

マメタニシ卵の胚発育と孵化に関する実験 —飼育液中の塩素含有量の影響について—

沖野哲也 初鹿 了

(掲載決定：平成4年12月2日)

要 約

マメタニシの実験室内産下卵を用いて、卵子の発育と塩素量との関係、および孵化に対する温度の影響を調べた。マメタニシが産下した1卵塊中の卵数は1~77個(平均17.7個)で、卵子は水道水(温度25℃)中において、24時間後に胞胚期になり、4日後に trochophore 期、5~7日後に veliger 期に発育し、産下後10~27日の間(平均17.5日)に稚貝が孵化した。稚貝が孵化するまでの日数は、水温30℃で7~15日(平均9.8日)、35℃で7~12日(平均9.6日)であった。孵化率は、水温25℃と30℃でそれぞれ92.5%、91%を示したのに対し、水温35℃では63%と低かった。塩素量20,000~5,000ppmの溶液中における卵子は、24時間以内にすべて卵細胞が崩壊し、4,000および3,000ppm溶液中の卵子は一部が veliger 期まで発育したが孵化はみられなかった。また、塩素量500ppmの溶液中では稚貝の孵化率が control 溶液中のそれとほぼ同様の結果を示したことからマメタニシの卵子は塩素量が、500ppmの溶液中でも発育可能と考えられた。

Key words : freshwater snail, *Parafossarulus manchouricus* egg, embryonation, hatching, chlorinity

緒 言

従来から肝吸虫 *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) の第1中間宿主マメタニシ *Parafossarulus manchouricus* の生態に関する研究は、主に野外観察が多く(長野, 1928; 久山, 1938; 稲臣, 1953; 西本, 1958)、実験室内での産卵や孵化の観察は杉原(1954)による報告のみで、詳細な報告は見当たらない。

岡山県では、マメタニシが海岸線に接近した場所にも生息しているので(長花ら, 1978)、さきに貝生息地への浸入海水の影響を調査した結果、冬の低温期で塩素量が600ppm以下の場所では貝が1ヶ月以上も生存可能であり(長花ら, 1981)、また、人工海水の稀釈液を用いた室内実験では塩素量1,000ppm以下では水温約28℃で1ヶ月以上生存可能と報告されている(初鹿ら, 1982)。

著者らは、マメタニシが生息可能な水中の塩素量を知る目的で、岡山県産マメタニシを用いて、産卵、卵子の発育と塩素量との関係および孵化に対する温度の影響について検討したので報告する。

材料と方法

実験に用いたマメタニシの成貝は、岡山県南部の水田

で採集した。

貝の飼育水には、水道水(汲み置き)と人工井戸水(Ulmer, 1975)を使用し、水道水は control 溶液とした。貝の餌としては宮入貝用の人工飼料(Saitoh and Itagaki, 1980)に若干組成を変えたものを与えた。

マメタニシは、表面の滑らかな所に産卵する習性があるので、内径28cm、高さ15cmの貝飼育水槽(全水量約7リットル)の内壁を食品包装用のラップフィルム(理研ビニル工業)で被い、底に約1cmの厚さに砂を入れ、その中に上記の飼育水を注入したのち、さらにラップフィルムで包んだガラス板(5×10cm)を数枚入れて、水温26~30℃の条件下でそれらの表面に産卵させた。産下卵の観察にあたっては、発育 age がほぼ揃った(2~32細胞期)卵塊をラップフィルムごと切り取り、一卵塊中の卵数の合計が control (25℃, 水道水)のみ200コ、他はすべて100コ宛のグループに分けた。各卵塊は各飼育液を入れた径9cmのガラスシャーレ(全水量約50ml)に移して卵子の発育状況を観察した。

温度の孵化に対する影響については、control 溶液を用い、卵塊を入れたシャーレを温度25℃, 30℃および35℃の恒温器内に置き、稚貝が孵化するまでの日数と孵化率を調べた。

また、卵子の発育と塩素量との関係については、卵子の飼育液として人工海水(アクアマリン、八洲薬品)を

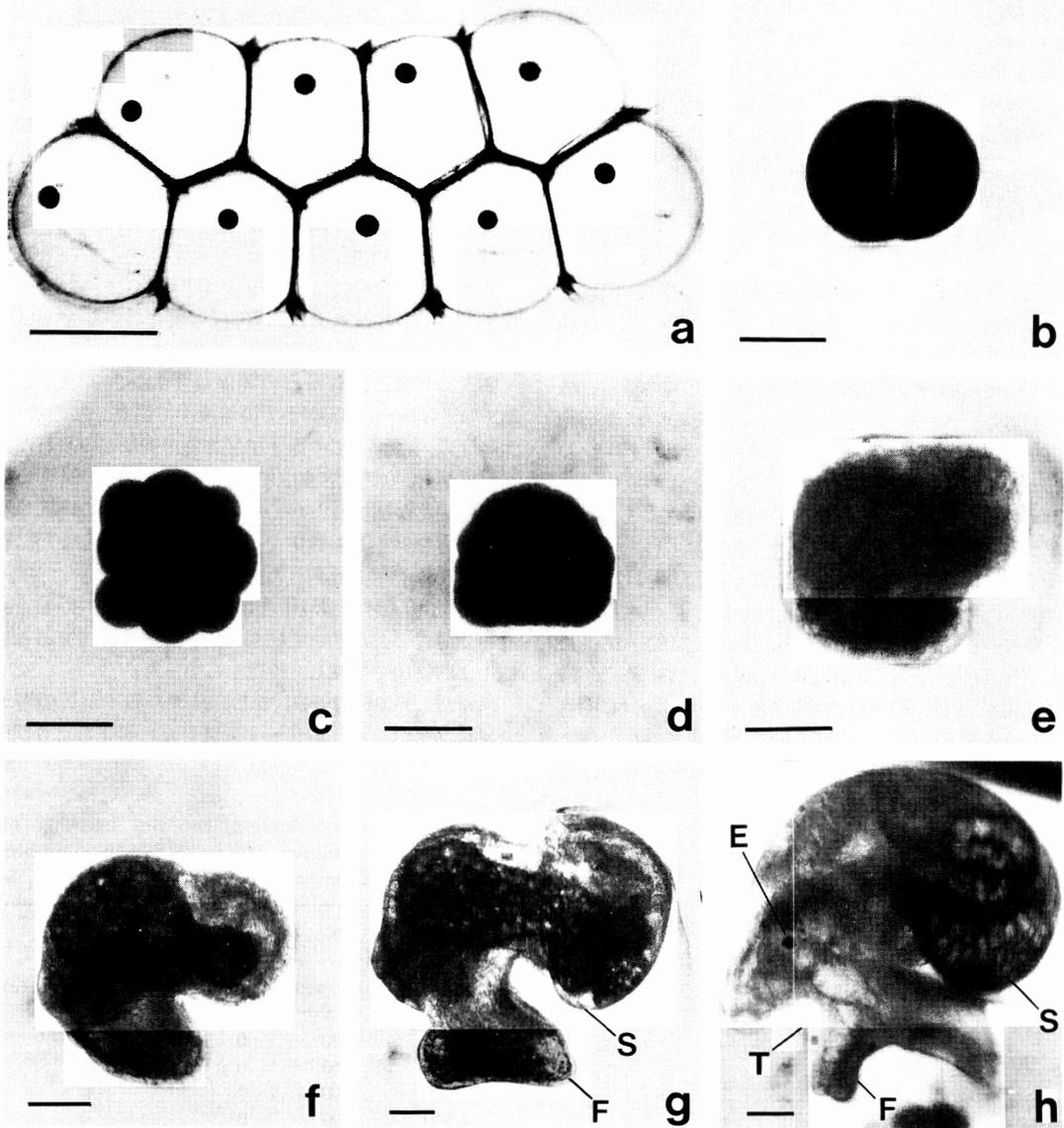


Fig. 1 Embryonic development of *P. manchouricus* eggs, incubated in tap water at 25°C.

- a: Encapsulated eggs just after being laid on a polyvinyl chloride resin surface.
- b: 2-Cell stage, after a few hours incubation.
- c: 16-Cell stage, after several hours incubation.
- d: Blastula stage, after 24 hours incubation.
- e: Trochophore stage, after four days incubation.
- f: Early veliger stage, after five days incubation.
- g: Middle veliger stage, after seven days incubation.
- h: Fully developed snail just before hatching, after 11 days incubation.

E = eye, F = foot, S = shell, T = tentacle [Scale bar = 1mm (a), 0.1mm (b-h)]

用いて検討した。この人工海水の塩素量を硝酸銀法で測定したのち、その原液を蒸留水で順次稀釈して塩素量20,000, 10,000, 5,000, 4,000, 3,000, 2,000, 1,000, 500, 200および100ppmの溶液を作成し、各溶液および成貝を採集した貝生息地の水(塩素量53ppm)の中に、卵子を入れて、温度25°Cの恒温器内に置き3日ごとに新しい溶液と交換して毎日観察した。

成 績

マメタニシが産下した卵塊(総計639卵塊)の観察では、1卵塊中の卵数は1~77個で、7~8個のものが最も多く、その平均卵数は17.7個であった。

産下直後の卵塊は卵嚢壁で区切られた2列の個室に分かれており、各個室は粘液で満たされ、その中に単細胞期の卵子が1コ宛存在した(Fig. 1 a)。マメタニシの卵子の卵割形式は不等全割である。control溶液中、水温25°Cにおける卵子の発育状況の観察では、卵子は数時間で2細胞期となり(Fig. 1 b)、16細胞期(Fig. 1 c)を経て、24時間後には胞胚期に発育して、幼生は卵嚢中で緩慢な回転運動を始めた(Fig. 1 d)。産下4日後には活発な回転運動をする trochophore (担輪子幼生)期となり(Fig. 1 e)、5日後には veliger (被面子幼生)前期(Fig. 1 f)、7日後には同中期(Fig. 1 g)に発育し、この時期の幼生では心臓の動きが確認された。産下8~11日後には、卵嚢中の各幼生は眼や足や触角が確認

できた(Fig. 1 h)。

control溶液中、水温25°C, 30°Cおよび35°Cで産下された卵子の孵化までの日数と孵化数については、Fig. 2に示した。水温25°Cでは、稚貝は産下10~27日後に卵嚢から脱出して孵化を完了し、孵化までの平均日数は17.5日で、200個中185個(孵化率92.5%)が孵化した。

水温30°C, 35°Cでは、産下2日後に trochophore 期となり、3日後に veliger 期、4~5日後には眼や触角が確認できる幼生に発育した。

水温30°Cで、稚貝は7~15日(平均9.8日)で孵化を完了、孵化率は91%、水温35°Cでは孵化日数が7~12日(平均9.6日)で、孵化率は63%であった。

卵子の発育と塩素量との関係は Table 1 に示した。塩素量20,000~5,000ppmまでの溶液中で飼育した卵塊は、24時間以内にすべての卵子で胚細胞の崩壊がみられた。

塩素量4,000ppmの溶液中では、24時間以内に94コの卵子で胚細胞が崩壊したが、6コの卵子は透明な球状の形態で発育を停止し卵嚢中で緩慢な回転運動をしたが、産下25日後にすべて死滅した。

塩素量3,000ppmの溶液中では、すべての卵子で veliger 期まで発育したが、いずれも貝殻の異常な個体であり、幼生は卵嚢中で死滅し、孵化しなかった。

塩素量2,000ppmの溶液中では、94コの卵子が貝殻形成の異常な発育を示し孵化せず死滅した。孵化した6個体

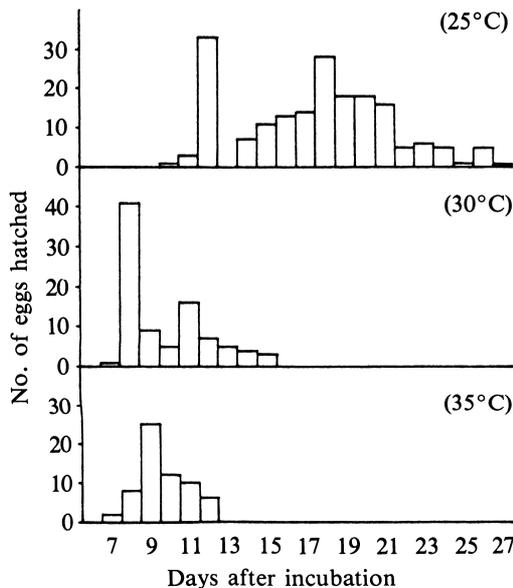


Fig. 2 Relationship between the hatching of *P. manchouricus* eggs and the temperature of the culture medium (tap water).

Table 1 Embryonic development and hatching of *P. manchouricus* eggs in various culture media with different chlorinity at 25°C

Chlorinity (ppm)	No. of eggs		No. of days up to hatching (average)
	examined	hatched	
20,000	100	0	0
10,000	100	0	0
5,000	100	0	0
4,000	100	0†	0
3,000	100	0‡	0
2,000	100	6(4)§	19-25 (22.3)
1,000	100	56(21)§	13-31 (20.8)
500	100	90(13)§	14-27 (20.0)
200	100	77(14)§	14-17 (15.2)
100	100	31(29)§	16-28 (19.7)
53*	100	91	12-17 (14.6)
control	200	185	10-27 (17.5)

* The habitat water of snails.

† All the embryos died within 25 days after incubation.

‡ The embryonic development stopped at the veliger stage.

§ No. of abnormal individuals.

中4個体は貝殻のいびつな稚貝であった。

塩素量1,000ppmの溶液中では、半数よりもやや多い56個体が孵化したが、そのうちの21個体は貝殻のいびつな稚貝であった。

塩素量500ppmの溶液中では孵化率がcontrol溶液中のそれと同様の値を示したが、13コの稚貝は貝殻のいびつな個体であった。稚貝の孵化までの平均日数はcontrol溶液中のものに比べて僅かに長かった。

また、塩素量200および100ppmの溶液中での孵化率は、control溶液中のそれと比較して塩素量の減少に伴って低下する傾向がみられ、殊に100ppmの溶液中では孵化した個体の多くが貝殻形成に異常のみられる稚貝であった。

貝生息地の水(塩素量53ppm)の中では、孵化までの日数が平均14.6日でcontrol溶液中での平均17.5日よりも短く、孵化率が91%でcontrol溶液中の92.5%とほぼ同様の値を示した。従って、貝生息地の水はマメタニシの卵子の発育にとって最適と考えられた。

考 察

マメタニシの成員が一回に産下する卵数について、杉原(1954)は9~26個で20~22個が多かったと述べているが、今回著者らが観察した一卵塊中の卵数は1~77個で、7~10個が最も多かった。この違いは、実験に用いたマメタニシの個体数(飼育密度)や、産卵させた水温の差異によるものと思われる。すなわち、杉原(1954)は10~15個のマメタニシを用い、5月中旬~6月中旬(水温20~24℃)に産卵させたのに対し、著者らは杉原(1954)とほぼ同じ大きさの飼育水槽に約200個の成員を入れ、7月初旬~下旬(水温26~30℃)に産卵させた。長野(1928)は、野外で同一成員から1回に産出される卵数は7~79個で、通常は30~60個位であるが、時として数個を断続的に産下したと報告している。今回の観察結果および従来の報告から、マメタニシが1回に産下する卵数は、数個から最高80個位までと思われる。

杉原(1954)は、水温20~24℃におけるマメタニシ卵子の孵化までの日数が15~26日(平均19.6~20.6日)と報告している。著者らの観察では、水温25℃における孵化日数は10~27日(平均17.5日)で、水温が高くなると平均孵化日数は短縮されたがその値にはばらつきがあった。この理由は定かではないが、飼育水の酸素供給不足が原因したのかもしれない。水温30℃と35℃における孵化日数にはそれほど顕著な差異がなく、孵化率は水温30℃の方がむしろ高かった。水温35℃における孵化率の低下は高温による影響とも考えられるが、飼育水中で卵囊表面に水カビの付着や原生動物等の発生がみられ、これらの水棲生物が卵囊内に侵入し、貝殻だけ残して死滅した個体も観察されたので、これらの影響も考えられる。本貝の生息地(水田)における水温は、貝の繁殖期(8

~9月)には平均31.4℃(最高39.3℃)とかなり高温になる(大山・沖野, 1992)。一方、住血吸虫の中間宿主貝 *Biomphalaria glabrata*, *B. pfeifferi* および *Bulinus globosus* は水温35℃の高温では、卵子の発育や孵化が起こらないと報告されているが(Nojima and Sato, 1981)、マメタニシは比較的高水温条件下でも生息できるようである。

マメタニシの卵子発育と塩素量との関係については、塩素量20,000~3,000ppmまでの溶液中では稚貝の孵化が全くみられず、2,000および1,000ppmの溶液中では孵化率がそれぞれ6%, 56%で、control溶液中の92.5%よりも明らかに低かった。従って、稚貝の孵化率からみると、control溶液中とほぼ同様の孵化率(90%)を示した500ppm溶液がマメタニシ卵の発育可能な塩素濃度の上限のように思われる。これと比較して、*Bulinus africanus* の卵子の孵化に対する塩分の影響について、塩分1,750ppm(塩素量約1,000ppm)の溶液中でもcontrol溶液と有意差なく孵化することが報告されている(Donnelly et al., 1983)。

一方、今回塩素量の少ない貝生息地の水(塩素量53ppm)やcontrol溶液が卵子の発育に適していたので、塩素量が少ない溶液中で良い結果を予想したが、塩素量200および100ppmの溶液中では孵化率が低下し、貝殻形成に異常を示す個体が多くなった。著者らは、この原因が塩素の要因以外にもあると考え、貝殻形成に重要な役割を果たすと考えられるカルシウムの量を塩素量200ppmの溶液とcontrol溶液および貝生息地の水(53ppm)について測定した結果、1ℓ当りのCaCO₃含有量がそれぞれ8.9mg, 42.5mgおよび63.4mgであり、殊に塩素量200ppmの溶液中でCaCO₃量が著しく少ないことが判明した。Madsen(1987)によると、*Helisoma duryi*, *Biomphalaria alexandrina*, *B. camerunensis*, *Bulinus truncatus* の4種貝は、非常に低いカルシウム濃度の溶液中(Ca²⁺が0.0625mM以下)で飼育すると貝殻が脆弱になり、高濃度のカルシウム溶液中ではより強固な貝殻を形成し、*B. alexandrina* と *B. camerunensis* は低カルシウム濃度の溶液中(Ca²⁺が0.01~0.03mM)で孵化率がわずかに低下したと報告している。このことから、飼育液中に貝殻形成に十分量のカルシウムが必要と思われるが、今回と同じ稀釈人工海水を用いたマメタニシ成員の生存試験でも、塩素量200および100ppmの溶液中では長期間の飼育によって貝殻が脆弱になることが確認されており(大山, 未発表)、蒸留水による人工海水の稀釈によって塩素量200および100ppmの溶液でカルシウム量が低下し、貝殻形成に異常を示した個体が出現し同時に孵化率も低下したと思われる。

これまで、野外におけるマメタニシの生息可能な塩素量については、約200ppm以下であり(佐藤ら, 1959), 10

mg/100cc程度の塩素の存在はマメタニシの生活に却って好適(稲臣, 1953)等の報告がある。岡山県南部の海岸線に接近し, 海水の影響を受けている本貝の分布地(倉敷市玉島, 岡山市浦安, 水門町)における塩素量については, 貝繁殖期(8~9月)で5.6~306.9ppm(平均97.8ppm)となり貝採集数と塩素量との間に高い正の相関がみられることを報告しており(大山・沖野, 1992), 今回の結果から, マメタニシは塩素量500ppmの環境下で生息可能と思われる。ただし, マメタニシの成貝が塩素量500ppmの溶液中で産卵が可能かどうか, また孵化直後の脆弱な稚貝がこの溶液中で発育を全うできるかどうかについては今後検討したい。

謝 辞

稿を終わるに当たり, マメタニシ成貝の生息可能な水質について御助言を頂いた当教室の大山文男助手, および資料作成に御支援して下さいました古川典子, 的場久美子の両氏に謝意を表します。

文 献

- 1) Donnelly, F. A., Appleton, C. C. and Schutte, C. H. J. (1983): The influence of salinity on certain aspects of the biology of *Bulinus* (*Physopsis*) *africanus*. Int. J. Parasitol., 13, 539-545.
- 2) 初鹿 了・清水泉太・大山文男・橋本昌司・長花 操 (1982): 岡山県における肝吸虫症の疫学的研究 (17) 稀釈海水中におけるマメタニシの生存試験. 寄生虫誌, 31 (2・補), 66-67.
- 3) 稲臣成一 (1953): 岡山県下吸虫類中間宿主の研究 (1) 「マメタニシ」の発育と水質. 岡山医誌, 65, 37-39.
- 4) 久山正策 (1938): 第1及び第2中間宿主ニ於ケル発育期吸虫類ノ季節的消長ニ就テ. 岡山医誌, 50, 327-437.
- 5) Madsen, H. (1987): Effect of calcium concentration on growth and egg laying of *Helisoma duryi*, *Biomphalaria alexandrina*, *B. camerunensis* and *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae). J. Ap. Ecol., 24, 823-836.
- 6) 長花 操・初鹿 了・清水泉太・川上 茂 (1978): 岡山県における肝吸虫症の疫学的研究 (1) マメタニシの分布状況. 寄生虫誌, 27, 165-170.
- 7) 長花 操・初鹿 了・清水泉太・大山文男 (1981): 岡山県における肝吸虫症の疫学的研究 (14) 海水流入用水中マメタニシの冬期生存試験. 寄生虫誌, 30 (2・補), 69.
- 8) 長野寛治 (1928): 肝臓ジストマ (*Clonorchis sinensis*) の撲滅に関する研究 其1, 水草除去並竹柴挿入による第一中間宿主マメタニシの撲滅法に就て. 東京医事新誌, (2563), 546-558.
- 9) 西本真士夫 (1958): 徳島県下の肝吸虫の研究 - とくに第1中間宿主について - (肝吸虫4). 四国医誌, 12, 580-595.
- 10) Nojima, H. and Sato, A. (1981): Effect of temperature and atmospheric pressure on the eggs of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*. Jap. J. Parasitol., 30, 121-126.
- 11) 大山文男・沖野哲也 (1992): 岡山県における肝吸虫症の疫学的研究 (25) マメタニシの生息密度と貝繁殖期の水質要因の統計的解析. 寄生虫誌, 41 (増), 87.
- 12) Saitoh, Y. and Itagaki, H. (1980): A new breeding system of *Oncomelania hupensis nosophora* in the laboratory. Jap. J. Parasitol., 29, 341-350.
- 13) 佐藤淳夫・杉原弘人・松尾喜久男・宮下一郎 (1959): 石川県における肝吸虫症の研究(第2報). 第15回日本寄生虫学会西日本支部大会講演抄録, 62-64.
- 14) 杉原弘人 (1954): 実験室内におけるマメタニシの発育観察. 医学と生物学, 33, 265-269.
- 15) Ulmer, M. J. (1975): 実験室内の貝の飼育についての注意. 寄生虫学実験法, 菊屋書房, 東京, 168-169.

Abstract

AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE EMBRYONATION AND HATCHING OF
PARAFOSSARULUS MANCHOURICUS EGGS –
INFLUENCE OF CHLORINITY ON THE CULTURE SOLUTION

TETSUYA OKINO AND RYO HATSUSHIKA

Department of Parasitology, Kawasaki Medical School, Kurashiki City 701-01, Japan

The influence of water temperature and chlorinity on the embryonic development and hatchability of *Parafossarulus manchouricus* eggs was investigated.

The number of eggs per egg mass was 1–77 (av. 17.7). In tap water, the eggs reached the blastula stage in one day, the trochophore stage in 4 days and the veliger stage in 5–7 days at 25°C. The young snails hatched in 10–27 days (av. 17.5) at 25°C, 7–15 days (av. 9.8) at 30°C and 7–12 days (av. 9.6) at 35°C. The hatching rates at 25°C, 30°C and 35°C were 92.5%, 91% and 63%, respectively.

The embryonic development and hatchability of eggs in different chlorinities can be described as follows: All eggs died within 24 hrs in chlorinities of 20,000–5,000ppm. In chlorinities of 4,000 and 3,000ppm, partial embryonic development occurred but no eggs hatched. In a chlorinity of 1,000ppm, the hatching rate was 56%. The hatchability of eggs was unaffected in a chlorinity of 500ppm. In chlorinities of 200 and 100ppm, it is supposed that shell formation was affected by the very low calcium concentration.