2	75.3	58.5	16.0	94.4	59.5	15.8	95.0
Glycine	140.5	111.5	241.9	221.3	122.0	230.0	239.3	224.2
Alanine	36.3	43.4	39.7	226.2	35.2	35.8	212.6	26.7
Cystine	11.4	+	+					
Valine	62.7	64.8	55.4	24.2	51.1	57.2	24.9	17.8
Methionine	5.7	9.3	+	6.8	+	15.5	5.7	175.5
Isoleucine	61.5	65.9	68.3	13.9	42.8	60.2	15.8	90.4
Leucine	64.1	77.1	67.4	83.2	46.5	63.5	80.7	9.8
Tyrosine	73.0	64.5	155.3	31.8	134.1	122.5	38.8	9.3
Phenylalanine	81.1	50.3	44.6	33.5	48.9	44.9	30.9	13.7
Lysine	50.9	36.4	23.9	27.4	45.1	48.6	28.7	54.4
Histidine	18.8	14.7	14.8	1.9	40.2	20.3	+	20.8
Arginine	69.8	71.6	33.3	71.9	70.3	39.3	69.9	33.1

* The organic materials (1) and (2) of the organic pearls are made up of yellow-brown thick tough layers and dark brown brittle masses, respectively.

The organic materials of the shell have relatively high amounts of aspartic acid and glycine. A significant difference could be found in the amino acid composition among the organic materials obtained from the periostracum, prismatic layer, nacre and ligament. A particular characteristic of each organic material was high content of alanine in the nacre, high contents of tyrosine in the prismatic layer and peri-

ostracum, and high content of methionine in the ligament. In the periostracum, prismatic layer and ligament relatively high contents of proline were found contrary to only minor amount of the imino acid in the nacre.

The organic materials of the pearls contain relatively large amounts of glycine as those of the parent shell. Amino acid compositions of the organic matrices of the prismatic and nacreous are very similar to those of the prismatic and nacreous layers of the parent shell, respectively. However it is evident that the amino acid composition of the organic materials of organic pearls does not correspond closely to any one of organic matrices of the normal parent shell. The organic materials of this kind of pearl are essentially similar in amino acid composition even when the appearance is quite different.

Discussion

Hare (1963) has reported that the amino acid composition of the organic matrix differs with structural units of the single shell of *Mytilus californianus*, and Beedham (1958) pointed out that large amounts of proline and methionine found in the inner ligament were related to a specialized function of this region. Tanaka *et al.* (1963) showed that the organic matrix in pearl nacre of *Pinctada fucata* was very similar in amino acid composition to that in the parent shell nacre.

The present study demonstrated that the organic matrices (conchiolin) in the different structural units secreted by different parts of the mantle tissue, were dissimilar to each other in amino acid composition. The periostracum is formed by the basal cells located in the bottom of the periostracal groove and is not calcified. It is made up of the protein having large amounts of proline, glycine and tyrosine, as reported in the periostracum of other molluscs (Beedham, 1958; Hare, 1963; Wada, 1966; Meenakshi *et al.* 1969). The content of serine in the periostracum is relatively high. The outer epithelium situated on the distal part of the outer mantle fold is responsible for the formation of prismatic layer which possesses the interlaced structure consisting of the eosinophilic interprismatic wall and haematophilic interlamellar sheet against haematoxylin-eosin staining (Wada, 1964). The organic wall is thick and similar in stainability to the periostracum of many molluscs. The organic sheet is delicate and appears to be less than the wall. The organic matrix of the prismatic layer has large amounts of glycine and tyrosine and is similar in amino acid pattern to that of the periostracum which is rich in quinone-tanned protein. The organic matrix of nacre secreted by the epithelial cells on the outer surface of the pallial part of mantle contains high amounts of aspartic acid, glycine and alanine. The matrix shows metachromasia and is basophilic (Wada, 1964). The amino acid com-

position of the organic material of ligament which is formed by the mantle isthmus is characterized by large amounts of aspartic acid, proline, glycine and methionine and small amounts of leucine and tyrosine.

The graft is cut off from the pallial part near the mantle edge and put together with a calcareous ball in the gonad of another oyster. Most of the grafts, which regenerated pearl sac, produce the nacreous pearl possessing the laminar structure and organic matrix similar to the nacreous layer of the parent shell. This fact indicates that the regenerated epithelial cells may preserve the natural secretive function in most cases (Aoki, 1959; Wada, 1959). The structure and amino acid composition of the prismatic pearl which is rarely formed correspond to those of the prismatic layer of the parent shell. However the organic materials of the organic pearls which are sometimes formed are very different in appearance and amino acid composition from the matrix of every structural unit of the normal parent shell, and seem to be an abnormal occurrence.

Acknowledgements

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

Summary

The amino acid composition of the organic matrices in nacreous, prismatic and organic pearls cultured by the pearl oyster, *Pinctada fucata*, was investigated setting against those of the parent shell to clarify the nature of the organic materials in the pearls and suppose the condition of occurrence of each pearl.

The organic matrices of the nacreous and prismatic pearls were very similar in amino acid composition and staining property to those of nacreous and prismatic layers of the parent shell, respectively. On the contrary, the organic materials of the organic pearl were conspicuously different in its appearance and amino acid composition from any matrix of different structural units of the normal parent shell. This fact suggests that the organic pearl is an abnormal occurrence secreted in anomalous conditions of the pearl sac epithelium.

References

- Aoki, S. 1959. Some experiments on the nuclear insertion in the pearl-culture of the pearl oyster (*Pinctada martensii*). III. Formation of the pearl-sac and the pearl when the pieces from three different parts of the mantle were inserted. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 5: 503-515.
- Beedham, G. E. 1958. Observations on the non-calcareous component of the shell of the Lamelibranchia. Quart. J. micr. Sci. 99: 341-357.
- Hare, P. 1963. Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. Science 139: 216-217.
- Meenakshi, V. R., Hare, P. E., Watabe, N. and Wilbur K. M. 1969. The chemical composition of the periostracum of the molluscan shell. Comp. Biochem. Physiol. 29: 611-620.
- Nakahara, H. and Machii, A. 1956. Studies on the histology of the pearl-sac. I. Histological observations of pearl-sac tissues which produce normal and abnormal pearls. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 1: 10-13.
- Tanaka, S., Hatano, H. and Ganno, S. 1963. Some aspect of conchiolin in pearl and shell. Rep. Nippon Inst. Sci. Res. Pearls 4, Rep. No. 74, 1-9.
- Tsujii, T. 1960. Studies on the mechanism of shell- and pearl-formation in mollusca. J. Fac. Fish. Pref. Univ. Mie 5: 1-70.
- Wada, K. 1959. Microscopic observations of cultured pearls at their early formation IV. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 5: 373-380.
- Wada, K. 1964. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs - VII. Histological and histochemical studies of organic matrices in shells. ibid. 9: 1078-1086.
- Wada, K. 1966. 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.
- Wada, K. 1970. The structure and formation of pearl. in 'Profiles of Japanese Science and Scientists 1970' (ed. by Yukawa, H.), Kodansha Ltd., Tokyo, pp. 227-244.

多毛虫食害貝殻内面に分泌された 異常有機物質のアミノ酸組成^{*,†}

和田 浩 爾

国立真珠研究所

黒褐色ないし茶褐色の有機物質が貝殻内表面に膜状あるいは瘤状に異常分泌され、ときとして貝殻内面全域をおおうことがある。こうした有機物質の異常分泌は、貝殻内面への多毛類 (Takahashi, 1937; Yonge, 1960; 水本, 1964) や細菌 (小竹, 1961) の侵入、その他の原因によっておこる外套膜外面上皮の炎症によっておこると考えられている。

アコヤガイ真珠養殖において、常法にしたがって移植した外套膜外面上皮細胞が再生によって形成した真珠袋上皮は真珠層真珠を一般に形成するが、稜柱層真珠や有機質真珠を時折形成することから、外套膜外面上皮細胞の分泌機能は外套膜の区域によって固定化したものでなく、単一細胞が条件次第で真珠層、稜柱層あるいは殻皮のいずれの物質も分泌すると考えられている。しかしながら有機質真珠を構成する有機物質は外見的にもアミノ酸組成からも殻皮とは異なり、むしろ外見的には貝殻内面に異常分泌した黒褐色ないし茶褐色の有機物質に類似し、病的な異常分泌物と考えられる (Wada, 1976)。

本研究は、外套膜外面上皮細胞の区域別分泌特性と移植細胞の分泌機能変化を明らかにし、真珠品質を向上する目的の一環としておこなった。

材 料 と 方 法

分析に供した材料は、多毛虫の寄生が原因となってアコヤガイ貝殻内面に異常分泌した黒褐色および黄褐色の2種類の有機物質である。貝殻は軟体部を切除、流水と蒸留水で充分に洗滌、乾燥したのも多毛虫の侵蝕穿溝が貝殻外面より内面に貫通し、有機物質が侵蝕穿溝を中心に形成したかを調べることによって、有機物質の異常分泌が多毛虫の寄生によっておこったか否かを判定した。

有機物質は3M酢酸を使用して貝殻中央内面より分離、蒸留水で数回洗滌、乾燥後約4mgを秤量し、2mlの6N塩酸の入った試験管にとり、封管して110°Cの恒温器で22時間加水分解、乾固後正確に5mlの0.2Nクエン酸緩衝液(pH 2.2)に溶解し分析に供した。アミノ酸分析はKLA-3型日立アミノ酸分析計を使用しておこなった。

* Koji Wada. Amino acid composition of anomalous organic materials secreted on the inner shell surface of *Pinctada fucata* by the infection of polychaeta. With English summary, p. 2217. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 20: 2214-2218. 1976.

† 国立真珠研究所業績 No. 222 (国立真珠研究所報告20: 2214-2218. 昭和51年8月)

結 果

Fig. 1 は本研究でアミノ酸分析に供した異常分泌物の表面を示す。黒褐色の有機物質は塊状、膜状および繊維状の不規則な沈着物からなり (Fig. 1 A), 酸に対しほとんど発泡し

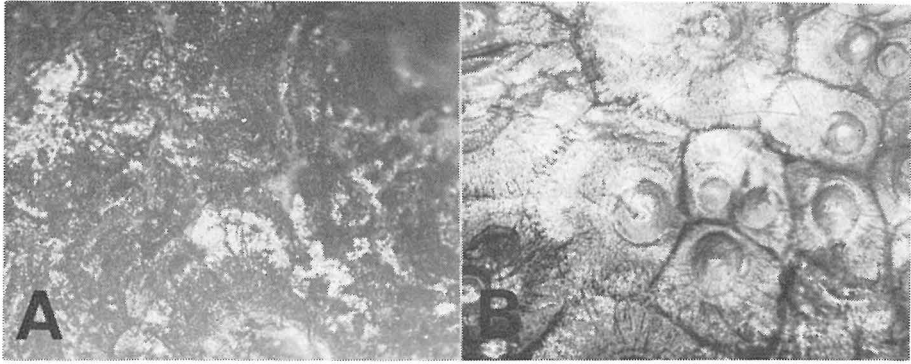


Fig. 1 Showing the superficial structures of abnormal organic materials secreted on the inner surface of shell nacre of the infected oysters. $\times 120$

A. Dark-brown organic material.

B. Yellow-brown material consisting of immature prismatic layer.

Table 1 Amino acid composition of anomalous organic materials secreted on the inner surface of shell nacre of the infected shell (amino acid residues per 1000 total residues)

Materials Amino acids	Anomalous organic materials		Shell			
	Yellow-brown	Dark-brown	Peri-ostracum	Prismatic layer	Nacre	Ligament
Cysteic acid	16.7	5.7	+	14.0	11.1	21.9
Aspartic acid	63.1	77.6	81.8	71.9	128.7	118.3
Threonine	30.6	38.7	41.5	20.7	8.2	21.4
Serine	68.0	65.1	81.2	64.5	56.0	34.1
Glutamic acid	46.7	61.2	64.8	31.7	32.5	33.7
Proline	73.6	77.5	94.4	59.5	15.8	95.0
Glycine	201.3	158.9	122.0	230.0	239.3	224.2
Alanine	41.0	40.7	35.2	35.8	212.6	26.7
Cystine		20.4				
Valine	78.3	64.8	51.1	57.2	24.9	17.8
Methionine	+	8.3	+	15.5	5.7	175.5
Isoleucine	75.1	66.5	42.8	60.2	15.8	90.4
Leucine	70.1	69.7	46.5	63.5	80.7	9.8
Tyrosine	105.6	92.3	134.1	122.5	38.8	9.3
Phenylalanine	40.7	48.6	48.9	44.9	30.9	13.7
Lysine	25.0	23.1	45.1	48.6	28.7	54.4
Histidine	9.1	13.3	40.2	20.3	+	20.8
Arginine	54.9	67.6	70.3	39.3	69.9	33.1

ないが、黄褐色の有機物質は乳房状 (Fig. 1 B) および花卉状の沈着物とその周辺に沈着した果粒とからなり、酸に対し激しく発泡した。

上記の表面構造を有する黒褐色および黄褐色の有機物質の分析結果を、全残基数1000あたりのアミノ酸残基数として、アコヤガイ貝殻各構造物から得た有機物質のアミノ酸組成 (Wada, 1976) と対比して Table 1 に示した。

Table 1 で判るように、黄褐色の有機物質と黒褐色の有機物質は互いに類似したアミノ酸組成を持つが、どちらかと言えば黄褐色の有機物質は貝殻稜柱構造の基質蛋白と非常に類似したアミノ酸組成を示し、黒褐色の有機物質は貝殻各構造物から得たどの基質蛋白のアミノ酸組成とも異なる傾向を示す。たとえば異常分泌物はともに相対的に多量のグリシンとチロシンを含むが、黄褐色の有機物質のグリシンとチロシン量は貝殻稜柱構造の蛋白とはほぼ類似するのに対し、黒褐色の有機物質のグリシンとチロシンの量的関係は貝殻各構造物のどの基質蛋白とも異なる。

考 察

青木(1966)はアコヤガイ貝殻内面に沈着した黒褐色の有機物質を分泌する外套膜外面上皮は非常に厚く、有機質真珠を生成する真珠袋上皮と類似することを、また Tsujii(1960)は有機質真珠を生成する真珠袋上皮はカタル性炎症をおこした腸管や炎症性水腫をおこした皮膚にみられる組織像と類似することを報告している。著者が今回分析した多毛虫の寄生が原因となって貝殻内面に生成した黒褐色の有機物質は外見的にもアミノ酸組成からみても貝殻各構造物一般皮、稜柱層、真珠層、蝶番一の有機基質とは異なり、有機質真珠の有機物質に非常に類似し(Wada, 1976)、Tsujii (1960) や青木 (1966) の報告を考慮すると病的な異常分泌物といえる。

この黒褐色の異常分泌物は、有機質真珠 (青木, 1966) と同じように、表面構造からみて幾つかの異なる有機物質の混合物と考えられ、殻皮とアミノ酸組成で多少異なるのは、チロシン量で判断すると、殻皮に比べてキノン化した蛋白質量の存在比率が少ないか、キノン化の低い蛋白質からなるか、あるいはこの両方によるであろう。したがって異常分泌物のアミノ酸組成は標本間でかなり差を生ずる (Wada, 1976)。

今回分析したすべての有機物質は外套筋痕の内側、いわゆる貝殻中央部内面から剝離しており、外套膜縁がこの部分まで収縮できないことから判断し、外套膜中央部の外面上皮細胞から分泌されたといえる。このうち黄褐色の有機物質は真珠形成初期に時々みられる未成熟な稜柱層の表面構造 (和田, 1958) をもち、貝殻や真珠の稜柱層の有機基質のアミノ酸組成 (Tanaka et al., 1963; Wada, 1976) と類似することから、主として稜柱物質からできていると思われる。この結果は、アコヤガイの外套膜中央部の外面上皮は条件次第で稜柱物質を分泌できることを示唆する。Tsujii (1960) や Beedham (1965) は *Anodonta* の貝殻再生実験をおこない、外套膜外面上皮は必要に応じて外套膜縁外褶内面および外面上皮の分泌機能もはたし、本来の真珠層分泌のほか殻皮や稜柱層も分泌できることを指摘した。今回の結果は、アコヤガイでも外套膜外面上皮は条件次第で非石灰化の有機物質を分泌することを同様に示したが、この非石灰化の有機物質は構造的にも、成分的にも、形成

メカニズムからも殻皮と同一物とするには問題が多い。

要 約

1) 多毛虫の寄生が原因となってアコヤガイ貝殻内面に生成した異常有機物質のアミノ酸組成を調べた。

2) 黒褐色の有機物質は、有機質真珠の有機物質と非常に類似したアミノ酸組成を示すが、貝殻を構成する殻皮、稜柱層、真珠層および蝶番から得たどの有機物質のアミノ酸組成とも異なる。

3) 黄褐色の分泌物は貝殻や真珠の稜柱層の有機物質と良く似たアミノ酸組成を示し、表面構造からも主に稜柱物質からなるといえる。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究に終始暖かい指導を下された京都大学理学部波多野博行教授に謹んで感謝の意を表す。

Summary

1) Amino acid analysis was made on dark-brown and yellow-brown organic materials abnormally secreted on the inner shell surface of *Pinctada fucata* by the infection of polychaeta.

2) The dark-brown organic material was similar in amino acid composition to the organic materials of organic pearls cultured by *Pinctada fucata* but differed from any one of organic matrices in the different structural units of the shell.

3) The yellow-brown organic material had the very similar amino acid composition to the organic matrix of prismatic layer of the shell and prismatic pearl.

4) The present study suggested that the outer epithelial cells of the mantle which form a nacre secrete abnormal organic materials under anomalous conditions and are able to form a prismatic layer.

文 献

- 青木 駿 1966. 異常真珠の出現防止に関する研究—とくに異常真珠の構造とその成因に関して—。真珠研究会々報, 4(4): 1-204.
- Beedham, G. E. 1965. Repair of the shell in species of *Anodonta*. Proc. zool. Soc. Lond. 145: 107-124.
- 小竹子之助 1961. アコヤガイ増殖に関する研究—V. アコヤガイの病害, 特に貝殻内面及真珠の黒変について。日本水産学会36年度年会講演。
- 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: 1143-1155.
- Takahashi, K. 1937. Notes on the polychaeta Annelid, *Polydora pacifica* n. sp., which bores holes in *Pinctada margaritifera* (Linne). Palao Tropical Biological Station Studies 1: 155-167.

- Tanaka, S., Hatano, H. and Ganno, S. 1963. Some aspect of conchiolin in pearl and shell. Rep. Nippon Inst. Sci. Res. Pearls 4, Rep. No. 74, 1-9.
- Tsujii, T. 1960. Studies on the mechanism of shell- and pearl-formation in mollusca. J. Fac. Fish. Pref. Univ. Mie 5 : 1-70.
- 和田浩爾 1958. 真珠形成初期の顕微鏡的觀察Ⅱ. 国立真珠研報 4 : 251-260.
- Wada, K. 1976. Amino acid composition of organic matrices in various pearls cultured by *Pinctada fucata*. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 20 : 2209-2213.
- Yonge, C. M. 1960. Oysters. London.

X線マイクロアナライザによる二枚貝貝殻中の元素濃度分布パターンの観察^{*,†}

和田 浩 爾・須 賀 昭 一

国立真珠研究所

日本歯科大学

軟体動物の貝殻中の微量元素含有量は (1) 生物種属, (2) 貝殻組織構造, (3) 貝殻鉱物種 (calcite か aragonite か), (4) 貝殻中における位置, (5) 棲息環境水の性質 (淡水か海水か), (6) 棲息環境水の温度や微量元素濃度などによって規定され, 生物的因子によって支配される部分と, 元素の化学的挙動と生成する炭酸塩の性状と関連して決まる部分とがあることを前報でふれた (和田・藤貫, 1974)。

代謝面から考えると, 貝殻物質は外套膜外面上皮細胞で産生され分泌された外套外液 extrapallial fluid から生成する。外套外液は電解質の混合溶液で, 蛋白質 (Kobayashi, 1964a, Wada, 1967a, b), ムコ多糖体 (Kobayashi, 1964b; 和田・古橋, 1971) や有機酸 (Crenshaw and Neff, 1969) を含み, そのイオン強度は生理的にある範囲内で調節されている (Wada and Fujinuki, 1976)。こうした溶液中で陽イオンと陰イオンは相互に作用してイオン対を形成し, また2価の陽イオンは蛋白質, ムコ多糖体や有機酸などと錯塩を形成するので, 貝殻の石灰化進行過程における各イオンの挙動は石灰化機構や各イオンの存在形態によって特異性を示すと考えられる。たとえば Wada and Fujinuki (1976, 未発表) は, 外套外液に含まれる Zn, Cu, Fe などの重金属元素が蛋白質やムコ多糖体と錯塩を形成する可能性を示唆した。

系統分類や組織生理の面から考えると, 貝殻の組織構造や鉱物種は種属による外套膜外面上皮細胞の分泌特性で規定され, さらに種属によっては外套膜の区域による分泌特性で規定され, 各元素の化学的挙動や生成する炭酸塩の性状が生物的因子と無関係ではあり得ないことがわかる。

いっぽう生理生態面から考えると, 外套外液のイオン濃度は電解質イオン濃度の全く異なる環境水に住む淡水産二枚貝と海産二枚貝とで特徴的な差を生じ (Wada and Fujinuki, 1976), それが貝殻内に含まれる微量元素の濃度に反映する傾向がある (和田・藤貫, 1974)。さらに生物は色々の種類の環境変化に対して, 生活上必要な生理調節を種属個有の生理調節メカニズムを通しておこなうが, 調節能力は個体の生理状態によっても違いを生ずる。たとえば水棲軟体動物は体表を通して環境水に溶ける無機成分を体内に取り込み, 外套膜

* Koji Wada and Shoichi Suga. The distribution of some elements in the shell of fresh-water and marine bivalves by electron microprobe analysis. With English summary, p. 2239. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 20: 2219-2240. 1976.

† 国立真珠研究所業績 No. 223 (国立真珠研究所報告 20: 2219-2240. 昭和51年8月)

外面上皮細胞を通して蛋白質、ムコ多糖体、無機成分などを分泌するが、それらの代謝量は環境変化や個体の生理変化にともなって変動する。また軟体動物も含め水棲無脊椎動物の炭酸塩殻内での Sr や Mg の濃度は、殻生成時の水温や塩分濃度に関連して変化することが知られている (Chave, 1954; Lowenstam, 1961; Pilkey and Goodell, 1963; Dodd, 1965)。分泌された各成分が貝殻の石灰化進行過程でどんな挙動をとりながら、どんな形で貝殻中に入るかはまだ不明な点が多いが、代謝量の変動が個体の生理活動との関連で貝殻組織に成長ないし石灰化の記録としてどのように刻み込まれるかについて、貝殻外面および組織内に刻まれる成長線や真珠構造の微細な層状および粒状構造の変化などが明らかにされつつある。

本研究は、数種の元素の分布と濃度が貝殻の石灰化前線や完成した貝殻の部位、組織構造、鉾物種などとどんな関係で変化するか、また元素間相互の分布と濃度の関係を X 線マイクロアナライザを使って調べ、貝殻中における微量元素の存在形態と貝殻の石灰化進行過程における数種の元素の挙動を予察し、真珠・貝殻の石灰化過程にみられる微量元素濃縮メカニズム、真珠品質への微量元素の影響、硬組織中での微量元素濃度分布パターンによる生理解析および環境解析の可能性などを検討する基礎資料を得ることを目的とする。

材料と方法

実験試料

本研究に使用した試料は次のとおりである。

アコヤガイ *Pinctada fucata* 3 年貝、殻長約 6 cm、真珠研究所多徳島臨海実験場前に設置した筏から垂下飼育していたものを1969年10月30日に採集。

アコヤガイ *Pinctada fucata* 当年貝、殻長約 2 cm、真珠研究所多徳島臨海実験場前に設置した筏から垂下飼育中の母貝に付着していたものを1973年10月19日に採集。

マガキ *Crassostrea gigas* 2 年貝、殻長約 4 cm、真珠研究所多徳島臨海実験場前に設置した筏の樽に付着していたものを1971年9月28日に採集。

ヒオウギ *Chlamys nobilis* 当年貝、殻長約 3 cm、真珠研究所多徳島臨海実験場前に飼育中のアコヤガイに付着していたものを1971年9月28日に採集。

イケチョウガイ *Hyriopsis schlegelii* 6 年貝、殻長約 12 cm、滋賀県水産試験場の試験池 (松原) に飼育していたものを1969年10月2日に真珠研究所の防火用水に移し、同月30日に採集。

イケチョウガイ *Hyriopsis schlegelii* 当年貝、殻長約 4 cm、滋賀県水産試験場の試験漁場 (西の湖) に飼育していたものを1973年10月30日に採集。

なお各試料の年令は推定年令である。

試料の作成

試料の固定、包埋、研磨片作成は筆者の 1 人須賀 (1966) が歯牙の研究に用いた方法に従っておこなった。すなわち試料の mantle-shell preparation を作るために、開殻器を

使って貝に栓をさし、軟体部とともに貝殻を10%フォルマリンで固定。固定試料は70%から100%までの各段階のエタノールと3段階の無水エタノールで各1日ずつ脱水ののち、3段階の styren monomer (hydroquinone を含まぬもの) に各1日ずつ室温で浸漬。浸漬試料は重合促進剤 E と触媒パーメック N を加えた polyester resin (Rigolac 2004 と Rigolac 70 F とを 7:3 の割合で混合したもの) 中に氷室で約2日間浸漬、同じ操作をさらに約2日間おこない、新しく作った上記の polyester resin に包埋、60℃前後で2日間重合。合成樹脂に包埋した試料は米国 Bronwill 社製硬組織薄切装置77型を用いて殻長に沿った0.5~1 mm の切片として切り出し、中砥と仕上砥を使って50 μ 程度の研磨片とした。

X線マイクロアナライザ (Electron microprobe analyser) による分析

研磨片はそのまま、あるいは microradiogram を撮影してのちアルミニウム試料台にアラルダイトで接着、試料台上でさらに仕上げ研磨、蒸留水で水洗、乾燥ののち炭素を真空蒸着、島津 ARL エレクトロンプローブ X線マイクロアナライザ (EMX-2 型) を用いて線分析。分析条件は加速電圧 20 KV, 試料電流 0.05~0.09 μ A, 試料送りの速度は 20 μ , 24 μ ないし 96 μ /min. であった。なお各元素の分析にあたって用いた特性 X 線、弯曲結晶、検出器は次の如くである。

	特性 X 線	弯曲結晶	検出器
Ca	CaK α 又は CaK β	LiF 又は ADP	Kr-Exatron
Mn	MnK α	LiF	"
Cu	CuK α	LiF	"
Zn	ZnK α	LiF	"
P	PK α	ADP	"
S	SK α	ADP	"
Cl	ClK α	ADP	"
Mg	MgK α	RAP	FPC
Na	NaK α	RAP	"
F	FK α	RAP	"

Contact microradiography による X 線吸収像の観察

一部の研磨片の contact microradiogram を X 線マイクロアナライザによる分析の前に撮影。使用装置はソフテックス社製 CMR 型、分析条件は管電圧 7 kv, 管電流 5 mA, ターゲットからフィルムまでの距離 4 cm, 照射時間 25~50 分、使用フィルムは Kodak 社の spectroscopic film 649-0。フィルムは現像、定着、水洗、乾燥ののちカナダバルサムでカバースリップとオブジェクトガラスの間に封入して検鏡に供した。

光学顕微鏡による観察

研磨片は Leitz 社 Panphot を用い、普通光および偏光で観察した。

結 果

X線マイクロアナライザによる元素分析は、大部分の試料でX線吸収像や光学顕微鏡観察と併用しておこなった。分析測線はすべての試料で貝殻での同じ位置とは限らなかった。また分析測線は分析ごとに腹側ないし背側に少しずらし、原則として同じ測線上を2度分析することをさけた。本研究でいう濃度は、CPS値(カウント数/秒)を換言したものである。

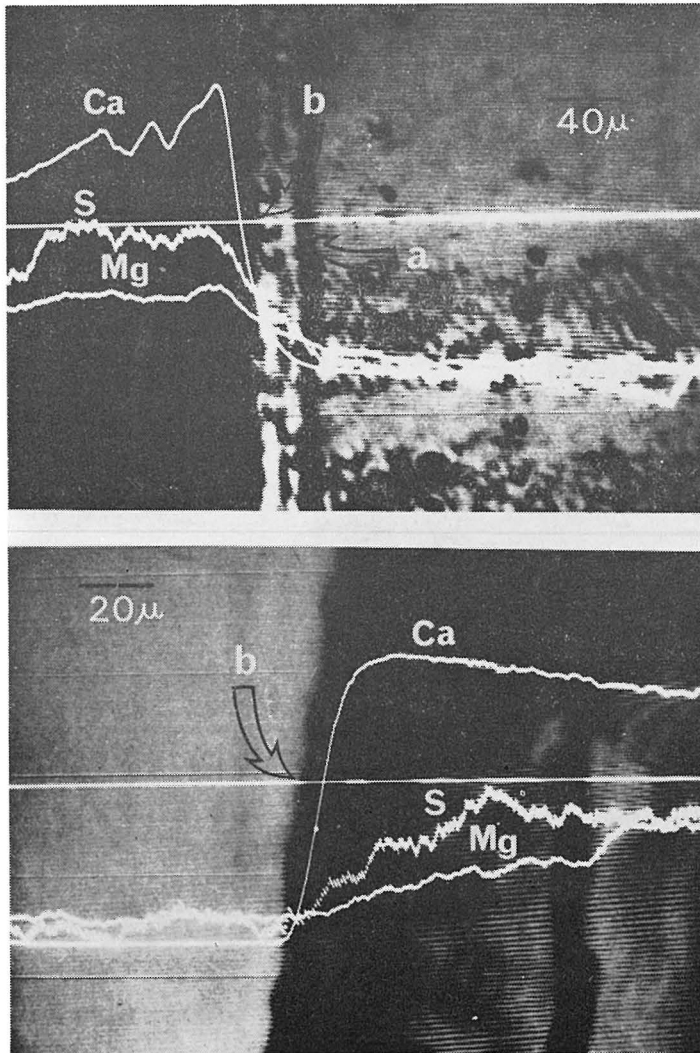


Fig. 1 The distribution curve of calcium, magnesium and sulfur in the growth front of shell of *Crassostrea gigas* (top) and *Chlamys nobilis* (bottom). Arrows a and b show the outer mantle surface and inner shell surface, respectively.

元素濃度分布変化と試料の対応

外套膜から貝殻への移行部における元素濃度分布の変化を知ることは、mantle-shell preparation 中の元素濃度分布パターンを線分析法で解析する上でも、石灰化進行過程を解析する上でも非常に重要である。

Fig. 1 はブラウン管上に画かせた後方散乱電子線（反転）像に、左右に走る白線上で分析した Ca, S, Mg の濃度分布を記録させたものである。Fig. 1 の上はマガキの mantle-shell preparation で、左約 $\frac{1}{3}$ の黒い部分は貝殻、矢印 a は外套膜外面、矢印 b は貝殻内面である。3 元素とも濃度は a から b へ向って漸増、b 点に接すると急増する。Fig. 1 の下はヒオウギの mantle-shell preparation で、ほぼ中央から右半分の黒い部分は貝殻、矢印 b は貝殻内面である。いずれも Ca 濃度は貝殻内面に接すると急増し、貝殻表面や石灰化度を知る目安となる。

各試料の元素濃度分布パターン

1. アコヤガイ Fig. 2 は3年生アコヤガイ貝殻を成長方向で切り出して作った mantle-shell preparation の microradiogram とそこに記入した AA' 線上でおこった X 線マイクロアナライザによる Ca と S の線分析を示す。分析位置は貝殻中央部に相当する。

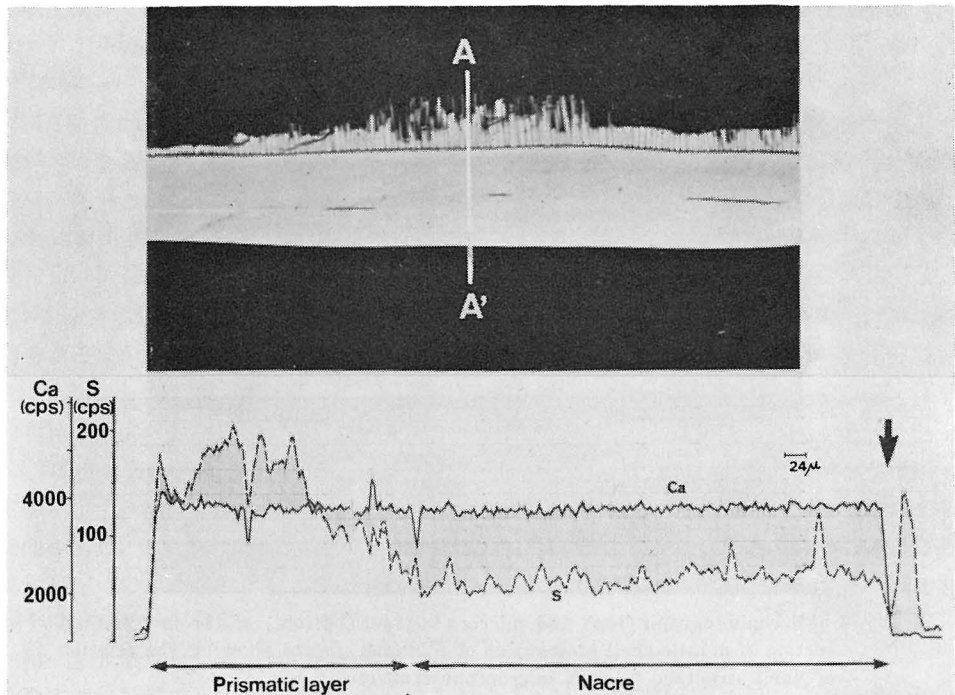


Fig. 2 Microradiogram (top) of the longitudinal section of mantle-shell preparation *Pinctada fucata* showing the relation of shell structure to microprobe line analysis (bottom) of calcium and sulfur along the line AA'. $\times 24$

Microradiogram からわかるように、筋肉付着部に形成される輝層はX線吸収度が高く、真珠構造は輝層によって外套膜中央域で形成される内層と外套縁膜部で形成される中層に区分される。X線吸収度は真珠構造と稜柱構造との境界で著しく低く、prism 間を埋める有機質壁 interprismatic wall も低い、真珠構造と個々の prism とでは大差ない。

X線マイクロアナライザの線分析によると、Caは外套膜および外套外液中でほとんど検出できないが、貝殻内面（矢印）に接すると急速かつ顕著な濃度上昇を示す。完成した貝殻中のCa濃度は、真珠構造中で変動しながらもほぼ一定、稜柱構造との境界で減少するが稜柱構造中でふたたび真珠構造とほぼ同じ値となり、そのち変動しながらもほぼ一定値を示す。

S濃度は外套膜外面で顕著な増加を示す。完成した貝殻中のS濃度は、貝殻内面から約240 μ までの真珠構造（内層）がそれより深層の真珠構造（中層）よりやや高く、稜柱構造にはいと増加しつづけ、稜柱構造中央付近で最高値に達する。

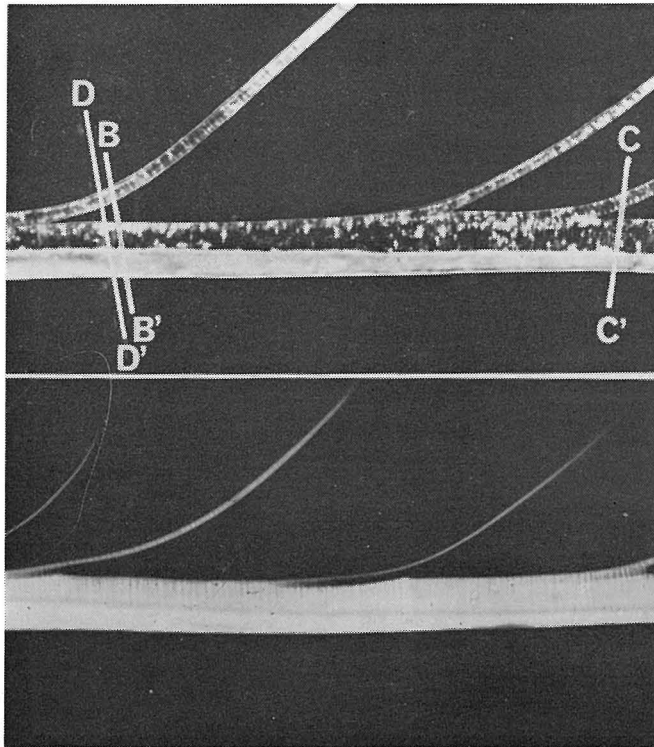


Fig. 3 Microphotograph (top) and microradiogram (bottom) of the longitudinal section of mantle-shell preparation of *Pinctada fucata* showing the relation of shell structure to each microprobe traverse of Fig. 4. $\times 29$

Fig. 3 は当年生アコヤガイの貝殻を成長方向で切り出して作った mantle-shell preparation の microradiogram と反射顕微鏡像であり、Fig. 4 はFig. 3 に記入した BB' 線上でCaとSとMg、CC' 線上でCaとNaとCl、DD' 線上でCaとMgとMn、また写真

に示した以外の線上でCaとPとFの組み合わせで、3元素間相互にみられる分布と濃度をそれぞれ貝殻組織構造との関連で調べたX線マイクロアナライザの線分析を示す。分析位置は外套縁膜に接する貝殻周辺部に相当する。

反射顕微鏡像からわかるように、分析測線BB', CC', DD'の各線上で真珠構造(中層)が貝殻内面(Fig. 3のB'側)より120 μ から170 μ ほどあり、真珠構造の外側にある140 μ から170 μ の稜柱構造から50 μ から100 μ へだてて厚さ約50 μ の稜柱構造突起がある。貝殻組織構造別のX線吸収率は3年貝の場合とほぼ同様の所見を示すほか、X線吸収度の低い陥入が貝殻外面より立ち上がる稜柱構造突起の基部で稜柱構造中へ深くはいる。

Ca濃度は貝殻内面(矢部b)に接すると急増、4 μ から20 μ の深さで僅かに減少、ふたたび急増して約24 μ の深さで最高に達する。そのうち真珠構造中のCa濃度は稜柱構造との境界へ向って徐々に減少、真珠構造と稜柱構造との境界で顕著に減少することが多い。稜柱構造中のCa濃度はprismとinterprismatic wallとの関連で激しく増減をくりかえしながら貝殻外面へ向って徐々に減少する。稜柱構造突起中のCa濃度分布パターンは稜柱構造と本質的に同じ増減のくりかえしを示す。

S濃度は真珠構造中では貝殻内面より徐々に増加、約24 μ の深さから稜柱構造との境界へ向って徐々に減少、稜柱構造中ではその中央に至るまで増加、そのうち貝殻外面から10 μ の位置まで減少、さらに貝殻外面へ向ってふたたび増加、Caがなくなる殻皮部分(矢印e)で高い値を示す。稜柱構造突起中のS濃度分布は稜柱構造と本質的には同じ変化を示す。

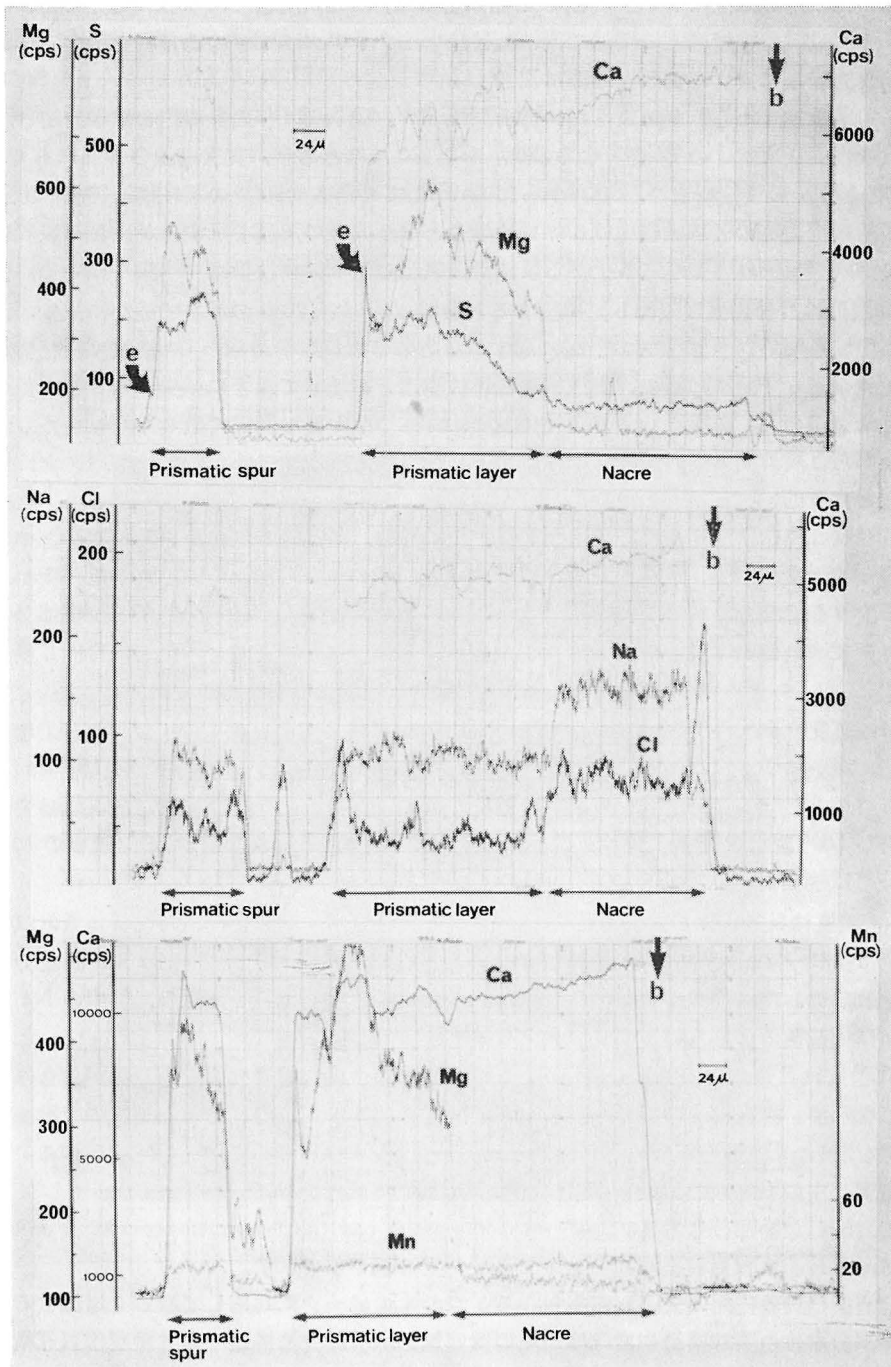
Mg濃度は真珠構造全域ではほぼ一定、BB'線上で貝殻内面と約120 μ の深さとで増加したが、かかる増加はDD'線上で認められない。稜柱構造中でMg濃度は急増、Ca濃度分布パターンと一致した増減をしながら貝殻外面より50 μ の位置まで増加、以後急減する。しかしDD'線上でMg濃度は貝殻外面直下で著しく増加した。稜柱構造突起中のMg濃度分布は稜柱構造と本質的に同じパターンを示す。

Na濃度は貝殻内面に接すると急増、約14 μ の深さで一度減少後ふたたび急増、真珠構造中ではほぼ一定値を示す。稜柱構造中のNa濃度は真珠構造に比べ低く、Ca濃度分布パターンと類似した変動を示しながら貝殻外面へ向って微増する。稜柱構造突起中のNa濃度分布は稜柱構造と本質的に同じパターンを示す。

Cl濃度は貝殻内面で著しく高いが、この部分を除き真珠構造では変動しながらもほぼ一定値を示す。稜柱構造中でCl濃度は著しく減少、CaやNa濃度分布と逆関係で増減する傾向を示し、Ca分布が認められない殻皮部分(矢印e)でClの存在が認められる。稜柱構造突起中のCl濃度は稜柱構造と本質的に類似するが、Na濃度の増減と必ずしも逆関係で増減しない部分もある。

MnとF濃度は貝殻全域にわたってほぼ一定の低い値を示す。

P濃度は貝殻内面(矢印)にみられる3つのCaピークに対応して激しく増減するが、この部分を除き真珠構造中ではほぼ一定の低い値を示す。稜柱構造中のP濃度は真珠構造に比べ微増するが、prismとinterprismatic wallと関連したCa濃度の増減と対応した増減を認めがたい。稜柱構造突起の内面と外面に著しく高いP濃度が認められる。



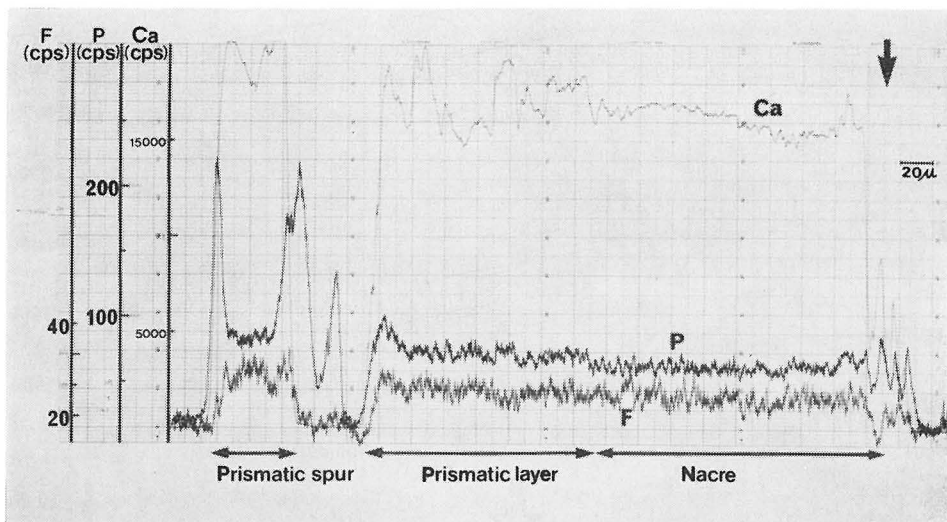


Fig. 4 Microprobe line analyses along three lines BB', CC' and DD' indicated in Fig. 3 and another line. The value of CPS represents count per second of each element. Arrows b and e show the inner shell surface and periostracum, respectively.

2. マガキ Fig. 5 は成長方向で切り出して作ったマガキの mantle-shell preparation の反射顕微鏡像であり, Fig. 6 は Fig. 5 に記入した AA' 線上で Ca と S と Mg, BB' 線上で Ca と Na と Cl, CC' 線上で Ca と Mg と Mn の組み合わせで, 3 元素間相互にみら

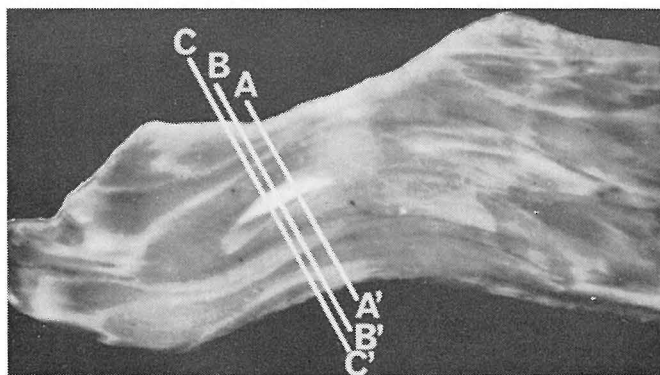


Fig. 5 Microphotograph of the longitudinal section of mantle-shell preparation of *Crassostrea gigas* showing the relation of shell structure to each microprobe traverse of Fig. 6. $\times 10$

れる分布と濃度を貝殻組織構造との関連で調べたX線マイクロアナライザの線分析を示す。分析位置は外套膜中央域で殻頂に近い部分である。

観察に供した mantle-shell preparation は, AA', BB', CC' の各線上で外套膜外面と貝殻内面が約51 μ 離れていた。貝殻内面(Fig. 5 の A' 側)より葉片構造が2200 μ から2300

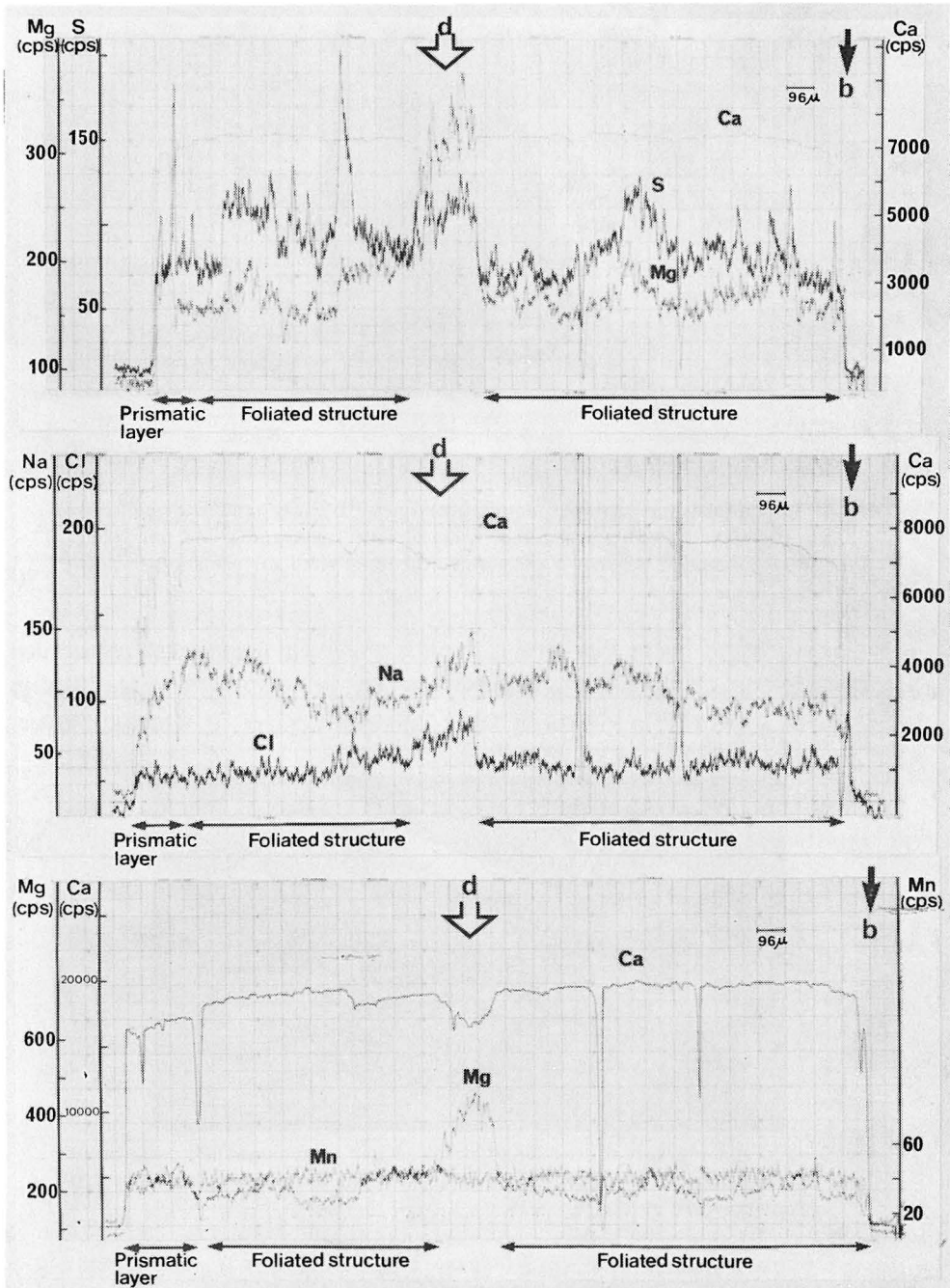


Fig. 6 Microprobe line analyses along three lines AA', BB' and CC' indicated in Fig. 5. Arrows b and d show the inner shell surface and chalky deposit, respectively.

μ あり、その外側に厚さ140 μ から290 μ の稜柱構造がある。葉片構造中には黒い層線が400 μ と900 μ の深さに、また白い層線が200 μ 、1900 μ と2100 μ の深さにあるほか、白墨質が1200 μ から1500 μ の深さにレンズ状に形成される。

Ca濃度は貝殻内面(矢印b)に接すると急増、増加を始めた直後いったん減少してからふたたび増加、約190 μ の深さまで微増してほぼ一定値に達するが、黒い層線で急速かつ顕著に減少するほか、白墨質(矢印d)で減少する。稜柱構造中のCa濃度はprismとinterprismatic wallとに関連した増減を激しく数回くりかえしながら貝殻外面へ向って減少する。

S濃度は貝殻内面に接すると急増、Ca濃度がいったん減少する内面直下で高く、いったん減少してから約720 μ の深さ、黒い層線で仕切られた層のほぼ中央まで変動しながら増加をつづけ、そこから約230 μ の深さまで減少、黒い層線上で急速かつ顕著に減少、白墨質中で著しく増加、さらに深層の葉片構造でふたたび増加、白い層線付近で著しく増加するなど、かなり激しく変動しながら稜柱構造との境界へ向って微増する。S濃度は稜柱構造中で減少、prismとinterprismatic wallとの関連でCa濃度の増減と逆関係で増減をくりかえす。

Mg濃度分布は、稜柱構造を除いて貝殻全域でS濃度分布と類似したパターンを示すが、稜柱構造中ではむしろ独立したパターンを示す。

Na濃度は貝殻内面に接すると急増、約1000 μ の深さまで変動しながら徐々に増加、そのうち約800 μ の深さまで減少してから稜柱構造との境界まで徐々に増加、この間2本の黒い層線上で著しく減少、白墨質中で増加する。稜柱構造中のNa濃度は貝殻外面へ向って減少しつづける。

Cl濃度は貝殻内面に接して高く、完成した貝殻中ではほぼ一定値を示すが、2本の黒い層線で著しく高く、また白墨質中で増加する。ここで白墨質中でCl濃度分布はNa濃度の増減とよく一致した変化を示すのに、葉片構造や稜柱構造中では独立したパターンを示す。

Mn濃度は貝殻全域でほぼ一定の低い値を示す。

3. ヒオウギ Fig. 7は成長方向で切り出して作ったヒオウギのmantle-shell preparationの偏光顕微鏡像と反射顕微鏡像であり、Fig. 8はFig. 7に記入したAA'線上でCaとSとMg、BB'線上でCaとNaとCl、CC'線上でCaとMgとMnの組み合わせで、3元素間相互にみられる分布と濃度を貝殻組織構造との関連でそれぞれX線マイクロアナライザによって調べた線分析を示す。また写真に示した以外の部分でCuとZnを分析した。分析位置は閉殻筋痕に隣接した貝殻中央域である。

観察に供したmantle-shell preparationは、AA'とBB'線上で外套膜外面と貝殻内面が約100 μ 離れていた。貝殻内面(Fig. 7のA'側)より輝層が約120 μ 形成され、その外側に約190 μ の葉片構造(外套縁膜で形成される中層)と約70 μ の葉片構造(外套膜縁で形成される外層)が順に積み重なる。CC'線上で外套膜外面と貝殻内面とは150 μ ほど離れ、貝殻内面より外面へ向って約100 μ の輝層、約220 μ の中層、約50 μ の外層が順に形成されている。

Ca濃度は貝殻内面(矢印)に接すると急増、貝殻中ではAA'とBB'線上のように部

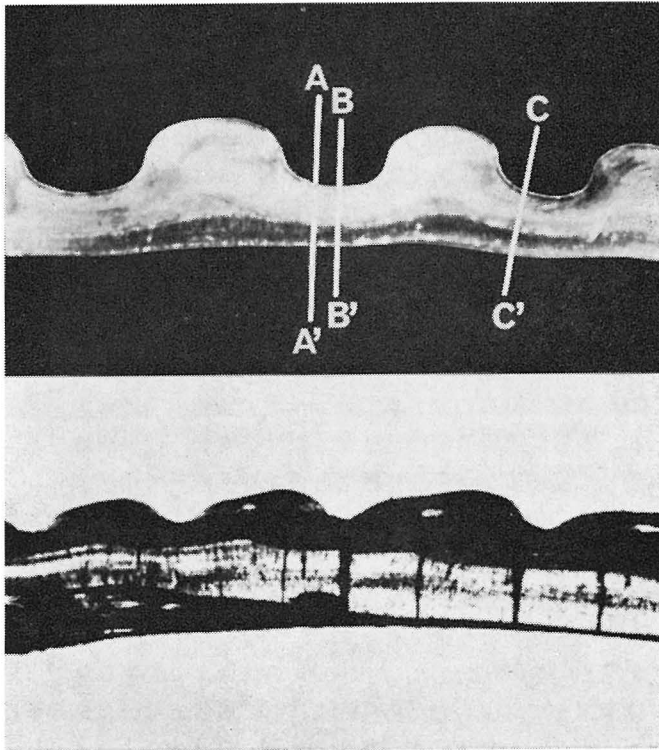


Fig. 7 Microphotographs (top, incident light; bottom, polarized light) of the longitudinal section of mantle-shell preparation of *Chlamys nobilis* showing the relation of shell structure to each microprobe traverse of Fig. 8. $\times 28$

分的に多少変動するがほぼ一定な部分と、CC'線上のように貝殻全域で激しく変動する部分がある。

S濃度は貝殻内面に接する前約 24μ にわたって高い値を示し、輝層中では深層へ向って徐々に減少、中層（葉片構造）では輝層に接する約 35μ で高く、いったん急減してから外層（葉片構造）との境界へ向って微増、外層中で急増して非常に高い値を示す。

Mg濃度は輝層中では深層へ向って微増するが低い値を示し、そのうち中層で増加、外層でさらに増加して最高値に達する。

Na濃度は貝殻内面に接すると急増、輝層では深層へ向って徐々に減少、輝層に接する中層部分で最低値を示したのち貝殻外面へ向って微増、貝殻外面直下でCaに先だて認められなくなる。

Cl濃度は貝殻内面に接して著しく高い値を示し、貝殻にはいと急減、貝殻中ではNa濃度分布と関係なく変動する。

Mn濃度は輝層では深層へ向って微増、そのうち中層から外層へ向って微減、貝殻外面直下で増加する。

CuとZn濃度は貝殻全域でほぼ一定の低い値を示す。

4. イケチョウガイ Fig. 9は成長方向で切り出して作った6年生イケチョウガイ貝

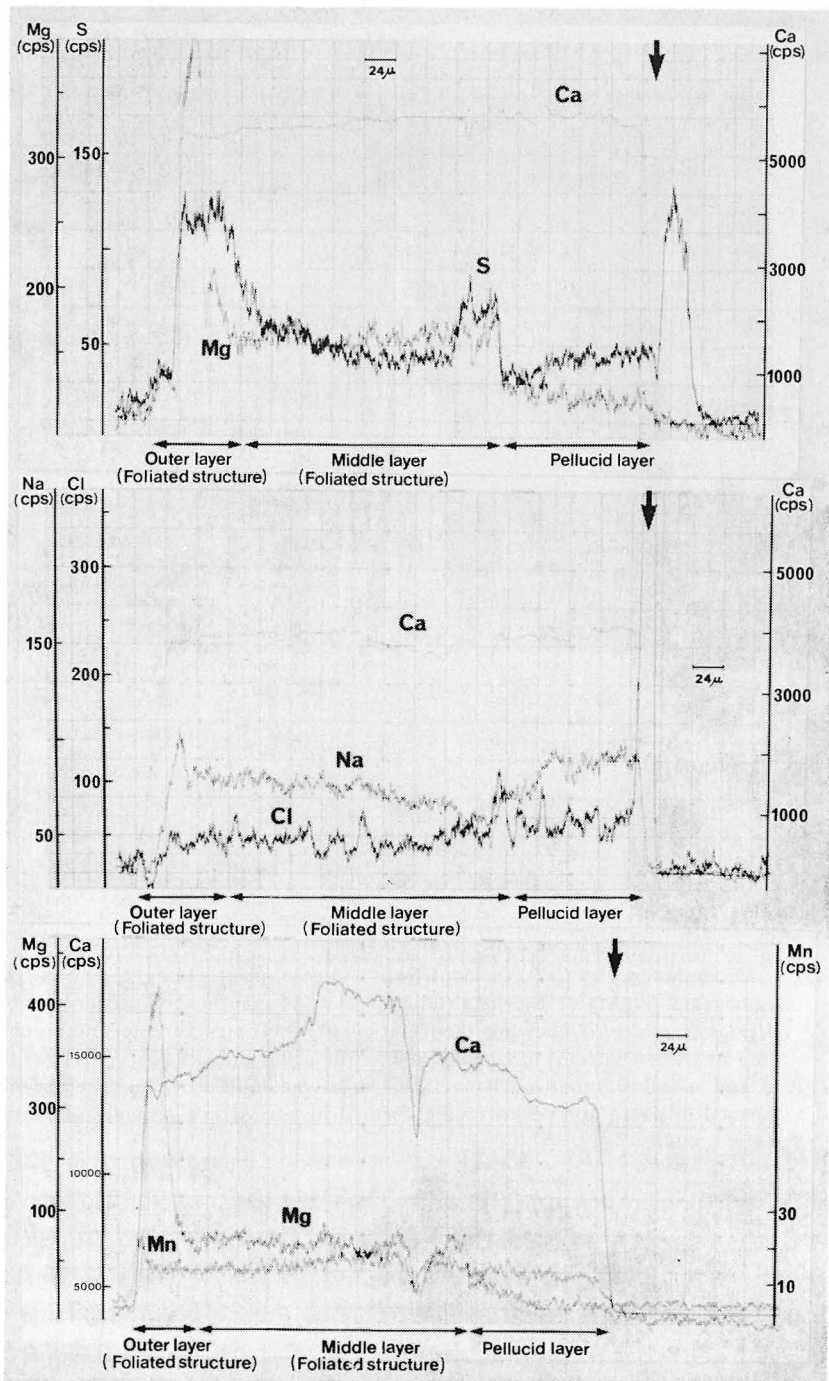


Fig. 8 Microprobe line analyses along three lines AA', BB' and CC' indicated in Fig. 7.

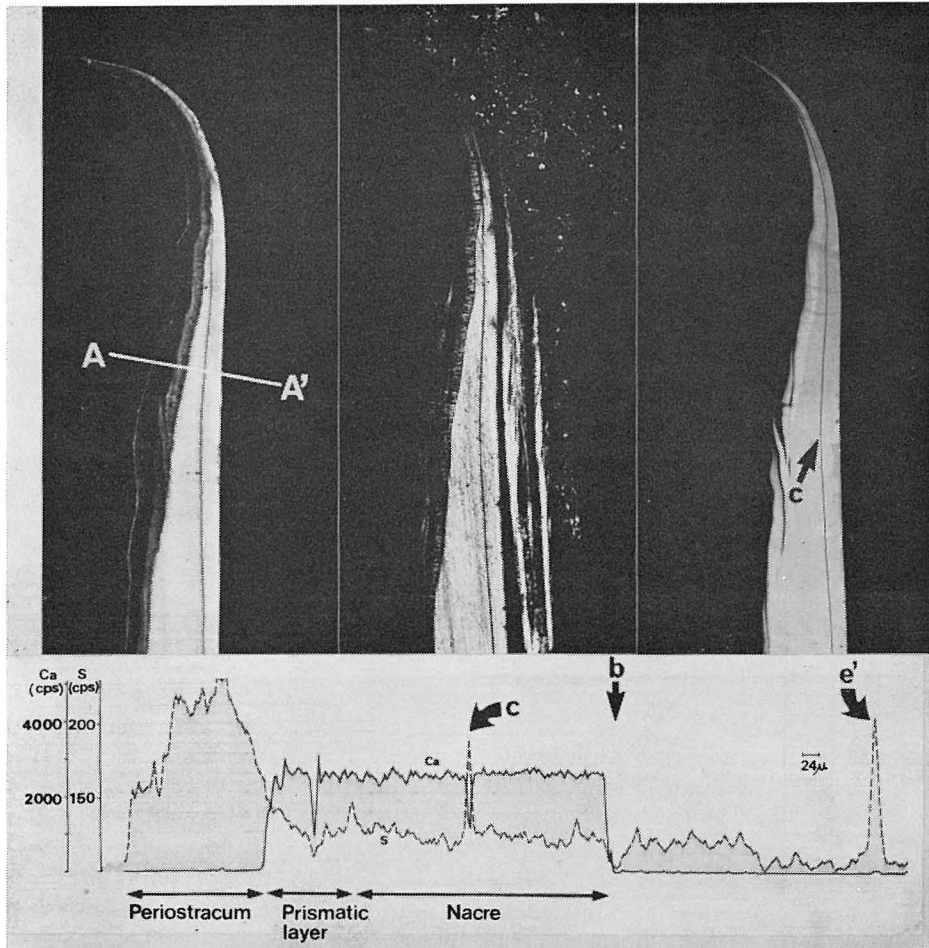


Fig. 9 Microphotographs (left, incident light; middle, polarized light) and micro-radiogram (right) of the longitudinal section of mantle-shell preparation of *Hyriopsis schlegelii* showing the relation of shell structure to microprobe line analysis (bottom) of calcium and sulfur along the line AA'. Arrows b, c and e' show inner shell surface, periostracum-like organic membrane formed in nacre and periostracum formed in periostracal groove, respectively. $\times 10$

殻の mantle-shell preparation の反射顕微鏡像、偏光顕微鏡像、microradiogram の比較、およびそこに記入した AA' 線上で起こった X 線マイクロアナライザによる Ca と S の線分析を示す。分析位置は外套縁膜に接する貝殻周辺部である。

観察に供した mantle-shell preparation は、AA' 線上で貝殻内面から約 750μ 離れた位置に殻皮溝中に生成した殻皮がある。貝殻内面 (A' 側) より約 750μ の真珠構造と約 260μ の稜柱構造が順に形成し、約 400μ の殻皮が貝殻外面をおおう。なお厚い殻皮様有機質層 (矢印 c) が真珠構造中に形成している。Microradiogram からわかるように、稜柱構

造はほぼ中央でX線吸収度の低い線で分割され、この分割線は貝殻外面に現われて成長線を形成する。

Ca は殻皮溝中の殻皮(矢印 e')と外套膜外褶中(矢印 e' と b との間)でほとんど検出できないが、貝殻内面(矢印 b)に接すると急増、増加を始めた直後いったん減少する。Ca 濃度は真珠構造ではほぼ一定なるも殻皮様有機質層(矢印 c)で著しく減少、稜柱構造も真珠構造とほぼ同じ値を示すがX線吸収度の低い分割線で著しく減少、殻皮中では検出できない。

S 濃度は殻皮溝中の殻皮(矢印 e')で高い値を示すほか外套膜組織中にも認められる。貝殻中でのS濃度は真珠構造では変動しながらもほぼ一定、真珠構造中に形成した殻皮様有機質層で顕著に増加、稜柱構造中にあるX線吸収度の低い分割線をはさんで減少、貝殻外面をおおう殻皮中で最高値に達する。

Fig. 10 は成長方向で切り出して作った当年生イケチョウガイ貝殻の mantle-shell preparation の反射顕微鏡像であり、Fig. 11 は Fig. 10 に記入した BB' 線上で Ca と S と Mg, CC' 線上で Ca と Na と Cl, DD' 線上で Ca と Mg と Mn の組み合わせで、3 元素間

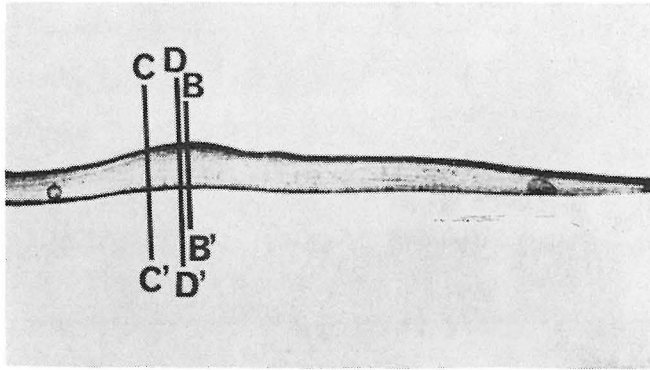


Fig. 10 Microphotograph of the longitudinal section of mantle-shell preparation of *Hyriopsis schlegelii* showing the relation of shell structure to each microprobe traverse of Fig. 11. $\times 10$

相互にみられる分布と濃度を貝殻組織構造との関連でそれぞれ調べたX線マイクロアナライザの線分析を示す。また CC' と DD' 線間で Cu と Zn を分析した。分析位置は外套縁膜に接する貝殻周辺部に相当する。

観察に供した mantle-shell preparation は、BB', CC', DD' の各線上で外套膜外面と貝殻内面とが約 70μ 離れ、貝殻内面(B'側)から 400μ から 450μ の真珠構造に接して約 60μ の稜柱構造が形成され、薄い殻皮が貝殻外面をおおう。

Ca 濃度は貝殻内面(矢印 b)に接すると急増、真珠構造では各分析線ごとに特徴あるパターンを示し、BB' と DD' 線上では稜柱構造で prism と interprismatic wall とに関連した増減をくりかえす。

S 濃度は貝殻内面に接して高い値を示し、貝殻中では全域にわたって変動するもほぼ一定、殻皮(矢印 e)で非常に高い値を示す。

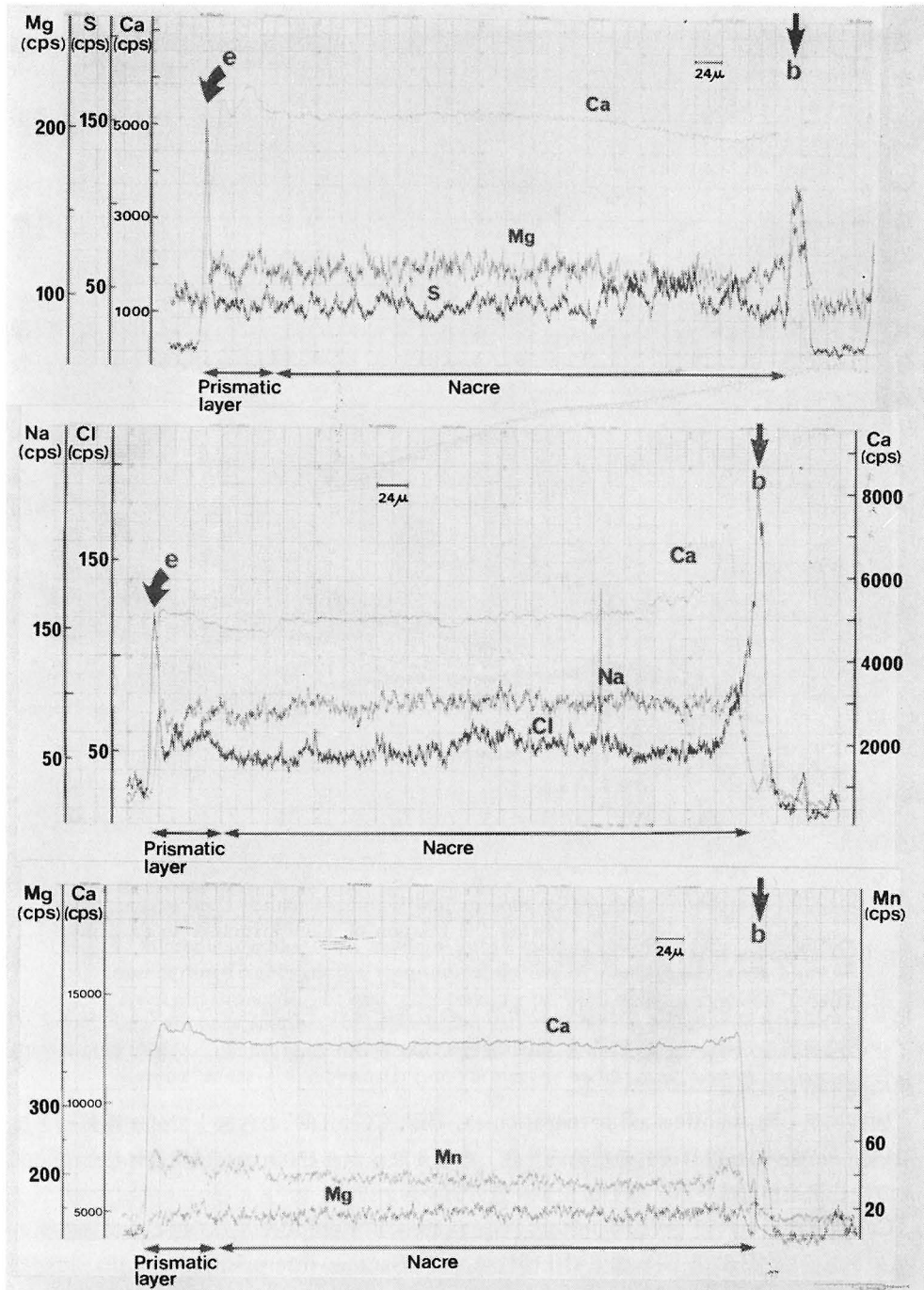


Fig. 11 Microprobe line analyses along three lines BB', CC' and DD' indicated in Fig. 10. Arrows b and e show the inner shell surface and periostracum, respectively.

Mg は貝殻内面に接して高い濃度を示すが、貝殻中では全域ではほぼ一定の濃度を示す。
Cl 濃度は貝殻内面に接して非常に高い値を示し、貝殻中では変動するもほぼ一定、殻皮にも認められる。

Na, Mn, Cu, Zn の4元素は貝殻全域ではほぼ一定の低い濃度を示す。

考 察

貝殻、サンゴ、石灰藻など生物の代謝を通して生成する炭酸塩殻中の微量元素に関する研究は、近年化学分析のほか放射化分析(太田・他, 1965)、フィッシュン・トラック法(Omura et al, 1973)、X線マイクロアナライザ(Moberly, 1968; Kobayashi 1975)などを使って進められ、元素の種類によっては炭酸塩殻中で偏在すること、ある種の微量元素が炭酸塩殻中へ濃縮される率は生物種、鉱物種、棲息環境水の温度や微量元素濃度と関連することなどが明らかになってきたことを緒言で述べた。

今回 mantle-shell preparation で得た微量元素濃度分布パタンの結果を、試料の密度、標本作成上の汚損、凹凸あるいはエッジ効果に留意しながら、数項目にわけて以下に考察する。

貝殻中の微量元素濃度分布パターン

1. 淡水産二枚貝と海産二枚貝との間にみられる特徴

淡水産種のイケチョウガイに比べ、海産種の貝殻は Mg, Sr, Na, K, Cl, SO₄などを多量に含むことを前報(和田・藤貫, 1974)でふれたが、今回の結果では貝殻中の Mg, Na, Cl, S などの元素濃度分布パターンも相違する。すなわち Mg, Na, Cl, S などの元素は、イケチョウガイではSが殻皮中で高濃度を示すことを除くと全石灰化層で低濃度ではほぼ均一に分布するのに対し、アコヤガイ、マガキ、ヒオウギなど海産種の貝殻では組織構造(真珠、稜柱、葉片など)が異なるとかなり違った濃度を示すほか、単一組織構造でも位置によって変動する。

2. 貝殻組織構造間に生ずる微量元素濃度分布差

貝殻中の微量元素濃度は組織構造間でかなり異なる。たとえばS濃度はイケチョウガイやアコヤガイの殻皮で認めたように、有機物中で非常に高い値を示す。この傾向は稜柱構造の有機物からなる interprismatic wall でも認めた。いっぽう石灰化層中の Mg と S 濃度は、アコヤガイ貝殻では稜柱構造が真珠構造より著しく高く、マガキ貝殻では白墨質が葉片構造や稜柱構造より高く、ヒオウギ貝殻では葉片構造が輝層より著しく高い。また Na と Cl 濃度は、アコヤガイ貝殻では真珠構造が稜柱構造より高く、ヒオウギ貝殻では葉片構造よりも輝層で高い傾向がある。

石灰化した組織構造間のこうした元素濃度分布差は、鉱物種、有機物の質や量、石灰化度や組織密度などと密接に関係する。すなわち Mg と S 濃度は calcite 層が aragonite 層より著しく高く、逆に Na と Cl 濃度は aragonite 層が calcite 層より高い傾向がある。したがって異なる組織構造からなる貝殻でも、イケチョウガイのように aragonite だけから

なるか、マガキ*のように calcite だけからなる種属では、元素濃度は異なる組織構造間でも類似する。

3. 単一貝殻組織構造中でおこる元素濃度変化

ある種の元素が単一貝殻組織構造中で特異的な濃度分布パターンを示すことがある。

稜柱構造にみられるパターン：貝殻組織構造は結晶の集合状態と有機物の分布とによって基本的にわかれる。稜柱構造の基本的な蜂窩状枠組は interprismatic wall によって作られ、interprismatic wall で囲まれた各々の prism は calcite 結晶(アコヤガイ、マガキ)あるいは aragonite 結晶(イケチョウガイ)からなる。このような構造からなる稜柱構造中の元素分布は、interprismatic wall の部分で Ca 濃度は低く S 濃度は高いのに対し、prism の部分で逆に Ca 濃度は高く S 濃度は低い。稜柱構造における Ca と S 濃度分布のかかる負相関は、生物種や鉱物種にかかわらず認められ、稜柱構造がもつ鉱物相と有機物相分布の特徴を反映する(和田・須賀, 未発表)。

ヒオウギの葉片構造にみられるパターン：ヒオウギ貝殻は外、中、内層ともに葉片構造からなる(Kobayashi, 1971)。ところでヒオウギ貝殻内面の電子顕微鏡所見によると、中層と内層内面に成長する calcite 結晶の形は細長い葉片状で、外層の calcite 結晶の形は短い葉片状で貝殻先端近くには外形不定の結晶集塊が生成する(和田, 未発表)。本研究で明白なように、Mg と S 濃度は外層の葉片構造が中層の葉片構造よりも著しく高く、また Mg は貝殻外面より 30μ までの外層一外形不定の結晶集塊が生成する部分一で特に高濃度を示す。この事実は、単一組織構造の貝殻を形成する貝でも組織構造に基本的な変化を与えない程度の分泌内容の差が外套膜の区域であることを暗示する。

異質層が混成するパターン：イケチョウガイ貝殻真珠構造中に形成した殻皮様有機質層やヒオウギ貝殻輝層と中層との境界に形成した異常な有機物では、Ca はほとんどなく、逆に S 濃度が著しく高い。またマガキ貝殻葉片構造中に形成した白墨質では Mg, Na, Cl, S などの元素濃度が周囲の葉片構造より高く、Ca 濃度が低い。このように異層がある組織構造中に形成すると、ある種の元素濃度分布に際立った変化を生ずる。外套膜外面上皮の分泌機能変化メカニズムは不明な点も多いが、イケチョウガイでは殻皮様有機質層が真珠構造中に、またカキ類では白墨質が葉片構造や稜柱構造中に屢々広範囲に形成する。

以上に述べたパターンのほか、ある種の元素濃度は単一組織構造の内面から外面へ漸増あるいは漸減するパターンや全域にわたって増減をくりかえすパターンなどがある。

貝殻中での各元素の存在形態

Mg : Ca と置換して固溶体 (Ca, Mg) CO_3 として炭酸カルシウム結晶中にはいる Mg は貝殻鉱物種 (calcite か aragonite か) と関連して濃度が決まるほか、本研究でも貝殻中の Mg 量は S 量と非常に強い正相関を示し(和田・藤貫, 1974), MgSO_4 の存在を示唆する。

Na, Cl : Na と Cl は aragonite 層で calcite 層より高濃度を示す傾向があるが、単一

* ただし輝層と蝶番の鉱物は aragonite である。

組織構造中での両元素の濃度分布パターンは生物種や組織構造によって変わる。たとえばアコヤガイやイケチョウガイ貝殻稜柱構造では、Na濃度はprismで高くinterprismatic wallで低く、逆にCl濃度はinterprismatic wallで高くprismで低い。この事実は、イケチョウガイ貝殻殻皮がClの高濃度を含むこととあわせて、Clの一部が有機物と関連して存在することを示唆する。またNaとClはhaliteが存在するマガキ貝殻白墨質(和田・藤貫, 1974)でMgやSとともに高濃度を示すが、マガキやヒオウギ貝殻葉片構造では互いにはっきりした関係なしに変動する。

S: S濃度は有機物からなる殻皮やinterprismatic wallで著しく高いことから、有機Sが存在すると考えられる。貝殻中の有機Sには2態が認められ、イケチョウガイ貝殻真珠構造有機基質には硫酸エステルと含硫アミノ酸とが存在し、殻皮には硫酸エステルはほとんど検出できない(和田・古橋, 1970)。

ところでイケチョウガイ貝殻殻皮と真珠構造の蛋白質との含硫アミノ酸残基数の合計は大差ないにもかかわらず、殻皮のS濃度はCPS値にして真珠構造の約3倍を示す。X線マイクロアナライザによる元素濃度分析でみられるかかる濃度差は、殻皮が全部有機物からなり、真珠構造は約95%の鉱物と約5%の有機物からなるため、単位容積あたりの有機物量が非常に異なること、非石灰化部と石灰化部では密度差が大きいため、電子線が到達する範囲一分析される容積一に大きな差を生ずることによると考えられる。

以上に論議した有機Sは少量成分で、アコヤガイ、クロチョウガイ、マベなどの貝殻稜柱構造やアサリ、シャコガイなどの貝殻に含まれるSの大部分は無機硫酸塩として存在すると報告されており(堀口, 1959b)、前述のようにMgとの無機塩が考えられる。

P: 堀口(1959b)は貝殻中のPは有機Pとして存在することを、いっぽうKado(1960)は*Ostrea gigas*で、和田・藤貫(1974)はマガキとヒオウギの貝殻で無機Pの存在の可能性を指摘し、Kobayashi(1975)は貝殻中のP濃度分布パターンが種属で著しく異なることを観察した。アコヤガイで貝殻中のP濃度が有機基質や鉱物質の分布と明白な関係にないとの今回の結果は、これらの報告を配慮すると、有機と無機の2態のPが貝殻中に存在することを示唆する。

F: Fはサメの歯牙や海産無脊椎動物の硬組織中に非晶質あるいは結晶質として広く分布することがLowenstam(1974)によって指摘されている。Glas(1962)はサメ歯牙エナメルに、またSuga et al.(1975)はイシダイとマダイ歯牙エナメルに哺乳動物の歯牙エナメルより非常に多量のFを検出し、これらの海産魚歯牙エナメル鉱物が哺乳動物歯牙エナメル鉱物hydroxylapatiteとは異なりfluorapatiteからなることを確認した。Suga et al.が使用した魚は本研究の海産二枚貝を飼育しておいた漁場付近で捕獲蓄養してあったことを配慮すると、貝殻と魚類歯牙エナメルのF濃度差は生物種の違いもさることながら、貝殻(炭酸塩)と歯牙(磷酸塩)との鉱物差がおおいに関係すると考えられる。

Mn, Cu, Zn: これらの重金属元素が外套外液や貝殻物質中へ濃縮される率は生物種で異なり、生物種によっては貝殻部分一内、中、外層一で異なる(和田・藤貫, 1974)。Wada and Fujinuki(1976, 未発表)によると、淡水産および海産二枚貝の外套外液中に存在するCu, Zn, Feのかなりの量は有機成分と挙動をともにし、有機成分との関連で貝殻中に

取り込まれる可能性がある。これに対し外套外液中の Mn のかなりの量はイオンとして存在すると考えられ、イケチヨウガイ貝殻に含まれる Mn の大部分が炭酸塩として存在するとの報告(堀口, 1959c; 阿部, 1973)と比較して興味深い。

しかし0.数 ppm から数10 ppm しか含まれない微量元素(堀口, 1959a, b, c; 和田・藤貫, 1974)の貝殻中での濃度偏在は、X線マイクロアナライザの分析限界を越えるとも考えられるので、これら微量元素が貝殻全域ではほぼ均一な濃度分布パターンを示すとの今回の結果は今後とも検討せねばならない。

生物種と貝殻中の元素濃度分布パターン

外套膜の分泌機能は、種属間で差があるだけでなく外套膜の区域で異なるから、貝殻を構成する組織構造の組み合わせ、組織構造を作る鉱物種や結晶の形、大きさ、集合状態、有機基質の質や量、鉱物相と有機相との分布状態などは種属間で特徴づけられる。しかも無機成分が外套外液中に濃縮される率は、生物種が異なるともちろんのこと、棲息環境水の塩類濃度と関連した生物体内のイオン濃度調節や浸透圧調節と関係し、また貝の生理状態によっても変化し(Wada and Fujinuki, 1976, 未発表)、生成する炭酸塩の性状や貝殻組織の性状などに影響する。その結果、貝殻中の微量元素濃度分布パターンは種固有の特徴を生じ、棲息環境水の性質や個体の生理変化を反映する。

石灰化前線にみられる元素濃度分布パターン

本研究では有機成分と関連する Cl と S 濃度がしばしば貝殻内面に接して高い値を示し、また Ca 濃度は貝殻内面に接すると急増し、内面から24 μ までの深さでいったん減少したのちふたたび増加してほぼ一定値に達した。もしこれら3元素の貝殻石灰化前線における濃度分布変化が実像であるとする、貝殻の石灰化一結晶の核生成がおこり成長して有機質シートと交互に累積して完成した層となるまで一は貝殻内面の極く表層で完了することを示唆する。

要 約

1. 数種の二枚貝の mantle-shell preparation 中の元素濃度分布をX線マイクロアナライザの線分析法で調べ、貝殻中の微量元素の存在形態および石灰化過程で微量元素がどんな因子に制約されて炭酸塩殻中へ取り込まれるかを考察した。
2. 貝殻を構成する組織構造の組み合わせ、組織構造を作る鉱物種や結晶の形、大きさ、集合状態、有機基質の質や量、鉱物相と有機相との分布状態は生物種間で異なり、これらと要素と関連して変わる微量元素濃度分布パターンに生物種の特徴が生ずる。
3. 組織構造や鉱物種が同じでも、ある種の微量元素濃度は外套膜の異なる区域で形成された層間で異なる生物種がある。
4. 貝殻中の微量元素濃度分布パターンは、イケチヨウガイと海産二枚貝との間で異なる。
5. 殻皮と稜柱構造の interprismatic wall で、S や Cl 濃度は高く Ca 濃度は低い。
6. Cl, S および Ca は貝殻石灰化前線で特異な濃度分布パターンを示す。

謝 辞

稿を終るに臨み、本研究着手の機会と種々の便宜を与えられた西海区水産研究所林知夫所長、有益な助言を下された真珠研究所杉本仁弥所長並びに通産省工業技術院地質調査所藤貫正主任研究官に謹んで感謝の意を表す。またX線マイクロアナライザ分析にあたって多大の協力を下された日本歯科大学 EPMA 共同研究室小川正昭助手、実験動物の飼育管理と採集に協力下された滋賀県水産試験場前河孝夫技師に深謝する。

なお本研究の一部は農林水産技術会議昭和46年度流動研究員制度による共同研究である。

Summary

1) The distribution of calcium, magnesium, sodium, manganese, copper, zinc, chlorine, phosphorus, sulfur and fluorine in the shells of the freshwater bivalve, *Hyriopsis schlegelii*, and the marine bivalves, *Pinctada fucata*, *Crassostrea gigas* and *Chlamys nobilis*, was investigated by electron microprobe analysis.

2) The distribution and content of minor elements such as magnesium, sodium, chlorine and sulfur in the shells depended on shell structure and mineral which were characterized in each species.

3) Magnesium content was very different between middle and outer layers which consisted of same structure and mineral in *Chlamys* shell.

4) Sulfur and chlorine contents were rich in thick conchiolin such as periostracum and interprismatic wall of prismatic structure.

5) The count per second of manganese, copper, zinc and fluorine was low and nearly constant with fluctuation in all calcified layers.

文 献

- 阿部修治 1973. 常磁性共鳴吸収法による天然炭酸カルシウム中のマンガンの存在状態の研究。「海洋の微量成分に関するシンポジウム」講演要旨 pp. 17-21 (東大海洋研).
- Chave, K. E. 1954. Aspect of the biochemistry of magnesium. 1. Calcareous marine organisms. *J. Geol.* 62: 266-283.
- Chrenshaw, M. A. and Neff, J. M. 1969. Decalcification at the mantle-shell interface in molluscs. *Amer. Zool.* 9: 881-885.
- Dodd, J. R. 1965. Environmental control of strontium and magnesium in *Mytilus*. *Geochim. Cosmochim. Acta* 29: 385-398.
- Glas, J. E. 1962. Studies on the ultrastructure of dental enamel. VI Crystal chemistry of shark's teeth. *Odont. Revy.* 13: 315-326.
- 堀口吉重 1956a. アコヤガイおよびイケチョウガイの生化学的研究—VIII. 貝殻の微量成分について (その1). *日水誌* 25: 392-396.
- 堀口吉重 1959b. 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.
- 堀口吉重 1959c. アコヤガイおよびイケチョウガイの生化学的研究—X. 貝殻中の Mn の形態について

- て。日水誌 25 : 675-679.
- Lowenstam, H. A. 1961. Mineralogy, O^{16}/O^{18} ratios and strontium and magnesium contents of recent and fossil brachiopods and their bearing on the history of the oceans. *J. Geol.* 69 : 241-260.
- Lowenstam, H. A. 1974. Impact of life on chemical and physical processes. in 'The Sea Vol. II' (ed. by Edward D. Goldberg) John Wiley & Sons Inc. pp. 715-796.
- Kado, Y. 1960. Studies on shell formation in molluscs. *J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. S*, 19 : 163-210.
- Kobayashi, I. 1971. Internal shell microstructure of recent bivalvian molluscs. *Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. E*, 2 : 27-50.
- Kobayashi, I. 1975. Preliminary study on the distribution of some elements in the shell of some bivalvian molluscs by the electron microprobe analyser. *Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. E*, 3 : 41-50.
- Kobayashi, S. 1964a. Studies on shell formation. X. A study of the proteins of the extrapallial fluid in some molluscan species. *Biol. Bull.* 123 : 414-422.
- Kobayashi, S. 1964b. Calcification in the 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.
- Moberly, R. Jr. 1968. Composition of magnesian calcites of algae and pelecypods by electron microprobe analysis. *Sedimentology* 11 : 61-82.
- Omura, A., Konishi, K., Nakanishi, T. and Sakanoue, M. 1973. Heterogeneities of uranium distribution in fossil and present-day *Tridacna* shells and their implications to dating. *Jap. J. Geol. Geograph.* XLIII : 1-20.
- 太田直一, 寺井稔, 大森昌衛 1965. 貝殻化石中のマグネシウム, カルシウム, リン, ナトリウムおよびカリウム含量. *日化誌* 86 : 1254-1258.
- Pilkey, O. H. and Goodell, H. G. 1963. Trace elements in recent mollusk shells. *Limnol. Oceanog.* 8 : 137-148.
- 須賀昭一 1966. 硬組織の microradiography. *歯界展望* 27 : 495-515.
- Suga, S., Wada, K. and Ogawa, M. 1975. Biophysical analyses of the enamelloids of the teleosts. International Association for Dental Research Japanese Division (Tokyo) Abstract No. 32.
- Wada, K. 1967. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs XIV. Modification of the amino acid pattern of proteins in the extrapallial fluid during the process of formation and mineralization of nacreous conchiolin in some bivalves. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 33 : 613-617.
- Wada, K. 1967. Studies on the mineralization of calcified tissues in molluscs XV. Amino acids in organic matter of extrapallial fluids forming calcite shell. *ibid.* 33 : 1002-1006.
- 和田浩爾・古橋保 1970. 軟体動物の石灰化組織の鈹物化に関する研究—XVII. イケチョウガイ貝殻における酸性多糖体の分布. *日水誌* 36 : 1122-1126.
- 和田浩爾・古橋保 1971. 軟体動物の石灰化組織の鈹物化に関する研究—XVIII. 外套膜が分泌する粘液の酸性多糖体. *日水誌* 37 : 13-17.
- 和田浩爾・藤貫正 1974. 軟体動物の生理調整における貝殻の形成と溶解の生理 I. 環境水—外套液—貝殻間の化学成分の分配関係からみた水棲軟体動物による微量成分の貝殻への濃縮について, *国立真珠研報* 18 : 2085-2110.
- Wada, K. and Fujinuki, T. 1976. Biomineralization in bivalve molluscs with an emphasis on the chemical composition of the extrapallial fluids. in 'The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants' (ed. by Watabe, N. and Wilbur, K. M.) Univ. South Carolina Press. (in press)

アコヤガイ外套膜の縁膜部に含まれる色素^{*,†}

矢野 勲
国立真珠研究所

前報 (矢野, 1975) において, 著者はアコヤガイの貝殻と養殖真珠の真珠層にしばしば形成されている暗褐色の異物中にフラボキサントンに類似したカロチノイド色素が含まれていることを明らかにした。いっぽう, 多くの研究者は貝殻の真珠層や養殖ならびに天然真珠がそれぞれ外套膜縁膜部の外面上皮細胞とそれが袋状になった組織 (真珠袋) によって分泌形成されることを報告している (Tsuji, 1960; 町井, 1968; 和田, 1972; Wilbur, 1972)。従って, 貝殻および真珠の真珠層中に形成された暗褐色の異物に含まれているカロチノイド色素は外套膜の縁膜部において生成されるものと想像される。本実験は真珠層中に形成された暗褐色の異物中のカロチノイド色素と外套膜との関係を明らかにするため, アコヤガイの外套膜, 特に真珠層を分泌形成する縁膜部に含まれるカロチノイド色素を検討したものである。

なお, 報告に先立ち, 本稿の御校閲を賜った国立真珠研究所杉本仁弥所長並びに同町井昭博士, 和田浩爾博士に対し, 深甚なる感謝の意を表する。

実験方法

試料: アコヤガイ *Pinctada fucata* は英虞湾内で垂下養成された3年生貝と4年生貝を使用した。試料の外套膜は真珠層を分泌形成している縁膜部を切り取り実験に供した。

色素の分離同定: 外套膜の縁膜部を乳鉢中でアセトンと共に磨碎し, アセトンに溶解した色素を窒素気流中40℃以下で減圧濃縮して石油エーテルに転溶した。得られた粗脂肪を常法により, 10% KOH メタノール溶液にてケン化し, 不ケン化物を石油エーテルに転溶後, メルク製アルミナカラムに吸着させメタノール・アセトン混液 (1:9) で展開して分画し, ただちに日立 323 型自記分光光度計で吸収スペクトルを測定した。さらに色素の同定に際し, Partition test (90%メタノール, 石油エーテル) と薄層クロマトグラフィーでの Rf 値の比較検討を行った。薄層クロマトグラフィーはメルク製シリカゲルGを吸着剤とし, アセトン・n-ヘキサンの混液 (1:4) で展開を行った。

結果および考察

アコヤガイ外套膜の縁膜部から得られた不ケン化物のカラムクロマトグラフィーは黄色

* Isao Yano. An acetone soluble pigment in the pallial zone of the mantle tissue of the pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould). With English summary, p. 2243. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 20: 2241-2243.

† 国立真珠研究所業績 No. 224 (国立真珠研報 20: 2241-2243. 昭和51年8月)

の1区分のみが認められ、さらに薄層クロマトグラフィーについても同様に1スポットのみが得られた。得られた色素は Partition test の結果下層性を示し、薄層クロマトグラフィーでの Rf 値は0.14であった。また、Table 1 に示した様に、得られた色素の吸収極大はカロチノイド色素の一種フラボキサントンのそれ(Kuhn and Brockmann, 1932; Karrer

Table 1. Comparison of absorption properties of an acetone soluble yellow pigment extracted from the pallial zone of the mantle tissue in the pearl oyster, *Pinctada fucata* with those of flavoxanthin.

Solvents	Absorption maxima (nm)	
	in mantle tissue	flavoxanthin
Carbon disulfide	418, 446, 470	420, 447, 478
Benzene	433, 460	430, 458
Chloroform	434, 460	429, 458
Petroleum-benzin	420, 451	422, 450
n-Hexane	425, 450	422, 450
Ethanol	424, 450	421, 448
Methanol	421, 446	420, 447

et al., 1942; Karrer and Jucker, 1943; Karrer and Rutschmann, 1944; Karrer et al., 1945) に類似していた。二枚貝類のカロチノイドはこれまで卵、生殖巣、筋肉その他の内臓組織について多くの研究 (Comfort, 1951; Fox, 1966; 清水ら, 1968a, b, c, d, e; Goodwin, 1972) があり、外套膜については清水ら (1968e) の報告がある。清水らはイタヤガイの外套膜を分析し、 β -カロチン、ルテイン、タラキサントニンおよび未ケン化のキサントフィルエステルが含まれることを報告している。これに比べて、アコヤガイ外套膜の縁膜部にはわずかに1種類のカロチノイドしか認められなかった。このことは、本実験ではカロチノイド色素が多く含まれていると考えられる外套膜先端の膜縁部を除いて、縁膜部のみを分析したためと思われる。今回の実験によりアコヤガイにおいて、真珠層を分泌形成する外套膜の縁膜部に前報で報告した暗褐色の異物中のカロチノイドと同じ種類の色素が認められたことは真珠層中に形成された暗褐色異物中の色素は外套膜の縁膜部で生成されていることを暗示する。外套膜のカロチノイド色素の体内における代謝過程については今後の問題であろう。

要 約

アコヤガイ *Pinctada fucata* の外套膜、特に真珠層を分泌形成する縁膜部に含まれるカロチノイド色素を薄層およびカラムクロマトグラフィーで調べた。

外套膜の縁膜部からアセトンで抽出した色素の不ケン化物はアルミナカラムで黄色の1分画に分けられた。色素は Partition test の結果下層性を示し、シリカゲルGを吸着剤とした薄層クロマトグラフィーでの Rf 値は0.14であった。また、可視部吸収スペクトルの

吸収極大はカロチノイド色素の一種フラボキサンチンのそれに類似していた。

Summary

An acetone soluble pigment in the pallial zone of the mantle tissue of the pearl oyster, *Pinctada fucata*, was investigated by means of column and thin-layer chromatography. The absorption maxima of the yellow pigment extracted from the pallial zone of the mantle tissue are shown in Table 1. The pigment was identified to be flavoxanthin like carotenoid.

文 献

- Comfort, A. 1951. The pigmentation of molluscan shells. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. **26**: 285-301.
- Fox, D. L. 1966. Pigmentation of Mollusca. in 'Physiology of Mollusca II' (ed. by Wilbur, K. M. and Yonge, C. M., Academic Press, New York) pp. 249-274.
- Goodwin, T. W. 1972. Pigments of Mollusca. in 'Chemical Zoology VII' (ed. by Florkin, M. and Scheer, B. T., Academic Press, New York) pp. 187-199.
- Kuhn, B. and Brockmann, H. 1932. Flavoxanthin. Z. Physiol. Chem. **213**: 192-198.
- 町井 昭 1968. 真珠袋形成に関する組織学的研究. 国立真珠研報 **13**: 1489-1539.
- 清水トシ・内田公子 1968a. 二枚貝のカロチノイドについて-I. アサリのカロチノイド色素. 日水誌 **34**: 154-158.
- 清水トシ・門馬令子 1968b. 二枚貝のカロチノイドについて-II. ハマグリのカロチノイド色素. 日水誌 **34**: 159-162.
- 清水トシ・太田洋子 1968c. 二枚貝のカロチノイドについて-III. シジミのカロチノイド色素. 日水誌 **34**: 210-213.
- 清水トシ・植原光子 1968d. 二枚貝のカロチノイドについて-IV. アカガイのカロチノイド色素. 日水誌 **34**: 503-506.
- 清水トシ・小田愛 1968e. 二枚貝のカロチノイドについて-V. イタヤガイのカロチノイド色素. 日水誌 **34**: 627-632.
- Tsujii, T. 1960. Studies on the mechanism of shell-and pearl-formation in mollusca. Jour. Fac. Fish. Pref. Univ. Mie **5**: 1-70.
- 和田浩爾 1972. 真珠袋の Ca 代謝機構と真珠の品質形成. 国立真珠研報 **16**: 1949-2027.
- Wilbur, K. M. 1972. Shell formation and regeneration. in 'Chemical Zoology VII' (ed. by Florkin, M. and Scheer, B. T., Academic Press, New York) pp. 103-145.
- 矢野 勲 1975. アコヤガイ貝殻および真珠の真珠層間に挟まれた暗褐色異物中の黄色色素. 国立真珠研報 **19**: 2149-2151.

採卵成績の年変動などからみたアコヤガイ の成熟と積算水温の関係^{*,†}

和田 克彦

国立真珠研究所

アコヤガイの種苗生産を能率よく行なうためには、まず成熟した卵と精子を任意の時期に得る必要がある。本種の種苗生産は、産卵誘発により得た卵と精子により行なわれているが、産卵誘発に失敗するケースが多く、その原因の1つに完熟個体の識別の困難さがあげられる。したがって任意の時期に産卵誘発に反応して完熟した卵や精子を提供し得る親貝を育成することが望まれ、それが可能になることによって、種苗の安定的かつ計画的生産ができるようになる。またこのことは育種研究の交配実験などの研究手法上も重要なことである。

二枚貝の生殖巣の成熟に影響する外部環境要因として、これまで水温、日照時間、餌料、月齢および潮汐などがあげられているが（金谷, 1973; 岩田, 1974）、その中でも水温が最もよく調べられている。水温はあらゆる代謝に関係しているため、成熟の生理学的機構の解析と結びつけることは、それだけでは非常に難しいであろう。成熟に関与する内部要因として、他の無脊椎動物や高等動物で重要であるとされているホルモンや神経分泌などについては、二枚貝ではまだ十分わかっていない（Antheunisse, 1963; Mori, 1968, 1969）。したがって成熟の生理学的機構の解明はともかくとして、完熟した卵や精子を得るという応用面では、今のところ水温を制御して飼育することにより、ある程度成熟をコントロールできることが、カキやホタテガイでわかっている（Loosanoff and Davis, 1952; Sastry and Blake, 1971）。アコヤガイでは、水温が生殖巣の成熟に与える影響について、稚貝の豊凶との関係（三重水試, 1949; 小林, 1951）や避寒された貝の生殖巣の観察（植本・谷口, 1959）の中で報告されている。また著者は前報（桑谷・西飯・和田, 1974）で、冬季（1～3月）にアコヤガイを水槽で種々の水温のもとに飼育して、生殖巣の成熟と放卵放精を組織学的に観察し、冬季でも十分成熟させることが可能であることを報告した。今回は産卵期に育種研究のため行なった産卵誘発結果と春～夏の成熟期間の水温との関係を検討し、生殖巣の成熟と積算水温の関係をとりまとめた。

本文に入るに先立ち、原稿の校閲をいただいた杉本仁弥所長および植本東彦室長、供試貝の管理に協力いただいた前田弘也技官に厚くお礼申し上げる。

* Katsuhiko T. Wada. Temperature requirement for maturation of gonads in Japanese pearl oyster. With English summary, pp.2251-2252. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 20: 2244-2253. 1976.

† 国立真珠研究所業績 No. 225 (国立真珠研報20: 2244-2253. 昭和51年8月)

方 法

ここで用いた資料は、1969～1975年（ただし1974年を除く）の夏に育種研究の交配実験のために行なった、アコヤガイ *Pinctada fucata* の産卵誘発結果および供試員の養殖されていた海域の毎日の水温記録である。産卵誘発に用いた貝は、全て前年から英虞湾多徳島地先の当所臨海実験場の養殖筏で、水深2 m層に垂下養殖されていたものであり、主として満2年、一部満3年のものである。本種の英虞湾での産卵期は7～8月であるが、その時期に適宜供試員を解剖して、生殖巣の肉眼観察により成熟の程度を調べ、完熟の個体が多い時を選んで産卵誘発を行なった。

産卵誘発法は、水温を急激に上昇させる温度刺激により、次に述べる2つの方法のいずれかを用いた。①16ℓ容の透明水槽に約12ℓの海水（水温約25℃）と供試員数個～数十個を收容し、貝が開殻したのを確認してから急激に高水温の大量の新鮮な海水を循環させ、水温を約30℃に昇温させ、放精がみられるまで続け、放精がみられた時、直ちに循環を停止する。放卵個体が現われたら、サイフォンで精子と卵を採取し、減水した分だけ新鮮海水を補給する。この補給は産卵を続行させるためである。（以後この方法を便宜的に集団誘発法と記す）。②2ℓ容のバットに供試員を2個体（雌雄各1個体）收容して25℃海水を流しておき、貝の開殻を確認してから、約30℃の新鮮海水を流して水温を上昇させ、放精がみられたら通水を停止し、放卵、放精の両方がおこったバットからサイフォンで採卵し、減水分を補給する（この方法を以後個別誘発法と記す）。なお①、②ともに、供試員は誘発を行なう日の1～2日前に養殖筏よりとりあげ、付着生物等を除去し、20～23℃に保った水槽に收容し、軽く通気しておき（低温処理）、誘発を行なう約30分前に空气中に露出させてから供した。

産卵誘発の成績は次のような各段階に区別した。①放卵も放精もしなかった場合、②放精のみあった場合、③放卵、放精したが、受精しないかあるいは受精率が著しく低かった場合、④放卵、放精し受精するが、奇形など発生の異常な場合、⑤受精も発生も正常で、少なくともD型幼生までは支障なく発生が進んだ場合。なお、本論文で「採卵」とは、特にただし書きがないとき、上記⑤のような場合について用いた。

養殖場の水温記録は、毎日午前11時～12時の間に供試員の垂下層である2 m層で観測されたものである。欠測した日については、その前後の日より直線的に変化したものとして推定値を用いた。

結 果

産卵誘発結果 Table 1 は各年の毎日の産卵誘発結果をまとめたものである。1969年は集団誘発法のみを行ない、1970年以後はそれに加えて個別誘発法も併用した。表には各回の供試員数を示したが、産卵誘発に成功した場合のそれは全ての個体が放卵放精したという意味ではない。ほとんどの場合、これら全供試員数のうち一部が放卵または放精したにすぎないが、放出個体数は特に計数しなかった。1973年は、生殖巣の肉眼観察では7月23日以前に既に採卵可能なほど供試員が成熟しているようであったが、採卵施設等の工

Table 1 Annual variation in the results of artificial spawning induction of the pearl oyster for crossing or selection experiments.

Year		1969			1970		1971		1972		1973		1975	
Date	Methods*	Mass	Mass	Indi.	Mass	Indi.	Mass	Indi.	Mass	Indi.	Mass	Indi.	Mass	Indi.
	July	14												
15														○12
16														
17									●30					○29
18		●15												○17
19		●15												
20		●30												
21		●30												○43
22							●30							●11
23		○30				●30						○24		
24												○22		●20
25		○29			●30					●30		○22		
26		●30			●30					●30		○22		
27										●22	○21	●21		
28					●34	○13			●30	●17				
29		●30			●15									○44
30	●30			●15	○7						○20	○11	○14	
31	●6			●30				●40	▲34					
August	1			●30							●20			
	2			●30					●20		○20			
	3								○30	●30				
	4	○30		▲6					●20	●20				
	5													
	6		△13											○24
	7								●30	●30				
	8								●30	●30				
	9	△15	△10						○30	○30				
	10		○15						●30					
	11	●30	○30						○30					
	12													
	13	△30	○30											
	14													
	15													
	16								○30	○30				
Rate of spawning†		.214	.214	.500	.261	.778	.818							

Note, ● : Not spawned, ○ : Only male spawned, ▲ : Male and female spawned but not fertilized or low fertilization rate, △ : Spawning and fertilized embryos abnormally developed, ○ : Spawning and fertilized embryos normally developed (Successful spawning). Figures mean the number

of individuals induced. * Mass: Induced in the mass, * Indi.: Pairs of male and female were induced separately with some exceptions. † Rate of spawning = (Number of ○) / (Total number of ○, ●, △, ▲ and ●). Marks connected by line mean the same specimens were induced repeatedly.

事のため、それまで誘発ができなかった。

Table 1 に示したように、採卵の時期は年により変動が著しい。第1回の採卵日についてみると、1975年の7月14日と1973年の8月10日とでは約1ヶ月の差がある。また、採卵成績も年により著しく違い、採卵に成功した率 (Rate of Spawning) は、1975、1973両年が高く、1969年、1970年、1972年が低い。特に1972年の7月に実施した誘発は全て失敗に終わった。また7月に採卵が可能な年は成功率が高く、8月にずれる年ほど成功率は低くなる傾向を示している。

各年の春～夏の水温変化 各年の3月～8月の水温変化を週平均値で示したのが Fig. 1 および Fig. 2 である。これらの図には1974年を除く1969年～1975年の6年間の平均値を同時に示した。各年毎の水温の変化は次の通りである。

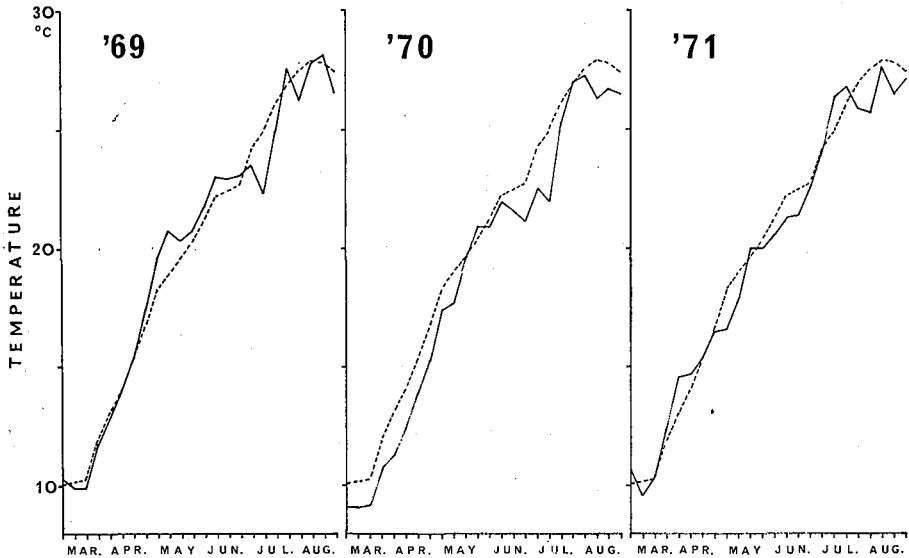


Fig. 1 Monthly changes in sea water temperature at the nursery farm in 1969, 1970 and 1971. Data are plotted by the mean values during the following four terms in each month; First: 1st-7th, Second: 8th-14th, Third: 15th-21st, Fourth: 22nd-last day of month. Dotted line shows the mean value in 1969-1975 except for 1974.

1. 1969年 3月から6月までの水温の上昇は順調であり、特に5月と6月は6年間の平均より高めに経過している。しかし、6月下旬～7月初旬は梅雨明けが遅かったことが原因してか停滞気味であり、7月下旬になって、やっと上昇した。この年の特徴はこの梅雨時の長い停滞である。

2. 1970年 この年は、今回調べた6年間のうちでも、最も水温が低く経過した年である。

すなわち、3月から8月のほぼ全期間を通じて、平均より約1℃低めで、わずかに5月下旬に高くなっている程度である。6～7月の梅雨期の長い停滞と、夏の最高水温が低いことも注目される。

3. 1971年 6年間の平均に最も似た変化をしているが、夏の最高水温が低めであるのが注目される。梅雨期の停滞はみられない。

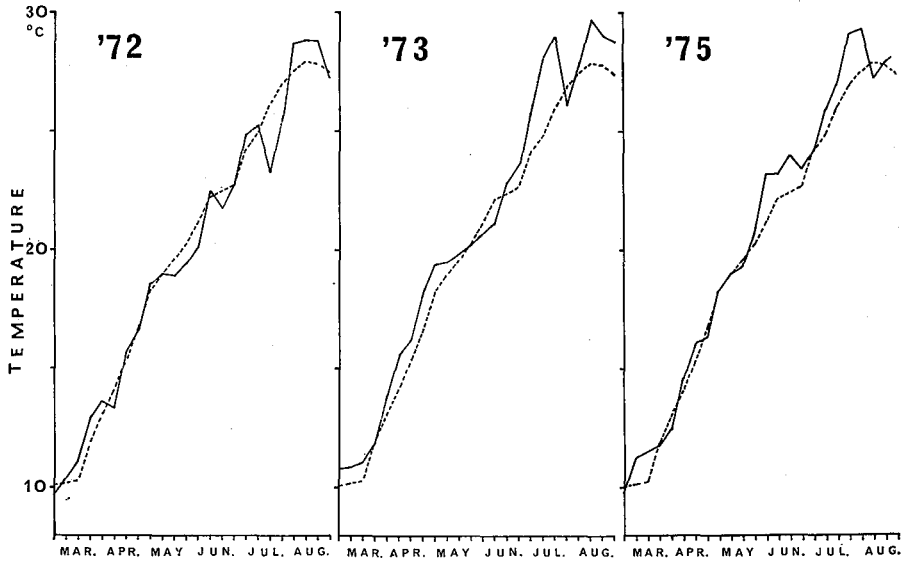


Fig. 2 Monthly changes in sea water temperature at the nursery farm in 1972, 1973 and 1975. Plotting of data and dotted line are same as in Fig. 1.

4. 1972年 3月から5月初めまでの変化は順調であるが、5月下旬、6月下旬、7月下旬にみられる停滞が特徴的である。8月に入って急激に上昇がみられた。

5. 1973年 6月中旬の低めの経過と、7月下旬の1時的低下を除くと、全般的に平均より高めに経過した年である。梅雨による停滞がまったくみられず、6月から7月への急上昇が著しく、7月第1週に既に25℃を越えており、夏の高水温とともに平均ときわだった相違をみせている。

6. 1975年 6月の梅雨期の停滞がやや長い、平均よりも1～2℃も高いままの経過であり、梅雨明けの上昇も比較的早く、その後も順調に上昇した年で、夏の最高水温が早く現われ、7月下旬～8月初旬となっている。全般的にみて平均より高めに経過した年である。

春～夏の積算水温と産卵誘発結果との関係 積算水温としては毎日の水温から13℃を減じた値を積算したものの $\sum(T_i - 13^\circ\text{C})$ を用いた。 $T_i \leq 13$ の日は0として計算した。13℃は、アコヤガイのいろいろな生理的活動が、低下あるいは停止する下限の水温とされている(小林・渡部, 1959)。積算値の毎日の変化を各年別にみたのが Fig. 3 である。図には産卵誘発結果を同時に示してある。ただし、Table 1 に示したもののうち、同じ日に集団誘発と

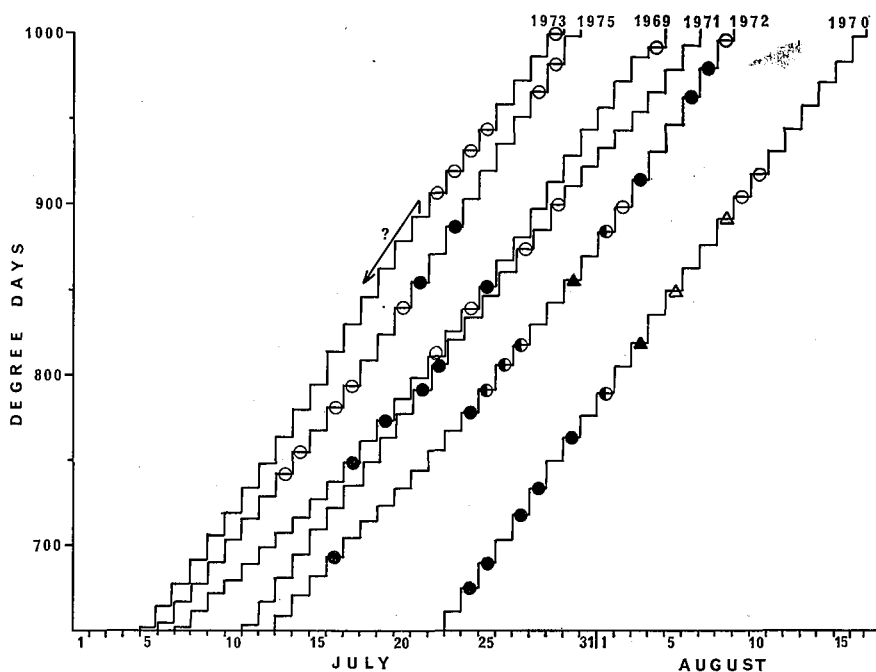


Fig. 3 Changes in daily exposure temperature above 13.0°C in degree-days ($\sum(T_i - 13.0^\circ\text{C})$) at the nursery farm and the results of artificial spawning induction shown by the same marks as in Table 1. Marks are plotted at the day when animals were transferred into the tank from the farm.

個別誘発の両方を行なった場合は、そのうち成績のよかった方を示した。また誘発結果は、供試員を漁場からとり上げた日にプロットしてあるので、Table 1 の誘発を行なった日と一致しない場合もある。図にみられるように、採卵成績のよかった1973年と1975年は積算水温が他の年の同時期に比較して高く、成績の悪かった1969年、1970年および1972年は低い。初めて採卵に成功した供試員をとり上げた日までの積算水温値は、1969年810.6、1970年904.0、1971年872.9、1972年897.9、1973年905.5および1975年741.3となる。雄の最初の誘發放精までの積算温度は、1970年789.5および1972年791.1で、他の年の最初の誘發放精までの積算温度は採卵のものと一致した。

考 察

今回の調査で、産卵誘発の成功率や産卵後の受精率、胚の発生状態などからみた採卵成績は、春から夏にかけての水温に大きく影響されることがわかった。それらを整理してみると次のようになる。①3月～7月の水温が平年より全般的に高めに経過した年は採卵成績がよく、逆に低めの年は悪い。②梅雨が長びくと水温の上昇が遅れ、採卵期も遅れるし採卵成績もよくない(1969年、1970年および1972年)。梅雨期の水温上昇の停滞がなく、直線的に夏の高水温に向う年は採卵成績がよい(1973年、1975年)。③採卵期は積算水温

$\sum(T_i-13^\circ\text{C})$ の値が約740になるころから始まるが、その年の最初の採卵日までの積算値は、春～夏の水温上昇が遅い年程大きくなる傾向がみられる。雄だけ放精した場合も含めるとその年の誘発に最初に成功した日までの積算値は740～800程度である（実験開始の遅れた1973年と実験回数の少ない1971年を除く）。

アコヤガイの成熟や産卵に与える水温の影響については、これまで多くの調査がなされている。三重水試（1949）によれば、稚貝の発生量は7月の水温が高い程豊作になり、特に初旬および中旬の水温が高い程発生が良好であるとしている。また小林（1951）は、稚貝の豊凶についてその年の7月の水温との間に正の相関を認めたほか、前年の8月の水温との間にも負の相関をみだしている。これらの関係は、成熟および産卵が水温に大きく影響された結果と考えられるが、彼らも述べているように、稚貝の豊凶は産卵後の幼生、稚貝の生残や成長も関係しており、それらに与える水温の影響も考えられる。したがって、生殖巣の成熟にのみ与える水温の影響は、稚貝の豊凶との関係のような包括的な調査では、厳密な解明が無理である。植本ら（1959）によれば、冬期水温の高い海域に養殖されていた貝は、その間に生殖巣の発達がみられ、4月には50%程度の個体が、環境条件さえよければ産卵を開始できる状態にまで成熟していたという。

このように、これまでアコヤガイの生殖巣の成熟に影響する環境条件の中でも、水温は非常に大きな役割を果していることがわかっている。今回の調査でも春～夏の水温が高い程採卵期は早くなり、採卵成績も良くなる傾向がみられた。特に、前述の三重水試（1949）および小林（1951）が指摘した7月の水温と生殖巣の成熟および産卵の間には、本実験でも明瞭な相関性が認められた。

著者は前報（桑谷・西飯・和田，1974）で、冬期（1～3月）陸上水槽で種々の一定水温のもとにアコヤガイの飼育を試み、高水温で飼育された貝の生殖巣ほど早く成熟し、中には放卵、放精した個体もみられたことを報告した。この実験は14℃、18℃、22℃、26℃および30℃の5区で貝を飼育し、30日後および50日後にそれぞれ各区20個体の生殖巣を組織学的に観察したものである。この結果より、積算水温 $\sum(T_i-13^\circ\text{C})$ と生殖巣の成熟度の関係を求めてみた。すなわち、成熟個体として卵および精子の放出の最も盛んな第4期と第5期および放出の終わった第6期にあたるものを選び、その占める割合を各水温区および各回ごとにみると、30日後においては、22℃区で23%、26℃区で63%、30℃区で73%、さらに50日後においては、18℃区で、10%、22℃区で65%であった（桑谷ら（1974）の Fig. 7 参照）。なお、30日および50日後の14℃区では、まだ上記の段階にまで成熟した個体が見られないため、また50日後の26℃区および30℃区では、一度産卵して再び成熟して来た個体が混合して複雑な組成を示したため、これらは全て除外した。以上のようにして得られた成熟個体の割合と積算水温値との関係をプロットしたのが Fig. 4 である。なお、積算水温は水槽内の水温がほぼ一定に保たれたと仮定して算出した（桑谷ら（1974）の Fig. 2 参照）。この関係はほぼ直線関係とみなせるが、成熟個体の割合（%）を y 、積算水温 $\sum(T_i-13^\circ\text{C})$ を x とすると $y=0.195x-43.4$ となる。 $100 \geq y \geq 73$ の範囲でもこの関係が成立すると仮定すると、 $y=100$ のとき $x=735$ となり、100%の個体が成熟するのに要する積算値は約735と推定される。これは組織学的にみた場合の成熟に要する積算値で

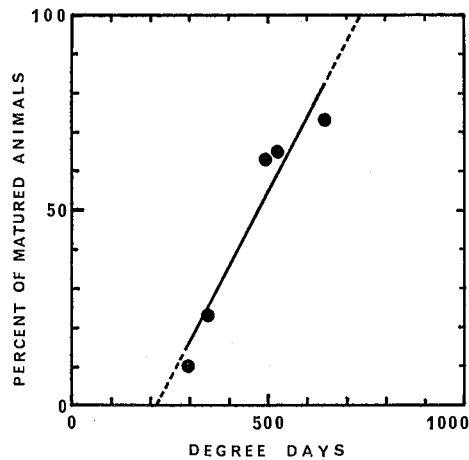


Fig. 4 The relation between the percent of histologically matured animals reared in the laboratory and degree-days exposure above 13.0°C. (Data from Figs. 2 and 7 in Kuwatani et al. (1974)).

ある。今回調査した産卵誘発に初めて成功した日までの積算水温が740~800であったことと考慮すると、アコヤガイの生殖巣は、積算水温 $\sum(T_i - 13^\circ\text{C})$ が700~800程度以上になって成熟に達すると推定される。

要 約

1. 積算水温とアコヤガイの成熟との関係を調べるため、英虞湾多徳島における1969年~1975年(1974年を除く)の6年間の春~夏の水温記録と、そこで養殖されていた貝の産卵誘発結果(育種研究のための採卵成績)を比較した。

2. 春~夏の水温が平年(6年間の平均)より高めに経過した年は採卵成績がよく、低めの年は梅雨期の水温停滞と関連して採卵成績が悪い。

3. 受精卵の発生が正常であるような産卵誘発に成功する時期までの積算水温 $\sum(T_i - 13^\circ\text{C})$ は、740~900と年により変動があった。雄だけでも初めて産卵誘発に応じた日までの積算値にすると740~800となる。前報の冬季水槽飼育実験結果を考慮して、アコヤガイの生殖巣の成熟に要する積算水温 $\sum(T_i - 13^\circ\text{C})$ を700~800以上と推定した。

Summary

The purpose of this article is to estimate the temperature requirement for maturation of gonads in Japanese pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould).

A lot of pearl oysters reared at the nursery farm in Ago Bay have been artificially induced to spawn for crossing or selection experiments at the spawning season every year (1969-1975 except for 1974). The results of artificial spawning induction have been fluctuated annually (Table 1). The data were analyzed in regard to the annual

variation in the results of the artificial spawning induction and in the sea water temperature of nursery farm at the season of gonadal development and spawning. The spawning was induced by thermal stimulus heating water from 25°C to 30°C. The animals were held in the tank for one or two days before induction at temperature of 20–23°C, and taken out of water to expose to the air for about an hour before induction. Both of these treatments were for an additional spawning stimulus.

The results obtained were summarized as follows.

1. The spawning season was earlier and the spawning induction were more successful in 1973 and 1975 than in the other years. In these years, the sea water temperature from March to August were higher than in the others. (Table 1 and Figs. 1 and 2)

2. Sum of the daily exposure temperature above 13.0°C in degree-days ($\sum_i (T_i - 13.0^\circ\text{C})$) calculated when the first successful spawning (Note in Table 1) was induced in each year was varied between 740 and 900. Temperature exposure in degree-days was varied between 740 and 800, being calculated when only male or both male and female spawned by induction firstly in each year (Fig. 3).

3. On the basis of the results of the previous paper by the author, the relation between the rate of matured animals (observed histologically) and sum of daily exposure temperature in degree-days was estimated (Fig. 4), and it was deduced that 735 degree-days were required for all (100%) animals to mature histologically.

4. Judging from the results above, it was concluded that more than 700–800 degree-days seemed to be required for Japanese pearl oyster gonad to mature in Ago Bay.

文 献

- Antheunisse, L. J. 1963. Neurosecretory phenomena in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Arch. Neerland. zool., 15: 237–314.
- 岩田清二 1974. 軟体動物の卵成熟と減数分裂の誘起. 遺伝, 28 (7): 10–16.
- 金谷晴夫 1973. 生殖—無脊椎動物. 海洋動物生理 (内田清一郎編) pp. 171–187. 東大出版会. 菊地省吾・浮 永久 1974a. アワビ属の採卵技術に関する研究 第1報 エゾアワビ *Haliotis discus hannai* INO の性成熟と温度との関係. 東北水研報, 33: 69–78.
- 菊地省吾・浮 永久 1974b. アワビ属の採卵技術に関する研究 第5報 クロアワビ *Haliotis discus REEVE* の性成熟と温度との関係. 同誌, 34: 77–85.
- 小林新二郎 1951. 英虞湾におけるアコヤガイ稚貝発生の豊凶と海況及び気象要因との相関について. 真珠の研究, 2 (1,2): 19–27.
- 小林新二郎・渡部哲光 1959. 真珠の研究. 技報堂.
- 桑谷幸正・西飯 保・和田克彦 1974. 冬季保温飼育されたアコヤガイの成熟. 国立真珠研報 18: 2118–2131.
- Loosanoff, V. L. and H. C. Davis 1950. Conditioning *Venus mercenaria* for spawning in winter and breeding its larvae in laboratory. Biol. Bull., 98: 60–65.
- Loosanoff, V. L. and H. C. Davis 1952. Temperature requirements for maturation of gonads of northern oysters. Biol. Bull., 103: 80–96.

- 三重県水産試験場 1949. 英虞湾における真珠稚貝の天然発生と水温との関係より本年度真珠稚貝の発生を予測す. 真珠養殖関係資料99.
- Mori, K. 1968. Effect of steroid on oyster-I. Activation of respiration in gonad by estradiol-17 β . Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **34** : 915-919.
- Mori, K. 1969. Effect of steroid on oyster-IV. Acceleration of sexual maturation in female *C. gigas* by estradiol-17 β . Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **35** : 1077-1079.
- Price, K. S. and D. Maurer 1971. Holding and spawning delaware bay oysters (*Crassostrea virginica*) out of season. II. Temperature requirement for maturation of gonads. Proc. Natl. Shell. Assoc., **61** : 29-34.
- Sastry, A. N. and N. J. Blake 1971. Regulation of gonads development in the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Biol. Bull., **140** : 274-283.
- 植木東彦・谷口宮三郎 1959. アコヤガイ *Pinctada martensii* (Dunker) の生殖腺に関する研究 III. 避寒漁場における生殖腺及び貝体重の変化. 国立真珠研報, **5** : 424-428.

異なる水温条件下におけるアコヤガイの酸素消費量ならびにアンモニア態窒素排泄量と肉重量との関係*,†

伊 藤 克 彦

国立真珠研究所

内湾の真珠養殖漁場の適切な生産管理を行なううえで、対象生物をめぐる物質の動態を明らかにすることは重要である。そのためには、アコヤガイ、*Pinctada fucata*、の代謝の実態を解明することが必要であるが、代謝量の季節的な動きを測定した例は少ない（宮内、1970、関、1972）。本報告では、1973年から1975年の3か年にわたり、養殖漁場の異なる深さに垂下したアコヤガイの酸素消費量とアンモニア態窒素排泄量の季節的な変化をもとにして、代謝量、肉重量および水温との相互関係について解析した。

報告にさきだち、内容の詳細なご討議を賜った花岡資博士に深謝の意を表す。また、研究遂行にあたり、終始ご助言をいただいた水本三朗技術研究室長、交配員の提供をいただいた和田克彦技官、貝の手入れ、現場の水温と比重の観測をおねがいをした前田ちや子氏に厚くお礼申しあげる。

実験方法

供試貝と試験期間 供試したアコヤガイは天然採苗後養殖した貝（NAT と略記）と人工採苗による集団同系交配貝第3代（ART₃ と略記）である。

Table 1. Pearl oyster and experimental periods

Experimental periods	Materials	remarks
July-December 1973	NAT* 4 years old	unknown
May-December 1974	NAT 3 years old	Ehime
	ART ₃ * 3 years old	Tatokujima, Ago Bay
June-December 1975	NAT 3 years old	Ehime

* NAT indicates the oyster of spat collection in the field, ART₃ the 3rd generation of the combined oyster of spat collection in the laboratory.

* Katsuhiko Itoh. Relations of oxygen consumption and ammonia nitrogen excreted to body size and to water temperature in the adult of pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould). With English Summary, pp. 2273~2275. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 20 : 2254~2275. 1976.

† 国立真珠研究所業績 No. 226 (国立真珠研報 20 : 2254-2275 昭和51年8月)

各年における試験期間と供試貝は Table 1 に示したとおりである。すなわち, 1973年には NAT 4 年貝について 7 月から 12 月までの 6 か月間, 1974 年には NAT 3 年貝と ART₃ 3 年貝について 5 月から 12 月までの 8 か月間, 1975 年には, NAT 3 年貝について 6 月から 12 月までの 7 か月間試験を行った。

試験方法 試験貝は英虞湾多徳島の真珠研究所臨海実験場地先の試験筏から海面下 0.5, 2, および 7 m の各層に垂下した。試験筏を設置した場所の平均水深は 16 m である。

代謝量測定用の供試貝は各個体ごとに標識を付し (各層について, 1973 年 7 個体, 1974 年 30 個体, 1975 年 50 個体), これらの標識個体の中から NAT は 5 個体, ART₃ は 10 個体を選び各年ごとの全試験期間を通して同一個体について代謝量を測定した。なお, 測定用の供試貝が試験期間途中でへい死した場合には, 標識個体の中からへい死したものと全重量が近似している貝を選び補充した。補充した貝の数は, 1973 年の 0.5 m 層の貝で 2 個体, 2 m 層 1 個体, 1974 年の NAT 0.5 m 層の貝で 2 個体, ART₃ 0.5 m 層 1 個体, 2 m 層 3 個体, 7 m 層 2 個体, 1975 年の 0.5 m 層の貝で 4 個体, 2 m 層 2 個体である。

測定用供試貝の湿肉重量と乾燥肉重量は, 別に各層に垂下した貝の 5 ~ 15 個体の全重量, 湿肉重量および乾燥肉重量を測定し, それらの湿肉重量と全重量の比, および乾燥肉重量と湿肉重量の比の平均値から推定した。

付着生物の除去は, 原則として毎月 1 回行った。

代謝量の測定 代謝量の測定に使用した海水は, 臨海実験場横の海面下 2 m から揚水し, 使用前に孔径 100 μ, 50 μ および 5 μ のカートリッジ式濾過器にて懸濁物質を除いたもので

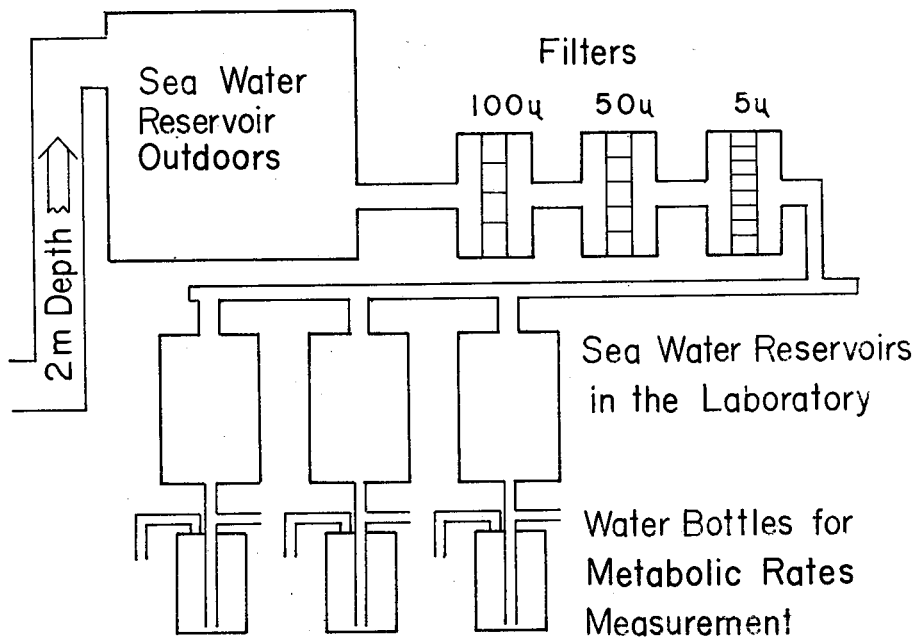


Fig. 1 Schematic diagram of running sea water system for measurement of metabolic rate.

ある。また、供試海水は自然の水温変化にまかせ、とくに温度の調節は行なわなかった。測定容器はアルミ箔または黒色ビニールで遮光した5ℓ広口ガラス瓶で、20ℓ貯水瓶からの連続給水式とした (Fig. 1)。

測定は通水条件とし、その通水量は測定容器から流出する海水の溶存酸素量が流入海水の溶存酸素量の最大10%減少することをめやすにしてスクリュウコックにて調節した (通水量にして16~45 l/hr)。実際の減少量はほぼ5%程度であった。供試貝は測定容器に

Table 2. Relation of oxygen consumption to time in hours after the entrance into water bottle for the metabolic rate measurement. Water temperature: 24.1 °C, Specific gravity (sigma-15): 23.2, Total weight of oyster: 40.2 g.

Time (hrs)	Oxygen consumption ($\mu\text{g atoms / hr / individ}$)
0.5	91.7
1.5	131.4
3.5	158.2
4.5	112.7
20.0	202.1
21.5	202.6
47.0	201.8
49.0	194.4
53.0	200.6
71.0	163.6
73.0	170.3

収容後しばらくは酸素消費量に変動が認められる (Table 2)。4.5 時間から20時間の間の測定が欠除しているが、20時間から53時間目にかけてほぼ安定した酸素消費量を示したことから、供試貝は測定日の前日に試験筏より各層ごとにとりあげ、貝掃除の後測定容器に収容し、18時間以上通水条件下においたのち流入水と流出水の溶存酸素量とアンモニア態窒素量を測定し、次式により酸素消費量 ($\mu\text{g atoms/hr/individ.}$) とアンモニア態窒素排泄量 ($\mu\text{g atoms/hr/individ.}$) を求めた。

$$\text{酸素消費量} = \frac{(\text{流入水中の溶存酸素量}) - (\text{流出水中の溶存酸素量})}{(\text{供試個体数})} \times \text{通水量}$$

$$\text{アンモニア態N排泄量} = \frac{(\text{流出水中のアンモニア態N量}) - (\text{流入水中のアンモニア態N量})}{(\text{供試個体数})} \times \text{通水量}$$

供試貝は、測定後ただちに試験筏の所定の深さにもどした。測定は1か月に2回を基本とした。

溶存酸素量の測定はウィンクラー法 (1/200 規定の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液にて滴定)、アンモニア態窒素量は Solórzano (1969) のフェノールハイポクロライト法によった。

環境の観測 野外環境として、3か年にわたり試験筏設置場所の0, 2, 5 および 7 m 層の水温と比重を毎日測定し、1975年には、これに溶存酸素量を加えた。また、室内における代謝量の測定時には、供試海水の水温、比重および溶存酸素量を測定した。

結 果

供試貝垂下海面の環境 1973年では (Fig. 2), 6月下旬以降, 水温は上昇し, 7月中旬から8月下旬には表面と2 m層で28°Cをこえたが9月以降徐々に低下した。低比重海水 (σ_{15} 19) は9月上旬と11月上旬に出現した。

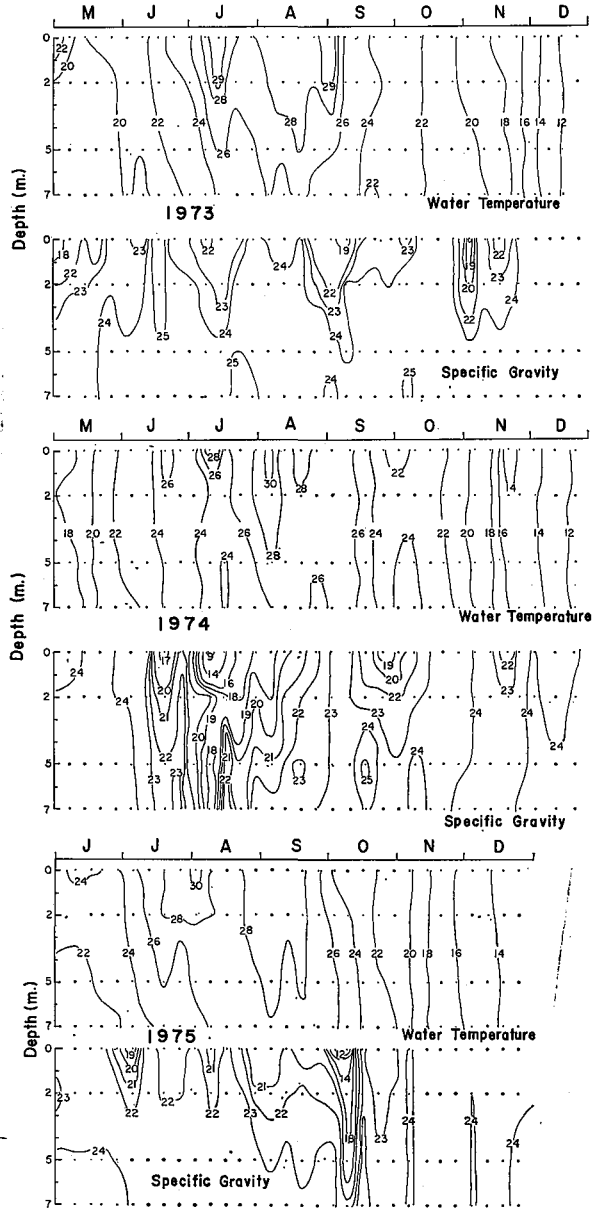


Fig. 2 Seasonal and vertical distributions of water temperature (°C) and specific gravity (sigma-15) in 1973, 1974 and 1975.

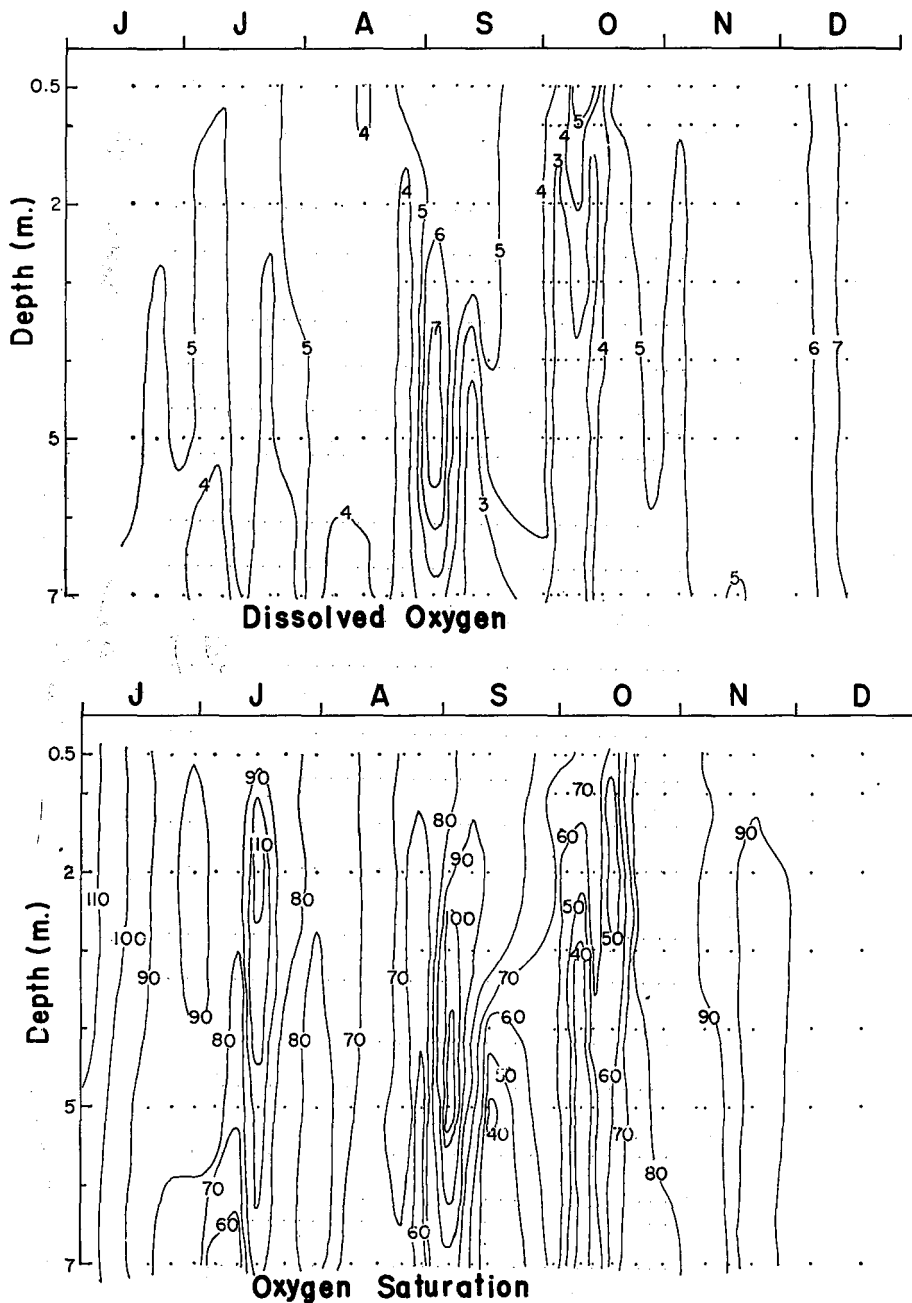


Fig. 3 Seasonal and vertical distributions of dissolved oxygen content (ml/l) and oxygen saturation (%) of sea water in 1975.

1974年には (Fig. 2), 水温は7月中旬に表面で28°Cをこえたが, その後, 24~26°Cで経過し, 7月の下旬より28°C以上の高水温が出現した。9月以降は徐々に低下した。比重については, 6月から7月にかけてきわめて顕著な低比重海水(表面で σ_{15} 9.0, 2 mで16~18, 7 mで18~20)が出現した。この期間の低比重化の傾向は深層までおよび, 8月中旬までの長期にわたった。その後, 低比重海水(σ_{15} 19)を9月末に表層部で観測した。

1975年には (Fig. 2), 水温は7月中旬から9月下旬にかけて2 m層でも28°C以上の値が続いた。低比重海水(σ_{15} 19)は6月末から7月はじめと, 9月末から10月はじめ(σ_{15} 12)にかけて出現した。溶存酸素量は (Fig. 3), 9月はじめに5 m層付近に7 ml/l (飽和度で約110%)以上の量が出現したが, 7 m層は4 ml/l (約60%)以下であった。その後, 10月にかけて深層部から徐々に低酸素化が表われ(7 m層で飽和度50%), 10月はじめには0.5 m層でも4 ml/l以下, 2 m層以下は3 ml/l以下(飽和度40~50%)になった。

代謝量測定時の水温, 比重ならびに酸素飽和度 1973年における代謝量測定時の水温, 比重ならびに酸素飽和度を Fig. 4 に示した。水温は7月中旬から8月末までほぼ28°C前後

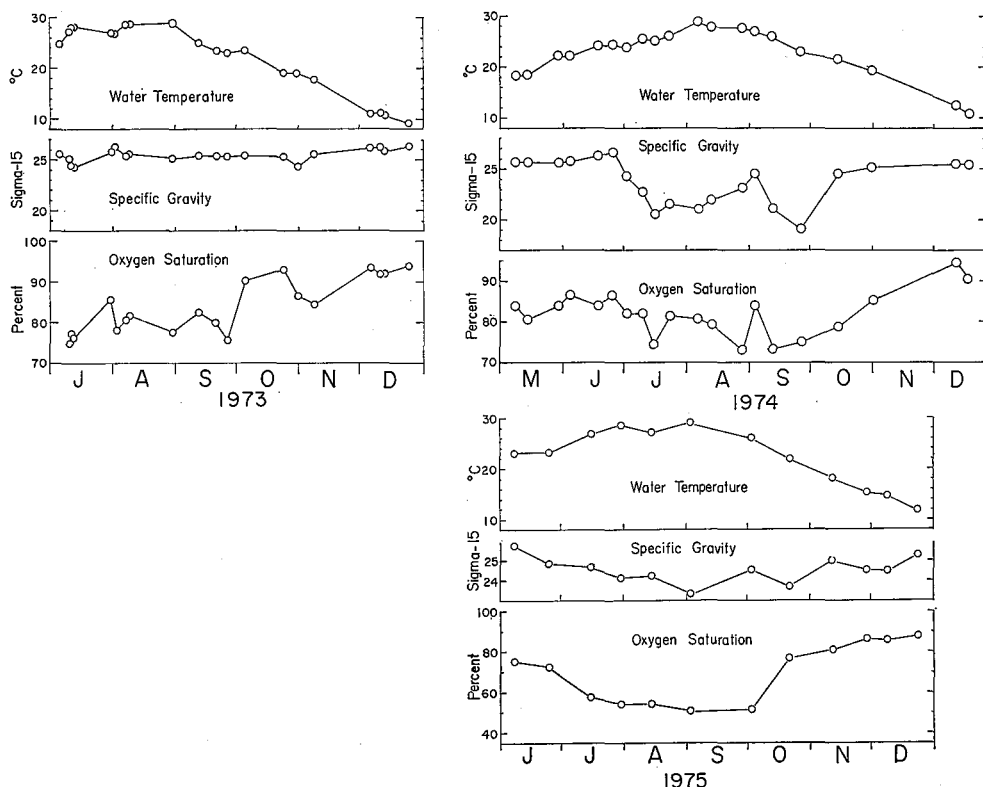


Fig. 4 Seasonal changes of water temperature, specific gravity and oxygen saturation in the experiments of metabolic rate in 1973, 1974 and 1975.

を示し、9月以降徐々に低下した。比重は全ての期間をとおして σ_{15} 25付近の値であった。酸素飽和度は、7月から9月下旬まで75~85%であったが、10月以降85~95%になった。

1974年には (Fig. 4), 水温は5月はじめの18°Cから上昇し、8月はじめに28°C以上になったが、その後低下した。比重は7月中旬から8月上旬にかけ σ_{15} 21前後となり、9月の中・下旬には低比重海水(σ_{15} 19)が出現したが、その他の期間では σ_{15} 24~25の間であった。酸素飽和度は7月中旬、8月下旬ならびに9月中旬に75%以下になったが、その他の時期は80%以上であった。

1975年には (Fig. 4), 水温は6月上旬(23°C)から上昇し、8月末に29°Cに達し、その後下降した。比重は6月中旬(σ_{15} 24.8)から9月のはじめ(σ_{15} 23.3)にかけて低下し、その後、10月に σ_{15} 23になった他は σ_{15} 24~25の間であった。酸素飽和度は6月には70~80%であったが、7月から10月はじめにかけ50%前後になった。10月下旬以降は80%以上になった。

以上のように、供試海水と試験筏設置海面の環境とを比較すると、1973年から1975年までの3か年の供試海水の水温と比重は、ほぼ試験筏海面2 m層の環境の動きにつれて経過していたと言えよう。しかし、1975年のみの観測であるが、供試海水の酸素飽和度は試験貝垂下環境(2 m層)の10~20%低い値(時期的には30%)となっている。

酸素消費量と通水量 貝の酸素消費量と通水量との関係については、Fig. 5に示したごとく、水温26.8°C、平均肉重量12.2 gの貝の酸素消費量は、通水量22~33 l/hrで96~116 $\mu\text{g atoms/hr/individ.}$ 、水温24.3°C、肉重量3.6 gの貝は、通水量16.5~35.5 l/hrで50

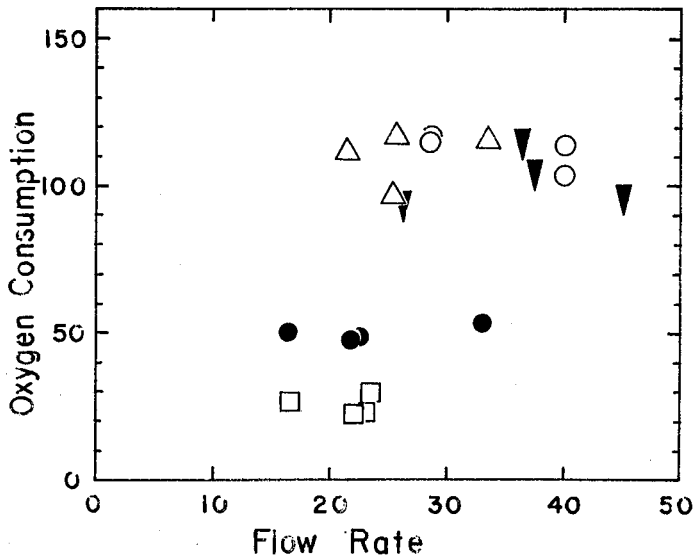


Fig. 5 Relations of oxygen consumption ($\mu\text{g atoms/hr/individ.}$) to flow rate (l/hr).

△: water temperature 26.8°C, wet meat weight 12.2 g. ○: 21.8°C, 18.0 g.

▽: 21.8°C, 15.4 g. ●: 24.3°C, 3.6 g. □: 11.8°C, 15.7 g.

$\mu\text{g atoms}$ 前後となりほぼ一定の値を示している。このことから、実験範囲内の通水量下における酸素消費量は通水量に影響されていないといえる。

酸素消費量の季節変化 1973年におけるアコヤガイの酸素消費量の季節変化を Fig. 6 に示した。0.5, 2 および 7 m に垂下してあった貝の酸素消費量は、8月にもっとも高い値を

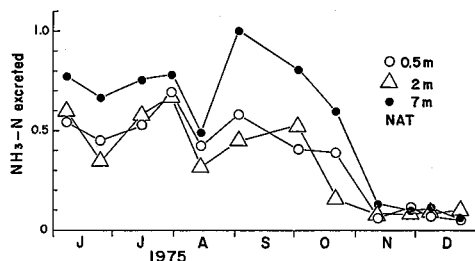
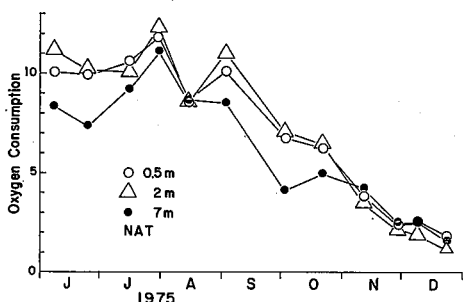
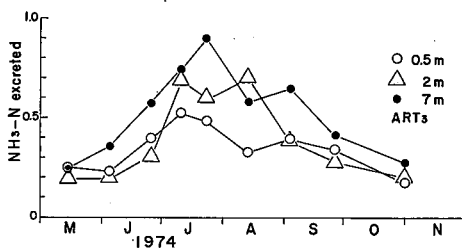
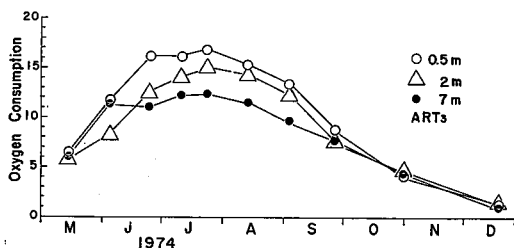
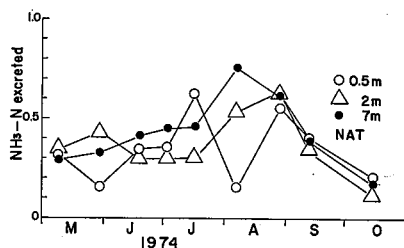
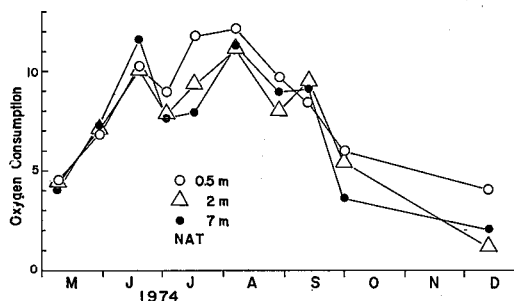
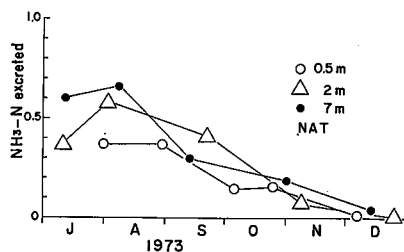
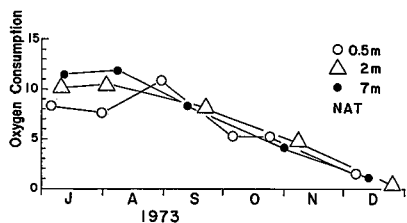


Fig. 6 Seasonal changes of oxygen consumption ($\mu\text{g atoms/hr/g}$ wet weight) of pearl oyster, NAT and ART₃, cultured at 0.5, 2, and 7 meter depths in 1973, 1974 and 1975. Each mark of NAT and ART₃ is followed in Table 1.

Fig. 7 Seasonal changes of ammonia nitrogen excreted of NAT and ART₃ ($\mu\text{g atoms/hr/g}$ wet weight) cultured at 0.5, 2 and 7 meter depths in 1973, 1974 and 1975. Each mark of NAT and ART₃ is followed in Table 1.

しめし（測定容器内の水温 28.3°C, 10~12 $\mu\text{g atoms/hr/g wet weight}$ ）だが、その後、水温の低下につれて減少した。

1974年の場合 (Fig. 6), 各層の NAT はいずれも 5 月から増加しはじめ, 6 月中旬 (24°C, 10~11.6 $\mu\text{g atoms}$), 8 月上旬 (28.4°C, 11.3~12.2 $\mu\text{g atoms}$), 9 月中旬 (22.5°C, 8.4~9.5 $\mu\text{g atoms}$) に酸素消費量のやまを示した。ART₃ の酸素消費量は水温の動きと似た形で変化した。

1975年の場合にも (Fig. 6), 7 月末 (28.4°C, 11.2~12.3 $\mu\text{g atoms}$) と 8 月末 (29°C, 8.5~11.0 $\mu\text{g atoms}$) に高い酸素消費量のやまを認めた。

アンモニア態窒素排泄量の季節変化 アコヤガイのおもな排泄窒素がアンモニア態であることから (関, 1972), 各深さに垂下した貝のアンモニア態窒素排泄量の季節変化を 3 か年にわたり測定した。1973年の場合 (Fig. 7), 各層とも 8 月はじめにたかい排泄量 (測定容器内の水温 28.3°C, 0.37~0.66 $\mu\text{g atoms/hr/g wet weight}$) を示したが、その後排泄量は減少した。

1974年の NAT の排泄窒素量の動きは (Fig. 7), 2 m と 7 m の貝はともに 8 月にたかい値 (28.4°C, 0.63~0.76 $\mu\text{g atoms}$) を示したのに対し, 0.5 m の貝に異常に低い値を認めたが, その理由は明らかではない。8 月下旬以降, 排泄窒素量は減少した。ART₃ の場合, 7 月はじめから中旬頃にかけてたかい排泄量を認めた (26~28°C, 0.52~0.90 $\mu\text{g atoms}$)。

1975年の場合 (Fig. 7), 排泄量は 7 月末にたかい値 (28.2°C, 0.76~0.78 $\mu\text{g atoms}$) を示し, その後減少したが, 9 月はじめにふたたびたかい値を 7 m の貝で示した (29°C, 1.0 $\mu\text{g atoms}$)。

代謝量測定用の供試貝とその他の標識貝との成長量の比較 代謝量の測定には, 実験期間をとおしてできるだけ同一個体を使用した, 測定用供試貝の成長とその他の標識貝の成長との違いを 1974年と 1975年について検討した。実験開始時と終了時における全重量の比を両者で比較すると, 1974年の NAT では, 代謝量測定用の貝はその他のものの約 98%, ART₃ では約 97%, 1975年の NAT では 97% であった。このことは, 代謝量測定用の貝の成長量がその他のものにくらべて年間成長量で約 2~3% ほど少なかったことを示している。この程度の成長量の違いが両者の貝の代謝に質的な相違をおこすほどの影響をおよぼすかいはあきらかではなく, 今後, 検討すべきものであろう。

酸素消費量, 肉重量および水温との関係 1973年から 1975年の 3 か年間のアコヤガイの酸素消費量の測定結果から, 測定回数の多い水温条件 (T) での貝の酸素消費量 (R) と肉重量 (W) の資料をもとに $R \cdot W \cdot T$ の関係をもとめた。

酸素消費量と体重との関係は

$$R = a W^b \quad (1)$$

で表わされる。ここで, R は単位時間あたりの酸素消費量, W は肉重量, a および b は定数である。

測定結果から, 水温 28.0, 23.3, 19.5, 15.0 および 10.8°C の各温度下における肉重量と酸素消費量との関係を式 (1) に従ってもとめ, Fig. 8, Table 3 を得た。定数 "b" は水

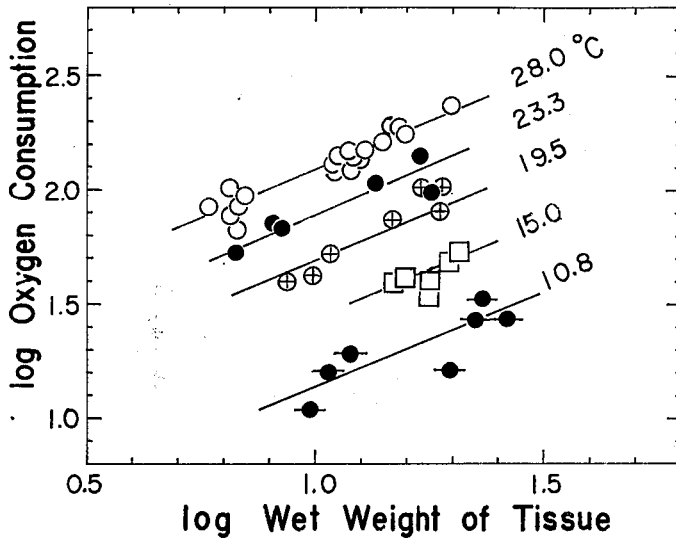


Fig. 8 Relationships between oxygen consumption ($\mu\text{g atoms/hr/individ}$) and wet weight of tissue (g/individ) under the different water temperatures in the adult of pearl oyster.

Table 3. Regression equations of oxygen consumption (R: $\mu\text{g atoms/hr/individ}$) on weight of tissue (W: g/individ) in the adult of pearl oyster under the different water temperatures ($^{\circ}\text{C}$).

Water temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Weight of tissue	
	Wet weight	Dry weight
28.0 (27.3–28.5)	$\log R=0.857 \log W+1.232$	$\log R'=0.941 \log W'+1.907$
23.3 (22.5–23.4)	$\log R=0.857 \log W+1.032$	$\log R'=0.941 \log W'+1.732$
19.5 (19.0–20.0)	$\log R=0.857 \log W+0.834$	$\log R'=0.941 \log W'+1.553$
15.0 (14.7–15.3)	$\log R=0.857 \log W+0.543$	$\log R'=0.941 \log W'+1.166$
10.8 (10.2–11.5)	$\log R=0.857 \log W+0.277$	$\log R'=0.941 \log W'+0.890$

温の変化に関係なく一定値をとるが, 定数 "a" は変化し, その対数值 "log a" と水温の対数值 "log T" との間には (Fig. 9)

$$\log a = 2.217 \log T - 2.023$$

の関係が認められた。したがって, アコヤガイの1個体, 単位時間あたりの酸素消費量 (R: $\mu\text{g atoms/hr/individ}$), 湿肉重量(W: g), 水温 (T: $^{\circ}\text{C}$) との間には

$$\log R = 2.217 \log T - 2.023 + 0.857 \log W \quad (2)$$

すなわち

$$R = 0.00948 T^{2.217} W^{0.857}$$

の関係が存在する。

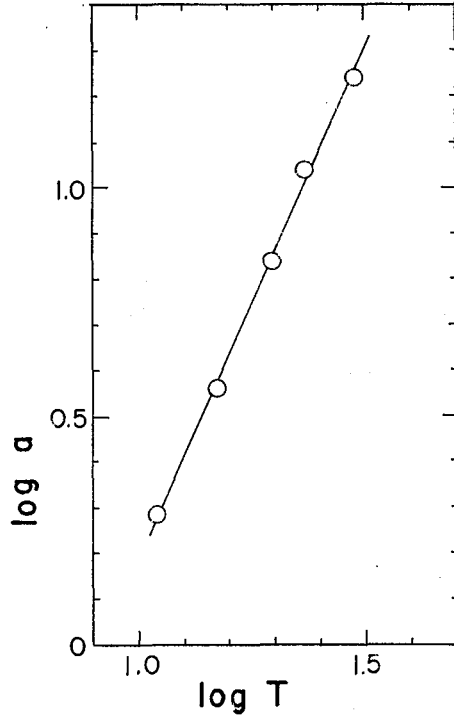


Fig. 9 Relation of log a to log water temperature.

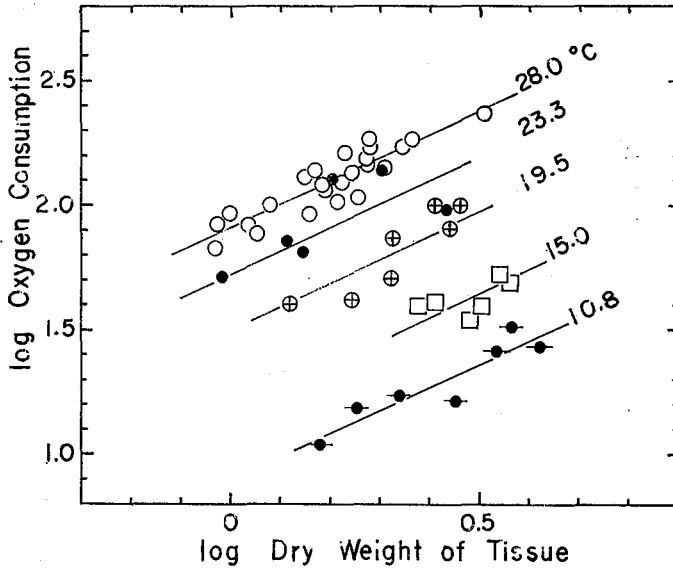


Fig. 10 Relationships between oxygen consumption ($\mu\text{g atoms/hr/individ}$) and dry weight of tissue (g/individ).

同様に, 乾燥肉重量 (W') と酸素消費量 (R') と水温との関係は (Fig. 10, 11, Table 3)

$$\log R' = 2.636 \log T - 1.899 + 0.941 \log W'$$

$$R' = 0.0126 T^{2.636} W'^{0.941}$$

で表わされる。

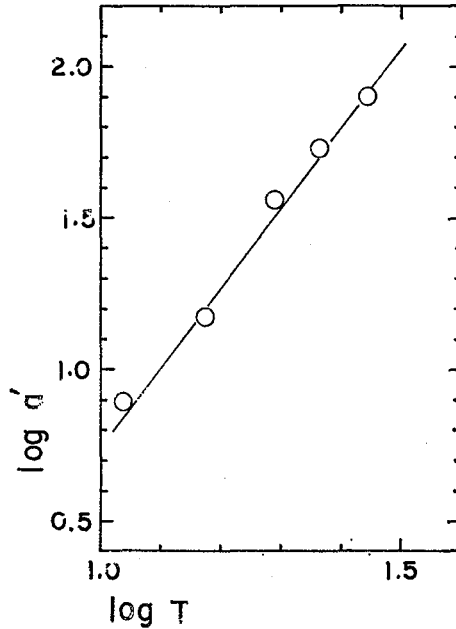


Fig. 11 Relation of $\log a'$ to \log water temperature.

排泄窒素量, 肉重量および水温との関係 排泄窒素量と肉重量との関係を各水温条件下にてもとめた (Fig. 12, 13, Table 4)。図および表にしめたように, 排泄窒素量 (E : $\mu\text{g atoms/hr/individ.}$), 湿肉重量 (W : g) ならびに水温 (T : $^{\circ}\text{C}$) との間には,

Table 4. Regression equations of ammonia nitrogen excreted (E : $\mu\text{g atoms/hr/individ}$) on weight of tissue (W : g/individ) in the adult of pearl oyster under the different water temperatures ($^{\circ}\text{C}$).

Water temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Weight of tissue	
	Wet weight	Dry weight
28.5 (28.0-29.1)	$\log E = 0.941 \log W - 0.149$	$\log E' = 0.912 \log W' + 0.611$
24.0 (23.6-24.5)	$\log E = 0.941 \log W - 0.400$	$\log E' = 0.912 \log W' + 0.358$
19.5 (19.0-20.0)	$\log E = 0.941 \log W - 0.578$	$\log E' = 0.912 \log W' + 0.158$
15.0 (14.7-15.3)	$\log E = 0.941 \log W - 0.947$	$\log E' = 0.912 \log W' - 0.205$
11.0 (10.8-11.4)	$\log E = 0.941 \log W - 1.123$	$\log E' = 0.912 \log W' - 0.676$

$$\log E = 0.941 \log W + \log k$$

$$\log k = -3.706 + 2.428 \log T$$

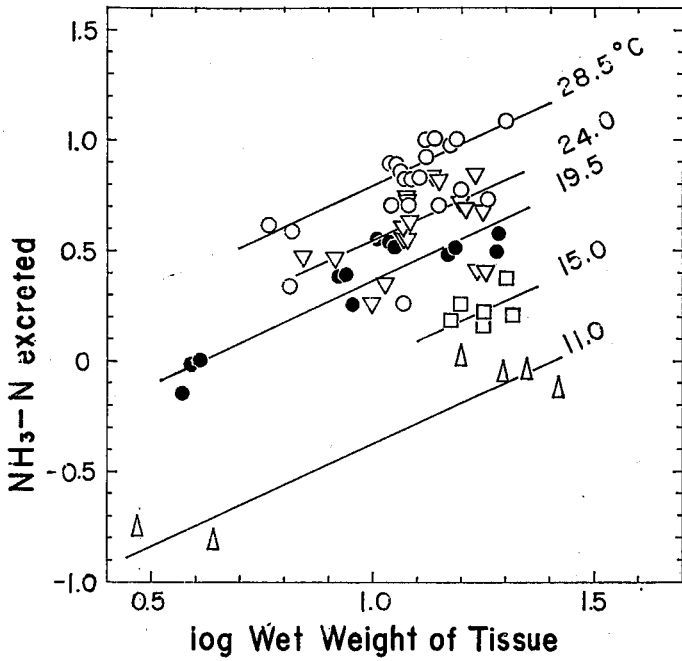


Fig. 12 Relationships between ammonia nitrogen excreted ($\mu\text{g atoms/hr/individ}$) and wet weight of tissue (g/individ) under the different water temperatures in the adult.

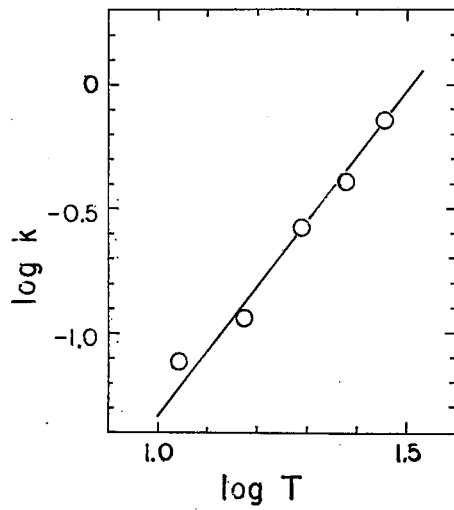


Fig. 13 Relation of log k to log water temperature.

すなわち

$$\log E = 2.428 \log T - 3.706 + 0.941 \log W \quad (3)$$

$$E = 0.000197 T^{2.428} W^{0.941}$$

の関係が存在した。

また, 乾燥肉重量 (W') と排泄窒素量 (E') と水温との関係は (Fig. 14, 15, Table 4)

$$\log E' = 3.000 \log T - 3.770 + 0.912 \log W'$$

$$E' = 0.000170 T^{3.000} W'^{0.912}$$

で表わされる。

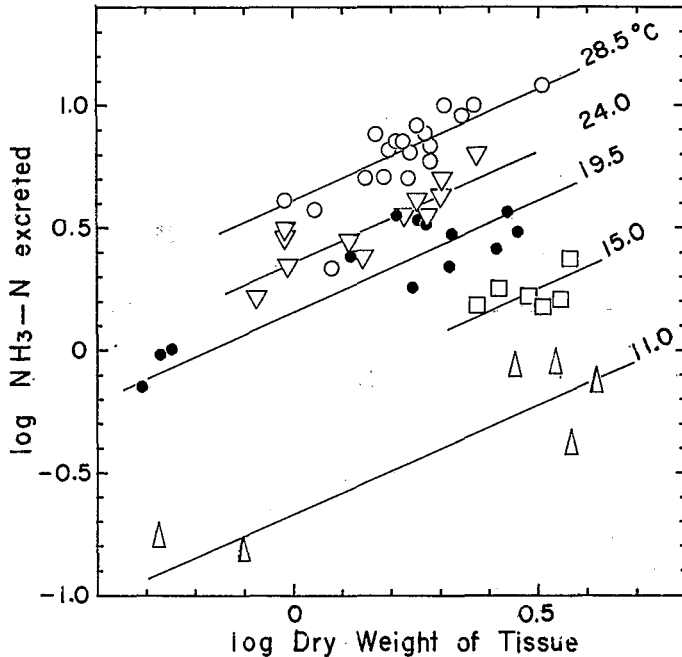


Fig. 14 Relationships between ammonia nitrogen excreted ($\mu\text{g atoms/hr/individ}$) and dry weight of tissue (g/individ) under the different water temperatures.

考 察

本実験における通水条件下でのアコヤガイの酸素消費量がいかなる代謝状態を表わしていたかが問題となる。 *Littorina littorea*, *Mytilus edulis*, *Patella vulgata* などの酸素消費量と貝の活動状態との関連から, 潮間帯に生息する貝類には餌料条件に関係なく活動時と標準時の酸素消費レベルが存在し, 活動時の代謝量は温度の変化にたいし著しく変動す

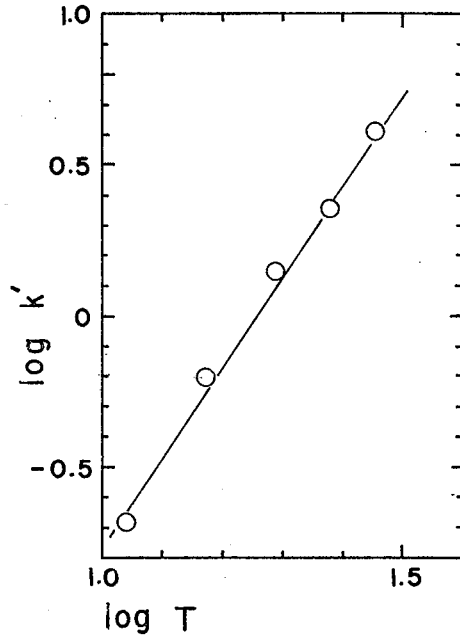


Fig. 15 Relation of log K' to log water temperature.

るのたいし、標準時のものはその変動が著しく小さいという指摘がある (Newell and Pye. 1970 a, b; 1971 a, b; Davies. 1966, '67)。それにたいし、カニの一種 *Carcinus maenas* と貝類の *Patella vulgata* について、標準時においても代謝量は温度に左右され、活動時の場合と似た変化をするという報告もある (Davies and Tribe. 1969)。また、Bayne (1973) は、酸素消費量に3つのレベルがあり、それらは標準時のもの、定常時のものおよび活動時のものであり、動物が維持エネルギー要求量以上の摂餌をすれば定常時の代謝となり、それ以下では30日から40日で標準時のレベルにさがるのとべている。貝類の酸素消費量についてこのような見解はあるが、代謝量と称するなかには活動時のものと標準時のものが存在することは十分に考えられる。さて、ここで測定したアコヤガイの代謝量は通水条件下での測定であり、活動時と標準時とを分けて測ることはできなかったが、無給餌条件下での測定であることから本実験でもとめた代謝量は、おそらく、Bayneの指摘した定常時の代謝を示していたものといえよう。

貝はそのおかれた環境にたいし可能なかぎり代謝を調整して生活していると考えられることから、どのような条件下における貝の代謝量が基準的なものかをきめることはむづかしい。そこで、ここでは、異った環境、すなわち0.5, 2, および7 mの各深さに垂下した貝の代謝量を季節的な環境変化(ここでは水温, 比重, 溶存酸素量)の状態のもとで測定し、それらの貝の代謝量と肉重量との関係を各水温条件下にてもとめて、それらの関係を各水温条件下における通常の平均的な貝の代謝量とみなした。

関 (1972) は25ℓ容器を使い止水式によってアコヤガイ(満3年貝)の酸素消費量とア

ンモニア態窒素排泄量を季節的な水温変化のもとで測定した。いま、関による代謝量測定時の水温と湿肉重量とから、式(2)と(3)にしたがい試算値をもとめて、それらの値と実測値とを比較した。その結果、5月の測定時の平均水温19.5℃, 平均湿肉重量9.2gでは、実測値と試算値との比は酸素消費量で1.63~1.75, アンモニア態窒素排泄量で0.83, 8月の水温28.1℃, 肉重量13.0gではそれぞれ0.83~1.01と0.95, 10月の水温20.0℃, 肉重量15.4gでは1.06~1.13と0.88, 11月下旬から12月上旬の水温13.1℃, 肉重量16.4gでは1.15~1.10と1.10となり、5月の測定結果を除けば式(2)と(3)は実測値とよく一致する。

式(2)と(3)に示したように、アコヤガイの代謝量は肉重量と水温とに相互関係があり、式(1)の係数“b”は一定値をとる。この点について、Ikeda (1974)は熱帯, 亜熱帯, 温帯ならびに寒帯海域の各種動物プランクトン群の酸素消費量を生息水温にちかい温度条件下でもとめた結果、定数“b”は寒帯域のものが大きく、熱帯域にむかうにつれて小さくなり、“b”と“a”とはともに水温と相関をもつことを指摘した。また、*Talorchestia* や *Emerita* について、室内において各種温度下にてもとめた R·W·T の関係では、水温が高くなるほど“b”は大きくなった (Newell. 1970)。

動物の R·W·T の関係をもとめるために、多くは、ある温度下で生活していた動物をつかい、実際に生息していた環境水温を考慮せずに各種温度に対する代謝量を測定している (植本. 1968)。したがって、水温にたいする動物の代謝反応に著しい違いを生ずるといふ指摘 (Newell and Pye. 1970 a) があるように、短期間で水温を人為的に制御した条件下でもとめた R·W·T の関係は動物の生活代謝の実態を把握するうえで十分ではない。

動物の代謝活動にたいする温度作用の大きさを検討するには、一般に温度係数 (Q_{10}) が用いられる。温度係数は次式によりあたえられる

$$Q_{10} = \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^{\frac{10}{t_2 - t_1}} \quad (4)$$

ここで R_1 と R_2 は温度 t_1 , t_2 の時の反応速度を表わす。

植本 (1968) は室内条件下にて13℃から33℃までの任意の水温下でのアコヤガイの酸素消費量をもとめ、各水温間での Q_{10} 値を検討し、 Q_{10} 値は温度の上昇にともない高くなるが、33℃をこえると低下することを指摘した。しかし、環境温度に十分な代謝調整をして生活している動物では、 Q_{10} 値の温度にともなう正規の形は、低い温度ほど Q_{10} 値は高く、温度の上昇につれて低くなるという (Davies. 1966; Davies and Tribe. 1969)。いま、式(2)と(3)から、酸素消費量と排泄窒素量について Q_{10} 値を各温度下で試算した (Table 5)。アコヤガイの生活適水温といわれる16℃から28℃の間の Q_{10} 値は酸素消費量で2.8, 排泄窒素量で3.1になる。さらに詳しくは、低水温になるほど Q_{10} 値は高くなり、とくに、アコヤガイの生活適水温の下限としての10℃~14℃の間ではそれぞれ、6.4と7.7を示す。ただし、水温が30℃をこえても式(2)と(3)に代謝量がしたがう限りでは Q_{10} 値は小さくなりつづけることになるが、この貝の生活水温の上限はほぼ30℃と考えられることから、それ以上の水温では式(2)と(3)は不適当になるであろう。また、植

Table 5. Temperature coefficients (Q_{10}) for the metabolic rate estimated from equations (2) and (3).

Water temperature (°C)	10-14	14-18	18-22	22-26	26-30	16-28
Q_{10} (O_2)	6.4	4.0	3.0	2.5	2.2	2.8
Q_{10} (NH_3-N)	7.7	4.6	3.4	2.7	2.4	3.1
Uemoto (1968)	(13-15)	(15-18)	(18-21)	(21-24)	(24-27)	(27-30)
Q_{10} (O_2)	1.8	1.9	2.2	2.0	2.8	4.2

本による各温度における Q_{10} 値の傾向との違いについては、室内にて代謝量を測定した際の水温にたいする貝の代謝調整に関係するものと考えられるが、この点については、今後、さらに検討する必要がある。いづれにせよ、式(1)の定数“b”が一定値をとることに問題はなからう。

個々の代謝量の測定時における水温と湿肉重量をもとに式(2)と(3)より試算した酸素消費量と排泄窒素量をそれらの実測値と比較し、その比の季節変化について検討した。

各々の酸素消費の実測値 (R_m) と計算値 (R_c) との比 (R_m/R_c) の季節変化を Fig. 16 に示した。図に示したように、1973年には R_m/R_c 比に大きな変化は認められない。1974年と1975年では、6月から7月にかけて R_m が R_c をおおきくうまわっている。一方、1975年の9月から10月には逆に R_c が R_m をこえている。

アコヤガイの生殖巣の成熟度指標としての閉殻筋、外套膜、鰓その他を除去した主要内臓塊重量 (I.W) と全肉重量 (M.W) との比 (I.W/M.W) の季節変化から (Fig. 17)、1973年は7月はじめにはすでに生殖巣の成熟はおわっていたが、1974年の NAT と ART₃ の生殖巣の成熟期は6月から7月下旬、1975年では6月から7月はじめまでと推定されるので、両年の R_m/R_c 比について6月から7月に認められる現象はアコヤガイの生殖巣の急速な成熟がおこる時期と一致する。したがって、その時期には性成熟の過程で代謝が活発化していたことが考えられる。また、1975年の9月から10月の R_m/R_c 比の動きは、Fig. 16に示したように試験海面の溶存酸素濃度が著しく減少していた時期(0.5mと2mで酸素飽和度50~70%、7mで30%)と一致すること、とくに7m層の貝でこの比が小さくなること、環境水中の溶存酸素量が1.5~1.0 ml/l 以下になるとアコヤガイの酸素消費量が低下すること(宮内・入江・1966; 宮内・1970)、酸素消費量と環境の溶存酸素量との間に正の相関があるという沢野の指摘(宮内・入江・1966より引用)、多毛類 (*Abarenicola pacifica* と *Lumbrineris zonata*) にかんする環境の酸素飽和度とそれらの酸素消費量との間に相互関係が存在するという指摘 (May, 1972) などから、長期にわたる環境の低酸素濃度条件にたいするアコヤガイの一種の代謝調整によるものと考えられる。この6月から7月と9月から10月の例を除けば R_m/R_c 比はほぼ1をはきんで分布する。

排泄窒素量の個々の実測値 (E_m) と計算値 (E_c) との比 (E_m/E_c) の季節変化を Fig. 16 にしめた。酸素消費量にくらべこの比は全体的に変動がはげしいが、1974、1975両年の6月から7月と1975年の9月から10月の時期を除けばほぼ1を中心とした分布を示す。6月から7月の生殖巣の成熟期には E_m が E_c より高くなっている。9月から10月には酸素

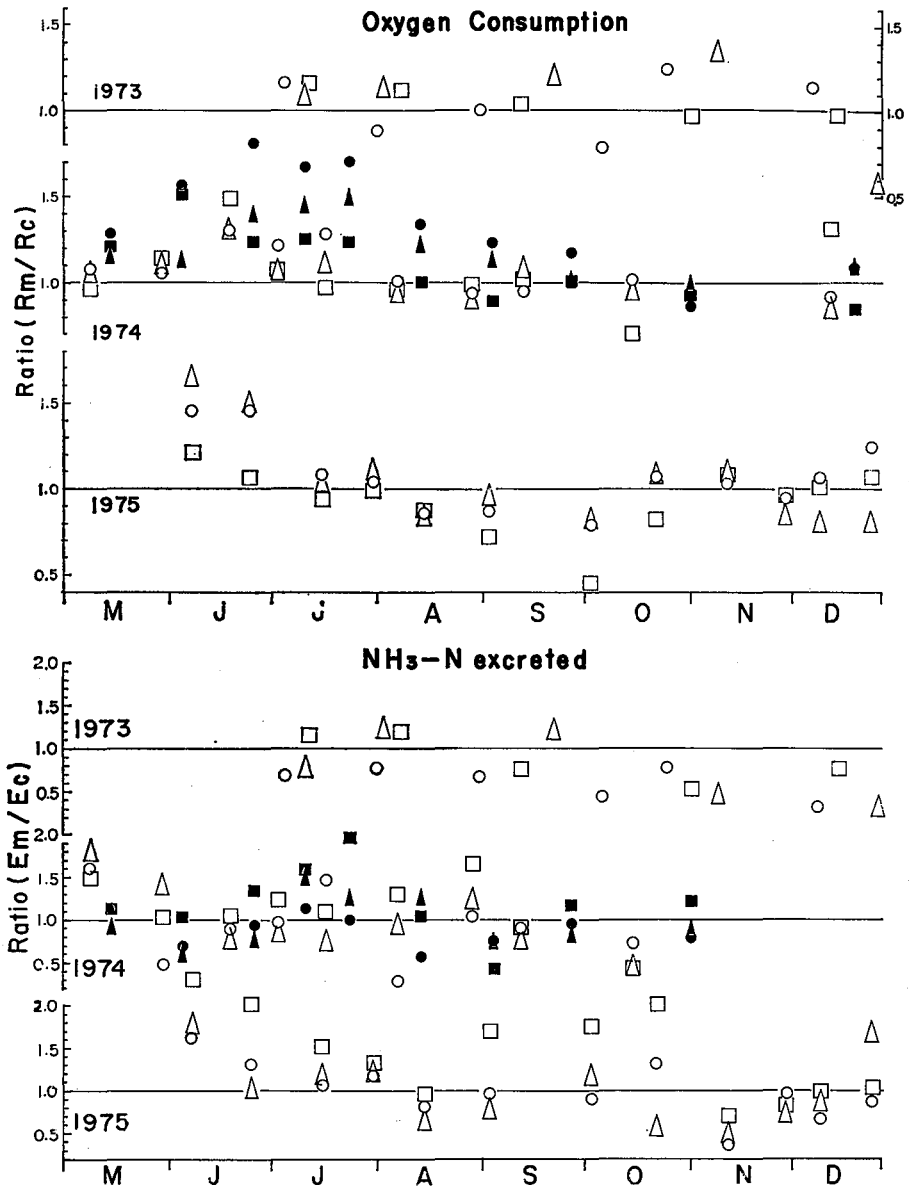


Fig. 16 Comparison of each actual measurement of oxygen consumption (R_m) and ammonia nitrogen excreted (E_m) with the estimations (R_c and E_c) from equations (2) and (3) on the water temperature and meat weight at each experiment.

○: 0.5 meter NAT, △: 2 meter NAT, □: 7 meter NAT, ●: 0.5 meter ART₃, ▲: 2 meter ART₃, ■: 7 meter ART₃.

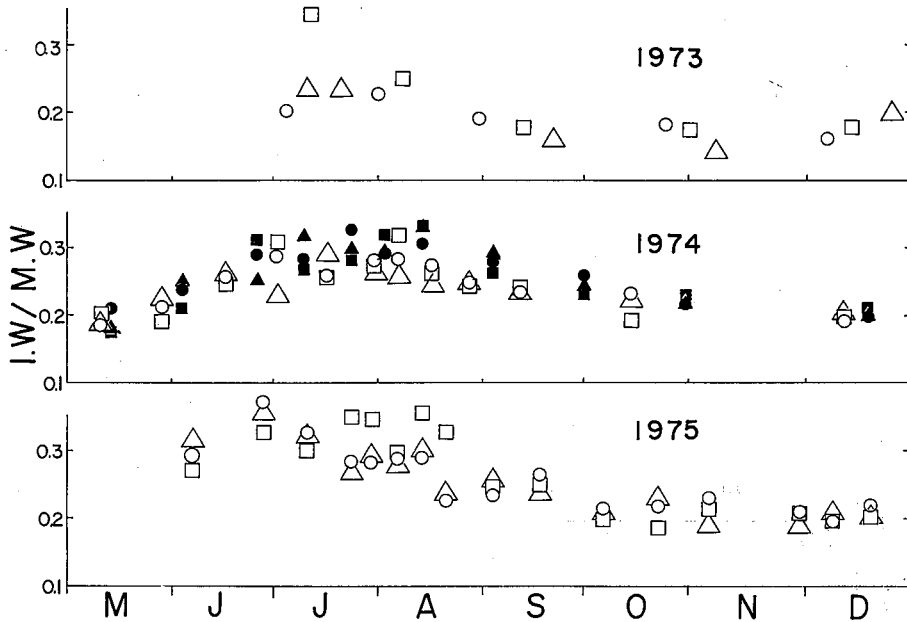


Fig. 17 Seasonal variations on the ratio, (I.W./M.W.), wet weight of internal organs (I.W) without gill, mantle and adductor muscle etc. to total wet weight of tissue (M.W) of pearl oysters cultured at each depth in 1973, 1974 and 1975. Each mark is followed in Fig. 16.

消費量とは逆に 7 m 層の貝の E_m が E_o を著しくうわまわっている。このことは、環境の低酸素化と関連があるかもしれない。

垂下養殖深度の違いは、貝の代謝量の実測値と計算値との比に明らかにあらわれている。すなわち、酸素消費量と排泄窒素量は、0.5 m と 2 m 層に垂下した貝の間にはそれほどの違いはないが、7 m 層の貝とは 1974, 1975 の両年で 10 月まで差が認められ、7 m 層の貝の酸素消費量は他 2 層のものより少なく、排泄窒素量は逆に多い傾向を示した。垂下層の違いによるこれらの代謝量の相違については、垂下養殖深度層の環境条件の特徴と関連づけ今後検討すべき問題である。

以上の論議から、環境の季節的な水温変化にともなうアコヤガイの代謝量の動態を把握するうえで、この代謝量・肉重量・水温の関係は急速な生殖巣の成熟期と長期にわたる低酸素化のような環境異常の時期以外のアコヤガイの代謝の実態をあらわしていると結論づけられる。

要 約

(1) 天然採苗後に養殖したアコヤガイ (NAT) と集団同系交配貝の第 3 代 (ART_3), *Pinctada fucata*, を 0.5, 2 および 7 m 層に垂下養殖し、それらの中の特定期間について年間を通して酸素消費量とアンモニア態窒素排泄量を測定した。1973 年から 1975 年にわた

る代謝量の測定値をもとに, 代謝量, 肉重量および水温との相互関係について解析した。

(2) 試験漁場の環境として, 水温と比重を0, 2, 5および7 mにつき毎日観測した。1975年にはこれに溶存酸素量を加えた。

(3) 水温と比重は0.5 m層で年間をとおしてもっとも変動が著しく, 7 m層の変動はゆるやかであった。1975年の9月から10月にかけて全層が低酸素化し, とくに, 7 m層に3 ml/l以下の低酸素水が出現した。

(4) 代謝量測定用の海水は水深2 m層より揚水し, 使用直前に濾過器にて懸濁物質を除去した。測定は通水条件でおこない, 水温は自然の変化にまかせ, とくに調節は行なわなかった。

(5) 代謝量は水温の季節的な変化にともない変動した。

(6) 酸素消費量 (R: $\mu\text{g atoms/hr/individ.}$), 湿肉重量 (W: g/individ.) および水温 (T: $^{\circ}\text{C}$) との間には, 成体で

$$\log R = 2.217 \log T - 2.023 + 0.857 \log W$$

アンモニア態窒素排泄量 (E: $\mu\text{g atoms/hr/individ.}$) と W と T との間には

$$\log E = 2.428 \log T - 3.706 + 0.941 \log W$$

の関係が認められた。

(7) 水温にともなう温度係数 (Q_{10}) は低水温時ほど高く, 水温の上昇につれ低くなった。

(8) 代謝量測定時の貝肉重量と水温をもとに式(2)と(3)から代謝量の計算値をもとめ, 実測値と比較した。1974, 1975両年とも6月から7月の生殖巣の急速な成熟期に実測値は計算値を著しくうまわった。

(9) 長期にわたる環境の低酸素条件下におかれた貝の酸素消費量の实測値は計算値よりも低く, 排泄窒素量は計算値よりも高かった。

(10) 養殖深度の違いにより貝の代謝量に差がみとめられた。酸素消費量は0.5 mと2 mの貝が7 mのものより時期的に高くなり, 排泄窒素量は7 mのものが他の2層の貝より高い値をしめした。

(11) 式(2)と(3)にしめした代謝量, 肉重量および水温との関係は, 急速な生殖巣の成熟期と長期にわたる低酸素化のような著しい環境異常の時期以外のアコヤガイの代謝の実態をあらわしているといえる。

Summary

Seasonal variations in the oxygen consumption and ammonia nitrogen excreted of pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould), cultured under the conditions of 0.5, 2 and 7 meter depths were determined from 1973 to 1975. One of these pearl oysters in this experiment were ones which cultured at the nursery ground after the spat collection in the field (NAT), the others were 3rd generation of the combined oysters which were collected in the laboratory (ART₃).

Relations of the oxygen consumption and the ammonia nitrogen excreted to the

weight of tissue under the different water temperatures were analysed, based on the seasonal variations in these metabolic rates.

Some of the marked animals of NAT (5 animals) and of ART₃ (10 animals) at each cultured layer were used for the determinations on the metabolic rate. The weight of tissue of them was estimated from the ratio, meat weight to total weight of other animals cultured at each depths.

Water temperature and specific gravity of sea water at 15°C were regularly observed at 0, 2, 5 and 7 meter depths (Fig. 2). Seasonal and temporal variations in water temperature and specific gravity were very remarkable at 0.5 meter depth, intermediate at 2 meter and relatively stable at 7 meter.

Sea water which was used to determined the metabolic rate was pumped up from 2 meter depth and filtered through the cartridge filters with 100, 50 and 5 μ pore size. The metabolic rates were determined under the conditions of running water and the seasonal changes of water temperature. It is probable that the metabolic rate shows the routine level. The metabolic rate seasonally changed with water temperature (Fig. 6 and 7).

Relationships between the metabolic rate, wet weight of tissue, and water temperature in the adult, are following (Fig. 8, 9, 12 and 13) ;

$$\log R = 2.217 \log T - 2.203 + 0.857 \log W$$

$$R = 0.00948 T^{2.217} W^{0.857}$$

$$\log E = 2.428 \log T - 3.706 + 0.941 \log W$$

$$E = 0.000197 T^{2.428} W^{0.941}$$

where R and E indicate the oxygen consumption (μ g atoms/hr/individ) and the ammonia nitrogen excreted (μ g atoms/hr/individ), W and T respectively wet weight of tissue (g/individ) and water temperature (°C).

Temperature coefficient (Q_{10}) of the oxygen uptake and nitrogen excretion by the pearl oyster between 10 and 28°C indicates the normal pattern that it is high at low temperature, and becomes lower with the increase of the temperature (Table 5).

On the basis of the comparisons of each measurement of the metabolic rates with the estimation from equations (2) and (3) on the water temperature and the meat weight at each measurement, both of oxygen uptake and nitrogen excretion of pearl oyster cultured at each depth at June to July in 1974 and 1975 are higher than the metabolic rates in the other seasons (Fig. 16). These months are corresponded to the maturing season of gonad (Fig. 17). The oxygen consumption of 7 meter depth oyster at September to October in 1975 is lower than the usual value, while the excretory nitrogen is higher. It is probable that these phenomena result

from the decrease of oxygen content in the field for a long time.

It is concluded that these relationships reflect the real metabolic rate of pearl oyster in the field conditions without the maturing season of gonad and the abnormal conditions such as the remarkable decrease of oxygen content for a long time.

文 献

- Bayne, B. L. 1973. Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. J. mar. biol. Ass. U. K., 53: 39-58.
- Davies, P. S. 1966. Physiological ecology of *Patella*. I. The effect of body size and temperature on metabolic rate. *ibid.* 46: 647-658.
- . 1967. Physiological ecology of *Patella*. II. Effect of environmental acclimation of the metabolic rate. *ibid.* 47: 61-74.
- and M. A. Tribe, 1969. Temperature dependence of metabolic rate in animals. *Nature*, 224: 723-724.
- Ikeda, T. 1974. Nutritional ecology of marine zooplankton. Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 22: 1-97.
- May, D. R. 1972. The effects of oxygen concentration and anoxia on respiration of *Abarenicola pacifica* and *Lumbrineris zonata* (Polychaeta). *Biol. Bull.*, 142: 71-83.
- 宮内徹夫 1970. アコヤガイの活力判定法に関する研究, 特に活力指標としての貝殻運動と貝殻形成について. 真珠技術研究会報 9: 1-221.
- 宮内徹夫・入江春彦 1966. 低圧酸素海水中におけるアコヤガイの酸素消費量と貝殻運動. 長大水産研報, 21: 139-144.
- Newell, R. C. 1970. Biology of intertidal animals. pp. 555. Elek, London.
- and V. I. Pye, 1970a. Seasonal changes in the effect of temperature on the consumption of the winkle *Littorina littorea* (L.) and the mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 34: 367-383.
- . 1970b. The influence of thermal acclimation on the relation between oxygen consumption and temperature in *Littorina littorea* (L.) and *Mytilus edulis* L. *ibid.* 34: 385-397.
- . 1971a. Quantitative aspects of the relationship between metabolism and temperature in the winkle *Littorina littorea* (L.). *ibid.* Ser B, 38: 635-650.
- . 1971b. Variations in the relationship between oxygen consumption, body size and summated tissue metabolism in the winkle *Littorina littorea* (L.). *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 51: 315-338.
- 関 政夫 1972. 養殖環境におけるアコヤガイ, *Pinctada fucata*, の成長および真珠品質に影響を及ぼす自然要因に関する研究. 三重県水試研報, 1: 32-149.
- Solórzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural water by the Phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, 14: 799-801.
- 植本東彦 1968. アコヤガイの酸素消費量と水温との関係について. 国立真珠研報, 13: 1617-1623.

アコヤガイ *Pinctada fucata* (GOULD)

2 地方型の染色体の数と概形

和田 克彦

(国立真珠研究所)

Number and Gross Morphology of Chromosomes
in the Pearl Oyster, *Pinctada fucata* (GOULD),
Collected from Two Regions of Japan*

Katsuhiko WADA

(National Pearl Research Laboratory, Kashikojima, Mie, Japan)

(挿図 Text-figs. 1-5)

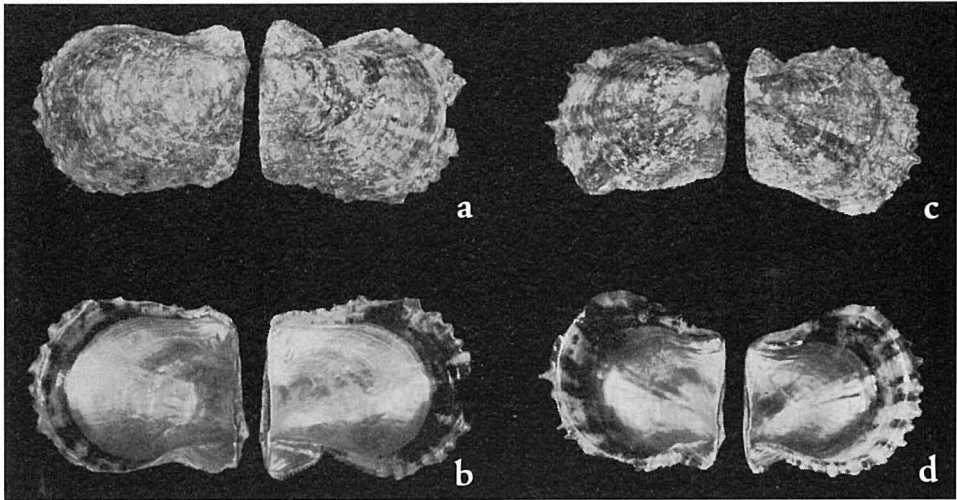
Abstract

The number and gross morphology of chromosomes in the pearl oyster, *Pinctada fucata* (GOULD), collected from two regions of Japan, Koshiki Island and Ago Bay, are reported. Eggs were prepared using the aceto-orcein squash method. Fourteen bivalents during meiosis and 28 chromosomes during mitosis were observed in the just fertilized or cleaving eggs. About four pairs may be classified as subtelocentrics and the others as meta- or submetacentrics in the tentative arrangements of colchicine-metaphase mitotic chromosomes. Though no difference in the chromosome number was observed between samples from the two local regions, it was impossible to determine whether or not differences in chromosomal morphology exist between them.

Introduction

OJIMA and MAEKI (1955) reported the haploid chromosome number of *Pinctada martensii* (DUNKER) to be 18 as seen in spermatocytes. TRANTER (1958) reported the haploid number of the Australian pearl oyster *Pinctada albina* (LAMARCK) to be about ten. Both of these studies were made from sectioned materials. Recently there have appeared some studies on the chromosomes of marine pelecypod mollusks which have been made from squashes of fixed and stained eggs and zygotes. Using such method INABA and IYAMA (1973) reported the haploid number as 14 (♀) and the diploid number as 28 (somatic cell) in *P. fucata*. Chromosome morphology of pelecypod mollusks, however, has been

* Contribution from the National Pearl Research Laboratory. No. 210.



Text-fig. 1. *Pinctada fucata* (Gould) from two regions in Japan.
a, b: from Ago Bay, $\times 0.4$; c, d: from Koshiki Island, $\times 0.5$.

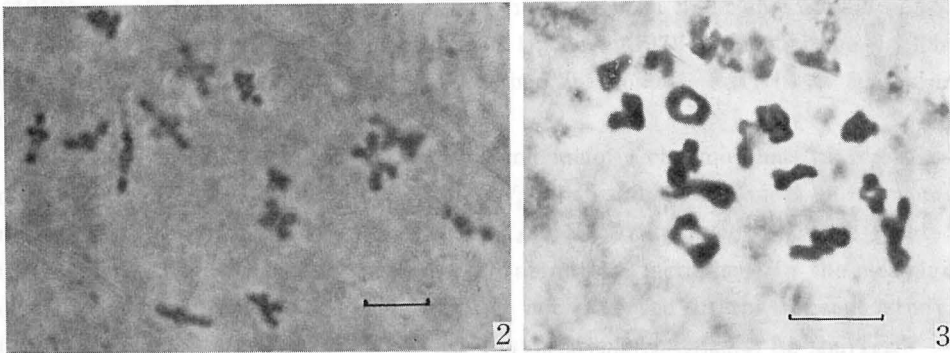
described in only a few species (MENZEL and MENZEL, 1965; AHMED and SPARKS, 1967; LONGWELL *et al.*, 1967; IEYAMA and INABA, 1974).

This paper deals with the number and gross morphology of the chromosomes in the pearl oyster, *Pinctada fucata* (GOULD), collected from two regions in Japan.

The writer offers his sincere thanks to Prof. Akihiko INABA of Hiroshima University for his kind advice and for correcting the manuscript and to Prof. Yoshio OJIMA of Kwansei Gakuin University for his kind suggestions.

Material and Methods

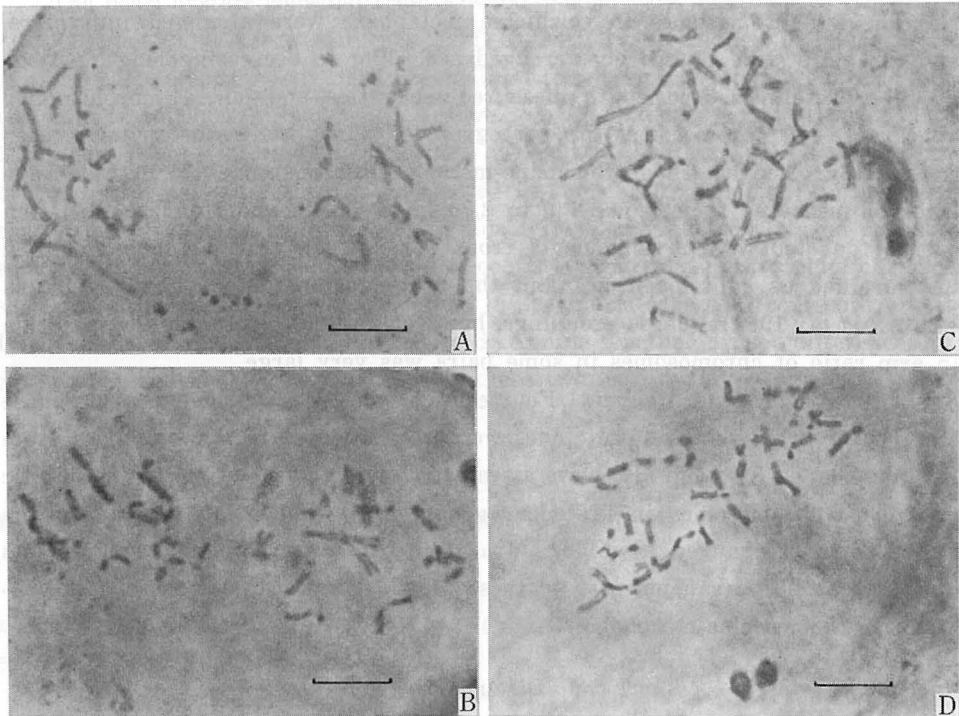
The specimens of *Pinctada fucata* used in this study came from a cultured population in Ago Bay, Mie Prefecture and from a wild population in Namako Lagoon at Koshiki Island, Kagoshima Prefecture (Text-fig. 1). All observations on the chromosomes were made from spawned, unfertilized or fertilized eggs and early cleavage embryos. Sexually mature mollusks were induced to spawn by thermal stimulation. The eggs and zygotes were fixed at intervals in Carnoy (3:1) and stored at a temperature of about -20°C . For induction of colchicine metaphases, fertilized eggs were treated with sea water containing 0.02% colchicine for 15–30 minutes (after LONGWELL *et al.*, 1967). Squash preparation of the eggs and embryos were made as follows: Several eggs or embryos were placed on a slide and flamed; they were then stained with aceto-orcein for two to five minutes, and finally squashed under a coverslip. The preparation was either examined at once or sealed with euparal for later use. Chromosome sets were observed and photographed using an Olympus photomicroscope equipped with a $100\times$ phase-contrast objective.



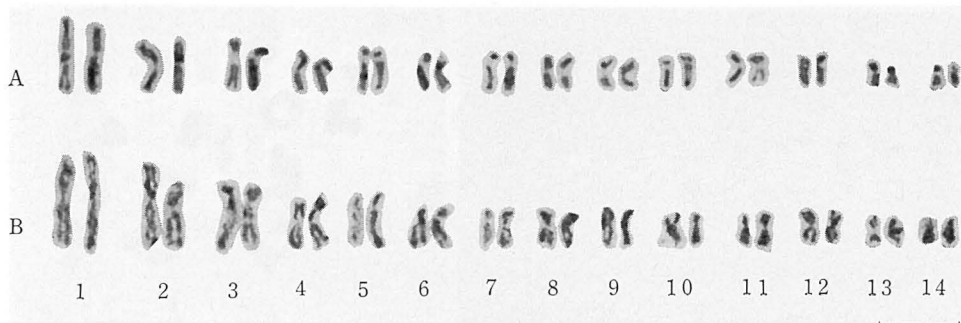
- Text-fig. 2.** Fourteen Metaphase I chromosomes of a fertilized egg. (Specimen from Ago Bay, Scale: 5μ)
- 3.** Fourteen Metaphase II chromosomes and a first polar body nucleus. (Specimen from Ago Bay, Scale: 10μ)

Observations

Samples from Ago Bay: Unfertilized eggs just after spawning were primary oocytes at Prophase of the first meiotic division. After fertilization the eggs proceeded to complete meiosis. Diakinesis or Metaphase I was observed in eggs ten to twenty minutes after fertilization (Text-fig. 2). About twenty to thirty minutes after fertilization eggs were at Metaphase II (Text-fig. 3). Fourteen



Text-fig. 4. A-D; Colchicine-metaphase chromosomes of first cleavages in *P. fucata* from Ago Bay. (Scale: 10μ)



Text-fig. 5. Tentative arrangements of colchicine-metaphase chromosomes of first cleavages in *P. fucata* from Ago Bay (A) and Koshiki Island (B). Arrangements are according to length and arm ratio as observed in the photographic prints. (Scale: $10\ \mu$)

chromosomes were counted in the plates of Metaphase I or II. The first polar body was not observed to divide until at least 95 minutes after fertilization. Also, male pronuclei in the eggs were not seen to separate into individually distinguishable chromosomes. Thirty to sixty minutes after fertilization the first and second polar bodies and the mitotic chromosomes of the first cleavage were observed in the embryo. Twenty-eight chromosomes were generally counted at mitotic metaphase in well spread preparations of colchicine-treated embryos (Text-fig. 4).

The 28 chromosomes in colchicine metaphase were arranged into pairs, and the pairs were tentatively arranged according to decreasing length (Text-fig. 5A). Total measured length, measured arm ratios, and general morphological appearance of chromosomes in photographic prints were the criteria used for pairing. The length of colchicine-metaphase chromosomes in first-cleavage embryos measured from $9.5 \pm 2.3\ \mu$ to $2.7 \pm 0.6\ \mu$ (mean and standard deviation of the four tentative arrangements from Text-fig. 4). About four pairs may be classified as subtelocentrics and the others as meta- or submetacentrics (LEVAN *et al.*, 1964). These groupings, however, are not definite as the variation in arm ratio of chromosomes in some pairs was very large.

Samples from Koshiki Island: Fourteen chromosomes at meiotic metaphase I or II and twenty-eight mitotic ones were also observed in the specimens from Koshiki Island. Text-fig. 5B shows a tentative arrangement of colchicine mitotic metaphase chromosomes in first-cleavage embryos. The mean length of each chromosome pair ranged from $9.8 \pm 1.6\ \mu$ to $2.7 \pm 0.2\ \mu$ in the photographic prints of four tentative arrangements. In these preparations also there occurred variations in chromosome morphology.

Discussion

OJIMA and MAEKI (1955) observed 18 haploid chromosomes in both primary and secondary spermatocytes of *Pinctada martensii* (= *P. fucata*). TRANTER

(1958) counted about ten haploid chromosomes in both male and female gonad sections of *P. albina*. Recently INABA and IEYAMA (1973) reported the haploid number to be 14 (♀) and the diploid number 28 (somatic cell) in *P. fucata* as observed in air-dried squashes.

Present observations on the mitotic and meiotic chromosomes of fertilized eggs indicate that the diploid number of *P. fucata* is 28. The haploid chromosome number of 14 was observed in Metaphase I or II during meiosis of the oocyte; the diploid number ($2n=28$) was observed at mitotic metaphase in the cleavage eggs. Meiosis of the male germ cell was not observed in the present study. LONGWELL and STILES (1968) counted the male chromosomes in the eggs of *Crassostrea virginica*, AHMED and SPARKS (1970) in the eggs of *Mytilus edulis* and *M. californianus*. The individual chromosomes of the male gamete, however, were not observable in the fertilized eggs of *P. fucata*.

The longest colchicine-metaphase mitotic chromosomes were clearly distinguishable from the shortest, but between these extremes were several chromosomes whose lengths differed only slightly. So it was difficult to designate any one chromosome complement as standard for *P. fucata*. It was also difficult to measure and describe the chromosome morphology. Further critical chromosome observations on *P. fucata* should be conducted to determine the standard karyotype.

The pearl oysters collected from Koshiki Island were identified as *P. fucata* (GOULD), not *P. martensii* (DUNKER) (cf. KURODA, 1930; KIRA, 1959). The shells of these samples are mostly dark greenish on the outside, relatively small in size and thin in thickness. Shell width (convexity) is relatively large. HABE (1961, 1967) and KURODA *et al.* (1971) pointed out that *P. martensii* was the synonym of *P. fucata*. No difference was observed in the chromosome number between specimens collected from Ago Bay and Koshiki Island; fourteen haploid chromosomes at meiotic metaphase I, II of the oocyte and twenty-eight diploid chromosomes at cleavage mitosis were observed in specimens collected from both areas. It is, however, impossible at present to determine whether or not differences in chromosomal morphology exist between these two local types.

要 約

アコヤガイ *Pinctada fucata* (GOULD) の染色体の数および概形を、三重県英虞湾産と鹿児島県甕島(ナマコ池)産の個体について、放出された受精前後の卵の押しつぶし標本で観察した。卵はカルノア液(醋酸1:エタノール3)で固定し醋酸オルセインで染色後押しつぶし標本とした。

放卵された卵は第1次卵母細胞で受精により減数分裂が進行するが、第1・第2分裂の中期像で $n=14$ の染色体が観察された(Text-figs. 2, 3)。卵割時の体細胞分裂のコルヒチン中期像では $2n=28$ が多くの細胞で認められた(Text-fig. 4)。

両地方産のものについてこの卵割時中期の写真像から相同染色体組を作って比較したが核型を決定することはできなかった。しかし何れの地方産のものにも3~4対の次端部動原体型と見られるものがあり、他は中部または次中部動原体型であった(Text-fig. 5)。したがって英虞湾産と甕島産の個

体は、染色体数が同じであることは確かであるが、核型に差があるかどうかを比較するには至らなかった。

References

- AHMED, M. & K. SPARKS, 1967. A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). *J. Fish. Res. Board Canada*, **24**(10): 2155-2159.
- & ———, 1970. Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. californianus*. *Biol. Bull.*, **138**(1): 1-13.
- HABE, T., 1961. Coloured illustrations of the shells of Japan (II). p.116. Hoikusha, Osaka. (in Japanese)
- , 1967. New illustrated encyclopedia of the fauna of Japan (II). p.236, fig. 882. Hokuryukan, Tokyo. (in Japanese)
- IEYAMA, H. & A. INABA, 1974. Chromosome numbers of ten species in four families of Pteriomorphia (Bivalvia). *Venus, Jap. J. Malacol.*, **33**(3): 129-137.
- INABA, A. & H. IEYAMA, 1973. Chromosomes in eleven species of Filibranchia (Bivalve Molluscs). *Venus, Jap. J. Malacol.*, **32**(4): 134. (Japanese abstract)
- KIRA, T., 1959. Coloured illustrations of the shells of Japan. rev. ed. p.118, pl.46, figs. 3 a, b and 7. Hoikusha, Osaka. (in Japanese)
- KURODA, T., 1930. Catalogue of the shell-bearing Molluscs in Japan. *Venus*, **2**(2), app.: 44; **2**(3) app.: 45. (in Japanese)
- KURODA, T., T. HABE & K. OYAMA, 1971. The sea shells of Sagami Bay. p.563 (Japanese) and p.358 (English). Maruzen Co., Tokyo.
- LEVAN, A., K. FREDGA & A. SANDBERG, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, **52**: 201-220.
- LONGWELL, A. C. & S. S. STILES, 1968. Fertilization and completion of meiosis in spawned eggs of the American oyster, *Crassostrea virginica* (GMELIN). *Caryologia*, **21**(1): 65-73.
- , ——— & D. G. SMITH, 1967. Chromosome complement of the American oyster *Crassostrea virginica*, as seen in meiotic and cleaving eggs. *Canad. J. Genet. Cytol.*, **9**: 845-856.
- MENZEL, R. W., 1968. Chromosome number in nine families of marine pelecypod mollusks. *Nautilus*, **82**(2): 45-58.
- & M. Y. MENZEL, 1965. Chromosomes of two species of quahog clams and their hybrids. *Biol. Bull.*, **129**(1): 181-188.
- OJIMA, Y. & K. MAEKI, 1955. Some cytological account of the maturation of the gonad in the pearl-oyster, *Pinctada martensii* (DUNKER). *Kwansei Gakuin Univ. Ann. Studies*, **3**: 1-4.
- TRANTER, D. J., 1958. Reproduction in Australian pearl oyster (Lamellibranchia) III. *Pinctada albina* (LAMARCK): Breeding season and sexuality. *Aust. J. Mar. and Fresh. Res.*, **9**(2): 191-216.

 Short Paper

Amino Acid Composition of Dark Brown Secretion Formed in Organ Culture of Mantle Tissue of the Pearl Oyster*

The tissue culture of invertebrates has progressed in recent years but their organ culture has not as much. The authors have been able to maintain mantle tissues of the pearl oyster in the culture medium¹⁾ shown in Table 1, and noticed that dark brown secretion was formed during culture.

Table 1. Culture medium for mantle tissue¹⁾

Tc Med 199 10X	1.00 ml
Salt supplementary solution	26.00
Kanamycin (100 µg/ml)	0.10
Fetal calf serum	10.00
Water	62.52
7.5% NaHCO ₃	0.28
1.4% NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.10

The tissue-piece of the pearl oyster, *Pinctada fucata*, in Ago Bay, Mie, Japan, was removed with scissors from the so-called pallial zone of right side mantle tissue and washed in the balanced salt solution for clam and squid containing Kanamycin (400 µg/ml). The mucus on the surface of the tissue-piece was carefully wiped with gauze immersed in the balanced salt solution. The tissue was then cut into tiny pieces of 2×2 mm with a razor and washed eight times in the balanced salt solution. Cultures were made for 14 days in an incubator gassed with 5% CO₂ at 26°C. Every 4 days, the old culture medium was replaced with the medium freshly made. The pH of the

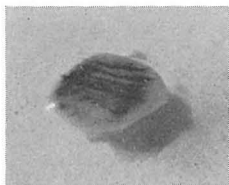


Fig. 1. Fourteen day culture showing surface deposition of dark brown secretion. ×8.

medium was kept to be 7.6–7.8 during incubation. On the 15th day, the tissues were removed from the medium and washed successively in the balanced salt solution and redistilled water. The dark brown secretion formed (Fig. 1) was carefully removed from the cultured tissue with a pincette, hydrolyzed in 6 N HCl at 110°C for 22 hr in a sealed tube, and analyzed with a Hitachi model KLA-5 amino acid analyzer.

Results obtained are as follows (residues/1000 total residues): Asp 92.2, Thr 46.5, Ser 37.4, Glu 114.2, Pro 45.6, Gly 67.0, Ala 51.9, Val 214.1, Ile 46.9, Leu 73.9, Phe 18.0, Lys 33.9, His 70.6, and Arg 87.2. Met, Cys and Tyr were not detected. The major amino acids are Val, Glu, Asp, Arg, His, Leu and Gly. Val and Glu, and the seven amino acids noted above account for about 33% and 72% of the total amino acid residues, respectively. Thus, amino acid composition of the secretion formed *in vitro* was dissimilar to that of any of the conchiolins²⁻⁴⁾ in the periostracum, prismatic layer and the nacre of the shell or of the pearls of the bivalve molluscs which have hitherto been reported.

We thank Professor Emeritus Shinjiro KOBAYASHI of Hokkaido University for revising the manuscript.

Isao YANO and Akira MACHII
National Pearl Research Laboratory
Kashikojima, Mie, Japan

References

- 1) A. MACHII: *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, **18**, 2111–2117 (1974).
- 2) M. FLORKIN, CH. GREGOIRE, S. BRICTEUX-GREGOIRE, and E. SCHOFFENIELS: *C. R. Acad. Sciences, Paris*, **252**, 440–442 (1961).
- 3) K. WADA: *This Bull.*, **32**, 295–303 (1966).
- 4) D. F. TRAVIS, C. J. FRANCOIS, L. C. BONAR, and M. J. GLIMCHER: *J. Ultrastruct. Res.*, **18**, 519–550 (1967).

Received August 1, 1975

* アコヤガイ外套膜の器官培養から得た分泌物のアミノ酸組成 (矢野 勲・町井 昭: 国立真珠研究所) 国立真珠研究所業績 No. 212

An Electron Microscope Study on the Calcification of the Exoskeleton in a Shore Crab*¹

Isao YANO*²

(Received July 10, 1975)

The early phase of calcification of the endocuticle newly formed after molting in the shore crab, *Gaetice depressus*, was studied by electron microscopy. In endocuticle matrix near the outer surface of the epidermal cell in which the calcification has begun, a number of small or large granular crystallites, 2-150 m μ in diameter, were found to be deposited in the fibrils. The fibrils, about 30-80 m μ thick, are dispersed randomly in the ground substance. In each elliptical border of the pore canals situated between the fibrils, the small granular crystallites, 2-26 m μ in diameter, are often deposited in minute spaces. With the advancement of calcification, small or large granular crystallites deposited in the fibrils begin to join with one another and gradually form the band-shaped clusters of crystallites. On the other hand, the small granular crystallites deposited in each border of the pore canals do not form any crystallite clusters even with the advancement of calcification.

Recently, several studies on the ultrastructure of the crustacean exoskeleton have been reported,¹⁻⁴⁾ though most of them involve the decalcified tissues except only a paper¹⁾ which concerns nondecalcified ones. A fine structural aspect of calcifying cuticles is of importance for further understanding of formation mechanism of the crustacean exoskeleton. This paper deals with the process of calcification of the endocuticle newly formed after molting in a shore crab under an electron microscope.

Material and Methods

Five males of *Gaetice depressus* of 5-6 mm in carapace length at the postmolt stage B*³, 32 hours after molting, were used as material. Small shell-pieces removed from the cardiac region (Fig. 1) of the carapace of each specimen were fixed with cold 4% glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) for 2 hours and then post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 hour. After embedding these pieces in Epon epoxy resin mixture, those were sectioned with a Porter-Blum microtome. Only the endocuticle portion (Fig. 2) of nondecalcified exoskeleton was examined in this study. Ultrathin sections were examined

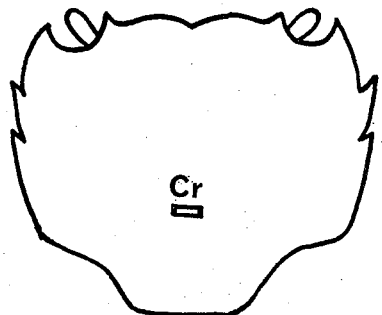


Fig. 1. Diagram of the carapace showing the part observed. The square represents the cardiac region removed. Cr: Cardiac region.

*¹ 国立真珠研究所業績 No. 220

*² National Pearl Research Laboratory, Kashikojima, Mie, Japan (矢野 勲: 国立真珠研究所)

*³ stage of the molting cycle according to Drach⁵⁾

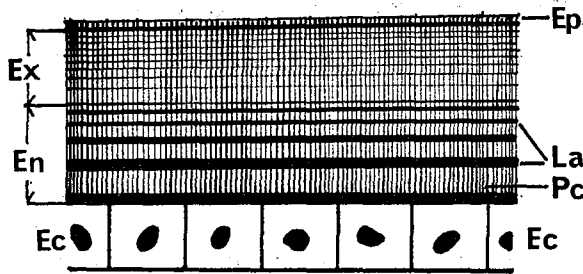


Fig. 2. Diagrammatic representation of a cross-section of the newly forming exoskeleton of the crab at the postmolt stage B. Ep: Epicuticle; Ex: Exocuticle; En: Endocuticle; La: Lamella; Pc: Pore canal; Ec: Epidermal cell.

unstained under the electron microscope of Hitachi HS-7.

Observation

Fig. 3 represents a slightly oblique section of the endocuticle newly formed in the 32th hour following molting. This figure shows a proceeding phase of calcification in the endocuticle. The formation of mineral crystals was found to occur at a site shortly distant from the outer surface of the epidermal cell. Namely, a number of small or large granular crystallites of 2–150 $m\mu$ in diameter are detected in the fibrils, about 30–80 $m\mu$ thick, which are dispersed randomly in the ground substance. In each elliptical border of the pore canals placed between the fibrils, the small granular crystallites of 2–26 $m\mu$ in diameter are often found to be deposited in minute spaces. In contrast, in these borders of the pore canals any fibrils are not recognizable, but the canals appear to be bounded by cytoplasmic membranes. The crystallites deposited in both of the fibrils and the borders of pore canals are regarded as crystalline CaCO_3 from their characteristic contour and also from the fact that most of mineral salts in the exoskeleton of *G. depressus* are CaCO_3 under chemical analysis (unpublished). TRAVIS¹¹ has demonstrated by X-ray diffraction that the greater part of the crystalline CaCO_3 deposited in a cuticular matrix of a crayfish is calcite. With the advancement of the calcification, small or large granular crystallites deposited in the fibrils begin to join with one another and gradually become to form the band-shaped clusters of crystallites. On the other hand, the small granular crystallites deposited in the border of the pore canals do not form any crystallite clusters even with the advancement of the calcification.

Discussion

Many workers have noticed by light microscopic observation that the endocuticle begins to calcify subsequently to the formation of matrix after molting.⁶⁻¹⁰ The present electron microscopic observation has clearly shown that in earlier calcification of the

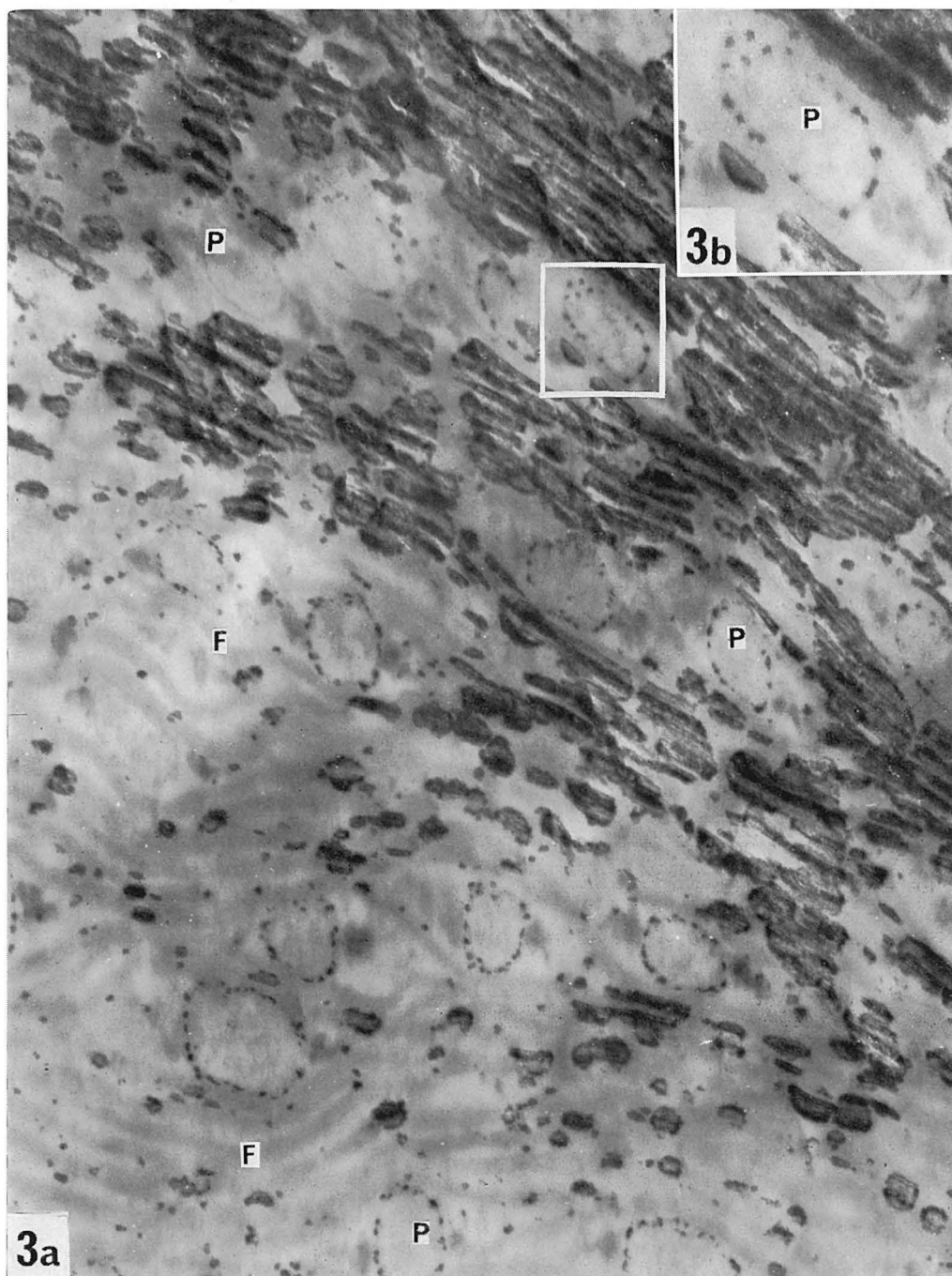


Fig. 3a. Slightly oblique section of calcifying endocuticle of the shore crab exoskeleton. Note that small or large granular crystallites scattered in both fibrils and elliptical borders of the pore canals of the matrix in which the calcification has begun. In the upper layer of the endocuticle, the band-shaped clusters of crystallites are deposited in the fibrils. P: Pore canal; F: Fibril. no stain. $\times 34700$.

Fig. 3b. Higher magnification of enclosed area in Fig. 3a. In each elliptical border of the pore canals placed between the fibrils, the small granular crystallites are often deposited in minute spaces. P: Pore canal. no stain. $\times 63100$.

endocuticle matrix newly formed after molting, a number of mineral crystallites deposit in the fibrils. This suggests that the nucleation of crystalline CaCO_3 in the endocuticle may be related to fibrils. In this respect, Travis¹⁾ has shown in a crayfish, *Orconectes virilis* that calcification is initiated in the matrices by the deposition of small mineral crystallites in close association with the filaments or fibers. However, in the exoskeleton of a shore crab, *G. depressus*, any fibrils are not recognizable in the borders of the pore canals in which the small granular crystallites are deposited. At present, it is impossible to decide whether the fibrils are related or not to the nucleation of crystalline CaCO_3 . Further studies are necessary for understanding the nucleation of crystalline CaCO_3 in the crustacean exoskeleton. With the advancement of the calcification, a number of the band-shaped clusters of crystallites are found to form in the upper layer of the endocuticle. This morphological evidence shows that growth of granular crystallites occurs even in the matrix which is distant from the outer surface of the epidermal cell. It is clear from the present observation that the innumerable pore canals, in which the cytoplasmic membranes are observed, enter transversely into the exoskeleton and the small granular crystallites are deposited in their borders. GREEN and NEFF⁴⁾ have shown in a fiddler crab that the microvilli of the epidermal cells enter into the pore canals of the exoskeleton. The author¹⁰⁾ have demonstrated in a shore crab, *G. depressus* that the epidermal cells lined the exoskeleton have a close relation to the cuticle calcification under histochemical observation. These evidences imply the possibility that with further calcification of the exoskeleton, the pore canal system may play an important role in transportation of calcium salts from the epidermal cells to the matrix of the endocuticle.

Acknowledgement

The author wishes to express his hearty thanks to Professor Emeritus Shinjiro KOBAYASHI and Professor Juro YAMADA of Hokkaido University for their invaluable criticisms of the manuscript.

References

- 1) D. F. TRAVIS: *Ann. New York Acad. Sci.*, **109**, 177-245 (1963).
- 2) K. SAIKI and M. MIYAWAKI: *Zool. Mag.*, **78**, 476-481 (1969).
- 3) A. C. NEVILLE and B. M. LUKE: *J. Insect Physiol.*, **17**, 519-526 (1971).
- 4) J. P. GREEN and M. R. NEFF: *Tissue & Cell*, **4**, 137-171 (1972).
- 5) P. DRACH: *Ann. Inst. Oceanog.*, Paris (N. S.), **19**, 103-391 (1939).
- 6) D. F. TRAVIS: *Biol. Bull.*, **108**, 88-112 (1955).
- 7) D. F. TRAVIS: *ibid.*, **113**, 451-479 (1957).
- 8) D. F. TRAVIS: *Acta Histochem.*, **20**, 193-222 (1965).
- 9) R. DENNELL: *Proc. Roy. Soc. (London)*, **134**, 485-503 (1947).
- 10) I. YANO: *This Bull.*, **38**, 733-739 (1972).

昭和 51 年 8 月 1 日 印刷
昭和 51 年 8 月 5 日 発行

三重県志摩郡阿児町賢島

発行所 **水産庁真珠研究所**

発行者 杉 本 仁 弥

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

20

August 1976



CONTENTS

- Wada, K. Amino acid composition of organic matrices in various pearls cultured by *Pinctada fucata*2209
- Wada, K. Amino acid composition of anomalous organic materials secreted on the inner shell surface of *Pinctada fucata* by the infection of polychaeta.....2214
- Wada, K. and Suga, S. Distribution of some elements in the shell of fresh-water and marine bivalves by electron microprobe analysis.....2219
- Yano, I. An acetone soluble pigment in the pallial zone of the mantle tissue of the pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould)2241
- Wada, K. T. Temperature requirement for maturation of gonads in Japanese pearl oyster2244
- Itoh, K. Relations of oxygen consumption and ammonia nitrogen excreted to body size and to water temperature in the adult of the pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould)2254

The originals published in other journals

- Wada, K. T. Number and gross morphology of chromosomes in the pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould), collected from two regions of Japan
- Yano, I. and Machii, A. Amino acid composition of dark brown secretion formed in organ culture of mantle tissue of the pearl oyster
- Yano, I. An electron microscope study on the calcification of the exoskeleton in a shore crab

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