

◇ 献 呈 論 文 ◇

ミヤイリガイ卵周囲の泥皮構成粒子の 径計測法とその応用結果

二 瓶 直 子

は じ め に

日本住血吸虫症の中間宿主ミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* は生息条件が微妙で、同症の偏在性をもたらす最も重要な要因と考えられる。ミヤイリガイの地理的分布の理由解明と、同貝大量飼育法の開発による実験室内日本住血吸虫症のシステムの確立を目的として、筆者は一連の飼育実験を行ってきた。ミヤイリガイは水陸両生貝で、陸生の親貝は湿土上で産卵し、孵化した稚貝は、水中で生長する。産卵の際親貝は卵の周囲に泥皮を附着させる。産卵活動の内、泥皮形成が重要で、その材料となる土壌の諸性質はミヤイリガイの分布や実験室内繁殖条件を規定する要因の1つとなると考えられる。直径約0.6 mmの卵を約0.1 mmの厚さで被う泥皮を構成する微細な粒子の径の測定は、普通顕微鏡下の実測など、従来の方法では困難である。本稿では新法も含めて4種の方法を比較検討しながら、現段階で最適な方法として走査型電子顕微鏡法を開発した。また本法により、実験室内土壌種別産卵実験で孵化数の多い土壌から得た、孵化に至適な泥皮構成土粒の粒径範囲を明らかにした。

I. 材料と方法

1. 実験材料

供試ミヤイリガイは山梨県産採集貝の成貝である。

供試土壌サンプルは、同貝の生息地で既往実験で産卵・孵化数の多かった甲府盆地竜王町富竹新田の灰色低地土と、非生息地で孵化数の少ない印旛沼畔千葉県佐倉市の黒泥土・福島県滝根町カルスト地方の腐植質土の、夫々表土の風乾細土である。

2. 飼育方法及び泥皮採取法

ミヤイリガイを二瓶(1978a)に準ずる方法、すなわち土を駄温浅鉢の底に敷き、親貝を入れて産卵させ、1月目に親を分離し、更に1月目に孵化した稚貝の数を数えた。その間、鉢の壁や土の表面から、泥皮を被った卵をできるだけ変形せぬようピンセットで採集し、管瓶に入れ保存した。

3. 泥皮構成土粒の計測法

1) 泥皮中の硅藻粒子の計測

泥皮1個を小試験管に入れ、1~2 mlの水とNaOH約0.05 gを加え、2日間時々攪拌し、分散させた。得られた懸濁液中の粒子のうち、形態的に識別の容易な硅藻粒について、長・短両径を目盛環をつけた光学顕微鏡で計測した。

2) 泥皮薄片標本法

スライドガラスにアラルダイトをつけ、泥皮約 20 個を平らに埋め込み、研磨した。これにデーキサイトをつけた別のスライドガラスを被せ、先のスライドガラスをはがし、研磨した。ここで得られた両面研磨済みの標本に、カナダバルサムのついたカバーガラスを貼りつけた。これを光学顕微鏡の最大×1,000までの倍率で計測した。また鉱物顕微鏡で鉱物の同定をした。なお今回のサンプル調整は岩本鉱産物 K.K. に依頼した。

3) 透過型電子顕微鏡法

泥皮 2~3 個を小試験管に入れ、水を 1~2 ml 加え高周波で分散させた。スポイトでサンプルをスライドガラスに 1~2 滴落としカバーガラスをかけて、電子顕微鏡（日本電子製）×10,000 で検鏡した。

4) 走査電子顕微鏡法

管瓶に入れて自然乾燥させた泥皮の内測および断面を走査型電子顕微鏡（日本電子 J S M T 20）で、×150 から×5,000 で観察した。撮影された写真から、団粒または単粒を区別し、夫々の長径を計測し、その測定値から、土粒の径の範囲と、その範囲内での出現頻度の極大値等を求めた。

II. 実験成績

1. ミヤイリガイの食物源としての珪藻に着目する方法

結果は表 1 に示した。顕微鏡にセットした目盛環で径を計測し補正したため、計測値は 3 μm 間隔となった。長さ 9~30 μm の珪藻を主とし、中でも 15 μm 、9 μm が多かった。幅は主として 3~9 μm で、中では 6 μm が最も多い。欠損した珪藻が多く、特に 3 μm 以下については珪藻と確認することが困難で、計測できなかつた。また種の同定も容易でないが、マルクビハリケイソウ (Synedra ulna あるいは S. ulna var. oxyrhynchus) が多く観察された。

2. 泥皮薄片標本法

本法では泥皮の断面から粒子の結合状態（構造）をそのまま観察し得る。写真 1 は、×100、写真 2 は×1,000 の顕微鏡倍率で撮影したもので黒い輪が泥皮を示し、その内測及び外側の白色部分がアラルダイト等の接着剤で光を透過した部分である。×1,000 では粗粒の長石、石英等の白色鉱物が光を透過しているが、粘土を初めとする細粒は、黒みを帯び不定型で、径の測定は困難であった。

鉱物顕微鏡下で、黒色部分は腐植で汚染された鉱物・有機物・炭素・磨触を受けた角閃石・輝石・電気石等で、白~淡黄色部分は長石・石英等の砂粒であり、親貝が作った泥皮の構造には特定の規則性がないことが分かった。

3. 透過型電子顕微鏡法

写真 3 で示したように、分散が不完全なため、粒子が重なり計測には不都合であった。十分な分散が可能であれば計測に役立つ。

4. 走査電顕法

写真 4、5 は、富竹土壌から得られた泥皮（以下富竹泥皮と略す）の、写真 6、7 は印旛沼泥皮の、夫々内側面、断面を示す。各土壌の内側面及び断面等の部位の差は、構造または構成粒子の径につい

表1 富竹泥皮1個に含まれる全硅藻の粒径別個数

幅 μm 長さ μm	0-3	-6	-9	-12	-15	-18	計
0-3	0	0	0	0	0	0	0
-6	13	11	0	0	0	0	24
-9	24	41	15	0	0	0	80
-12	19	24	10	2	0	0	55
-15	21	30	30	4	2	0	87
-18	13	28	26	6	0	0	73
-21	11	25	28	3	2	1	70
-24	6	8	16	4	0	0	34
-27	1	6	14	2	2	0	25
-30	3	16	13	4	1	0	37
-33	0	1	4	0	1	0	6
-36	0	4	8	2	1	0	15
-39	0	2	6	0	1	0	9
-42	0	5	2	1	0	0	8
-45	0	1	5	1	1	0	8
-48	0	0	2	1	0	0	3
-51	0	1	0	0	0	0	1
-54	1	0	3	0	0	0	4
-57	1	1	2	1	0	0	5
-60	0	0	3	0	0	0	3
-63	0	0	2	1	0	0	3
-66	0	1	2	1	0	0	4
-69	0	0	0	0	0	0	0
-72	0	0	0	0	0	0	0
-75	0	0	0	0	1	0	1
-78	0	0	0	0	0	0	0
-81	0	0	0	0	0	0	0
-84	0	0	1	0	0	0	1
-87	0	0	0	0	0	0	0
計	113	205	192	33	12	1	556

ては認められないと考えられる。本稿では予措としてのイオンスパッタリング^{*}の容易な外側面を検鏡した。

本法では、泥皮を破壊することなく、構造のまま、また団粒及び単粒の区別も観察できる。

富竹泥皮構成粒子の粗粒部分の観察は約×500が、その間を充填する細粒部分は約×2,000の倍率が適当であった。印旛沼泥皮の場合は×500、×2,000、×5,000のいずれの倍率でも団粒としてしか観察できず、団粒の計測には×2,000が適当であった。写真による計測値の結果は表2に示す。

産卵実験の結果は表3、4に示す。産卵・孵化数の多い富竹泥皮は、測定土粒の83%以上が単粒で、団粒は少ない。大きい粒子は $3.45\mu\text{m}$ に達するものもあるが、 $1.0\sim 1.21\mu\text{m}$ を主とし、ピークは $1.7\sim 6.9\mu\text{m}$ にあった。 $0.5\mu\text{m}$ 以下の粒子は泥皮の材料として必要ではない。

鉢壁での産卵はかなり認められるものの孵化数の少ない印旛沼泥皮は、団粒の比率が高く、単粒は65.3%以下である。団粒、単粒を含めた土粒は約 $1\sim 7\mu\text{m}$ の粒径が80%以上を占め、ピークは約 $15\mu\text{m}$ にある。従って印旛沼泥皮の粒径範囲の上限が富竹泥皮のそのピークに相当し、前者のピークが後者の下限に相当し、団粒を構成する個々の単位の粒径からみて、前者は極めて細粒からなっていることが分った。

供試土壌とそれから得られた泥皮、両者夫々の土粒の径を比較すると、富竹土壌の土性は砂壤土(日本農学会法、既分析値あり)で粗粒が多いにも拘らず、泥皮には細粒の物質が選別されているとみられる。しかし細粒物質の中から特に限定された粒径あるいは形状のものを選択している訳ではない。一方印旛沼土壌と、それから作られた泥皮は、ほぼ同粒径組成を示すが、団粒は前者に多かった。産卵数・孵化数共に少なく泥皮の得られなかった滝根土壌は、印旛沼土壌と同傾向を示し、団粒が約50%を占め、80%以上の土粒が $3\mu\text{m}$ 以下と極端に小さかった。

以上供試土壌・泥皮の粒径計測及び産卵・孵化数の結果から、産卵に至適な富竹土壌は、団粒が少なく、 $3.45\mu\text{m}$ の微砂も含むが、 $1.0\sim 1.21\mu\text{m}$ の径を主とする粒子であることが分かった。

III. 考 察

微量で微細粒子からなる泥皮構成粒子の大きさを、以上の4種の方法で測定することを試みた。

硅藻法では分散上の問題がある。高濃度の苛性ソーダの硅藻の被殻への影響は不明である。計測値自体は正確であるが、時間と専門的知識を要する。貝の餌として硅藻は有効であるが、泥皮中の硅藻が特殊な役割(栄養あるいは至適な粒径等)があつて、選択的に利用されているか否か、硅藻が泥皮構成土粒の径を代表するか否か等不明であり、今回はこの方法を採用しなかつた。今後硅藻の役割が指摘されれば、本法も貴重な結果をもたらすと思われる。

泥皮薄片標本は、軟弱岩石と同様の方法で作成されたが、薄片の作成にあたって後者より更に高度の技術を要し、而も最低20個位の多量の泥皮を要する。しかし、泥皮を破壊することなく、その表面及び断面において構造のまま観察し得る点では有利である。標本の厚さは $30\sim 40\mu\text{m}$ で、これより

* 走査電顕観察のために必要な試料への金属コーティングを、従来使われていた真空蒸着装置に代り、操作が容易かつ短時間で、試料ダメージの少ない、イオンスパッター(日本電子 Fine cort JFC-1100)を使用した。

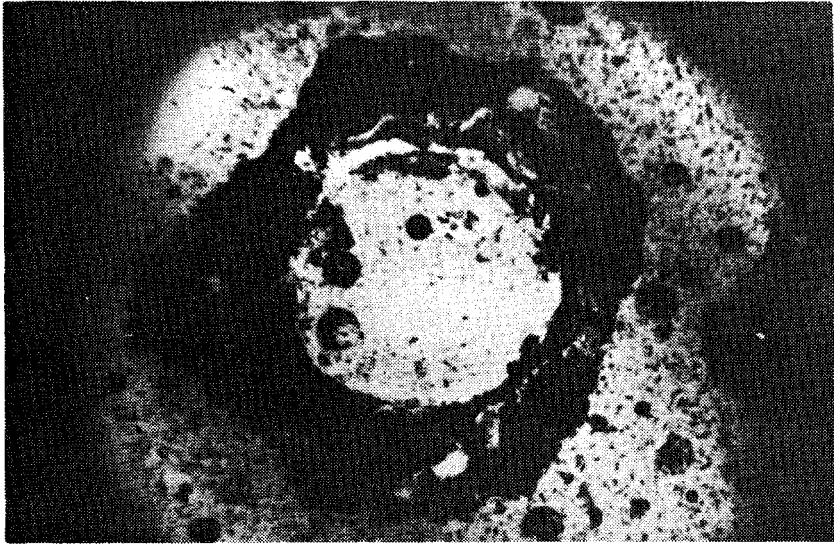


写真1. 泥皮薄片標本の光学顕微鏡写真
(富竹泥皮, $\times 100$)

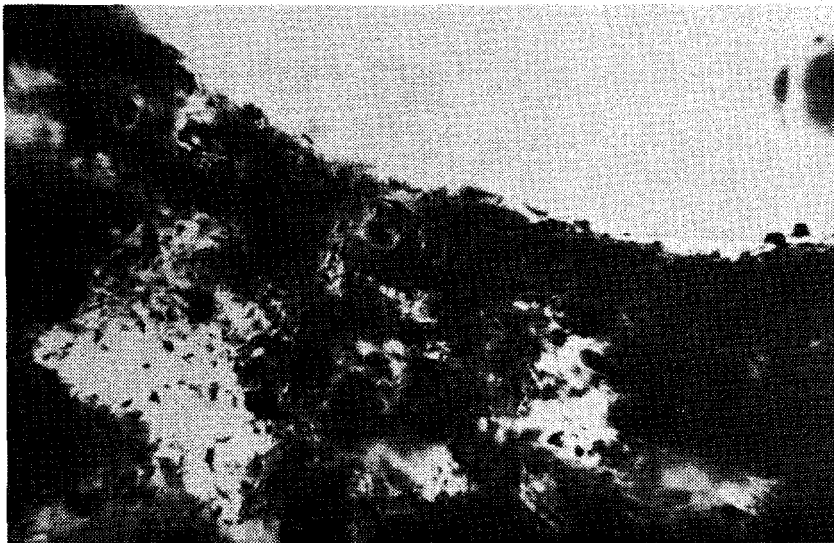


写真2. 同 上 (富沢泥皮, $\times 1,000$)

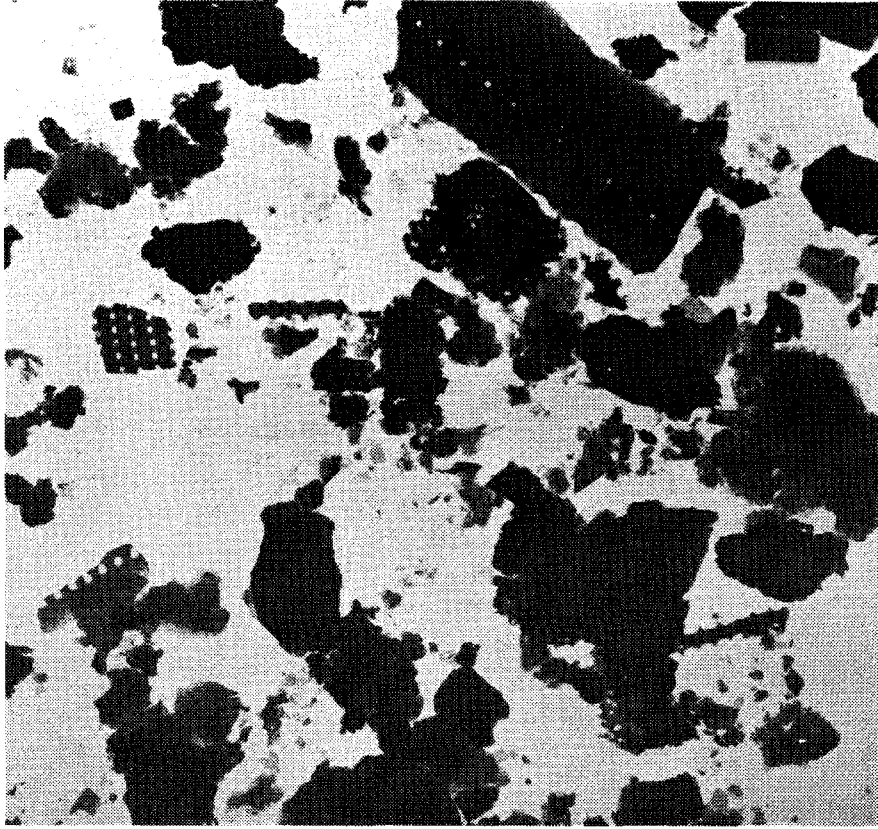


写真3. 泥皮の透過型電子顕微鏡写真
(富竹泥皮, $\times 10,000$)



写真4. 泥皮の走査型電子顕微鏡写真
(富竹泥皮内側面, $\times 2,000$)

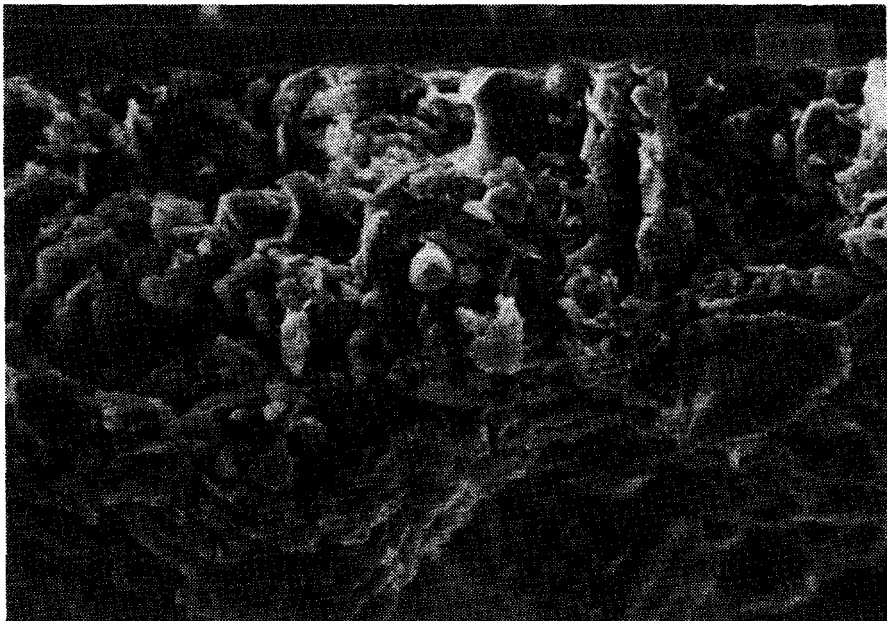


写真5. 同 上 (富沢泥皮断面, $\times 2,000$)

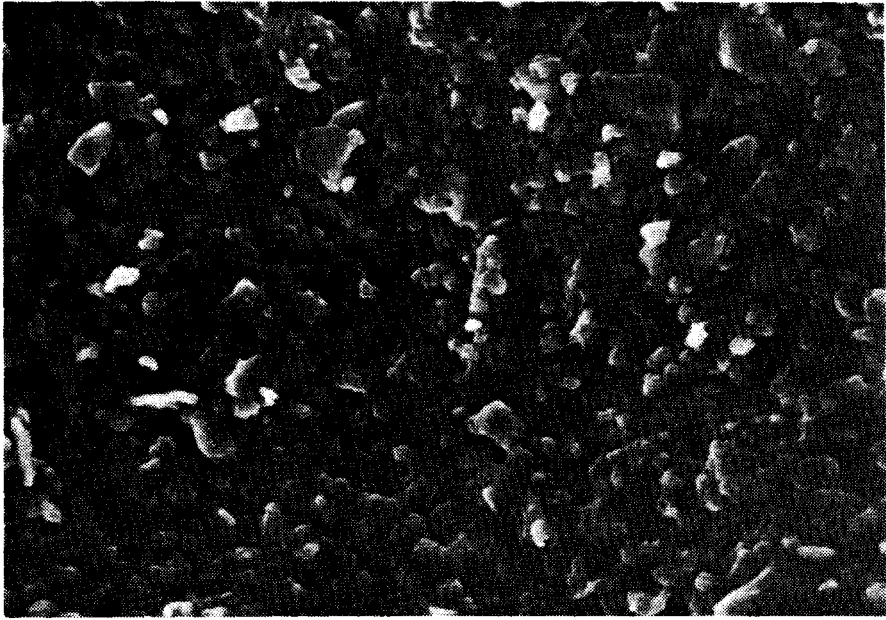


写真 6. 泥皮の走査型電子顕微鏡写真
(印旛沼泥皮内側面, $\times 2,000$)

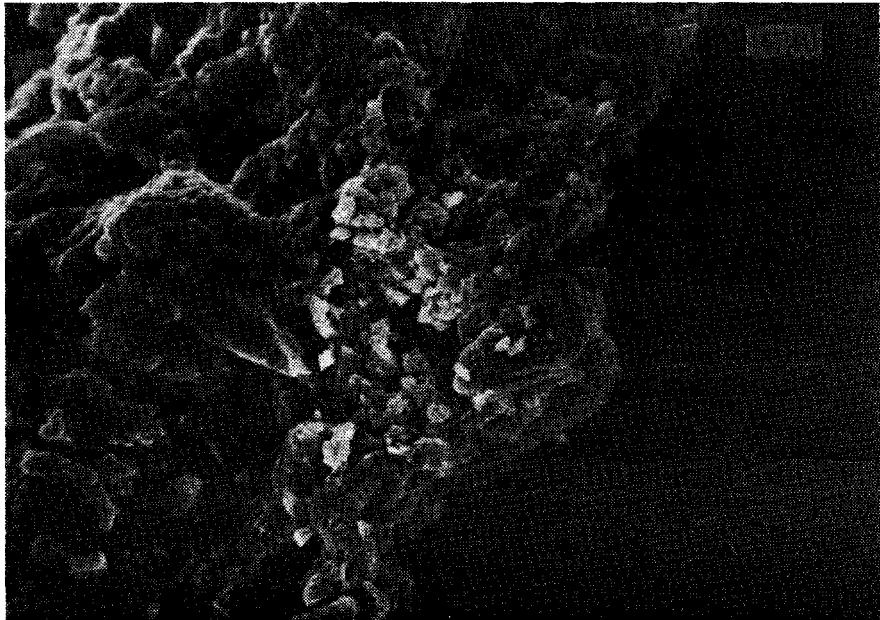


写真 7. 同 上 (印旛沼泥皮断面, $\times 2,000$)

表3. 土壤別産卵・孵化数 I

単位：個（♀5, ♂3/鉢）

採集地点	土地利用	地 形	飼 育 鉢 番 号			平 均	標 準 偏 差
			1	2	3		
山梨県富竹新田	水 田	釜無川沖積扇状地	273	160	112	182	264-99
千葉県印旛沼畔	水 田	印旛沼畔沖積低地	25	9	6	13	24-3

表4. 土壤別産卵・孵化数 II

単位：個（♀5, ♂2/鉢）

採集地点	土地利用	地 形	飼 育 鉢 番 号					平 均	標 準 偏 差
			1	2	3	4	5		
山梨県富竹新田	水 田	釜無川沖積扇状地	120	100	91	86	14	82	123-42
福島県 滝 根	牧草地	石灰岩山地	31	17	16	2	1	13	26-1

表2. 走査電顕による泥皮，土壌の構成粒子の径 単粒〔上段〕および単粒+団粒〔下段，カッコ内〕

土壌採集場所	サンプル	倍率	計測土粒数	単粒率	計測粒径範囲	うち高濃度粒径範囲*	最多濃度の粒径
富竹(山梨県)	泥皮1	2,300	72 (78)	92.3%	0.9-18.3 μm (0.9-18.3)	1.3-5.7 μm (1.3-6.1)	1.7, 3.4 μm (1.7, 3.4)
	泥皮2	580	272 (288)	94.4	1.7-34.5 (1.7-34.5)	3.4-12.1 (3.4-12.1)	5.1, 6.9 (6.9, 5.1)
	泥皮2	2,000	143 (155)	92.3	0.5-17.0 (0.5-19.5)	1.0-7.0 (1.5-8.0)	2.5 (2.5)
	泥皮3	2,000	103 (115)	89.6	1.0-14.0 (1.0-18.0)	1.0-4.5 (1.0-4.5)	2.0 (2.0)
	泥皮4	500	85 (85)	100	1.7-27.5 (1.7-27.5)	3.4-10.3 (3.4-10.3)	5.1 (5.1)
	泥皮4	2,000	153 (173)	88.4	0.5-25.5 (0.5-25.5)	2.0-5.0 (2.0-4.5)	2.0 (2.0)
	泥皮5	2,000	150 (173)	86.7	1.5-19.0 (1.5-19.0)	1.5-6.0 (1.5-5.0)	2.0 (2.0)
	土壌1	2,000	149 (149)	100	1.0-25.5 (1.0-25.5)	1.0-4.5 (1.0-4.5)	2.0 (2.0)
	土壌2	2,000	172 (205)	83.9	1.0-20.0 (1.0-20.0)	1.0-4.0 (1.0-5.0)	2.0 (2.0)
印旛沼(千葉県)	泥皮1	2,000	91 (192)	47.4	1.0-34.5 (1.0-34.5)	1.0-6.5 (1.0-5.0)	2.5 (1.5, 5.5)
	泥皮2	2,000	120 (207)	58.0	0.5-16.0 (0.5-16.0)	0.5-5.0 (1.5-4.5)	1.5 (1.5)
	泥皮3	2,000	147 (225)	65.3	0.5-19.0 (0.5-19.0)	1.0-3.5 (1.0-3.5)	1.5 (1.5)
	土壌1	2,000	17 (68)	25.0	(1.5-24.0)	(1.0-4.5)	(3.5)
滝根(茨城県)	土壌1	2,000	98 (193)	50.8	0.5-30.0 (0.5-30.0)	1.0-3.5 (1.0-3.0)	2.0 (2.0)

* 全計測粒径の80%以上を占める高濃度粒径範囲

薄い標本の作成は困難であり、土壌中に多いこれより細粒の物質は重なり合い光が透過せず計測できない。光学顕微鏡自体の倍率の限界（ $\times 1,000$ 以下）をもかんがみ、本法は今回の目的からみて限界があると考えた。

透過電顕法では正確な径の測定ができるが、分散方法に問題があり、実際の計測には不適であった。

走査電顕法では、最も容易に泥皮1個ずつ、破壊せず構造のまま、団粒や単粒の区別や、粗粒より細粒に到るあらゆる粒径を計測できる。また硅藻と各種無機鉱物片を形態から識別同定し得る。しかも手技は比較的容易である。ただ、表面に露出しているものしか計測できず、また計測値は実際の値より小さい傾向にある等の難点もあるが、現在では最良の方法であると考えて、泥皮の計測に用いた。

従来産卵実験にあたり、土壌のちがいがあるいは供試土壌の土性の違いによらず、飼育は可能であると考えられてきた（Ishii and Tsuda, 1951; 小宮ら, 1959その他）。しかしそれらの違いが影響するとした報告もみられる（松田, 1969; Davis, 1971; Dewitt 1952; Sandground and Moore, 1955; Wagner and Wong, 1956; van der Schalie and Davis, 1965; 同, 1968; Davis and Iwamoto, 1969）。筆者の既往の研究（二瓶, 1978a, bほか）で、カイの産卵や生育が特定の土壌型、土性に限定されていることが、初めて実験的に明らかにされた。また粒径別産卵実験と泥皮の走査電顕写真により、産卵は径 $37\sim 10\mu\text{m}$ の粒子を主とし、これに $10\mu\text{m}$ 以下の細粒子が混入したもの等が最適であることを明らかにした（二瓶, 1978a）。今回の硅藻法で得られた至適泥皮（富竹土壌による）の粒径は $9\sim 30\mu\text{m}$ で、この値は前回得られた粒径範囲内にあるが、やや粗粒の傾向を示している。

今回の採集土壌を供しての産卵実験とその際得られた泥皮の観察によって、至適な土壌泥皮の粒径は、団粒の少ない $1.0\sim 1.21\mu\text{m}$ を主とし、それ以上の粗粒が含まれていてもよいが、 $1.0\mu\text{m}$ 以下は必要ないことが分かった。一方泥皮に不適当な土粒は団粒が多く、かつ団粒を含めた全土粒が径 $3\sim 4\mu\text{m}$ 以下の粘土分のみでは、多量の孵化貝は得られぬことがわかった。

走査電顕法の開発により微量な微細粒子の径の計測が可能となり、今回得られた至適粒径範囲は、前回の結果より更に特定範囲に限定されていた。この範囲は、泥皮の中の卵の発育に適した通水性あるいは通気性を提供していると考えられるが、今後泥皮の化学性の卵発育に及ぼす影響を併せて検討し、泥皮の役割を解明して行きたい。なおこの結果は実験室内飼育の際の土壌の選択基準として重要であり、またカイの生息地の分布を考える上でも意義あるものとする。

IV. 要 約

ミヤリガイの生態、分布に影響を及ぼす土壌条件の中で、産卵時の卵周囲の泥皮を構成する粒子の径に着目し、微量土粒の径の測定法を開発し、至適粒径範囲を明らかにした。

①泥皮中の全硅藻を検鏡して、②泥皮薄片標本（泥皮の断面）を光学・鉱物顕微鏡で、③高周波により分散した土粒を透過型電子顕微鏡で、④泥皮の表面（内側面、断面、外側面）を走査型電子顕微鏡で計測した。その結果、第4の方法が、容易かつ正確に測定できることがわかった。

実験室内産卵実験と上記の走査電顕法による測定で、次の結果が得られた。甲府盆地内富竹土壌から得られた至適泥皮の土粒は、単粒が多く計測土粒の83%以上を占め、粒径は $1.0\sim 1.21\mu\text{m}$ を主と

し、中でも1.7~6.9 μm が多かった。産卵するが孵化率の低い印旛沼土壌からの泥皮は、単位が65.3%以下と少なく、主として1.5~3.5 μm の粒径で、中でも約1.5 μm が多かった。以上の結果から、泥皮構成粒子の至適範囲は既往の結果より更に特定範囲に限定されていることがわかった。

本研究を行なうにあたり、終始ご指導いただいたお茶の水女子大学地理学教室浅海重夫教授、東京大学医科学研究所寄生虫研究部田中寛教授に対し、また硅藻の同定をお願いした横浜市公害研究所福島修一氏に深く感謝の意を表します。また小論を1980年春に退官されるお茶の水女子大学地理学教室浅井辰郎教授に献呈致します。

参 考 文 献

- 1) Davis, G.M. (1971) : Mass cultivation of Oncomelania (Prosobranchia: Hydrobiidae) for studies of Schistosoma japonicum. Biomedical report (406th Medical Laboratory), 19, 85-161.
- 2) Davis, G.M. and Iwamoto, Y. (1969) : Factors influencing reproductivity of cultures of Oncomelania hupensis nosophora (Prosobranchia: Hydrobiidae). Amer. J. Trop. Med. Hyg., 18, 629-637.
- 3) Dewitt, W.B. (1952) : Pomatiopsis lapidaria, its occurrence in the Washington, D.C. and its laboratory rearing in comparison to that of Oncomelania spp. J. Parasit., 38, 321-326.
- 4) Ishii, N. and Tsuda, E. (1951) : Possibility on the spreading of Oncomelania nosophora, the intermediate snail host of Schistosoma japonicum, in other areas besides its own habitats. Yokohama med. Bull., 2, 366-375.
- 5) 小宮義孝・小島邦子・小山 力 (1959) : ベトリシャーレによる Oncomelania のかんたんな飼育法. 寄生虫誌, 8, 712-724.
- 6) 松田 肇 (1969) : 日本住血吸虫症に関する実験的研究, 第1報, ミヤイリガイの実験室における飼育繁殖方法について. 寄生虫誌, 18, 523-529.
- 7) 二瓶直子 (1978a) : ミヤイリガイの繁殖条件に関する研究, 1. 産卵に及ぼす土壌型, 土壌母材, 腐植含量の影響. 寄生虫誌, 27, 345-355.
- 8) 二瓶直子 (1978b) : ミヤイリガイの繁殖条件に関する研究, 2. 産卵に及ぼす土壌の粒径, 土性の影響. 寄生虫誌, 27, 463-472.
- 9) Sandground, J.H. and Moore, D.V. (1955) : Notes on the rearing of Oncomelania spp. in the laboratory. J. Parasit., 41, 109-113.
- 10) van der Schalie, H. and Davis, G.M. (1965) : Growth and stunting in Oncomelania (Gastropoda: Hydrobiidae). Malacologia, 3, 81-102.

- 11) van der Schalie, H. and Davis, G. M. (1968) : Culturing *Oncomelania* snails, (Prosobranchia: Hydrobiidae) for studies of oriental schistosomiasis. *Malacologia*, 6, 321-367.
- 12) Wagner, E.D. and Wong, L.W. (1956) : Some factors influencing egg laying in *Oncomelania nosophora* quadrasi, intermediate hosts *Schistosoma japonicum*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 5, 544-561.