

## 鶏卵殻の走査型電子顕微鏡による観察

藤井俊策・田村達堂

(広島大学水畜産学部畜産学科)

(1969年9月25日 受理)

### Scanning Electron Microscopy of the Hen's Egg Shell

Shunsaku FUJII and Tatsudo TAMURA

*Department of Animal Husbandry, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,  
Hiroshima University, Fukuyama*

(Figs. 1-17)

#### 緒 言

鶏の卵殻構造については、NATHUSIUS (1868, 1871)<sup>1)2)</sup>, GIERBERG (1923)<sup>3)</sup>, STEWART (1935)<sup>4)</sup>, MORAN と HALE (1936)<sup>5)</sup>, ROMANOFF と ROMANOFF (1949)<sup>6)</sup>, SAJNER (1955)<sup>7)</sup>, MATHER と EPLING ら (1962)<sup>8)</sup> その他多くの研究者によって、詳しく報告されている。しかし、これらの報告の多くは、卵殻を直接的にあるいは脱灰切片標本として、光学顕微鏡下で調べたものである。周知のように、卵殻のような不透明硬組織は、そのまま光学顕微鏡下で観察することは困難である。また脱灰薄切標本としても、これでは無機質が除かれた有機性基質のみを見ることになり、実際の卵殻構造を調べたとはいえない。

一方 EL-BOUSHY と SIMONS ら (1968)<sup>9)</sup> のように、卵殻を偏光顕微鏡で観察したり、MASSHOFF と STOLPMANN (1961)<sup>10)</sup>, SIMONS と WIERTZ (1963)<sup>11)</sup>, EL-BOUSHY ら<sup>9)</sup> のように、電子顕微鏡で調べた報告もある。しかしこれらの方法でも、卵殻の微細構造は知りえても、その全体的、立体的観察には充分でない。

最近わが国において、走査型電子顕微鏡 (Scanning Type Electron Microscope) が開発された。この電子顕微鏡は、金属などの硬物体の表面構造の観察には至便であり、工業界では広く用いられている。著者らは、走査型電子顕微鏡を用いて、鶏卵殻を直接的に観察することを試み、若干の知見を得た。

#### 材 料 と 方 法

この観察には、ホワイトレグホン種の卵殻を用いた。まず、放卵直後の新鮮卵を刀背で割り、卵白などの内容物を流し出した。ついで、卵殻内面を生理的食塩水で軽く洗い、10%ホルマリン液で固定した。一部の卵殻は、卵殻内面に密着する卵殻膜を、ピンセットで剥ぎ除き、10%ホルマリン液で固定した。なお卵殻膜の剝離は容易であるが、膜の一部は卵殻に附着して残った。

固定卵殻は、それぞれ次の3様に処理して観察試料とした。一群はそのままのもの (以下自然卵殻という)、一群は35%カセイソーダ液に24時間浸漬して、卵殻の有機質成分を溶出し (以下脱有機卵殻という)、一群は3%氷醋酸液で、いわゆる脱灰した (以下脱灰卵殻という)。これらの試料は、水洗し、37°C 孵卵器内で乾燥するか、もしくは漸強アセトン液で脱水乾燥した。完全乾燥後、アルミニウムまたは金で蒸着し、JSM-2 走査電子顕微鏡 (日本電子光学研究所製)、25KV の加速電圧下で鏡検した。

## 所見と考察

卵殻は構造的に、内側から外側に向って、卵殻膜、卵殻（石灰沈着層）、クチクラの諸層から構成されている。したがって本報では、上記区分の順に観察所見を述べることにする。なお試料は乾燥処理してあるから、有機成分は多少収縮しているのはやむをえない。

## 卵殻膜

卵殻膜は卵殻の最内側に位する線維性の被膜である。卵殻膜は詳しくは、薄い内卵殻膜と、やや厚い外卵殻膜の2層に分けられる。内卵殻膜は卵膜 egg membrane と云われ、直接卵白に接する膜である。外卵殻膜は内卵殻膜の外側に続き、卵殻層に接する膜である。卵殻膜の構造については、従来から光顕的によく調べられている<sup>1-3)</sup>。



Fig. 1. The shell membrane viewed from inside. It is composed of three layers. The innermost layer is the inner layer of the inner shell membrane. The middle layer is the outer layer of the inner shell membrane. The outermost layer is the outer shell membrane.  $\times 100$ .

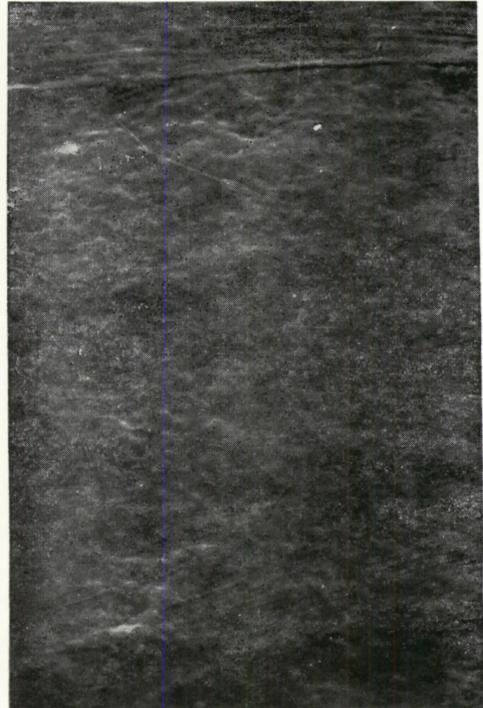


Fig. 2. Magnification of the inner layer of the inner shell membrane. The layer looks like a granular structure containing fine fibers.  $\times 1,000$ .

走査電子鏡検によって、自然卵殻を観察すると、卵殻膜は図1に見るように3層から形成されていた。3層は内側から、内卵殻膜内層、内卵殻膜外層、外卵殻膜である。内卵殻膜内層は図1、2と6のように、比較的平坦な内表面をもち、一見粘液膜様に見える。拡大して見ると、この層は図2のように無構造の粒状構造を呈し、その中を直径約 $0.5\mu$ の細線維が直線状に走っているのが、かすかに認められる。内卵殻膜内層は、明らかな境界なく内卵殻膜外層に移行していた。内卵殻膜外層は、内層とは著しく異なり、典型的な線維性膜であった(図3と6)。線維膜を構成する線維は、主として直径 $1\sim 2\mu$ の丸味

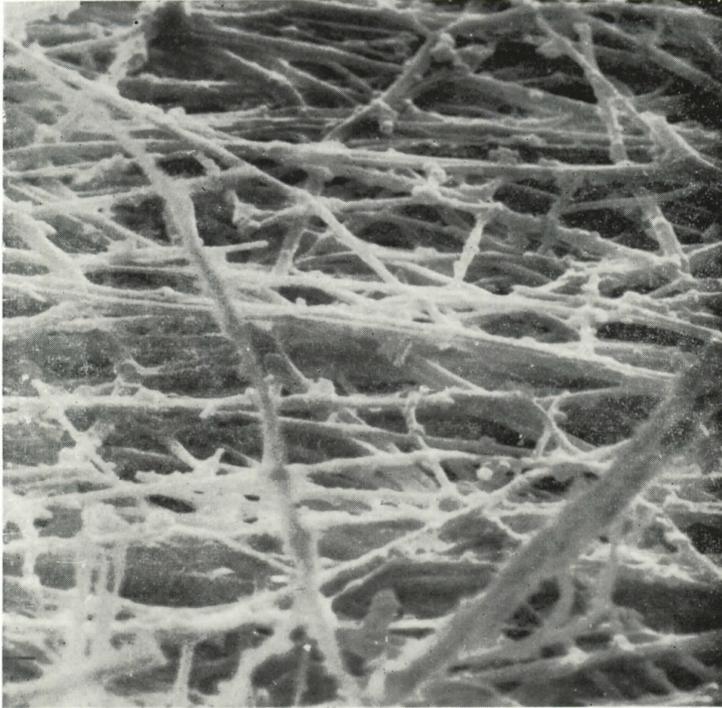


Fig. 3. Magnification of the outer layer of the inner shell membrane. The layer has been formed by a lamellar network of unbranched fibers. Dusty substances (mucin-like substances) are adhered around the fibers. So the demarcation of the fibers is somewhat unclear.  $\times 1,000$ .

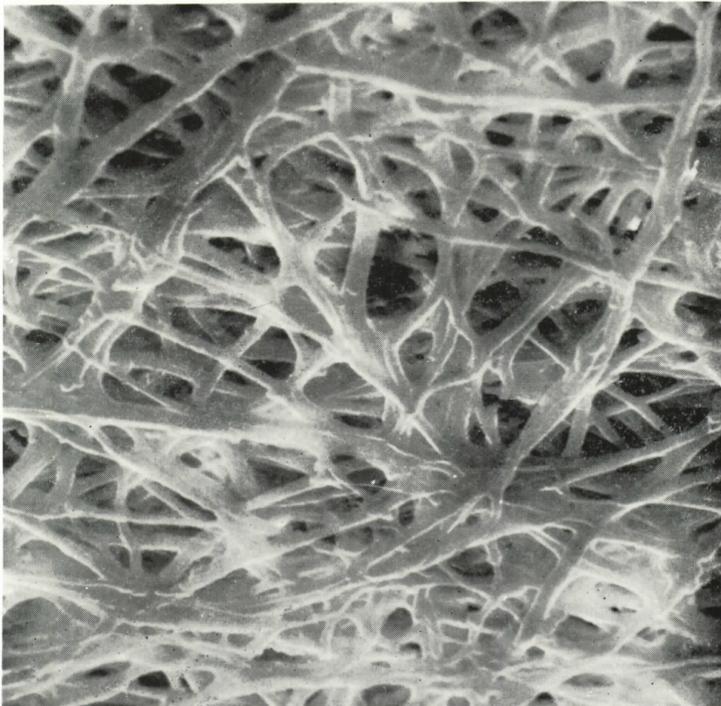


Fig. 4. Magnification of the outer shell membrane. The layer has been formed by a lamellar network of flattened fibers. There are anastomosis among these fibers, which have formed knots.  $\times 1,000$ .



Fig. 5. The outer surface of the outer shell membrane viewed from inside. The fibers of the outer shell membrane have entered the central depression of the mammillary knobs. Arrows indicate the mammillary knobs.  $\times 1,000$ .

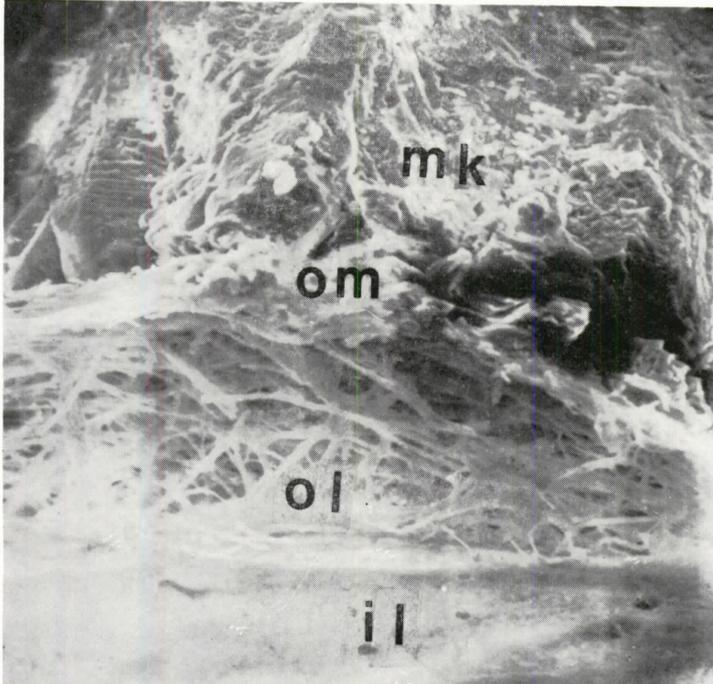


Fig. 6. Appearance of connection between the shell membrane and the mammillary knobs. Both layers are somewhat firmly connected by fibers, as is shown in Fig. 5. il: inner layer of the inner shell membrane; ol: outer layer of the inner shell membrane; om: outer shell membrane; mk: mammillary knob.  $\times 300$ .

を帯びた線維であり、ときに $3\sim 4\mu$ の太い線維も見られるが、これは融合した線維である。線維は分枝することなく、卵殻表面に平行に走り、これが縦と横に数層に交織して網眼を形成している。網眼は一辺 $10\sim 15\mu$ の方形を呈していた。とくに注目されることは、内卵殻膜外層の線維は、その周りが鱗片状にふくれており、これがため線維の輪郭がやや不鮮明であった。内卵殻膜は徐々に外卵殻膜に移行していた。

外卵殻膜は図1、4と5に見るように、内卵殻膜外層と同じように線維性の被膜であった。しかし外卵殻膜線維は、線維の太さ、走行などにおいて、内卵殻膜外層とは異っていた。外卵殻膜線維は、著しく扁平テープ様を呈し、巾 $3\sim 4\mu$ の太い線維であった。線維は直走することなく、軽く彎曲し、卵殻表面に平行に層状に配列していた。線維は所々において結び目状に融合していた。これがため線維は円形の網眼を形成し、網眼の大きさは卵殻膜内層のものより小さく、 $5\sim 10\mu$ 前後であった。外卵殻膜の外表面、すなわち卵殻乳頭層に接する面はやや不整であり、ここでは線維の一部は卵殻表面に垂直に走り、後述の乳頭突起の中央陥凹部や、乳頭突起の周囲間隙に進入していた(図5と6)。

卵殻膜は従来から、内卵殻膜と外卵殻膜の2層から構成されている点においては、諸家の見解が一致していた。しかし本観察においては上述のように、内卵殻膜は構造的に、さらに内外2層に分けられることを指摘した。従来の内卵殻膜は、著者らの見解によると、内卵殻膜外層に相当するものと考えられる。先にSIMONSら<sup>11)</sup>は、卵殻膜の電顕的観察によって、内卵殻膜内層の存在を報告している。

卵殻膜の線維の大きさ、走向状態などについては、例えばMORANら<sup>5)</sup>は、内卵殻膜線維は分枝が少く、ケラチンとムチンより成ると述べ、SIMONSら<sup>11)</sup>はそれは $1\mu$ 前後であり、大きなものでも $3\mu$ を越えないと述べ、MASSHOFら<sup>10)</sup>は $1\sim 2\mu$ と報告している。本観察では、内卵殻膜線維は $1\sim 2\mu$ の分枝

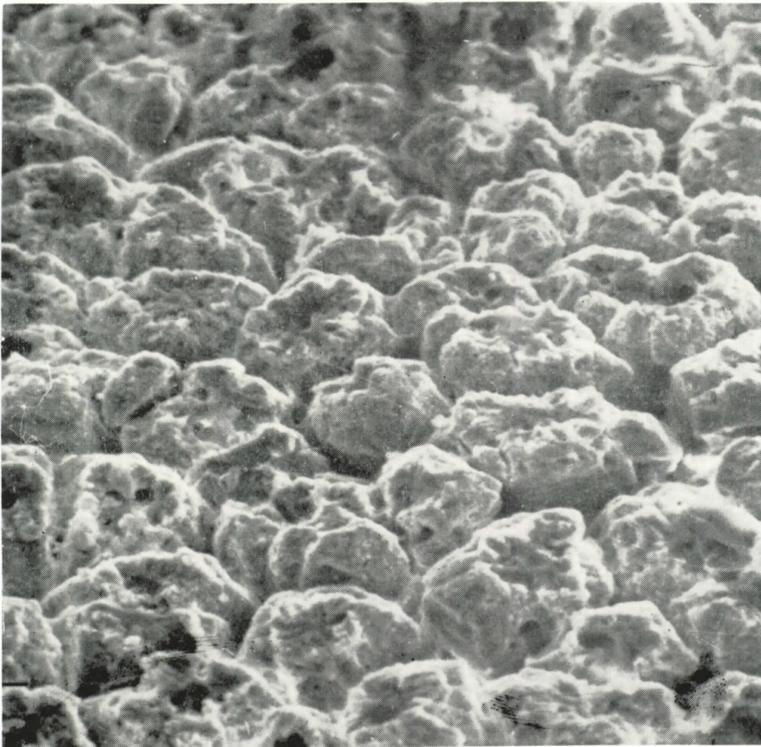


Fig. 7. The mammillary layer of the shell from which organic substances have been removed. A view from inside. The layer is made of numerous mammillary knobs (mammillae).  $\times 300$ .

しない線維であった。

内卵殻膜線維の構造について、MASSHOFF ら<sup>10)</sup>、SIMONS ら<sup>11)</sup> は電顕的観察において、この線維はケラチンを中軸として、その外圍を粘液多糖類物質が包んでいると報告している。上述のように著者らは、内卵殻膜線維は輪郭がやや不鮮明であるのが特徴であると述べた。MASSHOFF ら<sup>10)</sup>、SIMONS ら<sup>11)</sup> の云う線維構造から判断すると、先の線維の輪郭の不鮮明は、粘液多量物質の乾燥した凝塊によるものとも解せられる。外卵殻膜の構造について、MORAN ら<sup>5)</sup> はこの層はさらに3層に分けられ、最外層は2~5 $\mu$  の分枝しない線維網より成り、他の2層は0.8 $\mu$  前後の細い線維網より形成されていると述べている。本観察においては、外卵殻膜はMORAN の云うように、3層には分けえられなかった。この線維は一様に分枝しない、3~4 $\mu$  巾のテープ様線維で構成されていた。

外卵殻膜と卵殻乳頭層の接触について、ROMANOFF ら<sup>6)</sup> は乳頭層の乳頭突起が、外卵殻膜の外表面に頂端を埋没していると簡単に述べているに過ぎない。本観察においては、外卵殻膜線維は明かに乳頭突起内に進入しているのが認められた。このように外卵殻膜と卵殻乳頭層は、有機性基質を通じて連絡していた。このことから、卵殻膜と卵殻は緊密な接着を構成している。

#### 卵殻層 (石灰沈着層)

いわゆる卵殻層は、石灰の沈着した層である。この層は光顕的観察から、外側の spongy layer (海綿層または外卵殻層) と、内側の mammillary layer (乳頭層または内卵殻層) に分けられている。光顕的観察では、卵殻層は通常脱灰標本として調べられるのであるが、走査電子鏡検では、そのままの状態

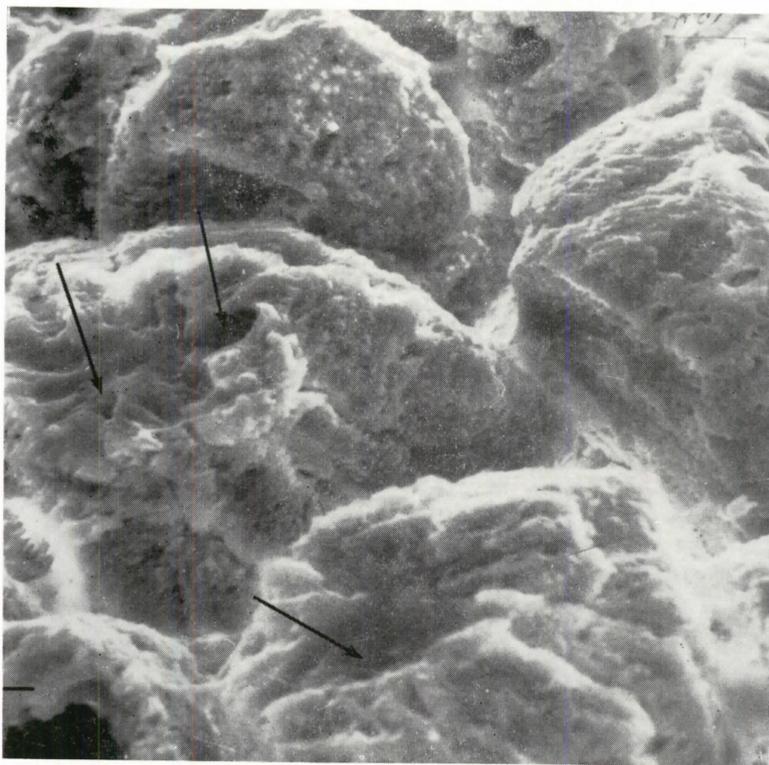


Fig. 8. Magnification of Fig. 7. The mammillary knobs are calcareous dome-like processes. The top of each knob is somewhat flattened and a crateriform depression lies at the center (the central depression). Several minute canals (arrows) are open at the bottom of the central depression. The knobs are separated by deep and wide interstices.  $\times 1,000$ .

直接的に調べることができた。

まず乳頭層を、内側から走査電子鏡検すると、自然卵殻では図4と5のように、乳頭層は外卵殻膜に被れて認められなかった。卵殻膜を溶出した脱有機卵殻では、図7と8のように乳頭層が明瞭に現われた。図7に見るように、卵殻乳頭層は乳頭突起 (mammillary knobs または mammillae) の存在によって特徴づけられた。乳頭突起は図7, 8, 10 と 11 のように、外卵殻層を基底として規則正しく、外卵殻



Fig. 9. Slightly protruded mammillary knobs. Arrow indicates an inner opening of the air pore.  $\times 1,000$ .

膜面に向って、ドーム状に突出している。乳頭突起の形状は、個々の卵によってかなり異なり、丘陵状に低い隆起を示すもの(図9)、あるいは図7のように典型的に円錐状のもの、中等度に隆起するものなど多様であった。図7のような典型的な乳頭突起では、基底部の直径は  $50\sim 60\mu$ 、高さは約  $30\mu$  であった。乳頭突起の頂端は、やや平坦であり、中央部は噴火口状に陥凹している(中央陥凹と仮称する)。陥凹底には直径約  $1\sim 2\mu$  の数個の細管口が認められた。この細管口は上述したところであるが、外卵殻膜線維が乳頭突起内に進入する通路と考えられる。中央陥凹の縁は鋸歯状に切れこみ、この切れこみは突起斜面の多数の裂溝に移行している。乳頭突起のこの形状から判断すると、石灰化現象が突起中心部を核として、放射状に進行したものと解せられる。個々の乳頭突起は、周りを深い溝によって囲まれていた(突起間溝と仮称する)。突起間溝の所々には、気孔口(内気孔口)が開いていた(図9)。次に乳頭突起の垂直断面を見ると、図10と11のように、突起の中心部に突起軸に平行に、大きな楕円形空洞が存在していた(中心空洞と仮称する)。空洞壁は著しく粗雑であった。この空洞は中心髄とも称せられる有機性基質で埋められているに違いない。乳頭突起の中心髄の存在は、古くから光顕的に推察されており、STEWART<sup>4)</sup> は光顕像でこの部は暗く見ると述べ、NATHUSIUS<sup>1)</sup> は中心髄は酸に不溶で、アルカリに可溶性有機質基質であると報告している。以上は脱有機卵殻の乳頭層の所見であるが、石灰沈着状態について概見すると、乳頭層は外卵殻層に比べて著しく多孔性海綿様であった。このことは乳頭

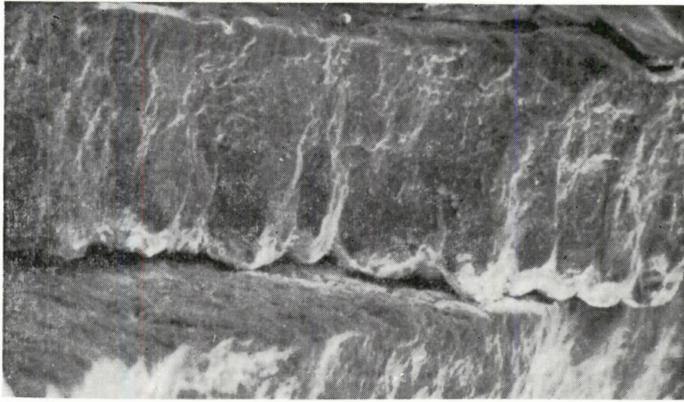


Fig. 10. Radial view through the shell from which organic substances have been removed. The shell is composed of a spongy layer and a mammillary layer.  $\times 100$ .

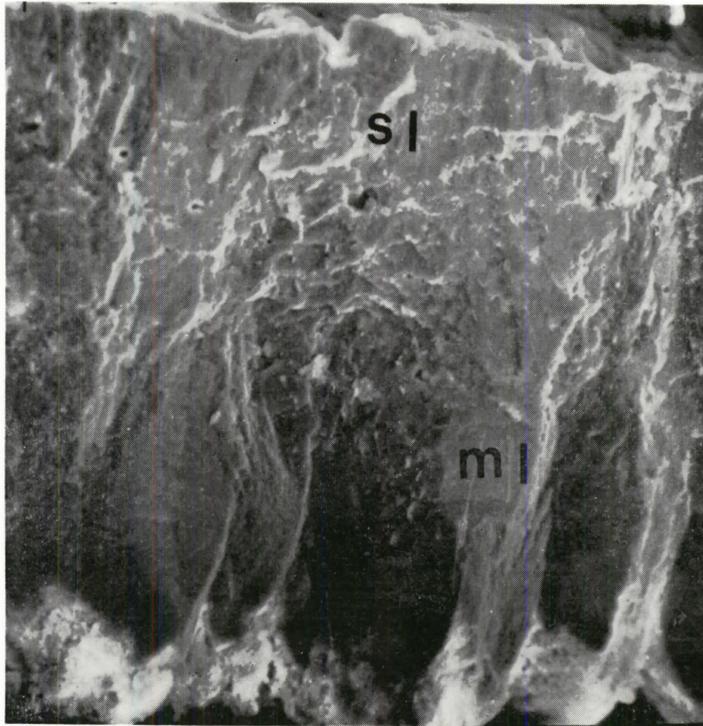


Fig. 11. Magnification of Fig. 10. The superficial layer of the spongy layer is more compactly calcified than the deep layer. The entire shell layer has been constructed radially by coarse and dense calcified columns, which are arranged at regular intervals. The mammillary knobs have a large cavity at the center. sl: spongy layer; ml: mammillary layer.  $\times 1,000$ .

層は外卵殻層に比して、石灰沈着において劣っていることを示唆する。なお上記の乳頭突起の中央陥凹や突起間溝は、自然状態では外卵殻膜線維のほかに、有機性基質で充填されているものと考えられる。

次に外卵殻層の構造を、同様に脱有機卵殻について観察する。外卵殻層は図10と11に見るように、乳頭層と明かな境界なく外側に続く緻密な石灰沈着層として示された。外卵殻層の石灰沈着は、全体を通じて一様でなく、部位によって疎密が見られた。一般に石灰沈着は、卵殻表層に移行するにつれて緻密となり、表層部はとくに緻密であった。よく見ると、卵殻表面に垂直方向にも、巾 $30\mu$ 前後の密と疎の石灰沈着柱が、交互に排列しているのが認められる。疎性の石灰柱は、乳頭層の乳頭突起に伸びている。このような石灰柱は、先に EL-BOUSHY ら<sup>9)</sup> が偏光顕微鏡で観察したものと一致する。

次に脱灰卵殻で卵殻層の構造を見ると、脱灰後に残った卵殻層の有機性基質は、密な線維網として示された(図12と13)。図12と13に見るように、基質線維は大体卵殻表層に平行に層を成して走っている。

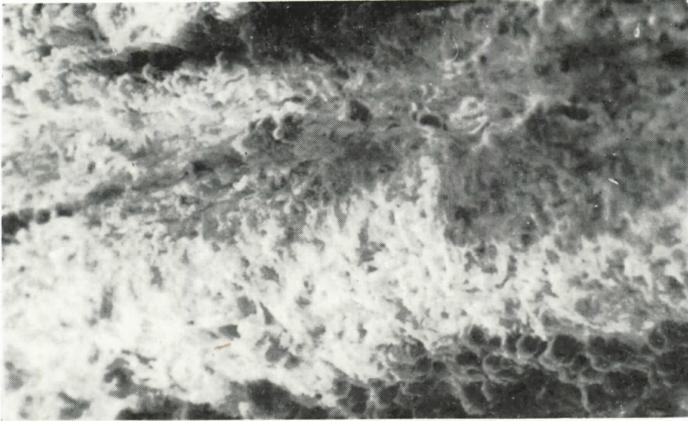


Fig. 12. The organic matrix of the shell after decalcification. It has been constructed by a meshwork of fibers.  $\times 300$ .

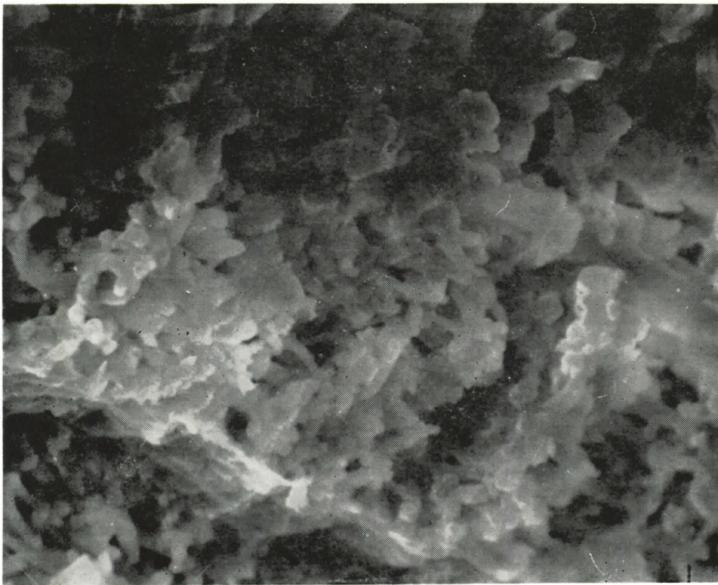


Fig. 13. Magnification of Fig. 12. Matrix fibers run parallel to the surface. The fibers have given off collateral branches. There are anastomosis among neighboring branches.  $\times 2,000$ .

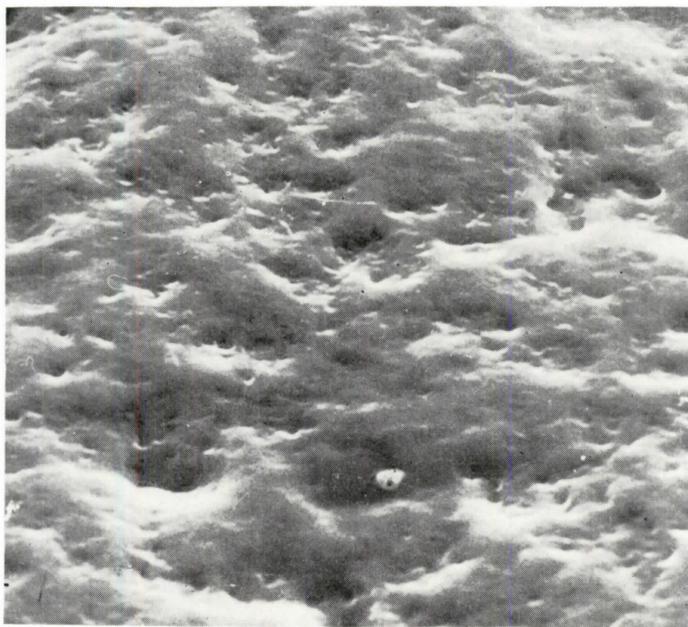


Fig. 14. The outer surface of the normal egg shell. The surface is very rough due to the presence of depressions and protrusions of irregular size or shape. Compared with Fig. 15.  $\times 300$ .



Fig. 15. The outer surface of the shell from which organic substances have been removed. Roughness of the surface is more distinct in this picture than in Fig. 14 with the cuticle. Air pores of various size and number open at the bottom of the depression.  $\times 300$ .

卵殻表層線維は直径  $1\sim 2\mu$  で、深層に移行するにつれて次第に太く  $2\sim 3\mu$  前後であった。各基質線維は、これと直交する方向に細い側枝を支別し、側枝は隣接のものとの吻合して、密な線維網を形成している。

卵殻の基質成分については、形態的、生化学的に多くの関心が払われてきた<sup>12)</sup>。ROMANOFF ら<sup>6)</sup>によると、卵殻基質は基質線維と粒子成分から成ると述べ、基質線維は全基質に平等に分布しているのではなく、乳頭層に近い所で最も豊富であると報告している。SIMONS ら<sup>11)</sup>の電顕的観察によると、卵殻基質は基質線維、微原線維、液胞などから成ると報告している。本観察においては、このような微細構造は観察できなかった。

#### 卵殻の外表面と気孔

卵殻の外表面は、一般に粗雑であり、ここに無数の気孔が開いている。卵殻表面の構造、気孔の形状、分布などは、光顕的によく調べられている。走査電子鏡検では、卵殻の表面構造がとくに明瞭に写し出された、図 14, 15 と 16 は、卵殻表面の走査電子鏡検像である。自然卵殻の卵殻表面は、図 14<sub>2</sub>に

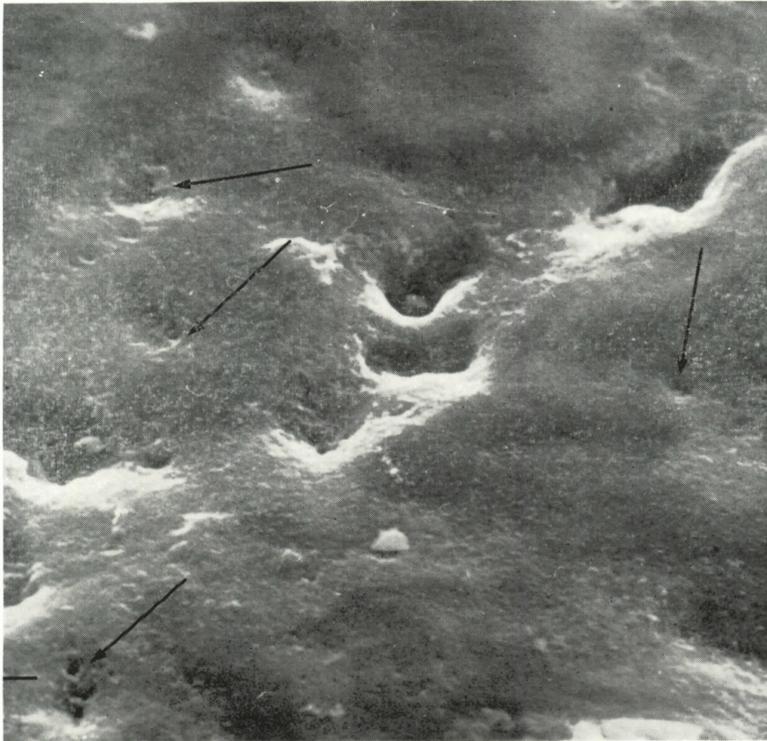


Fig. 16. Magnification of Fig. 15. Air pores have gathered at the depressed area. They vary in shape and size. Minute air pores (arrows) are open in the protruded area of the surface.  $\times 1,500$ .

見るように、陥凹隆起し、著しく粗雑である。クチクラ層が除かれた脱有機卵殻では、卵殻表面の粗雑性は、一層顕著となった(図15)。卵殻表面の陥凹部の形状は、不正円形、多角形、裂溝状など不定であった。陥凹部の底には、一様に1~数個の細管口、すなわち気孔の開口部(外気孔口)が認められる。このように外気孔口は、卵殻表面の陥凹部に群在していることから、陥凹部は気孔野とも称せられよう。外気孔口の形状は、円形、不正円形、裂隙状など多様であり、漏斗状に細くなって気孔管となっている。外気孔口の直径は一定していないが、約  $2\sim 5\mu$  であった。

一方卵殻表面の隆起部は、一般に平滑であるが、所々に直径約  $0.5\sim 1\mu$  の細孔が認められた (図16). この細孔も多分気孔の一種と考えられる. 気孔管は卵殻部を貫通して、前述したように乳頭突起間溝に開口するのであるが、走行の明かな気孔管は、本観察においては認められなかった. 気孔管の大きさ、走行などは、色素注入などによって調べられるが、気孔の大きさは HAINES と MORAN (1940)<sup>18)</sup> によると、約  $13\mu$  と報告している. 本観察では約  $2\sim 5\mu$  に過ぎなかった.

### クチクラ

クチクラは卵殻の外表面を包む薄膜であり、家鶏卵においてはとくに薄いことが知られている. 走査電子顕微鏡では、卵殻の表面観察によっては、クチクラは直接的には認められなかった. これはクチクラが



Fig. 17. Radial view through the shell. The letter C indicates the cuticle. The cuticle is a thin structureless membrane. sl: spongy layer.  $\times 300$ .

均質無構造であり、卵殻表面に密着しているがためである. 卵殻の横断面の観察では、クチクラは図17のように明示された. クチクラは厚さ約  $10\mu$  の無構造性の被膜であった. クチクラは卵殻表面の陥凹部、とくに気孔周辺で厚い傾向にあった.

クチクラに関する従来の報告を見ると、MORAN ら<sup>3)</sup> はクチクラは薄い蛋白性の透明膜であると述べ、ROMANOFF ら<sup>6)</sup> は銀染すると2層に分けられ、厚さは  $5\sim 10\mu$  であると報告している. SIMONS ら<sup>11)</sup> の電顕的観察では、クチクラは著しく胞状構造を呈しており、厚さは1例においては  $8.3\sim 12.8\mu$  他の1例では  $1.7\sim 2.3\mu$  であったと報告している. 本観察においては、このような詳しい観察はなしえないが、厚さに関しては上述のように約  $10\mu$  であった.

### 結 語

家鶏 (ホワイトレグホン種) の卵殻の構造を、自然状態、脱灰した状態、卵殻有機質を溶出した状態で、走査型電子顕微鏡下で観察し、次のような所見を得た.

1. 卵殻の最内層に位する卵殻膜は、内卵殻膜内層、内卵殻膜外層、外卵殻膜の3層より構成されて

いることが知られた。内卵殻膜内層は、少量の微細線維を含む無構造粒子性の膜であった。内卵殻膜外層は、直径1~2 $\mu$ の分枝しない線維網より成る線維性膜であった。外卵殻膜は、巾3~4 $\mu$ の扁平な線維より成る線維性膜であった。

2. 卵殻層の内側の乳頭層は、規則正しく排列する乳頭突起の存在によって特徴づけられた。有機質を除いた状態の乳頭突起は、基底部の直径50~60 $\mu$ のドーム状突起であった。乳頭突起の頂端は、噴火口状に陥凹し、陥凹底には数個の細管が認められた。突起の斜面は多数の裂溝によって鋸歯状を呈していた。乳頭突起の周囲は、深い溝で囲まれ、ここに内気孔口が開口していた。乳頭突起の中心部には、大きな空洞が認められた。

3. 卵殻層の外側の海綿層は、緻密な石灰の沈着層であった。無機質の沈着は、卵殻の表層において密性であり、深層において疎性であった。卵殻表面に垂直方向にも、疎性と密性の石灰帯が交互に排列していた。

4. 脱灰した卵殻層の有機性基質は、密な線維網として示された。基質繊維は多数の側枝を出し、表面に平行に走っていた。

5. 卵殻の外表面は、陥凹隆起の著しい粗面であった。陥凹部は複雑多様な形を呈し、陥凹底には気孔口が集まっていた。隆起部は表面平滑であり、細管口が存在していた。

6. クチクラは厚さ約10 $\mu$ の均質無構造的な被膜であった。

本研究に際しては、クレトイシKKの機械の使用を仰ぎ、中岡義朗、林一郎の両氏の協力をいただいたことを感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) NATHUSIUS W. von: *Z. wiss. Zool.*, **18**, 225-270 (1868). (quoted from ROMANOFF's The Avian Egg).
- 2) ———: *Ibid.*, **21**, 330-350 (1871), (quoted from ROMANOFF's The Avian Egg).
- 3) GIERSBERG, H.: *Z. wiss. Zool.*, **120**, 1-97 (1923).
- 4) STEWART, G.F.: *Poult. Sci.*, **14**, 24-32 (1935).
- 5) MORAN, T. and HALE, H.P.: *J. exptl. Biol.*, **13**, 35-40 (1936).
- 6) ROMANOFF, A.L. and ROMANOFF, A.J.: *The Avian Egg*, New York: Wiley; London: Hall (1949).
- 7) SAJNER, J.: *Acta Anat.* (Basel), **25**, 141-159 (1955).
- 8) MATHER, F.B., EPLING, G.P., and THORNTON, P.A.: *Poult. Sci.*, **41**, 963-970 (1962).
- 9) EL-BOUSHY, A.R., SIMONS, P.C.M., and WIERTZ, G.: *Poult. Sci.*, **47**, 456-467 (1968).
- 10) MASSHOFF, W. u. STOLPMANN, H.J.: *Z. Zellforsch.*, **55**, 818-832 (1961).
- 11) SIMONS, P.C.M. and WIERTZ, G.: *Z. Zellforsch.*, **59**, 555-567 (1963).
- 12) SIMKISS, K. and TYLER, C.: *Quart. J. micr. Sci.*, **98**, 19-28 (1957).
- 13) HAINES, R.B. and MORAN, T.: *J. Hyg.*, **40**, 453-461 (1940) (quoted from ROMANOFF's The Avian Egg).

#### SUMMARY

The structure of the hen's egg shell has been examined by many researchers under the optical microscope, polarization microscope, and electron microscope. In the present study, the structure of the egg shell of the White Leghorn hen was examined under the scanning electron microscope.

Completed eggs just after oviposition were used in this study. They were broken mechanically with a knife, and the inside was washed shortly with a physiological saline solution. The shells were fixed in a 10% formalin solution. After fixation, they were calcified by 3% glacial acetic acid. They were also dipped into 30~35% sodium hydroxide to remove organic substances from them.

The resulting materials were coated with gold or aluminum, and examined under the scanning electron microscope, Type JSM-2 (Japan Electron Optics Laboratory, Ltd.), at 25 KV accelerating voltage.

As is already known, the avian egg shell, from inside to outside, consists of the inner shell membrane, the outer shell membrane, the mammillary layer, the spongy layer, and the cuticle. By scanning electron microscopy, the inner shell membrane was divided into two layers, an inner and an outer layer. The

inner layer of the inner shell membrane had an amorphous granular appearance and contained fine fibers. The outer layer of the inner shell membrane was formed by a meshwork of fibers. These fibers were  $1\sim 2\mu$  in width and run parallel to the surface. They were surrounded by dusty substances that made their demarcation somewhat unclear.

The outer shell membrane was formed by a relatively dense meshwork of fibers. These fibers were  $3\sim 4\mu$  in width and looked like tapes. They anastomosed with one another in such manner as to form knots. The outer surface of the outer shell membrane was not so sharply defined. Some of the fibers entered the calcified part of the mammillary knobs.

The mammillary layer was made of numerous conical mammillary knobs (mammillae) arranged regularly with their base on the spongy layer. The calculous mammillary knobs from which organic substances had been removed were  $50\sim 60\mu$  in diameter at their base, and the diameter diminished toward the top. The top of each knob was somewhat flattened, and the center was crateriform (the central depression). Several small canals were open at the bottom of the central depression. The border of the central depression and the slope of the protrusions were indented sharply with many sulci. The individual knob had a large cavity, whose long axis was perpendicular to the surface. The cavity was filled with organic matrix of the natural egg. The mammillary layer changed gradually toward the spongy layer.

The spongy layer was densely calcified, yet the calcification was denser near the outer surface than in the deeper portion of the layer. On the other hand, the shell layer was constructed with dense and coarse calculous columns, which were arranged radially to the surface at regular intervals. In the calcified shell, these matrix fibers were  $1\sim 2\mu$  in width and gave off fine branches. There was anastomosis among neighboring branches.

The outer surface of the shell was not smooth, and had a strikingly convexo-concave appearance. The concave area of the surface had contained air pores. Some air pores were open in the convex area. The air pores penetrated the spongy layer and opened at the interspace between the mammillary knobs.

The cuticle was a thin structureless membrane about  $10\mu$  thick.