

笠貝の発生過程と授業での活用

*出口 竜 作

Developmental Processes in Marine Limpets and the Use for Biology Education

DEGUCHI Ryusaku

Abstract

Limpets (Mollusca: Gastropoda) are some of the most abundant animals in the intertidal zone of rocky shores. Here I report methods for collecting and culturing the limpets, especially *Nipponacmea fuscoviridis*, and describe developmental processes in this species. Adults of *N. fuscoviridis* collected from May to November had ripe gonads. They could be maintained for 1-2 months without food at room temperature. Immature oocytes obtained from ovaries were induced to mature by ammonia treatment. Following insemination, the ammonia-treated mature oocytes formed the first and second polar bodies, cleaved, and developed to veliger larvae within 1 day. *N. fuscoviridis* may be one of the most convenient animals for observing the developmental processes in the classroom.

Key words : Mollusca (軟体動物)

Experimental Animal (実験動物)

Sexual Reproduction (有性生殖)

Oocyte Maturation (卵成熟)

Fertilization and Development (受精と発生)

Biology Education (生物教育)

1 はじめに

潮がひいている時間に海に行き、潮間帯の岩盤やテトラポッドの表面をじっくりと観察してみる。笠型の貝殻を持った貝がたくさん張り付いていることに気付く。笠貝とよばれる貝たちである。これら笠貝は、分類学上は二つのグループに大別される。一つ目は、始祖腹足亜綱笠型腹足上目に属し、軟体動物腹足類の中で最も原始的だと考えられているグループである(白山, 2000)。このグループの笠貝は、鰓によって呼吸し、雌雄異体で体外受精を行う。二つ目は、直腹足亜綱異鰓上目有肺目に属し、肺のような呼吸器官を持って空

気中から酸素を取り入れているグループである。こちらのグループの笠貝は、雌雄同体で交尾による体内受精を行う。マイマイ(カタツムリ)やナメクジのなかまでである。二つの異なる分類群の貝たちが、異なる進化過程を経て似たような笠型の貝殻を進化させ、潮間帯での生活に適応したと考えられている(岩崎, 1999)。

雌雄異体で体外受精を行う笠貝は(これ以降、こちらのタイプの笠貝のみを取り上げる)、受精・発生過程を観察するための材料として、100年以上も昔から用いられてきた(Loeb, 1905; Wolfsohn, 1907)。メスの笠貝の卵巣から取り出した卵は未成熟な状態にあ

* 理科教育講座

り、精子を受容しても発生を開始することはできない (Guerrier et al., 1986)。一方、このような未成熟卵をアルカリ海水 (Loeb, 1905; Wolfsohn, 1907) やアンモニアを含むアルカリ海水 (Guerrier et al., 1986; Gould et al., 2001) で処理すると減数分裂が開始され、第一分裂中期まで進行した成熟卵を得ることができる。オスの笠貝の精巣から取り出した精子をこのような成熟卵に加えると、受精が起こり、発生が開始される。このように受精・発生を比較的容易に誘起できることから、笠貝はこの分野の研究材料として現在でも広く用いられている (Freeman, 2006; Deguchi, 2007)。

受精から形態形成に至る有性生殖の過程は、小学校理科第5学年、中学校理科第2分野、および高等学校生物Iの各段階での重要な学習事項となっている。また、「命の誕生」という点で、保健体育や道徳における学習とも密接に関連している。しかし、大学に入学してくる学生を対象にアンケート調査を実施すると、高等学校卒業までの間に受精・発生過程を実際に顕微鏡で観察したことがある学生はごくわずかであるという現状が明らかになる (図1)。この理由としては、学校現場において適当な実験材料を適当な時期に入手することが困難である点が第一に考えられる。また、材料を入手できた場合でも、それらを授業で使用するまで飼育・維持することが、学校現場では難しいのかもしれない。

本稿では、クサイロアオガイをはじめとした笠貝の

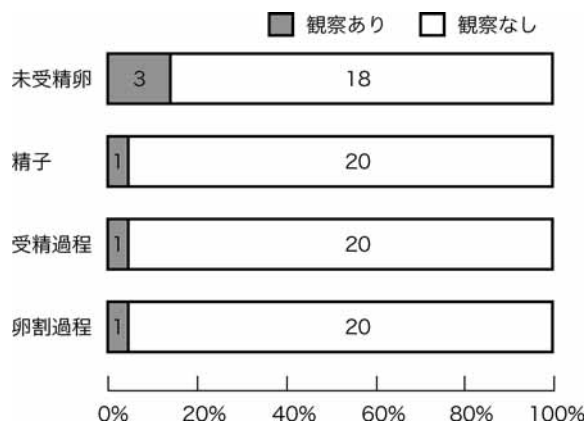


図1 顕微鏡観察に関するアンケート調査の結果。宮城教育大学自然環境専攻の2年生(平成18年度入学)の21名を対象に、入学時までに各項目の顕微鏡観察を行った経験があるかどうかを尋ねた。

採集法、飼育法、受精・発生過程などについて述べた上で、学校現場で用いる材料として適しているかどうかを考察する。

2 写真撮影

フィールドや研究室における笠貝の撮影には、デジタルカメラ (C-770またはC-3040 ZOOM, Olympus) を用いた。また、卵や精子、胚や幼生などの顕微鏡写真の撮影は、正立型の蛍光顕微鏡 (80i, Nikon) にデジタルカメラ (DS-5 M-L 1, Nikon) を接続して行った。

3 採集

本研究で用いた笠貝は、いずれも宮城県宮城郡七ヶ浜町の海岸で採集されたものである。干潮時にテトラポッド、岩盤、転石などに付着している個体を、金属製のヘラ (ホームセンター等で購入できる) を用いて剥がし取った。採集した個体を、蓋付きのプラスチック容器に現地の海水とともに入れ、容器を発泡スチロール製のクーラーボックスに入れて宮城教育大学に運んだ。気温の高い日には、クーラーボックスに保冷剤を入れ、採集中や輸送中における水温の上昇を防いだ。

七ヶ浜町の海岸には、私自身が識別できるだけでも8種の笠貝が生息している (表1)。貝殻の外側だけで容易に種を判別できるものもあるが、腹足部の色や貝殻の内側の色などを調べないと判別が難しいものもある。例えば、クサイロアオガイ (図2A) とコウダカアオガイ (図2B) は互いによく似ており、一見ただけでは区別が難しい。しかし、ヘラで剥がし取った個体の腹足部の側面を見ると、前者では特に色が付いていない (白い) のに対し (図3A)、後者では黒く縁どられていることが分かる (図3B)。また、軟体部を取り除き、貝殻の内側の色を観察すると、前者では青緑色、後者では白っぽい青色を帯びていることが多い (佐々木・奥谷, 1993)。慣れてくると、付着したままの状態でも、殻の模様や高さ、わずかな生息場所の違いなどによって両者を区別できるようになる。

表1に挙げた笠貝の中でも、クサイロアオガイ、コ

ウダカアオガイ、コガモガイは生息数が多く、潮間帯の比較的上部に付着しているため、干潮時刻から多少外れた時にも採集が可能である。また、これらは宮城県内の他の海岸でも普通に見られることが分かっている。

七ヶ浜町の海岸の笠貝が生殖巣を発達させている時期は、それぞれの種ごとに異なっている(表1)。クサイロアオガイやコガモガイは発達した生殖巣を長期にわたって持っているため、卵や精子を用いた観察・実験を行うには好都合である。

表1 七ヶ浜町の海岸で見られる笠貝と生殖時期

種	生殖巣の発達している時期
クサイロアオガイ <i>Nipponacmea fuscoviridis</i>	5～11月
コウダカアオガイ <i>Nipponacmea concinna</i>	9～11月
カスミアオガイ <i>Nipponacmea habei</i>	5、6月
コガモガイ <i>Lottia kogamogai</i>	5～10月
カモガイ <i>Lottia dorsuosa</i>	7、8月
ベッコウガサガイ <i>Cellana grata</i>	7、8月
ヨメガカサガイ <i>Cellana toreuma</i>	7、8月
マツバガイ <i>Cellana nigrolineata</i>	?

4 飼育

フィールドから持ち帰った笠貝は、観察・実験に使用するまで室内で飼育する。蓋付きのプラスチック容器に濾過海水(東北区水産研究所から譲り受けたもの;これ以降、「海水」は全てこの濾過海水を指す)をおよそ2/3の高さまで加え、そこに適当な数の笠貝を入れる(図4A)。容器内の海水にはエアレーションを施し、エアレーション用チューブの通気を妨げない程度に軽く蓋をする。採集後数日間はさかんに糞をするため、海水を毎日取り換えたほうがよい。水換えの際には、容器内の古い海水を捨て、蛇口から出した

水道水によって容器に付着している糞や粘液などを洗い流す。笠貝に直接水道水をかけても大丈夫である。その後、容器に新しい海水を入れる。その際、容器の上端部まで上がってきて付着している個体を、海水に浸るように容器の底などに移してやるとよい。水換えが終わったら、再びエアレーションを施し、蓋をする。飼育開始から1週間が経過し、ほとんど糞をしなくなったら、水換えの頻度を週に1～2回まで減らしても構わない。

飼育中の笠貝には特に餌を与える必要はない。また、温度制御ができない状況下でも飼育は可能である。宮城教育大学の飼育室では、室温は季節ごとに大きく変化する(夏場には30℃近くに達し、晩秋には15℃を下回る)。このような「劣悪な」環境下で飼育されているにもかかわらず、笠貝は1～2ヶ月の長期にわたって生存している。

コガモガイでは、飼育中の個体がしばしば自発的な放卵・放精を行う。場合によっては容器内の全ての個体が卵・精子を出してしまい、観察や実験に用いることができなくなることもある。一方、クサイロアオガイでは、このような自発的な放卵・放精はほとんど起こらない。また、飼育期間中に餌を全く与えていないにもかかわらず、生殖巣の退化は顕著には起こらず、採集から1ヶ月以上が経過しても卵・精子の採取(以下参照)が可能である。

5 未成熟卵と精子の採取

透明な容器に付着しているクサイロアオガイを腹足側から見ると、体内の生殖巣の色が分かる。黒色から褐色のものが卵巣、白色からクリーム色のものが精巣である(図4B)。生殖巣は黒っぽい内臓にそって存在しているため、オスでは黒と白のツートンカラーに見える場合が多い。なお、精巣の色は他の笠貝でも同様であるが、卵巣の色は種ごとに異なっている。例えば、カスミアオガイの卵巣は赤色をしている(佐々木・奥谷、1994)。

発達した生殖巣を持った個体を容器から剥がし取り、先のとがったピンセットで腹足部の中央を突き刺すと、内部から卵や精子がしみ出てくる。これらをピンセットですくうようにして集める。腹足部をピンセットで押しながらすくうことで、より多くの卵・精

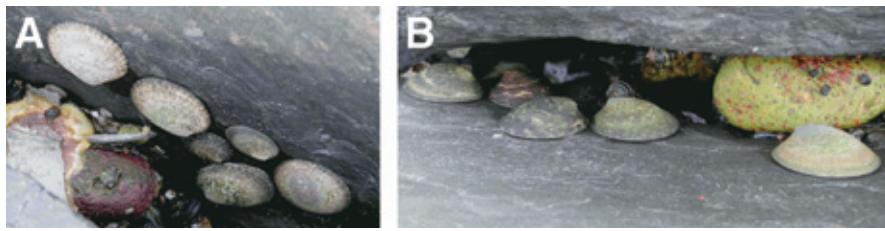


図2 フィールドにおけるクサイロアオガイ (A) とコウダカアオガイ (B)。七ヶ浜町の菖蒲田海岸で撮影した。

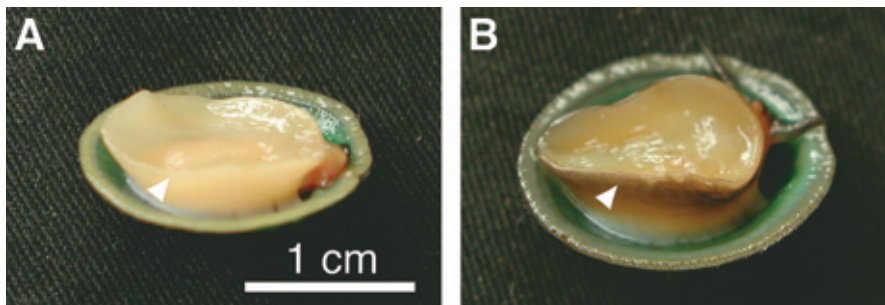


図3 クサイロアオガイ (A) とコウダカアオガイ (B) の軟体部。両者では腹足部の側面 (矢頭) の色が異なる。

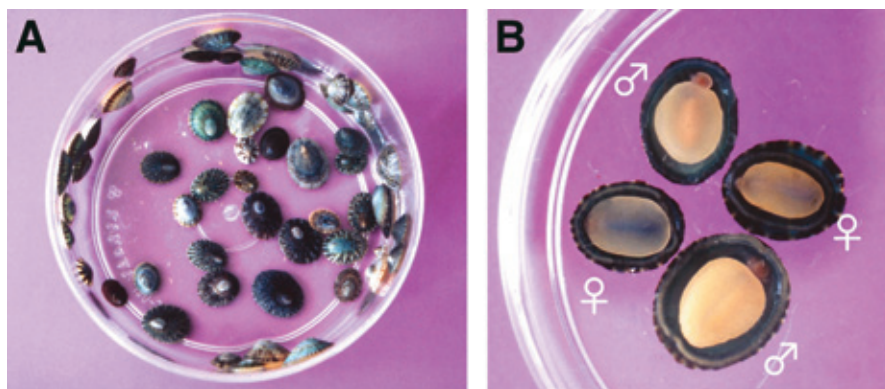


図4 飼育容器中の笠貝 (A) とクサイロアオガイの雌雄 (B)。プラスチック容器内の海水にエアレーションを施して飼育した。クサイロアオガイの場合、透明な容器に付着している個体を腹足側から見ることで、雌雄を判別できる。

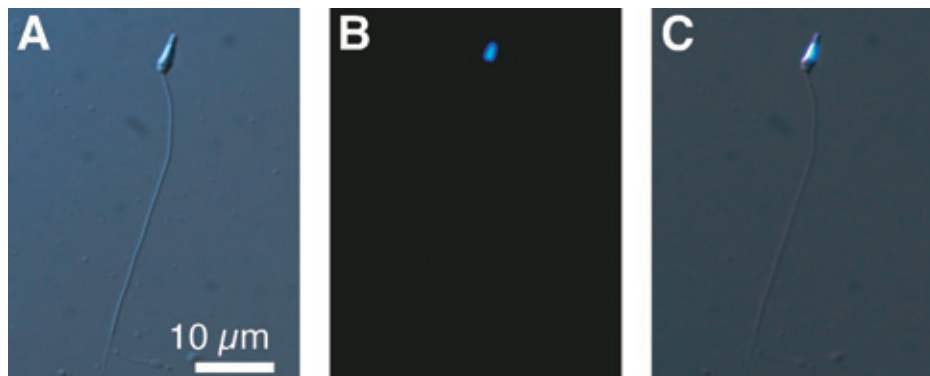


図5 クサイロアオガイの精子。精巣から取り出した精子を50 μMのヘキスト33342 (Sigma) を含む海水中に10分間浸した後にプレパラートを作成した。同一精子におけるノマルスキー微分干渉像 (A)、蛍光像 (B)、および両者の重ね合わせ像 (C) を表す。

子を得ることができる。これらの操作手順は、どの笠貝でも同じである。

オス個体の精巣から得られる精子は、すでに受精可能な状態にある。クサイロアオガイの精子の頭部は、水玉を少し引き伸ばしたような形をしている（図5A）。ヘキスト33342によるDNAの蛍光染色を行うと、核はその中央部に位置していることが分かる（図5B、5C）。核の前側と後ろ側（ヘキスト33342で染色されない領域）には、それぞれ先体とミトコンドリアが存在している。運動を停止している精子では、ペン毛を観察することも容易である。

メス個体の卵巣から得られる卵は、減数分裂の第一分裂前期の段階にある未成熟卵（一次卵母細胞）である。いびつな形をしており、周囲を透明な濾胞細胞の層で囲まれている（図6A）。また、未成熟卵の内部には、卵核胞と呼ばれる巨大な核がうっすらと透けて見える（図6A）。スライドグラスとカバーグラスの間の海水を適度に吸い取り、未成熟卵をわずかに押しつぶすようにすると、卵核胞の輪郭を明瞭に観察でき

るようになる。未成熟卵は、媒精しても発生を開始しない。受精・発生過程を観察するには、次項で述べるような卵成熟の誘起が必要である。

6 卵成熟の誘起

卵巣から取り出した未成熟卵を5 mM NH_4Cl を含む海水（pHを9に調整したもの）に10分間浸すと、ほぼ100%の卵において卵成熟が誘起される。アンモニア処理を受けた卵では、卵核胞が消失するとともに、濾胞細胞が剥がれ始める（図6B）。アンモニア処理から1時間程度が経過すると、濾胞細胞は完全に剥がれて1カ所にまとまる（図6C1）。それとともに、卵はほぼ完全な球形となる（図6C1）。このような成熟卵を墨を含む海水中に入れると、卵の周りに墨の粒子の侵入できない領域、すなわちゼリー層が形成されていることが分かる（図6C2）。成熟卵は、減数分裂の第一分裂中期の段階にあり、精子を加えない限りこの状態が維持される。

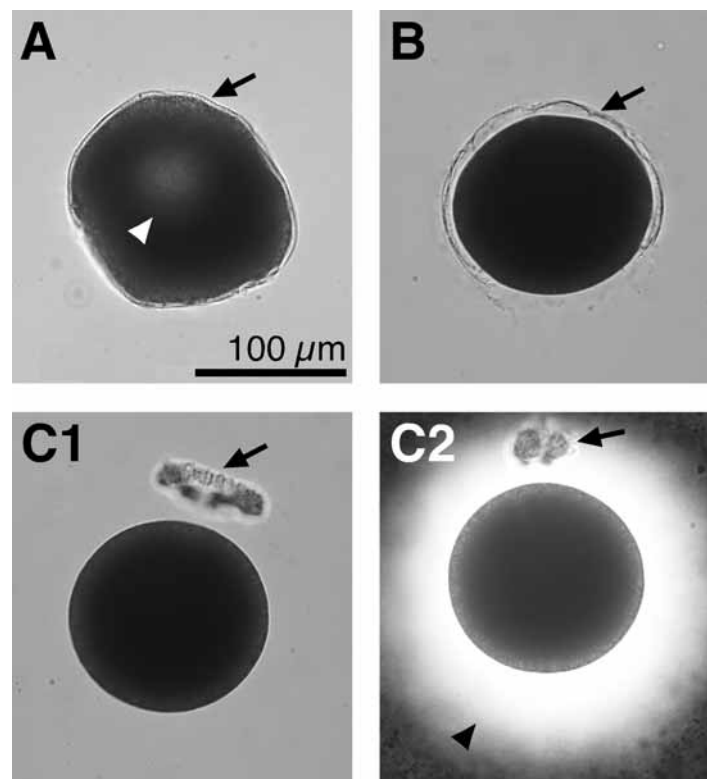


図6 クサイロアオガイの卵成熟過程。未成熟卵（A）、アンモニア処理後の成熟途中の卵（B）、および成熟卵（C1：海水中、C2：墨海水中）を表す。A～Cの矢印は濾胞細胞層、Aの矢頭は卵核胞、C2の矢頭はゼリー層を示している。

7 受精・発生の過程

アンモニア処理によって得られた成熟卵（図7A）に精子を加えると、受精が起こり、発生が開始される。クサイロアオガイの場合、精巣から切り出した精子は運動能力が乏しいため、ウニなどに比べ、多めに精子を加える必要がある。海水がわずかに白濁する程度の精子量であれば、ほぼ全ての卵が受精する。なお、成熟卵や精子は、室温で5時間ほど放置した後でも受精可能である。

受精した卵において最初に分かる形態変化は、第一極体の形成である（図7B）。引き続き、第一極体の直下で第二極体の形成が起こり（図7C）、減数分裂が完了する。極体は小さく透明であるため、慣れて

いないと極体であるかどうかを判定することは難しい。特に、成熟卵になっても濾胞細胞が完全に剥離せず、その一部が周囲に残っているような卵では、それらと極体との区別が極めて困難になる。このような場合には、卵をピペッティングして周囲に残っている濾胞細胞を完全に取り除いてから媒精するとよい。

減数分裂完了後、笠貝の受精卵は、軟体動物や環形動物などに特有の「らせん卵割」を行い、割球どうしの隙間をうめるような形で割球数を増していく（図7D～7F）。発生の速度は種により多少異なっており、また、水温にも依存する（高いほど速い）。クサイロアオガイの場合、媒精から2細胞期まで、20℃では約50分である。ウニなどの一般の海産無脊椎動物とは異なり、クサイロアオガイでは比較的高水温（30℃付近）

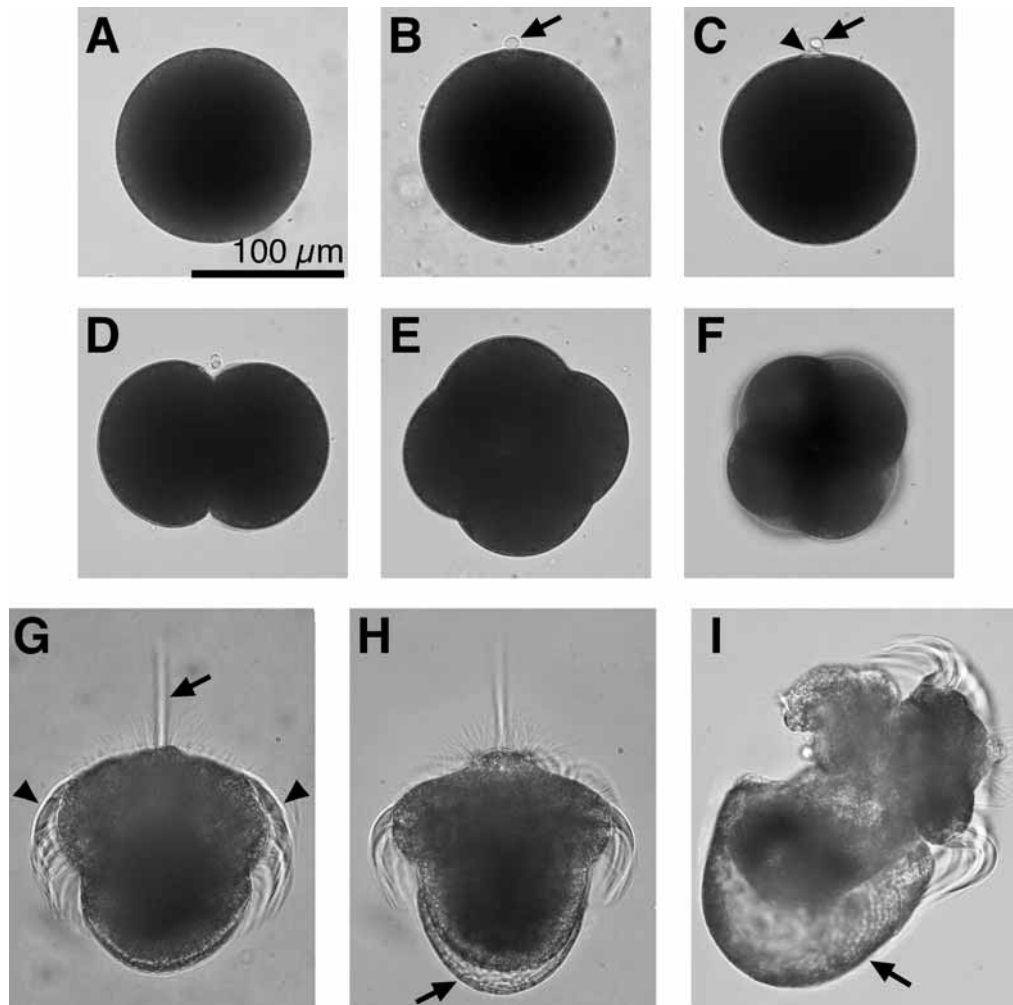


図7 クサイロアオガイの発生過程。媒精前の成熟卵（A）、第一極体形成時（B）、第二極体形成時（C）、2細胞期（D）、4細胞期（E）、8細胞期（F）、トロコフォア幼生期（G）、貝殻の形成開始時（H）、およびヴェリジャー幼生期（I）を表す。BとCの矢印は第一極体、Cの矢頭は第二極体、Gの矢印は頂毛、Gの矢頭は繊毛帯、HとIの矢印は貝殻を示している。

でも卵割過程は異常になりにくい。

後期発生を正常に進行させるためには、卵割前または卵割初期のうちに卵や胚を「洗浄」したほうがよい。卵や胚は容器の底に沈んでいる。そこで、上澄みの海水をピペットを用いてできる限り取り除いてから、新鮮な海水を加える。このような海水の交換を数回繰り返し、海水中の余分な精子やその他の不純物を取り除く。卵や胚をピペットで集め、新鮮な海水の入った別の容器に移してもよい。どちらの場合でも、洗浄後の卵や胚の密度は低いほうが望ましい。発生が正常に進むと、胚は6～8時間後にはトロコフォア幼生になり(図7G)、容器内を泳ぎ回るようになる。その後、貝殻の形成が始まり(図7H)、翌日には帽子型の貝殻を持ったヴェリジャー幼生に至る(図7I)。発生途中の胚を一定期間低温下に置くことにより、発生の進行を遅らせることも可能である。

8 クサイロアオガイの利点

ここで、受精・発生を観察するための材料として、クサイロアオガイが優れていると思われる点をまとめておく。なお、これらのうちのいくつかは、笠貝の他の種にも当てはまることを付記しておく。

① 採集

身近な海岸に多く生息しており、特別な採集器具を用いることなく容易に採集できる。

② 飼育

海水にエアレーションを施すだけで、1～2ヶ月にわたる飼育が可能である。温度制御や給餌を必要としない。

③ 卵と精子の採取

5月から11月にかけて発達した生殖巣を保持しており、その間は雌雄の判別が容易である。腹足部をピンセットで切り開くだけで、未成熟卵や精子を得ることができる。

④ 卵成熟

未成熟卵をNH₄Clを含む海水(pH9)に入れるだけで卵成熟を誘起することができる。卵核胞の消失、濾胞細胞の剥離、ゼリー層の形成といった卵成熟過程の観察が可能である。

⑤ 受精

成熟卵・精子ともに、室温保存下において少なくとも5時間は受精能力が保持される。加える精子の濃度を高くすると、ほぼ100%の受精率を得ることができる。

⑥ 発生

受精後、短時間のうちに減数分裂(極体形成)や初期卵割の過程を観察することができる。また、当日のうちにトロコフォア幼生、翌日にはヴェリジャー幼生に至る。水温が高くても発生が正常に進行する。

9 授業での活用

これまでに、宮城教育大学の学部の授業(理科教育専攻3年次対象の生物学実験IIや自然環境専攻2年次対象の生命地球科学実験Aなど)、教材生物ワークショップ(主に宮城県内の高等学校教員を対象としたもの)、コロンビア「自然科学及び数学教員養成システム強化」研修、公開講座などの場において、クサイロアオガイを用いた観察・実験を展開してきた。午前と午後を通じた授業(合計で5～6時間)を行う場合には、午前中に笠貝に関する講義、種の判別、雌雄の判別、卵・精子の採取、未成熟卵・精子の観察、アンモニア処理による卵成熟の誘起、卵成熟過程の観察などを、午後に入ってから成熟卵の観察、媒精後の受精・発生過程の観察、トロコフォア幼生やヴェリジャー幼生(あらかじめ作成しておいたもの)の観察、まとめの講義などを組み入れた。実施時期は春(5、6月)の場合も秋(10、11月)の場合もあり、受講人数も数名だけの場合から40名を越える場合までであったが、いずれの場合も材料の準備において困難を感じることはなかった。

比較的自由に時間の使える大学の授業とは異なり、中学校や高等学校では、基本的に1時間の授業(45～50分間)に収まる内容を考える必要がある。顕微鏡の準備のための時間や、不慣れた顕微鏡操作に要する時間等を考慮すると、あまり欲張ったメニューを用意しないほうが良いと思われる。(1)未成熟卵・精子の採取と観察、(2)極体形成と初期卵割過程の観察(あらかじめ成熟卵と精子を準備しておく必要がある)、(3)トロコフォア幼生・ヴェリジャー幼生の観察(前日に受精させておく必要がある)—などであれば、それぞれ1

時間の授業時間内での実施が可能ではないだろうか。この中でも、(1)の実施は比較的容易であり、有性生殖への興味・関心を引き出す上で有効な授業となるのではないかと考えている。

他の海産無脊椎動物に比べ、クサイロアオガイをはじめとした笠貝の採集・飼育は容易である。また、学校現場で比較的良好に用いられているバフンウニの生殖時期が冬期であるのに対し、クサイロアオガイは春から秋にかけて長期間使用することができる。今後、受精・発生を観察するための教材動物として広く扱われるようにするためには、安定した供給体制を整えるとともに、より簡単な飼育法や人工海水の使用の可否などを検討していく必要がある。

謝 辞

東北区水産研究所からは、本研究に不可欠な濾過海水を定期的にいただいた。深く感謝申し上げます。この研究の一部は、稲森財団の助成を受けて行われたものである。

文 献

- Deguchi, R. (2007). Fertilization causes a single Ca^{2+} increase that fully depends on Ca^{2+} influx in oocytes of limpets (Phylum Mollusca, Class Gastropoda). *Developmental Biology* 304, 652-663.
- Freeman, G. (2006). Oocyte and egg organization in the patellogastropod *Lottia* and its bearing on axial specification during early embryogenesis. *Developmental Biology* 295, 141-155.
- Gould, M. C., Stephano, J. L., Ortíz-Barrón, B. D., and Pérez-Quezada, I. (2001). Maturation and fertilization in *Lottia gigantea* oocytes: intracellular pH, Ca^{2+} , and electrophysiology. *Journal of Experimental Zoology* 290, 411-420.
- Guerrier, P., Guerrier, C., Neant, I, and Moreau, M. (1986). Germinal vesicle nucleoplasm and intracellular pH requirements for cytoplasmic maturity in oocytes of the prosobranch mollusc *Patella vulgata*. *Developmental Biology* 116, 92-99.
- 岩崎敬二 (1999) 貝のパラダイス。東海大学出版会。
- Loeb, J. (1905). On chemical methods by which the eggs of a mollusc (*Lottia gigantea*) can be caused to become mature. *University of California Publications in Physiology* 3, 1-8.
- 佐々木猛智・奥谷喬司 (1993) 新属 *Nipponacmea* : 従来 *Notoacmea* とされていたアオガイ類の再検討。貝雑 *VENUS* 52, 1-40。
- 佐々木猛智・奥谷喬司 (1994) 新種 *Nipponacmea habei* カスミアオガイの記載及び形態、種内変異型とその分布。貝雑 *VENUS* 53, 1-20。
- 白山義久 (2000) 無脊椎動物の多様性と系統。裳華房。
- Wolfsohn, J. M. (1907). The causation of maturation in the eggs of limpets by chemical means. *Biological Bulletin* 13, 344-350.

(平成19年9月28日受理)