NH₄ OH による二枚貝の産卵誘発*

相 良 順 一 郎

(東海区水産研究所)

Artificial Discharge of Reproductive Elements of Certain Bivalves caused
by Treatment of Sea Water and by Injection with NH₄OH

Jun'ichiro SAGARA

It has been reported that the discharge of sexual products of *Pecten yessoensis*, *Haliotis discus*, *H. sieboldii*, *Anadara subcrenata* and *Brachidontes senhousia* were artificially induced by simultaneous increase of temperature and alkalinity, but in *Mytilus edulis*, the mature sexual products were discharged by mere bathing its cut mantle in ammoniated sea water.

The writer, in the present experiment which used NH₄OH, was not only successful in obtaining the discharge of reproductive substances of *Macraa veneriformis*, *M. sulcataria*, *Gryphaea gigas* etc. but also of *Tapes japonica* and *Meretrix lusoria* which have not previously been induced to discharge artificially by the injection of k-salts or faradic stimulation. Results obtained are as follows:

1. Presumptively effective factor on the spawning induction of *Macraa*.

The first experiment using *Macraa veneriformis* and *M. sulcataria* was carried out to ascertain whether the induction of spawning was due to pH (alkalinity) or NH₄⁺ ion. The sea water including both NH₄OH (NH₄⁺ ion and pH) and NH₄Cl (NH₄⁺ ion), was effective in producing the discharge of reproductive substances, while NaOH (pH)-sea water was not effective. From these results, it is difficult to decide whether pH or NH₄⁺ ion is more effective, but it is conceivable that NH₄⁺ ion will be particularly effective in the discharge, as KCl solution is in the case of the mantle of *Mytilus edulis* (see Table 1).

2. The treatment with NH₄OH-sea water.

When *Macraa veneriformis*, *M. sulcataria*, *Gryphaea gigas*, *Corbicula japonica* and *Trapezium japonicum*, during their spawning season, were immersed in a suitable concentration of ammoniated sea water, they began to spawn their reproductive substances without the stimulation of temperature (see Table 2).

3. The injection method of NH₄OH solution.

Meretrix lusoria and *Tapes japonica* could not spawn with the treatment in NH₄OH-sea water, but successfully spawned when 2 cc of suitable concentration of NH₄OH solution were injected directly into the gonad (see Table 3).

As the ova and spermatozoa discharged by the methods above-mentioned were all mature, the author was successful in the artificial fertilization with ease and fertilized eggs developed normally to swimming larvae.

緒 言

NaOH 又は NH₄OH 等を用いて海水の pH を高めると同時に温度を高めて産卵を誘発させる試みは、二枚貝ではホタテガイ (木下 1943)⁷⁾ **, モガイ, ホトトギスガイ (日下部 1956)⁸⁾, 巻貝ではアワビ (猪野 1952)²⁾ 等でなされ、その方法が産卵誘発の手段として有効であると報告されている。又岩田 (1952)⁶⁾ はムラサキガイの生殖巣の入っている外套膜の一部を切りとつたものについて、これに NH₄OH-海水処理

1957 年 5 月 22 日 受理

* 東海区水産研究所業績 B 第 260 号

** 山本¹²⁾はホタテガイの産卵誘発には温度を急激に上げるだけで充分で pH を高める必要はないが、pH の下降は産卵を抑制すると述べている。

をただで生殖物質の放出を起させることが出来ると報告している。著者は今回主として NH_4OH を用いて二枚貝の産卵誘発に関する実験を行つた。そしてシオフキ、バカガイ等の外、これまでカリウム塩注射法、電気刺激法 (岩田 1948, 1949)^{3) 5)} 等によつても産卵誘発が出来なかつたアサリ、ハマグリについて放卵放精を促進することが出来た。こゝに報告し参考に供する次第であるが、懇切なる御教示並びに御校閲を戴いた岡山大学岩田清二博士、東海区水研猪野峻博士又御討議を戴いた深井麟之助博士、ベックマン pH メーターの測定について御教示と御便宜を戴いた大竹茂技官の諸氏に対し厚く感謝の意を表する。

材料及方法

供試貝類はすべて千葉県浦安産のもので、その殻長約 30~45mm のアサリ、約 45~60mm のハマグリ、約 30~40mm のシオフキ、約 50~70mm のバカガイ、約 23~28mm のヤマトシジミ、約 30~35mm のウネナシトマヤガイ、及び殻高約 50~80mm のカキを用いた。材料は大きさ、個数に応じてそれぞれ適量の海水 (615. 1.017~1.019) を入れた円形バット (直径 250mm, 高さ 130mm), 又はシャーレ (直径 120mm, 90mm, 高さ 60mm, 30mm) 中に収容し、予め調整した NH_4OH , NH_4Cl , NaOH 等の 1 規定 (N) 溶液を、後述の各所定規定濃度を含む海水になる様に加えて実験を行つた。又 NH_4OH の所定濃度の水溶液を後述の様につくり、これをアサリ、ハマグリ及びカキについては直接その生殖巣内に皮下注射用 $1/3\text{mm}$ 注射針を用いて 2cc 容量を注射する方法を行つた。注射の際は両殻の間に外径 6mm 位の硝子棒を挿入して殻を閉じない様に保つた。海水の pH の測定にはベックマン硝子電極 pH メーターを使用した。

実験結果並びに考察

1. 産卵誘発要因の検討

初めに産卵が誘発されるのは果して pH の上昇によるのか、それとも NH_4^+ イオンによるのかを検討するためにシオフキ及びバカガイを材料として、それ等を第 1 表の様な NH_4OH , NH_4Cl 及び NaOH の各種濃度の海水溶液中に投入し、放卵放精を行うか否かを調べてみた。なおアサリ及びハマグリ等では生殖巣から切り出した卵と精子を用いては受精が極めて困難であるが、その様な卵の成熟を促進して受精可能にするために用いられている NH_4OH (和田 1942, 畑中, 佐藤, 今井 1943)^{10) 11)} 以外の酪酸、尿素 (山本, 西岡 1943)¹¹⁾ についても、所定規定濃度の海水をつくり併せて実験を行つた。実験中の水温は 22.0~22.8°C であつた。実験の結果は第 1 表に示す通りである。

この表に示す通り、シオフキ、バカガイを収容した海水 (pH 8.27) に IN NH_4OH を添加して NH_4OH の濃度が 1/1000~1/100 N になる様にすると、pH は 8.72~9.90 に上昇し、約 10~30 分後に放卵放精を行う。これに反して IN NaOH を同様に添加して NaOH の濃度が 1/1000~5/1000 N になる様にすると、pH は 9.13~10.20 となり同様に pH は上昇するが、放卵放精は起らない。次に 1N NH_4Cl を同様に添加して NH_4Cl の濃度が 1/1000~1/10 N になる様にすると、pH は 7.93~7.21 となり pH は下がるが、 NH_4Cl の濃度が 1/40~1/10 N である NH_4Cl -海水中では NH_4OH 添加の場合よりやや遅れて 30~60 分後に放卵放精が起る。但し 1/40N 以下の濃度では反応が起らない。

以上の結果から、 NH_4OH の添加の場合の放卵放精には NH_4^+ イオンと pH の上昇の両方の要因が働いていると考えられ、 NaOH の添加の場合には NH_4^+ イオンの要因がなくて pH のみの要因であるが、この場合放卵放精が起らないことから、シオフキ、バカガイの放卵放精には NH_4^+ イオンが有効であるように思われる。しかし一般に強酸及び強塩基は細胞膜を通り難く、弱酸及び弱塩基は通り易いことが知られているので、 NaOH の添加の場合は単に貝のまわりの海水のアルカリ度が高くなつただけであつて貝の細胞内の pH は殆んど変らないのに、 NH_4OH 添加の場合は貝の細胞膜を通して細胞内もアルカリ性になつた為と考えられるので、簡単に NH_4^+ イオンのみの要因であるとの断定は下せない。なおホタテガイの場合⁷⁾ には pH を上昇させるのに NaOH の使用が有効であつたが、この場合は pH のみの要因であろう。 NH_4Cl 添加の場合の放卵放精は NaOH の場合と逆に pH の要因はなくて、 NH_4^+ イオンのみの要因と考えられる。しかしこれも NH_4Cl が弱塩基の NH_4OH と強酸の HCl とに加水分解して細胞内は膜を通り易い NH_4OH によりアルカリ性になるために放出が起ると考えられるので (岩田 1952)⁶⁾, NH_4^+ イオンの要因と

Table 1. Experiments with chemicals to determine whether pH or NH_4^+ ion induces the spawning of *Mactra*

Chemicals employed	Normality of each chemical in sea water	pH value *	<i>Mactra veneriformis</i>	<i>Mactra sulcataria</i>
NH_4OH	1/100	9.90	+	+
	8/1000	9.90	+	+
	5/1000	9.80	+	+
	3/1000	9.24	+	+
	1/1000	8.72	+	+
NH_4Cl	1/10	/	+	/
	1/20	(7.21)	+	/
	1/40	7.48	+	+
	1/50	/	-	-
	1/100	7.73	-	-
	8/1000	7.78	-	-
	5/1000	7.78	-	-
	3/1000	7.93	-	-
	1/1000	8.00	-	-
NaOH	5/1000	10.20	-	-
	3/1000	9.72	-	-
	1/1000	9.13	-	-
Urea **	1/20	(9.00)	-	-
	1/40	/	-	-
	5/1000	8.26	-	-
Butyric acid**	5/1000	5.21	-	-

Note : + Discharge. - No reaction.

pH value of original sea water is 8.27, but that in parentheses is 7.92.

* measured by glass electrode pH meter.

** These chemicals are usually used to mature eggs.

いうよりむしろ細胞内のアルカリ性を高めたためという方が妥当であろう。唯 NH_4Cl 添加の場合、 NH_4OH 添加によつて放出を起す濃度と同じ濃度では全然反応がなくて、 NH_4Cl の濃度がかんりの高濃度 (1/40 N) 以上でないと、放卵放精が起らないことは興味ある事実と思われる。

以上の如く、シオフキ及びバカガイの放卵放精に対して NH_4OH -海水と NH_4Cl -海水とが共に有効で、あつたので、 NH_4^+ イオンがこれ等の放出に特異な働きをすることが推察される。この現象はムササキガイの外巻片に於ける KCl 溶液 (岩田 1952)⁶⁾ の場合と類似している。但し今回の実験の範囲内ではその要因が pH によるものか、或は NH_4^+ イオンによるものかは断定し得ない。なお卵の成熟を促進して受精可能にする酪酸、尿素海水はいずれも放出には無効であつた。唯酪酸添加の場合海水が過度に酸性となるが、そのまゝの海水で実験を行つたので、未だ検討する必要はある。

2. NH_4OH -添加海水処理による産卵誘発

既述の通り産卵の誘発は NH_4OH でも NH_4Cl によつても誘発させることが出来るが、 NH_4OH の方がその所要濃度も少くて済み、又放出までの反応時間も早い傾向があるので、 NH_4OH を用い、たまたま産卵時期に當つていたシオフキ、バカガイその他の貝類について実験を行い、それぞれの貝類の実験期間中に於いて得られた各種濃度に於ける放出率を第2表に示した。実験期間中の海水の pH は約 8.0~8.3 の間であつた。なお実験の都度 pH の測定は行わなかつた場合もあるので、pH 値については第1表を参考とされたい。

表に示す通り、シオフキについては4月16日~7月30日及び8月24日~9月22日の間に於いて実験を行つた結果 (水温16~29°C), NH_4 の濃度が 5/1000~1/100 N の海水処理では約 50% の放出率を示すが、それより低い濃度の 3/1000, 1/1000N の濃度では約 26%, 12.5% であり、漸次放出率は悪くなる。放出は 5/1000N 以下の濃度では自然の産卵と同じであるが、8/1000N では一部の個体が、1/100N では殆んど全

Table 2. Relation between the normality of NH_4OH -sea water and the rate of discharge in certain bivalves

Species	<i>Mactra veneriformis</i>		<i>Mactra sulcataria</i>		<i>Gryphaea gigas</i>		<i>Corbicula japonica</i>		<i>Trapezium japonicum</i>	
Normality of NH_4OH -sea water	Discharged Nos. / Total Nos.	Rate of discharge	Discharged Nos. / Total Nos.	Rate of discharge	Discharged Nos. / Total Nos.	Rate of discharge	Discharged Nos. / Total Nos.	Rate of discharge	Discharged Nos. / Total Nos.	Rate of discharge
1/100	28/59	47.4*	7/18	38.9*	3/8	37.5	6/22	27.3	2/5	40.0
8/1000	26/46	56.5	6/12	50.0	—	—	—	—	—	—
5/1000	43/89	48.3	6/21	28.5	9/21	42.8	5/21	23.8	2/8	25.0
3/1000	10/39	26.2	2/7	28.6	2/9	22.2	6/18	33.3	—	—
1/1000	3/24	12.5	3/7	42.8	0/17	0	—	—	—	—
Duration of experiments	16 April-30 July 24 August-22 Sept.		17 April-4 July 4 August, 19 Sept.		23 June-27 August		27 June-24 July		23 June, 4 August	

* Sperm or eggs were abnormally discharged through ventral margin of shell instead of siphon.

Table 3. Relation between normality of NH_4OH solution injected and the rate of discharge in certain bivalves

Species	<i>Tapes japonica</i>		<i>Meretrix lusoria</i>		<i>Gryphaea gigas</i>	
Normality of NH_4OH -sea water	Discharged Nos. / Total Nos.	Rate of discharge	Discharged Nos. / Total Nos.	Rate of discharge	Discharged Nos. / Total Nos.	Rate of discharge
1/5	—	—	9/56	16.1	9/25	36.0
1/10	1/10	10.0	7/20	35.0	3/10	30.0
1/20	35/80	43.8	22/78	28.3	15/23	65.2
1/40	3/10	30.0	1/7	14.3	—	—
3/100	3/22	13.6	3/7	42.9	—	—
1/100	4/17	23.5	4/14	28.5	—	—
Duration of experiments	21 May - 27 June, 4 Sept. - 2 Oct.		31 May, 20 June - 28 Sept.		23 June - 10 August	

部の個体が異常な放出を行う。即ち卵や精子は水管から放出されずに間歇的な両殻の開閉運動によって腹縁から放出される。1/100N 以上になると、貝は殆んど殻を開くこと無く死に到る。これはアンモニアの毒性が1/100N 又はそれ以上になると強く影響してくるためと思われる。従つて貝自身にも又放出された卵や精子にも悪影響をあたえないで、而も放出率の良い 5/1000N が産卵を誘発させるのに適当な濃度であると云えよう。又放出までの時間は 1/1000N ではそれ以上の濃度に比べてより長くかかる傾向があり、3/1000~1/100N の間では貝の成熟度の差異がより多く影響するため、放出開始までの時間は個体差が大きく、約10分から60分までの間に放出するものが多い。

バカガイは4月17日~7月4日、8月4日及び9月19日の3回に亘り実験を行つたが、(水温16~24°C)、供試個体が少ないため、各濃度に於ける放出率は約30~50%で、シオフキの場合の様に濃度に比例した傾向は見られなかつたが、高濃度の8/1000、1/100N に於ける異常放出はシオフキのそれと全く同様であつた。放出までの時間もシオフキの場合と同じく約10~60分の間に放出するものが多い。

カキは6月23日~8月27日の間に実験を行つたが(水温24~26°C)、シオフキ、バカガイに有効である最低濃度の1/1000N では放出率は0であつた。このことは貝の種類によつて放出に有効な最低濃度が異なることを示している。供試個体が少なく8/1000N に於ける実験を欠いたが、3/1000N が最低放出限界濃度であり、3/1000~1/100N に於ける放出率は約20~40%を示した。放出までの時間は約15~80分の間で、低濃度の3/1000N では長くかかる傾向がある。

ヤマトシジミは6月27日~7月24日の間に実験を行つた(水温24~26°C)。供試個体も少なく、1/1000N 及び8/1000N の実験を欠くが、3/1000~1/100N の放出率は約20~30%を示した。放出は1時間以上経過してから行われる場合が多く、シオフキ及びバカガイ等に比し緩慢である。なおこの貝は川口に棲息するので実験に供する海水は棲息水域のそれと変らぬ塩分量の少ない海水を使用すべきであつたが、ここではシオフキ等に用いたと同じ普通海水を使用したので、その様な事が影響していると思われる。従つてこの貝については改めて実験を行う必要がある。

ウネナシトマヤガイはたまたま密生したカキに附着していたものを材料としたので、他の貝に比し供試個体は特に少なく、6月23日と8月4日に行つた5/1000N 及び1/100N についての実験のみである。従つて放出率、放出時間を云々することは早計であるので、表に掲げて参考とするに止める。

3. NH_4OH 溶液注射による産卵誘発

アサリ、ハマグリは前記の NH_4OH 海水処理法では全く無効であつた。そこで K 塩注射法に於ける様に生殖巣内に直接所定濃度の NH_4OH 水溶液注射を試みた所、放出を起させることが分つた。なおこの方法は既述の通り 2cc 容量を注射したが、貝が小さい場合は特に注射の際、溶液が体外に溢れ出る場合が多い。従つてどの程度の液量が生殖巣内に入つたかは明らかでない。この方法をアサリ、ハマグリ及びカキについて行つた結果を第3表に示した。

表に示す通り、アサリは5月21日~6月27日及び9月4日~10月2日の間に実験を行つた結果(水温20~24°C)、1/10~1/100N NH_4OH 注射による放出率は約10~40%を示した。なお1/10N 以上の溶液を注射すると、アンモニアの毒性が強く影響して、例えば1/2N 溶液では死ぬ場合がある。1/100N 以下の溶液は放出に無効であつた。放出は約10~70分後に行われ、数分又は数10分放出が続いて止まつて了う場合や、始めわずかず放出し数10分後に盛んに放出する場合、又放出量の多寡等個体による放出状況は多様であつた。

ハマグリは5月31日及び6月20日~9月28日の間に実験を行つた(水温20~29°C)。1/5~1/100N 溶液注射による放出率は約15~40%を示した。なお1/5N 以上の溶液注射は貝自身に悪影響をあたえること、又1/100N 以下の溶液は放出に無効であること等はアサリと同様である。唯ハマグリの方がアサリより貝が大きいので、 NH_4OH に対する抵抗力が後者より強い様である。しかし1N 溶液等の濃厚液を注射すれば死んで了う。放出までの時間及び放出状況はアサリの場合と殆んど同様であつた。カキは6月23日~8月10日の間に実験を行つた(水温24~26°C)。カキは注射の際、ガラス棒を両殻の間に挿入しても注射部位(左殻頂部の左側)まで針をさし入れることが困難なので、その部位を実験前日に小さく割つて予め注射し易い様にし、又衝撃の影響からの回復も考慮して実験を行つた。実験は1/5~1/20N のみの注射で放出率は約30~65%であつた。1/5N 以上の注射が悪影響をあたえることはアサリやハマグリと同様であるが、放出

に有効な最低濃度については実験を欠くため不明である。放出までの時間は 15 分位のものが多く、雌は雄に比べて放出は緩慢に行われる場合が多い。なお上記の NH_4OH 溶液注射法によりシオフキ及びバカガイも放出を起すが、注射法より簡便な NH_4OH 海水処理法で放出を起させ得るので、この実験は殆んど行わなかった。

4. NH_4OH により放出させた生殖物質による人工受精

シオフキ及びバカガイは成熟した個体の生殖巣から直接切り出した卵と精子を用いて人工受精が容易に出来る種類であるが、今回の様な NH_4OH を用いて放出させた卵はカリウム塩注射の場合と同じく、胚胞の明瞭な大きさの揃ったものであり、精子も活潑で共に組織片等の夾雑物も殆んどない。従つて切り出した卵と精子を使う方法に比し、種々の点ではるかに優れていると云えよう。勿論両者をかけ合せての受精は可能であり正常に発生する。これに反してアサリ及びハマグリは切り出した卵と精子を用いては人工受精が極めて困難な種類で、受精させるには既述の通り、 NH_4OH 海水、尿素水溶液或は酪酸海水等で卵を予め処理しなければならない。自然に放出された卵はアサリでは既に胚胞が消失して第 1 回の成熟分裂の中期の状態にあると云われているが (宮崎 1934)⁹⁾、 NH_4OH によつて放出させた卵はカリウム塩による放出の場合、その胚胞が明瞭に存在している (岩田 1948)⁴⁾ のに反して、既に消失して自然放出卵と全く変らない。

ハマグリ of 自然放出卵については報告はない様であるが、カリウム塩注射により放出された卵の中で、大きな内容の充実したものは胚胞の輪郭が既に不明瞭になつているものもあるが、未だ胚胞が消失していないものが大部分である (岩田 1948)⁴⁾ のに反し、 NH_4OH によつて放出させた卵はアサリ卵と同様に胚胞は全く消失している。

従つて今回の NH_4OH によつて放出させた卵と精子を用いてのアサリ及びハマグリ of 受精は可能であり正常に発生する。唯受精に当り注意すべきはシロチョウガイ of 発生の場合に於ける如く、海水中にアルカリが存在することは有害であり、発生過程に悪影響をあたえることが知られているので (和田 1942)¹⁰⁾、上記二法によつて放出させた卵は充分海水で洗つてから受精させる心がある。なおヤマトシジミ及びウネナシトマヤガイについては受精の実験を欠いたので、その可能性については不明である。

以上未だ不備の点が多々あるが遂次これを補うと共に、今後他の貝類についても実験をすすめて行きたい。

摘 要

NH_4OH を用いて二枚貝 of 産卵誘発に関する実験を行つて次の結果を得た。

1. シオフキ及びバカガイを材料として産卵が誘発されるのは pH の上昇によるものか、或いは NH_4^+ イオンによるものかを検討したが、そのどちらとも断定し得なかつた。しかし NH_4^+ イオンが放出に特異的な働きをすることが推察された。
2. 産卵期間中のシオフキ、バカガイ、カキ、ヤマトシジミ及びウネナシトマヤガイを適当な濃度の NH_4OH 添加海水中加入ることにより、その生殖物質を放出させることが出来た。
3. 同じく産卵期間中のアサリ及びハマグリは上記の NH_4OH 添加海水処理では無効であつたが、適当な濃度の NH_4OH 溶液 2cc をそれらの生殖巣内に注射することによつて放卵放精を起させることが出来た。
4. NH_4OH によつて放出させた卵と精子を用いての人工受精は可能であり、正常に発生する。

文 献

- 1) 畑中、佐藤、今井：本誌，11，5. 6，218，(1943).
- 2) 猪野：東海水研報，5，9，(1952).
- 3) 岩田：本誌，13，5，188，(1948).
- 4) — “ 13，6，237，(1948).
- 5) — “ 15，9，443，(1949).
- 6) — “ 17，6，157，(1952).
- 7) 木下、渋谷、清水：“ 11，5. 6，168，(1943).
- 8) 日下部：昭和 31 年度日本水産学会年会講演要旨，19，(1956).
- 9) 宮崎：水産学会報，6，2，71，(1934).
- 10) 和田：科学南洋，4，3，26，(1942).
- 11) 山本、西岡：動維，55，11. 12，372，(1943).
- 12) 山本：本誌，17，2，53，(1951).