

## ウズラ胚の角膜上皮細胞分裂及び網膜メラトニンのリズム

金子 智子・山口 優子・守安 紀子\*・大石 正\*

静岡県立大学短期大学部 432-8012 浜松市布橋

\* 奈良女子大学理学部生物学科 630-8506 奈良市北魚屋西町

### Corneal Mitotic and Retinal Melatonin Rhythms of Japanese Quail in the Embryonic Stage

Tomoko Kaneko, Yuko Yamaguchi, Noriko Moriyasu\* and Tadashi Oishi\*

*Hamamatsu College, University of Shizuoka, Nunohashi, Hamamatsu 432-8012*

\* *Department of Biology, Faculty of Science, Nara Women's University,  
Kitauoyanishi, nara 630-8506*

#### Abstract

We have attempted to know the presence of the corneal mitotic and retinal melatonin rhythms of the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*, using embryos sacrificed at every four hours for three days before and after hatching. The corneal mitotic rates and retinal melatonin levels did not rhythmically change in either LD or DD. The effect of the photoperiod on the development of the embryos has further been studied by incubating fertilized eggs in LD (12:12) DD, and LL for 5, 10, 15, and 17 days. As a result, the effect of the photoperiod on the body and eye weights could not be observed, but the micrographs of the cross sections of the eyes showed that the thickness of the cornea incubated in LD was greater than those in DD and LL. Further study must be required for the explanation of the latter. It was also found that the hatching time was accelerated in LL.

#### 1. 緒言

太陽の光の下で進化をしてきた生物にリズム現象があることは早くから知られている。近年、内因性の様々な概日リズムの存在が見出され、この機構を解明するためにはリズムを支配する

振動体の存在場所を確認することが重要な課題である。哺乳類の振動体は視交叉上核に存在することが明らかであるが<sup>1)</sup>、鳥類では種によって異なり、眼、松果体、視交叉上核に複数の振動体が存在するとされている。即ち、ニワトリやウズラ<sup>2-4)</sup>では眼と松果体に、スズメやブンチョウ<sup>5-6)</sup>では松果体に、さらにハト<sup>7)</sup>では眼と松果体以外に視交叉上核にもそれぞれ存在すると推測される。しかし、このような複数の振動体の相互関係の詳細は明らかでない。

眼内には網膜メラトニンや角膜上皮細胞分裂の概日リズムが認められ、眼の当て布実験や視神経切断実験から、これらは眼内の振動体によって支配されていることが明らかにされている<sup>8-10)</sup>。また、ツメガエルの網膜メラトニンリズムの振動体が網膜光受容体に存在するとの報告もある<sup>11)</sup>。一方、我々はウズラの眼瞼縫合により網膜メラトニンリズムが変化しないにも拘わらず角膜上皮細胞分裂リズムが消失することから、網膜メラトニンは角膜上皮細胞分裂に影響を与えないことを示した<sup>10, 12)</sup>。しかし、角膜上皮細胞分裂リズムを支配している振動体が眼内のどこに存在するかは明確にされていない。

概日リズムの個体発生、即ち発生のどの段階でリズムが発現するのかについてもこれまで十分には明らかにされていない。哺乳類の胎児の概日リズムは母親のリズム性に同調するとともに、母親のメラトニン量の変化が胎児に明暗の情報を伝えているとされている<sup>13-14)</sup>。鳥類の胚においては母親のメラトニンの影響を受けないが、何らかの内因的要因により概日リズムが発現し、胚の成長あるいは孵化等の生理的現象はこのリズムの影響を受ける可能性が考えられる。そこで、本研究ではLD(明暗 12:12) DD(恒暗)条件下で孵卵したウズラの孵化前後の角膜上皮細胞分裂数と網膜メラトニン量を測定し、それらのリズム性の有無について検討した。またLD(明暗 12:12) DD(恒暗)及びLL(恒明)の3条件下で孵卵した胚の体重、眼重量、孵化率、角膜の厚さをそれぞれ測定し、胚の成長と光条件との関係についても考察した。

## 2. 材料及び方法

### 2.1 材料

ニホンウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) の有精卵(加藤商店、愛知県豊橋市)を孵卵器(全慶園製、静岡県浜松市)を用いてそれぞれ明暗(12L / 12D) 恒暗(DD)または恒明(LL)条件下で1時間毎の転卵により孵卵した。この時の温度と湿度は $37.3 \pm 3$ 、50%であった。照明にはナショナルパルックボール(16W)を用い、卵の表面の照度を40 ~ 150Luxに保った。

### 2.2 観察試料と測定

以下の2つの条件で観察試料を作製し、リズムまたは角膜の厚さの測定を行った。

#### 実験 1

LD(6:00 ~ 18:00点灯)及びDD条件下で孵卵し、それぞれ孵卵15日目の12:00から17日目の12:00まで4時間毎に4 ~ 6個の卵から胚を取り出した。体重測定後、左右の眼球を摘出して重量を測定し角膜とeye cupとに分けた。左の眼球からは網膜を剥離して重量を測定後、凍結保存(-20 )した。両眼の角膜をALFAC solutionで24時間固定し、Mayerのヘマトキシリンで染色後、永久プレパラートを作製した。光学顕微鏡(オリンパス光学、CH)で角膜を観察し、1つの角膜当たり10視野で細胞分裂中期及び後期の細胞数を数え、1000細胞当たりの分裂数に換算

した。Radioimmunoassay 法<sup>9)</sup>により網膜のメラトニン量を決定した。体重、角膜上皮細胞分裂数、そして網膜メラトニン量はt-検定と Fisher PLSD によっていずれも危険率5%で検定し、統計的に解析した。

**実験 2**

LD (3:00 ~ 15:00 点灯) DD 及びLL 条件で孵卵し、孵卵 5 日目、10 日目、15 日目、17 日目のいずれも 9:00 ( 明期 ) と 21:00 ( 暗期 ) にそれぞれ 5 ~ 7 個の卵から胚を取り出した。体重測定後、5 日目の胚の全体を、その他の胚からは眼球を摘出して共に Bouin's solution で 24 時間以上固定した。5 日胚と眼球はそれぞれ厚さ 4 μ m のパラフィン切片としヘマトキシリン・エオシン染色した後、光学顕微鏡下で観察し角膜の厚さを測定した。角膜の厚さについては t-検定と Fisher PLSD によっていずれも危険率 5% で検定し、統計的に解析した。

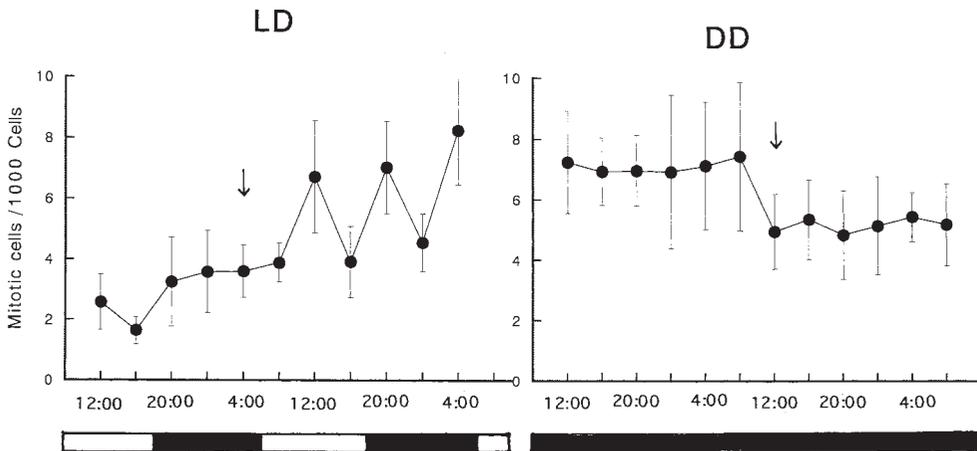
**3. 結果**

**実験 1**

Table 1 に示すように、孵化前後の胚の体重には LD 条件で孵卵したグループと DD 条件で孵卵したグループの間で差が認められなかった ( Unpaired t-test, p > 0.05 )。眼重量、相対眼重

**Table 1** Weights of the body and eye in the embryos incubated under LD and DD

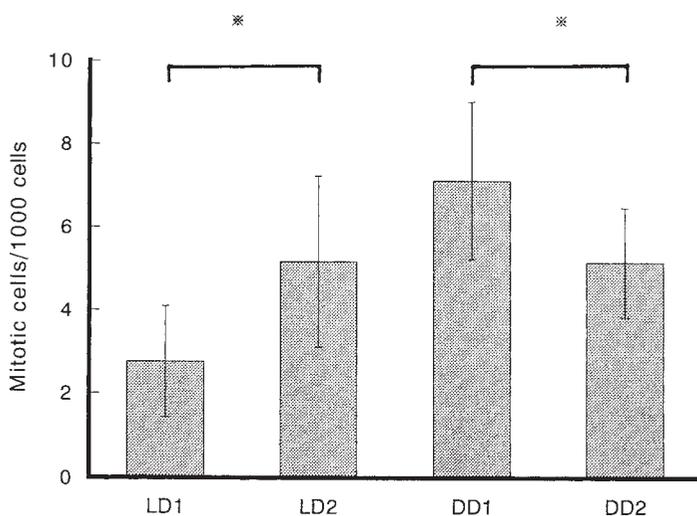
Body Wt. ( g ) Mean ± S.D. ( n )	Eye Wt. ( g ) Mean ± S.D. ( n )	Eye Wt. / Body Wt. ( g/mg ) Mean ± S.D. ( n )
LD 6.97 ± 0.76 ( 38 )	0.1446 ± 0.02 ( 72 )	20.86 ± 3.03 ( 72 )
DD 6.98 ± 0.76 ( 61 )	0.1466 ± 0.01 ( 104 )	21.12 ± 2.33 ( 104 )



**Fig. 1** Mitotic rhythms in the corneal epithelium before and after hatching under LD and DD. : The time of hatching, Error bar= ± SD

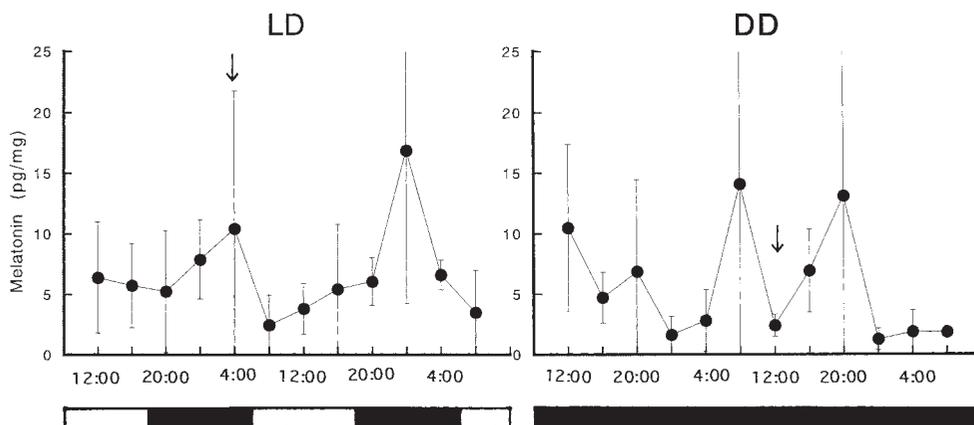
量（眼重量 / 体重）及び孵化率は、DD条件の方がLD条件のそれよりわずかに大きい、いずれにも有意な差は認められなかった（Unpaired t-test,  $p > 0.05$ ）。孵化時間は Fig. 1 及び Fig. 3 に示すようにLD条件の方がDD条件よりおよそ8時間早かった。

Fig. 1 に示すように、LD条件の角膜上皮細胞分裂数は孵化前において明期の値が暗期のどの値より低く、明暗に同調したリズム性を示したが（Fisher PLSD,  $P < 0.05$ ）孵化後の分裂数は明暗と関わり無く増減して明暗に同調したリズム性を示さなかった。DD条件の角膜上皮細胞分裂数は常に多くリズムは認められなかった。孵化の前後におけるそれぞれの胚の角膜上皮細胞分裂数を平均して比較するとLD条件では、孵化後の方が孵化前より有意に多いのに対し、DD条件では孵化前の方が有意に多かった（Fig. 2）。



**Fig. 2** Mitotic rates before and after hatching under LD and DD.

: Fisher PLSD,  $p < 0.05$ , LD1: before hatching, LD2: after hatching



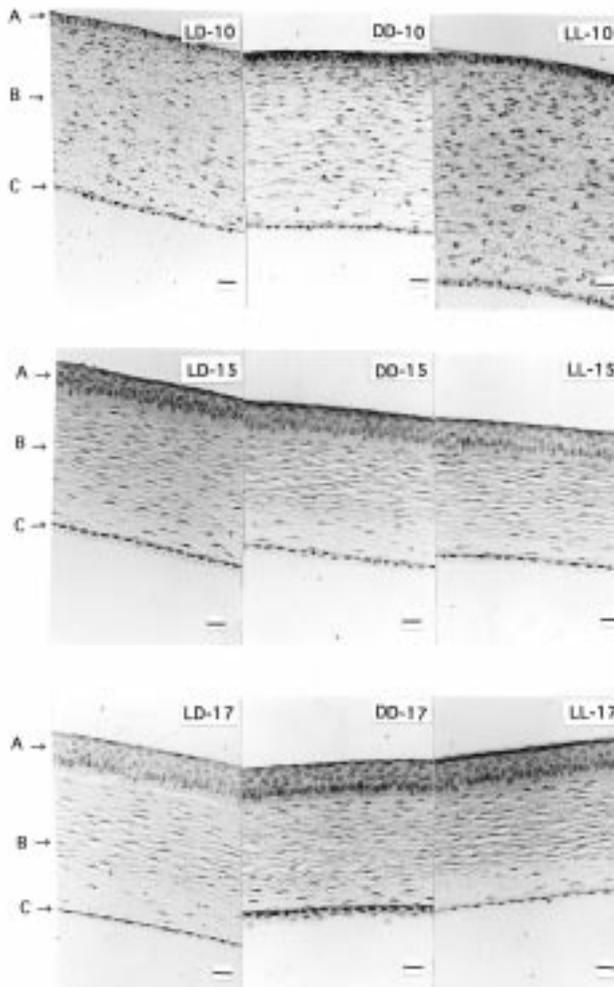
**Fig. 3** Retinal melatonin rhythms before and after hatching under LD and DD.

: The time of hatching, Error bar =  $\pm$  SD

Radioimmunoassay 法により、15日胚から17日胚のすべての網膜からメラトニンが検出されたが、LD、DD いずれの条件においても、網膜メラトニン量に明確なリズムは認められなかった (Fig. 3)。

## 実験 2

体重、眼重量、相対眼重量に光条件の違いによる差異は認められなかったが、孵化の時間はLL、LD、DDの順にそれぞれ数時間ずつ遅れる傾向であった。また、眼球の組織標本の観察から網膜の形態には光条件の違いによる影響は認められなかった。組織標本の観察から、5日胚では網膜や角膜の分化は認められず、孵卵10日以後の胚においては、角膜、レンズそして網膜の分化が認められた。しかし、10日胚では網膜の光受容細胞の分化は十分でなかった。Table 2 と



**Fig. 4** Microphotographs of the corneas stained with hematoxylin-eosin.

A: Epithelium, B: Stroma, C: Endothelium, LD10: 10 day embryo under LD, Scale bar=10 $\mu$ m

Fig. 4 に示すように、光条件の違いにより角膜の厚さに有意差が認められた。どの光条件で孵卵した胚においても角膜は、10日胚で最も厚く、15日胚、17日胚と発生が進むに従って薄くなった。また、発生の進行にともなって角膜上皮層は少しずつ厚さを増すのに対し、角膜固有層は次第に薄くなる。一方、角膜内皮層の厚さはほとんど変化しなかった。10日胚において、LL条件の角膜は、LD及びDD条件のそれと比較して、有意に厚いと言えた (Fisher PLSD,  $P < 0.05$ )。また、角膜の3層 (角膜上皮層、角膜固有層、角膜内皮層)のうち、角膜上皮層と角膜固有層に有意差が認められた。15日胚ではLD条件の角膜はDD及びLL条件のそれと比較して角膜固有層が厚かった (Fisher PLSD,  $P < 0.05$ )。17日胚ではLD条件の角膜がDD及びLL条件のそれより厚かったが、有意な差ではなかった (Fisher PLSD,  $P > 0.05$ )。

**Table 2** Thickness of the corneas in the embryos incubated under LD, DD and LL

	Epithelium ( $\mu\text{m}$ ) Mean $\pm$ S.D. ( n )	Stroma ( $\mu\text{m}$ ) Mean $\pm$ S.D. ( n )	Endothelium ( $\mu\text{m}$ ) Mean $\pm$ S.D. ( n )	Cornea ( $\mu\text{m}$ ) Mean $\pm$ S.D. ( n )
LD-10	10.62 $\pm$ 2.80 ( 4 )	132.74 $\pm$ 10.11 ( 4 )	3.66 $\pm$ 1.03 ( 4 )	147.03 $\pm$ 10.06 ( 4 )
DD-10	12.50 $\pm$ 1.46 ( 4 )	123.64 $\pm$ 15.82 ( 4 )	4.29 $\pm$ 0.83 ( 4 )	140.42 $\pm$ 15.15 ( 4 )
LL-10	15.28 $\pm$ 2.31*( 5 )	148.61 $\pm$ 12.03*( 5 )	6.28 $\pm$ 1.17 ( 5 )	170.17 $\pm$ 9.67*( 5 )
LD-15	30.14 $\pm$ 3.76 ( 5 )	107.55 $\pm$ 8.18*( 5 )	5.86 $\pm$ 1.17 ( 5 )	143.55 $\pm$ 8.75*( 4 )
DD-15	30.17 $\pm$ 1.47 ( 4 )	86.86 $\pm$ 14.07 ( 4 )	4.29 $\pm$ 0.83 ( 4 )	121.32 $\pm$ 14.75 ( 4 )
LL-15	28.86 $\pm$ 2.44 ( 5 )	86.83 $\pm$ 7.21 ( 6 )	5.06 $\pm$ 1.87 ( 6 )	120.75 $\pm$ 7.31 ( 6 )
LD-17	31.21 $\pm$ 5.03 ( 5 )	92.42 $\pm$ 15.72 ( 5 )	5.64 $\pm$ 1.64 ( 5 )	129.27 $\pm$ 19.28 ( 5 )
DD-17	26.78 $\pm$ 2.06 ( 4 )	84.99 $\pm$ 12.95 ( 4 )	4.29 $\pm$ 0.83 ( 4 )	116.05 $\pm$ 11.87( 4 )
LL-17	30.92 $\pm$ 2.16 ( 5 )	80.63 $\pm$ 13.49 ( 5 )	4.43 $\pm$ 0.78 ( 5 )	115.98 $\pm$ 16.10( 5 )

\*Fisher PLSD,  $p < 0.05$

## 4. 考 察

### 4.1 胚の成長に対する光条件の影響

今回の2つの実験は、光条件の違いが体重、眼重量、相対眼重量及び孵化率には影響を与えない事を示したが (Table 1)、少なくとも孵化時間はDD、LD、LLの順に数時間程度早まる事を示した。この結果は、Lauber et al. の行ったニワトリの実験<sup>15)</sup>と一致しており、孵卵時の光が胚の成長を促進する可能性を示唆している。しかし、Adam et al.<sup>16)</sup>は、ニワトリを使って視覚機能が完成した後の短時間の光が孵化の引き金として同程度に作用する事を示した。従って、今回、LLとLD条件の方がDD条件より孵化が早まったのは、孵卵15日以後の光が孵化の引き金となったためと判断される。

#### 4.2 角膜上皮細胞分裂リズム

孵化前後の胚の角膜上皮細胞分裂は明暗周期に同調する明確なリズムを示さなかった。Fig. 1 に示すようにLD条件の場合、孵化前は振幅の小さいリズム性が認められるのに対し、孵化後は細胞分裂数が明暗と無関係に増減している。一方、DD条件の場合は全体に分裂数は多いが、孵化後に減少している。これらの結果から、孵化が角膜上皮細胞分裂に何らかの影響を与えている可能性が推測されるので、孵化前後の角膜上皮細胞分裂リズムの有無を決定するためには、孵化時間を揃えた上での測定が不可決であると判断される。さらに、孵化がリズム現象に何らかの影響を与えているかあるいは、リズム現象が孵化に大きく関わっている可能性が示唆され、リズムと孵化の関係について新たな問題を提示している。

#### 4.3 網膜メラトニンリズム

15日胚から17日胚の網膜よりメラトニンが検出されたが、LDとDD条件のどちらにおいても網膜メラトニン量は明暗周期に同調する明瞭なリズムを示さなかった (Fig. 3)。ニワトリの孵化直前の胚には、網膜メラトニンのリズムの存在が報告されていて<sup>17)</sup>、本研究の結果はこれと一致しない。これは、種による違いの可能性も否定できないが、主として網膜メラトニン量の個体差が非常に大きかったことに起因していると推測される。従って、ウズラにおける孵化前後の網膜メラトニンリズムの確認には、さらなる研究が求められる。

#### 4.4 角膜の厚さ

Table 2 と Fig. 4 に示すように、角膜の厚さに孵卵時の光条件の影響が認められた。角膜を構成する3層(角膜上皮層、角膜固有層、角膜内皮層)のうち角膜固有層は、LL条件の10日胚で特に厚く、これに対して15日胚と17日胚では急に薄くなるのが観察された。また、15日胚と17日胚ではLD条件の角膜固有層が他の光条件のそれより厚かった。網膜の光受容細胞がまだ形成されていない10日胚においては、角膜が受ける光の直接の影響で角膜固有層の成長が促進される事が推測される。網膜の光受容細胞がすでに形成されている15日胚では、光受容細胞の光受容によって角膜固有層の成長が抑制されることが考えられる。ニワトリの成体において、LL条件下で扁平な角膜が誘導され、角膜上皮細胞分裂の抑制に起因する事が報告されている<sup>18-19)</sup>。しかし、本研究の角膜上皮細胞分裂数の測定結果から角膜上皮細胞分裂とこれら胚の角膜の厚さの違いとの関連を見出すことはできない。一方、角膜を切り取る際、LD条件の角膜とDD条件のそれとは、弾力性が違っていたことから、厚さだけでなく角膜の化学的成分の違いの可能性が推測され、この点についての究明が必要である。加えて、孵卵時の光条件により胚の角膜の厚さに違いを生じさせるメカニズムの解明には、角膜の個体発生についての研究も必要である。

### 5. 総括

明暗(LD)、恒暗(DD)、恒明(LL)の光条件下で孵卵したウズラ胚において、孵化前後の角膜上皮細胞分裂数と網膜メラトニン量測定し、角膜の発生の過程を観察する事によって以下の結果を得た。

(1) LD(12:12)及びDD条件で孵卵した胚において孵化前後の角膜上皮細胞分裂数と網膜メ

ラトニン量にはいずれも明確なリズムが認められなかった。

- (2) 角膜上皮細胞分裂リズムに孵化が何らかの影響を与えている可能性が推測された。
- (3) 孵卵時の光条件が孵卵時間に影響する事が明らかであり LL 条件の場合が最も早かった。
- (4) 孵卵時の光条件の違いは体重や眼重量に影響しないが、角膜の厚さに有意な差をもたらした。孵化時において LD 条件の角膜は DD、LL 条件のそれより厚かった。

## 文献

- 1 ) Miller, J. D. ( 1984 ) " On the nature of the circadian clocks in mammals." Am. J. Physiol. 264:R821-R832.
- 2 ) Simpson, S. M. and Follett B. K. ( 1981 ) " Pineal and hypothalamic pacemakers: Their role in regulating circadian rhythmicity in Japanese quail. J. Comp. physiol. 144:381-389.
- 3 ) Underwood, H., Binkley, S., Siopes, T. and Mosher, K. ( 1984 ) " Melatonin rhythms in the eyes, pineal bodies and blood of Japanese quails( *Coturnix coturnix japonica* )" Gen. Comp. Endocrinol., 56:70-81.
- 4 ) Underwood, H. and Siopes, T. ( 1985 ) "Melatonin rhythm in quail: Regulation by photoperiod and circadian pacemakers." J. Pineal Res., 2:133-143.
- 5 ) Gaston, S. and Menaker, M. ( 1968 ) "Pineal function: The biological clock in the sparrow?" Science 160:1125-1127.
- 6 ) Zimmerman, N. H. and Menaker, M. ( 1979 ) "The pineal gland: A pacemaker within the circadian system of the house sparrow. " Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76:999-1003.
- 7 ) Ebihara, S., Uchiyama, K. and Oshima, I. ( 1984 ) "Circadian organization in the pigeon.", *Columba livia*: The role of the pineal organ and the eye.", J. Comp. Physiol. A 154:59-69.
- 8 ) Oishi, T. and Matsumoto, M. ( 1985 ) "Circadian mitotic rhythm in the corneal epithelium of Japanese quail: Intraocular initiation of the rhythm." In "Circadian Clock and Zeitgebers." T. Hiroshige and K. Honma ( eds. ) pp. 45-54, Hokkaido University Press, Sapporo.
- 9 ) Sasaki, M., Masuda, A. and Oishi, T. ( 1995 ) "Circadian rhythms of corneal mitotic rate, retinal melatonin and immunoreactive visual pigments, and effects of melatonin on the rhythms in the Japanese quail," J. Comp. Physiol. A, 176:1-7.
- 10 ) Oishi, T., Mohri, Y., Kaneko, T., Sasaki, M., Hattori, A., Obara, Y. and Masuda, A. ( 1996 ) "Retinal melatonin is not involved in corneal mitotic rhythms in the Japanese quail: Effects of formoguanamine hydrochloride and eye-lid suture." J. Pineal Res., 21:149-154.
- 11 ) Cahill, G. M. and Besharse, J. C. ( 1995 ) "Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: Regulation by a photoreceptor oscillator." Prog. Retinal Eye Res. 14:267-291
- 12 ) 金子智子, 毛利弥生, 大石正 ( 1995 ) " Formoguanamine 処理ウズラの眼内概日リズムに及ぼす眼瞼縫合の影響 " 静岡県立大学短期大学部紀要 9:207-217.
- 13 ) Weaver, D. R. and Reppert, S. M. ( 1986 ) "Maternal melatonin communicates daylength to the fetus in Djungarian hamsters." Endocrinology, 119:2861-2863.
- 14 ) Davis, F. C. and Mannion, J. ( 1988 ) "Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother." Am. J. Physiol. 255:R439-R448.
- 15 ) Lauber, J. K. and Shutze, J. V. ( 1964 ) "Accelerated growth of embryo chicks under the influence of

- light." *Growth*, 28:179-190.
- 16) Adam, J. H. and Dimond, S. J. ( 1973 ) "Influence of light on the time of hatching in the domestic chick." *Anim. Behav.*, 19:226-229.
- 17) Zeman, M., Gwinner, E. and Somogyiova, E. ( 1992 ) "Development of melatonin rhythm in the pineal gland and eyes of chick embryo." *Experientia* 48:765-768.
- 18) Oishi, T. ( 1980 ) "Light-and dark-induced eye lesions in birds." In "Biological Rhythms in Birds: Neural and Endocrine Aspects" Y. Tanabe, K. Tanaka and T. Ookawa( eds. ), PP. 249-256 Springer-Verlag, Berlin.
- 19) Oishi, T., Shiraki, K., Sotani, U. and Okuzawa, I.( 1981 )"Effect of continuous light and continuous darkness on the eyes of adult chickens." *Acta. Soc. Ophthalmol, Jpn.* 85:132-136.

