

マガキ中腸腺の鑄型作成の試み

山元憲一*・半田岳志*・近藤昌和*

Trial of Corrosion Casting to the Digestive Diverticula of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*

Ken-ichi Yamamoto*, Takeshi Handa*, and Masakazu Kondo*

The digestive diverticula and the alimentary canal of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, were cast with a synthetic resin. The resin was prepolymerization methyl methacrylate (Mercox CL-2R) containing about 10 % Mercox MA as a hardener. The casting method would be useful similarly to the histological method for the observation of whole alimentary canal and digestive diverticula.

1 緒言

軟体動物の栄養吸収は中腸腺で行っていることが知られている。中腸腺への入口は、胃の構造を明らかにしている多くの報告の中で、胃の各部位に直接開口している様子が示されている¹⁻⁴⁾。中腸腺の形については、組織標本の観察から、樹枝状に広がっている様子が図示されている^{5,6)}。Nakazima⁶⁾は、軟体動物の中腸腺の形を比較検討している。しかし、これらはいずれも二次元的に図示されたもので、中腸腺の形およびそれと消化管との位置関係などを立体的に把握することが難しい。そこで、それらの立体的な構造を的確に表現するためには、鑄型の作成が最も有効な方法の一つである。Yonge⁷⁾はマガキの消化管のゼラチンの鑄型を作成し、胃およびそれに続く消化管の一部を立体的に図示している。しかし、中腸腺については、その入口付近まで、細部にわたる観察はなされていない。

著者らは、マガキ, *Crassostrea gigas*を用いて、半重合メチルメタクリレートを使った「脈管鑄型作成法」⁸⁾を参考にして中腸腺および消化管全体の鑄型の作製を試みたので、その方法と鑄型標本の紹介、および中腸腺の鑄型標本と組織像や胃を中心とした内臓の断面像との比較検討を行ったので報告する。

2 材料および方法

実験には、鑄型および胃の断面像の作成の場合には、殻高 125 ± 11 mm(平均値 \pm 標準偏差、以下同様に表す)、体重 135 ± 16 gの大きいマガキをそれぞれ25個体および10個体用いた。組織像の場合には、殻高 27 ± 3 mm、体重 2.5 ± 0.6 gの小さいものを5個体用いた。大きいものは広島県の養殖場より入手し、小さいものは水産大学校に隣接した海岸で採取した。いずれも、入手後、 $0.5 \mu\text{m}$ 以上の粒子を取り除いた海水を 1 l/min 注入した状態で5~10日間蓄養して絶食させ、実験に供した。

鑄型

マガキを 0.7 M/l の塩化マグネシウム水溶液に約60分間浸漬し、殻を開けさせて左殻を取り除いた後、唇弁が露出するように外套膜を切除した。濾過海水を満したポリエチレン細管(外径約1mm、長さ20cm、Hibiki No.3)を口から1cm挿入し、この細管を介して樹脂を注入した。ポリエチレン細管の先端は炎で炙って柔らかくして膨らみ(Fig. 1-A)を付け、注入時の同細管の脱落および樹脂の漏れを防止した。注入は、中口のプラスチックシリンジ(5ml、Top)で1分間に約 0.8 ml の速さで行った。注入量は、 3.0 ml とした。注入時には、 $0.2 \sim 0.4 \text{ ml}$ 注入すると

2002年9月2日受付. Received Sep. 2. 2002.

* 水産大学校生物生産学科(Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagatohmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

肛門から樹脂が流出し始めた。注入後、ポリエチレン細管からの樹脂の流出を防ぐために、同細管の一端を炎で炙って封入し、室温で約1時間放置して樹脂を硬化させた。次いで、恒温室で約50℃に維持した20%水酸化ナトリウム水溶液に6時間浸漬して肉質部を溶かし、水道水で洗って除去した。この操作を数回繰り返して、最後に十分に水洗した後、鑄型標本を水道水に浸して冷蔵保存した。

鑄型作成にはメルコックスCLシリーズを用いた。主剤には、特に赤色のものを選んだ。標本作製直前に、主剤(MERCOX CL-2 R、応研商事) 1 ml当り硬化剤(MERCOX MA、応研商事)を約0.1g加え、空気泡が混入しないように注意してガラス棒で良く混合させた。混合すると約5分後から硬化し始めるので、注入の操作はそれまでに完了させた。鑄型作成については、粘性を低下させるために加えるメタクリル酸メチルの添加についても検討した。

胃の断面像

観察は、Davidson液(エタノール:ホルマリン:氷酢酸:蒸留水=66:44:23:67)⁹⁾で固定後、安全剃刀で胃の部分を中心にして軟体部を切り開いて行った。

組織像

観察は、山元ら¹⁰⁾と同様にして、Davidson液で固定後、殻を除去し、常法に従って一団丸ごとのパラフィン切片(6 μm)を作成し、アザン染色して行った。

3 結果および考察

樹脂は、食道から肛門まではFig. 1 (A~L)に示したように比較的容易に注入することができた。中腸腺については、樹脂が胃の部分をはほぼ完全に覆うように展開した場合(Fig. 1-A, B)やそうでない場合など様々であった。中腸腺の管(Fig. 2)は、一定の周期(潮汐周期及び日周期)で開口や閉鎖を繰り返すと報告されている¹¹⁻¹⁵⁾。本研究では、時刻に関係なく樹脂の注入を行ったので、中腸腺の先端まで樹脂が注入された場合には、丁度中腸腺の管の開いている状態の時に注入の操作を行い、そうでない場合には中腸腺が閉じていた可能性が考えられる。合わせて、樹脂の注入時の圧力や注入前の絶食による中腸腺内の様子なども関係していたと考えられる。しかし、中腸腺への樹脂の入り具合の悪い個体では、その程度に応じて、胃の形、中腸腺の胃の表面での開口部、中腸腺が樹枝状に広がって

いる様子、胃と中腸および晶桿体囊との位置関係などを観察することが可能であった。

鑄型の色調は、胃の部分では概ね赤色を呈し、中腸腺の部分ではピンク色を呈していたが、腸では部分的に黄色みを帯びた白いまだらを示す場合(Fig. 1-A~G, I and J)が多く認められた。中には、胃および腸が全体にピンク色を呈す場合(Fig. 1-K)や黄色を呈す場合(Fig. 1-L)も出現した。赤色の樹脂を用いたにも関わらず、種々の色調を示した原因についてははっきりしない。しかし、このような色調の違いも各部位の観察を容易にしていた。

消化管への樹脂の注入は、マガキを塩化マグネシウム水溶液に浸漬した後の生きた状態で行ったが、Davidson液で固定した個体についても試みた。しかし、固定後の場合には、樹脂の注入がうまくいかず、鑄型標本の作製ができなかった。このことから、中腸腺の先端まで樹脂が行き渡る場合には、中腸腺の入り口から先端にかけて展開している枝上の管の繊毛(Fig. 2)の働きも関与していることが推測される。

樹脂の粘性を調節するためのメタクリル酸メチルの添加については、その量を種々変えて検討した。しかし、添加した場合にはいずれも水酸化ナトリウム処理後、鑄型が多数の小片に砕けた状態を呈し、Fig. 1に示したような一体となった標本を得ることができなかった。また、青色の樹脂を用いた場合には、標本の全体が黒っぽくなり、赤色の樹脂に比較してコントラストが小さく、各部位の観察には不適であった。

一方、鑄型標本の全体像を概観すると、樹脂が良く入ったと考えられる標本では、中腸腺が胃を覆っていた(Fig. 1-A, B)。このような中腸腺と胃の関係は、胃を中心とした組織像(Fig. 3)や断面像(Fig. 4)でみられる胃と中腸腺との位置関係と良く一致していた。一方、消化管は非常に短い個体(Fig. 1-D)や長いもの(Fig. 1-K)、また巻き方が微妙に異なる個体など種々出現した。これは、マガキの軟体部の形が殻の形に応じて異なることが一つの要因であると考えられる。

樹脂の入り具合の異なる個体で胃の部分拡大してみると、Fig. 5に示したように、食道、food sorting caecum、胃楯、中腸腺(DD 1~4)、中腸への開口部、中腸、晶桿体囊や晶桿体囊と中腸との間の連絡部位(SC)などが観察された。また、中腸腺への樹脂の入り具合が悪かった図(Fig. 5-B, C)は、Yonge⁷⁾がゼラチンの鑄型で観察しているものと概ね同じ像を示していた。しかし、中腸腺は、Yonge⁷⁾の図ではDD 1とDD 2に相当する2か所

が示されているが、本研究では Fig. 5-C に示すように大きく見て胃の4か所から枝分かれして展開している様子が確認された。一方、固定標本で胃を開いて見ると、中腸腺への開口部はDD1では5箇所 (Fig. 4-E)、DD2では1箇所 (Fig. 4-B) となっていた。しかし、DD3およびDD4については確認できなかった。中腸および晶桿体囊の内面には胃を開いた場合にはリング状の襞が見える (Fig. 4-A) が、鑄型ではそのような形状が認められなかった (Fig. 5-B、C、D)。しかし、中腸および晶桿体囊の内面の襞は固定する過程での産物かどうかを確認する必要はあると考えている。中腸、晶桿体囊や晶桿体囊と中腸との間の連絡部位は胃を開いた場合 (Fig. 4-C、F) と鑄型 (Fig. 5-B、C、D) とで同様な形を呈していた。これらのことから、本研究での鑄型標本は、胃および胃の周辺の部位の空所を比較的忠実に表していると考えられる。

一方、中腸腺については、Fig. 6 に示したように、その先端部まで樹脂が十分に入った場合 (Fig. 6-A) と先端部分に入っていないもの (Fig. 6-G~L) と比較すると中腸腺が枝別れして胃の周囲に展開している様子を確認することができた。また、先端部まで樹脂が十分に入った場合の先端部を採取して拡大すると、Owen⁵⁾ や Nakazima⁶⁾ が図示しているように、盲嚢になっている先端部とそれへの枝別れの様子を確認することができた (Fig. 6-B、C、E)。

以上のことから、本研究で紹介した鑄型作成の方法は、ほぼ忠実に消化管の全容、中腸腺の全容および中腸腺の微細な部分までその形状を立体的に表すことが可能であることが明らかとなった。

4 要約

マガキ, *Crassostrea gigas* を用いて、中腸腺を中心に消化管全体の鑄型標本の作製を試みた。樹脂には、主剤 (MERCOS CL-2 R、応研商事) 1 ml 当り硬化剤 (MERCOS MA、応研商事) を約0.1g加えたものを用いた。作成した鑄型標本と胃の周囲の組織像と比較検討した結果、本研究で紹介した鑄型作成法は中腸腺および消化管全体の観察に耐える標本の作製が可能であると判断した。

文 献

- 1) Purchon, R. D. : The stomach in the filibranchia and pseudolamellibranchia. *Proc. Zool. Soc., London*, **129**, 27-60 (1957).
- 2) Purchon, R. D. : The stomach in the Eulamellibranchia; Stomach type IV. *Proc. Zool. Soc., London*, **131**, 487-525 (1958).
- 3) Purchon, R. D. : The stomach in the Eulamellibranchia; Stomach type IV and V. *Proc. Zool. Soc., London*, **135**, 431-489 (1960).
- 4) Owen, G. : Observations on the stomach and digestive diverticula of the lamellibranchia. II. The Nuculidae. *Quart. J. micr. Sci.*, **97**, 541-567 (1955).
- 5) Owen, G. : Observations on the stomach and digestive diverticula of the lamellibranchia. I. The Anisomyaria and Eulamellibranchia. *Quart. J. micr. Sci.*, **97**, 517-537 (1955).
- 6) Nakazima, M. : On the structure and function of the mid-gut gland of Mollusca with a general consideration of the feeding habits and systematic relation. *Jpn. J. Zool.*, **11**, 469-566 (1956).
- 7) Yonge, C. M. : Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **14**, 295-386 (1926).
- 8) 大谷修: 脈管鑄型作成法. 医学・生物学領域の走査電子顕微鏡技術 (田中敬一編). 講談社, 東京, pp.119-131 (1993).
- 9) Bell, T. A. and D. V. Lightner : A handbook of normal Penaeid shrimps. World aquaculture society, USA, pp.2.
- 10) 山元憲一・近藤昌和・半田岳志・林安章 : アコヤガイの鰓換水に及ぼすホルマリンの影響. 水産増殖, **49** (4), 461-467 (2001).
- 11) McQuiston, R. W. : Cyclic activity in the digestive diverticula of *Lasaea rubra* (Montagu) (Bivalvia : Eulamellibranchia). *Proc. malac. Soc. Lond.*, **38**, 483-492 (1969).
- 12) Morton, B. : Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. II. Correlation of the rhythms of adductor activity, feeding, digestion and excretion. *Proc. malac. Soc. Lond.*, **38**, 401-414 (1969).
- 13) Morton, B. : A note on the cytological structure and function of the digestive diverticula of

1) Purchon, R. D. : The stomach in the filibranchia and pseudolamellibranchia. *Proc. Zool.*

- Mocoma balthica* correlated with the rhythm of the tide. *Malacological review*, **3**, 115-119 (1970).
- 14) Morton, B. and R. W. McQuiston : The daily rhythm of activity in *Teredo navalis linnaeus* correlated with the functioning of the digestive system. *Forma et functio*, **7**, 59-80 (1974).
- 15) Morton, B. : The biology, ecology and functional aspects of the organ feeding and digestion of the S.E. Asian mangrove bivalve, *Enigmonia aenigmatica* (Mollusca: Anomiacea). *J. Zool., Lond.*, **179**, 437-466 (1979).

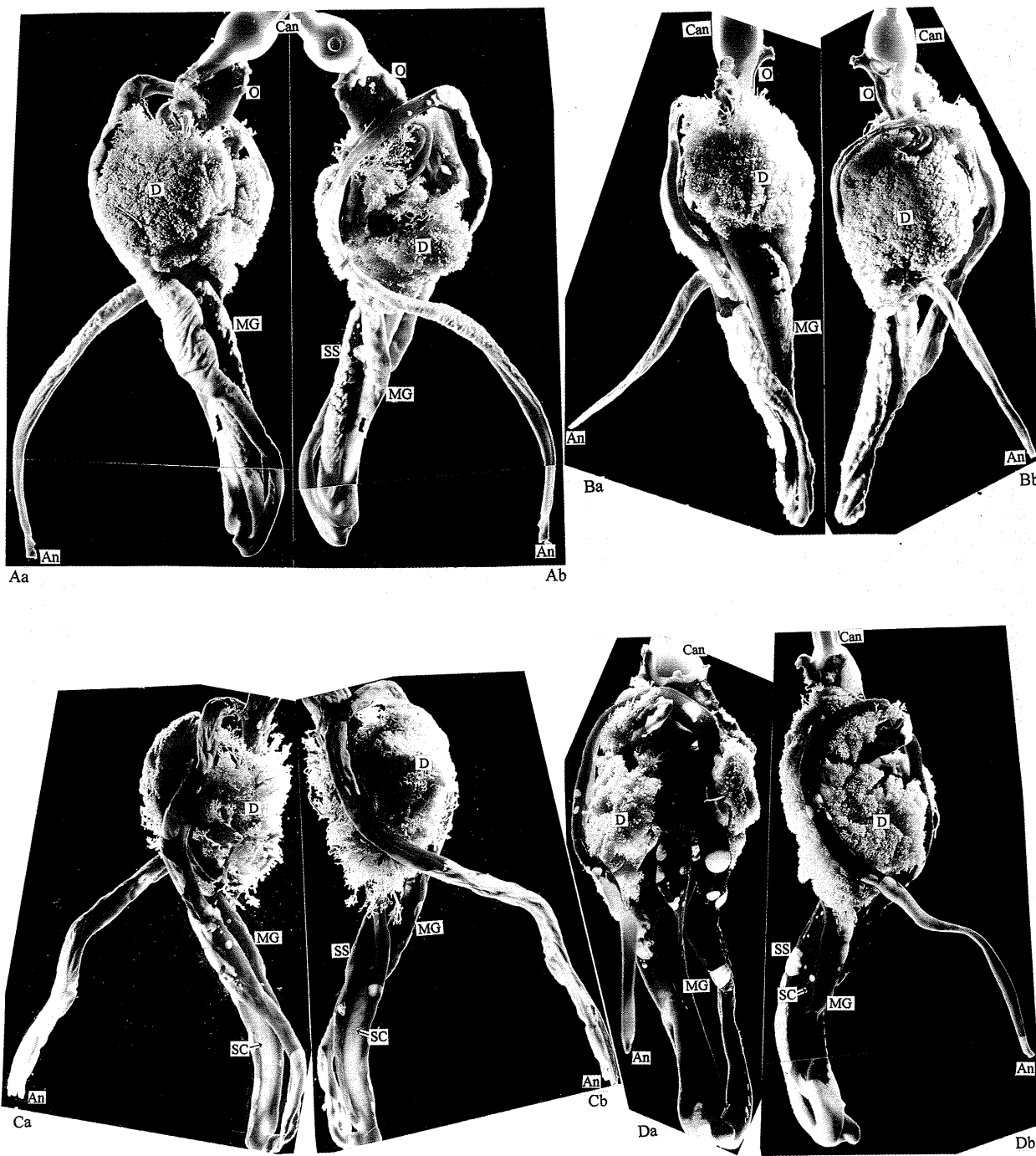


Fig. 1. Twelve cases (A~L) of corrosion cast of the digestive organ of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, from ventral (a) and dorsal aspects (b). Can: cannulation tubing, O: oesophagus, FC: food sorting caecum, GS: gastric shield, D: digestive diverticula, DD1~4: duct of digestive diverticula, OMG: opening of mig-gut, SS: style-sac, MG: mid-gut, SC: slit connecting mid-gut and style-sac, An: anus. Bar=10mm.

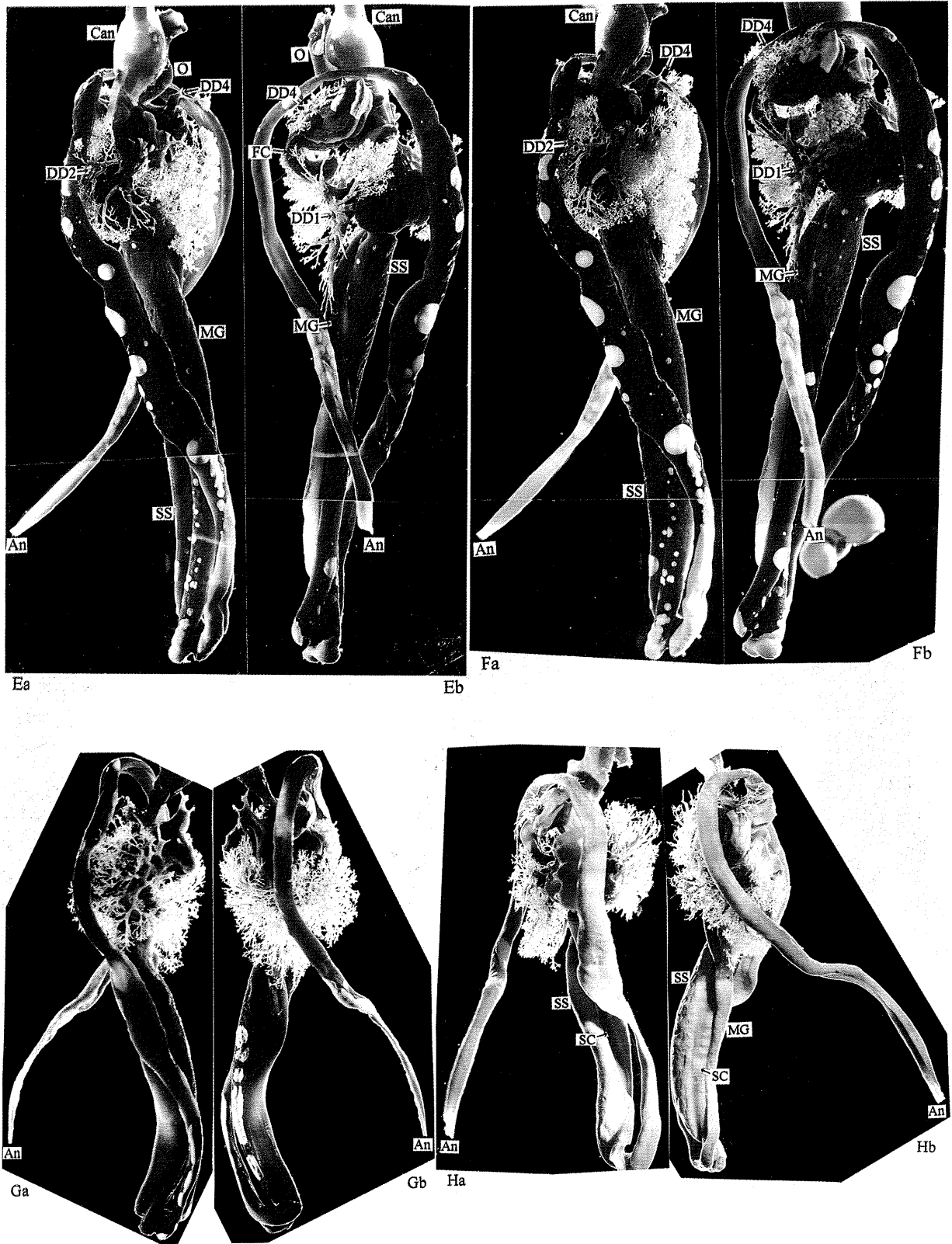


Fig. 1. (E~H)

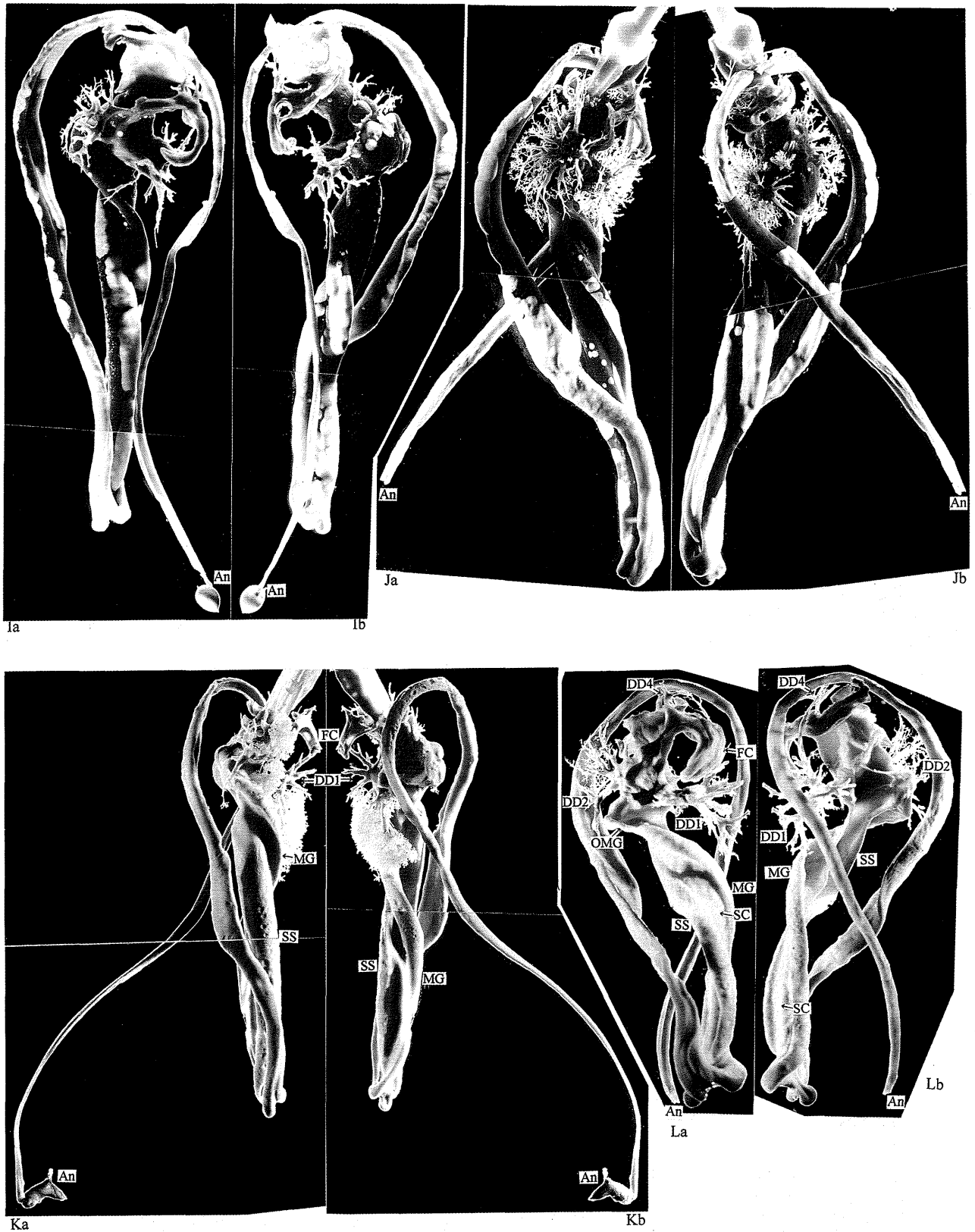


Fig. 1. (I~L)

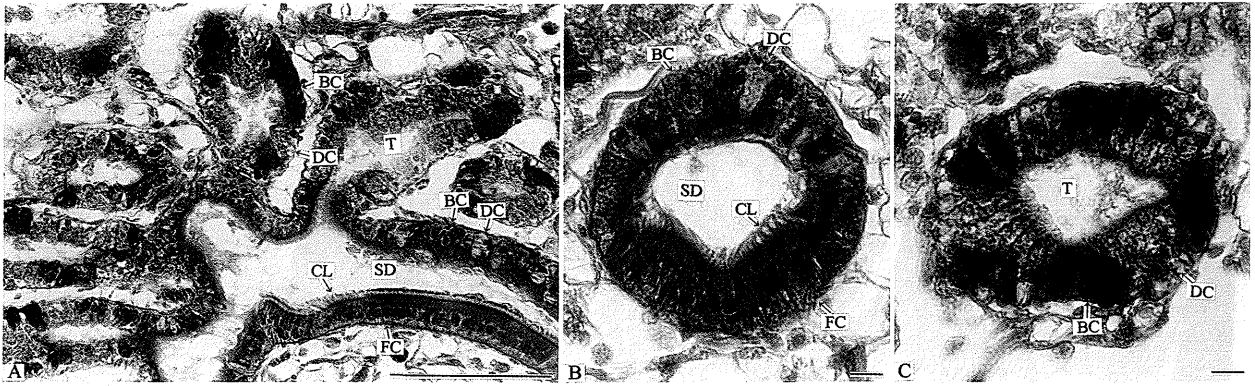


Fig. 2. Longitudinal section (A) and cross sections (B and C) of the digestive diverticula and ducts of digestive diverticula of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. T: tube, SD: secondary duct, CL: cilia, FC: flagellated cells, DC: digestive cells, BC: darkly staining cells. Bar in A = 100 μ m, and bars in B and C = 10 μ m.

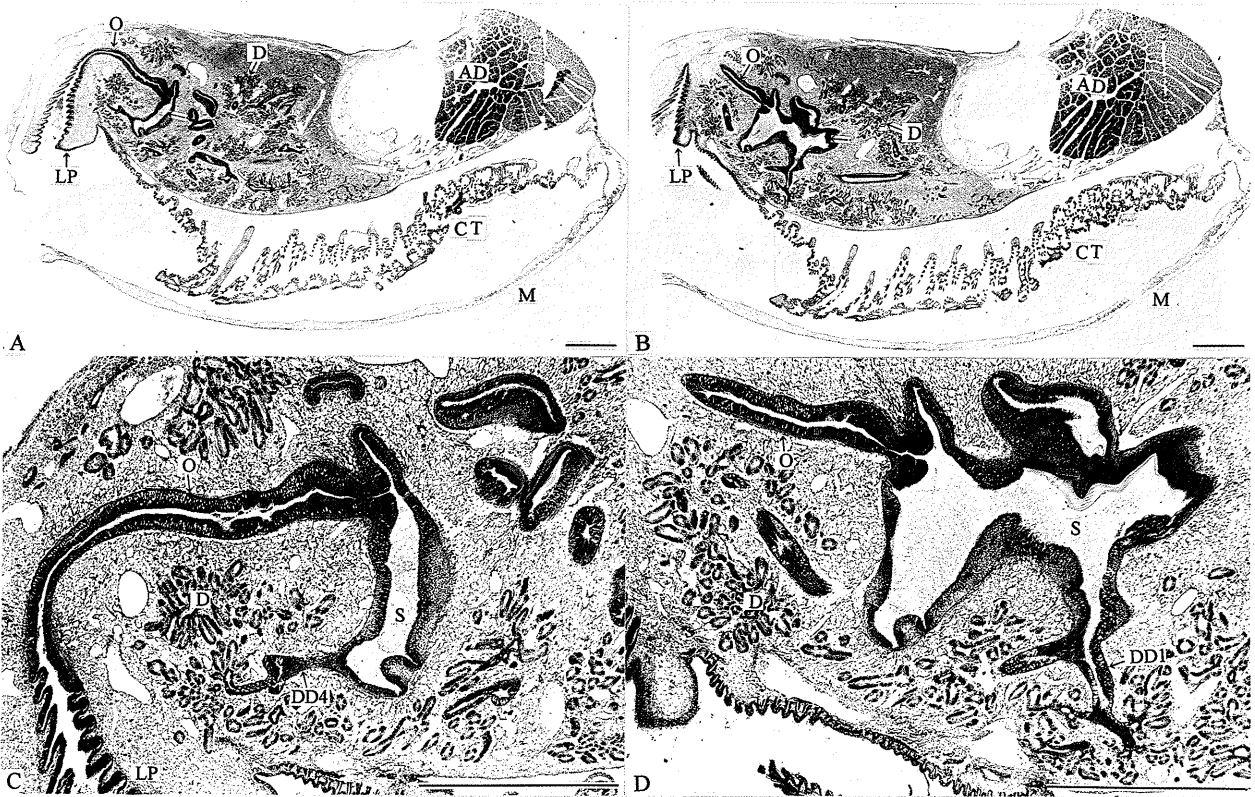


Fig. 3. Longitudinal sections of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. LP: labial palp, O: oesophagus, S: stomach, D: digestive diverticula, DD3 and DD1: duct of digestive diverticula, AD: aductor, CT: ctenidium, M: mantle. Bars = 1mm.

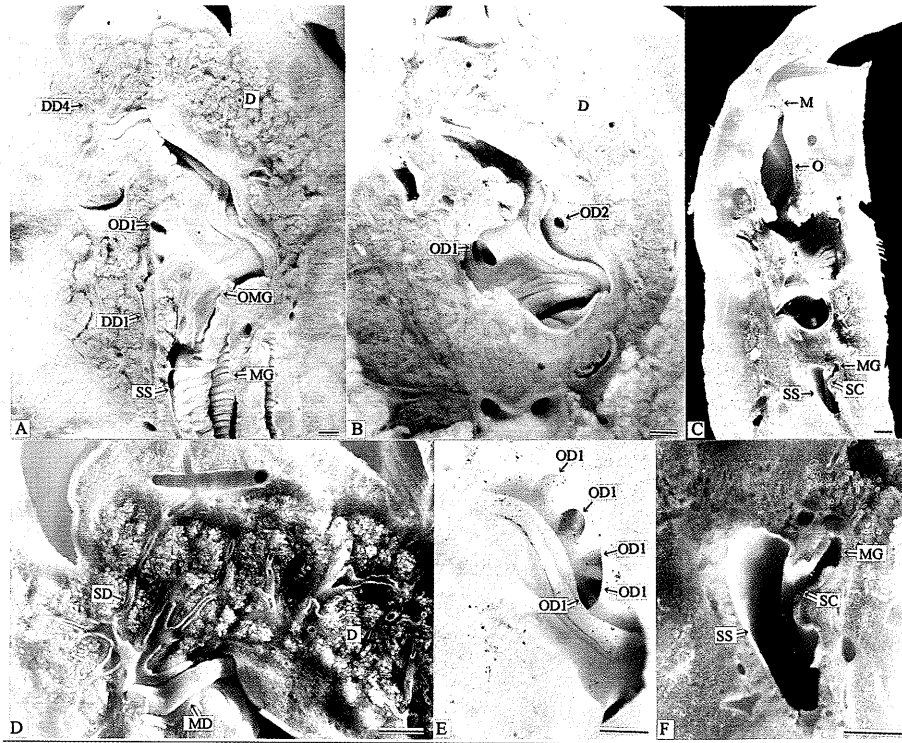


Fig. 4. Longitudinal sections at the stomach of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. M: mouth, O: oesophagus, D: digestive diverticula, DD1 and DD4: duct of digestive diverticula, MD: main duct, SD: secondary duct, ODI and OD2: opening of digestive diverticula, OMG: opening of mig-gut, SS: style-sac, MG; mid-gut, SC: slit connecting mid-gut and style-sac. Bars=1mm.

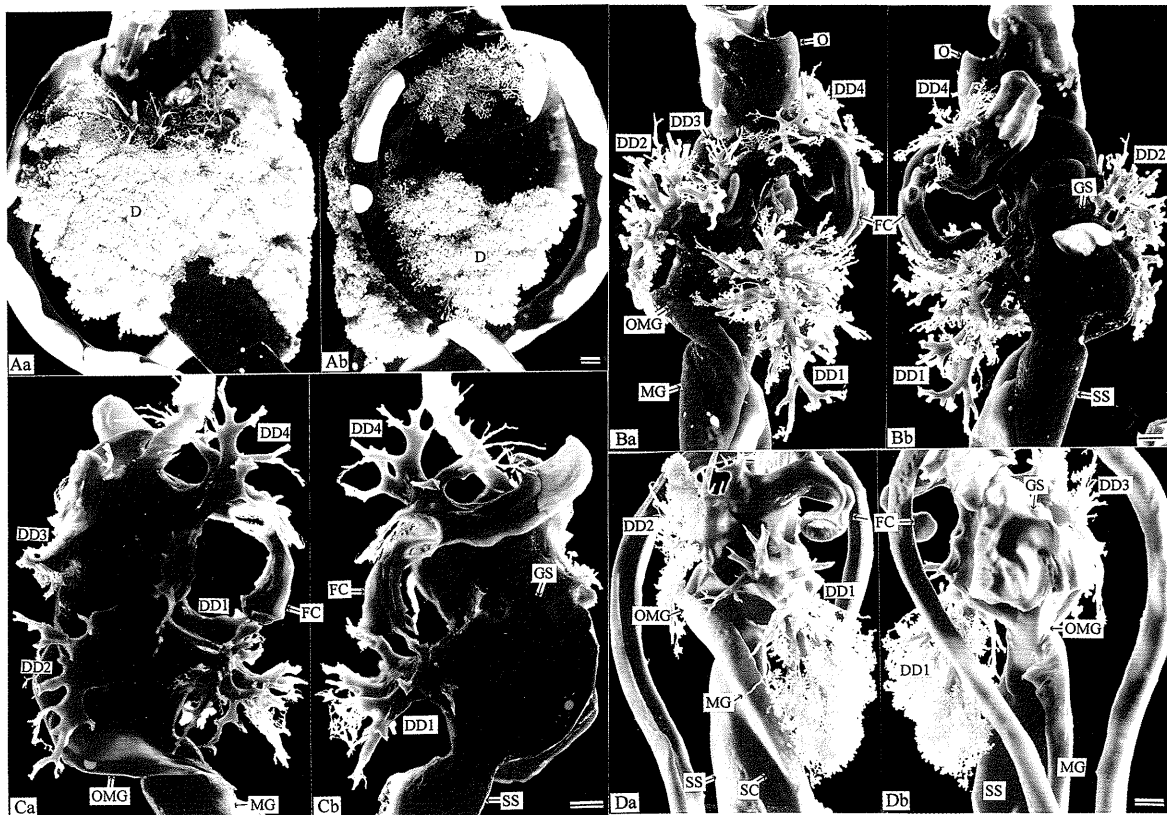


Fig. 5. Corrosion casts of the digestive diverticula and ducts of digestive diverticula of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, from ventral (a) and dorsal aspects (b). O: oesophagus, FC: food sorting caecum, GS: gastric shield, D: digestive diverticula, DD1~DD4: duct of digestive diverticula, OMG: opening of mig-gut, SS: style-sac, MG; mid-gut, SC: slit connecting mid-gut and style-sac. Bars=1mm.

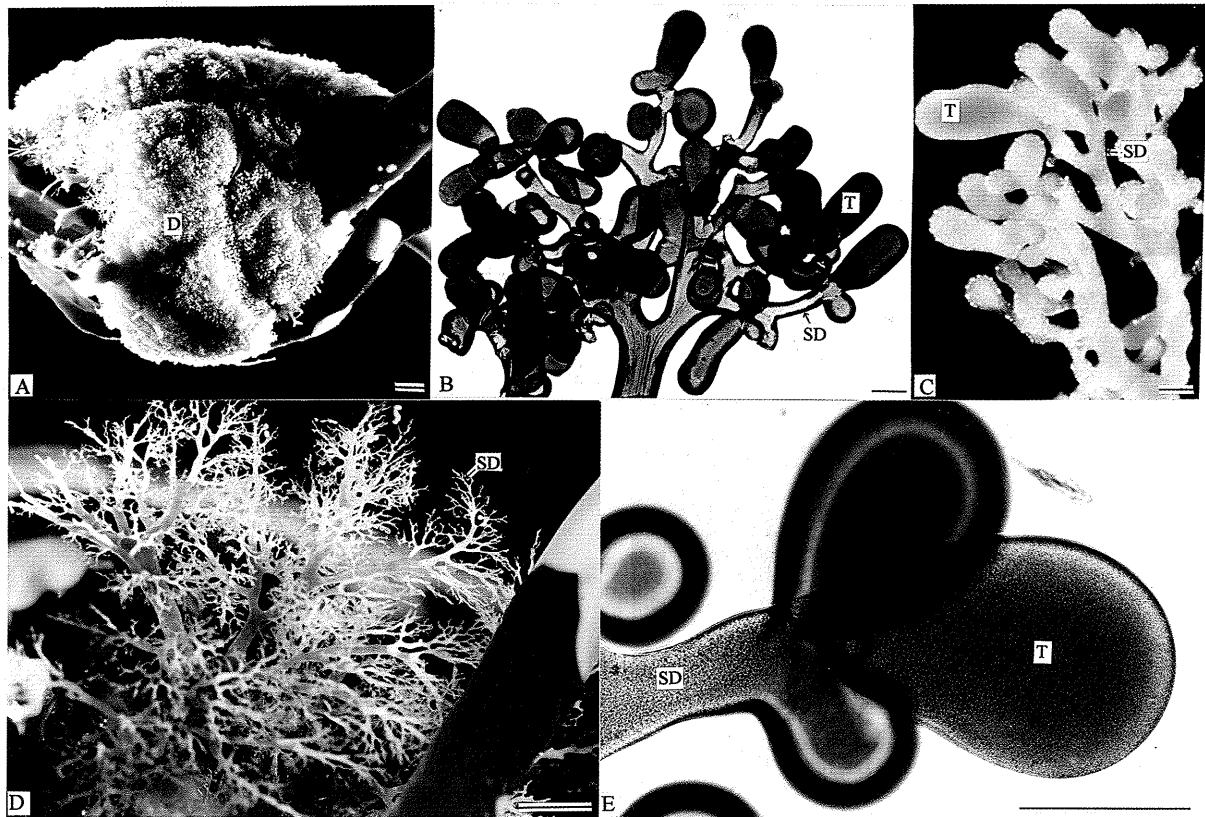


Fig. 6. Corrosion casts of the digestive diverticula and ducts of digestive diverticula of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. D: digestive diverticula, T: tube, SD: secondary duct. Bars in A and D=1mm, Other bars=100 μ m.