

魚類の黒色素胞に対するカリウムイオンの働き方 — 特に実験材料としての 摘出魚鱗の性質に就いての考察*

石 橋 貴 昭

九州大学理学部生物学教室

昭和 35 年 9 月 1 日受領

硬骨魚の色素胞が神経支配を受けていることは Ballowitz (1893), Wyman ('24), 富田 ('40), Parker ('48), Healey ('51, '54), Whitear ('52) 等の研究により明らかである。従つて従来実験材料とされている摘出魚鱗には、切断された、色素胞を含む鱗の表皮層中に神経繊維が残存していると考えられ、中葉ホルモン (MSH: 色素胞刺激ホルモン) の様な液性要因の効果も残つていることが充分考えられるから魚鱗は材料として決して単純なものでないことが推察される。

魚鱗の色素胞に外部からカリウムイオンを働かせると色素粒の凝集が起ることはよく知られているが、カリウムイオンの色素胞への働き方が直接的か或は残存神経を介しているのかこの点が問題となる。著者は先にこの点について二、三の実験を行い、既に予報的に報告したのであるが (石橋 '58), ここにそれ等の結果を詳報し併せて気付いた摘出魚鱗の性質に就いて二、三の考察を試みたい。

本文起稿に先立つて終始御指導と御鞭達を賜つた九州大学桑原万寿太郎教授、また有益な御助言を載いた森田弘道助教授に心から感謝の意を表する。

材 料 と 方 法

実験材料は飼育業者より入手した体長 5—6 cm のフナ *Carassius carassius*, コイ *Cyprinus auratus* 及び研究室近傍で採集した野生のメダカ *Oryzias latipes* の三種で、何れもそれらの体表から剝離された魚鱗を一旦淡水硬骨魚用の生理的塩類溶液 (山本 '49) に浸し次に検討する溶液が灌流する観察装置 (Ishibashi '57) に移し、150 倍及び 600 倍の顕微鏡下で観察した。色素胞の反応の大きさ即ち色素粒移動の大きさは一部は写真撮影によつて測定した。また写真撮影に依らない場合は顕微鏡の接眼レンズに入れたマイクロメーターによつて直接測定した。

実 験

1. 摘出魚鱗を等調 KCl 溶液に浸す際に見られる色素胞の反応: 特に KCl の長時間作用。

メダカの体表から摘出した鱗を直ちに生理的塩類溶液に入れる。この場合色素粒は最大限拡散を示すが、色素胞によつては所謂搏動を示すものがある。然し放置しておく (30 分—1 時間) と少し凝集を行つた後で静止状態になる。次にこの鱗を観察装置に移し KCl 単独溶液 (M/7.5 KCl, KHCO_3 で調整, PH 7.2) で灌流する。この際色素粒の凝集を起すのは鱗上のすべての色素胞でなく、全く凝集を起さないものや、枝のおよそ 1/2 迄しか色素粒の移動を起さないものがみられる。しかしながら短時間の観察だけでは色素胞が鱗上の表皮層に埋没していることとその分布位置から起ると考えられる溶液の滲透の時間差による反応の差であると云う疑いが出てくるので、長時間 KCl 溶液を灌流させて観察を続けた。その結果を第 I 図に示した。これは任意の時間々隔で写真撮影を行い、後で写真を基にして色素胞の枝の長さを測定し生理的塩類溶液中の枝の長さに対する百分率で色素粒移動の大きさを表わしたものである。これによるとカリウムイオンに対する色素粒凝集反応は一過性のものであつて或時間を経て再拡散してくることがわかる。この際通常の 1/2

* 九州大学理学部生物学教室業績第 98

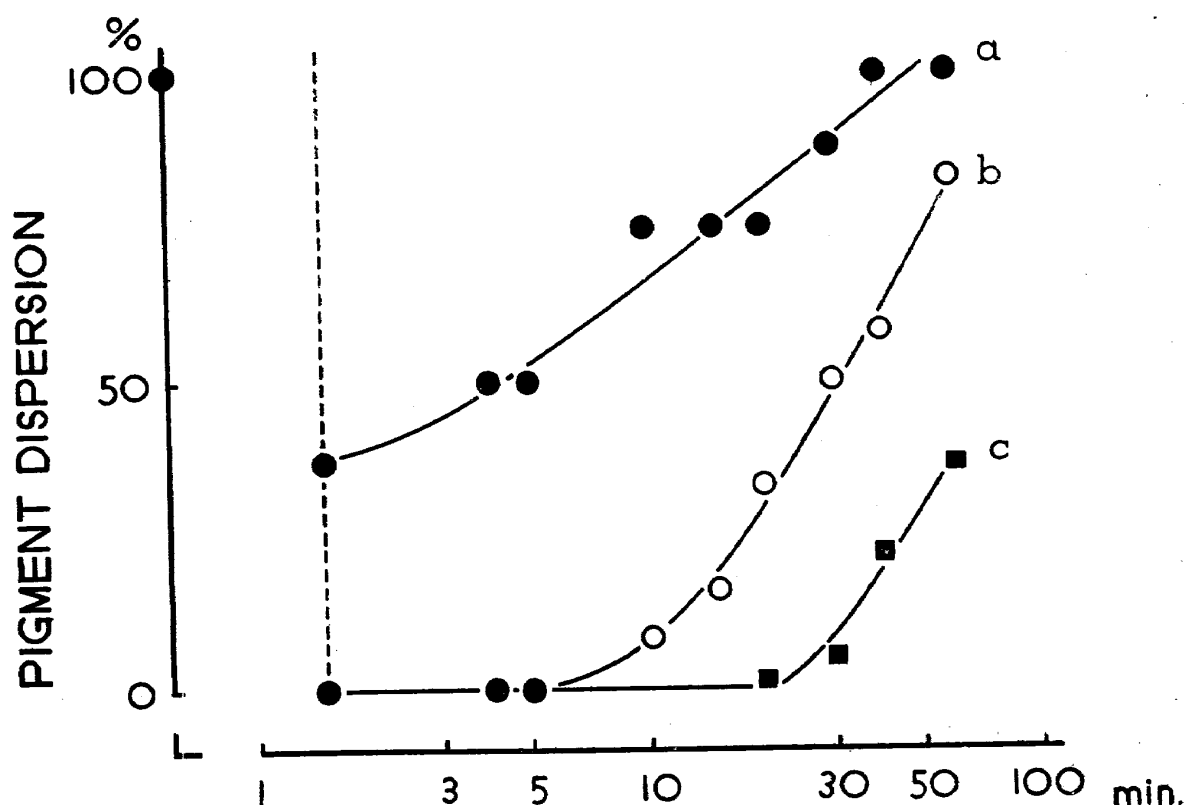


Fig. 1. The effect of the prolonged application of potassium ion upon melanophores of an isolated scale of *Oryzias latipes*. Four different types of response were observed in the melanophores of the same scale. A type of response which was insensitive to potassium ion was omitted from figure. The figure shows redispersion following aggregation of the pigment.

Ordinates: Relative magnitude of the pigment displacement expressed as percentage of the pigment dispersion of the melanophores in physiological salt solution.

Abcissae: Time in minutes expressed as logarithmic scale. The broken line of ordinates represents the initiation of the observation.

a: Response of the melanophore in distal part of the scale.

b, c: Response of the melanophore in proximal part of the scale. Temp. 27°C

しか凝集を示さない色素胞も或る時間がたつとその状態から再拡散が起つてくるから先に述べた種々の程度の凝集のみられる事実は透過の時間差によるものとは考えにくい。色素胞の鱗上の位置に注目してみると凝集を起さないものや不完全な凝集を示すものは鱗の遊離縁近くに位置したものであることがわかる。これ等のものは再拡散開始が最も速くしかも最初の拡散状態に完全に戻る。完全な凝集を起す色素胞のうち比較的再拡散開始時の速いものは中央部に、再拡散開始時の最もおそいものは基部に位置しており、両者共観察時間の1時間内では元の大きさまで戻らない。以上の様に同一鱗上の色素胞は凝集反応の性状から4型にわけられる。同様のことをコイで調べてみるとメダカの場合と異なつて表皮層、粘膜が厚い関係からか反応の時間差が可成り見られるが、それにもかかわらず凝集を起さないものや不完全な凝集しか示さない色素胞が鱗の遊離縁に位置する点は同様であつた。カリウムイオンによつて色素粒が凝集を起し再拡散してくる事実は古く Spaeth ('13) が報告しており、また最近尾崎 ('56) も報じているが色素胞の鱗上の位置関係については述べられていない。

2. 魚鱗色素胞を塩化アドレナリン溶液に浸す実験

観察装置は実験1と同様である。材料はメダカとコイの摘出魚鱗である。塩化アドレナリン液は後述する

様に生理的塩類溶液で種々の濃度に希釈溶解したものを用いた。先づ実験 1 に見られる様な再拡散をして、もはや KCl で凝集を起さなくなつた色素胞を塩化アドレナリン (1×10^{-4} M) 溶液で灌流すると例外なく凝集を示した。KCl とアドレナリンの間には作用機作の相違が推定される。

KCl に関し色素粒の凝集や再拡散の過程に様々の相違が見られることは、摘出魚鱗に残存している神経の分布と関連があると考えられる。D.C. Smith ('39) が述べている様にカリウムイオンがこの神経末端を刺激して色素粒凝集性の神経液を分泌させると仮定すると、ある色素胞では神経分布を欠くために色素粒凝集が起らず、あるものでは何等かの原因で末端構造を含めて神経が退化の途上にあるか、或は本来神経分布に粗密の差があつて、神経液の分泌が色素粒凝集を起す臨界濃度に達しないと云つた事が考えられる。又神経液分泌が臨界濃度に達して色素粒凝集が起つた場合、それは時と共に外液によつて希釈されて、再拡散が起ると考えると初めに濃度差があれば臨界濃度以下に希釈される時間差がそこに現われてくる筈である。アドレナリンを色素粒凝集性神経液に類似のものとして、種々の濃度の塩化アドレナリン溶液に魚鱗を浸し色素粒凝集を起す臨界濃度を見当付け、かつ完全に凝集の起つたところでアドレナリンを含まない正常な生理的塩類溶液に魚鱗を移し変えて色素胞の回復即ち色素粒が再拡散してくる時間を比較してみた。その結果が第 1 表にまとめられている。これに依ると 5.5×10^{-4} M の高濃度では観察時間 (約 2 時間) 内に再拡散が見られずアドレナリンの濃度が低くなるに従つて再拡散の開始時間が速くなつていくことがわかる。また 10^{-6} M ではもはや凝集すら起らない。

Table 1. The effectiveness of adrenalin in various concentrations to melanophores in an isolated fish scale. Table 1 represents the time required to initiate the redispersion of aggregated melanin granules within the melanophores, when the adrenalin solution is replaced by normal physiological salt solution.

Materials Conc. of Adrenalin M/l.	<i>Cyprinus auratus</i> (min.)	<i>Oryzias latipes</i> (min.)
5.5×10^{-4}	∞	
2.75×10^{-4}	56	
1×10^{-4}	50	68
5.5×10^{-5}	48	
2.75×10^{-5}		53
1×10^{-5}		3
5.5×10^{-6}		no effect
Temp.	18.5°C	23.0°C

3. 神経退化手術を施した魚鱗色素胞に対するカリウムイオン及びアドレナリンの作用

神経切除退化の方法は Mori ('31), Goodrich & Nichols ('33) 等の用いた方法で、魚鱗を双眼顕微鏡下で先端の細いピンセットを用いてその "Pocket" から摘出し再びその中に挿入する。魚鱗を摘出すことによつてそれ迄鱗の表皮層に入っていた神経繊維及び毛細血管が切断され、再び戻し入れて置くと、切断された神経末梢部が栄養障害を受けて退化する (Cannon & Rosenblueth, 49)。摘出後元の場所に挿入された魚鱗色素胞は最大限に拡散するので、魚を白い背景の容器に置くと他の体表の部分は色素粒凝集が起り挿入鱗は黒斑となつて残る。この黒斑は約 1 日はそのまま存続するがその後次第に褪色して来る。20 W の白色蛍光灯の真下 50 cm に置かれた黒、白背景の容器夫々に交互に魚を移し入れて体色変化をみて行くと 7 日から 10 日目になると挿入鱗の色調は殆んど正常鱗と区別が出来ない様になる。この事実は挿入鱗に神経の再生が行われた結果と考えられる。実験期間中水温は 23°C から 26°C であつた。以上の様な神経退化手術を施してから任意時間後魚鱗を観察装置に移し等調塩化カリウム溶液或は塩化アドレナリンを含む生理的塩類溶液を灌流させて、色素胞の反応を検討した。その結果神経切断操作後 3 時間目のものではカリウムイオンにより凝集は起るが完全に中心部迄は色素粒が移動せず、ちょうど実験 1 で鱗の遊離縁に近い色素胞にみられたような不完全な凝集しか示さない。更に時がたつにしたがい反応は悪くなり、18 時間以上たつたものではカリウムイオンに対する反応は全くみられなくなる (Fig. 2A)。しかしたとえば手術後 20 時間目のカリウムイオンに全く応じなくなつていく色素胞もこれにアドレナリンを作用させた場合には明瞭な色素粒凝

集を起す (Fig. 2B)。このように手術後 18 時間においてカリウムイオンに対する反応は一時なくなるのに

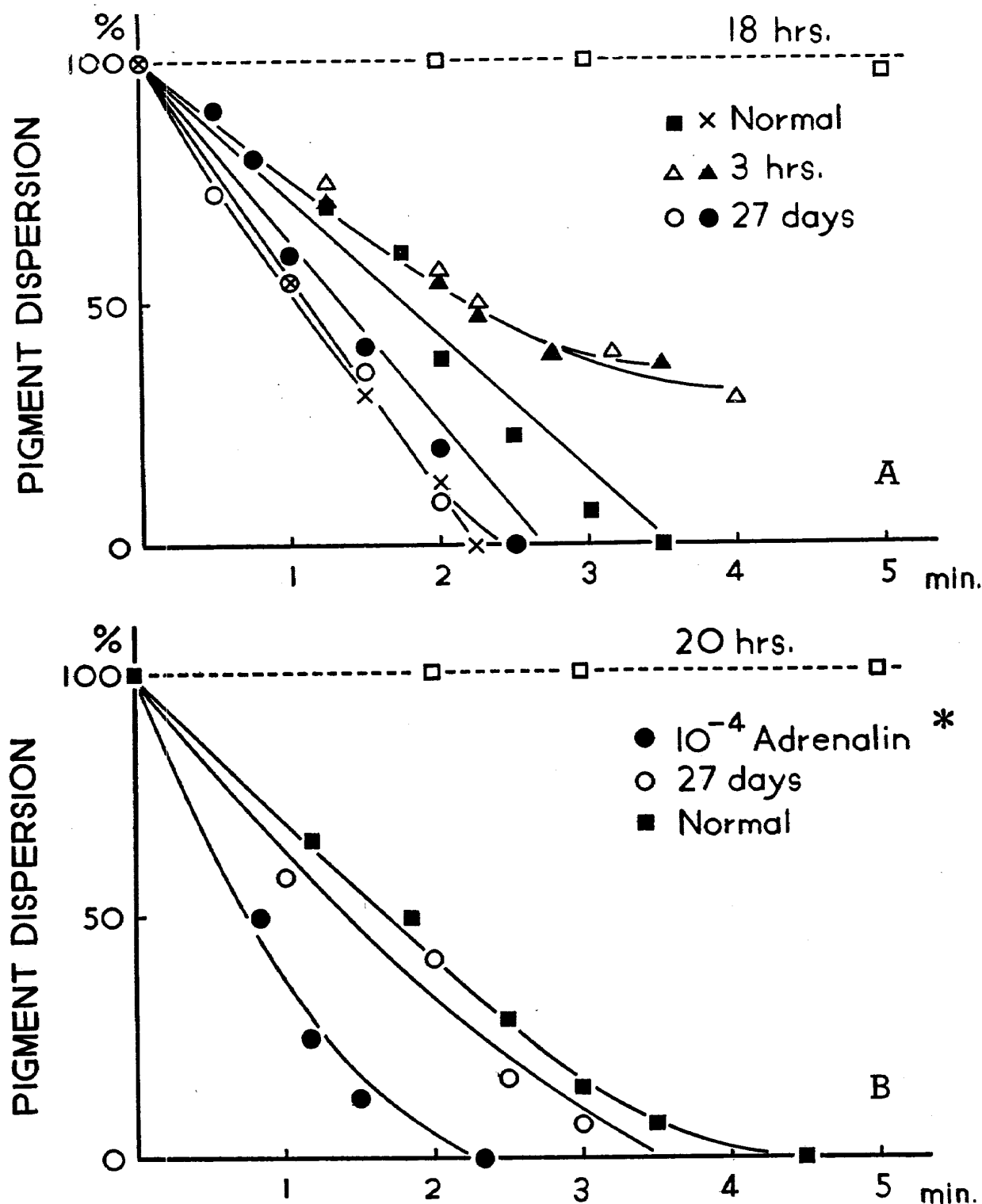


Fig. 2. Responses of melanophores in isolated fish scales to potassium ion under normal and denervated for several hours conditions.

Ordinates: The same as that of Fig. 1.

Abcissae: Time in minutes.

A: *Cyprinus auratus*

B: *Carassius*

*: Response to adrenalin of melanophores denervated before 20 hrs.

Temp. 25.5°C

もかわらず体表に戻してからたとえば 27 日間たつた魚鱗についてみると、正常なもの、すなわち体表の他の部位にある魚鱗をその時に摘出し対照としたものと全く同じようにカリウムイオンにより完全な凝集を起すのである (Fig. 2A, B)。

上記の魚鱗の摘出操作後 18 時間以上のものがカリウムイオンに応じないのは、神経の退化によるものでなく、摘出挿入操作によつて切断部位から周囲の水が透過し色素胞自体が滲透圧的に破壊されるために起るのではないかと云う疑念がある。そこで魚鱗を摘出して直ちに水道水に浸すことを摘出操作の対照として行つてみた。約 1 時間後この魚鱗にカリウムイオン及びアドレナリンを作用させてみたところ何れに対しても何の反応も示さない。この場合は滲透圧的に色素胞が破壊されたものと考えられるが、これに対して摘出後もとの“Pocket”に戻された魚鱗の場合 20 時間経過後でもアドレナリンによる凝集反応が残存している点からみて水の透過による色素胞の破壊が行われたとは考えられない。この実験 3 に用いられた色素胞は実験 1 にみられる様な初めからカリウムイオンに応じない色素胞が選ばれることを避けるために常に鱗の基部近くに分布するものの一つが選ばれた。

考 察

カリウムイオンを摘出魚鱗に長時間作用させた実験で同一鱗上の色素胞の位置により色素粒凝集及び再拡散の過程に異なる四つの型がみられた。この現象がすべての種の魚鱗に普遍的なものであるかどうかはわからないが、カリウムイオンは色素胞直接でなく神経を介して働くのであり、以上のような色素胞の反応の差違は神経分布の差異にもとづくということを暗示するように思われる。種々の濃度のアドレナリン溶液を用いること、および神経退化手術を施して後種々の時間を経過した色素胞にカリウムイオンを作用させることによつて実験 1 にみられる種々の反応型を殆んど再現出来る。Smith が述べている様にカリウムイオンが色素胞神経の末端を刺激してアドレナリン様の色素粒凝集性神経分泌液を放出させるとすると、カリウムイオンに全く応じない色素胞は神経分布を欠くか或は何等かの原因で退化したものと考え、また不完全な凝集しか起さないものは神経退化の途上にあるか、本来神経分布に粗であると考えればよく実験 1 の結果が説明される。

最近 Fujii ('58, '59) はドロメの尾鰭に作つた神経退化帯を利用してカリウムイオンが神経を介して働くことを明らかにしたが本報告および過去に於ける Smith の報告と共に色素胞神経の退化再生の確認は脊髄の電気刺激或は体色変化の検討によつたもので直接的証拠である組織学的検討を欠く点今後の研究が必要である。カリウムイオンが神経系の何れの部分に働くかについては、Nagahama ('53), Ueda ('55) 等のみたカリウムイオンの局所刺激が色素粒凝集を起させるのに有効であると云う事実を考えあわせると恐らく色素胞に非常に近接した神経末端構造ではないかと考えられる。Kinosita ('53) によれば生理的塩類溶液及びアトロピンを含む生理的塩類溶液中で拡散している色素胞と KCl 単液及びアドレナリンを含む生理的塩類溶液中で凝集している色素胞とについて色素胞の中心部と突起部との膜電位測定結果を比較してみると突起部に比して中心部の脱分極が著しい。この事実は色素胞の中心部に神経末端が集中して骨格筋の端板に相当する様な構造が存在することを暗示するようにも思える。今後の研究を要する問題である。

尾崎 ('56) は摘出魚鱗を生理的塩類溶液に浸すこと自体を一つの前処理と考え、無処理即ち摘出後直ちに被検液に入れ、処理、無処理について色素胞反応の相違を論じている。また Iwata & Yamane ('59) も前処理の効果について論じている。しかし摘出魚鱗を生理的塩類溶液に浸すことは残存神経を含めて色素胞がそれ迄浸つていた環境に近い状態に維持されると同時に色素胞刺激ホルモンの様な液性要因が排除されることを意味する。それで生理的塩類溶液に浸すことなしに直ちに被検液を作用させたりすることは摘出魚鱗の性質を考えると後述する様に問題がかえつて複雑になると思われる。

実験 3 に於いて神経退化魚鱗を得る操作の対照として摘出魚鱗を水道水に直ちにに入れてみたがこの処理を受

けた鱗の色素胞はもはやどのような反応も起さない。この際魚鱗を体表に戻して置けば正常な反応を示すことから鱗の表皮層上面の粘液層が元の鱗の“Pocket”に挿入した際よく密着して水の滲透を防ぐものと思われる。Wyman ('24) が魚の体表に直接塩イオンを作用させ色素胞に反応のみられないことから鱗の表皮層はイオンを透過させないと述べていることを考えると摘出魚鱗を水に浸したとき、摘出の際出来た鱗の基部の表皮切断面から水の滲透があり、他の被検液もここから滲透していくものと思われる。しかし生理的塩類溶液に長く浸して置くだけでも鱗上の粘液層の脱落がみられ、殊に外液にカルシウムイオンの存在しない液を用いたり、磷酸ナトリウムの様なカルシウム沈澱の塩を用いると特にこの離脱が著しい。したがってこの様な状態になつてくると被検液の滲透は表皮切断面だけでなく至るところから起つてくることが予想され、外液に浸す処理条件次第で色素胞を含めて表皮層が色々な程度に影響を受け、実際に被検液が何れの部分に働くのか判断することが困難になる。

要 約

1. コイ *Carassius carassius*, フナ *Cyprinus auratus* 及びメダカ *Oryzias latipes* の三種を用い摘出魚鱗の黒色素胞に対しカリウムイオンが直接的か或は神経を介して働くかを検討する実験を行つた。
2. 摘出魚鱗の黒色素胞にカリウムイオンを長時間作用させた結果カリウムイオンによる色素粒凝集は一過性であり時がたつと再拡散してくることがわかつた。しかもこの場合同一魚鱗上のすべての色素胞が様な反応を示すのではなく、それ等の分布位置により異なる 4 種の反応型が認められた。
3. 種々の濃度のアドレナリンを黒色素胞に作用させて色素粒凝集を起さしめ、後正常の生理的塩類溶液で洗うとある時間を経て色素粒の再拡散が起る。この場合アドレナリンの濃度の低い程再拡散開始が速い。
4. 神経退化手術を施した魚鱗の黒色素胞にカリウムイオンを作用させると、手術後時間の経過と共に色素粒凝集が不完全となり、遂に凝集反応は消失する。しかし更に時間が経過すると正常魚鱗の黒色素胞と全く同様に完全な凝集を示すようになる。以上の結果は魚の体色変化の検討結果とよく一致する。これ等の現象は魚鱗の神経の退化、再生と関連あるものと思われる。
5. 正常魚鱗に於いて、或は神経退化手術後時間が経過してカリウムイオンに応じない黒色素胞もアドレナリンに対しては明瞭な凝集反応を示す。この結果はアドレナリンとカリウムイオンの間に作用機構上の差異があることを暗示する。
6. 以上の実験結果からカリウムイオンは色素胞直接でなく神経を介して働くものと考えられる。また魚鱗上の色素胞の分布位置による反応の差異は神経分布の差異にもとづくことを暗示するように思われる。

文 献

- Ballowitz, E. 1893 Z. wiss. Zool., 56, 673. Cannon, W. B. & Rosenblueth, A. '49 The Supersensitivity of Denervated Structures. Macmillan Co. New York. 藤井良三 '58 動雑, 67, 225. Fujii, R. '59 Annot. Zool. Japon., 32, 47. Goodrich, H.B. & Nichols R. '33 Biol. Bull., 65, 253. Healey, E.G. '51 J. Exp. Biol., 28, 297. ——— '54 ibid., 31, 473. Ishibashi, T. '57 J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., IV, 13, 449. 石橋貴昭 '58 動雑, 67, 40. Iwata, K.S. & Yamane, H. '59 Biol. J. Okayama Univ., 5, 1. Kinoshita, H. '53 Annot. Zool. Japon., 26, 115. Mori, Y. '31 J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, 2, 185. Nagahama, H. '53 Jap. J. Zool., 11, 75. 尾崎久雄 '56 動雑, 65, 404. Parker, G.H. & Porter, H. '33 J. Exp. Zool., 66, 303. Parker, G.H. '48 Animal Colour Changes and their Neurohumours. Cambridge Univ. Press. Smith, D.C.

- '39 Amer. Nat., **73**, 247. **Spaeth, R.A.** '13 J. Exp. Zool., **15**, 527. 富田 軍二 '40 動雑, **52**, 141.
Ueda, K. '55 Annot. Zool. Japon., **28**, 194. **Whitear, M.** '52 Quart. J. Micr. Sci., **93**, 289.
Wyman, L.C. '24 J. Exp. Zool., **39**, 73. 山本 時男 '49 動物生理の実験, 河出書房.

Résumé

Action of Potassium Ion on Fish Melanophores with Some Considerations of the Characteristics of the Isolated Fish Scale

Takaaki ISHIBASHI

Department of Biology, Faculty of Science,
Kyushu University

The present reports are concerned with the analysis of the action of potassium ion on fish scale melanophores.

1. Using three species of teleosts, Carp (*Carassius carassius*), Funa (*Cyprinus auratus*) and Medaka (*Oryzias latipes*), the experiments were performed to ascertain whether potassium ion acts directly upon the melanophores or stimulates the nervous elements which are left alive in the isolated fish scale.

2. In prolonged application of potassium ion, it was observed that there were differences of reaction according to the locality of the melanophores in a scale. Moreover, the aggregation of the pigment granules within the melanophore which was induced by potassium ion had a transient phenomena.

3. The effectiveness of adrenalin in various concentrations upon the duration of the pigment aggregation to be induced by this agent has been examined. As the concentrations of adrenalin were increased, more and more the duration of pigment aggregation was prolonged.

4. The effect of denervation of the melanophore on the response to potassium ion was studied.

The scales were pulled out from their pockets with fine forceps and immediately slipped back into their pockets, thus severing all connections with the nervous system and allowing time for degeneration.

In tests of the effects of denervation on the response to potassium ion during the period of degeneration, the scales which had been withdrawn were compared with normal scales and with scales which had recovered from the denervated state.

In three hours after the operation, the magnitude of centripetal migration of pigment granules within the melanophore reached only about one-half that of normal scale melanophore. From 18 to 20 hours after the operation, the response of melanophores to potassium ion had disappeared. Corresponding to the passage of time after the operation, however, the response of melanophores was actually re-established and it was the same as that of a normal scale.

It may be suggested that these facts have relations with disintegration of the nerve fibers, including terminal structure connected with the melanophore, and a regrowth of them.

5. Both normal and denervated melanophore respond clearly to adrenalin. Furthermore, the melanophores which were originally insensitive to potassium ion, and the redispersed melanophores in prolonged application of this ion, were certainly responsive to adrenalin, thus suggesting a difference between potassium ion and adrenalin in mechanism of action to the melanophore.

6. It was assumed that potassium ion acts indirectly upon the melanophores through the nerve fibers which are left alive in an isolated scale. The failure or incompleteness of the response to potassium ion of the normal scale melanophores may be also explained by the lack or disintegration of the melanophore nerve.

新 着 図 書 (続 き)

Journal of the Institute of Polytechnics Osaka City University, Series D, 10, 1959

Journal of the Marine Biological Association, 39: 2, 1960

Meddelelser om Grønland Udgivne of Kommissionen for Videnskabelige Undersøgelser i Grønland, 122: 4

Memoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Nouvelle Serie, Serie A, 15-16, 19-21, 1957-1959

Microentomology, 24: 2, 1960

Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin, 35: 2, 1959

Okajimas Folia Anatomica Japonica, 36: 1-2, 1960

Philippine Journal of Science, 88: 2, 1960

Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, 67: 3, 1959-1960

Proceedings of the United States National Museum, 112: 3438, 1960

Referativnyj Zhurnal (Biologija), 15, 1960

Revue des Sociétés Savantes de Haute Normandie, 17, 1960

Revue d'Entomologie de l'URSS, 39: 3, 1960

Tijdschrift voor Entomologie, 103: 1-2, 1960

Travaux de la Station Biologique de Roscoff, 11, 1959

Trudy Zoologicheskogo Instituta, 27, 1960

Voprosy Ikhtiologii, 14, 1960

Zoologicheskyy Zhurnal, 39: 7, 1960

Zoologica, 45: 2, 1960

地質学雑誌, 66: 780-781, 1960

衛生害虫, 5: 1-4, 1960

弘前大学文理学部理科報告, 7: 1, 1960

北海道大学水産学部研究彙報, 11: 1-2, 1960

科学, 30: 7-10, 1960

解剖学雑誌, 35: 5, 1960

各国原子力情報, 65-66, 1960

高知大学学術研究報告 (自然科学), 9: 3, 1960

日本水産学会誌, 26: 9, 1960

生物統計学雑誌, 7: 1-2, 1960

植物学雑誌, 73: 868, 1960

自然科学と博物館, 27: 7-8, 1960

水産庁淡水区水産研究所研究報告, 10: 1, 1960

傷病統計学雑誌, 3: 1, 1960

天文月報, 53: 10, 1965

東北大学理科報告, (生物学), 26: 1-2, 1960

東京農業大学農学集報, 6: 1, 1960

鳥, 75-76, 1960

宇佐臨海実験所研究報告, 7: 1-2, 1960

人類学雑誌, 68: 1, 1960