

ミヤイリガイの生理学的研究

(1) ミヤイリガイの酸素消費と飢餓のそれにおよぼす影響について

柳沢 十四男 小宮 義孝

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和37年3月23日受領)

ミヤイリガイの生理に関する知見は、この貝の化学薬剤による殺貝、および環境改変による生態学的殺滅などに寄与し、ひいてはこの貝の媒介する日本住血吸虫症の予防に貢献しうる。すでに諸外国においては *Schistosoma mansoni* の媒介貝、*Australorbis glabratus* に関してその生理学的な基礎研究が比較的多く報告されている(von Brand *et al.*, 1948, 1950; Mehlman *et al.*, 1951; Newton *et al.*, 1955; Weinbach, 1953; Weinbach *et al.* 1956). これに反し、わが国における *S. japonicum* の中間宿主である *Oncomelania nosophora* においては阿部(1958)、森ら(1958, 1959)等その報告は少ない。筆者らは 1) 貝の呼吸生理、特に O_2 摂取量と貝の大きさとの関係、2) 貝の O_2 摂取におよぼす飢餓の影響、3) TCA 系の間代謝産物の O_2 摂取におよぼす影響などについて実験を行なったのでここに報告する。

材料と方法

実験に使用した貝は山梨県甲府盆地で採集された *Oncomelania nosophora* で、当実験室内において貝の棲息地土壌を半ば充した素焼植木鉢を脱塩素水道水を入れた大型ガラスシャーレ中に置き、米粉と水とを散布、実験に使用するまでに少くとも3日またはそれ以上飼育したものである。

緒言で述べた三つの実験についてそれぞれ次のような実験方法を行なった。

1) O_2 消費量と貝の大きさとの関係：飼育中の貝を蒸溜水でよく洗い、貝殻などに附着する水分をこし紙で取り去り、その重量を 0.5 mg まで torsion balance ではかり、殻長も 0.1 mm まで計測した。 O_2 消費量は Warburg 検圧計を用い、容量約 18~19 ml の容器に 20~25 コの貝を入れ、 $30^\circ C$ にて測定した。用いた貝が殻長 5.0 mm 以下の場合にはその貝数を適宜増加した。

呼吸メヂウムとして 1.0 ml の蒸溜水を用いた。Warburg 容器の中央井には 20% KOH 液を 0.5 ml 入れて CO_2 の吸収をはかった。温度平衡に要した時間は約 20~30 分で、貝の O_2 消費量に応じて 10~15 分間隔で 60~90 分間、検圧計の読み値を記録した。測定中の容器振盪は毎分 100 回、振幅は 3.5 cm である。測定後容器より取り出した貝は充分水分を除去した後、下口を閉じた messpipette にあらかじめ一定量の水を容れ、これに使用貝を投入し、約 15~30 分後における水の増量を以て使用貝の体積とした。

水中における貝の O_2 消費量を測定する実験では水中溶存 O_2 の測定に Winkler 氏法を用いた。すなわち約 300 ml の容量を有する共口栓つきガラスビン中に 50~100 コ体の貝を投入し、当初の O_2 量と一定時間経過(温度 $30^\circ C$ および $20^\circ C$) 後の水中 O_2 量との差をもつて貝の O_2 消費量とした。標本は各 3 標本とし N/100 Sodium thiosulfate をもつて滴定した。

2) 飢餓の貝 O_2 消費量および RQ におよぼす影響：殻長 6.0~8.0 mm を有す飼育貝 20 コ体よりなる貝群を 4 群無作為に設定した。実験群として用いた 3 群のそれぞれの平均殻長は 6.72 ± 0.36 mm, 6.93 ± 0.29 mm, 6.81 ± 0.48 mm でこれを飢餓群と名づける。対照群すなわち飼料投与群の殻長は 6.64~6.93 mm であつた。これらの貝は全て前項で述べた飼育方法にしたがつて飼育されていたものである。実験開始後対照群は $0.5 g / 300 \sim 350 cm^2$ の米粉を 5 日間に 1 度の割で投与し、あわせて散水により水分の補給をはかった。実験群すなわち飢餓群の 3 群はそれぞれ三つの素焼鉢に棲息地の土壌を入れずかつ飼料の米粉を与えることなく、対照群に用いたと同じ大きさの容器中に置き、水分のみは充分に補給した。実験群、対照群ともに植木鉢の壁にはい上つた貝

は毎日1回散水時にこれらを集めて植木鉢の中央部に置いた。

各貝群の O₂ 消費量および RQ 値(von Brand *et al.*, 1948 の法にしたがう)は、実験の初期は3日毎に、後期には6日毎に前項の方法にしたがつて測定を行なった。

飢餓貝の O₂ 消費および RQ 値に及ぼす飼料の再投与の影響を見るために、次の如き実験を行なった。飢餓開始後34日目に、飢餓群に飼料としての米粉を対照群と同様に与えた。飼料投与後3日および7日後に再びその O₂ 消費量および RQ 値を対照群とともに測定した。この実験は1959年2月10日に始め、同年3月23日に終了したが、この実験期間中の室温は最高 25°C、最低 15°C、平均 20°C であった。

3) TCA 系の中間代謝産物の貝自家呼吸に及ぼす影響：この実験に用いた貝は、少なくとも当実験室で3日間以上前記の方法で飼育され、かつ殻長 6.5 mm 以上を有する貝である。実験を始めるにあたり、これら貝を充分水洗した後解剖顕微鏡下で注意してその貝殻を取り除いた。これら貝軟体部は氷冷した容器におさめ、実験に必要な量に達するまで保存する。このような操作は貝殻を軟体部より除くのに可成の時間(1~2時間)を要するため、この間に軟体部の自己融解を防ぎ使用軟体組織をできうるかぎり新鮮に保つためである。貝殻を取り去つた軟体部はこれに附着する余分な水分をコシ紙で除き、torsion balance でその生鮮重量をはかつた後、ハサミで軟体組織を細切する。新鮮重量約 200 mg (成貝の約 15 個体に相当)の細切組織を Warburg 容器に入れ、1.5 ml の磷酸緩衝液(pH 7.1, 6.1)および 0.05 M 各基質 1.0 ml を容器主室に添加する。発生 CO₂ は中央井にある 20% KOH 0.5 ml で吸収する。基質として用いた TCA 系代謝産物は succinate, malate, fuma-

rate, citrate, および α -ketoglutarate で、その Na 塩を使用した。これら基質溶液は fumarate, α -ketoglutarate は N/10 HCl で、他の基質溶液はそれぞれの酸で溶液 pH 7.1 および 6.1 に調製した。

O₂ 消費量は QO₂ 値 (O₂ μ l/hr/mg dry weight) で示した。貝軟体部乾燥重量は次の方法で算出した。6.0 mm 以上の殻長を有する貝 1 標本 26 コ体よりなる 5 標本をとり、貝殻除去後生鮮重量をはかり、5 標本を 110°C、1 時間乾燥した後、乾燥重量をはかつた。生鮮重量と乾燥重量の比の標本平均は 23.9 \pm 1.5% であった。また

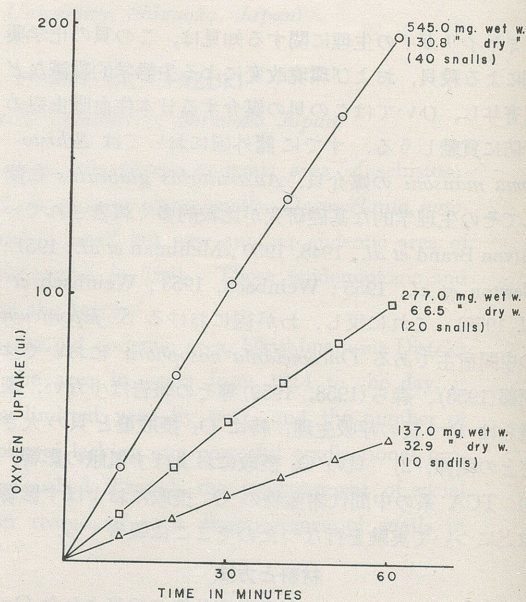


Fig. 1 Dependency of oxygen uptake upon the weight of soft tissue of *O. nosophora*

Table 1. Oxygen consumption of *Oncomelania nosophora* at 30°C

Group	Average shell length (mm)	Average body weight (mg)	No. of snail used	Oxygen uptake μ l/hr/snail	Oxygen uptake μ l/hr/mg dry w.
5 D	4.07 \pm .49	7.66 —	60	1.52	3.20
2 C	4.27 \pm .48	8.25 \pm 1.64	53	1.68	3.49
4 D	4.35 \pm .43	8.76 —	60	1.80	2.84
5 C	5.61 \pm .29	15.02 \pm 2.28	25	2.70	3.06
4 C	5.56 \pm .31	15.15 \pm 3.05	26	2.85	2.69
2 B	5.73 \pm .27	19.23 \pm 2.43	24	3.30	1.72
5 B	6.60 \pm .31	24.74 \pm 4.93	25	3.41	2.66
4 B	6.57 \pm .34	24.97 \pm 5.74	20	3.60	2.02
4 A	7.41 \pm .27	33.07 \pm 4.09	20	4.00	1.72
5 A	7.38 \pm .22	32.90 \pm 3.59	25	4.20	1.81
2 A	7.19 \pm .21	30.27 \pm 2.77	20	4.52	2.04

Respiratory medium, distilled water; Gas phase, air; Volume of vessel, 18-20 ml.

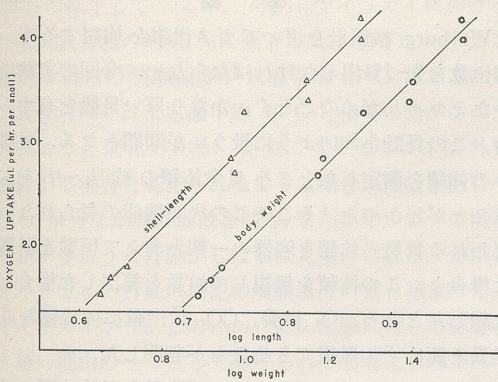


Fig. 2 Relation between size of *O. nosophora* and its oxygen uptake

貝軟体部組織重量とその O_2 消費量との関係は第1図に示したごとくで、この結果より実験に都合のよい使用量を生鮮重量で 200 mg として行なった。

結果

1) ミヤイリガイの大きさとその O_2 消費量の関係

a) Warburg 検圧計による貝の O_2 消費量

第1表は測定に用いた各貝群の平均殻長および平均体重のそれぞれを短く、且つ小さい群から順次配列し、各群の O_2 消費量を1個体当り ($O_2 \mu\text{l/hr/snail}$) および乾燥重量当り ($O_2 \mu\text{l/hr/mg dry w.}$) で表現した表である。この表により大形貝は小形貝よりより多量の O_2 を消費し、小形貝(幼若貝)ほど単位組織量の O_2 消費が高いことをうかがうことができる。ここで個体当りの O_2 消費量を、平均殻長および平均体重の対数に対してプロットすると第2図のようになり、これら二者の間には直線関係が認められた。

b) Winkler 氏法による貝の水中 O_2 消費量

平均殻長 $7.38 \pm 0.37 \text{ mm}$ を有する 50 コ体よりなる貝群を用い、 30°C および 20°C において水中の O_2 消費量を測定した。水温 30° および 20°C における O_2 消費量はそれぞれ $4.35 \mu\text{l/hr/snail}$ および $2.79 \mu\text{l/hr/snail}$ であった。さらに測定後この貝を乾燥状態で室温に放置し前記実験(1958年6月13日)後5日(同月18日)および11日(同月24日)目に前回と同様それぞれ 30°C , 20°C において O_2 の消費量を測定した。5日後にそれぞれ $3.52 \mu\text{l/hr/snail}$ 30°C , $1.61 \mu\text{l/hr/snail}$ 20°C , 11日後にはそれぞれ $2.37 \mu\text{l/hr/snail}$ 30°C , $1.53 \mu\text{l/hr/snail}$ 20°C の値をえた。 30°C および 20°C の O_2 消費は、かかる保存状態でそれぞれ低下するとはいえ、

常に 30°C の消費量は 20°C のそれよりも高く、この間の Q_{10} は約 2.1~1.5 を示した。またこの結果を Warburg 検圧計で測定した場合 (30°C) と比較すると、同一程度の大きさを有する貝は水中に置かれた場合でもまた水膜に貝体が覆われたような状態(Warburg O_2 測定時)でも、その O_2 消費量に大差はないことが判明した。

2) 飢餓および飼料の再投与が貝の O_2 消費量および RQ 値に及ぼす影響について

第3図は横軸に実験開始後の日数すなわち飢餓日数を縦軸に各貝群の O_2 消費量 (O_2/snail) を当初の値を 100% としてその後の変化をプロットし、更に右側の縦軸に RQ 値を示した。飢餓期間の 34 日間において飢餓貝群の O_2 消費量および RQ 値は飢餓の進行に伴ってその値は漸次減少し、34 日目には O_2 消費において実験当初の約 70%, RQ 値は当初の 0.83 から 0.67 までに減少した。これに対し対照の貝群(飼料投与貝群)においては両数値に多少の変動は認められるが、第3図の破線に近く一定値を示して散在し大きな変動は見られなかった。飢餓 34 日目の貝群に再び飼料を投与した所、投与 3 日間後には O_2 消費および RQ の両値とも対照群にまさる値を示し、更にその 4 日後の両測定値も対照群の示した両値まで完全に回復していた。

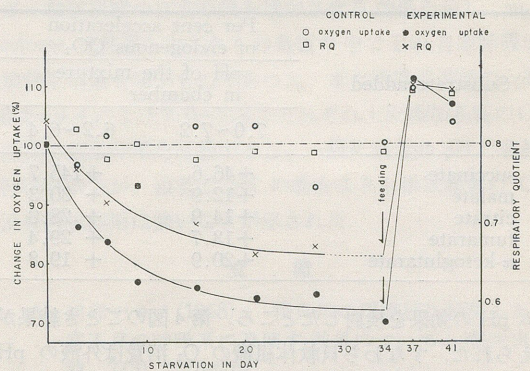


Fig. 3 Effect of starvation on oxygen uptake and respiratory quotient of *O. nosophora*

3) TCA 系中間代謝産物の貝軟体部細切標本の自家呼吸に及ぼす影響

citrate, fumarate, succinate, malate ら TCA 系の中間代謝産物の貝類体組織 O_2 消費に及ぼす影響を検した所、30~70% の O_2 消費の増加効果が見られたが、これらの実験前後における混合反応系 pH に多少の変化が観察された。そこで軟体組織 O_2 消費におよぼすメチウ

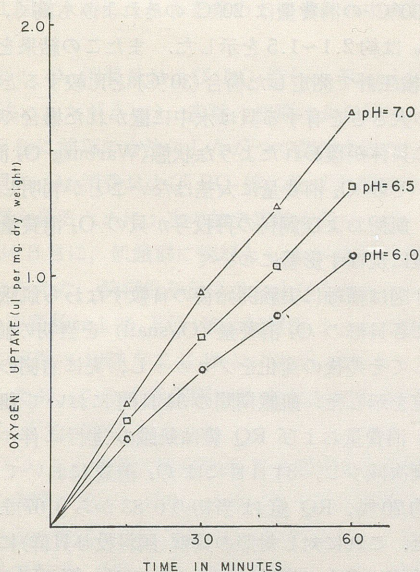


Fig. 4 Effect of pH of experimental fluid on endogenous oxygen uptake of minced soft tissue of *O. nosophora*

Table 2. Effect of tricarboxylic acid substrates upon the endogenous O_2 uptake of minced soft tissue

Substrate added	Per cent acceleration of endogenous QO_2	
	pH of the mixture in chamber	
	7.0~7.2	6.2~6.4
succinate	+46.6	+145.7
malate	+12.9	+ 30.3
citrate	+14.9	+ 28.0
fumarate	+13.7	+ 29.4
α -ketoglutarate	+20.9	+ 19.8

ム pH の効果を検討したところ、第 4 図のごとき結果がえられた。すなわち貝軟体組織の O_2 消費は外液の pH の変動に比較的敏感に反応して O_2 消費量が増減することが示された。そこで実験中の貝組織を含む反応液の pH の変化をできるだけ小さくするために、添加基質溶液の pH の補正と用うる緩衝液の量を増加（方法の項参照）することによって以後の実験を進めた。結果は第 2 表に示すごとく、メヂウム pH 7.0~7.2 で succinate の添加は他の何れの基質の添加の場合よりも貝の O_2 消費を大幅に増加させる。メヂウム pH 6.2~6.4 の場合は、pH 7.0~7.2 の場合より α -ketoglutarate を除いて、 O_2 消費量の増加率は大きであった。

考 察

Warburg 検圧計を用いてガス代謝を検討する時、容器恒数を先づ算出しなければならない。今回の実験に用いたミヤイリガイのごとく、かなり厚い貝殻を有する場合、この貝殻を如何ように扱うかが問題となる。貝殻のみの体積を測定したところ貝全体積の約 $1/3 \sim 1/4$ を占めることがわかった。そこでこの代謝機能の見られないと思われる貝殻の体積を容器の一部と考えて恒数を計算した場合と、この体積を無視して恒数を算出した場合とで比較したところ、 O_2 消費、 CO_2 放出量に何等認むべき差異を認めず、無視できることが判明した。

第 1 表に示されたように O_2 消費量を単位時間の単位乾燥重量で表現すると、小形すなわち幼若貝ほど O_2 摂取量が大きいという傾向が大体推定される。しかしかかる関係にも多少のくい違いが時に見受けられる。かかるくい違いは貝軟体部よりの貝殻除去の操作の不完全に主に帰因するものであらうと考えられる。いづれにしても幼若貝の組織が老熟貝の組織よりも代謝機能が高いという生物に一般に見られる現象が、ここでも観察された。

斧足類および腹足類の O_2 消費に関してはその消費量と体表面積または体重との関係について多少の議論がなされている。Weinland (1918) は淡水産二枚貝である *Anodonta* についてその O_2 消費量と体表面積とに正の相関があることを認め、一方 Liebsch (1928) はこれに対して Weinland の説を否定し、陸産の巻貝では O_2 消費と貝体重とに相関があるとしている。更に最近 von Brand *et al.* (1948) は *Schistosoma mansoni* の中間宿主である淡水産ヒラマキガイ *Australorbis glabratus* についてその O_2 消費を検討し、貝の O_2 消費量は体表面積の法則 ($W^{2/3}$) にしたがうことを報告している。著者は今回えられた結果を体表面積の法則に当てはめて見たが、殆んどこの法則に適合せず、直線関係はえられなかった。二枚貝巻貝などにおける O_2 消費量と体重量とのかかる関係はそれぞれの実験に用いた貝が異種であり、すなわちあるいは Pelecypoda に、あるいは Gastropoda に属して分類学的にも相当隔つたものであることにも一つの原因があると考えられる。

ミヤイリガイの O_2 消費に対する飢餓の影響を von Brand *et al.* (1948) の *A. glabratus* で観察したそれと比較して見ると、飢餓の影響は *A. glabratus* のそれに対する方がより大きく思われる。すなわち、*A. glabratus* においては飢餓開始後 20~24 日後に実験当初

の20%に低下しているが、今回ミヤイリガイにおけるそれは実験当初の約75%に低下したに過ぎない。かかる相異は彼らの実験温度が水温平均27°Cであるに対し、著者らのそれは室温平均20°Cと相当の差があったことによると考えられる。が更にミヤイリガイは外界の条件が不都合と考えられるような場合には殻を閉じて静止し、余分な水分の放散を防ぎ、またエネルギーの消費を防止するような行動がしばしば見受けられる。かかるミヤイリガイの行動は前記の実験温度の差と相まつて、ミヤイリガイが *A. glabratus* より飢餓に対して影響を蒙り難い理由の一つとしてあげられると考えられる。

呼吸商 RQ は von Brand *et al.* (1948)の法によつて測定したものであるが初めに期待したほど大きい値(1.0に近い値)はえられなかつた。一般に Warburg 容器室内中の液の pH が 5.0 以上の時はこの液中には保有される CO₂ gas の補正が必要である。今回は室内中の液は蒸留水であつたため、大体中性附近の pH 値であつた。したがつて液中への CO₂ 保有の補正が必要であつたが、これを行なつていないので真の RQ 値は今回えられた RQ 値よりも少なくともより大きい値であろうと想像される。

TCA 系の中間代謝産物の添加によるミヤイリガイ細切標本の O₂ 消費の増加率は反応メヂウムの pH が酸性を示した時の方がアルカリ性側のときよりも高い値を示した。Weinbach (1953) も *A. glabratus* を用いて今回と同じような実験を行なつているが、medium pH と O₂ 消費との関係が著者らと同様の結果をえている。反応メヂウムの酸性側でより強い O₂ 消費増加率を示す現象について、アルカリ性溶液中では基質がイオン化していないためであろうとしているが、この問題に関しては基質の細胞内への透過性ということとも関連し、今後の研究にまちたい。TCA 系の中間代謝産物の添加が貝組織の O₂ 消費を増加させるという今回の実験結果のみによつて、この代謝系がミヤイリガイにおいて機能を営みつつ存在すると結論することは早急であつて、他の中間代謝産物の O₂ 消費に対する効果、malonate の malate 酸化阻止効果などの他の特異的阻害剤の作用などを検討した後に初めて明瞭な結論がえられるものと考えられる。

結 論

1) Warburg 検圧計を用いミヤイリガイの大きさとその O₂ 消費量の関係を 30°C において測定観察したところ、O₂ 消費量を O₂ μl/hr/mg 乾燥重量で表現する

と、成熟貝より若い(小さい)貝の方が O₂ 消費量は大きく、代謝機能もより若い貝においてより高いことが示された。また O₂ 消費量を貝 1 個体当たり (O₂ μl/hr/snail) で示現すると平均殻長、平均体重の対数値とおおむね直線関係を有することが示された。

2) 貝の水中における O₂ 消費量を Winkler 氏法により測定し、同温度の Warburg 測定値と近い値がえられた。

3) 実験室内(平均室温 20°C 最高 25°C 最低 15°C)でミヤイリガイの自家呼吸ならびに RQ に及ぼす飢餓および飼料米粉再投与の影響を検討した。飢餓開始後時間の経過に伴つて O₂ 消費量および RQ 値は漸次低下し飢餓 34 日目にはその O₂ 消費は実験開始時の 70% に、RQ 値は当初の 0.83 から 0.67 に減少した。対照群(飼料投与群)の両値は実験期間を通じて多少の動ようは認められたがおおむね一定値を示した。

実験群である飢餓貝に実験開始後 34 日目に対照群と同様に再び飼料を投与した。投与 3 日後には飢餓時に減少した O₂ 消費量および RQ 値は対照群と殆んど同様の値を示し、完全に回復していた。

3) succinate, malate, fumarate, citrate, および α-ketoglutarate の TCA 系中の中間代謝産物はミヤイリガイ軟体組織の自家呼吸を増加させる効果を示し、succinate は使用したこれらの基質の中でその自家呼吸増加効果が最も強いものであつた。また組織浮游液の pH 6.2~6.4 および 7.0~7.2 でそれぞれ上記添加基質の O₂ 消費の増加作用を比較すると、一般に前者の pH の組織浮游液の方が、後者の pH の場合よりも添加基質の O₂ 消費増加作用は強いことが示された。

文 献

- 1) 阿部チヨノ(1958): 殺貝剤の四季別に採集した宮入貝の呼吸系に及ぼす効果について。寄生虫誌, 7(3), 278-279.
- 2) von Brand, T., Nolan, M. O. & Mann, E. G. (1948): Observations on the respiration of *Australorbis glabratus* and some other aquatic snails. Biol. Bull., 95(2), 199-213.
- 3) von Brand, T., Baernstein, H. D. & Mehlman, B. (1950): Studies on the anaerobic metabolism and the aerobic carbohydrate consumption of some fresh water snails. Biol. Bull., 68(3), 266-276, 1950.
- 4) Mehlman, B. & von Brand, T. (1951): Further studies on the anaerobic metabolism of some fresh water snails. Biol. Bull., 100(2),

199-205.

- 5) 森和雄・杉浦健一・塚田恵一・岡本謙一(1958) : 宮入貝の消化酵素に関する研究. 寄生虫誌, 7 (3), 279.
- 6) Mori, K., Sugiura, K., Nakagome, T., Okamoto, K. & Sugiura, S. (1959): Studies on the digestive enzymes of *Oncomelania nosophora* and some other aquatic snails. Showa Medical J., 9(3), 240-244.
- 7) Newton, W. L. & von Brand, T. (1955): Comparative physiological studies on two geographical strains of *Australorbis glabratus*. Exptl. Parasitol., 4(3), 244-255.
- 8) Weinbach, E. G. (1953): Studies on the intermediary metabolism of the aquatic snail, *Australorbis glabratus*. Arch. Biochem. Biophys., 42(2), 231-244.
- 9) Weinbach, E. G. & Nolan, M. O. (1956): The effect of pentachlorophenol on the metabolism of the snail, *Australorbis glabratus*. Exptl. Parasitol., 5(3), 276-284.

PHYSIOLOGICAL STUDIES ON ONCOMELANIA NOSOPHORA,
THE VECTOR SNAIL OF SCHISTOSOMA JAPONICUM
I. ON THE OXYGEN UPTAKE AND EFFECT OF
STARVATION UPON IT

TOSHIO YANAGISAWA & YOSHITAKA KOMIYA

(Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo)

From the theoretical standpoint studies on physiology of the vector snail harbouring juveniles of trematodes may yield some clues to the development of its chemical and ecological control. Our present knowledge about the respiratory metabolism of *Oncomelania nosophora*, the snail intermediate host of *Schistosoma japonicum*, is so scanty to outline its respiratory pattern. To lay a foundation towards such an approach, some respiratory aspects, oxygen consumption in air and water, effect of starvation on oxygen uptake and the effect of tricarboxylic acids upon the endogenous respiration of *O. nosophora* were studied. The results obtained were as follows:

1) The relation between oxygen uptake and the size of *Oncomelania nosophora* was detected by the use of Warburg manometric technique. The oxygen consumption expressed in O_2 $\mu\text{l/hr/mg}$ in dry weight at 30°C is higher in the younger snails than those in the older ones.

The respiratory rate shown in O_2 $\mu\text{l/hr/snail}$ which paralleled roughly with the shell-length and body-weight of snails used revealed the positive correlation with logarithm of the length and weight.

2) The amount of oxygen consumed by snails in water, being determined with Winkler's method, is almost same as those by Warburg method at the same temperature.

3) The effect of starvation on the endogenous respiration and RQ of adult snails is studied under the laboratory condition at an average room temperature of about 20°C (maximum, 25° and minimum, 15°C). Gradual decreases in oxygen uptake and RQ are seen over the whole period of 34-day starvation. At the end of 34-day starvation respiratory rate and RQ decrease to around 70% of the initial rate and to 0.67 from the initial value of 0.83, respectively.

4) The effects of some intermediate metabolic products, succinate, malate, fumarate, citrate and α -ketoglutarate upon the endogenous respiration of snails are detected. The addition of these substrates to the minced snail tissue suspension shows the following percents acceleration of the endogenous oxygen uptake: 46.6%, 12.9%, 14.9%, 13.7% and 20.9% in the cases of succinate, malate, citrate, fumarate, and α -ketoglutarate at 7.0-7.2 of medium pH and 145.7%, 30.3%, 28.0%, 29.4% and 19.8% at 6.2-6.4, respectively.