

宮入貝卵子の発育に及ぼす塩類の影響

野島尚武*, 片峰大助

長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学部門 (主任: 片峰大助教授)

Effect of mineral salts on growth of *Oncomelania nosophora* eggs

Hisatake NOJIMA* and Daisuke KATAMINE (Department of Parasitology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

Abstract : The authors have been making a series of laboratory investigations to find the most ideal condition for survival and development of *Oncomelania* eggs. As the second step of the study, the authors studied the effect of various mineral salts on the fresh eggs of *Oncomelania nosophora* which were taken off their mud-like covering. In simple NaCl solution as distilled water the naked eggs did not develop or died in a few days showing degeneration, regardless of the concentration of NaCl in the solution. Therefore, as a standard culture solution we used the mixed salts solution which contains NaCl 2.9g, KCl 0.05g, CaCl₂ · 2H₂O 0.13g, MgSO₄ · 7H₂O 0.05g and NaHCO₃ 0.20g per liter, showing pH 8.1 and 105 mOsm of osmolarity. In this standard solution kept at 25°C, the eggs normally developed to mature larvae and most of them hatched within 16 days after incubation. Higher pH over 10.2 or lower than 5.0 resulted a significant damage on the viability of the egg. The optimal potential of hydrogen of the solution seemed to be around 7.1 to 8.3, and the osmolarity must be limited under 108 mOsm. Effect of the mineral salts was tested by changing individually the amount of each component of the standard culture solution, and the following evidences were obtained : The eggs can continue their development up to maturity and hatch even in the modified standard solution lacking NaCl. On the other hand, the presence of proper amounts of KCl, CaCl₂, MgSO₄ and NaHCO₃ is indispensable for the eggs to attain maturity and hatch. The optimal amounts of respective salts are KCl 0.04 to 0.20g, CaCl₂ 2H₂O · 0.11 to 0.50g, MgSO₄ 7H₂O 0.05 to 0.11g and NaHCO₃ 0.16 to 0.40g.

Tropical Medicine, 18(2), 91-101, June, 1976

* 現所属, 鹿児島大学医学部医動物学教室

Present address : Department of Medical Zoology, Faculty of Medicine,
Kagoshima University

長崎大学熱帯医学研究所業績 第764号

Received for publication, June 12, 1976

緒 言

日本住血吸虫の中間宿主宮入貝の生態の研究は、日本住血吸虫病の予防撲滅対策を効果的に行うための基礎的事項として欠くことが出来ない。従来、宮入貝の成貝や稚貝に関しての生態学的観察は少なくないが、卵子に関しては知見に乏しい。

先に著者ら(1973)は卵子の発育・孵化に及ぼす温度と水分量の影響をみ、最も能率的に多数の稚貝を得るのに必要な方法について報告した。今回は、土壌上に産み落された卵子に於て、偶発的に泥皮の一部あるいは大部分を失なったものでは十分な水分があってもやがてなかの胚子は死滅することに疑問を發して、宮入貝の卵子を被っている防護物、即ち、泥皮を人工的に取り去り、卵膜が露出した裸の卵子を各種塩類溶液の中で培養を試みた。なかの胚子の発育を詳しく観察すると同時にその発育、孵化に及ぼす pH、浸透圧、塩類構成とそれらの濃度の諸条件を検討し、最も胚子の発育に適当な塩類溶液を作成したので報告する。

材料および方法

実験に用いられた宮入貝は甲府産の *Oncomelania nosophora* である。産卵のための土壌は久留米市筑後川沿岸の宮入貝自然棲息地より持ち帰ったものである。卵子は既に報告した産卵培地(野島, 1973)で宮入貝成貝を飼育・産卵させ、age のそろった卵子を使用した。

1. 泥皮摘除

上記卵子を湿った濾紙上に移し、実態顕微鏡下に解剖針を用い、すみやかに注意深く、全ての泥皮を取り除く。その裸の卵子では、なかの胚子は卵膜を透してその発育段階が容易に観察される。

2. 培養方法と観察

このような裸の卵子(以下、単に卵子)10個を 0.6 ml の塩類溶液の入った Chamber (ラプテック Tissue Culture 8 Chamber) で培養した。この培養容器は倒立顕微鏡で観察できる。Chamber は、カバーガラスでワセリン封を行ない完全密封された。ここで卵子および塩類溶液は無菌的処理や抗生物質の使用は行なわなかったが、微生物の発生は殆んどみられなかった。

培養は 25°C の恒温で行ない、観察は毎日特に発育初期の異常分裂の有無、心拍が認められる被面子前期に発育できた卵子数とそれに要した培養日数、孵化数とそれに要した培養日数について重点的に行なわれた。

引きつづき、供試卵子の全てが孵化を完了するまで、あるいは孵化しない卵子にあってはなかの胚子が死滅するまで観察している。尚、溶液の浸透圧の測定は東芝製 Osmometer によった。

成 績

1. 蒸留水中での発育

産卵直後の 2 分裂期から孵化直前の被面子後期に至る種々の発育段階の裸の卵子夫々 10 個を蒸留水中で培養してみた。その結果、2 分裂期の卵子ではすみやかに胚細胞の崩壊をみとめ、殆んど発育がみられなかった。囊胚期 (25°C, 3 日令) のものでは、10 個中 4 個がやっと担輪子期に発育できたのみでその後の発育はなかった。担輪子期 (4 日令) のものでは、10 個中 3 個が被面子前期に発育できたがそれでも囊状隆起等の発育異常を伴い、又、その間の発育は正常のものより 1 週間以上の遅れがあり、その後の発育はなかった。被面子前期 (6 日令) のものでは、全てが被面子中期に徐々に発育出来たが、どの胚子の腹足にも異常隆起をみとめ、その後の発育はなかった。被面子中期 (9 日令) のものでは 10 個中 8 個がやがて被面子後期に発育し、そのうち 6 個の卵子では孵化がみられたが、その稚貝は幼弱であった。被面子後期 (12 日令) のものでは既に発育がほぼ完了していることもあって正常な発育・孵化を行なった。

要するに発育途上にある裸の卵子を蒸留水中で培養するとその発育は著しい影響を受け以後の発育・孵化が困難になる。特に、発育初期では致命的障害を受ける。又、井戸水、川水、水道水中でも同様の結果を得ている。

以下の実験では全て産卵直後の 2 分裂期の卵子 (1 日令) を用い、その発育・孵化を観察したものである。(Table 1)

2. NaCl での発育

0.15, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.90% の NaCl 溶液で卵子夫々 10 個を培養すると 0.40% 以上の溶液では 24 時間以内に胚細胞の崩壊がみられる。一方、0.35% 以下では細胞分裂が進むものもみられるが、遅くとも 1 週間後には全ての胚細胞は崩壊し、死滅する。この時、濃度の高いもの程死滅するのが早い。要するにいかなる濃度の NaCl 溶液でも卵子の発育はみられなかった。(Table 2)

3. 標準液での発育、孵化の観察

両生類の培養に用いられる Holtfreter 氏液、

Steinberg 氏液, Niu-Twitty 氏液の組成を検討し, 次に示す組成とその濃度を有する標準液を作成した. 標準液: NaCl 2.9g, KCl 0.05g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.13g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, NaHCO_3 0.20g/l, 105 mOsm, pH 8.1

25°Cの恒温に於いて, この標準液での卵子の発育課程を培養日数に従って観察すると, 胚子は培養開始時に2分裂期, 2~3日目に囊胚期, 4~5日目に担輪子期, 6~7日目に被面子前期, 8~11日目に被面子中期, 12~15日目に被面子後期(成熟卵子)に発育する. この発育経過では卵子が泥皮を被って自然発育した時と同様に順調な発育がみられた. 液中にて大部分の成熟卵子は16日目までに, 卵膜を破って孵化し, 稚貝は脱ぎ去った卵膜を攝取したりして3週間は活発に動きまわることを認めた (Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6)

4. pH の影響

標準液の pH を0.1Nの HCl あるいは, NaOH を用いて, 種々の pH に調整して pH 4.0~10.2に至る培養溶液を作成し, 卵子夫々に10個を投入して発育・孵化を観察した. 至適 pH は7.1~8.3にあり, この範囲内で胚子の発育は順調で, 被面子前期に発育したものは全て引き続き発育を続け, 大部分が16日目ま

で孵化できた. 一方, pH 8.8以上のアルカリ側あるいは6.6以下の酸性側になると被面子前期までに発育できた卵子の数は少なく, 又, それまでの培養日数は長くなった. その後, 引き続き発育して孵化できた卵子の数は更に減少し, より多くの日数を要した. pH 10.2, 4.0では既に発育初期で著しい障害を受け被面子前期にさえ発育がみられない. (Table 3)

5. NaCl 濃度の影響 (浸透圧の変化)

標準液に含まれる5種の塩類のうち, NaCl だけの量を0~5.3g/lの範囲内で変化させて作成した塩類溶液の中で, 夫々卵子10個を培養, その発育・孵化を観察した. NaCl が3.1g/l (浸透圧が111mOsm) 以下の量である塩類溶液では, たとえ NaCl を欠いても他の4種の塩類(KCl, CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3) が含まれていると(11 mOsm) 胚子の発育, 孵化は順調に進み, 標準液での培養成績と殆んど同じであった.

一方, 3.3g/l (116 mOsm) 以上の NaCl の量になると発育・孵化に障害の影響が認められた. 3.3g, 3.5 g/l (夫々, 116, 125 mOsm) では僅かに発育速度が鈍り, 被面子前期に発育したものでもその後孵化に至らないものが1~3個生じた. 3.7g/l 以上 NaCl の

Table 1. Culture of naked *Oncomelania nosophora* eggs at different stages in distilled water

| Stage | No. of eggs examined | Early veliger | | Hatching | |
|----------------|----------------------|---------------|-------|----------|-------|
| | | No. | days | No. | days |
| 2-Cell | 10 | 0 | | 0 | |
| Trochophora | 10 | 8 | 9-12 | 0 | |
| Early veliger | 10 | | | 0 | |
| Middle veliger | 10 | | | 8 | 16-18 |
| Late veliger | 10 | | | 10 | 15-17 |

Table 2. Culture of naked *Oncomelania nosophora* eggs in saline of different NaCl concentrations

| NaCl (g/l) | pH | No. of 2-cell stage eggs examined | Early veliger | | Hatching | |
|------------|-----|-----------------------------------|---------------|-------|----------|-------|
| | | | No. | days | No. | days |
| 9.0 | 7.4 | 10 | 0 | | 0 | |
| 4.5 | 7.4 | 10 | 0 | | 0 | |
| 4.0 | 7.4 | 10 | 0 | | 0 | |
| 3.5 | 7.4 | 10 | 0 | | 0 | |
| 3.0 | 7.4 | 10 | 0 | | 0 | |
| 2.5 | 7.4 | 10 | 0 | | 0 | |
| 1.5 | 7.4 | 10 | 0 | | 0 | |
| 0.0 | 7.4 | 10 | 0 | | 0 | |

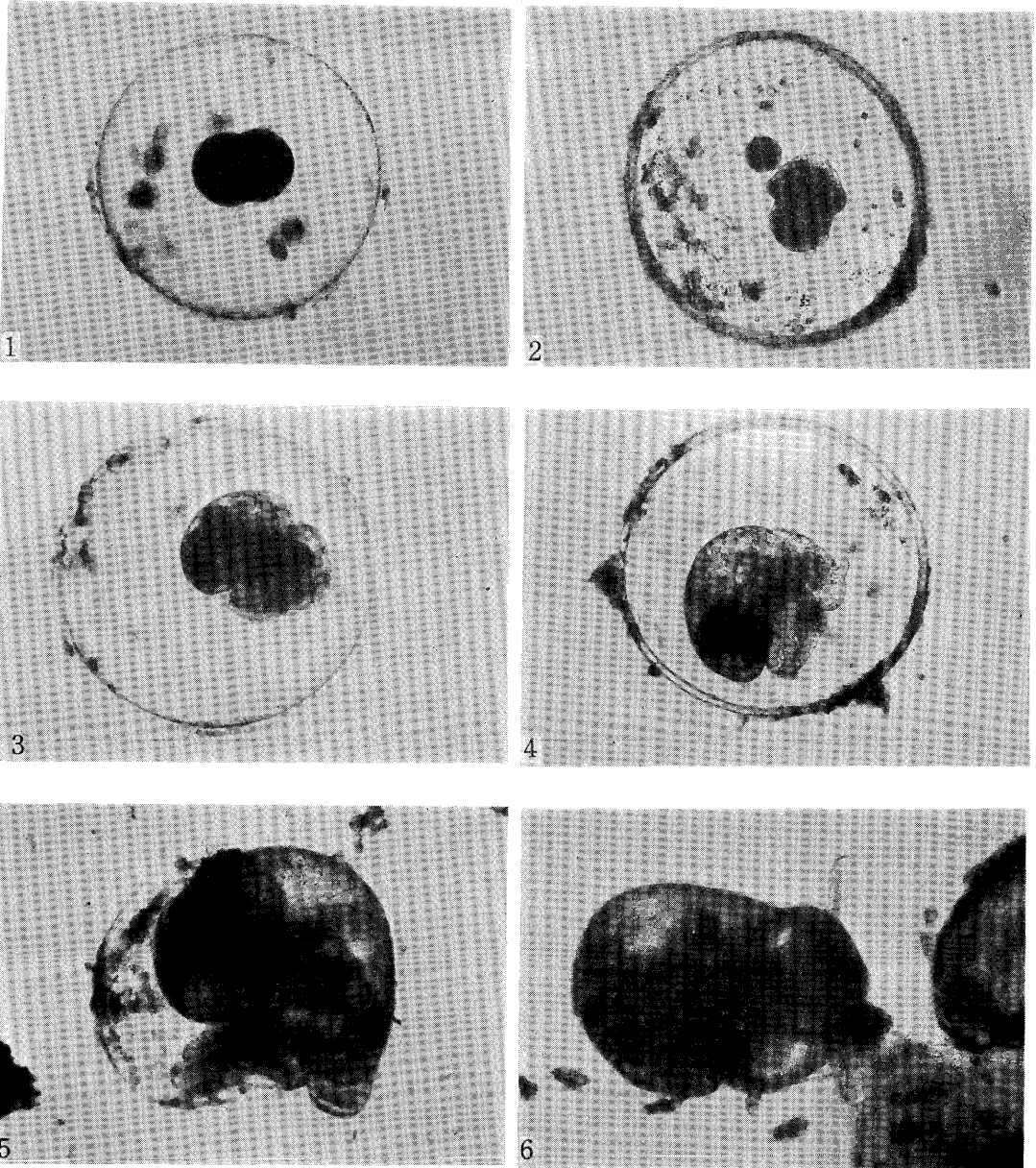


Fig. 1 2-Cell Embryo
 Fig. 2 Trochophora
 Fig. 3 Early veliger beginning heart beats
 Fig. 4 Middle veliger
 Fig. 5 Late veliger just before hatching
 Fig. 6 The young snail hatched in standard solution

量に於いては被面子前期に發育出来たものが少なくなり、その後發育して孵化することが困難になってくる。即ち、3.7g/l (129 mOsm) では被面子前期に發育できた胚子5個のうち、3個のみが孵化でき、3.9g/l (135 mOsm) では僅かに胚子2個が被面子前期に發育してもその後孵化に至らなかった。4.1g, 4.5g, 4.9g/l のものでもほぼ同様であり、より多くの培養日数でもって被面子前期に發育する胚子1~2個が認められるだけである。5.3g/l (179 mOsm) になると培養開始時より著しく障害があって發育はなかった。

このように卵子は NaCl 濃度の高い高張液での培養ではその發育、孵化に障害を受け、3.1g/l 以下の NaCl の量ではたとえ NaCl を欠いても順調な發育がみられ、極端な低張液にも低抗性があると思われる。しかしながら、低張になればなる程卵子は低浸透圧の影響を受け、卵子は膨化していく。即ち、産卵直後の卵子の直径 $0.660 \pm 0.017\text{mm}$ は 11 mOsm の溶液中では24時間後に $0.679 \pm 0.014\text{mm}$ に膨化する。宮入貝卵子の泥皮を取り去る過程で卵膜を損傷させた卵子では異常に長球形を呈したり、更に胚子が溶液中に飛び出すこともあった。(Table 4)

以上のことから、NaCl 濃度は低くても直接胚子の發育に影響は無いと考えられるが、以下の実験で各種塩類の濃度の影響をみる時 NaCl の濃度を相対的に変化させて試験溶液の浸透圧を100 mOsm 前後に維持させることにより高張液になるのを避け、又、低張

液での卵子に起るひずみを避けた。

6. KCl 濃度の影響

同様に標準液の塩類組成のうち KCl の量が0~1.00g/l の範囲内で卵子夫々10個の發育、孵化を観察した。順調な胚子の發育・孵化はKClの量が0.04~0.20g/l の範囲にある塩類溶液でみられ、培養後6~8日目に被面子前期16日までに殆んど全ての胚子が孵化して稚貝となる。0.30g/l 以上あるいは0.03g/l 以下の KCl の量になると胚子の發育・孵化に障害が認められ、發育速度が遅く、被面子前期に發育できる胚子が少なくなり、更に孵化できるものが減少する。0.60g, 0.80g/l の量では夫々5個、3個の胚子がやと被面子前期に發育できても孵化に至ることはなかった。1.00g/l のものでは、被面子前期にも發育できる胚子はなかった。一方、KClの濃度を極く低く0.005g/lの量にさせた溶液においてもなおかつ5個に孵化がみられ、その微量でも胚子の發育に有効に働くと考えられる。しかしながら、KClを全く欠くと胚細胞は24時間後には崩壊してしまう致命的影響を受ける(Table 5)。

7. CaCl₂ 濃度の影響

同様に標準液の塩類組成の CaCl₂ · 2H₂O の量が0~2.00g/l の範囲内で観察すると、順調な胚子の發育、孵化はCaCl₂ · 2H₂O の量が0.11~0.50g/l の範囲にある塩類溶液でみられ、大部分が16日までに孵化する。0.60g/l 以上、あるいは0.05g/l 以下の CaCl₂ · 2H₂O の量になると胚子の發育・孵化に悪い影響ができて

Table 3. Influence of pH on growth of naked *O. nosophora* eggs

| pH | No. of 2-cell stage eggs examined | Early veliger | | Hatching | |
|------|-----------------------------------|---------------|-------|----------|-------|
| | | No. | days | No. | days |
| 10.2 | 10 | 0 | | 0 | |
| 9.9 | 10 | 3 | 8-9 | 1 | 21 |
| 9.6 | 10 | 7 | 7-12 | 6 | 17-21 |
| 9.3 | 10 | 9 | 8-10 | 8 | 18-21 |
| 8.8 | 10 | 8 | 7-9 | 8 | 17-20 |
| 8.3 | 10 | 9 | 7-8 | 9 | 16-18 |
| 8.1 | 10 | 10 | 6-7 | 10 | 15-17 |
| 7.4 | 10 | 9 | 6-7 | 9 | 16-18 |
| 7.1 | 10 | 10 | 6-7 | 10 | 16-18 |
| 6.6 | 10 | 10 | 7-8 | 8 | 16-22 |
| 6.2 | 10 | 10 | 7-8 | 8 | 21-23 |
| 5.5 | 10 | 10 | 7-9 | 4 | 20-27 |
| 5.0 | 10 | 10 | 7-10 | 0 | |
| 4.0 | 10 | 0 | | 0 | |

Standard solution : 2.9g NaCl, 0.05g KCl, 0.13g CaCl₂ · 2H₂O
0.05g MgSO₄ · 7H₂O, 0.20g NaHCO₃ per liter

た. 0.60g, 1.00g/l の量では 発育が遅れ, 孵化が標準液にみられるそれより 2 日程遅れる程度であったが, 更に量を増して 1.50g/l のものでは胚子 4 個が被面子前期に発育するのがおくれ 8~11 日を要するが, その後孵化するものはない. 2.00g/l では被面子前期

にも発育出来なかった. 一方, CaCl₂ の濃度を低くした 0.09g, 0.07g/l のものでは, 夫々 10 個, 9 個が順調に被面子前期まで発育したが, 孵化が遅れ, なかに孵化しないものが夫々 2 個出てきた. 更に, 0.05g, 0.03g/l の量では被面子前期に発育しても孵化せず, 0.01

Table 4. Influence of osmotic pressure on growth of naked *O. nosophora* eggs

| Solution | | | No. of 2-cell stage eggs examined | Early veliger | | Hatching | |
|----------|-----|------|--------------------------------------|---------------|-------|----------|-------|
| NaCl | pH | mOsm | | No. | days | No. | days |
| 5.30 | 8.2 | 179 | 10 | 0 | | 0 | |
| 4.90 | 8.2 | 164 | 10 | 2 | 12 | 0 | |
| 4.50 | 8.1 | 155 | 10 | 2 | 11 | 0 | |
| 4.10 | 8.1 | 143 | 10 | 1 | 9 | 0 | |
| 3.90 | 8.1 | 135 | 10 | 2 | 8-10 | 0 | |
| 3.70 | 8.1 | 129 | 10 | 5 | 7-10 | 3 | 21-23 |
| 3.50 | 7.7 | 125 | 10 | 10 | 6-10 | 9 | 17-21 |
| 3.30 | 7.7 | 116 | 10 | 10 | 6-8 | 7 | 16-18 |
| 3.10 | 7.8 | 111 | 10 | 8 | 6-7 | 8 | 15-18 |
| 2.90 | 8.1 | 105 | 10 | 10 | 6-7 | 10 | 15-17 |
| 2.70 | 8.0 | 97 | 10 | 10 | 6-7 | 10 | 15-18 |
| 2.30 | 8.1 | 85 | 10 | 9 | 6-9 | 9 | 15-17 |
| 1.90 | 8.0 | 72 | 10 | 9 | 6-8 | 9 | 15-20 |
| 1.50 | 7.7 | 59 | 10 | 9 | 6-7 | 8 | 15-18 |
| 0.70 | 7.7 | 34 | 10 | 10 | 7-8 | 10 | 15-17 |
| 0 | 7.7 | 11 | 10 | 10 | 7-8 | 10 | 15-20 |

0.05g KCl, 0.13g CaCl₂ · 2H₂O, 0.05g MgSO₄ · 7H₂O, 0.20g NaHCO₃ per liter

Table 5. Growth response of naked *O. nosophora* eggs to KCl

| Solution | | | No. of 2-cell stage eggs examined | Early veliger | | Hatching | |
|--------------|-----|------|--------------------------------------|---------------|-------|----------|-------|
| KCl (g/l) | pH | mOsm | | No. | days | No. | days |
| 1.00 | 7.9 | 98 | 10 | 0 | | 0 | |
| 0.80 | 8.1 | 100 | 10 | 3 | 11 | 0 | |
| 0.60 | 8.1 | 101 | 10 | 5 | 9-10 | 0 | |
| 0.50 | 8.1 | 102 | 10 | 8 | 9-10 | 6 | 19-21 |
| 0.40 | 8.1 | 103 | 10 | 8 | 7-9 | 7 | 19-21 |
| 0.30 | 8.1 | 103 | 10 | 9 | 7-9 | 8 | 17-21 |
| 0.20 | 8.2 | 104 | 10 | 8 | 8 | 8 | 16-21 |
| 0.10 | 8.1 | 105 | 10 | 8 | 6-7 | 8 | 15-20 |
| 0.05 | 8.1 | 105 | 10 | 10 | 6-7 | 10 | 15-17 |
| 0.04 | 8.1 | 105 | 10 | 8 | 7-8 | 7 | 16-18 |
| 0.03 | 8.1 | 105 | 10 | 9 | 6-7 | 8 | 17-18 |
| 0.02 | 8.1 | 104 | 10 | 7 | 6-7 | 6 | 17-19 |
| 0.01 | 8.1 | 104 | 10 | 7 | 6-8 | 7 | 19-21 |
| 0.005 | 8.1 | 104 | 10 | 6 | 7-10 | 5 | 18-21 |
| 0 | 8.2 | 104 | 10 | 0 | | 0 | |

1.95-2.90g NaCl, 0.13g CaCl₂ · 2H₂O, 0.05g MgSO₄ · 7H₂O, 0.20g NaHCO₃ per liter

g/l あるいは CaCl_2 を欠くと被面子前期にも発育しない. (Table 6).

8. MgSO_4 濃度の影響

同様に標準液の塩類組成の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の量を 0~1.60g/l の範囲内で変動させ実験を行った. いずれの量に於いても, 胚子の大部分に孵化を認めたが 0.15 g/l 以上, 0.03g/l 以下では孵化に至るまでの培養日数が増し, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の量が 0.05~0.11g/l の範囲にある溶液で胚子は順調に発育し, 大部分が 6~7

日に被面子前期に16日までに孵化した. MgSO_4 は胚子の発育にその適当量が促進的に働くことがわかる. (Table 7).

9. NaHCO_3 濃度の影響

同様に標準液の塩類組成の NaHCO_3 の量が 0.16~0.40g/l の範囲による溶液で順調な胚子の発育・孵化がみられ, 胚子は 7 日前後に被面子前期に発育し, 大部分が 16 日までに孵化した. 0.80g/l 以上, 0.14g/l 以下の NaHCO_3 の量になるとその発育・孵化に悪影響

Table 6. Growth response of naked *O. nosophora* eggs to CaCl_2

| Solution | | | No. of 2-cell stage eggs examined | Early veliger | | Hatching | |
|--|-----|------|--------------------------------------|---------------|-------|----------|-------|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g/l) | pH | mOsm | | No. | days | No. | days |
| 2.00 | 7.5 | 83 | 10 | 0 | | 0 | |
| 1.50 | 7.6 | 90 | 10 | 4 | 8-11 | 0 | |
| 1.00 | 7.8 | 95 | 10 | 9 | 7-10 | 9 | 17-18 |
| 0.60 | 8.1 | 99 | 10 | 9 | 7-10 | 9 | 17-19 |
| 0.50 | 8.1 | 101 | 10 | 7 | 6-7 | 6 | 16-18 |
| 0.40 | 8.1 | 102 | 10 | 7 | 7-8 | 7 | 16-20 |
| 0.30 | 8.1 | 103 | 10 | 9 | 6-8 | 9 | 16-20 |
| 0.20 | 8.1 | 104 | 10 | 8 | 6-7 | 8 | 15-18 |
| 0.13 | 8.1 | 105 | 10 | 10 | 6-7 | 10 | 15-17 |
| 0.11 | 8.0 | 105 | 10 | 10 | 7-8 | 9 | 15-20 |
| 0.09 | 8.0 | 104 | 10 | 10 | 7-8 | 8 | 15-22 |
| 0.07 | 8.0 | 103 | 10 | 9 | 7-8 | 7 | 24-25 |
| 0.05 | 8.0 | 103 | 10 | 9 | 7-10 | 0 | |
| 0.03 | 8.0 | 102 | 10 | 7 | 10-15 | 0 | |
| 0.01 | 8.0 | 101 | 10 | 0 | | 0 | |

1.03-2.90g NaCl, 0.05g KCl, 0.05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.20g NaHCO_3 per liter

Table 7. Growth response of naked *O. nosophora* eggs to MgSO_4

| Solution | | | No. of 2-cell stage eggs examined | Early veliger | | Hatching | |
|--|-----|------|--------------------------------------|---------------|------|----------|-------|
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l) | pH | mOsm | | No. | days | No. | days |
| 1.60 | 8.1 | 62 | 10 | 10 | 7-8 | 10 | 21-23 |
| 0.80 | 8.1 | 83 | 10 | 10 | 7-8 | 9 | 19-23 |
| 0.40 | 8.1 | 93 | 10 | 9 | 6-9 | 9 | 18-21 |
| 0.20 | 8.1 | 100 | 10 | 8 | 6-8 | 8 | 18-20 |
| 0.15 | 8.1 | 106 | 10 | 9 | 6-8 | 8 | 18-20 |
| 0.11 | 8.1 | 106 | 10 | 10 | 6-7 | 10 | 16-19 |
| 0.07 | 8.1 | 105 | 10 | 9 | 6-7 | 8 | 15-19 |
| 0.05 | 8.1 | 105 | 10 | 10 | 6-7 | 10 | 15-17 |
| 0.03 | 8.2 | 105 | 10 | 10 | 6-7 | 9 | 17-20 |
| 0.01 | 8.1 | 105 | 10 | 10 | 6-7 | 9 | 18-22 |
| 0 | 8.2 | 105 | 10 | 10 | 7-9 | 10 | 20-24 |

1.30g-2.9g NaCl, 0.05g KCl, 0.15g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.20g NaHCO_3 per liter

がみられ、濃度の高い0.80g/lのものでは胚子4個が発育の遅れをみながら被面子前期に発育したが、その後死滅していった。1.50g/lでは担輪子期まで発育するのみとめられたにすぎず、3.00g/lでは全く発育がみられない。一方、濃度を低く0.14g, 0.10g, 0.06g, 0.04g, 0.01g/lに変化させた溶液では夫々大部分が順調に被面子前期に発育するがNaHCO₃の濃度が低くなるに従い、孵化に至る胚子の数が減って孵化が大巾に遅れてくる。NaHCO₃を全く欠くと僅かに胚子1個が15日に被面子前期に発育できたに過ぎなかった。尚、ここではpHは5.9を示し、低いpHの影響も受けていると思われる。(Table 8)。

10. その他の影響

1) 標準液の2倍、3倍に希釈した溶液中で、卵子夫々10個の発育、孵化を観察すると、2倍希釈のものでは発育が遅れて、胚子4個が8~11日に被面子前期に発育し、その全てが20日前後に孵化できたが、3倍希釈のものでは発育初期で死滅した。塩類の濃度比が適当と思われても夫々の塩類濃度の必要量を満たさなくなると発育、孵化に障害的に働くものと思われる。

2) 標準液に0.04~0.32g/lの範囲内でNaH₂PO₄を追加して卵子夫々10個の発育・孵化を観察しても何ら影響は認められなかった。

3) 一定量(0.6ml)の標準液を容れたChamberで卵子5個、10個、(Control), 30個、50個を培養、その発育、孵化を観察するといずれでも胚子は順調、7日前後に被面子前期に発育出来たがその後孵化がみ

られる時期が5個及び10個を培養したもので16日前後であるのに対し、30個、50個のものでは夫々16~19日、18~25日に遅れて孵化するのがみられた。卵子数を多くすると発育課程の後半から発育が抑制される。更に同じChamberを用い、それに容れる培養液の量を変え0.6ml (Control), 0.45ml, 0.3ml, 0.15mlの夫々で卵子10個を培養、胚子の発育・孵化を観察すると、0.45ml, 0.6mlのものでは順調な発育・孵化を示す。0.3ml, 0.15mlの液量では被面子前期までの発育に遅れはみられなかったが、孵化がみられるのが夫々、16~19日、18~25日と延長していくことが分り、同じような発育抑制が認められた。

考 察

宮入貝卵子の発生学的観察では、僅かに杉浦(1933)が卵子の発育過程を断片的にみたものがあるが、同一卵子を分割からその発育を追って孵化まで詳しくみたものはない。それは宮入貝卵子が土壌に由来した泥皮で被われ、中の胚子が透見できないことによる。又、実際に宮入貝の産卵行動の大部分が泥皮形成にあてられる事実は確認されているが、泥皮の役割については殆んど報告されていない。

ここに産卵直後の宮入貝卵子を用い、それを被っている泥皮を人工的に取り去り、裸の卵子を種々の条件で培養を試みると、単なる蒸留水やNaCl溶液では殆んど発育がみられず、井戸水、川水、水道水でも同

Table 8. Influence of NaHCO₃ concentrations on growth of naked *O. nosophora* eggs

| Solution | | | No. of 2-cell stage eggs examined | Early veliger | | Hatching | |
|-----------------------------|-----|------|--------------------------------------|---------------|-------|----------|-------|
| NaHCO ₃ (g/l) | pH | mOsm | | No. | days | No. | days |
| 3.00 | 8.3 | 75 | 10 | 0 | | 0 | |
| 1.50 | 8.3 | 75 | 10 | 0 | | 0 | |
| 0.80 | 8.3 | 100 | 10 | 4 | 8-11 | 0 | |
| 0.40 | 8.2 | 102 | 10 | 8 | 7-8 | 8 | 15-22 |
| 0.30 | 8.2 | 104 | 10 | 10 | 7-8 | 10 | 15-22 |
| 0.20 | 8.1 | 105 | 10 | 10 | 6-7 | 10 | 15-17 |
| 0.16 | 8.1 | 104 | 10 | 9 | 6-7 | 9 | 16-20 |
| 0.14 | 8.0 | 102 | 10 | 8 | 6-7 | 8 | 20-26 |
| 0.10 | 8.0 | 101 | 10 | 10 | 6-7 | 9 | 20-28 |
| 0.06 | 7.8 | 99 | 10 | 10 | 6-7 | 6 | 23-35 |
| 0.04 | 7.4 | 96 | 10 | 10 | 6-7 | 7 | 23-27 |
| 0.01 | 7.1 | 95 | 10 | 8 | 6-8 | 7 | 27-30 |
| 0 | 5.9 | 94 | 10 | 1 | 15 | 0 | |

0.20-0.90g NaCl, 0.05g KCl, 0.13g CaCl₂·2H₂O, 0.05g MgSO₄·7H₂O per liter

様に発育できなかつた。王ら(1956)が *O. hupensis* の卵子を用いてその泥皮を取り去った時の卵子の孵化率が12%に低下すると報告しているが、著者らの実験ではなかの胚子が被面期中期以降まで既に発育している卵子になると泥皮を取り去って蒸留水で培養しても孵化を行なうことができることから王らの用いた卵子には、相当発育の進んだものも混じっていたと考えられる。

種々の塩類溶液で裸の卵子の培養法に検討を重ねて行き、逐に、NaCl 2.9g, KCl 0.05g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.13g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05g, NaHCO_3 0.20g/lの組成を有する溶液(標準液)に於いてなかの胚子は完全に自然な発育、孵化を行なうことを見出し、詳しく発生の観察ができるようになった。

そこで、このような発育に好適な標準液を基に、溶液のpH、浸透圧、塩類構成とその濃度を変え、そこで胚子の発育・孵化をみて、その影響を追求した。先ず、pHについては胚子の発育・孵化の為に至適pHは7.1~8.3にあり、安羅岡(1961)が *O. nosophora* の成貝を用いてその開ヘタ反応でpH4.0~9.2に宮入貝の適応範囲があるとしているが、胚子は成貝に比べてその範囲が狭く、pHの影響を受けやすいと思われる。

次に、標準液に含まれる5種類のうち、NaClの濃度の影響をみると3.1g/l(浸透圧が111 mOsm)以下のNaClの量では、たとえNaClを欠いても他の4種の塩類が存在すると胚子は順調に発育・孵化する結果になったが、Naイオンそのものの供給は NaHCO_3 によって与えられることもあって、Naイオンの必要性を否定することではない。しかし、NaClの濃度を下げることによって胚子はその低張性の為に膨化し、もし泥皮を取り去る作業課程で、その卵膜に損傷があると、その損傷部に膨隆が生じ、時に胚子が溶液中に飛び出ることがあり、適当な浸透圧を保つことが必要である。3.3g/l(116 mOsm)以上のNaClの量になると胚子の発育に悪い影響がみられ、高張液での胚子の発育は障害的である。3.9g/l(135 mOsm)以上の高張液になると胚子は全く発育できない。

宮入貝の血液の浸透圧に関しては報告がないが、陸産貝類では Duval (1930), Arvanitaki and Cardot (1932), Drilhon and Florence (1942), Martin *et al.* (1958) が74~132 mOsmを報告し、淡水産貝類では、Picken (1937), Obuchowicz (1958), Neuman (1960), Todd (1962), Little (1965) が43~72 mOsmの範囲内で報告している。宮入貝の生態を野外及び実

験室内で観察すると稚貝においてむしろ水性を示し、成貝では陸性となり、その産卵行動は湿った土壌上で行なわれ、水陸両性の性格をもつ。本実験に於いて、なかの胚子が安定して好適な発育を行なう塩類溶液(標準液)での浸透圧105 mOsmは上記の陸産貝類の浸透圧の範囲内にあり、宮入貝及び胚子の生態と一致する。又、胚子の発育が全くみられない塩類溶液の135 mOsmの浸透圧は陸産貝類の範囲も越えていることがわかる。

次に、KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 について胚子の発育・孵化に好適な量的範囲は夫々0.04~0.20g, 0.11~0.50g, 0.05~0.11g, 0.16~0.40g/lにあり、その範囲を脱すると胚子の発育に障害的である。これをイオン濃度についてみると K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- の夫々は0.5~2.1, 2.0~9.0, 0.4~1.2, 1.9~4.8 mEqと表わされる範囲内で必須となる。

本実験と類似した貝類胚子の培養については *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria sudanica* 両種の卵塊より胚子周囲のゼリー様物質を取り除いた裸の胚子を用い、Beadle (1968) が塩類の組成が KHCO_3 , CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3 の夫々が0.10, 0.30, 0.25, 0.56 mEqの standard lake waterのなかで、又、Taylor (1973) が同じ二種胚子を KHCO_3 , CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3 の夫々が0.10, 0.85, 0.50, 0.50 mEqの standard mediumのなかでその胚子を発育させると同時に卵内溶液との夫々のイオン濃度の比較等を行なっている。本実験の好適イオン濃度域と比較すると standard mediumのMgの濃度のみに一致をみただけで、両者の溶液のいずれの電解質の濃度も本実験のものより濃度が低く、1/3以下になっている。本実験の標準液の3倍希釈液では胚子は発育初期で死滅することから、両者の溶液を宮入貝の裸の胚子の培養に用いることはできない。一方、いずれもNaClを欠いても Na^+ を NaHCO_3 の形で低濃度を与えれば発育・孵化させることができることは本実験でもNaClを欠くと低張性で不安定であっても胚子の発育・孵化が順調にみられたことと一致する。しかし、両者の報告とも胚子の発育に及ぼす塩類濃度の影響を詳しくみてなく、又、本実験に用いられた宮入貝は前鰓亜綱中復足目に属する一方、両者の用いた *Lymnaea*, *Biomphalaria* は有肺亜綱基眼目に属し、分類学上相当離れており詳しく比較できない。

宮入貝を用いて塩類溶液の影響をみたものでは Davis (1963) が台湾産の *O. formosana* での貝殻修

復に関する研究があり, Carriker's Lynmaeid Ringer's Solution (Carriker, 1946) を飼育液として良好な修復成績を得ている. その溶液は NaCl 2.0g, KH_2PO_4 0.1g, CaCl_2 0.3g, MgCl_2 0.3g, NaHCO_3 2.0g/l の組成よりできている. 更に Yasuraoka (1961) は宮入貝を各種塩類溶液で飼育し, M/8 NaCl, M/8 KCl, M/10 CaCl_2 , M/10 MgCl_2 (100:2.1:3.4:15.9) の溶液で最も活動的であると示し, KCl, CaCl, MgCl_2 のいずれか一つを欠くと開ヘタ反応, 生存率に悪影響があると報告している. 以上のことは本来自然の流水中には微量ながら種々の電解質が含まれており, 前者のようにその主な電解質の濃度を適当なバランスのもとに高められた飼育液では宮入貝の電解質代謝はより盛んになることを示し, 後者ではそのバランスを失なった飼育液では宮入貝の活動, 生存にむしろ悪影響を及ぼすことを示している. 今回の著者らの実験は, 宮入貝卵子の培養を目的に電解質の必要量の範囲を追求したもので, 夫々の濃度範囲内ではそのバランスが適当であると云える.

以上のように宮入貝卵子の泥皮を取り去っても適当な塩類溶液の中では発育・孵化することができ, 泥皮が単に乾燥あるいは外敵から卵子を保護することだけではなく, 生体膜として卵内溶液と地表水分との間の浸透圧及びイオンの調整, 更に呼吸に関与していると思われる.

稿を終るにあたり, 宮入貝採集の便宜をはかって戴いた山梨県衛生研究所, 久津見晴彦博士に深謝致します. 又, 当部門の三浦光政技官の協力を感謝する.

摘 要

産卵直後の宮入貝卵子を用い, その卵子を被っている泥皮を人工的に摘除した後の裸の卵子を25°Cの恒温のもとに種々の塩類溶液で培養を行ない, 次の結果を得た.

1) 卵子は蒸留水や単なる NaCl だけの溶液ではいかなる濃度でもなかの胚子は発育しない.

2) NaCl 2.9g, KCl 0.05g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.13g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, NaHCO_3 0.20g/l の夫々の量を含む溶液(標準液)の中で培養を行なうと胚子は順調に発育して, 16日前後に卵膜を破って孵化する.

3) pH 7.1~8.3 の範囲内で胚子の発育は順調である.

4) NaCl の濃度では 3.1g/l (浸透圧が 111 mOsm) 以下の量であれば, たとえ NaCl を欠いても他の成分があれば胚子は発育できる.

5) KCl, CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3 の濃度では, その量が夫々 KCl で 0.04~0.20g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ で 0.11~0.50g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ で 0.05~0.11g/l, NaHCO_3 で 0.16~0.40g/l の範囲内にある溶液に於て, 胚子の発育は良好である.

文 献

- 1) Arvanitaki, A. & Cardot, H. (1932): Sur les variations de la concentration du milieu intérieur chez les mollusques terrestres. J. Physiol. et Pathol. gén., 30, 577-592.
- 2) Beadle, L. C. (1969): Salt and water regulation in the embryos of freshwater pulmonate molluscs. 1. The embryonic environment of *Biomphalaria sudanica* and *Lymnaea stagnalis*. J. Exp. Biol., 50, 473-479.
- 3) Beadle, L. C. & Beadle, S. F. (1969): Salt and water regulation in the embryos of freshwater pulmonate molluscs. Sodium uptake during the development of *Biomphalaria sudanica*. J. Exp. Biol., 50, 481-489.
- 4) Carriker, M. R. (1946): Observations on the functioning of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis stagnalis appressa* Say. Biol. Bull., 91(1), 88-111.
- 5) Davis, G. M. (1963): Shell regeneration in *Oncomelania nosophora* (Gastropoda: Hydrobiidae). Malacologia., 2(1), 145-159.
- 6) Drilhon, A. & Florence, G. (1942): Le métabolisme purique chez les Gastéropodes. Etude d'*Helix*

- pomatia L. et d'Achatina achatina Lameere. Bull. Soc. Chim. Biol., 24, 96-103.
- 7) Duval, M. (1930) : Concentration moléculaire du sang de l'escargot. Ses facteurs, ses variations. Influence de l'état d'activité de l'animal. Ann. Physiol. Physicochim. Biol., 6, 346-364.
 - 8) 飯島利彦 (1965) : ミヤイリガイ. 107頁, 山梨県寄生虫予防会, 山梨
 - 9) Little, C. (1965) : Osmotic and ionic regulation in the prosobranch gastropod mollusc, *Viviparus viviparus* Linn. J. Exp. Biol., 43, 23-37.
 - 10) Martin, A. W., Harrison, F. M., Huston, M. J. and Stewart, D. M. (1958) : The blood volumes of some representative molluscs. J. Exptl. Biol., 35, 260-279.
 - 11) Neuman, D. (1960) : Osmotische Resistenz und Osmoregulation der Flusssdeckelschnecke *Theodoxus fluviatilis* L.. Biol. Zentr., 79, 585-605.
 - 12) 新島迪夫 (1964) : 組織培養 (中井準之助ら編集), 14 冷血動物組織の培養, 初版 566-574頁, 朝倉書店, 東京.
 - 13) 野島尚武 (1973) : 宮入貝卵子の発育と孵化に関する研究. 熱帯医学, 15(1), 23-35.
 - 14) Obuchowicz, L. (1958) : The influence of Osmotic pressure of medium on oxygen consumption in the snail *Viviparus fasciatus* (O. F. Müll.) *Streptoneura*. Bull. Soc. Amis. Sci. Poznań., B14, 367-370.
 - 15) 王倍信, 苑学理, 刘世圻 : 釘螺生殖与発育的研究. 中華医学雑誌, 42, 420-440.
 - 16) Picken, L. E. R. (1937) : The mechanism of urin formation in invertebrates. II. The excretory mechanism in certain mollusca. J. Exptl. Biol., 14, 20-34.
 - 17) Raven, C. P. (1964) : Development. In Physiology of Mollusca, vol. 1 (ed. K. M. Wilbur and C. M. Yonge) Academic Press, New York, 165-195.
 - 18) Robertson, J. D. (1964) : Osmotic and ionic regulation. In Physiology of Mollusca, vol. 1 (ed. K. M. Wilbur and C. M. Yonge) Academic Press, New York, 283-311.
 - 19) Taylor, H. H. (1973) : The ionic properties of the capsular fluid bathing embryos of *Lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria sudanica* (Mollusca: Pulmonata). J. Exp. Biol., 59, 543-564.
 - 20) Todd, M. E. (1962) : Osmoregulatory studies on several invertebrates. Ph. D. Thesis, University of Glasgow.
 - 21) Yasuraoka, K. (1961) : The effect of hydrogen ion concentration and salinity of water on extruding response and survival of *Oncomelania nosophora*, the vector of *Schistosoma japonicum* in Japan. Jap. J. M. Sc. & Biol., 14, 61-68.