

ウズラ網膜内油滴の発生学的研究¹⁾

小 西 喬 郎

京都市 京都大学理学部動物学教室

昭和 40 年 1 月 16 日 受領

ABSTRACT

Developmental Studies on the Retinal Oil Globules in Japanese Quail, *Coturnix coturnix japonica*. T. KONISHI (Department of Zoology, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto) *Zool. Mag.* 74: 119—131 (1965)

The process of the development of retinal oil globules has been investigated by microspectrophotometry (using an Olympus, MSP, A-IV) and by measurement of the globule diameter. The spectral patterns of the globules obtained during the development can be classified into 6 types: *a*) colorless (no absorption), *b*) green (max; 400–440 $m\mu$), *c*) no peak in 400–500 $m\mu$, *d*) three peaks in 400–500 $m\mu$, *e*) red (max; 530 $m\mu$), *f*) orange (max; 500 $m\mu$). Type *a* or *c* first appeared on 12th day after incubation followed by type *e*, and just before hatching type *b* and *f* appeared. Type *d* was found on 15th day. The results from the diameter measurement as well as the microspectrophotometry are as follows: i) Orange (*f*) and red (*e*) are not originated from *a* or *c*, but are formed with the differentiation of cones. ii) Green (*b*) seems to be derived from *a* or *c*, and orange (*f*) is formed through *d*. iii) In general, the increase in number of globules occurs until about 15th day and is followed by growth. (Received January 16, 1965)

鳥類および爬虫類の網膜に存在している有色油滴の役割は、古く Walls and Judd (1933) によって詳細に検討されたが、その生理的意義は現在なお解明されたとはいえない。また、これらの油滴の発生過程における変化についても、主として顕微鏡下での観察に基づいて追求され、円錐細胞の増加・生長を考慮に入れないで調べられたことから、有色油滴(三または四種類)の発生順序および油滴相互間の関連性に関する明確な結論が得られていない。油滴の発生を詳しく調べることは、その色素類(カロチノイド)の生合成という観点からも意義があると思われるし、また同時に円錐細胞外節に存在すると考えられている感光色素と関連させて有色油滴のもつ生理的意義を明らかにすることができる点において、鳥類における光と生殖腺発育の問題を解明していく上に、極めて重要な意味を持つものと思われる。著者はこれらの観点に立って、まず油滴の役割を調べる一つの方法として、油滴の発生過程における変化を、顕微分光測光法によって追求し、いくつかの知見を

得たので報告したい。

材料および方法

ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) の卵を 37°—38°C で孵化し、胚の発生過程における油滴の種類、光吸収および油滴の大きさの変化を調べた。最初の観察で、孵卵開始後 10 日目までは円錐細胞および油滴が、まだ形成されていないことが確かめられたので、孵卵後 11 日目から孵化後 1 日目まで、適当な間隔をおいて油滴の発生過程における各状態を観察した。孵卵は合計 700 個の卵を用いて 4 回にわたって行った。これらのうち未受精卵や発生途中で死亡した個体などを除いた結果、約 170 個の卵について調べたことになる。孵化率は平均して約 70% であった。

油滴の光吸収の測定にあたっては、まず赤色光下で網膜を生理食塩水 (PH 7.4) 中に取り出し、その一部を特別に薄いスライドガラスに載せ、これと同じ厚さのカバーガラスをかけて、周囲を真空グリースで封じ、顕微分光光度計(オリンパス, MSP-A-IV 型)を用いて測定した。測定には主として乾燥系反射対物鏡(90×, N.A. 0.65)を用いたが、この場合には厚さ 0.7 mm の石英スライドおよびカバーガラスを使用した。40×または 100×の通常の対物鏡を用いる場合には、厚さ 0.13—0.17 mm のカバーグ

1) This article is the report No. 5 of studies on photobiology.

ラスを使った。MSP-A IV 型は小穴・直良型(Nao-ra, 1955)で、集光器として同倍率の対物鏡が使用されており、タングステン灯から発せられた光は、double monochrometer を通って分光され、ピンホールを通して試料上で焦点を結ぶ。さらに試料を通った光は光電子増倍管で増幅され、マイクロアンメータで透過率(吸収)として記録される。90×反射対物鏡を用いた時の試料上の円形スポットの直径は 2.0μ であり、この反射対物鏡は球面収差が一応除去されている(野間, 1963)。測定は通常 $400-620\text{ m}\mu$ の波長範囲で、 $10\text{ m}\mu$ ごとに行った。波長幅は、 $400\text{ m}\mu$ で $0.9\text{ m}\mu$, $546\text{ m}\mu$ で $2.3\text{ m}\mu$, $1000\text{ m}\mu$ で $8.0\text{ m}\mu$ であった。

さらに顕微鏡下(Apochromatic lens を使用)で油滴の種類を調べると同時に、二種以上の油滴が存在している場合にはその割合を計数によって求めた。二種以上の油滴の割合、油滴の直径を求めるときには、スライドガラスに真空グリースを輪状につけ、それを生理食塩水中に入れて輪状のグリースの中央に網膜を載せ、カバーガラスをかけてから生理食塩水中より取り出して観察した。この方法で網膜がカバーガラスの重みによって変形するのを防ぐことができた。材料は常にベクテンの近くの網膜のほぼ中央にあたる部分を用いた。油滴の直径は $100\times$ 油浸レンズで、マイクロメーターによって測定した。

実 験 結 果

〔I〕油滴の発生段階と各ステージにおける油滴の割合について

ウズラの卵は $37^{\circ}-38^{\circ}\text{C}$ で孵卵後 16—18 日の間に孵化するが、孵卵後 11 日目までは油滴の形成がみられず、孵卵後 12 日目になって円錐細胞が形成されると同時に、初めて内節と外節の間に薄緑色に見える小さな油滴が出現する。その後約 24 時間を経過して、橙色に見える油滴が現れてくる(photo. 1)。この橙色油滴は出現当時、非常に色が薄く形も小さいが、その後全油滴の 15% 以上を占めるようになると、明瞭な橙色を示すようになる。橙色油滴が明瞭な橙色になってくる頃、今まで薄緑色に見えた油滴に薄緑色と黄緑色の二種類のあることが認められるようになる。この時期になって、初めて三種類の油滴が出現したことになる(photo. 2)が、やがてこの三種類はさらに明瞭に区別されるようになり、孵化直前になって、孵化後の状態とほぼ同じ色調を示すようになる。これらの観察に基づいて、油滴が最初に発生してから孵化後までの期間を、次に

示す I—VIII のステージに分類した(Table 1)。

St I: 油滴が出現した時期。この時期には薄緑色(PG)の油滴一種類しか存在しない。

St II: 橙色(O)の油滴が出現し、二種類になった時期。

St III: 薄緑色に見えていた油滴が薄緑色と黄緑色(YG)の二種類に区別されるようになった時期。しかしながらこの時期には、その区別はまだ不明瞭である。

St IV: 三種類の油滴[緑色(G), 黄緑色(YG), 橙赤色(OR)]が存在していることが明らかになった時期。卵黄の吸収はまだほとんど始まっていない。

Table 1. Developmental stages of the colored oil globules. (Hues of globules observed under microscope are indicated at the right of this table; PG: pale green, G: green, YG: yellowish green, YO: yellowish orange, O: orange, OR: reddish orange, R: red, BH: just before hatching, AH: after hatching.)

Stage	Days after Incubation	Droplets (Color)
I	12	PG
II	13	PG: O
III	14	PG: (YG): O
IV	14—15	PG: YG: OR
V	15	G: YO: OR
VI	15—16 (BH)	G: YO: OR
VII	16—17 (AH)	G: O: R
VIII	18—19 (AH)	G: O: R

St V: 卵黄の吸収が始まり、網膜のメラニン層が光に鋭敏に反応を示すようになった時期。三種類の油滴の色は、緑色、橙黄色(YO), 橙赤色である。

St VI: 卵黄の吸収が進み、孵化直前の状態。三種類の油滴の色は St V とほぼ同じ。

St VII: 孵化直後から約 3 時間後。油滴の色調は、緑色、橙色(O), 赤色(R)。

St VIII: 孵化後、卵黄がほとんど吸収されてなくなった状態。油滴の色調は VII と同じ。

このように分けられた St I—St VIII のうち、孵化前のステージ(St I—St VI)と孵卵後の日数の関係を Fig. 1 に示した。前に述べた通り、ウズラでは孵化日数が 16 日目—18 日目にわたり、すべての

個体がそろって発生してくれないので、油滴のそれぞれの発生段階は、約1日の幅を持つことになるが、Fig. 1 からわかるように、著者の示したステージの順序に従って、油滴の発生が孵卵日数と共に進んでいくことがわかる。

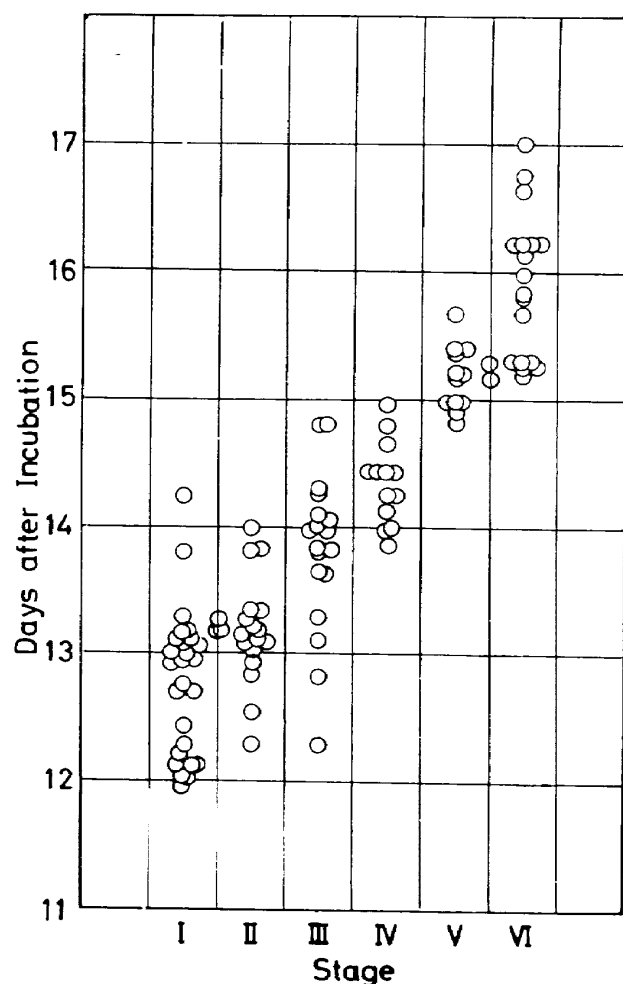


Fig. 1. Relationships between developmental stages and the times after incubation. (An open circle shows an egg examined. Intermediates between st I and II or between st V and st VI are illustrated on the line between the two stages in the figure).

St I で孵卵後 12 日目と 13 日目近くに多くの個体が集まっているのは、薄緑色の油滴が最初に出現した時期と、その数が増加していく時期とがこのステージに含まれているからであると思われる。それぞれのステージで、他の大部分の個体と比較して発生が特に遅れているものは、孵化率が約 70% であ

Table 2. Ratios of three kinds of globules on each developmental stage (Globules are classified into G, O and R groups on the basis of their absorption spectra).

Stage	G group (%)	O group (%)	R group (%)
I	100	0	0
II	88.6	0	11.4
II	82.5	0	17.5
II (III)	77.6	0	22.4
III	71.1	10.0	18.9
IV	58.7	20.5	20.5
V	56.7	21.2	22.3
VI	62.7	18.4	18.9
VII	55.6	22.0	22.4
Ad*	64.2	18.0	17.8

* adult

ったことから、途中で発生が止まる個体であった可能性が強い。

ここで記載を簡明にするために、上記のようにステージに分けると共に、油滴を各グループに分けて名称を付けることにする。まず成鳥に存在している、赤色、橙色、緑色の三種類の油滴の光吸収を調べた結果 (Fig. 2-8), 560 $m\mu$ (赤色油滴), 510 $m\mu$ (橙色油滴), 及び 400—440 $m\mu$ (緑色油滴) にそれぞれ極大吸収を示すことが確かめられた。これらの事実から、今後赤色油滴を R グループ、橙色油滴を O グループ、緑色油滴を G グループと表わすことにする。成鳥においても、発生過程におけると同様に、無色の油滴が存在しているが、これは便宜上 G グループに含めることにした。

油滴の発生過程において二種または三種類の油滴がどのような割合で存在しているかを示したのが Table 2 である。ここに示した数字は、多くの場合、5 個体以上の値を平均したものである (1 個体につき、300—500 個の油滴を計数して、油滴の割合を求めた)。測定の結果、かなりのばらつきが認められたが、だいたいの傾向は一応示されているようである。まず St II で、R 群の油滴が発生時よりかなり急激に増加してくることがわかる。St III になると、O グループに属すると思われるものが R 群の油滴と同じ様に急激に増加し、St V 以後では、G 群: 60%, R 群: 20%, O 群: 20% と、ほぼ一定の割

合を示すようになる(ここで, **G**, **O**, **R** の三群にわけたのは, 後に述べる吸収曲線の測定結果を考慮して分類したものである)。以上の油滴の発生状態並びに数の割合から, 油滴の発生順序は**G**群から**R**群が分かれ, さらに後になって**G**群から**O**群が生ずるものと考えることができる。しかしながら **St I** から **St IV** までの期間は, 一般に油滴の数の増加が著しいので, 油滴の発生状態および数の割合のみからその発生順序を論ずることは非常に危険である。従って以上の結果に, さらに発生過程における油滴の光吸収の型を考慮に加えて, 油滴の発生順序を推定することがより妥当であると考えた。

〔II〕 発生過程における油滴の光吸収

油滴の光吸収の測定結果は Fig. 2-2—Fig. 2-7 に示してある。ここに示したものは, いくつかの測定例を比較して得られたそれぞれのステージにおける典型的な吸収曲線である。吸収曲線の高さは油滴の大きさとスポットの大きさによって変わってくるので, 量的な意味を表わしているとはいえない。Fig. 2-1 に示したのは, 孵卵後 10—11 日目頃によく見られる薄緑色の油滴様物質の吸収曲線である。これが油滴でないことは, その大きさ及び存在する位置から容易に推察できる。しかしこの物質の示す吸収は, その後に現れる薄緑色の油滴の示す吸収に近い。この物質と油滴との関係はよくわからないが, 少なくとも油滴が形成される以前の網膜内に, 400—500 $m\mu$ にわたって吸収を示す物質が存在していることを示している。油滴は最初に出現したときは非常に小さく(直径: 0.8—1.0 μ), 顕微分光光度計の最小スポット(直径: 2.0 μ) よりもはるかに小さいので, その測定結果の信頼度はかなり低いとみななければならない。従って **St I** における測定結果はここに示さなかった。

橙色油滴が最初に出現した時の吸収曲線は Fig. 2-2 に示した (**St II**)。橙色油滴が 500 $m\mu$ 近傍に吸収極大をもち, 薄緑色の油滴が 400—500 $m\mu$ の間で少し吸収を示しているようにみえる。この他に 400—600 $m\mu$ にわたってほとんど吸収を示さないもの(無色)が多数存在していた。

St II のやや後半には, Fig. 2-3 に示したように, 530 $m\mu$ に極大吸収を示すものが観察された。**G** 群に二種類あることがわずかに認められる時期 (**St**

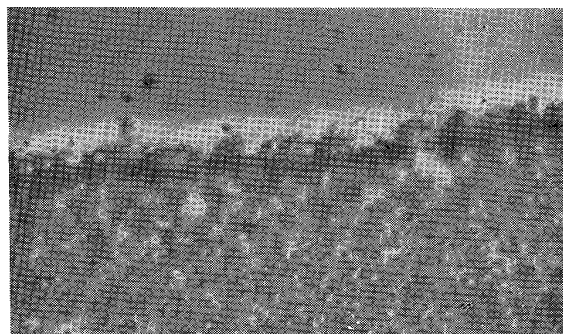
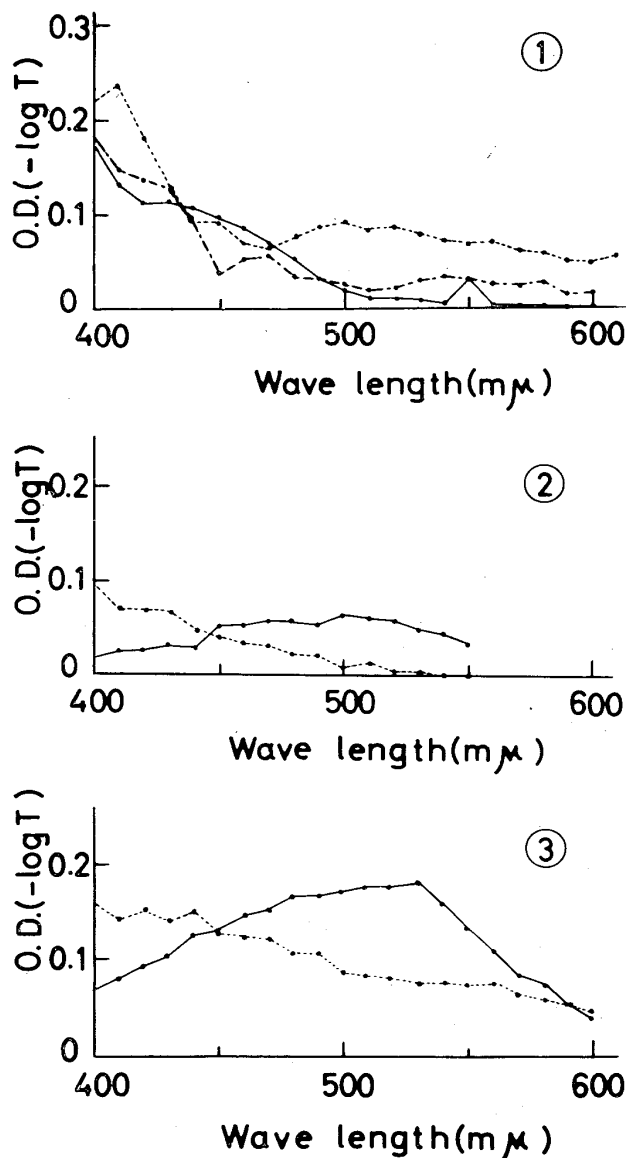
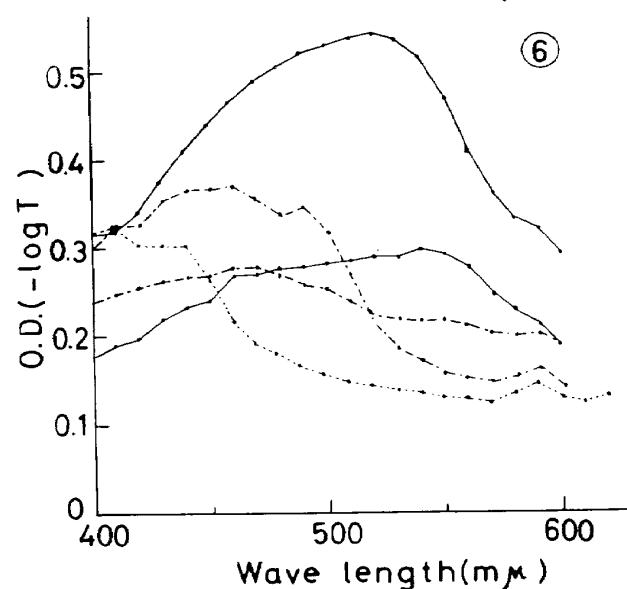
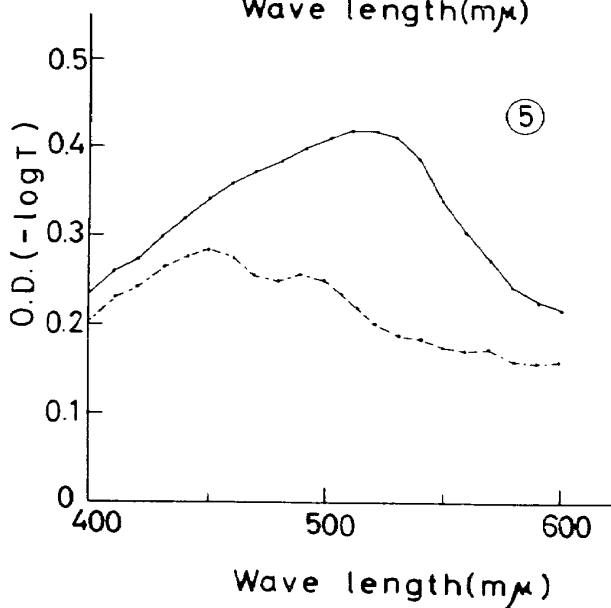
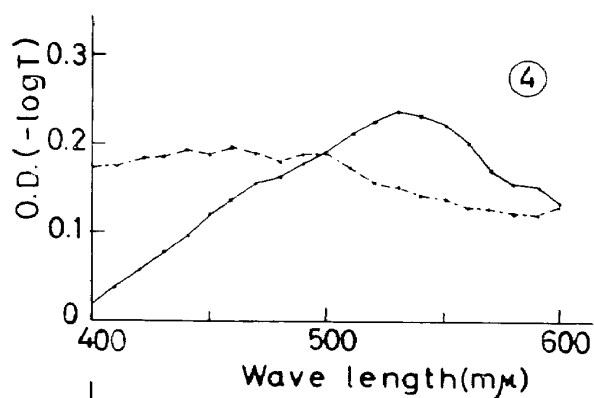


Photo. 1. Cones and oil globules at 12 days and 7 hours after incubation (st II).



III) には, 530 $m\mu$ に極大吸収をもつ橙色油滴と 400—500 $m\mu$ にわたって吸収を示すもの(短波長側へ漸次増加; **St II** のものと同じ)と, ほとんど吸



収を示さないものの三種類の吸収曲線が得られた (Fig. 2-4)。

三種の油滴が完全にそろった時期 (St IV) には、

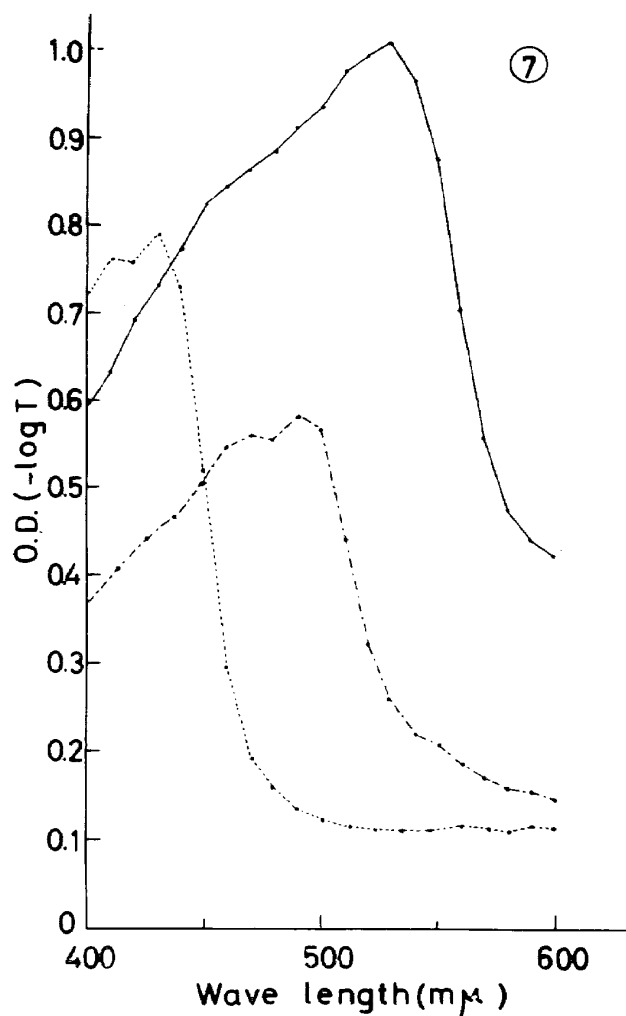


Fig. 2-1. Absorption spectra of the oil globule-like substances found on the 10-11th day after incubation. (three cases are shown.)

Fig. 2-2-2-7. Representative absorption spectra of the globules on each developmental stage.

Fig. 2-2; at the beginning of st II, Fig. 2-3; st II, Fig. 2-4; st III, Fig. 2-5; st IV, Fig. 2-6; st V, Fig. 2-7; st VI, VII, and VIII. (solid line: R group, chain line: O group, dotted line: G group. Colorless globules are always found during the development, but their spectra are not illustrated).

510—530 $m\mu$ に極大吸収を示すもの、400—500 $m\mu$ の間に三つの吸収の山を示すもの、400—500 $m\mu$ にわたって吸収を示し、短波長側ほど漸次吸収が増大するものと、三群が認められた (Fig. 2-5)。卵黄の

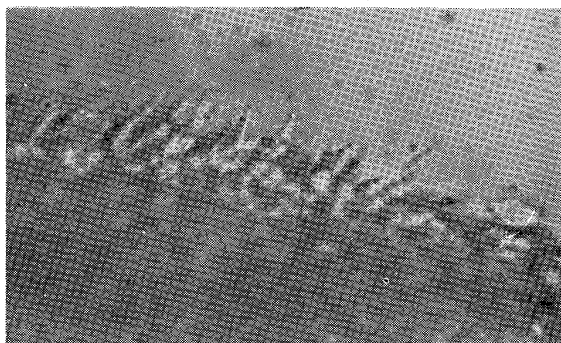


Photo. 2. Cones and oil globules at 13 days and 20 hours after incubation (st IV).

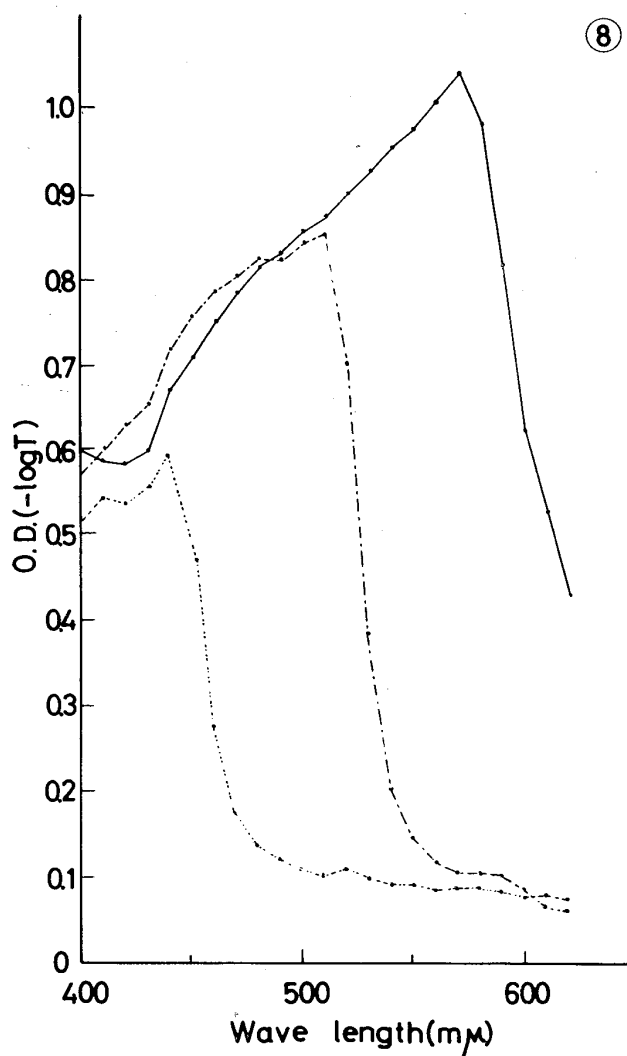


Fig. 2-8. Typical absorption spectra (G, O, and R groups) in adult quail. (solid line: R group, chain line: O group, dotted line: G group. An absorption spectrum of the colorless globule is omitted.)

吸収が始まる頃 (St V) にも, St IV の三群は存在しているが, その他に G 群特有の $440\text{ m}\mu$ に吸収極大を持つものが現われてくる。さらに $520\text{ m}\mu$ に極大吸収を示すものと共に, $550\text{ m}\mu$ に吸収極大をもつものが少し存在している (Fig. 2-6)。

孵化直前 (St VI) になると, $530\text{ m}\mu$ に吸収極大を持つものの他に, 540 , $550\text{ m}\mu$ に極大吸収を示すものが増加してくる。カロチノイド (Lutein 又は Zeaxanthin) 型の吸収を示すものはあまり見られず, それに代って $400\text{--}500\text{ m}\mu$ にわたり広い吸収帯を示すものが出現し, 成鳥に見られる O 群の吸収に近いもの ($490\text{ m}\mu$ に極大吸収) も存在している。G 群は St V におけるよりも $440\text{ m}\mu$ に極大吸収を示すものが増加している (Fig. 2-7)。

孵化後のステージ (St VII, VIII) では St VI とほとんど変わらず, 520 , 530 または $550\text{ m}\mu$ に極大吸収を示す R 群, 490 , $500\text{ m}\mu$ に極大吸収 (或いは $400\text{--}500\text{ m}\mu$ にわたって広い吸収帯) を示す O 群, および $440\text{ m}\mu$ に極大吸収を示す (無色のものを含める) G 群の三群が存在している。 $400\text{--}540\text{ m}\mu$ にわたって広い吸収帯を示すものが St VI から St VIII にかけて時々みられるが, その隣から一応 R 群に属するものではないかと考えられる。成鳥では R 群は $560\text{ m}\mu$ 附近に吸収極大をもち, O 群は $510\text{ m}\mu$ に吸収極大をもつ (Fig. 2-8) ので, この二群は孵化後, 成鳥になるまでの間に, 吸収極大が少し長波長側に移動するものと思われる。

以上の油滴の測定結果に基づいて, 発生過程に現われてくる吸収曲線の型は次に示すように要約することができる (Fig. 3)。

a): $400\text{--}620\text{ m}\mu$ の間で吸収を示さないもの (St I—St VIII に存在)。

b): $400\text{--}440\text{ m}\mu$ (特に $440\text{ m}\mu$) に吸収極大を持ち, $440\text{ m}\mu$ より長波長側で急速に吸光度の減少を示すもの (St V—St VIII に存在)。

c): $400\text{--}500\text{ m}\mu$ の間で吸収を示し, 短波長側ほど漸次吸収が増大するもの (St I—V に存在)。

d): $400\text{--}500\text{ m}\mu$ の間に三つの吸収の山を持つもの (St IV および St V に存在)。

e): $520\text{--}550\text{ m}\mu$ に吸収極大を持つもの。 $400\text{--}540\text{ m}\mu$ にかけて広い吸収帯をもつものも含める (St II—St VIII)。

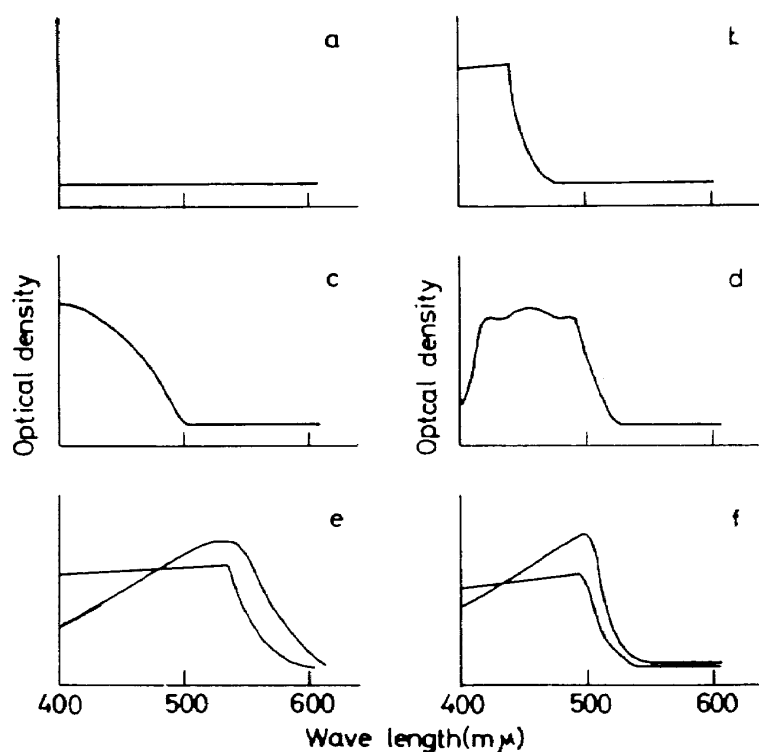


Fig. 3. Absorption patterns of oil globules observed during the development. (see text.)

f): 490—500 $m\mu$ に極大吸収を示すもの。400—500 $m\mu$ にかけて広い吸収帯をもつものも含める (St VI—VIII)。

ここで、*e* 型の吸収は St II における橙色油滴の吸収曲線で、その後色調が赤色に近づいてきてもあまり変化しないことをみれば、**R**群の油滴は既に早くから形成されていることになる (この型は *Astaxanthin* の吸収曲線に似ている)。しかるに *d* 型は St IV になって初めて出現し、St V に多数存在し、次の St VI にはほとんど見られなくなってしまう (この型は *Lutein* 又は *Zeaxanthin* の吸収曲線に似ている)。この *d* 型の消失と同時に *f* 型が初めて出現する。このように消失と出現が時期を同じくして起る事実は、*d* が *f* の前段階である可能性を強く示唆している。また *c* 型は St V までは見られず、*b* 型および *d* 型があたかもこれに入れ換るよう出現してくるので、*c* 型が *b* または *d* 型に変化していく可能性が容易に考えられる。

G 群 (*b* 型) および **O** 群 (*f* 型) がどの時期からどのような過程を経て形成されていくかについては、すべての油滴を連続的に測定したわけではないので、ここに得られた吸収曲線の型からだけでは明瞭な結

論が得られないかも知れない。従って更に油滴の大きさが発生過程においてどのように変化していくかを調べた結果を合せて、発生過程における各油滴間の関連性について検討してみたい。

〔Ⅲ〕 発生過程における油滴の大きさの変化

油滴直径の測定結果は Fig. 4 (平均値およびその 95% 信頼限界) と Table 3 (平均値およびその標準誤差) に示してある。油滴の発生初期における測定結果は、測定数が少いので平均値のみを示した。最初に出現した薄緑色の油滴はすべて直径 0.8—1.0 μ の大きさであったが、St II になると、直径 1.3—1.5 μ のものが現れた。この時に出現した **R**群の油滴はほぼその大きさが一定で、すべて 0.8—1.0 μ の大きさであった。St III になると **G**群にはかなり大きい油滴 (1.6—1.8 μ) が現

れるようになった。それに対し **R** 群は大きい油滴でも直径 1.2—1.4 μ の大きさであった。

St VI 以後の測定結果について、油滴群間およびステージ間の統計処理を行った結果、油滴群間に有意の差 ($p < 0.01$) が認められたのは、St IV における **R** と **O**、St V から St VIII における **R** と **G** および **R** と **O**、St VI および St VIII における **G** と **O** の間であり、その他の場合、即ち、St IV における **R** と **G**、St IV、V および VII における **G** と **O** の間には有意の差が認められなかった ($p > 0.05$)。それぞれの油滴群のステージ間については、**G**群は St V から St VII、**O**群は St V から St VIII、**R**群は St IV から St VII の間で有意の差 ($p < 0.01$) が認められた。

これらの結果のうち、**G** 群と **O** 群間で St VII において有意の差が認められなかった理由を考えてみる必要がある。測定値を詳しく検討した結果、St V では **O**群の一部が 0.8—1.0 μ の直径を持ち、残りの大部分はすべて 1.4—1.6 μ の直径を示したが、St VI になると小さい油滴が見られなくなり、大部分のものが 1.8—2.0 μ の直径を示すようになることがわかった。これに対し **G** 群は、St V では **O**群と

Table 3. Average diameters of three kinds of globules on each developmental stage.
(An intermediate between st II and st III is described as st II (III))

Stage	G group		O group		R group	
	No.	Diameter (μ)	No.	Diameter (μ)	No.	Diameter (μ)
I	8	0.88*	—	—	—	—
II	13	1.13	—	—	6	0.80
II	31	1.05 $\pm$ 0.032**	—	—	24	0.97 $\pm$ 0.029
II (III)	20	1.01	—	—	9	0.88
III	19	1.19	—	—	10	1.18
III	9	1.30	4	0.93	6	1.14
IV	43	1.38 $\pm$ 0.035	41	1.35 $\pm$ 0.028	38	1.47 $\pm$ 0.030
V	51	1.41 $\pm$ 0.030	46	1.43 $\pm$ 0.023	47	1.77 $\pm$ 0.023
VI	75	1.74 $\pm$ 0.031	42	1.89 $\pm$ 0.023	47	2.20 $\pm$ 0.024
VII	58	1.93 $\pm$ 0.050	38	2.04 $\pm$ 0.023	36	2.60 $\pm$ 0.049
VIII	45	1.87 $\pm$ 0.056	26	2.31 $\pm$ 0.016	29	2.62 $\pm$ 0.046
Ad***	54	2.63 $\pm$ 0.087	25	3.41 $\pm$ 0.063	24	3.50 $\pm$ 0.053

* mean, ** mean $\pm$ standard error, *** adult

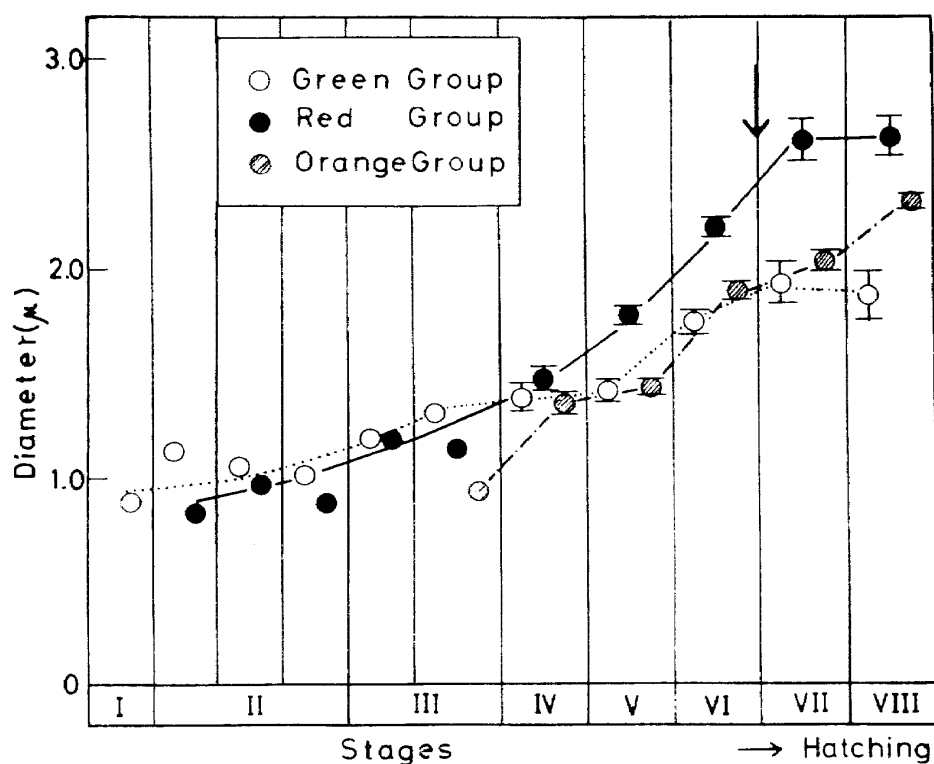


Fig. 4. Changes in diameters of three kinds of globules during the development (Mean values and the 95% confidence limits are illustrated.)

ほとんど変わらないが、St VI になって 1.4—2.2 μ の間の幅広い値を示すようになった。このためにまず St VI で G 群と O 群の間に有意の差が生じたと考

えられる。G 群の油滴の直径の平均値は、St VII でも St VIII でも、大きい偏差を示し、実際にその度数分布をとって調べた結果、大、小二種類の油滴が

存在していることが明らかになった。St VII に於て、O 群の油滴は G 群の中の大きい油滴とほぼ同じ大きさを示すので、G 群と O 群との間に有意の差が認められなかったのであろう。St VIII で再び G, O 間に有意の差が生じたのは、O 群の油滴の生長が顕著に起り G 群は生長を示さなかったためであると思われる。

成鳥の油滴の直径の測定結果を Table 3 に付け加えたが、この表から G, O, R 三群共に孵化後から成鳥に至る間に再び油滴の生長が起ることがわかる。孵化後 1 日目には、 $R > O > G$ であるのに対して、成鳥になると $R = O > G$ という関係になることから、孵化後 O 群の生長は他の二群に比して特に著しいことがわかる。

以上の油滴直径の測定結果から、油滴の発生過程における変化について次のことがいえると思われる。

1) R 群の油滴は、出現当時、既に存在していた薄緑色油滴よりも小さいということから、無色または薄緑色にみえる油滴の中に色素が生成蓄積され R 群の油滴になったのではなく、R 群は薄緑色油滴とは別に新生されたものと考えざるを得ない。

2) O 群の油滴が最初にできたときも、他の二群よりも小さかったので、O 群も既に形成されている油滴から生じたのではなく、新たに円錐細胞と共に形成されたと考えられる。

3) G 群の油滴が成鳥におけるものに近い吸収を示すようになるのは、St V 以後であることを既に述べた。油滴の直径も St V と St VI の間で急激に増大してくるので、この二つの現象に何らかの関連性が考えられる。また G 群は St VIII よりかなりばらつきを示しつつ、孵化前頃から明瞭に大、小二群に分れるようになる。これは G 群にいくつかの種類(少くとも二種)のあることを示している。

4) St I—IV は円錐細胞の生長よりも数の増加する時期であり、St V 以後は円錐細胞の生長の時期であることがわかった。要するに三群を別々にみると、R 群の生長は St VI から V の間に始まり孵化直後まで続く。O 群は St V から St VI の間に生長が始まり孵化 1 日後にもまだ続き、成鳥に至るまでの過程で、他の二群よりも生長が著しい。G 群の生長は St V から St VI の間に始まる。また G, O 二群は共に生長過程でその群に特有の光吸収を示す

ようになるので、油滴の生長とその色調の完成との間に重要な関係があるものと思われる。

考 察

鳥類の網膜内にある円錐細胞の外節と内節の間に有色油滴が存在している。この油滴の発生過程における変化については古くから研究され、その結果は Walls and Judd (1933) によって既に総括されている。三種類の油滴は爬虫類および鳥類のみに認められ、亀の類 (*Sternotherus odoratus*) では、最初無色の油滴が出現し、そのうちの大きいものが lemon yellow に変化するといわれている。さらに黄色油滴のうちの大きいものが橙色になり、その一部が赤色に変わり始め、これは孵化後までは ruby 色にならないといわれている。

これに反しハトではまったく異った発生過程を経ることが報告されている。即ち、孵化 3 日目になって、はじめて油滴が発生し、このときには既に無色、橙色、赤色の油滴が区別されるという。黄色油滴は孵化後 6 日目まで出現しないが、14 日目までに他の二種類の油滴よりもはるかにその数が多くなると述べられている。

またニワトリについてもいくつかの研究結果が報告されている。Schultze (1873) は孵化後 18 日目まで油滴の発生を認めず、18 日目に赤色油滴が出現し、その後黄色の油滴が出現すると報告している。それに反し Hahn (1916) は 10 日目に薄緑色の油滴を認め、16 日目にはじめて有色油滴を観察している。その一部は light yellowish-brown であり、他は dark reddish-brown であり、孵卵後 17 日目になって赤色および橙色の油滴が現れると述べている。さらに赤色油滴は reddish-brown の油滴から形成され、橙色と黄色の油滴は yellowish-brown から生ずると結論している。Walls and Judd (1933) は白色レグホンで三種の油滴の割合を調べ、すべての油滴は、その後の色調に関係なく、最初は無色であること、赤色油滴が最初に出現することを認めている。以上の報告を比較すると、おなじニワトリを用いた場合にも結果はまちまちになっていて、彼等の結果から一つの結論を導き出すことは非常に困難である。彼等の実験はすべて顕微鏡下での観察と三種の油滴の割合の計測を行ったものであるので、ま

ずこれらの方法に含まれている問題点がいくつか考えられる。即ち；

1)：顕微鏡下で発生過程における色調の変化を調べ、その結果から発生過程における油滴間の関係を論議する場合。

Walls and Judd (1933) は、アポクロマートを用いて色収差を除いて観察を行ったが、油滴自体が、ほぼ完全な球形をしているために、一種のレンズとして働くため、色収差を生ずる危険性がある。また油滴内の物質の濃度の変化によって、色調に変化をきたす可能性も当然考えられる。これは著者の得た R 群の色調の変化が、光吸収の点ではほとんど変化しない (530 $m\mu$ 附近に極大吸収を持つ) のに、顕微鏡下では明らかに変化していることから充分考えられることである。逆に異った群に属する油滴をその前段階において同じ色調として取り扱う危険性も含んでいる。

2)：三種の油滴の割合を調べ、発生過程における変化を追求する場合。

油滴の発生過程には、その数の増加 (円錐細胞の増加に基づいていると考えてよい) が起っている。実際に、Walls and Judd の結果に示されているように、網膜の一定面積あたりに存在している油滴の数は発生開始と共に増加していく。円錐細胞 (油滴) の生長のみが起っているときには、一定面積あたりの油滴の数は逆に減少することになるが、それにもかかわらず、一定面積あたりの数が実際に増加することは、網膜全体に含まれる油滴の数が飛躍的に増加していることになる。おそらく St IV までは油滴の数が急激に増加していると思われるので、三種の油滴のどれが増加していると考えるのが妥当であろう。油滴の増加率が不明であるとする、一つの油滴群のみが増加する場合に、あるステージと次のステージのそれぞれの油滴の割合 (%) の間に一定の関係が成立するが、増加する油割群が二群以上になると、そのような関係は成立しなくなる。従って油滴の数の増加が著しい時期に油滴の割合から発生順序を決めることは極めて困難である。以上の考察によって、油滴の光吸収の変化を調べることが、油滴の発生順序および油滴相互間の関係を知るために必要であると考えられる。

顕微分光測光法による網膜内油滴の光吸収の測定

は、最初 Fujimoto *et al.* (1957) によって数種の鳥および亀を用いて、さらにその後 Strother and Wolken (1959, 1960) によってニワトリの成鳥を用いて行われている。ここでは、Strother and Wolken の結果を取り上げ、著者のウズラの成鳥における測定結果 (Fig. 2-8) と比較して、顕微分光測光法における問題点を明らかにしてみたい。種の違いによって油滴の光吸収曲線は異なるが、その相違は本質的なものとは考えられず (Fujimoto *et al.* 1957)、また著者のニワトリにおける測定結果 (未発表) とウズラにおける結果 (Fig. 2-8) との間にも本質的な違いは見い出せなかった。従ってここに示したウズラの成鳥の結果と Strother and Wolken の得た結果とを比較することができるものと思われる。

彼等によれば、R 群は 500 $m\mu$ に極大吸収を持ち、第二の吸収の山が 550—560 $m\mu$ にあり、420 $m\mu$ あたりに肩を持っている。O 群は 470—480 $m\mu$ に広い吸収極大を示し、400 $m\mu$ に肩がある。G 群は 370—460 $m\mu$ に吸収を示し、400—440 $m\mu$ に広い極大吸収を持って、第二の吸収極大が 480 $m\mu$ に見られる。著者の得た結果はかなり異っていて、まず R 群の 500 $m\mu$ の吸収極大がなく、O 群の吸収極大はもっと長波長側 (510 $m\mu$) にあった。また G 群は 450 $m\mu$ から長波長側の吸収が少く、特に彼等の示している第二の吸収極大 (480 $m\mu$) は全然認められなかった。以上のような測定結果の違いの原因として、まず試料作製上の違いが考えられる。即ち、著者は網膜の一部を生理食塩水 (pH 7.4) 中に取り出し、すぐに測定しているが、彼等は網膜を 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 6.5) 中に取り出し、4°C で保存している。この試料作製過程の違いによって吸収曲線が異ってくる可能性は充分考えられる。

顕微分光光度計の構造からくる精度の違いは当然考えられるが、測定法そのものについても、測定結果を異ならしめる原因があると思われる。著者は試料の吸収と Blank の吸収とを別々に測定して試料の実吸収を計算した。Blank の吸収を 0 に合せて、各測定波長ごとに試料の吸収を得る方法を用いたときには、試料を視野から、測定ごとにはずさなければならぬので、次回に全く同一の部分測定することは難しくなる。この点がまず、Strother and Wolken の方法と異っている重要な点だと思われる。

著者が用いた顕微分光光度計は、集光器に同倍率の対物鏡を使用して、Schwarzschild-Villiger 効果 (S-V 効果) を除くように設計されているが、用いたスポットが試料に比べて大きいために、S-V 効果は除去されなかった (Naora, 1955)。この点は Strother の結果についても同様に考えられる。

このような誤差があるにしても、著者の得た吸収曲線 (成鳥) は、数回の測定によって充分再現性のあることが認められたので、油滴の発生過程における光吸収の変化を追求するのに顕微分光測光法を用いることは、最もすぐれた方法であるといえる。実際に、発生中の油滴の測定結果からも、吸収曲線の再現性のあることが認められた。但し、油滴の大きさとスポットの大きさによって光吸収の実測値は変化するので、定量的な取り扱いはできなかった。

発生過程の初期においては油滴の大きさが小さく、スポットの方がはるかに大きいので、S-V 効果が当然考慮されなければならない。しかしながら、これらの測定結果も信頼するに足る一応の傾向を示しているものとみてよい。測定中の色素の褪色の問題も考えられるが、抽出操作を行う時は褪色が急速に起る (Kimura and Hosoya, 1956) のに対し、intact の状態では測定中における褪色はほとんど認められなかった。しかし長時間放置すれば、吸収曲線が短波長側にずれ吸収極大が低くなってくる傾向がみられることは事実である。

ここで著者により得られた油滴の吸収曲線の型 (Fig. 3) に基づいて、胚の発生過程における三種の油滴の発生順序を考察してみる。*e* 型の吸収が R 群の油滴のものであり、それが St II から出現することは明らかである。St IV に出現する *d* 型の吸収は、その後形がかわり、*f* 型 (O 群) になると考えるのが妥当であろう。G 群の吸収である *b* 型が *c* 型から生じたのか、または *c* 型が O 群の *d* 型の前段階であるのかが一番の問題点になる。というのは St I—IV の間に、*c* 型の吸収が存在しているので、*c* 型が *b* 型にも *d* 型にも変化し得る可能性が依然として残されているからである。

しかしながら St III で出現した黄緑色の油滴が、他の油滴より小さいという事実は、*c* 型の吸収曲線が *b* 型に非常に似ているという点を考え合せて、*c* 型は *b* 型の前の状態であるという考え方の方を支持

しているものと思われる。従って三種の油滴のうち、まず無色または G 群の前駆体が出現し、次いで R 群が現れ、孵化前になって、O 群および G 群が完全に出現すると考えたい。このような油滴の光吸収に基づいた発生順序についての著者の考えは、油滴の大きさとその発現時期についての実験結果によっても強く支持されるものである。

Strother and Wolken (1960) は、Wald and Zussman (1938)、および Wald (1948) によるニワトリ網膜から抽出されたカロチノイド群に基づいて、赤色油滴は Astaxanthin、橙色油滴は Lutein 又は Zeaxanthin、緑色油滴は Galloxanthin であるとしており、著者の測定結果からも同じことがいえると思われる。

網膜内油滴は光受容に関してフィルターの役割をしているといわれている (Walls and Judd, 1933)。フィルターとしての役割を考える時、当然油滴と円錐細胞外節に存在している感光色素との関係が問題になる。鳥類の錐体物質としては、Tanabe (1952) によって、460, 540, 570 および 630 $m\mu$ に吸収を持つ 4 種の色素が報告され、Wald *et al.* (1955) によって、560 $m\mu$ に極大吸収を持つ Iodopsin が抽出されている。最近になって、Bridges (1962) はハトで 544 $m\mu$ に吸収極大を示す感光色素の抽出に成功している。同じ有色油滴をもつ爬虫類においても、Kimura and Hosoya (1956) によって、カメ (*Geoclemys reereisii*) で、650, 560, 480 $m\mu$ の三つの山が差スペクトル中に見い出されている。

顕微分光光度計を用いて一つの円錐細胞の吸収を測定した結果もいくつか報告され、Hanaoka and Fujimoto (1957) は、コイ (*Cyprinus carpio*) で、520—540 $m\mu$, 560—580 $m\mu$, 620—640 $m\mu$ および 670—680 $m\mu$ に差吸収を示す色素群を明らかにしている。最近になって、Brown and Wald (1964) や Marks *et al.* (1964) によって、ヒトやサルでも、三種の錐体物質があることが明らかにされている。以上の報告から、鳥類の円錐細胞にも、少なくとも三種類の感光色素がそれぞれ含まれていると推定することもできる。円錐細胞外節にあるこれらの感光色素と三種類の油滴との関係はまだよくわかっていないが、三種類の油滴の完成する時期 (St V) が網膜メラニン層の光に反応する時期に当たることを思えば、

光受容に始まる生理機構に関して、油滴が重要な意味を持っているという考え方も成り立つわけである。今後発生過程における感光色素の変化を追求していくことが、感光色素と油滴に含まれる色素との関係を明らかにする一つの方法でもある。

また視覚とは離れて、生殖腺発育に及ぼす光の影響を考えると、眼が存在する場合に赤色光が有効であるということ (Bissonnette, 1932; Benoit and Ott, 1938; Burger, 1943; 加藤, 1964) は、網膜内油滴がフィルターとして働いて短波長側の光を吸収しているからであるのかも知れない。油滴の役割は、いずれにしてもまだまだ今後研究されなければならない重要課題を含んでいるといわなければならない。

要 約

ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) の卵を用いて、網膜内有色油滴の発生過程を調べた結果、次のようなことが判明した。

i) 顕微鏡下での観察結果; 孵卵後 12 日目に、円錐細胞が形成されると同時に、まず薄緑色の油滴が出現する。13 日目には薄緑色と橙色の二種類に分かれ、孵卵後 15 日目頃になって、三種類の油滴が完全に出現する。これらの観察に基づいて、油滴の発生初期から孵化 1 日後までの期間を 8 段階に分けることができる (St I—St VIII)。

ii) 油滴の光吸収の測定結果; 油滴の光吸収の測定は、顕微分光光度計を用いて行った。St I—St VIII の間にみられる各油滴の吸収曲線を分類すると、およそ 6 つの型になる (Fig. 3)。また成鳥における赤、橙、緑色の三種の油滴の吸収曲線に基づいて、油滴を R, O, G の三群に分けることができた (Fig. 2-8)。e 型の吸収は R 群、f 型は O 群、b 型は G 群と、それぞれ特徴的な吸収曲線を示しているもので、これらの吸収曲線がはじめて認められたステージで、少くともその群の油滴が出現したものと推定することができる。

O 群 (f 型) 特有の型の中に、400—500 $m\mu$ にわたって広い極大吸収を示す型を含めたが、この型の前段階が d 型であると思われる。d 型は Lutein 又は Zeaxanthin の吸収曲線に近く、従ってこの色素が少くとも St IV から存在していることがわかった。成鳥にみられる G 群特有の b 型は St V から認めら

れたが、油滴の発生初期から既に認められる c 型は、G 群の b 型に極めて似ていることから、G 群に属する油滴は St I または St II から現われ、その後、徐々に特有の吸収曲線を示すように発達するものと考えられる。G 群の油滴の色素は Galloxanthin であろうと思われる。e 型の吸収曲線は Astaxanthin の吸収曲線に近く、R 群の油滴にこの色素が含まれることが確かめられた。無色と思われる油滴は St I から常に存在し、発生過程においては勿論、成鳥においても観察された。

iii) 油滴直径の測定結果; 一方において、以上の結果をさらに確めるため、発生過程における各油滴の直径を測定した。R 群、O 群共に、はじめて出現した時は、それまで出現していた他の油滴群よりも、一般に小さかった。この事実は、これらの油滴がすでに存在している油滴から変化したものではなく、円錐細胞の増殖と共に新しく形成されたものと思われる。

G 群の油滴は孵化前の頃から、大小二種類現れるが、R 群および O 群は、孵化前、孵化後を通じて、大きさがほぼ一定していることが認められた。

St I—St IV の間は、R, G, O の三群ともに小さい油滴を含んでいるので、この期間はこれらの油滴がさかんに形成されている時に当るとと思われる。St IV—St V の間に R 群の油滴の生長が始まり、St V—St VI で G および O 群の生長が始まる。三群とも、孵化後まで生長を続けるが、そのうちで O 群の生長は孵化 1 日後も著しく、成鳥に至るまでの間に、O 群と R 群はほぼ同じ大きさを示すようになる。G, O 二群に於ては、油滴の生長する時期と特有の吸収曲線の型を示す時期とがほぼ一致している。

謝 辞

この研究を行うにあたり、中村健児教授、ならびに光生物学研究グループ加藤勝助教授に、御指導、御助言を頂いたことに対し、深く感謝する。

文 献

- BENOIT, J. ET L. OTT (1938) Action de lumières de différentes longueurs d'onde sur la gonadostimulation chez le Canard male impubère. C. R. de la Soc. de biol. 127: 906-909.
 BISSENETTE, T.H. (1932) Studies on the sexual

- cycle in birds. VI. Effects of white, green, and red lights of equal luminous intensity on the testis activity of the European starling (*Sturnus vulgaris*). *Physiol. Zool.* 5: 92-123.
- BRIDGES, C.D.B. (1962) Visual pigment 544, a presumptive cone pigment from the retina of the pigeon. *Nature* 195: 40-42.
- BROWN, P.K. AND G. WALD (1964) Visual pigments in single rods and cones of the human retina. *Science* 143: 45-52.
- BURGER, J.W. (1943) Some effects of colored illumination on the sexual activation of the male starling. *J. Exp. Zool.* 94: 161-168.
- FUJIMOTO, K., T. YANASE AND T. HANAOKA (1957) Spectral transmittance of retinal colored oil globules re-examined with microspectrophotometer. *Japan. J. Physiol.* 7: 339-346.
- HAHN, E. (1916) Über den Farbensinn der Tagvögel und die Zapfenölkugeln. *Zschr. wiss. Zool.* 116: 1-42.
- HANAOKA, T. AND K. FUJIMOTO (1957) Absorption spectrum of a single cone in carp retina. *Japan J. Physiol.* 7: 276-285.
- 加藤 勝 (1964) 光と生物. 生物物理. 4: 1-8.
- KIMURA, E. AND Y. HOSOYA (1956) Further studies on cone substances. *Japan. J. Physiol.* 6: 1-11.
- MARKS, W., W.H. DOBELLE AND E.F. MACNICHOL, Jr. (1964) Visual pigments of single primate cones. *Science* 143: 1181-1183.
- NAORA, H. (1955) Microspectrophotometry of cell nucleus stained by Feulgen reaction. I. Microspectrophotometric apparatus without Schwarzschild-Villiger effect. *Exp. Cell. Res.* 8: 259-278.
- 野間正喜 (1963) 顕微分光光度計の原理と応用. 分析機器. 1: 17-22.
- SCHULTZE (1873) cited by Walls and Judd (1933)
- STROTHER, G.K. AND J.J. WOLKEN (1959) A simplified microspectrophotometer. *Science* 130: 1084-1088.
- STROTHER, G.K. AND J.J. WOLKEN (1960) Microspectrophotometry. I. Absorption spectra of colored oil globules in the chicken retina. *Exp. Cell Res.* 21: 504-512.
- TANABE, I. (1952) On the photosensitive substance in the chicken retina. *Japan. J. Physiol.* 3: 95-101.
- WALD, G. (1948) Galloxanthin, a carotenoid from the chicken retina. *J. Gen. Physiol.* 31: 377-383.
- WALD, G., P.K. BROWN, AND P.H. SMITH (1955) Iodopsin. *J. Gen. Physiol.* 38: 623-681.
- WALD, G. AND H. ZUSSMAN (1938) Carotenoids of the chicken retina. *J. Biol. Chem.* 122: 449-460.
- WALLS, G.L. AND H.D. JUDD (1933) The intraocular colour-filters of vertebrates. *British J. Ophthalmol.* 17: 645-675, 705-725.