

国立真珠研究所報告

21

昭和52年(1977)8月

Bulletin of the National Pearl Research Laboratory

21

August 1977

国立真珠研究所報告 21 (1977)

内 容

和田浩爾・須賀昭一	X線マイクロアナライザ，マイクロラジオグラフ，カラーテレビジョンディスプレイによる養殖真珠の石灰化像の研究	2277
船越将二	アコヤガイの血球数，血球組成および血球の大きさの季節変化	2299
船越将二	アコヤガイの血球組成および心臓搏動におよぼす溶存酸素量の影響	2309
山口一登・蓮尾真澄	アコヤガイの活力と環境要因の季節的変動との関係について	2315

学会誌等発表論文

和田浩爾・藤貫正 外套外液の化学組成からみた二枚貝における生体鈣物化

X線マイクロアナライザ，マイクロラジオ グラフ，カラーテレビジョンディスプレイ による養殖真珠の石灰化像の研究^{*,†}

和田 浩 爾 ・ 須 賀 昭 一

国立真珠研究所

日本歯科大学

貝の生殖腺あるいは外套膜組織中に移植した外套膜小片の外面上皮は真珠袋上皮に再生し、環境水とは全く隔離され、しかも母床組織とも直接接していない石灰化の場を袋の内側に形成する。宿主組織と癒着した上皮細胞は、新しい有機的環境のもとで宿主より真珠物質の素材の供給を受け、真珠物質を合成濃縮し、真珠袋の内側に分泌する。この分泌液の成分組成は外套外液とほぼ同じと考えられ、真珠はこの液から生成する。

ところがアコヤガイ養殖真珠には、真珠層真珠のほか成分や構造が著しく異なる稜柱層真珠や有機質真珠も形成され、分泌液の成分組成や石灰化の過程が真珠袋上皮細胞の性状によって互いに大きく相違すると考えられる。また外套膜の膜縁、縁膜あるいは中央部のいずれを移植するかによって、それぞれの外套膜の区域が形成する貝殻物質に対応した真珠が形成されることは、外套膜の区域によって分泌される溶液の成分組成や形成メカニズムが互いに異なること、しかもこの外套膜の区域による分泌特性は外套膜上皮が真珠袋上皮に再生したのちでも比較的良好に維持されることを示唆している。しかし化学分析するには真珠袋の分泌液はあまりにも少ないため、上述のことを究明するにはほかの研究手法によって間接的に証明していかねばならない。

さて石灰化組織は生物の死後も比較的長期にわたって保存され、組織中には石灰化の記録が化学組成や成長ないし石灰化の変動として刻み込まれる特性を利用して、個体の生活履歴や無機環境の空間的および時間的変遷を復元する試みが盛んにおこなわれ、種々の研究分野で硬組織研究の価値が益々増大している。しかし石灰化組織の研究には、常に大きな困難が付きまとう。組織学的研究においても、生化学的研究においても、組織が特定の無機塩を多量に含んでおり、切片作成や分析試料調製のうえで多くの困難をとまうだけでなく、これらの観察、検索あるいは分析から得られる情報にはおのずと限界がある。たとえば、非脱灰切片における有機物質の組織化学的検出には masking 効果やその他さまざまな障害があり、脱灰切片では無機塩の溶失とともにある程度有機質成分の移動、消失および変質が起っていると考えられ、また脱灰過程でおこる変化は特に電子顕微鏡観察に

* Koji Wada and Shoichi Suga. Studies on the state of minor elements and the mineralization patterns of various cultured pearls by means of electron microprobe analysis, microradiography and colour television display. With English summary, pp. 2297—2298. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 21: 2277—2298. 1977.

† 国立真珠研究所業績 No. 227 (国立真珠研究所報告 21: 2277—2298. 昭和52年8月)

としては研究的な価値を低めている。筆者らは硬組織研究につきまとうこうしたさまざまな困難を克服するために、軟組織研究では考えられないユニークな研究方法を開拓し、いくつかの理論的に異なる方法を組合せ、比較観察したり、実験に工夫をこらし、いかに有効な情報を得るかに努力している。

本研究の目的は、数種の元素の分布と濃度が真珠の組織構造、成分、鉱物種などどんな関係で変化するかをX線マイクロアナライザを使って調べ、石灰化過程における色々の種類の元素の挙動、質が異なる真珠の石灰化の場の特徴や真珠および貝殻の石灰化メカニズムを考察することと、水産研究の目的意識の中で、歯学で使われている硬組織研究のための組織学および組織化学的手法（須賀，1973）を取りあげ、適当な組合せによって水棲生物の硬組織を解析することがどんなに有効な情報をわれわれに与えるかを検討することにある。

材料と方法

実験材料

実験に供した材料はアコヤガイおよびイケチョウガイで養殖した各種の真珠である。アコヤガイ真珠は1968年春に常法に従って生殖腺に挿核手術、三重県下で養殖、真珠研究所のある賢島地先で1969年11月19日に採集した真珠層真珠、稜柱層真珠および有機質真珠である。イケチョウガイ真珠は1973年春に外套膜縁、縁膜および中心部から作った組織小片を外套膜組織中に挿入、滋賀県西の湖で養殖、1974年12月16日に採集した真珠層真珠および稜柱層真珠である。

標本作成

本研究のために pearl sac—pearl preparation を作成した。まず左殻を除去、挿核部の色と形状からそれぞれの真珠を判定、周囲組織をつけたまま真珠を切り出し、10%ホルマリンで固定。固定材料は水洗後脱水過程で余分の組織をできるだけ除去、前報（和田・須賀，1976）に従って樹脂包埋、Bronwill 社製硬組織薄切装置77型および砥石を使って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 microradiography と光学顕微鏡で観察したのちアルミニウム製試料台にアラルダイトで接着、さらに仕上げ研磨、蒸留水で水洗、乾燥のちカーボンを真空蒸着、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 0.06~0.09 μ A、試料送りの速度 50 μ ないし 100 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、彎曲結晶、検出器は次の如くである。

	特性X線	彎曲結晶 (4インチ)	検出器
Ca	Cak α または Cak β	LiF または PET	Kr または Ar-Exatron
Mn	MnK α	LiF	Kr-Exatron

P	PK α	PET	Ar-Exatron
S	SK α	"	"
Cl	ClK α	"	"
Mg	MgK α	RAP	FPC
Na	NaK α	"	"
F	FK α	"	"

Contact microradiography によるX線吸収像の観察

X線マイクロアナライザによる分析前に研磨片の contact microradiogram を撮影。使用装置はソフテックス社製 CMR 型, 分析条件は前報(和田・須賀, 1976)と同様にターゲットは Cu, 管電圧 7KV, 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 30~50分, 使用フィルムは Kodak 社製 spectroscopic film 649-0。フィルムは現像, 定着, 水洗, 乾燥後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 社製 Panphot を用い, 普通光および偏光で観察した。

カラーテレビジョンディスプレイによる観察

真珠の微細構造と石灰化状態は光学顕微鏡や microradiogram による観察で白黒の濃度差として表示されるが, 肉眼で識別の困難なわずかな濃度差を10色の擬似カラーでカラーモニター上に表示し, この事によって光学顕微鏡写真や microradiogram がわれわれに与えてくれる硬組織の微細構造や石灰化状態に関する情報の内容をさらに豊かにしようと考え, NAC 社製 Colour Data System を使用して研磨片を観察した。

研磨片の光学顕微鏡ネガフィルムまたは microradiogram を顕微鏡によって拡大撮影したネガフィルムをライトボックス上に置き, ビデオコンカメラで撮影してカラーモニター上に表示し, カラーフィルムで撮影した。

結 果

アコヤガイ養殖真珠

1. 真珠層真珠 Fig. 1 は真珠の中心を通る真珠層真珠の研磨片の偏光顕微鏡像で, Fig. 2 は Fig. 1 に記入した 2本の線の間で分析ごとに分析測線を少しずつずらしながら, Ca と S と Mg, Ca と Na と Cl, Ca と Mg と Mn, および 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真珠の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。なお本研究でいう濃度は, すべて CPS 値(カウント数/秒)を換言したものである。

偏光下の像からわかるように, 分析線上で真珠層は真珠核の周りに約 950 μ 形成しており, 厚い殻皮様有機質層(矢印○)が真珠層中に, 真珠表面から約 200 μ の深さに太い消光した層線として認められるほか, 粗い成長線が深さ 750 μ 附近にある。なお研磨標本作成中に生じたと思われる 50 μ ほどの空隙が, 真珠層と真珠核との境界に生じている。

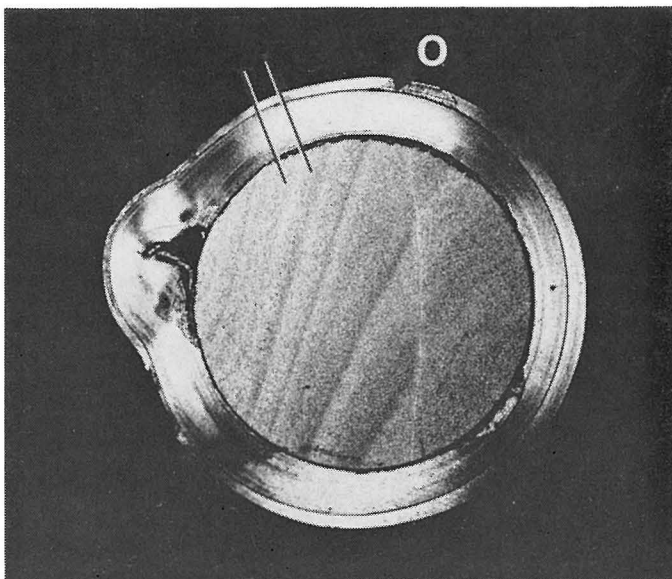


Fig. 1 Thin slice of nacreous pearl cultured by *Pinctada fucata* under polarized light showing the relation of pearl structure to microprobe traverses of Fig. 2. Arrow o shows periostracum-like organic membrane formed in nacre. $\times 7.3$

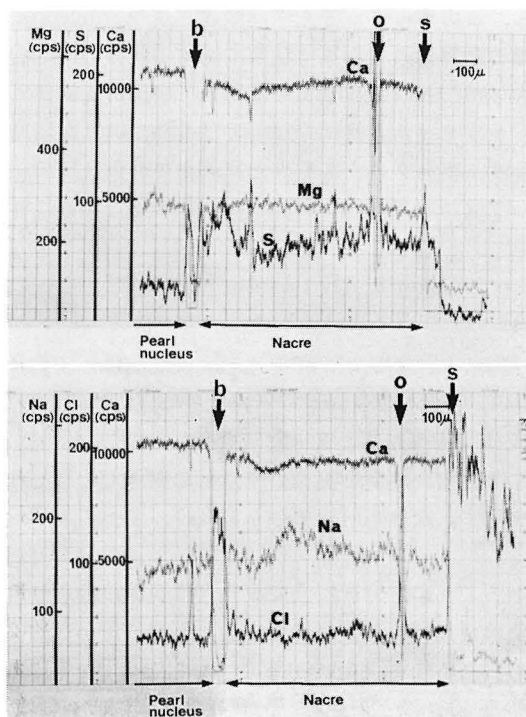


Fig. 2

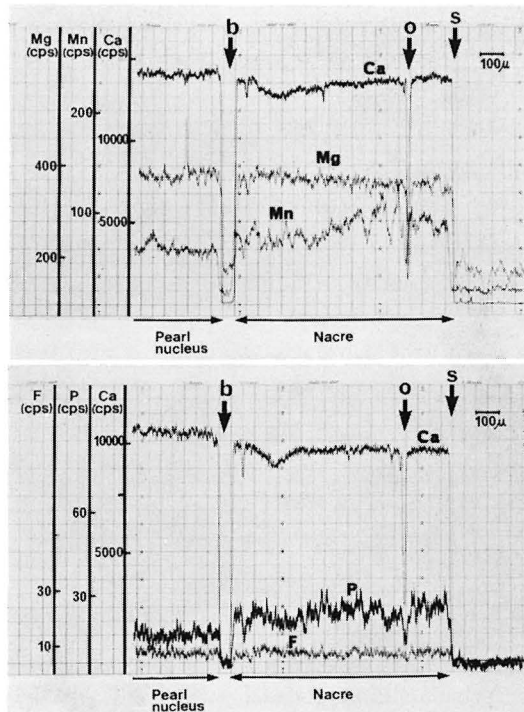


Fig. 2 Microprobe line analyses between two lines indicated in Fig. 1. Arrows s, o and b show pearl surface, periostracum-like membrane and boundary of nacre and pearl nucleus, respectively.

Ca 濃度は真珠表面 (矢部 s) に接すると急増, 真珠中では真珠層中に形成された殻皮様有機質層 (矢部 o) で急減するほか, 粗い成長線の位置に相当する深さ約 750 μ を中心に 150 μ の範囲でやや減少する。Ca は真珠核との境界に生じた空隙で検出できず, 真珠核中で真珠層中よりやや高い濃度を示す。

S は真珠表面に接する前約 70 μ の位置で急増, 真珠表面に接してさらに高い濃度を示す。真珠中の S 濃度は殻皮様有機質層で顕著に高いほか, Ca 濃度が減少する位置で逆に増加する傾向を示すなど, 真珠層全域にわたってかなり変動する。なお S 濃度は真珠層中で真珠核より高い。

Mg 濃度は真珠表面に接すると急増, 真珠中では殻皮様有機質層と真珠核との境界 (矢印 b) にある空隙の位置で著しく減少するほかはほぼ一定である。真珠核中の Mg 濃度は, 真珠層中のそれとほぼ同じ値を示す。

Na 濃度は真珠表面に接すると急増, 真珠中では真珠層中に形成された殻皮様有機質層で著しく減少したのち, 真珠表面から約 660 μ の深さまで変動をくりかえしながら微増, そののち減少, 真珠核との境界にある空隙では検出できない。真珠層中の Na 濃度は, 真珠核中のそれよりも僅かに高い傾向がみられる。

Cl 濃度は真珠表面に接する前に著しく高く、真珠中では真珠層中に形成された殻皮様有機質層で顕著に高いほかは変動しながらもほぼ一定値を示す。なお Cl の高濃度が真珠核との境界にある空隙で検出できる。

Mn 濃度は真珠表面に接すると増加、真珠中では真珠表面から 250 μ ほどの深さで最高に達し、そのち真珠核との境界へ向って漸減する。

P 濃度は真珠表面に接して増加、真珠中では変動しながらもほぼ一定、真珠層中で真珠核中よりやや高い。なお P 濃度は真珠層中に形成されていた殻皮様有機質層で減少する。

F 濃度は真珠表面に接すると僅かに増加、真珠中では全域にわたってほぼ一定の低い値を示す。

2. 稜柱層真珠 Fig. 3 は真珠の中心を通る稜柱層真珠の研磨片の反射顕微鏡像で、Fig. 4 は Fig. 3 に記入した 2 本の線の間で分析ごとに分析測線を少しずつずらしながら、Ca と S と Mg, Ca と Na と Cl, Ca と Mg と Mn, および 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真珠の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。

Fig. 3 でわかるように、分析に供した稜柱層真珠は分析測線上で稜柱層が真珠核に接して約 800 μ 形成しており、4~5 本の太い層線が認められる。

Ca 濃度は真珠表面（矢印 s）に接して小さなピークを示したのち急増、真珠中では calcite 結晶が存在する prism の位置で増加、有機物質からなる interprismatic wall の位置で減少、こうした prism と interprismatic wall とからなる稜柱構造との関連で激し

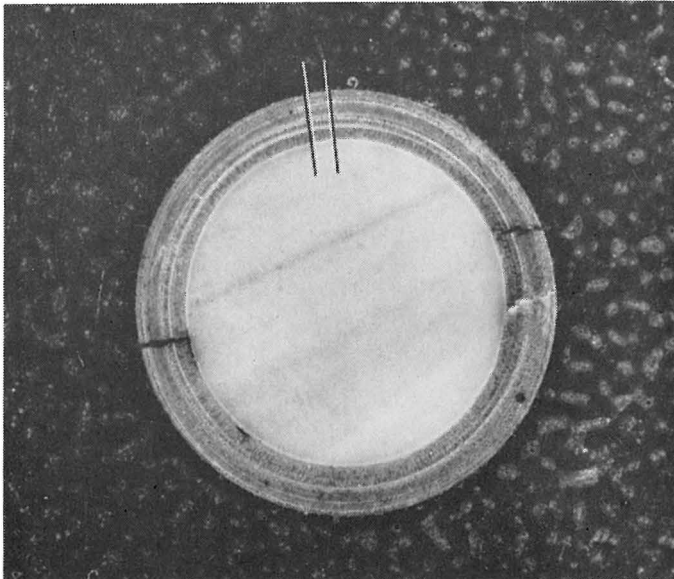


Fig. 3 Thin slice of prismatic pearl cultured by *Pinctada fucata* showing the relation of pearl structure to microprobe traverses of Fig. 4.
× 8

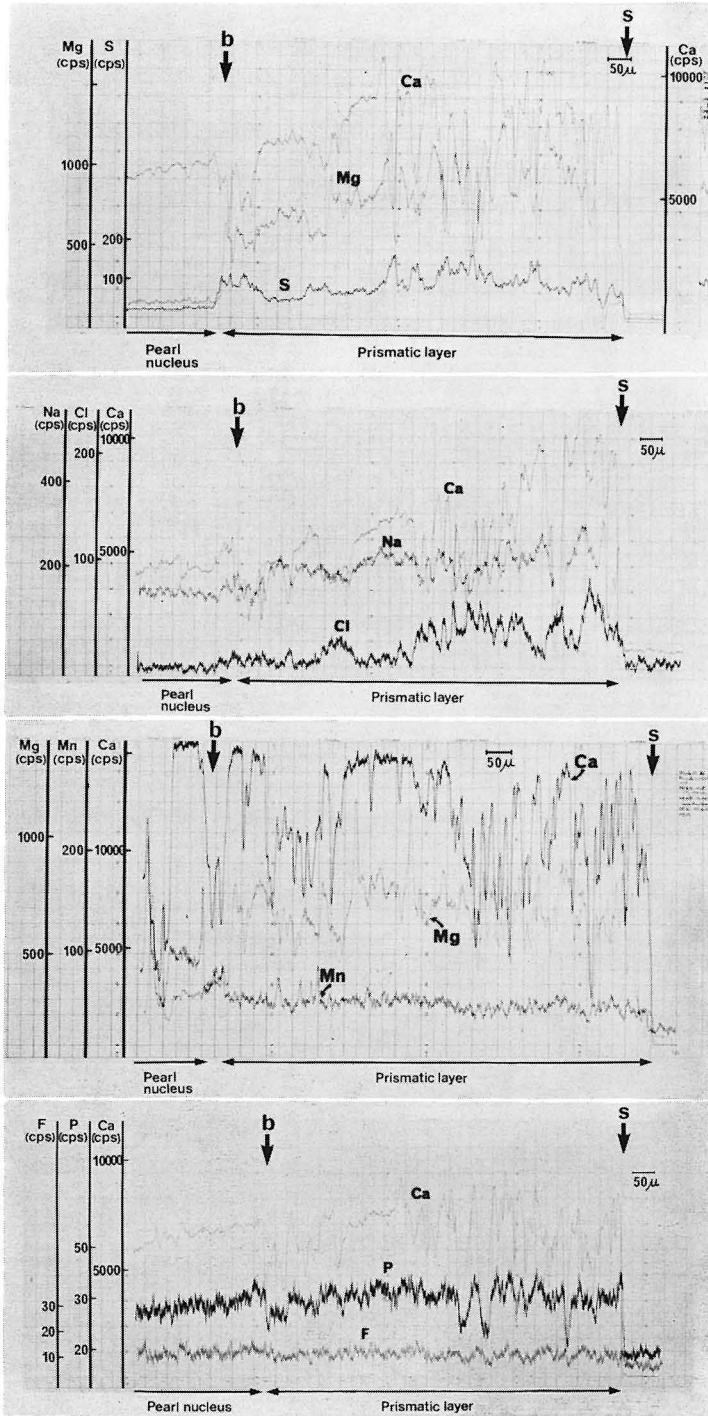


Fig. 4 Microprobe line analyses between two lines indicated in Fig. 3. Arrows s and b show pearl surface and boundary of prismatic layer and pearl nucleus, respectively.

く増減をくりかえす。なお Ca 濃度レベルは稜柱層中に認められた太い層線に相当する位置で低くなる傾向がある。

S 濃度は真珠表面に接すると増加、真珠中では prism の位置で減少、interprismatic wall の位置で増加し、Ca 濃度の増減と全く逆の関係で激しく増減をくりかえす。なお S 濃度レベルは稜柱層中に認められた太い層線に相当する位置で僅かに高くなり、また真珠核との境界(矢印 b)で約 100 μ にわたって増加する。

Mg 濃度は真珠表面より約 100 μ の深さから急増、稜柱層中では Ca 濃度分布パターンとほぼ一致した関係で prism と interprismatic wall との関連で激しく増減、真珠核中では急減する。

Na 濃度は真珠表面に接すると急増、稜柱層中では Mg 濃度と同じように Ca 濃度分布パターンとほぼ一致した関係で prism と interprismatic wall の分布に依存して激しく増減をくりかえす。

Cl 濃度は真珠表面に接すると増加、稜柱層中では prism の位置で減少、interprismatic wall の位置で増加し、Ca 濃度の増減と全く逆の関係で激しく増減する。なお Cl 濃度レベルは Ca 濃度レベルが低くなる部分で高くなる傾向が認められる。

Mn 濃度は真珠表面に接すると増加、真珠中では真珠核附近の深層をのぞけば、変動するもののほぼ一定値を示す。

P 濃度は真珠表面に接して増加、稜柱層中では鉍物が存在する prism の位置で増加、有機物質からなる interprismatic wall の位置で減少、Ca 濃度分布パターンと類似した傾向で変化する。

F 濃度は真珠中で僅かに増加、prism の位置で増加、interprismatic wall の位置で減少する。

3. 有機質真珠 Fig. 5 は真珠の中心を通る有機質真珠の pearl sac—pearl prepara-

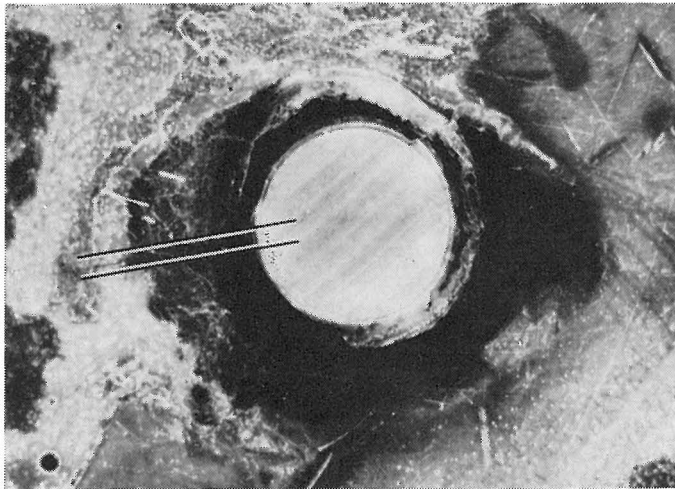


Fig. 5 Thin slice of organic pearl of *Pinctada fucata* showing the relation of pearl structure to microprobe traverses of Fig. 6. $\times 6.7$

tionの反射顕微鏡像で、Fig. 6はFig. 5に記入した2本の線の間で分析ごとに分析測線を少しずつずらしながら、CaとSとMg、CaとNaとCl、CaとMgとMn、および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真珠の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。

分析に供した有機質真珠は、分析測線上で異常有機物質が真珠核に接して形成した約200 μ の真珠層の外側に約1900 μ ~2200 μ 形成している。異常有機物質は均質ではなく、真珠層に接して約500 μ ~800 μ の層状の有機物質があり、その外側に約1000 μ ~1400 μ の塊状の有機物質がある(Fig. 5)。

Caは層状の異常有機物質中で小さなピークとして僅かに散在するが、塊状の異常有機物質中には稀にしか認められない。なおCa濃度は真珠層中および真珠核中で高く、真珠層と真珠核との境界(矢印b)でいったん急減する。

S濃度は真珠表面(矢印s)、すなわち塊状の異常有機物質に接すると増加、この異常有機物質の全域にわたって激しく変動をするが、層状の異常有機物質中で急増、この異常有機物質中でも全域でかなり変動するが常に高い値を示す。なおS濃度は真珠層中で急減、真珠核中でさらに減少してほぼ一定の低い値を示す。

Mg濃度分布は塊状の異常有機物質中で著しく不均一性を示し、層状の異常有機物質中では変動も少なく低い値を示す。なおMg濃度は真珠層中で増加、真珠核中で僅かに減少する。

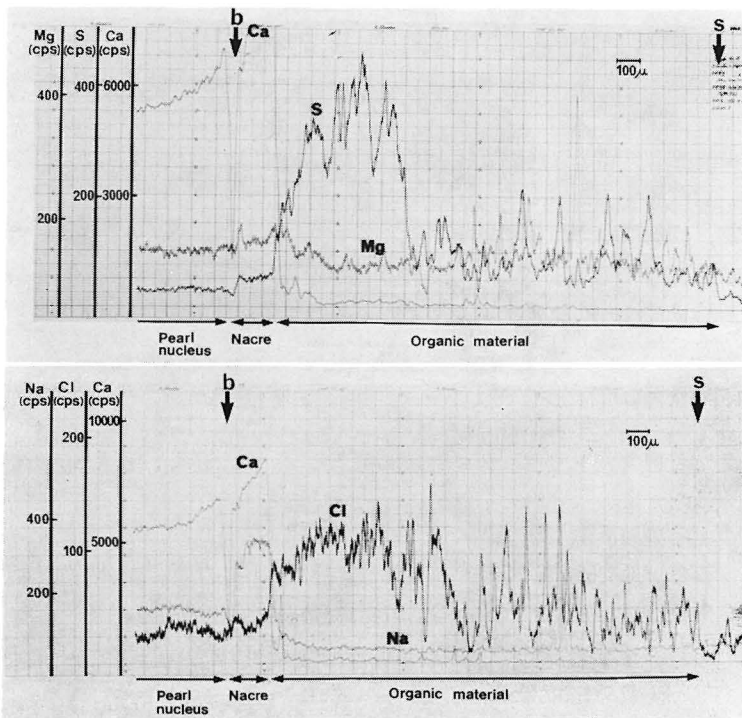


Fig. 6

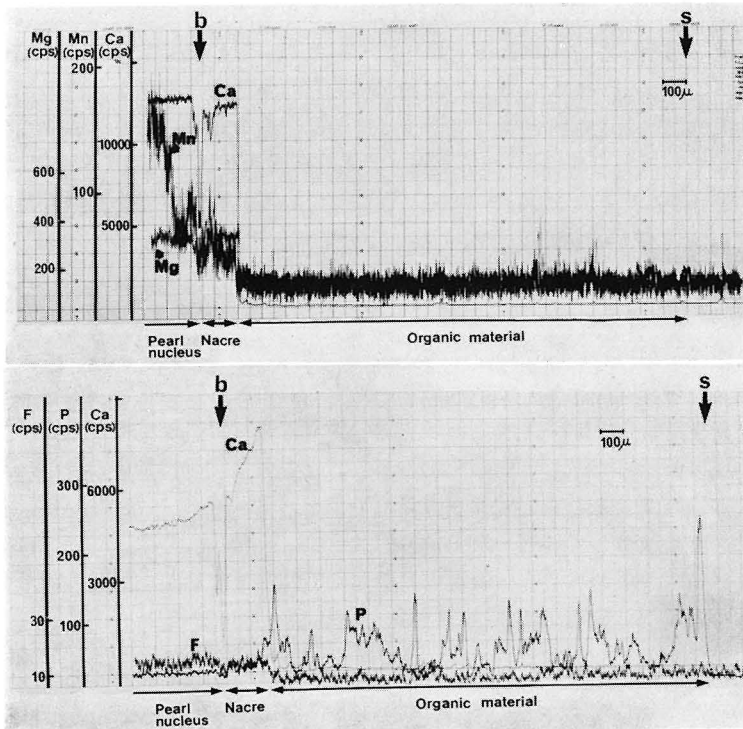


Fig. 6 Microprobe line analyses between two lines indicated in Fig. 5. Arrows s and b show pearl surface and boundary of nacre and pearl nucleus, respectively.

Na と Mn 濃度は異常な有機物質の全域でほとんど検出できない。なお Na 濃度は真珠層中で急増，真珠核中で急減してほぼ一定の低い値を示すのに対し，Mn 濃度は真珠層中で僅かに増加，真珠核中でさらに増加する。

Cl 濃度は塊状の異常有機物質の全域にわたって不均一で激しく変動するが，層状の異常有機物質中では全域にわたって変動しながらも高い値を示す。なお Cl 濃度は真珠層に接すると急減，真珠核中でもほぼ一定の低い値を示す。

P 濃度は異常有機物質の全域にわたって不均一でしかも激しく変動，真珠層および真珠核中ではほぼ一定の低い値を示す。

F 濃度は異常有機物質中でバックグランド相当の低い値を示し，真珠層に接すると微増，真珠核中でもほぼ一定の低い値を示す。

イケチョウガイ養殖真珠

1. 外套縁膜の薄片を移植してできた真珠層真珠 Fig. 7 は真珠の中心を通る真珠層真珠の pearl sac—pearl preparation の反射顕微鏡像と microradiogram をカラーダイアグラムで表示したもので，Fig. 8 はFig. 7 に記入した 2 本の線の間で分析ごとに分析測線を少しずつずらしながら，Ca と S と Mg，Ca と Na と Cl，Ca と Mg と Mn，および 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真珠の構造との関連

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。

分析に供した真珠層真珠は、分析測線上で真珠の直径は約3200 μ 、真珠層は真珠形成の中心の外側にそれぞれ約1200 μ と2000 μ 形成しており、真珠表面より約400 μ の深さに太い成長線が認められる。カラーダイアグラムからわかるように、密度は真珠表面から深層へ向って急速に高くなるが、太い成長線の位置で色合に何の変化もおこらない。また密

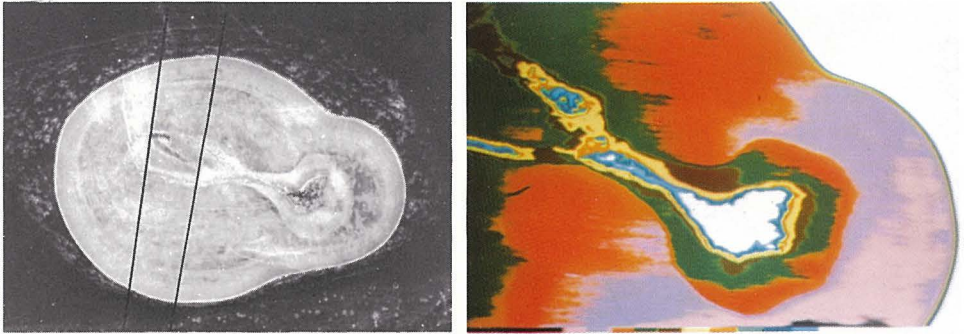


Fig. 7 Microphotograph (left, x 9.5) and colour diagram (right, x 18) of thin slice of nacreous pearl secreted by the pearl sac epithelium derived from a graft which was prepared the pallial zone of mantle of *Hyriopsis schlegelii*.

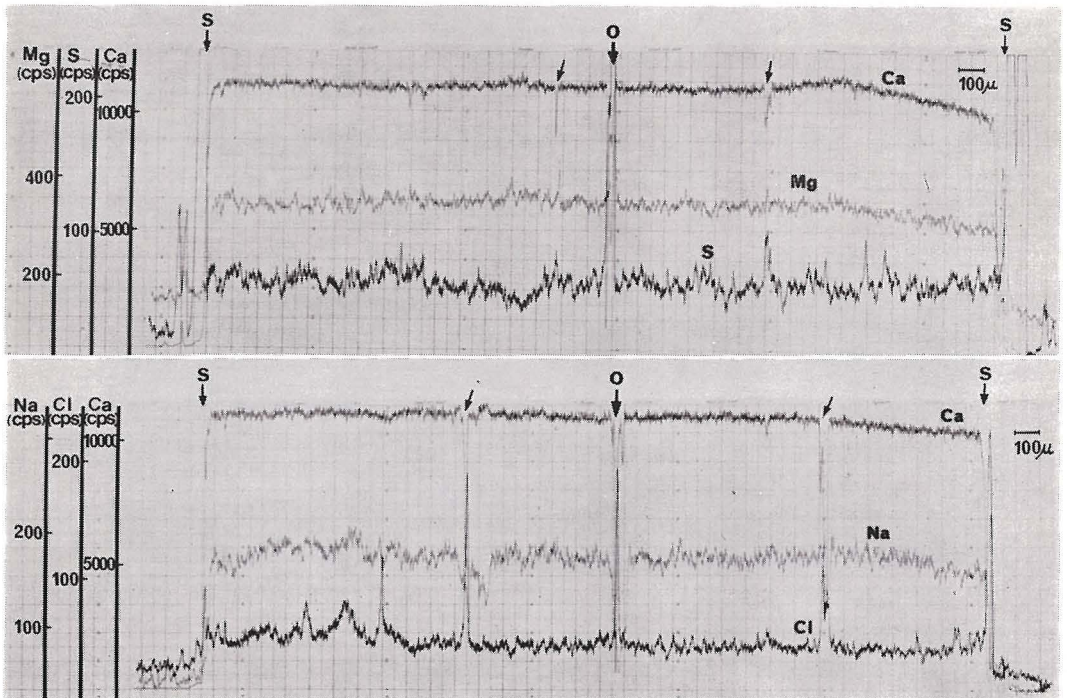


Fig. 8

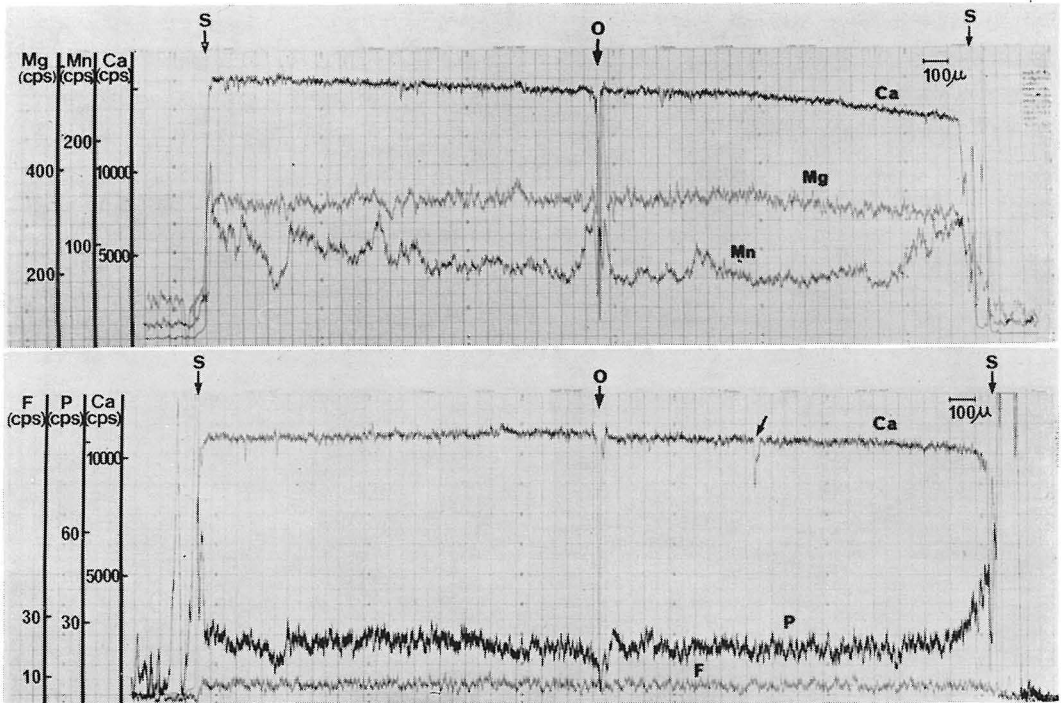


Fig. 8 Microprobe line analyses between two lines indicated in Fig. 7. Arrows s and o are pearl surface and organic material formed in the center of pearl, respectively.

度は真珠形成の中心で低くなる。

Ca 濃度は、真珠表面 (矢印 s) および表面に接する狭い範囲で 2 つないし 3 つのピークをつくりながら急増、そののち真珠表面から約 600μ の深さまで微増を続けたのち約 400μ の深さまで微減してほぼ一定の値を示す場合、真珠の中心へ向って微増を続ける場合、真珠表面から約 300μ の深さまで微増を続けたのちほぼ一定の値になる場合などがある。また真珠形成の中心にある有機物質 (矢印 o) と同じ程度の Ca 濃度の急減が真珠層中でおこったり (Fig. 8 の矢印)、これよりは小さい Ca 濃度の減少がみられるが、これらの減少ピークは太い成長線と関係ない。

S 濃度は真珠表面に接する直前の狭い範囲で著しく高く、真珠中では真珠形成の中心にある有機物質中で顕著に増加するほかは全域にわたって変動しながらもほぼ一定の値を示す。

Mg と Na 濃度は真珠表面に接すると増加、真珠中では Ca 濃度分布と類似したパターンを示しながら全域にわたってほぼ一定の値を示す。

Cl 濃度は真珠表面に接する直前の狭い範囲で著しく高く、真珠中では Ca 濃度が減少する位置で増加する傾向を示す。

Mn 濃度は真珠表面に接すると増加、真珠中では表層で高く、そののち真珠形成の中心へ向って減少し続けるが、真珠形成の中心にみられる増加ピークの両側で相対する 3 つ

ないし4つの大小の増減をくりかえし、周期性をおもわせる分布パンタを示す。

P濃度は真珠表面に接する直前の100 μ ほどの範囲で著しく高く、真珠中では表層で高い値を示し、深層へ向って急減、そののちほぼ一定の値を示す。

F濃度は真珠表面に接すると微増、真珠中では全域にわたってほぼ一定の極く低い値を示す。

2. 外套膜中心部の小片を移植してできた真珠層真珠 Fig. 9は真珠の中心を通る真珠層真珠の pearl sac—pearl preparation の反射顕微鏡像と microradiogram で、Fig. 10は Fig. 9に記入した2本の線の間で分析ごとに分析測線を少しずつずらしながら、CaとSとMg, CaとNaとCl, CaとMgとMn, および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真珠の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。

分析に供した真珠層真珠は、分析測線上で真珠の直径は約650 μ 、真珠層は真珠形成の中心にある有機物質や稜柱物質の外側にそれぞれ約300 μ 形成している。

Ca濃度は周囲組織中に僅か認められ、真珠表面(矢印s)および表面に接する狭い範囲で1つないし3つのピークをつくりながら急増することが多く、真珠中ではほぼ一定の高い値を示すが、多くの場合真珠形成の中心で減少、また中心の両側で増加ピークを示すこともある。

S濃度は周囲組織中にかなり認められ、真珠表面に接すると増加、真珠中では表層で高く、真珠形成の中心へ向って漸減、中心にある有機物質(矢印o)中で急増する。

Mg濃度は真珠表面に接すると微増、真珠中では真珠形成の中心を除くと全域でほぼ一定の低い値を示す。

Na濃度は真珠表面に接すると増加、真珠中では全域にわたって変動しながらもほぼ一定の値を示す。

Cl濃度は周囲組織中にかなり認められ、真珠表面に接して著しく高いこともあり、真珠中では全域にわたってほぼ一定の低い値を示す。

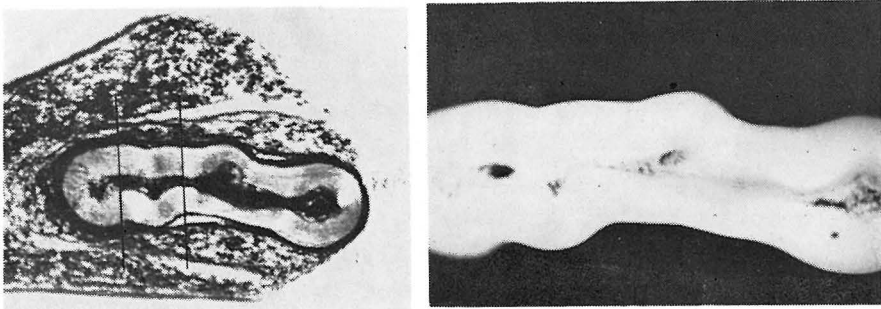


Fig. 9 Microphotograph (left, x 14) and microradiogram (right, x 32) of thin slice of nacreous pearl secreted by the pearl-sac epithelium derived from a graft which was prepared from the central area of mantle of *Hyriopsis schlegelii*.

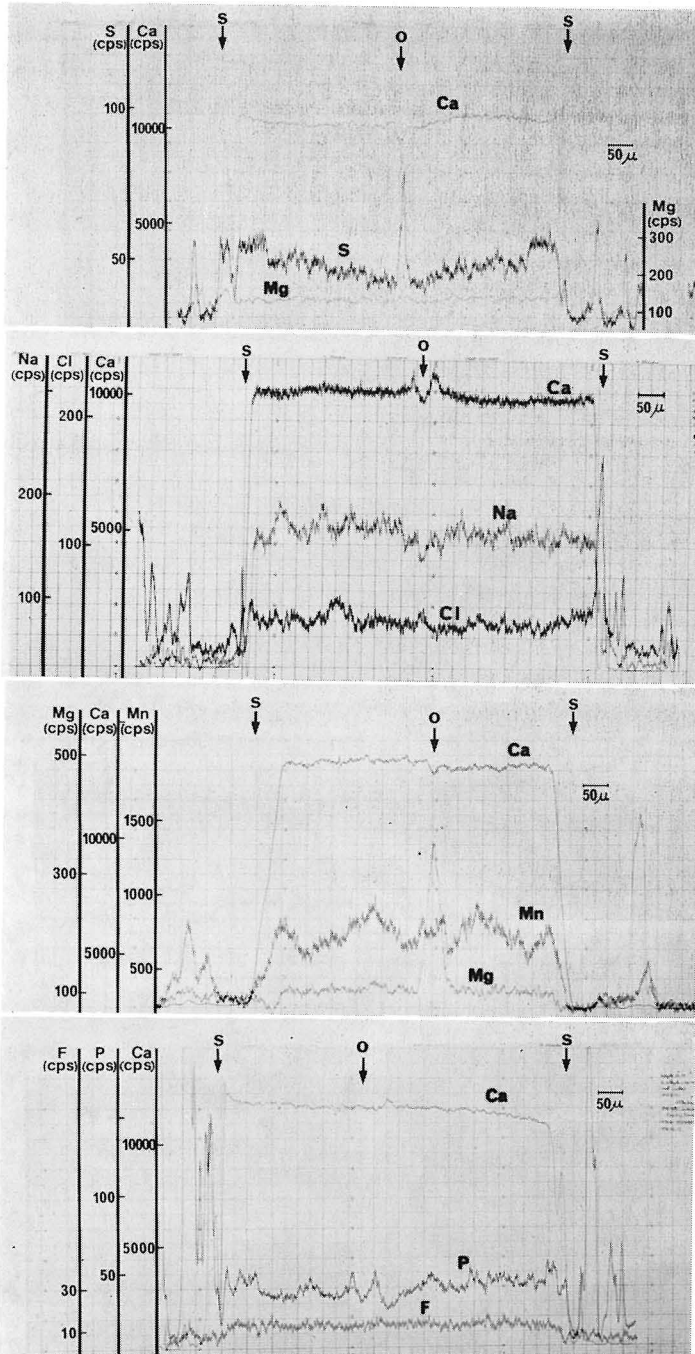


Fig. 10 Microprobe line analyses between two lines indicated in Fig. 9. Arrows s and o show pearl surface and organic material formed in the center of pearl, respectively.

Mn 濃度は周囲組織中では Ca 濃度分布と対応しながら認められ、真珠表面に接すると増加、真珠中では真珠形成の中心の両側で相対して2つの増加を示し、周期的に変化する傾向を示す。

P 濃度は周囲組織中にかなり認められ、真珠表面に接する直前の約 100 μ の範囲で著しく高く、真珠中では全域にわたって変動しながらもほぼ一定の低い値を示す。

F 濃度は真珠表面に接すると微増、真珠中では全域にわたってほぼ一定の極く低い値を示す。

3. 外套膜縁の小片を移植してできた稜柱層真珠 Fig. 11 は真珠の中心を通る稜柱層真珠の pearl sac—pearl preparation の透過顕微鏡像とカラーダイアグラムで、Fig. 12 は Fig. 11 に記入した2本の線の間で分析ごとに分析測線を少しずつずらしながら、Ca と S と Mg, Ca と Na と Cl, Ca と Mg と Mn, および 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真珠の組織構造との関係でそれぞれ調べたX線マイクロアナライザの線分析を示す。

分析に供した稜柱層真珠は、分析測線上で稜柱層が真珠形成の中心にある有機物質上に約 2100 μ 形成しており、稜柱層中には多数の成長線が認められる。

Ca の小さなピークが真珠表面に接する直前に現われるのに続いて、Ca 濃度は真珠表面(矢印s)に接すると急増、真珠中では aragonite 結晶が存在する prism の位置で増加、有機物質からなる interprismatic wall の位置で減少、こうした prism と interprismatic wall とからなる稜柱構造の特徴に関連した激しい増減をくりかえしながら、真珠形成の中心へ向って徐々に減少、中心にある有機物質(矢印o)中では極く僅かしか認められない。

S 濃度は真珠表面に接する直前の狭い範囲で著しく高く、真珠中では鉍物が存在する prism の位置で減少、有機物質からなる interprismatic wall の位置で増加、Ca 濃度の増減と全く逆の関係で激しく増減をくりかえす。

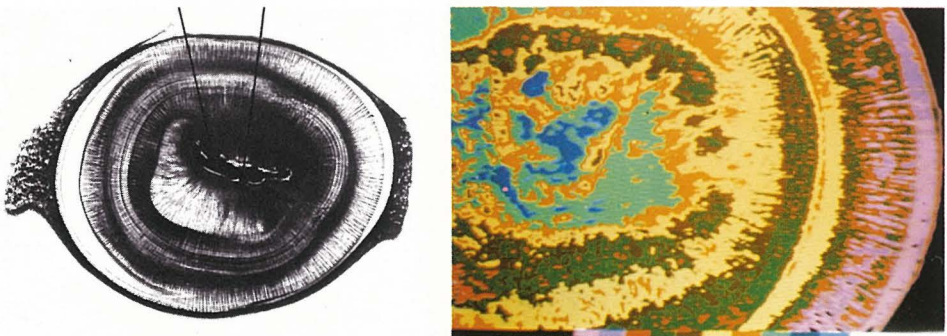


Fig. 11 Microphotograph (left, x 7.3) and colour diagram (right, x 22) of thin slice of prismatic pearl secreted by the pearl sac epithelium derived from a graft which was prepared from the mantle edge of *Hyriopsis schlegelii*.

Mg 濃度は真珠表面に接する狭い範囲と真珠形成の中心に生じた空隙で顕著に高いが、真珠中では全域にわたってほぼ一定の低い値を示す。

Na 濃度は真珠表面に接すると僅かに増加、真珠中では全域にわたってほぼ一定の低い値を示す。

P と Cl 濃度は、S 濃度分布パターンと全く同様に真珠表面に接する直前で著しく高く、真珠中では prism の位置で減少、interprismatic wall の位置で増加、S 濃度と同じく真珠形成の中心にある有機物質中でも著しく高い。

Mn 濃度は真珠表面に接すると急増、真珠表面からほぼ 90 μ の深さで最高値に達し、そのち真珠形成の中心へ向って減少し続けるが、約 900 μ ~ 1300 μ の深さにゆるやかな増加ピークがみられ、2つの大きな周期的変化を示す。このほか Mn の小さな増加ピークがそれぞれの周期間に認められる。これら Mn 濃度の周期的変化は、稜柱構造に関連した Ca 濃度変化とは独立するが、Mn 濃度は prism 中で増加、interprismatic wall で減少する。

F 濃度は真珠表面に接すると微増、真珠中では全域にわたってほぼ一定の極く低い値を示す。

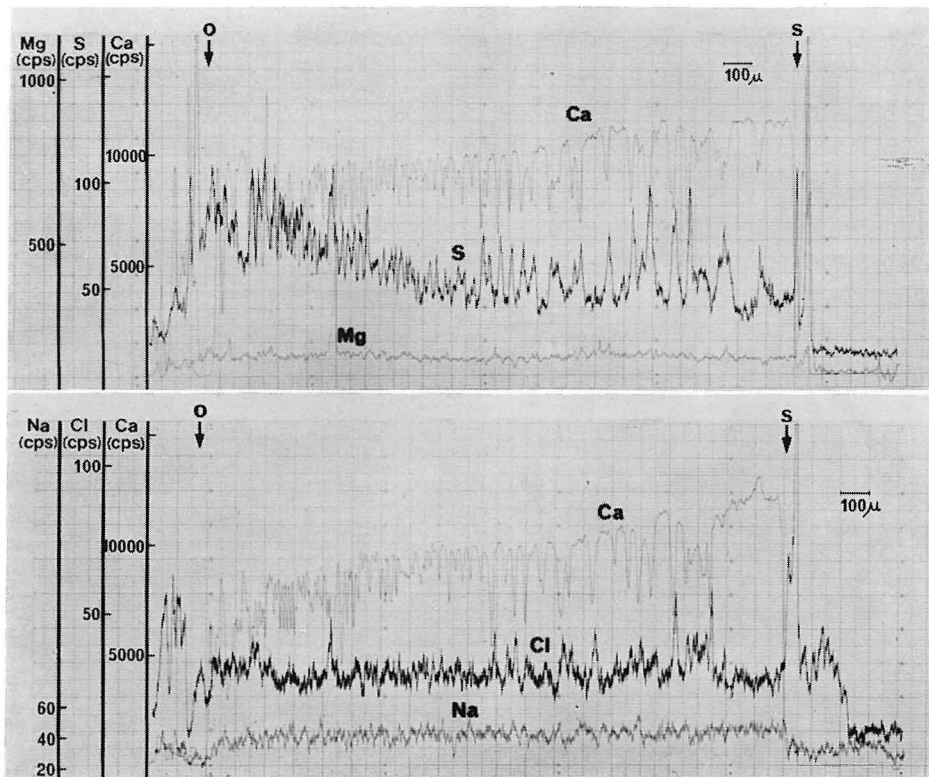


Fig. 12

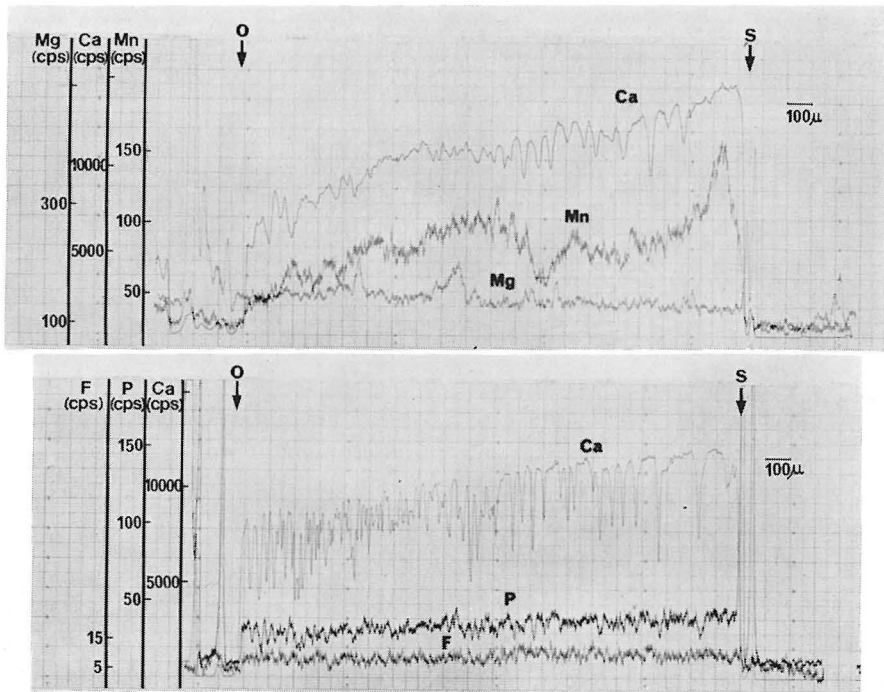


Fig. 12 Microprobe line analyses between two lines indicated in Fig. 11. Arrows s and o show pearl surface and organic material formed in the center of pearl, respectively.

考 察

X線マイクロアナライザ分析によって貝殻物質中に存在する元素の存在形態については前報(和田・須賀, 1976)で論じたが, こうした研究目的にとって真珠は貝殻に比べて多くの利点がある。すなわち, 貝殻外面と棲息環境水との間でイオンを直接交換する危険性や, 貝殻外面に付着した物質による汚染を配慮しない。しかも多量の有機相と無機相とが一定の位置関係を明確にとりながら固有の立体構造をもった稜柱層だけからなる稜柱層真珠や, 異常有機物質からなる有機質真珠を分析することにより, 各元素の存在形態を有機相や無機相との関連でより詳細に対応させうるし, 同じ稜柱構造でもアコヤガイは calcite, イケチョウガイは aragonite からなり, 無機相に関連する元素の存在形態を鉱物種との関連でも考察できる。

養殖真珠の微量元素濃度分布パターン

1. 淡水産真珠と海産真珠との間にみられる相違

アコヤガイによって養殖した海産真珠は, イケチョウガイによって養殖した淡水産真珠に比べ, Mg, Na, Cl, S などの元素を高濃度に含み, 逆に Mn 濃度はイケチョウガイの淡水産真珠やアコヤガイの真珠養殖に用いられる真珠核 (*Quadrula* や *Lamprotula* などの淡水産二枚貝の貝殻真珠層を球形にしたもの) で高い値を示す。この結果は淡水産二枚貝と海産二枚貝との貝殻無機成分を比較した化学分析(和田・藤貫, 1974)やX線マイクロ

ナライザ分析(和田・須賀, 1976)の結果と一致し、棲息環境水の各成分濃度や種の特性が貝の生理代謝を介して貝殻物質に含まれるそれぞれの濃度に反映する傾向があることを示唆する。

2. 真珠の組織構造間に生ずる元素濃度分布パタンの相違

真珠層 後述するように、淡水産種の Mn を除き今回の研究で調べた各元素濃度は、淡水産種も海産種も共に貝殻(和田・須賀, 1976を参照)および真珠の真珠層では他の組織構造に比較して全域にわたってほぼ一定で、変化するとしてもおだやかに変化する傾向がある。しかし Fig. 2, 8 と 10 からわかるように、各元素濃度が真珠層内で著しく変化することがあり、その原因としては異質層が形成してたり、真珠核との境界あるいは淡水産真珠の形成の中心にある有機物質や、標本作成過程で生じた亀裂や空隙などを指摘できる。

稜柱層 今回調べた多くの元素は、イケチョウガイ稜柱層真珠もアコヤガイ稜柱層真珠も、鉱物からなる prism と有機物質からなる interprismatic wall とから作られる稜柱層固有の立体構造に依存して激しく変動する独特の濃度分布パターンを示す。しかし低濃度の元素は稜柱層固有の濃度分布変化を現わしにくい。すなわち、Mg, Na, F などの元素はアコヤガイ稜柱層真珠で稜柱層固有の濃度分布パターンを示すのに対し、これらの元素濃度が低いイケチョウガイ稜柱層真珠では稜柱層固有の立体構造を反映した濃度分布パターンは明瞭には現われない。また Mn もアコヤガイ稜柱層真珠では固有の立体構造を反映した濃度分布パターンを現わさない。なお稜柱層構造に依存して変化する元素の濃度分布パターンは稜柱層の部分によってかなり変化するが、この変化は稜柱層を作る prism の大きさ、interprismatic wall の量、両者の分布などの違いにともなう稜柱層構造の部分的な変化や、標本作成にあたって稜柱層構造を切る角度に違いがあると薄切面に現われる prism と interprismatic wall の分布状態に変化を生ずることに主として原因する。

異常有機物質 有機質真珠は1ないし数種類の染色態度が異なる有機物質が異常に形成したもので、有機物質だけからなるものと鉱物果粒が僅かではあるが異常有機物質間に形成しているものがある。したがって後述するように、鉱物相と関連する Ca, Mg, Na, Mn, F などの元素はバックグランドに相当するほぼ一定の極く低い濃度を示し、有機物質とも関連する S, Cl, P などの元素、特に S と Cl 濃度分布は激しく変化しながら顕著なピークとなって現われる。

3. イケチョウガイ淡水産真珠にみられる Mn の周期的濃度分布変化

本研究からわかるように、成長量や質は異なるが同じ期間養殖した3つのイケチョウガイ真珠中の Mn 濃度分布は、互いにかなり類似した周期性を思わせるパターンを示す。すなわち各真珠とも真珠形成の中心の両側で対応した増減パターンを現わす。この事実は、貝の Mn 代謝および真珠袋上皮細胞の Mn 分泌代謝あるいはいずれかの Mn 代謝が、生理あるいは環境の季節変化に依存して周期的に変化する可能性を示唆する。なお Mn 代謝量がどんな時点で増減するかについては現在追求中である。

真珠および貝殻に含まれる微量元素の存在形態

Mg : Mg はアコヤガイ有機質真珠の異常有機物質ではバックグランドに相当する程度しか検出できず、また走査速度を配慮すると、稜柱層真珠の interprismatic wall を構成

する有機物質でも同様に極く低い濃度と考えられる。有機質真珠の異常有機物質のあるものは、稜柱層真珠の *interprismatic wall* の有機物質と染色性が類似し、真珠層の有機基質や稜柱層 *prism* 中の *interlamellar matrix* や *intercrystalline matrix* とは染色性を異にするが、外套外液中の大部分の Mg は真珠層中に含まれる有機基質の前駆物質と挙動をともにしないこと（和田・藤貫，未発表）などから、Mg は真珠や貝殻に含まれる有機相とは関係ない状態、すなわち鉱物相として存在すると結論できる。

このように Mg は鉱物相として存在するが、*calcite* からなるアコヤガイの稜柱層では高濃度に含まれ、同じ稜柱構造でもイケチヨウガイのように *aragonite* からなる稜柱層では *aragonite* からなる真珠層と同様に低濃度を示す。この事実は、Mg は Ca と置換して *calcite* 結晶中に入り易いことや、*calcite* の固溶体として存在する可能性を示唆する。しかし前報（和田・藤貫，1974；和田・須賀，1976）で論じたように貝殻中の Mg 量は S 量と非常に強い正相関を示し、これらの無機塩の存在も考えられる。

Na, Cl : Na は Mg と同様に、アコヤガイ有機質真珠の異常有機物質ではバックグラウンド程度しか検出できないし、稜柱層真珠の *interprismatic wall* を構成する有機物質で低濃度を示すから、大部分の Na は鉱物相と関連して存在すると考えられる。これに対して Cl は、有機質真珠の有機物質や稜柱層真珠の *interpismatic wall* を構成する有機物質中でかなり多量に検出されるだけでなく、真珠中に形成された異常有機物質塊や層、また石灰化前線で大量に検出されることから、かなりの Cl は有機相と関連して存在すると考えられる。

本研究では明らかでないが、前報（和田・須賀，1976）で指摘したように、アコヤガイ貝殻真珠層やマガキ貝殻白墨質中の Na と Cl 濃度は互いに正相関を示しながら変化する。マガキ貝殻白墨質では *halite* が証明されており（和田・藤貫，1974）、海産貝類の貝殻真珠層では、Towe and Thompson (1972) が指摘したように、Na と Cl は貝殻組織や *aragonite* 結晶中に封入された外套外液のインクルージョンとしても存在する可能性がある。

S : 貝殻中では有機 S と無機 S とがあり、有機 S として硫酸エステルと蛋白質を作る含硫アミノ酸とがあることを前報（和田・須賀，1976）で指摘した。本研究で有機質真珠の異常有機物質や稜柱層真珠の *interprismatic wall* を構成する有機物質から検出した多量の S は、染色性（和田，1964）を配慮すると、貝殻の殻皮や稜柱層の *interprismatic wall* 中の S と同じように主に蛋白質を作る含硫アミノ酸の S と考えられる。

P : イケチヨウガイ稜柱層真珠では *interprismatic wall* を構成する有機物質中で P 濃度は増加し、またアコヤガイ有機質真珠の異常有機物中で検出されることから、真珠中に有機 P が存在するといえる。しかしアコヤガイ稜柱層真珠では鉱物が存在する *prism* 中で P 濃度が増加しており、近年無機 P が無脊椎動物の石灰化組織や生体内鉱物で発見されていること（Lowenstam, 1974）を配慮すると、前報（和田・須賀，1976）でも指摘したように、無機 P が軟体動物の貝殻や真珠中にも存在する可能性がある。

Mn : Mn 濃度はアコヤガイ真珠では真珠核の部分、すなわち淡水産二枚貝貝殻真珠層、で真珠核の周りに形成した真珠層—すなわち真珠袋が分泌した部分—より高い。しかも Mn 濃度分布は、すでに述べたようにイケチヨウガイ真珠では周期的な変化を示す。さら

に、Mn 濃度は鈹物のある prism で増加し、有機物質からなる interprismatic wall で減少することが本研究から明白である。また Mn 濃度は有機質真珠の異常有機物質中ではバックグラウンド程度であったこと、イケチョウガイ外套外液中に存在する Mn の一部は有機物質と錯塩をつくっていること (Wada and Fujinuki, 1976; 未発表) などを配慮すると、Mn は貝殻や真珠中で主に無機塩として存在し、その一部は有機相との関連で存在すると考えられる。

F: アコヤガイの有機質真珠や稜柱層真珠を他の真珠と比較するとわかるように、貝殻や真珠中の F は鈹物相と関連して存在すると考えられる。

真珠の石灰化現象と品質

真珠袋上皮の形態 (中原・町井, 1956; 青木, 1966) や細胞内小器官 (Tsujii, 1968; Wada, 1970) は、真珠層、稜柱層あるいは異常有機物質のいずれを分泌するかによって互いに特徴づけられており、分泌された有機物質のアミノ酸組成 (Tanaka et al., 1963; Wada, 1976) も互いに大きく異なる。しかし真珠袋の分泌液を直接化学分析することは、液量が少なくまた採液自体も難かしいので不可能である。ところで Wada and Fujinuki (1976) は海産二枚貝の外套外液を化学分析し、外套外液の無機成分とその濃度は aragonite 殻を作る貝と calcite 殻を作る貝との間で差がないこと、また貝殻成長期と停止期との間でも大きな差はなく、有機物質と錯塩を作る重金属イオンや有機成分と考えられる一部の陰イオンを除いて、棲息海水のそれにほぼ類似することを示した。

本研究とこれまでの報告で得られた結果から、二枚貝の外套膜外面上皮およびそれ由来する真珠袋上皮の分泌液の主要な無機成分とその濃度は、生成する物質—少なくとも鈹物種—や石灰化速度によって大きく相違することはない。貝殻や真珠の石灰化は、生理的に調節された低過飽和濃度 (Wada and Fujinuki, 1976) のもとでおこるから、鈹物結晶核形成を誘起したり、鈹物種を決定する要素が石灰化の場にあるかどうかはまず問題で、上皮で産生され分泌された有機基質の化学成分や構造が大きな鍵をにぎっている。次に上皮が石灰化で消費された $\text{Ca}^{2+} \times \text{CO}_3^{2-}$ をいかにすみやかに供給できるかどうかは石灰化速度に関係すると結論できる。

要 約

1. アコヤガイおよびイケチョウガイの各種養殖真珠の pearl sac—pearl 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、真珠や貝殻中の微量元素の存在形態および真珠の品質を石灰化現象との関連で考察した。

2. 真珠中の元素濃度分布パターンは真珠の組織構造や成分組成に関連して変化し、ある種の元素濃度分布パターンは塩類濃度が著しく異なる棲息環境水に住むアコヤガイとイケチョウガイの間で顕著な差を生じた。

3. Mn はイケチョウガイ真珠では周期的な濃度分布変化をおこない、貝の Mn 代謝や真珠袋上皮細胞の Mn 分泌代謝が生理あるいは環境の季節変化に呼応して周期的に変化する可能性を示した。

4. 真珠や貝殻中に含まれる各種の微量元素の存在形態を推測した。すなわち

Mg は鉍物相との関連で存在し、その濃度は生成する炭酸塩の性状に依存して決まる。

Na と Mn は主に鉍物相との関連で存在し、Na はカキ貝殻白墨質や海産貝類貝殻真珠層では、組織構造中や鉍物結晶中に封入された外套外液のインクルージョンとして存在する可能性がある。

S, P および Cl は、有機相と関連したものと、鉍物相と関連したものととの2態がある。

F は鉍物相と関連した極く微量の成分である。

謝 辞

稿を終るに臨み、有益な助言を下された通産省工業技術院地質調査所藤貫正主任研究官、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、ならびに実験動物の飼育管理を下された滋賀県水産試験場水島久宣技師と滋賀県環境センター前河孝志技師に謹んで感謝の意を表す。またアコヤガイ養殖真珠の材料を提供下された島村真珠、ならびにイケチョウガイの細胞入れ手術に協力下さった大昭真珠に深謝する。

Summary

1) The distribution and content of calcium, magnesium, sodium, manganese, chlorine, phosphorus, sulfur and fluorine in various pearls cultured by the freshwater bivalve, *Hyriopsis schlegelii*, and the marine bivalve, *Pinctada fucata*, were investigated by electron microprobe analysis, microradiography and colour television display for clarify the state of minor elements in pearls and the mineralization patterns of pearls.

2) The distribution and content of the minor elements in pearls depended on (1) structure, (2) composition (inorganic phase or organic phase) and (3) crystal type (calcite or aragonite) of pearls, as reported in the preceding paper. Moreover (4) the concentration of electrolytes in environment (freshwater or sea water), (5) species of molluscs, and (6) physiological condition of organisms appear to influence the content of some minor elements in pearls and shells.

3) Manganese in *Hyriopsis* pearls shows the periodical change in distribution and concentration during the cultivation of pearls. This result obtained in the study suggests that the manganese metabolism by pearl sac epithelium and/or organisms periodically varies with the seasonal changes of physiological and environmental conditions.

4) It is assumed that the minor elements contained in pearls and shells are in the following state.

Magnesium was found in the mineral phase and its content always depended on

pearl and shell mineralogy. The ion seems to replace calcium ions in calcite and/or occur as solid solution of calcite.

Most of sodium and manganese were detected in the mineral phase of pearls and shells. It is possible that the greater part of sodium exists in the inclusion of extrapallial fluid trapped in aragonite crystals of nacre of marine bivalves as well as in chalky deposit of *Crassostrea* shell.

Sulfur, phosphorus and chlorine were found in not only mineral phase but also organic phase, respectively.

Fluorine seems to be a minor element in mineral phase.

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—, 真珠技術研究会報4(4): 1-204.
- Lowenstam, H.A. 1974. Impact of life on chemical and physical processes. in 'The Sea Vol. II' (ed. by Goldberg, E.D.), John Wiley & Sons Inc. pp. 715-796.
- 中原皓・町井昭 1956. 真珠袋の組織学的研究 I. 異常真珠と正常真珠の真珠袋の比較. 国立真珠研報 1: 10-13.
- 須賀昭一 1973. 「歯の研究法」(須賀昭一・田熊庄三郎・佐々木哲編), 医歯薬出版 pp. 54-154.
- 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, pp. 1-9.
- Tsuji, T. 1968. Studies on the mechanism of shell- and pearl-formation. XI. The submicroscopical observations on the mechanism of formation of abnormal pearls and abnormal shell. Jour. Fac. Fish., Pref. Univ. Mie 6: 59-66.
- 和田浩爾 1964. 軟体動物石灰化組織の鈹物化に関する研究 IX. 真珠層真珠, 稜柱層真珠および有機質真珠の有機基質の比較組織化学的観察. 国立真珠研報9: 1099-1103.
- 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.
- 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. 1976. Amino acid composition of organic matrices in various pearl cultured by *Pinctada fucata*. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 20: 2209-2213.
- Wada, K. and Fujinuki, T. 1976. Biomineralization in bivalve molluscs with emphasis on the chemical composition of the extrapallial fluid. in 'The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants' (ed. by Watabe, N. and Wilbur, K.M.), Univ. South Carolina Press, Columbia, pp. 175-190.
- 和田浩爾・須賀昭一 1976. 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. 国立真珠研報20: 2219-2240.

アコヤガイの血球数、血球組成および 血球の大きさの季節変化^{*†}

船 越 将 二
国立真珠研究所

変温動物であるアコヤガイの代謝は、環境水温によって強く影響を受ける（植本，1968 伊藤，1976）とともに水温その他環境要因の季節的な推移にもなって生殖（立石・安達，1957；植本，1958），体構成物質（田中・波多野，1952）および石灰代謝（和田，1972）に周期的変化が認められる。

血リンパ液は貝体内において内部環境を形成し、体内組織器官の生理的ならびに病理的变化は血リンパ液の性状に反映すると考えられる。血リンパ液の性状変化が貝の生理とどのような因果関係にあるかを追求するにあたり、その季節変化についての基礎知識を持つ必要があるので、アコヤガイを用いて血球数、血球組成および無顆粒血球の大きさの季節変化を調べた。

材料および方法

長崎県大村市玖島崎の国立真珠研究所大村支所前の海面下 1.5m 層に段籠に収容して垂下養殖した愛媛県産の満 2 年のアコヤガイを用いて、1971 年 6 月から 1973 年 3 月にかけて測定し（1971 年 6 月 23—25 日，7 月 6—9 日，7 月 26 日，8 月 24—26 日，9 月 27—30 日，10 月 21—23 日，11 月 22—26 日，12 月 14—17 日，1972 年 1 月 28 日—2 月 3 日，4 月 28 日，6 月 26 日—28 日，8 月 25 日，11 月 13 日，1973 年 1 月 11—12 日および 3 月 6 日に測定した。），1 回の測定に 12—15 貝を使用した。採血前の供試貝には物理的刺激を与えないように注意し、各養殖籠から 1 貝あて取り、午前 8 時—10 時に現場の筏で採血し、その場で直ちに後述の血球数ならびに血球組成測定用の標本作製を行なった。血リンパ液は注射器で心室から採血し、貝を水中から取り出して 30 秒以内に採血を完了した。試験貝は無作意に抽出したが、貝殻内面に有機質の異常分泌が認められるものおよび肉眼的に見て外套膜をはじめ生殖腺等軟体部が透明な明らかに不健康と思われる衰弱貝は供試貝から除外した。

血球数

血リンパ液を直接トーマ血球計算板（血検付）上に 1 滴々下し、直ちに反転して、シャーレの中でホルマリンガス（気温）に約 10 秒間さらして血球を固定した後、カバーガラス

* Shoji Funakoshi. Seasonal changes of hemocyte counts, hemocyte constituents and size of hemocytes in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. With English summary, p. 2306 Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 21: 2299—2308.

† 国立真珠研究所業積 No. 228. (国立真珠研究所報告 21: 2299—2308, 昭和52年 8 月)

をかけて湿室（シャーレの底に水を含ませた濾紙をしいたもの）に入れておき、できるだけすみやかに位相差装置（ニコン位相差 BM 40×10）で全血球数を計測した。

血球組成

スライドガラスの上に5%グルタルアルデヒド海水液を1滴取り、その上に血リンパ液を2滴々下し、有柄針でよく攪拌後、20—40 μの太さのガラス繊維を間にはさんでカバーガラスをかけ、周囲をパラフィン・バルサムで封じた。1個の貝について200血球を位相差（ニコン位相差 BM 100×10）で観察し、船越（1974）の分類に従って無顆粒血球、粗大顆粒血球および微小顆粒血球の3種類に分けてそれぞれの血球の比率を算定した。

平均無顆粒血球直径

無顆粒血球の直径の測定には血球組成算定と同一資料を用いた。固定した無顆粒血球は通常だ円形であり、接眼マイクロメーターを用いて長径と短径を測定してその平均値を血球の直径とし、1個の貝について無作意に60個の無顆粒血球を測定し、その平均値を平均無顆粒血球直径とした。

結果および考察

性別、体重と血球数および血球組成

雌雄と血球数および血球組成の関係を示したのが Fig. 1 および Table 1 であり、体重（湿肉重量）と血球数ならびに血球組成の関係を示したのが Fig. 2 および Fig. 3 であ

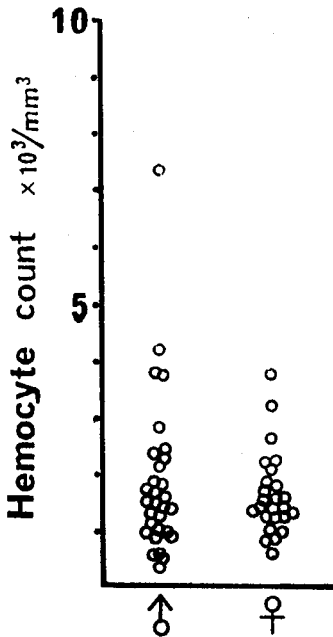


Fig. 1 Relationship between hemocyte counts and sex of 3-year-old pearl oysters in summer (27°C).

Table 1. Hemocyte constituents (%) in hemolymph between male and female of 3-year-old pearl oysters in summer (27°C)

		Agranular hemocyte	Coarsely granular hemocyte	Finely granular hemocyte
Male	Mean	95.7	1.9	2.1
	S.D.*	2.9	2.7	1.7
	S.E.†	0.7	0.6	0.4
	n‡	16	16	16
Female	Mean	97.8	0.8	1.0
	S.D.*	1.5	0.9	1.1
	S.E.†	0.4	0.2	0.3
	n‡	13	13	13

* Standard deviation

† Standard error

‡ Number of test animals

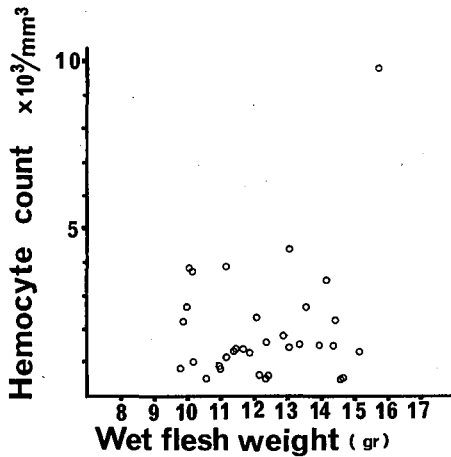


Fig. 2 Relationship between hemocyte counts and wet flesh weight of 3-year-old pearl oysters in summer (27°C).

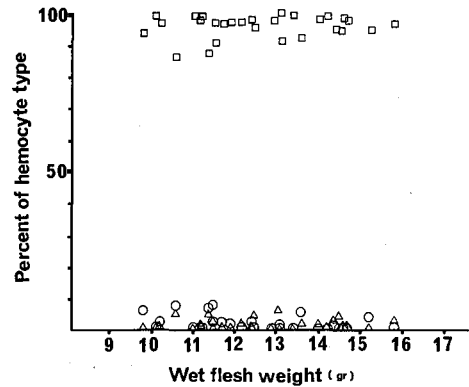


Fig. 3 Relationship between hemocyte constituents and wet flesh weight of 3-year-old pearl oysters in summer (27°C).

□, agranular hemocyte
○, coarsely granular hemocyte
△, finely granular hemocyte

る。Fig. 1 および Table 1 に示したように血球数ならびに血球組成には雌雄による差は認められず、また Fig. 2 および Fig. 3 に示したように血球数ならびに血球組成と体重の間に関連は認められなかった。したがって、本研究では試験貝は雌雄および体重には関係なく無作意に抽出した。

血球数

血球数にみられる季節的な推移は Fig. 4 および Appendix table 1 に示した。1971年6月23—25日水温23—24°Cにおいて血球数は平均3,000/mm³であった。その後7月上旬には水温は27—28°Cに上昇しほぼこの状態が8月下旬まで持続したとき、血球数は7月26日には平均1,700/mm³と少なくなったが、8月24—26日の測定値は平均3,100/mm³で7月と9月の測定値にくらべて高かった。この理由として、血球数は多くの個体では700—2,300/mm³に集まっていたが、4,000—8,000/mm³という高い値を示す個体も40%以上出現したために平均値が前後の時期にくらべて高い値を示したことがあげられる。9月27日水温24.5°Cでは平均1,700/mm³という低い値を示したが、その後秋から冬にかけて水温が下降するともなって血球数は増加し、11月22—26日水温16—17°Cのとき平均3,500/mm³、12月14—17日水温11—12°Cでは平均5,100/mm³となり1972年1月28日—2月3日水温9—10°Cでは平均7,200/mm³に増加した。春季水温が16.8°Cに上昇した冬眠覚せい後(小林・東畑, 1949 a, b)の4月28日には血球数は平均2,500/mm³に減少し、その後夏にかけて漸減し8月25日水温27°Cでは平均1,800/mm³となり、次いで秋から冬にかけては前年同様に増加し、1973年3月6日水温10°Cでは平均5,000/mm³となった。

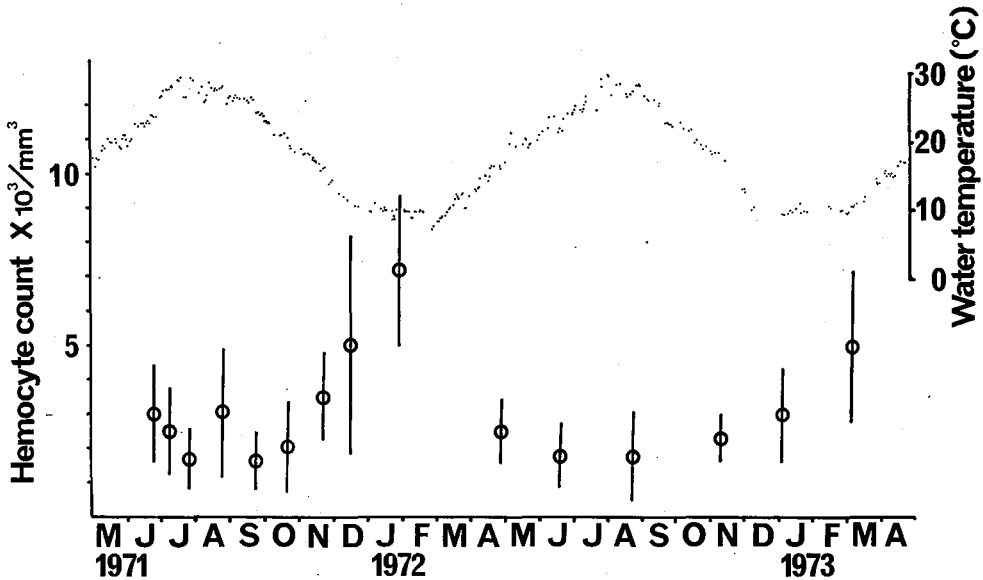


Fig. 4 Seasonal changes in hemocyte counts of pearl oysters. Vertical lines represent the 99% confidence limits.

1971年8月中旬—9月中旬にかけて大村湾で養殖中のアコヤガイに大量斃死(原因不明)が起り、本実験貝にも28%の斃死が認められた。同年8月24—26日の測定時において、前述のように4,000—8,000/mm³もの血球数を持つ個体数が多くなったため、血球数は個体による変異が大きかったが、一方1972年8月—9月には前年のような斃死現象は起らず同年8月25日の測定時には異常に高い血球数をもつ個体は少なくまた個体間の変異も小さかった。従って1971年8月24—26日の測定結果において異常に高い血球数を持つ個体が多く存在したことおよび個体間の変異が大きかったことは貝の生理的異常ないし斃死と強い関連があると考えられる。かりに1971年8月24—26日に測定した大量斃死時における血球数の異常な高まりを除外して考えるならば、夏の水温上昇と秋から冬にかけての水温下降にともなう血球数の変化は1971、1972の両年とも同じ動向を示すことからして、アコヤガイの血球数は夏季に少く、秋から冬にかけて漸増し、その後春から夏にかけて減少するという季節変化をするといえよう。

血球数は1971年および1972年ともに夏季にほぼ等しい最低値を示したが、秋から冬にかけての増加の程度は両年の間で相異があり、この原因としては両年の間の環境条件のちがいおよび1971年は2年貝であるのに対し1972年は1年加令した3年貝となっていることによる年令差が考えられるがこのことについては今後検討する。Yeager and Tauber (1935)は海産無脊椎動物の多くの種類について血球数を測定し、個体間の変異が大きいことを認めており、Narain (1973)は弁鰓類の血球数は脊椎動物にくらべて少なく、また個体間に変異が認められると述べている。アコヤガイにおいても Appendix table 1 の標準偏差に示したように比較的大きな個体間の変異が認められ、特に1971年8月24—26日の斃死現象

の起った時期および水温 9—12°C の冬眠時期の血球数に個体間の変異が大きい傾向を示した。

血球組成

アコヤガイの血リンパ液中には無顆粒血球 (*Agranular hemocyte*), 粗大顆粒血球 (*Coarsely granular hemocyte*) および微小顆粒血球 (*Finely granular hemocyte*) の3種類の

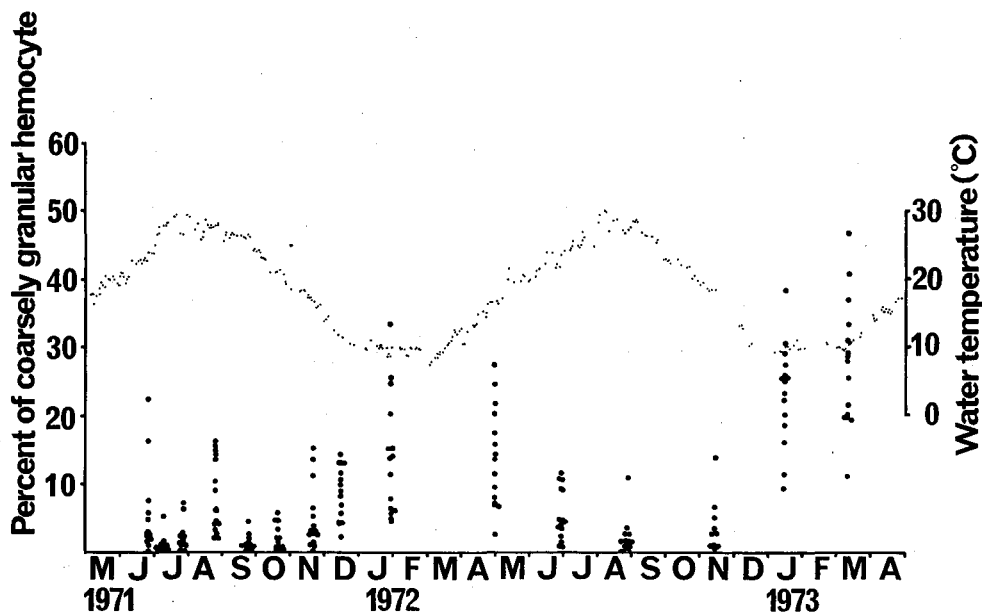


Fig. 5 Seasonal changes in the ratio of coarsely granular hemocytes in the hemocyte population of pearl oysters.

血球が常時認められる。測定時期ごとの血球組成は Appendix table 1 に示してあるように、微小顆粒血球が血球組成に占める比率は低く、各測定時期を通じて平均0.8—2.8%で明瞭な季節変化は認められず、従って血球組成の変化は無顆粒血球と粗大顆粒血球の間の相対的な出現比率の変化として認められた。

粗大顆粒血球が全血球中に占める比率は Fig. 5 に示してあり、1971年6月23—25日水温23—24°Cにおいて平均5.6%であった。その後水温が27—28°Cに上昇し、これが8月下旬まで持続したとき、7月6—9日には平均1.3%また7月26日には平均2.3%と低い値を示した。しかし8月24—26日には粗大顆粒血球の比率は平均8.1%と一時高くなった。その後9月27日—30日水温24.5°Cにおいて平均1.4%と低い値を示し、その後の水温低下につれて11月22—26日水温16—17°Cで平均4.9%に増加し、さらに水温が低下してアコヤガイが冬眠状態(小林・東畑, 1949 a, b)にはいった12月14—17日水温11—12°Cでは平均8.5%, さらに1972年1月28日—2月3日水温9—10°Cでは平均13.8%に増加を示した。次いで春季水温が16.8°Cに上昇した冬眠覚せい後の4月28日においても粗大顆粒血球の比率は平均13.7%で、1月28日—2月3日の測定値とほぼ同様な値を示していたが、その

後の水温上昇にともないその比率は減少し 8月25日水温27℃では平均1.8%となった。秋季11月13日水温19℃において粗大顆粒血球の比率は平均3.8%に増加し、その後水温が下降してアコヤガイが冬眠状態にあった1973年1月11—12日水温9.6℃では平均22.6%と著しい増加を示し、さらに3月6日水温10℃では平均27.1%にまで増加した。1971年8月24—26日の粗大顆粒血球の比率は平均8.1%であったがその値は前後の時期のものにくらべて高い値を示しており、前述したようにこの時期には大量斃死が起きている。一方1972年8月—9月には斃死現象は起らず、同年8月25日測定 of 粗大顆粒血球の比率は平均1.8%で低く、また1971年および1972年とも夏の水温上昇にともなって粗大顆粒血球の比率は低下し、秋から冬にかけては増加するという同様な季節的推移を示したことからして、1971年8月24—26日の測定結果にみられた粗大顆粒血球の高い比率は貝の生理異常ないしは斃死と強い関連があると考えられる。従って粗大顆粒血球組成の季節的推移を考察するに当っては、1971年8月24—26日の測定値を除いて考えるのが適切であると思われるので、粗大顆粒血球の全血球中に占める比率は夏に低く、秋から冬にかけて高くなり、その後水温が上昇しはじめる早春(16.8℃)まではその比率は高い値を保つが、夏季に向けての水温上昇にともない減少するという季節変化を示すといえる。

無顆粒血球が血球組成に占める比率は Appendix table 1 に示したように、粗大顆粒血球のそれと相対的に変化し、秋から冬にかけて粗大顆粒血球の比率が高くなるのとは反対に無顆粒血球の比率は減少を示している。血球数についてみると Fig. 4 に示したように秋から冬にかけてはその増加が起っており、血リンパ液中に出現する無顆粒血球および粗大顆粒血球の数はともに増加しているのであるが、無顆粒血球の増加の程度が粗大顆粒血球にくらべて低いために組成に占める比率は相対的に減少した。1971年8月の値は別として、夏季における粗大顆粒血球の比率は1971年および1972年ともに近似しているが、秋か

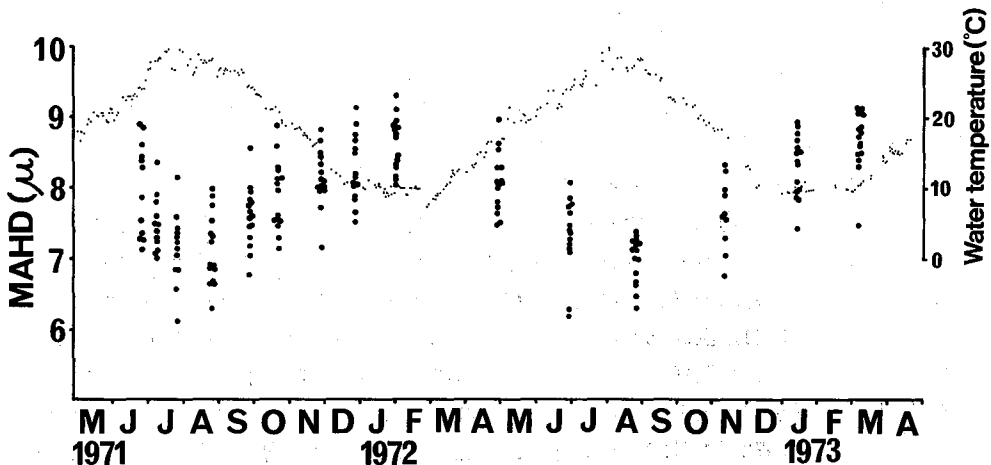


Fig. 6 Seasonal changes in mean agranular hemocyte diameters (MAHD) of pearl oysters.

ら冬にかけての増加の程度は兩年の間に相異がある。これは前述の血球数の場合と同様に環境条件および年令差との関連で今後検討すべき問題である。

平均無顆粒血球直径 (Mean agranular hemocyte diameter)

平均無顆粒血球直径とは血リンパ液中出现する無顆粒血球の平均的な大きさを示す1つの指数であり, その季節的な変化を Fig. 6 および Appendix table 1 に示した。平均

無顆粒血球直径は1971年6月23—25日水温23—24℃では平均7.9 μ であったが, その後水温が27—28℃に上昇してこれが持続した8月24—26日の測定時には平均7.0 μ と小さくなった。次いで秋から冬にかけての水温下降にともない平均無顆粒血球直径は大きくなり, 1972年1月28日—2月3日水温9—10℃で平均8.5 μ になった。春季水温が上昇して16.8℃になった4月28日には平均8.0 μ とその値は低下し, その後夏にかけての水温上昇にともないさらに小さくなって8月25日水温27℃では平均6.9 μ となり, 前年同時期とほぼ等しい値を示した。その後秋から冬にかけての平均無顆粒血球直径の値は前年と同様に大きくなり, 1973年3月6日水温10℃では平均8.6 μ となった。すなわち平均無顆粒血球直径は夏に小さく, 秋から冬にかけての水温低下につれて大きくなり, 春から夏にかけての水温上昇にともない小さくなるという明瞭な季節変化が認められた。

血リンパ液中出现する無顆粒血球の直径は4—13 μ の範囲にあり, その大きさごとの出現度数分布を季節ごとに比較すると (Fig. 7), 夏季の7—8月は直径5—6 μ の比較的小形の血球の出現率が他の測定時期にくらべて高く, 直径9—10 μ の比較的大形の血球の出現率が低かった。その後秋から冬にかけての水温下降にともなって, 大形のもの出現率が高くなり, 小形のものそれが低くなった。このように無顆粒血球の直径にみられる大きさごとの出現率に季節変化が認められ, これが平均無顆粒血球直径の季節変化となって現れているといえる。

アコヤガイの血リンパ液中にみられる無顆粒血球には, 直径4—13 μ の範囲で色々な大きさのものが同時に出現することと核細胞体比の値は細胞が大きいもの程小さいことなどから, 血リンパ液中に存在する無顆粒血球は同種類の血球で種々の成長過程にあるものが同時にまじって存在していると考えられる。一方, 直径約7 μ 以下のものには食作用はなく, 7—13 μ のものには比較的強い食作用が認められることから, 無顆粒血球には直径約7 μ を境界として

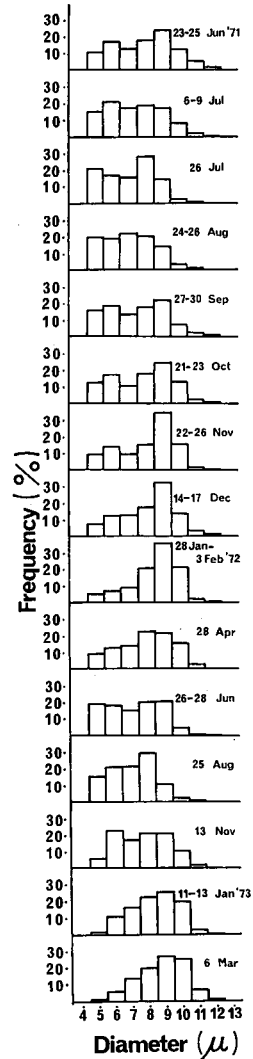


Fig. 7 Seasonal changes in the size-frequency distributions of the diameters of agranular hemocytes of pearl oysters.

それより大きいものと小さいものの2種類の機能的に異なる細胞が存在する可能性もある(船越, 1974)。アコヤガイの無顆粒血球の細胞学的ならびに生化学的知見は非常に少なく, 平均無顆粒血球直径の季節変化の原因を追求するにあたっては, 血球の形態と機能, 血球の生成と消耗の間の均衡, さらには血球形成素材との関連で今後検討されなければならない。

要 約

1) アコヤガイの血球数は夏季に少なく, 秋から冬季にかけての水温下降にともない増加し, 春から夏季にかけての水温上昇につれて減少した。

2) 粗大顆粒血球が全血球中に占める比率は, 夏季に低く, 秋から冬季にかけての水温低下につれて高くなり, 春季の冬眠覚せい後の水温16.8°Cにおいてもその比率は高い状態で推移したが, その後の夏季に向けての水温上昇にともない低くなった。

3) 平均無顆粒血球直径は夏季に小さく, 秋から冬季にかけての水温下降にともない大きくなり, 春から夏季に向けての水温上昇につれて小さくなった。

Summary

This study investigated the seasonal changes in the hemocyte counts, the hemocyte constituents and the mean agranular hemocyte diameters in the hemolymph withdrawn from the ventricle of the pearl oysters, *Pinctada fucata* (Gould), cultivated in the Omura bay.

Mean agranular hemocyte diameter indicates the average size of agranular hemocytes present within hemolymph. 60 agranular hemocytes per each oyster were required for the determination of mean diameter of cells. 12-15 pearl oysters were used for each experiment.

The results are as follows:

1. Hemocyte counts increased from autumn to winter, and decreased from spring to summer.

2. The ratio of coarsely granular hemocytes in hemocyte population increased with the decrease of water temperature from autumn to winter, and the relative high ratio was kept yet in early spring (16.8 °C), but subsequently decreased with the increase of water temperature.

3. With the seasonal changes of water temperature, mean agranular hemocyte diameter became larger from autumn to winter, and smaller from spring to summer.

文 献

船越将二 1974. アコヤガイの血球について. 国立真珠研報 18: 2140-2147.

伊藤克彦 1976. 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. 国立真珠研報 20: 2254-2275.

- 小林新二郎・東畑正敬 1949 a. 真珠養殖の研究 II. アコヤ貝の冬期の生活力に就いて (1). 日水誌 14(4):196—199.
- 小林新二郎・東畑正敬 1949 b. 真珠養殖の研究 III. アコヤ貝の冬期の活力に就いて (2). 日水誌 14(4):200—202.
- Narain, A. S. 1973. The amoebocytes of lamellibranch molluscs, with special reference to the circulating amoebocytes. *Malacological Review* 6:1-12.
- 田中正三・波多野博行 1952. 真珠に関する生化学的研究 (第1報) アコヤ貝成分の季節的变化について. 日化 73(12):870—873.
- 立石新吉・安達甫朗 1957. アコヤガイ *Pinctada martensii* (Dunker) の生殖巣の周年変化に関する組織学的観察. 長崎大水産研報 5:75—79.
- 植本東彦 1958. アコヤガイ *Pinctada martensii* (Dunker) の生殖腺に関する研究. 国立真珠研報 4:287—307.
- 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.
- 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.
- Yeager, J. F. and Tauber, O. E. 1935. On the hemolymph cell counts of some marine invertebrates. *Biol. Bull.* 69(1):66-70.

Appendix table 1 Seasonal changes in hemocyte counts, hemocyte constituents and mean agranular hemocyte diameters of pearl oysters.

Date	Number of test animals	Hemocyte count/mm ³ M±S*	MAHD† (μ) M±S*	Hemocyte constituents (%)			Water temperature (°C)
				AH‡	M±S* CGH''	FGH¶	
Jun. 23-25, '71	12	3000±1600	7.9±0.6	91.4±6.7	5.6±6.6	2.8±1.8	23-24
Jul. 6-9 ,	12	2500±1400	7.4±0.3	96.6±2.5	1.3±1.7	2.0±1.2	27-28
Jul. 26 ,	12	1700±1000	7.0±0.4	96.0±2.7	2.3±2.3	1.6±1.1	27-28
Aug. 24-26,	15	3100±2400	7.0±0.4	89.8±5.8	8.1±5.2	1.9±1.6	28
Sep. 27-30,	15	1700±1100	7.5±0.4	97.7±2.0	1.4±1.6	0.8±0.9	24.5
Oct. 21-23,	15	2100±1700	7.8±0.4	96.5±2.3	1.7±1.8	1.6±1.4	22
Nov. 22-26,	15	3500±1700	8.1±0.2	92.2±4.5	4.9±4.5	2.7±2.2	16-17
Dec. 14-17,	15	5100±4000	8.2±0.4	89.4±3.8	8.5±3.9	1.9±1.2	11-12
Jan. 28-Feb. 3, '72	15	7200±2800	8.5±0.3	83.2±8.4	13.8±8.5	2.8±1.5	9-10
Apr. 28 ,	15	2500± 900	8.0±0.4	83.5±7.2	13.7±7.2	2.6±0.9	16.8
Jun. 26-28,	14	1800± 900	7.3±0.5	92.2±4.2	5.5±3.8	2.2±1.5	23-24
Aug. 25 ,	15	1800±1600	6.9±0.3	96.7±3.1	1.8±2.6	1.3±1.8	27
Nov. 13 ,	15(10)**	2300± 900	7.5±0.4	94.8±3.7	3.6±3.8	1.3±0.5	19
Jan. 11-12, '73	15	3000±1300	8.2±0.4	76.1±8.3	22.6±7.9	1.1±0.6	9.6
Mar. 6 ,	15	5000±2800	8.6±0.4	71.1±9.7	27.1±8.8	1.6±1.5	10

* M : mean, S : standard deviation

† Mean agranular hemocyte diameter

‡ Agranular hemocyte

'' Coarsely granular hemocyte

¶ Finely granular hemocyte

** Number of test animals for hemocyte count measurement

アコヤガイの血球組成および心臓搏動数に およぼす溶存酸素量の影響^{*,†}

船 越 将 二

国立真珠研究所

血リンパ液は体内を循環し、生理的機能を営みながら体の内部環境を形成しており、海産貝類では棲息する海水の塩分濃度の変化にさいしては浸透圧等その血液性状に変化がみられ（川本，1954；Gilles，1972），水温の変化と血球数の増減は密接な関係がある（Feng，1965）ことが報告されている。さらに *Bucephalus sp.* および *Minchinia nelsoni* の寄生によって血リンパ液中の遊離アミノ酸組成に変化が起き（Feng，Khairallah and Canzonier，1970），細菌を貝体内に接種することによって血球組成が変化することが報告されている（Feng，Burke and Khairallah，1971）。このように環境要因の変化ならびに体組織の生理的ないし病的変化にさいしては血リンパ液の性状に変化が認められるという知見が得られており，今回は環境要因の1つである溶存酸素をとりあげ，その減少とそれともなう血球数および血球組成の変化について水槽実験を行ない検討したので報告する。

方 法

長崎県大村市玖島崎国立真珠研究所大村支所前の海面下2 m層に垂下養殖した愛媛県産満3年貝を用いた。血球数および血球組成は雌雄ならびに体重（湿肉重量）とは関連が認められない（船越，1977）ので，供試貝は無作意に抽出したが，ポリキータの貝殻穿孔等により貝殻内面に茶褐色の有機質が大量に分泌されているものと肉眼的にみて外套膜をはじめ生殖腺等軟体部が透明に見えるいわゆる水貝は除外した。

実験は1974年7月20—25日に行ない，貝は貝殻外面の付着物を除去後，17 l容のガラス水槽に12 lの海水を入れ，その中に15貝を収容して1群となし，6群を作った。供試貝は水槽に入れた後，24時間は充分な注水を行ない（水槽内の溶存酸素量は4.3 ml/l以上を常に保っていた），その後注水を止めると同時に実験を開始した。水面は流動パラフィン等でおおうようなことをせず自由面とし，酸素等のガス交換は自由としたが，貝の活発な呼吸代謝によって水槽水の溶存酸素量は短時間で急激に減少した。

測定は0（実験開始時），1.5，3，4.5および24時間後にそれぞれ1群ずつ供試した。別にエアレーションを行なって溶存酸素量を4.3 ml/l以上に保った1群を作り，28時間後に測定した。溶存酸素量は貝の位置する水槽の底層を採水してウインクラー法により測定し

* Shoji Funakoshi. Effect of dissolved oxygen contents on the hemocyte constituents and heart rate of the pearl oyster, *Pinctada fucata*. With English summary, p. 2314 Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 21: 2309—2314.

† 国立真珠研究所業績 No. 229. (国立真珠研究所報告21: 2309—2314. 昭和52年8月)

た。実験期間中水槽はウォーターバスで $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (環境水温) に保った。

血球数

心室から採血した血リンパ液を直接トーマ血球計算板(血検付)上に1滴々下し、直ちに反転して、シャーレの中でホルマリンガス(室温)に約10秒間さらして血球を固定した後、カバーガラスをかけて位相差装置(ニコン位相差 BM 40×10)で全血球数を測定した。

血球組成

スライドガラスの上に5%グルタルアルデヒド海水液を1滴取り、その上に血リンパ液を2滴々下し、有柄針でよく攪拌した後、20—40 μ の太さのガラス繊維を間にはさんでカバーガラスをかけ、周囲をパラフィン・バルサムで封じた。1個の貝について200血球を位相差(ニコン位相差 BM 100×10)検鏡し、無顆粒血球、粗大顆粒血球および微小顆粒血球の3種類に分けて(船越, 1974)それぞれの比率を算定した。

心臓搏動数

主として Feng (1965) の方法に従って、右側貝殻の心臓直上部をおよそ5×10 mmの長方形に切除して貝殻に窓を開け、囲心腔膜を傷つけないように注意して窓の部分の外套膜を切除した後、貝殻に開けた窓の部分は透明なビニール膜を外科用接着剤アロンアルファで接着して閉鎖する。以上の処置をした貝を使って外部から心臓搏動を観測した。観察用の貝は24時間流水水槽中で静養後、1) 規則正しい心臓搏動があること、2) 糞の排泄があることおよび3) 貝殻をガラス棒の先で軽くたたくとすみやかに閉殻することを確かめた後に実験に供し、10—15回の搏動に要する時間をストップウォッチで測定し、回数/分に換算した。

海水15 lを入れたガラス水槽に9貝を収容し、0(実験開始時)、1, 2, 3, 4, 5 および8時間後に溶存酸素量と心臓搏動数を測定した。

結 果

溶存酸素量の経時的変化と血球数ならびに血球組成の変化は Fig. 1, Fig. 2 および Table 1 に示した。実験開始時の溶存酸素量は4.33 ml/l であり、アコヤガイの活発な呼吸によって1.5時間後2.55 ml/l, 3時間後0.77 ml/l, 4.5時間後0.23 ml/l そして24時間後0.11 ml/l と比較的短時間で著しく減少した。一方エアレーションを行なった群は28時間後の測定時に4.51 ml/l と十分な溶存酸素量が存在し、その時の血球数および血球組成は実験開始時の群と同様な値を示していることからして、溶存酸素が十分に存在する状態下では28時間以内の止水状態で水槽内実験によって血球数および血球組成に変化が起きないことを示している。

血球数は溶存酸素量が実験開始時の4.33 ml/l および1.5時間後の2.55 ml/l ではそれぞれ平均2,000, 1,800/mm³で近似した値を示しており、3時間後溶存酸素量が減少して0.77 ml/l になった時血球数は2,500/mm³とやや増加の傾向を示しており、さらに4.5時間後の溶存酸素量が0.23 ml/l に減少した時には平均4,300/mm³に増加した。しかし24時間後溶存酸素量がさらに減少し0.11 ml/l になった時血球数は平均2,600/mm³に減っ

た。

Table 1 に示したように微小顆粒血球が血球組成に占める比率は、溶存酸素量が減少してもそれにともなつた変化はみられず平均0.9—1.5%という低い値を示したが、無顆粒血球と粗大顆粒血球の比率は溶存酸素量が一定値以下に減少した時変化した。すなわち溶存酸素量が 4.33, 2.55 および 0.77 ml/l では無顆粒血球は平均 91—93% を示し大きな変動はなく、また粗大顆粒血球は平均5—7%で近似した値を示したが、溶存酸素量が 0.23 ml/l に減少した時には粗大顆粒血球の比率は平均 16.7% に増加し、無顆粒血球の比率は相対的に減少して

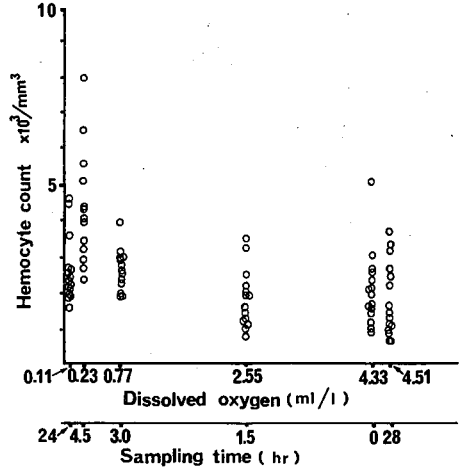


Fig. 1 Effect of dissolved oxygen contents on the hemocyte counts of pearl oysters.

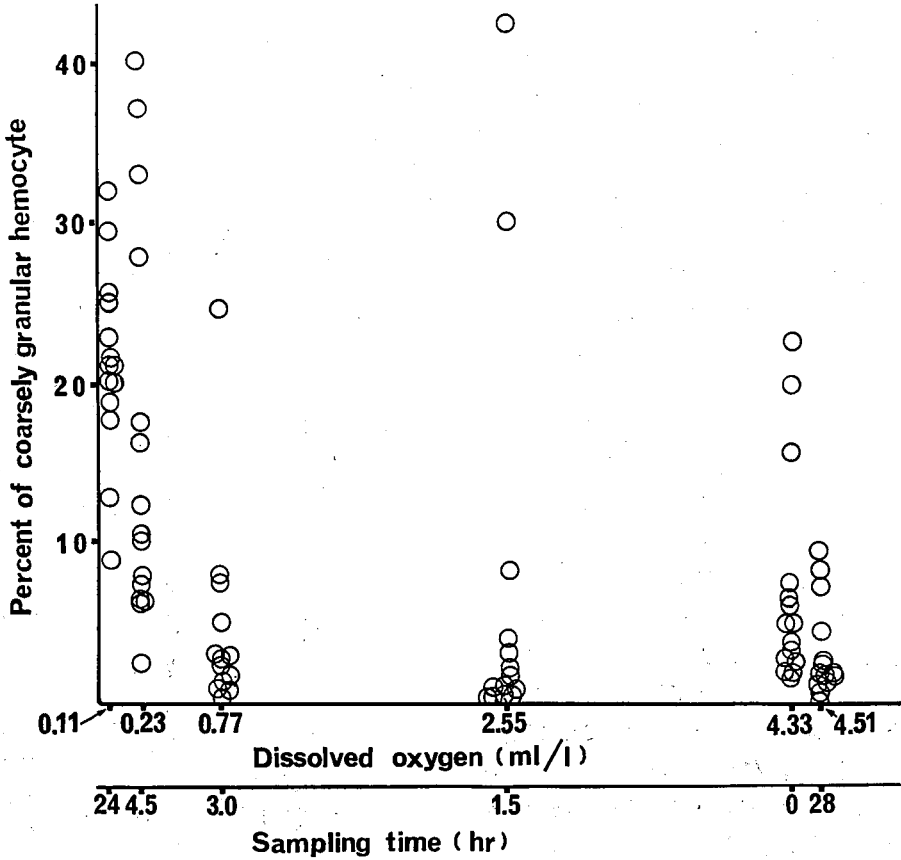


Fig. 2 Effect of dissolved oxygen contents on the ratio of coarsely granular hemocytes in the hemocyte population of pearl oysters.

82.9%になった。さらに溶存酸素量が減少し 0.11 ml/l では粗大顆粒血球の比率はさらに増加して平均20.3%になり、無顆粒血球の比率はさらに減少して78%になった。

心臓搏動数 (Fig. 3) は溶存酸素量が4.77

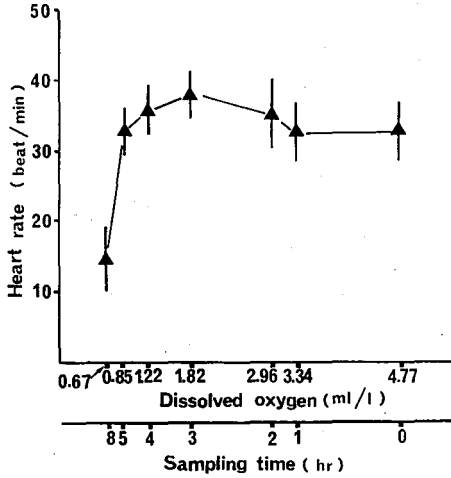


Fig. 3 Effect of dissolved oxygen contents on the heart rate of pearl oysters.

ml/l および 3.34 ml/l では平均 32.5 回/分であったが、その後溶存酸素量の減少にともない増加して、1.82 ml/l では37.7回/分と最高値を示した。その後は溶存酸素量の減少とともに心臓搏動数は減少し、溶存酸素量が 0.85 ml/l では心臓搏動数は平均 33.7 回/分となり、さらに溶存酸素量が減少して 0.67 ml/l のとき心臓搏動数は平均 14.1 回/分と著しい減少が認められ、この状態下で搏動の規則性が一時みだれた個体が9月のうち3貝、また心臓の収縮が充分に行なわれなくなった個体が9月のうち1貝それぞれ観察された。血球数および血球組成の変化は溶存酸素量が 0.77 ml/l から 0.23 ml/l に減少した時に認められたが (Fig. 1, Fig. 2, Table 1), この時の溶存酸素量の値は心臓搏動数が著しい減少を示

Table 1. Effect of dissolved oxygen contents on hemocyte constituents (%) in hemocyte population of pearl oysters.

Dissolved oxygen (ml/l)	0.11			0.23			0.77			2.55			4.33			4.51		
	AH*	CGH†	FGH‡	AH	CGH	FGH	AH	CGH	FGH	AH	CGH	FGH	AH	CGH	FGH	AH	CGH	FGH
Mean	78.1	20.3	1.3	82.9	16.7	1.1	93.4	4.9	1.5	92.3	6.6	0.9	91.5	6.9	1.3	95.0	2.8	1.9
S.D.	6.4	6.6	1.0	10.8	12.6	1.0	6.3	6.5	1.3	12.5	12.4	0.9	6.9	6.7	0.8	3.2	3.0	1.6
n	15	15	15	14	14	14	13	13	13	15	15	15	15	15	15	15	15	15

* AH: Agranular hemocyte
 † CGH: Coarsely granular hemocyte
 ‡ FGH: Finely granular hemocyte
 " S.D.: Standard deviation
 ¶ n: Number of test animals

したときの値と大体一致していた。

考 察

アコヤガイの酸素消費量と海水中の溶存酸素量の関係について、森(1948)は溶存酸素量が 0.5 ml/l 以下で酸素消費量が著しく減少すると報告しており、宮内・入江(1967)は溶存酸素量が $1.5-1\text{ ml/l}$ 以下で酸素消費量が急激に減少し、また貝殻の開閉運動は $1.5-1\text{ ml/l}$ 以下で振巾が大きくなりまた頻度が増加し、 0.5 ml/l 以下で平滑筋運動の日周期性が認められなくなると報告した。このように両報告には酸素消費量が急減する時の溶存酸素量に若干の差異がみられるものの、溶存酸素量がある値以下に減少すると呼吸代謝は急激に低下し、また貝殻の開閉運動にも明らかな変化が起ることを認めている。本実験においても溶存酸素量が 0.85 ml/l から 0.67 ml/l に減少した時に心臓搏動数が著しい減少をきたすと同時に心臓搏動の規則性が乱れたり心臓の収縮が不完全になる個体が現れたが、このことは血リンパ液の循環状態が悪くなることと同時に貝の活力が著しく減弱したことを示している。また溶存酸素量が 0.77 ml/l から 0.23 ml/l に減少した時に血球数の1時的な増加と血球組成の変化が認められた。今回の水槽内実験では比較的短時間で溶存酸素量が減少しており、溶存酸素量の減少過程における時間的経過、実験時期その他実験条件に相違があるため、前2者の結果と単純に比較検討することはできないが、前述の理由から、水温 $26-27.6^{\circ}\text{C}$ の環境下で垂下養殖してあったアコヤガイを用いた水槽内実験(水温 $27\pm 0.5^{\circ}\text{C}$)において、溶存酸素量 $0.85-0.67\text{ ml/l}$ という低い値の所は1つの臨界域であることがわかった。すなわちここを境界として生理活動は急激に低下し、血球数は一時的に増加するとともに血球組成の変化も起ったものと考ええる。

前報(船越, 1977)において、大量斃死が起った時期および冬期低水温下での貝の活力が著しく低下したいわゆる冬眠時に本実験の場合と同様な血球数の増加と血球組成の変化が顕著に起っているが、この現象はアコヤガイの活力の著しい低下または生理異常時において血液性状にあらわれる1つのパターンであると考えられ、特に粗大顆粒血球の出現比率の増加が注目される。しかし現象として血球組成の変化が認められたが、血球の機能とそれにもとづく生理的必然性については今後検討されるべき問題である。

要 約

1. 夏季水温 $26-27.6^{\circ}\text{C}$ の環境下に垂下養殖してあったアコヤガイを用い、水槽内実験(水温 $27\pm 0.5^{\circ}\text{C}$)によって溶存酸素量の低下にともなう心臓搏動数、血球数および血球組成の変化を調べた。
2. 溶存酸素量が 0.85 ml/l から 0.67 ml/l に低下した時、心臓搏動数は著しく減少した。
3. 溶存酸素量が 0.77 ml/l から 0.23 ml/l に低下した時、血球数の一時的増加と粗大顆粒血球の血球組成に占める比率の増加が起った。

Summary

This paper deals with the effect of dissolved oxygen contents on the heart rates, total hemocyte counts and hemocyte constituents of pearl oysters, *Pinctada fucata* (Gould), under laboratory condition (water temperature of 27 ± 0.5 °C).

The results are as follows:

1. When dissolved oxygen contents decreased from 0.85 ml/l to 0.67 ml/l, heart rates decreased remarkably.
2. When dissolved oxygen contents decreased from 0.76 ml/l to 0.23 ml/l, the increase of the hemocyte counts and ratio of coarsely granular hemocytes in the hemocyte population was observed respectively.

文 献

- Feng, S. Y. 1965. Heart rate and leucocyte circulation in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Biol. Bull., **128** (2): 198-210.
- Feng, S. Y., Khairallah, E. A. and Canzonier, W. J. 1970. Hemolymph-free amino acids and related nitrogenous compounds of *Crassostrea virginica* infected with *Bucephalus sp.* and *Minchinia nelsoni*. Comp. Biochem. Physiol., **34**: 547-556.
- Feng, S. Y., Feng, J. S., Burke, C. N. and Khairallah, L. H. 1971. Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca: Pelecypoda). Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., **120**: 222-245.
- 船越将二 1974. アコヤガイの血球について. 国立真珠研報 **18**: 2140-2147.
- 船越将二 1977. アコヤガイの血球数, 血球組成および血球の大きさの季節変化. 国立真珠研報 **21**: 2299-2308.
- Gilles, R. 1972. Osmoregulation in three molluscs: *Acanthochitona discrepans* (Brown), *Glycymeris glycymeris* (L.) and *Mytilus edulis* (L.). Biol. Bull., **142**: 25-35.
- 川本信之 1954. アコヤガイの生理的研究Ⅱ. 稀釈海水中に於ける介体液の氷点降下度に就いて. 日水誌 **20**(4): 273-276.
- 宮内徹夫・入江春彦 1967. 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. 長崎大水研報 **21**: 139-144.
- 森 主一 1948. 低圧 O₂ 海水中のアコヤガイの呼吸 (予報). 貝雑 **15** (1-4): 52-54.

アコヤガイの活力と環境要因の 季節的変動との関係について*†

山口一登・蓮尾真澄
国立真珠研究所

近年、全国的な傾向として、真珠養殖漁場におけるアコヤガイの歩留低下が著しくなっているが、それは取りも直さず真珠の歩留・品質の低下にもつながるものであり、業界にとってはまことに憂慮すべき問題として大きな関心が寄せられ、その対策が急がれている。貝の歩留をよくするとともに真珠の歩留・品質向上を計るための養殖技術体系を確立するには、まず貝の活力の動向を把握する必要がある。真珠養殖においてアコヤガイは自然のおよび人為的条件が複雑に交錯した養殖環境下で生活をしているものであり、そのためには養殖環境要因とのかかわりのもとで検討を進めるべきであると考えられる。

従来、アコヤガイの成長および生活諸現象と環境要因との関連については数々の研究が行なわれ成果をあげているが、貝の活力が正常に維持される環境条件、また異常となる環境条件などについては解明すべき問題点は多く残されているようである。

このような意味から、1973～1976年の4年間、養殖環境要因の季節変動とアコヤガイの活力との関連を時系列的に追究したので報告する。また、あわせて貝の斃死の一因についても言及した。

報告にあたり、海況観測および貝の測定に協力いただいた村上悦男、横尾義直両所員に感謝する。

試験方法

試験は大村湾内の長崎県大村市玖島崎地先において、1973年から1976年までの4年間にわたって実施した。各年における試験期間は1973年と1975年は7月から12月までの6か月間、1974年および1976年は6月から12月までの7か月間である。

環境要因調査は、水温、塩素量、溶存酸素量、懸濁物量、クロロフィルa量（1974、'75、'76年実施）およびCOD（1975、'76年実施）の各項目をとりあげ、ほぼ7日間隔で午前10時を中心として観測を実施した。観測層は0、1.5m、底層（平均水深3m）であるが貝の垂下層である1.5m層についてのみ図示した。各項目の測定方法は次の通りである。

水温および塩素量：Electronic Switchgear 社製サリノメーター MC 5型を使用。

* Kazuto Yamaguchi and Masumi Hasuo. Relation between activity of pearl oyster and seasonal changes of environmental factors in culture ground. Bull. Natl. Pearl Res. Lab. 21: 2315—2324.

† 国立真珠研究所業績 No. 230 (国立真珠研報 21: 2315—2324. 昭和52年8月)

溶存酸素量：ウィンクラー法によった。

懸濁物量：海水 5 l を Ultra filtra 984 H で吸引ろ過し、デシケーターで乾燥後重量を直示天秤で秤量した。

クロロフィル a 量：J.D.H. Strickland and T.R. Parsons の方法によった。

COD：ヨード滴定法によった。

活力指標調査に供したアコヤガイ *Pinctada fucata* は、1973年は愛媛県産の3年貝、1974年は前年に使用したのと同じ貝で、1973年11月に大村湾外に避寒し、1974年5月に再び大村湾に搬入した4年貝である。また1975年は大分県産、1976年は高知県産の各3年貝である。試験貝は玖島崎地先の試験筏から海面下 1.5 m 層に丸型化せん網籠に収容して垂下した。収容個数は1籠当り60貝である。試験期間中の貝掃除、籠のとり換えは原則として1か月に1回実施した。

試験貝各部の測定は、貝の生理的活力を表わす指標になるとと思われる項目について、次のような方法で行なった。

杆晶体重量：開殻してすみやかに杆晶体を取り出し、ろ紙で粘液、付着物を取り除き、直示天秤で秤量した。1回の測定には50貝を供した。

肉質湿重量：杆晶体を取り出した後、直ちに肉質部を貝殻から取りはずし、その重量を上皿天秤で秤量した（1回の測定数50貝）。

肉質乾燥重量：湿重量を測定したものを熱風循環式乾燥器内で90℃、3日間乾燥し、デシケーターで放冷後、その重量を上皿天秤で秤量した（1回の測定数50貝）。

この両者の測定値から肉質乾燥重量/肉質湿重量×100（以下、D/W 値と略記する）を算出した。

これらの測定は試験期間中原則として14日間隔で実施した。

また、貝の斃死率調査は、各年の試験開始時に200個体を丸型化せん網籠4籠に配分収容して海面下 1.5 m に垂下し、およそ7日間隔で実施の観測時に斃死貝の個数を数えた。

結 果

観測結果

結果のとりまとめに当っては、試験貝の垂下層（1.5 m）における数値のみを使用した。

1. 水温 水温の変化を Fig. 1 に示した。1973年は観測を開始した7月中旬にはすでに27℃を越え、8月末まで28～30℃台の高い水温が続いた。1974年は27℃を越えたのが7月下旬で、その持続期間は約40日であった。1975年は7月中旬に27℃を越え、下旬には一時的ながら30℃以上に上昇し、8月上旬から9月下旬にかけては28～29℃台を示した。高水温の持続期間は4年のうちでは最も長く約70日にわたったのが特徴的であった。1976年は前3年に比較して水温の上昇がおそく、7月末まではやや低目で、8月上旬になって27℃を越え、約30日間は28～29℃台を示したが、30℃を越えることはなかった。各年ともに9月上旬以降の水温は下降の経過をたどったが、1975年は他の3年に比較してやや高い傾向がみられた。

2. 塩素量 塩素量の変化を Fig. 2 に示した。各年ともに7月から9月にかけては変

動がはげしかったが、10月上旬以降は変動の幅は小さくなり安定した様相を呈した。とくに1974年の9月以降は他の3年に比較して塩素量の高いのが目立った。また、1976年は他の3年よりも相対的に低目に推移した。

3. 溶存酸素量 溶存酸素量の変化を Fig. 3 に示した。4年間を通じて、溶存酸素量は7月から9月にかけて減少の経過をたどり、3~4 ml/l 台の値を示した。10月以降は増加の傾向がみられ、5~6 ml/l 台の値を示した。とくに、1974年は他の3年よりも相対的

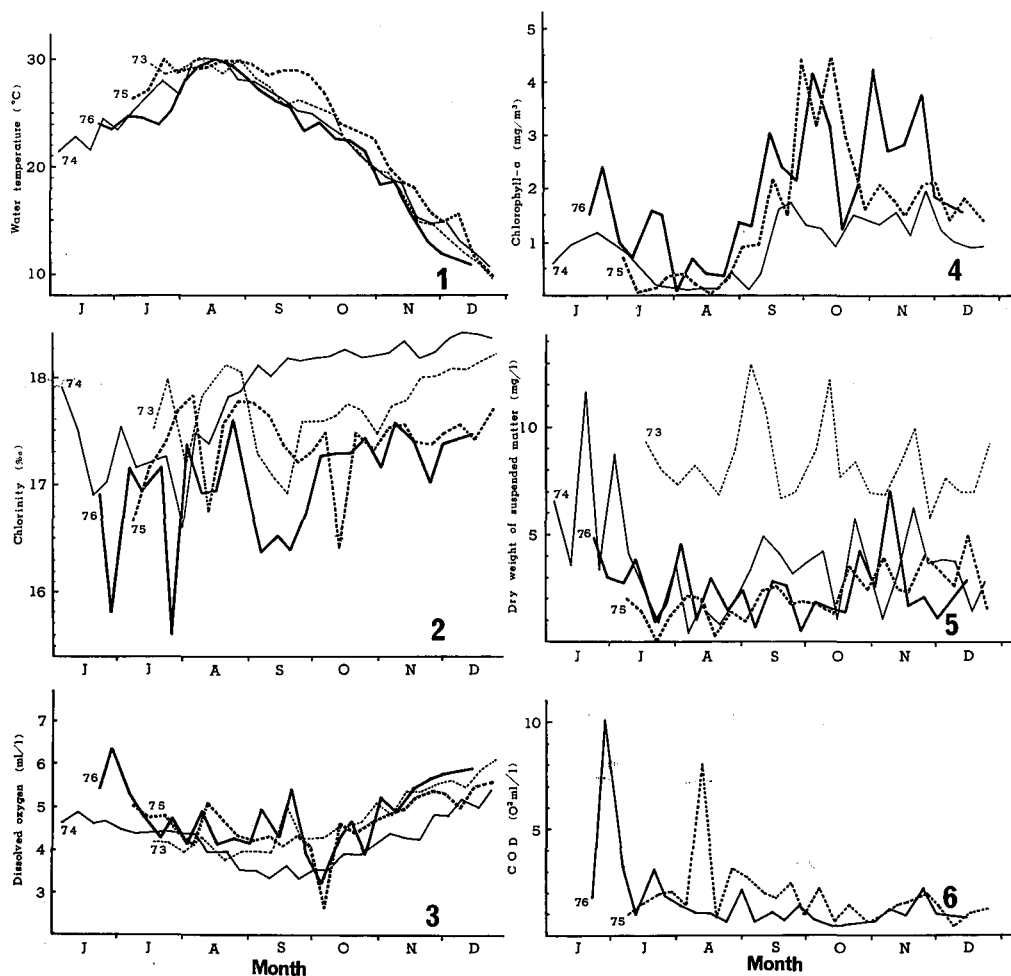


Fig. 1 Seasonal changes of water temperature (°C) at 1.5 meter depths from 1973 to 1976.

Fig. 2 Seasonal changes of chlorinity (‰) at 1.5 meter depths from 1973 to 1976.

Fig. 3 Seasonal changes of dissolved oxygen (ml/l) at 1.5 meter depths from 1973 to 1976.

Fig. 4 Seasonal changes of chlorophyll-a (mg/m³) at 1.5 meter depths from 1974 to 1976.

Fig. 5 Seasonal changes of dry weight of suspended matter (mg/l) at 1.5 meter depths from 1973 to 1976.

Fig. 6 Seasonal changes of COD (O₂ ml/l) at 1.5 meter depths in 1975 and 1976.

に低い値で推移した。

4. クロロフィル a 量 1974年から1976年までの3年にわたる測定結果についてのべる。クロロフィル a 量の変化を Fig. 4 に示した。各年ともに7月から8月にかけては低い値を示し、9月以降は急激に増加の傾向がみられたが、1974年は9月以降においても 1 mg/m^3 台の値を示すにすぎなかった。一方、1975年は9月下旬にかけては 4 mg/m^3 台を示し、10月下旬以降 1 mg/m^3 台の低目で経過した。また、1976年は全般的にクロロフィル a 量の多かった年で、とくに10月下旬から11月中旬までは前2年に比較して高い値を示した。各年に共通した現象として、クロロフィル a 量が低い値を示した時期は高水温の出現時期とほぼ一致していた。

5. 懸濁物量 懸濁物量の変化を Fig. 5 に示した。各年ともに、懸濁物量の変動の幅は大きく、1973年は $5.75 \sim 12.99 \text{ mg/l}$ 、1974年は $0.32 \sim 11.66 \text{ mg/l}$ 、1975年は $0.00 \sim 5.03 \text{ mg/l}$ 、および1976年は $0.47 \sim 7.03 \text{ mg/l}$ の範囲を示した。とくに1973年は7月中旬から12月下旬までの全期間を通じて他の3年よりも高い値で推移しているのが目立った。季節的な変動の特徴はあまり明瞭ではなかったが、1973年を除けば夏季は秋季よりもやや少ないような傾向がうかがわれた。

6. COD 1975年と1976年の2年にわたって測定した。COD の変化を Fig. 6 に示した。とくに高い値を除けば、両年とも大体 $0.4 \text{ O}_2\text{ml/l}$ から $3.0 \text{ O}_2\text{ml/l}$ の範囲で変動し、期間中の平均値は、1975年は $1.2 \text{ O}_2\text{ml/l}$ で、1976年は $1.5 \text{ O}_2\text{ml/l}$ を示した。季節的な特徴ははっきりとは認め難いが、夏季はやや高い値を示すような傾向がみられた。

貝肉質部の測定結果

1. 肉質湿重量 肉質湿重量の変化を Fig. 7 に示した。試験開始時における肉質湿重量の値は、各年相互間に差異がみられたが、これは供試貝の産地および年令の違いによるものである(以下、肉質乾燥重量、杆晶体重量の各差異についても同ようである)。1973年は湿重量の横ばい状態が試験開始時から10月中旬まで続き、それ以降は増量が認められた。1974年、1975年は試験開始時から9月上旬または9月中旬まではごくわずかの増量か、または減量を示し、ほとんど横ばいといえるような状態であったが、それぞれ9月中、下旬以降は増量が認められた。1976年は他の3年よりも時期的に早い8月中旬から重量の増加が目立ち、また9月以降における増量も大きかった。

2. 肉質乾燥重量 肉質乾燥重量の変化を Fig. 8 に示した。1973年は乾燥重量の横ばい状態が10月中旬まで続き、それ以降11月下旬まで増量した。1974年、1975年はそれぞれ8月下旬、9月中旬までは減量が続き、それ以降増量した。1976年は7、8月においてもわずかながら増量が認められ、9月中旬以降は他の3年よりも増量がいちじるしいのが特徴的であった。

3. 杆晶体重量 杆晶体重量の変化を Fig. 9 に示した。1976年を除けば、8月中旬から9月中旬までは重量の減少がみられ、9月下旬以降11月中旬までは増量の傾向がみられた。1976年は前3年に比較して8～9月における減量はあまり目立たず、8月中旬以降はほぼ横ばい状態で推移していた。

4. D/W値 肉質部の乾燥重量と湿重量との比率を算出し、これを肉質部の充実度を

示す指標とした。D/W値の変化を Fig. 10 に示した。1973年は7月中旬から9月中旬にかけて次第に低下し、D/W=9.2まで減少したが、それ以後10月中は横ばい状態を示した。11月以降12月中旬まではやや高い値となったが12月下旬には再び下向きとなった。1974年は7月上旬から下向きとなり9月上旬には、D/W=8.9まで減少し、それ以後12

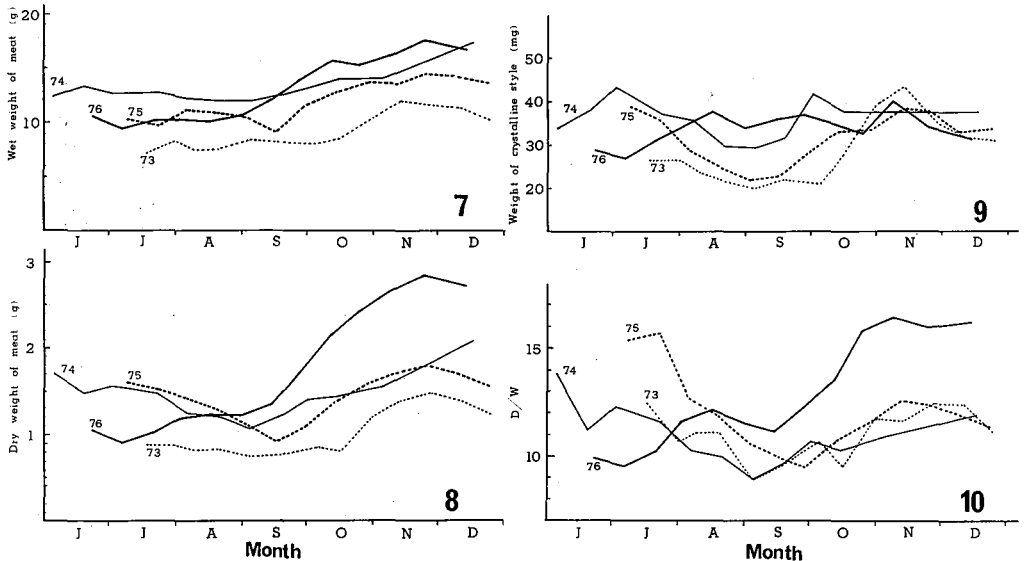


Fig. 7 Seasonal changes of wet weight of meat (g) from 1973 to 1976.

Fig. 8 Seasonal changes of dry weight of meat (g) from 1973 to 1976.

Fig. 9 Seasonal changes of weight of crystalline style (mg) from 1973 to 1976.

Fig. 10 Seasonal changes of ratio of wet meat weight to dry meat weight (D/W) from 1973 to 1976.

月中旬まではごくわずかずつながら増加した。1975年は7月下旬から引続き下向きを続け9月下旬にD/W=9.4まで減少し、その後11月中旬までは上向きとなりやや高い値を示したが、以後再び下向きとなった。1976年は7月上旬から8月中旬までは上向きであったが、その後下向きとなり9月中旬にはD/W=11.2となった。9月下旬からは上向きとなり次第に高い値を示すようになり11月上旬にはD/W=16台となり、それ以後は横ばいの状態を示した。このように、D/W値の推移は年によって異なった傾向がみられたが、4年間を通じて共通な現象は8月には数値が次第に相対的に小さくなり、高水温期の終末近く9月に最低値を示した。また、1976年10月以降の急増ぶりがとくに特異な現象であった。

5. 斃死率 斃死率の変化を Table 1 に示した。すなわち、年によって斃死率に差異が認められたが、各年ともに7月下旬ごろから斃死が目立つようになり、次第に増加し9月になると急増するが、10月以降は減少の傾向が認められた。とくに、27℃以上の高水温が出現した期間内における累積斃死率は、1973年は1.0%、1974年は5.8%、1975年は9.6%、1976年は4.5%となっており、1973年が最も斃死率は低く、1975年が最も高かった。

Table 1. Death rate of pearl oyster, from 1973 to 1976.

(1973)					(1975)						
	Number of pearl oyster		Death rate			Number of pearl oyster		Death rate			
	Life	Death	Present time	Accumulation		Life	Death	Present time	Accumulation		
Jul.	17	200	0	0 %	0 %	Jul.	8	200	0	0 %	0 %
	24	200	0	0	0		15	199	1	0.50	0.50
Aug.	1	200	0	0	0		23	199	0	0	0.50
	9	193*	1	0.52	0.52		29	199	0	0	0.50
	20	192	1	0.52	1.03	Aug.	5	194	5	2.51	3.00
	28	192	0	0	1.03		12	192	2	1.03	4.00
Sep.	4	192	0	0	1.03		19	191	1	0.52	4.50
	11	192	0	0	1.03		26	191	0	0	4.50
	18	192	0	0	1.03	Sep.	2	184	7	3.67	8.00
	25	191	1	0.52	1.55		10	182*	1	0.54	8.54
Oct.	5	191	0	0	1.55		16	179	3	1.65	10.05
	11	191	0	0	1.55		23	179	0	0	10.05
	16	191	0	0	1.55		29	179	0	0	10.05
	23	190	1	0.52	2.06	Oct.	6	173	6	3.35	13.07
	30	189	1	0.53	2.58		13	171	2	1.16	14.07
Nov.	6	189	0	0	2.58		20	169	2	1.17	15.08
	13	189	0	0	2.58		29	169	0	0	15.08
	20	189	0	0	2.58	Nov.	5	169	0	0	15.08
	27	189	0	0	2.58		12	168	1	0.59	15.58
Dec.	4	189	0	0	2.58		17	168	0	0	15.58
	11	189	0	0	2.58		25	167	1	0.60	16.08
	18	189	0	0	2.58	Dec.	1	165	2	1.20	17.09
	25	189	0	0	2.58		8	165	0	0	17.09
							15	164	1	0.61	17.59
							24	164	0	0	17.59

* 6 pearl oyster fall.

(1974)					(1976)						
	Number of pearl oyster		Death rate			Number of pearl oyster		Death rate			
	Life	Death	Present time	Accumulation		Life	Death	Present time	Accumulation		
Jun.	4	200	0	0 %	0 %	Jun.	22	200	0	0 %	0 %
	12	200	0	0	0		28	200	0	0	0
	19	200	0	0	0	Jul.	6	200	0	0	0
	25	200	0	0	0		12	200	0	0	0
Jul.	2	198	2	1.00	1.00		21	200	0	0	0
	9	198	0	0	1.00		26	200	0	0	0
	23	198	0	0	1.00	Aug.	2	198	2	1.00	1.00
	31	198	0	0	1.00		9	198	0	0	1.00
Aug.	6	198	0	0	1.00		16	196	2	1.01	2.00
	12	197	1	0.51	1.50		24	196	0	0	2.00
	21	195	2	1.02	2.50		31	194	2	1.02	3.00
	27	193	2	1.03	3.50	Sep.	6	194	0	0	3.00
Sep.	4	189*	4	2.07	5.50		14	191	3	1.55	4.50
	10	187	2	1.06	6.50		20	190	1	0.52	5.00
	18	178	9	4.81	11.00	Oct.	27	189	1	0.53	5.50
	24	175	3	1.69	12.50		4	189	0	0	5.50
Oct.	1	172	3	1.71	14.00		12	189	0	0	5.50
	8	169	3	1.74	15.50		18	188	1	0.53	6.00
	15	168	1	0.59	16.00		25	188	0	0	6.00
	23	165	3	1.79	17.50	Nov.	1	188	0	0	6.00
Nov.	5	164	1	0.61	18.00		8	187	1	0.53	6.50
	12	164	0	0	18.00		16	187	0	0	6.50
	19	163	1	0.61	18.50		24	187	0	0	6.50
	26	163	0	0	18.50	Dec.	30	187	0	0	6.50
Dec.	3	161	2	1.23	19.50		14	187	0	0	6.50
	9	159	2	1.24	20.50		21	186	1	0.53	7.00
	17	158	1	0.63	21.00						
	23	157	1	0.63	21.50						

* 2 pearl oyster fall.

考 察

アコヤガイの適温の上限は、水温と酸素消費量との関係から 27°C 近傍に存在すると推定している(植本, 1968)が、本試験においては各年ともに 27°C 以上の高水温が出現しているので、アコヤガイの活力に対して悪影響を及ぼしたことは明らかであり、また、その持続期間や上昇の度合は年によって異なっているため、影響の程度も年によって差異を生じたことを推察できる。

塩素量の変動は一般に、降雨量に影響されるところが大きい。6月から9月までの総降雨量をみると、1973年では712.2 mm, 1974年は553.0 mm, 1975年は999.5 mm, 1976年は1051.9 mmであった。1974年の9月以降は塩素量がとくに高かったのは降雨量の少なかったこと、また、1976年は全般的に低目に推移しているのは降雨量が比較的多かったことによるものと考えられる。アコヤガイの斃死、成長に影響が及ばないような低比重の限界は、比重13 ($\text{Cl } 9.98\%$) 以上に目安をおくのが妥当だと考えられる(片田, 1959)が、4年間を通じて、試験貝の垂下層では限界を下廻るような低塩素量は出現しなかったので、アコヤガイの活力に対して悪影響を及ぼすようなことはなかったといえよう。

溶存酸素量の最少値は、1973年は3.75 ml/l, 1974年は3.34 ml/l, 1975年は2.64 ml/l, 1976年は3.21 ml/lであった。ところで、アコヤガイの酸素消費は、外部環境水中の溶存酸素量が0.5 ml/lになるまではほぼ正常に行なわれ、それ以下になると急に減退する(森, 1948)ことから、活力に悪影響を与えるような低い溶存酸素量は出現しなかったと考えることができる。

クロロフィルa量については、1974年は他の2年に比較して9月以降は少なく、増加の程度も低かったのは降雨量の少なかったこと、1976年は全般的に多かったのは降雨量の多かったことも大きく影響していると考えられる。

アコヤガイは、海水中に懸濁している粒子を餌料とするいわゆる Suspension feeder といわれているが、懸濁物の餌料としての栄養面についてはまだ解明されていないようである。本試験では、懸濁物を乾重量として測定したが、その変動と貝の活力との関連をみいだすことは困難であり、また、クロロフィルa量との相関も認められなかった。これは、試験地点の水深が浅く底質が砂泥のため、風波による海底からの砂泥粒子混入の可能性があるため、その影響が測定結果にあらわれたのかもしれない。したがって、懸濁物の中に占める有機物と無機物との比率も今後の検討課題にすべきであると考えられる。

アコヤガイの生活とCODとの関係については、まだ判然としないようであるが、水産環境水質基準(日本水産資源保護協会, 1972)によれば1 ppm となっているので、1975年、1976年のCOD値(それぞれ $1.2 \text{ O}_2 \text{ ml/l}$, $1.5 \text{ O}_2 \text{ ml/l}$)は、直接的にアコヤガイの活力に対して悪影響を及ぼすほどの数値ではなかったと推察できる。

以上述べたごとく、環境要因のなかで、塩素量、溶存酸素量、CODなどは、単独要因としてアコヤガイに悪影響を与えると考えられるほどの異常な数値は認められなかった。しかしながら、各年ともに 27°C 以上の高水温がかなり長期間にわたって出現し、また、クロロフィルa量(アコヤガイの餌料の主体をなすと考えられる植物プランクトンの量的指

標)は、夏季には微量しか検出されなかったので、これら2要因は単独または複合的に貝の活力に対してかなりの影響を及ぼしたものと考えられる。

一方、貝の活力の度をあらわす指標として、杆晶体重量及びD/W値を測定したが、杆晶体重量は従来から生理指標として用いられているので、ここでは、D/W値の示す意味について触れてみたい。すでに述べたごとく、D/W値は肉質部の乾燥重量/湿重量×100によって算出した値であるが、この数値が相対的に低くなれば肉質部の水分含量が多くなったことを表わし、極度に低くなった場合は、外観的にいわゆる“みずがい、一カキ”については、いわゆる“みずがき、”と称するものは90%以上の水分を含んでいる(古川、久岡、1957)ので、アコヤガイについても同じような扱いをするならば、“みずがい、”のD/W値は10以下の数値となる一になるものと考えられる。すなわち、代謝が異常となり、異化作用がかなり進行したものと一応判断されるので、この数値は肉質部の充実度を示すことになり、活力の指標になり得ると考えられる。

以下、水温、クロロフィルa量、D/W値の3者の関連性について検討してみる。各年ともに高水温の出現時期にはクロロフィルa量が低い数値を示す傾向がみられたが、この時期とD/W値が最低値を示す時期との間にはずれがみられた。すなわち、水温が最高値を示した時期から約20日おけてD/W値は最低値を示し、また、クロロフィルa量が最低値を示した時期から約30日後にD/W値は最低値を示した。そこで、D/W値の各測定時以前の約20日間内における水温測定値の加重平均値を、また、クロロフィルa量については約30日間内における測定値の加重平均値をそれぞれ算出し、それらの数値とD/W値とを対比させて相関関係を検討した。その結果をTable 2に示した。これによれば、単

Table 2. Correlation of D/W (A) to chlorophyll-a (C), water temperature (T).

		1974	1975	1976
Correlation coefficient	r_{AC}	0.737	0.228	0.859
	r_{AT}	-0.736	-0.550	-0.851
Partial correlation coefficient	$r_{AC \cdot T}$	0.753	0.021	0.624
	$r_{AT \cdot C}$	-0.752	-0.481	-0.597
Multiple correlation coefficient	$r_{A \cdot TC}$	0.895	0.550	0.912

相関係数は1974年と1976年では、D/W値と水温との間には負の相関が、クロロフィルa量との間には正の相関がそれぞれ認められたが、1975年の場合は両者ともにD/W値との相関は認められなかった。次に偏相関係数は、1974年の場合 $r_{CA \cdot T}$ (水温を消去したときのクロロフィルa量とD/W値との偏相関係数)、 $r_{TA \cdot C}$ (クロロフィルa量を消去したときの水温とD/W値との偏相関係数)のいずれも有意性が認められた。1976年の場合は水温、クロロフィルa量のいずれも有意性が認められなかった。また、 $r_{A \cdot TC}$ (D/W値と水温、クロロフィルa量との間の重相関係数)は、1974年と1976年には有意性が認められた。これは、水温とクロロフィルa量との間には、D/W値に対する支配要因としての影響力に差があったことを意味している。すなわち、1974年の場合は、両者がそれぞれ単独に強い支配要因となり、1976年の場合は、両者の組み合わせ的な支配によってD/W値との間

に関連性を生じたことを意味している。以上のごとく統計処理の結果、水温、クロロフィルa量はそれぞれD/W値の変化に対して支配要因となり得ることがわかった。すなわち、水温が上昇(27℃以上に限定した場合)すればD/W値は低下し、また、クロロフィルa量が減少すればD/W値も低下する。

次に、1974年～1976年の夏季における水温・クロロフィルa量の出現状態、D/W値・杆晶体重量の変動状態を比較してみた(1973年はクロロフィルa量を測定していないので除く)。1974年は27℃以上の高水温が約40日間持続、その間の平均水温は28.3℃を示し、クロロフィルa量の平均は0.8mg/m³であった。また、各年ともにD/W値は27℃を越えた時点から低下の傾向があり、最低値を示すのは高水温期の終末近くであったから、27℃を越えて高水温期にはいった時点のD/W値と高水温期間中における最低のD/W値との差をみると2.64であった。同期間中に杆晶体重量は7.81mg減量した。1975年は高水温の持続期間約70日、平均水温29.0℃、クロロフィルa量は平均0.6mg/m³、D/W値の減少は6.58、杆晶体重量は12.58mg減量した。また、1976年では高水温の持続期間約30日、平均水温28.7℃、クロロフィルa量は平均0.7mg/m³、D/W値の減少は0.40、杆晶体重量は4.00mg減量した。以上の結果からも、1975年は他の2年に比較して高水温が長期間持続し、クロロフィルa量は少なく、D/W値・杆晶体重量の減少がとくに目立つ年であったことがわかる。すなわち、1975年の夏季は高水温・少餌料で、貝の活力低下が最も著しかったといえるが、これは、高水温期間中の累積斃死率は1975年が最も高かったことの裏付けをなすといえることができる。また、1976年を除けば、8月中旬から9月上旬にかけては、D/W値が極度に低下しているところから、この期間は貝の活力低下が著しく、とくに高い斃死率を示したものと考えられる。

一面、夏季の高水温期におけるアコヤガイの活力低下は、環境要因のほかには貝の産地、年令、生殖腺の成熟状態などの相違も関与しているのではないかと考えられる。

本試験の観測結果から、大村湾では夏季高水温の出現時期とほぼ一致してクロロフィルa量の減少が認められたが、27℃以上の水温における貝の代謝活動は、それ以下の水温の場合よりも激しくなると考えられ、その体内における異化を代償し得るだけのエネルギーの供給がない限り、蓄積栄養あるいは体構成物質の減耗が起こる(植本, 1968)ことから、貝の主たる餌料となる植物プランクトンの高水温期における極度の減少は、貝の代謝に異常をきたし、肉質部の充実度が低下する一因となり、それは貝の活力低下となって現われ、ひいては斃死につながるものと考えられる。

本試験の範囲内で、大村湾の真珠養殖漁場におけるアコヤガイの夏季の活力低下と斃死現象に結びつくのは高水温と餌料不足であり、高水温期にクロロフィルa量の減少するのは海況変動、気象条件とくに降雨量によると考えられる。しかしながら、斃死の一原因となるほどにクロロフィルa量が減少するのは、大村湾周辺における社会的諸条件の変遷とも関連があると考えられ、その究明は今後に残されている。また、高水温期において、貝の正常なる活力を維持するために必要なクロロフィルa量の最低値をみいだすことも重要な課題である。

アコヤガイは元来、底着性の生物であるが、真珠養殖の場合は、これを人為的に中層に

垂下したために、成長、生殖、抵抗性などにも何等かの変化をきたしているのではないかと考えられる。したがって、真珠養殖技術を改良、開発するためには、養殖環境下におけるアコヤガイの生態を究明することが基本的に必要であると痛感させられる。

要 約

1. アコヤガイの活力の動向と環境諸要因との関連性を追究するため、1973年～1976年の4年間にわたって水温、塩素量、溶存酸素量、クロロフィルa量、懸濁物量、CODについて観測し、一方、活力の指標として杆晶体重量、肉質湿重量・乾燥重量を測定した。

2. 27℃以上の高水温期の持続期間の長短、同期間中の平均水温の高低、クロロフィルa量の減少度合によってアコヤガイの活力、斃死率に差があらわれた。

3. 大村湾におけるアコヤガイの夏季の活力低下と斃死現象に結びつくのは、高水温と餌料不足であると推察した。

文 献

古川 厚・久岡 実 1957. 浅海養殖生産性の生物学的研究 III アサリ (*Venerupis philippinarum*) の水中懸垂飼育について. 内水研報告. 10: 1-19.

J.D.H. Strickland and T.R. Parsons 1968. A practical Handbook of seawater Analysis.

片田清次 1959. 低比重海水がアコヤガイ *Pinctada martensii* (Dunker) の斃死、成長並びに真珠の品質に及ぼす影響. 国立真珠研報 5: 489-493.

森 主一 1948. 低圧 O₂ 海水中のアコヤガイの呼吸. 貝雑 15(1-4): 46-51.

日本水産資源保護協会 1972. 水産環境水質基準.

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.

THE BELLE W. BARUCH LIBRARY IN MARINE SCIENCE NUMBER 5

THE MECHANISMS OF MINERALIZATION IN THE INVERTEBRATES AND PLANTS

Edited by Norimitsu Watabe
and Karl M. Wilbur

Symposium Sponsored by:

University of South Carolina

Duke University

National Science Foundation

(USA)

Akademie der Wissenschaften und

der Literatur, Mainz

(Germany)



Published for the Belle W. Baruch Institute for Marine Biology and

Coastal Research by the

UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA PRESS

COLUMBIA, SOUTH CAROLINA

Copyright © University of South Carolina 1976

First Edition

Published in Columbia, South Carolina, by the
University of South Carolina Press, 1976

Library of Congress Cataloging in Publication Data

International Symposium on the Mechanisms of
Mineralization in the Invertebrates and Plants,
Georgetown, S. C., 1974.
The mechanisms of mineralization in the inverte-
brates and plants.

(The Belle W. Baruch library in marine science;
no. 5)

Includes bibliographies and index.

I: Biomineralization--Congresses. I. Watabe,
Norimitsu, 1922- II. Wilbur, Karl M.
III. South Carolina. University. IV. Title.
V. Series.

QH512.I57 1974 574.1'9214 76-43986
ISBN 0-87249-351-2

Biom mineralization in bivalve molluscs with emphasis on the chemical composition of the extrapallial fluid

Koji Wada and Tadashi Fujinuki

Abstract-This study considers the mechanism of biom mineralization in molluscs with an emphasis on chemical composition of the extrapallial fluid. The actual concentrations of major constituents in the extrapallial fluid were found to be markedly different between freshwater and marine bivalves. This may be caused by physiological control related to the environmental medium. The extrapallial fluid of freshwater species had a much higher content of given inorganic constituents than the environmental water. In contrast, the concentrations of major constituents in the fluid of marine species were not much different from the environmental water. The calcium concentration was lower whereas the bicarbonate concentration was higher in freshwater species than in marine species. Concentration ratios of heavy metals differed between species. The heavy metals form complexes with proteins and/or acid mucopolysaccharides secreted by the outer mantle epithelium. No significant difference between the fluids forming aragonitic or calcitic shell has been found. The activity in metabolism of shell formation differs among species and is influenced by temperature and physiological conditions. The different activities are accompanied by formation and dissolution of shell minerals and exhibit seasonal variations and physiological differences in calcium and carbonate concentrations in the extrapallial fluid.

The determination of the degree of saturation of mineral species in biological systems is very important with respect to the mechanism of nucleation and crystal growth. However, relatively few studies have been reported in this field. The main reasons for this seem to

be the difficulties in collecting the solution which will produce the mineral phase and of estimating interactions between ions, and proteins or polysaccharides under physiological conditions.

In molluscs, the shell minerals aragonite and calcite are deposited from the solution termed the extrapallial fluid (de Waele, 1930) which is secreted by the outer mantle epithelium. The fluid contains proteins and polysaccharides and is regarded as supersaturated with respect to the shell minerals. Naturally, the extrapallial fluid of freshwater species is a far more dilute solution of electrolytes in comparison with marine species. Recently, Wada and Fujinuki (1974) have investigated the chemical composition of extrapallial fluid in freshwater and marine bivalves. It was shown that the concentrations of electrolytes in the freshwater species were much higher than the environmental water, while in the marine species the concentrations were similar to those in sea water, except for heavy metal ions. However, the bicarbonate ion was not determined at that time. In both freshwater and marine species, mineralization of shell occurs under physiologically controlled concentrations of calcium and carbonate. Heterogeneous nucleation of shell minerals can be found on the organic matrix, which appears to be an acid glycoprotein with sulfuric ester (Wada and Furuhashi, 1970). The degree of supersaturation required for the new crystals to grow in contact with the crystals already formed may not be as high as that for the heterogeneous nucleation on the organic matrix (Wada, 1972).

The present study attempts to consider shell formation on the basis of the chemical composition of the extrapallial fluid.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Materials

This study was carried out on 2 species of freshwater bivalves from the Nishinoko Swamp near Lake Biwa, Shiga Prefecture, and 4 species of marine bivalves from the Tatokujima waters of Ago Bay, Mie Prefecture, during the period of May, 1973 to May, 1974. The freshwater species, *Hyriopsis schlegeli* and *Cristaria plicata*, were kept separately in net baskets hung at a depth of about 0.5 m from a bamboo shelf in the swamp. Each of the marine species, *Pinctada fucata*, *Pinna attenuata*, *Crassostrea gigas* and *Chlamys nobilis*, was maintained in a net basket suspended from a wooden raft in the sea at a depth of about 2 m.

After slightly opening the valves with a shell-opener, extrapallial fluid was carefully collected by inserting a long needle through the pallial attachment into the central area between the mantle and shell. More than 20 ml of the fluid was required for the determination of the chemical composition. Numbers of specimens used at each time were 5 for *H. schlegeli* and *C. plicata*, about 260 for *P. fucata*, 10 for *P. attenuata*, 90 for *C. gigas* and 60 for *C. nobilis*.

Chemical composition of extrapallial fluid

The extrapallial fluid was preserved at 5°C for a few days until analyses were carried out, except for bicarbonate ion which was determined immediately after collection.

Environmental water for chemical analyses was collected at the depth of cultivation and filtered through a 0.45 µm membrane filter, except samples for the determination of bicarbonate. Temperature of environmental water was measured at 10 a.m. in the Nishinoko Swamp and at about 11 a.m. in the Tatokujima waters.

The pH of extrapallial fluid and environmental water was measured using a glass electrode immediately after sampling.

Determination of Shell Growth Rate

For investigating the growth rate of shell of each species during the experimental period, the under-water weight of the bivalves was measured following the technique employed in the previous work (Wada, 1972). The ratio shell weight/total weight under water was about 0.95 for *H. schlegeli* and about 0.90 for *C. plicata*. In *P. fucata*, the under-water weight of the animals roughly corresponds to that of the shell, and the dry shell weight S can be estimated from the under-water weight of the animal W according to the equation of $S = 1.7286W + 0.246$ (Nishii, 1965). Each of 10 specimens of each species was weighed monthly in a plastic vessel containing the environmental water.

Analytical Techniques

Analyses for alkali metals, alkaline earth metals and heavy metals were carried out by atomic absorption spectrometry using an air-acetylene flame at wavelengths of 589.0 nm (sodium), 766.4 nm (potassium), 670.7 nm (lithium), 422.6 nm (calcium), 285.2 nm (magnesium), 460.7 nm (strontium), 324.7 nm (copper), 213.8 nm (zinc), 248.3 nm (iron) and 279.4 nm (manganese). A series of standard solutions having a composition similar to the sample solutions was prepared for making calibration curves. The concentrations of anions were determined by gravimetry, volumetry, and spectrophotometry.

Sea Water

Sodium, magnesium, potassium and calcium: The sample was diluted with distilled water to 1,000 times for sodium, to 200 times for magnesium, to 100 times for potassium and calcium, and the absorption of the dilute sample solution was measured at the appropriate wavelength.

Lithium and strontium: The sample was aspirated directly into an atomic absorption spectrometer without dilution.

Copper, zinc, iron and manganese: Five liters of the sample were passed through a column (1 cm x 6 cm) of ion exchange resin. Adsorbed

metals were eluted with 2 N nitric acid. Three ml of perchloric acid were added to the eluate and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 5 ml of 0.3 N hydrochloric acid and submitted for atomic absorption spectrometry.

Bicarbonate: The content was determined by standard 0.01 N sulfuric acid titration using methyl red - bromcresol green as the indicator (Japanese Industrial Standard K 0101, 1966).

Chloride: Titration method was used with standard 0.1 N silver nitrate solution using potassium chromate solution as the indicator.

Sulfate: The sample was warmed to 60-70°C and allowed to stand overnight after the addition of 5 ml hot barium chloride solution (10%). The precipitated barium sulfate was filtered, ignited, and weighed.

Phosphorus: Ten ml of aluminum chloride solution (5%) were added to a 300 ml of the sample. Dilute ammonia solution (1.5 N) was added dropwise to the solution until a white precipitate had formed with stirring, and the precipitate was filtered and dissolved in 10 ml of hot 1.2 N hydrochloric acid. Ammonium molybdate and stannous chloride solutions were added and diluted with water and mixed well, and phosphorus in the developed solution was measured at 750 nm.

Swamp Water

Sodium, potassium, calcium and magnesium: The contents were determined by aspirating the sample directly into an atomic absorption spectrometer.

Copper, zinc, iron, manganese and bicarbonate: They were determined in the same way as in the sea water.

Chloride: Spectrophotometric measurement was carried out at 460 nm on a 25-ml sample to which mercuric thiocyanate and ferric sulfate solutions had been added, diluted with water and allowed to stand 15 minutes.

Sulfate: To a 5-ml sample, a suspension of barium chromate, ammonia solution containing calcium chloride and ethyl alcohol were added. After filtration, sulfate was measured at 420 nm.

Phosphorus: Five ml of nitric acid were added to a 500-ml sample and evaporated to dryness. Then 5 ml of hydrochloric acid were added, evaporated to dryness again, and the residue was dissolved in 10 ml of hot 1.2 N hydrochloric acid. This was followed by the same procedure as in the sea water analysis.

Chemical composition of extrapallial fluid

Extrapallial Fluid

For the analyses of all the ions except bicarbonate and chloride, organic substances were first decomposed completely by heating with nitric acid and perchloric acid and evaporated to dryness. The dried residue was dissolved in 0.3 N hydrochloric acid corresponding to the volume of pipetted sample.

Cations: For the determination of sodium, potassium, calcium and magnesium in marine bivalves, the treated sample solution was diluted with distilled water in the same proportion as described for the sea water. In freshwater bivalves, the dilution was 10 times for potassium, calcium and magnesium, and 100 times for sodium. Lithium, strontium and heavy metals were determined in both marine and freshwater species by aspirating the treated sample solution directly into an atomic absorption spectrometer.

Bicarbonate and chloride: They were analyzed following the procedures mentioned for the sea water, except the concentration of the standard silver nitrate solution was 0.1 N for marine species and 0.01 N for freshwater species in chloride analysis.

Sulfate and phosphorus: Analysis was carried out in both marine and freshwater species in the same way as described for the sea and swamp waters.

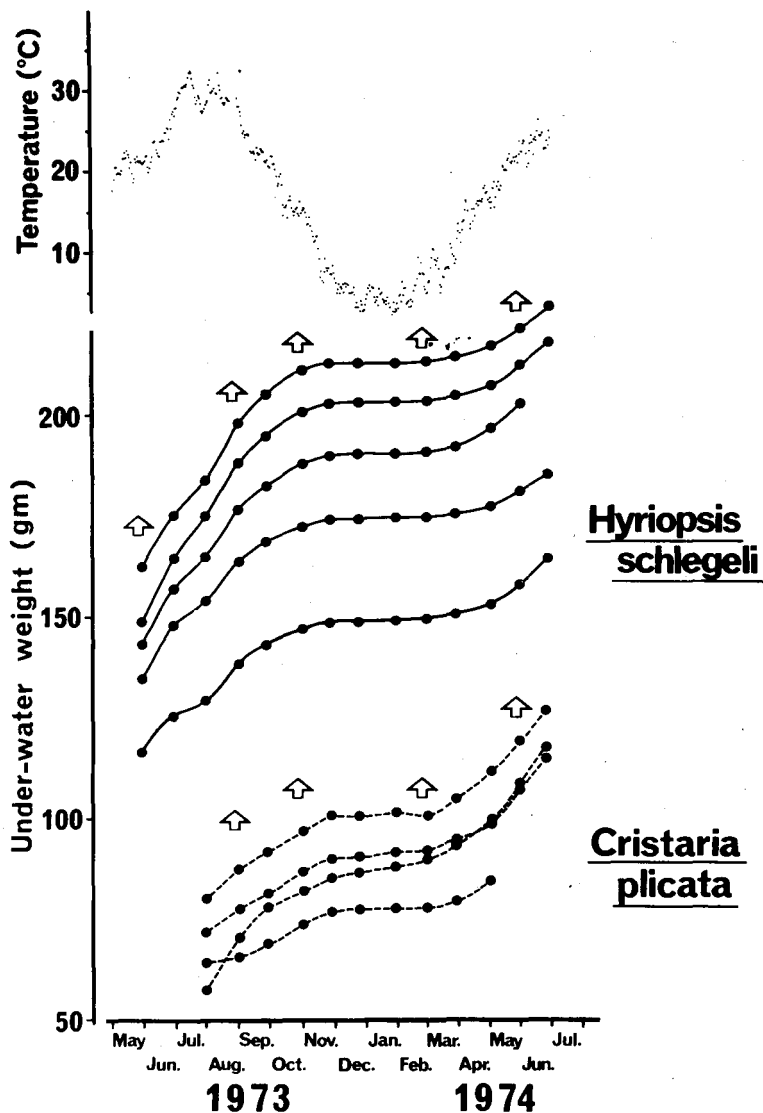
RESULTS

Freshwater Bivalves

Typical trends in the increases of the under-water weight in *H. schlegeli* and *C. plicata* are shown in Figure 1. These curves represent the growth of the shell since the tissues have a density approximately the same as the medium. Changes in slope of the growth curves indicate that the weight of both species increased from April to October at temperatures from 15-31°C. The growth rate decreased in summer at temperatures above 30°C. Also, the rate differed between increasing and decreasing temperatures at approximately the same temperature. Little increase in weight occurred from the middle of November to the middle of March at temperatures below 10°C.

Table 1 presents the results of the chemical analyses of extrapallial fluid of the freshwater species together with environmental water for comparison. Extrapallial fluid and environmental water were collected on the dates marked by arrows in Figure 1: on May 28, August 27, October 29 in 1973, February 25 and May 27 in 1974. Taking into account the changes in the slope of the growth curves, it is convenient to divide the sampling months into two periods of growth and rest.

Figure 1. Growth curve of the fresh-water bivalves *Hyriopsis schlegeli* and *Cristaria plicata*. Arrows show the months extrapallial fluid was collected.



May, August and October are grouped in the period of growth and February in the period of rest. The mean values of the samples of May, August, October in 1973 and May in 1974 are shown in the column of growth in Table 1. The extrapallial fluids of *H. schlegeli* and *C. plicata* show similar features not only in the chemical composition but also in seasonal changes of actual concentrations of major constituents, although the concentration ratios of each constituent differed somewhat from one another. Much higher concentrations of all given constituents occurred in the fluids of both freshwater species as compared to their environmental water. Environmental swamp water from Nishinoko contained 10.2 (± 1.5) ppm of calcium ion and 39 (± 6) ppm of bicarbonate ion during this experiment. In the extrapallial fluids, calcium was about 11 to 16 times and bicarbonate was about 14 to 17 times higher than the water. Table 1 also shows differences in the concentrations of major constituents between the

Chemical composition of extrapallial fluid

Table 1
Chemical composition of extrapallial fluid of freshwater bivalves (ppm)

Ion	Environmental water*	<i>Hyriopsis schlegeli</i>		<i>Cristaria plicata</i>	
		Growth	Rest	Growth	Rest
Na	8.7	509	508	523	524
K	3.1	22.5	20.9	22.4	19.7
Ca	10.2	163	132	155	119
Mg	4.2	15.3	18.1	16.1	15.0
Sr	0.000	0.38	0.27	0.44	0.30
Cu	0.002	0.33	0.35	0.25	0.23
Zn	0.039	1.46	1.57	1.27	0.93
Fe	0.009	3.15	1.70	1.79	0.81
Mn	0.038	2.98	2.30	1.80	2.07
HCO ₃	39	640	560	680	610
Cl	14.9	531	638	529	659
SO ₄	20	500	345	545	285
P	0.03	3.9	5.1	4.4	5.3
pH	7.47	8.15	8.23	7.97	8.33

*Mean value of ions in the water from the Nishinoko Swamp.

periods of growth and rest. Specifically, calcium, bicarbonate, and sulfate contents were relatively higher during the growth than during rest, whereas chloride content was higher in the period of rest for both species.

Heavy metals seem to form complexes with organic substances secreted by the outer mantle epithelium (Wada and Fujinuki, unpublished). This is also suggested by the data shown in Table 2, in which zinc, copper, manganese, and iron ions were reduced markedly in the extrapallial fluid after filtering through a 0.45 μ m membrane filter and dialyzed by collodion membrane. Phosphorus and sulfate contents were reduced considerably in the fluid after dialysis.

From Table 1 the ionic strength (I) of the extrapallial fluid was calculated as 0.044 (growth), 0.040 (rest) for *H. schlegeli*; 0.045 (growth), 0.039 (rest) for *C. plicata*, by considering only inorganic chemical constituents dissolved in the fluid (Table 3). Each value of the ionic strength of the extrapallial fluids was about 20 times as much as the environmental water's value ($I = 0.002$). The ionic strength of the fluid was somewhat higher in the period of growth. The ion product of the fluid was about 1,000 times higher than the water, but no difference was found between the growth and the rest (Table 3).

In order to examine the relation between the activity product or ion product and the formation of shell minerals, the chemical composition of extrapallial fluid from each individual of the freshwater bivalves was analyzed on one hand (Table 4), and the aragonite crystals

Table 2

Comparison of minor element content in the untreated, filtered and dialyzed extrapallial fluids extracted from a single individual (ppm)

Ion	<i>Hyriopsis schlegeli</i>			<i>Cristaria plicata</i>		
	A	B	C	A	B	C
Cu	0.25	0.10	0.02	0.33	0.12	0.01
Zn	1.55	0.50	0.06	1.48	0.55	0.04
Fe	3.76	2.74	0.90	1.70	1.20	0.44
Mn	1.67	1.15	0.54	1.23	0.78	0.14
SO ₄	4.98	4.95	3.68	4.15	2.88	2.70
P	6.24	4.50	1.45	2.50	2.50	0.94

A=Untreated, B=Filtered by 0.45 μ m membrane filter, C=Dialyzed by collodion membrane after filtration.

Table 3

Ionic strength I and ion product $M_{Ca^{2+},T} \cdot M_{CO_3^{2-}}$ of extrapallial fluid of freshwater bivalves calculated from the experimental data in Table 1

I	Environmental water	<i>Hyriopsis schlegeli</i>		<i>Cristaria plicata</i>	
		Growth	Rest	Growth	Rest
	0.002	0.044	0.040	0.045	0.039
$M_{Ca^{2+},T} \cdot M_{CO_3^{2-}}$	$10^{-9.6}$	$10^{-6.6}$	$10^{-6.7}$	$10^{-6.7}$	$10^{-6.6}$

$M_{Ca^{2+},T}$ = the molality of total calcium ion. Calcium is present in the extrapallial fluid as a free ion, ion pairs, and complexed. The total amount of calcium in these forms is expressed in relation to the total calcium ion (Ca^{2+},T); $M_{CO_3^{2-}}$ = the molality of carbonate ion.

Table 4

Analysis of extrapallial fluid extracted from each individual of freshwater bivalves (ppm)

Ion	<i>Hyriopsis schlegeli</i>			<i>Cristaria plicata</i>		
	Aug. 27, '73	Feb. 25, '74	May 27, '74	Feb. 25, '74	May 27, '74	Unhealthy
Na	506	495	512	509	508	276
K	21.0	20.5	13.4	15.9	21.0	29.2
Ca	139	137	140	116	131	676
Mg	16.8	17.8	13.3	10.6	15.6	11.3
Sr	0.43	0.27	0.40	0.29	0.45	0.85
Cu	0.29	0.42	0.30	0.04	0.38	0.12
Zn	1.68	1.83	1.5	0.25	2.0	0.5
Fe	4.30	1.18	1.58	0.15	3.20	1.30
Mn	1.28	2.25	3.12	1.72	2.15	3.06
HCO ₃	610	560	610	590	670	1440
Cl	511	638	589	592	525	315
SO ₄	320	350	650	270	870	510
P	5.1	4.9	2.5	4.0	4.1	8.1
pH	8.21	8.26	8.23	8.32	7.97	7.64

Chemical composition of extrapallial fluid

deposited on the nacre bathed in the fluid were observed on the other (Figs. 2-7). In normal individuals of *H. schlegeli* and *C. plicata*, the differences in the concentrations of calcium, bicarbonate, chloride, and sulfate between the periods of growth (August and May) and rest (February) were similar except in case of sulfate in *H. schlegeli* (see Table 1). However, the unhealthy individual of *C. plicata* was markedly different from the normal one analyzed at the same time. (Individuals, which reacted slowly to stimulation and had a cloudy extrapallial fluid, were designated "unhealthy"). Calcium and bicarbonate concentrations were considerably higher in the fluid of the unhealthy individual, whereas sodium, chloride and sulfate concentrations were lower. The pH of the fluid was also lower in the unhealthy animals.

Table 5 shows ionic strength and ion products of calcium and carbonate for the normal and unhealthy individuals. In *H. schlegeli*, the ion product was similar among those analyzed at different months. However, the product varied in *C. plicata*, and the unhealthy individual indicated the maximum of all the values.

The aragonite crystals on the surface of the nacre of *H. schlegeli* sampled in August, 1973 indicated etching (Fig. 2), a little growth in February, 1974 (Fig. 3), and initiation of new growth in May, 1974 (Fig. 4). On the other hand, in *C. plicata* the formation of new crystals already occurred in February, 1974 (Fig. 5). In the shell of May, 1974, active growth of aragonite crystals was observed on the nacre of the normal individual (Fig. 6), but in the unhealthy individual, the original outline of crystals had completely disappeared by natural dissolution (Fig. 7).

Marine Bivalves

Figure 8 shows the growth curves of shells of marine bivalves in under-water weight. They indicate that the effects of temperature from 8-30°C on the growth of shell varied considerably among species and even between individuals of the same species. In the summer, shells of *P. attenuata* and *C. gigas* grew a little in this experiment.

Table 5
Ionic strength I and ion product $\mathcal{M}_{Ca^{2+}, T} \cdot \mathcal{M}_{CO_3^{2-}}$ of extrapallial fluid calculated from the experimental data in Table 4

	<i>Hyriopsis schlegeli</i>			<i>Cristaria plicata</i>		
	Aug. 27, '73	Feb. 25, '74	May 27, '74	Feb. 25, '74	May 27, '74	
	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Unhealthy
I	0.039	0.040	0.047	0.037	0.050	0.068
$\mathcal{M}_{Ca^{2+}, T} \cdot \mathcal{M}_{CO_3^{2-}}$	$10^{-6.6}$	$10^{-6.7}$	$10^{-6.6}$	$10^{-6.6}$	$10^{-6.9}$	$10^{-6.1}$

Figure 2. An electron micrograph showing natural etching of aragonite crystals on the surface of shell nacre of a normal *H. schlegeli* in August 1973 (ion product = $10^{-6.6}$, pH 8.21, 28°C). X 3,700

Figure 3. Hexagonal crystals with different sized (110) and (010) faces grown on the surface of shell nacre of a normal *H. schlegeli* in February 1974 (ion product = $10^{-6.7}$, pH 8.26, 7°C). X 3,700

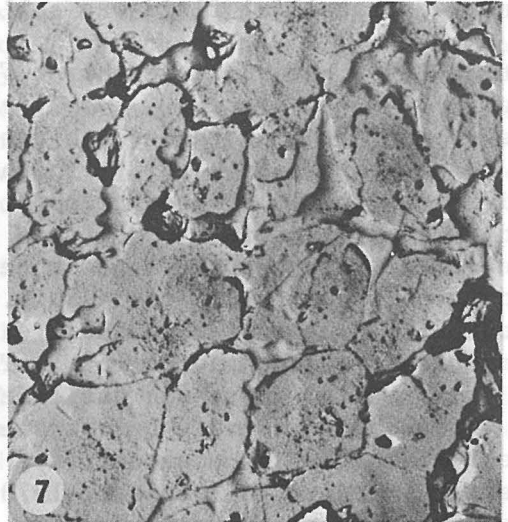
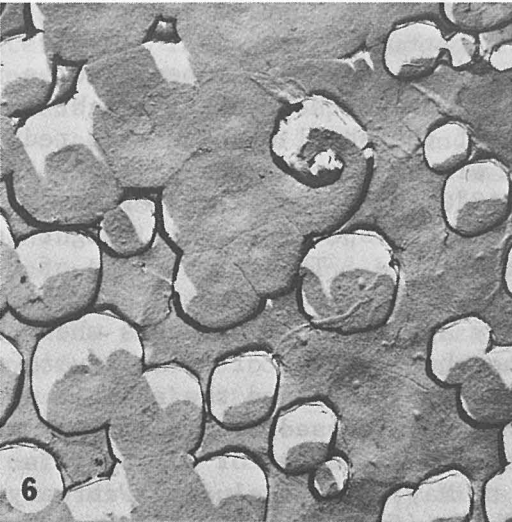
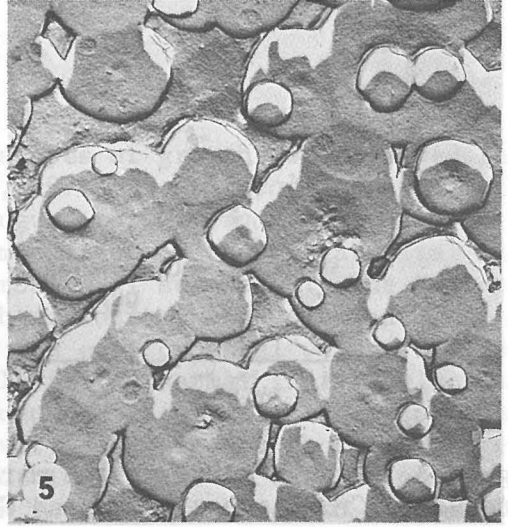
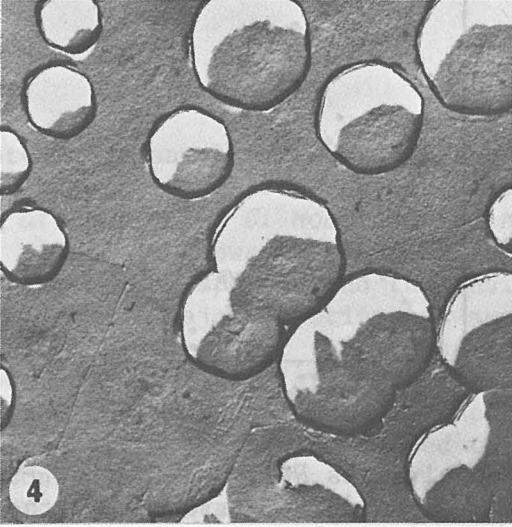
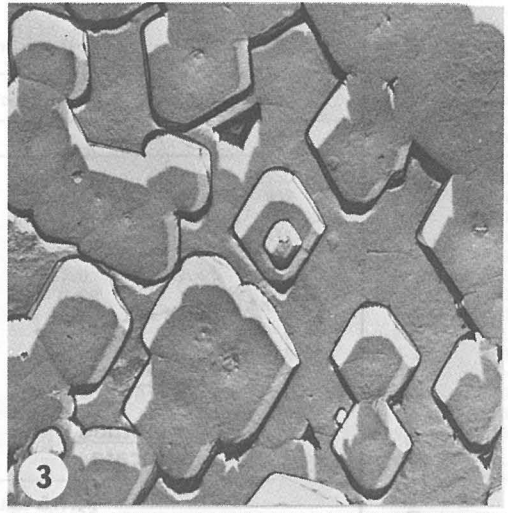
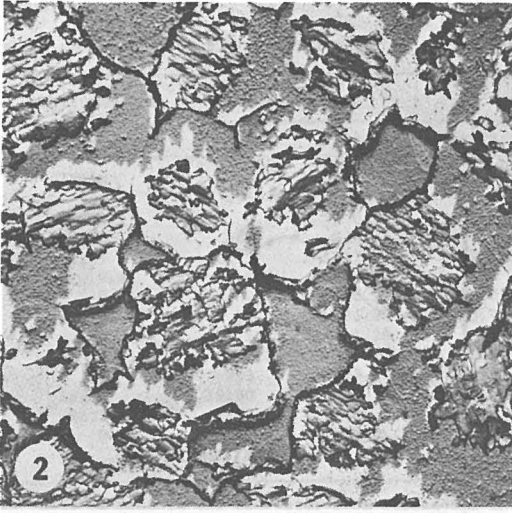
Figure 4. Large aragonite crystals grown on the surface of shell nacre of a normal *H. schlegeli* in May 1974 (ion product = $10^{-6.6}$, pH 8.23, 21°C). X 3,300

Figure 5. Surface of shell nacre of a normal *C. plicata* showing the formation of new small aragonite crystals in February 1974 (ion product = $10^{-6.6}$, pH 8.32, 7°C). X 3,700

Figure 6. Aragonite crystals grown on the surface of shell nacre of a normal *C. plicata* in May 1974 (ion product = $10^{-6.9}$, pH 7.97, 21°C). X 3,700

Figure 7. Naturally dissolved surface of shell nacre of an unhealthy *C. plicata* in May 1974 (ion product = $10^{-6.1}$, pH 7.64, 21°C). X 3,700

Chemical composition of extrapallial fluid



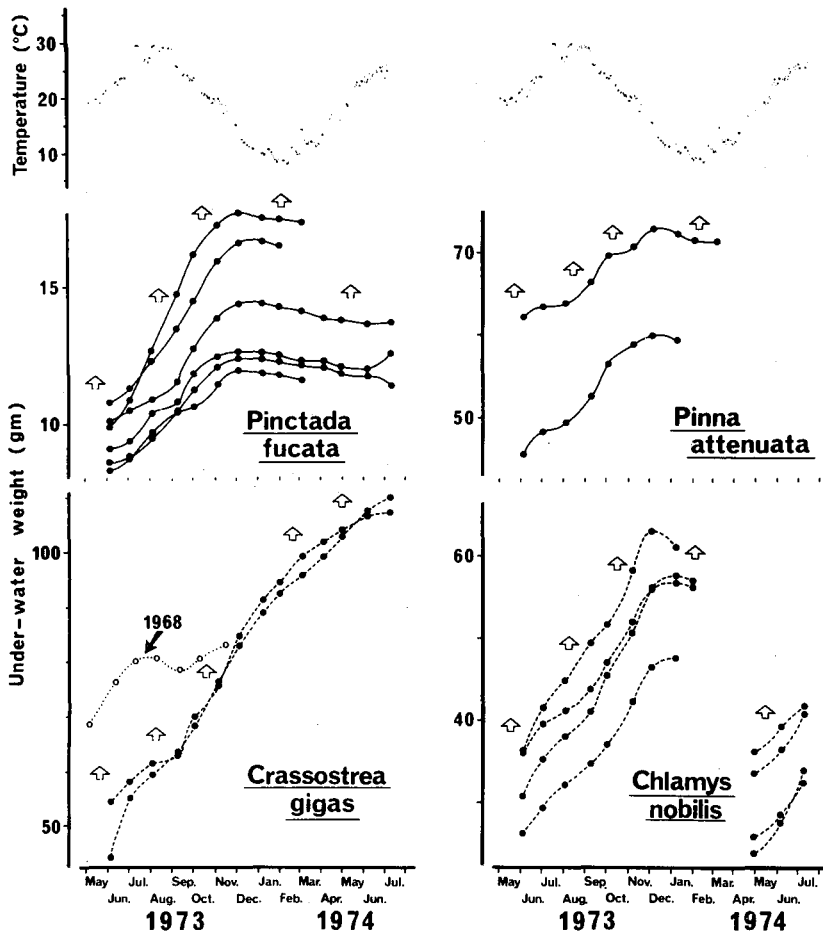


Figure 8. Growth curve of the marine bivalves *Pinctada fucata*, *Pinna attenuata*, *Crassostrea gigas* and *Chlamys nobilis*. Arrows show the months extrapallial fluid was collected.

But in 1968, the shell weight of *C. gigas* decreased (open circles in Fig. 8). *P. fucata* and *C. nobilis* increased their shell weight in the summer although the growth rate of the shell was somewhat reduced at temperatures above 28°C. In the winter, the increase of shell weight completely stopped at about 13°C in *P. fucata* and *P. attenuata* and at about 11°C in *C. nobilis*. In these species, shell weight decreased with further decline of temperature. The weight loss of *P. fucata* continued until early July, 1974, when the temperature reached about 22°C, but continued until early April in normal years when the temperature reached about 16°C. The shell weight of *P. attenuata* and *C. nobilis* also decreased until February, 1974, and the animals died at about 8°C. The weight loss seems to be caused by dissolution of shell minerals. On the contrary, the shell weight of *C. gigas* increased sharply from October, 1973 to May, 1974 including February when the temperature went down to the minimum of 7.5°C. The arrows in Figure 8 represent the time extrapallial fluid and environmental

Chemical composition of extrapallial fluid

Table 6
Chemical composition of extrapallial fluid of marine bivalves (ppm)

Ion	Environmental	<i>Pinctada fucata</i>		<i>Pinna attenuata</i>		<i>Crassostrea gigas</i>		<i>Chlamys nobilis</i>	
	water*	Growth	Rest	Growth	Rest	Growth	Rest	Growth	Rest
Na	10410	9920	10050	9720	10050	9880	10550	9780	10550
K	351	495	450	375	345	423	357	428	375
Li	0.15	0.20	0.35	0.15	0.17	0.17	0.12	0.19	0.14
Ca	410	387	439	387	420	382	415	398	420
Mg	1245	1233	1217	1180	1225	1196	1255	1183	1290
Sr	7.4	7.8	6.6	8.6	7.0	7.4	9.2	8.1	6.9
Cu	0.018	0.19	0.27	0.07	0.06	1.28	0.52	0.09	0.09
Zn	0.088	11.5	25.0	25.7	10.1	13.7	5.7	1.05	0.60
Fe	0.013	1.25	1.26	0.40	0.88	1.17	0.70	0.75	1.05
Mn	0.017	0.24	0.23	0.09	0.08	0.21	0.15	0.08	0.06
HCO ₃	135	223	303	146	167	317	156	227	-
Cl	18900	18580	19480	18470	19500	19170	18860	18440	19590
SO ₄	2635	2685	3200	2530	2740	2740	2735	2515	2855
P	0.05	47.7	25.4	6.3	0.3	8.9	9.6	16.3	15.9
pH	8.20	7.40	7.54	7.43	7.83	7.56	7.33	7.50	-

*Mean value of ions in the sea water from Tatokujima in Ago Bay.

water were sampled. Based on the slopes of growth, we regarded the period of rest as February and May, 1974 for *P. fucata*, February for *P. attenuata* and *C. nobilis*, and August for *C. gigas*.

Table 6 shows the chemical composition of the extrapallial fluids of the marine species and the environmental sea water. The concentrations of major constituents such as sodium, magnesium, and chloride were generally lower than those in the environmental water. Potassium, however, was always at higher levels in the normal individuals than in the environmental water. The concentrations of these major constituents in the fluids tended to vary depending on those in the environmental sea water. Calcium and bicarbonate concentrations in the fluids fluctuated in close relation to the formation and dissolution of shell minerals and were independent of those in the environmental water. For instance, *P. fucata* and *P. attenuata* had higher concentrations when shell weight decreased in the period of rest. Phosphorus content appeared to depend on the organic substances secreted through the outer mantle epithelium and varied from species to species. Significant differences were also demonstrated in concentration ratios of heavy metals of extrapallial fluid to sea water among species: higher ratio of zinc for *P. fucata* and *P. attenuata*, higher ratio of copper for *C. gigas*, and lower ratio of those heavy metals for *C. nobilis*.

The ionic strength of extrapallial fluid of the marine species ranged from 0.65 to 0.69 and was similar to the mean value of the environmental water ($\bar{I} = 0.68$) (Table 7). The values of the fluids had a tendency to be a little higher in the period of rest than during growth. Table 7 also shows that the values of the ion product in marine bivalves were usually higher than those of normal individuals of freshwater bivalves (Table 3). The values are higher during rest than growth in *P. fucata* and *P. attenuata*, whereas those for *C. gigas*

Table 7
Ionic strength I and ion product $M_{Ca^{2+}} \cdot T \cdot M_{CO_3^{2-}}$ of extrapallial fluid of marine bivalves calculated from the experimental data in Table 6

	Environmental water	<i>Pinetada fucata</i>		<i>Pinna attenuata</i>		<i>Crassostrea gigas</i>		<i>Chlamys nobilis</i>
		Growth	Rest	Growth	Rest	Growth	Rest	Growth
I	0.68	0.66	0.69	0.65	0.68	0.67	0.68	0.65
$M_{Ca^{2+}} \cdot T \cdot M_{CO_3^{2-}}$	$10^{-6.8}$	$10^{-7.5}$	$10^{-7.2}$	$10^{-7.6}$	$10^{-7.2}$	$10^{-7.2}$	$10^{-7.6}$	$10^{-7.3}$

are about 2.5 times greater during growth than rest. The difference may be caused by formation or dissolution of shell minerals, as was pointed out previously.

DISCUSSION

The actual concentrations of major constituents in the extrapallial fluid were markedly different in freshwater and marine bivalves and may be physiologically controlled in close interrelation with the actual concentrations of electrolytes in the environmental water. The fluid of freshwater species had much higher amounts of all constituents than the Nishinoko Swamp water. Although evident differences were found between the extrapallial fluids of marine species and their environmental sea water, as Wilbur (1972) has discussed, they were small compared to those between the freshwater species and their environment. Calcium concentration in freshwater bivalves was about half that of the marine species, whereas bicarbonate concentration in freshwater species was about 2-5 times that of marine species. The carbonate content calculated from the bicarbonate concentrations and the pH values in Tables 1, 4, and 6 was 4.2×10^{-2} mM - 9.3×10^{-2} mM for freshwater species and 2.2×10^{-3} mM - 7.9×10^{-3} mM for marine species, the former being about 10 times as high as the later.

The activity in metabolism of shell formation, which differed among species, was influenced by environmental factors, especially temperature, and was reflected in seasonal variations in the extrapallial fluid. The calcium and bicarbonate concentrations of the extrapallial fluid varied depending on formation and dissolution of shell minerals and were relatively lower during rest when etched crystals were not observed but higher during rest when shell weight decreased. Etched crystals were not observed during growth but were present in the period of rest when shell weight decreased. The conspicuous changes of the fluid seemed to follow closely physiological differences between individuals. The pH of fluid of unhealthy individuals of *C. plicata* decreased, presumably with the increases of metabolites, probably carbon dioxide and organic acids, as Crenshaw and Neff (1969) have demonstrated; and then calcium and bicarbonate concentrations in the fluid increased by dissolution of shell minerals.

Chemical composition of extrapallial fluid

In synthetic systems in which calcium carbonate is precipitated, large amounts of magnesium ion in solution promote the formation of aragonite (Kitano, 1962). However, shell mineral of the freshwater bivalves is in the form of aragonite and yet no significant difference was found between the actual concentrations of given inorganic constituents and the extrapallial fluids of marine bivalves which form aragonitic or calcitic shell (aragonite in *P. fucata* and *P. attenuata*; calcite in *C. gigas* and *C. nobilis*).

The content of heavy metals was reduced in accordance with the decrement of phosphorus and sulfate content after filtration and dialysis of extrapallial fluids, as seen in Table 2. Wada and Furuhashi (1971) have detected sulfuric ester in the acid mucopolysaccharide or acid mucopolysaccharide-protein complex contained in the fluid of *Pinctada fucata*. A large quantity of phosphorus also seems to be a component of the organic substances. It was evident from these facts that heavy metals in the extrapallial fluid form complexes with proteins and/or acid mucopolysaccharides produced by the outer mantle epithelium. The heavy metal-protein and/or -acid mucopolysaccharide complexes seem to be stable during filtration and dialysis.

Extrapallial fluid is a mixed solution of electrolytes and contains proteins and mucopolysaccharides. In a complex solution such as the extrapallial fluid, the interaction between charged ions and the complex between calcium and proteins or mucopolysaccharides or metabolic acids may reduce the effective concentration of calcium and carbonate ions, as discussed on the formation of bone mineral by Neuman and Neuman (1958). The present study has demonstrated that the ionic strength of the extrapallial fluid, which is physiologically controlled, varied between 0.036 and 0.050 for normal individuals of freshwater bivalves and between 0.64 and 0.71 for normal individuals of marine species. The values of the ion product $\mathcal{M}Ca^{2+} \cdot T \cdot \mathcal{M}CO_3^{2-}$ were higher in marine bivalves than in freshwater species, whereas the values of the activity product $aCa^{2+} \cdot aCO_3^{2-}$ in the marine species may be much smaller than those in freshwater species. Since the chemical composition of organic chemical species in the extrapallial fluids have not been determined in this study, the activity product of calcium and carbonate dissolved in the fluid could not be estimated. Therefore, it was not possible to calculate the actual degree of saturation with respect to shell minerals. However, it can be postulated that the biomineralization in bivalve molluscs occurs under saturation or low supersaturation, which is physiologically controlled, with respect to shell minerals.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our thanks to Professor Yasushi Kitano of the Water Research Laboratory, Nagoya University for his useful discussion and to Mr. Takashi Maegawa of Shiga Prefectural Fisheries Experimental Station for his assistance in measurements of under-water weight of freshwater bivalves.

REFERENCES

- Crenshaw, M. A. and Neff, J. M. 1969. Decalcification at the mantle-shell interface in molluscs. *Am. Zool.* 9:881-885.
- De Waele, A. 1930. Le sang d'*Anodonta cygnea* et la formation de la coquille. *Mém. Acad. r. Belg. Cl. sci.* 10:1-51.
- Japanese Industrial Standard (JIS) K 0101. 1966. Testing Method for Industrial Water, pp. 14-15.
- Kitano, Y. 1962. The behavior of various inorganic ions in the separation of calcium carbonate from a bicarbonate solution. *Bull. Chem. Soc. Japan* 35:1973-1980.
- Neuman, W. F. and Neuman, M. W. 1958. *The Chemical Dynamics of Bone Mineral*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Nishii, T. 1965. Examination of the underwater weight used for measuring the growth of the Japanese pearl oyster, *Pinotada martensii* (Dunker). *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.* 10:1264-1282.
- Wada, K. 1972. Nucleation and growth of aragonite crystals in the nacre of some bivalve molluscs. *Biom mineralization* 6:141-159.
- Wada, K. and Fujinuki, T. 1974. Physiological regulation of shell formation in molluscs. I. Chemical composition of extrapallial fluid. *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.* 18:2085-2110.
- Wada, K. and Furuhashi, T. 1970. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs - XVII. Acid polysaccharide in the shell of *Hyriopsis schlegeli*. *Bull. Jap. Soc. scient. Fish.* 36:1122-1126.
- Wada, K. and Furuhashi, T. 1971. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs - XVIII. Acid polysaccharide of mantle mucus of some marine bivalves. *Bull. Jap. Soc. scient. Fish.* 37:13-17.
- Wilbur, K. M. 1972. Shell formation in mollusks. In: Chemical Zoology, Mollusca, Vol. 7, pp. 103-145. Ed. by M. Florkin and B. T. Scheer. Academic Press, New York.

昭和 52 年 8 月 1 日 印刷
昭和 52 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

21

August 1977

◆

CONTENTS

- Wada, K. and Suga, S. Studies on the state of minor elements and the mineralization patterns of various cultured pearls by means of electron microprobe analysis, microradiography and colour television display2277
- Funakoshi, S. Seasonal changes of hemocyte counts, hemocyte constituents and size of hemocytes in the pearl oyster, *Pinctada fucata*.....2299
- Funakoshi, S. Effect of dissolved oxygen contents on the hemocyte constituents and heart rate in the pearl oyster, *Pinctada fucata*.....2309
- Yamaguchi, K. and Hasuo, M. Relation between activity of pearl oyster and seasonal changes of environmental factors in culture ground2315

The originals published in other journals

- Wada, K. and Fujinuki, T. Biomineralization in bivalve molluscs with emphasis on the chemical composition of the extrapallial fluid

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