

ミヤイリガイの生理学的研究

(2) 飢餓の貝軟体組織グリコーゲン量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 5 月 1 日受領)

著者らは第 1 報(柳沢・小宮, 1962)において日本住血吸虫の中間宿主であるミヤイリガイの呼吸代謝, 特にその酸素消費量および飢餓のそれにおよぼす影響について報告した。すなわち実験室内で貝を飢餓状態におくと, 貝の O_2 消費量は減少し, これらの飢餓貝に再び飼料の米粉を投与すると, 飢餓により減少した O_2 消費量が比較的短時間に回復するという現象が観察された。しかしこのような現象が如何なる機構によつておこるかという, 飢餓よりの回復機構については何も説明を行っていない。今回は前第 1 報に続き飢餓におかれた貝の軟体組織中の多糖類の量的変化を追究し, 前回の飢餓による O_2 消費の変化の説明を試みたのでここに報告する。

材料と方法

この実験に用いた貝は山梨県甲府盆地で採集したミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* である。採集した貝はその殻長により小形(殻長 6.5~7.0 mm), 中形(7.1~7.5 mm), 大形(7.6~8.0 mm)の三群に分け, 実験に使用する前, 少くとも 4 日間は前報(柳沢・小宮, 1962)と同様に実験室内で米粉により飼育したものである。実験の開始にさき立ち, これら三群の貝をそれぞれ半数に分ち, 各群の三つの半数を以てそれぞれ実験群(飢餓群)と対照群(飼料投与群)を設けた。対照群は棲息地土壌をもつた素焼植木鉢(口経約 25 cm)中におき, 鉢は更に脱塩素水道水を入れたガラス容器内に置き, 土壌への水分の補給をはかった。米粉 0.5 g/300~350 cm^2 を 7 日毎に植木鉢土壌に散布し, 更に毎日脱塩素水道水をスプレにより散水した。散水にさいし, 飼育容器の壁に這いつた貝はこれを容器中央部にもどす。実験群は植木鉢に土壌を容れずかつ飼料を与へず水分の補給のみを行い, 他の操作は対照群のそれと全く同様に行った。

飢餓貝への飼料の再投与は次のように行つた。実験開始後 21 日目に 1 標本につき 3 種の異つた殻長を有する

3 個の貝よりなる 12 標本を無作意に実験群よりとり出し, その半数 6 標本は少量の水分を散布し, 内側底面に米粉を塗布した小型シャーレ中に置き, 他の 6 標本はその対照として, 同型のシャーレに水のみを散布したものの中に置いた。シャーレは飼料の腐敗をできる限り自然に防ぐ意味で毎日新鮮なものと交換した。

実験室内の温度および湿度は自記温度湿度計により測定した。実験開始より終了時にいたる平均室温は 26.5°C (最高 31.5°, 最低 21.5°C), 平均湿度は 64.2% (最高 83.5%, 最低 40%) であつた。

貝組織内の glycogen の定量法は Carroll *et al.* (1956) の方法によつた。先づ貝は蒸留水で洗つた後殻長を測定, その貝殻を取り除き, 軟体組織の余分な水分をろ紙にて除き, ぜんまい秤にてその生鮮重量を測る。3 個体よりなる 1 標本をそのまま 5% 三塩化さく酸(TCA) 2.0~3.0 ml 中で Potter-Elvehjem のホモゲナイザーでつぶし, そのホモゲネイトを遠心後(除蛋白)一定量の上澄液をとる。上澄液に 5 倍量の 99.5% ethanol を加へ glycogen の沈澱をはかり沈澱物を遠心, 上澄をすてて, 一定量の蒸留水に溶解後 Anthron 示薬により比色法によつて測定した。glycogen 量は glucose γ /mg 組織生鮮重量として示し, glycogen 量への転換は行わなかつた。glycogen の抽出回数, 比色に用いた filter の波長は原記載と多少異なるがこの点に関しては考察の項で述べる。貝組織 glycogen の定量は前記 3 種の殻長を有する 3 個体よりなる標本, 3 標本について実験開始後 21 日間は 7 日間隔に定量を行い, 飼料再投与後は再投与後 4 日および 10 日目に定量した。

前記 TCA 抽出液中の ethanol により沈澱する物質を更に定性する目的で, 実験当初の定量時に使用した残余 TCA 抽出液 10 ml を用い ethanol 沈澱—上澄廃棄—蒸留水溶解の操作を 4 回繰り返して沈澱物質の純化をはかり, 最後に 1 N の硫酸にて 100°C 水浴にて 3 時間加水

第1表 飢餓および飼料投与両貝群の組織グリコーゲン量

飢餓日数	実験番号	使用貝数	使用貝総殻長	軟体部総重量	グルコース γ/mg 生鮮 重量	グルコ ース平 均重量
0	*F-1	3	22.35	34.5	71.13	70.12
	F-2	3	21.75	34.5	70.52	
	F-3	3	21.75	35.5	68.71	
	*S-1	3	21.85	35.5	73.83	72.38
	S-2	3	22.15	35.5	72.59	
	S-3	3	22.10	37.5	70.72	
7	F-1	3	21.65	34.0	67.92	70.39
	F-2	3	21.85	32.0	67.07	
	F-3	3	22.05	34.0	76.19	
	S-1	3	22.50	31.0	58.89	64.48
	S-2	3	21.95	32.0	62.91	
	S-3	3	21.65	31.0	71.63	
14	F-1	3	22.00	34.0	84.56	77.96
	F-2	3	22.55	39.0	72.35	
	F-3	3	22.15	36.5	76.95	
	S-1	3	21.65	30.0	59.21	53.93
	S-2	3	21.90	29.5	55.55	
	S-3	3	—	28.5	47.04	
21	F-1	3	21.75	34.0	69.90	69.87
	F-2	3	21.80	33.0	69.83	
	F-3	3	21.70	34.5	—	
	S-1	3	22.35	30.0	—	46.15
	S-2	3	21.65	26.0	43.53	
	S-3	3	22.10	28.0	48.77	
25	F-1	3	21.80	37.0	81.03	69.22
	F-2	3	21.90	33.5	57.41	
	S-1	3	22.05	28.5	55.09	
	S-2	3	21.85	28.0	45.40	50.25
	*Ref-S-1	3	21.50	28.5	59.73	63.78
	Ref-S-2	3	21.60	29.0	67.83	
	*Pet-S-1	3	22.25	30.0	34.50	29.60
	Pet-S-2	3	21.65	28.5	24.70	
31	F-1	3	21.60	34.0	75.77	67.11
	F-2	3	21.80	33.5	67.22	
	F-3	3	22.05	36.5	58.34	
	S-1	3	21.75	26.0	33.28	38.02
	S-2	3	21.35	26.0	43.54	
	S-3	3	21.20	27.0	37.23	
	Ref-S-1	3	21.40	28.5	62.05	26.06
	Pet-S-1	3	21.60	27.0	26.06	

* F-, S-, Ref-S, Pet-S は、飼料投与群、飢餓群、ペトリ皿飼料再投与群およびペトリ皿飢餓群を夫々示す。

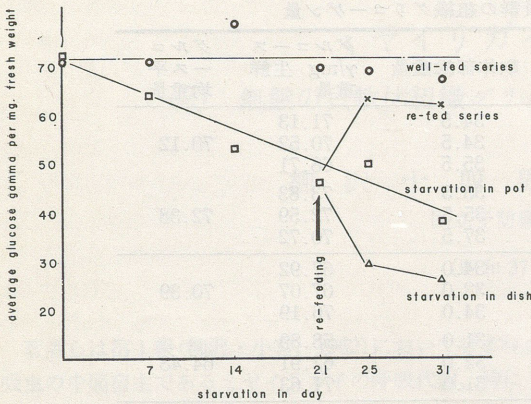
分解を施し、後炭酸バリウム未で中和後遠心し透明な上澄液を得る。この上澄液を東洋ろ紙 No. 51 にスポット butanol, pyridine, water, benzen (5 : 3 : 3 : 1) の溶媒で上昇法により3回展開し、硝酸銀により発色、対照の glucose, galactose とその Rf 値を比較した。

結果

1) 飢餓および飼料の投与が貝軟組織 glycogen 量に

およぼす影響

第1表および第1図に示すように飢餓群の貝は飢餓実験の全期間を通じて飢餓日数にともなつてその軟体部組織の glycogen 量は減少する。すなわち飢餓3週後にはその glycogen 量の減少量は当初の約37%に相当する。これに対し対照群のそれは平均70.77 γ/mg 生鮮組織重量(最高77.96, 最低67.11 γ/mg) でおおむね一定値を



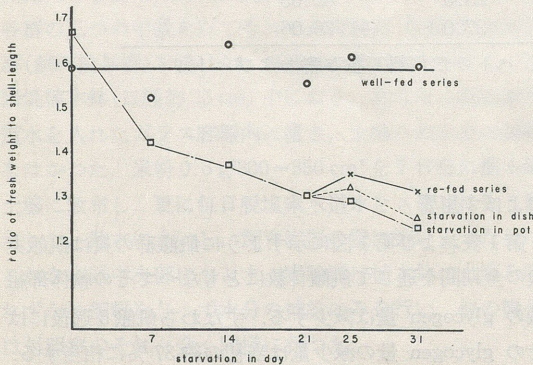
第1図 ミヤイリガイ組織グリコーゲン量に及ぼす飢餓および飼料再投与の影響

示していた。

これらの飢餓貝に対し、飢餓21日目に飼料としての米粉を前記の如く投与してその glycogen 量におよぼす影響を観察したところ投与4日後にすでに対照群の飼料投与貝組織 glycogen の約92%までに回復しており、投与10日後も約92%で対照群の glycogen 量までには完全に回復していなかった。

2) 飢餓および飼料の再投与が貝軟体部生鮮重量におよぼす影響について

飢餓および飼料の再投与と組織重量との関係を見るために、単位殻長(mm)に対する組織重量の比を求め、この比を縦軸に飢餓日数を横軸にとつて二者の関係を示したものが第2図である。図に示されるように、飢餓日数の延長にともなつて単位組織重量が減少することが実験群において示された。これに対し対照群においては単位

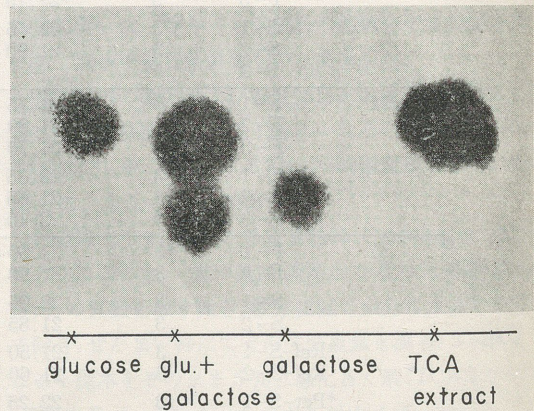


第2図 ミヤイリガイ軟体組織生鮮重量と飢餓及び飼料再投与の関係

組織重量が実験期間を通じておおむね一定値を示していた、今この第2図を第1図と比較すると飢餓日数の延長にともなつて実験群の glycogen 量と単位組織重量とは二者ともに低下する。しかし飼料の再投与後における二者の間には相当の差異がみとめられた。すなわち、組織 glycogen 量は飼料再投与により対照の92%にまで回復するが、単位組織重量は僅かにその値を増すのみであった。

3) 貝軟体組織の TCA(三塩化さく酸)抽出液の濾紙 chromatography による糖類の定性

軟体組織の TCA 抽出液に含まれ、エタノールにより沈澱する物質を加水分解し、これで濾紙クロマト法により展開発色せしめたところ第3図の如き chromatogram



第3図 貝 TCA 抽出液のアルコール沈澱物質のクロマトグラム

を得た(原点と展開物質との距離は縮少)。すなわち前記物質は加水分解により glucose のみを含んだ多糖類と考えられる。また glucose 以外の硝酸銀発色物質は全く観察されなかった。

考 察

Anthrone 指薬による glycogen 定量法について Carroll *et. al.* (1959) によると glycogen の動物組織よりの抽出には5% TCA 液で3回抽出を行えば97%以上の含有 glycogen が抽出できると報告している。しかし彼らの用いた動物組織は脊椎動物の肝・筋組織で今回著者等が使用した軟体動物の組織とはかなりその趣をことにしていると考えられる。そこで本実験材料に適合した抽出法、主に抽出回数を求めるため実験前に第2表に示すような抽出試験を行った。その結果ミヤイリガイ軟体組織中の glycogen は第1回の抽出で全量の約98%が

第2表 貝軟体部の TCA 抽出回数と
グルコーゲン抽出量

抽出回数	稀釈率	グルコーズ γ/ml. 稀釈液	軟組織 122.5 mg 中の総グ ルコース量 γ	平均	%
第1回	90X	79.9999	7199.991	7287.264	98.49
	90X	81.2726	7414.534		
	90X	81.6363	7347.267		
第2回	8X	14.7272	117.817	111.514	1.51
	8X	13.6363	109.090		
	4X	26.9090	107.636		
第3回	6X	3.6363	21.817	—	—
	6X	5.6363	33.817		
	3X	5.8181	17.454		

抽出できることが判明した。更に第1回の抽出残渣を第1回と同じ方法で抽出すると僅かに2%が抽出されたに過ぎなかつた。同様にして第3回の抽出を行ったが、この場合には抽出原液の稀釈率と稀釈被検液1ml当りの glucose 量との間に正しい比例関係が成立せず、したがって第3回目の定量結果は信頼できないものと考えられる。以上の抽出試験の結果から今回の実験においては5% TCA 液による1回の貝軟体組織抽出で充分であることが示された。

Corroll *et al.* (1956) の原法とことなるもう一つの点は発色度の測定に波長 610 mμ の filter を用いたことである。そこで定量に使った glucose 標準液の吸収曲線を 590~670 mμ の波長範囲で 10 mμ 間隔で観察したところ第4図の如き結果を得た。すなわち波長 620 mμ で最大の吸収を示しその両側の波長では吸収値は次第に減ずる。山下(1959)によれば Anthrone による glycogen 定量に 640 mμ を使用している。原法の 620 mμ と 610 mμ とでは定量上大差はないものと吸収曲線より判断される。

生物学的結果について 第1報(柳沢・小宮, 1962)においては飢餓のミヤイリガイ O₂ 消費におよぼす影響をみたが、今回の実験においても前回の実験条件とほとんど同様な条件(平均室温, 前回 20°C, 今回 26.5°C)において飢餓の組織 glycogen 量におよぼす影響を観察した。今この二者を比較すると、飢餓の進行にともなつて貝の O₂ 消費量および貝の glycogen 量がともに次第に減少し、両者への飢餓効果は互によく似た過程を示していた。更に飢餓によりこのように減少した貝の O₂ 消費量と glycogen 量は再び飼料として米粉を与へることによつて前者は対照群のそれと同程度に、後者の glycogen 量は対照のその90%以上にまで迅速に回復したのである。このような飢餓および飼料投与の貝 O₂ 消費量およ

び組織 glycogen におよぼす影響が互に相似であることから飢餓による貝 O₂ 消費量の減少は貝の組織 glycogen の減少によるものであると充分考えられる。しかし前回の実験においては飼料の再投与を行うときに飢餓貝を飼料散布した土壌におくことによつて行つた。このような飼料投与法は土壌面に存在する各種の微生物や有機物が散布した米粉と混在し、貝の米粉摂取とともにその体内にとり込まれる可能性がある。すなわち飢餓貝は飼料として与へた米粉

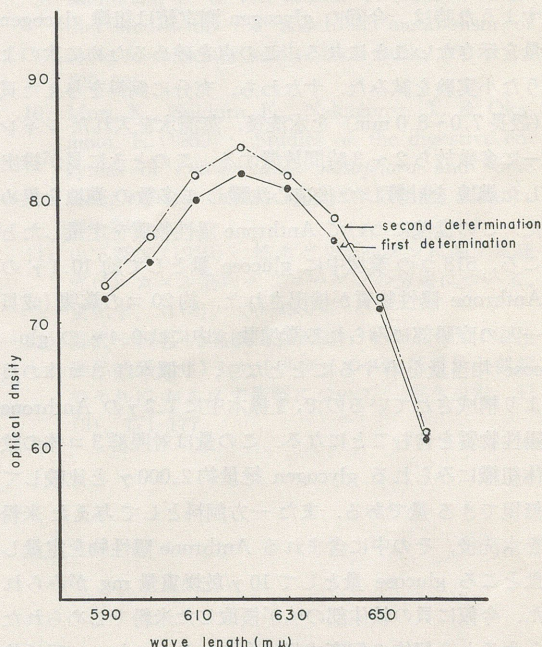


Fig. 4 Anthron 示薬により発色したグルコース標準液(150 γ/ml)の吸収曲線

を摂取利用することなく、これと混在する他の微生物や有機物を利用して飢餓より回復したとも考えられるわけである。事実、小宮ら(1960)はミヤイリガイの食性の研究を行い、貝棲息地の土壌より各種の珪藻を検出同定し Knop 変液をもつて培養した珪藻類のみで実験室内貝飼育試験を行つて、1.0 mm の殻長を有する幼貝が20週後には5 mm 以上の殻長を有する成貝となつたことを報じている。それ故今回の実験においては飼料の投与にあたり、実験方法の項で述べたごとく、比較的純粹に米粉のみを投与するようにし、且つ投与中に発生する細菌、カビ類などの増殖をできるだけ自然に防ぐ目的で、抗生

物質等を用いずに投与期間中は其の内壁に米粉を塗布したシャーレを毎日新鮮なものと交換した。

更にこのようにして比較的純粋に米粉を摂取した貝は、これを分解し、吸収して食物として利用しているかという疑問がある。実験中において飢餓群の貝殻をその軟体組織より除去するとき、貝の腸管末端のいわゆる直腸部にはほとんど糞塊に相当するようなものは見当らない。これに反し対照群の充分飼料を与へた貝の直腸部には楕円形の糞塊が20個内外常に観察された。若し与えた米粉が貝に摂取はされるが消化吸收されず糞塊中に排出され、その米粉が Anthrone 示薬に対して陽性を示すような時は、今回の glycogen 測定値は組織 glycogen 量を示さないことになる。この点を確めるために次のような小実験を試みた。すなわち、充分に飼料を与へた貝(殻長7.0~8.0 mm)を水洗後、蒸留水を入れたシャーレに多数放ち2~3時間放置する。このときに貝が排出した糞塊を計算した後遠心沈澱して多数の糞塊を集めた。この糞塊について Anthrone 陽性物質を定量したところ、518コの糞塊中に glucose 量として約10.1 γ の Anthrone 陽性物質が検出された。約20コの糞塊(成貝一匹の直腸部にみられる糞塊数)中には0.4 γ の glucose 相当量を有することとなり、1標本は3コ体の貝より構成されているので、1標本中に1.2 γ の Anthrone 陽性物質を含むことになる。この量は対照群3コ体の軟体組織にみられる glycogen 総量約2,000 γ と比較して無視できる量である。また一方飼料として与えた米粉を水洗後、その中に含まれる Anthrone 陽性物を定量したところ glucose 量として10 γ /乾燥重量 mg がみられた。今仮に貝の軟体部の $\frac{1}{3}$ が摂取した米粉でしめられたとすると3個体の飼育成貝に含まれる Anthrone 陽性物質は約90~110 γ glucose 相当量となり、これは組織全 glucose 量の僅々4~5%にすぎない。実験群の glucose 量が飢餓によつてその20~30%を減少することを考えれば米粉中の Anthrone 陽性物質もまた消化吸收されずに貝体中にあつたとしても敢て問題とするにたらない量と考えられる。以上の如き実験結果の考察から、ミヤイリガイは飢餓によつて体組織の glycogen を消費して生存に必要な energy の一部を産出し、したがつて1つの重要な energy 源である組織 glycogen の減少は O₂ 消費量の減少を招くにいたるものと思われる。更に投与した米粉摂取により組織 glycogen は新生増加され、再び glycogen の消費が盛んになるにつれてその O₂ 消費量および RQ 値も旧に復するものであらう。森ら(1959)

はミヤイリガイの組織に dextrogenic および saccharogenic な amylase の存在をみとめたことを報じているが、かかる事実もまた飼料としての米粉が利用される可能性を示すものと思われる。

次にもう一つの疑問として、飢餓が貝組織の脂質および水分含有量に影響しないだろうかということがある。この点を考慮して軟体部の脂質の定量を試みたが、定量法が適当でないためか飢餓と脂質量との間の関連をみる事ができなかつた。von Brand *et al.* (1957) は *A. glabratus* において10日の飢餓後に実験当初の66%まで脂質が減少したことを報告している。一般に動物組織では飢餓にさらされた時先づ glycogen の如き炭水化物の消費がおこり、それにつづいて脂質の消費がおこるといわれている。貝の死亡がみられない程度の飢餓に貝がさらされたとき、その組織内で酸化消費される物質が脂質よりも炭水化物が先づ消費されるであろうことは疑のない所である。しかし飢餓貝の組織脂質の消費に関しては更に検討の余地が残されていることと思われる。

第2図に示した如く飢餓貝の組織重量は飢餓の進行にともなつて減少することは、貝の O₂ 消費量および組織 glycogen 量の場合と同様であつた。しかし飼料の再投与によつて O₂ 消費量や組織 glycogen 量においてみられたような迅速な回復はほとんど観察されなかつた。飢餓により減少した glycogen 重量は飢餓21日目で、その組織重量の減少量の僅か20%を説明するに過ぎなかつた。したがつて貝の飢餓による組織重量の減少は組織 glycogen 量の減少以外のものがあることが判る。すなわち組織水分量、脂質量なども当然含まれると考えられるが、この点に関しては将来の検討にまちたい。

摘 要

ミヤイリガイを飢餓にさらし、また飼料として米粉を再び投与した時、その組織 glycogen 量におよぼす影響を、実験室内で観察し次の結果を得た。

1) *O. nosophora* の組織 glycogen 量は飢餓の進行とともに減少し、実験開始21日目には、飢餓貝の組織 glycogen 量は実験当初の63%まで減少した。対照群の飼料投与の貝は glucose 量として平均70.77 γ /mg 生鮮重量(最高77.66 γ 最低67.11 γ /mg)の glycogen 量を31日の実験期間において示した。

2) 飢餓21日目に飢餓貝に米粉を再投与すると、飢餓期間に減少した組織 glycogen 量は投与4日後にはすでに対照飼料投与群のその92%までに回復していた。

3) 組織重量も飢餓期間は減少して行くが、飼料の再投与によつては、減少した組織重量はほとんど回復しなかつた。

4) 貝組織の3塩化サク酸抽出液中の alcohol により沈澱する物質を加水分解して糖類の定性を試みたが、glucose が唯一の検索された糖であつた。

5) 飢餓による貝の O_2 消費と組織 glycogen 量の減少との関係、飢餓貝の組織重量の減少等について考察を行った。

稿を終るに当り本研究に用いた宮入貝を度々提供して下さいました山梨県衛生研究所地方病科科长飯島利彦博士に感謝致します。

主要文献

- 1) von Brand, T., Nolan, M. O. & Mann, E. R. (1948) : Observations on the respiration of *Australorbis glabratus* and some other aquatic snails. Biol. Bull., 95(2), 199-213.
- 2) von Brand, T., McMahon, H. & Nolan, M.O. (1957) : Physiological observation on starvation and deciccation of the snail, *Australorbis glabratus*. Biol. Bull., 113(1), 89-102.
- 3) Carroll, N. V., Longley, R. W. & Roe, J. H. (1956) : The determination of glycogen in liver and muscle by use of Anthrone reagent. J. Biol. Chem., 220, 583-593.
- 4) 橋本魁 (1959) : ミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* の雌雄判別法とその自然界における性比について. 寄生虫誌, 8(1), 76-80.
- 5) Itagaki, H. (1955) : Anatomy of *Oncomelania nosophora* (Robson) (Gastropoda). 貝類学雑誌 18(3), 161-167.
- 6) 小宮義孝・橋本魁 (1958) : ミヤイリガイの乾燥に対する抵抗性. 寄生虫誌, 7(6), 683-688.
- 7) 小宮義孝・小島邦子・小山力 (1960) : 自然界における *Oncomelania* の主な食物としての珪藻類 (*Oncomelania* の食性に関する研究 IV). 日本生態学雑誌, 10(1), 11-15.
- 8) McMahon, P., von Brand, T. & Nolan, M. O. (1957) : Observation on the polysaccharides of aquatic snails. J. Cell, Comp. Physiol., 50(2), 219-240.
- 9) Mehlman, B. & von Brand, T. (1951) : Further studies on the anaerobic metabolism of some fresh water snails. Biol. Bull., 100(1), 199-205.
- 10) Mori, K., Sugiura, K., Nakagome, T. & Okamoto, K. (1959) : Studies on the digestive enzymes of *Oncomelania nosophora* and some other aquatic snails. 昭和医学会雑誌, 19(3), 240-244.
- 11) 山下辰久 (1959) : 筋肉グリコーゲンに関する研究(1) カエル筋肉グリコーゲンの分層について, 生化学, 31(4), 300-308.
- 12) 柳沢十四男・小宮義孝 (1962) : ミヤイリガイの生理学的研究(1) ミヤイリガイの O_2 消費量と飢餓のそれにおよぼす影響について. 寄生虫誌, 11(3), 171-177.

PHYSIOLOGICAL STUDIES ON ONCOMELANIA NOSOPHORA, THE
VECTOR SNAIL OF SCHISTOSOMA JAPONICUM
II. EFFECT OF STARVATION UPON GLYCOGEN CONTENT
OF THE SNAIL SOFT TISSUE

TOSHIO YANAGISAWA & YOSHITAKA KOMIYA

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

The present work is an extension of the previous one in which the decrease and rapid recovery of oxygen uptake and RQ value were observed in the starved and re-fed starved snails, *O. nosophora*. No explanation, however, was given for such physiological changes as seen in the previous experiments. In order to obtain some clues as to such changes shown by *Oncomelania* snails during starvation and re-feeding, glycogen content in snail soft tissue was determined quantitatively. Results obtained were summarized as follows:

1) Glycogen content in *O. nosophora* maintained in the laboratory decreased with time of starvation and declined terminally to 63% of the pre-experimental level at 21st day of starvation. In the well-fed control snails the average glycogen content was 70.77 with 67.11 and 77.66 micrograms per mg fresh weight of soft tissue as both extremes over the whole period of 31-day experiment.

2) Re-feeding of starved snails on rice powder revealed that glycogen content in the re-fed snails reached 92% of that in well-fed control even 4 days after re-feeding.

3) Fresh weight of soft tissue also decreased with time of starvation and little recovery from its starvation level was shown by re-feeding with rice powder.

4) Chromatographic analysis on TCA extract of snail soft tissue indicated that glucose was only sugar present in extract used for glycogen determinations.

5) Some discussions on the relation between the effect of starvation upon oxygen uptake and glycogen content of snails and on the weight loss of soft tissue during starvation were briefly made.